(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017 年 7 月 27 日(27.07.2017)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2017/126532 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 5/071 (2010.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/001499

(22) 国際出願日: 2017 年 1 月 18 日(18.01.2017)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
62/280,784 2016 年 1 月 20 日(20.01.2016) US

(71) 出願人: 国立大学法人東京大学(THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 竹内 昌治(TAKEUCHI Shoji); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 森本 雄矢(MORIMOTO Yuya); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 森 宣仁(MORI Nobuhito); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 棚井 澄雄, 外(TANAI Sumio et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目９番２号 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

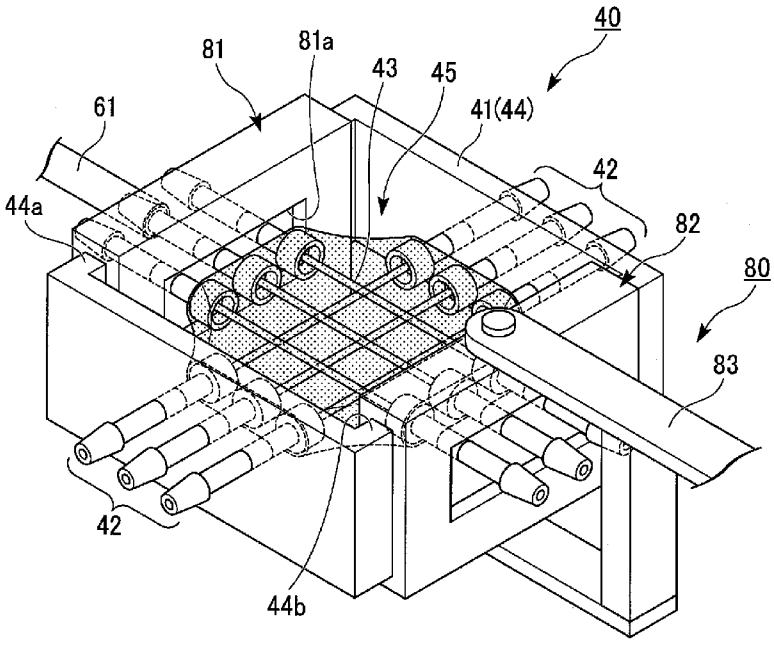
添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

WO 2017/126532 A1

(54) **Title**: ARTIFICIAL THREE-DIMENSIONAL TISSUE AND METHOD FOR MANUFACTURING SAME, PERFUSION DEVICE FOR ARTIFICIAL THREE-DIMENSIONAL TISSUE, AND METHOD FOR EVALUATING DRUG USING ARTIFICIAL THREE-DIMENSIONAL TISSUE

(54) 発明の名称 : 人工三次元組織とその製造方法、人工三次元組織灌流デバイス、人工三次元組織を用いた薬剤評価方法



(57) **Abstract**: This method for manufacturing an artificial three-dimensional tissue includes the steps of: preparing a perfusion device provided with a culture tank having a culture space surrounded by side walls, and a flow channel forming member which penetrates through opposing side walls and is suspended along a predetermined direction in the culture space; culturing first cells in the culture space and forming a first tissue layer through which the flow channel forming member penetrates; removing the flow channel forming member from the first tissue layer and forming a perfusion flow channel passing through the first tissue layer; culturing second cells disposed on the first tissue layer while perfusing a culture medium through the perfusion flow channel, and forming a second tissue layer; and applying an extension stimulation and/or a compression stimulation to the first tissue layer and the second tissue layer at least during culturing of the second cells.

(57) 要約:

[続葉有]

この人工三次元組織製造方法は、側壁に囲まれた培養空間を有する培養槽と、対向する側壁を貫いて培養空間に所定方向に沿って懸架された流路形成部材とを備えた灌流デバイスを準備することと、培養空間で第１細胞を培養して、流路形成部材が貫く第１組織層を形成することと、第１組織層から流路形成部材を抜去して第１組織層を貫通する灌流流路を形成することと、灌流流路に培地を灌流させながら第１組織層上に配置した第２細胞を培養して第２組織層を形成することと、少なくとも第２細胞の培養時に、第１組織層および第２組織層に伸展と圧縮との少なくとも一方の刺激を付与することと、を含む。

明　細　書

発明の名称 ：

人工三次元組織とその製造方法、人工三次元組織灌流デバイス、人工三次元組織を用いた薬剤評価方法

技術分野

[0001] 本発明は、人工三次元組織とその製造方法、人工三次元組織灌流デバイス、人工三次元組織を用いた薬剤評価方法に関する。

本願は、２０１６年１月２０日に出願された米国特許仮出願６２／２８０，７８４号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] 化粧品や薬品の試験、皮膚移植、ロボットへの搭載等に人工三次元組織の一つである人工皮膚組織は広く用いられている。特許文献１には、細胞外マトリックス成分を含む被膜で細胞の表面が被覆された被覆細胞を培養し、被覆細胞が積層された真皮組織層を形成すること、および真皮組織層上に表皮細胞を配置して表皮層を形成して人工皮膚モデルを製造する技術が開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特開２０１２－２０５５１６号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 人工皮膚組織の構築には、気液界面における培養が必須であるが、特許文献１に記載された培養は、表皮層とは最も離れた位置に配置されたメンブレンフィルタを介して培地が供給されるため、養分供給の効率が十分とはいえず、例えば、生体移植時の生着率が低い低品質の人工皮膚組織が製造される可能性がある。また、上記の培養では、表皮層を厚くすることは困難であっ

た。

[0005] 本発明は上記問題に鑑みてなされたものであり、高品質で表皮層が厚い人工三次元組織とその製造方法、人工三次元組織灌流デバイス、人工三次元組織を用いた薬剤評価方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明の第１の態様に従えば、所定方向に延びる人工三次元組織の製造方法であって、側壁に囲まれた培養空間を有する培養槽と、対向する前記側壁を貫いて前記培養空間に前記所定方向に沿って懸架された流路形成部材とを備えたデバイスを準備することと、前記培養空間で第１細胞を培養して、前記流路形成部材が貫く第１組織層を形成することと、前記第１組織層から前記流路形成部材を抜去して前記第１組織層を貫通する灌流流路を形成することと、前記灌流流路に培地を灌流させながら前記第１組織層上に配置した第２細胞を培養して第２組織層を形成することと、少なくとも前記第２細胞の培養時に、前記第１組織層および前記第２組織層に伸展と圧縮との少なくとも一方の刺激を付与することと、を含むことを特徴とする人工三次元組織の製造方法が提供される。

伸展と圧縮との少なくとも一方の刺激を付与する方向としては、流路形成部材が懸架された方向（灌流流路方向）や、第１組織層と第２組織層とを積層方向に屈曲した場合の第１組織層および第２組織層の層方向を選択することができる。流路形成部材が懸架された方向に伸展と圧縮との少なくとも一方の刺激を付与する場合は、伸展と圧縮との少なくとも一方の刺激を直線に沿って付与する構成や、例えば、生体モデルの湾曲する表面に沿って流路形成部材を曲線状に配置して曲線状の灌流流路を形成し、伸展と圧縮との少なくとも一方の刺激を当該曲線に沿って付与する構成としてもよい。第１組織層と第２組織層とを屈曲させた場合、あるいは湾曲させた場合には、第１組織層および第２組織層のうち、例えば、屈曲中心あるいは湾曲中心に近い側の層に圧縮の刺激が付与され、遠い側の層に伸展の刺激が付与される。

[0007] 本発明の第２の態様に従えば、本発明の第１の態様の製造方法で人工三次

元組織を製造することと、薬剤を前記人工三次元組織に接触させることと、前記薬剤の接触による刺激に対する前記人工三次元組織の応答、または前記人工三次元組織に対する前記薬剤の浸透性を測定することと、を含むことを特徴とする人工三次元組織を用いた薬剤評価方法が提供される。

[0008] 本発明の第３の態様に従えば、所定方向に延びる人工三次元組織に灌流が行われる人工三次元組織灌流デバイスであって、側壁に囲まれた培養空間を有する培養槽と、対向する前記側壁を貫いて前記培養空間における前記人工三次元組織を配置する領域に前記所定方向に沿って懸架される流路形成部材を取り付けおよび取り外し自在に支持する支持部と、前記対向する側壁のそれぞれに設けられ、前記人工三次元組織に係合して前記人工三次元組織の前記所定方向への収縮を抑える係合部と、前記人工三次元組織に伸展と圧縮との少なくとも一方の刺激を付与する刺激付与部と、を備えることを特徴とする人工三次元組織灌流デバイスが提供される。

[0009] 本発明の第４の態様に従えば、所定方向に延びる人工三次元組織であって、内部を貫通し前記所定方向に延びる灌流流路と、表面に前記所定方向に応じた方向に延びる皺部と、を有することを特徴とする人工三次元組織が提供される。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、高品質で表皮層が厚い人工三次元組織とその製造方法、人工三次元組織灌流デバイス、人工三次元組織を用いた薬剤評価方法を提供することことができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]本発明の実施の形態に係る人工皮膚組織１を模式的に示した斜視断面図である。

[図2]人工皮膚組織製造システム３０の概略的な構成図である。

[図3]灌流デバイス４０の第１実施形態の外観斜視図である。

[図4]伸展装置８０の図示を省略した灌流デバイス４０の外観斜視図である。

[図5]係合部４２ｃを軸方向で視た正面図である。

[図6]図５におけるＡ－Ａ線視断面図である。

[図7]人工皮膚組織１の製造手順を示す図である。

[図8]人工皮膚組織１の製造手順を示す図である。

[図9]人工皮膚組織１の製造手順を示す図である。

[図10]人工皮膚組織１の製造手順を示す図である。

[図11]人工皮膚組織１の製造手順を示す図である。

[図12]人工皮膚組織１の製造手順を示す図である。

[図13]人工皮膚組織１の製造手順を示す図である。

[図14]人工皮膚組織１の製造手順を示す図である。

[図15]人工皮膚組織１の製造手順を示す図である。

[図16]伸展の刺激を付与した場合の結果と、付与しなかった場合の結果とを示す写真図である。

[図17]培養された人工皮膚組織１の断面を示す写真図である。

[図18]培養された人工皮膚組織１の断面を示す蛍光画像である。

[図19]人工皮膚組織１の反発力測定を説明するための図である。

[図20]表皮層に３００μｍの変位を生じさせた際の反発力を測定した結果を示す図である。

[図21]表皮層に５００μｍの変位を生じさせた際の反発力を測定した結果を示す図である。

[図22]本実施形態に係る人工皮膚組織１における表皮層２０の表面状態を示す写真図である。

[図23]人工皮膚組織１の経皮吸収特性を計測する機構を概略的に示す図である。

[図24]人工皮膚組織１の経皮吸収特性を計測した結果を示す図である。

[図25]第２実施形態の灌流デバイス４０Ａの概略的な斜視図である。

[図26]生体モデルＦの長さ方向を含む鉛直面で断面した図である。

[図27]第２実施形態に係る人工皮膚組織１の製造手順を示す図である。

[図28]第２実施形態に係る人工皮膚組織１の製造手順を示す図である。

[図29]第２実施形態に係る人工皮膚組織１の製造手順を示す図である。

[図30]第２実施形態に係る人工皮膚組織１の製造手順を示す図である。

[図31]第２実施形態に係る人工皮膚組織１の製造手順を示す図である。

発明を実施するための形態

[0012] 以下、本発明の人工三次元組織とその製造方法、人工三次元組織灌流デバイス、人工三次元組織を用いた薬剤評価方法の実施の形態を、図１ないし図３１を参照して説明する。

本実施形態では、人工三次元組織として人工皮膚組織を製造する例を用いて説明する。

[0013] なお、以下の実施の実施形態は、本発明の一態様を示すものであり、この発明を限定するものではなく、本発明の技術的思想の範囲内で任意に変更可能である。また、以下の図面においては、各構成をわかりやすくするために、実際の構造と各構造における縮尺や数等を異ならせている。

[0014] （人工皮膚組織）

まず、本発明に係る人工皮膚組織について、図１を参照して説明する。

図１は、人工三次元組織である人工皮膚組織１を模式的に示した斜視断面図である。

人工皮膚組織１は、真皮組織層（第１組織層）１０と表皮層（第２組織層）２０とを含む。人工皮膚組織１は、真皮組織層１０と表皮層２０とが積層された方向（図１における上下方向、以下、積層方向と称する）と直交する平面に沿った所定方向（図１における左右方向、以下、第１方向と称する）に延びて形成されている。

[0015] 表皮層２０は、真皮組織層１０上に表皮細胞（第２細胞）２１を播種して培養することにより形成されたものである。表皮細胞２１としては、例えば、表皮角化細胞が使用できる。

[0016] 表皮細胞としては、ヒト、マウス、ラット等、哺乳動物由来の細胞が挙げられ、ヒト由来表皮細胞が好ましい。ヒト由来表皮細胞としては、表皮角化細胞、表皮メラノサイトが挙げられ、表皮角化細胞が好ましい。表皮角化細

胞としては、正常ヒト表皮角化細胞（Normal Human Epidermal Keratinocytes：NHEK） が挙げられる。表皮メラノサイトとしては、正常ヒト表皮メラノサイト（Normal Human Epidermal Melanocytes：NHEM）が挙げられる。

[0017] 真皮組織層１０は、細胞外マトリックス成分１１中の真皮細胞（第１細胞）１２を培養することにより形成されたものである。細胞外マトリックス成分１１としては、特に限定されないが、例えば、コラーゲン（Ｉ型、ＩＩ型、ＩＩＩ型、Ｖ型、ＸＩ型など）、マウスＥＨＳ腫瘍抽出物（ＩＶ型コラーゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカンなどを含む）より再構成された基底膜成分（商品名：マトリゲル）、ゼラチン、寒天、アガロース、フィブリン、グリコサミノグリカン、ヒアルロン酸、プロテオグリカンなどを例示することができる。真皮細胞１２としては、例えば、線維芽細胞を用いることができる。

