

ヒト 3 次元培養皮膚モデル「Neoderm-ED」の 皮膚刺激性試験代替キットとしての可能性評価 —構造評価—

久保健太郎¹、加藤雅一¹、小島肇夫²

¹株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング、²日本メナード化粧品株式会社

Feasibility study for three-dimensional cultured human skin models as
Alternatives to skin irritation testing

Kubo Kentaro¹, Katoh Masakazu¹, and Kojima Hajime²

¹Japan Tissue Engineering Co.,Ltd, ²Nippon Menard Cosmetic Co.,Ltd

【目的】

動物を用いる皮膚刺激性試験・経皮吸収試験などを代替する目的において、これまでに様々な動物代替材料が開発されてきた。培養皮膚モデルは、これらの試験への適用が期待される動物代替材料のひとつである。国内においては、TESTSKIN・EpiDerm・VitrolifeSkin等のキットが市販されており、キット間、および施設間評価の結果より、皮膚刺激性試験に対して有望であることが認証されつつある。しかしながら、現状はモデルの性能・使用期限・価格などの問題から実用化という面では導入を絞りきれていない。そこで、既に海外において販売されているヒト皮膚 3 次元培養皮膚モデル「Neoderm-ED」の動物代替材料としての可能性を評価する。本研究では構造に関する基礎的な解析を行う。

【方法】

(製造) 直径 24mm (6 ウェルプレートサイズ) のトランスウェル上でヒト線維芽細胞を含んだコラーゲンゲルを作製した (真皮層)。このコラーゲンゲル上にヒト角化細胞を播種し、エアリフト培養を 12~14 日間行った (表皮層)。

(構造評価) H&E 染色; 4%パラホルムアルデヒド溶液で固定した後、5 μ m のパラフィン切片を作製し、光学顕微鏡観察のために H&E 染色を行った。

免疫染色; 10 μ m の凍結切片を作製し、ABC法により Collagen, , Fibronectin, Laminin, Involucrin, Transglutaminase に対する免疫染色を行った。

(透過型電子顕微鏡: TEM 観察) 2%グルタルアルデヒド溶液 (前固定) と 2%四酸化オスミウム (後固定) で固定し、1%四酸化ルテニウムでブロック染色を行った。脱水・エポキシ樹脂包埋後、80nm の超薄切片を作製し、酢酸ウラン/鉛溶液で電子染色を行った。カーボン真空蒸着

後、TEM (JEOLjem2000EX) 観察を行った。

【結果】

(製造) エアリフト培養後、コラーゲンゲル上に重層化した表皮が均一に観察された。作製期間は 21 日間であった。

(構造評価) H&E 染色; 光学顕微鏡観察では、線維芽細胞を含むコラーゲンゲル上に 8~12 層の生細胞層と 10~15 層の角質層を保持する表皮が観察された。また、生細胞層においては、通常の皮膚で観察される基底層・有棘層・顆粒層が存在していた。免疫染色; 基底膜成分である Collagen, , Fibronectin, Laminin と分化マーカーである Involucrin, Transglutaminase が正常皮膚で観察される適切な部位に発現していた。

(透過型電子顕微鏡: TEM 観察) 角質層においては多くの細胞が密に重層化したケラチン層が観察され、通常の皮膚で見られる basket-wave パターンを示した。層間には脂質 2 重膜が観察され、多くの脂肪滴が散在していた。顆粒層の細胞はケラトヒアリン顆粒を含み、隣接する細胞とデスモゾームにより強く接着していた。表皮層と真皮層の境界部には基底膜が観察されたが、lamina densa・lamina lucida は未成熟であり、明確なヘミデスモゾーム構造は観察できなかった。

【結論】

本研究で評価したヒト皮膚 3 次元培養皮膚モデル「Neoderm-ED」は組織学的に正常皮膚と同様の多層構造を示した。また、基底膜成分や表皮分化マーカーも適切な部位に発現していた。脂質 2 重膜・ケラトヒアリン顆粒・デスモゾームなどの微細構造の特徴も正常皮膚と類似していた。これらの結果は「Neoderm-ED」が新しい培養皮膚モデルとして動物代替材料となり得る可能性を示唆している。