西山敏夫 富永直樹 中嶋啓介 林 利彦*

Interaction of Human Skin Fibroblasts with Collagen Fibrils

——Index for evaluation of regulatory materials on cellular activity in the skin——

Toshio Nishiyama, Naoki Tominaga, Keisuke Nakajima,
and Toshihiko Hayashi.*

Characteristic behavior of human skin fibroblasts in collagen gels has been investigated in order to clarify the interactions among the cells, collagen matrix, and diffusible factors. Dynamic behavior of fibroblasts in collagen gels was analyzed by video microscopy. Features that were observed include the development of extremely elongated cell shape and interactions between the cells and collagen fibrils. The interactions eventually resulted in the contraction of collagen gels. The contraction can be expressed in a quantitative way by size of the gel. It was stronger with human skin fibroblasts than with 3T3 established cells or with human fibrosarcoma cells. The intensity and rapidity of contraction increased with concentration of fetal bovine serum. Human skin fibroblasts in the contracted collagen gels stopped multiplying when density of collagen fibrils reached at more than $100\mu\text{g}/\text{mm}^3$. Fibroblasts under this condition had a smaller activity of protein synthesis than those in confluent monolayer culture. Growth response of fibroblasts in the contracted gels to epidermal growth factor was considerably retarded. These results suggest that human skin fibroblasts in collagen gels was in a resting state and in an environment more similar to in vivo tissue as compared to cells in conventional monolayer culture. The dynamic behavior of fibroblasts in collagen gels, the ability of fibroblasts to contract the collagen gels, and the cellular activity in contracted collagen gels might be new indices for evaluation of regulatory materials on cellular activity in the skin.

1. 緒 言

皮膚疾患や加齢変化,あるいは創傷治癒過程など,真皮は皮膚の恒常性を保つ上で重要な役割を果している¹⁻⁴⁾。真皮の構成は大別して細胞(主として線維芽細胞),細胞外マトリックス(主にコラーゲン),それに拡

散性因子(増殖因子,ホルモン,栄養素など)の三成分から成っているとみなせる。真皮の構造や機能の恒常性は,細胞自体の活性,細胞外マトリックスの構造,拡散性因子の質や量,あるいは,これら三者のバランスにより保持されている。この真皮の恒常性がどのような機構で保たれ,そして老化や病態によって細胞-マトリックス-拡散性因子の相互作用にどのような変化がおきているかを知ることができれば,皮膚を賦活化する物質や方法を開発することも可能になる。

現在一般に生物学的研究やその作用機序の解明には,細胞培養系がよく用いられ,多くの研究成果が報告され

資生堂基礎科学研究所:横浜市港北区新羽町1050

* 東京大学教養学部:東京都目黒区駒場3-8-1

Shiseido Basic Research Laboratories: 1050 Nippa-cho, Kohoku-ku, Yokohama 223.

* Department of Chemistry, College of Arts and Science, University of Tokyo: 3-8-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153.

ている。しかしながら、通常のプラスチック培養皿を用いた培養系では細胞活性や機能が果して *in vivo* 組織内の状態を反映しているか否か、とくに細胞外マトリックスによる影響があるのかわからない。一方、組織内では細胞と細胞外マトリックスの関係を観察するには複雑すぎる。そこで、細胞培養系を *in vivo* の状態により近づけるために、再構成したコラーゲンマトリックス内での細胞培養系が注目されつつある⁵⁻⁷⁾。この系は、コラーゲングル内培養系とよばれている。Bell らによりコラーゲングル内で線維芽細胞を培養するとコラーゲングルが収縮されることが示された⁷⁾。この現象は、線維芽細胞とコラーゲン線維との相互作用に基づくものである⁷⁻¹⁰⁾。再構築されたコラーゲン線維の立体構造の中で細胞は形態を大きく変え^{8,9)}、増殖抑制され¹¹⁾、さらに酵素発現や膜透過性が真皮の状態に類似してくることが報告されている¹²⁾。線維芽細胞とコラーゲン、それに血清からなる培養系は真皮モデルとなることが示された^{7,11,12)}。

