

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-16267
(P2016-16267A)

(43) 公開日 平成28年2月1日(2016.2.1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 L 27/00 (2006.01)	A 6 1 L 27/00 C	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 0 2 A	4 C 0 8 1

審査請求 未請求 請求項の数 15 O L (全 20 頁)

(21) 出願番号 特願2014-142724 (P2014-142724)
(22) 出願日 平成26年7月10日 (2014.7.10)

(71) 出願人 504176911
国立大学法人大阪大学
大阪府吹田市山田丘1番1号

(71) 出願人 000000387
株式会社A D E K A
東京都荒川区東尾久7丁目2番35号

(74) 代理人 110000040
特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ

(72) 発明者 明石 満
大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法
人大阪大学内

(72) 発明者 松▲崎▼ 典弥
大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法
人大阪大学内

最終頁に続く

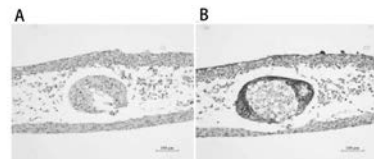
(54) 【発明の名称】 人工皮膚及びその製造方法

(57) 【要約】

【課題】真皮層内に毛包様組織が形成され、より生体に近い組織が構築された人工皮膚及びその製造方法を提供する。

【解決手段】一又は複数の実施形態において、線維芽細胞と細胞外マトリックス成分とを含む真皮層と、表皮層とを有し、前記真皮層が毛包様組織を備える人工皮膚に関する。一又は複数の実施形態において、毛乳頭細胞を含む細胞集合体と、三次元に配置された細胞外マトリックス成分を含む被膜でコートされた細胞とを含む細胞層を形成すること、及び前記細胞層上に表皮角化細胞を配置し培養することを含み、前記細胞集合体は、毛乳頭細胞を含む細胞の塊とそれを覆う表皮角化細胞を含む層とを有する、人工皮膚の製造方法に関する。

【選択図】 図5



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

線維芽細胞と細胞外マトリックス成分とを含む真皮層と、
表皮層とを有し、
前記真皮層が、さらに毛包様組織を備える、人工皮膚。

【請求項 2】

前記真皮層は、 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^{10}$ cells/cm³ の線維芽細胞を含む、請求項 1 記載の人工皮膚。

【請求項 3】

前記真皮層は、さらに血管内皮細胞を含む管状組織を備え、

前記毛包様組織と前記管状組織とが近接する、請求項 1 又は 2 に記載の人工皮膚。

10

【請求項 4】

前記毛包様組織は、毛乳頭細胞を含む細胞の凝集体と、前記凝集体を覆う表皮角化細胞とを含む、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の人工皮膚。

【請求項 5】

前記真皮層は、細胞外マトリックス成分を含む被膜でコートされた線維芽細胞を三次元に配置し培養することを含む製造方法により製造されたものである、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の人工皮膚。

【請求項 6】

細胞外マトリックス成分を含む被膜でコートされ、三次元に配置された細胞と、毛乳頭細胞を含む細胞集合体とを含む細胞層を形成すること、及び

前記細胞層上に表皮角化細胞を配置し培養することを含み、

前記細胞集合体は、毛乳頭細胞を含む細胞の凝集体とそれを覆う表皮角化細胞を含む層と有する、人工皮膚の製造方法。

20

【請求項 7】

前記細胞集合体を含む細胞層の形成は、

細胞外マトリックス成分を含む被膜でコートされた細胞を配置して細胞層を形成すること、

前記細胞層上に、前記細胞集合体を配置すること、及び

前記細胞集合体を覆うように細胞外マトリックス成分を含む被膜でコートされた細胞を三次元に配置することを含む、請求項 6 記載の人工皮膚の製造方法。

30

【請求項 8】

前記細胞層の形成は、さらに血管内皮細胞を配置することを含む、請求項 6 又は 7 に記載の人工皮膚の製造方法。

【請求項 9】

前記コートされた細胞は、細胞外マトリックス成分を含む被膜でコートされた線維芽細胞を含む、請求項 6 から 8 のいずれかに記載の人工皮膚の製造方法。

【請求項 10】

細胞外マトリックス成分を含む被膜でコートされた毛乳頭細胞を $4 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ cells/cm² 配置して毛乳頭細胞層を形成すること、及び

前記毛乳頭細胞層上に表皮角化細胞を配置し培養すること、を含む人工皮膚の製造方法。

40

【請求項 11】

細胞外マトリックス成分を含む被膜でコートされた線維芽細胞を三次元に配置し培養して細胞層を形成することを含み、

前記細胞層上に前記毛乳頭細胞を配置して前記毛乳頭細胞層を形成することを含む、請求項 10 記載の人工皮膚の製造方法。

【請求項 12】

前記表皮角化細胞の配置後の培養は、半気相暴露培養である、請求項 6 から 11 のいずれかに記載の人工皮膚の製造方法。

50

【請求項 1 3】

請求項 6 から 1 2 のいずれかに記載の人工皮膚の製造方法により製造された、人工皮膚。

【請求項 1 4】

請求項 1 から 5 及び 1 3 のいずれかに記載の人工皮膚と、前記人工皮膚が配置された容器とを含む、育毛、発毛、脱毛、除毛及び抑毛からなる群から選択される少なくとも一つの評価を行うための評価用キット。

【請求項 1 5】

請求項 1 から 5 及び 1 3 のいずれかに記載の人工皮膚と、前記人工皮膚が配置された容器とを含む、皮膚安全性、皮膚腐食性、皮膚刺激性及び皮膚透過性からなる群から選択される少なくとも一つの評価を行うための評価用キット。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、人工皮膚及びその製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

化粧品、医薬品及び医薬部外品等といったヒトに直接適用される物質の研究開発において、薬効試験、薬理試験及び安全性試験等といった物質の評価試験は重要である。これらの試験は、従来、マウスやラット等の動物を用いて行われているが、近年、動物愛護の観点から動物実験の見直しが求められている。物実験に代わる実験方法の一つとして、人工皮膚モデルを用いた *in vitro* 試験等があり、そのため様々な人工皮膚等の研究が行われている。

20

【0003】

特許文献 1 は、毛乳頭細胞スフェロイド及びそれを含有する発毛誘導剤を開示する。同文献は、線維芽細胞を含むコラーゲンを有する真皮層と表皮層とを有する人工皮膚組織に毛乳頭細胞スフェロイドを移植することを開示する。

特許文献 2 は、毛乳頭細胞とケラチノサイトとからなるスフェロイドをコラーゲンを播種してさらにコラーゲンを重層した後、ケラチノサイトを播種して培養した人工皮膚を開示する。

30

特許文献 3 は、真皮組織層と表皮層とを有する人工皮膚モデルであって、真皮組織層内に組織付属器官を含むことを開示する。

特許文献 4 は、ヒト又は動物から抜出して得た毛包又はその断片を真皮代用基質に移植することを含む皮膚代用物の製造方法を開示する。

特許文献 5 は、組織付属器官を構成する細胞をコラーゲンマトリックス層に配置して培養することによって組織付属器官様構造体を含む人工組織及びその製造方法を開示する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献 1】特開平 1 1 - 1 8 0 8 7 8 号公報 (特許 4 3 2 4 9 8 8)

40

【特許文献 2】特開 2 0 0 8 - 1 2 5 5 4 0 号公報 (特許 5 0 9 7 3 8 7)

【特許文献 3】特開 2 0 1 2 - 2 0 5 5 1 6 号公報

【特許文献 4】特開平 1 - 8 9 7 4 号公報 (特許 2 7 3 3 8 3 8)

【特許文献 5】特開 2 0 0 5 - 3 0 5 1 7 7 号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本開示は、一又は複数の実施形態において、毛包様組織を備える真皮層を有する人工皮膚及びその製造方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

50

【0006】

本開示は、一又は複数の実施形態において、線維芽細胞と細胞外マトリックス成分とを含む真皮層と表皮層とを有し、前記真皮層が、さらに毛包様組織を備える人工皮膚に関する。

【0007】

本開示は、一又は複数の実施形態において、毛乳頭細胞を含む細胞集合体と、三次元に配置された細胞外マトリックス成分を含む被膜でコートされた細胞とを含む細胞層を形成すること、及び前記細胞層上に表皮角化細胞を配置し培養することを含み、前記細胞集合体は、毛乳頭細胞を含む細胞の凝集体とそれを覆う表皮角化細胞を含む層と有する人工皮膚の製造方法に関する。

10

【0008】

本開示は、一又は複数の実施形態において、細胞外マトリックス成分を含む被膜でコートされた毛乳頭細胞を $4 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ cells/cm² 配置して毛乳頭細胞層を形成すること、及び前記毛乳頭細胞層上に表皮角化細胞を配置し培養することを含む人工皮膚の製造方法に関する。

