

ミネラル濃縮ホエー摂食が ラット皮膚ヒアルロナン代謝に与える影響の 分子レベルでの解析

中部大学応用生物学部 大石 祐一

要 旨

牛乳は、ヒトの食生活に欠かせないものになっている。しかし、チーズ等の作製においては、ミネラル濃縮ホエーという残渣が残り、その産業的な使用法は定かでない。一方、高齢社会を迎えた日本にとって、健康維持における食の重要性は益々高まっている。皮膚は、様々な細菌等から体を守る役割と体内の水分の蒸散を抑制する大きな役割を果たしており、健康のために皮膚機能の維持は非常に重要である。そこで、今回、ミネラル濃縮ホエーの皮膚機能で重要な役割を果たしているヒアルロナン代謝への影響を検討し、その産業への応用が可能であることを明らかにすることにした。

ミネラル濃縮ホエーとして2種類（Fondolac SL、Champirolact 28/13）を選択し、5%濃度で2週間ラットに給餌した。その結果、タンパク質栄養が不足である状態（6%カゼイン食）において、ヒアルロナン合成酵素1、2、および3のmRNAを増加させる傾向が認められた。しかし、皮膚ヒアルロナン量に影響を与えなかった。本結果は、ミネラル濃縮ホエーがヒアルロナン合成系に影響を与える可能性を示唆した。今後、ミネラル濃縮ホエーの皮膚ヒアルロナン代謝に与える影響を解明する上で、ヒアルロナン分解系の研究も必要であると考えられた。

キーワード

皮膚、ミネラル濃縮ホエー（Fondolac SL、Champirolact 28/13）、ヒアルロナン、ヒアルロナン合成酵素

I 本研究の目的

1.1 背景

牛乳は、アミノ酸バランスの良い飲料として乳児から老人まで幅広く利用されている。また従来から、飲料としてだけでなく、チーズ、ヨーグルトなど食品への応用は多々ある。最近では、牛乳のタンパク質であるカゼインのトリプシン処理によるペプチドに、牛乳中に含まれるカルシウムの小腸からの吸収を促進する作用が見出され、特定保健用食品として認められている。また、美容、

健康のために牛乳風呂に入浴する人も少なくない。しかし、牛乳を食品として利用した後の残渣もある。とくに、牛乳からチーズを作成して残渣となるミネラル濃縮ホエーは、保湿剤としてローション、石鹸等に使用されてもいるが、食品としての利用価値また、その作用機構は明らかとなっていない。

皮膚には、ヒアルロナン、コラーゲンという細胞外マトリクスが存在し、重要な作用を有している。ヒアルロナンは、肌の瑞々しさ、栄養物の供給、老廃物の排出などの様々な物質の輸送、皮膚における免疫提示細胞であるランゲルハンス細胞の移動などに関わっている。皮膚ヒアルロナン量の減少がランゲルハンス細胞の移動を減少させるとの報告もある (Mummertら、2000)。ヒアルロナンは、年齢とともに、特にヒトでは、40歳以降顕著に減少するが、皮膚機能維持にとっては大きな問題である。このように、ヒアルロナンは身体において重要な因子であり、それらの増減は疾病の起因となる。

現在、日本は高齢社会を迎え、医療費負担増が問題となっている。この問題解決のためには、健康維持、疾病予防が必要であり、食事の重要性がさらに大きくなっている。

1.2 目的

そこで、本研究の目的は、ラットを用いた、食餌中のミネラル濃縮ホエーの、皮膚の機能に重要なヒアルロナン代謝に与える影響を分子レベルで解析することとした。

ヒアルロナンは、D-N-アセチルグルコサミンおよびD-グルクロン酸の2糖の繰り返し構造であり、その繰り返しは10000以上となり、巨大な分子である。コラーゲンの6ヶ月とは大きく異なり、ヒアルロナンの半減期は皮膚においては数日、血中では、数分と言われ、非常に短い (Laurentら、1992)。

皮膚ヒアルロナン代謝に関する分子は、最近合成酵素が見出されたのみで、分解系については、見つかっていない。合成酵素は、3種類存在し、それぞれhyaluronan synthase (HAS)-1、-2 および3と名づけられた (Weigelら、1997)。HAS-1および-2は主に真皮繊維芽細胞で発現し、HAS-3は主に表皮の表皮細胞に発現している (Zhangら、2000; Sayoら、2002)。また、HAS-1およびHAS-2を比較すると、後者の比活性が非常に高い (Tammiら、1998)。これらの合成酵素は膜タンパク質であり、膜からの単離は失活につながるとされている。よって、現在、HASタンパク質の精製などはなされていない。以上のことから、現在の生化学的なヒアルロナンの研究は、*in vitro*系での³H-グルコサミンを用いたヒアルロナン合成量の測定、*in vivo*系でのヒアルロナン量測定、ヒアルロナン合成酵素1、2、および3のmRNA量測定に限られてしまう。

そこで、本研究の目的のために、具体的には、

- ① ミネラル濃縮ホエーを含有する食餌により、ラット皮膚におけるヒアルロナン代謝に与える影響について検討する。
- ② ヒアルロナン代謝に影響をあたえる分子をミネラル濃縮ホエー中から単離・同定する、
- ③ この影響がどのような機構により起こるのか、線維芽細胞も用いながら解析する、

こととする。

1.3 構成

本年度は、ミネラル濃縮ホエーを含有する食餌により、ラット皮膚におけるヒアルロナン代謝に与える影響について、

- ① ミネラル濃縮ホエー摂食の効果が見出しやすい実験系の確立を行った。具体的には、通常12%カゼイン食で飼育するラットを6%カゼイン食あるいは3%カゼイン食などで飼育し、若干ヒアルロナン量が減少したラットを作成することを検討した、
 - ② 次に、ミネラル濃縮ホエーを摂取させ、その効果を検討した。具体的には、ミネラル濃縮ホエー含有食餌を給餌したラット皮膚中のヒアルロナン量、ヒアルロナン合成酵素1、2、および3のmRNA量を測定した、
- ので、これらのことを報告する。

Ⅱ ラット栄養実験モデルの確立

第1節 緒言

今回の目的は、ミネラル濃縮ホエーが皮膚ヒアルロナン代謝に与える影響である。本研究では、ラットにミネラル濃縮ホエーを摂取させ、皮膚に存在するヒアルロナン量およびその合成酵素 mRNA 量について検討する。通常、ラットはアミノ酸バランスの良い固形試料あるいは12%カゼイン食で飼育する。この場合、成長期のラットは、一日10g程度体重が増え、皮膚中のヒアルロナンも十分存在する状態である。よって、このような食餌条件でミネラル濃縮ホエーを摂取させても、その効果を見出すことは難しいと考えられる。

そこで、ミネラル濃縮ホエーの効果を見出しやすい条件の探索が必要と考えた。筆者は、タンパク質栄養の悪化によって、ヒアルロナン量が1週間で顕著に減少すること、また、ヒアルロナン合成酵素2および3のmRNA量が1日で顕著に減少することを明らかにした。よって、今回、ミネラル濃縮ホエーの効果を検討する方法として、摂取するタンパク質の質と量を変化させることを考え、本章にて検討し、その結果から、ミネラル濃縮ホエー摂取の皮膚ヒアルロナンへの影響を検討する摂食条件を決定することにした。

第2節 方法

2.2.1 動物実験

動物は、Wistar系雄性ラット（Charles River, オリエンタル酵母、東京）、実験開始時体重150g前後のものを用いた。

ラットは、今後の実験も含めて、午前8時から午後8時までを昼、午後8時から午前8時までを夜とした飼育室にて気温22℃、湿度55%前後で飼育した。また、水は24時間自由摂取とした。

ラットは購入後、市販の固形試料（MF、オリエンタル酵母）で3日間飼育した。次に、12%カゼイン食（組成はTable2.1参照）を4日間自由摂取させた後、午前10時から午後6時まで8時間摂取のmeal feeding訓練を4日間行った。訓練したラットを7群（1群5匹）にわけ、12%カゼイン食群（12C）、6%カゼイン食群（6C）、3%カゼイン食群（3C）、12%カゼイン食と12%グルテン食を一日おきに給餌する群（12C12G）、12%カゼイン食10g/日群（12C10g）、6%カゼイン食6%グルテン食混合食群（6C6G）、無タンパク質食群（PF）とした（それぞれの群の食餌組成はTable2.1参照）。7日間meal feedingにて給餌させ、8日目に1時間30分給餌させた後（Table2.2）、麻酔し、背部の毛を動物用バリカン（夏目製作所製、東京）および市販髭剃り（松下電工、大阪）にて剃り、皮膚を採取した。

