

ヒト EGF 角膜実質内投与による血管新生についての検討

谷口 永津, 永江 康信, 渡辺 仁, 大橋 裕一, 木下 茂, 眞鍋 禮三

大阪大学医学部眼科学教室

要 約

大腸菌を用いた純度の高いヒト epidermal growth factor (hEGF) の大量生産が可能となり, 臨床応用への道が考えられている. しかし EGF には *in vivo* において血管新生作用があるとの報告があり, 血管新生作用の有無について再検討する必要がある. 今回徐放剤 (エチレンビニールアセテート) に封入した hEGF を白色家兎の角膜実質内に挿入して 2 週間経過観察した. positive control として basic fibroblast growth factor (bFGF) を, negative control として蒸留水のみを徐放剤に封入して挿入した. その結果, 500ng 以下の hEGF 挿入眼では血管新生は認められず, 組織学的にも炎症細胞の浸潤はわずかであった. 一方, 250ng の bFGF 挿入眼では全例に血管新生が発生し, 組織所見でも挿入初期から後期まで, 強い炎症が一貫して認められた. 従って, *in vivo* においては, 少なくとも 500ng までの量の hEGF には直接的な血管新生作用はないと考えられた. (日眼会誌 95: 52-58, 1991)

キーワード: hEGF, bFGF, 血管新生, 徐放剤, 角膜

The Effect of Recombinant Epidermal Growth Factor in Corneal Angiogenesis

Etsu Taniguchi, Yasunobu Nagae, Hitoshi Watanabe,
Yuichi Ohashi, Shigeru Kinoshita and Reizo Manabe

Department of Ophthalmology, Osaka University Medical School

Abstract

Recent advances in genetic engineering techniques have enabled large-scale manufacture of human epidermal growth factor (hEGF), making possible the clinical use of this particular agent in treating a variety of corneal epithelial disorders. In view of future application to humans, it has to be determined whether hEGF could induce neovascularization in the cornea upon topical instillation, since the angiogenic effect of mouse EGF on the cornea *in vivo* has been reported. For this, a sheet of slow-release form polymer (EVA) containing hEGF was surgically implanted into the rabbit corneal stroma in search for subsequent corneal neovascularization. EVA sheets contained one of the following agents: (1) 250ng hEGF, (2) 500ng hEGF, (3) 250ng bFGF (positive control), (4) vehicle alone (negative control). On 5 and 14 days after implantation, the corneas were excised, sectioned, and stained with hematoxylin and eosin for histological evaluation. Slit lamp examination revealed that marked neovascularization developed in the corneas when EVA sheets containing bFGF were implanted. A number of polymorphonuclear leukocytes were accumulated around the implants. However, neovascularization did not occur in the corneas when EVA sheets containing either concentrations of

別刷請求先: 553 大阪市福島区福島 1-1-50 谷口 永津

(平成 2 年 3 月 28 日受付, 平成 2 年 5 月 29 日改訂受理)

Reprint requests to: Etsu Taniguchi, M.D.

1-1-50, Fukushima-ku, Osaka, 553, JAPAN,

(Received March 28, 1990, and accepted in revised form May 29, 1990)

hEGF or vehicle alone were implanted. Only a few polymorphonuclear leukocytes infiltrated. This result indicates that as much as 500ng hEGF does not induce corneal neovascularization. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 95: 52-58, 1991)

Key words: Human epidermal growth factor, Basic fibroblast growth factor, Corneal angiogenesis, Neovascularization

I 緒 言

epidermal growth factor (EGF) は1962年 Cohen¹⁾ が、初めてマウス顎下腺中より抽出した53個のアミノ酸からなるペプチドで、表皮系細胞、線維芽細胞、血管平滑筋細胞、グリア細胞、肝細胞、消化管粘膜細胞など種々の細胞の増殖を刺激することが知られている。1975年 Gregory らは、ヒト尿中でベータ・ウロガストロンを発見したが²⁾、これにはマウス EGF と70%のアミノ酸配列の相同性があり、同じ生物学的活性があることが証明された。その後、Urdea らによりイースト菌を用いた大量の核酸合成が可能となり³⁾、1985年には大腸菌を用いた遺伝子操作によるヒト EGF (hEGF) が精製された⁴⁾⁵⁾。