【発明の効果】

【0009】

本開示によれば、一又は複数の実施形態において、真皮層内に毛包様組織を備える人工皮膚を提供できる。

【図面の簡単な説明】

20

【0010】

【図1】図1A及びBは、実施例1において毛乳頭細胞の局在位置変化を蛍光顕微鏡で観察した結果の一例であって、図1Aは三次元組織作製直後の組織上面の蛍光顕微鏡像であり、図1Bは一週間半気相暴露培養した三次元組織の上面の蛍光顕微鏡像である。

【図2】図2A及びBは、実施例1において組織の形態変化を半気相暴露培養した三次元組織のHE組織切片像で観察した結果の一例であって、図2Aは三次元組織を一週間培養した組織切片像(HE切片)であり、図2Bは二週間、半気相暴露培養した組織切片像(HE切片)である。

【図3】図3は二重細胞集合体の作製過程を示す画像の一例であって、図3Aは二重細胞集合体の位相差顕微鏡像であり、図3Bは二重細胞集合体の組織切片(HE切片)の顕微鏡像である。

30

【図4】図4は人工皮膚の作製工程を示す概略図である。

【図5】図5A及びBは、実施例2において細胞集合体の形態変化観察を行った結果の一例であって、図5AはKC播種直後の組織切片(HE染色)であり、図5BはKC播種から一週間半気相暴露培養した組織切片(サイトケラチン(CK)染色)の顕微鏡像である。

【図6】図6は、参考例2で作製した三次元組織の組織切片(HE切片)の顕微鏡像である。

【図7】図7は、実施例3で作製した人工皮膚の組織切片(HE切片)の顕微鏡像である。

40

【発明を実施するための形態】

【0011】

本開示において「人工皮膚」は、真皮層を構成する成分となる細胞外マトリックス成分(以下、「ECM成分」ともいう)と線維芽細胞とを含む真皮層と表皮層とを有し、真皮層が毛包様組織を備える。

【0012】

本開示において「毛包様組織」は、一又は複数の実施形態において、真皮層内に存在し、かつ毛乳頭細胞を含む細胞の凝集体とその凝集体を覆う表皮角化細胞(ケラチノサイト)とを有する。毛包様組織は、一又は複数の実施形態において、表皮角化細胞で覆われた毛乳頭細胞を含む細胞の凝集体を真皮層内で培養したものを含む。また、毛包様組織は、

50

一又は複数の実施形態において、真皮層内で培養することによって成長したものを含む。毛包様組織の形状は、一又は複数の実施形態において、楕円形及び球根形等が挙げられる。

【0013】

本開示において「真皮層」は、線維芽細胞を含む細胞とECM成分との集合体で構成され、その内部に少なくとも毛包様組織を備える。真皮層は、一又は複数の実施形態において、線維芽細胞以外の細胞を含んでいてもよい。線維芽細胞以外の細胞としては、一又は複数の実施形態において、血管内皮細胞、リンパ管内皮細胞、樹状細胞、メラニン細胞、脂肪細胞等が挙げられる。真皮層に含まれる線維芽細胞の濃度は、一又は複数の実施形態において、ヒトの皮膚に近い人工皮膚が得られることから、 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^{10}$ cells/cm³が好ましく、 $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^9$ cells/cm³がさらに好ましく、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^9$ cells/cm³が最も好ましい。真皮層は、一又は複数の実施形態において、毛包様組織以外の組織付属器官及び/又はそれを構成する細胞を含んでいてもよい。ECM成分としては、後述の例又は特許49419464号及び特開2012-115254号に開示のものが挙げられる。

10

【0014】

本開示において「表皮層」とは、一又は複数の実施形態において、真皮層上に形成された表皮角化細胞を含む細胞層をいう。表皮層は、一又は複数の実施形態において、細胞層上に表皮角化細胞を配置した後、半気相暴露培養して表皮角化細胞を分化誘導させることによって形成することができる。

20

【0015】

本開示の人工皮膚は、一又は複数の実施形態において、発毛、育毛及び/又は除毛の評価を行うための皮膚モデルとして使用できる。本開示の人工皮膚は、一又は複数の実施形態において、発毛等の評価のみならず、被検物質の皮膚に対する薬効試験、薬理試験及び安全性試験等といった薬剤評価に用いることができる。本開示の人工皮膚は、一又は複数の実施形態において、皮膚安全性、皮膚腐食性、皮膚刺激性及び皮膚透過性当の評価に用いることができる。本開示の人工皮膚は、一又は複数の実施形態において、脱毛症や火傷等による皮膚損傷の治療のための移植用皮膚として使用できる。

【0016】

[人工皮膚]

本開示は、一又は複数の実施形態において、線維芽細胞と細胞外マトリックス成分とを含む真皮層と表皮層とを有し、真皮層は毛包様組織を備える人工皮膚（以下、「本開示の人工皮膚」ともいう）に関する。本開示の人工皮膚は、一又は複数の実施形態において、真皮層内に毛包様組織を備え、より生体に近い人工皮膚であるという効果を奏する。本開示の人工皮膚は、後述する本開示の人工皮膚の製造方法により製造できる。

30

【0017】

真皮層に含まれる線維芽細胞の濃度は、一又は複数の実施形態において、ヒトの皮膚に近い人工皮膚が得られることから、 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^{10}$ cells/cm³が好ましく、 $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^9$ cells/cm³がさらに好ましく、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^9$ cells/cm³が最も好ましい。

40

【0018】

真皮層における毛包様組織の数は、一又は複数の実施形態において、ヒトの皮膚に近い人工皮膚が得られることから、 $1 \sim 500$ 個/cm²が好ましく、 $2 \sim 250$ 個/cm²がさらに好ましく、 $3 \sim 150$ 個/cm²が最も好ましい。

【0019】

真皮層は、一又は複数の実施形態において、細胞外マトリックス成分を含む被膜でコートされた線維芽細胞（以下、「コート線維芽細胞」ともいう）を三次元に配置し培養することを含む製造方法により製造されたものである。

【0020】

真皮層は、一又は複数の実施形態において、管状組織を備える。管状組織は、一又は複

50

数の実施形態において、毛包様組織と近接していることが好ましい。本開示において「毛包様組織と管状組織とが近接する」とは、毛包様組織と管状組織とが近くに位置していることをいう。「毛包様組織と管状組織とが近接する」としては、一又は複数の実施形態において、毛包様組織と管状組織とが接していること、毛包様組織と管状組織との間で物質等の移動が可能な位置にあること等を含む。管状組織は、一又は複数の実施形態において、1又は複数の分岐部を有する中空構造である。管状組織は、一又は複数の実施形態において、毛細血管網様組織とすることができる。管状組織の壁面は、一又は複数の実施形態において、血管内皮細胞を含み、実質的に血管内皮細胞によって構成されていることが好ましい。

【0021】

したがって、本開示は、一又は複数の実施形態において、線維芽細胞と細胞外マトリックス成分とを含む真皮層と表皮層とを有し、前記真皮層が管状組織に近接する毛包様組織を備える人工皮膚に関する。本形態の人工皮膚は管状組織に近接する毛包様組織を備えるため、一又は複数の実施形態において、*in vitro*において生体に近い発毛剤・育毛剤の評価モデルを提供できる。すなわち、発毛剤・育毛剤は毛根部の血行を改善することで効果を発揮するもの（ミノキシジルなど）が多く、本形態の人工皮膚によれば、真皮層に管状組織（血管網）を備え、この管状組織が毛包様組織に近接していることから、血行改善により効果を示す発毛剤・育毛剤の評価を行うことが可能になりうるという効果を奏しうる。

【0022】

[人工皮膚の製造方法]

本開示は、一又は複数の実施形態において、人工皮膚の製造方法に関する。

本開示の第1の実施形態における人工皮膚の製造方法は、毛乳頭細胞を含む細胞の集合体と、三次元に配置された細胞外マトリックス成分を含む被膜でコートされた細胞とを含む細胞層を形成すること、及び前記細胞層上に表皮角化細胞を配置し培養することを含み、前記毛乳頭細胞を含む細胞集合体は、毛乳頭細胞を含む細胞の凝集体とそれを覆う表皮角化細胞を含む層と有する。

【0023】

本開示の第1の実施形態における人工皮膚の製造方法によれば、真皮層内に毛包様組織を備える人工皮膚を効率よく製造できる。本開示の第1の実施形態における人工皮膚の製造方法によれば、一又は複数の実施形態において、毛乳頭細胞を含む細胞集合体を、ECM成分でコートされた細胞の細胞層内に配置し培養することから、より生体に近い真皮層を備える人工皮膚を製造できる。本開示の第1の実施形態における人工皮膚の製造方法によれば、一又は複数の実施形態において、発毛及び/又は育毛作用を奏しうる毛包様組織を備える人工皮膚を製造できるという効果を奏しうる。

