

試験研究報告書

[コラーゲン及び ENM 試験研究 第 2 報]

コラーゲンおよび ENM-5L の マウス皮膚メラニン色素細胞に及ぼす影響

試験受託機関

株式会社ティーエヌビーコーポレーション
ピーエムクリエイト 東海疾患モデル研究会
愛知県知多市朝倉町 3 9 6 番地

試験研究報告書

イ．試験テーマ

コラーゲンおよび ENM-5 L のマウス皮膚メラニン色素細胞に及ぼす影響

ロ．試験依頼者

三和実業株式会社

大阪府東大阪市岩田町 2-2-27

株式会社エンザミン研究所

大阪府摂津市正雀本町 1 丁目 27-22

ハ．試験受託機関

株式会社ティーエヌピーコーポレーション

ピーエムクリエイト 東海疾患モデル研究会

愛知県知多市朝倉町 396 番地

ニ．試験実地施設

藤田保健衛生大学 疾患モデル教育研究センター

愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪 1-98

ホ．試験実施者

藤田保健衛生大学衛生学部 疾患モデル管理学

吉原 大輔

ヘ．試験指導

藤田保健衛生大学衛生学部 疾患モデル管理学

教授 高橋 久英 (医学博士)

ト．試験実施期間

平成 16 年 10 月 01 日 ~ 平成 16 年 10 月 18 日 皮膚組織期間も含む

チ．はじめに

コラーゲンは、今や世界中の美容や健康食品分野で研究開発されている。特にコラーゲン作用の肌弾力性への有効な報告および骨粗鬆症では、骨の分解が抑制されたという報告がなされ、コラーゲンの機能性が注目をあびている。本試験・研究では、コラーゲンと、発酵物由来の機能性原料、細胞活性に有効な食品原料ENM（有用微生物発酵エキス）との併用によるメラニン色素細胞に及ぼす影響をマウスの背部皮膚を使用して報告する。なお、メラニン色素細胞は、投与終了後紫外線照射（UV-B）を1時間行ったのち、比較検討した。

尚、本試験は、試験テーマ「コラーゲン¹およびENM-5L²のマウス皮膚コラーゲン線維に及ぼす影響」と同時に検討した。

リ．試験材料及び方法

1 供試試料

株式会社 三和実業株式会社社製 粉末コラーゲン

株式会社 エンザミン研究所社製 液体ENM-5L（Lot No. 040720）

オリエンタル酵母（株）社製飼料：MF（飼料）を用事調整して実験に使用した。尚、精製水（pH5.89～pH6.20）はナルコ化粧品（株）社製にて、作製し実験に使用した。

2 被験物質と媒体との混合

下記の群構成に基づいて試料を飼料（オリエンタル酵母社製飼料：MF）に混ぜ、精製水を加えて練り餌を作製した。各群には近交系CF#1マウスを自家繁殖し、成熟の15週齢の雌（ ）を各群1匹、合計4匹を実験に使用した。

群構成

群 MFのみ

粉末飼料100g + 精製水100ml

群 コラーゲン+ENM-5L

粉末飼料100g + 精製水50ml + ENM-5L 50ml + コラーゲン5g

群 コラーゲン

粉末飼料100g + 精製水100ml + コラーゲン5g

群 ENM-5L

粉末飼料100g + 精製水50ml + ENM-5L 50ml

3 飼育管理

実験中の飼育管理は、オールフレッシュの無菌空気を送風し、自動調節（ 23 ± 1 、 $55 \pm 5\%$ ）したセンター内飼育室にて行った。各ゲージは週1回、床敷および給水瓶を交換した。その際には、1%のヒビテン液にてゲージの蓋およびゲージ棚を消毒した。

4 検査項目及び観察

イ) 皮膚の観察

UV - B (東芝製: ブラックライト 15W) を台座より 30 cm はなして設置し、1 回 4 匹に 1 時間照射した。照射前、照射後の各群の皮膚を観察した。肉眼的観察の後、ただちにエーテル麻酔下においてマウスを安楽死させ、背部皮膚を摘出した。

ロ) 皮膚組織学的検査

摘出した背部皮膚組織は常法に従って、10% 中性緩衝ホルマリン固定後、約 4 μ m のパラフィン切片を作成し、HE 染色とフォンタナマッソン染色を施し検鏡した。

又. 試験結果および考察

1 皮膚の観察

UV - B 照射前、照射後の皮膚を観察したが、照射後の皮膚を見比べると、群 群は皮膚の赤い発赤が目立つのに比べ、群 群のコラーゲンを投与した群はほとんど目立たなかった。(Fig 1、Fig 2)

