古谷 幸子

山口大学医学部眼科学教室

要 約

エキシマレーザー照射(193 nm)に対するラット角膜 の創傷治癒反応を検討するために、I型コラーゲン、フィ ブロネクチン、ラミニンおよび IV 型コラーゲンの局在 の変化を経時的に観察した.免疫螢光抗体法ではエキシ マレーザー照射により実質の I型コラーゲンに著明な変 化はなかったが、フィブロネクチンやラミニン、IV 型コ ラーゲンの局在は大きく変化した.照射1日後、フィブ ロネクチンに対する螢光が照射部の実質表面に増加し た.その後、照射部実質ではフィブロネクチンやラミニ ン、IV 型コラーゲンに対する螢光は増加し、7日目ごろ に、特に実質浅層に多量に認められた. ヘマトキシリン・ エオジン染色では,照射1日後,照射部の角膜実質細胞 が一過性に減少した.その後,実質中には活性化したと思 われる角膜実質細胞が多数認められた.これらの結果か ら,エキシマレーザー照射により活性化角膜実質細胞が 活発に細胞外マトリックスを産生し,持続的な創傷治癒 反応を引き起こす可能性が推定された.(日眼会誌 102: 229-238,1998)

キーワード:エキシマレーザー,細胞外マトリックス,角 膜実質細胞,角膜創傷治癒

Changes in Extracellular Matrix Components after Excimer Laser Photoablation in Rat Cornea

Sachiko Furutani

Department of Ophthalmology, Yamaguchi University School of Medicine

Abstract

To understand the response of rat corneal wound healing after excimer laser photoablation, we observed the chronological changes in the localization of type I collagen, fibronectin, laminin, and type IV collagen after photoablation of the rat cornea. With immunofluoresence techniques, no obvious changes in the localization of type I collagen could be observed in the area of the wound. However, the localization of fibronectin, laminin, and type IV collagen was dramatically changed. One day after ablation, the fluorescein intensity of fibronectin increased at the denuded surface. After that, fibronectin, laminin, and type IV collagen were dramatically increased, especially in the shallow layer

I 緒 言

角膜屈折矯正手術に用いられるエキシマレーザーは, アルゴンとフッ素の混合ガスを大電流の放電により励起 of the stroma, until about 7 days after ablation. In hematoxylin-eosin staining, keratocytes disappeared transiently from the area of the wound 1 day after ablation and then activated keratocytes migrated to the area. These results suggested that activated keratocytes might actively synthesize the extracellular matrix components. Therefore, sustained responses of keratocytes may be induced by excimer laser photoablation. (J Jpn Ophthalmol Soc 102: 229-238, 1998)

Key words: Excimer laser, Extracellular matrix, Keratocytes, Corneal wound healing

することによって生じる, excited dimer(励起二量体)が 基底状態に遷移する際に発せられる光子エネルギーを増 幅して得られる波長 193 nm の紫外線である.この光子 エネルギーにより分子間結合が切断されて組織を分解

Reprint requests to: Sachiko Furutani, M.D. Department of Ophthalmology, Yamaguchi University School of Medicine. 1144 Kogushi, Ube-shi, Yamaguchi-ken 755–8505, Japan

(Received July 25, 1997 and accepted in revised form November 18, 1997)

別刷請求先:755-8505 山口県宇部市小串1144 山口大学医学部眼科学教室 古谷 幸子

⁽平成9年7月25日受付,平成9年11月18日改訂受理)

し,切開・切除する¹¹².そのため熱による変性が少な く²¹³⁾,機械的な切除に比べ表面を平滑に,かつ正確に切除 することが可能である⁴⁵⁵.1985年に Seiler ら⁶¹によりは じめて人眼に臨床応用された.これまでに多くの角膜屈 折矯正手術および治療的角膜切除術に用いられている が,長期的な術後屈折率の予測性や⁷⁸⁹,再生した上皮下に 生じる膜様の混濁,すなわち haze⁹¹⁰⁰は未だ重要な問題 点である.

