

|              |   |
|--------------|---|
| Title        | 鶏胚皮膚細胞の体外における再合成と分化   |
| Author(s)    | 喜多野, 征夫   |
| Citation     |   |
| Issue Date   |   |
| Text Version | none  |
| URL          | <a href="http://hdl.handle.net/11094/29111">http://hdl.handle.net/11094/29111</a> |
| DOI          |   |
| rights       |   |
| Note         |   |

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

## 【 17 】

|         |  |
|---------|--|
| 氏名・(本籍) | 喜 多 野 征 夫<br>き た の ゆき お                                |
| 学位の種類   | 医 学 博 士  |
| 学位記番号   | 第 1 1 5 2 号  |
| 学位授与の日付 | 昭 和 4 2 年 3 月 2 8 日                                    |
| 学位授与の要件 | 医 学 研 究 科 内 科 系<br>学位規則第 5 条第 1 項該当                    |
| 学位論文題目  | 鶏胚皮膚細胞の体外における再合成と分化                                    |
| 論文審査委員  | (主査)<br>教 授 藤 浪 得 二<br>(副査)<br>教 授 吉 川 秀 男 教 授 清 水 信 夫 |

## 論 文 内 容 の 要 旨

## 〔目 的〕

皮膚組織を構成する細胞が未成熟の場合には、いろいろの分化過程を示すことが知られている。本実験では皮膚の未成熟な細胞を *in vitro* で予め単細胞に遊離せしめ、この単細胞を旋回培養法により体外培養して得られる再合成組織中で皮膚細胞の示す分化過程を形態的に究明するのが目的である。ことに、表皮細胞の分化で最も重要である角化現象に重点をおき、未熟表皮細胞の組織への再構成能やその分化過程の形態、また結合細胞との関係を検討し、本過程に対するホルモンやビタミンの影響、並びに、併置条件下における他種の細胞との関連性につき考究した。

## 〔方 法〕

1. 材料：9日目鶏胚背部の皮膚を、CaとMgとを含まないTyrode液で洗い、次いで0.02%EDTAで洗って、十分にCa<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>を除去して、1%トリプシン中で、37°C, 30分間 incubateした。トリプシン処理した皮膚片を培養液中で10回位軽く pipetting して得た細胞浮游液をレンズ紙3枚を通して濾過して、十分に分散されていない細胞塊を除去して、ほぼ単細胞から成る細胞浮游液を得た。

2. 培養法：細胞浮游液を Erlenmeyer フラスコに分注して、これを直径 3/4 inch, 70 rpm で平面上を円運動する旋回培養器上におき、37°C で培養した。

3. 培養液：Eagle 基本培養基に牛血清を10%加えたものを用いた。thyroxine と vitamin A はエタノールにそれぞれ 400 μg/ml, 20,000 IU/ml の濃度で溶解して保存溶液とし、これを培養液に添加して、最終濃度をそれぞれ 1.0~0.02 μg/ml, 20~5 IU/ml になるようにした。

HeLa 細胞は予め乳アルブミン水解物を1%加えた Earle 液に牛血清を10%添加した培養液で静置培養したもので、これをトリプシンで処理して分散し、旋回培養に移した。旋回培養には鶏胚皮膚細胞と同じ培養液を用いた。

4. 顕微鏡写真を撮り, cell aggregateの大きさを測定した。組織学的検索には, Bouin液で固定し, パラフィン包埋, 切片を作成して染色した。

(成 績)

### 1. 鶏胚皮膚細胞の aggregate

旋回培養開始後1時間で, 細胞はゆるく結合し, 3時間目には既に不整な形の aggregateを形成している。しかし aggregate 中での表皮細胞と真皮細胞の分離はまだ見られない。12時間目には aggregate は球形になり, 平均直径は 0.15 mm である。この頃には表皮細胞と真皮細胞はそれぞれ集団を形成し, 表皮細胞集団が真皮細胞に包み込まれるように位置する。やがてそれらの間に PAS 染色で示される基底膜が形成される。表皮細胞は互に密に接合し, 方形或いは多角形を呈しているが, 真皮細胞間の結合は疎で紡錘形を呈する。培養3日目には表皮細胞はその位置によって異なった形態を呈する。即ち基底膜に接している細胞は, いわゆる基底細胞の形態を保っているが, 表皮細胞集団の中央部の細胞は扁平化し, 棘細胞層上層の細胞と同様の形態を示す。表皮細胞集団の中央部には屢々囊胞様の空隙が見られる。4ないし5日目には表皮細胞集団の中央部に角層が形成される。時には表皮細胞集団が aggregate の表面に突出していることがあるが, この場合には角層は突出した表面に形成される。即ち, 角層の形成は常に真皮から最も離れた部分で起る。また表皮細胞だけから成る aggregate では角層は表面に形成され, 角層の形成は促進される。長期間培養すると dermal condensation が起り, 羽根原基の形成が認められる。

