

皮膚中の環境を再現できる 細胞培養用コラーゲンゲル

東京都立産業技術研究センター
機能化学材料技術部 バイオ技術グループ
研究員・利根川朝人

発表の目次

1. 背景

2. 技術の概要

3. 実用化に向けて

新技術でできること「肌のハリが向上するときの細胞を観察できる」

発表の目次

1. 背景

2. 技術の概要

3. 実用化に向けて

東京都立産業技術研究センターのヘルスケア産業支援

■ヘルスケア産業支援



- ・企業の技術開発を支援するための研究開発を実施し中小企業の製品化・事業化を共に目指す。
- ・2020年より化粧品、食品、医療分野の製品化や事業化を目指す中小企業に向けた技術支援事業を展開している。
- ・研究開発のターゲットとして、**化粧品開発向けの動物実験代替モデル**の開発を実施。

■なぜ動物実験代替モデルが必要なのか

地域	年代	国際動向
EU	2004	化粧品最終製品に対する動物実験の実施禁止
	2009	化粧品成分も含めた動物実験の禁止及びEU域外で動物実験された化粧品の販売禁止(一部毒性試験除く)
	2013	除外規定の撤廃,完全禁止
インド	2014	化粧品のための動物実験の実施及び動物実験された化粧品の輸入の禁止
米国	2018~	ワシントン州など10を超える州において動物実験された化粧品の販売を禁止
韓国	2018	代替法がある場合に限り、動物実験された化粧品の販売の禁止。ただし、特定の製品や原料分野等への適用除外あり

動物実験を使用した製品の販売規制が世界的に始まった

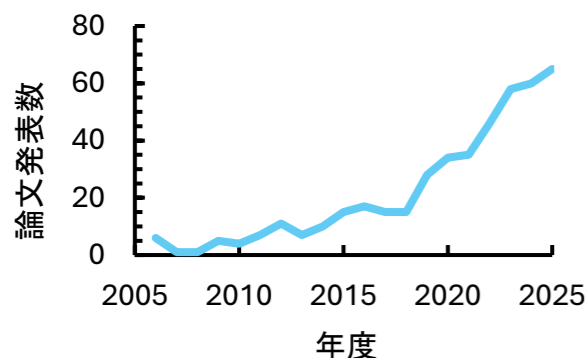
➡ **どのようなモデルが必要か**

近年の化粧品開発に求められる動物代替モデルとは

■近年の開発動向と動物実験代替モデルの選択

- ・近年の開発動向（皮膚科学的知見の重要性が向上）

ダーマコスメの論文発表数推移



- ・これまで情緒的価値やストーリー性を重視していたが、近年は**皮膚科学的知見に基づくメディカルコスメ、ダーマコスメ**などの商品コンセプトが注目されている※。

※) 令和5年度産業経済研究委託事業 化粧品産業の持続的な発展における今後の方向性に関する調査

- ・ダーマコスメ（Dermocosmetics）をキーワードとして論文発表数を調査すると、**2005年から急激に発表数が増加している。**

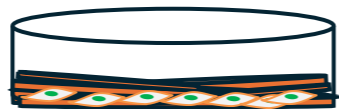
・細胞培養により皮膚を模倣する動物実験代替モデルの例

単層細胞培養実験



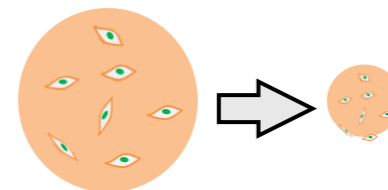
- ・細胞をプラスチック培養皿で培養
- ・細胞形状、タンパク質などを評価
- ・簡易に実験が可能

培養皮膚モデル



- ・細胞を皮膚に分化させて培養
- ・細胞形状、タンパク質などを評価
- ・実験に手間がかかる

コラーゲン収縮実験



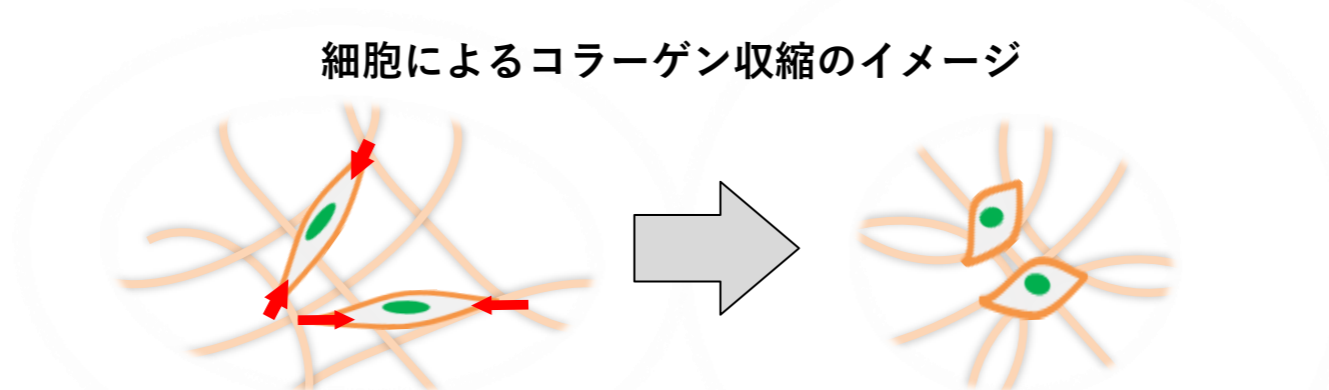
- ・真皮を模したコラーゲングルで細胞を培養
- ・主に収縮率のみで評価
- ・手技は煩雑だが短期間で実験可能

