

Original article

Evaluation of the effects of mixed herb extract on skin based on anti-glycation effect: A randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study

Naoki Matsuo¹⁾, Eiji Yuasa¹⁾, Hiroshige Kawai¹⁾,
 Kaori Ishizaki²⁾, Masayuki Yagi²⁾, Sumio Kondo³⁾

1) Karada Lab Inc. (Arkray Group), Kyoto, Japan

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

3) Medical Corporation Kenshokai Fukushima Healthcare Center, Osaka, Japan

Glycative Stress Research 2021; 8 (2): 98-109

(c) Society for Glycative Stress Research

(原著論文：日本語翻訳版)

抗糖化作用に着目した混合ハーブエキスの摂取による美肌作用の評価： ランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験

松尾直紀¹⁾、湯浅英司¹⁾、河合博成¹⁾、石崎 香²⁾、八木雅之²⁾、近藤澄夫³⁾

1) 有限会社からだサポート研究所（アークレイグループ）

2) 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

3) 医療法人健昌会 福島健康管理センター

抄録

【目的】糖化ストレス対策のひとつに、蓄積した糖化最終生成物（AGEs）の分解および代謝促進する方法がある。我々のグループはAGEsによる架橋を直接的に切断する作用や糖化修飾を受けた蛋白質の分解に関与する酸化蛋白質分解酵素（OPH）の活性を増強する作用を指標として多数の植物よりスクリーニングを実施して、両作用を併せもつ *Trigonella foenum-graecum*（フェヌグreek、種子）、*Foeniculum vulgare*（フェネル、種子）および *Hibiscus sabdariffa*（ハイビスカス、萼・苞）を見出した。さらに、これら3種類のハーブから成る混合ハーブエキス（MHE）は、先行研究の100 mg/日（低用量群）と300 mg/日（高用量群）の2群での探索的臨床試験において種々の抗糖化作用や生理機能が報告されている。そこで本研究では、先行研究における低用量群と同量のMHE 100 mg/日でランダム化プラセボ対照比較試験を実施して、抗糖化作用および肌に及ぼす影響について検証した。

連絡先：松尾直紀

有限会社からだサポート研究所（アークレイグループ）

〒602-0008 京都市上京区岩栖町59 擁翠園内

TEL: 050-5830-1040 FAX: 075-431-1253 e-mail: matsuo.hv@arkray.co.jp

共著者：湯浅英司 yuasa.al@arkray.co.jp; 河合博成 kawaih@arkray.co.jp;

石崎 香 ko-sei12@mail.doshisha.ac.jp; 八木雅之 myagi@mail.doshisha.ac.jp;

近藤澄夫 drc_shokuhin@drc-web.co.jp

Glycative Stress Research 2021; 8 (2): 98-109
 本論文を引用する際はここらを引用してください。
 (c) Society for Glycative Stress Research

【方法】対象は皮膚AGEs沈着量（AGE Reader muによる測定）が多い40歳以上65歳未満の日本人女性40名（MHE群：20名、プラセボ群：20名）とした。被験食はMHEとして1日100 mgでソフトカプセル形状の食品を用い摂取期間12週間にて、摂取前、摂取6週後、12週後に血液・尿検査、皮膚関連検査、理学検査、身体計測および問診を実施した。なお本試験は倫理審査委員会の承認を経て行われた（UMIN試験ID：UMIN000037855）。

【結果】試験中4名が辞退し、1名が解析除外基準に抵触したため解析対象者はMHE群19名、プラセボ群16名となった。主要評価項目のペントシジンは四分位範囲で外れ値と判定した1名を除き、解析対象者の平均値未満となったMHE群10名、プラセボ群6名のサブグループ解析で、MHE群のみ摂取前と比較して摂取12週後で有意に低下して、群間でもプラセボ群に対して有意な低下が認められた。カルボキシメチルリジン（CML）四分位範囲で外れ値と判定した1名を除き、さらにBMIが22.0以上のMHE群7名、プラセボ群5名のサブグループ解析で、MHE群のみ摂取前と比較して摂取12週後で低下の有意傾向が示された。VISIAによる画像解析による全例の結果において、シワの項目でMHE群のみ摂取前後で有意に低下し、群間でもプラセボ群に対して低下の有意傾向を示した。また、副次評価項目のキメ・色ムラ、褐色シミの項目でMHE群に改善効果が認められた。

【結論】MHE摂取により糖化関連項目および皮膚のシワ、キメ・色ムラ、褐色シミの改善が認められた。これらの作用には、MHEのAGEsによる架橋切断作用とOPH活性増強作用が寄与した可能性が考えられた。

KEY WORDS: 混合ハーブエキス、抗糖化、糖化最終生成物（advanced glycation end products: AGEs）、架橋切断、酸化蛋白質分解酵素（oxidized protein hydrolase: OPH）

はじめに

1912年、L. C. Maillard はアミノ酸と糖との非酵素的化学反応によって褐色物質が生成されることを報告した¹⁾。この褐変反応は発見者の名をとってメイラード反応と呼ばれている。この反応は古くは食品分野において加熱中に起こる褐変、風味の変化などの原因のひとつとして研究されてきたが、後にこの反応が生体内でも起こっていることが明らかとなった。初めに生体内メイラード反応として注目されたヘモグロビンの反応生成物であるヘモグロビンA1c（HbA1c）は、血糖コントロールの指標として臨床応用されている。現在は生体内で起こるメイラード反応は糖化と呼ばれるようになり、糖化反応が進行して最終的に生成する物質はAGEs（advanced glycation end products：糖化最終生成物）と呼ばれて、これまでに数十種類以上の構造体が報告されている²⁾。

加齢や代謝異常によるAGEsならびに糖化反応中間体の蓄積は、糖尿病合併症や動脈硬化症など様々な疾病に関与すると考えられている^{3,4)}。これらAGEsやその反応中間体による生体へのストレスは「糖化ストレス」と呼ばれ、老化危険因子のひとつに位置付けられている⁵⁾。糖化ストレスの対策として、食後高血糖の抑制、糖化反応の抑制、生成したAGEsの分解・排泄などがあり、近年それらを目的とする抗糖化素材が研究開発されている。これまでの抗糖化素材の大半はAGEsの生成を阻害するものであり、植物エキス（ドクダミ、セイヨウサンザシ、ローマカミツレ、

ブドウ葉）⁶⁾ やマンゴスチン⁷⁾ などで確認されている。一方で、AGEsを分解したり、AGEsによる架橋を切断したりするような作用はザクロ⁸⁾ やヒシ⁹⁾ などで確認されている。また、糖化修飾を受けた蛋白質の分解に関与する酵素であるOPH（oxidized protein hydrolase：酸化蛋白質分解酵素）の活性を増強する作用が植物エキス¹⁰⁾ で報告されている。これらAGEs架橋の切断および代謝促進に着目した抗糖化素材に関する報告は少なく、両作用を併せもつ素材の報告はごくわずかである。

我々は、AGEsの分解に着目してAGEs架橋の切断作用とOPHの活性増強作用を指標として、多数の植物よりスクリーニングを実施して、ともに高い効果を示した植物として *Trigonella foenum-graecum*（フェヌグreek、種子）、*Foeniculum vulgare*（フェネル、種子）および *Hibiscus sabdariffa*（ハイビスカス、萼・苞）を見出した¹¹⁾。さらに、これらフェヌグreek、フェネル、ハイビスカスから成る混合ハーブエキス（mixed herb extract：MHE）を、1日摂取量100 mgの低用量群と300 mgの高用量群の2群に分けた探索的臨床試験を実施した¹²⁾。試験は皮膚AGEs沈着量の多い年齢40歳以上65歳未満の女性を対象としてMHEを12週間連続摂取した結果、低用量群、高用量群ともに摂取前に比べてAGEsの一種であるペントシジンで有意な低下が認められた。また両群において糖代謝関連（空腹時血糖）が改善し、さらに高用量群のみで肝機能関連

