

# 培養ヒト線維芽細胞のコラーゲン合成に対する伊豆赤沢海洋深層水の効果

Effects of deep seawater pumped at Izu-Akazawa  
on collagen synthesis in cultured human fibroblasts

野村道康<sup>1</sup>・有賀みづえ<sup>1</sup>・山田勝久<sup>1</sup>・今田千秋<sup>2</sup>・小林武志<sup>2</sup>・濱田(佐藤)奈保子<sup>2</sup>

Michiyasu NOMURA<sup>1</sup>, Mizue ARUGA<sup>1</sup>, Katsuhisa YAMADA<sup>1</sup>,

Chiaki IMADA<sup>2</sup>, Takeshi KOBAYASHI<sup>2</sup> and Naoko HAMADA-SATO<sup>2</sup>

## Abstract

Collagen is an important composition of skin matrix to be paid attention in cosmetology. In the present study, effects of deep seawater on the synthesis of collagen in fibroblasts from human skins (NB1) were examined in culture. The fibroblasts were cultured in the presence of vitamin C (20 µg/mL) with 0 to 20% deep seawater (DSW) pumped from a depth of 800 m (5 km offshore) and in surface seawater (SSW) collected directly at the sea surface off Akazawa in Izu Peninsula, Shizuoka Prefecture, Japan. As a result, the collagen synthesis rose to 1.1 times in SSW compared with no added SSW. In contrast, the collagen synthesis remarkably rose to 1.9 times in DSW compared with no additive DSW. Other observations made during this study suggest that DSW promotes the expression of genes involved in Type I collagen synthesis (COL1) in the early stage in fibroblasts cultured with vitamin C.

**Key Words:** Izu-Akazawa, deep seawater, fibroblast, collagen synthesis, COL1

## 要　旨

コラーゲンは美容を考えるうえで重要な真皮マトリックス成分の一つで、その合成にはビタミンCが必要である。著者らは、ビタミンCの存在下で、ヒトの皮膚由来の線維芽細胞（以下、NB1）を伊豆半島赤沢（水深800m）から取水されている海洋深層水（以下、DSW）とその直上の表面海水（以下、SSW）を添加した培地で培養し、コラーゲンタンパク質（以下、コラーゲン）の合成量の違いを調べた。その結果、SSWでは対照区であるSSW無添加区と比べ1.1倍に上昇したコラーゲン合成量が、DSWではDSW無添加区と比べ1.9倍と、SSWと比較し顕著に上昇した。さらに、DSW添加区のNB1ではI型コラーゲンタンパク質遺伝子（COL1）の発現が早まることが判明した。

**キーワード：**伊豆赤沢、海洋深層水、線維芽細胞、コラーゲン合成、COL1

<sup>1</sup>(株)ディーエイチシー (〒106-0047 東京都港区南麻布2-8-21 南麻布MICビル7F)

<sup>2</sup>東京海洋大学大学院 (〒108-8477 東京都港区港南4-5-7)

## 1. 緒 言

一般に、海洋深層水は低温安定性、清浄性、富栄養性等の性質を有していることから、温度差発電、空調の冷媒、海産物の養殖用海水、飲料水の原料など様々な分野での利用が行われている（高橋、2000）。しかし、ヒトへの利用にあたり、海洋深層水と表面海水との比較をはじめ、海洋深層水が有する有効性の作用機序等を科学的に立証した研究例は極めて少ないので現状である。これまで、海洋深層水がヒトの生体へ及ぼす影響については、アトピー性皮膚炎症候群の患者の髪のミネラル比（Ca/Mg）の正常化（Kimata *et al.*, 2002）、抗酸化能や温浴後の保湿効果（河野・目代、2008）、さらに、マグネシウムによる血中中性脂肪および血糖値の低下、肝機能障害の改善、抗ストレス作用（齋藤ら、2004）等が報告されている。また、ヒトの細胞に及ぼす影響については、細胞増殖の促進及び細胞角化の増強（太田ら、2002）等が報告されており、海洋深層水がヒトに及ぼす影響が徐々に明らかになりつつあるが、今後、海洋深層水を食品、美容等の様々な分野へ用途を拡大するためには、ヒトの生体や細胞に対してより詳細な研究を行う必要がある。

