

Original article

## The relation of the OPH activity in the corneum, and skin AGEs

Kaori Ishizaki, Masayuki Yagi, Yuji Morita, Chieko Sakiyama, Yoshikazu Yonei

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

Glycative Stress Research 2020; 7 (2): 162-168  
(c) Society for Glycative Stress Research

(原著論文：日本語翻訳版)

## 角層 OPH 活性と皮膚 AGEs との関連性

石崎 香、八木雅之、森田祐二、崎山智恵子、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

### 抄録

**【目的】** 本研究は糖化ストレスの皮膚に対する影響評価の観点から、角層中の酸化蛋白分解酵素 (oxidized protein hydrolase: OPH) 活性と皮膚中の糖化最終生成物 (advanced glycation end products: AGEs) との関係を検証した。

**【方法】** 試験は健康な日本人男女 124 名を対象に、右上腕内側部の角層をテープストリッピングによって採取し、角層 OPH 活性、角層 CML 量を測定した。同時に、非侵襲 AGEs 測定機を使って、右腕前腕部の皮膚 AGEs 蓄積量を測定した。本研究は「人を対象とする研究」に関する倫理審査委員会の承認のもとに実施した。

**【結果】** 被験者の年齢と角層 OPH 活性には相関関係が認められなかった。年齢と角層 CML 量には弱い負の相関関係が認められた。一方、年齢と皮膚 AGEs 蓄積量には正の相関関係が認められた。角層 OPH 活性と角層 CML 量には弱い負の相関関係が認められた。角層 OPH 活性と皮膚 AGEs 蓄積量には相関関係が認められなかったが、サブクラス解析した結果、39 歳以下の女性の被験者群において、角層 OPH 活性と皮膚 AGEs 蓄積量には正の相関関係が認められた。さらに角層 CML 量と AGEs 蓄積量には弱い正の相関関係が認められた。

**【結論】** 角層 OPH 活性の強さは角層 CML 量の減少に関与する可能性があった。皮膚 AGEs 蓄積量は加齢とともに増加したが、角層 CML 量は加齢とともに減少した。角層 OPH 活性は年齢と相関関係を示さなかった。角層 CML 量、角層 OPH 活性は、加齢変化に直接的な影響を受けない可能性が考えられた。

連絡先：教授 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  
〒610-0321 京都府京田辺市多々羅都谷 1-3  
TEL & FAX : 0774-65-6394 e-mail : myagi@mail.doshisha.ac.jp  
共著者：石崎 香 ko-sei12@mail.doshisha.ac.jp; 森田祐二 ymorita707@yahoo.co.jp;  
崎山智恵子 csakiyam@mail.doshisha.ac.jp; 米井嘉一 yyonei@mail.doshisha.ac.jp

Glycative Stress Research 2020; 7 (2): 162-168  
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:** 酸化蛋白分解酵素 (oxidized protein hydrolase : OPH)、皮膚老化、CML ( $N^{\epsilon}$ -(carboxymethyl) lysine)、糖化ストレス、糖化最終生成物 (advanced glycation end products: AGEs)

## はじめに

糖化ストレスによる糖化最終生成物 (advanced glycation end products: AGEs) の生成や蓄積は、蛋白の褐色化、架橋形成による硬化、AGEs 受容体 (receptor for AGEs) による炎症を惹起し、生体機能の低下に影響している<sup>1)</sup>。生体内でのAGEs蓄積は糖尿病合併症、アルツハイマー病、骨粗鬆症、動脈硬化等の発症や進展要因になる。AGEsの一種であるペントシジンやCML ( $N^{\epsilon}$ -(carboxymethyl) lysine) は真皮のコラーゲン線維やエラスチン線維に蓄積することが報告されている<sup>2,3)</sup>。さらにCMLは比較的ターンオーバー時間が早い表皮中のケラチンにも蓄積が認められている<sup>4)</sup>。また角層AGEs蓄積量が多い皮膚は肌のキメが喪失し、老け顔に見えるとの報告がある<sup>5)</sup>。糖化ストレスの亢進や皮膚AGEsの蓄積は肌の弾力低下<sup>6)</sup>や見た目の老化<sup>7)</sup>に関与し、皮膚老化の進行を早める要因になる。

