

P2-112

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 —保存安定性評価—

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から、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。現在、これらのキットの品質保持期限を長くすることは、代替試験を行う実験者に対して重要な課題となっている。そこで、本研究では、品質保持期限の問題を解決するために、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」の保存安定性に関する検討を行い、最適な保存条件を設定する。

【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)。作製された培養皮膚モデルは寒天培地中に固定された状態で、温度制御可能な特殊容器を用いて輸送された。

(保存安定性の検討)

4℃、あるいは 15℃で 5・10 日間保存した培養皮膚モデルを用いて下記の構造・性能に関する評価を行った。

H&E 染色；4%パラホルムアルデヒド溶液で固定した後、5μm 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；10μm 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。

性能評価；Φ10mm のアッセイリングを用いて、培養皮膚モデルの表皮側に 100μl の 1%SLS 溶液を添加した。添加後、37℃・10%CO₂ インキュベーター内で 0.5, 1, 2, 4 時間暴露した。各時間暴露した後、1%SLS 溶液を除去し、培地で洗浄した。0.5mg/ml の MTT を含有した培地で 3 時間培養して、Φ8mm のバイプシーパンチを用いてアッセイリング内を打ち抜いた。バイオプシー片の色素を酸性イソプロパノール溶液で抽出し、570nm で吸光度を測定した。

【結果】

特殊容器を用いた輸送において、容器中の温度は 16~18℃で安定していた。4℃、あるいは 15℃で 5・10 日間保存しても基底層・有棘層・顆粒層・角質層を持つ構造の変化は観察されなかった。基底膜成分である Collagen、, Fibronectin, Laminin や分化マーカーである Involucrin, Transglutaminase の局在も維持されていた。性能評価においては、保存後も OD 値は保存前の 70~80%を維持しており、折 1%SLS における ET50 値も保存前と同レベルであった。

【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 4℃、あるいは 15℃で 10 日間安定であることが示唆され、品質保持期限の延長が期待された。代替試験を行う実験者に対する問題点のひとつを解決することにより、「Neoderm-ED」が新しい動物代替材料となり得る可能性があると考えられる。