【0024】

毛乳頭細胞を含む細胞集合体（以下、「毛乳頭細胞集合体」ともいう）は、毛乳頭細胞を含む細胞の凝集体と、それを覆う表皮角化細胞を含む層と有する。毛乳頭細胞集合体は、一又は複数の実施形態において、コアシェル構造（二重細胞集合体）であり、コア部は毛乳頭細胞を含む細胞の凝集体で形成され、シェル部は表皮角化細胞を含む細胞層（膜）で形成される。毛乳頭細胞集合体は、一又は複数の実施形態において、毛乳頭細胞以外の細胞を含んでいてもよい。毛乳頭細胞以外の細胞としては、特に限定されず、一又は複数の実施形態において、表皮角化細胞、毛包上皮幹細胞、メラノサイト（色素細胞）、色素幹細胞、外毛根鞘細胞、内毛根鞘細胞、結合組織鞘細胞、毛母細胞、脂肪幹細胞、等が挙げられる。毛乳頭細胞集合体の大きさは、一又は複数の実施形態において、ヒトの皮膚に近い人工皮膚が得られることから、直径が、30～500 μm であることが好ましく、50～200 μm であることがさらに好ましい。毛乳頭細胞集合体の形状は、一又は複数の実施形態において、球状である。毛乳頭細胞集合体は、一又は複数の実施形態において、特開2008-125540号公報に開示された方法及び実施例を参酌して調製できる。

【0025】

10

20

30

40

50

細胞外マトリックス成分を含む被膜でコートされた細胞（以下、「コート細胞」ともいう）は、細胞と、ECM成分を含む被膜（以下、「ECM膜」ともいう）とを有する。

細胞としては、一又は複数の実施形態において、線維芽細胞が挙げられ、その他には、上皮細胞、組織幹細胞、及び免疫細胞等が挙げられ、中でも線維芽細胞が好ましい。細胞は、一又は複数の実施形態において、ヒト由来の細胞であってもよいし、ヒト以外由来の細胞であってもよい。細胞は、一又は複数の実施形態において、胚性幹細胞、及び人工多能性幹細胞等の由来の細胞であってもよい。細胞は、一又は複数の実施形態において、培養細胞であってもよい。培養細胞としては、一又は複数の実施形態において、初代培養細胞、継代培養細胞、及び細胞株細胞等が挙げられる。細胞は、一種類でもよいし、二種類以上であってもよい。

10

ECM膜は、ECM成分を含みかつ細胞をコートする膜である。ECM膜は、一又は複数の実施形態において、ECM成分を1種類又は2種類以上含む。ECM膜は、一又は複数の実施形態において、物質A、及び物質Aと相互作用する物質Bを含んでいてもよく、好ましくは物質Aを含む膜と物質Aと相互作用する物質Bを含む膜とを含む。なお、ECM成分としての物質Aと物質Bについては、[ECM成分]の項で、詳しく説明する。

ECM膜の厚みは、適宜決定でき、一又は複数の実施形態において、ヒトの皮膚に近い人工皮膚が得られることから、 $1 \sim 1 \times 10^3$ nmが好ましく、 $2 \sim 1 \times 10^2$ nmがさらに好ましく、 $3 \sim 1 \times 10^2$ nmが最も好ましい。コート細胞は、一又は複数の実施形態において、特開2012-115254号公報に開示された方法を参酌して調製することができる。

20

【0026】

本開示の第1の実施形態における人工皮膚の製造方法は、毛乳頭細胞を含む細胞集合体と、三次元に配置された細胞外マトリックス成分を含む被膜でコートされた細胞とを含む細胞層を形成することを含む。

【0027】

細胞層における毛乳頭細胞集合体の数は、一又は複数の実施形態において、ヒトの皮膚に近い人工皮膚が得られることから、 $1 \sim 500$ 個/cm²が好ましく、 $2 \sim 250$ 個/cm²がさらに好ましく、 $3 \sim 150$ 個/cm²が最も好ましい。

【0028】

毛乳頭細胞集合体を含む細胞層の形成において、配置するコート細胞の数は、毛乳頭細胞集合体の大きさ及び形成する細胞層の厚みに応じて適宜決定でき、一又は複数の実施形態において、ヒトの皮膚に近い人工皮膚が得られることから、 $4 \times 10^5 \sim 1.5 \times 10^8$ cells/cm²が好ましく、 $6 \times 10^5 \sim 3 \times 10^7$ cells/cm²がさらに好ましく、 $1.5 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^7$ cells/cm²が最も好ましい。また、コート細胞は、一又は複数の実施形態において、ヒトの皮膚に近い人工皮膚が得られることから、 $1 \sim 500$ 層配置するのが好ましく、 $2 \sim 100$ 層積配置するのがさらに好ましく、 $5 \sim 50$ 層積層されるように配置するのが最も好ましい。

30

【0029】

毛乳頭細胞集合体を含む細胞層の形成において、コート細胞は、一又は複数の実施形態において、ECM膜でコートされた線維芽細胞を含むことが好ましい。配置するECM膜でコートされた線維芽細胞の数は、毛乳頭細胞集合体の大きさ及び形成する細胞層の厚みに応じて適宜決定でき、一又は複数の実施形態において、ヒトの皮膚に近い人工皮膚が得られることから、 $4 \times 10^5 \sim 1.5 \times 10^8$ cells/cm²が好ましく、 $6 \times 10^5 \sim 3 \times 10^7$ cells/cm²がさらに好ましく、 $1.5 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^7$ cells/cm²が最も好ましい。

40

また、ECM膜でコートされた線維芽細胞は、一又は複数の実施形態において、ヒトの皮膚に近い人工皮膚が得られることから、 $1 \sim 500$ 層配置するのが好ましく、 $2 \sim 100$ 層積配置するのがさらに好ましく、 $5 \sim 50$ 層積層されるように配置するのが最も好ましい。

【0030】

50

毛乳頭細胞集合体を含む細胞層は、一又は複数の実施形態において、毛乳頭細胞集合体を覆うようにコート細胞を配置することにより形成できる。また、毛乳頭細胞集合体を含む細胞層は、一又は複数の実施形態において、コート細胞を三次元に配置することによって形成された細胞層内に毛乳頭細胞集合体を導入することにより形成できる。配置する毛乳頭細胞集合体の数は、一又は複数の実施形態において、ヒトの皮膚に近い人工皮膚が得られることから、 $1 \sim 500$ 個/cm²が好ましく、 $2 \sim 250$ 個/cm²がさらに好ましく、 $3 \sim 150$ 個/cm²が最も好ましい。

【0031】

毛乳頭細胞集合体を含む細胞層の形成は、一又は複数の実施形態において、さらに血管内皮細胞を配置することを含む。血管内皮細胞を配置した場合、毛乳頭細胞集合体は、一又は複数の実施形態において、血管内皮細胞層上に配置することが好ましい。

10

【0032】

毛乳頭細胞集合体を含む細胞層の形成は、一又は複数の実施形態において、コート細胞を配置して細胞層（ベース層）を形成すること、細胞層上に毛乳頭細胞集合体を配置すること、及び細胞上に配置された細胞集合体を覆うようにコート細胞を三次元に配置することを含む。細胞層（ベース層）の形成の一又は複数の実施形態において、ベースコート細胞層は無くても良く、ベース層を作成する際はコート細胞が1層以上、又は2～50層積層されるように配置すればよい。配置するコート細胞は、一又は複数の実施形態において、ベース層を作成する場合は、ヒトの皮膚に近い人工皮膚が得られることから、 $4 \times 10^5 \sim 1.5 \times 10^8$ cells/cm²が好ましく、 $6 \times 10^5 \sim 3 \times 10^7$ cells/cm²がさらに好ましく、 $1.5 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^7$ cells/cm²が最も好ましい。

20

【0033】

毛乳頭細胞集合体を含む細胞層の形成は、一又は複数の実施形態において、基材上で行うことができる。基材は、一又は複数の実施形態において、多孔質膜を有する。基材としては、一又は複数の実施形態において、トランスウェル（登録商標）、及びセルカルチャーインサート（商品名）等が挙げられる。

【0034】

本開示の第1の実施形態における人工皮膚の製造方法は、一又は複数の実施形態において、一又は複数の実施形態において、基材上にコート細胞を配置して細胞層（ベース層）を形成することを含んでもよい。

