

## 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の分析

大矢 智博<sup>1)</sup>, 小幡 博人<sup>1)</sup>, 宮田 和典<sup>1)</sup>, 水流 忠彦<sup>2)</sup>, 澤 充<sup>3)</sup>, 宮内 聡<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>東京大学医学部眼科学教室, <sup>2)</sup>東京大学医学部附属病院角膜移植部

<sup>3)</sup>日本大学医学部眼科学教室, <sup>4)</sup>生化学工業株式会社東京研究所

### 要 約

角膜上皮の創傷治癒時における涙液中のグリコサミノグリカンの動態を, ウサギ上皮剝離モデルを用いて検討した. ウサギの角膜にトレパンマーク後に上皮をスパーテルを用いて機械的に剝離し, 剝離前, 剝離後3時間, 24時間, 48時間, 72時間後に涙液を採取した. 涙液の採取は, 生理食塩水 200  $\mu$ l を結膜嚢内に滴下後, 回収した. 回収した涙液中のヒアルロン酸とコンドロイチン硫酸をコンドロイチナーゼ ABC で不飽和二糖に分解した後, 高速液体クロマトグラフィーを用いて分離定量し, 単位タンパク当たりの不飽和二糖量として算出した. ヒアルロン酸由来の不飽和二糖 ( $\Delta$ Di-HA) は剝離後3時間  $420 \pm 130$  (p mol/mg protein), 24時間  $365 \pm 130$  (p mol/mg protein) であり, 剝離前  $42.2 \pm 13.8$  (p mol/mg

protein) に比べて有意に増加した ( $p < 0.01$ ).  $\Delta$ Di-HA は24時間以後は経時的に減少し, 剝離部位の上皮再被覆が完了する72時間後には, 剝離前と同様の値を示した. コンドロイチン硫酸由来の不飽和二糖のうち,  $\Delta$ Di-0S,  $\Delta$ Di-6S は剝離後3時間において有意に増加した ( $p < 0.01$ ) が,  $\Delta$ Di-4S は変化がなかった. ウサギ涙液中のグリコサミノグリカンは角膜上皮創傷治癒過程において重要な役割を果たしていることが考えられた. (日眼会誌 98: 1049-1055, 1994)

キーワード: ウサギ, 涙液, グリコサミノグリカン, ヒアルロン酸, 角膜上皮, 創傷治癒

## Quantitative Analysis of Glycosaminoglycans in Tear Fluids During Corneal Epithelial Wound Healing in Rabbits

Tomohiro Oya<sup>1)</sup>, Hiroto Obata<sup>1)</sup>, Kazunori Miyata<sup>1)</sup>,  
Tadahiko Tsuru<sup>2)</sup>, Mitsuru Sawa<sup>3)</sup> and Satoshi Miyauchi<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Ophthalmology, University of Tokyo School of Medicine

<sup>2)</sup>Section of Corneal Transplantation, University of Tokyo School of Medicine

<sup>3)</sup>Department of Ophthalmology, Nihon University School of Medicine

<sup>4)</sup>Tokyo Research Institute, Seikagaku-Kogyo Co., Ltd., Tokyo, Japan

### Abstract

We performed quantitative analyses of glycosaminoglycans in the tear fluids in a rabbit wound healing model. We ablated rabbit corneal epithelium with trephine and spatula, and sampled tear fluids before the epithelial ablation, and at 3, 24, 48, and 72 hours after it. After an instillation of 200  $\mu$ l saline solution in the conjunctival sac, as much tear fluid as possible was collected from the lower cul-de-sac. The glycosaminoglycans in the tears were then treated with chondroitinase ABC to make fractions of disaccharides. The quantities of

disaccharides were determined with high-performance liquid chromatography as weight per unit protein in the tears. The concentrations of  $\Delta$ Di-HA in the tear fluids at 3 and 24 hours were significantly higher than those before the treatment and returned to the initial value at 72 hours after making the epithelial wound. Among the disaccharides of chondroitin sulfate,  $\Delta$ Di-0S and  $\Delta$ Di-6S showed a significant increase at 3 hours after the treatment but  $\Delta$ Di-4S did not show any significant variation. The results suggest that the

別刷請求先: 113 東京都文京区本郷7-3-1 東京大学医学部眼科学教室 大矢 智博  
(平成6年4月18日受付, 平成6年6月21日改訂受理)

Reprint requests to: Tomohiro Oya, M.D. Department of Ophthalmology, University of Tokyo School of Medicine,  
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

(Received April 18, 1994 and accepted in revised form June 21, 1994)

glycosaminoglycans in the rabbit tear fluids may play an important role in the corneal epithelial wound healing process. (J Jpn Ophthalmol Soc 98: 1049-1055, 1994)

