

試験研究報告書

試験研究-1

コンドロイチン + コラーゲン + ENM-20SD 投与における

マウス血清ヒアルロン酸値の変動

試験研究-2

コンドロイチン + コラーゲン + ENM-20SD 投与における

マウスの皮膚組織変化

平成 17 年 03 月 20 日

試験受託機関

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

試験結果報告書

1. 概要

1.1 表題 1

コンドロイチン+コラーゲン+ENM-20SD投与におけるマウス血清ヒアルロン酸値の変動

1.2 試験番号 050202-1

1.3 試験目的

マウスに、コラーゲン、コンドロイチン及び有用微生物発酵代謝エキスであるENM-20SD 各々混合飼料を7日間給餌させ、皮膚組織とヒアルロン酸増減に及ぼす影響を検討する。(試験-1・-2)

1.4 試験委託者

株式会社 エンザミン研究所

〒612-8255 京都府京都市伏見区横大路六反畑 396 番地

1.5 試験委託契約者

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

1.6 試験指導者 癒しと健康科学協会(会長:藤田たえ子)

学術研究顧問(医学博士)高梁求栄

〒500-8835 岐阜市玉宮町1-3 森麻ビル2F 電話 058-263-3185

1.7 試験受託者及び試験実施施設

藤田保健衛生大学衛生学部(試験研究員) 吉原大輔

藤田保健衛生大学疾患モデル教育研究センター内

1.8 試験計画書

試験計画書を1部作成し、その原本は(株)エンザミン研究所で保管する。

複写は試験担当者の吉原大輔へ送付する。なお、試験計画に変更が生じた場合には直ちに協議し、その内容と理由を明記した変更書を1部作成し、保存する。

1.9 最終報告書

最終報告書を1部作成し、その原本は(株)エンザミン研究所で保管する。

複写は試験担当の吉原大輔へ送付する。なお、最終報告書に訂正が生じた場合には直ちに協議し、その訂正箇所と理由を明記した変更書を1部作成し、保存する。

1.10 被験物質

名称(略称)又はコード番号:	1) コラーゲン(フィッシュコラーゲン) 2) サメ抽出物 C-70K(コンドロイチン) 3) 有用微生物発酵代謝エキスパウダー(ENM-20SD)
ロット番号	: 1) 05012-F 2) 040900-C 3) 061201-E
提供者	: エンザミン研究所
入手量	: 1) 200 g 2) 200 g 3) 200 g
入手年月日	: 2005年1月25日
性状または剤型	: 1) 粉末 2) 粉末 3) 粉末
容器	: 1) アルミパック 2) アルミパック 3) アルミパック
使用期限	: 1) 06.01.20日 2) 05.09.01日 3) 06.12.01日
取り扱い上の注意	: 1) 用時調製 2) 用時調製 3) 用時調製
保存条件	: 1) 室温、乾燥 2) 室温、乾燥 3) 室温、乾燥
保存場所	: 藤田保健衛生大学 飼育実験室2 冷蔵庫内
使用後の残余物質の処理	: 試験終了後に試薬として保管する。

2 . 使用動物

- 2 . 1 TWY (スイス系由来の近交系マウス) 遺伝子型 Wild の雄
11 週齢を 1 週間予備飼育のあと使用
- 2 . 2 繁殖源は藤田保健衛生大学疾患モデルセンター内

2 . 1 馴化方法及び使用動物の群分け方法

7 日間の馴化期間を設ける。

馴化期間中に一般状態を 1 日 1 回観察する。

馴化期間中に一般状態で順調な発育がみられ、異常の認められない動物を原則的に試験に使用する。

馴化期間終了日の体重からコンピューターで発生させた乱数を用いた適正層別方式により、動物を各群に割り当てる。

1) 阿部 正信 (1986) : 長期毒性試験に用いるラット、マウスの体重変化の解析による群分けの適正層別方式の確立、薬理と治療、14 (12)、7285-7302 .

2 . 2 個体識別

2 . 2 . 1 馴化期間中

動物はケージ分けで識別する。

ケージには、馴化期間、試験番号、入荷年月日、動物種、ケージ番号、性別及び動物入荷番号を記載したケージカードを付ける。

2 . 2 . 2 群分け後 (実験期間中)

動物はケージ分けで個体を識別する。

ケージには、試験番号、性別、投与量、投与期間、ケージ番号及び動物番号を記載したケージカードを付ける。

3 . 動物管理

3 . 1 飼育室番号

(疾患モデル教育研究センター内 : 334 飼育室)

3 . 2 動物収容飼育条件

馴化期間中 : 6 匹 / 3 ケージ

群分け後 (実験期間中) : 6 匹 / 3 ケージ

3.3 飼育環境条件

設定温度 : 馴化、実験期間 : 21~25
設定相対湿度 : 馴化、実験期間 : 40~80%
照明時間 : 12 時間 (8 : 00~20 : 00)

3.4 飼料及び飲料水

3.4.1 飼料

飼料名 : MF (粉末)
製造元 : オリエンタル酵母株式会社
給餌方法 : MF に各試料混合自由摂取

3.4.2 飲料水

飲料水 : 上水道水
給水方法 : 自動給水により自由摂取させ、摂取量測定時は給水瓶で自由摂取させる。

4. 群構成及び被験物質投与

4.1 群構成、動物数

群	被験物質	動物数
	コントロール(無混合飼料) : MF	6
	コラーゲン + コンドロイチン	6
	コラーゲン + コンドロイチン + ENM-20SD	6
		計18

4.2 投与期間、投与経路及び投与量

投与期間 : 7 日間
投与経路 : 給餌 (MF 混合飼料) による経口投与
投与量 : コラーゲン: 1600mg/ヒト/日 (32mg/Kg/日)
コンドロイチン: 40mg/ヒト/日 (0.8mg/Kg/日)
ENM-20SD: 1000mg/ヒト/日 (20mg/Kg/日)