このことは、コラーゲン投与により照射による炎症を抑制している可能性を示唆している。

2 皮膚組織学的検査

フォンタナマッソン染色を見比べると、群コントロールのメラニン色素細胞の沈着が多くみられるのに比べ、群コラーゲン+ENM 群コラーゲンのメラニン色素細胞は非常に少なかった。群 ENM は少量であるがメラニン色素細胞が見られるが群コントロールよりメラニン色素細胞が小さく分裂傾向を示した、特に群の皮膚組織にはほとんどメラニン色素細胞はみられなかった。(Fig 3、Fig 4)

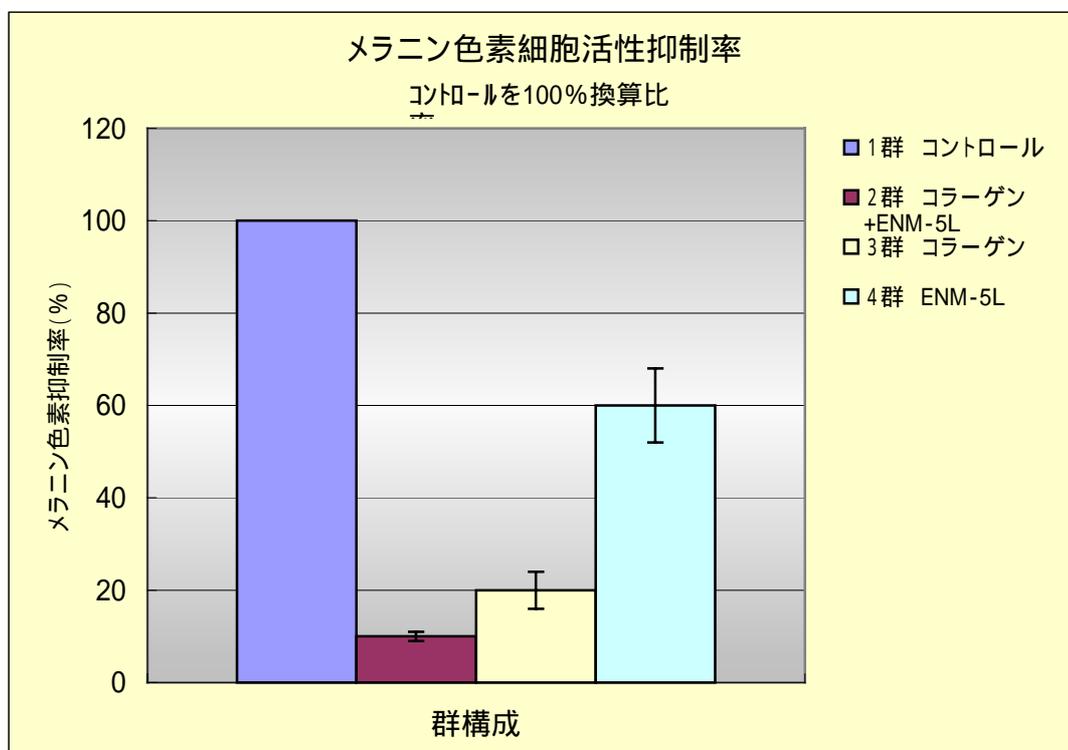
このことから、照射によるメラニン色素細胞の活性化が、コラーゲンおよび ENM を投与することにより抑制している可能性を示唆している。

しかし、使用したマウスがアルビノ (CF#1) であり、メラニン色素の合成を示唆するには限界がある。今後、有色マウスを用いて長期間投与と実験が必要であると考えている。

メラニン色素合成能を目視観察により観察し比率換算数値化「試験実施者数値化」にてコントロールのメラニン色素沈着率 100%とした場合、群コラーゲン+ENM-5L 10%、群コラーゲン 20%、群 ENM-5L 60%とコラーゲン及び ENM 群はメラニン色素の沈着を抑制した事が示唆できる、よってメラニン色素沈着抑制合成能に優れていることが示唆できる。

グラフ 1.にて比率表示

グラフ 1.



ル.まとめ

コラーゲンは、今や世界中の美容や健康食品分野で研究開発されている。特にコラーゲン作用の肌弾力性への有効な報告および骨粗鬆症では、骨の分解が抑制されたという報告がなされ、コラーゲンの機能性が注目をあびている。本試験・研究では、コラーゲンと、発酵物由来の機能性原料、細胞活性に有効な食品原料ENM（有用微生物発酵エキス）との併用によるメラニン色素細胞に及ぼす影響をマウスの背部皮膚を使用して報告した。なお、メラニン色素細胞は、投与終了後紫外線照射（UV-B）を1時間行ったのち、比較検討した。

UV-B照射前、照射後の皮膚を観察したが、照射後の皮膚を見比べると、群 群は皮膚の赤い発赤が目立つのに比べ、群 群のコラーゲンを投与した群はほとんど目立たなかった。

