

ブタ耳介由来コラーゲンの皮膚に対する効果 —表皮水分量および肌弾力への効果の検討—†

星淡子*, 渡邊百香*, 石井健二**, 國分菜摘*, 鈴木愛実*

Effects of porcine auricular collagen on mouse and human skin condition —Moisturizing action and elasticity—†

Hiroko Hoshi*, Momoka Watanabe*, Kenji Ishi**, Natsumi Kokubu*,
Manami Suzuki*

Collagen is one of the major extracellular matrix proteins in mammals and fish. Its abundance is especially concentrated in connective tissues, such as ears, tendons, ligaments, cartilage, and skin. Recently, collagen has been widely used as a biomaterial in artificial skin, suture thread, and artificial corneas and as a carrier vehicle for gene therapy in medical fields. We previously reported that extracted porcine auricular collagen (PAC) had exquisite viscoelasticity and promoted greater cell proliferation than skin-extracted collagen.

In this study, we demonstrated that auricular collagen inhibited water transpiration through in vivo and in vitro experiments, and that PAC sheets retained water and maintained skin elasticity in mouse and human skin. In vitro, a PAC solution significantly inhibited water transpiration compared to only water or to a mixture of water with 10% glycerol. In human trial participants, skin treatment with PAC sheets increased elasticity and obviously improved the skin's texture. These results suggested that PAC had good effects on the water retention, texture, and elasticity of skin compared to other skin collagen and/or moisturizing ingredients such as glycerol.

Key words : collagen, auricle, moisturizing, elasticity water transpiration

1 はじめに

コラーゲンは我々のからだに最も豊富に含まれ、生体の形態形成、維持を始めとして生命現象に広く関わるタンパク質である¹⁾。コラーゲンの材料としての使用は古くより皮革から始まり最近では人工皮膚や縫合糸の他にも遺伝子治療のキャリアーや人工角膜等の最新医用技術の分野に使用されている有用なバイオマテリアルである^{2), 3), 4), 5)}。

養豚は前橋市の主要な地場産業の一つであり、生産される食肉出荷額は全国的にも上位を占めている。しかし、食肉以外の部位の有用な利用に関しては未開拓の部分も多く、課題として残されているのが現状である。我々はこれまでに群馬県産ブタの耳介よりコラーゲンを抽出し、これまでにない優れた粘弾性と生物学的特性を有する、コラーゲンの抽出に成功した⁶⁾。

本研究では、群馬県産ブタ耳介由来コラーゲンをを用いて化粧品材料への応用について検討した。抽出した耳介由来コラーゲン (PAC) を溶液として塗布した際の水分蒸散量、シートとして加工し、貼付した際のマウスやヒ

トの肌への塗布、水分保持能や肌への弾力性等への寄与に関して検討を行った。

2 実験と方法

2・1 材料、試薬

実験に関するすべての試薬は和光純薬、特級もしくは一級試薬を用いた。コラーゲンの原料である、群馬県産ブタ耳介はエーアンドブイ企画様より供与いただいた。コラーゲンの抽出はブタ耳介を剃毛、細断後、脱脂、蒸留水にて洗浄し、ペプシンを含む酢酸を用いて抽出後、塩析及び透析により精製を行い、凍結乾燥にて精製コラーゲンを得た。ブタ耳介コラーゲン (PAC) は SDS-PAGE 後、CBB 及びウェスタンブロッティングにより確認した。対照として、市販のブタ真皮由来 I 型コラーゲン (ニッピ) またはブタ皮膚コラーゲン (日本ハム) を使用した。

2・2 マウス及びヒト実験準備と PAC シートの作成方法

動物実験は、前橋工科大学動物委員会承認の下、適切な飼育環境、管理の下で実験を行った。本研究により用

† 原稿受理 平成 31 年 2 月 28 日 Received February 28, 2019

* 生物工学科 (Department of Biotechnology)

** 工学研究科生物工学専攻 (Department of Civil and Environmental Engineering)

いたマウスは 15 か月齢，オスの Hos HRM-2 マウスを使用した。明/暗：12 h/12 h、室温 23-25 °C、湿度 30-50% の適切な環境下で飼育した。