本研究では真皮を模倣できる実験としてコラーゲン収縮実験に着目した

化粧品開発におけるコラーゲンの利用

■化粧品の有効成分を評価する実験：コラーゲン収縮実験

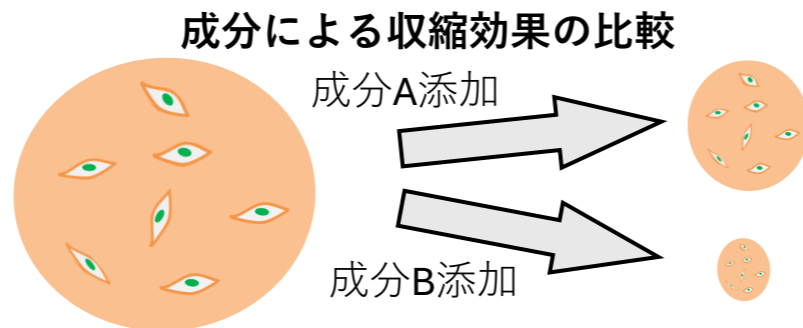
・コラーゲンの収縮とは



コラーゲンのネットワークを細胞が引っ張ることで生じる現象。コラーゲン繊維が引き締められが密に配向することで真皮と類似した構造※を作り出す。細胞によって引き締められたコラーゲン繊維が肌のハリ向上に重要だと考えられている。

※) Bell, E. et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1979.

・コラーゲン収縮実験の利用



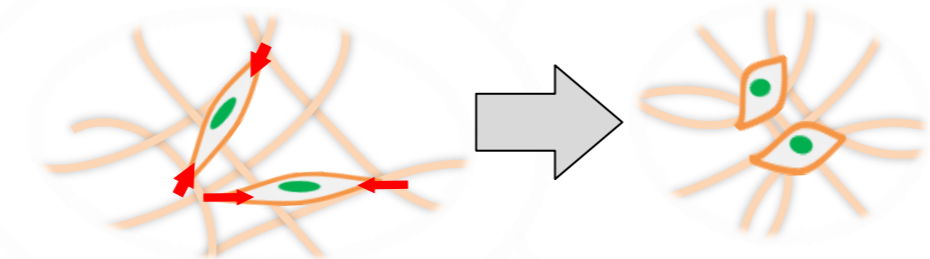
細胞を内部に含有したコラーゲンゲルへ成分を添加して、培養を行い収縮の度合いを比較する。収縮度合いから成分による肌のハリ改善への効果を試験できる。

化粧品成分のハリ改善効果の評価に使用されている

従来のコラーゲン収縮実験の疑問点

■ コラーゲンを収縮させた細胞はどうなっているのか

コラーゲン収縮による細胞の変化



- ・ゲルから働く張力が急激に消失することで、細胞が縮まり内部の骨格が崩壊。最終的に細胞が死んでしまう。※1
- ・動物の癒痕（損傷後の修復途中の組織）と、細胞の形状や内部のタンパク質発現が類似しており、創傷治癒のモデルとして有用性が報告されている。※2

※1)Grinnell, F., et al., *Experimental cell research*, 1999.

※2)Carlson, M. A. et al., *Wound repair and regeneration*, 2004.

肌のハリモデルなのか
それとも傷修復モデルなのか



従来モデルと本来欲しいモデルの比較

モデル	コラーゲン繊維	細胞
従来モデル	真皮組織に類似	癒痕に類似
欲しいモデル	真皮組織に類似	真皮の細胞に類似

細胞が正常ではない
↓
収縮が生じたときに、細胞にどんな影響があるかメカニズム調査が不可
↓
肌のモデルとして皮膚科学的な考察は困難

収縮したゲルの内部で真皮の細胞を再現したい (新技術の目的)

新技術の着想：張力を調節したコラーゲンゲル

■問題解決の着想

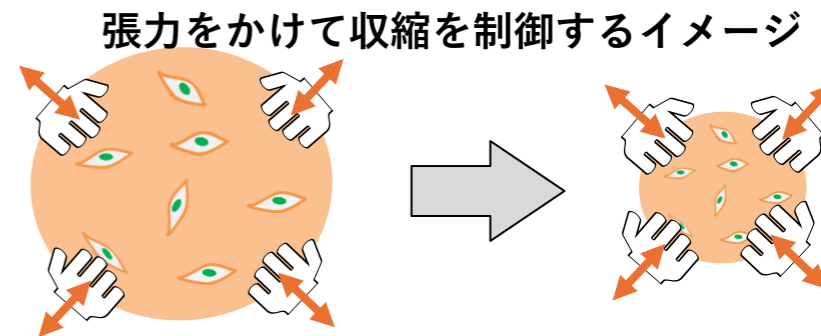
コラーゲン収縮時に...

従来法の原因

ゲル周囲の張力が急激に消失すると、癬痕様の細胞に変化する

新技術の解決方法

細胞が癬痕様に変化しないように、ゲル周囲の張力を調節する



新技術の仮説：ゲル周囲へ張力をかけながら収縮を制御することで細胞への変化を調節できるのではないか

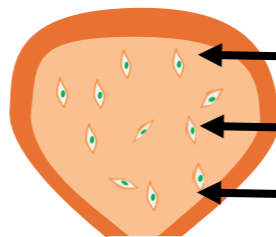
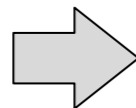
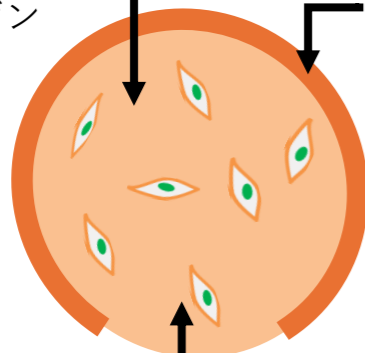
■C型枠で張力を制御するコラーゲン収縮モデルの開発

