

## 加齢 BALB/c マウスの小腸線維芽細胞の超微形態学的変化の抑制から評価した 乳酸菌混合発酵産物の抗加齢効果

<sup>1</sup>東京女子医科大学病院病理診断科（指導：西川俊郎教授）

<sup>2</sup>日本心臓血管研究振興会

アベ カズヒコ ニシカワ トシオ セキグチ モリエ  
阿部 一彦<sup>1</sup>・西川 俊郎<sup>1</sup>・関口 守衛<sup>2</sup>

（受理 平成26年2月17日）

### Ultrastructural Anti-aging Effects of a Lactic Acid Bacteria-fermented Soybean Abstract in Murine Duodenal Fibroblasts

Kazuhiko ABE<sup>1</sup>, Toshio NISHIKAWA<sup>1</sup> and Morie SEKIGUCHI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Surgical Pathology, Tokyo Women's Medical University Hospital

<sup>2</sup>Japan Research Promotion Society for Cardiovascular Diseases

The anti-aging effects of a lactic acid bacteria-fermented soybean abstract (LFS) on the nuclear pore complexes (NPCs) of murine duodenal fibroblasts were analyzed by ultrastructural parameters. Three experimental BALB/c mouse groups were used in the study: group A mice (n = 5; control group) were bred for 4 weeks on a standard feed, group B mice (n = 5) were bred for 6 months on a standard feed, and group C mice (n = 5) were bred for 6 months on a 1% LFS-containing standard feed. The mean NPC diameter for the groups A, B, and C was 124.09 ± 23.68, 98.01 ± 31.18, and 119.59 ± 23.40 nm, respectively, which indicates comparable NPC sizes for groups A and C, but significantly smaller NPC size for group B. In addition, the collagen fiber content of the surrounding fibroblasts was markedly decreased in group B than in other groups. Our findings suggest that long-term use of LFS in diet may sustain collagen synthesis of fibroblasts and inhibit the aging process in mice.

**Key Words:** collagen fiber, duodenum, fibroblast, lactic acid bacteria-fermented soybean abstract, nuclear pore complex

#### 緒 言

加齢にともないすべてのヒトに虚弱現象が生じることが報告されている<sup>1)</sup>。

我が国は2007年にWHO（世界保健機構）の定義する超高齢化社会となった。平均寿命は延びているが健康寿命（心身ともに障害がなく自立して活動的な生活ができる生存期間）との開きが2007年度で平均7年程度ある<sup>2)</sup>。

また2010年度の健康寿命の認知度は20歳以上において男女とも平均20%程度と低い現状にある<sup>3)</sup>。

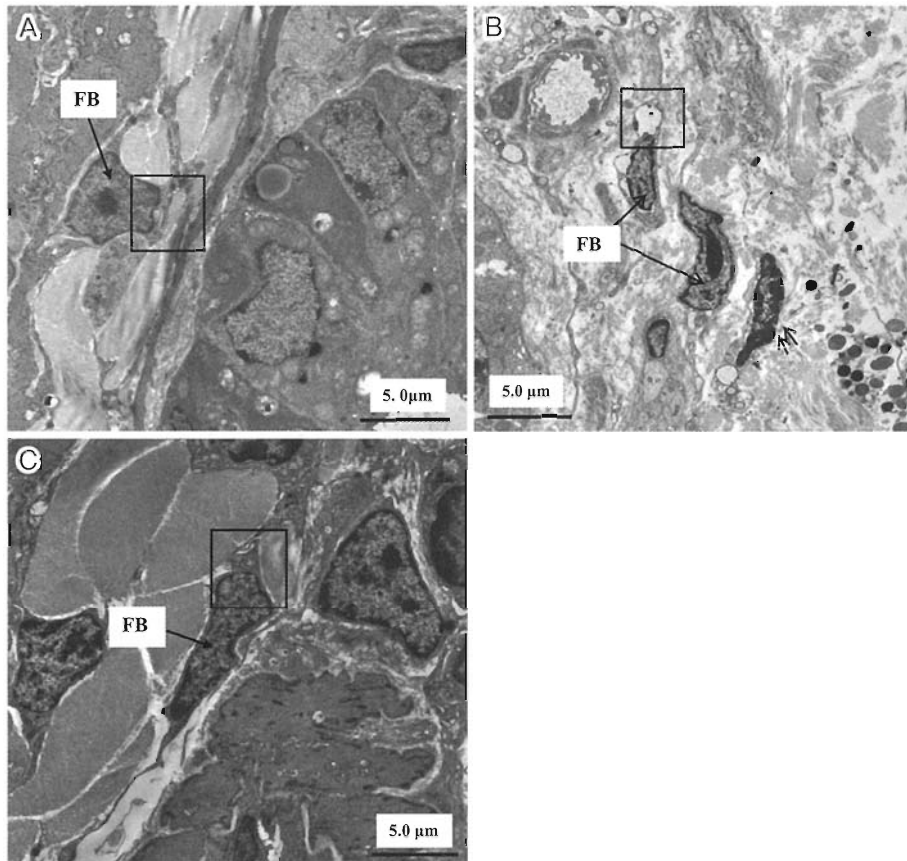
このため厚生労働省は健康寿命の延伸を重点項目に掲げている。このことは抗加齢の強化を意味している。

