

角膜アルカリ外傷治癒過程における keratocyte の動態について

藤沢久美子, 片上千加子, 山本 節

神戸大学医学部眼科学教室

要 約

家兎角膜アルカリ外傷治癒過程における keratocyte の増殖動態, コラーゲン産生について検討した。また, epidermal growth factor (EGF) 点眼療法の角膜実質創傷治癒に対する影響についても報告する。1N NaOH にて白色家兎角膜アルカリ外傷を作成し, 受傷後16時間目より, h-EGF (10 μ g/ml) または, 生食を1日5回点眼した。1~56日目眼角膜を摘出し, ³H-thymidine (10 μ Ci/ml) または³H-proline (10 μ Ci/ml) で標識した後, オートラジオグラフィーに供した。受傷後1日目創部の keratocyte は完全に死滅していたが, 創周辺部では特に内皮側の keratocyte が活性化され, 増殖を開始していた。7~14日目になると, 創部の keratocyte 密度はほぼ正常にまで repopulation が進行し, 創部 keratocyte は活発に³H-proline をとりこみ, コラーゲン産生を始めていた。14日目以降には, 上皮の reopening や潰瘍形成に伴い, 部分的に keratocyte の³H-thymidine のとりこみが活発になり, 増殖しているのが認められた。keratocyte の³H-proline とりこみは56日目まで持続しており, 角膜アルカリ外傷において, 長期にわたって, コラーゲン産生がおこなわれていることがわかった。また, EGF 点眼をおこなった角膜では, 初期の³H-thymidine のとりこみが促進されており, EGF が家兎角膜アルカリ外傷治癒過程初期において keratocyte の増殖を促進することが明らかとなった。(日眼会誌 95: 59-66, 1991)

キーワード: 角膜アルカリ外傷, EGF, ケラトサイト細胞増殖, コラーゲン産生, オートラジオグラフィー

Keratocyte Activity During Wound Healing of Alkali-Burned Cornea

Kumiko Fujisawa, Chikako Katakami and Misao Yamamoto

Department of Ophthalmology, School of Medicine, Kobe University

Abstract

The proliferation and collagen synthesis of keratocytes during corneal wound healing after alkali-burn were investigated using ³H-thymidine or ³H-proline autoradiography. The effect of epidermal growth factor (EGF) on keratocytes was also examined. On day 1 after burn, the wounded stroma lacked keratocytes, and keratocytes at the periphery of the wound started to proliferate from the endothelial side. On day 7 and day 14, the population of keratocytes returned to normal. Collagen synthesis activity of the keratocytes was observed from day 7 through day 56, with the highest activity on around day 21. After day 14, keratocytes at the site of epithelial reopening or ulceration

別刷請求先: 650 神戸市中央区楠町7-13-14 神戸大学医学部眼科学教室 藤沢久美子
(平成2年1月8日受付, 平成2年7月3日改訂受理)

Reprint requests to: Kumiko Fujisawa, M.D. Department of Ophthalmology, School of Medicine, Kobe University

7-13-14 Kusunoki-cho, Chuō-ku, Kobe 650, Japan

(Received January 8, 1990 and accepted in revised form July 3, 1990)

started to proliferate again. In the early stage of wound healing more keratocytes incorporated ³H-thymidine in eyes treated with EGF than those treated without EGF, suggesting that EGF may stimulate the proliferation of keratocytes in the early stage of wound healing (Acta Soc Ophthalmol Jpn 95 : 59—66, 1991)

Key words: Alkali-burned cornea, Epidermal growth factor, Keratocyte proliferation, Collagen synthesis, Autoradiography

I 緒 言

角膜アルカリ外傷は強力な化学腐食のため角膜全層にわたり広範な組織障害をきたし、臨床に多くの問題点を有する疾患と思われる。角膜の障害は上皮のみでなく、実質においても高度で、keratocyteの死滅、コラーゲンの融解、細胞外基質の破壊を来し、不透明治癒にいたる場合も多い。われわれは既に、家兎角膜アルカリ外傷創傷治癒過程における上皮再生に関して報告し、EGFやステロイドの影響についても検討してきた¹⁾。今回、実質の創傷治癒過程をkeratocyteの動態から検討した。

一方epidermal growth factor (以下EGFと略す)は、Cohenにより発見され²⁾³⁾、細胞の分裂、増殖に促進効果を有すると考えられている。角膜組織に対するEGFの作用についてもFratiらの報告⁴⁾にはじまり、数多くの研究がなされているが、その殆どは角膜上皮細胞に対する影響を検索したもの^{5)~8)}であり、角膜実質細胞であるkeratocyteに対するEGFの影響についてin vivoでの研究はほとんどない。