ヒト実験は、40 代から 60 代の女性 10 名を被験者として前橋工科大学人間実験委員会の承認の下に実験を行った。予め被験者に対するインフォームドコンセントを行ない受諾書の提出後、実験を開始した。ヒト及びマウスへ貼付けするための抽出 PAC のシートの作成は、0.5% D-リンゴ酸溶液で 0.3% に調製したブタ耳介コラーゲンを Fig. 1 に示すような型にそれぞれ流し込み、凍結乾燥により作製した。

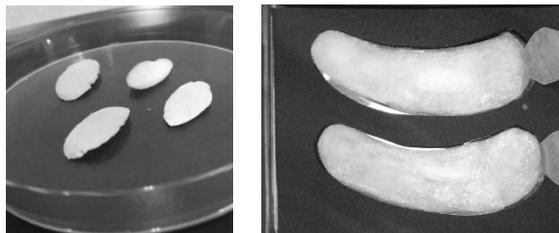


Fig. 1 PAC sheets.
Left: mouse-sized. Right: human-sized

2・3 PAC の水分蒸散に対する効果の検討

0.3% PAC 塩酸可溶性溶液、対照に蒸留水中に 10% グリセリンを含む水溶液を調製し、2.5cm 四方のろ紙 (ADVANTEC) にそれらの溶液を 200 μ l 添加して、室温 (20°C から 23°C)、湿度 20% 中のドライキャビネット内に静置した。0.5, 1, 2, 4, 8 時間後のろ紙の重量を計測し、経時的な水分蒸散量を測定した。蒸散水分量は溶液添加時の重量から計測時間の重量を差し引いた重さで算出し、水分蒸散量とした。それぞれのサンプルは 3 検体以上、測定は最低 3 回以上行った。統計処理はそれぞれの群間で t-test により有意差検定を行った。

2・4 ノードマウスに対する PAC シートの効果検討

15 か月齢の HRM-2 マウスに背骨の中心から左側の皮膚に PAC シート (タテ 1.0 センチ x 横 2.0 センチ) を貼付し、シートを溶解させるため還元水をスプレーすることで PAC シートの貼付実験を行った。比較対照には HRM-2 マウスの右側の皮膚に還元水をスプレーした。マウス皮膚の計測は皮膚計測器 (CosBeauty) を用いて水分率・油分率を測定した (各個体 8 回平均値)。表皮のレプリカはシリコンにより (有限会社アサヒバイオメッド) を用いて作製し、皮膚表面のキメの状態の変化を光学顕微鏡で観察した。実験は連日 21 日間行った。

2・5 ヒト顔面皮膚に対する PAC シートの効果

ヒト実験は、顔面の目の下から目尻の範囲での PAC シートの効果を検討した。PAC シートは、顔面左側眼珠の下側の目元から目尻にかけてのサイズに貼りつけ可能なシート (タテ 2.5 センチ x 横 6.5 センチ) をマウス実験の際と同様の方法で作成し用いた。実験は冬季の乾燥期間、12 月上旬から下旬にかけて 16 日間、毎日 PAC シートを貼付し 16 日後に皮膚の状態を計測、観察した。皮膚の評価は水分蒸散量 (Tewameter)、表皮水分量

(Corneometer)、肌弾力 (Cutometer) について機器計測器 (すべて Integral 社) を用いて使用前後での肌に対する効果を評価した。表皮の様子は皮膚計測器 (CosBeauty) を用いた写真撮影と共に、シリコンを用いたレプリカを作成して表皮キメの様子を光学顕微鏡にて観察、評価した。