角層は皮膚最外層に位置し、外界から生体を保護するバリア機能、保湿機能を有する<sup>8)</sup>。角層は表皮角化細胞の最終産物で、死んだ角化細胞が10~20  $\mu\text{m}$ の厚さで10~20層積み重なった構造を有する。角層は表皮ターンオーバーによる産生と最外層からの恒常的に剥離を繰り返している。このため角層は被験者に苦痛を与えることなく、粘着剤が塗布された剥離シートなどでの採取 (テープストリッピング) が容易である。テープストリッピングによる角層サンプルは、角層の形態変化<sup>9)</sup>、構成成分の変化<sup>10)</sup>、構成成分や酵素などの生化学的指標<sup>11,12)</sup>の評価に広く応用されている。

酸化蛋白分解酵素 (oxidized protein hydrolase: OPH) はブタ肝臓、ラット脳、ヒト血中などの生体組織中に存在するセリンプロテアーゼの一種である<sup>13)</sup>。OPHは蛋白のN末端アシル化アミノ酸を遊離する作用があるため、アシルペプチド分解酵素 (acylpeptide hydrolase ; APEH)<sup>14)</sup>、またはアシルアミノ酸遊離酵素 (acylamino-acid releasing enzyme ; AARE, EC 3.4.19.1)<sup>15)</sup>とも呼ばれている。近年、我々はOPHのヒト血清アルブミン-グルコース糖化反応モデル系におけるAGEs消去作用とヒト角層中にOPHが存在すること<sup>16)</sup>、OPH活性を増強させる天然物の存在<sup>17)</sup>を報告した。

本研究では糖化ストレスが皮膚に及ぼす影響を評価する観点から、健康な日本人男女を対象に、角層OPH活性と角層CMLおよび皮膚AGEs蓄積量を測定し、これらの関連性を検証した。

## 方法

### 被験者

本試験は20歳以上100歳未満の健康な男女を対象とした。被験者は同志社大学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の研究に関係する人で、予め開催した本試験に関する試験説明会に参加し、本試験の参加を文書で同意した人とした。被験者は本試験内容を理解し、試験への参加を文書で同意した124名とした。

### 角層の採取

角層は被験者の右上腕内側部から角層剥離用シート (角層チェッカー AST-01、アッシュジャパン、東京都千代田区) を用いて採取した。角層は1人の被験者に対してシート3枚を用いて採取した。角層は1枚目のシートを皮膚に貼付した時に貼付位置をマークし、1枚目を剥離後、2枚目と3枚目を使って同一箇所から合計3回採取した。角層蛋白量、角層CML量、角層OPH活性の測定には2枚目と3枚目の剥離シートを使用した (1枚目は測定に不使用)。

### 角層剥離用シートからの角層蛋白抽出

蛋白抽出液は0.1% Triton-X100を含む50 mol/L Tris-HCl緩衝 (pH 7.4) 1.5 mLを使用した。角層蛋白は、採取した2枚目と3枚目のシート (合計2枚) を前記蛋白抽出液1.5 mLが入ったサンプル瓶に入れ、超音波洗浄器内で超音波処理によって抽出した。超音波処理は3分間、30秒間隔を空けて3回繰り返し行った。得られた抽出液のうち360  $\mu\text{L}$ はOPH活性測定用として回収した (抽出液A)。残った抽出液は、引き続き5分間の超音波処理を30秒間隔で4回繰り返し行った。抽出液はその後、限外ろ過フィルター (Amicon Ultra Ultracel-3K; Merk, Darmstadt, Germany) を使用し、50 mol/L Tris-HCl pH 7.2に置換後、8倍に濃縮した (抽出液B)。

### 角層抽出液の蛋白濃度測定

抽出液の蛋白濃度の測定はDC Protein Assay (Bio-rad, CA, USA) を使用した。

### 角層抽出液中のOPH活性測定

角層OPH活性の測定には前記抽出液Aを使用した。OPHの酵素质質は、*N*-acetyl-L-alanine *p*-nitroanilide

(AAPA)を使用した。OPH活性は0.25 mol/L Tris-HCl (pH 7.4) 100  $\mu$ L、抽出液A 130  $\mu$ L、25 mmol/L AAPAを20  $\mu$ Lを混合した後、37°Cで24時間反応させ、OPHがAAPAを分解して遊離した *p*-nitroaniline (*p*-NA)量を405 nmで吸光度測定した。OPH活性は37°Cで1時間にAAPAから遊離する *p*-NA濃度 (mol/L)を1ユニット(U)と定義した。角層OPH活性は抽出液Aによって反応液中に遊離した *p*-NA量を、抽出液Aの蛋白濃度 (mg/mL)で除し、蛋白1 mgあたりのOPH活性値として算出した (U/mg)。

$$\text{角層OPH活性 (U/mg)} = (S_{24} - S_0) / 24 / P$$

S: 試料抽出液 *p*-NA濃度 (mol/L)

