

ヒト培養表皮の移植に関する基礎的検討 —培養条件について—

江藤 久志

広範囲な皮膚欠損創の治療に際して、培養表皮細胞を植皮として臨床的に応用する目的のために臨床に即した培養条件について検討し以下の結果を得た。

1) 細胞分離法では、ディスペーゼおよびトリプシンを用いる Takahashi, et al. の方法が比較的操作简单であり臨床で使用する上で効率がよいと考えられた。

2) DM-180 without CaCl₂ 培地 1L に、インシュリン 10 mg, デキサメサゾン 10⁻⁶M, EGF とコレラトキシンを 10 μg, アデノシン 48.1 mg, チミチン 0.73 mg, ピュトレッシン 0.16 mg を加えた培地で良好な表皮細胞の増殖が認められた。

3) この培地を用いた場合、添加する血清を 1%濃度まで下げた状態で分化の抑制された最も良好なシート状の増殖が得られた。

4) Type IV コラーゲンを培養基質として用いることにより feeder layer を使用した場合に匹敵する表皮細胞の増殖が認められた。また、コーティングの際の濃度は 10~30 μg/ml で十分であった。

5) ディスペーゼによりシート状態のまま培養表皮細胞を回収することができた。

(昭和63年2月17日採用)

Studies of the Culture Conditions of Keratinocytes for Clinical Use in Skin Grafting

Hisashi Etoh

The culture conditions of epidermal cells to be used clinically in skin grafting for extensive skin defect wounds such as burns were examined. The results were as follows.

1) It was confirmed by the present study that the cell separation method of Takahashi, et al. using dispase and trypsin was easy and useful for culturing keratinocytes for grafting to patients.

2) DM-180 culture medium without CaCl₂ supplemented with 10 ng/ml of EGF, 10 μg/ml of insulin, 10⁻⁶M dexamethasone, 10 ng/ml of cholera toxin, 48.1 mg/L of adenosine, 0.73 mg/L of thymidine, 0.16 mg/L of putrescine supported good epidermal cell proliferation.

3) When the serum concentration was lowered to 1%, the epidermal cell proliferation was the best, and the differentiation of the cells was suppressed.

4) The epidermal cell proliferation cultured on type IV collagen was equal to or better than that on feeder layers. Thus type IV collagen was proven to be a useful substrate for epidermal cell cultures. The concentrations of type IV collagen used for coating dishes were 10~30 $\mu\text{g/ml}$.

5) The cultured epidermal cells were separated from the surface of plastic culture dishes as intact sheets by treatment with 400 PU/ml of dispase. (Accepted on February 17, 1988) *Kawasaki Igakkaishi* 14(3): 317-327, 1988

Key Words ① Keratinocyte ② Culture ③ Medium ④ Skin graft

はじめに

表皮細胞の培養については従来より種々の方法が報告されている。しかし、上皮性細胞の培養は現在まだかなり困難であり、線維芽細胞などの間葉系由来の細胞の培養に比べてそれほど容易ではない。

Rheinwald and Green (1975) は再現性のあるヒト表皮細胞の培養を最初に報告した。彼らは Eagle's minimal essential medium (MEM) に 20% FCS, 0.4 $\mu\text{g/ml}$ ハイドロコチゾンを加えた培地で、培養基質として致死量の放射線を照射した Swiss 3T3 細胞を feeder layer として用い、ヒト表皮細胞を増殖させ、数回の継代も行った。¹⁾ その後、彼らはコレラトキシン,^{2), 3)} epidermal growth factor (EGF) を加えた培地によって表皮細胞の培養を改良した。⁴⁾ そして、1981年に O'Connor, et al. は臨床応用の最初の成功例を発表した。⁵⁾ 続いて1984年には Gallico, et al. も臨床応用を報告した。⁶⁾ 以来、熱傷などの広範囲な皮膚欠損創の治療に際して培養表皮の応用が注目されてきている。

現在行われている広範囲な皮膚欠損創の治療法としては、一般に本人以外の皮膚を用いた allograft や、一時的創面被覆材料を使用して創面を被覆し、わずかに残った患皮部から期間をおいて繰り返し薄い分層皮膚を採皮し、小皮膚片のパッチ状の植皮やメッシュ状に拡大して植皮を行う方法などが適用されている。このような治療方法では、治療期間が長期化し、手術回数も多くなるなどの問題点がある。このよう

な症例の治療に培養表皮移植を利用すれば、少ない患皮部を有効に利用でき、また治療期間を短縮することも可能であろう。さらに、将来的には、培養表皮移植は一時的創面被覆材料の代わりに永久生着可能な創面被覆材料として、広範囲皮膚欠損創の治療のための有用な手技となることが予測される。

臨床での培養表皮の利用を考えると、特定の施設に限らず、どの施設でも利用できる必要がある。このためには、表皮細胞をできるだけ簡単な手技を用いて培養し、かつ安定した、速やかな増殖の得られる培養方法の検討が重要である。このための問題点として、効率のよい細胞分離法、良好な細胞増殖のための培地条件、さらに培養基質についての検討が必要であろうと考えられるので、これらの点について検討した。

