

上皮増殖因子の家兎角膜内皮創傷治癒に及ぼす影響

中堀 裕子, 片上千加子

神戸大学医学部眼科学教室

要 約

上皮増殖因子 (EGF) の *in vivo* での家兎角膜内皮創傷治癒に及ぼす影響につき検討した。家兎角膜に冷凍凝固による内皮障害を加えた後、前房中に EGF (100 μ g/ml) を 0.1 ml 注入した。処置後 1, 2, 7 日目に角膜を摘出し、 3 H-チミジンで標識した後、オートラジオグラフィに供した。その結果、障害後 1 日目には EGF 群、対照群ともに障害部周囲の内皮細胞に 3 H-チミジン取り込みがあり、細胞増殖による治癒機転を認めたが、 3 H-チミジン取り込み内皮細胞数の比率は、EGF 群で対照群に比し有意に増加していた。一方、EGF 群において角膜新生血管や隅角部の増殖性変化などの副作用は認めなかつ

た。また、走査型電子顕微鏡による観察でも、EGF 群は対照群に比し内皮細胞の修復が促進されている所見を認めた。以上の結果から、EGF の角膜内皮創傷治癒促進作用が明らかとなった。角膜内皮障害の治療薬として、EGF の臨床応用をするためには、今後さらに検討を重ねる必要がある。(日眼会誌 99: 17-22, 1995)

キーワード：家兎角膜内皮創傷治癒，上皮増殖因子 (EGF)， 3 H-チミジン，オートラジオグラフィ，角膜内皮障害

The Effect of Epidermal Growth Factor on Corneal Endothelial Wound Healing in Rabbits

Yuko Nakahori and Chikako Katakami

Department of Ophthalmology, Kobe University School of Medicine

Abstract

We investigated the effect of epidermal growth factor (EGF) on rabbit corneal endothelial wound healing *in vivo*. After a 6 mm-diameter metallic cryoprobe was applied to rabbit corneas, 0.1 ml of recombinant human EGF (100 μ g/ml) or saline was injected into the anterior chamber. Corneas were excised on 1, 2, and 7 days postoperatively, labeled with 3 H-thymidine and subjected to autoradiography. Some corneas were examined by scanning electron microscopy. Autoradiography showed that the number of endothelial cells incorporating 3 H-thymidine in corneas treated with EGF was significantly greater than that in the control. Scanning electron microscopy demonstrated the effect of EGF

on accelerating endothelial healing. These findings indicate that EGF has a stimulatory effect on the proliferation of wounded rabbit corneal endothelial cells *in vivo*. Under the conditions tested in the present study, there were no side effects of EGF such as neovascularization or cellular proliferation in the angle. The results suggest that EGF might be clinically applicable for corneal endothelial disorders. (J Jpn Ophthalmol Soc 99: 17-22, 1995)

Key words: Rabbit corneal endothelial wound healing, Epidermal growth factor (EGF), 3 H-thymidine, Autoradiography, Corneal endothelial damage

I 緒 言

Epidermal growth factor (EGF) は、1962年Cohen¹⁾によりマウス顎下腺から発見されたポリペプチドで、生体のうち角膜上皮層に最も強く結合することから、角膜

に対する作用について活発な研究が行われてきた^{2)~7)}。特に角膜上皮細胞に対して、EGFが *in vitro* においても *in vivo* においても分裂・増殖を促進することが報告されている^{6)~8)}。角膜内皮細胞については、1977年のGospodarowiczら⁹⁾の報告をはじめとして、ウシ、ウサギ

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 中堀 裕子
(平成6年4月18日受付，平成6年8月10日改訂受理)

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

(Received April 18, 1994 and accepted in revised form August 10, 1994)

などの培養角膜内皮細胞の増殖を促進することが報告されており¹⁰⁾¹¹⁾, ヒトについても培養角膜内皮細胞の増殖を促進することが知られている¹²⁾¹⁴⁾. しかし, *in vivo*での検討は数少ない¹⁵⁾¹⁶⁾.

今回我々は, 角膜上皮障害を加えた家兎眼の前房中にEGFを注入し, *in vivo*でのEGFの角膜内皮創傷治癒に及ぼす影響につき細胞増殖動態も含め観察し, 併せてEGFの隅角部に及ぼす影響について検討した.