今回、われわれは家兎眼に1N NaOHを用いた実験的角膜アルカリ外傷を作成し、1日目から56日目までの種々の時期の角膜について、keratocyteの細胞増殖、コラーゲン産生に関してオートラジオグラフィーを用いて検討した。また角膜アルカリ外傷創傷治癒過程におけるEGFのkeratocyteに対する影響についても若干の知見を得たので報告する。

II 実験方法

実験動物には、体重2~3kgの成熟白色家兎(Japanese White)を使用した。Ketamine hydrochloride (Katalar[®]) 30mg/kg筋注にて全身麻酔した後、0.4%oxybuprocaine hydrochloride (Benoxyl[®])で点眼麻酔し、家兎角膜中央部に1N NaOHに浸した直径5mmの円形濾紙(東洋濾紙No. 2)を60秒間のせ、実験的角膜アルカリ外傷を作成した(図1)。50cc生理

食塩水にて洗眼し、直後のみを混合感染の予防のためErythromycin (Ilotycin[®])眼軟膏を点入した。

角膜アルカリ外傷作成後、16時間目より一眼にEGF、他眼にコントロールとして生理食塩水を1日5回点眼した。EGFは遺伝子組換えによって得られたヒトEGF(h-EGF)(アース製薬より供与)を生理食塩水に溶解し10 μ g/mlとしたものを用いた。アルカリ外傷作成後の16羽32眼において1, 2, 3, 7, 14, 21, 28, 56日目に、pentobarbital (Nembutal[®])静脈注射にて死亡させた後、角膜を摘出した。摘出角膜は、Dulbecco's minimum essential medium (DME) (GIBCO)中で³H-thymidine (Amersham, 100~130Ci/mmol) (10 μ Ci/ml), (1ml/cornea)または³H-proline (Amersham, 100~130Ci/mmol) (10 μ Ci/ml), (1ml/cornea)で37.0 $^{\circ}$ C, 4時間標識した後10%ホルマリンで固定し、パラフィン切片を作成し、組織学的検索、および既報⁹⁾に準じてautoradiographyを行った。暗室内で50%

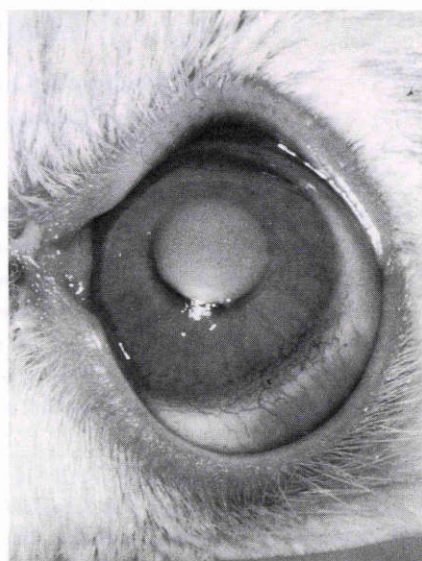


図1 1N NaOHに浸した直径5mmの濾紙でアルカリ外傷を作成した直後の家兎角膜写真

Konica NR-M2 autoradiography 用乳剤に浸した後、乾燥させ、シリカゲル入りの暗箱に収めて4℃で露出を行った。3週間後、暗箱より取り出し、Fuji Lendoleで現像、Fuji Lenfixで定着水洗した。その後、H-E染色を行い、光学顕微鏡下で組織学的検索をおこなうとともに、radioisotopeのとりこみを観察した。

III 結 果

1. ^3H -thymidine による autoradiography

受傷後1日目、創部のkeratocyteは完全に死滅しており、acellular zoneが認められた(図2)。創周辺部ではkeratocyteは丸みをおびて拡大し、 ^3H -thymidineをとりこんだ細胞もみられ、増殖を開始していた。keratocyteの ^3H -thymidineのとりこみ、創部へのrepopulationは内皮側において著明であった(図

