

角膜上皮障害治癒過程で出現するフィブロネクチンの由来について

—免疫電顕的検討—(図19)

高橋 堅 一 (秋田大学医学部眼科学教室)

The Origin of Fibronectin in Healing Corneal Epithelial Wounds Evaluated by Immunoelectron Microscopy

Ken-ichi Takahashi

Department of Ophthalmology, Akita University School of Medicine

要 約

フィブロネクチン (Fn) と角膜創傷治癒との間の密接な関連性が、主として家兎を用い、蛍光抗体法を利用した *in vivo* における種々の創傷実験によって明らかにされてきた。しかし Fn の供給源については、角膜の細胞による産生の可能性を含め不明な点が少なくない。そこで今回、家兎角膜中央部に7.0mm 径の上皮欠損創を作製し、その治癒過程で出現する Fn の由来を細胞レベルで検討する為、電顕的酵素抗体法による検索を行ない、次の様な結論が得られた。すなわち、受傷後30分という早期から創傷部とその近傍の実質全層にわたり活性化した keratocyte 粗面小胞体に特異的反應産物の集積が観察され、創傷治癒の進行と共に粗面小胞体内部に Fn の局在を示す fibroblast の数が増加し、その染色強度も増強して行った。以上の観察結果は、角膜創傷治癒において創局所での Fn 合成の重要性を反映したものと考えられる。(日眼 91 : 1164—1175, 1987)

キーワード：フィブロネクチン、角膜創傷治癒、角膜上皮欠損創、電顕的酵素抗体法、活性化した keratocyte

Abstract

The implication of fibronectin in corneal wound healing has been revealed by *in vivo* experiments using immunofluorescence methods. However, the source of fibronectin, including its possible production by corneal cells, continues to be unclear. In the current study, corneal epithelial wounds were made in rabbit eyes by scalpel debridement of a 7.0mm. diameter disc demarcated in the central cornea by a trephine, and an electron microscopic immunoperoxidase technique was employed to clarify the origin of fibronectin during the wound healing process, particularly at the cellular level. Shortly after the epithelial wound, specific reaction products were detected within the cisternae of some of the rough-surfaced endoplasmic reticuli in the activated keratocytes through the full thickness of the stroma underlying the wounded site and its neighborhood. In the process of wound repair, not only the number of stromal fibroblasts showing fibronectin localization within the rough endoplasmic reticuli, but also the staining intensity increased. Therefore, it is feasible that fibronectin production in the cornea per se can play an important role during wound healing.(Acta Soc Ophthalmol Jpn 91 : 1164—1175, 1987)

Key words : Fibronectin, Corneal wound healing, Corneal epithelial scrape wound, Electron microscopic immunoperoxidase technique, Activated keratocyte

別刷請求先：010 秋田市本道1-1-1 秋田大学医学部眼科学教室 高橋 堅一

Reprint requests to: Ken-ichi Takahashi, M.D. Dept. of Ophthalmol., Akita Univ. School of Med.
1-1-1 Hondo, Akita 010, Japan

(昭和62年6月16日受付) (Accepted June 16, 1987)

I 緒 言

フィブロネクチン(Fibronectin; 以下, Fn とする)は還元時の単量体分子量が約23万の糖蛋白質であり, 動物細胞表面などに不溶性の形で, もしくは血漿を初めとする体液中に水溶性の形で存在している¹⁾, その生物学的機能は, 細胞の接着性促進・細胞の運動性増加・組織損傷の修復・細胞分化の調節・細網内皮系による異物除去作用の促進・癌細胞の正常細胞への還元及び癌転移の抑制など多岐にわたるものである事が知られており¹⁾²⁾, 細胞生物学・発生学・生化学・臨床医学を含む広い分野の重要な問題に関与している。

Fn の多様な機能の中で, 臨床上殊に注目されてきたのは創傷治癒との関連性についてであった。1981年 Grinnell ら³⁾はモルモットに作製した皮膚切創の治癒過程における Fn 動態を免疫蛍光抗体法にて検討した結果, Fn が受傷後早期にフィブリン塊に取り込まれる事及び肉芽組織の膠原線維に沿って存在する事を発見し, Fn は皮膚創傷治癒過程で創部に認められる主要な構成要素であろうとした。眼科領域でも Fn と角膜創傷治癒との係り合いが特に脚光を浴びており, 主として家兎を用い, 蛍光抗体法を利用した種々の創傷実験が行なわれてきた。1981年 Fujikawa ら⁴⁾は円刃刀で角膜上皮擦過創を作製し, Fn の推移を経時的に観察しているが, 露出した実質表面に早期から Fn が出現し, 受傷22時間後にはその上を上皮細胞が伸展し始め, 創傷治癒の完了と共に Fn が消失する事を明らかにした。Fn の起源について Fujikawa ら⁴⁾は, 受傷によって透過性の亢進した血管からの漏出が初期における主要な供給源であろうと推測しているが, 実質細胞による局所での生合成の可能性についても否定はしていない。Nishida ら⁵⁾は実験的に水疱性角膜症を発現させ, 内皮細胞の修復と Fn 動態との関連を明らかにしたが, その可能な源として輪部血管から放出された血漿 Fn 及び再生内皮細胞や病変部付近の活性化した実質細胞による産生を挙げている。Ohashi ら⁶⁾は角膜中央部に熱傷を加え, Fn の動態を検索した結果, 実質修復の目的で病変部へと遊走してきた実質細胞に伴うかのような Fn 特異蛍光の動きを認め, 活性化した keratocyte が Fn を供給するのではないかと考察している。

以上の家兎を使った in vivo での角膜創傷実験によって, Fn は組織の修復経過と密接に関連した動きを示す事が明白にされたが, Fn 供給源については角膜の

細胞による産生の可能性を含め必ずしも明瞭ではない。

従来, 正常ないし創傷角膜における Fn の存在や動態に関しては蛍光抗体法による研究が主体であった。蛍光抗体法は細胞組織の微細構造まで観察できず, 細胞の種類決定や鑑別が困難などの欠点を持っているので, 細胞内の抗原性物質局在を論ずるには問題があると思われる。先に著者⁷⁾は正常家兎角膜における Fn の局在を免疫電顕的に検索し, デスメ膜実質側に強い Fn の沈着を見出すと共に内皮細胞粗面小胞体にも反応産物と思われる所見を得たが, これは in vivo での Fn 産生細胞を示唆する興味深い知見であった。従ってこれまでも度々指摘されてきた⁸⁾⁹⁾様に, 細胞内を含め正確な局在の決定にあたっては免疫電顕的検討が必要かつ有用な手段と考えられる。そこで今回, 家兎に角膜上皮欠損創を作製し, 治癒過程で出現する Fn の由来を細胞レベルで検討する為, 電顕的酵素抗体法による観察を行なったので, その結果につき報告する。