しかしながら、hEGF を実際に点眼剤として臨床応用するには⁶⁾⁷⁾、血管新生作用、発癌性の有無など解決しなければならない問題が残されている。例えば、1979年にGospodarowicz ら、Goldbaum らは、マウス EGF に血管新生作用があることを家兎角膜を用いて報告している⁸⁾⁹⁾。しかし、これら以前の報告は、すべてマウス顎下腺から抽出された EGF を使用しており、nerve growth factor を含んでいる。また、当時の技術により作成された EGF は必ずしも高純度とはいえないため、その血管新生作用についても正確とは言えない。

そこで今回、遺伝子操作による高純度の hEGF を使用し、臨床応用濃度として想定されている10~20 μ g/ml の点眼液が、角膜にどのような影響を与えるかを、特に血管新生の立場から検討した。この実験では、点眼後、角膜に実際に作用しようと思われる hEGF の最大量を、徐放剤に封入したインプラントを角膜実質内に挿入し、その血管新生作用を評価した。

II 実験方法

1. インプラント作成

徐放剤にはエチレンビニルアセテート(武田製薬)を使用した。エチレンビニルアセテートを8%塩化メチレン(半井)に溶解し、テフロンプレートに3 μ l 滴下

した。室温で乾燥後、その上に(1)蒸留水に溶解した hEGF (アース製薬) 250ng および500ng、(2)蒸留水に溶解した fibroblast growth factor (bFGF, R & D) 250ng、(3)蒸留水のみ、を載せて室温で乾燥し、再びエチレンビニルアセテート3 μ l を滴下した。その後再び室温乾燥し、鋏子で長さ3~4mm、直径0.5mm の円筒形に巻き込み、これをインプラントにした(図1a)。

2. インプラント埋没法

実験動物には約2.5kg の白色家兎5羽を使用した。角膜実質内ポケットは、角膜輪部から3mm の位置で、輪部に平行に実質中層部を4~5mm 剥離して作成した。3羽は、両眼の角膜の4時と8時の2か所(図1b)に実質内ポケットを作成し、同じ角膜内には hEGF あるいは蒸留水のみ、のいずれかの異なるインプラントを挿入した。2羽には、1眼のみに実質内ポケットを作成し、bFGF を含んだインプラントを挿入した。インプラント挿入後は特に処理を施さず、抗生物質の眼軟膏を塗布した。挿入後14日間連日細隙灯顕微鏡にて観察した。hEGF 500ng、蒸留水及び bFGF 250ng 挿入5、14日後の組織をヘマトキシリン-エオジン染色にて光学顕微鏡的に観察した。

III 実験結果

実験結果を表1に示す。hEGF 250ng、500ng、蒸留水のみではいずれも角膜血管新生は認められず、bFGF 250ng では全例角膜血管新生を認めた。経過観察期間の詳細については、以下に記載する。

1. インプラント挿入初期(5日後)

hEGF 250ng、500ng、蒸留水のみでは、挿入後に角膜浸潤、結膜充血などの炎症所見はなく、血管新生は認められなかった。組織学的には、インプラント周囲に少数の多核白血球の浸潤、活性化した角膜実質細胞を認めたのみであり、また hEGF 500ng 挿入眼でインプラント直上の角膜上皮細胞は、4~5層を保っていた。bFGF 250ng 挿入眼ではいずれもインプラント挿入後より著明な結膜充血、角膜浸潤が見られ、角膜内