(AST、ALT、 γ -GTP)の改善が認められた。

そこで本研究では、糖化ストレスを低減させるMHE摂取の効果の詳細を検証するため、MHEを1日100 mg、12週間摂取し、抗糖化作用および各種皮膚検査、ならびに各種臨床検査を行うランダム化比較試験を実施した。

方法

対象

対象は株式会社TTCが公募した有償ボランティア80名の40歳以上65歳未満の日本人女性をスクリーニングして本試験被験者を選抜し、ランダム化比較試験を実施した。被験者はスクリーニング検査を実施して、除外基準に当てはまらず選択基準に適合した応募者のうち、皮膚AGEs沈着量(AGE Reader muによる測定)が多い上位40名を選抜した。除外基準として、1)喫煙習慣のある者、2)飲酒を週4回以上行う習慣がある者、3)平均睡眠時間が5時間未満の者、4)抗糖化食品および抗糖化化粧品を常用している者、など32項目を設定した。また、試験期間中は、日常範囲を大きく逸脱する過度な運動、節食や過食を制限し、睡眠、入浴等の生活習慣も極力変えず、規則的な生活を維持する、など11項目の制限事項を設けて被験者に順守させた。

試験食品

試験食品は混合ハーブエキス(商品名:サトナシール)(有限会社からだサポート研究所、京都府京都市)を含有するMHE食品ならびにプラセボ食品の2種類とし、これらは風味、色等で識別できないように被膜を着色したソフトカプセルの形状とした。また、ソフトカプセル1粒がMHEとして100 mgとなるよう設計し、1日摂取量はソフトカプセル1粒とした。試験食品の組成および栄養成分をそれぞれTable 1、Table 2に示した。

Table 1. Test food composition
(Compounded amount: mg/capsule)

	MHE food	Placebo food
Safflower oil	169	159
MHE (Satonaceil)	100	—
Dextrin	—	100
Gelatin	113	113
Glycerine	45	45
Beeswax	14	14
Glycerine fatty acid ester	14	15
Caramel color	7	10
Soybean lecithin	3	3
Edible fat and oil	—	6
Total	465	465

MHE (mixed herb extract).

Table 2. Test food nutritional constituents
(Administration amount per day: per capsule)

	MHE food	Placebo food
Energy (kcal)	2.78	2.78
Protein (g)	0.11	0.10
Lipid (g)	0.20	0.20
Carbohydrate (g)	0.12	0.15
Sodium (mg)	0.36	0.03

MHE (mixed herb extract).

試験デザイン

ヒト試験のデザインは、ランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験とした。割付担当者は乱数を用いて割付表を作成し、選抜された40名を無作為に各20名の2群に分けた。割付表は割付担当者が封緘し、割付表開封時まで密封保管した。被験者は12週間にわたりMHE食またはプラセボを1日1回原則として空腹時に水またはぬるま湯と共に嚥まずに摂取し、摂取前(0週)および摂取6週後、12週後の計3回、血液・尿検査、皮膚関連検査、理学検査、身体計測および問診を受けた。

被験者は検査前日に入浴をすませ夜12時までに就寝し、検査当日はシャワーおよび入浴を禁止とした。また、検査前日午後10時から当日検査終了まで水以外は絶飲食とし、来院時刻は毎回同様の時刻として検査実施の時刻が毎回同様となるように設定した(±2時間以内)。

試験期間は2019年7月から2020年1月までとし、糖化項目以外の皮膚関連検査や血圧測定および採血等をDRC株式会社評価センターおよびいきいきクリニックにて実施し、皮膚関連糖化項目の検査を株式会社エージーイー研究所(京都市下京区)が実施した。

評価項目

主要評価項目は糖化項目として、皮膚AGEs沈着量、体内AGEsおよび血液検査によってペントシジン、カルボキシメチルリジン(CML)、3-デオキシグルコソニ(3DG)、グリオキサール(GO)、メチルグリオキサール(MGO)を測定した。他に、VISIAによる皮膚の画像解析(シワ)、インスリン抵抗性指数(HOMA-IR)、肝機能項目として血液検査(AST (GOT)、ALT (GPT))を実施した。

副次評価項目は、皮膚粘弾性、皮膚の色差、VISIAによる皮膚の画像解析、糖代謝および肝機能に関する血液検査(空腹時血糖、HbA1c、インスリン、 γ -GTP)、問診(抗加齢QOL共通問診票)とした。

その他、安全性の評価のため各種臨床検査および身体計測、理学検査を実施した。各種臨床検査の項目として、総ビリルビン、直接ビリルビン、間接ビリルビン、ALP、LDH、高感度CRP、総蛋白、アルブミン、A/G比、クレアチニン、尿素窒素、尿酸、中性脂肪、遊離脂肪酸、総コレステロール、LDLコレステロール、HDLコレステロール、non HDLコレステロール、動脈硬化指数、Na、

K、Cl、Ca、Fe、血球計数（白血球数、赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、血小板数、赤血球恒数、血液像）、尿一般検査（比重、pH、ウロビリノーゲン、ビリルビン、ケトン体、蛋白、糖、潜血、白血球エステラーゼ、亜硝酸塩）を実施した。身体計測および理学検査として、身長（初回のみ）、体重、体格指数（BMI）、体脂肪率、腹囲径、ヒップ周囲径、ウエストヒップ比、血圧、脈拍数を測定した。

被験者は生活日誌に、試験食品の摂取状況や有害事象の有無および生活習慣（食事、運動、アルコール摂取等）に変化がないか等を記録した。

検査方法

自覚症状（アンケート項目）

自覚症状の評価は抗加齢QOL共通問診票¹³⁾を用いて、「身体の症状」33項目と「心の症状」21項目に分けて最も状態が良い場合を1点、最も状態が悪い場合を5点とした5段階に分けて評価した。

身体計測・理学的検査

身長、体重、血圧、脈拍数のほか、体脂肪率は生体電気インピーダンス法による体成分分析装置Inbody 720（株式会社インボディ・ジャパン、東京都江東区）を用いて測定した。

血液検査

血液検査のうち糖化関連項目であるペントシジン、CML、3DG、GO、MGOは同志社大学大学院生命医科学研究科糖化ストレス研究センター監修のもと株式会社エージーイー研究所で測定を行い、それ以外は株式会社LSIメディエンス（東京都品川区）にて実施した。

皮膚関連検査

皮膚関連検査は、肌測定部位を洗浄後、恒温恒湿室（20～22℃、50±5%）にて皮膚AGEs沈着量および体内AGEsの測定を行った。その後、20分の馴化後に同恒温恒湿室内でVISIAの撮影、皮膚粘弾性、色差を測定した。

1) 皮膚AGEs沈着量

皮膚AGEs沈着量は、AGE Reader mu（Diagnoptics Technologies B.V., Groningen, Netherlands）を用いて測定した。測定部位は前腕内側（肘頭から前腕に向かって10 cm位）とした。

2) 体内AGEs

体内AGEsはAGEsセンサ（エア・ウォーター・バイオデザイン株式会社、兵庫県神戸市）を用いた。測定部位は左手中指とした。

3) 皮膚粘弾性

皮膚粘弾性は皮膚粘弾性測定装置キュートメーター

（Cutometer）MPA580（Courage+Khazaka electronic GmbH, Cologne, Germany）を用いて測定した。測定部位は上腕内側部（肘頭から上腕に向かって10 cm位）とした。