II 実験方法

使用動物として, 体重2.0~3.0kg の成熟白色家兎を実験に供した。

1. 角膜上皮欠損創の作製

手術用顕微鏡下で角膜中央部に7.0mm 径の円形創をトレビンにて作製した後, 円刃刀を用い上皮組織を慎重に擦過した。創作製の30分・3時間・6時間・12時間・24時間・72時間後に眼摘し, 角膜組織の全層を4×2mm の短冊状に細切(図1), 既報⁷⁾の如くに PLP 固定と凍結組織包埋を実施した。クライオスタットで

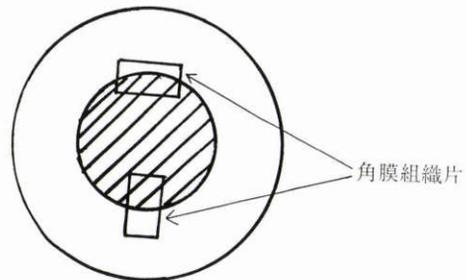


図1 眼摘後の角膜組織細切

フルオレスセインナトリウム点眼により上皮欠損部(斜線の範囲)を確認後, 欠損領域と残存した上皮組織との移行部全層を図の如く細切した。他に, intact な部や上皮欠損領域からの組織も検索した。受傷72時間後では欠損部の再被覆が完了していたので, 本来の創傷部中央から採取した組織片を用いた。

5 μ m厚の凍結切片を作製し、蛍光抗体法及び一部はヘマトキシリン・エオジン染色標本用とした。免疫電顕を目的として40 μ m厚の凍結組織切片も作製した。

2. 蛍光抗体法

多少の変更・修正はあるものの、既報⁷⁾に準拠して行なった。抗原抗体反応は、第1抗体として80倍希釈のIgG fraction goat anti-rabbit Fn (Cappel社)を使用し、第2抗体として fluorescein conjugated IgG fraction rabbit anti-goat IgG (Cappel社) 20倍希釈を用い、各々4 $^{\circ}$ C、12時間反応させる間接法で行なった。対照として、第1抗体の代わりに normal goat serum (Tago社)を使用した。

3. 電顕的酵素抗体法

具体的手技は既報⁷⁾とほぼ同様である。抗原抗体反応は直接法で行ない、50倍希釈の peroxidase (HRP) conjugated IgG fraction goat anti-rabbit Fn (Cappel社)を用いて4 $^{\circ}$ C、48時間反応させた。対照試験として、(1)抗Fn抗体の代わりに HRP conjugated goat IgG (Cappel社)を作用させたもの、(2)ブロック試験: IgG fraction goat anti-rabbit Fnを作用させた後、HRP conjugated IgG fraction goat anti-rabbit Fnと反応させたもの、を施行した。尚、LKB ミクロトームで作製した超薄切片の電顕観察は無染色で行なった。

III 観察結果

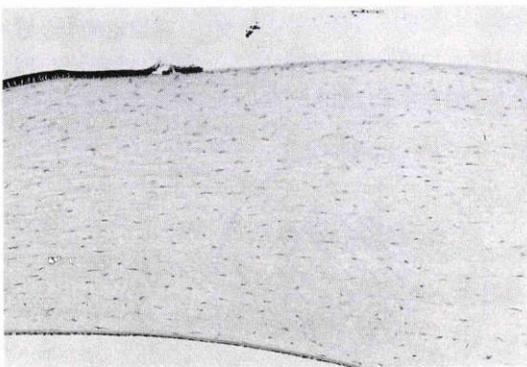
1. ヘマトキシリン・エオジン染色標本

受傷30分後の切片では創傷縁の上皮細胞層の高さが減少しており、一部表層細胞の剥脱が見られ、基底細胞は円柱状の形態を失いやや扁平化していた(図2-A, B)。この時点では未だ上皮細胞の伸展が見られなかった。創傷部及びその近傍の実質に浮腫を認めたが、膠原線維板の途絶・中断はなかった。keratocyte よりやや大きな楕円形の細胞が主として実質表層部に多数観察され、実質の中層や深部でも散見された(図2-B)。更に、小型で紡錘状ないし卵円形の細胞が極く少数ではあるが前部実質に認められた(図2-B)。

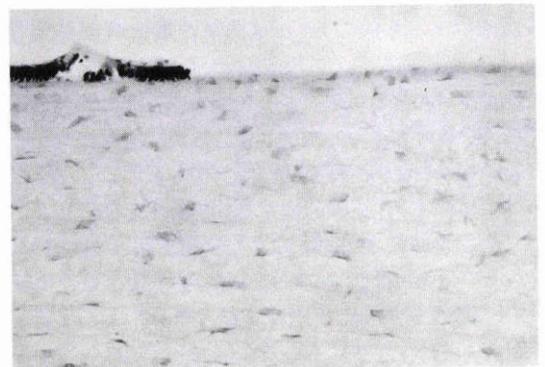
3時間後になると上皮組織の先端部は一層の扁平な細胞から構成された遊走上皮の形態を示す様になり、後方の上皮は2~3層であった。前部実質を中心として前述の大型並びに小型の細胞が認められ、殊に小型細胞の割合が増加している様であった。

6~24時間後には上皮の伸展が更に進行し、実質細胞の主体は小型細胞となり実質の全層にわたって認められた(図3-A, B)。実質の膨化も軽減し始めた。

72時間後になると上皮欠損部は扁平な1~3層の細胞で被覆され、実質には細長い keratocyte 的形態を呈する細胞が目立つ様になり(図4)、浮腫はほぼ消退し



A



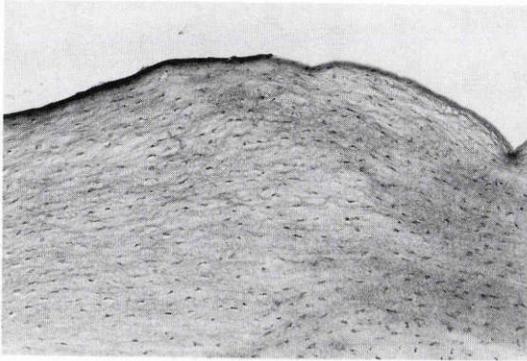
B

図2 受傷30分後

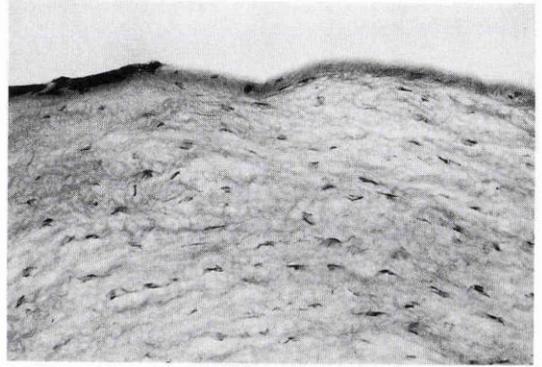
A: 創傷縁上皮細胞層の高さは幾分減少している。創傷部とその近傍の実質表層に、実質細胞の喪失は見られない。

