(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2010-502175
(P2010-502175A)
(43)公表日　平成22年1月28日(2010.1.28)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 5/07	(2010.01)	C12N	5/00	E	4B063
C12Q 1/02	(2006.01)	C12Q	1/02		4B065
C12Q 1/70	(2006.01)	C12Q	1/70		4C083
A61K 35/12	(2006.01)	A61K	35/12		4C087
A61K 35/23	(2006.01)	A61K	35/23		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 28 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2009-526123 (P2009-526123)
(86)(22)出願日　平成19年9月3日 (2007.9.3)
(85)翻訳文提出日　平成21年5月1日 (2009.5.1)
(86)国際出願番号　PCT/EP2007/059165
(87)国際公開番号　WO2008/028882
(87)国際公開日　平成20年3月13日 (2008.3.13)
(31)優先権主張番号　0653567
(32)優先日　平成18年9月4日 (2006.9.4)
(33)優先権主張国　フランス(FR)

(71)出願人　508129850
ビーエーエスエフ、ビューティー、ケア、ソルーションズ、フランス、エスエーエス
フランス、Ｆ－６９００７、リヨン、リュー、サン、ジャン－ドゥ－ディユー、３２
(74)代理人　100100354
弁理士　江藤　聡明
(72)発明者　ベーシュトアレ，ニコラ
フランス、Ｆ－６９２３０、サン、ジェニ－ラヴァル、ビス、リュー、デ、コロンジュ、７８
(72)発明者　アンドレ，ヴァレリ
フランス、Ｆ－６９４２０、アムピュイス、リュー、ドゥ、モントリー、１５

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＣＤ１４＋単球からランゲルハンス細胞及び／又は真皮／間質性樹状細胞を製造する方法

(57)【要約】
本発明は、生物、特にヒトの末梢循環血由来のＣＤ１４＋単球からランゲルハンス細胞（ＬＣ）、又は真皮／間質性樹状細胞（ＩＤＣ）、又はＬＣとＩＤＣを製造する方法であって、該ＣＤ１４＋単球を、ケラチノサイトなどの上皮細胞及び／又は皮膚線維芽細胞などの間充織細胞を含む細胞環境の存在下に入れ、ＣＤ１４＋単球をＬＣに、ＩＤＣに、又はＬＣ及びＩＤＣに分化させることを特徴とする方法に関する。本発明はまた、本方法によって得られる、少なくともＬＣ及び／又ＩＤＣと必要に応じてマクロファージと内皮細胞とを含む細胞又は組織モデルと、それらの用途に関する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
生物、特にヒトの末梢循環血由来のＣＤ１４＋単球からランゲルハンス細胞（ＬＣ）又は間質性／真皮樹状細胞（ＩＤＣ）、又はＬＣ及びＩＤＣを製造する方法であって、該ＣＤ１４＋単球を、ケラチノサイトなどの上皮細胞及び／又は皮膚線維芽細胞などの間充織細胞含む細胞環境の存在下に入れ、ＣＤ１４＋単球をＬＣ又はＩＤＣに、又はＬＣ及びＩＤＣに分化させることを特徴とする方法。
【請求項２】
上記ＣＤ１４＋単球を、ケラチノサイトなどの上皮細胞及び／又は皮膚線維芽細胞などの間充織細胞含む細胞環境の存在下に入れ、ＣＤ１４＋単球を、ＩＤＣ、及びマクロファージ及び／又は内皮細胞に、又はＬＣ、ＩＤＣ、マクロファージ及び／又は内皮細胞に分化させる請求項１に記載の方法。
【請求項３】
ＣＤ１４＋単球の分化が有意な量の外来性サイトカインを添加することなく行われる前請求項１又は２に記載の方法。
【請求項４】
単球をケラチノサイトなどの上皮細胞を含む細胞環境の存在下に入れ、単球を未成熟の機能的ＬＣに分化させる請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
単球を皮膚線維芽細胞などの間充織細胞を含む細胞環境の存在下に入れ、単球を未成熟の機能的ＩＤＣに分化させる請求項１～４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
単球をケラチノサイトなどの上皮細胞及び皮膚線維芽細胞などの間充織細胞、及び皮膚線維芽細胞などの間充織細胞含む細胞環境の存在下に入れ、単球を典型的なＬＣ及びＩＤＣに分化させる請求項１～５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
細胞または組織モデル内における、生物の特にヒトの末梢循環血に由来するＣＤ１４＋単球の融合を含むＣＤ１４＋単球の培養方法であって、該細胞または組織モデルがケラチノサイトなどの上皮細胞、及び／又は皮膚線維芽細胞などの間充織細胞を含み、且つ該モデル中でＣＤ１４＋単球を、ＬＣに、又はＩＤＣに、又はＬＣ及びＩＤＣに分化させるために、前記ＣＤ１４＋単球をケラチノサイトなどの上皮細胞、及び／又は皮膚線維芽細胞などの間充織細胞の存在下で培養することを特徴とする方法。
【請求項８】
ＣＤ１４＋単球の培養を、有意な量の外来性サイトカインを加えることなく行う請求項７に記載の方法。
【請求項９】
上記細胞または組織モデルが、表皮モデル、上皮モデル、真皮モデル、絨毛膜モデル、皮膚モデル、及び粘膜モデルからなる群から選ばれる請求項７または８に記載の方法。
【請求項１０】
上記細胞または組織培養モデルが、次の材料：
－間充織細胞、特に線維芽細胞を含むコラーゲン系またはフィブリン系ゲルまたはフィルム、
－１種以上のグリコサミノグリカン及び／又は必要に応じてキトサンを含んでいてもよい、また融合間充織細胞、特に線維芽細胞を含んでいても含んでいなくてもよいコラーゲン製多孔質マトリックス、
－間充織細胞、特に線維芽細胞を含んでいても含んでいなくてもよい、次の群：
半透性合成膜、特に半透性ニトロセルロース膜、半透性ナイロン膜、ポリテトラフルオロエチレン（テフロン（登録商標）（Ｒ）、ＰＴＦＥ）膜またはスポンジ、半透性ポリカーボネートまたはポリエチレンテレフタレート（ＰＥＴ）膜、酸化アルミニウムのキャピラリー多孔性構造を有する無機膜（半透性アノポア膜）、セルロースアセテートまたはエス

テル（ＨＡＴＦ）膜、半透性ビオポアＣＭ膜、半透性ポリエステル膜、
からなる不活性支持体、および
－間充織細胞、特に線維芽細胞を含んでいても含んでいなくてもよい、ポリカーボネート系またはポリスチレン系の培養用に処理した不活性支持体、
からなる群から選ばれる皮膚または絨毛膜マトリックス支持体を含む請求項７～９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
用いる細胞または組織モデルが、表面に上皮細胞、特にケラチノサイトを有する上記皮膚または絨毛膜支持体を含む請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
上記細胞または組織モデルが、少なくとも一種の他の細胞種、例えば神経細胞及び／又はメルケル細胞及び／又は内皮細胞及び／又はマクロファージ、及び／又はメラノサイト及び／又はリンパ球及び／又は脂肪細胞及び／又は剛毛や毛髪、脂腺などの皮膚付属物を含む請求項１０又は１１に記載の方法。
【請求項１３】
ＣＤ１４＋単球を、少なくとも間充織細胞を含む細胞または組織モデルで培養して、一部の単球を内皮細胞及び／又はマクロファージに分化させる請求項７～１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４】
上記細胞または組織モデルが上皮部分と連結マトリックスとを含み、ＬＣが実質的に上皮部分に局在し、ＩＤＣ、マクロファージ及び／又は内皮細胞が実質的に連結マトリックスに局在している請求項７～１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５】
ＣＤ１４＋単球をＬＣ及び／又はＩＤＣに分化させる方法であって、以下の工程：
－循環血からＣＤ１４＋単球を採取する工程；
－ＣＤ１４＋単球をＤＣへの分化を促進しない条件下に維持する工程；及び
－ＣＤ１４＋単球をＬＣ、又はＩＤＣ、又はＬＣ及びＩＤＣに分化を促進する条件下で、ＣＤ１４＋単球を、ケラチノサイトなどの上皮細胞及び／又は線維芽細胞などの間充織細胞を含む細胞環境の存在下に入れる工程、
を含む方法。
【請求項１６】
上記ＬＣ及び／又はＩＤＣの少なくとも１種と、さらに必要に応じてマクロファージ及び／又は内皮細胞とを含む請求項１～１５のいずれか一項に記載の方法により得られる細胞モデル。
【請求項１７】
上記ＬＣ及び／又はＩＤＣの少なくとも１種と、さらに必要に応じてマクロファージ及び／又は内皮細胞を含む請求項１～１５のいずれか一項に記載の方法により得られる、表皮モデル、上皮モデル、真皮モデル、絨毛膜モデル、皮膚モデル及び粘膜モデルからなる群から選ばれる組織モデル。
【請求項１８】
ケラチノサイトなどの上皮細胞を含む上皮部分と、皮膚または絨毛膜線維芽細胞間などの充織細胞を含む連結マトリックスとを含み、ＬＣが実質的に上皮部分に局在し、ＩＤＣ、マクロファージ及び／又は内皮細胞が実質的に連結マトリックスに局在している請求項１７に記載の組織モデル。
【請求項１９】
生物、特にヒトの末梢循環血から単離される凍結ＣＤ１４＋単球。
【請求項２０】
請求項１６に定義される少なくとも１種の細胞モデル、又は請求項１７又は１８に定義される少なくとも１種の組織モデルの、化粧品、皮膚薬学、薬学分野での試験モデルとして、及び／又は活性成分の選択ために使用する方法。

