

## ウサギ角膜上皮創傷治癒過程に及ぼすビトロネクチンの影響

加畑 隆通\*, 石橋 康久\*\*, 本村 幸子\*\*, 赤間 高雄\*\*\*, 八藤後武美\*\*\*,  
河野 一郎\*\*\*, 柏木平八郎\*\*\*, 泉 雅子\*\*\*, 林 正男\*\*\*\*

\*筑波大学付属病院眼科, \*\*筑波大学臨床医学系眼科

\*\*\*筑波大学臨床医学系内科, \*\*\*\*お茶の水女子大学理学部生物学科

## 要 約

ビトロネクチンは動物の血漿中に存在する糖タンパク質の一種で、フィブロネクチンより強い細胞接着伸展作用を持っており、また安定性にも優れている。我々はビトロネクチンの *in vivo* におけるウサギ角膜上皮創傷治癒過程に及ぼす影響を検討した。白色ウサギ11匹に直径6.5mmの上皮剝離創を作製後、右眼にビトロネクチンを、左眼に対照として生理食塩水を定時的に点眼し、上皮欠損の面積を経時的に計測した。結果は点眼2時間後から12時間後までビトロネクチン点眼群が生食点眼群よりも欠損面積が小さく、ビトロネクチンの点眼は創傷治癒早期に効果があると考えられた。ビトロネクチン点眼はフィブロネクチンと同様に角膜上皮疾患に応用しうることが示唆された。(日眼会誌 94:457-461, 1990)

キーワード：ビトロネクチン，角膜上皮欠損，創傷治癒，ウサギ角膜

## Effect of Vitronectin on the Healing of Rabbit Corneal Epithelial Damage

Takamichi Kabata\*, Yasuhisa Ishibashi\*\*, Sachiko Honmura\*\*

Takao Akama\*\*\*, Takemi Yatohgo\*\*\*, Ichiro Kono\*\*\*

Heihachiro Kashiwagi\*\*\*, Masako Izumi\*\*\*\* and Masao Hayashi\*\*\*\*

\*Department of Ophthalmology, University Hospital of Tsukuba

\*\*Department of Ophthalmology, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba

\*\*\*Department of Internal Medicine, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba

\*\*\*\*Department of Biology, Ochanomizu University

## Abstract

Vitronectin is one of the major cell-adhesive glycoproteins in mammalian plasma. We investigated the effect of topically applied vitronectin on the healing of rabbit corneal epithelial damage. Vitronectin was purified from rabbit serum by heparin-Sepharose affinity chromatography and autoclaved at 121°C for 20min after adjusting the concentration to 0.2mg/ml with saline. Rabbit corneal epithelium was abraded with ethanol and a laser blade in the central portion of the cornea which had been demarcated with a 6.5mm trephine. Vitronectin eye drops were instilled into the right eye, and sterile saline drops into the left eye as control. The dimensions of the circular epithelial defect were measured at various times after wounding. The area of epithelial damage of vitronectin-treated eyes was smaller than that of control eyes at 2hr~12hr after abrasion ( $p < 0.01$ ). These results

別刷請求先：305 茨城県つくば市天久保2-1-1 筑波大学附属病院眼科 加畑 隆通

(平成元年9月27日受付，平成元年11月10日改訂受理)

Reprint requests to: Takamichi Kabata, M.D. Dept. of Ophthalmol., Univ. Hospital of Tsukuba  
2-1-1 Amakubo, Tsukuba-shi, Ibaragi 305, Japan

(Received September 27, 1989 and accepted in revised form November 10, 1989)

suggested that topically applied vitronectin might accerelate the corneal epithelial wound healing at an early stage. Vitronectin can be considered as a candidate for treatment of corneal epithelial damage. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 94 : 457-461, 1990)

**Key words:** Vitronectin, Corneal epithelial damage, Epithelial wound healing, Rabbit cornea

## I 緒 言

ビトロネクチンは、1983年に E. Ruoslahti らによって命名された細胞接着性糖蛋白質の一種である<sup>1)</sup>。細胞接着性蛋白質としては、1973年に発見されたフィブロネクチンが各分野において研究が進んでいる。眼科領域でもフィブロネクチンは、西田らが角膜上皮の創傷治癒を促進することを報告して以来<sup>2)</sup>、角膜上皮疾患に応用されている<sup>3)~6)</sup>。

