

博士論文（要約）

灌流可能な血管を有する 皮膚モデルの構築

森 宣仁

目次

第1章 序論

1.1	本研究の目的と意義	4
1.2	研究の背景と従来研究	6
1.2.1	生体皮膚の構造及び機能	6
1.2.2	従来の皮膚モデル	7
1.2.3	皮膚モデルへの血管構築	9
1.2.4	灌流可能な血管流路の3次元組織への構築	13
1.3	本研究の提案手法及びその応用	16
1.3.1	血管流路を有する皮膚モデルの作製手法	16
1.3.2	血管流路を有する皮膚モデルの応用	16
1.3.3	皮膚モデルの研究開発における本研究の位置付け	19
1.4	本論文の構成	21

第2章 培養デバイス及び血管流路付き皮膚モデルの作製

2.1	緒言	22
2.2	血管流路付き皮膚モデルの培養デバイスの作製	22
2.2.1	皮膚モデル把持に関する要件及び対応方針	22
2.2.2	作製プロセス	23
2.3	血管流路付き皮膚モデルの構築	27
2.4	培養デバイスの評価	31
2.4.1	パリレンによる本体 - 底面プレートのシール効果	31
2.4.2	ワイヤ抜去に対するアンカ構造の効果	32
2.4.3	皮膚モデルの収縮に対するアンカ構造の効果	33
2.4.4	細胞及びコラーゲンの接着性に関する O ₂ プラズマの効果	35
2.4.5	皮膚モデルの収縮に対する O ₂ プラズマの効果	37
2.4.6	皮膚モデル - 培養デバイス間のシールに関する O ₂ プラズマの効果	38
2.5	結言	41

第3章 血管流路付き皮膚モデルの評価

3.1	緒言	42
3.1	血管流路付き皮膚モデルの要件	42
3.2	血管流路付き皮膚モデルの形態の評価	45
3.2.1	血管流路付き皮膚モデル全体の形態	45
3.2.2	表皮層	45
3.2.3	真皮層	49

3.2.4	血管流路	51
3.3	血管付き皮膚モデルの機能の評価	59
3.3.1	表皮バリア機能	59
3.3.2	血管流路の灌流機能	62
3.3.3	血管流路の分子サイズ選択的な透過性	62
3.3.4	血管流路の酸素・栄養供給機能	68
3.4	結言	72
第4章	血管流路付き皮膚モデルを用いた応用展開の検証	
4.1	緒言	76
4.2	経皮吸収試験への応用展開の検証	76
4.2.1	経皮吸収試験の実験方法	76
4.2.2	経皮吸収試験の結果	80
4.3	メカノバイオロジーのツール（伸展培養器）としての概念実証	83
4.4	結言	83
第5章	結論	
5.1	結論	85
5.2	今後の展望	87
参考文献		89
付録A	薬品、培地	101
付録B	細胞培養	103
付録C	凍結切片	104
付録D	HE染色	105
付録E	免疫染色	106
付録F	PLLチューブの作製	108
謝辞		111

第 1 章

序 論

1.1 本研究の目的と意義

本研究の目的は、灌流可能な血管構造を有する皮膚モデルを構築することである。本皮膚モデルは、従来の皮膚モデルと同等の真皮・表皮の二層に加え、新たに真皮層の内部に血管内皮細胞によって被覆された灌流可能な血管構造（以下、血管流路）を有することを特徴とする。さらに本研究では、作製した血管流路付き皮膚モデルが、化粧品開発や創薬における試験ツールとして利用可能であることを示す。加えて、皮膚のメカノバイオロジーに関する研究基盤としての応用についても概念実証を実施する。

皮膚は、体内と外界を隔てるバリア機能の役割を果たす人体最大の臓器である。また、皮膚には汗腺、脂腺、毛包などの付属器が存在し、血管と協働することで、体温調整や老廃物の排出といった役割を果たしている [1][2]。

皮膚の研究や治療のため 1980 年代に開発された皮膚モデル (skin-equivalent)[3] は、皮膚科学における研究ツールや、創傷部位の被覆としての利用のみならず、動物実験削減を求める社会の要請を受け、化粧品開発や創薬における動物実験の代替としても利用されている [4]。また、実際の皮膚を模倣するため、皮膚モデルは種々の細胞（メラノサイト、ランゲルハンス細胞等）で拡張され、さらに様々な制限があるものの、

三次元形状（乳頭層，皮下組織等），及び付属器（毛器官，汗腺等）の構築が試みられてきた [5]–[10]．その中でも，血管の再構築は，血管新生に関する研究基盤としての利用 [11]，皮膚モデル移植における生着率向上 [12]，薬物の血管への影響の測定 [13] といった様々な応用先があるため注目されている．加えて，血管は栄養及び酸素の供給経路として働くため，毛，汗腺，神経系，免疫系といった高次の構造及び機能を皮膚モデルに構築し，維持するための基盤となることが期待されている．これまで血管を構築するために，幹細胞や血管内皮細胞を真皮層に包埋して血管新生を誘導することで，毛細血管様の構造を有する皮膚モデルが構築されてきた．これらの皮膚モデルは血管新生の基礎研究，細胞治療，薬剤試験に利用されている [13]–[16]．しかしながら，これらの先行研究において構築された血管は，幹細胞もしくは血管内皮細胞が自発的かつランダムに形成した毛細血管様の閉じたネットワークであったため，外部とのインタフェースを設けて培養液や試薬を灌流することが困難であった．このため，血管を通じた皮膚モデルへの酸素及び栄養の供給や，血管からの溶液サンプリングが難しく，化粧品開発や創薬等のアプリケーションに制限を生じていた．制限の一例として，経皮吸収型製剤の血管への吸収の計測が困難であることが挙げられる．経皮吸収型製剤は，局所的に作用するステロイドや抗ヒスタミン薬等の貼付薬とは異なって，皮膚を透過した後，血管に吸収されて全身に作用する薬剤である．現在，一般に利用されている経皮吸収型薬剤としては，ニトログリセリン（狭心症治療薬），二硝酸イソソルビド（狭心症治療薬），クロニジン（高血圧治療薬），スコポラミン（酔い止め），エストラジオール（更年期障害治療薬），ニコチン（禁煙治療薬）などがあり [17]，いずれも皮膚への貼り付け後，血管を通じて全身に作用する．血管流路を有する皮膚モデルは，薬剤を貼り付けた際の血管への吸収特性を評価できるため，このような経皮吸収型製剤及びそのキャリアの開発に利用可能であると考えられる．

そこで本研究では，血管流路を皮膚モデル中に組み込むことを目指す．つまり，従来の表皮及び真皮層からなる皮膚モデルに対して，内皮細胞に覆われた血管流路を統合し，さらにこの血管流路の両端を培養デバイスのコネクタ部に固定することで，外部ポンプによる培養液の灌流を可能とする．血管流路の培養デバイスへの固定においては，皮膚モデルの培養中の収縮 [18]–[23] や作製プロセス中の力学的な負荷による，皮膚モデルの培養デバイスからの脱離が技術的課題となる．本研究では，培養デバイスに皮膚モデルの脱離を防止するための構造付加や表面処理を実施することでこの課題を解決する．本方法により作製した血管流路付き皮膚モデルは，化粧品試験や創薬において，被験物質を皮膚に塗布した際の血管吸収のモデルとして利用できると期待

できる。この利用可能性を実証するため、経皮吸収型製剤に使用される薬剤を被験物質として経皮吸収試験を実施する。また、別の応用展開として、培養デバイス及び皮膚モデルに対して周期的な伸長・圧縮を付加できるように改良することで、メカノバイオロジーのツールとしての利用可能性を検討する。

また、本研究の「皮膚モデルを培養デバイスに固定して灌流可能とする」技術は、他の細胞含有組織にも有効であり、特に再生医療における3次元組織構築に寄与することが期待できる。

以上のとおり、血管流路を有する皮膚モデルの構築は、皮膚に関する基礎研究、化粧品産業、創薬、再生医療といった広範な分野の発展に寄与する研究であると考ええる。

1.2 研究の背景と従来研究

1.2.1 生体皮膚の構造及び機能

ヒトの皮膚は Fig. 1.1 及び Table 1.1 に示すように、主に表皮 (epidermis) 及び真皮 (dermis) の二層からなる [24][25]。表皮は 50–200 μm 程度の厚みを持つ層であり、密に積み重なった細胞と、細胞の産生したケラチン (keratin) やセラミド (ceramide) により形成されている。表皮は上から順に角層 (stratum corneum), 顆粒層 (stratum granulosum), 有棘層 (stratum spinosum), 基底層 (stratum basale), 基底膜 (basement membrane) で構成される。これらの層は、基底層の角化細胞 (keratinocyte) が上層へ移動して分化することで形成され、最終的には角層となって剥離、脱落する。また、表皮を構成する細胞には、角化細胞以外に色素細胞であるメラノサイト (melanocyte) や、免疫系の一要素であるランゲルハンス細胞 (Langerhans cell) も存在する。皮膚の主要機能であるバリア機能を果たすのは表皮層であり、中でも角層が最も大きく寄与する。また、表皮は様々な物質の侵入を防ぐ一方で、脂溶性低分子に対しては経皮吸収におけるインタフェースとしても働く [26]。

真皮は主にコラーゲン (collagen) やエラスチン (elastin) 等の線維成分、及び細胞成分からなる層で、0.5–3 mm 程度の厚みを持つ。表皮に食い込む形で乳頭層 (dermal papillae) から始まり、乳頭下層 (subpapillary layer), 網状層 (reticular layer) からなる。乳頭層及び乳頭下層においては線維成分は疎だが細胞成分や毛細血管に富み、網状層はコラーゲン等の線維成分が密で細胞成分は疎である。真皮の細胞成分としては、線維芽細胞 (fibroblast) や各種免疫系の細胞が存在する。特に線維芽細胞は、線維成分を産生する役割を持っており、真皮の維持や創傷治癒において重要な役割を果たす。

他者の著作権に関わる図版を使用しているため、本図を非公開とする。

Fig. 1.1 生体皮膚の模式図. ([24] より引用 © Elsevier 2014.)

また、真皮には、栄養や酸素を供給することで恒常性を維持するための血管 (vascular channel) が存在する。血管は、血管内皮細胞 (vascular endothelial cell) 及びペリサイト (pericyte) によって被覆された管腔構造であり、皮下組織 (hypodermis, subcutaneous layer) から真皮へと上行し、真皮深層で平面的な血管網である皮下血管叢 (subcutaneous plexus) を形成する。そこからさらに上行し、乳頭下層と網状層との境界付近で乳頭下血管叢 (subpapillary plexus) を形成する。これらの血管叢における血管径は数十～数百 μm である。さらに、毛細血管が乳頭下血管叢から上行して乳頭でループを形成する。

また、皮膚には各種機能を担う付属器も存在している。付属器には、毛器官（毛包、毛等）、脂腺、汗腺、神経系等があり、血管と協働することで体温調節、老廃物の排出、センサとしての役割等を果たす。その他に皮膚を特徴付ける構造として、皮膚表面の細かい溝である皮溝 (sulcus cutis)、及び皮溝に囲まれた領域である皮丘 (crista cutis) からなるマイクロレリーフ、真皮の下で保温や衝撃吸収を担う皮下組織等がある。また、立体形状（骨格）を覆うかたちで形成されていることも皮膚の構造としての特徴の一つである。

以上のうち、本研究の皮膚モデルにおいて特に注目するのは、構造の観点からは表皮、真皮及び血管であり、また機能の観点からは表皮におけるバリア機能及び経皮吸収、血管による栄養と酸素の供給である。

1.2.2 従来の皮膚モデル

皮膚モデルは 1980 年代に Bell ら [3] によって開発され、様々な変法 [27]–[29] はあるものの、現在でも基本的にはオリジナルの作製法が用いられている。すなわち、真皮線維芽細胞 (normal human dermal fibroblast; NHDF) を包埋した I 型コラーゲンを真皮モデルとし、その上に表皮角化細胞 (normal human epidermal keratinocyte; NHEK) を播種して表皮層を形成した後、表皮層を空気に曝露した状態 (気液界面) で培養を行ったものである。Fig. 1.2 に示すように、この製法で作製した皮膚モデルは、ヒトの皮膚と同様に真皮と表皮の二層からなり、表皮の最上部においては角化が進んで角質が形成される。

皮膚モデルは、化粧品開発や創薬分野においては被験物質の皮膚刺激性 [30]–[32]、

Table 1.1 皮膚の構造と機能一覧.

大分類	小分類	機能
表皮	角層	化学的バリア (水分蒸発の防止含む)
	生細胞層 (顆粒層～基底膜)	皮膚の機械的強度
	メラノサイト	紫外線バリア 外観への寄与 (色素の産生)
	ランゲルハンス細胞	免疫系の一部
真皮	線維芽細胞	血管や付属器の足場
	ECM(主成分: I型コラーゲン)	皮膚の機械的強度
血管	血管叢 (= 血管流路)	栄養・酸素供給
	毛細血管	体温調節
立体的特徴	表皮突起	表皮と真皮の結合強化
	真皮乳頭	表皮幹細胞の居所
	マイクロレリーフ (皮溝, 皮丘)	触覚増幅 滑り止め 外観への寄与 (皮膚の肌理)
	曲面形状	立体骨格の被覆
付属器	毛器官	体温調節 皮膚の保護 表皮幹細胞の居所
	汗腺	体温調節 老廃物の排出
	脂腺	皮膚の保護 (皮脂の産生)
その他	神経系	センサ (触覚, 痛覚等)
	免疫系	異物バリア (微生物)

光毒性 [33] 及び皮膚中での代謝 [34] の評価ツールとして, 医療用途では火傷など皮膚の創傷部位への移植片として [35][36], 皮膚科学の基礎研究においては創傷治癒モデル [37][38] 等として, 幅広く利用されている. また, 上記分野での応用範囲を広げるため, 皮膚モデルに生体皮膚の各種構成要素を再構築し, 形態や機能を生体皮膚に近づける試みも行われている. Table 1.2 に皮膚モデルへの各種構成要素の再構築に関する代表的な報告をまとめた. Table 1.2 によれば, これらの試みのうちメラノサイトやランゲルハンス細胞といった細胞種を追加する方式のものは達成済である. しかしながら, 付属器の再構築や立体形状の構築は未だ不十分であり, この一つの要因として, 栄養及び酸素の供給経路としての血管流路が存在していないことが想定される. 次項

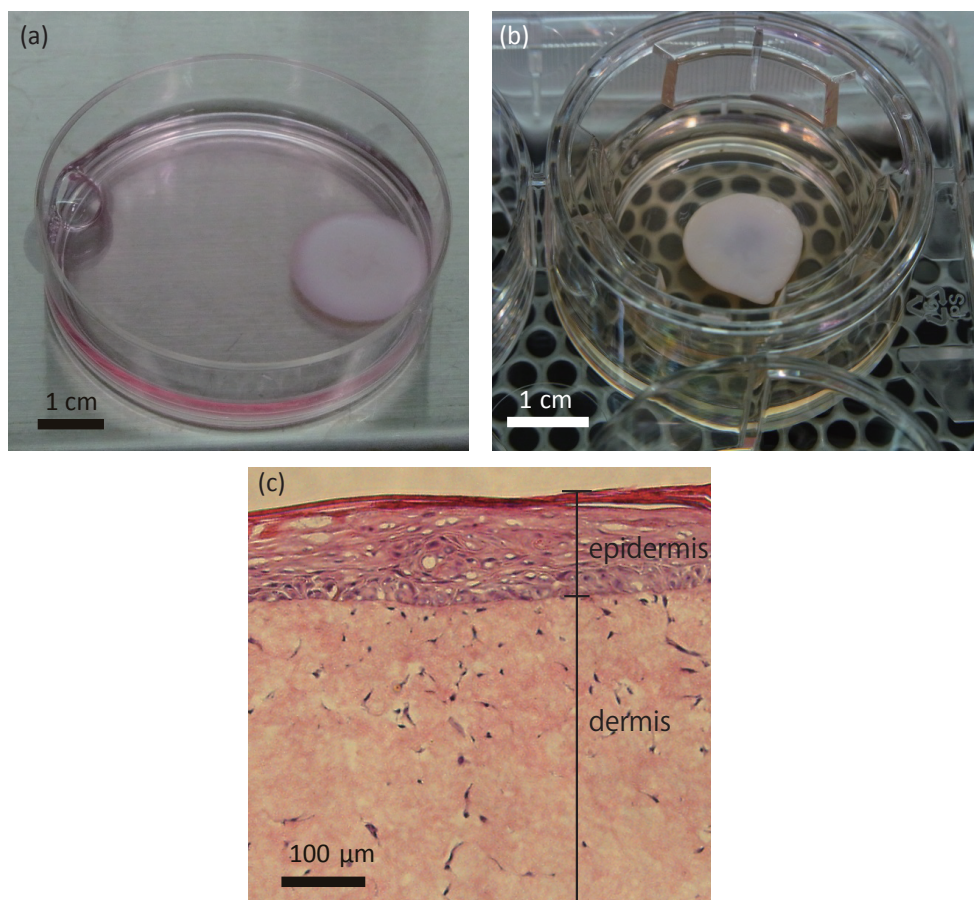


Fig. 1.2 従来手法 [26] を用いて作製した皮膚モデル. (a) 真皮モデル (NHDF 包埋コラーゲン). (b) 皮膚モデル (真皮モデルの上面に NHEK を播種したもの). (c) 皮膚モデルの断面図 (HE 染色像).

で詳細を述べるが、血管のうち皮膚モデルへの再構築が実施されているのは、外部から送液が困難な毛細血管様の構造だけである。従って、現時点の皮膚モデルにおける栄養供給は、培養液と接する真皮表面から内部への拡散のみに依る。外部から送液可能な血管流路を構築することができれば、真皮内部へ直接的に栄養及び酸素を供給することが可能となると考えられる。

1.2.3 皮膚モデルへの血管構築

各種構成要素の再構築に関する研究の中でも、皮膚モデル内への血管構築が特に盛んに取り組まれてきた。この理由は、血管を構築することで基礎研究、創薬、医療等諸分野での皮膚モデルの応用範囲が広がるからである。この一例として、血管新生に関する基礎研究や血管新生を抑制する薬剤の評価 [47][48] が挙げられる。また、厚い皮膚モデル (> 0.4 mm) は生体への移植時に移植ホストからの血管新生に時間がかかる

Table 1.2 皮膚モデルへの諸構成要素の再構築

大分類	小分類	サマリ	Bell, et al.[3]	Regnier, et al.[39]	Michel, et al.[40]	Facy, et al.[41]	Lmmers, et al.[42]	Lee, et al.[43]	Ponec, et al.[44]	Huang, et al.[45]	Bellas, et al.[46]
表皮	角層	+	+	+	+	+	+	^c ₋	+	+	+
	生細胞層(顆粒層～基底膜)										
	メラノサイト	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	ランゲルハンス細胞	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
真皮	線維芽細胞	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	ECM(主成分:I型コラーゲン)	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
血管	血管叢(=血管流路)	^a ₋	-	-	-	-	-	-	^a ₋	-	-
	毛細血管										
立体的特徴	表皮突起, 真皮乳頭	^b ₋	-	-	-	-	^b ₋	-	-	-	-
	マイクロレリーフ(皮溝, 皮丘)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	曲面形状	^c ₋	-	-	-	-	-	^c ₋	-	-	-
	毛器官	^d ₋	-	-	^d ₋	-	-	-	-	-	-
付属器	汗腺	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	脂腺	^e ₋	-	-	-	-	-	-	-	^e ₋	-
	神経系	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
その他	免疫系	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	皮下組織	^f ₋	-	-	-	-	-	-	-	-	^f ₋

+: 有り, -: 無しもしくは制限有り. 制限については以下に記載.

a. 毛細血管様の構造のみものは存在.

b. 構造のみ模倣.

c. 気液界面での培養ができていないため, 表皮形成不十分と推測.

d. 生体毛髪を包埋したものは存在.

e. 生体脂腺を包埋したものは存在.

f. silk 素材で皮下組織代替物を形成したもの.

ため生着率が悪いことが知られており、この問題を解決するためにも皮膚モデルへの血管の構築は取り組まれてきた [49]–[51].

皮膚モデルへの血管構築を達成するため、真皮層に幹細胞や血管内皮細胞を導入することで毛細血管様のネットワークを作製するアプローチが取られているが、真皮の材料や導入する細胞種が以下に述べるように試行錯誤されてきた. Black ら [52] はキトサンとコラーゲンで作製されたスポンジ状のポリマーに NHDF とヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells; HUVEC) を播種して真皮層とし、NHEK を真皮表面に播種することで表皮層を形成した (Fig. 1.3a). このようにして作製された皮膚モデル内部には、毛細血管様の管腔構造が構築された. また、Tonello ら [53] はヒアルロン酸多孔体 (HYAFF-11) に NHDF と HUVEC を播種することで真皮層を作製し、毛細血管様の構造が形成されることを確認した (Fig. 1.3b). Ponec ら [54] は、ラット由来のコラーゲンゲルに NHDF とヒト皮膚微小血管内皮細胞 (human dermal microvascular endothelial cell; HDMEC) を導入し、毛細血管様の構造を作製した (Fig. 1.3c). また、Ponec らは NHDF 及び HDMEC をセルカルチャーインサート上で培養して細胞外基質 (extracellular matrix; ECM) を産生させ、さらに NHEK とメラノサイトを播種して皮膚モデルを作製する試みも行った (Fig. 1.3d). この場合も毛細血管様の構造が形成されることが分かっている. Klar ら [55] は真皮の材料としてラット由来コラーゲンもしくはフィブリンを用い、間葉系幹細胞を含む脂肪間質血管細胞群 (adipose stromal vascular fraction; SVF) を真皮に包埋することで毛細血管様のネットワークを形成することに成功している (Fig. 1.3e). 同様に、Marino ら [56] も真皮の材料としてラット由来コラーゲンもしくはフィブリンを採用し、NHDF と HDMEC を包埋培養することで毛細血管様ネットワークの形成に成功した (Fig. 1.3f).

しかしながら、以上の血管構築の方法は、幹細胞もしくは血管内皮細胞の自発的かつランダムな血管新生 (neovascularization) を利用したものであるため、形成された毛細血管様の構造は外部からアクセスすることができず、流路として機能しない. 従って、外部ポンプを使用して培養液を灌流することでの皮膚モデルへの栄養供給や、血管からの溶液のサンプリングは困難であり、このことは血管付き皮膚モデルの基礎研究、創薬、医療等諸分野での利用可能性を制限している.

また、灌流可能な流路付きの皮膚モデルという観点では、シリコンやアクリルなど樹脂製のマイクロ流路と皮膚モデルを統合する研究も行われている (Fig. 1.4). Abaci ら [57] は、皮膚モデルを多孔質膜と隔てる形で PDMS マイクロ流路上に設置し、皮膚モデルの表皮に塗布した薬剤の流路への透過量を測定した (Fig. 1.4a). また、Ramadan

他者の著作権に関わる図版を使用しているため、本図を非公開とする。

Fig. 1.3 毛細血管様のネットワークを有する皮膚モデル. (a) 真皮層：コラーゲン+キトサンのスポンジ，細胞：NHDF+ HUVEC [52]. (b) 真皮層：ヒアルロン酸の多孔質体 (HYAFF-11)，細胞：NHDF+ HUVEC [53]. (c) 真皮層：コラーゲングル，細胞：NHDF + HDMEC [54]. (d) 真皮層：細胞の自己産生 ECM，細胞：NHDF + HDMEC [54]. (e) 真皮層：フィブリン，細胞：SVF [55]. (f) 真皮層：コラーゲングルもしくはフィブリン，細胞：NHDF + HDMEC [56]. (© Federation of American Societies for Experimental Biology 1998, © Elsevier 2003, 2014, © Springer 2005, © American Association for the Advancement of Science 2014)

ら [58] は、皮膚モデルを多孔質膜と隔てる形で樹状細胞を入れた PMMA マイクロ流路上に設置し、皮膚モデル表皮側にリポ多糖を接触させることで、皮膚モデルのバリア機能や流路内に存在する樹状細胞の免疫反応を計測した (Fig. 1.4b). このようなマイクロ流路と皮膚モデルの統合デバイスは灌流可能であるため、毛細血管様のネットワークを持つ皮膚モデルの課題であった液体のサンプリングを行うことができる。しかしながら、このようなデバイスは、血管内皮細胞が存在しないため血管ならではの特性（半透膜性、流れや生化学的な刺激による透過性の変化など）の計測が難しい点、及び流路の皮膚モデル下面以外への配置が困難な点が課題である。なお、後者については、栄養の供給経路として見た場合、皮膚モデルの下面付近にしか灌流による栄養供給ができず、真皮の中間～上層に直接栄養を供給することが困難という制限に繋がる。また、経皮吸収試験のツールとしての観点からは、真皮内における血管の空間的配置の影響を考慮しにくいこと、血管への透過と皮膚全層の透過の分離が困難といった制限にも繋がる。さらに、ヒト皮膚の模倣という観点からは、真皮層中に円筒形状で存在する血管の配置及び形状が実現困難となること、またこれに伴い、血管に対する流体力学的な影響の再現が困難となることといった制限もある。仮に皮膚モデル底面に血管内皮細胞を平面的に配置したとしても、これらの制限は依然として残ると考えられる。

以上、本項までに記載の内容から、皮膚モデル内部への灌流可能な血管流路構築が必要であると考えられる。なお、このような血管流路は、ヒト皮膚においては毛細血管に分岐する前の血管叢に相当すると考えられる。

他者の著作権に関わる図版を使用しているため、本図を非公開とする。

Fig. 1.4 マイクロ流路に統合された皮膚モデル. (a) 薬剤試験向けのポンプレス灌流流路付き皮膚モデル [57]. (b) 免疫反応試験向けのマイクロ流路統合皮膚モデル [58]. (© Royal Society of Chemistry 2015, 2016)

1.2.4 灌流可能な血管流路の 3 次元組織への構築

再生医療や創薬に向けて 3 次元組織を作製する組織工学の分野においては、3 次元組織への栄養及び酸素を供給するための血管流路の構築が行われている [59]. 本論文では、血管流路の構築方法を (a) 抜去法 (extraction method), (b) スタンプ法 (stamp method), (c) 3 次元テンプレート法 (3D template method), (b) 血管新生法 (neovascularization method) の 4 種類の方法に分類する (Fig. 1.5). これらを比較し、本論文の主目的である灌流可能な血管流路付き皮膚モデル作製に適用する方法、及び適用にあたって改善すべき点を明らかにする. なお、各方法の評価観点については網羅的ではなく、皮膚モデルへの適用にあたって重要となる観点を中心に記述する.

(a) 抜去法 [60]–[62]

抜去法においては、(i) 棒状部材（ニードル等）を貫通させた培養デバイス中にコラーゲンなどの ECM を注入してゲル化させ、(ii) ニードルを引き抜き、(iii) 血管内皮細胞を流路中に播種した後、外部ポンプと培養デバイスをチューブで接続して灌流を行う. 本方式のメリットとしては、全方式の中で最も簡便であることや、作製される流路断面が円形であるため、（同一断面積の場合に他の形状と比べて）外力に対して変形しづらいと考えられることがある. さらに、流路の深さ方向の位置を任意に設計可能であることもメリットである. 一方、多数の流路や、枝分かれや曲線などを含む複雑なネットワークの形成に制限がある点がデメリットである.

(b) スタンプ法 [63][64]

スタンプ法においては、(i, ii) PDMS 製のスタンプを用いて ECM にマイクロ流路を転写し、(iii) ECM の薄膜をアクリル樹脂で圧迫して流路をシールしたうえで、血管内皮細胞を播種、灌流を実施する. 本方式のメリットは、枝分かれなどを含む複雑なネットワークの血管流路を形成可能という点、流路位置を任意に設計可能という点等である. デメリットとしては、外力に対して変形しやすい直方体の流路となること、平面

的な流路以外は構成困難であること，ECM を培養デバイスで上下から圧迫するため ECM を露出した状態での培養が難しいことが挙げられる。

(c) 3次元テンプレート法 [65]–[67]

3次元テンプレート法においては，(i) 3D プリンタで培養デバイス中に犠牲構造 (sacrificial structure) を構築したうえで ECM を注入してゲル化させ，(ii) 犠牲構造を除去してマイクロ流路を形成し，(iii) 血管内皮細胞を播種し，灌流を実施する。なお，犠牲構造の材料としては糖類やゼラチン等が使用される。また，血管内皮細胞の播種方法として犠牲構造の中にあらかじめ混合しておく方法もある [68]。本方式のメリットは，複雑な3次元的なネットワークの任意形状・位置の血管流路を構築可能ということ，及び外力に対して変形しにくい円形断面の流路を構築可能ということである。一方，デメリットはハイドロゲルなどを造型可能な特殊な 3D プリンタが必要となる点である。ただし，近年の 3D プリンタ技術の発展及び一般化を考慮すると，近い将来にこの点はデメリットではなくなると推測できる。

(d) 血管新生法 [69]–[71]

血管新生法においては，(i) ソフトリソグラフィで作製した ECM 製のマイクロ流路に血管内皮細胞を播種し，(ii) 成長因子等の濃度勾配を利用して血管内皮細胞の血管新生を誘導して灌流可能な血管流路を構築する。本方式のメリットは，生体の毛細血管に近い3次元的なネットワークの流路を構築可能であるということ，形成される多くの流路断面が円形であり外力に対して変形しづらいことが挙げられる。一方，デメリットとしてはネットワーク形状・位置のコントロールが困難なこと，作製に時間がかかること (血管内皮細胞が 1 mm の厚さの ECM を貫通し灌流可能となるまでに約 1 週間)，ECM を露出して培養することが困難であること，ECM 中に組み込める細胞種が限定されることが挙げられる。最後の制限に関しては，本方式が成長因子等の勾配を利用したものであるため，例えば線維芽細胞などの血管新生因子を産生する細胞を ECM に埋め込んだ場合には，本来の濃度勾配を阻害してしまい，結果として血管流路を形成できないと推測したものである。

以上の方式を Table 1.3 にまとめた。血管流路付き皮膚モデル構築にあたっての必須要件と考えられる評価観点にはアスタリスク (*) を付記した。必須要件である「3. 流路断面形状 (外力に対する強さ)」は皮膚モデルが培養中に大きく収縮することから設定した。また，「5. ECM の露出培養」については，皮膚モデルの培養においては ECM

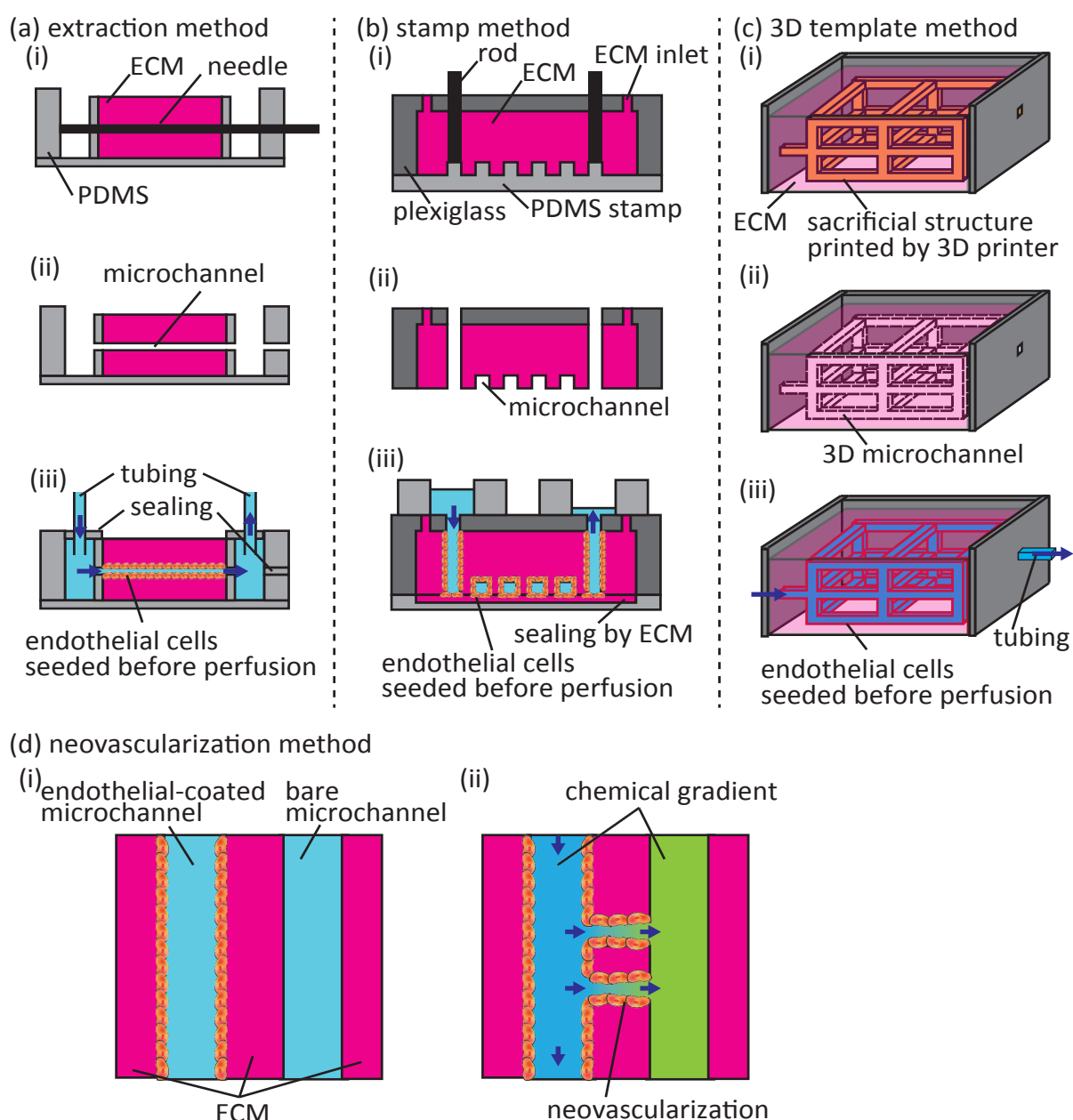


Fig. 1.5 3次元組織中への灌流可能な血管流路の構築. (a) 抜去法. (b) スタンプ法. (c) 3次元テンプレート法. (d) 血管新生法.

表面に NHEK を播種したうえで気液界面で培養する必要があることから設定した. 「6. ECM への他の細胞の導入」については, 皮膚モデルにおいて ECM 中に NHDF を包埋して培養する必要があることから設定した. 以上の必須要件を満たすのは (a) 抜去法及び (c) 3次元テンプレート法だが, (c) 3次元テンプレート法はハイドロゲルを造型可能な 3D プリンタを必要とすることから, 本研究では (a) 抜去法を使用することとした.

ただし, 皮膚モデルの作製にあたっては単純に抜去法を適用することはできない. この理由は, 皮膚モデルの培養中の収縮や, 収縮によって圧迫されたニードルを抜去

する際の力学的な負荷等によって、皮膚モデルが培養デバイスから脱離することが問題となるからである。

1.3 本研究の提案手法及びその応用

1.3.1 血管流路を有する皮膚モデルの作製手法

本研究では、組織構築や培養の際に生じる負荷に抗して皮膚モデルを把持可能な培養デバイスを作製することで、血管流路を皮膚モデル内に構築し、灌流培養を可能とする。

本研究において提案する培養デバイスは、Fig. 1.6 に示すように、皮膚モデル真皮層内の血管流路への接続部 (connection) を有する。血管流路は、対向する接続部間に棒状部材を通しておき、コラーゲンのゲル化後に引き抜いて血管内皮細胞を播種することで形成する (抜去法)。しかしながら、前節にて記載のとおり、棒状部材の引き抜きや培養中の収縮によって皮膚モデルが培養デバイス (接続部) から脱離することが問題となる。そこで、接続部に皮膚モデルを固定するためのアンカ構造 (anchoring structure) を設け、さらに ECM と細胞の接着性を増加させるための表面処理 (surface treatment) を施すことで、脱離の問題を解決する。なお、抜去法がもともと抱える問題点として枝分かれを含む複雑なネットワークの形成が困難ということがあったが、本研究では抜去法に用いる棒状部材として柔軟性を有するナイロンワイヤ採用し、これを格子状に配置することで枝分かれ構造のネットワークを形成可能とした。また、接続部の反対側末端には外部ポンプへの接続ポートがあり、これにより灌流が可能となる。さらに、本培養デバイスは開放構造となっているため、表皮の分化に必要な気液界面での培養が可能である。これによって、図に示すような従来と同じ真皮及び表皮の二層からなる皮膚モデルに対し、新たに血管流路を構築することができる。

1.3.2 血管流路を有する皮膚モデルの応用

本研究では、血管流路付き皮膚モデルの諸分野における利用可能性を示すため、その代表例として経皮吸収試験を実施する。これまで、経皮吸収型製剤の皮膚透過及び血管吸収の評価は、実験動物 (マウス, ラット, 豚) を用いた *in vivo* 試験を実施する [72]–[74] か、もしくは被験物質の物性値や皮膚モデル (血管無し) での吸収試験結果を基にしてシミュレーションする *in vitro* と *in silico* の組み合わせ手法 [75]–[81] で行われて

Table 1.3 3次元組織への血管流路作製法の比較.

