

ヒト癭痕組織 (肥厚性癭痕・ケロイド) 由来線維芽細胞の I 型コラーゲン・ゲル上およびゲル内培養系における検討

佐原慶一郎

コラーゲンを基質として用いる培養法は、細胞形態等が生体内に近くなり、細胞-コラーゲン相互作用をみる上で良い実験系と考えられる。本研究では、外科的手術時に得られた正常皮膚、肥厚性癭痕およびケロイドより線維芽細胞を遊出し、ゲル培養法による比較検討を行った。

コラーゲン・ゲル上、ゲル内培養では、正常真皮線維芽細胞の増殖は著しく抑制された。一方、ケロイド由来線維芽細胞では、プラスチック上に比べて抑制されてはいるものの、ゲル内でもなお強い増殖性を示した。コラーゲン・ゲル収縮を用いた比較では、ケロイド由来線維芽細胞の収縮力が最も強かった。

コラーゲン・ゲル収縮を抑制する薬剤の検討として、 $\text{IFN}\alpha-2b$ を用いた実験を行った。ケロイド由来線維芽細胞のゲル収縮状態は、 $\text{IFN}\alpha-2b$ (1000IU/ml) により正常真皮由来線維芽細胞のレベルにまで抑制された。

最後に平滑筋作用薬剤のコラーゲン・ゲル収縮に対する効果を検討した。各種線維芽細胞によるコラーゲン・ゲル収縮が平滑筋弛緩薬 (PGE_1 , Papaverine) により抑制された。このことは、培養線維芽細胞が平滑筋的収縮能を有することを示唆するものと考えられる。

(平成 8 年 10 月 1 日採用)

Contraction Phenomenon of Type I Collagen Lattices by Human Fibroblasts Isolated from Hypertrophic Scars and Keloids

Keiichiro SAHARA

An in vitro model of dermis was reconstituted by introducing fibroblasts either on or into the type I collagen lattice. The model was maintained in culture to investigate the cellular behaviors of human dermal fibroblasts and proliferative scar fibroblasts. Growth was suppressed on the third to seventh days of culture both on and in the collagen lattice and was compared with that on ordinal plastic.

To investigate the effects of various drugs on fibroblasts isolated from hypertrophic scars and keloids under a condition resembling those in vivo, we also cultured fibroblasts either on or in gels and evaluated the effects of $\text{IFN}\alpha-2b$, smooth-muscle affecting drugs (PGE_1 , Papaverine). The degree of gel contraction was compared

with that of normal dermal fibroblasts obtained from the same patients. The contraction in the keloid fibroblasts was invariably greater than that in the normal dermal fibroblasts. The contraction obtained in the IFN-treated keloid group did not differ from that observed in the untreated normal dermal fibroblast group. The overall mean collagen gel areas for these groups were similar. The smooth muscle relaxants (PGE₁, Papaverine) used in this experiment exerted a suppressive effect on the gel contraction, suggesting that contraction of the gel is due to the smooth muscle cell-like properties of cultured fibroblasts. (Accepted on October 1, 1996) *Kawasaki Igakkaishi* 22(3): 183-196, 1996

Key Words ① Fibroblast ② Hypertrophic scar ③ Keloid
④ Collagen gel contraction ⑤ IFN α -2b

はじめに

創傷治癒過程において何らかの要因による局所代謝異常が起これば、肥厚性瘢痕やケロイドが形成される。ケロイドは線維芽細胞由来の良性腫瘍とされているが、治療に抵抗し再発しやすいことより、その経過は必ずしも良性とは言い難い。これらの形成には、線維芽細胞による創収縮 (wound contraction) と線維芽細胞の増殖が重要な役割を果たしていると考えられている。

線維芽細胞の増殖や働きについては、従来プラスチック上での単層培養線維芽細胞による解析がなされてきた。しかし、実際 *in vivo* においては線維芽細胞単独では存在せず、その周囲にはコラーゲン等の間質が常に存在している。線維芽細胞をコラーゲン・ゲル中で培養すると、細胞は形態を変えてコラーゲン線維を再構成するために引き寄せ、やがて細胞を含むゲルの構造が真皮と非常に似るようになる (再構成真皮モデル)^{1),2)}。

単層培養線維芽細胞を用いた各種薬剤の効果に関する報告や、肉芽組織由来線維芽細胞によるコラーゲン・ゲル培養実験の報告³⁾はあるが、再構成真皮モデルを用いて肥厚性瘢痕とケロイドを比較検討した報告はきわめて少ない。

本研究では、線維芽細胞とコラーゲンとの相互作用が、肥厚性瘢痕やケロイドにおいても観

察されるか否かを明らかにするために、それぞれの線維芽細胞を用いて、コラーゲン・ゲル収縮能ならびにコラーゲンによる細胞増殖抑制作用について検討した。さらに、平滑筋作用薬剤のゲル収縮への作用をみることで、培養線維芽細胞が、平滑筋の薬理作用を示すかどうかを検討した。

臨床上創収縮のコントロールは、瘢痕拘縮の治療や肥厚性瘢痕およびケロイド発生の予防につながると考えられる。そこで、細胞障害性なしにコラーゲン産生抑制作用を有する Interferon (IFN) を用いて、コラーゲン・ゲル収縮の抑制実験を行った。

線維芽細胞と細胞外基質 (以下 ECM) の相互作用を解析することは、創傷治癒や肥厚性瘢痕・ケロイドの発生機序を解明するうえで重要なことと考えられる。

材料および方法

1. 瘢痕組織の採取

手術時に採取した肥厚性瘢痕 (6 例)、ケロイド (4 例) ならびに同一症例より切除した正常皮膚 (8 例) を用いた。このうち肥厚性瘢痕とケロイドはもっとも隆起した部分を材料とした。正常皮膚は切除瘢痕組織周囲の皮膚で、瘢痕から最も離れた部分を用いた。なお、肥厚性瘢痕とケロイドは増大傾向の違いにより区別した。すなわち、増大傾向がなく、一部に消退の徴候が

みられるものを肥厚性癍痕とし、自然消退せず徐々に増大しているものをケロイドとした。年齢は10歳から49歳(男性3例, 女性7例)で, 経過期間は, 1年2カ月から10年5カ月である。採取部位は, 耳垂部, 前胸部, 腹部, 肩, 上肢, 下肢と多岐にわたっている(**Table 1**)(**Fig. 1**)。

