明　細　書

発明の名称 ： 透明皮膚試料

技術分野

[0001] 本発明は、ライトシート顕微鏡により表皮直下組織の観察を可能とする透明皮膚試料、その製造方法、及び皮膚切片の処理方法に関する。

背景技術

[0002] 組織を３次元解析する技術として、蛍光顕微鏡を用いた技術が従来から行われていたが、蛍光顕微鏡で組織を観察する場合、組織を包埋し、ミクロトームにより切削された薄切片を作る必要があった。このような方法は、細胞構造などの微細構造を３次元的に解析することに適していたものの、より大きな組織構造を観察するためには、試料の調製及び褪色等の点で問題が生じた。こうした問題点を解決するために、シート状の励起光を試料側方から照射して、光学断面を得るライトシート顕微鏡が開発され、生体試料や生体組織などより大きい試料に対して３次元解析が可能になった。ライトシート顕微鏡を用いるには、ゼブラフィッシュやメダカのような透明度の高い試料が適していた一方、哺乳動物の生体組織や組織切片のような不透明な試料に対しては、透明化処理が必須となる。

[0003] 近年、組織試料の透明化技術が多数開発されてきている（特許文献１）。透明化技術としては、主に有機溶媒透明化剤を用いた技術（非特許文献１）と、水溶性透明化剤を用いた技術（非特許文献２）とに大別されるが、それぞれ透明化の困難性、透明化試料の屈折率、抗原性の維持の点で課題を有する。また、ヒト組織を透明化する場合、ヒト組織ではマトリクスが豊富であり、光散乱性が高く、透明化が難しいことが知られていた。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開２０１４－５２３１号公報

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Cell (2014) vol. 159, Issue 4, pp. 896-910
非特許文献2：Nature Neuro Science (2015), vol.18, No.10, pp1518-1529
非特許文献3：Cell (2014) vol. 157, Issue 3, pp. 726-39
非特許文献4：Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition Workshops:29-37

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明者らが、ヒト皮膚切片の透明化を試みたところ、皮膚中のマトリックスが豊富に存在することによる透明化の困難性に加え、透明化された皮膚試料の表皮直下を観察できないという課題を見いだした。

課題を解決するための手段

[0007] そこで、本発明者らが、かかる課題を解決すべく鋭意研究を行ったところ、表皮部分の透明化が不十分であることを見いだした（図１）。皮膚切片から表皮部分のみを排除する方法について検討を行ったところ、ディスパーゼ溶液による処理で表皮部分を除去することにより表皮直下の毛細血管構造を観察可能であることを見いだし、本発明に至った。

[0008] 具体的に、本発明は、ライトシート顕微鏡により表皮直下組織の観察を可能とする透明皮膚試料であって、表皮を伴わず、抗原性が維持された透明皮膚試料に関する。

[0009] 他の態様では、本発明は、取得された皮膚切片から透明皮膚試料を製造する方法、及び当該製造方法により製造された透明皮膚試料にも関する。

[0010] さらに別の態様では、本発明は、皮膚切片処理方法、及び当該処理方法により処理された皮膚試料をライトシート顕微鏡により観察する方法にも関する。

発明の効果

[0011] 本発明の透明皮膚試料を用いることにより、表皮直下の構造の観察が可能になる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]図１は、表皮除去処理を行わずに、透明化処理を行って取得したヒト皮膚試料について、一次抗体として抗ＣＤ３１抗体を用い、二次抗体としてＡｌｅｘａＦｌｕｏｒｏ５９４標識抗羊ＩｇＧ抗体を用いて、ライトシート顕微鏡により取得した三次元画像である。表皮直下の領域の構造が可視化できないことが理解できる。

[図2]図２（Ａ）は、表皮除去処理を行わずに透明化処理を行って取得した透明なヒト皮膚試料切片の写真である。表皮側に不透明な層が残る。図２（Ｂ）は、表皮除去処理を行い、次いで透明化処理を行って取得した透明なヒト皮膚試料切片の写真である。

[図3]図３は、表皮除去処理を行い、次いで透明化処理を行って取得したヒト皮膚試料について、一次抗体として抗ＣＤ３１抗体を用い、二次抗体としてＡｌｅｘａＦｌｕｏｒｏ５９４標識抗羊ＩｇＧ抗体を用いて、ライトシート顕微鏡により取得した三次元画像である。表皮直下の毛細血管の構造が可視化できた。図３（Ａ）は、ヒトの背中から取得された皮膚切片についての画像であり、図３（Ｂ）は、ヒトの顔から取得された皮膚切片についての画像である。背中では、毛細血管がループ構造をとっている一方で、顔では毛細血管はランダム構造をとる点で異なっている。