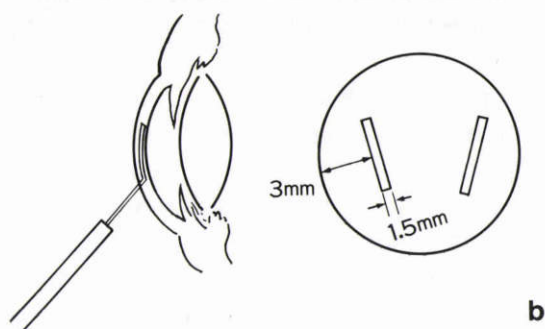
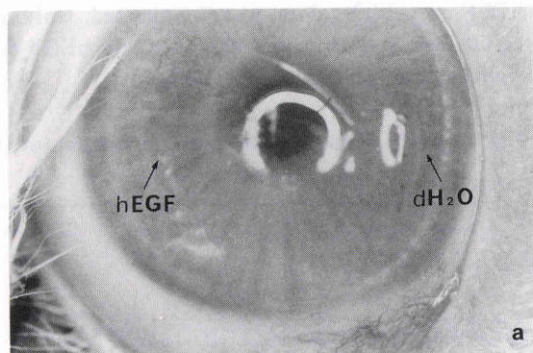
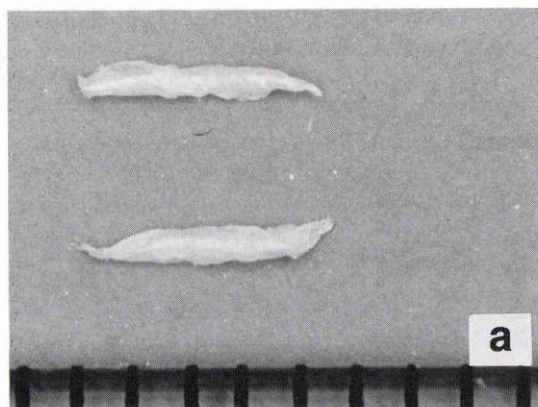


図1 (a) インプラント：8%塩化メチレンに溶解したエチレンビニールアセテートに、蒸留水に溶解した hEGF, bFGF, 蒸留水のみ、をつつみ、鉗子で長さ 3~4mm, 直径0.5mm の円筒形に巻き込んだ。(b) 角膜実質内ポケット：家兎角膜の 4 時と 8 時の 2 カ所、角膜輪部から 3mm の場所に、25G 針で角膜輪部の垂直方向に切創を作り、改良した隅角解離スパーテルで、実質中層部を輪部に平行に 4~5mm 剥離して角膜実質内ポケットを作成した。

表1 hEGF と FGF の角膜新生血管作用

血管新生	+	-
hEGF 250ng	0	4
hEGF 500ng	0	4
蒸留水のみ	0	4
bFGF 250ng	2	0

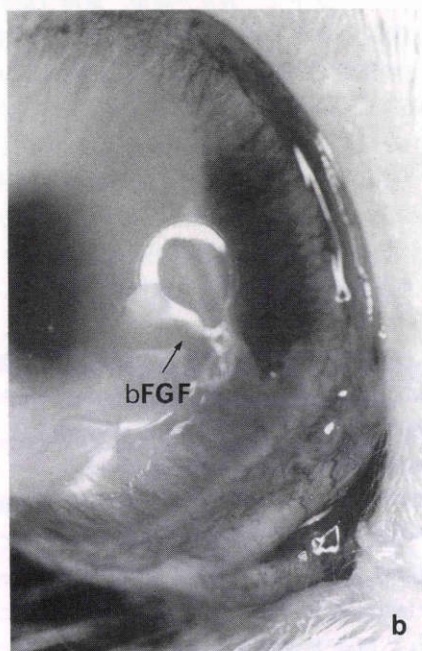


図2 (a) hEGF250ng, 蒸留水のみ挿入10日後の前眼部写真。9 時方向は hEGF, 3 時方向は蒸留水のみ、両者とも角膜浸潤、結膜充血は見られず、血管新生も認めなかった。(b) bFGF 250ng 挿入10日後の前眼部写真。著明な結膜充血、角膜浸潤を認め、多数の新生血管が、インプラント周囲に侵入していた。