5. 観察及び検査項目

5.1 一般状態の観察、体重測定及び摂餌・摂水量

一般状態は、被験物質投与日から実験期間終了日までの 7 日間 1 日 1 回以上観察する。

体重測定は、被験物質投与開始日及び7日目（投与期間終了日）に行う。

摂餌・摂水量は、被験物質投与開始日、被験物質投与開始後7日目（投与期間終了日）に行う。

5.2 生化学検査と皮膚組織学的検査

採取した血液細胞について以下の検査を行う。

生化学検査： マウスをエーテル麻酔下において、心臓より全採血して安楽死し、その血清を生化学検査する。なお、各種検査は（株）ナゴヤ医学学術センターに依頼する。

一般検査：総蛋白、アルブミン、尿素窒素、Ca、Mg、リン、総コレステロール。

特殊検査：血中ヒアルロン酸（ラテックス凝集免疫比濁法）

皮膚組織学的検査：安楽死させたマウスの背部皮膚と耳介部を摘出する。

一般検査：切出し、包埋処理を含むHE一般染色標本により顕鏡する。

特殊染色：EVG（エラスチカ・ワンギーソン）染色及びアザン染色により皮膚の膠原繊維、弾性繊維を顕鏡する。

5.3 剖検

実験期間終了日（投与期間終了翌日）に実施する。

各動物の皮膚組織を摘出し、中性緩衝ホルマリンに保存する。

皮膚組織の写真を撮影する。

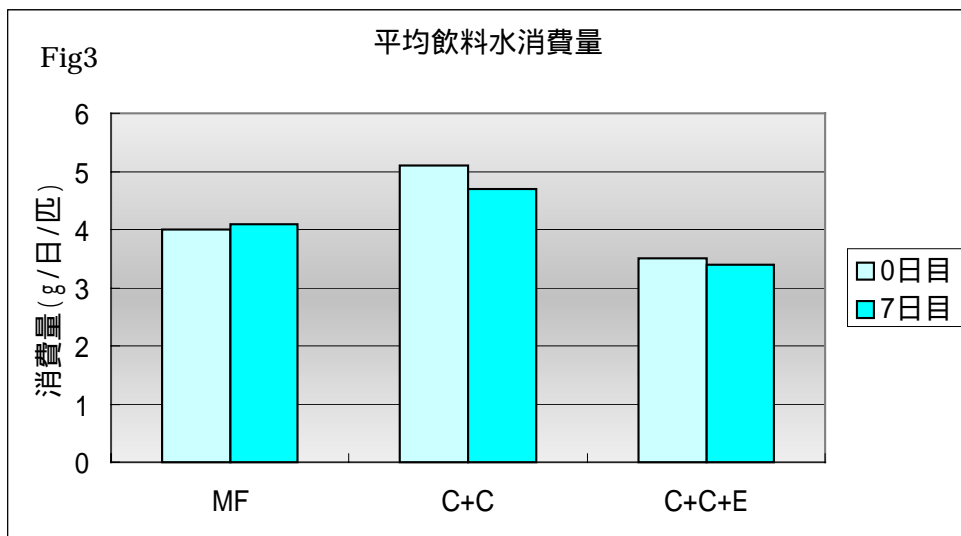
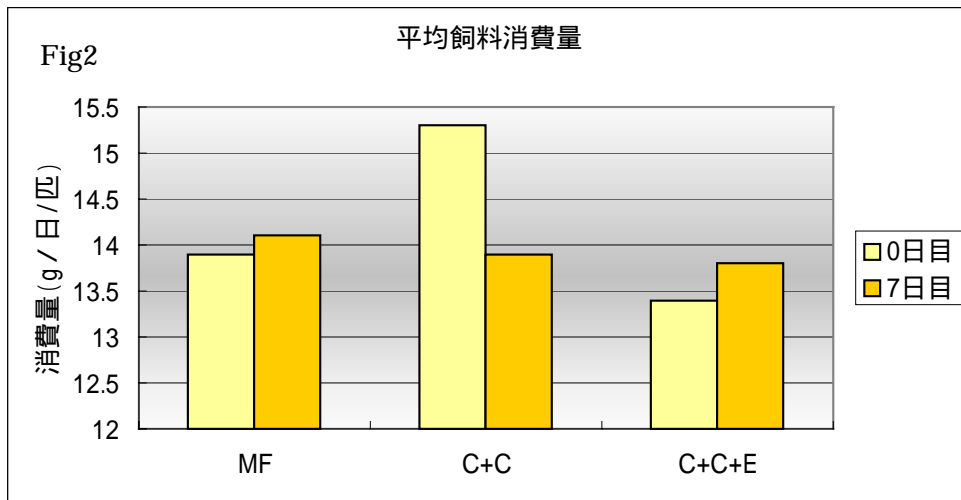
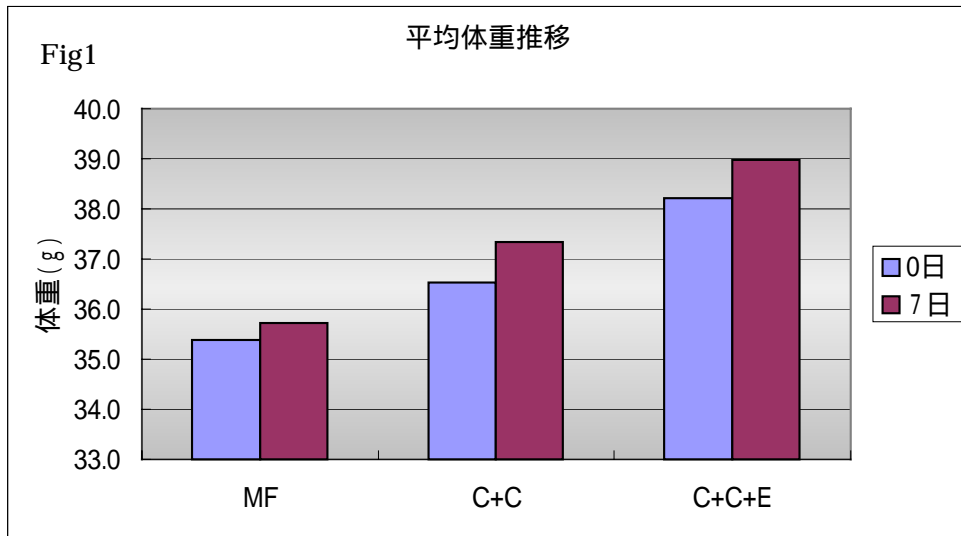
6. 試験成績

6.1 一般状態の観察、体重測定及び摂餌・摂水量

一般状態において、どの群にも死亡例はみられず、異常は認められなかった。

体重推移は、実験期間中において若干の増加がみられたが、特に被験物質によると思われる異常はみられなかった。その体重推移を Fig1 に示した。

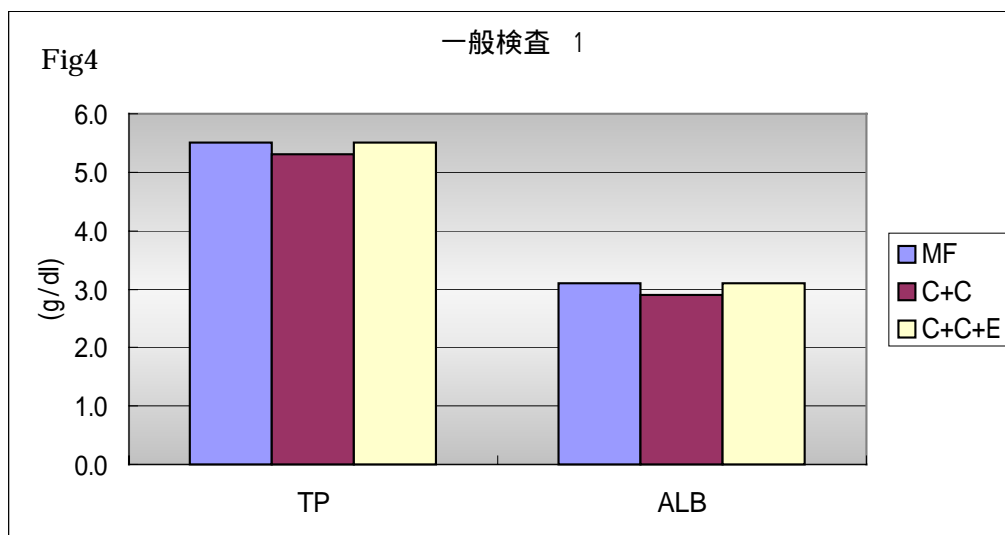
摂餌・摂水量は、実験期間中において若干の増加や減少がみられたが、特に異常はみられなかった。その摂餌・摂水量消費変化を Fig2, Fig3 に示した。