皮膚の採取においては、臀部近傍部を切り取り、直径18mmの円形カッターを用いて、この部分から2枚採取した（1枚は予備用）。残りの皮膚も含めて、皮下組織を除去後-80℃にて保存した。

Table 2-1 食餌の組成表

	12% カゼイン食	6% カゼイン食	3% カゼイン食	12% グルテン食	6%グルテン食 6%カゼイン食	無タンパク質食
カゼイン	14	7.0	3.5	15	7.0	
グルテン					7.5	
メチオニン	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	
β-コーンスターチ	65.6	72.6	76.1	64.8	64.3	79.8
大豆油	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
ミネラル類	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
ビタミン類・塩化コリン	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
セルロース	10	10	10	10	10	10
略 称	12C	6C	3C	12G	6C6G	PF

(%)

Table 2-2 動物実験スケジュール表

経過時間(日)

		-11	-8	-4	0	7	8	
Pellet	12%カゼイン食	10:00 ~ 18:00	12%カゼイン食				12%カゼイン食(10:00~18:00)	左と同じ食餌(1.5時間)
							6%カゼイン食(10:00~18:00)	左と同じ食餌(1.5時間)
							3%カゼイン食(10:00~18:00)	左と同じ食餌(1.5時間)
							12%カゼイン食12%グルテン食1日おき(10:00~18:00)	左と同じ食餌(1.5時間)
							12%カゼイン食 10g/日(10:00~18:00)	左と同じ食餌(1.5時間)
							6%カゼイン食6%グルテン食(10:00~18:00)	左と同じ食餌(1.5時間)
							無タンパク質食(10:00~18:00)	左と同じ食餌(1.5時間)

2.2.2 ヒアルロナン量測定実験

- ① 直径18mmに円形に切った皮膚を室温まで戻した後、重量を測定した。
- ② 脱脂のためにアセトンに浸し、窒素ガスにて乾燥後、再度重量を測定した。この重量100mg 当り10mlの50mMTris/HCl (pH7.8)、終濃度1%アクチナーゼE(科研製薬)および終濃度0.02%アジ化ナトリウムを添加し、40℃にて1週間振盪した。
- ③ 1週間後、終濃度10%になるようにトリクロロ酢酸を添加し、攪拌後、10分間5000rpm、4℃にて遠心し、上清を回収した。上清は、水酸化ナトリウムにて中性に戻した。
- ④ 本溶液をセントリプラスYM-30(ミリポア)にて1mlまで濃縮および生理食塩水に置換した。このうち500μlを0.15MNaClを含む終濃度20mM酢酸緩衝液(pH6.0)に混合後、0.01TRUのヒ

Table 2-3 定量性PCRに用いた rhas1, rhas2,rhas3,
および b-actinのプライマーおよびプローブ配列

Gene	Accession No.			Primer Sequence
β-actin	V01217	sense	2838-2856	CCC TGG CTC CTA GCA CCA T
		antisense	3041-3020	GAT AGA GCC ACC AAT CCA CAC A
		probe	2865-2866,2991-3015*	AGA TCA TTG CTC CTC CTG AGC GCA AGT
rhas1	AB097568	sense	438-455	GCG CGT GCT TAT GGT TGT AGA
		antisense	492-512	GCG AAG ACT TCT CGG AAC ATG
		probe	470-490	TGG CTG GAA CCA CAT TGA AGA ATT
rhas2	AF008201	sense	1427-1446	ACT TGG ACC GAG CCG TGT AT
		antisense	1512-1493	ACT TGG ACC GAG CCG TGT AT
		probe	1457-1486	AGC CCA GAC TCA GTA CCC TGT TGG TAA GGT
rhas3	AF543196	sense	808-829	GGC AAT CGC CAG GAA GAT AC
		antisense	890-871	TAT GCC TGC TTC CTT CGA GG
		probe	841-863	TGG CCG CAT CTG GAA CAT TCT CC

*β-actin probe: nucleotide 2867-2990 is intron sequence

アルロニダーゼ (*Streptomyces hyalurolyticus*由来、生化学工業社製) を添加し (計 1 ml)、60℃にて18時間反応させヒアルロナンを分解した。

- ⑤ 煮沸にて反応を停止後、分解液500 μl をマイクロコンYM-30 (ミリポア社製) に供し、濾液を回収し、ウロン酸定量 (Bitterら、1962) に供した。

2.2.3 mRNA量測定実験

2.2.3.1 RNAの抽出 (Chomczynskiら,1987)

- ① 凍結保存した皮膚は、ハンマーにて破碎後、約300mgを13ml丸底ポリプロピレンチューブ (SARSTEDT、アシスト) に入れ、変性溶液 (25mMクエン酸 (pH7.0)、0.5% (w/v) N-ラウロイルサルコシンを含む 4 M Guanidinium thiocyanate) 3 mlを添加し、ホモゲナイザーで十分にホモジナイズした。
- ② 300 μl の 2 M sodium acetate (pH4.0) 溶液を添加し、よく攪拌した。
- ③ 3.0ml の水飽和phenol溶液を添加し、30秒間ボルテックスに供した。
- ④ 600 μl のchloroform/ isoamyl alcohol溶液 (24 : 1) を添加し、30秒間ボルテックスに供した。
- ⑤ 氷上に15分間静置後、4℃、8,000rpmにて20分間遠心した。
- ⑥ 上清を別のチューブにとり、当量の2-propanolを添加、10分間室温で放置した。
- ⑦ 4℃、15,000rpmにて10分間遠心し、上清を除去した。
- ⑧ 沈殿を500 μl の変性溶液で懸濁させた後、当量の2-propanolを添加し、-20℃で1時間静置した。

- ⑨ 4℃、15,000rpmにて10分間遠心し、上清を除去した。
- ⑩ 沈殿を風乾後、二炭酸ジエチル処理した水（DEPC水）に溶解させた。この溶液をRNA溶液とした。
- ⑪ 次に、RNA溶液にRQ1 RNase-Free DNase（1,000U/ml、Promega、Madison、WI、U.S.A.）を添加し、37℃、30分間反応させた。
- ⑫ 水飽和phenol溶液100 μ l 添加、攪拌にて反応停止し、さらに15,000rpm、2分間、室温にて遠心した。
- ⑬ 上清を別のチューブに取り、さらにchloroform/isoamyl alcoholを100 μ l 添加、攪拌後、5,000rpm、2分間、室温にて遠心した。
- ⑭ 上清を採取し、これに1/10容量の5 M NaClおよび2容量のethanolを添加し、-20℃にて1時間放置した。15,000rpm、20分間、4℃にて遠心し、RNAを沈殿物として得た。
- ⑮ 再びDEPC水に溶解させた後、RNA濃度を、波長260nmでの吸光度にて測定した。

2.2.3.2 cDNAの調製

- ① 調製したDNA-free RNA5 μ gをRandom Hexamers（Applied Biosystemes）およびdNTP溶液と混合し、70℃にて5分間処理後、直ちに氷上で静置した。
- ② 逆転写酵素用緩衝液（5倍濃縮液、逆転写酵素に付属する緩衝液）8 μ l、RNaseインヒビター（RNase OUTTM、Recombinant、Invitrogen）dithiothreitol溶液および逆転写酵素（SuperScript III RNaseH-Reverse Transcriptase、Invitrogen）を添加後、25℃にて5分間、42℃にて50分間、70℃にて15分間処理し、cDNAを得た。

