

ウシ胎盤コラーゲンの特徴

福永 重治, 田中 晶子*, 原 環*, 竹之内一昭*, 中村富美男*

サンギ札幌研究所, 札幌市中央区南 10 条西 6 丁目 6-4-11 064

*北海道大学農学部畜産科学科, 札幌市北区北 9 条西 9 丁目 060

Characterization of bovine placental collagen

Shigeharu FUKUNAGA, Akiko TANAKA*, Tamaki HARA*,
Kazuaki TAKENOUCI*, Fumio NAKAMURA*

Sapporo laboratory, SANGI Corp., Minami 10 Nishi 6, Tyuouku, Sapporo, Hokkaido, Japan 064

* Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Hokkaido University.,
Kita 9 Nishi 9, Kitaku, Sapporo, Hokkaido, Japan 060

キーワード : 胎盤, 細胞外マトリックス, コラーゲン, ウシ

Key words : placenta, extracellular matrix, collagen, bovine

要 約

本研究では、胎盤におけるコラーゲンの特徴とその役割を明らかにするため、コラーゲン含量、抽出性、立体構造、および構成成分の局在について、ウシ妊娠満期胎子性胎盤を対象として検討した。

胎盤の形態を支持しているのはコラーゲンで、絨毛膜無毛部では層状構造を持ち、密に存在することにより保護膜としての強度を与え、絨毛膜有毛部では、薄いシート状の多数の分枝を持つ柔らかな絨毛を形成していた。有毛部と無毛部ではコラーゲンが量的にも質的にも異なっており、更には絨毛膜結合組織では、間質コラーゲンである I, III, V, および VI 型コラーゲンの他に II 型や IV 型コラーゲンの局在が観察され、他臓器のコラーゲンとは異なる動態を示した。これらの結果から、コラーゲンが胎盤の多様な機能と密接に関与していることが推測された。

緒 言

胎盤は、妊娠期間中、胎子の成長にとって必要不可欠な臓器であるが、出産と同時に排出され畜産副生物となる。畜産副生物としての胎盤は、古くから薬品・化粧品として用いられており、近年では、プラセンタエキスや種々の細胞外マトリックス構成成分の調製素材として利用されている (BROWN, 1982)。胎盤の形態は動物種によって異なるが、ウシではところどころで叢毛状に密集した絨毛膜絨毛が、飛石状に散在し、そ

の部位ごとに小さな胎盤を形成する子葉状胎盤に分類される (加藤と山内, 1989)。胎子は呼吸、養分吸収、排泄などの主要な生理機能を、母体側の子宮に依存しているが、この際の母子間の物質交換は胎盤を介して行われている。胎盤の細胞外マトリックスは、単に胎盤の形態を維持するだけでなく、物質交換の場として重要な生理機能を営んでおり、その主要な構成成分がコラーゲンであるといわれている (平山ら, 1982)。しかし胎盤細胞外マトリックスの特徴と役割の全容は明らかにされておらず、本研究ではウシ妊娠満期胎子性胎盤コラーゲンの特徴づけを試みた。

材料および方法

排出直後に採取したホルスタイン種ウシ妊娠満期胎子性胎盤を、絨毛膜有毛部と無毛部に分離し、以下の実験に供試した。

生化学的分析

試料を凍結粉碎した後、10 倍量 (W/V) のリン酸緩衝塩溶液 (PBS) で 4℃, 24 時間攪拌抽出した。遠心分離 (6,000 rpm, 15 分間) 後の上清を PBS 可溶性画分とし、PBS 抽出残渣には 20 倍量 (W/V) の 0.5 N 酢酸を加え、4℃, 24 時間攪拌抽出した後、遠心分離 (10,000 rpm, 20 分間) し、上清を酢酸可溶性画分とした。酢酸抽出残渣に対して、試料重量 100 mg 当たり 2 mg のペプシンを加え、50 倍量 (W/V) の 0.5 N 酢酸中で 4℃, 24 時間反応させた後、遠心分離 (15,000 rpm, 30 分間) した。上清を終濃度 2 M の NaCl で塩析し、遠心分離 (10,000 rpm, 30 分間) 後の沈殿をペプシン可溶性画分とした。また酢酸抽出残渣を 20 倍量

(W/V) のグアニジン塩酸溶液 (4 M グアニジン塩酸, 10 mM EDTA, 50 mM 酢酸ナトリウム, pH 5.8) 中で 4°C, 24 時間攪拌抽出し, 遠心分離 (15,000 rpm, 30 分間) した。上清を 0.5 N 酢酸に透析後, 終濃度 2 M の NaCl で塩析し, 遠心分離 (10,000 rpm, 30 分間) 後の沈殿をグアニジン可溶性画分とした。

