

# 表皮と真皮の相互作用に関する研究： 特に基底膜の形成について

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8665">http://hdl.handle.net/2297/8665</a>

## 表皮と真皮の相互作用に関する研究, 特に基底膜の形成について

金沢大学医学部病理学第一講座 (主任: 梶川欽一郎教授)

北 野 英 一

(昭和52年2月25日受付)

(本研究の一部は1975年第7回日本結合組織学会総会において発表した)

真皮は単に皮膚の支持的役割を果しているばかりでなく、表皮の分化や増殖に対して重要な作用をもっていることが知られている<sup>1)~3)</sup>。一方、培養された表皮からコラーゲン<sup>4)</sup>やコラーゲナーゼ<sup>5)</sup>が分泌され、表皮が真皮の構成に影響を与えることが示唆されている。

このような表皮と真皮との相互作用を解明する一つの手掛りは、表皮-真皮の接合部の研究であると思われる。表皮-真皮接合部は解剖学的に一つの機能単位をつくっているからである。電顕的には接合部は①表皮の半接着斑 (hemidesmosome), ②lamina lucida ③基底膜 (lamina densa) 及び ④anchoring fibril, microfibril, コラーゲン細線維を含む zona reticularis (zona diffusa) から成っている<sup>6)</sup>。

この表皮-真皮接合部の研究における中心課題は基底膜形成機序に関する問題である。基底膜は光顕的にPAS陽性、好銀性の薄層として同定されるが、この構造は主としてzona reticularisに対応する<sup>6)</sup>。広義の基底膜はlamina lucida, lamina densa及びzona reticularisを意味するが、一般にlamina densaが狭義の基底膜と呼び慣わされている。

最近の研究では、基底膜 (lamina densa) は上皮性起源をもつとする見解を支持する証拠が多くなった<sup>4)~12)</sup>。このうちで、Briggamanら<sup>13)</sup>の研究は注目し値する。彼等は表皮と真皮を分離した後、表皮と真皮及び死滅真皮を再結合させニワトリ胚絨毛尿膜の上に移植し、表皮-真皮接合部を電顕的にしらべた結果、基底膜は表皮の生死にかかわらず形成されるが、anchoring fibrilは真皮が死滅した場合には形成されないことを観察した。この成績に基き彼等は基底膜

は表皮細胞から分泌され、anchoring fibrilは結合組織由来であると結論した。同時に彼等は基底膜の最初の沈着に表皮の半接着斑が重要な役割を果していることを主張している。

しかし、冒頭で述べたように表皮と真皮の密接な相互関係を考慮すると、Briggamanらの成績に対していくつかの疑問が生れる。第1に、表皮の発育が真皮によって影響されるとすれば、表皮からの基底膜の産生はBriggamanらの言うように真皮の生死に全く関係なしに行われうるのであろうか。第2に、表皮細胞にのみ存在する半接着斑が基底膜の形成に果してどの程度の役割を演じているのであろうか。第3に、anchoring fibrilが結合組織に由来するとすれば、zona reticularisとはどのような関係にあるのであろうか。第4に表皮は基底膜の産生以外に真皮の構造にどのような影響を与えるのであろうか。これらの諸問題を解明する目的で、著者はBriggamanらの実験にない表皮と真皮の接合部の変化を再検討した。

### 実験材料と実験方法

生後3-4日目(体重7-10g)のWistar系雄ラットの胸部皮膚を材料とした。

表皮と真皮の分離 Briggamanら<sup>13)</sup>の方法に従って、直径3-4mmに細片した皮膚を0.4%冷トリプシン溶液(Difco社)に1-2時間作用させる。ついで、20%ウシ胎児血清(MBS社)に浸漬してトリプシンの作用を阻止し、実体顕微鏡下でピンセットを用いて表皮と真皮を分離した。

培養 剥離した表皮を真皮に載せ1-6日間培養し

Studies on epidermo-dermal interactions, with special reference to basal lamina formation. Eiichi Kitano, Department of Pathology (1) (Director: Prof. K. Kajikawa), School of Medicine, Kanazawa University

た。基底膜は後述のように真皮側に付着するので、既存の基底膜との混同をさけるため剥離真皮は裏返して使用した。

#### 1. 「表皮+生存真皮」の培養群

器官培養皿 (Falcon 社) の金属グリッドにレンズペーパーを敷き、その上に表皮と生存真皮の再結合片を載せた。Medium 199 (Difco 社) にウシ胎児血清10%、ニワトリ胚抽出液5%及び penicillin 100単位/mlと streptomycin 100 $\mu$ g/mlを加えて培養液 (本論文では標準培養液と称する) とし、2日目ごとに培養液を交換した。器官培養皿を37°Cの CO<sub>2</sub>-incubator に入れ、炭酸ガス5%及び空気95%を流通した。

ニワトリ胚抽出液 (CEE) の作製は、孵化13日目のニワトリ胚を用い、同量 (W/V) の Hanks 液を加えてホモジネートとし、遠心分離してその上清を使用した。

