

(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2008-508968

(P2008-508968A)

(43) 公表日 平成20年3月27日(2008.3.27)

(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 C 0 8 1
C 0 7 K 14/78	(2006.01)	C 0 7 K 14/78		4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 22 頁)

(21) 出願番号 特願2007-525228 (P2007-525228) (86) (22) 出願日 平成17年8月5日 (2005.8.5) (85) 翻訳文提出日 平成19年4月13日 (2007.4.13) (86) 国際出願番号 PCT/EP2005/008478 (87) 国際公開番号 W02006/018147 (87) 国際公開日 平成18年2月23日 (2006.2.23) (31) 優先権主張番号 102004039537.3 (32) 優先日 平成16年8月13日 (2004.8.13) (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)	(71) 出願人 507046750 フェニオン・ゲゼルシャフト・ミット・ベ シュレンクテル・ハフツング・ウント・コ ムパニー・コマンディットゲゼルシャフト P h e n i o n G m b H & C o . K G ドイツ連邦共和国デー 4 0 2 2 5 デュッ セルドルフ、メロヴィンガーブラッツ1ア ー番 (74) 代理人 100081422 弁理士 田中 光雄 (74) 代理人 100101454 弁理士 山田 卓二 (74) 代理人 100083356 弁理士 柴田 康夫 最終頁に続く
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

(54) 【発明の名称】 皮膚等価物を製造するための架橋コラーゲンマトリックス

(57) 【要約】

本発明は、皮膚等価物、真皮等価物、表皮等価物を製造するための架橋コラーゲンマトリックス、およびそのようなコラーゲンマトリックスに基づく皮膚等価物に関する。また本発明は、それらのコラーゲンマトリックスおよび真皮、表皮および/または皮膚等価物を製造するための方法に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

a. 低溶解性コラーゲンをコラーゲン含有組織から取得すること、
b. その低溶解性コラーゲンを、混合ユニットを使って、均一なコラーゲン懸濁液に変換すること、
c. そのコラーゲン懸濁液を凍結乾燥し、よって第1マトリックスAを製造すること、
d. 第1マトリックスAに架橋を施し、よって第2の機械的に安定化されたマトリックスBを製造すること、
e. 線維芽細胞を第2マトリックスB上に播種し、成長させること、
f. ケラチノサイトを第2マトリックスB上に播種し、成長させること、そして最後に、
g. マトリックスB内およびマトリックスB上で成長する線維芽細胞およびケラチノサイトを、全皮膚モデルの真皮部分および表皮部分が完全に形成されるまで、さらに培養すること
を特徴とする、全皮膚モデルの製造方法。

10

【請求項 2】

a. 低溶解性コラーゲンをコラーゲン含有組織から取得すること、
b. その低溶解性コラーゲンを、混合ユニットを使って、均一なコラーゲン懸濁液に変換すること、
c. そのコラーゲン懸濁液を凍結乾燥し、よって第1マトリックスAを製造すること、
d. 第1マトリックスAに架橋を施し、よって第2の機械的に安定化されたマトリックスBを製造すること
を特徴とする、コラーゲンマトリックスの製造方法。

20

【請求項 3】

a. 低溶解性コラーゲンをコラーゲン含有組織から取得すること、
b. その低溶解性コラーゲンを、混合ユニットを使って、均一なコラーゲン懸濁液に変換すること、
c. そのコラーゲン懸濁液を凍結乾燥し、よって第1マトリックスAを製造すること、
d. 第1マトリックスAに架橋を施し、よって第2の機械的に安定化されたマトリックスBを製造すること、
e. 線維芽細胞を第2マトリックスB上に播種し、成長させること、そして最後に、
f. マトリックスB内およびマトリックスB上で成長する線維芽細胞を、真皮等価物が完全に形成されるまで、さらに培養すること
を特徴とする、真皮等価物の製造方法。

30

【請求項 4】

a. 低溶解性コラーゲンをコラーゲン含有組織から取得すること、
b. その低溶解性コラーゲンを、混合ユニットを使って、均一なコラーゲン懸濁液に変換すること、
c. そのコラーゲン懸濁液を凍結乾燥し、よって第1マトリックスAを製造すること、
d. 第1マトリックスAに架橋を施し、よって第2の機械的に安定化されたマトリックスBを製造すること、
e. ケラチノサイトを第2マトリックスB上に播種し、成長させること、そして最後に、
f. マトリックスB内およびマトリックスB上で成長するケラチノサイトを、表皮等価物が完全に形成されるまで、さらに培養すること
を特徴とする、表皮等価物の製造方法。

40

【請求項 5】

低溶解性コラーゲンが、水性媒質中で数時間経っても、目に見える膨潤またはゲル化を示さないか、わずかな膨潤またはゲル化しか示さない粗繊維コラーゲンであり、好ましくは動物、より具体的には哺乳動物、好ましくはウマ、ブタまたはウシの腱、最も具体的にはウシのアキレス腱から得られる低溶解性コラーゲンであることを特徴とする、請求項1~4のいずれか1項に記載の方法。

50

【請求項 6】

凍結乾燥ステップc)が、毎時50 まで、具体的には毎時5 ~ 40 、好ましくは毎時10 ~ 30 、より好ましくは毎時15 ~ 25 、最も好ましくは毎時18 ~ 23 、よりいっそう好ましくは毎時20 ~ 22 の冷却速度で行なわれることを特徴とする、請求項1~5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 7】

請求項1に記載の方法によって得ることができる全皮膚モデル。

【請求項 8】

皮膚型タンパク質、より具体的にはエラスチンが発現されることを特徴とする、請求項7に記載の全皮膚モデル。

10

【請求項 9】

微生物、より具体的には病原性微生物を定着させることを特徴とする、請求項7または8に記載の全皮膚モデル。

【請求項 10】

微生物が黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus) ならびにカンジダ (Candida) 属、マラセチア (Malassezia) 属およびトリコフィトン (Trichophyton) 属の種から選択されることを特徴とする、請求項9に記載の全皮膚モデル。

【請求項 11】

請求項2に記載の方法によって得ることができるコラーゲンマトリックス。

【請求項 12】

請求項3に記載の方法によって得ることができる真皮等価物。

20

【請求項 13】

請求項4に記載の方法によって得ることができる表皮等価物。

【請求項 14】

真皮等価物、表皮等価物または全皮膚モデルを製造するための、請求項11に記載のコラーゲンマトリックスの使用。

【請求項 15】

物品を、より具体的には、有効性、望ましくない副作用、刺激作用、毒性作用および炎症作用もしくはアレルギー作用、または物質の適合性に関して、試験するための、請求項7~10のいずれか1項に記載の全皮膚モデル、請求項12に記載の真皮等価物または請求項13に記載の表皮等価物の使用。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、皮膚等価物、真皮等価物、表皮等価物を製造するための架橋コラーゲンマトリックス、およびそのようなコラーゲンマトリックスに基づく皮膚等価物に関する。また本発明は、それらのコラーゲンマトリックスおよび真皮、表皮または皮膚等価物を製造するための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

40

皮膚型全皮膚モデルは、インビトロ皮膚等価物ということもでき、皮膚科学における試験皮膚として、またアレルギー学において物質、例えば潜在的医薬もしくは化粧品、または光および熱などの作用因子を、それらの薬理作用または美容作用、より具体的には刺激作用、毒性作用および炎症作用に関して試験し、そしてまたそれらの適合性に関して試験するために、使用することができる。さらにまた、そのような系は、さまざまな免疫学的課題、組織学的課題および分子生物学的課題にも使用することができる。これには、例えば創傷治癒に関する研究、ならびに物質の浸透および吸収に関する研究などが含まれる。そのような全皮膚モデルを使った物質の試験には、動物試験およびヒトボランティアを使った試験と比較して大きな利点がある。なぜなら、全皮膚モデルを使って得られる結果の方が再現性が高く、試験をより迅速に、より少ない費用で行なうことができるからである

