

特別講演 (I)

Ocular Surface

—その生理と病態—

北野 周 作 (日本大学)

OCULAR SURFACE

Physiological & Pathological Properties

Shusaku Kitano

Department of Ophthalmology, School of Medicine, Nihon University

要 約

Ocular surface の mucin はアルブミンと共通の抗原性をもち、H, A, B, M, N などの血液型抗原基を有する。

正常の結膜嚢内に接種された細菌は、糸状、網状の mucin によって捕捉され、内眼角に集められ、約30分で眼外に排泄される。角膜上皮を傷害しておく、緑膿菌の吸着現象が認められる。

この surface mucin の turn over には正常の眼瞼運動が不可欠であり、millipore filter を用いた membrane biopsy によって形成の過程が明らかにされる。

Surface mucin は物理的ならびに生物学的 barrier として、眼球表面の防御に重要な役割を果たしている。

Mucin の主な産生源である goblet 細胞には特異的な形態と刺激に対する反応が示される。

この goblet 細胞を含めた結膜の性状は、角膜の透明性を保持する上にも密接に関連している。(日眼 91 : 1—26, 1987)

キーワード：眼球表面、ゴブレット細胞、ムチン、生体防御、結膜

Abstract

One of the most significant features of ocular surface is the maintenance of the corneal transparency which plays a principal part of optical refraction. Another feature is that of facing to the external circumstance such as physical-chemical stimulus, foreign bodies and infection.

With regard to the enough function of ocular surface under these conditions, defence mechanism of mucous membrane and wound healing process must be assumed to have some characteristics. Physiological and pathological properties have been studied as follows:

I) Ocular surface as a place of defence mechanism :

1) Nature of Ocular Mucins ;

After extraction with guanidine hydrochloride, two fractions derived from sepharose CL-2B are analysed biochemically and immunologically.

2) Bacterial Adhesion and Surface Mucins ;

別刷請求先：173 東京都板橋区大谷口上町30—1 日本大学医学部眼科学教室 北野 周作

Reprint requests to: Shusaku Kitano, M.D. Dept. of Ophthalmol., School of Med., Nihon Univ.

30-1 Oyaguchikami-machi, Itabashi-ku, Tokyo 173, Japan

(昭和61年11月20日受付) (Accepted November 20, 1986.)

Trapping process by mucin threads of *Pseudomonas aeruginosa* and *Listeria monocytogenes* which are inoculated onto cul-de-sac has been elucidated by means of scanning electron microscope.

3) Membrane Biopsies of Surface Mucins ;

Formation of surface mucins from inferior palpebral conjunctiva are clinically carried out with membrane biopsy of millipore filter method.

4) Mucins Secretion of Goblet Cells ;

Morphological studies of normal goblet cells and experimental studies with hydrochlorous acid and n-heptanol are performed histochemically.

II) Characteristics of Ocular Surface on the Aspects of Wound Healing :

1) Cornea ;

Wound healing of epithelial layers is utmost quick. Because turn-over ratio of corneal epithelium is quite big and each epithelial layer has its own structure of mosaic patterns. However, re-epithelization is particularly in need of surrounding normal conjunctiva when the damaged area is wide and closed enough to the limbus.

2) Limbus ;

Scanning electron microscopically epithelial cell groups with bright reflex are demonstrated in band-shape at the center of the limbus. These cells particularly react quickly to the damage of the epithelium.

3) Conjunctiva ;

Goblet cells reveal specific patterns of movement in regenerated conjunctival or even corneal epithelium.

III) New Observation Technique for Ocular Surface :

Clinical specular microscopy is introduced in special references to the ocular surface diseases.

IV) Conclusions :

1) One of the most important functions of goblet cells is to supply of mucins into the tear, but it is essentially also of importance in playing a part of defence mechanism of ocular surface.

2) Cornea, limbus and conjunctiva usually share divisional functions of ocular surface, while they are surprisingly suited for wound healing of epithelial layers. Significance of conjunctiva to the corneal diseases should be recognized. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 91 : 1-26, 1987)

Key words : ocular surface, goblet cell, mucin, conjunctiva, protective barrier

I はじめに

Ocular surface は二つの大きな特色を持っている。第一は構成要素の一つである角膜が透明で、屈折系として光学的に重要な役割を果していることである。

第二は常に外界に曝されているという環境下において、物理的・化学的の刺激、異物、感染など生体にとって危険な外的要因の影響を受けやすいことである。

このような条件下で ocular surface が十分な機能を発揮するためには、粘膜組織としての特性を持つ防御機構が必ず働いているはずである。たとえば、細菌や異物は上皮細胞に到達する以前に、涙液によって洗い流されるか、ムチンの gel に捉えられて眼外へ排出されてしまう。また涙液内にはリゾチーム、IgA、IgG、

ラクトフェリン、補体などの抗菌性物質が含まれ、眼の防御に役立っている^{1)~8)}。

さらに、ocular surface ではその構造を維持し、傷害を修復する過程においても何らかの特色がみられるものと考えられる。角膜表層の修復に結膜は密接に関与し、結膜が角膜の透明性を左右することもあり得る。

このような視点に立った上で、ocular surface の生理と病態に関して、2, 3 の知見を述べてみたい。

II 生体防御の場としてみた ocular surface

粘膜における主要な防御因子であるムチンが ocular surface ではどのような性状を示し、どのような働きをしているのか、またこのムチンを産生している

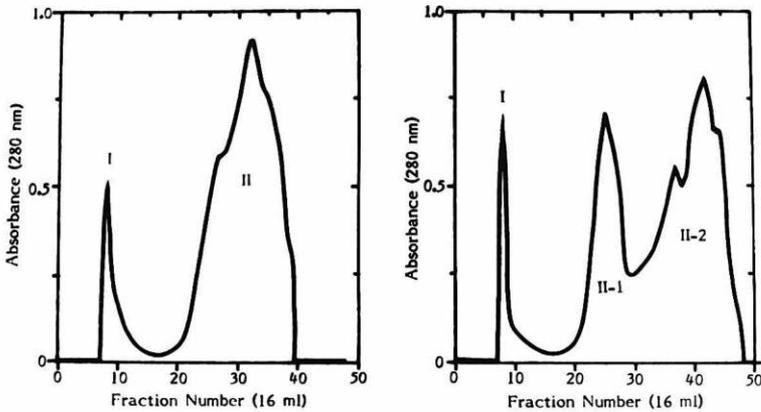


図1 塩酸グアニジンによるクロマトグラフィーで抽出されたムチンは二峰性で、ピークIIはサンプルによっては右の図のごとく2つのピークに分れることがある。

goblet 細胞についても検討してみたい。

1. ocular mucin の性状

正常な結膜囊をもっている人が、白内障、緑内障、網膜剥離などの手術的侵襲を受けた場合に眼の表面にはどのようなムチンが分泌されるのか分析を行った。

手術後の入院患者の眼帯に付着した眼脂を収集し、直ちに-20℃で保存し、必要に応じて4M 塩酸グアニジン溶液でムチンを抽出した。抽出をくり返した後、分画分子量200,000のウルトラフィルターを用いて濃縮し、直径24.7mm、長さ1,000mmのカラムに sepharose CL-2B を充填し、4M 塩酸グアニジンを用いて分子分画クロマトグラフィーを行った。

抽出された溶液には、280nmのモニターによって2峰性の分子量の物質が含まれていることが示された。分子量の大きい前方のピークIの山は低く、分子量の小さい後方のピークIIは、サンプルによっては、2つのピークに分れるものが認められた(図1)。

これらの分画は、それぞれ蒸留水に対して塩酸グアニジンが検出できなくなるまで透析を行ってから凍結乾燥し、原サンプルとして保存し以後の化学的分析に用いた。

今回は主として分子量の大きい方のピークIについて下記の如き分析を行った。

1) アミノ酸およびヘキサミンの分析

原サンプル1mgを6N塩酸によって、110℃、16時間加水分解し、アミノ酸分析器(HITACHI 835 AMINOACID ANALYZER)を用いてアミノ酸およびヘキサミンの分析を行った。

その結果は図2に示すごとくである。glutamic acid,

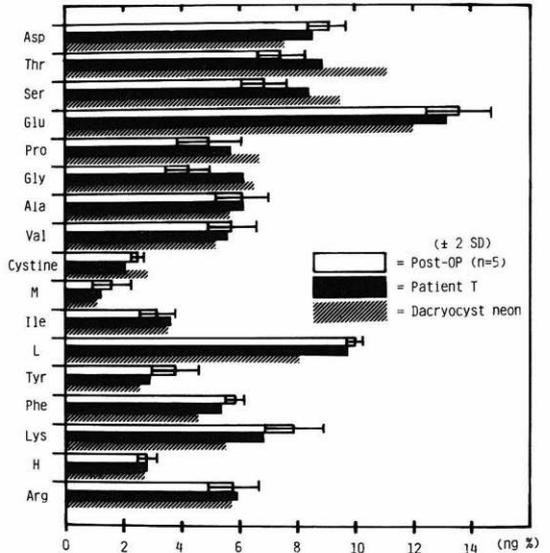


図2 ムチンのアミノ酸分析。Glutamic acid, Leucine, Aspartic acid, Lysine, Threonine, Serineなどが多く含まれている。(上段のカラムは術後患者から抽出したムチン、中段は口唇粘膜移植患者、下段は新生児涙嚢炎患者からのものである。図3も同様)。

leucine, aspartic acid, lysine について threonine, serineなどが多く含まれており、cystine, methionineは低いレベルを示した。

アミノ酸の総重量に対するN-acetylgalactosamine, N-acetylglucosamineの比は、それぞれ0.59±0.21, 0.224±0.05であった(図3)。

2) 6-デオキシヘキソースの定量

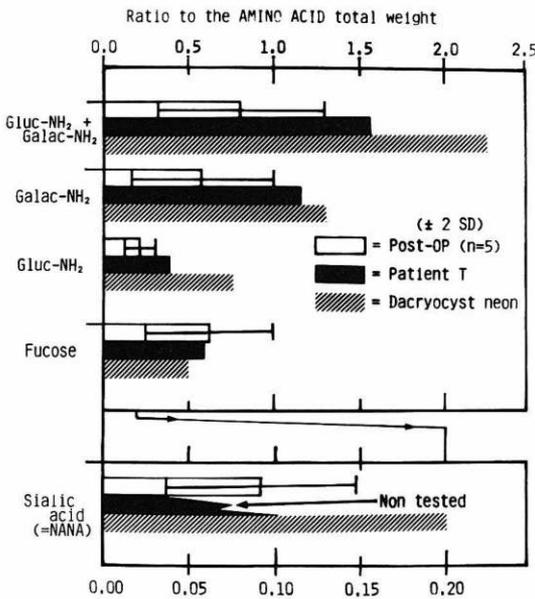


図3 ムチンの分析. アミノ酸総重量に対する N-acetylgalactosamine, N-acetylglucosamine, Fucose, Sialic acid の比.

L-フコースを標準として, L-シスチン・硫酸反応を用いて測定したが, アミノ酸総重量に対するフコースの比は 0.63 ± 0.19 であった(図3).

3) シアル酸の定量

Aminoff による過ヨウ素酸-チオバルビツール酸反応を用いて, N-アセチルノイラミン酸を標準物質とし

て測定したが, アミノ酸総重量に対する比は 0.92 ± 0.03 であった(図3).

なおこれらの化学的分析の値は, 5回にわたって抽出された原サンプルおのおのについて各項目ごとに行ったものの平均値および標準偏差を示したものである.

また同時期の入院患者中に, 口唇粘膜移植による結膜嚢形成の症例があり, 多量の眼脂が認められたので, これを別個に採集した.

さらに, 外来診療中の新生児涙嚢炎の数例について, 涙嚢洗滌を行った際に排出された粘液物質を採集した.

前者を Patient T, 後者を Dacryocyst. neo. として前述の手術患者と同様にムチンを抽出し, 化学的分析を行い参考とした. 図2および図3には, 術後に採取したムチンのサンプルと並べてこれらの値を図示した. それぞれに組成の比に若干の差が認められるが, いずれもムチンとしての化学的な性質はもっていた.

4) 免疫学的検査

第1回目に得られた原サンプルのピーク I, およびピーク II を, 1羽につき1mgの割合で16羽の家兎に Freund の complete adjuvant と混合して, 背面の20数箇所にわけた注射を1週おきに2回行い, 最後にブースターを静注して, 1週間後に全採血を行った.

採取した血清について抗体価の上昇の程度をウフトロニー法によって検査した結果, ピーク I に対しては3羽, ピーク II に対しては5羽の兎に沈降線の出現が

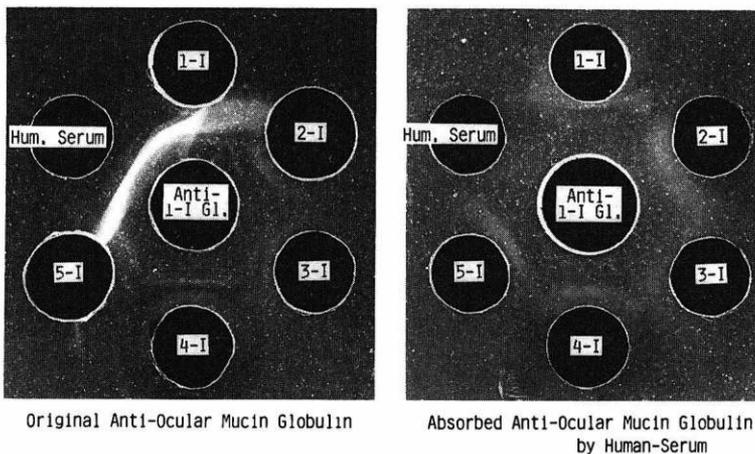


図4 抗ムチン血清の Ouchterlony. ピーク I に対する抗血清の沈降線. 左はヒト血清との間の強い沈降線を示し, 右はヒト血清吸収後に各サンプルとの間に残存する沈降線を示す.