B: Aの拡大写真である。創傷縁では一部表層細胞の剥脱と円柱状の形態を失いやや扁平化した基底細胞とが観察されるが、未だ遊走上皮の形態を呈していない。実質には keratocyte よりもやや大型で楕円形の細胞が多数認められ、卵円形ないし紡錘状の小型細胞も散見される。

(ヘマトキシリン・エオジン染色: A \times 25, B \times 64)



A



B

図3 受傷12時間後

A：受傷3時間後に始まった上皮の伸展は更に進行し，上皮欠損部が再被覆されつつある。

B：Aの拡大写真であるが，遊走上皮の先端端は一層の扁平な細胞から成り，実質には紡錘状あるいは卵円形の小型細胞が多数認められる。

(ヘマトキシリン・エオジン染色；A×25，B×64)

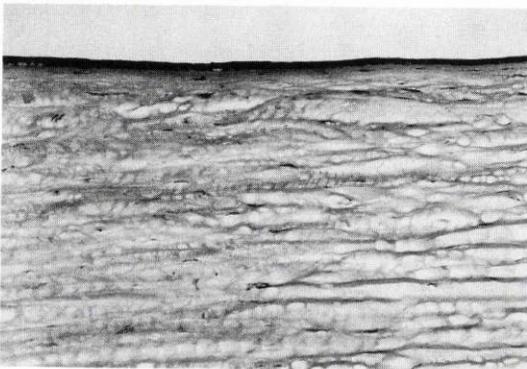


図4 受傷72時間後

この時期では上皮欠損部が1～3層の細胞により被覆され，実質には細長いkeratocyte的形態を呈する細胞が目立つ様になる。

(ヘマトキシリン・エオジン染色，×64)

た。

全観察期間を通じ実質細胞の密度は一定しており，細胞の喪失を認めなかった。

2. 蛍光抗体法

受傷3時間後の上皮欠損面には線状の微弱な特異蛍光が出現し(図5-A, B)，6～24時間と創傷治癒の進行につれこの蛍光が増強して行った(図6)。

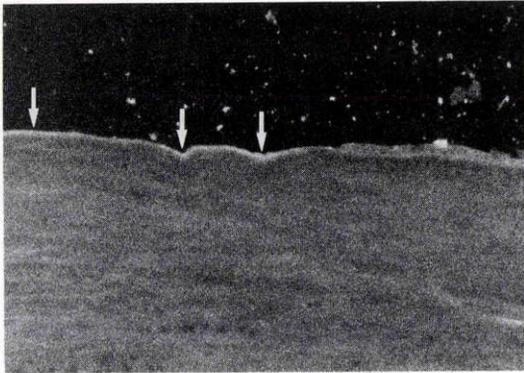
全経過を通じて上皮組織の最表層面に非特異的染色が認められ，時に細胞内でも見いだされた，実質の全層にわたり，膠原線維板に沿って走る繊細な毛髪状の

非特異的染色が認められた。全観察期間を通じてデスマ膜実質側に線状の特異蛍光が検出されたが，その染色強度に殆ど差はなく，一方デスマ膜の内皮側には非特異的な線状蛍光が観察された(図7-A, B, C)。

3. 電顕的酵素抗体法

免疫電顕上，上皮欠損領域・遊走上皮の基底膜領域(～実質表層部)・実質細胞粗面小胞体の内部並びに細胞周囲・デスマ膜実質側と内皮細胞粗面小胞体に特異的な反応産物が観察された。全経過を通じ，上皮細胞内やその細胞間隙には反応産物が認められなかった。

受傷30分後の創傷縁の上皮組織では desmosome が減少しており，創縁から約100 μ mの範囲の hemidesmosome は消失し，100～200 μ mの範囲でも hemidesmosome の明らかな減少を認めた。上皮下の基底膜領域に反応産物は観察されなかった(図8)。上皮欠損面には連続した lamina densa (basal lamina) が存在し，その所々に電子密度の高い顆粒状のペルオキシダーゼ陽性反応産物が沈着しており，直下の実質にも反応産物が散見された(図9-A, B)。創傷部とその近傍の実質における線維構造の保存は良好であり，膠原線維板間には多数の細胞突起を有する細長い keratocyte と共に，粗面小胞体・ゴルジ装置などの細胞内小器官に富み，時に核小体を認め，細胞突起の喪失ないし退縮した卵円形細胞が実質全層にわたり散在していた。この様な実質細胞の中で，一部の粗面小胞体内部に特異的な反応産物の弱い集積像が観察され(図10-A, B)，細



A



B

図5 蛍光抗体法(間接法)

A: 上皮伸展の始まった受傷3時間後に露出した実質表面で検出された弱い線状のFn抗原染色(矢印)

B: 第1抗体として normal goat serum を使用した対照試験

上皮欠損面に蛍光が観察されず、Aで示された染色は特異的なものである事が確認された。尚、上皮は強い非特異的蛍光を発している。

(A, B共に×100)

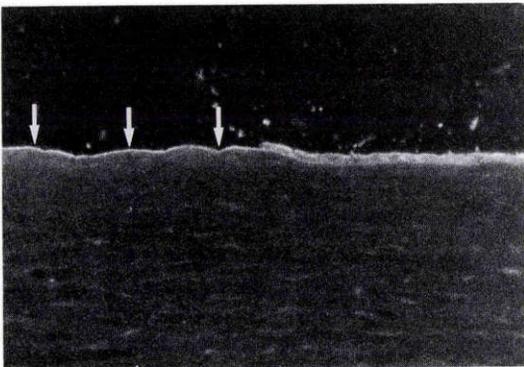


図6 蛍光抗体法

受傷12時間後の上皮欠損面に認められたFn特異蛍光(矢印)を示す。図5-Aと比べ、その染色強度は増強している。(×100)

胞周囲の実質にも反応産物の沈着を認めた(図11)。

前述した如く受傷3時間後には上皮の伸展が始まっており、遊走上皮の基底膜領域に特異的な反応産物が発見された(図12-A, B)。上皮欠損部の lamina densa 上に反応産物が線状に並んで沈着しており、前部実質にも反応産物が観察された(図13)。受傷30分後と比べ、粗面小胞体槽内部に反応産物の集積を示す実質細胞の数が増加していた。

受傷6~24時間後と創傷治癒の進行に伴って上皮欠損部の lamina densa 領域(図14)・遊走上皮の基底膜

領域(図15-A, B)・実質細胞粗面小胞体の槽内部(図16-A, B)における反応産物の染色強度が増強し、12~24時間後にピークに達した。この時期、大部分の実質細胞の拡張した粗面小胞体に反応産物が集積しており、細胞周囲にも強い沈着が認められた(図17)。

受傷72時間後には上皮欠損部の再被覆が完了していたが、hemidesmosomeの再生は始まっていなかった。この時点では、軽度な反応産物の沈着が実質表層部や一部の实質細胞粗面小胞体で認められるにすぎなかった(図18-A, B)。

