

Original article

## Verification of improvement of periorbital wrinkles by using Asakado Skin Care

Yoshikazu Yonei, Masayuki Yagi

Anti-Aging Medical Research Center / Glycative Stress Research Center,  
Faculty of Life and Medical Sciences, Doshisha University, Kyoto, Japan

Glycative Stress Research 2023; 10 (1): 27-42  
(c) Society for Glycative Stress Research

(原著論文：日本語翻訳版)

## Asakado 浅花堂スキンケア使用による目尻のシワ改善効果の 検証腸脳力を活かした質の高い健康長寿実現のアプローチ

米井嘉一、八木雅之

同志社大学大学院生命医科学研究科アンチエイジングリサーチセンター・糖化ストレス研究センター、京都

### 抄録

「化粧品機能評価法ガイドライン」シワグレードの1～3に該当する35歳以上55歳未満の健康な女性34名(43.4 ± 0.6歳)を対象とし、試験化粧品を塗布側に、目尻を中心に1日2回、8週間使用させ、反対側(無塗布側)は無処置とし、ハーフフェイス法による試験を行った。試験品はイナゴマメ(*Ceratonia siliqua* L.)果実エキス、アイ(*Polygonum tinctorium*)葉/茎エキス、リボソーム化成分など多種類の成分を含有するスキンケア化粧品とした。その結果、主要評価項目の塗布側の目尻シワグレード及び症例画像を用いた目尻シワグレードは専門医による目視評価で8週後に有意な改善を示した。しかしながら無塗布側も有意に改善し、両側間に有意差はなかった。目尻シワレプリカ解析では塗布側も無塗布側も試験前後で有意な変化はみられなかった。副次評価項目の皮膚粘弾性(R2)は塗布側も無塗布側も8週後に有意に改善したが、変化量には両側間に有意差はなかった。試験期間中に有害事象は認められず、試験品の安全性が確認された。本試験品に含まれる多種類の機能成分がリボソーム化成分の助けを受けて経皮吸収された後、反対側に作用した可能性について考察を加えた。仮説を検証するためには、今後の試験で試験品塗布後の有効成分の血中濃度を確認する必要がある。

連絡先：教授 米井嘉一  
同志社大学大学院生命医科学研究科アンチエイジングリサーチセンター/  
糖化ストレス研究センター  
〒610-0321 京都府京田辺市多々羅都谷 1-3  
TEL & FAX : 0774-65-6394 e-mail: yonei@mail.doshisha.ac.jp  
共著者：八木雅之 myagi@mail.doshisha.ac.jp

Glycative Stress Research 2023; 10 (1): 27-42  
本論文を引用する際はこちらを引用してください。  
(c) Society for Glycative Stress Research

**KEY WORDS:** 化粧品、目尻シワ、皮膚弾力性、ハーフフェイス法、イナゴマメ (*Ceratonia siliqua*)

## はじめに

シワは30歳ころから顔面に出始める。主要因は真皮に存在する線維芽細胞が生成する蛋白質、弾性線維とコラーゲンの量的ならびに質的变化によると考えられている<sup>1,2)</sup>。勿論、浅いシワは表皮の乾燥による表皮の構造変化も原因となる。常に日光に曝露される顔や頸部には深いシワが生じる。目尻のシワは人の視線が集まりやすく、気にする女性は多いため、美容皮膚科領域では目尻のシワ改善効果を有する化粧品の開発が期待されている。

本試験の目的は、被験化粧品(Asakado 浅花堂スキンケア)による目尻のシワ改善効果を検証することを目的に、目尻のシワがシワグレード<sup>3)</sup>の1~3に該当する35歳以上55歳未満の健康な女性を対象に、試験化粧品使用による目尻のシワの改善効果をハーフフェイス法により被験化粧品塗布側と無塗布側の比較によって検証した。

## 方法

### 対象

対象は、「化粧品機能評価法ガイドライン」に基づき、目尻シワのシワグレード標準写真([http://www.jcss.jp/journal/contents\\_guideline5.pdf](http://www.jcss.jp/journal/contents_guideline5.pdf))<sup>3)</sup>の1~3に該当する35歳以上55歳未満の健康な女性63名を募集した。試験対象者に該当する63名に対して事前検査&使用前(SCR&Visit-1)を行い、選択基準に該当し、除外基準に抵触しておらず、試験責任医師の判断により試験参加が妥当と判断された者の中より、被験者選抜基準に準じ34名を選抜し本試験の被験者とした。

選択基準を以下に示す。

- 1) 試験参加の同意取得時点での年齢が35歳以上55歳未満の女性
- 2) 健康な者で、皮膚疾患を含む、慢性身体疾患がない者
- 3) 目尻のシワがシワグレード標準写真の1~3に該当する者
- 4) 目尻のシワがほぼ左右対称にある者
- 5) 本試験の目的、内容について十分な説明を受け、同意能力があり、よく理解した上で自発的に参加を志願し、書面で本試験参加に同意できる者
- 6) 指定された検査日に来所でき、検査を受けることのできる者
- 7) 試験責任医師が本試験への参加を適当と認めた者

除外基準を以下に示す。

- 1) 現在、何らかの疾患を患い薬物治療を受けている者
- 2) 精神疾患、睡眠障害、高血圧、糖尿病、脂質異常症や重篤な疾患の既往歴・現病歴のある者
- 3) 肝、腎、心、肺、血液等の重篤な障害の既往歴・現病歴のある者
- 4) 消化器官に併存疾患および重篤な既往歴のある者
- 5) 化粧品に対するトラブルの既往歴、現病歴のある者
- 6) アトピー性皮膚炎、口囲皮膚炎、酒さ様皮膚炎等の皮膚症状を有する者
- 7) 評価部位に影響を与えるような美容施術、美容医療の経験のある者
- 8) 過去3ヶ月以内に以下の行為を行った者あるいは受けた者
  - a. ホルモン補充療法
  - b. 強い保湿効果や、シワに関する効果を示し得る化粧品類(アイクリーム、シーラー、パッチ等)の使用
  - c. 肌の改善を目的とする医薬品、医薬部外品、食品およびドリンク類の定期的な使用
- 9) 評価部位に傷や炎症を有する者
- 10) 過去1ヶ月において、疾患治療を目的とした、薬物の使用、塗布習慣のある者(頭痛、月経痛などの頓服歴は除く)
- 11) 日常的な飲酒量が純アルコール換算で平均60g/日を超える者
- 12) 試験期間中、生活習慣を変更する可能性のある者(夜間勤務、長期の旅行など)
- 13) 試験期間中、花粉症など季節性アレルギー症状を発症するおそれがあり、目鼻症状の悪化や抗アレルギー剤などを使用する可能性がある者
- 14) 試験期間中、日焼け行為など、故意に直射日光にあたることを控えることができない者
- 15) 妊娠中、授乳中あるいは妊娠の可能性のある者
- 16) 現在、他ヒト臨床試験に参加している者、他ヒト臨床試験参加後、3ヶ月間が経過していない者
- 17) その他、試験責任医師が本試験の対象として不適当と判断した者

### 試験デザイン

本試験は被験化粧品使用による目尻のシワの改善効果を被験化粧品塗布側と無塗布側を比較する並行群間遮蔽試験(ハーフフェイス法)によって検証した。

被験者は8週間にわたり朝晩のスキンケア後、被験化粧品を容器から1プッシュ(約0.5 mL)手に取り指先で指

定された目尻を中心に半顔全体に塗布し、なじませた。もう半顔は無塗布とした。観察回数は、使用前、使用4週後、使用8週後の3回とし、専門医による目尻シワグレード目視評価、症例画像を用いた専門医による目尻シワグレード目視評価、目尻シワ部位写真（Visia, Canfield Scientific, Parsippany, USA）、目尻シワレプリカ解析、皮膚粘弾性測定、医師による問診、副作用の発現有無/有害事象判定を施行した。目尻シワ部位写真（Visia）、目尻シワレプリカ解析、皮膚粘弾性測定については温度  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度  $50 \pm 5\%$ にて設定した環境試験室で実施した。被験者は生活日誌に試験期間中の被験化粧品使用状況、肌状態/体調の変化（有害事象調査）、生活状況の変化の有無、医薬品服用状況、サプリメント類の使用状況、月経有無について記録した。

本試験は34名で試験を開始し、全34名が完遂、解析対象とした。被験者34名（女性）の年齢は、 $43.4 \pm 0.6$ 歳であり、割付時の専門医による目尻シワグレード目視評価は、 $2.265 \pm 0.122$ であった。

## 試験品

試験品は約40年にわたって、自然界に存在する天然成分の有効性に着目し、最新の皮膚科学に基づいて、高性能・高品質の化粧品開発を行ってきた株式会社ナボカルコスメティックス（東京）（Nabocul Cosmetics, Tokyo, Japan）がこれまでの実績に基づき、天然素材を原料とした有効性の高い物質を活用し、さらに新しい美をもたらすという理念を掲げて社内研究チームと外部研究開発機構の協力のもと立ち上げた浅花堂プロジェクトの新商品として製造した製品である。

配合成分は次に示す：イナゴマメ果実エキス、アイ葉/茎エキス、カミツレ花エキス、グルコシルヘスペリジン、グルコシルルチン、ヒメフウロエキス、ヒドロキシプロリン、コエンザイムA、コンドロイチン硫酸Na、サッカロミセス溶解質エキス、ヒアルロン酸Na、 $\beta$ -グルカン、ポリアスパラギン酸Na、ミリスチン酸オクチルドデシル、ユビキノン（酸化型コエンザイムQ10）、ヒドロキシエチルセルロース、アデノシン三リン酸2Na、アルギニン、アロエベラ葉エキス、グリコシルトレハロース、グリセリルグルコシド、グリチルリチン酸2K、ヒドロキシフェニプロバミド安息香酸、パルミチン酸アスコルビル、ナイアシンアミド、パルミチン酸レチノール、コーン油、加水分解水添デンプン、甘草エキス、水添レシチン、キサンタンガム、カルボマー、BG、EDTA-2Na、グリセリン、PEG-60水添ヒマシ油、ヒドロキシアセトフェノン、ペンチレングリコール、水。代表的な成分は地中海沿岸に由来するイナゴマメ（*Ceratonia siliqua*）莢から分離・発見された新しい化合物成分で、分子式は  $\text{C}_{23} \text{H}_{24} \text{O}_{13}$  で、構造式は下図の通りである（Fig. 1）<sup>4</sup>。

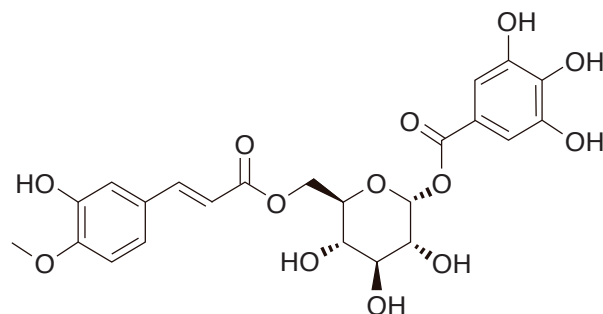


Fig. 1. Novel compound that is extracted from *Ceratonia siliqua*.