#### 2. 「表皮+生存真皮」のニワトリ胚絨毛尿膜上の移植群

表皮と生存真皮の再結合片をニワトリ胚絨毛尿膜 (chorioallantoic membrane, 以下 CAM と略す) に移植した。孵化7-9日目の鶏卵の卵殻及び卵殻膜を一部分除去して CAM を露出させ、血管のよく発達した部位に載せ、卵殻開窓部をパラフィルムで密閉して37°Cの孵卵器に入れ incubate した。

#### 3. 「表皮+死滅真皮」の CAM 上の移植群

剥離真皮を死滅させるため-40°Cと36°Cで凍結融解を10回くり返し、上記の方法で CAM に移植した。

#### 4. 高濃度 CEE を含む培養液による培養群

表皮と生存真皮の再結合片及び真皮のみを、30%に CEE を含む培養液<sup>4)</sup>を用いて (1) で記載したと同様な方法で培養した。

コラゲナーゼの検出 Gross ら<sup>5)</sup>の方法に従って、コラゲナーゼの検出をした。表皮と生存真皮の再結合片及び真皮のみを30% CEE を含む培養液で3日間培養したのち、組織片を Gross ら<sup>5)</sup>の方法によって作製したコラゲンゲル上に載せる。対照として標準培養液で3日間培養した組織片を用いた。これらを37°Cの CO<sub>2</sub>-incubator で48時間 incubate し、コラゲンゲルの融解の有無を検査した。

電顕試料の作製 正常皮膚、剥離した表皮と真皮及び各実験群の組織片を電顕的に観察した。組織は2.5%グルタルアルデヒド (0.1Mカコジル酸ソーダ緩衝液, pH7.4) と2%オスミウム酸 (同緩衝液, pH7.4) で重固定し、エチルアルコール系列脱水、エポン812で包埋した。

試料は LKB ultratome 1 でガラスナイフを用いて薄切し、ウラニール・鉛の重染色をおこなった。切片は日立 HU-11 型, HU-12 型又は日本電子 JEM-7A 型電子顕微鏡で直接倍率3,000~20,000倍で撮影した。

## 成 績

### I. 正常皮膚

生後3-4日目ラット皮膚の正常構造は従来の報告<sup>10)15)</sup>とほぼ同様である。表皮は7-10層の細胞から成る。胚芽層は2-3層の細胞から構成され、基底細胞には多数の遊離リボソームと tonofibril が存在する。表層にゆくにしたがい遊離リボソームは減少し、tonofibril が豊富となる。細胞は指状突起を出し、接着斑によって接合する。顆粒層は3-4層の細胞から成り、ケラトヒアリン顆粒が含まれる。角化層は菲薄で、keratin filament が充満している。

表皮基底面はおおむね平坦で、多数の半接着斑が存在する。基底面は基底膜で被われる。基底膜 (lamina densa) の幅は400~500 Åで、基底細胞と幅約500 Åの lamina lucida で隔てられている。

基底膜に接して anchoring fibril がみられる。表皮基底面に沿って線維芽細胞が並び、基底膜の間には疎に配列したコラゲン細線維が存在し、不完全な zona reticularis が区別される。

真皮にはコラゲン線維 (直径400~600 Å) が線維束を形成し、その間にはプロテオグリカンを表わす<sup>16)</sup>網状フィラメントがみられる。線維束間に線維芽細胞、肥満細胞及び組織球が存在する。線維芽細胞の周辺や小血管基底膜に接して FLS 線維 (FLS線維の形態は第V節で詳述する) がごく少数みられることがある。

### II 剥離表皮

トリプシンによって真皮から剥離された表皮では層状構築は保持され、基底面には多数の半接着斑が残存している。基底膜は真皮側に付着し、表皮基底面にはみとめられない (写真1, 2)。

### III. 「表皮+生存真皮」の培養群

#### 1. 器官培養群

1-2日目: 表皮は肥厚し、角化層の厚さは正常表皮の2-3倍になる。胚芽層の細胞の配列は乱れ、細胞間の指状突起や接着斑の減少がみられる。半接着斑は消失する。原形質には tonofibril と遊離リボソームが減少し、時々グリコーゲン顆粒や空泡が散在性にみとめられる。

表皮基底面はおおむね平坦で、真皮とまだ十分に

結合せず離開している処があるが、一様に幅約200Åの薄い基底膜で被われる(写真3)。表皮細胞との間には狭い lamina lucida がみとめられるが、処々、基底膜は表皮基底面から離開している。Anchoring fibril はみとめられない。

真皮はほぼ正常の構造を保っているが、結合組織細胞にミエリン様構造や脂肪滴がみとめられるものがある。

4日目：表皮はさらに肥厚し著明な過角化症がみられる。胚芽層の細胞は時々、ミエリン様構造がみられるほか、ほぼ正常の構造を保つが、それより表層の細胞には、しばしばミエリン様構造、空胞及び脂肪滴がみられ、細胞の変性が進行する。

表皮基底面は基底膜で被われ、その幅は400-700Åと厚くなる。基底細胞にしばしば小突起がみられる。小突起の表面は基底膜の形成が悪く、突起周辺の基底膜様物質の不規則な集積としてみとめられる(写真4)。基底膜様物質が存在するところに直径70-120μmの小胞がみられ、ある場合には小胞の表面に半接着斑様構造がみられる。基底膜及び基底膜様物質の外側には anchoring fibril が多数付着する。半接着斑が多数形成される処では lamina lucida は500-600Åと一定間隔を保つが、半接着斑の形成が少ない処では600-1000Åと拡張する(写真5)。