モデルの設計指針

細胞を含有した
低濃度コラーゲン

高密度コラーゲンの枠

枠がないスペース



弱い収縮

中程度の収縮

強い収縮

C型枠からの張力により
段階的に収縮を制御できる
モデルによって細胞に生じる
変化を調整する

発表の目次

1. 背景

2. 技術の概要

3. 実用化に向けて

実験概要

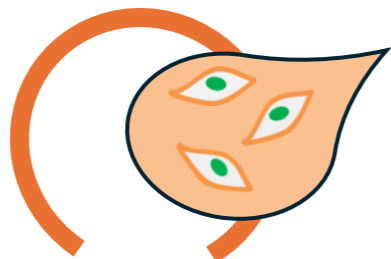
■ モデルの作製と薄切切片の観察

・モデルの作製方法

1) 4%コラーゲンの
3Dプリント



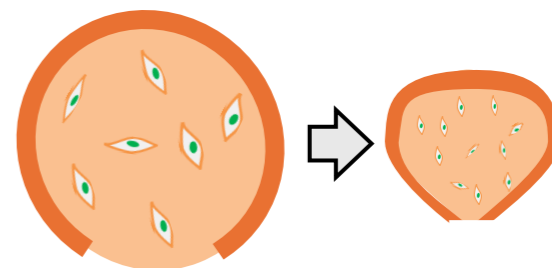
2) 0.4%コラーゲン+
線維芽細胞を注入



3) ゲル化

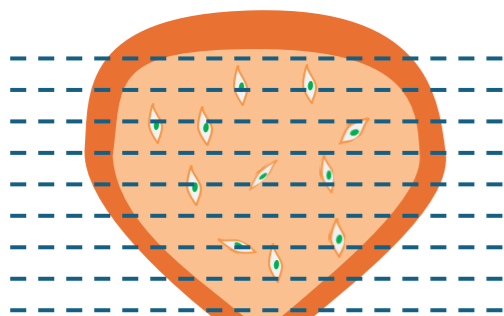


4) 細胞培養による収縮実験



・モデルの評価方法

1) 収縮後のモデルを薄切

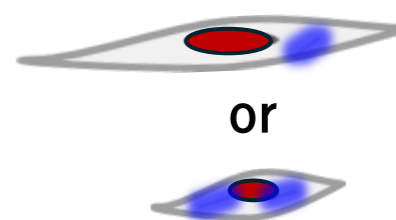


2) 薄切切片を染色して観察



- ・ HE染色 (形状評価)
- ・ 免疫染色 (タンパク質発現の評価)

3) 正常な細胞との類似性評価



正常

or

瘢痕様

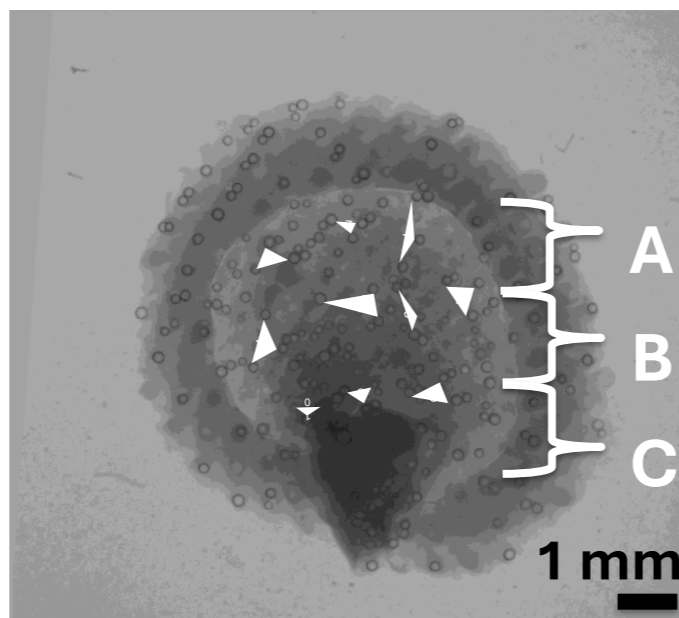
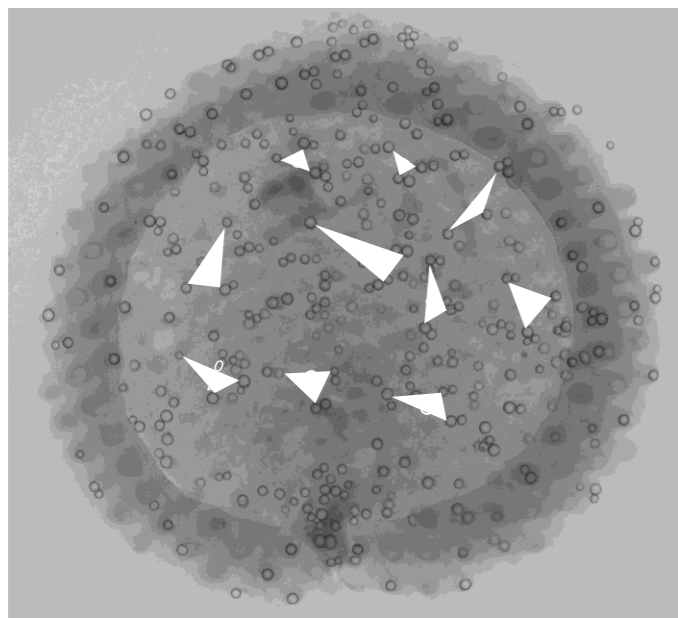
収縮を制御したそれぞれの部位を観察し細胞の変化を評価した

