

## 結膜における上皮増殖因子レセプター

宮下 公男

東海大学医学部眼科学教室

## 要 約

種々の状態における結膜上皮で、上皮増殖因子レセプター (EGFR) を免疫組織化学的に検討した。実験材料は正常結膜2眼、瞼裂斑2眼、創傷治癒過程にある結膜4眼、増殖性疾患5眼である。パラフィン包埋後切片を作成し、ウサギ抗ヒトEGFR抗体を用いてアビチン・ビオチン法を施行、ジアミノベンチジンによる染色を行った。その結果、正常結膜、瞼裂斑、創傷治癒過程にある結膜ではいずれも免疫組織学的にはEGFRは認められなかった。また増殖性疾患でも瞼球癒着部の上皮と翼状片の上皮にはEGFRは認められなかったが、翼状片術後肉芽腫の上皮では3眼中2眼にEGFRが認められた。したがって、ある種の結膜疾患の病態生理にはEGFRの発現の異常が関与しているものと思われる。(日眼会誌 96:569-571, 1992)

キーワード：結膜、上皮増殖因子レセプター、免疫組織化学、翼状片

## Epidermal Growth Factor Receptor in Conjunctiva

Kimio Miyashita

Department of Ophthalmology, School of Medicine, Tokai University

## Abstract

Epidermal growth factor receptor (EGFR) was studied in conjunctiva. Two specimens of normal conjunctiva and eleven of diseased ones, consisting of 2 pingueculas, 4 healing traumatic conjunctivas, and 5 proliferative disorders, were studied immunohistochemically using rabbit anti-human EGFR antibody with avidin-biotin and diaminobenzidine method. These investigations revealed that the immunoreactive EGFR was identified only in the conjunctiva of 2 of the 3 cases of granuloma following pterygium surgery but not in the other specimens, including the normal conjunctiva. This fact suggests that abnormal expression of the EGFR could play a role in pathological status of conjunctiva. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96:569-571, 1992)

Key words: Conjunctiva, Epidermal growth factor receptor, Immunohistochemistry, Pterygium

## I 緒 言

上皮増殖因子 (EGF) は上皮細胞の増殖促進 (in vitro)、創傷治癒の促進 (in vivo) などの作用を有することが知られている。一方EGF受容体 (EGFR) は

分子量130Kの蛋白質に分子量40Kの糖鎖がついた糖蛋白であり、正常上皮では基底細胞の細胞膜に認められるがEGFと結合すると細胞質内に進入し、その後分解される<sup>1)</sup>。眼科領域では涙液中にEGFが認められており<sup>2)</sup>、角膜や結膜上皮にEGFRが存在すること

別刷請求先：259-11 伊勢原市望星台 東海大学医学部眼科学教室 宮下 公男

(平成3年8月19日受付, 平成3年11月1日改訂受理)

Reprint requests to: Kimio Miyashita, M.D. Department of Ophthalmology, School of Medicine, Tokai University, Boseidai, Isehara 259-11, Japan

(Received August 19, 1991 and accepted in revised form November 1, 1991)

が示唆されている<sup>3)4)</sup>。

また、EGFRは創傷時の組織修復のために作用するのみならず、種々の疾患の病態生理にその発現の増加が関与していることが報告されている<sup>5)6)</sup>。しかしながら、眼科疾患においてEGFRの発現の異常がその病態に関与している疾患についての報告は著者の渉猟した限りではない。今回著者は正常および種々の病的状態における結膜で、EGFRの有無を免疫組織学的に検討したので報告する。

## II 実験方法

実験材料は、正常眼2眼、病的結膜11眼である。後者の内訳は、瞼裂斑2眼、正常治癒過程にあると思われた結膜4眼、増殖性疾患5眼である。正常治癒過程にある結膜としては、外傷性角膜穿孔縫合術後3週間、白内障術後4週間、硝子体手術後4週間、網膜剥離術後3週間の結膜を使用した。これらは種々の事情により再び手術を施行した際にトリミングの必要上切除したものである。増殖性疾患としては翼状片の上皮1眼、翼状片術後肉芽腫3眼、原因不明の結膜腫瘍術後の瞼球癒着部上皮1眼である。これらを中性緩衝ホルマリンで2～3日固定した後、アルコール系列で脱水