材料および方法

I. 表皮細胞分離法

成熟ラットおよびヒト正常皮膚を用い、下記のごとく細切組織片のトリプシン (Difco 1:250) 処理法、トリプシン、ディスパーゼ (合同酒精)、その他のプロテアーゼによる表皮シートの剥離法を検討した。

(1) 細切組織片トリプシン処理法

可能な限り真皮および皮下組織を除去した皮膚を磷酸緩衝液 (PBS) で十分に洗浄した後、約 1 mm 角に細切した。皮膚細切片を三角フラスコに移し、0.25% トリプシン液を加えて10分間スターラーにて攪拌した。解離した細胞を含む上清を採取した後、さらに新しいトリプ

シン液を加えて攪拌し上清を採取した。この操作を繰り返し行い、5分画採取した。採取した上清に、トリプシンの作用を止めるために、10%血清を含む培地を加え 1000 rpm, 10分間遠沈して細胞を集め、培養を行った。

(2) 表皮シート剥離法

1) トリプシンによる表皮シートの剥離

PBS で十分に洗浄した皮膚を 3~5 mm × 10 mm に細切し、PBS に溶かした 0.02% EDTA 液中で、室温にて 10分間静置後、0.25% トリプシン液に移し 4°C で overnight した。次に、PBS で洗浄後摂子を用いて真皮より表皮層のみを剥離し、血清を含む培地とともに 60分間攪拌し、遠沈して細胞を集め、培養を行った。

2) ディスパーゼによる表皮シートの剥離

Takahashi, et al.⁷⁾ の方法に準じて行った。

PBS で十分に洗浄した皮膚を 3~5 mm × 10 mm に細切し、培地に溶解した 1000 PU/ml のディスパーゼ液中にいれ、4°C, 24時間静置後、摂子を用いて表皮層を剥離した。表皮シートを 0.25% トリプシン液に移し、室温にて 13分間静置後血清を含む培地中に移して 30分間スターラーにて攪拌し、上清を採取して遠沈し、集めた細胞を培養に供した。

3) その他のプロテアーゼによる表皮シートの剥離

0.25% トリプシン, 1000 PU/ml ディスパーゼ以外に 0.1% コラゲナーゼ (日本テクニコン), 0.1% パンクレアチン (和光純薬) を用い 4°C, 24時間静置した後、表皮層の剥離が可能かどうか検討した。

II. 組織学的検査

組織を 10%ホルマリン液で固定し、切片をヘマトキシリン-エオジン (H-E) 染色した標本を光学顕微鏡にて観察した。細胞分離法の有効性の判定は、各方法で分離した細胞を 2~3週間培養した後、10%ホルマリン/燐酸緩衝液 (PBS) で固定後、1%ローダニールブルー液⁸⁾ で染色を行い細胞の増殖状態によって比較した。

III. 培養

ヒト正常皮膚より Takahashi らの方法に準じて分離した表皮細胞を用いた。

培養は、37°C, 5% CO₂, 95% Air の条件で行い、培地は F-12 (Flow Labo.), アミノ酸ビタミン組成を DM-160 アミノ酸ビタミン培地 (極東製薬) を用い、塩類組成をカルシウムを除いて MCDB-151 の処方⁹⁾ と同じにして組み合わせた無カルシウム培地 (DM-160/MCDB-151), 高マグネシウム-低カルシウムの DM-180 培地 (極東製薬), さらに DM-180 培地の組成からカルシウムを除いた DM-180 without CaCl₂ 培地の 4種類の培地を用いて培養を行い細胞の増殖を比較した。

細胞増殖因子として 10 ng/ml の上皮細胞増殖因子 (epidermal growth factor, EGF) (宝酒造), 10 µg/ml のインシュリン (Collaborative Research Inc.), 10⁻⁶M のデキサメサゾン (Sigma), 10 ng/ml コレラトキシン (化血研) を加えた。

また、無カルシウム培地と DM-180 培地の比較に際しては、無カルシウム培地に含まれている 48.1 mg/L のアデノシン, 0.73 mg/L のチミジン, 0.16 mg/L のピュトレッシンを DM-180 培地に増殖因子として加えて比較を行った。

カルシウムの濃度の検討に際しては、DM-180 without CaCl₂ 培地を用い、キレックス 100 レジンで (Bio-Rad) 処理¹⁰⁾ してカルシウムを除いた血清を 5% 濃度で使用し、0.14, 0.07, 0.035, 0.018, 0.009, 0 mM の CaCl₂ · 2H₂O を加えて培養を行い表皮細胞の分化が抑制された状態で、良好な増殖の得られる条件について検討した。また、カルシウムを除去した血清とカルシウムを除いていない血清について増殖状態を比較した。

表皮細胞の培養にキレックス処理血清を用いる方法は、経済的にも、時間的にも負担が大きく実用的でない。したがって、キレックス非処理の血清濃度条件を検討した。すなわち、上記のキレックス処理血清を使用した培養条件で最も良好な増殖に匹敵するキレックス非処理の血