[0018] 線維芽細胞としては、ヒト、マウス、ラット等、哺乳動物由来の細胞が挙げられ、ヒト由来線維芽細胞が好ましい。ヒト由来線維芽細胞としては、ヒト皮膚線維芽細胞（Normal Human Dermal Fibroblasts：NHDF）、ヒト肺線維芽細胞：Human Pulmonary Fibroblasts (HPF)、ヒト心臓線維芽細胞：Human Cardiac Fibroblasts (HCF)、ヒト大動脈外膜線維芽細胞：Human Aortic Adventitial Fibroblasts (HAoAF)、ヒト子宮線維芽細胞：Human Uterine Fibroblasts (HUF)、ヒト絨毛間葉系線維芽細胞：Human Villous Mesenchymal Fibroblasts (HVMF)等が挙げられ、ヒト皮膚線維芽細胞（NHDF）が好ましい。

[0019] 真皮組織層１０は、真皮組織層１０の内部を貫通し第１方向のに延びる灌流流路１３を有している。灌流流路１３は、表皮細胞２１を培養する際に培地（詳細は後述）が灌流する流路である。灌流流路１３の表面には、血管系細胞１４を用いて形成された管腔層１５が設けられている。血管系細胞１４としては、例えば、内皮細胞を用いることができる。

[0020] 血管系細胞としては、血管上皮細胞、血管内皮細胞等が挙げられ、血管内皮細胞が好ましい。血管内皮細胞としては、ヒト、マウス、ラット等、哺乳動物由来の細胞が挙げられ、ヒト由来血管内皮細胞が好ましい。ヒト由来血

管内皮細胞としては、ヒト臍帯静脈内皮細胞（Human Umbilical Vein Endothelial Cells：HUVEC）、 ヒト臍帯動脈内皮細胞（Human Umbilical Artery Endothelial Cells：HUAEC）、ヒト冠状動脈内皮細胞（Human Coronary Artery Endothelial Cells：HCAEC）、 ヒト伏在静脈内皮細胞（Human Saphenous Vein Endothelial Cells：HSaVEC）、 ヒト肺動脈内皮細胞（Human Pulmonary Artery Endothelial Cells：HPAEC）、 ヒト大動脈内皮細胞（Human Aortic Endothelial Cells：HAoEC）、ヒト皮膚微小血管内皮細胞（Human Dermal Microvascular Endothelial Cells：HDMEC）、 ヒト皮膚血管内皮細胞（Human Dermal Blood Endothelial Cells：HDBEC）、 ヒト皮膚リンパ管内皮細胞（Human Dermal Lymphatic Endothelial Cells：HDLEC）、 ヒト肺微小血管内皮細胞（Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells：HPMEC）、ヒト心臓微小血管内皮細胞（Human Cardiac Microvascular Endothelial Cells：HCMEC）、 ヒト膀胱微小血管内皮細胞（Human Bladder Microvascular Endothelial Cells：HBdMEC）、 ヒト子宮微小血管内皮細胞（Human Uterine Microvascular Endothelial Cells：HUtMEC）等が挙げられ、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）が好ましい。

[0021]（人工皮膚組織製造装置）

次に、上記の人工皮膚組織１を製造する人工皮膚組織製造装置について、図２乃至図６を参照して説明する。

図２は、人工皮膚組織製造装置３０の概略的な構成図である。

[0022] 人工皮膚組織製造装置３０は、灌流デバイス（人工三次元組織灌流デバイス）４０、培養皿５０およびポンプ６０を備えている。培養皿５０は、内部空間に灌流デバイス４０が載置される。ポンプ６０は、配管６１を介して灌流デバイス４０に培地を供給する。ポンプ６０は、灌流デバイス４０を介して培養空間４５に排出された培地Ｍを、配管６２を介して回収する。

[0023]（灌流デバイス４０の第１実施形態）

図３は、灌流デバイス４０の第１実施形態の外観斜視図である。灌流デバイス４０は、培養槽４１、コネクタ（支持部）４２、ワイヤー（線状部材、

流路形成部材）４３および伸展装置８０を備えている。図２に示すように、培養槽４１は、培養皿５０の内部に配置されている。図４は、伸展装置８０の図示を省略した灌流デバイス４０の外観斜視図である。

[0024] 図３および図４に示すように、培養槽４１は、側壁４４に囲まれ上下方向に貫通する培養空間４５を有する四角筒状に形成されている。側壁４４は、平面視で矩形状に設けられている。培養槽４４は、シリコンゴム等の可撓性材料で形成されている。培養空間４５の下端部は、底板４７（図７参照）によって閉塞・開放が切り替え可能である。底板４７は、後述するように、対向する側壁４４ａ、４４ｂの間に取り付け・取り外し自在に設けられている。培養空間４５は、底板４７を取り外すことで下端部が開放され、底板４７を取り付けることで下端部が閉塞される。

[0025] 図２に示すように、コネクタ４２は、装着部（筒部）４２ａ、接続部４２ｂ、係合部４２ｃおよび内部を貫通する貫通孔４２ｄを有している。装着部４２ａは軸状に形成され培養槽４１の側壁４４を貫通して装着されている。接続部４２ｂは、装着部４２ｂの一端に設けられている。接続部４２ｂは、培養槽４１の外側に配置され配管６１または配管６３（後述）に接続可能である。

[0026] 係合部４２ｃは、装着部４２ｂの他端に設けられている。係合部４２ｃは、培養槽４１の培養空間４５に側壁４４と隙間をあけて配置されている。図５は、係合部４２ｃを軸方向で視た正面図である。図６は、図５におけるＡ－Ａ線視断面図である。図５および図６に示すように、係合部４２ｃは、装着部４２ａの外周面と隙間をあけて同軸で配置された第２筒部４２ｅと、装着部４２ａの周方向に間隔をあけて配置された複数のリブ部４２ｆとを備えている。リブ部４２ｆは、装着部４２ａの外周面と第２筒部４２ｅの内周面とを接続する。リブ部４２ｆは、９０度間隔で４つ設けられている。装着部４２ａ、第２筒部４２ｅおよびリブ部４２ｆで囲まれた隙間４２ｇは、係合部４２ｃを軸方向に貫通している。

[0027] コネクタ４２は、対向する側壁４４のそれぞれに貫通孔４２ｄが同軸とな

る位置に複数対（図４では６対）装着される。３対のコネクタ４２は、第１方向に沿って配置され、他の３対のコネクタ４２は、第１方向とで水平方向で直交する第２方向に沿って配置されている。コネクタ４２のうち、少なくとも培養空間４５に露出する領域には、細胞外マトリックス成分１１に対する親液化処理が施されている。親液化処理としては、例えば、O_2プラズマ処理を採用できる。この親液化処理は、細胞の接着性を向上させる処理を兼ねている。

[0028] ワイヤー４３は、灌流流路１３を形成するために用いられる線状部材である。ワイヤー４３は、対向する側壁４４に同軸で装着されたコネクタ４２に取り付けおよび取り外し自在に支持される。ワイヤー４３は、コネクタ４２の貫通孔４２ｄに挿通（支持）されて培養空間４５の真皮組織層１０を配置する領域に懸架可能である。ワイヤー４３は、例えば、ポリアミド樹脂で形成されている。

[0029] 図２および図３に示すように、伸展装置８０は、挟持部８１、８２、クランク部８３、回転モータ８４および基台８５を備えている。基台８５は、培養皿５０の上部に一体的に固定されている。

[0030] 挟持部８１は、互いに対向する一対の側壁４４のうち、一方の側壁４４ａを厚さ方向の両側から挟持するように一体的に設けられている。挟持部８１は、側壁４４ａを高さ方向の全体に亘って挟持している。挟持部８１は、コネクタ４２が配置される領域に開口部８１ａを有している。挟持部８１に開口部８１ａが形成されていることにより、コネクタ４２は挟持部８１との干渉が回避されている。挟持部８１は、上端において基台８５に固定されている。

[0031] 挟持部８２は、互いに対向する一対の側壁４４のうち、側壁４４ａと対向する側壁４４ｂを厚さ方向の両側から挟持するように一体的に設けられている。挟持部８２は、側壁４４ｂを高さ方向の全体に亘って挟持している。挟持部８２は、コネクタ４２が配置される領域に開口部８２ａを有している。挟持部８２に開口部８２ａが形成されていることにより、コネクタ４２は挟

持部８２との干渉が回避されている。挟持部８２は、上端においてクランク部８３と連結されている。

[0032] クランク部８３は、長さ方向の一端側において、挟持部８２と、上下方向に延びる軸線周りに回転（揺動）可能に連結されている。クランク部８３は、長さ方向の他端側において、基台８５に固定された回転モータ８４と一体的に回転する回転部８４ａに、回転中心に対して偏心した位置で上記長さ方向について一体的に移動可能に連結されている。

[0033] 従って、伸展装置８０は、回転モータ８４が回転することにより、クランク部８３が回転部８４ａとの連結部の長さ方向の位置に応じて当該長さ方向に往復移動可能である。クランク部８３が長さ方向に移動することにより、クランク部８３と連結され側壁４４ｂを挟持する挟持部８２は、上記長さ方向に移動する。一方、側壁４４ａを挟持する挟持部８１は、基台８５に固定されている。そのため、可撓性材料で形成された培養槽４１は、挟持部８２の移動に応じて側壁４４ａ、４４ｂが対向する方向（以下、単に対向方向と称する）に弾性変形することにより、側壁４４ｂが対向方向に移動する。側壁４４ｂが対向方向に移動することにより、側壁４４ａ、４４ｂに対向して設けられたコネクタ４２同士の距離が増減することになる。

[0034] （人工皮膚組織１の製造方法）

次に、人工皮膚組織１の製造方法について、図７乃至図１５を参照して説明する。

本発明に係る人工皮膚組織（人工三次元組織）１の製造方法は、所定方向に延びる人工三次元組織１の製造方法であって、側壁４４に囲まれた培養空間４５を有する培養槽４１と、対向する側壁４４を貫いて培養空間４５に所定方向に沿って懸架されたワイヤー（線状部材、流路形成部材）４３とを備えた灌流デバイス（人工三次元組織灌流デバイス、デバイス）４０を準備することと、培養空間４５で細胞外マトリックス成分１１中の真皮細胞１２を培養して、ワイヤー４３が貫く真皮組織層１０を形成することと、真皮組織層１０からワイヤー４３を抜去して真皮組織層１０を貫通する灌流流路１３

を形成することと、灌流流路１３に培地を灌流させながら真皮組織層１０上に配置した表皮細胞２１を培養して表皮層２０を形成することと、少なくとも表皮細胞２１の培養時に、真皮組織層１０および表皮層２０に所定方向に沿った伸展と圧縮との少なくとも一方の刺激を付与することと、を含む。

[0035] 以下、人工皮膚組織１の製造方法について詳細に説明する。

図７乃至図１５においては、適宜、灌流デバイス４０のみを図示し、培養皿５０、ポンプ６０等の図示を省略している。また、図７以降においては、便宜上、伸展装置８０における挟持部８１、８２の図示を適宜省略し、底板４７についても理解を容易にするために、側壁４４に対して取り付けまたは取り外すものとして図示および説明する。

[0036] （灌流デバイス４０の準備）

灌流デバイス４０の準備としては、図７に示すように、上記の培養槽４１の対向する側壁４４に貫通孔４２ｄが同軸となるようにコネクタ４２を装着するとともに、側壁４４の下端部に底板４７を取り付けて培養空間４５の下端側開口を閉塞する。同軸となっている貫通孔４２ｄにワイヤー４３を挿通し、培養空間４５にワイヤー４３を懸架させる。

[0037] コネクタ４２のうち、少なくとも培養空間４５に露出する領域に親液化処理を施す。親液化処理は、培養槽４１に装着する前にコネクタ４２に実施してもよいし、側壁４４に装着したコネクタ４２に対して実施してもよい。

[0038] 側壁４４へのコネクタ４２の装着部の隙間、および底壁４６への底板４７の取付部の隙間をシールするために、シール材で培養空間４５に臨む培養槽４１の表面を被膜する。シール材としては、細胞外マトリックス成分１１、真皮細胞１２、表皮細胞２１に悪影響を与えない材料、一例として、ポリパラキシリレン（以下、パリレンと称する）が蒸着等の成膜方法により成膜される。シール材の膜厚としては、上記装着部の隙間および取付部の隙間に対して１／１００～１／１０であることが好ましい。また、シール材の膜厚は、上記装着部の隙間および取付部の隙間に対して１／５０～１／１０であることが好ましく、１／５０～１／２０であることがより好ましい。本実施形

態では、約５０μｍの隙間に対して２μｍの膜厚（１／２５）でシール材を成膜した。

[0039]（真皮組織層１０の形成）

灌流デバイス４０の準備が完了すると、真皮組織層１０を形成する。

真皮組織層１０の形成は、まず、図８に示すように、細胞外マトリックス成分１１と真皮細胞１２との混合物を培養槽４１の培養空間４５に注ぎ込む。混合物は、ワイヤー４３が浸漬される高さとなる量で注ぎ込まれる。本実施形態では、細胞外マトリックス成分１１としてコラーゲンが用いられている。

[0040] 細胞外マトリックス成分１１と真皮細胞１２との混合物が培養槽４１に注ぎ込まれると、混合物を所定条件で培養（インキュベーション）する。培養条件としては、真皮組織層１０の密度がヒトの真皮相当となる条件で行う。培養条件は、一例として、３７℃の温度下で２日間（４８時間）行った。

[0041] 培養によって細胞外マトリックス成分１１は収縮する。細胞外マトリックス成分１１は、係合部４２ｃに係合しているため、積層方向の収縮は拘束されないが、第１方向および第２方向の収縮は拘束される。より詳細には、図６に示されるように、細胞外マトリックス成分１１は、培養空間４５の中心とは逆側から係合部４２ｃの第２筒部４２ｅ、リブ部４２ｆに係合しているため、第２筒部４２ｅ、リブ部４２ｆが障壁となって中心側への収縮が抑制される。また、細胞外マトリックス成分１１は、積層方向への収縮により、第２筒部４２ｅの外周面、装着部４２ａの先端側の外周面に圧着されることになる。従って、細胞外マトリックス成分１１と係合部４２ｃとの間の摩擦力が大きくなり、第１方向および第２方向への収縮に対する抵抗力が大きくなる。特に、本実施形態では、係合部４２ｃが細胞外マトリックス成分１１に対する親液化処理が施されているため、細胞外マトリックス成分１１は、より大きな密着力で係合部４２ｃに密着し第１方向および第２方向への収縮に対する抵抗力が大きくなる。

