

培養細胞を用いた角膜内皮創傷治癒モデル

2. 細胞増殖動態の検討 (図9, 表1)

宮田 和典・村尾 元成 (東京大学医学部眼科学教室)
 澤 充・谷島 輝雄* (*日比谷眼科)

要 約

創傷治癒過程における細胞増殖動態を、ウシ角膜内皮創傷治癒モデルを用い Thymidine の analogue である Bromodeoxyuridine (BrdU) 及び抗 BrdU モノクローナル抗体を用いた酵素抗体法により検討した。ウシ角膜内皮細胞を培養面周辺を hydroxyethyl methacrylate (HEMA) で直径8mm にコートしたカバーグラス上で均一な単層状態に培養後、培養面の中央部に一定の大きさの創傷を作成し、経時的に12時間毎に BrdU を添加した培養液に置換、S 期にある細胞を標識した。処理標本をホルマリン固定後、抗 BrdU モノクローナル抗体及び Avidin Biotin Peroxidase Complex 法 (ABC 法) による免疫組織学的染色を行ない標識された細胞の核数を計測した。創傷作成後、細胞の伸展移動が少ない初期6時間、及びそれ以降活発に伸展移動を行なっている24時間までは、標識細胞はほとんど見られなかったが、24時間以降急増し48~60時間にピークに達し、創傷閉鎖する72時間以後は急激に減少した。また標識細胞は、創傷縁より0.6mm の範囲に集中しており創傷より離れた部位には少なかった。今回の実験結果より創傷治癒には、準備期、伸展移動期、伸展移動+細胞増殖期、接触抑制期が存在することが考えられた。(日眼会誌 93:287-293, 1989)

キーワード：ウシ培養角膜内皮細胞, Bromodeoxyuridine(BrdU), 抗 bromodeoxyuridine モノクローナル抗体, Avidin Biotin Peroxidase Complex 法 (ABC 法)

Kinetic Study of Cell Proliferation in a New Wound Healing Model Using Tissue Cultured Corneal Endothelial Cells

Kazunori Miyata, Motonari Murao, Mitsuru Sawa
and Teruo Tanishima

*Department of Ophthalmology, University of Tokyo School of Medicine and *Hibiya Eye Clinic, Tokyo*

Abstract

We studied cell kinetics in the wound healing process using cultured bovine corneal endothelium. We cultured bovine endothelial cells on coverslips coated by hydroxyethyl metacrylate (HEMA) which had on 8 mm HEMA-free zone in diameter, and produced wounds at the center of the monolayer cell sheets using a rotating silicone tip. At various time periods after injury, we added bromodeoxyuridine (BrdU) to the medium and incubated for 12 hours. Then, the specimens with fixed 10% phosphate-buffered formalin and were incubated with a monoclonal antibody against BrdU. The cells incorporating BrdU into DNA were stained by the Avidin Biotin Peroxidase Complex (ABC) method. At 12 hours, no labeled cells were observed. At 24 hours, 14.6 ± 4.0 cells were stained. The maximum labeling

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 宮田 和典
 (昭和63年12月26日受付, 平成元年1月18日改訂受理)

Reprint requests to: Kazunori Miyata, M.D. Dept. of Ophthalmol., School of Med., Univ. of Tokyo
 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

(Received December 26, 1988 and accepted in revised form January 18, 1989)

occurred during 48—60 hours after the wound. Seventy two hours after the wound, labeled cells decreased rapidly. Labeled cells were localized within 0.6mm from the wound edge throughout the wound healing process. It can be thought that the wound healing process comprised four phases, i.e., latent, migration, migration plus mitosis, and contact inhibition phases. The first is the latent phase observed during the first six hours after wound infliction. The cells respond to external expansion. The second phase is the migration phase which is last until 24 hours after wound infliction, and occurs mainly through cellular migration, while proliferation has only a minor contribution in this phase. The third is the migration plus mitosis phase. The cell proliferation shows a rapid increase after 72 hours after wound infliction. The wound healing model of corneal endothelium using cultured bovine endothelial cells is useful for quantitative studies of wound healing area and kinetic studies of endothelial cell proliferation. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 93: 287—293, 1989)