また、フォンタナマッソン染色を見比べると、群のメラニン色素細胞が多くみられるのに比べ、群 群のメラニン色素細胞は非常に少なかった。群は少ないが少しメラニン色素細胞が現れた。特に 群の皮膚組織にはほとんどメラニン色素細胞はみられなかった。

以上のことから、コラーゲンおよびENMは、UV-B照射による皮膚の炎症およびメラニン色素細胞活性化に抑制傾向を示唆した。今後、有色マウスを用いて長期間投与実験が必要であると考えている。

ヲ．謝辞

本研究の御指導をいただいた藤田保健衛生大学衛生学部疾患モデル管理学、高橋久英教授に御礼申し上げます。

試験実施者
藤田保健衛生大学衛生学部
疾患モデル管理学
吉原 大輔

Fig 1

UV 照射前 CF#1 1 群と 2 群



UV 照射前 CF#1 3 群と 4 群



Fig 2

UV 照射後 CF#1 1 群と 2 群



UV 照射後 CF#1 3 群と 4 群



考察

UV-B を CF#1(アルビノ)マウスに照射した場合には、発赤になるが、メラニン合成との関係は比較困難である。尚、 2 群は UV-B 照射後皮膚表面の炎症が少ない事が示唆できる。

今後有色マウスを用いて、長期間の連日照射実験が望ましい。

染色参考資料

フォンタナ・マッソン染色 (*Fontana-Masson stain*)

