

注入用コラーゲンのラット皮内注入後の組織学的変化

浜崎多美子

皮膚軟部組織の浅い陥凹性瘢痕や変形, しわに対して軟部組織増量の目的で使用される注入用牛アテロコラーゲン, ザイダーム コラーゲン注入剤 (ZCI), コーケン アテロコラーゲン インプラント (KAI) の2種類に関してラット皮内注入後の経時的变化を組織学的に観察, 比較した。ともに H-E 染色で真皮から真皮下に好酸性の無構造な部分として認められた。ZCI は周囲組織と境界明瞭な塊状で, 経時的にも著変を認めず, コラーゲン内部への線維芽細胞の浸潤を認めた。KAI は周囲組織と一部不明瞭な細かいウェーブ状の境界をもち, 濃淡が大きくびまん性に広がっていた。徐々に表層より細かく分散し真皮との混在が顕著で, 線維芽細胞の内部への浸潤は少なかった。ZCI が線維性, KAI が非線維性という性状によるコラーゲナーゼ分解性の差が2剤の組織像の違いに関与すると考えられた。また真皮内へ注入されたコラーゲンが, 真皮下に注入された場合より宿主コラーゲンによる置換が早い。このため, 真皮内への注入コラーゲンの混在程度が, 両者の経時的な残存に影響していると考えられた。

(平成7年3月24日採用)

Histologic Response to Intracutaneous Injectable Collagen in the Rat

Tamiko HAMASAKI

An injectable form of bovine dermal atelocollagen is widely used clinically to correct dermal scars and rhytides. The histologic fate and comparison of two types of injectable collagen, Zyderm Collagen Implant (ZCI) and Koken Atelocollagen Implant (KAI), administered intracutaneously to rats were studied. Biopsies were taken sequentially and analyzed by Hematoxylin-Eosin, Azan and Masson stains. Both types of collagen were homogeneous and eosinophilic. ZCI could be clearly distinguished and no apparent change was seen by 49 days postimplantation. Fibroblasts infiltrated into the injected collagen. KAI was observed to spread over a diffuse area with differential density. It had a small wavy border and part of it was not clearly distinguishable. Histological difference of these implanted collagens seems to be due to their structure, i. e., ZCI is fibrillar, whereas KAI is nonfibrillar. They could be differently degraded by the collagenase. It was also concluded that the volume of intradermally collagen had a significant effect on residual collagen, because the intradermally injected collagen was replaced by host collagen sooner than the subcutaneously injected collagen. (Accepted on March 24, 1995) *Kawasaki Igakkaishi* 21(1) : 33-40, 1995

Key Words ① Injectable collagen

② Histology

はじめに

形成外科を受診する患者の中で皮膚軟部組織の浅い陥凹性瘢痕や変形、加齢によるしわなど変形が軽微なため外科的治療の適応とならない症例がある。このような症例に対する治療法のひとつとして注入療法がある。歴史的には、注入材料としてパラフィン、シリコン¹⁾などが用いられたこともあるが、満足な結果は得られなかった。1976年 Knapp²⁾らによって注入用牛真皮コラーゲンが発表され、製品化後これからの症例に対する治療法として頻用されてきた。その効果については、治療部位、性状、注入回数によって差異が認められているものの、加齢によるしわを中心に高い有効率の報告がある。しかし、注入時に over correction が必要とされるように注入後の吸収を認める。各種コラーゲン剤の注入後の組織内での変化については、本剤の使用目的が美容的要素が高いため人での経時的な組織学的追究、比較が難しい。このため本研究は、ラットを用い、2種の注入用コラーゲンの注入後の経時的な組織変化を観察し比較することを目的とした。

実験材料および方法

本実験には2種類の注入用コラーゲンを使用した。ひとつはザイダーム コラーゲン注入剤 (Collagen Corporation, Palo Alto, CA) (以下 ZCI) であり、他方はコーケン アテロコラーゲン インプラント (Koken Company, Ltd. Tokyo) (以下 KAI) である。両者とも牛真皮のコラーゲンを抽出し、コラーゲン分子 (トロポコラーゲン) の両末端に存在しコラーゲンの主要な坑原決定基が存在するテロペプチドをペプシン処理により除外したアテロコラーゲンである。ZCI はこのアテロコラーゲン、蛋白質濃度 35 mg/ml を 0.3% 生理的燐酸緩衝液に分散