我々は、真皮の状態を反映しうるような *in vitro* 実験系を皮膚賦活剤の評価系とするために、コラーゲングル内培養系をさらに詳細に検討した。すなわち、本研究では *in vitro* 実験系を用いて、細胞—マトリックス—拡散性因子の相互作用を明らかにすることを目的に行ない、皮膚線維芽細胞の動態に及ぼすコラーゲンマトリックスや拡散性因子の作用についていくつかの新しい知見が得られた。

2. 実験

2.1 細胞培養

線維芽細胞はヒト皮膚より Explant 法で初代培養細胞を得て、10%ウシ胎児血清 (FBS, Gibco Labs.) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) で継代培養した。Swiss mouse 3T3 細胞 (線維芽細胞様) およびヒト線維肉腫細胞 (ATCC, CCL-121, HT 1080) は Flow 社より購入し、10% FBS を含む DMEM 培地で継代培養した。Epidermal Growth factor (EGF) はシグマ社より購入した。

2.2 コラーゲングルの調製

コラーゲンは、酸可溶性 I 型コラーゲン (ASC)、ペプシン処理 I 型コラーゲン (PSC) (プタ腱由来、新田ゼラチン社) を用いた。線維芽細胞を 0.02% EDTA 含む 0.1% トリプシン PBS (phosphate-buffered saline, pH 7.4) 溶液で処理し細胞懸濁液をつくる。所定の細胞数と所定濃度のコラーゲンの混合溶液をベトリ培養皿

(35mmφ) に注入後、直ちに 5% CO₂ インキュベーター内で 37°C で培養し、コラーゲンをゲル化させ所定期間培養した。培養液は 2 日ごとに交換した。コラーゲングル収縮度はゲルの直径を測定することにより評価した。

2.3 細胞形態の動的変化の観察

コラーゲングル内およびプラスチック培養皿での細胞の形態変化は、コマ撮り長時間ビデオ録画システム (三啓製) を用いて位相差およびノマルスキー式微分干渉顕微鏡により観察した。

2.4 細胞数の測定

プラスチック培養皿での単層培養系では、細胞数は Labarca と Paigen の方法¹³⁾ により DNA 量を測定し、細胞数に換算して求めた。本法においてヒト皮膚線維芽細胞 1 個当りの DNA 含量は約 11pg, マウス 3T3 細胞では約 20pg, ヒト線維肉腫細胞では約 22pg であった。収縮コラーゲングル内の細胞数は、コラーゲングルを 60°C で 30 分間加熱変性させ溶液とした後、前述の方法に従って DNA 量を測定して求めた。

2.5 タンパク質合成活性の測定

コンフルエントに達し増殖のとまった、単層培養系の線維芽細胞および収縮コラーゲングル内で増殖停止した細胞を用いてタンパク質合成活性を測定した。³H-ラベルのアミノ酸混合物 (Amersham) を含む 10% FBS-DMEM 培地で所定時間培養後、氷冷下で培地を回収し、新しい培地で細胞層を 2 回洗浄する。細胞あるいは収縮コラーゲングルを凍結融解を 3 回繰り返えし、その後超音波処理する。培地または細胞層を含む溶液に氷冷したトリクロル酢酸 (最終濃度 10%) を添加し沈殿を生じさせる。この沈殿物を氷冷した 10% トリクロル酢酸で 3 回洗浄後、蒸留水を添加し、懸濁液にする。この液を水溶性液体シンチレーターに溶解し、液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定しタンパク質合成量を求めた。

3. 結果

3.1 コラーゲングル内における皮膚線維芽細胞の形態変化

ヒト皮膚 (71 才女性頭部) 線維芽細胞をコラーゲングル内で培養したときの形態変化やコラーゲン線維との相互作用をビデオ録画により観察した。ゲル内培養開始後 4 時間目までは球形のままであるが、5 時間目以降から糸状偽足 (filopodia) が観察された (Fig.-1, A-C)。

この時点で細胞は既にコラーゲン線維と糸状偽足を介して相互作用しはじめた。5~10 時間の間にこの糸状偽

Fig.-1 The behavior of human skin fibroblasts within a collagen gel in terms of the sequential changes of their shapes.

