

シェーグレン症候群患者の涙液中 tumor necrosis factor- $\alpha$ 忍田 太紀<sup>1)</sup>, 岩田 光浩<sup>1)</sup>, 崎元 卓<sup>1)</sup>, 澤 充<sup>1)</sup><sup>1)</sup> 日本大学医学部眼科学教室

## 要 約

目的：シェーグレン症候群(SS)の眼表面病態形成における tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  の関与について検討するため、SS 患者の涙液中の TNF- $\alpha$  の存在を調べ、その濃度を測定し角膜上皮障害との関連性を検討した。

対象と方法：SS 患者 30 例 60 眼と健常者 30 例 60 眼を対象とし、涙液中の TNF- $\alpha$  濃度を酵素免疫測定法で測定した。角膜上皮障害を van Bijsterveld スコアで評価し、TNF- $\alpha$  濃度との相関を求めた。

結果：SS 患者の 33 眼で TNF- $\alpha$  を検出した(8~

1,500 pg/ml)。健常人はすべて測定感度以下であった。角膜上皮障害が van Bijsterveld のスコアで 2 点以上の群は、1 点以下の群より涙液中 TNF- $\alpha$  濃度が有意に高値であった ( $p < 0.03$ )。

結論：SS 患者の涙液中には TNF- $\alpha$  が存在し、その濃度が角膜上皮障害の程度と相関したことから、TNF- $\alpha$  は眼表面病態形成に役割を担っていると考えられた。(日眼会誌 108 : 297-301, 2004)

キーワード：TNF- $\alpha$ 、シェーグレン症候群、涙液、

Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in Tears of Patients with Sjögren SyndromeTaiki Oshida<sup>1)</sup>, Mitsuhiro Iwata<sup>1)</sup>, Takashi Sakimoto<sup>1)</sup> and Mitsuru Sawa<sup>1)</sup><sup>1)</sup> Department of Ophthalmology, Nihon University School of Medicine

## Abstract

**Purpose** : To determine the pathological role of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) in ocular surface disorder of patients with Sjögren syndrome (SS), TNF- $\alpha$  in the tears of patients with SS were analyzed. In addition, the relationship between TNF- $\alpha$  levels in the tear samples and the severity of the corneal epithelial disorder was evaluated.

**Material and Methods** : Tear samples were obtained from the 60 eyes of 30 patients with primary SS and the 60 eyes of 30 normal subjects. Tear samples were analyzed using a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect TNF- $\alpha$ . Corneal epithelial cell damage was examined with a slit-lamp biomicroscope and scored by the van Bijsterveld scoring system.

**Results** : TNF- $\alpha$  was detected in the tears of patients with SS at concentrations ranging from 8

to 1,500 pg/ml in 33 of the 60 eyes of the patients. In contrast, TNF- $\alpha$  was not detected in the tears of normal controls. The concentration of TNF- $\alpha$  was significantly higher in the tear samples from patients whose clinical scores were two or three points compared with patients whose scores were zero or one point (Mann-Whitney U test :  $p < 0.03$ ).

**Conclusions** : TNF- $\alpha$  was detected in the tears of patients with SS, and tear TNF- $\alpha$  levels showed a significant correlation with the grade of corneal epithelial damage, suggesting that TNF- $\alpha$  is a potent mediator in keratoconjunctivitis sicca.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 108 : 297-301, 2004)

**Key words** : Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), Sjögren syndrome, Tears

## I 緒 言

シェーグレン症候群は涙腺、唾液腺などの導管や腺房周囲にリンパ球が浸潤し、それに続く腺組織破壊と萎縮を伴う自己免疫疾患で、臨床的には涙液、唾液の分泌が

減少し乾燥症状を示す<sup>1)</sup>。病因には遺伝的素因、性ホルモン、環境因子などが複雑に関与していることが推測されてきたが、1997年にアポトーシスにより分断化された $\alpha$ -フォドリンが本疾患の自己抗原であると報告<sup>2)</sup>され、現在この自己抗原に対する免疫反応と本疾患の病態

別刷請求先：173-8610 東京都板橋区大谷口上町 30-1 日本大学医学部眼科学教室 忍田 太紀

(平成 15 年 3 月 3 日受付, 平成 15 年 10 月 23 日改訂受理)

