

家兔全層角膜移植後の角膜創傷治癒と細胞外マトリックスに関する免疫組織学的検索

加藤 卓次, 中安 清夫, 金井 淳

順天堂大学医学部眼科学教室

要 約

目 的：全層角膜移植術 (penetrating keratoplasty, PKP) 後の角膜創傷治癒を免疫組織化学的に解析する。

対象と方法：白色家兔 20 眼を用いて PKP を施行し、術後 3 日, 1, 2 週間, 1, 3 か月目の角膜組織をサンプルとし、コラーゲン (I, III, IV 型), ラージプロテオグリカン, コンドロイチン 4 硫酸, コンドロイチン 6 硫酸, ビメンチンの各抗体を使用して免疫染色を行い、経時的にその染色性を検討した。

結 果：術後 3 日目までに, host-graft junction に沿って IV 型コラーゲンが発現していた。術後 7 日目までは, 創部で III 型コラーゲン, ラージプロテオグリカ

ン, コンドロイチン 6 硫酸の発現が増加し, その後, これらは次第に消失した。上皮創傷治癒には 1 か月以上を要し, Descemet 膜の再生は術後 3 か月を経過してもなお未完了であった。

結 論：PKP 後の角膜創傷治癒においては, III 型コラーゲン, ラージプロテオグリカン, コンドロイチン 6 硫酸が重要な役割を果たしていると考えられた。(日眼会誌 103: 519—526, 1999)

キーワード：全層角膜移植, 角膜創傷治癒, 細胞外マトリックス, コラーゲン, プロテオグリカン

Corneal Wound Healing and Immunohistological Features of Extracellular Matrix Following Penetrating Keratoplasty in Rabbits

Takuji Kato, Kiyoo Nakayasu and Atsushi Kanai

Department of Ophthalmology, Juntendo University School of Medicine

Abstract

Purpose : To analyze corneal wound healing after penetrating keratoplasty (PKP).

Materials and methods : We performed PKP on 20 white rabbit eyes, and applied immunohistochemical techniques. The distribution of type I, III and IV collagens, large proteoglycan, chondroitin 6-sulfate, chondroitin 4-sulfate, and vimentin was determined at postoperative intervals of 3 days, 1 week, 2 weeks, 1 month and 3 months.

Results : By day 3, staining for type IV collagen was observed along the host-graft junction. By day 7, staining for type III collagen, large proteoglycan and chondroitin 6-sulfate had increased in the repair region, and then diminished with increasing

postoperative time. Epithelial wound healing required more than one month, whereas the remodeling of Descemet's membrane did not terminate at 3 months after PKP.

Conclusion : The data from this study suggest that type III collagen, large proteoglycan and chondroitin 6-sulfate play a crucial role in the corneal wound healing after PKP. (J Jpn Ophthalmol Soc 103: 519—526, 1999)

Key words : Corneal wound healing, Penetrating keratoplasty, Extracellular matrix, Collagen, Proteoglycan

I 緒 言

近年の細胞生物学, 分子生物学の進展により, かつては

組織を構築するための単なる足場と考えられていた細胞外マトリックスが複雑な細胞活動を調節, 制御している可能性が示されつつある。特にインテグリンファミリー

別刷請求先: 113-8421 東京都文京区本郷 2-1-1 順天堂大学医学部眼科学教室 加藤 卓次

(平成 10 年 8 月 4 日受付, 平成 11 年 2 月 25 日改訂受理)

Reprint requests to: Takuji Kato, M.D. Department of Ophthalmology, Juntendo University School of Medicine, 2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421, Japan

(Received August 4, 1998 and accepted in revised form February 25, 1999)

などの細胞側の接着分子の解明¹⁾や、さらに、これらの接着分子に対するマトリックス側のリガンドのアミノ酸配列レベルでの同定²⁾によって、細胞外マトリックスは細胞活動に動的な影響を与える生理活性物質の側面を持つことが次第に明らかになってきた。

創傷治癒においては、受傷を契機として細胞は新たな細胞外マトリックスを産生するが、細胞外に分泌されたマトリックス成分は組織の三次元的な“場”の情報を細胞にフィードバックし、細胞はその情報に基づいて自らの挙動を決定していくと推測される。細胞と液相としてのサイトカイン、そして、固相としてのマトリックス、これらの精巧な情報のクロストークによって創傷の治癒は完成される。

角膜は無血管組織であるため、創傷治癒過程における細胞と細胞外マトリックスの相互作用の解明のために、極めて単純化されたモデルを提示しているといえる。さらに、角膜移植眼における創傷治癒では、細胞同士が自己と非自己の壁すら乗り越えて、組織の修復のために調和的に機能することを示している。

過去における角膜創傷治癒の研究は、放射状角膜切開術(radial keratotomy, RK)³⁾やエキシマレーザー^{3)~7)}など、屈折矯正手術後の角膜やアルカリ外傷モデルなどを用いた研究が多く、全層角膜移植後の角膜創傷治癒を細胞外マトリックスの再生という観点から経時的に観察した報告はほとんどない。