50

。

【 0 0 0 3 】

近年、原材料および製品を試験するためのインビトロ系として、ヒト細胞培養物が広く使用されるようになった。器官様ヒト組織またはバイオ人工構築物および共培養系は、細胞培養技術のさらなる発達を表している。得られた結果は、単細胞培養物を使って得られる結果よりも、さらにいっそう適切に、人間に応用することができる。

【 0 0 0 4 】

EP 0 197 090 B1は、皮膚等価物を形成させるための方法であって、酸性コラーゲン溶液を線維芽細胞などの収縮性細胞と混合することによって水和コラーゲン格子がもたらされる方法を開示している。pHの中和後に、コラーゲン原線維がコラーゲン格子中に沈殿する。収縮性細胞がコラーゲン格子に付着し、それを収縮させることで、真皮等価物が形成される。コラーゲン格子に皮膚パンチ生検を導入することにより、パンチ生検由来のケラチノサイトは真皮等価物の表面上で成長することができ、その結果、皮膚等価物が形成される。

10

【 0 0 0 5 】

EP 0 285 474 B1には、コラーゲンおよび線維芽細胞から得られる真皮等価物ならびに多層表皮等価物を含む皮膚等価物が開示されている。表皮等価物を得るために、毛包などのヒトまたは動物外植片が、真皮等価物に接種される。

【 0 0 0 6 】

EP 0 020 753 B1には、組織、より具体的には皮膚組織を形成させるための方法であって、やはり水和コラーゲン格子に線維芽細胞が導入され、コラーゲン格子の収縮後に組織が形成される方法が記載されている。その組織に、前もってインビトロで培養されたケラチノサイトまたは包皮から単離されたケラチノサイトを適用することにより、皮膚代替物を形成させることができる。

20

【 0 0 0 7 】

EP 0 418 035 B1は、線維芽細胞などの収縮剤によって収縮される水和コラーゲン格子、および浸透性要素と接触しているコラーゲンゲルを含む、組織等価物が記載されている。コラーゲンと収縮剤との混合物がコラーゲンゲルに適用される。コラーゲン格子の径方向または横方向の収縮は、コラーゲンゲルとポリカーボネート膜などの浸透性要素との接触によって抑制されるので、格子はその厚さ方向にのみ収縮する。次に、真皮等価物の形成後に、ケラチノサイトを播種することにより、皮膚等価物を形成させることができる。

30

【 0 0 0 8 】

さらにまた、米国特許US 5,861,153には、担体上の表皮等価物からなり、その表皮等価物はケラチノサイトおよびランゲルハンス細胞の誘導または非誘導前駆体を含む、皮膚等価物が開示されている。担体は、線維芽細胞含有コラーゲン格子または表皮から引き離された真皮切片、人工膜、コラーゲンに基づく皮下代替物または合成材料であることができる。

【 0 0 0 9 】

米国特許US 4,963,489には、セルロースなどの生物学的に適合する材料からなる基礎的骨組みを支質細胞、例えば線維芽細胞が包んでいる、インサイチューで生成される支質組織が記載されている。記載されている系は、とりわけ三次元皮膚培養系の生成に使用することができ、ケラチノサイトおよびメラノサイトが、その真皮等価物、すなわち三次元担体マトリックスに適用される。

40

【 0 0 1 0 】

米国特許US 5,755,814には、インビトロ試験系として使用すること、治療目的に使用すること、皮膚モデル系が記載されている。この系は、線維芽細胞が含有されている不溶性コラーゲンの三次元架橋マトリックスおよび重層化した分化表皮細胞の層を含み、表皮細胞層はコラーゲンマトリックスの表面と直接接触している。このマトリックスは、熱処理および水の除去によって架橋すること、カルボジイミドなどの化学剤によって架橋すること、

50

【 0 0 1 1 】

米国特許US 5,882,248には、米国特許US 5,755,814に記載のヒト皮膚モデル系に対する化学物質または作用因子の作用を決定するための方法が記載されている。皮膚モデル系と被験物質との間の相互作用が、皮膚モデル系の細胞による物質の放出、ならびにそれらの細胞の代謝、増殖、分化および再編成に対する作用から決定される。

【 0 0 1 2 】

さらにまた、WO 95/10600には、表皮等価物を得ることができる方法が記載されている。この表皮等価物は、医薬品および/または化粧品の日焼け試験に使用することができる。

【 0 0 1 3 】

国際特許出願WO 01/092477には、単離した真皮線維芽細胞を分化および/または増殖させるための方法であって、線維芽細胞を、それらが増殖することのできる三次元ゲル様マトリックスで培養する方法が開示されている。培養される線維芽細胞の他にも、このマトリックスは、コラーゲン溶液、すなわち組織型マトリックスタンパク質から形成されるヒトまたは動物コラーゲンの骨組みも含有する。この方法により、2つの組織型層、すなわち真皮等価物および表皮等価物から構成される、器官様インビトロ皮膚モデルが得られるとされている。その器官型皮膚モデルは、組織学的にも機能的にも、自然の皮膚におおむね一致するとされている。

【 0 0 1 4 】

既知の皮膚モデルが持つ短所は、それらが一般に、一層またはそれ以上のケラチノサイトの表皮層だけからなることである。重層表皮が得られる場合は、病原体による汚染の危険を伴う組織外植片が使用されることが多く、その皮膚等価物を後に試験皮膚として使用する場合は、それが偽結果につながる。記載の皮膚モデルが真皮部分を持つ場合は、海綿状の架橋材料からなることが多く、これは、コラーゲンに加えて、他の非皮膚型材料も含有することができる。先行技術に記載されている皮膚等価物の真皮部分がコラーゲンおよび線維芽細胞だけからなる場合には、コラーゲンゲルの著しい縮みおよびそこからの液体の排出に起因すると考えられる不確定な縮み過程を起こしやすい。そのため、先行技術に記載されている皮膚等価物には、特定サイズの試験皮膚としては、限られた適性しかなく、それらを使って得られる結果も、自然のヒト皮膚には限られた程度にしか応用できないことになる。さらにまた、コラーゲンおよび線維芽細胞の真皮部分を持つ従来の皮膚等価物は、加工が困難なコラーゲンゲルを使用するので、製造が面倒でもある。ゲル溶液は低温で、すなわち最適には氷上で、攪拌する必要がある、ピペット操作も冷時に行なう必要がある。なぜなら、そうしなければ、液状であり続けることができないからである。次に、ゲル溶液を培養器で、例えば37℃に加熱する。ゲル化はこれらの条件下および正しいpHでのみ起こる。ゲル溶液が温かいほど、加工は困難になる。そのうえ、ゲルを強く加熱しすぎると、コラーゲンが変性して、ゲルが使用に適さなくなる恐れがある。

【 0 0 1 5 】

最後に、先行技術から知られている皮膚モデルは皮膚への類似性が最適とは言えないことも指摘しておく必要がある。特に、重要な真皮分化マーカーであるエラスチンの発現は、天然真皮とは異なり、既知の皮膚モデルでは、どこにも見られない。

【 発明の開示 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 6 】

したがって、本発明が取り組んだ技術的課題は、表皮層と真皮層の両方を持ち、上述した先行技術の短所を免れ、試験皮膚として、例えば薬理作用および美容作用の研究ならびに皮膚科学的適合性の試験に使用することができるような、自然のヒト皮膚に実質的に一致するヒトインビトロ全皮膚モデルを提供すること、そしてそのインビトロ全皮膚モデルを製造するための手段を提供することだった。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 7 】

10

20

30

40

50

本発明によれば、この課題は、

- a) 低溶解性コラーゲンをコラーゲン含有組織から取得すること、
 - b) その低溶解性コラーゲンを、混合ユニットを使って、均一なコラーゲン懸濁液に変換すること、
 - c) そのコラーゲン懸濁液を凍結乾燥し、よって第1マトリックスAを製造すること、
 - d) 第1マトリックスAに架橋を施し、よって第2の機械的に安定化されたマトリックスBを製造すること、
 - e) 線維芽細胞を第2マトリックスB上に播種し、成長させること、
 - f) ケラチノサイトを第2マトリックスB上に播種し、成長させること、そして最後に、
 - g) マトリックスB内およびマトリックスB上で成長する線維芽細胞およびケラチノサイトを、全皮膚モデルの真皮部分および表皮部分が完全に形成されるまで、さらに培養すること
- を特徴とする、全皮膚モデルの製造方法によって解決される。