2. 線維芽細胞の培養法

線維芽細胞は, ヒト正常真皮, 肥厚性癍痕, ケロイドより Explant 法にて初代培養した。培養液は, 抗生物質 (100units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin)を加えた Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) に10%胎児牛血清 (FBS) を混合させて使用した。培養は37°C, 5% CO₂ インキュベーター内で行い, 培地交換は3~4日ごとに行い継代維持した。加齢による影響を抑えるために, 継代数4~10の細胞を用いて実験を行った。なお, 細胞形態は, 位相差顕微鏡にて観察した。

3. コラーゲン・ゲルの作製

Elsdale and Bard⁴⁾の方法に従い, コラーゲンはペプシン処理 I 型コラーゲン(ブタ腱由来, 新田ゼラチン製, Japan)を用いた。培地には

DMEM を使用し, これに加える FBS 濃度は10%になるように調整した。次に, 各線維芽細胞を PBS (PH7.4, 0.02% EDTA, 0.1%トリプシンを含む) 溶液で処理して細胞分散液を作った。

ゲル内培養の場合には, コラーゲン溶液と, DMEM 培地 (10% FBS を含む) および細胞分散液を最終コラーゲン濃度が1.5mg/ml, 細胞数が 1×10^5 個/ml になるように混合し, 1 ml ずつ直径35mm の bacteriological dish (Falcon 社, Japan)に注入した。直ちに37°C, 5% CO₂ インキュベーター内に移し培養すると, 約10分間でゲル化した。ゲル化後さらに培地を1 ml 重層した。それから約3時間後にゲルをディッシュから愛護的に剥がし浮遊状態にした。

ゲル上培養の場合には, 上記と同様にして細胞分散液を含まないコラーゲン・ゲルを作製し, ゲル化直後に 1×10^5 個/ml の細胞をゲル上に播種し培養した。培地は2日毎に交換した。

4. コラーゲン・ゲル収縮の測定

線維芽細胞を含んだゲルは, 培養液中に浮遊しており, 収縮する様子が肉眼で観察できる。コラーゲン, ゲルはほぼ円形のまま均一に収縮し

Table 1. Cases of proliferative scars

Case	Age · Sex	Scar	Site	Cause	Passage
1	14y M	HTS	abdomen	ope.	2y5m
2	21y F	HTS	knee	trauma	1y2m
3	29y F	HTS	abdomen	ope.	1y8m
4	10y M	HTS	chest	trauma	3y5m
5	49y M	HTS	elbow	trauma	1y5m
6	36y F	HTS	abdomen	ope.	2y2m
7	38y F	KL	shoulder	trauma	10y5m
8	37y F	KL	abdomen	ope.	8y5m
9	25y F	KL	ear	pierce	2y5m
10	24y F	KL	abdomen	ope	5y5m

HTS : Hypertrophic scar

KL : Keloid

ope : operation

passage : period from injury to scar revision

y=year, m=month

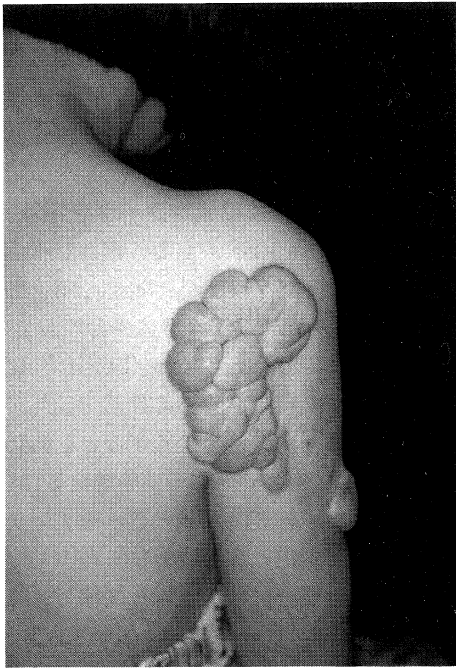


Fig. 1. Example of severe keloid scarring on the right upper arm and shoulder of a 38-year-old female

ていくので、最大直径と最小直径の平均をもってゲルの直径とし算出する方法もあるが、今回は収縮したゲルの輪郭を OHP フィルムにトレースし、パーソナルコンピューター(アップル社, USA) を用いてその面積を算出した⁵⁾。

5. 細胞増殖度の測定

コラーゲン・ゲル上及びゲル内での細胞数の測定は、細切したゲルをコラゲナーゼ(4 mg/ml, Sigma 社製, USA)で37°C, 1時間インキュベーション後遊離した細胞を回収し、血算盤にて算定した。

6. 実験

1) 正常皮膚、肥厚性瘢痕及びケロイド由来線維芽細胞の通常培養下での比較

培養細胞の形態の変化を位相差顕微鏡を用いて観察した。

2) コラーゲンの細胞増殖に与える影響の検討

正常皮膚、肥厚性瘢痕及びケロイドより得られた線維芽細胞を下記 i) ~ iii) の各々のグ

ループで培養を行い細胞増殖度の測定を行った。

i) プラスチックディッシュ上培養

ii) コラーゲン・ゲル上培養

iii) コラーゲン・ゲル内培養

3) コラーゲン・ゲルを用いた各細胞の収縮力の比較

正常皮膚、肥厚性瘢痕及びケロイド由来線維芽細胞のゲル上培養における収縮力の比較を行った。

4) コラーゲン・ゲル収縮を抑制する薬剤の検討

培養液中に、IFN α -2b (10IU, 100IU, 1000 IU/ml, Schering Co., USA) を加えゲル上培養して各線維芽細胞によるゲル収縮状態を比較した。

5) コラーゲン・ゲル収縮に対する平滑筋作用薬剤の作用

筋弛緩薬として PGE₁, Papaverine を培養液中に添加し、前述の条件下でゲル上培養を行った。

7. データ解析

各グループにおける比較は、Duncan's range test にて行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

結 果

1. 培養細胞の形態

初代培養において、正常真皮由来線維芽細胞では最初3日間は球状を呈し、細胞質の伸展は認められなかった (Fig. 2(a))。その後細胞質の伸展が見られるようになり、5日目頃にはほとんどが紡錘形となった (Fig. 2(b))。これに対し、ケロイド由来線維芽細胞では、1日目より紡錘形を呈するようになり、細胞質の伸展が認められた (Fig. 2(d))。

sparse な状態では、両者の間に形態的な差は認められなかった。一方、confluent な状態では、正常真皮由来線維芽細胞が単層で均一になるのに対して (Fig. 2(c))、ケロイド由来線維芽細胞では、細胞密度が密な部分と疎な部分が混在し、その結果いわゆる hills and valleys 様の形