図3 (a) hEGF500ng 挿入 5 日後の角膜組織のヘマトキシリン-エオジン染色。インプラント周囲に少数の多核白血球の浸潤、活性化した角膜上皮細胞を認めた。インプラント直上の角膜上皮細胞は、4~5層を保っていた。(EVA：エチレンビニールアセテートのインプラントを示す。) (b) bFGF 250ng 挿入 5 日後の角膜組織のヘマトキシリン-エオジン染色。多数の炎症細胞、活性化した角膜実質細胞を実質層に認め、特にインプラント周囲の実質組織で著明であった。インプラント直上の角膜上皮細胞は、伸展して偏平化していた。(c) 蒸留水のみ挿入 5 日後の角膜組織のヘマトキシリン-エオジン染色。インプラント周囲に少数の多核白血球の浸潤、活性化した角膜実質細胞を認めた。インプラント直上の角膜上皮細胞は、伸展して偏平化していた。

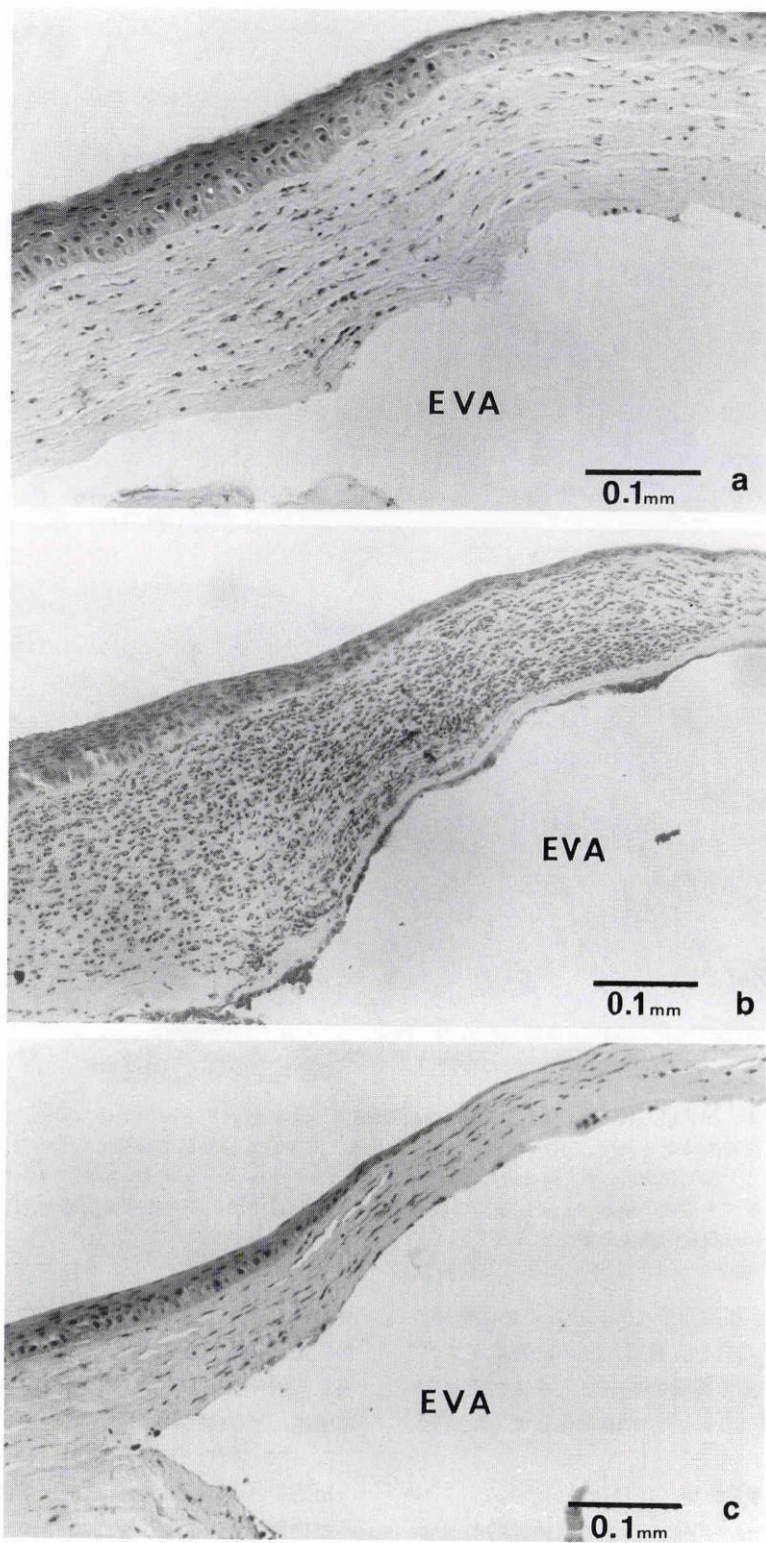


図 3

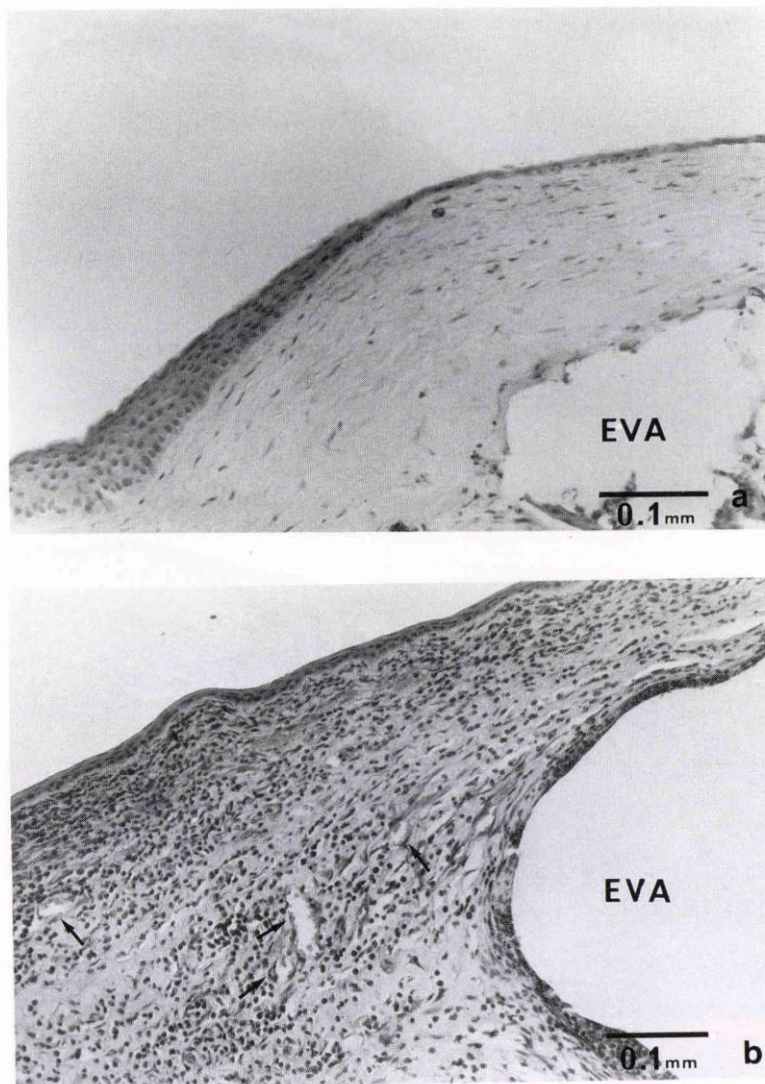


図4 (a) hEGF500ng 挿入14日後の角膜組織のヘマトキシリン-エオジン染色。炎症細胞は見られず、インプラント直上の角膜上皮細胞も伸展して偏平化していた。(b) bFGF250ng 挿入14日後の角膜組織のヘマトキシリン-エオジン染色。インプラント周囲に依然強い炎症細胞の浸潤が見られ、実質中層に新生血管を認めた。(矢印は実質内新生血管を示す。)

