

# ラット皮膚における線維性長周期線維の形成機序： 電子顕微鏡的研究

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8757">http://hdl.handle.net/2297/8757</a>

## ラット皮膚における線維性長周期線維の 形成機序—電子顕微鏡的研究

金沢大学医学部病理学第1講座(主任: 梶川欽一郎教授)

山 村 弟 一

(昭和54年1月9日受付)

線維性長周期(Fibrous long spacing, 以下, FLS と略称する)線維は対称性に並ぶ1000~2600 Åの周期性横紋をもつ線維の総称名である。この線維は *in vitro* でコラーゲン溶液に酸性ムコ多糖又は糖蛋白を加えることによって形成されることが知られており, その横紋パターンによって少なくとも4つのタイプに分類されている<sup>1)~3)</sup>。 *In vivo* で見出される FLS 線維の形態にはかなりの差異がみられるが, 凡そ2つのタイプに区別されると思われる。第1のタイプは *in vitro* で形成される FLS 線維に類似した構造を示す線維で, 主横紋の間に多数の微細な横紋を有し, 紡錘形の線維をつくる傾向がある。この種の FLS 線維はしばしば神経組織や神経鞘腫に見出されている<sup>4)5)</sup>。第2のタイプは1本の太い横紋が900~1200 Åの間隔で並び線維軸に平行に走る微細フィラメントが識別され, 線維の中は約1200~8000 Åと広く時々シート状に配列する線維である。この種の FLS 線維は様々な生理的又は病的組織(デスメー膜<sup>6)</sup>, 椎間板髄核<sup>7)</sup>, 滑液膜<sup>8)</sup>, 網膜細動脈<sup>9)</sup>, リンパ節<sup>10)11)</sup>, 鞏皮症皮膚<sup>12)</sup>, 表皮癌<sup>13)</sup>, カラギニン肉芽腫<sup>14)</sup>, 環状肉芽腫<sup>15)</sup>, 分娩後子宮<sup>16)</sup>, リューマチ熱心臓<sup>17)</sup>, ダウノマイシンネフローゼ<sup>18)</sup>, 骨髓線維症<sup>19)</sup>)に見出されている。本研究で取り上げるのはこの第2のタイプの FLS 線維である。

FLS 線維の形成機序については, *in vitro* の実験から詳しく解析され, コラーゲン分子が糖の存在によって640 Å周期の線維における配列と異なった配列をとるためであるとされている<sup>1)~3)</sup>。 *In vivo* における形成機序に関してはほとんど未解決で, *in vitro* と同じくコラーゲン分子と糖との相互作用によるものと漠然と推定されているにすぎない。我々の教室の北野<sup>20)</sup>は培養皮膚を観察中に, コラーゲナーゼ活性が上昇した培

養組織に多数の FLS 線維が出現することを見出し, FLS 線維の形成とコラーゲナーゼ活性との間に密接な関係があることを示唆した。しかし FLS 線維の形成に対して, コラーゲナーゼ活性の上昇が不可欠な要素であるか否か, 又そうとすれば, コラーゲナーゼが FLS 線維の形成に対してどのような役割をもち, どのような機序で FLS 線維が形成されるかについては解明されていない。

本研究はこれらの問題を解明するために計画されたものである。本論文では, まず FLS 線維の形成に対してコラーゲナーゼの必要性を証明し, 次にコラーゲナーゼの侵襲によって FLS 線維を形成しうる線維はいわゆるレチクリン線維であることを明らかにし, これらの所見に基いて, *in vivo* における FLS 線維の形成機序について考察を加える。

### 実験材料と方法

実験材料として, Wistar 系雄ラットの胸部皮膚を用いた。

#### I. 皮膚培養

生後1日目のラットの皮膚を1.5~2mmに細片し, レンズペーパーを敷いた器官培養皿(Falcon社)の金属グリッドの上に乗せ培養した。培養液として TC 199 medium (Difco 社)にウシ胎仔血清(Gibco 社)10%とカナマイシン100r/mlを加えた培養液(以下, FCS medium と称する)と, さらに EDTA 0.02%を添加した培養液(以下, FCS + EDTA medium と称する)の2種類の培養液を用いた。培養には炭酸ガス5%, 空気95%を流通した CO<sub>2</sub>-incubator を使用し, 37°Cで4日間培養した。培養液は2日目に交換した。

The mechanism of the formation of fibrous long spacing fibers in the rat skin - an electron microscopic study. **Teiichi Yamamura**, Department of Pathology (I), (Director: Prof. K. Kajikawa), School of Medicine, Kanazawa University.

## II. コラゲナーゼの検出

培養組織におけるコラゲナーゼの検出には FCS medium 培養 4 日目の組織片を、ピンセットで表皮と真皮を剥離し、それぞれ剥離面を下にして 0.4% コラゲン-ゲル上に載せ、37°C で 48 時間 CO<sub>2</sub>-incubator に incubate し、コラゲン-ゲル融解の有無をみた。コラゲン-ゲルは仔ウシ皮膚から 0.05 M 酢酸で抽出したコラゲンから作成した。又、培養液のコラゲナーゼ活性を測定する目的で、永井らの方法<sup>21)</sup>に従い、0.2% <sup>14</sup>C-コラゲン基質溶液と培養 4 日目の培養液とを混合し 37°C で反応させたのち、その上清を液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。

## III. 酵素処理

各種の酵素処理を表 1 の条件で行った。

### 1. 細菌性コラゲナーゼ

胎生 19 日、生後 1 日、及び 12 ヶ月のラットの皮膚を細片し 10 ~ 90 分間細菌性コラゲナーゼで処理した。又 FCS medium 及び FCS + EDTA medium で 4 日間培養した皮膚をそれぞれ緩衝液で洗浄したのち、20 分間コラゲナーゼで処理した。

### 2. コンドロイチナーゼ ABC

生後 1 日目のラットの皮膚を細片し、45 分間コンドロイチナーゼ ABC で処理した。又 FCS medium で 4 日間培養した皮膚を 2.5% グルタルアルデヒド (0.05M カコジル酸ソーダ緩衝液 pH7.4) で 4°C、30 分間固定後、vibratome で約 100 $\mu$  の厚さに薄切し、緩衝液で 3 時間洗浄したのち、コンドロイチナーゼ ABC で 3 時間処理した。

### 3. $\alpha$ キモトリプシン

生後 1 日目のラットの皮膚を細片し、 $\alpha$  キモトリプシンで 45 分間処理した。又 FCS medium で 4 日間培養した皮膚を緩衝液で洗浄したのち同様の処理を行なった。

### 4. 細菌性コラゲナーゼ、コンドロイチナーゼ ABC 又は $\alpha$ キモトリプシンによる二重酵素処理

生後 1 日目のラットの皮膚を細片し、1) コンドロイチナーゼ ABC 45 分 + 細菌性コラゲナーゼ 20 分、2)  $\alpha$  キモトリプシン 45 分 + 細菌性コラゲナーゼ 20 分、3) 細菌性コラゲナーゼ 20 分 + コンドロイチナーゼ ABC 45 分、4) 細菌性コラゲナーゼ 20 分 +  $\alpha$  キモトリプシン 20 分の 4 種の組み合わせで酵素処理を行った。

以上の実験の対照として酵素を含まない緩衝液に incubate した試料を用いた。

## IV. 電顕的観察

組織を 2.5% グルタルアルデヒド (0.05M カコジル酸ソーダ緩衝液 pH7.4) で 4°C、60 分間固定後、2% オスミウム酸 (0.05M カコジル酸ソーダ緩衝液 pH7.4) で 4°C、90 分間固定した。次いでエタノール系列で脱水、エボン 812 で包埋した。

超薄切片はガラスナイフ又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、酢酸ウラニール・硝酸鉛の二重染色又はタンニン酸染色<sup>22)</sup>を行った。又、酸性ムコ多糖及び糖蛋白の検出のために、ルテニウムレッド (RR) 染色を併用した。切片は日立 HU-500 型で直接倍率 1200 ~ 30,000 で観察した。