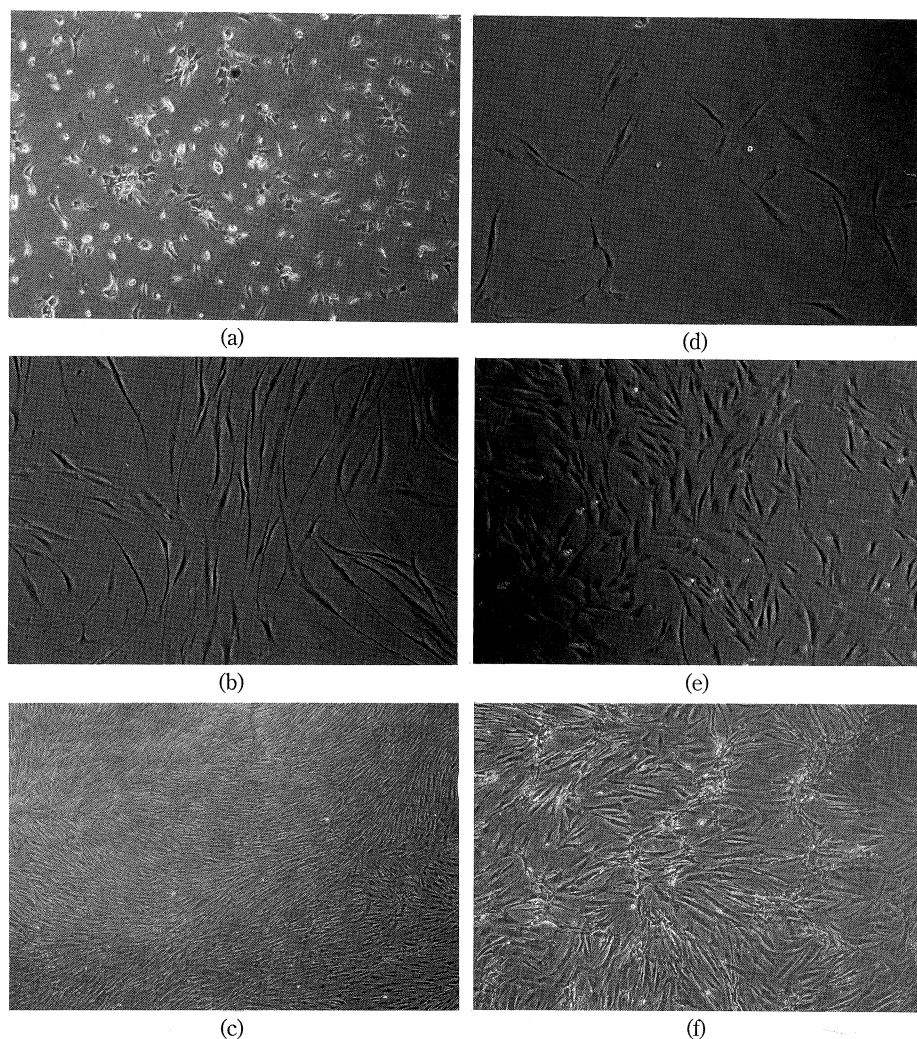


Fig. 2. Comparison of human dermal fibroblasts and keloid derived fibroblasts in the primary culture. Photographs (a)~(c) show human dermal fibroblasts, and photographs (d)~(f) show keloid fibroblasts.

Photographs (a) and (d) were taken at one day, (b) and (e) at five days, (c) and (f) at fourteen days of culture.

(a), (c), (f) : ($\times 40$), (b), (d), (e) : ($\times 100$)

態を呈した(**Fig. 2(f)**).

2. コラーゲンの細胞増殖に与える影響

プラスチック上, コラーゲン・ゲル上及びゲル内で各線維芽細胞を培養し, その増殖曲線(**Fig. 3**)より細胞倍加時間を算出した. 細胞倍加時間の逆数が細胞増殖度に対応するので, 次式よりプラスチック上での細胞倍加時間を基準として, 増殖抑制指数を求めた⁶⁾ (**Table 2**).

増殖抑制指数 = [プラスチック上での細胞倍加時間] / [他の条件下での細胞倍加時間]

正常真皮線維芽細胞は, プラスチック上に比べて, ゲル上では増殖が著明に(約57%)抑制された. すなわち細胞倍加時間の延長と細胞飽和密度の低下が認められた. ゲル内ではさらに抑制され, 5日目以降の増殖はほとんど認められなくなった. 肥厚性瘢痕由来芽細胞では, プ

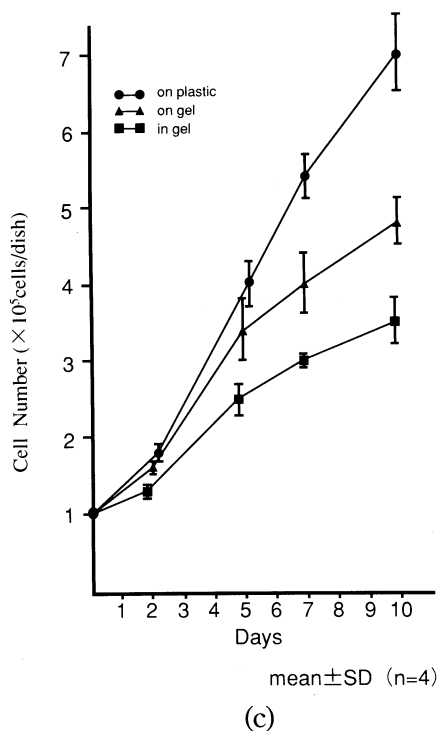
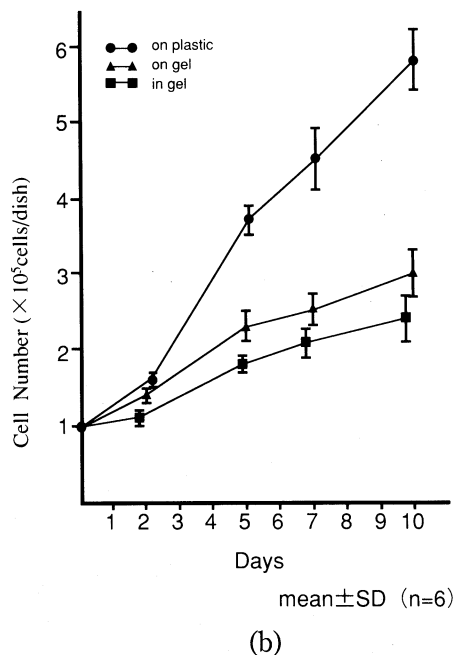
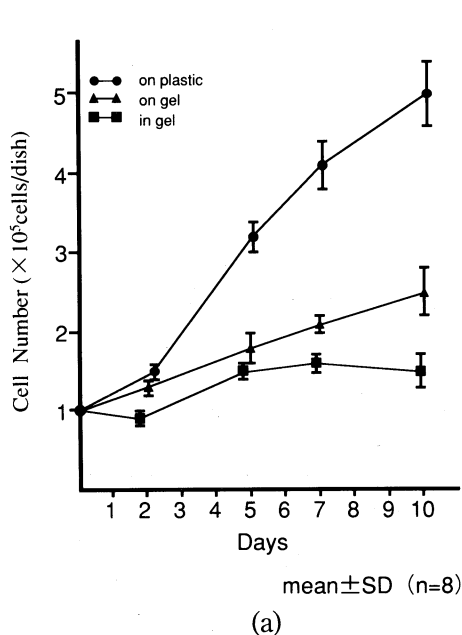