真皮は全般に縮小するため、コラーゲン線維の配列は密にみえる。結合組織細胞は変性を示すものが多く、原形質にはしばしばミエリン様構造、空胞及び脂肪滴がみとめられる。線維芽細胞や組織球の周辺及び小血管の基底膜に接して、少数の FLS 様線維がみとめられるが、その量は正常皮膚と比べてやや多い。

5-6日目：表皮の肥厚と過角化症はさらに著しくなり、基底細胞の変性も増加する。

表皮基底面の小突起はほとんど消失し、半接着斑は増加する。表皮基底面はほぼ正常の構造を示す基底膜で被われる(写真6)。結合組織細胞の崩壊はさらに著しくなり、基底膜の下方には変性した結合組織細胞が散在し、細胞間はコラーゲン線維で占められ、基底膜に接して anchoring fibril は存在するが、zona reticularis の形成はみられない。

## 2. 「表皮+生存真皮」の CAM 上移植群

CAM は血管の豊富な疎性結合組織から成り、表面は一層の立方上皮で被覆されている。

卵殻側の CAM 上皮に表皮と生存真皮の再結合片を載せて incubate すると、同部の CAM 上皮は消失し、真皮が CAM 結合組織と接するようになる。しばしば真皮をとりまくように CAM 結合組織細胞が増殖するが、真皮結合組織とは構造的に明瞭に区別さ

れる。

1-2日目：表皮は肥厚するが、器官培養の場合に比べて、表皮細胞の変性は少なく、基底面には幅300-400Åの基底膜が連続性に出現している。Lamina lucida もみとめられるが、処々不規則な拡大を示す。基底細胞の半接着斑はほとんどみられない。基底膜下に極く少数の anchoring fibril が付着している処がある。結合組織細胞は表皮下に散在性に存在し、zona reticularis の形成はみられない。

5-6日目：表皮と真皮の構造は最もよく維持される。表皮は過角化症を伴った肥厚がみられるが、細胞の微細構造はほとんど正常表皮のそれに匹敵する。基底面はほぼ平坦で完全に基底膜で被われる。基底膜の幅は約500Åで、基底細胞との間は幅500Åの lamina lucida で隔てられる。多数の半接着斑がみとめられる。基底膜の下には anchoring fibril が形成される(写真7)。

結合組織細胞の変性はほとんどみられない。表皮に沿って線維芽細胞が長い突起を延ばし、基底膜との間には細いコラーゲン線維とプロテオグリカンを含む zona reticularis が形成される。

## IV. 「表皮+死滅真皮」の CAM 上移植群

移植5-6日目では、表皮の大部分は真皮の表面を被覆する性質を失い、しばしば真皮内に不規則に膨出する細胞の集塊をつくる。このような表皮細胞にはリポゾームの減少、tonofibril の凝縮、脂肪滴、小胞体の拡大及び水腫様の突出などがみられ、その表面には基底膜は全く形成されない(写真8)。変性の高度な表皮細胞の周囲に、まれではあるが、著明な microfibril の集積(写真9)、又は微細フィラメントと共に FLS 様線維が多数にみとめられた。FLS 様線維は幅の広いシート状の構造物をつくることもある(写真10)。

しかし、移植片の一部には表皮が死滅真皮の表面を層状をなして被覆する処もみられる。そこでは他の培養系と同じく過角化症を伴った表皮の肥厚がみられ、基底細胞の変性は軽度である。基底面には様々な程度の基底膜の形成がみられる。小部分に lamina lucida を介したほぼ正常な連続性の基底膜がみられるが(写真11)、大部分は幅の不定な基底膜様物質が断続的に表皮基底膜を被い lamina lucida の形成はないか、または甚だ痕跡的にしかみとめられない(写真12)。時々、基底膜様物質が集塊状に表皮基底面に沈着していることがある(写真13)。いずれの場合にも、基底細胞の半接着斑はほとんどみとめられず、また anchoring fibril や zona reticularis は全く形

成されない。

移植片の死滅真皮の中へ CAM 結合組織が表皮直下まで侵入することがある。このような移植片では表皮は真皮の表面を被覆し、表皮には肥厚がみられるが変性がほとんどみられない。基底膜にはほぼ連続性の基底膜が形成される(写真14)。しかしその幅は約400Åと一般に狭い。Lamina lucida は正常の幅をもつ層として識別される。半接着斑は散在性に存在するがその数は少ない。基底膜に接して少数の anchoring fibril の形成がみられる。CAM の線維芽細胞はしばしば表皮基底面に沿って配列するが、zona reticularis の形成はほとんどみとめられない。

#### V. 高濃度 CEE を含む培養液による培養群

表皮と生存真皮の再結合片を30% CEE を含む培養液で5-6日間培養すると、培養組織数の約23%において特異な所見がみられた。すなわち、真皮のコラゲン線維が殆んど消失し、表皮直下、結合組織細胞表面及び細胞表面から少し離れた位置に微細フィラメントを伴った FLS 様線維と microfibril がみとめられた(写真15)。時々 microfibril に無定形物質が混在しているが、基底膜は全くみとめられない。

