

## 筋膜を用いた新しい粘膜裏打ち筋組織の検討

森 克 哉

東京慈恵会医科大学形成外科学講座

(受付 平成 19 年 10 月 9 日)

### DEVELOPMENT OF A NEW MUCOSA-LINING TISSUE USING FASCIA

Katsuya MORI

*Department of Plastic and Reconstructive Surgery, The Jikei University School of Medicine*

Flaps with a mucosal lining are in great demand for nasal, oral, tracheal and urogenital reconstruction. To develop a new reconstructive material, we attempted to construct a mucosal lining with fascia. First, we obtained sublingual mucosa from Japanese white rabbits. The separated mucosal cells were subcultured twice for 4 weeks. The cells were transplanted to the fascia of the femoral muscles in the same rabbits from which the mucosal tissue had been obtained. The fascial tissue transplanted with the mucosal cells was removed together with the muscular tissue 1 week after transplantation. To examine whether the mucosal cells had implanted in the fascia, the removed tissue was microscopically observed after staining with hematoxylin and eosin and immunostaining for cytokeratin. The growth of membranous tissue was confirmed by observation of the fascia stained with hematoxylin and eosin. Cytokeratin, as a specific indicator of mucosal and dermal tissues, was observed in most cells constituting the growing membrane. In conclusion, we established a fasciomucosal complex tissue. These results indicate that the fascia is useful as a scaffold that cross-links between the transplanted mucosa and the muscle.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2008 ; 123 : 7-14)

Key words : mucosal lining, fascia, fasciomucosal complex, scaffold, mucosal transplantation

#### I. 緒 言

再建外科治療において組織移植術は広く用いられ、良好な結果を得ている。複合組織移植として粘膜の裏打ち (lining) を有する再建組織の需要は大きく、鼻腔、口腔、食道の再建、また生殖泌尿器領域では、膣再建や膀胱癌切除後の膀胱再建などにおいて粘膜付組織が必要とされる。しかし、現時点でこの粘膜裏打ち組織移植はごく一部で試みられているに過ぎない<sup>1)-5)</sup>。この中で宮脇ら<sup>6)</sup>は、イヌの皮下組織に舌下粘膜を移植した血管茎皮弁を作製し、これを頬部に作製した全層組織欠損部に血管吻合による遊離組織移植を行い、欠損部の

被覆に成功した。しかしながら、この方法は鼻、頬部といった皮膚面と粘膜面が近接する組織の再建にはきわめて有用な方法であるが、複雑な管腔構造をもった組織あるいは運動機能をもつ組織への応用は難しく、膀胱や膣、咽頭食道などの中空性器官の再建に応用するには課題が残された。このような背景から本研究では、膀胱や食道など、内腔が粘膜で覆われる中空性器官の再建に応用できる筋層付き粘膜裏打ち組織の開発を目指し、培養した家兎の口腔粘膜細胞を fibrin glue と混じて、筋層上へ移植することで筋-粘膜複合組織の作製を試みた。また、筋組織と粘膜とを架橋させる目的で筋膜上に培養粘膜細胞を移植して、筋-筋膜-

粘膜複合組織を作製し、これらの臨床応用の可能性を検討した。

## II. 材料および方法

### 1. 実験動物および動物実験

本研究には、取り扱いが容易で外科的処置が簡便であることから日本白色種成熟雌家兔(体重 3.0～3.5 kg)を実験動物として用い、合計 16 頭使用した。これらの実験および動物の飼育については、東京慈恵会医科大学動物実験指針に則って計画し、本学動物実験委員会の審査を経て承認の下で施行した。動物は、室温  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$ 、12 時間照明 (07:00～19:00, 照度 300 lx) で管理された飼育室において個別ケージを用いて、不断給餌および不断給水下で飼育した。なお、以下のすべての手術は、ペントバルビタールナトリウム (25 mg/kg, i.v.) を用いて麻酔を導入し、イソフルラン (2.5%) の吸入による麻酔維持の下で行った。術後は、オルビフロキサシン (5 mg/kg) を 1 日 1 回皮下投与し、かつ術創の消毒を行うことで感染を防止した。また、組織を評価する際の動物の安楽死についてはペントバルビタールナトリウム (100 mg/kg, i.v.) を用いることで十分に苦痛を排除するように配慮した。