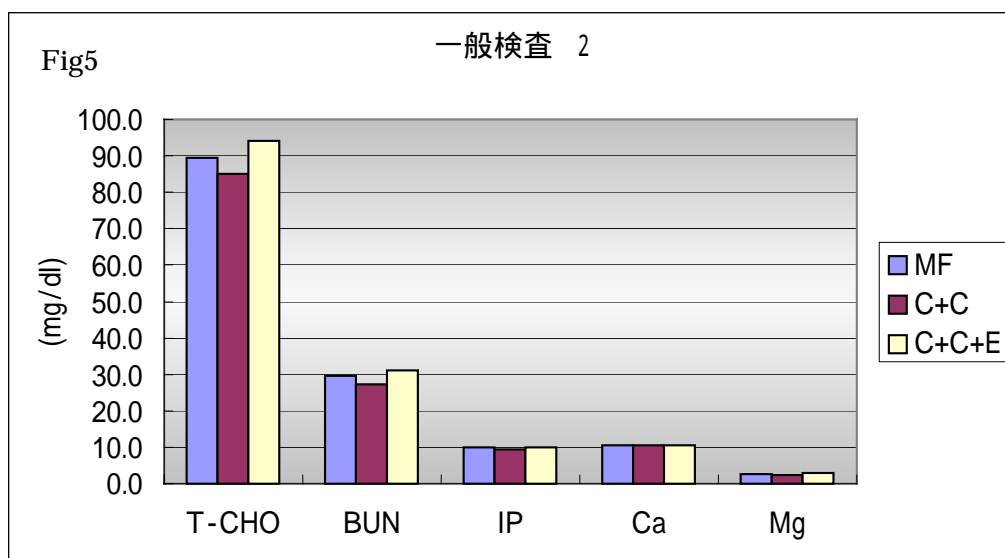
6.2 生化学検査

生化学検査

一般検査：各群を比較しても、測定値に大差はなく、被験物質の影響的效果はほとんどみられなかった。その検査結果を Fig4, Fig5 に示した。



血中の総蛋白 (TP) 及びアルブミン (ALB) 値



血中の総コレステロール、尿素、窒素、無機リン、Ca、及び Mg 値

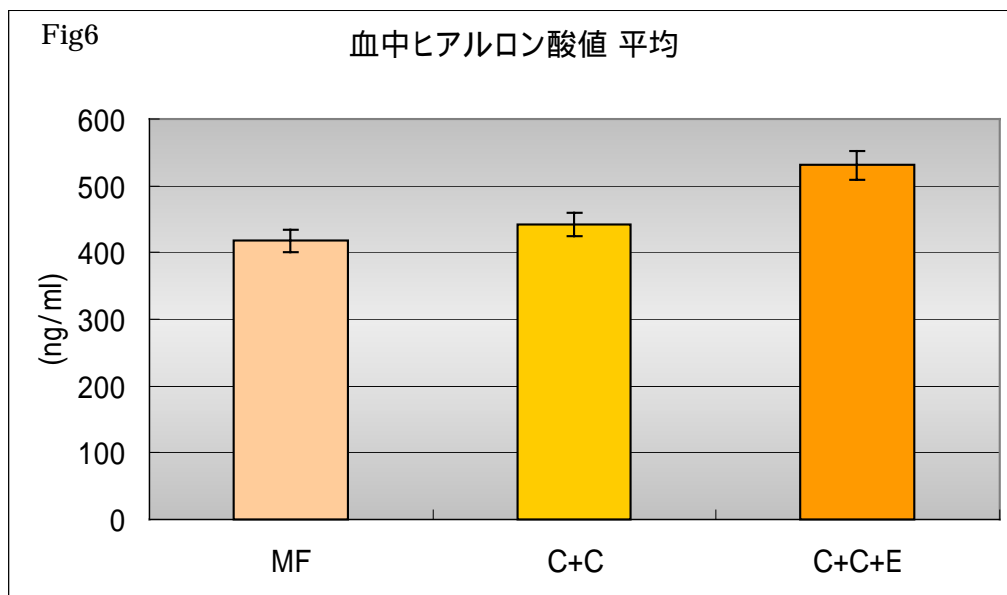
血中ヒアルロン酸：血中のヒアルロン酸はコントロール群 (MF = 417.5ng/ml) に対しコンドロイチン+コラーゲン群は (C+C = 441.7ng/ml) コンドロイチン + コラーゲン+ENM-20SDの群が (C+C+E = 530.8ng/ml) 他の群に比べC+C+E