Key words: Bovine, cultured corneal endothelium, Bromodeoxyuridine, Antibromodeoxyuridine monoclonal antibody, Avidin Biotin Peroxidase Complex method

I 緒言

角膜内皮細胞層の創傷治癒過程の細胞増殖能には動物を用いた細胞動態の解析^{1)~5)}の結果から種差があるとされる。即ち家兎においては細胞分裂像が多数認められ、細胞増殖のピークは創傷作成後24~48時間にあり創傷部の細胞の50%が³H-thymidineにより標識され³⁾、その分裂能は猫よりも比較的高いとされている²⁾。また猿においては、創傷部の³H-Thymidineによる標識細胞は12~19%であり、家兎などに比較して創傷治癒過程における細胞分裂能が低いと指摘されている⁵⁾。ヒトの角膜内皮細胞の創傷治癒は、主に創傷部周辺の内皮細胞の伸展移動により行なわれるとされているが^{6)~8)}、organ culture および *in vivo* における³H-thymidineを用いた実験で、その取り込みが認められることから細胞増殖能はあると推測する報告もある⁹⁾¹⁰⁾。しかし創傷治癒過程における細胞の伸展移動の増殖の関係については、不明な点が多い。

今回我々は、角膜内皮細胞の創傷治癒過程における細胞動態を創傷治癒面積の定量化が可能な培養細胞を用いた角膜内皮細胞のモデル¹¹⁾において、ThymidineのanalogueであるBromodeoxyuridineを投与し、抗BrdUモノクローナル抗体を用いて標識後、Avidin Biotin Peroxidase Complex method (ABC法)により染色する方法を検討した。

II 実験材料及び方法

培養細胞としてウシ角膜内皮細胞を用い、既報¹¹⁾に従って組織培養を行なった。即ち培養は、37℃、炭酸ガス5%、湿度100%の条件下の炭酸ガスインキュベ-

ター内で行なった。培養液はイーグル MEM 培地、アール液 (GIBCO 社) にウシ胎児血清 (10%) 及びゲンタマイシン (20 μ g/ml) を加えたものを使用した。また既報¹¹⁾に従い角膜内皮細胞総数を一定にし、外方への細胞の移動を防ぐために、細胞培養ベッドとして直径8mmの培養面を残してその他をhydroxyethyl methacrylate (HEMA HOYA 社) を用いコーティングした24mm培養用カバーグラスを使用した。

創傷治癒実験は、以下のごとく行なった。創傷形成は培養10日目に培養面上で滅菌したシリコンチップ回転による細胞擦過法にて行なった。標本は、創傷作成後から72時間まで12時間毎に以下の処理を行なった。固定前の12時間に培養液に10 μ g/mlの5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, SIGMA 社) を添加し、12時間培養後直ちに10%緩衝ホルマリンにて24時間、4℃で固定した。固定後、0.01M 燐酸緩衝液 (PBS) で洗浄後、1N 塩酸にて60℃15分間、次に0.05%プロテアーゼ Type IV (SIGMA 社) を室温にて15分反応させ、蒸留水およびPBSで洗浄した。ABC法には、Vectastain ABC kit (Vector 社) を用いた。洗浄後希釈正常血清にて37℃で20分インキュベーションした後、抗BrdUモノクローナル抗体 (コスモバイオ社) と4℃で24時間インキュベーションした。PBSで洗浄した後、ビオチン化抗体 (ABC kit) を加えて37℃で1時間インキュベーション後、洗浄した。次いで0.3%過酸化水素のメタノール溶液を加えて室温で30分間インキュベーションした。再度PBSにて洗浄後Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC kit) を加えて37℃で1時間インキュベーションした。PBSにて洗浄後、0.1%四塩酸ジアミノベンチジン (SIGMA 社) を用いたペルオ