我々は乳酸菌混合発酵産物（以下、発酵産物）の

抗加齢効果について加齢BALB/cマウス十二指腸の超微形態変化の抑制能から評価している。特に十二指腸の組織を用いた理由の発端は、加齢によってマウス十二指腸の吸収上皮細胞の上部に存在する微絨毛の長さが短くなるとの報告にある<sup>4)</sup>。

これまで我々は発酵産物<sup>5)6)</sup>の加齢マウス十二指腸に対する抗加齢効果について走査型電子顕微鏡（以下、SEM）、透過型電子顕微鏡（以下、TEM）を用いて検討し次のことを明らかにしてきた：①加齢マウス十二指腸の吸収上皮細胞の微絨毛の長さの短縮抑制効果<sup>7)</sup>、②加齢マウス十二指腸の粘膜固有層の有窓型毛細血管の窓幅の狭小抑制効果<sup>8)</sup>である。

加齢とともに皮膚の真皮は線維芽細胞数の減少とコラーゲン量の低下を呈し、しわの原因になること



**Fig. 1** Transmission electron micrographs of fibroblast and the surrounding collagen fibers in the duodenal submucosa of BALB/c mice

A: Mice (n=5) bred for 4 weeks on a standard feed (control). B: Mice (n=5) bred for 6 months on a standard feed. C: Mice (n=5) bred for 6 months on a 1% LFS-containing standard feed. The plasma membrane of the fibroblast of B is damaged (double arrows). FB: fibroblast, LFS: lactic acid bacteria-fermented soybean abstract.

は周知の事実となっている<sup>9)</sup>。低栄養も皮膚のダメージに関与している。例えば、絶食によって皮膚のコラーゲン合成が減少することが報告されている<sup>10)</sup>。

コラーゲンを構成する主なアミノ酸はグリシン (33.5%)、プロリン (12%)、ヒドロキシプロリン (10%)である。コラーゲンは2個の特有なアミノ酸 (ヒドロキシプロリンとヒドロキシリシン) を含む<sup>11)</sup>。

これまで栄養素の消化吸収に重要な役割を担っている小腸の粘膜下組織層に存在するコラーゲンを合成する線維芽細胞およびその周辺に存在するコラーゲン線維形成について核膜孔複合体 (以下、NPC) の観点に立った TEM による詳細な解析は報告されていない。