今回、我々は家兎の全層角膜移植モデルを用いて角膜創傷治癒における細胞外マトリックスの役割を明らかにする目的で本研究を行った。

II 実験方法

白色家兎(体重2.5~3.0 kg)10匹を実験に使用した。塩酸ケタミン(ケタラル®筋注)およびキシラジン塩酸塩(セラクター®筋注)で全身麻酔後、6 mm トレパンで角膜移植片を作製し、異なる個体間で交換移植を行い、10-0 ナイロン糸で16針端々縫合した。術直後と翌日から1日2回抗生剤を点眼した。術後3日、1,2週間、1,3か月後に各2匹ずつをベントバルビタールナトリウム(ネプター®静注)で致死後、眼球を摘出し、強角膜片を作製した。強角膜片はOCT compound(Baxter Scientific)に包埋し、直ちに液体窒素中で急速凍結し、クリオスタットで薄切して7µmの凍結切片を作製した。切片は室温で1時間風乾した後、4°Cで10分間アセトン固定し、0.01 M リン酸緩衝液(PBS)で15分間洗浄した。3%過酸化水素水に10分間浸して、内因性ペルオキシダーゼの除去を行った後、1%ウシ血清に30分間反応させ、非特異反応のブロッキングを行った。免疫染色法としてlabelled strept-avidin biotin(LSAB)法を用い、以下に示す一次抗体を60分間反応させた。抗I型コラーゲン抗体(mouse, 1:200, Carbiochem, Cambridge, 米国), 抗III型コラー

ゲン抗体(mouse, 1:200, Carbiochem), 抗IV型コラーゲン抗体(goat, 1:200, Southern Biotechnology, Birmingham, 米国)抗ラーズプロテオグリカン抗体(mouse, 1:200, 生化学工業), 抗コンドロイチン4硫酸抗体(mouse, 1:200, 生化学工業), 抗コンドロイチン6硫酸抗体(mouse, 1:200, 生化学工業), 抗ビメンチン抗体(mouse, 1:200, Dako, Carpinteria, 米国), 二次抗体としてビオチンラベル抗mouseおよびgoat IgG抗体(1:100, Dako)を30分間反応させ、さらに、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(Dako)を15分間反応させた後、基質溶液(0.02%過酸化水素水+ジアミノベンジン)を滴下して発色させた。切片はメチルグリーンで核染色を行い、エタノール系列で脱水、キシロール透徹後、カナダバルサムで封入し光学顕微鏡で観察した。陰性対照として一次抗体の変わりに1%(ウシ血清)と反応させた切片を用いた。また、プロテオグリカンに対する免疫染色はブロッキング操作の前にコンドロイチナーゼABC(生化学工業)による消化を行った。すなわち、切片を0.2 units/mlのABCase, 酢酸ナトリウム, 20 mM Tris-HCL, pH 8.0 溶液中で37°C, 1時間反応させた。

III 結果

術後3日：術後3日の所見ではhost-graft間の創傷治癒は不十分で、角膜全層にわたる間隙に上皮細胞や多核白血球が入り込んでいた(図1A, B)。創部表面は上皮細胞によって覆われていたが、この部分でのIV型コラーゲンの染色性は不整で、上皮基底膜はまだ十分に形成されていなかった(図1C)。実質のhost-graft間の間隙に入り込んだ上皮細胞と、この部分に集積した角膜実質細胞の周囲にはIV型コラーゲンの染色が観察された(図1D)。創部は浮腫を起こし、角膜厚は正常の約2倍程度まで厚くなっていた。創部の周辺にはビメンチン陽性の角膜実質細胞が集積していた(図1E)。創部周囲の実質細胞付近にラーズプロテオグリカンの染色所見がかすかにみられた(図1F)。Descemet膜の断裂部は実質側にカール状に入り込んだまま再生していなかった(図1G)。

術後1週間：Host-graft間の間隙は消失し、この部分に新たに結合組織が形成され、創部の角膜厚は約1.5倍になっていた(図1H)。上皮基底膜のIV型コラーゲンは本来の線状の染色性を示さず、創部の上皮下にdiffuseに染色されていた(図2A)。形態的に上皮の層状構造はほぼ回復しているものの、創部での上皮基底細胞の一部は正常角膜上皮では発現しないビメンチンを発現していた(図2B)。新たに形成された結合組織中には、ビメンチン陽性の実質細胞が高密度に集積している(図2B)。この結合組織はI, III型(図2C)、IV型コラーゲン(図2A)およびラーズプロテオグリカン、コンドロイチン6硫酸(図2D)に対する染色性陽性である。この新しい結合組織中では、コンドロイチン4硫酸に対する染色性はむしろ低

