

翼状片と肥満細胞

—翼状片の肥満細胞では塩基性線維芽細胞増殖因子の発現が亢進している—

中神 哲司, 村上 晶, 沖坂 重邦

防衛医科大学校眼科学教室

要 約

翼状片 5 例および正常結膜 4 例の切除組織について免疫組織化学的に塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)の局在を, また, *in situ* hybridization 法により bFGF 特異的メッセンジャー RNA (bFGFmRNA) の局在を検討した。翼状片, 正常結膜ともトルイジンブルー染色でメタクロマジーを呈する肥満細胞に, bFGF 免疫組織染色で強い陽性所見が得られた。翼状片組織のメタクロマジー陽性肥満細胞密度は, 正常結膜に比較し有意に多く認められ, 肥満細胞における bFGF 陽性率は, 翼状片 84%, 正常結膜 69% であった。*In situ* hybridization 法での検討から, 翼状片において多くの肥満細胞に bFGFmRNA

陽性所見が得られたが, 正常対照者の結膜では, bFGFmRNA 陽性肥満細胞はほとんど認められなかった。翼状片組織では, 肥満細胞の bFGF 産生および保有が亢進しており, 肥満細胞の bFGF が翼状片の進展に関与している可能性があると考えられた。(日眼会誌 102: 300—306, 1998)

キーワード: 翼状片, 肥満細胞, 塩基性線維芽細胞増殖因子, 免疫組織化学, *In situ* hybridization 法

Pterygium and Mast Cells

— Expression of Basic Fibroblast Growth Factor Increase in Mast Cells of the Pterygium —

Tetsushi Nakagami, Akira Murakami and Shigekuni Okisaka

Department of Ophthalmology, National Defense Medical College

Abstract

We examined the expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) protein immunohistochemically, and bFGF specific messenger RNA (bFGFmRNA) by *in situ* hybridization in the excised tissue of 5 cases of pterygium and 4 cases of normal conjunctiva. Immunohistochemical staining for bFGF showed strong positive staining in metachromatic mast cells stained with toluidine blue in the pterygium and in normal conjunctival specimens. The mean metachromatic mast cell count in pterygium specimens was increased significantly when compared with normal conjunctiva. In mast cells, bFGF positive rate was 84% in pterygium specimens, and

69% in normal conjunctival specimens. *In situ* hybridization indicated that the bFGFmRNA is located in most mast cells in pterygium specimens, but in only a few mast cells in normal conjunctival specimens. These results suggest that increased bFGF protein produced and stored by mast cells in the pterygium may contribute to its progression. (J Jpn Ophthalmol Soc 102: 300—306, 1998)

Key words: Pterygium, Mast cells, Basic fibroblast growth factor, Immunohistochemistry, *In situ* hybridization

I 緒 言

塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)は線維芽細胞の増殖を促進する因子とし

て発見されたが, 線維芽細胞のみでなく, 多種にわたる細胞の増殖促進, 細胞運動, 細胞分化に関与し, 生体内では血管新生や創傷治癒に深く関わっていることが知られている¹⁾²⁾, 組織学的に線維芽細胞の増殖, 膠原線維, 類弾性

別刷請求先: 359-0042 埼玉県所沢市並木 3—2 防衛医科大学校眼科学教室 中神 哲司
(平成 9 年 9 月 1 日受付, 平成 9 年 12 月 15 日改訂受理)

Reprint requests to: Tetsushi Nakagami, M.D. Department of Ophthalmology, National Defense Medical College,
3-2 Namiki, Tokorozawa-shi, Saitama-ken 359-0042, Japan

(Received September 1, 1997 and accepted in revised form December 15, 1997)

線維の蓄積および著明な血管侵入をみる^{3,4)}翼状片の発生、進展において bFGF が関与している可能性が高いと考えられる。一方、翼状片組織には正常結膜に比較し肥満細胞密度が明らかに高いことが報告⁵⁾されている。従来、この肥満細胞と bFGF との関係について、肥満細胞由来のヘパリンがヘパリン結合性増殖因子である bFGF との結合を介して関与すると考えられてきた^{6,7)}が、最近肥満細胞が bFGF を直接産生、貯蔵することが報告⁸⁻¹⁰⁾され注目されている。今回、翼状片と正常結膜において、免疫組織化学的に bFGF タンパクの局在を、また、*in situ* hybridization 法により bFGF メッセンジャー RNA (bFGFmRNA) の局在を検討した。また、bFGF 陽性細胞および bFGFmRNA 陽性細胞と肥満細胞との関係について検討し、興味ある知見が得られたのでここに報告する。