表皮は肥厚するが tonofibril や遊離リゾソームの減少、多数のミエリン様構造、空泡及び脂肪滴の出現がみられ、細胞の変性が高度である。真皮の結合組織細胞の崩壊も著しい。

FLS 様線維は850-1400Åの対称性に並ぶ横紋を有し、線維の長軸に走るフィラメントが識別される。フィラメントの直径は約20Åまたはそれ以下で、横紋を貫いているように見える。横紋が時々2本に分れていることがあるが、横紋間の substiation はみられない(写真15)。FLS 様線維が2-3本互に連って縞のあるシートをつくることある。FLS 様線維の両端では横紋が不鮮明になり、線維軸に平行に走るフィラメントと、線維周囲の微細フィラメントが連続している。

真皮のみをこの培養液で5日間培養した場合にもコラゲン線維がほとんど消失し、微細フィラメントを伴った FLS 様線維と microfibril がみとめられる(写真16)。

FLS 様線維の出現は表1に示すように、表皮と生存真皮の再結合片の培養群における出現率は真皮のみの培養群の約2倍に増加している。

#### VI. コラゲナーゼの検出

上記の30% CEE を含む培養液で培養された表皮と生存真皮の再結合片及び真皮をコラゲンゲルに incubate すると、ゲルの融解がもたらされることが観

察された(写真17, 18)。

コラゲンゲルの融解頻度は表2に示すように、表皮と生存真皮の再結合片の培養群における融解頻度が真皮のみの培養群の約2倍と高いことが注目される。対照として標準培養液で培養したものでは、両者ともにコラゲンゲルの融解がみとめられなかった。

さらに、コラゲンゲルに incubate した表皮と生存真皮の再結合片のうち、ゲルの融解したものと、融解しないものとを、それぞれ電顕的に観察すると、前者ではコラゲン線維の消失と FLS 様線維の出現があり(写真19)、後者ではコラゲン線維が存在し FLS 様線維の増加はみとめられなかった(写真20)。

### 考 察

#### 1. 基底膜の形成

皮膚をトリプシンで処理すると、表皮は真皮から分離し、基底膜は真皮側に残る。この事実は lamina lucida にはその下の基底膜構成成分よりトリプシンで水解されやすい蛋白が含まれていることを示している。分離した表皮は真皮の基底膜が付着していない側と再結合させているので表皮の下にみとめられる基底膜は incubation の間に新生されたものであると行うことができる。

本研究における所見を総括すると表3に示す通りである。この表に示されるように、基底膜は真皮の生死にかかわらず形成されるので、基底膜成分は表皮から分泌されると結論される。しかし、基底膜の形成の程度は各実験系でかなりの差異があることが注目される。表皮と生存真皮の再結合片を CAM 上に移植した場合には表皮細胞も真皮結合組織細胞もよく構造が保たれ、基底膜の形成は最も良好である。表皮と生存

表1 高濃度 CEE を含む培養液で培養した組織における FLS 様線維の出現率

培養組織片	出現率
「表皮+生存真皮」	8/35個 (22.9%)
「真皮のみ」	2/16個 (12.5%)

表2 高濃度 CEE を含む培養液で培養した組織におけるコラゲンゲルの融解頻度

培養組織片	融解頻度
「表皮+生存真皮」	4/60個 (6.7%)
「真皮のみ」	2/60個 (3.3%)

真皮の再結合片を器官培養した場合には、CAM 上の移植の場合に比べて、表皮細胞や結合組織細胞の変性が目立つが、変性を免れた基底細胞に面して完全な基底膜の形成がみられる。基底膜の形成が最も不良なのは、表皮と死滅真皮の再結合片を CAM 上に移植した場合である。この場合には表皮細胞はしばしば真皮表面を被覆する性質を失い塊状をなして真皮内に膨出し、そこでは基底膜の形成はみとめられない。基底膜は表皮細胞が層状構築を保って真皮表面を被覆する部分にのみ断続的にみとめられるにすぎない。しかし、CAM 結合組織細胞が表皮直下まで侵入した場合には、表皮の被覆性は全般に保持され、表皮上層の細胞の変性は著しいが基底膜の構造は保たれており、それに面して、ほぼ連続的な基底膜が形成される。

以上のように、真皮結合組織の変性が少ない場合ほど表皮の構造はよく保持され、真皮が死滅した場合には、表皮本来の被覆能力すら失われるという事実は、表皮の構造と機能の維持に対して、真皮結合組織が重要な影響を与えていることを示唆している。さらに、表皮が同種の真皮と接触する場合には、異種の CAM 結合組織と接触する場合に比べて表皮の構造維持がより良好であるという所見も、表皮の発育がそれに接する結合組織の性状に依存していることを示すものである。したがって、上述の各実験系における基底膜形成の程度の差異は結合組織の状態が表皮の機能に作用し、表皮からの基底膜成分の分泌に影響を与えた結果であると解釈することができるであろう。