は若干の高い値を示唆した。ヒアルロン酸値を Fig6 に示した。

MF 群を (値 100) とした場合、C+C+E 群 (127.13) は「比率換算」約 26 ~ 27%のヒアルロン酸値が高いことが示唆された。

MF 群と C+C 群の場合、(105.80) にて約 5%の数値を示した。

C+C 群と C+C+E 群の場合、(120.17) にて約 20%の数値を示した。

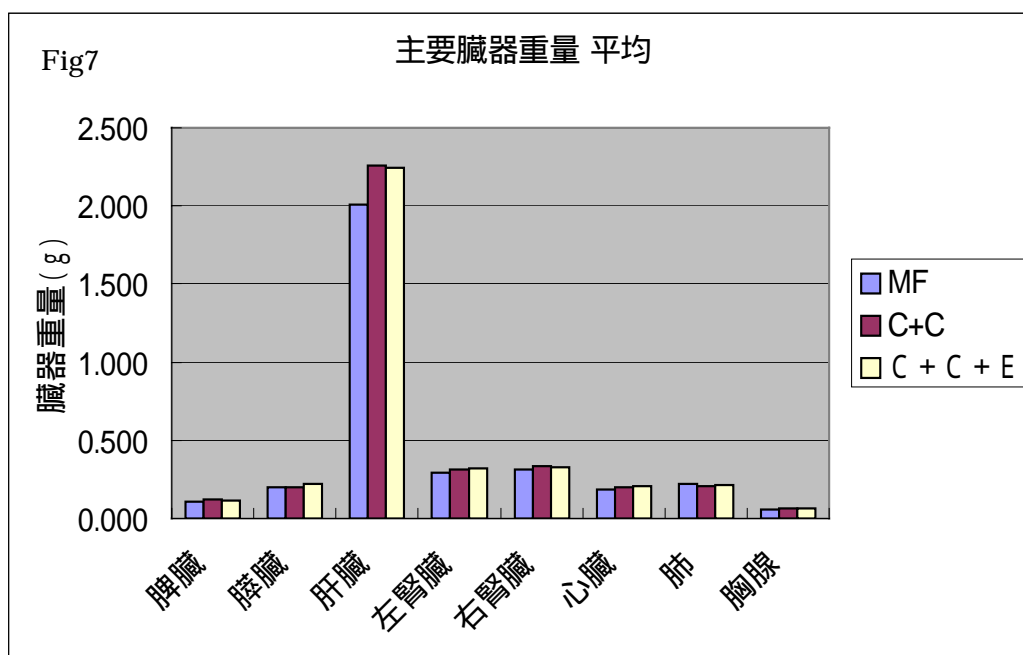


各群のヒアルロン酸値

6.3 剖検検査

主要臓器の臓器重量は、どの臓器も各群で大差はなく、特に異常はみられなかった。

Fig7 に示す。



6. 4 皮膚組織学的検査

皮膚組織の検査所見を TABLE1 及び写真を photo1-1-1 ~ photo2-3-3 にて記載した。

Table.1 各群の皮膚及び耳の組織所見

組織	皮膚			耳		
	CON 群	C+C 群	C+C+E 群	CON 群	C+C 群	C+C+E 群
H.E 染色	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
アザン マロリー染色	コラーゲン +	コラーゲン +~++	コラーゲン ++~+++	コラーゲン +	コラーゲン +~++	コラーゲン ++~+++
エラスチカ ワンギーソン染色	コラーゲン +	コラーゲン +~++	コラーゲン ++	コラーゲン +	コラーゲン +~++	コラーゲン ++

組織的所見 十：普通 卅：やや良い 卅：良い

Table.1 及び photo1-1-1 ~ 1-3-3 「写 1 (皮膚組織)」 ~ 2-1-1 ~ 2-3-3 「写 2 (耳組織)」
(倍率は全て 40 倍に統一した。)

各群コラーゲンの生成に著明な差は認められなかった。しかしアザンマロリー染色 (青色) とエラスチカワンギーソン染色 (赤茶色) では若干ではあるが、コントロール群より C + C 群、C + C + E 群と「写真 1-2-3・1-3-3 と 2-2-3・2-3-3」染色濃度が濃く各被験物質効果は期待できるものと示唆した。

6. 5 考察

一般状態において、全群で死亡例はみられず、異常は認められなかった。

又、体重推移も、実験期間中において若干の増加がみられたが、特に被験物質によると思われる異常はみられなかった。

摂餌・摂水量も、実験期間中において若干の増加や減少がみられたが、特に異常はみられなかった。

一般検査 (生化学検査) においても、各群を比較し測定値に大差はなく、被験物質の影響的効果はほとんどみられなかった。これは、実験動物マウス (TWY) の個体が小さい為と考えられる、よって長期間試験を実施する、又ウサギ、犬等の大動物に投与の検討も必要と思われる。

血中のヒアルロン酸はコントロール群 (MF = 417.5ng/ml) に対しコンドロイチン + コラーゲン群は (C+C = 441.7ng/ml)、コンドロイチン + コラーゲン + ENM-20SD の群が (C+C+E = 530.8ng/ml) 他の群に比べ C+C+E は若干の高い値を示唆した。

この事は、皮膚組織の線維芽細胞組織及びコラーゲン組織の生成、ヒアルロン酸生成に関し皮膚への有効性が示唆される。今後、強制経口投与における試験と、安全性が重視の食品応用素材の為、摂取量による安全性や機能性も今後の課題となる。

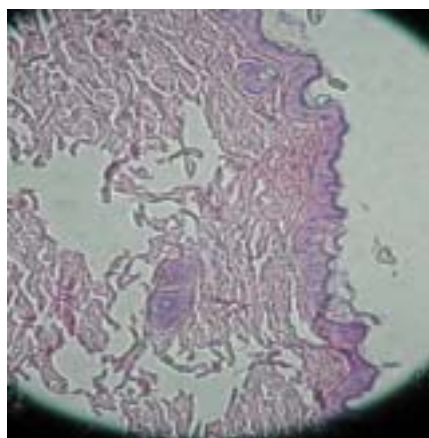
なお、主要臓器の臓器重量は、どの臓器も各群で大差はなく又、特に異常はみられなかった事により、食品応用素材の危険性は無いことが示唆された。

組織所見にて、体重及び各種検査値に被験物質の原因と思われる著明な差は認められなかったが、その結果は組織検査でも同様な所見を得た。血中ヒアルロン酸についてはC+C+E群に若干の有効性を見たが有意な差は認められなかった。

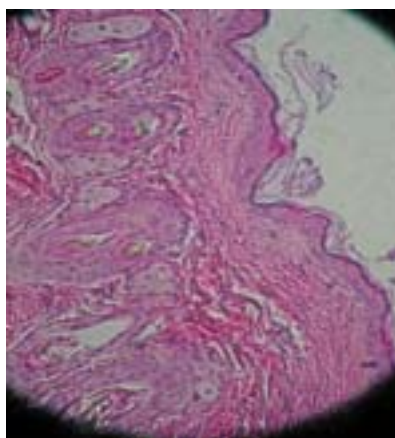
以上の結果は投与期間1週間と短く、コラーゲン、コンドロイチン量、ENM-20SDを強制経口投与にてヒト常用量に相当する被験物質を与えることにより有意な見解も見い出される可能性は示唆できる。又今後コラーゲン、ENMの大量投与による実験が必要であると考えらる。