### 2. 口腔粘膜細胞の培養

家兔に前述の方法で全身麻酔を施し、舌下面から生理食塩水を用いた hydrodissection 法によって全層粘膜を小円刃刀 (No. 15) で  $5 \times 15$  mm の大きさで挙上、採取した (Fig. 1)。術創は 5-0 のポリグリコール酸縫合糸で一期的に閉創した。

採取した粘膜は、カルシウム、マグネシウム不含の滅菌磷酸緩衝生理食塩水 (以後、PBS<sup>-</sup>) で 3 回洗浄後、約 1 mm 片に細切し、35 mm プラスチックシャーレに入れ、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  in air で培養した。培養液は、Dulbecco 修正 Eagle 培地 (SIGMA) と F-12 培地 (Invitrogen Corp.) を 3:1 の割合で混ぜ、hydrocortisone (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , SIGMA), transferrin (5 ng/ml, SIGMA), insulin (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , SIGMA), penicillin (100 U/ml, SIGMA), amphotericin (0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , SIGMA), triiodothyronine ( $2 \times 10^{-9}$  M, SIGMA) を混じたものを使用した<sup>7)8)</sup>。牛胎児血清 (FCS) を 10% になるように加えた。さらに trafermin (科研製薬)

Table 1. Contents of the tissue culture medium

Material	Concentration
Dulbecco's modified Eagle's medium : Ham'F12=3:1 (total 200 ml)	
hydrocortisone	0.5 mg/ml
transferrin	5 $\mu\text{g}/\text{l}$
insulin	5 $\mu\text{g}/\text{ml}$
penicillin	100 U/ml
kanamycin	0.1 mg/ml
amphotericin B	0.25 mg/ml
triiodothyronine	$2 \times 10^{-9}$ M
trafermin	0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Fetal Calf Serum (FCS)	10%

を 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  になるように加えた<sup>9)</sup> (Table 1)。

培養開始から 3 日目で培養液を交換し、5 日後、sub-confluent となった時点でトリプシン (0.25%) -EDTA (1 mM) (Invitrogen Corp.) を用いて、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  で 30 分間インキュベートして単細胞状態の細胞浮遊液を得た。この細胞浮遊液は PBS<sup>-</sup> を用いて 400 G で 10 分間遠心洗浄し、前述の培養液で細胞数を  $1 \times 10^4$  個/ml に調整し継代した。さらに 2 週間後同様の方法で細胞数を  $1 \times 10^5$  個/ml に調整し継代を行った。培養細胞の評価および培養細胞移植は、継代 2 代目のものを用いた。

培養細胞はその中に含まれる粘膜細胞の割合を算定するために、家兔 cytokeratin に交差性を有する抗ヒト type 1/type 2 サイトケラチンマウスモノクローナル抗体 (AE1/AE3, PROGEN) を用いて粘膜細胞を免疫組織化学的に標識した。免疫染色の発色操作には、市販の streptavidin-biotin-peroxidase 染色キット (ヒストファイン SAB-PO(M) キット, ニチレイ) を用い、陽性像の発色には diaminobenzidine (DAB) 発色キット (DAB 基質キット, ニチレイ) を用いた。

### 3. fibrin glue を用いた培養粘膜細胞の筋層への移植

#### 1) 移植床の作製

全身麻酔下で粘膜を採取した同一の個体の大腿部を縦切開し、大腿直筋を露出した。筋体中央まで筋線維に沿って切開を加え、シリコン製組織拡張器 (6.5 ml,  $1.5 \times 3.0$  cm) を挿入するポケットを作製した。挿入後に組織拡張器を拡大する生理食

