

Flow Cytometric Studies of Cell Kinetics in Normal Human Epidermis

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7844

フローサイトメトリーによる正常ヒト表皮細胞動態の研究

金沢大学医学部皮膚科学教室 (主任：広根孝衛教授)

金沢医科大学皮膚科学教室 (主任：石崎 宏教授)

早 川 幸 紀

(昭和61年1月8日受付)

正常ヒト表皮における細胞動態の性、年齢および部位による変動をフローサイトメトリーにより検討した。0～81歳の皮膚良性腫瘍患者42人の手背および腸骨部から採取した正常皮膚片を酢酸固定後超音波処理して裸核浮遊液を作り、それをRNaseおよび沃化プロピジウムで処理してフローサイトメーターで測定し、S期細胞およびG₂+M期細胞の比率を電算機で算定した。これらのパラメーターに性および年齢による差異は認められなかった。S期細胞およびG₂+M期細胞の比率には部位による有意差が認められ、いずれも腸骨部におけるよりも手背においてより高い値を示した。そのような部位差は長期間にわたる露光により生じうるように思われた。

Key words flow cytometry, epidermal cell kinetics

正常表皮では、基底層に存在する胚芽細胞が一定の細胞周期を経て分裂し、再生産された細胞が表皮の表面から剝離脱落する角質細胞を補うことによって組織の恒常性が維持されている。しかし、胚芽細胞の細胞周期と細胞増殖は外界から表皮に加えられる種々の刺激、たとえばスコッチテープによる角質層の人工的剝離¹⁾²⁾や紫外線照射³⁾により大きな影響を受けることが知られている。また、顕著な表皮肥厚を示す乾癬では胚芽細胞の細胞周期の変動と細胞増殖の亢進が起こることが知られている⁴⁾。それ故、表皮細胞の動態に関する研究は、正常表皮における生理的な細胞再生産の機構を理解するために、また紫外線の影響や乾癬の病態生理を理解するために盛んに行われてきた。近年この分野を中心として皮膚科領域の研究にフローサイトメトリー (flow cytometry, FCM) が利用されているが、その導入は他の領域におけるよりも遅く、それによる情報も少ない。その大きな理由は、デスマゾームにより互いに強く接着している表皮細胞を損傷することなく分散してFCM測定用の単離細胞浮遊液を得ることが技術的に容易でなかったためである。しかし、近年Møllerら⁵⁾によってFCM測定用試料の作製は著し

く改良され、信頼できるデータが得られるようになった。

著者はこの改良法を用いて正常ヒト表皮から裸核浮遊液を作り、そのDNA分布をFCMで測定し、S期細胞およびG₂+M期細胞の比率の変動に影響を及ぼす因子について検討したので報告する。

材料および方法

0～81歳 (平均49.1歳) の男性29人および1～41歳 (平均19.5歳) の女性13人の患者から皮膚片を採取した。患者は良性皮膚腫瘍以外の疾患を有せず、また細胞周期に影響を及ぼす薬剤を服用していないものであった。生検は患者の同意を得たのち行った。

生検は1%メピバカインで局所麻酔後施行し、約1cm²の皮膚片を採取した。細胞周期の日周期変動を除外するため、生検はすべて午前11時頃に行った。皮膚片は手背および腸骨部の正常皮膚からそれぞれ21個採取された。

表皮細胞の裸核の浮遊液はMøllerら⁵⁾の方法により作製した。すなわち、皮膚片を1%酢酸に4℃で24～72時間浸漬し、表皮を真皮から剝離したのち、表

Abbreviations: CV, coefficient of variation; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; FCM, flow cytometry; LI, labelling index; MI, mitotic index; PBS, phosphate buffered saline; RNase, ribonuclease.