## V. 光顕的観察

電顕用のエボン包埋試料から 1 $\mu$  切片を作成しトルイジンブルー染色を行った。又パラフィン包埋切片に H・E 染色、鍍銀染色及びレゾルシンフクシン染色を行った。

## 成 績

### I. 正常皮膚の真皮の構造

#### 1. 胎生期ラット (胎生 19 日)

光顕的所見：真皮は薄く、表皮基底部から処々胚芽細胞が乳頭状に突出し毛芽を形成する。真皮には多数の幼若間葉細胞が存在し、毛芽の周囲は 1 ~ 2 層の毛芽-間葉細胞<sup>23)</sup>で包まれる。真皮間質には多数の好銀線維が錯走し、コラゲン線維はほとんど認められない。

表 1 酵素処理の条件

酵 素	緩 衝 液 (pH)	酵素濃度	作 用 時 間
Bacterial Collagenase (Sigma type III & VI)	0.1M Tris-HCl buffer (pH7.4) + 0.2 M NaCl + 4 mM CaCl <sub>2</sub>	1 mg/ml	10~90分
Chondroitinase ABC (生 化 学 工 業)	0.1M Tris-HCl buffer (pH8.0)	2.5u/ml	(未固定) 45分 (固定後) 3時間
$\alpha$ -chymotrypsin (Worthington Biochemical Co.)	0.08M Tris-HCl buffer (pH7.8) + 0.1M CaCl <sub>2</sub>	1 mg/ml	20~45分

表皮基底面や毛芽周囲には好銀線維が特に豊富である。

電顕の所見：RR染色標本を電顕的に観察すると、真皮間質はRR陽性のフィラメントと粒子から成る網状構造が豊富で、その中に直径約400Åのコラゲン線維が散在している。フィラメントと粒子から成る網状構造は礎質の酸性ムコ多糖を表わしていることは多くの人達によって報告され<sup>24)~27)</sup>、本研究でも後述の酵素消化の成績から確められた。コラゲン線維は多量のRR陽性物質で包まれ、処々密集して0.5μ又はそれ以下の細い線維束を形成する。

### 2. 幼若ラット(生後1日)

光顕の所見：毛芽が増加し、乳頭層と網状層がようやく区別される。真皮の結合組織細胞は紡錘形の線維芽細胞の形態を示すが、毛芽周囲では幼若な毛芽-間葉細胞として認められる。真皮にはなお多数の好銀線維が認められるが、真皮下層では細いコラゲン線維が混在している。好銀線維は胎生期と同じく表皮基底面や毛芽周囲に特に集在している。弾力線維はほとんど認められない。

電顕の所見：胎生期と同じく真皮間質には酸性ムコ多糖が豊富で、コラゲン線維は直径約400Åと細いが、しばしば線維束を形成する。線維束の直径は一般に細く、大部分は1.5μ以下である。線維束の輪郭は不整で、線維束をつくる個々の線維は多量のRR陽性物質に包まれ、後述の成熟動物におけるコラゲン線維束とは明らかに区別される(写真1)。毛芽、末梢神経又は毛細血管周囲に、少数のFLS線維が見出されることがある。

### 3. 成熟ラット(生後12ヶ月)

光顕の所見：皮脂腺と立毛筋を伴う多数の毛包が発育し、真皮には結合組織細胞は少なく多量の線維成分が存在する。乳頭層では細いコラゲン線維と共にかなり多数の好銀線維が認められるが、網状層では細胞間には太いコラゲン線維で占められ、好銀線維はほとんど認められない。しかし、毛包、毛細血管、末梢神経及び立毛筋の周囲は好銀線維で包まれている。弾力線維は真皮のコラゲン線維間に散在性に認められ、特に毛包周囲に比較的良好に発達している。

電顕の所見：真皮は全般に様々な太さのコラゲン線維束で占められ、線維束の間には礎質の酸性ムコ多糖が介在する。乳頭層では線維束の直径は0.5~2μと比較的小さい。線維束を構成する個々の線維の直径は約900Åで、その表面はRR陽性物質の薄層で包まれる。これに対して、網状層では線維束は直径4~7.5μと太く、個々のコラゲン線維の直径も約1000Å

又はそれ以上と増加する。線維は緻密に配列し、RRは線維束の内部に浸透し難く、線維束の表層のみがRRに染色される(写真2)。一方、光顕的に好銀線維が密に認められる毛包、毛細血管、末梢神経及び立毛筋の周囲では線維束の直径は1μ以下で、個々の線維の直径も400~900Åと比較的細い線維が含まれており、線維表面にはRR陽性物質が多い。

## II. コラゲナーゼによる真皮の変化

### 1. 胎生期ラット

胎生19日目のラットの皮膚をコラゲナーゼに20分間incubateすると、真皮のコラゲン線維は完全に消失し、それに代って多数のFLS線維が出現する。表皮基底膜は処々消化されるが、そこにはFLS線維は認められない。

### 2. 幼若ラット

生後1日目のラット皮膚について、コラゲナーゼの作用をより詳しく観察した。

コラゲナーゼを10分間作用させた場合には、既存のコラゲン線維の一部がコラゲナーゼの侵襲を受け、FLS線維と640Å周期のコラゲン線維とが隣接して認められる。しかしコラゲン線維の直径はより細くなり、その表面のRR陽性物質は不規則な凝集を示す。FLS線維の形態は様々で、数本のフィラメントの上に、粒子状に凝集したRR陽性物質が周期性に並ぶものや、RR陽性の明瞭な横紋をもって線維状を呈するもの、又、粒子状に凝集したRR陽性物質の周囲に放射状にフィラメントが付着したものなどが混在し、これらの構造物の間には様々な移行が認められる。しかし、640Å周期のコラゲン線維とFLS線維との間に直接の移行は認められない。

コラゲナーゼを20分間作用させた場合は、胎生19日目の場合と同様にコラゲン線維は完全に消失し、細胞間に様々な太さのFLS線維が多数出現する(写真3)。FLS線維の横紋はRR強陽性である。コラゲナーゼ10分処理の場合と同じく、放射線状にフィラメントを付着したRR陽性の粗大粒子の集合も少なからず認められる。又、様々な大きさのFLS線維がRR陽性の無定形物質の中に包埋されている処もある。

さらにコラゲナーゼを90分間作用させると、FLS線維はほとんど全部崩壊し、RR陽性の顆粒状物質とフィラメントの凝集物に変る(写真4)。その崩壊過程を観察すると、FLS線維の横紋をつくるRR陽性物質の凝集と共に、横紋間のフィラメントの走行は不明瞭となり、次第に線維が分解し、遂に顆粒状物質とフィラメントの混合物に変るようみえる。

以上のコラゲナーゼの様々な処理時間を通じて、基

底膜は部分的に消化されるが、そこには FLS 線維は形成されない。又酸性ムコ多糖は形成された FLS 線維の間に残存している。弾力線維及び microfibril はコラゲナーゼの作用を受けない。

次に、FLS 線維の形成に対する糖の影響を検討する目的で、コンドロイチナーゼ ABC と  $\alpha$  キモトリプシンの前処置を行った。

コンドロイチナーゼ ABC 45 分間処理によって真皮の線維間を占める酸性ムコ多糖はほとんど完全に消化されるが、コラゲン線維表面の RR 陽性物質は残存する。このような前処置を行った皮膚に、コラゲナーゼを 20 分間作用させると、前処置を行わなかった場合と同様に、多数の FLS 線維が形成された。