4) 皮膚色差

皮膚色差測定は分光測色計CM-2600dおよび肌解析ソフトウェアCM-SA（コニカミノルタ株式会社、東京都港区）を用いた。測定部位は頬および上腕内側部とした。

5) 顔面皮膚の画像解析

顔面皮膚の画像解析はVISIA Evolution（Canfield Imaging Systems, Inc., NJ, USA）を用いた。

統計解析

解析はIBM SPSS Statistics 23（日本IBM株式会社、東京都中央区）を用いて実施し、結果は被験者背景因子および安全性評価項目を平均値±標準偏差で示し、それ以外は平均値±標準誤差で示した。計測項目の検定方法は、摂取前、摂取6週後、摂取12週後で測定回数が3回の場合はDunnettの多重比較検定、2回の場合は1標本t検定を用いて、摂取後各時点の値を摂取前の検査値と比較評価した。群間比較については対応のないt検定（2標本t検定）を用いた。アンケート項目の検定方法は、摂取前、摂取6週後、摂取12週後で測定回数が3回の場合はWilcoxon符号付順位検定の結果をHolmの方法で調整して摂取後各時点のスコアを事前検査と比較した。群間比較についてはMann-WhitneyのU検定を用いた。有意水準はいずれも両側検定で危険率5%未満を有意、10%未満を有意傾向ありとした。

倫理基準

本試験は、ヘルシンキ宣言に基づく倫理原則および個人情報保護法に則り、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）および人を対象とする医学系研究に関する倫理指針ガイダンス（文部科学省、厚生労働省）に遵守して実施した。また、本研究は上野クリニック倫理審査委員会（東京都台東区）へ事前に審査書類を提出し、2019年7月25日に審査され承認を受けた。被験者へのインフォームドコンセントはスクリーニング検査前に行われ、被験者は試験計画の内容を十分に理解した後、同意書を提出して自主的に試験の参加を希望した。本研究の概要はUMIN臨床試験登録システム（UMIN-CTR）に登録された（UMIN試験ID：UMIN000037855）。

結果

解析対象集団

Fig. 1に試験参加者の追跡フローチャートを示した。被験者募集は2019年7月から開始し、9月4日と5日にスクリー

ニング検査をした後、40名がMHE群20名とプラセボ群20名へランダムに割付けられ本試験に参加した。その後、1名が転倒による怪我のため手術および長期間のリハビリを行うこととなり自らの意思で試験を中止し、1名が妊娠のため辞退した。また、1名が緑内障の疑いのため試験期間中に治療を開始して本試験を辞退し、1名が仕事の都合

で来院できなくなり辞退した。以上4名の脱落者を除き、さらに1名が試験食品の摂取率が80%を下回っており、制限事項も遵守できていなかったため解析対象から除外した。したがって、MHE群19名、プラセボ群16名の計35名を解析対象者とした。これら被験者の背景はTable 3に示した。

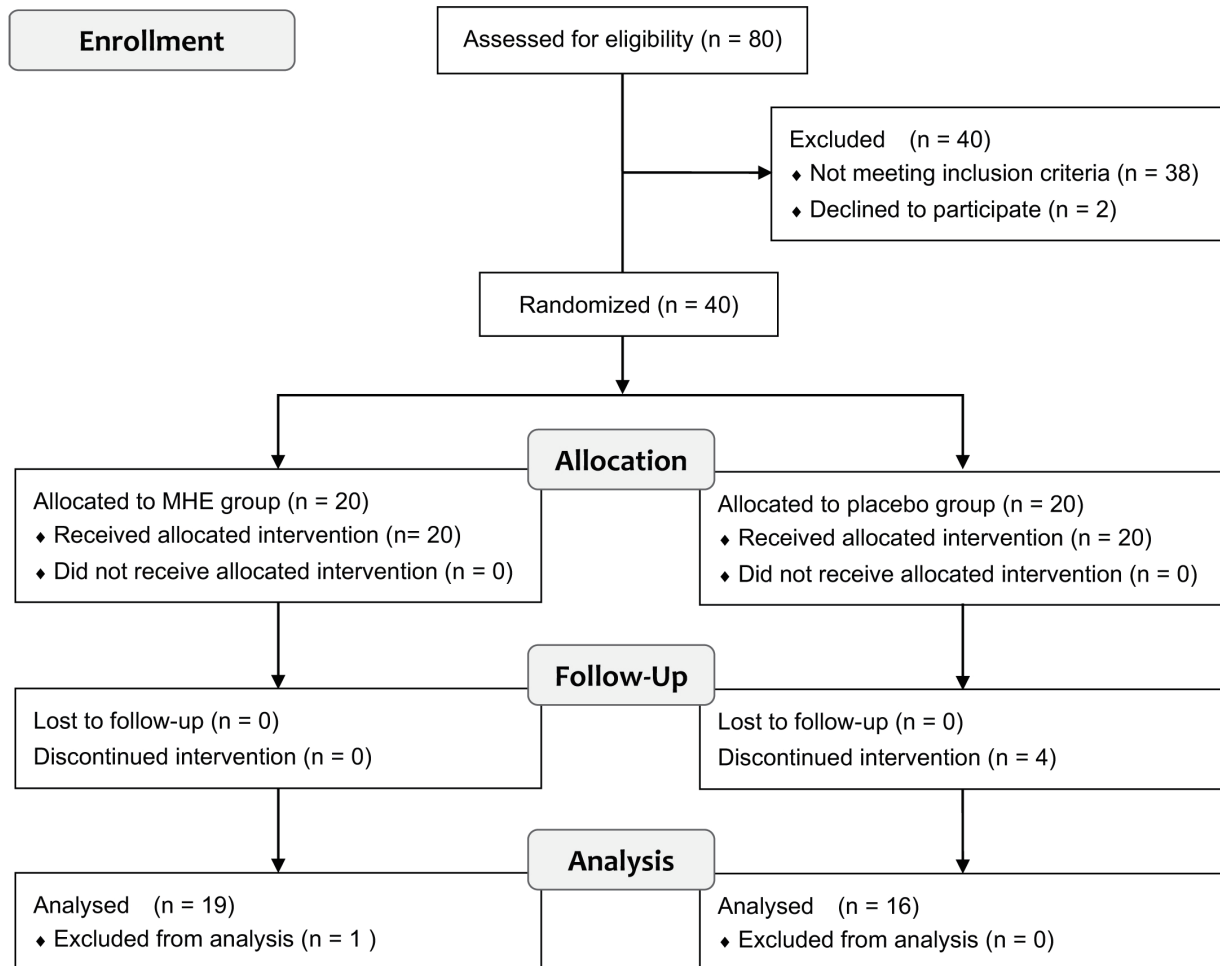


Fig.1. Tracking flow diagram for trial subjects.

MHE (mixed herb extract).

Table 3. Baseline demographic and clinical characteristics

	Unit	All subjects	MHE group	Placebo group	p-value
Target size		35	19	16	(t-test)
Age	years of age	50.6 ± 6.5	50.1 ± 6.2	51.3 ± 7.0	0.577
Height	cm	157.6 ± 5.1	157.5 ± 5.4	157.7 ± 4.8	0.893
Weight	kg	53.7 ± 9.6	54.7 ± 9.7	52.5 ± 9.5	0.491
Body fat	%	29.4 ± 6.7	29.7 ± 6.9	29.1 ± 6.5	0.815
BMI	kg/m ²	21.6 ± 3.3	22.0 ± 3.5	21.0 ± 3.0	0.371
Skin AGEs deposit level		2.22 ± 0.29	2.19 ± 0.22	2.26 ± 0.35	0.460

Measured value: mean ± standard deviation. p-value: intergroup comparison of the MHE group and the Placebo group by two-sample t-test. MHE (mixed herb extract), BMI (body mass index), AGEs (advanced glycation end products).