P: 試料抽出液の蛋白濃度 (mg/mL)

24: 24時間

0: 反応直後 (0時間)

### 角層CML量の測定

角層抽出液のCML量測定には前記抽出液Bを使用した。CML濃度はCircuLex CML/N<sup>e</sup>-(Carboxymethyl) lysine ELISA Kit (MBL、愛知県名古屋市)を使用して測定した。角層CML量は抽出液BのCML濃度を、抽出液Bの蛋白濃度で除し、蛋白1 mgあたりのCML量を算出した ( $\mu$ g/mg)。

### 皮膚中AGEs蓄積量の測定

皮膚中AGEs蓄積量の測定にはAGE Reader mu (DiagnOptics, Groningen, Nederland)を使用した。測定部位は右前腕とした。

### 統計解析

角層OPH活性、角層CML活性は平均値  $\pm$  標準偏差で示した。解析結果の検定は統計解析ソフトBellCurve for Excel (社会情報サービス、東京都新宿区)を使用した。相関性の解析はピアソンの積率相関係数を用いて評価した。相関性は $0.4 < |r| \leq 1.0$ を相関性あり、 $0.2 < |r| \leq 0.4$ を弱い相関性ありとした。解析結果は危険率 (p value) 5%未満を有意とした。

### 倫理基準

本研究はヘルシンキ宣言 (2013年WMAフォルタレザ総会で修正) および人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (文部科学省、厚生労働省告示)を遵守して実施した。角層の採取および皮膚AGE蓄積量の測定については事前に被験者に対して試験内容を十分に説明し、本人が試験の参加を希望し、自主的な同意書の提出を受けて実施した。本研究は同志社大学 (申請番号: 180003)、一般社団法人糖化ストレス研究会 (承認番号: 糖ス倫 2018第003号)の「人を対象とする研究」に関する倫理審査委員会の審議・承認のもとに実施した。

## 結果

### 被験者

本試験の被験者は124名 (男性32名、女性92名)であった。被験者の年齢と人数は、20歳代14名 (女性)、30歳代21名 (男性2名、女性19名)、40歳代28名 (男性2名、女性26名)、50歳代15名 (男性7名、女性8名)、60歳代10名 (男性4名、女性6名)、70歳代17名 (男性7名、女性10名)、80歳代18名 (男性10名、女性8名)、90歳代1名 (女性)で、平均年齢が $57.6 \pm 17.8$ 歳 (平均値  $\pm$  標準偏差)であった。

### 年齢と角層OPH活性、角層CML量および皮膚AGEs蓄積量の関係

被験者の年齢と角層OPH活性には相関関係が認められなかった (Fig. 1-a)。年齢と角層CML量には弱い負の相関関係 ( $y = -0.075x + 12.062$ ,  $r = -0.250$ ,  $p < 0.05$ )が認められた (Fig. 1-b)。一方、年齢と皮膚AGEs蓄積量には正の相関関係 ( $y = 0.0165x + 1.4514$ ,  $r = 0.587$ ,  $p < 0.05$ )が認められた (Fig. 1-c)。

角層OPH活性と角層CML量には弱い負の相関関係 ( $y = -0.0023x + 0.1122$ ,  $r = -0.242$ ,  $p < 0.05$ )が認められた (Fig. 2)。角層OPH活性と皮膚AGEs蓄積量には相関関係が認められなかった (Fig. 3)。角層CML蓄積量と皮膚AGEs蓄積量には弱い負の相関関係 ( $y = -2.9209x + 14.8392$ ,  $r = -0.273$ ,  $p < 0.05$ )が認められた (Fig. 4)。