$\alpha$  キモトリプシンで 45 分間処置すると、線維間の酸性ムコ多糖の一部、及びコラゲン線維表面の RR 陽性物質の大部分は消化される。しかし、コラゲン線維の形態には変化は認められない。このような前処置を行った皮膚をコラゲナーゼに 20 分間 incubate すると、コラゲン線維束は RR 陽性の微粒子と多数のフィラメントから成る集塊になり、FLS 線維の形成は認められなかった (写真 5)。

### 3. 成熟ラット

生後 1 年目のラットの皮膚にコラゲナーゼを 20 分間作用させた場合には、真皮網状層のコラゲン線維は横紋の不鮮明化と共に、縦走する細線維に分解するが、FLS 線維の形成は認められない (写真 6)。しかし、乳頭腫、毛包膨隆部、毛細血管、末梢神経又は立毛筋の周囲のように、RR 陽性物質を伴う細線維束が存在する部位では FLS 線維が形成される (写真 7)。しかし、FLS 線維は幼若ラットの場合に比べて、数が少ないばかりでなく、大きさも小さく、又、RR 陽性の粗大粒子とフィラメントが連結した不完全な FLS 線維様の構造物がしばしば混在している。

表皮基底膜には一部において表皮基底部からの剥離や凝集が認められるが、FLS 線維の形成はない。又、弾力線維には変化は認められない。

### III. FLS 線維に対する酵素作用

生後 1 年目の幼若ラットの皮膚について、コラゲナーゼ処理によって形成された FLS 線維が、酵素消化に対してどのような態度を示すかを検討した。

既述のように、幼若ラット皮膚のコラゲン線維はコラゲナーゼ 20 分間処理によって、ほとんど全部 FLS 線維に変るが、コラゲナーゼを 90 分作用させると、形成された FLS 線維の大部分は消化されることが示された。

次に、コラゲナーゼ 20 分間処理によって FLS 線維

が形成された幼若ラット皮膚に、 $\alpha$  キモトリプシンを 20 ~ 45 分間作用させると、FLS 線維は消失し、RR 陽性の小粒子とフィラメント状物質の混合物に変わった (写真 8)。 $\alpha$  キモトリプシンの代わりにコンドロイチナーゼ ABC を 45 分間作用させた場合には、線維間の酸性ムコ多糖は当然完全に消化されるが、FLS 線維やそれと共存するフィラメントを付着した RR 陽性粒子は抵抗を示した (写真 9)。

## IV. 皮膚培養

### 1. FCS medium 培養

光顕的所見：生後 1 日目のラットの皮膚を FCS medium で 4 日間培養すると、表皮の角化層は肥厚し、真皮には変性細胞が多く、細い好銀線維は著しく減少する。

電顕的所見：最も顕著な変化は真皮表層に認められる。結合組織細胞は全般に密に存在するが、原形質には脂肪滴やミユリン様物質を含み、細胞の変性が進行していることが示される。細胞間のコラゲン線維は完全に消失し、RR 陽性の無定形物質に包埋された多数の FLS 線維が認められる (写真 10)。しばしば microfibril の増加が伴われる。FLS 線維は無定形物質と移行し、線維の大きさは様々で、シート状の配列を示すことがまれではない。

真皮深層では、酸性ムコ多糖とコラゲン線維束が存在し、FLS 線維は認められない。コラゲン線維の形態は培養前と同様であるが、その数は増加している。

以上の培養皮膚をコラゲナーゼに 20 分間 incubate すると、真皮表層に形成された FLS 線維は著しく減少し、一方、真皮深層のコラゲン線維は FLS 線維に変る。培養皮膚の真皮表層に出現した microfibril はコラゲナーゼに対して抵抗を示す。

次に、培養皮膚を固定後、コンドロイチナーゼ ABC で 3 時間処理すると、線維束間の酸性ムコ多糖は消化されるが、真皮表層に形成された FLS 線維とそれを包埋する無定形物質及び microfibril は全く消化されない。これに対して、 $\alpha$  キモトリプシンを 45 分間作用させると真皮表層の FLS 線維や無定形物質は完全に消失し、微小な RR 陽性粒子を含むフィラメント状物質に変る。同時に microfibril の数は著しく減少する。

### 2. FCS + EDTA medium 培養

光顕的所見：表皮は FCS medium 培養と同じく角化層は肥厚し、真皮には変性細胞が多いが、細胞間には少数のコラゲン線維を混じた細い好銀線維で占められる。

電顕的所見：結合組織細胞はしばしば変性を示す。FCS medium 培養と異なって FLS 線維は全く形

成されず、細胞間は多量のコラーゲン線維で占められる(写真11)。これらのコラーゲン線維は直径が約400Åで細い線維束をつくる。

この培養組織をコラーゲナーゼで20分間処理すると、真皮全層にわたってコラーゲン線維は完全に消化され、無定形物質と共に、再び多数のFLS線維が認められる(写真12)。

### 3. 培養組織におけるコラーゲナーゼ活性

FCS mediumで4日間培養した皮膚の表皮と真皮を剥離し、それぞれコラーゲンゲルにincubateすると、大部分の真皮の周辺ではゲルの融解が認められるが、表皮の周辺ではほとんど認められない(写真13)。

しかし、培養4日目の培養液中から直接コラーゲナーゼ活性の上昇を証明することはできなかった。

## 考 察

### 1. コラーゲナーゼ活性とFLS線維

北野<sup>20)</sup>はin vitroで培養された幼若ラット皮膚をコラーゲンゲルにincubateしたところ、ゲルの融解をおこすものと、おこさないものがあることを認め、ゲルを融解した組織片では真皮のコラーゲン線維がFLS線維に変ることを観察し、FLS線維の形成と組織コラーゲナーゼ活性の上昇との間に密接な関係があるものと推定した。また、FLS線維がしばしば出現するカラギニン肉芽腫<sup>14)</sup>、分娩後子宮<sup>20)</sup>、又は表皮癌<sup>13)</sup>にコラーゲナーゼ活性の上昇が伴われることが報告されている。これらの成績からコラーゲナーゼ活性がFLS線維の形成に重要な役割をもつことが推定されるのであるが、本研究では、この推定を支持するさらにいくつかの証拠がえられた。

第1に、FCS mediumで4日間培養した幼若ラットの真皮はコラーゲンゲルを融解することから、組織コラーゲナーゼの活性が上昇していることが示され、電顕的に多数のFLS線維が認められること、第2に、培養mediumにEDTAを添加して、コラーゲナーゼ活性を阻害するとFLS線維の形成は阻止されるが、この培養組織を細菌性コラーゲナーゼにincubateすると再びFLS線維が形成されること、第3に、幼若ラット皮膚を細菌性コラーゲナーゼにincubateすると多数のFLS線維が形成されることである。これらの成績は、FLS線維の形成にはコラーゲナーゼ活性の上昇が不可欠な因子であることを強く示唆している。

培養皮膚のコラーゲナーゼ活性の上昇は上述のようにコラーゲンゲル融解法で証明されたが、培養液中からは直接に証明することはできなかった。この理由は、培養液のウシ胎仔血清に含まれるコラーゲナーゼ活性の

阻害剤に基因するものと考えられる<sup>20)</sup>。

本研究に用いられたコラーゲナーゼは細菌性コラーゲナーゼであるため、その特異性が問題になるが、幼若ラット皮膚を細菌性コラーゲナーゼにincubateした場合も、コラーゲナーゼ活性の上昇を示した培養皮膚における場合もFLS線維の形成に関しては全く同一の所見がえられたので、少なくともFLS線維の形成に関しては、細菌性コラーゲナーゼも組織コラーゲナーゼも同様な効果をもっているものと考えられる。

### 2. レチクリン線維とFLS線維

本研究で注目された所見は、幼若ラット皮膚にコラーゲナーゼを作用させた場合には、多数のFLS線維が形成されるのに対し、成熟ラット皮膚では、コラーゲン線維は分解されるが、FLS線維は局限した部位にのみ少数しか形成されないという事実である。この成績はコラーゲナーゼの侵襲によって容易にFLS線維を形成するコラーゲン線維と、形成しないコラーゲン線維が存在することを示している。このような差異は何に基因するのであろうか。これが解決すべき次の問題となる。

