

第 101 回 日本眼科学会総会 宿題報告 II

眼の細胞生物学

神経麻痺性角膜症

—角膜知覚の臨床的意義に関する細胞生物学的研究—

西 田 輝 夫

山口大学医学部眼科学教室

共同研究者

中村 雅胤, 近間泰一郎, 大藤 圭子, 長野 敬, 田中 俊朗, 榎 美穂

(山口大学医学部眼科学教室)

Ted W Reid, Sandra M Brown

(Department of Ophthalmology and Visual Sciences, Texas Tech University)

Christopher J Murphy

(Department of Surgical Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin)

Mark J Mannis

(Department of Ophthalmology and Visual Sciences, University of California Davis)

研究協力者

上野 一郎, 原 久美子, 武内 清枝, 末富美千代, 内田 隆子

(山口大学医学部眼科学教室)

要 約

神経麻痺性角膜症(neurotrophic keratopathy)は, 角膜知覚を司る三叉神経が障害され角膜知覚が低下した時に生じ, 角膜上皮の創傷治癒の遅延による種々の上皮障害と角膜実質の融解が臨床的な特徴である。神経麻痺性角膜症の治療には, 角膜上皮を保護する療法や fibronectin 点眼療法などが有効であるとされているが確実な治療法はない。本研究では, 知覚神経伝達物質である substance P の角膜上皮細胞に対する作用の細胞生物学的研究を通じて, 角膜知覚の生理的意義を考察し, さらに神経麻痺性角膜症の病態の解明と新しい治療法を開発することを目的とした。Substance P は tachykinin family の一つで, 11 個のアミノ酸から成るペプチドである。家兎角膜器官培養を用いた研究から, substance P 単独では角膜上皮の伸長には何ら影響を認めないが, insulin-like growth factor-1(IGF-1)が共存すると substance P および IGF-1 の濃度に応じて角膜上皮の伸長が促進された。他の神経伝達物質(acetylcholine,

norepinephrine, serotonin など)や tachykinins(neurokinin A, eledoisin など)では IGF-1 との相乗作用は観察されず, substance P に特異的な作用であることが明らかとなった。Substance P は tachykinin family に対する受容体(NK-1, NK-2 および NK-3)と結合することにより, その生理作用を発現する。Substance P と IGF-1 の相乗作用には, これらのうち NK-1 受容体が関与することを明らかにした。さらに, IGF-1 は角膜上皮細胞の substance P 受容体の結合定数や結合部位数に何ら影響を与えず, この相乗作用は受容体レベルでの反応ではないことが明らかとなった。外界からの信号や刺激に反応して, 細胞内の信号伝達経路が活性化され, 種々の生理作用が発現する。Substance P と IGF-1 による角膜上皮伸長促進反応は, 細胞内信号伝達経路である protein kinase C および tyrosine kinase の阻害剤により相乗作用が抑制され, これらの二つの経路が積極的な意義を有することが明らかとなった。細胞外マトリックス

別刷請求先: 755 山口県宇部市小串 1144 山口大学医学部眼科学教室 西田 輝夫
(平成 9 年 8 月 18 日受付, 平成 9 年 9 月 24 日改訂受理)

Reprint requests to: Teruo Nishida, M.D., D.Sc. Department of Ophthalmology, Yamaguchi University School of Medicine, 1144 Kogushi, Ube-shi, Yamaguchi-ken 755, Japan

(Received August 18, 1997 and accepted in revised form September 24, 1997)

に対する受容体である integrin を介して、角膜上皮細胞と fibronectin などの細胞外マトリックスとの接着が角膜上皮創傷治癒では重要な役割を演じており、interleukin 6 および表皮成長因子(EGF)が角膜上皮細胞での integrin の発現を促し、角膜上皮創傷治癒を促進することをこれまで報告してきた。Substance P および IGF-1 を添加して角膜上皮細胞を培養すると、integrin $\alpha 5$ および $\beta 1$ の messenger RNA (mRNA) 発現が促進していることが reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法により明らかとなり、実際に fibronectin マトリックスに接着する角膜上皮細胞数も増加した。したがって、substance P と IGF-1 による角膜上皮伸長促進作用の機序の一つとして integrin の発現の促進が考えられる。Tachykinin family は、一般に C 末端に phenylalanine-任意のアミノ酸-glycine-leucine-methionine amide (FXGLM) のアミノ酸配列を有することが共通の構造である。IGF-1 との相乗作用に必要な substance P の最小構造を検討すると、C 末端の 4 個のアミノ酸配列を有するペプチドである phenylalanine-glycine-leucine-methionine amide (FGLM) では相乗作用を認めたが、構造的に類似の isoleucine-glycine-leucine-methionine amide (IGLM), valine-glycine-leucine-methionine amide (VGLM), tyrosine-glycine-leucine-methionine amide (YGLM), あるいは 3 個のアミノ酸配列である glycine-leucine-methionine amide (GLM) などのペプチドでは全く相乗作用が認められず、FGLM が最小必須アミノ酸配列であることが明らかとなった。これらの *in vitro* での研究成果に基づき、*in vivo* での角膜上皮創傷治癒に対する substance P と IGF-1 あるいは FGLM と IGF-1 の点眼の効果を検討すると、substance P と IGF-1 および FGLM と IGF-1 の点眼はともに角膜上皮欠損の再被覆を有意に促進することが認められた。実際に臨床的にも、

substance P と IGF-1 の点眼が家族性自律神経失調症 (Riley-Day 症候群) の症例で、角膜知覚の低下と涙液減少のために遷延化した上皮欠損を伴う神経麻痺性角膜症の角膜上皮欠損の修復に有効であった。さらに、substance P の最小必須アミノ酸配列である FGLM と IGF-1 の点眼が三叉神経麻痺による角膜上皮障害の治療に有効であった。Substance P と IGF-1 あるいは FGLM と IGF-1 の点眼療法の神経麻痺性角膜症に対する臨床的有用性について、今後症例を重ねて検討する必要がある。生体内で最も知覚の鋭敏な角膜において、知覚神経支配の重要性は臨床的に認識されていたが、本研究により知覚神経伝達物質である substance P が液性因子である IGF-1 と互いに協調的に作動し、角膜上皮の恒常性の維持や創傷治癒過程に積極的に関与していることが明らかとなった。現在の医学では神経を再生させることは困難であるが、神経伝達物質である substance P と IGF-1 を投与することにより、あたかも正常の神経支配があるかのような錯覚を角膜上皮細胞に与えることは可能であると考えられる。角膜ヘルペスや糖尿病などでしばしば経験する角膜知覚の低下した症例では、substance P の減少により角膜上皮細胞の細胞外マトリックスへの接着性などが障害され、その結果として種々の角膜上皮障害が生じることが神経麻痺性角膜症の病態の一つではないかと考えられる。神経麻痺性角膜症に対する根治的な治療法として、本研究により substance P (あるいは FGLM) と IGF-1 点眼療法の確立への第一歩が踏み出されたものとする。(日眼会誌 101: 948-974, 1997)

キーワード：神経麻痺性角膜症，神経伝達物質，Substance P, IGF-1, 細胞接着，角膜上皮，創傷治癒，Integrin, Focal adhesion kinase, Paxillin, Fibronectin, 角膜知覚

Neurotrophic Keratopathy —Studies on Substance P and the Clinical Significance of Corneal Sensation—

Teruo Nishida

Department of Ophthalmology, Yamaguchi University School of Medicine

Abstract

Neurotrophic keratopathy, which often follows damage to the trigeminal nerve, is clinically characterized by various types of epithelial disorders and melting of corneal stroma. To understand both the pathology of neurotrophic keratopathy and the physiological significance of corneal sensation, we investigated both the cellular and molecular functions of a sensory neurotransmitter, substance P, in

corneal epithelial cells. Our findings prompted us to try a new mode of treatment for neurotrophic keratopathy. Substance P, a member of the tachykinin family, is an 11-amino-acid peptide. In an organ culture system using rabbit corneas, substance P alone had no effect on corneal epithelial migration. In the presence of insulin-like growth factor-1 (IGF-1), however, substance P synergis-

tically facilitated corneal epithelial migration in proportion to the concentration of substance P or of IGF-1. Other neurotransmitters (acetylcholine, norepinephrine, serotonin etc.) or tachykinins (neurokinin A, eldoisin etc.) did not show this synergistic effect with IGF-1. Among receptors for the tachykinin family (NK-1, NK-2, or NK-3) only the NK-1 receptor system was involved in the synergistic effect of substance P and IGF-1 on corneal epithelial migration. IGF-1 affected neither the binding constant nor the number of sites of substance P receptors in corneal epithelial cells, suggesting that the synergistic effect was not regulated at the receptor level. Various extracellular signals activate the intracellular signal transduction system, thus amplifying specific biological functions. We found that the addition of inhibitors of protein kinase C or tyrosine kinase clearly inhibited the synergistic effect of substance P and IGF-1 on corneal epithelial migration, demonstrating that protein kinase C and tyrosine kinase are involved in the synergistic effect. During corneal epithelial wound healing, epithelial cells must attach to a provisional, extracellular fibronectin matrix. We previously reported that interleukin 6 and epidermal growth factor (EGF) facilitate corneal epithelial wound healing by activating the expression of fibronectin receptor (integrin). Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) revealed that substance P and IGF-1 increased expression of mRNA for integrins $\alpha 5$ and $\beta 1$ in cultured corneal epithelial cells and also increased the number of cells that attached to a fibronectin matrix. These findings strongly suggest that substance P and IGF-1 synergistically increase corneal epithelial migration by activating the expression of integrin. Tachykinins share a five amino acid sequence, phenylalanine-free amino acid-glycine-leucine-methionine amide (FXGLM), at the C-terminus. Studying substance P, we found that a four amino acid sequence at the C-terminus, FGLM, was the minimum amino acid sequence for the synergistic effect on corneal epithelial migration. Structurally similar tetrapeptides mimicking other members of the tachykinin family isoleucine-glycine-leucine-methionine amide (IGLM), valine-glycine-leucine-methionine amide (VGLM), tyrosine-glycine-leucine-methionine amide (YGLM), and the tripeptide glycine-leucine-methionine amide (GLM) did not have any synergis-

tic effect with IGF-1. Based on these findings *in vitro*, we investigated the effect of eye drops containing substance P plus IGF-1 or FGLM plus IGF-1 on the epithelial wound closure of rabbit corneas *in vivo*. Both combinations significantly facilitated corneal epithelial wound closure. In a clinical setting, the administration of substance P plus IGF-1 effectively treated corneal epithelial defects in a patient with Riley-Day syndrome, a disease in which corneal epithelial defects persist because of loss of corneal sensation and hypolacrimation. In a patient with neurotrophic keratopathy due to trigeminal nerve paralysis following surgery, eye drops containing FGLM plus IGF-1 eliminated superficial punctate staining. Although we have treated only two cases, these clinical results encourage further development of such eye drops for the treatment of various corneal epithelial disorders resulting from neurotrophic keratopathy. The long-recognized importance of the trigeminal nerve to the maintenance of the corneal epithelium is partially clarified by our finding that a neural factor (substance P) acts synergistically with a humoral factor (IGF-1) to maintain the integrity of the corneal epithelium by up-regulating fibronectin receptors. Thus in neurotrophic keratopathy the lost or diminished corneal sensation may signal an insufficiency of substance P resulting in inadequate cell adhesion to the fibronectin matrix. Both prophylactic treatment and fibronectin eye drops have been reported to promote resurfacing in epithelial disorders, but there is no specific treatment for neurotrophic keratopathy. Current medicine cannot regenerate a damaged trigeminal nerve, but the administration of substance P and IGF-1 might send messages to epithelial cells as if they were innervated. Treatment with eye drops containing substance P plus IGF-1 or FGLM plus IGF-1 may shed light on future approaches to treatment of neurotrophic keratopathy. (J Jpn Ophthalmol Soc 101: 948-974, 1997)

Key words: Neurotrophic keratopathy, Neurotransmitter, Substance P, Insulin-like growth factor-1 (IGF-1), Cell attachment, Corneal epithelium, Wound healing, Integrin, Focal adhesion kinase, Paxillin, Fibronectin, Corneal sensation

I 緒 言

角膜疾患の病態は、遺伝性のものから感染症まで極めて多彩で、治療には内科的な薬物療法と外科的な手術療法を適切に選択することが必要である。抗生物質や抗ウイルス剤などの抗微生物剤の開発や、角膜移植術などの外科的治療法の進歩により、多くの角膜疾患を今日治療することができるようになってきた。一方、細胞生物学や分子生物学の進歩により、我々は角膜の恒常性の維持機構や創傷治癒過程などに関与する因子をより深く理解することができるようになってきた。角膜上皮の幹細胞 (stem cell) が輪部に存在すること^{1)~3)}、XYZ theory で説明される角膜上皮の動態⁴⁾、あるいは角膜上皮創傷治癒を調節する因子である表皮成長因子 (EGF) や interleukin 6 などのサイトカインの作用や fibronectin やヒアルロン酸などの細胞外マトリックスの作用の解明などが、角膜の生理や病理の理解に大きく貢献した (表 1)。

我々は従来角膜上皮創傷治癒の機序における細胞外マトリックス、特に fibronectin-integrin 系の役割について研究を重ねてきた。これらの研究を通じて角膜知覚が低下している症例にしばしば遷延性角膜上皮欠損が生じることを臨床的に経験した。種々の角膜疾患の鑑別に当たり、角膜知覚検査が重要な位置を占めていることを経験している。このことは、角膜への知覚神経支配が角膜、特に上皮の構造と機能の維持に重要な役割を演じていることを示している。しかしながら、角膜に対する知覚神経の

生理的意義や機能に関しては未だ十分には解明されていない。

本研究では、知覚神経系の神経伝達物質である substance P の角膜上皮に対する生理作用を明らかにし、神経麻痺性角膜症の病態のより深い理解とその治療の可能性を模索することを目的とした。

II 神経麻痺性角膜症

我々は fibronectin など角膜上皮創傷治癒を促進する薬剤の研究の過程で、fibronectin 点眼療法の適応となる遷延化した角膜上皮欠損の症例では、角膜知覚が低下している例が多いことに気づいた。角膜の知覚を司る三叉神経が、中枢、神経節あるいは末梢のどのレベルで傷害されても、角膜知覚は低下し、角膜、特に上皮に種々の病変が生じることが、古くは 1824 年に Magendie⁵⁾により最初に報告されている。また、1894 年には三叉神経痛に対する外科手術の重篤な合併症の一つとして角膜障害が報告⁶⁾されている。このように 170 年以上前の 19 世紀から、多くの先人たちは、臨床的に三叉神経が傷害され知覚が低下している症例では、多彩な角膜障害が生じることを経験し報告してきた。Neurotrophic keratitis の臨床的特徴は、結膜充血、虹彩炎、角膜浮腫による stippled haze、水疱形成、点状表層角膜症 (SPK) などの種々の角膜上皮障害であり、上皮欠損部は乾燥しており混濁している⁷⁾⁸⁾。最近の Krachmer らの教科書によると、neurotrophic keratitis を三期に分け、それぞれの段階での特

表 1 角膜上皮創傷治癒に関する成長因子、サイトカインおよび細胞外マトリックス

	細胞・器官培養	In vivo 動物実験	臨 床
成長因子			
EDGF	NR	↑ 238) 239)	NR
EGF	↑ 128) 240) -243)	↑ 244) -247)	↑ 248) 249)
FGF	↑ 250) 251)	↑ 252) -255)	NR
HGF	↑ 256)	NR	NR
KGF	↑ 256) 257)	↑ 258)	NR
MGF	NR	↑ 259) 260)	NR
PDGF	↑ 261)	↑ 262)	NR
TGF-β	↑, ↓ 240) 263)	NR	NR
サイトカイン			
Interleukin 1	↑ 264)	NR	NR
Interleukin 6	↑ 191)	↑ 265)	NR
細胞外マトリックス			
Fibronectin	↑ 127) 128) 266) -268)	↑ 130) 131)	↑ 133) 134) 135) 140) 269)
ヒアルロン酸	↑ 150) 153) 270)	↑ 131)	↑ 159)
Laminin	↑ 266)	NR	NR
Collagen type IV	↑ 266) 271) 272)	NR	NR
Vitronectin	NR	↑ 273)	NR

↑：促進，↓：抑制，NR：報告なし
EDGF：eye-derived growth factor, EGF：epidermal growth factor, FGF：fibroblast growth factor, HGF：hepatocyte growth factor, KGF：keratinocyte growth factor, MGF：mesodermal growth factor, PDGF：platelet-derived growth factor, TGF-β：transforming growth factor-β NR：not reported

徴と治療の原則が詳細に記載されている⁹⁾。Jaffe⁷⁾は neurotrophic keratitis の治療として、角膜上皮障害の発生を予防することが最善の治療法であり、強制閉眼が有用であると述べている。現在でも確実な治療法はなく、神経麻痺性角膜症は治療に苦慮する疾患の一つである。

角膜知覚が低下したために生じる多彩な病像に対し

表2 神経麻痺性角膜症の所見と原因

神経麻痺性角膜症の所見	
・点状表層角膜症 ・再発性角膜びらん ・遷延性角膜上皮欠損 ・角膜潰瘍	
神経麻痺性角膜症の原因	
・ヘルペス性角膜炎 (HSV, VZV) ・脳腫瘍, 聴神経腫瘍 ・眼科手術後 (角膜移植術・白内障手術など) ・角膜熱傷, 角膜化学熱傷 ・中毒性角膜症 (点眼麻酔剤・β-ブロッカーなど) ・先天性 (Adie 症候群, 家族性自律神経失調症など) ・角膜ジストロフィ (格子状など) ・糖尿病	
HSV : herpes simplex virus, VZV : varicella zoster virus	

て, neuroparalytic keratitis, neurotrophic ulcer など種々の病名が用いられてきたが, 一つの疾患群として神経麻痺性角膜症 (neurotrophic keratopathy) という疾患概念が必要である。神経麻痺性角膜症では, その基本的な原因は角膜知覚の低下にあるが, 極めて多彩な臨床所見が表現される (表2)^{9)~19)}。角膜上皮の最表層に点状のフルオレセインの染色が観察される SPK を生じる例や, さらに重篤な症例では, 角膜上皮全層が欠損し再被覆が生じない遷延性角膜上皮欠損となり, 最終的に実質の融解が生じ角膜潰瘍となる例も経験する。これらの神経麻痺性角膜症の病態は, 基本的に角膜上皮創傷治癒の遅延であると考えられる。角膜知覚が低下する原因として最も頻度が高いのは, 好神経ウイルスである単純ヘルペスウイルスや帯状疱疹ウイルスの感染によるヘルペス性角膜炎であり^{20)~25)}, 実際に臨床上角膜知覚の低下が鑑別診断の大きなポイントである。一方, 角膜内の神経が切断されるような眼科手術 (角膜移植術など) の後^{26)~35)}, 角膜熱傷やアルカリ熱傷による神経線維を含む角膜強膜組織の壊死, 点眼麻酔剤などの頻用による中毒性角膜症などにおいても角膜知覚の恒常的な低下がしばしば認められる^{36)~43)}が, これらの症例では三叉神経線維の末梢での障

表3 Tachykinin family のアミノ酸配列

Tachykinins	Phe-Xaa-Gly-Leu-Met-NH ₂
Substance P	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂
Neurokinin A	His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂
Neurokinin B	Asp-Met-His-Asp-Phe-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂
Physalaemin	pGlu-Ala-Asp-Pro-Asn-Lys-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH ₂
Eledoisin	pGlu-Pro-Ser-Lys-Asp-Ala-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH ₂
Kassinin	Asp-Val-Pro-Lys-Ser-Asp-Gln-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂

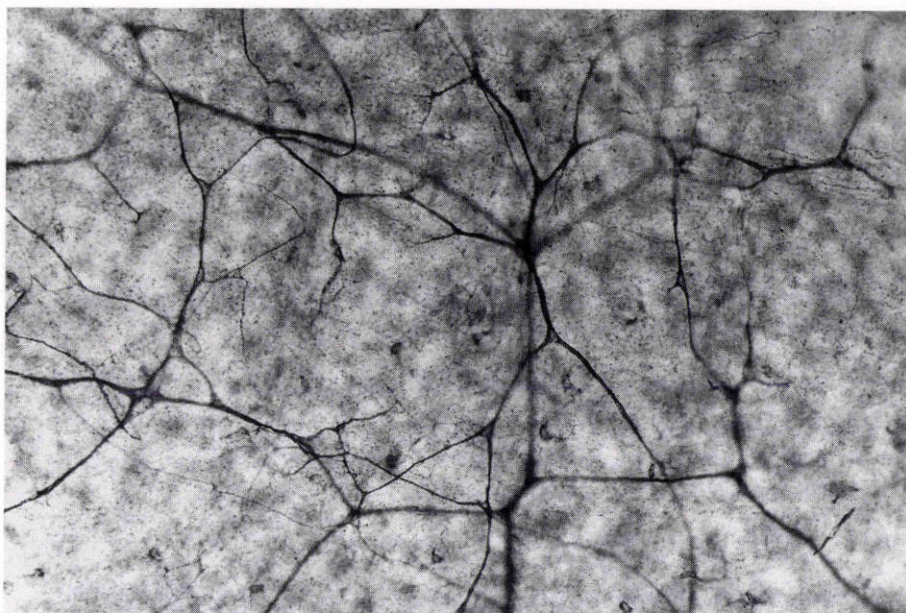


図1 角膜における神経線維の分布 (ラット, 塩化金染色)。角膜実質内の異なる深さに神経線維が網状に分布している。



図2 角膜における substance P の局在(ラット, 蛍光抗体法, laser confocal microscope).