ビトロネクチンは *in vitro* において、フィブロネクチンと類似の細胞接着伸展作用を持ち<sup>1)7)8)</sup>、細胞伸展活性の強さ、安定性などにおいてはフィブロネクチンよりも優れている<sup>9)</sup>。ビトロネクチンもフィブロネクチンと同様に角膜上皮の創傷治癒を促進する可能性が考えられるが、*in vivo* におけるその作用はまだ確かめられていない。今回、我々はウサギ角膜上皮創傷治癒過程におけるビトロネクチン点眼の効果を検討したので報告する。

## II 実験方法および材料

実験はウサギ角膜上皮欠損モデルを作製し、その創傷治癒過程に対するビトロネクチン点眼の効果を検討した。

実験動物として、眼疾患を認めない日本在来白色ウサギ11羽22眼を使用した。ビトロネクチンの精製は、ビトロネクチンのヘパリン結合性が尿素添加により増加する性質<sup>9)</sup>を利用した八藤後らの方法に従った<sup>8)</sup>。すなわち、ウサギ血清を Sepharose 4B の前カラムに通し、通過分画をヘパリン親和性カラムに通した。ヘパリン親和性カラムの通過分画に尿素を加え、8M 尿素とし、再びヘパリン親和性カラムに通した。カラムに結合したビトロネクチンを0.5M NaCl で溶出し、精製した。精製したビトロネクチンは SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いて、他の血漿タンパクを含まないことを確認した。精製したビトロネクチンは4℃で生理食塩水を用いて十分透析後、オートクレーブにて121℃、1.2kg/cm<sup>2</sup>、20分間、滅菌を行い、生理食塩水にて0.2mg/ml の濃度に調整したものを点眼液

として使用した。また対照点眼液として滅菌生理食塩水を使用した。

角膜上皮欠損モデルの作製は、松本らの方法に従った<sup>10)</sup>。ペントバルビタール静注にて全身麻酔後、顕微鏡下においてトレパンを用いて、角膜中央に直径6.5mmの浅い円形創を作製した。次いで無水アルコールを浸した直径5.5mmの円形濾紙を角膜の円形創内に5秒間密着させ、基底膜、ポーマン膜を損傷しないように機械的に上皮を擦過した。

上皮欠損面積の測定は、上皮欠損部をフルオレスセインにて染色したのち、メディカルニコール(倍率1.5倍)にて写真撮影し、そのネガフィルムをニコン万能投影器 V-24A にて20倍に拡大し、トレースして、comptuted table digitizer (Hewlett Packard 社製)を用いて面積測定を行った。

点眼は、右眼にビトロネクチン、左眼に生理食塩水を各1滴ずつ同時に点眼した。また点眼間隔は、角膜上皮欠損作製直後より1時間毎に12時間、その後は6時間毎とした。上皮欠損の撮影は2時間毎に12時間、その後6時間毎に撮影した(図1)。

## III 実験結果

実験結果を表1に示した。また上皮欠損の大きさの推移を図2に示した。表1および図2では上皮欠損作製直後の面積を100とした各時点における測定面積の

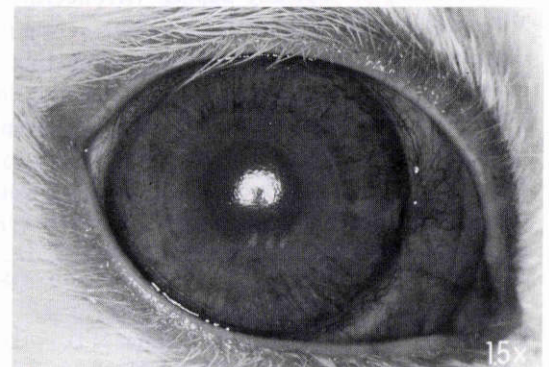


図1 角膜上皮欠損創作製直後



表1 欠損創作製直後の面積を100とした時の面積の推移 (平均±標準偏差)

時間	ビトロネクチン点眼群	生理食塩水点眼群
0	100	100
2	101.13±5.16	105.53±3.50
4	95.59±2.01	101.28±4.54
6	92.05±4.08	97.29±5.38
8	89.65±4.51	93.82±3.57
10	87.45±4.29	91.96±3.14
12	81.62±5.41	85.25±3.46
18	61.04±9.66	64.78±9.87
24	43.48±7.04	46.48±7.08
30	29.82±10.9	30.90±9.41
42	10.12±5.94	10.78±5.52