に血管新生を認めた。組織所見では、多数の炎症細胞、活性化した角膜実質細胞を実質層に認め、特にインプラント周囲の実質組織で著明であった。インプラント直上の角膜上皮細胞は、伸展して偏平化していた(図3)。

2. インプラント挿入中期(10日後)

hEGF 250ng, 500ng, 蒸留水のみでは角膜内に血管新生の侵入はなかった。組織学的には、hEGF で初期に

見られた炎症細胞は消退し、またインプラント直上の角膜上皮細胞の多層化もこの時期には認められず、伸展して偏平化していた。bFGF 挿入眼では、すでに新生血管は、インプラントに到達していた(図2)。

3. インプラント挿入後期(14日後)

hEGF 250ng, 500ng, 蒸留水のみではいずれも角膜への血管新生は認められず、組織所見でも、炎症細胞は見られなかった。bFGF 挿入眼では、インプラントに

達した新生血管は、中期に比べ細くなっていた。組織学的には、インプラント周囲に依然強い炎症細胞の浸潤が見られ、実質中層にも新生血管を認めた(図4)。

IV 考 按

現在、臨床応用に考えられているhEGF点眼剤の濃度は10~20 μ g/mlであり、この濃度のhEGFを白色家兎の正常角膜に1日5回を2週間投与した実験では、新生血管の侵入はないと報告されている¹⁰⁾。さらに、同じ濃度のEGF点眼の臨床使用例でも、血管新生を助長しないと報告されている⁷⁾。しかしながら、この条件だけではhEGFに血管新生作用があるか否かを判定することは困難と思われる。

今回のエチレンビニールアセテートを使用した実験から、少なくとも500ng以下のhEGFには角膜における直接的な血管新生作用はないことが明らかとなった。

Schultzらは、EGF点眼後の結膜嚢内のEGF量を測定したところ、10分後には5~10%のみが残存し、しかも角膜上皮に残存するのは僅か0.1%であったと報告している¹¹⁾。この結果を適用すれば、10~20 μ g/mlの濃度で点眼を行った場合の角膜への作用量は、25~100ngの範囲にあると想定できる。一方、蒸留水中に置かれたエチレンビニールアセテートからのEGF量を測定したMurrayらの実験では、放出量は0~2日後の早期よりpeakに達した後、3~6日後には半減し、2週間後にはpeak時の14%になるとしている¹²⁾。すなわち、角膜実質内に埋め込んだエチレンビニールアセテート内からは、2週間以内に大部分のEGFが放出されているはずである。これら2つの事実をふまれば、今回、エチレンビニールアセテートと共に角膜実質内に挿入した250ng、および500ngのhEGF量が条件として十分に厳しいこと、評価期間としての2週間が妥当であることは明白であろうと思われる。

以前より、hEGFには、in vitroでは血管内皮細胞に対する増殖刺激作用はないとされていた¹³⁾。しかし近年、マウスEGFに牛の網膜毛細血管内皮細胞やネズミの肺微細血管内皮細胞¹⁴⁾、および腸骨動脈内皮細胞¹⁵⁾に対する増殖刺激作用のあることがin vitroで報告され、EGFがやはりある種の血管内皮細胞の増殖を刺激する可能性のあることが示唆されている。

他方、in vivoでは、今回より多量のEGFを投与して、家兎角膜に新生血管が見られたとの報告があ

る⁸⁾⁹⁾。実際、これらの実験では、マウスEGFとpositive controlとして用いたbFGFとの間に新生血管発生に要する量はほぼ同じであった。しかしこの結果は、当時使用された全てのgrowth factorの純度の低さに起因していたとも考えられる。事実、高純度の製剤を使用した今回の実験では、EGFとpositive controlのbFGFの間に明らかな差が見られている。もっとも、500ngより以上の量で角膜に血管新生が起こる可能性は残されており、これについて、炎症細胞の誘導や他のgrowth factorの関与を考えておく必要がある。