マウス皮膚染色（HE・アザンマロリー・エラスチカワンギーソン染色）

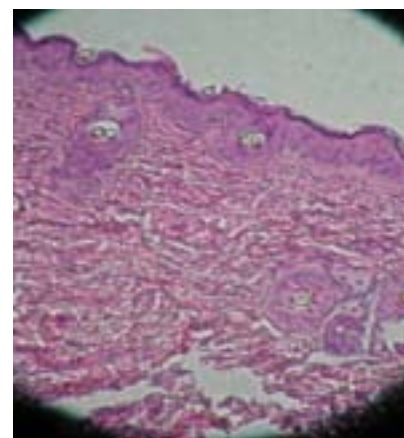
Photo 1



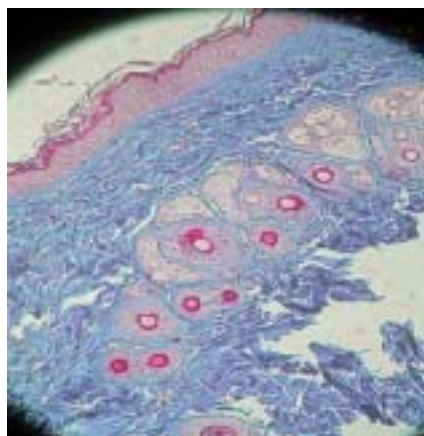
No.1-1-1 コントロール
一般染色（HE）染色：



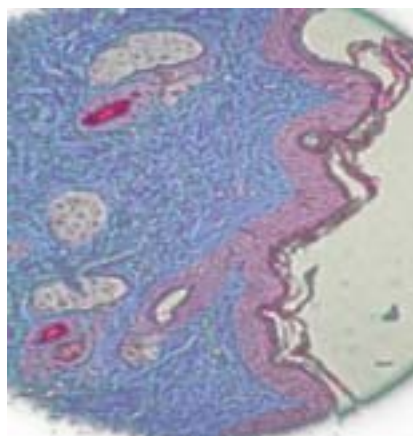
No.1-1-2 C+C



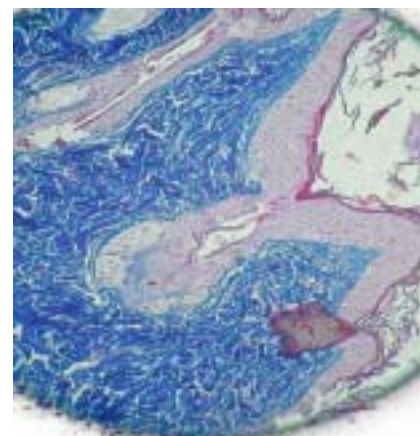
No.1-1-3 C+C+E



No.1-2-1 コントロール

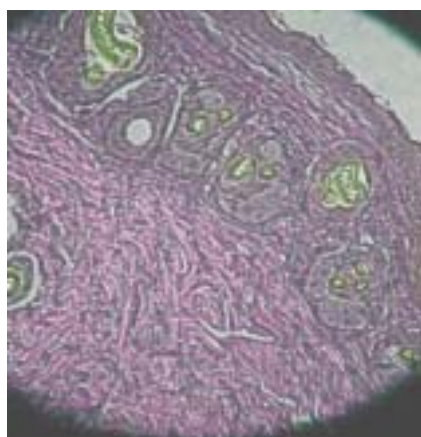


No.1-2-2 C+C

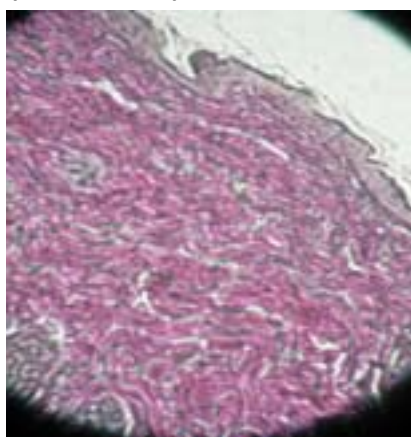


No.1-2-3 C+C+E

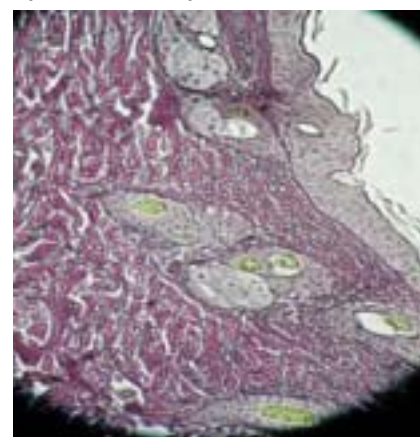
アザンマロリー染色：膠原繊維（コラーゲン）は青く染まっている。（低色 高色）



No.1-3-1 コントロール



No.1-3-2 C+C

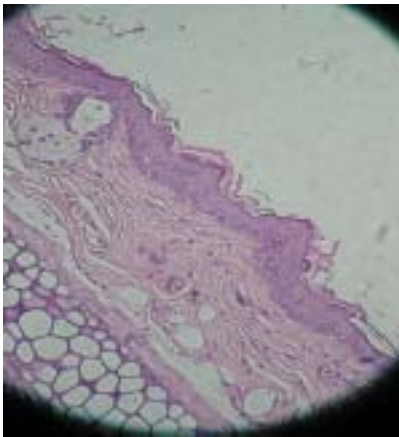


No.1-3-3 C+C+E

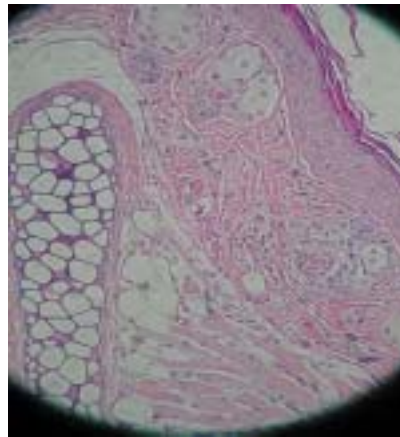
エラスチカワンギーソン（EVG）染色：膠原繊維（コラーゲン）赤色染色

マウス耳 染色 (HE・アザンマロリー・エラスチカワンギーソン染色)

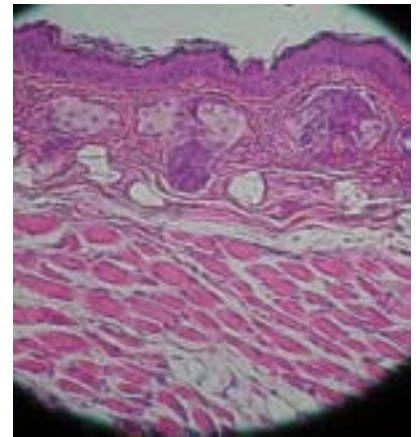
Photo 2



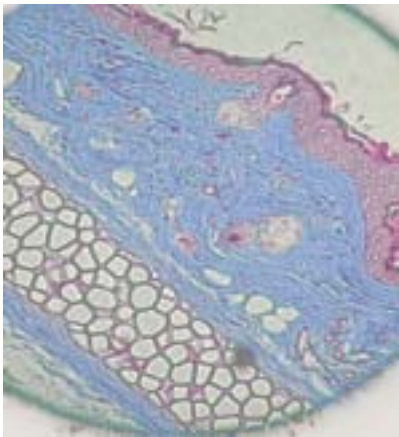
No.2-1-1 コントロール
一般染色 (HE) 染色 :