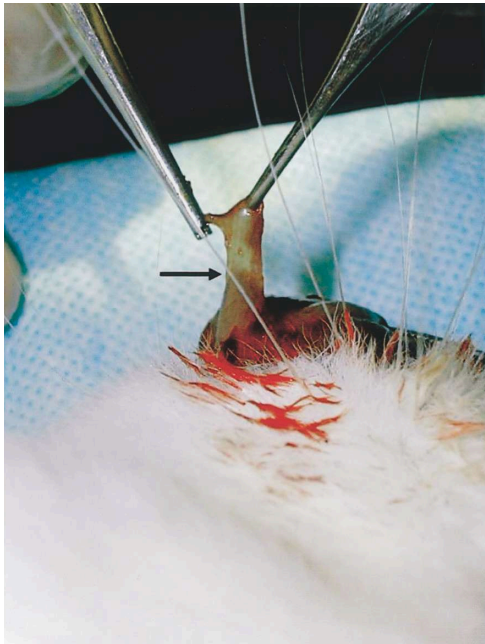


Fig. 1. The rabbit sublingual mucosal tissue ablated by the hydrodissection method  
Arrow: Ablated mucosal tissue

塩水注入用のリザーバーは近傍の皮下に埋入した。同時に粘膜細胞を注入するためのシリコン製チューブ  $\phi 1$  mm を組織拡張器に沿って埋入し、注入口はリザーバー付近の皮下に固定した (Fig. 2A, 2B)。

### 2) 培養粘膜細胞移植および移植床の拡張

術後7日目に培養粘膜細胞に fibrin glue 1 ml を混ぜ、全身麻酔下で培養細胞注入用チューブから  $3 \times 10^6$  個の細胞を注入して、チューブは抜去した<sup>10)</sup> (Fig. 2C)。組織拡張器の拡張は粘膜細胞注入4日目より開始し、生理食塩水を1回に1.5 ml 注入した。この操作は、週2回2週間で合計4回行った。

### 3) 組織採取および評価

2週後に家兔を前述の方法で安楽死させ、粘膜細胞を注入した部位の外科的損傷を避けるため大腿直筋筋体を全周性に剝離し、筋組織を摘出した。10% 緩衝 formalin で24時間固定後、常法に従い paraffin 包埋標本を作製した。標本は、 $4 \mu\text{m}$  で薄切し、脱 paraffin 後、hematoxylin eosin (HE)

