

# 角膜穿孔創治癒過程における epidermal growth factor の 角膜実質細胞に及ぼす影響

薄木 佳子<sup>1)</sup>, 片上千加子<sup>2)</sup>, 山本 節<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>兵庫県立加古川病院眼科, <sup>2)</sup>神戸大学医学部眼科学教室

## 要 約

家兎角膜穿孔創に epidermal growth factor (以下, EGF) を点眼し, 角膜実質細胞の *in vivo* での増殖動態に及ぼす EGF の作用について検討した。家兎角膜中央部に長さ 8 mm の穿孔創を作成し, EGF (10  $\mu$ g/ml) または対照として生理食塩水を 1 日 4 回点眼し, 1, 2, 3, 7 日後に角膜を摘出し, <sup>3</sup>H-チミジン (10  $\mu$ Ci/ml) で 37°C 4 時間標識したのちオートラジオグラフィーに供した。EGF 点眼角膜では対照に比べて, 受傷後 1, 2, 3, 7 日

目ともに角膜実質細胞における<sup>3</sup>H-チミジンの取り込みが有意に増加し, 実質創傷治癒が促進された。EGF が角膜穿孔創治癒過程初期において角膜実質細胞の増殖を促進し, 創傷治癒を促進することが明らかになった。(日眼会誌 99: 1209—1213, 1995)

キーワード: EGF, 角膜実質細胞, 角膜創傷治癒, <sup>3</sup>H-チミジン, オートラジオグラフィー

## The Effect of Epidermal Growth Factor on Keratocytes During Healing of Corneal Penetrating Incision

Yoshiko Usuki<sup>1)</sup>, Chikako Katakami<sup>2)</sup> and Misao Yamamoto<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Ophthalmology, Hyogo Prefectural Kakogawa Hospital

<sup>2)</sup>Department of Ophthalmology, Kobe University School of Medicine

## Abstract

We investigated the effect of epidermal growth factor (EGF) on keratocytes during corneal wound healing focusing on cell proliferation. A penetrating linear incision was made in the center of rabbit corneas. The corneas were then treated with eye drops of recombinant human EGF (10  $\mu$ g/ml) or physiological saline (control) four times a day. After 1, 2, 3, and 7 days, the corneas were excised, labeled with <sup>3</sup>H-thymidine (10  $\mu$ Ci/ml) at 37°C for 4 hours and subjected to autoradiography. The results demonstrated increased number of keratocytes in-

corporating <sup>3</sup>H-thymidine on the 1st, 2nd, 3rd and 7th days of healing and accelerated stromal wound healing in corneas treated with EGF compared with the controls. Thus, EGF stimulates proliferation of keratocyte and promotes corneal stromal wound healing. (J Jpn Ophthalmol Soc 99: 1209—1213, 1995)

Key words: EGF, Keratocytes, Corneal wound healing, <sup>3</sup>H-thymidine, Autoradiography

## I 緒 言

Epidermal growth factor (EGF) は角膜上皮細胞の増殖を促進し, 角膜上皮創傷治癒を促進する物質としてよく知られている<sup>1)~8)</sup>。EGF はまた, 角膜内皮に対しても創傷治癒促進作用をもつことが明らかとなっている<sup>9)~11)</sup>。一方, EGF の角膜実質に及ぼす影響についての報告は極

めて少ない。臨床的に角膜穿孔あるいは角膜潰瘍により角膜実質の菲薄化した症例に対して EGF の点眼が有効であることから<sup>12)</sup>、EGF が角膜実質の創傷治癒を促進する可能性があるが, その機序に関する基礎的研究は数少ない。家兎角膜穿孔創に EGF を点眼した群では対照群に比較して創傷の引張り強度 (tensile strength) が増大することが報告<sup>12)~14)</sup>され, Woost ら<sup>12)</sup>は EGF の角膜実

別刷請求先: 650 兵庫県神戸市中央区楠町 7-5-2 神戸大学医学部眼科学教室 片上千加子  
(平成6年1月25日受付, 平成7年7月17日改訂受理)