【請求項２１】
請求項１６に定義される少なくとも１種の細胞モデル、又は請求項１７又は１８に定義される少なくとも１種の組織モデルの、生物の防御／感染プロセスで起こる現象と活性の評価のために、特に特定の活性成分の免疫刺激または免疫抑制活性の評価のために、上記活性成分による免疫調整の評価と誘導のために、外部試薬のアレルギー、刺激、感作活性を予測するためのインビトロ試験実施のために、または分子または化学物質の試験、特に毒性調査を実施するために使用する方法。
【請求項２２】
請求項１６に定義される少なくとも一種の細胞モデル、又は請求項１７又は１８に定義される少なくとも一種の組織モデルの、上皮性障壁の生理病理学；皮膚や粘膜の刺激性；例えばウイルスや、ＨＩＶなどのレトロウイルス、バクテリア、糸状菌、微生物、粒子抗原などの生物学的攻撃、；光毒性；光保護；さらには活性成分、特に化粧品または薬品活性成分の効果；最終製品、特に化粧品又は薬品製品の効果；病原性物質による感染のメカニズムの試験のために使用する方法。
【請求項２３】
請求項１６に定義される少なくとも一種の細胞モデル、又は請求項１７又は１８に定義される少なくとも一種の組織モデルの、ＨＩＶなどのレトロウイルスを含むウイルスの感染、複製、伝播現象のメカニズムの試験、又はワクチンや薬品の投与なども含む新しい治療法の探索と開発に使用する方法。
【請求項２４】
請求項１６に定義される少なくとも一種の細胞モデル、又は請求項１７又は１８に定義される少なくとも一種の組織モデルの、病原性物質、例えばウイルス、ＨＩＶなどのレトロウイルス、バクテリア、糸状菌、微生物、粒子抗原などの存在の検出のために使用する方法。
【請求項２５】
請求項１６に定義される少なくとも一種の細胞モデル、又は請求項１７又は１８に定義される少なくとも一種の組織モデルの、医療、生物医学又は化粧品用途に使用する方法、特にインビトロまたはインビボでの免疫または寛容応答の調整、環境的な攻撃、特に紫外線照射などの物理的な攻撃や刺激／アレルギー／感作物質などの化学的な攻撃や生物学的攻撃の結果としての免疫又は寛容応答の、特に予防又は治療目的での調整のために使用する方法。
【請求項２６】
請求項１６に定義される少なくとも一種の細胞モデル、又は請求項１７又は１８に定義される少なくとも一種の組織モデルの、組織工学及び細胞工学用途に使用する方法、医学または生物医学的用途、具体的には、免疫応答を刺激可能なＤＣ注入法による抗癌細胞療法；自己免疫疾患の場合の細胞療法に使用する方法や、例えばアネルギー性Ｔ細胞の産生による免疫寛容刺激の惹起や；免疫系を侵す疾患の遺伝子療法に使用する方法、またはワクチンの開発及び製造のために使用する方法。
【請求項２７】
以下の工程：
－生物の末梢循環血からＣＤ１４＋単球を単離する工程、
－皮膚または粘膜細胞を支持体上に播種し、栄養培地中で培養して、再生組織を得る工程、
－該再生組織に、皮膚または粘膜細胞と同時に、あるいは同時でなくＣＤ１４＋単球を播種する工程、
－該ＣＤ１４＋単球と皮膚または粘膜細胞とを含む再生組織をＣＤ１４＋単球が、ＬＣに、ＩＤＣと内皮細胞及び／又はマクロファージの混合物に、ＬＣとＩＤＣと内皮細胞及び／又はマクロファージの混合物に分化する条件下で培養する工程（なお、再生組織が表皮モデルである場合は、皮膚細胞は表皮ケラチノサイトであり、再生組織が真皮モデルである場合は、皮膚細胞は皮膚線維芽細胞であり、再生組織が上皮モデルである場合は、粘膜

細胞は上皮粘膜細胞であり、再生組織が絨毛膜モデルである場合は、粘膜細胞は粘膜線維芽細胞である）、
からなる組織モデルの製造方法。
【請求項２８】
ケラチノサイト又は上皮粘膜細胞を、及び必要に応じてメルケル細胞及び／又はメラノサイト含む上皮部分と、真皮または絨毛膜線維芽細胞を含む連結マトリックスとを含む再生皮膚または再生粘膜を製造する方法であって、以下の工程：
－ケラチノサイトまたは上皮粘膜細胞を栄養培地中に播種し、必要に応じてメルケル細胞及び／又はメラノサイトの存在下で、ＩＤＣと必要に応じて内皮細胞及び／又はマクロファージを含む真皮または絨毛膜モデルの表面で培養する工程（ただし、上記真皮または絨毛膜モデルが請求項２７に定義する真皮または絨毛膜モデルの製造方法により得られるものである）、および
－上記ケラチノサイトまたは上皮粘膜細胞の存在下で、ＣＤ１４＋単球がＬＣに分化する条件下で、生物の末梢循環血から単離したＣＤ１４＋単球をケラチノサイトまたは上皮粘膜細胞と同時に、あるいは同時でなく播種・培養する工程、
からなる方法。
【請求項２９】
前記細胞がヒト細胞である請求項２７又は２８に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、末梢循環血から単離したＣＤ１４＋単球から、樹状細胞を、特にランゲルハンス細胞及び／又は間質性樹状細胞／真皮樹状細胞を製造する方法に関するものであり、特に、組織モデルを作製して、特に活性成分の試験及び／又は関連する生物学的／生化学現象の研究する方法に関するものである。
【背景技術】
【０００２】
樹状細胞（ＤＣ）は、免疫系を斥候としての抗原を有している細胞である。実際、このような細胞は、ほぼいたる所に存在しており、例えば、胸腺、全身循環系や第二リンパ系臓器や、皮膚や単層または多層の粘膜などの末梢組織に存在する。生物中には非常に小数の樹状細胞しかないが、ＤＣは、免疫応答の特異性、強度、種類を制御して特異的な免疫応答を引き起こす中心であり、また生得免疫と獲得免疫間の中間に位置するものである。ＤＣは、免疫応答を引き起こす機能に加えて、末梢の寛容を引き起こす役割も持っている。
【０００３】
多くの免疫系細胞や血液細胞と同様に、ＤＣ前駆体は、ＣＤ３４＋造血始原細胞の分化に由来している。これらは、血流により皮膚や粘膜内を移動し、分化して未成熟ＤＣとしてそこに住み着く。この未成熟状態は、特徴的な表現型を有し、ごく効果的に抗原を捕捉する能力を有している。細胞内の位置により、末梢ＤＣの異なる二つの表現型が知られている。
【０００４】
－ランゲルハンス細胞（ＬＣ）は、マルピーギ型組織（皮膚及び粘膜）の上皮に存在し、そこで具体的にはＣ型レクチンであるランゲリンを分泌している。ランゲリンは、超微細構造を持つＬＣに特異的な参照標識である細胞質物質、バーベックの形成に関与している。ＬＣは、ＣＤ１ａやＨＬＡ－ＤＲなどの特徴的な標識をも発現する。
【０００５】
－間質性ＤＣ（ＩＤＣ）は、粘膜層にも認められるし、皮膚の真皮にも認められる。後者の場合、これらは皮膚ＤＣ（ＤＤＣ）と記述される。これらの細胞は、多くの類似点をもち、また単球（monocytes）／マクロファージの細胞系と共通の標識を持っている。皮膚の真皮中では、ＤＣＣは、具体的にはＤＣ－ＳＩＧＮを発現し、また特徴的な標識、例え

ばＨＬＡ－ＤＲやＦＸＩＩＩａ、ＭＭＲ、ＣＤ１ａを発現する。以下、粘膜層または皮膚真皮のいずれに存在するかとは無関係に、間質性樹状細胞（ＩＤＣ）一般について述べる。

【０００６】

抗原を捕捉の後、ＬＣとＩＤＣは、リンパ節に向かって移動し、抗原の情報をＴリンパ球に伝える。ＬＣとＩＤＣの活性化に伴うこの移動は、表現型の変化と機能の変化として現れる。例えば、「活性化された」ＬＣとＩＤＣは、共刺激標識であるＣＤ８０とＣＤ８６を発現するようになり、これらの細胞の皮膚移動に必須であるＣＣＲ７レセプターを発現するようになる。リンパ節では、活性化されたＬＣとＩＤＣが「成熟」型の表現型を獲得し、またはこれらがＴリンパ球との相互作用により「絡み合った」ＤＣを形成する。この成熟条件は、特徴的な表現型、例えばＣＤ８３とＤＣ－ＬＡＭＰの発現と同義であり、また強固な外部刺激能力、即ちＴリンパ球増殖を誘導する能力と同義である。エキソ抗原を捕捉後に近くのリンパ節に移動する能力があるため、ＬＣとＩＤＣは、接触アレルギーなど多くの皮膚病理の原因となり、最近では、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）の最初の標的とされている。

【０００７】

ＬＣとＩＤＣの興味ある用途、特に皮膚または粘膜由来の線維芽細胞型の上皮細胞または間充織細胞との併用してのＬＣとＩＤＣの興味ある用途は、次のような三次元器官型の培養に供することである：

－ＬＣのみを用いる「再生表皮」モデルと「再生粘膜」モデル、例えば膣や口腔型のモデル（Ｒｅｇｎｉｅｒ ｅｔ ａｌ、ＪＩＤ １９９７； １０９：５１０－２； Ｐａｔｅｎｔ ＥＰ ０７８９０７４ ｏｆ Ｌ’ＯＲＥＡＬ； Ｓｉｖａｒｄ ｅｔ ａｌ、Ｅｘｐ. Ｄｅｒｍａｔｏｌ. ２００３； １２：３４６－５５）、

－ＤＣＣまたはＩＤＣを用いる「再生真皮」モデル及び「再生絨毛膜」モデル（Ｇｕｉｒｏｎｎｅｔ ｅｔ ａｌ、ＪＩＤ ２００１； １１６：９３３－９ ａｎｄ Ｄｕｍｏｎｔ ｅｔ ａｌ., ＡＩＤＳ Ｒｅｓ. Ｈｕｍ. Ｒｅｔｒｏｖｉｒｕｓｅｓ ２００４； ２０：３８３－９７）。