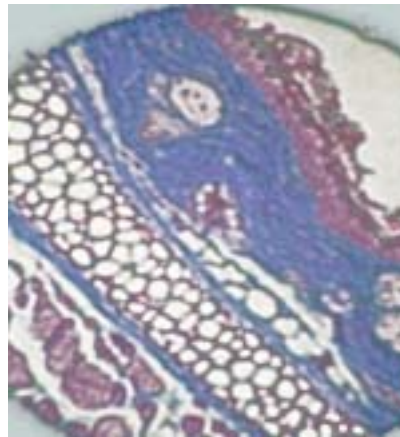
No.2-1-2 C+C



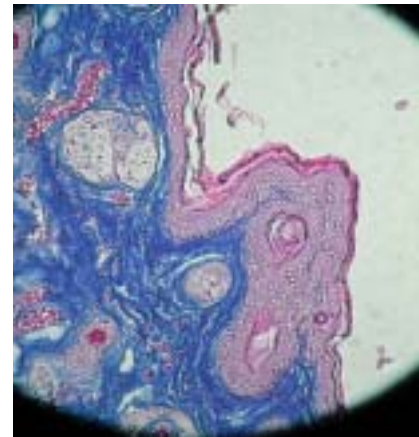
No.2-1-3 C+C+E



No.2-2-1 コントロール

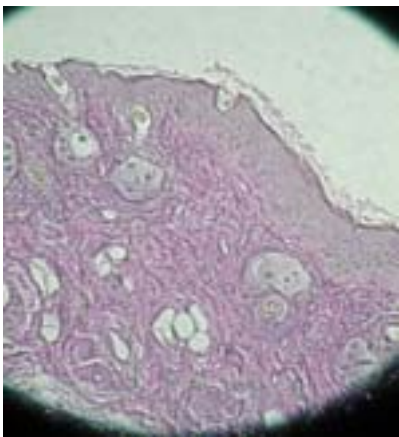


No.2-2-2 C+C

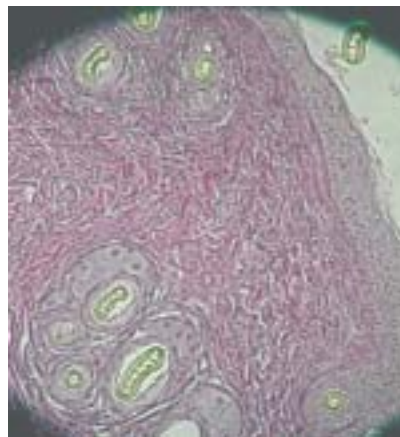


No.2-2-3 C+C+E

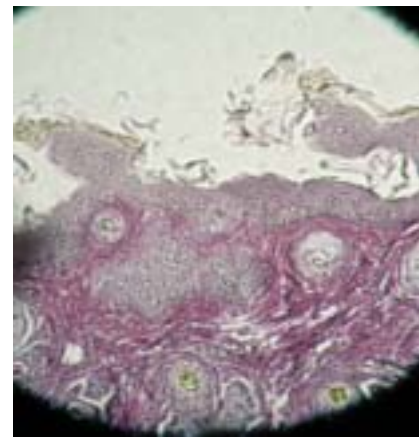
アザンマロリー染色 : 膠原繊維 (コラーゲン) は青く染まっている。(低色 高色)



No.2-3-1 コントロール



No.2-3-2 C+C



No.2-3-3 C+C+E

エラスチカ・ワンギーソン (EVG) 染色 : 膠原繊維 (コラーゲン) 赤色染色

試験研究結果報告 -2

1. 概要

1.1 表題 2

コンドロイチン+コラーゲン+ENM-20SD投与による紫外線照射マウスの色素沈着に対する抑制作用の検討

2. 投与期間、投与経路及び投与量

投与期間： 7日間

投与経路： 給餌（MF混合飼料）による経口投与

投与量： コラーゲン； 1600mg/ヒト/日（32mg/Kg/日）

コンドロイチン； 40mg/ヒト/日（0.8mg/kg/日）

ENM-20SD； 1000mg/ヒト/日（20mg/kg/日）

3. 使用動物

DBA/2（近交系マウス）の雄11週齢を1週間予備飼育の後使用。

繁殖施設は藤田保健衛生大学疾患モデル教育研究センター内

4. 群構成

3群/1匹

群	被験物質	動物数
	コントロール(無混合飼料):MF	1
	コラーゲン+コンドロイチン	1
	コラーゲン+コンドロイチン+ENM-20SD	1
		計3

5. 観察及び検査項目

マウスを1週間各試験群に給餌し、試験最終日にペントバルビタール液にて麻酔し、ただちに脱毛後、紫外線（UV-B）を1時間照射し、エーテル麻酔下において安楽死させ、マウスの背部皮膚と耳介部を摘出する。

一般検査：切り出し、包埋処理を含むHE一般染色標本により顕鏡する。

特殊染色：フォントナマッソン染色（メラニン細胞を染色）及びアルシャン青染色（酸性粘液多糖類を染色）により皮膚の色素沈着等を顕鏡する。

なお、皮膚の組織検査は（株）ナゴヤ医学学術センターに依頼する。

6. 試験結果および考察

紫外線 UV-B を照射することにより、1 週間各群に飼料添加による給与した。DBA/2 マウスの皮膚にいかなる色素沈着が有るかと予備的検討として、以下結果を得た。

Table.2 各群の組織所見（皮膚及び耳） 倍率は全て 240 倍

組織	皮膚			耳		
	CON 群	C+C 群	C+C+E 群	CON 群	C+C 群	C+C+E 群
群	CON 群	C+C 群	C+C+E 群	CON 群	C+C 群	C+C+E 群
H.E 染色	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
フォンタナ マッソン染色	+	十~卅	卅	+	十~卅	卅~卅
アルシアン ブルー染色	+	十~卅	卅	+	十~卅	卅~卅

組織的所見

十：普通 卅：やや良い 卅：良い

組織的所見

Table.2 および photo3-1-1 ~ 3-3-3 マウスの皮膚組織および photo 4-1-1 ~ 4-3-3 マウスの耳皮膚組織において各群酸性多糖類（ヒアルロン酸を含む）の生成に被験物質の効果と思われる所見は微量の変化であった。

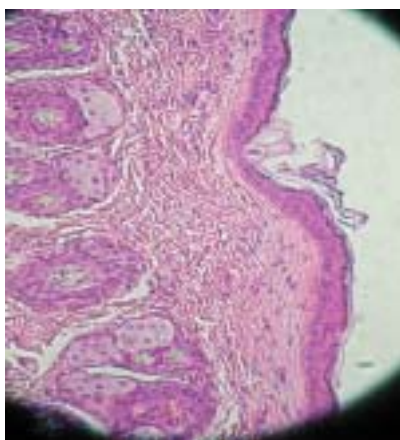
しかし、若干では有るがフォンタナマッソン染色のメラニン色素は「3-2-3・4-2-3」は、メラニン色素黒点が他より少なく評価された。

アルシアンブルー染色の酸性多糖類（青色）は「3-3-3・4-3-3」は青染色が他検体と比べると強く現れた、これは酸性多糖類を多少生成している事が示唆された。

尚、この結果は投与量、投与期間の不足によるもの、および給与方法の検討も必要と思われる、今後強制経口投与の実験も課題である。

マウス皮膚 染色 (HE・ホントナマッソン・アルシアンブルー染色)

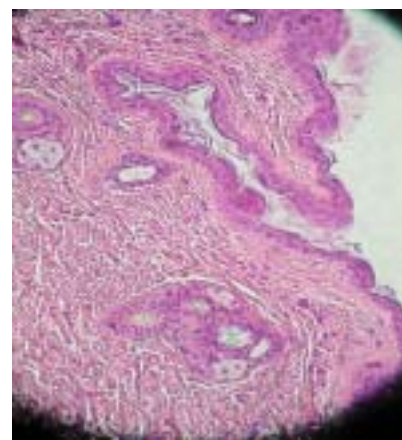
Photo.3



No.3-1-1 コントロール
一般染色 (HE) 染色 :



No.3-1-2 C+C



No.3-1-3 C+C+E



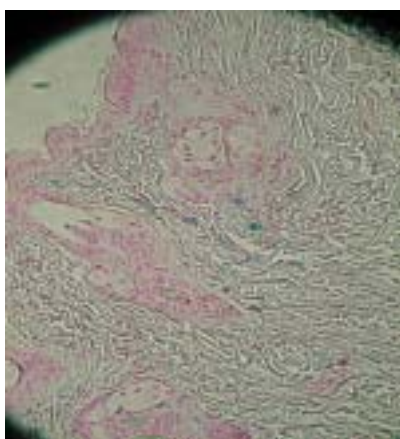
No.3-2-1 コントロール
フォンタナマッソン染色 :