## 有効性評価項目

### 専門医による目尻シワグレード目視評価

試験開始時は日本化粧品学会（<http://www.jcss.jp/>）が「新規効能取得のための抗シワ製品評価ガイドライン」において定めたシワグレード<sup>3)</sup>に基づき、試験開始時のスコア付けを行った。

各観察時は各測定ポイントで、試験開始時または前回の測定ポイントの写真を参照しながらシワグレード評価に基づきスコア付けを行い、各グレードの標準写真に当てはまらない場合は、その中間値あるいは1/4値のスコアを用いた（2.5や2.25など）。

### 症例画像を用いた専門医による目尻シワグレード目視評価

試験開始時はシワグレード標準写真<sup>3)</sup>に基づき、目尻の症例画像の試験開始時のスコア付けを行った。

各観察時は各測定ポイントで、試験開始時または前回の測定ポイントの写真を参照しながらシワグレード評価に基づきスコア付けを行い、各グレードの標準写真に当てはまらない場合は、その中間値あるいは1/4値のスコアを用いた（2.5や2.25など）。

### 目尻シワレプリカ解析

被験者の左右目の際5mm部位よりちりめんシワ部位まで採取したサンプルを反射用3Dレプリカ解析システムASA-03RXD（アサヒバイオメッド、東京）を用いて解析した。サンプル解析範囲は、1) 目尻から約5～7mm部位より1.0cm×1.0cmの範囲、2) 目尻から約10～12mm部位より1.0cm×1.0cmの範囲とし、0度、180度の双方より解析実施し、平均を採用値とした。評価項目は以下の通りとした。

#### 1) 目尻より約5～7mm

シワ面積率/シワ体積率/総シワ平均深さ/最大シワ平均深さ/最大シワ最大深さ/シワ個数

#### 2) 目尻より約10～12mm

シワ面積率/シワ体積率/総シワ平均深さ/総シワ最大深さ/シワ個数

## 副次評価項目

### 皮膚粘弾性測定

キュートメーター Cutometer MPA580<sup>®</sup> (Courage-Khazaka, Köln, Germany) を用いて、左右顔、耳朶下と唇端とを結んだ中心部を5回測定し、R2値を基準にした、最上値・最下値データを削除した3回測定値の平均を使用した。

### その他評価項目

#### 目尻シワ部位写真 (VISIA)

VISIA-Evo (Canfield Scientific) を用いて左右顔面を撮影し、目尻シワ部位をトリミングにて抽出した。

### 安全性評価項目

#### 医師による問診 / 副作用の発現有無 / 有害事象判定

事前検査&使用前時には背景調査票、以降の観察時には被験者の自覚症状、および有害事象の発現について確認し、カルテに記録するとともに問診、適切な処置を行った。

## 統計解析

解析対象項目は、専門医による目尻シワグレード目視評価、症例画像を用いた専門医による目尻シワグレード目視評価、目尻シワレプリカ解析、皮膚粘弾性測定とし、検査結果数値は Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft Corp.) を用いて累計表に集計し、基本統計量として平均値、標準偏差、標準誤差、最大値、最小値を算出した。解析に用いる数値は実測値および使用前よりの変化量とした。カテゴリーデータとして得られる各検査項目は検査時点ごとの集計を行った。統計解析は SAS (SAS 9.4) または SPSS (Statistics 26) など適切な統計解析ソフトを用いて実施し、すべての検定について有意水準は両側検定で5%とした。

群間比較について、解析データは、各検査時の被験化粧品塗布側と無塗布側の比較を対応のある t 検定 (両側検定) で統計解析を行った。専門医による目尻シワグレード目視評価より得られるスコアは、ノンパラメトリックとして取り扱い、群間での比較には Wilcoxon の符号付順位検定を行った。

経時比較について、解析データは、使用前と使用後の各観察期との比較を対応のある t 検定で統計解析を行った。専門医による目尻シワグレード目視評価より得られるスコアは、ノンパラメトリックとして取り扱い、経時比較には Wilcoxon の符号付順位検定を行った。

## 倫理審査

本試験はヘルシンキ宣言 (2013年10月フォルタレザ改訂) に基づく倫理的原則、および「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (2017年一部改正)」に則り、「一般社団法人糖化ストレス研究会」(東京都中野区) にてヒト試験倫理委員会の承認のもとに施行した (GSE #2022-

001)。本試験については臨床試験事前登録を行った (UMIN #000046645)。

## 結果

### 有効性評価項目

#### 専門医による目尻シワグレード目視評価 (Table 1)

塗布側において、使用前 ( $2.27 \pm 0.12$ ) → 使用4週後 ( $2.20 \pm 0.120$ ) → 使用8週後 ( $2.10 \pm 0.12$ ) と減少し、使用前と比較して使用4週後 ( $p = 0.005$ ) および、使用8週後 ( $p < 0.001$ ) で有意に改善した (Fig. 2)。

無塗布側においても、使用前 ( $2.27 \pm 0.12$ ) → 使用4週後 ( $2.21 \pm 0.12$ ) → 使用8週後 ( $2.10 \pm 0.12$ ) と減少し、使用前と比較して使用4週後 ( $p = 0.029$ ) および、使用8週後 ( $p < 0.001$ ) で有意に改善した。

両側間に有意差はなかった。

#### 症例画像を用いた専門医による

#### 目尻シワグレード目視評価 (Table 1)

塗布側において、使用前 ( $2.27 \pm 0.12$ ) → 使用4週後 ( $2.18 \pm 0.12$ ) → 使用8週後 ( $2.08 \pm 0.120$ ) と減少し、使用前と比較して使用4週後 ( $p < 0.001$ ) および、使用8週後 ( $p < 0.001$ ) で有意に改善した (Fig. 3)。

無塗布側においても、使用前 ( $2.27 \pm 0.12$ ) → 使用4週後 ( $2.19 \pm 0.12$ ) → 使用8週後 ( $2.06 \pm 0.12$ ) と減少し、Wilcoxon の符号付順位検定による経時比較において、使用前と比較して使用4週後 ( $p = 0.003$ ) および、使用8週後 ( $p < 0.001$ ) で有意に改善した。

両側間に有意差はなかった。

#### 目尻シワレプリカ解析 (Table 2)

目尻より5mmのシワ面積率 / シワ体積率 / 総シワ平均深さ / 最大シワ平均深さ / 最大シワ最大深さ / シワ個数、目尻より10~12mmのシワ面積率 / シワ体積率 / 総シワ平均深さ / 総シワ最大深さ / シワ個数について、塗布側において有意に改善した項目はなかった。両側間に有意差はなかった。

### 副次評価項目

#### 皮膚粘弾性測定 (Table 3)

R2について、塗布側において使用前 ( $0.788 \pm 0.012$ ) → 使用4週後 ( $0.780 \pm 0.011$ ) → 使用8週後 ( $0.809 \pm 0.009$ ) と推移し、対応のある t 検定による経時比較において、使用前と比較して使用8週後 ( $p = 0.004$ ) で有意に改善した (Fig. 4)。

無塗布側についても使用前 ( $0.792 \pm 0.010$ ) → 使用4週後 ( $0.803 \pm 0.009$ ) → 使用8週後 ( $0.815 \pm 0.007$ ) と推移し、対応のある t 検定による経時比較において、使用前と比較して使用8週後 ( $p < 0.001$ ) で有意に改善した。

**Table 1. Periorbital wrinkle grades assessed by specialized doctors.**

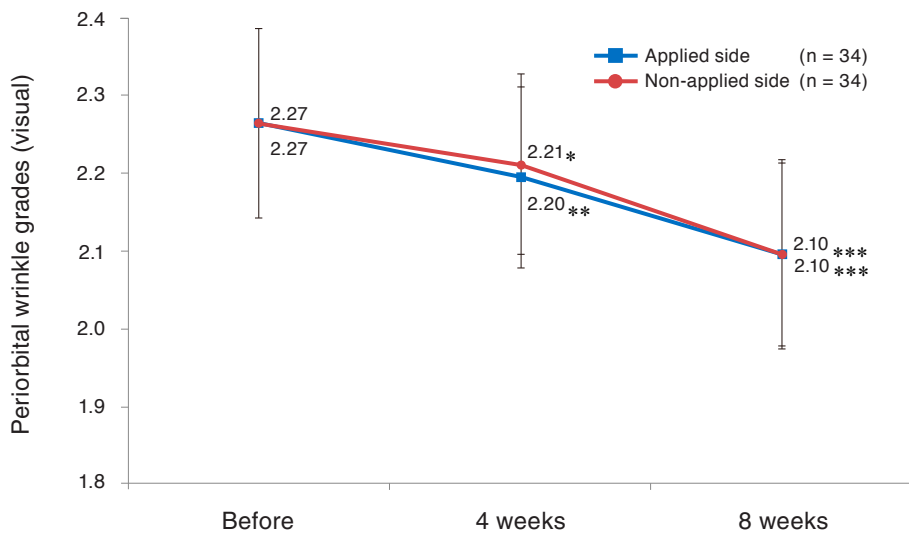
Periorbital wrinkle grades		Time Comparison					Comparison between groups	
		Before	4 W	P value	8 W	P value	p value (4W)	p value (8W)
Visual	Applied	2.27 ± 0.12	2.20 ± 0.12	<b>0.005</b>	2.10 ± 0.12	<b>&lt;0.001</b>	0.527	1.000
	Non-applied	2.27 ± 0.12	2.21 ± 0.12	<b>0.029</b>	2.10 ± 0.12	<b>&lt;0.001</b>		
Photographic images	Applied	2.27 ± 0.12	2.18 ± 0.12	<b>0.001</b>	2.08 ± 0.12	<b>&lt;0.001</b>	0.782	0.597
	Non-applied	2.27 ± 0.12	2.19 ± 0.12	<b>0.003</b>	2.06 ± 0.12	<b>&lt;0.001</b>		

Periorbital wrinkle grades are assessed by visual inspection and photographic images. Results are expressed as mean values ± SEM, n = 34. Wilcoxon signed-rank sum test is used for analysis of the time comparison with before usage and the comparison between applied side and non-applied side. SEM, standard error mean.

