

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01302

研究課題名 (和文) エラスチン再生による生体軟組織の伸展性向上と健康長寿医療への展開

研究課題名 (英文) Effects of elastin ingredient on the extensibility of biological soft tissues and the application of elastin to geriatric medicine

研究代表者

山本 衛 (Yamamoto, Ei)

近畿大学・生物理工学部・准教授

研究者番号：00309270

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要 (和文) : エラスチンが組織の伸展性や柔軟性を支配している構成要素であるにもかかわらず, エラスチン成分に着目したバイオメカニクス的研究は, 国内, 国外ともにこれまでに殆ど実施されていない. 本研究では, 損傷した皮膚損傷の修復を促進させる有効成分の探索を行うための基礎データを得ることを最終目標として, ヘアレスマウスの背部皮膚に紫外線を照射した後, エラスチン成分を塗布した皮膚組織に対し力学的試験を実施した. その結果, エラスチンの塗布によって, 紫外線照射による皮膚の硬化を抑制する可能性があることが示唆された. 今後, 皮膚の成分変化などの生化学的もしくは組織形態学的分析を実施する必要があるものと考えられた.

研究成果の概要 (英文) : Collagen and Elastin are structural proteins of the dermis and are closely related to the tissue properties. It is known that ultraviolet rays decrease proteins such as elastin in the dermis. However, the biomechanical contribution of elastin to the skin properties remains unknown. The purpose of the present study was to determine whether the external medication of elastin ingredients is effective for the maintenance and improvement of the skin extensibility. Specifically, we studied the enhanced healing efficacy for ultraviolet damage by the application of an ointment involved elastin ingredients. The results obtained indicate that the stiffening or hardening of skin tissues due to the ultraviolet irradiation is presumably suppressed by the elastin application to skin tissues. Moreover, the elastin application possibly prevents the acanthosis of skin tissues due to the ultraviolet irradiation.

研究分野：バイオメカニクス

キーワード：バイオメカニクス エラスチン 皮膚 力学的特性 損傷治療

### 1. 研究開始当初の背景

エラスチンは、コラーゲンとともに、腱や靭帯、皮膚、血管などの生体軟組織の形態や機能と密接に関与する代表的な生体高分子線維である。これまでに、コラーゲンを対象とした研究は非常に盛んに行われており、バイオマテリアルとしても幅広く応用されている。これに対して、エラスチンに関する研究はコラーゲンと比較して極端に遅れており、エラスチンが組織の伸展性や柔軟性を支配している構成要素であるにもかかわらず、エラスチン成分に着目したバイオメカニクス的研究は、国内、国外ともにこれまでに実施されていない。

これまでの生化学的ならびに組織形態学的研究によって、各生体組織中に存在するエラスチンの含有率や微細構造は、徐々に明らかにされつつある。しかしながら、生体軟組織の力学的機能におけるエラスチン線維の働きや力学的な重要性や貢献度はついては、定量的には解明されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、損傷した皮膚の修復を促進させる有効成分の探索を行うための基礎データを得ることを最終目標として、ヘアレスマウスの背部皮膚に紫外線を照射した後、エラスチン成分含有ワセリンを塗布した皮膚組織に対し力学的試験を実施した。得られた結果より、損傷治癒過程にある皮膚の力学的特性に及ぼすエラスチン成分の影響について検討した。

### 3. 研究の方法

マグロ動脈球よりエラスチン成分を精製した。ミキサーなどで細かく砕いた動脈球に対し、脱脂・脱水・真空乾燥処理を施すことで、不溶性エラスチンを得た (Fig. 1)。その後、シュウ酸処理及び透析処理を行うことで可溶性エラスチンを精製した (Fig. 2)。白色ワセリンに精製した可溶性エラスチンを 5% の割合で混合させ、エラスチン含有ワセリンを作製した。



Fig. 1 Insoluble elastin



Fig. 2 Soluble elastin

14 週齢のヘアレスマウス (雄) 28 匹を用いて実験を行った。28 匹のうち、紫外線照射を施さない 7 匹を Control 群 (n = 7) とし、残りのマウス 21 匹には紫外線照射を施した。そのうち、紫外線照射のみを施した 7 匹を UV 群 (n = 7)、照射後に白色ワセリン 0.1 g を塗布した 7 匹を Placebo 群 (n = 7)、エラスチン含有したワセリンを 0.1 g 塗布した 7 匹を Elastin 群 (n = 7) とした。

