

培養家兎水晶体上皮細胞に対するカルシウムの影響

向井公一郎¹⁾²⁾, 松島 博之¹⁾, 石井 康雄²⁾, 小原 喜隆¹⁾

¹⁾獨協医科大学眼科学教室, ²⁾ニュービジョン眼科研究所

要 約

目 的：水晶体上皮細胞の挙動は、白内障および後発白内障の発生に関連して注目される。家兎水晶体上皮細胞の形態および性質に対するカルシウムの影響を解析することを目的とした。

方 法：家兎水晶体囊から水晶体上皮細胞を解離し、MEM(minimum essential medium) (12% FBS(fetal bovine serum))で1週間培養(5% CO₂, 37°C)した。培養細胞を再び採取し、直径7 mmの円筒管を固定した直径35 mm培養用ディッシュの管内に、1×10⁴個の細胞数を約2時間静着させた。静着後、円筒管を除去し、カルシウム濃度を0, 2, 10, 20 mMに調整したMEM(12% FBS)に置換した。培養細胞は位相差顕微鏡を用いて観察後、 α -SMA(α -Smooth Muscle Actin), BrdU(bromodeoxyuridine)で免疫染色を行い、形態および増殖能を検討した。また、水晶体上皮細胞をコラーゲンゲル内で培養し、カルシウムの濃度変化によ

るゲルの収縮率を検討した。

結 果：位相差顕微鏡下の観察で、高カルシウム濃度培地では線維芽様の形態に変化した細胞が多くみられた。BrdU 免疫染色では、高カルシウム濃度培地で染色陽性細胞が増加していて、カルシウム(−), 2 mM 培地では減少していた。 α -SMA 染色では、高カルシウム濃度培地、カルシウム(−)培地の細胞に陽性細胞が多数みられた。コラーゲンゲル内培養では、高カルシウム濃度培地使用によりゲル収縮は著明であった。

結 論：白内障、後発白内障の発生および嚢収縮に水晶体上皮細胞のカルシウムによる変化が関与する可能性がある。(日眼会誌 110 : 361–369, 2006)

キーワード：白内障、後発白内障、カルシウム、嚢収縮、線維芽細胞

Effects of Calcium on Lens Epithelial Cells in Rabbits

Koichiro Mukai¹⁾²⁾, Hiroyuki Matsushima¹⁾, Yasuo Ishii²⁾ and Yoshitaka Obara¹⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Dokkyo University School of Medicine

²⁾New Vision Eye Research Institute

Abstract

Purpose : The action of lens epithelial cells (LECs) is important for cataract and posterior subcapsular cataract after cataract surgery. In this study, we analyzed the effects of calcium on the characteristics of LECs.

Methods : The LECs were collected using albino rabbits and incubated in minimum essential medium [MEM, Introgen Corp. (12% fetal bovine serum : FBS)] (37°C, 5% CO₂) for a week to induce their proliferation. Cell culture dishes (35 mm) were prepared and 7 mm cylindrical pipes were placed in them. After that, around 10,000 cultured LECs were placed in the pipes and incubated. After 2 hours incubation, the pipes were removed and various doses of MEM (0, 2, 10 and 20 mM) replaced the calcium. Proliferation and shapes of LECs were observed using a confocal microscope and immunohistological analysis [α -smooth muscle actin (α -SMA) and bromodeoxyuridine (BrdU)]. The LECs were incubated with collagen gel and different calcium doses (0, 2, 10 and 20 mM) of MEM to calculate the contraction rate.

Results : It was observed that the LECs changed to fibroblast-like cells at high doses of calcium using a confocal microscope. Histological studies showed that the BrdU positive cells were increased by using 10 and 20 mM calcium MEM, but the positive cells were decreased by using 0 and 2 mM calcium MEM. Increase of α -SMA stained cells was recognized when using 0, 10 and 20 mM calcium MEM. The contraction rate of collagen gel was increased by using the 10 and 20 mM calcium MEM.