These photographs were taken from a video monitor. After 2 hr in a collagen gel, fibroblasts were spherical in shape (A : 2 hr 5 min after starting the gel culture) and numerous filopodia (f) projected circumferentially into the surrounding collagen matrix (B : 7 hr 25 min; C : 9 hr 28 min). Initial pseudopodial extension began into the collagen gel (D : 11 hr 9 min) and cells became bipolar or tripolar with increasing length of the pseudopodia (p) (E : 24 hr 4 min). After 41 hr, cells became bipolar with an extremely elongated shape (F : 41 hr 25 min; G : 43 hr 12 min; H : 46 hr 6 min). Cellular motility even in extremely elongated shape was observed during this period (F to H). Bar, 50 μ m.

足の数は増加し、1時間当り約20偽足を出していた。10時間後、糸状偽足の数はしだいに減少し、偽足 (pseudopodia) が形成されはじめた (Fig.-1, D, E)。偽足は細長くなり、二極性、三極性の形態となった (15~24時間)。40時間後、ほとんどすべての細胞は二極性の細長い形態となった (Fig.-1, F)。細胞の長さは $263 \pm 60 \mu\text{m}$ ($n=30$) であった。細胞の細長い偽足の先端は、他の細胞からの偽足と相互作用しているかのように観察された。この細長い形態をした細胞は全体としての移動はほとんどないが、核の相対的な動きから細胞質の流動性が確認された (Fig.-1, F-H)。48時間後、顕微鏡下で観察される細胞の97%が二極性の細長い形態となっていた。線維芽細胞様といわれる 3T3 細胞でも糸状偽足を出し、その後二極性の紡垂形態となる。しかし皮膚線維芽細胞でみられるような極めて細長い形態にはならなかった。ゲル内を細胞が移動する像が観察された。線維肉腫細胞でも糸状偽足の形成から二極性の紡垂形態となり、さらに一時的に細長い形態となるが、細胞の形態は一定せず、偽足を短縮し球形の形態にもどるなど形態変化が繰返しおきていることが観察された。これらの細胞は、正常線維芽細胞 (Fig.-1) のような細長い形態を維持せず、球形に近い形態となった (Fig.-2)。

3.2 線維芽細胞によるコラーゲンゲル収縮

コラーゲンゲル収縮は生きた細胞、特に線維芽細胞様の細胞に特有の現象である。ゲル収縮速度やゲル収縮度

Fig.-2 Differential interference microscopy of fibrosarcoma in a collagen gel. The figure in collagen gel culture is shown on day 6. $\times 170$.

Fig.-3 Contraction of collagen gels by fibroblasts.

Each point represents the average of 3 gels. Deviations are not shown because they were all very small ($< \pm 0.5\text{mm}$). ● human skin fibroblasts (age 30, 7th PDL): ○ established 3T3 cells. Initial number of cells was 1×10^4 cells/ml. Collagen concentration was 0.3mg/ml. Medium was changed every 2 days.

Fig.-4 Contraction of collagen gels by human skin fibroblasts or human fibrosarcoma cells.

Each point represents the average of 3 gels: deviations were $< \pm 0.5\text{mm}$. ● human skin fibroblasts (age 30, 5th PDL): ○ human skin fibroblasts (age 30, 28th PDL): △ human fibrosarcoma cells. Initial number of cells was 1×10^4 cells/ml. Collagen concentration was 0.5mg/ml. Medium was changed every 2 days.