**Table 2. Replica analysis of periorbital wrinkles.**

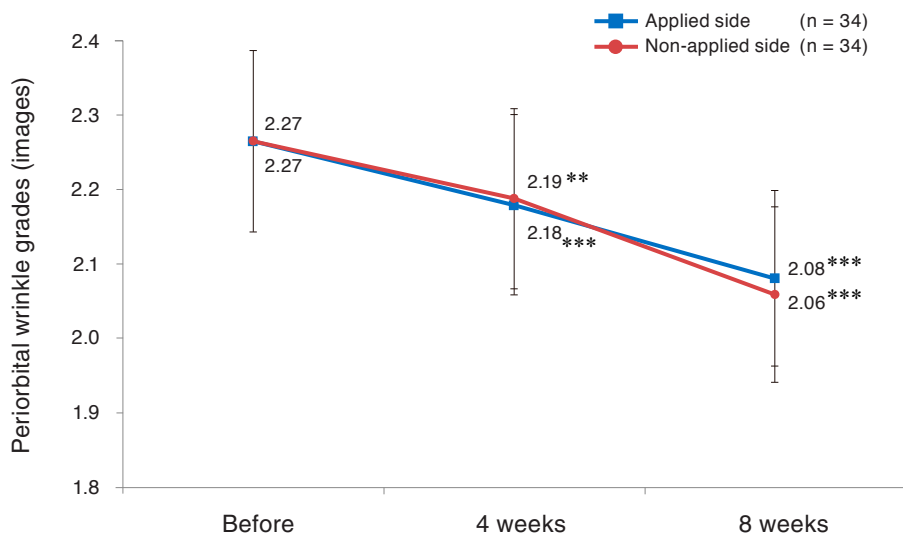
Replica analysis			Time Comparison					Comparison between groups	
			Before	4 W	P value	8 W	P value	p value (4W)	p value (8W)
Area ratio of wrinkles (5 mm)	$\mu\text{m}^2/\text{mm}^2/100$	Applied	2.73 ± 0.18	3.00 ± 0.19	<b>0.015</b>	3.10 ± 0.19	<b>0.013</b>	0.730	0.750
		Non-applied	2.66 ± 0.16	2.88 ± 0.18	<b>0.088</b>	2.98 ± 0.18	<b>0.008</b>		
Volume fraction of wrinkles (5 mm)	$\mu\text{m}^3/\text{mm}^2/100$	Applied	39.39 ± 2.70	43.51 ± 3.05	<b>0.019</b>	46.12 ± 3.43	<b>0.017</b>	0.746	0.564
		Non-applied	38.22 ± 2.37	41.56 ± 2.74	<b>0.097</b>	43.35 ± 2.70	<b>0.010</b>		
Average depth of total wrinkles (5 mm)	$\mu\text{m}$	Applied	149.90 ± 1.74	150.57 ± 1.63	0.661	152.79 ± 1.72	<b>0.051</b>	0.474	0.379
		Non-applied	150.17 ± 1.62	151.68 ± 1.56	0.255	151.77 ± 1.23	0.197		
Average depth of maximum wrinkles (5 mm)	$\mu\text{m}$	Applied	152.22 ± 2.10	153.44 ± 1.96	0.461	156.45 ± 2.50	<b>0.030</b>	0.706	0.629
		Non-applied	152.84 ± 1.70	154.47 ± 1.50	0.302	156.14 ± 1.47	<b>0.035</b>		
Maximum depth of maximum wrinkle (5 mm)	$\mu\text{m}$	Applied	401.12 ± 9.80	410.30 ± 14.13	0.315	432.84 ± 14.97	<b>0.006</b>	0.365	0.642
		Non-applied	402.40 ± 13.26	399.63 ± 10.06	0.718	426.13 ± 15.23	0.107		
Number of wrinkles (5 mm)	N/mm	Applied	0.55 ± 0.02	0.58 ± 0.02	<b>0.027</b>	0.58 ± 0.02	<b>0.021</b>	0.307	0.880
		Non-applied	0.54 ± 0.02	0.56 ± 0.02	0.374	0.57 ± 0.02	<b>0.016</b>		
Area ratio of wrinkles (10 mm)	$\mu\text{m}^2/\text{mm}^2/100$	Applied	2.79 ± 0.25	3.23 ± 0.29	<b>0.001</b>	3.10 ± 0.24	<b>0.017</b>	0.084	0.787
		Non-applied	2.70 ± 0.22	2.89 ± 0.25	0.226	2.98 ± 0.23	<b>0.027</b>		
Volume fraction of wrinkles (10 mm)	$\mu\text{m}^3/\text{mm}^2/100$	Applied	41.04 ± 3.98	47.97 ± 4.85	<b>0.002</b>	45.83 ± 4.05	<b>0.019</b>	0.090	0.745
		Non-applied	39.45 ± 3.41	42.51 ± 3.87	0.202	43.68 ± 3.67	<b>0.032</b>		
Average depth of total wrinkles (10 mm)	$\mu\text{m}$	Applied	155.19 ± 2.85	155.92 ± 2.82	0.682	156.09 ± 2.58	0.584	0.309	0.980
		Non-applied	155.12 ± 2.44	157.48 ± 2.73	0.056	155.97 ± 2.34	0.442		
Maximum depth of total wrinkle (10 mm)	$\mu\text{m}$	Applied	402.70 ± 11.18	409.28 ± 12.87	0.277	413.55 ± 14.60	0.185	0.343	<b>0.007</b>
		Non-applied	400.44 ± 8.46	399.15 ± 7.91	0.817	382.77 ± 7.16	<b>0.025</b>		
Number of wrinkles (10 mm)	N/mm	Applied	0.49 ± 0.03	0.53 ± 0.03	<b>0.011</b>	0.52 ± 0.02	<b>0.025</b>	<b>0.036</b>	0.992
		Non-applied	0.49 ± 0.03	0.49 ± 0.03	0.981	0.51 ± 0.03	<b>0.049</b>		

Periorbital wrinkle is analyzed at 5 mm and 10-12 mm from the corner of the eye. Results are expressed as mean values ± SEM, n = 34. Paired t test is used for analysis of the time comparison with before usage and the comparison between applied side and non-applied side. SEM, standard error mean.



**Fig. 2. Visual inspection assessment of periorbital wrinkle grades by a specialized doctor.**

The mean value ± SEM, n = 34. Applied side, test-product topically applied for 8 weeks. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 vs before usage, Wilcoxon signed-rank sum test. SEM, standard error mean.



**Fig. 3. Visual assessment of periorbital wrinkle grades by specialized doctors using case photographic images.**

The mean value ± SEM, n = 34. Applied side, test-product topically applied for 8 weeks. \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 vs before usage, Wilcoxon signed-rank sum test. SEM, standard error mean.

Table 3. Skin Viscoelasticity Measurement.

Skin elasticity		Time Comparison					Comparison between groups	
		Before	4 W	P value	8 W	P value	p value (4W)	p value (8W)
R0	Applied	0.32 ± 0.01	0.34 ± 0.01	<b>0.001</b>	0.33 ± 0.01	<b>0.024</b>	0.479	0.552
	Non-applied	0.31 ± 0.01	0.33 ± 0.01	<b>0.004</b>	0.32 ± 0.01	0.165		
R2	Applied	0.79 ± 0.01	0.78 ± 0.01	0.320	0.81 ± 0.01	<b>0.004</b>	0.089	0.589
	Non-applied	0.79 ± 0.01	0.80 ± 0.01	0.179	0.82 ± 0.01	<b>0.001</b>		
R5	Applied	0.58 ± 0.02	0.51 ± 0.02	<b>0.000</b>	0.56 ± 0.02	0.163	<b>0.031</b>	0.805
	Non-applied	0.58 ± 0.02	0.55 ± 0.01	<b>0.001</b>	0.56 ± 0.01	0.055		
R6	Applied	0.37 ± 0.01	0.34 ± 0.01	<b>0.023</b>	0.35 ± 0.01	0.342	0.747	0.803
	Non-applied	0.37 ± 0.01	0.34 ± 0.01	<b>0.008</b>	0.35 ± 0.01	<b>0.021</b>		
R7	Applied	0.42 ± 0.01	0.39 ± 0.01	<b>0.000</b>	0.42 ± 0.01	0.351	0.052	0.948
	Non-applied	0.42 ± 0.01	0.41 ± 0.01	<b>0.022</b>	0.42 ± 0.01	0.264		

Skin elasticity is Measured by Cutometer. Results are expressed as mean values ± SEM, n = 34. Paired t test is used for analysis of the time comparison with before usage and the comparison between applied side and non-applied side. R0, Uf; R2, biological elasticity (Ua1/Uf1); R5, net elasticity (Ur/Ue); R6, viscoelasticity (Uv/Ue); R7: elastic recovery (Ur1/Uf1); SEM, standard error mean.

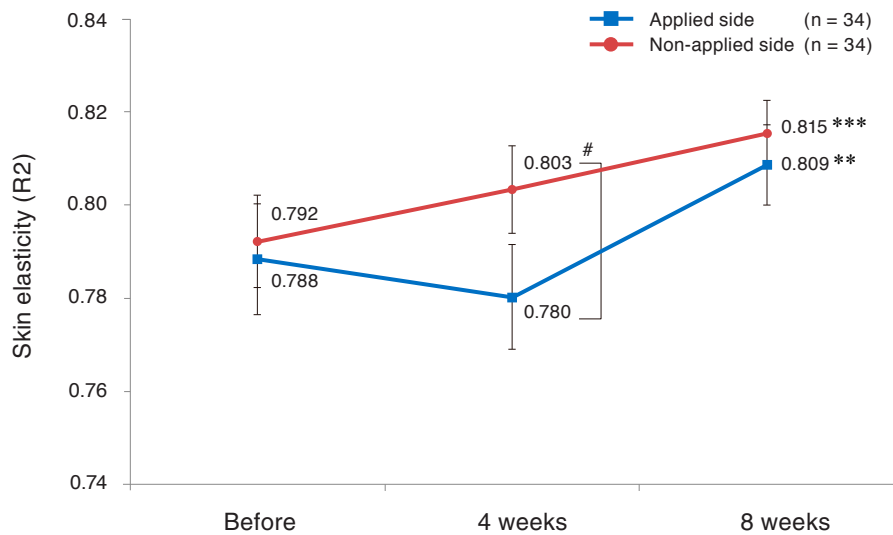


Fig. 4. Skin elasticity changes.