Reprint requests to: Chikako Katakami, M.D. Department of Ophthalmology, Kobe University School of Medicine,  
7-5-2 Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe-shi, Hyogo-ken 650, Japan

(Received January 25, 1995 and accepted in revised form July 17, 1995)

質細胞増殖促進作用によると推論している。また、EGFが培養角膜実質細胞の増殖を促進することも報告されている。しかし、EGFの*in vivo*における角膜実質細胞に及ぼす影響についての詳細な検討はほとんどなされていない。今回我々は、EGFの角膜実質創傷治癒促進機序について解明する目的で、*in vivo*におけるEGFの角膜実質細胞に及ぼす影響を細胞増殖の面から検討した。

## II 実験方法

実験には成熟日本白色家兎(体重2~3kg)16匹32眼を用いた。家兎を塩酸ケタミン(ケタラール®)筋注(30mg/kg)で麻酔し、さらに、0.4%塩酸オキシブプロカイン(ベノキシール®)で点眼麻酔の後、尖状刀で角膜中央部に長さ8mmの穿孔創を作成した。直後のみエリスロマイシン(アイロタイシン®)眼軟膏を点入した。処置後、右眼にEGF、対照として左眼に生理食塩水の点眼を1日4回行った。EGFはrecombinant human EGF(大塚製薬から供与)を生理食塩水に溶解し、10 $\mu$ g/mlの濃度としたものを用いた。受傷後1, 2, 3, 7日目に家兎を致死量のペントバルビタールナトリウム(ネンプタル®)で死亡させた後、角膜を摘出し、<sup>3</sup>H-チミジン(Amersham, 100~130 Ci/mmol)(10 $\mu$ Ci/ml)を含むDME(Dulbecco's minimum essential medium, GIBCO)中で37°C4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た。切片は既報の方法<sup>15)</sup>に準じて、オートラジオグラフィに供した。すなわち、暗室内で50%コニカNR-M2オートラジオグラフィ用乳剤に浸した後、乾燥させ、シリカゲル入りの暗箱に収めて4°Cで露出を行った。1~2週間後、フジ レンドール(富士フィルム)で現像、フジ レンフィックス(富士フィルム)で定着、水洗し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い光学顕微鏡で組織学的検索を行うとともに、<sup>3</sup>H-チミジンを取り込んだ角膜上皮細胞、角膜実質細胞数を計測した。

## III 結果

受傷後1日目、穿孔創周辺の上皮細胞が伸展・移動し、実質欠損部にはepithelial plugが形成されていた。受傷後2日目、創部は上皮細胞によって被覆され、創周辺の実質層では角膜実質細胞が丸みを帯びて活性化し、<sup>3</sup>H-チミジンを取り込んだ細胞も認められた(図1)。<sup>3</sup>H-チミジンを取り込んだ上皮細胞、実質細胞数を計測したところ、EGF点眼角膜において対照角膜に比較して、角膜上皮細胞および実質細胞による<sup>3</sup>H-チミジンの取り込みが有意に増加していた(表1, 2)。角膜上皮細胞と実質細胞の判別については、角膜上皮層および創部のepithelial plug内の細胞は角膜上皮細胞とし(図1A, Bの矢印)、角膜実質層内(図1C, Dの矢じり)および創部の明らかに実質から移動したと思われる細胞(図2A矢じり)を角膜実質細胞とした。判別困難な細胞および角膜実質以