表2 ビトロネクチンの生物学的活性

生物学的活性	結合する相手
細胞接着伸展	細胞 (細胞膜上レセプター), コラーゲン
細胞移動	グリコサミノグリカン (ヘパリン)
食作用の促進	細菌
補体系との関係	C5b-7 複合体
凝固系との関係	トロンビンとアンチトロンビンIIIの複合体

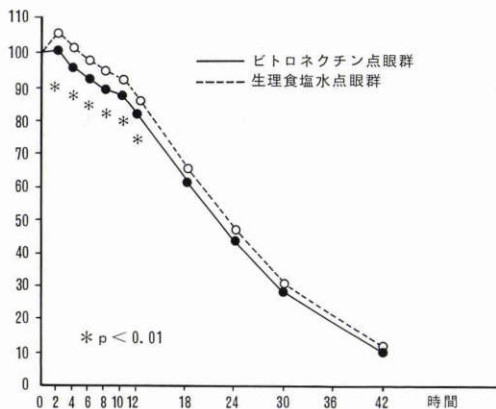


図2 欠損面積の推移 (縦軸は欠損創作製直後の面積を100とした時の面積, 横軸は時間を示す)

変化をあらわしている。

上皮欠損創作製直後のビトロネクチン点眼群, 生理食塩水点眼群の各々の面積は, 前者が $2.857 \pm 0.114 \text{cm}^2$ , 後者が $2.813 \pm 0.128 \text{cm}^2$ であり, 両者間に有意な差は認めなかった。

測定時間毎に両群を比較すると, 点眼開始後2時間

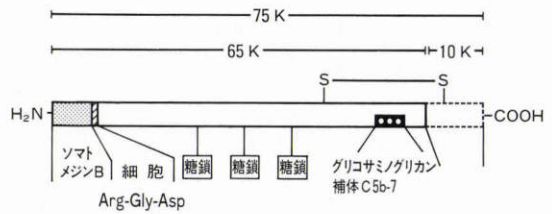


図3 ビトロネクチンの分子モデル

表3 ビトロネクチンとフィブロネクチンとの比較

	ビトロネクチン	フィブロネクチン
分子量	75 kDa およびその分解物 65 kDa	480 kDa (240 kDa×2)
存在部位	血漿, 血小板, 腎結合織, 羊水, 他	血漿, 細胞表面, 胎盤, 肝臓, 他
血漿中濃度	約0.2 mg/ml	約0.3 mg/ml
細胞伸展活性	10	1
安定性	室温で40日間以上	室温で1週間
オートクレーブ滅菌(121°C, 20分, 1.2kg/cm <sup>2</sup> )	可 (活性1/3)	不可 (活性0)

後から12時間後において1%以下の危険率で両群の間に差が認められた(t検定  $p < 0.01$ ). すなわち点眼開始後2時間後から12時間後はビトロネクチン点眼群の方が生食点眼群よりも創傷面積が小さいことが判明した。12時間以降になると両群の間に差は認められなくなった。

また上皮欠損創作製後の時間と欠損面積との関係の回帰直線を求めると, ビトロネクチン点眼群は  $y = 105.58 - 2.37x$ , 生理食塩水点眼群は  $y = 109.91 - 2.44x$  であり, 両群の回帰係数の間には有意な差を認めなかった。

## IV 考 按

### 1. ビトロネクチンの特性について

ビトロネクチンの機能的ドメインは1984年に明らかにされており<sup>11)</sup>, フィブロネクチンの細胞接着部位の塩基配列である Arg-Gly-Asp と同じ塩基配列をビトロネクチンも持っている<sup>12)</sup>(図3)。またビトロネクチンの生物学的活性はフィブロネクチンと同様な細胞接着伸展作用の他, 表2に示したように補体との結合<sup>13)</sup>, 凝固系との関係<sup>14)</sup>を持ち臨床注目を集めている。

さらにビトロネクチンは細胞接着伸展作用に関し

て、フィブロネクチンよりも活性の強さ、安定性に優れている(表3)。特に熱に対し強く、121°C、20分のオートクレーブ滅菌を施行してもビトロネクチンの細胞伸展活性は1/3にしか落ちないが<sup>8)</sup>、フィブロネクチンでは完全に失活する。また、ビトロネクチンでは滅菌が可能なので、血液をプールして点眼剤として使用しても安全であると考えられる。