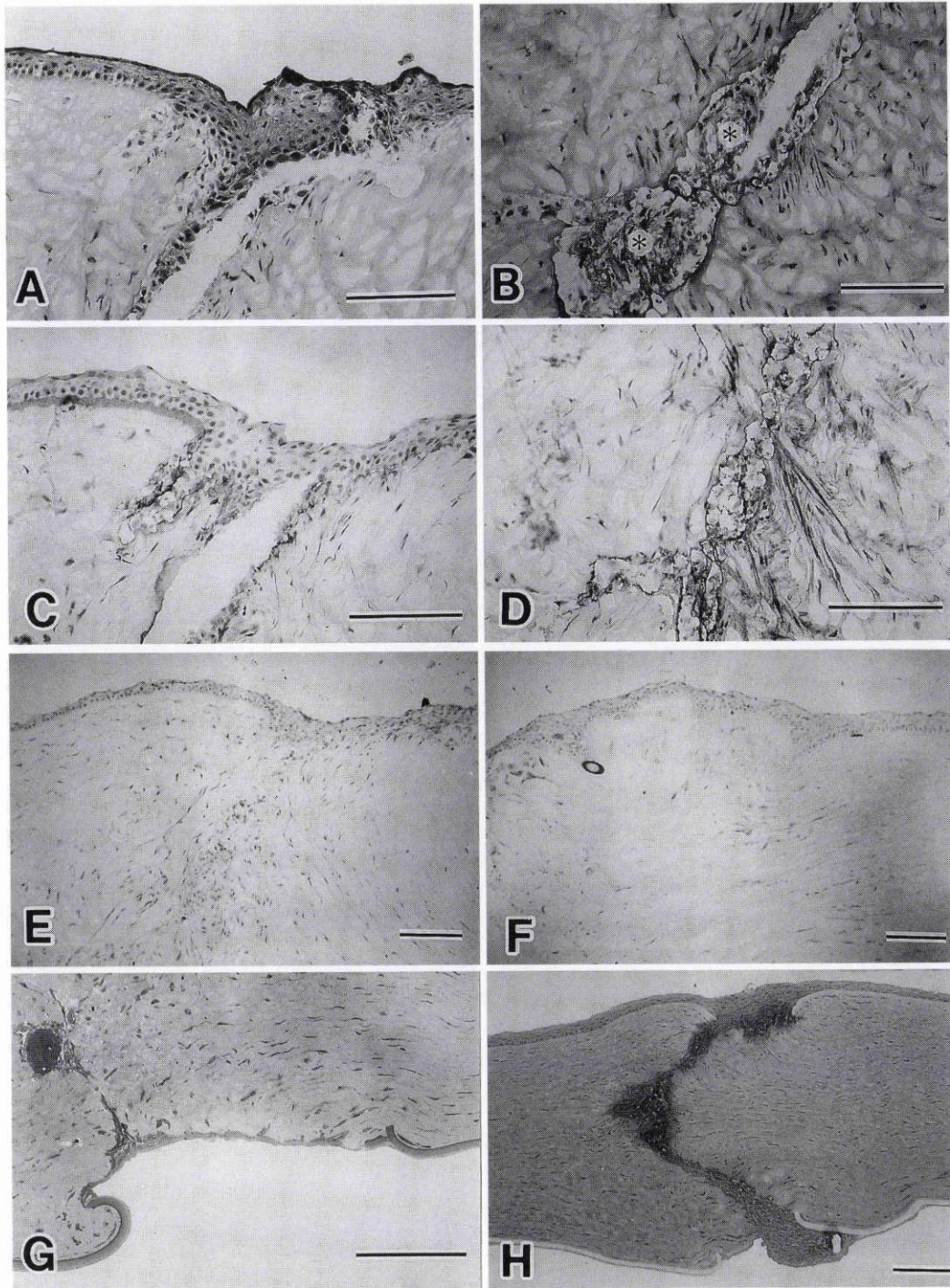


図 1 A：術後 3 日. 上皮側 host-graft junction では創は離開し, 上皮細胞が創部に入り込んでいる. ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色. B：術後 3 日. Host-graft junction の実質部分にも上皮細胞 (*印) が入り込み, 創部周辺に実質細胞が集積している. HE 染色. C：術後 3 日. 抗 IV 型コラーゲン抗体. 創部では基底膜構造が失われている. D：術後 3 日. 抗 IV 型コラーゲン抗体. Host-graft junction の実質部分に集積した上皮および実質細胞の周囲に IV 型コラーゲンの染色性が観察される. E：術後 3 日. 抗ビメンチン抗体. Host-graft junction に活性化した実質細胞が集積する. F：術後 3 日. 創部の周囲にラージプロテオグリカンの染色性がかすかにみられる. G：術後 3 日. Descemet 膜は断裂し実質側にカール状に入り込んでいる. トルイジンブルー (TB) 染色. H：術後 1 週間. Host-graft junction には新たな結合組織が形成される. TB 染色. バーはすべて 100 μm

下していた (図 2 E). 断裂した Descemet 膜は, この時期にはまだ実質中にカールしたままであった (図 1 H).