Conclusion : The changes of calcium concentration might be an important factor for the development of cataract, posterior subcapsular opacification, and contraction of the lens capsule after cataract surgery.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 110 : 361–369, 2006)

Key words : Cataract, Posterior subcapsular opacification, Calcium, Capsule contraction, Fibroblast

別刷請求先：321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林 880 獨協医科大学眼科学教室 向井公一郎

(平成 16 年 5 月 20 日受付, 平成 17 年 8 月 15 日改訂受理) E-mail : k.mukai@jcom.home.ne.jp

Reprint requests to : Kouichirou Mukai, M.D. Department of Ophthalmology, Dokkyo University School of Medicine, 880 Kitakobayashi, Mibu-machi, Shimotsuga-gun, Tochigi 321-0293, Japan

(Received May 20, 2004 and accepted in revised form August 15, 2005)

I 緒 言

白内障および後発白内障の発生に水晶体上皮細胞の挙動が強く関連している。上皮細胞の生理活性を阻害する要因の1つとして、過剰なカルシウムが水晶体蛋白質の分解や凝集を生じ、水晶体の混濁が生じることが報告¹⁾されている。ヒト白内障では水晶体内のカルシウム濃度が上昇し²⁾、特に皮質白内障では、初期白内障から成熟白内障までに約16倍ものカルシウムの濃度上昇が報告³⁾されている。亜セレン酸ラット白内障実験モデルにおいても、水晶体混濁以前に細胞内カルシウムが上昇し、タンパク質分解酵素を活性化し蛋白質の分解と凝集を生じ、白内障が生じることが知られている⁴⁾。我々は、ヒト水晶体でもカルシウム濃度の上昇から水晶体蛋白質変化が生じることを報告⁵⁾した。また培養ヒト水晶体細胞ではカルシウム濃度が高濃度および低濃度であってもカルシウムが上皮細胞の増殖性異常や形態学的変化を来すこと⁶⁾も分かっている。水晶体上皮細胞の重層化と前嚢下白内障の関与も報告⁷⁾されている。今回、濃度の異なるカルシウムが水晶体上皮細胞の細胞形態、増殖能そして細胞収縮などへの影響を検討するために、増殖性が高い家兎水晶体上皮細胞を培養し解析した。

II 実験方法

1. 家兎水晶体の上皮細胞の培養およびカルシウム濃度調整(図1)

8週齢の白色家兎眼球を摘出し、角膜および虹彩を分離し水晶体嚢を摘出した。採取した水晶体嚢を剝離しトリプシンEDTA溶液(Invitrogen Corp)を用いて37°Cで10分間処理し、水晶体上皮細胞を解離後 minimum essential medium(MEM)12% 仔牛胎児血(FBS)(JRH Biosciences)含有培地で1週間培養(5% CO₂, 37°C)した。直径35 mm 培養用ディッシュの管内に直径7 mmの円筒管を固定し、コンフルエントになった水晶体上皮細胞をトリプシン処理によって剝離して細胞数を1×10⁴個に調整して、円筒管内に細胞を播種し、約2時間培養して静着させた。カルシウムの影響を観察するためにカルシウムが入っていないMEM(12% FBS)を用意した。塩化カルシウム(和光)を加えることでカルシウム濃度の異なる(カルシウム(-), 2, 10, 20 mM) MEMを作製した。カルシウム(-)MEMは、FBSのみに含まれるカルシウム(約0.2 mM)として使用した。水晶体上皮細胞が静着後7 mmの円筒管を除去し、異なったカルシウム濃度のMEMに置換した。水晶体上皮細胞は培養後4日と7日に位相差顕微鏡(IX 70, OLYMPUS)を使用して、観察比較し各細胞をカウントした。全ての実験には4つのディッシュを使用し、統計的検討は、Fisher's Protected Least Significant Difference(PLSD)の多重比較検定を行った。

2. 組織免疫学解析

水晶体上皮細胞の増殖能の変化を解析するために、培養後4日と7日に上皮細胞を10%ホルマリンで固定し、細胞増殖期S期の指標としてDNA複製のための前駆体であるチミジンのアナログであるBrdU(5-bromo-2'-deoxyuridine, ZYMED)を取り込ませ、抗BrdU(5-bromo-2'-deoxyuridine, ZYMED)の免疫染色を行った。その後、培養用ディッシュ全細胞数におけるBrdU陽性細胞数を調べて増殖細胞数を測定した。また4, 7日後の抗 α 平滑筋繊維アクチン α -SMA(α -Smooth Muscle Actin, Progen)の免疫染色を行い、水晶体上皮細胞の線維芽細胞様の細胞への変化を観察した。組織免疫解析には酵素抗体法のavidin-biotinylated peroxidase complex(ABC法)を用いた。HISTOFINE SAB-PO(MULTI) kit(NICHIREI)を使用した。