30

【0035】

コート細胞の配置後、毛乳頭細胞集合体の配置に先立ち、所定の期間培養を行うことが好ましい。培地は、一又は複数の実施形態において、Eagle's MEM培地、Dulbecco's Modified Eagle培地（DMEM）、Modified Eagle培地（MEM）、Minimum Essential培地、RDMI、及びGlutaMax培地等が挙げられる。培地は、一又は複数の実施形態において、血清を添加した培地であってもよいし、無血清培地であってもよい。培養温度は、一又は複数の実施形態において、良好な人工皮膚が得られることから、 $4 \sim 60$ が好ましく、 $20 \sim 40$ がさらに好ましく、 $30 \sim 37$ が最も好ましい。培養時間は、一又は複数の実施形態において、良好な人工皮膚が得られることから、 $1 \sim 24$ 時間、好ましくは $6 \sim 24$ 時間である。

40

【0036】

本開示の第1の実施形態における人工皮膚の製造方法は、細胞集合体を含む細胞層上に表皮角化細胞を配置し培養することを含む。表皮角化細胞は、一又は複数の実施形態において、細胞集合体を含む細胞層の表面を覆うように配置する。表皮角化細胞は、一又は複数の実施形態において、表皮角化細胞の細胞層が1層形成されるように配置することが好ましい。培養は、一又は複数の実施形態において、半気相暴露培養が挙げられる。表面の表皮角化細胞が空気に曝された状態で培養することにより、表皮角化細胞を分化誘導させることによって表皮層を形成することができる。培養温度は、一又は複数の実施形態にお

50

いて、良好な人工皮膚が得られることから、 $4 \sim 60$ が好ましく、 $20 \sim 40$ がさらに好ましく、 $30 \sim 37$ が最も好ましい。培養時間は、一又は複数の実施形態において、培養温度によっても異なるが、 3 日以上が好ましく、 $3 \sim 28$ 日がさらに好ましく、 $5 \sim 14$ 日が最も好ましい。培地としては、上述のものが挙げられる。

【0037】

本開示の第1の実施形態における人工皮膚の製造方法によれば、一又は複数の実施形態において、表皮角化細胞の配置から好ましい培養条件を選択することにより $3 \sim 30$ 日、 $5 \sim 14$ 日、さらには7日程度で毛包様組織を備える人工皮膚を製造できる。

【0038】

本開示の第2の実施形態における人工皮膚の製造方法は、ECM成分を含む被膜でコートされた毛乳頭細胞（以下、「コート毛乳頭細胞」ともいう）を $4 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ cells/cm² 配置して毛乳頭細胞層を形成すること、及び前記毛乳頭細胞層上に表皮角化細胞を配置し培養することを含む。コート毛乳頭細胞は、毛乳頭細胞とECM膜とを含む。ECM膜は上述の通りである。

10

【0039】

本開示の第2の実施形態における人工皮膚の製造方法によれば、一又は複数の実施形態において、上記所定の量のコート毛乳頭細胞を含む毛乳頭細胞層と表皮角化細胞とを積層することによって、コアシェル構造の毛乳頭細胞集合体を形成できる。本開示の人工皮膚の第2の製造方法によれば、一又は複数の実施形態において、毛包様組織の前駆体である毛乳頭細胞集合体が形成されるため、好ましくは毛乳頭細胞集合体の準備を別途行わない場合であっても毛包様組織を備える真皮層を有する人工皮膚を製造できる。

20

【0040】

本開示の第2の実施形態における人工皮膚の製造方法は、より生体に近い真皮層を形成する点から、一又は複数の実施形態において、コート細胞を三次元に配置し培養して細胞層を形成することを含むことが好ましい。コート細胞は、上述の通りであって、一又は複数の実施形態において、ECM膜でコートされた線維芽細胞が挙げられる。細胞層の形成は、少なくともECM膜でコートされた線維芽細胞を含む細胞層を形成することが好ましく、コート線維芽細胞以外のコート細胞を配置することを含んでいてもよい。配置するコート線維芽細胞の数は、一又は複数の実施形態において、 $4 \times 10^5 \sim 1.5 \times 10^8$ cells/cm² が好ましく、 $6 \times 10^5 \sim 3 \times 10^7$ cells/cm² がさらに好ましく、 $1.5 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^7$ cells/cm² が最も好ましい。

30

言い換えると、ECM膜でコートされた線維芽細胞が、一又は複数の実施形態において、良好な人工皮膚がえられることから、 $1 \sim 500$ 層配置するのが好ましく、 $2 \sim 100$ 層積層されるように配置するのがさらに好ましく、 $5 \sim 50$ 層積層されるように配置するのが最も好ましい。

【0041】

本開示の第2の実施形態における人工皮膚の製造方法は、コート毛乳頭細胞を 4×10^5 cells/cm² 以上配置して毛乳頭細胞層を形成することを含む。コート毛乳頭細胞は、真皮層内に形成される毛包様組織の大きさをより大きくする点から、一又は複数の実施形態において、 $4 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ cells/cm² 配置して毛乳頭細胞層を形成することが好ましく、 $6 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ cells/cm² がより好ましく、 $6 \times 10^5 \sim 2.5 \times 10^6$ cells/cm² がさらに好ましく、 $9 \times 10^5 \sim 1.5 \times 10^6$ cells/cm² が最も好ましい。

40

言い換えると、コート毛乳頭細胞は、一又は複数の実施形態において、少なくとも複数層積層されるように配置することが好ましく、より好ましくは $2 \sim 10$ 層、さらに好ましくは $3 \sim 5$ 層である。

【0042】

本開示の第2の実施形態における人工皮膚の製造方法は、一又は複数の実施形態において、コート細胞を含む細胞層上にコート毛乳頭細胞を配置することを含む。配置するコート毛乳頭細胞の数は、上述の通りである。

50

【 0 0 4 3 】

本開示の第2の実施形態における人工皮膚の製造方法は、一又は複数の実施形態において、毛乳頭細胞上に表皮角化細胞を配置し培養することを含む。表皮角化細胞の配置及び培養は、第1の実施形態と同様である。

【 0 0 4 4 】

〔二重細胞集合体の製造方法〕

上述の通り、本開示の第2の実施形態における人工皮膚の製造方法によれば、上記所定の量のコート毛乳頭細胞を含む毛乳頭細胞層と表皮角化細胞とを積層することによって、コアシェル構造の毛乳頭細胞集合体を形成できる。よって、本開示は、一又は複数の実施形態において、コート毛乳頭細胞を $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^4$ cells/cm² 配置して毛乳頭細胞層を形成すること、及び前記毛乳頭細胞層上に表皮角化細胞を配置し培養することを含む二重細胞集合体の製造方法（以下、「本開示の二重細胞集合体の製造方法」ともいう）に関する。本開示の二重細胞集合体の製造方法によれば、一又は複数の実施形態において、毛乳頭細胞の凝集体とそれを覆う表皮角化細胞とを含むコアシェル構造の二重細胞集合体を製造することができる。

【 0 0 4 5 】

コート毛乳頭細胞は、真皮層内に形成される毛包様組織から毛軸の形成が促進される適切なサイズを作製する点から、一又は複数の実施形態において、 $500 \sim 5,000$ cells/cm² 配置することが好ましく、又は $2,000 \sim 3,000$ cells/cm² 配置することがさらに好ましい。

【 0 0 4 6 】

二重細胞集合体の製造は、一又は複数の実施形態において、細胞凝集塊の形成に適した基材上で行うことが好ましい。細胞凝集塊の形成に適した基材としては、一又は複数の実施形態において、細胞低吸着処理が行われたウェルプレート等が挙げられる。

【 0 0 4 7 】

〔評価キット〕

本開示は、一又は複数の実施形態において、本開示の人工皮膚と、本開示の人工皮膚が配置された容器とを含む評価用キット（以下、「本開示の評価用キット」ともいう）に関する。本開示の評価用キットは、一又は複数の実施形態において、育毛、発毛、脱毛、除毛及び抑毛等のための被検物質の評価を行うことができる。本開示の評価用キットは、一又は複数の実施形態において、発毛等の評価のみならず、被検物質の皮膚に対する薬効試験、薬理試験及び安全性試験等といった薬剤評価に用いることができる。本開示の評価用キットは、一又は複数の実施形態において、皮膚安全性、皮膚腐食性、皮膚刺激性及び皮膚透過性等の評価に用いることができる。

【 0 0 4 8 】

容器としては、一又は複数の実施形態において、トランスウェル（登録商標）、及びセルカルチャーインサート（商品名）等が挙げられる。本開示の評価用キットは、一又は複数の実施形態において、容器を配置するマルチディッシュ等を含んでいてもよい。

