

実験的表皮嚢腫に関する研究

梶川 浩

外傷性表皮嚢腫の研究は、以前より行われているが、単離状の個々の表皮細胞が皮下組織に迷入した状態を設定した研究は行われていない。今回、ラットの背部皮膚真皮内に遊離表皮細胞の自家移植を行い、個々の表皮細胞の動態および運命を画像解析システムにて検討し、さらに、移植表皮細胞の増殖と分化を電子顕微鏡的に観察した。

(実験方法)

実験動物は、F344系雄ラット（生後5週、体重100g）を使用した。ラットの両側耳介を切離し、軟骨除去後トリプシン処理して、DNase-I溶液下に表皮細胞浮遊液を作製した。そしてウシ胎児血清添加MEM培地を加えて濾過した後、PBS溶液で洗浄して表皮細胞懸濁液を作製し、それをラットの背部皮膚真皮内に注射し、経時的に生検を施行した。生検した材料は二分割し、一方をH-E染色切片としてハイグレード画像解析装置による画像解析を行い、他方は超薄切片を作製して電顕的に観察した。

(光学顕微鏡および電子顕微鏡的所見)

注入後6時間では、遊離表皮細胞が真皮下層から筋層にかけて散在していた。12時間目には隣接する表皮細胞間にデスモゾームの形成が認められた。1日目には表皮細胞の増殖によりネストを形成した。2日目には表皮様構築が更に進展し、最下層の基底細胞様表皮細胞には、基底板の形成が認められた。3日目には表皮様構築の中心部に角質細胞層の形成が見られた。5日目には最下層の表皮細胞に完全な基底板が形成され、anchoring fibrilが観察された。7日目には、典型的な表皮嚢腫構造を呈した。基底細胞層の表皮細胞は扁平化が進み、基底板の不整が目立つようになった。嚢腫の周囲では多数の線維芽細胞による被包化が強まった。14日目には表皮細胞はすべて角質化し、角化嚢腫の周囲に異物巨細胞や組織球が出現した。そして21日目には角化嚢腫は消失し、もはや真皮内には観察されなかった。

(光学顕微鏡的レベルでの画像解析)

画像解析にて表皮嚢腫の表皮細胞と耳介正常皮膚の表皮細胞との比較を行った。そして、以下の結果を得た。

(1) 表皮嚢腫の表皮細胞は正常皮膚の表皮細胞に比べ、個々の核の平均面積は有意に小さい値を示した。

(2) 嚢腫壁の表皮細胞は、正常表皮細胞よりも有意に扁平化の傾向を示した。

この実験的嚢腫の消失は、表皮様構築が完成して嚢腫を形成した後に、何らかの理由によって増殖能をもった表皮細胞がその分裂機能を停止し、表皮細胞の供給が途絶えてしまうことによると考えられた。

(平成3年9月21日採用)

An Experimental Epidermal Cyst : A Study by Light and Electron Microscopy, and the Image Analysis Method

Hiroshi Kajikawa

Several studies of traumatic epidermal cysts have previously been carried out, but there have been no reports as to whether the implantation of autologous epidermal cells (EC) can cause continuous development of these cysts. The purpose of this study was to observe the fate of the epidermal cysts formed by an intradermally implanted EC.

Materials and method : F344 male rats weighing about 100 g each were used. The ears were split along the cartilage, which was removed together with subcutaneous tissue. The specimens were trypsinized, after which the epidermis was separated from the dermis. An EC suspension was prepared from the epidermal sheets and this was injected intradermally into the shaved back skin of the rats. Specimens were obtained by punch biopsies from 6 hrs to 21 days after injection of the EC under general anesthesia. These specimens were observed light and electron microscopically. In addition, they were analyzed by light microscopic morphology, using an automatic image analyzer system.

Light and electron microscopic observations : Six hours after injection, the implanted EC were observed diffusely through out the dermis, in which moderate edema had developed. In some intercellular regions of the EC, an early stage of cell adhesion began to appear. Twelve hours after injection, mature desmosomal attachments were observed. One day after injection, the EC formed small nests associated with cellular infiltration. Two days after injection, large nests consisting of the proliferated EC resembled the normal epidermal structure, and basal lamina began to form gradually at the epidermal-dermal interface. On day 3, the EC were found to have formed epidermal cysts with central keratinization. Anchoring fibrils appeared at the epidermal-dermal interface on day 5. Seven days after injection, the cysts developed fully mature epidermal cysts like those observed in clinical cases. However the EC had predominantly become flattened cells, and the basal lamina was more irregular than it was on day 5. Fibroblasts surrounded the cysts, resulting in collagenation. Fourteen days after injection, all EC had become horny cells in the cystic epidermis and, as the result, they became keratinous remnants. Mononuclear cells and giant cells appeared around the cysts. On day 21, epidermal cysts were entirely absent from the dermis.

Morphometric analysis by an automatic image analyser : On morphometric comparison of the cystic wall with normal epidermis, the results were as follows,

(1) The mean nuclear area of each keratinocyte from the epidermoid cyst walls was significantly smaller than that from normal epidermis.

(2) The shape of each nucleus in the cystic walls was significantly flatter than that in the normal epidermis.

In this study, the growth environment which at one time induced the cystic proliferation of implanted autologous EC but not their continuous proliferation was observed in the dermis. (Accepted on September 21, 1991) *Kawasaki Igakkaishi* 17(3): 269-288, 1991

Key Words ① Epidermal cyst ② Epidermal cell
③ Intradermal implantation

目 的

外傷性表皮嚢腫は、表皮下真皮組織内に迷入した表皮組織が増殖して嚢腫を形成するものといわれている。¹⁾しかし、全層皮膚組織の表皮下移植によって、移植表皮細胞が必ずしも表皮様構築を維持し、永続的な増殖を営むことが可能になるとは限らず、²⁾皮下組織内では、表皮細胞の増殖に対して抑制的に働く内部環境因子の存在が示唆されている。³⁾

これまで、動物に外傷性表皮嚢腫を発生せしめる実験的研究では、完全に構築された表皮組織が使用されている。¹⁾しかし、表皮嚢腫が外傷による表皮細胞の迷入と考えられているにもかかわらず、表皮構築をもたない状態、換言すれば、表皮細胞が個々に遊離した状態にて自己の真皮内に存在する場合でも、表皮嚢腫を形成し、表皮構築の永続することが可能か否かについては、いまだ解明されていない。

1980年、Doranら⁴⁾は、家兎の皮膚、角膜、食道の各々の扁平上皮から遊離上皮細胞を作製し、ヌードマウスへの皮内移植を行い、それらの移植細胞の分化経過を観察し報告した。この異種移植は、上皮細胞の増殖及び分化を比較研究する目的で行われているが、その実験の結果、移植細胞による嚢腫形成が観察されている。その後、Lavkerら⁵⁾は家兎の遊離表皮細胞を、ヌードマウスの背部皮内に異種移植し、その経過を電子顕微鏡的に観察した。それらの実験結果によると、皮内移植された家兎遊離表皮細胞は表皮嚢腫を形成し、35日目の観察においても生

存したと報告している。

一方、中川ら⁶⁾はモルモットの耳介皮膚から遊離表皮細胞を作製した後、同種モルモットの背部皮内に注入移植した後の経過を観察した。さらに、シクロスポリンを投与したモルモットにおいて同様の同種移植を行った。その結果、同種モルモットへの移植では、移植表皮細胞は表皮嚢腫を形成したが、移植後5日目には消滅していることが観察された。しかし、シクロスポリンを投与したモルモットでは、表皮嚢腫の生存期間が有意に延長したと報告している。

今回著者は、ラットの耳介表皮を用いて遊離表皮細胞を作製し、背部真皮組織内に自家移植を行った。そして、移植細胞により形成された表皮嚢腫について、その個々の移植細胞の増殖と分化の時間的経過をハイグレード画像解析装置にて定量的に検討した。さらに、それらの移植表皮細胞の動態を電子顕微鏡的に観察し、形成された表皮嚢腫における表皮様構築の推移を微細構造的に調べた。

材料および実験方法

実験動物は、F344系雄ラット(日本クレア)、の生後5週齢、体重95~100gを39匹使用した。

遊離表皮細胞を皮内移植する手法は中川ら^{6),7)}の方法を用いた。簡単に記載すると、ラットの両側耳介をペントバルビタールナトリウム(35mg/kg, Pitman-Moore)麻酔下に切離し、耳介を軟骨層で両側に剝離して表裏の皮膚組織を2枚に分離し、耳介軟骨を除去した後0.2%トリプシン(1:250, Difco)で37°C、1時間処理し、