術後 2 週間: 創部の上皮下の IV 型コラーゲンの発

現は, この時期になっても実質浅層まで diffuse な染色性を示していて, 本来の線状の染色性に回復していなかった (図 2 F). 創部には 1 週目同様 III 型コラーゲン (図 2

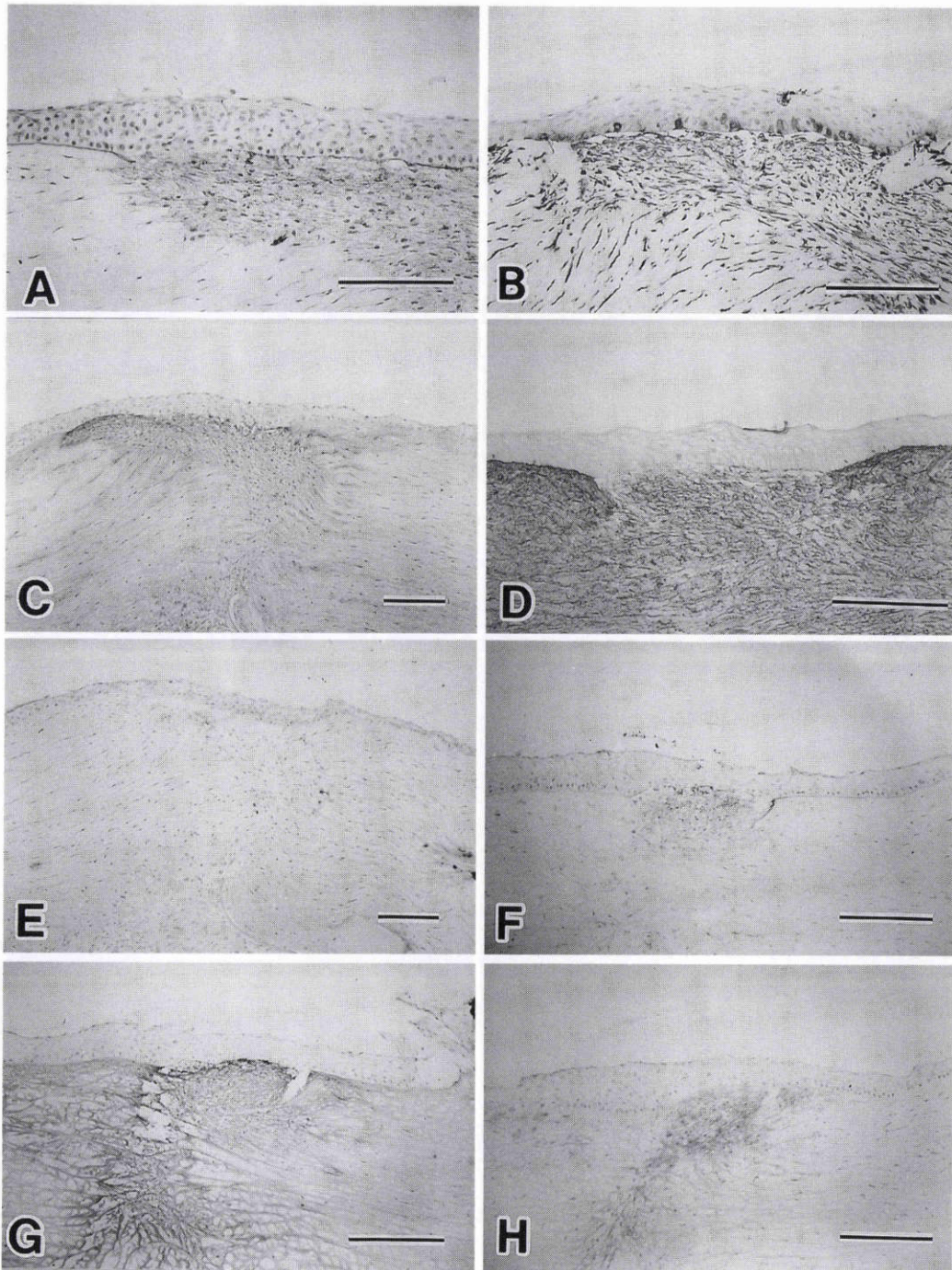


図2 A:術後1週間.抗IV型コラーゲン抗体.IV型コラーゲンはdiffuseに染まり基底膜本来の形態は回復していない.B:術後1週間.抗ビメンチン抗体.創部にはビメンチン陽性の実質細胞が高密度に集積し,上皮基底細胞も一部ビメンチンを発現している.C:術後1週間.抗III型コラーゲン抗体.新たに形成された結合組織はIII型コラーゲンを含んでいる.D:術後1週間.抗コンドロイチン6硫酸抗体.E:術後1週間.抗コンドロイチン4硫酸抗体.F:術後2週間.抗IV型コラーゲン抗体.G:術後2週間.抗III型コラーゲン抗体.H:術後2週間.抗ラージプロテオグリカン抗体.バーはすべて100 μ m

G)およびラージプロテオグリカン(図2H)が発現し,コンドロイチン4硫酸に対する染色性は低下したままであった(図3A).

術後1か月:術後1か月目には,host-graft間にはまだ角膜実質細胞の集積をみるものの,角膜厚はほぼ正常角膜と同等に回復している(図3B).しかし,実質のコラーゲン線維の連続性はまだ十分に回復しているとはい

い難く,一部縦方向に断裂していた(図3B).