### サブクラス解析

被験者を年齢 (39歳以下/40歳以上)、性別 (男/女)、に群分けして、角層OPH活性、角層CML量および皮膚AGEs蓄積量の相関性を解析した。

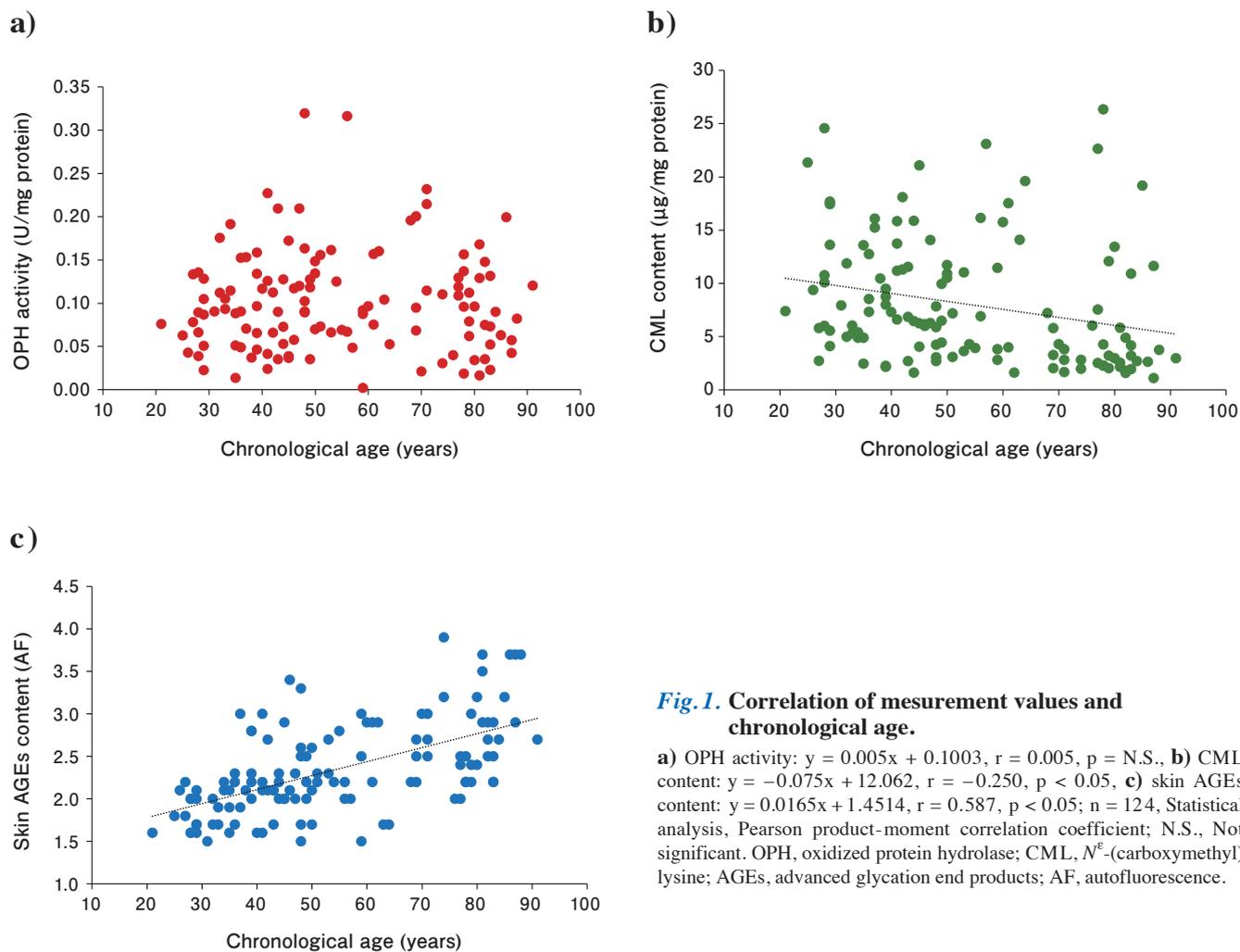
年齢が39歳以下の女性の被験者群において、角層OPH活性と皮膚AGEs蓄積量には正の相関関係が認められた ( $y = 0.0406x + 0.0096$ ,  $r = 0.362$ ,  $n = 33$ ,  $p < 0.05$ )。この他の群間には相関関係が認められなかった。

## 考察

### 加齢と角層OPH活性、角層CML量、皮膚AGEs蓄積量の関係

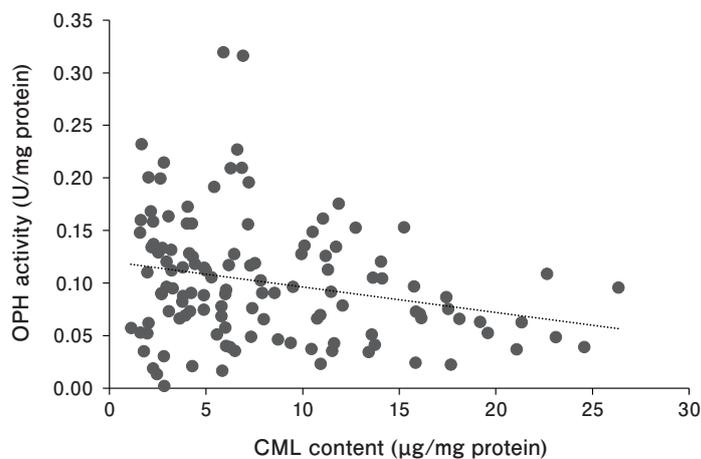
本試験結果では被験者の年齢と皮膚AGEs蓄積量に正の相関関係が認められた。

20~80歳代の健康な男女58名を対象に、種々の非侵襲AGEs測定機を使用して皮膚AGEs蓄積量を前腕部または上腕部で測定した先の研究結果では、被験者の年齢と正の相関性が認められている<sup>18)</sup>。この他にも前腕部や上腕部の皮膚で測定されたAGEs蓄積量は加齢とともに増加することが様々な調査結果で報告されている<sup>19-21)</sup>。本試験結果