The mean value ± SEM, n = 34. Applied side, test-product topically applied for 8 weeks. \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 vs before usage, # p < 0.05 vs non-applied side, paired-t test. SEM, standard error mean.

また対応のある t 検定による群間比較において、塗布側が無塗布側に対して、使用 4 週後 ( $p = 0.027$ ) で有意に低かった。8 週後には両側間に有意差はなかった。

## 安全性

試験品が起因と考えられる副作用はすべての被験者において確認されなかった。

## 考察

### 結果の概略

本試験は、目尻のシワがシワグレード標準写真<sup>3)</sup>の 1 ~ 3 に該当する 35 歳以上 55 歳未満の健康な女性 34 例を対象に、被験化粧品使用による目尻のシワの改善効果を被験化粧品塗布側と無塗布側を比較する並行群間遮蔽試験 (ハーフフェイス法) によって検証した。

今回の試験の有効性評価項目である専門医による目尻シワグレード目視評価と症例画像による目尻シワグレード目視評価では、塗布側で有意な改善が見られたものの、無塗布側においても有意な改善を認め、シワについては群間有意差がなかった。一方、目尻シワレプリカ解析では差がなかった。浅い目尻シワについては前後比較の繊細な変化が、専門医による目視では検知されたが、レプリカ解析では困難であった可能性が考えられた。

副次評価項目の皮膚粘弾性測定については、8 週後に塗布側に有意な改善が認められたが、無塗布側でも改善しており、両側間の解析でも有意差は認められなかった。

一方、試験品には多種類の機能性成分や皮膚への浸透性を高める乳化剤やリボソーム化成分が含まれている。ハーフフェイス法では、機能性成分が皮膚塗布により経皮吸収された結果、結構を介して顔面反対側に影響を及ぼした可能性が残ってしまう。

考察の流れとしては、含有成分の効能について文献的情報を収集し、シワへの作用、経皮吸収の可能性について推考した。また、どのような追加試験を行えば、経皮吸収して反対側に効果を及ぼしたことが検証できるかについて考察を加えた。

### 試験品の成分について

はじめに、試験品の機能性に関する代表的な成分について解説する。

#### ・イナゴマメ (*Ceratonia siliqua* L.) 果実エキス

イナゴマメ (*Ceratonia siliqua* L.) は、主に地中海地方を原産とするマメ科植物である。イナゴマメの莢果、すなわち、イナゴマメの莢及び果肉はキャロブ (carob) と呼ばれ、古くから食用又は食品原料として利用されてきた。成熟した莢果は長さ 10 ~ 25 cm 程度で、甘味を呈する。イナゴマメの莢果には、多糖類、セルロース及びミネラル類が多く含まれ、抗酸化ポリフェノール<sup>5)</sup> やタンパク質や非炭水

化物系の低分子化合物等が少量含まれている。近年、イナゴマメの新たな機能に関する研究が進められており、樹皮抽出物は L-チロシンを基質とするチロシナーゼに対して阻害作用を示し、臨床試験では 28 日間の塗布で紫外線による色素沈着の肌色の均一性が 3% 改善された<sup>6)</sup>。イナゴマメ莢果 (pod) 抽出物が潰瘍性大腸炎や胃潰瘍などの消化器疾患の予防及び治療効果を有することが報告されている<sup>7,8)</sup>。イナゴマメ抽出物には、新規ポリフェノール化合物としてイソフェルラ酸と没食子酸とがそれぞれグルコースにエステル結合した化合物 ( $C_{23}H_{24}O_{13}$ ) が含まれ (Fig. 1)、イナゴマメの種子抽出物に  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性があり、体重増加の抑制効果を有する<sup>4)</sup>。効果評価により、「OLANDU」はコラーゲン COL 1 A 1 遺伝子の発現を促進し、コラーゲン生成を促進し、シワを薄くする可能性が報告している<sup>9)</sup>。

試験品に含まれるレチノイド化合物 (パルミチン酸レチノール) は、光老化皮膚の治療に有効な外用剤として数十年にわたり使用されており、ナイアシンアミドはシワ改善作用を有する医薬部外品である。角化細胞のレチノイド応答性遺伝子を検証した試験では、ビタミン A エステルであるプロピオン酸レチニルの活性が、ナイアシンアミド (Nam) およびイナゴマメ果実エキスにより増強ことが示されている<sup>10)</sup>。本試験品においても、このような相乗効果が期待できる。

#### ・アイ葉 / 莖エキス *Polygonum tinctorium*

アイ (*Polygonum tinctorium*) とは「藍」と書くタデ科の植物で、タデアイ (蓼藍) とも呼ばれている。藍は主に染料として使用されていたが、古くから解毒や解熱にも効果が知られていた。現在は研究が進み、抗腫瘍作用、抗酸化、抗炎症、抗ウイルス、抗アレルギー<sup>11)</sup>、抗腫瘍作用<sup>12)</sup> など多くの効能・効果が発見されている。藍から抽出した主要化合物の一つであるトリブタントリンが、ヒト皮膚線維芽細胞において様々な HGF 誘導物質によって刺激される HGF 産生を強く阻害することを見出した。肝細胞増殖因子 (HGF) は、正常な細胞機能の調節に加え、悪性細胞の形質転換やがん細胞の増殖・浸潤・転移に関与することが明らかにされており、HGF 産生阻害は、悪性細胞の形質転換や腫瘍の進行に対し抑制的に作用すると推測される<sup>12)</sup>。2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) 誘発アトピー性皮膚炎マウスを用いた実験では、藍抽出物が血清中の IgE およびインターロイキン-4 濃度を抑制、病変皮膚のマスト細胞由来のカスパーゼ-1 の発現を抑制し、臨床症状を改善した<sup>11)</sup>。化粧品領域では、藍抽出物が保湿作用、炎症を抑える作用、美白作用、抗酸化作用、肌の弾力性を高めてシワを改善する作用が報告されている<sup>13)</sup>。

我々の研究室では紅蓼 (*Persicaria hydropiper*) 抽出物に、*in vitro* 試験で強力な AGEs 生成抑制作用、アルデヒド (3-DG, GO, MGO) 生成抑制作用があることを報告している<sup>14)</sup>。類縁種のアイ (*Persicaria tinctorium*) 抽出物が同様の抗糖化作用を有するか否かについては、今後の検証が待たれる。



### ・カミツレ花エキス *Anthemis nobilis*

カミツレ(別名:ジャーマンカモミール、学名:*Anthemis nobilis*)は、ヨーロッパを原産とし、紀元前1世紀頃にはすでにハーブ療法として用いられ、中世には消化器系の不調や膨満感の緩和や睡眠を促す効果が記録されている。現在においても、乳児から大人まで幅広い年齢層で不安感、筋肉の痙攣、皮膚のトラブル、消化器系の不調を緩和・改善するハーブとして評価されており、ヨーロッパの代表的なメディカルハーブとして位置づけられる<sup>15,16</sup>。花はリンゴ様のフルーティーでふくよかな芳香をもち、その香りが鎮静・リラックス効果をもたらすことから現在では世界各国でハーブティーとして愛飲されている<sup>17</sup>。主な成分は、テルペノイド類のセスキテルペン、 $\alpha$ -ピサポロール、カマズレン、フラボノイド類のアピゲニン、ケルセチン、パツレチン、ルテオリンとそれらのグルコシドである<sup>18,19</sup>。

カミツレ花 *Anthemis nobilis* (Chamomile: flower, AN)、セイヨウサンザシ果実 *Crataegus oxyacantha* (Hawthorn: berry, CO)、ドクダミ草 *Houttuynia coradata* (Doku-dami: whole plants, HC)、ブドウ葉 *Vitis vinifera* (Grape: leaf, VV) を含むミックスハーブは臨床試験において、オープン試験にてHerbMix製品600 mg/日、12週間摂取にて血中CMLおよび3DGの減少、皮膚粘弾性の改善(皮膚弾力(R2, R7)の上昇)<sup>20</sup>、二重盲検試験にて製品3,000 mg/日、8週間摂取にて血中CMLおよび3DG ( $p < 0.1$ )の減少傾向、自覚症状の善スコア改善<sup>21</sup>、二重盲検試験にて製品100 mg/日、12週間摂取にて血中3DGの減少、上腕皮膚のメラニン量指数および色差  $b^*$  (黄色の指標)の低下を認め<sup>22</sup>、安定した抗糖化作用を発揮している。本成分は皮膚粘弾性の改善に寄与した可能性がある。

### ・ヒドロキシプロリン

体内で最も多く存在する蛋白質であるコラーゲンは、骨、皮膚、軟骨、血管などの結合組織の正常な構造と強度を維持するための必須蛋白である。コラーゲンの全アミノ酸(AA)の57%をグリシン、プロリン、ヒドロキシプロリン(Hyp)が占めている<sup>23</sup>。ヒドロキシプロリンは、皮膚のI型コラーゲン中にも豊富に含まれるアミノ酸で、プロリルヒドロキシラーゼによるプロリンの翻訳後修飾を介して不可逆的に合成される。ヒドロキシプロリンは、I型コラーゲン内のGly-X-Yの繰り返し配列の「Y」の位置に存在する。ヒドロキシプロリンは、コラーゲン合成およびコラーゲンや関連組織の三重らせん構造の熱力学的安定性に重要な役割を担っている<sup>24,25</sup>。プロリンのヒドロキシ化にはアスコルビン酸(ビタミンC)が必要であるため、ビタミンC欠乏によりコラーゲン中のヒドロキシプロリンの割合が少なくなり、安定性が低下し、壊血病を惹起する。

ヒドロキシプロリン摂取によって、肌のコラーゲン合成の増加、表皮の角化細胞の増殖促進を示唆する報告がある。ヒドロキシプロリンの誘導体であるアセチルヒドロキシプロリンには、創傷治癒促進効果、角層水分量増加<sup>26</sup>による保湿作用が知られている。