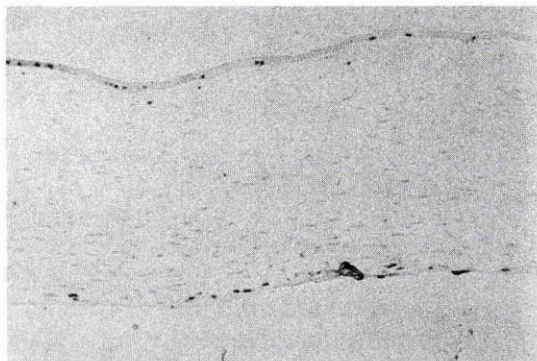


図4-1

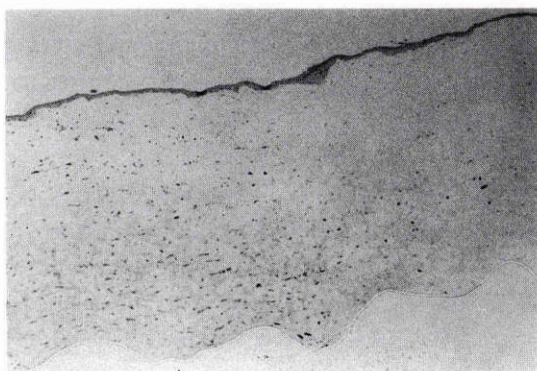


図4-2

図4 (図4-1)はコントロール角膜受傷後2日目の創周辺部、内皮側のkeratocyteに ^3H -thymidineのとりこみを認めた(×65)。(図4-2)はEGF点眼角膜受傷後2日目の創周辺部、EGF点眼角膜ではkeratocyteの ^3H -thymidineのとりこみはコントロールより活発におこなわれており上皮下のkeratocyteにもとりこみを認めた。(×65)。

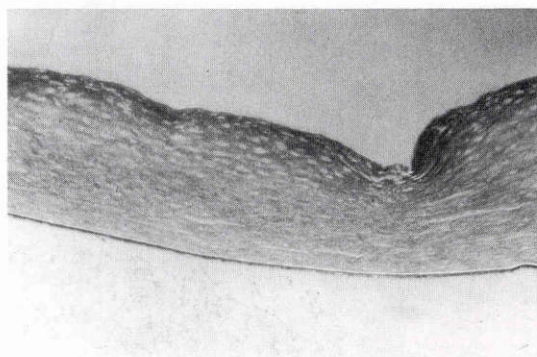


図2 受傷後1日目の創部光学顕微鏡写真。創部ではkeratocyteが完全に死滅していた。(×65)

図3から図7は ^3H -thymidineによるオートラジオグラフィー光顕写真。

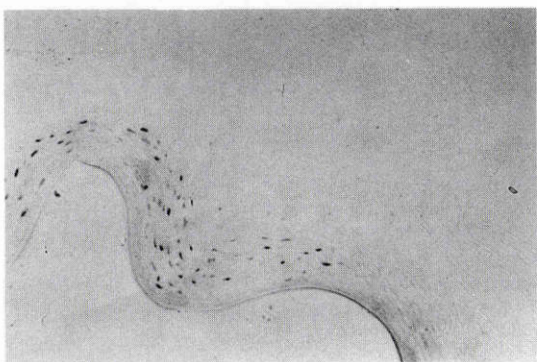


図3 受傷後1日目のコントロール角膜。創周辺部では内皮側のkeratocyteに ^3H -thymidineの取り込みを多数認めた。(×65)

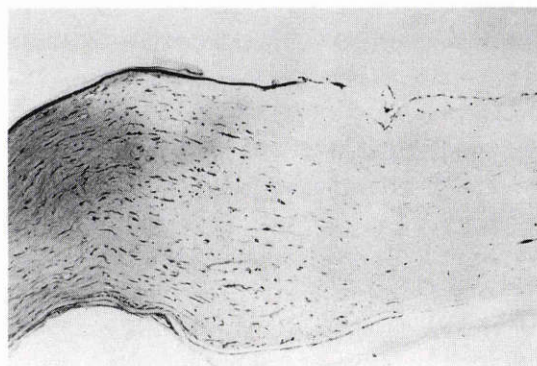


図5 受傷後3日目のコントロール角膜。(×65)

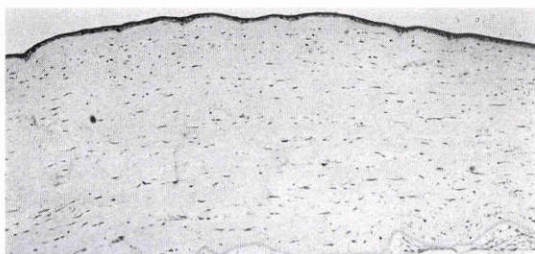


図6 受傷後7日目のコントロール角膜創部。創部の keratocyte の密度はほぼ正常に回復しており、創部で keratocyte の ^3H -thymidine のとりこみが認められた。(×65)