させた線維性コラーゲン懸濁液で、コラーゲン注入剤の95%はI型で、5%はIII型である。一方 KAI は、蛋白質濃度 30 mg/ml 濃度で生理的燐酸緩衝液に溶解された非線維性溶液である。10°C以下の温度ではほぼ透明であるが、37°Cに加温するとコラーゲン線維形成がおこり白濁する。

実験は、ウィスター系雄ラット (200~220 g) の15匹を用いた。ネンプタル腹腔内麻酔後、背部を剃毛し皮内に注入用コラーゲン2種 (ZCI, KAI) を30ゲージ皮内針にて0.1 ml ずつ、1匹に各2か所注入した。注入直後、2, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49日目に各3か所の注入部位を表皮を含めて摘出した。生検標本は10%ホルマリン固定、パラフィン包埋後、Hematoxylin-Eosin 染色およびAzan 染色、Masson 染色を行い光顕にて観察した。

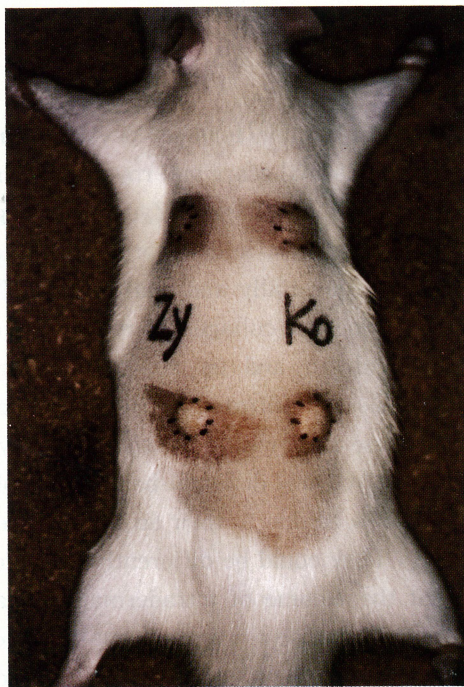


Fig. 1. Two types of injectable collagen implant are injected in the dorsal skin of the rat. Zy: Zyderm Collagen Implant (I), Ko: Koken Atelocollagen Implant.