以上の全観察期間において、実質細胞のゴルジ装置には反応産物の局在が判然とせず、反応産物を含んだ vesicle も確認できず、デスメ膜実質側での反応産物の染色強度にも殆ど変化が見られなかった(図19-A, B, C)。

IV 考 察

今回の実験において角膜上皮欠損創は機械的擦過により作製されたが、従来からの報告¹⁰⁾¹¹⁾と同様、欠損面に lamina densa が無傷のまま残存していた。受傷30分後の創縁部の上皮に、表層細胞の剥脱や基底細胞における円柱状形態の喪失による上皮細胞層の高さの減少・desmosomeの減少・hemidesmosomeの消失ないし減少が認められた。受傷直後に創縁の上皮がこの様な形態学的変化を起こす事は既に指摘されてお

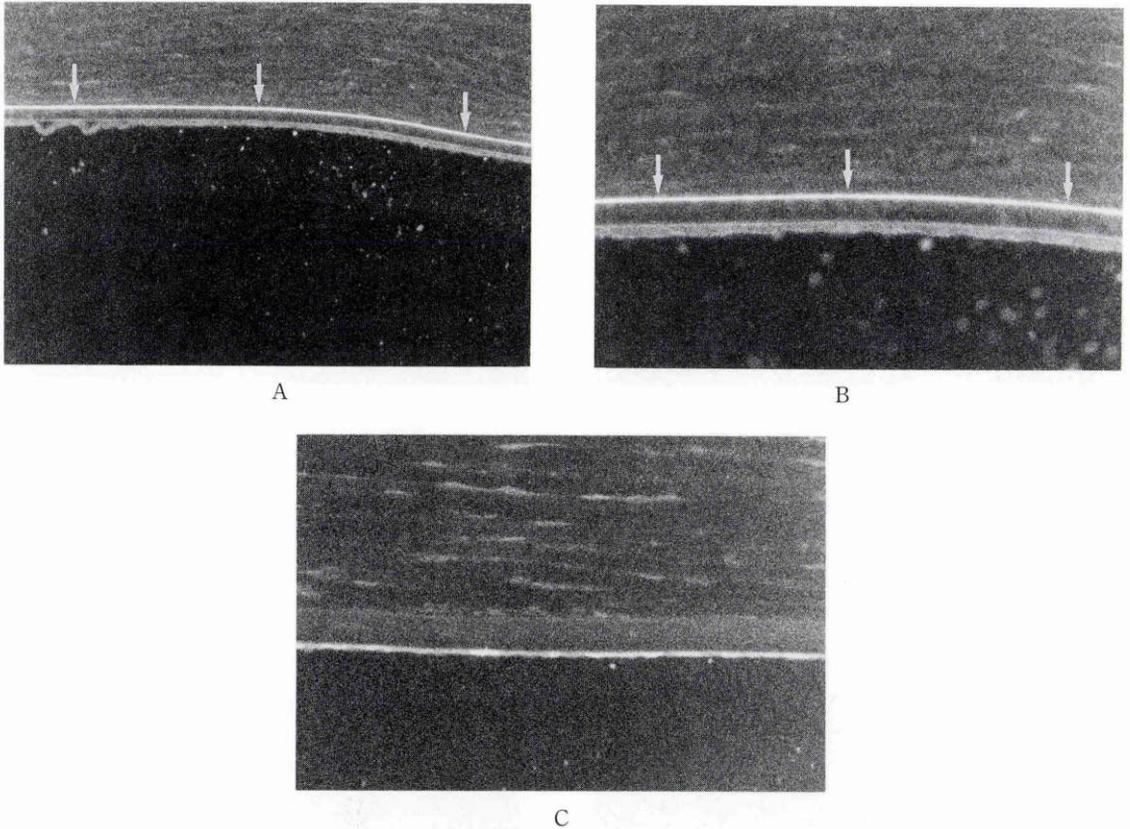


図7 蛍光抗体法

Aは受傷3時間後、Bは受傷12時間後のデスマ膜に観察された線状蛍光を示しており、Cは第1抗体として normal goat serum を用いたコントロールである。A、Bにおいて、デスマ膜実質側に認められる特異的染色（矢印）の強さには殆ど差がない。（A×100；B、C×200）

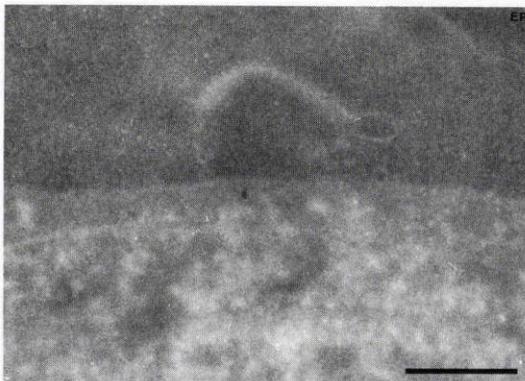


図8 電顕酵素抗体法（直接法）

受傷30分後
創傷縁上皮組織の基底膜領域（～前部実質）には反応産物が認められない。バーは0.5 μ mを示し、以下の電顕写真においても同様である。（EP 上皮細胞）

り¹¹⁾、遊走上皮への変態を反映した所見と思われるが、伸展を開始するまでの期間の創傷治癒に占める重要性が窺われる。受傷3時間後に上皮の伸展が始まり、その先端端は一層の扁平な細胞から構成されていたが、これまでの報告¹⁰⁾¹¹⁾と同様に desmosome の減少・hemidesmosome の消失が観察された。先端端の上皮細胞の起源については未だ定説がないが、今回の観察でも示された様に zonula occludens の認められない事及び減少してはいるものの desmosome が存在する事から、翼細胞や基底細胞であろうと推測する研究者¹¹⁾もいる。

免疫組織化学的に観察した上皮欠損領域や遊走上皮の基底膜領域（～前部実質）における Fn 動態をまとめると以下の様になる。すなわち今回の免疫電顕的検索の結果、受傷30分後の上皮欠損領域で初めて Fn が散