しパラフィンに包埋した。

厚さ5 $\mu$ mの切片を作成後脱パラフィンを行い、0.1%過酸化水素水—100%メタノールで室温・30分間内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。その後Dako社IgG-ウサギ・キットを使用し、1%正常ヤギ血清で37 $^{\circ}$ C、30分処理した。一次抗体としてはウサギ抗ヒトEGFR抗体(Cambridge Research Biochemical社, Lot. 3720)を用いて37 $^{\circ}$ C、30分間反応させた。二次抗体としてはヤギ抗ウサギIgG抗体を使用して37 $^{\circ}$ C、30分間反応させ、アビチン・ビオチン法でジアミノベンチジンによる発色を行った。核染色はヘマトキシリンで行った。対照には一次抗体のかわりに正常ウサギ血清を使用して上記と同じ処理を行った標本を用いた。

## III 結果

正常結膜は輪部も含めて抗EGFR免疫組織化学染色で陽性所見は認められなかった(図1)。瞼裂斑上皮も染色陰性であった。正常な創傷治癒過程にあると思われた結膜4眼はいずれも上皮の多層化、一部に角化がみられたが、すべて抗EGFR免疫組織化学染色で陽性所見は認められなかった(図2)。これらに対し、翼

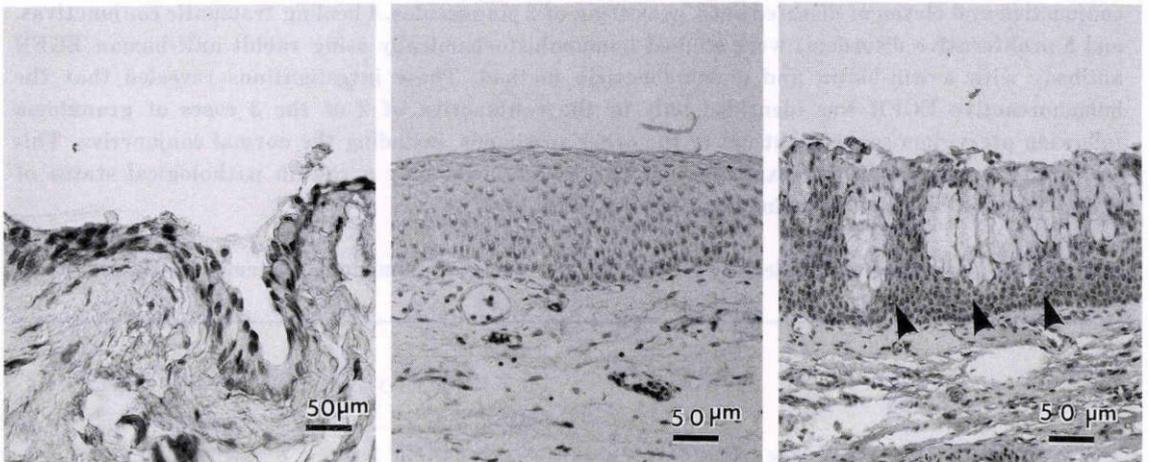


図 1

図 2

図 3

図1 正常結膜。免疫組織化学的にEGFRは認められない。抗EGFR免疫組織化学染色；DAB発色，核染色：ヘマトキシリン， $\times 150$ 。

図2 硝子体手術後4週間後の結膜。上皮の多層化が認められ細胞増殖の亢進が示唆されるが、免疫組織化学的にEGFRは認められない。抗EGFR免疫組織化学染色；DAB発色，核染色：ヘマトキシリン， $\times 150$ 。

図3 翼状片術後肉芽腫。上皮の多層化が認められ、抗EGFR免疫組織化学染色で陽性所見が認められる(矢頭)。抗EGFR免疫組織化学染色；DAB発色，核染色：ヘマトキシリン， $\times 150$ 。

状片術後肉芽腫の上皮は、いずれも多層化、一部に角化がみられ、3眼中2眼に基底細胞からその上層にかけて抗EGFR免疫組織化学染色陽性所見が認められた(図3)。翼状片や瞼球癒着部の上皮では染色陰性であった。