Reprint requests to : Taiki Oshida, M. D. Department of Ophthalmology, Nihon University School of Medicine, 30-1 Oyaguchi-Kamicho, Itabashi-ku, Tokyo 173-8610, Japan

(Received March 3, 2003 and accepted in revised form October 23, 2003)

との関連について研究が進められている。

眼表面での特有な病態は角結膜上皮細胞の過剰脱落、バリア機能の低下、ムチン発現の減少、扁平上皮化生などである<sup>3)</sup>。眼表面の恒常性が破綻し乾性角結膜炎を来すメカニズムは解明されていないが、現在までに考えられてきた機序としては涙液分泌の減少に伴う乾燥や機械的刺激、涙液の浸透圧上昇に伴う細胞障害などである<sup>4)</sup>。

近年シェーグレン症候群患者では、結膜において interleukin(IL)-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , transforming growth factor (TGF)- $\beta$  1 をコードする messenger ribonucleic acid (mRNA) の発現が増強していること<sup>4)~6)</sup>や、涙液中の IL-1 $\alpha$ , IL-6 濃度が健常人に比較して上昇していることが報告<sup>6)7)</sup>されており、本疾患の眼表面病態形成に炎症性サイトカインが関与していることが推定されている。

TNF- $\alpha$  は多くの機能を有する代表的な炎症性サイトカインである。標的細胞は白血球はもとより、角膜上皮<sup>8)</sup>を含む上皮系細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞、軟骨細胞、そして脂肪細胞など非常に幅広く、またその作用も抗腫瘍活性、抗微生物活性、分化・増殖の調節、免疫誘導、炎症、組織修復など多岐にわたる<sup>9)</sup>。TNF- $\alpha$  のヒト角膜上皮細胞に対する作用については、我々<sup>10)</sup>は過去に細胞増殖抑制作用を有することを報告した。

これまでシェーグレン症候群患者の涙液中 TNF- $\alpha$  濃度を測定した報告はなく、その存在および役割については検討されていない。そこで今回、我々はシェーグレン症候群患者の眼表面では TNF- $\alpha$  が涙液中に発現し、角結膜障害に関与しているとの仮説を立て、シェーグレン症候群患者の涙液中に TNF- $\alpha$  が存在するかを調べ、その濃度を測定し角膜上皮障害の重症度との関連性について検討したので報告する。

## II 方 法

### 1. 対 象

本研究は、日本大学医学部倫理委員会および日本大学医学部附属板橋病院臨床研究検討委員会の承認のもと、被験者に対し十分な説明を行った後、文書による承諾を得て行った。対象はヨーロッパ診断基準<sup>11)</sup>を満たし、他の自己免疫性疾患や腺外症状を合併していない一次性シェーグレン症候群患者 30 例 60 眼である。一方、正常対照群(以下、正常群)は全身疾患がなく、屈折異常以外の眼疾患をもたない健常人 30 例 60 眼である。シェーグレン症候群患者および正常群の内訳を表 1 に示す。

### 2. 方 法

#### 1) 涙液の採取

シルマ試験第一法(自由瞬目下、点眼麻酔を用いず結膜嚢内に 5 分間挿入)で涙液を採取し、シルマ試験紙(シルマ試験紙<sup>®</sup>, 昭和薬品)の目盛りを読み取った後、シ

表 1 対象の内訳

	シェーグレン症候群 (n=30)	正常群 (n=30)
男性/女性	3 例/27 例	5 例/25 例
年 齢	52.9 $\pm$ 9.4 歳	40.5 $\pm$ 19.3 歳
シルマ値	4.4 $\pm$ 3.6 mm	24.1 $\pm$ 7.6 mm

平均値 $\pm$ 標準偏差

ルマ試験紙を約 2 $\times$ 2 mm に細切して生理食塩水 90  $\mu$ l を入れたマイクロチューブに浸漬し-20 $^{\circ}$ C で凍結保存した。測定に際してはマイクロチューブ内の溶液を室温で解凍した後、シルマ試験紙をマイクロピペットで十分に攪拌した。その後、マイクロチューブを遠心分離し、上清 50  $\mu$ l を検体とした。