今回の線維芽細胞の NPC の直径の計測およびコラーゲン線維形成の解析はナノメートルレベルでの評価なので光学顕微鏡は使用せず TEM を用いて評

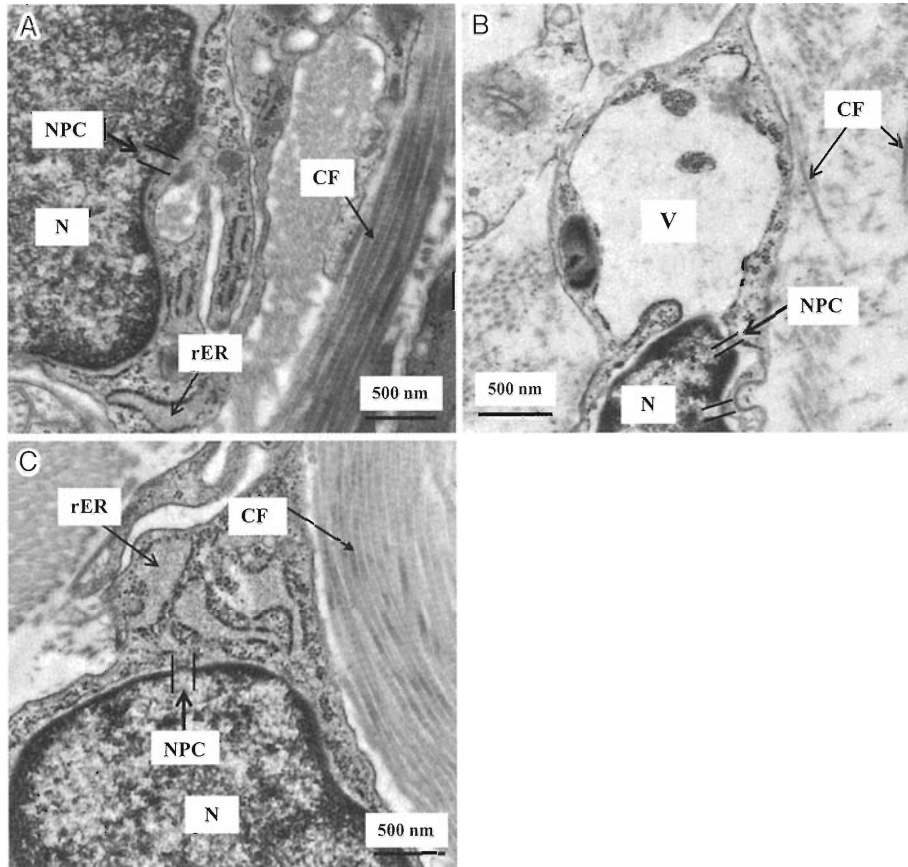
価した。

本研究では発酵産物の抗加齢効果について、粘膜下組織層に存在する線維芽細胞の NPC の直径の狭小化抑制とコラーゲン線維形成の低下抑制との関連に着目した。

老化分子でもある p53 の欠失は、Hutchinson-Gilford 早老症候群のモデルマウスで認められる老化形質を改善し、寿命の延長をもたらすとの報告<sup>12)</sup>があり、線維芽細胞は p53 タンパク質量が低下すると核膜孔のサイズが大きくなること<sup>13)</sup>が線維芽細胞の NPC に着目した理由である。

またコラーゲン線維の形成に関しては、加齢した線維芽細胞はコラーゲンの mRNA の発現量が減少しており、SEM によってコラーゲン線維束を形成しないことが観察されている<sup>14)</sup>。

NPC の主要部分の直径は約 120nm である<sup>15)</sup>。NPC の構造は電子顕微鏡によって明らかにされて



**Fig. 2** Transmission electron micrographs of fibroblast NPC and the surrounding collagen fibers (enlarged images indicated by squares of Fig. 1)

A: Mice (n=5) bred for 4 weeks on a standard feed (control). B: Mice (n=5) bred for 6 months on a standard feed. C: Mice (n=5) bred for 6 months on a 1% LFS-containing standard feed. The NPC diameter of B is markedly smaller than those of A and C, which appear normal. B can be observed as a large vacuole between the nucleus and cytoplasm of the fibroblast.

CF: collagen fiber, LFS: lactic acid bacteria-fermented soybean abstract, N: nucleus, NPC: nuclear pore complex, rER: rough-surfaced endoplasmic reticulum, V: vacuole.

きた<sup>16)</sup>. NPCはコラーゲン遺伝子の転写を受けた mRNAの細胞質への通過部位であると同時に細胞質と核質との分子流通の場でもある<sup>17)</sup>.