試験品には、5ドロキシプロリンの他に、レシチン、ルチン誘導体(グルコシルルチン)、パルミチン酸アスコルビルが加わっている。Merck社の複合原料RonaCare VTA (Merck KGaA, Germany)<sup>27,28</sup>は、ヒドロキシプロリン、ルチン誘導体、リン酸アスコルビルMgを含むリポソームが皮膚に浸透することにより、ヒアルロン酸を分解酵素から保護すると同時に細胞外マトリックスであるグルコサミノグルカンの合成促進を発揮するよう設計されており、本試験品でも同様に作用が期待できる。

### ・ナイアシンアミド

ナイアシンアミド(別名:ニコチン酸アミド、ビタミンB3)とはビタミンB3の一種で、魚、肉、豆、穀物などの食物に含まれ、医薬部外品として認証を受けている。

*In vitro*ではセラミド合成促進作用が知られている。ヒト正常培養ケラチノサイト(角化細胞)に各濃度のナイアシンアミドを添加し、セラミド合成量を14C-セリンのセラミドへの取り込みで測定したところ、濃度1  $\mu\text{M}$ 以上のナイアシンアミドの添加は、有意( $p < 0.01$ )にセラミドの合成を高めた<sup>29</sup>。

培養ケラチノサイトに10  $\mu\text{M}$ ナイアシンアミドを添加し、細胞間脂質構成成分であるセラミド、脂肪酸およびコレステロールの合成を14C-酢酸の各脂質への取り込みで測定した結果、10  $\mu\text{M}$ ナイアシンアミドの添加は、セラミドだけでなく脂肪酸およびコレステロールの合成も有意( $p < 0.01$ )に促進した<sup>29</sup>。

近畿大学医学部皮膚科 河田 暁教授らは、ナイアシンアミドのヒト皮膚シワにおける有用性を検証した<sup>30</sup>。目の周りに細かいシワを有する28名の日本人被験者(31-49歳、平均39.4歳)の半顔に4%ナイアシンアミド配合O/W型保湿剤を、残りの半顔にナイアシンアミド未配合O/W型保湿剤を、二重盲検法に基づいて8週間にわたって塗布した。4週目および8週目に日本化粧品工業連合会のガイドラインに基づいて、2名の研究者による観察と写真の組み合わせ、「著効」「有効」「やや有効」「不変」「悪化」の5段階で評価した結果、4%ナイアシンアミド配合保湿剤の塗布は、8週目において28名のうち18名に中程度以上のシワ改善効果を示した。この結果は、ナイアシンアミドがシワ改善効果を有することを示すが、基剤によるナイアシンアミドの浸透性向上が寄与した可能性を指摘している<sup>30</sup>。

ナイアシンアミドの抗シワ作用のメカニズムは、現時点では明確にされていないが、*in vitro*試験においてコラーゲン合成量が減少した培養ヒト線維芽細胞へのナイアシンアミドの添加によりコラーゲン合成量の有意な増加が報告されていることから<sup>31</sup>、コラーゲンの合成促進にある程度の特異性があり、この作用が寄与している可能性が考えられる。また、その他、ナイアシンアミドが有する細胞賦活性など複合的な作用メカニズムである可能性も考えられる。今後の検証が待たれる。

## ・シワ形成の機序

本試験における主要目標はシワ形成の予防である。はじめにシワ形成の機序について概説する。

シワは30歳ころから顔面に出始める。主要因は真皮に存在する線維芽細胞が生成する蛋白質、弾性線維とコラーゲンの量的ならびに質的变化によると考えられる<sup>32-34</sup>。もちろん、浅いシワは表皮の乾燥による表皮の構造変化も原因となる。

常に日光に曝露される顔や頸部には深いシワが生じる。農業従事者などではほとんど毎日多量の太陽光線を浴びるため、50歳頃には特に頸部に菱形皮膚と呼ばれる三角形の深いシワが発症する。深いシワに囲まれた皮膚は、やや黄色みを帯び、触れるとごわごわしている。菱形皮膚の真皮には病理組織学的に抗CML抗体陽性物質が真皮上層から中層にかけて塊状沈着している<sup>35</sup>。すなわち皮膚にAGEsの一種であるCMLが沈着する。この変化は、顔面皮膚でも20歳ころではまだ見られず、紫外線を浴びない皮膚では高齢になっても見られない。紫外線を慢性に浴びた皮膚の加齢性変化であるが、シワとの関連は不明である。

表皮を下から支える真皮を構成する成分としては、細胞成分と線維性組織を形成する間質成分（細胞外マトリックス成分）に二分され、主成分である間質成分は、大部分がコラーゲンからなる膠原線維とエラスチンからなる弾性線維、およびこれらの間を埋める基質で占められており、細胞成分としてはこれらを産生する線維芽細胞がその間に散在している<sup>1,36,37</sup>。

コラーゲンは、3本のペプチド鎖が3重らせん構造を成しており、各ペプチド鎖はアミノ酸組成として、(グリシン-アミノ酸X-アミノ酸Y)<sub>n</sub>と表される3個ごとにグリシンを含む繰り返し構造をもち、アミノ酸Xとアミノ酸Yにはプロリンおよびヒドロキシプロリンが約21%を、アラニンが約11%を占めることが知られている<sup>38-41</sup>。

間質成分の大部分を占めるコラーゲンはI型コラーゲン(80-85%)とIII型コラーゲン(10-15%)が一定の割合で会合(同種の分子またはイオンが比較的弱い力で数個結合し、一つの分子またはイオンのようにふるまうこと)することによって構成された膠質状線維である<sup>42</sup>。I型コラーゲンは皮膚や骨に最も豊富に存在し、強靱性や弾力をもたせ、組織の構造を支える働きがある。III型コラーゲンは、細い線維からなり、しなやかさや柔軟性をもたらす作用があり、それぞれ皮膚のハリを支える<sup>1,36,43</sup>。また、細胞成分として線維芽細胞(fibroblast)は、真皮に分散しており、コラーゲン線維や弾性線維、ムコ多糖を産生する細胞である。必要に応じて線維芽細胞が活発に働きこれらの物質が順調につくられている。

シワの形成に関与するコラーゲン線維と弾性線維、および表皮・真皮の移行部の基底膜の蛋白質に紫外線が与える

影響が明らかになってきている。紫外線Bは表皮角化細胞を刺激し、炎症性サイトカインIL-1 $\alpha$ 、IL-6やTNF $\alpha$ を生成・放出する。これらのサイトカインが真皮線維芽細胞およびオートクライン様式で角化細胞を刺激し、コラーゲンや弾性線維を切断する酵素MMP-1、MMP-3、MMP-9などのmRNAと蛋白質レベルを高め、さらに活性を亢進させ、これらの線維成分の切断が進みしわになると考えられる<sup>44</sup>。動物実験レベルでは弾性線維を切断するエラスターゼ活性を抑えることにより、紫外線誘発シワ形成を著しく抑制できることから、シワ形成は主に弾性線維の量的、質的变化によるとの考え方が提示されている<sup>34</sup>。一方、コラーゲン線維を切断するMMP-1の発現が明らかであり、コラーゲンの減少がシワの原因との考え方も強い。

一方、紫外線Aは直接真皮線維芽細胞に働き、MMP-1など線維蛋白質を切断する酵素のmRNA、蛋白レベルを高めるためにシワ形成に至ると考えられている<sup>45</sup>。紫外線BとAによるMMP-1のmRNA亢進の引き金には、いずれも活性酸素が関与している。さらに、最近、赤外線が紫外線同様に活性酸素を介してMMP-1の活性亢進に関与していることが明らかになっている<sup>46</sup>。その細胞内活性化系路にはMAPKが関与している<sup>47</sup>。

紫外線を浴びる頻度に比例して、間質成分への影響が大きくなり、シワの形成促進、色素沈着の増加など老化現象が徐々に進行する<sup>48</sup>。コラーゲンについては、UVA曝露によりコラーゲン合成能の減少が報告されており<sup>49</sup>、このような長期紫外線暴露後の細胞外マトリックス成分の産生・分解系バランスの崩れが光老化の原因であると考えられている<sup>50</sup>。このような背景から、紫外線曝露によって合成量が減少するコラーゲンの合成を促進することは、紫外線曝露による光老化の抑制に重要であり、シワ形成を抑えるには抗酸化剤が有効と考えられる。

創傷治癒部位の線維芽細胞の中には、間葉系幹細胞マーカーであるp75NTRを発現しているものがある。細胞培養系では、コラーゲン線維に付着した線維芽細胞は、タンパク質成長因子の存在下でも成長を停止し、健常組織の線維芽細胞の静止状態を模倣している。創傷治癒部位の線維芽細胞は増殖し、コラーゲン線維に取り囲まれている。このことは、創傷治癒部位のコラーゲン線維に付着した線維芽細胞に新たな増殖開始因子が存在すること、コラーゲン由来のペプチドであるプロリルヒドロキシプロリン(Pro-Hyp)が生成されることを示している。Pro-Hypは、コラーゲングル上で培養したp75NTR陽性線維芽細胞の増殖を誘発するが、p75NTR陰性線維芽細胞の増殖は誘発しない。Pro-Hypは特定の線維芽細胞に対する低分子量の成長開始因子であり、創傷治癒過程に関与している<sup>51</sup>。

プロリルヒドロキシプロリン(Pro-Hyp)およびヒドロキシプロリルグリシン(Hyp-Gly)は、コラーゲン加水分解物の摂取によりヒト血中に出現し、コラーゲングルに付着した線維芽細胞の増殖を促進し、コラーゲン産生を促進す

ることから、皮膚や関節症状の改善などコラーゲン加水分解物の摂取による有益性に関連すると考えられている<sup>52)</sup>。Pro-Hypは、ゼラチンやコラーゲン加水分解物の経口投与によっても組織に供給される。従って、ゼラチンやコラーゲン加水分解物の補給は、慢性創傷に対する治療効果が期待できる。動物実験やヒト臨床試験において、ゼラチンやコラーゲン加水分解物の摂取は、動物やヒトの褥瘡の治療を促進し、糖尿病動物における創傷治癒遅延を改善する。

### シワ形成予防

シワの原因として最も大きいのは、UV暴露など光老化であり、酸化ストレスである<sup>1)</sup>。従って、抗酸化物質はシワ形成予防に有効である。試験品成分のイナゴマメ果実エキス<sup>53)</sup>、アイ葉/茎エキス<sup>54)</sup>、カミツレ花エキス<sup>55)</sup>、ヒメフウロエキス<sup>56,57)</sup>、ユビキノンは抗酸化作用を有する。