清濃度を求めるために DM-180 without CaCl₂ 培地に 5, 2.5, 1.25, 0% の血清を加えてその結果を調べた。

基質については, type IV コラーゲン (新田ゼラチン), feeder layer, および, 通常の組織培養用シャーレのプラスチック上での表皮細胞の増殖を比較した. type IV コラーゲンは 300, 100, 30, 10, 3 $\mu\text{g/ml}$ に PBS で希釈し, 1 ml/35 mm dish で, 37°C, 24 時間 incubation してコーティングして用いた. feeder layer は, 30 Gy 放射線照射した正常ヒト線維芽細胞を用いた. 2 週間培養後, ホルマリン/PBS で固定し, ローダニールブルー染色を行い細胞の増殖を比較した。

IV. 培養表皮の回収

5% 血清を含む培地で 2~3 週間の培養によって増殖したヒト表皮細胞のシートをディスペパーゼでシート状に剥離が可能かどうか検討した. ディスペパーゼは, 10% 血清を含む MEM で 400 PU/ml の濃度とし, 4°C, overnight と, 37°C で 1 時間の incubation とについて検討した。

結 果

I. 細胞分離法の検討

細切組織片トリプシン処理法により得た培養では, 線維芽細胞の混入が多く認められ表皮細胞の増殖は認められなかった (Fig. 1). これに対して, トリプシンにより表皮シートを剥離した後に得た細胞の培養では線維芽細胞の混入は少なかった. しかしながら, 組織学的に観察すると, トリプシンによる表皮シートの剥離では, 基底細胞と有棘細胞の間で剥離してしまい, 基底細胞が真皮側に残りやすい傾向が認められた. また, 表皮シート中の細胞も細胞間の結合が脆弱になっており解離しやすい傾向が認められ, 剥離後の表皮シートの取扱いを慎重にする必要があった (Fig. 2a).

次に, ディスペパーゼによる表皮シートの剥離について検討した. 表皮シートはトリプシンを用いた場合に比べて容易に剥離できた. 組織学

的観察では, 表皮シートは基底膜の部分で剥離しており, 基底細胞は表皮シート中によく保たれており, 真皮側に残存する傾向は認められなかった. また, 表皮シート中の細胞も強く結合しており, 細胞の解離傾向はなく, 取扱いも容易であった (Fig. 2b). さらに, 剥離した表皮シート中の細胞は, 短時間のトリプシン処理後, 培地中で攪拌することにより容易に分離することができた。

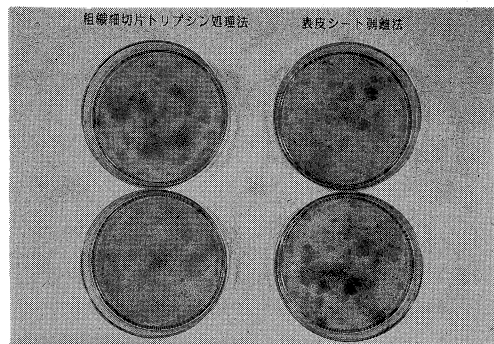


Fig. 1. The peel-off method of epidermis shows better cell growth of keratinocytes than the trypsin-digestion method of small minced skin fragments.

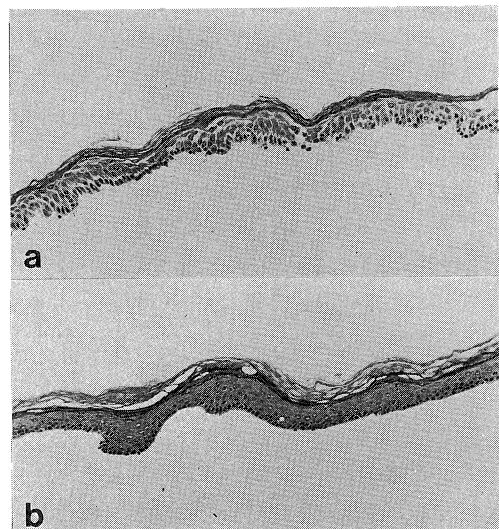


Fig. 2. (a) The micrograph of epidermis peeled off from the dermis by treatment with 0.25% trypsin solution at 4°C, 24h. (b) The micrograph of the epidermis treated with 1000 PU/ml of dispase at 4°C, 24h. (H-E stain, $\times 200$).