Substance P に対する黄緑の特異蛍光が線状に実質内に観察される。

害であると考えられる。脳腫瘍や聴神経腫瘍に対する手術に伴う三叉神経麻痺^{44)~51)}, さらには先天性の家族性自律神経失調症など⁵²⁾では, 三叉神経核あるいは神経節レベルでの障害により角膜知覚が低下する。糖尿病患者においても, 角膜知覚の低下がしばしば認められ, 糖尿病角膜症の病態に知覚神経が関与している可能性が示唆される^{53)~61)}。

角膜が透明性を維持し, 眼球の窓としての役割を果たすためには, 角膜そのもののみならず, 角膜を取り巻く環境の役割を知ることが必要である。角膜は, 体の中で最も知覚が鋭敏な組織である。正常角膜には血管が存在しないが, 三叉神経による神経支配の調節とともに, 涙液, 前房水, あるいは輪部系蹄血管や結膜からの液性因子による細胞機能の調節を受けており, “角膜は血液由来の液性成分の中に浮かんでいる神経を伴った組織である”と考えべきである。したがって, 角膜の生理や病態を考えるときには, 神経系因子による調節機構と, 涙液などに由来する液性因子による調節機構の両者の働きを考慮せねばならない。

角膜への神経支配は, 三叉神経の第1枝である眼神経がさらに長毛様体神経となり, 角膜輪部で輪状の plexus を形成し角膜実質中を放射状に分布する。角膜実質中で無髄となり, その後実質から上皮の方に向かって前方に進み, 上皮下で再び plexus を形成し微細な神経終末を角膜上皮層に分布する。角膜における神経終末の密度は 1 mm^2 当たり約 6,500 と極めて多く, その直径は $0.5\sim 5\text{ }\mu\text{m}$ の繊細な無髄神経である(図1)^{62)~75)}。角膜内には substance P, calcitonin gene-related peptide (CGRP), acetylcholine などの神経伝達物質の存在が免疫組織学的な研究や生化学的な研究により明らかにされている(図2)^{76)~101)}。

Substance P は, 1931 年に von Euler ら¹⁰²⁾によって, ウマの脳と小腸から血圧降下と腸管を収縮させる因子と

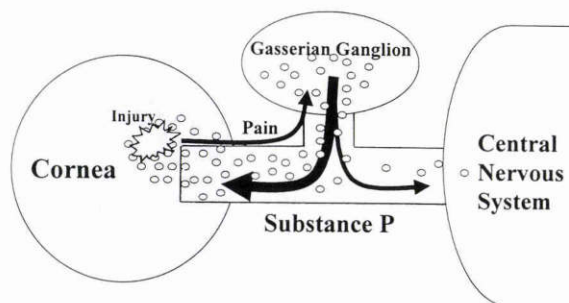


図3 角膜創傷治癒における substance P.

して初めて報告された。Substance P は, 知覚神経の伝達物質であり 11 個のアミノ酸から成る神経ペプチドで, tachykinin family の一つである(表3)^{103)~106)}。一方, 神経終末から分泌された substance P は速やかに enkephalinase で分解される。

角膜が障害されると, その刺激は三叉神経節に伝えられ, 電気的な action potential の変化として中枢に伝達され, 痛みとして感じる。刺激に反応して, 三叉神経節から substance P が遊離され, action potential を調節すると考えられているが, 刺激に反応して神経節から遊離した substance P のうち, 約 20% が中枢に向かい, 約 80% が逆に末梢に向かうと考えられている。Substance P は, 中枢のみならず, 末梢で重要な生理作用を有していると考えられ, いわゆる neurotrophic factor であると考えられてきた(図3)。

III 角膜上皮創傷治癒機序の研究

外界の変化を認識し生体の生理的機能や構造のみならず, 精神神経的な安定性(恒常性)を維持するために, 多くの感覚器の中でも視覚情報が極めて重要な位置を占めている。角膜は眼球の最前部に位置し, 水晶体とともにレンズ系としての役割を演じている。角膜に要求される最も重要な生理機能は, 透明で外界の光を完全に眼内に導入することと, 網膜へ正確に焦点を合わせるために適切な屈折力を有することである。しかしながら, 角膜は外界に直接面しており, その解剖学的な位置より極めて外界の変化の影響を受けやすく, しばしば角膜, 特にその表面である上皮に障害が生じる。幸いなことに, これら外界からの侵襲に対して極めて速やかに反応し, 正常の角膜では上皮欠損は短時間で修復される。しかしながら, 感染症(特に角膜ヘルペスなど)や糖尿病あるいは慢性関節リウマチなどの全身疾患を有する例では角膜上皮創傷治癒が遅延する^{12)22)48)107)~115)}。

正常角膜では, 上皮下の基底膜部に主として laminin や collagen type IV が存在する。角膜上皮の欠損が生じると, 欠損部に fibronectin が出現する^{116)~118)}。残存している上皮細胞が, この一時的な基底膜である fibronectin マトリックスの上に接着し, 移動することで創傷治癒が開始される(角膜上皮創傷治癒第一相, 細胞移動期)。この

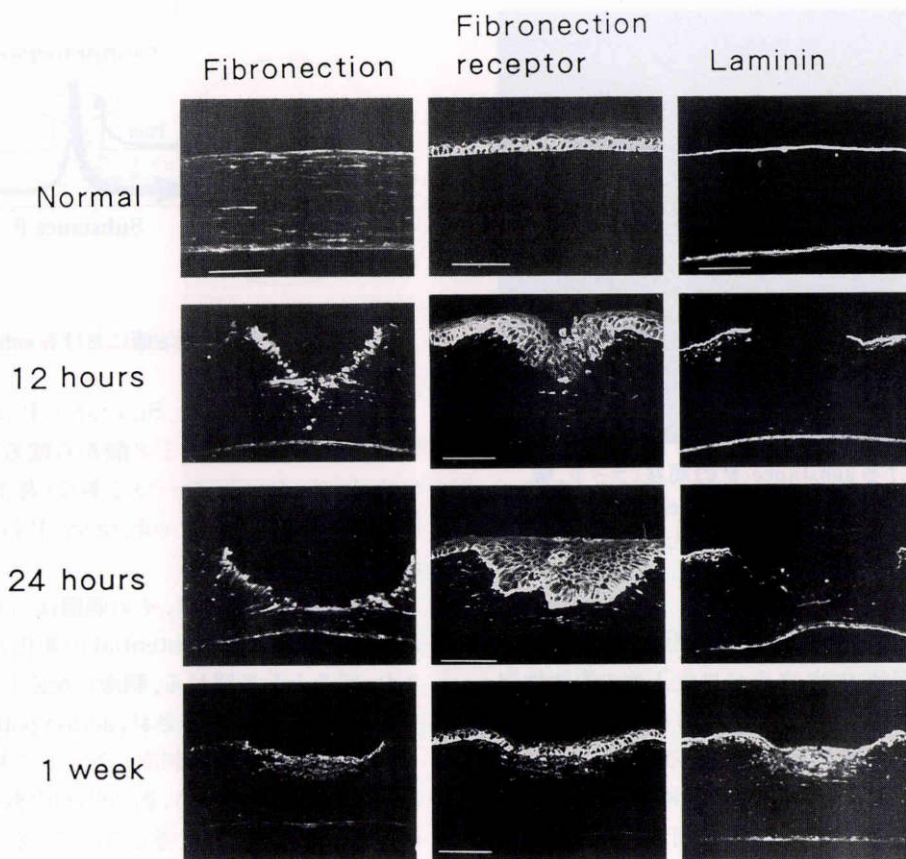


図4 正常角膜と障害角膜における fibronectin, fibronectin receptor, laminin の局在(ラット, 蛍光抗体法)¹¹⁸⁾.
バーは 100 μ m.

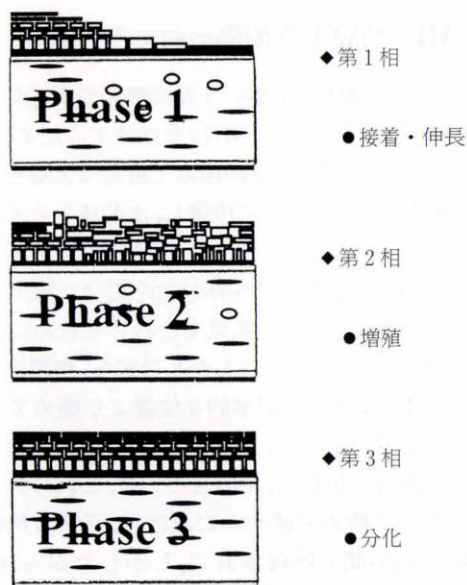


図5 角膜上皮創傷治癒機転.

時, 活動的な角膜上皮細胞において, fibronectin 受容体である integrin $\alpha 5 \beta 1$ の発現が亢進している(図4). 一層の上皮細胞で欠損部が被覆されると, 角膜上皮細胞は増殖を開始し, 上皮の厚みが増加する(第二相, 細胞増殖期). その後, 上皮細胞は分化し, 正常角膜上皮で認められるような整然とした層構造が形成され, 創傷治癒が完成する(第三相, 細胞分化期)(図5)^{119)~122)}. このように,

角膜上皮の創傷治癒過程の第一相である上皮細胞の接着や伸長の作動システムとして fibronectin-integrin 系が極めて重要な役割を演じている. 角膜のみならず皮膚の表皮の創傷治癒においても, また性周期に伴う子宮内膜上皮の変化においても fibronectin-integrin 系が中心的な役割を演じており^{123)~126)}, 組織や臓器の違いを乗り越えて外胚葉由来の上皮・表皮系細胞での創傷治癒に共通の機序が存在することは極めて興味のあることである.

前述のように角膜上皮欠損は自発的に速やかに修復することより, 原因のいかんにかかわらず上皮欠損の治療の原則として粘性点眼剤, 人工涙液, 油性眼軟膏, 治療用コンタクトレンズ装用あるいは圧迫眼帯などの角膜を保護する目的の治療法で角膜上皮創傷治癒が自然に進行するのを待つしかなかった. しかしながら, これらの治療法に反応しない上皮欠損の症例がある. 角膜上皮創傷治癒の機序に関する細胞生物学的な研究により, fibronectin, ヒアルロン酸や EGF などの生物学的に活性を有する物質が明らかとなり, このような遷延性角膜上皮欠損に対する治療に応用されてきた.

接着性糖蛋白質である fibronectin が角膜上皮欠損部に出現し, 角膜上皮創傷治癒に重要な役割を演じていることが報告^{116)~118)}された. 実際に fibronectin の添加により角膜器官培養において角膜上皮の伸長が促進されること^{127)~129)}, また *in vivo* での角膜上皮創傷治癒が fi-

bronectin 点眼により促進されること¹³⁰⁾¹³¹⁾などを我々は明らかにした。そこで、患者自身の血液から短時間で精製した autologous な fibronectin¹³²⁾を点眼し、角膜ヘルペス後などに認められる遷延性角膜上皮欠損が2週間以内に完全に再被覆化することを報告¹³³⁾¹³⁴⁾した。さらに、fibronectin 点眼により外傷後の反復性角膜びらん¹³⁵⁾の再発が防止できることを報告¹³⁵⁾した。その後の臨床研究により、fibronectin 点眼の有用性が報告^{136)~144)}されている。

一方、ヒアルロン酸はその粘性を利用して内眼手術時の手術補助剤として用いられてきたが^{145)~148)}、生物学的な機能として fibronectin と結合して角膜上皮創傷治癒を促進することが明らかとなった^{122)131)149)~154)}。臨床的にも種々の角膜上皮障害の治療に有効であることが報告^{155)~159)}され、現在では厚生省の承認を得て角膜上皮障害治療薬として広く用いられている。このように、細胞生物学的研究の成果が実際に臨床に応用され、fibronectin 点眼やヒアルロン酸点眼などの角膜上皮修復を積極的に促進する治療法が開発された。

IV Substance P の細胞生物学的研究

角膜の構造と機能の維持に三叉神経などの神経系が重要な役割を演じていることを認識し、主として三叉神経がどのように角膜、特に角膜上皮細胞に作用しているかの研究が多く、先人たちにより行われてきた。Sigelman¹⁶⁰⁾は、三叉神経をジアテルミー凝固破壊して作製した神経麻痺性角膜症のラットにおいて、角膜上皮の創傷治癒活性は変化しないものの角膜上皮細胞の分裂が約20%低下していることを明らかにし、三叉神経が角膜上皮細胞の機能の制御に関与していることを報告した。三島¹⁶¹⁾¹⁶²⁾は三叉神経が切断されても角膜に加えられた外傷は透明治癒するが、上皮の修復がやや遅延しており、上皮細胞の脱落の増加と増殖の低下が原因である可能性を示した。一方、杉浦¹⁶³⁾は三叉神経切断家兎において、電子顕微鏡を用いた研究から、角膜上皮細胞内や上皮細胞間の支持機構の障害を示し、三叉神経が角膜上皮の修復過程において細胞の形態学的分化の過程を調節していることを報告した。Fujita¹⁶⁴⁾は capsaicin を新生マウスに投与した場合、角膜内の神経線維が退行変性し角膜上皮層の構造が乱れることを報告した。その後も、三叉神経の傷害による角膜上皮細胞の反応性について多くの研究がなされており、角膜上皮の細胞内の acetylcholine 減少による細胞増殖の低下、細胞層の菲薄化、細胞間の tight junction の障害や細胞間隙の拡大による透過性亢進、角膜上皮細胞と基底膜の接着低下による創傷治癒の遅延などが報告^{17)68)165)~173)}されている。このように、臨床的にもまた動物を用いた研究からも三叉神経の障害が角膜上皮の障害を引き起こし、三叉神経が角膜上皮の構造や機能の維持に対してきわめて重要な役割を果たしてい

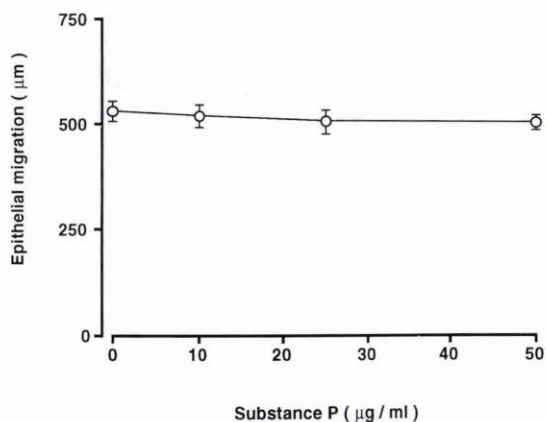


図6 角膜上皮伸長に対する substance P の影響。
家兎角膜片を24時間種々の濃度の substance P を添加した培養液で器官培養した。Substance P 単独では角膜上皮の伸長に影響を与えなかった¹⁷⁴⁾¹⁷⁵⁾。

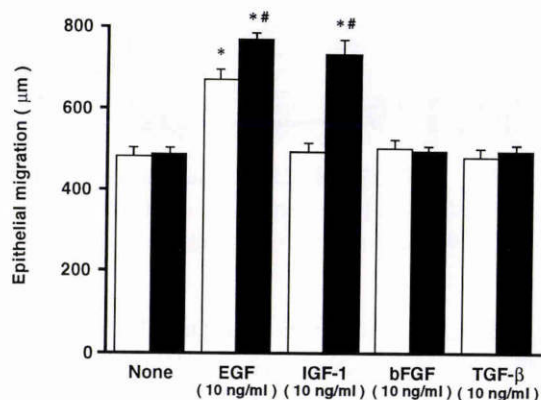


図7 角膜上皮伸長に対する substance P と各種成長因子の相乗作用。

家兎角膜片を24時間 substance P (50 μg/ml) と種々の成長因子 (10 ng/ml) を添加した培養液で器官培養した。Substance P, IGF-1, bFGF, TGF-β は単独では角膜上皮の伸長に影響を与えなかった。EGF はそれ自身伸長を促進した。Substance P は IGF-1 および EGF との相乗作用が認められた¹⁷⁴⁾¹⁷⁵⁾。□: None, ■: Substance P (50 μg/ml), *: p<0.01 vs None, #: p<0.01 vs without substance P