【 0 0 4 9 】

本開示の評価用キットは、一又は複数の実施形態において、所定の検査に用いる試薬、材料、及び用具、並びにその評価についての説明書（取扱説明書）の少なくとも1つをさらに含んでいてもよい。

【 0 0 5 0 】

〔評価方法〕

本開示は、一又は複数の実施形態において、本開示の人工皮膚を用いた被検物質を評価する方法（以下、「本開示の評価方法」ともいう）に関する。本開示の評価方法は、被検物質を、本開示の人工皮膚に接触させること、及び、被検物質の接触による被検物質による人工皮膚への影響を観察することを含む。本開示の評価方法によれば、一又は複数の実施形態において、従来の方法と比較して生体の皮膚に近い環境で被検物質の評価を行うことができるという効果を奏しうる。本開示の評価方法は、一又は複数の実施形態において

、新薬の創出（スクリーニング）等における各種分子量の薬物の動態評価、化粧品や医薬部外品等の開発における評価において極めて有用なツールとなりうる。評価としては、一又は複数の実施形態において、育毛、発毛、脱毛、除毛、抑毛、薬剤評価、皮膚安全性、皮膚腐食性、皮膚刺激性及び皮膚透過性等の評価が挙げられる。

【0051】

[ECM成分]

以下に、ECM成分について例を挙げて説明する。

【0052】

ECM成分としての物質Aと物質Bとの組み合わせとしては、一又は複数の実施形態において、RGD配列を有する高分子とRGD配列を有する高分子と相互作用する高分子（以下、「相互作用を有する高分子」ともいう）との組み合わせ、又は、正の電荷を有する高分子と負の電荷を有する高分子との組み合わせが挙げられる。

10

【0053】

（RGD配列を有する高分子）

RGD配列を有する高分子とは、細胞接着活性を担うアミノ酸配列である「Arg-Gly-Asp」（RGD）配列を有する高分子をいう。本明細書において「RGD配列を有する」とは、元来RGD配列を有するものでもよいし、元来RGD配列を有しないものにRGD配列を結合させたものでもよい。RGD配列を有する高分子は、生分解性であることが好ましい。RGD配列を有する高分子としては、RGD配列を有するタンパク質、RGD配列を結合させた天然由来高分子、RGD配列を結合させた合成高分子が挙げられる。

20

【0054】

RGD配列を有するタンパク質としては、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン、カドヘリン、コラーゲン等が挙げられる。

【0055】

RGD配列を結合させた天然由来高分子は、元来RGD配列を有しない天然由来高分子に、RGD配列を結合させた高分子である。元来RGD配列を有しない天然由来高分子としては、コラーゲン、ゼラチン、アルブミン、グロブリン、プロテオグリカン、酵素、抗体、水溶性ポリペプチド、低分子ペプチド、 α -ポリリジン、 β -ポリリジン、キチン、キトサン等が挙げられる。

30

【0056】

RGD配列を結合させた合成高分子は、合成高分子にRGD配列を結合させた高分子である。RGD配列を結合させた合成高分子の分子形状は、直鎖状、グラフト状、くし状、樹状、星型状、網目状等のいずれであってもよい。合成高分子としては、ポリウレタン、ポリカーボネート、ポリアミド、又はこれらの共重合体；ポリエステル、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド-co-ポリアクリル酸）、ポリアミドアミン dendrimer、ポリエチレンオキサイド、ポリ-L-カプロラクタム、ポリアクリルアミド、ポリ（メタクリル酸メチル-co-ポリメタクリル酸オキシエチレン）等が挙げられる。

【0057】

RGD配列を有する高分子は、良好な人工皮膚が得られることから、これらの中でも、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン、カドヘリン、ポリリジン、エラスチン、RGD配列を結合させたコラーゲン、RGD配列を結合させたゼラチン、RGD配列を結合させたキチン、及びRGD配列を結合させたキトサンが好ましく、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン、ポリリジン、RGD配列を結合させたコラーゲン、及びRGD配列を結合させたゼラチンがさらに好ましい。

40

【0058】

（相互作用する高分子）

相互作用する高分子とは、RGD配列を有する高分子と相互作用する高分子をいい、RGD配列を有する高分子と相互作用する天然由来高分子と、RGD配列を有する高分子と相互作用する合成高分子が挙げられる。本明細書において「相互作用する」とは、一又は

50

複数の実施形態において、静電的相互作用、疎水性相互作用、水素結合、電荷移動相互作用、共有結合形成、タンパク質間の特異的相互作用、及び又はファンデルワールス力等によって化学的及び又は物理的に R G D 配列を有する高分子と相互作用する高分子とが結合、接着、吸着、又は電子の授受が可能な程度に近接することを意味する。相互作用する高分子は、生分解性であることが好ましい。

【 0 0 5 9 】

R G D 配列を有する高分子と相互作用する天然由来高分子としては、一又は複数の実施形態において、コラーゲン、ゼラチン、プロテオグリカン、インテグリン、酵素、抗体、水溶性ポリペプチド、低分子ペプチド、ポリアミノ酸、エラスチン、ヘパリン、ヘパラン硫酸、デキストラン硫酸、ヒアルロン酸等が挙げられる。ポリアミノ酸としては、一又は複数の実施形態において、 α -ポリリジン又は β -ポリリジン等のポリリジン、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸等が挙げられる。

10

【 0 0 6 0 】

相互作用する高分子としては、良好な人工皮膚が得られることから、これらの中でも、ゼラチン、デキストラン硫酸、ヘパリン、ヒアルロン酸、グロブリン、アルブミン、ポリグルタミン酸、コラーゲン、エラスチンが好ましく、ゼラチン、デキストラン硫酸、ヘパリン、ヒアルロン酸、コラーゲンがさらに好ましく、ゼラチン、デキストラン硫酸、ヘパリン、ヒアルロン酸が最も好ましい。

【 0 0 6 1 】

R G D 配列を有する高分子と相互作用を有する高分子との好ましい組み合わせとしては、一又は複数の実施形態において、フィブロネクチンとゼラチン、フィブロネクチンと α -ポリリジン、フィブロネクチンとヒアルロン酸、フィブロネクチンとデキストラン硫酸、フィブロネクチンとヘパリン、フィブロネクチンとコラーゲン、ラミニンとゼラチン、ラミニンとコラーゲン、ポリリジンとエラスチン、ビトロネクチンとコラーゲン、R G D 配列を結合させたコラーゲン又は R G D 配列を結合させたゼラチンとコラーゲン又はゼラチン、等が挙げられる。

20

中でも、フィブロネクチンとゼラチン、フィブロネクチンと α -ポリリジン、フィブロネクチンとヒアルロン酸、フィブロネクチンとデキストラン硫酸、フィブロネクチンとヘパリン、ラミニンとゼラチンが好ましく、フィブロネクチンとゼラチンがさらに好ましい。なお、R G D 配列を有する高分子及び相互作用を有する高分子は、それぞれ一種類ずつでもよいし、相互作用を示す範囲で二種類以上をそれぞれ併用してもよい。

30

【 0 0 6 2 】

(正の電荷を有する高分子)

正の電荷を有する高分子とは、正の電荷を有する、天然由来高分子又は合成高分子をいう。正の電荷を有する天然由来高分子としては、一又は複数の実施形態において、正の電荷を有する水溶性天然由来高分子が好ましい。正の電荷を有する水溶性天然由来高分子としては、一又は複数の実施形態において、塩基性コラーゲン、塩基性ゼラチン、リゾチーム、シトクロム c、ペルオキシダーゼ、ミオグロビン、正の電荷を有する水溶性ポリペプチド、正の電荷を有する低分子ペプチド、正の電荷を有するポリアミノ酸、キチン、キトサン等が挙げられる。正の電荷を有するポリアミノ酸としては、一又は複数の実施形態において、ポリ(α -リジン)、ポリ(β -リジン)等のポリリジン；ポリアルギニン、ポリヒスチジン等が挙げられる。正の電荷を有する合成高分子の分子形状は、直鎖状、グラフト状、くし状、樹状、星型状、網目状等のいずれであってもよい。正の電荷を有する合成高分子としては、一又は複数の実施形態において、正の電荷を有するポリウレタン、ポリアミド、正の電荷を有するポリカーボネート、又はこれらの共重合体；正の電荷を有するポリエステル、ポリジアリルジメチルアンモニウムクロライド (P D D A)、ポリアリルアミンハイドロクロライド、ポリエチレンイミン、ポリビニルアミン、ポリアミドアミンデンドリマー等が挙げられる。

40

【 0 0 6 3 】

(負の電荷を有する高分子)