細胞外マトリックスは単なる支持組織ではなく,細胞 の移動,分化,増殖などに関与する1112.角膜実質は主に I 型コラーゲンから,角膜上皮基底膜はⅣ型コラーゲンや ラミニンなどの細胞外マトリックスから構成されてい る12)13).角膜上皮剝離や実質切開の際,直ちにフィブロネ クチンが創部表面に出現し,周辺の上皮細胞の一時的な 基質として伸展移動を促進させる.フィブロネクチンは 創部を上皮細胞が被覆すると,速やかに消失する140~16.基 底膜成分であるⅣ型コラーゲンやラミニンは、フィブロ ネクチンとは全く逆に反応して上皮基底膜の傷害と同時 に消失する.創傷治癒過程に従って上皮基底膜部に出現 し,正常な状態へと修復される17.このように,細胞外マ トリックス成分は創傷と反応して各々の重要な役割を果 たしている.したがって,エキシマレーザー照射に対する 角膜の細胞外マトリックス成分の変化を観察すること は,創傷治癒過程や haze を考える上で重要である.

今回我々は,エキシマレーザー照射後の角膜の創傷治 癒過程において,このような角膜の細胞外マトリックス 成分がどのように変化するかを,特に照射中央部の角膜 実質層を中心に経時的に観察した.

Ⅱ 方 法

1. 抗体

ー次抗体として, ウサギ血清抗ヒトおよびウシ I 型コ ラーゲン抗体(LSL), ウサギ血清抗マウス W型コラーゲ ン抗体(LSL)を 1,000 倍に, ウサギ血清抗ヒトフィブロネ クチン抗体(LSL), ウサギ血清抗マウスラミニン抗体 (LSL)を 2,000 倍に, それぞれ 1% のカゼインを添加した リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を用いて希釈した. 陰性対 照として, 500 倍に希釈した正常ウサギ血清(Cappel, West Chester, PA, 米国)を用いた. 二次抗体として, フ ルオレスセイン・イソチオシアネイト(FITC)標識ヤギ 抗ウサギ IgG 抗体(Cappel)を 1% カゼイン添加 PBS で 1,000 倍に希釈して用いた.

2. エキシマレーザー照射後のラット角膜組織の経時 的観察

ラット(Wistar Kyoto 系, 雄, 300 ~ 400 g, 25 匹, 成和 実験動物研究所)をペントバルビタールナトリウム(ネン ブタール[®],大日本製薬)の腹腔内注射(30 mg/kg)で麻酔 した.エキシマレーザーは EC-5000(ニデック)を用い, 角膜上皮剝離は行わずに, PTK モードで照射直径 3 mm, pulse 周波数 30 Hz, 総切除深度はヒト眼において 60 um が得られるシステムパラメータ設定でラット角膜を両眼 とも照射した.エキシマレーザー照射1.3.7日および4. 8.16.24 週後に肉眼および細隙灯顕微鏡で前眼部を観察 後,過量のペントバルビタールナトリウム(ネンブター ル®)で安楽死させ,摘出した両眼のうち,片眼を OCT compound (Miles, Elkhart, IN, 米国) 中に包埋してアセ トン・ドライアイス中で凍結し, Microtome cryostat (HM 505 N. Zeiss, Oberkochen,ドイツ)を用いて厚さ8 um の凍結切片を作製した.切片を1% periodate lvsine paraformaldehyde(PLP)溶液により5分間固定後,PBS で洗浄し、1%カゼイン添加PBSと1時間室温で反応さ せ、非特異的吸着を防止した、希釈した一次抗体を切片に 添加し,室温で1時間反応させた.PBS で洗浄した後,希 釈した二次抗体を室温で1時間反応させた.PBS で十分 に洗浄した後, PBS で 50% に希釈した無螢光グリセリン で封入し, 螢光顕微鏡 (Axioskop 50, Zeiss) を用いて暗視 野で観察し、フジクローム ISO 400 で写真撮影した.ま た,摘出した片眼を塩化ヘキサデシルピリジニウム・ホ ルマリン固定後,パラフィン包埋し,滑走式 Microtome (HISTOSLIDE 2000, Leica, St. Gallen, スイス)を用いて 厚さ4µmのパラフィン切片を作製し,ヘマトキシリン ・エオジン染色による組織学的観察を行い,フジクロー ム ISO 100 を用いて写真を撮影した.