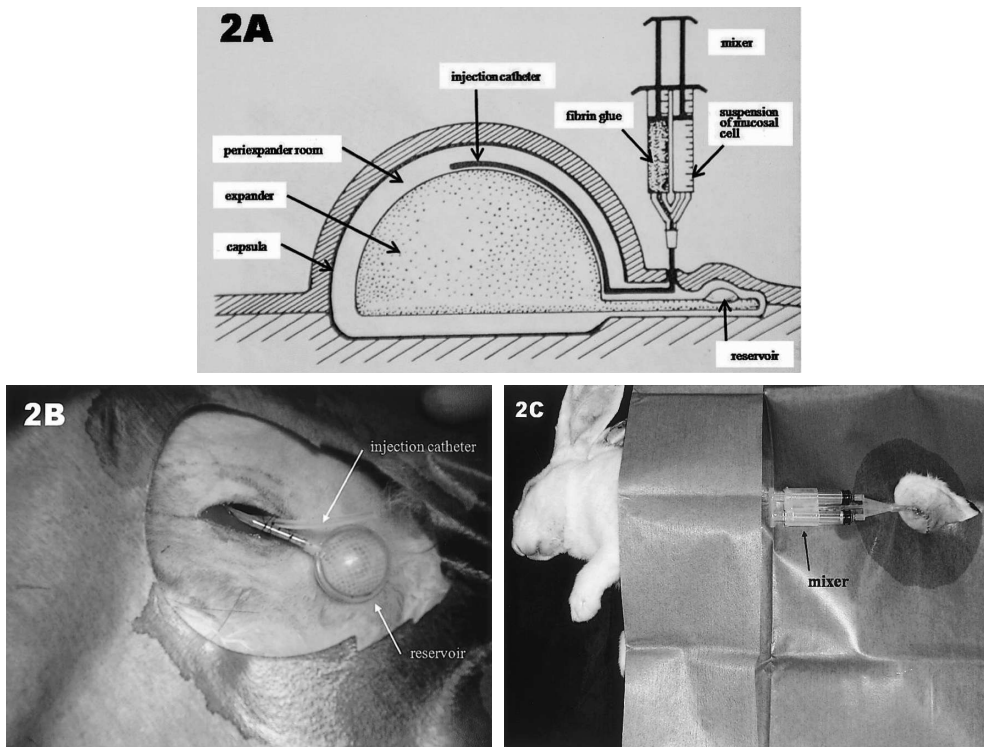


Fig. 2. A schema (2A) and practice (2B and 2C) of insertion of a tissue expander and its reservoir into the muscular tissue, and injection of cultured mucosal cells through the injection tube  
A schema (2A) is quoted from a previous report<sup>10)</sup>.

染色を施して組織拡張器周囲に移植した培養粘膜細胞が生着しているかについて観察した。

#### 4. 培養粘膜細胞の筋膜上への移植

##### 1) 培養粘膜細胞移植

全身麻酔下で粘膜を採取した同一の個体の大腿筋膜上にインシュリンシリンジ (29G 針付) を用

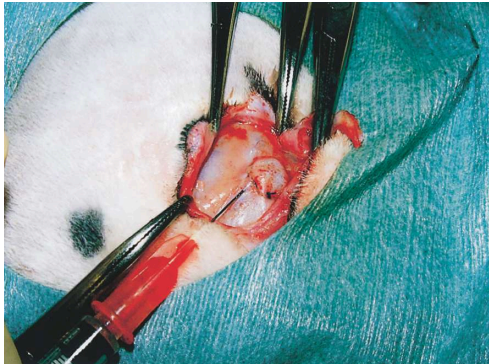


Fig. 3. Transplantation of mucosal cell suspension onto the fascia of the rectus femoris

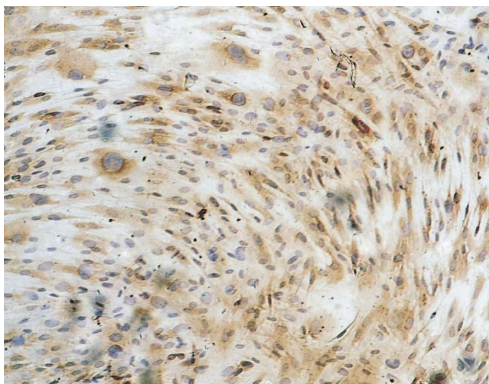


Fig. 4. Immunohistochemistry of cultured cells obtained from the hypoglossus mucosal tissue. Cytokeratin positive mucosal cells are shown as brown signals.

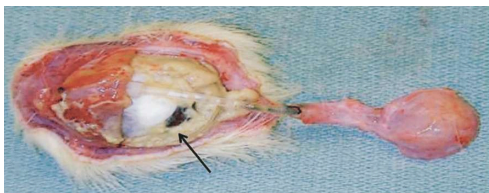


Fig. 5. Result of transplantation of mucosal cells mixed with fibrin glue into muscular parenchyma

An arrow shows a rice bran like structure appeared 1 week after injection of mucosal cells mixed with fibrin glue.

いて  $1.0 \times 10^7$  個の培養粘膜細胞を注入した (Fig. 3).

##### 2) 組織採取および評価

1 週間後に家兔を前述の方法で安楽死させ、細胞を注入した筋膜を筋実質とともに 1 cm 角の大ききで摘出し、同様に 10% 緩衝 formalin で 24 時間固定後、常法に従い paraffin 包埋標本を作製した。標本は  $4 \mu\text{m}$  で薄切し、脱 paraffin 後、HE 染色および前述と同様に抗サイトケラチン抗体を用いた免疫染色を行い、筋膜上に移植した培養粘膜細胞が生着しているかについて観察した。



Fig. 6. Microscopic observation (H-E stain) of the rice bran like structure shown in Fig. 5.

The rice bran like structure contain a few cells looking like fibroblast (\*). It is thought that the unstructured area is occupied with fibrin glue injected.



Fig. 7. Result of transplantation of cultured mucosal cells onto the fascia

An arrow shows the fascial tissue with a membrane tissue proliferating after mucosal cell transplantation.