外から由来したと思われる細胞は除外した。受傷後3日目、上皮細胞は重層化しており、創部を覆っていた。創部では実質層の修復が開始されていた。EGF点眼角膜では、上皮細胞・実質細胞ともに<sup>3</sup>H-チミジンの取り込み細胞は対照角膜に比較して有意に増加していた(表1, 2)。受傷後7日目では、創部は5~6層の上皮細胞層で覆われ、実質欠損部は活性化された実質細胞が移動し、実質層の修復が進みつつあった(図2)。EGF点眼角膜では、対照角膜に比べて実質層の修復が進行し、治癒の促進が認められた(図2)。この時期においても、EGF点眼角膜では<sup>3</sup>H-チミジン取り込み細胞数は上皮細胞・実質細胞ともに対照角膜に比して増加していた(表1, 2)。以上、一切片当たりの<sup>3</sup>H-チミジン取り込み細胞数は、上皮細胞においては受傷後2, 3, 7日目において対照角膜に比較してEGF点眼角膜に多く、2日目と7日目で有意差を認めた(表1)。角膜実質細胞においては受傷後1, 2, 3, 7日目のいずれの時期においてもEGF点眼角膜で<sup>3</sup>H-チミジンの取り込みは対照角膜より有意に増加していた(表2)。以上の結果から、家兎角膜穿孔創においてEGF点眼により創傷治癒が促進され、受傷後早期において角膜上皮細胞のみならず、角膜実質細胞の増殖が促進されることが明らかとなった。

## IV 考 察

EGFはCohen<sup>16)</sup>によりマウスの顎下腺から発見されたポリペプチドで、生体の組織のうち角膜上皮と最も強く結合し<sup>17)</sup>、角膜上皮にEGFの受容体が存在することが明らかとなり<sup>18)</sup>、EGFの角膜上皮に対する作用についての研究が活発に行われた。Fratiら<sup>3)</sup>は、家兎に角膜上皮欠損を作成し、EGF点眼群でその治癒速度が有意に促進されることを報告した。その後、Savageら<sup>4)</sup>、Hoら<sup>5)</sup>、河場ら<sup>6)</sup>、Kitazawaら<sup>7)</sup>が同様に*in vivo*での実験を行い、Gospodarowiczら<sup>8)</sup>は*in vitro*において角膜上皮細胞に対するEGFの創傷治癒促進効果について述べている。また、EGFの内皮細胞に関する作用については、Gospodarowiczら<sup>9)</sup>、Fabricantら<sup>10)11)</sup>は培養角膜内皮細胞を用いて、EGFは内皮細胞とも強く反応することを示した。

一方、EGFの角膜実質細胞に対する作用に関しての報告は角膜上皮、角膜内皮細胞に比べて極めて少なく、Woostら<sup>12)</sup>、Brightwellら<sup>13)</sup>の報告が散見される。Woostら<sup>12)</sup>は家兎角膜に全層切開創を作成し、EGF、デキサメタゾンなどの点眼を行い、創傷の引張り強度(tensile strength)を測定し創の強度を検討している。その結果、tensile strengthはEGF単独点眼群が最も大きく、次にEGFとデキサメタゾンの混合点眼群、生理食塩水のみ、デキサメタゾン単独点眼群の順であった。また同時に、培養角膜実質細胞に対して培養液中にEGFやデキサメタゾンを添加し、実質細胞の<sup>3</sup>H-チミジンの取り込