#	観点 (大分類)	観点 (小分類)	(a) 抜去法	(b) スタンプ法	(c) 3次元テンプレート法	(d) 血管新生法
1	作製可能な流路形状の特性	流路位置, ネットワーク形状の制御	○可	○可	○可	×難
2		複雑なネットワークの形成	△制限有	△制限有	○可	○可
3*		流路断面形状 (外力に対する強さ)	○円形	×四角形	○円形	○円形
4		流路径	50 μm ~	50 μm ~	100 μm ~	10~50 μm
5*	培養条件の自由度	ECM の露出培養	○可	×難	○可	×難
6*		ECM への他の細胞の導入	○可	○可	○可	×制限有
7	加工条件	血管流路作製に要する時間	○短い	○短い	○短い	×長い
8		必要な加工装置	汎用 3D プリンタ, もしくは NC (numerical control) 加工装置	フォトリソグラフィ用の装置	ハイドロゲルを造型可能な 3D プリンタ	フォトリソグラフィ用の装置

*: 血管流路付き皮膚モデル作製にあたっての必須要件

いた。動物実験の削減が求められる現在, *in vitro* + *in silico* の手法が望ましいが, この手法では *in vitro* と *in silico* の二段階の実験が必要になることや, 血管に関するパラメータ (血管壁の透過係数等) は類似物質の *in vivo* での数値を利用する必要があることが課題である。本研究では, 血管流路付き皮膚モデルの表皮から経皮吸収型製剤であるカフェイン (caffeine) 及び二硝酸イソソルビド (isosorbide dinitrate; ISDN) の溶液を載せ, 血管流路及び真皮底面への透過量を測定する (Fig. 1.7)。また, その際に血管の透過性を変化させる因子を添加することで, 本実験系が生体に類似した挙動を示すことを確かめ, 血管流路付き皮膚モデルの経皮吸収試験への利用可能性を示す。

また, 他の応用例として, 本培養デバイスおよび血管流路付き皮膚モデルのメカノバイオロジー (機械的刺激が細胞や組織等に与える影響を研究する学問) のツールとしての概念実証を実施する。 *in vivo* において皮膚は伸長や圧縮, 摩擦といった様々な

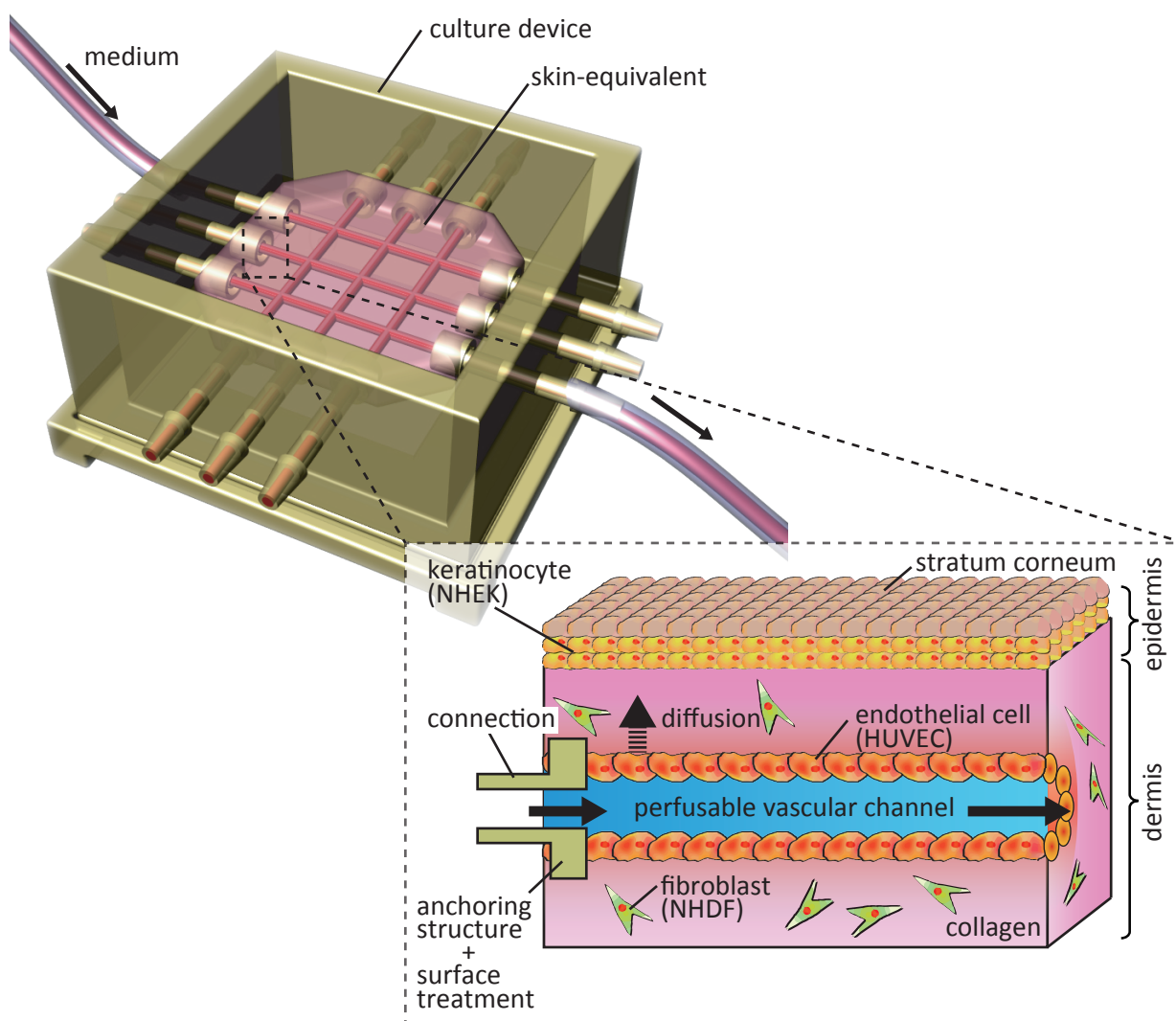


Fig. 1.6 本研究の提案手法. (© Elsevier 2016)

機械的刺激を受けており、これによって皮膚の細胞の遺伝子発現や、組織としての形態・機能が変化する。例えば強い伸長刺激を与えると皮膚の厚みが増えたり、創傷治癒が遅滞したり、逆に適度な機械的刺激であれば創傷治癒が加速されるといったことが知られている。近年、このような機械的刺激に対する皮膚の反応機構の解明や、あるいは機械的刺激を利用した皮膚モデルの改善・改良を目的として、皮膚細胞や皮膚モデルに対して伸展などの機械的刺激を与える研究が注目を集めている [101][102]。そこで、本研究の血管流路付き皮膚モデル及びその培養デバイスに対して伸長・圧縮などの機械的刺激を与えることで、形態や機械的強度の向上や、皮膚のメカノバイオロジーのツールとしての概念実証がなされることが考えられる。

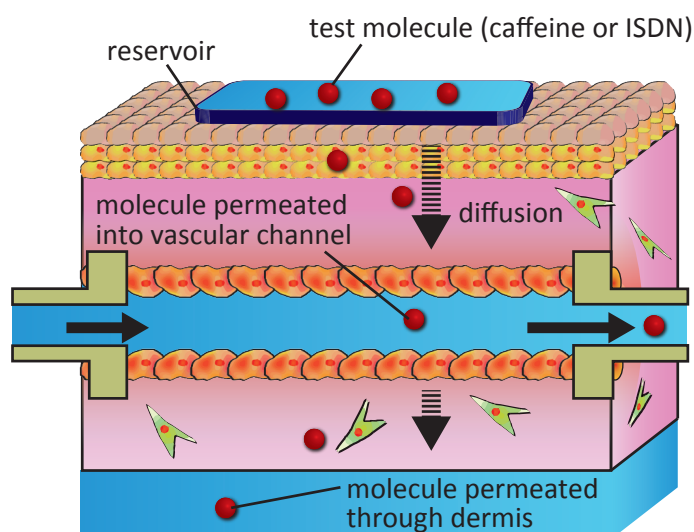


Fig. 1.7 灌流可能な血管流路を有する皮膚モデルを用いた経皮吸収試験。

1.3.3 皮膚モデルの研究開発における本研究の位置付け

すでに Table 1.2 に記載したように、皮膚モデルそのものの研究開発として、ヒト皮膚に存在する様々な構造や付属器を構築する試みが行われてきた。一方、ヒトの皮膚を発生学的な見地から見ると Fig. 1.8 に示すように、大きな流れとしては、表皮及び真皮の形成、血管の形成、立体的特徴（表皮突起、真皮乳頭）の形成、付属器（毛器官、脂腺、汗腺等）の形成という順で発生していく [107][108]。そこで、本研究では皮膚モデルの研究開発について、Fig. 1.9 に示すようなロードマップを想定する。このロードマップでは、横軸に皮膚の構成要素を記載しており、この順に研究開発を進めるものとしている。構成要素は概ね皮膚の発生学的な順序に基づいて並べられており、各段階における構成要素の構築が、次の段階の前提条件として機能する（ただし、神経系及び免疫系は発生学的にはより初期から形成されるが、皮膚とは別系統のシステムであると考え、ロードマップの最後に記載した。実際、発生学において神経系と免疫系の発生は別の分類で記載されることが多い）。このロードマップにおいて、本研究は従来研究で作製されてきた表皮及び真皮からなる皮膚モデルの次段階である、血管の形成に位置づけられる。さらに血管形成の段階をより細分すると、(1) 血管流路（ヒト皮膚においては血管叢に相当）の構築、(2) 毛細血管付き血管流路の構築、(3) 動静脈構造の構築の3段階のステップになるが、本研究は(1)に焦点を置くものである。また、本研究では(2)についても概念実証を実施する。

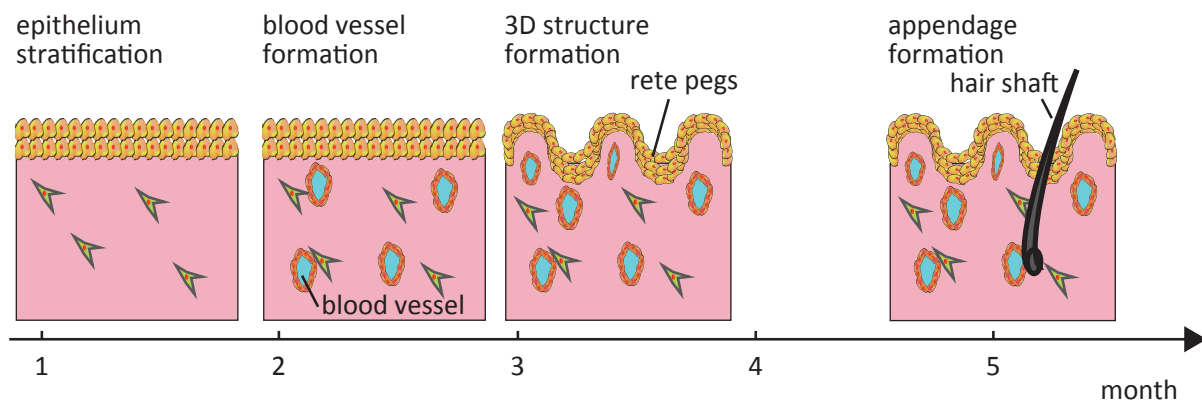


Fig. 1.8 ヒト皮膚の発生（実際には重複する期間もあり，完全に時間軸で分離することはできない）.

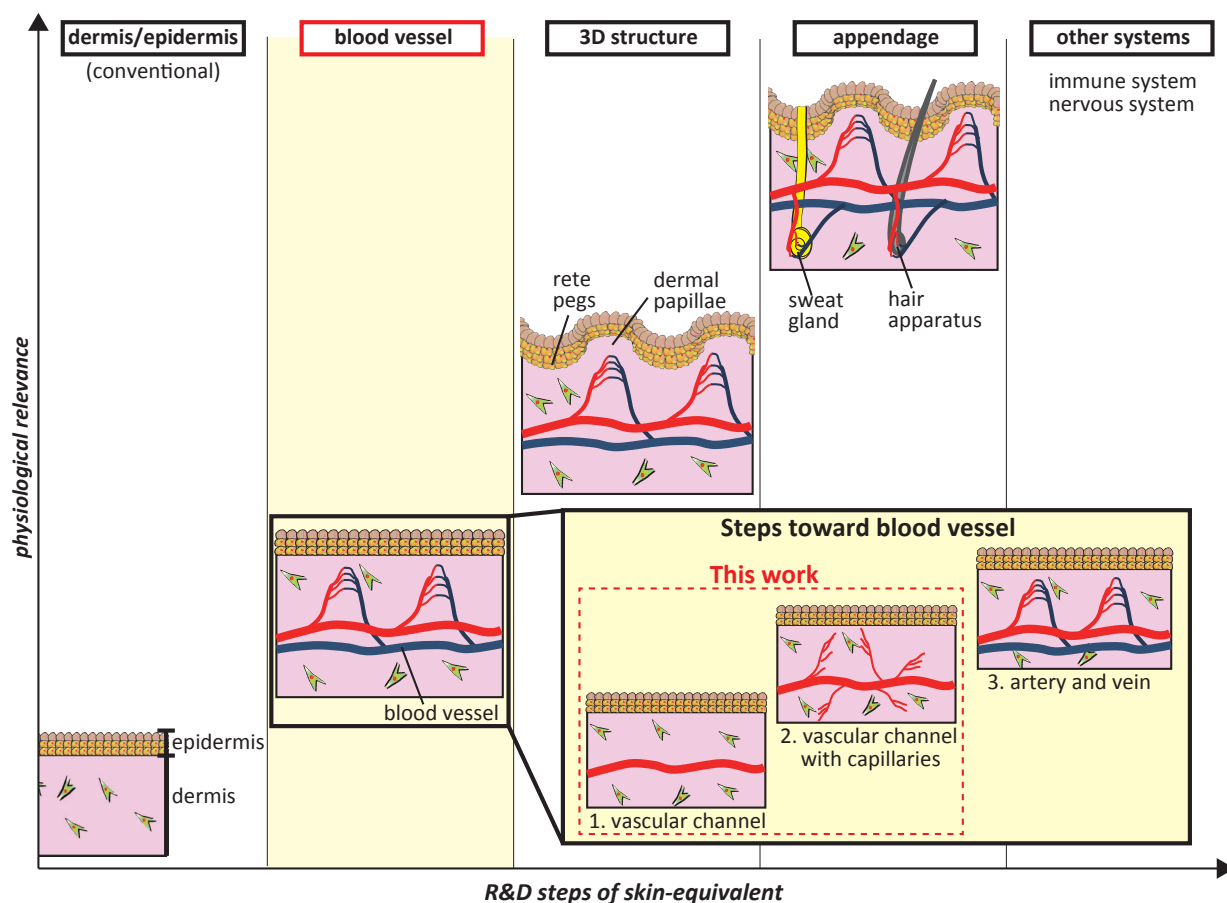


Fig. 1.9 皮膚モデル研究開発における本研究の位置付け.

以上に述べたように，本研究は皮膚モデルをヒト皮膚に近づける研究開発の流れにおいて，基盤となる研究であると考えられる。

1.4 本論文の構成

本論文は全 5 章から構成される。

第 1 章 序論

本研究の目的と意義，本研究の背景，及び従来研究について記述した．また，本研究の提案手法及び応用展開について説明した．

第 2 章 培養デバイス及び血管流路付き皮膚モデルの作製

本研究で提案する皮膚モデル培養デバイスの設計，及び当該デバイスを用いた灌流可能な血管流路を有する皮膚モデルの構築方法について記載する．

第 3 章 血管流路付き皮膚モデルの評価

構築した血管流路付き皮膚モデルの形態・機能について評価を行い，本研究の皮膚モデルが従来皮膚モデル相当の形態・機能を有していること，及び皮膚モデル中に構築した血管流路が血管としての形態・機能を有していることを示す．

第 4 章 血管流路付き皮膚モデルを用いた応用展開の検証

血管流路付き皮膚モデルを用いて経皮吸収試験を実施し，化粧品や創薬分野での利用可能性を示す．また，伸展培養条件での培養を行い，皮膚の基礎研究分野（メカノバイオロジー）での利用可能性についても概念実証を行う．

第 5 章 結論

本研究の結論を述べ，今後の展望について記載する．

第 2 章

培養デバイス及び血管流路 付き皮膚モデルの作製

2.1 緒言

本章では、まず本研究で用いる血管流路付き皮膚モデルの培養デバイスの作製方法について記載する。本培養デバイスは、皮膚モデルを構築・培養する際に摩擦や収縮等が発生しても皮膚モデルがデバイスから脱離せず、外部ポンプによる灌流が実施可能となるよう設計・作製した。さらに、本章では、本培養デバイスを用いた血管流路付き皮膚モデルの構築方法について詳述する。また、作製した培養デバイスの皮膚モデルの把持性能等、デバイスの作製条件や設計に関する評価結果についても記載する。

2.2 血管流路付き皮膚モデルの培養デバイスの作製

2.2.1 皮膚モデル把持に関する要件及び対応方針

血管流路付き皮膚モデルの構築においては、血管流路の構築及び灌流を可能とするため皮膚モデルを培養デバイスに把持する必要がある。皮膚モデルの把持にあたっての要件は、主に構築・培養中の皮膚モデルの脱離を防止することである。具体的には第 1 章にも記載したように、(1) 流路形成のためのワイヤ抜去による摩擦に耐えうること、(2) 培養中の皮膚モデルの収縮に耐えうることが必要である。また、灌流可能とす

Table 2.1 皮膚モデルの把持に関する要件

要件
(1) 流路形成のためのワイヤ抜去による摩擦に耐えうること
(2) 培養中の皮膚モデルの収縮に耐えうること
(3) 皮膚モデルと培養デバイス接続部間がシールされていること

するためには、(3) 皮膚モデルと培養デバイス接続部間がシールされていることも重要である (Table 2.1). これらの要件に対し、本研究では (A) 培養デバイスの接続部に皮膚モデルを機械的に把持するためのアンカ構造の設置、及び (B) 細胞及びコラーゲンの接着性を向上する表面処理 (O_2 プラズマ処理) の二つを組み合わせ対応を行う。

以降の項で (A) 及び (B) を含めた作製プロセスについて記載する。これらの皮膚モデル把持に関する効果の評価については、「2.4 培養デバイスの評価」にその結果を記載する。

2.2.2 作製プロセス

Fig. 2.1 に培養デバイスの作製プロセスを示し、以下、各工程ごとの詳細を記載する。なお、各項番は図中の番号と対応している。

(i) 3D プリンタによる本体及び底面プレートの造形

培養デバイスは、本体及び底面プレートの二つの部品からなる。本体には Fig. 2.2 に詳細を示す接続部があり、接続部のデバイス内側の端部にはアンカ構造、外側の端部には送液用のチューブを接続するためのポートがある。アンカ構造は、接続部に比べて外径が大きく (接続部: 1.5 mm, アンカ構造: 2.7 mm), これにより皮膚モデルの真皮を培養デバイスに固定する設計となっている。また、この外径差に加えて、アンカ構造と接続部はメッシュ構造で繋がっており、真皮形成時にコラーゲンがメッシュ構造と一体になってゲル化することで、把持の効果を向上する。

これらの部品をインクジェット方式の 3D プリンタである AGILISTA-3100 (キーエンス社) を用いて造形した。AGILISTA-3100 は造形物の空洞部分に水溶性のサポート材を充填して 3 次元形状を作製するが、このような樹脂は細胞への影響が懸念される。そのため、組織培養に用いる際にはサポート材を十分に除去する必要がある (Fig. 2.3). そこで本ステップでは、各部品の造形後に金属ワイヤ等を用いて手作業で可能な限りサポート材を除去したうえで、サポート材溶解済みの水溶液に浸漬して 90 分の超音波

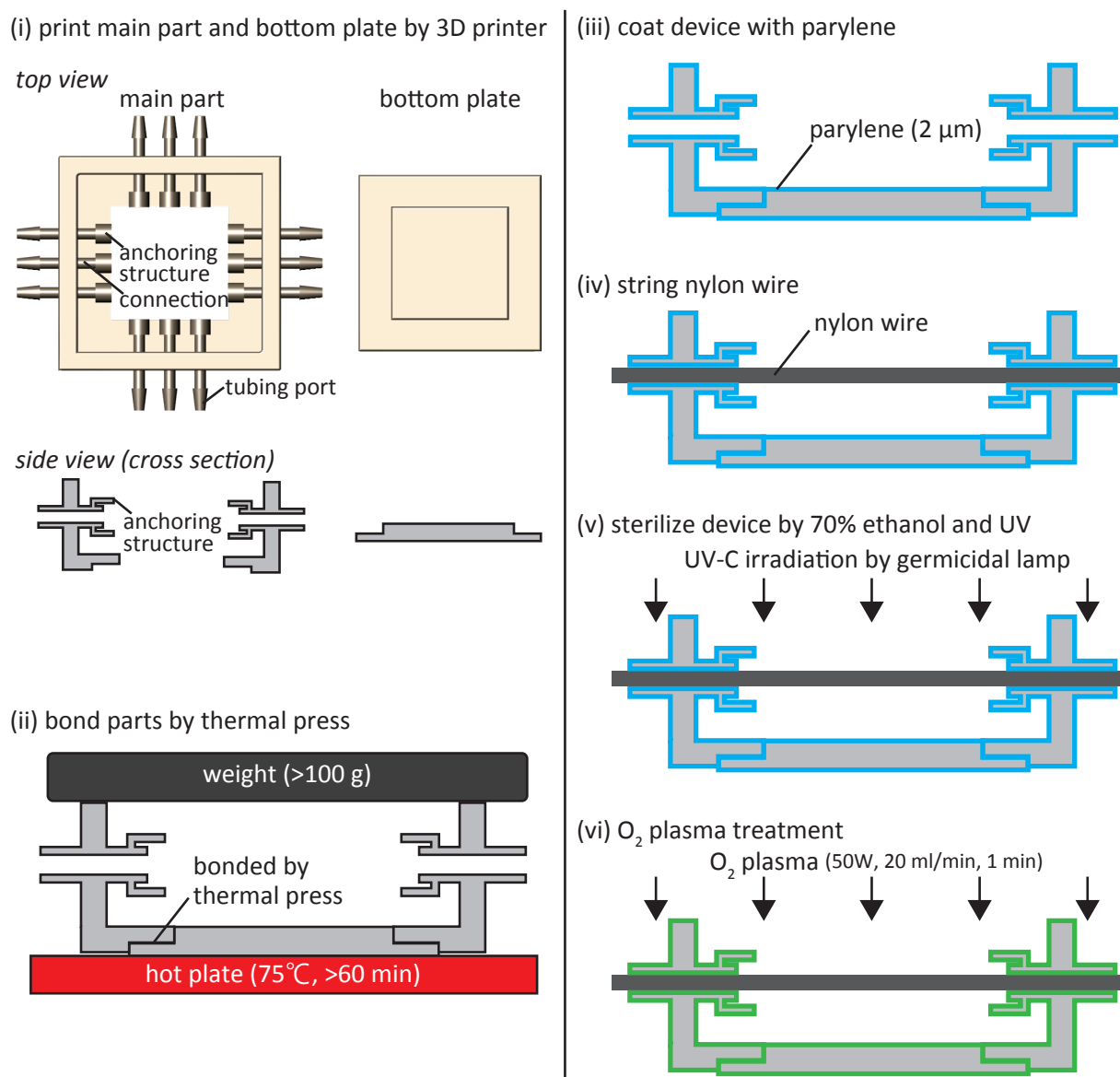


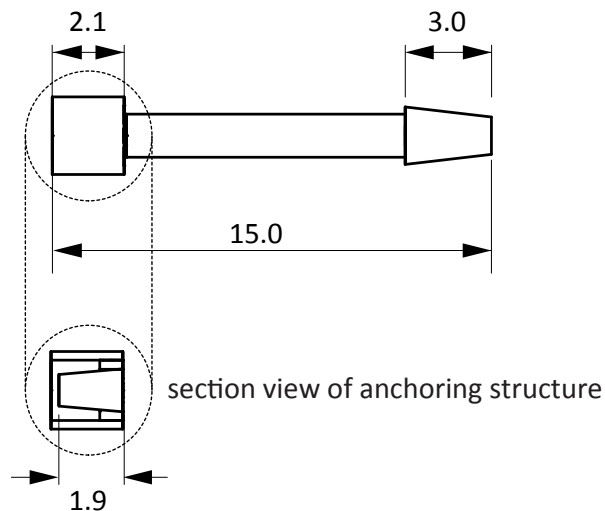
Fig. 2.1 培養デバイスの作製プロセス. (i) 3D プリンタによる本体及び底面プレートの造型. (ii) 本体と底面プレートの熱圧着 (パリレン蒸着のための仮接着). (iii) パリレン蒸着. (iv) ナイロンワイヤの架線. (v) 滅菌. (vi) 細胞・コラーゲン接着性向上の表面処理, (© Elsevier 2016)

洗浄, さらに新しい水道水に浸漬して 90 分の超音波洗浄を 5–6 回, さらにイオン交換水に置換して 90 分の超音波洗浄を 1 回実施し, 風乾した (細胞・組織培養に用いない場合は 2–3 回の超音波洗浄で十分サポート材を除去可能). 水分の残存は, 以降のステップで実施するパリレンの蒸着に影響するため, 十分に乾燥させる必要がある.

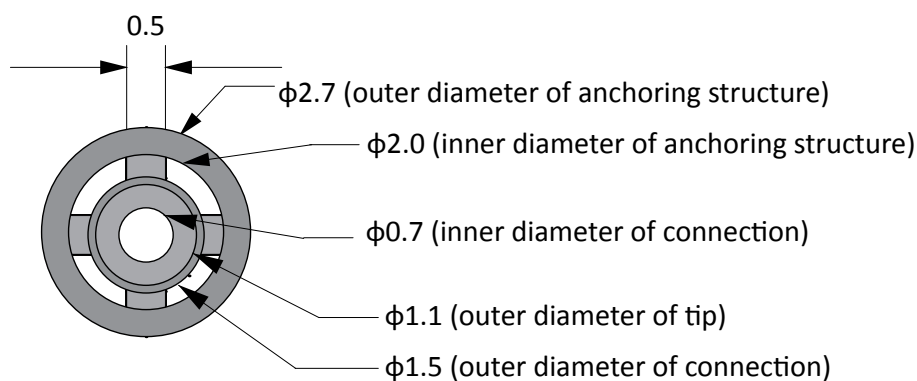
(ii) 本体と底面プレートの熱圧着

本体及び底面プレート (Fig. 2.4a) を接着するため, 本体上面に 100 g の錘を載せ, 本

(a) top view of connection



(b) front view of anchoring structure



unit: mm

Fig. 2.2 接続部及びアンカ構造の詳細図. (a) 接続部詳細. (b) アンカ構造詳細.

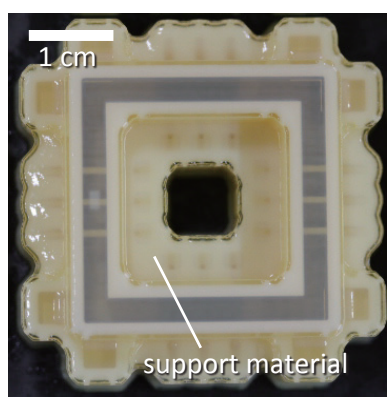
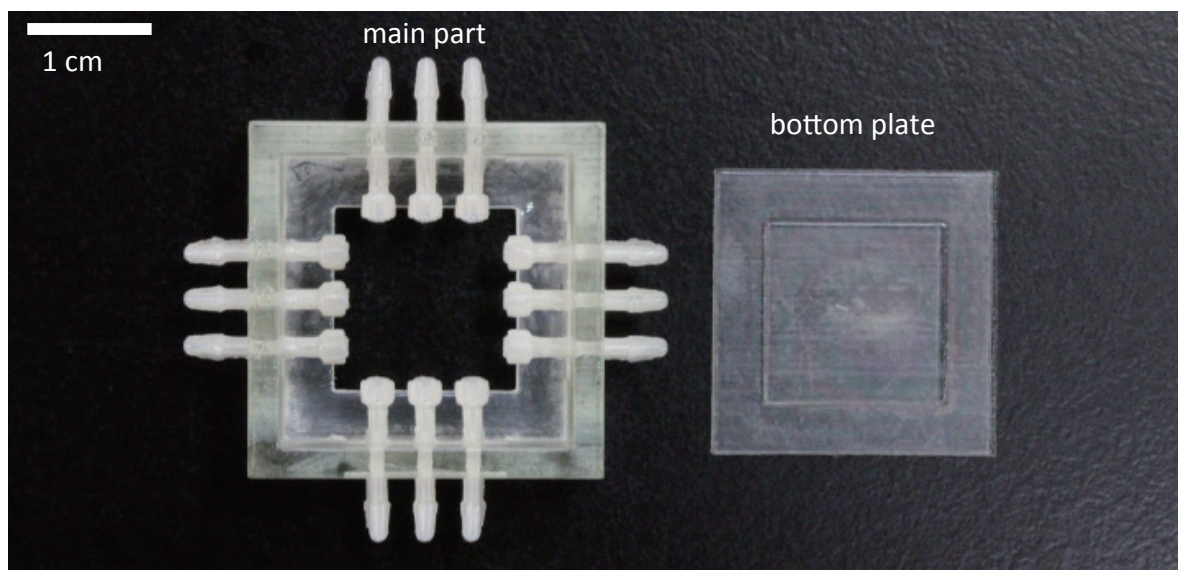


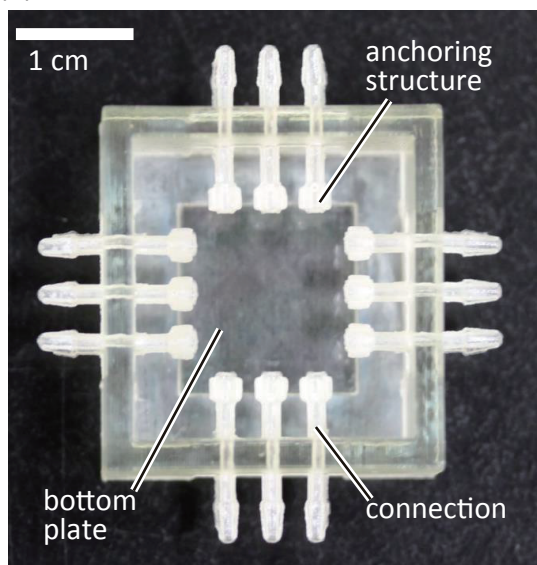
Fig. 2.3 造形直後の培養デバイス（サポート材未除去）.

体底部に底面プレートをはめ込んだ状態で 75°C, 60 分以上の加熱をすることで熱圧着した. なお, AGILISTA-3100 の樹脂は熱圧着で十分な接着効果は得られず, 本工程は

(a) parts of culture device



(b) assembled culture device



(c) culture device with strung nylon wires

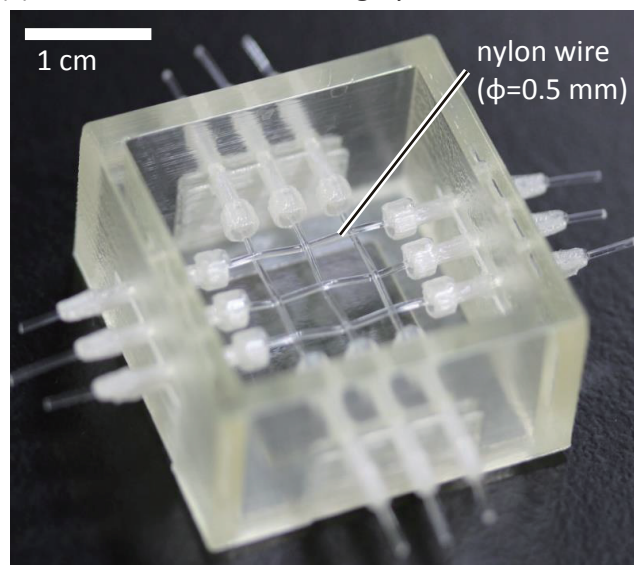


Fig. 2.4 培養デバイスの外観写真. (a) 培養デバイスの本体, 及び底面プレート. (b) 組立後の培養デバイス. (c) ナイロンワイヤ架線後の培養デバイス. (© Elsevier 2016)

以降のパリレン蒸着に向けた仮接着のためのステップである.

(iii) パリレン蒸着

パリレン C (Parylene C) は耐化学薬品性, 耐水性, 電気絶縁性等の特長を持つポリマーであり, その生体適合性の高さから各種医療機器や埋め込みデバイスのコーティングに利用されている. 本研究でも, 培養デバイスの生体適合性を向上させる目的で

厚さ 2–4 μm のパリレンをコーティングした (Fig. 2.4b). また, 本ステップは, 培養デバイスの本体と底面プレート間の隙間をパリレンによってシールする目的も兼ねている. つまり, パリレンのコーティングにより, 本体と底面プレートはピンセットで強い力を加えないと外れない程度に密着し, 水やコラーゲンをデバイス内に入れても漏れないようにシールされる.

(iv) ナイロンワイヤの架線

10 号 (直径 0.52 mm) のナイロンワイヤを接続部に架線した. Fig. 2.4c のように格子状に架線することで, 抜去法においても枝分かれ構造を含むネットワークを形成することができる. なお, ワイヤ径についてはより細いものでも利用可能であり, 本研究では 3 号のワイヤ (0.29 mm) でも流路の形成を実施した. また, 実験によっては単純化を目的として, 中央の接続部に 1 本のワイヤのみを架線した. ワイヤ架線の条件 (格子状または直線) については, 各実験の項目にて記載する.

(v) 滅菌

70% エタノールに数秒間浸漬した後, 滅菌水 (超純水をオートクレーブ処理したもの) で洗い, クリーンベンチ内で UV 滅菌灯で一晩 UV-C を照射して滅菌を行った. この際, 同時にクリーンベンチのファンで風乾も実施した. また, 本ステップ以降は無菌的に操作を行った.

(vi) 細胞・コラーゲン接着性向上の表面処理

O_2 プラズマによりパリレン表面への細胞及びタンパク質の接着性が向上することが報告されており [82]–[84], 本研究でも細胞 (NHDF) 及びコラーゲンの接着性向上の表面処理として O_2 プラズマ処理を行った. その際の条件は, O_2 ガス流量が 20 mL/min, 出力が 50 W, 処理時間が 1 min とした. なお, 本ステップは「2.3 血管流路付き皮膚モデルの構築」の直前 (1 時間以内) に実施した.

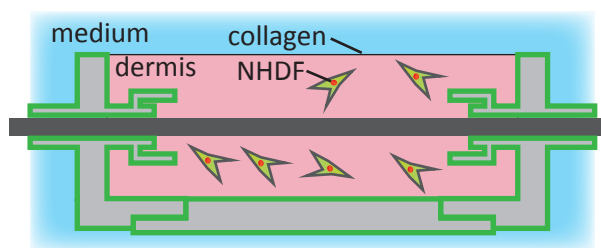
2.3 血管流路付き皮膚モデルの構築

Fig. 2.5 及び Fig. 2.6 に血管流路付き皮膚モデルの構築プロセスを示し, 以下, 各工程ごとの詳細を記載する. なお, 各項番は図中の番号と対応している.

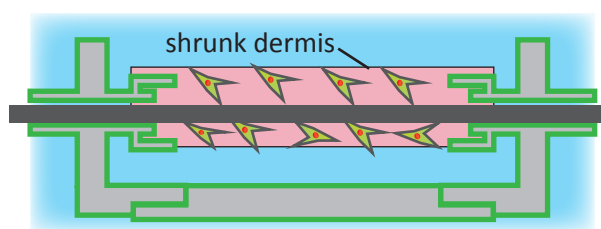
(i) NHDF を懸濁したコラーゲンのデバイスへの注入

氷上にて I 型コラーゲン酸性溶液 (5 mg/mL) を $10\times$ PBS で中和し, この中和さ

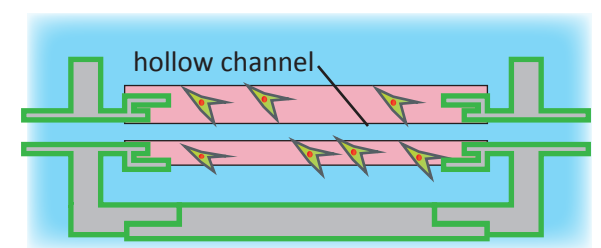
(i) fill device with collagen containing NHDF



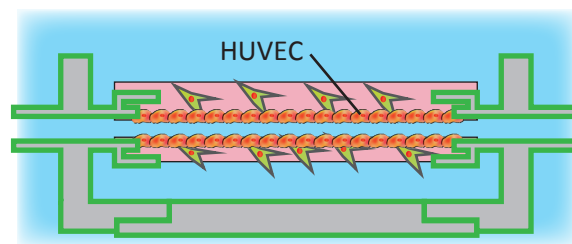
(ii) incubate to induce shrinkage of dermis layer



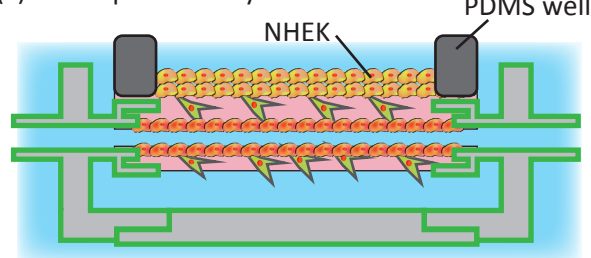
(iii) remove wires



(iv) seed HUVEC in channel



(v) form epidermis layer



(vi) start perfusion culture at air-liquid interface
cornified layer (stratum corneum)

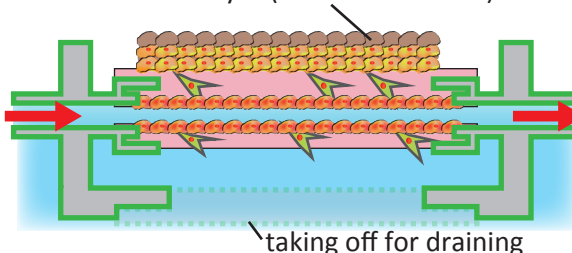


Fig. 2.5 血管流路付き皮膚モデルの構築プロセス. (i) NHDF を懸濁したコラーゲンのデバイスへの注入. (ii) NHDF 包埋コラーゲングル (真皮) の収縮. (iii) ワイヤ抜去による空洞流路形成. (iv) 空洞流路への HUVEC 播種. (v) 表皮層の形成. (vi) 気液界面での灌流培養. (© Elsevier 2016)

れたコラーゲン溶液に NHDF の懸濁された線維芽細胞増殖培地-2(fibroblast growth medium-2, FGM-2)を混合した. 続いて, 得られた NHDF 懸濁コラーゲン溶液で培養デバイスを満たし, インキュベータ (37°C, 5% CO₂) で 30–60 分間, 静置してゲル化させた. これによって得られた NHDF 包埋コラーゲングルを, 以降, 真皮 (あるいは真皮層) と呼ぶ. なお, コラーゲン密度と NHDF の細胞密度は後程詳細な検討結果を記載するが, 特に明記しない限り, 本章のアンカ構造及び O₂ プラズマ処理の評価においては, I 型コラーゲン溶液, 10× PBS, NHDF を懸濁した FGM-2 (8 × 10⁵ cells/mL) を 9:1:17 で混合した. 第 3 章以降では第 2 章における検討結果に則り, 9:1:5 で混合した.

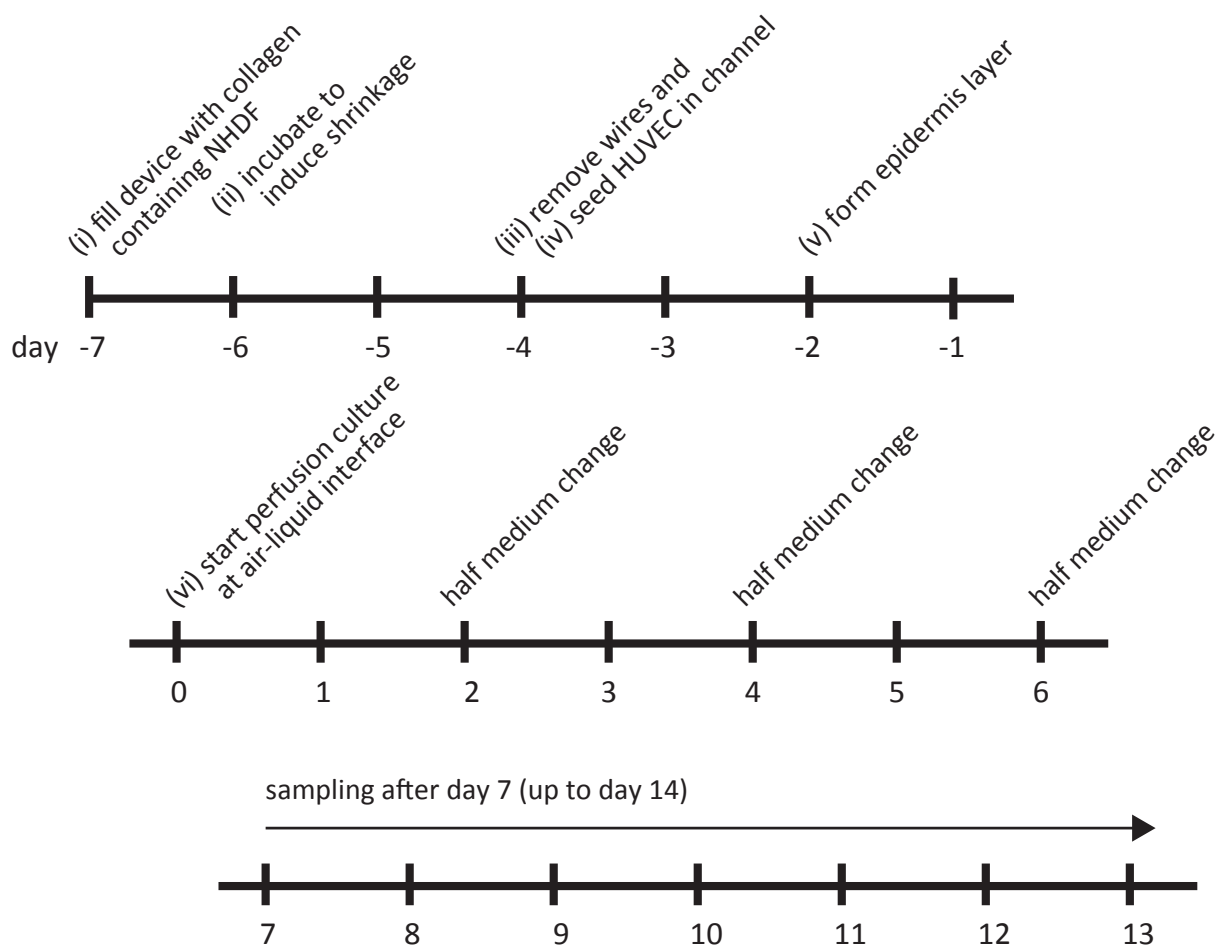


Fig. 2.6 血管流路付き皮膚モデル構築のスケジュール

(ii) NHDF 包埋コラーゲングル（真皮）の収縮

NHDF によるコラーゲングルの収縮を促すため、接続部から剥離しないように注意しつつ、デバイス表面に吸着しているコラーゲングルをピペットチップによって剥離した。剥離後、真皮収縮用培地に浸漬した状態で 2-3 日間、培養を行い、真皮層を収縮させた。なお、コラーゲングルの収縮は皮膚モデル形成において、十分なコラーゲン密度を得るために必要なステップである。

(iii, iv) ワイヤ抜去による空洞流路形成、及び空洞流路への HUVEC 播種

血管流路形成のため、まず、真皮収縮用培地を内皮細胞増殖培地 -2 (endothelial growth medium-2, EGM-2) に置換した。続いて、ワイヤを抜去することで、細胞に被覆されていない空洞の流路を形成した。空洞流路形成後、ただちにシリンジポンプ及びシリンジを用いて EGM-2 に懸濁した HUVEC (0.2 mL , $2 \times 10^6 \text{ cells/mL}$) を注入して、空洞流路下側に接着させるためインキュベータ内で 20 分間、静置した。20 分間の静置

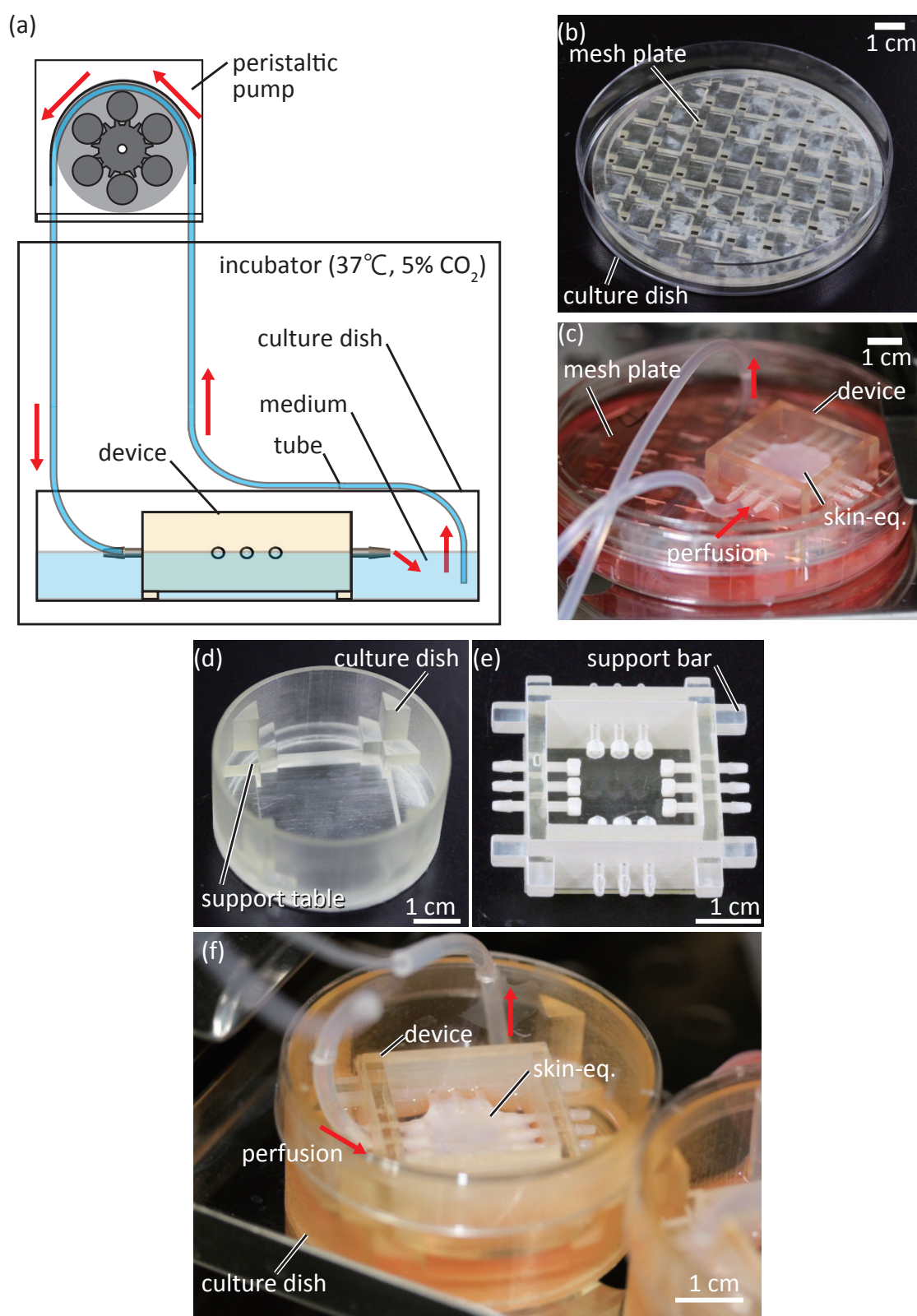


Fig. 2.7 血管流路付き皮膚モデルの灌流システム. (a) 灌流システム全体図. (b, c) メッシュプレートを使用した場合の灌流培養. (d, e, f) 支持台付きの培養ディッシュ及び支持棒付き培養デバイスを使用した場合の灌流培養. (© Elsevier 2016)