[図4]図４は、表皮除去処理を行い、次いで透明化処理を行って取得したヒト皮膚試料について、一次抗体として抗ＣＤ３１抗体とＣｙ３標識抗αＳＭＡ抗体を用い、二次抗体としてＡｌｅｘａＦｌｕｏｒｏ４８８標識抗羊ＩｇＧ抗体とを用いて、ライトシート顕微鏡により取得した三次元画像である。図４（Ａ）は、ヒトの背中から取得された皮膚切片についての画像であり、図４（Ｂ）は、ヒトの顔から取得された皮膚切片についての画像である。α-ＳＭＡは、平滑筋において発現されるタンパク質であり、ＣＤ３１は血管内皮細胞で発現されるタンパク質である。図４Ａ及びＢから、血管内皮細胞を取り囲む平滑筋が示されており、背中と顔の皮膚では、毛細血管の構造が異なっている。背中の皮膚は上から毛細血管を見たときに点のように見えること

が多い一方で、顔の皮膚の毛細血管は上から見ても、ネットワークになっているように見える。すなわち、背中の皮膚では、ループ状の毛細血管が上に向かって伸びていると考えられる一方で、顔の皮膚の毛細血管は、横にひろがっているということで異なる。

[図5]図５は、表皮除去処理を行い、各種透明化処理方法を用いて透明化されたヒト皮膚試料について、透明度を示す図である。

[図6]図６Ａは、表皮除去処理を行い、各種透明化処理方法を用いて透明化されたヒト皮膚試料の写真である。図６Ｂは、各種透明化処理方法において透明化された皮膚試料におけるHaze率を示すグラフである。

[図7]図７は、目尻の皮膚、皮下脂肪組織、及び輪状筋肉が一体となった皮膚サンプルについて、それぞれCD31と、LYVE1、Perilipin、又はdystrophinとの共標識画像を示す。

[図8]図８は、若い被験者群と、老齢の被験者群の頬、目尻及び背中由来の表皮除去された皮膚試料について、血管をCD31抗体で可視化した画像である。

[図9]図９は、可視化された血管の体積、直径、及び分枝数を測定し、若い被験者群と、老齢の被験者群とで比較したグラフである。

発明を実施するための形態

[0013] 本発明は、ライトシート顕微鏡により表皮直下組織の観察を可能とする透明皮膚試料であって、表皮を伴わず、抗原性が維持された透明皮膚試料に関する。

[0014] 本発明において、皮膚試料は、任意の動物種から取得された皮膚試料であってもよいし、三次元培養技術により培養された培養皮膚組織であってもよい。動物種として、任意の哺乳動物、例えばヒト、ブタ、ウマ、ウシ、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、サル、チンパンジーなどが挙げられるが、これらに限定されない。美容に役立てる観点から、皮膚試料はヒトから取得されることが好ましい。皮膚試料の取得箇所は任意の箇所であってよく、例えば顔面、腕部、腹部、臀部などが挙げられる。また、くすみ、肌荒れ、シミ、シワ、皮膚炎などの皮膚トラブルが存在する皮膚領域における構造を

解析する観点から、皮膚トラブルが存在している皮膚領域から皮膚試料を取得することができる。

[0015] 「透明」とは、ライトシート顕微鏡による観察を可能にする透明度であれば任意の透明度であってよい。ライトシート顕微鏡による観察を可能にする観点から、透明とは、波長３８０ｎｍ～７８０ｎｍの光線が透過することができることをいい、好ましくは波長４５０ｎｍ～７５０ｎｍ、より好ましくは波長４９０ｎｍ～６５０ｎｍの光線が透過できることをいう。「ライトシート顕微鏡により表皮直下組織の観察を可能とする透明」皮膚試料は、ライトシート顕微鏡にのみ供される試料であることを意図しておらず、かかる透明性を有する皮膚試料であれば、通常の蛍光顕微鏡、共焦点顕微鏡などでの観察も当然に可能である。透明性は、任意の指標により決定することができ、例えば下記の式：

[数1]

$$Tp = (Tt - (1 - s1) \times \alpha) / s1 - Td/s1$$

{式中、

Ｔｄは拡散透過率であり、

Ｔｔは全光線透過率であり、

ｓ１は皮膚組織の面積率であり、

αは、カバーガラスの全光線透過率（０．７７）であり、

Ｔｐは皮膚組織の平行光線透過率である}

で表される平行光線透過率を用いることができる。かかる平行光線透過率を計算した場合に、１０％～１００％である。拡散透過率、全光線透過率、及び平行光線透過率については、Ｈａｚｅ　ｍｅｔｅｒを用いることで計算することができる。より具体的に、村上色彩技術研究所製のＨＲ－１００製品を用いて決定することができる。平行光線透過率の下限は、ライトシート顕微鏡により表皮直下組織の観察する観点から、２０％以上が好ましく、よ

り好ましくは２５％以上である。Ｆｏｃｕｓ法を用いる観点では、透明度は３０％以上が好ましい。ｉＤＩＳＣＯ法を用いる観点では、４０％以上の透明度が好ましく、さらに好ましくは４５％以上である。上限は特に特定されないが、達成可能な数値範囲として、例えば９０％以下、より好ましくは８０％以下、さらに好ましくは６０％以下が挙げられる。