ナイアシンアミド(ニコチンアミドとも呼ばれる)とニコチン酸(一般にナイアシンとも呼ばれる)は、生体内で互いに変換されるため、ビタミンB(3)と呼ぶ。ナイアシンアミドは、水素の授受に関わる重要な補酵素の構成成分である<sup>58)</sup>。ここでは、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)とニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸(NADP)という2つのコードヒドロゲナーゼが中心的な重要性を持っている。ナイアシンアミドの外用は、経表皮水分損失の減少や角質層の水分量の改善など、表皮のバリア機能を安定化させる効果がある。ナイアシンアミドは、ケラチンなどのタンパク質合成の増加、セラミド合成の促進、ケラチノサイトの分化の促進、細胞内のNADPレベルの上昇をもたらす。老化した皮膚では、ナイアシンアミドの局所適用により、表面構造が改善され、シワが滑らかになる<sup>58)</sup>。

ルチンは、ケルセチン配糖体であり、抗酸化作用を有することが知られているバイオフィラボノイドの一種である。ルチンの生体内での効果を調べるために、ルチンを含むクリームをヒトの皮膚に4週間塗布する二重盲検臨床試験が実施されている。30～50歳の被験者40名を対象に、2週間後と4週間後に、真皮密度、皮膚の弾力性、カラスの足跡の長さ、面積、目尻のしわの数を、コントロールとルチン含有クリームのいずれかを塗布した後に分析した結果、ルチンは、皮膚の弾力性を高め、シワの長さ、面積、数を減少させシワ形成抑制を有することが確認された<sup>59)</sup>。ルチンは、ヒト皮膚線維芽細胞(HDFs)のコラーゲン、タイプI、アルファ1(COL1A1)のmRNA発現を増加させ、マトリックスメタロペプチダーゼ1(MMP1)のmRNA発現を減少させることが確認されるとともに、ルチンの活性酸素消去活性が用量依存的に刺激されることを検証し、ルチンが酸化ストレス条件下で保護作用を発揮することが確認された<sup>59)</sup>。

ヒドロキシプロリンはシワ形成に関与する。UVB誘発光老化マウスモデルでは、UV照射により、皮膚のカタラー

ゼ、特にスーパーオキシドジスムターゼの活性が上昇し、マロジアルデヒド含量が減少し、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP-1、MMP-3)の産生とヒドロキシプロリンの減少を惹起される<sup>60)</sup>。組織学的評価では、炎症性細胞の浸潤、コラーゲン分解およびエラスチン異常を認められる。これらの結果は、シワ形成につながる所見と考えられ、ヒドロキシプロリンの減少が関与することを示している。

ヒドロキシプロリン(Hyp)単独投与によりシワ改善効果を検証した報告はないが、Hyp含有ペプチドに関する報告はいくつかある。コラーゲンペプチド補給が、ヒトの皮膚の保湿、弾力、しわの改善に有効な治療法であるかを検証する目的で、3%のGly-Pro-Hypを含むトリペプチド(Gly-X-Y)含有率15%以上の低分子コラーゲンペプチド(LMWCP)の二重盲検無作為プラセボ対照試験が実施されている。対象(n=64)は、プラセボまたはLMWCPの1,000 mgを1日1回、12週間投与するよう無作為に割り当てられ、ベースライン時、6週間後、12週間後に、肌の潤い、しわ、弾力性のパラメータを評価した。プラセボ群と比較して、LMWCP群では6週間後および12週間後に皮膚の水分補給値が有意に高かった。LMWCP群では12週後、プラセボ群に比べ、視覚評価スコアと皮膚のしわの3つのパラメータが有意に改善された。また、皮膚弾力性については、LMWCP群では3項目中1項目が12週後にベースラインから有意に改善し、プラセボ群に比べLMWCP群では3項目中2項目が12週後に有意に高くなった。これらの結果から、LMWCPがヒトの皮膚の保湿、弾力、シワを改善するための健康機能性食品素材として使用できる可能性が示唆された<sup>61)</sup>。

本試験では、試験品に配合されたこれらの成分が互いに強調しあい統合的に作用して、シワ形成の改善に貢献したと推測している。

### ・皮膚老化への糖化ストレスの関与

グルコースなどの還元糖は塩基性溶液中でアルデヒド基とケトン基を形成する。また脂質のβ酸化や過酸化によっても同様にアルデヒド基とケトン基を生じる。糖化ストレスとはアルデヒド基とケトン基が過剰に生成される状態を意味する。アルデヒドとケトンはカルボニル基をもつことが特徴で、カルボニル基は電気陰性度の高い酸素原子に電子が引き寄せられて分極し、炭素原子は求核攻撃を受けやすくなっている。これら反応基が蛋白質などの生体物質と非制御的に反応すると、翻訳後修飾(蛋白質変性)、老廃物の蓄積、機能性蛋白質の劣化、TCAサイクルの機能障害、細胞内シグナルの活性化や組織障害を惹起し、加齢に伴う退行性変化の大きな要因になる<sup>62)</sup>。狭義のメイラード反応は、還元糖と蛋白質の非酵素的、非可逆的の反応により、シッフ塩基(Schiff base)の形成、アマドリ転移、様々な中間体形成を経て、蛋白質糖化最終生成物(advanced glycation end products: AGEs)の生成に至るまでの過程を意味する。

糖化ストレスは皮膚老化の大きな危険因子である<sup>62,63)</sup>。糖化ストレスによって皮膚を構成するコラーゲンやエラチ

ンが変性すると、弾力性の消失やたるみが生じる。AGEsの蓄積は黄ばみを生じる。ケラチンやフィラグリン(天然保湿成分)の糖化は皮膚から水分蒸散を増やし、保湿機能を低下させる。フィラグリンの減少は皮膚バリアの破綻を助長し、アトピー性皮膚炎の発症リスクを高める<sup>64)</sup>。また、糖化ストレスは色素細胞のメラニン産生を亢進させる<sup>65)</sup>。

#### ・皮膚粘弾性の改善 副次評価項目

加齢に伴い皮膚の弾力性は失われる<sup>2)</sup>。真皮のI型コラーゲン線維は三重らせん構造を有し、エラスチン線維とともに皮膚の弾力性を維持する役割を担う。加齢に伴い線維芽細胞からのフィブロネクチンなど細胞外マトリックス成分の産生が低下し、コラーゲン、エラスチンの産生も低下する。また糖化ストレスによってコラーゲン線維がAGE化して架橋を形成し、線維としての可動性が低下することが皮膚弾力性低下の大きな原因となっている<sup>66)</sup>。コラーゲン蛋白を構成するリジンやアルギニン残基は糖化反応を受けやすく、AGE化して線維間架橋を形成し、そのためにコラーゲンは可動性を失う<sup>66)</sup>。ヒトにおける皮膚弾力の加齢に伴う変化をFig. 5に示す<sup>20)</sup>。糖化ストレスが強い糖尿病患者では健常者に比べR2、R7の弾力性曲線が下方シフトする。AGE Readerで測定した皮膚AGEs 蛍光量は皮膚Stiffnessと正相関を示す<sup>67)</sup>。

皮膚粘弾性R2を指標にした過去の臨床試験を紹介する。多種類の美容成分が配合されている美容液の目尻のシワと肌質改善効果の検証試験では、目尻シワの改善効果に加え、皮膚弾力性の改善を報告している<sup>68)</sup>。CutometerのR5(弛

緩段階の弾力性部分に対する吸引段階の弾力性部分の比)では試験品塗布側で塗布前 $0.51 \pm 0.07$ から塗布4週後 $0.56 \pm 0.14$ と増加(改善)傾向を示した( $p = 0.076$ )が、R2(皮膚の元の状態に戻る能力と最大振幅の比)では試験品塗布側で塗布前 $0.62 \pm 0.07$ から塗布4週後 $0.70 \pm 0.09$ と有意に増加し( $p = 0.002$ )、R7(曲線全体に対する弾力性回復部分の比)でも試験品塗布側で $0.31 \pm 0.04$ から4週後 $0.38 \pm 0.14$ と有意に増加した( $p = 0.018$ )。

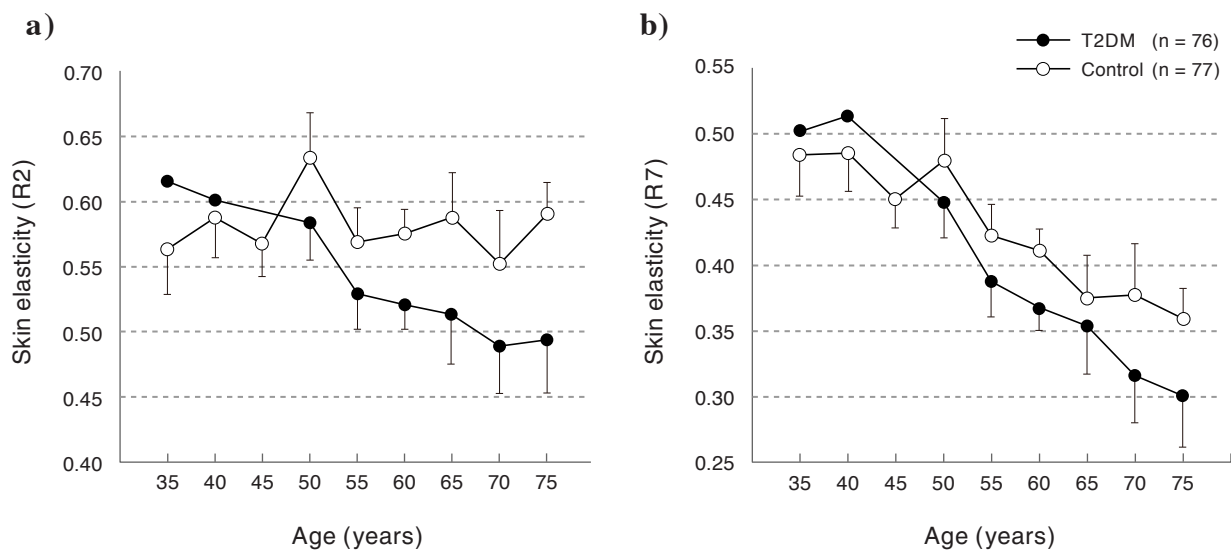
今回の試験では、R5、R7に有意な変化はなく、R2は有意に低下しており、試験品では皮膚弾力性改善作用は確認できなかった。

これまでのミックスハーブ<sup>69)</sup>、マンゴスチンエキス<sup>70)</sup>、マンゴスチン果皮抽出物配合黒酢飲料<sup>71)</sup>、ヒシエキス<sup>72)</sup>の経口摂取で、皮膚弾力性の改善作用が報告されている。これらはAGEs生成抑制作用を有する機能成分を含有している。

試験品の含有成分のうち、カミツレ花エキス、グルコシルヘスペリジン、グルコシルルチンにAGEs生成抑制作用を含有するが、皮膚弾力性の改善にまでは至らなかったと考えられる。

#### 塗布側と無塗布側との間に差が見られなかった理由

これまで述べたように、試験品の含有成分の特性をみれば、シワ形成の緩和、皮膚弾力性の改善作用は説明がつく。しかし問題は、今回の試験で塗布側と無塗布側との間に差が見られなかった点である。



**Fig. 5. Transitional change by age of skin elasticity and impacts of glycative stress.**

**a)** R2, **b)** R7. The mean value  $\pm$  SEM,  $n = 77$ , healthy persons;  $n = 76$ , patients with type 2 diabetes (T2DM). Measurement of the inside of an upper arm using Cutometer (Courage & Khazaka). R2, biological elasticity (Ua1/Uf1); R7, elastic recovery (Ur1/Uf1); SEM, standard error mean.