### 2. 皮膚細胞 aggregate に対する thyroxine と vitamin A の影響

thyroxine は表皮細胞の角化を促進する。この作用は 0.02  $\mu\text{g/ml}$  の濃度においても認められる。次いで thyroxine を培養開始後それぞれ24, 48, 72, 96時間目に, 0.1  $\mu\text{g/ml}$  の濃度に添加して, 24時間作用させた試料について120時間目の角質形成率を組織切片で比較すると, 早期に thyroxine 処理を行なったものほど, 角質形成が多く見られた(表1)。thyroxine は aggregate の形成過程にも影響を及ぼす。即ち aggregate は大小不同となり, 特に 0.1 mm 以下の小型の aggregate が増加する。

vitamin A は 5 IU/ml の濃度で角化を完全に阻止した。

表1 皮膚細胞 aggregate の角化に対する thyroxine (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ) の影響。(数字は組織切片において角層形成を認めた表皮細胞塊数の全表皮細胞塊数に対する比率の平均と標準偏差を示す)。

|                 |          |                     |
|-----------------|----------|---------------------|
| 対 照             |          | 22.72 $\pm$ 5.14(%) |
| 0.1% ethanol 処理 |          | 20.17 $\pm$ 5.04    |
| thyroxine 処理    | 24—26時間  | 18.41 $\pm$ 5.70    |
| thyroxine 処理    | 24—48時間  | 33.13 $\pm$ 7.55    |
| thyroxine 処理    | 48—72時間  | 30.06 $\pm$ 5.88    |
| thyroxine 処理    | 72—96時間  | 26.77 $\pm$ 6.88    |
| thyroxine 処理    | 96—120時間 | 23.42 $\pm$ 7.20    |

### 3. 皮膚細胞と HeLa 細胞との混合 aggregate

皮膚細胞と HeLa細胞との混合浮游液を旋回培養すると混合 aggregateが形成される。混合 aggregate 中で, 表皮細胞は集団を形成し, その周辺を真皮細胞が取巻いている。

HeLa 細胞間の結合は疎で、その間に屢々紡錘形の真皮細胞が混在している。表皮細胞は皮膚細胞 aggregate におけると同様の分化過程をたどり、5 日目には角層を形成する。羽根原基形成も屢々認められる。HeLa 細胞単独の aggregate では島状の壊死巣が屢々認められるが、混合 aggregate では HeLa 細胞の壊死巣は少なく、小型である。即ち HeLa 細胞は皮膚細胞の分化に対して影響を及ぼさない。皮膚細胞、特に真皮細胞は HeLa 細胞の生存に対して良好に影響すると結論出来る所見を得た。

〔総括〕

9 日目鶏胚からトリプシン処理して得た游離皮膚細胞を旋回培養して cell aggregate を形成した。aggregate 中で 24 時間以内に表皮細胞と真皮細胞が分離して、表皮細胞の集団が真皮細胞に包み込まれるように位置する。表皮細胞と真皮細胞の間には基底膜が形成される。さらに培養を続けると aggregate の分化が進行し、角質形成が起り、羽根原基の形成も見られる。角質形成は常に真皮細胞から最も離れた部分で始まる。

thyroxine は表皮細胞の角化を促進し、vitamin A は角化を阻止する。thyroxine は角質形成の初期の段階に作用する。さらに皮膚細胞 aggregate の形成過程に作用させると thyroxine は aggregate の大小不同を生じ、特に小型の aggregate の数を増加せしめる。

皮膚細胞の aggregation に対する他種の細胞の影響を見るため、HeLa 細胞との混合 aggregate を形成した。表皮細胞の組織再構成に対して HeLa 細胞の存在は何等の影響も与えないが、HeLa 細胞と真皮細胞との関係は、表皮細胞と真皮細胞との関係と異なり、真皮細胞中に HeLa 細胞が比較的浸潤性に混在している。

## 論文の審査結果の要旨

表皮の角化現象は、皮膚が身体を外界から保護するという機能を行なう上で、最も重要な現象である。本論文は *in vitro* において未分化な鶏胚皮膚より得た単細胞から再構成した組織 (cell aggregate) を用いて、角化現象に及ぼす種々の因子の影響について研究したものである。即ち 9 日目鶏胚皮膚よりトリプシン処理によって得た単細胞浮游液を旋回培養すると、24 時間以内に cell aggregate が形成され、その内部で表皮細胞と真皮細胞が分離し、表皮細胞の集団は真皮細胞に包み込まれるように位置する。さらに培養を続けると、表皮細胞の分化が起り、角質が表皮細胞集団の中央部に形成される。真皮に接している表皮細胞は角化しない。表皮細胞だけから成る aggregate では角化が非常に早く起る。この事より、真皮細胞が表皮細胞の角化に対して抑制的に働くと考えられる。さらに角化現象に対する各種ホルモンの作用を検討し、thyroxine に著明な角化促進作用を認めている。thyroxine 処理の時間を変えることにより、thyroxine は角化現象の初期の段階に作用すると推定している。皮膚細胞と HeLa 細胞との混合 aggregate においては、表皮細胞は皮膚細胞単独の aggregate におけると同様に角化する。

皮膚の体外培養については、器官培養や単層培養により多くの研究がなされているが、本研究は *Moscona* により考案された旋回培養法により、単細胞浮游液から同時に、多数の比較的等しい大き

さと、同じ組織構造を持った cell aggregate を作成し、これを用いて角化現象を中心とした皮膚生理の解明を行なったものである。Eagle 基本培養基に10%牛血清を添加した比較的単純な培養基中で、cell aggregate に正常な皮膚組織分化が観察され、長期間良好な状態で培養出来ることは、この cell aggregate が従来の器官培養や単層培養に比較して秀れた面を持つ実験材料であることを示すものである。

従って、本研究は皮膚生理の解明に寄与する所大であり、かつ cell aggregate の新しい応用分野を示した点でも興味があり、今後の研究発展が期待される。