Ⅲ 結 果

1. I 型コラーゲン

正常角膜において, I型コラーゲンは実質にほぼ均一 に染色された(図1a).照射1および3日後,切除された 表面でI型コラーゲンの染色性が増していたが,表面以 外の実質全層にはほとんど変化はなかった(図1b,c).7 日後,照射部中央の実質中層から深層にかけてはほとん ど変化は認められなかったが,実質浅層ではI型コラー ゲンに対する螢光がわずかに増強していた(図1d).4お よび8週後,照射部中央の実質浅層に限局して帯状に増 強したI型コラーゲンの螢光が認められた.実質中層か ら深層にかけて変化はなかった(図1e,f).24週後では 正常角膜とほとんど類似していたが,実質浅層ではまだ わずかに染色性が増していた(図1g).

2. フィブロネクチン

正常角膜では、フィブロネクチンは実質中および実質 のコラーゲン線維に沿って螢光が認められた.また、デス メ膜にも螢光が認められた(図2a).照射1日後,照射部 実質の表面にフィブロネクチンに対する強い螢光が観察 された(図2b).3日後、上皮はほぼ全体を再被覆してい るが、フィブロネクチンに対する螢光は1日後と同様に、 照射部実質の表面に強く認められた(図2c).7日後にな ると、照射中央部ではフィブロネクチンに対する螢光が 特に実質浅層で認められた(図2d).4週後、実質浅層に



図1 エキシマレーザーによる角膜切除後のI型コラーゲン局在の経時的変化. 正常角膜においてI型コラーゲンは実質にほぼ均一に染色された.照射後,実質浅層でわずかに染色性を増し ていたが,顕著な変化は認められなかった.

a:正常角膜, b:1 日後, c:3 日後, d:7 日後, e:4 週後, f:8 週後, g:24 週後, バーは 200 µm

限局したフィブロネクチンに対する強い螢光が認められた.実質深層の螢光は,正常角膜とほぼ同様であった(図2e).8および24週後も実質浅層にフィブロネクチンに対する強い螢光が認められ,それ以外の実質中の螢光は 正常角膜に類似していた(図2f,g).

3. ラミニン

正常角膜では、ラミニンに対する螢光は上皮基底膜と デスメ膜に認められた、実質中にも薄く線状に認められ た(図3a).照射1日後、上皮基底膜部のラミニンに対す る螢光は認められず、基底膜を完全に含んで実質浅層が 切除されていることが確認された、実質については変化



図2 エキシマレーザーによる角膜切除後のフィブロネクチン局在の経時的変化. 正常角膜おいてフィブロネクチンは実質中および実質のコラーゲン線維に沿って認められた.また,デスメ膜 にも認められた.照射初期には実質の表面に強い螢光が観察された.その後,実質浅層に限局した強い螢光が 認められた.

a:正常角膜,b:1日後,c:3日後,d:7日後,e:4週後,f:8週後,g:24週後,バーは200µm

がなかった(図3b).3日後,再生された上皮と実質との 間にラミニンの特異螢光が断片的に認められた.照射部 の実質中には,正常に比べ点状および線状の螢光がわず かに増強していた(図3c,d).7日後,再生された上皮と 実質との間にかなり連続的なラミニンに対する螢光が観 察され,実質浅層に強い螢光が帯状に認められた(図3e, f).4週後,照射部全体にわたって上皮基底膜の部分に太 く連続的なラミニンに対する螢光が観察された.照射部 実質浅層のラミニンに対する螢光は,7日後と同様に帯 状に強く認められた(図3g).8,16および24週後,照射



図3 エキシマレーザーによる角膜切除後のラミニン局在の経時的変化.