の後、デバイスを上下反転させて、再度インキュベータ内で 20 分間、静置して、空洞流路上側へ HUVEC を接着させた。これにより空洞流路の全面に HUVEC が接着する。

(v) 表皮の形成

表皮を形成するため、まず、EGM-2 を表皮形成用培地に置換した。続いて、真皮層の上面に PDMS で作製したウェルを設置し、その内側に表皮形成用培地に懸濁した NHEK (0.55mL, 2×10^6 cells/mL) を播種した。この際、PDMS 製ウェルの内外で液面が同じになるようにして、約 24 時間、インキュベータで培養を行った。なお、ここで用いた PDMS 製ウェルは、NHEK が真皮表面から移動・滑落しないようにするためのものである。以降、ここで形成した NHEK の層を表皮層と呼び、表皮層及び真皮層を合わせて皮膚モデルと呼ぶ。

(vi) 気液界面での灌流培養

NHEK を播種して 24 時間の培養を行った後、PDMS ウェルを取り外した。表皮層の分化及び角化を促進するため、表皮層が空気に暴露されるよう液面を調整した。さらに、底面プレートをピンセットを用いて取り外したうえで、接続部にシリコンチューブを接続し、ペリスタポンプにより培地の灌流を開始した (Fig. 2.7a)。なお、灌流培養において、培地が十分に交換されるよう、培養デバイスは培養ディッシュ底面から離れた状態で維持した。具体的には、Fig. 2.7b, c に示すように凹凸を有するメッシュ状の底板を培養ディッシュに敷いて灌流培養を行うか、もしくは Fig. 2.7d-f に示すように支持台付きの培養ディッシュと支持棒付きの培養デバイスを用いて灌流培養を実施した。

2.4 培養デバイスの評価

2.4.1 パリレンによる本体 - 底面プレートのシール効果

「2.2 血管流路付き皮膚モデルの培養デバイスの作製」にて記載したように、培養デバイスを構成する本体と底面プレートは、熱圧着後、パリレンを蒸着することでシールされる。本項では、培養デバイスのシールに適切なパリレンの厚みを調べるため、厚みを 0–4 μm の間で変化させた培養デバイスを用意し、この培養デバイスにコラーゲンを注入してゲル化が完了した時点での漏出量を計測した。Fig. 2.8 にその結果を示す。なお、成功率は、漏出量がコラーゲン注入量の 5% 未満のものを成功として算出した。

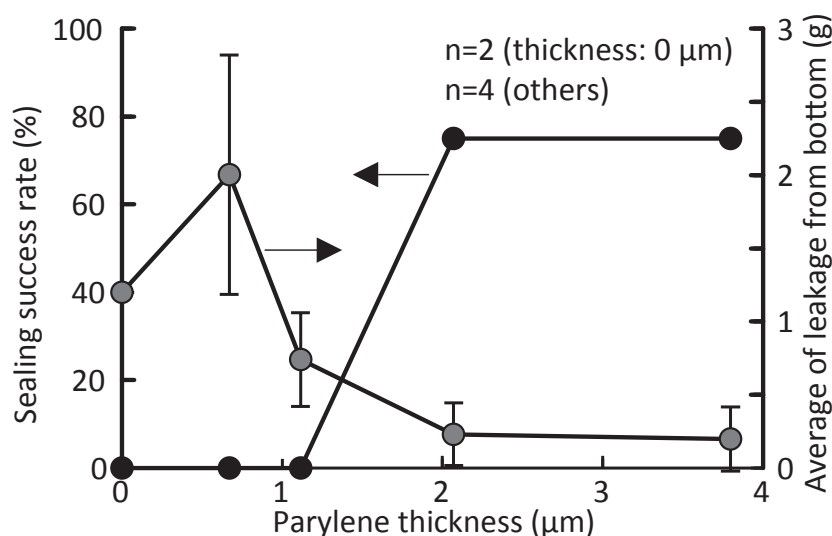


Fig. 2.8 パリレンの厚みと、漏出量及びシール成功率の関係。シール成功率は注入したコラーゲンの培養デバイスからの漏出量が5%未満のものを成功とした。平均漏出量は $\text{mean} \pm \text{s.d}$ で表示。

グラフより、パリレンの厚みが2 μm より小さい場合 (0, 0.67, 1.1 μm , ただし0 μm は熱圧着のみ), 全ての培養デバイスで5%より大きい漏出が発生し, 本体と底面プレートの間がうまくシールできていないことが分かる。一方, パリレンの厚みが2 μm より大きい場合 (2.1, 3.8 μm), 4個中3個 (75%) の培養デバイスでシールに成功した。この結果から, 本研究では十分なシール効果が得られると考えられる2–4 μm を培養デバイス作製におけるパリレンの厚みとした。

2.4.2 ワイヤ抜去に対するアンカ構造の効果

ナイロンワイヤを抜去する際に真皮層に摩擦力がかかる。この摩擦力に抗して, アンカ構造が真皮を培養デバイスの接続部に固定し続ける効果を評価するため, アンカ構造の無いデバイスとアンカ構造の有るデバイスを用意し, ナイロンワイヤを3本平行に架線した状態で真皮層を形成した後, ワイヤを抜去した。なお, いずれのデバイスも O_2 プラズマ処理済である。また, アンカ構造の外径として2.1, 2.7, 3.3 mmの3種類の培養デバイスを用意した。以下, それぞれ小サイズ, 中サイズ, 大サイズと記載する。アンカ構造の無いデバイスでは直径1.5 mmの接続部が露出している。

この評価実験の結果, Fig. 2.9a, bに示すように, アンカ構造の無いデバイスではワイヤ抜去時に真皮層の脱離が発生し, アンカ構造の有るデバイスでは真皮層の脱離は

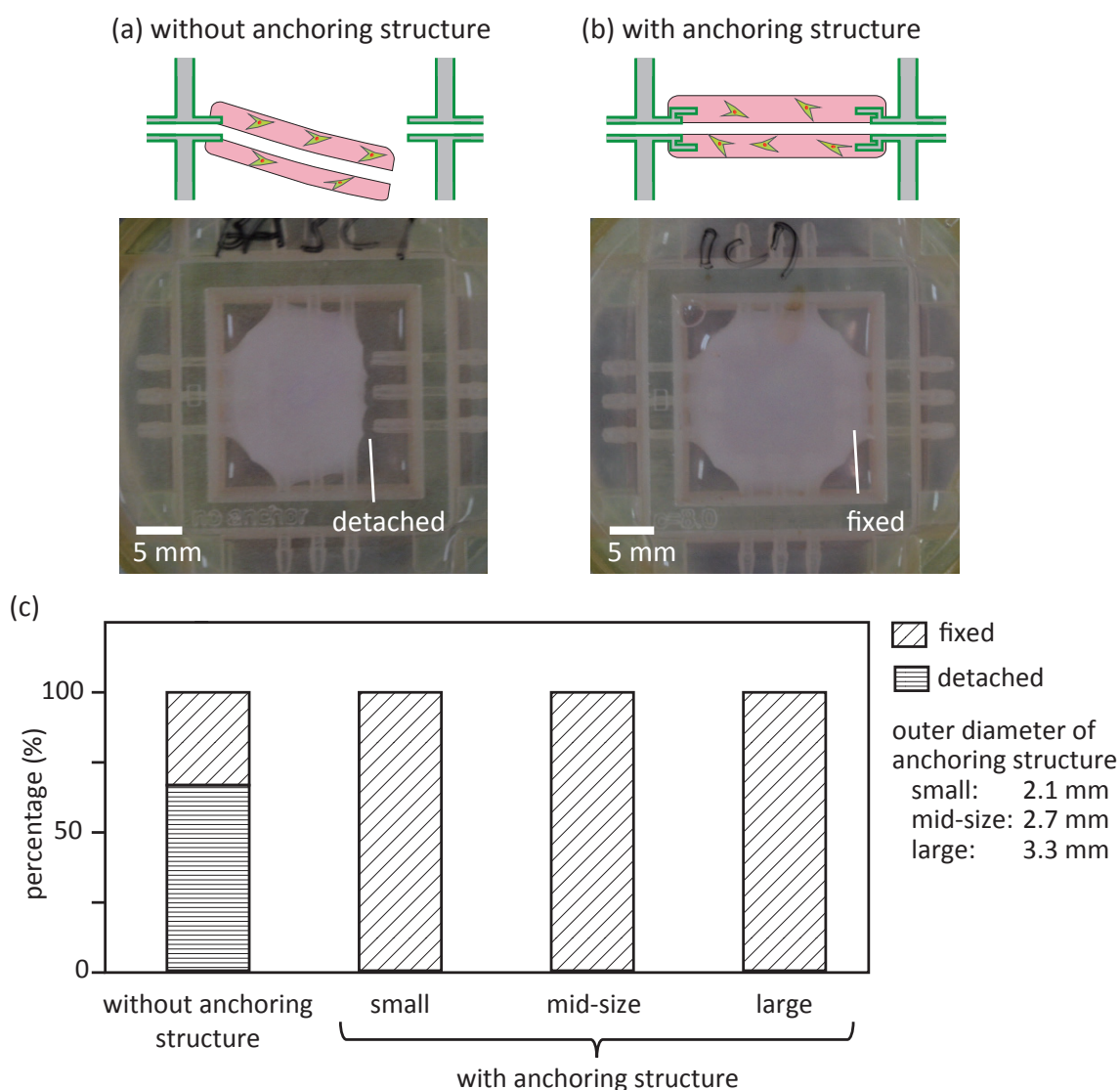


Fig. 2.9 ワイヤ抜去後の真皮の状態. (a) アンカ構造無しの場合 (脱離). (b) アンカ構造有りの場合 (固定維持). (c) アンカ構造の有無 (及びアンカ構造の直径) と, ワイヤ抜去後の真皮の脱離 / 固定維持の割合の関係 (n=3). (© Elsevier 2016)

発生せず, 接続部に固定された状態で維持された. これは, ワイヤ抜去の際に真皮層がアンカ構造から垂直抗力を受けるためと考えられる. なお, Fig. 2.9c に示すように, アンカ構造の直径による差異はこの範囲では見られず, アンカ構造を有する全デバイスでワイヤ抜去時に真皮層を維持する効果があった.

2.4.3 皮膚モデルの収縮に対するアンカ構造の効果

アンカ構造の皮膚モデル収縮に対する効果を評価するため, アンカ構造の無いデバ

本図は雑誌掲載の形での刊行 (5 年以内に出版予定) が予定されるため、
非公開とする

Fig. 2.10 アンカ構造の有無及びサイズ毎の皮膚モデルの状態. (a) アンカ構造なし (直径 1.5 mm の接続部のみ). (b) 小サイズのアンカ構造 (直径 2.1 mm). (c) 中サイズのアンカ構造 (直径 2.7 mm). (d) 大サイズのアンカ構造 (直径 3.3 mm).

イス, 小サイズ～大サイズのアンカ構造を有するデバイスを用意し, 流路形成の工程 (ワイヤ架線, HUVEC 播種) を省略して, 非灌流条件によって皮膚モデルを構築した.

この実験の結果, Fig. 2.10 に示すように, アンカ構造が無い場合には皮膚モデルが培養デバイスからほぼ脱離したのに対し, 小サイズ～大サイズのアンカ構造を設置した場合には皮膚モデルを培養デバイスに固定し続けられることが分かった. また, Fig. 2.10a から分かるように収縮による皮膚モデルの脱離は, 皮膚モデルの四隅から発生することが推測できる. このことから, Fig. 2.11a に示すように接続部の先端に接する正方形を定義し, この四隅で皮膚モデルが存在しない領域の面積を求めることで, アンカ構造の皮膚モデル収縮に対する効果を定量評価した. なお, 面積の計算は ImageJ により, 以下のとおり実施した.

1. 接続部の先端に接する正方形 (一辺 1.25 cm) により画像をクロップする.
2. 画像を 8 bit に変換し, threshold により二値化する. なお, 全画像に対し threshold の設定は同じものを用いる.
3. Analyze particle プラグインを適用し, 四隅の面積を算出する.

この測定の結果, Fig. 2.11b に示すように, アンカ構造のサイズが大きくなるほど皮膚モデルの存在しない領域は小さくなった. つまり, アンカ構造のサイズが大きいほど皮膚モデルの水平方向の収縮が抑制されるということである. これは, アンカ構造と接続部の外径差が大きくなることで, 皮膚モデルが収縮する際にアンカ構造から受ける垂直抗力がより大きくなるためと考えられる.

ただし, この結果からアンカ構造が大きいほどよいということにはならない. 皮膚モデル構築のプロセスにおいては, 表皮を形成する際に, 真皮層に PDMS 製のウェルを設置したうえで NHEK を播種する. このとき, Fig. 2.11c に示すように PDMS 製ウェル内に NHEK 懸濁液を保持できず, NHEK 懸濁液が漏出してしまうことがある. この

本図は雑誌掲載の形での刊行 (5 年以内に出版予定) が予定されるため、
非公開とする

Fig. 2.11 アンカ構造の有無及びサイズ毎の皮膚モデル収縮の定量評価. (a) 皮膚モデル収縮量の評価用領域 (皮膚モデルが存在しない領域) の定義. (b) 皮膚モデルが存在しない領域の面積 (mean \pm s.d., n=4). (c) NHEK 播種時に発生する漏出の模式図. (d) NHEK 播種の成功率 (漏出発生を失敗と定義, n=4).

NHEK の漏出を失敗と定義し, Fig. 2.11d にアンカ構造のサイズ毎の NHEK 懸濁液保持成功率を示す. このグラフによれば, 大サイズのアンカ構造においてのみ, NHEK 懸濁液保持に失敗する培養デバイスが存在していたことが分かる. これはアンカ構造が存在したことにより, 真皮層の表面に凹凸ができ, PDMS 製ウェルとの間に隙間が生じたためと考えられる. 以上の結果から, 本研究では中サイズのアンカ構造を用いることとした.

2.4.4 細胞及びコラーゲンの接着性に関する O₂ プラズマの効果

O₂ プラズマ処理の細胞及びコラーゲンゲルの接着性向上に関する効果を評価するため 2 次元培養系での評価を実施した. まず, ガラスボトムディッシュ (直径 35 mm) に 2 μ m のパリレンを蒸着し, 培養デバイス同様に 70% エタノール及び UV で滅菌後, O₂ プラズマ処理を実施した. また, コントロールとして O₂ プラズマ未処理のものも用意した. これらのパリレン蒸着済み培養ディッシュに NHDF を播種し, 1 日間培養を実施したところ, Fig. 2.12 に示す結果を得た. Fig. 2.12a 及び b に示すように, O₂ プラズマ未処理と O₂ プラズマ処理済みいずれのパリレン表面においても NHDF が接着する様子が観察された. しかし, その接着の様子には違いがあり, O₂ プラズマ処理済みのパリレン表面においては, O₂ プラズマ未処理の場合と比べて NHDF がより大きく伸展して接着していた. さらに, 細胞を PFA で固定後, 核を染色するエチジウムホモダイマーによって蛍光染色を行い (Fig. 2.12c, d), 画像処理ソフト ImageJ により全画像を同条件で二値化し, 観察視野中における細胞の被覆面積割合を計測した. この結果, O₂ プラズマ処理済みのパリレン表面においては, O₂ プラズマ未処理の場合と比べて, NHDF がおよそ 2 倍の面積を占めていることが分かった (Fig. 2.12e). この結果は, O₂ プラズマ処理済みの場合に, O₂ プラズマ未処理の場合と比べて, 細胞が大きく伸展して接着していること, より多くの細胞が接着していることの両方によるものと考えら

本図は雑誌掲載の形での刊行 (5 年以内に出版予定) が予定されるため、
非公開とする

Fig. 2.12 O₂ プラズマ処理を行った場合のパリレン表面の細胞接着性評価. (a) O₂ プラズマ未処理のパリレン表面に接着した NHDF の明視野画像. (b) O₂ プラズマ処理済みパリレン表面に接着した NHDF の明視野画像. (c) O₂ プラズマ未処理のパリレン表面に接着した NHDF のエチジウムホモダイマー染色画像. (d) O₂ プラズマ処理済みパリレン表面に接着した NHDF のエチジウムホモダイマー染色画像. (e) 細胞の被覆面積の割合 (エチジウムホモダイマー染色画像を二値化して算出). n=10, **p<0.01, 対応の無いスチューデント t 検定.

れる. また, この結果から, 本実験の条件, すなわち細胞種として NHDF を使用し, 厚さ 2 μm のパリレンに対し 50 W, 20 mL/min, 1 min で O₂ プラズマ処理を実施した場合においても, 先行研究同様に細胞の接着性が向上されるといえる. これは, O₂ プラズマ処理によりインテグリンを初めとする細胞の接着分子がパリレン表面に吸着しやすくなったためと推測される. なお, Fig. 2.12a 及び b の表面に顆粒状の物体が存在するが, これはパリレンの粒子などの塵や表面の構造に由来するものであり, 微生物のコンタミネーションではない.

次に, 先述の細胞接着性の評価と同様にパリレンを蒸着したガラスボトムディッシュを用意し, その上でコラーゲン (細胞不含) をゲル化させた. 1 時間のインキュベートの後, コラーゲンゲルをピンセットで剥離し, ディッシュに残存するコラーゲンに対する免疫染色を実施した. この結果, Fig. 2.13 に示すように, O₂ プラズマ処理有無に関わらず, コラーゲンゲルの接着が観察された. しかし, その接着の様子には違いがあり, O₂ プラズマ未処理の場合, ディッシュの中央から離れた箇所 (Fig. 2.13e) では O₂ プラズマ処理済みの場合 (Fig. 2.13b) と比べて強い蛍光が検出されたが, 一方で免疫染色作業中の洗浄操作によると思われるコラーゲンゲルの剥離が観察された. また, ディッシュの中央付近 (O₂ プラズマ未処理の条件では剥離発生領域内) において蛍光強度を計測したところ, Fig. 2.13f に示すように O₂ プラズマ処理済みの条件の方が高い蛍光強度を示すことが分かった. これらの結果から, O₂ プラズマ未処理のパリレン表面には O₂ プラズマ処理済みの表面に比べて多くのコラーゲンゲルが吸着するが, 一方で外力にさらされた際に吸着したコラーゲンゲルが剥離しやすいと推測される. この吸着性の差に関するメカニズムは究明できていないが, 一つの推測として O₂ プラズ

マ未処理のパリレン表面に対するコラーゲンゲルの吸着が疎水性相互作用であるのに対し、 O_2 プラズマ処理済みの場合においては、パリレン表面に生じた官能基 (-OCO, -CO, -COOH 等) とコラーゲンとの間で共有結合性の吸着が起きているのではないかと考えられる。この点に関する検証は、今後の課題である。

さらに、先述の内容と同様にパリレンを蒸着したガラスボトムディッシュを用意し、その上で NHDF を含むコラーゲンをゲル化させた。この NHDF 包埋コラーゲンを 2 日間、培養した後、PFA で固定し、蛍光標識ファロイジンにより細胞骨格として細胞質内に偏在するアクチン線維を染色した。これを共焦点顕微鏡により観察したところ、Fig. 2.14 に示すように O_2 プラズマ未処理のパリレン表面には細胞がほとんど接着していないのに対し、 O_2 プラズマ処理済の表面にはコラーゲンゲルから伸展した NHDF が接着している様子が観察された（なお、Fig. 2.14c に示すグラフは、細胞アクチン線維由来の蛍光を二値化により抽出し、パリレン表面上のピクセル値を測定した平均値である）。このことから、NHDF は、コラーゲンゲルに包埋された場合でも、 O_2 プラズマ処理済の表面に接着することが分かった。このように NHDF がコラーゲンゲルとパリレン表面の両方に接着することで、NHDF 包埋コラーゲンゲル全体として、パリレン表面との間の接着性が向上すると考えられる。

最後に、培養デバイス内で NHDF を含むコラーゲンをゲル化させた。この NHDF 包埋コラーゲン（真皮層と同等の構成）を 1 日間、培養した後、PFA で固定し、蛍光標識ファロイジンによりアクチン線維を染色した。これを共焦点顕微鏡により観察したところ、Fig. 2.15 に示すように、Fig. 2.14 と同様の傾向が見られた。すなわち、 O_2 プラズマ未処理の表面に比べ、 O_2 プラズマ処理済の表面に多くの細胞が接着していた。このことから、パリレンを蒸着したアンカ構造上においても、ガラスボトムディッシュでの結果と同様に、 O_2 プラズマ処理によって細胞の接着性が向上することが示唆された。

2.4.5 皮膚モデルの収縮に対する O_2 プラズマの効果

皮膚モデル収縮によるデバイスからの脱離を O_2 プラズマ処理が防止する効果を評価するため、 O_2 プラズマ未処理のデバイスと O_2 プラズマ処理済のデバイスとを用意し、血管流路付き皮膚モデルの構築プロセスを最後まで通して実施した。なお、ワイヤは格子状に架線した。

この結果、Fig. 2.16a-c に示すように O_2 プラズマ未処理のデバイスでは、灌流培養の最中にデバイスからの脱離が発生した。一方、 O_2 プラズマ処理済のデバイスでは灌流培養期間中（7 日以上）に脱離は発生せず、培養デバイス接続部に固定された状態で

本図は雑誌掲載の形での刊行 (5 年以内に出版予定) が予定されるため、
非公開とする

Fig. 2.13 O₂ プラズマ処理表面へのコラーゲン接着評価. (a) O₂ プラズマ処理済表面でのコラーゲン免疫染色画像. (b) O₂ プラズマ未処理表面でのコラーゲン免疫染色画像. (c,d) コラーゲン無しで免疫染色のみ実施したコントロール. (e) ディッシュ中央付近での蛍光輝度. n = 8 (no O₂ plasma), 9 (O₂ plasma), ***p<0.001, 対応の無いスチューデント t 検定.

本図は雑誌掲載の形での刊行 (5 年以内に出版予定) が予定されるため、
非公開とする

Fig. 2.14 O₂ プラズマ処理表面への NHDF 包埋コラーゲン接着評価. (a) O₂ プラズマ未処理表面でゲル化させた NHDF 包埋コラーゲン蛍光画像 (2 日間培養後). (b) O₂ プラズマ処理済表面でゲル化させた NHDF 包埋コラーゲン蛍光画像 (2 日間培養後). 拡大図はパリレン表面に接着した NHDF. (c) パリレン表面上での細胞由来の蛍光輝度. n = 12, ***p<0.001, 対応の無いスチューデント t 検定.

本図は雑誌掲載の形での刊行 (5 年以内に出版予定) が予定されるため、
非公開とする

Fig. 2.15 O₂ プラズマ処理したアンカ構造表面への NHDF 包埋コラーゲン接着評価. (a) O₂ プラズマ未処理表面でゲル化させた NHDF 包埋コラーゲン蛍光画像 (1 日間培養後). インセットは観察部位を示したもので、実際は NHDF 包埋コラーゲンが存在する状態で観察した. (b) O₂ プラズマ処理済表面でゲル化させた NHDF 包埋コラーゲン蛍光画像 (1 日間培養後). (c) 表面上での細胞由来の蛍光輝度. n = 18, **p<0.01, 対応の無いスチューデント t 検定.

維持された. これは O₂ プラズマ処理によって, 細胞 (NHDF) 及びコラーゲンの培養デバイス表面への接着性が向上した結果と考えられる. なお, O₂ プラズマ未処理の場合, 注入口付近から皮膚モデルが脱離することが多かった. これは, 皮膚モデルの収縮と灌流する液体の圧力とが複合的に作用した結果, 発生した現象と考えられる.

2.4.6 皮膚モデル - 培養デバイス間のシールに関する O₂ プラズマの効果

皮膚モデルと培養デバイス接続部間のシールに関する O₂ プラズマ処理の効果を評価

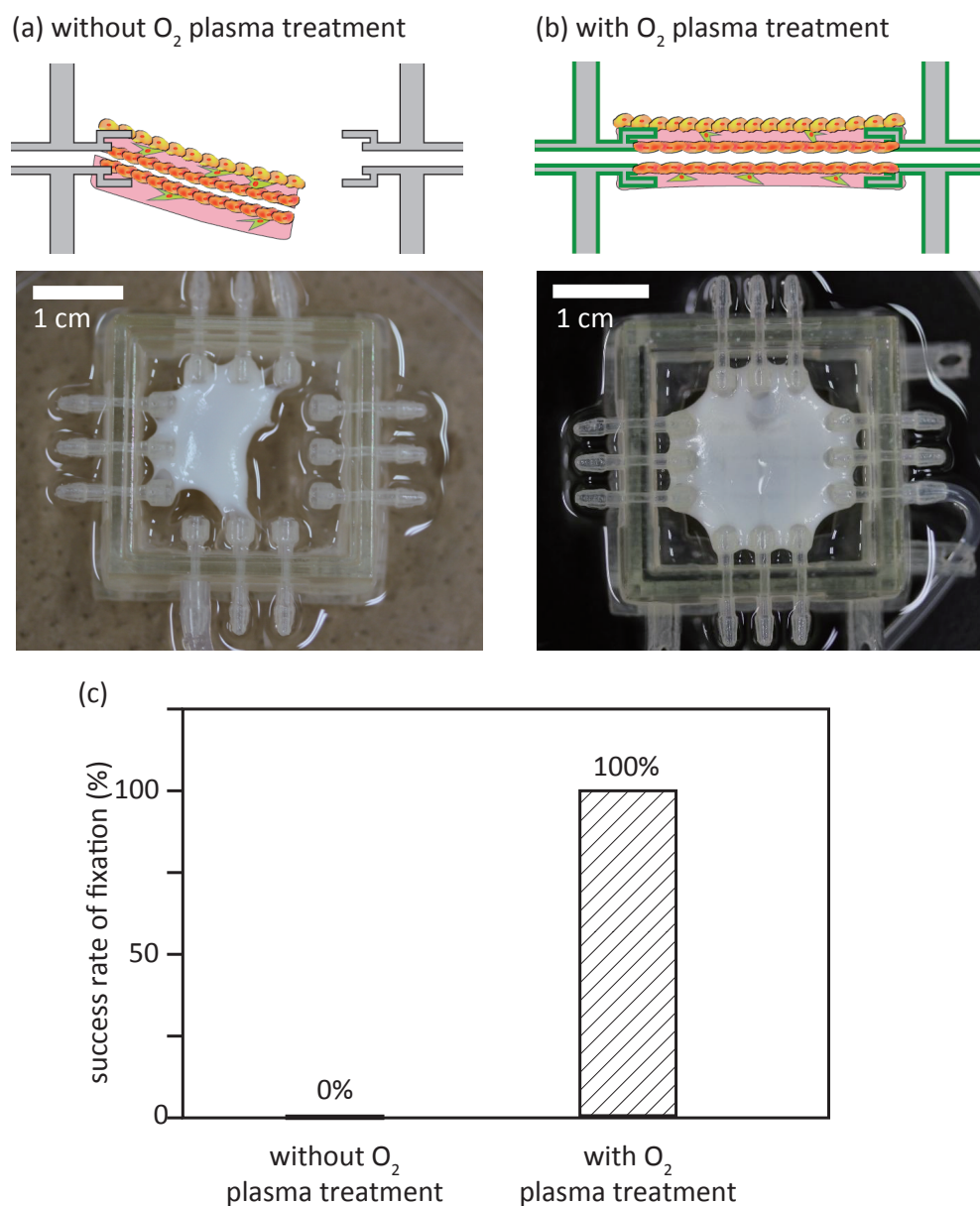
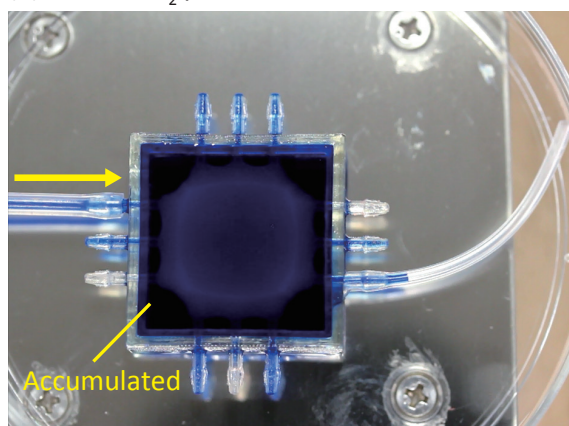
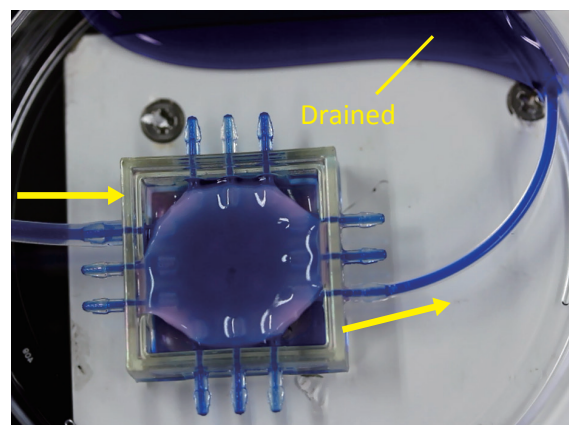
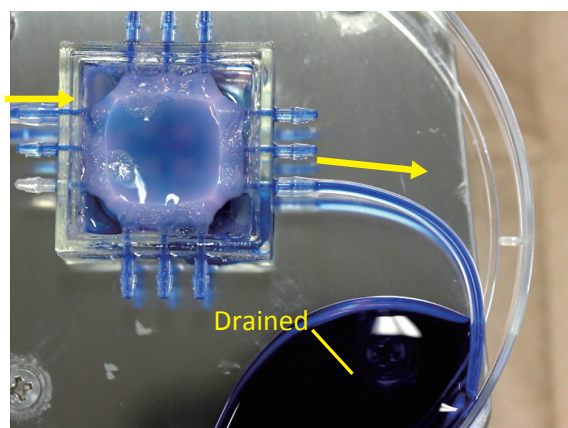


Fig. 2.16 表皮形成及び灌流培養実施後の皮膚モデルの状態. (a) O₂ プラズマ未処理の場合 (脱離). (b) O₂ プラズマ処理済の場合 (固定維持). (c) O₂ プラズマ処理の有無と灌流培養実施後の固定成功率の関係 (n>3). (© Elsevier 2016)

するため、ここでは O₂ プラズマ未処理 / 処理済のデバイスに真皮層を形成したものを用いて、送液された液体が排出口から排出される量を測定した（排出されなかった液体については、培養デバイス接続部と真皮から漏出したことになる）。また、皮膚用接着剤ダーマボンド®を用いて接続部と真皮の境界面をシールした場合も合わせて比較した。なお、ワイヤは格子状に張り、また HUVEC は播種していない。Fig. 2.17 に示すように、PBS と青インクを混合したものをシリンジポンプを用いて 0.5 mL/min で注

(a) without O_2 plasma treatment(b) with O_2 plasma treatment

(c) sealed by Dermabond



(d)

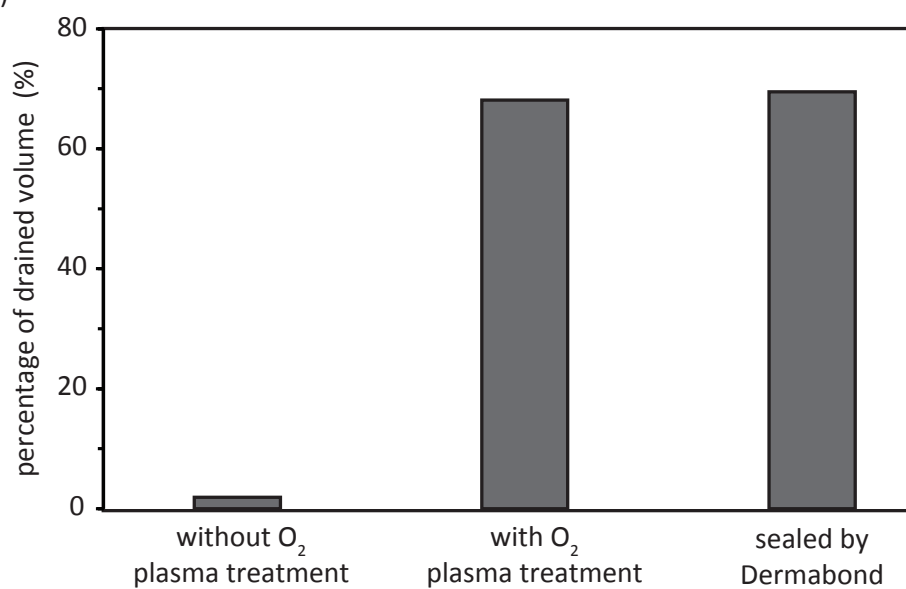


Fig. 2.17 O_2 プラズマ未処理 / 処理済, 及びダーマボンドによる接着の, 送液された液体の排出量に対する影響. (a) O_2 プラズマ未処理. (b) O_2 プラズマ処理済. (c) ダーマボンドによるシール. (d) 注入量に対する排出量の割合. (© Elsevier 2016)

入した結果、 O_2 プラズマ未処理の場合、注入した液体のうち、排出されたのは 2% 程度だけで、ほとんどがデバイス内に漏出・蓄積してしまった (Fig. 2.17a, d). 一方、 O_2 プラズマ処理済の場合、注入した液体は、約 70% が排出補助用のチューブを通じて培養デバイスの外へと排出された (Fig. 2.17b, d). また、ダーマボンドによりシールした場合も、 O_2 プラズマ処理済の場合と同様に、約 70% が培養デバイス外へ排出された (Fig. 2.17c, d). この結果から、 O_2 プラズマ処理により灌流時の液体の圧力に耐え得る程度に、培養デバイス接続部と真皮が接着されることが示唆された。また、その程度は皮膚用接着剤であるダーマボンドと同等であった。本研究では、皮膚モデルへの接着剤混入が、皮膚モデルを用いた種々の用途（例えば、遺伝子やタンパク質の定量分析等）に好ましくないと考え、 O_2 プラズマ処理を用いることとした。なお、 O_2 プラズマ処理済の場合でも 30% 程度が排出されなかった。これは、本実験で用いた流速が 0.5 mL/min と大きかったこと（実際の灌流培養ではこの 1/10 程度の流速で送液する）、真皮の収縮が不十分な状態で送液したこと、HUVEC を播種していない状態で送液したこと等が原因となり、注入した液体の漏出が発生したものとする（後述の経皮吸収試験では十分に灌流培養を行った皮膚モデルに対して低流速で送液を行っているが、この際、注入した液体の 90% 以上が排出口から排出されることを確認できている）。

以上、本節の結果からアンカ構造及び O_2 プラズマ処理を組み合わせることによって、血管流路付き皮膚モデルを培養デバイスに把持し続け、灌流培養を実施できることが分かった。

2.5 結言

本章では、血管流路付き皮膚モデルを構築するための培養デバイスの作製方法について述べた。また、当該培養デバイスを用いて血管流路付き皮膚モデルを構築する方法について記載した。さらに、培養デバイスのアンカ構造、及びコラーゲン・細胞の接着性向上処理（ O_2 プラズマ処理）が、皮膚モデルの把持にもたらす効果を明らかにした。

第 3 章

血管流路付き皮膚モデルの 評価

3.1 緒言

本章では，2 章で構築方法を示した血管流路付き皮膚モデルについて，形態及び機能の観点から評価する．まず，血管流路付き皮膚モデルが満たすべき要件についてまとめ，続いて各要件を検証するかたちで皮膚及び血管について各々の観点から，形態及び機能の評価を行う．本章により，本研究の血管流路付き皮膚モデルが皮膚モデルとしての要件を満たすこと，またその内部に構築された血管流路が血管としての要件を満たすことを明らかにする．

3.1 血管流路付き皮膚モデルの要件

血管流路付き皮膚モデルの評価に先立ち，先行研究や生体に関する情報をもとに，本研究における血管流路付き皮膚モデルの評価観点を Table 3.1 にまとめた．従来皮膚モデル，従来の血管流路，及び生体の皮膚においては様々な評価観点があるが，本研究では，血管流路付き皮膚モデルの有望な応用分野である経皮吸収試験において重要と考えられる項目を評価することとした．さらに，この評価観点をもとに，具体的な要件を Table 3.2 にまとめた．まず，表皮層については，主に従来方式で作製した皮膚

Table 3.1 皮膚モデルと血管に関する主要な評価観点

大分類	小分類	評価観点	評価実施有無			
			本研究	従来皮膚モデル [24], [26]–[28], [85] [86]	従来血管流路 [59][67]	ヒト皮膚 [25][59] [91]
形態	表皮	厚み	○	○	-	○
		分化状態	○	○	-	○
		脂質組成	× ^a	○	-	○
		微細構造	× ^a	○	-	○
	真皮	厚み	○	○	-	○
		コラーゲン密度	○	○	-	○
		他種 ECM(elastin 等)	× ^a	○	-	○
	血管流路	直径	○	-	○	○
		壁面構造	○	-	○	○
		毛細血管への分枝	○ ^b	-	○	○
		動静脈構造	× ^c	-	× ^e	○
機能	表皮	バリア機能	○	○	-	○
		機械的強度	× ^a	○	-	○
	真皮	血管や付属器の足場	○ ^d	○ ^d	-	○
		機械的強度	× ^a	○	-	○
	血管流路	栄養・酸素供給	○	-	○	○
		体温調節	× ^a	-	×	○

a. 経皮吸収では重要度が低いため評価しない。

b. 本研究では概念実証レベルとして実施する。

c. ロードマップ上の次のステップのため評価できない。

d. 構築プロセスから自明であるため特段の評価はしない。

e. 本研究の皮膚モデルと同スケール (~500 μm) では構築例ない。

モデル（従来皮膚モデル）[3][26][85][86]を比較の対象として要件を定義する。従来皮膚モデルと同等の表皮層を形成することで、従来皮膚モデルについて既に得られている知見（バリア機能や物質代謝などのヒト皮膚との相関 [26][75])を活用可能と考えられるためである。具体的に要件を定義すると、まず形態については、表皮層の厚みが約 50 μm 程度であること（これはヒトの皮膚の表皮厚みにも相当する [87])、表皮が分化して下層（基底膜，基底層）～上層（顆粒層，有棘層）に階層化していること、及び角層が形成されていることが要件となる。また、機能的な観点からの要件は、従来皮膚モデルと同じように、バリア機能を有することである。

真皮層については、コラーゲンゲルの最終密度がヒト皮膚同等の 10–300 mg/mL 程度であること [88]，また、ヒト真皮層と同等の厚み (0.5–3 mm 程度 [88]–[91])を有する

Table 3.2 血管流路付き皮膚モデルの要件

大分類	小分類	評価観点	要件
形態	表皮	厚み	従来皮膚モデル相当の厚み (約 50 μm) を有すること
		分化状態	下層～上層に分化していること 角層が形成されていること
	真皮	厚み	ヒト皮膚相当の真皮厚み (0.5–3 mm)
		コラーゲン密度	ヒト皮膚相当のコラーゲン密度を有すること (10–300 mg/mL)
	血管流路	直径	直径 300 μm 前後の管構造であること (閉塞していないこと)
		壁面構造	壁面が HUVEC に被覆されていること HUVEC がタイトジャンクションを形成していること
		毛細血管への分枝	血管流路からの HUVEC のスプラウティングが形成されること ^a
機能	表皮	バリア機能	バリア機能を有すること
	血管流路	栄養・酸素供給	外部から送液できること (灌流可能であること) 分子サイズについて選択的な透過性を有すること 栄養、酸素を周辺組織に供給できること

a. 本項目は概念実証レベル。

ことを形態に関する要件とする。なお、真皮層の機能については、真皮が皮膚付属器や血管の足場としての役割が主であることから、本研究においては特に要件を設定しない。

血管流路の形態に関しては、直径 300 μm 前後 (ヒト真皮の血管径 [92]) の管構造を維持していること、さらにその管構造の壁面が血管内皮細胞 (本研究では HUVEC) に被覆されていること、HUVEC がタイトジャンクションを形成していることを要件とする。なお、先に示したように本研究では血管流路の構築を主な目的としており、毛細血管への分枝に関しては、毛細血管形成に向けた第一のステップ (概念実証) として、血管流路からの HUVEC のスプラウティングを要件とした。機能に関しては、本研究における大前提である外部からの送液可能性 (灌流可能であること)、血管壁の特徴である分子サイズ選択的な透過性を有すること、また生体における血管の最も基本的な役割である栄養及び酸素の供給が可能であることを要件とする。

なお、血管流路付き皮膚モデルの全体の構成として、表皮層、真皮層、及び血管流路の三要素が構築されている必要がある。また、血管流路付き皮膚モデル全体としての機能は「第 4 章 血管流路付き皮膚モデルを用いた応用展開の検証」で示される応

用展開が該当するため、本章ではこれ以上触れない。

以降の節で、これらの要件に沿って、血管流路付き皮膚モデルの評価を行う。

3.2 血管流路付き皮膚モデルの形態の評価

3.2.1 血管流路付き皮膚モデル全体の形態

Fig. 3.1a に血管流路付き皮膚モデルの外観写真を示す。目視により、構築した皮膚モデルに表皮が形成されていることが分かる（皮膚モデル上面のやや黄色がかって見える箇所）。表皮の形成は、Fig. 3.1b に示すようにピンセットで表皮を引きはがすことでより明確に確認できた。

さらに血管流路付き皮膚モデル全体の形態を詳細に観察するため、凍結切片を作製してヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。なお、このとき灌流をせずに単に気液界面のみで培養した皮膚モデル（非灌流）もネガティブコントロールとして用意した。灌流の有無以外は同条件である。この結果、Fig. 3.2 に示すように灌流と非灌流いずれの場合も真皮の上に表皮が形成されており、また真皮層の中ほどに血管流路が構築されていることが確認できた。なお、非灌流 (Fig. 3.2b) の場合には、血管流路が潰れて閉塞しており、この点については「3.2.4 血管流路」にて改めて議論する。