10

【0018】

先行技術で用いられるコラーゲングルとは全く異なり、ステップb) で得られるコラーゲン懸濁液は、有利なことに、室温で困難を伴わずに貯蔵およびピペット操作することができる。

【0019】

本発明に従って得ることができる全皮膚モデルは、とりわけ頑強であるので、既知のモデルと比較して取り扱いが容易である。さらにまた、本発明に従って得ることができる全皮膚モデルは、培養槽の底によく接着するので、まだ完全には形成されていない皮膚モデルが時期尚早に剥離して、その結果、使用に適さなくなるといったことがない。

20

【0020】

本発明に関して「培養」という用語は、例えば代謝出発物質および代謝産物の導入および除去などによる、適切な環境での、例えば線維芽細胞またはケラチノサイトなどの細胞の生命機能の、好ましくはインビトロでの維持、より具体的には、細胞の増殖を意味する。

【0021】

本発明に関して線維芽細胞とは、天然の線維芽細胞、より具体的には真皮中に見いだされる線維芽細胞、遺伝子改変線維芽細胞、もしくは自然突然変異によって生じる線維芽細胞、またはその前駆体であると理解される。線維芽細胞は動物由来であってもヒト由来であってもよい。

30

【0022】

本発明に関して「低溶解性コラーゲン」とは、水性媒質中で数時間経っても、目に見える膨潤を示さないか、わずかな膨潤しか示さず、ゲル化をほとんどまたは全く示さない、とりわけゲル化を全く示さない粗繊維コラーゲンであると理解される。低溶解性コラーゲンは、好ましくは、動物、より具体的には哺乳動物、好ましくはウマ、ブタまたはウシの腱から、さらに好ましくはウシのアキレス腱または皮膚から、より具体的にはウシのアキレス腱から得られる。

【0023】

均一なコラーゲン懸濁液への変換は、当業者が適切と考える任意の混合ユニットを使って、またはそのような混合ユニット内で、好ましくはスタティックミキサー内で、またはウルトラタラックス (Ultra Turrax) を使って、行なうことができる。

40

【0024】

要求されるマトリックスの寸法に一致する寸法を持つ容器に、例えばマイクロタイタープレートのウェルに、コラーゲン懸濁液を導入する。

【0025】

後で、容器の壁への冷凍乾燥コラーゲンマトリックスの接着が改善されるように、容器、例えばマイクロタイタープレートのウェルを、コラーゲン懸濁液で満たす前に、それらをさまざまな薬剤で被覆してもよい。適切な被覆剤は、例えばコラーゲン、ゼラチン、ポ

50

リリジン、フィブリンもしくはフィブリノゲン/トロンビンまたはフィブロンекチンである。被覆するには、容器の内壁をまず、その薬剤の溶液または懸濁液で濡らし、容器を乾燥させて、薬剤の層が容器の内表面に形成されるようにし、最後に、容器をコラーゲン懸濁液で満たす。

【0026】

凍結乾燥（冷凍乾燥）ステップc）は、これらの容器内で行なわれる。冷凍を低い冷却速度で行なうと、大きい氷結晶が得られ、それが生成物内での濃度差および分離を引き起こす。遅い顕著な氷結晶の成長は、とりわけ大きな氷結晶の形成をもたらす、冷凍中に温度勾配が存在する場合は、その勾配の方向に氷結晶が整列される。この場合、得られた生成物への浸透は、大内径の柱状構造または煙突構造によって起こる。しかし、これらの粗く成長した構造は、比表面積が小さくなるので、再構成挙動に悪影響が及ぶ。

10

そのため、生物学的材料の冷凍乾燥では、冷却は通常、急速に行なわれる。

【0027】

しかし出願人は、驚いたことに、冷凍乾燥ステップにおけるコラーゲン懸濁液の遅い冷却が、マトリックスAおよびBの品質に対して有利な作用を持つことを見いだした。本発明によれば、冷却速度は毎時50 まで、より具体的には毎時5 ~ 40 、有利には、毎時10 ~ 30 、好ましくは毎時15 ~ 20 、より好ましくは毎時18 ~ 23 、よりいっそう好ましくは毎時20 ~ 22 である。

このような好ましく得ることができる凍結乾燥物は、生成物表面に皮膜を持つ。

20

【0028】

この皮膜は、有利なことに、冷凍乾燥マトリックスの表面に小孔を形成し、それがその後の線維芽細胞の定着にとって、とりわけ良い条件を提供する。なぜなら、それらはマトリックス内への線維芽細胞の遅い移動を助長するからである。これに対して、冷凍乾燥ステップ時の速い冷却速度は、線維芽細胞が与えられた培養時間内に新たに合成される細胞外マトリックスで完全には満たすことができないような「クレーター」を表面に持つ、通気孔付きのマトリックスをもたらすことが多い。播種されたケラチノサイトは、これらのクレーター中に落ちて、その中で凝集し、そこから拡散することができるので、皮膚モデルの被覆が、したがって皮膚モデルの分化が、有意な影響を受けうる。

【0029】

架橋ステップd）は、当業者が適切であると思う任意の物理的または化学的架橋方法によって行なうことができる。出願人は、驚いたことに、グルタルアルデヒドが、その細胞毒性およびアポトーシス性にもかかわらず、本発明の方法にとってとりわけ好適な架橋剤であることを見いだした。しかし架橋は、UV照射および熱脱水架橋（DHT）などの物理的方法によって行なうこともできる。

30

【0030】

本発明によれば、好適な化学架橋剤は、コラーゲン繊維のさまざまなポリペプチド鎖上にあるリジン残基およびヒドロキシリジン残基のアミノ基と反応する基を持つ二官能性物質である。さらにまた、遊離グルタミン酸残基および遊離アスパラギン酸残基のカルボキシル基を活性化し、次にそれが別のポリペプチド鎖のアミノ基と反応することにより、本発明によるコラーゲン繊維の架橋を得ることもできる。本発明によれば、2本のコラーゲン繊維間の架橋は、アミノ基とジイソシアネートとの反応によって、またはアシルアジドの形成によって達成することもできる。本発明の目的に使用することができるもう一つの標準的架橋方法は、EDC（1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）-カルボジイミド）などのカルボジイミドをN-ヒドロキシスクシンイミドと併用することによる架橋である。本発明によれば、アミノ基と反応するホモ二官能性架橋剤、例えばp-ベンゾキノン、ジメチルアジポイミデート、ピメルイミド酸ジメチル、スベルイミノ酸ジメチル、1,4-フェニレンジイソチオシアネート、ポリオキシエチレン-ビス-（イミダゾリルカルボニル）、ビス-〔ポリオキシエチレン-ビス-（イミダゾリルカルボニル）〕およびスベリン酸-ビス-（N-ヒドロキシスクシンイミドエステル）などによる架橋反応も可能であり、生物学的架橋剤、より具体的には酵素、好ましくはペプチド鎖を互いに連結する能力を持つトランス

40

50

グルタミナーゼ、またはリジルオキシダーゼ (EC 1.4.3.13) の使用も、同様に可能である。他の架橋選択肢は参考文献EP-A2-0898973に言及されている。