今回の実験で使用したビトロネクチン濃度は0.2 mg/mlであり、ウサギ血漿中の推定濃度に相当する濃度を使用した。in vitroでのビトロネクチンの細胞接着伸展活性は、今回使用した濃度の2,000分の1の0.1 µg/mlで最大活性の50%を示す<sup>8)</sup>。従って創傷治癒効果においても、今回の実験に用いた濃度より低い濃度でも有効であろうと推定される。

## 2. ビトロネクチンの角膜上皮創傷治癒過程に及ぼす影響

角膜上皮欠損においては、初期に角膜上皮細胞のsliding, migrationがおこり<sup>15)</sup>、フィブロネクチンではこのsliding, migrationを促進することにより、創傷治癒初期に効果があるとされている<sup>16)</sup>。

今回の実験では、ビトロネクチン点眼群と生理食塩水点眼群との間に、点眼2時間後から12時間後まで差がみられたが、図2に見るように、生食点眼群では上皮欠損作製直後、一時的に創が拡大する傾向にあった。これは創縁の上皮細胞が、上皮欠損作製時の侵襲により障害されているのに加えて、生理食塩水の頻回点眼により更に上皮細胞が障害され、剝離、脱落して創が拡大したものと考えられる。一方、ビトロネクチン点眼群ではこの創の拡大はほとんど認められなかった。これらの結果に対して2つの考察が可能である。1つは、ビトロネクチン点眼群でも同様な創の拡大があったが、生食点眼群に比してすみやかに角膜上皮のsliding, migrationがおこり、測定値には現れなかった可能性がある。もう1つは、創縁の上皮細胞は上皮欠損作製時の侵襲により障害され、剝離しやすくなっているが、ビトロネクチンの細胞接着作用によりそれが抑制され、ビトロネクチン点眼群では創の拡大が起らなかったことが考えられる。ビトロネクチンが上皮細胞のsliding, migrationを促進したのか、単に上皮細胞の脱落を防止したのか、それとも両方の作用を有するかは、今回の実験結果からでは明らかではない。しかし、角膜上皮の脱落防止などの創傷治癒過程の特殊な部分を含めて、ビトロネクチン点眼は創傷治癒初期に効果があるものと考えられる。

創傷治癒曲線全体を見ると、ビトロネクチン点眼群と生食点眼群との間に治癒速度において差を認めなかった。また点眼2時間後から12時間後まで上皮欠損面積の大きさに差が見られているが、これは主として、点眼2時間から4時間までの差を反映していると考えられる。従って、点眼開始4時間後以降においては、ビトロネクチンは角膜上皮のsliding, migrationを促進していないと考えられる。フィブロネクチンでは、創傷治癒速度が速くなるという報告<sup>17)</sup>と、対照に比して差はないという報告<sup>18)19)</sup>がある。一方、FrangiehらはビタミンA欠乏ラットにおいて、フィブロネクチン角膜上皮創傷治癒上、有効であったと報告している<sup>20)</sup>。我々は今回の実験結果から、フィブロネクチンおよびビトロネクチンは、角膜が正常な上皮の修復を行っている場合にはそれをさらに促進させる活性は低く、何らかの病的な状態で角膜上皮創傷治癒が障害されている場合に、効果があるのではないかと考えている。今回の角膜上皮欠損モデルでは、上皮欠損作製直後に一時的に結膜の浮腫が見られ、惹起された炎症は強く、創縁の上皮細胞が障害されていた可能性が考えられ、そこにビトロネクチン点眼が効果を示したものと推定される。

今回の実験では、上皮欠損作製後12時間までは1時間毎の頻回点眼を行い、12時間以降は6時間毎の点眼をしており、ビトロネクチンの投与方法に大きな差が存在する。我々は本実験を行う前の前実験として、同じ実験モデルを使用して6時間毎に点眼と観察をおおまかに行っている。その結果、ビトロネクチン点眼群と生食点眼群との間に大きな差を認めなかった。それゆえ、本実験では、創傷治癒過程早期に的を絞り、早期に頻回の点眼と観察を行った。1時間毎の頻回点眼が6時間毎の点眼よりも効果がある可能性はあるが、今回の実験結果のみからは推定できない。