II 実験方法

実験には, 体重2.5kgの白色家兎18匹18眼をEGF群, 対照群の2群に分け, 各群9匹9眼を使用した. 塩酸ケタミン(ケタラル®[®], 30mg/kg筋注)で全身麻酔後, 0.4%塩酸オキシプロカイン(ペノキシール®[®])を点眼し, Yeeら¹⁷⁾の方法に準じて, 家兎角膜中央部に直径6mmの金属製プローベを用いて液体窒素による冷凍凝固を5秒間加え, 角膜内皮障害を作成した. 次いで, 前房水0.1mlを吸引し, EGF群ではrecombinant human-EGF(大塚製薬から供与)を生理食塩水に溶解し, 100 μ g/mlの濃度とした液を0.1ml, 対照群では生理食塩水0.1mlを前房内に注入した.

処置後, 1, 2, 7日目に, それぞれ6匹(EGF群3匹, 対照群3匹)の家兎をペントバルビタールナトリウム(ネンブタール®[®], 20mg/kg静注)で致死麻酔後, 前房水0.1mlを吸引し, 強角膜片を摘出した. 採取した前房水は, 注入したEGFの残留濃度を知らるために, 抗recombinant human-EGF抗体を用いたRIA系(測定感度0.1ng/ml)によるhuman-EGFの免疫活性を測定した¹⁸⁾. 各群2匹の家兎から摘出した強角膜片は, 直ちに³H-thymidine(Amersham, 100~130Ci/mmol, 10 μ Ci/ml)を含むDME(Dulbecco's minimum essential medium, GIBCO)中で37°C, 24時間標識し, 10%緩衝ホルマリンで固定後, 角膜中央部で半割し(図1), パラフィン切片を作成した後, 既報の方法に準じてオートラジオグラフィに供した¹⁹⁾. すなわち, 切片は脱パラフィ

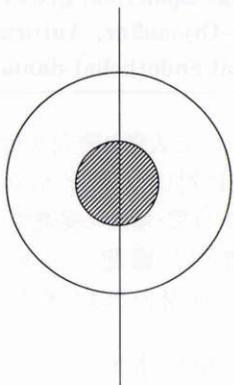


図1 組織標本作成時の模式図.

角膜中央部で半割し, 内皮障害部を含む切片を作成した.(図の斜線部は冷凍凝固施行部).

ン後, 暗室内で50%Konica NR-M2オートラジオグラフィ用乳剤を塗布後乾燥させ, シリカゲルを入れた暗箱に密閉し, 4°Cで露出を行った. 2週間後, Fuji Lendole(富士フィルム)で現像し, Fuji Lenfix(富士フィルム)で定着後水洗し, H-E染色を施し, 光学顕微鏡で組織学的検索およびラジオアイソトープ取り込みを観察した. また, 各群1匹から摘出した強角膜片は, 2%グルタルアルデヒドで固定し, 脱水後臨界点乾燥後蒸着し, 角膜内皮細胞の状態を走査型電子顕微鏡で観察した.

III 結果

光学顕微鏡によるオートラジオグラフィの結果, 障害後1日目にはEGF群, 対照群ともに, 障害部である角膜中央部では内皮細胞が脱落していた. デスメ膜は, 内皮細胞脱落部位でも正常であった. 一方, 障害部近傍の角膜内皮細胞では, 活発な³H-チミジンの取り込みが見られ, 細胞増殖による角膜内皮治癒機転を認めた(図2,

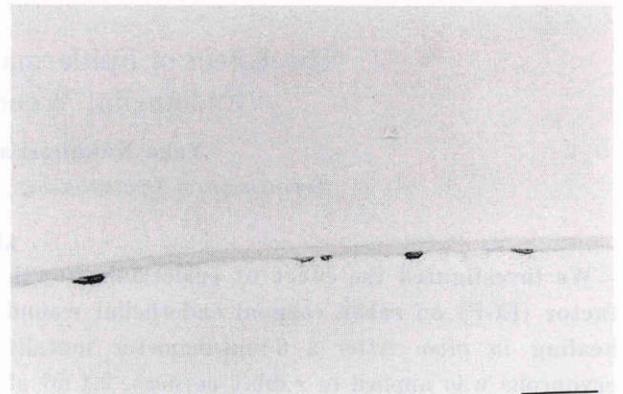


図2 冷凍凝固後1日目の³H-チミジンオートラジオグラフィ像(対照群).