3 結果と考察

3・1 PAC の水分蒸散量抑制効果の検討

PAC の水分蒸散の抑制効果を検討するため、0.3% ブタ耳由来コラーゲン (PAC) と 10% グリセリン水溶液をろ紙に含ませ、蒸発する水分量を経時的に計測した。一般的に化粧水等に含まれる濃度のグリセリン溶液を含むろ紙では、4 時間後まで直線的に著しく水分が蒸発した。PAC では、グリセリン水溶液と同様に 4 時間まで直線的に蒸発したが、蒸発量は 10% グリセリン水溶液と比較して緩やかであった。特に 2 時間後では、PAC 溶液サンプルは有意に水分の蒸散を抑制した (Fig. 2)。その後も PAC は他の溶液と比較して水分の蒸散を抑制した。この結果より、PAC は現在化粧品で使用されるグリセリンと比較して水分の蒸散量を抑制する効果が示された。近年の研究で溶液の粘度が高いほど水分保持能力が高い報告がある⁷⁾。我々のこれまでの研究では、PAC は同濃度のブタ皮膚由来コラーゲンと比較して著しく粘弾性に優れていることを報告している⁸⁾。よって、PAC は優れた粘弾性により水分の蒸散量を抑え、水分保持効果を有することが示唆された。

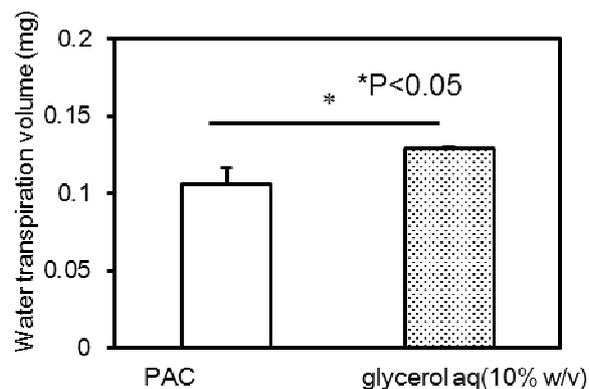


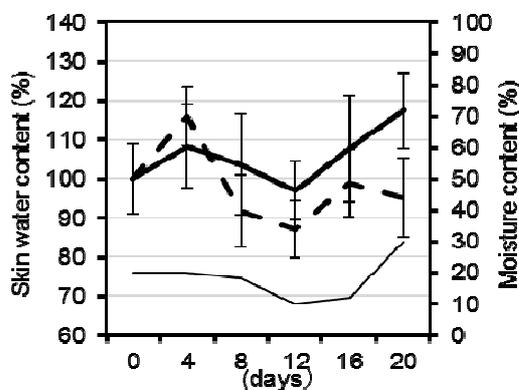
Fig. 2 Effect of PAC on water transpiration rate in filter paper

3・2 マウスの皮膚に対する PAC シートの効果

15 か月齢ノードマウスの皮膚に対して PAC シートの保湿効果を検討した。PAC シートを背骨を中心として片側に、反対側には対照として還元水を等量 21 日間連続貼付、塗布した。実験の結果を Fig. 3A に示す。経時的な表皮の水分率を皮膚計測器で計測した結果、表皮水分量は 4 日目までは PAC シートを溶解させた還元水を塗

布した皮膚の方が表皮水分率は高かったが、4日以降はPACシートを貼付した背部皮膚水分率は還元水を塗布した背部水分率よりも高かった。この傾向は21日後の実験終了時まで持続したことより、PACシートは皮膚の水分保持機能を保持する能力を有していることが示唆された。この傾向は溶液としてPACを背部に塗布した実験でも同様の傾向が見られた。更に、PACシートを貼付した14日後の皮膚についてシリコンレプリカを作成し、キメ等について形態変化を行った(Fig. 3B.)。観察の結果、対照として使用した還元水の塗布による皮膚は塗布の前後で大きな変化が見られなかったが、PACシートを貼付した皮膚では、キメの形や深さが明らかになった。還元水自身にも保湿、キメを整える効果のあることがわかっているが、本研究の結果よりPACはキメを整え、肌への水分保持機能に寄与することが示された。

(A)



(B)