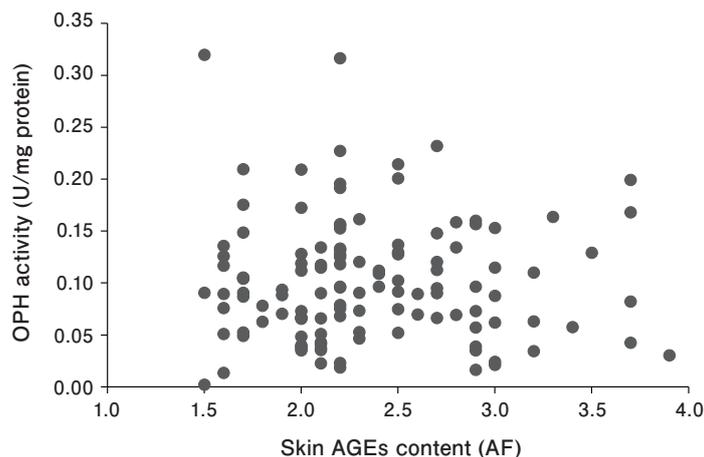
**Fig.1. Correlation of measurement values and chronological age.**

**a)** OPH activity:  $y = 0.005x + 0.1003$ ,  $r = 0.005$ ,  $p = \text{N.S.}$ , **b)** CML content:  $y = -0.075x + 12.062$ ,  $r = -0.250$ ,  $p < 0.05$ , **c)** skin AGEs content:  $y = 0.0165x + 1.4514$ ,  $r = 0.587$ ,  $p < 0.05$ ;  $n = 124$ , Statistical analysis, Pearson product-moment correlation coefficient; N.S., Not significant. OPH, oxidized protein hydrolase; CML,  $N^{\epsilon}$ -(carboxymethyl) lysine; AGEs, advanced glycation end products; AF, autofluorescence.



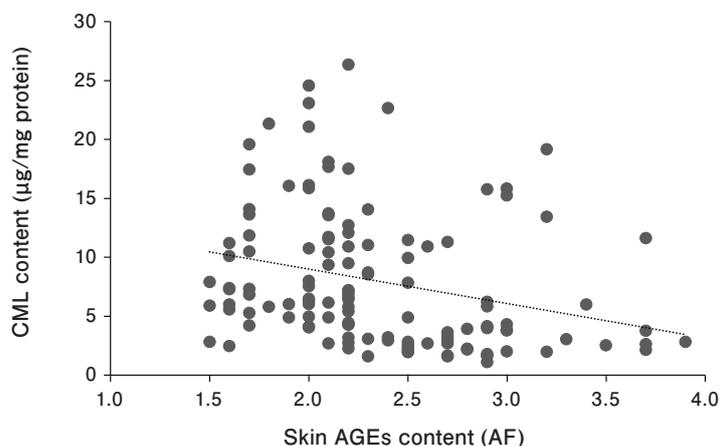
**Fig.2. Correlation of OPH activity and CML content.**

Correlation,  $y = -0.0023x + 0.1122$ ,  $r = -0.242$ ,  $p < 0.05$ ,  $n = 124$ ; Statistical analysis, Pearson product-moment correlation coefficient. OPH, oxidized protein hydrolase; CML,  $N^{\epsilon}$ -(carboxymethyl) lysine.



**Fig.3. Correlation of OPH activity and skin AGEs content.**

Correlation,  $y = -0.0019x + 0.1056$ ,  $r = -0.018$ ,  $p = \text{N.S.}$ ,  $n = 124$ ; Statistical analysis, Pearson product-moment correlation coefficient; N.S., Not significant. OPH, oxidized protein hydrolase; AGEs, advanced glycation end products; AF, autofluorescence.