Briggaman ら<sup>12)</sup> は *in vitro* の実験で表皮基底膜

の最初の沈着は基底細胞の半接着斑の下におこることを観察し、基底膜の形成に対して半接着斑の役割を重視している。一方、Nadol ら<sup>13)</sup> は魚類の表皮細胞の観察において、半接着斑の出現以前に基底膜の形成がおこることを報告している。堀<sup>18)</sup> は創傷治癒の再生表皮の基底膜は半接着斑に面して濃縮することから、半接着斑は表皮と基底膜の接着装置として働いているものと推定した。

本研究では、表皮と生存真皮の再結合片の器官培養 1-2 日目で剥離表皮に残存していた半接着斑は消失し、表皮基底面に菲薄な基底膜の形成がみられた。培養日数を経ても半接着斑のない場所にも基底膜が形成されている像にしばしば遭遇した。半接着斑の発育が良好な場所では基底膜と表皮基底面との間はほぼ一定の幅(約500Å)をもった lamina lucida で隔てられているが、半接着斑のない所では lamina lucida の幅が600Å以上に広がるのが観察された。

表皮と死滅真皮の再結合片を CAM 上に移植した場合に基底膜はあっても lamina lucida の形成は甚だ不完全で、半接着斑はほとんどみとめられない。lamina lucida の形成機序は不明であるが、この所見は lamina lucida の存在と半接着斑の形成との間に何らかの関係があることを示唆している。

以上の所見を総合すると、半接着斑は基底膜の形成そのものに必要な構造ではなく、lamina lucida で基底膜が表皮から隔てられると、基底膜をより強固に表皮細胞に固着させる役割をもっているものと考えられる。

表3 各実験群における表皮と真皮の変化

培養組織片		「表皮+生存真皮」		「表皮+死滅真皮+CAM」		高濃度 CEE を含む培養液 による培養群
		器官培養群	CAM上の移植群	CAM侵入なし	CAM侵入あり	
表皮	肥厚	卍	卍	+	++	卍
	変性	++	±	(卍) 註	+	卍
	半接着斑	++	卍	-	+	-
基底膜		++	卍	+	+	-
L. lucida		卍	卍	±	++	-
Anchoring fibril		卍	++	-	±	-
Z. reticularis		-	+	-	-	-
真皮	細胞の破壊	++	-	卍	-	卍
	FLS 様線維	±	±	(+)	-	卍
	Microfibril	-	-	(+)	-	卍

註：層状構築の消失を含める。

## 2. Anchoring fibril と zona reticularis の形成

Anchoring fibril は表皮基底膜に接して存在する特殊な細線維である<sup>19)20)</sup>。この線維の本態は不明であるが, Laguens<sup>21)</sup> は anchoring fibril が基底膜と密接な位置関係にあることから上皮由来であると推定した。本研究では, anchoring fibril は表皮が生存真皮と接する場合には常に形成されるが, 表皮が死滅真皮と接する場合には, 基底膜が形成されても anchoring fibril はみとめられなかった。しかし, CAM 結合組織細胞が死滅真皮の中へ表皮下まで侵入した場合には anchoring fibril が形成されることが観察された。この所見は anchoring fibril の形成には生きた結合組織の存在が必要であるという Briggaman ら<sup>12)</sup> の見解を支持するものである。

上述のように anchoring fibril の形成には結合組織の存在が必要であるが, 基底膜に接してのみみとめられることから, 結合組織成分と基底膜成分との相互関係によって形成されるものと推定される。しかし, この線維の形成にあづかる結合組織成分やその起源は明らかでない。表皮と生存真皮の再結合片を CAM 上に移植した場合はしばしば表皮に沿って線維芽細胞が配列し, 基底膜との間に anchoring fibril とコラーゲン細線維を含む zona reticularis が形成される。しかし, 表皮と生存真皮の器官培養 5-6 日では, 基底膜と共に多数の anchoring fibril が形成されるにもかかわらず, 線維芽細胞の表皮への接近や zona reticularis はみとめられない。したがって, anchoring fibril の形成には zona reticularis の存在は必要ではなく, anchoring fibril の構成成分は遠隔の結合組織細胞から供給されるものと推定される。anchoring fibril の形成機序については今後さらに検討する必要がある。

Zona reticularis の形成機序については, in vivo の観察に基いて, 上皮細胞から分泌される多量の無定形物質(基底膜前駆物質)が, 上皮に接近する線維芽細胞から供給されるコラーゲン細線維で器質化されることによって基底膜に改造されると共に, この新生されたコラーゲン細線維が zona reticularis を構成するという見解が報告されている<sup>18)22)23)</sup>。

本研究では一般にこの所見を支持する所見に遭遇することは少なかったが, 表皮と生存真皮を CAM 上に移植した場合に表皮に接近した線維芽細胞と基底膜との間に zona reticularis の形成がみられた。また, 表皮と死滅真皮の移植片では, 表皮下に基底膜様物質の集積がみられたが zona reticularis の形成

はみられなかった。これらの所見は, zona reticularis の形成は表皮から過剰の基底膜成分が分泌され, しかもそれに対して反応しうる線維芽細胞の存在が必要であることを示唆している。本研究において, 上述の in vivo の実験に比べて zona reticularis の形成が少ないのは, in vitro では一般に細胞の生存条件が悪いために, 表皮からの基底膜成分の分泌や線維芽細胞の反応力が低下していることに基くものと解釈される。