3).その後,経過とともに創部実質への keratocyte の repopulation が進行し(図4, 図5)受傷後7日目になると創部の keratocyte は正常角膜実質の密度とほぼ同程度にまで回復していた(図6)。受傷後14日目から28日目になると創部に repopulate してきた keratocyte は障害されたコラーゲン線維の脱落によると思われる間隙に沿って,多数集積していた。しかし,創部実質のコラーゲン線維の走行, keratocyte の配列は不整であった(図8)。keratocyte の ^3H -thymidine の取り込みは,受傷後1日目から3日目頃まで非常に活発におこなわれ,7日目頃まで持続していたが,創部 keratocyte の密度がほぼ正常に回復した後,radioactive な keratocyte は減少し,増殖が低下している傾向を認めた(図3, 4, 5, 6, 7, 9)。受傷後2日目の角膜では,一旦上皮は再生されているが,その後,14日目以降には,様々の時点で上皮の reopening, または潰瘍の形成が出現し,潰瘍の形成に伴ってその部の keratocyte は再び活発に ^3H -thymidine を取り込んでいるのが認められた(図7, 10)。2日目コントロール角膜受傷後創周辺部において内皮側の keratocyte に ^3H -thymidine のとりこみを認めたがEGF点眼角膜では keratocyte の ^3H -thymidine のとりこみはコントロールより活発におこなわれており上皮下の keratocyte にもとりこみを認めた(図4)。3日目までの初期の創傷治癒過程において,EGF点眼群とコントロール群で, ^3H -thymidine をとりこんだ keratocyte の数を1切片あたりについて,各群それぞれ8枚の切片において測定し平均したものを比較したところ,2日目の時点においてEGF点眼群の方が有意に keratocyte のとりこみが増加していた。EGFはこの時点において keratocyte の増殖促進作用を有することが示された(表1)。

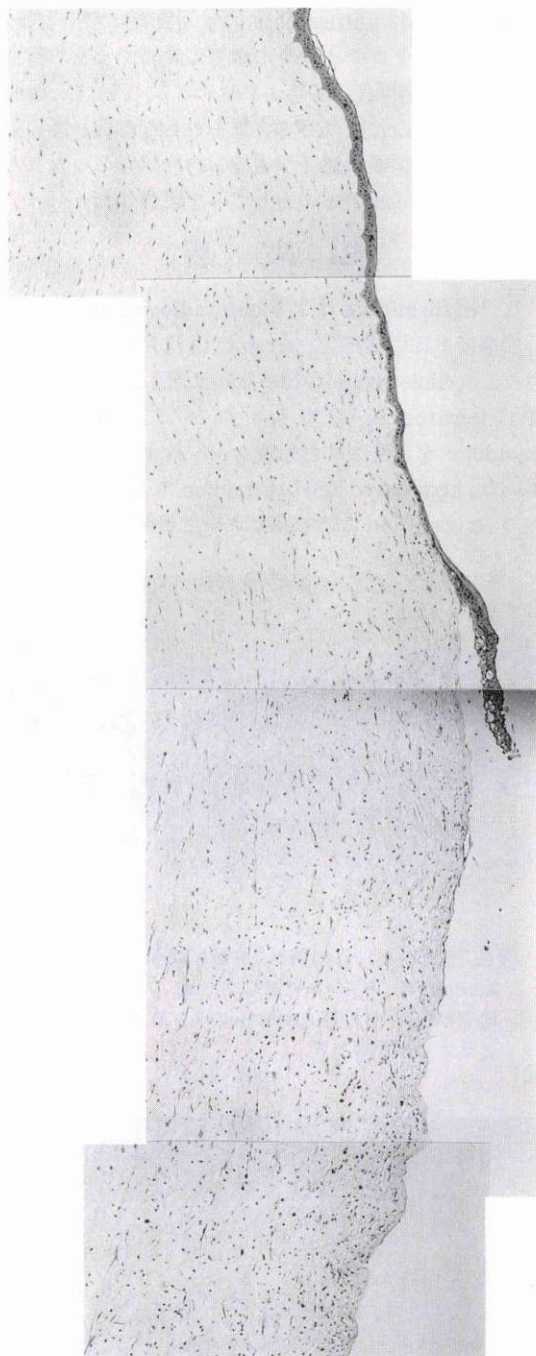


図7 受傷後14日目のコントロール角膜。写真上部は創周辺部,下部は創部。創周辺部では ^3H -thymidine のとりこみは殆ど認められなかったが,上皮剥離のおこっている創部では実質 keratocyte に多数の ^3H -thymidine のとりこみを認めた。(×65)