【0031】

線維芽細胞およびケラチノサイトは、製造しようとする皮膚モデルの所要の性質に適合させることができる、当業者に公知の方法によって、取得され、培養される。

【0032】

さらにまた、本発明の好ましい一実施形態では、ステップf)におけるケラチノサイトの播種前、播種中、または播種後に、ヒト由来および動物由来の、例えば哺乳動物の、他の細胞タイプおよび/または他の組織タイプの他の細胞、および/またはその前駆細胞、例えばメラノサイト、マクロファージ、単球、白血球、形質細胞、ニューロン細胞、脂肪細胞、ランゲルハンス細胞の誘導および非誘導前駆細胞、ランゲルハンス細胞および他の免疫細胞、内皮細胞、皮膚または皮膚関連細胞の腫瘍に由来する細胞、より具体的には脂腺細胞または皮脂腺組織または皮脂腺外植片、汗腺の細胞または汗腺組織または汗腺外植片、毛包細胞または毛包外植片；ならびに他の器官の腫瘍または転移に由来する細胞などを、マトリックスに播種してもよい。さまざまな起源の幹細胞、組織特異的幹細胞、胎性および/または成人幹細胞も、皮膚モデルに組み入れることができる。したがって、本発明の方法は、2つの組織特異的な層、すなわち真皮等価物および表皮等価物から構成される、器官様インビトロ皮膚モデルを提供する。その器官型皮膚モデルは、組織学的にも機能的にも、自然の皮膚に実質的に一致する。

【0033】

マトリックスAの架橋には、マトリックスB上およびマトリックスB中で成長する真皮等価物が、培養期間中に縮みをほとんどまたは全く起こさないという効果がある。したがって、所定の直径、均質な表面および培養槽の縁との所定の境界を持つ皮膚等価物が得られる。試験表面として用いられる全皮膚モデルの均一なサイズおよび均質な品質のおかげで、薬理作用および/または美容作用に関する物質の試験における結果の質が向上し、試験結果の再現性が高まる。

【0034】

したがって、線維芽細胞を培養するためのマトリックスBは、培養しようとする線維芽細胞と、ヒト由来または動物由来の好ましくは新鮮なコラーゲン懸濁液から新たに構成されたコラーゲンの骨組みとを、0.5%~5%コラーゲンに相当するマトリックス1mlあたり約5~50mgのコラーゲン濃度で含有する。0.8~2.5%コラーゲンに相当するマトリックス1mlあたり8~25mgの範囲が好ましく、0.8%~1.2%コラーゲンに相当するマトリックス1mlあたりコラーゲン8~12mgの範囲は、特に好ましい。

【0035】

コラーゲンの骨組みは、低溶解性コラーゲンの好ましくは無細胞酸性懸濁液から得られ、懸濁液のタンパク質濃度は、好ましくは、0.5~1.5重量%に相当する5~15mg/mlである。コラーゲン溶液のpH値は0.1~6.9の範囲、好ましくは2.0~5.0の範囲、より好ましくは3.0~4.5の範囲、最も好ましくは3.5~4.0の範囲にある。

【0036】

線維芽細胞含有マトリックスを培養するために、細胞培養培地（好ましくはDMEM細胞培養培地）、緩衝液（例えばヘペス緩衝液）、血清（好ましくはウシ胎仔血清（FCS）、正常ウシ血清（NCS）、正常ヒツジ血清（NLS）、合成血清または血清代替物）、および好ましくは1マトリックスあたり $1 \sim 6 \times 10^5$ 個の線維芽細胞、より具体的には前培養線維芽細胞を含有する溶液を、マトリックスBに加える。

【0037】

マトリックスBをさらに安定化するために、フィブロネクチンおよび/またはラミニン、好ましくはヒトフィブロネクチンおよび/またはラミニンを、マトリックスに加えるか、培養培地中に加えてもよい。フィブロネクチンは、線維芽細胞内で産生される構造タンパク質または接着タンパク質であり、インビボでは他の高分子、例えばコラーゲンに結合し、細胞を隣接細胞に付着させるという機能を持っている。ラミニンは、基底膜のタンバ

10

20

30

40

50

ク質であり、細胞はこれに接着することができる。したがって、線維芽細胞 - コラーゲンマトリックスへのフィブロネクチンおよび / またはラミニンの添加は、コラーゲンへの線維芽細胞の結合も、線維芽細胞同士の結合も促進する。両タンパク質は、マトリックスの製造中にマトリックスに直接組み入れてもよいし、架橋ステップ後に、溶解した形態で、例えば培養培地に溶解して、マトリックスに加えてもよい。これは、細胞播種ステップの前に行なってもよいし、細胞播種ステップと並行して行なってもよい。

【 0 0 3 8 】

次に、コラーゲンマトリックスにおける線維芽細胞の培養を、好ましくは液内培養によって行なう。本発明に関して「液内培養法」または「液内培養」とは、細胞を培養するための方法であって、細胞が栄養溶液で覆われている方法であると理解される。したがって、線維芽細胞含有マトリックスBは、好ましくは、細胞培養培地に沈められ、約30 ~ 約40 の温度でインキュベートされる。

10

【 0 0 3 9 】

本発明に従って得られる全皮膚モデルを培養するための記載の方法に加えて、培養条件を変えることにより、例えば培地成分により、インビボでの状況にさらに近づく、より良い障壁機能を獲得するように、本モデルを最適化することができる。これは、例えば浸透研究を行なう場合に重要であり、皮膚の障壁機能を改善する物品の製造にとっても重要である。さらにまた、環境因子（洗剤との接触）または遺伝的原因による障壁機能の医学的障害がある。最適化された障壁機能を持つ皮膚モデルは、ここでも重要になるだろう。障壁機能の改善は、培養条件（例えば湿度、温度）の改变、培地中の化学成分（セラミド、ビタミンC）または遺伝子改変ケラチノサイトによって達成することができる。障壁機能の変化は、表面静電容量を測定することによって測定することができる。障壁機能の改善に関する詳細な情報は、例えば参考文献US-A1-200220168768に見いだすことができる。

20

【 0 0 4 0 】

真皮等価物における線維芽細胞の成長を改善するために、線維芽細胞とケラチノサイトとを共培養する場合であれば、ケラチノサイトによって放出される因子を培養培地に加えてもよい。例えば調整培養上清（すなわち培養ケラチノサイトの上清および / またはケラチノサイトと他の細胞タイプ、例えば内皮細胞、免疫細胞もしくは線維芽細胞などとの共培養物の培地上清）を使用することができる。

【 0 0 4 1 】

本発明のもう一つの有利な実施形態では、後に真皮等価物を得ることができるような方法で、線維芽細胞を上述のマトリックスBで培養する。これは、好ましくは、

30

- a. 低溶解性コラーゲンをコラーゲン含有組織から取得すること、
 - b. その低溶解性コラーゲンを、混合機を使って、均一なコラーゲン懸濁液に変換すること、
 - c. そのコラーゲン懸濁液を凍結乾燥し、よって第1マトリックスAを製造すること、
 - d. 第1マトリックスAに架橋を施し、よって第2の機械的に安定化されたマトリックスBを製造すること、
 - e. 線維芽細胞を第2マトリックスB上に播種し、成長させること、そして最後に、
 - f. マトリックスB内およびマトリックスB上で成長する線維芽細胞を、真皮等価物が完全に形成されるまで、さらに培養すること
- を特徴とする真皮等価物の製造方法によって行なわれる。

40

【 0 0 4 2 】

本発明に関して「真皮等価物」とは、自然の真皮に実質的に一致する、コラーゲンおよび線維芽細胞の結合組織様の層であると理解される。

【 0 0 4 3 】

このようにして得た真皮等価物は、スクリーニング方法および診断方法に使用することができ、より具体的には、化学物質、植物抽出物および金属、例えば潜在的医薬もしくは化粧品の構成成分、または他の作用因子（物理量）、例えば光もしくは熱、放射能、音、電磁放射線、電場などの作用を研究するために、そしてまた光毒性、すなわち異なる波長

50

の光が細胞構造に及ぼす損傷作用を研究するために、使用することができる。本発明に従って製造される真皮等価物は、創傷治癒を研究するためにも使用することができ、気体、エアロゾル、煙および粉塵が細胞構造または代謝もしくは遺伝子発現に及ぼす作用を研究するのにも適している。

【0044】

本発明に関して「作用因子」とは、皮膚または皮膚細胞に作用する光、熱などの物理的媒体であると理解される。したがって本発明は、本発明に従って製造される真皮等価物を使ったスクリーニング方法および診断方法にも関する。