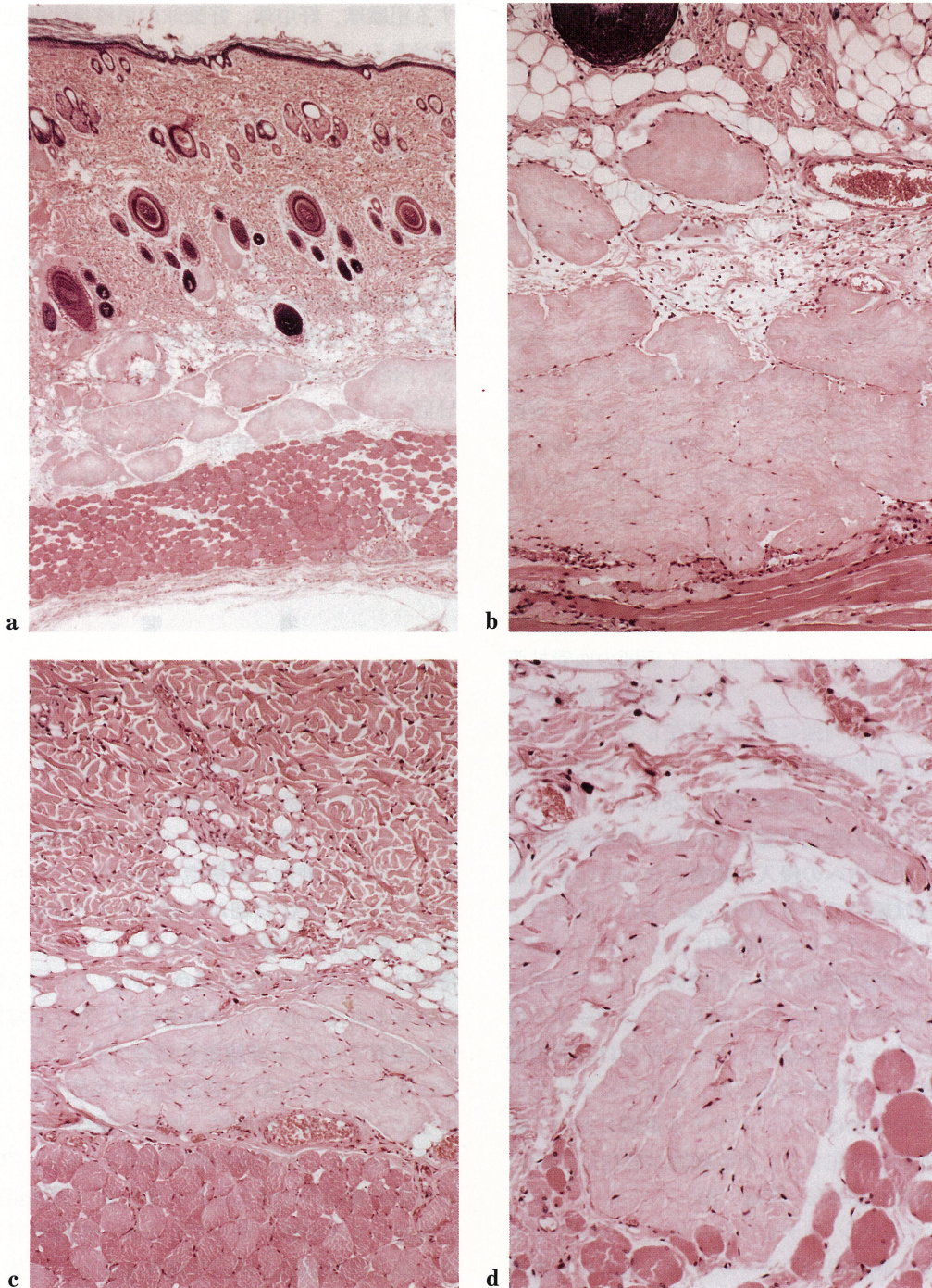


Fig. 2. Biopsy after injection with Zyderm Collagen Implant (I). (H-E)

- a) 2 hours postimplantation. Injected collagen is observed as eosinophilic and amorphous islands. ($\times 28$)
- b) 2 days postimplantation. Mononuclear cells infiltrated around the injected collagen. ($\times 70$)
- c) 28 days postimplantation. Fibroblasts infiltrated into the injected collagen. ($\times 70$)
- d) 49 days postimplantation. The injected collagen could be clearly distinguished and no apparent change was seen. ($\times 140$)

結 果

肉眼的所見：注入直後の状態では、**Figure 1**のように4か所の注入部位は、外観状は隆起を認める。2種とも14日目には、平坦化している。

組織学的所見：H-E染色標本を中心に観察を行った。

1) ザイダーム コラーゲン注入剤

注入2時間後：注入したコラーゲンは、真皮から真皮下に無構造の好酸性で濃淡差の小さい、比較的大きな塊状に分かれて入っている。周囲真皮および脂肪組織とは、明瞭な境界を有している(**Fig. 2a**)。この特徴は2日目のAzan染色でも明白である(**Fig. 4a**)。2日目：コラーゲンを中心とした周囲組織にリンパ球を中心とし、組織球、好中球、好酸球の単核炎症細胞の浸潤を認める。コラーゲン塊の中への細胞浸潤は少ない。注入部を中心として周囲の血管拡張を認める(**Fig. 2b**)。7日目：線維芽細胞がコラーゲン境界周囲に線状に存在している。14日目：炎症細胞浸潤は減少し、一方、異物巨細胞などの異物反応は認めない。28日目：コラーゲン注入状態の変化は認めないが、線維芽細胞のコラーゲン内への侵入が顕著となっている。血管拡張は続いている(**Fig. 2c, 5a**)。35日目：コラーゲンバンドルが明瞭になってきているが、内部への脂肪細胞の侵入を認め、バンドル間に間隙が形成されている。49日目：コラーゲンは残存している。真皮内に入った部分は周囲組織と混在し、不明瞭であるが、真皮下に入っている部分の変化はない。バンドル間隙に沿って線維芽細胞が存在する。炎症細胞が散在しており、血管拡張も認める(**Fig. 2d**)。