は線維芽細胞の種類により異なる。**Fig.-3** にヒト皮膚(30才女性)線維芽細胞と 3T3 細胞によるゲル収縮の経時変化を示した。線維芽細胞様といわれる 3T3 細胞でもゲル収縮をおこすが、正常線維芽細胞に比べ収縮速度も遅く、さらに収縮度も低下していた。**Fig.-4** に上述の線維芽細胞で継代数 5 代と 28 代の細胞と、ヒト線維肉腫細胞によるゲル収縮の経時変化を示した。ヒト線維肉腫細胞では、3 日目まで全くゲル収縮をおこさなかった。4 日目で収縮度は 22% であった。一方、正常線維芽細胞(継代数 5)では 16 時間目にゲル収縮がおこりはじめ、急激に収縮し、4 日目で収縮度は 69% であった。継代数が 28 代目の細胞は、いわゆる *in vitro* 老化した細胞で、ほとんど増殖しない細胞である。継代数 5 代目の増殖性のよい(細胞倍加時間 23 時間)、いわゆる若い細胞に比べ、老化した線維芽細胞ではゲル収縮が開始するまでの時間が約 5 時間であり、ゲル収縮を早くおこすことが認められた。収縮速度ならびに収縮度に差は認められなかった。

次に、正常線維芽細胞のゲル収縮におよぼす血清の影響を検討した(**Fig.-5**)。ゲル収縮は、血清濃度に依存しており、無血清では全くおこらなかった。また、血清濃度が 5% 以上ではゲル収縮速度および収縮度に差はほとんど認められなかった。

3.3 収縮コラーゲンゲル内での線維芽細胞の増殖性ならびに生合成活性

線維芽細胞とコラーゲン線維との相互作用により、コラーゲンゲルは収縮し、ゲル内のコラーゲン線維密度は増大する。培養開始時の細胞数を 2×10^4 cells/ml とし、コラーゲン濃度を 0.3, 0.5, 0.9mg/ml でゲルを作製すると経時でゲルは収縮する。これらの条件下での細胞増殖曲線を **Fig.-6** に示した。プラスチック培養皿上での増殖曲線から皮膚線維芽細胞(30才女性)の細胞倍加時間は 23 時間であった。培養 6 日目以降でコンフルエントに達し増殖がとまった。一方、ゲル内での増殖曲線から、コラーゲン濃度によらず細胞倍加時間は約 73 時間であった。細胞数が増加後、培養日数が 6 日目、12 日目、16 日目(初期コラーゲン濃度が、それぞれ 0.3, 0.5, 0.9 mg/ml の場合)で増殖停止した。この時点でゲル内の細胞はプラスチック培養皿の単層培養の場合と異なり疎らな状態であった。次に細胞増殖停止時のコラーゲンゲル内の状態を **Table-1** に示した。それぞれの培養日数でのゲルは体積は、収縮ゲルの直径からゲルの厚さを算

Fig.-5 Effect of FBS concentration on collagen gel contraction.

Each point represents the average of 3 gels: deviations were $\leq \pm 0.5$ mm. ○ 0%, △ 0.3%, □ 1.0%, ● 5.0%, ▲ 10% FBS (fetal bovine serum). Initial number of human skin fibroblasts (age 30, 7th PDL) was 2×10^4 cells/ml. Collagen concentration was 0.5mg/ml. Medium was changed every 2 days.

Fig.-6 Growth curves of human skin fibroblasts in collagen gels.

Each point represents the average of triplicate measurements. The cell number was determined as described in Experiments at the times indicated. ○ grown on plastic dishes (8cm²): grown in collagen gels (initial concentration of collagen was 0.3mg/ml (●), 0.5mg/ml (▲), or 0.9mg/ml (■)). Medium was changed every 2 days.