## I 緒言

ヒアルロン酸は、N-アセチル-D-グルコサミンとグルクロン酸から成る高分子ムコ多糖で、細胞外マトリックスとして広く生体内に存在する<sup>1)</sup>。生体内においてヒアルロン酸は、組織の発生、創傷治癒過程や炎症などで重要な働きを有することが知られている<sup>2)~4)</sup>。眼科領域では内眼手術時における角膜上皮細胞の保護と前房の維持の目的で使用されている<sup>5)</sup>。また、その性質の一つである保水性を利用して、涙液異常による角膜上皮障害に対しての点眼治療が試みられている<sup>6)~8)</sup>。近年、ヒアルロン酸が *in vivo* ならびに *in vitro* の実験で、角膜上皮の創傷治癒を促進するとの報告がなされている<sup>9)~12)</sup>。また、最近ではウサギ涙液中にヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸などのグリコサミノグリカンが存在することが確認され、角膜上皮創傷治癒過程に関連して、その濃度が変動することが示されている<sup>13)</sup>。本研究では、涙液中のグリコサミノグリカンと角膜創傷治癒との関連をさらに検討するために、角膜上皮の創傷治癒時における涙液中のグリコサミノグリカンの動態を、ウサギ上皮剥離モデルを用いて検討した。

## II 実験方法

### 1. 対象および方法

対象には雌白色ウサギ 8 匹 8 眼 (体重約 3.5 kg) を用いた。塩酸ケタミン (ケタラル®) を体重 1 kg 当たり 50 mg 筋注し、麻酔した。角膜上皮を直径 7.7 mm のトレパンによりマーキングした後、スパーテルを用いて角膜上皮を鈍的に剥離した。涙液採取法は、マイクロピペットで生理食塩水 200  $\mu$ l を下眼瞼を牽引した結膜嚢内に滴下し、数回受動的に瞬目させた後、刺激を与えないようにマイクロピペットを用いて可能な限り回収した。涙液の採取は、上皮剥離前、剥離後 3 時間、24 時間、48 時間、72 時間後に行った (すべて n=8)。

### 2. 検体の定量方法

検体にコンドロイチナーゼ ABC (chondroitinase ABC, 5 U/ml, 生化学工業) と 100 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0) を加え、37°C で 2 時間消化した。コンドロイチナーゼ ABC により、ヒアルロン酸とコンドロイチン硫酸は N-アセチルヘキサミニド結合を脱離反応的に切断され、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸の各々に対応する不飽和二糖に分解される。ヒアルロン酸分解に由来する不飽和二糖は  $\Delta$ Di-HA (2-acetamido-2-deoxy-3-O-( $\beta$ -D-glucopyranosyluronic acid)-D-glucose)

Key words: Rabbit, Tear fluids, Glycosaminoglycans, Hyaluronic acid, Corneal epithelium, Wound healing

glucose), コンドロイチン硫酸分解に由来する不飽和二糖は  $\Delta$ Di-0 S (2-acetamido-2-deoxy-3-O-( $\beta$ -D-glucopyranosyluronic acid)-D-galactose),  $\Delta$ Di-6 S (2-acetamido-2-deoxy-3-O-( $\beta$ -D-glucopyranosyluronic acid)-6-O-sulfo-D-galactose),  $\Delta$ Di-4 S (2-acetamido-2-deoxy-3-O-( $\beta$ -D-glucopyranosyluronic acid)-4-O-sulfo-D-galactose) である ( $\Delta$  は不飽和を表し, Di は dimer, HA はヒアルロン酸, 0 S は 0 硫酸, 6 S は 6 硫酸, 4 S は 4 硫酸の略である)。 $\Delta$ Di-HA,  $\Delta$ Di-0 S,  $\Delta$ Di-6 S,  $\Delta$ Di-4 S の構造式, 分子式を表 1 に示す。コンドロイチナーゼ ABC 消化のみの場合、ヒアルロン酸の消化が不十分である可能性があるため、さらにコンドロイチナーゼ AC-II (chondroitinase AC-II, 5 U/ml, 生化学工業) と 100 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) を加え 37°C で 2 時間消化した。次に、得られた消化液中のタンパクを除くために、分子量 1 万以上を取り除く限外濾過膜 (ウルトラフリー-C 3 GC, 日本ミリポアリミテッド) で濾過し、濾液に回収された不飽和二糖を次項に述べるように

