

抗アレルギー薬による水晶体上皮細胞の増殖抑制

鈴木 裕子, 岩城 正佳, 今川 路子, 竹内 実

愛知医科大学眼科学教室

要 約

目 的：各種抗アレルギー薬の水晶体上皮細胞増殖抑制効果を検討する。

方 法：抗アレルギー剤(トラニラスト, フマル酸ケトチフェン, クロモグリク酸ナトリウム)を培養水晶体上皮細胞に加え, 細胞増殖を 3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) と 5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) を使用する方法で測定した。コラーゲンとサイトカインの産生[transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) および basic-fibroblast growth factor (b-FGF)] を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA 法) で測定した。細胞のアポトーシスを TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling method (TUNEL 法) と DNA ladder 検出法で調べた。

結 果：トラニラスト, フマル酸ケトチフェンは水晶体上皮細胞の増殖を抑制し, その効果は後者の方が強かった。クロモグリク酸ナトリウムは増殖抑制効果はなかった。トラニラスト, フマル酸ケトチフェンはコラーゲン合成の抑制を示したが, TGF- β 1, b-FGF の産生に対する効果は明らかではなかった。増殖抑制の過程で, TUNEL 陽性細胞と DNA ladder が検出された。

結 論：フマル酸ケトチフェン, トラニラストの点眼は後発白内障に有効で臨床応用できる可能性があると考えられ, その作用機序にアポトーシスの関与が推定された。(日眼会誌 105 : 517-523, 2001)

キーワード：水晶体上皮細胞, トラニラスト, フマル酸ケトチフェン, 細胞増殖, アポトーシス

Anti-allergic Drugs Inhibit the Proliferation of Bovine Lens Epithelial Cells in Culture

Hiroko Suzuki, Masayoshi Iwaki, Michiko Imagawa and Makoto Takeuchi

Department of Ophthalmology, Aichi Medical University, School of Medicine

Abstract

Purpose : To examine the inhibitory effects of tranilast, ketotifen fumarate, and disodium cromoglycate which are used clinically as anti-allergic agents, on the growth of bovine lens epithelial cells (LE) in culture.

Methods : LE was grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 10% fetal calf serum and growth was measured with 3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and 5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU). Production of collagen, transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), and basic-fibroblast growth factor (b-FGF) were measured with corresponding enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Apoptotic cell death was detected by TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling method (TUNEL technique) and the DNA ladder method.

Results : Both ketotifen and tranilast inhibited the growth of LE, and half-inhibitory concentrations were 200 μ M and 1,000 μ M, respectively. Disodium cromoglycate did not inhibit LE proliferation significantly. Ketotifen and tranilast decreased the synthesis of collagen but had no obvious effect on TGF- β 1 and b-FGF production. Apoptotic cell death was detected in LE treated with ketotifen or tranilast.

Conclusion : Ketotifen and tranilast may be clinically useful for the prevention of aftercataract. Apoptotic cell death may be involved in the process. (J Jpn Ophthalmol Soc 105 : 517-523, 2001)

Key words : Bovine lens epithelial cells, Ketotifen, Tranilast, Cell proliferation, Apoptosis

別刷請求先：480-1195 愛知県愛知郡長久手町岩作雁又 21 愛知医科大学眼科学教室 鈴木 裕子
(平成 12 年 12 月 3 日受付, 平成 13 年 3 月 8 日改訂受理)

Reprint requests to : Hiroko Suzuki, M. D. Department of Ophthalmology, Aichi Medical University, 21 Yazako, Karimata, Nagakute-cho, Aichi-gun, Aichi 480-1195, Japan

(Received December 30, 2000 and accepted in revised form March 8, 2001)

I 緒 言

トラニラスト(リザベン[®])は眼科や他科で臨床使用されている抗アレルギー薬であるが、抗アレルギー作用以外に細胞増殖抑制があるといわれ、それを利用した多くの臨床報告がある。ケロイドおよび肥厚性瘢痕の治療や心臓血管の再狭窄予防¹⁾²⁾、緑内障濾過手術の濾過胞維持³⁾、屈折手術後の角膜混濁の防止⁴⁾、後発白内障の抑制⁵⁾⁶⁾などが報告されている。フマル酸ケトチフェン(ザジテン[®])は、抗アレルギー作用と抗ヒスタミン作用を有し、他にケロイドや肥厚性瘢痕の治療に有効であると報告⁷⁾されている。このような抗アレルギー薬のいわば副次的作用の薬理的、生化学的メカニズムを追求した報告は少ない。また、これら抗アレルギー薬を比較して研究した報告はない。