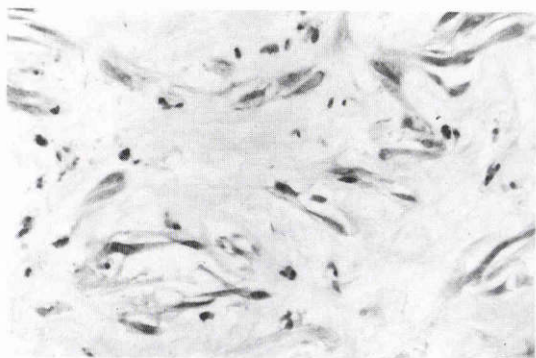


図8 受傷後14日目コントロール角膜創部光顕写真。創部にrepopulateしてきたkeratocyteはコラーゲン線維の間隙に沿って長く突起をのびして集積しているが、その配列は不整であり、コラーゲン線維の走行も乱れていた。(×450)

表1 ^3H -thymidine をとりこんだ keratocyte の数

受傷後の日数	銀粒子の集積を認めた keratocyte の数/切片	
	生食点眼角膜	EGF 点眼角膜
1	63±11.3	—
2	41±8.1*	89±21.6*
3	26±7.5	30±7.0

*有意差を認めた (t 検定, $P<0.001$)

^3H -thymidine によるオートラジオグラフィにおいて、1切片あたりの銀粒子の集積を認めた keratocyte の個数を計測し、EGF 点眼角膜とコントロール角膜で比較した。2日目において有意に EGF 点眼角膜においてとりこみが増大していた。数値は各群それぞれ8枚の切片の平均値±標準偏差。

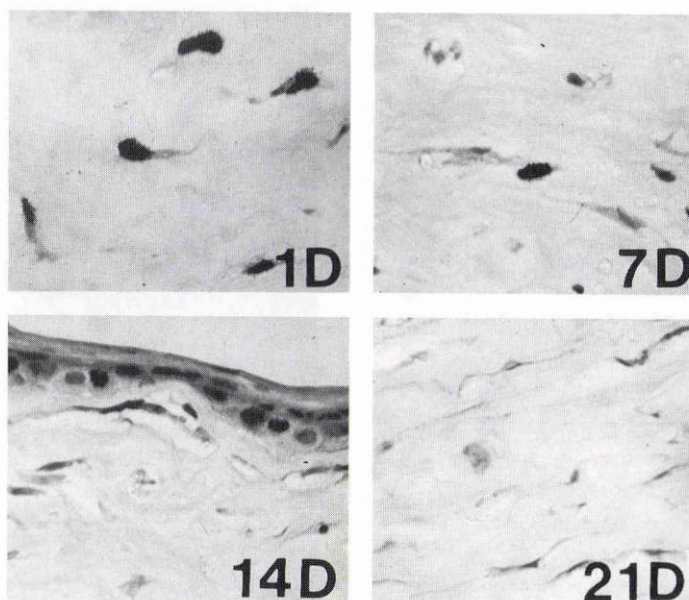


図9 受傷後1日目、7日目、14日目、21日目の ^3H -thymidine によるオートラジオグラフィ光顕写真。受傷後1日目には創周辺の keratocyte に多数の銀粒子の集積を認め、7日目には創部に repopulate してきた keratocyte にも銀粒子の集積を認めた。14日目、21日目になると上皮剝離部以外では keratocyte の銀粒子の集積は減少の傾向を認めた。(×300)

2. ^3H -proline による autoradiography

keratocyte の ^3H -proline の取り込みは、創部への keratocyte の repopulation がかなり進行した受傷後7日目頃より増加していた(図11)。14日目から21日目になるとさらに ^3H -proline の取り込みは活発になり、脱落コラーゲン線維の間隙に集積している ker-

atocyte でも活発な取り込みが認められ、この部でも活発なコラーゲン産生が行われていることが示唆された(図12, 13)。受傷後28日目の角膜では、 ^3H -proline の取り込みはやや低下する傾向を認めたが(図14)、56日目角膜では再び、活発な取り込みが認められ、コラーゲン産生が依然としておこなわれていることが示唆さ

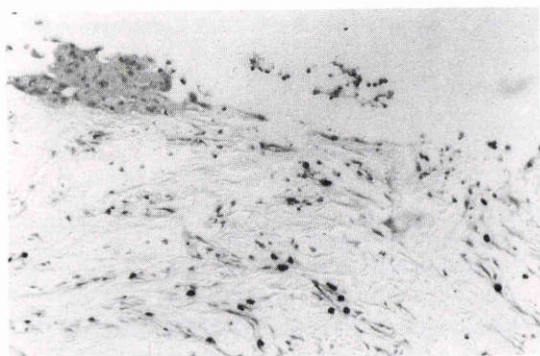


図10 受傷後28日目の ^3H -thymidineによるオートラジオグラフィー創部光顕写真。上皮は剝離し、その部の実質では粗なコラーゲン線維の中で再び多数のkeratocyteに銀粒子を認めた。(×170)