メラニン色素はメラニン産生性の状態を確認する為、下記に示すような色素低産生性タイプの本染色を行う。フォンタナのアンモニア銀液は完全遮光して使用。

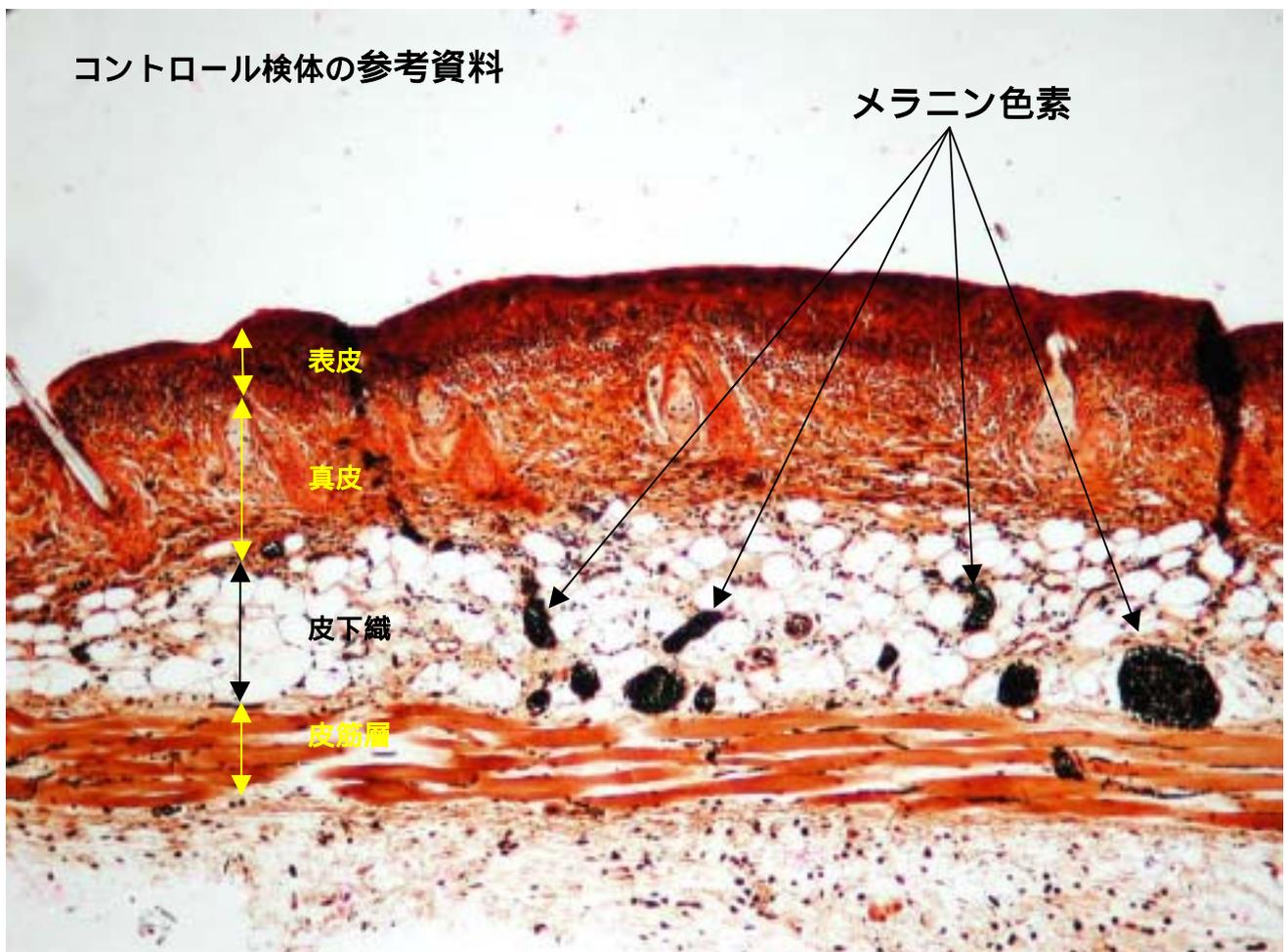


Fig.3 HE 染色

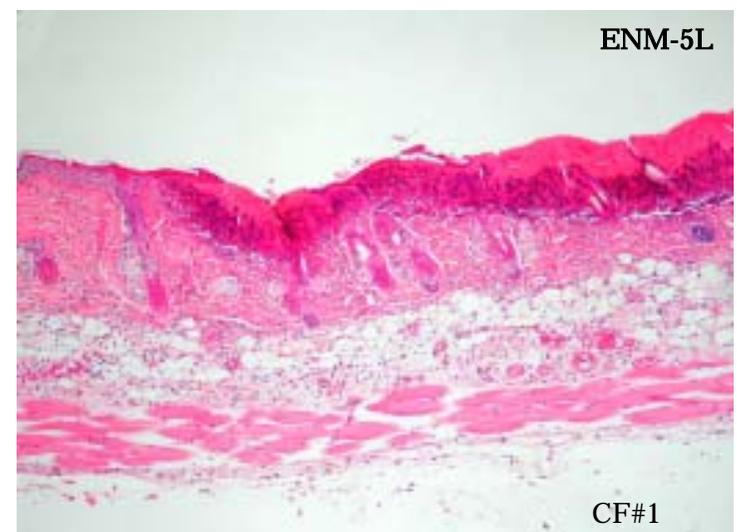
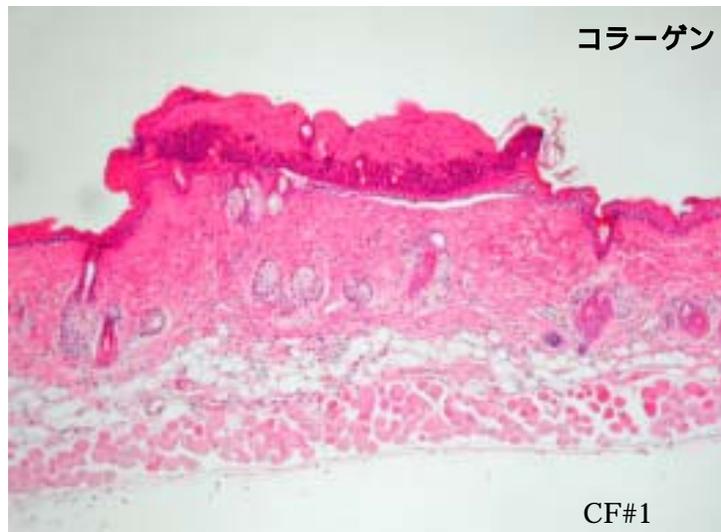
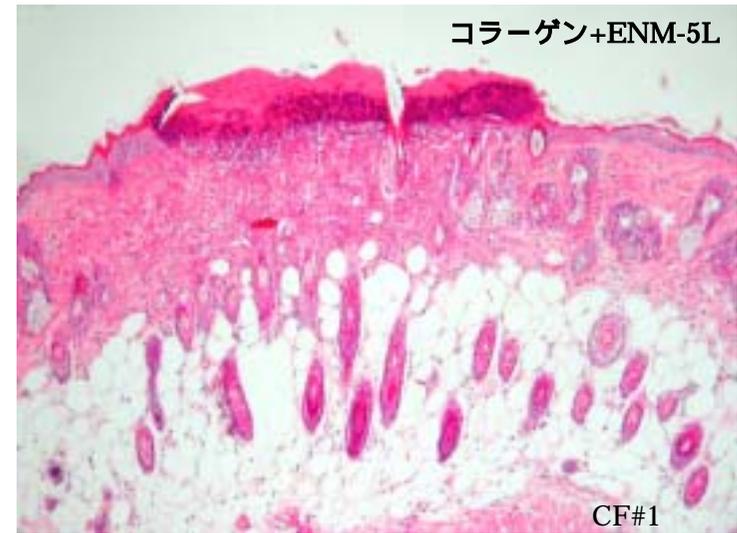


Fig.4 フォンタナ・マッソン染色