2) コーケン アテロコラーゲン インプラント

注入2時間後：コラーゲンは、真皮から真皮下にびまん性に広がるように入っている。周囲組織との境界は細かいウェーブ状で一部不明瞭である。好酸性色調の濃淡が顕著である(**Fig. 3a**)。この特徴は2日目のAzan染色でも明白である(**Fig. 4b**)。2日目：リンパ球を中心と

する組織球、好中球、好酸球の単核炎症細胞浸潤がある。周囲組織および一部コラーゲンが細かく縮れたようになった部分では、内部への浸潤を認める。注入部を中心として周囲の血管拡張を認める(**Fig. 3b**)。7日目：線維芽細胞がコラーゲン境界周囲に見られる。14日目：2日目に比べ炎症細胞浸潤の減少を認める。28日目：コラーゲンは表層より小塊となり、真皮および脂肪組織内に侵入している。細かくなったコラーゲン周囲を線維芽細胞が取り囲んでいるが、内部への浸潤は少ない(**Fig. 3c, 5b**)。49日目：コラーゲンはさらに表層から細かく分散し、混在が進行し、判別不可能な部分が増加している。コラーゲン内の線維芽細胞数は少ない。その周囲には炎症細胞の散在、血管拡張を認める(**Fig. 3d**)。

考 察

本研究では、使用した2種類の注入用コラーゲンの組織像を経時的に比較した。注入直後の状態では、ZCIが周囲組織と明瞭な境界をもち、いくつかの比較的大きな塊状を呈しているのに対し、KAIは、周囲組織と一部境界不明瞭である。ともに好酸性の無構造な領域として染色されているが、KAIは細かく縮れたような濃淡を認め、真皮内へも細かく入り込んでいる。この特徴は、2日目のAzan染色(**Fig. 4**)でも明白に示されている。この相違には、ZCIが線維性懸濁液でKAIが非線維性溶液であること、さらに注入時にもKAIが容易に注入可能であったように、注入剤の粘稠性、軟性も関与していると考えられる。その後の時間経過とともに、ZCIは一部の真皮内に注入された部分が、周囲組織と混在して不明瞭となってくるが、皮膚筋層に近いほど周囲組織と明白な境界を有し、全体は塊状を維持している。Burke et al.³⁾、DeLustro et al.⁴⁾は、ブタを用いて皮下にZCIを注入し、36日目、39日目の生検組織で本実験と同様な好酸性のコラーゲンが、皮下に周囲と明確な境界をもって存在することを示している。一方、KAI