【０００８】

現在これらはほとんど使用されない。次の理由のためである。

１．生体外でＬＣとＩＤＣを製造する、高速で単純で安価な工業的な方法が存在しないこと、

２．再生組織の上皮部分または連結部分のみを有し、関連組織部分の両方を含む部分を決して有さない３Ｄモデルが不完全であること。

【０００９】

Ｒｅｇｎｉｅｒら、Ｓｉｖａｒｄら、及びＤｕｍｏｎｔらの報告は、臍帯血由来のＣＤ３４＋前駆体を取り扱うものであり、次のような重大な欠点を含んでいる：

１．抽出に用いる臍帯血の量が少ないため、分離されるＣＤ３４＋始原細胞の数が小さく、工業的な利用が困難である。

２．ＬＣまたはＩＤＣに細胞を分化させるには、３Ｄモデルに取り込ませる前に、ＣＤ３４＋始原細胞の前培養（６～１２日間）が必要である。

３．記載の方法は、ＬＣまたは一部ＩＤＣを含む再生表皮、再生粘膜、再生絨毛膜を培養するために、培地に外来性サイトカインを添加する必要がある。

【００１０】

Ｇｕｉｒｏｎｎｅｔらの報告では、著者等は、血液単球からＤＣＣを生成し、それを再生真皮モデルに取り込ませている。同様に、次の二つの欠点が存在する。

１．ＤＣＣに分化させるには、再生真皮に取り込ませる前に単球の前培養（６日間）が必要である。

２．ＤＣＣを含む再生真皮を培養するには、培地に外来性サイトカインの添加が必要である。

同じ報告中で、著者等は、添加サイトカインなしに真皮等価物に直接取り込まれた単球は

、ＤＣに分化しないと報告している。
【００１１】
Ｌ’Ｏｒｅａｌの特許ＵＳ６，１３０，４８２では、ケラチノサイトとＬＣ前駆体とを共培養して、その際、前駆体のＬＣへの分化が進むように適当な栄養培地中に特に表皮モデル中に取り込ませて共培養して、ある製品の刺激活性またはアレルギー活性を評価している。しかしながら、この出願特許では、Ｃａｕｘら、Ｎａｔｕｒｅ、１９９２　Ｎｏｖ．　１９、３６０（６４０１）：２５８－６１に記載されている方法を用いて、臍帯血由来のＣＤ３４＋造血始原細胞が使用されている。この報告に記載の方法は、ＣＤ３４＋造血始原細胞を外来性サイトカインの存在下で培養する工程を含んでいる。この特許は、一般的に、ＬＣの前駆体がＣＤ１ａ＋を発現可能としているが、ＣＤ３４＋造血細胞の、ＬＣのＣＤ３４＋前駆体としての利用が述べられているのみである。しかし、末梢血中のＣＤ３４＋造血細胞の数は少なく、工業的に満足できる分化方法を開発することが難しい。臍帯血由来前駆体の使用は、この血液が大量に入手できないため好ましくない。
【００１２】
最近、ＢＡＳＦビューティー・ケア・ソリューション・フランス（Ｃｏｌｅｔｉｃａ、仏国特許ＦＲ２８３３２７１Ｂ１、２００１年１２月１日出願）は、ＣＤ１４＋単球をＬＣと、ＩＤＣと、少量のＬＣと少量のＤＣＩに分化させ、これをヒトの皮膚または粘膜由来の上皮細胞及び／又は間充織細胞の存在下で培養することについて述べている。この特許に記載されているのは以下のものである。
－ＬＣのみを含む「再生表皮」モデルと「再生粘膜」、
－ＤＣＣまたはＩＤＣを含む「再生真皮」モデルと「再生絨毛膜」モデル、
－ＬＣとＩＤＣとを同時に含む「再生皮膚」モデルと「再生粘膜」モデル。
【００１３】
上述のように、既存の方法の欠点は、外来性サイトカインの存在下で、３Ｄモデルに取り込ませる前の単球を前培養（６日間）して、細胞をＬＣに、ＩＤＣに、またはＬＣとＩＤＣとを同時に分化させる必要があることである。
【００１４】
正常なヒト皮膚に近い免疫適格組織モデルを開発するためにＬＣ及び／又はＩＤＣを提供する目的で、単球のＬＣ及び／又はＩＤＣへの分化について述べているのは、現在までのところ、エンゲルハードリオンの開発した方法、すなわち特許ＦＲ２８３３２７１Ｂ１のみである。しかしながらこの方法も、単純でより安価で迅速な分化方法を用いて、さらに改善可能である。
【先行技術文献】
【特許文献】
【００１５】
【特許文献１】米国特許ＵＳ６，１３０，４８２号
【特許文献２】仏国特許ＦＲ２８３３２７１Ｂ１号
【非特許文献】
【００１６】
【非特許文献１】Ｎａｔｕｒｅ、１９９２　Ｎｏｖ．　１９、３６０（６４０１）：２５８－６１
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１７】
本発明は、上記の技術上の問題それぞれを、初めて、安全、確実かつ再現性よく克服するものであり、工業・商業的に、特に農業飼料及び／又は医療及び／又は薬物及び／又は化粧品用途の工業的規模で利用可能である。
【００１８】
本発明は主に、末梢循環血由来の生物前駆体からのＬＣまたはＩＤＣの生成、ＬＣとＩＤＣの同時生成、ＩＤＣとマクロファージと内皮細胞の同時生成、またはＬＣとＩＤＣと

マクロファージと内皮細胞の同時生成からなる。
【００１９】
特に、本発明は、上記の細胞（ＬＣ、ＩＤＣ／ＤＣＣ等）を含む表皮、上皮、真皮、絨毛膜、皮膚または粘膜モデルを、生物の特に哺乳類、特にヒトの表皮、上皮、真皮、絨毛膜、皮膚または粘膜を再生させるうえで品質に最も優れるモデルを提供する。本発明の他の目的は、上皮の及び／又は連結シート、及び皮膚または粘膜の免疫適格等価物を提供することである。
【００２０】
特に、本発明は、末梢循環血由来の単球を分化させて上記の細胞（ＬＣ、ＩＤＣ／ＤＣＣ等）を得る方法を提供することからなる。
【００２１】
本発明はまた、上記モデルを、動物試験、特に化粧品原料の刺激性及び／又は感作性を試験する方法に代わる方法として提供することからなる。
【００２２】
本発明の他の目的は、上記のモデルを、活性成分、特に化粧品、皮膚薬、医薬の試験に、特にこれらの活性及び／又は毒性または薬毒性を評価する試験に提供することである。
【００２３】
本発明の他の目的は、上記のモデルを、分子または化学物質の試験、特にこれらの毒性試験に提供することである。
【００２４】
本発明はまた、上記のモデルを、細胞内でのまた細胞内レベルでの生物学的／生化学現象の評価に提供することである。
【００２５】
本発明の主な目的は、例えば外部試薬のアレルギー性／刺激性／感作性を予測するために生体外試験を行うなどの目的で、薬毒性試験用のモデル／・ツールを提供することである。
【００２６】
本発明のさらに他の目的は、免疫調節活性を持つ物質を調査するためのモデル／ツールを提供することである。
【００２７】
本発明はまた、上記のモデルを、組織工学または細胞工学に、特に生物の組織の少なくとも一部を修復するための組織工学または細胞工学に利用することに関する。
【課題を解決するための手段】
【００２８】
特に断らない限り、本発明の範囲内において、「細胞」は常に「生細胞」である。
【００２９】
本発明の「末梢循環血」とは、血液が回路をなしている血液系を有するいずれかの生物の血液、特に末梢血であり、特に動物の血液、哺乳類、好ましくはヒトの血液である。
【００３０】
「活性成分」とは、潜在的に工業的な面で、特に農業飼料、食品、皮膚薬物、薬物、化粧品産業などの面で面白い活性をもつ何らかの物質、製品または組成物である。
【００３１】
「外来性サイトカインの添加」とは、関係する細胞培地中に存在する細胞により合成されるサイトカインに加えて、少なくとも一種のサイトカインを添加することを意味する。
【００３２】
本発明は、したがって、上皮細胞及び／又は間充織細胞（例えば線維芽細胞など）の存在下での、ＣＤ１４＋単球の
－ＬＣ、
－ＩＤＣ、
－ＬＣとＩＤＣ、

－ＩＤＣとマクロファージ及び／又は内皮細胞、
－ＬＣとＩＤＣとマクロファージ及び／又は内皮細胞
への分化に関する。
【００３３】
特に、本発明は、ＣＤ１４＋単球のＬＣ及び／又はＩＤＣへの分化（分化促進条件下での前培養がない、特に外来性サイトカインを用いる前培養がない分化）に関し、特に、ＬＣ及び／又はＩＤＣを含む細胞モデルを得るための、例えば線維芽細胞種の上皮細胞及び／又は間充織細胞の存在下での分化であって、培養を、好ましくは実質的に多量の外来性サイトカインを添加することなく、即ち培地中に存在する細胞によって合成される内因性サイトカイン以外に何らサイトカインを加えることなく行う分化に関する。
【００３４】
特に、本発明は、次の工程：
－循環血、特にヒトの循環血からＣＤ１４＋単球を採取する工程；
－ＣＤ１４＋単球を、ＤＣへの分化を促進しない条件下に維持する工程；及び
－ＣＤ１４＋単球をＬＣ、またはＩＤＣ、またはＬＣとＩＤＣに分化させない条件で、ＣＤ１４＋単球を、ケラチノサイトなどの上皮細胞及び／又は線維芽細胞などの間充織細胞を含む細胞環境に接触させる工程、からなる、ＣＤ１４＋単球をＬＣ及び／又はＩＤＣに分化させる方法に関する。
【００３５】
特に循環血から採取後、短時間でまたは直ちにＣＤ１４＋単球を播種するために、ＣＤ１４＋単球をＣＤへの分化を促進しない条件下に維持する工程は、好ましくはその時間を制限したほうがよい。
【００３６】
ＣＤ１４＋単球のＤＣへの分化を促進しない条件は、いずれの外来性サイトカインをも含まない培養条件下で得られるものであることが好ましい。特に、この目的は、ＣＤ１４＋単球が、ＤＣ分化経路に入り込まないことである。
【００３７】
特に本発明により、一定レベルの細胞死を伴うＣＤ１４＋単球の前培養を避けることができるため、前駆体／細胞の比を増加させることができる。
【００３８】
細胞外で生成したＤＣは、非常に敏感で壊れやすい細胞である。まず最初に調べる必要のある変数は、得られる細胞の収率である。ＤＣをいずれかの細胞培養モデル中に播種すると、ＤＣの量の低下及び／又は細胞死亡率が、その量が特定できないものの、大きいことは明白である。本発明のＣＤ１４＋単球をＤＣ前駆体として利用すると、この問題を克服し、細胞量の増加をもたらすことができる。
【００３９】
本発明によれば、単球のＬＣまたはＩＤＣへの分化が培養６日間ですむため、時間を大きく短縮することができる。
【００４０】
本発明によれば、好ましくは外来性サイトカインの使用がないため、特に反応剤の面で有利である。
【００４１】
本発明によれば、特にできた細胞の品質の面で有利である。生体外での単球からのＤＣの生成は、可溶性免疫メディエーター、サイトカインの影響下での細胞分化の相に関係している。最近、ある報告（Ｎｉｃｏｌａｓ Ｂｅｃｈｅｔｏｉｌｌｅ ｅｔ．ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｌｅｕｋｏｃｙｔｅｓ Ｂｉｏｌｏｇｙ：単球由来のランゲルハンス細胞と間質性／真皮樹状細胞サブセットの混合物は、Ｔｈ２仲介性の炎症性条件において、炎症性刺激にそれぞれ異なる反応をする）によれば、単球由来のＬＣ型およびＤＤＣ型のＤＣは、細胞分化過程で「同期」していないと述べられている。言い換えれば、分化をはじめたＣＤ１４＋単球は、すべてが同じ分化段階にはないＬＣとＤＣＣを生成す

る。この分化段階を避けることで、この不完全さを除くことができる。本発明において培養する単球は、細胞により、細胞再生物のサイトカインやマトリックスの環境により影響を受け、ＤＣの分化に対して、より生理的な環境を形成する。