IGF-1: insulin-like growth factor-1

bFGF: basic fibroblast growth factor

TGF-β: transforming growth factor-β

EGF: epidermal growth factor

ることが明らかとなった。しかしながら、実際にどのような機序で作用しているのかについては未だ解明されていない。角膜上皮創傷治癒過程において、作動系として fibronectin-integrin 系が基本的に重要であることが従来の研究から明らかにされたが、これらの研究成果をさらに発展させ、このような角膜上皮の創傷治癒過程が神経系因子によりどのように制御されているのかについて、細胞生物学的あるいは分子生物学的な手法を用いて研究した。

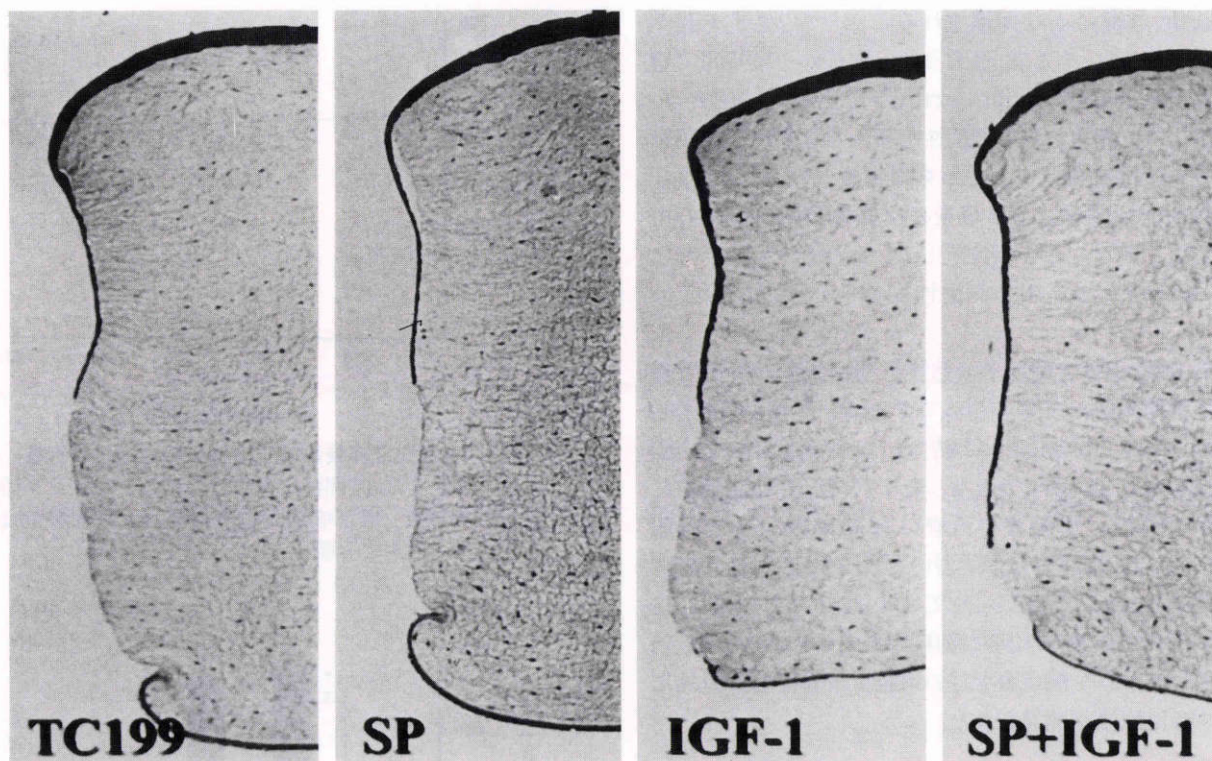


図8 角膜上皮伸長に対する substance P と IGF-1 の相乗作用 (ヘマトキシリン・エオジン染色, 培養 24 時間後). Substance P (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) あるいは IGF-1 (10 ng/ml) を単独に添加しても対照 (TC 199) と比較して角膜上皮の伸長に差異は認められなかった. Substance P と IGF-1 をともに添加すると伸長は促進された.

1. 角膜上皮伸長に対する substance P の作用

角膜上皮に対する substance P の生理作用を調べる目的で, 我々が先に開発した角膜器官培養法¹²⁷⁾を用いて, 角膜上皮創傷治癒の第一相である角膜上皮の伸長に対する substance P の効果を検討した¹⁷⁴⁾¹⁷⁵⁾.

Substance P を種々の濃度で培養液に添加しても角膜上皮の伸長に変化は認められず, substance P そのものでは角膜上皮創傷治癒に影響を及ぼさないと考えられた (図 6). 角膜は前述のごとく涙液や前房水に接しており, これらに含まれる液性の因子によっても角膜上皮創傷治癒が制御されている可能性がある. 実際, 涙液中には EGF, interleukin 1 などの成長因子やサイトカインが含まれていることが報告^{176)~190)}されている. そこで, 神経由来の因子である substance P がこれらの液性因子と協調して制御機構に関与している可能性を考え, substance P と種々の成長因子とを同時に添加して角膜上皮の伸長への作用を検討した. Substance P は検討した成長因子のうち, insulin-like growth factor-1 (IGF-1) および EGF が共存すると相乗的に角膜上皮の伸長を有意に促進した (図 7, 8). 我々は, 細胞外マトリックスである fibronectin や炎症性サイトカインの一つである interleukin 6 が角膜上皮の伸長を促進することを報告¹²⁷⁾¹²⁹⁾¹⁹¹⁾したが, substance P は fibronectin や interleukin 6 あるいは他の細胞外マトリックスやサイトカインとはこのような相乗作用を示さなかった (図 9). Substance P と

IGF-1 の相乗作用は各々の濃度に依存しており (図 10), さらに substance P を分解する酵素である enkephalinase を添加すると相乗作用は認められなかった. このように, 神経系因子である substance P と液性因子である IGF-1 の双方により角膜上皮創傷治癒の第一相である上皮伸長の過程が制御されていることが明らかとなった.

Substance P とともに相乗的に角膜上皮の伸長を促進する IGF-1 は成長因子の一つで, アミノ酸 70 個から成る分子量約 7,600 のポリペプチドである. 従来ソマトメジン C として知られていたが, insulin と類似した生理作用を有することや insulin receptor と結合することなどから, 現在では IGF-1 と呼ばれ, 種々の細胞の増殖や分化を促進する作用が報告されている^{192)~198)}. IGF-1 は 4 つの domain から構成され, A domain と B domain は二つのジスルフィド結合で結ばれており, また A domain の中にも一つの SS 結合が存在する (図 11). A domain と B domain の間には C domain が存在しており, IGF-1 の構造は insulin の前駆体である proinsulin ときわめてよく類似している. IGF-1 および proinsulin のアミノ酸配列を比較すると, A domain と B domain で極めて homology が高く, 同一の遺伝子に由来していると推測される¹⁹⁴⁾¹⁹⁷⁾. そこで, insulin にも IGF-1 と同様に substance P との相乗作用が認められるかについて検討したが, insulin と substance P との相乗作用は認めら

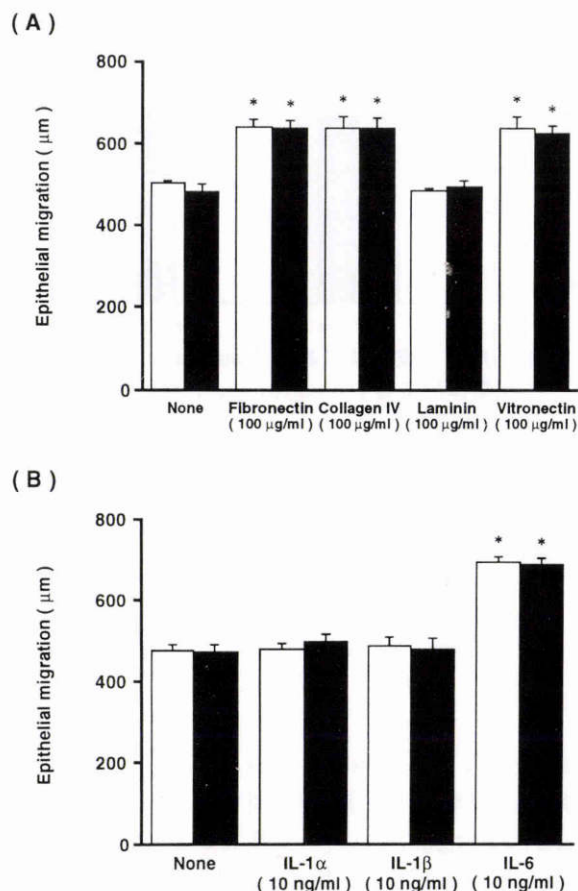


図 9 角膜上皮伸長に対する substance P と各種細胞外マトリックス(100 μg/ml, A)あるいはサイトカイン(10 ng/ml, B)の影響(24 時間培養). Substance P は, fibronectin, laminin, collagen type IV, vitronectin, interleukin 1, interleukin 6 との相乗作用は認めなかった¹⁷⁵⁾. □: None, ■: Substance P (50 μg/ml), *: p<0.01 vs None

れず, substance P との相乗作用は IGF-1 に特異的であることが明らかとなった. 一方, 他の tachykinin family や他の神経伝達物質を検討したところ, substance P のみ IGF-1 との相乗作用が認められた(図 12).

2. 角膜上皮細胞における substance P 受容体

細胞の機能を調節・制御する種々の生物学的シグナルは, 細胞表面の受容体と結合することにより細胞内の信号伝達経路を増幅し, 最終的に角膜上皮細胞の接着や伸長に関与する作動系の因子が活性化され, 生理活性を発現する. Substance P と IGF-1 には, それぞれに特異的な受容体が存在する^{103)~106)197)199)~205)}. したがって, substance P 単独あるいは IGF-1 単独では角膜上皮の伸長に影響を与えないのに, 双方が共存する時のみ角膜上皮の伸長が促進される機序として, 受容体レベルでの cross talk か細胞内信号伝達系での cross talk が考えられる. そこで, 角膜上皮細胞における substance P と IGF-1 の受容体について検討した.

Substance P の受容体として, NK-1, NK-2, NK-3 の三つが存在する^{103)~106)199)200)}. それぞれの受容体は ta-

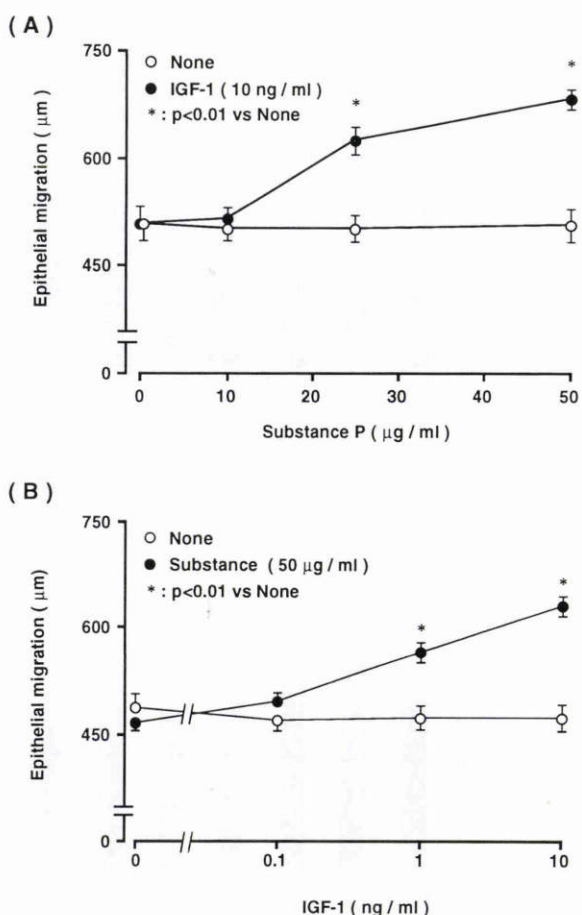


図 10 角膜上皮伸長に対する substance P と IGF-1 の相乗作用.

家兎角膜片を 24 時間 substance P (0-50 μg/ml, A) と IGF-1 (0-10 ng/ml, B) を培養液に添加して器官培養した. Substance P と IGF-1 の相乗作用は各々の濃度に依存して認められた¹⁷⁴⁾.

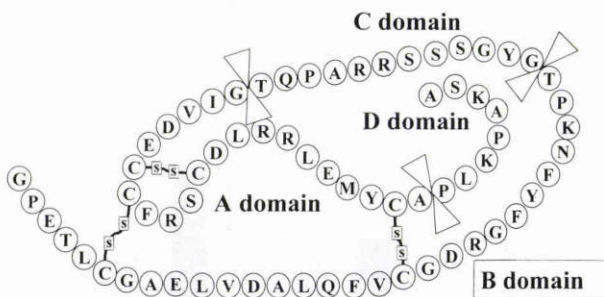


図 11 IGF-1 の分子構造.

chykinin family のメンバーである substance P, neurokinin A あるいは neurokinin B などそれぞれに対して異なる親和性を有している. Substance P と IGF-1 の相乗作用が substance P 受容体のうち, どの subtype を介しているのかを器官培養の実験系で上皮の伸長を指標に検討した²⁰⁶⁾. NK-1, NK-2, NK-3 それぞれの agonist は, 単独では角膜上皮の伸長に何の影響も与えなかった. IGF-1 が共存しても NK-2 agonist あるいは NK-3 agonist は角膜上皮の伸長に対して何の影響も認められ

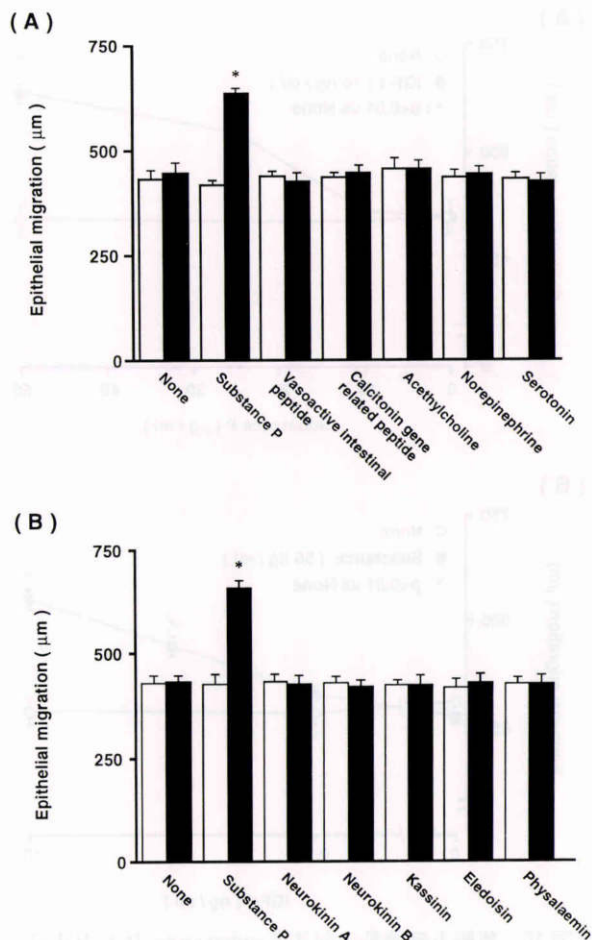


図12 角膜上皮伸長における substance P と IGF-1 の相乗作用に対する substance P の特異性.

家兎角膜片を24時間種々の神経伝達物質 (2×10^{-5} M, A)あるいは種々の tachykinin family (2×10^{-5} M, B)と IGF-1 (10 ng/ml)を培養液に添加して器官培養した.種々の神経伝達物質や tachykinin family の中でも substance P にのみ IGF-1 との相乗作用が認められた¹⁷⁴⁾. □: None, ■: IGF-1 (10 ng/ml), *: $p < 0.01$ vs None

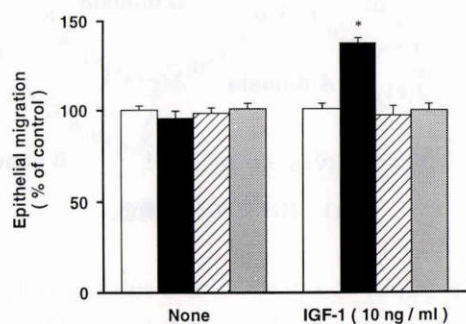


図13 角膜上皮伸長に対する substance P 受容体 agonist と IGF-1 の相乗作用.

家兎角膜片を substance P 受容体 (NK-1, NK-2, NK-3) agonist (2×10^{-5} M)と IGF-1 (10 ng/ml)を培養液に添加して24時間器官培養した. NK-1 agonist と IGF-1 による相乗作用が認められた²⁰⁶⁾. □: None, ■: NK-1 agonist, ▨: NK-2 agonist, ▩: NK-3 agonist, NK agonists: 2×10^{-5} M, *: $p < 0.01$ vs None

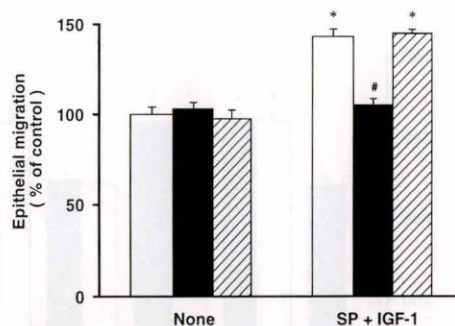


図14 角膜上皮伸長における substance P と IGF-1 の相乗作用に対する substance P 受容体 antagonist の影響.

Substance P 受容体 (NK-1, NK-2) antagonist (2×10^{-5} M)を substance P (2×10^{-5} M)および IGF-1 (10 ng/ml)を含む培養液に添加して家兎角膜片を24時間器官培養した. NK-1 antagonist のみが substance P と IGF-1 による相乗作用を阻害した²⁰⁶⁾. □: None, ■: NK-1 antagonist, ▨: NK-2 antagonist, NK antagonists: 2×10^{-5} M, *: $p < 0.01$ vs None, #: $p < 0.01$ vs SP + IGF-1

なかったが, NK-1 agonist のみが IGF-1 との角膜上皮伸長への相乗作用を示した(図13). 逆に, NK-1 および NK-2 の antagonist を用いて検討すると, NK-1 antagonist のみが substance P と IGF-1 による角膜上皮伸長を阻害した(図14). これらの結果から, substance P と IGF-1 の相乗作用の発現には, NK-1 受容体が関与していることが明らかとなった.

次に, substance P と IGF-1 がお互いの受容体の親和性などを変化させることにより相乗作用が発現するのかについて検討した. 角膜上皮細胞の substance P 受容体について, 125 I で放射標識した substance P を用いて, 培養した家兎角膜上皮細胞への結合を測定した²⁰⁶⁾. 角膜上皮細胞は substance P と結合し, その結合定数(Kd)は 0.45 nM で, 結合部位数(Bmax)は細胞当たり 21,000 個であった. 一方, 角膜上皮細胞を IGF-1 とともに培養しても, substance P に対する角膜上皮細胞の結合定数も結合部位数も何ら変化を認めなかった. 逆に 125 I で放射標識した IGF-1 を用いて, IGF-1 受容体について測定したが, 結合定数(Kd)は 4.1 nM で, 結合部位数(Bmax)は細胞当たり 100,000 個であった. 細胞をあらかじめ substance P とともに培養しても, IGF-1 に対する角膜上皮細胞の結合定数や結合部位数に変化を認めなかった. これらの実験成績から, 角膜上皮細胞には substance P および IGF-1 に対する受容体が存在しているが, IGF-1 により substance P 受容体の, 逆に substance P により IGF-1 受容体の結合性には何の影響も与えず, substance P と IGF-1 による角膜上皮細胞への相乗作用は, 受容体レベルでの制御(cross talk)ではないことが明らかとなった.