その他のコラゲナーゼ、パンクレアチンなどのプロテアーゼでは表皮シートは剝離できなかった。

II. 培養条件についての検討

当初、従来より市販されている培地中で最もカルシウム濃度の低い F-12, DM-160 アミノ酸ビタミン組成と MCDB-151 培地の塩類組成からカルシウムを除いた塩類組成を組み合わせた DM-160/MCDB-151, 低カルシウム—高マグネシウムの DM-180 培地, さらに DM-180 培地からカルシウムを除いた組成の DM-180 培地 without CaCl₂ の 4 種類の培地について比較した。

F-12 と DM-160/MCDB-151 培地の 10% FBS 添加時の比較では 3 週目にはいずれも細胞は confluent な状態になったが, F-12 では一部の細胞が完全に単層状態にならず疎な状態であるのに対して DM-160/MCDB-151 培地では密で良好な増殖が認められた (Fig. 3)。

この DM-160/MCDB-151 培地と DM-180 培地との比較では, DM-180 培地で細胞の増殖はより良好であったが, 細胞の重層化が著明で, 分化傾向が認められた (Fig. 4)。このため DM-180 培地の組成からカルシウムを除いた DM-180 without CaCl₂ 培地との比較を行った。その結果, カルシウムを除いた DM-180 培地の方がより分化の抑制された状態でより良好な細胞増殖が認められた。このため以後この培地を表皮細胞の培養に用いた。

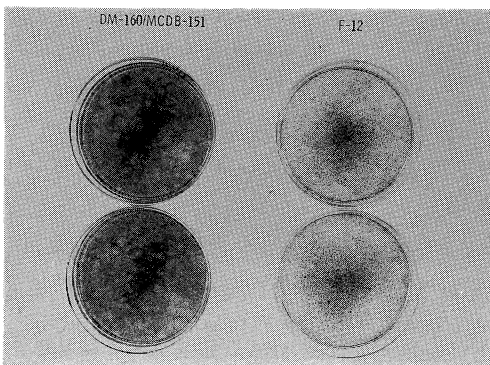


Fig. 3. DM-160/MCDB-151 medium shows better cell growth of keratinocytes than F-12 medium.

同一濃度の通常の血清とカルシウム除去血清との比較では, カルシウム除去血清に比べて通常の血清の方が細胞の増殖状態は良好であった (Fig. 5)。

キレックス処理血清を 5% 添加した培地でカルシウム濃度を検討したところ, 0.035 mM (5 mg/L) のカルシウムを加えた場合に細胞の分化は抑制され, しかも単層状態で良好に増殖した (Fig. 6)。

また, このカルシウム濃度と, キレックス非処理血清の濃度の比較では, 5% 濃度では分化傾向が認められ, 1.25% で分化の抑制された単層状態の増殖を示し, 0.035 mM のカルシウムを加えた場合と同様の増殖が得られた (Fig. 6)。

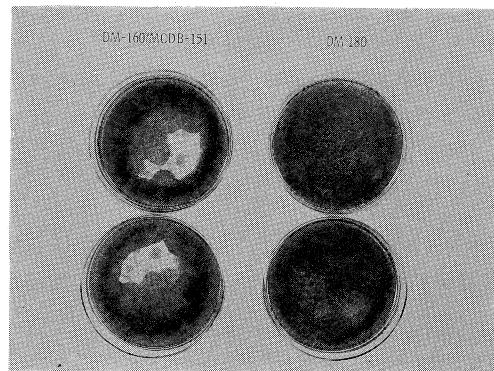


Fig. 4. DM-180 medium shows better cell growth than DM-160/MCDB-151 medium.

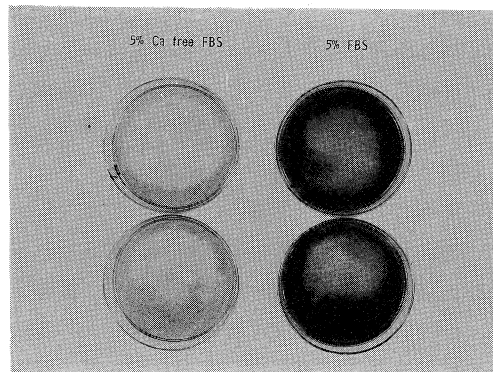


Fig. 5. The culture medium containing 5% FBS shows better cell growth than the medium supplemented with calcium free FBS.

その後、DM-180 without CaCl_2 培地にキレックス非処理 FBS を 1% 添加した培地に増殖因子を加えた条件下で、分化が抑制された単層状態の良好な表皮細胞の培養が得られた (Fig. 7).

基質についての検討では、10~30 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度の type IV コラーゲンによるコーティングで feeder layer と同程度、もしくはそれ以上の細胞の増殖が認められた。しかし、組織培養用のシャーレのプラスチック上では良好な細胞の増殖は得られなかった (Fig. 8)。この結果より、type IV コラーゲンは表皮細胞の培養に際して、feeder layer に代わる基質として使用可能であることが分かった。また、コーティングは、10~30 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で十分であった。

III. 培養表皮の回収法

4°C, overnight では、シャーレ周辺部より培養表皮シートの剥離が認められ、最終的にはシャーレの底面積よりも縮んだ状態でシャーレ中に浮上した。

37°C で incubation した場合には、35 分頃より周辺部よりの剥離が認められ、約 1 時間でシャーレの底面積に比べて 1/4 程度に縮んだ状態で剥離した (Fig. 9)。また、周辺部が剥離した時点で、剥離していない部分を摂子で注意深く剥離しても培養表皮シートは破れることなく回収することができた。