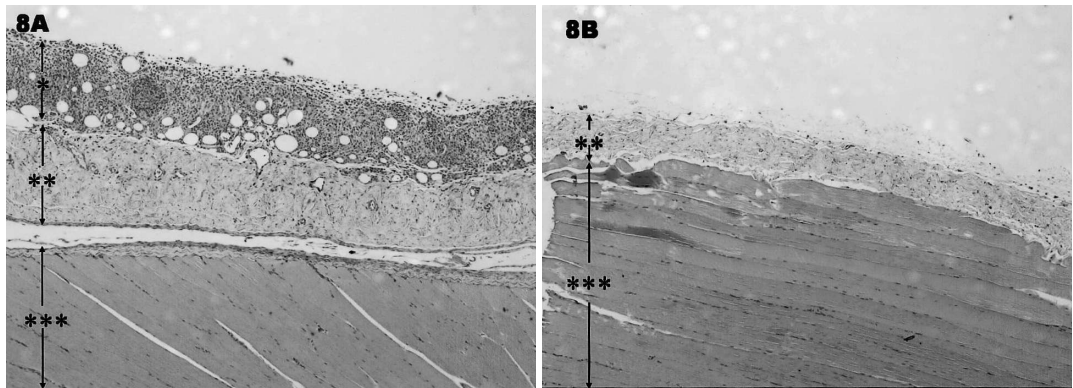


Fig. 8. Microscopic observation of the fasciomuscular tissue 1 week after the transplantation of cultured mucosal cells.

8A: tissue transplanted with the mucosal cells (microscopic observation of Fig. 7)

8B: its control (no transplantation)

\*: growing membrane \*\* the fascial tissue \*\*\* the muscular tissue

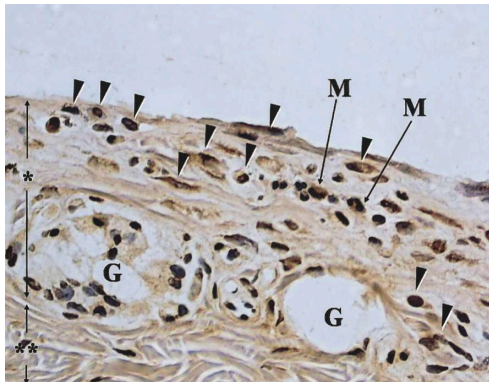


Fig. 9. Immunohistochemistry of the membrane tissue growing 1 week after the transplantation of cultured mucosal cells

Arrowheads show cytokeratin positive mucosal cells colored with brown.

M: mitosis of mucosal cells

G: gland like structure

\*: growing membrane \*\* the fascial tissue

### III. 結 果

#### 1. 口腔粘膜細胞の培養

約 4 週間の培養で筋膜に移植可能な量の培養細胞  $3 \times 10^6$  個から  $1 \times 10^7$  個を得た。また、増殖した培養細胞中に占める cytokeratin 陽性細胞は平均 92% であった (Fig. 4)。

#### 2. fibrin glue を用いた培養粘膜細胞の筋層への移植

摘出した組織拡張器は、すべて拡張器の周囲に米粕様の付着を観察した (Fig. 5)。また、組織標

本で培養粘膜細胞は筋層に lining を形成しておらず、fibrin glue と考えられる空隙を認めた (Fig. 6)。

#### 3. 培養粘膜細胞の筋膜上への移植

培養粘膜細胞注入後、1 週間で筋膜上に何らかの組織が生着していた (Fig. 7)。HE 染色において細胞を注入した筋膜上には膜様組織の増生を観察した (Fig. 8A)。これらの所見は非注入側の筋膜上では観察されなかった (Fig. 8B)。前述した抗 cytokeratin 抗体を用いた免疫染色では、この膜様組織は cytokeratin 陽性であり、不規則であるものの層状化を呈していた。また、腺様組織の構築や細胞分裂像も確認された (Fig. 9)。