図11から図15は ^3H -prolineによるオートラジオグラフィー光顕写真。

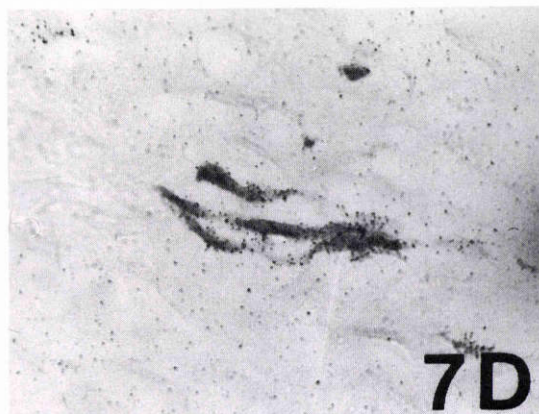


図11 受傷後7日目、keratocyteの細胞質に銀粒子を認めた。(×690)

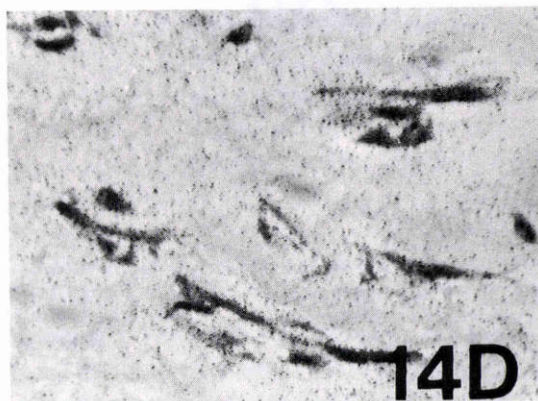


図 12

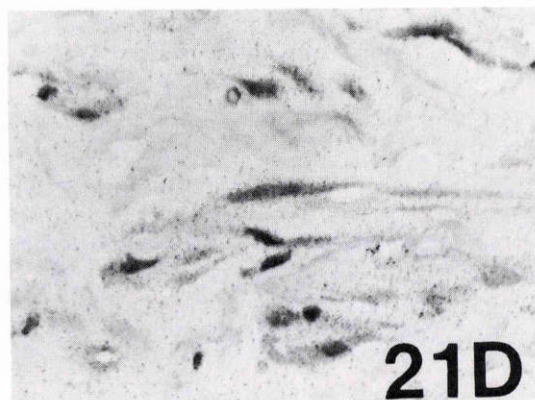


図 13

図12, 13 受傷後14日目および21日目、創部のほとんどのkeratocyteに、銀粒子の集積を認めた。(×690)

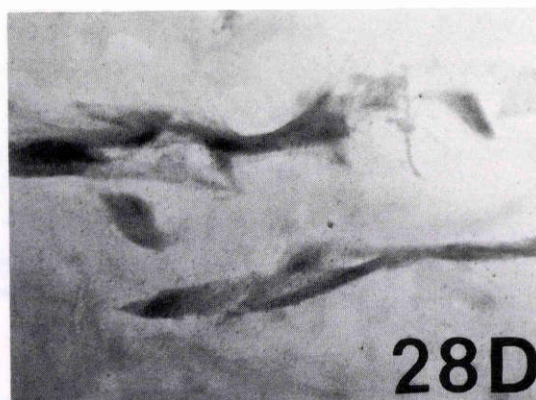


図14 受傷後28日、21日目に比較して、銀粒子の集積した創部keratocyteは減少している傾向を認めた。(×690)

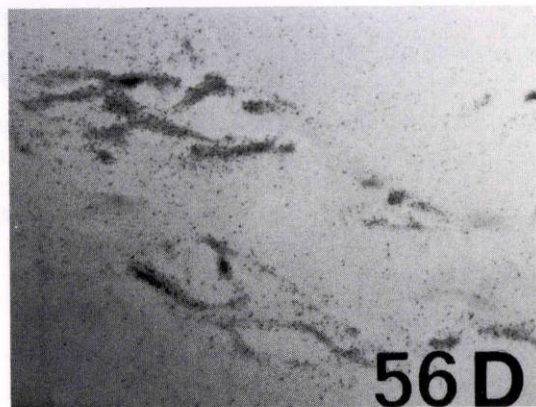


図15 受傷後56日目、28日目に比較して創部keratocyteの銀粒子の集積は再び活発になっていた。(×690)