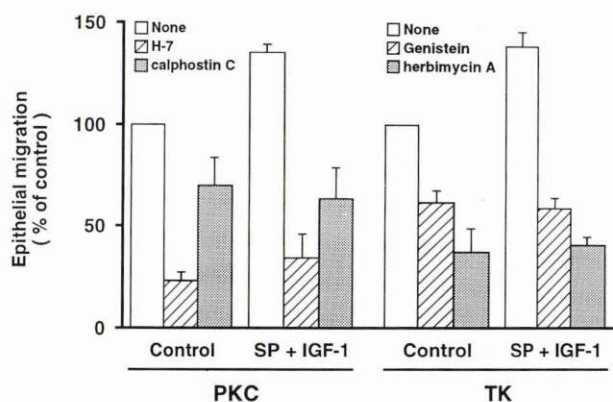


図15 Substance P と IGF-1 による角膜上皮伸長への相乗作用に対する protein kinase 阻害剤の影響. Substance P (2×10^{-5} M) および IGF-1 (10 ng/ml) を含む培養液に protein kinase C 阻害剤 (H-7, 30 μ M; calphostin C, 10 μ M) あるいは tyrosine kinase 阻害剤 (genistein, 10 μ M; herbimycin A, 10 μ M) を添加して家兎角膜片を 24 時間器官培養した. Protein kinase C 阻害剤および tyrosine kinase 阻害剤は角膜上皮の伸長を阻害した.

3. Substance P と IGF-1 の作用に関与する細胞内信号伝達機構

細胞へのシグナルが細胞膜の受容体で認識されると、細胞内信号伝達系 (signal transduction system) が活性化される. 代表的な信号伝達系には, protein kinase C, tyrosine kinase と cyclic adenosine 3', 5' monophosphate (c-AMP) や cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate (c-GMP) に依存する protein kinase A あるいは protein kinase G が知られている. そこで, substance P と IGF-1 による角膜上皮伸長に対する相乗作用への細胞内信号伝達系の関与について protein kinase C や tyrosine kinase の阻害剤を用いて検討した. 図15に示すように, substance P と IGF-1 を同時に添加して促進された角膜上皮の伸長は, protein kinase C 阻害剤の H-7 あるいは calphostin C や tyrosine kinase 阻害剤の genistein や herbimycin A によって阻害された. これらの実験結果から, substance P と IGF-1 の二つのシグナルは, protein kinase C と tyrosine kinase 系を介して, 角膜上皮の伸長を促進することが明らかとなった.

4. Substance P の角膜上皮細胞の移動に対する作用

角膜上皮が欠損部へ移動するためには, integrin を介する fibronectin などの基質への接着と細胞内の裏打ち蛋白質の活性化が重要である. Substance P と IGF-1 による角膜上皮伸長促進作用が fibronectin-integrin 系で制御されているかについて検討した.

1) Integrin

角膜上皮細胞には, fibronectin をはじめとする細胞外マトリックスに対する受容体である integrin が存在し, fibronectin との結合が角膜上皮細胞の接着・伸展・移動の作動系として極めて重要である^{118)120)122)207)~209)}. Inte-

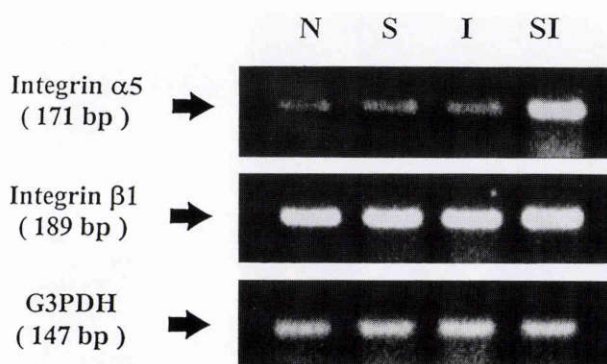


図16 Substance P と IGF-1 による integrin $\alpha 5$ および integrin $\beta 1$ の発現促進.

家兎角膜上皮細胞を substance P (2×10^{-5} M) および IGF-1 (10 ng/ml) を含む培養液で 2 時間培養し, RT-PCR 法を用いて integrin $\alpha 5$ および integrin $\beta 1$ に対する mRNA を測定した. Substance P と IGF-1 により integrin $\alpha 5$ および integrin $\beta 1$ の発現が促進した. N: None, S: SP (2×10^{-5} M), I: IGF-1 (10 ng/ml), SI: SP+IGF-1

grin は α と β の二つの subunits から構成されるヘテロダイマーで, fibronectin 分子の細胞結合 domain の arginine-glycine-aspartic acid (RGD) のアミノ酸配列を認識する. 多くの種類の α subunit や β subunit が存在するが, fibronectin に対する受容体は主として $\alpha 5 \beta 1$ である^{210)~217)}. そこで, substance P と IGF-1 による角膜上皮の伸長に対する相乗作用が, 作動系である integrin の発現を介しているのかについて検討した.

角膜上皮細胞の integrin 活性は, 培養細胞を fibronectin でコートした plastic 培養皿に反応させ, 接着した細胞の数を計測した¹⁷⁴⁾. 角膜上皮細胞を substance P あるいは IGF-1 単独で添加して培養しても, 細胞の fibronectin への接着性には変化を認めなかった. しかしながら, substance P と IGF-1 をともに添加して細胞を培養すると, 接着細胞数は有意に増加した. この時, glycine-arginine-glycine-aspartic acid-serine-proline (GRGDSP) ペプチドを同時に添加すると, 角膜上皮細胞と fibronectin との接着は阻害されたが, 対照として用いた類似構造の glycine-arginine-glycine-glutamic acid-serine-proline (GRGESp) ペプチドでは何の影響も認められなかった. GRGDSP は integrin が認識することのできる RGD 配列を有しており, fibronectin-integrin の結合を阻害する. したがって, substance P と IGF-1 により角膜上皮細胞の integrin 活性は増強され, fibronectin により接着しやすくなることが明らかとなった.

次に, substance P と IGF-1 により, 実際に integrin の遺伝子発現が刺激されるのかについて reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて検討した. 図16に示すように, substance P あるいは

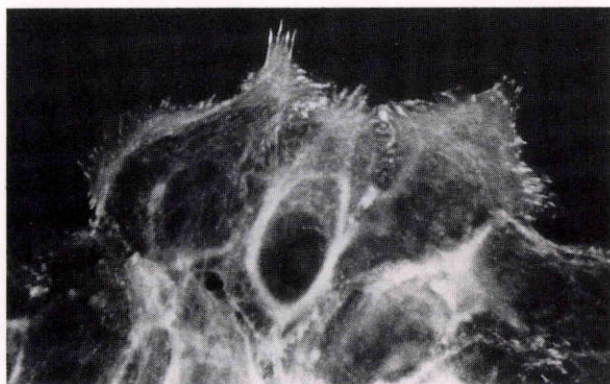


図 17 角膜上皮細胞における蛋白質リン酸化.

ヒト角膜上皮(HCE)細胞を substance P (2×10^{-5} M) および IGF-1 (10 ng/ml) を含む培養液で 30 分間培養し、抗 phosphotyrosine 抗体および rhodamine-phalloidin で二重染色した。接着斑の部分に強く黄緑の蛍光が観察された。

は IGF-1 単独では対照と比較して integrin $\alpha 5$ および integrin $\beta 1$ のバンドに著明な変化を認めなかった。しかしながら, substance P と IGF-1 を同時に添加して培養すると, integrin $\alpha 5$ および integrin $\beta 1$ のバンドはともに増強され, integrin $\alpha 5$ の messenger RNA (mRNA) は約 4 倍, また integrin $\beta 1$ の mRNA は約 1.5 倍に発現が増加していた。これらの結果から, 角膜上皮の伸展・移動の作動系である integrin の活性や mRNA 発現を substance P と IGF-1 が相乗的に刺激していることが明らかとなった。

2) リン酸化経路

細胞が外からシグナルを受けると, 受容体を介して細胞内の信号伝達経路が活性化され, 多くは kinase と呼ばれる蛋白質のリン酸化酵素の作用により, 次々と蛋白質のリン酸化が生じ, いわゆる kinase cascade を形成する。そこで, tyrosine 残基がリン酸化されている蛋白質の局在を phosphotyrosine に対する抗体を用いて, substance P と IGF-1 で刺激した角膜上皮細胞で染色した (図 17)。播種した角膜上皮細胞は, fibronectin マトリックス上で大きく広がり, 伸展する部分には扇状のいわゆる lamellipodia が観察された。この部分で強く基質と結合していると考えられるが, この接着斑の部分に強く黄緑の蛍光が観察された。このことは, 細胞が伸展する時に形成される接着斑の部分の蛋白質がより強くリン酸化されていることを示唆する。

3) Focal adhesion kinase (FAK)

細胞外マトリックスに対する受容体である integrin の遺伝子発現が, substance P と IGF-1 により刺激されることを明らかにしたが, integrin に対応して細胞膜の内側には裏打ち蛋白と呼ばれる蛋白質が存在している。その一つは FAK である。FAK は, 分子量が 125,000 で, tyrosine のリン酸化を受ける蛋白質である。さらに,

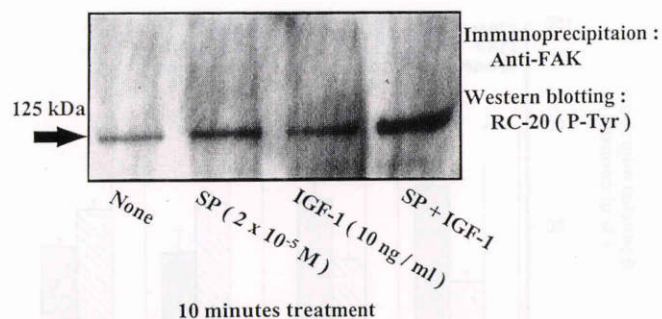


図 18 FAK のリン酸化に対する substance P および IGF-1 の影響。

Substance P (2×10^{-5} M) および IGF-1 (10 ng/ml) を含む培養液で HCE 細胞を 10 分間培養した後, focal adhesion kinase (FAK) に対する monoclonal 抗体を用いて FAK を免疫沈降させ, 電気泳動後 phosphotyrosine に対する抗体 (RC-20) で染色した western blot の結果, Substance P と IGF-1 は FAK のリン酸化を相乗的に促進した。

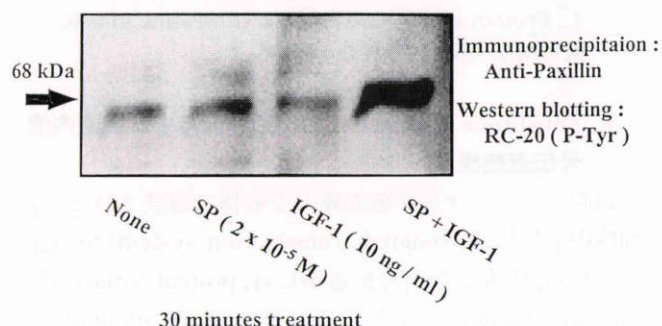


図 19 Paxillin のリン酸化に対する substance P および IGF-1 の影響。

Substance P (2×10^{-5} M) および IGF-1 (10 ng/ml) を含む培養液で HCE 細胞を 30 分間培養した後, paxillin に対する monoclonal 抗体を用いて paxillin を免疫沈降させ, 電気泳動後 phosphotyrosine に対する抗体 (RC-20) で染色した western blot の結果, Substance P と IGF-1 は paxillin のリン酸化を相乗的に促進した。

FAK 自身 tyrosine kinase 活性を有しており, 隣接する他の蛋白質をリン酸化する。FAK は細胞接着斑に局在しており, integrin の機能に密接に関与している^{218)~220)}。このように FAK は, 細胞の接着, 増殖や分化の過程で重要な機能を果たしている。

Substance P あるいは IGF-1 を添加すると, それぞれ単独では FAK のリン酸化の変化は認められなかった。しかしながら, substance P と IGF-1 をともに添加して培養すると, FAK のリン酸化が著明に増強した (図 18)。この FAK のリン酸化は, substance P と IGF-1 を添加して 5~10 分後が最も強く, 30 分後にはやや低下していた。これらの成績は, substance P からのシグナルと IGF-1 からのシグナルの二つがきた時のみ, FAK がリン酸化され活性化されることを示している。

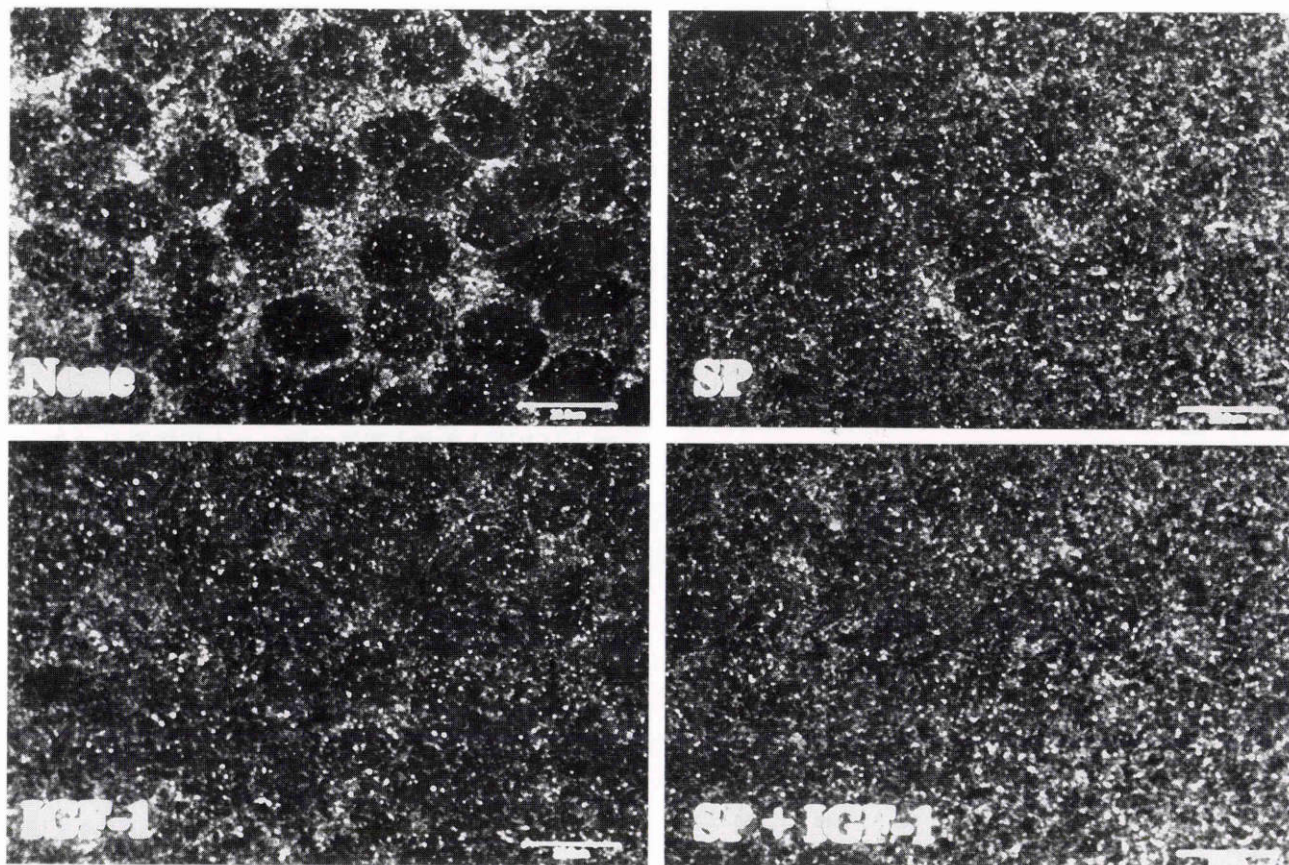


図20 Substance P および IGF-1 による mitogen activated protein (MAP) kinase の translocation. HCE 細胞を substance P (2×10^{-6} M) と IGF-1 (10 ng/ml) を添加して培養し、抗 MAP kinase 抗体を用いて蛍光抗体法で観察した。Substance P 単独でも、IGF-1 単独でも MAP kinase の translocation が観察された。

4) Paxillin

Paxillin は細胞と基質との接着部に局在する細胞骨格系の蛋白質(分子量 61 kDa)でアミノ酸 557 個から構成される。FAK の活性化に伴いリン酸化され、アダプター蛋白質として機能する²²¹⁾²²²⁾。Substance P と IGF-1 という二つのシグナルが共存することにより FAK が活性化された時、実際に paxillin がリン酸化されるかについてヒト角膜上皮(HCE)細胞を用いて、免疫沈降法と western blot 法を用いて検討した。

Substance P あるいは IGF-1 それぞれ単独に刺激しても、paxillin のリン酸化の変化を認めなかったが、FAK と同様に、substance P と IGF-1 の双方で同時に細胞を刺激すると、paxillin のリン酸化が著明に増強した(図19)。FAK が5~10分後にリン酸化が最高に達したのに比し、paxillin のリン酸化は30分で最高となった。これらの成績から、paxillin も FAK と同様に、substance P と IGF-1 の双方が共存する時のみ、リン酸化され活性化されることが明らかとなった。

5) Mitogen activated protein (MAP) kinase

細胞内の別のリン酸化経路として主に増殖に関与すると考えられている MAP kinase は、種々の成長因子により活性化される serine/threonine kinase で、MAP

kinase 自身は threonine と tyrosine 残基でリン酸化を受ける。活性化した MAP kinase は細胞質から核内に移行(translocation)し、核内転写因子をリン酸化して転写活性を上昇させると考えられている。MAP kinase は、次々とリン酸化を行い、いわゆる MAP kinase cascade を形成する^{223)~225)}。次に、substance P と IGF-1 により角膜上皮細胞の MAP kinase が活性化されるかどうかについて western blot 法と蛍光抗体法で検討した。

前述の FAK や paxillin と異なり、MAP kinase は substance P あるいは IGF-1 単独の刺激でも活性型 MAP kinase の増加が認められ、substance P と IGF-1 を同時に添加しても、それ以上には活性型 MAP kinase が増加しなかった。MAP kinase の活性化による translocation を MAP kinase に対する抗体を用いて、その局在を蛍光抗体法で観察した。培養液のみで培養した角膜上皮細胞では、核内に MAP kinase の局在は認められず、細胞質内のみ MAP kinase が観察された。Substance P のみ、IGF-1 のみ、あるいは substance P と IGF-1 の双方を添加した群では、核内を含めた細胞内全体で、MAP kinase の特異蛍光が観察された(図20)。これらの結果から、substance P および IGF-1 はともに、単独で MAP kinase を活性化するが、二つのシグナルの間