#### 2) TNF- $\alpha$ 濃度の測定

検体中の TNF- $\alpha$  濃度は酵素免疫測定法(ELISA)(ヒト TNF- $\alpha$ , 超高感度 ELISA キット<sup>®</sup>, コスモ・バイオ社)(測定感度<0.09 pg/ml)を用いて測定した。

#### 3) 涙液中 TNF- $\alpha$ 濃度の計算

検体中の TNF- $\alpha$  濃度から涙液中の TNF- $\alpha$  濃度への換算方法は以下の計算式(1)を用いた。

涙液中の TNF $\alpha$  濃度 =

$$\text{検体の TNF}\alpha \text{ 濃度} \times \text{希釈倍率} \times 100 / \text{回収率} \quad (1)$$

ただし 希釈倍率 = (V+90)/V

V:シルマ値から算出した涙液量

この式の中で希釈倍率を求めるための涙液量(V)とシルマ値との検量線、およびシルマ試験紙からの TNF- $\alpha$  の回収率は既報<sup>12)</sup>に従い以下の方法で求めた。

#### i) シルマ値と涙液量(V)との関係

既知量(1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 13, 15, 17, 20  $\mu$ l)の生理食塩水をシルマ試験紙の先端に滴下・吸収させシルマ値を記録し涙液量とシルマ値の検量線を算出した。

#### ii) シルマ試験紙からの TNF- $\alpha$ の回収率

既知濃度(0, 31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 pg/ml)の TNF- $\alpha$  溶液 5  $\mu$ l をシルマ試験紙に吸収させ細切(2 $\times$ 2 mm)して、生理食塩水 90  $\mu$ l を入れたマイクロチューブに浸漬し、攪拌・遠心分離した後上清 50  $\mu$ l を検体とした。これを前述の ELISA キットを用いて TNF- $\alpha$  濃度を測定し回収率を算出した。

#### 4) 角膜上皮障害、シルマ値との関係

角膜上皮障害の評価は角膜における蛍光色素の染色程度を van Bijsterveld のスコア<sup>13)</sup>を用いて 0~3 の 4 段階に点数化し、シルマ値、van Bijsterveld スコアおよび涙液中の TNF- $\alpha$  濃度との相関を検討した。

## III 結 果

### 1. シルマ値と涙液量(V)との関係

シルマ試験紙の先端に滴下し吸収させた生理食塩水の容量とシルマ値の関係を図 1 に示す。生理食塩水の容量

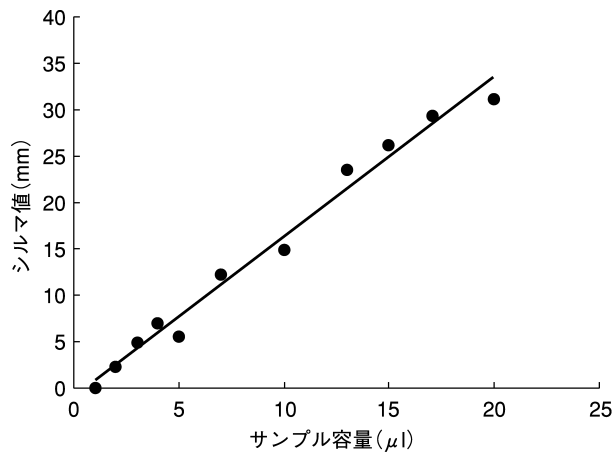


図 1 涙液量とシルマ値との関係。  
 $y=1.72x-0.91$ (回帰係数 0.983)の正の相関がみられる。

とシルマ値との関係は回帰式  $y=1.72x-0.91$ (回帰係数 0.983)で表される正の相関がみられ、このことからシルマ値から採取された涙液量を計算し得ることがわかった。

2. シルマ試験紙からの TNF- $\alpha$  の回収率

既知濃度の TNF- $\alpha$  溶液 5  $\mu$ l を滴下したシルマ試験紙からの TNF- $\alpha$  の回収率は 62.5, 125, 250, 500, 1,000 pg/ml ではそれぞれ  $8.9 \pm 3.7$ (平均値  $\pm$  標準偏差)%,  $9.5 \pm 3.8\%$ ,  $9.1 \pm 3.2\%$ ,  $10.6 \pm 4.0\%$ ,  $11.0 \pm 3.1\%$  で濃度による回収率に差はなく全体で  $10.0 \pm 4.2\%$  であった。0, 31.3 pg/ml では測定感度以下であった。

