

2013B1603

BL19B2

培養環境におけるコラーゲンゲル構造の品質評価法の開発
Development of the Quality Evaluation Method of Collagen Gel Structure
in Culture Environment

足立 浩章, 坂 貞徳, 田中 浩

Hiroaki Adachi, Sadanori Ban, Hiroshi Tanaka

日本メナード化粧品（株）総合研究所

Research Laboratories, Nippon Menard Cosmetic Co., Ltd.

化粧品の有効性を評価することを目的として、現在様々な試験が行われているが、特に真皮に関しては、コラーゲンゲルを用いた三次元培養系が用いられている。本課題では、より生体に近い培養環境の構築とその評価系の確立につながる情報を得る為に、皮膚組織およびコラーゲンゲルの極小角および小角 X 線散乱を測定した。その結果、皮膚組織においてコラーゲン線維の径や 65 nm の周期に関する構造と思われる回折を捉える事ができた。コラーゲンゲルの回折プロファイルは皮膚組織とは異なるものであったが、対応していると思われる回折がいくつか得られた。また、コラーゲンゲル内のⅢ型コラーゲン比率の変化に伴いゲルの回折が変化することから、コラーゲンの組成によってコラーゲン線維構造が変化していると考えられた。

キーワード： コラーゲンゲル、皮膚、真皮コラーゲン

背景と研究目的：

2009年3月よりEUにおいて化粧品開発に関わる動物実験が禁止されたことを受け、化粧品の有効性を評価するためには、動物に代わり、培養細胞や三次元培養皮膚モデルを用いることが主流になっている。培養細胞は、通常、シャーレ上に平面培養（二次元培養）を行うが、生体環境により近づける為に立体培養（三次元培養）を行うことがある。皮膚においては、コラーゲンゲル（主にⅠ型コラーゲンを用いる）内での真皮線維芽細胞の包埋培養や、さらにその上部に角化細胞を播種・分化させ表皮部位を形成した三次元培養皮膚モデルの構築など、より生体に近い条件においての評価が進められている。しかし、生体反応と異なる結果が得られるケースもあり、より生体に近い評価系が期待されている現状がある。

一方、真皮線維芽細胞は、コラーゲン等の細胞外マトリックスと結合し、情報を認識することで、細胞外環境に依存した変化を示すと考えられている。コラーゲンにはいくつかの種類があり、体の部位によってその構成は異なっている。皮膚の真皮においては、線維成分の90%がコラーゲンで占められており、そのうち約80%がⅠ型コラーゲン、約15%がⅢ型コラーゲンである。これ以外にも、コラーゲン線維間に存在するエラスチン線維や、線維の間隙を満たす基質（プロテオグリカンや糖タンパク質が中心）により、真皮の細胞外環境が形成されている。よって、Ⅰ型の

コラーゲンを中心に数種類のコラーゲンやエラスチン、基質などが水を含んだ状態で複雑に組み合わせられて存在している生体の真皮中では、これらが形成する微細な構造やその変化が、細胞機能や皮膚性状に影響していると考えられる。しかし、これらの構造や作用メカニズムには、まだまだ不明な点が多い。これまでのコラーゲンをを用いた検討において、コラーゲン濃度やコラーゲン組成を変化させると、コラーゲンの弾性やコラーゲンに包埋した線維芽細胞の遺伝子発現が変化することを確認した。これらのことは、コラーゲン構造の変化が物性や細胞機能に作用したと考えている。一方、コラーゲンを走査型電子顕微鏡で観察すると、コラーゲン線維が絡まった構造および線維が束になった構造が観察された（図 1）。電子顕微鏡画像から計測したところ、コラーゲン線維の平均直径は 49.4 nm であった。電子顕微鏡での観察は、明瞭で分かりやすい画像が得られる利点はあるが、試料を固定・乾燥させる必要があるため、水や基質を含む実際の生体環境とは異なる状態を観察している。

そこで、本課題は、ヒト・ブタ皮膚組織およびコラーゲンの構造を比較するために、固定・乾燥等の前処理を行わず生の状態で X 線散乱実験を行うことを目的とした。特に、コラーゲンの線維径を含む微細構造を解析し、さらに組成の異なるコラーゲンの構造変化から、成体に近い培養環境の構築とその評価系について検討した。