皮下組織を除去した後、0.025% DNase-I (crude, Sigma) 溶液下に先の丸いガラス棒で軽くしごいて表皮細胞浮遊液を作製した。採取した表皮細胞数は、 $5 \sim 6 \times 10^6$ 個であった。ウシ胎児血清添加 Eagle MEM 培地 (Flow Laboratories) を加えてガーゼで濾過した後、0.01 M phosphate-buffered saline (pH 7.2) 溶液で3回洗浄して最終的に0.6 mlの表皮細胞懸濁液を作製し、それをラットの背部皮内に4カ所に分けて注射し、経時的(3, 6, 12時間, 1, 2, 3, 5, 7, 9, 12, 14, 18, 21日目)に、各々3匹ずつ生検を施行した。生検した材料は二分割し、一方はヘマトキシリン・エオジン染色を行い光学顕微鏡にて観察し、他方はグルタルアルデヒド・オスmium酸で固定した後、エポン812で包埋し、酢酸ウラニール・クエン酸鉛による電子染色後、H-500型電子顕微鏡(日立)で観察を行った。また、ヘマトキシリン・エオジン染色標本をIBAS-2000型ハイグレード画像解析装置(Kontron Bildanalysen, Germany)にて画像解析を行った。

結 果

1. 光学顕微鏡的組織所見

注入後3~6時間: 遊離状の表皮細胞が、背部の真皮下層から筋層にかけてびまん性に散在し、ときには集簇状となっていた。多形核白血球の浸潤がみられ、結合組織は軽度浮腫状を呈した (Fig. 1)。

注入後12~48時間: 表皮細胞が増殖し種々の大きさのネストを形成した。これらのネストには表皮様構築がみられ、その周囲には小円形細胞

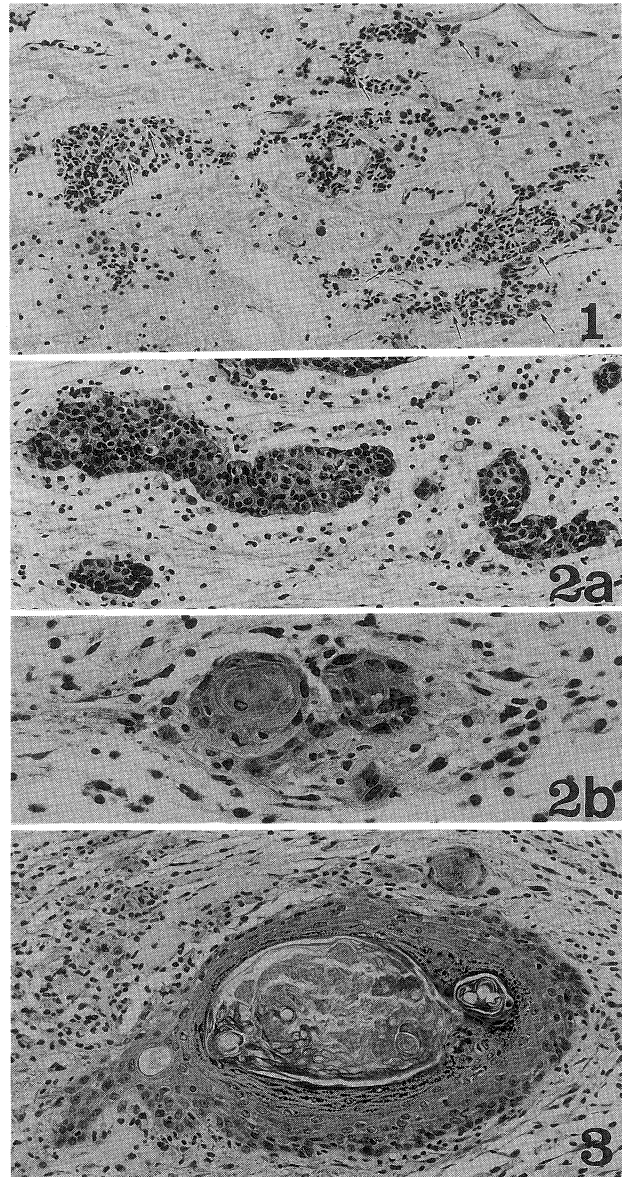


Fig. 1. Skin of a rat six hours after implantation, the implanted epidermal cells (arrowheads) were observed diffusely through the dermis with cellular infiltration (H-E, $\times 200$).

Fig. 2. a. Twenty-four hours after implantation, epidermal cells were found to proliferate actively and formed nests of various size in the dermis (H-E, $\times 200$).

b. A high magnification micrograph of a nest. The nest composed of 10-15 epidermal cells showed an epithelium-like structure (H-E, $\times 400$).

Fig. 3. Three days after implantation, the epidermal cells of the nest formed a cyst with an epithelium-like structure lining the cavity and central keratinization (H-E, $\times 200$).

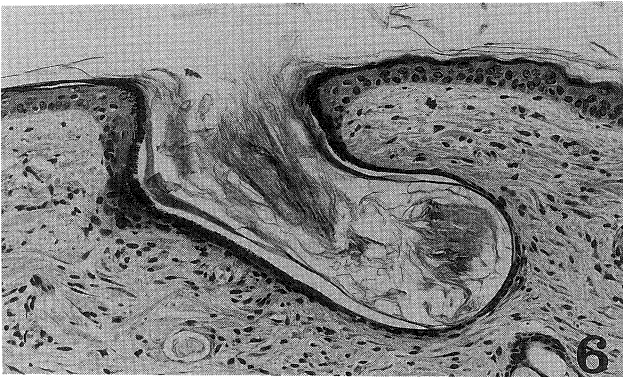
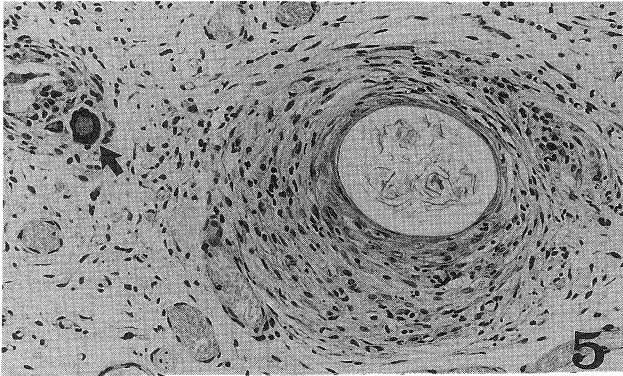
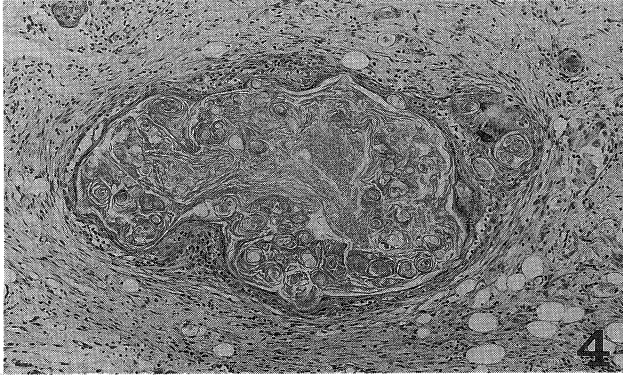


Fig. 4. Seven days after implantation, a cyst formed by the implanted epidermal cells developed a fully mature epidermal cyst with a lot of keratinous debris (H-E, $\times 200$).

Fig. 5. Eighteen days after implantation, cells of the thin living cellular layers in an epidermal cyst were extremely flattened. Beneath the cysts a multilayered sheath of fibroblasts was observed. Note the infiltration by the accumulation of lymphocytes, histiocytes, and foreign body giant cells (arrowhead) (H-E, $\times 200$).

Fig. 6. Keratinous squamae due to epidermal cysts were eliminated through the perforating canals of the skin (H-E, $\times 200$).

と多形核細胞の浸潤を伴っていた。また浸潤細胞は、ネストの細胞間にも入りこんでいた(Fig. 2 a, b)。

注入後3~5日：ネストは成長して互いに融合するものがあり、大小さまざまな表皮様構築の集塊を形成した。これらのネストには、辺縁から中心に向かって顕著な角質の形成が認められ、嚢腫が形成された(Fig. 3)。嚢腫壁の表皮様構築は、真皮に境された基底細胞層と4~6層の有棘細胞層、3~5層のケラトヒアリン顆粒を豊富に含む顆粒細胞層から成っていた。また、嚢腫を取り囲むように線維芽細胞の増殖がみられた。

注入後7~12日目：遊離表皮細胞により形成された嚢腫は、典型的な表皮嚢腫様の構造を呈した。中心の角質部は、より大きく増大して角質物質を大量に蓄積したが、その反面嚢腫壁の表皮細胞層の厚さは菲薄になった(Fig. 4)。

注入後14~18日目：真皮内に成長した嚢腫の消失する傾向が認められるようになった。嚢腫壁の細胞層の菲薄化がいつそう進展して1層ないし2層となり、表皮細胞も極めて扁平化し、核も消失するものが多くなった。また、壁の周囲では線維芽細胞による被包化が強まった(Fig. 5)。さらに異物巨細胞や貪食型の大型の単核細胞(組織球)が出現し、角質化の進行により結果的に崩壊した嚢腫の破砕片の周囲に浸潤した。

真皮浅層にある嚢腫のなかには、背部の表皮や毛包上皮などの付属器官と癒合するものも見られた。その結果、内容物である角質物質はこれらを経由して、最終的に表皮外に排出された(Fig. 6)。