**Fig.4. Correlation of CML content and skin AGEs content.**

Correlation,  $y = -2.9209x + 14.8392$ ,  $r = -0.273$ ,  $p < 0.05$ ,  $n = 124$ ; Statistical analysis, Pearson product-moment correlation coefficient. CML, *N*<sup>ε</sup>-(carboxymethyl) lysine; AGEs, advanced glycation end products; AF, autofluorescence.

からも皮膚AGEs蓄積量には被験者の加齢変化が関与したと考えられた。

また、年齢と角層CML量には弱い負の相関関係が認められ、年齢と角層OPH活性には相関関係が認められなかった。

20～70歳代の健康な女性52名を対象に、本試験と同様の方法で角層CML量とOPH活性を測定した結果、被験者の年齢と角層CML量は正の相関関係、角層OPH活性とは負の相関関係を示し、本試験と異なる結果が得られた<sup>16)</sup>。CMLは脂質の酸化や生体の酸化ストレスによっても生成する<sup>22)</sup>。本試験の角層CML測定量は加齢以外の因子に影響を受けた可能性が考えられた。OPH活性の加齢変化に関して男女を対象として行われた調査報告はない。角層中に存在するセリンプロテアーゼ (serine protease) にはトリプシン様酵素 (trypsin-like serine protease) であるstratum corneum tryptic enzyme (SCTE)、kallikrein-related peptidase (KLK)-5、キモトリプシン様酵素

(chymotrypsin-like serine protease)であるstratum corneum chymotryptic enzyme (SCCE)、KLK-7が報告されている<sup>11, 12)</sup>。SCTEは加齢によって低下するが、KLK5とKLK7は加齢変化しない<sup>23)</sup>。角層剥離に関与するカテプシンD (cathepsin D) やアポトーシスに関与するCaspaseは、加齢の関係が明確になっていない。OPHの加齢変化に対する関与については、さらなる検証が必要である。本試験の結果から、加齢は角層CML量、角層OPH活性に直接的な影響を及ぼす因子ではない可能性が示唆された。

#### 角層OPH活性、角層CML量および皮膚AGEs蓄積量の関係

本試験では角層OPH活性と角層CML量に弱い負の相関関係が認められた。本結果は既報<sup>16)</sup>の結果と一致した。ヒト血清アルブミン-グルコース糖化反応液中にOPHを添加して反応させた報告では、OPHがCMLを減少させる可能性が示されている<sup>16)</sup>。このため角層OPH活性の低下は

角層CML量の増加に関与している可能性が示唆される。

角層OPH活性と皮膚AGEs蓄積量には相関関係が認められなかった。しかし、39歳以下の女性被験者において、角層OPH活性は皮膚AGEs蓄積量と正の相関関係を示した(サブクラス解析)。皮膚AGEs測定機で測定されるAGEs蓄積量は蛍光性を有する<sup>24)</sup>がCMLは非蛍光性AGEsの一種である<sup>25)</sup>。角層OPH活性と角層CMLまたは皮膚AGEs蓄積量との関係には、OPHに対するAGEsの種類や特性が関与する可能性がある。蛍光性を有するAGEs、CML共に糖化反応の最終産物ではあるが、構造も物性も異なる。このためOPHの反応特異性や基質特異性がそれらをどの程度許容できるかについては、さらなる検討が必要である。同様に角層CML量と皮膚AGEs蓄積量が負の相関関係を示した結果についても、AGEsの物性や測定方法の違いが影響を及ぼした可能性は否定できない。しかし角層CML量は皮膚AGEs蓄積量の測定値と異なる意義の糖化ストレス状態を反映する可能性も考えられる。

### 角層OPH活性と糖化ストレス

本試験では糖化ストレスの皮膚に対する影響評価の観点から、角層OPH活性と角層CMLおよび皮膚AGEs蓄積量の関連性を検証した。糖化ストレスによるAGEsの生成蓄積は皮膚老化の進展要因になる<sup>5-7)</sup>。皮膚でのAGEs蓄積は褐色化、無秩序な蛋白架橋形成による弾力性の低下、組織蛋白の機能低下をもたらす。例えば、糖化ストレスが強い状態にある糖尿病患者の皮膚コラーゲン中にはペントシジンやCMLの蓄積が非糖尿病患者よりも多い<sup>2)</sup>。2型糖尿病患者の皮膚弾力は非糖尿病患者と比べて低下している<sup>6)</sup>。さらに蛋白のカルボニル化は皮膚の黄色化に関与することが報告されている<sup>26)</sup>。皮膚の糖化ストレスを評価する方法には、非侵襲AGEs測定機による皮膚中AGEs蓄積量の測定<sup>18)</sup>、テープストリップ法による角層CMLの測定<sup>27)</sup>などがある。皮膚に対する糖化ストレスの影響評価は、皮膚中AGEs蓄積量、角層CML量がマーカーになり得る。