障害部周囲の角膜内皮細胞による³H-チミジンの取り込みが見られる. バーは25 μ m

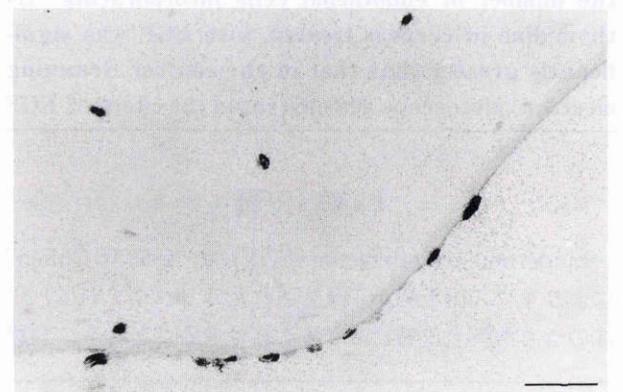


図3 冷凍凝固後1日目の³H-チミジンオートラジオグラフィ像(上皮増殖因子(EGF)群).

障害部周辺の角膜実質細胞および内皮細胞に多数の³H-チミジン取り込みを認める. バーは25 μ m

3). EGF 群と対照群を比較するために、各群それぞれ 10 枚の切片につき、切片中のすべての残存する角膜内皮細胞数および ^3H -チミジン取り込み内皮細胞数を計測し、全内皮細胞数のうち、 ^3H -チミジン取り込み内皮細胞数の比率を求めた。EGF 群 36.7%, 対照群 26.0%と、EGF 群において ^3H -チミジン取り込み内皮細胞数の比率

表 1 冷凍凝固後 1 日目の全角膜内皮細胞中の ^3H -チミジン取り込み角膜内皮細胞の比率 (%)

EGF 群	36.7*
対照群	26.0

* : 有意差を認める (Mann-Whitney test, $p < 0.05$)
数値は各群それぞれ 10 枚の切片の中間値。

^3H -チミジンオートラジオグラフィにおいて、1 切片あたりの全内皮細胞数と ^3H -チミジン取り込み内皮細胞数の比率を計測した。ECG: 上皮増殖因子

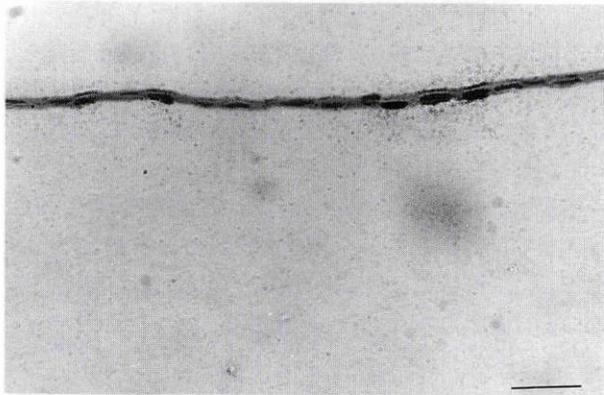


図 4 冷凍凝固後 1 日目の ^3H -チミジンオートラジオグラフィ像 (EGF 群).

障害部付近の角膜上皮層は菲薄化し単層となっており、多数の ^3H -チミジン取り込みを認める。バーは 25 μm

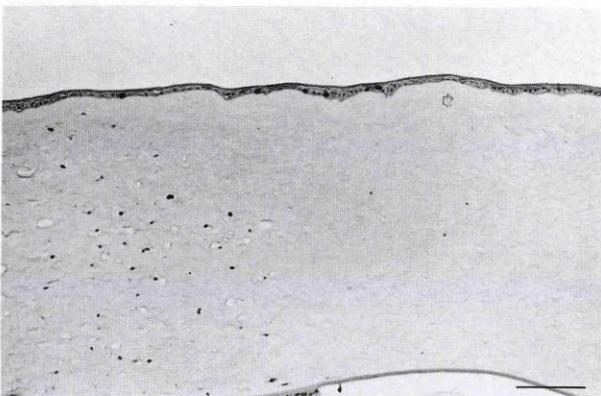


図 5 冷凍凝固後 2 日目の ^3H -チミジンオートラジオグラフィ像 (EGF 群).