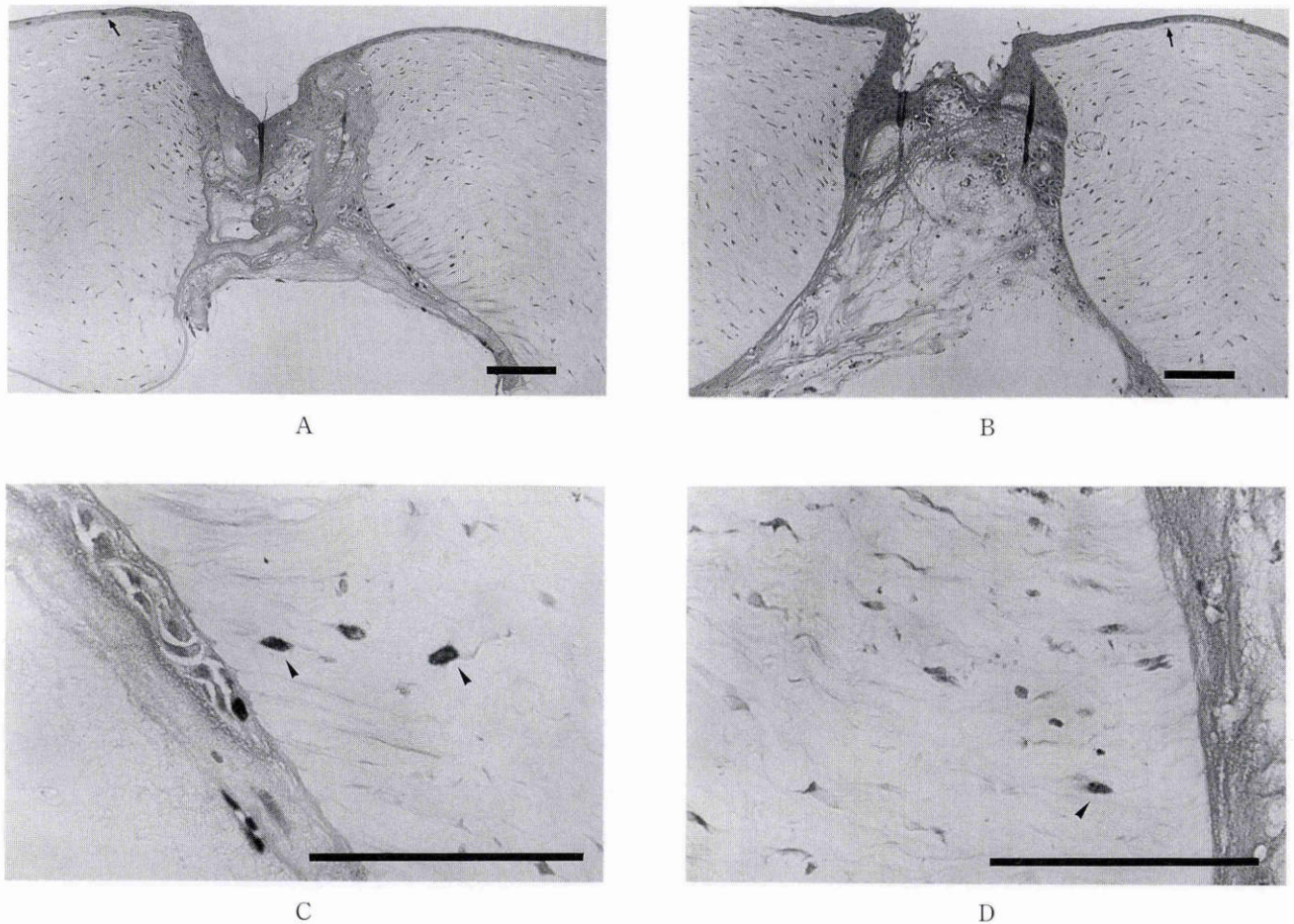


図1 角膜穿孔創受傷後2日目の $^3\text{H}$ -チミジンオートラジオグラフィ。A: EGF点眼角膜, B: 対照角膜, C: Aの強拡大, D: Bの強拡大

矢印は $^3\text{H}$ -チミジンを取り込んだ角膜上皮細胞, 矢じりは $^3\text{H}$ -チミジンを取り込んだ角膜実質細胞, バーは100  $\mu\text{m}$

表1 1切片当たりの $^3\text{H}$ -チミジン取り込み角膜上皮細胞数

日数	EGF点眼角膜	対照角膜
1	7.3 $\pm$ 4.5	10.3 $\pm$ 4.6
2	15.5 $\pm$ 6.7**	4.7 $\pm$ 2.2**
3	22.2 $\pm$ 4.9	15.7 $\pm$ 6.5
7	72.8 $\pm$ 9.8***	45.8 $\pm$ 5.8***

EGF: epidermal growth factor

\*\* : 有意差を認める (t-test,  $p < 0.005$ )

\*\*\* : 有意差を認める (t-test,  $p < 0.001$ )

数値は, 各群4眼の組織切片各2枚 (各計8枚) において細胞数を計測し, 平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。