そこで、本研究では海洋深層水の美容分野への応用の可能性を調査するために、美容にとって重要な真皮マトリックス成分の一つであるコラーゲンタンパク質（以下、コラーゲン）に着目し、ヒト皮膚線維芽細胞のコラーゲン合成量に対する影響を調査した。一般に、コラーゲンの合成には、重要な構成成分であるヒドロキシプロリンやヒドロキシリジンの酵素的合成を行うビタミンCが必要である（Murad *et al.*, 1983）。そこで、著者らはビタミンC添加系において、水深800mより取水管により汲み上げられた海洋深層水（以下、DSW）がコラーゲン合成に及ぼす影響について、その直上の海面から採水容器により採水した表面海水（以下、SSW）の場合と比較したほか、得られた結果について分子生物学的手法により解析したところ、興味深い知見が得られたので報告する。

## 2. 材料と方法

### 2.1 細胞及び予備培養方法

本研究では、生体内においてコラーゲンをはじめとする真皮マトリックス成分の合成を担うヒト皮膚由来線維芽細胞（NB1RGB RCB0222、理化学研究所バイオリソースセンター、以下、NB1）の培養を、各試験で別途設定した場合を除き、10%牛胎仔血清含有イーグルMEM（日本製薬製）培地を用い、37°C、5%CO<sub>2</sub>で行った。なお、培養細胞の剥離回収にはトリプシンEDTA（GIBCO製）を用いた。

### 2.2 コラーゲン合成評価系の検討

ビタミンCは、培養時の熱や酸素に極めて不安定であり、数日間に及ぶ評価系においては適当ではないと考えられたため、本研究では、これに代えて水溶性安定化ビタミンC誘導体であるリン酸-L-アスコルビルマグネシウム（昭和电工製）を評価系に用いた。リン酸-L-アスコルビルマグネシウムは、化粧品分野で今日汎用されており、生体内的フォスファターゼによりビタミンCに転換される物質で、本報ではこれをビタミンC（以下、V.C）と表記した。

V.Cはその塩の種類に関わらず、コラーゲン合成能を促進する作用が報告されている（関根ら、2008；Shibayama *et al.*, 2008）。そこで、まず初めに、NB1のコラーゲン合成量とV.Cの添加濃度との相関を調べ、以下の評価に用いるV.Cの添加量を設定した。NB1を96穴マイクロプレートに2×10<sup>4</sup>個/穴となるように播種し、コンフルエントになるまで予備培養を行った。予備培養後、培地成分を除去し、V.Cを0～100μg/mLとなるように加えた0.5%牛胎仔血清含有イーグルMEM培地を添加した後、37°C、5%CO<sub>2</sub>で48時間の評価培養を行った。評価培養後は、細胞中のコラーゲン（collagen）及びコラーゲン以外のタンパク質（以下、非コラーゲン/non collagen）に対する特異的染色性を利用したコラーゲンステインキット（コスモバイオ製）を用いて、コラーゲン及び非コラーゲンの定量を行った。すなわち48時間の評価培養後、培

地成分を除去するために、各ウェルを  $100\text{ }\mu\text{L}$  の PBS(-)（日水製薬製）で 2 回洗浄した後、染色液を各ウェルに  $40\text{ }\mu\text{L}$  添加し、室温、暗所で 30 分間インキュベーションを行った。インキュベーション後、染色液を除去するために各ウェルを  $100\text{ }\mu\text{L}$  の PBS(-) で 5 回洗浄した後、コラーゲン及び非コラーゲンに特異的に結合した色素を抽出するために、各ウェルに  $100\text{ }\mu\text{L}$  の抽出液を添加し、室温で 1 分間インキュベーションを行った。これを用いてマイクロプレートリーダー (MTP-800, コロナ電気製) により、 $490\text{ nm}$  (コラーゲン) と  $595\text{ nm}$  (非コラーゲン) の吸光度を測定し、定量を行った。なお、結果はコラーゲン及び非コラーゲン合成量を、実測値に加えて相対値 (V.C 無添加培養 (対照区) で得られた値を各々 100 とする) でも示した。また、NB1 の細胞活性への影響については MTT 還元法 (山田ら, 2007) によりコラーゲン合成量の測定と同時に確認した。すなわち 48 時間の評価培養後、 $0.5\%$  MTT (同仁化学製) 液を各ウェルに  $20\text{ }\mu\text{L}$  添加して  $37^\circ\text{C}$  で 2 時間インキュベーションを行った。インキュベーション後、培地成分を除去するために、各ウェルを  $100\text{ }\mu\text{L}$  の PBS(-) で 3 回洗浄した後、 $100\text{ }\mu\text{L}$  の  $0.04\text{ mol/L}$  塩酸含有イソプロパノール溶液を分注してさらに 1 時間インキュベーションを行い、生成したフォルマザンを抽出した。これを用いてマイクロプレートリーダーにより  $570\text{--}655\text{ nm}$  の吸光度を測定し、細胞活性の指標とした。