主要評価項目

主要評価項目の結果は [Table 4](#)、[Table 5](#) に示した。

全例では、糖化項目のうち、ペントシジンおよびCMLにおいてMHE群で摂取前から摂取12週後で有意な低下が認められた。しかしながら両項目においてプラセボ群でも有意ではないが各測定値の平均が低下しており、群間での有意な差は認められなかった。VISIAによる皮膚の画像解析の結果、顔右側のシワがMHE群で摂取前に比べ摂取12週後に有意に低下したが、プラセボ群では有意な変化は認められなかった ([Fig. 2](#))。このときのMHE

群はプラセボ群に対して低下の有意傾向がみられた ($p = 0.075$)。また、HOMA-IRが両群において有意に高くなったが、群間での有意差は認められなかった (MHE群 $p = 0.039$ 、プラセボ群 $p < 0.001$ 、群間 $p = 0.162$)。その他、主要評価項目は摂取前後および群間において有意な変化はなかった。

糖化項目において、皮膚AGEs沈着量で解析対象者の平均値以上となったMHE群7名とプラセボ群5名のサブグループを設定した。このサブグループでの皮膚AGEs

Table 4. Primary outcomes

Parameter	Unit	Reference range	Group	0W	6W	12W
Skin AGEs deposit level	AF	–	MHE	2.19 ± 0.05	2.09 ± 0.06	2.17 ± 0.06 ††
			Placebo	2.26 ± 0.09	2.21 ± 0.10 †	2.27 ± 0.09
Internal body AGEs level	AF	–	MHE	0.506 ± 0.014	0.517 ± 0.010	0.557 ± 0.022 ††
			Placebo	0.505 ± 0.014	0.523 ± 0.017 †	0.489 ± 0.020
Imaging analysis by VISIA	Skin wrinkles (right cheek)	–	MHE	0.390 ± 0.051	0.307 ± 0.045 #	0.309 ± 0.054 #
			Placebo	0.412 ± 0.069	0.424 ± 0.063	0.428 ± 0.048
Glucose metabolism	HOMA-IR	1.6 or below	MHE	0.973 ± 0.116	1.059 ± 0.104	1.161 ± 0.111 #
			Placebo	0.719 ± 0.073	0.834 ± 0.070	1.034 ± 0.067 ##
Liver function	AST (GOT)	U/L	10 - 40	MHE	18.7 ± 1.1	20.3 ± 1.3
				Placebo	18.8 ± 0.9	19.5 ± 1.1
	ALT (GPT)	U/L	5 - 45	MHE	15.3 ± 2.0	17.1 ± 2.0
				Placebo	13.1 ± 0.7	14.8 ± 1.0

Subjects: n = 19 (MHE group), n = 16 (Placebo group). † Placebo group of AGEs-related value in 8W is 15 subjects because one subject was missing their value(s). †† MHE group of AGEs-related value in 12W is 18 subjects because one subject was missing their value(s). Measurement value: mean ± standard error of the mean. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: Comparison with the Placebo group (two-sample t-test). # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$: Comparison with before administration (Dunnett's test). MHE (mixed herb extract), AGEs (advanced glycation end products), AF (autofluorescence), HOMA-IR (homeostasis model assessment for insulin resistance), AST (GOT): aspartate aminotransferase (glutamic oxaloacetic transaminase), ALT (GPT): alanine aminotransferase (glutamic-pyruvic transaminase).

Table 5. Blood AGEs-related testing

Parameter	Unit	Group	0W	12W
Pentosidine	ng/mL	MHE	8.15 ± 0.46	7.30 ± 0.49 ##
		Placebo	8.27 ± 0.60	7.38 ± 0.32
CML	μg/mL	MHE	0.79 ± 0.04	0.70 ± 0.04 ##
		Placebo	1.05 ± 0.22	0.86 ± 0.13
AGEs in blood	3-Deoxyglucosone (3DG)	MHE	0.183 ± 0.020	0.169 ± 0.012
		Placebo	0.192 ± 0.031	0.184 ± 0.011
Glyoxal (GO)	ng/mL	MHE	46.5 ± 2.6	47.1 ± 2.2
		Placebo	42.4 ± 3.5	47.7 ± 2.6
Methylglyoxal (MGO)	ng/mL	MHE	28.6 ± 2.3	28.5 ± 2.7
		Placebo	28.3 ± 2.7	28.1 ± 3.4

Subjects: n = 19 (MHE group), n = 16 (Placebo group). Measurement value: mean ± standard error of the mean. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: Comparison with the Placebo group (two-sample t-test). # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$: Comparison with before administration (paired t-test). MHE (mixed herb extract). AGEs (advanced glycation end products), CML (*N*^ε-(carboxymethyl) lysine).

沈着量の変化をFig. 3に示した。MHE群は摂取前 $2.44 \pm 0.02 \rightarrow 12$ 週後 2.29 ± 0.07 ($p = 0.051$)と低下の有意傾向がみられたが、プラセボ群は摂取前 $2.70 \pm 0.11 \rightarrow 12$ 週後 2.58 ± 0.12 ($p = 0.305$)と有意な変化はなかった。

ペントシジンは四分位範囲を用いて外れ値と判定したプラセボ群1名を除外し、さらに解析対象者の平均値未満となったMHE群10名とプラセボ群6名のサブグループを設定した。その結果、MHE群のみで摂取前から摂取12週後で有意に低く、群間比較ではMHE群の変化量はプラセボ群の変化量に対して有意な低下が認められた (Fig. 4)。

CMLは四分位範囲を用いて外れ値と判定したプラセボ群1名を除外し、さらに解析対象者でBMIが22.0以上で

あるMHE群7名とプラセボ群5名のサブグループを設定した。その結果、MHE群のみで摂取前 $0.81 \pm 0.06 \mu\text{g/mL} \rightarrow 12$ 週後 $0.70 \pm 0.07 \mu\text{g/mL}$ ($p = 0.068$)で低下の有意傾向がみられたが、プラセボ群は摂取前 $0.78 \pm 0.07 \mu\text{g/mL} \rightarrow 12$ 週後 $0.78 \pm 0.08 \mu\text{g/mL}$ ($p = 0.983$)と有意な変化は認められなかった (Fig. 5)。

GOは四分位範囲を用いて外れ値と判定したプラセボ群1名を除いたMHE群19名とプラセボ群15名のサブグループを設定した。その結果、プラセボ群で摂取前 $40.1 \pm 2.8 \text{ ng/mL} \rightarrow 12$ 週後 $47.1 \pm 2.7 \text{ ng/mL}$ ($p = 0.050$)で増加傾向がみられたが、MHE群では摂取前 $46.5 \pm 2.6 \text{ ng/mL} \rightarrow 12$ 週後 $47.1 \pm 2.2 \text{ ng/mL}$ ($p = 0.841$)とほぼ変化はなかった (Fig. 6)。

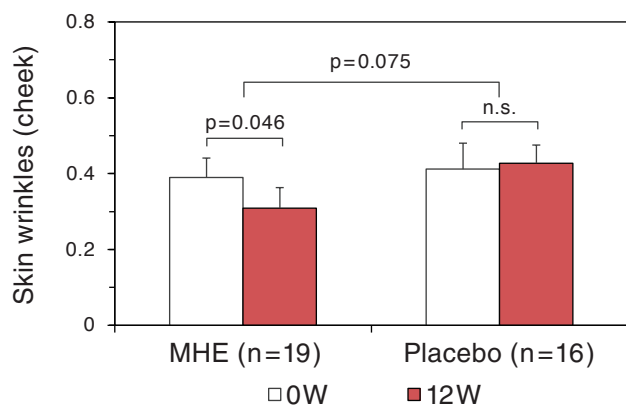


Fig. 2. Changes in the skin (cheek) wrinkles measured by VISIA.