あり、それぞれのピークに対する抗体の産生を認めた。

このI及びIIに対する抗血清は互いにI及びIIの抗原に対していずれも複数の沈降線の形成がみられ、IIの抗原はIの抗原よりも強い抗原性がみられた。また、この抗眼ムチン血清はヒト全血清との間に沈降線を認め、免疫電気泳動法によって、この沈降線はヒト血清のアルブミンに相当していたが、等電点電気泳動によって、このサンプルにアルブミンの含有を確認することが出来なかったことから、この抗原物質はアルブミンと共通の抗原性を有する物質によるものであろうと考えた。また、ヒト血清によって吸収を行うと著明な沈降物を生じ、この上清の抗眼ムチン血清にはヒト血清との間には沈降線は生ずることなく、Iの抗原との間には明らかな沈降線の残存が見られた。図4はヒト血清吸収前と吸収後の沈降線を示しているが、5回にわたって採取したピークIの抗原のいづれに対しても同じような反応が認められている。

5) 血液型抗原基について

酸素、酸およびアルカリによる加水分解によらないサンプル分子の末端基の構成について血液型抗原の活性の有無によって検討をおこなった。[以後の検索はサンプル量の関係から術後材料(Post-OP)についてのみ行った] O(H) 抗原基は抗O(H) レクチンを用い、A、B、M、N、Le^a、Le^bおよびRh(D)については、それぞれの抗血清を用いてサンプルによる吸収試験を行った。

ピークIについては1～5回の全てのものにH、A、B、M、N、Le^a、Le^bの抗体に吸収がみられ、何れの型の抗原基も存在することが考えられた。また、Pに対しては検査が行われず、Dの抗原基の存在は認められなかった。

小括

人の眼のムチンの性状を化学的に調べた報告は少ない^{9)~13)}。

MooreとTiffany¹⁰⁾¹¹⁾によると、人のglycoproteinの3つのfractionの中で、分子量が約 1.3×10^6 であるGP2の分画がgoblet細胞由来のものであるとし、人結膜のムチンのゲル状の特性は強く水を含んでいるGP1、GP2の存在によると報告している。またこれらの高分子量のglycoproteinは、分子量20万のsubunit(GP3M)の集合体であり、GP3Mは約70%がcarbohydrateであって、その形はoligosaccharideの鎖がserineとthreonineに富んだpolypeptideのbackboneに共有結合しているという。

Chaoら¹²⁾は内眼角部に存在するmucous threadを収集し、naclおよびureaによってムチンを可溶化し、CL-sepharose 4Bのカラムで分析している。そして高いcarbohydrate-protein ratioをもち、serineとthreonineのレベルが高く、galactoseとsialic acidの比率が高いなどの結果を報告し、高分子量のlipoglycoproteinがムチン性の特色をもつことを示した。

結膜からのムチンは、表面の細胞のmicrovilliに吸着され、正常下では涙の水分層の中には比較的不溶性の形で存在するといわれている³⁾⁵⁾¹⁶⁾。

今回著者の採用した方法は、消化管におけるムチンの抽出と分析に用いられたもので¹⁴⁾、眼のムチンに対しては初めての試みと思われるが、分析の対象とした高分子量の分画であるピークIは、ヘキソサミン、ヘキソース、シアル酸を含むglycoproteinであって、血清や結合織のglycoproteinではなく、ムチンとしての特性をもつことが確認された。

また眼のムチン分子の中には、ある種の型の血液型抗原基が胃粘膜、唾液腺、膵外分泌腺などと同じように含まれていることが明らかにされた。

2. Bacterial adherence と surface mucin

結膜嚢に接種された細菌の消長を、特にocular surfaceのムチンとの関連に重点をおき、走査型電子顕微鏡を用いて観察した。

細菌は日本大学医学部微生物学教室に保存されている緑膿菌IID 1117, elastase(+), protease(+)¹⁵⁾およびListeria monocytogenes ATCC 5105の2種類を用いた。両者ともTrypticase soy brothで37°C、20時間培養し、 10^8 CFU/mlに調整した菌浮遊液を作製した。

正常ならびに次亜塩素酸液点眼による処置後の家兎結膜嚢内に、菌浮遊液0.07mlを滴下し、10分後および30分後に眼球を摘出した。

3%グルタルアルデヒドに固定し、角膜+球結膜および円蓋部+脛結膜のいくつかの小片に分けてさらに固定したのち、限界点乾燥、金蒸着を行い、走査型電子顕微鏡で観察した。

次亜塩素酸液は200ppmの濃度のものを結膜嚢内に滴下し、角膜および結膜の表層を均等に傷害した。その後10分経過したのちに菌浮遊液を滴下した。

正常眼では、菌接種10分後、角膜、球結膜には極めて稀に1～2コの菌が遊離した形で表面にのっている状態が認められた。特に菌がムチンの糸や膜と直接接触している所見はなかった(図5)。

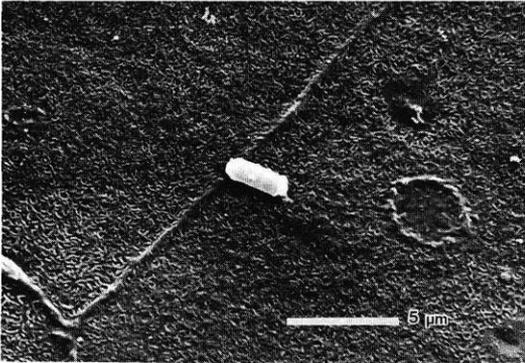


図5 正常家兎結膜嚢にリステリア菌接種10分後、稀に角膜上に孤立して菌がみられる。

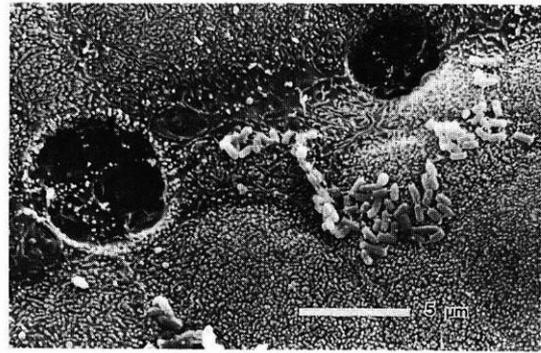


図8 正常家兎結膜嚢に緑膿菌接種10分後、円蓋部結膜に細いムチン糸のからまった菌塊が散在している。

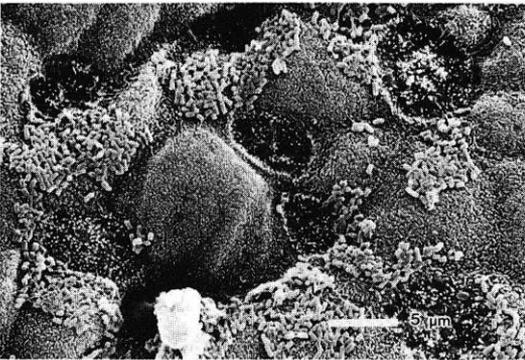


図6 正常家兎結膜嚢にリステリア菌接種10分後、円蓋部結膜に菌塊が散在している。

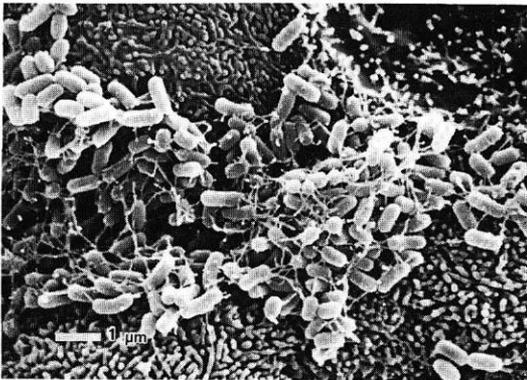


図7 図6の強拡大、菌は細いムチン糸によってからめられて塊り状となっている。

円蓋部から脛結膜にかけては、図6および7のリステリア菌、図8の緑膿菌の例に示すごとく菌の集団が散在し、極めて細い糸状のムチンがからみついているのが認められた。

菌接種30分後においては、球結膜に1~2コの菌が認められる例はあっても、円蓋部から脛結膜には全く菌は認められず、おそらく、眼脂の一部として眼外に排泄されてしまったものと推定される。

上記の所見は、緑膿菌、リステリア菌とも同様であった。

次亜塩素酸液点眼によって、眼球表層に傷害を与えた場合は、特に円蓋部および脛結膜でムチンの分泌が正常よりも多くなっており、粉状、糸状、膜状となって細胞表面に認められた。上皮細胞の表面も小孔の形成や、microvilliの萎縮などの傷害が観察された。

緑膿菌を接種して10分後に角膜に特異的な所見が認められた。すなわち、上皮細胞の表面には網状、膜状、糸状のムチンがあり、この中に菌が散在し、その菌の周囲のムチンは消失して菌は直接上皮細胞に接着しており(図9)、強拡大の写真(図10)ではmicrovilliと菌が接触している状態が観察された。pitが形成され上皮細胞へのadherenceがおきつつある所見と考えられる。

リステリア菌では緑膿菌にみられたような角膜上の所見はなかった。

球結膜には、いずれの菌も認められず、円蓋部から脛結膜にかけては、ムチン糸にからまった菌やムチン膜に包みこまれたような菌が散在して認められた(図11, 12, 13)。

特にリステリア菌の場合は、正常の結膜嚢に接種した時と同じように、多数の菌が粒状、糸状、膜状のムチンにからまって存在する傾向が認められた(図14)。

円蓋部および脛結膜で緑膿菌の存在が認められたが角膜でみられたようなpitの形成や上皮細胞とのad-

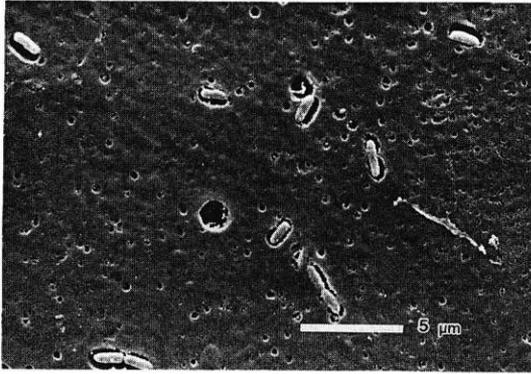


図9 次亜塩素酸による傷害結膜囊に緑膿菌接種後10分、角膜上に形成された膜状のムチン内に菌が散在している。

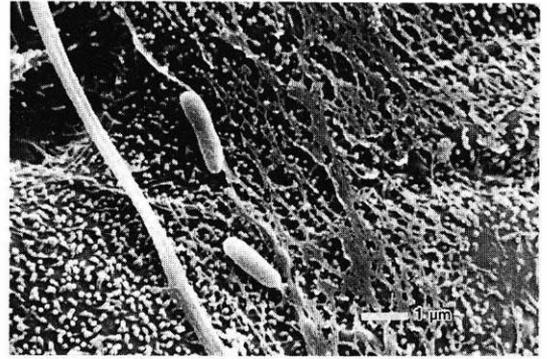


図11 細かい網状のムチンに付着した菌

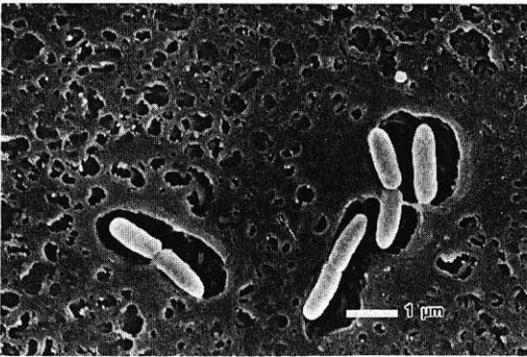


図10 次亜塩素酸傷害結膜囊内に接種10分後、角膜上の緑膿菌。菌の周囲のムチンは融解し、菌と角膜上皮細胞の microvilli との接着が認められ、pit の形成と adherence が起きている。

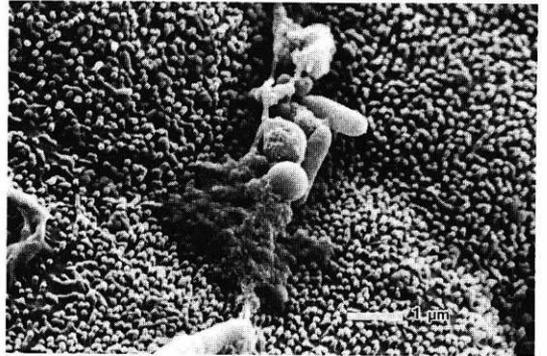


図12 血球, cell debris, ムチン塊などと一緒にムチン糸にからまった菌。

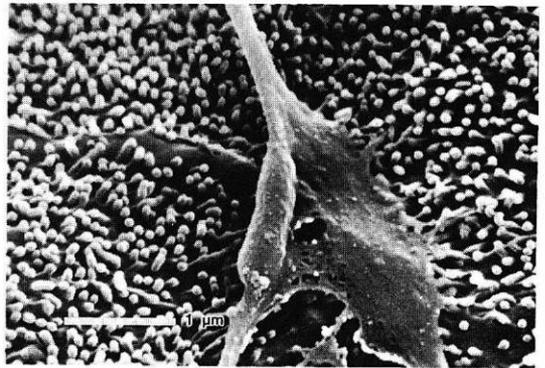


図13 膜状のムチンに包みこまれた菌。

図11, 12, 13 次亜塩素酸傷害結膜囊に緑膿菌接種10分後、円蓋部附近の睑結膜の所見。

数の菌が睑縁部に塊り状となって存在し、ムチン塊や cell debris と共に眼外に排泄される寸前の状態と思われた (図17, 18)。

herence の所見はなく、緑膿菌の角膜と結膜に対する病原性の差によるものと思われる。

goblet 細胞から分泌されたムチンは極めて粘性が強く、菌がムチンに付着し、あたかもとりもちで捕えられた虫のように動けなくなっている所見が認められる (図15, 16)。

睑結膜では、しばしば糸状のムチン、mucus thread を形成し、細菌は血球や cell debris など表層にあったものと一緒にしてからめとられ、単なる異物として処理されている (図12)。