[0016] 皮膚試料の透明化は、既知の透明化処理、例えば非特許文献１～２に記載の透明化処理を行うことで達成することができる。透明化処理は、皮膚試料を透明化剤と接触させることにより行われる。透明化剤としては、有機溶媒透明化剤と水溶性透明化剤が挙げられ、有機溶媒透明化剤の例としてｉＤＩＳＣＯ、ＢＡＢＢなど、水溶性透明化剤として、ＣＬＡＲＩＴＹ、ＣＵＢＩＣ、Ｓｃａｌｅ／Ｓ、ＦｏｃｕｓＣｌｅａｒなどが挙げられる。これらの透明化剤は、定法に基づいて使用することができる（非特許文献１～２）。通常、透明化処理は、固定処理及び抗体標識処理が行われた皮膚試料に対して行われるが、透明化処理の過程で標識処理が行われてもよい。

[0017] 透明化処理としてｉＤＩＳＣＯ法を用いた場合、本発明の透明皮膚試料の製造方法は以下の工程：

皮膚切片を表皮除去用の酵素溶液と接触させる工程、

当該皮膚切片を固定溶液と接触させて固定する工程、

アジ化ナトリウムを含む溶液と接触させる工程、

メタノール溶液と接触させる工程、

ジクロロメタン溶液と接触させる工程、

ベンジルエーテル溶液と固定させる工程、

を含む、前記方法。

抗体を含む溶液と接触させる標識工程がさらに含まれてもよい。標識工程は、アジ化ナトリウムを含む溶液と接触させる工程の後に行われうる。

[0018] 透明化処理としてＢＡＢＢ法を用いた場合、本発明の透明皮膚試料の製造方法は以下の工程：

皮膚切片を表皮除去用の酵素溶液と接触させる工程、

当該皮膚切片をメタノール溶液と接触させて固定する工程、

ＢＡＢＢ溶液（ベンジルアルコール及びベンジルベンゾエートの混合溶液）と接触させる工程、

を含む、前記方法。

抗体を含む溶液と接触させる標識工程がさらに含まれてもよい。標識工程は、メタノール溶液と接触させる工程の後に行われうる。

メタノール溶液は、薄メタノール溶液（例えば３３％）から１００％メタノールまで順次置換してもよい。

[0019] 透明化処理としてＣＵＢＩＣ法を用いた場合、本発明の透明皮膚試料の製造方法は以下の工程：

皮膚切片を表皮除去用の酵素溶液と接触させる工程、

当該皮膚切片を固定溶液と接触させて固定する工程、

アミノアルコール、界面活性剤、及び尿素を含むＣＵＢＩＣ－１溶液と接触させる工程、

アミノアルコール、界面活性剤、及び糖類を含むＣＵＢＩＣ－２溶液と接触させる工程、

を含む、前記方法。

抗体を含む溶液と接触させる標識工程がさらに含まれてもよい。標識工程は、ＣＵＢＩＣ－１溶液との接触工程の後に行われうる。CUBIC-１に使用されるアミノアルコールとして、N,N,N’,N’-テトラキス(2-ヒドロキシプロピル)エチレンジアミンが挙げられ、界面活性剤としては、ＴｒｉｔｏｎＸ－１００が挙げられる。CUBIC-2溶液に使用されるアミノアルコールとして、2,2’,2’’-ニトリロトリエタノールが挙げられ、界面活性剤として、ＴｒｉｔｏｎＸ－１００が挙げられ、糖類としてスクロースが挙げられる。

[0020] 透明化処理としてＳｃａｌｅ／Ｓ法又はＦｏｃｕｓＣｌｅａｒ法を用いた場合、本発明の透明皮膚試料の製造方法は以下の工程：

皮膚切片を表皮除去用の酵素溶液と接触させる工程、

当該皮膚切片を固定溶液と接触させて固定する工程、

Ｓｃａｌｅ／Ｓ溶液又はＦｏｃｕｓＣｌｅａｒ溶液と接触させる工程、

を含む、前記方法。

抗体を含む溶液と接触させる標識工程がさらに含まれてもよい。標識工程は、固定工程後に行われうる。

[0021] 表皮を伴わない皮膚試料とは、表皮が、物理的、化学的、又は酵素的処理により除去された試料のことをいう。表皮は、皮膚の最外層に存在しており、最外層から角層、顆粒層、有棘層、及び基底層から構成され、表皮基底膜により真皮から隔てられる。理論に限定されることを意図するものではないが、表皮は、透明化を困難にするメラノサイトや、屈折率の高い角層を含んでいるため透明化処理による透明化が難しく、そのため表皮を含む透明皮膚試料では、表皮直下の構造を観察できないことが分かった（図１）。表皮を伴わない皮膚試料とは、表皮を実質的に伴っていなければよい。表皮を実質的に伴わないとは、本発明の目的であるライトシート顕微鏡による表皮直下組織の観察を可能である限りでは、表皮の細胞をある程度含んでいてもよく、ライトシート顕微鏡のレーザーを透過性の表皮であれば、皮膚試料に含まれていてもよい。また、皮膚試料は、皮膚とともに、真皮層のさらに深部に存在する皮下脂肪組織や筋肉組織が含まれていてもよい。