#### 対象および方法

##### 1. 発酵産物

発酵産物の調製法はShin et al.の論文<sup>5)</sup>にあるように、豆乳に厳選された12種類の乳酸菌および4種類の酵母を接種し微生物共棲混合培養法によって得られる純粋な発酵産物である。発酵産物の上澄み部分には必須および非必須アミノ酸、各種ビタミン、各種ミネラル、短鎖脂肪酸(酢酸、酪酸など)・乳酸、オリゴ糖、大豆ペプチド、レシチン(大豆リン脂質)など、下層の沈殿物部分には乳酸菌と酵母の菌体成分(ムラミルジペプチド、ペプチドグリカン、ザイモサン)など毎日の健康維持に欠かせない多種

多様な栄養素成分が含まれている<sup>6)</sup>.

##### 2. 実験動物

3週齢の近交系BALB/cマウス(雄/Japan SLC, Inc.)を15匹導入し、1週間馴化期間を設けた。実験はマウスをA群、B群、C群の3群に分けて行った: A群. MF標準飼料(Oriental Yeast Co. Ltd., Japan)飼育(以下、標準飼育)の若い4週齢マウス(5匹)(コントロール); B群. 標準飼育の6ヵ月齢マウス(5匹); C群. 1%発酵産物含有MF標準飼料飼育(以下、発酵産物飼育)の6ヵ月齢マウス(5匹)。

動物実験は「株式会社エイ・エル・エイ中央研究所実験動物倫理規定」に従って実施した。この倫理規定は11ページ(A4判)におよぶが「趣旨及び基本原則」の抜粋は以下の通りである。第1条 研究

機関等における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年文部科学省告示第71号。以下「文科省基本指針」という。)に基づき株式会社エイ・エル・エイ(以下「ALA」という。)において動物実験等を適正に行うため、必要な事項を定めるものとする。動物実験等の実施に当たっては、動物の愛護および管理に関する法律(昭和48年法律第105号。以下「法」という。), 実験動物の飼養および保管ならびに苦痛の軽減に関する基準(平成18年環境省告示第88号。以下「飼養保管基準」という。), 文科省基本指針, 動物実験の適正な実施に向けたガイドライン(平成18年6月1日日本学術会議策定。以下「ガイドライン」という。), 動物の処分方法に関する指針(平成7年総理府告示第40号), その他の法令等に定めがあるもののほか、この規定を遵守し、動物実験の原則である次の各号に掲げる事項(3R)に基づき、適正に行われなければならない。1. 代替法の利用(Replacement), 2. 使用数の削減(Reduction), 3. 苦痛の軽減(Refinement)。

### 3. BALB/c マウス十二指腸の線維芽細胞のTEM観察およびそのNPCの直径の定量評価法

頸椎脱臼により屠殺したBALB/cマウスから十二指腸を採取し直ちに細切した後、3%グルタルアルデヒド固定および1%四酸化オスミウム固定、エタノール濃度系列脱水、エポキシ樹脂包埋、超薄切片作製などTEM(H-7650型/Hitachi High-Technologies Co., Japan)による撮影のための常法処理を行った。粘膜下組織層の線維芽細胞のNPCおよびその周辺のコラーゲン線維をTEMにて撮影した。

各実験群の線維芽細胞8個のNPCの直径はコンピュータ(WinROOF画像解析ソフト/Mitani Co., Japan)にて計測した。得られたデータは平均値±標準偏差で表し、統計処理はScheffeの方法により3群間比較を行った。危険率5%未満を有意差ありと判定した。

## 結 果

### 1. BALB/c マウス十二指腸の線維芽細胞および周辺コラーゲン線維のTEM観察

今回のTEMを用いた観察では線維芽細胞の分布や数には3群間で特に変化は認められなかった。

B群の標準飼育6ヵ月齢の線維芽細胞は核周囲に小胞体由来と考えられる大きな空胞が観察された。また線維芽細胞の細胞膜が破壊されている像も観察された。線維芽細胞のNPCの直径は小さく観察さ