21日目に採取した3匹のラットに

において、背部の計12カ所の真皮組織内には表皮
嚢腫はもはや認められなかった。

2. 光学顕微鏡的レベルでの画像解析

移植細胞により形成された表皮嚢腫の壁を構
成する個々の表皮細胞について、核面積及び核
の形態を経時的に調べ、ラット耳介の正常表皮
細胞から得たデータと比較を行った。ここでは、
核形態について、F-shape という形状係数(核
の断面が真円のときは最大1となり、不規則度
が高いほどその数値は小となる)を用いて核の
最長径に対する最短径の比を計測した。さらに、
表皮嚢腫の無細胞性の角質面積と有核性表皮細胞
の総核面積を測定し、表皮嚢腫の断面積に対
する角質面積及び総核面積との比も調べた。上
記の比較検定は、Student's T test にて行った。

表皮細胞の核面積は、ラット耳介皮膚の表皮
細胞核に比べ、移植後3時間では差がみられな
かったが、移植後1日目より増大し始め、3日
目にピークを示した。その後は減少傾向を示す
が、7日目までは正常表皮細胞核に比べ有意に
増大傾向を持続した。しかし、9日目になると
有意差がなくなり、12日目以後にはむしろ減少
傾向を示すようになった (Fig. 7)。

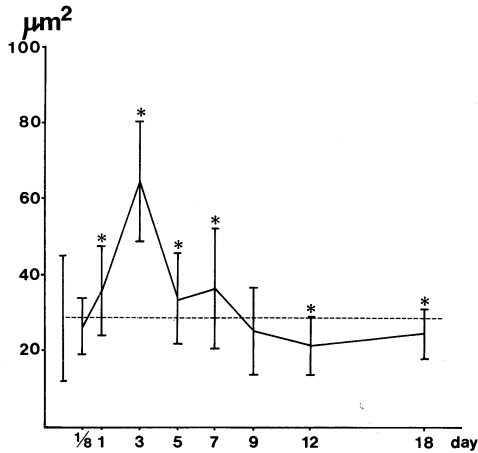


Fig. 7. Mean nuclear area (±SD) in the epidermal cysts with time following implanta-
tion.
Solid line: Cystic epidermal cell group
Dashed line: Normal epidermal cells of the ears as control *p<0.05

核形態の推移では、移植直後の細胞核は、F-
shape が約0.8と類円形をしており、正常皮膚の
表皮細胞核の0.7より大きい値を示していた。そ
して1日目ではほぼ同じになるが、3日目を過ぎ
てから急激に低下し楕円形への変化が強くなり、

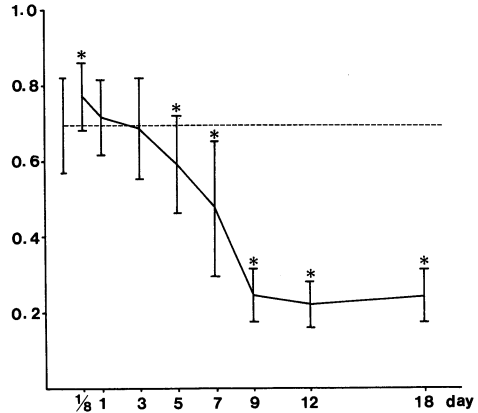


Fig. 8. Changes in the nuclear shapes of the cystic epidermal cells with time following implantation.
F-shape (±SD) is represented by a parameter as the shortest diameter/the longest diameter of each nucleus.
Solid line: F-shape of cystic epidermal cell group
Dashed line: F-shape of normal epidermal cells of the ears as control *p<0.05

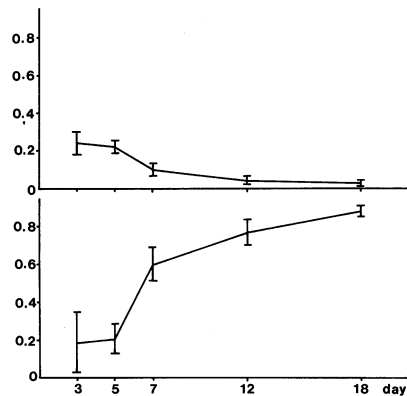


Fig. 9. Comparison of total nuclear area or keratinous area in the epidermal cyst and whole area of the cyst with time following implantation.
Upper: Ratio of total nuclear area in the cyst to whole area of the cyst
Lower: Ratio of keratinous area in the cyst to whole area of the cyst

9日目以後は約0.2と長楕円の形態を示した(Fig. 8).

さらに、表皮嚢腫断面積に対する角質面積と総核面積の各々の占める比は、角質面積の占める比が3日目から18日目まで増加傾向を示し、とくに5日目から7日目にかけて顕著であった。これとは逆に総核面積の比は漸次減少傾向を示した(Fig. 9)。このことは、嚢腫壁を構築する表皮細胞の角化亢進により、有核性の細胞成分が喪失したことを意味している。

3. 電子顕微鏡的所見

移植後6～12時間：5～10個の表皮細胞が集簇したネストの電子顕微鏡的観察によって、隣接する表皮細胞間にデスモゾームの形成過程が認められた。デスモゾームは、まず細胞膜に接着板が出現し、接着板にトノフィラメントが入り込むことによって完全なデスモゾーム構造が完成し、細胞間の接着が行われた(Fig. 10)。ネストを構築する表皮細胞の核は細胞質に比して大きく、円形のものも少なく楕円形または核膜に軽度の凹凸をもつ不整形のものが多数を占めた。細胞質内には、種々の程度にトノフィラメントの凝集が認められたが、ケラトヒアリン顆粒は認められなかった。トノフィラメントの凝集は、移植直前の遊離表皮細胞と比較して、移植12時間経過後の表皮細胞では、顕著に増大しており、とくに核の周囲を圍繞するような所見が認められた。また、細胞質内に多数の空胞を伴った変性表皮細胞や多くの細胞破砕片がネストと混在して認められた。

移植後1日目：移植表皮細胞のなかで、細胞の核が大きく、円形ないし楕円形を呈するものが多く認められるようになった。核クロマチンは核膜に沿って認められるのみで、そのため核は明調となった。細胞質内のトノフィラメントの凝集は軽度であり、びまん状に散在した(Fig. 11)。これらの表皮細胞の細胞質内には、ときには貪食体が見られた(Fig. 12)。貪食体は、トノフィラメントの凝集した表皮細胞由来の細胞崩壊物が主であったが、ときには、1個の細胞の形態をとどめている貪食体も認められた。ま

た、上に記載したような明るい核と細胞質をもった基底細胞様の表皮細胞とデスモゾームで接着したdark cellの出現が認められた(Fig. 13)。このdark cellは、ミトコンドリアの膨化と細胞質内の空胞化を伴い、細胞全体が収縮状となって暗調を呈した。また、細胞間には好中球やリンパ球が見られたが、表皮細胞と特別な接着など特異な所見は認められなかった。

移植後2日目：移植表皮細胞の増殖集塊に表皮構築様の層状構造が認められるようになった。この層状構造は、真皮結合組織に直接接する細胞層から集塊の中心部に向かい5～6層を形成した細胞が基石状に並列して見られた(Fig. 14)。最下層の細胞層は表皮の基底細胞層様の細胞の配置をとり、細胞の外形は類円形で、核は大きく、核膜は軽度に凹凸がある。細胞質内には、豊富なりボゾームやミトコンドリアが認められるが、トノフィラメントは少なかった(Fig. 15)。ときには、結合組織側の細胞膜が部分的に肥厚してヘミデスモゾームの形成が認められ、この部に基板様の不定形の物質が沈着したが、基板の連続性は認められなかった(Fig. 16)。最下層の細胞層より上層に向かって細胞の形態は、やや扁平化する傾向が認められた。細胞破砕片は、細胞間隙には認められず、むしろ最下層の細胞層直下の結合組織間に累積しているのが認められた。

移植後3～5日目：移植表皮細胞による表皮構築様の層状構造の中心部に角質細胞層の形成が認められるようになった。この角質細胞層は3～6層の菲薄な細胞が輪状に配列し、角質部を形成した。この角質細胞層につづく細胞層では、細胞質内に極めて顕著なケラトヒアリン顆粒の出現が認められた(Fig. 17)。ケラトヒアリン顆粒を含有する細胞層は3～5層で、正常細胞の表皮構築からいえば、有棘細胞層の上層から顆粒細胞層に該当している。角質細胞層に近い細胞の核は不整形で、細胞質の占める割合が大きくなり、また細胞質では、トノフィラメントの凝集が顕著に認められた。移植表皮細胞による表皮構築の最下層すなわち基底細胞層

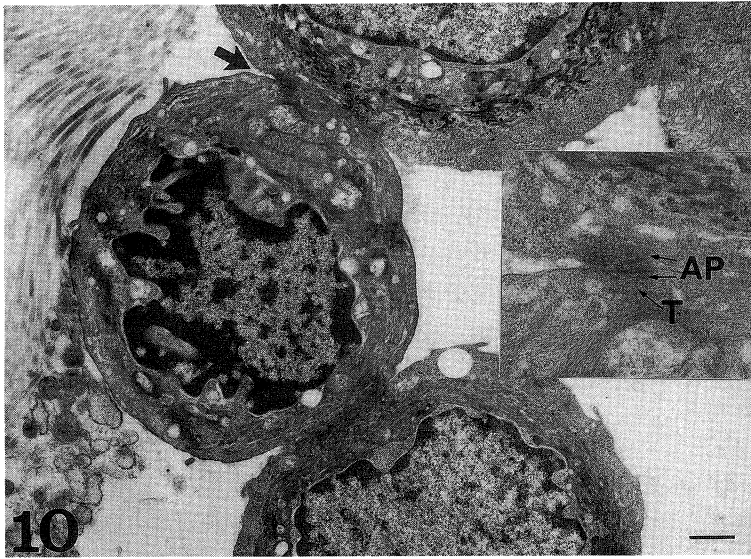


Fig. 10. Electron micrograph of implanted epidermal cells on 6 hours after implantation. Each epidermal cell as a whole is relatively round. In intercellular regions, desmosomal attachments (arrowhead) are observed. T; Tonofilament, AP; Attachment plate. Bar=1 μ m.