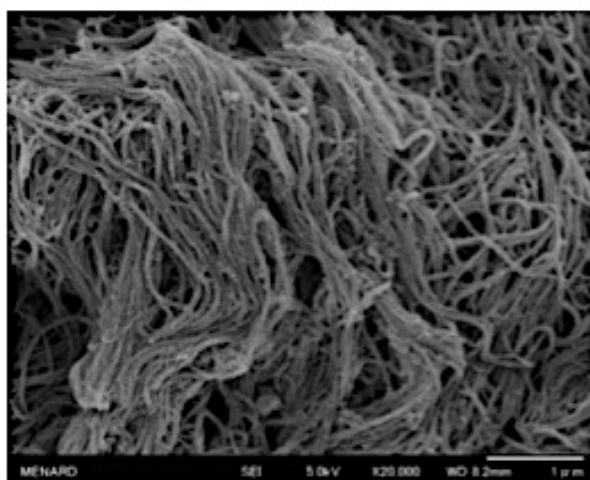


図 1. コラーゲンの電子顕微鏡画像

実験：

本研究では、市販のコラーゲン溶液（Cellmatrix、新田ゼラチン株式会社製）から作製したコラーゲンゲル、ヒト皮膚組織（TRANSKIN、株式会社ケー・エー・シー製）およびブタ皮膚組織（ユカタンミニブタ皮膚、日本チャールス・リバー株式会社製）を測定用の検体として用いた。組成の異なる 3 種類のコラーゲンゲルは、市販の I 型および III 型のコラーゲン溶液（Cellmatrix type I-A および Cellmatrix type III）を体積比で 10:0、8:2、5:5 のそれぞれの比率で混合、pH 調整した後、遠心処理によって 2 倍程度濃縮させたものをゲル試料として用いた。また、ヒトおよびブタの皮膚組織は、真皮部分を 2 mm 程度の厚さに切り分け、生体とゲルのコラーゲン環境を比較するために使用した。検体は、2 枚のカプトン膜に挟んだ後、治具に固定し、試料とした。この 2 枚のカプトン膜の間隙は 2 mm である。なお、各検体は 2-3 個作製し、データの再現性を確認した。

コラーゲンは、構成単位のトロポコラーゲン（＝コラーゲン分子、I 型コラーゲンの場合、長さ約 300 nm、直径約 1.5 nm）から始まり、細線維、原線維、線維、線維束という階層構造をとる

が、体の部位によってその線維状態が異なる^[1]。このように幅広い大きさを持つコラーゲンの構造を捉えるために、極小角 X 線散乱 (USAXS) と小角 X 線散乱 (SAXS) の併用が可能な BL19B2 を使用した。測定条件は、X 線エネルギーが 18 keV、カメラ長が USAXS 42 m、SAXS 3 m、測定波数 (q) レンジはそれぞれ USAXS $0.005\text{--}0.2\text{ nm}^{-1}$ 、SAXS $0.06\text{--}3\text{ nm}^{-1}$ である。カメラ長の較正は、ニワトリの腱由来のコラーゲン線維を用いた。検出器は PILATUS 2M を使用した。

結果および考察：

ヒト皮膚およびブタ皮膚について、二次元測定データを図 2 に、これを円環積分し、一次元化したプロファイルおよびそれらの再現性を検討した結果を図 3 に示す。これら皮膚真皮部位の回折の内、今回は以下の 2 種類のピークに注目した。

1 つ目は、ヒト-ブタ間で共通する位置に存在するピーク群であり、 $q=0.096\text{ nm}^{-1}$ (面間隔 $d=65.2\text{ nm}$) および $q=0.284\text{ nm}^{-1}$ ($d=22.1\text{ nm}$) の位置に見られた (図 3 左、破線)。トロポコラーゲンが少しずつずれて配向することに起因するコラーゲン細線維の縞模様の周期構造が約 67 nm であるので、 $q=0.096\text{ nm}^{-1}$ ($d=65.2\text{ nm}$) の位置にあるピークはこれを反映している可能性がある。