時にはうすい膜状となったムチンに菌が包みこまれた所見もみられる (図13)。

30分後の標本では、緑膿菌はどこにも認められず、リステリア菌の場合は粉状のムチンにまぶされて、多

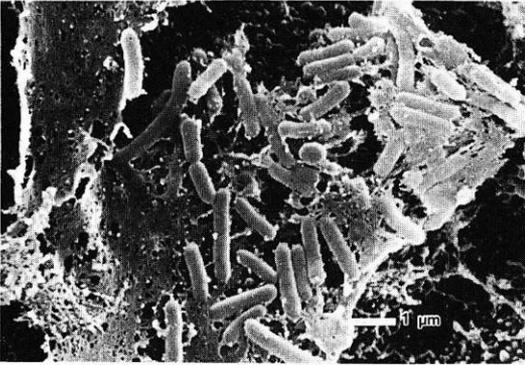


図14 次亜塩素酸傷害結膜囊にリステリア菌接種10分後の円蓋部附近瞬結膜。粒状、糸状、膜状のムチンに付着した菌塊。

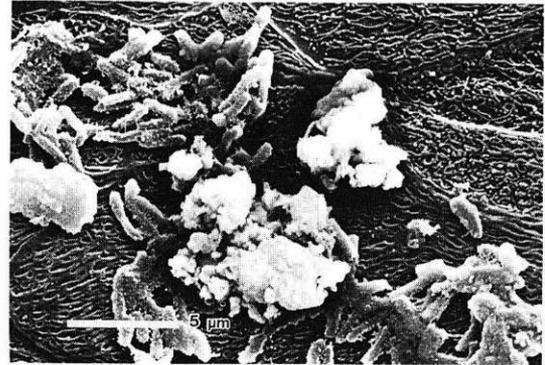


図 17

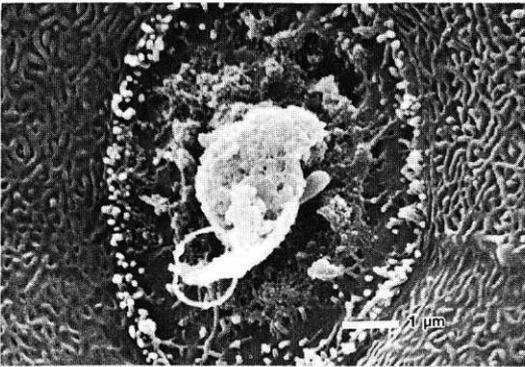


図15 次亜塩素酸傷害結膜囊に緑膿菌接種10分後、球結膜 goblet 細胞のムチンに付着した菌。

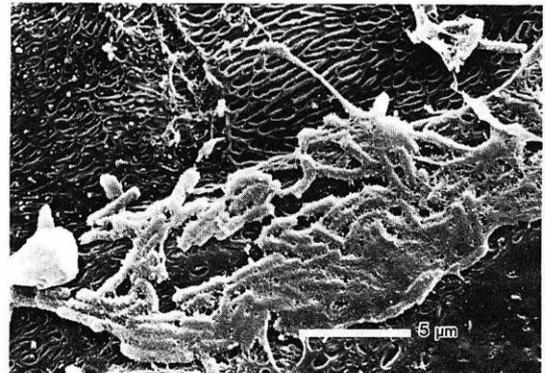


図 18

図17, 18 次亜塩素酸傷害結膜囊にリステリア菌接種30分後、瞬縁に近い所の瞬結膜。ムチンにまぶされた菌塊とムチン塊が眼外に排泄されようとしている。

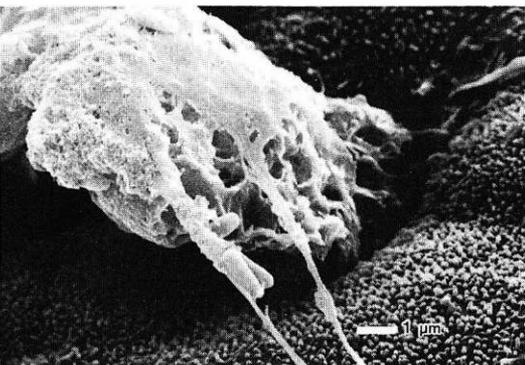


図16 次亜塩素酸傷害結膜囊に緑膿菌接種10分後、goblet 細胞から放出されたムチン塊およびムチン糸に付着した菌。

小括

微生物による感染の成立には、adherence (付着)、colonization(定着)、invasion(侵入)、multiplication

(増殖)などの過程が必要である¹⁹⁾。ocular surface のような粘膜組織では、上皮細胞に付着する以前に、その表面を覆っているムチンの gel を貫通することが感染の前提となる。

ocular surface で gel 様構造を示すムチンは不溶性のもので極めて粘着性が強いことが知られており³⁾¹¹⁾¹⁶⁾、細菌や異物は上皮細胞に到達する前に捕捉されてしまう。このような mucus trapping が正常の粘膜では、細菌を排除する上に大きな働きをしている^{11)16)~19)}。正常の家兔の結膜囊内に接種された緑膿菌およびリステリア菌は、接種後10分においてムチン糸に捕捉された菌塊として円蓋から瞬結膜にかけて認められ、30分後には瞬縁より排泄される寸前かすでに排泄されて眼内には認められない状態となった。

結膜囊内に滴下された菌は、角膜、球結膜、瞬結膜にびまん性に拡散されるであろうが、ocular surface

のムチンが、瞬目によってあたかもワイパーのごとく作用し、眼の表層にある細菌は他の異物や cell debris と共に拭いとられて、円蓋部から下眼瞼結膜に集積され、これが30分前後経過すると眼外へ眼脂として排泄されるものと思われ、surface mucin の物理的 barrier としての働きが示されている。

ocular surface における細菌の接種実験では、緑膿菌^{20)~22)}、Moraxella bovine²³⁾、リステリア菌²⁴⁾などいくつかの報告がみられるが、ムチンの物理的 barrier に関する記載はほとんどない。

感染の初期の段階である adherence、菌の付着は、上皮細胞を傷害させると容易となることが知られている。たとえば、マウスの気管を0.1N の HCl で曝露すると、正常では1/1,000 μm^2 に対し、50/1,000 μm^2 と緑膿菌の付着が増加している。

この増加は、ムチンに含まれている糖の一つ N-acetylneuramic acid によって抑制されるという¹⁸⁾¹⁹⁾。

ムチンのない生後5日目のマウスでは緑膿菌は容易に角膜を浸透し感染がおきるが、ムチンのある成熟マウスでは感染の発生は認められていない²¹⁾。

飯田²⁵⁾は家兎角膜培養細胞に対する緑膿菌の吸着性はマンノース、ガラクトースの処理によって阻害されることを報告している。

またムチンを neuramidase 処理で分解すると、膀胱上皮への大腸菌の吸着が増加するという成績も紹介されている²⁶⁾²⁷⁾。

このように receptor mediated の細菌が上皮細胞に付着あるいは吸着される過程を、ムチンの中の糖が競合することにより抑制する事実が知られている^{16)26)~28)}。

さらに、ocular surface のムチン層の中には、IgA⁷⁾、分泌型 IgA、リゾチーム、ベタリジンなどがとりこまれており、前者と併せて生物学的な barrier として ocular surface の防御に重要な役割を果している。

次亜塩素酸液で ocular surface に傷害を与えた時に、角膜に病原性を有する緑膿菌では細胞表面を覆っているムチン膜を溶かして、角膜上皮細胞に付着する所見が認められた。

次亜塩素酸によって上皮細胞表面が傷害されると同時にムチンの分泌が異常に増加し、菌を固着したまま除去されずにいたため、緑膿菌の付着を助長したことが考えられる。

消化管においてもムチンの滞留をきたす疾患の cystic fibrosis では、上皮細胞に菌が付着しやすく感染

をおこし、ムチンがむしろ病的に働くことが示唆されている¹⁸⁾¹⁹⁾。

三井²⁹⁾³⁰⁾はムチン液に緑膿菌を浮遊して、家兎角膜に接種すると定型的 ring abscess を発生させることを認め、ムチンによる感染の助長を報告している。

このようにムチンが常在定住菌や病原菌の栄養素となつて、時には生体にとって防御の目的に反する働きをする場合もあると考えられる³¹⁾。

3. surface mucin の membrane biopsy

ヒトの下眼瞼結膜における surface mucin の生成の経過を明らかにするため、millipore filter を用いた membrane biopsy を行った。

Adams¹⁷⁾の方法に準じて、0.025 μ の pore size の millipore filter の2 \times 10mm の小片を用い、プラスチック製 applicator に両面テープで接着し、3秒間軽く中央部の下眼瞼結膜を圧迫後、cpc-formalin 液に固定した。染色は PAS-hematoxylin または Alcianblue-PAS を実施した。

なお filter は予め冷水に30分間浸漬したあと、乾燥させ、主として粗な面を使用した。

filter の粗な面を用い強く圧迫すると、時には瞼結膜の上皮細胞層のほぼ全層がシートとして採取されることがあるが、結膜上皮には PAS 染色で円く赤く染る多数の goblet 細胞が含まれているのが認められる(図19カラー)。goblet 細胞の表面に突出したムチンや、goblet 細胞から圧出された mucous granules は粒状で輪廓がかなり明瞭に染め出される。細胞外へ分泌されたばかりのムチンは極めて細い糸状ないし境界の少しばやけた斑点として認められる。

放出されたムチンは瞬目時の眼瞼の動きによって粒から線へ、そしてうすい膜へと形を変化しつつ、ocular surface の上を拡散してゆく(図20カラー)。線状のムチンはしばしば直交する像を示す。

うすい膜状となったムチンはより合わされて、糸状の形の mucous thread を形成する。細い thread が何本か集合して太さを増し、しばしば波のような模様が示される(図21カラー)。

goblet 細胞がアンカーとなり mucous thread は隣のもの同士と互に連絡する特性があるため network を形成し、biopsy の標本では波状のパターンとなるのであろう。この事実を裏づける所見は、家兎の下眼瞼結膜の走査電顕像でも明らかに認められている(図22)。

太くなった mucous thread でできた網の中には、剝離した上皮細胞や異物、さまざまな大きさの空胞、脂

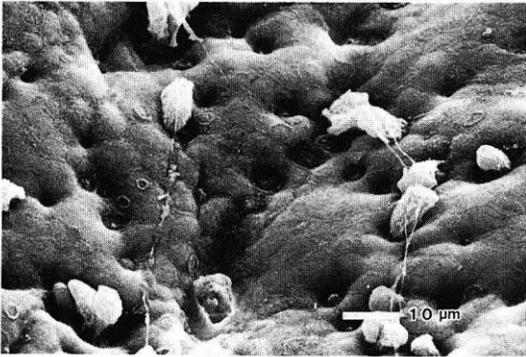


図22 次亜塩素酸点眼20分後の家兎眼結膜, goblet 細胞間に細いムチン糸による連絡がみられる。

肪成分などが包みこまれている。

特に円蓋部では、塊り状となった mucous thread が認められることがあるが、そのそばでは新しく分泌されたムチンが粒状に散在しており、surface mucin の turn over の行われていることを示している。

球結膜においても眼結膜と同じ位の goblet 細胞の分布がヒト、家兎も同様に認められる。

正常でも少数の多核白血球が biopsy 標本に認められることはあるが、中毒性黒皮症に続発した dry eye や、シェーグレン症候群の標本では、動きの少ない膜状のムチン塊の他に、多核白血球の集団が認められた(図23カラー)。またアルカリ腐蝕の症例でも、変性した上皮細胞とともに多核白血球の著明な浸潤が認められた。

小括

millipore filter による粘膜組織の biopsy は、細胞の染色性を阻害することなく、局所の細胞の状態が変形なく保持されるという特色をもち³²⁾、ocular surface の観察にも利用されている^{33)~37)}。

Norn^{38)~41)}によると、goblet 細胞から分離されたムチンは、膨張して線維性となり上皮細胞の上に広がるが、剥脱して最終的には長い糸となって下円蓋に集められ、goblet 細胞から下円蓋にいたるまでの時間は1分~30分以上までさまざまであるという、lipid で汚染された ocular surface のムチンの糸や膜は、瞬目作用によってまきとられて下円蓋部に集められ、涙点を通してあるいは内眼角部より眼外へ排泄されることは眼の清掃の上で極めて重要であると指摘されている⁵⁾¹⁷⁾⁴¹⁾。

mucous fibrils がガーゼのメッシュの中で直交することを Norn が報告し³⁹⁾、Egbert³³⁾、Adams¹⁷⁾らは

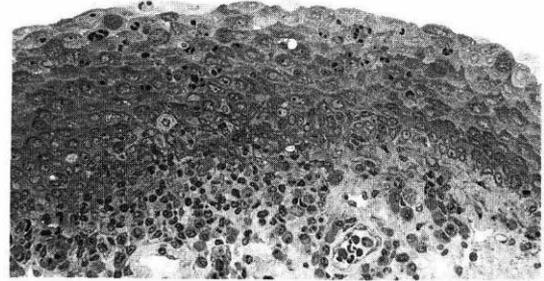


図24 dry eye の症例からの球結膜 biopsy, 上皮細胞層内に多核白血球の浸潤があり, physiological inflammation の状態である。サフラン O-H-E 染色。×200

membrane biopsy によって mucous thread が net work を作ることを認めている。

今回の実験によっても、ヒトの ocular surface において goblet 細胞から最初に mucous granules の粒状として分泌されたムチンが上皮細胞の上に糸状、膜状、網状となって拡がり、眼瞼の動きによってこれらがまきとられて終には太い紐状の形で下円蓋部に集められる過程が確認された。

これらのムチンの糸や膜あるいは網の中には、異物、cell debris, あるいは前述のような細菌など眼の表層にあるものが器械的に拭いとられることにより ocular surface が保護されている。

dry eye などの病的な例の biopsy 標本に、集団的な多核白血球の浸潤を認めたが、肉眼的、生体顕微鏡的にこれらの眼には急性感染症にみられるごとき炎症性所見は特にみられていない。

なおシェーグレン症候群の非感染状態の結膜の組織標本においても、上皮細胞層内における多核白血球の浸潤が証明された(図24)。

このように粘膜では常時かなりの多核白血球やリンパ球、マスト細胞などが粘膜下織に浸潤し、粘膜上皮を通じて防御環境ないし外界に遊出していることが知られており、粘膜を主座とする多核白血球の消費は、感染防御の生理上重要な意味をもち、生理的炎症、physiological inflammation と呼ばれている⁴²⁾。

dry eye, アルカリ腐蝕、顔面神経麻痺などでは感染の機会の多いことが経験されるが、このような障害を受けやすい条件下では白血球の集団が結膜上皮細胞層内あるいは上皮細胞上をパトロールし、ocular sur-

faceの防御に当たっているものと考えられる。

4. Indian ink 点眼による surface mucin の観察

ムチンにカーボン粒子の結合する性質を利用し、正常では透明のため見ることのできない mucous thread を黒く染めて観察することができる¹⁷⁾。

インディアンインクを1 μ L 結膜嚢に点眼し、mucous thread の状態を16mm 映画で撮影し観察した。

正常者では滴下直後よりインディアンインクは眼球表層に拡散し、結膜の細かいひだに染め出される。約1分後より小さい粒状の塊りが現われはじめ10分後には数コに増加する。約20分後には、内眼角に近い所に網状となったムチンが出現するが、40分後には丸い塊り状となって内眼角に認められ、一部はすでに皮膚面に排泄される。この時点では、結膜の他の部分に全くインディアンインクは認められない。

1時間後には、墨の塊りとして内眼角に近い眼瞼の皮膚の上において乾燥し始め、ついにはひからびて sleepy seeds と呼ばれる状態となる。

顔面神経麻痺の例においては、約10分後においてもかなりの量が円蓋部に残留している。

marginal tear strip の所に紐状となったインクが、眼瞼運動時に出沒するのが認められる。

15分後、球結膜はかなりきれいになるが、円蓋部に糸状のムチンが存在し、40分後でも残存している。

1時間後において、内眼角部に大きな塊りがみられるが、これにつながった太い紐状のムチンが円蓋部に横たわり、皮膚面への排泄は行われていない。

surface mucin の移動は瞬目作用によって発生する。

すでに1949年に、Anantanarayana⁴³⁾は瞬目は Zipper で瞼を耳側から鼻側へ向って順次縮めてゆく形で行われ、この動きのため涙液が涙点に向かって流れてゆくと報告している。