### 2.3 コラーゲン合成に及ぼす DSW の影響 (V.C 無添加系)

**2.2** と同様の操作で NB1 を播種し、コンフルエントになるまで予備培養を行った後、培地成分を除去し、DSW の最終濃度が  $0.1\text{--}10.0\%$  となるように調製した  $0.5\%$  牛胎仔血清含有イーグル MEM 培地を添加し、さらに  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{CO}_2$  で 48 時間の評価培養を行った。評価培養後は、**2.2** と同様に細胞活性及びコラーゲン合成量の測定を行った。なお、結果は DSW 無添加培養で得られたコラーゲン合成量を 100 として相対値で示した。

### 2.4 コラーゲン合成に及ぼす DSW の影響 (V.C 添加系)

**2.2** と同様の操作で NB1 を播種し、コンフルエントになるまで予備培養を行った後、培地成分を除去し、DSW の最終濃度が  $0\text{--}20\%$  となるように調製した  $0.5\%$  牛胎仔血清含有イーグル MEM に、V.C を  $20\text{ }\mu\text{g/mL}$  となるように加えた培地を添加し、さらに  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{CO}_2$  で 48 時間の評価培養を行った。評価培養後は、**2.2** と同様に細胞活性及びコラーゲン合成量の測定を行った。また、DSW の添加によりコラーゲン合成量が顕著に増加した濃度領域においては、SSW を比較対照として同様の試験を行った。なお、結果は DSW 及び SSW 無添加培養で得られたコラーゲン合成量を各々 100 として相対値で示した。

### 2.5 コラーゲン合成に関する分子生物学的解析

V.C 存在下における、DSW による NB1 のコラーゲン合成促進の作用機序を分子生物学的手法により調査するため、I 型コラーゲンの合成に関与する遺伝子 (以下、COL1) の発現量について解析を行った。NB1 を 6 穴マイクロプレートに  $3 \times 10^5$  個/穴となるように播種しコンフルエントになるまで予備培養を行った後、培地成分を除去した。これに**2.4** で用いた評価培地のうち、DSW 無添加及び  $0.5\%$  DSW で調製した培地を添加し、 $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{CO}_2$  で  $0$ ,  $6$ ,  $24$  時間の評価培養を行った。評価培養後、細胞を回収し、SV Total RNA Isolation System (Promega 製) を用いて総 RNA の抽出を行った。First strand cDNA は SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen 製) を用いて  $42^\circ\text{C}$  (120 分間),  $85^\circ\text{C}$  (5 分間) の加熱処理により合成を行った。得られた cDNA は COL1 及び内部標準遺伝子であるグリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) の合成オリゴヌクレオチドプライマー (Table 1) (吉川ら, 2003) と Go Taq Green Master Mix (Promega 製) を用いて PCR 増幅を行った。PCR (My Cycler™ thermal cycler, BIO-RAD 製) による增幅は  $94^\circ\text{C}$  で 2 分間初期加熱後、 $94^\circ\text{C}$  (1 分間),  $60^\circ\text{C}$  (1.5 分間),

Table 1 Primers used in this present study (Yoshikawa *et al.*, 2003)

Gene		Primers
COL1	Forward	TGGATACGCGGACTTTGTTG
	Reverse	CGGCTGGGCCCTTCTTA
GAPDH	Forward	CATTGATGGCAACAATATCCACTT
	Reverse	CAACGGATTGGTCGTATTGG