3.2.2 表皮層

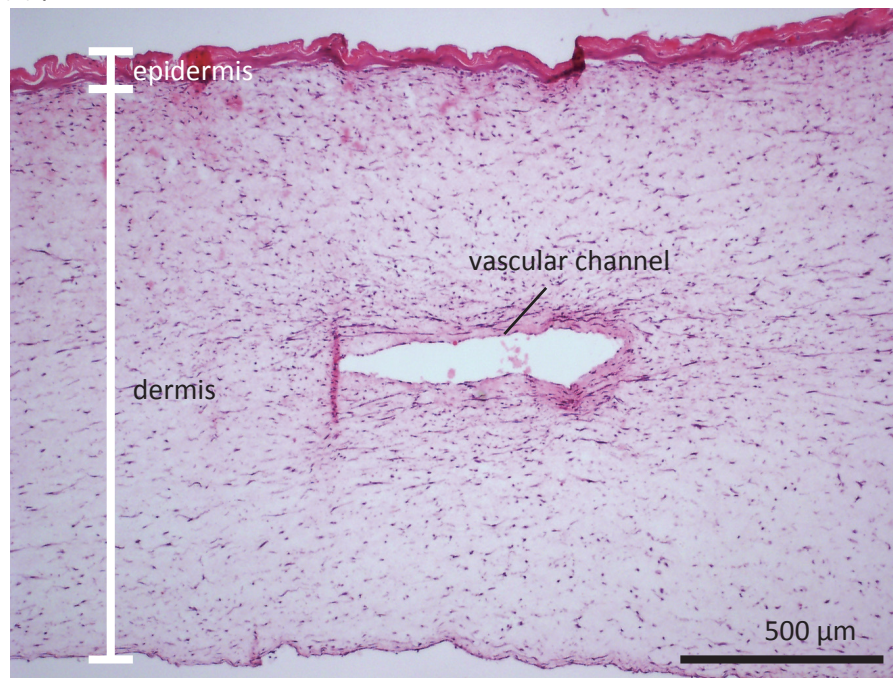
Fig. 3.3a, b に血管流路付き皮膚モデル（灌流、及び非灌流条件）の表皮層周辺の HE 染色像を示す。凍結切片であるため切断角度により多少の誤差はあるが、その厚みがおおよそ 50 μm であることが分かった。また、その最上層において角質が形成されていることが観察された（表皮のうち、赤色に染色されている箇所）。なお、灌流条件で培養した皮膚モデルと非灌流条件で培養した皮膚モデルを比較すると、非灌流条件では表皮がやや薄く、また角層に空隙が多い。これは非灌流の場合、灌流に比べて表皮への栄養供給が少なかったことが原因と考えられる。

HE 染色に加えて、表皮の分化を評価する目的で凍結切片に対する免疫染色も実施し、

本図は雑誌掲載の形での刊行 (5 年以内に出版予定) が予定されるため、
非公開とする

Fig. 3.1 血管流路付き皮膚モデルの外観。(a) 灌流条件下で培養した血管流路付き皮膚モデル。(b) ピンセットにより表皮を引きはがした状態。

(a) perfused



(b) non-perfused

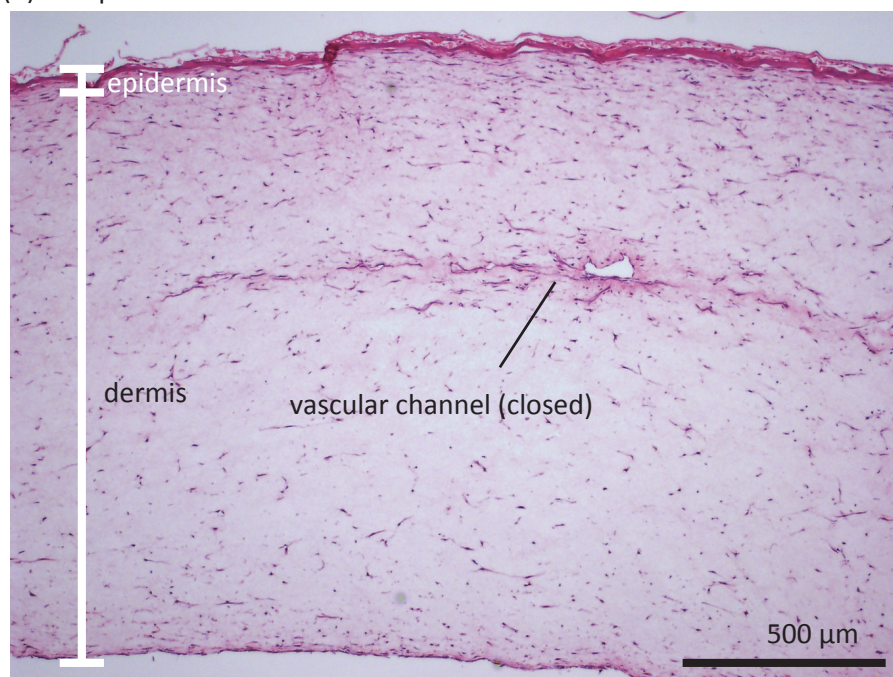
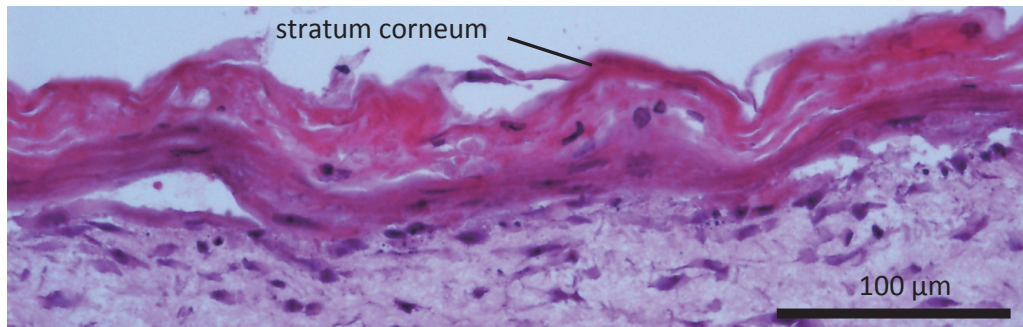


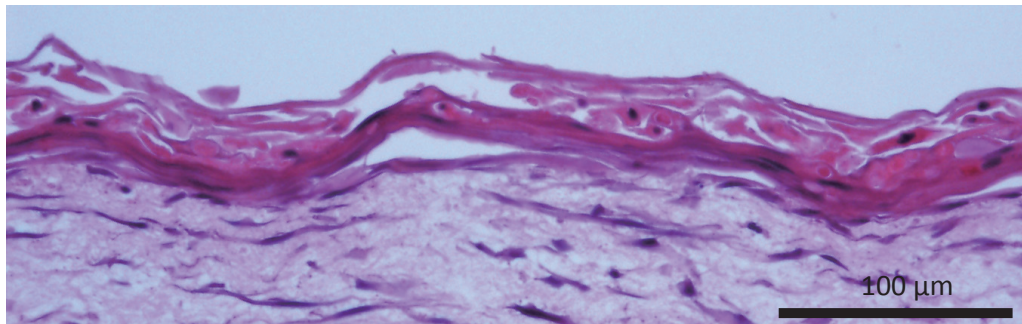
Fig. 3.2 血管流路付き皮膚モデルの全体像(HE 染色像). (a) 灌流条件下で培養した皮膚モデル. (b) 非灌流条件下で培養した皮膚モデル. (© Elsevier 2016)

共焦点顕微鏡により観察した (Fig. 3.3c, d). 免疫染色で対象としたタンパク質はサイトケラチン 10 (CK10), 及びサイトケラチン 15 (CK15) であり, それぞれ表皮の上層, 下層で発現することが知られているタンパク質である. 構築した皮膚モデルにおいては,

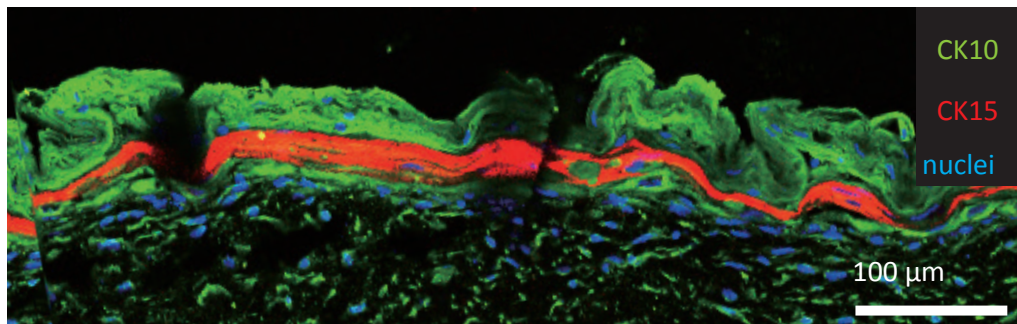
(a) perfused (epidermis)



(b) non-perfused (epidermis)



(c) perfused (epidermis)



(d) non-perfused (epidermis)

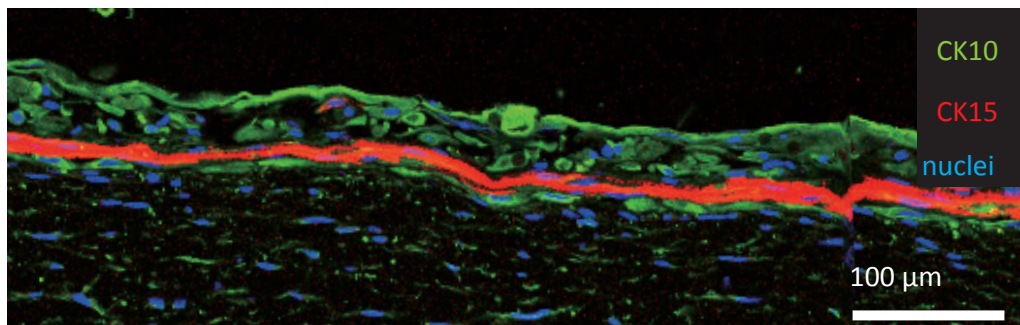


Fig. 3.3 血管流路付き皮膚モデルの表皮拡大像. (a) HE 染色像 (灌流条件下で培養). (b) HE 染色像 (非灌流条件下で培養). (c) 免疫染色像 (灌流条件下で培養, 緑: CK10, 赤 CK15, 青: 核 (DAPI)). (d) 免疫染色像 (非灌流条件下で培養. 抗体と色の対応は (c) と同じ). (© Elsevier 2016)

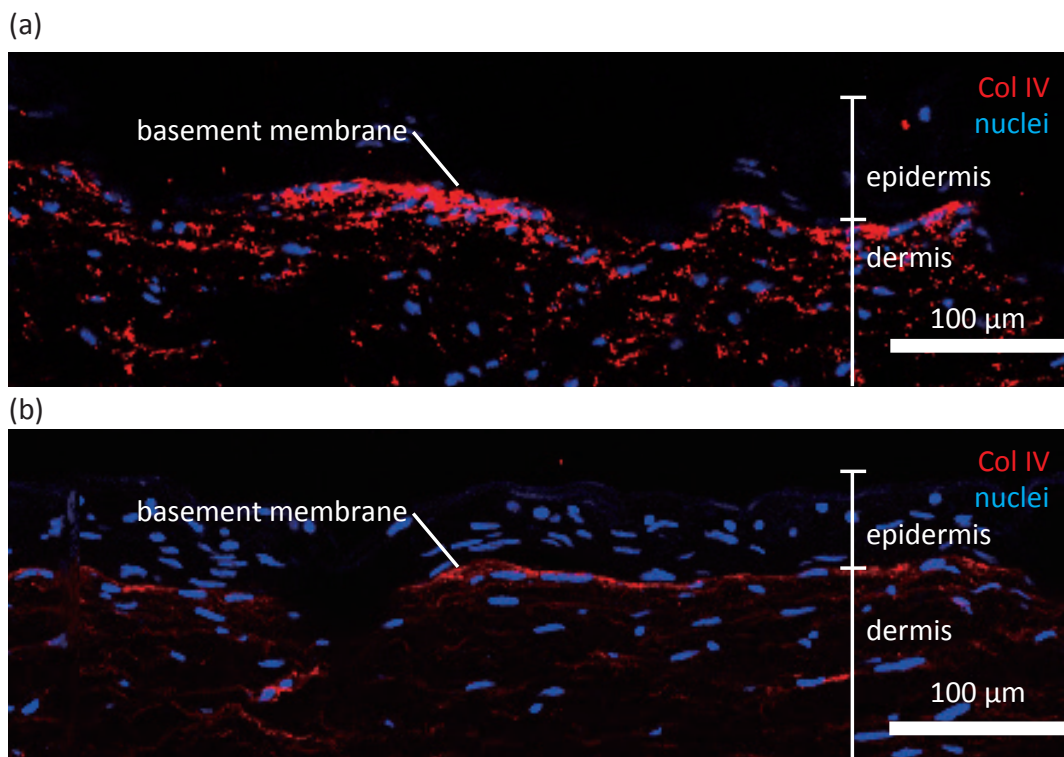


Fig. 3.4 血管流路付き皮膚モデル表皮の IV 型コラーゲン免疫染色像. (a) 灌流培養条件下で培養. (b) 非灌流培養条件下で培養.

灌流、非灌流の場合いずれにおいてもそれぞれ表皮上層、下層に局在していることが確認できた. このことから、表皮の分化が正常に促進されたことが示唆される. さらに表皮基底膜の形成を確認するため、灌流培養した皮膚モデルに対して、基底膜において多く発現するタンパク質である IV 型コラーゲンの免疫染色を実施した. Fig. 3.4 に示すように、表皮と真皮の境界面に IV 型コラーゲンが多く存在していることから、表皮基底膜が形成されていると推測できる.

皮膚モデル全体にわたる表皮厚みの分布を評価するため、二光子顕微鏡により皮膚モデルを上面から観察した. この際、Fig. 3.5a に示すように、複数測定部位 (A: 表皮中央部, B: 表皮右端 (血管流路上), C: 表皮上端, D: 表皮右上) について観察を実施した. いずれの部位においても Fig. 3.5b に示すように表皮及び真皮の二層構造が観察された. なお、Fig. 3.5b は測定部位 A のものであり、緑の蛍光は主に NHEK のケラチンの自家蛍光に由来するもの、白は角層およびコラーゲンゲルの自家蛍光に由来するものである. 各測定部位について厚みを測定したところ、Fig. 3.5c に示すように平均 57 μm の厚みで、その標準偏差は約 5 μm であった. この平均及び標準偏差は従来皮膚

本図は雑誌掲載の形での刊行 (5 年以内に出版予定) が予定されるため、
非公開とする

Fig. 3.5 表皮の厚み分布評価. (a) 測定部位. A: 表皮中央部, B: 表皮右端 (血管流路上), C: 表皮上端, D: 表皮右上. (b) 測定部位 A における二光子顕微鏡像. 緑色は主に NHEK のケラチンの自家蛍光, 白色は角層とコラーゲンの自家蛍光に由来. 中央の画像は画像処理ソフト (Zeiss Zen) により, 表皮の表面を描画したもの (Green チャンネルのみ使用). (c) 各測定部位での表皮厚み. 一元配置分散分析により検定 ($n=4$, n.s.: not significant).

モデル相当の数値である. なお, この測定結果から有意差は検出されなかった. これらのことから, 皮膚モデル全体にわたって, 表皮が概ね一様な厚みで存在していると考えられる.

以上のことから, 本研究の血管流路付き皮膚モデルは, その形態に関して従来皮膚モデル相当の厚みを有すること, 下層～上層に分化していること, 及び角層が形成されていることという表皮層に関する要件を充足していることが分かった.

3.2.3 真皮層

まず, 真皮層の培養に伴う厚み及びコラーゲングル密度の変化に関する傾向を調べるため, 予備実験として真皮層のみを培養した場合の厚みを測定した. その結果, Fig. 3.6 に示すように, 真皮層の収縮は約 1 日で定常に達し, 以降は大きな変化は生じなかった. また, コラーゲン密度に関しては, 定常に達した時点で約 14 mg/mL になり, 要件に記載の数値を達成した. ただし, 初期密度によって最終密度は異なるため, この数値は参考値である. 実際に用いる真皮層のコラーゲン初期密度及び最終密度はこの後の評価で詳細に議論する. なお, コラーゲングル密度は, 真皮層の面積, 厚み, 及び初期密度の数値を利用して算出した. また, この予備実験の結果を基に, 真皮層の培養日数を 2-3 日とした.

次に, 血管流路付き皮膚モデル構築の全工程を終えた段階での真皮層厚みを, コラーゲングルの初期密度をパラメータとして調べた. この実験の結果, Fig. 3.7 に示すようにコラーゲングルの初期密度が大きいほど最終的な真皮厚みが大きくなる (逆に言えば, 初期密度が小さいほど大きく収縮すること, 及び初期密度 2.5 mg/mL 近傍で最終厚みの値が急激に立ち上がる傾向があることが分かった. また, 厚みの要件につい

て考えると、初期密度が 2.5 mg/mL より大きい場合に要件値である 0.5 mm 以上になる。ただし、この数値は培養デバイスの高さに依存する数値であると考えられるため、より高さのある設計とすることで要件値 (0.5 mm) を達成することは可能であると考えられる。また、コラーゲンゲルの最終密度について考えると、初期密度が大きいほど最終密度が小さくなる傾向があること、及び 3 mg/mL 近傍で定常に達することが分かった。なお、コラーゲンゲルの初期密度を増大させると最終密度が減少する傾向にあることは文献 [23] でも報告されており、これは初期密度が小さい場合、NHDF がより活

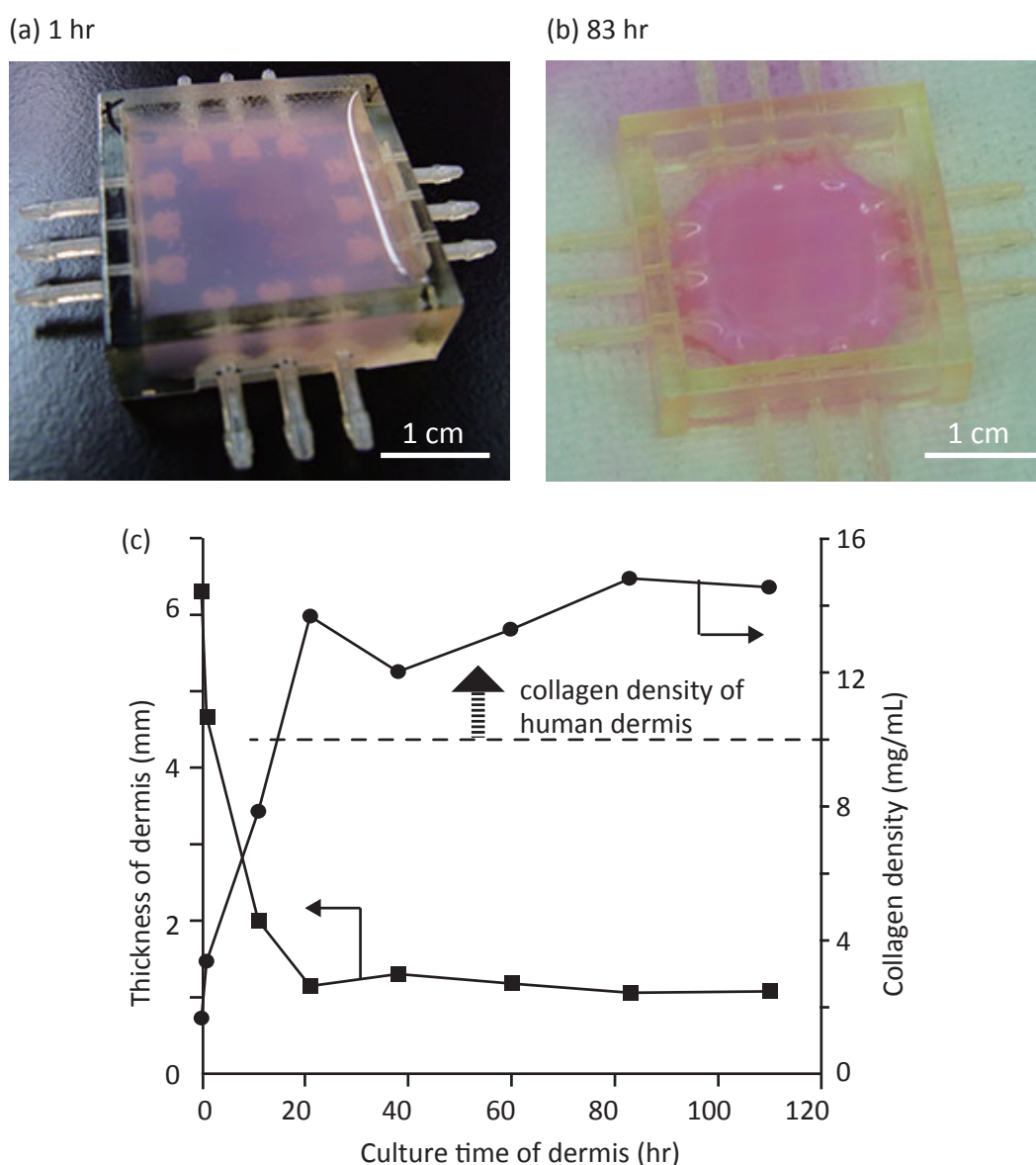


Fig. 3.6 真皮層収縮に伴う厚みの変化. (a) コラーゲンゲル化後 1 時間の真皮層. (b) コラーゲンゲル化後 83 時間の真皮層, (c) 真皮層厚みの時間変化 (左軸: 真皮層厚み, 右軸: 真皮層厚みから算出したコラーゲン密度).

発にコラーゲンの線維を配向し、ゲルを収縮させるためだと推測されている。本実験系においては水平方向の収縮を制限しているものの、同様の現象が起きたと考えられる。また、要件値 (10–300 mg/mL) について考えると、初期密度 1 mg/mL において要件の範囲から外れているが、その他の初期密度においては要件の範囲内にあることが分かった。

以上のことから、本研究の培養デバイスを用いて皮膚モデルを構築する場合、コラーゲンゲルを初期密度 2.5–4 mg/mL の範囲で調整することにより、要件を充足する真皮層を構築できることが分かった。また、初期密度をこれより低い値に設定することもできるが、その場合は培養デバイスの設計を変更する必要があること、また要件を満たす初期密度値に下限がある (1–1.6 mg/mL の間) ことが分かった。これらの結果は、要件の充足を示すばかりではなく、本研究のデバイスを用いた血管流路付き皮膚モデル構築にあたっての設計論としての意味も持つ。

なお、従来の皮膚モデル作製法 [3] を初めとし、3 次元組織の構築にあたっては Fig. 3.8a に示すように細胞を ECM ゲル中に包埋して拘束を与えずに収縮させたものを利用することが多い (肝臓細胞 [103], 腺組織由来の正常及び腫瘍細胞 [104])。収縮によって細胞密度が高まり、また ECM の密度が増加する効果が得られる。一方、本研究においては、アンカ構造による拘束があり水平方向への収縮は抑止されるが、垂直方向への収縮によって必要なコラーゲン密度を得る戦略を取った (Fig. 3.8b)。このように所定方向への収縮を抑止する系は筋組織の作製において報告されている [105][106]。なお、所定方向への組織の収縮は、細胞密度を向上しつつ、細胞の配向性を生む効果が得られ、筋組織においては筋収縮運動に寄与する。このような細胞の配向性の観点で、従来法で作製した皮膚モデル (拘束なし) と、本実験系で作製した皮膚モデル (水平方向に拘束) を比較すると、Fig. 3.9 に示すように、本実験系においては NHDF がより水平方向へ伸展・配向している様子が観察された。これは水平方向への拘束による現象と考えられる。生体皮膚においては、例えば文献 [25] の切片画像を見ると、水平方向に細胞が伸展している様子が観察され、一方で垂直方向に伸展している細胞がないことが分かる。本実験系で作製した皮膚モデルは、(従来皮膚モデルに比べ) 形態的にこのような生体皮膚に近いと考えられる。この形態的な類似性がもたらす効果は、タンパク質の産生量や遺伝子発現解析によって評価する必要がある、今後の課題である。

3.2.4 血管流路

Fig. 3.10 に血管流路周辺の拡大像を示す。灌流条件下で培養した皮膚モデルの HE

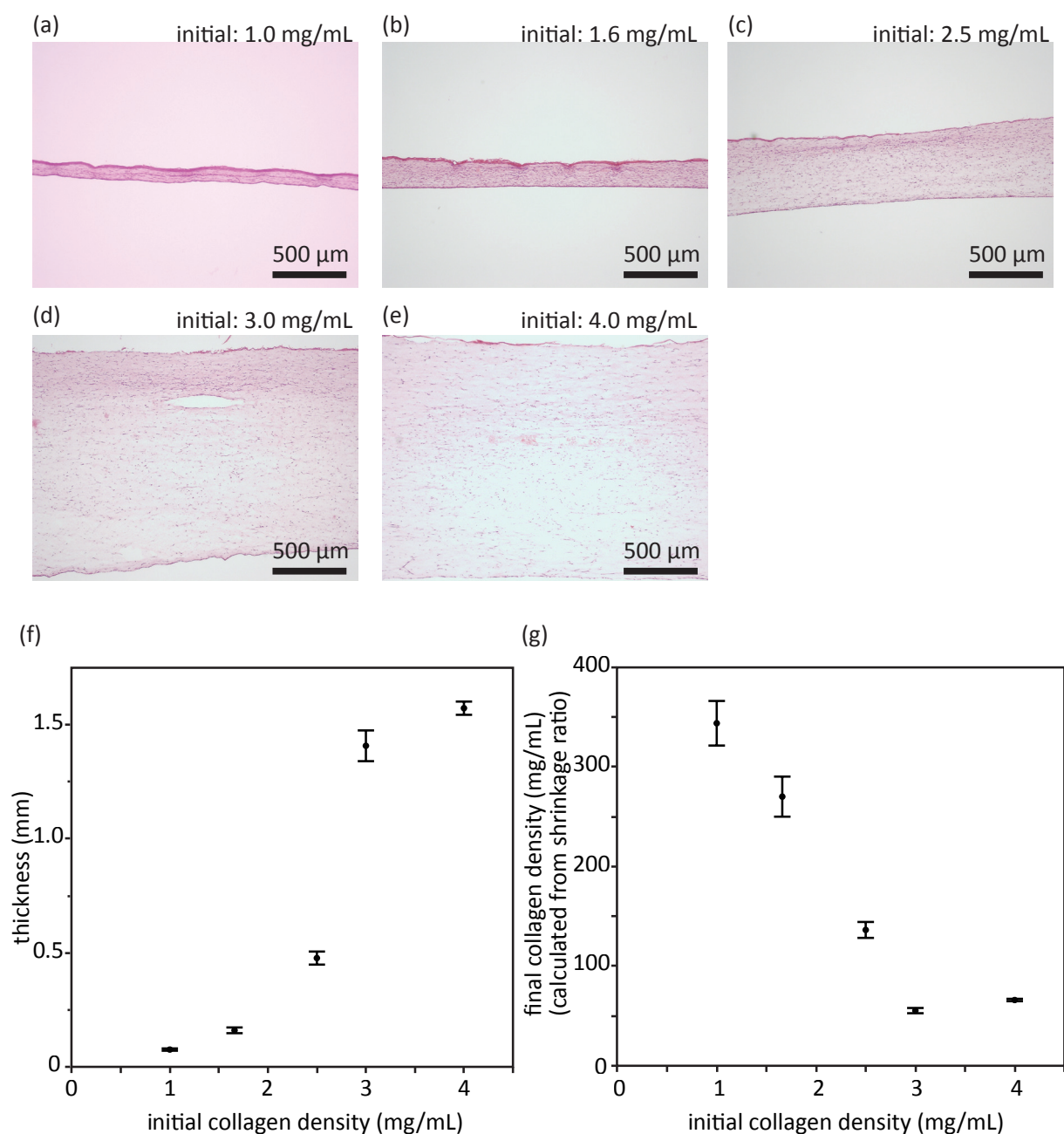


Fig. 3.7 血管流路付き皮膚モデル構築を最終工程まで終わらせた際の真皮厚み. (a-e) 異なるコラーゲン初期密度 (1.0, 1.6, 2.5, 3.0, 4.0 mg/mL) の皮膚モデルの HE 染色像. (f) コラーゲン初期密度と真皮厚みの関係. (g) コラーゲン初期密度と最終密度の関係. mean \pm s.d. で表示. n = 5.

染色像 (Fig. 3.10a) から, 血管流路は真円ではなく垂直方向に収縮した形状となっていて, ことが分かった. 長軸直径 600 μ m, 短軸直径 100 μ m の楕円として近似すると, 周長は 1.2 mm であり, これは 380 μ m の真円に相当し, 概ね要件として定めた直径 300 μ m を充足する. なお, このように収縮した形状になっているのは, 真皮層の垂直方

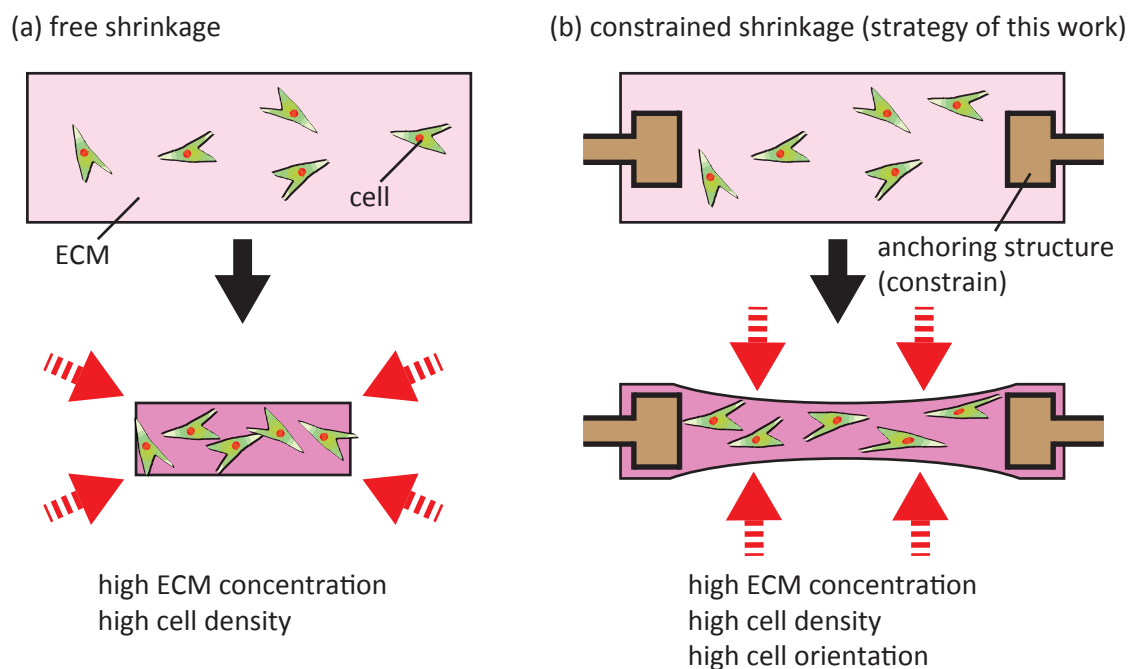


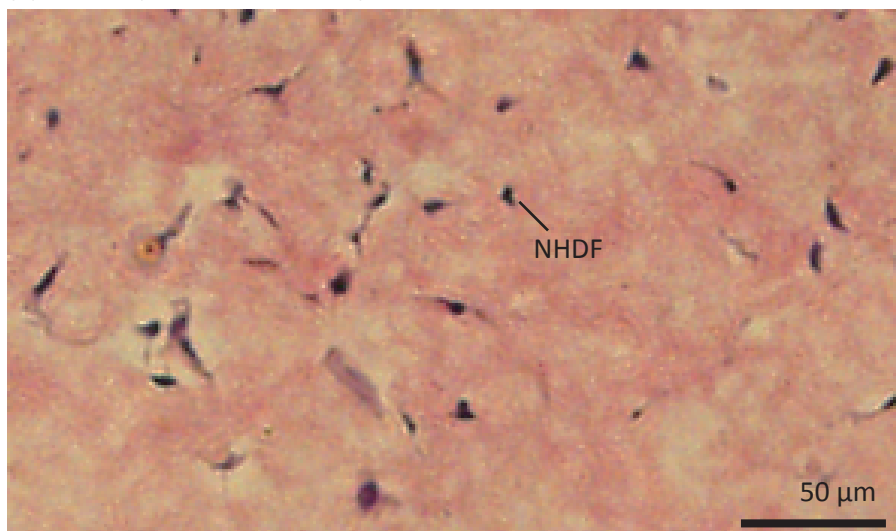
Fig. 3.8 3次元組織構築における ECM の収縮. (a) 拘束無しで自由に収縮させる方式. (b) 所定方向に拘束して収縮させる方式 (本研究の方式).

向への収縮に起因するものであると考えられる. 断面が真円であることは灌流可能な血管流路にとって必須ではないが, より真円に近づけるためには使用するワイヤの形状を楕円にすることで対策できると思われる. なお, 血管流路のサイズについては Fig. 3.11 に示すように, 小さい径のワイヤを使用することで, より小さい径の流路を形成することもできる. Fig. 3.11a では直径 $520\ \mu\text{m}$, Fig. 3.11b では直径 $290\ \mu\text{m}$ のワイヤを用いてそれぞれ流路を形成した.

また, 非灌流条件の皮膚モデル (Fig. 3.10b) においては, 血管流路の大部分が癒着し, 閉塞していることが観察された. この結果から, 灌流条件下で培養した皮膚モデルの血管流路が閉塞していないのは, 培養液の灌流による圧力によるものと推測できる. ただし, 流路構造の維持には灌流による圧力だけでなく, HUVEC が流路を覆っていることによる効果もあると考えられる. このことは, HUVEC の有無による流路構造の維持を調べた予備実験の結果 (Fig. 3.12) から推察される. この場合, どちらも灌流条件下で培養を行ったが, HUVEC が無い場合, 流路構造が維持されずに閉塞してしまった.

血管流路の形態についてより詳細に調べるため, 血管流路壁面を構成する HUVEC に関する免疫染色を実施した. まず, 基底膜の成分である IV 型コラーゲンの免疫染色を実施したところ, Fig. 3.10c, d に示すように血管流路壁に沿って IV 型コラーゲンが

(a) dermis (without constrain)



(b) dermis (with horizontal constrain)

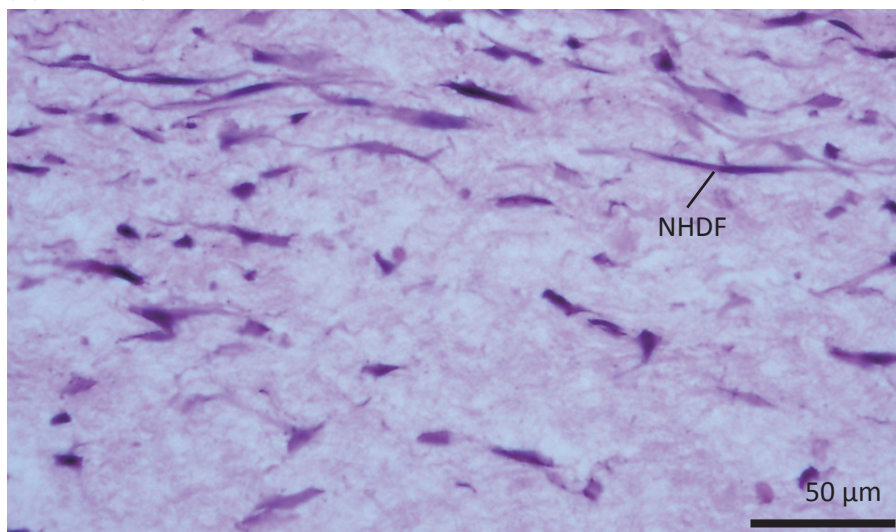


Fig. 3.9 血管流路付き皮膚モデルの真皮 (表皮直下) 拡大像. (a) 従来手法により真皮層を自由収縮させて作製したサンプル. (b) 本研究の方式により真皮層を水平方向 (紙面左右及び奥行き方向) に拘束した状態で作製したサンプル (非灌流条件). (© Elsevier 2016)

局在していることが分かった. また, HUVEC の細胞接着分子である CD31 の免疫染色を実施したところ, Fig. 3.10e, f に示すように, IV 型コラーゲンと同様に血管流路壁を覆うようにして CD31 が局在していることが分かった, このことから, HUVEC が血管流路の壁面を被覆するようにして接着していることが示唆された.

さらに, HUVEC による血管流路の被覆状態を詳細に調べるため, 灌流培養を実施する直前 (NHEK 播種済み) の皮膚モデルの血管流路を, CD31 抗体を用いて免疫染色

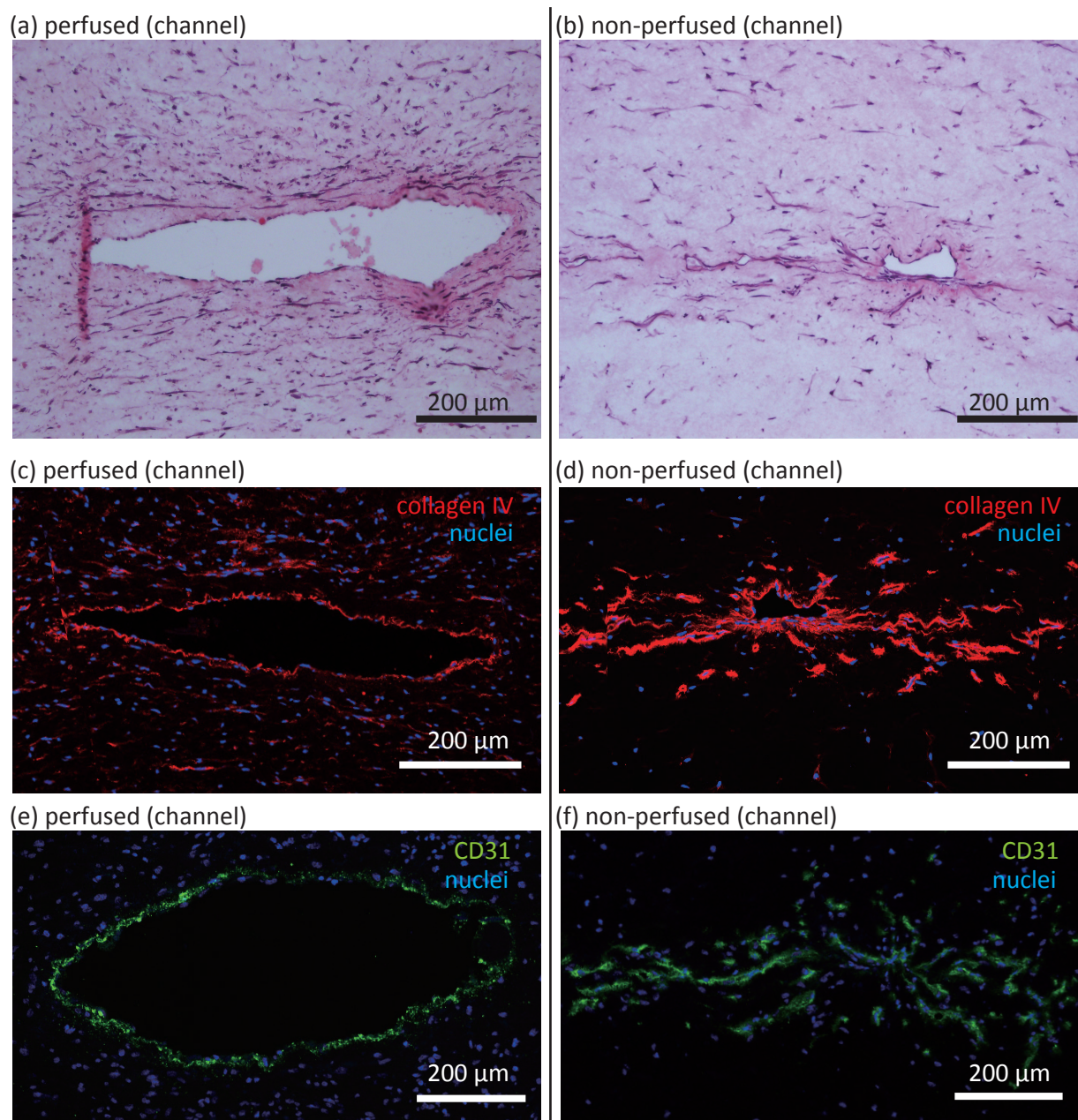


Fig. 3.10 血管流路付き皮膚モデルの血管流路拡大図. (a, b) HE 染色像 (それぞれ灌流及び非灌流培養条件). (c, d) IV 型コラーゲンに対する免疫染色像 (赤: IV 型コラーゲン, 青: 核). (e, f) CD31 に対する免疫染色像 (緑: CD31, 青: 核). (© Elsevier 2016)

し、二光子顕微鏡により観察した (Fig. 3.13). なお、二光子顕微鏡は、二光子励起により蛍光色素を励起する顕微鏡であり、長波長の励起光を使用するため通常の共焦点顕微鏡より組織深部を観察できる特長がある. この観察の結果、Fig. 3.13a に示すように、CD31 を発現した HUVEC が、少なくとも 1 mm の距離にわたって管構造を維持した血管流路の壁面を被覆していることが分かった. また、Fig. 3.13b に Fig. 3.13a の共

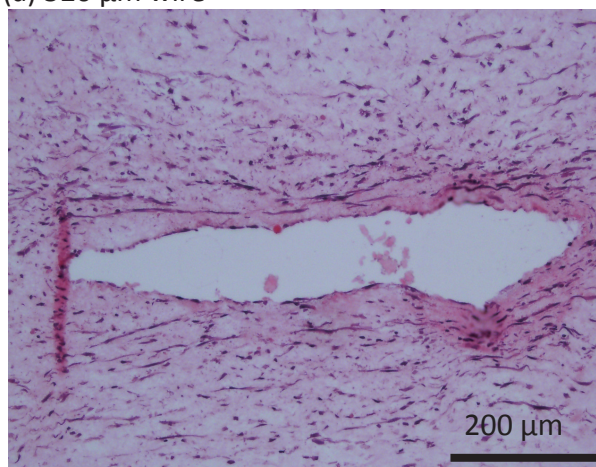
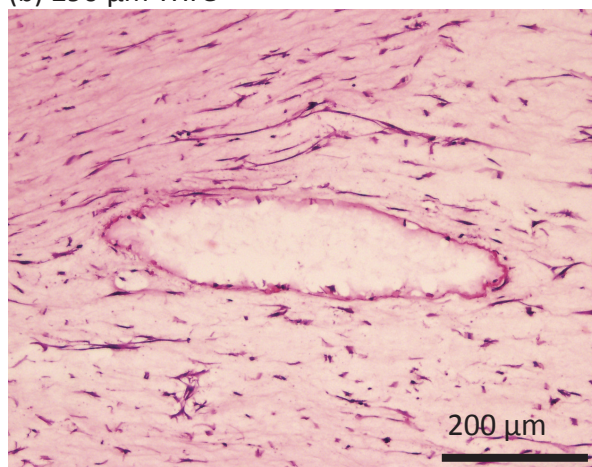
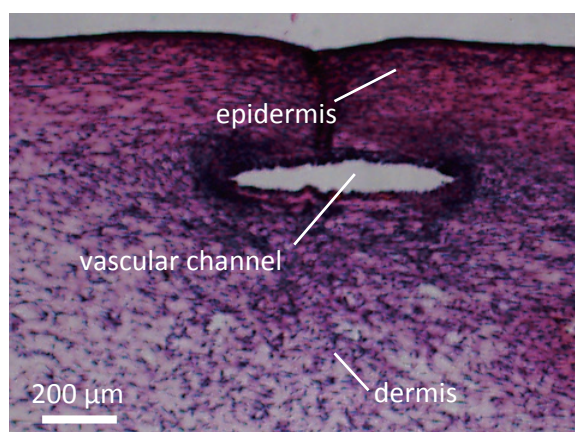
(a) 520 μm wire(b) 290 μm wire

Fig. 3.11 ナイロンワイヤの直径による血管流路のサイズ変更. (a) 10 号のナイロンワイヤ (直径 520 μm) により形成した流路 (Fig. 3.10a と同じ). (b) 3 号のナイロンワイヤ (直径 290 μm) により形成した流路. (© Elsevier 2016)

(a) with HUVEC



(b) without HUVEC

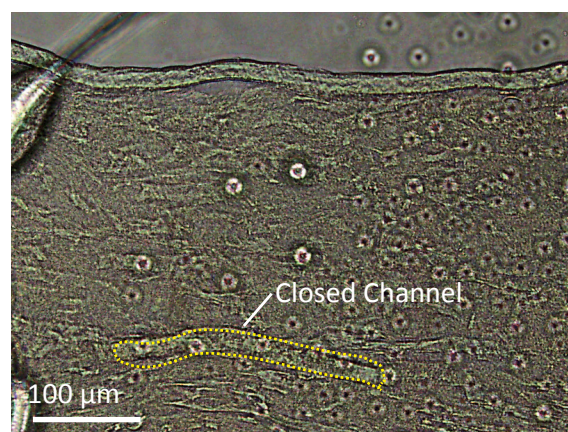


Fig. 3.12 HUVEC 有無による流路形状維持の比較. (a) HUVEC 有り (HE 染色). (b) HUVEC 無し (未染色). いずれも灌流条件下で培養.