### IV. 考 察

内面が粘膜で覆われる中空性器官の一般的な壁構造は、上皮の下層に粘膜固有層、粘膜筋板、粘膜下組織を有している。これらの組織は、粘膜上皮を支持するほか、粘膜筋板は器官の収縮にも働く。このような独特の構造を持つ器官の再建、とりわけ壁の欠損の修復には壁組織の移植という手段が考えられる。移植片は同じ器官の健全な部位より確保することも可能であるが、欠損が広範にわたる場合、構造が似た他器官より組織を移植する方法が一般的な考え方であろう。また近年、tissue engineering の発展にともなって *in vitro* で粘膜シートを作り、移植する方法も試みられている<sup>8)</sup>。一般に粘膜シートは collagen gel に粘膜細

胞を播種し layer を作る。こうして作られた粘膜シートは口腔粘膜の欠損創などに応用されているが<sup>8)11)~14)</sup>、移植片が脆弱であるという欠点も指摘される。このように粘膜移植においては移植片の構造的な強度が問題になることが多い。この点において我々は、粘膜を裏打ちする組織として骨格筋を応用することを考えた。この方法はまず舌下から採取した粘膜を分離・培養して粘膜細胞を増殖させた。次いで大腿直筋内に組織拡張器を挿入して空隙を作り、拡張器周囲に培養した粘膜細胞を注入することで、内腔が粘膜で覆われた中空性の筋-粘膜複合組織を作製するというものである。

舌下由来の口腔粘膜の細胞培養においては、細胞数の確保、粘膜細胞以外、すなわち線維芽細胞などの異種細胞の混入、継代培養による細胞の変異、および清浄性といった問題が存在する。細胞数は1回の採取より約4週間の培養で総細胞数が $3 \times 10^6$ 個から $1 \times 10^7$ 個であり、細胞の増殖速度としては遅いが本研究では *in vitro* のみならず移植後の細胞の増殖も期待しているため<sup>6)</sup>、移植に用いる細胞数としては十分に確保されたものと考えられた。異種細胞の混入に関しては、上皮に特異的に発現する cytokeratin を marker として増殖した培養細胞中に占める cytokeratin 陽性細胞、つまり粘膜細胞の割合を算定したところ、その平均は92%であり、ほぼ純粋な粘膜細胞の培養に成功した。継代を繰り返すことにより粘膜細胞が持つ本来の特徴が少しずつ損なわれることも一般に言われているが、2回の継代において移植に必要な十分な細胞数を高純度で確保できたことより、今回行った培養による細胞の変異はないものと考えられた。また、培養細胞を臨床に応用する際に細胞の清浄性も問題となる場合がある<sup>7)15)</sup>。これまで報告されている粘膜細胞の培養法の中には、マウス由来の細胞（線維芽細胞など）と共培養することにより、マウス細胞が放出する何らかの成長因子を期待していたものが報告されている<sup>16)~19)</sup>。この点において我々の行った培養法では、異種細胞を必要としないため移植時における細胞の contamination の懸念はない。ただし、栄養源として FCS を使用し、添加した成長因子も異種動物に由来するものを使用していることから、今後は培養に添加する血清は自己血清に、成長因子もヒトの

recombinant 製剤に置き換えるなど、純粋にヒト由来の材料を応用することも視野に入れ、さらに純度の高い粘膜培養法を確立する必要があると考えられた。

培養した粘膜細胞は、筋-粘膜複合組織、すなわち粘膜裏打ち筋組織を作製する目的で組織拡張器により筋組織内に作製した空隙に注入した。ここでは注入した粘膜細胞が組織に固着することを期待して注入する細胞に fibrin glue を混じた。しかし、全例において拡張器周囲に米粕様の付着を見たものの、組織学的には少数の線維芽細胞様の細胞を認めるに過ぎず、かつ空隙に富み、粘膜細胞が筋層に生着していることは認められなかった。このことから米粕様の変化は fibrin glue が変性したものであると考えられた。したがって、この方法では、筋-粘膜複合組織を作製することはできず、筋組織と粘膜の複合組織の作製にはこれらを架橋する、なんらかの scaffold が必要であると考えられた。