瞬目時に上眼瞼は垂直に降りてくるが、下眼瞼は内方への動きが主であり、surface mucin の移動に関与している。

Norn⁴¹⁾によると mucous thread の移動は正常者で 1.1mm/min で、瞬目と涙の産生がこの速さに関与するという。

Adams¹⁷⁾は2~3 μ L のインディアンインクを滴下して観察しているが、marginal tear strip と結膜から完全に消失するのに5~10分かかり、内眼角皮膚面に押し出されるのに1~12時間を要するとし、インディア

ンインクの排出に瞬目の影響の強いことを指摘している。

瞬目運動の不完全な顔面神経麻痺例において、インディアンインクの排泄が著しく遅延することが証明され、ocular surface のムチンの分布と更新に正常な眼瞼の運動が不可欠であることを示している。

5. ムチンを産生する goblet 細胞について

ocular surface のムチンの源は主に goblet 細胞である。この goblet 細胞の形態と反応について観察してみたい。

家兎の正常の結膜上皮層内には、多数の goblet 細胞が含まれているが、その形態や上皮層中の深さ、染色性、刺激に対する反応などの点で必ずしも一様ではない^{44)~48)}。例えば球結膜の表面を走査型顕微鏡で goblet 細胞を観察すると、crypt の中に潜っているもの、わずかな分泌からかなりの量の内容を出しているもの、ほとんどすべての内容を出きった状態のものにいたるまでさまざまな変化が認められる(図25)。

また球結膜においては、一般に goblet 細胞は円形ないし横楕円形で核は側方に偏在している。瞼結膜ではたて長で核は底辺にあることが多く、刺激に対する反応が強く示される。microvilli は両者に共通して、一般の上皮細胞より疎であり electron dense である。

球結膜における goblet 細胞の反応の所見は下記のごとくである。

0.4% 塩酸ペノキシネート液を1分間隔で6回点眼した場合、分泌機能が亢まり、goblet 細胞は円く隆起し、その表面から粒状、糸状のムチンが分泌される(図26)。

さらにやや強い刺激、200ppm の次亜塩素酸液を点眼すると、10分後に破綻した細胞膜の部分よりのムチンの流出が認められ、この所見は図29に示す n-ヘプタノール処置後の像とほぼ同様である。40分後では内容放出後の円形の凹みが残されている(図27)。高濃度の2000ppm の場合は、ほとんどすべての goblet 細胞が内容を放出して collapse に陥り、その跡が円い凹みとなって示されている(図28)。細胞毒性の強い2000ppm の時は、2週間経ってもこの goblet 細胞の内容放出後の像が残存している⁴⁹⁾。

n-ヘプタノールを角膜や結膜に塗布すると上皮細胞の変性・崩壊がみられるが(図48)、72時間後の塗布巣周辺の goblet 細胞では、べったりした膜状のムチンが流れ出し、隣の goblet 細胞からの流出と互に連絡している状態が認められる(図29)。

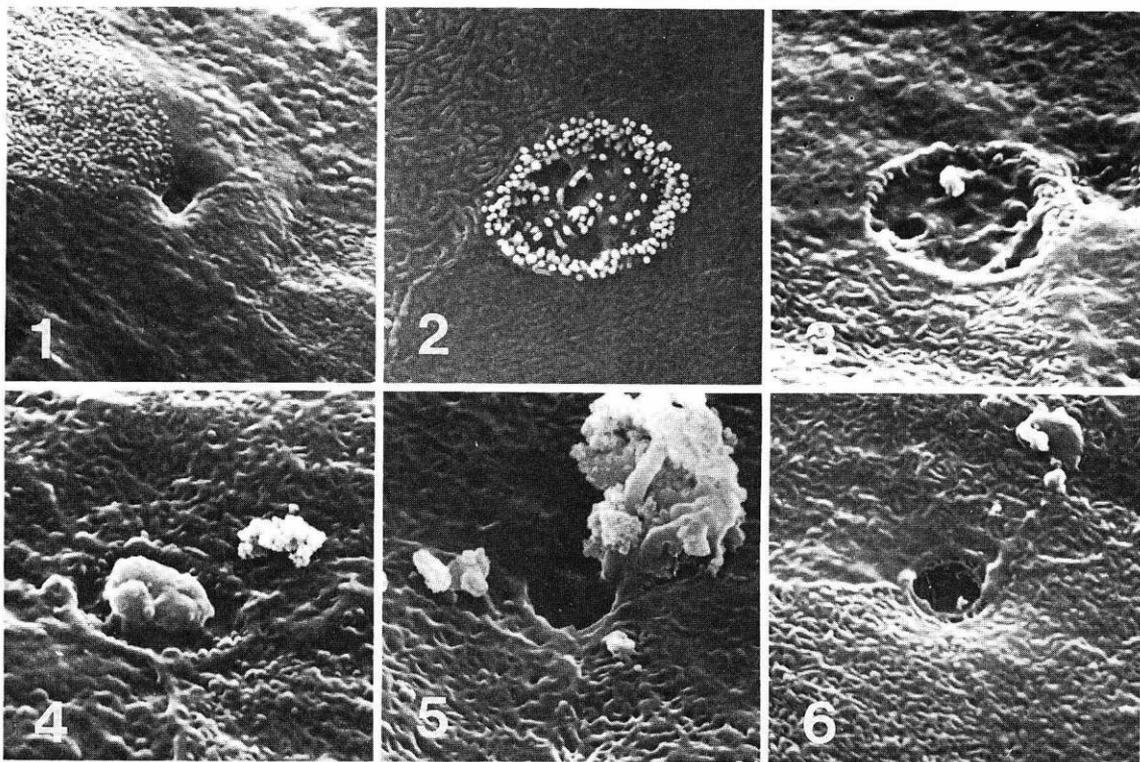


図25 家兎結膜の goblet 細胞の分泌前から分泌後までのいろいろな形態

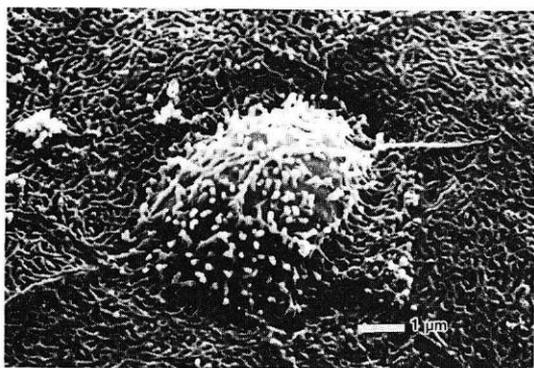


図26 家兎球結膜 goblet 細胞. 0.4%塩酸ペノキネート6回点眼6時間後, goblet 細胞は隆起し, 粒状あるいは細い糸状のムチンが分泌されている.

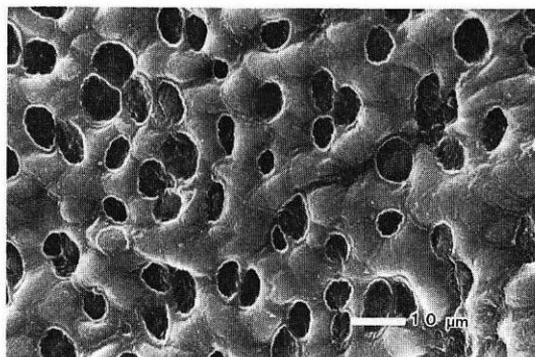


図27 次亜塩素酸(200ppm)点眼40分後の家兎円蓋部結膜, 内容を放出したあとの goblet 細胞が, 円形の凹みとして残されている.

脛結膜の goblet 細胞の反応は球結膜の goblet 細胞に比し, 形態的な変化が強い.

200ppm の次亜塩素酸液点眼10分後の標本では, 背の高い goblet 細胞の内容が一挙に噴出して墓石状の奇観を呈する (図30, 31).

噴出したムチン塊の側面には細かい皺状の inter-

digitation の跡がはっきりと認められる (図32). また一部のものでは先端部が対側の球結膜に当って圧迫され平坦となっている所見が示されている (図31).

goblet 細胞の分泌は, 通常は merocrine 型と考えられ⁶⁴⁾, 成熟した分泌顆粒は細胞表面を著しく損傷することなく放出される. 図33では, 大きな顆粒のかたま

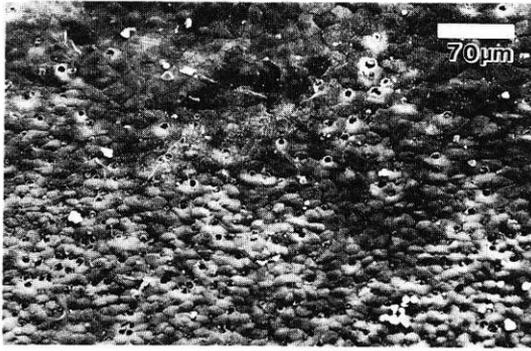


図28 次亜塩素酸(2000ppm)点眼10分後の家兎輪部球結膜。内容放出後の goblet 細胞の開口部。

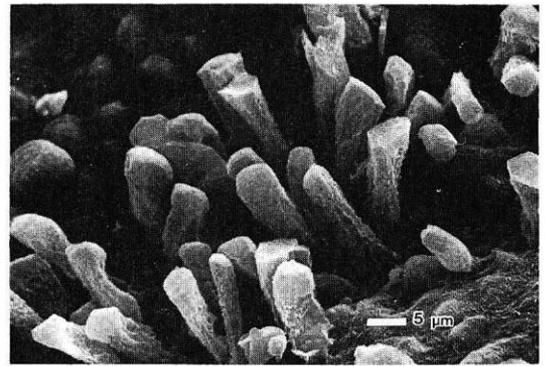


図31 家兎眼結膜の goblet 細胞。次亜塩素酸点眼40分 goblet 細胞の内容が深部まで突出し、墓石状の奇観を示している。側面には隣接細胞との interdigitation の跡がみられる。

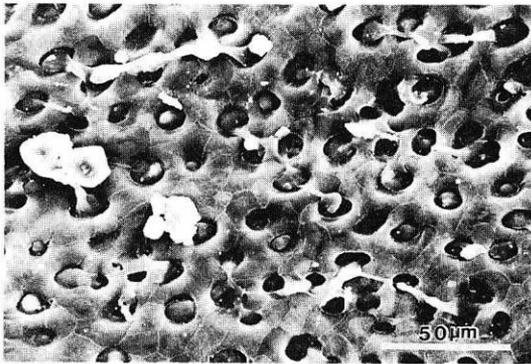


図29 家兎球結膜 goblet 細胞。n-ヘプタノール塗布72時間後病巣近傍の goblet 細胞で、べったりした膜状のムチンが隣接の goblet と連絡している。内容を放出したあとの goblet 細胞は円形の凹みを示す。

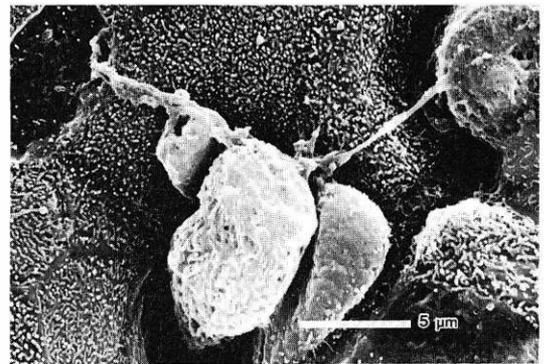


図32 家兎眼結膜 goblet 細胞。次亜塩素酸点眼10分後、噴出した goblet 細胞の内容。側面には interdigitation の跡がはっきり認められる。また隣接の goblet 細胞との間にムチン糸の連絡がみられる。

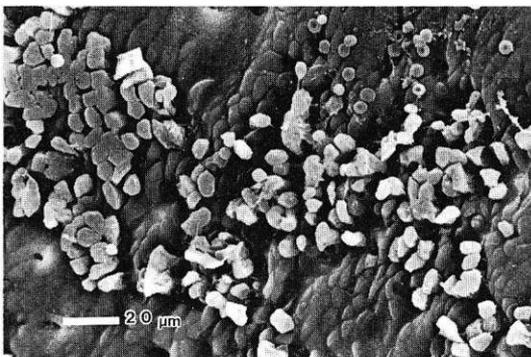


図30 家兎眼結膜 goblet 細胞。次亜塩素酸(200ppm)点眼40分後の眼結膜 goblet 細胞。内容が一挙に噴出している。先端は対側の球結膜に圧迫され平坦になっている。

りが放出されているが、細胞の表面の形質は保全されていて merocrine 型を示している。

時には goblet 細胞の細胞質の一部が分泌顆粒と共に細胞外へ放出されるという apocrine 型分泌を行なう(図34)。強い刺激が加えられるとほとんどすべての内容が一挙に放出される holocrine 型に近い分泌を示す⁷⁾。図35は200ppm の次亜塩素酸点眼20分後の球結膜 goblet 細胞の所見であるが、多量の分泌顆粒が放出されたあとの空洞状となった形質が示されている。これに相当する透過電顕像が図36であり、goblet 細胞は深部に僅かの分泌顆粒を留めるのみの状態を示している。このあと、再び分泌顆粒を生成するのか、細胞が脱落してゆくのかは明らかではない。

成熟した goblet 細胞の胞体は、分泌顆粒で満され、

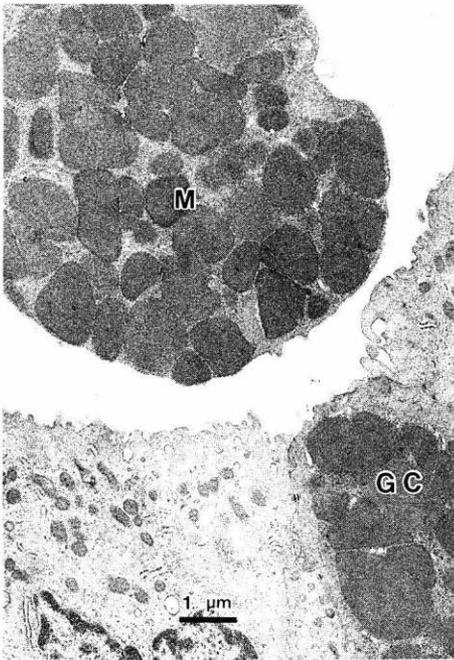


図33 goblet 細胞の分泌：1. 分泌顆粒の塊りが放出されているが細胞形質は保全されている。merocrine 型分泌と考えられる。正常家兎眼結膜。

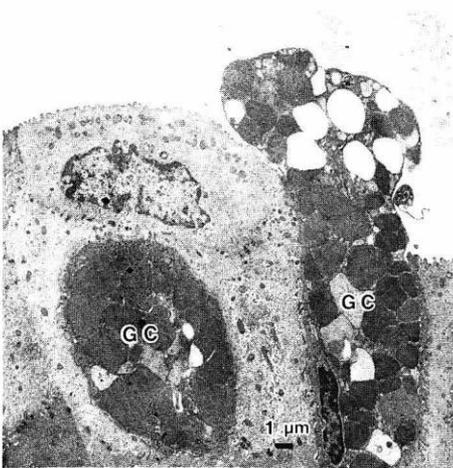


図34 goblet 細胞の分泌：2. 形質の一部が分泌顆粒と共に放出されている apocrine 型を示す。正常家兎眼結膜。

核は圧迫されて偏在する。隣接の細胞との間に interdigitiation が存在し、desmosomes で接着している。図37はたまたま生じた人工産物による隙間を通じて、goblet 細胞の側面が観察できた例であり、疎な microvilli, 分泌顆粒, 隣接細胞との接着状態など、goblet