以上の結果から、前述の計算式(1)は x を採取された涙液のシルマ値として

涙液中の TNF- $\alpha$  濃度 =

$$\text{検体の TNF-}\alpha \text{ 濃度} \times \text{希釈倍率} \times 100/10$$

$$\text{ただし、希釈倍率} = (x + 155.71) / (x + 0.91)$$

となり、この計算式を用いて涙液中の TNF- $\alpha$  濃度を計算した。

3. 涙液中 TNF- $\alpha$  濃度の測定

シェーグレン症候群患者 30 例 60 眼のうち、19 例 33 眼で涙液中に TNF- $\alpha$  を検出した [8~1,500 pg/ml,  $364 \pm 360$ (平均値  $\pm$  標準偏差)pg/ml]。一方、正常群ではすべて測定感度以下であった。

4. 角膜上皮障害、シルマ値との関係

シェーグレン症候群患者において van Bijsterveld のスコアによる角膜上皮障害の重症度と涙液中の TNF- $\alpha$  濃度との関係では、van Bijsterveld スコアが 2 点以上の群は 1 点以下の群より涙液中の TNF- $\alpha$  濃度が有意に高値であった(Mann-Whitney U 検定,  $p < 0.03$ ) (図 2)。

シェーグレン症候群患者において、シルマ値と涙液中 TNF- $\alpha$  濃度との間には相関関係はなかった(図 3)。

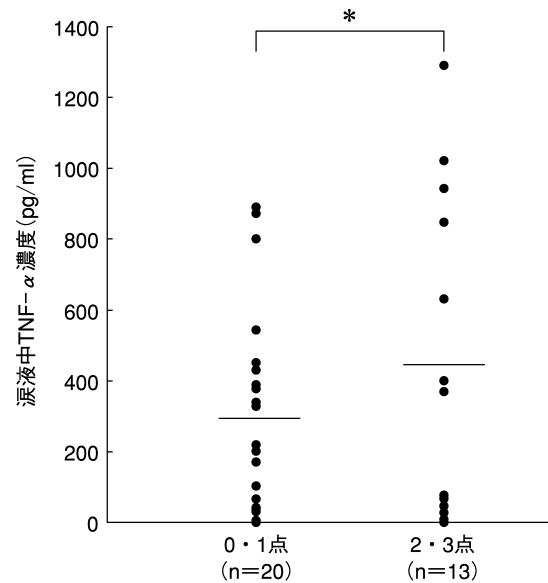


図 2 角膜上皮障害と涙液中 tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  濃度との関係。

シェーグレン症候群患者において van Bijsterveld スコアが 2 点以上の群では 1 点以下の群より涙液中 TNF- $\alpha$  濃度が有意に高値である。

\* : Mann-Whitney U 検定  $p < 0.03$

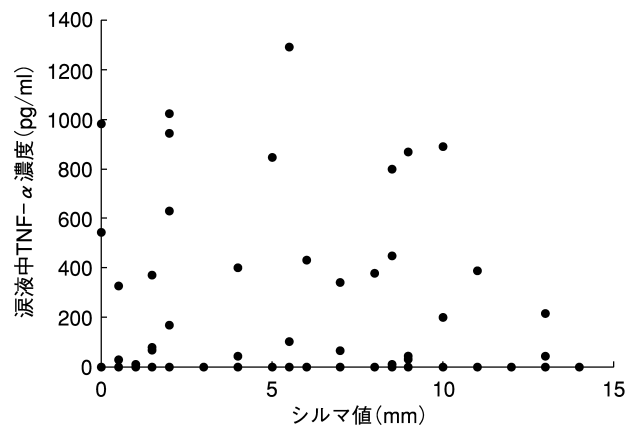


図 3 シルマ値と涙液中 TNF- $\alpha$  濃度。

シェーグレン症候群患者においてシルマ値と涙液中 TNF- $\alpha$  濃度との間に相関関係はない(n=60)。

IV 考 按

自己免疫疾患の病態形成には、炎症性サイトカインが深く関与すると考えられている。炎症性サイトカインの主軸を成す TNF- $\alpha$  は、シェーグレン症候群、関節リウマチ(RA)、強皮症の患者血清で濃度が上昇し<sup>14)</sup>、特に関節リウマチにおいては関節腔で TNF- $\alpha$  が持続的、かつ過剰に産生され滑膜増殖や軟骨組織破壊といった関節病変を惹き起こすと報告<sup>15)</sup>されており、病態形成における重要性が明らかになっている。RA の新しい治療法として TNF- $\alpha$  を阻害する抗 TNF- $\alpha$  モノクローナル抗体