Table-1 Volume of Contracted Collagen Gel and Density of Collagen Fibrils

Initial Concentration of Collagen	Days in Culture	Volume of Gel (mm^3)	Cell Number ($\times 10^4$)	Density of Collagen ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$)	Density of Cell ($\times 10^3/\text{mm}^3$)
0.3mg/ml	6	6.0	14	100	23
0.5mg/ml	12	10	22	100	22
0.9mg/ml	16	18	18	95	15

Initial volume of gel : 2000mm^3 .Initial cell number : 4×10^4 cells.

出し求めた。コラーゲン線維密度は、培養開始時のコラーゲン量をゲル体積で割って求めた。細胞の増殖停止に対するコラーゲンの効果は、培養開始時のコラーゲン濃度（初濃度）に関係なく、コラーゲン線維密度が約 $100 \mu\text{g}/\text{mm}^3$ 以上の高密度になるまで収縮すると増殖停止することが示された。さらにこの時点の細胞密度は約 $1.5 \times 10^4 \sim 2.3 \times 10^4$ cells/ mm^3 であったが、3.1の顕微鏡観察から細胞の体積は約 $2000 \mu\text{m}^3$ であるので、ゲル 1mm^3 に占める細胞の体積は $3.0 \sim 4.6 \times 10^{-2} \text{mm}^3$ であり、ゲルの体積の30分の1から20分の1しか占めていない。

以上のことから、コラーゲンゲル内での細胞増殖停止は、いわゆる単層培養系でいわれている細胞密度依存性の増殖停止（コンフルエントに達し接触阻害による増殖

停止）とは異なるし、またコラーゲンマトリックスとの単純な接触によるのではなく、細胞とコラーゲン線維との特異的な相互作用に基づくものであることが示唆された。

このように10%血清の存在下で収縮コラーゲンゲル内で増殖停止した線維芽細胞の増殖性ならびに生合成活性を検討した。**Fig.-7** にプラスチック培養皿上の単層培養系と比較して、収縮ゲル内でのタンパク質合成の経時変化を示した。培地中に分泌されるタンパク質の量と細胞層に存在する量を図示した。タンパク質合成量は経時で増加するが、24時間後の収縮ゲル内での細胞の合成量は、単層培養系に比べ、細胞層で0.26倍、培地中への分泌量で0.86倍に、そして合計で0.39倍に減少していた。収縮コラーゲンゲル内で増殖停止した線維芽細胞はタンパク質合成活性も顕著に低下しており、静止状態にあることが示された。次にこの静止状態にある線維芽細胞の

Fig.-7 Protein synthesis of human skin fibroblasts in contracted collagen gels.

Human skin fibroblasts (age 30, 7th PDL) were grown in collagen gels and used 3 days after the cessation of proliferation. Cultures were used 2 days after reaching confluency on plastic dishes. The protein synthesis was determined as described in Experiments at the times indicated. Each point represents the average of triplicate measurements. ○ in the medium : ● in the cell layer or in the contracted gels.

Fig.-8 Growth response to EGF of human skin fibroblasts in contracted collagen gels.

Human skin fibroblasts (age 30, 8th PDL) were grown in collagen gels and used 3 days after the cessation of proliferation. At this stage, EGF (25ng/ml) was added to the medium. The medium containing EGF (25 ng/ml) was changed every 2 days. Each point represents the average of triplicate measurements. ○ without EGF : ● with EGF (25ng/ml).

増殖性を検討した。線維芽細胞に対する強力な増殖因子である EGF に対する増殖応答曲線を Fig.-8 に示した。25ng/ml の EGF を静止状態にある収縮ゲル内の線維芽細胞に作用すると、単層培養系に比べ、EGF 添加後 1 日目では増殖応答せず、その後の増殖応答も大きく遅れるものの、7~10 日後には細胞数は約 40% ほど増加することが明らかとなった。このように、ゲル収縮し、コラーゲン線維が高密度となり増殖停止し、静止状態にある線維芽細胞も、完全に増殖機能を失ったわけではなく、EGF のような強力な増殖因子に対しては再び増殖応答することが示された。