このことから我々は、細胞を支持する scaffold として筋実質の表面を覆っている筋膜を考え、粘膜細胞を移植する部位を筋膜上に変更した。その結果、本来筋膜上には存在しない cytokeratin 陽性細胞からなる layer、すなわち移植した粘膜細胞に由来する粘膜層を認め、筋-筋膜-粘膜複合組織を作製することに成功した。ただし、今回得られた粘膜細胞の移植から1週間後の移植部位の所見では、本来口腔粘膜にみられる細胞の重層化は十分なものではなかった。この点において、今後、移植から数週もしくは数カ月後の所見を観察することで、移植粘膜層の形成に関する形態的、機能的な検討を重ねる必要があると思われる。

近年、少量の細胞や健常組織を採取し、*in vitro* で培養・増殖させることで、生体類似組織を作製し自己移植する細胞移植治療が盛んに研究されている。口腔粘膜培養上皮シートもそのうちの1つである。これらは、羊膜<sup>20)</sup>やヒアルロン酸スポンジにアテロコラーゲンのゲルを組み合わせたマトリックス<sup>21)</sup>、無細胞化した同種真皮マトリックス (ADM)<sup>22)</sup>やヒト新鮮屍体真皮<sup>15)</sup>などを scaffold として粘膜細胞を培養し作製される。粘膜の支持組織として強固な膜状組織を用いて膜-粘膜複合組織を作製して移植するという手法である。本研

究では、筋組織と粘膜とを架橋する scaffold として筋膜を応用したが、これまでの方法のように scaffold となる組織を生体外に取り出した上で粘膜細胞を培養するのではなく、採取した少量の細胞を培養によって増殖させ、そうして得た自己の粘膜細胞を生体内に注入することで筋-筋膜-粘膜複合組織を作製したことは初めての試みである。

本研究において、粘膜裏打ち筋組織の作製が家兎モデルを用いて可能であることが明らかとなった。これは膀胱や膣、咽頭食道のような筋層に包まれた粘膜裏打ちを有する中空性器官の再建に応用可能であると考えられる。頭頸部の粘膜側における深い欠損創の再建では、皮弁の代わりにあらかじめ筋膜上に粘膜層を作製した組織を欠損部位に補綴すれば、より自然に近い形に復元が可能であろう。また、婦人科疾患における膣部を含む広範囲欠損の再建でも同様である。例えば口腔や膣から粘膜を採取し腹直筋などに粘膜層を作製しておけば、本来粘膜組織で覆われる腔腔は機能的にもより近い形で再建が可能となる。このように粘膜裏打ち筋弁としての応用が今後期待されると考えられる。さらに、今回作製した筋-筋膜-粘膜複合組織は、筋組織から剥離して筋膜-粘膜複合組織としても利用可能である。つまり、筋膜という強固な膜状組織に粘膜層を作り、崩れにくいシート状に構成したことにより移植時の組織移動や周囲粘膜との縫合固定も容易となる。この自家粘膜を用いた筋膜-粘膜シートは、例えば、広範囲熱傷例での眼瞼、口唇部等における粘膜側の再建への応用などが考えられる。また、膣再建では従来から皮膚移植を行っているが、筋膜-粘膜複合組織を移植することでより生理的な腔腔の再建が可能となる。

以上のように本研究では、粘膜の scaffold として筋膜を用い、筋膜上に cyokeratin 陽性の粘膜細胞が増生し筋-筋膜-粘膜複合組織を作製することに成功した。このことにより筋組織と粘膜とを架橋する scaffold として筋膜が利用可能であることが明らかとなり、粘膜を有する中空性器官の再建に広く応用できると期待される。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました東京慈恵会医科大学形成外科学講座栗原邦弘教授に、また本研究にあたり多大のご協力を頂いた本学総合医科学研究センター臨床医学研究所の成相孝一先生、本学細菌学講座の関啓子教授に深謝いたします。