コラーゲンモデルの収縮実験

■段階的な収縮制御

C型枠が収縮に与える影響を評価するために、枠がない部分(画像下部分)から1.5mmずつの領域で区切り、収縮前の面積と比較した。

収縮の様子
(左 培養直後, 右 培養3日後)



面積%
(収縮前を100%)

A : $64.5 \pm 19\%$

B : $39.2 \pm 5.9\%$

C : $25.6 \pm 11\%$

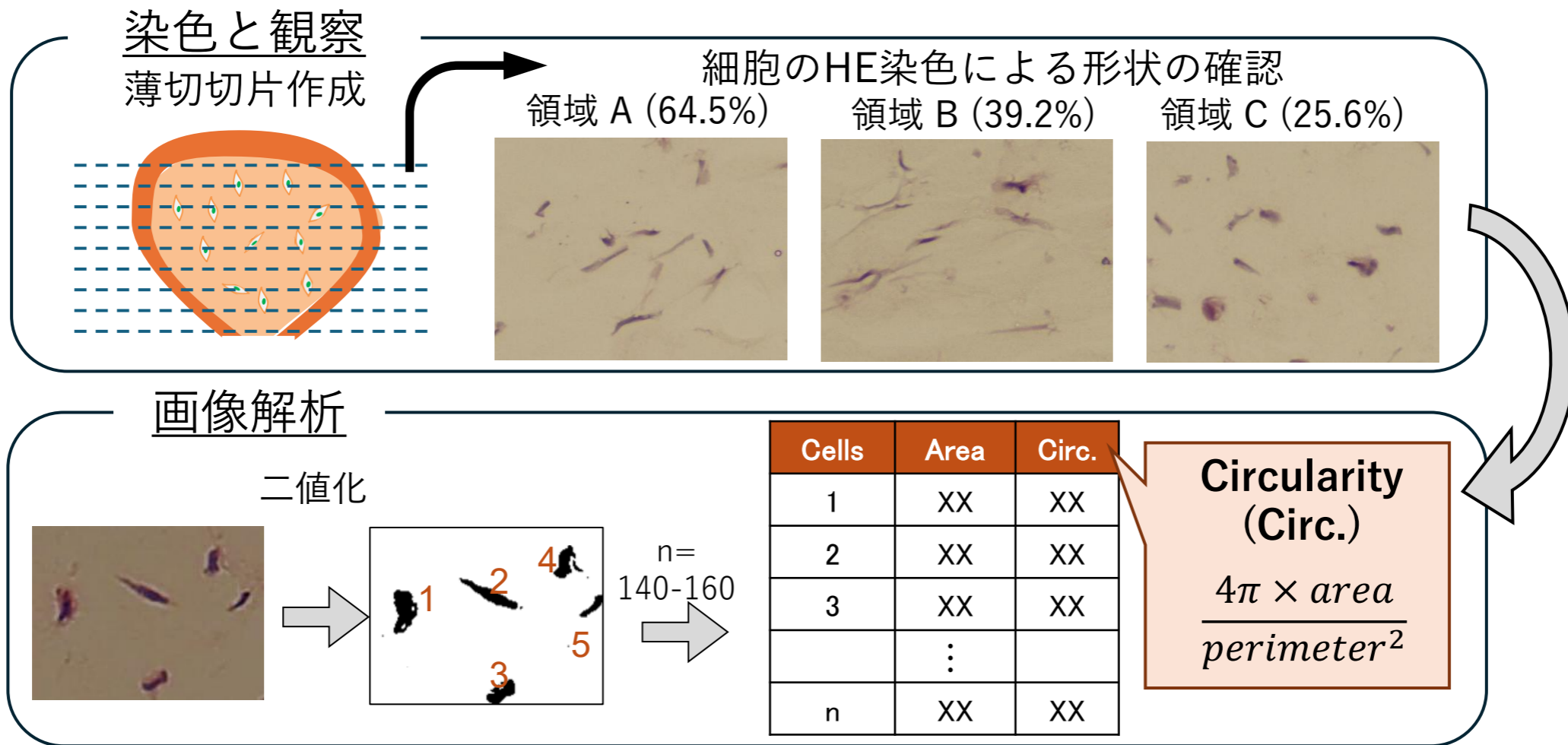
段階的に強さが異なるコラーゲン収縮を再現することに成功

➡ 各領域において中の細胞はどのようなになっているのか

モデルの評価1: 細胞形状の評価(データ取得)

■ 薄切切片の作製とHE染色

収縮制御による細胞形状への影響を評価するために、収縮強度が異なる3つの領域について細胞の形状を確認した。観察した細胞の画像を画像解析で2値化し面積と真円度を取得した。