72°C（2分間）を1サイクルとし、このサイクルを30回繰り返した後、72°C（10分間）の加熱処理を行った。得られたPCR産物は、アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムプロマイド（wako製）で染色した後、紫外線照射（302 nm）により検出されるバンド強度をゲル撮影装置（Bio Doc-IT™ Imaging System, UVP 製）により画像化して比較を行った。

## 2.6 統計処理

得られたデータは、必要に応じて平均値±標準偏差で表した。なお、データ間の有意差はノンパラメトリック多重比較検定（Steel-Dwass 検定）を行い、各試験のDSW無添加及びSSW無添加の値と比較し、 $p<0.05$ を有意と判定した。

## 3. 結 果

### 3.1 コラーゲン合成評価系の検討

V.Cの添加濃度とコラーゲン合成量の相関について調査した結果、V.Cを0～20 μg/mL 添加した系ではV.Cの濃度に依存してコラーゲン合成量が増加したが、20 μg/mL以上の添加ではその傾向が鈍化した（Fig. 1, Table 2）。一方、非コラーゲン量はV.Cの添加によりほとんど影響されずほぼ一定であった。このことから、本研究で用いたV.Cはコラーゲンを特異的に増加させる作用を有することが改めて確認され、評価培地への適切な添加量は20 μg/mLであると判断した。また、V.C添加系において非コラーゲンの合成量にはほとんど影響が認められなかったことから、本研究ではコラーゲン合成量のみを調査した。

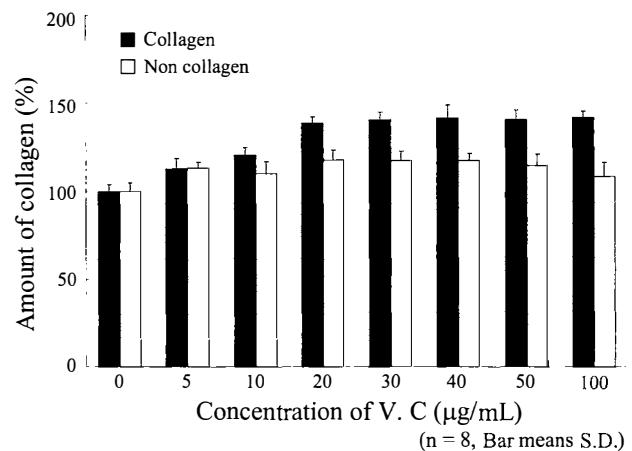


Fig. 1 Effect of V.C (0-100 μg/mL) on collagen synthesis. (n = 8, Bar means S.D.)

Table 2 Amount of collagen and non collagen with each concentration of V.C

V.C (μg/ml)	Collagen (μg/well)	*Non collagen (μg/well)
0	1.70	29.35
5	1.92	33.21
10	2.08	32.23
20	2.44	34.50
30	2.47	34.38
40	2.49	34.38
50	2.48	33.52
100	2.53	31.74

\*Non collagen: Noncollagenous protein

### 3.2 コラーゲン合成に及ぼす DSW の影響

V.C無添加系において、DSW自身がコラーゲン合成に及ぼす影響について調査した結果、DSWには顕著なコラーゲン合成促進作用は認められず、本評価におけるDSWの最高濃度10.0%においても微増（111%， $p<0.05$ ）した程度であった（Fig. 2）。

一方、V.C添加系において、DSWのコラーゲン合成への影響を調べた結果、5～20%になるように調整したDSWではコラーゲン合成量に有意差は認められなかった（Fig. 3）。次に、DSWの最終濃度が0～1.0%となるように調製した培地でコラーゲン合成量を比較した結果、0.1～0.9%DSWにおいて添加濃度に依存してコラーゲン合成量が増加し、特に0.9%DSWでは190%に至る顕著な増加が認められた。なお、1.0%DSWではコラーゲン合成量が0.9%DSWと比較して有意（ $p<0.05$ ）に低下した（Fig. 4a）。次に、最終濃度を0～1.0%に調