菲薄化している部位の角膜上皮層は重層化傾向にある。障害部の実質層にも少数の細胞出現を認め、障害部周辺の実質細胞では活発な ^3H -チミジン取り込みが見られる。バーは 100 μm

は有意に増加していた (Mann-Whitney test, $p < 0.05$, 表 1)。また、障害後 2 日目、7 日目には、内皮細胞による ^3H -チミジン取り込みは認めなかった。

EGF 群、対照群ともに、冷凍凝固による障害後 1 日目には、障害部付近の角膜上皮層は菲薄化し単層となっており、菲薄化した部位およびその周囲の上皮に多数の ^3H -チミジン取り込み細胞を認めた (図 4)。障害部の実質層には細胞を認めず (図 4)、障害部周辺の実質細胞に EGF 群では特に多数の ^3H -チミジン取り込みを認めた (図 3)。2 日目には、上皮層は菲薄化している部位の周辺部ではやや重層化傾向にあり、障害部の実質層にも少数の細胞出現を認め、障害部周辺の実質細胞では ^3H -チミジン取り込みが見られた (図 5)。7 日目には、対照群では上皮層はまだ菲薄化しており、活発な ^3H -チミジン取り込みが見られた (図 6)。実質細胞は周辺部の正常部に比し、やや細胞数が少なかった。一方、EGF 群では上皮層はほぼ正常に等しく重層化し、 ^3H -チミジン取り込

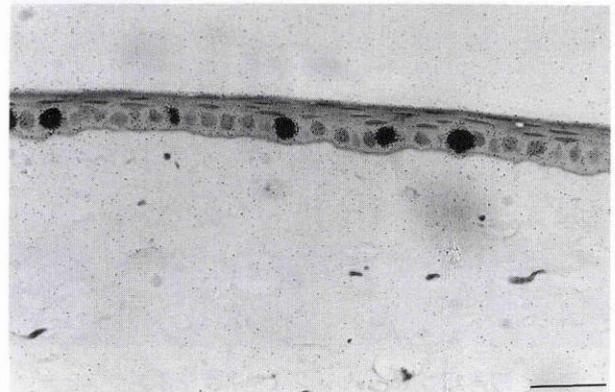


図 6 冷凍凝固後 7 日目の ^3H -チミジンオートラジオグラフィ像 (対照群).

角膜上皮層はまだ菲薄化しており、活発な ^3H -チミジン取り込みが見られる。バーは 25 μm

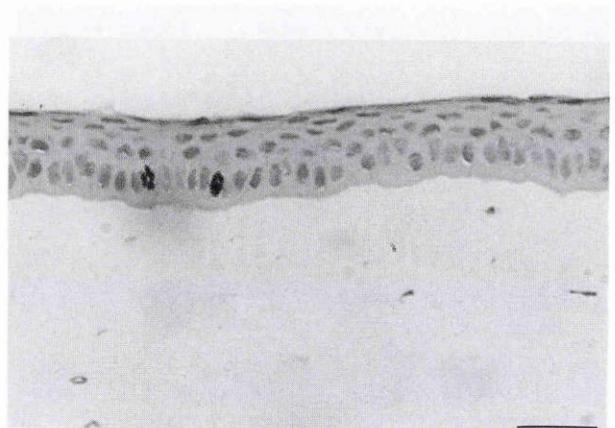


図 7 冷凍凝固後 7 日目の ^3H -チミジンオートラジオグラフィ像 (EGF 群).

角膜上皮層はほぼ正常に等しく重層化し、 ^3H -チミジン取り込みも正常角膜同様の状態に復している。バーは 25 μm

みも正常角膜とほぼ同様の状態に復していた(図7)。実質層においても細胞数はほぼ正常となり、 ^3H -チミジン取り込みは認められなかった。また、両群ともに角膜新生血管は見られなかった。

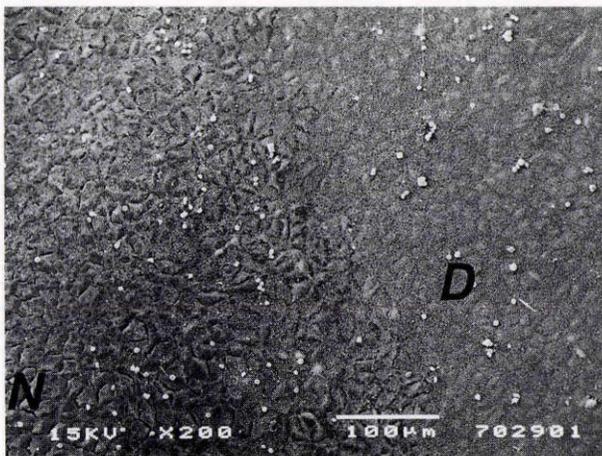
隅角部は、両群ともに ^3H -チミジン取り込みは認めず、EGF群においても増殖性変化を示唆する所見を認めなかった(図8)。

走査型電子顕微鏡による観察では、障害後1日目には角膜中央部で、冷凍凝固により障害され、デスメ膜から剥離し変形した角膜内皮像が認められた(図9)。また境界部では、ほぼ正常な状態の角膜内皮細胞と内皮細胞の脱落により露出した無構造なデスメ膜との間に、変形した角膜内皮細胞が観察された(図10 a, b)。障害後2日目は、1日目とあまり変化なく、障害された角膜内皮像を認めた。障害後7日目には境界部に、障害後1日目から



図8 隅角部の ^3H -チミジンオートラジオグラフィ像。

隅角部では、 ^3H -チミジン取り込み細胞は認めず、増殖性変化を示唆する所見は見られない。バーは40 μm



a: ほぼ正常な状態の角膜内皮細胞(N)と内皮細胞の脱落により露出した無構造なデスメ膜(D)との間に、変形した角膜内皮細胞を認める。

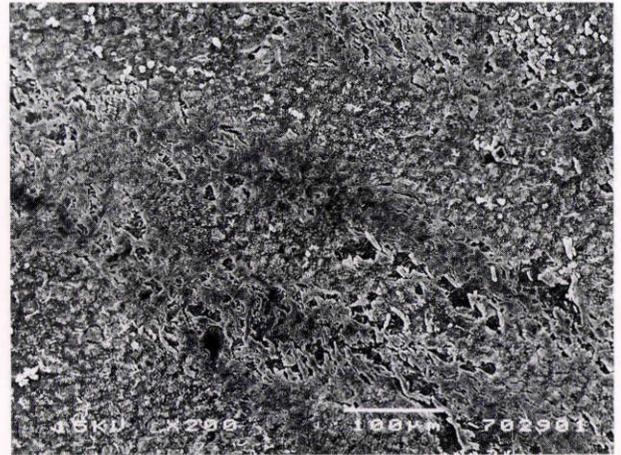


図9 冷凍凝固後1日目の走査型電子顕微鏡像(EGF群)。

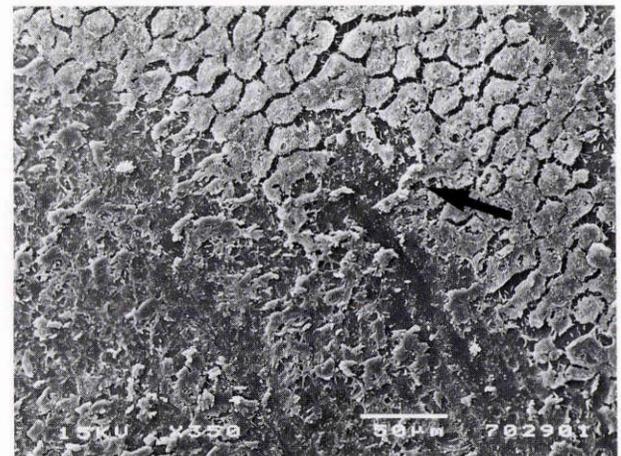
障害され、脱落・変形した角膜内皮細胞を認める。

やや丸みを帯び、修復期にあると考えられる紡錘形に変形拡大した内皮細胞が観察された。これは、Yeeら¹⁷⁾の報告と同様の所見であり、修復期にある内皮細胞と考えられた。この時期、EGF群では対照群と比較し、六角形の正常な形により近い細胞が観察され、修復が促進されている結果であると考えられた(図11, 12)。