50

負の電荷を有する高分子とは、負の電荷を有する、天然由来高分子又は合成高分子をいう。負の電荷を有する天然由来高分子としては、一又は複数の実施形態において、負の電荷を有する水溶性天然由来高分子が好ましい。負の電荷を有する水溶性天然由来高分子としては、一又は複数の実施形態において、酸性コラーゲン、酸性ゼラチン、アルブミン、グロブリン、カタラーゼ、 γ -ラクトグロブリン、チログロブリン、 α -ラクトアルブミン、卵白アルブミン、負の電荷を有する水溶性ポリペプチド、負の電荷を有する低分子ペプチド、デキストラン硫酸等が挙げられる。負の電荷を有する合成高分子の分子形状は、直鎖状、グラフト状、くし状、樹状、星形状、網目状等のいずれであってもよい。負の電荷を有する合成高分子としては、一又は複数の実施形態において、負の電荷を有するポリウレタン、負の電荷を有するポリアミド、負の電荷を有するポリカーボネート、及びこれらの共重合体；負の電荷を有するポリエステル、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリスチレンスルホン酸、ポリアクリルアミドメチルプロパンスルホン酸、末端カルボキシ化ポリエチレングリコール等が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0064】

正の電荷を有する高分子と負の電荷を有する高分子との好ましい組み合わせとしては、一又は複数の実施形態において、 γ -ポリリジン塩とポリスチレンスルホン酸塩、 α -ポリリジンとポリスチレンスルホン酸塩、キトサンとデキストラン硫酸、ポリアリルアミンハイドロクロライドとポリスチレンスルホン酸塩、ポリジアリルジメチルアンモニウムクロライドとポリスチレンスルホン酸塩、ポリジアリルジメチルアンモニウムクロライドとポリアクリル酸塩等が挙げられ、良好な人工皮膚が得られることから、これらの中でも、 γ -ポリリジン塩とポリスルホン酸塩、ポリジアリルジメチルアンモニウムクロライドとポリアクリル酸塩が好ましい。ポリスチレンスルホン酸塩としては、一又は複数の実施形態において、ポリスチレンスルホン酸ナトリウム（PSS）等が挙げられる。なお、正の電荷を有する高分子及び負の電荷を有する高分子は、それぞれ、一種類ずつでもよいし、相互作用を示す範囲で二種類以上をそれぞれ併用してもよい。

【0065】

本開示は以下の一又は複数の実施形態に關しうる。

[A1] 線維芽細胞と細胞外マトリックス成分とを含む真皮層と、表皮層とを有し、

前記真皮層が、さらに毛包様組織を備える、人工皮膚。

[A2] 前記真皮層は、 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^{10}$ cells/cm³の線維芽細胞を含む、[A1]記載の人工皮膚。

[A3] 前記真皮層は、さらに血管内皮細胞を含む管状組織を備え、

前記毛包様組織と前記管状組織とが近接する、[A1]又は[A2]に記載の人工皮膚。

[A4] 前記毛包様組織は、毛乳頭細胞を含む細胞の凝集体と表皮角化細胞とを含む、

[A1]から[A3]のいずれかに記載の人工皮膚。

[A5] 前記表皮角化細胞は、前記毛乳頭細胞で構成された細胞の凝集体を覆う、[A4]記載の人工皮膚。

[A6] 前記真皮層は、前記毛包様組織を1~500個/cm²含む、[A1]から[A5]のいずれかに記載の人工皮膚。

[A7] 前記毛包様組織は、直径が30~500 μ mである、[A1]から[A6]のいずれかに記載の人工皮膚。

[A8] 前記毛包様組織の形状は、楕円形である、[A1]から[A7]のいずれかに記載の人工皮膚。

[A9] さらに脂肪層を含み、前記脂肪層上に前記真皮層が形成されている、[A1]から[A8]のいずれかに記載の人工皮膚。

[A10] 前記真皮層は、細胞外マトリックス成分を含む被膜でコートされた線維芽細胞を三次元に配置し培養することを含む[A1]から[A10]のいずれかに記載の人工皮膚。

[B 1] 細胞外マトリックス成分を含む被膜でコートされ、三次元に配置された細胞と、毛乳頭細胞を含む細胞集合体とを含む細胞層を形成すること、及び

前記細胞層上に表皮角化細胞を配置し培養することを含み、

前記細胞集合体は、毛乳頭細胞を含む細胞の凝集体ととそれを覆う表皮角化細胞を含む層と有する、人工皮膚の製造方法。

[B 2] 前記細胞集合体を含む細胞層の形成は、

細胞外マトリックス成分を含む被膜でコートされた細胞を配置して細胞層を形成すること、

前記細胞層上に、前記細胞集合体を配置すること、及び

前記細胞集合体を覆うように細胞外マトリックス成分を含む被膜でコートされた細胞を三次元に配置することを含む、[B 1]記載の人工皮膚の製造方法。

[B 3] 前記細胞集合体は、直径が30～500 μ mである、[B 1]又は[B 2]に記載の人工皮膚の製造方法。

[B 4] 前記細胞層の形成は、細胞外マトリックス成分を含む被膜でコートされた線維芽細胞を $4 \times 10^5 \sim 1.5 \times 10^8$ cells/cm²配置することを含む、[B 1]から[B 3]のいずれかに記載の人工皮膚の製造方法。

[B 5] 前記コートされた線維芽細胞を $4 \times 10^5 \sim 1.5 \times 10^8$ cells/cm²配置して毛乳頭細胞層を形成することを含む、[B 4]記載の人工皮膚の製造方法。

[B 6] 前記細胞層の形成は、さらに血管内皮細胞を配置することを含む、[B 1]から[B 5]のいずれかに記載の人工皮膚の製造方法。

[B 7] 細胞外マトリックス成分を含む被膜でコートされた毛乳頭細胞を $4 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ cells/cm²配置して毛乳頭細胞層を形成すること、及び

前記毛乳頭細胞層上に表皮角化細胞を配置し培養すること、を含む人工皮膚の製造方法。

[B 8] 細胞外マトリックス成分を含む被膜でコートされた線維芽細胞を三次元に配置し培養して細胞層を形成することを含み、

前記細胞層上に前記毛乳頭細胞を配置して前記毛乳頭細胞層を形成することを含む、[B 7]記載の人工皮膚の製造方法。

[B 9] 前記表皮角化細胞の配置後の培養は、半気相暴露培養である、[B 1]から[B 8]のいずれかに記載の人工皮膚の製造方法。

[C 1] [B 1]から[B 9]のいずれかに記載の人工皮膚の製造方法により製造された、人工皮膚。

[D 1] [A 1]から[A 1 0]及び[C 1]のいずれかに記載の人工皮膚と、

前記人工皮膚が配置された容器とを含む、育毛、発毛、脱毛、除毛及び抑毛の少なくとも一つの評価を行う評価用キット。

[D 2] [A 1]から[A 1 0]及び[C 1]のいずれかに記載の人工皮膚と、

前記人工皮膚が配置された容器とを含む、皮膚安全性、皮膚腐食性、皮膚刺激性及び皮膚透過性からなる群から選択される少なくとも一つの評価を行うための評価用キット。

[E 1] 人工皮膚を用いた被検物質を評価する方法であって、

前記人工皮膚が、[A 1]から[A 1 0]及び[C 1]のいずれかに記載の人工皮膚であり、

被検物質を、前記人工皮膚に接触させること、及び、被検物質の接触による被検物質による人工皮膚への影響を観察することを含む評価方法。

[F 1] 細胞外マトリックス成分を含む被膜でコートされた毛乳頭細胞を500～5,000 cells/cm²配置して毛乳頭細胞層を形成すること、及び前記毛乳頭細胞層上に表皮角化細胞を配置し培養することを含む二重細胞集合体の製造方法。

[F 2] 前記コートされた毛乳頭細胞を、細胞低吸着処理が行われたウェルプレート配置することを含む。[F 1]の二重細胞集合体の製造方法。

【 0 0 6 6 】

以下に、実施例及び参考例を用いて本開示をさらに説明する。但し、本開示は以下の実

10

20

30

40

50

施例に限定して解釈されない。

【実施例】

【0067】

[コート細胞の作製]

特開2012-115254号公報の記載に基づきコート細胞を調製した。

<正常ヒト皮膚線維芽細胞(NHDF)>

細胞はNHDF(LONZA社製)、細胞外マトリックス成分はフィブロネクチン(FN)及びゼラチン(G)を使用した。細胞をFN溶液及びG溶液に交互に計9回浸漬させることによって(FN浸漬操作:5回、G浸漬操作:4回)、ゼラチンとフィブロネクチンを含む被膜でNHDFがコートされたコート細胞(コートNHDF)を作製した(被膜の厚み:9nm)。なお、被膜の厚みは特開2012-115254号公報の実施例に記載の方法により測定した。