れ、その細胞周辺のコラーゲン線維は低密度であった(Fig. 1B; Fig. 2B)。

一方でC群の発酵産物飼育6ヵ月齢の線維芽細胞の核周囲に空胞は観察されなかった。線維芽細胞のNPCの直径は大きく観察された。線維芽細胞周辺のコラーゲン線維は比較的高密度に存在していた(Fig. 1C; Fig. 2C)。これらの所見は、A群の標準飼育4週齢の線維芽細胞の内部構造および細胞周辺のコラーゲン線維の状態(Fig. 1A; Fig. 2A)と同様であった。

### 2. BALB/c マウス十二指腸の線維芽細胞のNPCの直径

B群の標準飼育6ヵ月齢の線維芽細胞におけるNPCの直径は $98.01 \pm 31.18 \text{ nm}$  ( $n=5$ ; 計測NPC数: 216/計測細胞数: 8)であった(Fig. 3B)。C群の発酵産物飼育6ヵ月齢の線維芽細胞におけるNPCの直径は $119.59 \pm 23.40 \text{ nm}$  ( $n=5$ ; 計測NPC数: 212/計測細胞数: 8)であった(Fig. 3C)。またA群の標準飼育4週齢の線維芽細胞におけるNPCの直径は $124.09 \pm 23.68 \text{ nm}$  ( $n=5$ ; 計測NPC数: 216/計測細胞数: 8)であった(Fig. 3A)。

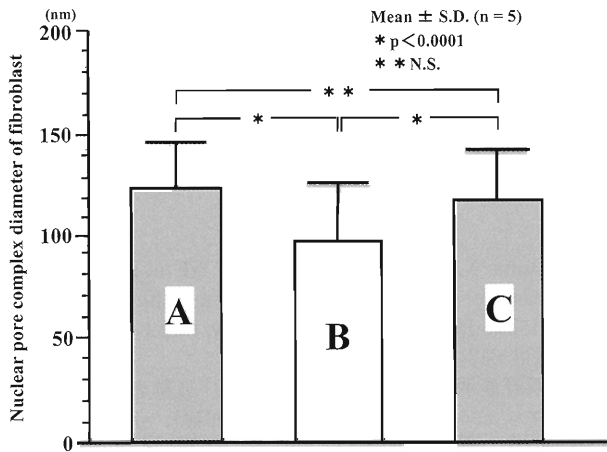
C群の発酵産物飼育6ヵ月齢の線維芽細胞におけるNPCの直径(Fig. 3C)とA群の標準飼育4週齢の線維芽細胞におけるNPCの直径(Fig. 3A)との間に有意差は認められなかった(A vs. C [N.S.])。

一方でB群の標準飼育6ヵ月齢の線維芽細胞におけるNPCの直径(Fig. 3B)は、C群の発酵産物飼育6ヵ月齢の線維芽細胞におけるNPCの直径(Fig. 3C)およびA群の標準飼育4週齢の線維芽細胞におけるNPCの直径(Fig. 3A)との間に有意差が認められた(A vs. B [ $p < 0.0001$ ]; C vs. B [ $p < 0.0001$ ])。

## 考 察

線維芽細胞は主にコラーゲンを合成するが、未分化間充織細胞から局所的に発生しその組織内に一生とどまる定住型細胞である<sup>18)</sup>。

線維芽細胞のコラーゲン線維形成は何段階かの過程からなる。アミノ酸(プロリン, リジンなど)のエンドサイトーシスによる取り込み後、コラーゲン遺伝子を基に転写(mRNA)が行われ、リボソーム上でmRNAが翻訳されコラーゲンポリペプチド鎖(プロ $\alpha$ 鎖)が合成され粗面小胞体槽内に放出される。小胞体槽内で補因子のビタミンCの存在下、プロ $\alpha$ 鎖のプロリンとリジン残基は水酸化されヒドロキシプロリン, ヒドロキシリジンとなる。さらに糖化などを受け、コラーゲンの前駆体である3重ら



**Fig. 3** Comparison of the diameter of the NPC of the duodenal submucosa fibroblast of groups A, B, and C mice

Measurements were determined by computer software. Group A mice were bred for 4 weeks on a standard feed (control). Group B mice were bred for 6 months on a standard feed. Group C mice were bred for 6 months on a 1% LFS-containing standard feed. The mean NPC diameter of group B was significantly smaller than that of group A and group C. LFS: lactic acid bacteria-fermented soybean abstract, NPC: nuclear pore complex, N.S.: not significant.