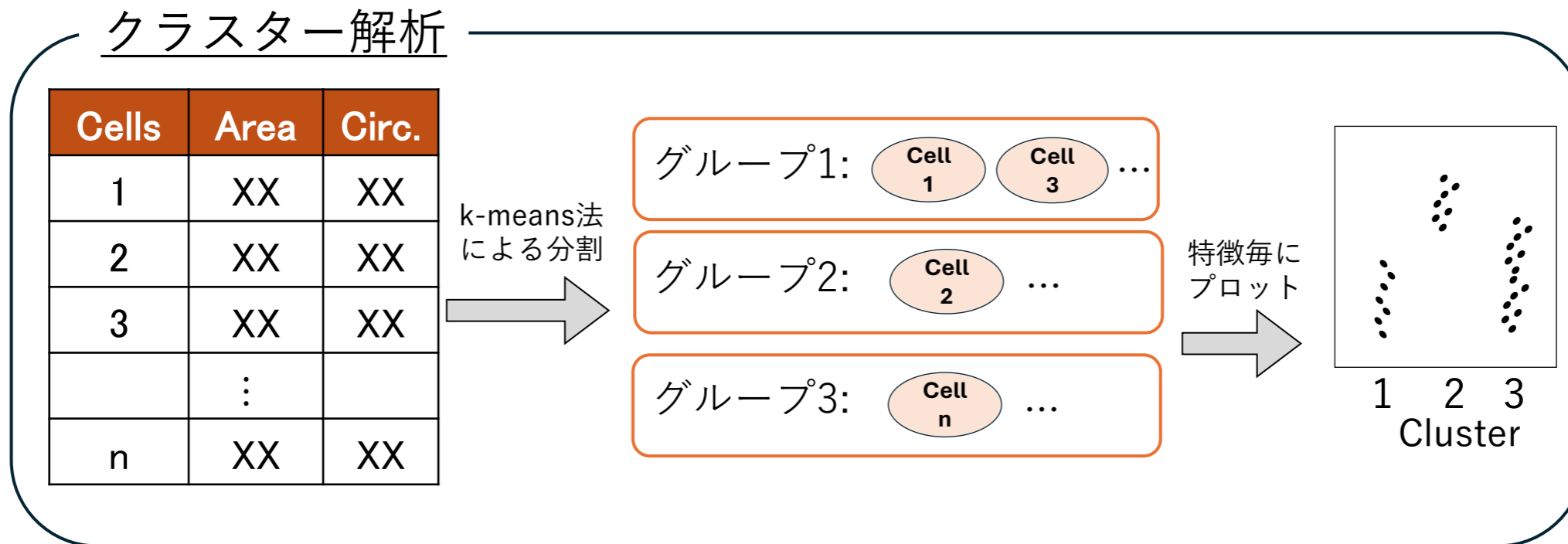


収縮が異なる領域における細胞形状のデータを抽出

モデルの評価1: 細胞形状の評価(データ解析)

■細胞形状の特徴によるグループ分け

収縮度合いによって変化した細胞形状の分布を可視化するため、収縮強度が異なる3つの領域に存在する一つ一つ細胞について、面積と真円度の項目に着目してグループ分けを行った。



各領域に含まれる細胞の形状（面積、真円度）を解析

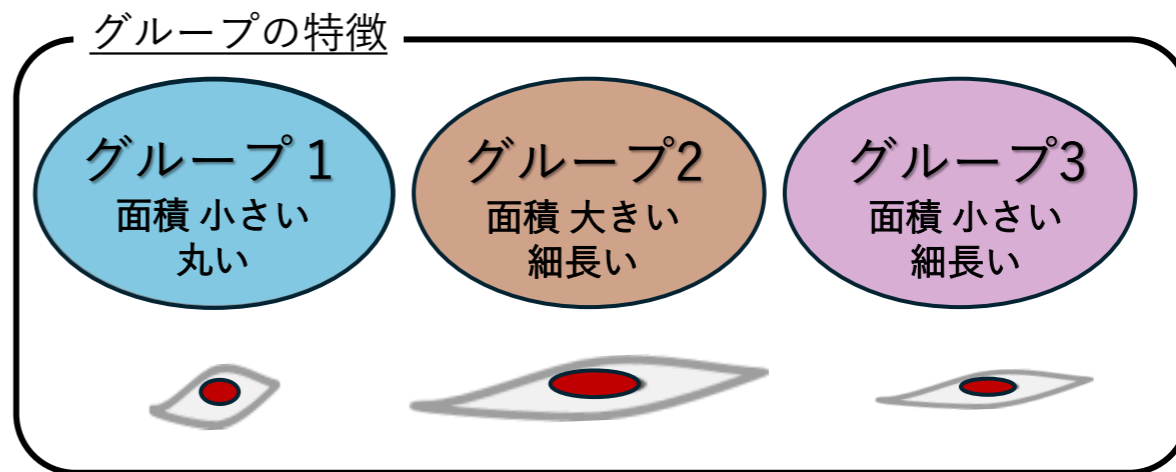
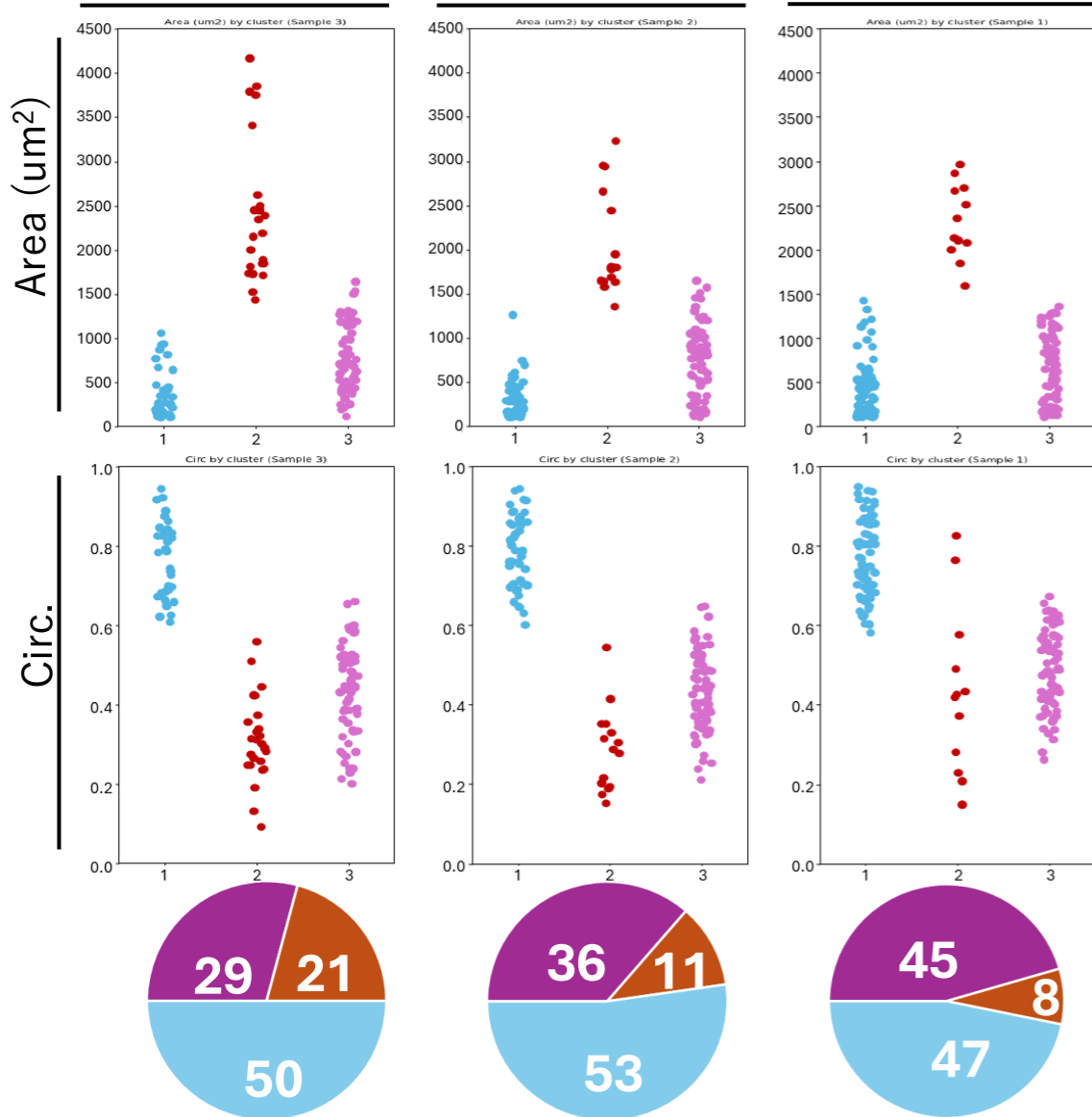
➡ 収縮が異なる領域毎にどのような特徴の細胞が分布するのか