2 つ目は、ヒトとブタで位置が異なるピーク群であり、ヒト皮膚では $q=0.067\text{ nm}^{-1}$ ($d=93.2\text{ nm}$)、 $q=0.125\text{ nm}^{-1}$ ($d=50.1\text{ nm}$)、 $q=0.176\text{ nm}^{-1}$ ($d=35.7\text{ nm}$)、 $q=0.224\text{ nm}^{-1}$ ($d=26.9\text{ nm}$)、ブタ皮膚では $q=0.054\text{ nm}^{-1}$ ($d=116.8\text{ nm}$)、 $q=0.104\text{ nm}^{-1}$ ($d=60.6\text{ nm}$)、 $q=0.147\text{ nm}^{-1}$ ($d=42.7\text{ nm}$)、 $q=0.198\text{ nm}^{-1}$ ($d=31.8\text{ nm}$) のそれぞれ 4 本が見られた (図 3 左、実線)。コラーゲン線維は階層的な紐状の構造をしているため、長さや径という 2 つの構造が考えられる。構成単位であるトロポコラーゲンが長さ約 300 nm 、直径約 1.5 nm とされるので、長さ方向の周期構造である 67 nm を除くと、今回観察された 300 nm 以下の構造は、線維径を反映していると推測された。これらの回折が線維の集合を反映しているとして最密充填を仮定すると、 $1 : 1/\sqrt{3} : 1/2$ という比率が当てはまるが、今回観察されたピークの大きさには当てはまらない。したがって、今回観察されたピークは、少なくとも 2 つ以上の独立した線維径の構造を示していると思われた。ヒト皮膚およびブタ皮膚は、測定する部位により多少のデータのバラツキが見られるが、今回議論しているピークは再現よく観察された (図 2 右)。