3. コラーゲンゲルによる水晶体上皮細胞収縮能解析

水晶体上皮細胞の収縮に対する影響を観察するために、直径35 mm 培養用ディッシュに2 mlの0.1%ペプシン処理I型コラーゲン溶液Collagen I-PC(高研)を含有した2 mMカルシウム添加MEM溶液を、1×10⁵個の水晶体上皮細胞とともにゲル化させて単層培養した⁸⁾。カルシウム濃度の相違によるコラーゲンゲルの収縮能を観察するために、3時間後カルシウム(-), 2, 10, 20 mMに調整したMEM(12% FBS)を1 mlずつ添加した。24時間培養静置後、ゲルを培養液に浮遊した状態にして24時間毎に培地を交換しながら、さらに4日間培養した⁹⁾。その後、ゲルの長径および短径を測定して面積を求め、35 mm 培養ディッシュとの面積比により各群で収縮率を算出した。収縮率の計算方法は、培養前のゲルの径は35 mmであり、培養後のゲルの長径をa、短径をbとすると、 $[(a \times b) / (35)^2] \times 100 (\%)$ として計算した。

4. 白色家兎による超音波白内障手術後の前房内カルシウム測定

手術および術後炎症と前房内カルシウム濃度変化を比較するために、2.0 kgの日本白色家兎5羽に、超音波白内障吸引術を施行後1日、7日、14日目の前房水を毛様体扁平部付近より採取し、カルシウム測定キット(カルシウムCテストワコー, 和光純薬)を用いてカルシウム定量を行い、術後のカルシウム変化を検討した。統計的検討として多重比較検定Fisher's PLSDを行った。

III 結 果

1. 位相差顕微鏡による観察

培養後4日目(図2)および培養後7日目(図3)の位相差顕微鏡による観察結果を示す。生理的濃度である2 mMカルシウム添加群では、六角形を保ちつつ伸展した細胞が中央部で観察できた。生理的低濃度でありながら、ごく少数の線維芽細胞様細胞も出現していた。周辺