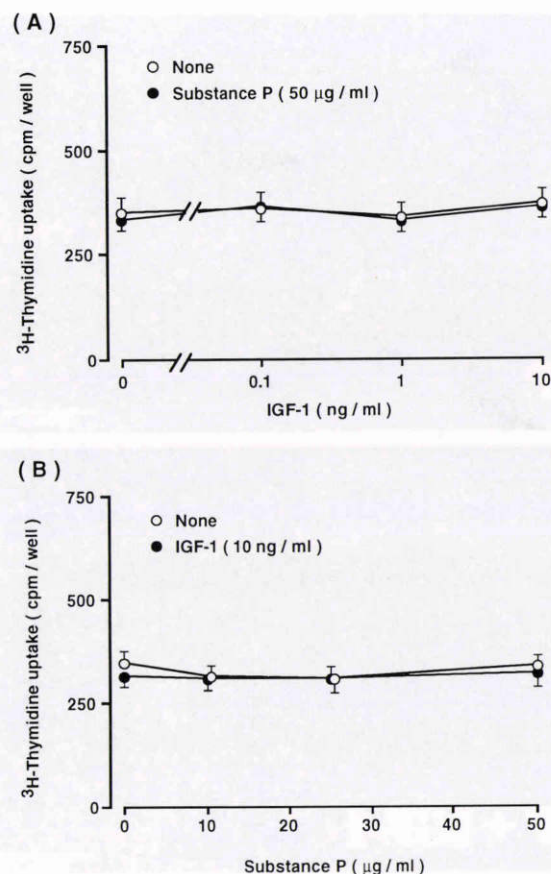


図21 Substance PとIGF-1による角膜上皮細胞増殖への影響。

家兎角膜上皮細胞を substance P (50 µg/ml) および IGF-1 (10 ng/ml) を含む培養液で培養し、³H-thymidine の取り込みを測定した。Substance P も IGF-1 も家兎角膜上皮細胞の増殖には何ら影響を与えなかった¹⁷⁴⁾。

に相乗的な作用を示さないことが明らかとなった。

5. 角膜上皮細胞増殖

角膜上皮創傷治癒過程の第二相である細胞増殖に対して、substance P と IGF-1 がどのような作用を有するかについて、培養した家兎角膜上皮細胞による³H-thymidine の取り込みを指標に検討した¹⁷⁴⁾。種々の濃度の substance P のみあるいは IGF-1 を添加して培養しても³H-thymidine の取り込みに変化は認められず、また substance P と IGF-1 を組み合わせて添加しても³H-thymidine の取り込みに変化は認められなかった(図21)。このように、substance P と IGF-1 は角膜上皮細胞の増殖を刺激しないことが明らかとなった。

V 動物眼での研究(*in vivo*)

Substance P が IGF-1 と相乗的に角膜上皮の伸長を促進することが、これら角膜器官培養系あるいは培養細胞を用いた実験系で明らかとなったが、実際に *in vivo* の研究モデルにおいて、substance P と IGF-1 の点眼が角膜上皮の創傷治癒を促進するかについて家兎角膜で検

討した²²⁶⁾。

家兎角膜の上皮剥離を n-heptanol で行い、substance P および IGF-1 をそれぞれ単独で、あるいは組み合わせて点眼し、角膜上皮欠損面積を経時的に測定した(図22)。上皮剥離24時間後において、対照として用いた基剤の生理的リン酸緩衝液(PBS)のみを点眼した群と比較して、substance P 単独あるいは IGF-1 単独の点眼では欠損面積に何ら差異を認めなかった。しかしながら、substance P と IGF-1 を同時に点眼すると、上皮欠損部の面積は顕著に縮小していた。欠損面積の経時的な変化を検討すると(図23)、PBS 点眼群、substance P 単独点眼群、および IGF-1 単独点眼群の間には上皮修復のパターンに有意な差異は認められず、12~36時間にかけて直線的に欠損部の面積が縮小していた。一方、substance P と IGF-1 をともに点眼した群では、12時間後から上皮修復が促進され、18時間以降対照群に比較して有意に欠損面積が縮小していた。これらの成績を基に、角膜上皮欠損修復速度を計算すると、対照群は、毎時 0.92 ± 0.18 (平均値 $\pm$ 標準偏差) mm² であるのに対し、substance P のみの点眼群では 0.91 ± 0.11 mm²、IGF-1 のみの点眼群では 0.89 ± 0.08 mm² であり、対照群と比較して有意な差を認めなかった。しかしながら、substance P と IGF-1 を同時に点眼した群では毎時 1.09 ± 0.09 mm² と有意に上皮欠損修復が促進していた。これらの成績から、substance P あるいは IGF-1 は単独では *in vivo* で角膜上皮創傷治癒に対して何ら影響を与えないが、substance P と IGF-1 が同時に存在すると相乗的に角膜上皮創傷治癒を促進することが明らかとなった。

VI 臨床応用

神経麻痺性角膜症の病態の一つとして、知覚神経の傷害に伴う substance P の欠乏が考えられる。実際に臨床症例で生検を行って角膜中に含有される substance P 量の変化を計測することは不可能である。しかしながら、substance P と IGF-1 による相乗的な角膜上皮創傷治癒の促進が研究室における基礎研究から明らかとなり、我々眼科医の仕事は、これらの基礎研究の成果を如何にして臨床の場に応用し、現在治療法のない疾患の治療に役立てるかと考える。そのためには、より安定で、より小分子で、必要にして十分な生物学的作用を有する物質を見出すことが肝腎である。

1. Substance P の最小必須構造

Substance P の生理作用は、平滑筋のみならず血管内皮細胞に対する作用などきわめて多くの組織に対する生理作用が報告^{106)(227)~233)}されている。さらに、substance P の生理作用は動物種により異なるが、家兎では縮瞳などを引き起こす。そこで、これらの substance P の有する他の生理作用をできるだけ排除し、IGF-1 との相乗作用に必要なしてかつ十分な最小必須アミノ酸配列を求める研

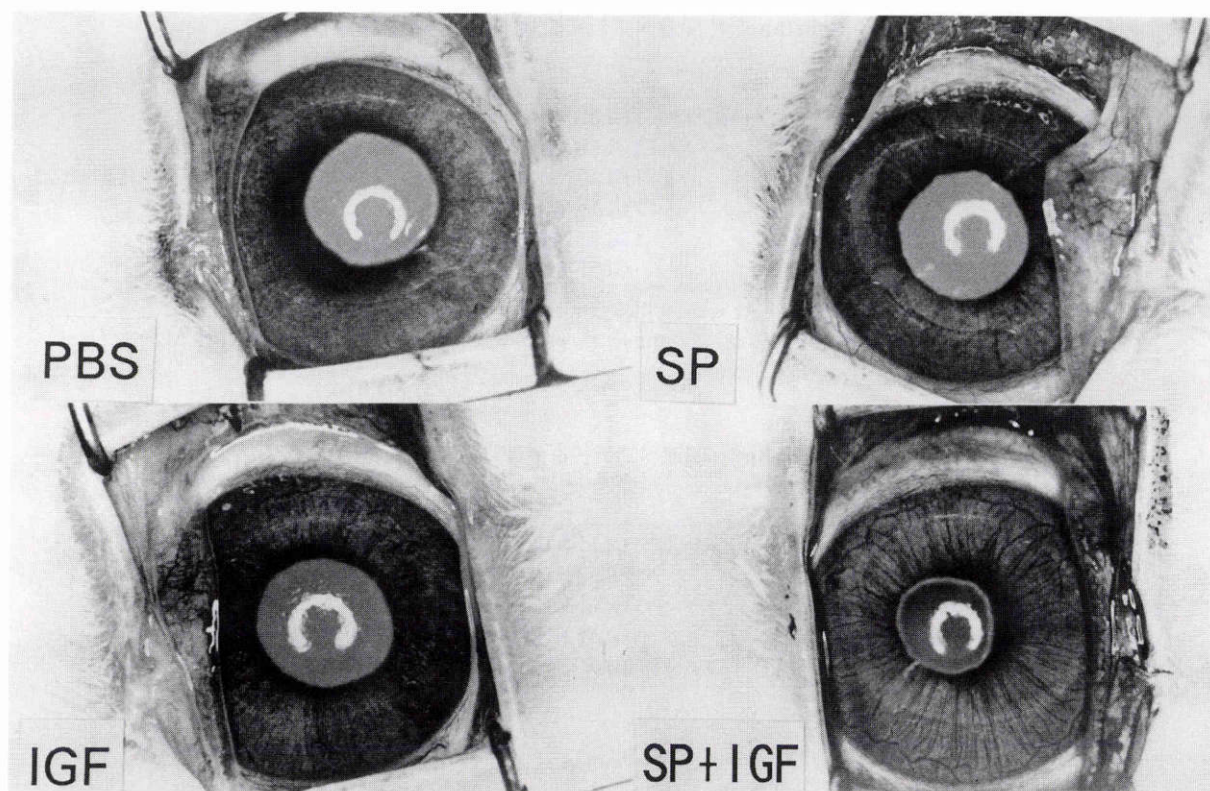


図 22 Substance P および IGF-1 点眼による角膜上皮創傷治癒への影響。

家兎角膜上皮を n-heptanol で剥離し, substance P (1 mg/ml), IGF-1 (1 μ g/ml) あるいは substance P+IGF-1 点眼を施行した上皮剥離 24 時間後の前眼部写真. Substance P 単独あるいは IGF-1 単独の点眼では対照とした PBS 点眼と欠損面積の差異を認めなかった. しかしながら, substance P と IGF-1 を同時に点眼すると角膜上皮欠損の修復は有意に促進した²²⁶⁾.

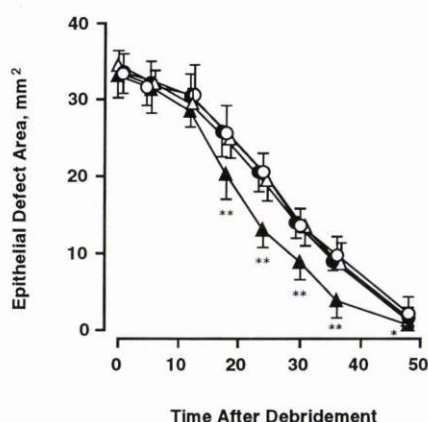


図 23 Substance P および IGF-1 点眼による角膜上皮欠損面積の経時変化。

家兎角膜上皮を n-heptanol で剥離し, substance P (1 mg/ml), IGF-1 (1 μ g/ml) あるいは substance P+IGF-1 点眼を施行し, 経時的に欠損面積を測定した. Substance P 単独あるいは IGF-1 単独の点眼では対照とした PBS 点眼と比較して欠損面積に差異を認めなかった. しかしながら, substance P と IGF-1 を同時に点眼すると角膜上皮欠損の修復は有意に促進した²²⁶⁾. ○: PBS, ●: SP, △: IGF-1, ▲: SP+IGF-1, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs PBS

究を行った. Substance P を代表とする tachykinin family は, C 末端の 5 個のアミノ酸配列が FXGLM

(phenylalanine-任意のアミノ酸-glycine-leucine-methionine) という共通の構造を有している. そこで, substance P の C 末端の構造を残しながら長さの異なる短いペプチドの作用について検討した. Substance P の C 末端から 7 個 glutamine-glutamine-phenylalanine-phenylalanine-glycine-leucine-methionine amide (QQF-FGLM), 6 個 glutamine-phenylalanine-phenylalanine-glycine-leucine-methionine amide (QFFGLM), 5 個 phenylalanine-phenylalanine-glycine-leucine-methionine amide (FFGLM), あるいは 4 個 phenylalanine-glycine-leucine-methionine amide (FGLM) のアミノ酸配列を有するペプチドは, それ自身は角膜上皮の伸長に何の影響も与えなかったが, substance P と全く同様に IGF-1 と相乗的に角膜上皮の伸長を促進した. しかしながら, C 末端の 3 個のアミノ酸配列由来の tripeptide である GLM は, それ自身単独で角膜上皮の伸長に影響を与えないのみならず, IGF-1 との相乗作用も認めなかった (表 4). 次に, tachykinin family の他のメンバーである neurokinin A, neurokinin B, physalaemin あるいは eledoisin の C 末端から 4 個のアミノ酸配列を有する tetrapeptide である valine-glycine-leucine-methionine amide (VGLM), tyrosine-glycine-leucine-methionine amide (YGLM) あるいは isoleucine-glycine-leucine-

表4 Substance P 関連ペプチドと IGF-1 との相乗作用

		単独での作用	IGF-1 との相乗作用
Substance P	PRKPQQFFGLM-NH ₂	—	+
SP(5-11)	QQFFGLM-NH ₂	—	+
SP(6-11)	QFFGLM-NH ₂	—	+
SP(7-11)	FFGLM-NH ₂	—	+
SP(8-11)	FGLM-NH ₂	—	+
SP(9-11)	GLM-NH ₂	—	—

—：作用なし +：作用あり IGF-1: insulin-like growth factor-1

P: proline, R: arginine, K: lysine, Q: glutamine, F: phenylalanine, G: glycine, L: leucine, M: methionine

表5 Tachykinin 関連ペプチドと IGF-1 との相乗作用

		単独での作用	IGF-1 との相乗作用
Substance P	PRKPQQFFGLM-NH ₂	—	+
FGLM(SP-8-11)	FGLM-NH ₂	—	+
VGLM(Neurokinin A, B 8-11)	VGLM-NH ₂	—	—
YGLM(Physalaemin 8-11)	YGLM-NH ₂	—	—
IGLM(Eledoisin 8-11)	IGLM-NH ₂	—	—

—：作用なし +：作用あり

methionine amide(IGLM)について IGF-1 との相乗作用を検討したところ, substance P 由来の FGLM のみが IGF-1 との相乗作用を示し, それ以外の tetrapeptide には何の作用も認めなかった(表5). これらの成績から, substance P と IGF-1 の相乗作用には, substance P の構造に由来する FGLM という4個のアミノ酸配列が最小限必要であることが明らかとなった.

次にこの FGLM という tetrapeptide が角膜上皮創傷治癒に対して IGF-1 と相乗的な促進作用を示すのかについて *in vivo* で検討した. 前述のように, n-heptanol で作製した家兎角膜上皮欠損モデルに対して, 点眼を行い上皮欠損面積の縮小を観察したところ, substance P と IGF-1 を同時に点眼した時と同様に, FGLM と IGF-1 の同時点眼で角膜上皮創傷治癒は有意に促進した. 興味あることは, 家兎においては substance P により縮瞳が認められたが, FGLM にはこの縮瞳作用がなく, 瞳孔径は変化しなかった. このように, substance P の構造に由来する FGLM という短いペプチドを用いることにより, 角膜上皮の伸長促進に対する IGF-1 との相乗作用を残しながら, 縮瞳という副反応を除去することが可能となった.

2. 神経麻痺性角膜症の治療

今回の研究成果を基に, Texas Tech University の眼科および山口大学医学部附属病院眼科において, 神経麻痺性角膜症の症例に対して, それぞれの Institutional review board(IRB)による承認と被検者からの同意を得た後に substance P と IGF-1 の点眼療法あるいは FGLM と IGF-1 の点眼療法を試みた.

症例1

家族性自律神経失調症(Riley-Day 症候群)は慢性進行性疾患で, 末梢自律神経系および感覚神経系の neuron に変性が生じ, 自律神経障害や感覚障害を訴える. 泣いても涙が出ない無涙症が一つの特徴である⁵²⁾²³⁴⁾²³⁵⁾. 症例は, 16 か月の白人女児で, 生下時から嚥下困難や発育遅延を認め, 家族性自律神経失調症と診断されていた. 本症例においても, 泣いても涙が出ない無涙症が認められ, 角膜反射が消失していた. 角膜の中央部に上皮欠損と潰瘍が認められ, 角膜上皮欠損が遷延化していた. 人工涙液などの治療には全く反応しないため, 左眼に対しまず substance P の点眼のみを試みたが, 効果が認められず, 10 日後に substance P 点眼に insulin の点眼を加えた. しかしながら, substance P と insulin の同時点眼によっても効果は認められず, substance P と IGF-1 の点眼に切り替えたところ, 5 日目から上皮の再被覆が始まり 30 日後には, 上皮欠損は完全に再被覆され, 混濁を残すものの安定した状態となった. このように, 家族性自律神経失調症による神経麻痺性角膜症の症例に対して, substance P と IGF-1 の点眼が有効であった²³⁶⁾.