[0022] 表皮除去のための物理的処理としては、熱処理、メスやピンセットなどを用いた剥離処理が挙げられ、目視下又は顕微鏡下において、表皮領域が除去される。酵素的処理としては、タンパク質分解酵素による処理が挙げられる。タンパク質分解酵素としては、非特異的酵素、特異的酵素のいずれをもちいてもよく、表皮細胞を分離する目的では、ディスパーゼ、トリプシンなどが用いられる。表皮と真皮の境界は、乳頭層と呼ばれる入り組んだ構造を有するため、表皮を効率よく除去する観点では、酵素処理が好ましい。酵素処理により表皮が除去されると、乳頭構造を維持しつつ表皮が除去された皮膚試料の取得しうる。また熱処理などの物理的処理では、真皮のタンパクの抗原性が失われるので抗原性維持の観点からも酵素処理が適している。

[0023] 抗原性が維持された皮膚試料とは、皮膚試料中に含まれる種々のタンパク

質のエピトープ部分に、対応する抗体が特異的に結合可能である皮膚試料のことをいう。抗原性が維持された皮膚試料は、必ずしも全ての抗原性が維持されることを意図していない。そもそも免疫染色の分野では、固定処理などの処理の間に一部の抗原性が失われることが通常であり、精製タンパク質やエピトープに対して特異的結合性を有する抗体であっても、必ずしも固定試料において特異的結合が生じるわけではない。したがって、本発明において「抗原性が維持された」とは、少なくとも１種、又はそれ以上の抗体が特異性を持ってエピトープへの結合性を有することをいう。透明化処理が抗体処理後に行われる場合、透明皮膚試料は、標的抗原に結合された標識抗体を含む。以下のものに限定されることを意図するものではないが、一例として、ＣＤ３１、ＬＹＶＥ１、ペリリピン及びジストロフィンからなる群から選ばれる少なくとも１のタンパク質についての抗原性が維持されることが好ましい。皮膚直下の脈管を可視化する観点から、ＣＤ３１、ＬＹＶＥ１に対する抗原性が維持されることが好ましい。

[0024] 透明皮膚試料をライトシート顕微鏡に供し、皮膚試料中の特定のタンパク質を抗体で認識させることにより可視化することができる。また、皮膚に含まれる任意の構造に特異的に発現するタンパク質に対する抗体を用いることで、皮膚に含まれる任意の構造を観察することができる。皮膚の構造として、細胞外マトリックス、リンパ管、静脈、動脈、毛細血管、神経、汗腺、皮脂腺、細胞成分、例えば肥満細胞、形質細胞、線維芽細胞、ランゲルハルス細胞、メルケル細胞、血管内皮細胞、リンパ管内皮細胞、神経細胞、汗腺細胞などが挙げられるが、これらに限定されることを意図するものではない。例えば、血管を可視化する場合、血管の細胞に特異的に発現するタンパク質、ＣＤ３１、ｖＷＦ、ＣＤ３４などに対する抗体が用いられる。細胞外マトリクスを可視化する場合、コラーゲン、エラスチン、αＳＭＡ、ファイブロネクチンなどに対する抗体が用いられる。神経を可視化する場合、ＰＧＰ９．５などに対する抗体を用いることができる。リンパ管を可視化する場合、ＬＹＶＥ－１、ポドプラニンなどに対する抗体が用いられる。これらの抗体

は、単独で用いられてもよいし、組み合わせて使用することもできる。

[0025] 透明皮膚試料を観察するために用いられる抗体は、任意の動物種から取得された抗体であってよく、またファージディスプレイ法などの遺伝子工学的に作成された抗体であってもよい。動物種としては、マウス、ヒト、ラット、ウサギ、ヤギ、ラクダ、ロバなどが挙げられ、これらの動物に抗原を導入することで抗体を取得することができる。抗体は、モノクローナル抗体であってもよいし、ポリクローナル抗体であってもよい。これらの抗体の組み合わせであるキメラ抗体であってもよい。抗体の代わりに結合性を有する抗体フラグメントを使用することもできる。抗体のフラグメントの例としては、Ｆａｂフラグメント、Ｆｖフラグメント、Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメント、Ｆａｂ’フラグメント、またはｓｃＦｖが挙げられる。

[0026] 抗原に直接結合する抗体自体に、ライトシート顕微鏡による観察を可能にする標識が付されていてもよいし、抗原に直接結合する抗体に対する二次以降の抗体に標識が付されていてもよい。付される標識は、蛍光顕微鏡に用いられる任意の蛍光標識が好ましく、例えばローダミン、フルオレセイン、Ｃｙ色素、アレクサなど任意の蛍光標識が使用される。複数の抗原にそれぞれ結合する抗体を使用し、各抗体を区別して結合する二次抗体として異なる標識を付された抗体を用いることにより、複数の抗原を同時、又は連続して可視化することもできる。

[0027] 抗体での標識に加えて、又は抗体での標識に代えて、透明皮膚試料中の細胞に対し、核染色を行うこともできるし、蛍光タンパク質を発現させることもできる。核染色試薬としては、公知の蛍光試薬を用いることができ、例えばＤＡＰＩ、プロピジウムヨージド（ＰＩ）、ヘキスト３３３４２などを用いることができる。核染色や、抗体の蛍光標識は、それぞれ区別して識別が可能な蛍光波長を有するように選択すること好ましい。蛍光タンパク質、例えばＧＦＰなどは、所望のプロモーターの下流にＧＦＰ、ＹＦＰの遺伝子を導入したトランスジェニック動物を作成することにより、又はベクターを局所的に動物に発現させることにより利用できる。