#### IV 考 按

今回の研究では、正常結膜上皮では免疫組織化学的にはEGFRは認められなかった。しかしながら、EGFの点眼を行うと結膜上皮中にS期細胞が増加する<sup>4)</sup>ことなどからは、結膜上皮におけるEGFRの存在は否定できない。したがって本研究で採用した免疫組織化学的手法では、正常結膜上皮のEGFRは検出限界以下であり、このために染色陰性であったと考えるのが妥当と思われた。また瞼裂斑や創傷治癒過程にある結膜上皮では、正常に比し多層化・角化がみられ細胞増殖が亢進していると思われるものの、正常結膜上皮と同様に免疫組織化学的にはEGFRは検出されなかった。この両者で免疫組織化学的に差が認められなかったことは、正常状態にある上皮ではマスキングによりEGFRとEGFの結合が妨げられることにより細胞増殖は促進されないのに対して、創傷時にはEGFRが増加するのではなくマスキングの解除によってEGFRとEGFの結合が進み細胞増殖が促進されるためと思われる<sup>7)</sup>。

一方治癒過程の異常で、細胞増殖が異常に亢進していると思われる翼状片術後肉芽腫の上皮ではEGFRが免疫組織化学的に認められた。したがって、このような異常治癒過程においては正常治癒過程にみられるようにマスキングの解除によりEGFの効果が発現するというメカニズムとは異なり、EGFRの発現が増加している可能性が示唆された。厳密には免疫組織化学的手法では物質の増減は論じられないが、正常結膜上皮では検出限界以下だったEGFRが翼状片術後肉芽腫の上皮では染色陽性であったことより、EGFRが増加していると考えられることは許容されると思われる。ただし、同じく増殖性疾患や治癒過程の異常と思われる翼状片上皮や瞼球癒着部上皮では免疫組織化学的にはEGFRは認められなかった。翼状片の原因は不明であ

るものの、上皮下にも変性がみられるなど必ずしも上皮に限局した病態ではない<sup>8)</sup>。また瞼球癒着の形成も上皮自体の過剰増殖のみが原因ではなく、創傷(手術)後に上皮欠損面の接触が癒着を引き起こしていることも考えられる。したがって、これらは創傷(手術)に対する上皮増殖が過剰である翼状片術後肉芽腫とは病態が異なるものと思われた。

EGFRは基底細胞で産生されるが、細胞が分化、表層に向かうにしたがって消失するが<sup>7)</sup>、ある種の皮膚増殖性疾患<sup>5)</sup>や扁平上皮癌<sup>6)</sup>ではEGFRが増加していることが知られており、結膜疾患における今回の結果と一致するものと思われた。したがって、本研究においてはある種の結膜疾患に限ってEGFRの発現の異常がその病態に関与している可能性が示唆された。このことは将来の結膜疾患の治療を考える上で有意義なものであると思われた。

御校閲を戴きました尾羽沢大教授に深謝いたします。

#### 文 献

- 1) 橋本公二, 松本邦夫, 東山真理, 他: 上皮成長因子, 久保田淳, 佐野栄春, 山村雄一編: 現代皮膚科学大系年刊版90-A, 東京, 中山書店, 24-33, 1990.
- 2) Ohashi Y, Motokura M, Kinoshita Y, et al: Presense of epidermal growth factor in human tears. Invest Ophthalmol Vis Sci 30: 1879-1882, 1989.
- 3) Kitazawa T, Kinoshita S, Fujita K, et al: The mechanism of accelerated corneal epithelial healing by human epidermal growth factor. Invest Ophthalmol Vis Sci 31: 1773-1778, 1990.
- 4) 坪田一男: 結膜の細胞診. 日眼会誌 95(抄録): 154, 1991.
- 5) 天野雅行, 菊池 新, 西川武二: 皮膚疾患と増殖因子. 蛋核酵 36: 356-360, 1991.
- 6) 上田政和, 清水信義, 阿部令彦: 増殖因子受容体を標的としたターゲット療法. 蛋核酵 36: 474-480, 1991.
- 7) 福山隆一, 清水信義: 増殖因子受容体の組織分布. 蛋核酵 36: 320-329, 1991.
- 8) Spencer WH, Zimmerman LE: Conjunctiva, in Spencer WH (ed): Ophthalmic Pathology, vol 1 (3rd ed), Philadelphia, WB Saunders Co, 174-176, 1990.