症例2

次に, substance P の構造に由来する tetrapeptide である FGLM ペプチドと IGF-1 点眼が SPK の治療に有効であった山口大学医学部附属病院での 1 例を報告する. 症例は, 左三叉神経痛に対して神経血管減圧術を受けた後に角膜上皮障害が出現した 48 歳の女性で, 術後約 1 か月頃から左眼の充血, 視力障害を自覚し近医を受診した. 角膜知覚の低下が認められ, 神経麻痺性角膜症の診断のもと, fibronectin 点眼および抗生剤の点眼や眼軟膏により加療され, 一旦軽快したが, fibronectin 点眼療法を

中止すると上皮欠損が再発したため、精査加療目的で当科を紹介され受診した。初診時、左眼視力は0.2(矯正不能)、角膜知覚は10 mm以下と低下していた。左眼角膜中央部に潰瘍を認めた。初診時より再びfibronectinと抗生剤の点眼を開始し、潰瘍は消失し軽快した。しかしながら、fibronectin点眼を中止すると角膜中央部に潰瘍が再発してくるため、fibronectin点眼は続行して経過観察した。Fibronectin点眼により大きな上皮欠損は消失したが、経過観察期間中、SPKは残存し徐々に増強してきた。そこで、fibronectinを一旦中止し、FGLMペプチドとIGF-1の点眼を開始した。1週間後には、SPKが改善し角膜実質浅層の混濁も軽快し、点眼開始2週間後には矯正視力1.2に改善した。本症例では、三叉神経痛を除くための外科的治療により生じた神経麻痺性角膜症に対して、遷延性角膜上皮欠損の治療にはfibronectin点眼が有効であった。しかしながら、fibronectin点眼の中止により再発すること、SPKが頑強に持続することが問題であった。FGLMとIGF-1の点眼療法によりSPKが著明に改善するのみならず、fibronectin点眼療法を中止しても角膜上皮欠損の再発が認められなかったことから、角膜上皮欠損再発の予防にFGLMとIGF-1の点眼療法が有効であると考えられた。

今後、さらに症例を重ねて検討していく必要はあるが、substance PとIGF-1の点眼療法あるいはsubstance Pに由来するペプチドであるFGLMとIGF-1の点眼療法が神経麻痺性角膜症の治療に有効であると考えられる。

VII おわりに

我々は、神経麻痺性角膜症を臨床的にしばしば経験することから、知覚神経伝達物質であるsubstance Pに注目して、substance PとIGF-1が共存する時にのみ角膜上皮の伸長が促進されることを見出した。Substance PとIGF-1の相乗作用は、これまで他のどの細胞においても報告されたことはなく、今回我々がはじめて明らかにしたことである。角膜の整然とした美しい構造は、極めてありきたりではあるが、神経系因子と液性因子との二重調節機構により巧妙に維持されている。どちらの因子が欠けても角膜の正常構造の維持が破綻し、また創傷治療が遅延する。臨床的には角膜知覚の測定により、ある程度知覚神経機能を推測することができ、種々の角膜疾患の診断と治療の選択に当たり、角膜知覚を測定することの臨床的な意義を再確認した。一方、従来から考えられてきた、潤滑や保湿としての涙液ではなく、角膜に対する液性因子の供給経路としての涙液の役割を見直すことも必要である。角膜疾患の診断に当たり病態を理解し適切な治療法を選択するためには、細隙灯顕微鏡による角膜そのものの状態の把握と同時に、角膜知覚や涙液の状態など角膜を取り巻く環境の把握が重要であると考えられる。

今回報告した細胞生物学的および分子生物学的な研究

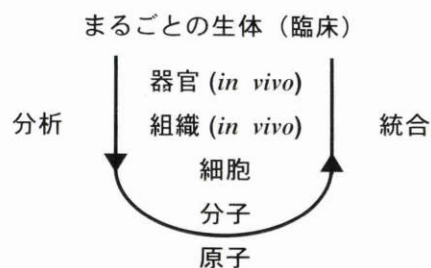


図24 臨床医学研究の反転作戦(研究方法論)。
須田²³⁷⁾より改変。

から、substance PとIGF-1による角膜上皮伸長の促進は、細胞の接着性の亢進、integrinの遺伝子発現の増強、接着斑のFAKやpaxillinのリン酸化の増強などが重要な機序であることを明らかにすることができた。しかしながら、極めて興味あることは、substance PのみでもIGF-1のみでも、これらの作用は認められず、substance PとIGF-1の双方が存在する時にのみ作用が認められることである。細胞のsubstance P受容体とIGF-1受容体は全く異なるものであり、protein kinase Cやtyrosine kinaseを介する細胞内信号伝達系で細胞内蛋白質がリン酸化されていく時に、substance Pからの信号とIGF-1からの信号の両者を必要とする蛋白質が経路のどこかに存在するはずである。残念ながら、今回の研究では、この物質を同定することはできなかったが、細胞生物学あるいは分子生物学的にも、今後研究を進めていくべき極めて興味ある問題であると考えられる。

今回の宿題報告の研究を通じて、広範囲な医学の各分野での成果を応用して現在難治の眼疾患の治療にどのようにして挑戦していくのかという臨床研究の一つのスタイルを経験することができた。研究課題は毎日の臨床の場に存在しており、患者は我々医師が学んでいく上での学客である。臨床の現場で、今日の症例から問題点を見出し、現在の眼科学で治療できない疾患に対しては、その問題の解決に向かって努力する必要がある。眼科学も医学の一分野であり、近代医学や近代科学の知識や技術を総動員して、丸ごとの生体、器官、組織、細胞、分子へとより分析的に精密に解析していかなければならない。しかし、臨床研究において重要なことは、我々眼科医の究極の目的を忘れてはならないことである。適当な段階で、もう一度分子レベルでの理解を統合して、丸ごとの生体での理解へと方向転換することが必要であり、このことが明日の症例に役立つものであると確信する。須田(元大阪大学蛋白質研究所代謝部門教授、元愛媛大学医学部長)は、このような研究の方向転換を“医学研究における反転作戦”と名づけている²³⁷⁾。研究に携わるようになって26年経ち、ようやくその言葉の意味と重みが理解できるようになったと感じている(図24)。

今回の研究成果は、神経麻痺性角膜症の病態の理解への第一歩を踏み出したのみであり、今後さらにこれらの

成果を基に、より深い病態の理解と治療法の開発に向けて研究を続けていく必要がある。

宿題報告の機会を与えていただいた日本眼科学会評議員、日本眼科学会会員および第101回日本眼科学会総会会長の宇山昌延教授(関西医科大学)に衷心より感謝の意を表する。細胞生物学・分子生物学の進歩の時代をともに歩きながら、良き先輩として今までご指導やご助言をいただき、講演において座長の労をお取りいただいた玉井 信教授(東北大学)に感謝申し上げる。今回の研究を行うに当たり、それぞれの持ち場で最大の働きをし、努力と協力を惜しなかつた山口大学医学部眼科学教室の教室員全員に心より感謝する。佐々木かおる博士(市立豊中病院眼科)からのヒト角膜上皮細胞(HCE細胞)の提供に対し感謝する。研究の各場面で貴重なご助言や激励をいただいた乾 誠教授(山口大学医学部薬理学)、吉田謙一教授、水上洋一先生(山口大学医学部法医学)および岡 芳知教授(山口大学内科学第三)に衷心より感謝する。

本研究は、1987年 visiting professor として University of California Davis(UCD)に滞在した時、Ted W Reid, Ph.D., Christopher J Murphy, DVM, Ph.D.および Mark J Mannis, MD, FRCS(当時 UCD)との熱心な議論が発端となり、substance Pの生理作用に関する共同研究が開始された。彼らの長年にわたる変わらぬ友情と信頼に感謝する。

本研究の一部は、文部省科学研究費(基盤研究B2 #09470381)およびライオンズクラブ国際協会336-D地区(Lions Club International Fund)からの研究助成により行われた。

最後に、眞鍋禮三先生(大阪大学名誉教授)と大鳥利文先生(近畿大学教授)の長年にわたるご指導に対して改めて心よりの感謝の気持ちを捧げる。

文 献

- 1) Sun TT, Green H: Cultured epithelial cells of cornea, conjunctiva and skin: Absence of marked intrinsic divergence of their differentiated states. *Nature* 269: 489—493, 1977.
- 2) Schermer A, Galvin S, Sun TT: Differentiation-related expression of a major 64 K corneal keratin *in vivo* and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* 103: 49—62, 1986.
- 3) Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G, Sun TT, Lavker RM: Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: Implications on epithelial stem cells. *Cell* 57: 201—209, 1989.
- 4) Thoft RA, Friend J: The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 1442—1443, 1983.
- 5) Magendie PA: De l'influence de la cinquieme paire de nerfs sur la nutrition et les fonctions de l'oeil. *J Physiol (Paris)* 4: 176—177, 1824.
- 6) von Frey M: Beiträge zur physiologie des schmerzsinns. Ber verhandlungen der königlich sächsischen Gesellschaft der Wissenschaften zu Leipzig 46: 185—196, 1894.
- 7) Jaffe M: Neuroparalytic keratitis. *Arch Ophthalmol* 20: 688—689, 1938.
- 8) Pannabecker CL: Keratitis neuroparalytica. *Arch Ophthalmol* 32: 456—463, 1944.
- 9) Groos EB Jr: Neurotrophic keratitis. In: Kraichner JH, et al (Eds): *Cornea*. CV Mosby, St Louis 1339—1347, 1997.
- 10) Paton L: The trigeminal nerve and its ocular lesions. *Br J Ophthalmol* 10: 305—342, 1926.
- 11) Duke-Elder SS, Leigh AG: Inflammations of the cornea: Keratitis. In: Duke-Elder SS (Ed): *System of Ophthalmology*, vol 8. Diseases of the Outer Eye. Henry Kimpton, London, 729—862, 1965.
- 12) Cavanagh HD, Colley A, Pihlaja DJ: Persistent corneal epithelial defects. *Int Ophthalmol Clin* 19: 197—206, 1979.
- 13) Grayson M: Epithelial keratopathy. In: Grayson M (Ed): *Diseases of the Cornea*. CV Mosby, St Louis 269—275, 1979.
- 14) Grayson M: Neurologic diseases. In: Grayson M (Ed): *Diseases of the Cornea*. CV Mosby, St Louis 421—430, 1979.
- 15) Miller NR: Topical diagnosis in the trigeminal somatic sensory system. In: Miller NR (Ed): *Walsh and Hoyt's Clinical Neuro-Ophthalmology*. Williams & Wilkins, Baltimore 1054—1070, 1985.
- 16) Foster CS: Corneal manifestations of neurologic diseases. In: Smolin G, et al (Eds): *The Cornea: Scientific Foundations and Clinical Practice*. Little, Brown and Company, Boston 413—426, 1987.
- 17) Cavanagh HD, Colley AM: The molecular basis of neurotrophic keratitis. *Acta Ophthalmol* 67 (Suppl 192): 115—134, 1989.
- 18) Arffa RC: Epithelial diseases. In: Arffa RC (Ed): *Grayson's Diseases of the Cornea*. Mosby Year Book, St Louis 324—332, 1991.
- 19) Pavan-Langston D: Viral diseases of the cornea and external eye. In: Albert DM, et al (Eds): *Principles and Practice of Ophthalmology: Clinical Practice*. WB Saunders, Philadelphia 117—161, 1994.
- 20) Cavanagh HD, Pihlaja D, Thoft RA, Dohlman CH: The pathogenesis and treatment of persistent epithelial defects. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 81: 754—769, 1976.
- 21) Womack LW, Liesegang TJ: Complications of herpes zoster ophthalmicus. *Arch Ophthalmol* 101: 42—45, 1983.
- 22) Liesegang TJ: Corneal complications from herpes zoster ophthalmicus. *Ophthalmology* 92: 316—324, 1985.
- 23) Harding SP, Lipton JR, Wells JCD: Natural history of herpes zoster ophthalmicus: Predictors of postherpetic neuralgia and ocular involvement. *Br J Ophthalmol* 71: 353—358, 1987.
- 24) Cobo LM: Corneal complications of herpes zoster ophthalmicus. Prevention and treatment. *Cor-*

- nea 7: 50—56, 1988.
- 25) **Liesegang TJ**: Ocular herpes simplex infection: Pathogenesis and current therapy. *Mayo Clin Proc* 63: 1092—1105, 1988.
 - 26) **Koenig SB, Berkowitz RA, Beuerman RW, McDonald MB**: Corneal sensitivity after epikeratophakia. *Ophthalmology* 90: 1213—1218, 1983.
 - 27) **Rao GN, John T, Ishida N, Aquavella JV**: Recovery of corneal sensitivity in grafts following penetrating keratoplasty. *Ophthalmology* 92: 1408—1411, 1985.
 - 28) **Hung JY**: Corneal sensation in retinal detachment surgery. *Ann Ophthalmol* 19: 313—315, 1987.
 - 29) **John T, Rao GN, Aquavella JV**: Corneal sensitivity in aphakic and pseudophakic eyes. *CLAO J* 14: 101—104, 1988.
 - 30) **Mathers WD, Jester JV, Lemp MA**: Return of human corneal sensitivity after penetrating keratoplasty. *Arch Ophthalmol* 106: 210—211, 1988.
 - 31) **Shivitz IA, Arrowsmith PN**: Corneal sensitivity after radial keratotomy. *Ophthalmology* 95: 827—832, 1988.
 - 32) **Campos M, Hertzog L, Garbus JJ, McDonnell PJ**: Corneal sensitivity after photorefractive keratectomy. *Am J Ophthalmol* 114: 51—54, 1992.
 - 33) **Tugal Tutkun I, Akarcay K, Közer Bilgin L, Sansoy N, Urgancioglu M**: Corneal sensitivity after penetrating keratoplasty. *Eur J Ophthalmol* 3: 66—70, 1993.
 - 34) **Ishikawa T, Park SB, Cox C, del Cerro M, Aquavella JV**: Corneal sensation following excimer laser photorefractive keratectomy in humans. *J Refract Corneal Surg* 10: 417—422, 1994.
 - 35) **John T**: Corneal sensation after small incision, sutureless, one-handed phacoemulsification. *J Cataract Refract Surg* 21: 425—428, 1995.
 - 36) **Willis WE, Laibson PR**: Corneal complications of topical anesthetic abuse. *Can J Ophthalmol* 5: 239—243, 1970.
 - 37) **Van Buskirk EM**: Corneal anesthesia after timolol maleate therapy. *Am J Ophthalmol* 88: 739—743, 1979.
 - 38) **Chang FW, Reinhart S, Fraser NM**: Effect of 30% sodium sulfacetamide on corneal sensitivity. *Am J Optom Physiol Opt* 61: 318—320, 1984.
 - 39) **Spinelli D, Vigasio F, Montanari P**: Short-term and long-term timolol maleate effects on corneal sensitivity. *Doc Ophthalmol* 56: 385—392, 1984.
 - 40) **Rosenwasser GO**: Complications of topical ocular anesthetics. *Int Ophthalmol Clin* 29: 153—158, 1989.
 - 41) **Rosenwasser GO, Holland S, Pflugfelder SC, Lugo M, Heidemann DG, Culbertson WW, et al**: Topical anesthetic abuse. *Ophthalmology* 97: 967—972, 1990.
 - 42) **Weissman SS, Asbell PA**: Effects of topical timolol (0.5%) and betaxolol (0.5%) on corneal sensitivity. *Br J Ophthalmol* 74: 409—412, 1990.
 - 43) **Szerenyi K, Sorken K, Garbus JJ, Lee M, McDonnell PJ**: Decrease in normal human corneal sensitivity with topical diclofenac sodium. *Am J Ophthalmol* 118: 312—315, 1994.
 - 44) **Rose W**: Surgical treatment of trigeminal neuralgia. *Lancet* 1: 295—302, 1892.
 - 45) **Peet MM, Schneider RC**: Trigeminal neuralgia. *J Neurosurg* 9: 367—377, 1952.
 - 46) **Davies MS**: Corneal anaesthesia after alcohol injection of the trigeminal sensory root. Examination of 100 anaesthetic corneae. *Br J Ophthalmol* 54: 577—586, 1970.
 - 47) **Onofrio BM**: Radiofrequency percutaneous Gasserian ganglion lesions. Results in 140 patients with trigeminal pain. *J Neurosurg* 42: 132—139, 1975.
 - 48) **Mackie IA**: Role of the corneal nerves in destructive disease of the cornea. *Trans Ophthalmol Soc UK* 98: 343—347, 1978.
 - 49) **Adams GG, Cullen JF**: Neuroparalytic keratitis and the effect of cervical sympathectomy following operative procedures for trigeminal neuralgia. *Scott Med J* 32: 86—88, 1987.
 - 50) **Tos M, Drozdiewicz D, Thomsen J**: Medial acoustic neuromas. A new clinical entity. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 118: 127—133, 1992.
 - 51) **Sterkers JM, Morrison GA, Sterkers O, El-Dine MM**: Preservation of facial, cochlear, and other nerve functions in acoustic neuroma treatment. *Otolaryngol Head Neck Surg* 110: 146—155, 1994.
 - 52) **Goldberg MF, Payne JW, Brunt PW**: Ophthalmologic studies of familial dysautonomia. The Riley-Day syndrome. *Arch Ophthalmol* 80: 732—743, 1968.
 - 53) **Schwartz DE**: Corneal sensitivity in diabetics. *Arch Ophthalmol* 91: 174—178, 1974.
 - 54) **Hyndiuk RA, Kazarian EL, Schultz RO, Seideman S**: Neurotrophic corneal ulcers in diabetes mellitus. *Arch Ophthalmol* 95: 2193—2196, 1977.
 - 55) **Nielsen NV, Lund FS**: Diabetic polyneuropathy. Corneal sensitivity, vibratory perception and Achilles tendon reflex in diabetics. *Acta Neurol Scand* 59: 15—22, 1979.
 - 56) **Rogell GD**: Corneal hypesthesia and retinopathy in diabetes mellitus. *Ophthalmology* 87: 229—233, 1980.
 - 57) **Schultz RO, Peters MA, Sobocinski K, Nassif K, Schultz KJ**: Diabetic keratopathy as a manifestation of peripheral neuropathy. *Am J Ophthalmol* 96: 368—371, 1983.
 - 58) **Schultz RO, Peters MA, Sobocinski K, Nassif K, Schultz KJ**: Diabetic corneal neuropathy. *Trans Am Ophthalmol Soc* 81: 107—124, 1983.
 - 59) **Ruben ST**: Corneal sensation in insulin dependent and non-insulin dependent diabetics with proliferative retinopathy. *Acta Ophthalmol* 72: 576—580, 1994.