[0042] 細胞外マトリックス成分１１と真皮細胞１２との混合物の培養が完了する

ことにより、図９に示すように、積層方向が収縮し、第１方向および第２方向の収縮が抑制され、内部をワイヤー４３が貫く真皮組織層１０が形成される。

[0043]（灌流流路１３および管腔層１５の形成）

次に、コネクタ４２に支持されているワイヤー４３を抜去する。これにより、図１０に示すように、真皮組織層１０には、第１方向に延びる空洞である灌流流路１３が形成される。このとき、真皮組織層１０は、両端部において係合部４２ｃに係合しているため、ワイヤー４３の抜去時にコネクタ４２から脱離することなく安定してコネクタ４２に支持される。

[0044] 次に、図１１に示すように、コネクタ４２の貫通孔４２ｄを介して、灌流流路１３に臨む真皮組織層１０の表面に血管系細胞１４を注入（播種）し一定時間培養することにより、管腔層１５を形成する。これにより、灌流流路１３は、管腔層１５に囲まれた状態となる。

[0045]（表皮層２０の形成）

次に、表皮層２０を形成するための準備を行う。

図１２に示すように、培養槽４１から底板４７を取り外すとともに、図２に示したように、培養槽４１を培養皿５０の内部に載置する。次いで、第１方向の一方側のコネクタ４２の接続部４２ｂに配管６１を接続し、第１方向の他方側のコネクタ４２の接続部４２ｂに配管６３を接続する。各側の接続部４２ｂに接続する配管６１または配管６３については３つのコネクタ４２全てに接続してもよいし、一部のみに接続してもよい。

[0046] 表皮層２０を形成するための準備が完了すると、真皮組織層１０上に表皮細胞２１を播種する。表皮細胞２１が播種されると、ポンプ６０から配管６１および貫通孔４２ｄを介して培地Ｍを灌流流路１３に灌流させながら表皮細胞２１を培養する。表皮細胞２１の培養は、表皮細胞２１を気体に曝しながら、灌流流路１３の培地Ｍを真皮組織層１０を介して拡散させる気液培養により行われる。これにより、図１３に示すように、表皮細胞２１が分化誘導されて表皮層２０を形成することができる。表皮層２０を形成する際の培

養条件は、一例として、３７℃の温度下で９日間行った。

[0047] 一方のコネクタ４２を介して灌流流路１３に灌流された培地Ｍは、他方のコネクタ４２および配管６３を介して培養皿５０の内部空間に排出される。また、灌流流路１３から真皮組織層１０に拡散した培地Ｍの一部は、培養槽４１の開口部４６ａおよび溝部４６ｃを介して培養皿５０の内部空間に排出される。培養皿５０に排出された培地Ｍは、配管６２を介して回収される。ポンプ６０からの培地Ｍの供給量と、配管６２を介しての培地Ｍの回収量とは、表皮層２０の培養時に真皮組織層１０の下側が培地Ｍに浸漬され、表皮細胞２１が空気に曝されるように培養皿５０内の培地Ｍの液位が保たれる値に設定される。

[0048] 表皮層２０を形成する際には、上述したように、伸展装置８０における回転モータ８４が回転しクランク部８３、挟持部８２および側壁４４ｂが長さ方向に移動することにより、側壁４４ｂに設けられたコネクタ４２が、固定状態の側壁４４ａに設けられたコネクタ４２に対して離間または接近する方向に移動する。回転モータ８４が回転したときにクランク部８３と回転部８４ａとの連結部が側壁４４ａから離れる方向に移動する際には、図１４に示すように、側壁４４ｂに設けられたコネクタ４２は、固定状態の側壁４４ａに設けられたコネクタ４２に対して離間する方向に移動するため、コネクタ４２に支持された真皮組織層１０および表皮層２０に対しては伸展の刺激が付与される。

[0049] 一方、回転モータ８４が回転したときにクランク部８３と回転部８４ａとの連結部が側壁４４ａに接近する方向に移動する際には、図１５に示すように、側壁４４ｂに設けられたコネクタ４２は、固定状態の側壁４４ａに設けられたコネクタ４２に対して接近する方向に移動するため、コネクタ４２に支持された真皮組織層１０および表皮層２０に対しては、伸展の状態からの圧縮の刺激が付与される。

[0050] 上記の真皮組織層１０および表皮層２０に対する伸展の刺激と、圧縮（または伸展からの解放）の刺激とは、所定の周波数で付与される。当該周波数

としては、例えば、０．０３Ｈｚ以上、０．２５Ｈｚ以下が好ましい。周波数が上記下限値を下回る場合には、周期が長くなり刺激を付与した効果が十分に得られない可能性がある。周波数が上記上限値を上回る場合には、周期が短くなり所定厚さの表皮層２０が得られない可能性がある。

[0051] 上記の真皮組織層１０および表皮層２０に対する伸展または圧縮させる量としては、側壁４４ａ、４４ｂに設けられたコネクタ４２間の距離に対して±２０％の歪量が好ましく、±１０％の歪量がより好ましい。

[0052] （評価方法）

本発明は、さらにその他の態様として、本発明の人工皮膚組織１を用いた薬剤の皮膚に対する刺激性を評価する方法に関する。本発明における薬剤とは、医薬品等の薬物、化粧品や医薬部外品等を含む。１本発明の評価方法によれば、例えば、従来の方法と比較して実際の皮膚に近い環境で薬剤の評価を行うことができる。また、本発明の評価方法は、例えば、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である。

[0053] 本発明の評価方法は、例えば、薬剤を前記人工皮膚組織と接触させること、及び、薬剤の接触による刺激に対する応答を測定することにより行うことができる。応答の測定は、例えば、経皮電気抵抗を測定すること等によって行うことができる。薬剤は、評価対象となる物質のことをいい、例えば、無機化合物及有機化合物等が挙げられる。

[0054] ［実施例］

図１６（ａ）、（ｂ）は、上述の製造方法により真皮組織層１０上に表皮層２０が培養された人工皮膚組織１の断面を示す写真図である。図１６（ａ）は、上述した伸展の刺激を０．１Ｈｚ、歪量を±５％で付与した場合の結果を示す写真図である。図１６（ｂ）は、上述した伸展の刺激を付与しなかった場合の結果を示す写真図である。

[0055] 図１６（ａ）、（ｂ）に示されるように、伸展の刺激を付与しなかった場合には、厚さが約２２μｍの表皮層が培養されたのに対して、伸展の刺激を

付与した場合には、厚さが約５３μｍの表皮層が培養されたことを確認できた。

[0056] 図１７（ａ）、（ｂ）、（ｃ）は、培地Ｍの灌流を行わない状態で真皮組織層１０上に表皮層２０を培養した人工皮膚組織１の断面を示す写真図である。図１７（ａ）は、伸展の刺激を０．０６Ｈｚ、歪量を±１０％で付与した場合の結果を示す写真図である。図１７（ｂ）は、伸展の刺激を０．１Ｈｚ、歪量を±１０％で付与した場合の結果を示す写真図である。図１７（ｃ）は、伸展の刺激を０．２Ｈｚ、歪量を±１０％で付与した場合の結果を示す写真図である。

[0057] 図１７（ａ）、（ｂ）、（ｃ）に示されるように、伸展の刺激を０．０６Ｈｚで付与した場合には約１２４μｍの厚さで表皮層が培養され、伸展の刺激を０．１Ｈｚで付与した場合には約３９μｍの厚さで表皮層が培養され、伸展の刺激を０．２Ｈｚで付与した場合には約４３μｍの厚さで表皮層が培養されたことを確認できた。

[0058] 図１８（ａ）、（ｂ）、（ｃ）は、培地Ｍの灌流を行わない状態で真皮組織層１０上に表皮層２０を培養した人工皮膚組織１の断面を示す蛍光画像である。図１８（ａ）は、伸展の刺激を０．０６Ｈｚ、歪量を±１０％で付与した場合の結果を示す蛍光画像である。図１８（ｂ）は、伸展の刺激を０．１Ｈｚ、歪量を±１０％で付与した場合の結果を示す蛍光画像である。図１８（ｃ）は、伸展の刺激を０．２Ｈｚ、歪量を±１０％で付与した場合の結果を示す蛍光画像である。

[0059] 図１８（ａ）、（ｂ）、（ｃ）に示されるように、表皮層２０のうち真皮組織層１０側にケラチン１５（Keratin15）で形成された基底部２０ａが培養され、表皮層２０のうち表面側にケラチン１０（Keratin10）で形成された表層部２０ｂが培養されたことを観察できた。

[0060] 上述の製造方法により形成した人工皮膚組織１について、ロバスト性として反発力を測定した。反発力の測定は、図１９に示すように、灌流デバイス４０に支持された人工皮膚組織１の裏面側を支持し、表皮層２０を圧縮する

フォースゲージＦＧを用い、人工皮膚組織１を所定量圧縮した際の反発力を測定した。

[0061] 図２０は、上述した伸展の刺激を付与して形成した表皮層と、伸展の刺激を付与せずに形成した表皮層について、フォースゲージＦＧにより圧縮して３００μｍの変位を生じさせた際の反発力を測定した結果である。図２１は、上述した伸展の刺激を付与して形成した表皮層と、伸展の刺激を付与せずに形成した表皮層について、フォースゲージＦＧにより圧縮して５００μｍの変位を生じさせた際の反発力を測定した結果である。図２０に示されるように、伸展の刺激を付与して形成した表皮層は、変位３００μｍでは伸展の刺激を付与せずに形成した表皮層よりも２倍以上の反発力が計測された。また、図２１に示されるよに、伸展の刺激を付与して形成した表皮層は、変位５００μｍでは伸展の刺激を付与せずに形成した表皮層よりも１．６倍程度の反発力が計測された。いずれの場合についても、伸展の刺激を付与して表皮層を形成した場合は、伸展の刺激を付与しない場合と比較して大きな頑健性を有することが確認できた。

[0062] 図２２は、培地Ｍの灌流を行わない状態で、伸展の刺激を０．２Ｈｚ、歪量を±１０％で付与して真皮組織層１０上に表皮層２０を培養した人工皮膚組織１における表皮層２０の表面状態を示す写真図である。図２２に示されるように、本実施形態の製造法で形成された表皮層２０の表面には、伸展方向および当該伸展方向と直交する方向に延びる皺部が形成されたことを確認できた。従って、本実施形態に係る人工皮膚組織１は、より人体に近い表皮層２０を有するものとなる。

[0063] 図２３は、灌流デバイス４０を用いて人工皮膚組織１の経皮吸収特性を計測する機構を概略的に示す図である。図２３に示すように、人工皮膚組織１における表皮層２０上にはリザーバー４９が載置されている。経皮吸収特性の計測には、一例として、カフェインおよびＩＳＤＮ（二硝酸イソソルビド）を含む溶液Ｌを用いる。溶液Ｌには、一例として、９．４μｍｏｌのカフェインおよび３．８μｍｏｌのＩＳＤＮが含まれている。この溶液Ｌは、リ

ザーバー４９に貯留される。

[0064] 人工皮膚組織１の経皮吸収特性は、リザーバー４９から人工皮膚組織１を浸透して人工皮膚組織１の下方に到達した培地ＭＡと、リザーバー４９から人工皮膚組織１および灌流流路１３を浸透して灌流によりコネクタ４２の貫通孔４２ｄに到達した培地ＭＢとについて、カフェインおよびＩＳＤＮの物質量を計測した。また、灌流流路１３の内皮機能性を確認するために、血管内皮増殖因子の有無のそれぞれの状態で計測した。

[0065] 図２４は、人工皮膚組織１の経皮吸収特性を計測した結果を示す図であり、灌流開始からの経過時間を横軸とし、培地ＭＡ、ＭＢの初期量を基準としたカフェインまたはＩＳＤＮの物質量を縦軸として示している。図２４（Ａ）には、培地ＭＡにおいて計測されたカフェインの物質量と時間との関係が示されている。図２４（Ｂ）には、培地ＭＡにおいて計測されたＩＳＤＮの物質量と時間との関係が示されている。図２４（Ｃ）には、培地ＭＢにおいて計測されたカフェインの物質量と時間との関係が示されている。図２４（Ｄ）には、培地ＭＢにおいて計測されたＩＳＤＮの物質量と時間との関係が示されている。各図においては、血管内皮増殖因子の有無毎（無；-□-、有；-●-で示されている）の関係が示されている。

[0066] 図２４に示されるように、培地ＭＡ、ＭＢのいずれについてもカフェインおよびＩＳＤＮが計測されたことから、真皮組織層１０、表皮層２０、灌流流路１３のいずれも経皮吸収特性を有することが確認できた。また、培地ＭＡにおいては、血管内皮増殖因子が無い状態の方が有る状態よりも多くのカフェインおよびＩＳＤＮが計測され、培地ＭＢにおいては、血管内皮増殖因子が有る状態の方が無い状態よりも多くのカフェインおよびＩＳＤＮが計測されたことから灌流流路１３が内皮機能性を有することが確認できた。

[0067]（灌流デバイス４０Ａの第２実施形態）

続いて、灌流デバイス４０Ａの第２実施形態について、図２５乃至図３１を参照して説明する。

これらの図において、図１乃至図２４に示す第１実施形態の構成要素と同

一の要素については同一符号を付し、その説明を省略または簡略化する。

第１実施形態では平面状の人工皮膚組織１を製造する場合を例示したが、第２実施形態では、断面形状が曲面の人工皮膚組織１を製造する例を用いて説明する。

[0068] 図２５は、培養槽４１に生体モデルＦが設けられた灌流デバイス４０Ａの概略的な斜視図である。生地モデルＦは、指を模したモデルである。図２６は、生体モデルＦの長さ方向（所定方向、第１方向）を含む鉛直面で断面した図である。図２７～図３１は、生体モデルＦの長さ方向と直交する面で断面した図である。