II 実験方法

1. 対 象

平成 8 年 7 月から平成 9 年 4 月までに、防衛医科大学校病院で切除された翼状片 5 例、年齢 55.0 ± 7.97 (平均値 $\pm$ 標準偏差) 歳、および他の内眼手術の結膜切開部から切除された 2×3 mm の鼻側輪部付近正常結膜 4 例、年齢 62.5 ± 13.2 歳を対象とした。正常結膜の採取は、術前に本研究に対する説明の上、同意が得られた患者に対して施行されたものである。

2. 組織切片の作製

切除された組織を 4°C のザンボン固定液で一晩固定後 OCT compound[®] (Miles) に包埋し、急速凍結した。5 μm の凍結薄切切片を作製し、以下に示す方法で免疫組織化学的検索および *in situ* hybridization 法で検討した。組織片の作製に当たって、固定前に標本を十分伸展し、病変の先端部から基底部まで観察できるように中央部を長軸に沿って細切した。

3. 免疫組織化学的検討

薄切切片をメタノールに溶解した 0.3% 過酸化水素溶液に 30 分間浸漬させ、内因性ペルオキシダーゼを除去後、一次抗体として 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗ヒト bFGF モノクローナル抗体 (和光)、および陰性対照として 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のマウス IgG 1 (DAKO) を 4°C で一晩反応させ、Labelled Streptavidin Biotin 法 (ヒストファイン SAB-PO (M) キット[®], ニチレイ) により免疫組織化学染色を行った。発色を 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) で行い、光学顕微鏡を用いて赤色に染色された陽性細胞 (bFGF 陽性細胞) の分布を観察した。続いて、組織切片を写真撮影後メタノールに浸漬させ、AEC を完全に溶解脱色し、同一切片を 0.5 N 塩酸に溶解した 1% トルイジンブルー¹²⁾ で 10 分間染色し、再び写真撮影した。200 倍に拡大した bFGF 免疫組織化学染色後、およびトルイジンブルー染色後両者のカラー写真を比較することで、切片全範囲に認められる

bFGF 陽性細胞数、トルイジンブルー染色で赤紫色にメタクロマジーした細胞 (メタクロマジー陽性細胞) 数、および bFGF 陽性かつメタクロマジー陽性細胞数を計測した。また、明らかな凝血塊および正常角膜部分を除いた上皮組織の面積を画像解析ソフト (NIH image[®]) を用いて計測し、メタクロマジー陽性細胞密度を計算した。

4. *In situ* hybridization 法

プローブとして Reed ら⁸⁾¹³⁾の報告と同様の合成オリゴヌクレオチド (5'-AGCCAGGTAACGGTTAGCACACA-CTCC-3': ヒト bFGFmRNA 692~718 に相補的なアンチセンス鎖、および陰性対照としてセンス鎖) にジゴキシゲニンをテーリングしたものを用いた。ジゴキシゲニンのテーリングは DIG oligonucleotide tailing kit[®] (Boehringer Mannheim) を用いて digoxigenin-labeled deoxyuridine-triphosphate/deoxyadenosine-triphosphate (DIG-dUTP/dATP) 法で行った。1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のプローブ、25% ホルムアミド、1 $\times$ Denhardt 溶液、4 $\times$ saline-sodium citrate buffer (SSC)、10% (W/V) 硫酸デキストラン、サケ精子 DNA 10 mg/ml を含む hybridization 溶液で 37°C 一晚ハイブリダイズした。その後、標本を最終的に 0.25 $\times$ SSC、 37°C で洗浄した。500 倍アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体 (Boehringer Mannheim) と室温で 2 時間反応後、内因性アルカリフォスファターゼ活性阻害のため、0.2 mM levamisole を含んだ nitroblue tetrazolium salt/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (NBT/BCIP) 溶液で青色に発色させた。また、連続切片を 0.5 N 塩酸に溶解した 1% トルイジンブルー¹²⁾ で 10 分間染色し、メタクロマジー陽性細胞と比較した。