2.2.3.3 mRNA量の測定

- ① mRNA量は定量性PCR法を用いたが、その装置としてPRISM7000（Applied Biosystemes）を用いた。
- ② 定量性PCR試薬の調製は、試薬付属のプロトコールに従った。
- ③ 反応液は、TaqMan Universal PCR Master Mixを用いた。
 β -アクチンは各RNAのcDNA溶液1 μ l、他は3 μ lを用いて、mRNA量を測定した。なお、 β -アクチン等のプライマー、プローブは、Table 2-3に記す。
- ④ PCRのサイクル数は、50回とした。
- ⑤ 各mRNA量は各サンプルの β -アクチンmRNA量に対する比で表した。
- ⑥ 本実験は、1群あたり5検体にて行った。5検体の結果から、平均値と標準誤差を求めるとともに、Student-Newman-Keuls test検定を用いて有意差検定を行った。

第3節 結果

2.3.1 体重変化（図2-1）

12C群は、従来どおりに体重が増加した。一方、PF群は、減少し続けた。3Cおよび一日10g (12C10g) は、ほとんど体重増加は無く、本結果は、以前に行った12%グルテン食 (アミノ酸バランスの悪い食餌) と似た結果だった。6C6G群は12C群と変わらず、また、6C、12C12G群は、12Cよりも若干少なめだった。

2.3.2 皮膚重量 (図 2-2)

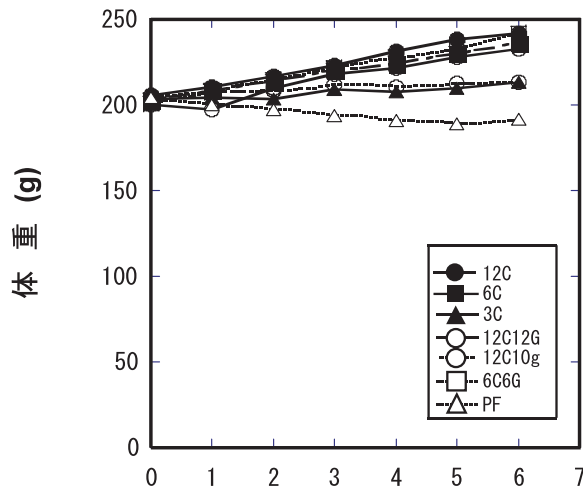


図2-1 栄養条件の違いの体重への影響

12C;12%カゼイン食投与群, 6C ;6%カゼイン食群, 3C;3%カゼイン食群, 12C12G;1日おきに12%カゼイン食, 12%グルテン食を摂食させる群, 12C10g;12%カゼイン食を一日10g摂食させる群, 6C6G;6%カゼイン食および6%グルテン食を含む食餌を摂食させる群, PF; 無タンパク質摂食群

12C群、6C群、3C群、一日10g群、12C12G群、6C6G群およびPF群の皮膚重量は、それぞれ118mg、105mg、99mg、111mg、116mg、123mg、96mgとなった。単位面積あたりの皮膚重量は、12C群と比して、PF群は有意に減少した。12C12G、12C10g、6C6G各群は、12Cとほとんど変わらなかった。6C、3C群は、12C群よりも減少傾向を示し、3CはPF群とほとんど変わらなかった。

2.3.3 ヒアルロナン量 (図 2-3)

12C群を1としたとき、6C群、3C群、12C10g群、12C12G群、6C6G群およびPF群のヒアルロナン量は、それぞれ0.55、0.32、0.64、1.03、0.49、0.33となった。本結果は、以前当研究室で行ったPF群の実験と比較して、同傾向を示した。また、3CはPF群とほぼ同程度、6C、一日10gおよび6C6G群はほぼ同等だった。

2.3.4 ヒアルロナン合成酵素 2 mRNA量 (図 2-4)

12C群の皮膚ヒアルロナン合成酵素 2 mRNA量を1とした場合、6C群、3C群、12C10g群、

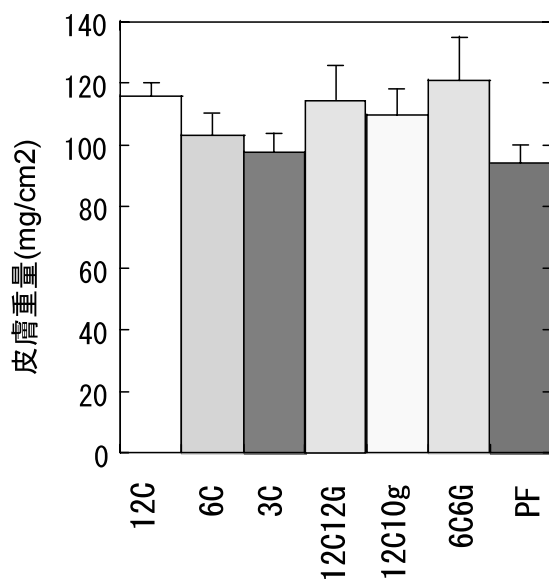


図2-2 栄養条件の違いの皮膚重量への影響

12C;12%カゼイン食投与群, 6C ;6%カゼイン食群, 3C;3%カゼイン食群, 12C12G;1日おきに12%カゼイン食, 12%グルテン食を摂食させる群, 12C10g;12%カゼイン食を一日10g摂食させる群, 6C6G;6%カゼイン食および6%グルテン食を含む食餌を摂食させる群, PF; 無タンパク質摂食群

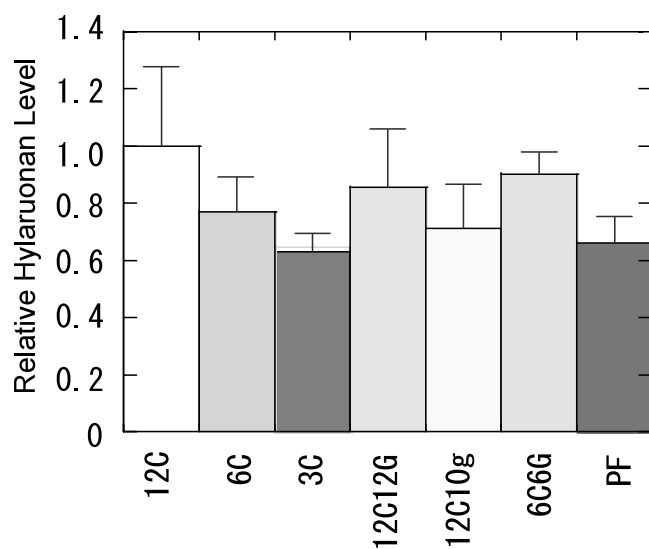


図2-3 栄養条件の違いの皮膚ヒアルロン量への影響

12C;12%カゼイン食投与群, 6C ;6%カゼイン食群, 3C;3%カゼイン食群, 12C12G;1日おきに12%カゼイン食, 12%グルテン食を摂食させる群, 12C10g;12%カゼイン食を一日10g摂食させる群, 6C6G;6%カゼイン食および6%グルテン食を含む食餌を摂食させる群, PF; 無タンパク質摂食群

12C12G群、6C6G群、PF群各群のmRNA量は、それぞれ0.60、0.12、0.13、0、0.53、0.14となり、3C、12C12G群は、PF群とほぼ同等だった。また、6Cと6C6G群はほぼ同等だった。

第4節 考察

本研究の目的は、ミネラル濃縮ホエー摂食による皮膚ヒアルロン量への影響であり、そのため

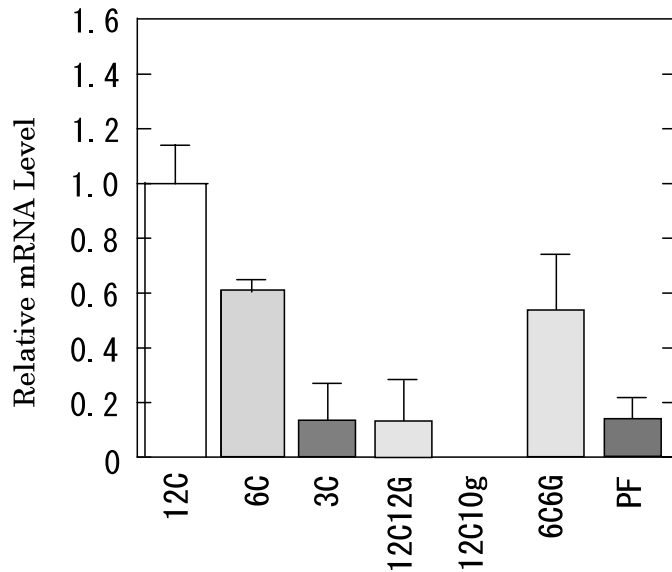


図2-4 栄養条件の違いの皮膚ヒアルロン合成酵素2mRNA量への影響

12C;12%カゼイン食投与群, 6C ;6%カゼイン食群, 3C;3%カゼイン食群, 12C12G;1日おきに12%カゼイン食, 12%グルテン食を摂食させる群, 12C10g;12%カゼイン食を一日10g摂食させる群, 6C6G;6%カゼイン食および6%グルテン食を含む食餌を摂食させる群, PF; 無タンパク質摂食群