Fig. 11. Electron micrograph of a small nest composed with epidermal cells on one day after implantation. The nuclei of these cells are round. Bar=5 μ m.

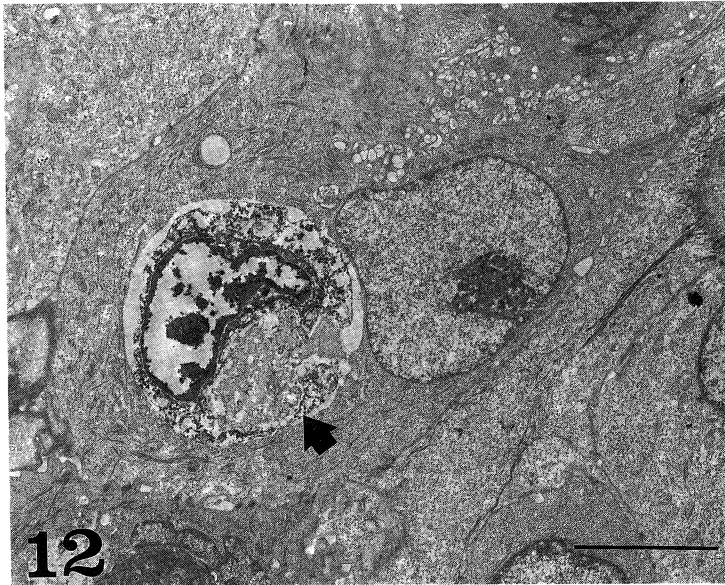


Fig. 12. Electron micrograph of an epidermal cell phagocytosing a keratinized cell (arrowhead) on one day after implantation. This cell contains a still recognizable nuclear fragment in the cytoplasmic phagosome. Bar=5 μ m.

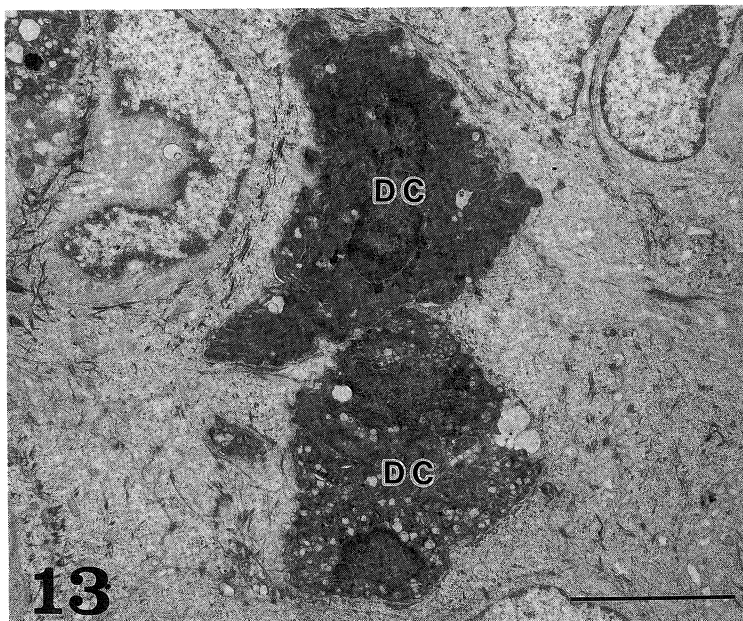


Fig. 13. Electron micrograph of dark cells with shrinkage degeneration in an epidermal nest on one day after implantation. In the cytoplasm of dark cells (DC), swelling of mitochondria is remarkable and vacuolization tends to occur readily. The DCs are bound to the adjacent epidermal cells through desmosomes. Bar=5 μ m.

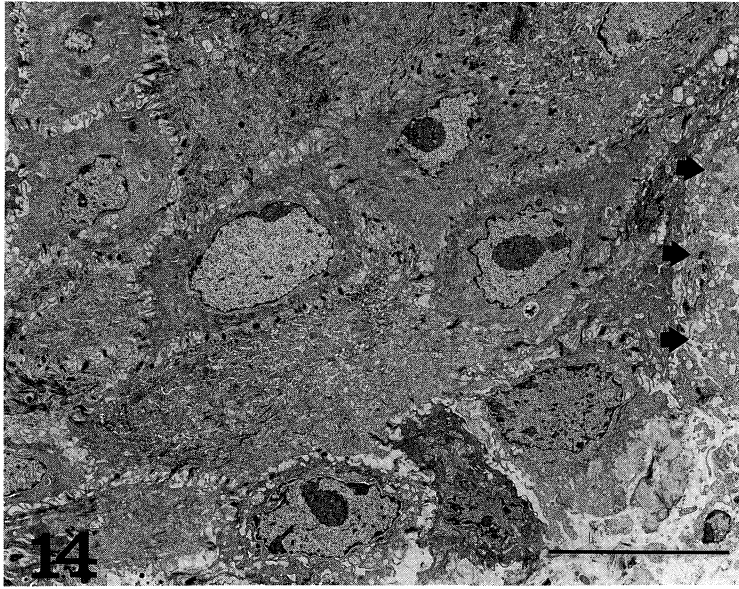


Fig. 14. Electron micrograph of the epidermal cell layers in epidermal cyst formation on 2 days after implantation. Basal and prickle layers of the cystic wall resemble the normal structure of the epidermis. Debris (arrowheads) due to implanted epidermal cells remains in contact with the epidermal cells in the connective tissue. Bar=10 μ m.

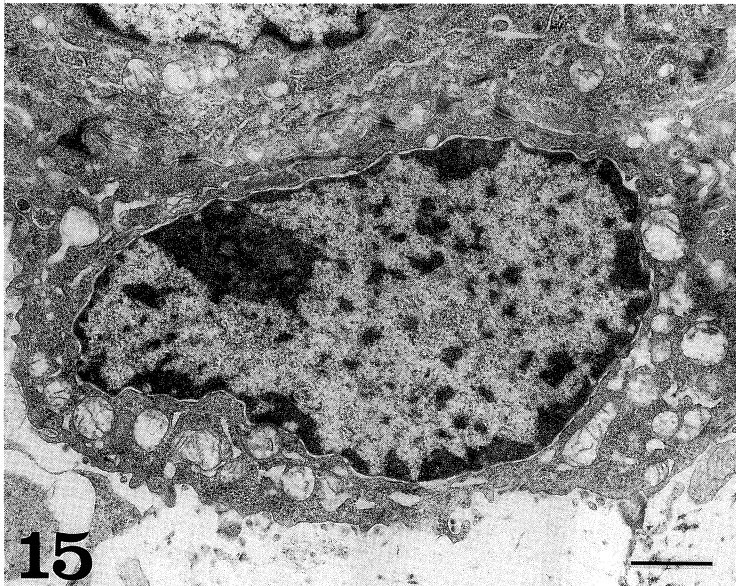
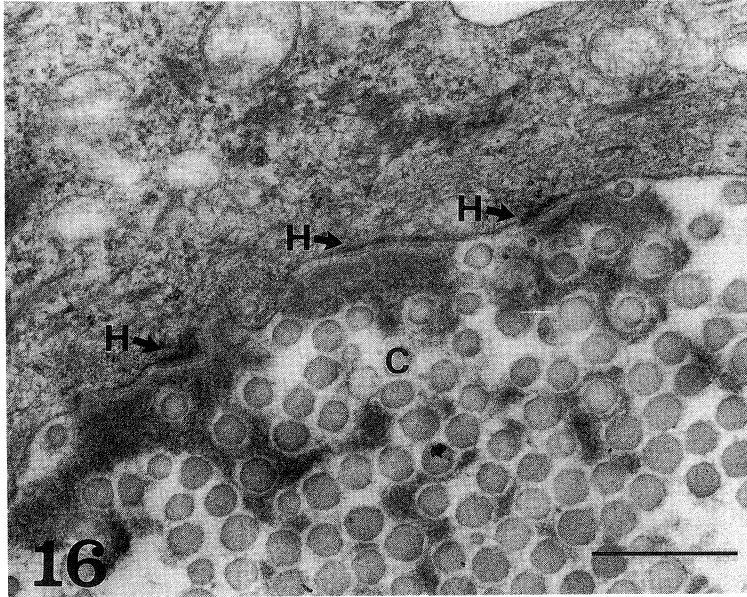
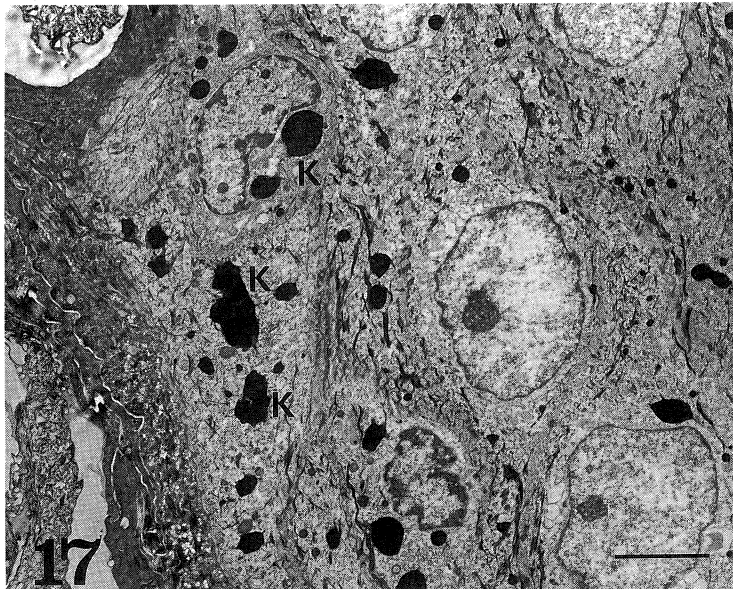