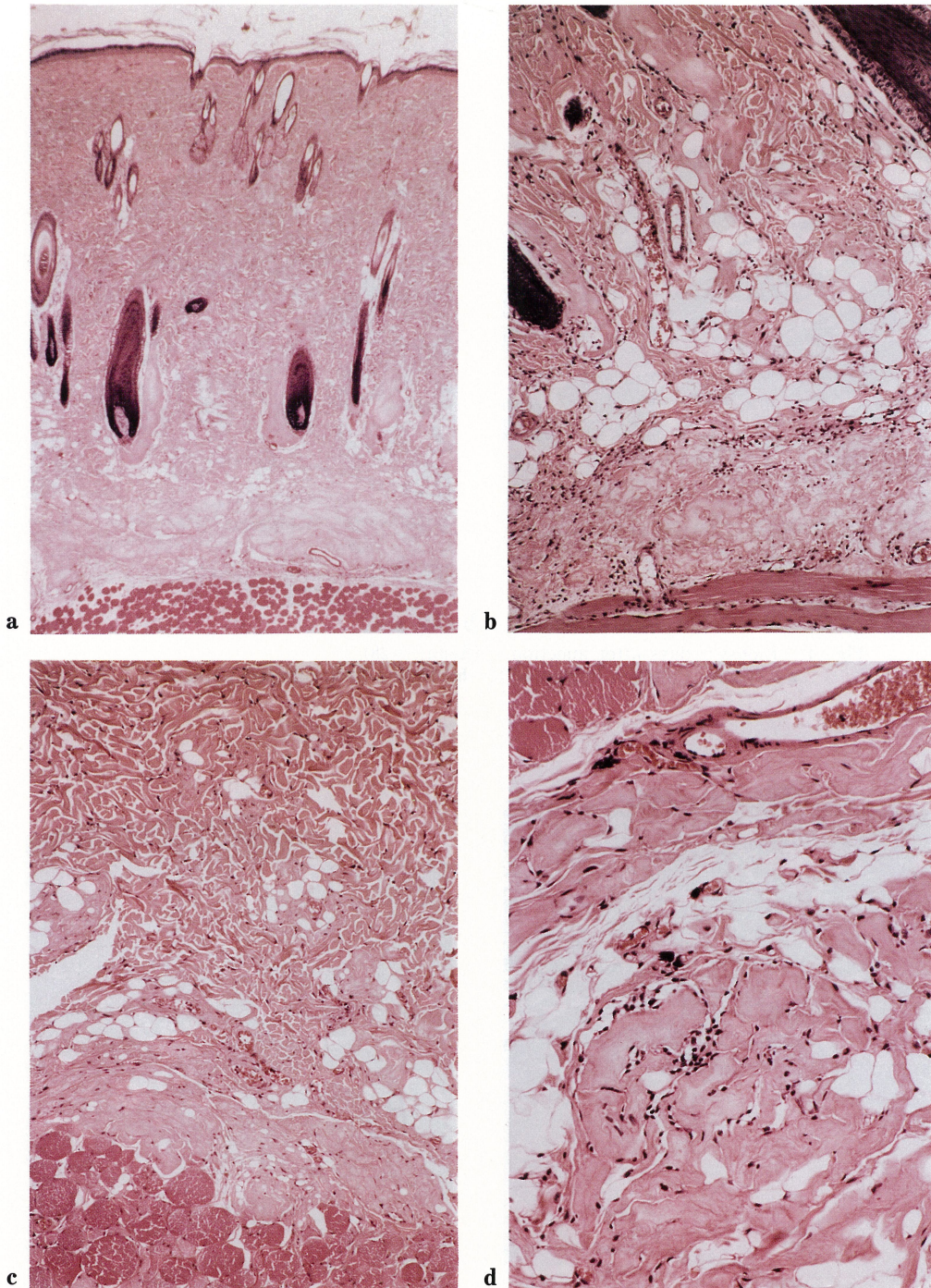


Fig. 3. Biopsy after injection with Koken Atelocollagen Implant. (H-E)

- a) 2 hours postimplantation. The injected collagen is observed to spread over a diffuse area. ($\times 28$)
- b) 2 days postimplantation. Mononuclear cells infiltrated around and into the injected collagen. ($\times 70$)
- c) 28 days postimplantation. Most of fibroblasts infiltrated around the injected collagen. ($\times 70$)
- d) 49 days postimplantation. The injected collagen into subcutaneum is only distinguishable. ($\times 140$)

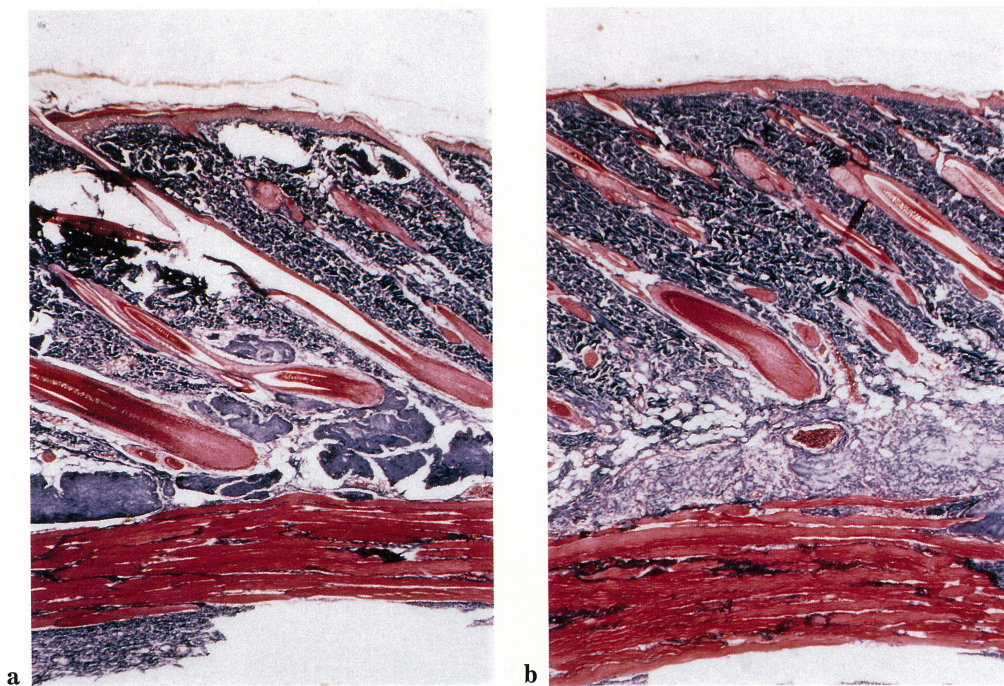


Fig. 4. Biopsy 2 days after injection. (Azan, $\times 28$)

a : Zyderm Collagen Implant (I), b : Koken Atelocollagen Implant.