1 N NaOH に懸濁した凍結粉碎試料と, 各抽出画分のタンパク質含量を biuret 法により, また, コラーゲン含量の指標としてのヒドロキシプロリン量は BERGMAN と LOXLEY の方法 (1963) により測定した。形態学的観察

- 1) アルカリ処理・細胞消化法 (KOMAI and USHIKI, 1991) によりコラーゲンのみの試料を作成し, 走査電子顕微鏡で観察した。
- 2) 凍結切片を作成し, HE 染色を行った。また凍結切片に対して I 型から VI 型コラーゲンに対する各々特異的な抗血清を第 1 抗体として用い, FITC 標識した第 2 抗体で可視化した間接蛍光抗体染色を行い, 光学顕微鏡下で観察した。

結 果

生化学的分析

無毛部のタンパク質含量は, 有毛部よりもやや高い値となっていたが, ヒドロキシプロリン (Hyp) 量で

は有毛部の約 5 倍となっており, 総タンパク質中に占めるコラーゲンの割合が多かった (表 1)。各抽出画分を比較すると, 有毛部では, タンパク質, コラーゲン量ともに, PBS 可溶性画分が酢酸可溶性画分よりも高くなっていた。特に, タンパク質では PBS 可溶性がペプシン可溶性よりも高い値を示した。またタンパク質およびコラーゲンの抽出性は有毛部の方が無毛部に比べて高い傾向にあり, PBS 可溶性はタンパク質量で約 10 倍, コラーゲン量で約 8 倍が抽出されていた。酢酸可溶性ではタンパク質量で約 2 倍, コラーゲン量で約 3 倍となっていた (表 1)。

電子顕微鏡像

細胞消化法による絨毛膜横断面の観察像から, 組織全体にコラーゲン線維が存在することが確認された (図 1 A, B)。有毛部では薄く滑らかなシート状の多数の絨毛をコラーゲンが形成していることが観察された (図 1 A)。また絨毛の基部には血管が多数存在し, 血管壁とその周辺にコラーゲンが密に, その下層 (内腔側) では比較的まばらに存在していることが観察された。無毛部では, 様々な太さのコラーゲン細線維束が緻密な網目状に重積した下層, 細線維束間に間隙が観察される中間層, 束状に密集している上層の 3 層構造が観察された (図 1 B)。

表 1 ウシ絨毛膜のタンパク質およびコラーゲン含量

	タンパク質		ヒドロキシプロリン	
	有毛部	無毛部	有毛部	無毛部
	(%)	(%)	(mg/g)	(mg/g)
含有量	5.48	6.33	1.25	6.05
PBS 可溶性	18.86	1.85	1.67	0.24
酢酸可溶性	8.99	4.08	1.14	0.37
* 抽出性				
ペプシン可溶性	14.75	16.94	35.75	26.89
グアニジン可溶性	19.25	15.81	3.76	2.46

* 抽出性は組織中に含まれる量を 100% として, 各々の画分に含まれる割合を百分率で示した。

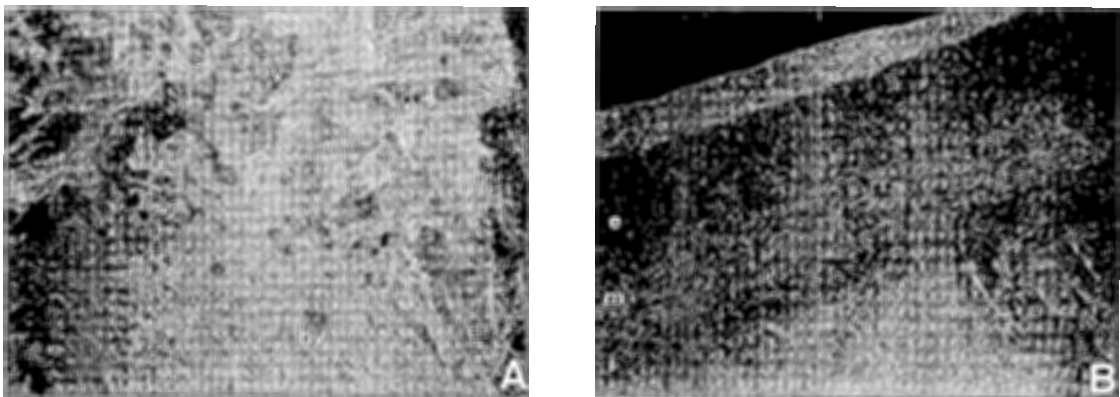


図 1 絨毛膜コラーゲンの走査電子顕微鏡像

有毛部 (A) の横断面ではシート状の絨毛 (v) と基部の血管 (bv) が, 無毛部 (B) では外層 (e), 中間層 (m), 内層 (i) の三層構造が観察される。倍率 470 倍