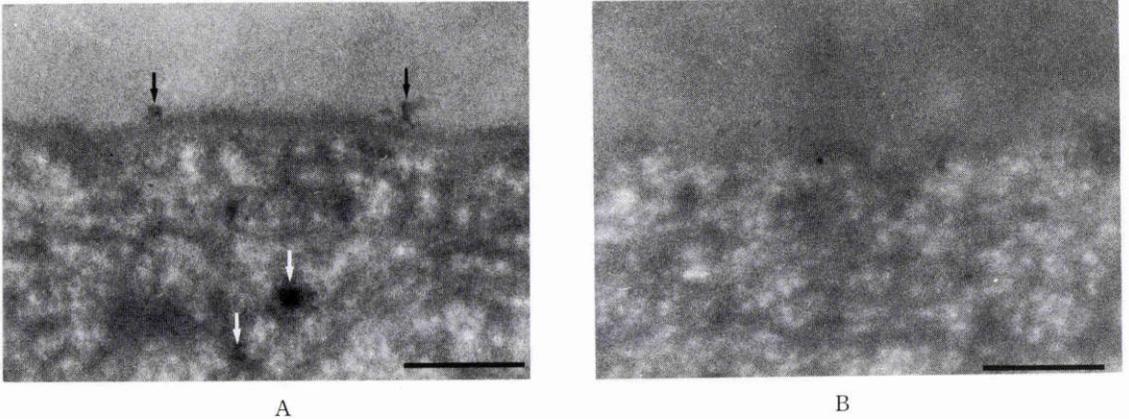


図9 電顕酵素抗体法

受傷30分後

A: 上皮欠損部の lamina densa 上(黒矢印)及び実質表層部(白矢印)に、高電子密度なペルオキシダーゼ陽性反応産物の沈着が散見される。

B: ブロック試験, 上皮欠損領域に反応産物が観察されず, A で示された反応産物は特異的なものである事が確認できた。

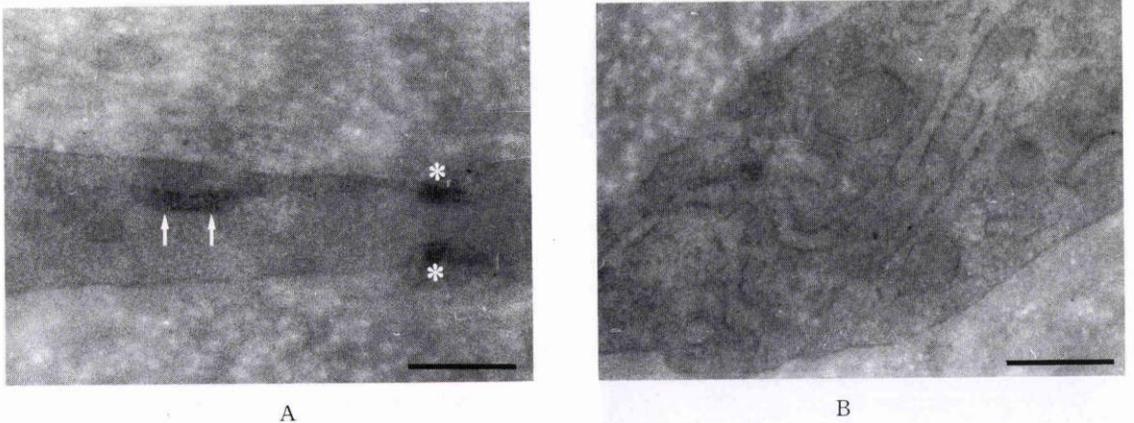


図10 電顕酵素抗体法

受傷30分後, 創傷部の実質表層

A: 実質細胞粗面小胞体の槽内部に軽度な顆粒状の特異的の反応産物が集積しており(矢印), また細胞膜と接する実質にも反応産物が見られる(星印)。

B: HRP conjugated goat IgG を使用した対照試験, 実質細胞の粗面小胞体に A で見た様な顆粒状物質が観察されない。

在性に検出され, 上皮の伸展が開始された3時間後では遊走上皮の基底膜領域に Fn を認めると共に, 露出した実質表面に Fn が線状に沈着する様になり, 治癒過程の進行に伴い染色強度は増強したが, 上皮による再被覆の完了した72時間後では実質表層に軽微な反応産物の沈着を見るにすぎなかった。蛍光抗体法でも, 受傷3時間後の上皮欠損面に初めて Fn が検出された点を除くと, Fn 蛍光の推移は免疫電顕での結果とよく

一致していた。今回の観察結果は蛍光抗体法を用いて同様な実験を行なった Fujikawa ら⁴⁾のそれとよく符号しており, Fn と組織損傷の修復との緊密な関連性が再認識された。

組織学的, 組織化学的及び放射性同位元素を利用した研究によって, 角膜実質創傷後早期から創部周囲の keratocyte に細胞突起の退縮傾向・細胞質の過形成・核小体出現などの変化が顕れ (hypertrophied cell),

創部に向かって遊走する間に速やかに fibroblast へと移行する事¹²⁾、慎重に作製した上皮擦過創では実質細胞の喪失や代謝障害を認めず、受傷後直ちに前部実質の keratocyte が実質障害の場合と同じ形態学的変化を示し、fibroblast へと変態する事¹³⁾、などが既に知られている。これらの実験から、keratocyte は角膜が損傷を受けた時に初めて活性化する一種の予備細胞である事が明らかとなった。今回の上皮障害実験においても、受傷直後から創傷部とその近傍の keratocyte は同様な形態学的変化を示し始め、創傷治癒の進行に伴い

fibroblast 化した細胞の主体となる事が確認されたが、従来の報告¹³⁾と異なり keratocyte の変化は実質表層部に留まらず実質全層に及ぶものである事が明らかとされた。同時に、このような活性化した keratocyte は受傷後早期から Fn を産生する事が免疫電顕的検索によって立証された。光顕での観察から、通常見る keratocyte より幾分大型な楕円形細胞 (hypertrophied cell¹²⁾に相当すると思われる)が多数認められ、小型で卵円形ないし紡錘状の細胞 (fibroblast¹²⁾)も散見された。この変化は前部実質が中心であったが実質の中層や深部にも認められ、治癒過程の進行と共に fibroblast が多数を占めるに至った。これらの細胞を電顕的に検索すると、細胞突起の退縮傾向が見られ、粗面小胞体・ゴルジ装置などの細胞内小器官に富み、しばしば核小体を有する細胞として観察され、活発な蛋白合成を反映する像であった。事実、免疫電顕上、受傷30分後から一部実質細胞の粗面小胞体槽内部に軽度な特異的反応産物の集積が認められ、細胞周囲の実質でも Fn の沈着が見られた。12~24時間後では大部分の fibroblast 粗面小胞体に Fn の局在が観察され、粗面小胞体及び細胞周囲における反応産物の染色強度もピークに達した。上皮による再被覆が完了した72時間後には粗面小胞体内部に Fn の局在を示す fibroblast がわずかししか認められず、その染色性も微弱であった。尚、蛍光抗体法でも膠原線維板間の実質細胞に相当すると思われる毛髪状蛍光を検出したが、同様な染色は対照