Fig. 3. Time-course of the growth of (a) human dermal fibroblasts, (b) hypertrophic scar derived fibroblasts, (c) keloid derived fibroblasts cultured on plastic (●), on gel (▲), or in gel (■)

べて抑制されているものの、ゲル上、ゲル内でもなお強い増殖性を示した。

3. コラーゲン・ゲル収縮

コラーゲン・ゲルは、ラグ期の後、速やかに収縮を開始し、培地中に浮遊した (Fig. 4)。

Figure 5 に正常真皮線維芽細胞、肥厚性瘢痕及びケロイド由来線維芽細胞によるコラーゲン・ゲル収縮の経時的変化を示した。ケロイド群では、培養72時間目において、 $72 \pm 4\%$ と非常に強い収縮を認めた(他群と $p < 0.05$ で有意差あり)。

4. IFN α -2b の効果

Figure 6 に IFN α -2b (1000IU/ml) を添加した場合の各線維芽細胞によるゲル収縮の経時的変化を示した。全ての線維芽細胞において、IFN 投与群はゲル収縮が著しく抑制された(非

ラスチック上に比べてゲル上で約35%抑制され、ゲル内では約60%抑制された。一方、ケロイド由来線維芽細胞の増殖は、プラスチック上に比

Table 2. Index for growth repression by collagen
HTS : Hypertrophic scar

Cell	Index for growth repression		
	on plastic	on gel	in gel
Human fibroblast	1.0	0.43	0.37
HTS fibroblast	1.0	0.66	0.40
Keloid fibroblast	1.0	0.86	0.63

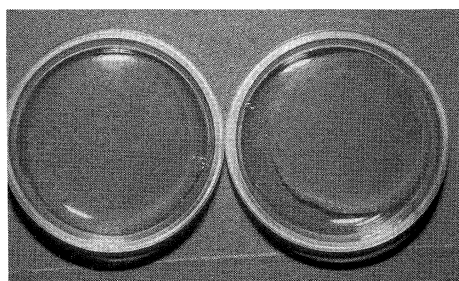


Fig. 4. Appearance of contracted collagen lattice

投与群と $p < 0.05$ で有意差あり). また IFN 投与群の各線維芽細胞間においてもそれぞれ有意差を認めた ($p < 0.05$). しかしながら, 各細胞における収縮抑制率に有意差は認められなかった ($p > 0.05$) (**Fig. 7**).

IFN α -2b (1000IU/ml) を投与したケロイド由来線維芽細胞のゲル収縮曲線は, 正常線維芽細胞のコントロール群 (非投与群) に近い収縮状態を呈した (**Fig. 8**).

Figure 9 に示すように, 各細胞においてそれぞれ IFN α -2b の濃度依存性にゲル収縮が抑制された.

5. 平滑筋弛緩薬の効果

PGE₁ (**Fig. 10**) および Papaverine (**Fig. 11**) により, すべての線維芽細胞において濃度

依存性にコラーゲン・ゲル収縮が抑制された.

考 察

コラーゲンは, 組織内において線維化した状態で存在しているが, これは単独の形で存在しているのではなく, 他の物質が結合あるいは共存している. このように組織や器官は, 多種多様な物質及び細胞を含み非常に複雑であるため, コラーゲンに限らず ECM の生理的機能を調べるためには, 組織よりも単純な細胞培養系が不可欠と考えられる²⁾.

創傷治癒や肥厚性瘢痕, ケロイドなどの発生病理の研究において, 真皮線維芽細胞の増殖調節や増殖抑制 (停止) のメカニズムの解明は, 重要な問題である. このメカニズムに関しては, contact inhibition⁷⁾ や density-dependent inhibition⁸⁾ の説がある. しかし, in vivo において線維芽細胞は, コラーゲンなどの ECM に囲まれていて, 互いに接することはない為 contact inhibition の状況は適合しない. また, in vitro においても, 正常線維芽細胞は, confluent に達した後も多層化して増殖することが知られている⁹⁾. さらに, in vivo での線維芽細胞は, in vitro での confluent な状態よりもはるかに低密度で存

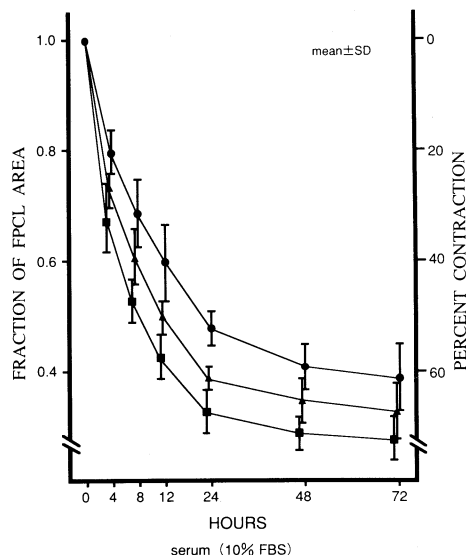


Fig. 5. Contraction of collagen lattices by human dermal fibroblasts (●) and fibroblasts isolated from hypertrophic scar (▲) and keloid (■). Contraction curves were significantly different ($p < 0.05$). FPCL: Fibroblast-populated collagen lattice