角層は皮膚の最外層に位置し、主にバリア機能と保湿機能を有し、見た目(外観)に関与する。角層は死んだ細胞で構成されるが、蛋白分解、脂質代謝、蛋白修飾、抗酸化に関与する酵素が存在する。これらの酵素は皮膚のターンオーバー、保湿機能、バリア機能の維持に関与している。表皮上層から角層にはブレオマイシン水分解酵素(bleomycin hydrolase: BH)が多く存在する<sup>28)</sup>。BHは分子量4.5万のアミノペプチダーゼの一種でフィラグリン(filaggrin)が分解されたペプチドのN末端をさらに分解し、アミノ酸を遊離する酵素である。BHの作用によって遊離したアミノ酸は天然保湿因子(natural moisturizing factor: NMF)として機能する。このため角層BH活性が高値な皮膚はバリア機能を良好な状態を維持することができる。皮膚のバリア機能は加齢、紫外線の暴露、ターンオーバーの乱れなどによって低下する。乾燥を感じている女性はBHの発現が低いことが示唆されている<sup>29)</sup>。角層に存在する酵素の作用はBHと同様に被験者の加齢変化だけでな

く、生活習慣も影響していると考えられる。

本試験では被験者の年齢と皮膚AGEs蓄積量は正の相関関係を示した。この結果は既報<sup>18-21)</sup>と同様に糖化ストレスと皮膚AGEs蓄積量が強く関係していることを示している。一方、本試験では被験者の年齢と角層OPH活性に相関関係が認められなかった。さらに年齢と角層CML量には弱い負の相関が認められ、既報<sup>16)</sup>の結果と異なった。しかし角層OPH活性と角層CML量は既報と同様に負の相関が認められた。また、サブクラス解析の結果、39歳以下の女性の被験者において、角層OPH活性と皮膚AGEs蓄積量との間に正の相関関係が観察された。その一方で、年齢とは有意な相関は認められなかった。以上のことから、角層OPHは、年齢よりも糖化ストレスによって生じるAGEs量との関連が強い可能性が示唆された。角層AGEs量の増加は肌のキメ喪失に関与する<sup>5)</sup>。よって角層OPHは角層中のAGEsに作用して、糖化ストレスによる皮膚表面状態の変化に歯止めをかける役割を担っている可能性が考えられた。

### 研究限界

OPHは翻訳後修飾を受けた蛋白のN末端アミノ酸の遊離作用に関する報告が多数ある。しかし糖化ストレスによるAGEs化蛋白を分解する酵素として検証した報告は殆どなく、皮膚におけるAGEs分解酵素の存在や意義は十分解明されていない。本試験では既報<sup>16)</sup>と異なる被験者群で、既報と同様の結果(OPH活性とCML量の相関性)と異なる結果(OPH活性と年齢の相関性)が得られた。今後はさまざま被験者を対象として角層OPH活性と糖化ストレスの関係の検証を進める必要がある。

### 結論

OPH活性が強いほど角層CML量は減少し、皮膚においてOPHは糖化ストレスに対し防衛的に働いている可能性が示唆された。OPH活性と皮膚蛍光性AGEs蓄積量との関連性は認められなかったが、多種多様なAGEsとOPHの反応特異性や基質特異性については殆ど明らかになっておらず、今後の検証が必要である。