正常角膜においてラミニンは上皮基底膜とデスメ膜に認められた. 実質中にも薄く線状に認められた. 照射に より上皮基底膜部の螢光は消失した後, 再生された上皮と実質との間に断片的に認められた. その後, 上皮基 底膜部にはかなり連続的な螢光が観察され, 実質浅層に強い帯状の螢光が 24 週後まで認められた. a:正常角膜, b:1 日後, c:3 日後照射境界部(矢印より右側が照射部), d:3 日後照射中央部, e:7 日後照射境 界部, f:7 日後照射中央部, g:4 週後, h:8 週後, i:16 週後, j:24 週後, バーは 200 µm

部の上皮基底膜部のラミニンに対する螢光は,太く直線 的に認められた.照射部実質浅層の帯状の螢光も4週後 と同様に認められた(図3h~j).

4. IV 型コラーゲン

正常角膜では,IV 型コラーゲンに対する螢光は上皮基 底膜とデスメ膜に認められる他に,実質中にも点状に認 められた(図 4 a).1日後,上皮基底膜部の IV 型コラーゲ



図4 エキシマレーザーによる角膜切除後の IV 型コラーゲン局在の経時的変化.

正常角膜において IV 型コラーゲンは上皮基底膜とデスメ膜に認められる他に,実質中にも点状に認められた. 照射により上皮基底膜部の螢光は消失した後,再生された上皮と実質との間に弱く不連続な局在が認められ た.その後,上皮基底膜部には連続的な螢光が観察され,実質浅層に強い層状の螢光が24 週後まで認められた. a:正常角膜,b:1日後,c:3日後照射境界部(矢印から右側が照射部),d:3日後照射中央部,e:7日後,f:4週 後,g:8 週後,h:16 週後,i:24 週後,バーは 200 μm

ンに対する螢光は,照射部では認められなかった.実質中の IV 型コラーゲンに対する点状の螢光は変化がなかった(図4b).3日後,照射周辺部では再被覆化した上皮と 実質との間に弱く不連続な IV 型コラーゲンの局在が認 められたが,照射中央部でははっきりしなかった.照射部 実質内では,点状の IV 型コラーゲンがやや増強してい た(図4c,d).7日および4週間後,照射部実質の中央部 においても上皮基底膜部の IV 型コラーゲンに対する螢



図5 エキシマレーザーによる角膜切除後のヘマトキシリン・エオジン染色所見の経時的変化. 照射により実質浅層では角膜実質細胞が減少していた.その後,照射部の実質中には多数の腫大化および球状 化した角膜実質細胞が侵入し,実質浅層に集束していた.組織の修復とともに角膜実質細胞は正常と同様なコ ラーゲン線維に沿った横長の形態に回復しているが,上皮直下には球状の細胞を多く認めた. a:正常角膜,b:1日後,c:3日後,d:7日後,e:4週後,f:8週後,g:16週後,h:24週後,バーは200μm

光が直線的に認められた.実質浅層には IV 型コラーゲ ンに対する螢光が層状に強く認められ,中・深層では点 状螢光がやや増強していた(図4e,f).8,16 および24 週 後,上皮基底膜部の IV 型コラーゲンに対する螢光は,ラ ミニンと同様にかなり連続的に認められた.照射部の実 質浅層の螢光は依然として層状に強く認められた.実質 中層から深層にかけての IV 型コラーゲンに対する点状 の螢光は,正常に類似して認められた(図4g~i).

5. ヘマトキリシン・エオジン染色

正常角膜(図5a)と比べ,1日後の照射部の実質浅層で

は角膜実質細胞が減少していた(図5b).3日後までには 上皮欠損は修復されていた.照射部の実質には,腫大化お よび球状化した角膜実質細胞と考えられる細胞成分が侵 入していた(図5c).7日後,照射部の実質中には,さらに 多数の角膜実質細胞が侵入し,実質浅層に集束していた (図5d).4週後,照射部実質の角膜実質細胞は減少し,正 常と同様なコラーゲン線維に沿った横長の形態に回復し ているが,上皮直下には正常角膜と比較すると,球状の角 膜実質細胞が多く認められた(図5e).8,16および24週 後,照射部実質の角膜実質細胞はさらに減少し,上皮直下 には正常角膜と比較すると,球状の角膜実質細胞がやや 多く認められたが,ほぼ正常角膜と同様な状態になって いた(図5f~h).