紫外線照射実験の開始後 1 週間は、波長 302 nm の UV ハンディーランプを用いて、週 6 日、1 日 1 回 20 分 (紫外線量 1,800 mJ/cm<sup>2</sup>) の条件で紫外線照射を行った。2 週目以降は、紫外線照射を行わずに、ヘアレスマウスの背部皮膚にワセリン及びエラスチン含有ワセリンを 0.1 g 塗布した。実験開始から 4 週間後に、ヘアレスマウス背部皮膚に対して吸引負荷試験を実施した (Fig. 3)。陰圧を作用させ、皮膚を吸引し、その際に生じる皮膚の変形量を赤外線プローブ距離測定器で計測すると同時に吸引圧力を測定した。

吸引圧力とその際に生じる皮膚の変形量から剛性を算出した。一般に、皮膚吸引負荷試験によって得られたデータと、試験片および試験装置の条件より、皮膚のヤング率を推定できることが知られている。皮膚のヤング率  $E$  は以下の式にて得られる。

$$E = \frac{pr(1-\nu)}{2\epsilon \left[ \text{Arcsin} \left( \frac{2rd}{r^2+d^2} \right) - \frac{2rd}{r^2+d^2} \right]}$$

$p$  は吸引圧力、 $r$  は吸引プローブ半径、 $\nu$  は皮膚のポアソン比、 $\epsilon$  は皮膚の厚さ、 $d$  は吸引によって生じる皮膚の変形量を示す。吸引プローブ半径は 4.635 mm であり、皮膚のポアソン比及び厚さは、それぞれ 0.3 及び 3 mm とした。

また、皮膚組織の表面形状を計測するために、紫外線照射後 (実験開始から 7 日目)、および塗布期間終了後 (実験開始から 30 日目) に皮膚のレプリカを作製した。レプリカ作製には、ニトロセルロース、ベンジルアルコール、イソプロパノールの混合液を用いた。作製したレプリカが Fig. 4 に示す。作製した

レプリカに対して、走査型レーザー顕微鏡を用いた表面粗さ計測を実施した。さらに、紫外線照射および塗布期間終了後に、皮膚組織を摘出し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。HE により、表皮層、真皮層の厚さを計測した。

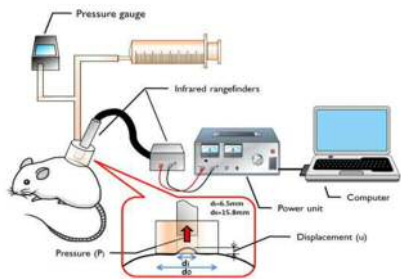


Fig. 3 Suction test



Fig. 4 Skin replica

#### 4. 研究成果

皮膚吸引負荷試験から得られたデータより算出した各群の剛性を Fig. 5 に示す。Control 群と他の 3 群 (UV 群, Placebo 群, Elastin 群) の間に有意差がみられ、紫外線照射によって皮膚の剛性が増加することが示された。一方、Placebo 群と Elastin 群の剛性は、UV 群よりも低値となる傾向がみられたが有意差は確認できなかった。各群のヤング率を Fig. 6 に示す。Control 群と他の 3 群の間には有意差がみられた。また、有意差はみられないものの、UV 群、Placebo 群、Elastin 群の順に低ヤング率を示した。

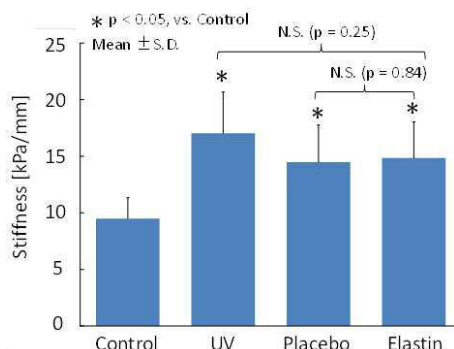


Fig. 5 Stiffness

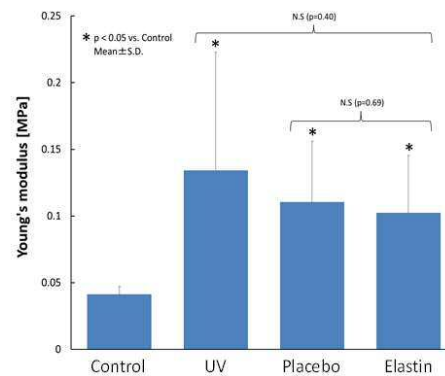


Fig. 6 Young's modulus

レーザー顕微鏡で撮影した皮膚レプリカの画像を Fig. 7 に示す。実験終了時 (実験開始から 30 日目) の UV 群, Placebo 群, Elastin 群の正中線方向の算術平均粗さ (Ra) は、それぞれ  $10.09 \pm 0.53 \mu\text{m}$  (Mean  $\pm$  S.D.),  $8.23 \pm 1.24 \mu\text{m}$ ,  $6.00 \pm 2.01 \mu\text{m}$  であり、エラスチンの塗布によって表面の凹凸が減少する傾向がみられた。HE 染色を施し、撮影した組織画像を Fig. 8 に示す。HE 染色した組織標本から得られた各実験群の表皮厚さを Fig. 9 に示す。紫外線を照射した UV 群, Placebo 群, Elastin 群が、正常皮膚である Control 群に比べ、表皮が有意に厚くなることが示された。また、Elastin 群の表皮厚さは、UV 群と Placebo 群と比較して薄くなる傾向がみられた。