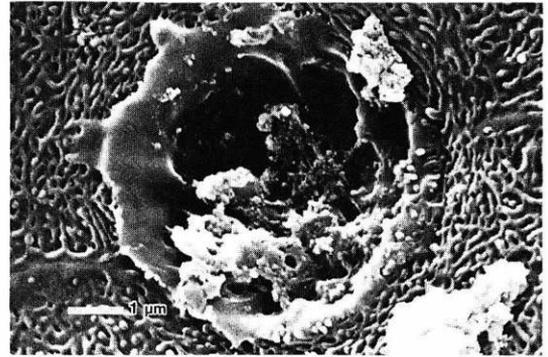


図35 goblet 細胞の分泌：3. 次亜塩素酸点眼20分後の球結膜 goblet 細胞。ほとんどすべての分泌顆粒が一挙に形質と共に放出され、その跡が空洞状を示している。holocrine 様の分泌。

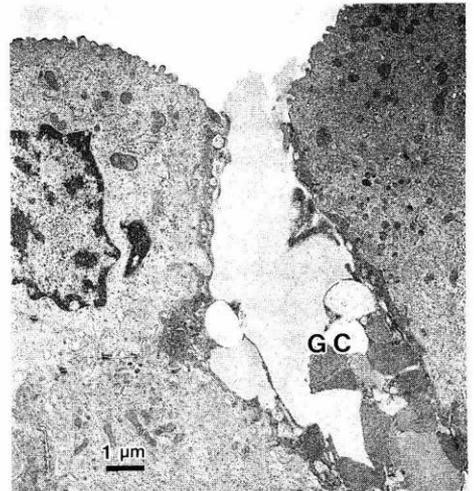


図36 goblet 細胞の分泌：4. 一部の分泌顆粒を残すのみの goblet 細胞。次亜塩素酸点眼20分後の家兎眼結膜。

細胞の特色が示されている。このような所見はタンニン酸染色による透過型電顕像の図38においても明らかに認められる。

なお、この図の左上方に細胞質が goblet 細胞と同じように濃染する上皮細胞の一部が示されているが、おそらく非 goblet 性のムチン産生上皮細胞^{(52)~(56)}と思われる。

この細胞は、上皮細胞の表層を被う酸性ムコ多糖を産生して、cell coat あるいは glycocalyx と呼ばれる構造を形成すると考えられている。

図39ではタンニン酸染色によって glycocalyx が上

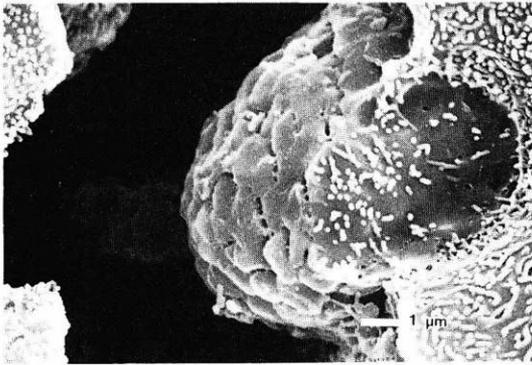


図37 家兎眼結膜 goblet 細胞, 人工産物のクラックを通して, 分泌顆粒, interdigitation, 隣接一般上皮細胞との接着状態などが示されている。

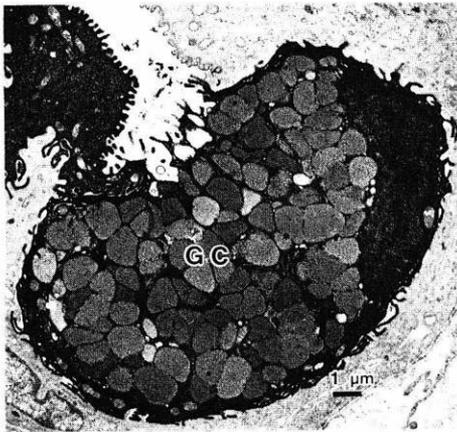


図38 家兎球結膜の goblet 細胞, タンニン酸染色によって胞体が濃染し, 疎な microvilli, interdigitation が示される。左上方に濃染しているのは, 非 goblet 性ムチン産生上皮細胞。

皮細胞の microvilli を被う薄い層として示されている。

glycocalyx は涙液層中のムチンと親和性をもち, overlap していて両者の間にはっきりした境界は認められない¹⁶⁾⁵⁰⁾⁵¹⁾⁵⁷⁾。

組織学的に goblet 細胞の染色性が一定でないのは, 内容の組成が異なるためとされているが⁴⁵⁾, PAS 染色, レクチン染色では, どの goblet 細胞もほぼ同様に染まる。しかし Alcian-blue-PAS 染色をしてみると, 図40カラーに示すように青味がかかった色調から赤までいろいろの程度に染まり, 必しも染色性は一様ではない。一般に上皮層の中で深層にあって未熟と思われる goblet 細胞は Alcian-blue 親和性が強く青くみえる。

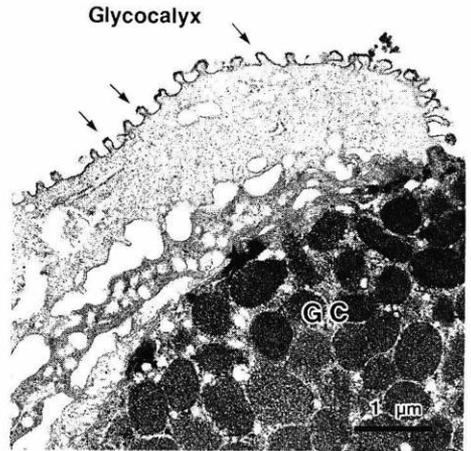


図39 家兎球結膜上皮細胞表面の glycocalyx. タンニン酸染色で microvilli の表面に glycocalyx が濃く染まって示される (矢印)。

また, 結膜の欠損部に再生したての goblet 細胞, 欠損部に向ってこれから遊走しようとしている病巣周辺の上皮細胞中の goblet 細胞なども青味がつよく染まり, 酸性基の豊富な内容をもつことが示唆されている⁵⁸⁾ (図49カラー)。

小括

goblet 細胞がどこからどのようにして発生し, どのように脱落してゆくのかその life cycle については必ずしも明らかにされていない^{59)~67)}。

Duke-Elder の System of Ophthalmology に引用されている上田⁶⁸⁾の報告によると, 上皮細胞からの転化と杯状芽細胞の両者より発生するという。

小腸の goblet 細胞は crypt の底にある特殊な mother cell からのみ発達するという意見や1つの stem cell から goblet 細胞を含む4種の上皮が分化するとの説がある⁶⁰⁾⁶⁹⁾。また空腸では crypt の単一の stem cell から goblet も一般上皮細胞も分化するという⁷⁰⁾。

n-ヘプタノールで球結膜の一部の上皮を除去し, 48時間後に H₃-thymidine を点眼ならびに結膜下注射によって投与し, 2週間後に再生した上皮の部分切除, 固定しオートラジオグラフィーの標本作製した。この標本では, 再生した上皮層内の goblet 細胞の核に grain がとりこまれており, 病巣周囲に存在していた基底細胞からこの新しい goblet 細胞が分化したことを示唆している (図41)。

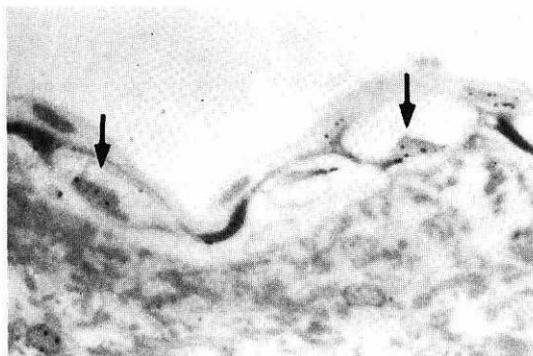


図41 家兎球結膜再生上皮中の goblet 細胞. n-ヘプタノールで上皮除去後48時間に, H₃-thymidine 投与, 2週間後に再生上皮を切除して作成した標本. goblet 細胞の核に grain がとりこまれている(矢印). トルイジン青染色. ×400.

基底細胞層において goblet 細胞の分化が始まる所見は正常のヒト球結膜の標本でも認められる.

ただし, 今回の実験結果からでは goblet 細胞の life cycle を明らかにすることはできなかった.

goblet 細胞におけるムチンの生成や分泌のコントロールがどのようにして行われているのか, 消化管ではいくつかの成績が報告されているが^{61)~65)}, 結膜では今後の検討課題である.

なお, 創傷治癒に伴う goblet 細胞の所見については次の項において述べることにする.

III Ocular surface の創傷治癒における特性

1. 角膜上皮細胞層における修復

角膜上皮は代謝活動が盛んで turn over の早いことが知られている. たとえば基底細胞層を H₃-thymidine で標識しておくと, 7~8日で最表層に達し, 一部の細胞は表面より剝脱しつつある所見が得られる. すなわち角膜上皮の life span は約1週間である.

さらに, 角膜上皮はモザイク状構造をなし, 互に overlap した形で層を作っている. 1コの細胞が脱落したあとは数コの細胞が分担して欠損を補うことができる.

また欠損部への細胞の移動は表層の扁平細胞から翼状細胞, 基底細胞までのどの層においてもそれぞれの高さに応じて行われる.

上述のような特性から, 角膜上皮細胞層の修復は迅速に行われうるのである⁷²⁾.

1) 創傷の治癒過程

外傷, 化学的腐蝕などの損傷においては, 1時間後に修復機転の始まっていることが認められる.

まづ創縁の細胞は六角形から円形に近い形になり, 細胞間隙が開いてくる.

このような細胞の表面に「ひだ」が発生する. これは細胞を下層から浮き上げ, 移動を容易にさす準備段階であり, ruffling と呼ばれる.

受傷後3~24時間までの間に, filopodia と呼ばれる細い偽足状突起や, lamellipodia と呼ばれる膜状となった形質がみられ, 欠損部に向っての細胞の遊走像が認められる^{72)~79)}.

filopodia は触角のような機能を持ち, 細胞が移動するのに適している所かどうか探索する役を果しているといわれ⁸⁰⁾, 細胞の移動には filamentous actin の働きが関与していると考えられている^{81)~84)}.

細胞の遊走に伴う上皮細胞の変形は病巣よりかなり遠く離れた所まで及ぶ⁸⁵⁾. 遊走につづいて, 24~48時間後から細胞分裂が始まり, 細胞の数が増し, 1~2層から4~5層へと厚さも増してくる. 家兎の角膜上皮欠損部は線状創で2日, 6mm²の擦過創で5日, 3mm²のアルカリ腐蝕巣で14日という程度で, 再生上皮によって被われるようになる. 再生したての上皮細胞は microvilli が疎で短く細胞間隙もあいていて, basement membrane や hemidesmosomes の発育が悪く, 固有層と十分な接着を保つことができない.

2) 結膜上皮による角膜欠損部の修復

ほとんどすべての角膜の上皮が傷害され, しかも1~2mm 結膜に至るまで範囲が及ぶような場合は, 結膜の上皮によって角膜が cover されることになる^{86)~88)}. 図42はラットの角膜に n-ヘプタノール⁸⁹⁾を塗布して角膜全面の上皮細胞を除去してから17日経った時の伸展標本であるが, 角膜上には密な goblet 細胞が分布しており, この上皮層が結膜由来のものであることを示している. 組織所見においてもまぎれもなく角膜の上に goblet 細胞が存在している (図43カラー).

電顕像では一部の goblet 細胞の胞体が上皮の基底膜に接しているのが注目される (図44).

Shapiro⁸⁶⁾の報告によると, 再生初期の1~2層の上皮細胞層内には goblet 細胞はなく, 再生後5~10日で limbus に出現し, 上皮再生後10~14日, 定型的結膜上皮で被われるようになると多数の goblet 細胞が角膜全般に亘って認められてくる.

14~28日では, 中央部から goblet 細胞が減少し,

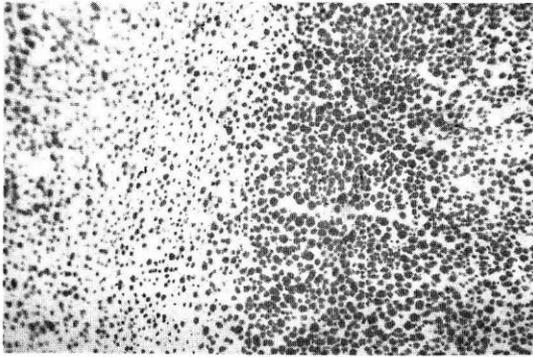


図42 ラット角膜再生上皮中の goblet 細胞, n-ヘプタノールによる上皮除去後17日, 再生した角膜上皮中には, 結膜より密な goblet 細胞が分布している(図の右半分), PAS, $\times 40$

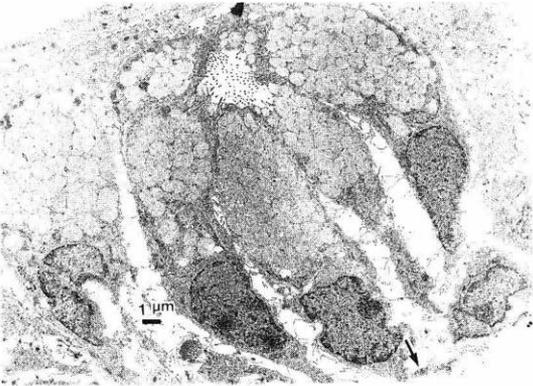


図44 ラット角膜再生上皮中の goblet 細胞, 特有なバナナの房状の goblet 細胞が再生上皮中にみられ, その一部の細胞は基底膜に接している。(矢印)

29~35日では goblet 細胞は角膜になく, 上皮は角膜上皮の形をとるといふ。

この5つの Stage を経て, 角膜全面の欠損部に再生した上皮は, 結膜の上皮から角膜へと trans-differentiation の行われることが知られている。

図45カラーは上皮再生24日目の標本であるが, 角膜中央部より goblet 細胞が漸減してゆく所見を示し, Shapiro の Stage IV に相当している。