焦点画像を Z 方向に射影したものを示す. この画像から, 流路壁面が血管内皮細胞に特徴的な敷石状の構造によって覆われていることが確認できた. また, 血管流路を覆う HUVEC が血管壁の透過性を決定する構造であるタイトジャンクションを形成しているか調べるため, 灌流培養を実施した後の皮膚モデルの血管流路に対し, タイトジャンクションのマーカーである ZO-1 についての免疫染色を行い, 二光子顕微鏡で観察した (Fig. 3.14). この結果, CD31 と同様に ZO-1 が血管流路壁面に沿って存在しており, タイトジャンクションが形成されていることが分かった.

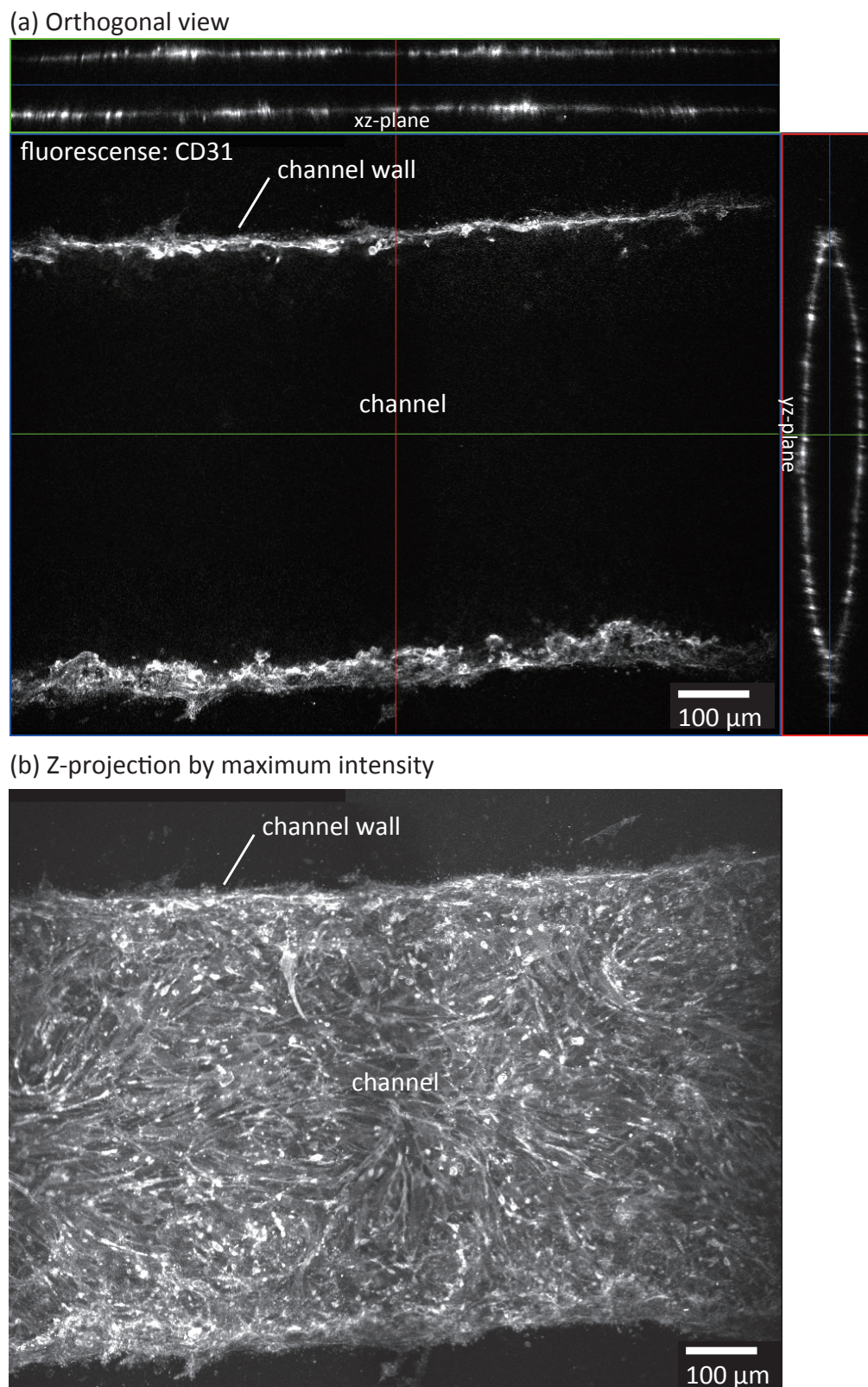


Fig. 3.13 血管流路付き皮膚モデルの CD31 免疫染色共焦点画像（二光子顕微鏡で撮影，複数視野を画像処理ソフトで接合）．灌流培養実施前．(a) 共焦点画像の xy , yz , xz 平面での断面像 (Orthogonal view)．(b) Z 方向への射影像（各ピクセルの最大輝度による射影）．（© Elsevier 2016）

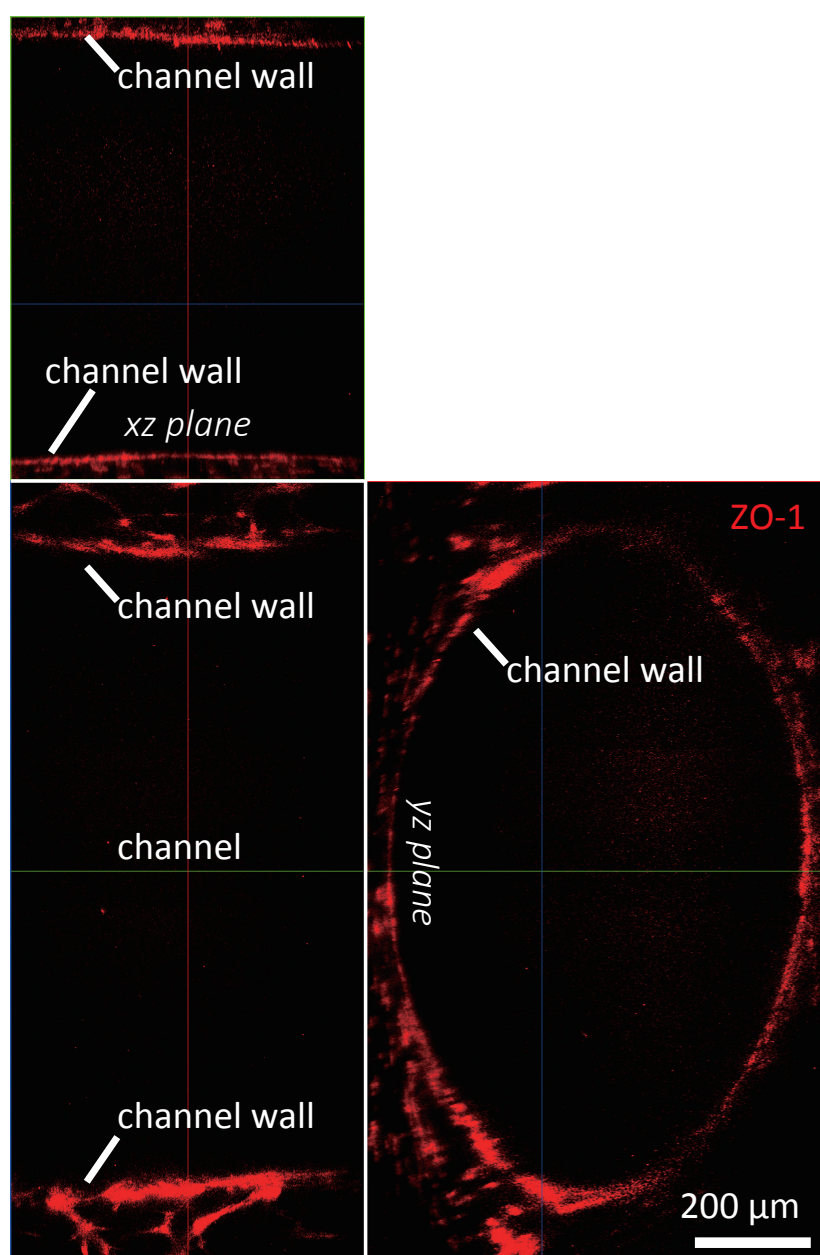


Fig. 3.14 血管流路付き皮膚モデルの ZO-1 免疫染色共焦点画像（二光子顕微鏡で撮影，複数視野を画像処理ソフト Image J で接合）．灌流培養実施後．（© Elsevier 2016）

さらに，本実験系において毛細血管の構築が可能であることを示すため，血管流路を真皮中に構築した後，血管流路付き真皮を血管内皮用培地 (EGM) に浸漬し，長期培養 (3 週間) を実施した．このサンプルの血管流路を CD31 により免疫染色し，二光子顕微鏡により観察したところ，Fig. 3.15 に示すように流路壁面から真皮層へのスプラウティングが確認された．管腔構造は確認できていないものの，このスプラウティン

本図は雑誌掲載の形での刊行 (5 年以内に出版予定) が予定されるため、
非公開とする

Fig. 3.15 血管内皮用培地 (EGM) にて真皮中の血管流路を長期浸漬培養 (3 週間) した際の免疫染色共焦点画像 (二光子顕微鏡で撮影, 画像処理ソフト Image J で z 方向に average 射影後, スプラウティング箇所を明瞭にするためローカルコントラスト・エンハンス処理を実施).

グは毛細血管形成を示唆する現象と考えられる. なお, 長期の浸漬培養の後も流路にバブルを通過・排出させることが可能であったため, 血管流路の管構造も維持されていたと考える. この結果は, 将来的に毛細血管付きの皮膚モデルを構築する際に有用な知見である.

以上の結果より, 血管流路の形態に関する要件として定めた, 直径 300 μm 前後の管構造であること (閉塞していないこと), 壁面が HUVEC に被覆されていること, 及び HUVEC がタイトジャンクションを形成していることの三点が充足されていることが確認できた. また, 血管流路の構造を維持するためには HUVEC による被覆と灌流の圧力が重要な役割を果たすこと, ワイヤ径により血管流路のサイズを調整できることが明らかになった. これらの事実は, 血管流路の設計に関して重要な知見である.

3.3 血管付き皮膚モデルの機能の評価

3.3.1 表皮バリア機能

表皮のバリア機能を評価するため, まずマイクロピペットを使用して血管流路付き皮膚モデル表面に 100 μL の PBS を静かに配置した. 配置された PBS は, Fig. 3.16 に示すように皮膚モデル表面で半球状の液滴を形成した. 一般に真皮層に水溶液 (PBS 等) を配置した場合, 液滴は形成されずに真皮上に広がる一方, 角層が形成された表皮層は撥水性を有し, 配置された水溶液は液滴を形成する. このことから, 本実験において, 皮膚モデル表面に形成された表皮層 (及び表皮層の最上部にある角層) がバリア機能を有していると考えられる.

また, 表皮のバリア機能を定量的に評価するため, LCR メータを用いて, 皮膚モデルのキャパシタンスを測定した. キャパシタンスは皮膚のバリア機能の指標とされ, その値が低いほどバリア機能がよりよく発揮されていることを示している [93][94]. な

お、バリア機能が高いほどキャパシタンスが低くなるのは、バリア機能を担う角質のキャパシタンスが、真皮層に多く含まれる水分のそれよりも小さいためであるとされている。これらの先行研究において、RC 並列回路を皮膚の等価回路として測定が実施されており、また 1 kHz 付近で測定することで角層の特性が測定可能であるとされている。本実験においては、Fig. 3.17a に示すように、皮膚モデル上面中央付近に形成された表皮層と、皮膚モデルの端にある真皮が露出した部位それぞれに、LCR メータに接続した 5 mm 間隔の電極を接触させ、1 kHz でのキャパシタンスを測定した。この結果、Fig. 3.17b に示すように表皮層のキャパシタンスは真皮層のキャパシタンスに比べて有意に小さかった。また、キャパシタンスの変化が水分の寄与によるものであることを補助的に示すため、キャパシタンスと合わせて抵抗値も測定したところ、抵抗値は表皮が有意に高かった (Fig. 3.18)。この結果は、表皮バリア機能が低下すると抵抗値が下がるという報告と合致する (なお、本実験は固定済みサンプルで実施したが、Fig. 3.18 に示すように Fig. 3.17b と同様に表皮のキャパシタンスが低かったことから、PFA 固定後も電気的特性に大きな影響を与えないと推測される)。以上の結果から、本研究の血管流路付き皮膚モデルにおいては、表皮の機能要件であるバリア機能が形成されていることが示唆された。

さらに、従来法 [3] に則って作製した皮膚モデルとのキャパシタンスの比較を実施した。測定の対象としたのは、従来皮膚モデル及び血管流路付き皮膚モデルの表皮だが、本研究の皮膚モデルについては NHEK の播種量を 7.7×10^5 cells/cm² (1 倍量 NHEK) と 1.5×10^6 cells/cm² (2 倍量 NHEK) とした二種類を用意した。これらの皮膚モデル表皮に

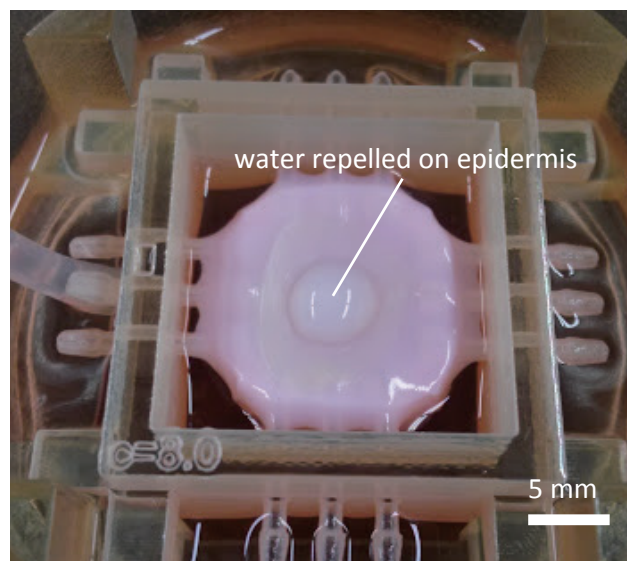


Fig. 3.16 血管流路付き皮膚モデルの表皮バリア機能の評価 (撥水性). (© Elsevier 2016)

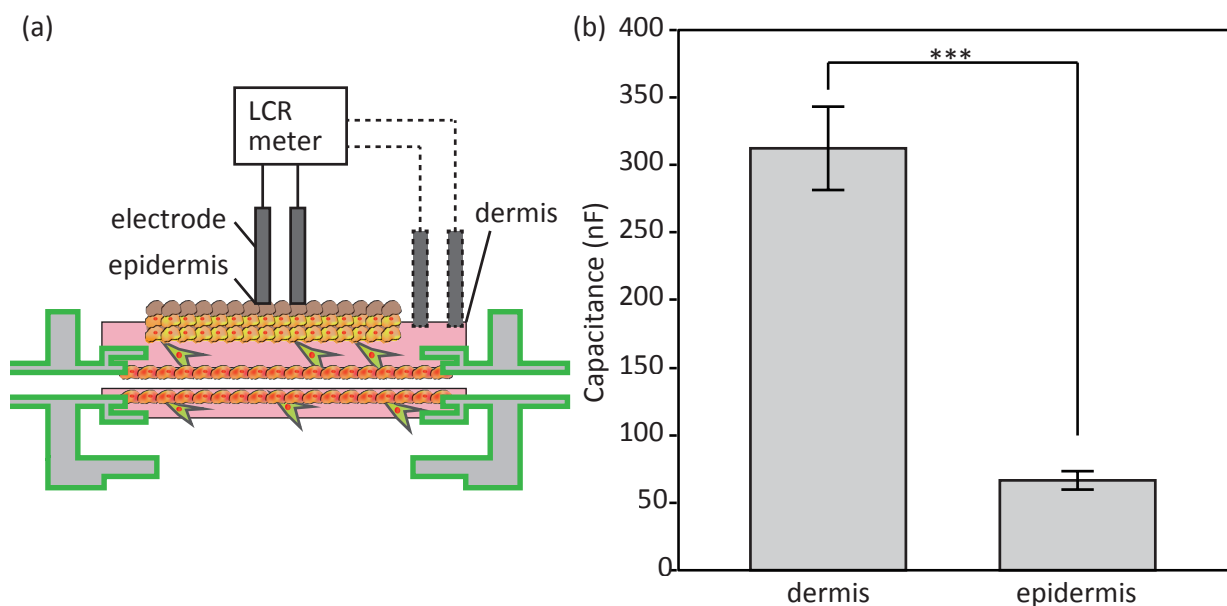


Fig. 3.17 血管流路付き皮膚モデルの表皮バリア機能の評価(キャパシタンス測定). (a) 実験セットアップ概念図, LCR メータにより, 真皮及び表皮部のキャパシタンスを測定. (b) 真皮及び表皮のキャパシタンス値 (mean \pm s.d., $n=3$, *** $p<0.001$, 対応の無いスチューデント t 検定). (© Elsevier 2016)

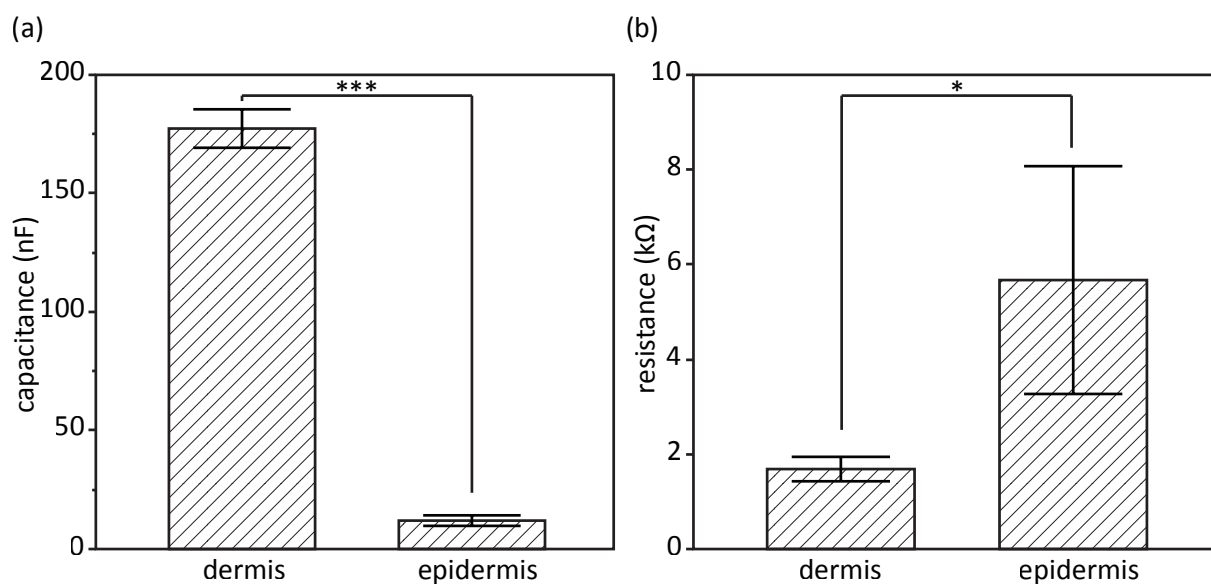


Fig. 3.18 PFA 固定後, 一か月程度スクロースに浸漬したサンプルの表皮及び真皮の電気的特性詳細. (a) キャパシタンス値, (b) 抵抗値 (mean \pm s.d., $n=3$, * $p<0.05$, ** $p<0.001$, 対応の無いスチューデント t 検定).

ついでにキャパシタンス測定の結果を Fig. 3.19 に示す。従来皮膚モデル表皮及び 2 倍量 NHEK の皮膚モデル表皮のキャパシタンスは、1 倍量 NHEK の皮膚モデル表皮のキャパシタンスと比べて有意に小さかった (Fig. 3.19c)。また、従来皮膚モデル表皮と 2 倍量 NHEK の皮膚モデル表皮のキャパシタンスの間に有意差はなかった。なお、この結果は Fig. 3.19a, b に示す HE 染色像において、1 倍量 NHEK の皮膚モデルの角層が 2 倍量 NHEK の皮膚モデルの角層と比べて、不連続な個所があることから理解できる。また、この実験結果は、本研究の皮膚モデルが従来皮膚モデル相当のバリア機能を有することだけでなく、NHEK の播種量によって表皮のバリア機能を調整できることも意味すると考えられる。

3.3.2 血管流路の灌流機能

皮膚モデル内に構築した血管流路が灌流可能であることを確認するため、観察を容易にするため通常より真皮層の厚みを薄くした皮膚モデルを作製し（流路には HUVEC 未播種、ワイヤは格子状に架線）、蛍光ビーズを含んだ培養液をシリンジポンプで注入し、蛍光顕微鏡で観察した (Fig. 3.20a)。この結果、注入された蛍光ビーズが流路内を流れていく様子が観察された。また、全工程を完了させた血管流路付き皮膚モデルに対しては、血管流路に気泡を注入し、その気泡が血管流路内を流れることを確認した (Fig. 3.20b)。これらのことから皮膚モデルが灌流可能であることが示された。

3.3.3 血管流路の分子サイズ選択的な透過性

分子サイズと血管流路壁の透過性の関係性を調べるため、通常より真皮層の厚みを薄くした皮膚モデルに血管流路を作製し、NHEK は播種せず、5 日間の灌流培養を行った後、ローダミン B (479 Da)、フルオレセインイソチオシアネートデキストラン (FITC デキストラン, 20 kDa)、ローダミン B イソチオシアネートデキストラン (RITC デキストラン, 70 kDa) の三種類の蛍光分子を含んだ溶液を流して、蛍光顕微鏡にて輝度の変化を測定した。Fig. 3.21a–c に示すように、分子量の小さい蛍光分子ほど、血管流路外に大きく拡散していることが分かる。また、Fig. 3.21d に示すように、HUVEC を播種していない場合、70 kDa の RITC デキストランを用いた場合でも、大きな拡散が観察された。Fig. 3.21c においてこれほどの拡散は生じていないことから、流路全体が一様にシールされていることが示唆された。

また、拡散の定量評価のため、Fig. 3.22a に示すパラメータ定義、及び以下に記載する式を用いて透過係数を算出した。なお、本研究で用いた透過係数の算出方法は文献

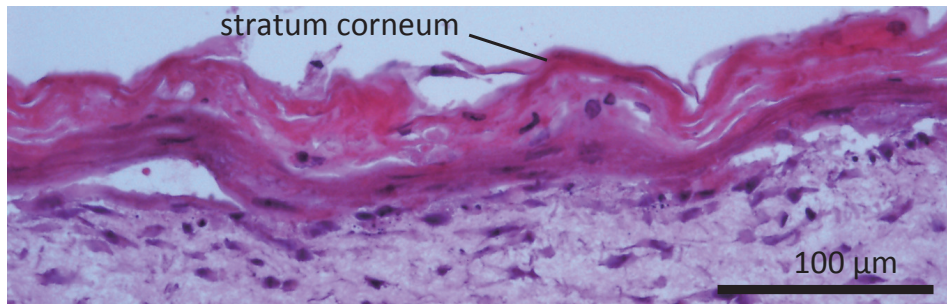
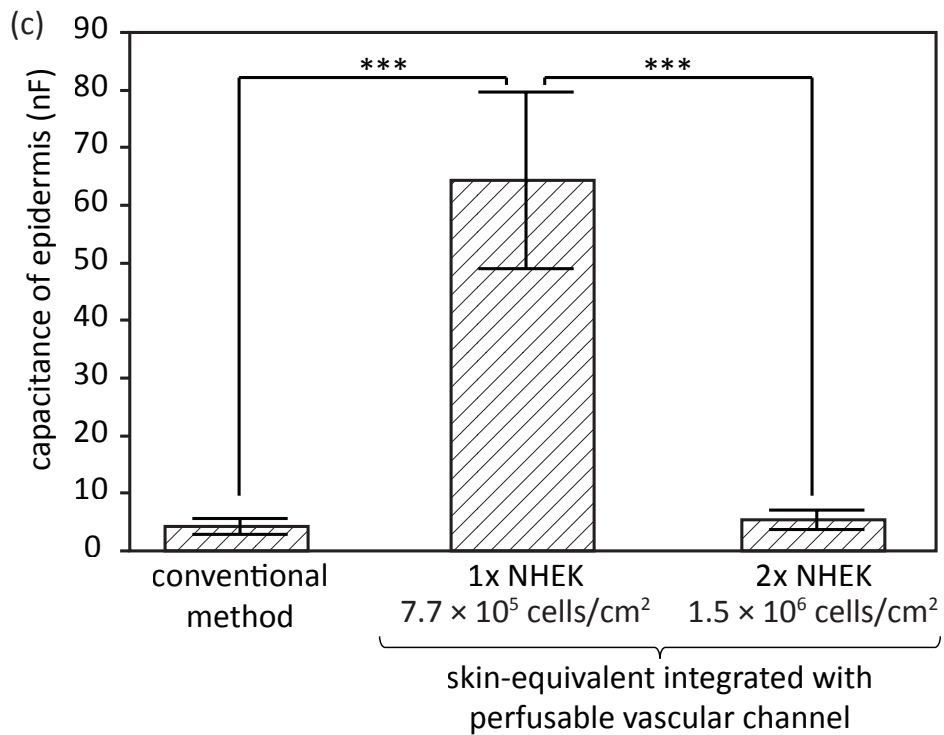
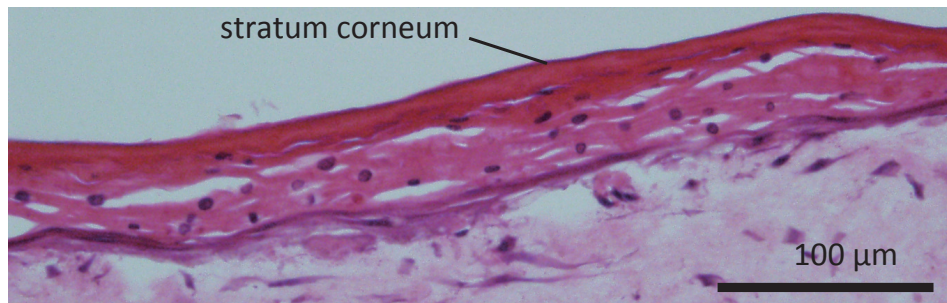
(a) 7.7×10^5 cells/cm² (1x NHEK)(b) 1.5×10^6 cells/cm² (2x NHEK)

Fig. 3.19 NHEK 播種密度によるバリア機能の変化. (a) 1 倍量の NHEK を播種した場合の HE 染色像 (Fig. 3.3a と同じ). (b) 2 倍量の NHEK を播種した場合の HE 染色像. (c) 従来手法で作製した皮膚モデル, 及び本研究の手法で作製した皮膚モデル表皮のキャパシタンス比較 (n>3, ***p<0.001, 一元配置分散分析により有意差を検定後, Tukey-Kramer の HSD 検定で各ペアを比較). (© Elsevier 2016)

[95][96]に記載があるため、ここでは導出は省略し、最終的な式のみ記載する．上記文献によれば、流路を断面が真円の円柱で近似した場合、透過係数 P は次の式で算出できる．

$$P = \frac{I_{t=T} - I_{t=0}}{T (I_{t=0} - I_{bg})} \cdot \frac{d}{4}$$

ただし、 T は計測時間（今回の実験では 6 分）、 d は流路の直径、 I_{bg} は蛍光分子を送液する前に励起光のみを照射して測定した輝度積算値であり、バックグラウンド輝度を表している．なお、輝度の積算範囲は Fig. 3.22a の ROI として囲んだ箇所であり、実際には画像を縦に 10 分割し、それぞれの領域ごとに透過係数を算出した．また、画像中に部分的に気泡が混入している箇所は透過係数の算出に影響があると考えられたため、当該領域を除外した．また、 $I_{t=0}$ 、 $I_{t=T}$ はそれぞれ測定開始時刻（流路が蛍光色素で満たされた時刻）と T だけ経過した時刻の輝度積算値である．上式に基づいて透過係数を算出したところ、Fig. 3.22b に示すように分子量が大きいほど透過係数が小さくなる傾向があると分かった．なお、70 kDa (RITC デキストラン) の透過係数について、流路中に HUVEC を播種した先行研究では 10^{-6} – 10^{-5} cm/s の値が報告されており、本実験における測定値はこの範囲内にある．さらに、血管流路が HUVEC に部分的に覆われていないことによるリークを評価するため、Fig. 3.22b の 70 kDa RITC デキストランのデータの分布を Fig. 3.23 に示す．一般に外れ値の閾値とされる第 3 四分位及び第 1

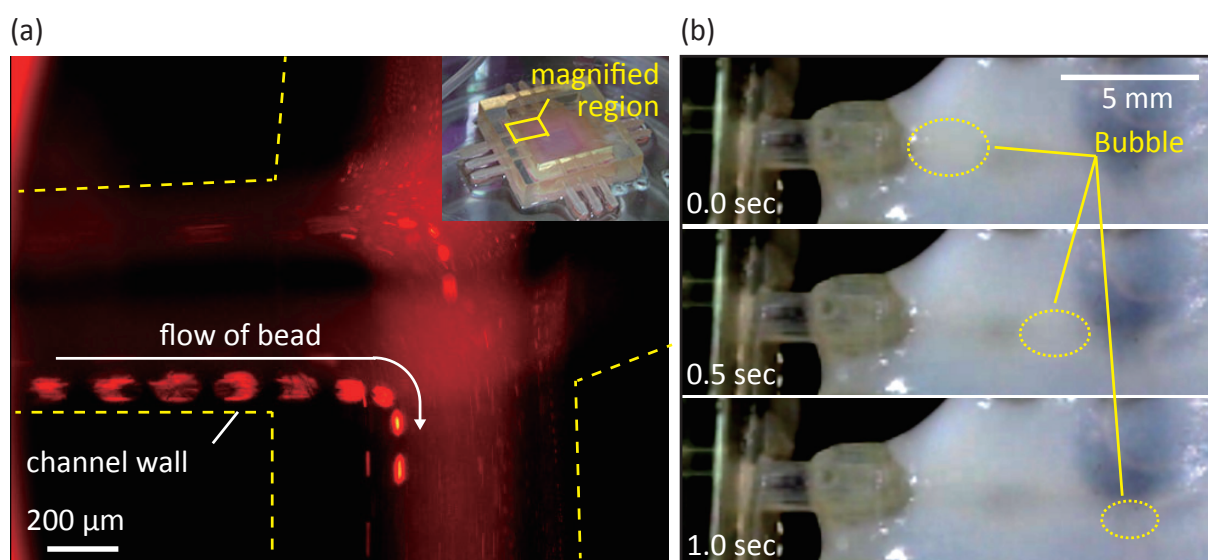


Fig. 3.20 灌流機能の検証．(a) 流路内 (HUVEC 未播種) 内に流した蛍光ビーズの軌跡．(b) 流路に注入した気泡．いずれも流路は格子状に架線．

四分位の上下 $1.5 \times$ 四分位範囲外にはデータが存在しなかった。また、このほかにスミルノフ・グラブス検定によっても外れ値の検定を行ったが、やはり外れ値となるデータは存在しなかった ($p=0.01$)。このことから、測定結果に外れ値として検出されるほど大きな影響を与えるような高い透過係数の箇所は、今回の測定ではなかったといえる。以上の結果から、本研究の血管流路には要件として定めた分子サイズ選択的な透過性があり、またその透過係数は先行研究と同程度のオーダーにあること、さらに測定の範囲内では大きなリークが存在しないことが分かった。これは本研究の血管流路において HUVEC が密に結合して（タイトジャンクションを形成して）壁面を覆っていることを示唆している。なお、HUVEC によるタイトジャンクションの形成は TEER によって計測する方法もあるが、一般に TEER による測定は多孔質のメンブレン上に HUVEC を単層培養した系で実施され、本研究のような ECM 中に形成した流路では実施されていない [59]。これは流路内に電極を挿入するのが困難なためであり、本研究においてもこれが原因で実施には至っておらず、多くの先行研究同様、透過係数の計測による評価とした。

また、ここまでの実験で用いた血管流路は 5 日間の灌流培養を行ったものであったが、灌流培養が HUVEC に与える影響を評価するため 1 日間のみ灌流培養した血管流路に RITC デキストランを注入して比較を実施した。この結果、Fig. 3.24 に示すように 1 日間のみ灌流培養を実施した血管流路は、5 日間灌流培養を実施した血管流路に比べて大きな拡散が観察された。全体の培養期間が異なる（1 日間灌流培養のものは 5 日間灌流培養のものより 4 日間、流路内での培養期間が短い）ため厳密な比較にはならないが、培養液の灌流が HUVEC に影響を与え、HUVEC 間の結合が密になったことで透過性が下がったものと推測される。短時間のずり応力が加わった場合には内皮細胞の透過性が上昇し、長時間のずり応力が加わった場合には静置培養に比べて強化されることが報告されており [97]、これと同様の現象が本実験でも起きたものと思われる。このことは、本研究の血管流路においては HUVEC が内皮細胞として機能していることを示しており、血管のモデルとしての有用性を示唆している。

また、本実験系における蛍光色素の拡散について、その実験結果の妥当性を理論的に検証した。本実験系の拡散は、血管流路を無限円筒とみなすことで、円筒座標系での拡散方程式によって記述できる。

$$\frac{\partial f(r, t)}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 f(r, t)}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial f(r, t)}{\partial r} \right)$$

ただし、 $f(r, t)$ は血管流路の中心からの距離 r 、時刻 t における濃度、 D はゲル中にお

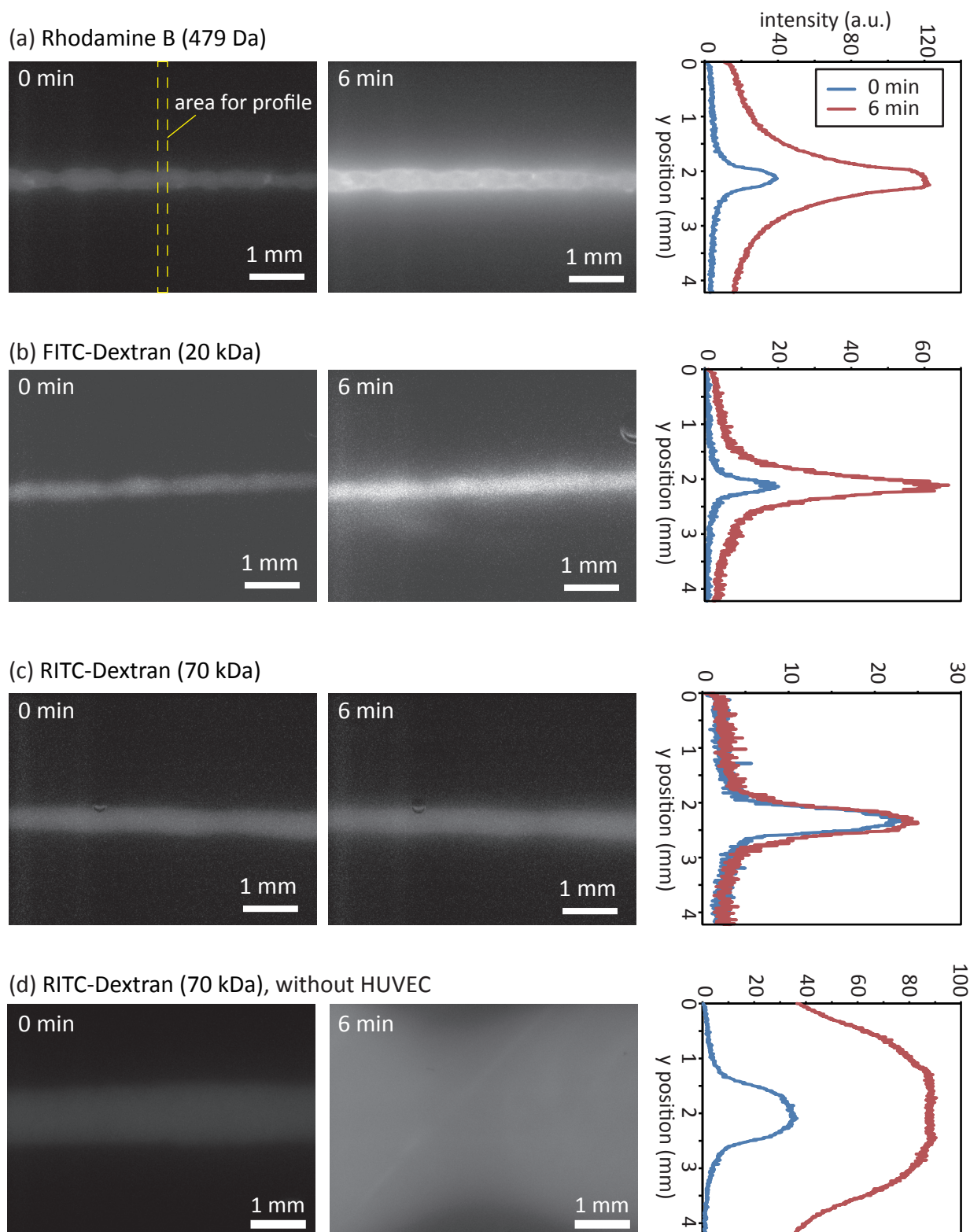


Fig. 3.21 血管流路に蛍光溶液を送液した際の輝度変化及びそのプロファイル. (a) ローダミン B (479 Da) を送液した場合の拡散の様子及び輝度プロファイル. (b) FITC デキストラン (20 kDa) を送液した場合の拡散の様子及び輝度プロファイル. (c) RITC デキストラン (70 kDa) を送液した場合の拡散の様子及び輝度プロファイル. (© Elsevier 2016)

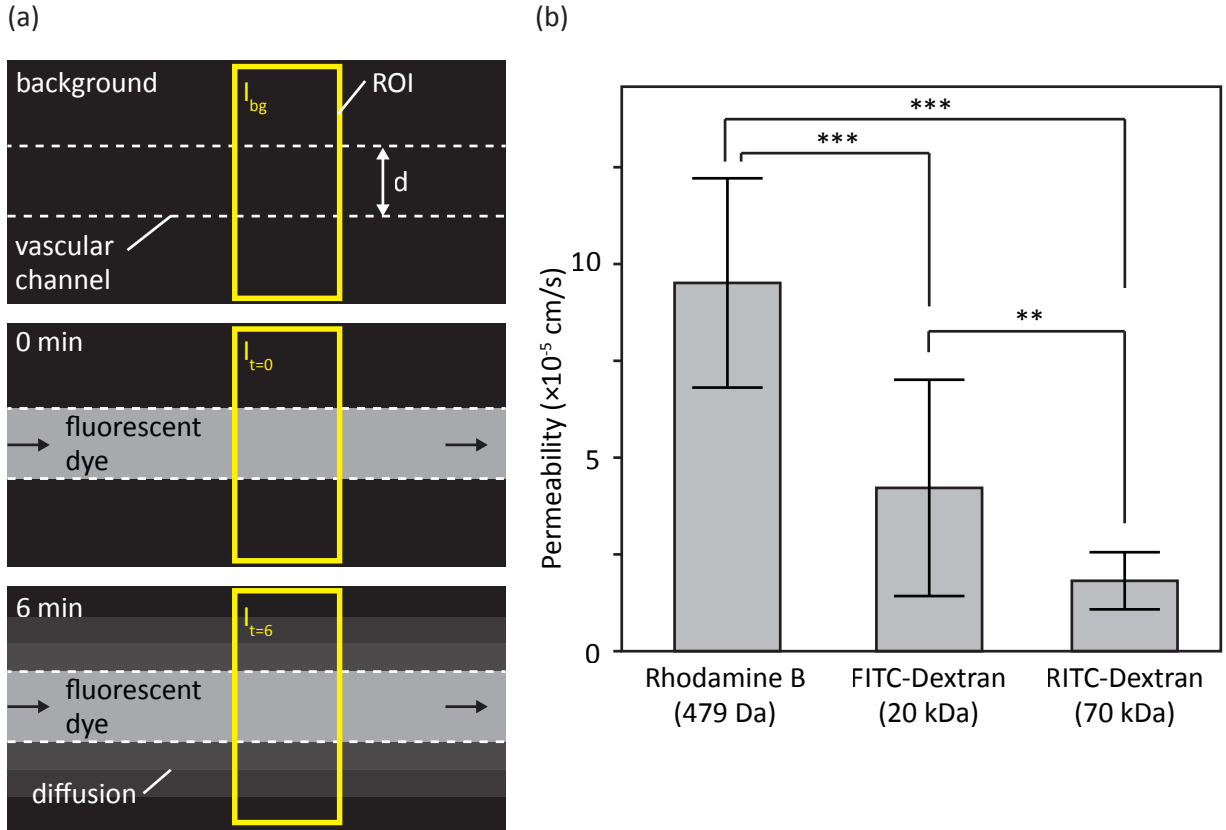


Fig. 3.22 蛍光輝度から算出した各蛍光物質の透過係数. (a) 透過係数計算におけるパラメータの定義. (b) 各物質の透過係数. ($n = 17$ (Rhodamine B, 2 デバイス), 23 (FITC-Dextran, 3 デバイス), 18 (RITC-Dextran, 2 デバイス), $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, 一元配置分散分析により有意差を検定後, Tukey-Kramer の HSD 検定で各ペアを比較). (© Elsevier 2016)

ける蛍光物質の拡散係数である. この拡散方程式の境界条件は, 時刻 $t=0$ における濃度条件, 及び流路壁面における流束の連続性を考慮し, 次のように書ける.

$$f(r, 0) = 0 \quad (r > R)$$

$$-D \frac{\partial f(r, t)}{\partial r} \bigg|_{r=R} = P(f_0 - f(R, t))$$

ただし, P は流路壁の透過係数, f_0 は流路内の濃度 (一定) である. この方程式の解析的な解の導出は困難であるため, 本研究においては有限要素法シミュレーションソフトウェア COMSOL により数値計算を実施した (Fig. 3.25). なお, シミュレーションは拡散と同じ方程式により記述される伝熱シミュレーションによって代用した. また, 拡散係数 D 及び透過係数 P は, 文献 [117]–[119] に記載の数値及び回帰曲線を用いて推測した値を使用した. 具体的には $D_{479 \text{ Da}} = 4.5 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$, $D_{20 \text{ kDa}} = 6.5 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$, $D_{70 \text{ kDa}}$

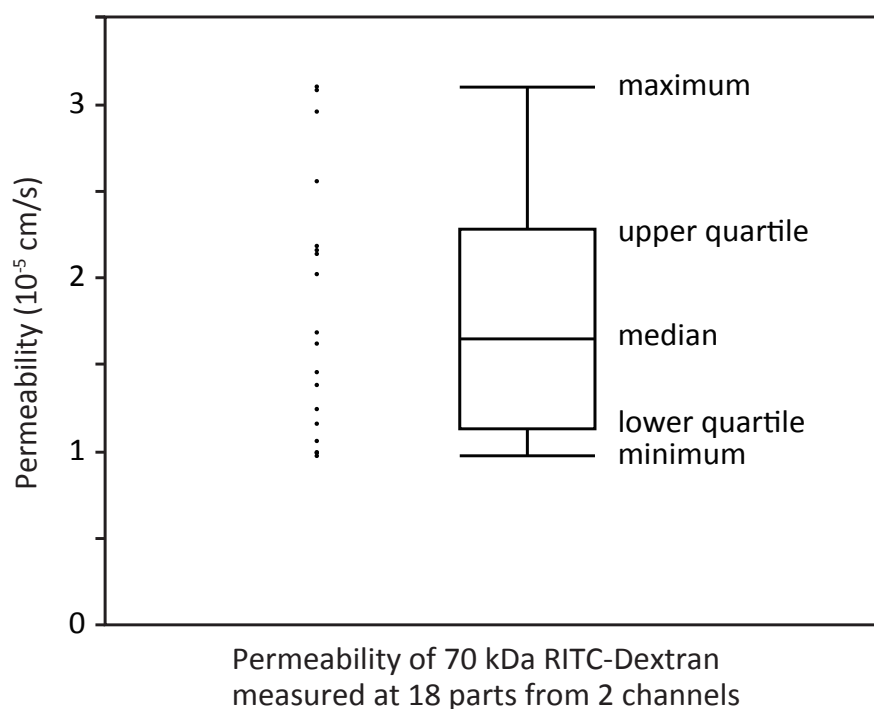


Fig. 3.23 70 kDa の RITC デキストランを流した際の透過係数の分布. 独立の 2 実験で得た 2 セットの画像を, それぞれ縦に 10 分割 (約 560 μm 毎) して計測. うち 2 計測結果については, 画像中の気泡の影響があったため破棄.