にタンパク質栄養条件の良い12%カゼイン食よりも低く無タンパク質食よりもある程度高い皮膚ヒアルロン量となる群を探索した。今回の結果から、12%カゼイン食群より低く、無タンパク質食群よりも高い群として、6%カゼイン食群が挙げられる。6%カゼイン食6%グルテン食群(6C6G)も該当する群ではあったが、ミネラル濃縮ホエー摂食の実験を行う上で基本となる餌が単純であることも必要であるため、今回の実験で用いる基本となる餌は、6%カゼイン食とすることにした。

なお、タンパク質栄養が充分良い条件、すなわちヒトとして通常生活している状態でのミネラル濃縮ホエーの効果を検討すべく、12%カゼイン食を基本とする食餌での実験も行った。

Ⅲ ミネラル濃縮ホエー摂食による皮膚ヒアルロナン量の影響

第1節 緒言

ヒアルロナンは、非常に大きな分子量をもつ多糖である。「I 本研究の目的」も述べたが、皮膚では、様々な物質の輸送、皮膚免疫細胞の移動、肌の瑞々しさなどに関わっている。さらに、ヒトにおいては、年齢とともに皮膚ヒアルロナン量は減少し、40歳代においては、乳児の約半分といわれている。合成は、3種類のヒアルロナン合成酵素（Hyaluronan Synthase, Has）によって行われており、様々なサイトカイン、ホルモン、また食餌タンパク質によって、そのmRNA量は大きく変動する（Kurodaら、2001、Sayoら、2002、Oishiら、2003）。

皮膚ヒアルロナンの半減期は数日といわれており（Laurent、1992）、また、その合成酵素の半減期は数時間といわれている（Mian、1986）。食餌タンパク質においても、24時間後には合成酵素のmRNA量が顕著に変動する（Oishiら、2003）。

一方、牛乳は、アミノ酸バランスの良い飲料として広く一般に利用されており、その加工品であるチーズ、バター、ヨーグルトも新たな効果が言われている。しかし、加工品を製造する上で副産物として大量に残るものも存在し、その1つとしてミネラル濃縮ホエーがある。

そこで、本章では、このミネラル濃縮ホエーの有用性を見出すべく、摂食させることにより、皮膚ヒアルロナン代謝に与える影響を検討することにした。今回用いたミネラル濃縮ホエーは、ドイツMeggle社のFondolac SLおよびAlpavit社のChampirolact 28/13とした。実験は、予備飼育したラットに2週間上記2種類のミネラル濃縮ホエーを5%含む12%カゼイン食あるいは6%カゼイン食を給餌し、ラット背面皮膚のヒアルロナン量、ヒアルロナン合成酵素mRNA量を測定した。また、使用したミネラル濃縮ホエーには25%程度タンパク質が含まれているので、タンパク質量を合せた群を設けるとともに、低ゲル化性ホエータンパク質濃縮物（ニュージーランドFonterra Co-operative Group Limited社）を飼料とした群も設けた。ネガティブコントロールとして、無タンパク質食群を設けた。今回2週間飼育を行ったが、その理由は、他の物質の摂食試験において2週間あるいは3週間が有効であることが明らかとなったからである。

さらに、ミネラル濃縮ホエーの効果がヒアルロナン代謝のみに与えるものか否かを確認するために、皮膚に最も多いタンパク質であるコラーゲンのmRNA量も測定した。コラーゲンは20種類以上同定されているが、皮膚では、I型およびⅢ型コラーゲンが多いので、この2種類について検討した。

第2節 方法

3.2.1 動物実験

動物は、Wistar系雄性ラット（Charles River、オリエンタル酵母、東京）、実験開始時体重150g前後のものを用いた。

ラットの予備飼育は、第2章と同様に行った。

本飼育は、12%カゼイン食群 (12C)、12%カゼイン食+1.6%カゼイン食群 (12CC)、12%カゼイン食+5%Fondolac SL群 (12CSL)、12%カゼイン食+5%Champiolact 28/13群 (12CCh)、6%カゼイン食群 (6C)、6%カゼイン食+1.6%カゼイン食群 (6CC)、6%カゼイン食+5%Fondolac SL群 (6CSL) 群、12%カゼイン食+5%Champiolact 28/13群 (6CCh)、12%Alacen472食群 (ホエータンパク質濃縮物、12WPC)、6%Alacen472群 (6WPC)、および無タンパク質食群 (PF) の11群 (1群5匹) とした。(それぞれの群の食餌組成はTable2.1および3.2参照)。14日間meal feedingにて給餌させた。15日目に1時間30分給餌させた後、麻酔し、背部の毛を動物用バリカンおよび市販髭剃り (松下電工、大阪) にて、剃った後、皮膚を採取した。

Table 3-1 使用したミネラル濃縮ホエーの組成

商品名	ミネラル濃縮ホエー		ホエー濃縮タンパク質
	Fondolac SL	Champiolact 28/13	Alacen 472
製造メーカー	Meggle(ドイツ)	Alpavit(ドイツ)	Fonterra Co-operative Group Limited
タンパク質	25	28.0	81.5
水分	4	3.5	4.0
灰分	18	13.0	3.0
脂質	3	2.0	5.5
乳糖	41-16		
炭水化物		55.0	6.0

(%)

* 上記材料の提供、分析等は、明治乳業株式会社研究本部食機能科学研究所栄養研究部および技術開発家救助生産技術研究部原料素材開発グループのご協力をいただいた。

Table 3-2 食餌の組成表

	12%カゼイン + 1.6%カゼイン食	12%カゼイン + Fondolac SL食	12%カゼイン + Champiolact 28/13食	6%カゼイン + 1.6%カゼイン食	6%カゼイン + Fondolac SL食	6%カゼイン + Champiolact 28/13食
カゼイン	15.9	14	14	8.9	7.0	7.0
メチオニン	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Fondolac SL		5.0			5.0	
Champiolact 28/13			5.0			5.0
Alacen 472						
β-コーンスターチ	63.7	60.6	60.6	64.8	67.6	67.6
大豆油	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
ミネラル類	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
ビタミン類・塩化コリン	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
セルロース	10	10	10	10	10	10
略 称	12CC	12CSL	12CCh	6CC	6CSL	6CCh

(%)

Table 3-2 食餌の組成表(続き)

	12% Alacen 472 食	6% Alacen 472 食
カゼイン メチオニン Fondolac SL Champiolact 28/13 Alacen 472	15	7.5
β-コーンスターチ	64.8	72.3
大豆油	5.0	5.0
ミネラル類	4.0	4.0
ビタミン類・塩化コリン	1.2	1.2
セルロース	10	10
略 称	12WPC	6WPC

(%)

Table 3-3 動物実験スケジュール表

		-11	-8	-4	0	経過時間(日)	14	15
Pellet	12%カゼイン食	10:00 ~ 18:00	12%カゼイン食			12%カゼイン食(10:00~18:00)	左と同じ食餌(1.5時間)	
						12%カゼイン食+1.6%カゼイン食(10:00~18:00)	左と同じ食餌(1.5時間)	
						12%カゼイン+5%Fondolac SL食(10:00~18:00)	左と同じ食餌(1.5時間)	
						12%カゼイン+5%Champiolact 28/13食(10:00~18:00)	左と同じ食餌(1.5時間)	
						6%カゼイン食(10:00~18:00)	左と同じ食餌(1.5時間)	
						6%カゼイン食+1.6%カゼイン食(10:00~18:00)	左と同じ食餌(1.5時間)	
						6%カゼイン+5%Fondolac SL食(10:00~18:00)	左と同じ食餌(1.5時間)	
						6%カゼイン+5%Champiolact 28/13食(10:00~18:00)	左と同じ食餌(1.5時間)	
						12%Alacen 472 食(10:00~18:00)	左と同じ食餌(1.5時間)	
						6%Alacen 472 食(10:00~18:00)	左と同じ食餌(1.5時間)	
						無タンパク質 食(10:00~18:00)	左と同じ食餌(1.5時間)	