4. 考 察

皮膚を賦活化する薬剤の *in vitro* での評価法を開発する目的で、我々は皮膚の構造や機能の恒常性を維持するのに重要な役割を果たしている真皮に注目し¹⁻⁴⁾、真皮を構成している線維芽細胞、コラーゲン線維、拡散性因子（血清など）を基本因子と考え、これら三者間の相互関係を明らかにしようとする実験系としてコラーゲングル内培養系を検討した。研究を進めるにあたり、我々は次のような作業仮説を考えた。すなわち、加齢とともに皮膚の柔軟性が低下したり、硬くなったり、あるいは、しわが多くなるのは、真皮内の線維芽細胞の機能低下やコラーゲンマトリックス構造の質的、量的変動の蓄積、血液中からの因子の質的、量的変化、あるいは、三者の相互に及ぼす影響の変化によると考えられる。このような仮説を実証するには線維芽細胞の機能やコラーゲンマトリックスの構造、拡散性因子の影響、さらには三者間の相互作用などの機構を解明せねばならないが、これらを検討する方法としてコラーゲングル内培養系は極めて有効な手段であると思われる。

コマ撮りビデオ録画により、コラーゲンマトリックス内での細胞とコラーゲン線維との相互作用や、細胞形態の大きな変化の動的な観察が可能であることを示した。線維芽細胞はコラーゲン線維を引張ったり、離したりしながらコラーゲン線維を配向し再配列すると同時に細胞形態を劇的に変え、真皮内で観察されるような、二極性の極めて細長い形態となる⁸⁻¹⁰⁾。これは、細胞とコラーゲン線維との相互作用によるものであり、例えば、糸状偽足の頻度や細長い形態への変化の速度、あるいは、細胞の移動速度や、細胞内流動性の速度などを定量的に測定できれば、コラーゲンマトリックスの影響下での新しい細胞活性の指標となり得るものと考えられる。

Fig.-1 に示した細胞とコラーゲン線維の相互作用の

結果としてコラーゲングル収縮がおこる。ゲル収縮は両者の相互作用の強さの指標となると考えられる。コラーゲングルの収縮が線維芽細胞によりおこるのは細胞とコラーゲン線維の結合^{7,9,14)}、さらには細胞骨格（アクチン、チューブリン、ミオシンなど）の作用^{7,9)}によるものと推察されている。細胞の種類による収縮能力の差は、マウス由来およびヒト由来の線維芽細胞について検討され、収縮力は正常線維芽細胞が最も強く、次いで樹立細胞、最も弱いのが形質転換した細胞であることが報告されている¹⁴⁾。我々の結果からも種は異なるが、樹立細胞である 3T3 細胞はヒト皮膚線維芽細胞よりゲル収縮能が減少していること、さらにヒト線維肉腫細胞では、ほとんど欠損していることが認められた。また、細胞形態変化の動的観察から、皮膚線維芽細胞の方が細胞表面とコラーゲン線維との相互作用が強いことが示唆された。この相互作用の本質についてはまだ不明な点が多いが、その結果としておこるゲル収縮は、正常、異常細胞の生物学的評価法として、さらには線維芽細胞の機能の新しい指標となりうるものと考えられる。線維芽細胞によるゲル収縮は血清により大きく影響される。最近、血清中のフィブロネクチンがゲル収縮のための因子であることが報告されたが¹⁵⁾、ゲル収縮を促進する血清中の因子が明らかになれば、新しい細胞賦活剤を見出すことができるものと考えられる。