$= 4.5 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$, $P_{479 \text{ Da}} = 7.5 \times 10^{-6} \text{ m/s}$, $P_{20 \text{ kDa}} = 9.1 \times 10^{-7} \text{ m/s}$, $P_{70 \text{ kDa}} = 4.6 \times 10^{-7} \text{ m/s}$ を用いた (添字は分子量). 実際のデータと比較するため, 観察方向 (Fig. 3.25 の紙面上下方向) に輝度を積算したうえで疑似フォクト関数によりピークフィッティングを行い, 比較のための特徴量として半値幅を算出した (Fig. 3.26a). なお, この際, 流路径として実際の流路径の分布を用いて複数回の計算を行った. さらに, 実際のデータについても同様に蛍光輝度プロファイル (Fig. 3.21) に対して疑似フォクト関数をフィッティングして半値幅を算出した. 以上のシミュレーション結果と実測データの半値幅の比較を Fig. 3.26b に示す. 両者は概ね一致しており, 蛍光色素の拡散についての実験結果が, 理論的に妥当であることが示唆された. なお, シミュレーションと実測データとで最大 18% の誤差が生じているが, これはシミュレーションに使用したパラメータ (拡散係数及び透過係数) が本実験系と異なることや, 流路形状が実際には真円ではないことなどに起因すると推測される.

3.3.4 血管流路の酸素・栄養供給機能

血管流路の周辺組織への酸素及び栄養供給機能を評価するため, まずアラマーブルー

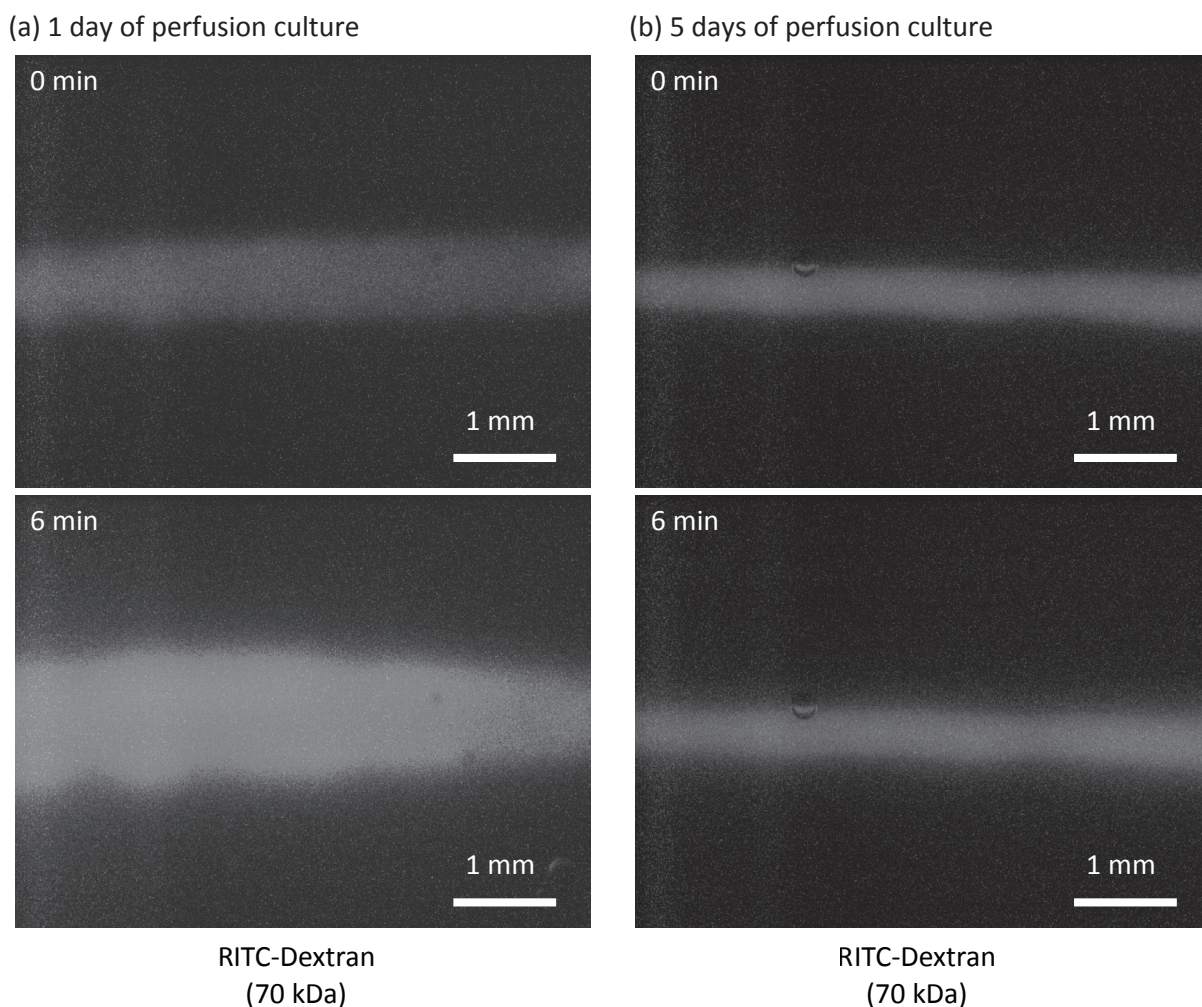


Fig. 3.24 灌流培養の期間による透過性の差異. (a) 5 日間の灌流培養を実施した血管流路 (Fig. 3.21c と同じ), (b) 1 日間の灌流培養を実施した血管流路. いずれも 70 kDa の RITC デキストランを使用.

を用いて、作製した皮膚モデル全体としての活性を測定する予備実験を実施した. アラマーブルーは、細胞内で代謝 (nicotinamide adenine dinucleotide による還元) されて非蛍光の青色から蛍光の赤色へと変化する色素であり、生細胞数の定量に利用される. 今回の実験では、Fig. 3.27a に示すように皮膚モデルをアラマーブルーを含んだ培地に浸漬し、6 時間インキュベートした (図中ではデバイス内外の色が分かれているが、実際には内外で溶液が対流によって交換されるように設置したため、ここまで顕著な差は見えない). インキュベートの後、アラマーブルーを含んだ溶液を採取し、マイクロプレートリーダーにより励起 530 nm / 蛍光 590 nm で測定を実施した. この結果、Fig. 3.27b に示すように灌流条件下で培養した皮膚モデルから採取したサンプルは、非灌流条件下で培養した皮膚モデルに比べて強い蛍光が検出された. このことから、灌流に

本図は雑誌掲載の形での刊行 (5 年以内に出版予定) が予定されるため、
非公開とする

Fig. 3.25 流路からの蛍光色素拡散のシミュレーション結果 (流路径 300 μm の場合).

本図は雑誌掲載の形での刊行 (5 年以内に出版予定) が予定されるため、
非公開とする

Fig. 3.26 流路からの蛍光色素拡散のシミュレーション結果 (観察方向への積算値) と実測値の比較. (a) 観察方向への積算値 (流路径 300 μm の場合). (b) 実測データとの半値幅の比較.

よって皮膚モデル内部に栄養及び酸素が供給され、生細胞数（もしくは各細胞の増殖状態などの活性）が多くなると推測された。

さらに灌流による栄養及び酸素の供給機能を評価するため、血管流路付き皮膚モデルの真皮層での細胞の分布を調べた。まず灌流条件及び非灌流条件それぞれで 10 日間培養した皮膚モデルの凍結切片を作製し、DAPI によって核染色した。この凍結切片を蛍光顕微鏡で撮影し、ImageJ により以下の処理を実施した。

1. 血管流路の上部及び下部から、100 μm 毎に矩形領域を設定した (Fig. 3.28a, b).
なお、表皮層及び真皮層底面は分析対象から除いた。
2. "threshold" 及び "watershed" により画像を二値化した。
3. 79 μm^2 (直径 10 μm の円の面積) 以上の粒子を、核の中心が切片内に存在する細胞と仮定して、"analyzing particle" プラグインによってカウントした。

以上の処理によって領域毎の細胞数の分布を測定した結果を Fig. 3.28c, d に示す。まず、灌流条件と非灌流条件で培養した皮膚モデルそれぞれの細胞数分布について、組織全体の平均細胞密度で比較すると、灌流条件のものは 6×10^7 cells/cm³、非灌流のものは 2×10^7 cells/cm³ であり、灌流条件の平均細胞密度は、非灌流条件のものに比べて 3 倍程度大きかった。次に、細胞の分布については、灌流条件で培養した皮膚モデルと非灌流条件で培養した皮膚モデルいずれの場合においても、血管流路の周囲の細胞密度が高く、血管流路からの距離が離れるにつれて細胞密度が減少していく傾向があった。灌流条件で培養した皮膚モデルの細胞密度は、0–100 μm の階級において最も高く、

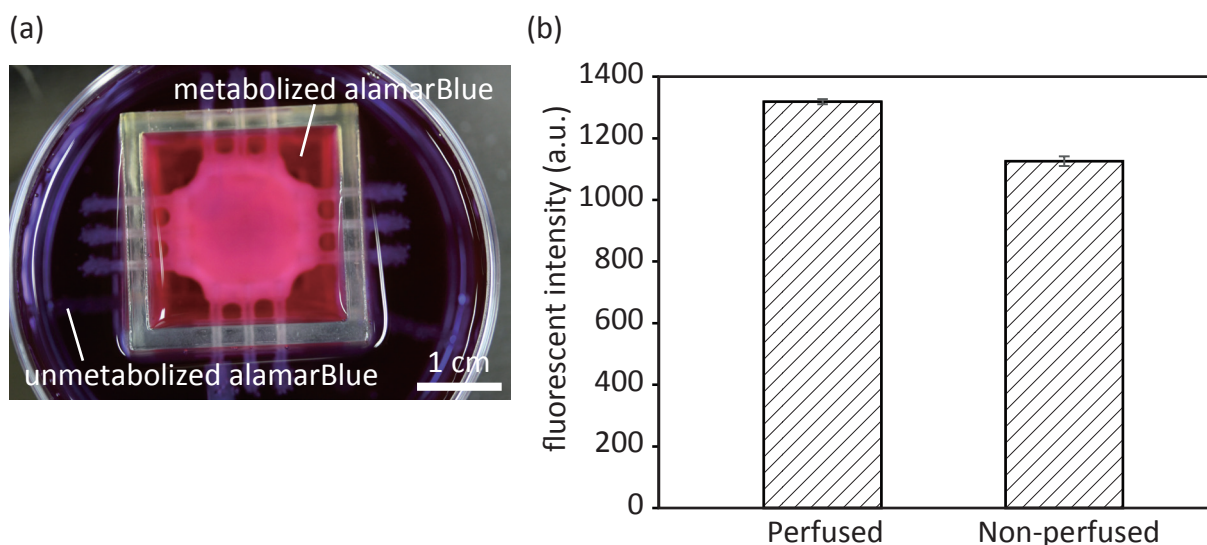


Fig. 3.27 アラマーブルーによる皮膚モデル活性の測定. (a) 皮膚モデルをアラマーブルーに浸漬した際の反応の様子 (参考), 実際はデバイス内外で溶液が対流し, 交換されるように設置. (b) 代謝されたアラマーブルーの蛍光測定 (mean \pm s.d., $n=5$, 同一デバイスから採取した 5 サンプル).

非灌流条件で培養した皮膚モデルの同階級の約 4 倍の密度であった.

これらの結果は, 栄養及び酸素が血管流路からその周辺の組織へと供給されたこと (血管流路の機能要件) を示している. さらに, Fig. 3.28c に示された結果は, 本研究の灌流システムが, (皮膚モデルに限定せず) 分厚く密度の高い組織の培養にも有用であることも示唆している. 何故なら, 灌流条件で培養した皮膚モデルでは階級 $-100-100\ \mu\text{m}$ における細胞密度が $10^8\ \text{cells}/\text{cm}^3$ のオーダーで維持されているが, 一般に $10^8\ \text{cells}/\text{cm}^3$ オーダーの細胞密度を組織深部で維持するのは栄養及び酸素の拡散に制限があり困難 [98] なためである. ただし, 今回用いた実験系においては血管流路の影響を単純化する目的で一本の血管流路のみを構築したため, 血管流路から遠い場所では細胞密度は $10^7\ \text{cells}/\text{cm}^3$ のオーダーとなった. また, 組織表面からの細胞数分布は概ね指数関数によって近似できることが知られていることから [98], 本実験においてもより詳細な考察を行うべく, 指数関数 $y = A \exp(-\alpha x)$ をヒストグラムに対してフィッティングした. この結果, 灌流条件においては R^2 乗値が高く ($R^2 > 0.8$), よく近似できることが分かった. 一方, 非灌流条件においては R^2 乗値が低く ($R^2 \sim 0.2$), 近似精度が低いことが分かった. これは, 非灌流条件においては血管流路の閉塞により酸素・栄養が供給されず, 近似の前提 (血管流路壁面を組織表面とみなしたこと) が成立していないことが理由と推測される. また, 先行研究 [98] の報告値によれば $A = 17 \times 10^7\ \text{cells}/$

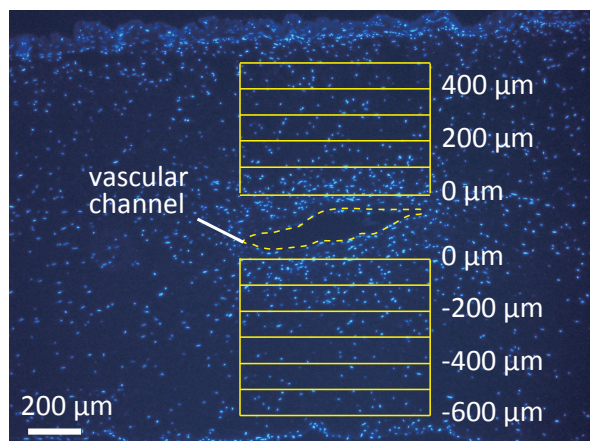
cm^3 , $\alpha = 0.0043 \mu\text{m}^{-1}$ であり, 本研究の灌流培養を実施したサンプルでの数値 (流路壁面から上側: $A = 22 \times 10^7 \text{ cells/cm}^3$, $\alpha = 0.0068 \mu\text{m}^{-1}$, 下側: $A = 16 \times 10^7 \text{ cells/cm}^3$, $\alpha = 0.0041 \mu\text{m}^{-1}$) と同程度であり, この結果は培地に直接接触している組織表面と同程度の酸素・栄養が, 血管流路によって皮膚モデル中に供給されたことを示唆されている. また, 流路壁面から上側では減衰定数 α がやや大きい, この理由としては, 下側は浸漬した培地からの酸素・栄養の拡散の影響があるのに対し, 上側の酸素・栄養の供給は血管流路からの拡散が支配的であるためと推測される (血管流路は円筒状であるため, 組織表面が一様に培地に浸漬している場合に比べて拡散の減衰は大きくなる). 以上の結果から, 組織全体にわたって均一に高い細胞密度を維持するためには, 減衰定数の逆数が約 $150 \mu\text{m}$ であることを考慮すると, $300 \mu\text{m}$ 程度の間隔での血管流路ネットワークを構築するか, もしくは主となる血管流路から血管新生を誘導して毛細血管網を構築することで栄養及び酸素の拡散距離を増大させる必要があると考えられる.

3.4 結言

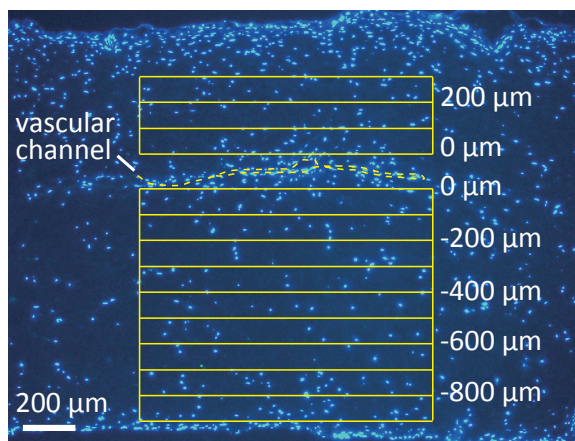
本章では, まず, 本研究の血管流路付き皮膚モデルに関する要件を表皮層, 真皮層, 及び血管流路について定義した. これらの要件は従来皮膚モデルやヒトの皮膚, 及び血管流路に関する従来研究に基づき, 形態及び機能に分類して設定した. 次に, ここで設定した要件を検証するかたちで, 第2章に記載の方法で作製した血管流路付き皮膚モデルを分析した. 表皮については, 従来皮膚モデル相当の厚み (約 $50 \mu\text{m}$) があり, さらに分化及び角層の形成も確認された. また, 表皮がバリア機能を有していることについても撥水性とキャパシタンス測定の二つの方法を用いて検証された. これらの結果により表皮に関する形態・機能要件の充足が証明されたが, これらの結果に加えて, NHEK の播種量によってバリア機能を調整できるという知見が得られた. これは, 皮膚モデルの設計と作製に有用な知見であると考えられる.

真皮については, 主にコラーゲンゲルの密度と厚みについて検証を行った. 真皮層の厚みがコラーゲンゲルの初期密度が小さいほど薄くなること, 及びコラーゲンゲルの最終密度がコラーゲンゲルの初期密度が大きいほど低くなる傾向があることが分かった. また, この結果から, 本研究の培養デバイスで要件を充足するために適切なコラーゲンゲル初期密度が $2.5\text{--}4.0 \text{ mg/mL}$ の範囲であることが明らかになった. なお, 初期密度を 2.5 mg/mL 以下にすることも可能だが, デバイスの寸法を修正する必要がある. このように, コラーゲンゲルの初期密度と, 最終密度及び厚みの関係は, デバイスの設計論においても必要な知見である.

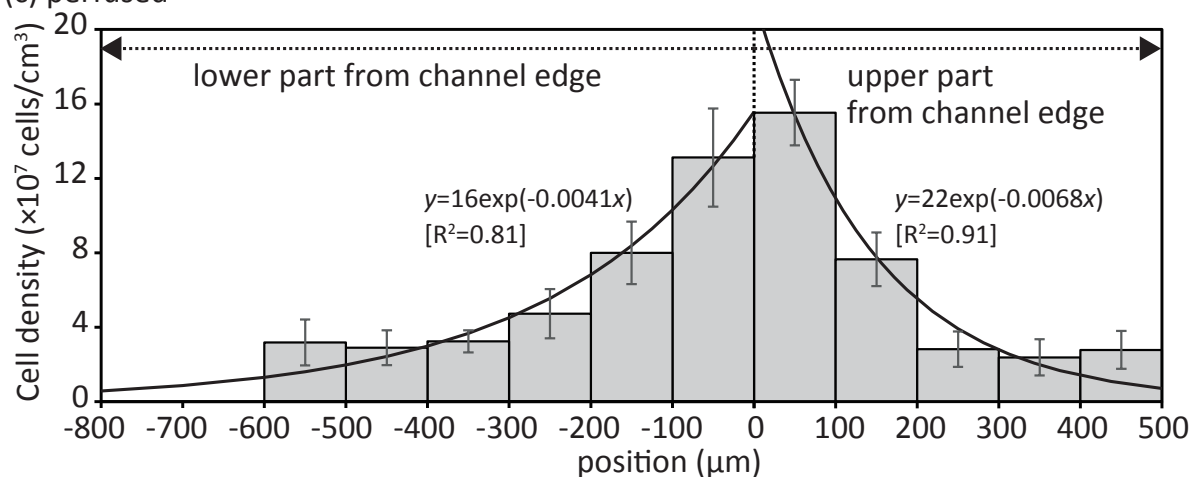
(a) perfused



(b) non-perfused



(c) perfused



(d) non-perfused

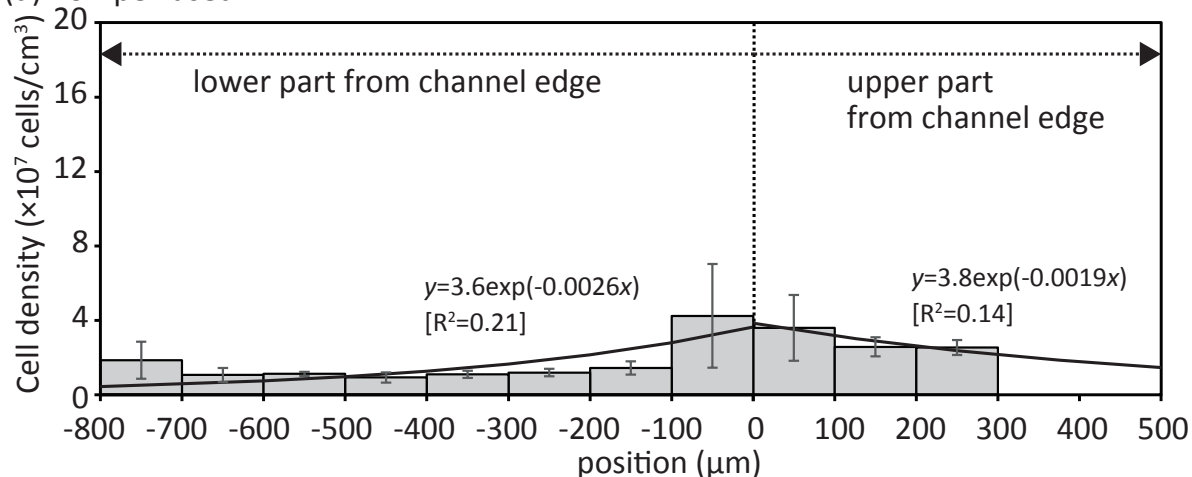


Fig. 3.28 血管流路からの距離と細胞数の関係の解析. (a) 灌流条件下で培養した皮膚モデルの核染色画像と細胞数測定領域 (黄色). (b) 非灌流条件下で培養した皮膚モデルの核染色画像と細胞数測定の定義枠 (黄色). (c) 灌流条件下で培養した皮膚モデルの細胞数分布. (d) 非灌流条件下で培養した皮膚モデルの細胞数分布. データは mean \pm s.d. で表示 (n=5, 同一サンプルの異なる切片). (© Elsevier 2016)

Table 3.3 血管流路付き皮膚モデルの評価結果と先行研究との比較

大分類	小分類	評価観点	評価項目	評価結果			
				本研究	従来皮膚モデル [24][26]–[28][85][86][113]	従来血管流路 [59][67][112]	ヒト皮膚 [25][59][91][109]–[111]
形態	表皮	厚み	厚み	50 μm	35–150 μm	-	50–100 μm
		分化状態	角層, 上層～下層	CK10, 15	CKs, loricrin, filaggrin 他	-	CKs, loricrin, filaggrin 他
	真皮	厚み	厚み	1.4 mm	~0.1 mm	-	0.5–3 mm
		コラーゲン密度	コラーゲン密度	55 mg/mL	~150 mg/mL	-	10–300 mg/mL
		血管流路	直径	長軸 600 μm 短軸 100 μm (~380 μm の円)	-	50–500 μm	30–300 μm
	血管流路	壁面構造	内皮細胞被覆	CD31	-	CD31, vWF 他	CD31, vWF 他
			タイトジャンクション	ZO-1	-	ZO-1, claudin 他	ZO-1, claudin 他
		毛細血管への分枝	スプラウティング	CD31	-	CD31, vWF 他	CD31, vWF 他
機能	表皮	バリア機能	撥水性	水滴形成	水滴形成	-	水滴形成
			キャパシタンス	5.4 nF	4.3 nF	-	~10 pF
	血管流路	栄養・酸素供給	分子サイズ	有り,	-	有り,	ヒト文献値無
			選択的な透過性	10^{-5} cm/s @70kDa	-	10^{-6} – 10^{-5} cm/s @70kDa	(mouse 10^{-6} cm/s @70kDa)
			細胞密度	~ 10^8 cells/cm ³ @ 流路近傍 ~ 10^7 cells/cm ³ @ 流路遠方	-	~ 10^7 cells/cm ³ @ 流路遠方 (近傍データ無)	~ 10^8 cells/cm ³ @ 乳頭下層 ~ 10^6 cells/cm ³ @ 網状層

血管流路に関しては、灌流培養後も中空の管構造を維持していること、及びその壁面が HUVEC に被覆されていること、さらに HUVEC がタイトジャンクションを形成していることが組織学的に示された。また、血管流路の機能として分子サイズ選択的な透過性があること、及び血管流路を通じた栄養・酸素供給が可能であることが示された。特に栄養・酸素の供給機能については、皮膚モデルに限らず他の組織にも転用

可能な機能であると考えられる。

以上の結果から，本研究で作製した皮膚モデルは，従来の皮膚モデル同等の表皮層及び真皮層に加えて，新たに，血管としての形態及び機能を備えた灌流可能な流路（すなわち血管流路）を有することが示された．これらの形態及び機能は Table 3.3 に示すように，ヒト皮膚と比較して同程度の特徴と値が得られており，本研究の血管流路付き皮膚モデルの生体モデルとしての有用性が示唆されている．ただし，バリア機能の指標であるキャパシタンスはヒト皮膚に比べて大きく，バリア機能が小さいことが分かった．これは，従来の皮膚モデルと同様の現象であり，よりヒト皮膚に近いバリア機能を実現するためには，使用する培地組成の改善（成長因子の追加，MMP 阻害剤の追加等 [85][120]）や，機械的な刺激の付与（次章にて詳細記載）など，さらなる培養条件の改善が必要である．次章では，この血管流路付き皮膚モデルを用いた応用展開について検証する．

第 4 章

血管流路付き皮膚モデルを用いた応用展開の検証

4.1 緒言

本章では，第 2 章で作製し，第 3 章で基本的特性を評価した血管流路付き皮膚モデルの，種々の分野への応用可能性について検証する．まず，応用展開の中でも最も実現に近いと考えられる経皮吸収型製剤の試験（経皮吸収試験）への適用可能性を検証する．次に，他の応用例として，近年，生物学や組織工学において注目を集めているメカノバイオロジーのツールとしての利用可能性を探る．具体的には，第 2 章に記載の培養デバイスを伸長及び圧縮が可能となるように改良することで，皮膚モデルを周期的に伸展させながら培養することを可能とする．これによってメカノバイオロジーのツールとしての概念実証を行う．

4.2 経皮吸収試験への応用展開の検証

4.2.1 経皮吸収試験の実験方法

まず経皮吸収試験の実験セットアップを Fig. 4.1 に示す．Fig. 4.1a に示すように，血管流路付き皮膚モデルの表皮に，内径 8 mm，厚み 0.5 mm のシリコーンゴムを皮膚用の接着剤 (DERMABOND ADVANCED®) で接着して，試験対象の薬剤を含む溶液を保

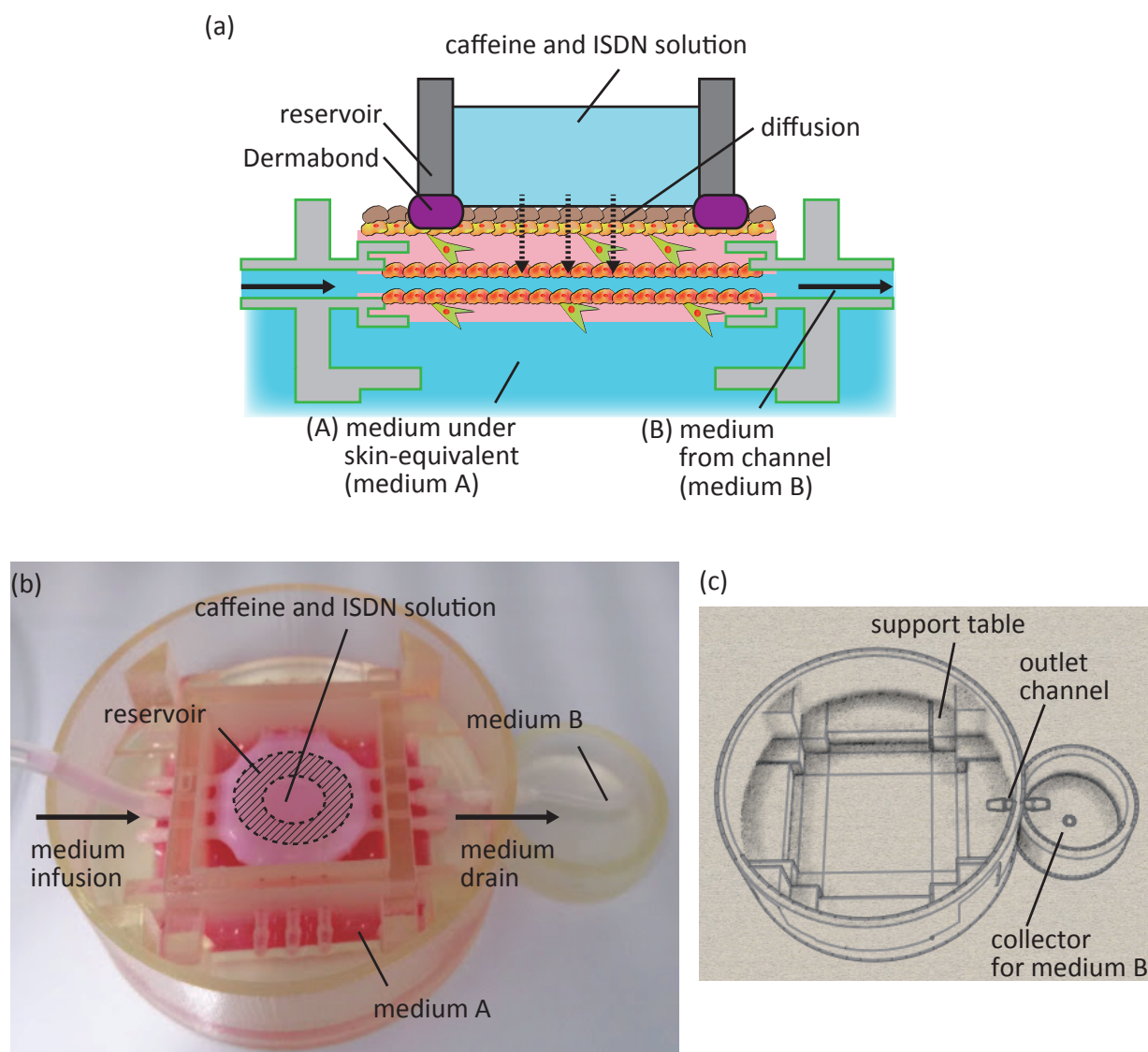


Fig. 4.1 経皮吸収試験の実験セットアップ. (a) 経皮吸収試験の模式図. 皮膚モデル下面の培地から採取した液を medium A, 血管流路から採取した液を medium B と定義. (b) 経皮吸収試験のセットアップ写真. 網掛け部はシリコーンゴムで作製したウェル. (c) 培養デバイスを浮かせた状態で支持する台, 及び血管流路からの排液を採取するためのコレクタを備えた経皮吸収用ディッシュの模式図. (© Elsevier 2016)

持するためのウェルを設けた. なお, 血管流路については中央の接続部間に一本のみワイヤを架線して作製した. また, 皮膚モデル構築のための培養デバイスとしては, Fig. 2.7 にて示した支持棒付きの培養デバイスを用いた. 経皮吸収試験中に皮膚モデル下面 (真皮層) を培地に接触させた状態で維持するため, 同じく Fig. 2.7 に示した支持台付きの培養ディッシュを用いた. ただし, 培養ディッシュは経皮吸収試験向けに一部設計を修正し, 培養デバイス及び皮膚モデルに注入されて反対側から排出された液

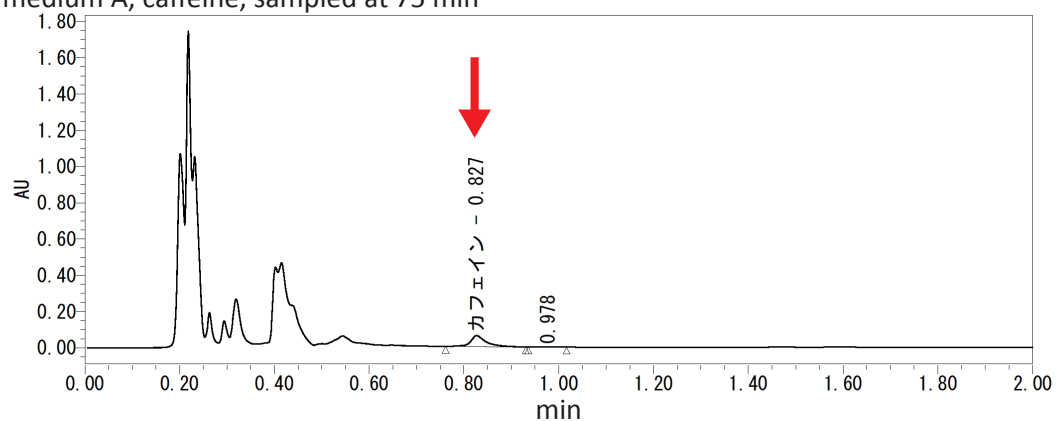
Table 4.1 HPLC の条件

物質	移動相比率 (水：アセトニトリル)	検出波長	保持時間 (目安)	カラム温度	流量
カフェイン	90 : 10	220 nm	0.83 分	40°C	0.6 mL/min
ISDN	50 : 50	220 nm	0.45 分	40°C	0.6 mL/min

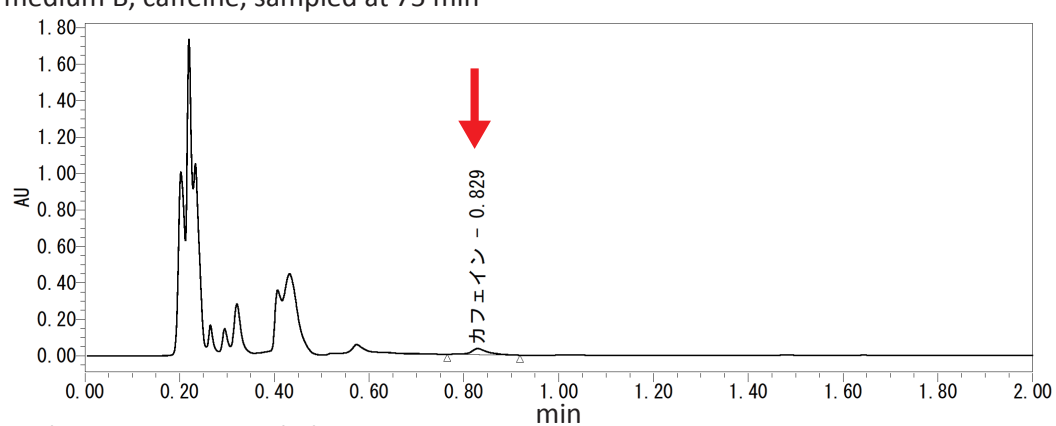
体をディッシュ外に溜めおくための排出用流路及びコレクタを設けた (Fig. 4.1b, c). これによって、皮膚モデル下面の培地 (medium A) と流路から排出された培地 (medium B) が混ざりあうことなく採取可能となった.

次に、実際に実施した経皮吸収試験の手順を示す. まず、培地 (無添加の高グルコース DMEM) の入ったシリンジをシリンジポンプに設置し、シリコンチューブを通じ、培養デバイスに接続し、6 mL/h で送液を開始した. なお、培養デバイスの排出側のポートは培養ディッシュの排出用流路に接続されているため、先に述べたように、送液された培地はディッシュ外のコレクタへと排出され、溜め置かれた. 送液開始から 15 分経過した時点で最初のサンプリングを行った. サンプリングは、皮膚モデル下面の培地 (medium A) と流路から排出された培地 (medium B) それぞれについて実施した. なお、medium A に関してはサンプリングした液量と同量の培地 (無添加の高グルコース DMEM) を培養ディッシュに追加した. また、medium B についてはコレクタから全量 (約 1.5 mL) を回収したが、この時点で 1.4 mL 未満しか回収できなかったものはどこかでリークが発生していると判断し、最終的な分析の対象から除外した. 最初のサンプリングの後、すぐにカフェインと ISDN の混合溶液 100 μ L を表皮上に設置したウェル内に入れ、以降、15 分毎に同様のサンプリングを実施した. なお、カフェインと ISDN の混合溶液は、20 mg/mL の濃度でカフェインを PBS に溶解した溶液と、100 mg/mL の濃度でジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide; DMSO) に ISDN を溶解した溶液とを 10:1 の割合で実験直前に混合・調製した. なお、カフェインと ISDN はいずれも経皮吸収型製剤として用いられる物質であることから、本研究における経皮吸収試験のモデル物質として利用した. 以上の実験において、培養デバイス及びディッシュは、32°C (皮膚モデルを用いた刺激性試験や経皮吸収試験における常温) に設定した恒温庫内に設置した. また、血管流路内の HUVEC が内皮機能を有していることを確認するため、血管内皮細胞の透過性を変化させる因子 VEGF を添加した群も用意した. VEGF を加える場合は、経皮吸収実験を実施する 2 日前に 20 ng/mL の濃度になるように表皮形成用培地に添加した.

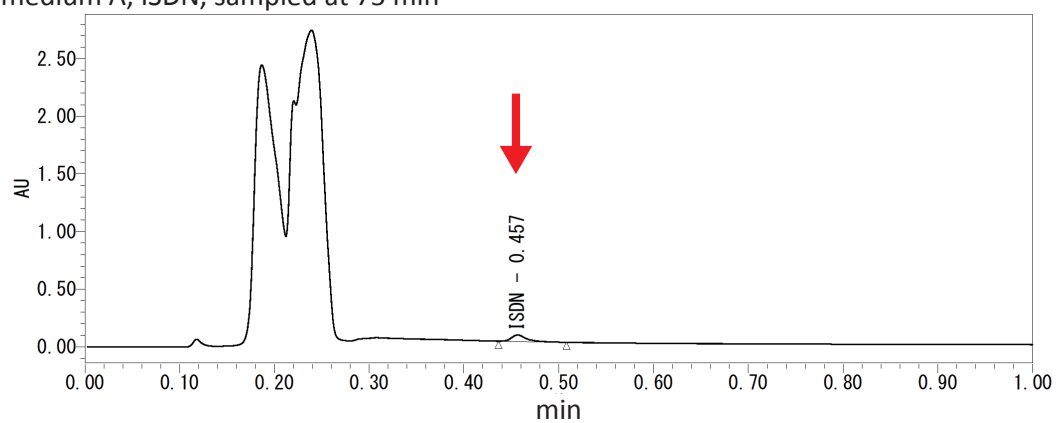
(a) medium A, caffeine, sampled at 75 min



(b) medium B, caffeine, sampled at 75 min



(c) medium A, ISDN, sampled at 75 min



(d) medium B, ISDN, sampled at 75 min

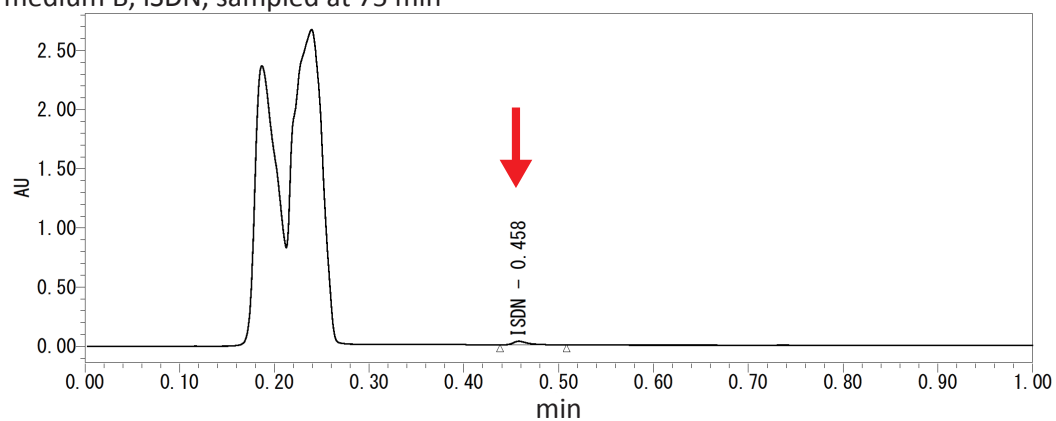


Fig. 4.2 カフェイン及び ISDN 用条件のクロマトグラム (75 分経過時の各サンプルから).