Measured value: mean $\pm$ standard error of the mean. Analysis: Dunnett's test (intragroup) and two-sample t-test (intergroup). MHE (mixed herb extract).

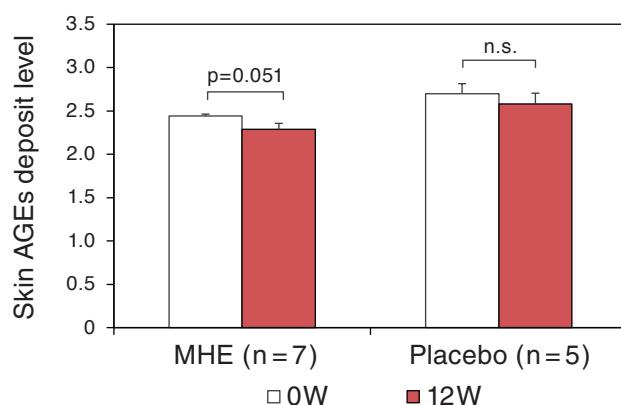


Fig. 3. Changes in the skin AGEs deposit measured by AGE Reader mu: subgroup analysis.

Measured value: mean $\pm$ standard error of the mean. Analysis: Dunnett's test (intragroup) and two-sample t-test (intergroup). MHE (mixed herb extract), AGEs (advanced glycation end products).

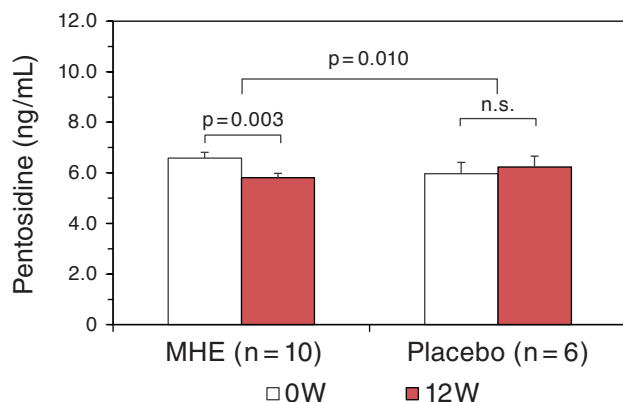


Fig. 4. Changes in blood pentosidine: subgroup analysis.

Measured value: mean $\pm$ standard error of the mean. Analysis: paired t-test (intragroup) and two-sample t-test (intergroup). MHE (mixed herb extract).

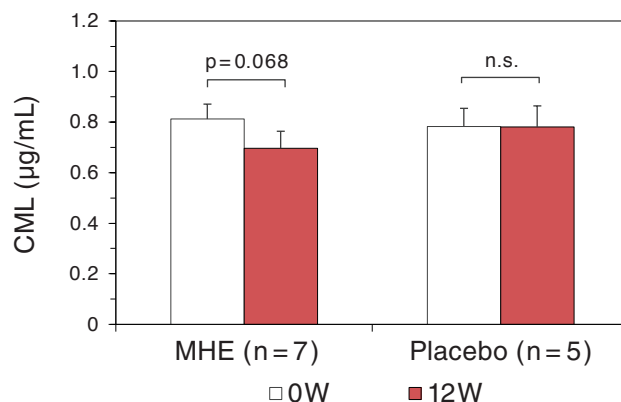


Fig. 5. Changes in blood CML: subgroup analysis.

Measured value: mean $\pm$ standard error of the mean. Analysis: paired t-test (intragroup) and two-sample t-test (intergroup). MHE (mixed herb extract), CML (N^{ϵ} -carboxymethyl lysine).

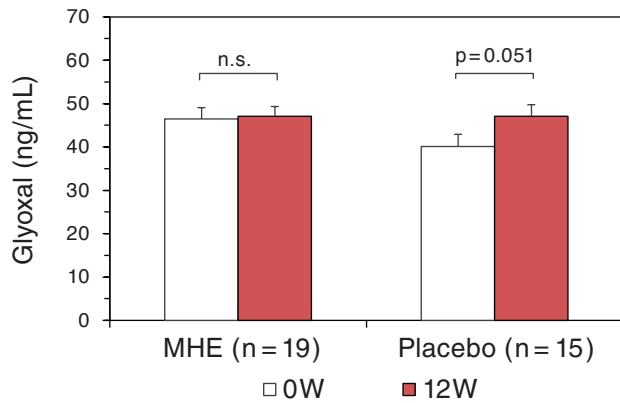


Fig. 6. Changes in blood glyoxal: subgroup analysis.

Measured value: mean $\pm$ standard error of the mean. Analysis: paired t-test (intragroup) and two-sample t-test (intergroup). MHE (mixed herb extract).

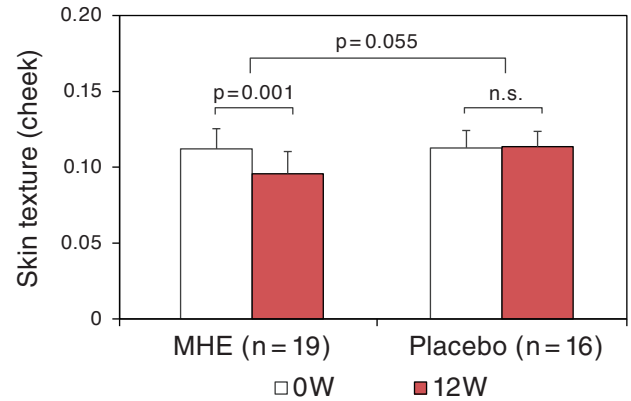


Fig. 7. Changes in the skin (cheek) texture measured by VISIA.

Measured value: mean $\pm$ standard error of the mean. Analysis: Dunnett's test (intragroup) and two-sample t-test (intergroup). MHE (mixed herb extract).

副次評価項目

副次評価項目である皮膚の粘弾性、色差およびVISIAによる皮膚の画像解析、血液検査（空腹時血糖、HbA1c、インスリン、 γ -GTP）、問診（抗加齢QOL共通問診票）においては、次の2項目で改善が認められた（Table 6）。

1) 皮膚（顔面）のキメ・色ムラ

皮膚（顔面）のキメ・色ムラの変化をFig. 7に示した。

MHE群は摂取前 $0.112 \pm 0.013 \rightarrow 12$ 週後 0.096 ± 0.015 ($p = 0.001$)と有意な低下であったが、プラセボ群は摂取前 $0.113 \pm 0.011 \rightarrow 12$ 週後 0.113 ± 0.010 ($p = 0.995$)と有意な変動はなかった。群間比較ではMHE群の変化はプラセボ群の変化に対して、低下の有意傾向がみられた ($p = 0.055$)。

2) 皮膚（顔面）の褐色シミ

皮膚（顔面）の褐色シミの変化をFig. 8に示した。

全例においてMHE群がプラセボ群に対して有意に低下した ($p = 0.032$)。また、MHE群は摂取前 $0.606 \pm 0.014 \rightarrow 12$ 週後 0.595 ± 0.013 ($p = 0.120$)で、プラセボ群は摂取前 $0.618 \pm 0.015 \rightarrow 12$ 週後 0.625 ± 0.012 ($p = 0.274$)とともに有意な変動はなかった。