我々は抗アレルギー薬のこのような作用についての基礎的な研究を行いたいと考え、その第一歩として培養水晶体細胞に対する作用について実験を行った。ここにその結果を示し、後発白内障治療・予防薬としての可能性についても考察した。

II 実験方法

1. 実験材料

ウシの眼球は食肉卸業者から購入した。トラニラスト(C₁₈H₁₇NO₅ Mr 327.3)、フマル酸ケトチフェン(C₁₉H₁₉NOS·C₄H₄O₄ Mr 425.5)、クロモグリク酸ナトリウム(C₂₃H₁₄Na₂O₁₁ Mr 512.3)はそれぞれ純品薬剤原末をキッセイ薬品、参天製薬、藤沢製薬から提供を受けた。Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)はニプロ社から、ウシ胎児血清、balanced salt solution(BSS)、0.5%トリプシン溶液は Gibco から購入した。

2. ウシの水晶体上皮細胞の採取と培養

ウシの眼球から水晶体を摘出し、水晶体囊を剝離し、BSSで洗浄後、水晶体囊を35 mm培養皿(NUNC)に入れ、10%ウシ胎児血清を含むDMEM 2 ml中で37°C、5% CO₂循環で初代培養を行った。水晶体囊は組織培養後1日で培養皿の底に接着するのが確認され、2~3日後には前囊縁から水晶体上皮細胞の外生があった。3日毎の培養液交換を原則とし、10日後に外生増殖した水晶体上皮細胞をトリプシン処理で細胞を収集し、さらに、同培地で継代培養し-80°Cで冷凍保存したものを適宜実験に用いた。各実験には継代3代目の水晶体上皮細胞を用いた(図1)。細胞はほとんどが円形に近い不整形であったが、突起を出す線維芽細胞様変化を示すものも存在した。細胞核、細胞境界は明瞭であった。

3. 細胞増殖の測定

細胞増殖はテトラゾリウム塩の一種、3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromideを用い細胞の還元力を測定する方法(MTT法)^{8)~10)}と5-bromo-

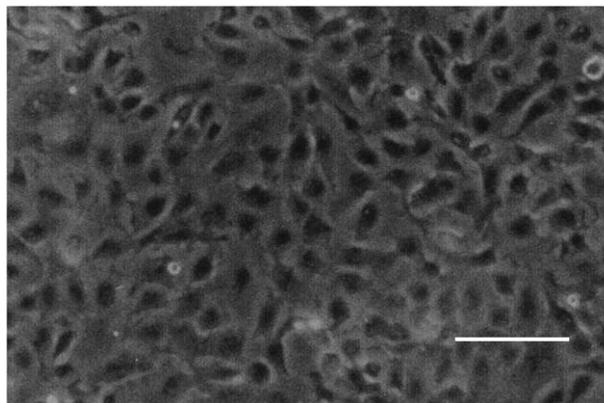


図1 コンフルエント状態の培養ウシ水晶体上皮細胞。
バーは200 μm

2'-deoxy-uridineのDNAの取り込みを測定する方法(BrdU法)^{11)~13)}の2法で調べた。

MTT法はCell Titer 96[®](プロメガ社)を使用した。抗アレルギー薬(トラニラスト0~3 mMまたはフマル酸ケトチフェン0~1 mM、またはクロモグリク酸ナトリウム0~1 mM)を添加したDMEM培地200 μlを分注した96穴マイクロプレート中に細胞を2×10³/wellの濃度で接種した。マニュアルに従い、24時間培養後テトラゾリウム塩を含む色素液を添加し、37°Cで4時間インキュベーション後、変換されたフォルマザン産物の量を540 nmの吸光度で測定した。同実験を5回行った。

BrdU法はBrdUラベリング&ディテクションキットIII[®](Roche社)を使用した。抗アレルギー薬を上記同様に添加した培地で96穴マイクロプレート中に細胞を接種(2×10³/well)し、24時間培養した。その後、マニュアルに従い、BrdUラベリング液添加、37°Cで4時間インキュベーション、ヌクレアーゼ処理、peroxidase標識BrdU抗体(マウスモノクローナル抗体、Fab fragment)添加、peroxidase基質添加をそれぞれ行い、DNA中に取り込まれたBrdU量を415 nmの吸光度で測定した。同実験を5回行った。

