

## 培養網膜色素上皮細胞とフィブロネクチンについて

## 3. 光凝固による治癒過程でのフィブロネクチン産生 (図3)

山川 良治・吉村 長久・岡田 守生  
 浅山 邦夫・小林 博・松村 美代 (京都大学医学部眼科学教室)  
 白川 弘泰・荻野 誠周 (眼細胞生物学研究室)

## Fibronectin in Cultured Chick Retinal Pigment Epithelial Cells

## 3. The Production of Fibronectin after Laser Burn

Ryoji Yamakawa, Nagahisa Yoshimura, Morio Okada,  
 Kunio Asayama, Hiroshi Kobayashi, Miyo Matsumura,  
 Hiroyasu Shirakawa, Nobuchika Ogino

*Department of Ophthalmology, Kyoto University Faculty of Medicine*

## 要 約

単層となった培養網膜色素上皮細胞に光凝固を行い、フィブロネクチンの動態と細胞の修復過程を調べた。フィブロネクチンは光凝固2時間後には出現し、3日目まで染色像が見られたが、次第に減少した。一方形態的にみると細胞の修復は7日目でも十分でなく、14日間要した。これらのことより、フィブロネクチンは色素上皮再生の初期にその役割を演じていると考えられた。(日眼 91:409-414, 1987)

キーワード：培養網膜色素上皮細胞，フィブロネクチン，光凝固，組織再生

## Abstract

Argon laser photocoagulation was performed in confluent monolayered retinal pigment epithelial cells (RPE). The intense fibrillar network pattern of fibronectin (FN) was visualized on the laser burn area after 2 hours by indirect immunofluorescence. This fibronectin pattern was maintained for several days. By scanning electronmicroscopy, it was revealed that it took two weeks for the complete regeneration of RPE, and at this time the immunostaining of FN was very faint. FN appeared before the beginning of morphological repair and disappeared before its completion. FN was revealed to be related to the regeneration of RPE at an early stage. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 91: 409-414, 1987)

Key words: Retinal pigment epithelial cells, Fibronectin, Laser burn, Tissue regeneration

## I 緒 言

眼科領域では角膜の創傷治癒過程にフィブロネクチンが関与していることが注目されている<sup>1)</sup>。それでは光凝固等による網膜の損傷に対してもフィブロネクチンは何らかの役割をもつてであろうか。既報<sup>2)</sup>の如く網膜色素上皮細胞がフィブロネクチンを合成する事実か

らもそれは十分考えられる。しかし、ウサギ網膜に光凝固をしてフィブロネクチンの動態を調べた西川らの報告<sup>3)</sup>によると網膜下にはフィブロネクチンが出現するが網膜にはフィブロネクチンは出現しないと述べている。そしてこれらはおそらく脈絡膜の血漿成分が漏出してこるためと彼らは考えている。

一方単層となった培養網膜色素上皮細胞は Turk-

別刷請求先：606 京都市左京区聖護院川原町53 京都大学医学部眼科学教室 山川 良治

Reprint requests to: Ryoji Yamakawa, M.D. Dept. of Ophthalmol., Faculty of Med., Kyoto Univ.

53 Shogoinkawara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan

(昭和61年9月11日受付)(Accepted September 11, 1986.)

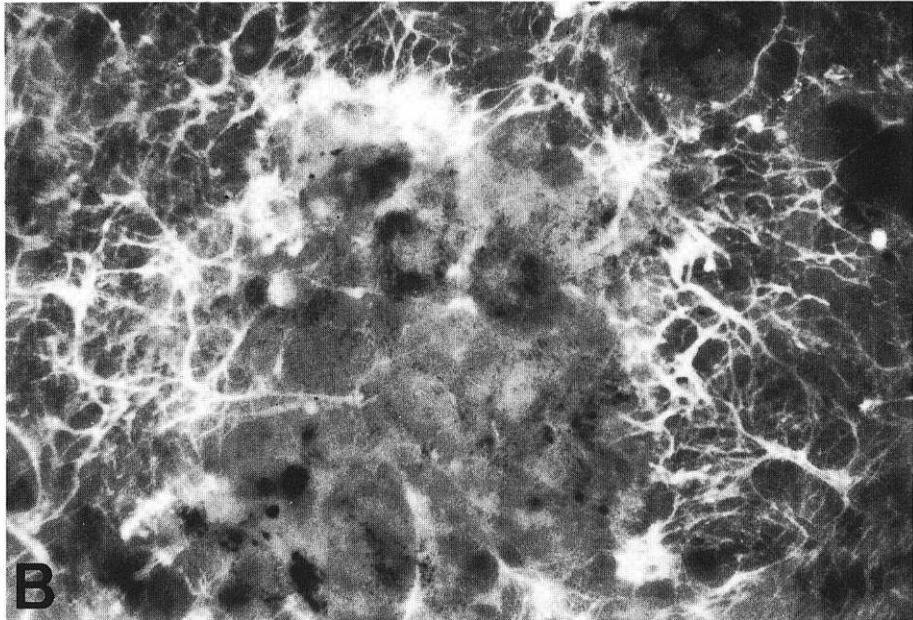
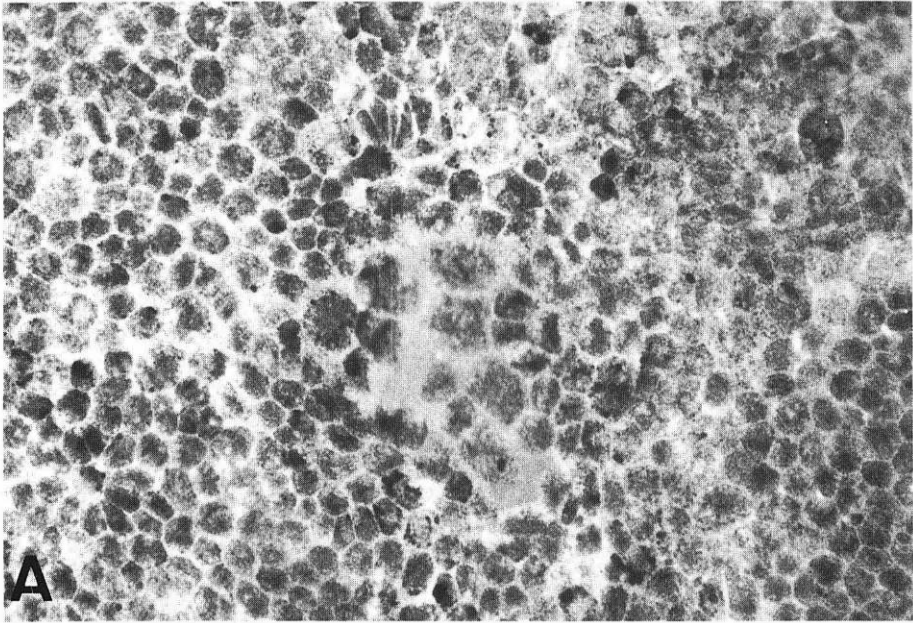


図1 光凝固後のフィブロネクチンの間接蛍光抗体像

- A. 光凝固直後でフィブロネクチンの染色像に変化がない、原倍率66倍  
B. 光凝固2時間後で光凝固部を取り囲むようにフィブロネクチンの染色像が見られる、原倍率132倍

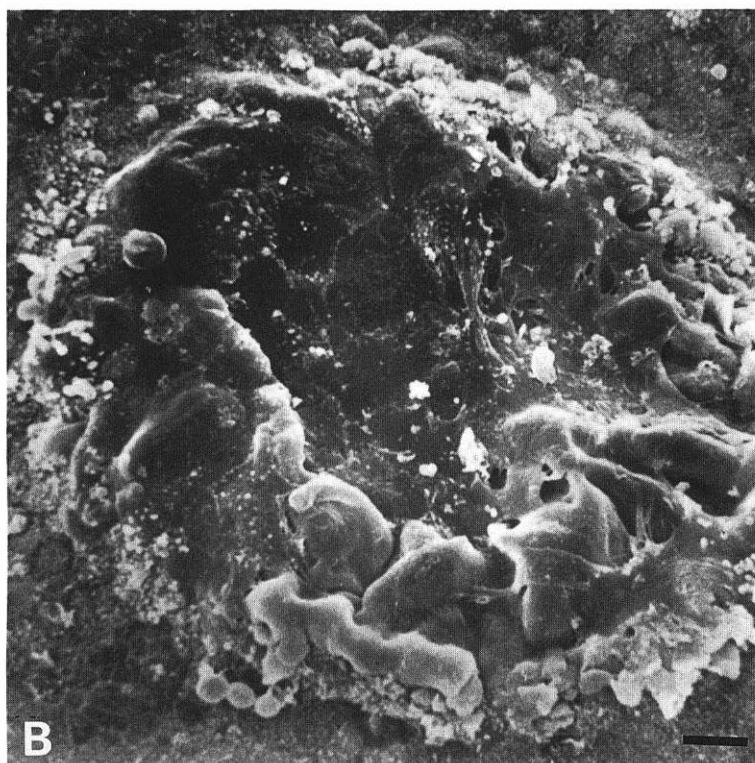
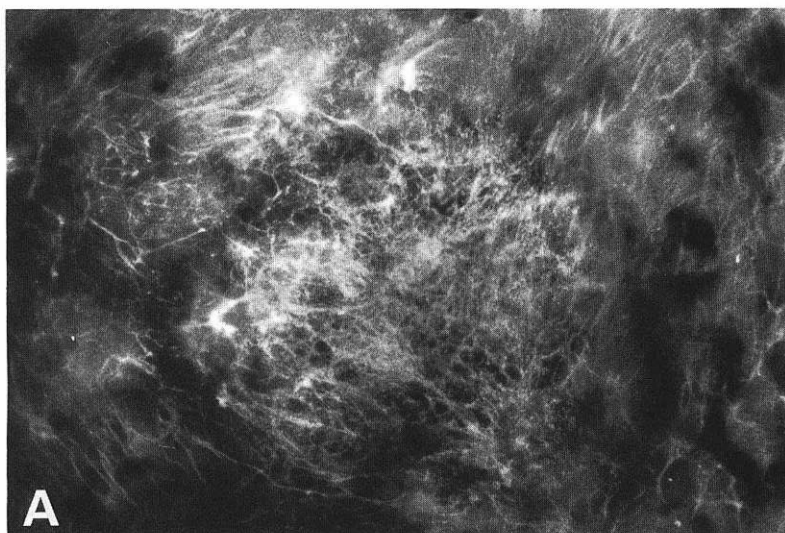


図2 光凝固後1日目のフィブロネクチンの間接蛍光抗体像と走査型電子顕微鏡像  
A. 光凝固部を覆うようにフィブロネクチンの染色像が見られる, 原倍率132倍  
B. 同時期の走査型電子顕微鏡像, 細胞は全く修復されていない, 原倍率990倍  
バー: 10 $\mu$ m

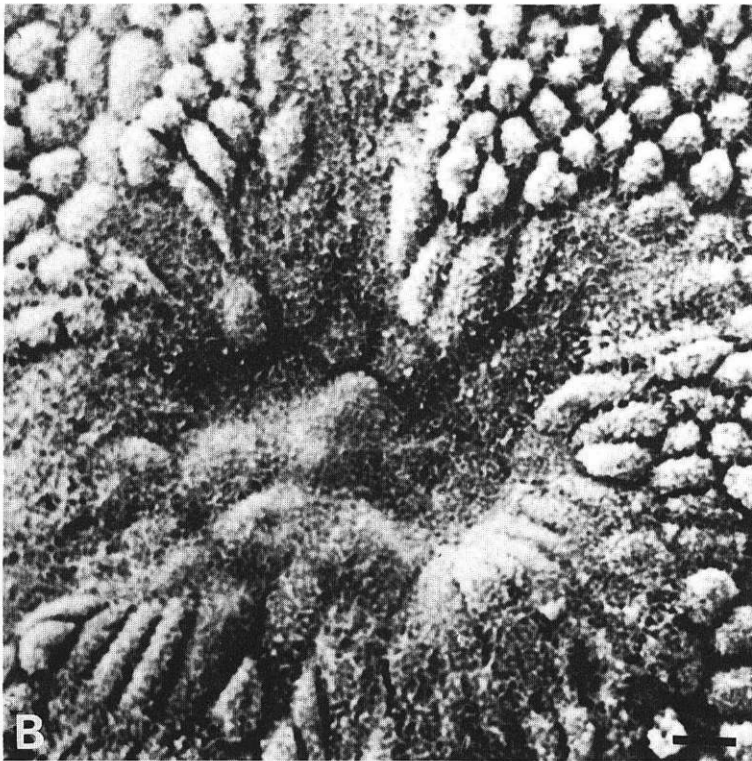
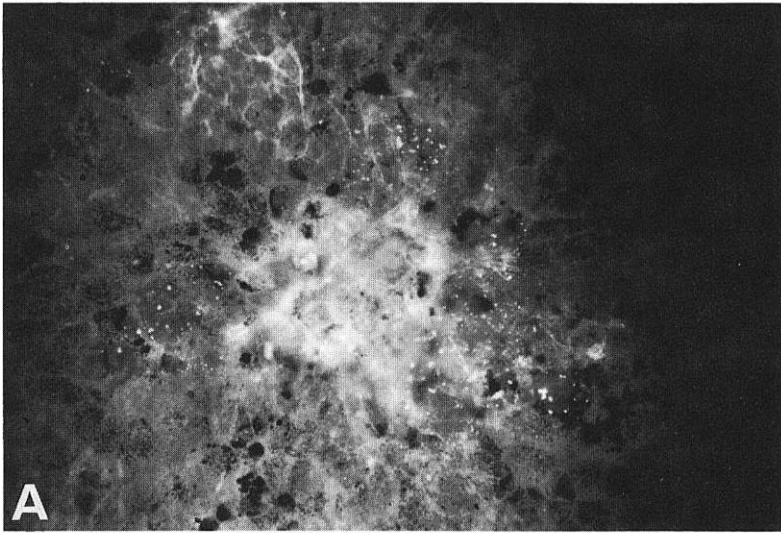


図3 光凝固後7日目のフィブロネクチンの間接蛍光抗体像と走査電子顕微鏡像  
A. フィブロネクチンの染色像は減弱している。原倍率66倍  
B. 同時期の走査型電子顕微鏡像。細胞は修復されているが完全ではない。原倍率990倍 バー：10 $\mu$ m

senら<sup>4)</sup>が述べているように *in vivo* と極めて近い状態であるといわれている。そこでこの単層となった培養網膜色素上皮細胞を一つのモデルとして、光凝固を行い色素上皮の創傷からの治癒過程をそのフィブロネクチンがどのような役割を持つかしらべてみた。

## II 実験方法及び材料

### 1. 実験材料

ウシ胎児血清フィブロネクチンと交叉反応しない抗フィブロネクチン抗体は前報と同じ方法で作成した<sup>2)</sup>。二次抗体として、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識ウサギ抗ヤギ IgG は Miles-Yeda Ltd. (Rehovot, Israel) のを使用した。他の試薬は市販の特級指定のものを使用した。

### 2. 網膜色素上皮細胞の培養

網膜色素上皮細胞は林らの方法<sup>5)</sup>で培養した。

### 3. 光凝固の方法

カバーガラス上に細胞を培養し confluent になった時期に Coherent 社製 アルゴンレーザー装置にて、0.25watt, 0.02秒, 80 $\mu$ m spot の凝固を約100発おこなった。そして、2時間後、4時間後、1日目、3日目、7日目、14日目に間接蛍光抗体法によるフィブロネクチンの染色像と、同時に走査型電子顕微鏡で形態の変化を観察した。

### 4. 間接蛍光抗体法

細胞を3.5%ホルムアルデヒドにより室温で20分間固定後、0.2% Triton X-100で侵漬して細胞膜の透過性を上昇せしめた後、50倍希釈した抗フィブロネクチン抗体を1時間細胞培養用インキュベーター内で反応させた。次いで細胞を洗浄後、16倍希釈した FITC 標識二次抗体を同じ条件で45分間反応させた。

### 5. 走査電子顕微鏡

細胞を2.5%グルタルアルデヒドに固定後、アルコール系列で脱水し酢酸イソアミルに置換し、日立臨界面乾燥装置 HCP-2で液化二酸化炭素を用いて臨界面乾燥し、エイコーエンジニアリング社イオンコーターIB-2型にて金蒸着を行い、日立S-430走査型電子顕微鏡を用いて観察した。

## III 結果

光凝固直後では、図1Aのように間接蛍光抗体法ではフィブロネクチンの染色像には変化がなかった。しかし、光凝固2時間後にはすでに周辺部からフィブロネクチンの染色像が光凝固部を取り囲むように生じて