[0028] 本発明の別の態様では、本発明は、皮膚切片から透明皮膚試料を製造する方法又は皮膚切片の処理方法にも関する。皮膚切片は、予め取得された皮膚切片を用いることができる。これらの方法は、以下の：

皮膚切片を表皮除去用の酵素溶液と接触させて表皮を除去する工程、

皮膚切片を固定溶液と接触させて固定する工程、

皮膚切片を透明化試薬と接触させて透明化する工程

を任意の順番で含むことができる。表皮除去工程、固定工程そして透明化工程をこの順番で行うことが好ましい。固定工程の後に、皮膚切片を標識抗体溶液と接触させる標識化工程をさらに含んでもよい。各工程の前後に、洗浄工程を含んでもよい。本発明のさらなる態様では、皮膚切片から透明皮膚試料を製造する方法により製造された透明皮膚試料にも関する。

[0029] 表皮除去工程は、例えば、表皮除去用の酵素溶液中で、室温、加温化又は冷却下で数時間～数日間インキュベートすることにより行われうる。酵素反応を促進する観点では、３７℃付近、例えば３３℃～４０℃が好ましい。一方で、タンパク質の変性を防止する観点からは冷却下でインキュベートすることがこのましく、例えば０℃～５℃、好ましくは４℃～５℃でインキュベートされる。表皮を適切に除去する観点では、例えば冷却下で１時間日～２日間インキュベートすることが好ましく、３時間から１２時間インキュベートすることが更に好ましい。表皮のみを除去するため、酵素溶液を浸したガーゼなどの支持体に対して、皮膚切片の表皮側を接触させてインキュベートすることが好ましい。最も適切には、酵素溶液を浸したガーゼなどの吸水性の支持体上に、皮膚切片の表皮を下側にして戴置することでインキュベートされる。インキュベート条件は試料の取得部位に応じて異なりうるし、試料取得部位の状態によっても変化しうる。例えば、荒れた肌では、皮膚バリア機能が低下していることから、酵素溶液の浸透が早く、弱いインキュベート条件、例えば短時間及び低温度の条件が選択されうる。酵素溶液との接触後に、ピンセットなどを用いて表皮を真皮から剥離することで表皮が除去される。

[0030] 固定工程は、免疫染色の分野において使用される通常の方法に従い行うことができる。固定溶液として、パラホルムアルデヒド、メタノール等を用いることができる。一例として、４％パラホルムアルデヒド溶液中に、皮膚切片を浸し、室温又は冷却下で、数分～数日間インキュベートすることで行われうる。固定後の試料に対しては、酵素処理が効きにくいため、表皮除去工程の後に、固定工程が行われることが好ましい。

[0031] 標識工程は、免疫染色の分野において使用される通常の方法に従い行うことができる。例えば、固定された試料を、標的抗原に対する抗体を一次抗体溶液中でインキュベートし、洗浄後、一次抗体に対する標識された二次抗体の溶液中でインキュベートすることもできる。抗体の希釈率、インキュベート時間、温度は、使用する抗体に応じて適宜選択することができる。褪色を避ける観点から、標識二次抗体溶液とのインキュベートは、暗所で行うことが望ましい。標識工程後の処理及び保管は全て暗所で行うことが望ましい。

[0032] 透明化工程は、既知の透明化試薬の溶液中で、試料をインキュベートすることで行われる。透明化工程の一例として、ｉＤＩＳＣＯ法（iDISCO: A Simple, RapidMethod to Immunolabel Large Tissue Samples for Volume Imaging. Cell 159, 896910, November 6, 2014）、ＣＵＢＩＣ法、Ｓｃａｌｅ法、又はＦｏｃｕｓＣｌｅａｒ法による処理が挙げられる。十分に透明な試料を取得するため、透明化試薬及びインキュベート時間などは適宜選択することができる。

[0033] 標識工程を経て作成された透明皮膚試料は、ライトシート顕微鏡や蛍光顕微鏡での観察に供される。ライトシート顕微鏡や蛍光顕微鏡での観察は、これらの顕微鏡の通常用いられる方法で行うことができる。例えば付与された標識に応じて入射光を選択し、励起光に応じたフィルターを選択することにより、標識からの励起光の観察が可能になる。

[0034] 本発明の透明皮膚試料を用いることにより、皮膚内部の微細構造を観察することができ、それにより皮膚内部構造についての知見の蓄積を目的としている。皮膚のトラブル、例えば肌荒れ、シミ、シワ、肝斑、ニキビなどの皮

膚領域における皮膚内部構造を精緻に観察することで、その原因や、改善・治療法の開発に役立ちうる。本発明は、侵襲的に取得された皮膚切片を用いることが必要とされるものの、そのライトシート顕微鏡は蛍光顕微鏡での観察方法は、現在開発が行われている非侵襲的な皮膚内部構造の観察方法とは比較できないほど優れており、またその可視化対象の構造も明確である。したがって、将来的に利用が期待される非侵襲的手法による皮膚内部構造の観察に先立ち、皮膚内部構造についてのデータ及び知見の蓄積が可能となる。