4. コラーゲンの合成の測定

コラーゲンの合成はI型コラーゲン分子のプロセッシング副産物であるプロペプチド(procollagen type I C-peptide, PIP)を測定する方法を用いた。96穴マイクロプレートに水晶体上皮細胞を2×10³/wellの濃度で接種しサブコンフルエントに培養した後、抗アレルギー薬入りの無血清培地に新しく置換えし(対照、トラニラスト50, 100, 200 μM、フマル酸ケトチフェン25, 50, 100 μM)、経時的に培養上清を採取(2, 6, 12, 24, 48, 72時間)したものをサンプルとした。PIP EIA Kit[®](TaKaRa)を使用し、マニュアルに従い各サンプルのPIP濃度を490 nmの吸光度で測定し、スタンダード曲線からPIPの濃度を求めた。同実験を3回行った。

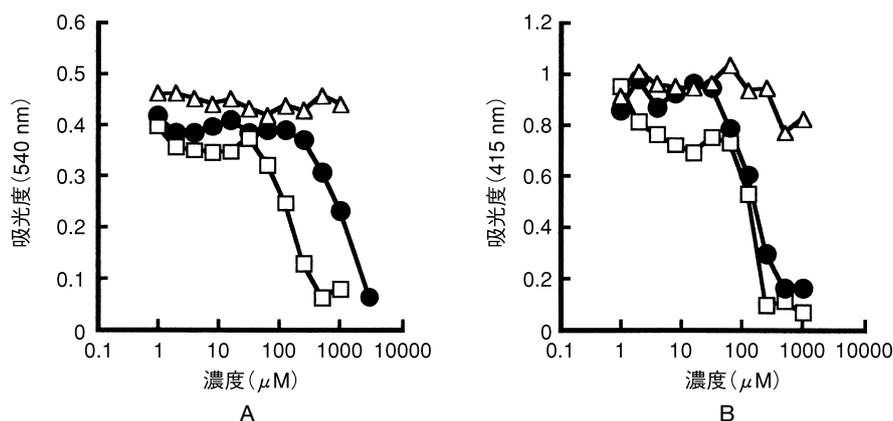


図 2 抗アレルギー薬添加による培養ウシ水晶体上皮細胞の細胞増殖。

A : 3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT 法), B : 5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU 法) で測定。

● : トラニラスト添加, □ : フマル酸ケトチフェン添加, △ : クロモグリク酸ナトリウム添加

5. サイトカイン(T細胞ベータ成長因子, 塩基性線維芽細胞増殖因子)の測定

水晶体上皮細胞をサブコンフルエントに培養し, 抗アレルギー薬入り無血清培地に置換し(対照, トラニラスト 50, 100, 200 μM , フマル酸ケトチフェン 25, 50, 100 μM), 経時的に上清を採取(2, 6, 12, 24, 48, 72時間)したものをそれぞれの Quantikine Human Kit[®] (R & D Systems 社)を使用し, マニュアルに従い酵素結合免疫吸着法(ELISA 法)で T細胞ベータ成長因子(TGF- β 1)および塩基性線維芽細胞増殖因子(b-FGF)を測定した(450 nm). TGF- β 1は活性型, 潜在型を合計した総量とした。同実験を3回行った。

6. アポトーシスの検出

アポトーシスを TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling method (TUNEL 法)と DNA ladder で検出した。TUNEL 法には TaKaRa の MK 500[®]を使用した。水晶体上皮細胞をサブコンフルエントに培養後, 抗アレルギー薬を添加した培地で(対照, トラニラスト 100, 200 μM , フマル酸ケトチフェン 50, 100 μM) 36時間培養し, アポトーシスを誘導したものを固定・浸透化し fluorescein isothiocyanate (FITC)-dUTP 標識し, 蛍光顕微鏡で観察した。DNA ladder の検出では 75 cm^2 培養フラスコで水晶体上皮細胞をサブコンフルエントに培養し, 抗アレルギー薬を添加した培地に置換して 48時間細胞培養しアポトーシスを誘導した。TaKaRa の MK600[®]を使用して細胞から断片化 DNA を分離・抽出し, 2% アガロースゲルで電気泳動し(100 V, 35分), DNA ladder の検出を行った。