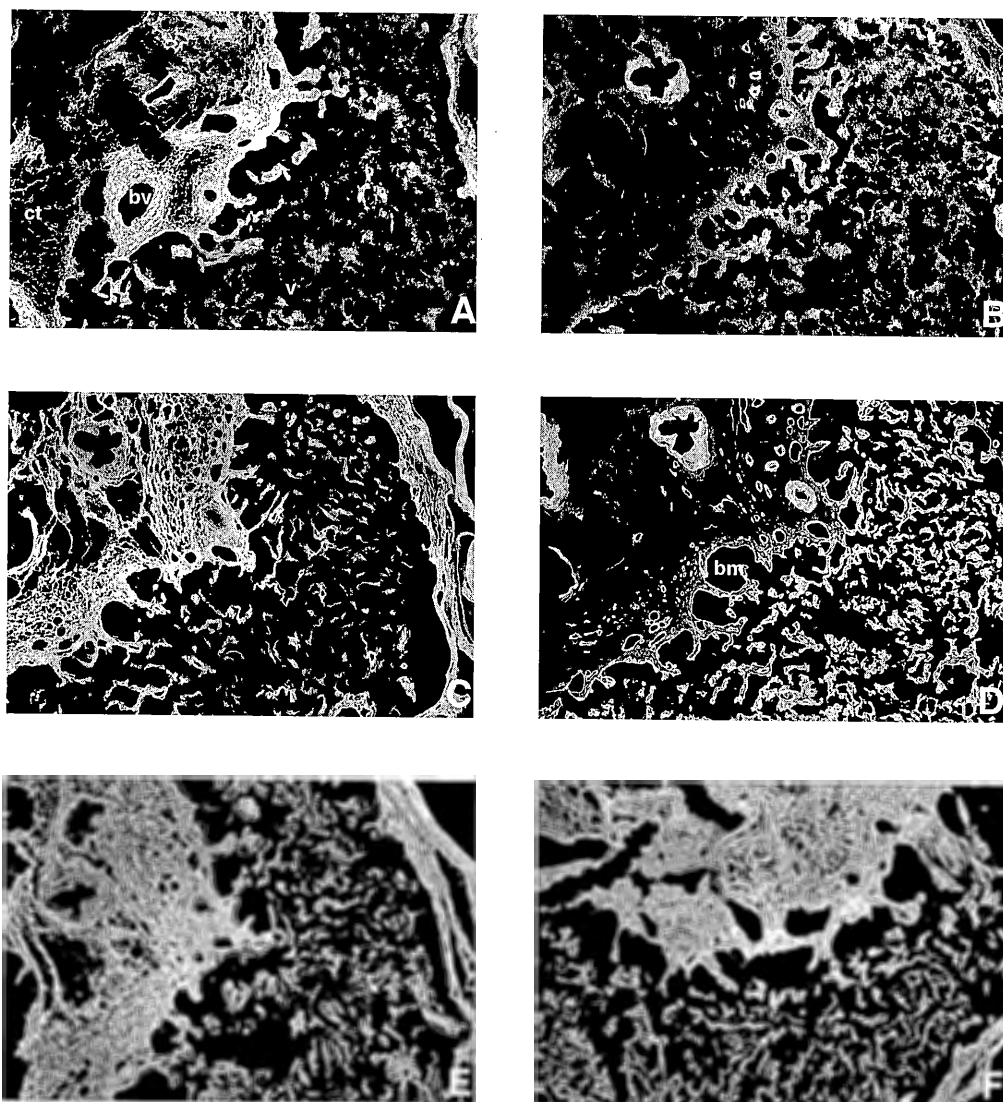


図2 絨毛膜有毛部の免疫染色像

Aは抗I型, Bは抗II型, Cは抗III型, Dは抗IV型, Eは抗V型, Fは抗VI型コラーゲン抗血清を第1抗体として用いた蛍光顕微鏡像を示す。図中のbmは基底膜, bvは血管, ctは結合組織, vは絨毛を示す。倍率25倍