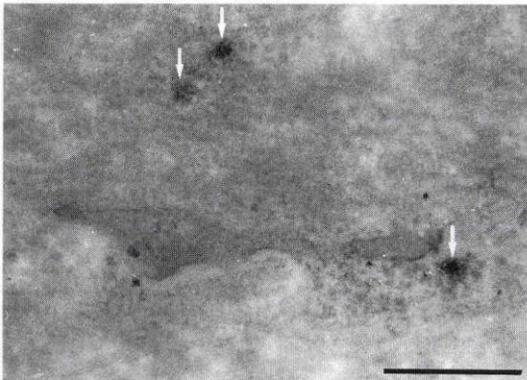
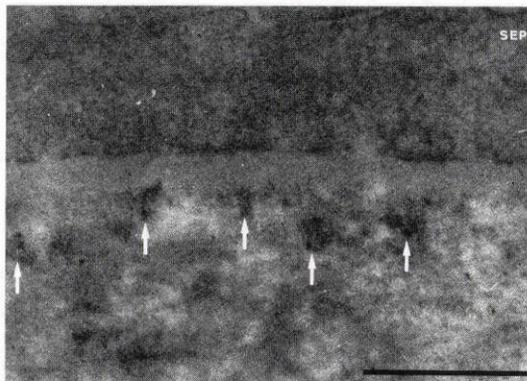
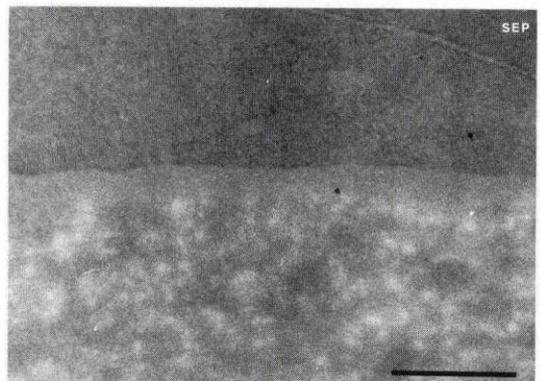


図11 電顕酵素抗体法

受傷30分後、創傷部の実質深層
実質細胞周囲の実質で発見された陽性反応産物の沈着像 (矢印)



A



B

図12 電顕酵素抗体法

受傷3時間後

A: 遊走上皮の基底膜領域に特異的反応産物が沈着している (矢印)。(SEP 遊走上皮細胞)

B: HRP conjugated goat IgG を用いたコントロール。A で観察された様な反応産物を認めない。

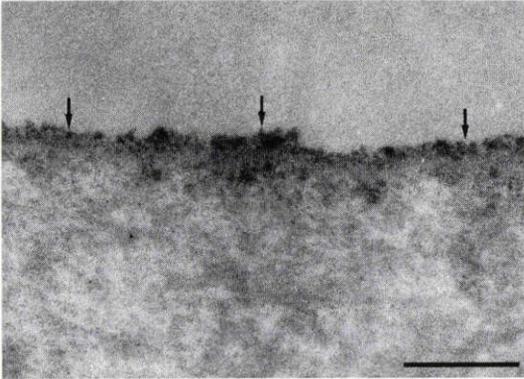


図13 電顕酵素抗体法

受傷3時間後

露出した実質表面に陽性反応産物が線状に並んで沈着しており(矢印), 前部実質にも特異的の反応産物が見られる。

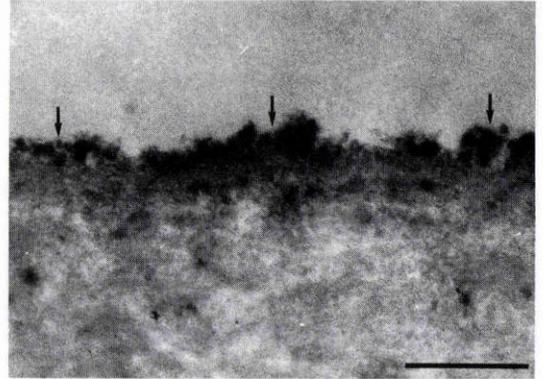
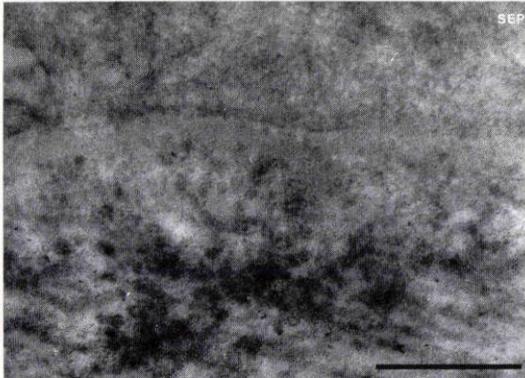


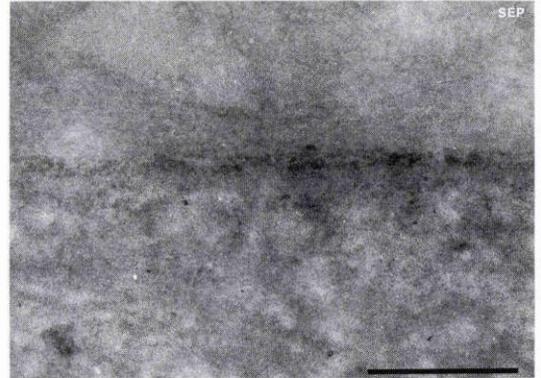
図14 電顕酵素抗体法

受傷24時間後

上皮欠損部の lamina densa 上(矢印)及び直下の実質に認められた特異的の反応産物の沈着。図13と比較し、反応産物の染色強度が著しく増強している。



A



B

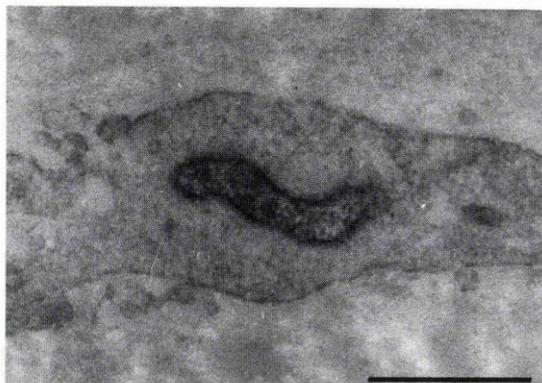
図15 電顕酵素抗体法

A: 受傷12時間後, 遊走上皮細胞下の実質表層部で観察された特異的の反応産物の強い沈着

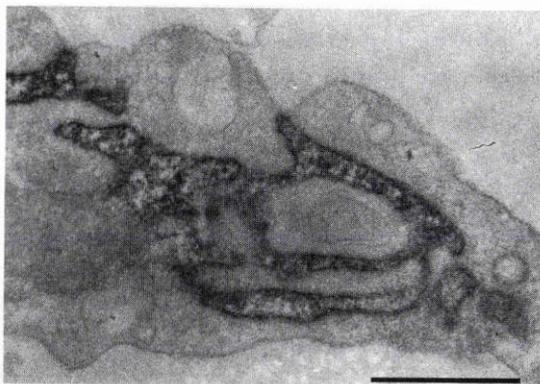
B: 受傷24時間後, 遊走上皮の lamina densa 部にも陽性反応産物が検出される。