前房水中のhuman-EGFの免疫活性測定の結果、EGF注入後1日目は0.73 ng/ml、2日目には0.19 ng/mlと低下し、7日目には検出限界以下(0.10 ng/ml以下)であった(表2)。

IV 考 按

今回我々は、冷凍凝固により角膜内皮を障害した家兔の前房中にEGFを注入し、*in vivo*におけるEGFの角膜内皮創傷治癒に及ぼす影響について検討した。その結果、角膜内皮障害後1日目には、EGF群、対照群ともに



b: ほぼ正常な状態の角膜内皮細胞および障害され脱落しつつある角膜内皮細胞(矢印)。

図10 冷凍凝固後1日目の境界部の走査型電子顕微鏡像(対照群)。

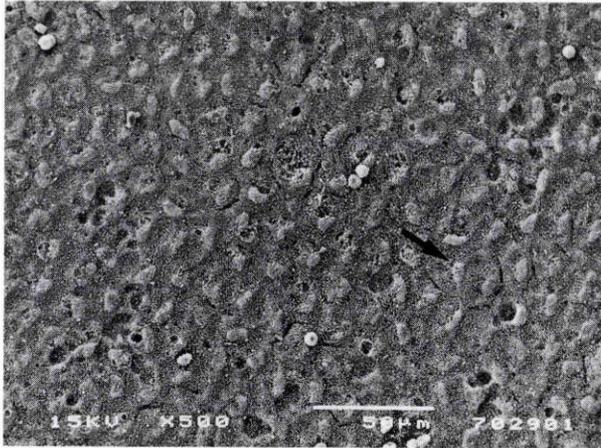


図11 冷凍凝固後7日目(対照群)の走査型電子顕微鏡像。
修復期にあると考えられる丸みを帯びた角膜内皮細胞(矢印)。

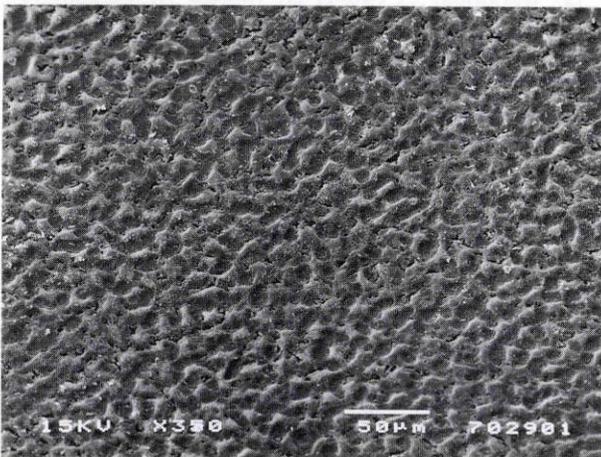


図12 冷凍凝固7日後(EGF群)の走査型電子顕微鏡像。
修復期にあると考えられる紡錘形に変形拡大した角膜内皮細胞。図11の対照群に比し、内皮細胞の形は六角形に近く、修復は促進されている。

障害部周囲の角膜内皮細胞による³H-チミジンの取り込みが見られたが、取り込み内皮細胞数の比率は、対照群に比し、EGF群で有意に増加していた。角膜内皮障害後2日目には、角膜内皮細胞による³H-チミジンの取り込みは認めなかった。この時期には、細胞分裂・増殖による創傷治癒が終了していることを示す結果であると考えられる。また、走査型電子顕微鏡による観察では、角膜中央部で冷凍凝固により障害された角膜内皮細胞を認め、境界部では内皮細胞が変形、消失していた。しかし、障害後7日目には、修復期にあると考えられる内皮細胞が観察され、EGF群では対照群の同部位で見られる内皮細胞の形状が、より正常に近く修復が促進されていると考えられた。以上の結果から、EGFは、*in vivo*で、創傷治癒過程におけるウサギ角膜内皮に対し細胞増殖促進