安全性評価項目

安全性評価項目（臨床検査値、身体測定値、理学検査値）は、試験期間中に摂取前後での比較で一部の項目において有意な変化がみられたが、いずれも軽微な変動であり臨床問題となるものではないと判断した（Table 7）。有害事象においては、MHE群で31件（頭痛、肩こり、生理痛など）、プラセボ群で17件（感冒、生理痛、便秘など）確認された。MHE群で「血腫（左手親指甘皮）」、プラセボ群で「左橈骨遠位端骨折」、「胃腸炎」の程度が中等度であった以外は、いずれの有害事象もすべて軽度であり、これらすべての有害事象は試験食品との関連性はないと医師が判断した。

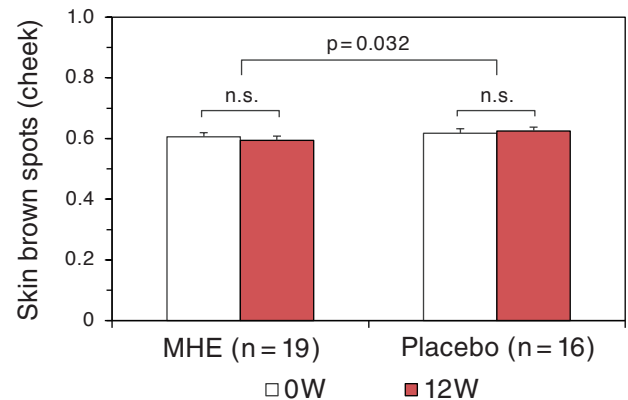


Fig. 8. Changes in the skin (cheek) brown spots measured by VISIA.

Measured value: mean $\pm$ standard error of the mean. Analysis: Dunnett's test (intragroup) and two-sample t-test (intergroup). MHE (mixed herb extract).

考察

皮膚AGEs沈着量が多い40歳以上65歳未満の女性を対象にMHEを1日100 mgで12週間摂取すると、MHE群においてペントシジンおよびCMLが有意に低下した。また、糖化反応中間体であるGOにおいて、四分位範囲を用いて外れ値と判定したプラセボ群1名を除いたサブグループ解析の結果、プラセボ群ではGOの増加の有意傾向が認められたが、MHE群では変化はなかった。プラセボ群でみられたGOの増加変化の原因については不明であるが、MHE摂取によりGOの増加が抑えられる改善効果が示唆された。これまでにAGEsの一種であるペントシジンやCMLは糖化反応中間体を経て生成されることが報告されているが、その一部はGOを中間体としていることが明らかとなっている^{14,15}。したがって、MHEは体内にあるペントシジンやCMLに対する直接的な作用、もしくは

Table 6. Secondary outcomes

Parameter		Unit	Reference range	Group	0W	6 W	12W	
Skin viscoelasticity (Cheek)	R2			MHE	0.851 ± 0.014	0.841 ± 0.012	0.849 ± 0.012	
				Placebo	0.838 ± 0.014	0.835 ± 0.010	0.833 ± 0.009	
	R7			MHE	0.553 ± 0.018	0.540 ± 0.016	0.555 ± 0.017	
				Placebo	0.538 ± 0.016	0.535 ± 0.015	0.541 ± 0.014	
Color difference (Cheek)	L*			MHE	65.3 ± 0.4	65.7 ± 0.4 ##	66.2 ± 0.4 ##	
				Placebo	65.6 ± 0.8	66.0 ± 0.8	66.4 ± 0.7 ##	
	a*			MHE	10.53 ± 0.32	10.44 ± 0.26	10.56 ± 0.35	
				Placebo	9.58 ± 0.52	9.69 ± 0.48	9.96 ± 0.42	
	b*			MHE	17.9 ± 0.3	17.2 ± 0.4	16.8 ± 0.4 ##	
				Placebo	19.0 ± 0.6	18.1 ± 0.5 #	18.1 ± 0.6 #	
	Melanin Index			MHE	1.11 ± 0.02	1.05 ± 0.03 ##	1.01 ± 0.03 ##	
				Placebo	1.18 ± 0.05	1.13 ± 0.05 ##	1.11 ± 0.05 ##	
	Hb SO ₂ Index			%	MHE	57.2 ± 1.2	59.6 ± 1.2 ##	61.9 ± 1.3 ##
					Placebo †	59.2 ± 2.1	61.2 ± 1.8 #	63.6 ± 1.9 ##
Color difference (Upper arm)	L*			MHE	68.9 ± 0.4	68.9 ± 0.4	69.3 ± 0.4 ##	
				Placebo	67.8 ± 0.7	67.7 ± 0.7	68.3 ± 0.7 ##	
	a*			MHE	5.82 ± 0.29	5.42 ± 0.25 ***	5.47 ± 0.23 #	
				Placebo	6.14 ± 0.36	6.29 ± 0.39	6.22 ± 0.34	
	b*			MHE	16.4 ± 0.5	16.4 ± 0.4	17.1 ± 0.4 ##	
				Placebo	16.9 ± 0.6	17.3 ± 0.6	17.7 ± 0.6 ##	
	Melanin index			MHE	0.82 ± 0.03	0.81 ± 0.03	0.83 ± 0.03	
				Placebo	0.90 ± 0.06	0.92 ± 0.06	0.92 ± 0.06	
	Hb SO ₂ index			%	MHE	58.9 ± 1.6	60.6 ± 1.7	62.8 ± 1.5 #
					Placebo †	57.2 ± 2.2	58.7 ± 2.2	63.2 ± 2.5 #
Imaging analysis by VISIA	Brown Spots			MHE	0.606 ± 0.014	0.606 ± 0.013	0.595 ± 0.013 *	
				Placebo	0.618 ± 0.015	0.622 ± 0.014	0.625 ± 0.012	
	Pores			MHE	0.196 ± 0.035	0.214 ± 0.038	0.228 ± 0.042 #	
				Placebo	0.164 ± 0.024	0.166 ± 0.024	0.172 ± 0.023	
	Porphyrin			MHE	0.028 ± 0.009	0.027 ± 0.009	0.027 ± 0.008	
				Placebo	0.037 ± 0.009	0.034 ± 0.008	0.031 ± 0.006	
	Red			MHE	127.1 ± 13.1	109.5 ± 10.2 ##	111.8 ± 12.0 #	
				Placebo	127.1 ± 9.9	122.3 ± 11.6	113.6 ± 8.8 #	
	Spots			MHE	0.307 ± 0.019	0.301 ± 0.021	0.309 ± 0.025	
				Placebo	0.361 ± 0.029	0.360 ± 0.030	0.355 ± 0.032	
	Texture			MHE	0.112 ± 0.013	0.095 ± 0.011 ##*	0.096 ± 0.015 ##	
				Placebo	0.113 ± 0.011	0.111 ± 0.012	0.113 ± 0.010	
	UV Spots			MHE	0.259 ± 0.013	0.260 ± 0.013	0.274 ± 0.012 ##	
				Placebo	0.278 ± 0.019	0.279 ± 0.021	0.291 ± 0.019 #	
Glucose metabolism	Glucose	mg/dL	70 - 109	MHE	81.6 ± 1.3	83.2 ± 1.6	81.0 ± 1.3	
				Placebo	81.5 ± 1.6	81.2 ± 1.5	81.8 ± 1.6	
	HbA1c [NGSP]	%	4.6 - 6.2	MHE	5.65 ± 0.07	5.62 ± 0.07	5.63 ± 0.07	
				Placebo	5.59 ± 0.07	5.56 ± 0.07	5.61 ± 0.07	
	Insulin	μU/mL	1.7 - 10.4	MHE	4.79 ± 0.54	5.13 ± 0.48	5.75 ± 0.51 #	
				Placebo	3.53 ± 0.33	4.14 ± 0.31	5.11 ± 0.32 ##	
Liver function	γ-GTP	U/L	30 or below	MHE	19.5 ± 3.9	19.9 ± 4.5	18.6 ± 4.1	
				Placebo	14.5 ± 1.6	13.9 ± 1.4	14.1 ± 1.7	

Subjects: n = 19 (MHE group), n = 16 (Placebo group). † Placebo group of Hb SO₂ Index is 15 subjects because one subject's value was subject to an error value elimination. Measurement value: mean ± standard error of the mean. * p < 0.05, ** p < 0.01: Comparison with the Placebo group (two-sample t-test). # p < 0.05, ## p < 0.01: Comparison with before administration (Dunnett's test). MHE (mixed herb extract), Hb (hemoglobin), UV (ultraviolet), NGSP (National Glycohemoglobin Standardization Program), γ-GTP (γ-glutamyltransferase).