フィブロネクチンは創傷治癒に伴って角膜上に出現し<sup>21)</sup>、正常角膜においてもデスメ膜およびヒトでは上皮下にも存在することが確かめられている<sup>22)</sup>。ビトロネクチンについては眼組織における局在はまだ分かっておらず、その役割も未知である。しかし、今回の実験によって、ビトロネクチンが角膜上皮に対して創傷治癒を促進しうることが示唆され、難治性角膜上皮疾患に対する点眼薬として、臨床応用が期待される。

## 文 献

- 1) Hyman EG, Pierschbacher MD, Ohgren Y, et al: Serum spreading factor (Vitronectin) is



- present at the cell surface and in tissues. Proc Natl Acad Sci USA 80: 4003-4007, 1982.
- 2) Nishida T, Nakagawa S, Aeata T, et al: Fibronectin promotes epithelial migration of cultured rabbit cornea in situ. J Cell Biol 97: 1653-1657, 1983.
  - 3) 西田輝夫, 八木純平, 大鳥利文, 他: フィブロネクチン点眼剤の臨床効果. 臨眼 42: 33-37, 1988.
  - 4) 千原悦夫, 直井信久, 吉田晴子: Fibronectin による角膜上皮びらんおよび角膜潰瘍の治療成績. 眼紀 35: 1846-1848, 1984.
  - 5) 松本雄二郎, 石橋康久, 河野恵子: 難治性角膜上皮疾患に対するフィブロネクチン点眼の臨床応用. 臨眼 79: 622-625, 1985.
  - 6) 伊藤真理子, 山田 宏, 加藤桂一郎, 他: 難治性角膜上皮疾患に対する Fibronectin 点眼の使用経験. 眼臨 80: 1095-1098, 1986.
  - 7) Barnes DW, Silnutzer J: Isolation of human serum spreading factor. J Biol Chem 258: 12548-12552, 1983.
  - 8) Yatohgo T, Izumi M, Hayashi M, et al: Novel purification of vitronectin from human plasma by heparin affinity chromatography. Cell Struct Funct 13: 281-292, 1988.
  - 9) Hayashi M, Akama T, Kono I, et al: Activation of vitronectin (serum spreading factor) binding of heparin by denaturing agents. J Biochem 98: 1135-1138, 1985.
  - 10) 松本雄二郎, 石橋康久: 角膜上皮創傷モデルの作製とその治癒過程の検討. 日眼会誌 88: 1329-1334, 1984.
  - 11) Suzuki S, Piershbacher MD, Hyman EG, et al: Domain structure of vitronectin. Alignment of active sites. J Biol Chem 259: 15307-15314, 1984.
  - 12) Suzuki S, Oldberg A, Hayman EG, et al: Complete amino acid sequence of human vitronectin deduced from cDNA. Similarity of cell attachment sites in vitronectin and fibronectin. EMBO J 4: 2519-2524, 1985.
  - 13) Müller-Eberhard HJ: The membrane attack complex. Springer Semini Immunopathol 7: 93-141, 1984.
  - 14) Ill CR, Ruoslahti E: Association of thrombin-antithrombin III complex with vitronectin in serum. J Biol Chem 260: 15610-15615, 1985.
  - 15) 北野周作: 角膜の創傷治癒について. 眼紀 29: 648-661, 1975.
  - 16) 西田輝夫: 角膜障害治癒過程に出現するフィブロネクチンの病態. 最新医学 39: 2104-2108, 1984.
  - 17) Nishida T, Nakagawa S, Nishibayashi C, et al: Fibronectin enhancement of corneal epithelial wound healing of rabbits in vivo. Arch Ophthalmol 102: 455-456, 1984.
  - 18) Newton C, Hatchell DL, Klintworth GK, et al: Topical fibronectin and corneal epithelial wound healing in the rabbit. Arch Ophthalmol 106: 1277-1279, 1988.
  - 19) 松本雄二郎: 角膜上皮創傷治癒に及ぼす各種点眼液の影響. 日眼会誌 91: 72-79, 1987.
  - 20) Frangieh GT, Hayashi K, Teekhasaene C, et al: Fibronectin and corneal epithelial wound healing in the vitamin A-Deficient Rat. Arch Ophthalmol 107: 567-571, 1989.
  - 21) 真鍋禮三, 西田輝夫: フィブロネクチン. 眼紀 33: 2136-2142, 1982.
  - 22) 渡辺敏明, 熊谷俊一: ヒト角膜 fibronectin の蛍光抗体法による局在の検討. 日眼会誌 86: 426-432, 1982.