キンダーゼ基質（0.02%過酸化水素との混合液）を加え室温で30分インキュベーション後洗浄し、スライドガラスに包埋した。また対照として、BrdU 無添加群および BrdU 添加群で染色過程における抗 BrdU モノクローナル抗体のかわりにマウス正常非免疫 IgG を使用した群との 2 群につき培養48時間後に固定し染色を行なった。

染色標本は顕微鏡にて観察後撮影し印画紙上に100倍に拡大し、標識細胞総数の計測と、その局在の検討とを行なった。局在の検討は、標識細胞と創傷部との位置関係を明確にするために創傷部の中心より0.2 mm 刻みの同心円内の単位面積あたりの標識細胞数および創傷縁の位置の創傷部中心からの距離を測定した。

III 結 果

1. 創傷作成後の分裂細胞の経時的変化

創傷作成後12時間では、標識細胞はほとんど見られなかった(図1, 7)。24時間では、創傷縁に沿って創傷中心に向かって移動を初めた細胞のうち分裂前期から後期と思われる細胞がわずかに存在し(図2a, b)、 14.6 ± 4.0 (平均±標準偏差)個の標識細胞を認めた(図7)。36時間には標識細胞は増加し創傷縁に沿った2, 3列の細胞が標識され(図3a, b)、標識細胞数は急激に増加し 198.0 ± 2.0 個となった(図7)。48, 60時間においては、標識細胞は更に増加し、創傷縁より5~6列の細胞が標識され(図4, 5a, b)、それぞれ、 201.7 ± 16.1 個、 226.3 ± 24.9 個とほぼピークに達した(図7)。72時間以降は分裂細胞は減少し(図6, 7)創傷部閉鎖後はほとんど見られなかった。また対照とした2群は、BrdU を添加しなかった群及び BrdU は添加するが染色の過程で抗 BrdU モノクローナル抗体のかわりにマウス IgG を使用した群との2群ともに培養48時間後に実験した結果、標識細胞は認められなかった。

2. 標識細胞の局在

創傷作成後12時間目では、創傷縁は中心部より 0.90 ± 0.1 mmにあるが、標識細胞は全く観察できなかった。24時間目には、創傷縁は、中心より 0.74 ± 0.04 mmの領域にあるが、 $0.6 \sim 1.0$ mmの領域において少数の標識細胞を認めた。36時間目における創傷縁は、 0.62 ± 0.08 mmの領域にあったが、 $0.6 \sim 0.8$ mmの領域に $176.9 \pm 28.0/\text{mm}^2$ と標識細胞数のピークを認めた。また1.2mmより外側には、標識細胞は認められなかった。同様に、48, 60時間目には、創傷縁は、 $0.50 \pm$

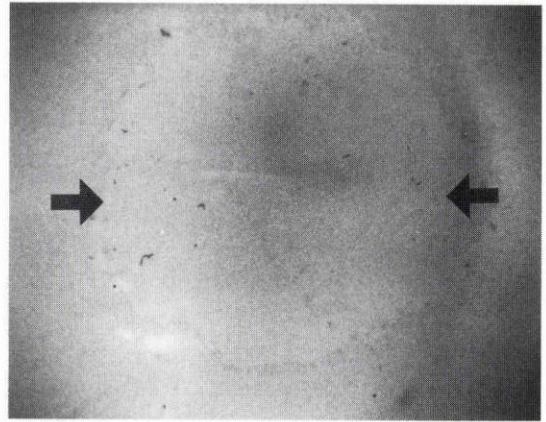
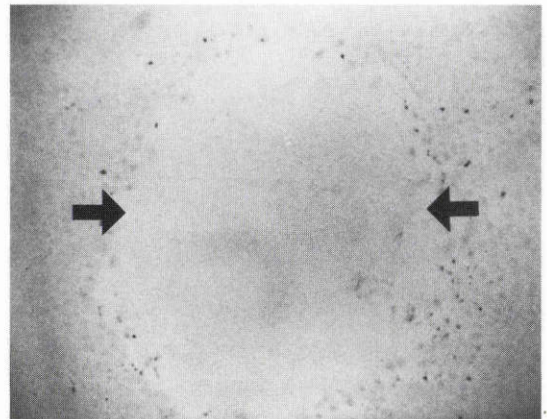