でも見い出された。fibroblast 周囲の実質に認められた Fn は細胞から分泌されたものであろうと推測されたが, 蛋白質に糖を付加する機能を持つとされるゴルジ装置に Fn の局在が明瞭でなく, 反応産物を含んだ vesicle なども確認し得ず, Fn 分泌機構の形態学的証明はできなかった。今回免疫電顕に使用した標識抗体は IgG 留分であったが, 細胞内小器官レベルでのより良好な抗原局在の観察の為に, 抗体 IgG 分子の大きさを小さくして F(ab')₂ ないし Fab' とする試みも必要かと思われる。粗面小胞体は外分泌性蛋白質生合成の場である事が承認されている。実質細胞粗面小胞体

認められた今回の所見は, 粗面小胞体内部での Fn の消長と前述した上皮欠損領域や遊走上皮の基底膜領域で観察された Fn 動態とが時間的によく相関する点, 並びに培養した角膜実質(実質細胞)が Fn を合成できるという以前の実験結果^{14)~16)}に鑑み, 上皮障害後早期から創傷部及びその近傍の活性化した keratocyte が実質全層にわたって Fn を産生し, 上皮欠損領域へと供給して上皮伸展の為に暫定的基質形成に深く関与している事を示唆するものであろう。従来の角膜創傷実験において, Fn 供給源として実質細胞などと共に輪部血管の関与が想定されてきた⁹⁾。今回の実験では輪部



A



B

図16 電顕酵素抗体法

受傷24時間後

Aは上皮欠損部の実質表層，Bは実質深層に認められた実質細胞の粗面小胞体槽内部で観察される特異的の反応産物の集積像，図10-Aと比べ，染色強度の増強が顕著である。

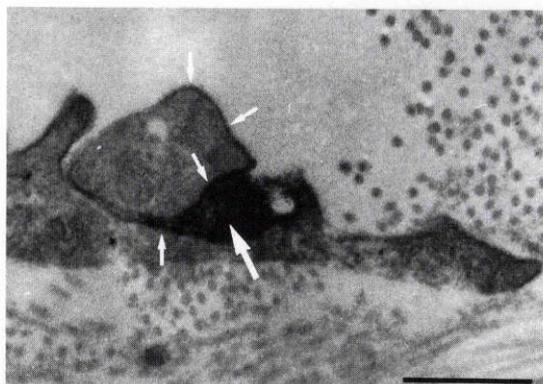
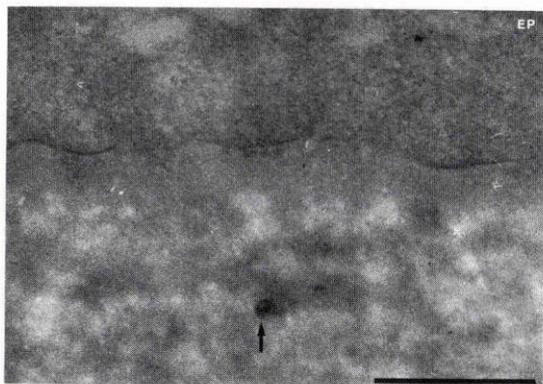


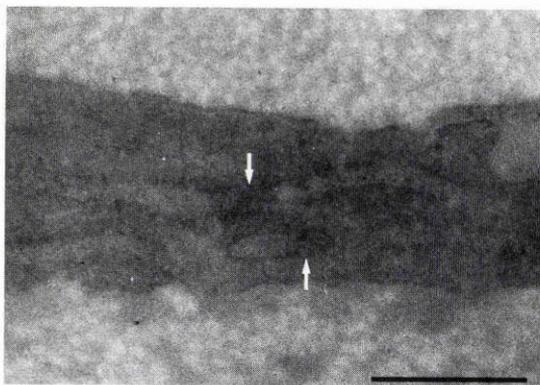
図17 電顕酵素抗体法

受傷24時間後

上皮欠損部の実質深層で発見された実質細胞周囲の強い陽性反応産物の沈着(大矢印)。この反応産物を取り巻く細胞膜表面にもペルオキシダーゼ陽性産物が見られる(小矢印)。