このいずれの方法を用いても、培養表皮シートは、細胞間の結合を保ったままの状態ですり表面より剥離可能であり、移植のためシリコンメッシュガーゼ、もしくは、ワセリンガーゼ上に基底細胞側を上にして回収することができた (Fig. 10)。

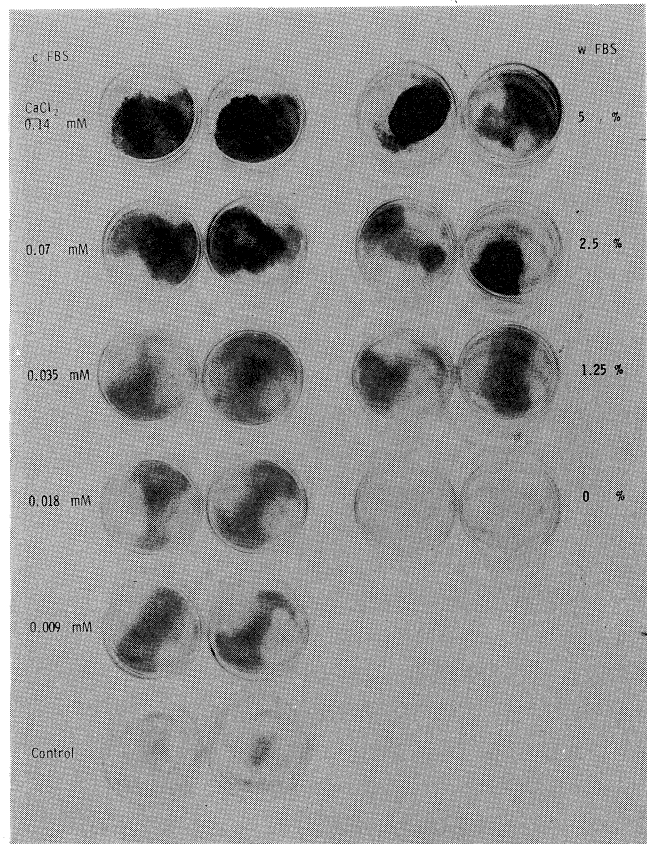


Fig. 6. Effects of various concentrations of calcium (left two lanes), and effects of various concentrations of FBS on cell growth (right two lanes).

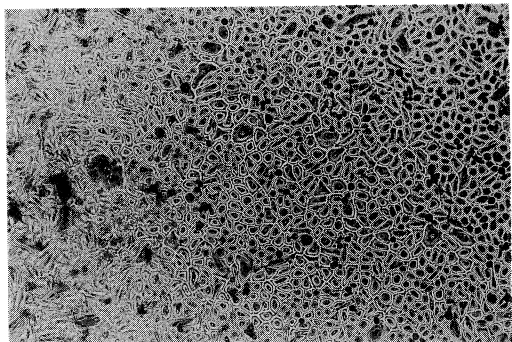


Fig. 7. Phase-contrast micrograph of cultured keratinocytes after 14 days in culture in DM-180 medium supplemented with 1% FBS and growth factors (Rho-danile blue stain, $\times 100$).

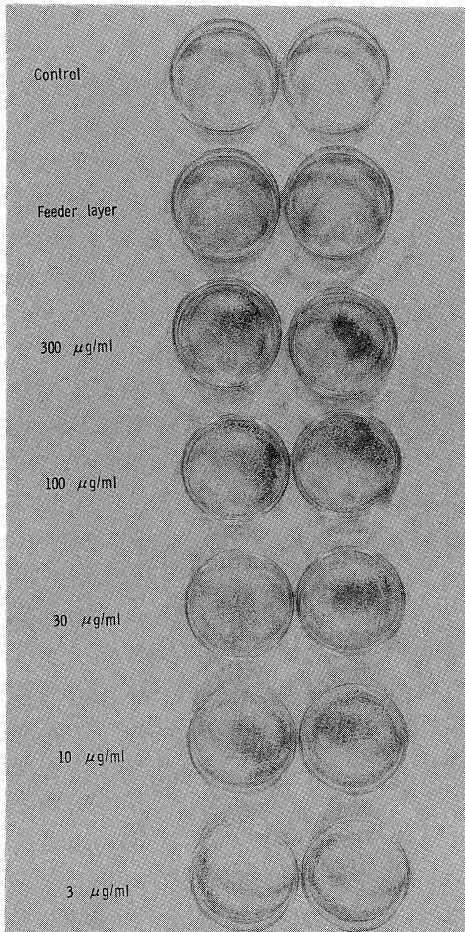


Fig. 8. Effects of feeder layer and various concentrations of type IV collagen on keratinocyte growth.