モデルの評価1: 細胞形状の評価(解析結果)

領域 A(64.5%)

領域 B(39.2%)

領域 C(25.6%)



・収縮が強くなると細胞はグループ2からグループ3へ分布が変化
→強収縮環境では瘢痕の様な特徴 (従来モデルと類似)

・弱-中収縮環境ではグループ2の細胞が増加
→大きく細長い細胞は真皮網状層の細胞と類似※

※) Jipu, R. et al., *Biomedicines*, 2025.

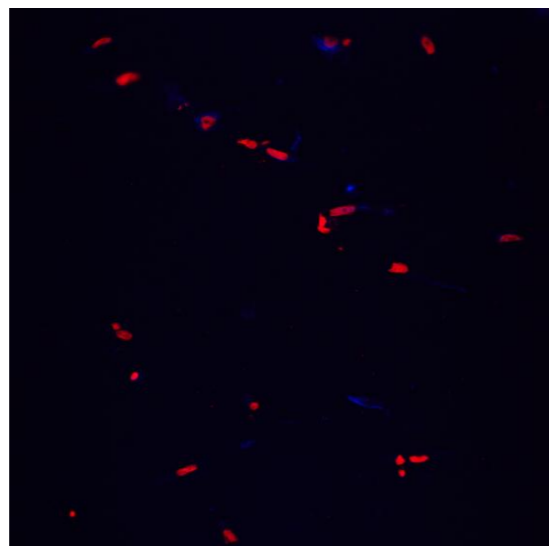
モデルの評価 2: タンパク質発現の評価

■免疫染色

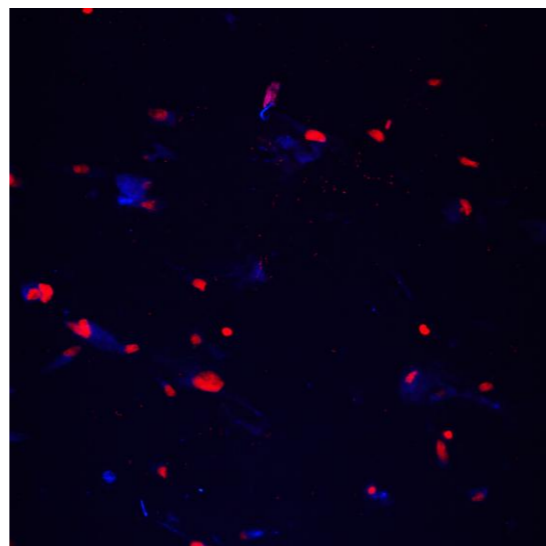
収縮制御による細胞内のタンパク質発現の変化を評価するために、収縮強度が異なる3つの領域について細胞内に発現しているタンパク質を確認した。**α-SMAと呼ばれる瘢痕の細胞内で強く発現するタンパク質**(筋線維芽細胞の分化マーカー)と**細胞の核**を染色した。

各領域におけるタンパク質発現の変化
(青: α-SMA, 赤:細胞核)