【００４２】

生体外で生成されたＤＣが、自発的に「成熟」する能力を有していることはよく知られているが、これは、成熟ＤＣがもはや活性化や刺激を受けないため、大きな問題である。本発明者等は、これらの細胞の未成熟条件を生体外で制御するが、単球をＬＣとＤＣＣの前駆体として直接使用することで、生体外での自発的な成熟のリスクを除くことができる。また、本発明に係る細胞または組織培養モデルをＣＤ１４＋単球のＤＣへの分化システムとして使用する利点は、生理的なものである。皮膚や粘膜中でのＤＣ分化の自然の条件をよりよく再現し、生体内での同族体と同様の未成熟のＤＣを得ることができるためである。

【００４３】

同じ意味で、前もって生成したＤＣを使用するのでなく、ＣＤ１４＋単球をＤＣの前駆体として用いることで、現在のモデル内で、表現型としてより未成熟で、機能的により敏感なＬＣとＤＣＣとを培養することができる。実際、また同じ意味で、本発明者等は最近、ＣＤ３４＋始原細胞に由来し、外来性サイトカイン存在下で再生絨毛膜中で培養したＤＣが、外来性サイトカインの存在下で培養した同族体と較べて、ＨＩＶウイルスの複製の点でより満足できる非成熟条件を有していることを示した。（Ｓａｎｄｙ　Ｄｏｍｏｎｔ　ｅｔ　ａｌ．，　上皮下の粘膜層等価物に取り込まれると、樹状細胞は未成熟段階を維持し、Ｔ細胞サブセットの非存在下で、Ｒ５型ＨＩＶ－１種を複製する能力を保持する。ＡＩＤＳ　Ｒｅｓ．　ａｎｄ　Ｈｕｍ．　Ｒｅｔｒｏｖｉｒｕｓｅｓ　２０：　３８３－３９７、２００４）。得られたＤＣは、既に報告のものとは大きく異なり、特に仏国特許ＦＲ２８３３２７１Ｂ１（２００１年１２月１０日出願）のものとは大きく異なる。

【００４４】

さらに、ＣＤ１４＋単球を直接、皮膚ＤＣの前駆体として用いると、すでに報告されている方法に較べて、より生理的な方法を与える。事実、生物中では、血液単球は皮膚に侵入し、ここで細胞やサイトカインやマトリックスの環境がその分化を制御する。前もって分化させたＤＣをこの培養モデル中へ取り込ませることも可能であるが、直接その前駆体のＣＤ１４＋単球を用いる方法と較べると、現在のところまだ不満足である。この方法の改良は、免疫組織学的には、この三次元培養モデル中でのＬＣとＤＣＣのより均一な細胞分布を意味する。

【００４５】

本発明によれば、新たに分離された単球を、モデル中で使用する前に凍結させてもよい。

【００４６】

本発明によれば、生体内の同族体と実質的に同一の表現型で同一の機能をもつ細胞を生成させることができる。

【００４７】

本発明は、特に共培養すると、

－上皮環境中で、表現型的に及び／又は機能的にＬＣに分化し、

－連結環境では、表現型的に及び／又は機能的にＩＤＣ、マクロファージ及び内皮細胞に分化するユニークな細胞前駆体に関する。

【発明を実施するための形態】

【００４８】

したがって、第一の側面によれば、本発明は、生物の、特にヒトの末梢循環血由来ＣＤ１４＋単球から、ＬＣ、またはＩＤＣ、またはＬＣとＩＤＣとを生産する方法であって、ＣＤ１４＋単球をケラチノサイトなどの上皮細胞及び／又は皮膚線維芽細胞などの間充織細胞を含む細胞環境に入れることによりＣＤ１４＋単球をＬＣに、またはＩＤＣに、またはＬＣとＩＤＣとに分化させることを特徴とする方法に関する。

【００４９】
都合のよいことに、ＣＤ１４＋単球の分化により、ＩＤＣとマクロファージと内皮細胞とが、またはＬＣとＩＤＣとマクロファージと内皮細胞が得られる。都合のよいことに、ＬＣとＩＤＣの細胞集団の分布は、単球とともに培養される細胞の種類により変動する。ケラチノサイトを使用すると、ＬＣへの分化が増加し、線維芽細胞を使用するとＩＤＣへの分化が増加する。
【００５０】
都合のよいことに、いずれの外来性サイトカインをも添加することなく、単球の分化を引き起こすことができる。ある実施様態においては、外来性サイトカインの添加を行わない。
【００５１】
都合のよいことに、ケラチノサイトなどの上皮細胞環境で成長している単球は、単球の未成熟の機能的ＬＣへの分化を促進する。本発明者等の意図するところでは、「未成熟」とは、これらの単球が、活性化標識（ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＣＲ７）や熟成標識（ＣＤ８３、ＤＣ－ＬＡＭＰ）を発現しないか、発現しても極めて少量であることを意味する。他方、未成熟のＬＣは、ＣＣＲ６を発現する。
【００５２】
本発明者等の意図するところでは、「機能的」とは、抗原内在化能力（未成熟条件）、細胞移動能力（未成熟活性化条件）、および抗原提示能力（成熟条件）を有することをいう。
【００５３】
ある実施様態においては、皮膚線維芽細胞などの間充織細胞環境での単球の培養では、単球の未成熟機能的ＩＤＣへの分化が促進される。上記の定義を参照。ただし、未成熟ＩＤＣはＣＣＲ６を発現しない。
【００５４】
都合のよいことに、ケラチノサイトなどの上皮細胞と皮膚線維芽細胞などの間充織細胞を含む環境での単球の培養では、単球の典型的なＬＣとＩＤＣへの分化が促進される。本発明者等の意図においては、「典型的」とは、未成熟の表現型及び機能の点で、すなわち刺激やストレス後の反応など能力の点で、それらの細胞内同族体に近いことをいう。
【００５５】
培養（分化）に用いる上皮細胞及び／又は間充織細胞の、ＣＤ１４＋単球に対する比率は、ＬＣ及び／又はＩＤＣと、上皮細胞及び／又は間充織細胞との間の望ましい細胞の分布に依存している。
【００５６】
第二の側面によれば、本発明は、細胞または組織モデル内での、生物の特にヒトの末梢循環血に由来するＣＤ１４＋単球の融合を含むＣＤ１４＋単球の培養方法であって、該細胞または組織モデルがケラチノサイトなどの上皮細胞、及び／又は皮膚線維芽細胞などの間充織細胞を含み、また該モデル中でＣＤ１４＋単球を、ＬＣに、またはＩＤＣに、またはＬＣとＩＤＣに分化させるために、上記ＣＤ１４＋単球をケラチノサイトなどの上皮細胞、及び／又は皮膚線維芽細胞などの間充織細胞の存在下で培養を行うことを特徴とする方法に関する。
【００５７】
いずれの外来性サイトカインも加えることなく単球を培養することが好ましい。
【００５８】
この細胞または組織モデルは、表皮モデル、上皮モデル、真皮モデル、絨毛膜モデル、皮膚モデルまたは粘膜モデルからなる群から選ばれ、特に歯肉または膣粘膜のものであることが好ましい。
【００５９】
この三次元培養モデルは、次のものからなる群から選ばれる皮膚または絨毛膜マトリックス支持体であることが好ましい。

【００６０】
－間充織細胞、特に線維芽細胞を含むコラーゲン系またはフィブリン系ゲルまたはフィルム、
－一種以上のグリコサミノグリカン及び／又は必要に応じてキトサンを含んでいてもよい、また間充織細胞、特に線維芽細胞を含んでいても含んでいなくてもよいコラーゲン製多孔質マトリックス、
－間充織細胞、特に線維芽細胞を含んでいても含んでいなくてもよい、次の群の材料のいずれかからなる不活性支持体：半透性合成膜、特に半透性ニトロセルロース膜、半透性ナイロン膜、ポリテトラフルオロエチレン（テフロン（登録商標）（Ｒ）、ＰＴＦＥ）膜またはスポンジ、半透性ポリカーボネートまたはポリエチレンテレフタレート（ＰＥＴ）膜、酸化アルミニウムのキャピラリー多孔性構造を有する無機膜（半透性アノポア膜）、半透性ポリエステル膜、
－間充織細胞、特に線維芽細胞を含んでいても含んでいなくてもよい、ポリカーボネート系またはポリスチレン系の培養用に処理した不活性支持体。
【００６１】
用いる組織モデルは、表面に上皮細胞を、特にケラチノサイトを載せた上記の皮膚または絨毛膜支持体であることが好ましい。
【００６２】
この細胞または組織モデルは、少なくとも一種の他の細胞種、例えば神経細胞及び／又は内皮細胞及び／又はメラノサイト及び／又はリンパ球及び／又は脂肪細胞及び／又は剛毛や毛髪、脂腺などの皮膚付着物を有していることが好ましい。
【００６３】
少なくとも間充織細胞を含む細胞または組織モデルに取り込まれた時に、一部のＣＤ１４＋単球が、内皮細胞とマクロファージに分化することが好ましい。
【００６４】
この方法は、主にＬＣを、またはＩＤＣを、またはＬＣとＩＤＣの混合物、またはＬＣとＩＤＣと内皮細胞とマクロファージの混合物、またはＩＤＣと内皮細胞とマクロファージの混合物を含んでいることが好ましい。
【００６５】
好ましくは、この細胞または組織モデルが、上皮部分と連結マトリックスとを有し、ＬＣが実質的に上皮部分に局在し、ＩＤＣとマクロファージと内皮細胞が実質的に連結マトリックスに局在することを特徴とする。
【００６６】
第三の側面によれば、本発明は、少なくとも一種の上記ＬＣ及び／又はＩＤＣ細胞と、さらに必要に応じてマクロファージ及び／又は内皮細胞とを含む、上記の方法により得られる細胞モデルに関する。
【００６７】
上記モデルは、得られるＤＣが上記の方法で得られたものとは異なり、その主な差がＬＣとＩＤＣの細胞分化過程の同期性にあることを特徴とする。
【００６８】
第４の側面によれば、本発明は、上記ＬＣ及び／又はＩＤＣの少なくとも一種と、さらに必要に応じてマクロファージ及び／又は内皮細胞とを含む、上記の方法の一つにより得られる、表皮モデル、上皮モデル、真皮モデル、絨毛膜モデル、皮膚モデル及び粘膜モデルからなる群から選ばれる組織モデル、特に歯肉または膣粘膜の組織モデルに関する。
【００６９】
この細胞または組織モデルは免疫適格であることが好ましい。
【００７０】
この組織モデルは、ケラチノサイトなどの上皮細胞を含む上皮部分と、皮膚または絨毛膜線維芽細胞間など充織細胞を含む連結のマトリックスを含み、ＬＣが実質的に上皮部分に局在し、ＩＤＣ、マクロファージ及び／又は内皮細胞が実質的に連結マトリックスに局