【0045】

本発明の好ましい一実施形態は、研究対象物質および/または研究対象作用因子の存在下および不在下における真皮等価物の処理、ならびに真皮等価物の細胞または細胞構成成分に観察される作用の比較を含む。

【0046】

本発明のもう一つの好ましい実施形態は、本発明に従って製造される真皮等価物を使って、ならびに真皮等価物および表皮等価物からなる本発明の全皮膚等価物を使って、物質の浸透を研究する方法である。

【0047】

もう一つの特に好ましい実施形態として、本発明は、真皮等価物および表皮等価物からなる全皮膚等価物の製造を目的として、マトリックス中で真皮線維芽細胞および表皮ケラチノサイトを培養するための、上述したタイプの方法にも関する。この方法では、上述した線維芽細胞含有コラーゲンマトリックスの製造およびインキュベーションの1~3週間後、好ましくは10~14日後に、ケラチノサイトをマトリックス上に播種する。

【0048】

本発明に関して「ケラチノサイト」とは、動物由来であってもヒト由来であってもよい、角化扁平上皮を形成する表皮の細胞、遺伝子改変ケラチノサイト、もしくは自然突然変異によって生じるケラチノサイト、またはそのようなケラチノサイトの前駆体であると理解される。完全に角化した高分化表皮の発達は、使用するケラチノサイト中の基礎幹細胞の割合に大いに依存するので、本発明による方法のステップf)でマトリックスに播種されるケラチノサイトは、ヒト生検組織に由来する、大部分が未分化のケラチノサイト幹細胞であることができる。しかし、細胞株またはある種の分化細胞も、使用することができる。正常皮膚ケラチノサイトの代わりに、粘膜ケラチノサイトまたは腸管上皮細胞をマトリックスに適用してもよい。これらは、好ましくは前培養細胞であり、特に好ましい一実施形態では、細胞継代数が1または2のケラチノサイトであるが、さらに高い継代数の細胞も使用することができる。

【0049】

マトリックスへのケラチノサイトの播種は、好ましくは、細胞培養培地中で、特に好ましい一実施形態では、約1~30%のウシ胎仔血清、NCS、合成血清または血清代替品ならびに細胞の増殖および分化を促進するさまざまな濃度のさまざまな添加物を含有するDMEM/F12培地中に行なわれる。次に、好ましくは、特にマウス由来のEGF、または他の動物由来の匹敵する調製物、表皮成長因子(hEGF)(例えば0.2 µg/l培地の濃度)ならびに例えば0.8mM CaCl₂を含有するDMEM培地に、マトリックスを沈めて、好ましくは1~10日間、より好ましくは3~7日間の液内培養に付す。

【0050】

ケラチノサイト層の完全な分化は、例えばhEGFおよびBPE(ウシ下垂体抽出物)を含まないDMEMにおけるエアリフト培養によって達成される。本発明に関して「エアリフト培養」とは、栄養培地液面の高さがマトリックスの高さに正確に合わせられ、一方、ケラチノサイトまたはケラチノサイトによって形成される細胞層は栄養培地液面の上であって、栄養培地によって覆われないような培養、すなわち培養は空気/栄養培地界面で行なわれ、培養物が下から栄養を供給されるような培養であると理解される。この目的を達するために、例えば、皮膚モデルをマイクロタイタープレートから持ち上げ、ペトリ皿中の金属ス

10

20

30

40

50

ペーサー上に載っている濾紙上に置く。培地を、それが濾紙を完全に覆うのではなくて、液縁が皮膚モデルの基部付近（気／液界面）に存在するようなレベルまで、ペトリ皿に導入する。エアリフト培養の継続時間は、当業者の要求に応じて、さまざまであることができる。典型的には約1～4週間である。この期間中に、真皮等価物および表皮等価物からなる皮膚型インビトロ全皮膚モデルが発達する。

【0051】

インビトロ全皮膚モデルを製造するための本発明の方法は、ケラチノサイトの播種前、播種中、または播種後に、他の細胞タイプ、例えばメラノサイト、マクロファージ、単球、白血球、形質細胞、ニューロン細胞、脂肪細胞、ランゲルハンス細胞の誘導および非誘導前駆細胞、ランゲルハンス細胞、他の免疫細胞、内皮細胞、および皮膚または皮膚関連細胞の腫瘍に由来する細胞を、マトリックスに播種し、さらに培養することができるように、有利に改変してもよい。上記の細胞は、ヒト由来であっても、動物由来であってもよい。

10

【0052】

したがって本発明は、本発明の方法ならびに任意に後述のおよび／または前述の従来培養法によって製造された、皮膚型インビトロ全皮膚モデル、より具体的にはヒトインビトロ全皮膚モデルであって、表皮部分に少なくとも1層の増殖細胞層、数層の分化細胞層および少なくとも1層の角化細胞層を含み、表皮等価物は、基底層、有棘層、顆粒層および角質層を含み、特有のBMタンパク質、例えばラミニンおよびコラーゲンIVからなる基底膜が、真皮等価物と表皮等価物との間に存在し、さらにまた、皮膚型タンパク質、例えばトランスグルタミナーゼ、インボルクリン、コラーゲンIV、ラミニン、フィラグリン、フィブロネクチン、K-67、サイトケラチン10、そして特にエラスチンが発現されるモデルにも関する。

20

【0053】

ただしストレスマーカーであるサイトケラチン6はごくわずかししか発現しない。これは本発明のインビトロ全皮膚モデル中の細胞が比較的低いストレス状態にあることを示している。例えば創傷治癒中または再生中の皮膚では、強いCK6発現が観察される。

【0054】

真皮細胞および表皮細胞の増殖挙動および分化は、培養段階中に電場または電磁場を真皮モデルまたは全皮膚モデルに適用することによって、改変することができる。

30

【0055】

製造された全皮膚モデルは、その複雑さゆえに、特に、化学／医薬産業および化粧品産業におけるさまざまな課題に取り組むために使用することができる。より具体的には、本発明に従って製造される皮膚等価物は、物品を、例えば有効性、望ましくない副作用、例えば刺激作用、毒性作用および炎症作用もしくはアレルギー作用、または物質の適合性などに関して試験するのに適している。これらの物質は、潜在的に医薬としての、より具体的には皮膚薬としての使用がもくろまれている物質、または化粧品や皮膚と接触する消費者物品、例えば洗濯洗剤などの構成成分である物質であることができる。

【0056】

本発明に従って製造される皮膚等価物は、例えば、物質の吸収、輸送および／または浸透を研究するためにも使用することができる。さらに、他の作用因子（物理量）、例えば光または熱、放射能、音、電磁放射線、電場の研究、例えば光毒性、すなわち異なる波長の光が細胞構造に及ぼす損傷作用の研究にも適している。本発明に従って製造される皮膚等価物は創傷治癒の研究にも使用することができ、気体、エアロゾル、煙および粉塵が細胞構造または代謝もしくは遺伝子発現に及ぼす作用の研究にも適している。

40

【0057】

物質または作用因子がヒト皮膚に及ぼす作用は、例えば、ヒトまたは動物皮膚モデル系の細胞によるサイトカインまたは伝達物質などの物質の放出、ならびにそれらの細胞の遺伝子発現、代謝、増殖、分化および再編成に対する作用から決定することができる。細胞損傷を定量化するための方法を使って、より具体的にはテトラゾリウム誘導体などの生体

50

染色色素を使って、例えば皮膚細胞に対する細胞毒作用を検出することができる。本発明のヒト皮膚等価物を使った物質または作用因子の試験は、組織学的方法も、免疫学のおよび／または分子生物学的方法も含みうる。