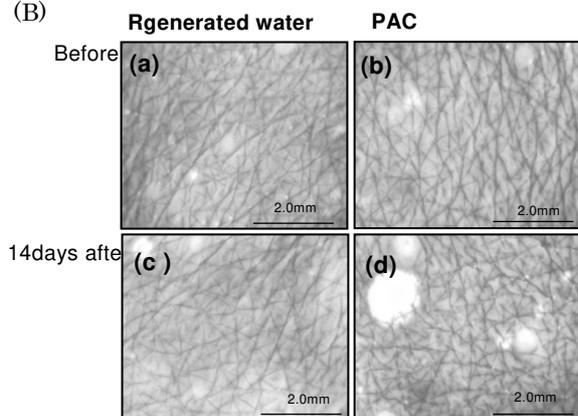


Fig. 3. Effect of PAC sheets on mouse skin

(A): Water content of mouse skin. Dotted line is regenerated water, bold linear line is PAC sheet, and thin line is humidity. (B): Mouse skin condition using scope photograph. (a) and (c) are treatments with regenerated water, and (b) and (d) are treatments with PAC sheets and regenerated water. Upper phases show skin before treatment and lower phases show after treatment.

3・3 PACシートのヒト皮膚への効果

PACシートのヒト皮膚への効果を検討した。インフォームドコンセント後、40代から60代の女性10名に被験者として協力いただき実験を行った。実験は顔面目元へのシート貼付け後、還元水を用いてシートを溶解させ、塗布した。PACシートは16日間、毎日夜に貼付の実施を依頼し、シート使用前後の対象部位の肌の水分蒸散量、表皮水分量、弾力性、キメの形成に関して各種計測器による測定試験を行った。実施期間中、被験者10名中、2名は肌への違和感が見られたため、実験を中止し、8名で評価検討を行った。16日後のPACシート貼付部位の表皮の水分量、蒸散量、肌弾力測定の結果をFig. 4に示す。被験者全体の使用前平均値を100%とした際に、シート使用後の皮膚水分蒸散量と肌弾力において効果が見られた。角質層における水分蒸散量は最も効果の高かった被験者ではコラーゲンシートの使用前後で59%抑制した(Fig. 4(A.)) (被験者平均値：12%水分蒸散抑制)、個別データを解析した結果、被験者8名中7名において有意に水分蒸散量の低下が見られた。一方で、表皮水分量に関しては変化がなかった(Fig. 4(C.))。しかし、表皮水分量に関しては、8名中4名の表皮水分量の上昇がシート貼付けの効果によって見られた。最も効果の高かった被験者では、使用前の水分量と比較して、45%の水分量の上昇が見られた(被験者平均値：9%上昇)。この結果に関しては、個人間の数値の差が大きく、平均として水分量に反映されなかったものと考えられる。肌弾力に関しては、皮膚表面を陰圧でプローブ開口部に引き込み、開口部に引き込まれた皮膚長をプリズムを用いて測定した。今回評価として用いた指標は皮膚退縮時の弾力部の割合を使用前の指標値を100とした際の値を求めた⁹⁾。この指標に基づいて皮膚の弾力を計測した結果、8名中5名の肌弾力が有意に上昇していることが示された(Fig. 4(B.))。最も数値の高い被験者の使用前と比較して、36%の上昇が見られた(被験者平均値：15%上昇)。更に比較的数値の高かった被験者の対象部位でのPACシート使用前と使用後の肌の状態を拡大鏡にて写真撮影を行った結果、使用前と比較して使用後の皮膚はふっくらとしたキメが見られた(Fig. 4(D.))。キメは皮膚角質層の水分量に伴って細かく、深くなることが知られていることから^{10), 11)}、PACシートの効果がヒトに対する皮膚水分量の保持とキメに対して有効であることを示した。