による治療が実用化され、その効果が報告<sup>16)17)</sup>されつつある。

今回、角結膜上皮障害を疾患の主要な病態とするシェーグレン症候群患者の眼表面では TNF- $\alpha$  が涙液中に発現し、角結膜障害に関与しているとの仮説のもとにシェーグレン症候群患者の涙液中 TNF- $\alpha$  濃度を測定した結果、30 例 60 眼のうち 19 例 33 眼で TNF- $\alpha$  を検出した。これまでシェーグレン症候群患者の涙液中 TNF- $\alpha$  濃度を測定した報告はなく、初めてその存在が確認された。

一方、正常群の涙液からは TNF- $\alpha$  は検出されなかった。健常人を対象とした涙液中のサイトカインについては IL-1  $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , IL-6, IL-8 の存在が報告<sup>7)18)</sup>されているが、TNF- $\alpha$  の濃度は測定感度以下とされており<sup>6)</sup>、今回の我々の正常群 30 例 60 眼を検討した結果も同様であった。

今回行った涙液中 TNF- $\alpha$  濃度の測定では、涙液の採取はシルマ試験紙を使用して採取する方法を用いた。この方法は、採取された涙液量とシルマ値との間に相関関係が成り立ち、採取された涙液の容量をシルマ値から換算できることが必要である。涙液量とシルマ値との相関性は、近藤ら<sup>12)</sup>によりすでに確認されているが、今回我々の実験でもその相関性が確認された。また、TNF- $\alpha$  濃度は涙液を吸収させたシルマ試験紙を生理食塩水に浸漬し TNF- $\alpha$  を溶出させ ELISA で測定した。シルマ試験紙からの TNF- $\alpha$  濃度の回収率は一定の割合を示したことから、方法 3) に示した計算式(1)が成立するものとして ELISA の測定結果から涙液中の TNF- $\alpha$  濃度を算出した。このシルマ試験紙を使用して涙液を採取する方法はシェーグレン症候群のように涙液量の少ない被験者から涙液を採取するには適した方法であるといえる。

今回、涙液中 TNF- $\alpha$  は正常対照群からは検出されず、シェーグレン症候群患者から検出されたことは TNF- $\alpha$  が本疾患の病態形成に関与していることが考えられる。この TNF- $\alpha$  の由来は、シェーグレン症候群では血清中の TNF- $\alpha$  の濃度が上昇していることや<sup>14)</sup>、結膜で TNF- $\alpha$  をコードする mRNA が増強して発現していることが報告<sup>4)</sup>されているが今回は検討していない。

我々は過去に TNF- $\alpha$  のヒト角膜上皮細胞の増殖に対する影響を培養細胞を用いて調べ、培養ヒト角膜上皮細胞の増殖が培養液に添加した TNF- $\alpha$  の濃度に依存して抑制されることから、TNF- $\alpha$  はヒト角膜上皮細胞の増殖を抑制する作用を有すると報告<sup>10)</sup>した。今回の結果は、涙液中 TNF- $\alpha$  と角膜上皮障害との相関があることを考えさせるものであった。

さらに、上皮障害スコアと TNF- $\alpha$  濃度との間に有意の差がみられたことは、TNF- $\alpha$  の上皮障害との関係を示すものであった。しかし、涙液中の TNF- $\alpha$  濃度の上昇が直接シェーグレン症候群における角膜上皮障害の原