表2 前房水中 human-EGF 免疫活性測定結果

免疫活性 (ng/ml)	
EGF 注入前	検出限界以下
注入後1日目	0.73
注入後2日目	0.19
注入後7日目	検出限界以下
検出限界値：0.10 ng/ml	

作用を有し、内皮創傷治癒を促進することが明らかとなった。一方、EGFの前房内注入による副作用として考えられる角膜新生血管および隅角部での増殖性変化は今回の実験では認められなかった。

EGFは、創傷治癒過程において、様々な細胞に対して増殖促進作用を持つことが知られている。角膜についても、上皮細胞、実質細胞、内皮細胞のいずれにもEGFレセプターが存在しており、濃度依存性に増殖促進作用を有することが報告されている⁵⁾。上皮については、EGFが生体のうち角膜上皮層に最も強く結合することから、多数の研究が活発に行われてきた^{6)~8)}。実質についても、角膜アルカリ外傷治癒過程初期に増殖が促進されることや²⁰⁾、実質細胞増殖能やコラーゲン産生を促進し、角膜実質創傷治癒を促すことが報告されている²¹⁾。最近、EGFの様々な角膜疾患に対する治療薬としての可能性が考えられ、上皮障害に対してはすでに点眼薬として臨床応用されつつあり^{22)~24)}、日本でも治験段階にあるが、実質や内皮の障害に対するEGFの臨床応用については、まだ検討されている段階である。内皮細胞に対するEGFの作用については、*in vitro*の系で、1977年のGospodarowiczら⁹⁾以来、ウシ、ウサギなどの培養角膜内皮細胞の増殖を促進することが報告されている¹⁰⁾¹¹⁾。また、Fabricantら¹²⁾によりヒト角膜内皮がEGFレセプターを有することが確認された。Nayakら¹³⁾は、ヒト角膜周辺部の角膜内皮細胞を培養し、EGF添加群と無添加群の取り込みを比較した結果、EGF添加群では有意に³H-チミジン取り込みが増加したと報告している。またCouchら¹⁴⁾は、組織培養されたヒト角膜上皮の内皮細胞の増殖能がEGFにより亢進すると報告している。しかし、*in vivo*におけるEGFの角膜内皮創傷治癒に及ぼす作用については、1982年にFabricantら¹⁵⁾、1989年にYoshidaら¹⁶⁾の報告があるが、報告数は少ない。

生体内において、角膜内皮細胞の創傷治癒は、伸展・移動および細胞分裂による増殖による²⁵⁾²⁶⁾、ヒトでは増殖能は非常に低く、角膜内皮の創傷治癒機転は主として角膜内皮細胞の伸展・移動によるとされている²⁶⁾²⁷⁾。しかし、若年者においては角膜内皮細胞の増殖能が高いことが報告されており、鉗子分娩による角膜内皮障害などでは、増殖による創傷治癒も行われているものと考えられる²⁸⁾。

家兎角膜は増殖能が高く、冷凍凝固後の角膜内皮創傷

治癒も非常に早いことが知られており²⁹⁾、ヒト角膜内皮とは細胞増殖動態に非常に差がある。したがって、今回の結果をそのままヒトに当てはめることはできないが、角膜内皮障害の治療薬として、EGFが有効である可能性を示す結果であると考えられた。しかし、将来、臨床の場において角膜内皮障害に対しEGFを使用するためには、さらに検討を重ねる必要がある。