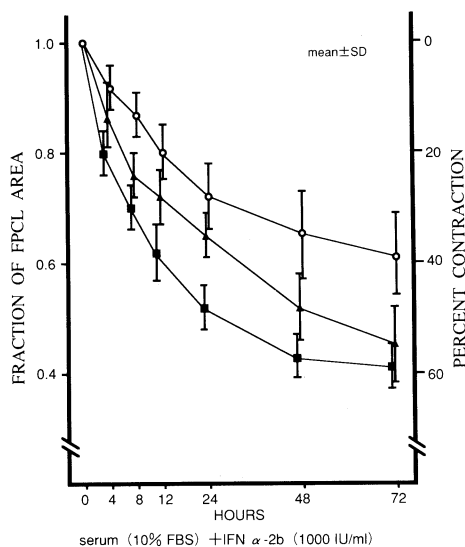


Fig. 6. Contraction of collagen lattices by all IFN-treated groups, human dermal fibroblasts (○), hypertrophic scar derived fibroblasts (▲), and keloid derived fibroblasts (■). Contraction curves were significantly different among IFN-treated groups ($p < 0.05$).

在しており、density-dependent inhibition の状態ともかなり異なっている。そこで、上記の説に基づかずに線維芽細胞の増殖を抑制(停止)させる方法が模索されてきた。最近コラーゲン・ゲルを基質として用いる培養法において、細胞の形態や増殖が、より in vivo に近くなり、通常の培養では見られなかった様々な分化機能が発現することがわかってきた^{4), 10), 11)}。

コラーゲン・ゲル培養は、もともと真皮を構成する主要細胞である線維芽細胞と ECM であるコラーゲンを用いて in vitro で真皮を創ろうという試みで、再構成真皮モデルと見なされつつある。さらに、ゲル培養では、線維芽細胞の増殖が著明に抑制されることも知られている^{11)~14)}。

1. コラーゲンと細胞の相互作用

今回の実験では、Figure 3 に示すように、ゲル上培養で線維芽細胞の増殖が抑制され、confluent に達する前に増殖が停止した。ゲル内培養ではさらに抑制され、5 日以内に増殖を停止す

ることがわかった。これらの結果は、Sarber ら¹²⁾の結果と一致する。

西山ら⁶⁾は、ヒト正常線維芽細胞の増殖度は、ゲル上のような二次元平面上では、コラーゲンによる抑制は受けないと報告しているが、前述のように著者らの実験では、ゲル上培養においても増殖抑制作用が認められた。

コラーゲンによる増殖抑制のメカニズムの一つとして、線維芽細胞がゲルを収縮させるために、細胞周囲のコラーゲン密度が高まり、細胞が物質的に封じ込められる可能性が挙げられる¹⁵⁾。しかし、ゲル上培養での増殖抑制は、物理的封じ込めだけでは説明がつかない。既に報告されているように、コラーゲンと接触することにより増殖が抑制(停止)されるメカニズムが存在することが考えられる^{13), 14)}。また、Folkman らによれば¹⁶⁾、ゲル上、ゲル内及び生体内では、線維芽細胞の形態が二極性紡錘形を呈することが報告されており、この形態が増殖抑制に関与している可能性がある。

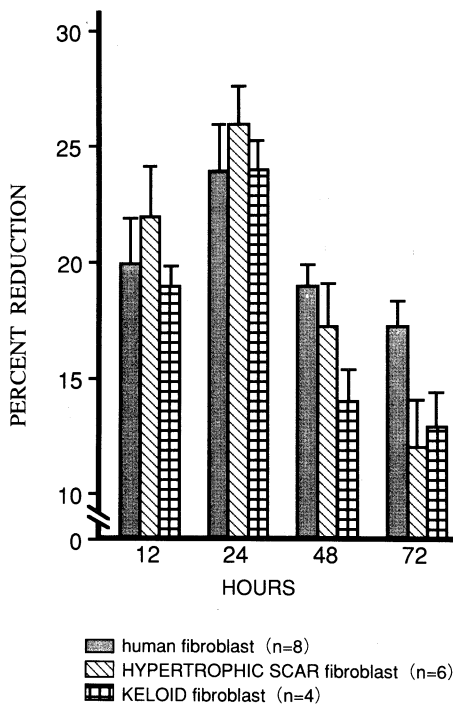


Fig. 7. IFN-induced reduction of FPCL contraction was not significant among groups ($p > 0.05$).

2. 細胞形態

本研究において、正常真皮線維芽細胞は、細胞質の伸展が3日目以降に始まるのに対して、ケロイド由来線維芽細胞では、1日目より細胞質の伸展が認められ、両者の性質に相違があることを示した。このことはケロイド由来線維芽細胞の方が、運動性の高いことを示唆している。また、今回 confluent な状態において観察されたケロイド由来線維芽細胞の細胞配列の乱れ (hills and valleys 様形態) は、Vande Berg ら^{17),18)}の所見と一致している。こうした特徴的な形態は、細胞同士が自らのもつ収縮力により引き寄せ合うために生じるものと考えられる。なお、正常真皮線維芽細胞と肥厚性瘢痕では、著明な差は認められなかった。

3. コラーゲン・ゲルの収縮能

線維芽細胞をコラーゲン・ゲル中で培養すると、コラーゲン線維に速やかに接着し、細胞形態は伸展し、その結果コラーゲン線維が再配列

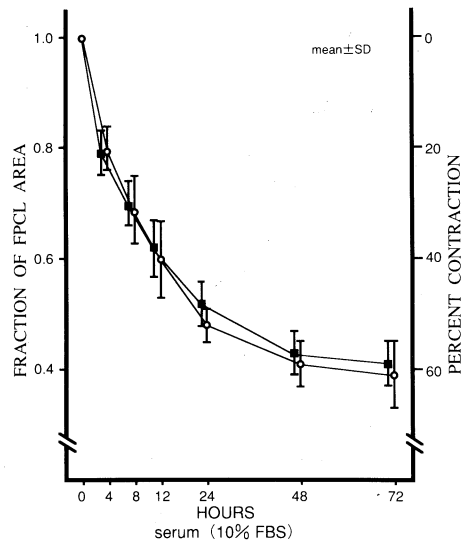
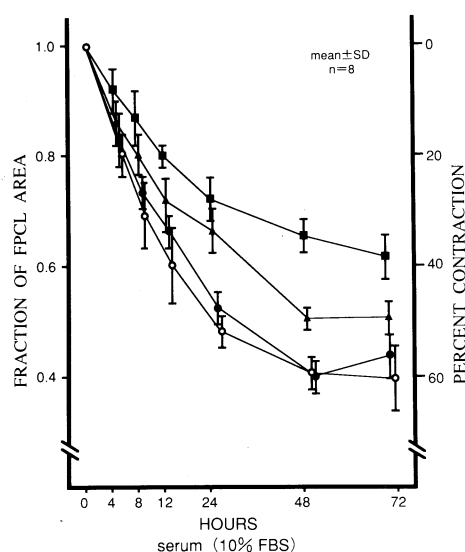