[0035] 本明細書において言及される全ての文献はその全体が引用により本明細書に取り込まれる。

[0036] 以下に説明する本発明の実施例は例示のみを目的とし、本発明の技術的範囲を限定するものではない。本発明の技術的範囲は特許請求の範囲の記載によってのみ限定される。本発明の趣旨を逸脱しないことを条件として、本発明の変更、例えば、本発明の構成要件の追加、削除及び置換を行うことができる。

実施例

[0037] 酵素処理工程

ディスパーゼ（Ｒｏｃｈｅ）（３８Ｕ／ｖｉａｌ）をｍｉｌｌｉＱ水３８ｍｌで溶解した。シャーレにキムワイプを敷きディスパーゼを浸した。０．５ｍｍ角のヒト皮膚切片の表皮側を下にして、ディスパーゼに浸し、４℃で一晩インキュベートした。翌日、ピンセットを用いて角層を剥した。

[0038] ＣＵＢＩＣを用いた透明化処理

５ｍｍ角のヒト皮膚切片を４％パラホルムアルデヒド（ＰＦＡ）中に浸漬し、Ｒｏｔａｔｏｒ　ＲＴ－５０（ＴＡＩＴＥＣ）で回転させ、４℃で一晩インキュベートして固定した。固定された皮膚切片試料をＣＵＢＩＣ－１溶液中で１週間浸透させた。ＣＵＢＩＣ－１処理後に、ＰＢＳで３回洗浄し、２０％スクロース溶液中にて４℃で一晩回転させた。そののち、Ｏ．Ｃ．Ｔ　ｃｏｍｐｏｕｎｄ（Sakura ファインテック）中で凍結させた。解凍後、ＰＢＳで３回洗浄したのち、一次抗体溶液中で３７℃で３日間浸透させた。Ｐ

ＢＳＴ （ＰＢＳ＋０．１％ｔｒｉｔｏｎ） で３回洗浄した後、二次抗体溶液中で３７℃で一晩浸透させた。ＰＢＳＴ （ＰＢＳ＋０．１％ｔｒｉｔｏｎ） で３回洗浄した後、２０％スクロースで一晩浸し、ＣＵＢＩＣ－２溶液に入れ、４℃で１週間インキュベートした。ＣＵＢＩＣ-１及びＣＵＢＩＣ-２の組成は、Susaki et al., Cell. 2014 Apr 24;157(3):726-39に記載の通りである。具体的に、CUBIC-１溶液は、N,N,N’,N’-テトラキス(2-ヒドロキシプロピル)エチレンジアミン、ＴｒｉｔｏｎＸ－１００、及び尿素を含む溶液であり、CUBIC-2溶液は、2,2’,2’’-ニトリロトリエタノール、ＴｒｉｔｏｎＸ－１００、及びスクロースを含む溶液である。

[0039] ＳｃａｌｅまたはＦｏｃｕｓＣｌｅａｒを用いた透明化処理

５ｍｍ角のヒト皮膚切片を４％パラホルムアルデヒド（ＰＦＡ）中で４℃にて固定した。固定後ＰＢＳで３回洗浄した後、一次抗体中で４℃で７日間浸透させ、ＰＢＳＴで３日間洗浄し、二次抗体で４℃で７日間浸透させた。ＰＢＳＴで洗浄した後、Ｆｏｃｕｓ Ｃｌｅａｒ（販売元：ＣＥＤＡＲＬＡＮＥ）又はＳｃａｌｅ（販売元：オリンパス社）で４℃で７～１４ 日間浸透させた。

[0040] ｉＤＩＳＣＯを用いた透明化処理

５ｍｍ角の皮膚サンプルを４％ＰＦＡで固定した。ＰＢＳで３回洗浄した。５％Ｔｒｉｔｏｎ ２．５％Ｔｗｅｅｎ２０のＰＢＳ溶液中で振とうした後、ＰＢＳで３回洗浄した。そののち、Ｐｅｒｍ Ｂｌｏｃｋ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（０．５ｇＢＳＡ、５０μｌ Ｔｗｅｅｎ２０、３００μｌの５％アジ化ナトリウムを入れたＰＢＳ溶液５０ｍｌ）中で振とうさせた。続いて、一次抗体を含む溶液中で３７℃、３日間振とうさせ、ＰＢＳＴ（０．１％Ｔｗｅｅｎ２０）で３日間洗浄した。二次抗体を含む溶液中で３７℃、３日間振とうさせたのち、ＰＢＳＴ（０．１％Ｔｗｅｅｎ２０）で３日間洗浄した。その後、５０％ＭｅＯＨ で３時間、７０％ＭｅＯＨで３時間、１００％ＭｅＯＨで一晩浸振とうさせた。最後に、ジクロロメタン（Ｓｉｇｍａ）で１５分間×２回振とうし、ジベンジルエーテル（Ｓｉｇｍａ） 中で一晩静