幼若ラットと成熟ラットの真皮における線維成分の最も大きな形態学的差異は、前者では真皮全層に多数の好銀線維(レチクリン線維)が存在するのに対し、後者では、好銀線維は全般に少なく、乳頭層、毛包、毛細血管、末梢神経、立毛筋の周囲など、ごく局限した部位にのみ存在することである。

レチクリン線維の定義については議論があるが、一般に、光顕的に好銀性を示し、電顕的には無定形物質に包まれた細いコラーゲン線維で、鍍銀標本ではいわゆる「外鍍銀」を呈するとされている<sup>30)</sup>。本研究では、好銀線維の豊富な幼若ラット皮膚のコラーゲン線維は、輪郭の不整な細い線維束をつくり、個々の線維の直径も小さく(約400Å)、線維表面は多量のRR陽性物質で包まれている。同様な形態のコラーゲン線維は、成熟ラットにおいては、光顕的に好銀線維が比較的多く認められる部位にのみ認められる。したがって、このような多量のRR陽性物質で包まれた細いコラーゲン線維から成る線維束が光顕的な好銀線維、すなわちレチクリン線維に対応するものと考えられる。一方、光顕的にコラーゲン線維(鍍銀標本では褐染する線維)と同定される線維は、電顕的に輪郭の平滑な太いコラーゲン線維束で、個々のコラーゲン線維の直径は大きく(約1000Å)、密に配列し、線維表面のRR陽性物質は少ない点でレチクリン線維とは区別される。レチクリン線維の表面に存在する多量のRR陽性物質の化学的性状については、まだ明確ではないが、コンドロイチナーゼABCに対して抵抗があり、 $\alpha$ キモトリプシンによっ

て大部分が消化されることから、少なくとも一種の糖蛋白が主成分であろうと思われる。

コラゲナーゼ処理によって観察される FLS 線維の形成部位やその量は、上述のレチクリン線維のそれらとよく一致し、又、成熟ラットにみられるように太い成熟コラゲン線維はコラゲナーゼで分解されても FLS 線維を形成しないという事実は、コラゲナーゼの侵襲によって FLS 線維をつくる線維はレチクリン線維であることを強く示唆している。

幼若ラット真皮はほとんどレチクリン線維で構成されるにもかかわらず、これを培養すると、FLS 線維は真皮表面層にのみ形成されるのは、この培養日数では産生されたコラゲナーゼが深部にまで浸達しないためであると解釈される。この解釈は、培養皮膚をコラゲナーゼに incubate すると、真皮深部にも FLS 線維が形成されることによって支持される。

### 3. FLS 線維の形成機序

前述のように、FLS 線維はレチクリン線維がコラゲナーゼの侵襲を受けた結果形成されると考えられるのであるが、それはどのような機序によるのであろうか。

コラゲナーゼ処理によっておこる FLS 線維の形成過程をみると、レチクリン線維の消失と共に、RR 陽性の粗大粒子とフィラメントの集積を伴って様々な大きさの FLS 線維が出現し、その間には多くの移行を認めることができる。しかし、レチクリン線維と FLS 線維との間の構造的移行を示唆する像には遭遇しなかった。したがって、FLS 線維はコラゲナーゼによって生じたレチクリン線維の分解産物から再構築されるものと考えられる。

In vitro の実験では、FLS 線維は糖の存在のもとでコラゲン分子が特定の配列をとることによって形成されることが明らかにされているので<sup>23)</sup>、in vivo の FLS 線維の形成にも、おそらく同様な機構が働いているものと推定される。実際、FLS 線維の横紋部分は RR に対して強い親和性を示し、コラゲナーゼの長時間処理によって、FLS 線維が分解されることは、FLS 線維は少なくともコラゲンと糖から構成されていることを示している。

FLS 線維の横紋部分に含まれる糖の化学的性状や起源については十分明らかでないが、コンドロイチナーゼ ABC に抵抗があること、又、コラゲナーゼ処理以前にコンドロイチナーゼ ABC で線維間の酸性ムコ多糖を除去しても、FLS 線維が形成されることから判断すると、礎質の酸性ムコ多糖が FLS 線維の形成に関与する可能性は少ないものと思われる。一方、 $\alpha$  キモ

トリプシンでレチクリン線維表面の糖蛋白を除去したのちに、コラゲナーゼを作用させると、線維はフィラメント状物質に分解されるが、FLS 線維は形成されない事実は、FLS 線維の形成にレチクリン表面の糖蛋白が重要な役割を果していることを示している。FLS 線維は  $\alpha$  キモトリプシンによって崩壊し、RR 陽性の小粒子を含むフィラメントに変る。この現象は FLS 線維の横紋部分の糖蛋白が分解されるためであると解釈される。又、FLS 線維を構成するコラゲンがある程度の変性を蒙ったコラゲンで、 $\alpha$  キモトリプシンの作用を受けやすいという可能性も否定できないであろう。

FLS 線維の構成コラゲンはレチクリン線維のコラゲンから供給されることは疑いはない。近年コラゲン分子に少なくとも 4 種の分子種が区別され、レチクリン線維は type III コラゲンで構成されることが報告されている<sup>31)32)</sup>。したがって、FLS 線維の構成コラゲンは生化学的には type III コラゲンであると思われる。

本研究では type I コラゲンが優勢であるとされる成熟動物の真皮網状層<sup>31)32)</sup>、type IV コラゲンが含まれるとされる表皮基底膜<sup>33)</sup>はコラゲナーゼによって分解されるが、FLS 線維は形成されなかった。しかし、この所見から type I、type IV コラゲンには FLS 線維を形成する能力がないと結論するのは早計である。In vitro の実験で示されるように、FLS 線維の形成には、コラゲン分子と糖との適当な量的関係が必要であると考えられるからである。Type I コラゲンで構成される成熟コラゲンには、それに随伴する糖蛋白が少量であり、基底膜では糖蛋白が過剰であることが、FLS 線維の形成を阻害するのかも知れない。

以上を総合すると、コラゲナーゼによってレチクリン線維が分解し、それを構成する type III コラゲンと線維表面から遊離する糖蛋白との相互作用の結果、FLS 線維が形成されるものと考えられるのである。

## 結 論

In vivo における FLS 線維の形成に関与する因子を解明する目的で、幼若ラットと成熟ラットの皮膚、及び培養皮膚について電顕的研究を行った。得られた成績を総括すると次の通りである。

1. 胎生期及び新生期ラットの皮膚を細菌性コラゲナーゼに incubate すると、真皮のレチクリン線維は消化され、多数の FLS 線維が出現した。同様な所見は培養皮膚にも認められ、その真皮にはコラゲナーゼ活性の上昇が証明された。培養液に EDTA を加えコラゲ

ナーゼ活性を阻害すると、FLS線維の形成は完全に阻止された。この培養組織を細菌性コラゲナーゼに incubate すると、再び FLS 線維の形成がおこった。

2. 成熟ラット皮膚を細菌性コラゲナーゼに incubate すると、真皮の成熟コラゲン線維は分解されるが、FLS線維の形成は認められなかった。しかし、毛包、毛細血管、末梢神経、立毛筋の周囲のようにレチクリン線維の存在部位では少数の FLS 線維が形成された。

3. コラゲナーゼ処理の前に、コンドロイチナーゼ ABC で礎質の酸性ムコ多糖を除去しても、FLS 線維の形成にはほとんど影響はみられなかった。しかし、 $\alpha$ キモトリプシンでレチクリン線維周囲の糖蛋白を除去すると、コラゲナーゼ処理による FLS 線維の形成は阻止された。

4. 以上の成績から、FLS 線維はコラゲナーゼの侵襲の結果生ずるレチクリン線維の分解産物、すなわちコラゲン分子とおそらくはそれに随伴する糖蛋白との相互作用によって形成されると考えられる。

謝辞：御指導と御校閲を賜りました恩師梶川欽一郎教授に深謝の意を表します。また組織培養法に関して金沢大学ガン研究所ウイルス学教室、小倉寿博士に御助言を戴き深く感謝の意を表します。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かたがたに厚く御礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) Highberger, J. H., Gross, J. & Schmitt, F. O. : Electron microscope observation of certain fibrous structures obtained from connective tissue extract. *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 3321 - 3322 (1950).
- 2) Gross, J. : The behavior of collagen units as a model in morphogenesis. *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, 2 suppl., 261 - 274 (1956).
- 3) Chapman, J. A. & Armitage, P. M. : An analysis of fibrous long spacing forms of collagen. *Connect. Tiss. Res.*, **1**, 31 - 37 (1972).
- 4) Watanabe, K. : Banded spindle-shaped structures in the notocord of *salmo irideus*. *Anat. Rec.*, **178**, 229 - 242 (1974).
- 5) Cravioto, H. & Lockwood, R. : Long-spacing fibrous collagen in human acoustic nerve tumors. In vivo and in vitro observation. *J. Ultrastruct. Res.*, **24**, 70 - 85 (1968).
- 6) Jakus, M. A. : Studies on the cornea II. The fine structure of Descemet's membrane. *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, 2 suppl., 243 - 252 (1956).
- 7) Cornah, M. S., Meachim, G. & Parry, G. W. : Banded structures in the matrix of human and rabbit nucleus pulposus. *J. Anat.*, **107**, 351 - 362 (1970).
- 8) 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).
- 9) Gartner, J. : "Long-spacing" Kollagen in der Wand einer Netzhautarteriole. *Path. Microbiol.*, **29**, 55 - 62 (1966).
- 10) Mollo, F., Monga, G. & Stramignoni, A. : Banded structures in the connective tissue of lymph nodes in Hodgkin's disease. *J. Microsc.*, **7**, 451 - 454 (1968).
- 11) Mollo, F. & Monga, G. : Banded structures in the connective tissue of lymphoma, lymphadenitis and thymoma. *Virchow's Arch. B.*, **7**, 356 - 366 (1971).
- 12) Kobayashi, T. & Asboe-Hansen, G. : Ultrastructure of generalized scleroderma. *Acta Dermatovenereol.*, **52**, 81 - 93 (1972).
- 13) Hashimoto, K., Yamanishi, Y. & Maeyaens, E. : Collagenolytic activities of squamous cell carcinoma of the skin. *Cancer Res.*, **33**, 2790 - 2801 (1973).
- 14) Pérez-Tamayo, R. : Collagen resorption in carragenin granuloma. *Lab. Invest.*, **22**, 137 - 159 (1970).
- 15) Chales, C. R., Cooper, P. H. & Helwig, E. B. : The fine structure of granuloma annulare. *Lab. Invest.*, **36**, 444 - 451 (1977).
- 16) 寺田 督 : 分娩後退縮時におけるラット子宮筋層の超微構造的変化. 十全医会誌, **85**, 222 - 238 (1976).
- 17) Banfield, W. G., Lee, C. K. & Lee, C. W. : Myocardial collagen of the fibrous long spacing type. *Arch. Pathol.*, **95**, 262 - 266 (1973).
- 18) Buss, H. U. & Lamberts, B. : Das Nierenglomerulom der Ratte bei experimenteller Daunomycinnephrose. Vergleichende durchstrahlungs und rasterelektron enmikroskopische Untersuchngen. *Beitr. Path. Bd.*, **148**, 360 - 387 (1973).
- 19) Kamiyama, R. & Shimamine, T. : Fibrous



long spacing-like fibers in the bone marrows of primary myelofibrosis. *J. Electron Microsc.*, **26**, 339-341 (1977).

20) 北野英一：表皮と真皮の相互作用に関する研究.特に基底膜の形成について. *十全医会誌*, **86**, 286-303 (1977).

21) Terato, K., Nagai, Y., Kawanishi, K. & Yamamoto, S. : A rapid assay method of collagenase activity using  $^{14}\text{C}$ -labeled soluble collagen as substrate. *Biochim. et Biophys. Acta*, **445**, 753-762 (1976).

22) 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).

23) 橋本 健：皮膚の発生学, 毛の発生. 基礎皮膚科学, p.38-49, 朝倉書店 (1973).

24) Myers, D. B., Highton, T. C. & Rayns, D. G. : Acid mucopolysaccharides closely associated with collagen fibrils in normal human synovium. *J. Ultrastruct. Res.*, **28**, 203-213 (1969).

25) Thyberg, J., Lohmander, S. & Friberg, U. : Electron microscopic demonstration of proteoglycans in guinea pig epiphyseal cartilage. *J. Ultrastruct. Res.*, **45**, 407-427 (1973).

26) 堀 功：創傷治癒における再生表皮細胞の基底膜形成に関する電子顕微鏡的研究. *十全医会誌*, **83**, 379-400 (1974).

27) 北田博久：ニワトリ胚大動脈の礎質と弾力線維の電子顕微鏡的研究. *十全医会誌*, **84**, 513-529 (1975).

28) Jeffrey, J. & Gross, J. : Collagenase from rat uterus. Isolation and partial characterization. *Biochemistry*, **9**, 268-273 (1970).

29) Werb, Z. & Burleigh, M. C. : A specific collagenase from rabbit fibroblast in monolayer culture. *Biochem. J.*, **137**, 373-385 (1974).

30) 梶川欽一郎：コラーゲンとレチクリン. *日皮会誌*, **75**, 675-696 (1965).

31) Fleishmajer, R., Gay, S., Meigel, W. N. & Perlish, J. S. : Collagen in the cellular and fibrotic stage of scleroderma. *Arthritis Rheum.*, **21**, 418-428 (1978).

32) Meigel, W. N., Gay, S. & Weber, L. : Dermal architecture and collagen type distribution.

*Arch. Derm. Res.*, **259**, 1-10 (1977).

33) Chung, E., Rhodes, R. K. & Miller, E. J. : Isolation of three collagenous component of probable basement membrane origin from several tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 1167-1174 (1976).

#### 写 真 説 明

写真1 生後1日目ラットの真皮. RR染色. RR陽性物質に包まれた細いコラーゲン線維(Co)が線維束を形成. 線維間に酸性ムコ多糖を表わすフィラメントと粒子がみられる(矢印).  $\times 40,000$

写真2 生後12ヶ月ラットの真皮網状層. RR染色. 太いコラーゲン線維(Co)によって線維束が形成され, 線維表面のRR陽性物質は乏しい. 線維束の外側に酸性ムコ多糖(AMP)が存在.  $\times 40,000$

写真3 コラーゲナーゼで20分間処理した生後1日目ラット皮膚. コラーゲン線維は完全に消失し, 細胞間にはFLS線維(矢印)が形成される. RR染色.  $\times 9,000$

写真4 コラーゲナーゼで90分間処理した生後1日目ラット皮膚. FLS線維は消化され, フィラメントとRR陽性の粗大粒子に変わる. RR染色.  $\times 27,000$

写真5  $\alpha$ キモトリプシン45分処理後コラーゲナーゼに20分間incubateした生後1日目ラットの皮膚. コラーゲン線維は消化され, 微粒子とフィラメントの混合物となるが, FLS線維は形成されない. RR染色.  $\times 18,000$

写真6 コラーゲナーゼで20分間処理した生後12ヶ月の真皮網状層. コラーゲン線維は細線維に分解されるが, FLS線維は形成されない. タンニン酸染色.  $\times 40,000$

写真7 同上材料の乳頭層. 毛包周囲にみられたFLS線維(矢印). RR染色.  $\times 18,000$

写真8 生後1日目ラットの皮膚. コラーゲナーゼ20分処理後 $\alpha$ キモトリプシンで20分間処理. FLS線維は消失し, 小粒子とフィラメントの混合物に変わる. RR染色.  $\times 18,000$

写真9 生後1日目ラットの皮膚. コラーゲナーゼ20分処理後コンドロイチナーゼABCで45分間処理. 線維間の酸性ムコ多糖は消化されるが, FLS線維は残存する. RR染色.  $\times 18,000$

写真10 FCS medium培養4日目. コラーゲン線維は完全に消失し, 細胞間は多数のFLS線維(矢印)を含む無定形物質で占められる.  $\times 9,000$

写真11 FCS + EDTA midium培養4日目. 細胞間

はコラーゲン線維で占められ、FLS 線維は形成されない。タンニン酸染色。× 9,000

写真 12 同上の培養組織片をコラーゲナーゼに 20 分間 incubate した標本。コラーゲン線維は完全に消失し、FLS 線維（矢印）と無定形物質に変る。タンニ

ン酸染色。× 9,000

写真 13 コラーゲンゲル融解。FCS medium 培養 4 日目の真皮と表皮。大部分の真皮周辺にゲルの融解がみられる（長い矢印）。表皮周辺にはほとんど融解がない（短い矢印）。

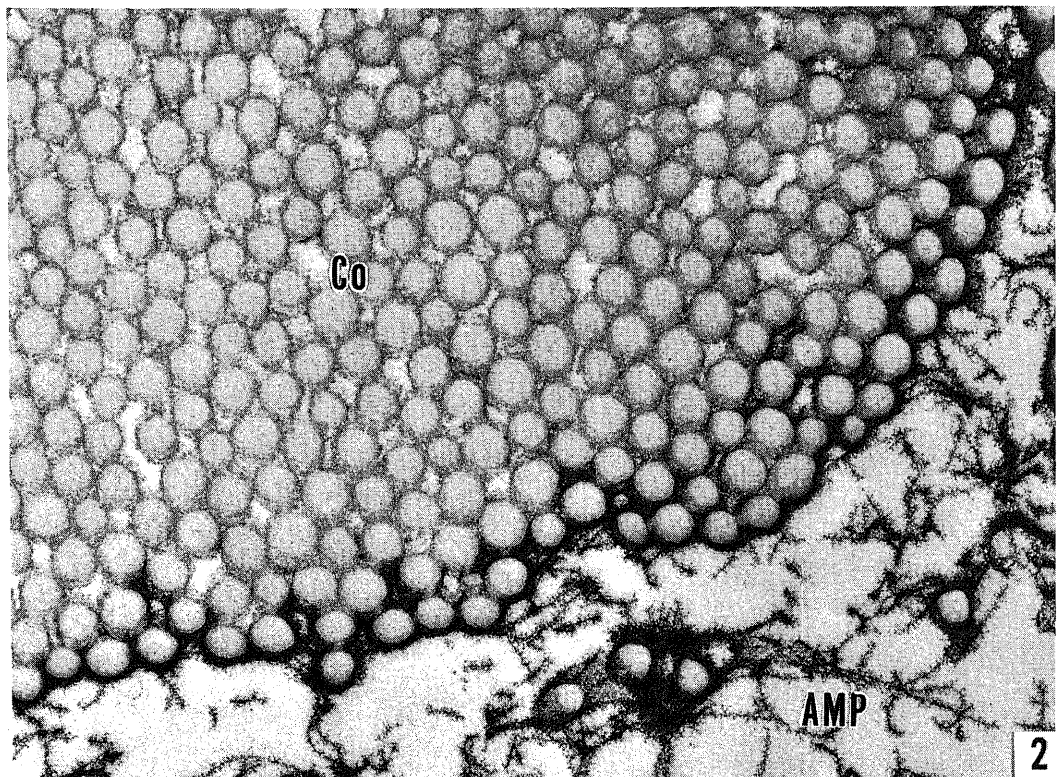
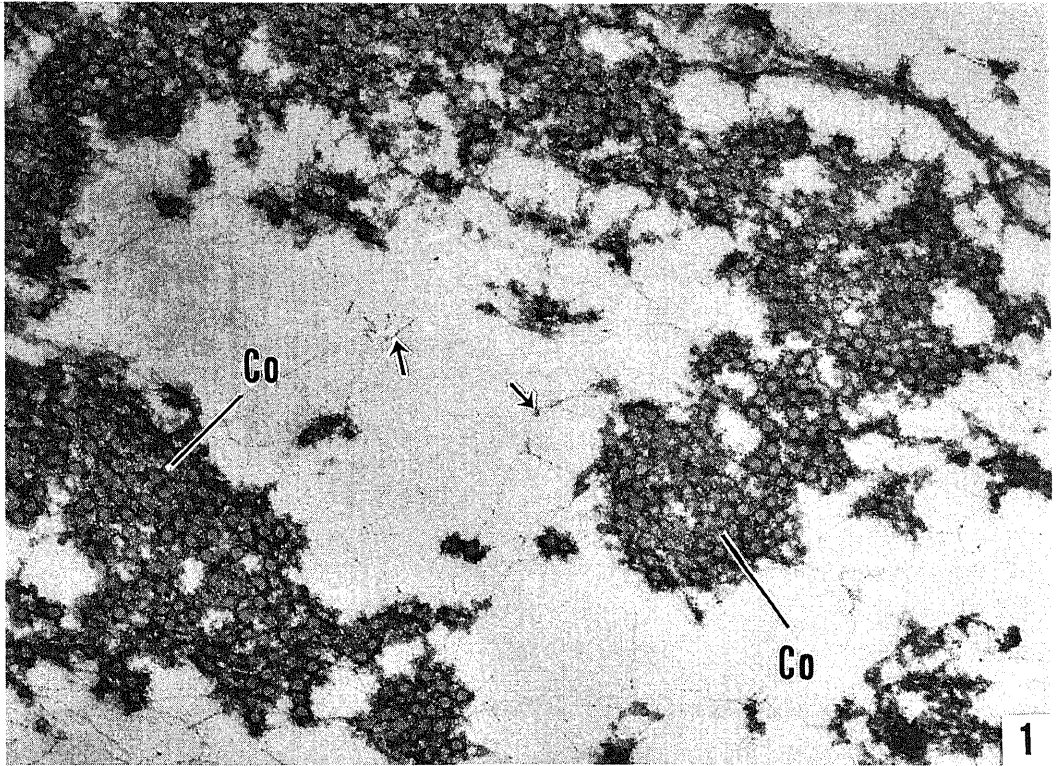
**The mechanism of the formation of fibrous long spacing fibers in the rat skin -an electron microscopic study.** Teiichi Yamamura, Department of Pathology (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920, Japan. *J. Juzen Igk. Z.*, 88, 38-52 (1979).

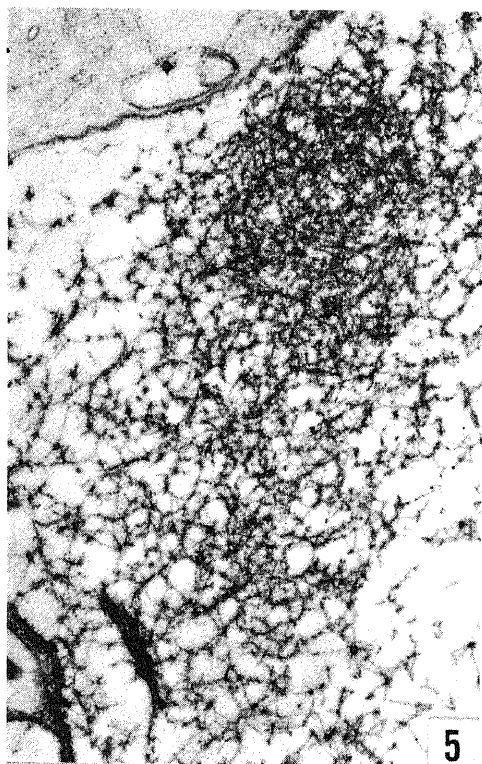
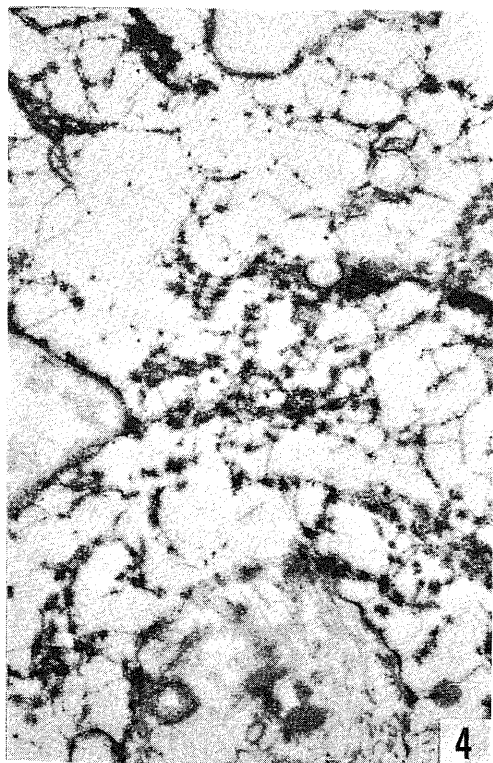
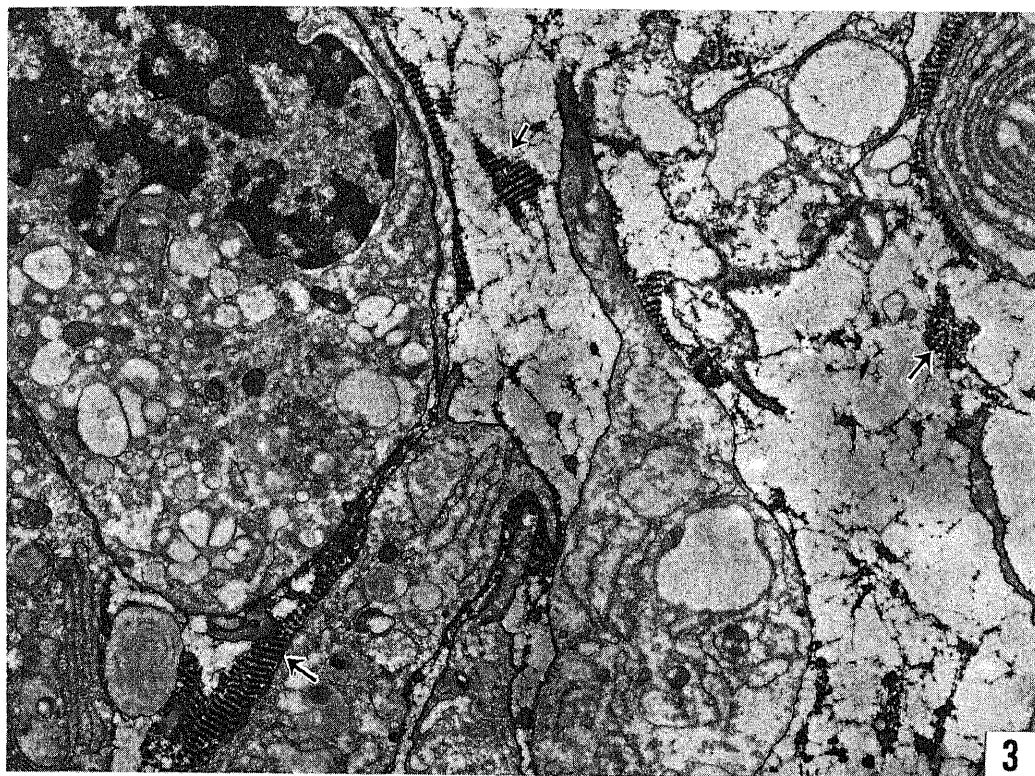
#### Abstract

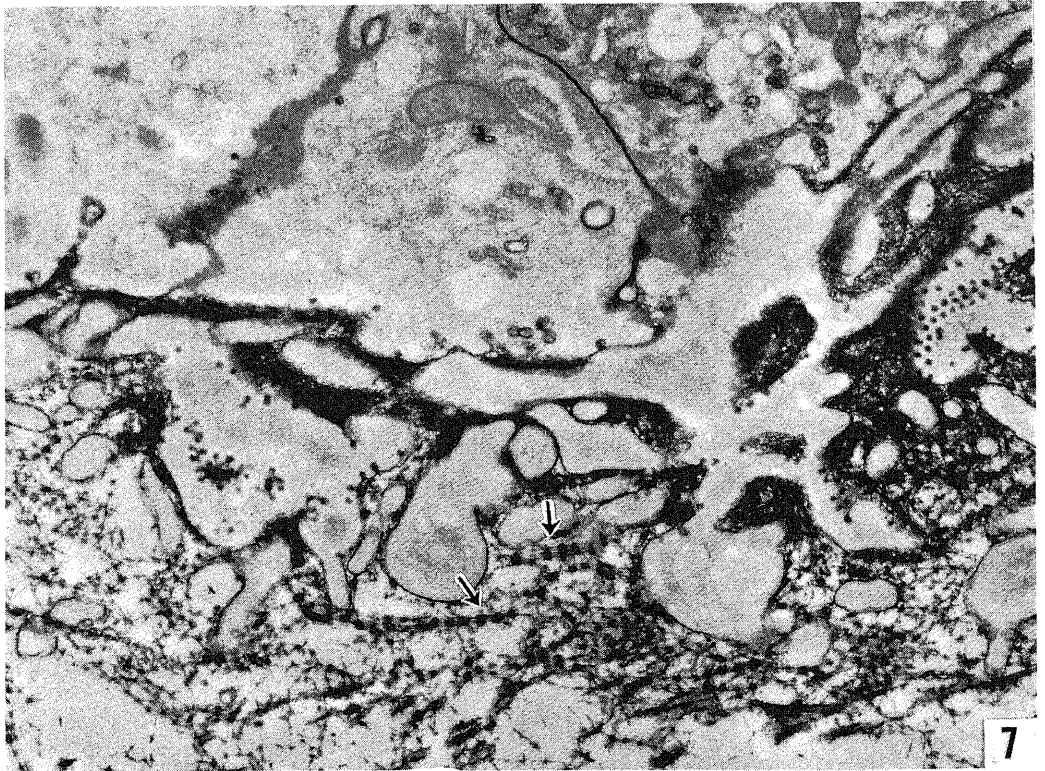
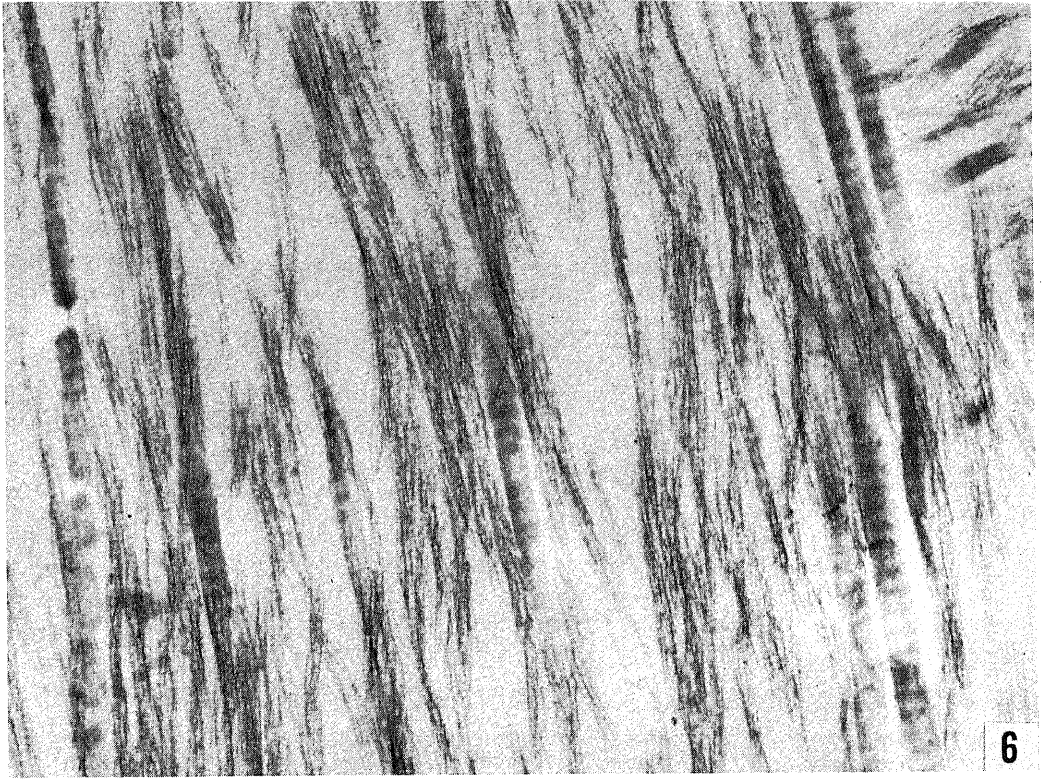
Factors involved in the formation of fibrous long spacing (FLS) fibers were studied by electron microscopy of the rat skin. If the skin of newborn rats was incubated in bacterial collagenase, dermal reticulin fibers were readily converted into FLS fibers. Similar finding was obtained in the skin explants cultured in vitro, in which the increase of collagenase activity was demonstrated. Addition of EDTA, a collagenase inhibitor, to the culture medium, resulted in complete inhibition of the conversion of reticulin fibers into FLS fibers. It occurred again, however, if such skin explants were incubated in bacterial collagenase. In the skin of adult rats, when subjected to collagenase treatment, dermal collagen fibers were broken down, but no FLS fibers were formed, except in the areas where reticulin fibers were normally found, such as around hair follicles or blood capillaries.

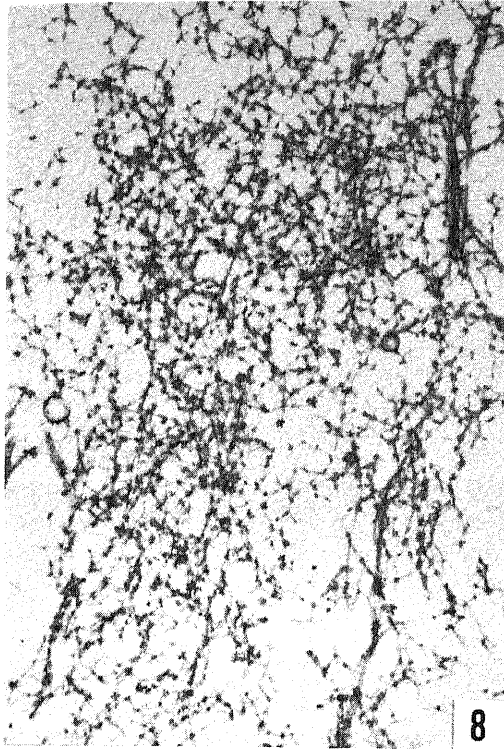
If ruthenium red stainable substances associated with reticulin fibers were removed by  $\alpha$ -chymotrypsin prior to collagenase treatment, reticulin fibers were resolved into fine filaments which failed to aggregate to form FLS fibers. On the other hand, elimination of proteoglycans in the ground substance did not appear to influence the FLS fiber formation.

The evidence suggests that the formation of FLS fibers results from the interaction between degradation products of reticulin fibers subjected to collagenase attack, i.e. collagen molecules and probably reticulin associated glycoproteins.

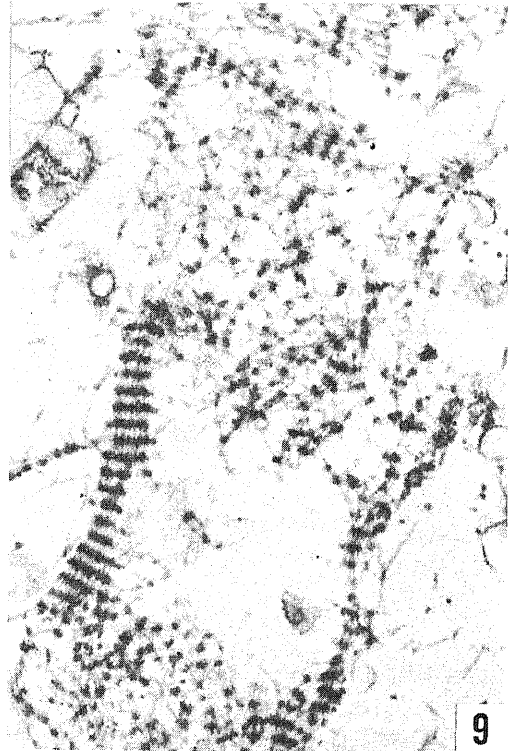




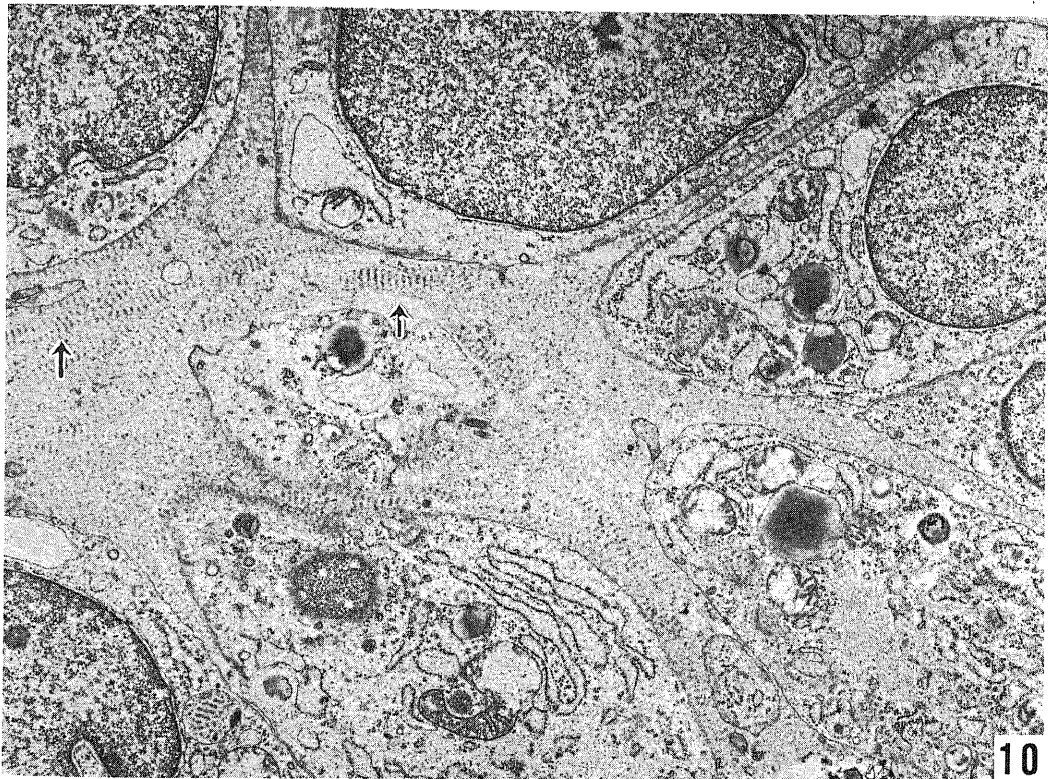




8



9



10