III 結 果

1. 細胞増殖に対する効果

図 2 に各薬剤の濃度と 24 時間後の細胞増殖の関係を示した。トラニラスト, フマル酸ケトチフェンは水晶体

上皮細胞の増殖を濃度依存的に抑制した。トラニラストでは 100 μM 以上の濃度で増殖抑制がみられ, 50% 抑制濃度は MTT 法で約 1 mM, BrdU 法で 200 μM であった。フマル酸ケトチフェンでは 50 μM 以上の濃度で抑制がみられ, 50% 抑制濃度は MTT 法で約 200 μM , BrdU 法で 150 μM であった。クロモグリク酸ナトリウムでは 0~1 mM の範囲で細胞増殖抑制効果はなかった。上記実験は同一条件で数回追試したが, 同様の結果を得た。

2. コラーゲンの合成に対する効果

薬剤無添加の対照において, 培養水晶体上皮細胞は約 24 時間後からコラーゲンの合成がみられ, 72 時間後で約 550 ng/ml の PIP を培地に分泌した。細胞増殖に影響の少ない濃度(トラニラスト 50~200 μM , フマル酸ケトチフェン 25~100 μM)で I 型コラーゲンの合成に対する薬剤の効果調べた。トラニラスト 50 μM 添加群以外でコラーゲンの有意な合成抑制効果がみられ, 濃度依存性もあった。72 時間後の 50% 合成抑制濃度はトラニラスト約 200 μM , フマル酸ケトチフェン約 50 μM と推定された(図 3)。同一測定キットで 3 回の測定を施行したが, 同じ結果を得た。

3. サイトカイン産生に対する効果

薬剤無添加の対照において, TGF- β 1 は約 6 時間後から産生がみられた。TGF- β 1 産生量は 72 時間の時点でフマル酸ケトチフェンが 350 μM , 対照が 700 μM で, フマル酸ケトチフェンに産生抑制があったが濃度依存性は明らかではなかった。トラニラストは有効な抑制はなかった(図 4)。b-FGF はトラニラスト, フマル酸ケトチフェンの両薬剤ともに本方法で検出できる量の産生はなかった。今回使用した Quantikine Human Kit[®] (R & D Systems 社)の b-FGF の検出限界は 3 pg/ml である。

4. アポトーシスの検出の結果

TUNEL 法では対照以外の抗アレルギー薬を添加し

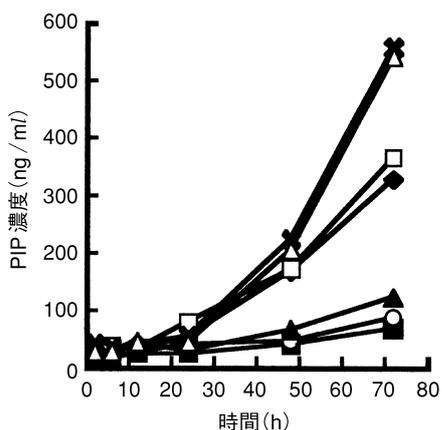


図 3 抗アレルギー添加による培養ウシ水晶体上皮細胞のコラーゲン合成の経時的変化。

無添加の対照, トラニラスト (50, 100, 200 μM), フマル酸ケトチフェン (25, 50, 100 μM) 添加をしたウシ水晶体上皮細胞から産生された procollagen type-I C-peptide (PIP) 濃度を 72 時間まで測定した。

△: 対照, ×: トラニラスト 50 μM , □: トラニラスト 100 μM , ◆: トラニラスト 200 μM , ▲: フマル酸ケトチフェン 25 μM , ○: フマル酸ケトチフェン 50 μM , ■: フマル酸ケトチフェン 100 μM

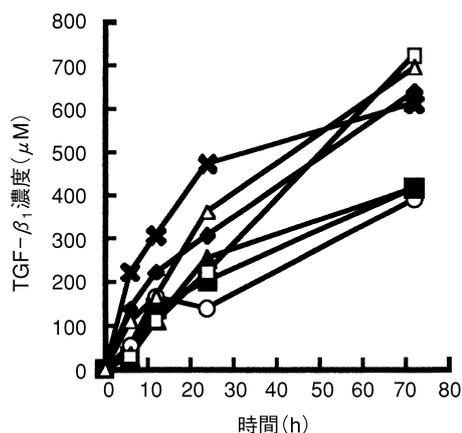


図 4 抗アレルギー添加による培養ウシ水晶体上皮細胞の transforming growth factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) の経時的変化。