[0069] 図２６および図２７に示されるように、生体モデルＦは、背側の表面を曲面部７０として培養槽４１の底壁４６から培養空間４５に露出して設けられている。培養槽４１の底壁４６と生体モデルＦとの接合部は、細胞外マトリックス成分１１、真皮細胞１２、表皮細胞２１に悪影響を与えない材料、一例として、ポリパラキシリレン（以下、パリレンと称する）が蒸着等の成膜方法により成膜されてシールされている。ワイヤー４３は、第１方向に関する曲面部７０の傾斜に応じて、指先側が低くなるように懸架されている。図２７に示されるように、ワイヤー４３は、生体モデルＦの周方向に間隔をあけて複数（図２７では５本）設けられている。各ワイヤー４３と生体モデルＦとの距離は、ワイヤー４３と生体モデルＦとの間に形成される真皮組織層１０の厚さが所定値を確保できる距離に設定されている。なお、ワイヤー４３の本数は、表皮層２０の幅（周方向の長さ）に応じて適宜決定される。

[0070] なお、図２６および図２７では図示を省略しているが、ワイヤー４３の数に応じてコネクタ４２は、側壁４４に５対（合計１０本）設けられている。また、伸展装置８０における挟持部８１、８２は、図２６に示すように、対向する側壁４４ａ、４４ｂの上部をそれぞれ挟持している。

他の構成は、上記第１実施形態の灌流デバイス４０と同様である。

[0071] （人工皮膚組織１の製造方法）

続いて、上記の灌流デバイス４０Ａを用いて人工皮膚組織１を製造する方

法について説明する。ここでは、灌流デバイス４０Ａの準備は完了しているものとして説明する。

まず、真皮組織層１０を形成するために、図２７に示すように、細胞外マトリックス成分１１と真皮細胞１２との混合物を培養槽４１の培養空間４５に注ぎ込む。混合物は、ワイヤー４３が浸漬される高さとなる量で注ぎ込まれる。

[0072] 細胞外マトリックス成分１１と真皮細胞１２との混合物が培養槽４１に注ぎ込まれると、混合物を所定条件で培養する。培養された細胞外マトリックス成分１１と真皮細胞１２との混合物は、ワイヤー４３が懸架された方向の収縮が抑えられ、他の方向については収縮するため、図２８に示されるように、曲面部７０に沿った形状の真皮組織層１０が形成される。

[0073] 次に、ワイヤー４３を抜去することにより、図２９に示されるように、真皮組織層１０に複数（本実施形態では５つ）の灌流流路１３が形成される。続いて、灌流流路１３に臨む真皮組織層１０の表面に血管系細胞１４を注入（播種）し一定時間培養することにより、管腔層１５を形成する。

[0074] 次に、図３０に示すように、真皮組織層１０上に表皮細胞２１を播種する。表皮細胞２１が播種されると、培地Ｍを灌流流路１３に灌流させながら表皮細胞２１を気液培養する。表皮細胞２１の培養中には、側壁４４ｂを挟持する挟持部８２が側壁４４ａに対して離間または接近する方向に移動することにより、コネクタ４２に支持された真皮組織層１０および表皮層２０に対しては、伸展の状態からの圧縮の刺激が付与される。

[0075] これにより、図３１に示されるように、表皮細胞２１が分化誘導されて表皮層２０を形成することができる。本実施形態では、真皮組織層１０および表皮層２０が曲面部７０に沿った曲面形状の人工皮膚組織１が得られる。本実施形態では、伸展の刺激を付与しなかった場合と比較して厚い表皮層２０を有する人工皮膚組織１が得られる。

[0076] このように、本実施形態では、上記第１実施形態の灌流デバイス４０を用いた場合と同様の作用・効果が得られることに加えて、生体モデルＦの曲面

部７０に沿った形状で厚い表皮層２０を有する高品質の人工皮膚組織１を容易に製造することができる。従って、本実施形態では、所望部位の生体モデルＦを用意して用いることにより、所望部位の形状で厚い表皮層２０を有する高品質の人工皮膚組織１を容易に得ることができる。

[0077] 本実施形態では、伸展方向および当該伸展方向と直交する方向に延びる皺部が形成されより人体に近く大きな反発力の表皮層２０を有するとともに、内皮機能性を有する灌流流路１３を備える人工皮膚組織１を容易に得ることができる。

[0078] 以上、本発明の好ましい実施の形態について詳述したが、本発明はかかる特定の実施の形態に限定されるものではなく、特許請求の範囲内に記載された本発明の要旨の範囲内において、種々の変形・変更が可能である。

[0079] 例えば、上記実施形態では、人工皮膚組織１として指の皮膚組織を例示して説明したが、上述したように、他の部位の皮膚組織を人工的に製造する際にも本発明を適用可能である。

[0080] また、上記実施形態では、人工三次元組織として人工皮膚組織を例示したが、この構成に限定されるものではなく、他の人工組織についても本発明を適用可能である。

[0081] また、上記実施形態では、係合部４２ｃの親液化処理としてO_2プラズマ処理を処理を例示したが、これに限定されるものではなく、他の親液化処理を採ってもよい。係合部４２ｃへの細胞外マトリックス成分１１と真皮細胞１２との混合物の密着性を高める方法として、親液化処理ではなく、例えば皮膚用の接着剤を用いてもよい。皮膚用の接着剤を用いる場合には、細胞外マトリックス成分１１および真皮細胞１２に悪影響が及ばない材料のものを選択することが好ましい。

[0082] また、上記実施形態では、灌流流路１３を形成するための流路形成部材として線状部材であるワイヤー４３を用いる構成を例示したが、ワイヤー４３の他に、例えば、ゲル材またはポリマーで作製した細胞付きあるいは細胞入り３のファイバーを用いる構成であってもよい。この構成を採って、例えば

、細胞として血管系細胞１４を含む流路形成部材を用いることにより、血管系細胞１４を注入する工程を別途設ける必要がなくなり、製造効率を向上させることが可能となる。灌流流路１３としては、線状である構成に限られない。例えば、面状部材を流路形成部材として用いることにより、面状の灌流流路を形成することも可能である。この場合、灌流させる培地の流量を多くすることが可能となり、養分供給効率を高めることで一層高品質の人工皮膚組織を製造することができる。面状の流路形成部材としては、例えば、メッシュ材を用いることができる。

[0083] また、上記実施形態では、真皮組織層１０および表皮層２０に対してワイヤー４３あるいは灌流流路１３が延びる方向に伸展・圧縮の刺激を付与する構成を例示したが、この構成に限定されない。例えば、図２６に示した生体モデルＦの背側の曲面部７０に沿って、図３１に示した真皮組織層１０および表皮層２０を培養する際には、真皮組織層１０および表皮層２０に対して曲面部７０に沿って伸展・圧縮の刺激を付与する構成としてもよい。さらに、真皮組織層１０および表皮層２０を積層方向に屈曲させることにより伸展・圧縮の刺激を付与する構成としてもよい。上記の場合には、真皮組織層１０および表皮層２０のうち、湾曲中心あるいは屈曲中心に近い側の層に圧縮の刺激を付与し、遠い側の層に伸展の刺激を付与することができる。

[0084] 上記実施形態では、表皮細胞２１を培養して表皮層２０を形成するための培地を灌流させるために灌流流路１３を用いる構成を例示したが、この構成に限定されるものではない。例えば、組織表面（例えば表皮層２０）に薬剤を塗布し、当該薬剤の灌流流路１３への取り込みを評価するために灌流流路１３を用いる等の構成であってもよい。また、灌流流路１３を流れる培地中に薬剤を混入させ、当該薬剤が灌流流路１３から真皮組織層１０または表皮層２０への拡散を評価するために灌流流路１３を用いる等の構成であってもよい。このような構成で灌流流路１３を用いる場合には、表皮層２０を形成する前に灌流流路１３を形成する必要はなく、表皮層２０を形成した後に灌流流路１３を形成する手順であってもよい。また、評価対象を、例えば、

真皮組織層１０のみとする場合には、表皮層２０を形成する必要もなくなる。

[0085] また、上記実施形態では、人工三次元組織として人工皮膚組織１を例示したが、これに限定されるものではない。人工三次元組織としては、例えば、上述した線維芽細胞の代わりに、骨格筋細胞または心筋細胞を用いた筋組織であってもよい。さらに、肝細胞を用いた肝臓組織や膵臓系細胞を用いた膵臓組織等の消化器系組織、腎臓系細胞を用いた腎臓組織等の泌尿器系組織、神経系細胞を用いた神経組織であってもよい。このような組織に本発明を適用する場合には、上記実施形態で用いた細胞外マトリクスは必ずしも存在していなくてもよく、各種細胞のみを集積したものであってもよい。

産業上の利用可能性

[0086] 本発明によれば、高品質の人工三次元組織とその製造方法、人工三次元組織灌流デバイス、人工三次元組織を用いた薬剤評価方法を提供できる。このため、本発明は、例えば、化粧品、医薬、製薬等の分野において有用である。

符号の説明

[0087] １…人工皮膚組織（人工三次元組織）、 １０…真皮組織層（第１組織層）、 １１…細胞外マトリックス成分、 １２…真皮細胞（線維芽細胞、第１細胞）、 １３…灌流流路、 １４…血管系細胞、 １５…管腔層、 ２０…表皮層（第２組織層）、 ２１…表皮細胞（第２細胞）、 ４０、４０Ａ…灌流デバイス（人工三次元組織灌流デバイス）、 ４１…培養槽、 ４２…コネクタ（支持部）、 ４２ａ…装着部（筒部）、 ４２ｃ…係合部、 ４２ｅ…第２筒、 ４２ｆ…リブ部、 ４３…ワイヤー（線状部材、流路形成部材）、 ４４…側壁、 ４５…培養空間、 ４６…底壁（底部）、 ７０…曲面部、 Ｆ…生体モデル、 Ｍ…培地

請求の範囲

[請求項1] （灌流流路＋伸展or圧縮）

所定方向に延びる人工三次元組織の製造方法であって、

側壁に囲まれた培養空間を有する培養槽と、対向する前記側壁を貫いて前記培養空間に前記所定方向に沿って懸架された流路形成部材とを備えた灌流デバイスを準備することと、

前記培養空間で第１細胞を培養して、前記流路形成部材が貫く第１組織層を形成することと、

前記第１組織層から前記流路形成部材を抜去して前記第１組織層を貫通する灌流流路を形成することと、

前記灌流流路に培地を灌流させながら前記第１組織層上に配置した第２細胞を培養して第２組織層を形成することと、

少なくとも前記第２細胞の培養時に、前記第１組織層および前記第２組織層に伸展と圧縮との少なくとも一方の刺激を付与することと、

を含むことを特徴とする人工三次元組織の製造方法。

[請求項2] 前記刺激を所定の周波数で付与することを特徴とする請求項１記載の人工三次元組織の製造方法。

[請求項3] 前記対向する側壁にそれぞれ設けた係合部に前記第１組織層の一部を係合させて前記所定方向への収縮を抑えながら前記第１組織層を形成することを特徴とする請求項１または２記載の人工三次元組織の製造方法。

[請求項4] 前記培養槽を可撓性材料で形成し、

前記対向する側壁を前記所定方向に撓ませることにより、前記係合部を介して前記刺激を付与することを特徴とする請求項３記載の人工三次元組織の製造方法。

[請求項5] 前記第１細胞を培養して前記第１組織層を形成することは、細胞外マトリックス成分中の真皮細胞を培養して真皮組織層を形成することを含み、

前記第２細胞を培養して前記第２組織層を形成することは、前記真皮組織層上に表皮細胞を配置し表皮層を形成することを含むことを特徴とする請求項１から４のいずれか一項に記載の人工三次元組織の製造方法。

[請求項6] 前記刺激を付与することにより、前記表皮層の表面に前記刺激の付与方向に応じた方向に延びる皺部を形成することを特徴とする請求項５記載の人工三次元組織の製造方法。

[請求項7] 前記培養槽の底部に、前記所定方向に沿って延びる生体モデルの一部である曲面部を設け、

前記人工三次元組織を前記曲面部上に形成することを特徴とする請求項１から６のいずれか一項に記載の人工三次元組織の製造方法。

[請求項8] 請求項１から７のいずれか一項に記載の製造方法で人工三次元組織を製造することと、

薬剤を前記人工三次元組織に接触させることと、

前記薬剤の接触による刺激に対する前記人工三次元組織の応答、または前記人工三次元組織に対する前記薬剤の浸透性を測定することと、

を含むことを特徴とする人工三次元組織を用いた薬剤評価方法。

[請求項9] 所定方向に延びる人工三次元組織に灌流が行われる人工三次元組織灌流デバイスであって、

側壁に囲まれた培養空間を有する培養槽と、

対向する前記側壁を貫いて前記培養空間における前記人工三次元組織を配置する領域に前記所定方向に沿って懸架される流路形成部材を取り付けおよび取り外し自在に支持する支持部と、