Fig. 8. IFN-treated ($\text{IFN}\alpha\text{-2b}$, 1000IU/ml) keloid fibroblast (■) showed similar contraction with normal human dermal fibroblast group (○), ($p < 0.05$).

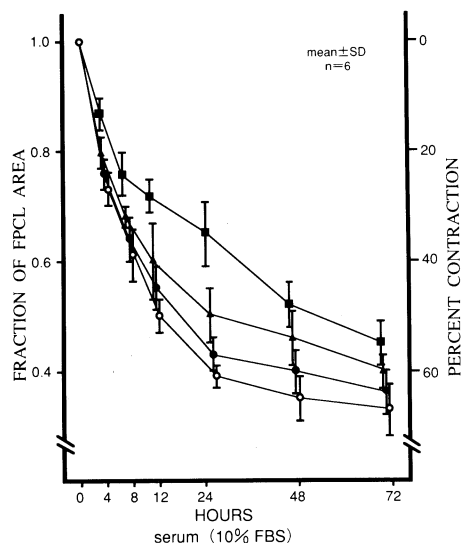
し、ゲルの収縮が起こる。ゲル収縮は、培養条件 (血清濃度、細胞数、コラーゲン濃度) に依存して進行することは、Bell ら¹⁹⁾により報告されている。また Montesano と Orci²⁰⁾の報告でも明らかのように、血清中に含まれる各種因子 (サイトカイン等) の作用によって線維芽細胞のゲル収縮能が刺激されると考えられる。本研究において増殖性瘢痕由来線維芽細胞の強い収縮能が証明された (ケロイド>肥厚性瘢痕 \geq 正常真皮)。Ehrlich²¹⁾は、ゲル収縮力の差について、ゲルを構成するコラーゲンの型の違いにその原因を求めているが、著者らの実験では、同一のゲル (type I collagen) を用いており、このことはそれぞれの細胞自体の収縮力に差があることを示している。

4. $\text{IFN}\alpha\text{-2b}$ の効果

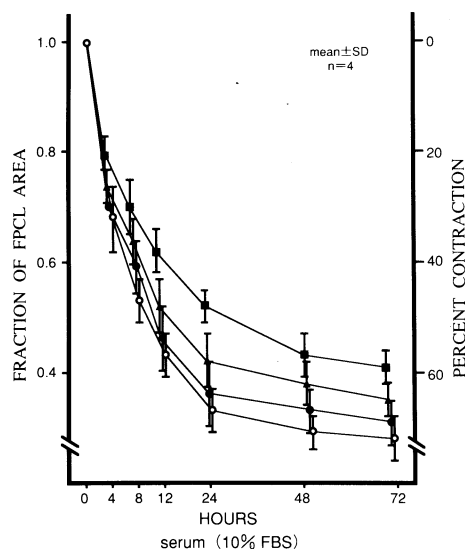
インターフェロン (IFN) は、抗ウイルス活性の他にも非常に多面的な作用を有することが知られている。また、コラーゲン産生抑制作用や線維芽細胞の走化性の抑制などの報告もある²²⁾。Berman と Duncan は²³⁾、 $\text{IFN}\alpha\text{-2b}$ を局所投



(a)



(b)



(c)

Fig. 9. Effect of IFN α -2b concentration on the contraction of collagen lattices by human dermal fibroblasts (a), hypertrophic scar derived fibroblasts (b), and keloid derived fibroblasts (c). Gels were incubated without (○: control) or with added IFN α -2b, at 10 IU/ml (●), 100 IU/ml (▲), and 1000 IU/ml (■).

down-regulatory growth factor として肥厚性癬痕やケロイドの治療薬になりうる可能性を示すものと考えられる。

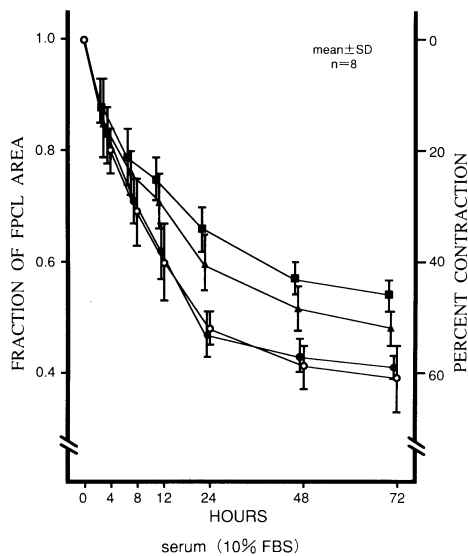
5. 平滑筋弛緩薬の作用

各線維芽細胞のコラーゲン・ゲル収縮が平滑筋弛緩薬により抑制されることを確認した。このことは、培養線維芽細胞が、平滑筋の収縮能を有することを示唆するものである。

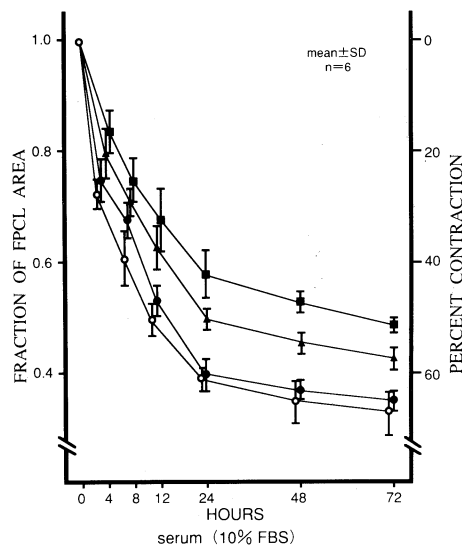
Gabbiani ら^{24)~26)} は、形態学的検討より筋線維芽細胞と称すべき線維芽細胞とは異なった性質を示す細胞の存在を指摘している。これに対し、Schurch ら²⁷⁾ や馬場²⁸⁾ は、筋線維芽細胞は何らかの原因により線維芽細胞が変化した移行形であると考えている。