EGFが主として細胞分裂により角膜創傷治癒を促進することは以前より報告されている^{11)16)~19)}。今回の実験でも、hEGFインプラントの挿入初期に、インプラント直上部分の角膜上皮細胞が、negative controlのように伸展されることなく多層構造を保ち、かつ放出量が低下すると思われる後期には菲薄化することが示された。角膜実質内に挿入したhEGFが、果たしてどの位角膜上皮に達するかはわからないが、このことは、ある量以上のhEGFが存在する場合に、正常な角膜上皮細胞にもin vivoにおいて過剰増殖が引き起こされる可能性のあることを示唆している。

この研究の一部は、文部省科学研究費補助金02454406、大阪アイバンク研究助成金及び透明組織研究費を使用した。

文 献

- 1) Cohen S: Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animals. *J Biol Chem* 237: 1555-1562, 1962.
- 2) Gregory H: Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor. *Nature* 257: 325-327, 1975.
- 3) Urdea MJ, Merryweather JP, Mullenbach GT, et al: Chemical synthesis of a gene for human epidermal growth factor in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 7461-7465, 1983.
- 4) Oka T, Sakamoto S, Miyoshi K, et al: Synthesis and secretion of human epidermal growth factor by *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 7212-7216, 1985.
- 5) Ohgai H, Kumakura T, Komoto S, et al: Production of rat epidermal growth factor by *Escherichia coli* cells containing a secretion plasmid. *J Biol* 10: 151-160, 1989.
- 6) 大橋裕一, 本倉真代, 吉田弘俊, 他: Epidermal growth factor点眼液の臨床応用. 第42回臨床眼科学会, 東京, 1988.
- 7) 木下 茂, 大橋裕一, 渡辺 仁, 他: ヒトEGF点

眼の角結膜上皮疾患に対する効果. 第13回角膜カンファレンス, 北海道, 1989.

- 8) **Gospodarowicz D, Bialecke H, Thankral TK**: The angiogenic activity of the fibroblast and epidermal growth factor. *Exp Eye Res* 28: 501—514, 1979.
- 9) **Goldbaum MH, Cleveland P, Wickham MG, et al**: Corneal cell and vessel response to epidermal growth factor fibroblast growth factor and immune response. *Invest Ophthalmol Vis Sci (Suppl)* 18: 38, 1979.
- 10) **Kitazawa T, Kinoshita S, Fujita K, et al**: The mechanism of accelerated corneal epithelial healing by human epidermal growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, in press.
- 11) **Schultz GS, Davis JB, Eiferman RA**: Growth factor and corneal epithelium. *Cornea* 7: 96—101, 1988.
- 12) **Murray JB, Brown L, Langer R, et al**: A micro sustained release system for epidermal growth factor. *In Vitro* 19: 743—748, 1983.
- 13) **Gospodarowicz D, Greenburg G, Bialecki H**: Factors induced in the modulation of cell proliferation in vivo and in vitro; the role of fibroblast and epidermal growth factors in the proliferative response of mammalian cells. *In Vitro* 14: 85—118, 1978.
- 14) **McAuslan BR, Bender V, Reilly W, et al**: New functions of epidermal growth: Stimulation of capillary endothelial cell migration and matrix-dependent proliferation. *Cell Biol Int Rep* 9: 175—182, 1985.
- 15) **Weinstein R, Weng K**: Growth factor responses of human arterial endothelial cells in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol* 22: 549—556, 1986.
- 16) **Culbertson WW, Schantzlin D, West C, et al**: The effect of epithelial growth factor on corneal epithelial defects. *Invest Ophthalmol Vis Sci (Suppl)* 19: 74, 1980.
- 17) **Ho PC, Elliot JH**: Kinetics of corneal epithelial regeneration. II. Epithelial growth factor and topical corticosteroids. *Invest Ophthalmol* 14: 630—633, 1975.
- 18) **Daniele S, Frati L, Fiore C, et al**: The effect of the epithelial growth factor on the corneal epithelium in humans. *Albrecht von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* 210: 159—165, 1979.
- 19) **Brightwell JR, Riddle SL, Eiferman RA, et al**: Biosynthetic human EGF accelerates healing of neodecadron-treated primate corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 105—109, 1985.