れた(図15)。EGF点眼角膜と非点眼角膜において ^3H -prolineのとりこみに大差を認めなかった。

IV 考 按

角膜アルカリ外傷は、角膜組織の広範な融解を来し、上皮をはじめ実質のkeratocyte, コラーゲン, 細胞外基質の破壊を招き、不透明治癒にいたる。家兎などを用いた角膜アルカリ外傷についての研究は数多くみられ、角質実質の創傷治癒過程についてPfisterら¹⁰⁾は電顕を用いて形態学的に検討しており、また、Chungら¹¹⁾はMicroradiogramにて角膜アルカリ外傷後のコラーゲンの変化を追跡している。しかし、角膜アルカリ外傷創傷治癒過程をkeratocyteの細胞動態より検討した報告はほとんどない。われわれは、創傷治癒過程のkeratocyteの動態を、keratocyteの細胞増殖とコラーゲン産生の面より検討した。

角膜アルカリ外傷においては組織融解のため、受傷後keratocyteは完全に死滅する。健常角膜においては、keratocyteは極めてturn overの長い細胞であることが知られているが¹²⁾、アルカリ外傷後創周部のkeratocyteが活性化され活発に増殖し、創部のacellular zoneへrepopulationを開始する。この時、内皮側のkeratocyteが先に増殖を開始し、すり鉢状に創部へ進入してくることが特徴的であった。これは、角膜に対するアルカリ腐食の強さが角膜中央部ほど深部にまでおよんでいる可能性もあるが、北野が指摘しているように¹³⁾、胎生期の角膜実質の発生過程と角膜創傷治癒過程は類似していて、胎生期の実質の発育が深層より始まるように、実質創傷治癒も深層から開始していく何らかの生物学的な理由が存在することが示唆される。keratocyteの ^3H -thymidineのとりこみよりkeratocyteは受傷後1日目よりすでに増殖を開始し、7日目頃まで活発に増殖していることがわかった。しかし、その後 ^3H -thymidineのとりこみは減少し、keratocyteは粗なコラーゲン線維の間に突起をのぼすように入り込み、それらのkeratocyteが ^3H -prolineを活発にとりこんでいることより盛んにコラーゲン産生に従事していることが示唆された。すなわち、家兎角膜アルカリ外傷実質創傷治癒過程において、先ずkeratocyteの細胞増殖がおこなわれ、ある程度repopulationが進行した後にkeratocyteのコラーゲン産生が開始されることが考えられた。しかし、アルカリ外傷においては、角膜上皮の再剥離や角膜潰瘍が受傷後期に繰り返しておこり、この部では実質のkeratocyteは再

び、活発に細胞増殖をおこないはじめているのが認められた。コラーゲン線維の走行やkeratocyteの配列は非常に不整であり、細胞外基質の未熟も高度であると思われる。keratocyteの ^3H -prolineのとりこみは受傷後21日目頃非常に活発になり28日目頃にはやや低下するが、56日目には再び活発化する。既に、Cionniらが家兎角膜に切開創を加えた後の創傷治癒過程においてコラーゲン生成が二相性におこなわれると報告しているが¹⁴⁾、アルカリ外傷後においてもkeratocyteのコラーゲン産生は二相性におこなわれている可能性がある。また、家兎角膜アルカリ外傷において、コラーゲン産生が長期間にわたって持続していることがわかった。

EGFは、角膜上皮細胞の増殖促進作用を有することが報告されている。角膜実質創傷治癒に対するEGFの影響についても、いくつかの報告をみる。Calelら¹⁵⁾、Petroutsosら¹⁶⁾はincisionを加えた創傷角膜にEGFを点眼し、その剝離抵抗(tensile strength)を検討し、受傷後4週間目では、EGF点眼角膜にて有意に上昇していたと述べている。三島ら¹⁷⁾は培養細胞にEGFを添加し、EGFが実質細胞に対しても細胞増殖促進作用を有すると述べている。また、Woostらもin vitroでfibroblastの ^3H -thymidineのとりこみについて検討し、EGFがfibroblastのDNA合成を促進していることを報告している¹⁸⁾。しかし、in vivoでEGFのkeratocyteへの影響を明らかにした報告はわれわれの知るかぎりではほとんどみられない。今回のわれわれの実験結果よりEGF点眼角膜では非点眼角膜に比べて、受傷後2日目のkeratocyteの細胞増殖が有意に促進されており、EGFがin vivoでkeratocyteの増殖にも促進的な効果を有することが示された。角膜アルカリ外傷治癒過程においては、前述のように上皮のreopeningや潰瘍形成など、keratocyteの細胞増殖に影響を及ぼすと考えられる因子が複雑に作用するため、長期的なEGFの作用を検討することは困難であり受傷早期のみで検討した。keratocyteの ^3H -prolineのとりこみはEGF点眼角膜、非点眼角膜で大差を認めなかったが、これに関しては、今後定量的に解析する必要があると思われる。