在していることが好ましい。

【００７１】

上記モデルは、得られるＤＣが上記の方法で得られたものとは異なり、その主な差が、この三次元培養モデルにおけるＬＣとＩＤＣの細胞分化過程の同期性にあることを特徴とする。

【００７２】

第５の側面によれば本発明は、生物、特にヒトの末梢循環血から単離される凍結ＣＤ１４＋単球に関する。

【００７３】

特に本発明によれば、生物の防御／感染過程、例えば刺激やアレルギーや感作現象に関与する現象全体を説明可能な、官能性の異なる複数のＤＣの細胞群を作製することができる。

【００７４】

したがって、第６の側面によれば、本発明は、上に定義される少なくとも一種の細胞モデルまたは組織モデルの、化粧品、皮膚薬学、薬学分野での試験モデルとして及び／又は活性成分の選択ための利用に関する。

【００７５】

もう一つの面白いＬＣ及び／又はＩＤＣの用途は、これらを新規分子の刺激性と感作性の比の評価に用いることである。２００５年以降化粧品最終製品の毒性試験に動物の使用を禁じるＥＵ指令２００３／１５／ＥＣは、公共試験器官や工業試験機関に、新規分子の感作性試験のための体外評価方法や試験管内評価方法の開発を求めている。接触アレルギーにおける重要な役割のため、動物試験の代わりとしての皮膚状ＤＣの使用は、現在開発の主軸となっている。

【００７６】

第７の側面によれば、本発明は、上に定義される少なくとも一種の細胞モデルまたは組織モデルの、生物の防御／感染プロセスで起こる現象と活性の評価、特に特定の活性成分の免疫刺激または免疫抑制活性の評価のための、上記活性成分による免疫調整の評価と誘導のための、外部試薬のアレルギー、刺激、感作活性を予測するための体外試験実施のための、または分子または化学物質の試験、特に毒性調査を実施するための利用に関する。

【００７７】

第８の側面によれば、本発明は、上に定義される少なくとも一種の細胞モデルまたは組織モデルの、上皮性障壁の生理病理学；皮膚や粘膜の刺激性；生物学的攻撃、例えばウイルスや、ＨＩＶなどのレトロウイルス、バクテリア、糸状菌、微生物、粒子抗原などの攻撃；光毒性；光保護；さらには、活性成分、特に化粧品または薬品活性成分の効果；最終製品、特に化粧品または薬品製品の効果；病原性物質による感染のメカニズムの試験への利用に関する。

【００７８】

好ましくは、本発明は活性成分等の毒性の評価に関する。特に、この試験は、細胞の標識を、特にＤＣの標識を測定して行われる。

【００７９】

第９の側面によれば、本発明は、上に定義される少なくとも一種の細胞モデルまたは組織モデルの、ＨＩＶなどのレトロウイルスを含むウイルスの感染、複製、伝播現象のメカニズムの試験への、またはワクチンや薬品の投与なども含む新しい治療法の探索と開発への利用に関する。

【００８０】

第１０の側面によれば、本発明は、上に定義される少なくとも一種の細胞モデルまたは組織モデルの、病原性物質、例えばウイルス、ＨＩＶなどのレトロウイルス、バクテリア、糸状菌、微生物、粒子抗原などの存在の検出への利用に関する。

【００８１】

第１１の側面によれば、本発明は、上に定義される少なくとも一種の細胞モデルまたは

組織モデルの、医学、生物医学または化粧品用途への利用、特に体外または体内での免疫または寛容応答の調整、特に環境的な攻撃、特に紫外線照射などの物理的な攻撃や刺激／アレルギー／感作物質などの化学的な攻撃や生物学的攻撃の結果としての免疫または寛容応答の予防または治療目的での調整のための利用に関する。

【００８２】

第１２の側面によれば、本発明は、上に定義される少なくとも一種の細胞モデルまたは組織モデルの、組織工学及び細胞工学用途への利用、医学または生物医学的用途、具体的には、免疫応答を刺激可能なＤＣ注入法による抗癌細胞療法；自己免疫疾患の場合の細胞療法での利用や、例えばアネルギー性Ｔ細胞の産生による免疫寛容刺激の惹起や；免疫系を侵す疾患の遺伝子療法への利用、またはワクチンの開発を製造のための利用に関する。

【００８３】

第１３の側面によれば、本発明は、以下の工程からなる組織モデルの製造方法に関する。

【００８４】

－生物の末梢循環血からＣＤ１４＋単球を単離する工程、

－皮膚または粘膜細胞を支持体上に播種し、栄養培地中で培養して、再生組織を得る工程、

－該再生組織に、皮膚または粘膜細胞と同時に、あるいは同時でなく、ＣＤ１４＋単球を播種する工程、

－該ＣＤ１４＋単球と皮膚または粘膜細胞とを含む再生組織をＣＤ１４＋単球が、ＬＣに、ＩＤＣと内皮細胞及び／又はマクロファージの混合物に、ＬＣとＩＤＣと内皮細胞及び／又はマクロファージの混合物に分化する条件下で培養する工程（なお、再生組織が表皮モデルである場合は皮膚細胞は表皮ケラチノサイトであり、再生組織が真皮モデルである場合は皮膚細胞は皮膚線維芽細胞であり、再生組織が上皮モデルである場合は粘膜細胞は上皮粘膜細胞であり、再生組織が絨毛膜モデルである場合は粘膜細胞は粘膜線維芽細胞である）。

【００８５】

これらの上皮細胞は、例えば少なくとも一種の皮膚組織から分離される。

【００８６】

これらの皮膚または粘膜細胞の播種を、ＣＤ１４＋単球の播種の前に行っても、後に行ってもよい。

【００８７】

ＣＤ１４＋単球の播種を、皮膚または粘膜細胞の播種と同時に行うことが好ましい。

【００８８】

第１４の側面によれば、本発明は、ケラチノサイトまたは上皮粘膜細胞を、および必要に応じてメルケル細胞及び／又はメラノサイトを含む上皮部分と真皮または絨毛膜線維芽細胞を含む連結マトリックスとを含む再生皮膚または再生粘膜を製造する方法であって、以下の工程からなる方法に関する。

【００８９】

－ケラチノサイトまたは上皮粘膜細胞を栄養培地中に播種し、必要に応じてメルケル細胞及び／又はメラノサイトの存在下で、ＩＤＣと必要に応じて内皮細胞及び／又はマクロファージを含む真皮または絨毛膜モデルの表面で、培養する工程（ただし、上記真皮または絨毛膜モデルが上に定義する真皮または絨毛膜モデルの製造方法により得られるものである）、および

－上記ケラチノサイトまたは上皮粘膜細胞の存在下でＣＤ１４＋単球がＬＣに分化する条件下で、生物の末梢循環血から単離したＣＤ１４＋単球をケラチノサイトまたは上皮粘膜細胞と同時に、あるいは同時でなく播種・培養する工程。

【００９０】

これらの組織モデルを作製する方法は、外来性サイトカインの添加を必要としないことが好ましい。

【００９１】
実施例に関する説明を読めば、本発明の他の目的や特徴、利点が、当業界の熟練者にさらに明確になるであろう。なお、これらの実施例は、説明を目的に提供されるものであって、本発明の範囲を制限するものではない。
【００９２】
これらの実施例は本発明の重要な一部であり、明細書から全体として、従来技術と比較して新規であるとみられる特徴はいずれも、実施例も含めて、その機能及び一般性において、本発明の重要な一部である。
【００９３】
したがって、各々の実施例は、ある一般的な範囲を有している。
【００９４】
実施例において、百分率は特に断りのない限り質量換算のものであり、温度は特に断りのない限り摂氏温度であり、圧力は特に断りのない限り大気圧である。
【実施例】
【００９５】
実施例１：末梢循環血からの単球の分離方法
一人以上のヒト供与者から静脈血を、好ましくは真空採血システムまたはリチウムヘパリンなどの通常の抗凝固剤製品を入れたバッグに採血して末梢循環血を得た。
【００９６】
好ましくは、循環血からの単球の分離を次の方法により行う。
１．リンパ球分離用の媒体を用いて血液を遠心分離し、単核性細胞を回収する。
－抗体カクテル、例えば抗ＣＤ３、抗ＣＤ７、抗ＣＤ１６、抗ＣＤ１９、抗ＣＤ５６、抗ＣＤ１２３抗体や、磁気ビーズに結合した抗グリコホリンＡで標識する。磁化されたカラムに通し、溶出する非標識単球のみを回収する。
－または磁気ビーズに結合した単球に特異的な抗体で、例えば抗ＣＤ１４抗体で標識する。磁気カラムを通して、標識された単球のみをカラム中に保持する。カラムから溶出後、標識された単球を回収する。
－またはフィコエリトリンなどの蛍光色素に結合した、単球に特異的な抗体、例えば抗ＣＤ１６抗体で標識する。フラックスサイトメトリーで細胞を分類後、標識した単球のみを回収する。
２．これらの単球は、当業界の熟練者にはよく知られているいずれかの物理的分離方法を用いて、特に沈降または遠心分離を用いて分離され、続く培養にそのまま使用される。
３．１００ｍＬの試料の血液から、最高約１５０百万（±２０百万）個の単核性の細胞が抽出され、最高４０百万個の単球が精製される。
【００９７】
実施例２：末梢循環血から分離された単球の凍結方法
実施例１で得られた単球を、栄養培地、例えば血清とＤＭＳＯ（ジメチルスルホキシド）などの凍結保護剤を加えたＲＰＭＩ培地に懸濁し、次いで凍結させる。
単球融解時の、細胞死亡率は３０％未満である。
【００９８】
１００ｍＬの試料の末梢循環血からり、最高８０×10^6個の単球が凍結され、最高７６×10^6個の単球が融解後に回収される。
【００９９】
実施例３：共培養のケラチノサイトとＬＣの多細胞単一層モデル
単球の入手：実施例１または実施例２を参照
培養シャーレ中で、例えば６ウェル型の培養シャーレ中で、１～２×10^6個のヒトケラチノサイトと１～２×10^6個のヒト単球（実施例１または２で得られたもの）を、栄養培地中で、例えばＫ－ＳＦＭ型の培地中で培養する。外来性サイトカインを加えずに、栄養培地、例えばＫ－ＳＦＭ型培地中で共培養を６日間続ける。
【０１００】

当業界の熟練者にはよく知られている酵素法、特にトリプシン処理によりこの細胞を回収し、混合細胞溶解液中の２×１０^{5}個のケラチノサイトと単球からなる細胞をモノクローナル抗ランゲリン抗体とともに培養し、フラックスサイトメトリーで分析する。最高４０％のランゲリン＋ＬＣが観察される。