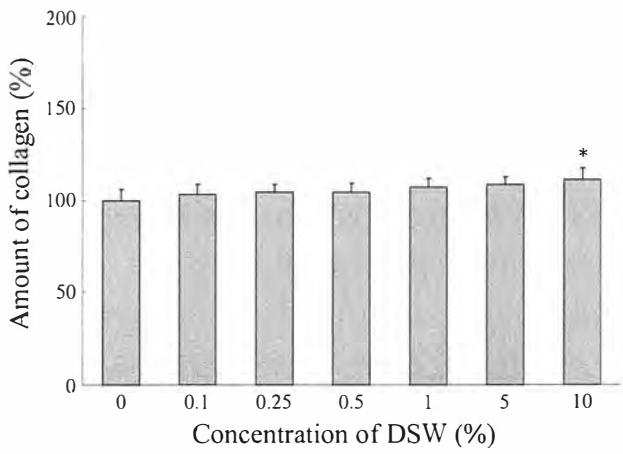


Fig. 2 Effect of DSW (0-10%) on collagen synthesis.

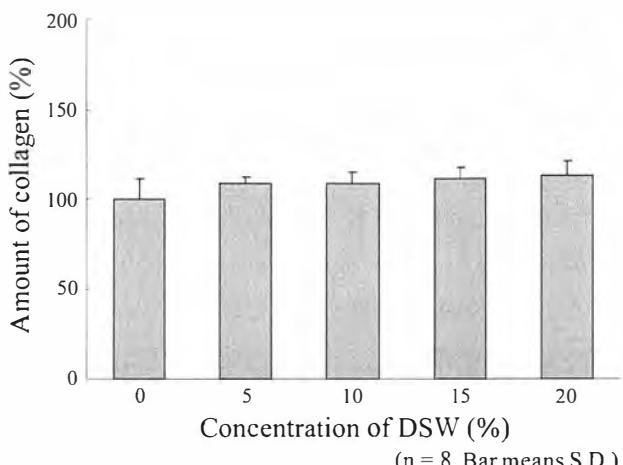


Fig. 3 Effect of DSW (0-20%) on collagen synthesis with V.C.

製したSSWでも同様の試験を行ったところ、0.8～1.0%SSWにおいて若干のコラーゲン合成量の増加がみられたものの、DSWに比べて極めて増加量は小さかった(Fig. 4b)。なお、本試験では、DSW及びSSWの添加による細胞活性の低下は認められなかった(Fig. 5)。以上の結果より、V.C存在下におけるDSWのコラーゲン合成促進作用はSSWには見られない特異的な作用であることが示された。

### 3.3 コラーゲン合成に関与するmRNA (COL1)の発現量

DSW無添加及びコラーゲン合成量の増加が認められた0.5%DSW添加におけるCOL1の発現量について解析を行った結果、DSW無添加区では評価

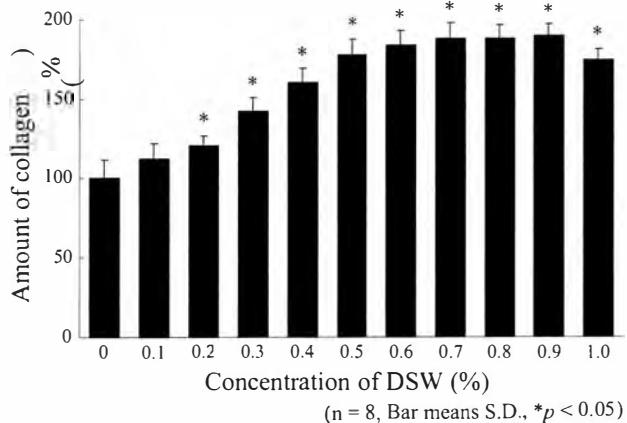


Fig. 4a Effect of DSW (0-1%) on collagen synthesis with V.C.

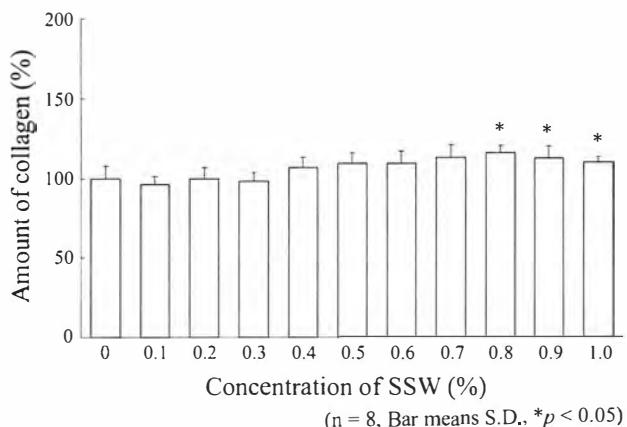


Fig. 4b Effect of SSW (0-1%) on collagen synthesis with V.C.