【0058】

したがって、本発明の好ましい一実施形態は、本発明に従って製造されたヒト皮膚等価物を使って、物質または作用因子がヒト皮膚に及ぼす作用、より具体的には薬理作用を研究するための方法を含む。特に好ましい一実施形態では、XTTテトラゾリウム還元試験（EZ4U試験）またはアラマープルー（レサズリン還元試験，Promega）を行なう。EZ4Uは、生細胞によって、強く着色したホルマザンに還元されうる、無毒性水溶性黄色テトラゾリウム塩である。還元には完全なミトコンドリアが要求されるので、この試験は細胞の生存能を評価するために使用することができる。本発明に従って使用することができる生存能アッセイであって、やはりテトラゾリウム化合物に基づいているものには、例えばMTT、MTSまたはWST-1試験などがある。これらは、Rocheなどから試験キットとして入手することができる。細胞生存能は、損傷した細胞膜を持つ細胞からの乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH）の放出に基づいて評価することもできる。損傷した細胞膜を持つ細胞は、トリパンブルーによって選択的に着色することができる。

10

【0059】

本発明のもう一つの好ましい実施形態は、物質の浸透を研究するための方法であって、本発明に従って製造される真皮等価物と、本発明に従って製造される皮膚等価物との両方を、研究対象の物質で処理し、両方の系で得られた結果を互いに比較する方法を含む。

20

【0060】

本発明のもう一つの特に好ましい実施形態では、化学物質または他の作用因子が特殊な皮膚タイプに及ぼす作用を調べる。この実施形態では、所定の皮膚タイプの細胞、例えば色素が少ない皮膚タイプおよび／または色素が多い皮膚タイプを使って、本発明の皮膚等価物を樹立し、それを物質または作用因子の作用について試験する。

【0061】

本発明のもう一つの特に好ましい実施形態では、本発明に従って製造される皮膚等価物を、皮膚疾患を研究するためおよび皮膚疾患の新しい処置を開発するためのモデル系として使用する。例えば、ある種の遺伝性または後天性皮膚疾患を持つ患者の細胞を使って、患者特異的な皮膚モデル系を樹立することができ、次にそれを使って、ある種の治療方法および／または医薬の有効性を研究し、評価することができる。

30

【0062】

好ましい一実施形態として、本発明に従って製造される皮膚等価物に、微生物、より具体的には病原性微生物を定着させることができる。病原性微生物または寄生微生物、特にヒト病原性微生物などの定着は、とりわけ好ましい。本発明に関して微生物とは、特に真菌、細菌およびウイルスである。微生物は、好ましくは、真菌または病原性および／または寄生細菌から選択される。特に好ましい真菌は、カンジダアルビカンス（*Candida albicans*）、毛癬白癬菌（*Trichophyton mentagrophytes*）および癬風菌（*Malassezia furfur*）である。特に好ましい病原性および／または寄生細菌は黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）である。

40

【0063】

対応する定着皮膚等価物を使用することにより、微生物そのものによる定着の過程、より具体的には感染過程と、その定着に対する皮膚の応答との両方を、研究することができる。さらにまた、定着前、定着中または定着後に適用した物質が定着そのものに及ぼす作用、または皮膚等価物に対する定着の作用に及ぼす作用を、問題にしているタイプの皮膚等価物で研究することができる。

【0064】

本発明は、上述の培養方法を行なうことができる架橋マトリックスにも関する。上述のように、本発明によるマトリックスとそこで培養される線維芽細胞との組み合わせは、真皮等価物、表皮等価物および／または器官様全皮膚モデルの製造に使用することができる

50

。

【0065】

本発明は、

- a. 低溶解性コラーゲンをコラーゲン含有組織から取得すること、
 - b. その低溶解性コラーゲンを、混合機を使って、均一なコラーゲン懸濁液に変換すること、
 - c. そのコラーゲン懸濁液を凍結乾燥し、よって第1マトリックスAを製造すること、
 - d. 第1マトリックスAに架橋を施し、よって第2の機械的に安定化されたマトリックスBを製造すること、
 - e. ケラチノサイトを第2マトリックスB上に播種し、成長させること、そして最後に、
 - f. マトリックスB内およびマトリックスB上で成長するケラチノサイトを、表皮等価物が完全に形成されるまで、さらに培養すること
- を特徴とする、表皮モデルの製造方法にも関する。

10

【0066】

この場合は、全皮膚モデルを製造するための本発明の方法とは異なり、表皮モデルの骨組みまたは担体として働くケラチノサイトだけをマトリックス上に播種し、ケラチノサイトがまず増殖し、次にそれらが分化して、全4層からなる表皮が形成されるような条件下で培養する。好ましくは、マトリックス材料にケラチノサイトがより良く接着するように、そしてまた、細胞外マトリックスまたは基底膜のタンパク質がもたらす細胞シグナルが提供されるように、マトリックスを細胞外マトリックスまたは基底膜のタンパク質で前処理する。本発明の目的に適したタンパク質の例は、コラーゲンIVまたは他のタイプのコラーゲン、フィブロネクチンおよびラミニンである。本発明は、このようにして形成された表皮モデルにも関する。この表皮モデルは、全皮膚モデルと同様に、やはり多様な試験に使用することができる。

20

【0067】

好ましい培養培地は、DMEM（ダルベッコ変法イーグル培地）、M199およびハムF12培地である。しかし、線維芽細胞の培養が可能な他の任意の細胞培養培地も使用することができる。好ましくはウシ胎仔血清（FCS）を血清として使用するが、NCSおよび血清代替品も好適であり、緩衝液としては、例えばヘペス緩衝液を使用する。細胞培養培地、緩衝液および血清の溶液のpH値は、好ましくは6.0~8.0、例えば6.5~7.5の範囲にあり、より具体的には7.0である。

30

【0068】

本発明によれば、培地は他の因子、例えばホルモン、成長因子、接着タンパク質、抗生物質、選択因子、酵素および酵素阻害剤などを含有してもよい。

【0069】

表皮等価物におけるケラチノサイトの成長を改善するために、線維芽細胞とケラチノサイトとを共培養する場合であれば、線維芽細胞によって放出される因子を、培養培地に加えてもよい。例えば、調整培養上清（すなわち培養線維芽細胞および/または線維芽細胞と他の細胞タイプ、例えば内皮細胞、免疫細胞またはケラチノサイトなどとの共培養物の培地上清）を使用することができる。

40

【0070】

以下の図面および実施例は本発明を例示するものであって、決して本発明を限定するものではない。

【実施例1】

【0071】

マトリックスAの製造

濃酢酸（氷酢酸）875 μ lで酸性化した脱イオン水700mlを1000mlガラスビーカーに注ぎ込む。その溶液を、攪拌子を含む市販の磁気攪拌機で攪拌する。回転している水柱にウシ腱コラーゲン7.0gを一度に攪拌しながら加えた後、その混合物を攪拌機から取り出し、攪拌せずに室温で4時間静置する。混合物のpHを30分ごとに監視する。このpHは3.5~4の範

50

囲にあるべきである。その混合物を30分ごとに1分間にわたって高速で攪拌する。懸濁液の温度が決して上昇しないようにすることが重要である。最後に、懸濁液を高速で3分間攪拌することによって均一化する。均一化工程による加熱を避けるために、懸濁液を室温に保つ。乳状のコラーゲン懸濁液が得られる。存在する気泡を全て除去するために、懸濁液を20、400r.p.m. (=24.73G)で、1分間遠心分離してもよい(Hettich Universal 16 R, ローター直径138mm)。そうすれば発泡することなく気泡が消える。分注器を使って、懸濁液を24穴細胞培養プレートのウェルに移す。次に、充填済プレートを手で持ち上げ、わずかに傾けて、全ての方向に回することにより、ウェルの壁がマトリックス表面より上の部分もゲル溶液で濡れるようにする。これにより、ウェルにおけるマトリックスの接着が改善される。このように処理した充填済プレートを冷凍乾燥機に直接入れ、その中で冷凍する。