## 3. Microfibril

Microfibril はコラーゲン線維や弾力線維の形成と共に, 線維芽細胞や平滑筋細胞の周囲に増加するので, 一般にこれらの線維形成細胞から分泌されるものと信じられている<sup>24)</sup>。また, 勝田<sup>25)</sup> は実験的動脈硬化症の初期に内皮下に多量の microfibril が集積する像をみとめ, 内皮細胞からも microfibril が産生される可能性を示唆している。

本研究において30% CEE を含む培養液で真皮のみを培養すると, microfibril の著しい増加がみとめられるので, microfibril が結合組織細胞から産生されることは明らかである。一方, 表皮と死滅真皮の再結合片を CAM 上に移植した場合に, 移植片の一部において表皮直下に多量の microfibril の集積がみられた。基底膜は全く形成されない。表皮細胞にかなり強い変性がみられるが, 真皮結合組織細胞は完全に死滅している。ここにみられた microfibril は表皮細胞に由来することは明瞭である。したがって, ある生活環境; おそらく生存に不適当な環境においては表皮細胞からの基底膜の分泌が阻止され, microfibril が産生されるようになるものと思われる。

## 4. コラーゲナーゼと FLS 様線維

本研究で興味ある所見の一つは培養液の CEE の濃度を30%上昇させた場合, 真皮に多数の FLS 様線維が見出されたことである。同様な FLS 様線維はこれまで様々な結合組織に見出されている。一般にはカラギニン肉芽腫<sup>26)27)</sup>, 分娩後退縮子宮<sup>28)</sup>, 皮膚癌<sup>23)29)</sup>などコラーゲン線維の分解の亢進が推定される病的組織に見出されることが多い。また, 本研究で示されるように生理的には幼若組織にも少数の FLS 様線維が存在する。この線維の形成機序については未解決であるが, 上記の FLS 様線維の出現頻度の高い病的組織では同時にコラーゲナーゼ活性の上昇が報告されている<sup>26)29)~31)</sup>。本研究においても, FLS 様線維のみられる組織ではコラーゲンを融解することが証明された。しかも, コラーゲンを融解した組織片では, 真皮コラーゲン線

維の消失と FLS 様線維の出現が観察され、コラゲンゲルを融解しないものでは多数のコラゲン線維がみとめられた。これらの事実から、FLS 様線維は組織コラゲナーゼの活性の上昇と密接な関係があることが強く示唆される。しかし、FLS 様線維がコラゲナーゼによるコラゲン線維の分解過程そのものを表しているのか、あるいは、分解されたコラゲンと他の成分との相互作用によって形成されるかは未解決である。いづれにしても、FLS 様線維の存在はコラゲナーゼ活性の上昇を示す形態学的指標となるものと思われる。

上記の培養法でコラゲナーゼ活性が上昇する機序は明らかではない。Gross ら<sup>32)</sup>は変態期オタマジャクシ尾において、コラゲナーゼは表皮細胞から分泌されることを報告している。本研究においては、真皮のみを培養した場合に FLS 様線維の出現やコラゲンゲルの融解がみられるので、真皮からコラゲナーゼが産生されることは疑いがない。しかし、表皮と生存真皮の再結合片の培養では、真皮のみの培養に比べて FLS 様線維の出現率やコラゲンゲルの融解頻度が高いので、表皮からもコラゲナーゼが産生されるものと思われる。

一方、組織内にコラゲナーゼが不活性状態で存在することが知られているので<sup>33)</sup>、高濃度の CEE が不活性コラゲナーゼを活性化する可能性も否定することはできないであろう。

コラゲナーゼ活性が上昇した培養組織片では、基底膜は全く形成されないが、この理由についてはいくつかの可能性が考えられる。基底膜はコラゲンを含むので<sup>34)</sup>、コラゲナーゼによって分解される可能性は否定されない。また、30% CEE を含む培養液で培養した場合には、一般に細胞の崩壊が著しいので、このような生存に不適な環境下では、表皮からの基底膜成分の分泌が阻止される可能性も考えられる。

以上の考察から、表皮と真皮の間には密接な相互関係が存在することが示唆される。表皮からの基底膜成分の分泌は表皮の発育状態によって左右され、表皮の発育状態は真皮の性状によって影響をうけるものと考えられる。基底膜に接する anchoring fibril の形成には真皮結合組織細胞の生存が必要であるが、zona reticularis の形成とは直接の関係はないようにみえる。Zona reticularis は過剰に産生される基底膜成分に対して反応する線維芽細胞によって形成されるものと思われる。

一方、ある生活環境、おそらく細胞の生存に不適当

な環境では、表皮細胞は microfibril やコラゲナーゼを産生し、基底膜形成の阻止、コラゲンの分解、FLS 様線維の形成など真皮の細胞間物質の性状に影響を与えることが示された。