III 結 果

1. 免疫組織化学的検討

1) bFGF タンパクの局在

翼状片先端部に近接する角膜上皮細胞層、およびボウマン膜に明らかな bFGF 陽性所見は認められなかった (図 1 a)。翼状片、正常結膜とも上皮細胞層にびまん性の弱い陽性所見が得られた。上皮組織には、翼状片、正常結膜とも細胞質に強い陽性所見を認める細胞が散在していた。この細胞以外に、形態的に血管内皮細胞および線維芽細胞と考えられる一部の細胞に弱い陽性所見が認められた (図 1 a, b, 2)。陰性対照では明らかな染色を認めなかった。

2) bFGF 陽性細胞およびメタクロマジー陽性細胞の比較

連続二重染色の結果から、翼状片、正常結膜ともに上皮下に散在する bFGF 陽性細胞の多くはメタクロマジー陽性であり、肥満細胞と考えられた。bFGF 陽性細胞中メタクロマジー陽性肥満細胞である割合は翼状片に高かった (表 1)。また、メタクロマジー陽性の肥満細胞の多くは bFGF 陽性であったが、明らかな陽性所見を呈さない細

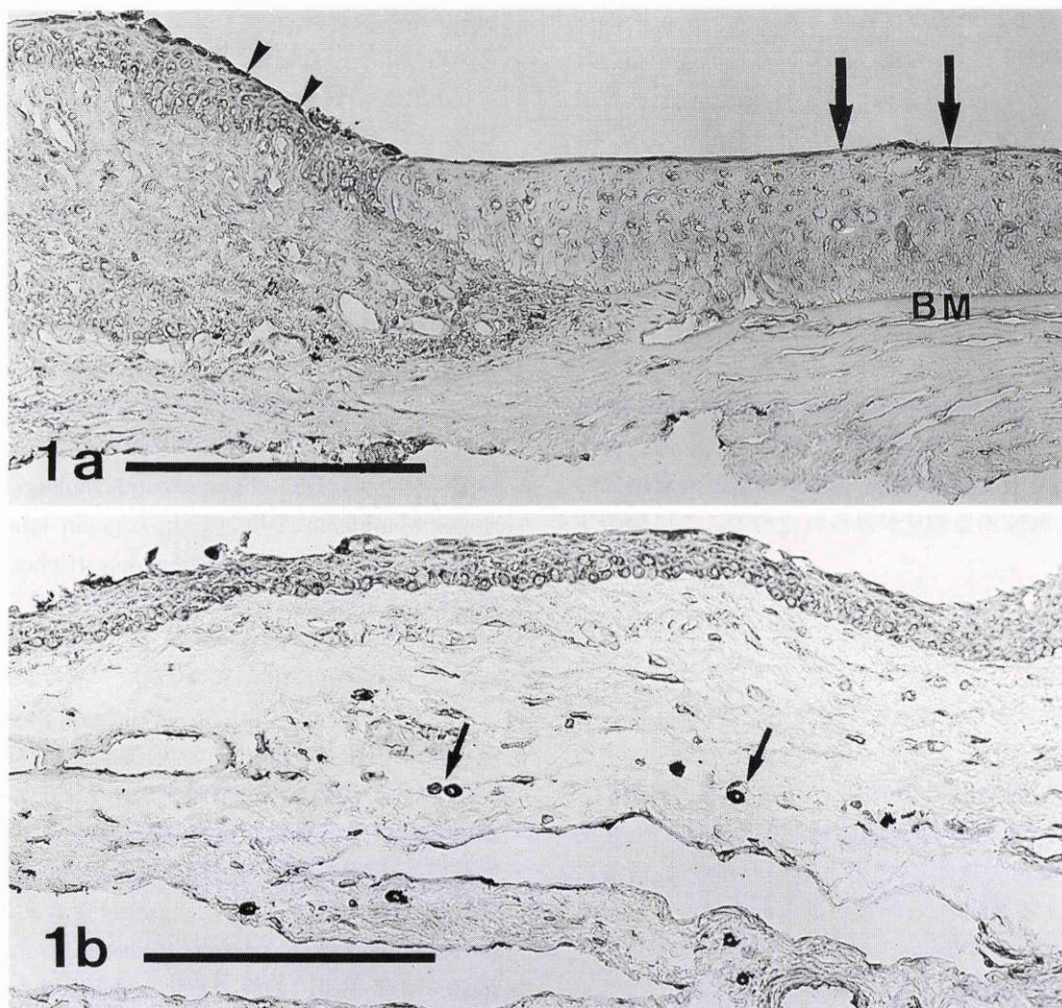


図1 翼状片の塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)免疫組織染色像.

a: 先端部, 角膜上皮細胞層(矢印), ボウマン膜(BM)は染色されていない, 翼状片上皮細胞層(矢じり)はびまん性に弱く染色されている, 症例は50歳女性, パーは200 μm

b: 体部, 上皮細胞層はびまん性に染色されている, 上皮下組織には細胞質が強く染色される細胞(矢印)が散在している, 形態的に, 血管内皮細胞, 線維芽細胞と考えられる一部の細胞も染色されている, 症例は50歳女性, パーは200 μm

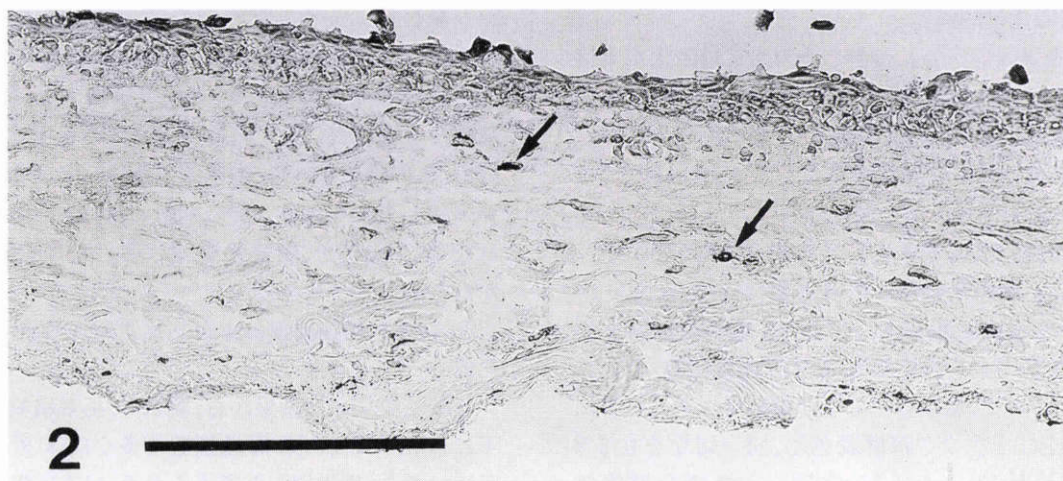


図2 正常結膜のbFGF免疫組織染色像.