稿を終えるにあたり、ご校閲賜りました山本 節教授に深謝いたします。

文 献

- 1) **Cohen S**: Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem* 237: 1555—1562, 1962.
- 2) **Carpenter G, Cohen S**: Epidermal growth factor. *Ann Rev Biochem* 48: 193—216, 1979.
- 3) **Covelli I, Rossi R, Mozzi R, Frati L**: Synthesis of bioactive ¹²⁵I-labeled epidermal growth factor and its distribution in rat tissues. *Eur J Biochem* 27: 225—230, 1972.
- 4) **Frati L, Daniele S, Delogu A, Covelli I**: Selective binding of the epidermal growth factor and its specific effects on the epidermal cells of the cornea. *Exp Eye Res* 14: 135—141, 1972.
- 5) **本合 幹**: 角膜細胞における上皮増殖因子 (EGF) およびそのレセプターに関する研究. *あたらしい眼科* 7: 1515—1521, 1990.
- 6) **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報一. *眼紀* 40: 2858—2863, 1989.
- 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, Birdwell CR**: 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—89, 1977.
- 10) **Raymond GM, Jumblatt MM, Bartels SP, Neufeld AH**: Rabbit corneal endothelial cells *in vitro*: Effects of EGF. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 474—479, 1986.
- 11) **Joyce NC, Matkin ED, Neufeld AH**: Corneal endothelial wound closure *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 1548—1559, 1989.
- 12) **Fabricant RN, Alpar AJ, Centifanto YM, Kaufman HE**: Epidermal growth factor receptors on corneal endothelium. *Arch Ophthalmol* 99: 305—308, 1981.
- 13) **Nayak SK, Binder PS**: The growth of endothelium from human corneal rims in tissue culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25: 1213—1216, 1984.
- 14) **Couch JM, Cullen P, Casey TA, Farbre JW**: Mitotic activity of corneal endothelial cells in organ culture with recombinant human epidermal growth factor. *Ophthalmology* 94: 1—6, 1987.
- 15) **Fabricant RN, Salisbury JD, Berkowitz RA, Kaufman HE**: Regenerative effect of epidermal growth factor after penetrating keratoplasty in primates. *Arch Ophthalmol* 100: 994—995, 1982.
- 16) **Yoshida A, Laing RA, Joyce NC, Neufeld AH**: Effects of EGF and indomethacin on rabbit corneal endothelial wound closure in excised corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 1991—1996, 1989.
- 17) **Yee RW, Geroski DH, Matsuda M, Champeau EJ, Meyer LA, Edelhauser HF**: Correlation of corneal endothelial pump site density, barrier function, and morphology in wound repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 1191—1201, 1985.
- 18) **Ohashi Y, Motokura M, Kinoshita Y, Mano T, Watanabe H, Kinoshita S, et al**: Presence of epidermal growth factor in human tears. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 1879—1882, 1989.
- 19) **Katakami C, Sahori A, Kazusa R, Yamamoto M**: Keratocyte activity in wound healing after epikeratophakia in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 1837—1845, 1991.
- 20) **藤沢久美子, 片上千加子, 山本 節**: 角膜アルカリ外傷治癒過程における keratocyte の動態について. *日眼会誌* 95: 59—66, 1991.
- 21) **薄木佳子, 片上千加子, 山本 節**: EGFの角膜実質創傷治癒に及ぼす影響. *眼紀* 43: 534, 1992.
- 22) **Daniele S, Frati L, Fiore C, Santoni G**: The effect of epidermal growth factor (EGF) on the corneal epithelium in human. *Graefes Archiv Ophthalmologie* 210: 159—165, 1979.
- 23) **Elliott JH**: Epidermal growth factor; *in vivo* ocular studies. *Trans Am Ophthalmol Soc* 78: 629—656, 1980.
- 24) **Kandarakis AS, Page C, Kaufman HE**: The effect of epidermal growth factor on epithelial healing after penetrating keratoplasty in human eyes. *Am J Ophthalmol* 98: 411—415, 1984.
- 25) **Hirsch M, Renard G, Faure JP, Pouliquen Y**: Formation of intercellular spaces and junctions in regenerating rabbit corneal endothelium. *Exp Eye Res* 23: 385—397, 1976.
- 26) **Waring GO, Bourne WM, Edelhauser HF, Kenyon KR**: The corneal endothelium; normal and pathologic structure and function. *Ophthalmology* 89: 531—590, 1982.
- 27) **Doughman DJ, Van Horn DL, Rodman WP, Byrnes P, Lindstrom RL**: Human corneal endothelial layer repair during organ culture. *Arch Ophthalmol* 94: 1791—1796, 1976.
- 28) **Tetsumoto K, Kubota T, Rummelt V, Holbach LM, Naumann GOH**: Epithelial transformation of the corneal endothelium in forceps birth-injury-associated keratopathy. *Cornea* 12: 65—71, 1993.
- 29) **Yano M, Tanishima T**: Wound healing in rabbit corneal endothelium. *Jpn J Ophthalmol* 24: 297—309, 1980.