皮を0.3%ジチオスレイトル(Sigma)含有0.2 M リン酸緩衝塩類溶液 (phosphate buffered saline, PBS, pH 7.4)に37°Cで15分間浸漬し、氷冷しつつ超音波処理した。超音波処理にはBranson Sonic Power, Model 200 Sonifierを使用した。得られた核浮遊液を27 μ m ナイロンメッシュ (NBC工業 N. No.S457S)で濾過したのち、濾液を300 gで3分間遠心、沈渣をPBSで再遠心して核を単離した。これを0.25%ribonuclease (RNase, Sigma Type II A) 含有PBSに37°Cで30分間浸漬、PBSで洗浄し、沃化プロピジウム (50 mg/l)で1時間染色後、再度27 μ m ナイロンメッシュで濾過してFCM測定に供した。

個々の核のDNA量の測定にはOrtho, Cytofluorograf 50-Hを使用した。測定前に、標準蛍光粒子 (Coulter, Lot3452)を用いて試料の流量率を毎秒約100個に、またヒストグラムの変動係数(coefficient of variation, CV)が3%以下、散乱光のCVが4%以下となるように機械を調整した。DNAヒストグラムを得るため毎回平均約10万個の核を測定した。G₁+G₀期の細胞、S期の細胞およびG₂+M期の細胞の比率はFujikawaら⁹⁾のプログラムを用いて電算機で算定され、いずれも表皮の全核細胞数に対する百分率で表わすこととした。なお、推計学的に比較する2群の分散をF検定法で検定したのち、平均値±標準誤差(mean±SEM)を算定し、t検定を行った。また、3群の群間比較は分散分析後多重比較を行った。

成 績

得られた測定値を性別、年齢別および部位別に解析した。

表1は女性群と男性群の正常表皮におけるDNA分布を示す。S期細胞およびG₂+M期細胞の比率について性差は認められなかった。

表2は手背と腸骨部の正常表皮におけるDNA分布を示す。S期細胞およびG₂+M期細胞の比率はいずれも腸骨部におけるよりも手背において有意により高い値を示した。

表3、4は3群の異なる年齢集団、すなわち、若年者群(0~19歳)、壮年者群(20~59歳)および高齢者群(60~81歳)におけるDNA分布を示す。部位による差異を除外するため、ここでは手背に関する測定値と腸骨部に関する測定値を別々に解析した。その結果、手背と腸骨部ともにS期細胞の比率についてもG₂+M期細胞の比率についても3群の間に有意差は認められなかった。

考 察

FCM測定用の単離細胞浮遊液を作るためには表皮を真皮から分離し、さらにデスモゾームによって互いに接着している表皮細胞を分散することが必要である。そのための方法として酵素処理法と非酵素処理法がある。酵素処理法の代表的なものはClausenらの方

Table 1. The DNA distribution in normal epidermis of females and males

Fraction	Female (n=13)	Male (n=29)	Significance
G ₁ +G ₀	90.2±0.4	89.8±0.5	NS
S	7.6±0.5	8.1±0.4	NS
G ₂ +M	2.1±0.1	2.1±0.1	NS

Results expressed as percentage±SEM of nucleated cells.

Table 2. The DNA distribution in normal epidermis of the back of hands and iliac region

Fraction	Back of hands (n=21)	Iliac region (n=21)	Significance
G ₁ +G ₀	89.1±0.3	90.9±0.4	p<0.01
S	8.6±0.4	7.3±0.4	p<0.05
G ₂ +M	2.3±0.1	1.9±0.1	p<0.01

Results expressed as percentage±SEM of nucleated cells.

Table 3. The DNA distribution in normal epidermis of the back of hands in different age groups

Fraction	0-19 yr (n=7)	20-59 yr (n=9)	Significance
G ₁ +G ₀	89.5±0.5	88.4±0.5	NS
S	8.2±0.5	9.1±0.5	NS
G ₂ +M	2.2±0.1	2.3±0.1	NS

Fraction	20-59 yr (n=9)	60-81 yr (n=5)	Significance
G ₁ +G ₀	88.4±0.5	89.4±0.9	NS
S	9.1±0.5	8.0±0.9	NS
G ₂ +M	2.3±0.1	2.5±0.04	NS

Fraction	0-19 yr (n=7)	60-81 yr (n=5)	Significance
G ₁ +G ₀	89.5±0.5	89.4±0.9	NS
S	8.2±0.5	8.0±0.9	NS
G ₂ +M	2.2±0.1	2.5±0.04	NS

Results expressed as percentage±SEM of nucleated cells.