皮膚の採取においては、臀部近傍部を切り取り、直径18mmの円形カッターを用いて、この部分から2枚採取した(1枚は予備用)。残りの皮膚も含めて、皮下組織を除去後-80℃にて保存した。

3.2.2 ヒアルロナン量測定実験

2.2.2と同様に行った。

3.2.3 mRNA量測定実験

2.2.3と同様に行った。

第3節 結果

3.3.1 体重変化 (図3-1)

12%カゼイン食 (12C) 群、12%カゼイン食+1.6%カゼイン食群 (12CC) 群は、従来とおりに体重が増加した。また、6%カゼイン食 (6C) 群、6%カゼイン食+1.6%カゼイン食群 (6CC) 群も12C群との差は認められなかった。ミネラル濃縮ホエー摂取群、ホエー濃縮タンパク質群においても有意な差は認められなかった。一方、PF群は、減少し続け、4日目以降、他の群とは有意な差がついた。

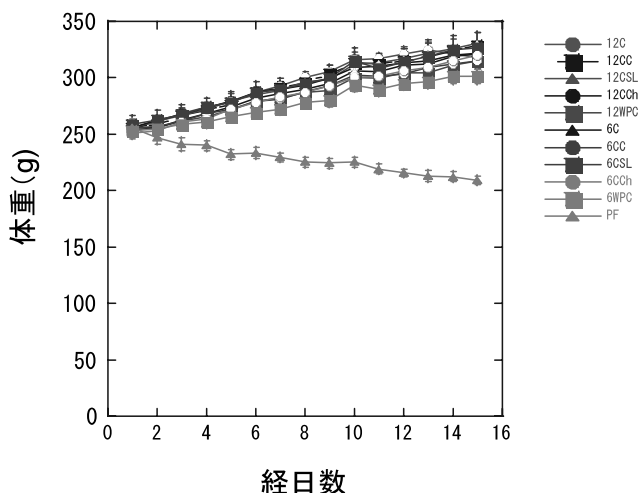


図3-1 ミネラル濃縮ホエー摂取による体重への影響

12C;12%カゼイン食群(全体のコントロール, 12WPCのコントロール), 12CC: 12%カゼイン食+1.6%カゼイン食群(12CSL, 12CChのコントロール), 12CSL; 12%カゼイン食+5%Fondolac SL食, 12CCh; 12%カゼイン食+5%CHampiolact 28/13食, 12WPC;12%Alacen472食群, 6C;6%カゼイン食群(6WPCのコントロール), 6CC: 6%カゼイン食+1.6%カゼイン食群(6CSL, 6CChのコントロール), 6CSL; 6%カゼイン食+5%Fondolac SL食群, 6CCh; 6%カゼイン食+5%CHampiolact 28/13食群, 6WPC;6%Alacen472食群, PF;無タンパク質食群

3.3.2 皮膚重量 (図3-2)

どの群においても有意な差は認められなかった。

無タンパク質食群の皮膚重量は、コントロールである12%カゼイン食群を1とした場合、0.77であり、従来の結果と同様だった (Oishiら、2002、Oishiら、2003)。

ミネラル濃縮ホエーの Champiolact 28/13摂取群 (12CChおよび6CCh群) は、コントロールである12CCおよび6CCを1とした場合、0.85および0.86となり、もう1種類のFondolac SL摂取群は、それぞれ1.09、0.88となった。

また、低ゲル性ホエータンパク質濃縮物摂取群 (12WPC、6WPC) では、コントロールに対して0.94および0.93であった。

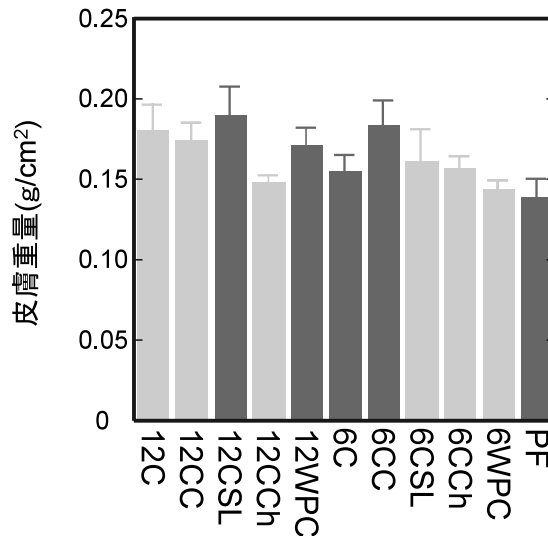


図3-2 ミネラル濃縮ホエー摂取による皮膚重量への影響

12C:12%カゼイン食群(全体のコントロール, 12WPCのコントロール), 12CC: 12%カゼイン食+1.6%カゼイン食群(12CSL,12CChのコントロール), 12CSL:12%カゼイン食+5%Fondolac SL食, 12CCh:12%カゼイン食+5%Champiolact 28/13食, 12WPC:12%Alacen472食群, 6C:6%カゼイン食群(6WPCのコントロール), 6CC: 6%カゼイン食+1.6%カゼイン食群(6CSL,6CChのコントロール), 6CSL:6%カゼイン食+5%Fondolac SL食群, 6CCh:6%カゼイン食+5%Champiolact 28/13食群, 6WPC:6%Alacen472食群, PF:無タンパク質食群

3.3.3 ヒアルロナン量 (図 3 - 3)

無タンパク質食群 (PF) では、12%カゼイン食群 (12C) と比較して減少した (0.76)。本結果は、減少率が低いものの、従来の結果と同じだった (Oishiら、2003)。

12%カゼイン食群 (12C) と 6%カゼイン食群 (6C) とは、条件設定時の実験 (第2章) と異なり、差が認められなかった。

12%Alacen472 (低ゲル化性ホエータンパク質濃縮物、12WPC) 群は、コントロール群である12%カゼイン食群 (12C) と比較して、ヒアルロナン量が減少傾向を示した (12%カゼイン食群を1とすると0.71)。6%群 (6WPC) では差がなかった (6%カゼイン食群を1とすると0.97)。

ミネラル濃縮ホエー摂食群では、コントロール群である12%カゼイン食+1.6%カゼイン食群 (12CC) を1として比較すると、12%カゼイン食+5%Fondolac SL摂食群 (12CSL) および12%カゼイン食+5%Champiolact 28/13摂食群 (12CCh) はそれぞれ1.02、1.01であった。また、6%カゼイン食+5%Fondolac SL摂食群および6%カゼイン食+5%Champiolact 28/13摂食群は6%カゼイン食+1.6%カゼイン食群 (6CC) と比較して、0.87および1.00となり、効果は認められなかった。

3.3.4 ヒアルロナン合成酵素mRNA量

3.3.4.1 Has1 mRNA量 (図 3 - 4)

12%カゼイン食+1.6%カゼイン食群 (12CC) 群のmRNA量を1とした場合、12%カゼイン食+5%Fondolac SL摂食群 (12CSL) が1.67を示し、増加傾向を示した。一方、12%カゼイン食+5%Champiolact 28/13摂食群 (12CCh) が0.66を示し、減少傾向を示した。6%カゼイン