表 1 グリコサミノグリカンの構造式・分子式

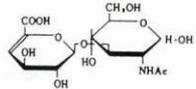
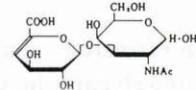
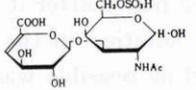
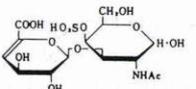
<p><math>\Delta</math>Di-HA</p> <p>2-acetamido-2-deoxy-3-O-(<math>\beta</math>-D-glucopyranosyluronic acid)-D-glucose</p> <p>分子式: <math>C_{14}H_{26}NO_{11}</math></p> <p>分子量: 378.3</p>	
<p><math>\Delta</math>Di-0S</p> <p>2-acetamido-2-deoxy-3-O-(<math>\beta</math>-D-glucopyranosyluronic acid)-D-galactose</p> <p>分子式: <math>C_{14}H_{26}NO_{11}</math></p> <p>分子量: 378.3</p>	
<p><math>\Delta</math>Di-6S</p> <p>2-acetamido-2-deoxy-3-O-(<math>\beta</math>-D-glucopyranosyluronic acid)-6-O-sulfo-D-galactose</p> <p>分子式: <math>C_{14}H_{26}NO_{14}S</math></p> <p>分子量: 458.4</p>	
<p><math>\Delta</math>Di-4S</p> <p>2-acetamido-2-deoxy-3-O-(<math>\beta</math>-D-glucopyranosyluronic acid)-4-O-sulfo-D-galactose</p> <p>分子式: <math>C_{14}H_{26}NO_{14}S</math></p> <p>分子量: 458.4</p>	

表2 コンドロイチン硫酸由来の不飽和二糖の分離と検出

充填剤: YMC-GEL-PA-120-S 5
カラム: 内径 8 mm × 長さ 15 cm (ステンレス)
溶出条件: 0 mM → 100 mM Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> の直線グラジェント (50 分間)
流速: 0.5 ml/min
検出条件: 2-シアノアセトアミドによるポストカラム蛍光検出
励起波長-331 nm 蛍光波長-383 nm

高速液体クロマトグラフィーで分離, 定量した. また, 涙液中のタンパク濃度は Lowry 法<sup>14)</sup>により, ウシ血清アルブミンを標準としたタンパク質につき検量線を作成し定量した. ヒアルロン酸とコンドロイチン硫酸の消化産物 (不飽和二糖) の濃度は, 単位タンパク当たりの不飽和二糖量として算出した.

### 3. 高速液体クロマトグラフィーの条件

コンドロイチン硫酸由来の不飽和二糖を分離, 検出するにあたっては, 充填剤 YMC-GEL-PA-120-S 5 (YMC 株式会社), カラム (内径 8 mm × 長さ 15 cm, 外筒ステンレス) を使用した. 試料を 0 mM → 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> の直線グラジェント (50 分間) により, 0.5 ml/min の流速で溶出した. カラムからの溶出液に 1% の 2-シアノアセトアミドを含む 50 mM 四ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.0) を 0.5 ml/分の流速で加え, 140°C に設定してある反応槽 (DB-5, 島村計器製作所) を通過させた. 反応液の蛍光を分光蛍光検出器 (821-FP, 日本分光工業株式会社) でモニターした. 励起波長は 331 nm, 蛍光波長は 383 nm とした (表 2).

ヒアルロン酸由来の不飽和二糖を分離, 検出するにあたっては, 充填剤 YMC-GEL-PA-120-S 5 (YMC 株式会社), カラム (内径 8 mm × 長さ 30 cm, 外筒ステンレス) を使用した. 試料を 30 mM の Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を含む 70% アセトニトリルにより, 0.5 ml/min の流速で溶出した. カラムからの溶出液に 1% の 2-シアノアセトアミドを含む 50 mM 四ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.0) を 0.5 ml/分の流速で加え, グラッシカーボン電極を用いて, 360 mV の印加電圧で電気化学検出を行った (表 3).

## III 結 果

### 1. 標準品によるクロマトグラム

コンドロイチン硫酸由来の不飽和二糖を分離, 検出する条件で,  $\Delta$ Di-0 S,  $\Delta$ Di-6 S,  $\Delta$ Di-4 S の標準品 (生化学工業) 各 50 ng クロマトグラムを示す (図 1). この条件ではグルコースなどの非イオン性物質は非吸着部分に溶出され, また  $\Delta$ Di-0 S と  $\Delta$ Di-HA は分離しないため, クロマトグラムでは同一位置に溶出される.

次に, ヒアルロン酸由来の不飽和二糖を分離, 検出する条件で  $\Delta$ Di-HA,  $\Delta$ Di-0 S の標準品各 50 ng のクロマトグラムを示す (図 2). この条件ではグルコースなどの

表3 ヒアルロン酸由来の不飽和二糖の分離と検出

充填剤: YMC-GEL-PA-120-S 5
カラム: 内径 8 mm × 長さ 30 cm (ステンレス)
溶出条件: 30 mM の Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> を含む 70% アセトニトリル
流速: 0.5 ml/min
検出条件: 2-シアノアセトアミドによるポストカラム電気化学検出
電極-グラッシカーボン 印加電圧長-360 mV

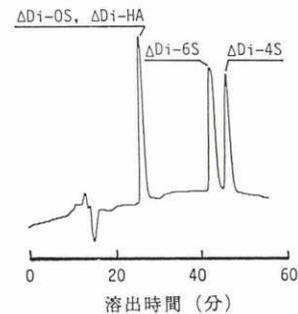


図1 標準品によるクロマトグラム (コンドロイチン硫酸を分離する条件).

この条件では  $\Delta$ Di-0 S と  $\Delta$ Di-HA は分離しないため, 同一位置に溶出される.  $\Delta$ : 不飽和, Di: dimer, HA: ヒアルロン酸, 0 S: 0 硫酸

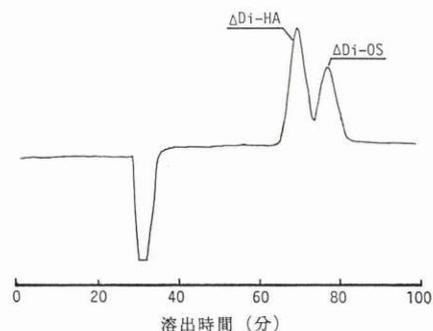


図2 標準品によるクロマトグラム (ヒアルロン酸を分離する条件).

この条件では  $\Delta$ Di-0 S と  $\Delta$ Di-HA は分離している.

非イオン性物質も保持される. また, クロマトグラムでは, コンドロイチン硫酸の分離条件では分離しなかった  $\Delta$ Di-HA と  $\Delta$ Di-0 S が分離している.

### 2. 検体のクロマトグラム

コンドロイチン硫酸を分離する条件での上皮剥離前のクロマトグラムを示す (図 3-1). グルコースなどの非吸着成分が約 16 分に溶出されている. 前述のように  $\Delta$ Di-HA は  $\Delta$ Di-0 S と同一位置に溶出されている. その後,  $\Delta$ Di-6 S,  $\Delta$ Di-4 S の順に溶出されている. 次に, 上皮剥離後 3 時間のクロマトグラムを示す (図 3-2). 剥離前に比較し,  $\Delta$ Di-0 S および,  $\Delta$ Di-HA,  $\Delta$ Di-6 S のピークが著しく高くなっているが,  $\Delta$ Di-4 S の変化はない.

次に, ヒアルロン酸と  $\Delta$ Di-0 S を分離するために溶出条件を変えた上皮剥離前のクロマトグラムを示す (図

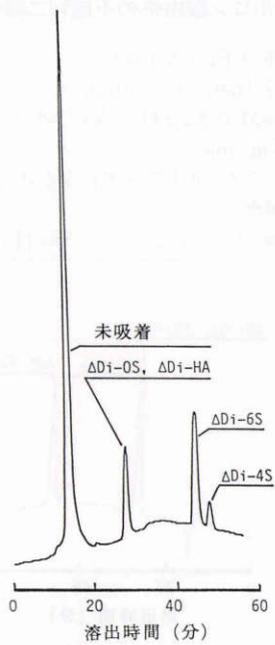


図3-1 上皮剥離前のクロマトグラム (コンドロイチン硫酸を分離する条件).  
 グルコースなどの非吸着成分が約16分に溶出されている. ΔDi-HAはΔDi-0Sと同一位置に溶出され, その後ΔDi-6S, ΔDi-4Sの順に溶出されている.  
 6S: 6硫酸, 4S: 4硫酸

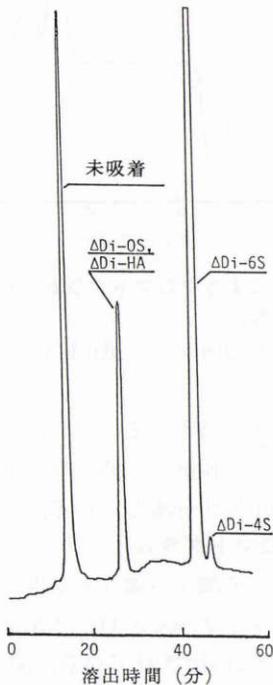


図3-2 上皮剥離後3時間のクロマトグラム (コンドロイチン硫酸を分離する条件).  
 剥離前(図3-1)に比べΔDi-0SおよびΔDi-HA, ΔDi-6Sのピークが高いが, ΔDi-4Sは変化ない.

4-1). コンドロイチン硫酸の分離条件では, 非吸着成分に溶出された成分もこの条件では3本の未確認ピークと

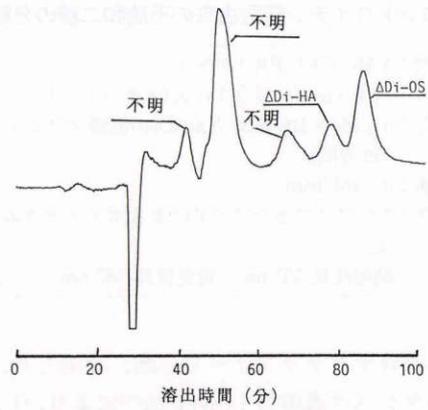


図4-1 上皮剥離前のクロマトグラム (ヒアルロン酸を分離する条件).  
 コンドロイチン硫酸の分離条件では非吸着部分に溶出された成分も, この条件では3本の未確認ピークとして溶出されている. また, ΔDi-HAとΔDi-0Sは別々に溶出されている.

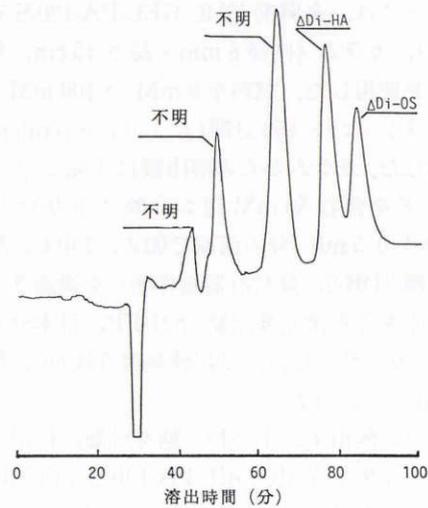


図4-2 上皮剥離後3時間のクロマトグラム (ヒアルロン酸を分離する条件).  
 いずれのピークも, 剥離前(図4-1)に比べて高くなっている.

して溶出されている. また, ΔDi-HAとΔDi-0Sは別々に溶出されている. 上皮剥離後3時間のクロマトグラムでは, いずれのピークも剥離前に比べて高くなっている(図4-2).

3. 検体の定量結果

上皮剥離前, 剥離後3時間, 24時間, 48時間, 72時間後の単位タンパク量当たりの各グリコサミノグリカンの定量結果をDuncanの多重比較検定によって比較検討した.

ヒアルロン酸量(ΔDi-HA量)は, 上皮剥離前  $42.2 \pm 13.8$  (p mol/mg protein)であった. 上皮剥離後3時間および24時間のヒアルロン酸量は, それぞれ  $420 \pm 130$ ,  $365 \pm 130$  (p mol/mg protein)であり, 剥離前に比べて

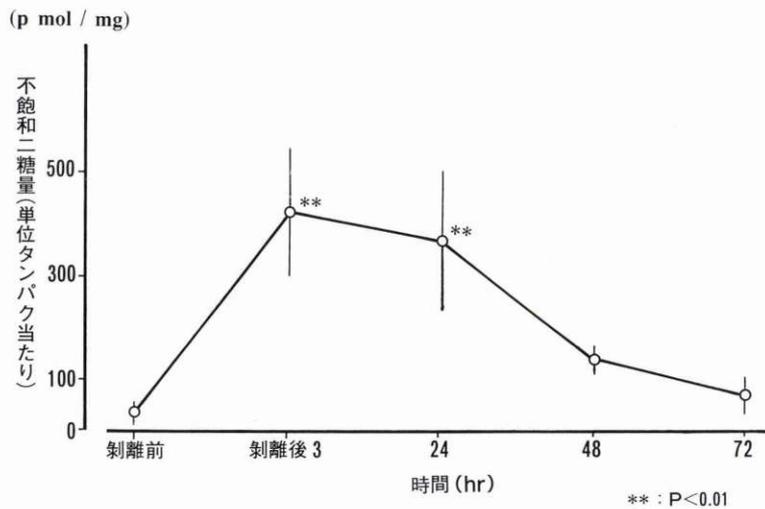


図5 ヒアルロン酸量の経時的变化。

ヒアルロン酸量は上皮剥離後3時間および24時間において、剥離前に比べて有意に増加し、その後経時的に減少した。

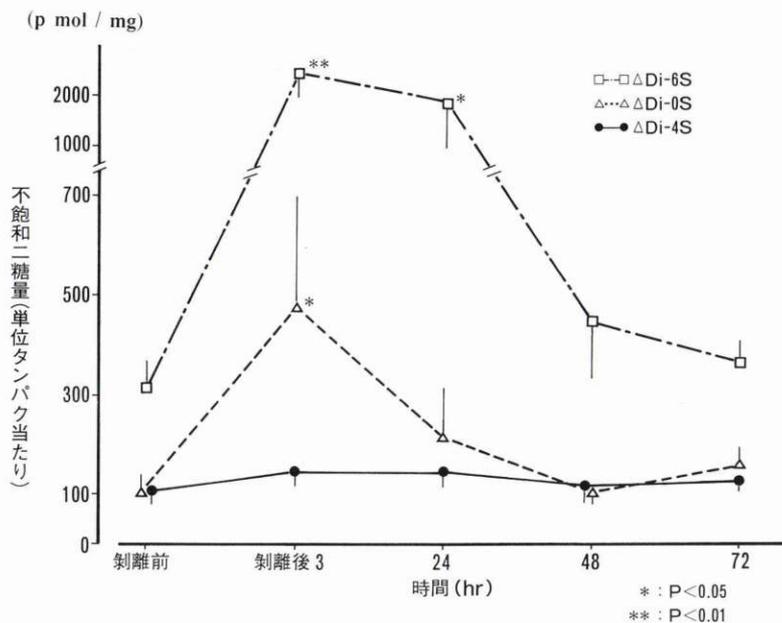


図6 コンドロイチン硫酸量の経時的变化。

コンドロイチン硫酸量のうち、 $\Delta$ Di-0S および  $\Delta$ Di-6S が剥離後3時間において有意に増加し、その後経時的に減少した。 $\Delta$ Di-4Sの変動は認められなかった。

有意に増加していた ( $p < 0.01$ )。24時間以降は経時的に減少し、剥離後48時間の値は  $140 \pm 26.4$  (p mol/mg protein)、剥離部位の上皮による再被覆が完了する72時間後には  $69.4 \pm 23.3$  (p mol/mg protein) と剥離前とほぼ同様の値を示した (図5)。

次に、コンドロイチン硫酸の異性体である  $\Delta$ Di-0S量は、上皮剥離前  $114 \pm 22.1$  (p mol/mg protein) であった。上皮剥離後3時間では、 $478 \pm 215$  (p mol/mg protein) と剥離前に比べて有意に増加した ( $p < 0.05$ )。剥離後24時間は  $213 \pm 93.0$  (p mol/mg protein)、48時間では  $109 \pm 26.6$  (p mol/mg protein)、72時間では  $151 \pm$

$33.1$  (p mol/mg protein) と経時的に減少し、剥離前とほぼ同様の値を示した (図6)。同様に  $\Delta$ Di-6Sは、上皮剥離前  $315 \pm 76.4$  (p mol/mg protein) であったが、上皮剥離後3時間は  $2,438 \pm 599$  (p mol/mg protein) であり、剥離前に比べて有意に増加した ( $p < 0.01$ )。また、剥離後24時間においても  $1,825 \pm 842$  (p mol/mg protein) の値を示し、剥離前に比べて有意に増加していた ( $p < 0.05$ )。その後、48時間  $446 \pm 149$  (p mol/mg protein)、72時間  $368 \pm 38.2$  (p mol/mg protein) と経時的に減少し、剥離前とほぼ同様の値に復した (図6)。一方、 $\Delta$ Di-4Sは、上皮剥離前  $114 \pm 28.1$  (p mol/mg protein)、

上皮剝離後3時間は $149 \pm 33.9$  (p mol/mg protein), 24時間は $148 \pm 24.6$  (p mol/mg protein), 48時間は $116 \pm 20.1$  (p mol/mg protein), 72時間は $128 \pm 17.6$  (p mol/mg protein) であり, 各時点の間に有意な差は認められなかった (図6).

なお, 正常ウサギおよび角膜上皮剝離ウサギの涙液中にはケラタン硫酸とデルマタン硫酸は全く検出されなかった.

#### IV 考 按

角膜上皮傷害の修復は, 隣接する細胞の伸展, 移動および分裂によって行われる. この創傷治癒過程は種々の要因により修飾されることが知られており, フィブロネクチン, epidermal growth factor (EGF) などは創傷治癒促進に働く<sup>15)~17)</sup>. また, これらフィブロネクチンやEGFは涙液中に存在していることが確認されており<sup>15)18)</sup>, *in vivo*において, 角膜上皮創傷治癒に関与していることがわかっている<sup>15)16)</sup>. 近年, ヒアルロン酸ナトリウムが角膜上皮の創傷治癒を促進するとの報告がなされている<sup>9)~12)</sup>. ウサギ涙液中にもグリコサミノグリカンが存在することが確認され, 角膜上皮創傷治癒と関連して, その濃度が変動することが示されている<sup>13)</sup>. これまで涙液の三層 (脂質層, 液層, ムチン層) のうち, ムチン層は, アルシアンブルー染色およびコロイド鉄染色陽性で, ムコ多糖の存在が示唆されていた<sup>19)~21)</sup>. しかし, 涙液中のグリコサミノグリカンの存在を詳細に分析した報告はなかったが, 最近, Miyauchi ら<sup>13)</sup>は濾紙を用いてウサギの涙液を採取し, 涙液中のグリコサミノグリカンを高速液体クロマトグラフィーで分離, 定量することに成功した. グリコサミノグリカンは通常生体内ではタンパク質と共有結合して, 多糖-タンパク質複合体 (プロテオグリカン) として存在している. プロテオグリカンからタンパク質を除いたグリコサミノグリカン混合物を分離するための方法としては, ①グリコサミノグリカンの組成, 構造, 大きさ, 形などによる溶解度の相違に基づくエタノール分画, ②電気密度の相違に基づくイオン交換クロマトグラフィー, ③電気泳動, ④第四級アンモニウム塩による分画, ⑤グリコサミノグリカンの酵素分解生成物の高速液体クロマトグラフィーによる分離, などがある<sup>22)</sup>. その中でも高速液体クロマトグラフィーによる分離は, 新しいカラムの開発, 技術の進歩によって, 従来の化学組成分析に比べ, 迅速で再現性良く微量で分析できる優れた方法である. 今回は, この Miyauchi の高速液体クロマトグラフィーによる方法でグリコサミノグリカン定量測定を行った. しかし, 涙液分泌の少ないウサギから, なるべく刺激のない状態で涙液を採取することは困難なため, 涙液を生理食塩水で希釈した. また, 個体によって採取できる涙液量には差があるため, グリコサミノグリカンの定量は涙液中に含まれる単位蛋白当た

りの濃度で表した.

今回の我々の実験で, 角膜上皮を剝離したウサギの涙液中には, 術後3時間と24時間において, ヒアルロン酸の有意な増加を認め, 上皮の再被覆が完了する72時間後には, ほぼ術前の値に低下した. このことは角膜上皮の創傷治癒過程において, 内因性のヒアルロン酸が発現したことを示唆する. Asari ら<sup>23)</sup>はウシ鼻軟骨から抽出した hyaluronic acid-binding region を用いて, ウサギ正常角膜のヒアルロン酸の組織化学的な局在を報告している. それによると, 角膜上皮 (細胞間) と内皮の apical surface に強い染色性を認め, 実質のケラトサイトには弱い染色性を認めている. また, Miyauchi ら<sup>24)</sup>はウサギの角膜上皮の創傷治癒過程におけるヒアルロン酸の局在を組織化学的に検討した実験では, 剝離後1日目に上皮欠損部周囲の上皮と欠損部以下の実質細胞が hyaluronic acid-binding region で強く染色され, 7日後においても染色性は正常より強かったと報告している. 角膜上皮創傷治癒過程におけるヒアルロン酸の発現機序は, 前述の報告と併せて考えると, 上皮欠損部周囲と欠損部以下の実質細胞で生成され, その結果として涙液中に出現したものであることが考えられた. しかし, 涙液中のヒアルロン酸は涙腺や結膜の杯細胞などから由来している可能性も否定できない.

ウサギの角膜に含有されるグリコサミノグリカンの組成は, 上皮では主としてコンドロイチン硫酸, 実質ではケラタン硫酸とデルマタン硫酸の2大成分から成る<sup>25)</sup>. 今回の実験では, 角膜上皮剝離前および上皮剝離後の涙液中にはケラタン硫酸とデルマタン硫酸は全く検出されなかったが, コンドロイチン硫酸の異性体の変動を認めた. コンドロイチン硫酸の異性体のうち, コンドロイチンおよびコンドロイチン6硫酸 (特にコンドロイチン6硫酸) が術後有意な増加を認め, 経時的に減少したが, コンドロイチン4硫酸の変動は認めなかった. 特にコンドロイチン6硫酸は, 剝離前に比較し, 約10倍のオーダーで涙液中に増加したことは特筆に値する. これは単に上皮細胞の構築が壊れたために増加したのか, 能動的に生成されているのかについては明らかでない. また, なぜ異性体によって増減に差があるのかも詳細は不明である. このことを考える上で, ウサギ耳軟骨に創傷を作成し, 治癒過程におけるヒアルロン酸とコンドロイチン硫酸の組成を検討した報告は参考となる<sup>26)</sup>. それによると, 治癒後の軟骨中のヒアルロン酸とコンドロイチン6硫酸は正常軟骨に比べ増加している. さらに,  $\Delta$ Di-6 S/ $\Delta$ Di-4 S は正常軟骨では0.27であったが, 治癒後の軟骨では1.58と上昇していた. また, ウサギやニワトリの胎児軟骨は成人軟骨に比べ, コンドロイチン6硫酸量の増加とコンドロイチン4硫酸量の減少が認められるとの報告もある<sup>27)28)</sup>. これらから, 軟骨の創傷治癒過程や成長発達過程ではコンドロイチン6硫酸が増加, コンドロイ

チン4硫酸が減少し、成熟軟骨への成長とともに増減がなくなると考えられる。涙液中のヒアルロン酸、コンドロイチン6硫酸の増加は、この軟骨の創傷治癒過程の変化と一致しており、涙液中のグリコサミノグリカンは創傷治癒に関与している可能性が考えられる。これら涙液中に増加したヒアルロン酸、コンドロイチン6硫酸などの組織に由来するかは不明であるが、創傷治癒の局所で能動的に生成され、涙液中に分泌されることが予想できる。また、Nishidaら<sup>10)</sup>によると、角膜の器官培養において、ヒアルロン酸の添加は上皮の伸展を促進するが、コンドロイチン硫酸は上皮の伸展を促進しなかったと報告している。涙液中のコンドロイチン硫酸の増加が創傷治癒を促進しているのか否かは不明であるが、少なくとも壊れた上皮細胞構築を修復する過程で分泌された可能性が考えられる。

以上、今回の研究で、ウサギ角膜上皮の創傷治癒過程では涙液中のヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン6硫酸が増加することが判明した。この増加は72時間後には上皮剝離前の値にほぼ復したことから、ウサギ涙液中のグリコサミノグリカンは、角膜上皮創傷治癒過程において、重要な役割を果たしていることが考えられた。今後、涙液中の増加したグリコサミノグリカンの由来や、発現の機序について、さらなる検討が必要と考えられる。