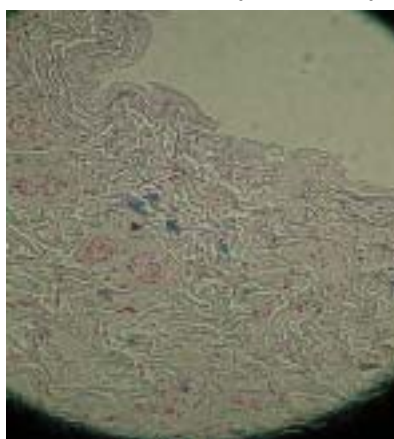
No.3-2-2 C+C



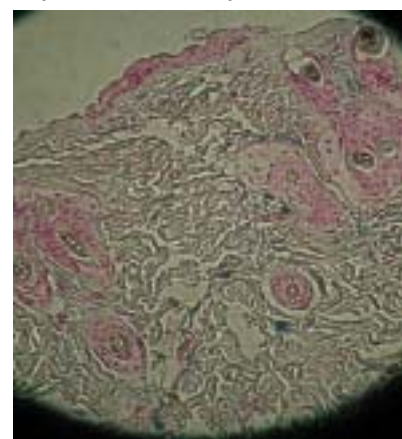
No.3-2-3 C+C+E
(多い 少ない)



No3-3-1 コントロール
アルシアンブルー染色 :



No.3-3-2 C+C



No.3-3-3 C+C+E

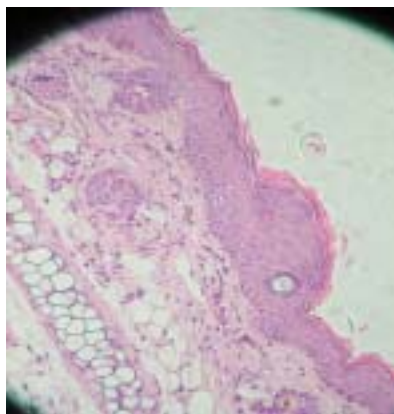
アルシアンブルー染色 : 酸性多糖類 (ヒアルロン酸) 青色染色

マウス耳 染色 (HE・ホントナマッソン・アルシアンブルー染色)

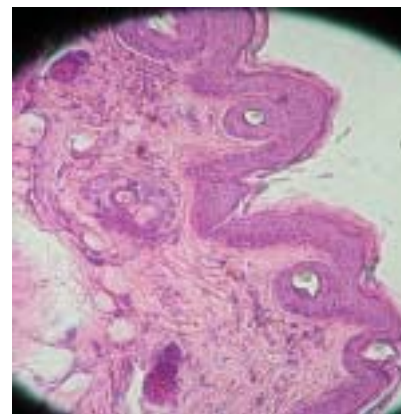
Photo.4



No.4-1-1 コントロール
一般染色 (HE) 染色 :



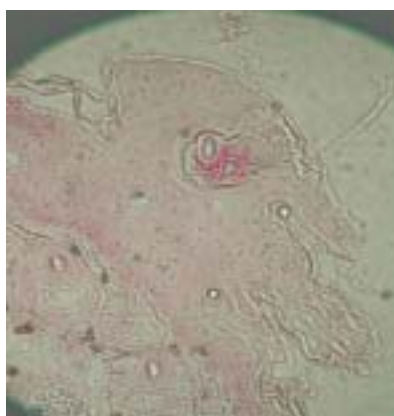
No.4-1-2 C+C



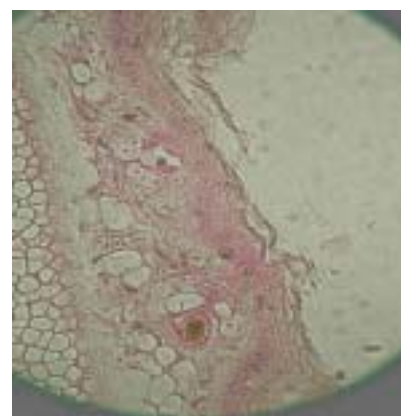
No.4-1-3 C+C+E



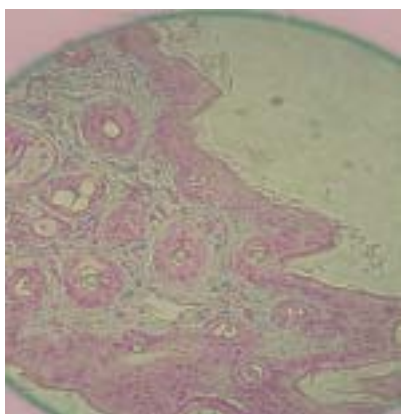
No.4-2-1 コントロール
フォンタナマッソン染色 : メラニン色素 = 黒色の点 (毛根以外)



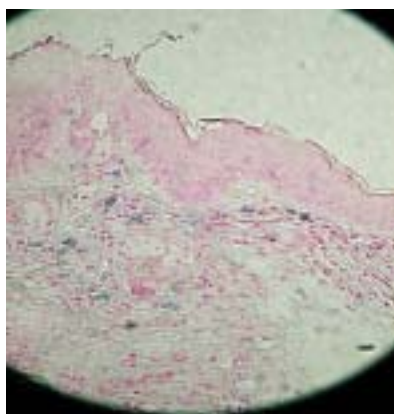
No.4-2-2 C+C



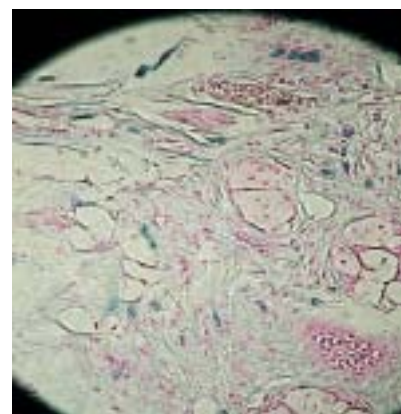
No.4-2-3 C+C+E
(多い 少ない)