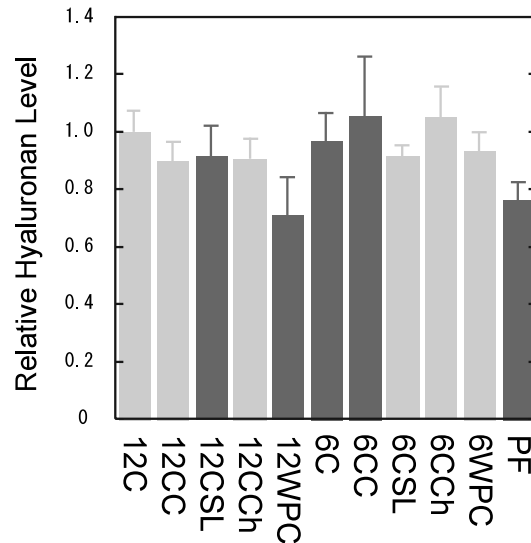


図3-3 ミネラル濃縮ホエー摂取による皮膚ヒアルロナン量への影響

12C:12%カゼイン食群(全体のコントロール, 12WPCのコントロール), 12CC: 12%カゼイン食+1.6%カゼイン食群(12CSL, 12CChのコントロール), 12CSL: 12%カゼイン食+5%Fondolac SL食, 12CCh: 12%カゼイン食+5%CHampiolact 28/13食, 12WPC: 12%Alacen472食群, 6C: 6%カゼイン食群(6WPCのコントロール), 6CC: 6%カゼイン食+1.6%カゼイン食群(6CSL, 6CChのコントロール), 6CSL: 6%カゼイン食+5%Fondolac SL食群, 6CCh: 6%カゼイン食+5%CHampiolact 28/13食群, 6WPC: 6%Alacen472食群, PF: 無タンパク質食群

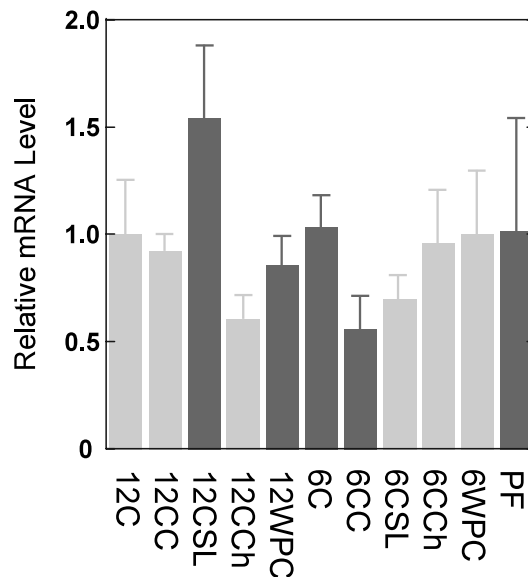


図3-4 ミネラル濃縮ホエー摂取による皮膚ヒアルロナン合成酵素1 mRNA量への影響

12C:12%カゼイン食群(全体のコントロール, 12WPCのコントロール), 12CC: 12%カゼイン食+1.6%カゼイン食群(12CSL, 12CChのコントロール), 12CSL: 12%カゼイン食+5%Fondolac SL食, 12CCh: 12%カゼイン食+5%CHampiolact 28/13食, 12WPC: 12%Alacen472食群, 6C: 6%カゼイン食群(6WPCのコントロール), 6CC: 6%カゼイン食+1.6%カゼイン食群(6CSL, 6CChのコントロール), 6CSL: 6%カゼイン食+5%Fondolac SL食群, 6CCh: 6%カゼイン食+5%CHampiolact 28/13食群, 6WPC: 6%Alacen472食群, PF: 無タンパク質食群

食+1.6%カゼイン食群（6CC）のmRNA量を1とした場合、6%カゼイン食+5%Fondolac SL摂食群が1.25、6%カゼイン食+5%Champiolact 28/13摂食群が1.72を示し、ミネラル濃縮ホエー投与によって、ヒアルロナン合成酵素1のmRNA量が増加する傾向が認められた。低ゲル化性ホエータンパク質濃縮物（WPC）投与群に関しては、12%、6%群ともにカゼイン食と変化なかった（それぞれ0.86、0.97）。

また、無タンパク質食群 (PF) のmRNA量は12%カゼイン食群 (12C) のものと変化なかった (1.01)。

3.3.4.2 Has2 mRNA量

12%カゼイン食+1.6%カゼイン食群 (12CC) 群のmRNA量を1とした場合、12%カゼイン食+5%Fondolac SL摂食群 (12CSL) が0.89、12%カゼイン食+5%Champiolact 28/13摂食群 (12CCCh) が0.61を示し、ヒアルロンン合成酵素2のmRNA量を増加させる効果はなかった。6%カゼイン食+1.6%カゼイン食群 (6CC) のmRNA量を1とした場合、6%カゼイン食+5%Fondolac SL摂食群 (6CSL) が1.18、6%カゼイン食+5%Champiolact 28/13摂食群 (6CCCh) が1.18を示し、増加傾向を示した。低ゲル化性ホエータンパク質濃縮物投与群に関しては、12% (12WPC) で減少傾向を示し、6%群 (6WPC) で増加を示した (それぞれ0.63、2.07)。

また、無タンパク質食群 (PF) のmRNA量は12%カゼイン食群 (12C) のものと比較して顕著に減少し (12%カゼイン食群を1とすると0.39)、これは従来と同様の結果であった。

3.3.4.3 Has3 mRNA量

無タンパク質食群 (PF) のmRNA量は12%カゼイン食群 (12C) のものと比較して変わらなかった (1.07)。本結果は、従来の結果と異なった (Oishiら、2003)。この原因は摂食期間を1週間から2週間に延ばしたことも考えられるが、不明である。また、12%カゼイン食群 (12C) と6%カゼイン食群 (6C) のmRNA量も変化がなかった (12%カゼイン食群を1とすると1.19)。

12%カゼイン食+1.6%カゼイン食群 (12CC) 群のmRNA量を1とした場合、12%カゼイン食+5%Fondolac SL摂食群 (12CSL) が1.37で増加傾向が認められた。一方、12%カゼイン食+5%Champiolact 28/13摂食群 (12CCCh) が0.99を示し、変わらなかった。

6%カゼイン食+1.6%カゼイン食群 (6CC) のmRNA量を1とした場合、6%カゼイン食+5%Fondolac SL摂食群 (6CSL) が1.26、12%カゼイン食+5%Champiolact 28/13摂食群 (6CCCh) が1.17を示し、増加傾向を示した。低ゲル化性ホエータンパク質濃縮物投与群に関しては、12% (12WPC)、6% (6WPC) とともにコントロールと変わらなかった (それぞれ0.88、0.94)。

3.3.5 コラーゲンmRNA量

3.3.5.1 I型コラーゲンmRNA量

無タンパク質食群 (PF) のmRNA量は12%カゼイン食群 (12C) と比較して、従来通りに低下した (0.44、Oishiら、2002)。

12%カゼイン食+1.6%カゼイン食群 (12CC) 群のmRNA量を1とした場合、12%カゼイン食+5%Fondolac SL摂食群 (12CSL) が0.86、12%カゼイン食+5%Champiolact 28/13摂食群 (12CCCh) が0.70を示し、減少傾向を示した。6%カゼイン食+1.6%カゼイン食群 (6CC) のmRNA量を1とした場合、6%カゼイン食+5%Fondolac SL摂食群 (6CSL) が1.60、6%カゼイン食+5%Champiolact 28/13摂食群 (6CCCh) が1.27を示し、ミネラル濃縮ホエー摂食によ

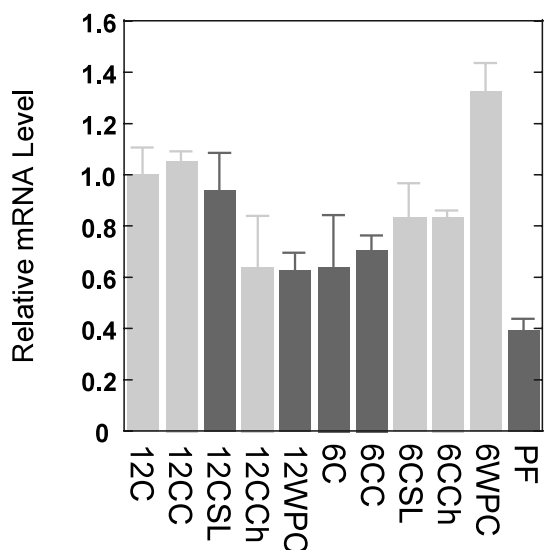


図3-5 ミネラル濃縮ホエー摂取による皮膚ヒアルロナン合成酵素2mRNA量への影響

12C;12%カゼイン食群(全体のコントロール, 12WPCのコントロール), 12CC: 12%カゼイン食+1.6%カゼイン食群(12CSL, 12CChのコントロール), 12CSL; 12%カゼイン食+5%Fondolac SL食, 12CCh; 12%カゼイン食+5%CHampiolact 28/13食, 12WPC;12%Alacen472食群, 6C;6%カゼイン食群(6WPCのコントロール), 6CC: 6%カゼイン食+1.6%カゼイン食群(6CSL,6CChのコントロール), 6CSL;6%カゼイン食+5%Fondolac SL食群, 6CCh;6%カゼイン食+5%CHampiolact 28/13食群, 6WPC;6%Alacen472食群, PF;無タンパク質食群