置した。

[0041] 皮膚サンプルとして、顔から取得された皮膚切片と、背中から取得された皮膚切片を用いた。酵素処理を行って、表皮を除去した皮膚サンプルと、酵素処理を行わず、表皮を残した皮膚サンプルを調製した。皮膚サンプルに対し、ｉＤＩＳＣＯ法による透明化処理を行った。透明化処理を行った後の試料を図２に示す。一次抗体としてＰＢＳで100倍希釈された抗ＣＤ３１ヒツジ抗体（販売元：Ｒ＆Ｄsystems）を用い、二次抗体としてＰＢＳで200倍希釈されたＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ５９４標識抗ヒツジＩｇＧ抗体（販売元：Invitrogen）を用いた。また共染色として、ＰＢＳで希釈されたＣｙ３標識抗αＳＭＡ抗体（販売元：Sigma）を用いて染色を行った。染色された皮膚試料をライトシート顕微鏡（製造元カールツァイス社）において観察した。表皮を残した皮膚サンプルにおいて、ＣＤ３１を可視化した写真を、図１に示す。表皮を除去した皮膚サンプル（背中から取得された皮膚切片と顔から取得された皮膚切片）について、ＣＤ３１を可視化した写真を図３（Ａ）及び図３（Ｂ）に示す。また、表皮を除去した皮膚サンプル（背中から取得された皮膚切片と顔から取得された皮膚切片）について、ＣＤ３１とαＳＭＡを可視化し、３次元構造を構築した写真を図４（Ａ）及び（Ｂ）に示す。

[0042] 透明度測定法

角層を除去された皮膚組織に対し、ＣＵＢＩＣ処理、ＦｏｃｕｓＣｌｅａｒ処理、Ｓｃａｌｅ処理、及びｉＤｉｓｃｏ処理をそれぞれ行った。透明処理を行った皮膚組織について透明度測定を、Tainaka et al., Cell. 2014 Nov 6;159(4):911-24を参照して改編して用いた。Ｈａｚｅ　ｍｅｔｅｒ（会社名：製品番号：）にて、ヒト皮膚組織のTd：拡散透過率Tt：全光線透過率を測定した。皮膚組織が試験片すべてを覆っていないので面積率（ｓ１）での補正を行い、皮膚組織の平行光線透過率（Ｔｐ）を算出した。具体的には、下記式：

Ｔｐ＝（Ｔｔ－（１－ｓ１）×α）／ｓ１－Ｔｄ/s1

｛式中、

Ｔｄは拡散透過率であり、

Ｔｔは全光線透過率であり、

ｓ１は皮膚組織の面積率であり、

αは、カバーガラスの全光線透過率（０．７７）であり、

Ｔｐは皮膚組織の平行光線透過率である}

で算出した。結果を図５に示す。

また、拡散透過率を全光線透過率で割ることによりＨａｚｅ（％）を計算した。

[0043] ヒト皮膚サンプル

ヒト皮膚サンプルを、ILSBIO LLC (Chestertown, MD)又は (Gakugeidai-Nishiguchi Clinic) から取得した。ILSBIO から取得されたアジア人の顔面及び背中の皮膚試料は全て、米国及び国際倫理ガイドラインに基づいて取得した。ＩＬＳＢＩＯプロトコールは、ヘルスアンドヒューマンサービス認証治験審査委員会 (Health and Human Services registered Institutional Review Board (IRB)) により承認されている。収集の前にインフォームドコンセントを得た。

[0044] また、学芸大西口クリニックから、日本人男性及び女性の目尻から、皮膚、輪状筋肉及び皮下脂肪組織が一体となった皮膚サンプルを取得した。これらの対象が、アトピー性皮膚炎や酒さを患っていないことを確認した。全てのサンプルを急速冷凍し、そして組織学的分析に供した。ヒト対象を含む全ての手法は、資生堂グローバルイノベーションセンターの治験審査委員会により承認されており、そして全ての対象に対して書面のインフォームドコンセントを得た。

[0045] 得られた皮膚サンプルを、上述の酵素処理工程に供し、角層を剥がした。角層が剥がされた皮膚サンプルを４％パラホルムアルデヒド（ＰＦＡ）中に浸漬することで固定した。

[0046] 透明化

[0047] 固定された顔面由来の皮膚サンプルを、Cubic、Focus Clear、BAAB、及びi

DISCO法に供し、透明化を行った。透明化された皮膚サンプルを撮影した（図６Ａ）。透明化された皮膚サンプルについて、上述の通り、光透過率を測定し、Ｈａｚｅ（％）を測定した。結果を図６Ｂに示す。