Table 4. The DNA distribution in normal epidermis of the iliac region in different age groups

Fraction	0-19 yr (n=4)	20-59 yr (n=10)	Significance
G ₁ +G ₀	89.4±0.7	90.7±0.5	NS
S	8.4±0.6	7.4±0.5	NS
G ₂ +M	2.2±0.3	1.9±0.1	NS

Fraction	20-59 yr (n=10)	60-81 yr (n=7)	Significance
G ₁ +G ₀	90.7±0.5	91.9±0.8	NS
S	7.4±0.5	6.5±0.8	NS
G ₂ +M	1.9±0.1	1.6±0.2	NS

Fraction	0-19 yr (n=4)	60-81 yr (n=7)	Significance
G ₁ +G ₀	89.4±0.7	91.9±0.8	NS
S	8.4±0.6	6.5±0.8	NS
G ₂ +M	2.2±0.3	1.6±0.2	NS

Results expressed as percentage±SEM of nucleated cells.

法⁷⁾で、それは皮膚片を0.25%トリプシン液の表面に37°Cで約30分間浮かべたのち、真皮組織と一緒に表皮基底層をそれより上の分化細胞層から分離し、次に真皮組織に付着している基底細胞をethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA) 液中で機械的に振とうして分散する方法である。なお、この方法で得られた単離細胞はその後100%エタノールで固定する必要があるが、また得られたS期細胞およびG₂+M期細胞の比率はいずれも表皮基底層の細胞数に対する百分率で表されることになる。非酵素処理法の代表的なものはMøllerらの方法⁹⁾で、それは皮膚片を0.5~1.0%酢酸に5°Cで24~72時間浸漬したのち表皮を真皮から分離し、次に表皮を0.3%ジチオスレイトル液に37°Cで15分間浸漬後超音波処理して細胞を破碎し、裸核を分散する方法である。なお、この方法で得られたS期細胞およびG₂+M期細胞の比率はいずれも表皮の有核細胞の総数に対する百分率で表されることになる。著者は本研究の予備実験として両者を比較検討したが、Clausenらの方法⁷⁾には真皮組織と一緒に基底細胞層を分化細胞層から分離する操作が難しく浮遊液中に基底細胞だけでなく分化細胞が種々の程度に混入してくるという短所があり、また組織が未固定であるため生検後細胞分散までの操作を滞りなく進めねばならないという制約もあった。これに対してMøllerらの方法⁹⁾は操作が容易であり、また生検後直ちに細胞は酢酸で固定されるから、その後24~72時間の範囲内で適宜の時間に次の操作を始めることができるという長所があった。このような理由により、本研究ではMøllerらの方法⁹⁾が用いられた。

さて、正常ヒト表皮における細胞動態の研究は従来主に組織学的方法によって得られた核分裂指数(mitotic index, MI)とオートラジオグラフィにより得られた標識指数(labeling index, LI)の解析に基づいてきた。Epsteinら⁸⁾はS期細胞のマーカーとしての³H-チミジンを使用してオートラジオグラフィを行い、正常ヒト表皮のLIは4.9%であると初めて報告した。その後正常ヒト表皮のLIに関する成績は多数報告されてきたが、それらの中には若干の混乱があった。それは標識細胞の数え方によるもので、若干の研究者^{9)~12)}は基底細胞100個当たりの標識基底細胞数としてLIを算定したが、他の研究者^{8)~11)~13)}は基底細胞100個当たりの標識基底細胞数+標識基底層直上層細胞数として算定した。前者の方法によるものはgerminative LIと呼ばれ、その値は2.2~3.8%^{9)~12)}、後者の方法によるものはtotal LIと呼ばれ、その値は4.2~5.5%^{8)~11)~13)}とされている。このように正常ヒト表皮のLIに関する報告はかなりの多いが、LIと年齢また

は部位との関係について述べたものはまだ少ない。Kligman¹⁴⁾は若年者(18~25歳)と高齢者(69~86歳)の下肢および背の皮膚の表皮LIを比較し、LIの年齢および部位による変動を示した。すなわち、高齢者におけるLI値は若年者におけるその約1/2であり、また下肢におけるLIは背におけるそれよりも高値を示したと述べている。一方、Thuringerら¹⁵⁾は種々の年齢のヒトの腹部皮膚におけるMIを検索し、MIは加齢とともに増加すると述べている。