Table 7. Physical testing and clinical chemistry testing

Parameter		Unit	Reference range	Group	0 W	6 W	12 W
Body composition	Weight	kg		MHE	54.42 ± 9.58	54.81 ± 9.21	54.68 ± 9.01
				Placebo	52.46 ± 9.52	52.87 ± 9.41	52.92 ± 9.50 #
	BMI	kg/m²		MHE	21.95 ± 3.44	22.07 ± 3.37	22.07 ± 3.31
				Placebo	21.02 ± 3.03	21.28 ± 2.95	21.20 ± 2.96 #
	Body fat	%		MHE	29.64 ± 6.76	30.74 ± 6.83 ##	29.97 ± 6.51
				Placebo	29.11 ± 6.50	30.36 ± 6.20 ##	29.77 ± 5.83
Blood pressure	Systolic	mmHg	MHE	112.2 ± 16.0	114.1 ± 18.4	114.8 ± 18.1	
			Placebo	112.6 ± 15.1	109.2 ± 14.7	110.2 ± 12.2	
	Diastolic	mmHg	MHE	77.6 ± 10.4	78.6 ± 13.9	77.1 ± 12.0	
			Placebo	77.0 ± 8.1	74.6 ± 7.1	75.6 ± 6.4	
Pulse rate		bpm	MHE	68.2 ± 10.1	72.8 ± 9.1 ##	71.0 ± 7.7 #	
			Placebo	69.4 ± 11.1	70.2 ± 10.2	71.6 ± 7.3	
Liver function	Total bilirubin	mg/dL	0.2 - 1.2	MHE	0.80 ± 0.43	0.67 ± 0.39 ##	0.74 ± 0.31
				Placebo	0.82 ± 0.24	0.70 ± 0.30 #	0.83 ± 0.25
	Direct bilirubin	mg/dL	0.0 - 0.2	MHE	0.11 ± 0.06	0.11 ± 0.05	0.11 ± 0.05
				Placebo	0.11 ± 0.03	0.11 ± 0.03	0.10 ± 0.04
	Indirect bilirubin	mg/dL	0.2 - 1.0	MHE	0.70 ± 0.40	0.57 ± 0.38 ##	0.64 ± 0.28
				Placebo	0.71 ± 0.23	0.59 ± 0.30	0.73 ± 0.23
	ALP	U/L	100 - 325	MHE	189.5 ± 60.6	200.5 ± 61.8 #	195.1 ± 57.5
				Placebo	199.8 ± 72.7	206.2 ± 74.0	203.4 ± 69.8
	LDH	U/L	120 - 240	MHE	176.5 ± 30.6	175.5 ± 30.6	174.1 ± 32.1
				Placebo	190.8 ± 28.7	185.1 ± 25.0 #	183.8 ± 24.2 #
Inflammation	High-sensitivity CRP	mg/dL		MHE	0.039 ± 0.036	0.070 ± 0.078	0.049 ± 0.100
				Placebo	0.057 ± 0.068	0.057 ± 0.076	0.044 ± 0.057
Protein	Total protein	g/dL	6.7 - 8.3	MHE	7.34 ± 0.34	7.32 ± 0.40	7.22 ± 0.31
				Placebo	7.24 ± 0.34	7.19 ± 0.34	7.22 ± 0.30
	Albumin	g/dL	3.8 - 5.2	MHE	4.51 ± 0.21	4.34 ± 0.22 ##	4.32 ± 0.16 ##
				Placebo	4.51 ± 0.21	4.41 ± 0.27	4.36 ± 0.16 ##
	A/G ratio		1.1 - 2.0	MHE	1.62 ± 0.18	1.49 ± 0.19 ##	1.51 ± 0.18 ##
				Placebo	1.67 ± 0.22	1.61 ± 0.22	1.55 ± 0.16 ##
Nitrogenous component	Creatinine	mg/dL	0.47 - 0.79	MHE	0.659 ± 0.066	0.632 ± 0.069 #	0.644 ± 0.075
				Placebo	0.642 ± 0.088	0.592 ± 0.084 ##	0.613 ± 0.094 #
	Urea nitrogen	mg/dL	8.0 - 20.0	MHE	11.98 ± 2.85	11.46 ± 2.64	12.08 ± 2.80
				Placebo	12.10 ± 3.03	12.31 ± 3.10	12.37 ± 2.68
	Uric acid	mg/dL	2.5 - 7.0	MHE	4.44 ± 1.04	4.48 ± 0.96	4.40 ± 0.99
				Placebo	3.96 ± 1.14	3.93 ± 1.20	3.94 ± 1.17
Lipid metabolism	Triglyceride	mg/dL	30 - 149	MHE	78.8 ± 51.1	85.3 ± 41.2	68.4 ± 30.0
				Placebo	71.5 ± 25.7	80.9 ± 38.0	67.4 ± 24.5
	Free fatty acid	mEq/L	0.10 - 0.90	MHE	1.008 ± 0.251	1.008 ± 0.279	1.031 ± 0.235
				Placebo	1.057 ± 0.197	1.004 ± 0.232	0.956 ± 0.201
	Total cholesterol	mg/dL	120 - 219	MHE	224.8 ± 25.8	227.4 ± 35.9	227.1 ± 28.3
				Placebo	223.0 ± 30.0	227.0 ± 36.2	227.0 ± 37.6
	LDL cholesterol	mg/dL	65 - 139	MHE	136.2 ± 20.3	138.1 ± 31.5	137.7 ± 25.4
				Placebo	137.9 ± 25.8	138.1 ± 29.8	137.9 ± 27.4
	HDL cholesterol	mg/dL	40 - 95	MHE	72.8 ± 10.2	72.2 ± 10.4	75.7 ± 10.8 #
				Placebo	70.8 ± 10.5	72.8 ± 12.1	75.6 ± 14.3 #
Non-HDL cholesterol	mg/dL	90 - 149	MHE	152.0 ± 27.7	155.2 ± 35.9	151.4 ± 29.4	
			Placebo	152.2 ± 29.0	154.3 ± 33.5	151.4 ± 29.6	
Atherogenic index			4.0 or below	MHE	2.153 ± 0.613	2.217 ± 0.744	2.060 ± 0.567
				Placebo	2.201 ± 0.583	2.176 ± 0.606	2.044 ± 0.482 ##

Subjects: n = 20 (MHE group), n = 16 (Placebo group). Measurement value: mean ± standard deviation. * p < 0.05, ** p < 0.01: Comparison with the Placebo group (two-sample t-test). # p < 0.05, ## p < 0.01: Comparison with before administration (Dunnett's test). MHE (mixed herb extract), BMI (body mass index), ALP (alkaline phosphatase), LDH (lactate dehydrogenase), CRP (C-reactive protein), A/G (albumin/globulin) LDL (low-density lipoprotein), HDL (high-density lipoprotein).