再生した上皮が結膜から角膜へと性質が転換する機序は不明であるが, 角膜に血管化が強くおこると goblet 細胞の消失がみられない⁹⁰⁾⁹¹⁾。

家兎の角膜で n-ヘプタノールによる全面上皮除去後4週間, あるいは次亜塩素酸液による傷害後3カ月を経ても, なお角膜上に多数の goblet 細胞が残存し

て, 角膜上皮への転換が行われない例が認められる⁹¹⁾。

角膜上皮における創傷治癒の特性として, 1) 障害を受けやすいが修復も早い, 2) 細胞の遊走が活発である, 3) 再生上皮が結膜由来である時は, goblet 細胞は経過に応じて特異的な消長を示す, などの点が挙げられる。

2. 輪部における修復

輪部における創傷治癒については, 家兎を用い熱形成用のチップによる火傷, 冷凍凝固などの傷害を与え, その治癒過程を観察した。

輪部では走査型電顕で明るくみえる細胞, 明調細胞が特に多く帯状の配列をとっている⁹²⁾⁹³⁾。

この輪部一帯は, 上皮基底細胞層における H_3 -thymidine のとりこみが perilimbal で明らかに多く, telephase の polarity があるとか⁹⁴⁾⁹⁵⁾, Neutral red 点眼後の色素出現が著明である⁹⁶⁾, 角膜と結膜の両方の性質を持っている⁹⁷⁾などの特色が報告され, 輪部は結膜とも角膜とも異っていると考えられる^{98)~100)}。

輪部に作られた欠損部附近では, 明調細胞群と結膜の細胞が1体となって早い速度で橋のような形をしてのびてくる所見が認められる。熱処理12時間後, 明調細胞は細長く変形し, 欠損部に向い遊走する(図46)。

24時間後には欠損部の中央を横断する帯状の橋が形成され, 時と共にこの巾が広がって欠損部が次第に被われてゆく。

この過程において, 橋の角膜側と結膜側ではその動きに大きな差が認められる。すなわち, 橋と角膜との間の欠損は, 角膜側より上皮細胞が遊走してきて cover し, 結膜性の細胞はのびていかない, そして橋を

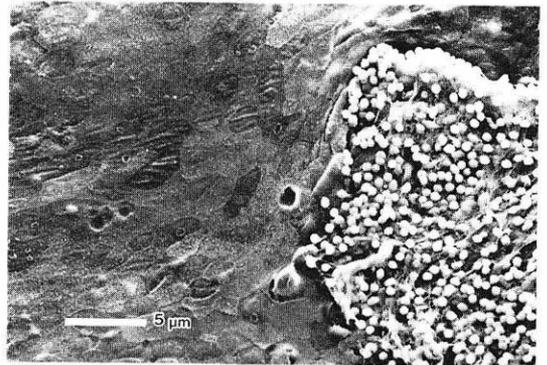


図46 家兎輪部の創傷治癒, 熱傷後12時間, 輪部の明調細胞を主体とする遊走細胞群が欠損部に向う, 右側が白血球に被われた輪部の欠損。

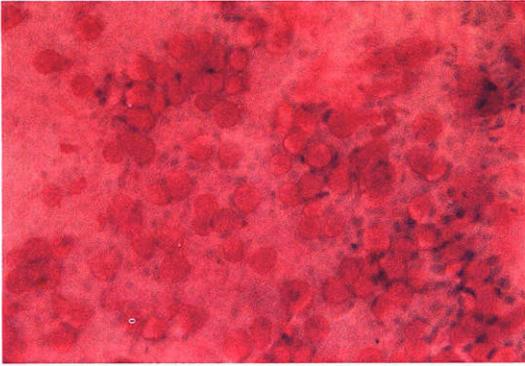


図19 membrane biopsy : 1. 正常下眼瞼結膜よりシートとして得られた結膜上皮層に多数の goblet 細胞が認められる, PAS-HE 染色, ×200

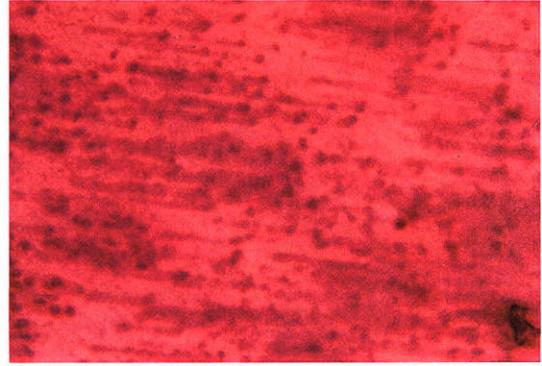


図20 membrane biopsy : 2. 正常下眼瞼結膜, goblet 細胞から分泌された粒状のムチンは眼瞼運動によって線状, 膜状に拡散する, PAS-HE 染色, ×40

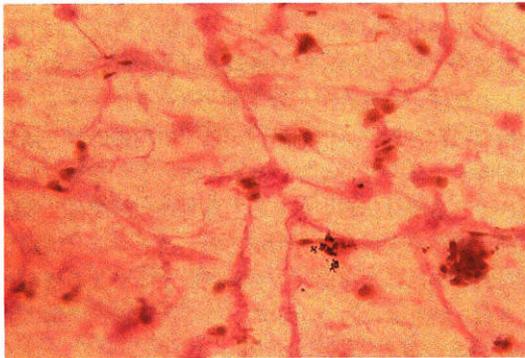


図21 membrane biopsy : 3. より合わさったムチン糸は, しばしば波状のパターンを示す, PAS-HE 染色, ×100

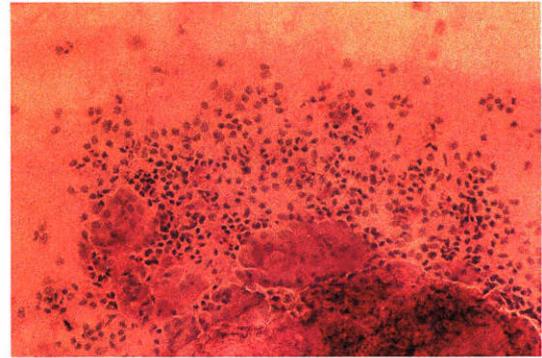


図23 membrane biopsy : 4. シェーグレン症候群, 塊り状のムチンと多数の多核白血球の浸潤があり, physiological inflammation の状態を示す, PAS-HE 染色, ×40



図40 家兎眼瞼結膜の goblet 細胞, 染色性が一様ではない, 一般に深部の goblet 細胞の方が青色を示す, Alcian Blue-PAS 染色, ×100

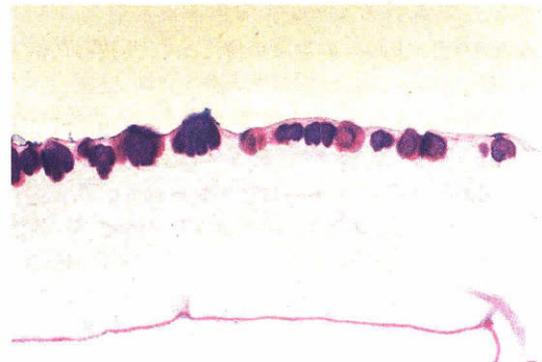


図43 ラット角膜再生上皮中の goblet 細胞, 再生角膜上皮細胞層内に多数の goblet 細胞が分布している, Alcian-Blue-PAS, ×40

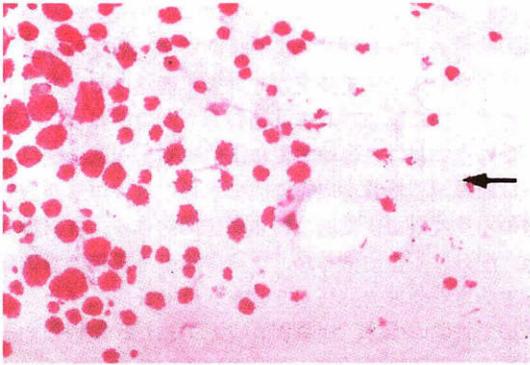


図45 ラット角膜再生上皮中の goblet 細胞, n-ヘプタノールによる除去後, 24日目, 再生上皮中の goblet 細胞は角膜中央部より漸減している, Shapiro の Stage IV に相当, PAS. ×100

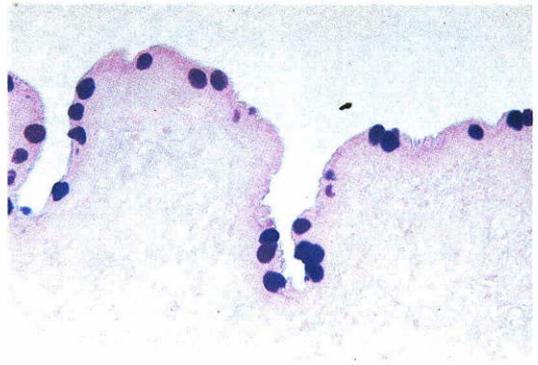


図49 家兎球結膜 goblet 細胞の反応, n-ヘプタノール塗布 4 日後, 周辺の goblet 細胞, 上皮細胞層の遊走が始っている時は, goblet 細胞は酸性基が豊富になり青く染まる, Alcian-Blue-PAS. ×100

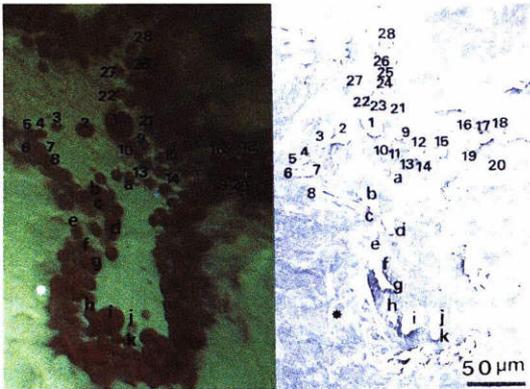


図50 家兎の実験的角膜ヘルペス, ウイルス接種 7 日後の樹枝状潰瘍, 左側の specular microscopy で得られた像を走査型電顕像と対比させてある。

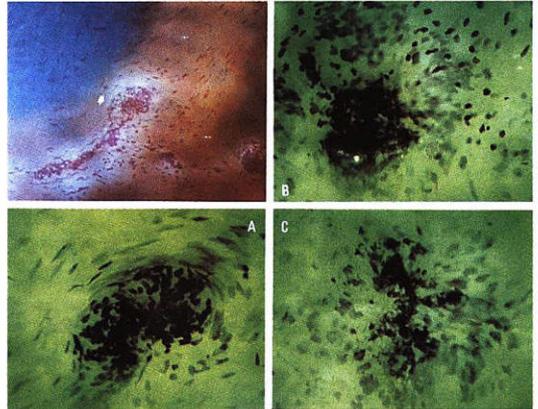


図51 人の樹枝状角膜炎, 先端の結節部 (白矢印) の治癒過程, A は治療前, B は IDU 頻回点眼 3 日後, C は 5 日後の所見。

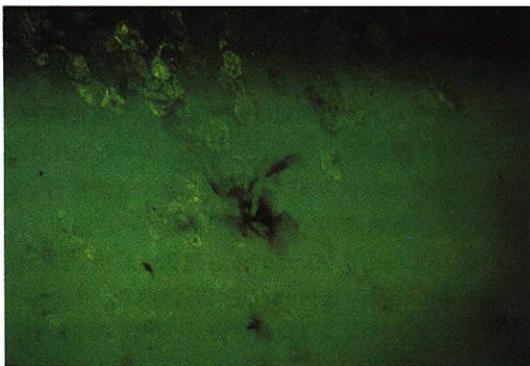


図52 乾性角結膜炎にみられた初期のフィラメント, ローゼベンガルに淡染する剥脱しかけている数コの変性上皮細胞がより合わさってフィラメントが形成されている。

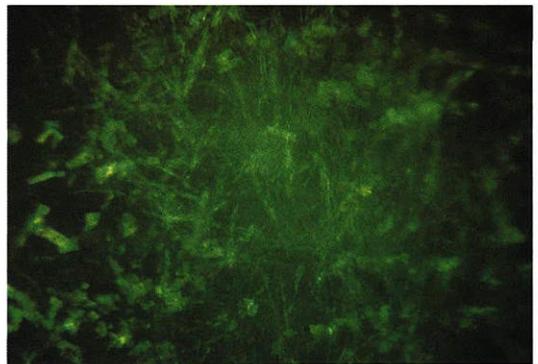


図53 陳旧性角膜ヘルペスにみられた結晶状沈着, 針状, 長方形の結晶が不均等に散在している。

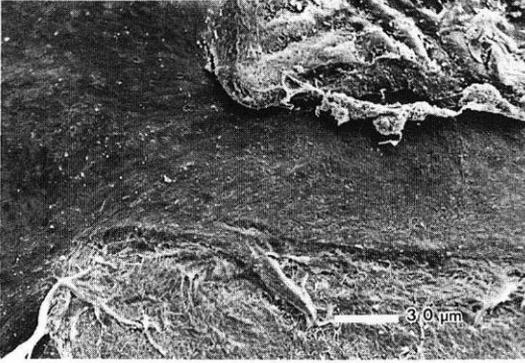


図47 家兎輪部の創傷治癒。熱傷後24時間、遊走細胞によって欠損部を横断する帯状の橋が形成される。上方に角膜側、下方に結膜側の欠損が認められる。

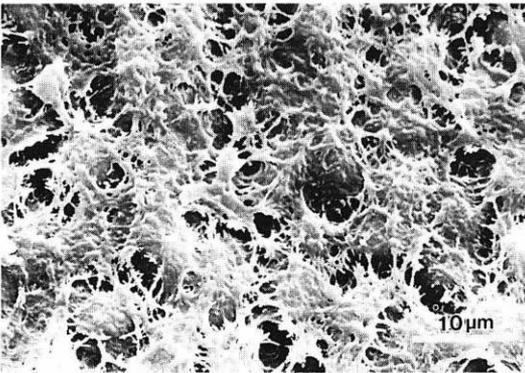


図48 家兎球結膜。n-ヘプタノール1分間塗布1時間後の所見。一面に上皮細胞層の破壊がおきている。

構成している結膜性の細胞は橋と結膜との間にできた欠損に向ってのびてゆくのである⁹³⁾。Buck⁸⁵⁾もラット輪部に作られた欠損で、結膜からの上皮はのびてこないことを報告している。

冷凍凝固による傷害においても、明調の細胞群が明らかな反応を示し、明調細胞帯の巾の広がり認められる。

輪部における創傷治癒の特性として、1) 明調細胞帯が活発な反応を示す。2) 近傍の結膜上皮細胞と共に欠損部を横断する橋を早期に作る。3) 結膜上皮細胞は容易に角膜側へはのびてゆかない。などの点が挙げられる。

3. 球結膜における修復

結膜における創傷治癒を検討するため、輪部球結膜にn-ヘプタノール塗布、熱傷、冷凍凝固による傷害あるいは次亜塩素酸液点眼による腐蝕を行い、修復過程

を観察した。

n-ヘプタノールを1分間塗布すると、結膜の表層は細胞の形が全く不明瞭となり、金平糖状となった壊死細胞が一面に認められる(図48)。

この傷害後1日の標本では、fibrin, cell debris, ムチン様無定型物質が傷害部表面に散在しているが、一層の不連続な上皮細胞の遊走が認められる。3日後には、配列は不正であるが、2～3層の上皮細胞が再生している。