10

<正常ヒト毛乳頭細胞(DPC)>

細胞として予め蛍光(cell tracker orange)染色したDPCを使用した以外は、同様にしてゼラチンとフィブロネクチンを含む被膜でDPCがコートされたコート細胞(コートDPC)を作製した(被膜の厚み:9nm)。

【0068】

[人工皮膚の作製(実施例1-1)]

特開2012-115254号公報の記載の方法に基づき、24wellセルカルチャーインサート(corning社製、内直径:6.5mm、膜面積:0.33cm²)に、コートNHDFを6×10⁵cells播種して真皮組織(6層)を作製した。1日培養後、コートDPCを真皮組織上に4×10⁵cells播種してDPC層(4層)を作製した。さらに1日培養後、DPC層上に正常ヒト表皮角化細胞(KC)を1.8×10⁵cells播種してKC層(1層)を形成し、所定期間、半気相暴露培養或いは液中培養することで人工皮膚を得た。なお、培地は毛乳頭細胞用培地(PromoCell社製)とHuMedia-KG2(クラボウ社製)とを1:1に混合したものを使用し、培地交換は1日に1回行った。

20

【0069】

[人工皮膚の作製(実施例1-2)]

真皮組織を作製しない(コートNHDFの播種を行わない)こと、及びDPCを5×10⁵cells播種すること以外は、(実施例1-1)と同様の方法で人工皮膚を作製した。

30

【0070】

[人工皮膚の作製(参考例1)]

コートDPCの播種細胞数を1×10⁵cells(DPC層:1層)とした以外は、(実施例1-1)と同じ操作で人工皮膚を作製した。

【0071】

(局在位置変化の確認)

毛乳頭細胞の局在位置変化を蛍光顕微鏡で観察した。その結果の一例を図1に示す。図1は、実施例1の組織上面からの蛍光顕微鏡写真である。図1Aは組織作製直後の写真、図1Bは一週間半気相暴露培養後の写真である。図1Aに示すように、組織作製直後は赤く染色されたDPCが培養基材全面に均一に分布していた。一方、一週間半気相暴露培養した図1Bでは、毛乳頭細胞同士が集まって直径100μm程度の細胞塊(細胞集合体)、毛乳頭組織を形成していた。

40

【0072】

(組織の形態変化観察)

組織の形態変化を半気相暴露培養した三次元組織のHE組織切片像で観察した。その結果の一例を図2に示す。図2は、NHDF-DPC-KC(6-4-1)構造の組織切片像である。図2Aは一週間半気相暴露したHE切片像であり、図2Bは二週間半気相暴露したHE切片像である。図2Aに示すように、一週間半気相暴露培養した組織断片には直

50

径100 μ m程度の毛乳頭細胞の集合体(矢印)が観察された。これにより、毛乳頭構造が三次元組織内に形成されていることが確認された。また二週間半気相暴露培養することによって、図2Bに示すように、培養一週間で観察されていた毛乳頭組織が表皮角化細胞で囲まれ、毛包様組織が形成されたことが確認された。すなわち毛器官構造を有する人工皮膚が得られたことが確認された。

【0073】

上記組織の形態観察結果をまとめたものを下記表1に示す。真皮体積密度は、NHDF播種数から真皮層体積(HE切片から求めた真皮層厚みと培養基材底面積から算出)を割った値とした。なお、真皮層の厚みは、HE切片を光学顕微鏡観察により3箇所測定し、その平均を算出することにより求めた。

【表1】

(表1)	細胞積層構造	各細胞層の層数	真皮体積密度 (cells/cm ³)	DPC平面密度 (cells/cm ²)	培養方法	
					半気相暴露	液中
実施例1-1	NHDF-DPC-KC	6-4-1	2.3 \times 10 ⁸	1.2~1.5 \times 10 ⁶	○	△
実施例1-2	DPC-KC	5-1	—	—	○	△
参考例1	NHDF-DPC-KC	6-1-1	3.0 \times 10 ⁸	3.0 \times 10 ⁵	×	×

○:毛包様組織のサイズが50 μ m以上
 △:毛包様組織のサイズが50 μ m未満
 ×:毛包様組織形成なし

【0074】

表1に示すように、DPCが積層されるようにDPC層を形成し(DPC平面密度:1.2 \times 10⁶~1.5 \times 10⁶cells/cm²)、その上にKCを積層して培養を行うことによって、三次元組織内に毛包様組織が形成されることが確認できた。一方、参考例1(DPC平面密度:3.0 \times 10⁵cells/cm²)では、毛包様組織は形成されなかった。また、KC播種後の培養を半気相暴露培養とすることによって、形成される毛包様組織の径をより大きくすることができた。

【0075】

[二重細胞集合体の作製]

低吸着表面処理されたU底の96ウェルプレート(住友ベークライト社製)に、DPCを3 \times 10³cells/well播種し、12~24時間37℃でインキュベートして直径100 μ m程度のDPC細胞集合体を作製した。次にDPC細胞集合体が形成されたウェルにKCを3 \times 10³cells/well播種し、12~24時間インキュベートして直径150~200 μ m程度のコアシェル構造の毛乳頭細胞集合体(二重細胞集合体、DPC-KCスフェロイド)を得た。得られた二重細胞集合体を図3A及びBに示す。図3Aは位相差顕微鏡像であり、図3BはHE切片の顕微鏡像である。

【0076】

[人工皮膚の作製(実施例2)]

図4に示す手順で人工皮膚を作製した。まず、24wellセルカルチャーインサートにコートNHDFを5 \times 10⁵cells播種し1日培養した。次に二重細胞集合体をセルカルチャーインサート1つ当たり30個(90個/cm²)となるように播種し、1時間インキュベートした。細胞集合体の接着を確認後、NHDFコート細胞を2 \times 10⁶cells播種して細胞集合体を完全にNHDFコートで覆い細胞集合体を含む細胞層を形成した。さらにこの細胞層上にKCを2 \times 10⁵cells播種し、半気相暴露で一週間培養して三次元組織を作製した。なお、培地は毛乳頭細胞用培地(PromoCell)と

10

20

30

40

50

HuMedia - KG2 (クラボウ) とを 1 : 1 に混合したものを使用し、培地交換は 1 日に 1 回行った。

【0077】

組織切片像を確認することによって細胞集合体の形態変化観察を行った。その結果の一例を図 5 に示す。図 5 A は KC 播種直後の組織切片 (HE 染色) の顕微鏡像であり、図 5 B は KC 播種から一週間半気相暴露培養した組織切片 (サイトケラチン (CK) 染色) の顕微鏡像である。図 5 B に示すように、細胞集合体の外殻 (シェル部) はケラチン陽性であり、内部 (コア部) には毛乳頭細胞を含む組織があることから、三次元組織内に毛包様組織が導入出来ていることが確認できた。また、図 5 A と図 5 B とを比較すると細胞集合体の形状が、円形 (球形) から楕円形に変化しており、毛器官を有する人工皮膚が作製できた。なお、この人工皮膚における真皮体積密度は、 $2.5 \times 10^8 \text{ cells/cm}^3$ であった。

10

【0078】

(参考例 2)

二重細胞集合体に代えて、DPC により構成された DPC 細胞集合体を用いた以外は実施例 2 と同様にして三次元組織を作製した。得られた組織切片 (HE 切片) の顕微鏡像を図 6 に示す。図 6 に示すように、参考例 2 の三次元組織は一週間組織を培養すると、真皮層と細胞集合体の境界が不明瞭になった (細胞集合体: 矢印)。また、細胞集合体の周りにも KC が存在せず、毛包様組織を形成していなかった。なお、この人工皮膚における真皮体積密度は、 $2.5 \times 10^8 \text{ cells/cm}^3$ であった。

20

【0079】

[人工皮膚の作製 (実施例 3)]

24well セルカルチャーインサートにコート NHDF を $5 \times 10^5 \text{ cells}$ 播種し 1 日培養した。続いてヒト臍帯静脈血管内細胞 (HUV EC) を $7 \times 10^4 \text{ cells}$ 播種し 1 日培養した。続いて実施例 2 の二重細胞集合体を、セルカルチャーインサート 1 つ当たり 30 個 (90 個/cm^2) となるように播種し、1 時間インキュベートした。細胞集合体の接着を確認後、NHDF コート細胞を $2 \times 10^6 \text{ cells}$ 播種して細胞集合体を完全に NHDF コート細胞で覆い細胞集合体を含む細胞層を形成した。さらにこの細胞層上に KC を $2 \times 10^5 \text{ cells}$ 播種し、半気相暴露で一週間培養して三次元組織を作製した。なお、培地は毛乳頭細胞用培地 (PromoCell 社製) と HuMedia - KG2 (クラボウ社製) とを 1 : 1 に混合したものを使用し、培地交換は 1 日に 1 回行った。