[0048] 免疫標識

皮膚、輪状筋肉及び皮下脂肪組織の多重標識

ＰＦＡ溶液で固定された皮膚、輪状筋肉及び皮下脂肪組織が一体となった皮膚サンプルをＰＢＳで洗浄し、ＰＢＳ中の０．５％ＴｒｉｔｏｎＸ－１００で透過処理し、次にＰＢＳ中の１％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００／０．５％Ｔｗｅｅｎ－２０とインキュベートした。３日間ブロッキング溶液とインキュベートした後に、試料をブロッキング溶液中の一次抗体と、３７℃で３日間インキュベートした。ここで、ＣＤ３１に対する抗ポリクローナルヒツジ抗体（(R&D systems, Minneapolis, MN)と、ＬＹＶＥ－１に対するポリクローナルウサギ抗体(Angiobio, San Diego, CA)，ペリリピンに対するポリクローナルモルモット抗体（Progen, Heidelberg, Germany）、又はジストロフィンに対するポリクローナルウサギ抗体（Santa Cruz biotechnology, Dallas, Texas)とを、一次抗体として用いた。ここで、抗ＣＤ３１抗体と抗ＬＹＶＥ１抗体で共標識を行った皮膚サンプル、抗ＣＤ３１抗体と抗ペリリピン抗体で共標識を行った皮膚サンプル、及び抗ＣＤ３１抗体と抗ジストロフィン抗体で共標識を行った皮膚サンプルを得た。これらの共標識を行った皮膚サンプルをＰＢＳ－Ｔで二日間洗浄し、そして次にブロッキング溶液に希釈したＡｌｅｘａＦｌｕｏｒｏ５９４標識抗ヒツジＩｇＧ抗体（販売元：Invitrogen）、及びＡｌｅｘａＦｌｕｏｒｏ４８８標識抗ウサギＩｇＧ抗体又はＡｌｅｘａＦｌｕｏｒｏ４８８標識抗モルモットＩｇＧ抗体を二次抗体として、３７℃３日間インキュベートすることにより多重標識を行った。

[0049] 頬、目尻、及び背中由来の皮膚サンプルのCD31についての単標識

ＰＦＡ溶液で固定された頬、目尻、及び背中由来の皮膚サンプルをＰＢＳで洗浄し、ＰＢＳ中の０．５％ＴｒｉｔｏｎＸ－１００で透過処理し、次にＰＢＳ中の１％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００／０．５％Ｔｗｅｅｎ－２０とイ

ンキュベートした。３日間ブロッキング溶液とインキュベートした後に、試料をブロッキング溶液中の一次抗体と、３７℃で３日間インキュベートした。ここで、ＣＤ３１に対する抗ポリクローナルヒツジ抗体（(R&D systems, Minneapolis, MN)を一次抗体として用いた。試料をＰＢＳ－Ｔで二日間洗浄し、そして次にブロッキング溶液に希釈したＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ５９４標識抗ヒツジＩｇＧ抗体（販売元：Invitrogen）を二次抗体として、３７℃３日間インキュベートすることにより単標識を行った。

[0050] 免疫標識後のサンプルを上述の通りｉＤＩＳＣＯ法に供し、透明化を行った。透明化された皮膚サンプルを、顕微鏡及びイメージング分析に供した。

[0051] 顕微鏡及びイメージング分析

免疫標識を行った皮膚サンプルについて、光シート蛍光顕微鏡（Lightsheet microscopy Z.1, Carl Zeiss, Germany)を用いて画像を取得した。最大プロジェクションを、ソフトウェアZen (Carl Zeiss)を用いて行った。Imarisソフトウェア（Bitplane, Concord, MA）を3D用に用いた。抗ＣＤ３１抗体と抗ＬＹＶＥ１抗体で共標識を行った皮膚サンプルについては、皮膚の領域、抗ＣＤ３１抗体と抗ペリリピン抗体で共標識を行った皮膚サンプルについては、皮下組織の領域、及び抗ＣＤ３１抗体と抗ジストロフィン抗体で共標識を行った皮膚サンプルについては筋肉層の領域について、CD31と、LYVE1, Perilipin、Dystrophinとをそれぞれ可視化して３次元画像を取得した（図７）。

[0052] 頬、目尻及び背中の皮膚を、２の年齢群、すなわち「若い群（頬の皮膚については、平均年齢２０．８±４．８歳、年齢範囲１８～２９歳、ｎ＝４；目尻の皮膚については、平均年齢２０．５±５．４歳、年齢範囲１２～２７歳、ｎ＝４；背中の皮膚について平均年齢１９．３±６．４歳、年齢範囲１８～２０歳、ｎ＝３）」、並びに「年老いた群（頬の皮膚について平均年齢46.3±２．２歳、年齢範囲４５－５０歳；目尻の皮膚について平均年齢５１．３±９．７歳、年齢範囲３５－６１歳、ｎ＝４：背中の皮膚について平均年齢４４．３±４．１歳、年齢範囲３９－４９歳、ｎ＝３）に分けた。これら

の対象の頬、目尻、背中の皮膚における血管を、上述の抗ＣＤ３１抗体を用いた標識により可視化して撮影を行った(図８）。形態的３次元分析を、既報（非特許文献４：Bise R, Sato I, Kajiya K, et al. (2016) 3D Structure Modeling of Dense Capillaries by Multi-Objects Tracking. Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition Workshops:29-37）の通りに行い、画像から、血管の体積、サイズ及び毛細血管の分枝数を測定した（図９）。

[0053] 統計分析

全ての統計を平均±SDで示した。ANOVAを用い、続いてPosthock検定を使用して、統計分析を行った。対照群と、複数群との比較における統計的有意差を評価するために、Tukey検定、次にBartlett検定を用いた。$P<0.05$を有意差とした。