遊走細胞の中や、病巣より少し離れた球結膜の上皮層の中には goblet 細胞は見当たらない。移動中あるいは修復のための遊走段階にある上皮細胞層内の goblet 細胞はそのほとんどが内容の mucous granules を放出して虚脱状態となり(図29)、組織学的に同定ができなくなるものと考えられる⁶⁷⁾⁸⁸⁾。

この現象は、ヘプタノール傷害に特有なものではなく、化学的腐蝕、熱傷や冷凍凝固などにおいても認められる。図27は200ppmの次亜塩素酸点眼後の円蓋部結膜の所見であるが、goblet 細胞の内容はほとんど放出され、その跡が円形の凹みとして多数残されている。

一般に、球結膜上皮細胞は角膜上皮細胞ほど遊走は著明ではない。しかし filopodia, lamellipodia をのびして欠損部に向って遊走する現象は角膜と共通しており、修復の初期の段階である。

遊走について細胞分裂がおきてくる。

ヘプタノールによる傷害では3日後に活発な細胞分裂像が観察され、この後次第に再生上皮の厚さが増加する。5日後、再生上皮は6～7層に達し、最も厚くなる時期に当たるが、初めて goblet 細胞が再生上皮細胞層内に出現する。7日後には上皮層の厚さが減少するのに反し、goblet 細胞の数が増し、その形態も多様となる。この時期は走査型電顕によっても、明るさ、形が不規則な再生上皮の中に、goblet 細胞の散在しているのが認められ、2週間以上経過すると、上皮細胞は成熟度を増し正常に近い構造を示し、ムチンを分泌している状態の goblet 細胞も観察される。遊走前の上皮細胞層内の goblet 細胞や、再生後の上皮内に出現した新しい goblet 細胞は Alcian blue 親和性が強く、酸性基の多い mucous granules を持っている(図49カラー)⁵⁸⁾。

結膜上皮細胞層の創傷治癒の特性として、1) 修復は角膜上皮細胞層より遅いこと⁸⁵⁾¹⁰¹⁾¹⁰²⁾、2) 遊走段階にある上皮細胞ないし再生したての上皮細胞の中には goblet 細胞は認められない。などの点が挙げられる。

小括

角膜、輪部、結膜はそれぞれに特色をもった創傷治癒を営んでいるが、決して独立したのではなく、直接あるいは間接的な影響を互に受けている¹⁰³⁾¹⁰⁴⁾

角膜全面の上皮が傷害を受けた場合には、周辺の結膜性細胞によって再生が起こる。これらの細胞は遊走と増殖によって角膜を被うが、結膜の性格から次第に角膜性の細胞へと転換が行われる。

しかし、血管化がおきたり、炎症が強かったりすると永い間角膜上の細胞が結膜の性質を保つようになる。このような場合、再発性上皮欠損や実質の創傷治癒の遅延が起こる。臨床的にも Stevens-Johnson 症候群、トラコーマ、Sjögren 症候群、Vit. A 欠乏症、アルカリ腐蝕などで、広汎な結膜の障害のある例では、角膜上皮への転換がうまく行われず、経過が遷延し予後の悪いことが経験される。

このような症例では、通常角膜移植で透明治癒を得ることは難かしく、Keratoepithelioplasty など治療方法に一段の工夫が必要とされる^{105)~109)}。

したがって、角膜、結膜を含めた広い範囲に病変がある場合は、予後の判定や治療に際して、角膜、結膜を単独に分けて考えるべきではない。角膜上皮の異常の一因は、結膜上皮の異常に起因するかも知れない。Shapiro⁸⁶⁾の提唱した“Pan ocular surface disease”という考え方の上に乗って対処すべきである。

IV 新しい ocular surface の観察方法 —specular microscopy

先端に wide converter がつけられている甲南カメラ製、広視野 specular microscope を用い、随時 1% Rose-bengal 染色を併用すると、ocular surface の病態を新しい角度からとらえることができる。

上皮表層の変化は、反射の亢進、rose-bengal 染色性の強弱、配列の異常などの変化として、中層および基底層では種々の程度の浮腫を、実質の表層では新生血管や沈着物などを観察することができる^{110)~114)}。

まづ家兎の実験的角膜ヘルペスにおける病巣を走査型電顕と対比して検討した。

ウイルスを接種後、5~7日目に発生した初期の小浸潤巣から定型的な樹枝状潰瘍にいたるまで各時期の病巣を 1% Rose-bengal で染色し、specular microscope で撮影した。その後 3% グルタルアルデヒド液を角膜表面に滴下して固定し、眼球摘出後にさらに固定を行ってから走査型電顕用の資料を作成し

た。

図50カラーはウイルス接種7日後に発生した樹枝状潰瘍の一部について撮影したものである。

上方の病巣については1から28まで、下方の病巣についてはaからkまで、確実に specular microscope と走査型電顕による所見を対比することができた部分を示した。たとえば、1, 2, 3あるいはf, g, iはRose-bengal に好染する変性細胞で剝離直前の所見である。4, 5, 6, 7, 8は潰瘍縁にあって変形した細胞であり、13, 14, 15, 16は虚脱に陥った円型の上皮細胞である。

*印は生体顕微鏡では観察できなかった潰瘍周辺の浮腫を起した細胞で、走査型電顕では大型のやや隆起した細胞として認められている。

図51カラーは人における樹枝状潰瘍の治癒過程を示したものである。矢印で示した潰瘍先端部の結節状の病巣を specular microscope で観察した。Aは治療前、BはIDU頻回点眼後3日目、Cは5日目の同一病巣である。AではRose-bengal に濃染する変性細胞が集団を作って結節状の病巣を形成し、その周囲には紡錘型の細胞が病巣をとりまいている。B, Cと病巣は次第に縮小すると同時に病巣周囲より大型の細胞が遊走し修復に関与している所見が認められる。

図52カラーは乾性角結膜炎にみられたフィラメントの所見である。角膜の下方には、反射の強い大型の変性した細胞が散在している。あるものは細胞の中央に小さな核を有している。

剝離しかけている数コの細胞は、Rose-bengal に淡染しているが、これらがより合わさってフィラメントを形成しつつある状態が示されている。極めて初期のフィラメントの像である。

図53カラーは陳旧性のヘルペス性角膜炎にみられた実質表層の結晶状沈着である。

長方形ないし針状の結晶が不均等に分布している。長方形の結晶の中には、青色を帯びているものが混っている。

上述の例は2, 3の代表例として図示したのであるが、specular microscope による ocular surface の観察は、生体において細胞単位で病態を捉えることができ、今までの細隙電顕とは違った角度での情報を提供するものである。

角・結膜疾患の病態の解明に、一つの有用な方法と考えられる。

V むすび

ocular surface は粘膜組織の1つであると同時に、一部は光学系としての機能を兼ねており、その生理と病態にはさまざまな特性がみられる。

いくつかの特性については既に述べた通りであるが、ここでは2つの点をとりあげてむすびにしたい。

第1は goblet 細胞ならびに surface mucin の意義である。

goblet 細胞は tear film に対して、mucous layer を構成するためのムチンを提供している。しかし goblet 細胞から分泌されるムチンの大部分は角膜ならびに結膜の表面に surface mucin を形成し、物理的および生物学的 barrier として、異物の排除、微生物のコントロール、表層細胞の代謝など、ocular surface の防御と機能の保持に重要な役割を果している。

goblet 細胞が結膜上皮にみられない時は、結膜の分化に異常のあることを意味し、角膜上皮内に goblet 細胞が認められる時は、障害を起しやすく、治癒が遅延する。

このように goblet 細胞の消長は、結膜のみならずある時は角膜の性状を判定する上でよき指標ともなっている。また主として goblet 細胞によって産生されるムチンの性状は、ocular surface の異常をよく反映している^{88)115)~120)}。

第2に結膜の意義である。

角膜、輪部、結膜はそれぞれに応じた機能を分担しているが、独立したものではなく有機的なつながりをもつて1つの ocular surface を構成している。

特に角膜の機能と形態を維持するためには健全な結膜が必要である。

眼球表層の病変において結膜の占める意義を改めて認識すべきである。

特別講演の機会を与えていただいた日本眼科学会評議員の皆様には心から感謝申しあげると共に、この研究に絶大な協力をいただいた日大板橋病院眼科の教室員、同窓生各位をはじめ日大医学部微生物学教室の石橋梯子助教授、日大医学部化学教室の竹内重雄助教授、日大理工学部の沢村良二教授、新川橋病院の石井康雄氏に感謝申しあげます。

なお本研究の一部は文部省科学研究費、課題番号「61480370」[ocular surface の防御機構に関する研究]の援助を受けたことに謝意を表します。

文 献

- 1) **Bron AJ, Seal DV**: The defences of the ocular surface. *Trans Ophthalmol Soc UK* 105: 18-25, 1986.
- 2) **Lemp MA, Blackman HJ**: Ocular surface defense mechanisms. *Ann of Ophthalmol* Jan 61-63, 1981.
- 3) **Van Haeringen NJ**: Clinical biochemistry of tears. *Survey of Ophthalmol* 26: 84-96, 1981
- 4) **Liotet S, Triclot MP, Perideriset M, Warnet VN, Laroche L**: The role of conjunctival mucus in contact lens fitting. *The CLAO Journal* 11: 149-154, 1985.
- 5) **Tiffany JM, Bron AJ**: Role of tears in maintaining corneal integrity. *Trans Ophthalmol Soc UK* 98: 335-338, 1978
- 6) 鈴木 泰, 中尾哲章, 松田整二, 中川 喬, 新飯田裕一: ELISA法によるヒト涙液中ラクトフェリンの定量. *眼紀* 37: 659-663, 1986.
- 7) **Chao CCW, Vergnes J, Freeman IL, Brown SI**: Biosynthesis and partial characterization of tear film glycoprotein. Incorporation of radioactive precursors by human lacrimal gland explants in vitro. *Exp Eye Res* 30: 411-425, 1980.
- 8) **Holly FJ, Lemp MA**: Tear physiology and dry eyes. *Survey Ophthalmol* 22: 69-87, 1977.
- 9) **Iwata S, Kabasawa I**: Fractionation and chemical properties of tear mucoids. *Exp Eye Res* 12: 360-367, 1971.
- 10) **Moore JC, Tiffany JM**: Human ocular mucus. Origins and preliminary characterization. *Exp Eye Res* 29: 291-301, 1979.
- 11) **Moore JC, Tiffany JM**: Human ocular mucus. Chemical studies. *Exp Eye Res* 33: 203-212, 1981.
- 12) **Chao CW, Vergnes J, Brown SI**: Fractionation and partial characterization of macromolecular components from human ocular mucus. *Exp Eye Res* 36: 139-150, 1983.
- 13) **Friend J, Kiorpes T, Thoft RA**: Conjunctival goblet cell frequency after alkali injury is not accurately reflected by aqueous tear mucin content. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 612-618, 1983.
- 14) **Takeuchi S, Kanazawa k, Hasegawa R, Kimoto I, Iimura F, Kobayashi M**: Comparative biochemical and immunological study of mucoprotein in mucus secreted in dog digestive tract. in Kawai K Ed.: *Gastric Mucus and Mucus Secreting Cells*, 89-102 *Excerpta Medica, Tokyo*, 1985.

- 15) 深沢義村：病原体の生体侵入メカニズム，病態生理 2：553—559, 1983.
- 16) **Wells, P.A, Hazlett LD**：Complex carbohydrates at the ocular surface of the mouse：An ultrastructural and cytochemical analysis. *Exp Eye Res* 39：19—35, 1984.
- 17) **Adams AD**：The morphology of human conjunctival mucus. *Arch Ophthalmol* 97：730—734, 1979.
- 18) **Ramphal R, Pyle M**：Evidence for mucins and sialic acid as receptors for pseudomonas aeruginosa in the lower respiratory tract. *Infect and Immun* 41：339—344, 1983.
- 19) **Ramphal R, Pyle M**：Adherence of mucoid and non-mucoid pseudomonas aeruginosa to acid injured tracheal epithelium. *Infect and Immun* 41：345—351, 1983.
- 20) **Stern GA, Lubniewski A, Allen C**：The interaction between pseudomonas aeruginosa and the corneal epithelium. An electron microscopic study. *Arch Ophthalmol* 103：1221—1225, 1985.
- 21) **Hazlett LD, Wells P, Spann B, Berk RS**：Penetration of unwounded immature mouse cornea and conjunctiva by pseudomonas：SEM-TEM analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19：694—697, 1980.
- 22) **DeCarlo JD, Van Horn DL, Hyndiuk RA, Davis SD**：Increased susceptibility to infection in experimental xerophthalmia. *Arch Ophthalmol* 99：1614—1617, 1981.
- 23) **Chandler RL, et al**：Scanning electron microscope studies on preparations of bovine cornea exposed to *Moraxella bovine*. *J Comp Path* 93：1—8, 1983.
- 24) **Zimianski MC, Dawson CR, Tongi B**：Epithelial cell phagocytosis of *Listeria monocytogenes* in the conjunctiva. *Invest Ophthalmol* 13：623—626, 1974.
- 25) 飯田貴士：緑膿菌の家兎角膜培養細胞への吸着性。第89回日眼総会抄録，p119. 1985.
- 26) **Freter R**：Mechanisms of association of bacteria with mucosal surface, Elliott K (ed), *Adhesion and Microorganism Pathogenicity*. Ciba Foundation Symp 80, Pittman Medical, London 36, 1980.
- 27) **Freter R, Jones GW**：Models for studying the role of bacterial attachment in virulence and pathogenesis. *Rev of Inf Dis* 5(Suppl 4)：647—658, 1983.
- 28) **Walker WA**：Host defense mechanisms in the gastrointestinal tract. *Pediatrics* 57：901—916, 1976.
- 29) **Mitsui Y**：The role of mucin on experimental pseudomonas keratitis in rabbits. *Invest Ophthalmol* 15：208—213, 1976.
- 30) 三井彦彦：角膜感染症。日眼 79：1651—1664, 1975.
- 31) 中谷林太郎：粘膜の感染防御機構。病態生理 2：560—566, 1983.
- 32) **Seavall EN, Grand NG**：Cytology of the oral mucosa by a filter imprint technic. *J of Invest Dermat* 1963.
- 33) **Egbert PR, Lauber S, Maurice DM**：A simple conjunctival biopsy. *Am J Ophthalmol* 84：798—801, 1977.
- 34) **Nelson JD**：Ocular surface impressions using cellulose acetate filter material. *Ocular pemphigoid. Survey of Ophthalmol* 27：67—69, 1982.
- 35) **Hatchell DL, Sommer A**：Detection of ocular surface abnormalities in experimental vitamin A deficiency. *Arch Ophthalmol* 102：1389—1393, 1983.
- 36) **Tseng SCG**：Staging of conjunctival squamous metaplasia by impression cytology. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 92：728—733, 1985.
- 37) 大路正人, 切通 彰, 木下 茂, 大橋裕一：臨床検査としてのImpression cytologyとその角結膜疾患への応用。臨眼 40：209—212, 1986.
- 38) **Norn MS**：Mucus on conjunctiva and cornea. *Arch Ophthalmol* 41：13—24, 1963.
- 39) **Norn MS**：Mucous thread in inferior conjunctival fornix. Qualitative analysis of the normal mucous thread. *Acta Ophthalmol* 44：33—42, 1966.
- 40) **Norn MS**：Cells and vacuoles in the mucous thread of the inferior conjunctival fornix. *Acta Ophthalmol* 46：1125—1134, 1968.
- 41) **Norn MS**：Mucus flow in the conjunctiva. *Acta Ophthalmol* 47：129—146, 1969.
- 42) 飯島宗一：炎症の概念と感染症。病態生理 2：547—552, 1983.
- 43) **Anantanarayana A**：A note on the mechanism of eyelid closure in blinking. *Proc All India Ophthalmol Soc* 10：154—158, 1949.
- 44) 松本和郎, 三村康男：結膜杯細胞の組織化学。結合組織 6：85—90, 1974.
- 45) **Srinivasan BD, Worgul BV, Iwamoto T, Merrian GR**：The conjunctival epithelium. II. Histochemical and ultrastructural studies on human and rat conjunctiva. *Ophthalmic Res* 9：65—79, 1977.
- 46) **Greiner JV, Henriquez A, Covington HI, Weidman TA, Allansmith MR**：Goblet cells of the human conjunctiva. *Arch Ophthalmol* 99：