6. 肉眼および細隙灯顕微鏡による観察

角膜の混濁は観察期間を通じて肉眼では認められず, 細隙灯顕微鏡による観察では,4週後の角膜の上皮下に うっすらとしたびまん性の混濁が認められた.8,16およ び24週後では上皮下混濁はかなりうすく,細隙灯顕微鏡 による観察でかろうじて認められる程度であった.

IV 考 按

我々は、エキシマレーザー照射に対する角膜の創傷治 癒反応を角膜実質層の細胞外マトリックス成分の局在変 化を中心に経時的に観察した.今回の実験から、エキシマ レーザー照射により I 型コラーゲンの局在はほとんど変 化を認めなかった.しかし、フィブロネクチン、ラミニン および IV 型コラーゲンの局在は、照射によりダイナ ミックに変化していた.このような細胞外マトリックス 成分の分布変化は、照射後の角膜実質細胞の動態と非常 によく類似していた.したがって、照射部位に侵入してき た角膜実質細胞が活発にフィブロネクチン、ラミニンお よび IV 型コラーゲンを合成分泌していることが推定され た.

I型コラーゲンは線維状蛋白質で,角膜実質の主たる 構成成分である¹³⁾.今回の結果,照射7日~24週後まで実 質浅層において一定の深さで増強したI型コラーゲンの 螢光は,新しく合成されたI型コラーゲンかも知れない. Andersonら¹⁸⁾は照射3週間後のヒト角膜で,角膜実質細 胞のコラーゲン合成を示す prolyl 4-hydroxylase やI型 コラーゲンの前駆体である type I carboxy procollagen を認め,I型コラーゲン合成が照射3週間以内には開始 されると推測している.また今回の実験で,照射前後で実 質中層から深層はI型コラーゲンの染色性に著明な変化 を認めず,レーザー刺激に対してあまり影響は受けてい ないことが示唆された.

フィブロネクチンは,創傷治癒の際に細胞が一時的に 基質と接着するのを助ける接着性の糖蛋白質である¹⁹⁾. 照射1日後,フィブロネクチンが照射部実質の表面に多 量に出現していることから,エキシマレーザー照射時に もフィブロネクチンは緊急時の上皮細胞が伸展・移動す るための足場となっていると考えられる^{10~16}.照射3お よび7日後の組織では,実質内にフィブロネクチンに対 する螢光が増強し,照射部全層にわたって角膜実質細胞 によるフィブロネクチンの合成・分泌が亢進していると 考えられる.Hannaら²⁰もエキシマレーザー6日後の組 織で,フィブロネクチンが実質の浅層および深層に軽度 沈着していることを報告している.また今回,24 週後に おいてもフィブロネクチンが実質浅層に沈着しているこ とから,長時間にわたって上皮基底膜や実質の創傷治癒 が持続していることが示唆された.照射後,24 週から1 年²¹⁰,あるいは1年以上¹⁸⁰にわたって実質浅層にフィブロ ネクチンが認められたという報告もある.

ラミニンは糖蛋白質で,基底膜の主要な構成成分であ る²². IV 型コラーゲンは,三次元的なネットワーク様に 集合して基底膜構造の安定性に関与する基底膜成分であ る²³⁾.照射後の再生上皮と実質の境界部には、まずラミニ ンが,遅れてIV型コラーゲンが断片的に出現して基底膜 の修復が進行し,1週後には連続した直線状に認められ た.しかし、4~24週間後にかけて、正常組織に比してラ ミニンに対する螢光は太く強く,基底膜の修復には長期 間を有することが示唆された.このことは,基底膜のアン カリングフィブリルである VII 型コラーゲンが, サル²⁴⁾ およびヒト18)で12週以上も不規則な形のままで認めら れたという報告からも示唆される.また,今回の実験か ら,照射3日後の実質全体でIV型コラーゲンに対する 点状螢光が増強し、ラミニンも実質のコラーゲン線維に 沿って増強した後,照射部の実質浅層に強い帯状の螢光 を認めた.この結果とヘマトキシリン・エオジン染色で 観察された角膜実質細胞の動態から,従来上皮細胞が分 泌するとされていた