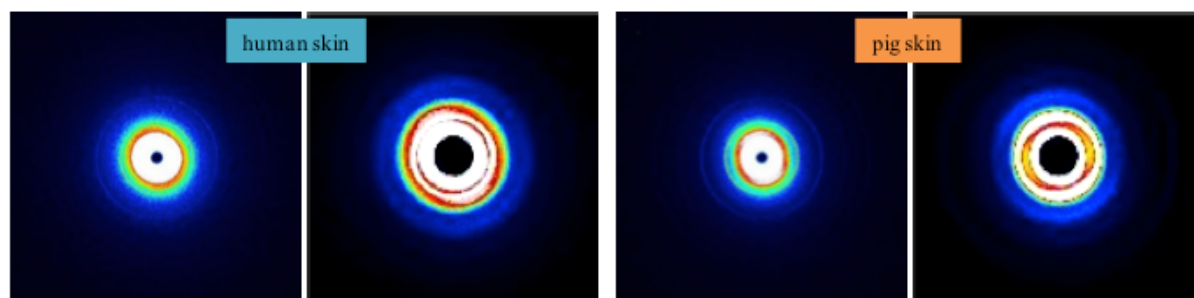


図 2. ヒト皮膚およびブタ皮膚の二次元測定データ (SAXS) 左：全体図、右：中央拡大図

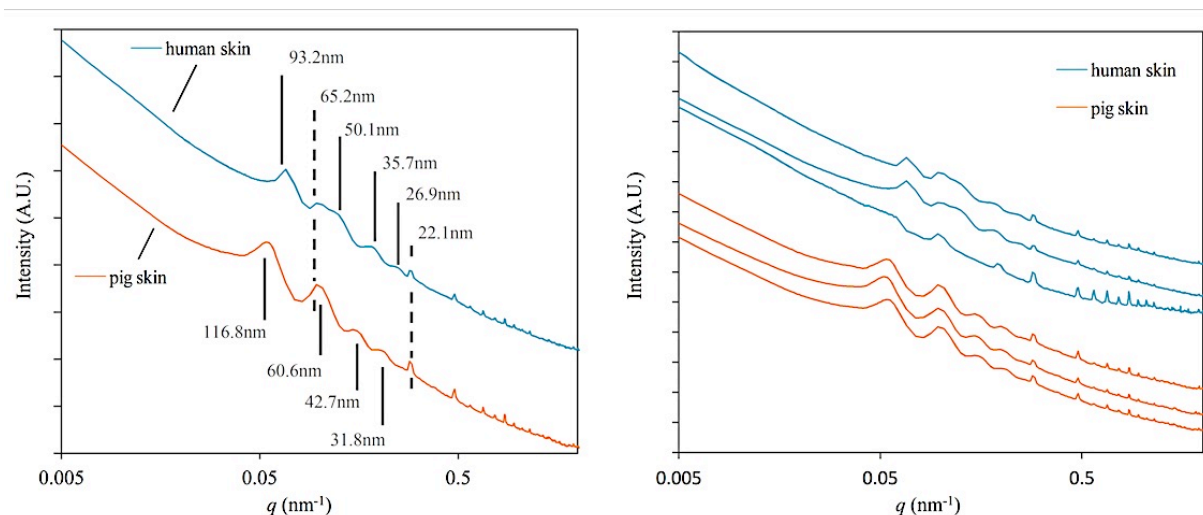


図 3. ヒト皮膚およびブタ皮膚の一次元化データおよびそれらの再現性 (USAXS + SAXS)

コラーゲングルについて、二次元測定データを図 4 に、これを円環積分し、一次元化したプロファイルおよび再現性を検討した結果を図 5 に示す。コラーゲングルにはブタ由来のコラーゲン溶液を用いているため、今回はブタ皮膚と比較した。コラーゲングルのプロファイルは、皮膚組織のプロファイルとは様子が異なっており、 $q=0.284 \text{ nm}^{-1}$ ($d=22.1 \text{ nm}$) の小さいピーク (図 5 左、▲) と $q=0.089 \text{ nm}^{-1}$ ($d=70.5 \text{ nm}$) 付近にあるブロードなピーク (図 5 左、△) が見られた。小さいピーク (▲) はブタの皮膚組織にあるピーク位置と一致する。ブロードなピーク (△) はブタの皮膚組織における 4 つのピークを含むようなピークと思われる。よって、コラーゲングルには皮膚真皮組織と対応すると思われる 2 種類のピークが観察され、これらは両者に共通する成分であるコラーゲンが作る構造に由来すると考えられた。コラーゲングルの電子顕微鏡画像 (図 1) から算出した平均線維径 49.4 nm は、やや小さいがゲルに見られるブロードなピークに含まれることから、観察されたブロードなピークは線維径を反映したものであり、 22.1 nm のピークはより小さい単位の線維径であると推測された。加えて、ゲル内のⅢ型コラーゲン比率が増えると、ブロードなピークの中のより大きい成分が増え、ピーク幅がより小角側へ広がることが観察された。

それゆえ、この構造がコラーゲン線維の径を反映していると仮定すると、Ⅲ型コラーゲンを含むことによりコラーゲングル線維の平均直径が増加したと考えられた。Ⅰ型コラーゲンから成る線維は分子が密に詰まったものであるのに対し、Ⅲ型コラーゲンから成る線維は分子の詰まり具合が疎であるとされる^[2]。これを踏まえると、線維内にⅢ型コラーゲン分子が増えると、分子間に隙間ができ、結果として線維径が増加しているのではないかと考えられた。