【０１０１】

実施例４：共培養の線維芽細胞とＤＤＣと多細胞単一層モデル

単球の入手：実施例１または実施例２参照

培養シャーレ中で、例えば６ウェル型の培養シャーレ中で、１～２×１０^{6}個のヒトケラチノサイトと１～２×１０^{6}個のヒト単球（実施例１または２で得られたもの）を、栄養培地中、例えばＦＢＭ型の培地で培養する。外来性サイトカインを加えずに、栄養培地、例えばＦＢＭ型培地中で共培養を６日間続ける。

【０１０２】

当業界の熟練者にはよく知られている酵素法、特にトリプシン処理によりこの細胞を回収し、混合細胞溶解液中の２×１０^{5}個のケラチノサイトと単球からなる細胞をモノクローナル抗ＤＣ－ＳＩＧＮ抗体とともに培養し、フラックスサイトメトリーで分析する。最高６０％のＤＣ－ＳＩＧＮ＋ＤＣＣが観察される。

【０１０３】

実施例５：活性成分の効果で分泌されるサイトカインの分布を調べるための実施例３及び４に記載の単一層多細胞モデルの利用

ヒト皮膚用の活性成分の刺激、感作、アレルギー活性を評価するため、また炎症性または抗炎症性活性を予測するため、次の方法により培養上澄液中に分泌されるサイトカイン、例えばＩＬ－１とＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－１０、ＴＮＦ－α、ＩＮＦ－γを定量する。

－このモデルは、実施例３または４に記載の方法により作製する。

－最終濃度が０．０５％となるようにレチノールを培養培地に添加し、３日間放置する。

－次いで、培養上澄液を回収し分析する。

【０１０４】

レチノールが、炎症性サイトカイン分泌の刺激を引き起こすことがわかる。

【０１０５】

実施例６：実施例３～４に記載の多細胞単一層モデルの活性成分の、免疫活性化または免疫抑制活性の評価への利用

活性成分や非活性成分に対する免疫応答及び／又は免疫寛容を生じる応答を誘起するＬＣとＤＣＣの能力を評価するために、次の方法でフラックスサイトメトリーにより表現型の種類を調べた。

－実施例３または実施例４に記載の方法によりモデルを作製する。

－次いで培養培地に活性成分をいろいろな濃度で添加し、３日間放置する。

－次いでトリプシン処理により細胞を回収する。

ケラチノサイトとＬＣからなる、あるいは線維芽細胞とＤＣＣからなる２×１０^{5}個の細胞を含む混合細胞溶解液を、各種の抗体（抗ＣＣＲ７、抗ＨＬＡ－ＤＲ、抗ＣＤ８０、抗ＣＤ８３、抗ＣＤ８６、抗ＤＣ－ＬＡＭＰ）を含む液中で培養する。

【０１０６】

細胞表現型を決めることで、試験した活性成分の免疫活性（誘導及び／又は標識分子発現の増加）または免疫抑制状況（阻害及び／又は標識分子発現の抑制）を決めることができる。

【０１０７】

実施例７：実施例３～４記載の多細胞単一層モデルの、活性成分の免疫調節活性の測定のための利用

刺激、感作、またはアレルギーストレス後の、活性成分の免疫調節効果を、

次の方法により調べる。

－このモデルは、実施例３または実施例４に記載の方法により作製する。

－次いで、３００μｌのＴＮＰ（２，４，６－トリニトロベンゼンスルホン酸）を５ｍＭの濃度で添加し、３７℃で３０分間放置する。
－この刺激後に、この培養培地に活性成分をいろいろな濃度で添加し、２日間放置する。
－この細胞を含む培地を、ＩＬ－１２などのイムノサイトカインの分泌を調べるために回収する。回収された細胞は、抗ランゲリン抗体または抗ＤＣ－ＳＩＧＮ抗体とともに培養し、その後、フラックスサイトメトリーでＬＣまたはＤＣＣをそれぞれ分離する。
－分離したＬＣまたはＤＣＣを、ボイデン型移動チャンバー（膜の空孔が５～８μｍであり、ＭＡＴＲＩＧＥＬ™被覆ありまたはなし）に播種し、３７℃で最長７２時間培養する。
－移動したＬＣまたはＤＣＣの数を、例えば光学顕微鏡でカウントして求める。

【０１０８】
移動試験及び／又はＩＬ－１２の合成と分泌の試験の結果、試験対象の活性成分の免疫調節特性が明らかとなる。

【０１０９】
実施例８：ＬＣを含む三次元的な多細胞再生真皮モデル
単球の入手：実施例１または実施例２を参照。

【０１１０】
このモデルは、次の方法で作製した。
－０．５～１×１０^{6}個の正常のヒト皮膚ケラチノサイトをボイデンチャンバー型（孔径０．４μｍの多孔膜）挿入物に播種し、栄養培地中で、例えば好ましくは最終濃度が１ｍＭのコウシ血清とアスコルビン酸と、好ましくは最終濃度が１０ｎｇ／ｍＬのＥＧＦ（上皮成長因子）、好ましくは最終濃度が０．４μｇ／ｍＬの濃度のハイドロコルチゾン、好ましくは最終濃度が０．１２ＩＵ／ｍＬの濃度のウムリン、好ましくは最終濃度が０．４μｇ／ｍＬのイスプレル、及び好ましくは最終濃度が２．１０$^{-9}$Ｍのトリヨードチロニン、好ましくは最終濃度が２４．３μｇ／ｍＬのアデニン、好ましくは最終濃度が１００μｇ／ｍＬのノルモシンを添加したＤＭＥＭ－グルタマックス型培地中で、２日間培養する。

【０１１１】
－次いで、１～５×１０^{4}個の単球を、上皮に相当する表面上に播種し、これをさらに２日間培養する。
－この培養物を、浸漬培養に用いたのと同一の培地（ただし、コウシ血清、ハイドロコルチゾン、ウムリン、イスプレルａｎｄトリヨードチロニンは含まない）内で気液界面において、さらに１０日間培養する。
－この培養物を、ティッシュテック（Ｒ）などの非晶性樹脂に含ませ、液体窒素中で直接凍結させる。
－組織学的切片の免疫組織化学的試験を行い、特異抗体を用いて細胞の種類を同定する。
－標識を行った結果、ＬＣ（ランゲリン＋細胞）の存在が確認される。

【０１１２】
結論
レクチン、すなわちランゲリンの観測で示されるように、再生表皮モデル中に加えられた単球は、ＬＣ型のＤＣに分化する。

【０１１３】
実施例９：ＬＣを含む三次元多細胞着色及び／又は神経性再生表皮モデル
単球の入手：実施例１または実施例２を参照
このモデルは、実施例８に記載の方法により０．５～１×１０^{5}個の正常のヒト皮膚由来のメラノサイト及び／又はメルケル細胞と、ケラチノサイトとを同時に播種して作製する。

【０１１４】
実施例８に記載の標識に加えて、メラニンを検出するためにメラノサイト（ＨＭＢ４５）の標識とＤＯＰＡ反応を実施し、またメルケル細胞を同定するために抗ケラチン２０抗

体で標識する。
【０１１５】
結論
レクチン、すなわちランゲリンの観測で示されるように、着色及び／又は神経性再生表皮モデルにとりこまれた単球は、ＬＣ型ＤＣに分化する。
【０１１６】
実施例１０：ＬＣを含む歯肉および膣再生粘膜の三次元多細胞上皮モデル
単球の入手：実施例１または実施例２を参照
このモデルは、実施例８に記載の方法で作製する。ただし、次のように一部を変更する。
【０１１７】
－通常のヒトケラチノサイトを、通常のヒト歯肉及び膣粘膜の上皮細胞に置き換える。
－培養培地中の血清の濃度は１％である。
－培養は、培地に浸漬して実施する。
－標識の結果は、ＬＣ（ランゲリン＋細胞）の存在を示す。
結論
レクチン、すなわちランゲリンの観測で示されるように、歯肉や膣の再生粘膜の上皮モデルに取り込まれた単球は、ＤＣまたはＬＣ型に分化する。
【０１１８】
実施例１１：三次元多細胞再生皮膚モデル
このモデルは、再生真皮培養物上に、さらに再生表皮の培養を行ったものである。
【０１１９】
この再生真皮モデルは、次の方法により作製する。
－０．５～１×10^{6}個の正常なヒト皮膚の線維芽細胞を、ジフェニルホスホリルアジドで架橋したコラーゲンのマトリックス基材上に播種し、栄養培地中で、例えば１０％コウシ血清と、好ましくは最終濃度が１ｍＭのアスコルビン酸、好ましくは最終濃度１０ｎｇ／ｍＬのＥＧＦ（上皮成長因子）、および好ましくは最終濃度が１００μｇ／ｍＬのノルモシンを添加したＤＭＥＭ－グルタマックス中で、１４日間培養する。
【０１２０】
この再生皮膚モデルは、次の方法により得る。
－０．５～１×10^{6}個の通常のヒトケラチノサイトを皮膚等価物上に播種し、栄養培地中で、例えばコウシ血清と、好ましくは最終濃度が１ｍＭのアスコルビン酸と、また好ましくは最終濃度が１０ｎｇ／ｍＬのＥＧＦ（上皮成長因子）と、好ましくは最終濃度が０．４μｇ／ｍＬのハイドロコルチゾンと、好ましくは最終濃度が０．１２ＩＵ／ｍＬのウムリンと、好ましくは最終濃度が０．４μｇ／ｍＬのイスプレルと、好ましくは最終濃度が２×10^{-9}Ｍのトリヨードチロニンと、好ましくは最終濃度が２４．３μｇ／ｍＬのアデニンと、好ましくは最終濃度が１００μｇ／ｍＬのノルモシンを添加したＤＭＥＭ－グルタルナックス／ハムＦ－１２（比率＝３／１Ｖ／Ｖ）中で培養する。培養は、浸漬条件で７日間継続する。
【０１２１】
培養物を気液界面におき、さらに１４日間、同一培地で浸漬培養する。ただし、コウシ血清とハイドロコルチゾン、イスプレル、トリヨードチロニン、ウムリンは除く。
【０１２２】
結論
皮膚の両方の細胞種、表皮と真皮とを生体外で再生することができる。
【０１２３】
実施例１２：ＤＣＣとマクロファージと内皮細胞とを含む三次元多細胞再生真皮モデル
単球の入手：実施例１または実施例２を参照
再生真皮を、実施例１１に準じて培養する。
【０１２４】