## 結 論

表皮-真皮の相互作用をしらべる目的で次の実験を行った。幼若ラットの表皮と真皮をトリプシンによって分離し、表皮と生存真皮及び死滅真皮を再結合させ 1~6 日間器官培養またはニワトリ胚絨毛尿膜上に移植し、表皮と真皮の接合部、特に基底膜の形成の状態を電顕的に観察した。得られた結果は次の通りである。

1. 基底膜は真皮の生死にかかわらず形成され、基底膜構成成分は表皮細胞によって産生されることが示された。しかし、産生される基底膜の状態は真皮の生存の程度によって影響されることが注目された。

2. 基底膜の形成は半接着斑の有無にかかわらずみとめられたことから、半接着斑は基底膜構成成分の最初の沈着に必ずしも必要ではなく、むしろ基底膜を基底細胞に接着させる装置として働いているものと考えられる。

3. Anchoring fibril は表皮と死滅真皮とを再結合させた場合には形成されなかった。この所見は anchoring fibril の形成には真皮が生きていることが必要であることを示している。Zona reticularis は表皮に接近する線維芽細胞によって形成されるが、anchoring fibril は zona reticularis と関係なく形成される。

4. Microfibril は表皮及び結合組織細胞から産生されることが示された。

5. 表皮と生存真皮を高濃度にニワトリ胚抽出液を含む培養液で培養すると、コラゲナーゼ活性の上昇が証明された。形態学的には真皮のコラゲン線維の分解と FLS 様線維の増加があり、基底膜の形成はみられなかった。

謝辞：御指導を賜りました恩師梶川欽一郎教授に深謝の意を表します。また、研究遂行に際して御助言、御協力を戴きました教室員各位と電子顕微鏡室技術員の方々に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Dodson, J. W. : J. Embryol. Exp. Morph., 17, 83 (1967).
- 2) Wessells, N. K. : Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 52, 252 (1964).



- 3) McLoughlin, C. B. : J. Embryol. Exp. Morph., 9, 385 (1961).
- 4) Hay, E. D. & Dodson, J. W. : J. Cell Biol., 57, 190 (1973).
- 5) Gross, J. & Lapiere, C. M. : Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 48, 1014 (1962).
- 6) Briggaman, R. A. & Wheeler, C. E. : J. Invest. Dermatol., 65, 71 (1975).
- 7) Pierce, G. B. Jr. : Cancer Res., 25, 656 (1965).
- 8) Pierce, G. B. Jr. & Nakane, P. K. : Lab. Invest., 17, 499 (1967).
- 9) Blumcke, S., Rode, J. & Niedorf, H. R. : Z. Zellforsch., 93, 84 (1969).
- 10) Cohen, A. M. & Hay, E. D. : Develop. Biol., 26, 578 (1971).
- 11) Dodson, J. W. & Hay, E. D. : Exp. Cell Res., 65, 215 (1971).
- 12) Briggaman, R. A., Dalldorf, F. G. & Wheeler, C. E. Jr. : J. Cell Biol., 51, 384 (1971).
- 13) Briggaman, R. A. & Wheeler, C. E. Jr. : J. Invest. Dermatol., 51, 454 (1968).
- 14) Bell, R. & Kellum, R. E. : Acta Dermatovenereol., 47, 350 (1967).
- 15) Epstein, W. L. : J. Invest. Dermatol., 47, 551 (1966).
- 16) 北田博久 : 十全医会誌, 84, 513 (1975).
- 17) Nadol, J. B. Jr., Gibbins, J. R. & Porter, K. R. : Develop. Biol., 20, 304 (1969).
- 18) 堀 功 : 十全医会誌, 83, 379 (1974).
- 19) Palade, G. E. & Farquhar, M. G. : J. Cell Biol., 27, 215 (1965).
- 20) Swanson, J. : J. Invest. Dermatol., 50, 195 (1968).
- 21) Laguens, R. : J. Ultrastruct. Res., 41, 202 (1972).
- 22) Kajikawa, K. & Kakihara, S. : Exp. Mol. Path., 11, 17 (1969).
- 23) 北野英一, 三輪淳夫, 山村第一, 井川一正, 桃井文夫, 黒田邦彦, 梶川欽一郎 : 十全医会誌, 85, 8 (1976).
- 24) 梶川欽一郎 : 日病会誌, 64, 3 (1975).
- 25) 勝田省吾 : 十全医会誌, 85, 154 (1976).
- 26) Pérez-Tamayo, R. : Lab. Invest., 22, 137 (1970).
- 27) 近藤勝彦 : 十全医会誌, 83, 163 (1974).
- 28) 寺田 督 : 十全医会誌, 85, 222 (1976).
- 29) Hashimoto, K., Yamanishi, Y., Maeyens, E., Dabbous, M. K. & Kanzaki, T. : Cancer Res., 33, 2790 (1973).
- 30) Jeffrey, J. J. & Gross, J. : Fed. Proc., 26, 670 (1967).
- 31) Jeffrey, J. J., Coffey, R. J. & Eisen, A. Z. : Biochem. Biophys. Acta., 252, 136 (1971).
- 32) Gross, J. & Nagai, Y. : Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 54, 1197 (1965).
- 33) Abe, S. & Nagai, Y. : J. Biochem. 73, 897 (1973).
- 34) Kefalides, N. A. : Biochem. Biophys. Res. Comm., 45, 226 (1971).