せんのプロコラーゲンを産生する。プロコラーゲンが細胞外に分泌されたのち、プロコラーゲンの両端に存在するプロペプチドが、特定のプロペプチド切断酵素により切断される。このことによりコラーゲン分子が会合し横紋周期構造を有するコラーゲン細線維を形成する。さらに多数のコラーゲン細線維が会合してコラーゲン線維となる<sup>19)</sup>。

最近、加齢した線維芽細胞のコラーゲンの mRNA の発現量が減少することが報告されている。また SEM 観察によって、加齢していない線維芽細胞のコラーゲン線維は束を形成しているが、加齢した線維芽細胞のコラーゲン線維は束を形成しないことが報告されている<sup>14)</sup>。線維芽細胞から細胞外に分泌されたプロコラーゲンの両端にあるプロペプチドはプロコラーゲンがコラーゲン線維を形成するために切断されることが必要であるが、このプロペプチドを切断するプロペプチド切断酵素の mRNA の発現量が加齢によって減少することが報告されている。特に III 型コラーゲンのプロペプチド切断酵素 mepirin の減少が著しい<sup>20)</sup>。この酵素の減少によってコラーゲン分子同士が会合することができないためコラーゲン線維の形成ができなくなる。

老化分子でもある p53 の欠失は、Hutchinson-

Gilford 早老症候群のモデルマウスで認められる老化形質を改善し、寿命の延長をもたらす<sup>12)</sup>。p53 の活性化は加齢に伴う様々な疾患に関与しているが、p53 はヒトの心不全で増加していることが報告されている<sup>21)</sup>。線維芽細胞の核膜孔のサイズは p53 タンパク質量の低下によって大きくなることが報告されている<sup>13)</sup>。

本研究は発酵産物の抗加齢効果を評価するために、加齢小腸の粘膜下組織層に存在する線維芽細胞における NPC の直径の狭小化の抑制とコラーゲン線維形成の低下抑制の関連について TEM および TEM 像の画像解析手法を用いて評価した。

粘膜下組織層には消化吸収されたアミノ酸、ミネラル、グルコースなどを回収する有窓型毛細血管、カイロミクロンを回収する集合リンパ管、粘膜下神経叢(マイスナー神経叢)、好酸球、形質細胞、リンパ球などが存在している。粘膜下組織層の柔軟性と張力抵抗性はコラーゲン線維が支えている。

B 群の標準飼育 6 ヶ月齢の線維芽細胞の核周囲には小胞体由来と考えられる大きな空胞が観察された。この核周囲の空胞は変性した細胞に出現すると考えられている<sup>22)</sup>が、加齢によっても同様の形態構造変化を生じると推察される (Fig. 1B ; Fig. 2B)。また線維芽細胞の NPC の直径 (Fig. 2B ; Fig. 3B) は A 群のコントロールである標準飼育 4 週齢の NPC の直径 (Fig. 2A ; Fig. 3A) に比べて小さくなっていた。このことは標準飼育 6 ヶ月齢マウスの線維芽細胞における NPC の直径の狭小化は老化分子でもある p53 タンパク質量が関係しているための加齢現象と推察される。また線維芽細胞の周辺にはコラーゲン線維は低密度に観察された (Fig. 2B)。このことから加齢による線維芽細胞のコラーゲンの mRNA 発現量の減少とプロコラーゲンの両端にあるプロペプチドの切断に必要なプロペプチド切断酵素の mRNA 発現量の減少が推察された。