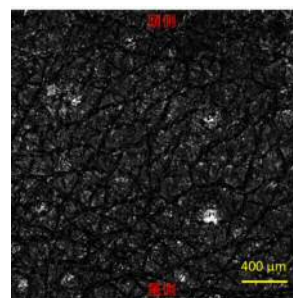


Fig. 7 Image of the skin replica

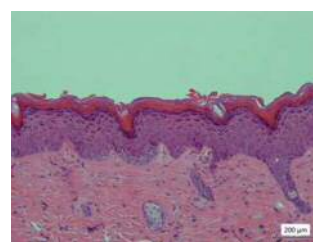


Fig. 8 HE-stained skin tissue

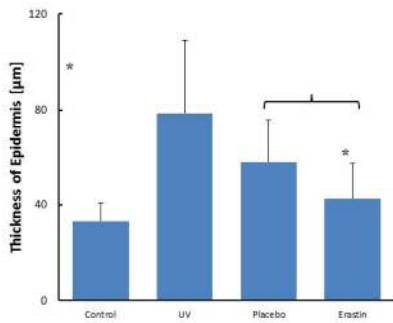


Fig. 9 Epidermis thickness

以上の結果から、紫外線に暴露された皮膚は硬くなり、伸展性に悪影響を及ぼすことが示唆された。紫外線を照射することで、真皮中に存在する細胞外マトリックスであるコラーゲンやエラスチン構造の破壊やそれらの成分の変性、そして線維性タンパク質の分解酵素の活動が促進されることが報告されている。このような生化学的な反応が紫外線照射によって引き起こされ、本研究においても紫外線照射によって損傷した皮膚の伸展性が低下したものと推察される。また、エラスチン成分含有ワセリンを塗布した Elastin 群の剛性及びヤング率が、有意差はないものの UV 群と比較して低値を示すことから、塗布したエラスチンが真皮内のエラスチン変性の抑制に働いたこと、線維芽細胞が活性化し、エラスチン生産量が増加した可能性があることが推察された。先行研究では、エラスチン含有培地中で線維芽細胞が活性化したと報告されており、本研究においても、エラスチンを塗布した皮膚組織において、組織内のエラスチン量が増加した可能性があり、皮膚の伸展性に影響を及ぼしたものと考えられる。今後は、実験試料を増やすとともに、よりエラスチン成分が損傷皮膚に浸透しやすい基材の探索などを行うことで、損傷皮膚の伸展性向上に対するエラスチン塗布の効果を検証する予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

- ① Imai, D., Kawamura, Y., Takemori, K., Ito, H., Yamamoto, E., Influence of elastin application on the mechanical properties of dorsal skins in hairless mice subjected to ultraviolet irradiation, The 12th International Symposium on Advanced Science and

Technology in Experimental Mechanics, 2017, 2017年11月4日, 金沢歌劇座(石川県金沢市).

- ② Yamamoto, E., Takemori, K., Ito, H., Effects of elastin components on the biomechanical and histomorphological properties of ultraviolet-irradiated skins in hairless mice, Fifth Japan-Switzerland Workshop on Biomechanics, p.22, 2017年9月16日, ツェルマツト(スイス).
- ③ Yamamoto, E., Imai, D., Takemori, K., Ito, H., Biomechanical contribution of elastin components to the extensibility of skin tissues, The International Conference on Computational & Experimental Engineering and Science (ICCES2017), 2017年6月28日, フンシャル(ポルトガル).
- ④ 山本衛, 竹森久美子, 伊藤浩行, 紫外線を照射した皮膚組織の生体力学および組織形態学的特性, 日本実験力学会第16回バイオメカニクス分科会講演会, 2017年3月18日, 名古屋大学(愛知県名古屋市).
- ⑤ 山本衛, 須崎有亮, 竹森久美子, 伊藤浩行, 紫外線照射を施した皮膚組織の表面形状観察, 日本機械学会第29回バイオエンジニアリング講演会, 2017年1月16日, 愛知県産業労働センターウインクあいち(愛知県名古屋市).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://waka.kindai.ac.jp/tea/ei/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 衛 (YAMAMOTO Ei)

近畿大学・生物理工学部・准教授

研究者番号: 00309270

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし