

マウス皮膚における細胞外マトリックス構成成分の加齢に伴う超微構造的変化

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9094

マウス皮膚における細胞外マトリックス構成成分の 加齢に伴う超微構造的変化

金沢大学医学部病理学第一講座 (主任：中西功夫教授)

河 原 栄

(昭和58年11月14日受付)

細胞外マトリックス構成成分の加齢に伴う超微構造的変化を知る目的で、生後1日、3週、3月、13月、25月令の ddy 系雄マウス皮膚を電顕的に観察した。電顕試料には通常の染色に加え、ルチニウムレッド染色、タンニン酸染色を併用した。3週と13月令の材料にはストレプトミセス・ヒアルロニダーゼ、コンドロイチナーゼ AC、コンドロイチナーゼ ABC 消化試験、30%尿素および10%蔞酸処理、並びに細菌性コラゲナーゼ消化試験を加えて検討した。最も著しい変化は真皮網状層のコラゲン線維に認められた。コラゲン線維と線維束の直径はそれぞれ、3週令、 80 ± 16 nm, 1.50 ± 0.70 μ m；3月令、 123 ± 22 nm, 2.70 ± 1.13 μ m；13月令、 143 ± 40 nm, 2.96 ± 1.86 μ m；25月令、 138 ± 47 nm, 3.34 ± 2.40 μ m であった。蔞酸、尿素、コラゲナーゼ作用に対してはコラゲン線維が太い程抵抗性が高かった。特異な変化は太いコラゲン線維に枝分れを示す不整形の巨大コラゲン線維が加齢マウスの真皮網状層に出現することであった。この巨大線維は3月令マウスの真皮網状層深層に出現し始め、13月令以後では網状層全域に認められるようになった。巨大コラゲン線維は蔞酸、尿素、コラゲナーゼに対して、太いコラゲン線維と同様に抵抗性が高かった。これらの所見から、加齢に伴う主な変化は架橋結合の多い太いコラゲン線維が増加することと、隣接するコラゲン線維が互いに融合して形成される巨大コラゲン線維が出現することであった。更に、13月令のマウス真皮では、網状層においてしばしばコラゲン線維束間のプロテオグリカン凝集体に血漿成分が付着していることがあった。これは加齢と共に進行するコラゲン線維の緻密化によって組織液の分布に異常を来し、血漿成分が部分的に凝集することによるものと考えられた。尿素および蔞酸処理によって現われるコラゲン線維のラセン構造について考察を加えた。

Key words Mouse skin, Aging, Electron microscopy, Extracellular matrix

皮膚における細胞外マトリックス構成成分はコラゲン、エラスチン、グリコサミノグリカン(以下 GAG と略)、構造糖蛋白および組織液である。電子顕微鏡(以下電顕と略) 的にはコラゲン線維、弾性線維、microfibril、GAG が core protein や link protein と結合しているプロテオグリカン凝集体、主にラミニンとIV型コラゲンから成る基底膜を同定することができる。加齢に伴うこれらの構成成分の変化については生化学的に多くの研究が報告されている¹⁻⁴⁾。例えば、コラゲンについては中性塩および酸可溶性コラゲンが減少し、不溶性コラゲンが増加すること²⁾、さまざまな化学的侵襲に対するコラゲン線維の抵抗性が高まることなどが知ら

れている。これらは加齢に伴ってコラゲン分子間の架橋結合が増加することによると解釈されている⁵⁾。また、コラゲンの分子種では、胎生期に多いIII型コラゲンは加齢と共に減少することも報告されている。エラスチンは生後から増加し始め、成熟期以後ではほぼ一定であるが、リジン、アルギニンなどのアミノ酸が増加し⁶⁾、デスモシン、イソデスモシンは漸減する⁷⁾。GAG についてはヒアルロン酸が胎生期から成長期にかけて著しく減少するが、デルマトン硫酸は加齢に拘らず一定値を保つと言われている⁸⁾⁹⁾。

一方、形態学的にはこれまで主に光顕的に研究されてきており、加齢に関する超微構造的変化についての

Ultrastructural Changes of the Extracellular Matrix Components in the Mouse Skin due to Aging. **Ei Kawahara**, Department of Pathology (I) (Director: Prof. I. Nakanishi), School of Medicine, Kanazawa University.

知見は乏しく、断片的である。加齢に伴ってコラーゲン線維の直径が増加すること¹⁰⁾や、老令期には巨大不整形コラーゲン線維が出現すること¹¹⁾、日光露出部の皮膚では弾性線維に断裂や顆粒状の病変がみられること¹²⁾などが報告されているにすぎない。加齢による変化は、老令期に突然現れるのではなく、生後から成長、成熟、老化にわたって連続的に進行するものと考えられる。従って、加齢に関連する超微構造的変化があるとすれば、それはどの時期から始まり、どのような形態学的変化をとげて形成されるのかを明確にする必要があろう。著者はこのような観点に立って、生後から老令期に至るまでの各時期のマウス皮膚の細胞外マトリックス構成成分の超微構造を特殊染色や各種化学物質、酵素消化処理を加えて観察すると共に、尿素や酢酸処理によって生ずるコラーゲン線維のラセン構造について検討したのでここに報告する。

材料および方法

生後1日、3週、3月、13月、25月令の ddy 系雄マウス背部皮膚を実験材料に供した。

電顕試料の作製：実験動物をと殺後直ちに背部皮膚を採取し、組織片を細切して、2.5%グルタルアルデヒド(0.1 M カコジル酸緩衝液, pH 7.4)で4°C, 1時間固定し、更に2%オスミウム酸(0.1 M カコジル酸緩衝液, pH 7.4)で4°C, 2時間固定した。次いでエタノール系列で脱水、エポン 812 で包埋した。超薄切片はダイヤモンドナイフを用い、LKB ウルトラトームで作成し、酢酸ウラニル・硝酸鉛の二重染色を行った。試料は日立 HU-500 型の電子顕微鏡 (75 KV) で直接倍率 1,500-30,000 で観察した。弾性線維の同定にはタンニン酸染色¹³⁾を用いた。

ルテニウムレッド染色：GAG や糖蛋白の多糖体の同定のために Luft の方法¹⁴⁾に従ってルテニウムレッド (以下 RR と略) 染色を行った。25%グルタルアルデヒド 1 ml と 1000 ppm RR 液 (0.1 M カコジル酸緩衝液, pH 7.4) 19 ml を混合して前固定液とし、4°C, 1時間固定後、1000 ppm RR 液 (0.1 M カコジル酸緩衝液, pH 7.4) 中に4°C, 1晩暗所にて浸漬した。更に4%オスミウム酸 1 ml と 1000 ppm RR 液 (0.1 M カコジル酸緩衝液, pH 7.4) 1 ml を混合した固定液で22°C, 5時間、暗所にて固定した。その後上記と同様の脱水、包埋を行い、超薄切片を作成した。試料には電子染色を加えずに電子顕微鏡で観察した。

コラーゲン線維および線維束の直径の測定：各年令群における真皮乳頭層と網状層のコラーゲン線維の直径を直接倍率 10,000 の電顕フィルムを5倍に引き伸ばし、各々400個計測した。またコラーゲン線維束の直径を直接倍率 1,500 の電顕フィルムを3倍に引き伸ばして各々100個を計測した。これら各々のヒストグラムを作成して各群および部位における差異を検討した。

酵素消化試験：3週、13月令マウスの組織片をコンドロイチナーゼ ABC (生化学工業), コンドロイチナーゼ AC (生化学工業), ストレプトミセス・ヒアルロニダーゼ (生化学工業), トリプシン (Sigma, type I, U. S. A.) および α -キモトリプシン (Worthington Biochem. Co., U. S. A.) に37°Cで浸漬後、RR 染色を施し、電顕試料を作成して観察した。また、細菌性コラーゲナーゼ (Sigma, type VI, U. S. A.) に3週、13月令のマウスの各組織片を未固定のまま37°C, 40分浸漬し、つづいて通常電顕試料作成法と同様の方法で試料を作成した。各酵素の緩衝液, pH, 濃度, 作用時間および2.5%グルタルアルデヒドによる固定の

Table 1. Conditions of treatment with various enzymes used in the experiment

Enzyme	Buffer	Concentration	Incubation time	Fixation
Collagenase	0.1M Tris-HCl buffer (pH 7.4) +0.2M NaCl+4mM CaCl ₂	1mg/ml	40min	—
Chondroitinase ABC	0.1M Tris-HCl buffer (pH 8.0)	1u/ml	2 hr	+
Chondroitinase AC	0.1M Tris-HCl buffer (pH 8.0)	1u/ml	2 hr	+
Hyaluronidase	0.1M Acetate buffer (pH 5.0)	20u/ml	2 hr	+
Trypsin	0.08M Tris-HCl buffer (pH 7.8) +0.1M CaCl ₂	1mg/ml	40min	—
α -Chymotrypsin	0.08M Tris-HCl buffer (pH 7.8) +0.1M CaCl ₂	1mg/ml	40min	—

有無については表1に示す通りである。各酵素を含まない緩衝液に浸漬した試料を作成し、これを対照標本とした。

尿素および尿酸処理：3週および13月令のマウス皮膚を約 1×1 mm大に細切して、10%尿酸水溶液(pH 0.68)および30%尿素液(0.15 M 酢酸緩衝液, pH 4.8)に、それぞれ5分と2時間22°Cで浸漬した後、通常の電顕試料作成法に従って処理し、電顕的に観察した。

光顕的観察：各年令群のマウス皮膚の一部は10%ホルマリン固定、パラフィン包埋、ヘマトキシリン・エオジン、鍍銀、PAS、アルシアン青(pH 2.5)、エラスチカ・ワンギーソン、アザン染色を施して光顕的に観察した。

成 績

I. 皮膚真皮の構造

1. 生後1日令(幼若期)

光顕所見：生後1日目のマウス真皮は薄く、乳頭層と網状層とを判然と識別することはできない。毛包および毛芽と血管網が目立ち、結合組織細胞は多く、類円形から紡錘形の形態を示す。間質は細網線維とアルシアンブルー陽性物質で満たされている。コラーゲン線維は乏しく、弾性線維は同定されない。PAS陽性物質は表皮基底面や毛包周囲に認められる。血管周囲には少数の脂肪細胞がみられる。

電顕所見：真皮の間質には直径25–40 nm (33 ± 5 nm)のコラーゲン線維(図1A)と、直径5–15 nmのmicrofibrilが認められ、豊富な礎質で埋められている。コラーゲン線維はしばしば $0.74 \pm 0.44 \mu\text{m}$ の線維束を形成する。microfibrilはコラーゲン線維束の内外に認められ、束状配列をとることが多い。弾性線維は未だ認められない。表皮および毛包の基底膜は連続性で、lamina lucidaとlamina densaが区別される。lamina lucidaとlamina densaは共に30–40 nmの

厚さを示す。lamina densaに接着して直径20–30 nmのanchoring fibrilが同定される。毛細血管の内皮細胞は背が高く、互いにtight junctionで接着し、一部は周細胞で包まれている。内皮細胞や周細胞の外周には厚さ60–100 nmの基底膜様の構造物がみられる。大部分の結合組織細胞は比較的良好に発達した粗面小胞体やゴルジ装置を備えており、線維芽細胞の形態をとっている。偽突起と少数のライソゾームをもつ大食細胞や、低電子密度の特殊顆粒を備えた脂肪細胞も散見される。

2. 3週令(成長期)

光顕所見：この時期には真皮乳頭層と網状層とが区別される。乳頭層や毛包周囲には紡錘形の線維芽細胞、細網線維、細いコラーゲン線維が認められ、微細な弾性線維も出現している。弾性線維は特に毛包周囲に多い。アルシアンブルー陽性物質もかなり豊富である。PAS陽性物質は基底膜に一致して認められる。網状層では間質はほぼ太いコラーゲン線維で占められる。アルシアンブルー陽性物質は少なく、細網線維は血管周囲や立毛筋の周囲にみられるにすぎない。網状層表層には弾性線維が形成されている。紡錘形の線維芽細胞がコラーゲン線維間に散在し、少数の大食細胞もみられるが脂肪細胞はまれである。

電顕所見：乳頭層や毛包周囲のコラーゲン線維は直径40–100 nm (60 ± 14 nm)で、 $0.66 \pm 0.28 \mu\text{m}$ の錯走する線維束を形成している。microfibrilは1日目に比べて著しく少ない。大部分のmicrofibrilは直径約10 nmで、束状配列をとって集束し、表皮や毛包基底膜直下や血管周囲に分布している。弾性線維は毛包周囲や乳頭層の網状層移行部に同定される。弾性線維はタンニン酸染色陽性のエラスチン凝集体とこれを取り巻く弾性線維 microfibril からなり、エラスチン凝集体は50–200 nmの大きさを示す。弾性線維の近傍には未だエラスチン凝集体の沈着がないmicrofibril束をみることがある。(図2A)。しばしば小さい弾性線維が互

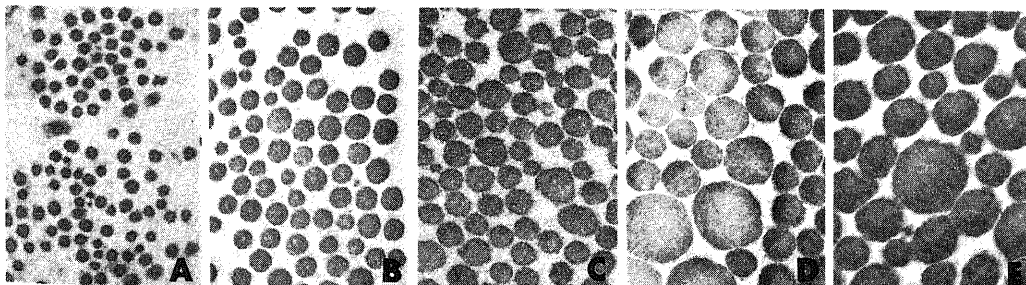


Fig. 1. Cross sections of the collagen fibers in the dermises of mice 1 day (A), 3 weeks (B), 3 months (C), 13 months (D) and 25 months old (E). $\times 30,000$.

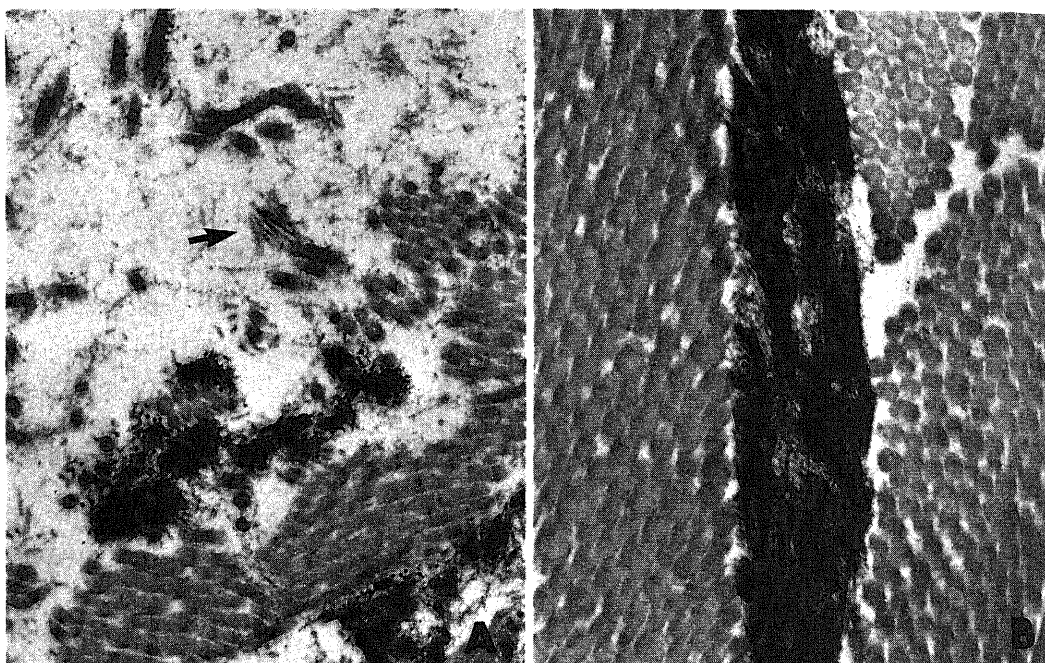


Fig. 2. Immature elastic fibers in the papillary dermis of a 3-week-old mouse (A) representing oxytalan fiber (arrow) and elaunin fibers, and mature elastic fibers in the reticular dermis of a 13-month-old mouse (B). Tannic acid stain, $\times 30,000$.

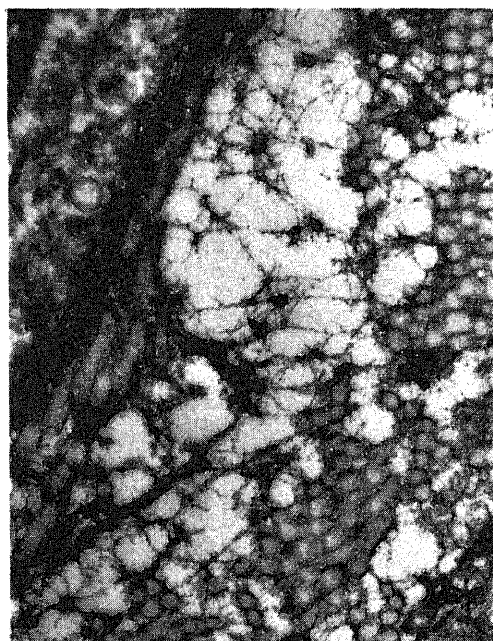


Fig. 3. Fine network composed of ruthenium red (RR) positive filaments and granules representing proteoglycan aggregates in the papillary dermis of a 3-week-old mouse. Individual collagen fibers are invested by thin RR-positive material. Ruthenium red stain, $\times 45,000$.

いに吻合して太い弾性線維を形成している像に遭遇する。コラーゲン線維および線維束の間はRR陽性の直径3–6 nmのフィラメントの網状構造で占められている。フィラメントの網状構造の交点にはRR陽性の20–40 nmの粒子がみられる。コラーゲン線維はRR陽性物質の薄層で包まれ、これにフィラメントが連結している(図3)。乳頭層、毛包周囲や血管周囲には厚いRR陽性物質で包まれたコラーゲン線維をみることがある。このコラーゲン線維は直径40–70 nmで、0.3–1.0 μm の線維束を形成する。光顕でみられる細網線維の局在から類推すると、この線維束は細網線維に相当するものと思われる。

網状層のコラーゲン線維は直径40–120 nm (80 ± 16 nm)である(図1B)。コラーゲン線維は $1.50 \pm 0.70 \mu\text{m}$ の線維束を作って表皮基底面に対し斜交している。網状層表層のコラーゲン線維束間や立毛筋周囲には弾性線維が同定される。小さな弾性線維が線維芽細胞に近接して認められることもある。microfibrilは主に血管周囲や弾性線維の周りに散見される。コラーゲン線維束間の礎質はRR陽性のフィラメントと粒子からなる網状構造をとる。フィラメントも粒子も乳頭層においてみられたと同様の形態である。網状層のコラーゲン線維もRR陽性の薄層で包まれている。線維束内のコラーゲン

線維間隙は狭く、フィラメントは同定されず、まれに粒子がコラーゲン線維に沿って点在する。表皮および毛包の基底膜の厚さは lamina lucida 20–30 nm, hemidesmosome 直下の lamina densa 40–60 nm, hemidesmosome 間の lamina densa 30–40 nm であり, hemidesmosome 直下の lamina densa は 1 日目に比べて明らかに肥厚している。anchoring fibril は直径 20–30 nm で, 直径 30–50 nm のコラーゲン線維間に介在する(図 4 A)。毛細血管の内皮細胞は扁平で, 内皮細胞および周細胞は厚さ 20–30 nm の lamina lucida と 40–60 nm の lamina densa から成る連続性の基底膜で囲まれる。線維芽細胞は乳頭層においても網状層においてもよく発育した粗面小胞体とゴルジ装置を有している。しばしばゴルジ空胞は拡張し, この中に絮状または微細線維状物質を認める。大食細胞は多数のライソゾームと偽突起を備えており, その同定は容易である。

3. 3 月令 (成熟前期)

光顕所見: 毛包周囲には弾性線維が著しく増加する。乳頭層や毛包周囲では細胞成分が減少する。間質にはアルシアンブルー陽性物質はほとんどみられず, 細網線維は基底膜に接して少数認められるにすぎない。その他の間質成分は 3 週令と同様である。網状層

には太いコラーゲン線維が線維束を形成して密に配列し, 細網線維は血管周囲にみられるのみである。弾性線維は著しく増している。特に網状層表層では太い弾性線維が認められる。アルシアンブルー染色は陰性である。

電顕所見: 乳頭層および毛包周囲にみられるコラーゲン線維は直径 40–100 nm (58 ± 12 nm), コラーゲン線維束は直径 $0.82 \pm 0.54 \mu\text{m}$ である。毛包周囲には大小さまざまな弾性線維が多数認められる。乳頭層の表皮基底膜下には外周性弾性線維 microfibril の乏しい小さな弾性線維が認められる。コラーゲン線維および線維束の間は 3 週令と同様の RR 陽性の礎質で埋められている。コラーゲン線維を取り巻く RR 陽性の薄層も 3 週令と変わらない。細網線維に相当すると思われるコラーゲン線維束はこの時期ではほとんど認められない。

網状層のコラーゲン線維は直径 80–180 nm (123 ± 22 nm) (図 1 C), 直径 $2.70 \pm 1.13 \mu\text{m}$ の線維束を形成し, 緻密に配列している。明らかにコラーゲン線維の直径も, 線維束の直径も増大する。注目されることは網状層深層に不整形のコラーゲン線維が出現することである。このコラーゲン線維は直径 200 nm 以上で, 不整形の異常形態をとるので本論文では特に巨大線維と呼ぶことにする。巨大線維は 13 月令以後の網状層に多数みら

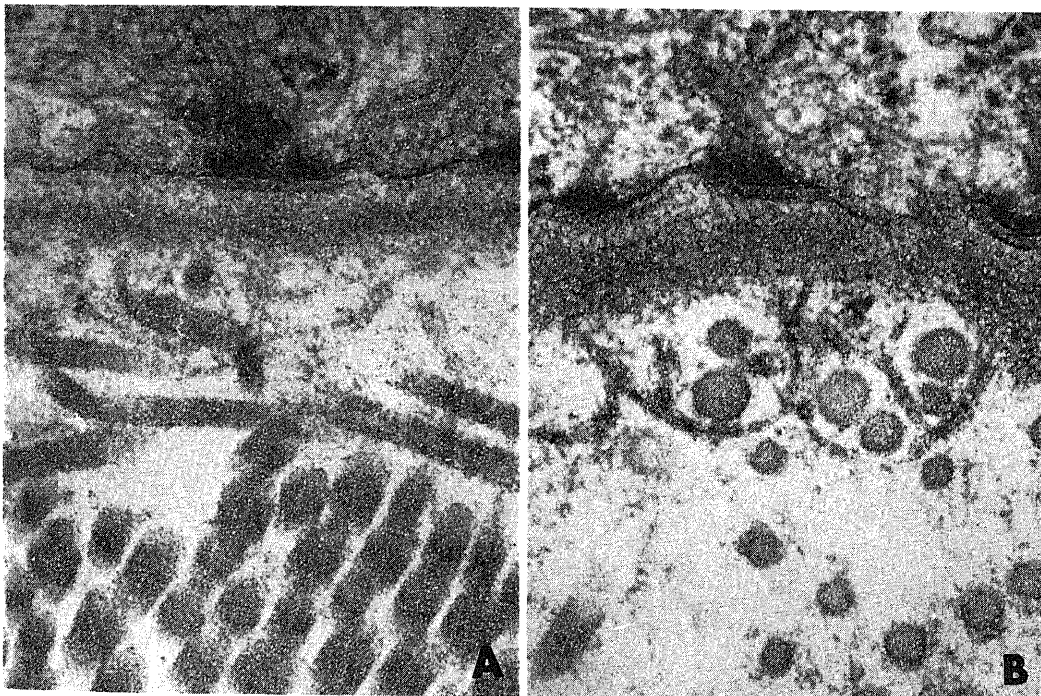


Fig. 4. Epidermal basement membranes and anchoring fibrils of a 3-week-old (A) and a 13-month-old (B) mouse. $\times 90,000$.

れるようになるので次項で詳しく述べる。網状層の弾性線維は大きく、エラスチン凝集体の沈着も豊富である。コラーゲン線維束間に認められる RR 陽性の礎質は 3 週令のそれと同じ形態である。線維束内のコラーゲン線維が緻密に配列している場合には、コラーゲン線維を取り巻く RR 陽性の薄層も粒子もほとんど認められず、太いコラーゲン線維が互いに接着しているようにみえる場合が多い。表皮および毛包の基底膜は 3 週目と異なりほぼ一様の厚さである。lamina lucida 20–30 nm, lamina densa 60–90 nm である。直径 20–40 nm の anchoring fibril は lamina densa 直下のコラーゲン線維をループ状に巻いて配列していることがある。毛細血管の内皮細胞の形態は 3 週令と同様で、基底膜についても lamina lucida 20–30 nm, lamina densa 40–80 nm と変わらない。線維芽細胞は 3 週令と同様、粗面小胞体、ゴルジ装置の発育が良好で、コラーゲン線維束間に細長い突起を伸ばしている。

4. 13 月令 (成熟後期)

光顕所見：この時期の真皮は 3 月令に比べて乳頭層が薄く、網状層が厚い。乳頭層の間質成分も細胞成分も 3 月令のそれと同じである。網状層もほぼ同様であるが、深層のコラーゲン線維または線維束は 3 月令に比

べ太く、線維束間の線維芽細胞は減少している。

電顕所見：乳頭層および毛包周囲の線維成分については 3 月令とほぼ同様である。コラーゲン線維は直径 40–100 nm (58 ± 10 nm) で線維束の直径は $0.84 \pm 0.60 \mu\text{m}$ である。コラーゲン線維や線維束の間には RR 陽性の網状構造が認められるが、この時期のフィラメントには RR 陽性の架状物質が付着していることが多い。架状物質が多量に凝着している場合にはフィラメントは太く剛直性で、枝状構造を示し、RR 陽性の粒子は不明瞭である (図 5 A)。このような部位ではコラーゲン線維は厚い RR 陽性の架状物質で包まれている。

網状層のコラーゲン線維は太く、線維束は大きい。コラーゲン線維は直径 80–300 nm (143 ± 40 nm) (図 1 D)、線維束は直径 $2.96 \pm 1.86 \mu\text{m}$ である。3 月令に出現し始めた巨大線維はこの時期には網状層全層に散見されるようになる。特に、深層ではその数も多く、時に直径が 600 nm に達することがある。巨大線維は横断面でみると凹凸があり、しばしばハツ頭状の形態である。深い切れ込みや小空隙がみられることがある (図 6 A)。縦断面では、66–69 nm の明瞭な横紋周期をもつ短少な線維で、この巨大線維からコラーゲン線維に枝分かれしているのが特徴である (図 6 B)。従って、近

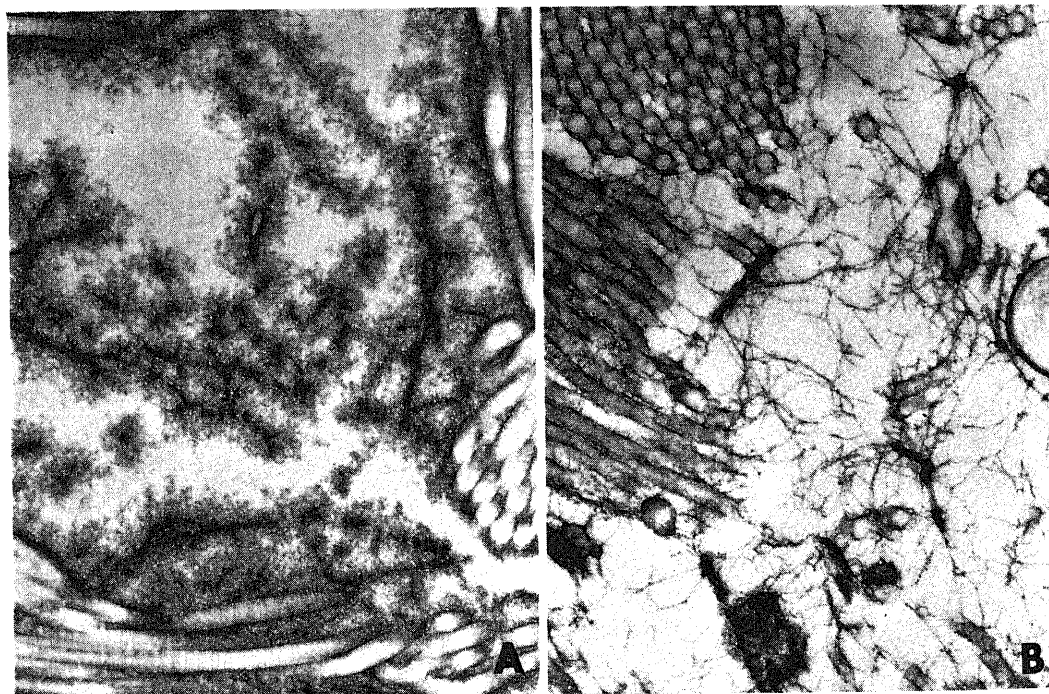


Fig. 5. Thick and rigid filamentous structure with flocculent material (A), and fine network disclosed after incubation with the buffer solution for 90 min (B) in the papillary dermis of a 13-month-old mouse. Ruthenium red stain, $\times 30,000$.

接するコラゲン線維が部分的に融合して形成されたものと考えられる。横断面で認められる切れ込みや小空隙にはRR陽性物質が認められるので、このような構造は枝分かれや不完全な融合によって生ずるものと判断しうる。少数のmicrofibrilが血管周囲に認められる。弾性線維の分布は3月令とほとんど変わらないが、タンニン酸陽性のエラスチン凝集体が大きく、弾性線維microfibrilは相対的に少ない傾向がある(図2B)。コラゲン線維は線維束内で密在しているの、コラゲン線維外周のRR陽性物質は少ないが、線維間隙が広い部位にはRR陽性の架状物質が認められる。巨大線維とコラゲン線維との間隙にも同様の架状物質が多い。また、コラゲン線維束の間はRR陽性の枝状形態をとる礎質で占められることが多い。表皮および毛包基底膜は3月令のそれと同様で、lamina lucida 20-30 nm, lamina densa 60-90 nmである。anchoring fibrilの形態は3月令と同様であるが、anchoring fibrilのほとんどはコラゲン線維をループ状に巻いて配列している(図4B)。毛細血管基底膜は厚さ20-30 nmのlamina lucida, 40-100 nmのlamina densaから成り、lamina densaがやや厚い。線維芽細胞は線維束間に細長い突起を伸ばしている。原形質には拡張した粗面小胞体やゴルジ空胞がみられる。

5. 25月令(老令期)

光顕所見：この時期の真皮の構造は13月令と同一である。

電顕所見：乳頭層、毛包周囲のコラゲン線維は直径40-100 nm (66 ± 16 nm), 線維束は直径 0.80 ± 0.64 nmであり、成長期から老令期までほぼ一定である。弾性線維の大きさ、分布は13月令と同様である。時々束状配列のmicrofibrilが基底膜直下に認められる。

網状層のコラゲン線維は直径80-250 nm (138 ± 47 nm)(図1E)、線維束の直径は $3.34 \pm 2.40 \mu\text{m}$ であり、13月令に比べて増加することはない。巨大線維も混在しているが、13月令とほぼ同様の分布、大きさを示す。表皮、毛包および毛細血管の基底膜の厚さは13月令と変わらず、anchoring fibrilの大きさ、配列も同様である。線維芽細胞の形態は13月令と同様である。

II. RR陽性物質の酵素消化

1. 3週令

ストレプトミセス・ヒアルロニダーゼまたはコンドロイチナーゼAC処理を行うと乳頭層においても網状層においてもRR陽性のフィラメントは消失し、粒子が部分的に残存する。コンドロイチナーゼABC処理ではフィラメント、粒子共に完全に消失する。これらの酵素消化ではコラゲン線維を取り巻く薄層はほとん

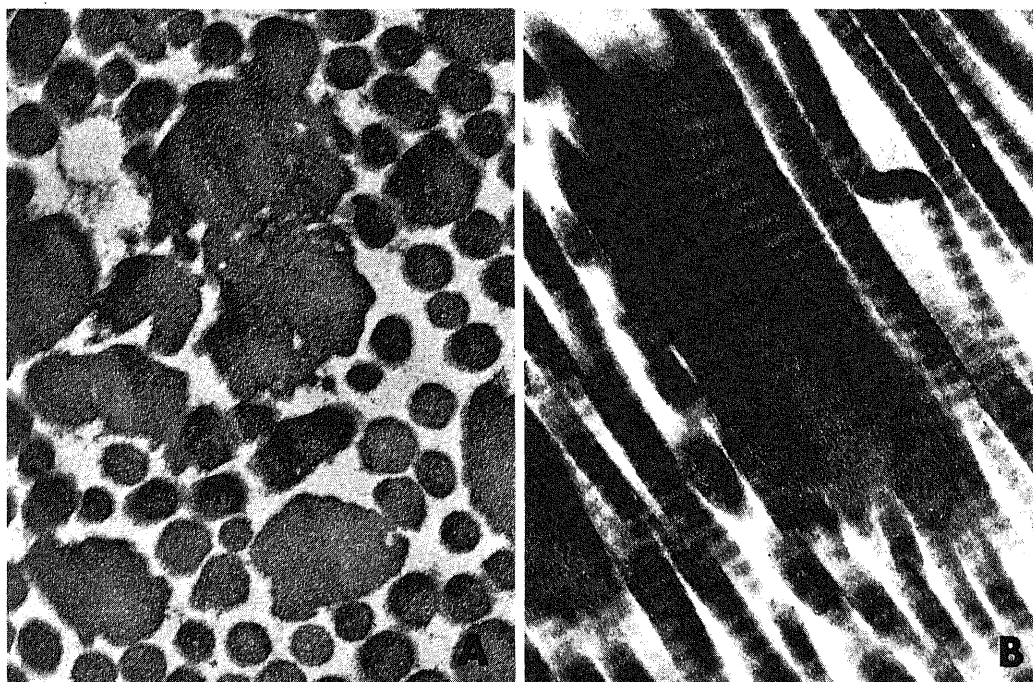


Fig. 6. Giant collagen fibers appearing in the reticular dermis of a 13-month-old mouse. A, cross section; B, longitudinal section. $\times 45,000$.

ど消失しない。トリプシンおよび α -キモトリプシン処理の場合には網状構造は一部疎開することがあるがほぼ保たれている。コラーゲン線維外周のRR陽性物質は完全に消化される。

2. 13 月 令

酵素を含まない緩衝液でincubateするとRR陽性の架状物質は消失し、直径3-7 nmのフィラメントと20-60 nmの粒子から成る網状構造が明瞭に認められるようになる(図5 B)。このことはフィラメントに付着していた架状物質が緩衝液で容易に流出してしまうことを示している。同じように巨大線維やコラーゲン線維周囲の架状物質は緩衝液で消失する。ストレプトミセス・ヒアルロニダーゼおよびコンドロイチナーゼAC処理では、ほぼ3週令の場合と同様の結果であるが、コラーゲン線維の周りの粒子はより残存する傾向がある(図7)。コンドロイチナーゼABC処理の場合にはフィラメントも粒子も完全に消化される(図8)。これらの酵素に対してコラーゲン線維外周の薄層は抵抗性を示す。トリプシンおよび α -キモトリプシン消化では3週令と同様にコラーゲン線維外周の薄層は消失する(図9)。

III. 尿素, 脲酸処理およびコラーゲナーゼ消化

3週と13月令のマウス皮膚を尿素、脲酸、コラーゲナーゼに浸漬し、特に真皮網状層のコラーゲン線維の変性状態を比較検討した。

1. 尿素 処 理

尿素を作用させるとコラーゲン線維は膨化し、細線維に解離する。注目されることはこの変性過程に細線維がラセン構造を示すことである。5分および2時間尿素溶液に浸漬してコラーゲン線維の変性過程を観察すると、次の3段階の形態変化をとるものと推定される。まずコラーゲン線維に斜めに走る亀裂が生じ、亀裂部には3-20 nm直径の細線維が認められるようになる(軽度変性)。この程度の変性の場合には部分的に63-66 nmの横紋周期が認められる。次にコラーゲン線維は著しく膨化し、横紋が消失すると共に、ラセン状に回転して走る3-20 nm直径の細線維に解離する(中等度変性)。更に変性が進むとラセン構造は不明瞭になり、少数の直径3-6 nmの細線維がゆるくねじれ合って走る構造を示す(高度変性)(図10)。

3週令と13月令のマウス真皮のコラーゲン線維を比較してみると明らかに13月令の線維の変性程度は軽

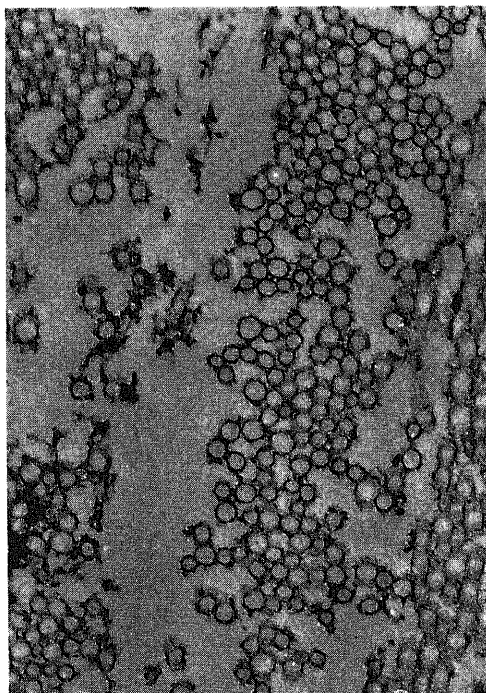


Fig. 7. Disappearance of filaments and partial preservation of granules after treatment with chondroitinase AC in the papillary dermis of a 13-month-old mouse. Ruthenium red stain, $\times 30,000$.

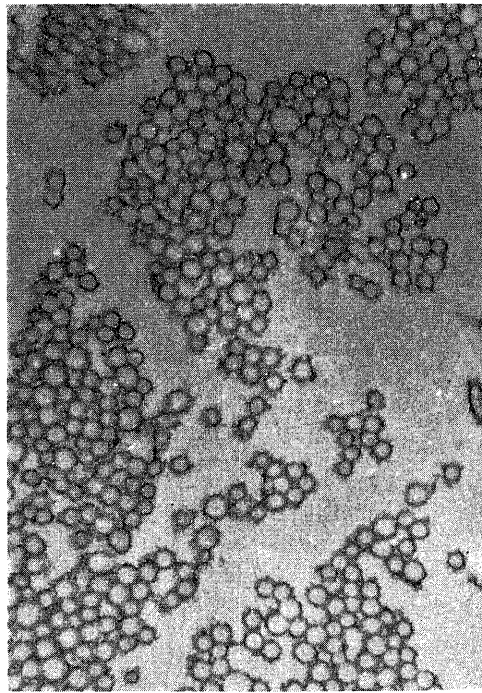


Fig. 8. Complete digestion of RR-positive filaments and granules after treatment with chondroitinase ABC in the papillary dermis of a 13-month-old mouse. Ruthenium red stain, $\times 30,000$.

度である。3週令のマウスの場合には5分間の浸漬で大部分のコラゲン線維に軽度の変性が、2時間の浸漬で中等度から高度の変性が認められる。一方、13月令では5分間の浸漬でコラゲン線維に何ら形態変化が起こらず、2時間の浸漬で軽度から中等度の変性を示すコラゲン線維がみられるにすぎない。巨大線維は軽度変性を示すにとどまり、特に切れ込みに一致して細線維が解離している像をみることが多い。尿素処理によってラセン構造が現れる場合には、ラセンの角度は $65-80^\circ$ 、ピッチは $1.0-2.0\mu\text{m}$ である。

2. 尿酸処理

尿酸処理による真皮網状層のコラゲン線維の変性過程は尿素による場合とほぼ同様である。特異なことは尿酸によるコラゲン線維の形態変化は尿素の場合に比べて、加齢に伴う差異が少ないことである。すなわち、3週令マウスのコラゲン線維は5分間の浸漬でも2時間の浸漬でも大部分は中等度の変性を示し、これに対し13月令の場合には5分間で軽度の変性を、2時間の浸漬で軽度から中等度の変性を示す(図11)。更に、3週令で2時間浸漬の場合においても少数のコラゲン線維が高度変性をきたすに留まる。巨大線維も2時間の

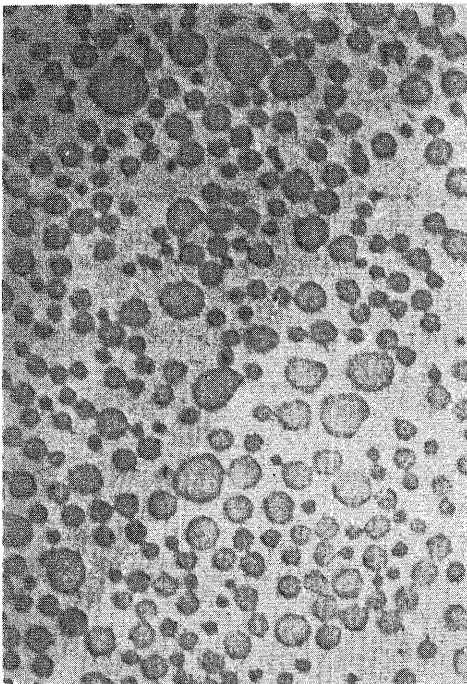


Fig. 9. Complete elimination of RR-positive material investing collagen fibers by treatment with α -chymotrypsin for 90 min in the reticular dermis of a 13-month-old mouse. Ruthenium red stain, $\times 30,000$.



Fig. 10. Collagen fibers in the reticular dermis of a 13-month-old mouse treated with urea for 2 hr. $\times 30,000$.



Fig. 11. Collagen fibers in the reticular dermis of a 13-month-old mouse of treatment with oxalic acid for 2 hr. $\times 30,000$.

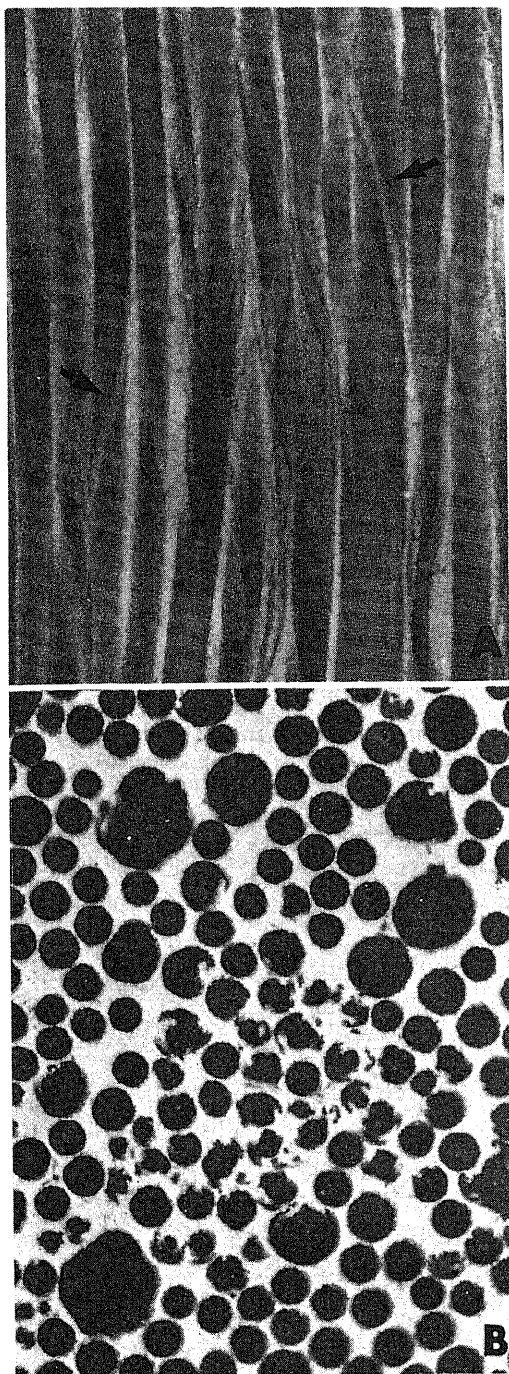


Fig. 12. Collagen fibers in the reticular dermis of a 13-month-old mouse after treatment with bacterial collagenase for 40 min. A, longitudinal section; B, cross section. Note electron lucent oblique lines (arrow) in the longitudinal section and irregular clefts in the cross section. $\times 45,000$.

浸漬の場合に軽度から中等度の変性を示す。酢酸処理による細線維のラセンの角度は $60-75^\circ$ で、ピッチは $1.5-2.5 \mu\text{m}$ である。

3. コラゲナーゼ消化

コラゲナーゼ消化を 40 分間行くと、コラゲン線維はその辺縁から徐々に細線維に解離し、つづいて融解消失する。コラゲン線維の消化過程を縦断面で観察すると、縦走する $5-15 \text{ nm}$ 直径の細線維に解離して融解する (図 12 A)。一方、横断面でみるとコラゲン線維はその辺縁部から消化を受けて微細な裂隙を形成すると共に、細線維が辺縁部にけば立つように現れる (図 12 B)。つづいて線維は細線維に分断され、ついには細線維は減少し消失する。3 週と 13 月令のマウスのコラゲン線維の酵素感受性は明らかに異なる。3 週令の場合にはコラゲン線維の大部分は細線維化し、一部融解消失していることが多い。13 月令の場合には辺縁部のみ細線維に解離し、横紋周期が残存しているコラゲン線維が多く、完全に細線維に解離するコラゲン線維は散在性に認められるにすぎない。巨大線維は切れ込みが虫食い状に開大し、この部分に細線維が現れる程度の消化を受けている。13 月令にみられる変性の軽いコラゲン線維には時々斜走する線維が出現することがある。同時に、線維の長軸に対して $75-85^\circ$ の角度をなす微細な裂隙がみられることが注目される。

表皮、毛包基底膜はコラゲナーゼ処理によって、lamina densa が虫食い状に消化される。また、anchoring fibril は完全に消化される。

考 察

加齢に関連する変化は一般に成熟以後に始まり経年的に進行し、病的疾患に基づく病変以外の変化を指すものと定義されている¹⁵⁾。しかし、この変化は老令期に突然現れるのではなく、成長期や成熟期前半から徐々に起こり、老令期になるとより明瞭に認めることができる性質をもつと考えられる。本研究においては老令期に認められたマウス皮膚の間質の変化は既に成熟前期に出現し始め、成熟後期においてはほとんど完成するようになることが確認されたので、これらの変化を加齢に伴う変化としてとらえ、特に差異が明らかな成長期と成熟後期の間質の変化を比較検討し、考察を加えることにする。

I. コラゲン線維

1. コラゲン線維および線維束の直径

加齢に伴ってマウス真皮網状層のコラゲン線維および線維束はその太さを増し、緻密に配列するようになる。このようにコラゲン線維が経年的に太くなることは既に Gross¹⁰⁾ によって報告され、加齢による形態学

的变化の一つであるとされている。注目されることは図13に示すように網状層のコラゲン線維および線維束の太さは成長期から成熟後期まで漸次増加するが、成熟後期と老令期の間には有意差は認められないことである。ヒドロキシプロリン量で測定されるコラゲン量は一般に加齢と共に増加すると言われている¹⁶⁾¹⁷⁾が、成熟期と老令期の間にはコラゲン量に差異はないという報告¹⁸⁾やむしろ老令期に至ると減少するという報告¹⁹⁾もみられる。従って、本研究で示されたように成長期から成熟期まではコラゲン線維は太さを増し、老令期にはコラゲンのturn overが極めて緩徐である²⁰⁾ためにコラゲンの増減が少なく、コラゲン線維の太さは変わらないものと考えることができる。

一方、加齢に伴ってコラゲン線維は熱収縮力が増加すること¹⁾、中性塩や弱酸可溶性コラゲンが減少すること²⁾、コラゲナーゼに対する感受性が低下すること³⁾や酸に対する膨潤性が低下すること⁴⁾などが知られている。これらの変化はコラゲン分子間の共有性架橋結合が増加することによるものと考えられている。しかしながら、どのような架橋結合が加齢に伴って形成されるのかについての知識は未だ乏しい。例えば dehydro-hydroxylysiononorleucine や dehydro-di-hydroxylysiononorleucine のような還元性架橋²¹⁾は全て成長期までに最大値に達し、以後急速に減少することが報告されている²²⁾。また、近年、藤本らによって、骨、軟骨、アキレス腱などのコラゲンに加齢と共に増

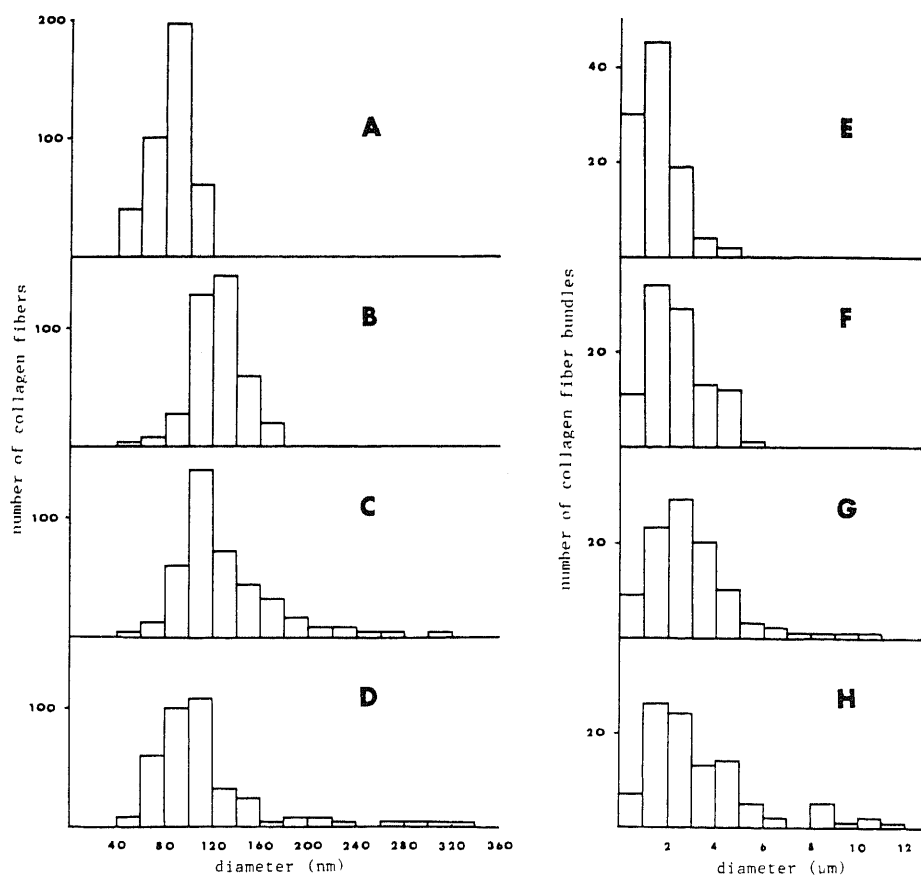


Fig. 13. Diameter histograms of collagen fiber (A-D) and fiber bundle (E-H) in the reticular layers of mice of 3 weeks (A and E), 3 months (B and F), 13 months (C and G) and 25 months old (D and H). A : $n=400$, mean=80nm, S.D.=16nm. B : $n=400$, mean=123nm, S.D.=22nm. C : $n=400$, mean=143nm, S.D.=40nm. D : $n=400$, mean=138nm, S.D.=47nm. E : $n=100$, mean=1.50 μ m, S.D.=0.70 μ m. F : $n=100$, mean=2.70 μ m, S.D.=1.13 μ m. G : $n=100$, mean=2.96 μ m, S.D.=1.86 μ m. H : $n=100$, mean=3.34 μ m, S.D.=2.40 μ m.

加する非還元性架橋成分である pyridinoline²³⁾が発見されたが、皮膚ではこの架橋成分は未だ証明されていない。しかし、本研究において示されたように、13月令マウスの網状層の太いコラーゲン線維と、3週令の細いコラーゲン線維の尿素、蔞酸、コラーゲナーゼ作用に対する感受性は明らかに異なっている。尿素は一種の蛋白質の変性剤であり、コラーゲン線維に対しては水素結合や疎水結合を分断し、共有結合にはほとんど作用しない性質をもっている²⁴⁾。本研究で示されるように尿素の作用に対して3週令のマウス皮膚網状層のコラーゲン線維の多くは細線維に解離し、一方、13月令の網状層の太い線維ではこのような作用を受けにくい。このことは少なくとも加齢マウスにみられる太いコラーゲン線維がより多くの共有性架橋結合を内在していることを示しているものと理解される。蔞酸は強酸としてコラーゲン線維に非特異的に作用し、非共有結合のみならず共有結合をも分断すると考えられる。前述した還元性架橋は酸に不安定な架橋である²¹⁾。本研究では3週令よりも13月令マウスのコラーゲン線維が蔞酸に対して若干安定性が高いことが確認されたので、還元性架橋以外の酸安定性の架橋が太いコラーゲン線維には増加しているものと考えられよう。動物性コラーゲナーゼはコラーゲン分子のN末端から3/4の部位を特異的に切断する²⁵⁾。これに対して、細菌性コラーゲナーゼは必ずしも一定部位のペプチド結合を切断するものではなく、同時に、市販のコラーゲナーゼには種々の非特異的プロテアーゼが含まれていると考えられている²⁶⁾ので、その作用機序は複雑である。Weiss²⁶⁾はこの種のコラーゲナーゼが線維状の不溶性コラーゲンに作用する場合には最初に“タマネギをむく”ように線維の表面に働き、その後コラーゲン分子のペプチド結合を切断するものと推測している。今回、組織内コラーゲン線維に対する細菌性コラーゲナーゼの作用を検討してみると、Weiss²⁶⁾の指摘する様なコラーゲン線維の消化過程が確認されると共に、太い線維ほどコラーゲナーゼに対する抵抗性が高かった。従って、加齢に伴って形成される太い線維には、既に尿素や蔞酸処理で示唆されるように、各種プロテアーゼ作用にも比較的安定な非還元性架橋が存在するものと推定される。

2. 巨大線維

本研究で特に注目されるのは、成熟期以後に出現する特異な形態をもった巨大線維である。同様の形態を示すコラーゲン線維はNemetschekら¹¹⁾によって既に報告され、老令期における皮膚のコラーゲン線維の特徴とされている。彼らはこのような線維は、コラーゲン線維同志のみせかけの融合であろうと述べている。今回、詳細な検討を加えることによって、この巨大線維は既

に成熟期前半に出現し始め、その形態発生については隣接する線維が融合して形成されるもので、単なるみせかけの融合ではないと考えられた。

異常形態をとるコラーゲン線維は、Ehlers-Danlos症候群²⁷⁾などのコラーゲンの遺伝性疾患におけるコラーゲン線維、Staubesandら²⁸⁾がinterfibrillar collagen dysplasiaと呼ぶ高血圧や糖尿病の血管壁にみられる線維、老化軟骨に出現するamiantoid線維²⁹⁾が挙げられる。異常な線維形態をとるコラーゲンの遺伝性疾患にはEhlers-Danlos症候群²⁷⁾、dermatospraxis³⁰⁾、cutis laxa³¹⁾などが報告されている。このような疾患におけるコラーゲン線維はしばしば細線維がほぐれたように見え、横紋も明瞭でないことが多く、特に、dermatospraxisでは象形文字様と表現される異様な形態をとるので、巨大線維とは全く違うものと考えられる。Staubesandら²⁸⁾が指摘した異常コラーゲン線維は、高血圧や糖尿病、静脈瘤、Dupuytren拘縮、手根管症候群などの疾患で認められる³²⁾が、これらの線維の多くは細線維のゆるい結合から成り、横紋周期も必ずしも明瞭ではないので巨大線維とは異質の形態をとっている。これに対して、amiantoid線維は極めて太く、明瞭な横紋をもち、時に末梢部でコラーゲン線維に枝分かれしており、本論文の巨大線維に最も類似しているように思われる。このようなamiantoid線維は老化軟骨の他に変形性関節症³³⁾、滑膜肉腫や悪性神経鞘腫³⁴⁾、ババイン消化後の関節軟骨³⁵⁾などで報告されている。amiantoid線維の形態発生については、既存のコラーゲン線維の融合であるという説²⁹⁾と新生コラーゲンの異常凝集によって形成されるという説³⁴⁾がある。既存のコラーゲン線維の融合であるという説は、この線維近傍にコラーゲン産生細胞が認められないことが主な理由である。また、新しく作られたコラーゲンの異常凝集であるという説は、遺伝性疾患や病的状態において異常線維が出現することから類推しているものである。本研究では下記の見解により、巨大線維は隣接するコラーゲン線維が互いに接着し、何らかの結合が起こって融合した線維であると結論された。第一に巨大線維近傍に線維芽細胞が認められることがないことである。第二に巨大線維には横紋が明瞭で、成熟コラーゲン線維に枝分かれする構造をとることである。第三に巨大線維の出現に先立ってコラーゲン線維が密着する像をみることができることである。また、コラーゲナーゼの作用に対して巨大線維は他の太いコラーゲン線維と同様の感受性を示すことである。

次にどのようにしてこのような融合が起こるかという問題が生ずる。Staubesandら³²⁾は異常な形態をとるコラーゲン線維が出現する場合には、1) 異常コラ

ン分子が合成分泌されること、2) リジロキシダーゼなどの特異酵素欠乏によってコラーゲン分子の細胞外凝集に異常が起こること、3) 礎質の変化に引き続いて異常な線維凝集、改築、分解が起こることの3つの可能性があるとして述べている。しかしながら、遺伝的な酵素欠損や異常コラーゲン分子の産生が加齢に伴って生ずるとは考えにくい。従って、3) の可能性が最も考えられる。GAG や糖蛋白の変化が異常コラーゲン線維の形成に関与しているという報告がある²⁹⁾³⁶⁾。本研究においては、巨大線維が出現するのに先行して、線維束内のコラーゲン線維が部分的に接着するようになることが注目される。このような部位ではコラーゲン線維を包む糖蛋白の薄層も不明瞭である。従って、巨大線維は太いコラーゲン線維を取り巻く GAG や糖蛋白が部分的に減少し、このため隣接する線維が互いに密着し合うようになり、線維間の結合が進行することによって形成されるものと思われる。

3. コラーゲン線維のラセン構造

尿素および蔭酸処理を行うとコラーゲン線維は膨化し、3–20 nm 直径の細線維から成るラセン構造を示すようになることは興味深い。コラーゲン線維のラセン構造は尿素や塩酸グアニジンによって生ずる³⁷⁾ばかりでなく、未固定材料をメサクリレートで包埋した場合³⁸⁾や、凍結切断法で観察した場合³⁹⁾にもみることができる。未固定メサクリレート包埋の大動脈外膜コラーゲン線維においては、ラセン状に配列する細線維の直径は 3.0–3.5 nm、ラセンのピッチは $1.07 \mu\text{m}$ ³⁸⁾、心臓のコラーゲン線維の凍結切断法の場合には細線維の直径は 7–8 nm、ラセンのピッチは 750 nm ³⁹⁾であると報告されている。この細線維は Smith⁴⁰⁾によって提唱された 5 本のトロポコラーゲンからなる microfibril に相当するので、生の状態の成熟コラーゲン線維は microfibril がラセン状に回転し、より合わさって形成されるものと主張されている。一方、Lilie ら³⁷⁾は塩酸グアニジンや尿素処理によって生じたコラーゲン線維のラセン構造の場合には $1.09 \mu\text{m}$ のピッチであると報告している。著者の実験では尿素で $1.0\text{--}2.0 \mu\text{m}$ ピッチ、 $65\text{--}80^\circ$ 角度；蔭酸で $1.5\text{--}2.5 \mu\text{m}$ ピッチ、 $60\text{--}75^\circ$ 角度であり、細線維は 3–20 nm の直径であった。このような角度、ピッチや細線維の直径の数値が著者を含め報告者によって異なるのはコラーゲン線維の太さ、使用薬剤の種類、薬剤の pH、濃度、作用時間などの影響によるものと考えられる。コラーゲナーゼ処理によっては、コラーゲン線維は辺縁から徐々に直径 5–15 nm の細線維に解離し、ラセン構造はとらないことが多い。これは既に述べたようにコラーゲナーゼが尿素や蔭酸と違う作用をもつことによるとと思われる。注意深く観察する

と、横断面の虫食い状に消化されている部分に一致して縦断面では $75\text{--}85^\circ$ の角度をもって斜走する裂隙が認められることがある。この裂隙はコラーゲナーゼによってラセン状に配列している細線維が消化されてきた可能性がある。コラーゲナーゼ処理ではコラーゲン線維は膨化することが少ないので、このような斜走する裂隙の角度が、尿素および蔭酸の場合よりも正確に“生の状態”の線維の角度を表すと思われるが、その数は少なく、ピッチを正確に測定することが難しい。いずれにしても皮膚のコラーゲン線維に認められるラセン構造は単なるコラーゲン線維の変性過程に生ずるみせかけの構造ではなく、むしろ未固定の状態における成熟コラーゲン線維の構造そのものを示すものであろう。

II. GAG と糖蛋白

真皮にはヒアルロン酸、デルマトン硫酸、コンドロイチン 6 硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸の 5 種の GAG が存在する。このうちヒアルロン酸とデルマトン硫酸が主要成分である。ヘパリンは肥肝細胞内に存在⁴¹⁾し、ヘパラン硫酸は主に基底膜に局在すること⁴²⁾が知られている。生化学的に GAG の量は胎生期から成長期まで減少し続け、成熟期以後にはほとんど変化しない。成長期までの GAG 量の減少はヒアルロン酸の減少によるもので、デルマトン硫酸の量は特に変わらないと報告されている⁴³⁾。組織内では、硫酸化 GAG は core protein と結合し、プロテオグリカンとして存在している。ヒアルロン酸はプロテオグリカンと link protein を介して非共有性に結合して巨大なプロテオグリカン凝集体を形成している⁴³⁾。形態学的にはプロテオグリカン凝集体は RR 染色によって粒子とフィラメントからなる網状構造として描出する。特に、粒子は標本作製の際の脱水処理により本来のプロテオグリカン凝集体の“domain”が複雑に収縮したものと理解されている⁴⁴⁾。

3 週、13 月令のマウス真皮における RR 陽性の網状構造はコンドロイチナーゼ ABC 処理により完全に消失する。ストレプトミセス・ヒアルロニダーゼやコンドロイチナーゼ AC 消化によってはフィラメントの消失がみられるが、粒子は一部残存する。従って、フィラメントはヒアルロン酸を主成分とする GAG、粒子はデルマトン硫酸やヒアルロン酸を含むプロテオグリカン凝集体を表していると考えられる。

3 週令と 13 月令のマウス真皮における礎質の性状を比較してみると、13 月令のマウス真皮のプロテオグリカン凝集体には RR 陽性の架状物質が付着していることが多かった。この架状物質は対照緩衝液によって容易に消失するので組織液に含まれる血漿成分が凝集しているものであろう。このような構造はしばしば滑

膜にも認められることが報告されている⁴⁵⁾。GAGは血漿成分と静電的に結合することが知られている⁴⁶⁾。また、血漿成分の約1/4が血管外の細胞間質組織液として分布している⁴⁷⁾。血管基底膜は3週令と13月令の間に特に差異は認められなかったので、上記の変化が病的であるとは思われない。従って、加齢と共に真皮のコラゲン線維が緻密化することに伴い組織液の分布に不均衡が起こり、線維束間に組織液が貯留することによって血漿成分がGAGに付着するものと考えられる。13月令マウスの対照標本では、3週令の場合と同様にフィラメントと粒子からなる網状構造が認められた。このことはプロテオグリカン凝集体の構造には3週令と13月令との間に差がないことを示している。

3週令のマウスにおいてはコラゲン線維の全周を取り囲むRR陽性の薄層は、トリプシンまたは α -キモトリプシンで消化され易く、コンドロイチナーゼABCでは全く消化されないことから糖蛋白であると考えられる。13月令においてもコラゲン線維が密着している場合を除いてこの薄層が同定される。13月令マウスにみられる巨大線維周囲には血漿成分をみることがあるが、この場合には糖蛋白の薄層が巨大線維を取り巻いている。これらのことはコラゲン線維間にはGAGと組織液に加えて構造糖蛋白が存在していることを示しているものであろう。皮膚に存在する構造糖蛋白としてフィブロネクチン⁴⁸⁾、ラミニン⁴⁹⁾、microfibril糖蛋白⁵⁰⁾が知られている。このうち、ラミニンは専ら基底膜に局在し、microfibril糖蛋白は弾性線維の構成成分である。フィブロネクチンは線維芽細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞などの細胞周囲やコラゲン線維周囲に存在する⁴⁸⁾。従って、本研究で示されたコラゲン線維周囲の糖蛋白はフィブロネクチンである可能性が最も高い。

III. 弾性線維

弾性線維は形態学的に中央の無構造部分とその周囲を取り巻くmicrofibrilの二成分からなる⁵⁰⁾。無構造部分はエラスチン凝集体で、外周性microfibrilは糖蛋白であることが知られている⁵⁰⁾。成熟ヒト真皮の弾性線維の構築は乳頭層下部にelaunin fiberの網状構造があり、そこから垂直に表皮基底膜に向かってoxytalan fiberが分枝し、網状層に向かっては太いelastic fiberが分枝しているものである⁵¹⁾。oxytalan fiberは弾性線維microfibrilの束状集合体で、未だエラスチンの沈着が認められない線維である。elaunin fiberは少量のエラスチン凝集体がoxytalan fiberに沈着した弾性線維である。elaunin fiberは互いに吻合し、エラスチン凝集体の増量と共に成熟した弾性線維に成長すると言われている。マウスにおいても生後から弾性線維の形成が始まり、3週令から3月令にかけて真皮

乳頭層、毛包周囲、網状層表層でelaunin fiberが時々吻合を行い太い成熟弾性線維に成長することが確認されたので、ヒトにおけると同様の過程をとって弾性線維は形成されると考えられる。

加齢に伴う弾性線維の変化は乳頭層に現れるという報告⁵²⁾がある。Bouissouら⁵²⁾は乳頭層の弾性線維の変化の程度をType 0-IIIまでの4種に分類した。Type 0は正常皮膚、Type Iは乳頭層の弾性線維が細くなり、数が減少したもの、Type IIは乳頭層の弾性線維が消失したもの、Type IIIはType IIの変化が網状層表層にまで広がっているものである。彼らはこの変化が加齢および動脈硬化の程度と密接に関係していると述べている。更に、日光照射部位には乳頭層にelastosisが起こり、顆粒状や虫食い状の弾性線維が出現することが知られている¹²⁾⁵³⁾。また、最近、直接日光照射を受けていない老令期の皮膚にも乳頭層の弾性線維にelastolysisが起こることが報告されている¹²⁾。しかしながら、この場合には間接的な日光照射の影響を完全に否定しえない。本研究では、13月令マウスにおいても25月令においても上記のような変化は確認されなかった。従って、加齢に伴って起きる動脈硬化や長期間にわたる直接または間接的な日光照射を除くと、弾性線維には特別な加齢変化は起こらないものと考えられる。

IV. 表皮基底膜とanchoring fibril

表皮基底膜は、1)表皮と真皮の接着、2)表皮の機械的支持、3)アルブミンのような高分子の物質の通過に対するbarrierの3つの機能を有する⁵⁴⁾。lamina densaはIV型コラゲンとラミニンから成り、表皮の機械的支持に関与している。また、lamina lucidaにはラミニンとGAGおそらくヘパラン硫酸が存在し、接着機能と高分子物質の通過を阻止する役割を果たしている⁴²⁾⁵⁵⁾。加齢と表皮基底膜の厚さの関係を調べてみると、lamina densaは3月令までマウスの成長と共に徐々に肥厚するが、それ以後は一定であった。また、lamina lucidaはlamina densaの肥厚に伴って若干狭小化する傾向が認められるにすぎなかった。従って、このようなlamina densaの肥厚とlamina lucidaの狭小化は加齢に伴う変化というよりは成長、成熟における基底膜の機能の完成を示すものと解釈すべきと思われる。

anchoring fibrilは本研究でも示されたように、コラゲナーゼで消化されることからコラゲンの一種であろうと推測され、これを支持する報告⁵⁶⁾もみられる。コラゲン分子種についてはV型コラゲンが含まれている可能性が推定されているが⁵⁶⁾、未だ証明されていない現状である。anchoring fibrilは、皮膚の他に歯肉扁平上

皮基底膜直下に同定される⁵⁷⁾ように、機械的刺激を受けやすい表皮、粘膜の基底膜と結合組織間質との結合を強化する構造物であると考えられる。今回、加齢に伴う anchoring fibril の形態変化を追跡してみると、1日令と3週令のマウスでは基底膜に垂直に並び、3月令マウスでは時々 anchoring fibril がループ状に配列し、13月令と25月令になると、ほとんどが細いコラーゲン線維を巻き込んでループ状に配列するようになる。この経年的な変化は基底膜の成熟後に表皮と真皮との結合を補強するという anchoring fibril の役割を示すものと思われる。

結 論

細胞外マトリックス構成成分の加齢に伴う超微構造的変化を知る目的で、1日(幼若期)、3週(成長期)、3月(成熟前期)、13月(成熟後期)、25月令(老令期)のマウス皮膚を電顕的に観察した。特に最も差異のみられた成長期と成熟後期の真皮については、尿素、蔞酸処理並びにコラーゲナーゼ消化試験を加えて比較検討し、次の結果を得た。

1. 真皮網状層におけるコラーゲン線維とコラーゲン線維束の直径はそれぞれ3週令 80 ± 16 nm, 1.50 ± 0.70 μ m; 3月令 123 ± 22 nm, 2.70 ± 1.13 μ m; 13月令 143 ± 40 nm, 2.96 ± 1.86 μ m; 25月令 138 ± 47 nm, 3.34 ± 2.40 μ m であり、成熟後期まで加齢と共に増加した。成熟後期と老令期との間にはコラーゲン線維およびコラーゲン線維束の直径に有意な差異は認められなかった。尿素、蔞酸およびコラーゲナーゼの作用に対して、13月令マウスの網状層コラーゲン線維は3週令のそれより抵抗性が高かった。このことは加齢に伴ってコラーゲン線維が太くなるとコラーゲン分子間の架橋結合が増加することとほぼ平行しているものと考えられた。

2. 成熟後期および老令期の真皮網状層にはしばしば直径200 nm以上の不整形の巨大コラーゲン線維が出現した。この線維は隣接するコラーゲン線維の部分的な融合によって形成され、この形成にはコラーゲン線維間のGAGと糖蛋白の減少が関与しているものと考えられた。

3. 尿素および蔞酸処理によってコラーゲン線維は膨化し、3-20 nm直径の細線維から成るラセン構造を示した。コラーゲナーゼ処理によってもコラーゲン線維は辺縁部から消化を受け、細線維が消失することによって75-85°の角度のラセン構造を示すことがあった。従って、成熟コラーゲン線維はmicrofibrilがラセン状により合わさって形成されているものと推定された。

4. 加齢と共に乳頭層や網状層のコラーゲン線維束間

のプロテオグリカン凝集体には血漿成分が多量に付着することが観察された。このことは加齢に伴ってコラーゲン線維が緻密に配列するようになると共に、組織液に含まれる血漿成分が線維束間に凝集することを表していると思われる。

5. 弾性線維は成長期から成熟期までの間に互いに吻合して太い成熟弾性線維に成長し、その数も増加したが、成熟期以後はほぼ一定で、その分布、形態に異常は認められなかった。表皮、毛包基底膜および血管の基底膜には加齢に伴って起こる特異な変化はみられなかった。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導を賜りました梶川欽一郎名誉教授、御校閲を賜りました中西功夫教授に深謝の意を表します。また、研究遂行に際して御助言、御協力を戴きました教室員各位と電子顕微鏡室技術員の方々に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Verzar, F.: Aging of the collagen fiber. *Int. Rev. Connect. Tissue Res.*, **2**, 243-300 (1964).
- 2) Gross, J.: Studies on the formation of collagen. II. The influence of growth rate on neutral salt extracts of guinea pig dermis. *J. Exp. Med.*, **107**, 265-277 (1958).
- 3) Kohn, R. R. & Rollerson, E.: Aging of human collagen in relation to susceptibility to the action of collagenase. *J. Gerontol.*, **15**, 10-14 (1960).
- 4) Banfield, W. G.: The solubility and swelling of collagen in dilute acid with age variations in man. *Anat. Rec.*, **114**, 157-171 (1952).
- 5) Epstein, E. H.: [α_1 (III)]₃ Human skin collagen released by pepsin and preponderance in fetal life. *J. Biol. Chem.*, **249**, 3225-3231 (1974).
- 6) Labella, F. S. & Vivian, S.: Amino acid composition of elastin in the developing human aorta. *Biochim. Biophys. Acta*, **133**, 189-194 (1967).
- 7) Lansing, A. I., Roberts, E., Ramasarma, G. B., Rosenthal, T. B. & Alex, M.: Changes with age in amino acid composition of arterial elastin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **76**, 714-717 (1951).
- 8) Loewi, G. & Meyer, K.: The acid mucopolysaccharides of embryonic skin. *Biochim. Biophys. Acta*, **27**, 453-456 (1958).
- 9) Breen, M., Weinstein, H. G., Johnson, R. L., Veis, A. & Marshall, R. T.: Acidic glycosaminoglycans in human skin during fetal development

- and adult life. *Biochim. Biophys. Acta*, **201**, 54-60 (1970).
- 10) **Gross, J.**: Connective tissue fine structure and some methods for its analysis. *J. Geront.*, **5**, 343-360 (1950).
 - 11) **Nemetschek, T., Bowitz, R. & Nemetschek-Gansler, H.**: Alterung Kollagener Fibrillen. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.*, **59**, 34-43 (1975).
 - 12) **Bravermann, I. M. & Fonferko, E.**: Studies in cutaneous aging. I. The elastic fiber network. *J. Invest. Dermatol.*, **78**, 434-443 (1982).
 - 13) **Kajikawa, K., Yamaguchi, T., Katsuda, S. & Miwa, A.**: An improved electron stain for elastic fibers using tannic acid. *J. Electron Microsc.*, **24**, 287-289 (1975).
 - 14) **Luft, J. H.**: Ruthenium red and violet. I. Chemistry, purification, method of use for electron microscopy and mechanism of action. *Anat. Rec.*, **171**, 347-368 (1971).
 - 15) **Hall, D. A.**: The aging of connective tissue, p 1-4, Academic Press, London, New York, San Francisco, 1976.
 - 16) **Linder, J.**: Skin aging. A review. p 249-259. In H. G. Vogel (ed.), *Connective tissue and aging*, Excerpta Medica, Amsterdam, 1973.
 - 17) **Nimni, M. E., DeGuia, E. & Bavetta, L. A.**: Changes in the quantity and nature of collagen in rabbit skin as a function of age. *Nature*, **207**, 865-866 (1965).
 - 18) **Weinstein, G. D. & Boucek, R. J.**: Collagen and elastin of human dermis. *J. Invest. Dermatol.*, **35**, 227-229 (1960).
 - 19) **Lee, M. M. C.**: Physical and structural age changes in human skin. *Anat. Rec.*, **129**, 473-493 (1957).
 - 20) **Nimni, M. E. & Bavetta, L. A.**: Collagen synthesis and turnover in the growing rat under the influence of methyl prednisolone. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **117**, 618-623 (1964).
 - 21) **Bailey, A. J., Robins, S. P. & Balian, G.**: Biological significance of the intermolecular cross-links of collagen. *Nature*, **251**, 105-109 (1974).
 - 22) **Robins, S. P., Shimokomaki, M. & Bailey, A. J.**: The chemistry of the collagen cross-links. Age-related changes in the reducible components of intact bovine collagen fibers. *Biochem. J.*, **131**, 771-780 (1973).
 - 23) **Fujimoto, D., Akiba, K. & Nakamura, N.**: Isolation and characterization of a fluorescent material in bovine Achilles tendon collagen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **76**, 1124-1129 (1977).
 - 24) **Finch, A., Gardner, P. J., Ledward, D. A. & Menashi, S.**: The thermal denaturation of collagen fibers swollen in aqueous solutions of urea, hexamethylenetetramine, p-benzoquinone and tetra-alkylammonium salts. *Biochim. Biophys. Acta*, **365**, 400-404 (1974).
 - 25) **Sakai, T. & Gross, J.**: Some properties of the products of reaction of tadpole collagenase with collagen. *Biochemistry*, **6**, 518-528 (1967).
 - 26) **Weiss, J. B.**: Enzymatic degradation of collagen. *Int. Rev. Connect. Tissue Res.*, **7**, 101-157 (1976).
 - 27) **Vogel, A., Holbrook, K. A., Steinmann, B., Gitzelmann, R. & Byers, P. H.**: Abnormal collagen fibril structure in the gravis form (type I) of Ehlers-Danlos syndrome. *Lab. Invest.*, **40**, 201-206 (1979).
 - 28) **Staubesand, J. & Fischer, N.**: Collagen dysplasia and matrix vesicles. Researches with the electron microscope into the problem of so-called "Weakness of the vessel wall". *Pathol. Res. Pract.*, **165**, 374-391 (1979).
 - 29) **Hough, A. J., Mottram, F. C. & Sokoloff, L.**: The collagenous nature of amianthoid degeneration of human costal cartilage. *Am. J. Pathol.*, **73**, 201-216 (1973).
 - 30) **Fj Ø lstad, M. & Helle, O.**: A hereditary dysplasia of collagen tissues in sheep. *J. Pathol.*, **112**, 183-188 (1974).
 - 31) **Marchase, P., Holbrook, K. & Pinnel, S. R.**: A familial cutis laxa syndrome with ultrastructural abnormalities of collagen and elastin. *J. Invest. Dermatol.*, **75**, 399-403 (1980).
 - 32) **Staubesand, J. & Fischer, N.**: The ultrastructural characteristics of abnormal collagen fibrils in various organs. *Connect. Tissue Res.*, **7**, 213-217 (1980).
 - 33) **Ghadially, F. N., Lalonde, J. M. A. & Yong, N. K.**: Ultrastructure of amianthoid fibers in osteoarthritic cartilage. *Virchows Arch. [Cell Pathol.]*, **31**, 81-86 (1979).
 - 34) **Orenstein, J. M.**: Amianthoid fibers in a synovial sarcoma and a malignant schwannoma. *Ultrastruct. Pathol.*, **4**, 163-176 (1983).

- 35) 森泉哲次: モルモット関節軟骨の修復. 組織学的, オートラジオグラフィ的及び電子顕微鏡的観察. 十全医会誌, 92, 334-345 (1983).
- 36) Patterson, D. F. & Minor, R. R.: Hereditary fragility and hyperextensibility of the skin of cats. A defect in collagen fibrillogenesis. *Lab. Invest.*, 37, 170-179 (1977).
- 37) Lillie, J. H., MacCallum, D. K., Scaletta, L. J. & Occhino, J. C.: Collagen structure. Evidence for a helical organization of the collagen fibril. *J. Ultrastruct. Res.*, 58, 134-143 (1977).
- 38) Bouteille, M. & Pease, D. C.: The tridimensional structure of native collagenous fibrils, their proteinaceous filaments. *J. Ultrastruct. Res.*, 35, 314-338 (1971).
- 39) Rayns, D. J.: Collagen from frozen fractured glycerinated beef heart. *J. Ultrastruct. Res.*, 48, 59-66 (1974).
- 40) Smith, J. W.: Molecular pattern in native collagen. *Nature*, 219, 157-158 (1968).
- 41) Schiller, S. & Dorfman, A.: Effect of age on the heparin content of rat skin. *Nature*, 185, 111-112 (1960).
- 42) Hassell, J. R., Gehron, R. P., Barrach, H. J., Wilczek, J., Rennard, S. I. & Martin, G. R.: Isolation of a heparan sulfate containing proteoglycan from basement membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 4494-4498 (1980).
- 43) Rosenberg, L., Hellmann, W. & Kleinschmidt, A. K.: Electron microscopic studies of proteoglycan aggregates from bovine articular cartilage. *J. Biol. Chem.*, 250, 1877-1883 (1975).
- 44) Hascall, G. K.: Cartilage proteoglycans. Comparison of sectioned and spread whole molecules. *J. Ultrastruct. Res.*, 70, 369-375 (1980).
- 45) 岡田保典: マウス滑液膜の発育と超微構造. 十全医会誌, 87, 70-89 (1978).
- 46) Lindahl, U. & Höök, M.: Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules. *Annu. Rev. Biochem.*, 47, 385-417 (1978).
- 47) Neuberger, A.: Observations on the presence and metabolism of plasma proteins in skin and tendon. p 35-43. In R. E. Tunbridge (ed.), *Connective tissue*, Thomas, Springfield, 1957.
- 48) Stenman, S. & Vaheri, A.: Distribution of a major connective tissue protein, fibronectin, in normal human tissues. *J. Exp. Med.*, 147, 1054-1064 (1978).
- 49) Foidart, J. M., Bere, E. W., Yaar, M., Rennard, S. I., Gullino, M., Martin, G. R. & Katz, S. I.: Distribution and immunoelectron microscopic localization of laminin, a noncollagenous basement membrane glycoprotein. *Lab. Invest.*, 42, 336-342 (1980).
- 50) Ross, R. & Bornstein, P.: The elastic fiber. I. The separation and partial characterization of its macromolecular components. *J. Cell Biol.*, 40, 366-381 (1969).
- 51) Pereira, C., Rodrigo, F. G. & Bittercourt-Sampaio, S.: Oxytalan, elannin, and elastic fibers in the human skin. *J. Invest. Dermatol.*, 66, 143-148 (1976).
- 52) Bouissou, H., Fabre, M. T., Julian, M., Rumeau, J. L. & Huron, R.: La biopsie cutanée permet-elle de connaître l'état de la paroi vasculaire? *Rev. Europ. Etudes Clin. Biol.*, 15, 444-453 (1970).
- 53) Montagna, W. & Carlisle, K.: Structural changes in aging human skin. *J. Invest. Dermatol.*, 73, 47-53 (1979).
- 54) Briggman, R. A. & Wheeler, C. E.: The epidermal-dermal junction. *J. Invest. Dermatol.*, 65, 71-84 (1975).
- 55) Hay, E. D.: Extracellular matrix. *J. Cell Biol.*, 91, 205s-223s (1981).
- 56) Martinez-Henandez, A. & Amenta, P. S.: The basement membrane in pathology. *Lab. Invest.*, 48, 656-677 (1983).
- 57) Palade, G. E. & Farquhar, M. G.: A special fibril of the dermis. *J. Cell Biol.*, 27, 215-224 (1965).

Ultrastructural Changes of the Extracellular Matrix Components in the Mouse Skin due to Aging Ei Kawahara, Department of Pathology (I), (Director: Prof. I. Nakanishi), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 — J. Jusen Med. Soc., 92 771—788 (1983)

Key words: Mouse skin, Aging, Electron microscopy, Extracellular matrix

Abstract

Ultrastructural changes of extracellular matrix components of the skin with age were studied, using ddY strain male mice 1 day, 3 weeks, 3 months, 13 months and 25 months of age. The routine electron stain as well as ruthenium red and tannic acid stains was employed. Studies were also made on the tissues treated with streptomyces hyaluronidase, chondroitinase AC, chondroitinase ABC, bacterial collagenase, 30% urea and 10% oxalic acid. The collagen fibers of the reticular layer of dermis showed most remarkable changes. The diameters of individual collagen fibers and collagen fiber bundles were 80 ± 16 nm, 1.50 ± 0.70 μ m in 3-week-old ; 123 ± 22 nm, 2.70 ± 1.13 μ m in 3-month-old ; 143 ± 40 nm, 2.96 ± 1.86 μ m in 13-month-old and 138 ± 47 nm, 3.34 ± 2.40 μ m in 25-month-old mice respectively. It was noted that the thicker the collagen fibers, the less vulnerable to urea, oxalic acid and collagenase. Irregular-shaped giant collagen fibers which showed branching into thick collagen fibers, appeared in the reticular dermis of aged mice. These fibers were first observed in the deeper reticular dermis of mice 3 months of age, and they were scattered in the entire thickness of the reticular layer with advancing age. The giant collagen fibers showed same vulnerability to urea, oxalic acid and collagenase as that of thick collagen fibers. These findings indicated that the age-related changes were an actual increase in thick collagen fibers with many intermolecular cross-links and an appearance of giant collagen fibers which were formed by fusion of adjacent collagen fibers. In addition, plasma components attached to proteoglycan aggregates were frequently observed between collagen bundles in the reticular dermis of mice of 13 months of age, assuming that abnormal distribution of tissue fluid secondary to tightly packed collagen fibers with age resulted in focal aggregation of plasma components. Further discussion was made on the spiral structure of collagen fibers disclosed by the treatments of urea and oxalic acid.