無添加の対照, トラニラスト (50, 100, 200 μM), フマル酸ケトチフェン (25, 50, 100 μM) 添加をしたウシ水晶体上皮細胞から産生された TGF- β_1 濃度を 72 時間まで測定した。

△: 対照, ×: トラニラスト 50 μM , □: トラニラスト 100 μM , ◆: トラニラスト 200 μM , ▲: フマル酸ケトチフェン 25 μM , ○: フマル酸ケトチフェン 50 μM , ■: フマル酸ケトチフェン 100 μM

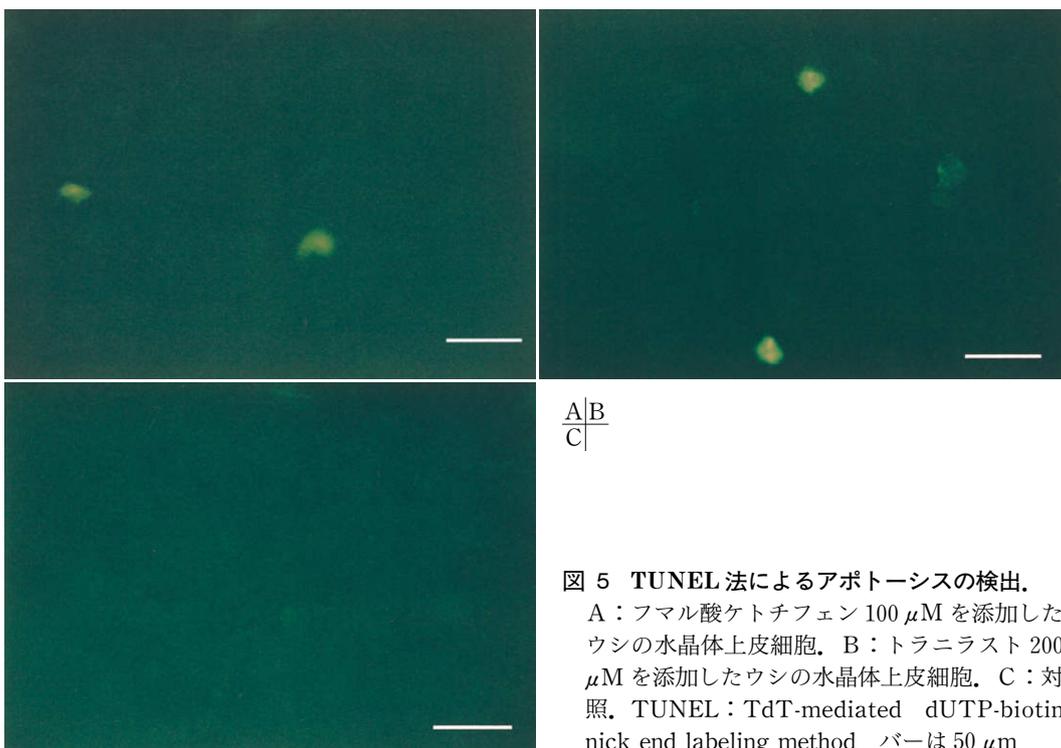


図 5 TUNEL 法によるアポトーシスの検出。

A: フマル酸ケトチフェン 100 μM を添加したウシの水晶体上皮細胞, B: トラニラスト 200 μM を添加したウシの水晶体上皮細胞, C: 対照. TUNEL: TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling method. バーは 50 μm

たものに蛍光を発している細胞があり, 光学顕微鏡でこの細胞を観察すると細胞容積が小さくなっているのが確認された(図 5)。DNA ladder の検出ではトラニラスト, フマル酸ケトチフェン添加群に DNA ladder が検出され DNA の断片化を示した。また, 対照では DNA lad-