正常表皮の細胞動態のFCMによる研究はまだ極めて少ない。Bauerら¹⁶⁾は女性88人と男性99人から採取した正常皮膚片をトリプシン・超音波で処理して得られた表皮細胞浮遊液のDNAヒストグラムを解析し、S期細胞およびG₂+M期細胞の比率について性差は認められず、またS期細胞の比率については部位差も認められないが、G₂+M期細胞の比率には部位差があり、下肢におけるよりも上肢において有意に高かったと報告している。なお、G₂+M期細胞の比率は加齢とともに低下すると述べているが、対象者の年齢層の詳細は記載されていない。一方、Frentzら¹⁷⁾は36~87歳の下腿潰瘍患者20人から採取した正常皮膚片を酢酸・超音波で処理して得られた表皮細胞の核浮遊液のDNAヒストグラムを解析し、S期細胞およびG₂+M期細胞の比率については年齢および性による差異は認められず、G₂+M期細胞の比率については部位差も認められないが、S期細胞の比率は部位差を示し、大腿前面および腸骨部におけるよりも前腕伸側において有意に高いことを報告した。

著者の成績は、S期細胞およびG₂+M期細胞の比率に性差および年齢差が認められない点ではBauerら¹⁶⁾やFrentzら¹⁷⁾の成績に一致した。部位差に関して著者の成績はS期細胞およびG₂+M期細胞の比率がいずれも腸骨部におけるよりも手背においてより高いことを明らかにした。これはFCMによって得られたBauerら¹⁶⁾ならびにFrentzら¹⁷⁾の成績と部分的に一致し、またLIをパラメーターとしたKligman¹⁰⁾の成績と一致した。次の問題は正常表皮の細胞動態のパラメーターにおける部位差の要因であるが、この点について考察したものはこれまで全くない。ここで従来の他家の実験および著者の実験における皮膚生検部位と成績を再吟味してみると、表皮細胞の増殖活性を表わすパラメーターの値は下肢よりも上肢において(Bauerら¹⁶⁾)、大腿前面および腸骨部よりも前腕伸側において(Frentzら¹⁷⁾)、また腸骨部よりも手背において(著者)高いことが示されている。すなわち、表皮細胞の増殖活性を表わすパラメーターの値は非露光部よりも露光部においてより高いといえる。このことか

ら部位差は長期間にわたる日光照射により生じることが推測される。この問題に関してごく最近興味ある実験成績が示されている。Hirone^ら¹⁸⁾は、中波長と長波長の紫外線の少量混合照射を連日6週間施行後ヘアレスマウスの表皮細胞動態の変動をFCMで検索し、S期細胞およびG₂+M期細胞の比率は照射終了時に著しい高値を示すこと、その後徐々に低下するが照射終了後6週目でも依然として対照に比べて有意に高いことを示した。この実験成績を考慮に入れるならば、本研究における表皮細胞動態のパラメーターにおける部位差は主に長期間にわたる日光照射により生じたものと考えてよいように思われる。

結 論

0~81歳の皮膚良性腫瘍患者42人から得られた正常表皮におけるS期細胞およびG₂+M期細胞の比率をFCMを用いて測定し、性、年齢および部位による変動を検討した。得られた成績は次のようである。

1. S期細胞およびG₂+M期細胞の比率に性および年齢による差異は認められなかった。

2. S期細胞およびG₂+M期細胞の比率はいずれも腸骨部の表皮におけるよりも手背の表皮において有意の高値を示した。このような部位による差異は長期間にわたる露光により生じることが推測された。

謝 辞

稿を終えるに当たり、御指導および御校閲いただきました金沢大学医学部皮膚科学教室広根孝衛教授に深甚の謝意を表します。また、DNAヒストグラムの解析について御助言をいただきました山口大学医学部病理学教室高橋 学教授および金沢医科大学共同研究室藤川孝三郎講師、ならびに資料の推計学的処理法について御助言いただきました金沢大学医学部衛生学教室橋本和夫教授に心からの謝意を表します。

文 献

1) Pinkus, H.: Examination of the epidermis by the strip method of removing horny layers. I. Observations on the thickness of the horny layer, and on mitotic activity after stripping. *J. Invest. Dermatol.*, **16**, 383-386 (1951).
 2) Pinkus, H.: Examination of the epidermis by the strip method. II. Biometric data on regeneration of the human epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, **19**, 431-447 (1952).
 3) Pullmann, H., Galosi, A., Jakobeit, C. & Steigleder, G. K.: Effects of selective ultraviolet phototherapy (SUP) and local PUVA treatment of

DNA synthesis in guinea pig skin. *Arch. Dermatol. Res.*, **267**, 37-45 (1980).