上皮下組織に細胞質が強く染色される細胞(矢印)が少数認められる, 症例は59歳男性, パーは200 μm

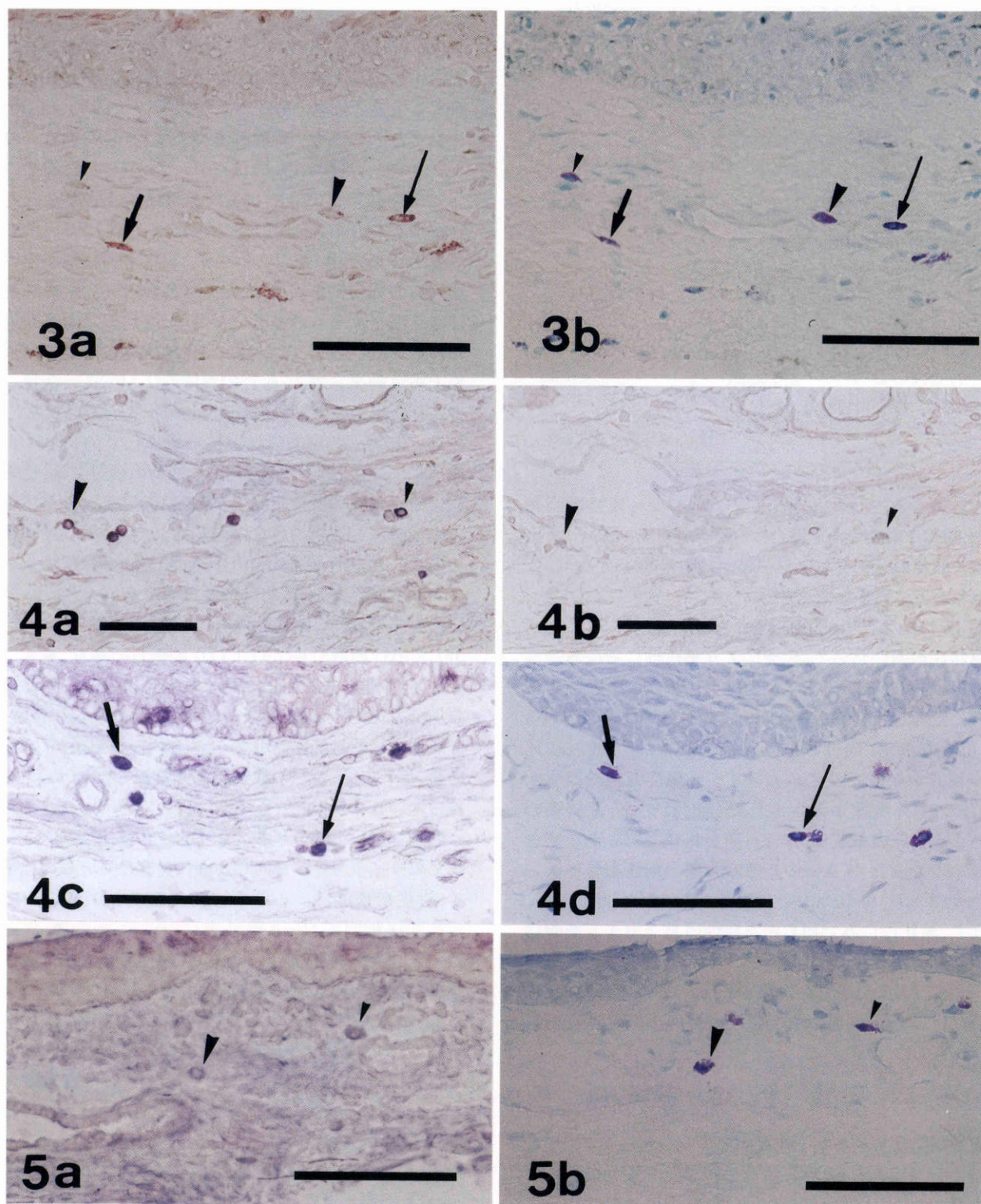


図3 翼状片体部の bFGF 免疫組織染色およびトリイジンブルー二重染色の組織像。

a: bFGF 免疫染色, b: トリイジンブルー染色. 両者とも陽性の細胞 (矢印) の他に, トリイジンブルー染色ではメタクロマジー陽性だが, bFGF 免疫染色で明らかな陽性を示さない細胞 (矢じり) も認められる. 症例は 62 歳女性. バーは 100 μ m

図4 翼状片体部の *in situ* hybridization 法による bFGF メッセンジャー RNA (bFGFmRNA) の局在。

a, b: 連続切片でのアンチセンスプロブ (a), 陰性対照としてセンスプロブ (b) を用いた *in situ* hybridization 法での染色結果. 位置関係から同一細胞と考えられる細胞 (矢じり) が, a では紫色に染色されているが, b では明らかな染色が認められない.

c, d: 連続切片での *in situ* hybridization 法およびトリイジンブルー染色結果. c では, 上皮細胞層の不規則な陽性所見および上皮下組織に陽性細胞の散在が認められる. 矢印の細胞は, 位置関係から同一細胞と考えられ, bFGFmRNA 陽性細胞はトリイジンブルーでメタクロマジーする肥満細胞と考えられる. 症例は 51 歳男性. a~d: バーは 100 μ m

図5 正常結膜の *in situ* hybridization 法による bFGFmRNA の局在。

a: *In situ* hybridization 法. b: a のと連続切片をトリイジンブルー染色したもの. 矢じりの細胞は同一細胞と考えられるが, 翼状片症例に比較し *in situ* hybridization 法での染色強度は弱い. 症例は 46 歳女性. バーは 100 μ m

表1 塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)陽性細胞中メタクロマジー陽性細胞の割合(%)

翼状片	82.7 ± 6.03	p < 0.05
正常結膜	65.5 ± 14.7	

t 検定, 平均値 ± 標準偏差

表2 メタクロマジー陽性細胞密度およびメタクロマジー陽性細胞中 bFGF 陽性の割合

	メタクロマジー 陽性細胞密度 (個/mm ²)	bFGF 陽性率 (%)
翼状片	45.5 ± 10.8	84.4 ± 5.45
正常結膜	12.3 ± 4.67	68.8 ± 11.1

p < 0.001 p < 0.05
t 検定, 平均値 ± 標準偏差

胞も認められた(図3a, b). メタクロマジー陽性肥満細胞中, bFGF 陽性である割合は有意に翼状片に高く, また翼状片組織のメタクロマジー陽性細胞密度は正常結膜に比較し有意に高かった(表2).