図1 創傷作成後12時間目の創傷部および標識細胞の光学顕微鏡写真(×10) ←は創傷部辺縁を示す。

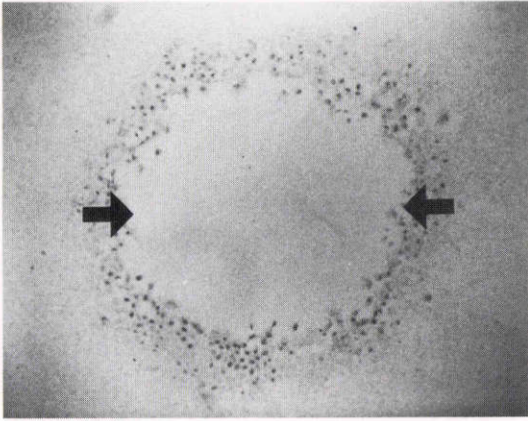


a

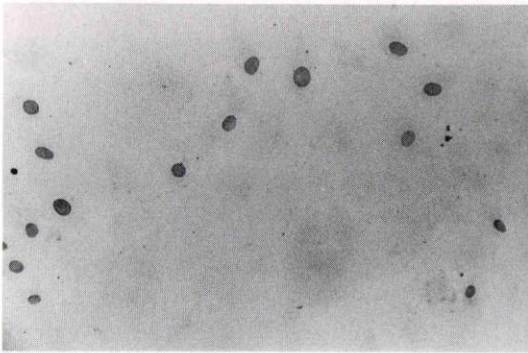


b

図2 創傷作成後24時間目の創傷部および標識細胞の光学顕微鏡写真(a×10, b×50) ←は創傷部辺縁を示す。

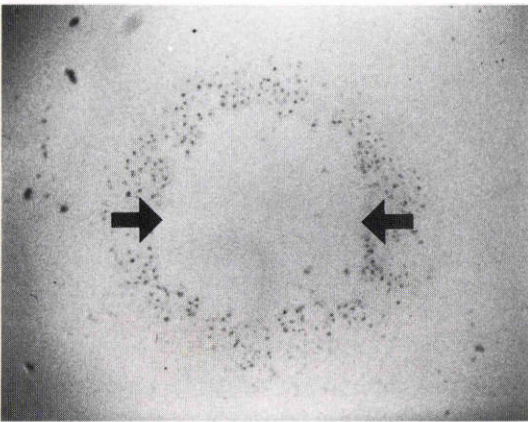


a

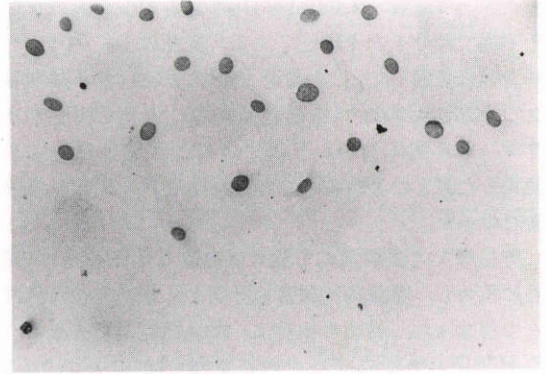


b

図3 創傷作成後36時間目の創傷部および標識細胞の光学顕微鏡写真 (a×10, b×50) ←は創傷部辺縁を示す。

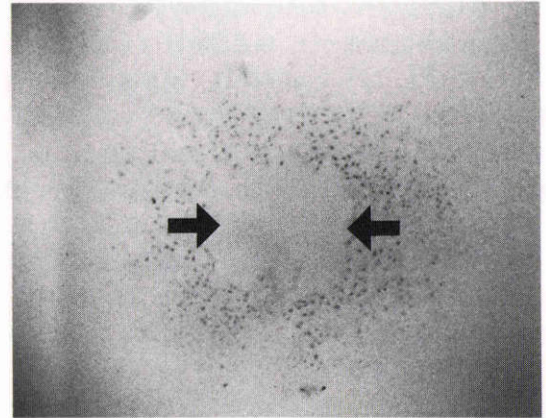


a

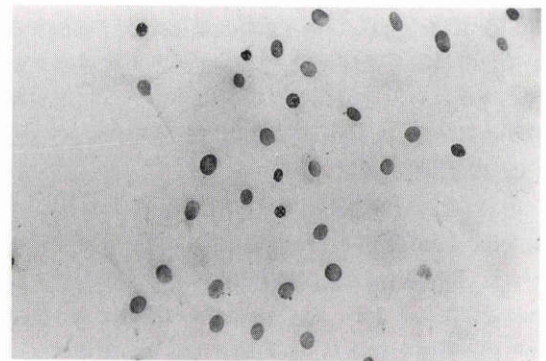


b

図4 創傷作成後48時間目の創傷部および標識細胞の光学顕微鏡写真 (a×10, b×50) ←は創傷部辺縁を示す



a



b

図5 創傷作成後60時間目の創傷部および標識細胞の光学顕微鏡写真 (a×10, b×50) ←は創傷部辺縁を示す

0.80mm, $0.36 \pm 0.05\text{mm}$ の位置にありそれぞれ $0.4 \sim 0.6\text{mm}$ の領域に $142.3 \pm 66.8/\text{mm}^2$, $228.8 \pm 15.6/\text{mm}^2$ とピークを認め、ほぼ創傷縁を含む領域に一致していた。72時間目には創傷縁は0.2mm以内に限局、標識細胞数も減少し、中心部より0.6mm内に散在し、0.8mmより外側には、ほとんど見られなかった(図8)。

IV 考 案

細胞の分裂能を検討する上で、一定時間内に分裂期もしくは分裂後の細胞を標識する方法が有用である。従来用いられてきた方法では、 ^3H -Thymidine を用いて標識するオートラジオグラフィ^{2)3)5)9)10)12)~14)}が主であり、放射性同位元素を使用するため特殊な施設が必要であったり、人体への被爆の問題などがあった。そこで今回は、やはりS期の細胞に取り込まれる Thymidine の analogue である BrdU を投与し、その