考 察

I. 表皮細胞分離法について

Rheinwald and Green (1975),¹⁾ Peehl and Ham (1980)⁹⁾ は、真皮を可能な限り除去した皮膚を細切し、細切片をトリプシン液中で攪拌し、その上清より表皮細胞を得ている。しかし、著者の検討ではこの方法では線維芽細胞の混合が多く表皮細胞のみの培養を得ることはできなかった。また、Laerum (1969)¹¹⁾ は、トリプシン液によって表皮層を剝離し、真皮側に残存した基底細胞を機械的に採取することによって基底細胞を集めている。しかし、この方法で

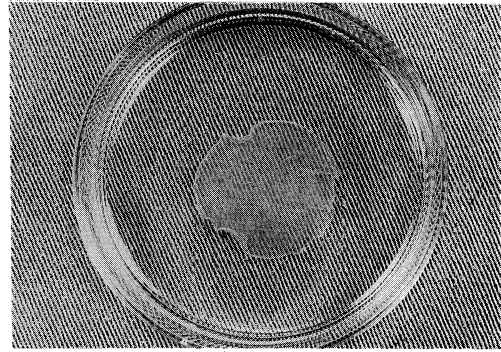


Fig. 9. Cultured epidermal sheet released from culture dish surface.

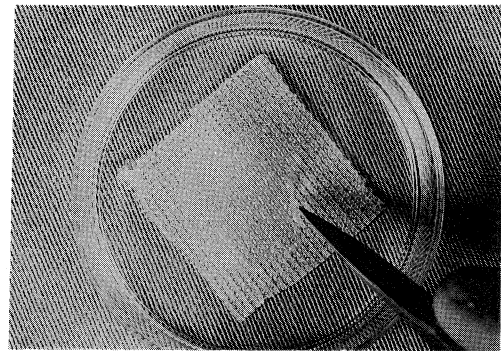


Fig. 10. The released epidermal sheet put on a piece of vaseline gauze (Adaptic®, Johnson & Johnson).

も、組織細切片の攪拌と同じように真皮由来の線維芽細胞の混合の可能性がある、表皮細胞のみの培養を得るための細胞分離法としては適していないと考えられた。このため、Eisinger, et al. (1979),^{12), 13)} 大熊(1980),¹⁴⁾ Price, et al. (1983),^{10), 15)} Kubilus, et al. (1985),¹⁶⁾ Fleckman, et al. (1985),¹⁷⁾ 熊谷ら(1985),¹⁸⁾ Hefton, et al. (1986)¹⁹⁾ は、トリプシン液、もしくは、それと EDTA 液を併用して、皮膚より表皮層のみを剝離した表皮シートより培養のための表皮細胞を得ている。Kitano and Okada (1983)²⁰⁾ は、ディスパーゼを用いて表皮シートの剝離を行い、基底膜の部分より表皮シートが剝離でき、基底細胞層は剝離した表皮側に良く保たれていたと報告した。また、Takahashi らは、ディスパーゼにより表皮シートを剝離した後、表皮シートをトリプシン液で短時間処理

して細胞を得る方法が、トリプシンのみを用いて表皮シートを剥離する方法に比べて細胞の生存率が高かったとしている。⁷⁾ 著者の検討では、トリプシン、ディスパーゼのいずれでも表皮層のみをシート状に剥離することはできたが、トリプシンで剥離した表皮シートに比べてディスパーゼにより剥離した表皮シートの方が取扱いが容易であった。トリプシン、ディスパーゼ以外のプロテアーゼとしてコラゲナーゼ、パンクレアチンの使用についての検討では、この両者ともに表皮シートの剥離には使用できないことが分かった。これらの点から、Takahashiらが報告したディスパーゼとトリプシンを用いる細胞分離法が比較的操りも容易で、生存率の高い細胞を効率よく分離できる方法であると考えている。

II. 培養条件について

Peehl and Ham (1980) は、MCDB-151 無血清培地 (chemical defined medium) を用い、表皮細胞の clonal growth が可能であると報告した。この際に、培地中のカルシウム濃度について検討しており、その結果では、0.03 mM のカルシウム濃度でヒト表皮細胞は良好に増殖する。²¹⁾ また、0.03~0.1 mM では表皮細胞は著明に増殖が促進する。さらに、0.3 mM まではゆっくり増殖するが、1.0 mM では細胞増殖は劇的に抑制されると報告した。²²⁾ また、Yuspa, et al. (1981) はマウスの表皮細胞で 0.02~0.09 mM のカルシウム濃度では、表皮細胞の基底細胞の性質を保ったままの良好な増殖が得られたが、1.2~1.4 mM に上昇すると増殖が停止し終末分化が認められたと報告した。²³⁾ 著者のカルシウム濃度についての検討でも、0.035 mM すなわち 5 mg/L のカルシウムを加えた場合に分化の抑制された単層状態での増殖が得られた。この結果は、以上の報告と一致する。Peehl and Ham は、彼らの培地条件では 2 代目以降の細胞の増殖があまり良くないので、trace elements を変更した MCDB-152,²⁴⁾ bovine pituitary extract その他の増殖因子を添加した MCDB-153²⁵⁾ と一連