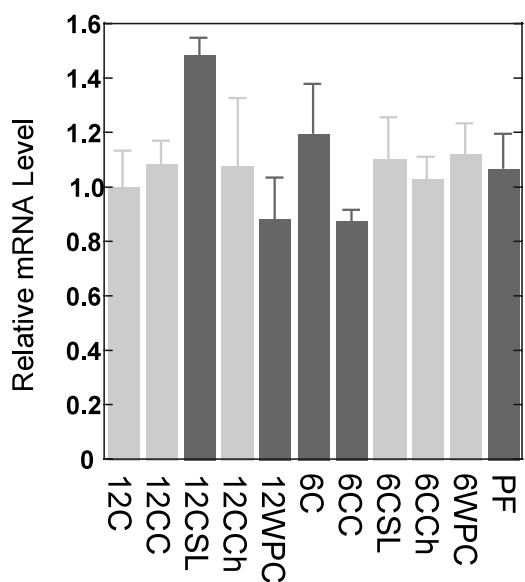


図3-6 ミネラル濃縮ホエー摂取による皮膚ヒアルロナン合成酵素3mRNA量への影響

12C;12%カゼイン食群(全体のコントロール, 12WPCのコントロール), 12CC: 12%カゼイン食+1.6%カゼイン食群(12CSL, 12CChのコントロール), 12CSL; 12%カゼイン食+5%Fondolac SL食, 12CCh; 12%カゼイン食+5%CHampiolact 28/13食, 12WPC;12%Alacen472食群, 6C;6%カゼイン食群(6WPCのコントロール), 6CC: 6%カゼイン食+1.6%カゼイン食群(6CSL,6CChのコントロール), 6CSL;6%カゼイン食+5%Fondolac SL食群, 6CCh;6%カゼイン食+5%CHampiolact 28/13食群, 6WPC;6%Alacen472食群, PF;無タンパク質食群

って、I型コラーゲンmRNA量が増加する傾向が認められた。低ゲル化性ホエータンパク質濃縮物（WPC）投与群に関しては、12%、6%群それぞれ、1.48、1.66となり、増加傾向あるいは増加を示した。

3.3.5.2 Ⅲ型コラーゲンmRNA量

無タンパク質食群（PF）のmRNA量は12%カゼイン食群（12C）と比較して、従来通り I 型

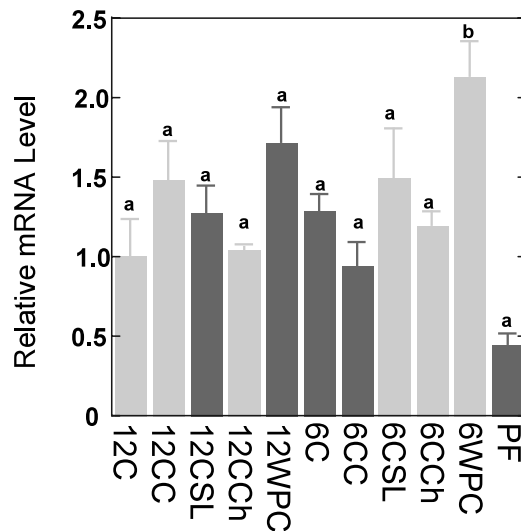


図3-7 ミネラル濃縮ホエー摂取による皮膚Ⅰ型コラーゲンmRNA量への影響

12C;12%カゼイン食群(全体のコントロール, 12WPCのコントロール), 12CC: 12%カゼイン食+1.6%カゼイン食群(12CSL,12CChのコントロール), 12CSL;12%カゼイン食+5%Fondolac SL食, 12CCh;12%カゼイン食+5%CHampiolact 28/13食, 12WPC;12%Alacen472食群, 6C;6%カゼイン食群(6WPCのコントロール), 6CC: 6%カゼイン食+1.6%カゼイン食群(6CSL,6CChのコントロール), 6CSL;6%カゼイン食+5%Fondolac SL食群, 6CCh;6%カゼイン食+5%CHampiolact 28/13食群, 6WPC;6%Alacen472食群, PF;無タンパク質食群
グラフ上の文字は、P<0.01での有意差(Student-Neuman-Keuls test)を示す。

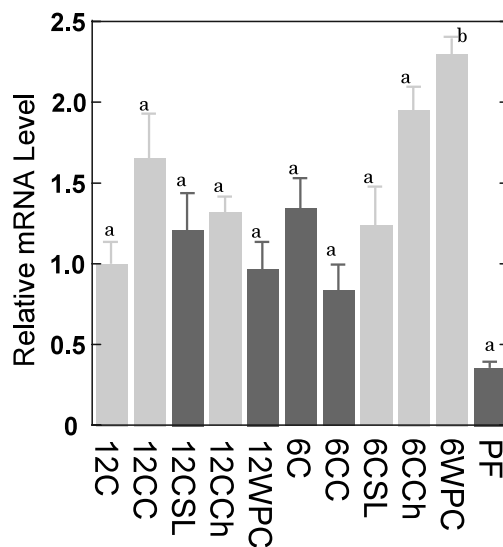


図3-8 ミネラル濃縮ホエー摂取による皮膚Ⅲ型コラーゲンmRNA量への影響

12C;12%カゼイン食群(全体のコントロール, 12WPCのコントロール), 12CC: 12%カゼイン食+1.6%カゼイン食群(12CSL,12CChのコントロール), 12CSL;12%カゼイン食+5%Fondolac SL食, 12CCh;12%カゼイン食+5%CHampiolact 28/13食, 12WPC;12%Alacen472食群, 6C;6%カゼイン食群(6WPCのコントロール), 6CC: 6%カゼイン食+1.6%カゼイン食群(6CSL,6CChのコントロール), 6CSL;6%カゼイン食+5%Fondolac SL食群, 6CCh;6%カゼイン食+5%CHampiolact 28/13食群, 6WPC;6%Alacen472食群, PF;無タンパク質食群
グラフ上の文字は、P<0.01での有意差(Student-Neuman-Keuls test)を示す。

コラーゲン以上に低下した (0.35、Oishiら、2002)。

12%カゼイン食+1.6%カゼイン食群 (12CC) 群のmRNA量を1とした場合、12%カゼイン食+5%Fondolac SL摂食群 (12CSL) が0.73、12%カゼイン食+5%Champiolact 28/13摂食群 (12CCh) が0.79を示し、減少傾向を示した。6%カゼイン食+1.6%カゼイン食群 (6CC) のmRNA量を1とした場合、6%カゼイン食+5%Fondolac SL摂食群 (6CSL) が1.49、6%カ

ゼイン食 + 5% Champiolact 28/13 摂食群 (6 CCh) が 2.34 を示し、ミネラル濃縮ホエー投与によって、Ⅲ型コラーゲン mRNA 量の増加する傾向が認められた。低ゲル化性ホエータンパク質濃縮物 (WPC) 投与群に関しては、12%、6% 群は、それぞれ 0.97 および 2.30 となり、6% 群に関して、有意に増加した。

第4節 考察

今回、ミネラル濃縮ホエー摂食の皮膚ヒアルロナン代謝に与える影響について、ラットを用いて行った。2週間での体重増加は、無タンパク質食群以外は、同様だった (図 3-1)。

皮膚重量は、無タンパク質食群で減少傾向を示したが、他群ではコントロールとほとんど変わらず、ミネラル濃縮ホエー摂食による影響はなかった。

ヒアルロナン量は、12%カゼイン食群、6%カゼイン食群にミネラル濃縮ホエーを加えても、ともに効果が認められなかった (図 3-3)。また、無タンパク質食群での減少が顕著でなかった。この原因として、従来の1週間の摂食ではなく、2週間による摂食によって、一時的に減少したヒアルロナン量が合成系の促進あるいは分解系の抑制によって12%カゼイン食群との差が縮まったのかもしれないと考えられた。今後、タイムコースなどの実験により、解決されることが考えられる。