2. *In situ* hybridization 法による検討

翼状片組織において, 症例により染色性に差はあるものの, 検討した5例すべてに上皮下に散在する細胞の細胞質に陰性対照ではみられない濃い青色の染色が認められ, bFGFmRNA 陽性と考えられた(図4a, b). 連続切片での検討から多くのメタクロマジー陽性の肥満細胞が bFGFmRNA 陽性と考えられた(図4c, d). 正常結膜のほとんどの肥満細胞は, 陰性対照と比較し明らかな染色を認めなかったが, 4例中2例の一部の肥満細胞に淡い染色が得られ, bFGFmRNA 陽性が疑われた(図5a, b). しかし, 翼状片にみた明らかな陽性所見を呈する細胞は認められなかった. また, 翼状片および正常結膜上皮細胞の一部にも bFGFmRNA 陽性所見が認められたが, 症例, 部位により染色性は異なり, 一定の傾向は認められなかった(図4c, 5a).

IV 考 按

肥満細胞はアレルギー性炎症反応を引き起こす主要な細胞の一つであるが, 創傷治癒や線維化を伴う慢性炎症ばかりでなく, 正常組織や病的状態における血管新生にも深く関与すると考えられている^{6,7}. 組織学的に線維芽細胞の増生, リンパ球・形質細胞などの炎症細胞浸潤や著明な血管侵入を認める翼状片組織^{3,9}では, 肥満細胞密度は正常結膜に比較し明らかに高く⁵, 肥満細胞が翼状片の発生, 進展に関与している可能性が高い. これらの慢性炎症や線維化, 血管新生における肥満細胞の役割は完全には解明されていないが, 肥満細胞に由来する数多くのケミカルメディエータが関与するとされ, その中でも腫瘍壊死因子 α (TNF- α) やインターロイキン (ILs) などの

サイトカインが注目されている^{6,7}. 最近, このサイトカインの一つとして bFGF が肺, 皮膚, 関節の滑膜における肥満細胞で直接産生され, また, 肥満細胞が bFGF を貯蔵する主要な細胞であることが報告⁸⁻¹¹された. bFGF は分泌のためのシグナル配列を持たず, その細胞外への放出メカニズムは明らかではなかったが^{11,2}, 肥満細胞においては脱顆粒とともに bFGF が細胞外へ放出される機序が推定されている^{8,10,11}. 肥満細胞脱顆粒に伴い細胞外へ放出された bFGF は, その強い線維芽細胞増殖作用や血管新生作用により, 線維化を伴う慢性炎症や血管新生に深く関与するものと考えられる. これまで眼表面組織においては, 角膜上皮, 実質, 内皮細胞, 結膜上皮細胞, 結膜上皮下線維芽細胞, 血管内皮細胞に bFGF の発現が報告¹⁴⁻¹⁸されているが, 最近 Powers ら¹⁹により, 翼状片組織のほとんどの肥満細胞が免疫組織化学的に bFGF を発現していることが報告された. 今回の検討では, 従来の報告同様に結膜上皮細胞, 一部の線維芽細胞および血管内皮細胞に bFGF の局在が認められ, Powers ら¹⁹の報告と同様に翼状片組織の bFGF 陽性細胞の多くはメタクロマジー陽性であり, 肥満細胞と考えられた. また, 今回の検討では, 翼状片組織に加え正常結膜組織においても, bFGF 陽性細胞の 65% 以上は肥満細胞であり, 翼状片および正常結膜組織ともに肥満細胞は bFGF の主要な貯蔵源であることが確認された. 肥満細胞の bFGF 産生, 貯蔵能には組織特異性がなく, 生体内で共通に, 正常組織の維持や病的状態時の bFGF 供給源としての役割を持っているのかも知れない.