一方で C 群の発酵産物飼育 6 ヶ月齢の線維芽細胞の所見は、A 群のコントロールである標準飼育 4 週齢の線維芽細胞の所見 (Fig. 1A ; Fig. 2A ; Fig. 3A) と同様に観察された。線維芽細胞の核周囲に空胞はなく、線維芽細胞の NPC の直径は大きく観察された (Fig. 1C ; Fig. 2C ; Fig. 3C)。このことは発酵産物飼育 6 ヶ月齢マウスの線維芽細胞における NPC の直径の狭小化の抑制は、発酵産物の抗加齢効果による p53 タンパク質量の減少のためと推察される。また線維芽細胞の周辺のコラーゲン線維は束

を形成して観察された (Fig. 2C). このことは発酵産物の抗加齢効果による線維芽細胞のコラーゲンの mRNA 発現量の減少の抑制とプロコラーゲンの両端のプロペプチドの切断に必要なプロペプチド切断酵素の mRNA 発現量の減少を抑制するためと推察される。

我が国は超高齢化社会になったが、加齢に伴い低栄養傾向を示す割合が確実に増えている。具体的には、消化器機能が障害された高齢者では低栄養が出現しやすくなり死亡率も高くなる<sup>23)</sup>。そして低栄養の高齢者では筋肉が落ちて握力や歩く力が弱くなり日常生活が不自由になりやすいこと、さらには認知機能が落ちやすく認知症になりやすいことなどがあげられる<sup>24)</sup>。良好な栄養素の摂取の良否が加齢の加速現象に大きく関与していると考えられる<sup>23)24)</sup>。このことが健康長寿の延伸に導く抗加齢効果の妨げになっていると考えられる。

栄養素は転写因子として遺伝子発現に影響を及ぼす。ヒトゲノムでは 48 におよぶ転写因子ファミリーが最も大切な栄養センサーと考えられている<sup>25)</sup>。ビタミン C はコラーゲン遺伝子を転写レベルで活性化することが報告されている<sup>26)</sup>。

発酵産物は加齢したマウス十二指腸の栄養素の消化吸収の役割を担う微絨毛の長さの短縮を抑制<sup>7)</sup>し、また栄養素を回収する有窓型毛細血管の窓幅の狭くなるのを抑制する<sup>8)</sup>ことを明らかにしてきた。このことは発酵産物に含まれる多種多様な栄養素が体内に効率良く取り込まれることを示している。

このことから発酵産物に含まれるプロリン、リジンなどのアミノ酸、ビタミン C などの多種多様な栄養素が線維芽細胞のコラーゲン mRNA の発現量の低下抑制、プロペプチド切断酵素の mRNA の発現量の低下抑制に関与し、さらに老化分子でもある p53 タンパク質の発現量の低下による NPC の直径の狭小化抑制にも関与し抗加齢効果を生じたものと推察される。

今後、発酵産物の抗加齢効果による線維芽細胞の NPC の狭小化抑制とコラーゲン線維形成の低下抑制との関連を明確にするためには p53 タンパク質量、コラーゲンの mRNA 発現量、プロペプチド切断酵素の mRNA 発現量などの測定が課題である。