表2 1切片当たりの $^3\text{H}$ -チミジン取り込み角膜実質細胞数

日数	EGF点眼角膜	対照角膜
1	23.2 $\pm$ 5.4**	11.8 $\pm$ 4.3**
2	17.7 $\pm$ 4.6*	12.0 $\pm$ 2.3*
3	21.7 $\pm$ 9.0*	10.3 $\pm$ 4.9*
7	23.6 $\pm$ 8.1***	5.8 $\pm$ 2.7***

\* : 有意差を認める (t-test,  $p < 0.05$ )

\*\* : 有意差を認める (t-test,  $p < 0.005$ )

\*\*\* : 有意差を認める (t-test,  $p < 0.001$ )

数値は, 各群4眼の組織切片各2枚 (各計8枚) において細胞数を計測し, 平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。

みに及ぼす効果を検討し, *in vivo* での tensile strength の強度と平行した結果が得られたことから, EGF が角膜実質細胞の DNA 合成を促進することにより創傷治癒を促進すると推測している。

本実験では, *in vivo* における EGF の角膜実質細胞に及ぼす作用を検討する目的で, 家兎角膜に穿孔創を作成し, 受傷後早期において EGF 点眼が角膜創傷治癒に及ぼす影響を $^3\text{H}$ -チミジンオートラジオグラフィの手法

を用いて細胞増殖の点から検討した。その結果, EGF 点眼により角膜上皮細胞では受傷後2, 3, 7日目において, 角膜実質細胞では受傷後1, 2, 3, 7日目のいずれの時期においても $^3\text{H}$ -チミジンの取り込みは対照角膜よりも有意に増加しており, EGF が上皮細胞のみならず, 実質細胞の増殖を促進することが明らかとなった。また, 7日目において実質創傷治癒は EGF 点眼角膜で著明に促進されていた。角膜上皮細胞における受傷後1日目の