収縮コラーゲングル内で線維芽細胞はコラーゲン線維との相互作用により二極性の細長い形態となり増殖停止する¹¹⁾。我々も Fig.-6 に示すように増殖抑制から増殖停止を確認し、この停止がコラーゲン密度に関係していることを見出した。この密度は真皮の状態に類似しているので、組織内で細胞増殖が静止状態にあることの原因の 1 つはコラーゲン線維の密度と考えられる。また、線維芽細胞が示す性質として、生合成したコラーゲンのプロセッシング¹⁶⁾、細胞膜の透過性、酵素発現¹²⁾が収縮コラーゲングル内では真皮の状態に近似していることも報告されている。このような事実から、収縮コラーゲングルは真皮モデルになると考えられる。本報告では、この真皮モデル内での線維芽細胞は、タンパク質合成活性が大きく低下しており、生合成活性も静止状態にあることを示している。また、細胞増殖因子 EGF の作用を検討し、細胞の増殖応答性は遅延するが明らかに増殖性を示し、また長期間作用させても異常に増殖することなく再び増殖停止することが明らかになった。真皮組織内の線維芽細胞への EGF の作用は、まだ不明な点が多いが、我々の結果から、真皮内でも EGF は増殖因子として作

用する可能性が示唆された。

以上、真皮モデル内での線維芽細胞は、コラーゲンマトリックスの影響下にあるため、真皮内での機能を再現している面がいくつか明らかになった。種々の細胞活性の測定（例えば、生合成活性、増殖、酵素活性など）をこの真皮モデル内で行えば、より真皮の状態に類似した、あるいは一致した結果を得ることができるものと期待できる。これらを指標とし、真皮を反映しうるような皮膚賦活剤評価の有効な系を収縮コラーゲンゲル系でつくることができると考えられる。

以上のように、コラーゲン線維の立体構造内での線維芽細胞の形態変化や細胞の動きの観察、それにとりまうコラーゲンゲル収縮現象、さらには、構築されたコラーゲン線維内での細胞増殖や細胞活性の測定により、線維芽細胞の *in vivo* における機能や、真皮の複雑な機能や構造を解明する糸口をこの *in vitro* 実験系から読み取ることができ、さらに皮膚賦活剤評価法としうるものと考えられる。

文 献

- 1) P. Sengel, "Developmental Mechanism: Normal and Abnormal" p.123 (1985) Alan R. Liss, Inc., New York
- 2) H. Bouissou, M.T. Pieraggi, M. Julian, Path. Res. Pract., **178**, 515 (1984)
- 3) M.D. Carter, A.K. Balin, Med. Clin. North. America., **67**, 531 (1983)
- 4) P. Saiag, B. Coulomb, C. Lebreton, E. Bell, L. Dubertret, Science, **230**, 669 (1985)
- 5) 木村友厚, 安井夏生, 大沢 傑, 小野啓郎, 整形外科基礎科学, **12**, 62 (1985)
- 6) 常盤孝義, 日下泰徳, 佐藤二郎, 組織培養, **12**, 476 (1986)
- 7) E. Bell, B. Ivarsson, C. Merrill, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 1274 (1979)
- 8) J. J. Tomasek, E. D. Hay, K. Fujiwara, Dev. Biol., **92**, 107 (1982)
- 9) J. J. Tomasek, E. D. Hay, J. Cell Biol., **99**, 536 (1984)
- 10) 西山敏夫, 富永直樹, 林 利彦, 応用細胞生物学研究, **4**, 1 (1985)
- 11) R. Sarber, B. Hull, C. Merrill, T. Soranno, E. Bell, Mech. Ageing Dev., **17**, 107 (1981)
- 12) B. Coulomb, L. Dubertret, C. Merrill, M. Fosse, J. Breton-Gorius, C. Prost, R. Touraine, J. Invest. Dermatol., **81**, 75 (1983)
- 13) C. Labarca, K. Paigen, Anal. Biochem., **102**, 344 (1980)
- 14) B. M. Steinberg, K. Smith, M. Colozzo, R. Pollack, J. Cell Biol., **87**, 304 (1980)
- 15) P. Gillery, F. Maquart, J. Borel, Exp. Cell Res., **167**, 29 (1986)
- 16) B. Nusgens, C. Merrill, Ch. Lapière, E. Bell, Collagen Rel. Res. **4**, 351 (1985)

(昭和62年4月3日受理)