このモデルは、次の方法により得る。
－１～５×１０^{4}個の単球を、皮膚等価物の表面に播種し、さらに７日間培養する。
－培養物を、ティッシュテック（Ｒ）等の非晶性樹脂に含ませ、液体窒素中で直接凍結させる。
－組織学的切片の免疫組織化学的試験を行い、特異抗体を用いて細胞の種類を同定する。
－標識を行った結果、ＤＤＣ（ＤＣ－ＳＩＧＮ＋細胞）とマクロファージ（ＣＤ６８＋細胞）と内皮細胞（ＣＤ３１＋細胞とＣＤ３６＋細胞）の共存がわかる。
【０１２５】
結論
再生真皮モデルに取り込ませて培養したこれらの単球が、ＤＤＣ型のＤＣに分化し、またマクロファージや内皮細胞に分化することができる。
【０１２６】
実施例１３：ＩＤＣとマクロファージと内皮細胞とを含む三次元多細胞再生絨毛膜モデル
単球の入手：実施例１または実施例２を参照
このモデルは、実施例１２に記載の方法で作製した。異なる点は、次の通りである。
－用いる線維芽細胞が、通常のヒト歯肉及び膣粘膜由来の線維芽細胞である。
－標識を行った結果、ＩＤＣ（ＤＣ－ＳＩＧＮ＋細胞）とマクロファージ（ＣＤ６８＋細胞）と内皮細胞（ＣＤ３１＋細胞とＣＤ３６＋細胞）との共存がわかる。
【０１２７】
結論
歯肉及び膣型の再生絨毛膜モデルに取り込み培養した単球は、ＩＤＣ型にＤＣに分化し、またマクロファージや内皮細胞分化できる。
【０１２８】
実施例１４：ＬＣを含む三次元多細胞再生皮膚モデル
単球の入手：実施例１または実施例２を参照
再生皮膚モデルを実施例１１に準じて培養する。
このモデルは次の方法で得る。
－１～５×１０^{4}個の単球を、皮膚等価物上にケラチノサイトとともに播種する。
－標識を行った結果、培養物の上皮部分にＬＣ（ランゲリン＋細胞とバーベック＋顆粒）の存在が認められる。
【０１２９】
結論
この再生皮膚モデル中でケラチノサイトとともに培養した単球は、ＬＣ型のＤＣに分化する。
【０１３０】
実施例１５：ＬＣを含む三次元多細胞着色及び／又は神経性再生表皮モデル
単球の入手：実施例１または実施例２を参照
このＬＣを含む再生皮膚モデルは、実施例１４に準じて培養する。
【０１３１】
このモデルは、次の方法で得る。
－１～５×１０^{4}個の正常なヒト皮膚由来のメラノサイト及び／又はメルケル細胞を、ケラチノサイトおよび単球とともに、再生真皮に播種する。
－実施例１４に記載の標識に加え、
メラニンの検出のためメラノサイト（ＨＭＢ４５）の標識とＤＯＰＡ反応を行い、またメルケル細胞の同定のために抗ケラチン２０抗体を用いる標識を行う。
【０１３２】
結論
この再生皮膚モデル中でケラチノサイトとメラノサイト及び／又はメルケル細胞とともに培養した単球は、ＬＣ型のＤＣに分化する。

【０１３３】
実施例１６：ＬＣを含む三次元多細胞再生粘膜モデル
単球の入手：実施例１または実施例２を参照
このモデルは実施例１４に記載の方法に準じて得る。変更点は、次の通りである。
－ケラチノサイトは、正常のヒト歯肉及び膣粘膜の上皮細胞で置き換え、線維芽細胞は、正常のヒト歯肉及び膣粘膜由来の線維芽細胞とする。
－上皮形成段階での培養培地中のコウシ血清の濃度は１％である。
－培養は、すべて培地中での浸漬培養でおこなう。
－標識を行った結果、培養物の上皮部分中にＬＣ（ランゲリン＋細胞とバーベック＋顆粒）の存在が認められる。

【０１３４】
結論
この再生粘膜モデル中で歯肉または膣型の上皮細胞とともに培養した単球は、ＬＣ型のＤＣに分化する。

【０１３５】
実施例１７：ＤＣＣとマクロファージと内皮細胞とを含む三次元多細胞再生皮膚モデル
単球の入手：実施例１または実施例２を参照
この再生皮膚モデルは、実施例１１に準じて培養する。

【０１３６】
このモデルは、次の方法で得る。
－１～５×１０^{4}個の単球を、皮膚等価物の表面に播種し、さらに７日間培養する。
－標識を行った結果、ＤＣＣ（ＤＣ－ＳＩＧＮ＋細胞）とマクロファージ（ＣＤ６８＋細胞）と内皮細胞（ＣＤ３１＋細胞とＣＤ３６＋細胞）の共存が確認される。
結論
再生皮膚モデルの皮膚部分に取り込ませ培養した単球は、ＤＤＣ型のＤＣに分化し、また同時にマクロファージと内皮細胞に分化する。

【０１３７】
実施例１８：ＤＣＣとマクロファージと内皮細胞とを含む三次元多細胞着色及び／又は神経性再生表皮モデル
このモデルは実施例１７記載の方法にしたがって、１～５×１０^{4}個の正常なヒト皮膚由来のメラノサイト及び／又はメルケル細胞とケラチノサイトとを同時に播種して得る。

【０１３８】
実施例１７に記載の標識に加えて、メラニンの検出のためメラノサイト（ＨＭＢ４５）の標識とＤＯＰＡ反応を行い、またメルケル細胞の同定のために抗ケラチン２０抗体を用いる標識を行う。

【０１３９】
結論
着色及び／又は神経性再生表皮モデルの皮膚部分に取り込んで培養した単球は、ＤＤＣ型のＤＣに分化し、同時にマクロファージと内皮細胞に分化する。

【０１４０】
実施例１９：ＩＤＣとマクロファージと内皮細胞とを含む再生粘膜の三次元多細胞モデル
単球の入手：実施例１または実施例２を参照
このモデルは、実施例１７に記載の方法で得る。ただし、変更点は次の通りである。
－ケラチノサイトを正常のヒト歯肉及び膣粘膜上皮細胞に変更し、線維芽細胞を、正常のヒト歯肉及び膣粘膜由来の線維芽細胞に変更する。
－上皮形成段階での培養培地中のコウシ血清の濃度は１％である。
－培養は、すべて培地中での浸漬培養で行う。
－標識を行った結果、ＩＤＣ（ＤＣ－ＳＩＧＮ＋細胞）とマクロファージ（ＣＤ６８＋細胞）と内皮細胞（ＣＤ３１＋細胞とＣＤ３６＋細胞）の共存が認められる。

【０１４１】
結論
歯肉および膣型の再生粘膜モデルの連結部分に取り込ませて培養した単球は、ＩＤＣ型のＤＣに分化し、同時にマクロファージと内皮細胞に分化する。
【０１４２】
実施例２０：ＬＣとＤＣＣとマクロファージと内皮細胞とを含む三次元多細胞再生皮膚モデル
単球の入手：実施例１または実施例２を参照
このモデルは、次の方法で得る。
－このＤＣＣとマクロファージと内皮細胞とを含む再生真皮モデルは、実施例１２に記載の方法で作製する。
－ＬＣを含む再生皮膚モデルは、実施例１４に準じて得られる。
－標識を行った結果、培養物の表皮部分にＬＣ（ランゲリン＋細胞と－バーベック＋顆粒）が、培養の皮膚部分にＤＣＣ（ＤＣ－ＳＩＧＮ＋細胞）とマクロファージ（ＣＤ６８＋細胞）と内皮細胞（ＣＤ３１＋細胞とＣＤ３６＋細胞）の共存が認められる。
【０１４３】
結論
再生皮膚モデル中の皮膚部分で培養し次にケラチノサイトとともに培養した単球は、表皮部分でＬＣ型のＤＣに分化し、同時に皮膚部分でマクロファージと内皮細胞に分化する。
【０１４４】
実施例２１：ＬＣとＤＣＣとマクロファージと内皮細胞とを含む三次元多細胞着色及び／又は神経性再生表皮モデル
単球の入手：実施例１または実施例２を参照
このモデルは次の方法で得る。
－ＤＣＣとマクロファージと内皮細胞とを含む再生真皮モデルは、実施例１２に準じて得る。
－ＬＣを含む着色及び／又は神経性再生表皮モデルは、実施例１５に準じて作製する。
－標識を行った結果、培養物の表皮部分にＬＣ（ランゲリン＋細胞とバーベック顆粒）と、培養物の皮膚部分にＤＣＣ（ＤＣ－ＳＩＧＮ＋細胞）とマクロファージ（ＣＤ６８＋細胞）と内皮細胞（ＣＤ３１＋細胞とＣＤ３６＋細胞）の共存が認められる。
【０１４５】
結論
皮膚部分で培養し、ついで着色及び／又は神経性再生表皮モデルにおいてケラチノサイト、メラノサイト及び／又はメルケル細胞とともに培養して得た単球は、表皮部分においてＬＣ型のＤＣに分化し、皮膚部分においてＤＤＣ型のＤＣに分化し、同時にマクロファージと内皮細胞に分化する。
【０１４６】
実施例２２：ＬＣとＩＤＣとマクロファージと内皮細胞とを含む三次元多細胞再生粘膜モデル
単球の入手：実施例１または実施例２を参照
このモデルは次の方法で得る。
－このＩＤＣとマクロファージと内皮細胞とを含む再生絨毛膜モデルは、実施例１３に準じて作製する。
－ＬＣを含む再生粘膜モデルは、実施例１６に準じて作製する。
－標識を行った結果、上皮部分でＬＣ（ランゲリン＋細胞とバーベック＋顆粒）、培養の連結部分でＩＤＣ（ＤＣ－ＳＩＧＮ＋細胞）とマクロファージ（ＣＤ６８＋細胞）と内皮細胞（ＣＤ３１＋細胞とＣＤ３６＋細胞）の共存が認められる。
【０１４７】
結論

歯肉及び膣型の再生粘膜モデルの連結部分で培養し、ついで上皮細胞とともに培養した単球は、上皮部分でＬＣ型のＤＣに分化し、連結部分でＩＤＣ型のＤＣに分化し、同時にマクロファージと内皮細胞に分化する。

【０１４８】

実施例２３：実施例２０に記載の三次元多細胞再生皮膚モデルの、太陽光ＵＶ照射の影響の試験への利用

いろいろな環境因子の影響を、特に太陽光ＵＶ照射の影響を調べるために、免疫組織化学的試験による再生皮膚モデル中でのＬＣとＤＣＣの移動とこれらの表現型を、次の方法で評価した。

－このモデルは、実施例２０に記載の方法で得る。

－培養４２日目に、例えば、２Ｊ／ｃｍ^{2}のＵＶＡと０．５Ｊ／ｃｍ^{2}のＵＶＢに相当する、単一照射線量が５２６ｋＪ／ｃｍ^{2}の太陽エネルギーで、この再生皮膚を照射する（太陽光照射器サンテストＣＰＳ＋、アトラス）。培養をさらに２日間継続する。