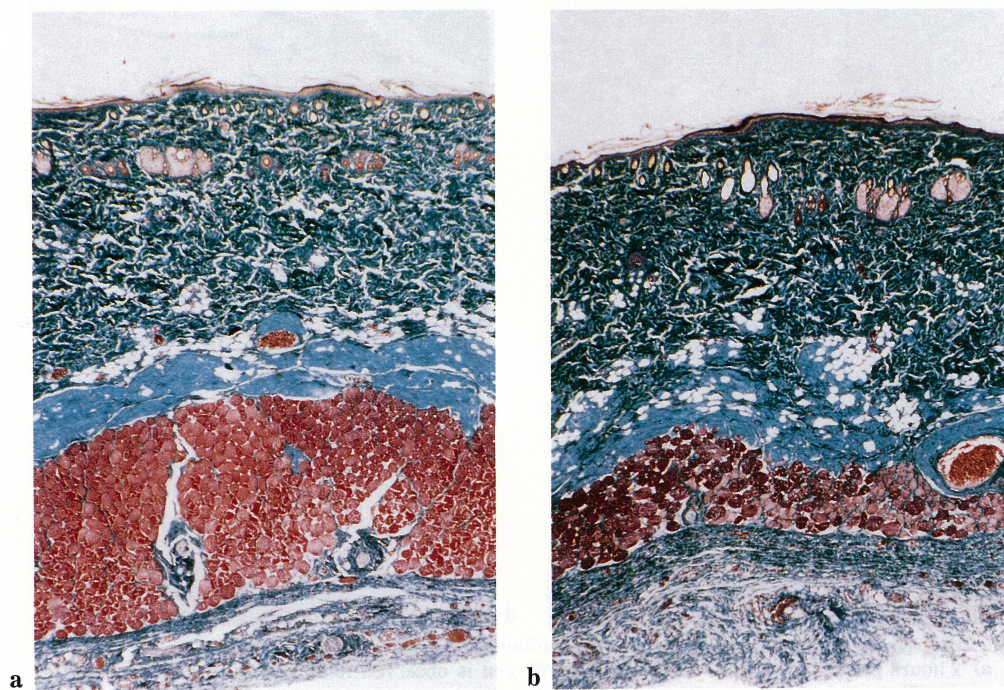


Fig. 5. Biopsy 28 days after injection. (Masson, $\times 28$)

a : Zyderm Collagen Implant (I), b : Koken Atelocollagen Implant.

は28日目にはコラーゲンが表層より小塊となり真皮及び脂肪組織内に入り込む状態を示し、真皮内に入り込んだ部分は、周囲組織と判別できなくなっていく。Figure 5は28日目をMasson染色で比較したものである。KAIは周囲組織との混在部が徐々に増加し、確認可能な範囲は減少していく。

炎症反応に関して、Burke et al.³⁾は注入24時間後に血管周囲のリンパ球、組織球と少数の好中球、好酸球を含む細胞浸潤が見られ、以後1週で相対的な好中球の減少、好酸球の増加があり、2週までには細胞浸潤は減少傾向となることを報告している。本実験でも両者ともに2日目でリンパ球を中心とする単核炎症細胞浸潤をコラーゲン周囲に認め、その後14日目には減少を示している。しかし、49日目でも細胞は散在して見られ、これはKAIに多く認められた。ZCIに関して、人の背部皮膚への注入実験でも3~4か月間、散在性浸潤が持続することが報告されている^{5),6)}。