## 結 論

本研究の結果から、発酵産物の継続投与は加齢した小腸の粘膜下組織層に存在する線維芽細胞における NPC の直径の狭小化の抑制およびコラーゲン線

維形成の低下を抑制することが示唆された。したがって発酵産物には健康寿命の延伸に導く抗加齢効果があることが示唆された。

開示すべき利益相反状態はない。

## 文 献

- 1) Doba N, Tokuda Y, Goldstein NE et al: A pilot trial to predict frailty syndrome: the Japanese Health Research Volunteer Study. *Exp Gerontol* **47**: 638-643, 2012
- 2) 新野直明: 平均寿命と健康寿命。「高齢者保健福祉マニュアル」(安村誠司・甲斐一郎編), pp14-16, 南山堂, 東京 (2013)
- 3) 独立行政法人国立健康・栄養研究所監修: 健康寿命の認知状況。「国民健康・栄養の現状~平成 22 年度厚生労働省国民健康・栄養研究所」, pp51, 第一出版, 東京 (2013)
- 4) 市川良治: 個体の加齢に伴う小腸上皮細胞の超微形態学的変化に関する電子顕微鏡的研究: マウス十二指腸吸収上皮細胞の高さ及び微絨毛の長さについて. *日臨電顕会誌* **23**: 1-12, 1990
- 5) Shin R, Suzuki M, Mizutani T et al: Improvement of Experimentally Induced Hepatic and Renal Disorders in Rats using Lactic Acid Bacteria-fermented Soybean extract (Biofermentics™). *Evid Based Complement Alternat Med* **6**: 357-363, 2009
- 6) 水谷武夫: 乳酸菌生産物質の主な成分。「科学的エビデンスが乳酸菌生産物質の謎を解く」(関口守衛編), pp30-35, 創英社/三省堂書店, 東京 (2012)
- 7) 阿部一彦, 西川俊郎, 大縄悟志ほか: 加齢マウス十二指腸微絨毛丈の短縮抑制能から評価した乳酸菌発酵産物 (Biofermentics™) のアンチエイジング効果. *東京女医大研紀* **29**: 134-135, 2009
- 8) 阿部一彦, 西川俊郎, 大縄悟志ほか: BALB/c マウス十二指腸有窓型毛細血管の窓幅から評価した乳酸菌発酵産物 (Biofermentics™) のアンチエイジング効果. *東京女医大研紀* **30**: 124-125, 2010
- 9) Roupe G: Skin of the aging human being. *Lakartidningen* **98**: 1091-1095, 2001
- 10) 大石祐一: 皮膚, 美容と栄養。「健康栄養学~健康科学としての栄養生理化学」(小田裕昭・加藤久典・関泰一郎編), pp139-146, 共立出版, 東京 (2005)
- 11) Mescher AL: Fibers. *In* Junqueira's Basic Histology (12th ed), pp93-99, McGraw-Hill, New York (2010)
- 12) Varela I, Cadiñanos J, Pendás AM et al: Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation. *Nature* **437**: 564-568, 2005
- 13) Feldherr CM, Akin D, Cohen RJ: Regulation of functional nuclear pore size in fibroblasts. *J Cell Sci* **114**: 4621-4627, 2001
- 14) 山羽宏行: コラーゲン線維束構築における XII 型コラーゲンの機能と加齢変化. *FRAGRANCE J* **38**: 41-46, 2010
- 15) 助川 淳: 核膜孔複合体の構造と機能. *実験医* **14**: 45-50, 1996
- 16) Rout MP, Aitchison JD: The nuclear pore complex as a transport machine. *J Biol Chem* **276**: 16593-16596, 2001

- 17) **Ross MH, Pawlina W**: Nuclear components. *In* Histology: A Text and Atlas (5th ed), pp72-80, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore (2006)
- 18) **Mescher AL**: Cells of connective tissue. *In* Junqueira's Basic Histology (12th ed), pp 86-93, McGraw-Hill, New York (2010)
- 19) **Ross MH, Pawlina W**: Connective tissue fibers. *In* Histology: A Text and Atlas (5th ed), pp149-160, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore (2006)
- 20) 村上祐子, 足立浩章, 坂井田勉ほか: 加齢にともなう III 型コラーゲン/I 型コラーゲンの比率の減少メカニズム~III 型コラーゲンプロペプチド切断酵素 meprin の加齢変化. 粧技誌 47 : 278-284, 2013
- 21) **Song H, Conte JV Jr, Foster AH et al**: Increased p53 protein expression in human failing myocardium. *J Heart Lung Transplant* 18: 744-749, 1999
- 22) 森脇昭介, 山内政之, 宇佐美孝子ほか: 細胞質内の空胞について. 日臨細胞会誌 19 : 499-505, 1980
- 23) 新開省二: 高齢者の低栄養の現状とその予防. 医事新報 (4615) : 71-77, 2012
- 24) 新開省二: 高齢期の食・栄養の重要性と食環境の整備. 老年社会科学 34 : 420-425, 2012
- 25) **Müller M, Kersten S**: Nutrigenomics: goals and strategies. *Nat Rev Genet* 4: 315-322, 2003
- 26) 畑隆一郎: 活性持続型ビタミンCによるコラーゲン遺伝子の発現制御と器官の創製.「第51回日本栄養食糧学会講演要旨集」, p 13 (1997)