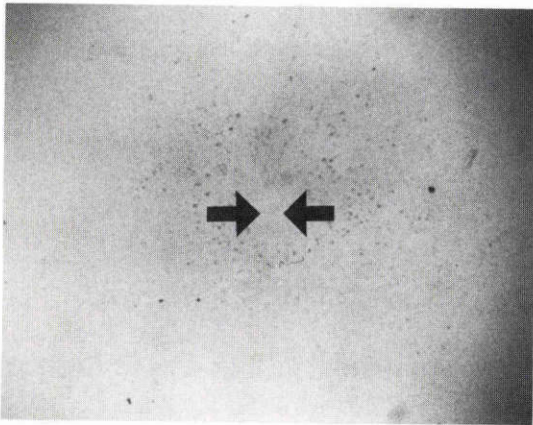


図6 創傷作成後72時間目の創傷部および標識細胞の光学顕微鏡写真(×10) ←は創傷部辺縁を示す

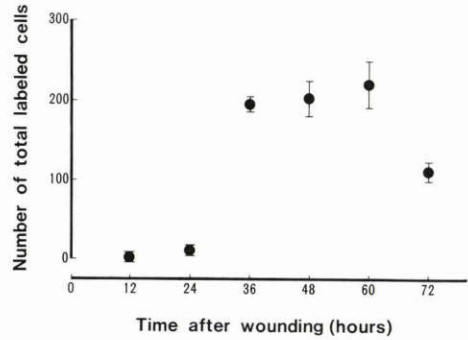


図7 標識細胞総数の経時的変化。36時間目より標識細胞数の急激な増加がおり48, 60時間目とピークに達した後、72時間目には急激な減少を見ている

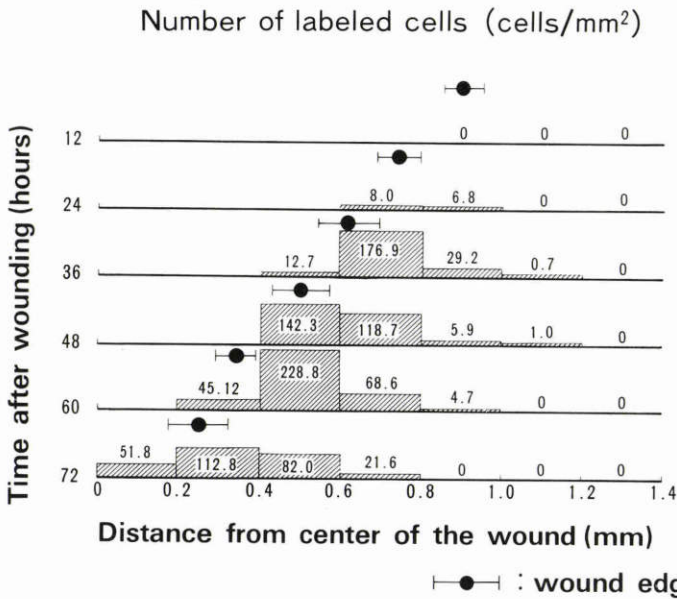


図8 標識細胞の局在(●は創傷縁の位置を示す)。各時間ともに標識細胞は、創傷縁周囲に限局している

後 BrdU モノクローナル抗体を用いて標識する方法¹⁵⁾を用いた。この方法は、酵素抗体染色法と組合せることにより、³H-Thymidine を用いたオートラジオグラフィと良く相関することが報告されている¹⁶⁾。この染色法では、BrdU を取り込んだ核のみ陽性に染色されるため、本創傷治癒モデルのようにカバーガラス上の単層細胞の核染色において陽性細胞の判定が容易で有用であると考えられる。

ウシ角膜内皮培養細胞を用いた本実験系においては、24時間目までは創傷部の縮小は見られるものの標識細胞は少なく36時間目以降急激に増加し48~60時間目にピークに達している。その後標識細胞は、急激に減少し、創傷閉鎖時にはほとんど認められなくなり、細胞の伸展移動と分裂は治癒状態に応じて役割が異なっていることがわかった。また標識細胞の局在についての検討からは、分裂する細胞は創傷辺縁より0.6mmの領域に局在しており、confluent にある一層の内皮細胞に欠損ができた場合、細胞分裂はその欠損部の周辺の細胞で起こることが確かめられた。以上の点は、従来の *in vivo* での報告もよく一致するものであった。即ち *in vivo* において家兎角膜内皮細胞は高い分裂能を有し、その細胞増殖は24~48時間後にピークに達し、増殖像は創傷縁1mm に局在して観察されると報告されている³⁾。また創傷閉鎖後は、contact inhibition が生じ細胞分裂は急激に減少するとされ³⁾¹⁷⁾、今回の結果と創傷治癒の時間経過に相違はあるもののその変化は類似するものである。猿では形態学的に細胞分裂像はほとんど見られないが⁴⁾、オートラジオグラフィによる報告では創傷の周辺の細胞12~19%は³H-Thymidine の取り込みを行っているとされる⁵⁾。ヒトにおいて、Doughman らは organ culture で創傷治癒機転はほとんど伸展移動によりなされ、増殖は極めて少ないとしている⁷⁾⁸⁾。Treffers らは、48時間目には創傷周辺の細胞に³H-Thymidine の取り込みがみられ、72時間目に分裂細胞数がピークに達すると報告している¹⁰⁾。

既報¹¹⁾では、培養ウシ角膜内皮細胞を用いた創傷治癒モデルにより今回の実験と同サイズの創傷を作成し創傷治癒過程の定量的評価を行った。創傷作成後6時間までは、創傷周辺の細胞の伸展移動はほとんど無かった。6~12時間で、創傷治癒率(単位時間あたりの創傷治癒面積)は、やや増加し、12時間目以降、60時間目まで治癒率はピークに達した。その後治癒率は減少し84時間後に創傷部は閉鎖した。この結果と今回の細胞増殖動態の結果を合わせて考察すると、24時間

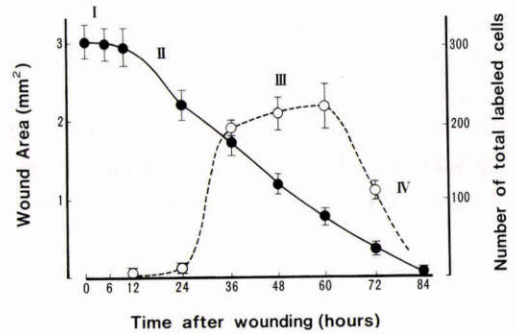


図9 創傷治癒曲線および細胞増殖曲線。●は創傷部の面積を示す。○は標識細胞数を示す
I. 準備期, II. 伸展移動期, III. 伸展移動+細胞分裂期, IV. 接触抑制期

表1 創傷治癒における細胞動態

- | |
|-----------------|
| I. 準備期 |
| II. 伸展移動期 |
| III. 伸展移動+細胞分裂期 |
| IV. 接触抑制期 |

目までは細胞増殖は非常に少ないため、この時期の創傷治癒は主に細胞の伸展移動により行なわれ、36時間目には細胞増殖は急激に増加し48~60時間目にピークに達していることから、36時間目以降の創傷治癒は細胞の伸展移動だけでなく細胞増殖の因子が加わったと考えられる。72時間以降は、創傷治癒率および細胞増殖ともに急激に減少した(図9)。以上より本創傷治癒モデルの治癒過程の経時的变化を分析すると準備期、伸展移動+細胞増殖期、接触抑制期の4過程に分けられる(表1)。

準備期は、外からの刺激を感知し創傷縁の細胞が伸展移動を開始し一定の速度になるまでの時期である。この時期には種差が存在すると考えられ、家兎においてはこの時間帯は、ほとんど見られないとの報告があり¹⁸⁾、ヒトでは organ culture における実験で24時間以内との報告がある⁸⁾。本創傷治癒モデルにおいては創傷作成後6時間は、ほとんど細胞の移動はみられず準備期と考えられる¹¹⁾。

伸展移動期は、創傷治癒が主に細胞の伸展移動でほぼ一定の速度で行なわれていると考えられる時期である。今回の実験では、創傷作成後24時間までは細胞増殖がほとんど見られず、この時間帯において創傷治癒は細胞の伸展移動のみで行なわれていると考えられるため、創傷作成後12~24時間がこの伸展移動期に当た

ると考えられる。

伸展移動+細胞分裂期は、細胞の伸展移動と細胞増殖が同時に生じている時期である。家兎において創傷作成後16時間以降が³⁾、本モデルにおいては、創傷作成後24~60時間に、細胞分裂が盛んに行なわれているため24時間以後がこの時期と考えられる。