線維芽細胞は、ともに7日目の標本で注入したコラーゲン周囲に観察されている。ZCIでは最初コラーゲン塊周囲に存在した線維芽細胞は、コラーゲン内へ顕著に浸潤していく。一方、KAIでは、コラーゲンが時間とともに小さく分断されていくためか内部への浸潤は少なく、ほとんどが周囲を取り囲むように見られる。ともに注入したコラーゲン周囲に細いコラーゲン原線維の存在を認める。線維芽細胞は、浸潤した注入剤の中で宿主のコラーゲンを合成することが可能であり、注入コラーゲンは、この宿主のコラーゲンに取り換えられていく³⁾。また真皮内での注入コラーゲン剤が、宿主の反応を刺激していることが知られている⁵⁾。さらに、合成されたコラーゲンはWeigert染色により、宿主真皮に存在する弾性線維をもたないことが認められている³⁾。しかし、注入コラーゲンは注入層によっても残存期間に相違があり、真皮より皮下の残存期間が長い。プタでは16週後でも確認でき³⁾、真皮より深い皮下組織内に注入されたコラーゲンでは、人背部への注入実験であるが、9

か月後でも宿主組織に代わっていないとの報告がある⁶⁾。本実験でも真皮下に注入された部分の残存は多かった。

コラーゲン剤の注入後の残存量に関して、DeLustro et al.⁷⁾は、モルモット皮下に2剤を蛋白質量を等しくして注入後、11日、25日目の宿主細胞除去後の残存湿重量で、KAIがZCIより有意に残存量が減少することを示している。KAIは非線維性溶液であり、注入後に線維化の過程をたどる。これは、生体内で非線維性コラーゲンは急速に分解され、線維化によりコラゲナーゼ分解性が低下するため安定化するという性質により⁸⁾、線維性コラーゲンであるZCIより分解が早くなる一因と考えられる。これらのことは、今回の実験での2剤の組織像の相違点と合致し、あるいは、この注入時の状態がコラゲナーゼによる分解性の差を示しているとも考えられる。

お わ り に

ここでは、2種のコラーゲン、ザイダームコラーゲン注入剤、コーケン アテロコラーゲンインプラントをラットの背部皮内に注入し、その消退過程を病理組織学的に検索した。前者は境界明瞭な塊状で残存し、コラーゲン内への線維芽細胞の浸潤が顕著であった。後者はびまん性に広がっており、徐々に真皮内に分散していき、線維芽細胞の浸潤は少なかった。これらのことから、ZCIが線維性、KAIが非線維性という性状によるコラゲナーゼ分解性の差が注入後の組織像の相違へ関与し、また真皮内への混在状態が、両者の経時的な残存程度に大きく影響していると考えられた。

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました川崎医科大学薬理学教室 斎藤泰一教授、同大学形成外科教室 森口隆彦教授に深甚なる謝意を捧げます。

なお、本研究の一部は川崎医科大学プロジェクト研究費 (No. 6-609) の援助において行われた。

文 献

- 1) Chaplin CH : Loss of both breasts form injection of silicone (with additive). *Plast Reconstr Surg* 41 : 447—450, 1969
- 2) Knapp TR, Kaplan EN, Daniels JR : Injectable collagen for soft tissue augmentation. *Plast Reconstr Surg* 60 : 398—405, 1977
- 3) Burke KE, Naughton G, Waldo E, Cassai N : Bovin collagen implant : Histologic chronology in pig dermis. *J Dermatol Surg Oncol* 9 : 889—895, 1983
- 4) DeLustro F, Smith ST, Sundsmo J, Salem G, Kincaid S, Ellingsworth L : Reaction to injectable collagen : Results in animal models and clinical use. *Plast Reconstr Surg* 79 : 581—594, 1987
- 5) Burke KE, Naughton G, Cassai N : A Histological, Immunological, and electron microscopic study of bovine collagen implants in the human. *Ann Plast Surg* 14 : 515—522, 1985
- 6) Kligman AM : Histologic responses to collagen implants in human volunteers : Comparison of Zyderm Collagen with Zyplast Implant. *J Dermatol Surg Oncol* 14 (Suppl 1) : 35—38, 1988
- 7) DeLustro F, Condell RA, Nguyen MA, McPherson JM : A comparative study of the biologic and immunologic response to medical devices derived from derma collagen. *J Bilmed Mater Res* 20 : 109—120, 1986
- 8) 小西 淳 : コラーゲンの性状と生体反応. 第35回コラーゲン研究会. 1988, pp 69—73