A



B

図18 電顕酵素抗体法

受傷72時間後

上皮欠損部の再被覆が完了したこの時期では，軽度な特異的の反応産物の沈着(矢印)が実質表層部(A)や一部の实質細胞粗面小胞体(B)で認められるにすぎない。

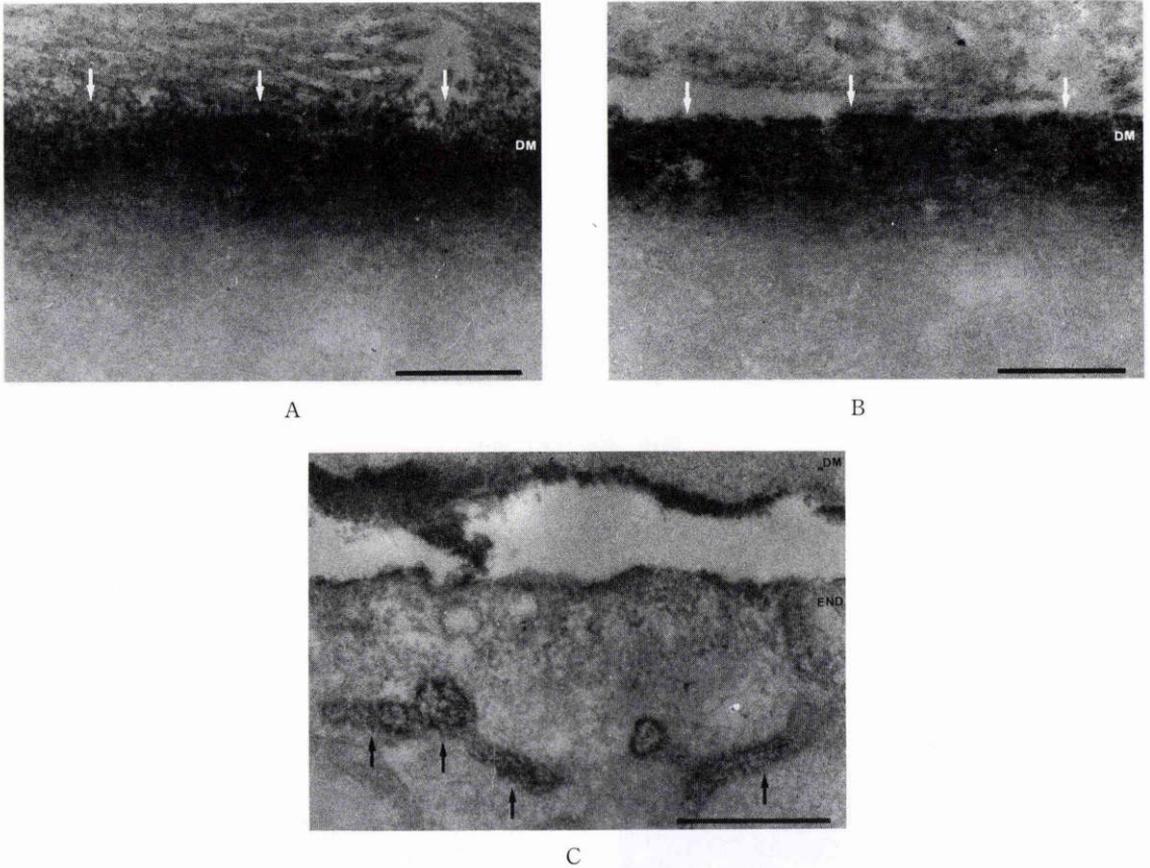


図19 電顕酵素抗体法

Aは受傷30分後、Bは72時間後のデスマ膜実質側に観察された陽性反応産物(矢印)であるが、染色強度には殆ど差を認めない。Cは受傷24時間後の内皮細胞粗面小胞体に発見された特異的反應産物(矢印)である。内皮細胞はデスマ膜から剝離しており、その細胞膜とデスマ膜内皮側とに強い非特異的沈着が見られる。(DM デスマ膜、END 角膜内皮細胞)

領域の観察を行っていないので、これについては否定も肯定もできない。ただ、受傷30分後という早期から実質細胞がFn産生を開始した事実は、創局所におけるFn合成が角膜創傷治癒過程で出現するFnの重要な供給源の1つであろう事を暗示している。

今回の実験では上皮細胞内にFnの局在を確認できなかったが、単離した細胞を用いたin vitroの系で角膜上皮細胞のFnを合成できる事が知られている¹⁴⁾。加えて、角膜から上皮や内皮を剝離し、上皮+実質・実質・実質+内皮を培養してFn産生量の比較検討を行なった実験では、産生されたFnの量は[実質+内皮]が最も多く、最も少ないのが[上皮+実質]であった事から、上皮細胞のFn産生能は低いと推定されて

いる¹⁵⁾。従って角膜上皮細胞によるFn産生は、今回免疫電顕に用いた抗Fn抗体の感度では検出できないほど微量であったと想像される。

角膜内皮細胞がFnを合成する事は種々の動物を用いた培養実験によって明らかとされており^{14)17)~20)}、先に著者⁷⁾も正常家兎角膜におけるFnの局在を免疫電顕的に検討し、デスマ膜実質側に認められたFnの産生源が内皮細胞である事を強く示唆する観察結果を報告した。今回の実験において、デスマ膜の実質側で観察された特異的反應産物の染色強度には全経過を通じ殆ど変化が見られず、内皮細胞によるFn産生が高まっている事を示す免疫組織化学的根拠は得られなかったため、角膜内皮組織が上皮障害治癒過程に直接

関係しているとは思われなかった。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲をいただきました櫻木章三教授に感謝致します。また、種々の御協力をいただきました小関 武講師、香山久江氏に感謝致します。

本論文の要旨は、第91回日本眼科学会総会(京都市)で報告した。

文 献

- 1) 林 正男, 平野英保: フィブロネクチンの構造と機能—ドメイン構造・遺伝子構造を中心に—。蛋白質・核酸・酵素 28: 169—181, 1983.
- 2) 米増國雄, 佐々木隆子, 中西 彰: フィブロネクチン (Fibronectin) と炎症。Minophagen Medical Review 30: 121—135, 1985.
- 3) Grinnell F, Billingham RE, Burgess L: Distribution of fibronectin during wound healing in vivo. J Invest Dermatol 76: 181—189, 1981.
- 4) Fujikawa LS, Foster CS, Harrist TJ, et al: Fibronectin in healing rabbit corneal wounds. Lab Invest 45: 120—129, 1981.
- 5) Nishida T, Ohashi Y, Inoue Y, et al: Dynamics of fibronectin in corneal wound healing: Immunohistochemical study of experimental bullous keratopathy in rabbits. Cornea 1: 311—317, 1982.
- 6) Ohashi Y, Nakagawa S, Nishida T, et al: Appearance of fibronectin in rabbit cornea after thermal burn. Jpn J Ophthalmol 27: 547—555, 1983.
- 7) 高橋堅一: 正常家兎角膜におけるフィブロネクチンの局在について—免疫電顕的検討—。眼紀 37: 1372—1379, 1986.
- 8) 眞鍋禮三, 西田輝夫: フィブロネクチン (Fibronectin)。眼紀 33: 2136—2142, 1982.
- 9) 眞鍋禮三, 西田輝夫, 大橋裕一他: 角膜上皮障害に対する新しい治療の試み—フィブロネクチンの基礎と臨床—。日眼 88: 401—413, 1984.
- 10) Fujikawa LS, Foster CS, Gipson IK, et al: Basement membrane components in healing rabbit corneal epithelial wounds: Immunofluorescence and ultrastructural studies. J Cell Biol 98: 128—138, 1984.
- 11) Crosson CE, Klyce SD, Beuerman RW: Epithelial wound closure in the rabbit cornea:

A biphasic process. Invest Ophthalmol Vis Sci 27: 464—473, 1986.

- 12) Kitano S, Goldman JN: Cytologic and histochemical changes in corneal wound repair. Arch Ophthalmol 76: 345—354, 1966.
- 13) Dohlman CH, Gasset AR, Rose J: The effect of the absence of corneal epithelium or endothelium on the stromal keratocytes. Invest Ophthalmol 7: 520—534, 1968.
- 14) Fujikawa LS, Lee RE, Vastine DW, et al: Fibronectin, laminin, type IV collagen and bullous pemphigoid antigen deposition by rabbit corneal cells in tissue culture. ARVO Abstract Invest Ophthalmol Vis Sci 25(Suppl): 72, 1984.
- 15) 田中 均, 西田輝夫: 角膜に於けるフィブロネクチン産生細胞。日眼 90: 297—300, 1986.
- 16) 福田昌彦, 八木純平, 安本京子他: 培養家兎角膜実質細胞におけるフィブロネクチンとアクチンの局在とその相互関係について。日眼 90: 1506—1513, 1986.
- 17) Zetter BR, Martin GR, Birdwell CR, et al: Role of the high-molecular-weight glycoprotein in cellular morphology, adhesion, and differentiation. Ann NY Acad Sci 312: 299—316, 1978.
- 18) Goldminz D, Vlodavsky I, Johnson LK, et al: Contact inhibition and regulation of endocytosis in the corneal endothelium: Correlation with a restricted surface receptor lateral mobility and the appearance of a fibronectin meshwork. Exp Eye Res 29: 331—351, 1979.
- 19) Gospodarowicz D, Greenburg G, Vlodavsky I, et al: The identification and localization of fibronectin in cultured corneal endothelial cells: Cell surface polarity and physiological implications. Exp Eye Res 29: 485—509, 1979.
- 20) Gospodarowicz D, Greenburg G, Foidart JM, et al: The production and localization of laminin in cultured vascular and corneal endothelial cells. J Cell Physiol 107: 171—183, 1981.

(第91回日眼総会原著)