10

【0072】

24穴細胞培養プレートに導入したコラーゲン懸濁液を、加熱可能棚を持つ冷凍乾燥機で冷凍した後、減圧下で乾燥する。

【0073】

20のゲル溶液温度から出発して、冷凍速度は毎時18〜23にする。冷凍乾燥工程全体を約20〜27時間続ける。

【実施例2】

【0074】

マトリックスAの架橋によるマトリックスBの製造

20

大きく平坦な表面を持つ皮膚モデルを得るために、線維芽細胞を播種する前に、コラーゲンマトリックスを化学的に固定する。グルタルアルデヒド(GA)を固定剤として使用する： $C_5H_8O_2$, MW = 100.12。

【0075】

グルタルアルデヒド溶液をピペットで、24穴細胞培養プレート中の24個のマトリックスAの各マトリックス上に、注意深く移す。マトリックス表面を損傷しないように、溶液がウェルの内縁を伝ってゆっくり落ちるようにする。グルタルアルデヒド溶液は、コラーゲンスポンジの内部に浸透するのに、数分間を要する。浸透度が増すにつれて、マトリックスの色が純白から灰-淡黄色に変わる。次に、細胞培養プレートに覆いを載せ、溶液の蒸発を避けるために、端部をパラフィルムで密封する。処理済プレートを遮光下に室温で24時間保存する。

30

【0076】

マトリックスの架橋は、洗浄および平衡化を含めて、好ましくは5日間かけて、但至少なくとも4日間かけて、行なうことができる。

【実施例3】

【0077】

真皮等価物の製造

架橋コラーゲンマトリックス上に播種する前に、線維芽細胞培地を含有する細胞培養瓶で、適切な継代数の線維芽細胞を前培養する。必要な細胞密度に達した後、培養培地を吸引除去する。トリプシン溶液の添加によって細胞を培養瓶の底から剥離させ、培養培地で洗浄し、遠心分離によって取り出す。細胞数を決定した後、細胞懸濁液を $1 \sim 6 \times 10^5$ 線維芽細胞/mlの濃度に調節する。線維芽細胞培地で平衡化したマトリックスを含有するマイクロタイタープレートのウェルから、マトリックスが依然として湿ったままである程度に、培地を吸い出す。それぞれに $1 \sim 6 \times 10^5$ 個の線維芽細胞を含有する各1mlの線維芽細胞培地を、マトリックス表面を損傷しないように、ピペットでマトリックスの表面上に移す。播種が完了したら、プレートに覆いを載せ、次にそれを培養器に水平に入れる。マトリックス上での線維芽細胞の培養は $37^\circ C$ / 5% v/v CO_2 で行なう。培養培地を定期的に換える。2〜4週間後に、真皮モデルが完全に発達する。

40

【実施例4】

【0078】

50

全皮膚モデルの製造

架橋コラーゲンマトリックス上に播種する前に、線維芽細胞培地を含有する細胞培養瓶で、適切な継代数の線維芽細胞を前培養する。必要な細胞密度に達した後、培養培地を吸引除去する。トリプシン溶液（または接着細胞を剥離するのに適した他の任意の溶液）の添加によって細胞を培養瓶の底から剥離させ、線維芽細胞培地で洗浄し、遠心分離によって取り出す。細胞数を決定した後、細胞懸濁液を $1 \sim 6 \times 10^5$ 線維芽細胞/mlの濃度に調節する。培養培地で平衡化したマトリックスを含有するマイクロタイタープレートのウェルから、マトリックスの表面が依然として湿ったままである程度に、培地を吸い出す。それぞれに $1 \sim 6 \times 10^5$ 個の線維芽細胞を含有する各1mlの線維芽細胞培地を、マトリックス表面を損傷しないように、ピペットでマトリックスの表面上に移す。播種が完了したら、プレートに覆いを載せ、次にそれを培養器に水平に入れる。マトリックス上での線維芽細胞の培養は $37 \pm 5\% \text{ v/vCO}_2$ で行なう。培養培地を定期的に換える。

10

【0079】

2～4週間の線維芽細胞培養期間後に、その真皮モデル上にケラチノサイトを播種する。この目的を達するために、ケラチノサイト培地を含有する細胞培養瓶で、適切な継代数のケラチノサイトを前培養する。必要な細胞密度に達した後、培養培地を吸引除去する。トリプシン溶液の添加によって細胞を培養瓶の底から剥離させ、培養培地（ケラチノサイト培地）で洗浄し、遠心分離によって取り出す。細胞数を決定した後、細胞懸濁液を $1 \sim 6 \times 10^5$ ケラチノサイト/mlの濃度に調節する。真皮等価物を含有するマイクロタイタープレートのウェルから、真皮等価物の表面が依然として湿ったままである程度に、培地を吸い出す。それぞれに $1 \sim 6 \times 10^5$ 個のケラチノサイトを含有する各1mlのケラチノサイト培地を、マトリックス表面を損傷しないように、ピペットでマトリックスの表面上に移す。播種が完了したら、プレートに覆いを載せ、次にそれを培養器に水平に入れる（液内培養）。マトリックス上での線維芽細胞およびケラチノサイトの培養は $37 \pm 5\% \text{ v/vCO}_2$ で3～7日間行なう。培養培地を定期的に換える。

20

【0080】

3～7日間の液内培養後に、ケラチノサイト培地をウェルから吸引除去する。まだ不完全な全皮膚モデルをウェルから取り出し、濾紙上に置く。その濾紙をペトリ皿中の金属スペーサーに載せる。不完全な全皮膚モデルを濾紙上に載せた後、培地が濾紙の上縁に達して皮膚モデルの基部を取り巻く程度に、培養培地をペトリ皿に充填する（エアリフト培地、気/液界面培地）。皮膚モデルの表面は培養培地で覆われない（エアリフト培養または気/液界面）。皮膚モデルを、要求される分化度に応じて、気/液界面に1～4週間放置する。培養培地を定期的に換える。

30

【0081】

3種類の培養培地の組成を以下の表に示す。

線維芽細胞：

	最終濃度
DMEM (Glutamax I)	
FCS	10%
ペニシリンG	100 U/ml
ゲンタマイシン	25 $\mu\text{g/ml}$
アスコルビル-2-リン酸	1 mM

40

【0082】

ケラチノサイト：

	最終濃度
DMEM (Glutamax I)	
ハムF 12	
FetalClone II	10%
EGF	10 ng/ml
ヒドロコルチゾン	0.4 μ g/ml
インスリン	0.12 U1/ml
コレラ毒素	10^{-10} M
トリヨードチロニン	2×10^{-9} M (5 μ g/ml)
アデニン	2.43 μ g/ml
ペニシリンG	100 U1/ml
ゲンタマイシン	25 μ g/ml
アスコルビル-2-リン酸	1 mM

10

【 0 0 8 3 】

気 / 液界面

	最終濃度
DMEM (Glutamax I)	
ハムF12	
ヒドロコルチゾン	0.4 μ g/ml
インスリン	0.12 U1/ml
ペニシリンG	100 U1/ml
ゲンタマイシン	25 μ g/ml
BSA	1.6 mg/ml
アスコルビル-2-リン酸	1 mM

20

【 実施例 5 】

【 0 0 8 4 】

全皮膚モデル中のエラスチンの検出

分化済み皮膚モデルを気 / 液界面から直接取り出し、クリオスタット中で冷凍し、切断する（厚さ8 μ m）。切片を-20 の冷アセトンで10分間固定した後、TBS（トリス緩衝食塩水）で繰り返し洗浄する。抗エラスチン抗体（ウサギ：Novotec）をTBSで1：40に希釈し、切片に滴下し、その上で60分間放置する。次に切片を、TBS中で5分間、3回洗浄する。1：20に希釈したヤギ / 抗ウサギ抗体Alexaコンジュゲート（Molecular Probes製）を、二次抗体として使用する。コラーゲンマトリックスの高い天然蛍光を遮断するために、二次抗体を0.1%エバンスブルー溶液で希釈する。二次抗体を切片に滴下し、その上で60分間放置する。次にそれらをTBSで5分間、3回洗浄する。最後に、DAKO Faramount 包埋剤を使って抗体標識切片にカバーガラスをかける。一次抗体なしの切片を陰性対照としてインキュベートする。