4) Gelfant, S.: The cell cycle in psoriasis: a reappraisal. *Br. J. Dermatol.*, **95**, 577-590 (1976).

5) Møller, U. & Larsen, J. K.: DNA flow cytometry of isolated keratinized epithelia: a methodological study based on ultrasonic tissue disaggregation. *Cell Tissue Kinet.*, **12**, 203-211 (1979).

6) Fujikawa, K.: A method for the cell cycle analysis by microcomputer. *J. Kanazawa Med. Univ.*, **9**, 105-112 (1984).

7) Clausen, O. P. F., Lindmo, T., Sandnes, K. & Thorud, E.: Separation of mouse epidermal basal and differentiating cells for microflow fluorometric measurements. *Virchow Arch. B Cell Pathol.*, **20**, 261-275 (1976).

8) Epstein, W. L. & Maibach, H. I.: Cell renewal in human epidermis. *Arch. Dermatol.*, **92**, 462-468 (1965).

9) Lachapelle, J. M., Gillman, T.: Tritiated thymidine labeling of normal human epidermal cell nuclei. A comparison, in the same subjects, of *in vivo* and *in vitro* techniques. *Br. J. Dermatol.*, **81**, 603-616 (1969).

10) Allegra, F. & DePanfilis, G.: An *in vivo* method of studying the kinetics of cell proliferation in normal human epidermis. *Acta Dermatovener.*, **54**, 87-90 (1974).

11) Van Neste, D., Staquet, M. J., Viac, J., Lachapelle, J. M. & Thivolet, J.: A new way to evaluate the germinative compartment in human epidermis, using [³H] thymidine incorporation and immunoperoxidase staining of 67 K polypeptide. *Br. J. Dermatol.*, **108**, 433-439 (1983).

12) Weinstein, G. D., McCullough, J. L. & Ross, P.: Cell proliferation in normal epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, **82**, 623-628 (1984).

13) Camplejohn, R. S., Gelfant, S., Chalker, D. & Sittampalam, Y.: Mitotic and labelling activity in normal human epidermis *in vivo*. *Cell Tissue Kinet.*, **17**, 315-322 (1984).

14) Kligman, A. M.: Perspectives and problems in cutaneous gerontology. *J. Invest. Dermatol.*, **73**, 39-46 (1979).

15) Thuringer, J. M. & Katzberg, A. A.: The effect of age on mitosis in the human epidermis. *J.*

Invest. Dermatol., **33**, 35-39 (1959).

16) **Bauer, F. W., Crombag, N. H. C. M. N., DeGroot, R. M. & DeJongh, G. J.**: Flow cytometry as a tool for the study of cell kinetics in epidermis. *Br. J. Dermatol.*, **102**, 629-639 (1980).

17) **Frentz, G. & Møller, U.**: DNA flow cytometry of human epidermis: interindividual and regional variations in normal skin. *Clinic. Exptl. Dermatol.*, **8**, 19-26 (1983).

18) **Hirone, T. & Kawara, S.**: Unpublished data.

Flow Cytometric Studies of Cell Kinetics in Normal Human Epidermis Yukinori Haya-kawa, Department of Dermatology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920, and Department of Dermatology, Kanazawa Medical University, Uchinada, 920-02 — *J. Juen Med. Soc.*, **95**, 1-6 (1986)

Key words: flow cytometry, epidermal cell kinetics

Abstract

Flow cytometric studies of epidermal cell kinetics were performed on normal skin obtained from forty-two patients aged 0-81, with benign cutaneous tumors. Single nuclear suspension was prepared by ultrasonication of the epidermis which had been separated from the dermis by mean of acetic acid, and then treated with RNase and propidium iodide for measurement with flow cytometer. The proportions of S- and G₂+M-fractions were estimated using a computer with a specific program. No significant variations due to sex and age were found in these parameters. Significant regional differences were found in the S- and G₂+M-fractions, with higher values in the back of hands than in the iliac region of the abdomen. It appeared likely that the differences between these two regions is caused mainly by long term of exposure to the sunlight.