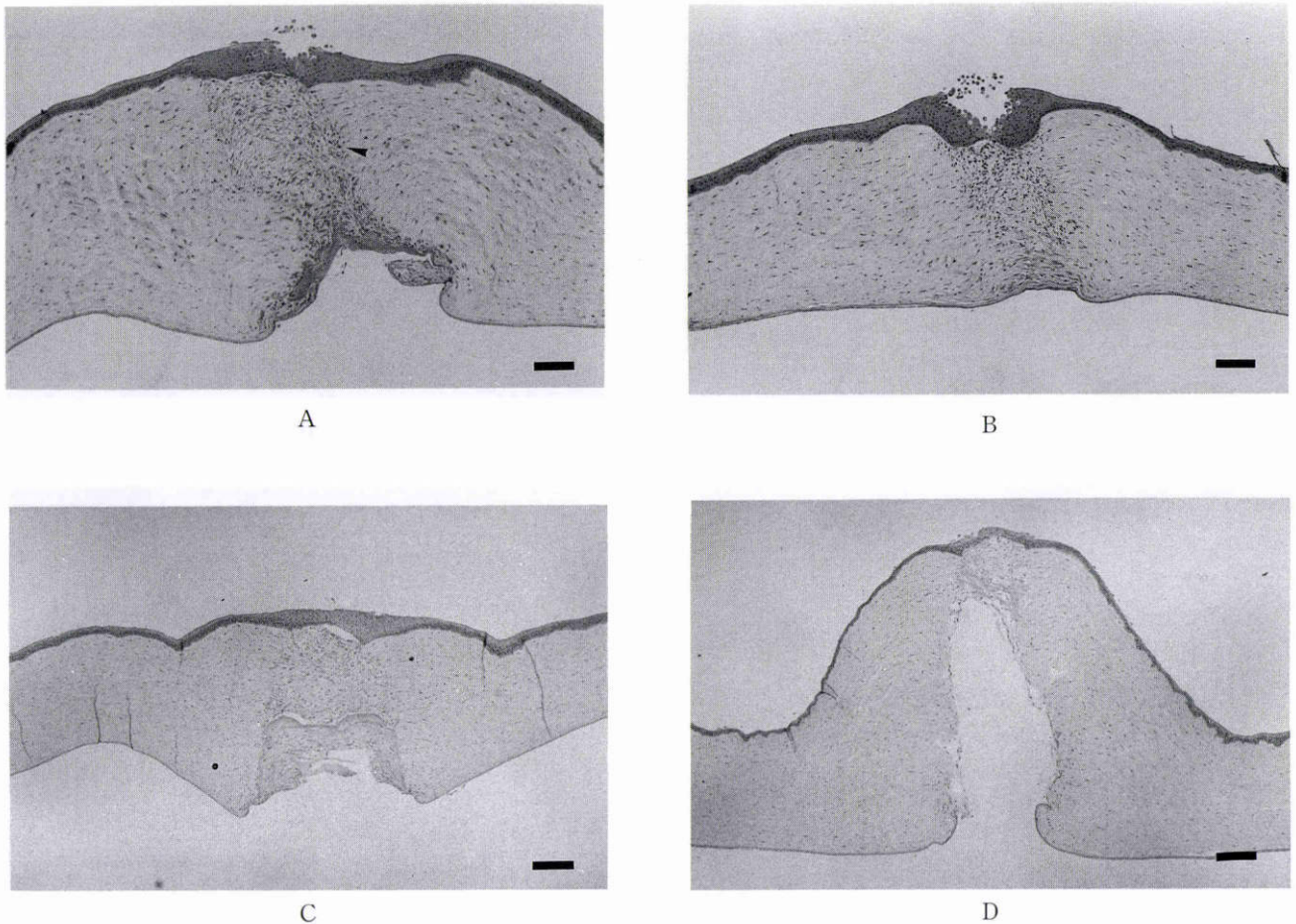


図2 角膜穿孔創受傷後7日目の組織所見.

A, B:  $^3\text{H}$ -チミジンオートラジオグラフィー. 矢じりは $^3\text{H}$ -チミジンを取り込んだ角膜実質細胞. A, C: EGF点眼角膜. B, D: 対照角膜. AとB, CとDはいずれも同一家兎の左右眼であるが, A, BとC, Dは異なる家兎である. バーは100  $\mu\text{m}$

$^3\text{H}$ -チミジン細胞数はEGF点眼角膜と対照角膜との間に差を認めないが,これは,角膜上皮細胞は創傷治癒過程において受傷後16~24時間目頃までは増殖による治癒を開始せず,EGFの作用も十分に発現されないことが明らかとなっており<sup>20)</sup>,そのことを裏付ける結果と考えられる.一方,角膜実質細胞はEGFにより早期から増殖が促進されることが明らかとなり,EGFに対する反応が上皮細胞とは異なる可能性が考えられる.

先のWoostら<sup>12)</sup>は,創傷引張り強度と培養細胞の $^3\text{H}$ -チミジンの取り込みによって,EGFの角膜実質細胞に対するDNA合成促進作用を推測するにとどまったが,我々の実験では家兎角膜に穿孔創を作成し, $^3\text{H}$ -チミジンオートラジオグラフィーの手法を用いることにより,直接*in vivo*におけるEGFの角膜上皮細胞および角膜実質細胞の増殖に及ぼす作用を明らかにし得た.EGF受容体が角膜上皮,内皮のみならず,角膜実質細胞にも存在することが報告<sup>18)</sup>されており,EGF受容体を介して角膜実質細胞増殖促進作用を発現すると考えられる.最近,EGFを臨床的に用い,難治性の角膜潰瘍や穿孔性角膜外傷例での治癒効果が報告されているが,これは今回の実

験で明らかになったようにEGFが角膜上皮細胞のみならず,角膜実質細胞に対しても増殖促進作用を有することに基づくものと考えられる.

今回の実験結果から,EGFが角膜実質創傷治癒を促進すること,その機序の一つとしてEGFの角膜実質細胞増殖促進作用が明らかになった.EGFは実質細胞による細胞外マトリックス産生にも影響を及ぼす可能性が考えられる.EGFの角膜実質創傷治癒の促進機序についてさらに検討するため,今後,個々の実質細胞における細胞外マトリックス,特にコラーゲン産生に及ぼすEGFの作用について検討を加える必要がある.