前記対向する側壁のそれぞれに設けられ、前記人工三次元組織に係合して前記人工三次元組織の前記所定方向への収縮を抑える係合部と、

前記人工三次元組織に伸展と圧縮との少なくとも一方の刺激を付与

する刺激付与部と、

を備えることを特徴とする人工三次元組織灌流デバイス。

[請求項10] 前記培養槽の底部に、前記所定方向に沿って延びる生体モデルの一部である曲面部が設けられ、

前記人工三次元組織は前記曲面部上に配置されることを特徴とする請求項９記載の人工三次元組織灌流デバイス。

[請求項11] 所定方向に延びる人工三次元組織であって、

内部を貫通し前記所定方向に延びる灌流流路と、

表面に前記所定方向に応じた方向に延びる皺部と、

を有することを特徴とする人工三次元組織。

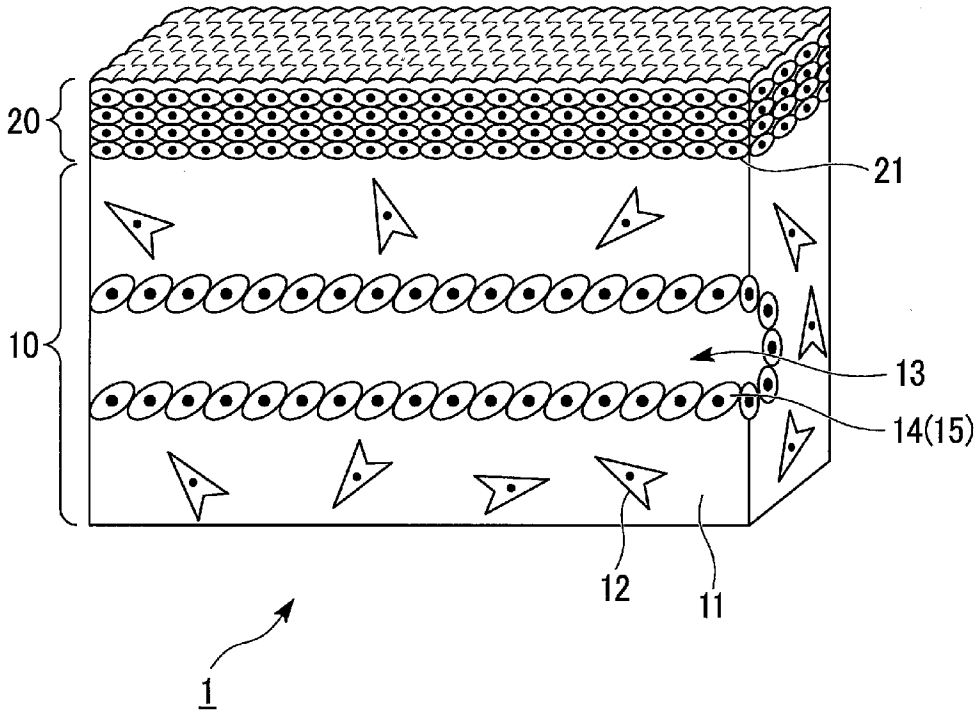
[請求項12] 細胞外マトリックス成分および真皮細胞を含む真皮組織層と、

表皮細胞を含み前記真皮組織層上に形成された表皮組織層とを含み、

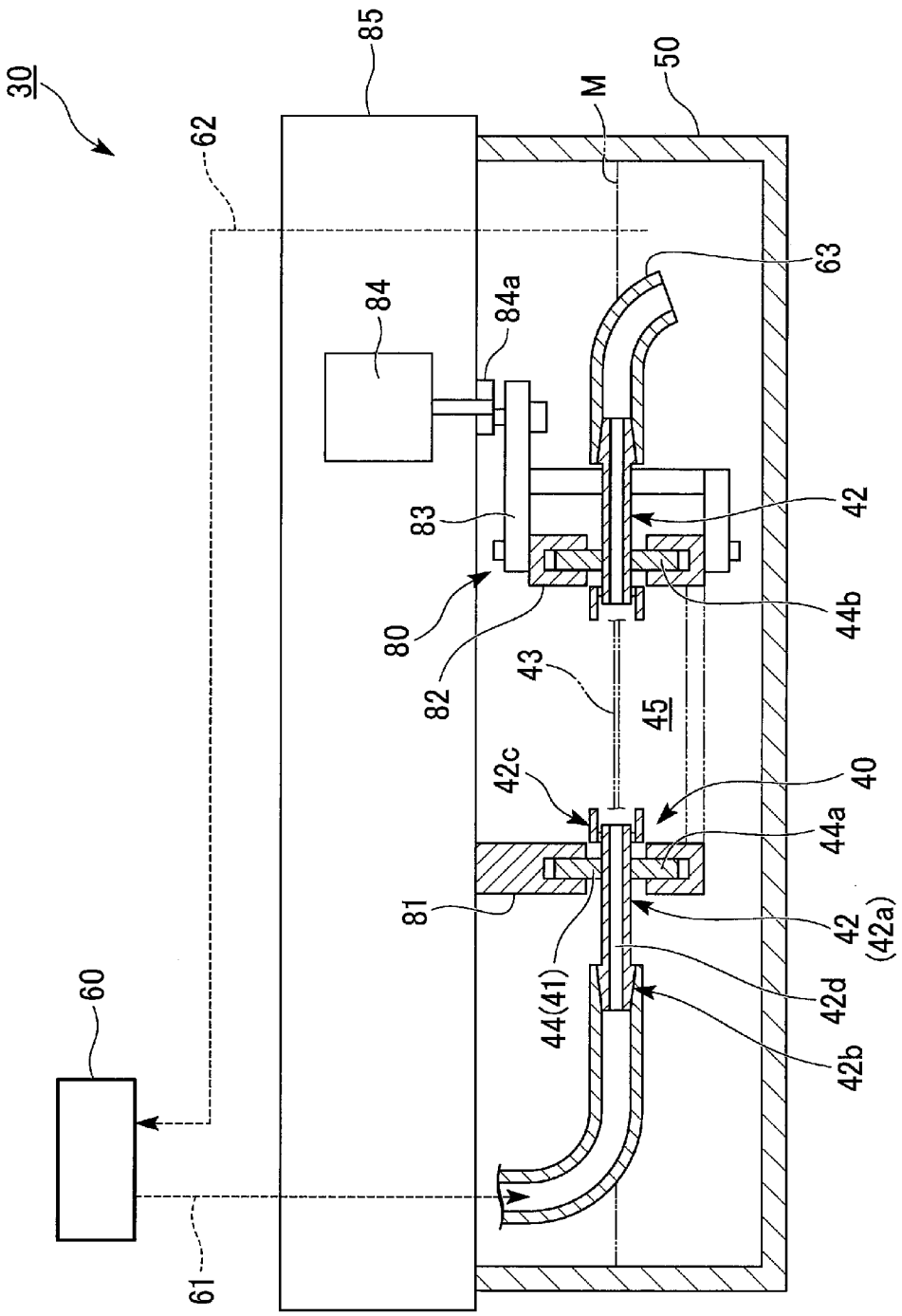
前記灌流流路は、前記真皮組織層の内部を貫通し前記所定方向に延び、

前記皺部は、前記表皮組織層の表面に前記所定方向に応じた方向に延びて形成されていることを特徴とする請求項１１記載の人工三次元組織。

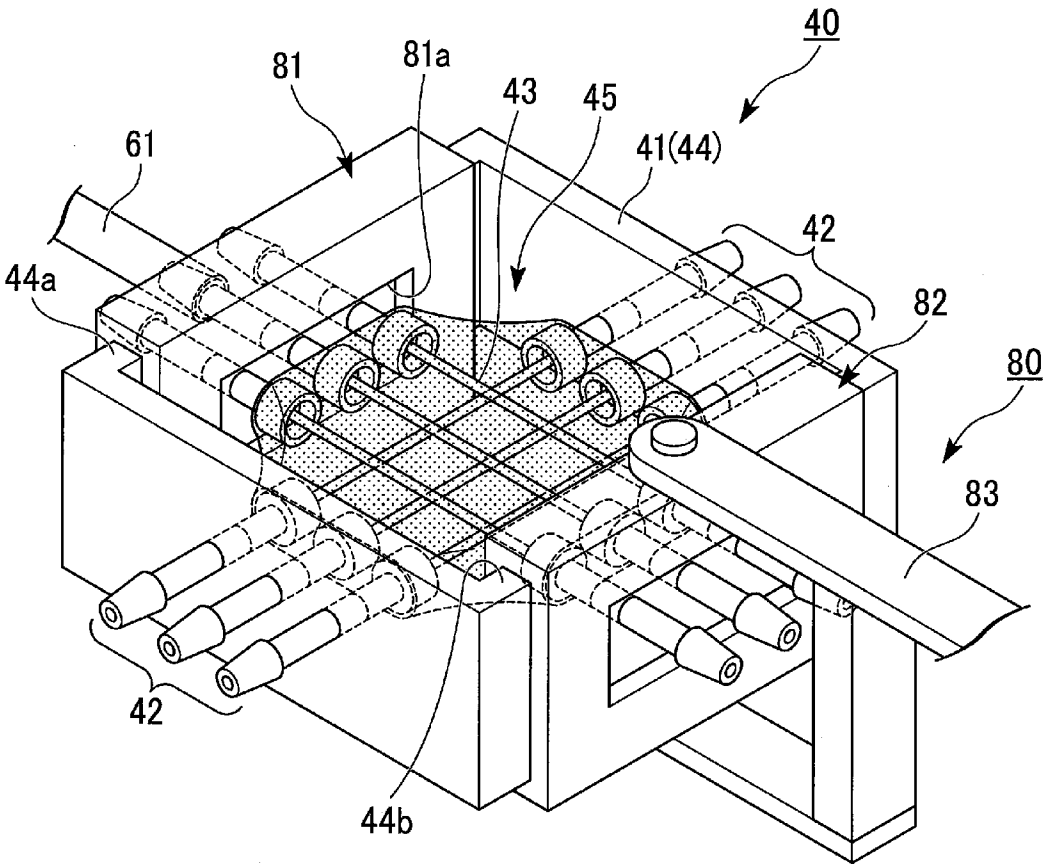
[図1]



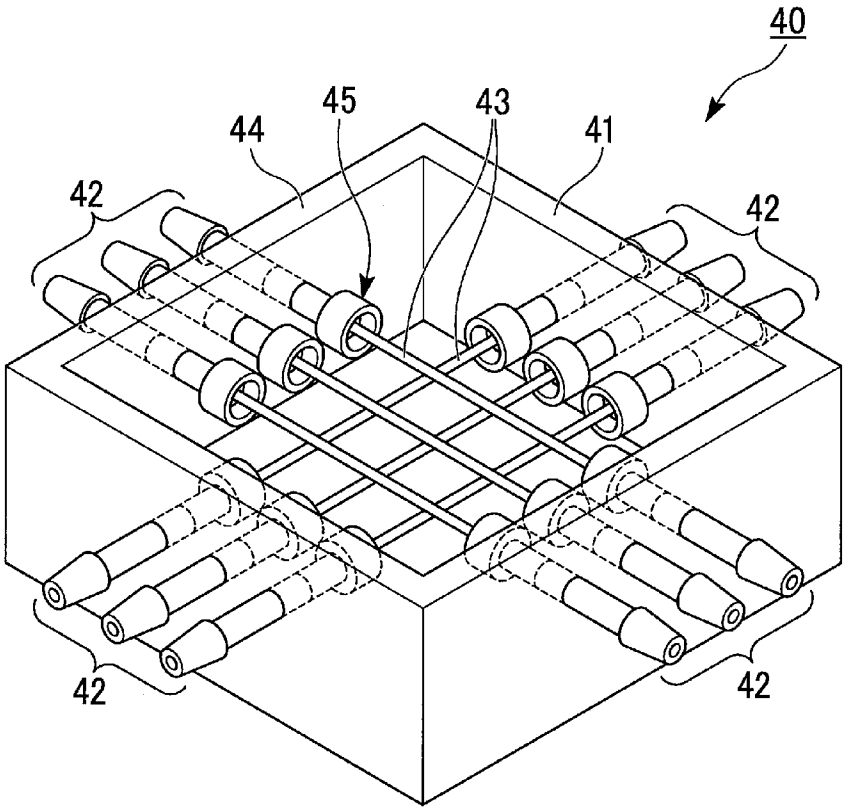
[図2]


30
85
62
M
50
63
84
84a
83
42
80
44b
82
43
45
42c
40
44a
81
42
(42a)
44(41)
42d
42b
60
61

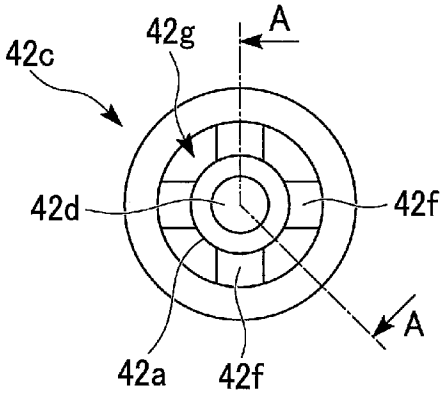
[図3]



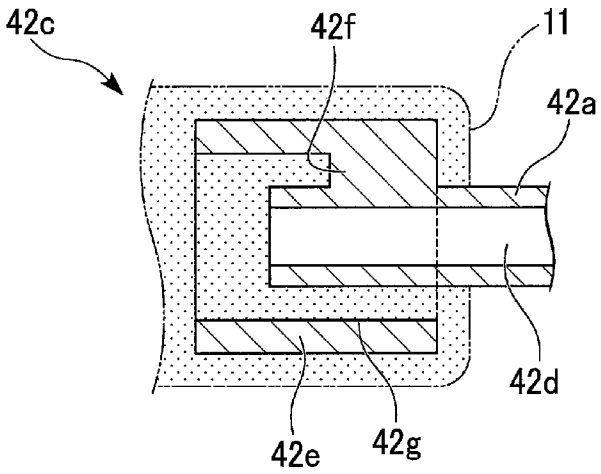
[図4]



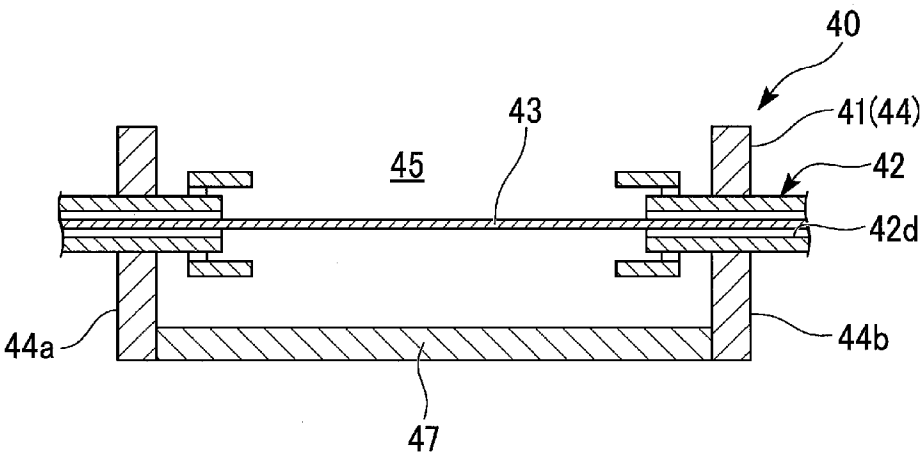
[図5]