No.4-3-1 コントロール
アルシアンブルー染色 : 酸性多糖類 (ヒアルロン酸) 青色染色



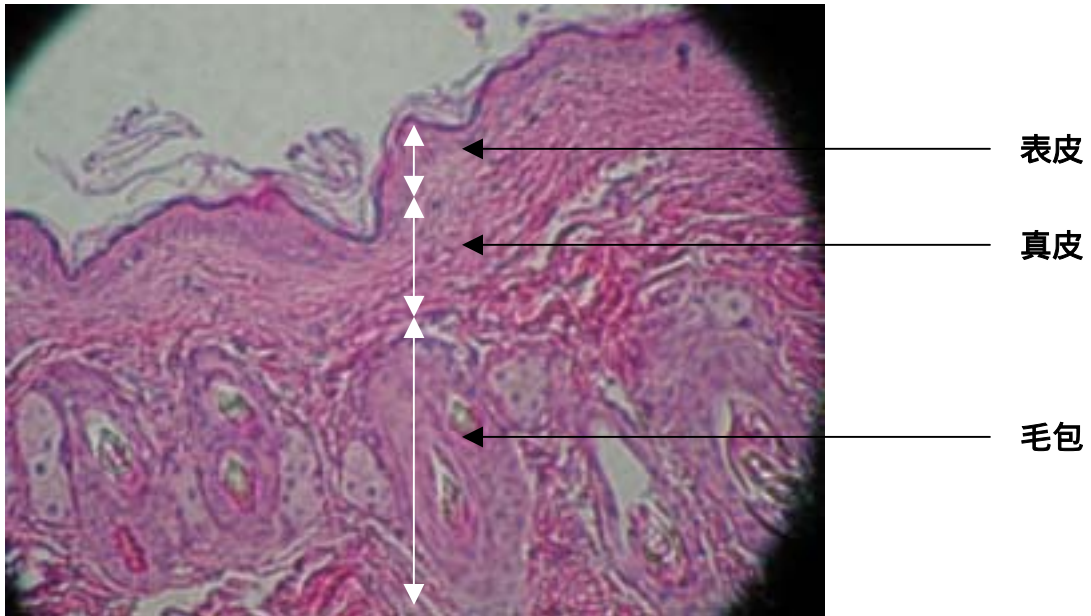
No.4-3-2 C+C



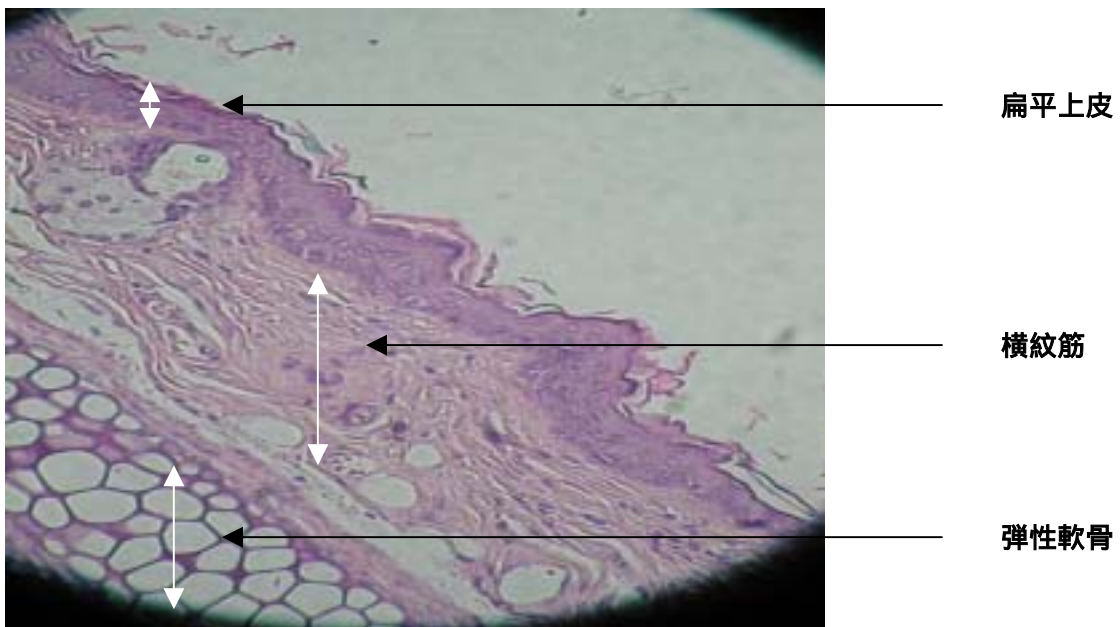
No.4-3-3 C+C+E

參考 資料 1

皮膚組織 = 表皮 · 真皮 · 毛包



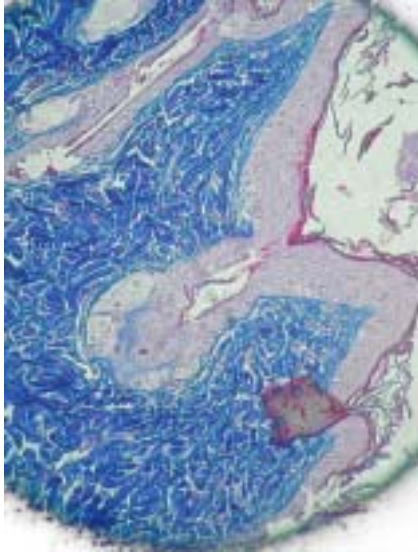
耳介組織 = 扁平上皮 · 橫紋筋 · 彈性軟骨



参考 資料 2

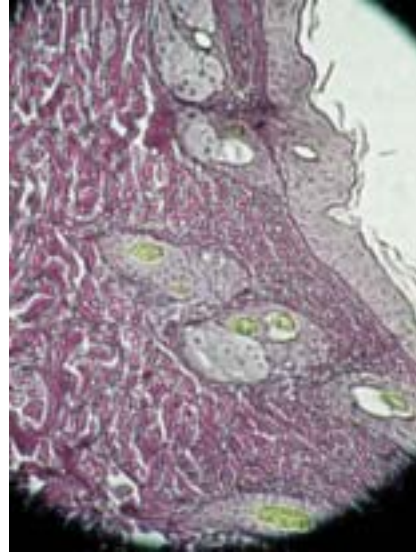
アザンマロリー染色：

膠原繊維（コラーゲン）は
青く染まっているほどコラーゲン生成が高い。



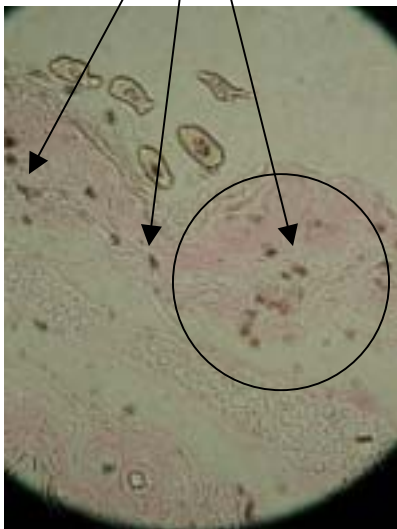
エラスチカワンギーソン（EVG）染色：

膠原繊維（コラーゲン）は
赤く染まっているほどコラーゲン生成が高い。



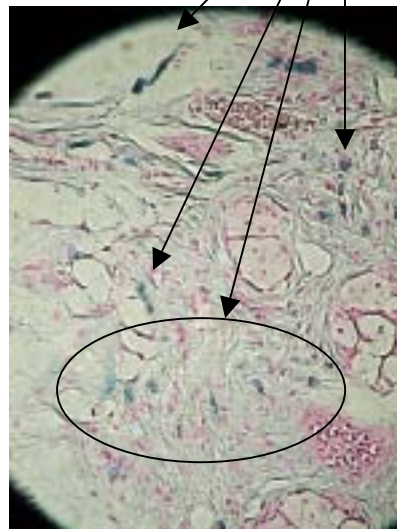
フォンタナマッソン染色：

メラニン色素 = 黒色の点



アルシアンブルー染色：

酸性多糖類（ヒアルロン酸）青色染色



藤田保健衛生大学衛生学部
藤田保健衛生大学疾患モデル教育研究センター
吉原大輔