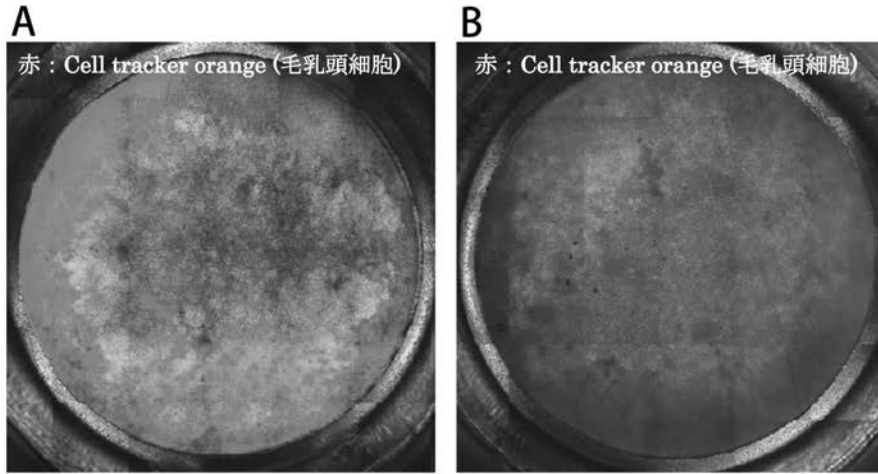
30

【0080】

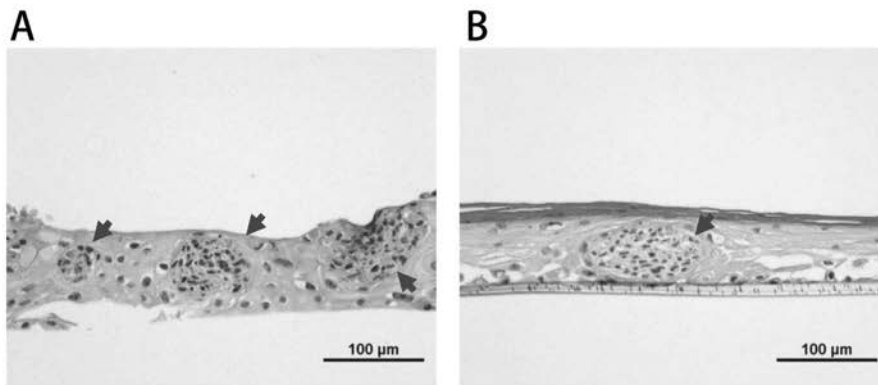
組織切片像を確認することによって細胞集合体の形態変化観察を行った。その結果の一例を図 7 に示す。図 7 は実施例 3 の組織切片像である。図 7 A は組織作製直後 (培養 1 日目) の切片を CD31 染色した像である。CD31 陽性の HUV EC 細胞が管状組織 (血管) を形成し、血管網が毛包様組織に近接している人工皮膚 (真皮体積密度: $2.5 \times 10^8 \text{ cells/cm}^3$) を得た。図 7 B は半気相暴露培養 1 週間後の HE 切片の顕微鏡像である。これをみると、細胞集合体から毛軸の形成が確認されていることが確認できた。以上から血管網が近接する毛器官を有する人工皮膚モデルを作製出来た。

40

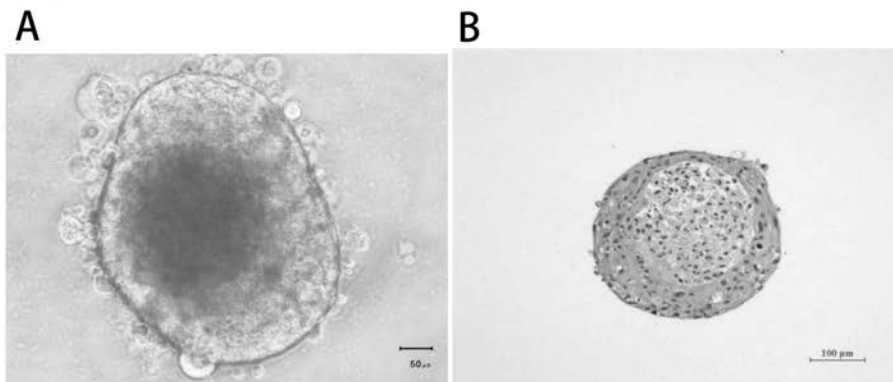
【 図 1 】



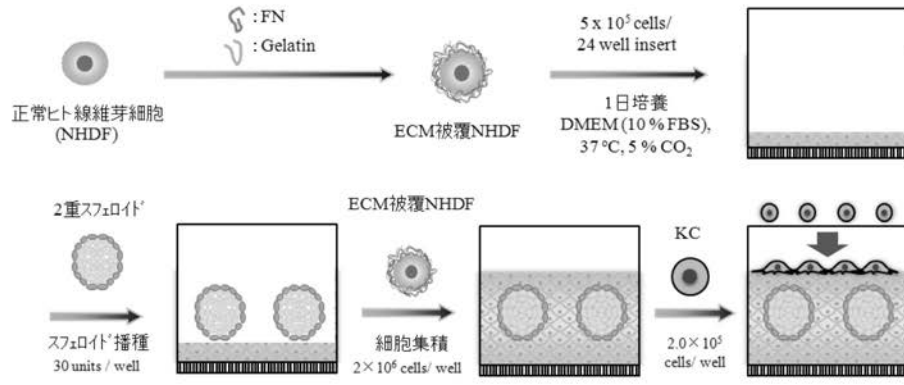
【 図 2 】



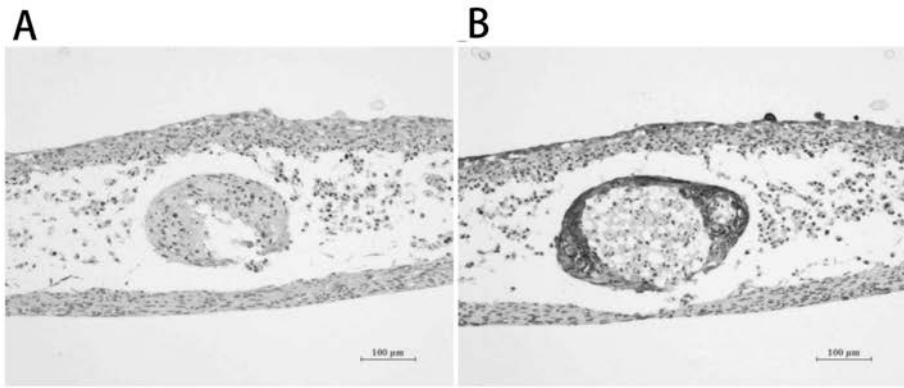
【 図 3 】



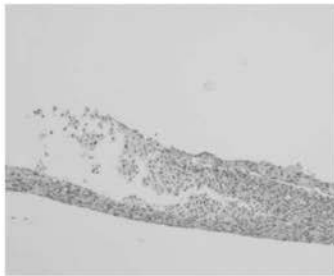
【 図 4 】



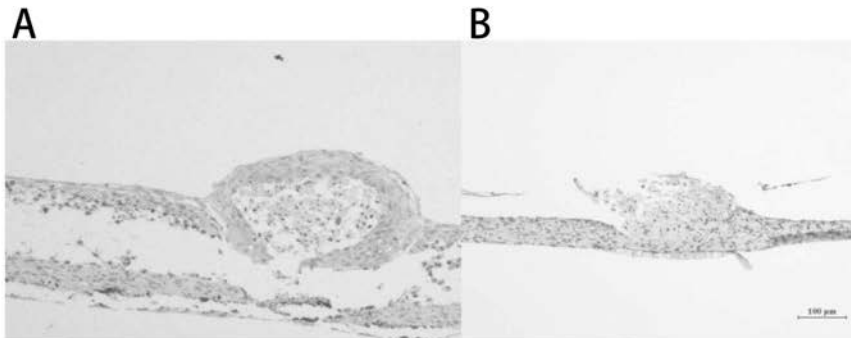
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



フロントページの続き

- (72)発明者 小池 誠治
東京都荒川区東尾久7丁目2番35号 株式会社A D E K A内
- (72)発明者 日渡 謙一郎
東京都荒川区東尾久7丁目2番35号 株式会社A D E K A内
- (72)発明者 山口 雄
東京都荒川区東尾久7丁目2番35号 株式会社A D E K A内
- Fターム(参考) 4B065 AA90X AA93X BB19 BC11 BD39 CA44
4C081 AB19 BA17 CD34 EA02