## 文 献

- 1) Carls FR, Jackson IT, Behl AK, Lebeda R, Webster H. Prefabrication of mucosa-lined flaps: a preliminary study in the pig model. *Plast Reconstr Surg* 1998; 101: 1022-8.
- 2) Rath T, Millesi W, Lang S, Millesi-Schobel G. Mucosal prelamination of a radial forearm flap for intraoral reconstruction. *Eur J Plast Surg* 1998; 21: 166-70.
- 3) Simman R, Jackson IT, Andrus L. The use of prefabricated buccal-mucosa lined flap in an animal model that could be used for vaginal reconstruction. *Plast Reconstr Surg* 2002; 109: 1044-9.
- 4) Gunter L, Ronald S, Nils-Claudius G, Rainer S. Prelaminating the fascial radial forearm flap by using tissue-engineered mucosa: improvement of donor and recipient site. *Plast Reconstr Surg* 2001; 108: 1564-72.
- 5) Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Yamamoto K, Adachi E, et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med* 2004; 351: 1187-96.
- 6) Miyawaki T, Degner D, Jackson IT, Barakat K, Elmazar H, Moreira A, et al. Easy tissue expansion of prelaminated mucosa-lined flaps for cheek reconstruction in a canine model. *Plast Reconstr Surg* 2002; 109: 1978-85.
- 7) Izumi K, Takacs G, Terashi H, Feinberg SE. Ex vivo development of a composite human oral mucosal equivalent. *J Oral Maxillofac Surg* 1999; 57: 571-7.
- 8) Ueda M, Hata K, Horie K, Torii S. The potential of oral mucosal cells for cultured epithelium: a preliminary report. *Ann Plast Surg* 1995; 35: 498-504.
- 9) 安田正人, 石川 治, 高橋健造, 宮地良樹. ヒト真皮線維芽細胞の体の部位による形質の違い: 塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)に対する反応性の検討. *皮膚の科学* 2006; 5: 21-5.
- 10) Jiao XY, Tanczos E, Dodic T, Voigt M,

- Haberstroh J, Stark GB. Prefabrication of bilaminar-epithelialized composite flap with tissue expander and cultured keratinocytes. *Plast Reconstr Surg* 1999; 103: 138-44.
- 11) O'Connor NE, Mulliken JB, Banks-Schlegel S, Kehinde O. Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet* 1981; 1: 75-8.
  - 12) Gallico GG, O'Connor NE, Compton CC. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med* 1984; 311: 448-451.
  - 13) Hata K, Kagami H, Ueda M, Torii S, Matsuyama M. The characteristics of cultured mucosal cell sheet as a material for grafting, comparison with cultured epidermal cell sheet. *Ann Plast Surg* 1995; 34: 530-8.
  - 14) Ueda M, Sumi Y, Mizuno H, Hata K. Clinical results of cultured epithelial grafting delivered by bio-skin bank system-the Nagoya experiences. *Materials Science and Engineering* 1998; C6: 211-9.
  - 15) 泉 健次, 寺師浩人. よりクリーンな培養複合口腔粘膜の開発. *新潟歯会誌* 1999; 29: 187-8.
  - 16) Rheinwald J, Green H. Serial cultivation of strain of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 1975; 6: 331-44.
  - 17) De Luca M, Albanese E, Megna M. Evidence that human oral epithelium reconstituted in vitro and transplanted onto patients with defects in the oral mucosa retains properties of the original donor site. *Transplant* 1990; 50: 454.
  - 18) Ueba M, Ebata K, Kaneda T. In vitro fabrication of biotificial mucosa for reconstruction of oral mucosa: Basic research and clinical application. *Ann Plast Surg* 1991; 27: 540.
  - 19) Raghoobar GM, Tomson AM, Scholma J. Use of cultured mucosal grafts to cover defects caused by vestibuloplasty: an in vitro study. *J Oral Maxillofac Surg* 1995; 53: 872.
  - 20) 佐竹良之. 口腔粘膜培養の上皮移植. *Dental Diamond* 2005; 30: 103-4.
  - 21) 奥田一博. 口腔粘膜培養シートによる歯肉増大への試み. *The Quintessence* 2004; 23: 1878-85.
  - 22) An G, Walter RJ, Nagy K. Closure of abdominal wall defects using acellular dermal matrix. *J Trauma* 2004; 56: 1266-75.