術後3か月:角膜の浮腫は消失し,実質のコラーゲン線維は連続性を回復していた(図3C).IV型コラーゲンは一部diffuseに染色されているものの,本来の線状の基底膜構造に回復しつつあった(図3D).Descemet膜の断裂部では新しいDescemet膜が再生されつつあるが,本来のDescemet膜に比較して約1/2以下の厚みであり

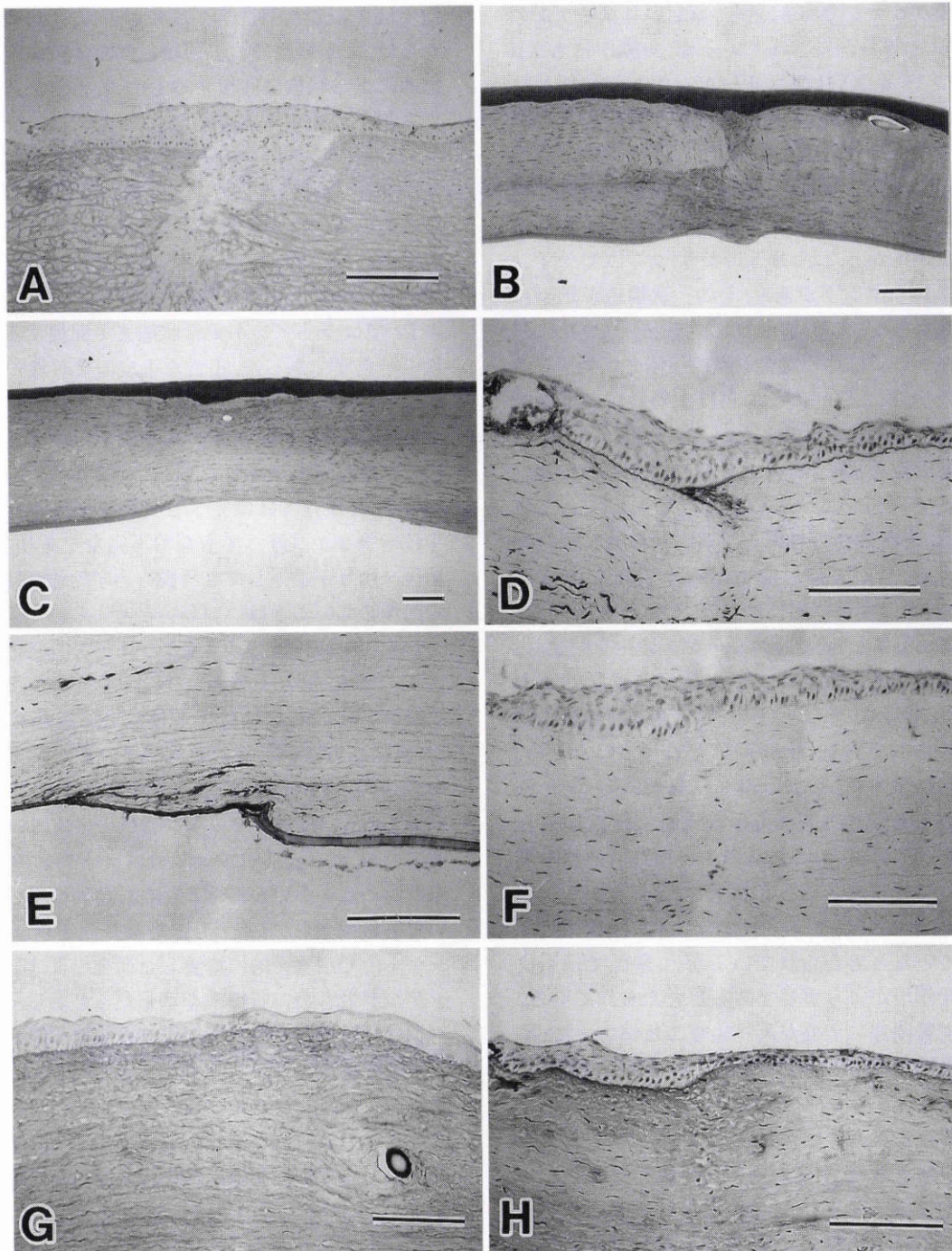


図3 A:術後2週間,抗コンドロイチン4硫酸抗体,染色性は低下したままである.B:術後1か月,実質のコラーゲン線維は一部断裂したままである.TB染色.C:術後3か月,実質のコラーゲン線維の連続性はほぼ回復している.TB染色.D:術後3か月,抗IV型コラーゲン抗体,基底膜本来の線状の構造に戻りつつある.E:術後3か月,抗IV型コラーゲン抗体,新しいDescemet膜が再生されつつあるが,厚みは1/2以下である.F:術後3か月,抗ラージプロテオグリカン抗体,ほとんど染色性をみない.G:術後3か月,抗コンドロイチン6硫酸抗体,正常部と創部の差は観察されなくなる.H:術後3か月,抗III型コラーゲン抗体,バーはすべて100 μ m

(図3E),また,断裂部付近ではIV型コラーゲンがdiffuseに発現していることから,Descemet膜は術後3か月経過してもまだ再生過程にあることを示していた(図3E).ラージプロテオグリカンに対する創部での染色性の増強は,もはや観察されなくなっていた(図3F).同様にコンドロイチン6硫酸の発現も正常部との差異が少な

くなっていた(図3G).しかし,創部でのIII型コラーゲンの発現はこの時期になってもやや増強していた(図3H).