因であるとするには、TNF- $\alpha$  濃度の上昇が角結膜障害による結果である可能性もあり、今後さらに検討が必要であると考えられる。

シェーグレン症候群患者の結膜で、IL-1  $\alpha$ , IL-6, IL-8, TGF- $\beta$  1 や TNF- $\alpha$  をコードする mRNA が増強して発現し<sup>4)~6)</sup>、涙液そのものに含まれる IL-1  $\alpha$ , IL-6 の濃度が健常人に比較して有意に上昇していることが報告<sup>6)7)</sup>されており、今回の結果と合致するものである。これらのサイトカインの角膜上皮細胞の増殖にかかわる作用については、IL-1 が keratinocyte growth factor (KGF), hepatocyte growth factor (HGF) の発現を増強させ<sup>19)20)</sup>、角膜上皮細胞の増殖を促進させる作用を持つ<sup>21)</sup>。ヒト角膜上皮細胞は IL-1 および IL-6 を恒常的に産生しており<sup>18)22)~25)</sup>、かつ、角膜上皮障害が生じた際には IL-1 や IL-6 の発現が増強することから<sup>26)</sup>、IL-1 と IL-6 は角膜上皮の恒常性維持と創傷治癒に働くと考えられている。一方、角膜上皮細胞の増殖を抑制する因子としては TGF- $\beta$  が知られている<sup>27)</sup>。TGF- $\beta$  は涙液およびすべての角膜組織に存在するとされているが<sup>28)</sup>、涙液中に存在するものはほとんどが蛋白と結合した潜在型として存在し活性型はわずかであるとされている<sup>29)</sup>。Vesaluoma ら<sup>30)</sup>は眼症状を伴うアトピー性皮膚炎患者の涙液から約 1,000 ng/l の TNF- $\alpha$  を検出しているが、角膜上皮障害との関連性については検討されていない。

今後さらに多くの症例で検討するとともに、TNF- $\alpha$  の結膜上皮に対する影響や結膜障害との関係についても検討してみる必要がある。さらに、他の角膜上皮障害を来す疾患の涙液中 TNF- $\alpha$  濃度と重症度とについて調べ、シェーグレン症候群とで比較検討することはシェーグレン症候群の眼表面の病態と TNF- $\alpha$  との関連をより深く理解するために必要であると考えられる。また、今回の結果は現在欧米でリウマチの治療薬として認可されている抗 TNF- $\alpha$  抗体<sup>16)17)</sup>がシェーグレン症候群患者の角膜上皮障害の治療においても応用できると推定される。

## 文 献

- 1) Fox RI, Kang H : Pathogenesis of Sjögren's syndrome. Rheum Dis Clin North Am 18 : 517-538, 1992.
- 2) Haneji N, Nakamura T, Takio K, Yanagi K, Higashiyama H, Saito I, et al : Identification of  $\alpha$ -fodrin as a candidate autoantigen in primary Sjögren's syndrome. Science 276 : 604-607, 1997.
- 3) Pflugfelder SC, Huang AJW, Feuer W, Chuchovski PT, Pereira IC, Tseng SCG : Conjunctival cytologic features of primary Sjögren's syndrome. Ophthalmology 97 : 985-991, 1990.
- 4) Pflugfelder SC, Jones D, Ji Z, Afonso A, Monroy D : Altered cytokine balance in the tear fluid and conjunctiva of patients with Sjögren's syndrome keratoconjunctivitis sicca. Curr Eye