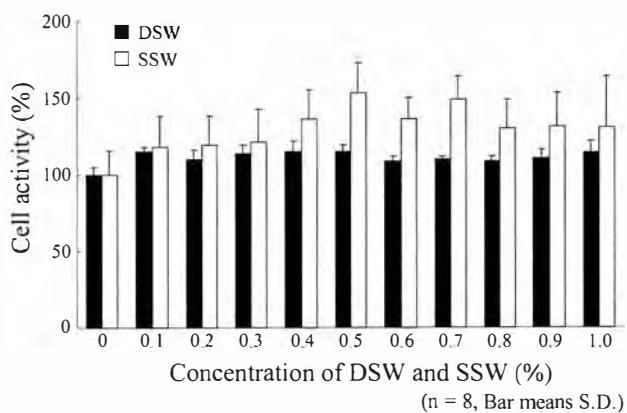


Fig. 5 Effect of DSW and SSW (0-1%) on cell activity.

培養開始24時間後に至ってCOL1の発現量の上昇が認められたのに対し、0.5%DSW添加区では評価培養開始6時間後からCOL1の発現量の上昇が認められた(Fig. 6)。

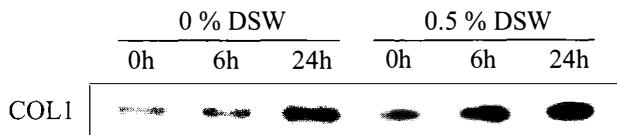


Fig. 6 Expression of COL1 with DSW.

#### 4. 考 察

コラーゲン合成に必要なV.Cを添加した系において、0.2~1.0%のDSWの添加によりコラーゲンの合成量が顕著に増加したことから、この濃度範囲ではDSWの添加により、NB1へのV.Cの影響が強くなっていると推察された。一方、5~20%になるように調整したDSWではコラーゲン合成量に有意差は認められなかったことから、DSW添加によるNB1のコラーゲン合成促進作用には好適な濃度領域が存在すると推察された。なお、コラーゲンの合成は細胞の創傷治癒の際にも活発に行われることが知られている(Varani *et al.*, 2009)。しかし、本研究においてコラーゲン合成量が顕著に増加した0.2~1.0%のDSW添加濃度では、NB1の細胞活性に低下傾向が見られなかったことから、本研究におけるコラーゲン合成量の増加は損傷した細胞の修復作用によるものではないと考えられる。一方、RT-PCRの結果から、0.5%DSWの添加によりCOL1が早期に発現することが示されたことから、この濃度ではコラーゲンの合成開始時期が早期化し、48時間培養によるコラーゲン合成量が増加したと推察された。

このDSWの作用発現の要因として、まずDSWとSSWの含有成分の相違が考えられる。一般にDSWとSSWでは栄養塩類の含有量が異なることが報告されている(木下ら, 2002)。しかし、これらの栄養塩類がコラーゲンの合成に及ぼす影響については未だ明らかになっておらず、今後の興味ある課題である。また、海水中には多くの微量元素が存在し、これらの微量元素は生体に相互作用を示すことが知られている。例えば亜鉛はコバルト、鉛、セレン、銅、ヒ素、金、銀、水銀、白金、鉄、クロム、ニッケル、マンガン、カドミウムなどとの相互関係がすでに証明されている(木村, 2001)。これらの

微量元素の内、マンガンや鉄などのように水深とともに含有量が高くなるものが報告されており(榎田ら, 2009), これらの知見からDSWとSSWに含まれる微量元素間の比率には違いが生じていると推察されることから、DSW中に存在する微量元素の比率が細胞に影響を及ぼす要因となっている可能性も推察される。なお、本研究でNB1に影響を及ぼしたと思われるDSW中の成分が栄養塩類なのか、微量元素なのか、あるいは両者の相互作用によるもののか、ということについては今後、詳細に研究して行きたいと考えている。さらに、V.C存在下におけるDSWとコラーゲン合成との関係について詳細な研究を行っていくにあたり、DSWの添加による細胞内V.C濃度の変動について調査するとともに、哺乳類における細胞内へのビタミンCの取り込みに大きく関与するナトリウム依存性ビタミンC輸送タンパク質(SVCT1及びSVCT2)(Tsukaguchi *et al.*, 1999)に対するDSWの影響について調査することも今後の課題と考えている。