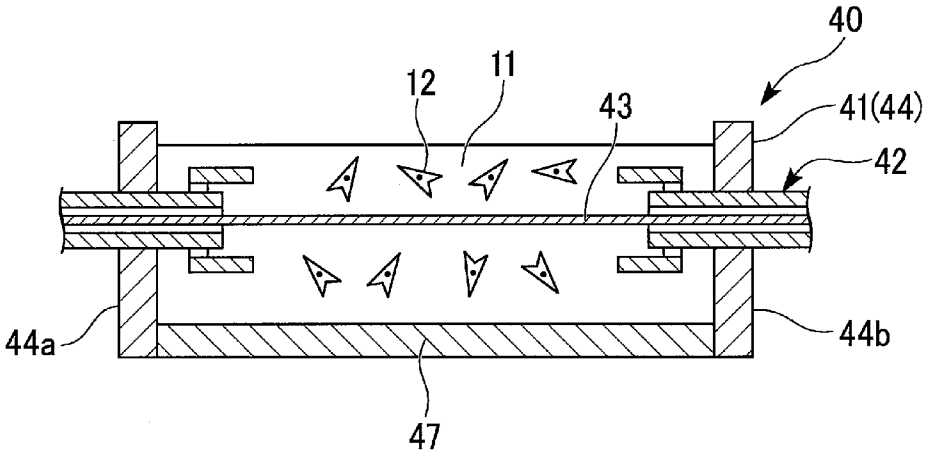
[図6]



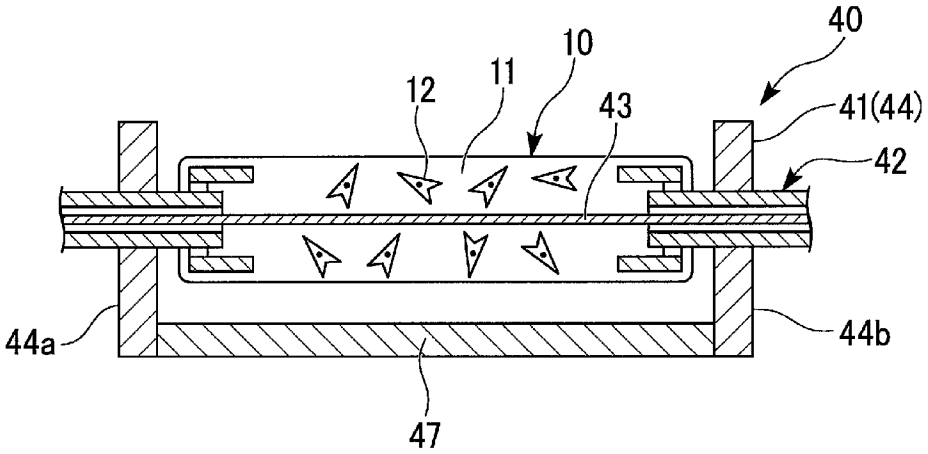
[図7]



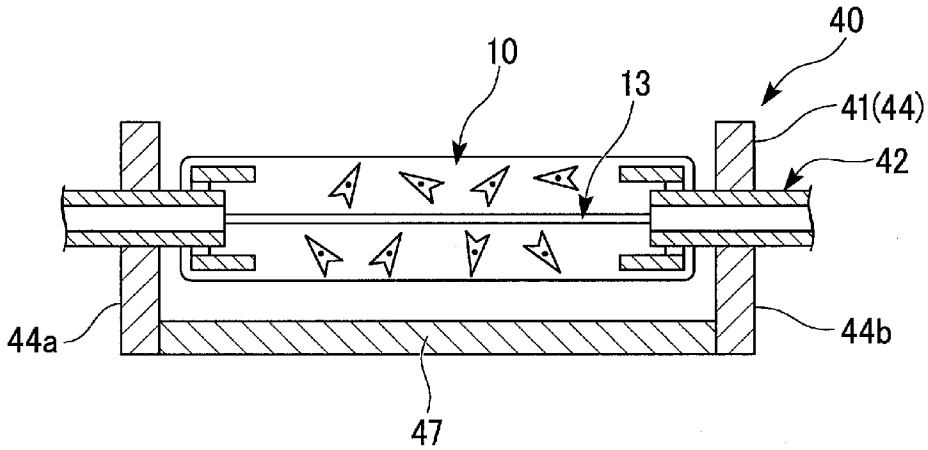
[図8]


40
12
11
43
41(44)
42
44a
44b
47

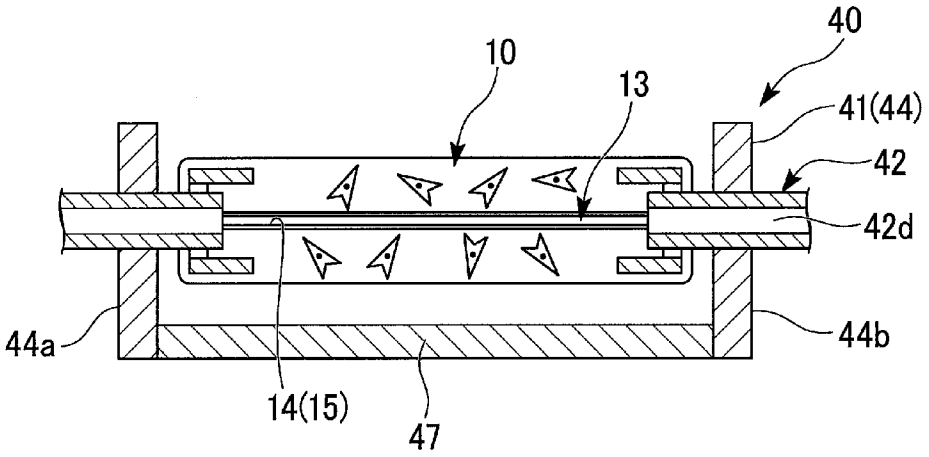
[図9]


40
10
11
12
43
41(44)
42
44a
44b
47

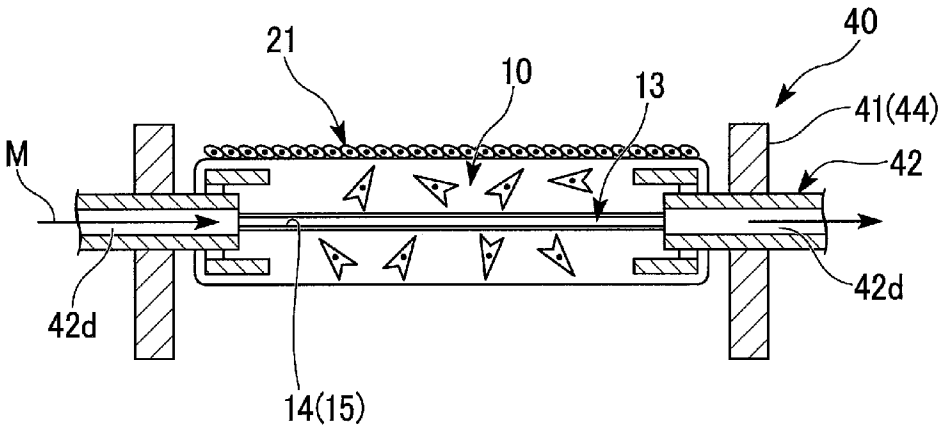
[図10]


40
10
13
41(44)
42
44a
44b
47

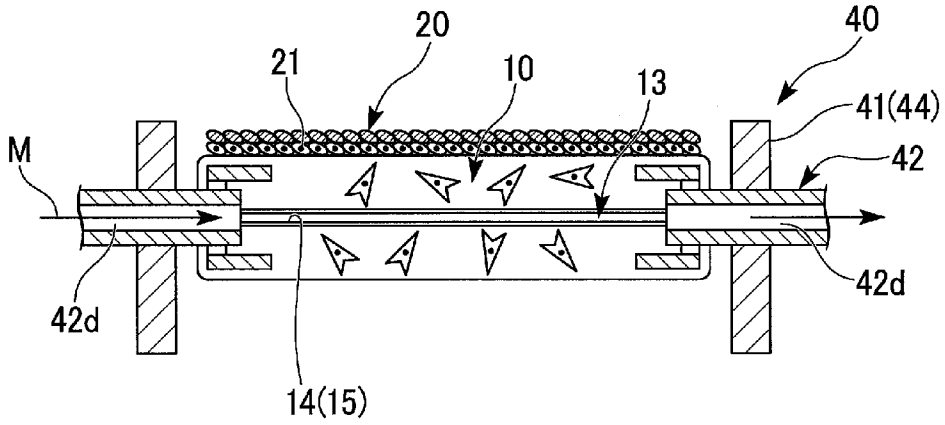
[図11]


40
10
13
41(44)
42
42d
44a
44b
14(15)
47

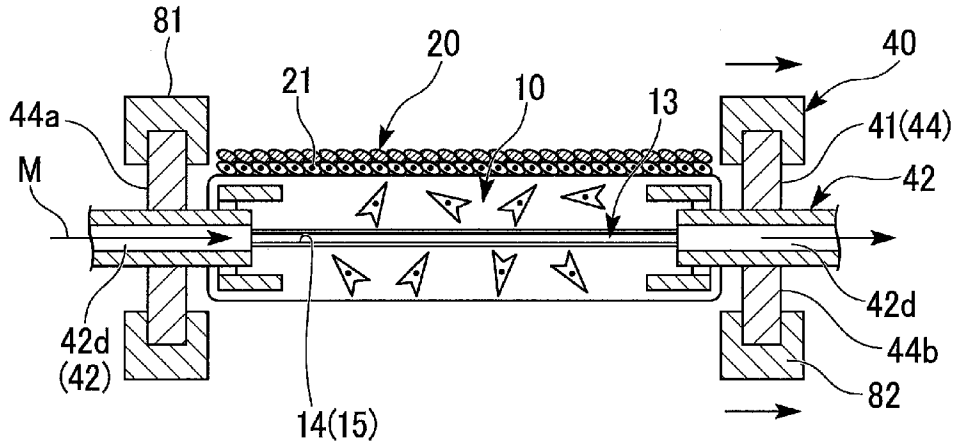
[図12]


21
40
10
13
41(44)
M
42
42d
42d
14(15)

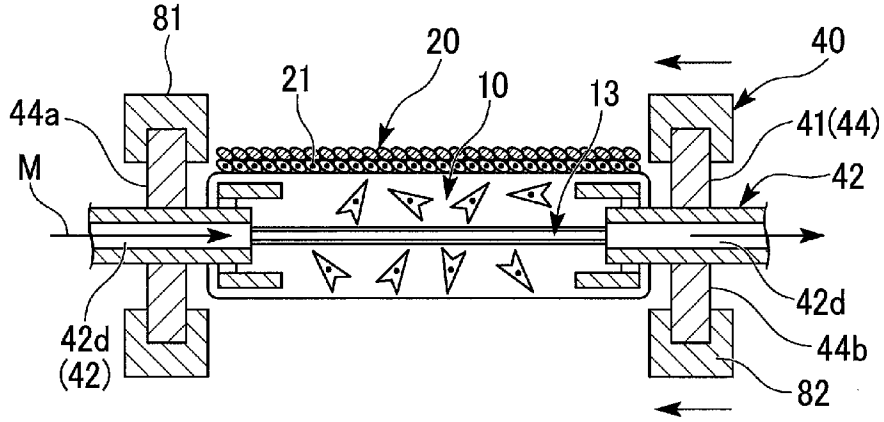
[図13]


20
40
21
10
13
41(44)
M
42
42d
42d
14(15)

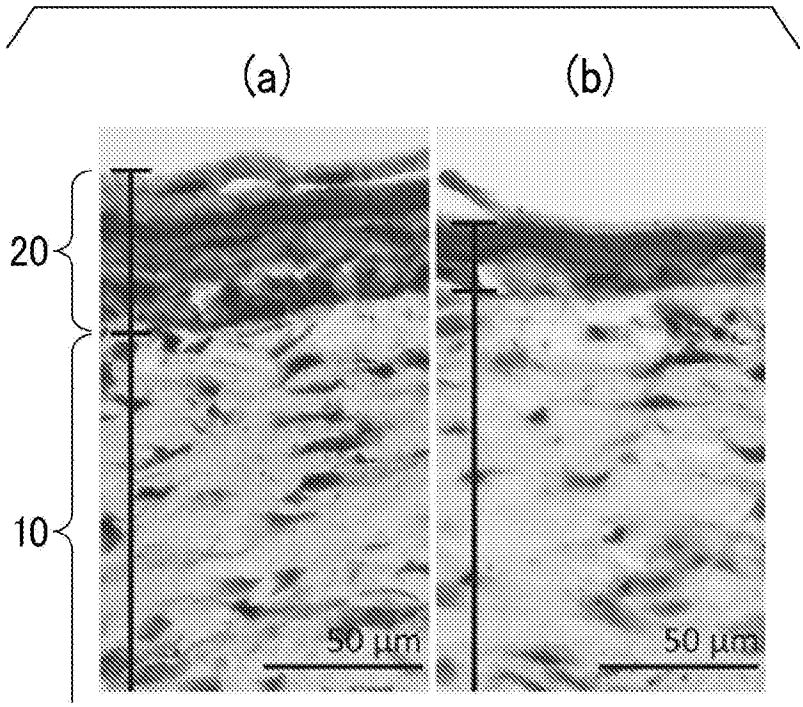
[図14]


81
20
21
10
13
40
44a
41(44)
M
42
42d
(42)
14(15)
42d
44b
82

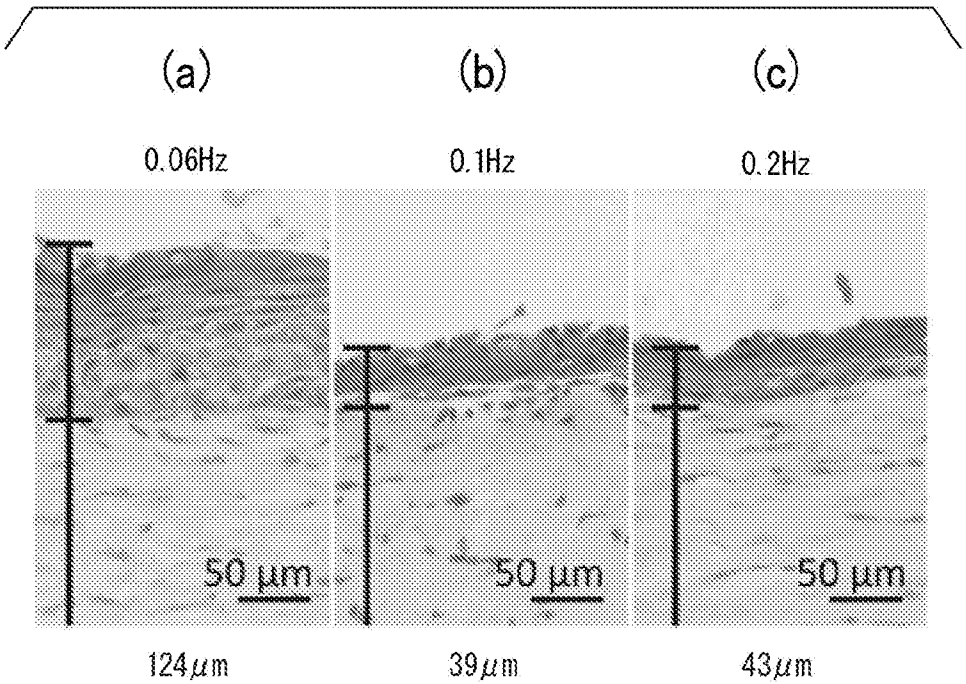
[図15]