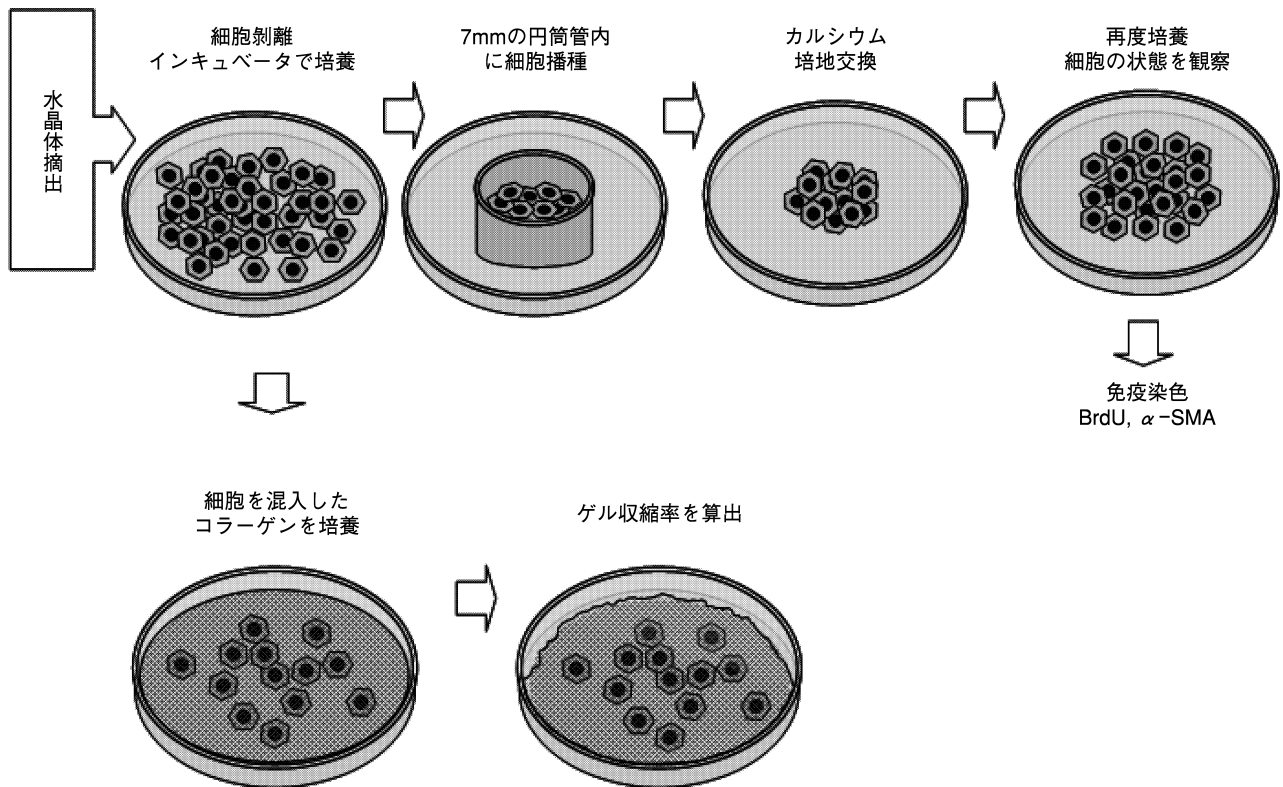


図 1 実験方法.

実験方法の概略を示す。家兎水晶体より採取した水晶体上皮細胞をインキュベーターで培養することにより増殖させた。増殖細胞をトリプシン処理によりディッシュから剥離し、35 mm ディッシュ中央に 7 mm の円筒管を静置し、上方から一定数の細胞を播種した。細胞が静着したところで円筒管を除去し、異なる濃度のカルシウムを添加した minimum essential medium (MEM) を加えて培養させ、増殖した細胞の状態を観察し免疫染色することで細胞の状態を解析した。同時に採取した細胞を混入したコラーゲンゲルを作製し、同様に異なるカルシウム濃度の MEM と培養することで、細胞の増殖によるコラーゲンゲルの収縮状態を比較検討した。BrdU: bromodeoxyuridine, α -SMA: α -Smooth Muscle Actin

部では僅かに形態が変化した細胞がみられた。MEM にカルシウムを含有させていないカルシウム(－)培地で培養した細胞では個々の上皮細胞は膨化し、細胞の伸展は遅延していた。周縁部では細胞伸展が疎であった。高濃度のカルシウム(10 mM および 20 mM)を添加した群では、細胞は大小不整な形で周辺部まで伸展し、周辺部では線維芽様細胞が多数出現し増加しつつあった。20 mM カルシウムを添加した細胞では、培養 7 日目の周辺部で小円形の変性傾向をもった細胞がみられた。

2. 組織免疫学的解析

培養水晶体上皮細胞の増殖能を比較するため経時的に全細胞数変化と BrdU 染色細胞の観察をすることにより、増殖能の比較を行った。培養全細胞数の推移を図 4 に示す。培養後 4 日目までは、各群に大きな差はなかったが、培養 7 日目になるとカルシウム濃度 2 mM 群では細胞数が $7.3 \times 10^4 \pm 16$ 個まで増加し、カルシウム(－)濃度群では培養 7 日目では $4.0 \times 10^4 \pm 19$ と半数の細胞数であった。高濃度カルシウムである 10 mM 群および 20 mM 群では、7 日目で 10 mM が $10.4 \times 10^4 \pm 16$ 、20 mM が $9.8 \times 10^4 \pm 16$ 個で同日のカルシウム(－)

培地に比較して明らかに増加していた($p < 0.001$, Fisher's PLSD)。BrdU 染色陽性細胞の推移(図 5)を観察すると生理的濃度であるカルシウム 2 mM 群で軽度の増加を示し、培養 7 日目で 183.3 ± 3.1 個なのに対し、カルシウム(－)濃度群では培養 7 日目で陽性細胞が減少し、 55.8 ± 0.5 個であった。高カルシウム濃度群では、経時的に陽性細胞が増加し、培養 7 日目では 10 mM で 174.5 ± 8.0 個、20 mM で 280.3 ± 4.4 個であった。BrdU 陽性部位は、伸展している周縁部の核が主に染まっていた。

図 6 に α -SMA による免疫学的染色結果を示す。位相差顕微鏡で変化のみられた中央部の細胞は、各群弱い染色を認めた。周辺部では、カルシウム濃度が高くなると陽性細胞が多数認められた。また、カルシウム(－)濃度群、高濃度の 20 mM 群では、小円形の細胞が散在している中に α -SMA 抗体強陽性細胞が多数みられた。

3. コラーゲンゲルを用いた異常細胞による組織収縮の検討(図 7, 8)