- Res 19 : 201—211, 1999.
- 5) **Jones DT, Monroy D, Ji Z, Atherton SS, Pflugfelder SC** : Sjögren's syndrome : Cytokine and Epstein-Barr viral gene expression within the conjunctival epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35 : 3493—3504, 1994.
  - 6) **Solomon A, Dursun D, Liu Z, Xie Y, Macri A, Pflugfelder SC** : Pro- and anti-inflammatory forms of interleukin-1 in the tear fluid and conjunctiva of patients with dry-eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 : 2283—2292, 2001.
  - 7) **Tishler M, Yaron I, Geyer O, Shirazi I, Nafataliev E, Yaron M** : Elevated tear interleukin-6 levels in patients with Sjögren syndrome. *Ophthalmology* 105 : 2327—2329, 1998.
  - 8) **Cubitt CL, Lausch RN, Oakes JE** : Differential regulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene expression in human corneal cells by pro-inflammatory cytokines. *J Immunol* 153 : 232—240, 1994.
  - 9) **Vilcek J, Lee TH** : Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem* 266 : 7313—7316, 1991.
  - 10) **Funamoto H, Iwata M, Sawa M** : Antiproliferative effects of IFN-gamma and TNF-alpha on corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34(4) : S 1411, 1993. Abstract nr 3503.
  - 11) **Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM, Balestrieri G, Bencivelli W, Bernstein RM, et al** : Preliminary criteria for the classification of Sjögren's syndrome. Results of a prospective concerted action supported by the European community. *Arthritis Rheum* 36 : 340—347, 1993.
  - 12) 近藤容子, 岡本全泰, 岡本茂樹, 大橋裕一, 高杉潔, 近藤泰紘 : 慢性関節リウマチ患者における涙液中 IL-1 $\beta$ . *眼紀* 48 : 1363—1366, 1997.
  - 13) **van Bijsterveld OP** : Diagnostic tests in the sicca syndrome. *Arch Ophthalmol* 82 : 10—14, 1969.
  - 14) 石田 博, 柳田英寿 : 膠原病とサイトカイン. *臨床病理* 47 : 327—334, 1999.
  - 15) **Feldmann M, Brennan FM, Maini RN** : Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* 14 : 397—440, 1996.
  - 16) 澤田滋正, 龍順之助, 武井正美 : 慢性関節リウマチの最新治療, 抗 TNF- $\alpha$  抗体, 抗 IL-6 受容体抗体療法. *日大医誌* 60 : 439—441, 2001.
  - 17) **Shanahan JC, St. Clair EW** : Tumor necrosis factor- $\alpha$  blockade : A novel therapy for rheumatic disease. *Clin Immunology* 103 : 231—242, 2002.
  - 18) **Nakamura Y, Sotozono C, Kinoshita S** : Inflammatory cytokines in normal human tears. *Curr Eye Res* 17 : 673—676, 1998.
  - 19) **Chedid M, Rubin JS, Csaky KG, Aaronson SA** : Regulation of keratinocyte growth factor gene expression by interleukin 1. *J Biol Chem* 269 : 10753—10757, 1994.
  - 20) **Tamura M, Arakaki N, Tsubouchi H, Takada H, Daikuhara Y** : Enhancement of human hepatocyte growth factor production by interleukin-1 $\alpha$  and -1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  by fibroblasts in culture. *J Biol Chem* 268 : 8140—8145, 1993.
  - 21) **Boisjoly HM, Laplante C, Bernatchez SF, Salsese 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.
  - 22) 坂本真栄, 清野雅子, 田澤 豊, 稲田捷也, 吉田昌男 : ヒト角膜培養上清中の IL-1 活性. モノクローナル抗体を用いた ELISA による検出. *眼紀* 41 : 505—510, 1990.
  - 23) 坂本真栄, 稲田捷也, 千葉可芽里, 吉田昌男, 田澤 豊 : 人眼角膜上皮細胞によるインターロイキン 6 およびインターロイキン 1 $\alpha$  の産生. *日眼会誌* 95 : 728—732, 1991.
  - 24) **Wilson SE, He YG, 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.
  - 25) **Becker J, Salla S, Dohmen U, Redbrake C, Reim M** : Explorative study of interleukin levels in the human cornea. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 233 : 766—771, 1995.
  - 26) **Sotozono C** : Second injury in the cornea. The role of inflammatory cytokines in corneal damage and repair. *Cornea* 19 : 155—159, 2000.
  - 27) 木下 茂 : 角結膜上皮. 創傷と修復. *眼紀* 47 : 761—769, 1996.
  - 28) **Nishida K, Kinoshita S, Yokoi N, Kaneda M, Hashimoto K, Yamamoto S** : Immunohistochemical localization of transforming growth factor- $\beta$  1, - $\beta$  2, and - $\beta$  3 latency-associated peptide in human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35 : 3289—3294, 1994.
  - 29) **Kokawa N, Sotozono C, Nishida K, Kinoshita S** : High total TGF- $\beta$  2 levels in normal human tears. *Curr Eye Res* 15 : 341—343, 1996.
  - 30) **Vesaluoma M, Rosenberg ME, Teppo AM, Grönhagen-Riska C, Haahtela T, Tervo T** : Tumour necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) in tears of atopic patients after conjunctival allergen challenge. *Clin Exp Allergy* 29 : 537—542, 1999.