- 2190—2197, 1981.
- 47) 山林茂樹, 塚原重雄: サル結膜杯細胞における組織化学的研究. PAS-AB染色とシアリーダーゼPAS-AB染色. 第89回日眼総会, 1985.
 - 48) 杉田 新, 阿久根秀樹, 吉岡久春: 角膜輪部における杯細胞の表面形態. あたらしい眼科 2: 699—702, 1985.
 - 49) 吉村 久, 吉沢 徹, 崎元 卓, 北野周作: 塩素による角結膜障害—走査電子顕微鏡的観察. 第1報. 次亜塩素酸, 三塩化窒素を用いた障害実験における角結膜表層の病態. 眼紀 37: 975—984, 1986.
 - 50) Nichols BA, Dawson CR, Tongi B: Surface features of the conjunctiva and cornea. Invest Ophthalmol Vis Sci 24: 570—576, 1983.
 - 51) Nichols BA, Chiappino ML, Dawson CR: Demonstration of the mucous layer of the tear film by electron microscopy. Invest Ophthalmol Vis Sci 26: 464—473, 1985.
 - 52) Takakusaki I: Fine structure of the human palpebral conjunctiva with special reference to the pathological changes in vernal conjunctivitis. Arch Histol Jap 30: 247—282, 1969.
 - 53) Srinivasan BD, Worgul BV, Iwamoto T, Merriam GR: The conjunctival epithelium. Histochemical and ultrastructural studies on human and rat conjunctiva. Ophthalmic Res 9: 65—79, 1977
 - 54) Greiner JV, Kenyon KR, Henriquez AS, Korb DR, et al: Mucus secretory vesicles in conjunctival epithelial cells of wearers of contact lenses. Arch Ophthalmol 98: 1843—1846, 1980.
 - 55) Dilly PN, Mackie IA: Surface changes in the anaesthetic conjunctiva in man with special reference to the production of mucus from a non-goblet-cell source. Brit J Ophthalmol 65: 833—842, 1981.
 - 56) 山林茂樹, 藤井靖久, 永田哲士: サル結膜の糖タンパク質に関する組織化学的研究. あたらしい眼科 1: 276—278, 1984.
 - 57) Ito S: Form and function of the glycocalyx on free cell surface. Phil Trans R Soc Lond B 268: 55—66, 1974.
 - 58) 富田隆之, 伏見典子, 北野周作, 石井康雄: Goblet cell及びその周辺細胞—組織化学的及び電顕的観察. 第90回日眼総会, 1986.
 - 59) Freeman JA: Goblet cell fine structure. Anat Rec 154: 121—148, 1964.
 - 60) Cheng H, Leblond CP: Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian theory of the origin of the four epithelial cell types. Am J Anat 141: 537—562, 1974.
 - 61) MacDermot RP, Donaldson RM, Tier JR: Glycoprotein synthesis and secretion by mucosal biopsy of rabbit colon and human rectum. J Clin Invest 54: 545—554, 1974.
 - 62) Leblond CP, Messier B: Renewal of chief cells and goblet cells in the small intestine as shown by radioautography after injection of thymidine-H³ into mice. Anat Rec 132: 247—259, 1958.
 - 63) Boat TF, Cheng PW, Keinger JD et al: Proteinases release mucin from airways goblet cells. in Mucus and Mucosa. Nugent. J (ed), London (Ciba Foundation Symposium 109) 4—19, 1984.
 - 64) Specian RD, Neutra MR: Mechanism of rapid mucus secretion in goblet cells stimulated by acetylcholine. J Cell Bio 85: 626—640, 1980.
 - 65) Neutra MR, Phillips TL, Phillips TE: Regulation of intestinal goblet cells in situ, in mucosal explants and in the isolated epithelium. in Mucus and Mucosa. Nugent, J (ed), London (Ciba Foundation Symp 109), 20—39, 1984.
 - 66) Pfister RR: The normal surface of conjunctiva epithelium. A scanning electron microscopic study. Invest Ophthalmol 14: 267—279, 1975.
 - 67) Geggel HS, Gipson IK: Removal of viable sheets of conjunctival epithelium with dispase II. Invest Ophthalmol Vis Sci 26: 15—22, 1985.
 - 68) 上田美知子: 幼若家兎結膜の成熟過程, 特に杯状細胞に関する細胞学的研究. 眼紀 10: 1072—1098, 1959.
 - 69) Kessing SV: Mucous gland system of the conjunctiva. A quantitative normal anatomical study. Acta Ophthalmol Supp 95: 7—131, 1968.
 - 70) Wiernik G, Plant M: The origin and kinetics of goblet cells in the human jejunum during irradiation. Brit J Radiology 44: 348—356, 1971.
 - 71) Cell Structure: An introduction to biomedical electron microscopy. Carr KE, Toner PG (ed), Churchill Livingstone NY, 47—48, 1982.
 - 72) 北野周作: 角膜上皮層の創傷治癒について. 日本コレ学会誌 21: 253—257, 1979.
 - 73) Matsuda H, Smelser GK: Epithelium and stroma in alkali-burned corneas. Arch Ophthalmol 89: 396—401, 1973.
 - 74) Pfister RR: The healing of corneal epithelial abrasions in the rabbit: A scanning electron microscope study. Invest Ophthalmol 14: 648—661, 1975.

- 75) **Niebroj TK, Gierek A**: Scanning microscope observations of alkali-burned rabbit cornea treated with corneal homogenisates. *Ophthalmologica* 170: 64—71, 1975.
- 76) **Vrabec F, Obenberger J, Vrabec J**: Ring-shaped alkali burns of the rabbit cornea, Epithelial and endothelial change. *Arch Klin Exp Ophthalmol* 197: 233—241, 1975.
- 77) **Henriquez AS, Philaja DJ, Dohlman CH**: Surface ultrastructure in alkali-burned rabbit cornea. *Am J Ophthalmol* 81: 324—331, 1976.
- 78) **Kuwabara T, Perkins DG, Cogan DG**: Sliding of the epithelium in experimental corneal wounds. *Invest Ophthalmol* 15: 4—14, 1976.
- 79) **Haik BG, Zimmy ML**: Scanning electron microscopy of corneal wound healing in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 16: 787—796, 1977.
- 80) **Albrecht-Buehler G**: Filopodia of spreading 3T3 cells. Do they have a substance exploring function? *J of Cell Biol* 69: 275—286, 1976.
- 81) **Gipson IK, Anderson RA**: Actin filaments in normal and migrating corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol* 16: 161—166, 1977.
- 82) **Gipson IK, Riddle CV, Kiorpes TC, Spurr SJ**: Lectin binding to cell surfaces: Comparisons between normal and migrating corneal epithelium. *Develop Biology* 96: 337—345, 1983.
- 83) **Soong HK, Fairly JA**: Actin in human corneal epithelium. *Arch Ophthalmol* 103: 565—568, 1985.
- 84) **Pfister RR**: The effects of the chemical injury on the ocular surface. *Ophthalmology* 90: 601—609, 1983.
- 85) **Buck R**: Cell migration in repair of mouse corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 18: 767—784, 1979.
- 86) **Shapiro MS, Friend J, Thoft RA**: Corneal re-epithelization from the conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 21: 135—142, 1981.
- 87) **Kinoshita S, Friend J, Thoft RA**: Biphasic cell proliferation in transdifferentiation of conjunctiva to corneal epithelium in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 1008—1014, 1983.
- 88) **Geggel HS, Friend J, Thoft RA**: Conjunctival epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25: 860—863, 1984.
- 89) **Cintron C, Hassinger L, Kublin CL, Friend J**: A simple method for the removal of rabbit corneal epithelium utilizing n-heptanol. *Ophthalmic Res* 11: 90—96, 1979.
- 90) **Tseng SCG, Hirst LW, Farazdaghi M, Green R**: Goblet cell density and vascularization during conjunctival transdifferentiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25: 1168—1176, 1984.
- 91) **Tseng SCG, Hirst LW, Maumenee AE, Kenyon KR, Sun T, Green WR**: Possible mechanisms for the loss of goblet cells in mucin deficient disorders. *Ophthalmology* 91: 545—552, 1984.
- 92) 中馬 光, 富田隆之, 崎元 卓, 北野周作: 角膜輪部上皮細胞の超微形態. *眼紀* 33: 2327—2335, 1982.
- 93) 中馬 光, 吉村能至, 崎元 卓: Limbus障害後の修復過程に見られる結膜上皮細胞の特徴ある動き. *日眼* 88: 873—884, 1984.
- 94) **Worgul BV, Srinivasan BD, Merriam GR**: The conjunctival epithelium. 1. Methods for preparing isolated whole mounts of the rat conjunctival epithelium. *Ophthalmic Res* 8: 401—406, 1976.
- 95) **Worgul BV, Srinivasan BD**: The conjunctival epithelium. III. Evidence for a preferred orientation of dividing cells in the perilimbal region. *Ophthalmic Res* 10: 177—182, 1978.
- 96) 船橋知也: 視器生体染色. *日眼* 84: 1826—1880, 1980.
- 97) **Kinoshita S, Kiorpes TC, Friend J, Thoft RA**: Limbal epithelium in ocular surface wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 23: 73—80, 1982.
- 98) **Greiner JV, Covington HI, Allansmith MR**: The human limbus. A scanning electron microscopic study. *Arch Ophthalmol* 97: 1159—1165, 1979.
- 99) **Latkovic S, Nilsson SE**: The ultrastructure of the normal conjunctival epithelium of the guinea pig. II. Superficial layer of the perilimbal zone. *Acta Ophthalmol* 57: 123—134, 1979.
- 100) **Schermer A, Galvin S, Sun TT**: Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J of Cell Biology* 103: 49—62, 1986.
- 101) **Friend J, Thoft RA**: Functional competence of regenerating ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17: 134—139, 1978.
- 102) **Jumblatt MM, Neufeld AH**: Characterization of cyclic AMP mediated wound closure of the rabbit corneal epithelium. *Curr Eye Res* 1: 189—195, 1981.
- 103) **Wright P**: Cicatrizing conjunctivitis. *Trans Ophthalmol Soc UK* 105: 1—17, 1986.
- 104) 檀上真次, **Friend J, Thoft RA**: 角膜上皮創傷

- 治癒に対する結膜上皮の関与について, 第90回日眼総会, 1986.
- 105) **Thoft RA**: Conjunctival transplantation. *Arch Ophthalmol* 95: 1425—1428, 1977.
- 106) **Thoft RA**: Keratoepithelioplasty. *Am J Ophthalmol* 97: 1—6, 1984.
- 107) **Gipson IK, Friend J**: Transplant of corneal epithelium to rabbit corneal wounds in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 425—433, 1985.
- 108) **Gipson IK, Geggel HS, Spurr-Michaud SJ**: Transplant of oral mucosal epithelium to rabbit ocular surface wounds in vivo. *Arch Ophthalmol* 104: 1529—1533, 1986.
- 109) 真鍋禮三: 治療的角膜移植. *臨眼* 40: 1017—1026, 1986.
- 110) 葛西 浩, 江波戸文秀, 植田達子, 東野 巖他: 角膜上皮のSpecular Microscopy. *眼紀* 31: 1704—1710, 1980.
- 111) 江波戸文秀, 葛西 浩, 崎元 卓: 角膜上皮Specular microscopyの臨床応用. *眼紀* 32: 1319—1324, 1981.
- 112) 葛西 浩, 江波戸文秀, 崎元 卓, 北野周作: 角膜上皮細胞の病態. *Specular microscope*による観察. *臨眼* 36: 879—889, 1982.
- 113) 渡部保男, 中安清夫, 平野 東, 金井 淳: コンタクトレンズによる角膜障害—*Specular microscope*および走査型電子顕微鏡による観察—, *日本コレ学会誌* 24: 238—245, 1982.
- 114) **Lemp MA, Gold JB, Wong S, Mahmood M, et al**: An in vivo study of corneal surface morphologic features in patients with keratoconjunctivitis sicca. *Am J Ophthalmol* 98: 426—428, 1984.
- 115) **Kinoshita S, Kiorpes TC, Friend J, Thoft RA**: Goblet cell density in ocular surface disease. A better indicator than tear mucin. *Arch Ophthalmol* 101: 1284—1287, 1983.
- 116) **Ralph RA**: Conjunctival goblet cell density in normal subjects and in dry eye syndromes. *Invest Ophthalmol* 14: 299—302, 1975.
- 117) **Greiner JV, Convington HI, Korb DR, Allansmith MR**: Conjunctiva in asymptomatic contact lens wearers. *Am J Ophthalmol* 86: 403—413, 1978.
- 118) **Greiner JV, Convington HI, Allansmith MR**: Surface morphology of giant papillary conjunctivitis in contact lens wearers. *Am J Ophthalmol* 85: 242—252, 1978.
- 119) **Lee WR, Murray SB, Williamson J, Mckean DL**: Human conjunctival surface mucin. A quantitative study of normal and diseased tissue. *Graef Arch Klin Ophthalmol* 215: 209—221, 1981.
- 120) **Török M, Süveges I**: Morphological changes in “Dry eye syndromes”. *Graef Arch Clin Exp Ophthalmol* 219: 24—28, 1982.