老化の仕方は個々により異なるが皮膚においても同様である<sup>73-75</sup>。乾燥肌になる人、しみやしわ、黄ばみが気になる人、弾力性が乏しくなる人など様々である。うるおい年齢は皮膚水分量測定<sup>63,76</sup>、しみ年齢・しわ年齢は画像解析<sup>76</sup>、黄ばみ年齢は色差計や皮膚AGEs (advanced glycation end products) 蛍光測定<sup>77</sup>、もちほだ(はり)年齢は弾力性検査<sup>20,63,78</sup>によって視覚パラメータが定量化されてきた。

そして危険因子は全身、皮膚に共通である。抗酸化サプリメントを摂取すれば、体内も皮膚も同時に作用を受ける。抗糖化サプリメントであっても同様である。

今回の試験品は、皮膚局所塗布されたものであるが、乳化剤やリポソーム化成分を併用しており、皮膚への浸透性能は高いことが予測される。その結果、試験品の影響が塗布部だけでなく無塗布部にも表れた可能性が考えられる。この問題については、試験品塗布後に有効成分の血中濃度変化を確認することで検証できると思われる。

## 安全性

安全性評価の結果、試験品が起因と考えられる副作用は確認されなかった。試験品の安全性については、特に問題ないと判断した。

## 結論

目尻のシワが気になる女性を対象に、試験品塗布による皮膚への作用を検証した結果、含有する多種類の機能性成分の総合作用の結果、目尻シワの改善が二つの評価法(診察によるシワグレード目視、画像によるシワグレード目視)により認められた。しかしながら無塗布の反対側も同様に改善を認め、塗布側と無塗布側との間に統計学的有意差はなかった。試験期間中に試験品に関する有害事象は認められず、安全性が確認された。一方、試験品は多種類の機能成分を含み、含有成分の乳化とリポソーム化による皮膚浸透能の強化を企図していることから、成分が経皮吸収された後、反対側に移行して作用した可能性は否定できなかった。本推論を検証するためには、今後の試験で試験品塗布後に有効成分が経皮吸収されて、血中濃度の上昇を確認する必要がある。

## 利益相反申告

本研究を施行するにあたり株式会社ナボカルコスメティックスより支援を受けた。

## 参考文献

- 1) Ichihashi M, Ando H, Yoshida M, et al. Photoaging of the skin. *Anti-Aging Med.* 2009; 6: 46-59
- 2) Ichihashi M, Yagi M, Nomoto K, et al. Glycation stress and photo-aging in skin. *Ant-Aging Med.* 2011; 8: 23-29.
- 3) Japanese Cosmetic Science Society. Wrinkle grade standard photo of periorbital wrinkles. Guidelines for cosmetic function evaluation methods. (in Japanese) [http://www.jcss.jp/journal/contents\\_guideline5.pdf](http://www.jcss.jp/journal/contents_guideline5.pdf)
- 4) Tsim K, Yashiro T, Dong T, et al. New polyphenol compound. Patent JP6976014B1, 2021.
- 5) Zulim Botega D, Bastida S, Marmesat S, et al. Carob fruit polyphenols reduce tocopherol loss, triacylglycerol polymerization and oxidation in heated sunflower oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society.* 2009; 86: 419-425.
- 6) Lall N, Kishore N, Momtaz S, et al. Extract from *Ceratonia siliqua* exhibits depigmentation properties. *Phytother Res.* 2015; 29: 1729-1736.
- 7) Rtibi K, Jabri MA, Selmi S, et al. Preventive effect of carob (*Ceratonia siliqua* L.) in dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in rat. *RSC Advances.* 2016; 6: 19992-20000.
- 8) Rtibi K, Selmi S, Grami D, et al. Chemical constituents and pharmacological actions of carob pods and leaves (*Ceratonia siliqua* L.) on the gastrointestinal tract: A review. *Biomed Pharmacother.* 2017; 93: 522-528.
- 9) Nabocul Cosmetics Co., Ltd. Developed a new brand "Asakado" and announced "OLANDU", the latest technology chemical compound in the aging care field. Press Distribution, Jan 19, 2022. (in Japanese) [https://kyodonewsprwire.jp/prwfile/release/M106981/2021196276/\\_prw\\_PR1fl\\_LS85a7Fd.pdf](https://kyodonewsprwire.jp/prwfile/release/M106981/2021196276/_prw_PR1fl_LS85a7Fd.pdf)
- 10) Lam ECS, Li R, Rodrigues MR, et al. Enhanced retinoid response by a combination of the vitamin A ester retinyl propionate with niacinamide and a flavonoid containing *Ceratonia siliqua* extract in retinoid responsive *in vitro* models. *Int J Cosmet Sci.* 2021; 43: 102-106.
- 11) Han NR, Kang SW, Moon PD, et al. Genuine traditional Korean medicine, *Naju Jjok* (Chung-Dae, *Polygonum tinctorium*) improves 2,4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis-like lesional skin. *Phytomedicine.* 2014; 21: 453-460.
- 12) Motoki T, Takami Y, Yagi Y, et al. Inhibition of hepatocyte growth factor induction in human dermal fibroblasts by tryptanthrin. *Biol Pharm Bull.* 2005; 28: 260-266.
- 13) Cella Cosmetics. *Persicaria tinctoria* leaf/stem extract. "Ingredient Dictionary," Cella Cosmetics. (in Japanese) [https://cella.jp/ingredient/detail.php?p\\_id=1370](https://cella.jp/ingredient/detail.php?p_id=1370) (Accessed at Feb 7, 2023)
- 14) Takabe W, Yamaguchi T, Hayashi H, et al. Identification of antiglycative compounds in Japanese red water pepper (red leaf variant of the *Persicaria hydropiper* Sprout). *Molecules.* 2018; 23: 2319.