接触抑制期は、創傷面積の減少に伴い細胞の伸展移動、分裂ともに減少する時期で、細胞間接着構造が再生される時期と推定される³⁾¹⁷⁾。この時期と伸展+細胞増殖期の境を明確にするのは困難であるが、本モデルにおいては、細胞増殖が急激に減少する72時間以後と考えられた。

以上、前回報告した角膜内皮培養細胞を用いた本創傷治癒モデルの経時的、定量的評価に、今回の BrdU を用いた細胞増殖動態の解析を加えることにより創傷治癒過程の経時的な変化をより詳細にとらえることができた。

本論文の執筆にあたり東大眼科、増田寛次郎教授の御校閲に感謝致します。

文 献

- 1) **Chi HH, Teng CC, Katzin HK**: Healing process in the mechanical denudation of the corneal endothelium. *Am J Ophthalmol* 49: 693-703, 1960.
- 2) **Van Horn DL, Sendele DD, Seideman S, et al**: Regenerative capacity of the corneal endothelium in rabbit and cat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 16: 597-613, 1977.
- 3) **Yano M, Tanishima T**: Wound healing in rabbit corneal endothelium. *Jpn J Ophthalmol* 24: 297-309, 1980.
- 4) **Van Horn DL, Hyndiuk RA**: Endothelial wound repair in primate cornea. *Exp Eye Res* 21: 113-124, 1975.
- 5) **Matsubara M, Tanishima T**: Wound-healing of corneal endothelium in monkey: An autoradiographic study. *Jpn J Ophthalmol* 27: 444-450, 1983.
- 6) **Kaufman HE, Capella JA, Robbins JE**: The human corneal endothelium. *Am J Ophthalmol* 61: 835-841, 1966.
- 7) **Doughman DJ, Van Horn D, Rodman WP, et al**: The ultrastructure of the human organ cultured cornea: 1. Endothelium. *Arch Ophthalmol* 92: 516-523, 1974.
- 8) **Doughman DJ, Van Horn D, Rodman WP, et al**: Human corneal endothelial layer repair during organ culture. *Arch Ophthalmol* 94: 1791-1796, 1976.
- 9) **Simonsen HA, Sorensen KE, Sperling S**: Thymidine incorporation by human corneal endothelium during organ culture. *Acta Ophthalmol* 59: 110-118, 1981.
- 10) **Treffers WF**: Human corneal endothelial wound repair. *Ophthalmology* 89: 605-613, 1982.
- 11) **宮田和典, 村尾元成, 中蔵信一他**: 培養細胞を用いた創傷治癒モデル, 1. 創傷治癒過程の観察と定量. *日眼* 93(1): 9-15, 1989.
- 12) **Leblond CP, Messier B, Kopriwa B**: Tymidine-³H as a tool for the investigation of the renewal of cell populations. *Lab Invest* 8: 296-398, 1959.
- 13) **Mills NL, Donn A**: Incorporation of tritium-labeled thymidine by rabbit corneal endothelium. *Arch Ophthalmol* 64: 443-446, 1960.
- 14) **Bito LZ, Harding CV**: Tritium retention by corneal endothelium after incorporation of ³H-Thymidine. *Arch Ophthalmol* 65: 553-556, 1961.
- 15) **Gratznar HG, Pollack A, Ingram DJ, et al**: Deoxyribonucleic acid replication in single cells and chromosomes by immunologic techniques. *J Histochem Cytochem* 24: 34-39, 1976.
- 16) **Sugiura H, Hattori T, Fukuda M**: Immunohistochemical detection of bromodeoxyuridine in formalin-fixed tissues. *Histochemistry* 85: 193-195, 1986.
- 17) **Hirsch M, Renard G, Faure JP, et al**: Formation of intercellular spaces and junctions in regenerating rabbit corneal endothelium. *Exp Eye Res* 23: 385-397, 1976.
- 18) **Matsuda M, Ubels JL, Edelhauser HF**: Corneal endothelial healing rate and the effect of topical retinoic acid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 1193-1198, 1986.