IV 考 按

角膜を構成する細胞外マトリックスは,主にコラーゲ

ンとプロテオグリカンである。近年、新しいコラーゲンの分子種が次々と明らかにされているが、角膜中にも XII 型コラーゲン⁸⁾⁹⁾や XVII 型コラーゲン¹⁰⁾などの新しい分子種が同定され、これらの機能的役割が関心を集めている。一方、プロテオグリカンの研究は、その化学構造の多様性や側鎖のグリコサミノグリカンの複雑な硫酸化構造などのため、他の細胞外マトリックス成分と比較しても未解明の点が多かったが、最近になり、コアプロテインの遺伝子のクローニングが進み、その一次構造が次々に明らかにされてきた。また、種々のプロテオグリカンに対するモノクローナル抗体の開発や高速液体クロマトグラフィを用いた研究によって、その角膜中の局在や定量的解析が可能になってきた。

角膜の創傷治癒過程は RK などの屈折矯正手術において詳細に検討されている³⁾。このような切開によって生じた創部では、術直後から角膜上皮細胞が移動し細胞増殖を伴いながら、やがて創部は epithelial plug によって充填される。同時に創部周囲にはトランスフォームした角膜実質細胞が集積し、新たなコラーゲン産生を開始し、やがて epithelial plug はコラーゲンなどの細胞外マトリックスと置き換わって行く。一方、全層角膜移植後の創部では縫合によって host-graft 間は密着しているため、epithelial ingrowth は生じないように思われるが、今回の観察からは host-graft junction の隙間に術直後から角膜上皮細胞が入り込み、これらの上皮細胞は創部の実質側境界面に基底膜成分である IV 型コラーゲンを発現していた。正常組織中では、基底膜成分は主に上皮系の細胞が産生していると考えられているが¹¹⁾、創部では上皮と実質の相互作用がより重要であると考えられている。移植角膜の実質創部に上皮が入り込むことによって、本来は角膜実質部には存在しない基底膜成分が一時的に発現されると考えられる。術後 1 週目の所見からも、創部の上皮と実質細胞の双方の細胞周囲に IV 型コラーゲンの陽性所見が観察された。実質の創部に角膜実質細胞などが集積し、約 1 週間前後から活発に細胞外マトリックス成分を産生していく過程で、これらの上皮と上皮基底膜は消失していく。Host と graft の間を埋めるように新たに産生される結合組織は、当初は III 型コラーゲン、ラージプロテオグリカン、コンドロイチン 6 硫酸を強く発現しているが、やがて I 型コラーゲンなどに置き換わっていく。特に創部でのラージプロテオグリカンとコンドロイチン 6 硫酸の発現の増加は、今回の研究で得られた新知見である。

RK 手術の術後の角膜上皮創部治癒と全層角膜移植の術後のそれとの最大の相違は、全層角膜移植術後には知覚神経が十分に回復していない点で、その影響で上皮創傷治癒は遅延している可能性が考えられる¹²⁾。スペキュラーマイクロスコープを用いた研究からは、全層角膜移植術後の角膜上皮創傷治癒は従来考えられていたほど早

期ではないことが指摘されている¹³⁾。今回の我々の研究からは、上皮細胞は約 1 週間には光学顕微鏡レベルで形態的に正常状態に回復するものの、術後 2 週間が経過しても創部の上皮基底細胞にはビメンチンが発現しており、この時点では上皮基底細胞は活発な増殖を行っており、上皮創傷治癒は完了していないことを示していた。間葉系の中間径フィラメントであるビメンチンは通常の上皮系細胞では発現しないものの、増殖能の亢進した上皮では発現することが知られている¹⁴⁾¹⁵⁾。また、上皮基底膜の IV 型コラーゲンが正常状態まで回復するのに 1 か月以上が必要であった。正常な上皮の接着性の維持には上皮基底膜の正常化が不可欠であり、これらの点から考えると、全層角膜移植術後の基底膜を含めた上皮創傷治癒には 1 か月以上が必要であるといえる。また、実質の治癒は約 1~3 か月でほぼ完了しているが、Descemet 膜の再生は術後 3 か月経ってもなお不完全であり、全層角膜移植後 3 か月が経過しても角膜の力学的強度は正常状態まで回復しているとはいえないと考えられた。