カルシウム濃度の異なる MEM を添加後、水晶体上皮細胞とともに 4 日間培養したコラーゲンゲルの結果を

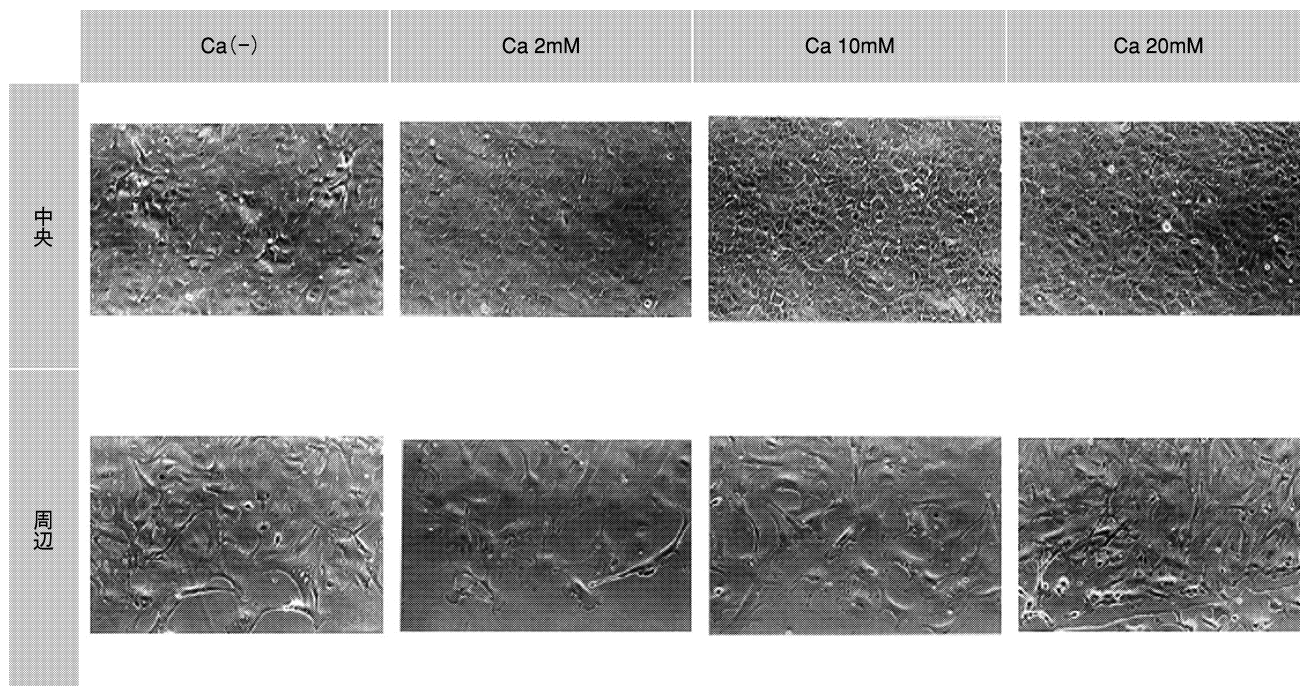


図 2 カルシウム濃度の異なる培養液を加えた水晶体上皮細胞(培養 4 日目).

下がリーディングエッジである周辺部，上がコンフルエントになった中央部を示す。生理的濃度の 2 mM カルシウム培地では整然とした細胞が観察されるが，カルシウムを含有していない培地では水晶体上皮細胞が膨化していた。高濃度のカルシウム添加培地では細胞形状が大小不正になり，周辺部では多数の線維芽細胞が出現していた。