の培地を発表しており、さらにアミノ酸組成を変更した MCDB-153LB²⁵⁾ を報告している。しかし、これらの chemical defined medium は細胞の clonal growth によって検討されているので、著者の目的とする臨床での移植のため短期間での表皮細胞の大量培養に利用できるかどうかさらに検討の余地がある。この点を考え、DM-160 培地のアミノ酸ビタミンの組成と、MCDB-151 培地の塩類組成からカルシウムを除いた塩類組成を組み合わせた DM-160/MCDB-151 培地を調製し、市販の F-12 培地と細胞の増殖状態を比較した。結果は、DM-160/MCDB-151 培地の方が良好な増殖が得られた。DM-160/MCDB-151 培地と DM-180 培地の比較では、DM-180 培地でより良好な増殖が得られた。この DM-160/MCDB-151 培地と DM-180 培地との相違は、アミノ酸ビタミン組成は全く同じであり塩類組成のみが異なっている。DM-180 培地は MEM など一般に使用されている基礎培地に含まれているカルシウム濃度の 1/10 に下げられており、マグネシウム濃度が高くされている。通常のごとく 10% 血清をこの DM-180 培地に加えた培養では、血清に由来するカルシウムによって培地中のカルシウム濃度が上昇し表皮細胞の分化を起こしてしまうため、この DM-180 培地でも不適當であると思われた。今回の成績では DM-180 よりカルシウムを除き、さらに血清に含まれるカルシウムの影響を避けるため、血清濃度を 1% まで下げることによって分化の抑制された最も良好な増殖が得られた。培地に添加する血清に由来するカルシウムが表皮細胞の分化に大きな影響を与えることに注意する必要がある。また、カルシウム除去血清で細胞増殖が悪かった点については、血清からカルシウムを除去する際に血清中に存在している増殖因子やカルシウム以外の金属 (trace elements など) が一緒に除去された可能性がある。これらの点より、培地の塩類組成の微妙なバランスが表皮細胞の増殖、分化という現象に大きくかかわっていることが予想される。

培養基質については、feeder layer の使

用,^{1),18)} 臍より抽出したコラーゲン, フィブロンectin, ラミニン処理したシャーレを用いて表皮細胞の培養を行った報告²³⁾がある。また, ウシの eye lens capsule 上での培養で表皮細胞の良好な増殖が得られている。²⁷⁾ しかしながら, フィブロンectinやラミニンは非常に高価であり, ウシの eye lens capsule は入手がむずかしい。また, feeder layer の場合には, 使用する細胞を常に培養しておく必要があり不便である。現在まで type I, type II コラーゲンなどが各種の細胞の培養に使用されているが, 今回使用した type IV コラーゲンは基底膜の主要な成分の一つであり, ウシの eye lens capsule にも含まれている成分でもある。このため type IV コラーゲン単独でも表皮細胞の培養のための基質として使用できるのではないかと考え, その可能性について検討した。その結果は, type IV コラーゲンは表皮細胞の良好な基質になることが分かり, feeder layer に比べて表皮細胞の培養をより簡単な操作で行うことができ, 臨床への応用に有用であると思われる。

Ⅲ. 培養表皮の回収法について

培養表皮シートのシャーレ表面よりの剥離については, 1979年, Green, et al. はディスペーゼを用いることにより表皮細胞間の結合が保たれたままのシート状態で回収可能であること

を報告した。²⁾ 熊谷らは, 100 PU/ml のディスペーゼ液で 4°C, 15時間処理して移植可能な状態で剥離でき, 剥離した表皮シートは薄くやや取り扱いにくかったが, 少々手荒な操作をしても分散した遊離細胞にならなかったと報告している。¹⁸⁾ 著者はこの濃度に比較して 400 PU/ml とやや高い濃度で検討し, 4°C overnight, 37°C での incubation とともに細胞間の結合が保たれたままの intact な状態で表皮シートを剥離することができた。そして, 摂子を用いて裏打ちとして使用したシリコンメッシュガーゼもしくはワセリンガーゼの上に基底細胞側が移植面に接するよう上にして回収することができた。4°C overnight に比べて 37°C での incubation では処理時間は約1時間ですみ, 臨床での使用など時間に制約のある場合にはこの方法の方がより有効であろうと思われる。

本論文の要旨の一部は, 第30回日本形成外科学会総会において発表した。また, その後の成果は, 第31回日本形成外科学会総会において発表予定である。

稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲を賜りました川崎医科大学形成外科学教室 谷 太三郎教授, ならびに森口隆彦助教授に謝意を表するとともに, 本研究に際して直接に懇切丁寧な御指導を頂きました同大学実験病理学教室 難波正義助教授に深謝致します。また, 実験材料の入手に御協力頂きました形成外科学教室員各位, ならびに組織培養センターの皆様の御協力に深謝致します。