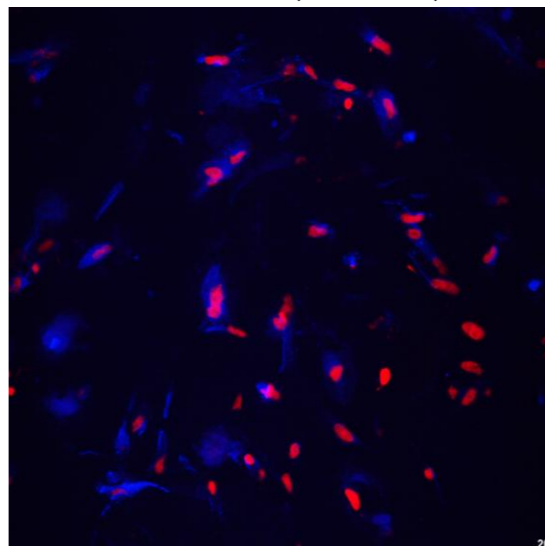
領域 A (64.5%)



領域 B (39.2%)



領域 C (25.6%)

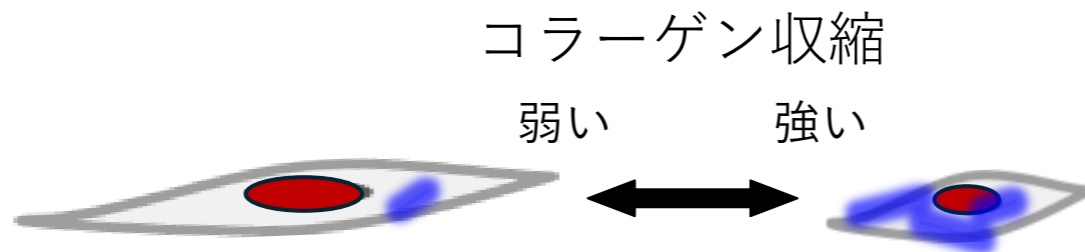


- ・ 強収縮環境では細胞内にα-SMAの発現が強い→タンパク質は瘢痕と同様の特徴(従来モデルと同様)
- ・ 弱-中収縮環境ではα-SMA発現細胞が減少→正常な真皮細胞に類似

小括

■まとめ

- ・収縮が強い領域では、傷の修復を担う細胞の特徴(面積が小さく内部で α -SMAが強く発現)が多くみられた。
- ・収縮が弱い-中程度の領域では、正常な細胞に近い特徴(面積が大きく細長い形状、 α -SMAの発現が少ない細胞)が増加した



モデル	コラーゲン繊維	細胞
従来モデル	真皮組織に類似	瘢痕に類似
本研究のモデル	真皮組織に類似	収縮が強い: 瘢痕に類似
		収縮が中～弱い: 真皮の細胞に類似?

疑問点：コラーゲン収縮実験は肌のハリモデルなのか？傷修復モデルなのか？

収縮が弱い～中程度の領域では肌のハリを評価できるモデルになる可能性が示唆された

発表の目次

1. 背景

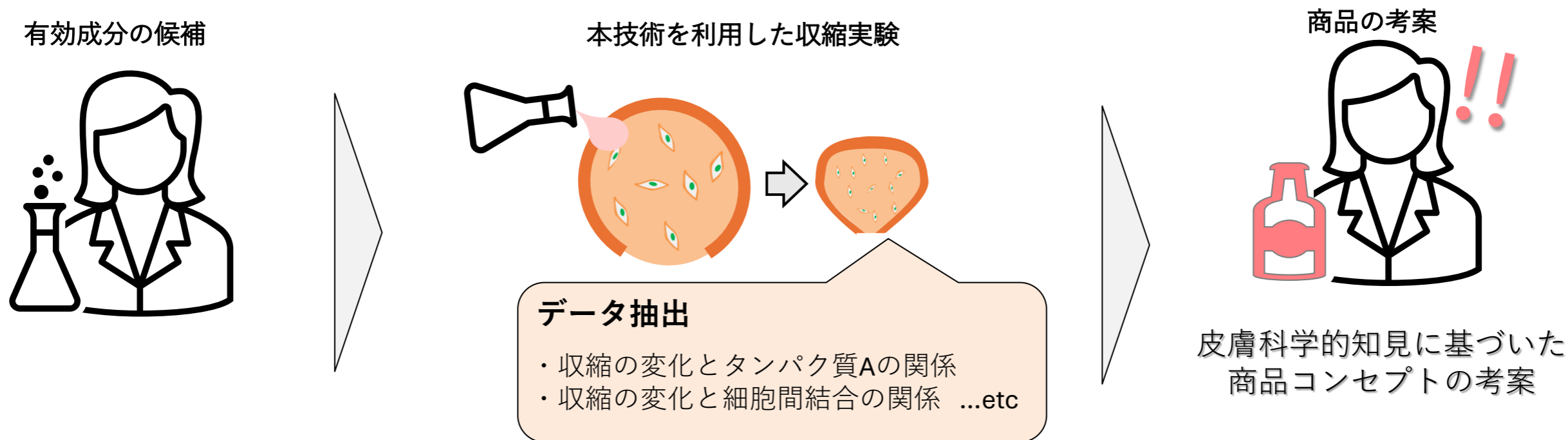
2. 技術の概要

3. 実用化に向けて

新技術で想定される使用用途

■有効性データ取得により皮膚科学的に基づく商品コンセプトの考案をサポート

化粧品メーカーが所有する有効成分について、本技術のモデルを使用することで肌のハリへの有効性を評価できる。特に有効成分が細胞へ与える影響を解明することで、有効性に関わる皮膚科学的な知見を得ることができる。



化粧品成分の肌のハリへの有効性を評価するモデルとして利用が期待できる

一方で、実用化に向けての課題もあり...

