



Title	Recombinant human epidermal growth factor and corneal neovascularization
Author(s)	根津, 永津
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38110">https://hdl.handle.net/11094/38110</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	ね づ へ つ 根 津 永 津
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 0 6 8 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 5 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科外科系専攻
学 位 論 文 名	Recombinant human epidermal growth factor and corneal neovascularization (上皮成長因子と角膜血管新生)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 田 野 保 雄 (副査) 教 授 遠 山 正 彌 教 授 吉 川 邦 彦

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### (目 的)

Epidermal growth factor (EGF, 上皮成長因子) 産生細胞は全身に広く分布し、ほとんどの体液より検出される。特にヒト正常涙液中では  $1 \sim 10 \text{ ng/ml}$  と血中濃度 ( $100 \sim 200 \text{ pg/ml}$ ) に比べ高濃度で存在し、EGF が眼表面の創傷治癒に深く関与しているように思われる。近年、遺伝子工学の発達により、大腸菌を用いた大量の遺伝子組み換えヒト EGF の精製が可能になり、眼科領域ではいち早く点眼薬として臨床応用されつつある。実際、 $20, 50 \mu\text{g/ml}$  のヒト EGF 点眼により、白色家兎では角膜上皮細胞の創傷治癒が促進される。しかし、EGF には in vivo, in vitro で種々の細胞に対して、多彩な作用が報告されており、臨床応用のためには正常組織に及ぼす副作用の検討が必要である。今回、角膜上皮欠損モデルを用いてヒト EGF 点眼薬の効果を確認した後、EGF の作用の中で、特に正常角膜上皮細胞の増殖能に及ぼす影響と角膜血管新生作用の有無について白色家兎を用いて検討した。

#### (方法ならびに成績)

##### ①正常角膜上皮細胞の増殖能におよぼすヒト EGF の影響

白色家兎 5 羽の両眼に生理食塩水に溶解した  $20 \mu\text{g/ml}$  ヒト EGF を、6 羽に基剤のみを 1 日 5 回 4 日間点眼した後、それぞれの角膜上皮細胞を採取し、フローサイトメーターにより G0/G1 期, S 期, M 期の細胞頻度を測定した。その結果、ヒト EGF 点眼群と基剤点眼群との間には角膜上皮細胞の増殖能に関して差は認められなかった ( $P < 0.05$ )。

##### ②ヒト EGF の血管新生作用についての検討

白色家兎を用いた角膜実質内挿入実験では、 $1 \mu\text{g}$  以下のヒト EGF は角膜血管新生を起こさなかった。ニワトリ有精卵の尿漿膜を用いた実験系では basic fibroblast growth factor (bFGF, 塩基性繊維芽細胞増殖因子) は濃度依存性に新生血管を発生したのに対して、ヒト EGF では、血管の収束を生じたものの血管数を増加させず、コントロールとの間に有意差は示さなかった ( $P < 0.05$ )。以上のように、今回の血管新生モデルではヒト EGF は単独では血管新生作用を示さなかった。

##### ③ bFGF のヒト EGF による角膜血管新生作用におよぼす影響

$250 \text{ ng}$  bFGF を大腿部の筋肉内に挿入すると同時に、ヒト EGF および  $250 \text{ ng}$  牛胎児血清をコントロールとして角膜実質内に挿入した。その結果、コントロールを挿入した場合には角膜血管新生が生じなかったのに対して、ヒト

EGF では角膜血管新生が生じた。このように微量でも bFGF の影響下ではヒト EGF が角膜血管新生作用を示すことがわかった。

#### ④海面活性剤のヒト EGF による角膜血管新生作用に及ぼす影響

臨床応用の至適濃度と考えられている、 $20\mu\text{g/ml}$  ヒト EGF 点眼を正常角膜に点眼した場合の 5 分後、60 分後の全角膜実質内ヒト EGF 量はそれぞれ 2.0 ng, 1.8 ng, 角膜上皮欠損眼ではそれぞれ 40.5 ng, 4.5 ng であった。したがって、②の結果と考えあわせるとヒト EGF 単独で点眼薬を作成した場合、角膜血管新生の問題はないと考えられる。しかしながら、実際にヒト EGF を点眼薬として臨床応用するためには容器への吸着が問題となり、吸着防止剤の混入が必要不可欠となる。そこで、吸着防止剤の tween80 を取り上げ、tween80 存在下でのヒト EGF の角膜血管新生作用について検討してみた。100 ng ヒト EGF のみ、ヒト EGF tween80 を添加したもの、tween80 のみをそれぞれ 4 羽 8 眼の角膜実質内に挿入したところ、ヒト EGF に tween80 を添加したものは全例に角膜血管新生を生じた。このように、ヒト EGF 単独では角膜血管新生は生じないが、EGF になんらかの要素が加わった場合、角膜輪部血管からの血管内皮細胞の発芽がおこり、角膜血管新生が生じることがわかった。

#### (総括)

ヒト EGF 単独では、正常角膜上皮細胞の過剰増殖、角膜血管新生の可能性は低く臨床応用に問題はないと思われる。しかし、角膜輪部血管がなんらかの要素により発芽するようなことがあれば、EGF は血管内皮細胞の遊走・増殖に積極的に働き、角膜血管新生を強く促す可能性がある。今後、臨床応用上でこの点に留意して点眼薬の開発をすすめる、また使用する必要があると考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

近年、純度の高い遺伝子組み換えヒト epidermal growth factor (EGF) の大量生産が可能となり、眼科領域でも特に眼表面の創傷治癒を促進する薬剤として臨床応用されつつある。本研究は、ヒト EGF 点眼剤が臨床応用される上で最も問題となる、①上皮欠損のない場合の角膜上皮細胞の増殖能に及ぼす影響、②角膜血管新生に及ぼす影響について検討したものである。

研究の結果、まず白色家兎角膜を用いた実験から、角膜上皮欠損のある場合には上皮細胞の増殖を促進するが上皮欠損のない場合には増殖能に影響を与えないことがわかった。また、白色家兎角膜および鶏の尿漿膜を用いた実験から、ヒト EGF 単独では血管新生作用は認められないが、basic fibroblast growth factor が共存した場合には角膜血管新生が発生することがわかった。さらに臨床で点眼薬として開発する場合に必要な不可欠となる容器の吸着防止剤の 1 つである tween80 が共存した場合にも角膜血管新生が発生することから、点眼薬として開発していくためには吸着防止剤の選択に十分な注意が必要であることがわかった。本研究はヒト EGF の臨床応用においてきわめて重要な研究であり学位に値すると思われる。