文 献

- 1) Rheinwald, J. G. and Green, H.: Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocyte: keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6: 331-344, 1975
- 2) Green, H.: Cyclic AMP in relation to proliferation of the epidermal cells: a new view. *Cell* 15: 801-811, 1978
- 3) Green, H., Kehinde, O. and Thomas, J.: Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc. natl. Acad. Sci. USA* 76: 5665-5668, 1979
- 4) Rheinwald, J. G. and Green, H.: Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocyte. *Nature* 265: 421-424, 1977
- 5) O'Connor, N. E., Mulliken, J. E., Banks-Schlegel, S., Kehinde, O. and Green, H.: Grafting of burn with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cell. *Lancet* 10: 75-78, 1981
- 6) Gallico, G. G., O'Connor, N. E., Computon, C. C., Kehinde, O. and Green, H.: Permanent coverage

- of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N. Engl. J. Med.* 311: 448—451, 1984
- 7) Takahashi, H., Sano, K., Yosizato, K., Sioya, N. and Sasaki, K.: Comparative studies on methods of isolating rat epidermal cell. *Ann. plast. Surg.* 14: 258—266, 1985
 - 8) Rheinwald, J. G. and Green, H.: Formation of a keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from a teratoma. *Cell* 6: 317—330, 1975
 - 9) Peehl, D. M. and Ham, R. G.: Clonal growth of human keratinocytes with small amount of dialyzed serum. *In Vitro* 16: 526—538, 1980
 - 10) Price, F. M., Taylor, W. G., Camalier, R. F. and Sanford, K. K.: Approaches to enhance proliferation of human epidermal keratinocytes in mass culture. *JNCI* 70: 853—861, 1983
 - 11) Laerum, O. D.: Oxygen consumption of basal and differentiating cells from hairless mouse epidermis: a new method for obtaining almost pure selections of basal and differentiating cells respectively. *J. invest. Dermatol.* 52: 204—211, 1969
 - 12) Eisinger, M., Lee, J. S., Hefton, J. M., Darzynkiewicz, Z., Chiao, J. W. and Harven, E.: Human epidermal cell cultures: growth and differentiation in the absence of dermal components or medium supplements. *Proc. natl. Acad. Sci. USA* 76: 5340—5344, 1979
 - 13) Eisinger, M., Monden, M., Raaf, J. H. and Fortoner, J. G.: Wound coverage by a sheet of epidermal cells grown in vitro from dispersed single cell preparation. *Surgery* 88: 287—293, 1980
 - 14) 大熊 登: 培養ヒト表皮ケラチノサイトの分化過程の形態的・生化学的検討. *日皮会誌* 9: 1089—1101, 1980
 - 15) Price, F. M., Camalier, R. F., Gantt, R., Taylor, W. G., Smith, G. H. and Sanford, K. K.: A new culture medium for human skin epithelial cells. *In Vitro* 16: 147—158, 1980
 - 16) Kubilus, J., Scott, I., Harding, C. R., Yendle, J. and Baden, H. P.: The occurrence of profilaggrin and its processing in cultured keratinocytes. *J. invest. Dermatol.* 85: 513—517, 1985
 - 17) Fleckman, P., Dale, B. A. and Holbrook, K. A.: Profilaggrin, a high-molecular-weight precursor of filaggrin in human epidermis and cultured keratinocytes. *J. invest. Dermatol.* 85: 507—512, 1985
 - 18) 熊谷憲夫, 仁科博道, 保坂登美子, 荻野洋一: ヒト培養表皮移植に関する研究—自家培養表皮移植による広範囲熱傷創の治療—. *日形会誌* 5: 465—474, 1985
 - 19) Hefton, J. M., Caldwell, D. G., Bioizes, D. G., Balin, A. K. and Carter, D. M.: Grafting of skin ulcers with cultured autologous epidermal cell. *J. Am. Acad. Dermatol.* 14: 399—405, 1986
 - 20) Kitano, Y. and Okada, N.: Separation of the epidermal sheet by dispase. *Br. J. Dermatol.* 108: 555—560, 1983
 - 21) Peehl, D. M. and Ham, R. G.: Clonal growth of human keratinocytes with small amount of dialyzed serum. *In Vitro* 16: 526—538, 1980
 - 22) Boyce, S. T. and Ham, R. G.: Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined culture and serum-free serial culture. *J. invest. Dermatol.* 81: 33s-40s, 1983
 - 23) Yuspa, S. H. and Morgan, D. L.: Mouse skin cells resistant to terminal differentiation associated with initiation of carcinogenesis. *Nature* 293: 72—74, 1981
 - 24) Tsao, M. C., Walthall, B. J. and Ham, R. G.: Clonal growth of normal human epidermal keratinocytes in a defined medium. *J. cell. Physiol.* 110: 219—229, 1982
 - 25) Pirijs, L., Yasumoto, S., Feller, M., Doniger, J. and Dipaolo, J. A.: Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *J. Virol.* 61: 1061—

1066, 1987

- 26) Vaughan, F., Gray, R. and Bernstein, I. A.: Growth and differentiation of primary rat keratinocytes on synthetic membranes. *In Vitro* 22: 141—149, 1986
- 27) Lenoir, M. C., Bernard, B. A., Ferracin, J., Shreot, B. and Vermooen, A. J. M.: Growth and differentiation of human keratinocytes cultured on eye lens capsules. *Arch. dermatol. Res.* 278: 120—125, 1985