真皮線維芽細胞と筋線維芽細胞とが、全く異なった細胞であるか、移行形であるかは、まだ不明な点が多く、さらなる検討を要する。

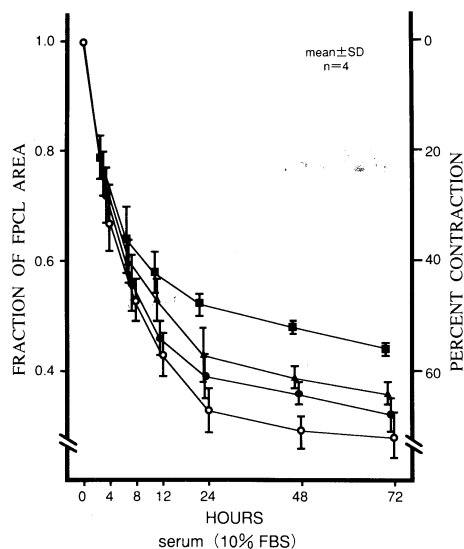
与し、ケロイドの縮小とケロイド由来線維芽細胞の collagen, glycosaminoglycan 及び collagenase 産生の正常化を認めている。本研究では、IFN α -2b が各線維芽細胞のゲル収縮を濃度依存的に抑制した。とくに、1000 IU/ml 投与したケロイド線維芽細胞の収縮状態は、正常線維芽細胞の収縮状態に近いという結果を得た。この濃度では、細胞自体への障害性は少ないと考えられる。これらのことより、IFN α -2b は、



(a)



(b)



(c)

Fig. 10. Effect of smooth muscle relaxant (PGE_1) concentration on the contraction of collagen lattice by human dermal fibroblasts (a), hypertrophic scar derived fibroblasts (b), and keloid derived fibroblasts (c).

Gels were incubated without (○: control) or with added PGE_1 at $0.01 \mu\text{g}/\text{ml}$ (●), $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ (▲), or $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ (■).

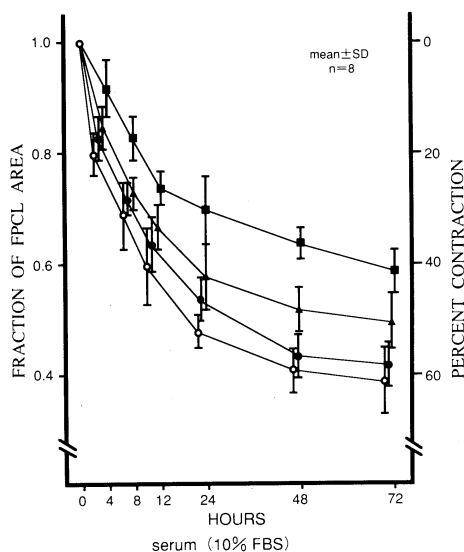
い実験系であると考えられる。

- 通常培養下において, sparse な状態では, 各線維芽細胞間で明らかな細胞形態の差は認められなかった。一方, confluent な状態では, 正常線維芽細胞が均一になるのに対して, ケロイド由来線維芽細胞は, hills and valleys 様形態を示した。
- ケロイド由来線維芽細胞はゲル上及びゲル内でも強い増殖性を示した。
- コラーゲン・ゲル収縮力は, 正常真皮線維芽細胞よりも, 増殖性瘢痕由来線維芽細胞の方が強かった (ケロイド>肥厚性瘢痕 \geq 正常真皮)。
- ケロイド由来線維芽細胞のゲル収縮能は, $\text{IFN}\alpha-2\text{b}$ ($1000 \text{IU}/\text{ml}$) により正常真皮線維芽細胞のレベルにまで抑制された。
- ゲル収縮能は, 培養線維芽細胞の平滑筋的

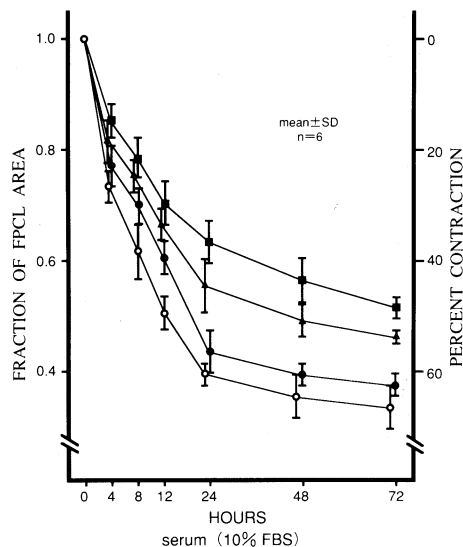
ま と め

正常真皮線維芽細胞と肥厚性瘢痕及びケロイド由来線維芽細胞を, コラーゲン・ゲル培養を用いて比較検討した。

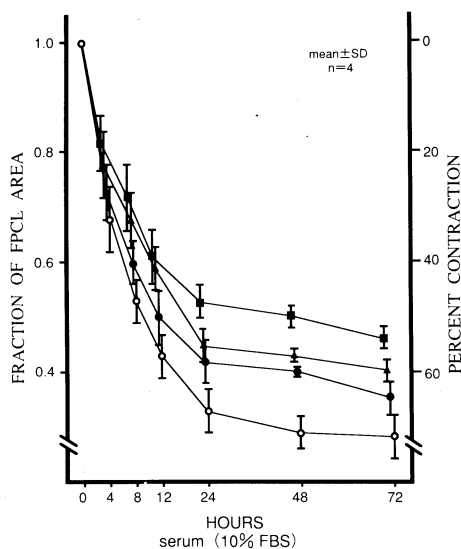
- コラーゲン・ゲルを用いた再構成真皮モデルは, 創傷治癒過程における創部収縮のよ



(a)



(b)



(c)

Fig. 11. Effect of Papaverine concentration on the contraction of collagen lattice by human dermal fibroblasts (a), hypertrophic scar derived fibroblasts (b), and keloid derived fibroblasts (c).