肥満細胞は多種のサイトカインを合成, 貯蔵するが, すべてのサイトカインを同じように保有しているのではなく, 組織や病態により異なっていることが知られている²⁰. 肥満細胞の bFGF 陽性率について, 正常肺, 皮膚組織でも多数の肥満細胞は bFGF 陽性であるが, 肺線維症, 皮膚血管腫においては正常組織より多くの肥満細胞に bFGF が陽性であったと報告¹⁰されている. 翼状片において, 肥満細胞の bFGF 陽性率は正常結膜より高く認められた. また, 正常結膜では, ほとんどの肥満細胞に明らかな bFGFmRNA 陽性所見を認めなかったが, 翼状片では多くの肥満細胞にはっきりとした bFGFmRNA 陽性所見が認められた. *In situ* hybridization 法では mRNA の複写数により得られる信号強度が変化し, 放射性標識プローブを用いた場合に定量が可能とされる²¹. 今回は免疫学的検出をしているため, 染色強度から mRNA 量の比較はできないが, 翼状片において bFGFmRNA 陽性肥満細胞が多く認められたのは, 検出感度を越えた bFGFmRNA 量を持つ肥満細胞が多いためと考えられる. これらの結果から, 翼状片組織においては, 正常結膜組織に比較し肥満細胞の bFGF 保有率が高いのみでなく, bFGF 産生も亢進しており, 何らかの刺激により肥満細胞が活性化されていることが推測される.

肥満細胞の bFGF 産生を促進する因子は明らかでないが、翼状片では先端部上皮下の線維芽細胞に stem cell factor(SCF)が異常発現しており、これが翼状片組織の肥満細胞集積の要因となる可能性を報告⁵⁾した。この SCF は、肥満細胞の遊走、増殖促進効果のみでなく、TNF- α や ILs などのサイトカインを含む各種ケミカルメディエータの合成促進や放出刺激作用を持つとされる²²⁾。これらのサイトカインに加えて、SCF が肥満細胞の bFGF 産生を刺激する可能性は高く、翼状片において、先端部に異常発現した SCF が肥満細胞の集積のみでなく、bFGF 産生、放出を刺激する因子となっている可能性がある。

翼状片の拡大・進展要因として、紫外線などの刺激により角膜上皮細胞が障害され、輪部角膜上皮下の線維芽細胞浸潤を誘発し、これをきっかけに翼状片が進展していくとの仮説³⁾²³⁾がある。角膜上皮細胞に存在する bFGF は外傷により細胞質から漏出しボウマン膜へ沈着するとの報告²⁴⁾もあり、翼状片先端部付近の角膜上皮やボウマン膜に bFGF の集積が確認されるのであれば、翼状片進展の要因として興味深いと考える。しかし、今回の検討からは、翼状片先端部角膜上皮、ボウマン膜への明らかな bFGF 陽性所見は得られなかった。翼状片の切除時に紫外線などの刺激を受けていたとは限らないが、この結果からは、角膜上皮下に線維芽細胞が浸潤していく直接の要因として、bFGF の関与は明らかではない。この要因の解明には、今後他の因子を含めた検討が必要と思われる。

翼状片の進展には、多くのサイトカインをはじめとするケミカルメディエータが複雑に関与していると推測され、単一の要因で説明可能なものではないと考えられる。今回の検討から、翼状片組織では正常結膜に比較し肥満細胞密度が高いのみでなく、その bFGF 保有率、産生能が亢進していることが明らかになった。bFGF は、その生理活性からも翼状片にみられる組織学的変化の形成に深く関与しており、翼状片進展の一要因であると推測された。

本論文の要旨は第 101 回日本眼科学会総会(平成 9 年 5 月、京都)で発表した。

文 献

- 1) 西川克三, 吉竹佳乃: FGF ファミリー. 黒木登志夫(編): 最新医学からのアプローチ 13 細胞増殖因子. メジカルビュー社, 東京, 44—55, 1995.
- 2) 服部 豊: FGF およびその受容体ファミリーの個体における役割と病気とのかかわり. 門脇 孝(編): 臨床医のための実験医学シリーズ 10 細胞増殖因子の最前線. 羊土社, 東京, 70—82, 1993.
- 3) 沖坂重邦, 工藤正人, 船橋正員, 中田先一: 翼状片の発生機転. 眼科 27: 633—642, 1985.
- 4) Austin P, Jakobiec FA, Iwamoto T: Elastodysplasia and elastodystrophy as the pathologic bases of ocular pterygia and pinguecula. Ophthalmology