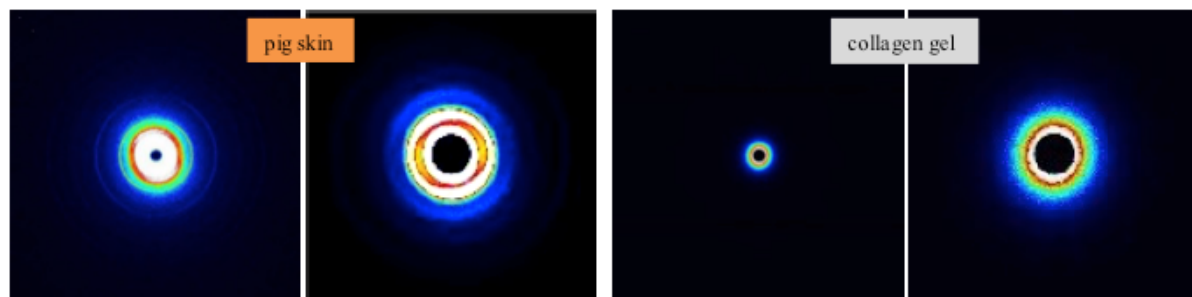


図 4. ブタ皮膚およびコラーゲングルの二次元測定データ (SAXS) 左：全体図、右：中央拡大図

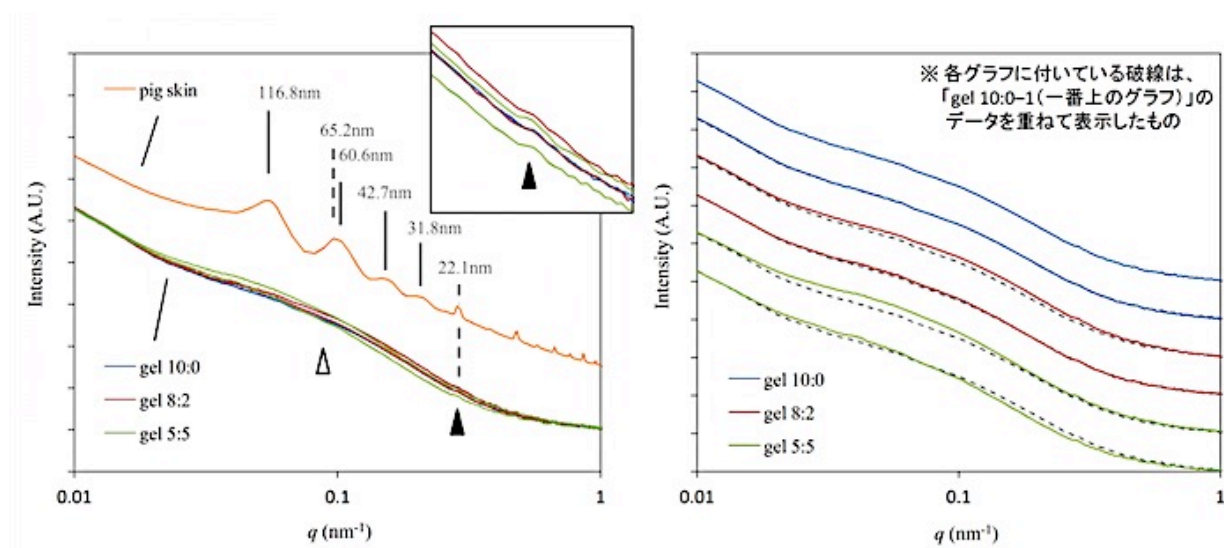


図 5. ブタ皮膚およびコラーゲングルの一次元化データおよびコラーゲングル測定の再現性 (USAXS + SAXS)

今後の課題：

本課題においては、水を抱えた生の状態の試料を用いて、皮膚真皮組織やコラーゲングルの回折像を捉える事ができ、両者に対応するような回折も見られた。また、Ⅲ型コラーゲンの比率を変化させることで、その回折にも変化が見られることが確認できた。一方で、組織とゲルの回折像は明らかに異なっていた。その理由として「コラーゲンの結晶化度が低く、ゲルでは明瞭なピークが見えない」ことや「組織のコラーゲンが修飾タンパク質などの作用で一定の大きさの線維に揃っている」ことが考えられたが、詳細については更なる検討を要する。したがって、コラーゲングルの評価法として、本手法は培養環境下のコラーゲングルと同様に水を抱えた状態のゲルの微細な構造を議論できる点で顕微鏡的手法とは異なる知見を得ることができるものであった。しかし、ゲルを比較・評価していくためには、より明瞭な X 線散乱プロファイルが得られるサンプルないし光学系が必要である。

今後は、より顕著な像が見られるようにするための条件検討や今回観察されたピークの帰属を行い、コラーゲングルを用いた際に観察できる構造を決定する必要がある。また、Ⅲ型コラーゲンの作用だけでなく、ヒアルロン酸などの基質やエラスチン線維、修飾タンパク質などの影響を確認することで、より生体に近い培養環境が構築でき、細胞外環境の有用な評価系が確立できると考えられる。

参考文献：

- [1] Kastelic, J., Galeski, A. and Baer, E., *Connective Tissue Research*, **6(1)**, 11-23, (1978).
- [2] Junqueira L.C., Montes G.S., Martins J.E., Joazeiro P.P., *Histochemistry*, **79(3)**, 397-403, (1983).

©JASRI

(Received: April 9, 2014; Early edition: November 30, 2015; Accepted: December 11, 2015;

Published: January 25, 2016)