基底膜成分を角膜実質細胞でも

産生 している可能性が示唆された. Hanna ら200も照射6日後 に IV 型コラーゲン, ラミニン, フィブロネクチン, プロ テオグリカンが実質浅層に沈着することをウサギ角膜に おいて報告している.また,照射4週後にラミニンがサル 角膜上皮下実質に認められたという報告50や,20週後に IV 型コラーゲンがヒト角膜の照射部実質浅層において 認められ,創傷治癒時には角膜実質細胞の細胞外マト リックス産生能が変化する可能性があるという報告180も ある.IV 型コラーゲンやラミニンは単に膜構造を作って いるだけではなく、細胞の接着や移動を促進するなどの 働きをもっている11)22)26).角膜実質細胞は,正常時には細 胞外マトリックス受容体であるβ1インテグリンが弱く 発現しているだけであるが、創傷治癒時にはα1~α5鎖 が出現して多様性を示す27.これらのことから、レーザー 刺激によって角膜実質細胞が活性化され,基底膜成分を 実質中に多量に分泌することにより創傷治癒過程が促進 されるのではないかと考えられる.

現在までに,エキシマレーザー照射後の創傷治癒過程

平成10年4月10日

における各種細胞外マトリックスの局在・分布は免疫組 織学的に検討されている18/20/21/24/25).しかし,今回我々が報 告したような種々のマトリックス成分を同時に24週間 にわたって検討した報告は我々が知る限りない.今回の 実験結果から,照射後の創傷治癒過程において個々のマ トリックス成分が非常に類似した動態を示し,種々のマ トリックス成分が協調的に、あるいは相互的に作用しな がら修復に向かうと考えられた.また,エキシマレーザー は予想以上に広範囲の角膜実質細胞に影響を与え,細胞 外マトリックス産生能を変化させるなどの創傷治癒反応 を持続的に引き起こしていた.このような持続的な角膜 実質の創傷治癒過程が,術後の haze や屈折率の戻りの 原因になるかも知れない.したがって、エキシマレーザー 照射による角膜屈折矯正手術を行う場合には,今回報告 したような細胞外マトリックスの経時的変化および角膜 実質細胞による持続的な創傷治癒が起こり得る可能性を 十分に考慮する必要があると考えられる.

稿を終えるに当たり,本研究に際しご指導とご校閲を賜り ました山口大学医学部眼科学教室の西田輝夫教授に深謝いた します.研究全般にわたり,直接ご指導いただいた同教室の田 中俊朗先生および中村雅胤博士に心から謝意を表します.ま た,研究にご協力いただいた同教室の原久美子氏に感謝いた します.

文 献

- Garrison BJ, Srinivasan R: Microscopic model for the ablative photodecomposition of polymers by far ultraviolet radiation (193 nm). Appl Phys Lett 44:849-851, 1984.
- Waring III GO: Development of a system for excimer laser corneal surgery. Trans Am Ophthalmol Soc 87:854–983, 1989.
- Trokel SL, Srinivasan R, Braren B: Excimer laser surgery of the cornea. Am J Ophthalmol 96: 710-715, 1983.
- Kerr-Muir MG, Trokel SL, Marshall J, Rothery S: Ultrastructural comparison of conventional surgical and argon fluoride excimer laser keratectomy. Am J Ophthalmol 103: 448–453, 1987.
- 5) Renard G, Hanna K, Saragoussi J-J, Pouliquen Y : Excimer laser experimental keratectomy. Ultrastructural study. Cornea 6:269-272, 1987.
- Seiler T, Bende T, Wollensak J, Trokel S: Excimer laser keratectomy for correction of astigmatism. Am J Ophthalmol 105:117–124, 1988.
- Taylor HR, McCarty CA, Aldred GF: Predictability of excimer laser treatment of myopia. Arch Ophthalmol 114: 248—251, 1996.
- Tengroth B, Epstein D, Fagerholm P, Hamberg-Nyström H, Fitzsimmons TD: Excimer laser photorefractive keratectomy for myopia, Clinical results in sighted eyes. Ophthalmology 100:739– 745, 1993.