### 謝辞

本研究の一部は、第19回糖化ストレス研究会(2019年8月31日、京都)にて発表した。

### 利益相反申告

本研究で使用した皮膚AGEs測定機器は、AGE Reader muをセリスタ株式会社(東京都千代田区)から貸与を受けた。

## 参考文献

- 1) Ichihashi M, Yagi M, Nomoto K, et al. Glycation stress and photo-aging in skin. *Anti-Aging Med.* 2011; 8: 23-29.
- 2) Dyer DG, Dunn JA, Thorpe SR, et al. Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *J Clin Invest.* 1993; 91: 2463-2469.
- 3) 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 Clin Invest.* 1997; 108: 797-802.
- 4) Kawabata K, Yoshikawa H, Saruwatari K, et al. The presence of N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl) lysine in the human epidermis. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1814: 1246-1252.
- 5) 五味貴優. 角層のAGEs評価法とその応用. *Bio Industry.* 2011; 28: 20-26.
- 6) 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.
- 7) 山岸昌一, 松井孝憲, 上家明美, 他. 皮膚AGEs値は見た目年齢と相関する. *Pharma Medica.* 2015; 33: 91-95.
- 8) Benítez JM, Montáns FJ. The mechanical behavior of skin: Structures and models for the finite element analysis. *Computers and Structures.* 2017; 190: 75-107.
- 9) Bashir SJ, Chew AL, Anigbogu A, et al. Physical and physiological effects of stratum corneum tape stripping. *Skin Res Technol.* 2001; 7: 40-48.
- 10) Rogers J, Harding C, Mayo A, et al. Stratum corneum lipids: the effect of ageing and the seasons. *Arch Dermatol Res.* 1996; 288: 765-770.
- 11) Suzuki Y, Koyama J, Moro O, et al. The role of two endogenous proteases of the stratum corneum in degradation of desmoglein-1 and their reduced activity in the skin of ichthyotic patients. *Br J Dermatol.* 1996; 134: 460-464.
- 12) Caubet C, Jonca N, Brattsand M, et al. Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7. *J Invest Dermatol.* 2004; 122: 1235-1244.
- 13) Miyagi M, Sakiyama F, Kato I, et al. Complete covalent structure of porcine liver acylamino acid-releasing enzyme and identification of its active site serine residue. *J Biochem.* 1995; 118: 771-779.
- 14) Tsunasawa S, Imanaka T, Nakazawa T. Apparent dipeptidyl peptidase activities of acylamino acid-releasing enzymes. *J Biochem.* 1983; 93: 1217-1220.
- 15) Kobayashi K, Smith JA. Acyl-peptide hydrolase from rat liver. Characterization of enzyme reaction. *J Biol Chem.* 1987; 262: 11435-11445.
- 16) Yagi M, Ishigami M, Mori R, et al. Reduction effect of oxidized protein hydrolase (OPH) on advanced glycation end products and OPH-like activity in human stratum corneum. *Glycative Stress Res.* 2017; 4: 184-191.
- 17) Ishizaki K, Yagi M, Sakiyama C, et al. Influence on the oxidized protein hydrolase (OPH) activity of herbal tea extract. *Glycative Stress Res.* 2020; 7: 22-28.
- 18) Morita Y, Yagi M, Ishizaki K, et al. Evaluation of the glycative stress by non-invasive skin AGEs measurement devices. *Glycative Stress Res.* 2019; 6: 92-102.
- 19) Meerwaldt R, Graaff R, Oomen PH, et al. Simple non-invasive assessment of advanced glycation endproduct accumulation. *Diabetologia.* 2004; 47: 1324-1330.
- 20) 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.
- 21) Yamagishi S, Fukami K, Matsui T. Evaluation of tissue accumulation levels of advanced glycation end products by skin autofluorescence: A novel marker of vascular complications in high-risk patients for cardiovascular disease. *Int J Cardiol.* 2015; 185: 263-268.
- 22) Fu MX, Requena JR, Jenkins AJ, et al. The advanced glycation end product, Nεpsilon-(carboxymethyl) lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions. *J Biol Chem.* 1996; 271: 9982-9986.
- 23) Komatsu N, Saijoh K, Sidiropoulos M, et al. Quantification of human tissue kallikreins in the stratum corneum: dependence on age and gender. *J Invest Dermatol.* 2005; 125: 1182-1189.
- 24) Meerwaldt R, Graaff R, Oomen PHN, et al. Simple non-invasive assessment of advanced glycation endproduct accumulation. *Diabetologia.* 2004; 47: 1324-1330.
- 25) Ahmed MU, Thorpe SR, Baynes JW. Identification of N εpsilon-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycosylated protein. *J Biol Chem.* 1986; 261: 4889-4894.
- 26) Ogura Y, Kuwahara T, Akiyama M, et al. Dermal carbonyl modification is related to the yellowish color change of photo-aged Japanese facial skin. *J Dermatol Sci.* 2011; 64: 45-52.
- 27) Kamitani Y, Yagi M, Nomoto K, et al. Non-invasive collection of stratum corneum samples by a tape-stripping technique. *Anti-Aging Med.* 2013; 10: 55-59.
- 28) Kamata Y, Taniguchi A, Yamamoto M, et al. Neutral cysteine protease bleomycin hydrolase is essential for the breakdown of deaminated filaggrin into amino acids. *J Biol Chem.* 2009; 284: 12829-12836.
- 29) Son ED, Kim Y, Joo KM, et al. Skin dryness in apparently healthy human skin is associated with decreased expression of bleomycin hydrolase in the stratum corneum. *Clin Exp Dermatol.* 2015; 40: 247-253.