- 60) **Hosotani H, Ohashi Y, Yamada M, Tsubota K**: Reversal of abnormal corneal epithelial cell morphologic characteristics and reduced corneal sensitivity in diabetic patients by aldose reductase inhibitor, CT-112. *Am J Ophthalmol* 119: 288—294, 1995.
- 61) **Saini JS, Khandalavla B**: Corneal epithelial fragility in diabetes mellitus. *Can J Ophthalmol* 30: 142—146, 1995.
- 62) **Schorstein T**: Ein beitrage zur hornhautinner-
vation des menschlichen auges. *Arch f Augenheil-*
kunde 108: 601—613, 1934.
- 63) **Sakamoto K**: Histological study on the innervation of the human cornea. *Tohoku J Exp Med* 54: 105—114, 1951.
- 64) **Zander E, Weddell G**: Observation on the innervation of the cornea. *J Anat* 85: 68—99, 1951.
- 65) **Mensher JH**: Corneal nerves. *Surv Ophthalmol* 19: 1—18, 1974.
- 66) **Ruskell GL**: Ocular fibres of the maxillary nerve in monkeys. *J Anat* 118: 195—203, 1974.
- 67) **Tervo T, Joo F, Huikuri KT, Toth I, Palkama A**: Fine structure of sensory nerves in the rat cornea: An experimental nerve degeneration study. *Pain* 6: 57—70, 1979.
- 68) **Beuerman RW, Schimmelpfennig B**: Sensory denervation of the rabbit cornea affects epithelial properties. *Exp Neurol* 69: 196—201, 1980.
- 69) **Schimmelpfennig B**: Nerve structures in human central corneal epithelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 218: 14—20, 1982.
- 70) **Miller NR**: Anatomy and physiology of the trigeminal nerve. In: Miller NR (Ed): *Walsh and Hoyt's Clinical Neuro-Ophthalmology*. Williams & Wilkins, Baltimore, 999—1043, 1985.
- 71) **ten Tusscher MP, Klooster J, Vrensen GF**: The innervation of the rabbit's anterior eye segment: A retrograde tracing study. *Exp Eye Res* 46: 717—730, 1988.
- 72) **ten Tusscher MP, Klooster J, van der Want JJ, Lamers WP, Vrensen GF**: The allocation of nerve fibres to the anterior eye segment and peripheral ganglia of rats. I. The sensory innervation. *Brain Res* 494: 95—104, 1989.
- 73) **Beckers HJ, Klooster J, Vrensen GF, Lamers WP**: Ultrastructural identification of trigeminal nerve endings in the rat cornea and iris. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 1979—1986, 1992.
- 74) **石田誠夫**: 角膜神経の臨床. 大原国俊(編): 角膜 MOOK 50 角膜—新しい知見・疾患概念と治療—. 金原出版, 東京, 8—21, 1993.
- 75) **Müller LJ, Vrensen GFJM, Pels L, Cardozo BN, Willekens B**: Architecture of human corneal nerves. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 985—994, 1997.
- 76) **Tervo T, Palkama A**: Ultrastructure of the corneal nerves after fixation with potassium permanganate. *Anat Rec* 190: 851—860, 1978.
- 77) **Miller A, Costa M, Furness JB, Chubb IW**: Substance P immunoreactive sensory nerves supply the rat iris and cornea. *Neurosci Lett* 23: 243—249, 1981.
- 78) **Tervo K, Tervo T, Eränkö L, Eränkö O**: Substance P immunoreactive nerves in the rodent cornea. *Neurosci Lett* 25: 95—97, 1981.
- 79) **Shimizu Y**: Localization of neuropeptides in the cornea and uvea of the rat: An immunohistochemical study. *Cell Mol Biol* 28: 103—110, 1982.
- 80) **Tervo K, Tervo T, Eränkö L, Vannas A, Cuello AC, Eränkö O**: Substance P-immunoreactive nerves in the human cornea and iris. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 23: 671—674, 1982.
- 81) **Tervo T, Tervo K, Eränkö L**: Ocular neuropeptides. *Med Biol* 60: 53—60, 1982.
- 82) **Katz DM, Markey KA, Goldstein M, Black IB**: Expression of catecholaminergic characteristics by primary sensory neurons in the normal adult rat *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 3526—3530, 1983.
- 83) **Osborne NN**: The occurrence of serotonergic nerves in the bovine cornea. *Neurosci Lett* 35: 15—18, 1983.
- 84) **Tervo T, Tervo K, Eränkö L, Vannas A, Eränkö O, Cuello AC**: Substance P immunoreaction and acetylcholinesterase activity in the cornea and Gasserian ganglion. *Ophthalmic Res* 15: 280—288, 1983.
- 85) **Lehtosalo JI**: Substance P-like immunoreactive trigeminal ganglion cells supplying the cornea. *Histochemistry* 80: 273—276, 1984.
- 86) **Sasaoka A, Ishimoto I, Kuwayama Y, Sakiyama T, Manabe R, Shiosaka S, et al**: Overall distribution of substance P nerves in the rat cornea and their three-dimensional profiles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25: 351—356, 1984.
- 87) **Stone RA, Kuwayama Y**: Substance P-like immunoreactive nerves in the human eye. *Arch Ophthalmol* 103: 1207—1211, 1985.
- 88) **Colin S, Kruger L**: Peptidergic nociceptive axon visualization in whole-mount preparations of cornea and tympanic membrane in rat. *Brain Res* 398: 199—203, 1986.
- 89) **Kuwayama Y, Stone RA**: Distinct substance P and calcitonin gene-related peptide immunoreactive nerves in the guinea pig eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28: 1947—1954, 1987.
- 90) **Osborne NN, Tobin AB**: Serotonin-accumulating cells in the iris-ciliary body and cornea of various species. *Exp Eye Res* 44: 731—746, 1987.
- 91) **Bee JA, Kuhl U, Edgar D, von der Mark K**: Avian corneal nerves: Co-distribution with collagen type IV and acquisition of substance P immunoreactivity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29: 101—107, 1988.
- 92) **Corvetti G, Pignocchino P, Sisto Daneo L**: Distribution and development of substance P immunoreactive axons in the chick cornea and uvea.

- Basic Appl Histochem 32: 187—192, 1988.
- 93) **Stone RA, McGlinn AM**: Calcitonin gene-related peptide immunoreactive nerves in human and rhesus monkey eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29: 305—310, 1988.
 - 94) **Tinsley PW, Fridland GH, Killmar JT, Desiderio DM**: Purification, characterization, and localization of neuropeptides in the cornea. *Peptides* 9: 1373—1379, 1988.
 - 95) **Ueda S, del Cerro M, LoCascio JA, Aquavella JV**: Peptidergic and catecholaminergic fibers in the human corneal epithelium. An immunohistochemical and electron microscopic study. *Acta Ophthalmol* 70 (Suppl 192): 80—90, 1989.
 - 96) **Uusitalo H, Krootila K, Palkama A**: Calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactive sensory nerves in the human and guinea pig uvea and cornea. *Exp Eye Res* 48: 467—475, 1989.
 - 97) **Jones MA, Marfurt CF**: Calcitonin gene-related peptide and corneal innervation: A developmental study in the rat. *J Comp Neurol* 313: 132—150, 1991.
 - 98) **Beckers HJ, Klooster J, Vrensen GF, Lamers WP**: Ultrastructural identification of trigeminal nerve endings in the rat cornea and iris. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 1979—1986, 1992.
 - 99) **Beckers HJM, Klooster J, Vrensen GF, Lamers WP**: Substance P in rat corneal and iridal nerves: An ultrastructural immunohistochemical study. *Ophthalmic Res* 25: 192—200, 1993.
 - 100) **Tervo K, Latvala TM, Tervo TM**: Recovery of corneal innervation following photorefractive keratoablation. *Arch Ophthalmol* 112: 1466—1470, 1994.
 - 101) **Marfurt CF, Echtenkamp SF**: The effect of diabetes on neuropeptide content in the rat cornea and iris. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 1100—1106, 1995.
 - 102) **von Euler US, Gaddum JH**: An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J Physiol* 72: 74—87, 1931.
 - 103) **Nakanishi S**: Mammalian tachykinin receptors. *Annu Rev Neurosci* 14: 123—136, 1991.
 - 104) **Dutta AS**: Tachykinins, substance P, neurokinin A and neurokinin B. In: Timmerman H (Ed): *Small Peptides, Pharmacology Library*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam 355—414, 1993.
 - 105) **清遠純夫**: サブスタンス P 受容体作用物質, 蛋白質核酸酵素 38: 1841—1852, 1993.
 - 106) **Kahl BF, Reid TW**: Substance P and the eye. *Prog Retin Eye Res* 14: 473—504, 1995.
 - 107) **Ericson S, Sundmark E**: Studies on the sicca syndrome in patients with rheumatoid arthritis. *Acta Rheumatol Scand* 16: 60—80, 1970.
 - 108) **Mandelcorn MS, Blankenship G, Machemer R**: Pars plana vitrectomy for the management of severe diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 81: 561—570, 1976.
 - 109) **Jayson MI, Easty DL**: Ulceration of the cornea in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 36: 428—432, 1977.
 - 110) **Brightbill FS, Myers FL, Bresnick GH**: Postvitrectomy keratopathy. *Am J Ophthalmol* 85: 651—655, 1978.
 - 111) **Perry HD, Foulks GN, Thoft RA, Tolentino FI**: Corneal complications after closed vitrectomy through the pars plana. *Arch Ophthalmol* 96: 1401—1403, 1978.
 - 112) **Foulks GN, Thoft RA, Perry HD, Tolentino FI**: Factors related to corneal epithelial complications after closed vitrectomy in diabetics. *Arch Ophthalmol* 97: 1076—1078, 1979.
 - 113) **Chung H, Tolentino FI, Cajita VN, Acosta J, Refojo MF**: Reevaluation of corneal complications after closed vitrectomy. *Arch Ophthalmol* 106: 916—919, 1988.
 - 114) **Hemady R, Chu W, Foster CS**: Keratoconjunctivitis sicca and corneal ulcers. *Cornea* 9: 170—173, 1990.
 - 115) **Fox RI, Kang HI**: Pathogenesis of Sjogren's syndrome. *Rheum Dis Clin North Am* 18: 517—538, 1992.
 - 116) **Fujikawa LS, Foster CS, Harrist TJ, Lanigan JM, Colvin RB**: Fibronectin in healing rabbit corneal wounds. *Lab Invest* 45: 120—129, 1981.
 - 117) **Suda T, Nishida T, Ohashi Y, Nakagawa S, Manabe R**: Fibronectin appears at the site of corneal stromal wound in rabbits. *Curr Eye Res* 1: 553—556, 1981/1982.
 - 118) **Murakami J, Nishida T, Otori T**: Coordinated appearance of β 1 integrins and fibronectin during corneal wound healing. *J Lab Clin Med* 120: 86—93, 1992.
 - 119) **Tervo T, van Setten GB, Päällysaho T, Tarkkanen A, Tervo K**: Wound healing of the ocular surface. *Ann Med* 24: 19—27, 1992.
 - 120) **Nishida T**: Extracellular matrix and growth factors in corneal wound healing. *Curr Opin Ophthalmol* 4: 4—13, 1993.
 - 121) **Dua HS, Gomes JA, Singh A**: Corneal epithelial wound healing. *Br J Ophthalmol* 78: 401—408, 1994.
 - 122) **中村雅胤, 西田輝夫**: 上皮創傷治癒におけるヒアルロン酸とフィブロネクチン—インテグリン系の相互作用について. *Connective Tissue* 26: 227—235, 1994.
 - 123) **Clark RAF**: Cutaneous wound repair: A review with emphasis on integrin receptor expression. In: Janssen H, et al (Eds): *Wound Healing*. Wrightson Biomedical Publishing Petersfield, 7—17, 1991.
 - 124) **Nishida T, Murakami J, Otori T**: Expression of fibronectin receptor (integrin) in the uterus of rats in relation to the estrous cycle. *Histochemistry* 96: 279—283, 1991.
 - 125) **Clark RAF**: Biology of dermal wound repair. *Dermatol Clin* 11: 647—666, 1993.

- 126) Gailit J, Clark RAF: Wound repair in the context of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 6: 717—725, 1994.
- 127) Nishida T, Nakagawa S, Awata T, Ohashi Y, Watanabe K, Manabe R: Fibronectin promotes epithelial migration of cultured rabbit cornea *in situ*. *J Cell Biol* 97: 1653—1657, 1983.
- 128) Watanabe K, Nakagawa S, Nishida T: Stimulatory effects of fibronectin and EGF on migration of corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28: 205—211, 1987.
- 129) Nishida T, Nakamura M, Mishima H, Otori T: Differential modes of action of fibronectin and epidermal growth factor on rabbit corneal epithelial migration. *J Cell Physiol* 145: 549—554, 1990.
- 130) Nishida T, Nakagawa S, Nishibayashi C, Tanaka H, Manabe R: Fibronectin enhancement of corneal epithelial wound healing of rabbits *in vivo*. *Arch Ophthalmol* 102: 455—456, 1984.
- 131) Nakamura M, Nishida T, Hikida M, Otori T: Combined effects of hyaluronan and fibronectin on corneal epithelial wound closure of rabbit *in vivo*. *Curr Eye Res* 13: 385—388, 1994.
- 132) Nishida T, Nakagawa S, Awata T, Nishibayashi C, Manabe R: Rapid preparation of purified autologous fibronectin eyedrops from patient's plasma. *Jpn J Ophthalmol* 26: 416—424, 1982.
- 133) Nishida T, Ohashi Y, Awata T, Manabe R: Fibronectin. A new therapy for corneal trophic ulcer. *Arch Ophthalmol* 101: 1046—1048, 1983.
- 134) Nishida T, Nakagawa S, Manabe R: Clinical evaluation of fibronectin eyedrops on epithelial disorders after herpetic keratitis. *Ophthalmology* 92: 213—216, 1985.
- 135) Nishida T, Nakagawa S, Awata T, Tani Y, Manabe R: Fibronectin eyedrops for traumatic recurrent corneal erosion. *Lancet* 2: 521—522, 1983.
- 136) 石橋康久, 松本雄二郎, 河野恵子: 角膜上皮障害に対するフィブロネクチンの臨床応用. *最新医学* 39: 2101—2103, 1984.
- 137) 松本雄二郎, 石橋康久, 河野恵子, 河野一郎: 難治性角膜上皮疾患に対するフィブロネクチン点眼の臨床応用. *眼臨* 79: 622—626, 1985.
- 138) 宮田和典, 中蔵信一, 沼賀二郎, 谷島輝雄: 5-Fluorouracil による角膜上皮障害に対するフィブロネクチンの臨床応用. *あたらしい眼科* 3: 1049—1051, 1986.
- 139) 高橋栄一, 齊藤直也, 皆川和男: フィブロネクチン点眼剤の調製と臨床応用. *医薬ジャーナル* 22: 67—71, 1986.
- 140) Nishida T, Yagi J, Fukuda M, Kusube T, Otori T: Spontaneous persistent epithelial defects after cataract surgery. *Cornea* 6: 32—37, 1987.
- 141) 森本啓介, 西田輝夫, 大鳥利文: 三叉神経鞘腫摘出後にみられた neurotrophic ulcer に対するフィブロネクチン点眼療法の効果. *眼科* 30: 729—732, 1988.
- 142) Nishida T: Role of fibronectin in corneal epithelial wound healing. In: Cavanagh HD (Ed): *The Cornea: Transactions of the World Congress on the Cornea III*. Raven Press, New York, 619—625, 1988.
- 143) 鈴木雅信, 安藤一彦, 宮田和典, 澤 充, 谷島輝雄: フィブロネクチンの臨床応用. *眼紀* 40: 2699—2703, 1989.
- 144) 大橋秀行, 西田輝夫, 大鳥利文: 角膜熱傷による遷延性角膜上皮欠損に対するフィブロネクチン点眼療法. *眼紀* 41: 945—950, 1990.
- 145) Polack FM: Healon (Na hyaluronate). *Cornea* 5: 81—93, 1986.
- 146) Balazs EA, Denlinger JL: Clinical uses of hyaluronan. In: Balazs EA, et al (Eds): *The Biology of Hyaluronan*, Ciba Foundation Symposium 143. Wiley, Chichester 265—280, 1989.
- 147) Bernatchez SF: Use of hyaluronic acid in ocular therapy. In: Edoman P (Ed): *Biopharmaceutics of Ocular Drug Delivery*. CRC Press, Boca Raton 105—120, 1993.
- 148) Goa KL, Benfield P: Hyaluronic acid. A review of its pharmacology and use as a surgical aid in ophthalmology, and its therapeutic potential in joint disease and wound healing. *Drugs* 47: 536—566, 1994.
- 149) Miyauchi S, Sugiyama T, Machida A, Sekiguchi T, Miyazaki K, Tokuyasu K, et al: The effect of sodium hyaluronate on the migration of rabbit corneal epithelium. I. An *in vitro* study. *J Ocular Pharmacol* 6: 91—99, 1990.
- 150) Nishida T, Nakamura M, Mishima H, Otori T: Hyaluronan stimulates corneal epithelial migration. *Exp Eye Res* 53: 753—758, 1991.
- 151) Sugiyama T, Miyauchi S, Machida A, Miyazaki K, Tokuyasu K, Nakazawa K: The effect of sodium hyaluronate on the migration of rabbit corneal epithelium. II. The effect of topical administration. *J Ocular Pharmacol* 7: 53—64, 1991.
- 152) Nakamura M, Hikida M, Nakano T: Concentration and molecular weight dependency of rabbit corneal epithelial wound healing on hyaluronan. *Curr Eye Res* 11: 981—986, 1992.
- 153) Nakamura M, Mishima H, Nishida T, Otori T: Binding of hyaluronan to plasma fibronectin increases the attachment of corneal epithelial cells to a fibronectin matrix. *J Cell Physiol* 159: 415—422, 1994.
- 154) Nakamura M, Nishida T: Recent developments in the use of hyaluronan in wound healing. *Exp Opin Invest Drugs* 4: 175—188, 1995.
- 155) 濱野 孝, 堀本幸嗣, 李 三榮, 米虫節夫: ハードコンタクトレンズ装用眼における3時—9時方向の角結膜上皮障害に対するヒアルロン酸ナトリウム点眼液の効果—色彩計を用いた充血の定量的評価—. *あたらしい眼科* 10: 627—630, 1993.
- 156) 糸井素純, 金 玉順, 木村泰朗, 金井 淳, 百瀬隆行, 神吉和男, 他: 多施設二重盲検法によるコンタクトレンズ装用者における角膜上皮障害に対するヒアルロン酸ナトリウム点眼液の臨床評価. *あたらしい眼科* 10: 617—626, 1993.

- 157) 北野周作, 大鳥利文, 増田寛次郎: 0.3% ヒアルロン酸ナトリウム点眼液の重症角結膜上皮障害に対する効果. *あたらしい眼科* 10: 603—610, 1993.
- 158) 北野周作, 大鳥利文, 増田寛次郎, 米虫節夫: 角膜上皮障害に対するヒアルロン酸点眼液の臨床効果—グルタチオン点眼液との比較試験—. *眼紀* 44: 487—497, 1993.
- 159) Shimmura S, Ono M, Shinozaki K, Toda I, Takamura E, Mashima Y, et al: Sodium hyaluronate eyedrops in the treatment of dry eyes. *Br J Ophthalmol* 79: 1007—1011, 1995.
- 160) Sigelman S, Friedenwald JS: Mitotic and wound-healing activities of the corneal epithelium. *Arch Ophthalmol* 52: 46—57, 1954.
- 161) 三島濟一: 角膜に対する三叉神経支配の意義に就いて. *日眼会誌* 59: 205—213, 1955.
- 162) Mishima S: The effects of the denervation and the stimulation of the sympathetic and the trigeminal nerve on the mitotic rate of the corneal epithelium in the rabbit. *Jpn J Ophthalmol* 1: 65—73, 1957.
- 163) 杉浦清治, 松田英彦: 三叉神経切断による角膜上皮細胞の変化について. *日眼会誌* 71: 1123—1137, 1967.
- 164) Fujita S, Shimizu T, Izumi K, Fukuda T, Same-shima M, Ohba N: Capsaicin-induced neuroparalytic keratitis-like corneal changes in the mouse. *Exp Eye Res* 38: 165—175, 1984.
- 165) Alper MG: The anesthetic eye: An investigation of changes in the anterior ocular segment of the monkey caused by interrupting the trigeminal nerve at various levels along its course. *Trans Am Ophthalmol Soc* 73: 323—365, 1976.
- 166) Schimmelpfennig B, Beuerman R: A technique for controlled sensory denervation of the rabbit cornea. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 218: 287—293, 1982.
- 167) Gallar J, Pozo MA, Rebollo I, Belmonte C: Effects of capsaicin on corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 1968—1974, 1990.
- 168) Gilbard JP, Rossi SR: Tear film and ocular surface changes in a rabbit model of neurotrophic keratitis. *Ophthalmology* 97: 308—312, 1990.
- 169) 荒木かおる, 大橋裕一, 桑山泰明, 木下 茂, 眞鍋禮三: 栄養障害性角膜潰瘍モデル—経頭蓋法による家兎三叉神経切断法—. *眼紀* 42: 857—860, 1991.
- 170) 荒木かおる, 木下 茂, 孫 乃学, 桑山泰明, 大橋裕一, 眞鍋禮三: 三叉神経切断の家兎角膜上皮に及ぼす影響. *日眼会誌* 96: 710—714, 1992.
- 171) 荒木かおる, 木下 茂, 桑山泰明, 大橋裕一: 三叉神経切断眼における角膜上皮の創傷治癒速度について. *日眼会誌* 97: 906—912, 1993.
- 172) Baker KS, Anderson SC, Romanowski EG, Thoft RA, SundarRaj N: Trigeminal ganglion neurons affect corneal epithelial phenotype. Influence on type VII collagen expression *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 137—144, 1993.
- 173) Araki K, Ohashi Y, Kinoshita S, Hayashi K, Kuwayama Y, Tano Y: Epithelial wound healing in the denervated cornea. *Curr Eye Res* 13: 203—211, 1994.
- 174) Nishida T, Nakamura M, Ofuji K, Reid TW, Mannis MJ, Murphy CJ: Synergistic effects of substance P with insulin-like growth factor-1 on epithelial migration of the cornea. *J Cell Physiol* 169: 159—166, 1996.
- 175) Nakamura M, Nishida T, Ofuji K, Reid TW, Mannis MJ, Murphy CJ: Synergistic effect of substance P with epidermal growth factor on epithelial migration in rabbit cornea. *Exp Eye Res* 65: 321—329, 1997.
- 176) 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.
- 177) van Setten GB, Viinikka L, Tervo T, Pesonen K, Tarkkanen A, Perheentupa J: Epidermal growth factor is a constant component of normal human tear fluid. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 227: 184—187, 1989.
- 178) van Setten GB: Epidermal growth factor in human tear fluid: Increased release but decreased concentrations during reflex tearing. *Curr Eye Res* 9: 79—83, 1990.
- 179) van Setten GB, Tervo T, Viinikka L, Perheentupa J, Tarkkanen A: Epidermal growth factor in human tear fluid: A minireview. *Int Ophthalmol* 15: 359—362, 1991.
- 180) van Setten G, Schultz G: Transforming growth factor-alpha is a constant component of human tear fluid. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 232: 523—526, 1994.
- 181) Gupta A, Monroy D, Ji Z, Yoshino K, Huang A, Pflugfelder SC: Transforming growth factor beta-1 and beta-2 in human tear fluid. *Curr Eye Res* 15: 605—614, 1996.
- 182) Kokawa N, Sotozono C, Nishida K, Kinoshita S: High total TGF- β 2 levels in normal human tears. *Curr Eye Res* 15: 341—343, 1996.
- 183) Li Q, Weng J, Mohan RR, Bennett GL, Schwall R, Wang ZF, et al: Hepatocyte growth factor and hepatocyte growth factor receptor in the lacrimal gland, tears, and cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 727—739, 1996.
- 184) Schüller S, Knorr M, Steuhl KP, Thiel HJ: Lacrimal secretion of human epidermal growth factor in perforating keratoplasty. *Ger J Ophthalmol* 5: 268—274, 1996.
- 185) Sheardown H, Cheng YL: Tear EGF concentration following corneal epithelial wound creation. *J Ocular Pharmacol Ther* 12: 239—243, 1996.
- 186) van Setten GB: Basic fibroblast growth factor in human tear fluid: Detection of another growth factor. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 234: 275—277, 1996.
- 187) Yoshino K, Garg R, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC: Production and secretion of transforming growth factor beta (TGF- β) by the human la-