- 9) Lohmann C, Gartry D, Muir MK, Timberlake G, Fitzke F, Marshall J: 'Haze' in photorefractive keratectomy: Its origins and consequences. Laser Light Ophthalmol 4: 15-34, 1991.
- 10) Sher NA, Chen V, Bowers RA, Frantz JM, Brown DC, Eiferman R, et al: The use of the 193 nm excimer laser for myopic photorefractive keratectomy in sighted eyes. A multicenter study. Arch Ophthalmol 109: 1525—1530, 1991.
- Jain S, Azar DT: Extracellular matrix and growth factors in corneal wound healing. Curr Opin Ophthalmol 5: 3-12, 1994.
- 12) Ben-Zvi A, Rodrigues MM, Krachmer JH, Fujikawa LS: Immunohistochemical characterization of extracellular matrix in the developing human cornea. Curr Eye Res 5:105-117, 1986.
- 13) Nakayasu K, Tanaka M, Konomi H, Hayashi T: Distribution of types I, II, III, IV and V collagen in normal and keratoconus corneas. Ophthalmic Res 18:1—10, 1986.
- 14) Fujikawa LS, Foster CS, Harrist TJ, Lanign JM, Colvin RB: Fibronectin in healing rabbit corneal wounds. Lab Invest 45: 120—129, 1981.
- 15) Suda T, Nishida T, Ohashi Y, Nakagawa S, Manabe R : Fibronectin appears at the site of corneal stromal wound in rabbits. Curr Eye Res 1:553— 556, 1981/1982.
- Nishida T: Extracellular matrix and growth factors in corneal wound healing. Curr Opin Ophthalmol 4: 4—13, 1993.
- 17) Murakami J, Nishida T, Otori T: Coordinated appearance of β₁ integrins and fibronectin during corneal wound healing. J Lab Clin Med 120:86–93, 1992.
- 18) Anderson JA, Binder PS, Rock ME, Vrabec MP: Human excimer laser keratectomy. Immunohistochemical analysis of healing. Arch Ophthalmol 114: 54—60, 1996.
- McDonald JA : Extracellular matrix assembly. Ann Rev Cell Biol 4:183—207, 1988.
- 20) Hanna KD, Pouliquen Y, Waring III GO, Savoldelli M, Cotter J, Morton K, et al: Corneal stromal wound healing in rabbits after 193 nm excimer laser surface ablation. Arch Ophthalmol 107: 895—901, 1989.
- 21) Latvala T, Tervo K, Mustonen R, Tervo T : Expression of cellular fibronectin and tenascin in the rabbit cornea after excimer laser photorefractive keratectomy : A 12 month study. Br J Ophthalmol 79:65—69, 1995.
- 22) Martin GR, Timpl R: Laminin and other basement membrane comportents. Ann Rev Cell Biol 3:57-85, 1987.
- 23) Farquhar MG: The glomerular basement membrane. In: Hay ED(Ed) : Cell Biology of Extracel-

lular Matrix. Plenum, New York, 365-418, 1981.

- 24) SundarRaj N, Geiss III MJ, Fantes F, Hanna K, Anderson SC, Thompson KP, et al : Healing of excimer laser ablated monkey corneas. An immunohistochemical evaluation. Arch Ophthalmol 108 : 1604—1610, 1990.
- 25) Malley DS, Steinert RF, Puliafito CA, Dobi ET: Immunofluorescence study of corneal wound healing after excimer laser anterior keratectomy in the monkey eye. Arch Ophthalmol 108:1316— 1322, 1990.
- 26) Cameron JD, Skubitz APN, Furcht LT: Type IV collagen and corneal epithelial adhesion and migration. Effects of type IV collagen fragments and synthetic peptides on rabbit corneal epithelial cell adhesion and migration *in vitro*. Invest Ophthalmol Vis Sci 32: 2766-2773, 1991.
- 27) Lauweryns B, van den Oord JJ, Volpes R, Foets B, Missotten L: Distribution of very late activation integrins in the human cornea. An immunohistochemical study using monoclonal antidies. Invest Ophthalmol Vis Sci 32:2079–2085, 1991.