der は確認されなかった(図 6)。

IV 考 按

西ら¹⁴⁾は白内障手術時に採取した前囊に付着したヒト水晶体上皮細胞は, 初期には主として六角形で細胞境界

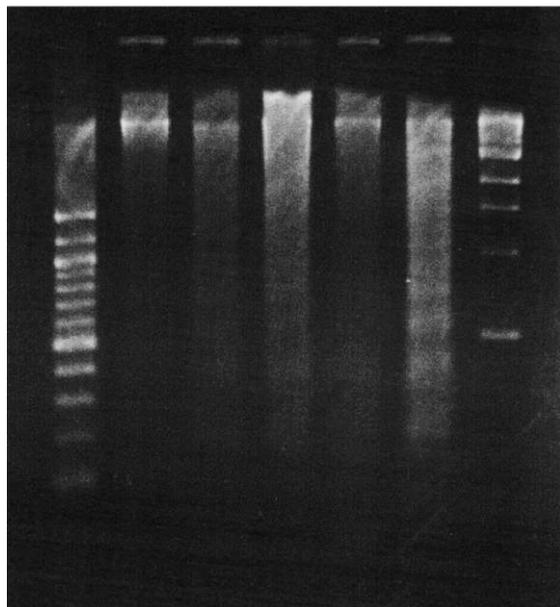


図 6 アガロース・ゲルを用いた電気泳動での DNA ladder の検出。

左レーンから 100 bp マーカー, 対照, フマル酸ケトチフェン 50 μ M, フマル酸ケトチフェン 100 μ M, トラニラスト 100 μ M, トラニラスト 200 μ M, 1 kb マーカー. 対照以外の抗アレルギーを添加したものに DNA ladder が検出された。

は鮮明, 核は明確に観察されるとし, 細胞培養の時間経過とともに球形囊胞状細胞, 小型細胞, 線維芽細胞様細胞に変化すると報告している. 今回使用したウシ水晶体上皮細胞はヒトやラットの水晶体上皮細胞に比し発育は良好であったが, 継代培養を重ねるに従い線維芽細胞様細胞に変化する傾向は共通していた. したがって, 実験には形態変化の影響の少ない 3 代目水晶体上皮細胞を培養使用した.

使用した抗アレルギー薬のうち, トラニラスト, フマル酸ケトチフェンは水晶体上皮細胞の増殖を抑制したが, クロモグリク酸ナトリウムには増殖抑制効果はなかった. これら 3 薬剤はいずれも細胞膜の安定化を通して, 肥満細胞からのアレルギー物質を抑制することにより抗アレルギー作用を発揮するといわれている. しかし, このような作用のあるものがすべて細胞増殖抑制作用があるわけではないことがわかった. 50% 細胞増殖抑制濃度はフマル酸ケトチフェンがトラニラストの約 1/5 で, 同じ濃度ではフマル酸ケトチフェンの方がより強い増殖抑制を示すことが判明した. 抗アレルギー薬の細胞増殖抑制作用の眼科的な応用に細胞生物学的な検討を加えたのは本報告が最初である.

後発白内障予防に対するトラニラストの効果については, 既に宮沢ら⁵⁾が動物実験で, また Tobarri ら⁶⁾は実験でヒトに点眼していずれも有効であると報告している. 宮沢らによると, 0.5% および 1% トラニラスト 1 日 4 回

の点眼により, 眼内レンズ手術を施行した家兎眼の後発白内障が対照に比べ検眼鏡スコア値が約 2 分の 1 になったという. また, Tobarri らはトラニラスト点眼薬を用いヒト白内障術後の後囊混濁の防止効果を画像解析を用いて定量的に測定し, トラニラスト点眼したものは混濁度が約 3 分の 1 に減少したという. 宮沢らは前房内へのトラニラストの移行を高速液体クロマトグラフィーで測定したデータを記載しているが, μ M 以下の濃度であり, この値では我々の実験での有効な増殖抑制効果には達していないと思われた. しかし, 術後 4 週間後の一点のみのデータであり, 術直後の眼内移行の良好な時期には増殖抑制に十分な濃度に達している可能性もある. フマル酸ケトチフェンも含め, 術後の眼内への移行についてさらに検討が必要と考えた.

細胞増殖の測定にはインジケータの違う 2 つの方法, すなわち MTT 法と BrdU 法を用いた. 両者とも, マニュアルにはトリチウムチミジンを用いる方法と一致すると述べており, 我々の実験でも両者はほぼ一致した結果を与え, とともに信頼度が高くかつ簡便な方法であることがわかった.