最後に、本報は伊豆赤沢海洋深層水を用いた研究であったが、協力が得られるのであれば日本各地の海洋深層水についても同様の研究を行い、各々の海洋深層水の特徴について生物学的なアプローチを試みたいと考えている。

#### 参考文献

- 榎田和彦・横山由香・吉野美紀・佐藤義夫・加藤義久(2009)駿河湾における微量元素(Mn, Fe, Ni, CuおよびCd)の鉛直分布と変動. 海深研, 10, 9-17.
- Kimata, H., H. Tai, K. Nakagawa, Y. Yokoyama, H. Nakajima and Y. Ikegami (2002) Improvement of skin symptoms and mineral imbalance by drinking deep sea water in patients with atopic eczema/dermatitis syndrome (AEDS). Acta Medica (Hradec Kralove), 452, 83-84.
- 木村美恵子(2001)海のミネラルと健康. 深層海水と健康研究会誌, 1, 39-58.
- 木下淳司・近磯晴・宮原司(2002)小田原沖海洋深層水の栄養塩類特性について. 海深研, 3, 7-13.
- 河野雅弘・目代貴之(2008)深層水ミネラルと生体への効果. 海深研, 9, 15-20.
- Murad, S., S. Tajima, G. R. Johnson, S. Sivarajah and S. R. Pinnell. (1983) Collagen synthesis in cultured human skin fibroblasts: effect of ascorbic acid

- and its analogs. *J. Invest. Dermatol.*, 81, 158-162.
- 太田裕紀子・植松季栄・井上紳太郎 (2002) 富山海洋深層水の正常ヒト表皮細胞に及ぼす影響. *海深研*, 3, 15-19.
- 齋藤佳世・柴田浩志・木曾良信・森谷敏夫・木村美恵子 (2004) 海洋深層水の脂質代謝、自律神経活動に及ぼす影響. *深層海水と健康研究会誌*, 4, 83-88.
- 関根孝・藤堂浩明・横手よし子・杉林堅次 (2008) 化粧品有効成分としての大豆ペプチドの皮膚透過性とその効果に関する研究. *大豆たん白質研究*, 11, 127-131.
- Shibayama, H., M. Hisama, S. Matsuda, M. Ohtsuki, M. Iwaki (2008) Effect of a novel ascorbic derivative, disodium isostearyl 2-O-L-ascorbyl phosphate on human dermal fibroblasts: increased collagen synthesis and inhibition of MMP-1. *Biol. Pharm. Bull.*, 31, 563-568.
- 高橋正征 (2000) 海にねむる資源・海洋深層水. あすなろ書房, 東京, 189 pp.
- Tsukaguchi, H., T. Tokui, B. Mackenzie, U. V. Berger, X. Z. Chen, Y. Wang, R. F. Brubaker and M. A. Hediger (1999) A family of mammalian Na<sup>+</sup>-dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature*, 399, 70-75.
- Varani, J., P. Perone, M. O. Deming, R. L. Warner., M. N. Aslam, N. Bhagavathula, M. K. Dame and J. J. Voorhees (2009) Impaired keratinocyte function on matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) damaged collagen. *Arch. Dermatol. Res.*, 301, 497-506.
- 山田勝久・今田千秋・土屋孝弘・宮本勝城・辻坊裕・小林武志・濱田(佐藤)奈保子 (2007) 海洋環境より分離された糸状菌培養液の美白素材への応用研究. *粧技誌*, 41, 254-260.
- 吉川美弘・鎌田愛子・堂前英資・合田征司・川本章代・小正裕・池尾隆 (2003) IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  刺激がヒト骨芽細胞様細胞の細胞外マトリックスタンパク質 mRNA 発現におよぼす影響. *再生歯誌*, 1, 36-46.

(2010年9月10日受付；2011年5月20日受理)