81
20
21
10
13
40
44a
41(44)
M
42
42d
(42)
42d
44b
82

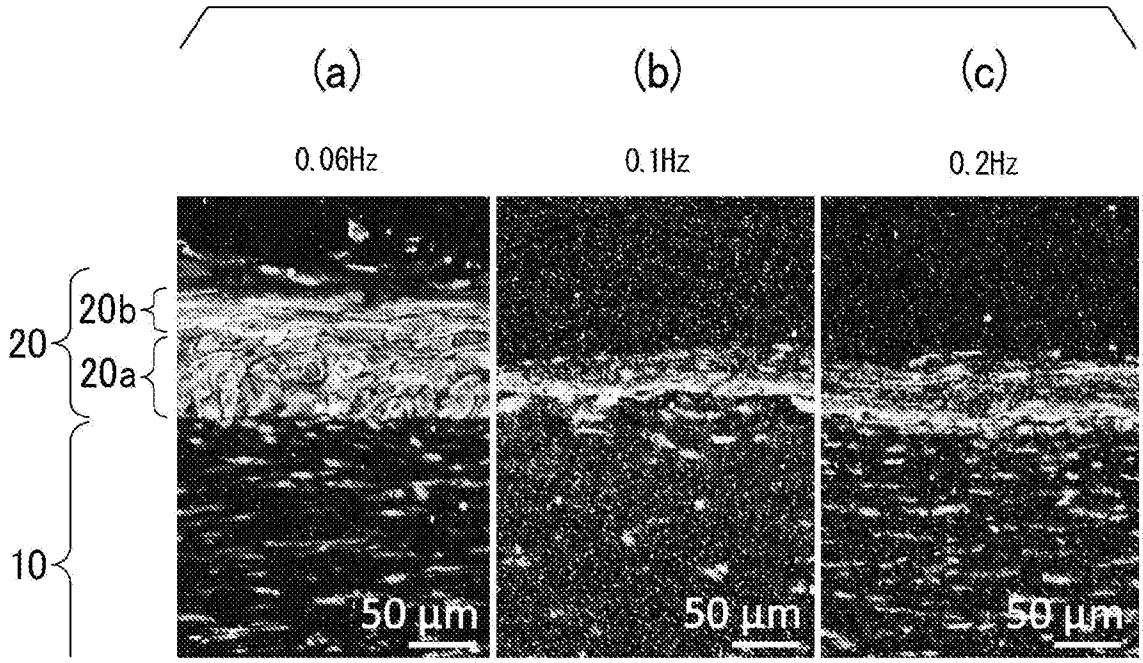
[図16]


(a)
(b)
20
10
50 μm
50 μm

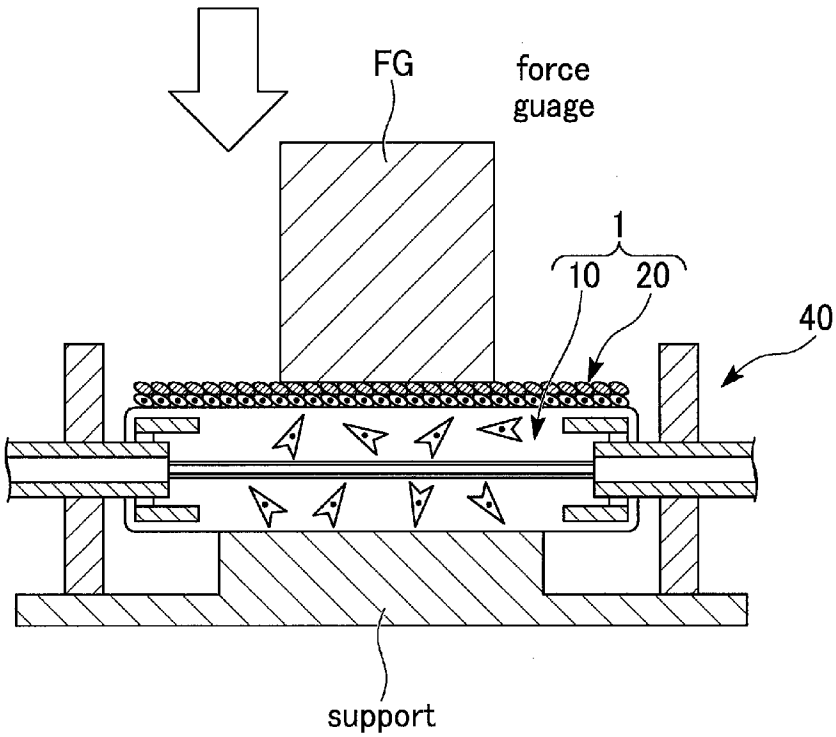
[図17]


(a)
(b)
(c)
0.06Hz
0.1Hz
0.2Hz
50 μm
50 μm
50 μm
124μm
39μm
43μm

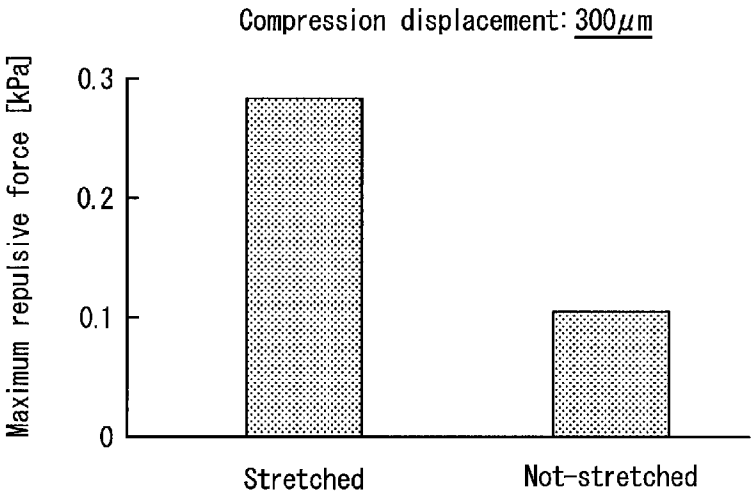
[図18]


(a)
(b)
(c)
0.06Hz
0.1Hz
0.2Hz
20
20b
20a
10
50 μm
50 μm
50 μm

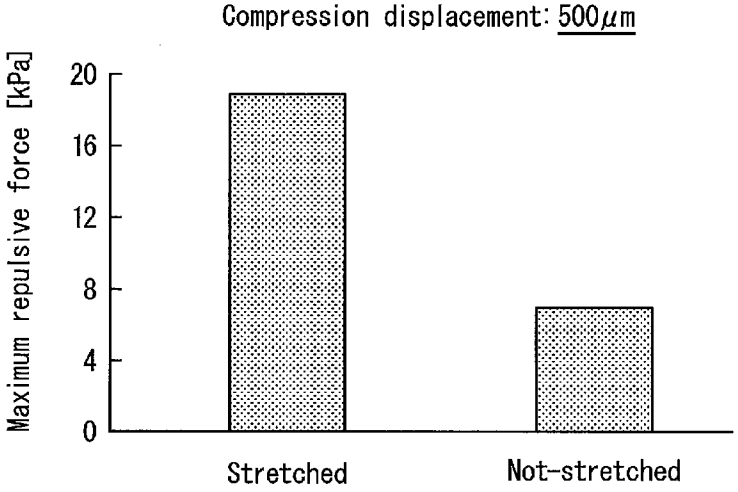
[図19]


FG
force
guage
1
10
20
40
support

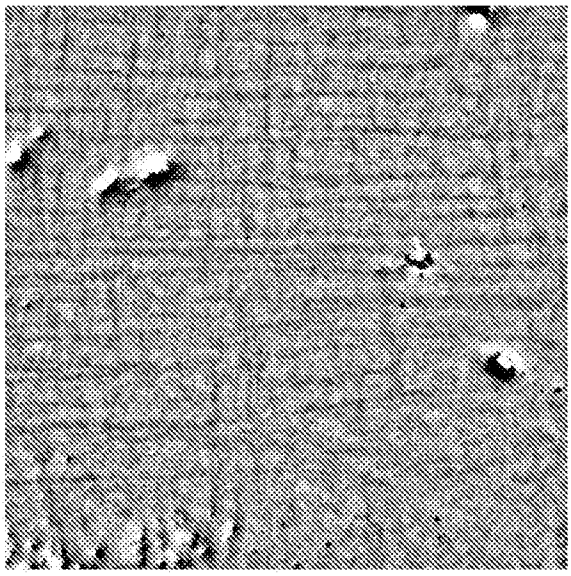
[図20]


Compression displacement: 300μm
Maximum repulsive force [kPa]
0.3
0.2
0.1
0
Stretched
Not-stretched

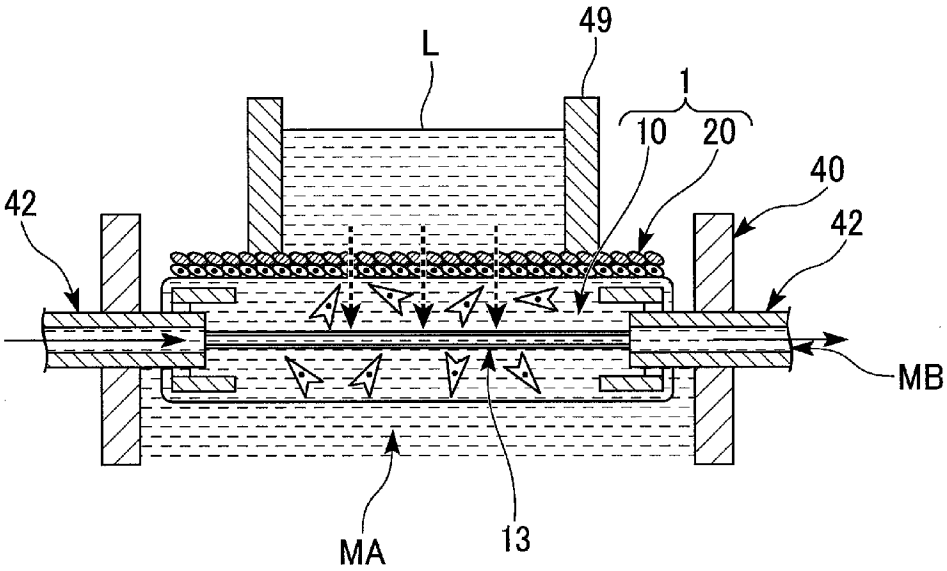
[図21]


Compression displacement: 500μm
Maximum repulsive force [kPa]
20
16
12
8
4
0
Stretched
Not-stretched

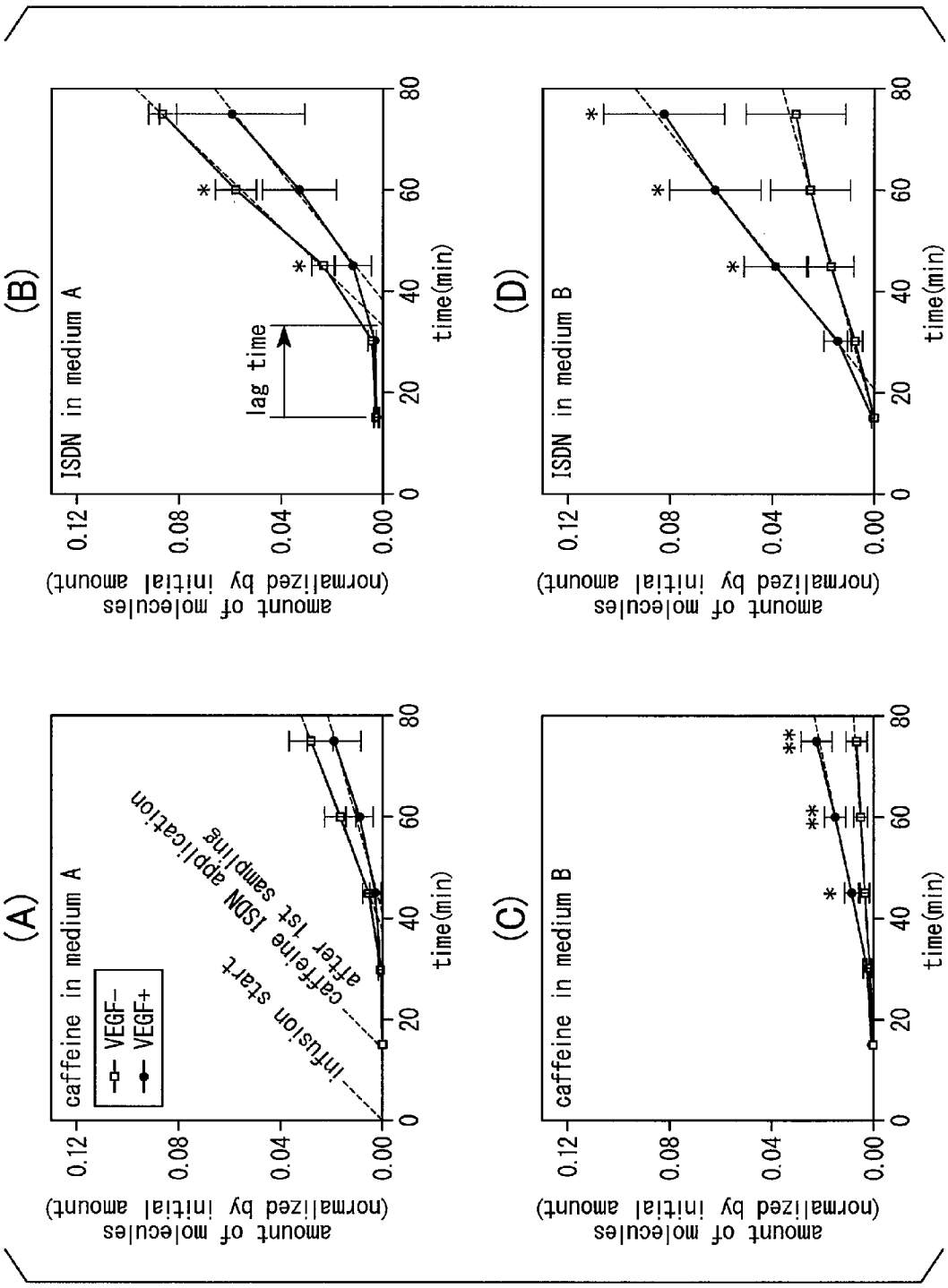
[図22]