上記手順によって採取したサンプル (medium A 及び B について, 送液開始から 15, 30, 45, 60, 75 分経過時に取得) に含まれる試験物質 (カフェインと ISDN) を定量するため, 高速液体クロマトグラフィ (HPLC) による分析を行った. 分析条件は Table 4.1 に示すとおりであり, 定量解析には外部標準法を利用した.

4.2.2 経皮吸収試験の結果

経皮吸収試験を上記の手順に従って実施したところ, Fig. 4.2 に示すように試験物質が medium A と B の両方から検出された (図は送液開始から 75 分時点でのサンプルの分析結果). なお, いずれもオーダで 1–10 $\mu\text{g/mL}$ 程度の濃度であった. この結果から, 本実験系で経皮吸収された薬剤のうち, 血管流路へ透過・流入したもの, 及び皮膚モデル全てを透過して下面に通過してきたものを分別して検出可能であることが示された.

さらに本実験系の性質を詳しく調べるため, 各時間で取得した試験物質の濃度値から, medium A 及び medium B への透過積算量を算出した (Fig. 4.3). Fig. 4.3a, b は medium A 中のカフェイン及び ISDN それぞれの透過積算量, Fig. 4.3c, d は medium B 中のカフェイン及び ISDN それぞれの透過積算量の経時変化を表している. なお, グラフの透過積算量は, ウェルに入れた試験物質の初期量 (カフェインは 9.4 μmol , ISDN は 3.8 μmol) で規格化したものである. また, VEGF 添加群 (VEGF+) と VEGF 非添加群 (VEGF-) がプロットされているが, まず VEGF 非添加群のみに絞って結果の記載及び議論を進める.

血管流路付き皮膚モデルの経皮吸収について, その時間的特性を調べるためラグタイムを見積もった. ラグタイムの見積もりは, 試験物質の適用時刻と, 試験物質の積算量の変化に直線をフィッティングした際の x 軸との交点の差で定義される. なお, 直線のフィッティングには, 傾きを最大化する 3 点 (medium A については 30, 45, 60 分の点, medium B については 45, 60, 75 分の点) を用いた. また, フィッティングした直線はグラフ中において点線で示した. この見積もりの結果, medium A においてはラグタイムが約 20 分 (カフェイン 23 分, ISDN 18 分), medium B においてはラグタイムが約 5 分 (カフェイン 6 分, ISDN 1 分) であることが分かった. この結果は, 血管流路付き皮膚モデルの形態により説明できると考えられる. すなわち, 表皮から吸収された試験物質は, まず表皮から近い位置にある血管流路に到達し, 続いて真皮底面に到達することでこのような結果が得られたものと思われる. なお, 従来皮膚モデルにおけるカフェインのラグタイムは 26 分という数値が報告 [114] されており, 本研究

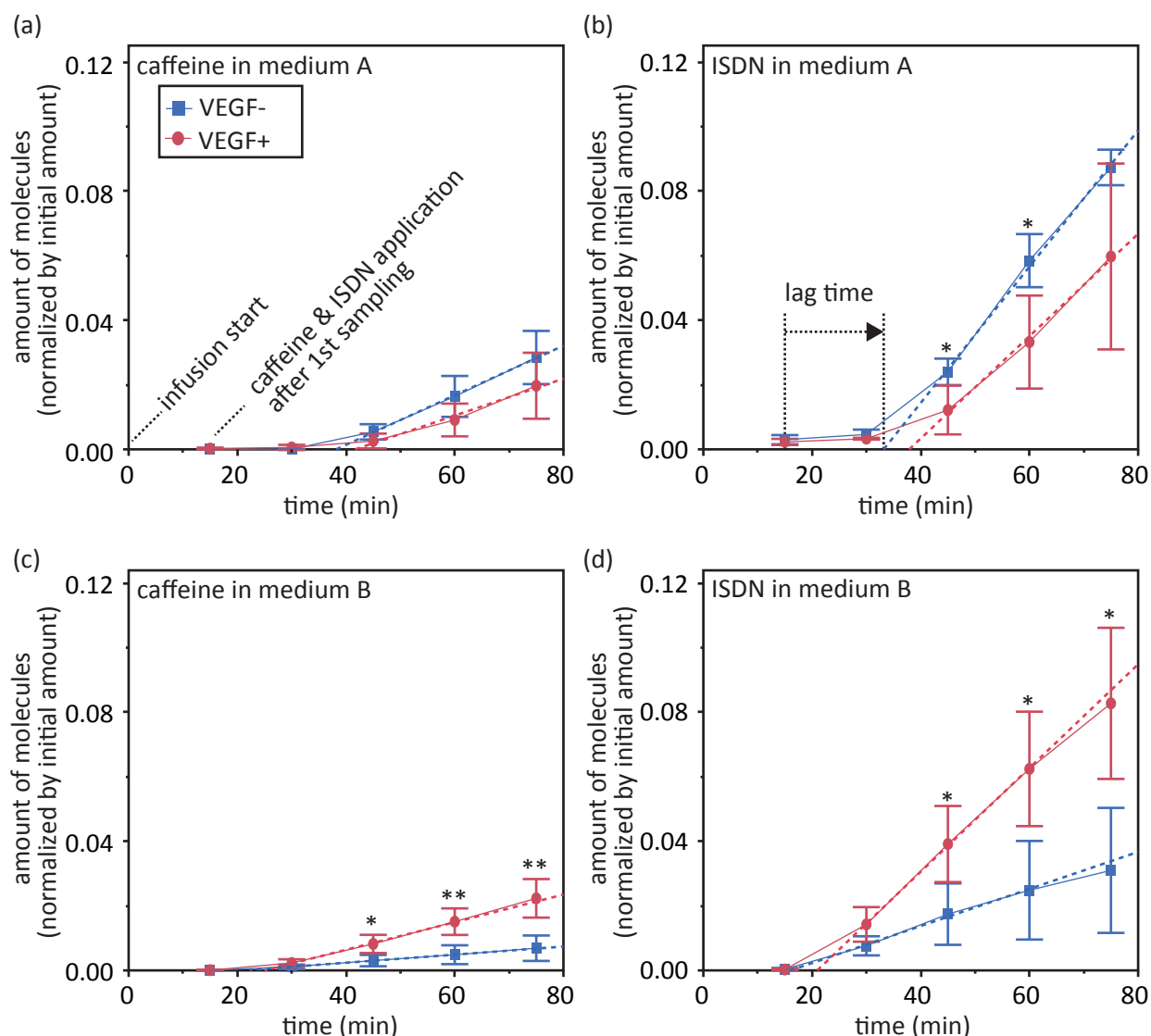


Fig. 4.3 試験物質の透過積算量の経時変化. ウェルに入れた試験物質の初期量で規格化. (a) medium A 中のカフェインの透過積算量. (b) medium A 中の ISDN の透過積算量. (c) medium B 中のカフェインの透過積算量. (d) medium B 中の ISDN の透過積算量. いずれも, 青い四角が VEGF 非添加群, 赤い丸が VEGF 添加群を示す. 点線はフィッティングした直線. mean \pm s.d.(n=4) で表示. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, 対応の無いスチューデントの t 検定 (各時刻で VEGF 添加群と非添加群を比較).

の皮膚モデルの medium A におけるラグタイムと同程度である. また, *in vitro* でのヒト皮膚 (つまり血流が無く, 表皮~真皮の透過が支配的な系) におけるカフェインのラグタイムは約 255 分 ([115] のデータから算出) であり, 本研究及び従来の皮膚モデルに比べて 10 倍程度大きい. 皮膚モデルのバリア機能がヒト皮膚に比べて低いことが, このような結果につながったと考えられる. また, 表皮~血管のカフェインのラグタ

Table 4.2 経皮吸収試験結果と、従来皮膚モデル、ヒト皮膚との比較

評価パラメータ	吸収経路	試験物質	本研究 皮膚モデル	従来 皮膚モデル	ヒト皮膚
透過係数 (10^{-6} cm/s)	表皮→真皮底面	カフェイン	2.5	0.2–15	0.01–0.2 (<i>in vitro</i>)
		ISDN	7.0	4.8–38	3.2 (<i>in vitro</i>)
	表皮→血管	カフェイン	1.7	-(血管無)	0.03 (<i>in vitro</i>)
		ISDN	7.6	-(血管無)	-(文献無)
ラグタイム (分)	表皮→真皮底面	カフェイン	23	26	255 (<i>in vitro</i>)
		ISDN	18	-(文献無)	-(文献無)
	表皮→血管	カフェイン	6	-(血管無)	10 (<i>in vivo</i>)
		ISDN	1	-(血管無)	-(文献無)

イムについては、*in vivo* のヒト皮膚における血漿中のカフェイン濃度変化から算出した数値が約 10 分 [73] であり、本研究の皮膚モデルの medium B の数値と同程度であった。ヒト皮膚においては表皮直下の毛細血管による吸収が支配的であり、本研究の皮膚モデルとは吸収の経路はやや異なるため単純な比較はできないが、今後他の物質を用いてヒト皮膚との相関を取ることで、血管流路付き皮膚モデルを用いてヒト皮膚における経皮吸収のラグタイムを見積もることが可能となると考えられる。

また、カフェインと ISDN の透過積算量の比に注目すると、ISDN の透過積算量は、カフェインの透過積算量の 3–4 倍であった。この結果はヒト皮膚や従来皮膚モデルにおけるカフェイン及び ISDN の透過性に関する報告 [99] と一致している。なお、このような透過性の傾向は、ISDN の方がカフェインに比べて脂溶性であり、経皮吸収の主要な経路である細胞間隙経路 (脂溶性分子が多く割合を占める) を通過しやすいことに起因する。さらに、ラグタイムの見積もりのためフィッティングした直線の傾きから、表皮～真皮の見かけの透過係数を算出したところ、カフェインで 2.5×10^{-6} cm/s、ISDN で 7.0×10^{-6} cm/s であり、これは従来皮膚モデルと同程度のオーダー、*in vitro* のヒト皮膚と比べて数倍～十数倍程度のオーダーである [99]。なお、見かけの透過係数は、直線の傾きに、試験物質溶液の体積 100 μ L を乗じ、付与面積 0.50 cm² で除することで得られる。また、表皮～血管の見かけの透過係数を算出したところ、カフェインで 1.7×10^{-6} cm/s、ISDN で 7.6×10^{-6} cm/s であった。*in vivo* のヒト皮膚における血漿中のカフェイン濃度変化から算出した数値は約 0.03×10^{-6} cm/s であり [73]、やはり本研究の皮膚モデルはヒト皮膚に比べて透過係数が大きいことが分かる。ラグタイムと同様に、今後ヒト皮膚との相関データを集積することが重要と考えられる。なお、皮膚モデルとヒト皮膚の相関については、従来皮膚モデルにおいて実施されており、透過係数の対数値が直線的な関係になることが知られている [99]。また、表皮～血管の透過係数算

出にあたっては、付与面積の代わりに血管の表面積を用いた (本研究の皮膚モデルにおいては長さ 8 mm, 直径 500 μm の円筒の側面表面積を用い, ヒト皮膚においては皮膚表面積と毛細血管の表面積がおおよそ 1:1 である事実 [116] を用いた). ここまでの結果及び議論を Table 4.2 に示した.

次に, VEGF 非添加群及び添加群の比較を行う. Fig. 4.3a, b に示すように, medium A においては試験物質の透過積算量は VEGF 非添加群と添加群の間に有意差がないか, もしくは VEGF 添加群の方が少ない (45, 60 分における ISDN の透過積算量) という結果であった. medium B へ試験物質が透過したことで medium A への透過量が減った可能性もあるが, いずれの試験物質においても最終的な (75 分時点における) 透過積算量について有意差がないことから, 今回の実験結果では 45, 60 分における ISDN で検出された有意差は実験誤差であると推測するのが妥当であると考え (複数の測定点において t 検定を行っているため, 有意差の誤検出は統計上, 生じうる). この点について, 試行を重ねて統計的な検証を実施し, 精度を高めることは今後の課題である. 一方, medium B においては, Fig. 4.3c, d に見られるように VEGF 添加群の試験物質の透過積算量は, 45 分以降, VEGF 非添加群に比べて有意に大きくなった. この結果は, 血管流路の透過性が VEGF によって制御できることを示唆している. また, VEGF によって血管の透過性が増化することは *in vivo* における研究で報告 [100] されており, 本研究で作製した皮膚モデルの血管流路が生体に類似した内皮機能を有していることも示唆された.

以上の結果から, 血管流路付き皮膚モデルの, 経皮吸収試験における血管吸収のモデルとしての利用可能性が示されたと考える.

4.3 メカノバイオロジーのツール (伸展培養器) としての概念実証

本節は雑誌掲載の形での刊行 (5 年以内に出版予定) が予定されるため、
非公開とする

4.4 結言

本章では, 第 2 章で作製, 第 3 章で基本的特性を評価した血管流路付き皮膚モデル

の応用展開について検証を実施した。応用の具体的内容としては、まず、最も実現可能性が高いものとして、経皮吸収型製剤の血管吸収の試験としての利用可能性を検討した。経皮吸収型製剤のモデル薬剤としてカフェインと ISDN を選定し、両試験物質を表皮に適用したところ、皮膚全層の透過、及び血管流路への透過の両方を検出することができた。また、皮膚全層の透過と血管流路への透過とでは、そのラグタイムが異なっており、血管流路の空間的配置が影響していることが推測された。これは従来の血管流路を持たない皮膚モデルでは測定困難な現象であり、本研究の皮膚モデルを用いる利点の一つである。また、透過係数及びラグタイムについて従来皮膚モデル/ヒト皮膚との比較を実施したところ、本研究の皮膚モデルは従来皮膚モデルとは同程度の透過性を持つものの、ヒト皮膚に比べて透過しやすいことが判明した。これは表皮バリア機能がヒト皮膚に比べて劣っていることに起因すると考えられる。経皮吸収試験において本皮膚モデルを用いるためには *in vivo* との相関データの蓄積や、3 章にも記載したように表皮バリア機能の改善が必要である。また、*in vivo* において血管透過性を変化させることが知られている VEGF を添加したところ、本皮膚モデルにおいても血管流路への試験物質透過量が有意に増加した。これらの結果から、血管流路付き皮膚モデルの経皮吸収型製剤の血管吸収試験における利用が期待できる。

また、別の応用展開として血管流路付き皮膚モデルの伸展培養を実施・評価した。培養デバイスの材料を柔軟性の高いシリコンゴムに変更することで、血管流路付き皮膚モデルに様々な変形を与えることが可能となった。また、一方向への伸長・圧縮を繰り返す伸展装置に培養デバイスを設置して皮膚モデルを伸展培養したところ、非伸展条件のものと比べて表皮厚みの向上が観察された。さらに、試行した周波数の中では 0.06 Hz においてその効果が最も高く、厚みは 120 μm に達し、表皮下層から上層への分化も他の周波数で培養したものに比べて明瞭に観察された。また、フォースゲージを用いて皮膚モデルを押下することで簡易的に硬さを評価したところ、伸展培養した皮膚モデルの最大反発力が非伸展培養のものに比べて 2-3 倍程度大きくなり、硬さが向上したことが分かった。皮膚モデルの硬さは移植治療で使用する際にハンドリングのために重要となる性質であり、この結果は伸展培養の有用性を示唆するものである。また、伸展培養した皮膚モデルの表皮に微小な格子状のシワ様構造が形成されたことについても、皮膚の外観に関する研究への寄与が期待できる。

第 5 章

結 論

5.1 結論

本研究では、皮膚モデルを把持するための構造を持つ培養デバイスを用いて、灌流可能な血管流路をモデル内部に構築する方法を確立した。さらに、作製したモデルが、皮膚モデル及び血管流路として必要な形態及び機能を備えていることを明らかにしたうえで、経皮吸収型製剤の血管吸収試験への応用可能性を示した。

本研究の方法で皮膚モデルを作製することにより、従来同様の真皮・表皮の二層に加え、新たに真皮層内部に HUVEC によって被覆された血管流路を有する皮膚モデルを構築することに成功した。さらに本研究では、作製した血管流路付き皮膚モデルの形態及び機能に関する基本的な特性を調べ、皮膚モデル及び血管としての要件が充足されることを示した。加えて、血管流路付き皮膚モデルの応用可能性を示すため、経皮吸収型製剤の試験（創薬分野）及び伸展培養（皮膚のメカノバイオロジーなどの皮膚の基礎研究分野）を実施・評価した。これにより、血管流路付き皮膚モデルの幅広い分野での利用可能性が示された。

血管流路付き皮膚モデルの作製にあたって、構築・培養プロセス中に皮膚モデルの培養デバイスへの把持を (1) アンカ構造の設置、及び (2) O_2 プラズマによる培養デバイス表面処理の二つの対策によって達成した。アンカ構造は、真皮層内部に留置されたワイヤを抜去する際に生じる摩擦による皮膚モデル脱離と、皮膚モデルの培養中の

収縮による脱離を防止する効果を有していた。また、 O_2 プラズマ処理は、(アンカ構造と同様に) 皮膚モデルの培養中の収縮による脱離防止効果、さらに皮膚モデル及び培養デバイス間のシールに関して効果を有していた。この二つの対策を組み合わせることにより、皮膚モデル中に血管流路を構築可能となることが示された。本研究の血管流路の構築手法は、皮膚モデルだけでなく、細胞を包埋したハイドロゲルで造られた組織中に血管流路を構築する際にも利用可能であり、再生医療や組織工学において有用であると考ええる。

作製した血管流路付き皮膚モデルについて、表皮には従来皮膚モデルと同程度の厚みがあり、下層から上層への分化、及び角層の形成が確認された。また、表皮のバリア機能が撥水性及びキャパシタンス測定によって示された。さらに、バリア機能は NHEK の播種量を増やすことによって増大することが明らかになった。また、真皮については、コラーゲンゲルの初期密度と、厚み及び最終密度の関係を明らかにしたことで、本研究の培養デバイスを用いてヒト真皮同等のコラーゲンゲル最終密度及び厚みを得るためにはコラーゲ初期密度を 2.5–4.0 mg/mL の範囲に設定すればよいことが明らかになった。これらの表皮及び真皮に関する評価結果は、皮膚モデル作製にあたって、所望の厚みやバリア機能を実現したり、あるいはデバイスの設計変更をするにあたって有用な知見であると考ええる。血管流路に関しては、培養期間を通じて中空の管構造を維持していること、流路壁面が HUVEC に被覆され、タイトジャンクションが形成されていることが HE 染色及び免疫染色によって示された。さらに、分子サイズ選択的な透過性があり、その透過係数が血管流路に関する先行研究と同程度のオーダーであることが確かめられた。また、血管流路の周囲の細胞密度が高く (10^8 cells/cm³ のオーダー) になっていることから、栄養・酸素の供給機能が示唆された。特に、この栄養・酸素供給機能については、皮膚モデルに限らず再生医療や組織工学において高密度の組織を構築する際に役立つことが期待できる。

経皮吸収型製剤の試験においては、カフェインと ISDN を試験物質として表皮に適用し、皮膚全層の透過、及び血管流路への透過の検出に成功した。この際、血管流路が真皮層の中ほどにあることから、血管流路への透過は、皮膚全層の透過よりも短いラグタイムで検出された。さらに、HUVEC の内皮機能を確認するために VEGF を添加したところ、血管流路への試験物質の透過積算量が有意に増加した。*in vivo* においても VEGF の添加が血管の透過性を亢進させることが知られていることから、本皮膚モデルの血管流路が *in vivo* に類似した内皮機能を有していることが示唆された。これらの結果は、血管流路付き皮膚モデルの経皮吸収試験における利用可能性を示してい

る。ただし、従来皮膚モデルと同様に、ヒト皮膚に比べて物質が透過しやすい傾向があったため、この点は将来的に培養条件の改良（培地の成長因子最適化、伸展培養の適用等）によって改善すべき課題であると考ええる。

また、別の応用展開として血管流路付き皮膚モデルの伸展培養を実施・評価した。シリコーンゴムを材料とした培養デバイス、及び伸展装置を用いて皮膚モデルを伸展培養したところ、表皮厚みの向上、表皮下層から上層への分化の促進が観察された。また、フォースゲージを用いた簡易的な計測により、皮膚モデルの硬さが向上した。さらに、伸展培養した皮膚モデルに微小な格子状のシワ様構造が観察された。これらの結果は、伸展培養が血管流路付き皮膚モデルの形態的、機械的特性を向上させるとともに、メカノバイオロジーなどの皮膚の基礎研究分野のツールにもなりうることを示唆している。

以上のことから、本研究の血管流路付き皮膚モデルが、皮膚及び血管のモデルとして満たすべき基本的な形態及び機能を有し、さらに幅広い分野において応用展開が期待できると考える。

5.2 今後の展望

一般に、皮膚モデルの応用展開としては (1) 種々の皮膚付属器及び構造の追加拡張、(2) 化粧品開発や創薬における試験、(3) 火傷や潰瘍への移植としての使用が想定される。本節では、これら四つの観点から、本研究で提案した血管流路付き皮膚モデルの展望を述べる。

まず、(1) 皮膚付属器や構造の追加拡張の観点からは、本研究の血管流路付き皮膚モデル自体が皮膚付属器・構造の追加拡張に相当するものであると同時に、将来的に毛器官、脂腺、汗腺、神経系といった付属器再構築の基礎となりうることを期待される。例えば毛器官は、その基部である毛球に入り込んだ血管からの栄養供給によって維持されているが、これまでの皮膚モデルには栄養を供給可能な血管流路が存在しなかった。しかし、本研究で提案した皮膚モデル中の血管流路によって毛器官を初めとした付属器に対して栄養供給を行うことで、付属器の *in vitro* での再構築が可能になると期待できる。なお、*in vitro* での付属器再構築は、皮膚基礎研究、創薬、移植医療等の分野での皮膚モデルの利用範囲を拡大する。ただし、本研究の血管流路付き皮膚モデルを皮膚付属器に対する栄養経路として使用するためには、現状のままでは不足であり、主流路から分岐して付属器に栄養を供給するための毛細血管を構築する必要がある。第3章にて血管内皮用培地 (EGM) で長期培養を行うことで HUVEC が、真皮層にスプ

ラウティングすることが確認できたが、皮膚モデル中での毛細血管網構築のためにはこの条件の最適化(培養期間, ECM 濃度, 培地, 細胞密度等)を実施する必要があると考えられる。

また、(2)化粧品開発や創薬分野における展望としては、「4.2 経皮吸収試験への応用展開の検証」に記載したように試験物質の経皮吸収、及び血管への吸収のモデルとしての利用が期待できる。この分野での利用にあたっての課題は、*in vivo* との相関データが不足しているため、これを充足することである。また、より生体に近づけるため、表皮の厚みや分化の状態及びバリア機能を向上するとともに、血管流路の透過性もより生体の数値に近づけていく必要がある。これは培地や培養期間といった培養条件の最適化や、「4.3 メカノバイオロジーのツール(伸展培養器)としての概念実証」で示した伸展培養を取り入れることで達成可能であると考えられる。

(3)の移植医療における利用については、本研究で構築した血管流路が栄養供給の経路として働くことで、移植後の生着率を向上することが期待される。ただし、このためには(1)と同様に毛細血管網が構築されていることが望ましい。また、移植医療においては患者自身の細胞(自家細胞)を用いることが望ましいが、本研究では内皮細胞として血管モデルによく利用される臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を用いており、多くの場合、患者自身の臍帯の利用は困難である。そのため、内皮細胞として皮膚微小血管内皮細胞(HDMEC)や、MSC や iPS 等の幹細胞由来のものを利用することが望ましく、これらの細胞を利用した場合の培養条件の最適化が必要である。

また、より将来の展望として、ロボットの被覆材としての利用も期待できる。本研究で構築した血管流路を用いることで、ロボットの表面で皮膚モデルを培養・維持することができると考えられる。これによってよりヒトに近い外観、温度、触感等を得られることが期待できる。「4.3 メカノバイオロジーのツール(伸展培養器)としての概念実証」にて実施した曲面形状上での皮膚モデル構築がこの概念実証に相当すると思う。ただし、これは移植医療における課題でもあるが、長期間の培養にあたっては皮膚モデル及び血管流路をより強靱にする必要があり、これは前述したように培養条件の最適化や伸展培養によってなされることが考えられる。また、血管流路の周囲を覆って構造を維持するペリサイトや平滑筋細胞などを追加導入することも対策として考えられる。さらに、表皮幹細胞を新規に導入することにより表皮のターンオーバーを実現する必要もある。また、外観や触感をヒトに近づけるためには体毛やシワなど、(1)に記載の種々の付属器・構造の再構築が重要である。

参考文献

- [1] Y.Y. Al-Tamer, E.A. Hadi, I. eldin I. Al-Badrani, Sweat urea, uric acid and creatinine concentrations in uraemic patients, *Urol. Res.* 25 (1997) 337–340. doi:10.1007/BF01294662.
- [2] X. Dai, H. Okazaki, Y. Hanakawa, M. Murakami, M. Tohyama, Y. Shirakata, K. Sayama, Eccrine Sweat Contains IL-1 α , IL-1 β and IL-31 and Activates Epidermal Keratinocytes as a Danger Signal, *PLoS One*. 8 (2013) e67666. doi:10.1371/journal.pone.0067666.
- [3] E. Bell, H. Ehrlich, D. Buttle, T. Nakatsuji, Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness, *Science*. 211 (1981) 1052–1054. doi:10.1126/science.7008197.
- [4] F. Groeber, M. Holeiter, M. Hampel, S. Hinderer, K. Schenke-Layland, Skin tissue engineering — In vivo and in vitro applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63 (2011) 352–366. doi:10.1016/j.addr.2011.01.005.
- [5] S. Huang, Y. Xu, C. Wu, D. Sha, X. Fu, In vitro constitution and in vivo implantation of engineered skin constructs with sweat glands, *Biomaterials*. 31 (2010) 5520–5525. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.03.060.
- [6] G. Lammers, G. Roth, M. Heck, R. Zengerle, G.S. Tjabringa, E.M. Versteeg, T. Hafmans, R. Wismans, D.P. Reinhardt, E.T.P. Verwiel, P.L.J.M. Zeeuwen, J. Schalkwijk, R. Brock, W.F. Daamen, T.H. van Kuppevelt, Construction of a Microstructured Collagen Membrane Mimicking the Papillary Dermis Architecture and Guiding Keratinocyte Morphology and Gene Expression, *Macromol. Biosci.* 12 (2012) 675–691. doi:10.1002/mabi.201100443.
- [7] M. Michel, N. L'Heureux, R. Pouliot, W. Xu, F.A. Auger, L. Germain, Characterization of a new tissue-engineered human skin equivalent with hair, *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.* 35 (1999) 318–326. doi:10.1007/s11626-999-0081-x.
- [8] V. Facy, V. Flouret, M. Régnier, R. Schmidt, Langerhans Cells Integrated into Human Reconstructed Epidermis Respond to Known Sensitizers and Ultraviolet Exposure, *J. Invest. Dermatol.* 122 (2004) 552–553. doi:10.1046/j.0022-202X.2004.22209.x.

- [9] A.L. Clement, T.J. Moutinho, G.D. Pins, Micropatterned dermal–epidermal regeneration matrices create functional niches that enhance epidermal morphogenesis, *Acta Biomater.* 9 (2013) 9474–9484. doi:10.1016/j.actbio.2013.08.017.
- [10] N. Mori, Y. Morimoto, S. Takeuchi, Vessel-like channels supported by poly-l-lysine tubes, *J. Biosci. Bioeng.* (2016). doi:10.1016/j.jbiosc.2016.05.011.
- [11] V. Hudon, F. Berthod, A.F. Black, O. Damour, L. Germain, F.A. Auger, A tissue-engineered endothelialized dermis to study the modulation of angiogenic and angiostatic molecules on capillary-like tube formation in vitro, *Br. J. Dermatol.* 148 (2003) 1094–1104. doi:10.1046/j.1365-2133.2003.05298.x.
- [12] B. Hendrickx, J.J. Vranckx, A. Luttun, Cell-based vascularization strategies for skin tissue engineering., *Tissue Eng. Part B. Rev.* 17 (2011) 13–24. doi:10.1089/ten.TEB.2010.0315.
- [13] P.-L. Tremblay, F. Berthod, L. Germain, F.A. Auger, In Vitro Evaluation of the Angiostatic Potential of Drugs Using an Endothelialized Tissue-Engineered Connective Tissue, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 315 (2005) 510–516. doi:10.1124/jpet.105.089524.
- [14] A.F. Black, F. Berthod, N. L'heureux, L. Germain, F.A. Auger, In vitro reconstruction of a human capillary-like network in a tissue-engineered skin equivalent, *FASEB J.* 12 (1998) 1331–40.
- [15] A.S. Klar, S. Güven, T. Biedermann, J. Luginbühl, S. Böttcher-Haberzeth, C. Meuli-Simmen, M. Meuli, I. Martin, A. Scherberich, E. Reichmann, Tissue-engineered dermo-epidermal skin grafts prevascularized with adipose-derived cells, *Biomaterials.* 35 (2014) 5065–5078. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.02.049.
- [16] D. Marino, J. Luginbuhl, S. Scola, M. Meuli, E. Reichmann, Bioengineering Dermo-Epidermal Skin Grafts with Blood and Lymphatic Capillaries, *Sci. Transl. Med.* 6 (2014) 221ra14–221ra14. doi:10.1126/scitranslmed.3006894.
- [17] M.M. Fel'dshtein, L.B. Malkhazov, I.B. Kadenatsi, A.E. Vasil'ev, Kinetics of the delivery of glyceryl trinitrate and isosorbide dinitrate from the transdermal systems nitropercuten and sorbopercuten in experiments in vitro, *Pharm. Chem. J.* 27 (1993) 819–825. doi:10.1007/BF00780571.
- [18] P. Fernandez, A.R. Bausch, The compaction of gels by cells: a case of collective mechanical activity, *Integr. Biol.* 1 (2009) 252. doi:10.1039/b822897c.
- [19] F. Grinnell, Fibroblast–collagen-matrix contraction: growth-factor signalling and mechanical loading, *Trends Cell Biol.* 10 (2000) 362–365. doi:10.1016/S0962-

8924(00)01802-X.

- [20] F. Grinnell, Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices, *Trends Cell Biol.* 13 (2003) 264–269. doi:10.1016/S0962-8924(03)00057-6.
- [21] F. Grinnell, W.M. Petroll, Cell Motility and Mechanics in Three-Dimensional Collagen Matrices, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26 (2010) 335–361. doi:10.1146/annurev.cellbio.042308.113318.
- [22] T. Nishiyama, N. Tominaga, K. Nakajima, T. Hayashi, Quantitative-Evaluation of the Factors Affecting the Process of Fibroblast-Mediated Collagen Gel Contraction by Separating the Process into 3 Phases, *Coll. Relat. Res.* 8 (1988) 259–273.
- [23] Y.K. Zhu, T. Umino, X.D. Liu, H.J. Wang, D.J. Romberger, J.R. Spurzem, S.I. Rennard, Contraction of fibroblast-containing collagen gels: Initial collagen concentration regulates the degree of contraction and cell survival, *Vitr. Cell. Dev. Biol.* 37 (2001) 10–16.
- [24] S.H. Mathes, H. Ruffner, U. Graf-Hausner, The use of skin models in drug development., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 69–70 (2014) 81–102. doi:10.1016/j.addr.2013.12.006.
- [25] 清水宏, 新しい皮膚科学, 第2版, 中山書店, 東京, 2011.
- [26] 芋川玄爾, 矢作彰一, 落合康宣, 平尾哲二, 太田裕紀子, 波多野豊, 樋口和彦, 岡野由利, 山田涼子, 大林恵, 京谷大毅, 猪股慎二, 小倉有紀, 天野聡, 坪信子, 佐用哲也, 安部正敏, 石川治, 笠明美, 林伸和, 清水健司, 神原敏光, 赤松浩彦, 矢田幸博, 八谷輝, 船坂陽子, 久間將義, 板見智, 乾重樹, 堀田光行, 岩渕徳郎, 相馬勤, 飯野雅人, 鈴木尋之, 小島肇夫, 高橋豊, 楠原寛子, 桑原裕史, 宮澤正明, 坂口斉, 杉林堅次, 機能性化粧品素材開発のための実験法—in vitro/細胞/組織培養, シーエムシー出版, 東京, 2007.
- [27] T. Maruguchi, Y. Maruguchi, S. Suzuki, K. Matsuda, K.-I. Toda, N. Isshiki, A New Skin Equivalent: Keratinocytes Proliferated and Differentiated on Collagen Sponge Containing Fibroblasts., *Plast. Reconstr. Surg.* 93 (1994).
- [28] H.M. Powell, S.T. Boyce, EDC cross-linking improves skin substitute strength and stability., *Biomaterials.* 27 (2006) 5821–7. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.07.030.
- [29] W. Lu, J. Yu, Y. Zhang, K. Ji, Y. Zhou, Y. Li, Z. Deng, Y. Jin, Mixture of fibroblasts and adipose tissue-derived stem cells can improve epidermal morphogenesis of tissue-engineered skin., *Cells. Tissues. Organs.* 195 (2012) 197–206. doi:10.1159/000324921.
- [30] C. Augustin, C. Collombel, O. Damour, Use of Dermal Equivalent and Skin Equivalent Models for in Vitro Cutaneous Irritation Testing of Cosmetic Products: Comparison

- with in Vivo Human Data, *J. Toxicol. Cutan. Ocul. Toxicol.* 17 (1998) 5–17. doi:10.3109/15569529809049300.
- [31] N. Alépée, C. Tornier, C. Robert, C. Amsellem, M.-H. Roux, O. Doucet, J. Pachot, M. Méloni, A. de Brugerolle de Fraissinette, A catch-up validation study on reconstructed human epidermis (SkinEthic RHE) for full replacement of the Draize skin irritation test, *Toxicol. Vitro* 24 (2010) 257–266. doi:10.1016/j.tiv.2009.08.024.
- [32] H. Kandárová, P. Hayden, M. Klausner, J. Kubilus, P. Kearney, J. Sheasgreen, In vitro skin irritation testing: Improving the sensitivity of the EpiDerm skin irritation test protocol., *Altern. to Lab. Anim.* 37 (2009) 671–89.
- [33] F. Netzlaff, C.-M. Lehr, P.W. Wertz, U.F. Schaefer, The human epidermis models EpiSkin®, SkinEthic® and EpiDerm®: An evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 60 (2005) 167–178. doi:10.1016/j.ejpb.2005.03.004.
- [34] K. Sugibayashi, T. Hayashi, K. Matsumoto, T. Hasegawa, Utility of a Three-Dimensional Cultured Human Skin Model as a Tool to Evaluate the Simultaneous Diffusion and Metabolism of Ethyl Nicotinate in Skin, *Drug Metab. Pharmacokinet.* 19 (2004) 352–362. doi:10.2133/dmpk.19.352.
- [35] S.T. Boyce, G.D. Warden, Principles and practices for treatment of cutaneous wounds with cultured skin substitutes, *Am. J. Surg.* 183 (2002) 445–456. doi:10.1016/S0002-9610(02)00813-9.
- [36] S.P. Zhong, Y.Z. Zhang, C.T. Lim, Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* 2 (2010) 510–525. doi:10.1002/wnan.100.
- [37] Y. Xie, S.C. Rizzi, R. Dawson, E. Lynam, S. Richards, D.I. Leavesley, Z. Upton, Development of a Three-Dimensional Human Skin Equivalent Wound Model for Investigating Novel Wound Healing Therapies, *Tissue Eng. Part C Methods* 16 (2010) 1111–1123. doi:10.1089/ten.tec.2009.0725.
- [38] S. Küchler, N.B. Wolf, S. Heilmann, G. Weindl, J. Helfmann, M.M. Yahya, C. Stein, M. Schäfer-Korting, 3D-Wound healing model: Influence of morphine and solid lipid nanoparticles, *J. Biotechnol.* 148 (2010) 24–30. doi:10.1016/j.jbiotec.2010.01.001.
- [39] M. Régnier, C. Duval, J.B. Galey, M. Philippe, A. Lagrange, R. Tuloup, R. Schmidt, Keratinocyte-melanocyte co-cultures and pigmented reconstructed human epidermis:

- models to study modulation of melanogenesis., *Cell. Mol. Biol.* 45 (1999) 969–980.
- [40] M. Michel, N. L'Heureux, R. Pouliot, W. Xu, F.A. Auger, L. Germain, Characterization of a new tissue-engineered human skin equivalent with hair, *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.* 35 (1999) 318–326. doi:10.1007/s11626-999-0081-x.
- [41] V. Facy, V. Flouret, M. Régnier, R. Schmidt, Langerhans Cells Integrated into Human Reconstructed Epidermis Respond to Known Sensitizers and Ultraviolet Exposure, *J. Invest. Dermatol.* 122 (2004) 552–553. doi:10.1046/j.0022-202X.2004.22209.x.
- [42] G. Lammers, G. Roth, M. Heck, R. Zengerle, G.S. Tjabringa, E.M. Versteeg, T. Hafmans, R. Wismans, D.P. Reinhardt, E.T.P. Verwiel, P.L.J.M. Zeeuwen, J. Schalkwijk, R. Brock, W.F. Daamen, T.H. van Kuppevelt, Construction of a Microstructured Collagen Membrane Mimicking the Papillary Dermis Architecture and Guiding Keratinocyte Morphology and Gene Expression, *Macromol. Biosci.* 12 (2012) 675–691. doi:10.1002/mabi.201100443.
- [43] W. Lee, J.C. Debasitis, V.K. Lee, J.H. Lee, K. Fischer, K. Edminster, J.K. Park, S.S. Yoo, Multi-layered culture of human skin fibroblasts and keratinocytes through three-dimensional freeform fabrication, *Biomaterials.* 30 (2009) 1587–1595. doi:DOI 10.1016/j.biomaterials.2008.12.009.
- [44] M. Ponec, A. El Ghalbzouri, R. Dijkman, J. Kempenaar, G. van der Pluijm, P. Koolwijk, Endothelial network formed with human dermal microvascular endothelial cells in autologous multicellular skin substitutes, *Angiogenesis.* 7 (2004) 295–305. doi:10.1007/s10456-004-6315-3.
- [45] S. Huang, Y. Xu, C. Wu, D. Sha, X. Fu, In vitro constitution and in vivo implantation of engineered skin constructs with sweat glands, *Biomaterials.* 31 (2010) 5520–5525. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.03.060.
- [46] E. Bellas, M. Seiberg, J. Garlick, D.L. Kaplan, In vitro 3D full-thickness skin-equivalent tissue model using silk and collagen biomaterials., *Macromol. Biosci.* 12 (2012) 1627–36. doi:10.1002/mabi.201200262.
- [47] V. Hudon, F. Berthod, A.F. Black, O. Damour, L. Germain, F.A. Auger, A tissue-engineered endothelialized dermis to study the modulation of angiogenic and angiostatic molecules on capillary-like tube formation in vitro, *Br. J. Dermatol.* 148 (2003) 1094–1104. doi:10.1046/j.1365-2133.2003.05298.x.
- [48] P.-L. Tremblay, F. Berthod, L. Germain, F.A. Auger, In Vitro Evaluation of the Angiostatic Potential of Drugs Using an Endothelialized Tissue-Engineered Connective Tissue, *J.*

- Pharmacol. Exp. Ther. 315 (2005) 510–516. doi:10.1124/jpet.105.089524.
- [49] B. Hendrickx, J.J. Vranckx, A. Luttun, Cell-based vascularization strategies for skin tissue engineering., *Tissue Eng. Part B. Rev.* 17 (2011) 13–24. doi:10.1089/ten.TEB.2010.0315.
- [50] P.S. Sahota, J.L. Burn, M. Heaton, E. Freedlander, S.K. Suvarna, N.J. Brown, S. MacNeil, Development of a reconstructed human skin model for angiogenesis, *Wound Repair Regen.* 11 (2003) 275–284. doi:10.1046/j.1524-475X.2003.11407.x.
- [51] S. MacNeil, Progress and opportunities for tissue-engineered skin, *Nature.* 445 (2007) 874–880. doi:10.1038/nature05664.
- [52] A.F. Black, F. Berthod, N. L'heureux, L. Germain, F.A. Auger, In vitro reconstruction of a human capillary-like network in a tissue-engineered skin equivalent, *FASEB J.* 12 (1998) 1331–40.
- [53] C. Tonello, B. Zavan, R. Cortivo, P. Brun, S. Panfilo, G. Abatangelo, In vitro reconstruction of human dermal equivalent enriched with endothelial cells, *Biomaterials.* 24 (2003) 1205–1211. doi:10.1016/S0142-9612(02)00450-7.
- [54] M. Poncet, A. El Ghalbzouri, R. Dijkman, J. Kempenaar, G. van der Pluijm, P. Koolwijk, Endothelial network formed with human dermal microvascular endothelial cells in autologous multicellular skin substitutes, *Angiogenesis.* 7 (2004) 295–305. doi:10.1007/s10456-004-6315-3.
- [55] A.S. Klar, S. Güven, T. Biedermann, J. Luginbühl, S. Böttcher-Haberzeth, C. Meuli-Simmen, M. Meuli, I. Martin, A. Scherberich, E. Reichmann, Tissue-engineered dermo-epidermal skin grafts prevascularized with adipose-derived cells, *Biomaterials.* 35 (2014) 5065–5078. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.02.049.
- [56] D. Marino, J. Luginbuhl, S. Scola, M. Meuli, E. Reichmann, Bioengineering Dermo-Epidermal Skin Grafts with Blood and Lymphatic Capillaries, *Sci. Transl. Med.* 6 (2014) 221ra14–221ra14. doi:10.1126/scitranslmed.3006894.
- [57] H.E. Abaci, K. Gledhill, Z. Guo, A.M. Christiano, M.L. Shuler, Pumpless microfluidic platform for drug testing on human skin equivalents, *Lab Chip.* 15 (2015) 882–888. doi:10.1039/C4LC00999A.
- [58] Q. Ramadan, F.C.W. Ting, In vitro micro-physiological immune-competent model of the human skin, *Lab Chip.* 16 (2016) 1899–1908. doi:10.1039/C6LC00229C.
- [59] M.I. Bogorad, J. DeStefano, J. Karlsson, A.D. Wong, S. Gerecht, P.C. Searson, Review: in vitro microvessel models., *Lab Chip.* 15 (2015) 4242–4255. doi:10.1039/c5lc00832h.