#### 文 献

- 1) Daniele S, Frati L, Fiore C, Santoni G: The effect of the epidermal growth factor (EGF) on the corneal epithelium in humans. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 210: 159-165, 1979.
- 2) Reim M, Keher T, Lund M: Clinical application of epidermal growth factor in patient with most severe eye burns. *Ophthalmology* 197: 179-184, 1988.

- 3) **Frati L, Daniele S, Delogu A, Covelli I:** 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.
  - 4) **Savage CR, Cohen S:** Proliferation of corneal epithelium induced by epidermal growth factor. *Exp Eye Res* 15: 361—366, 1973.
  - 5) **Ho PC, Davis WH, Elliott JH, Cohen S:** Kinetics of corneal epithelial regeneration and epidermal growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 13: 804—809, 1974.
  - 6) 河場亨子, 中安清夫, 金井 淳: ヒト EGF および Fibronectin の家兎角膜創傷治癒効果について. *日眼会誌* 88: 1237—1249, 1987.
  - 7) **Kitazawa T, Kinoshita S, Fujita K, Araki K, Watanabe H, Ohashi Y, et al:** The mechanism of accelerated corneal epithelial healing by human epidermal growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 1773—1778, 1990.
  - 8) **Gospodarowicz D, Mescher AL, Brown KD:** The role of fibroblast growth factor and epidermal growth factor in the proliferative response of the corneal and lens epithelium. *Exp Eye Res* 25: 631—649, 1977.
  - 9) **Gospodarowicz D, Mescher AL, Birdwell CR:** Stimulation of corneal endothelial cell proliferation *in vitro* by fibroblast and epidermal growth factor. *Exp Eye Res* 25: 75—90, 1977.
  - 10) **Fabricant RN, Salisbury JD, Berkowicz RA, Kaufman HE:** Regenerative effects of epidermal growth factor after penetrating keratoplasty in primates. *Arch Ophthalmol* 100: 994—995, 1982.
  - 11) **Fabricant RN, Alpar AJ, Centifanto YM, Kaufman HE:** Epidermal growth factor receptors on corneal endothelium. *Arch Ophthalmol* 99: 305—308, 1981.
  - 12) **Woost PG, Brightwell J, Eiferman RA, Schultz GS:** Effect of growth factors with dexamethasone on healing of rabbit corneal stromal incisions. *Exp Eye Res* 40: 47—60, 1985.
  - 13) **Calel B:** Human epidermal growth factor—The influence on the healing of surgically closed corneal wounds. *Acta Ophthalmol* 182: 58—61, 1987.
  - 14) **Petrousus G, Sebag J, Coutois Y:** Epidermal growth factor increases tensile strength during wound healing. *Ophthalmic Res* 18: 299—300, 1986.
  - 15) **Katakami C, Sahori A, Kazusa R, Yamamoto M:** Keratocytes activity in wound healing after epikeratophakia in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 1837—1845, 1991.
  - 16) **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.
  - 17) **Covelli I, Rossi R, Mozzi R, Frati L:** Synthesis of bioactive <sup>131</sup>I-labeled epidermal growth factor and its distribution in rat tissues. *Eur J Biochem* 27: 225—230, 1972.
  - 18) **Hongo M, Itoi M, Yamaguchi N, Imanishi J:** Distribution of epidermal growth factor (EGF) receptors in rabbit cornea epithelial cells, keratocytes and endothelial cells, and the changes induced by transforming growth factor-1. *Exp Eye Res* 54: 9—16, 1992.
  - 19) **Brightwell JR, Riddle SL, Eiferman RA, Valenzuela P, Barr PJ, Merryweather JP, et al:** Biosynthetic human EGF accelerates healing of neodecadron-treated primate corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 105—110, 1985.
  - 20) **Inoue M, Katakami C:** The effect of hyaluronic acid on corneal epithelial cell proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 2313—2315, 1993.
-