皮膚のうち、真皮で発現しているヒアルロナン合成酵素 2 の mRNA 量は、無タンパク質群ではコントロールである12%カゼイン食群と比較して顕著に減少した (図 3-5)。ミネラル濃縮ホエー摂食では、コントロールと比較して顕著な差が認められなかった。ただし、タンパク質栄養が不足した場合には、増加傾向を示した。低ゲル化性ホエータンパク質濃縮物 (WPC) 投与群においては、低タンパク質栄養状態において、ヒアルロナン合成酵素 2 mRNA 量を増加させた。しかし、ヒアルロナン量は増加しておらず、今後ヒアルロナン分解系に与える影響等を検討する必要があると考えられた。

ヒアルロナン合成酵素 3 の mRNA 量 (図 3-6) は、2種類のミネラル濃縮ホエー摂食ともに増加傾向を示した。ヒアルロナン合成酵素 3 は主に、表皮で発現していることを考えると、ミネラル濃縮ホエーは、表皮のヒアルロナン量を増加させる可能性が考えられた。

ヒアルロナン合成酵素 1 の mRNA (図 3-4) は、ヒアルロナン合成酵素 2 および 3 と比較してヒアルロナンの合成量が少ないが、ヒアルロナン合成酵素 2 および 3 と同様の傾向を示し、6%カゼイン食にミネラル濃縮ホエーを添加することにより、増加傾向を示した。

以上のことから、ヒアルロナン代謝に関して、6%カゼイン食にミネラル濃縮ホエーを添加した群において3種類のヒアルロナン合成酵素 mRNA 量は増加傾向を示したが、ヒアルロナン量は変化なかった。この原因を解明するためには、分解系の研究が必要である。今後、ヒアルロナン分解系が解明されることが待たれる。

皮膚は、タンパク質としてコラーゲンを多く含む。特にⅠ型およびⅢ型コラーゲンは、ヒアルロナンと同様、タンパク質栄養に大きく影響を受ける (Oishiら、2002)。そこで、今回、Ⅰ型およびⅢ

型コラーゲンのmRNA量についても検討し、ヒアルロナン合成酵素のmRNA量と比較した。ミネラル濃縮ホエー摂取は、タンパク質栄養不足の場合、I型およびⅢ型コラーゲンともに増加傾向を示した。しかし、タンパク質栄養が十分の場合には、この効果を示さなかった。また、低ゲル性ホエータンパク質濃縮物摂取群でもタンパク質栄養不足の場合、顕著にI型およびⅢ型コラーゲンmRNA量を増加させた。

以上の結果は、ミネラル濃縮ホエー摂取は、タンパク質栄養が十分な場合は、ヒアルロナン代謝およびコラーゲン代謝に影響を与えず、タンパク質栄養が不足している場合に、ヒアルロナン合成およびコラーゲン合成を増加させる可能性を示唆した。

IV 総合討論

本研究では、ミネラル濃縮ホエー摂取によるヒアルロナン代謝への影響を検討した。

2週間の摂取によって、タンパク質栄養の十分な状態では、ヒアルロナン代謝に影響を与えることがなかった。

しかし、タンパク質栄養が不足になった場合、ミネラル濃縮ホエーを5%添加することにより、ヒアルロナン合成酵素のmRNA量を増加させる傾向があった。このことは、ヒアルロナン代謝を改良する可能性があると考えられた。今後、ヒアルロナン分解系が解明され、ミネラル濃縮ホエーの分解系への影響が明らかにされれば、さらに、その効果が明らかになるであろう。

今回2種類のミネラル濃縮ホエーを用いたが、その効果は異なった。この2種類の組成がどのように異なるのかを確認の上、今回の結果を確認することにより、さらに何が今回の効果に関与しているのか解明されるだろう。

タンパク質栄養によるヒアルロナン代謝への影響にはインスリン様成長因子-I (IGF-I) およびその結合タンパク質インスリン様成長因子結合タンパク質1 (IGFBP-1) が大きく関わっていると考えられる (Oishiら、2003)。IGF-I およびIGFBP-1は主に肝臓で合成され、血中を介して、各臓器で作用すると考えられている。皮膚でのコラーゲン代謝と同様にヒアルロナン代謝にも影響を与え、IGF-Iの減少は、コラーゲン合成、ヒアルロナン合成を抑制する (Kurodaら、2001)。ミネラル濃縮ホエー摂取により血中のIGF-IおよびIGFBP-1量がどのように影響を受けるのかについて、今後検討する必要がある。

現在、日本はさらに高齢化が進んでいる。健康を維持する上で、タンパク質栄養を十分とることは必要ではあるが、肝臓疾患等により十分にタンパク質が摂取できないような患者にとって、コラーゲンの結果も含めて本結果は、ミネラル濃縮ホエー摂取が皮膚の維持にとって、良いことを示唆している。今後、ミネラル濃縮ホエーの長期間摂取での影響、組成中の何が影響を与えるのか、またこの作用機構などの解明が必要であろう。

V 参考文献

- Bitter, T. and Muir, H. M. A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.*, 4, 330-334 (1962).
- Chomczynski, P., and Sacchi, N., Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162, 156-159 (1987).
- Kuroda, K., Utani, A., Hamasaki, Y., and Shinkai, H. Up-regulation of putative hyaluronan synthase mRNA by basic fibroblast growth factor and insulin-like growth factor-1 in human skin fibroblasts. *J. Dermatol. Sci.*, 26, 156-160 (2001).
- Laurent, T.C., and Fraser, J.R. Hyaluronan. *FASEB J.*, 6, 2397-2404 (1992)
- Mian, N. Analysis of cell-growth-phase-related variations in hyaluronate synthase activity of isolated plasma-membrane fractions of cultured human skin fibroblasts. *Biochem. J.*, 237, 333-342 (1986).
- Mummert, M. E., Mohamadzadeh, M., Mummert, D. I., Mizumoto, N., and Takashima, A. Development of a peptide inhibitor of hyaluronan-mediated leukocyte trafficking. *J. Exp. Med.*, 192, 769-779 (2000)
- Oishi, Y., Fu, Z., Ohnuki, Y., Kato, H., and Noguchi, T. a Effects of Protein Deprivation on $\alpha 1$ (I) and $\alpha 1$ (III) collagen and its degrading system in rat skin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 117-126 (2002)
- Oishi, Y., Kato, H., Noguchi, T., Dietary protein as a potent regulator of the hyaluronan synthase gene in rat skin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67, 736-742 (2003)
- Sayo, T., Sugiyama, Y., Takahashi, Y., Ozawa, N., Sakai, S., Ishikawa, O., Tamura, M., and Inoue, S. Hyaluronan synthase 3 regulates hyaluronan synthesis in cultured human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 118, 43-48 (2002).
- Tammi, M., Tammi, R. Hyaluronan in the epidermis. In "Science of Hyaluronan Today." <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/hyaluronanE.html> (1998)
- Weigel, P.H., Hascall, V.C., and Tammi, M. Hyaluronan synthases. *J. Biol. Chem.*, 272, 13997-14000 (1997)
- Zhang, W., Watson, C.E., Liu, C., Williams, K.J., and Werth, V.P. Glucocorticoids induce a near-total suppression of hyaluronan synthase mRNA in dermal fibroblasts and in osteoblasts: a molecular mechanism contributing to organ atrophy. *Biochem. J.*, 349, 91-97 (2000).

VI 謝辞

ミネラル濃縮ホエーおよび低ゲル化性ホエータンパク質濃縮物の供与およびタンパク質量等の分析は、明治乳業株式会社研究本部食機能科学研究所 栄養研究部 栄養生理グループ星清子氏、技術開発研究所生産技術研究部原料素材開発グループ大友英生氏、野間晃幸氏に行っていた。ここに御礼を申し上げます。

本研究を行うに当り、本学大学院応用生物学研究科佐々木理恵氏、本学応用生物学部応用生物化学科赤池由美氏、沖浩充氏、坪井知恵氏、仁田千里氏、中村将輝氏、花井一氏、細川暢彦氏、三好秀典氏、環境生物科学科住田隆晃氏に感謝いたします。