家兎角膜アルカリ外傷では、受傷後早期より実質深層のkeratocyteの増殖がおこなわれ、先ずacellular zoneとなっている創部へkeratocyteがrepopulateした後融解したコラーゲンの間隙でkeratocyteがコラーゲン産生をおこなって実質の創傷治癒が進行する

ことがわかった。そして、コラーゲン産生はすくなくとも受傷56日目ではまだ活発におこなわれていることが示唆された。また、上皮の状態や潰瘍の形成にともなう受傷後期においても再び部分的に keratocyte の細胞増殖がおこなわれ、長期間にわたり細胞増殖とコラーゲン産生を繰り返していることがわかった。

本論文の要旨は第55回日本中部眼科学会で発表した。

文 献

- 1) 藤沢久美子, 片上千加子, 山本 節: 角膜アルカリ外傷に対する EGF とステロイドの併用療法, 上皮再生過程第1報, 眼紀 40: 2858—2863, 1989.
- 2) Cohen S: Purification of a nerve-growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neuro-cytotoxic antiserum. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 46: 301—311, 1960.
- 3) Cohen S: Isolation of a mouse submaxillary gland protein acceleration incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. J Biol Chem 237: 1555—1562, 1962.
- 4) Frati L, Daniele S: Selective binding of the epidermal growth factor and its specific effects on the epithelial cells of the cornea. Exp Eye Res 14: 135—141, 1972.
- 5) Brightwell JR, Riddle SL, Eiferman RA, et al: Biosynthetic human EGF accelerates healing of neodecadron-treated primate corneas. Invest Ophthalmol Vis Sci 26: 105—110, 1985.
- 6) Kandarakis AS, Catsy Page BS, Kaufman HE: The effect of epidermal growth factor on epithelial healing after penetrating keratoplasty in human eyes. Am J Ophthalmol 98: 411—415, 1984.
- 7) Schultz GS, Davis JB, Eiferman RA: Growth factors and corneal epithelium. Cornea 7: 96—101, 1988.
- 8) Singh G, Foster CS: Epidermal growth factor in alkali burned corneal epithelial wound healing. Am J Ophthalmol 103: 802—807, 1987.
- 9) Katakami C, Perkins T, Dorfman N, et al: Polymorphonuclear leukocytes inhibit proliferation of epithelial cells of rabbit cornea. 日眼会誌 92: 798—805, 1988.
- 10) Pfister RR: The effects of chemical injury on the ocular surface. Ophthalmol 90: 601—609, 1983.
- 11) Chung JH, Fagerholm P: Stromal reaction and repair after corneal alkali wound in the rabbit: A quantitative microradiographic study. Exp Eye Res 45: 227—237, 1987.
- 12) Kitano S: Cytoplasmic granules of the corneal stroma cell. Invest Ophthalmol 5: 277, 1966.
- 13) 北野周作: 角膜の創傷治癒について. 眼紀 29: 1341—1358, 1978.
- 14) Cionni RJ, Katakami C, Lavrich JB, et al: Collagen metabolism following corneal laceration in rabbits. Curr Eye Res 5: 549—558, 1986.
- 15) Caley B, Fagerholm P: Human epidermal growth factor—The influence on the healing of surgically closed corneal wounds. Acta Ophthalmologica 65(Suppl 182): 58—61, 1987.
- 16) Petroustos G, Courtois SY: Epidermal growth factor increases tensile strength during wound healing. Ophthalm Res 18: 299—300, 1986.
- 17) 三島 弘, 榎田 洋, 西田輝夫, 他: 角膜上皮細胞および実質細胞に対する各種増殖因子の影響について. 第55回日本中部眼科学会抄録, D-26, 182, 1989.
- 18) Woost PG, Brightwell J, Eiferman RA: Effect of growth factors with dexamethasone on healing of rabbit corneal stromal incisions. Exp Eye Res 00: 40—60, 1985.