- crimal gland. *Curr Eye Res* 15: 615–624, 1996.
- 188) **Yoshino K, Monroy D, Pflugfelder SC**: Cholinergic stimulation of lactoferrin and epidermal growth factor secretion by the human lacrimal gland. *Cornea* 15: 617–621, 1996.
 - 189) **Fukuda M, Mishima H, Otori T**: Detection of interleukin-1 β in the tear fluid of patients with corneal disease with or without conjunctival involvement. *Jpn J Ophthalmol* 41: 63–66, 1997.
 - 190) **Vesaluoma M, Teppo AM, Grönhagen-Riska C, Tervo T**: Release of TGF- β 1 and VEGF in tears following photorefractive keratectomy. *Curr Eye Res* 16: 19–25, 1997.
 - 191) **Nishida T, Nakamura M, Mishima H, Otori T**: Interleukin 6 promotes epithelial migration by a fibronectin-dependent mechanism. *J Cell Physiol* 153: 1–5, 1992.
 - 192) **Salmon WD, Daughaday WH**: A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage *in vitro*. *J Lab Clin Med* 49: 825–836, 1957.
 - 193) **Daughaday WH, Hall K, Raben MS, Salmon WD, van den Brande JL, van Wyk JJ**: Somatomedin: Proposed designation for sulphation factor. *Nature* 235: 107–109, 1972.
 - 194) **Rinderknecht E, Humbel RE**: The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 253: 2769–2776, 1978.
 - 195) **Daughaday WH, Rotwein P**: Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations. *Endocr Rev* 10: 68–91, 1989.
 - 196) **Heyner S, Garside WT**: Biological actions of IGFs in mammalian development. *Bioessays* 16: 55–57, 1994.
 - 197) **高橋伸一郎, 竹中麻子, 野口 忠**: 動物の成長を司るホルモン, インスリン様成長因子 I, 蛋白質核酸酵素 41: 267–280, 1996.
 - 198) **Verschure PJ, Van Noorden CJ, Van Marle J, Van den Berg WB**: Articular cartilage destruction in experimental inflammatory arthritis: Insulin-like growth factor-1 regulation of proteoglycan metabolism in chondrocytes. *Histochem J* 28: 835–857, 1996.
 - 199) **Lavielle S, Chassaing G, Ploux O, Loeuillet D, Besseyre J, Julien S, et al**: Analysis of tachykinin binding site interactions using constrained analogues of tachykinins. *Biochem Pharmacol* 37: 41–49, 1988.
 - 200) **Regoli D, Drapeau G, Dion S, Couture R**: New selective agonists for neurokinin receptors: Pharmacological tools for receptor characterization. *Trends Pharmacol Sci* 9: 290–295, 1988.
 - 201) **Pessin JE, Frattali AL**: Molecular dynamics of insulin/IGF-I receptor transmembrane signaling. *Mol Reprod Dev* 35: 339–344, 1993.
 - 202) **Rosenzweig SA, Oemar BS, Law NM, Shan-kavaram UT, Miller BS**: Insulin like growth factor 1 receptor signal transduction to the nucleus. *Adv Exp Med Biol* 343: 159–168, 1993.
 - 203) **Jones JL, Clemmons DR**: Insulin-like growth factors and their binding proteins: Biological actions. *Endocr Rev* 16: 3–34, 1995.
 - 204) **LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT, Jr**: Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 16: 143–163, 1995.
 - 205) **Kadowaki T, Tobe K, Honda-Yamamoto R, Tamemoto H, Kaburagi Y, Momomura K, et al**: Signal transduction mechanism of insulin and insulin-like growth factor-1. *Endocr J* 43: S 33–41, 1996.
 - 206) **Nakamura M, Ofuji K, Chikama T, Nishida T**: The NK 1 receptor and its participation in the synergistic enhancement of corneal epithelial migration by substance P and insulin-like growth factor-1. *Br J Pharmacol* 120: 547–552, 1997.
 - 207) **Tervo K, Tervo T, van Setten GB, Virtanen I**: Integrins in human corneal epithelium. *Cornea* 10: 461–465, 1991.
 - 208) **Gipson IK, Watanabe H, Zieske JD**: Corneal wound healing and fibronectin. *Int Ophthalmol Clin* 33: 149–163, 1993.
 - 209) **Nakamura M, Nishida T**: Role of integrin and fibronectin in corneal epithelial migration. *Jpn J Ophthalmol* 38: 246–251, 1994.
 - 210) **Hynes RO, Yamada KM**: Fibronectins: Multifunctional modular glycoproteins. *J Cell Biol* 95: 369–377, 1982.
 - 211) **Hynes R**: Molecular biology of fibronectin. *Ann Rev Cell Biol* 1: 67–90, 1985.
 - 212) **Ruoslahti E**: Integrins. *J Clin Invest* 87: 1–5, 1991.
 - 213) **Hynes RO**: Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69: 11–25, 1992.
 - 214) **Ruoslahti E**: Fibronectin and its $\alpha 5 \beta 1$ integrin receptor in malignancy. *Invasion Metastasis* 14: 87–97, 1994–5.
 - 215) **Akiyama SK, Olden K, Yamada KM**: Fibronectin and integrins in invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 14: 173–189, 1995.
 - 216) **Faull RJ, Ginsberg MH**: Dynamic regulation of integrins. *Stem Cells* 13: 38–46, 1995.
 - 217) **Ruoslahti E**: Integrin signaling and matrix assembly. *Tumor Biol* 17: 117–124, 1996.
 - 218) **Parsons JT, Schaller MD, Hildebrand J, Leu TH, Richardson A, Otey C**: Focal adhesion kinase: Structure and signalling. *J Cell Sci Suppl* 18: 109–113, 1994.
 - 219) **Schaller MD, Parsons JT**: Focal adhesion kinase and associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 6: 705–710, 1994.
 - 220) **Hanks SK, Polte TR**: Signaling through focal adhesion kinase. *Bioessays* 19: 137–145, 1997.
 - 221) **Turner CE**: Paxillin: A cytoskeletal target for

- tyrosine kinases. Bioessays 16: 47—52, 1994.
- 222) **Matsuda M, Kurata T**: Emerging components of the Crk oncogene product: The first identified adaptor protein. Cell Signal 8: 335—340, 1996.
 - 223) **Seeger R, Krebs EG**: The MAPK signaling cascade. FASEB J 9: 726—735, 1995.
 - 224) **Geilen CC, Wiprecht M, Orfanos CE**: The mitogen-activated protein kinases system (MAP kinase cascade): Its role in skin signal transduction. A review. J Dermatol Sci 12: 255—262, 1996.
 - 225) **Whitmarsh AJ, Davis RJ**: Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. J Mol Med 74: 589—607, 1996.
 - 226) **Nakamura M, Ofuji K, Chikama T, Nishida T**: Combined effects of substance P and insulin-like growth factor-1 on corneal epithelial wound closure of rabbit *in vivo*. Curr Eye Res 16: 275—278, 1997.
 - 227) **Hartschuh W, Weihe E, Reinecke M**: Peptidergic (neurotensin, VIP, substance P) nerve fibres in the skin. Immunohistochemical evidence of an involvement of neuropeptides in nociception, pruritus and inflammation. Br J Dermatol 109: 14—17, 1983.
 - 228) **Pernow B**: Substance P. Pharmacol Rev 35: 85—141, 1983.
 - 229) **McGillis JP, Organist ML, Payan DG**: Substance P and immunoregulation. Fed Proc 46: 196—199, 1987.
 - 230) **Wallengren J, Hakanson R**: Effects of substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide in human skin and their involvement in sensory nerve-mediated responses. Eur J Pharmacol 143: 267—273, 1987.
 - 231) **Payan DG**: Neuropeptides and inflammation: The role of substance P. Annu Rev Med 40: 341—352, 1989.
 - 232) **Skerrett PJ**: Substance P causes pain but also heals. Science 249: 625, 1990.
 - 233) **Otsuka M, Yoshioka K**: Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. Physiol Rev 73: 229—308, 1993.
 - 234) **北 耕平**: Riley-Day 症候群 (familial dysautonomia). 日本臨床 50: 846—851, 1992.
 - 235) **Blumenfeld A, Slaughter SA, Axelrod FB, Lucente DE, Maayan C, Liebert CB, et al**: Localization of the gene for familial dysautonomia on chromosome 9 and definition of DNA markers for genetic diagnosis. Nature Genetics 4: 160—164, 1993.
 - 236) **Brown SM, Lamberts DW, Reid TW, Nishida T, Murphy CJ**: Neurotrophic and anhidrotic keratopathy treated with substance P and insulinlike growth factor 1. Arch Ophthalmol 115: 926—927, 1997.
 - 237) **須田正巳**: 酵素研究の進め方Ⅲ. 赤堀四郎(編): 酵素研究法第2巻. 朝倉書店, 東京, I-VI, 1955.
 - 238) **Thompson P, Desbordes JM, Giraud J, Pouliquen Y, Barritault D, Courtois Y**: The effect of an eye derived growth factor (EDGF) on corneal epithelial regeneration. Exp Eye Res 34: 191—199, 1982.
 - 239) **Petroutsos G, Courty J, Guimaraes R, Pouliquen Y, Barritault D, Plouët J, et al**: Comparison of the effects of EGF, pFGF and EDGF on corneal epithelium wound healing. Curr Eye Res 3: 593—598, 1984.
 - 240) **Mishima H, Nakamura M, Murakami J, Nishida T, Otori T**: Transforming growth factor- β modulates effects of epidermal growth factor on corneal epithelial cells. Curr Eye Res 11: 691—696, 1992.
 - 241) **Schultz G, Chegini N, Grant M, Khaw P, MacKay S**: Effects of growth factors on corneal wound healing. Acta Ophthalmol 70 (Suppl 220): 60—66, 1992.
 - 242) **van Setten GB, Tervo T, Tervo K, Tarkkanen A**: Epidermal growth factor (EGF) in ocular fluids: Presence, origin and therapeutical considerations. Acta Ophthalmol 70 (Suppl 220): 54—59, 1992.
 - 243) **Maldonado BA, Furcht LT**: Epidermal growth factor stimulates integrin-mediated cell migration of cultured human corneal epithelial cells on fibronectin and arginine-glycine-aspartic acid peptide. Invest Ophthalmol Vis Sci 36: 2120—2126, 1995.
 - 244) **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.
 - 245) **Petroutsos G, Sebag J, Courtois Y**: Epidermal growth factor increases tensile strength during wound healing. Ophthalmic Res 18: 299—300, 1986.
 - 246) **Brazzell RK, Stern ME, Aquavella JV, Beuerman RW, Baird L**: Human recombinant epidermal growth factor in experimental corneal wound healing. Invest Ophthalmol Vis Sci 32: 336—340, 1991.
 - 247) **Sheardown H, Wedge C, Chou L, Apel R, Rootman DS, Cheng YL**: Continuous epidermal growth factor delivery in corneal epithelial wound healing. Invest Ophthalmol Vis Sci 34: 3593—3600, 1993.
 - 248) **Daniele S, Frati L, Fiore C, Santoni G**: The effect of the epidermal growth factor (EGF) on the corneal epithelium in humans. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 210: 159—165, 1979.
 - 249) **Caporossi A, Manetti C**: Epidermal growth factor in topical treatment following epikeratoplasty. Ophthalmologica 205: 121—124, 1992.
 - 250) **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.
 - 251) **Grant MB, Khaw PT, Schultz GS, Adams JL,**

- Shimizu RW: Effects of epidermal growth factor, fibroblast growth factor, and transforming growth factor- β on corneal cell chemotaxis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 3292-3301, 1992.
- 252) Assouline M, Hutchinson C, Morton K, Mascarelli F, Jeanny JC, Fayein N, et al: *In vivo* binding of topically applied human bFGF on rabbit corneal epithelial wound. *Growth Factors* 1: 251-261, 1989.
- 253) Rieck P, Assouline M, Savoldelli M, Hartmann C, Jacob C, Pouliquen Y, et al: Recombinant human basic fibroblast growth factor (Rh-bFGF) in three different wound models in rabbits: Corneal wound healing effect and pharmacology. *Exp Eye Res* 54: 987-998, 1992.
- 254) Rieck P, David T, Hartmann C, Renard G, Courtois Y, Pouliquen Y: Basic fibroblast growth factor modulates corneal wound healing after excimer laser keratomileusis in rabbits. *Ger J Ophthalmol* 3: 105-111, 1994.
- 255) David T, Rieck P, Renard G, Hartmann C, Courtois Y, Pouliquen Y: Corneal wound healing modulation using basic fibroblast growth factor after excimer laser photorefractive keratectomy. *Cornea* 14: 227-234, 1995.
- 256) Wilson SE, Walker JW, Chwang EL, He YG: Hepatocyte growth factor, keratinocyte growth factor, their receptors, fibroblast growth factor receptor-2, and the cells of the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 2544-2561, 1993.
- 257) Sotozono C, Kinoshita S, Kita M, Imanishi J: Paracrine role of keratinocyte growth factor in rabbit corneal epithelial cell growth. *Exp Eye Res* 59: 385-392, 1994.
- 258) Sotozono C, Inatomi T, Nakamura M, Kinoshita S: Keratinocyte growth factor accelerates corneal epithelial wound healing *in vivo*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 1524-1529, 1995.
- 259) Rich LF, Weimar VL, Squires EL, Haraguchi KH: Stimulation of corneal wound healing with mesodermal growth factor. *Arch Ophthalmol* 97: 1326-1330, 1979.
- 260) Smith RS, Smith LA, Rich L, Weimar V: Effects of growth factors on corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 20: 222-229, 1981.
- 261) Hoppenreijns VP, Pels E, Vrensen GF, Felten PC, Treffers WF: Platelet-derived growth factor: Receptor expression in corneas and effects on corneal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 637-649, 1993.
- 262) Murali S, Hardten DR, DeMartelaere S, Olevsky OM, Mindrup EA, Hecht ML, et al: Effect of topically administered platelet-derived growth factor on corneal wound strength. *Curr Eye Res* 13: 857-862, 1994.
- 263) Hayashi K, Frangieh G, Wolf G, Kenyon KR: Expression of transforming growth factor- β in wound healing of vitamin A-deficient rat corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 239-247, 1989.
- 264) Boisjoly HM, Laplante C, Bernatchez SF, Salesse C, Giasson M, Joly MC: Effects of EGF, IL-1 and their combination on *in vitro* corneal epithelial wound closure and cell chemotaxis. *Exp Eye Res* 57: 293-300, 1993.
- 265) Nishida T, Nakamura M, Mishima H, Otori T, Hikida M: Interleukin 6 facilitates corneal epithelial wound closure *in vivo*. *Arch Ophthalmol* 110: 1292-1294, 1992.
- 266) Cameron JD, Hagen ST, Waterfield RR, Furcht LT: Effects of matrix proteins on rabbit corneal epithelial cell adhesion and migration. *Curr Eye Res* 7: 293-301, 1988.
- 267) Ohji M, Mandarino L, SundarRaj N, Thoft RA: Corneal epithelial cell attachment with endogenous laminin and fibronectin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 2487-2492, 1993.
- 268) Wang X, Kamiyama K, Iguchi I, Kita M, Imanishi J: Enhancement of fibronectin-induced migration of corneal epithelial cells by cytokines. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 4001-4007, 1994.
- 269) Gundorova RA, Brikman IV, Ibadova SI, Isaeva RT: Stimulation of penetrating corneal wound healing by exogenous fibronectin. *Eur J Ophthalmol* 4: 202-210, 1994.
- 270) Inoue M, Katakami C: The effect of hyaluronic acid on corneal epithelial cell proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 2313-2315, 1993.
- 271) Cameron JD, Skubitz AP, Furcht LT: Type IV collagen and corneal epithelial adhesion and migration. Effects of type IV collagen fragments and synthetic peptides on rabbit corneal epithelial cell adhesion and migration *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 2766-2773, 1991.
- 272) Maldonado BA, Furcht LT: Involvement of integrins with adhesion-promoting, heparin-binding peptides of type IV collagen in cultured human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 364-372, 1995.
- 273) 加畑隆通, 石橋康久, 本村幸子, 赤間高雄, 八藤後武美, 河野一郎, 他: ウサギ角膜上皮創傷治癒過程に及ぼすビトロネクチンの影響. *日眼会誌* 94: 457-461, 1990.