きていた(図1B)。そして1日目には図2Aのように光凝固部を覆うようにフィブロネクチンの染色像がみられた。しかしこの時期には走査型電子顕微鏡像では組織の修復はまだ始まっていなかった(図2B)。フィブロネクチンの染色像は大体3日目まで続くが7日目になると、フィブロネクチンの染色像はほとんど消失してきていた(図3A)。しかし、この時期にも図3Bのように細胞の再生はまだ完全には行われていなかった。走査電子顕微鏡では14日目にみると細胞はほぼ再生していた。

## IV 考 按

光凝固による網膜の損傷治癒においては、色素上皮細胞の再生が重要な役割を担っているのは周知のとおりである<sup>6)~8)</sup>。しかし、その再生のメカニズムを知るうえで網膜の光凝固からの治癒過程を観察するのに、西川ら<sup>3)</sup>のように *in vivo* で行うと個々の細胞の状態がつかめないと血液成分の混入の問題がある。そこで、今回の実験では色素上皮を一層の細胞として取り出し、純粋に色素上皮の再生を観察した。前回報告したように<sup>9)</sup>ニワトリ胚培養網膜色素上皮細胞は十分分化した状態では基底膜にしかフィブロネクチンは存在せず、*in vivo* と極めて似通っている。また、培養細胞では必ず仔牛血清を添加するために、仔牛血清中のフィブロネクチンとの交叉反応が無視できないが、前回報告した<sup>2)</sup>ウシ血清中のフィブロネクチンと交叉反応しない特異抗体を使用したので培養網膜色素上皮細胞自ら合成したフィブロネクチンの動態を調べたといえる。おそらくフィブロネクチンは光凝固周辺部の細胞から合成されたものであろう。

今回の実験では、フィブロネクチンは形態的修復が行われる以前に生じ、形態的修復が完了する前には消失している。一般に組織の修復には4つの段階があるとされている<sup>10)</sup>。つまり、inflammation, fibroplasia, scar maturation, scar contraction に分けられるが、フィブロネクチンは網膜色素上皮細胞によって産生され極めて初期の段階で働いていると思われる。

本研究は文部省科学研究費一般 A61440075の支援を受けた。記して謝意を表する。

## 文 献

- 1) Nishida T, Nakagawa S, Awata T, Ohashi Y, Watanabe K, Manabe R: Fibronectin promotes epithelial migration of cultured rabbit cornea *in situ*. *J Cell Biol* 97: 1653-1657, 1983.
- 2) 山川良治, 吉村長久, 岡田守生, 小林 博, 松村美

- 代, 白川弘泰, 荻野誠周: 培養網膜色素上皮細胞とフィブロネクチンについて, 1. 特異抗体の作成. 日眼 91: 80-86, 1987.
- 3) 西川憲清, 笹岡厚子: 家兎網膜光凝固によるフィブロネクチンの出現. 日眼 86: 794-797, 1982.
- 4) **Turksen K, Aubin JE, Sodek J, Kalnins VI:** Localization of laminin, type IV collagen, fibronectin, and heparan sulfate proteoglycan in chick retinal pigment epithelium basement membrane during embryonic development. *J Histochem Cytochem* 33: 665-671, 1985.
- 5) **Hayashi M, Matsumoto A, Hamashima Y, Tsukahara I:** Phagocytic activity of cultured retinal pigment epithelium. Uptake of polystyrene spheres and staphylococcus aureus. *Exp Eye Res* 28: 427-434, 1979.
- 6) **Wallow IHL, Tso MOM, Fine BS:** Retinal repair after experimental xenon arc photocoagulation. 1. A comparison between rhesus monkey and rabbit. *Am J Ophthalmol* 75: 32-52, 1973.
- 7) **Wallow IHL, Tso MOM:** Retinal repair after experimental xenon arc photocoagulation. 2. A clinical and light microscopic study of the evolution of retinal lesions in the rhesus monkey. *Am J Ophthalmol* 75: 610-626, 1973.
- 8) **Wallow IHL, Tso MOM:** Retinal repair after experimental xenon arc photocoagulation. 3. An electron microscopic study of the evolution of retinal lesions in the rhesus monkey. *Am J Ophthalmol* 75: 957-972, 1973.
- 9) 山川良治, 吉村長久, 岡田守生, 小林 博, 松村美代, 白川弘泰, 荻野誠周: 培養網膜色素上皮細胞とフィブロネクチンについて, 2. 細胞外分布について. 日眼 91: 319-323, 1987.
- 10) **Wilkins RB, Kulwin DR:** Wound healing. *Ophthalmology* 86: 507-510, 1979.
-