Fig. 15. Electron micrograph of a basal cell of the epidermal cyst on 2 days after implantation. This cell is oval in outline and has abundant mitochondria. Bar=1 μ m.



16

Fig. 16. Electron micrograph of the cystic epidermal-dermis interface on 2 days after implantation. Incomplete basal lamina is observed. H; Hemidesmosome, C; Collagen fiber. Bar=0.5 μ m.



17

Fig. 17. Electron micrograph of the cystic wall with keratin formation on 3 days after implantation. Keratin products are observed in the center of the cyst and a number of keratohyaline granules (K) began to appear below the horny layer of the cystic wall. Bar=5 μ m.

では、完全な基底板が形成され、anchoring fibrilの参入が認められた (Fig. 18). このような角質形成に至る表皮構築中には、しばしば表皮細胞間にリンパ球様細胞の非上皮性単核細胞の浸潤を認めるが、ランゲルハンス細胞は認めることができなかった。

移植後7~12日目：表皮様構築の中心部に形成された角質部は巨大になり、この角質部を包む細胞層に顕著な形態的变化が現れた。まず、基底細胞層に該当する細胞は、もはや類円形をとるものではなく、扁平化し核も細胞の外形に一致して長楕円形を呈した (Fig. 19). このような細胞の核膜は軽度凹凸があり、核膜周囲には核を取り囲むように空胞の形成が認められ、また、細胞質内では、粗面小胞体の膨化があり、トノフィラメントの凝集もびまん状に認められた。さらに、この細胞層の上層から角質層までの細胞は、顕著に扁平化し、細長い核が出現した。ケラトヒアリン顆粒の産生も減少し、小型のものが散在的に認められた。この反面、角質細胞層はよく発達し、空洞状の角質部には、多量の不定形の角質物質が見られた。一方、基底板については断裂があり、不連続性が目立つようになった。このような表皮囊腫の形態をとる表皮様構築は、その周囲を密なコラーゲン線維によって圍繞され、コラーゲン線維間には、粗面小胞体の顕著に発達した線維芽細胞が多数認められた。

移植後14~18日目：表皮囊腫の形態をとった表皮様構築の破綻が出現した。巨大な角質部を囲んで紐状となった表皮細胞は層状を呈するが、細胞はすべて角質化し、もはや有核性の表皮細胞を認めることはなかった (Fig. 20a). さらに、角質部は水腫状となり、残骸を残すのみとなって表皮構築は崩壊状態となった。このような表皮細胞の形状をとどめることのない角質破砕片の周囲には、多量のライソゾームを細胞質内に含有したマクロファージとリンパ球の蝟集するのが見られた (Fig. 20b).

考 察

1. 外傷性表皮囊腫の発生に関する諸説

外傷性表皮囊腫の組織由来及び発生機序に関しては諸説がある。¹⁾ 囊腫の由来に関する主な説は、先天的胚芽由来説 (Franke)、迷入した表皮組織由来説 (Reverdin)、迷入した異物に刺激誘発された皮膚付属器による上皮細胞由来説 (Pels-Leusden)などに代表される。その後、細胞のもつ幹細胞的な潜在能力や周囲組織における炎症の有無が影響するという説などが提唱された。⁸⁾

一方、外傷性表皮囊腫の発生機序に関する実験的研究では、Peer²⁾がヒトの胸部皮下に皮膚組織を移植した結果、移植組織が1カ月で消滅したため、ヒトの場合は単に表皮組織が皮下に迷入しただけでは、永続的に囊腫を形成するとは考え難いことを初めて報告した。また、梶川³⁾は、臨床例における外傷性表皮囊腫の表皮様細胞と、囊腫直上の被覆表皮の表皮細胞を、画像解析にて比較した結果、細胞核の面積や形状が有意に異なり、形態的には、表皮囊腫の表皮様細胞が迷入した表皮細胞由来とは断定できないことを報告した。

外傷性表皮囊腫については、日常の臨床でもしばしば経験する症例でもあり、^{9)~20)} また、今世紀のはじめより病態の解明に絶えざる努力が払われてきたにもかかわらず、その発生機序に関して、いまだ詳細は明確にされていない。

2. 実験的囊腫の形成過程

従来行われてきた表皮囊腫形成に関する実験では、構築の保たれた皮膚組織が使用されてきた。Bakerら²¹⁾は、全層の皮膚組織による囊腫形成の過程を調べるために、ラットの背部にシート状の全層皮膚を皮下移植して経時的に観察した。その結果、皮膚組織の辺縁の表皮細胞が増殖しつつ反転しながら伸展した後、互いに癒合することによって表皮囊腫を形成したことを報告した。

一方、今回の実験では、まず6~12時間で5

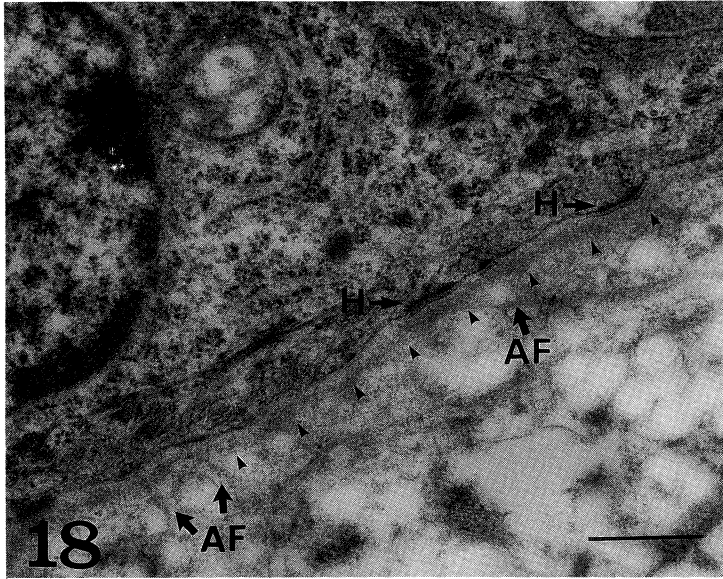


Fig. 18. Electron micrograph of the cystic epidermis-dermis interface on 5 days after implantation. Mature basal lamina is observed (arrows), and anchoring fibrils (AF) are linked to the basal lamina.
H; Hemidesmosome. Bar=0.5 μ m.

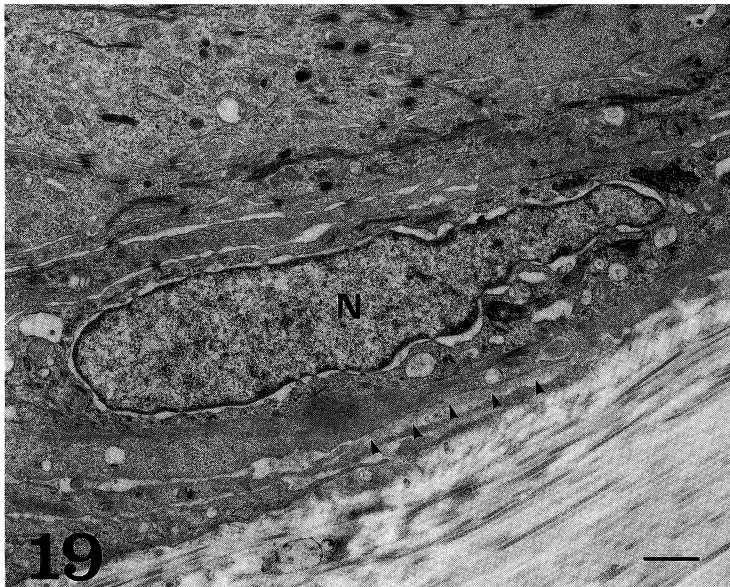


Fig. 19. Electron micrograph of the basal layer of the cystic wall on 7 days after implantation. A basal cell-like epidermal cell became gradually flattened in outline and vacuolization surrounding the nucleus is observed. A few mitochondrias are scattered in the cytoplasm. The rough endoplasmic reticulum is expanded. The basal lamina (arrows) is discontinuous in many places.
N; Nucleus. Bar=1 μ m.