後発白内障の形成には水晶体上皮細胞の増殖, 化生以外にコラーゲンの合成が関与するといわれる¹⁵⁾¹⁶⁾. 水晶体上皮は通常 IV 型コラーゲンを産生するが, 化生した場合は I 型も産生するといわれている¹⁷⁾. 本研究で I 型コラーゲンの産生があったが, これは培養水晶体上皮細胞は後発白内障を形成する場合と類似した増殖を示すためと考えた. 培養系ではウシとヒトの水晶体上皮細胞で I 型コラーゲンを産生するとの報告¹⁸⁾¹⁹⁾がある. トラニラスト, フマル酸ケトチフェンにコラーゲン合成の有意な抑制があったことは線維性混濁を抑制する可能性を推定し興味深い. この抑制は細胞増殖抑制に必要な濃度より低濃度で可能であった. コラーゲン合成でも, 細胞増殖同様, フマル酸ケトチフェンがトラニラストより強い抑制を示し, 特にフマル酸ケトチフェンは低濃度 (50% 抑制濃度, 5 μ M) でもコラーゲン産生抑制がみられることから, 後発白内障防止により有効である可能性があると考えた.

両薬剤の細胞増殖抑制とコラーゲン産生阻害の分子メカニズムは解明されていないが, トラニラストでは同薬剤が TGF- β 1 の産生を抑制する作用によるという説がある. 郡司ら²⁰⁾は 1~10 μ M のトラニラストは癬痕皮膚線維芽細胞の TGF- β 1 の産生を約 2 分の 1 に抑制すること, Ikeda ら²¹⁾は星状細胞で 150~300 μ M のトラニラストは DNA 合成やコラーゲン合成を抑制するが, その機序は TGF- β 1 を抑制することによると推定している. 西ら¹⁸⁾は水晶体上皮細胞で細胞増殖・コラーゲン合成に関するサイトカインとして TGF- β , b-FGF などの存在を報告している. これらの報告に基づき, 両薬剤の水晶体上皮細胞の TGF- β 1, b-FGF 産生への効果を

調べた。しかし、両薬剤とも TGF- β 1 の産生に対する効果は水晶体上皮細胞では明らかではなく、b-FGF の産生は検出限界以下であり、効果は不明であった。過去の報告との矛盾の理由は明らかではなく、さらに薬剤濃度を含め研究が必要と考える。

さらに、水晶体上皮細胞の増殖抑制の分子メカニズムを研究するためアポトーシスの関与を調べた。TUNEL 法では細胞死した水晶体上皮細胞は浮遊するため、一部培養皿に接着した状態で残っている細胞にアポトーシスを検出した(図 4)。したがって、TUNEL 陽性細胞の比率、頻度については明らかではなかった。次に、DNA ladder の検出を試みた(図 5)。薬剤を添加した細胞にアポトーシスに特徴的である DNA の断片化が検出された。以上の実験結果から、両薬剤はアポトーシスの関与する細胞死を惹き起こすことが推定された。

創傷治癒過程においてアポトーシスが関係するといわれており、このアポトーシスが阻止されると肥厚性癍痕が生じるとの報告²²⁾がある。本研究で両薬剤に共通してアポトーシス誘導が検出されたが、いわば癍痕組織の一種と考えられる後発白内障の形成を阻害するという作用機序は有用である可能性が高いと考えた。アポトーシスは炎症や細胞内物質の流出のない静かな細胞死といわれる²³⁾。実際、アポトーシスは正常な水晶体上皮や白内障手術後の水晶体上皮に生じているとの報告²⁴⁾²⁵⁾がある。両薬剤がこのような細胞死を惹き起こすメカニズムは不明であるが、細胞膜に働いてアポトーシスカスケードを刺激する可能性があると考えられる。西ら²⁶⁾は Fas 刺激性モノクローナル抗体を用いた水晶体上皮のアポトーシスが起ることを報告しており、この抗体を用いた後発白内障予防への可能性も推定している。両薬剤によるアポトーシスの経路がどのような経路によるものか今後の検討が望まれる。

文 献

- 1) 岩平佳子, 丸山 優: ケロイド・肥厚性癍痕の発生・増悪に対するトラニラストの予防的効果. 臨床医薬 8 : 225—232, 1992.
- 2) 加藤和三, 玉井秀男, 早川弘一: 経皮的冠動脈形成術後の再狭窄に対するトラニラストの臨床的検討 プラセボを対照とした第Ⅲ相二重盲検比較試験. 臨床医薬 12 : 65—85, 1995.
- 3) 千原悦夫, 落合春幸, 董 瑾: 緑内障濾過法に対する TGF- β 1 阻害剤トラニラストの効果. 眼紀 50 : 260—266, 1999.
- 4) 岡本 進: エキシマレーザー(PRK)術後の角膜上皮混濁に対するトラニラストの抑制効果. あたらしい眼科 14 : 239—243, 1997.
- 5) 宮沢優美子, 岡本 進, 酒井達朗, 岩城陽一: 後発白内障に対するトラニラスト点眼薬の抑制効果. あたらしい眼科 14 : 1707—1709, 1997.
- 6) Tobari I, Iwaki Y, Miyake K : Effect of tranilast