- 90: 96—109, 1983.
- 5) 中神哲司, 村上 晶, 沖坂重邦, 海老原伸行: 翼状片と肥満細胞—肥満細胞数, 表現型, stem cell factor 局在の検討—. 日眼会誌 101: 662—668, 1997.
- 6) Levi-Schaffer F: Mast cell/fibroblast interactions in health and disease. Chem Immunol 61: 161—185, 1995.
- 7) Meininger CJ: Mast cells and tumor-associated angiogenesis. Chem Immunol 62: 239—257, 1995.
- 8) Reed JA, Albino AP, McNutt NS: Human cutaneous mast cells express basic fibroblast growth factor. Lab Invest 72: 215—222, 1995.
- 9) Qu Z, Huang X, Ahmadi P, Andresevic J, Planck SR, Hart CE, et al: Expression of basic fibroblast growth factor in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis and degenerative joint disease. Lab Invest 73: 339—346, 1995.
- 10) Qu Z, Liebler JM, Powers MR, Galey T, Ahmadi P, Huang X, et al: Mast cells are a major source of basic fibroblast growth factor in chronic inflammation and cutaneous hemangioma. Am J Pathol 147: 564—573, 1995.
- 11) Inoue Y, King Jr TE, Tinkle SS, Dockstader K, Newman LS: Human mast cell basic fibroblast growth factor in pulmonary fibrotic disorders. Am J Pathol 149: 2037—2054, 1996.
- 12) Enerbäck L: Mast cells in rat gastrointestinal mucosa 2. dye-binding and metachromatic properties. APMIS 66: 303—312, 1966.
- 13) Reed JA, McNutt NS, Albino AP: Differential expression of basic fibroblast growth factor(bFGF) in melanocytic lesions demonstrated by *in situ* hybridization. Am J Pathol 144: 329—336, 1994.
- 14) Wilson SE, Schultz GS, Chegini N, Weng J, He Y: Epidermal growth factor, transforming growth factor alpha, transforming growth factor beta, acidic fibroblast growth factor, basic fibroblast growth factor, and interleukin-1 proteins in the cornea. Exp Eye Res 59: 63—72, 1994.
- 15) Bernauer W, Wright P, Dart JK, Leonard JN, Lightman S: Cytokines in the conjunctiva of acute and chronic mucous membrane pemphigoid: An immunohistochemical analysis. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 231: 563—570, 1993.
- 16) Li D, Tseng SCG: Three patterns of cytokine expression potentially involved in epithelial-fibroblast interactions of human ocular surface. J Cell Physiol 163: 61—79, 1995.
- 17) Wilson SE, He Y, Lloyd SA: EGF, EGF receptor, basic FGF, TGF beta-1, and IL-1 alpha mRNA in human corneal epithelial cells and stromal fibroblasts. Invest Ophthalmol Vis Sci 33: 1756—1765, 1992.
- 18) Kria L, Ohira A, Amemiya T: Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth

- factor, platelet derived growth factor, transforming growth factor- β and tumor necrosis factor- α in the pterygium. *Acta Histochem* 98: 195—201, 1996.
- 19) **Powers MR, Qu Z, O'Brien B, Wilson DJ, Thompson JE, Rosenbaum JT**: Immunolocalization of bFGF in pterygia: Association with mast cells. *Cornea* 16: 545—549, 1997.
- 20) **Bradding P, Okayama Y, Howarth PH, Church MK, Holgate ST**: Heterogeneity of human mast cells based on cytokine content. *J Immunol* 155: 297—307, 1995.
- 21) **Young III WS, 吉井 章(訳)**: オリゴデオキシヌクレオチドプローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション. *Wilkinson DG(編), 中根一穂, 他(監訳)*: MEDSi バイオ実験法シリーズ *In situ* ハイブリダイゼーション. メディカル・サイエンス・インターナショナル, 東京, 31—42, 1995.
- 22) **Valent P**: The riddle of the mast cell: Kit(CD117)-ligand as the missing link? *Immunol Today* 15: 111—114, 1994.
- 23) **Cameron ME**: Histology of pterygium: An electron microscopic study. *Br J Ophthalmol* 67: 604—608, 1983.
- 24) **Adams AP, Meklir B, Joyce NC**: *In situ* injury-induced release of basic-fibroblast growth factor from corneal epithelial cells. *Am J Pathol* 139: 961—967, 1991.
-