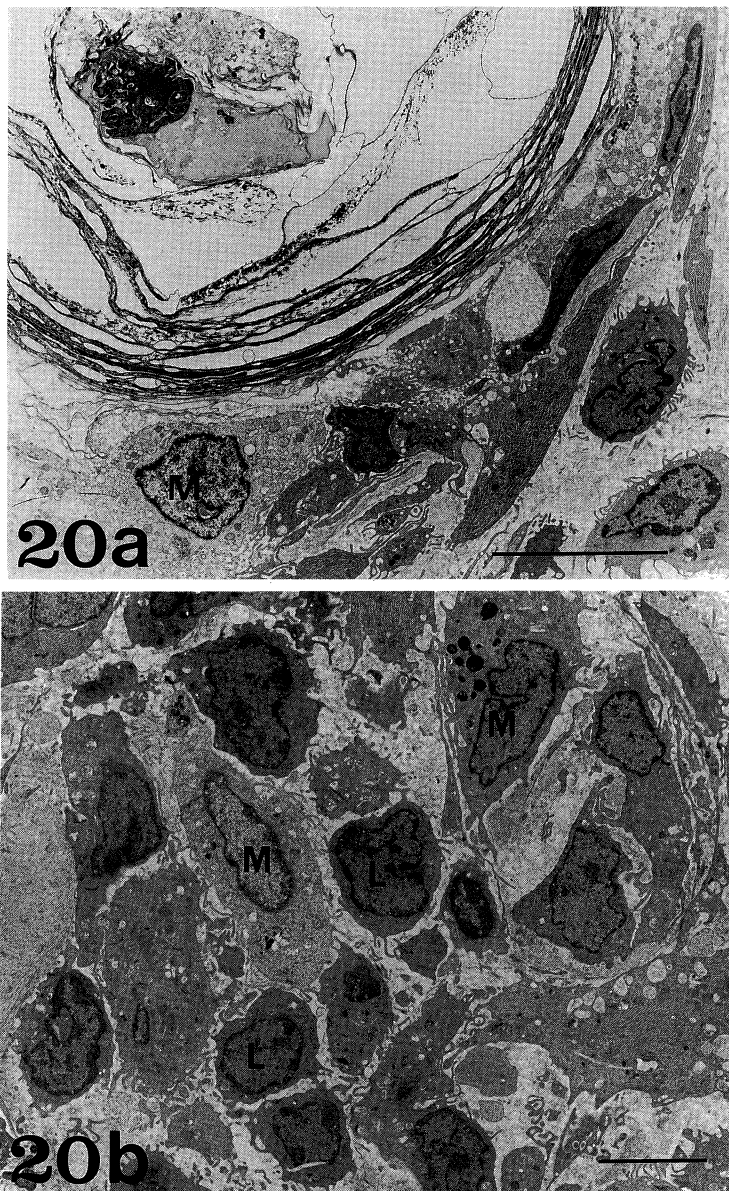


Fig. 20. Electron micrograph of a degenerated epidermal cyst on 14 days after implantation. The degenerated cystic wall is consisted of necrotic horny cells (a). Beneath the cyst, infiltration of macrophages (M) and lymphocytes (L) are observed in the edematous connective tissue (b). a : Bar = 10 μ m, b : Bar = 5 μ m.

～10個の遊離表皮細胞の細胞間結合によるネストが形成され、そのネストが成長して表皮様構築が行われた。すなわち、24時間ではそれらが融合し20～30個の表皮細胞による大ネストが形

成され、その中央付近から角質化が始まり、その角質層の増大によって3日目には表皮嚢腫の形態を呈していた。このようなネストにおける表皮細胞の増殖と分化の構造的関係については、

ネストを構成する表皮細胞のなかに、細胞分裂周期を繰り返す幹細胞が存在し、分裂による細胞の増殖そして分化が進行するものと思われた。表皮細胞に幹細胞の存在することは疑いのない事実で、基底細胞層にある幹細胞が分裂して、角質化し剥離していく細胞の数を補っているわけであるが、基底細胞層のレベルで一つの細胞群の集合体が増殖および分化の基本単位として存在するという、epidermal proliferating unit (EPU) の概念が Potten ら^{22)~24)} によって提唱されている。EPU では基底細胞の10~14個が集まって一つの六角形構造を構築し、そのうちの一つが幹細胞で、分裂した幹細胞の一方がこの六角形の細胞柱のなかを上昇しながら分化するという。したがって、移植の初期に真皮組織内に認められた10個前後から成るネストそのものがEPU に相当しているのかもしれない。

表皮細胞の角化の段階が一定方向への方向性をもつという極性傾向は、in vitro での遊離表皮細胞培養においても認められている。^{25)~27)} 単離された表皮細胞は、シート状に表皮様構築を形成する際に、培養皿に接した表皮細胞が立方形となり、上層の細胞が扁平化し最上層には角質層が形成される。

さらに、このような上皮細胞の構築における極性傾向の研究は、甲状腺上皮細胞によって行われている。^{28)~31)} 藤田ら³¹⁾ によると、間質組織内に存在するコラーゲン線維が上皮細胞の基底側を生み出し、上皮細胞の極性を誘導する可能性のあることを示唆している。今回の実験でも移植後2日目にコラーゲン線維束に接する最外層の基底細胞様の表皮細胞に基板の形成が始まる頃には中央の表皮細胞の一部で角化が始まっており、表皮細胞とコラーゲン線維との接触が、表皮細胞の極性傾向を規定してしまうのかもしれない。

一方、ラット耳介正常表皮では角質層や顆粒層は非常に菲薄であるが、移植された表皮細胞の表皮様構築では角質層の周囲に多数のケラトヒアリン顆粒を認めた。Billingham ら³²⁾ は、ハムスターの耳介皮膚表皮と足底真皮組織との交

差移植実験を行い、足底真皮上に移植された耳介皮膚の表皮細胞が著明な角化を示したことを報告した。そして、これは間質組織の存在が表皮細胞に影響を与えていることを示唆していると考えた。嶋ら³³⁾ は、間質組織中のコラーゲン濃度に着目し、その濃度変化が与える上皮分化への影響を、粘膜上皮組織を利用して in vitro で調べた。その結果コラーゲン濃度の増加は、上皮細胞の増殖能の促進だけでなく、その重層分化能も促進させ、大きな影響を与えることを示した。今回の実験においても、移植されたラット耳介表皮の表皮細胞が、結合組織の豊富な背部皮内に移植されたことにより、増殖のみならず分化も促進した可能性が示唆された。

3. 実験的嚢腫の画像解析

実験的嚢腫における表皮細胞の核面積は移植後1日目には正常表皮より増加し、3日目にピークとなった後、徐々に減少するが、9日目に正常皮膚と同程度の大きさになった。そして12日目にはむしろ正常皮膚の表皮細胞よりは減少していた。一般に核面積の増減は、核内DNAや核内蛋白の量を反映していると考えられている。^{34), 35)} 今回の実験でも、表皮細胞が角質細胞に至る分化の進行した12日目頃には正常表皮よりも核面積の減少を示す経過をとった。これは、増殖や表皮様構築形成に必要な蛋白の合成に関与する核内DNAが減少したことを示唆していると思われる。

表皮細胞核は移植の早期では類円形を呈するが、3日目より急速に紡錘形への形態的な変貌が認められた。このような形態変化の一つの要因としては、嚢腫壁において、表皮細胞が中央部に増大した角質物質と、周囲コラーゲン組織との狭間で物理的な圧迫を受けることが考えられる。Gömar ら³⁶⁾ は、in vitro で機械的圧力に対する表皮細胞の形態的变化を調べた。そして機械的圧迫ストレスによって表皮細胞の形態は紡錘形となり、角化も促進されたと報告した。すなわち、今回の表皮細胞核の類円形より紡錘形への経時的な移行は、in vivo においての、物理的圧迫力による表皮細胞への影響が多分に加味

されたものであると解釈できる。

以上の画像解析結果より、移植された遊離表皮細胞の増殖と分化の経過は、初期の増殖能亢進期と、引き続いて起こる分化能亢進期の二つに分けることができた。そして、その転換期となる時期は移植後3日目頃と推測された。