実用化への課題1

■課題:実験工程が多い

従来法では3段階の実験（工程2-4）であったが新技術では全行程で6段階の実験が必要になり、実験の煩雑さが技術普及のハードルになることが懸念される。

準備から観察までの一覧の工程

1) コラーゲンの
3Dプリント

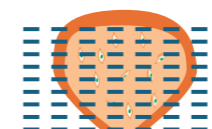
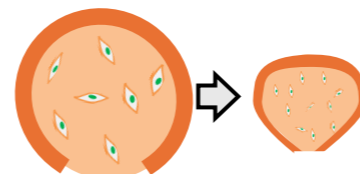
2) コラーゲンと
細胞を注入

3) ゲル化

4) 収縮実験

5) モデルを薄切

6) 染色と観察



改善すべき点

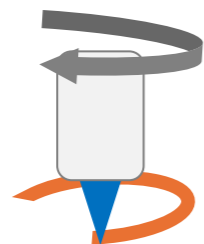
- ・ 実験毎にコラーゲンの調整と3Dプリントが必要になる。
- ・ 使用するコラーゲンは要時調整が必須。保管できない。

共同研究で解決したい課題1：工程1の短縮および煩雑さの解消

実用化への課題と共同研究先企業への期待1

■枠の作製方法の変更

現状：4%コラーゲンの3Dプリント



- ・形の調整が可能
- ・その場でコラーゲンを調整する

変更案：保存性に優れた材料で代替



- ・形の調整は難しい
- ・乾燥して保存可能

■共同研究への期待

- ・保存性に優れかつ細胞培養へ利用できる素材を扱うメーカーと共同研究を希望
- ・枠を保管できるようになることで、実験工程の短縮を期待
- ・煩雑さを解消することで、本技術の手法をより広いユーザーへの展開できると期待

実用化への課題2

■課題:実験工程が多い

従来法では3段階の実験（工程2-4）であったが新技術では全行程で6段階の実験が必要になり、技術普及のハードルになることが懸念される。

準備から観察までの一覧の工程

1) コラーゲンの
3Dプリント



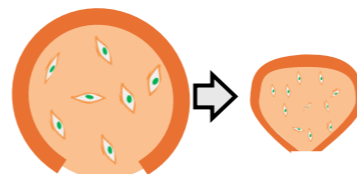
2) コラーゲンと
細胞を注入



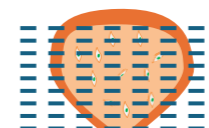
3) ゲル化



4) 収縮実験



5) モデルを薄切



6) 染色と観察



改善すべき点

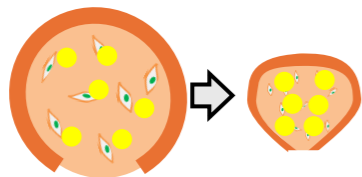
- ・ 工程5,6の切片作製と染色実験は手技が煩雑
- ・ 工程4で収縮を評価できれば、従来法と同様の使い方が可能

共同研究で解決したい課題2：工程5,6を保留して工程4で簡易に評価する方法の開発

実用化への課題と共同研究先企業への期待2

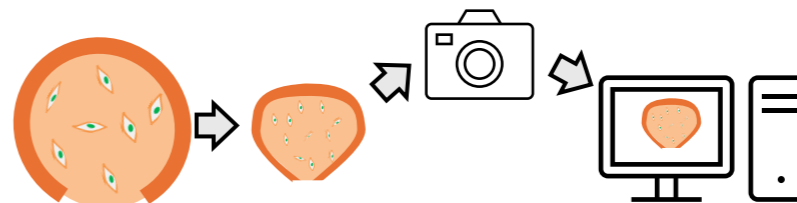
■収縮の評価方法の改善

現状：ゲル上にビーズを分散させて収縮を算出



- ・収縮を算出できる部位の解像度が低い(1.5mm程度)
- ・ビーズ分散の手間がかかる

変更案：画像解析等の手法で解析



- ・解像度向上が期待できる
- ・ビーズ分散が必要ない

■共同研究への期待

- ・画像解析技術やアプリ開発が可能な企業と共同研究を希望
- ・ビーズ分散工程の短縮を期待
- ・染色による解析前に、従来法と同様の簡便な評価ができる選択肢を提供
- ・従来法を置き換えるモデルとして利用者数向上を期待

社会実装への道筋

時期	取り組む課題や明らかにしたい原理等	社会実装へ取り組みについて記載
基礎研究	・コラーゲン濃縮方法、モデルの設計が完了、特許出願	
現在	・C型モデル収縮時の細胞挙動を解明	
1-2年後	・枠作製方法の変更 ・実験工程の短縮が実現	例: 新たな素材による枠形成法の確立
1-2年後	・収縮の評価方法の改善 ・収縮実験の簡便化を実現	例: 画像解析を用いたC型モデル収縮の解析

そのほか、各種化粧品の有効性評価を実施する企業との共同研究による、評価系のバリデーション実施を随時受け付けています。

共同研究先企業への貢献

- 本格導入にあたっての技術指導等
- 都産技研の制度を利用したマッチファンディング型共同研究の実施

ご興味がある方はお気軽にお声かけください。

新技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 細胞培養用のゲル基材の収縮を抑制するための枠、枠とゲル基材とを含む培養キット、培養キットを用いた細胞培養方法、及び培養キットを用いた評価方法
- 出願番号 : 特願2025-005129
- 出願人 : (地独) 東京都立産業技術研究センター、落合博子
- 発明者 : 利根川朝人、落合博子

お問い合わせ先

地方独立行政法人東京都立産業技術研究センター
企画部 開発企画室

TEL 03-5530-2528

e-mail kaihatsu@iri-tokyo.jp

ご清聴ありがとうございました