- eyedrops in preventing posterior capsule opacification : Preliminary report. J Cataract Refract Surg 25 : 1394—1399, 1999.
- 7) 北吉 光, 松本維明, 升岡 健: フマル酸ケトチフェン(ザジテン)のケロイドと肥厚性癍痕に対する臨床効果. 新薬と臨牀 45 : 1570—1580, 1996.
- 8) Mosmann T : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 65 : 55, 1993.
- 9) Toda H, Shiho O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto K : An improved colorimetric assay for interleukin 2. J Immunol Methods 93 : 157, 1986.
- 10) Denizot F, Lang R : Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J Immunol Methods 89 : 271, 1986.
- 11) Gratzner HG : Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine : A new reagent for detection of DNA replication. Science 218 : 474—475, 1982.
- 12) Vanderlaan M, Thomas CB : Characterization of monoclonal antibodies to bromodeoxyuridine. Cytometry 6 : 501—505, 1985.
- 13) Gonchoroff NJ, Greipp PR, Kyle RA, Katzmann JA : A monoclonal antibody reactive with 5-bromo-2-deoxyuridine that does not require DNA denaturation. Cytometry 6 : 506—512, 1985.
- 14) 西 佳代, 西 起史: ヒト水晶体上皮細胞の組織培養 その1—その形態変化と PMMA, サイトカインによる影響—。あたらしい眼科 7 : 1213—1223, 1990.
- 15) 重光利朗: 後発白内障. 眼科診療プラクティス 14 : 246—247, 1994.
- 16) 藤塚容子: 後発白内障. 図説眼組織病理学. 金原出版, 東京, 266—267, 1991.
- 17) 西 佳代, 西 起史, 藤原 勉, 疋田光史, 白澤榮一: ヒト白内障水晶体上皮細胞によるコラーゲン I, IV, V, VI の産生. 眼紀 45 : 506—509, 1994.
- 18) 西 佳代, 西 起史, 藤原 勉, 白澤榮一: 人眼白内障水晶体上皮細胞の増殖およびコラーゲン産生—IL-1 α , IL-1 β , TGF- β 2, b-FGF の効果—. 眼紀 45 : 836—841, 1994.
- 19) Laurent M, Kern P, Courtois Y, Regnault F : Synthesis of types I, III and IV collagen by bovine lens epithelial cells in long-term culture. Exp Cell Res 134 : 23—31, 1987.
- 20) 郡司裕則, 周 立軍, 館下 亨, 小野一郎, 金子史男: トラニラストが線維芽細胞の TGF- β 1, コラーゲン, コラゲナーゼ産生に与える影響に関する実験的研究. 日形会誌 16 : 765—772, 1996.
- 21) Ikeda H, Inao M, Fujiwara K : Inhibitory effect of tranilast on activation and transforming growth factor β 1 expression in cultured rat stellate cells. Biochem Biophys Res Commun 227 :

- 322—327, 1996.
- 22) 赤坂喜清, 石川由起雄, 犬塚 潔, 足羽紀子, 木口英子, 石井壽晴: 隆起性および扁平癬痕におけるアポトーシス関連抗原の発現. *Connective Tissue* 30 : 29—35, 1998.
- 23) **Wyllie AH, Kerr FR, Currie AR** : Cell death : The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68 : 251—306, 1980.
- 24) **Wilson SE, Li Q, Weng J, Barry-Lane PA, Jester JV, Liang Q, et al** : The Fas-Fas ligand system and other modulators of apoptosis in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 : 1582—1592, 1996.
- 25) **Kato K, Kurosaka D, Nagamoto T** : Apoptotic cell death in rabbit lens after lens extraction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38 : 2322—2330, 1997.
- 26) 西 起史, 西 佳代, 和田香識, 大本安一: ヒト白内障水晶体上皮細胞における Fas-Fas リガンド経路によるアポトーシス. *あたらしい眼科* 15 : 1445—1450, 1998.
-