芦原ら³⁷⁾はヒトの皮膚を用いて³H-Tymidineの局所標識法による細胞の増殖と分化について調べた。それによると、基底細胞の世代時間は約4日と推定している。さらに、この基底細胞が、基底層にとどまる時間も平均4日であったという。Susi³⁸⁾は、マウスの口腔粘膜での基底細胞のターン・オーバーを調べ、顆粒細胞への分化は約5日かかり、角質化までは約7.5日と報告した。これらの結果より類推すると、今回の実験的嚢腫は、いったんは移植された時点で増殖能を保持した基底細胞の分裂によって形成されるが、次世代以後の増殖能を保持する基底細胞が何らかの抑制をうける結果、細胞分裂が停止して基底細胞の供給が途絶え、これがために表皮嚢腫全体として衰退してしまい、結果的に嚢腫の消失を招いたことがうかがわれた。

4. 実験的嚢腫の消失様式

移植後14~18日目に、線維芽細胞によって被包化された表皮嚢腫のほとんどは、角質産物となり、これらは異物として組織球(マクロファージ)や異物巨細胞に貪食された。しかし、このような貪食による消失様式とは異なり、正常表皮細胞や毛包上皮細胞が角質産物を取り込み、これらの細胞を経由して体外に排泄するような様式が認められた。この真皮内に存在する異物が、表皮や毛包上皮を通じて体外に排除される現象を、Mehregan³⁹⁾は transepithelial elimination(経上皮性排除)と呼称した。この現象の発現には、異物と表皮の位置的關係が重要であるとともに、ある程度の炎症細胞の浸潤が必要条件であると考えられている。⁴⁰⁾ 今回の実験でも、この経上皮性排除が観察されたのは、浅層の真皮内や毛包上皮に近接した所に存在した表皮嚢腫からであった。

5. 表皮様構築の微細構造

遊離表皮細胞の真皮内移植後6時間で細胞膜に接着板が認められ、デスモゾーム形成の初期段階が認められた。12時間では、トノフィラメントが接着板に入り込み、その完成が認められた。これは、Lavkerら⁵⁾のケラチノサイトの分化に関する実験でのデスモゾーム形成過程とほぼ同様の経過を示すものであった。さらに、創傷治癒におけるデスモゾーム形成の報告⁴¹⁾や、*in vitro*における細胞接着過程の研究^{42), 43)}においても同様の所見を呈するものであった。

また、基板とその接着装置であるヘミデスモゾームの形成は移植後2日目頃に認められたが、最初表皮細胞のコラーゲン線維側に、ヘミデスモゾームと対になった基板が出現し、経日とともに基板が細胞膜に沿って横に延び、不連続な基板が互いに連絡して連続性の基板が完成された。このような形成過程は、I型コラーゲンゲル上で培養された表皮細胞にみられる基板形成⁴⁴⁾と同様の過程を経るものであった。

一方、真皮内移植後1日目には、表皮細胞の細胞質内に貪食体が認められた。この表皮細胞の貪食能については、ヒトの創周囲の表皮細胞、⁴⁵⁾ プタの皮内異物反応時、⁴⁶⁾ ラットの歯エナメル上皮細胞、⁴⁷⁾ マウスの胎児の甲状腺上皮細胞⁴⁸⁾などで報告されている。この貪食能は、細胞間結合の再構築を行うにあたって、細胞周囲の清掃を自らが行っている結果と考えられている。^{45)~48)} このような貪食能は、今回の実験においても、デスモゾームなどの細胞間結合が完成される前後の特定の時期のみに認められる現象であり、表皮細胞による貪食は、細胞崩壊片の処理がマクロファージなどの貪食細胞にのみ委ねられているのではなく、非貪食性の細胞が積極的に関与することを示唆するものであり、興味深い現象である。

さらに1日目頃には、表皮構築中に dark cell が観察された。この dark cell は、リボゾームの密な集積と濃縮したクロマチンそしてミトコンドリアの高度な膨化を伴うことで、Johannisson⁴⁹⁾の報告したB型 dark cell と形態的特

徴が一致している。一方、dark cell の出現自体が組織の固定操作に基づく artifact とする見解がある。⁵⁰⁾しかし、今回の一連の実験においては、移植後1日目の時期にしか認められていないことから、単なる artifact とは考えられず、B型 dark cell と同じ形態的特徴を示す dark cell は、壊死に陥った細胞であるとする考えが支持されている。^{51)~54)}このような dark cell の出現の意義については、これまで明らかにされていないが、細胞の増殖が環境的に狭い空間のもとで、いわば細胞が詰めあったあるいは押し込められた状況にあるときに、その発現をみるという見解がある。^{51),52)}実験的嚢腫の表皮様構築を形成する初期において、壊死的な dark cell が出現することは、構築細胞が一定した配置密度で均衡を保持するうえで、ある種の調節的な意味があるのかもしれない。⁵⁵⁾

このようにして移植表皮細胞の増殖集塊は、正常表皮で見られるような層状の構築を完成し、基底細胞層、有棘細胞層、顆粒細胞層、角質細胞層としての微細構造的な特徴を示した。そして、角質層の増大によって表皮嚢腫を形成した。しかしながら、移植後7日目を経過する頃より、基底細胞層に該当する細胞に顕著な形態的变化が出現した。この表皮細胞の特徴は、もはやこれまでのような類円形の外形を示すことがなく、極めて扁平となり、核も細胞の外形と一致して長楕円形となった。さらに、核膜周囲に空胞の形成や粗面小胞体の膨化、さらにはミトコンドリアの減少傾向がみられ、このような所見は、細胞の変性過程を示唆するものである。したがって、移植後7日目を経過した表皮様構築には、正常形態としての基底細胞層が消失することになる。

このように、何らかの理由によって増殖能をもつ基底細胞が欠落してしまうために、残存する表皮細胞は分化の一途をたどり、角質細胞となって死滅し、結果的に嚢腫は消失するものと考えられる。

結 語

1. 外傷性表皮嚢腫の実験モデルの一つとして、ラットの耳介より採取した表皮細胞を個々に遊離して背部の真皮内に移植した。移植後、遊離表皮細胞は真皮内でネストを形成し、そのネストを一つの基本単位として増殖した後、典型的な表皮嚢腫を形成した。さらに、表皮嚢腫は3日目以降には角質を産生するようになり、角化嚢腫が出現した。しかし、7日目以降には嚢腫の表皮様構築に破綻が生じるために、嚢腫形態を保持できなくなり、角化嚢腫は移植後21日目には消失していた。

2. 実験的嚢腫の電子顕微鏡的観察により、7日目以後に出現する表皮様構築の破綻は、嚢腫壁の基底細胞層において、基底細胞様の表皮細胞が変性過程にあることと密接な関連を有することが示唆された。

3. 実験的嚢腫の画像解析により、移植表皮細胞は移植後3日目頃までは増殖能が優位にあるが、3日目以後には逆転して分化能が優位になることが推定された。

4. 実験的嚢腫の消失は、表皮様構築が完成して嚢腫を形成した後に、増殖能をもった表皮細胞が何らかの理由によってその分裂を停止し、表皮細胞の供給が途絶えてしまうことによると考えられた。

稿を終えるにあたり、ご指導とご校閲をいただきました川崎医科大学形成外科 森口隆彦教授と、ご校閲いただきました同薬理学教室 斎藤泰一教授に深謝します。また直接ご指導とご校閲をいただきました同薬理学教室本間隆義助教授、及び実験手法について貴重なご助言をいただきました同 前皮膚科学助教授 中川昌次郎先生に感謝します。

なお、本論文の要旨は、第32回日本形成外科学会学術集会(1989年4月21日、浦安)、第18回日本形成外科学会中国・四国地方会例会(1989年9月2日、小郡)、第33回日本形成外科学会学術集会(1990年4月6日、東京)にて発表した。