α -ジケトン構造を切断するメカニズム¹¹⁾でGOの生成を抑えることによる間接的な作用によって、ペントシジンおよびCMLの生成を阻害して抗糖化作用を発揮している可能性が考えられる。

先行研究ではMHEを12週間、1日100 mg 摂取した群（低用量群）、1日300 mg 摂取した群（高用量群）の両群において摂取前後でペントシジンの有意な低下が認められた（それぞれ $p = 0.022$ 、 $p = 0.011$ ）¹²⁾。本研究でもMHE群でペントシジンの低下が認められ、先行研究の結果と一致している。これらの血中AGEsおよび糖化反応中間体の低減作用は、MHEに含まれる3種類のハーブそれぞれ単独で報告されているAGEs架橋切断作用とOPH活性増強作用による可能性がある¹¹⁾。特にOPHにはCMLや蛍光性AGEsを減少させる作用が認められており¹⁶⁾、MHEがOPH活性を増強させることで体内のAGEsの分解・代謝促進に寄与している可能性がある。

皮膚関連の評価項目におけるMHE摂取による顔面のシワの有意な低下も先行研究と一致している¹²⁾。さらに本研究では皮膚（顔面）のキメ・色ムラや褐色シミにおいて改善効果が認められた。これまでに、コラーゲンの糖化による肌弾力の低下がシワの一因となっている可能性や、角層AGEsによる肌のキメの低下への関与、糖化による皮膚の黄変化など、糖化による皮膚への影響が報告されている^{17, 18)}。したがって、MHE摂取による皮膚関連項目の改善効果は、体内のAGEsおよび糖化反応中間体の低下作用が寄与していると推測される。

先行研究において、糖代謝関連の空腹時血糖が低用量群、高用量群の両群で有意に低下し、HOMA-IRは高用量で有意に低下し、低用量群でも低下の有意傾向を示した¹²⁾。一方で、本研究では両群でHOMA-IRが有意に高くなり、空腹時血糖は摂取前後で有意な変化は認められなかった。糖代謝関連の項目のひとつであるHbA1cは、報告の多くが糖尿病被験者の研究ではあるが日本国内外で季節変動があることが報告されており^{19, 20)}、日本では1～4月（冬・春）が高値で8～11月（夏・秋）が低値になる傾向がある²¹⁾。先行研究は摂取前（0週）が2月、摂取12週後が5月であり、0週時点のHOMA-IRが高めの値であった可能性がある。一方、本研究期間はMHE群だけでなくプラセボ群も有意に高くなっており、摂取前（0週）が9月、摂取12週後が12月であることからHOMA-IRの低値から高値への季節変動が試験結果に影響した可能性がある。空腹時血糖についての結果の差異の要因は不明である。

また、肝機能関連においては先行研究では高用量群でのみ改善効果が認められ、低用量群では効果が認められなかったことから、本研究では改善効果をもたらすには摂取量が少なかった可能性が考えられる。

結語

MHEの摂取により、皮膚のシワ、キメ・色ムラ、褐色シミの改善効果が認められた。これらの美肌効果は、MHEがもつ抗糖化作用による体内のAGEs量の減少、特にペントシジン、CMLおよびGOの低減が寄与していることが考えられる。したがって本研究により、MHEの摂取は糖化ストレスでAGEsを体内にすでに蓄積した人においてAGEs量を減らし、それによって美肌効果が期待できることが示された。

なお、MHEの連続摂取において高い安全性を有することが確認された。

利益相反申告

本研究の臨床試験は有限会社からだサポート研究所が研究費を出資し、株式会社TTCの管理のもと適切に実施された。また血中の糖化関連項目（ペントシジン、CML、3DG、GO、MGO）の定量は有限会社からだサポート研究所が研究費を出資し、株式会社エージーイー研究所が受託して実施した。近藤澄夫は医療法人健昌会 福島健康管理センターに所属する本試験の実施医師責任者であり、委託業務を遂行したが開示すべき利益相反事項はない。

謝辞

本研究の発表にあたり一般財団法人 医食同源生薬研究財団（東京都中央区）より支援を受けた（IDF#21005）。

参考文献

- 1) Maillard LC. Action des acides amines sur les sucres: Formation des melanodines par voie methodique. *CR Acad Sci.* 1912; 154: 66-68.
- 2) Perrone A, Giovino A, Benny J, et al. Advanced glycation end products (AGEs): Biochemistry, signaling, analytical methods, and epigenetic effects. *Oxid Med Cell Longev.* 2020; Article ID 3818196.
- 3) Moldogazieva NT, Mokhosoev IM, Mel'nikova TI, et al. Oxidative stress and advanced lipoxidation and glycation end products (ALEs and AGEs) in aging and age-related diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2019; Article ID 3085756.
- 4) Kehm R, Baldensperger T, Raupbach J, et al. Protein oxidation-formation mechanisms, detection and relevance as biomarkers in human diseases. *Redox Biology.* 2021; 101901.
- 5) Yonei Y, Takabe W. Aging assessment by anti-aging medical checkup. *Health Evaluation and Promotion.* 2015; 42: 459-464.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) Yagi M, Mitsuhashi R, Watanabe A, et al. Cleaving effect of pomegranate (*Punica granatum*) extract on crosslink derived from advanced glycation endproducts. *Glycative Stress Res.* 2015; 2: 58-66.
- 9) Takeshita S, Yagi M, Uemura T, et al. Peel extract of water chestnut (*Trapa bispinosa* Roxb.) inhibits glycation, degrades α -dicarbonyl compound, and breaks advanced glycation end product crosslinks. *Glycative Stress Res.* 2015; 2: 72-79.
- 10) 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.
- 11) Kawai H, Matsuo N, Yuasa E, et al. Investigation of herbal extracts that have both OPH activity enhancing action and AGE crosslink cleaving activity. *Glycative Stress Res.* 2021; 8: 39-44.
- 12) Yuasa E, Matsuo N, Kawai H, et al. Anti-glycation effect of mixed herb extract in an exploratory clinical trial. *Glycative Stress Res.* 2021; 8: 87-97.
- 13) Oguma Y, Iida K, Yonei Y, et al. Significance evaluation of Anti-Aging QOL Common Questionnaire. *Glycative Stress Res.* 2016; 3: 177-185.
- 14) Banerjee S. Formation of pentosidine cross-linking in myoglobin by glyoxal: Detection of fluorescent advanced glycation end product. *J Fluoresc.* 2017; 27: 1213-1219.
- 15) Ferreira AEN, Ponces Freire AMJ, Voit EO. A quantitative model of the generation of N^{ϵ} -(carboxymethyl) lysine in the Maillard reaction between collagen and glucose. *Biochem J.* 2003; 15: 109-121.
- 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) Ichihashi M, Yagi M, Nomoto K, et al. Glycation stress and photo-aging in skin. *Anti-Aging Med.* 2011; 8: 23-29.
- 18) Yagi M, Yonei Y. Glycative stress and anti-aging: 7. Glycative stress and skin aging. *Glycative Stress Res.* 2018; 5: 50-54.
- 19) Tseng CL, Brimacombe M, Xie M, et al. Seasonal patterns in monthly hemoglobin A1c values. *Am J Epidemiol.* 2005; 161: 565-574.
- 20) Iwahashi A, Hirobata T, Minamino H, et al. Evaluation of seasonal changes in hemoglobin A1c and triglyceride at our institute. *Medical Journal of Japanese Red Cross Wakayama Medical Center.* 2015; 33: 17-21.
- 21) Osonoi T, Saito M, Douguchi S, et al. Annual changes in the profile of type 2 diabetic patients with insulin therapy from 2008 to 2018. *Med Cons and New Remed.* 2019; 56: 881-891.