#### 文 献

- 1) Balazs EA: Amino sugar-containing macromolecules in the tissues of the eye and ear, In 'The Amino Sugars. II-A' In: Balazs EA, et al (EDS): 401-460, Academic Press, New York, 1965.
- 2) Weigel PH, Frost SJ: The role of hyaluronic acid in inflammation and wound healing. *Int J Tiss Reac* X 6: 355-365, 1988.
- 3) Toole BP, Gross J: The extracellular matrix of the regenerating newt limb: Synthesis and removal of hyaluronate prior to differentiation. *Dev Biol* 25: 57-77, 1971.
- 4) Derby MA: Analysis of glycosaminoglycans within the extracellular environments encountered by migrating neural crest cells. *Dev Biol* 66: 321-336, 1978.
- 5) Miller D, Stegmann R: Use of sodium hyaluronate in human IOL implantation. *Ann Ophthalmol* 13: 811-815, 1981.
- 6) Polack FM, McNiece MT: The treatment of dry eyes with Na Hyaluronate (Healon®). *Cornea* 1: 133-136, 1982.
- 7) Limberg MB, Kaufman HE: Topical application of hyaluronic acid and chondroitin sulfate in the treatment of dry eyes. *Am J Ophthalmol* 103: 194-197, 1987.
- 8) 伏見典子, 吉村 久, 崎元 卓, 北野周作: ヒアルロン酸あるいはムチンを主成分とする人工涙液の点眼効果について. *眼科* 31: 747-756, 1989.
- 9) Miyauchi S, Sugiyama T, Machida A, Sekiguchi T, Miyazaki K, Tokuyasu K, et al: The effect of sodium hyaluronate on the migration of rabbit corneal epithelium. I. An *in vitro* study. *J Ocul Pharmacol* 6: 91-99, 1990.
- 10) Nishida T, Nakamura M, Mishima H, Otori T: Hyaluronan stimulates corneal epithelial migration. *Exp Eye Res* 53: 753-758, 1991.
- 11) Sugiyama T, Miyauchi S, Machida A, Miyazaki K, Tokuyasu K, Nakazawa K: The effect of sodium hyaluronate on the migration of rabbit corneal epithelium. II. The effect of topical administration. *J Ocul Pharmacol* 7: 53-64, 1991.
- 12) Nakamura M, Hikida M, Nakano T: Concentration and molecular weight dependency of rabbit corneal epithelial wound healing on hyaluronan. *Curr Eye Res* 11: 981-986, 1992.
- 13) Miyauchi S, Morita M, Kuramoto K, Horie K, Tokuyasu K: Hyluronan and chondroitin sulphate in the tear fluid of rabbit. *Curr Eye Res* (in press)
- 14) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.
- 15) 渡辺 潔, 大橋裕一: フィブロンネクチンの角膜疾患への応用. *眼科* 32: 1211-1216, 1990.
- 16) 渡辺 仁: EGFと角膜. *あたらしい眼科* 6: 1635-1641, 1989.
- 17) 小幡博人, 宮田和典: 角膜の創傷治癒. *Biomedical Perspectives* 2: 81-92, 1993.
- 18) Ohashi Y, Motokura M, Kinoshita Y, Mono T, Watanabe H, Kinoshita S, et al: Presence of epidermal growth factor in human tears. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 1879-1882, 1989.
- 19) 奥山 隆, 宮内 聡: ムコ多糖体(眼のグリコサミノグリカン)動物成分利用集成(陸産動物篇). *R&D プラニング*, 112-121, 1987.
- 20) Mishima S: Some physiological aspects of the precorneal tear film. *Arch Ophthalmol* 73: 233-241, 1966.
- 21) 瀬川雄三: 角膜上皮の微細構造. *眼紀* 19: 1168-1173, 1968.
- 22) 瀬野信子: グリコサミノグリカンの分離法: 新生化学実験講座3. 糖質II, プロテオグリカンとグリコサミノグリカン. 日本生化学会(編), 東京化学同人, 東京, 27-39, 1991.
- 23) Asari A, Miyauchi S, Takahashi T, Kohno K, Uchiyama Y: Localization of hyaluronic acid, chondroitin sulfate, and CD44 in rabbit cornea. *Arch Histol Cytol* 55: 503-511, 1993.
- 24) 宮内 聡, 森田美香, 浅利 晃, 関口智子, 堀江克之, 徳安清親: ウサギ角膜上皮の創傷治癒とヒアルロン酸. 第17回角膜カンファレンス抄録集, 72, 1993.
- 25) Gregory JD, Lars CL, Damle SP: Proteoglycans of rabbit corneal stroma. *J Biol Chem* 257: 6965-6970, 1982.
- 26) Hasty KA, Smith GN, Kang AH: Studies on glycosaminoglycans of regenerating rabbit ear cartilage. *Dev Biol* 86: 198-205, 1981.
- 27) Mathews MB: Macromolecular evolution of connective tissue. *Biol Rev* 42: 499-551, 1967.
- 28) Robinson HC, Dorfman A: The sulfation of chondroitin sulfate in embryonic chick cartilage epithelium. *J Biol Chem* 244: 348-352, 1969.