-
- [60] K.M. Chrobak, D.R. Potter, J. Tien, Formation of perfused, functional microvascular tubes in vitro, *Microvasc. Res.* 71 (2006) 185–196. doi:10.1016/j.mvr.2006.02.005.
- [61] G.M. Price, K.H.K. Wong, J.G. Truslow, A.D. Leung, C. Acharya, J. Tien, Effect of mechanical factors on the function of engineered human blood microvessels in microfluidic collagen gels, *Biomaterials.* 31 (2010) 6182–6189. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.04.041.
- [62] D.-H.T. Nguyen, S.C. Stapleton, M.T. Yang, S.S. Cha, C.K. Choi, P. a Galie, C.S. Chen, Biomimetic model to reconstitute angiogenic sprouting morphogenesis in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110 (2013) 6712–6717. doi:10.1073/pnas.1221526110.
- [63] A.P. Golden, J. Tien, Fabrication of microfluidic hydrogels using molded gelatin as a sacrificial element, *Lab Chip.* 7 (2007) 720. doi:10.1039/b618409j.
- [64] Y. Zheng, J. Chen, M. Craven, N.W. Choi, S. Totorica, A. Diaz-Santana, P. Kermani, B. Hempstead, C. Fischbach-Teschl, J.A. López, A.D. Stroock, In vitro microvessels for the study of angiogenesis and thrombosis., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 9342–7. doi:10.1073/pnas.1201240109.
- [65] J.S. Miller, K.R. Stevens, M.T. Yang, B.M. Baker, D.-H.T. Nguyen, D.M. Cohen, E. Toro, A.A. Chen, P.A. Galie, X. Yu, R. Chaturvedi, S.N. Bhatia, C.S. Chen, Rapid casting of patterned vascular networks for perfusable engineered three-dimensional tissues, *Nat. Mater.* 11 (2012) 768–774. doi:10.1038/nmat3357.
- [66] L.E. Bertassoni, M. Cecconi, V. Manoharan, M. Nikkhah, J. Hjortnaes, A.L. Cristino, G. Barabaschi, D. Demarchi, M.R. Dokmeci, Y. Yang, A. Khademhosseini, Hydrogel bioprinted microchannel networks for vascularization of tissue engineering constructs, *Lab Chip.* 14 (2014) 2202–2211. doi:10.1039/C4LC00030G.
- [67] D.B. Kolesky, K.A. Homan, M.A. Skylar-Scott, J.A. Lewis, Three-dimensional bioprinting of thick vascularized tissues, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113 (2016) 3179–3184. doi:10.1073/pnas.1521342113.
- [68] V.K. Lee, D.Y. Kim, H. Ngo, Y. Lee, L. Seo, S.-S. Yoo, P.A. Vincent, G. Dai, Creating perfused functional vascular channels using 3D bio-printing technology, *Biomaterials.* 35 (2014) 8092–8102. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.05.083.
- [69] L.E. Bertassoni, M. Cecconi, V. Manoharan, M. Nikkhah, J. Hjortnaes, A.L. Cristino, G. Barabaschi, D. Demarchi, M.R. Dokmeci, Y. Yang, A. Khademhosseini, Hydrogel bioprinted microchannel networks for vascularization of tissue engineering constructs, *Lab Chip.* 14 (2014) 2202–2211. doi:10.1039/C4LC00030G.

- [70] J. Kim, M. Chung, S. Kim, D.H. Jo, J.H. Kim, N.L. Jeon, Engineering of a Biomimetic Pericyte-Covered 3D Microvascular Network, *PLoS One*. 10 (2015) e0133880. doi:10.1371/journal.pone.0133880.
- [71] J.A. Whisler, M.B. Chen, R.D. Kamm, Control of Perfusable Microvascular Network Morphology Using a Multiculture Microfluidic System, *Tissue Eng. Part C Methods*. 20 (2014) 543–552. doi:10.1089/ten.tec.2013.0370.
- [72] A. El-Kattan, C.S. Asbill, S. Haidar, Transdermal testing: practical aspects and methods, *Pharm. Sci. Technol. Today*. 3 (2000) 426–430. doi:10.1016/S1461-5347(00)00316-3.
- [73] N. Otberg, A. Patzelt, U. Rasulev, T. Hagemeister, M. Linscheid, R. Sinkgraven, W. Sterry, J. Lademann, The role of hair follicles in the percutaneous absorption of caffeine, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 65 (2008) 488–492. doi:10.1111/j.1365-2125.2007.03065.x.
- [74] H. Gabiga, K. Cal, S.X. Janicki, Effect of penetration enhancers on isosorbide dinitrate penetration through rat skin from a transdermal therapeutic system, *Int. J. Pharm.* 199 (2000) 1–6. doi:10.1016/S0378-5173(99)00363-4.
- [75] Hikima Tomohiro, Kaneda Noriaki, Matsuo Kyouhei, Tojo Kakuji, Prediction of Percutaneous Absorption in Human Using Three-Dimensional Human Cultured Epidermis LabCyte EPI-MODEL, *Biol. Pharm. Bull.* 35 (2012) 362–368. <http://ci.nii.ac.jp/naid/130001872317>.
- [76] K. Kretsos, G.B. Kasting, A geometrical model of dermal capillary clearance., *Math. Biosci.* 208 (2007) 430–53. doi:10.1016/j.mbs.2006.10.012.
- [77] T. Hikima, M. Komatsu, D. Mori, K. Tojo, Prediction of percutaneous absorption in human of nicotine from marketed TTS using three-dimensional human cultured epidermis, in: 40th Annu. Meet. Expo. Control. Release Soc., 2013: pp. 2–3.
- [78] B. Godin, E. Touitou, Transdermal skin delivery: Predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 1152–1161. doi:10.1016/j.addr.2007.07.004.
- [79] Y.G. Anissimov, O.G. Jepps, Y. Dancik, M.S. Roberts, Mathematical and pharmacokinetic modelling of epidermal and dermal transport processes., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 169–90. doi:10.1016/j.addr.2012.04.009.
- [80] Y.G. Anissimov, M.S. Roberts, Modelling dermal drug distribution after topical application in human., *Pharm. Res.* 28 (2011) 2119–29. doi:10.1007/s11095-011-0437-2.
- [81] K. Kretsos, G.B. Kasting, J.M. Nitsche, Distributed diffusion-clearance model for

- transient drug distribution within the skin., *J. Pharm. Sci.* 93 (2004) 2820–35. doi:10.1002/jps.20187.
- [82] T.Y. Chang, V.G. Yadav, S. De Leo, A. Mohedas, B. Rajalingam, C.L. Chen, S. Selvarasah, M.R. Dokmeci, A. Khademhosseini, Cell and protein compatibility of parylene-C surfaces, *Langmuir*. 23 (2007) 11718–11725. doi:10.1021/la7017049.
- [83] T. Hoshino, I. Saito, R. Kometani, K. Samejima, S. Matsui, T. Suzuki, K. Mabuchi, Y.X. Kato, Improvement of neuronal cell adhesiveness on parylene with oxygen plasma treatment, *J. Biosci. Bioeng.* 113 (2012) 395–398. doi:10.1016/j.jbiosc.2011.11.003.
- [84] T. Trantidou, C. Rao, H. Barrett, P. Camelliti, K. Pinto, M.H. Yacoub, T. Athanasiou, C. Toumazou, C.M. Terracciano, T. Prodromakis, Selective hydrophilic modification of Parylene C films: a new approach to cell micro-patterning for synthetic biology applications., *Biofabrication*. 6 (2014) 25004. doi:10.1088/1758-5082/6/2/025004.
- [85] S. Amano, N. Akutsu, Y. Matsunaga, T. Nishiyama, M.F. Champlaud, R.E. Burgeson, E. Adachi, Importance of balance between extracellular matrix synthesis and degradation in basement membrane formation., *Exp. Cell Res.* 271 (2001) 249–62. doi:10.1006/excr.2001.5387.
- [86] K.Y. Arai, A. Fujioka, R. Okamura, T. Nishiyama, Stimulatory effect of fibroblast-derived prostaglandin E₂ on keratinocyte stratification in the skin equivalent., *Wound Repair Regen.* 22 (2014) 701–11. doi:10.1111/wrr.12228.
- [87] G.E. Flaten, Z. Palac, A. Engesland, J. Filipović-Grčić, Ž. Vanić, N. Škalko-Basnet, In vitro skin models as a tool in optimization of drug formulation, *Eur. J. Pharm. Sci.* 75 (2015) 10–24. doi:10.1016/j.ejps.2015.02.018.
- [88] S.A.M. Shuster, M.M. Black, E.V.A. McVitie, The influence of age and sex on skin thickness, skin collagen and density, *Br. J. Dermatol.* 93 (1975) 639–643. doi:10.1111/j.1365-2133.1975.tb05113.x.
- [89] P.J. Caspers, G.W. Lucassen, R. Wolthuis, H.A. Bruining, G.J. Puppels, In vitro and in vivo Raman spectroscopy of human skin., *Biospectroscopy*. 4 (1998) S31-9. doi:10.1002/(SICI)1520-6343(1998)4:5+<S31::AID-BSPY4>3.0.CO;2-M.
- [90] L. Y., H. K., Skin thickness of Korean adults, *Surg. Radiol. Anat.* 24 (2002) 183–189. doi:10.1007/s00276-002-0034-5.
- [91] I. Pathan, C. Setty, Chemical Penetration Enhancers for Transdermal Drug Delivery Systems, *Trop. J. Pharm. Res.* 8 (2009). doi:10.4314/tjpr.v8i2.44527.

- [92] M.J.C. van Gemert, J.P. Hulsbergen Henning, A model approach to laser coagulation of dermal vascular lesions, *Arch. Dermatol. Res.* 270 (1981) 429–439. doi:10.1007/BF00403787.
- [93] J.C. Lawler, M.J. Davis, E.C. Griffith, Electrical Characteristics of the Skin: The Impedance of the Surface Sheath and Deep Tissues, *J. Invest. Dermatol.* 34 (1960) 301–308. doi:10.1038/jid.1960.52.
- [94] M.J. Goretsky, A.P. Supp, D.G. Greenhalgh, G.D. Warden, S.T. Boyce, Surface electrical capacitance as an index of epidermal barrier properties of composite skin substitutes and skin autografts., *Wound Repair Regen.* 3 (1995) 419–25. doi:10.1046/j.1524-475X.1995.30406.x.
- [95] G.M. Price, J. Tien, Methods for Forming Human Microvascular Tubes In Vitro and Measuring Their Macromolecular Permeability, in: *Methods Mol. Biol.*, 2011: pp. 281–293. doi:10.1007/978-1-59745-551-0_17.
- [96] V.H. Huxley, F.E. Curry, R.H. Adamson, Quantitative fluorescence microscopy on single capillaries: alpha-lactalbumin transport, *Am J Physiol Hear. Circ Physiol.* 252 (1987) H188-197.
- [97] J.M. Tarbell, Shear stress and the endothelial transport barrier., *Cardiovasc. Res.* 87 (2010) 320–30. doi:10.1093/cvr/cvq146.
- [98] M. Radisic, J. Malda, E. Epping, W. Geng, R. Langer, G. Vunjak-Novakovic, Oxygen gradients correlate with cell density and cell viability in engineered cardiac tissue., *Biotechnol. Bioeng.* 93 (2006) 332–43. doi:10.1002/bit.20722.
- [99] Kano Satoshi, Todo Hiroaki, Sugie Kenichi, Fujimoto Hidenori, Nakada Keiichi, Tokudome Yoshihiro, Hashimoto Fumie, Sugibayashi Kenji, Utilization of Reconstructed Cultured Human Skin Models as an Alternative Skin for Permeation Studies of Chemical Compounds, *Altern. to Anim. Test. Exp.* 15 (2010) 61–70. doi:10.11232/aatex.15.61.
- [100] W.G. Roberts, G.E. Palade, Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor., *J. Cell Sci.* 108 (1995) 2369–79.
- [101] H.M. Powell, K.L. McFarland, D.L. Butler, D.M. Supp, S.T. Boyce, Uniaxial strain regulates morphogenesis, gene expression, and tissue strength in engineered skin., *Tissue Eng. Part A.* 16 (2010) 1083–92. doi:10.1089/ten.TEA.2009.0542.
- [102] S. Yano, M. Komine, M. Fujimoto, H. Okochi, K. Tamaki, Mechanical stretching

- in vitro regulates signal transduction pathways and cellular proliferation in human epidermal keratinocytes., *J. Invest. Dermatol.* 122 (2004) 783–90. doi:10.1111/j.0022-202X.2004.22328.x.
- [103] G. Michalopoulos, H.C. Pitot, Primary culture of parenchymal liver cells on collagen membranes, *Exp. Cell Res.* 94 (1975) 70–78. doi:10.1016/0014-4827(75)90532-7.
- [104] 岩井峯子, ヒト正常および腫瘍細胞の三次元培養による組織再構築に関する研究, *奈良医学雑誌*. 43 (1992) 94–103.
- [105] S. Hinds, W. Bian, R.G. Dennis, N. Bursac, The role of extracellular matrix composition in structure and function of bioengineered skeletal muscle, *Biomaterials*. 32 (2011) 3575–3583. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.01.062.
- [106] Y. Morimoto, M. Kato-Negishi, H. Onoe, S. Takeuchi, Three-dimensional neuron–muscle constructs with neuromuscular junctions, *Biomaterials*. 34 (2013) 9413–9419. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.08.062.
- [107] K.L. Moore, T.V.N. Persaud, 瀬口春道, 小林俊博, E.G. del Saz, ムーア人体発生学, 医歯薬出版, 東京, 2011.
- [108] W.J. Larsen, G.C. Schoenwolf, S.B. Bleyl, P.R. Brauer, P.H. Francis - West, 仲村春和, 大谷浩, ラーセン人体発生学: カラー版, 西村書店, 東京, 2013.
- [109] K. Morita, Y. Miyachi, Tight junctions in the skin, *J. Dermatol. Sci.* 31 (2003) 81–89. doi:10.1016/S0923-1811(03)00038-0.
- [110] 今山修平, 皮膚病理イラストレイテッド2 免疫染色, 学研メディカル秀潤社, 東京, 2014.
- [111] J.M. Sorrell, Fibroblast heterogeneity: more than skin deep, *J. Cell Sci.* 117 (2004) 667–675. doi:10.1242/jcs.01005.
- [112] V.K. Lee, D.Y. Kim, H. Ngo, Y. Lee, L. Seo, S.-S. Yoo, P.A. Vincent, G. Dai, Creating perfused functional vascular channels using 3D bio-printing technology, *Biomaterials*. 35 (2014) 8092–8102. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.05.083.
- [113] S. Kano, H. Todo, K. Furui, S. Kenichi, Y. Tokudome, F. Hashimoto, H. Kojima, K. Sugibayashi, Comparison of Several Reconstructed Cultured Human Skin Models by Microscopic Observation: Their Usefulness as an Alternative Membrane for Skin in Drug Permeation Experiments, *Altern. to Anim. Test. Exp.* (2011) 51. doi:10.11232/aatex.16.51.
- [114] K. Ackermann, S. Lombardi Borgia, H.C. Korting, K.R. Mewes, M. Schäfer-Korting, The Phenion® Full-Thickness Skin Model for Percutaneous Absorption Testing, *Skin*

- Pharmacol. Physiol. 23 (2010) 105–112. doi:10.1159/000265681.
- [115] S. Trauer, A. Patzelt, N. Otberg, F. Knorr, C. Rozycki, G. Balizs, R. Büttemeyer, M. Linscheid, M. Liebsch, J. Lademann, Permeation of topically applied caffeine through human skin - A comparison of in vivo and in vitro data, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 68 (2009) 181–186. doi:10.1111/j.1365-2125.2009.03463.x.
- [116] A. Krogh, *The Anatomy and Physiology of Capillaries*, New Haven, Yale University Press, 1922.
- [117] T. Kihara, J. Ito, J. Miyake, Measurement of Biomolecular Diffusion in Extracellular Matrix Condensed by Fibroblasts Using Fluorescence Correlation Spectroscopy, *PLoS One*. 8 (2013) e82382. doi:10.1371/journal.pone.0082382.
- [118] P. Kapusta, Absolute diffusion coefficients: compilation of reference data for FCS calibration, PicoQuant Application Note (2010).
- [119] D. Mehta, A.B. Malik, Signaling mechanisms regulating endothelial permeability., *Physiol. Rev.* 86 (2006) 279–367. doi:10.1152/physrev.00012.2005.
- [120] S.T. Andreadis, K.E. Hamoen, M.L. Yarmush, J.R. Morgan, Keratinocyte growth factor induces hyperproliferation and delays differentiation in a skin equivalent model system, *Faseb J.* 15 (2001) 898–906. doi:DOI 10.1096/fj.00-0324com.

付録 A 薬品, 培地

本研究で使用した薬品, 培地を以下にまとめる.

Table S1 薬品一覧

薬品	メーカー
FGM-2 Fibroblast Growth Medium-2 BulletKit	Lonza
KGM-Gold Keratinocyte Growth Medium BulletKit	Lonza
EGM-2 Endothelial Cell Growth Medium-2 BulletKit	Lonza
ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) 高グルコース	Sigma-Aldrich
ハム F-12 (Ham's F-12)	Sigma-Aldrich
ペニシリン・ストレプトマイシン	Sigma-Aldrich
ヒドロコルチゾン	Sigma-Aldrich
アデニン	Sigma-Aldrich
カフェイン	Sigma-Aldrich
二硝酸イソソルビド (ISDN)	Sigma-Aldrich
ローダミン B	Sigma-Aldrich
フルオレセインイソチオシアネートデキストラン (20 kDa)	Sigma-Aldrich
ローダミン B イソチオシアネートデキストラン (70 kDa)	Sigma-Aldrich
トリプシン EDTA	Sigma-Aldrich
CELLBANKER(セルバンカー) 1	ゼノアック
ウシ由来 I 型コラーゲン IAC-50	高研
L- アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム塩 n 水和物	和光純薬工業
インスリン	和光純薬工業
血管内皮成長因子 (VEGF)	和光純薬工業
アセトニトリル (HPLC グレード)	和光純薬工業
4% パラホルムアルデヒド	武藤化学
ジメチルスルホキシド	関東化学
ダーマボンドアドバンス	エチコン

薬品	メーカー
type IV collagen antibody (rabbit, polyclonal)	Abcam
cytokeratin 10 (CK10) antibody (rabbit, monoclonal)	Abcam
cytokeratin 15 (CK15) antibody (mouse, monoclonal)	Abcam
CD31 antibody (mouse, monoclonal)	BD Science
ZO-1 antibody (mouse monoclonal)	Invitrogen
マイヤーヘマトキシリン	和光純薬工業
キシレン	和光純薬工業
0.5% エオシン Y エタノール溶液	和光純薬工業
エンテランニュー	MERCK
OCT コンパウンド	サクラファインテックジャパン
フルオロマウント	Diagnostic BioSystems
alexa fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L) antibody	Invitrogen
alexa fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) antibody	Invitrogen
alexa fluor 568 goat anti-mouse IgG (H+L) antibody	Invitrogen
alexa fluor 568 goat anti-rabbit IgG (H+L) antibody	Invitrogen
DAPI(4',6- ジアミジノ -2- フェニルインドール)	Invitrogen
ウシ胎仔血清 (FBS)	Biosera
リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)	細胞科学研究所

Table S2 培地

培地	用途	組成
FGM-2	NHDF の単層培養	-(キット品のため省略)
KGM-Gold	NHEK の単層培養	-(キット品のため省略)
EGM-2	HUVEC の単層培養, 皮膚 モデル血管流路の培養	-(キット品のため省略)
真皮収縮用培地	皮膚モデル真皮層の培養	DMEM に 10% FBS, 1% ペニシリン・ストレプトマイシン, 70 µg/mL アスコルビン酸を添加 (いずれも終濃度)
表皮形成用培地	皮膚モデル表皮層の培養	DMEM と Ham's F-12 の 3:1 混合液に 10% FBS, 1% ペニシリン・ストレプトマイシン, 70 µg/mL アスコルビン酸, 0.4 µg/mL ヒドロコルチゾン, 5 µg/mL インスリン, 25 µg/mL アデニンを添加 (いずれも終濃度)

付録 B 細胞培養

細胞培養の各手順は次のとおりである。

解凍

1. 液体窒素またはディープフリーザから凍結バイアルを取り出す。
2. 37°Cのウォーターバスで1分程度湯浴し、バイアル内容物を半溶解する。
3. 37°Cに温めておいた各細胞用の培地をバイアル内に入れ、ピペッティングで完全に溶解させ、細胞懸濁液とする。
4. 遠心(約 250 G, 5 分)により細胞を回収し、各細胞用の培地に懸濁して細胞培養ディッシュに播種する。

培養・増殖

1. 1-2 日おき(週 3 回)に培地を交換する。
2. 70-80% コンフルエントに達した時点で継代するか、もしくは皮膚モデル構築に使用する。ただし、NHDF を真皮形成に使用する場合は 100% コンフルエントに達した直後のものを利用した。なお、継代数としては NHDF は 10 継代、NHEK と HUVEC は 5 継代以下のものを使用した(購入した細胞を 0 継代として数えた場合)。

継代

1. PBS(-) で 1-2 回、培養ディッシュを洗う。
2. トリプシン EDTA(0.05%) を入れ、1-3 分程度、37°Cのインキュベータ内で静置する。
3. 細胞が培養ディッシュから完全に剥がれたら、血清入り DMEM を入れ、細胞懸濁液を作る。
4. 遠心(約 250 G, 5 分)により細胞を回収し、各細胞用の培地に懸濁して細胞培養ディッシュに播種する(1 枚のディッシュを 4-10 枚程度にスプリット)。

凍結

1. 継代と同様の手順で細胞の剥離、遠心による回収まで実施する。
2. 1×10^6 cells/ml の細胞密度でセルバンカーに懸濁し、クライオチューブに分注する。
3. フリージングコンテナに入れ、ディープフリーザで凍結する。一日後、液体窒素に移動する。なお、一年以内に使用する場合は液体窒素に移動せず、ディープフリーザで保存した。

付録 C 凍結切片

凍結切片作製の手順は以下のとおりである。なお、用途に応じて、パラホルムアルデヒドで固定を行ってから凍結する通常の凍結切片と、固定せずに凍結する新鮮凍結切片がある。新鮮凍結切片は、凍結時に組織が損傷・変形しやすい、スライドガラスから組織が剥離しやすいといったデメリットがある一方、タンパク質や細胞が固定の影響を受けないため、免疫染色において染色の難しい抗原を対象とする場合に有効である。

凍結切片

1. 4% パラホルムアルデヒドに浸漬し、皮膚モデルを固定する (4 時間, 4°C)。
2. 固定した皮膚モデルを順に 10% スクロース (約 2 時間), 20% スクロース (約 2 時間), 30% スクロース (一晩) に浸漬する (全て 4°C)。
3. OCT コンパウンドに浸漬する (1 時間, 室温)。
4. 包埋皿に OCT コンパウンドを入れ、その中に皮膚モデルを沈め、液体窒素で凍結する。
5. クライオスタットにより 7 μm の凍結切片にし、スライドグラスに張り付ける。スライドグラスは剥離防止処理がなされたものを使用する。
6. 1 時間程度室温で風乾した後、染色操作 (HE 染色もしくは免疫染色) を行う。すぐに染色を行わない場合は、スライドグラス用の箱に密封し、-20°C で保管する。

新鮮凍結切片

1. 包埋皿に OCT コンパウンドを入れ、その中に皮膚モデルを沈め、液体窒素で凍結する。
2. クライオスタットにより 7 μm の凍結切片にし、スライドグラスに張り付ける。スライドグラスは剥離防止処理がなされたものを使用する。
3. 1 時間程度室温で風乾した後、染色操作を行う。すぐに染色を行わない場合は、スライドグラス用の箱に密封し、-20°C で保管する。

付録 D HE染色

HE染色の手順は次のとおりである。なお、以下の工程により、核が紫、コラーゲンと細胞質が薄いピンク色、角層が濃い赤に染まる。

1. 凍結切片を張り付けたスライドグラスを水道水で20回洗い、OCTコンパウンドを洗い流す。
2. マイヤーヘマトキシレンに浸漬し、5分間静置する。
3. 水道水を流し込んでいる大きな容器(発泡スチロール等)にスライドグラスを入れ、5分間、水洗・色出しを行う。
4. エオジンに浸漬し、1分間振盪する。
5. 99%エタノールに浸漬し、10秒程度振盪してエオジンを洗い落とす。合計3回実施する。
6. キシレンに浸漬し、10秒程度浸透して透徹する。合計3回実施する。
7. エンテランニューで封入する。

付録 E 免疫染色

免疫染色の手順は以下のとおりである。なお、CD31 はパラホルムアルデヒドによる抗原性の低下が観察されたため、新鮮凍結切片を用いた。

CK10, CK15, IV 型コラーゲンの免疫染色

1. 凍結切片を張り付けたスライドガラスを PBS に浸漬し、室温で 10 分静置する。これを 3 回繰り返す、OCT コンパウンドを洗い流す。
2. 切片が乾燥しないよう気をつけつつ、スライドガラスの水分を拭き取り、切片を撥水性のペンで囲む。
3. 1% BSA (PBS に溶解) を切片の上に滴下し、4 時間、4°C で静置し、ブロッキング (1 次抗体の非特異吸着の防止) する。
4. 1 次抗体を 1% BSA で 1/200 に希釈し、4°C で一晩静置する。
5. 切片上の液体を PBS に置換し、室温で 5 分静置する。これを 3 回繰り返す、1 次抗体を洗い流す。
6. 2 次抗体を 1% BSA (または PBS) で 1/200 に希釈し、切片上の液体と置換し、室温で 2 時間静置する。
7. 切片上の液体を PBS に置換し、室温で 5 分静置する。これを 3 回繰り返す、2 次抗体を洗い流す。必要に応じて、DAPI により核染色する。
8. フルオロマウントで切片を封入する。
9. 蛍光顕微鏡、または共焦点顕微鏡で観察する。

CD31 の免疫染色

1. スライドガラスに張り付けた新鮮凍結切片に、1% BSA で 1/200 に希釈した 1 次抗体を滴下し、室温で 2 時間静置する。
2. 切片上の液体を PBS に置換し、室温で 5 分静置する。これを 3 回繰り返す、1 次抗体を洗い流す。
3. 2 次抗体を 1% BSA (または PBS) で 1/200 に希釈し、切片上の液体と置換し、室温で 1 時間静置する。
4. 切片上の液体を 4% パラホルムアルデヒドで置換して、切片を固定する。

5. 切片上の液体を PBS に置換し、室温で 5 分静置する。これを 3 回繰り返し、2 次抗体及びパラホルムアルデヒドを洗い流す。必要に応じて DAPI で核染色する。
6. フルオロマウントで切片を封入する。
7. 蛍光顕微鏡、または共焦点顕微鏡で観察する。

血管流路の免疫染色

1. 4% パラホルムアルデヒドで約 3 時間固定する。
2. PBS でサンプル全体を 3 回洗った後、0.1% Triton-X (1% BSA に溶解) をシリンジを用いて血管流路に注入し、室温で 20 分間静置する。この際、培養デバイスの注入口と排出口に接続されたシリコンチューブをクリップで挟んで閉じておく(以下、静置する際は同様)。
3. 1% BSA でサンプル全体を 3 回洗った後、1% BSA を血管流路に注入し、室温で 1 時間静置する。
4. 1% BSA で 1/100 に希釈した 1 次抗体を血管流路に注入し、4°Cで一晩静置する。
5. 1% BSA でサンプル全体を 3 回洗った後、1% BSA を血管流路に注入し、1 次抗体を洗い流す。
6. 1% BSA で 1/100 に希釈した 2 次抗体を血管流路に注入し、室温で 2 時間静置する。
7. PBS でサンプル全体を 3 回洗った後、PBS を血管流路に注入し、2 次抗体を洗い流す。
8. 二光子顕微鏡により観察する。

付録 F PLLチューブの作製

本文では真皮層中の空洞流路に HUVEC を播種して血管流路を構築し，強度が向上されたことを報告した．本論文の主旨とはやや離れるが，流路を被覆して強度を向上する別の方法として，半透膜性を有するポリ-L-リシン製のチューブ (PLL チューブ) で流路を構成する方法も実施した (Fig. S1a)．PLL チューブを用いた方法は，HUVEC を使用しないため，作製期間が短縮可能，共培養に伴う培地組成検討が不要といったメリットがある．一方，血管内皮特有の機能 (血管新生，薬剤への反応など) は持たないため，これを省略した限定的な系となる．以下，作製方法を記載する (Fig. S1b)．

1. アルギン酸ナトリウム溶液 (1 wt%) を，シリンジを用いてガラス細管 (内径 0.6 mm) の先端から，塩化カルシウム溶液 (200 mM) 中に射出し，アルギン酸ゲルファイバを作製する．アルギン酸ゲルファイバの流路は，射出流量により調整可能である (Fig. S2a-c)．また，蛍光での可視化が必要な場合は，1% (v/v) となるように蛍光ビーズ (0.1 μm) をアルギン酸ナトリウム溶液に加えておく．
2. アルギン酸ゲルファイバを PLL 溶液 (0.01 wt%) に浸漬し，PLL でコートした後，超純水で余剰の PLL を洗い流す．なお，アルギン酸ゲルへの PLL の吸着は 180 分以上で概ね飽和する (Fig. S2d-f)．また，Fig. S1c に示すように，2 本のファイバを結び，結合点にアルギン酸ナトリウム溶液を滴下し，塩化カルシウム溶液を噴霧することで，枝分かれしたファイバを作製することができる．このようなファイバを使用することで，分岐した流路を作製することも可能である．
3. PLL コートしたアルギン酸ゲルファイバをディッシュ内で所望の形状に成形した後，中和したコラーゲン溶液を流し込んでゲル化させる．
4. PLL コートしたアルギン酸ゲルファイバの両端が露出するように，コラーゲンゲルを切除する．
5. クエン酸ナトリウム (200 mM) を入れ，アルギン酸ゲルを溶解し，PLL 膜のみを残すことで，PLL チューブが作製される (Fig. S3)．なお，このようにして作製した PLL チューブは，コラーゲンゲル中に包埋された細胞により収縮が発生する場合でも，流路構造を維持可能であった (Fig. S4)．

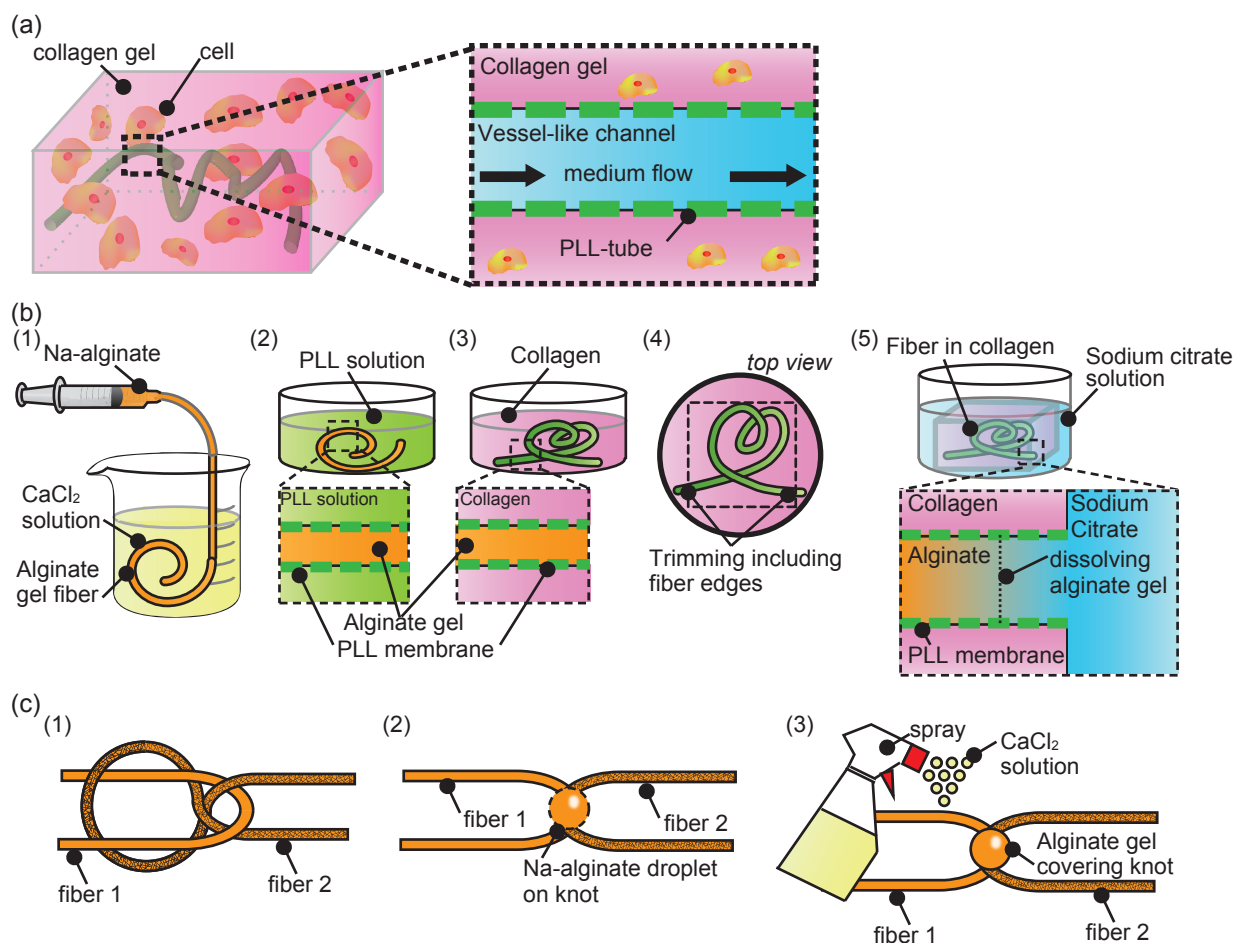


Fig. S1 PLL チューブの概念図と作製方法. (© Elsevier 2016)

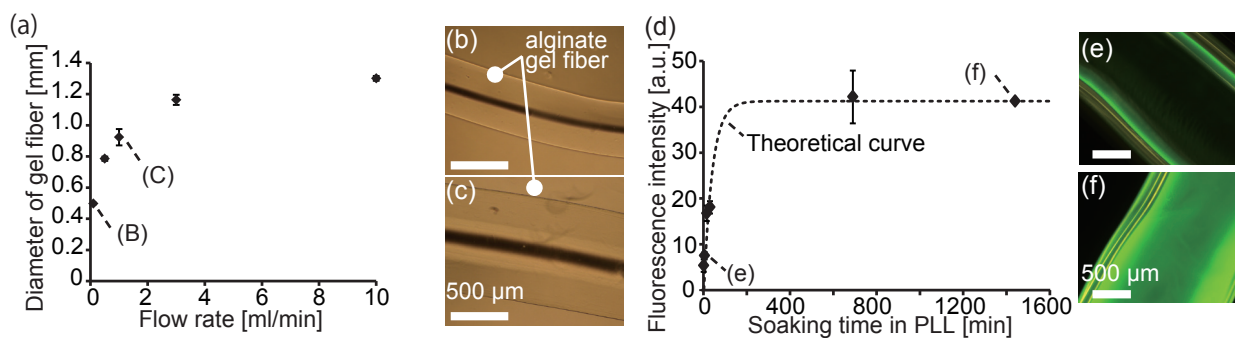


Fig. S2 アルギン酸ゲルファイバの径と流速の関係, 及び蛍光量 (PLL に結合した FITC 由来) と PLL 浸漬時間の関係. (© Elsevier 2016)

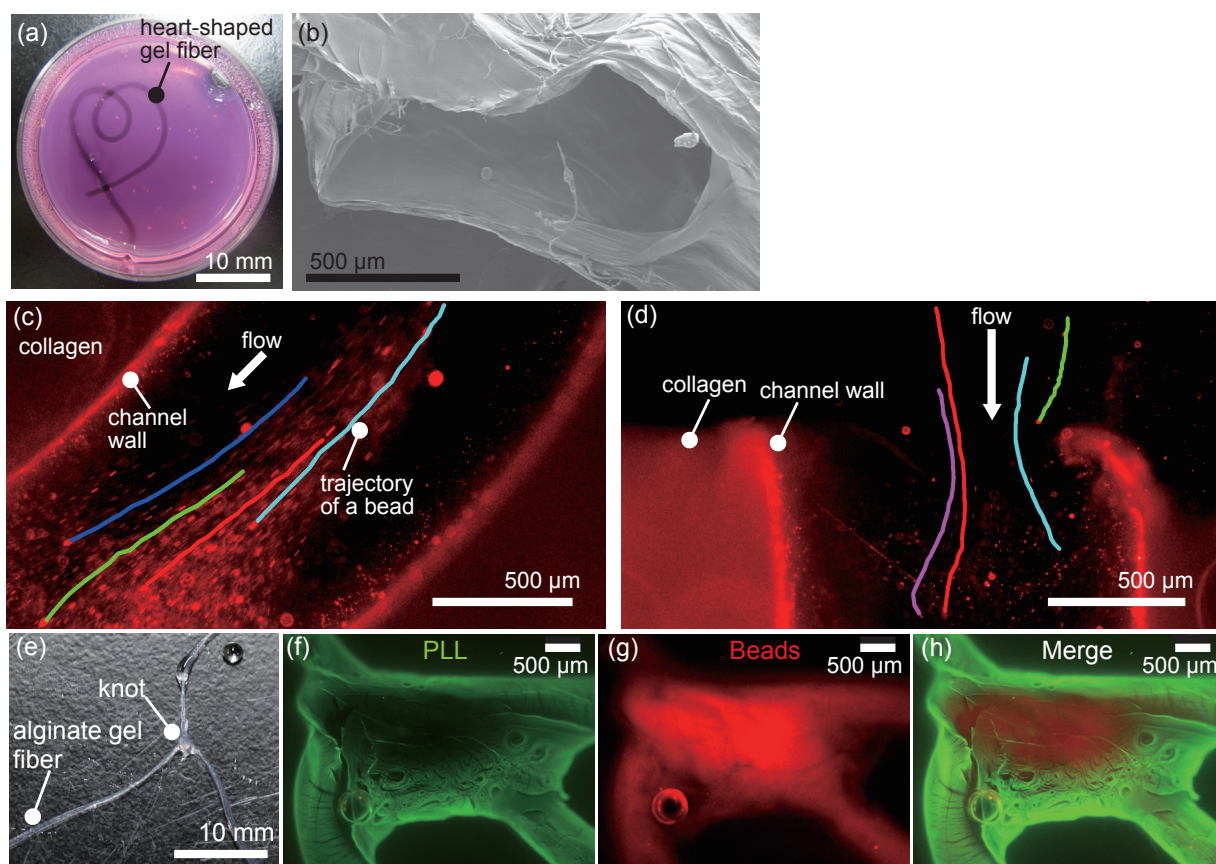


Fig. S3 作製したアルギン酸ゲルファイバ及びPLLチューブ. (a) コラーゲンゲル中のPLLコートされたアルギン酸ゲルファイバ (溶解前). (b) アルギン酸ゲル溶解後の流路口SEM画像. (c, d) アルギン酸ゲル溶解時の蛍光ビーズの流れ. (e) 枝分かれ構造を持つアルギン酸ゲルファイバ. (f-h) 分岐部分の蛍光画像. (© Elsevier 2016)

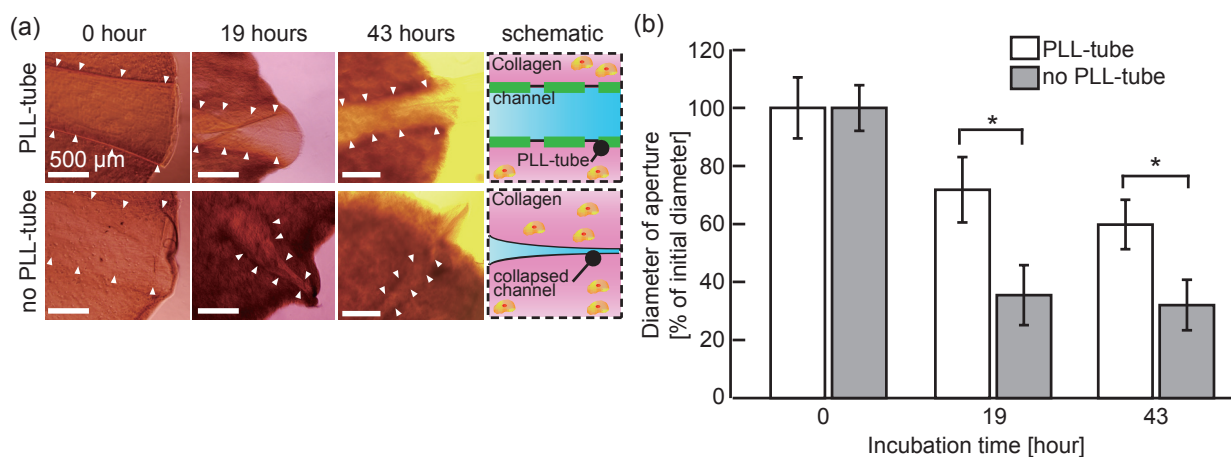


Fig. S4 細胞 (NHDF) により収縮するコラーゲンゲル中のPLLチューブ口径変化. (© Elsevier 2016)

謝 辞

本項目は個人情報保護の観点から非公開とする

以上

博士論文

森 宣仁