角膜切開創付近で、III 型コラーゲンの発現が増加することは既に報告¹⁶⁾されている。正常角膜での III 型コラーゲンの含有量は乾燥重量の 10% 前後にすぎない¹⁷⁾が、創傷部では創傷後の比較的早い時期から発現が増加し、創傷治癒の過程で、次第に I 型コラーゲンに置き換わっていく。III 型コラーゲン自体の生体内の機能が未解明のため、治癒過程での III 型コラーゲンの役割もなお未解明の点が多いが、この現象は、角膜に限らず皮膚においても観察されている¹⁸⁾。線維芽細胞を種々のコラーゲンゲル中で三次元的に培養した研究では、III 型コラーゲンゲルが最も高い収縮率を示したことから、III 型コラーゲンは創傷治癒の過程で創傷部の収縮と創の閉鎖に重要な役割を果たしていると推定される¹⁹⁾²⁰⁾。また、角膜切開創に限らずエキシマレーザー後の上皮混濁部にも III 型コラーゲンは観察されており^{5)~7)}、III 型コラーゲンの発現の増加は様々な創傷治癒に共通した現象であるといえる。

今回観察されたように、ラージプロテオグリカンが創傷部で一時的に発現していることは興味深い現象である。今回用いたラージプロテオグリカン抗体は、パーシカンなどの巨大プロテオグリカンを認識するとされている²¹⁾²²⁾。パーシカンはニワトリ胚芽細胞から単離されたコンドロイチン硫酸プロテオグリカンで、未分化間充織や形態形成途上の組織など活発に細胞増殖を起こしている組織中に一時的に発現される²³⁾。パーシカンの機能としては、他のコンドロイチン硫酸鎖を持つプロテオグリカン同様、細胞接着阻害活性があり、また、ヒアルロン酸、各種コラーゲン、フィブロンectin などとの結合能を持つことが明らかにされている²⁴⁾。リコンビナントのパーシカンを用いた研究では、パーシカンの N 末端側のドメインがヒアルロン酸と結合することが証明されてい

る²⁵⁾。このようなラージプロテオグリカンの構造上の特徴から考えると、おそらく、これらの分子は創傷部でのヒアルロン酸などのマトリックス成分と細胞との相互作用に影響を与えていると推定される。ラージプロテオグリカンの正常角膜組織での局在は確認されておらず、今回の観察からも創傷部以外の正常角膜組織では発現していなかった。我々は既に、ラージプロテオグリカンがエキシマレーザー照射後の上皮下混濁部に一致して発現することを報告²⁶⁾している。これらのラージプロテオグリカンは正常角膜では発現しないものの、創傷治癒過程で組織の remodeling に一定の役割を果たした後、約 3 か月前後で創傷治癒の完了とともに組織から消失していくと考えられる。

Host と graft の間に新たに形成される結合組織中では、ラージプロテオグリカンとともにコンドロイチン 6 硫酸が強く発現され、逆にコンドロイチン 4 硫酸の染色性は低下していた。コンドロイチン 4 硫酸とコンドロイチン 6 硫酸は、どちらも N-アセチル D-ガラクトサミンと D-グルクロン酸の繰り返し構造から成るが、硫酸基の位置がガラクトサミン分子の C4 か C6 かの相違がある。このような硫酸基の位置の異なる 2 種類の異性体の組織分布や機能の相違は興味深い問題である。ウサギ耳軟骨の創傷治癒過程でコンドロイチン 6 硫酸が増加するという現象²⁷⁾や、ウサギの角膜上皮創傷治癒過程で涙液中のコンドロイチン 6 硫酸の上昇²⁸⁾が報告されている。また、我々はエキシマレーザー照射後の角膜中のグリコサミノグリカンを定量的に解析した研究で、コンドロイチン 6 硫酸が増加することを見出している²⁹⁾。このような先行研究と今回の観察結果から考えると、コンドロイチン硫酸の異性体の中でも特にコンドロイチン 6 硫酸は創傷治癒過程で発現が増加し、創傷部の remodeling に重要な役割を果たしていると考えられる。一方、今回の我々の観察からは、コンドロイチン 4 硫酸の創部での染色性はむしろ低下しており、硫酸基の導入位置の相違によって、両者の機能的役割は大きく異なると推測された。

以上、白色家兔の全層角膜移植モデルを用いた研究から、基底膜を含めた角膜上皮の治癒は術後 1 か月以上を要し、また、Descemet 膜の再生は術後 3 か月経過してもなお不十分であることが明らかとなった。免疫組織化学的には、host-graft junction における III 型コラーゲン、ラージプロテオグリカン、コンドロイチン 6 硫酸が創傷治癒過程に重要な役割を果たしていると考えられた。ただし、今回の研究結果をヒトの組織に適用するためには、家兔とヒトでの細胞の分裂能の相違など³⁰⁾の種差に関して若干の注意を払う必要があると考えられる。