文 献

- 1) Wien, M. S. and Caro, M. R. : Traumatic epithelial cysts of the skin. *JAMA* 102 : 197—200, 1934
- 2) Peer, L. A. : Fate of buried skin grafts in man. *Arch. Surg.* 39 : 131—144, 1939
- 3) 梶川 浩 : 外傷性表皮嚢腫の成立機序に関する研究—嚢腫壁と被覆表皮の形態計測的比較—。川崎医学会誌 16 : 153—159, 1991
- 4) Doran, T. I., Vidrich, A. and Sun, T. T. : Intrinsic and extrinsic regulation of the differentiation of skin, corneal and esophageal epithelial cells. *Cell* 22 : 17—25, 1980
- 5) Lavker, R. D. and Sun, T. T. : Rapid modulation of keratinocyte differentiation by the external environment. *J. Invest. Dermatol.* 80 : 228—237, 1983
- 6) Nakagawa, S., Bang, D., Takei, Y., Jinno, Y. and Ueki, H. : A histologic study on the fate of intradermally implanted epidermal cells in guinea pigs : A new method for evaluation of skin allograft survival. *J. Invest. Dermatol.* 89 : 234—237, 1987
- 7) Nakagawa, S., Takei, Y., Bang, D., Jinno, Y. and Ueki, H. : Histological study on the fate of haptened epidermal cells injected intradermally in guinea pigs. *Arch. Dermatol. Res.* 279 : 111—115, 1987
- 8) King, E. S. : Post-traumatic epidermoid cysts of hands and fingers. *Br. J. Surg.* 21 : 29—43, 1933
- 9) 大熊正隆 : 上皮性嚢腫の発生機序に関する実験的研究。皮と泌 4 : 107, 1936
- 10) Epstein, W. L. and Kligman, A. M. : Epithelial cysts in buried human skin. *AMA Arc. Dermatol.* 76 : 437—445, 1957
- 11) 五十嵐勉 : 膝蓋部外傷性上皮嚢腫の1例。皮の臨 6 : 681—683, 1964
- 12) 小島和彦, 一瀬正治, 鬼塚卓弥 : 足底部に発生した traumatic epithelial cyst. 手術 25 : 637—642, 1971
- 13) 塚越葉子, 平井昭男, 加茂紘一郎 : 足趾に多発した epidermoid cyst. 西日皮 43 : 226—229, 1981
- 14) 江口一彦, 西尾一方 : 足趾の表皮嚢腫。皮病診療 5 : 917—920, 1983
- 15) 沢田幸正, 角田孝彦, 山原慎一, 枝松 満 : Epidermal inclusion cyst の2例。臨皮 38 : 141—144, 1984
- 16) 八木英一, 多田有平, 高橋伸也 : 異物により表皮嚢腫を生じた2例。皮の臨 27 : 243—246, 1985
- 17) 小川智美, 難波克彦 : 皮膚組織の迷入により発生した眼瞼腫瘍。日眼紀 38 : 448—453, 1987
- 18) 山本達雄, 浅井俊弥, 大川 司 : 外傷性上皮嚢腫。皮病診療 9 : 225—226, 1987
- 19) 朝比奈昭彦, 松山友彦, 江藤隆史, 土田哲也, 関 利江, 石橋康正 : 特異な臨床像を呈した足底表皮嚢腫の1例。皮の臨 31 : 106—107, 1989
- 20) Greer, K. E. : Epidermal inclusion cyst of the sole. *Arch. Dermatol.* 109 : 251—252, 1974
- 21) Baker, B. R. and Mitchel, D. F. : The pathogenesis of epidermoid implantation cysts. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 19 : 494—501, 1965
- 22) Potten, C. S. : The epidermal proliferative unit : The possible role of the central basal cell. *Cell Tissue Kinet.* 7 : 77—88, 1974
- 23) Potten, C. S. : Cell replacement in epidermis (keratopoiesis) via discrete units of proliferation. *Int. Rev. Cytol.* 69 : 271—318, 1981
- 24) Clausen, O. P. F. and Potten, C. S. : Heterogeneity of keratinocytes in the epidermal basal layer. *J. Cutan. Pathol.* 17 : 129—143, 1990
- 25) Fusenig, N. E. and Worst, P. K. M. : Mouse epidermal cell cultures II. Isolation, characterization and cultivation of epidermal cells. *Exp. Cell Res.* 93 : 443—457, 1975
- 26) Voigt, W. H. and Fusenig, N. E. : Organotypic differentiation of mouse keratinocytes in cell culture : A light- and electron-microscopic study. *Biol. Cellularie* 34 : 111—118, 1979

- 27) Sun, T. T. and Green, H. : Differentiation of the epidermal keratinocyte in cell culture : Formation of the cornified envelope. *Cell* 9 : 511—521, 1976
- 28) Mauchamp, J., Margotat, A., Chambard, M., Charrier, B., Remy, L. and Michel-Bechet, M. : Polarity of three-dimensional structures derived from isolated hog thyroid cells in primary culture. *Cell Tissue Res.* 204 : 417—430, 1979
- 29) Chambard, M., Gabrion, J. and Mauchamp, J. : Influence of collagen gel on the orientation of epidermal cell polarity : Follicle formation from isolated thyroid cells and from preformed monolayers. *J. Cell Biol.* 91 : 157—166, 1981
- 30) Kitajima, K., Yamashita, K. and Fujita, H. : Fine structural aspects of follicle-like cavity formation from dispersed porcine thyroid cells cultured in a collagen substrate. *Arch. Histol. Jap.* 50 : 113—127, 1987
- 31) 藤田尚男：細胞接着と細胞極性。生体の科学 41 : 108—114, 1990
- 32) Billingham, R. E. and Silvers, W. K. : The origin and conservation of epidermal specificities. *N. Engl. J. Med.* 268 : 477—480, 1963
- 33) 嶋 隆義, 上田 実, 金田敏郎, 星野 洸：培養細胞による粘膜組織の再構成に関する研究。日口腔科会誌 37 : 886—903, 1988
- 34) 車谷峰子, 馬場俊一, 鈴木啓之：石灰化上皮腫における腫瘍細胞の形態計測的研究。日皮会誌 91 : 433—438, 1981
- 35) 平野峰子：皮膚腫瘍細胞核の研究。第1報。石灰化上皮腫における分化に伴う核の変化について。日臨電顕会誌 13 : 131—141, 1980
- 36) Gömar, F. E., Bernd, A., Bereiter-Hahn, J. and Holzman, H. : A new model of epidermal differentiation : Induction by mechanical stimulation. *Arch. Dermatol. Res.* 282 : 22—32, 1990
- 37) Ashihara, T., Kitamura, T., Takeoka, O., Fujita, S., Kodama, M., Shinoda, M. and Hashimoto, I. : Autographic studies on cell proliferation and differentiation in the human epidermis in vivo. *Arch. Histol. Jap.* 28 : 399—410, 1967
- 38) Susi, F. R. : Studies of cellular renewal and protein synthesis in mouse oral mucosa utilizing ^3H -cystine. *J. Invest. Dermatol.* 51 : 403—408, 1968
- 39) Mehregan, A. H. : Elastosis perforans serpiginosa. A review of the literature and report of 11 cases. *Arch. Dermatol.* 97 : 381—393, 1968
- 40) 佐藤良夫, 設楽篤幸, 森下美知子, 永井 透, 山口茂光, 本好捷宏 : Elimination 現象と elimination dermatoses. *西日皮* 43 : 1078—1084, 1981
- 41) Krawczyk, W. S. and Wilgram, G. F. : Hemidesmosome and desmosome morphogenesis during epidermal wound healing. *J. Ultrastruct. Res.* 45 : 93—101, 1973
- 42) Morejohn, L. C. and Pratley, J. N. : Differential effects of trypsin on the epidermis of rana Catesbeiana. *Cell Tissue Res.* 198 : 349—362, 1979
- 43) Overton, J. and DeSalle, R. : Control of desmosome formation in aggregating embryonic chick cells. *Dev. Biol.* 75 : 168—176, 1980
- 44) 谷口 滋：培養ヒト表皮細胞による基板形成。日皮会誌 94 : 727—736, 1984
- 45) Odland, G. and Ross, R. : Human wound repair. I. Epidermal regeneration. *J. Cell Biol.* 39 : 135—151, 1968
- 46) Wolf, K. and Hönigsman, H. : Permeability of the epidermis and the phagocytic activity of keratinocytes. *J. Ultrastruct. Res.* 36 : 176—190, 1971
- 47) Moe, H. and Jessen, H. : Phagocytosis and elimination of amelocyte debris by stratum intermedium cells in the transitional zone of the enamel organ of the rat incisor. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 131 : 63—75, 1972

- 48) Rømer, P. and Gaugin, J. : The early development of the median thyroid gland of the mouse. *Z. Anat. Entwickl-Gesch.* 139 : 319—336, 1973
- 49) Johannisson, E. : The foetal adrenal cortex in the human. It's ultrastructure at different stages of development and in different functional stages. *Acta Endocrinol. (Suppl. 130)* 58 : 7—107, 1968
- 50) Glasø, M. and Hovig, T. : The influence of fixation on the morphology of mouse epidermis. A light and electron microscopical study with special reference to "dark cells" and epidermal carcinogenesis. *Virchows Arch. [B]* 54 : 73—88, 1987
- 51) Parsons, D. F., Marko, M., Braun, S. J. and Wansor, K. J. : "Dark cells" in normal, hyperplastic, and promoter-treated mouse epidermis studied by conventional and high-voltage electron microscopy. *J. Invest. Dermatol.* 81 : 62—67, 1983
- 52) Honma, T., Saito, T. and Fujioka, Y. : Possible role of apoptotic cells of the oral epithelium in the pathogenesis of aphthous ulceration. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 59 : 379—387, 1985
- 53) Harmon, B. V. : An ultrastructural study of spontaneous cell death in a mouse mastocytoma with particular reference to dark cells. *J. Pathol.* 153 : 345—355, 1987
- 54) Lavker, R. M., Zheng, P. and Dong, G. : Aged skin : A study by light, transmission electron, and scanning electron microscopy. *J. Invest. Dermatol.* 88 : 44s—51s, 1987
- 55) Budtz, P. E. and Spies, I. : Epidermal tissue homeostasis. Apoptosis and cell emigration as mechanisms of controlled cell deletion in the epidermis of the toad, *Bufo bufo*. *Cell Tissue Res.* 256 : 475—486, 1989