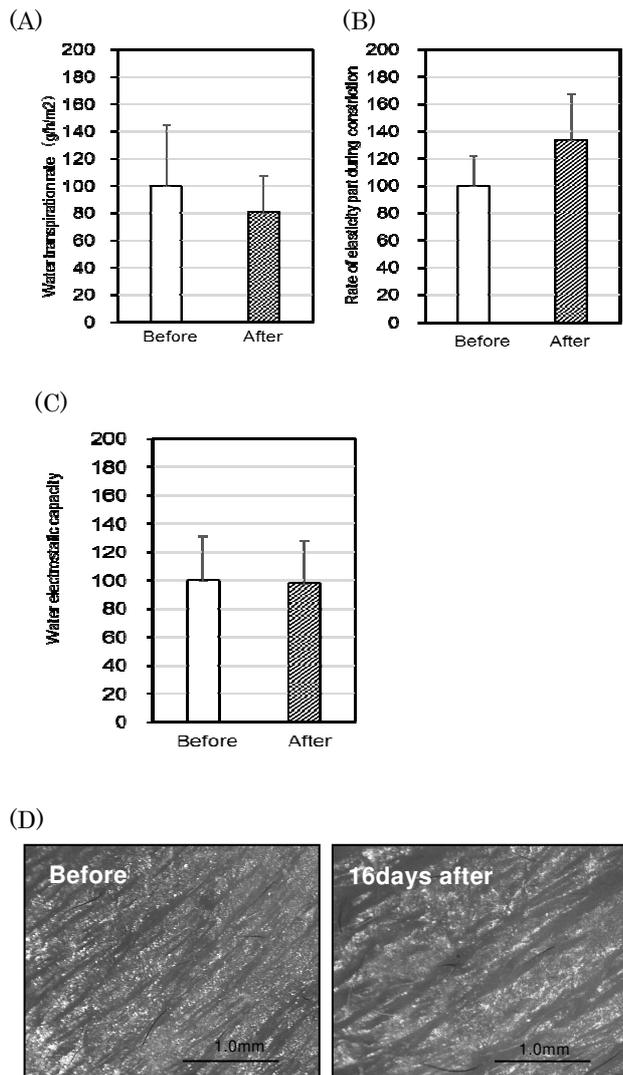


Fig.4. Effect of PAC sheets on human skin condition (A): Water transpiration rate of surface skin. (B): Elasticity of skin. (C): Water content of epidermis. (D): Observation of skin condition using scope photograph.

4 結語

ブタ耳介コラーゲン(PAC)溶液及びシートは水分の蒸散を有意に抑制する効果のあることを示した。マウスによる *in vivo* 試験では、PAC シートは表皮水分量を増やす傾向を示した。更にヒト試験においては、PAC シートは水分蒸散量を抑え、肌の弾力性を向上させる傾向があることを示した。同時に肌の弾力性向上により肌の状態はキメの整った細かな肌を観察することができた。以上の結果より、ブタ耳介由来コラーゲンは化粧品素材として有用であることを示した。今後は化粧品の開発に向け、民間企業と共に研究、開発を進めていく必要があるだろう。

謝辞

本研究は前橋市長期対応型新製品・新技術開発推進補助金(H27-29年度)によって遂行された研究である。

参考文献

- 1) 藤本大三郎, “細胞外マトリックスのバイオサイエンスとバイオテクノロジー”, (1989), 株式会社アイピーシー, p. 5.
- 2) K. Maren, J. Thilo, E. S. Karym, M. Ulrike, A. Annekatrin, K. Benjamin, S. Katharina, E. Wolfgang, B. Dieter, H. Andreas and S. T. Gundula, *Int. J. Mol. Med.*, 25, 701 (2010).
- 3) C. Chung, I. E. Erickson, R. L. Mauck and J. A. Burdick, *Int. Tissue Eng. Part A.*, 14, 1121 (2008).
- 4) W. Meyer, J. Kacza, N. H. Zschemisch, S. Godynicki and J. Seeger, *Annals Anatomy*, 189, 143 (2007).
- 5) B. R. Williams, R. A. Gelman, D. C. Poppke and K. A. Piez, *J. Biol. Chem.*, 253, 6578 (1983).
- 6) 星淡子, 荒井雄太郎, 石井健二, 北川浩司, 高橋昌伸, 星将貴, “前橋工科大学研究紀要”, 17 31, (2014)
- 7) 知念正剛, 黒木まどか, 日高三郎, “老年歯学”, 28(1) (2013)
- 8) 石井健二, “平成 28 年度修士論文”, (2015)
- 9) M. Hori, S. Kishimoto, Y. Tezuka, H. Nishigori, K. Nomoto and U. Hamada, *Anti-Aging Medicine*, 7(11), 129, (2010)
- 10) 大原浩樹, 伊藤恭子, 飯田博之, 松本均, “日本食品科学工業会誌”, 56, 137, (2009)
- 11) 宮地良樹, 松永佳世子, 古川福実, 宇津木龍一, “美容皮膚科学改訂 2 版”, 南山堂, (2009)