## 写 真 説 明

写真1. 剥離表皮. 半接着斑(↑)は残存, 基底膜はみられない. ×20,000.

写真2. 剥離真皮. 基底膜(B)は真皮側に付着. ×11,200.

写真3. 「表皮+生存真皮」の器官培養, 1日目. 基底細胞の表面に薄い基底膜(B)の形成. ×17,000.

写真4. 同上, 4日目. 基底細胞の小突起周辺の基底膜様物質(BI)の集積があり, 多数の anchoring fibril が形成(↑). V: 小胞. ×22,400.

写真5. 同上, 4日目. 表皮は基底膜で被われているが, 半接着斑の少ないところでは lamina lucida が拡張(↑). ×25,000.

写真6. 同上, 6日目. 表皮は基底膜で被われる. 多数の半接着斑がみとめられる. 矢印: anchoring fibril, L: 脂肪滴. ×25,000.

写真7. 「表皮+生存真皮」のCAM 上移植, 6日目. 表皮は基底膜で被われる. 半接着斑が多数みとめられる. Zona reticularis の形成(Z). 矢印: anchoring fibril, C: 結合組織細胞. ×10,500.

写真8. 「表皮+死滅真皮」のCAM 上移植, 6日目. 死滅真皮内へ変性した表皮細胞の膨出. 基底膜はみとめられない. ×6,000.

写真9. 同上. 表皮細胞(E)の下方に著明な microfibril (Mf)の集積. 基底膜の形成はない. ×30,000.

写真10. 同上. 表皮細胞(E)の下方にシート状の FLS 様線維の形成. 基底膜はみられない. ×30,000.

写真11. 同上. 変性の少ない表皮細胞下の基底膜(B)の形成. 半接着斑はみられない. Anchoring fibril は形成されない. ×24,000.

写真12. 同上. 表皮基底面に基底膜様物質 (B1) が付着. lamina lucida, 半接着斑は全く形成されない.  $\times 30,000$ .

写真13. 同上, 5日目. 表皮下の基底膜様物質 (B1) の集積. Anchoring fibril はみられない.  $\times 28,000$ .

写真14. 同上, 6日目. CAM 結合組織細胞が死滅真皮へ侵入した部分. 基底膜の形成. Anchoring fibril ( $\uparrow$ ) がみとめられる. 半接着斑 (H) が少ない.  $\times 18,000$ .

写真15. 高濃度 CEE を含む培養液で培養された「表皮+生存真皮」, 5日目. 変性した表皮細胞 (E) 直下, 結合組織細胞 (C) の周囲に FLS 様線維の形成 ( $\uparrow$ ). L: 脂肪滴.  $\times 15,000$ .

写真16. 真皮のみの高濃度 CEE を含む培養液による

培養, 6日目. 線維芽細胞 (C) の周囲に FLS 様線維 ( $\uparrow$ ) と microfibril (Mf) の形成. L: 脂肪滴.  $\times 30,000$ .

写真17. コラゲンゲル融解. 高濃度 CEE を含む培養液で培養した「表皮+生存真皮」の組織片 (左) と標準培養液で培養した組織片 (右).

写真18. コラゲンゲル融解. 高濃度 CEE を含む培養液による真皮の培養組織片 (左) と標準培養液による培養組織片 (右).

写真19. コラゲンゲルを融解した培養組織片. 真皮コラゲン線維の消失と FLS 様線維の形成 ( $\uparrow$ ).  $\times 15,000$ .

写真20. コラゲンゲルを融解しなかった培養組織片. 多数のコラゲン線維がみとめられる. FLS 様線維は形成されない.  $\times 15,000$ .

### A b s t r a c t

For the purpose of investigating epidermo-dermal interaction the following experiments were carried out. Epidermis and dermis in the young mouse skin were separated by trypsin digestion. The epidermis was recombined with the viable or non-viable dermis. The recombinants were cultured in vitro, or grafted to chick chorioallantoic membrane for 1 to 6 days, and examined by electron microscopy. The results obtained were as follows:

(1) Formation of basal lamina occurred in recombinants of epidermis with both viable and non-viable dermis, indicating that the constituents of the basal lamina were produced by epidermal cells. It was, however, noted that the quantity of basal lamina produced appeared to be affected by the degree of dermal viability.

(2) Basal lamina was formed no matter whether hemidesmosomes were present or not. This finding suggests that hemidesmosomes are not necessary for the initial deposition of basal lamina constituents, but may serve as an apparatus adhering basal cells to basal lamina.

(3) Anchoring fibrils were not found in recombinants of epidermis with non-viable dermis, indicating that dermal viability was required for the formation of these fibrils. In recombinants of epidermis with viable dermis, anchoring fibrils appeared independently of the presence of zona reticularis which was formed by fibroblasts lying close to the epidermis.

(4) There was morphological evidence indicating that both epidermal and mesenchymal cells were capable of producing microfibrillar components in the dermis.

(5) In recombinants of epidermis and viable dermis which were cultured in medium containing high concentration of chick embryo extract, increased collagenolytic activity was demonstrated. Morphologically there were lysis of collagen fibers and an increasing number of FLS-like fibers. No basal lamina was formed.



