Gels were incubated without (○: control) or with added Papaverine, at 10^{-6} M/l (●), 10^{-5} M/l (▲), or 10^{-4} M/l (■).

みる実験が行われている。とくに、コラーゲン・ゲルを用いた実験は、より生体真皮に近いことよりその期待が持たれる。

稿を終えるにあたり、ご指導とご校閲を賜りました川崎医科大学形成外科学教室 森口隆彦教授ならびに、南フロリダ大学形成外科 M. C. Robson 教授に深甚なる謝意を捧げます。そして研究にご協力いただきました形成外科学教室各位に感謝致します。

なお、本論文の要旨は、第4回日本形成外科学会基礎学術集会(1995年10月、於倉敷)、シンポジウム「創傷治癒とサイトカイン」にて発表した。

本研究の一部は、川崎医科大学 プロジェクト研究費 (No. 7-711) 及び平成7年度文部省科学研究費(課題番号06671497)の援助によって行われたことを付記し、感謝の意を表します。

性質に起因すると考えられる。

肥厚性瘢痕とケロイド由来線維芽細胞は、正常真皮線維芽細胞とは異なった性質をもつことは間違いないようであり、今後細胞培養による肥厚性瘢痕やケロイド診断の可能性があると考えられる。また、臨床応用への可能性として、様々な薬剤を培養細胞に投与して、その反応を

文 献

- 1) Yoshizato K, Taira T, Yamamoto N, Sasaki K: Remodeling of collagen: an in vitro model of connective tissue. *Biomedical Res* 6: 287—296, 1985
- 2) 浅賀宏昭, 吉里勝利: コラーゲンゲル形成の細胞生物学. *化学総説* 8: 153—160, 1990
- 3) 石川修一: 線維芽細胞によるコラーゲンゲル収縮. *日形会誌* 9: 27—35, 1989
- 4) Elsdale T, Bard J: Collagen substrata for studies on cell behavior. *J Cell Biol* 54: 626—637, 1972
- 5) Sahara K, Kucukcelebi A, Ko F, Phillips LG, Robson MC: Suppression of in vitro proliferative scar fibroblast contraction by interferon alfa-2b. *WOUND REP REG* 1: 22—27, 1993
- 6) 西山敏夫, 坪 信子, 堀井和泉, 林 利彦: コラーゲンゲル内での正常線維芽細胞と線維肉腫細胞 (HT 1080) の挙動の相違. *TCRC* 9: 87—92, 1991
- 7) Todaro GJ, Lazar GK, Green H: The initiation of cell division in a contact-inhibited mammalian cell line. *J Cell Comp Physiol* 66: 325—334, 1965
- 8) Stoker MGP, Rubin H: Density dependent inhibition of cell growth in culture. *Nature* 215: 171—172, 1967
- 9) Elsdale TR: Parallel orientation of fibroblasts in vitro. *Exp Cell Res* 51: 439—450, 1968
- 10) Yang J, Nandi S: Growth of cultured cells using collagen as substrate. *Int Rev Cytol* 81: 249—286, 1983
- 11) Kono T, Tanii T, Furukawa M, Mizuno M, Taniguchi M, Ishii M, Hamada T, Yoshizato K: Correlation of contractility and extent of differentiation in mouse fibroblastic cell lines cultured in collagen lattices. *J Dermatol* 17: 149—154, 1990
- 12) Sarber R, Hull B, Merrill C, Soranno T, Bell E: Regulation and proliferation of fibroblasts of low and high population doubling levels grown in collagen lattices. *Mech Age Dev* 17: 107—117, 1981
- 13) Yoshizato K, Taira T, Shioya N: Collagen-dependent growth suppression and changes in the shape of human dermal fibroblasts. *Ann Plast Surg* 13: 9—14, 1984
- 14) Yoshizato K, Taira T, Yamamoto N: Growth inhibition of human fibroblasts by reconstituted collagen fibrils. *Biomed Res* 6: 61—71, 1985
- 15) 幸野 健, 谷井 司, 古川雅祥, 水野信之, 谷口彰治, 石井正光, 濱田稔夫, 吉里勝利: I 型コラーゲン・ゲル上およびゲル内培養法におけるヒト真皮線維芽細胞の増殖と細胞周期分析. *西日皮膚* 52: 986—992, 1990
- 16) Folkman J, Moscona A: Role of cell shape in growth control. *Nature* 273: 345—349, 1978
- 17) Vande Berg JS, Rudolph R, Woodward M: Comparative growth dynamics and morphology between cultured myofibroblasts from granulating wounds and dermal fibroblasts. *Am J Pathol* 114: 187—200, 1984
- 18) Vande Berg JS, Rudolph R: Cultured myofibroblasts: A useful model to study wound contraction and pathological contracture. *Ann Plast Surg* 14: 111—120, 1985
- 19) Bell E, Ivarsson B, Merrill C: Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 1274—1278, 1979
- 20) Montesano R, Orci L: Transforming growth factor β stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: Implications for wound healing. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 4894—4897, 1988
- 21) Ehrlich HP: The modulation of contraction of fibroblast populated collagen lattices by type I, II, and III collagen. *Tiss Cell* 20: 47—50, 1988
- 22) 佐々木哲雄: 線維化とその抑制. *西日皮膚* 52: 219—225, 1990

- 23) Berman B, Duncan MR : Short-term keloid treatment in vivo with human interferon alpha-2b results in a selective and persistent normalization of keloidal fibroblast collagen, glycosaminoglycan, and collagenase production in vitro. *J Am Acad Dermatol* 21 : 694—702, 1989
- 24) Gabbiani G, Hirschel BJ : Granulation tissue as a contractile organ : A study of Structure and function. *J Exp Med* 135 : 719—734, 1972
- 25) Gabbiani G, Ryan GB, Majno G : Presense of modified fibroblasts in granulation tissue and possible role of wound contraction. *Experientia* 27 : 549—550, 1971
- 26) Majno G, Gabbiani G, Hirschel BJ : Contraction of granulation tissue in vitro : Similarity to smooth muscle. *Science* 173 : 548—550, 1971
- 27) Schurch W, Seemayer TA, Lagace R, Gabbiani G : The intermediate filament cytoskeleton of myofibroblasts : an immunofluorescence and ultrastructural study. *Virchows Arch* 403 : 323—336, 1984
- 28) 馬場祥行 : ラット口蓋粘膜癒痕組織由来筋線維芽細胞に関する生化学的検討. *口病誌* 55 : 599—614, 1988