30

40

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2005/008478

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61L27/24		
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) A61L		
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, PAJ, WPI Data, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 809 313 A (COLETICA) 30 November 2001 (2001-11-30) page 4, line 8 - line 15 page 6, line 25 - line 33 page 7, line 4 - page 10, line 15 examples 1,3,4,6,10,11,14 claims 1-27	1-4, 7, 9-15
X	EP 0 702 081 A (GUNZE LIMITED) 20 March 1996 (1996-03-20) column 2, line 26 - column 5, line 3 example 1 claims 1-14	1-4, 7-15
----- -/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> 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 5 April 2006		Date of mailing of the international search report 20/04/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5516 Patentlaan 2 NL - 2260 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Derrien, A-C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2005/008478

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 314 109 A (UNIVERSITY OF MEDICINE AND DENTISTRY OF NEW JERSEY) 3 May 1989 (1989-05-03) page 4, line 56 - page 5, line 40 page 6, line 8 - line 10 page 9, line 11 - line 52 examples 1-3 claims 1-19	1-5,7-15
X	US 2003/170892 A1 (BOYCE STEVEN T) 11 September 2003 (2003-09-11) page 2, paragraph 11 page 3, paragraph 22 - paragraph 28 page 4, paragraph 31 - paragraph 32 page 4, paragraph 36 - paragraph 40 page 5, paragraph 44 page 6, paragraph 55 - paragraph 56 claims 1-33	1-5,7-15
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 2000, no. 08, 6 October 2000 (2000-10-06) -& JP 2000 125855 A (GUNZE LTD), 9 May 2000 (2000-05-09) abstract	1-5,7-15
X	GEESIN J.C., BROWN L.J., LIU Z., BERG R.A.: "development of a skin model based on insoluble fibrillar collagen" JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH, vol. 33, 1996, pages 1-8, XP008062607 the whole document	1-4,7-15
A	US 5 282 859 A (EISENBERG ET AL) 1 February 1994 (1994-02-01) the whole document	1-15
A	LIU J.Y., HOU L.Z., YAN W.Q.: "fabrication of tissue engineered skin equivalent" CHINESE JOURNAL OF REPARATIVE AND RECONSTRUCTIVE SURGERY, vol. 15, no. 4, 2001, pages 235-239, XP008062613 abstract	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2005/008478

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2809313	A	30-11-2001	NONE	
EP 0702081	A	20-03-1996	JP 2858087 B2 JP 8089239 A	17-02-1999 09-04-1996
EP 0314109	A	03-05-1989	CA 1336405 C JP 2057263 A JP 2834155 B2	25-07-1995 27-02-1990 09-12-1998
US 2003170892	A1	11-09-2003	AU 2003217907 A1 CA 2478107 A1 EP 1483373 A2 JP 2005518910 T WO 03076604 A2	22-09-2003 18-09-2003 08-12-2004 30-06-2005 18-09-2003
JP 2000125855	A	09-05-2000	NONE	
US 5282859	A	01-02-1994	AT 161408 T AU 632693 B2 WO 9116010 A1 CA 2080693 A1 DE 69128530 D1 DE 69128530 T2 DK 526550 T3 EP 0526550 A1 ES 2111566 T3 FI 924773 A GR 3026463 T3 HU 63319 A2 JP 7047043 B JP 5506169 T RU 2135191 C1	15-01-1998 07-01-1993 31-10-1991 25-10-1991 05-02-1998 20-08-1998 31-08-1998 10-02-1993 16-03-1998 21-10-1992 30-06-1998 30-08-1993 24-05-1995 16-09-1993 27-08-1999

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/008478

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 314 109 A (UNIVERSITY OF MEDICINE AND DENTISTRY OF NEW JERSEY) 3. Mai 1989 (1989-05-03) Seite 4, Zeile 56 - Seite 5, Zeile 40 Seite 6, Zeile 8 - Zeile 10 Seite 9, Zeile 11 - Zeile 52 Beispiele 1-3 Ansprüche 1-19	1-5, 7-15
X	US 2003/170892 A1 (BOYCE STEVEN T) 11. September 2003 (2003-09-11) Seite 2, Absatz 11 Seite 3, Absatz 22 - Absatz 28 Seite 4, Absatz 31 - Absatz 32 Seite 4, Absatz 36 - Absatz 40 Seite 5, Absatz 44 Seite 6, Absatz 55 - Absatz 56 Ansprüche 1-33	1-5, 7-15
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN Bd. 2000, Nr. 08, 6. Oktober 2000 (2000-10-06) -& JP 2000 125855 A (GUNZE LTD), 9. Mai 2000 (2000-05-09) Zusammenfassung	1-5, 7-15
X	GEESIN J.C., BROWN L.J., LIU Z., BERG R.A.: "development of a skin model based on insoluble fibrillar collagen" JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH, Bd. 33, 1996, Seiten 1-8, XP008062607 das ganze Dokument	1-4, 7-15
A	US 5 282 859 A (EISENBERG ET AL) 1. Februar 1994 (1994-02-01) das ganze Dokument	1-15
A	LIU J.Y., HOU L.Z., YAN W.Q.: "fabrication of tissue engineered skin equivalent" CHINESE JOURNAL OF REPARATIVE AND RECONSTRUCTIVE SURGERY, Bd. 15, Nr. 4, 2001, Seiten 235-239, XP008062613 Zusammenfassung	1-15

INTERNATIONAL RESEARCH REPORT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/008478

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
FR 2809313	A	30-11-2001	KEINE
EP 0702081	A	20-03-1996	JP 2858087 B2 17-02-1999 JP 8089239 A 09-04-1996
EP 0314109	A	03-05-1989	CA 1336405 C 25-07-1995 JP 2057263 A 27-02-1990 JP 2834155 B2 09-12-1998
US 2003170892	A1	11-09-2003	AU 2003217907 A1 22-09-2003 CA 2478107 A1 18-09-2003 EP 1483373 A2 08-12-2004 JP 2005518910 T 30-06-2005 WO 03076604 A2 18-09-2003
JP 2000125855	A	09-05-2000	KEINE
US 5282859	A	01-02-1994	AT 161408 T 15-01-1998 AU 632693 B2 07-01-1993 WO 9116010 A1 31-10-1991 CA 2080693 A1 25-10-1991 DE 69128530 D1 05-02-1998 DE 69128530 T2 20-08-1998 DK 526550 T3 31-08-1998 EP 0526550 A1 10-02-1993 ES 2111566 T3 16-03-1998 FI 924773 A 21-10-1992 GR 3026463 T3 30-06-1998 HU 63319 A2 30-08-1993 JP 7047043 B 24-05-1995 JP 5506169 T 16-09-1993 RU 2135191 C1 27-08-1999

フロントページの続き

(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, 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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100104592

弁理士 森住 憲一

(72)発明者 アウグスト・ベルント

ドイツ連邦共和国デー - 5 5 4 1 1 ピンゲン - ケンプテン、キルヒシュトラッセ 2 2 番

(72)発明者 ヴォルフガング・フリース

ドイツ連邦共和国デー - 8 2 3 9 3 イッフェルドルフ、シュタルタッハー・シュトラッセ 2 4 アー
番

(72)発明者 カルステン・リュウディガー・メヴェス

ドイツ連邦共和国デー - 5 5 1 2 8 マインツ、アルバヌスシュトラッセ 8 2 アー番

(72)発明者 マルティナ・ラウス

ドイツ連邦共和国デー - 6 1 4 4 0 オーバーウルゼル、メメラ・シュトラッセ 5 番

(72)発明者 ヘンリエッテ・ベンツ

ドイツ連邦共和国デー - 8 1 2 4 1 ミュンヘン、プラネッガー・シュトラッセ 3 9 番

(72)発明者 シュテファン・キッペンベルガー

ドイツ連邦共和国デー - 6 0 3 1 6 フランクフルト・アム・マイン、バウムヴェーク 2 1 番

F ターム(参考) 4C081 AB19 BA06 CD121 CD34 DA02 EA02 EA06

4H045 AA10 CA40 EA20 EA34 FA67