- 15) Johnson LR, et. German chamomile. "Guide to Medicinal Herbs", Nikkei National Geographic Inc, Tokyo, pp145-147, 2014. (in Japanese)
- 16) Miraj S, Alesaeidi S. A systematic review study of therapeutic effects of *Matricaria recuitta* chamomile (chamomile). *Electron Physician*. 2016; 8: 3024-3031.
- 17) Nagashima T. German chamomile. "Herbal Tea: The Healing of Science", Flargrance Journal, Tokyo, pp42-43, 2010. (in Japanese)
- 18) McKay DL, Blumberg JB. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recuita* L.). *Phytother Res*. 2006; 20: 519-530.
- 19) Hayashi S. German chamomile. "The Encyclopedia of Medical Herb", Tokyodo Shuppan Co. Ltd, Tokyo, pp74-75, 2016. (in Japanese)
- 20) Kubo M, Yagi M, Kawai H, et al. Anti-glycation effects of mixed-herb-extracts in diabetes and pre-diabetes. *J Clin Biochem Nutr*. 2008; 43(Suppl. 1): 66-69.
- 21) Yonei Y, Miyazaki R, Takahashi Y, et al. Anti-glycation effect of mixed herbal extract in individuals with pre-diabetes mellitus: A double-blind, placebo-controlled, parallel group study. *Anti-Aging Med*. 2010; 7: 26-35.
- 22) Kawai H, Shoshihara M, Kawakami H, et al. Anti-glycation and skin beautification properties from ingestion of mixed herb extract: A placebo-controlled, double-blind, randomized, parallel-group study. *Glycative Stress Res*. 2016; 3: 236-245.
- 23) Li P, Wu G. Roles of dietary glycine, proline, and hydroxyproline in collagen synthesis and animal growth. *Amino Acids*. 2018; 50: 29-38.
- 24) Gordon MK, Hahn RA. Collagens. *Cell Tissue Res*. 2010; 339: 247-257.
- 25) Srivastava AK, Khare P, Nagar HK, et al. Hydroxyproline: A potential biochemical marker and its role in the pathogenesis of different diseases. *Curr Protein Pept Sci*. 2016; 17: 596-602.
- 26) Cosmetic ingredients online. Basic information, purpose of formulation, and safety of hydroxyproline. *Cosmetic Ingredient Journal*, the latest update at July 11, 2022. (in Japanese)  
<https://cosmetic-ingredients.org/skin-conditioning-miscellaneous/1271/>
- 27) Matsumoto Trading Co., Ltd. Ronacare VTA. "Database of Cosmetic Ingredients," Sept 1, 2009. (in Japanese)  
<https://matsumoto-trd.com/product/pdf/concept/h02.pdf>
- 28) Matsumoto Trading Co.,Ltd. Ronacare ASCIII & Ronacare VTA. "Database of Cosmetic Ingredients," Oct 1, 2009. (in Japanese)  
<https://matsumoto-trd.com/product/pdf/02/vo2/05.pdf>
- 29) Tanno O. Improvement epidermal permeability barrier by increasing *de novo* synthesis of ceramides. *Fragrance Journal*. 1999; 27(10); 23-28. (in Japanese)
- 30) Kawada A, Konishi N, Oiso N, et al. Evaluation of anti-wrinkle effects of a novel cosmetic containing niacinamide. *J Dermatol*. 2008; 35: 637-642.
- 31) Matts PJ, Oblong JE, Bissett DL. A review of the range of effects of niacinamide in human skin. *International Federation of Societies of Cosmetic Chemists (IFCC) Magazine*. 2002; 5: 285-289.
- 32) Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, et al. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature*. 1996; 379(6563): 335-339.
- 33) Chung JH, Seo JY, Choi HR, et al. Modulation of skin collagen metabolism in aged and photoaged human skin *in vivo*. *J Invest Dermatol*. 2001; 117: 1218-1224.
- 34) Hachiya A, Kobayashi A, Ohuchi A, et al. The paracrine role of stem cell factor/c-kit signaling in the activation of human melanocytes in ultraviolet-B-induced pigmentation. *J Invest Dermatol*. 2001; 116: 578-586.
- 35) Mizutani K, Ono T, Ikeda K, et al. Photo-enhanced modification of human skin elastin in actinic elastosis by *N*<sup>ε</sup>-(carboxymethyl)lysine, one of the glycoxidation products of the Maillard reaction. *J Invest Dermatol*. 1997; 108: 797-802.
- 36) Asada Y. "Mechanism and functions of the dermis." The Encyclopedia of Cosmetic Dermatology. Chuo Shoin Co.,Ltd. Tokyo, pp28-33, 2022. (in Japanese)
- 37) Shimizu H. Dermis." Textbook of Modern Dermatology." Nakayama Shoten Co.,Ltd. Tokyo, pp13-20, 2018. (in Japanese)
- 38) Hattori S, Kuwaba K. Cosmetics and Collagen. "Manufacturing, Application and Development of Collagens 2. CMC Publishing Co.,Ltd. Tokyo, pp143-166, 2020. (in Japanese)
- 39) Oki M, et. "collagen" Encyclopedic dictionary of chemistry, Tokyo Kagaku Dojin, 1989; 814. (in Japanese)
- 40) Okuyama K. "Molecular structure of collagen" Manufacturing, Application and Development of Collagens II," CMC Publishing Co.,Ltd. pp1-12, 2020. (in Japanese)
- 41) Seiwa Kasei Co Ltd. Hydrolyzed collagen derived from fish scale. Patent JP2007326869A. Dec 20, 2007.
- 42) Keene DR, Sakai LY, Bächinger HP, et al. Type III collagen can be present on banded collagen fibrils regardless of fibril diameter. *J Cell Biol*. 1987; 105: 2393-2402.
- 43) Murakami Y, Adachi H, Sakaida T, et al. The Reduction mechanism of the type III/I collagen ratio with aging: Age-related change in meprin, a type III collagen propeptide cleavage enzyme. *Journal the Society of Cosmetic Chemists of Japan*. 2013; 47: 278-284. (in Japanese)
- 44) Woodley DT, Kalebec T, Banes AJ, et al. Adult human keratinocytes migrating over nonviable dermal collagen produce collagenolytic enzymes that degrade type I and type IV collagen. *J Invest Dermatol*. 1986; 86: 418-423.
- 45) Herrmann G, Walscheke M, Lange TS, et al. UVA irradiation stimulates the synthesis of various matrix-metalloproteinases (MMPs) in cultured human fibroblasts. *Exp Dermatol*. 1993; 2: 92-97.
- 46) Schieke SM, Schroeder P, Krutmann J. Cutaneous effects of infrared radiation: From clinical observations to molecular response mechanisms. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2003; 19: 228-234.
- 47) Calles C, Schneider M, Macaluso F, et al. Infrared A radiation influences the skin fibroblast transcriptome: Mechanisms and consequences. *J Invest Dermatol*. 2010; 130: 1524-1536.
- 48) Asada Y. Acute and chronic skin lesions. "The Encyclopedia of Cosmetic Dermatology." Chuo Shoin Co.,Ltd., Tokyo, pp195, 2002. (in Japanese)
- 49) Tanaka H, Okada T, Konishi H, et al. The effect of reactive oxygen species on the biosynthesis of collagen and glycosaminoglycans in cultured human dermal fibroblasts. *Arch Dermatol Res*. 1993; 285: 352-355.
- 50) Obayashi K, Kyotani D, Masuda K, et al. Inhibitory

- effects of the plant extracts on matrix proteinases. *Journal the Society of Cosmetic Chemists of Japan*. 1998; 32: 272-279. (in Japanese)
- 51) Sato K, Asai TT, Jimi S. Collagen-derived di-peptide, prolylhydroxyproline (Pro-Hyp): A new low molecular weight growth-initiating factor for specific fibroblasts associated with wound healing. *Front Cell Dev Biol*. 2020; 8: 548975.
- 52) Asai TT, Oikawa F, Yoshikawa K, et al. Food-derived collagen peptides, prolyl-hydroxyproline (Pro-Hyp), and hydroxyprolyl-glycine (Hyp-Gly) enhance growth of primary cultured mouse skin fibroblast using fetal bovine serum free from hydroxyprolyl peptide. *Int J Mol Sci*. 2019; 21: 229.
- 53) Ben Ayache S, Behija Saafi E, Emhemmed F, et al. Biological activities of aqueous extracts from carob plant (*Ceratonia siliqua* L.) by antioxidant, analgesic and proapoptotic properties evaluation. *Molecules*. 2020; 25: 3120.
- 54) Tokuyama-Nakai S, Kimura H, Hirabayashi Y, et al. Constituents of flavonol O-glycosides and antioxidant activities of extracts from seeds, sprouts, and aerial parts of *Polygonum tinctorium* Lour. *Heliyon*. 2019; 5: e01317.
- 55) Al-Dabbagh B, Elhaty IA, Elhaw M, et al. Antioxidant and anticancer activities of chamomile (*Matricaria recutita* L.). *BMC Res Notes*. 2019; 12: 3.
- 56) Ben Jemia M, Aidi Wannes W, Ouchikh O, et al. Antioxidant activity of Tunisian *Geranium robertianum* L. (Geraniaceae). *Nat Prod Res*. 2013; 27: 2076-2083.
- 57) Catarino MD, Silva AMS, Cruz MT, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Geranium robertianum* L. decoctions. *Food Funct*. 2017; 8: 3355-3365.
- 58) Gehring W. Nicotinic acid/niacinamide and the skin. *J Cosmet Dermatol*. 2004; 3: 88-93.
- 59) Choi SJ, Lee SN, Kim K, et al. Biological effects of rutin on skin aging. *Int J Mol Med*. 2016; 38: 357-363.
- 60) Zhou Y, He L, Zhang N, et al. Photoprotective effect of *Artemisia sieversiana* Ehrhart essential oil against UVB-induced photoaging in mice. *Photochem Photobiol*. 2021 Nov 12.
- 61) Kim DU, Chung HC, Choi J, et al. Oral intake of low-molecular-weight collagen peptide improves hydration, elasticity, and wrinkling in human skin: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Nutrients*. 2018; 10: 826.
- 62) Nagai R, Mori T, Yamamoto Y, et al. Significance of advanced glycation end products in aging-related disease. *Anti-Aging Med*. 2010; 7: 112-119.
- 63) Yonei Y, Uenaka S, Yagi M, et al. Effects on skin by dewaxed brown rice: An open label test. *Glycative Stress Res*. 2021; 8: 29-38.
- 64) Furue M, Chiba T, Tsuji G, et al. Atopic dermatitis: immune deviation, barrier dysfunction, IgE autoreactivity and new therapies. *Allergol Int*. 2017; 66: 398-403.
- 65) Abe Y, Takabe W, Yagi M, et al. Inhibition of AGE-induced melanogenesis in B16 melanoma cells by iridoid-containing plants. *Glycative Stress Res*. 2017; 4: 67-70.
- 66) Cerami A, Vlassara H, Brownlee M. Glucose and aging. *Sci Am*. 1987; 256: 90-96.
- 67) Ishizaki K, Yagi M, Morita Y, et al. Relationship between glycative stress markers and skin stiffness. *Glycative Stress Res*. 2020; 7: 204-210.
- 68) Kaneko T, Miyata A, Ishida N. Cosmetic essence makes both effects which looks younger than the actual age and skin improvement. *Medical Consultation & New Remedies*. 2016; 53: 807-814. (in Japanese)
- 69) Yonei Y, Yagi M, Hibino S, et al. Herbal extracts inhibit Maillard reaction, and reduce chronic diabetic complications risk in streptozotocin-induced diabetic rats. *Anti-Aging Med*. 2008; 5: 93-98.
- 70) Ohno R, Moroishi N, Sugawa H, et al. Mangosteen pericarp extract inhibits the formation of pentosidine and ameliorates skin elasticity. *J Clin Biochem Nutr*. 2015; 57: 27-32.
- 71) Takabe W, Yagi M, Ogura M, et al. Effect of mangosteen pericarp extract-containing black vinegar drink on skin quality through anti-glycative actions. *Glycative Stress Res*. 2017; 4: 158-171.
- 72) Takeshita S, Ishioka Y, Uemura T, et al. Reducing effect of the long term intake of water chestnut (*Trapa bispinosa* Roxb.) pericarp extract on glycative stress in the placebo-controlled double blinded clinical trial and *in vitro* inhibitory actions on low-density lipoprotein (LDL) glycation. *Glycative Stress Res*. 2017; 4: 299-316.
- 73) Yonei Y, Mizuno Y. The human dock of tomorrow: Annual health checkup for anti-aging. *Ningen Dock*. 2005; 19(6): 5-8.
- 74) Yonei Y, Takabe W. Aging assessment by anti-aging medical checkup. *Health Evaluation and Promotion*. 2015; 42: 459-464.
- 75) Yonei Y, Takabe W, et al. What does the Anti-Aging Medical Checkup show?: Data presentation. *Health Evaluation and Promotion*. 2017; 44: 600-605.
- 76) Miyamoto K, Inoue Y, Hsueh K, et al. Characterization of comprehensive appearances of skin ageing: An 11-year longitudinal study on facial skin ageing in Japanese females at Akita. *J Dermatol Sci*. 2011; 64: 229-236.
- 77) Nomoto K, Yagi M, Arita S, et al. A survey of fluorescence derived from advanced glycation end products in the skin of Japanese: Differences with age and measurement location. *Anti-Aging Med*. 2012; 9: 119-124.
- 78) Yo K. The relationship between aging-related changes in cheek appearance and skin properties. *Journal of the Japanese Society for Cutaneous Health*. 2012; 34: 108-112. (in Japanese)