間接蛍光抗体染色像

I型コラーゲン抗体によっては、絨毛膜の血管壁と結合組織全般が染色されており、絨毛直下では細かい網目状に、下層ほど粗い網目状に染色されていた(図2A)。軟骨特有とされているII型コラーゲンに対する抗体では、絨毛と基底膜、血管壁が染色され、絨毛直下の結合組織も陽性反応を示した(図2B)。III型コラーゲン抗体では、I型と同様に結合組織全般が網目状に染色されたが、血管壁周囲ではI型よりも陽性反応が弱かった(図2C)。IV型コラーゲン抗体では基底膜と血管壁が染色され、絨毛直下の結合組織も陽性反応を示した(図2D)。VおよびVI型コラーゲン抗体による染色像では、I型コラーゲン抗体に対して陽性反応を示した部分がいずれも強く染色されていた(図2E, F)。

部位別に見ると結合組織ではI, III, V, VI型コラーゲン抗体による染色が観察されたが、絨毛直下は、い

ずれの抗体によっても下層よりも密な網目状に染色されていた。またこの部位はII, IV型コラーゲン抗体に対しても陽性反応を示し、絨毛先端はII型コラーゲン抗体でも染色されていた。血管壁ではI, II, IV, V, VI型コラーゲン抗体による強い染色が観察され、基底膜ではII, IV型コラーゲン抗体による染色が認められた。

考 察

胎盤の絨毛膜有毛部と無毛部は、コラーゲン含量が異なるだけではなく、有毛部で、より可溶化されやすいという抽出性の相違から、質的にも異なっていることが示された。これは走査電子顕微鏡で観察された、明確な形態の相違やコラーゲン細線維束の存在様式が異なっていることと一致していた。更にプロテオグリカンも有毛部と無毛部とで量的、質的に異なっており(結果は示していない)、主として母子間の物質交換を

担当する有毛部と、形態を維持し、保護膜としての強度を付与する無毛部との機能の相違を反映したものと考えられる。

免疫染色像から、絨毛膜結合組織中に、軟骨や硝子体特有とされているII型コラーゲンや、基底膜特有とされているIV型コラーゲンの存在が確認された。生体内で基底膜中に存在しているIV型コラーゲンが、胎盤において基底膜の他に結合組織でも存在することはすでに報告されている (AMENTA *et al.*, 1986; RUKOSUEV *et al.*, 1990)。しかしII型コラーゲンに関して部分的に染色が見られたことは、他臓器と異なり興味深い結果となった。胎盤の細胞外マトリックスは、胎子の成長に伴い、変化して行くことが知られている (BLANKENSHIP and KING, 1993) が、出産の前後でも量的、質的变化が見られる (SHARPE *et al.*, 1990)。本研究では出産後、排出された満期胎盤を試料としたが、様々な機能を営む胎盤でのコラーゲンの役割を知る上でも、経時的変化を含めたより詳細な検討が必要なものと思われる。

文 献

- AMENTA, P.S., S. GAY, A. VAHERI, and A. MARTINEZ-HERNANDES (1986) The extracellular matrix is an integrated unit: ultrastructural localization of collagen type I, III, IV, V, fibronectin and laminin in human placenta. *Collagen Rel. Res.*, **6**: 125-152.
- BERGMAN, I. and R. LOXLEY (1963) Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Anal. Chem.*, **35**: 1961-1965.
- BLANKENSHIP, T.N. and B.F. KING (1993) Developmental changes in the cell columns and trophoblastic shell of the macaque placenta: an immunohistochemical study localizing type IV collagen, laminin, fibronectin and cytokeratins. *Cell Tissue Res.*, **274**: 457-466.
- BROWN, R. (1982) Collagen in health and disease. (Jayson, M. and J. Weiss, eds.) 456-480. Livingstone. New York.
- 平山博章, 奥山輝明, 古谷 博 (1982) ヒト胎盤におけるコラーゲンについて. *日本産婦人科学会雑誌*, **34**: 1839-1845
- 加藤喜太郎, 山内昭二 (1989) 家畜比較発生学. 第1版. 84-96. 養賢堂. 東京.
- KOMAI, Y. and T. USHIKI (1991) The three-dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **32**: 2244-2258.
- RUKOSUEV, V., A.K. NANAIEV, and A.P. MILVANOV (1990) Participation of collagen types I, III, IV, V, and fibronectin in the formation of villi fibrosis in human term placenta. *Acta Histochem.*, **89**: 11-16.
- SHARPE, K.L., H. EILER, and M. HOPKINS. (1990) Changes in the proportion of type I and type III collagen in the developing and retained bovine placentome. *Biol. Reprod.*, **43**: 229-235.