－次いで、ＬＣとＤＣＣの移動を観察し、それらの表現型条件を特定するため一連の抗体（抗ＣＤ１ａ、抗ＣＤ８０、抗ＣＤ８３、抗ＣＤ８６、抗ＣＣＲ７、抗ＤＣ－ＬＡＭＰ、抗ＤＣ－ＳＩＧＮ、抗ランゲリン、抗ＨＬＡ－ＤＲ）を用いて、免疫組織化学的試験を実施する。

【０１４９】

太陽光ＵＶ照射後、培養物の皮膚部分においてＬＣの移動が観察され、ＬＣとＤＣＣ上にＣＣＲ７レセプター発現の獲得が観察される。また、皮膚部分に移動したＬＣのみが、熟成標識ＤＣ－ＬＡＭＰを発現する。

【０１５０】

結論

この多細胞モデルは、したがって、移動、活性化、及び熟成能力を持つＬＣとＤＣＣとを標的とすることで、ＵＶストレスを予測することができる。

【０１５１】

実施例２４：実施例２０に記載の三次元多細胞再生皮膚モデルの、活性成分の有効性の評価への利用

ヒト皮膚用の活性成分の消炎作用を評価するために培養上澄液中への炎症性サイトカインの、例えばＩＬ－１や、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＴＮＦ－α、ＩＮＦ－γの分泌を、次の方法により測定する。

－このモデルは、実施例２０に記載の方法により得る。

－培養４２日目に、例えば、２Ｊ／ｃｍ^{2}のＵＶＡと０．５Ｊ／ｃｍ^{2}のＵＶＢに相当する、単一照射線量が５２６ｋＪ／ｃｍ^{2}の太陽エネルギーで、この再生皮膚を照射する（太陽光照射器サンテストＣＰＳｓ＋、アトラス）。

－次いで、３％の酸化防止剤を、例えばフラバグラム（Ｒ）（ヘスペリチンラウレート、エンゲルハード）と、さらにフラベンジャー（Ｒ）（クエルシチンカプリレート、エンゲルハード）を含むか含まない８μｌの化粧用製剤を再生皮膚に塗布し、１０日間放置する。

－処理終了後、再生皮膚をさらに４８時間浸漬培地中で培養した後、酸化防止剤処理の有効性を次のようにして評価する。１．細胞生存度の試験（メチルチアゾールテトラゾリウム－ＭＴＴ試験）、

【０１５２】

２．培養上澄液中のサイトカイン分泌物のフラックスサイトメトリー（ＣＢＡ－サイトメトリックビーズアレイ）での分析

【０１５３】

【表１】

	再生皮膚 コントロール	再生皮膚 ＵＶ照射	再生皮膚 ＵＶ照射 ＋フラバグラム	再生皮膚 ＵＶ照射 ＋フラベンジャー
MTT（生存度）	100%	76%	88%	92%
IL1β (pg/mL)	76	179	125	97
IL6 (pg/mL)	379	649	452	426
IL8 (pg/mL)	275	395	312	294
TNFβ (pg/mL)	53	152	105	89

【０１５４】

本発明の方法により、太陽光ＵＶストレスが、細胞生存度の低下と炎症性インターロイキンの産生量の増加をもたらすことがわかる。したがって、適当に選択された活性成分を用いて、この炎症性分子の合成と細胞死亡率の上昇を抑えることが望ましい。試験した活性成分の中では、二種の化合物、フラバグラムとフラベンジャーが、これら二つの変数を元の値に維持する傾向を示し、有効性を示した。

【０１５５】

実施例２５：実施例１４、１７および２０に記載の三次元多細胞再生皮膚モデルの、活性成分の免疫刺激活性または免疫抑制活性の評価への利用

ＬＣ及び／又はＤＣＣが、ある活性成分に対して免疫及び／又は免疫寛容を生じる応答を誘起するかどうかどうかを評価するために、これらの細胞の、同種異系の無処理Ｔリンパ球の増殖を刺激する作用を、次の方法で評価する。

－このモデルは、実施例１４、１７および２０に記載の方法により得る。

－培養後４２日目に、活性成分を、綿棒を用いて直接塗布する（局所塗布）か、培養培地に活性成分を添加（全身的塗布）して、１０日間処理する。

－処理後、培養物を、３７℃でトリプシン（１ｍｇ／ｍＬ）を用いて２時間酵素処理し、次いでコラアゲナーゼ（１ｍｇ／ｍＬ）で処理して、ＬＣ及び／又はＤＣＣを回収する。

－このＬＣ及び／又はＤＣＣを３日間、同種異系の未処理Ｔリンパ球とともに、１０％ヒトＡＢ血清を添加したＲＰＭＩ培地中で培養する。細胞数が１２５～８，０００の範囲のＬＣ及び／又はＤＣが得られ、これを10^5個の未処理Ｔリンパ球とともに培養する。混合リンパ球の培養３日目に、２０μｌの５ｍＣｉのトリチニウムチミジンを添加し、１８時間処理する。

－この結果を、横軸にＬＣ及び／又はＤＣＣの個数をとり、縦軸に同種異系の無処理Ｔリンパ球へのトリチニウムチミジン導入量ｃｐｍ（１分間のカウント数）をプロットしたクラフで示す。

【０１５６】

【表２】

ＬＣ又はＤＣＣの個数	CPM（未処理）	CPM（活性）
125	500	500
250	800	1500
500	1000	10000
1000	1500	22500
2000	2300	39850
4000	2800	47250
6000	3000	52500
8000	3800	55000

【０１５７】
未処理Ｔリンパ球をほんの少し増殖させる（１×１０^{3}～４×１０^{3}ｃｐｍ）未処理のＬＣ及び／又はＤＣＣと比較すると、活性成分Ｘとの処理後、ＬＣ及び／又はＤＣＣは、Ｔリンパ球の増殖を強く刺激する（５×１０^{4}～７×１０^{4}ｃｐｍ）。
【０１５８】
実施例２６：三次元多細胞モデルの、アレルギー反応を調節可能な活性成分のスクリーニングへの利用
刺激、感作、およびアレルギーストレスを引起した後の、活性成分の免疫調節効果を、次の方法で調べる。
－このモデルは、実施例１２に記載の方法に準じて得る。
－２１日間培養後、好ましくは最終濃度が２％の刺激性物質（ドデシル硫酸ナトリウム）及び好ましくは最終濃度が０．２５％の増感剤ＤＮＣＢ（１、４－クロロ－ジニトロベンゼン）を培養培地に入れ、２４時間処理する。
－次いで、このようにして得た培養培地に、最終濃度が３％の安定化剤を含有あるいは非含有の１００μｌの化粧品製剤を加え、３日間処理する。
－処理後、培養上澄を回収して、例えばＩＬ－１０とＩＬ－１２を測定し、
一連の抗体、抗ＣＤ８０、抗ＣＤ８３、抗ＣＤ８６、抗ＣＣＲ７、抗ＤＣ－ＬＡＭＰ、抗ＨＬＡ－ＤＲを用いて免疫組織化学的試験を行う。
【０１５９】
ＩＬ－１０とＩＬ－１２の分泌と免疫組織化学によるＤＣＣの表現型の試験の結果より、試験する活性成分の免疫調節能を確定する。
【０１６０】
結論
本特許の多細胞モデルは、したがってサイトカインを分泌、活性化、熟成させる能力を持つＤＣＣをスクリーニングすることにより活性成分のもつ潜在的な免疫調整効果が評価可能な試験手段となる。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2007/059165

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N5/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 688 483 A (KIRIN BREWERY [JP]) 9 August 2006 (2006-08-09) column 62; claims 1-28	1-28
X	GUIRONNET G ET AL: "Phenotypic and functional outcome of human monocytes or monocyte-derived dendritic cells in a dermal equivalent" JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, NEW YORK, NY, US, vol. 116, no. 6, June 2001 (2001-06), pages 933-939, XP002211124 ISSN: 0022-202X the whole document	1-18

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
26 October 2007	20/11/2007

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	SCHWACHTGEN, J

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2007/059165

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/050271 A (COLETICA [FR]; INST NAT SANTE RECH MED [FR]; BECHETOILLE NICOLAS [FR];) 19 June 2003 (2003-06-19) the whole document	16-28
X	EP 0 789 074 A1 (OREAL [FR]) 13 August 1997 (1997-08-13) the whole document	16-28
X	BAZIL V ET AL: "SHEDDING AS A MECHANISM OF DOWN-MODULATION OF CD14 ON STIMULATED HUMAN MONOCYTES" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 147, no. 5, 1991, pages 1567-1574, XP002455997 ISSN: 0022-1767 figure 7	19

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2007/059165

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1688483 A	09-08-2006	AU 2004258032 A1	27-01-2005
		CA 2533121 A1	27-01-2005
		WO 2005007839 A1	27-01-2005
		US 2006182721 A1	17-08-2006
WO 03050271 A	19-06-2003	AU 2002366532 A1	23-06-2003
		CA 2469792 A1	19-06-2003
		DE 10297513 B4	14-06-2007
		DE 10297513 T5	10-02-2005
		FR 2833271 A1	13-06-2003
		GB 2399347 A	15-09-2004
		JP 2005518787 T	30-06-2005
		US 2005008623 A1	13-01-2005
EP 0789074 A1	13-08-1997	AT 256732 T	15-01-2004
		CA 2195795 A1	24-07-1997
		DE 69726772 D1	29-01-2004
		DE 69726772 T2	04-11-2004
		DK 789074 T3	29-03-2004
		ES 2213808 T3	01-09-2004
		FR 2743817 A1	25-07-1997
		JP 3021379 B2	15-03-2000
		JP 9201410 A	05-08-1997
		PT 789074 T	31-05-2004
		US 5861153 A	19-01-1999

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ 35/36	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	35/36	
Ａ６１Ｐ 37/02	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/02	
Ａ６１Ｐ 17/16	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/16	
Ａ６１Ｋ 8/98	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	8/98	
Ａ６１Ｑ 19/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｑ	19/00	
Ａ６１Ｑ 17/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｑ	17/04	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 オルリー，イザベル
フランス、Ｆ－６９５４０、イリニュイ、リュー、デルブール、８
(72)発明者 ペリエ，エリック
フランス、Ｆ－３８１３８、レ、コテ、ダレイ、シェマン、デ、ローリエ

Ｆターム(参考) 4B063 QA18 QA20 QQ06 QQ07 QQ08 QQ10 QQ17 QQ91 QR77 QS36 QS39 QX01 QX10
4B065 AA90X AC20 BA24 BA30 BB19 BC01 BC42 BC50 BD39 CA44 CA46
4C083 AA111 CC02 CC19 EE17
4C087 AA01 AA02 AA03 BB41 BB48 BB63 CA04 MA02 NA14 ZA89 ZB07