文 献

- 1) Hynes RO : Integrins : Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69 : 11—25, 1992.
- 2) Pierschbacher MD, Ruoslahti E : Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 309 : 30—33, 1984.
- 3) Assil KK, Quantock AJ : Wound healing in response to keratorefractive surgery. *Surv Ophthalmol* 38 : 289—302, 1993.
- 4) Hanna KD, Pouliquen Y, Waring G III, 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.
- 5) 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—22, 1990.
- 6) 中安清夫, 石川 隆, 金井 淳 : エキシマレーザーの眼科的応用, 角膜への影響. *眼科* 36 : 1387—1396, 1994.
- 7) Anderson JA, Binder PS, Rock ME, Vrabcic MP : Human excimer laser keratectomy. Immunohistochemical analysis of healing. *Arch Ophthalmol* 114 : 54—60, 1996.
- 8) Kato T, Nakayasu K, Kanai A : Immunohistochemical localization of type XII collagen in the bovine cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 : s 1009, 1996.
- 9) Wessel H, Anderson S, Fite D, Halvas E, Hempel J, SundarRaj N : Type XII collagen contributes to diversities in human corneal and limbal extracellular matrices. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38 : 2408—2422, 1997.
- 10) Gordon MK, Fitch JM, Foley JW, Gerecke DR, Linsenmayer C, Birk DE, et al : Type XVII collagen (BP 180) in the developing avian cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38 : 153—66, 1997.
- 11) Ohji M, SundarRaj N, Hassell JR, Thoft RA : Basement membrane synthesis by human corneal epithelial cells *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35 : 479—85, 1994.
- 12) Beuerman RW, Schimmelpfennig B : Sensory denervation of the rabbit cornea affects epithelial properties. *Exp Neurol* 69 : 196—201, 1980.
- 13) Tsubota K, Mashima Y, Murata H, Yamada M, Sato N : Corneal epithelium following penetrating keratoplasty. *Br J Ophthalmol* 79 : 257—260, 1995.
- 14) Lauweryns B, van-den-Oord JJ, de-Vos R, Missotten L : A new epithelial cell type in the human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34 : 1983—1990, 1993.
- 15) Lauweryns B, van-den-Oord JJ, Missotten L : The transitional zone between limbus and peripheral cornea. An immunohistochemical study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34 : 1991—1999, 1993.
- 16) Cintron C, Hong BS, Covington HI, Macarak EJ : Heterogeneity of collagens in rabbit cornea : Type

- III collagen. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29:767—75, 1988.
- 17) **Newsome DA, Gross J, Hassell JR**: Human corneal stroma contains three distinct collagens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 22:376—381, 1982.
- 18) **Clore JN, Cohen IK, Diegelmann RF**: Quantitation of collagen types I and III during wound healing in rat skin. *Proc Soc Exp Biol Med* 161:337—340, 1979.
- 19) **Ehrlich HP**: The modulation of contraction of fibroblast populated collagen lattices by types I, II, and III collagen. *Tissue Cell* 20:47—50, 1988.
- 20) **Ehrlich HP**: Wound closure: Evidence of cooperation between fibroblasts and collagen matrix. *Eye* 2:149—157, 1988.
- 21) **Sobue M, Nakashima N, Fukatsu T, Nagasaka T, Fukata S, Ohiwa N, et al**: Production and immunohistochemical characterization of a monoclonal antibody raised to proteoglycan purified from a human yolk sac tumour. *Histochem J* 21:455—460, 1989.
- 22) **Isogai Z, Shinomura T, Yamakawa N, Takeuchi J, Tsuji T, Heinegard D, et al**: 2 B 1 antigen characteristically expressed on extracellular matrices of human malignant tumors is a large chondroitin sulfate proteoglycan, PG·M/versican. *Cancer Res* 56:3902—3908, 1996.
- 23) **Yamagata M, Shinomura T, Kimata K**: Tissue variation of two large chondroitin sulfate proteoglycans (PG·M/versican and PG·H/aggrecan) in chick embryos. *Anat Embryol* 187:433—444, 1993.
- 24) **Yamagata M, Suzuki S, Akiyama SK, Yamada KM, Kimata K**: Regulation of cell-substrate adhesion by proteoglycans immobilized on extracellular substrates. *J Biol Chem* 264:8012—8018, 1989.
- 25) **LeBaron RG, Zimmermann DR, Ruoslahti E**: Hyaluronate binding properties of versican. *J Biol Chem* 267:10003—10, 1992.
- 26) **中安清夫, 後藤淑子, 石川 隆, 金井 淳**: エキシマレーザー角膜表層切除後上皮下混濁のグリコサミノグリカン. *日眼会誌* 100:350—357, 1996.
- 27) **Hasty KA, Smith G Jr, Kang AH**: Studies on glycosaminoglycans of regenerating rabbit ear cartilage. *Dev Biol* 86:198—205, 1981.
- 28) **大矢智博, 小幡博人, 宮田和典, 水流忠彦, 澤 充, 宮内 聡**: ウサギ角膜上皮創傷治癒過程における涙液中のグリコサミノグリカン. *日眼会誌* 98:1049—1055, 1994.
- 29) **Kato T, Nakayasu K, Kanai A**: Analysis of glycosaminoglycans in rabbit cornea after excimer laser keratectomy. *Br J Ophthalmol* (in press).
- 30) **加藤卓次, 中安清夫**: 内皮創傷治癒機転. 大橋裕一(編): 水疱性角膜症. *メジカルビュー*, 東京, 124—129, 1997.