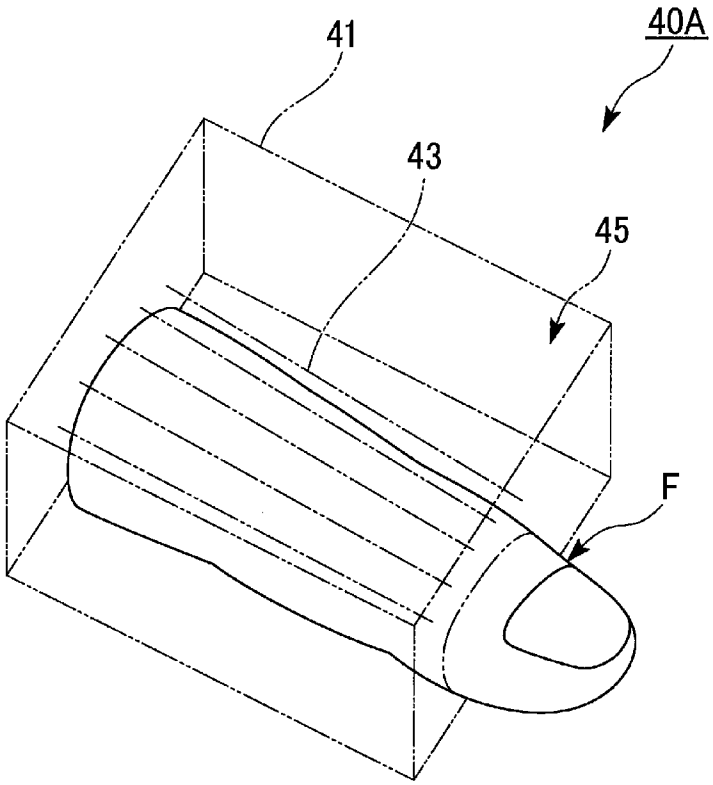
[図23]



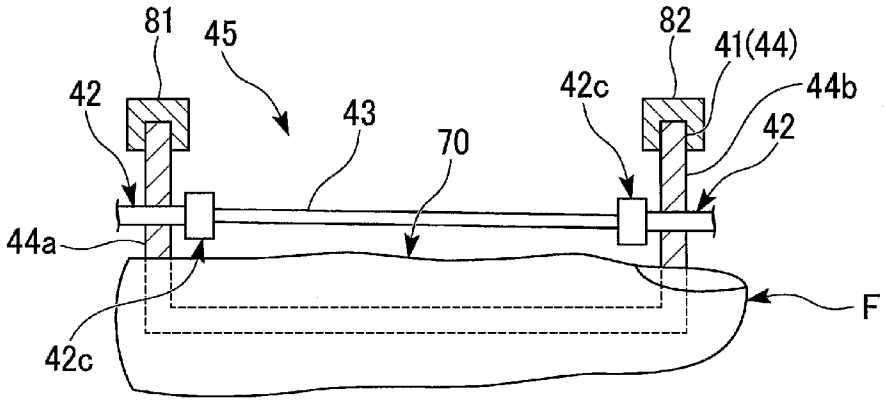
[図24]


(A)
caffeine in medium A
VEGF−
VEGF+
infusion start
caffeine ISDN application after 1st sampling
amount of molecules (normalized by initial amount)
time(min)
(B)
ISDN in medium A
lag time
amount of molecules (normalized by initial amount)
time(min)
(C)
caffeine in medium B
amount of molecules (normalized by initial amount)
time(min)
(D)
ISDN in medium B
amount of molecules (normalized by initial amount)
time(min)

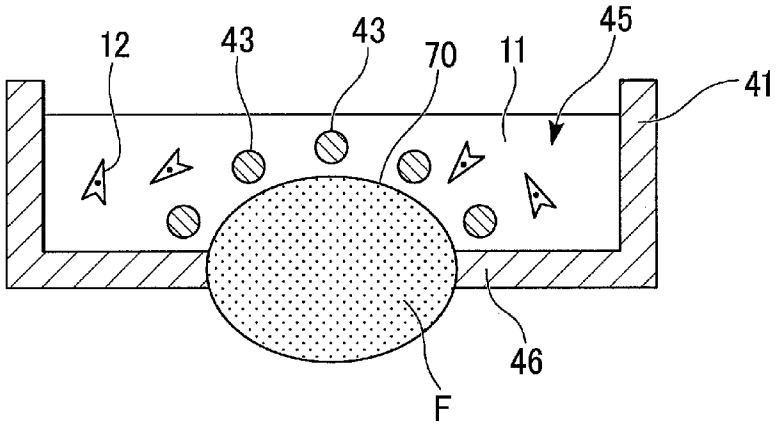
[図25]



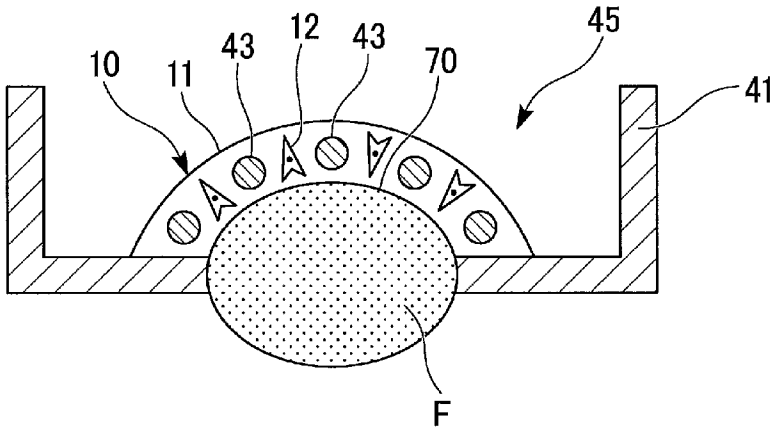
[図26]



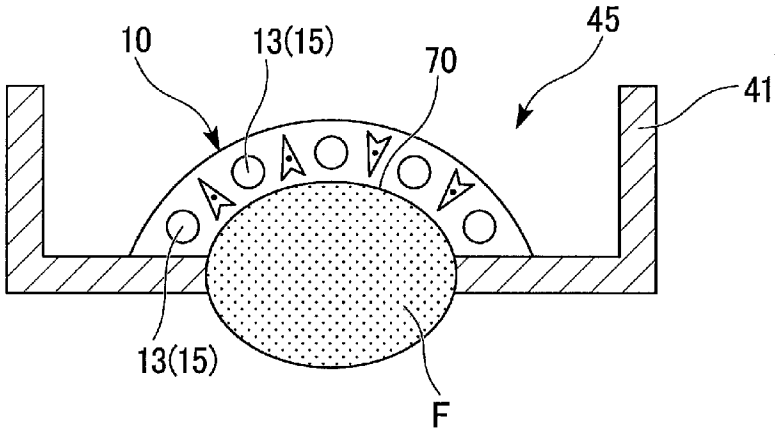
[図27]



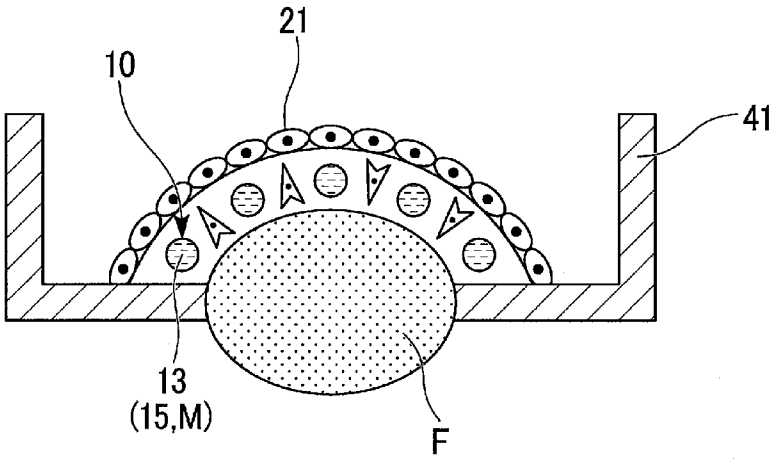
[図28]



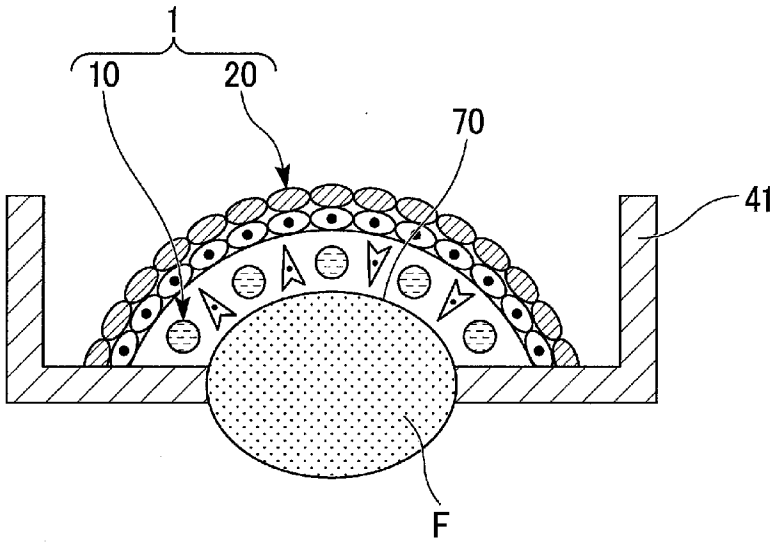
[図29]



[図30]



[図31]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2017/001499

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N5/071(2010.01)i

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)
C12N5/071

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2017 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2009-531067 A (Nortis, Inc.), 03 September 2009 (03.09.2009), claims; paragraphs [0019] to [0021], [0033], [0048], [0053], [0066] & US 2007/0224677 A1 claims; paragraphs [0039] to [0041], [0053], [0068], [0073], [0086] & JP 5356215 B2 & WO 2007/112192 A2 & EP 2004810 A2 & CN 101410507 A	1-12
A	JP 2005-518910 A (University of Cincinnati), 30 June 2005 (30.06.2005), claims & US 2003/0170892 A1 claims & WO 2003/076604 A2 & EP 1483373 A2 & CA 2478107 A1 & AU 2003217907 A1	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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 application or patent 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
05 April 2017 (05.04.17)	18 April 2017 (18.04.17)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2017/001499

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2012-205516 A (Osaka University), 25 October 2012 (25.10.2012), claims & US 2014/0024010 A1 claims & WO 2012/133629 A1 & EP 2692858 A1	1-12
A	JP 2010-539938 A (Nortis, Inc.), 24 December 2010 (24.12.2010), claims; paragraphs [0093] to [0096]; fig. 13B to D & US 2010/0279268 A1 claims; paragraphs [0151] to [0154]; fig. 13B to D & WO 2009/042639 A2 & EP 2203554 A2 & AU 2008304532 A1 & CN 101855341 A & CA 2700371 A1	1-12
P,A	WO 2016/047230 A1 (The University of Tokyo), 31 March 2016 (31.03.2016), entire text (Family: none)	1-12
P,A	MORI,N. et al., Skin integrated with perfusable vascular channels on a chip, Biomaterials, Nov. 2016, Vol.116, p.48-56	1-12

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１７／００１４９９

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N5/071(2010.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N5/071

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１７年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１７年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１７年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	JP 2009-531067 A（ノーティス，インク）2009.09.03，特許請求の範囲，[0019]-[0021]，[0033]，[0048]，[0053]，[0066] & US 2007/0224677 A1，特許請求の範囲，[0039]-[0041]，[0053]，[0068]，[0073]，[0086] & JP 5356215 B2 & WO 2007/112192 A2 & EP 2004810 A2 & CN 101410507 A	1-12

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー

「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
０５．０４．２０１７	１８．０４．２０１７

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｎ　２９３６
飯室　里美
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	JP 2005-518910 A（ユニバーシティ・オブ・シンシナティ）2005.06.30，特許請求の範囲 & US 2003/0170892 A1，特許請求の範囲 & WO 2003/076604 A2 & EP 1483373 A2 & CA 2478107 A1 & AU 2003217907 A1	1-12
A	JP 2012-205516 A（国立大学法人大阪大学）2012.10.25，特許請求の範囲 & US 2014/0024010 A1，特許請求の範囲 & WO 2012/133629 A1 & EP 2692858 A1	1-12
A	JP 2010-539938 A（ノーティス，インク）2010.12.24，特許請求の範囲，[0093]-[0096]，図 13B-D & US 2010/0279268 A1，特許請求の範囲，[0151]-[0154]，図 13B-D & WO 2009/042639 A2 & EP 2203554 A2 & AU 2008304532 A1 & CN 101855341 A & CA 2700371 A1	1-12
P,A	WO 2016/047230 A1（国立大学法人東京大学）2016.03.31，全文（ファミリーなし）	1-12
P,A	MORI,N. et al., Skin integrated with perfusable vascular channels on a chip, Biomaterials, Nov. 2016, Vol.116, p.48-56	1-12