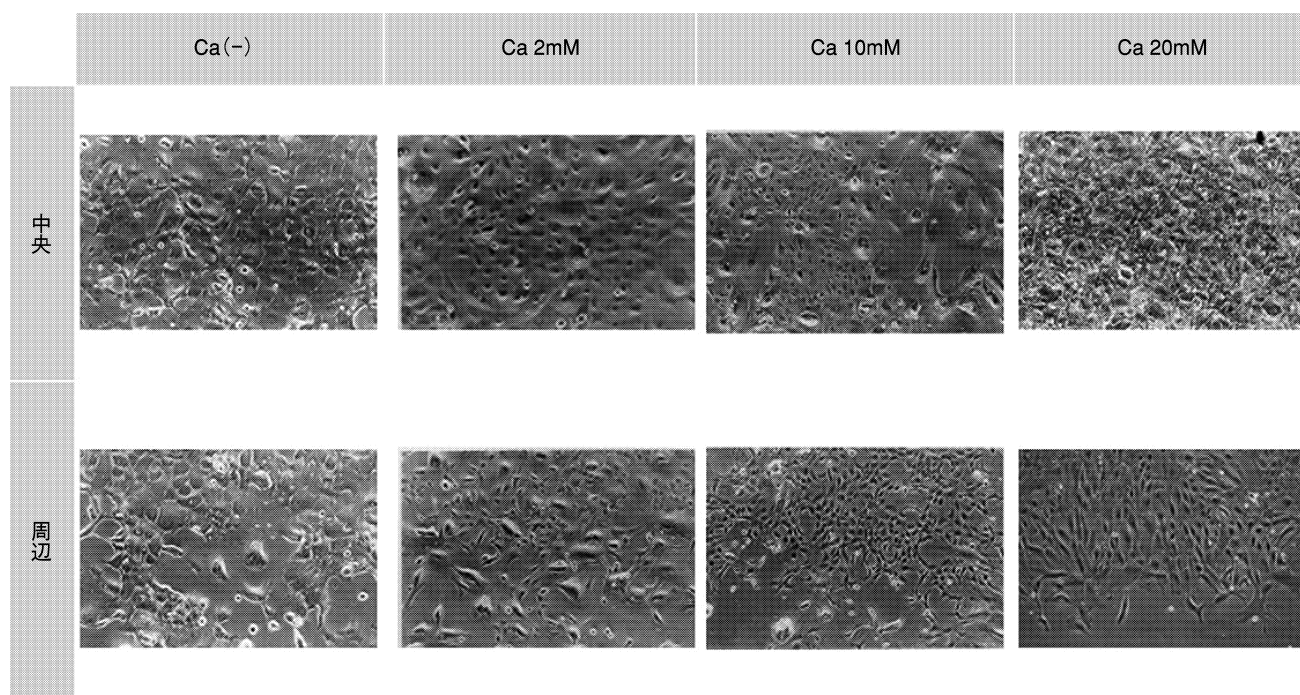


図 3 カルシウム濃度の異なる培養液を加えた水晶体上皮細胞(培養 7 日目).

培養 7 日目になると，4 日目に比べてさらに変化が顕著になった。生理的濃度のカルシウム添加培地に比べ，カルシウム(-)，高濃度カルシウム培地では不正な細胞が多数出現しているのが観察できた。

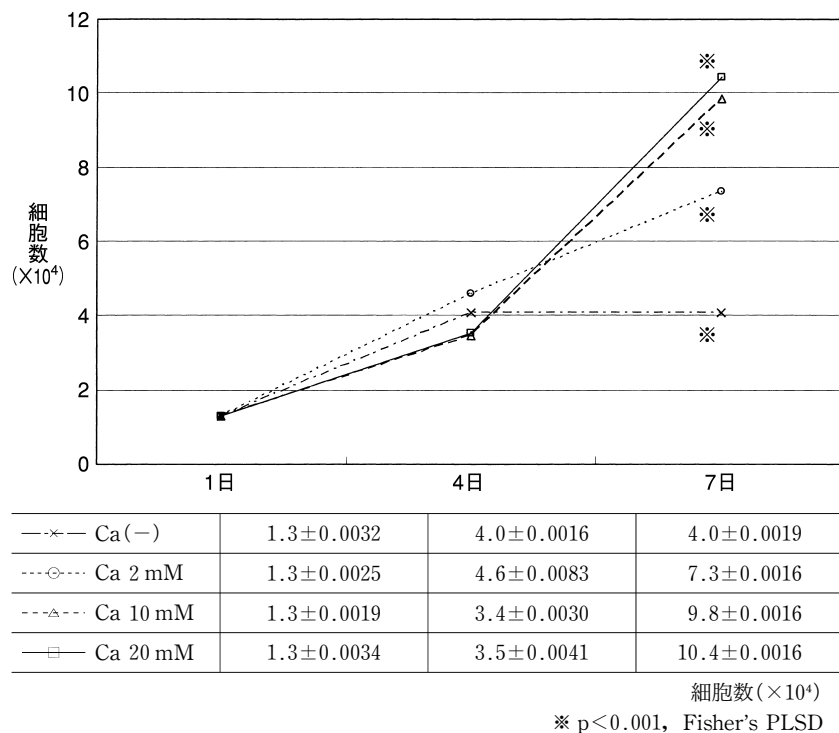


図 4 全細胞数の推移.

ディッシュ内の細胞数をカウントすると培養 4 日目までは大きな差が無いが, 7 日目では 2 mM カルシウム濃度培地に比べ, 10 mM, 20 mM の高濃度カルシウム培地では細胞数が統計的に有意に増加していた ($p < 0.001$, Fisher's PLSD). カルシウム(-)培地では細胞数の増加が停止していた. Fisher's PLSD: Fisher's Protected Least Significant Difference

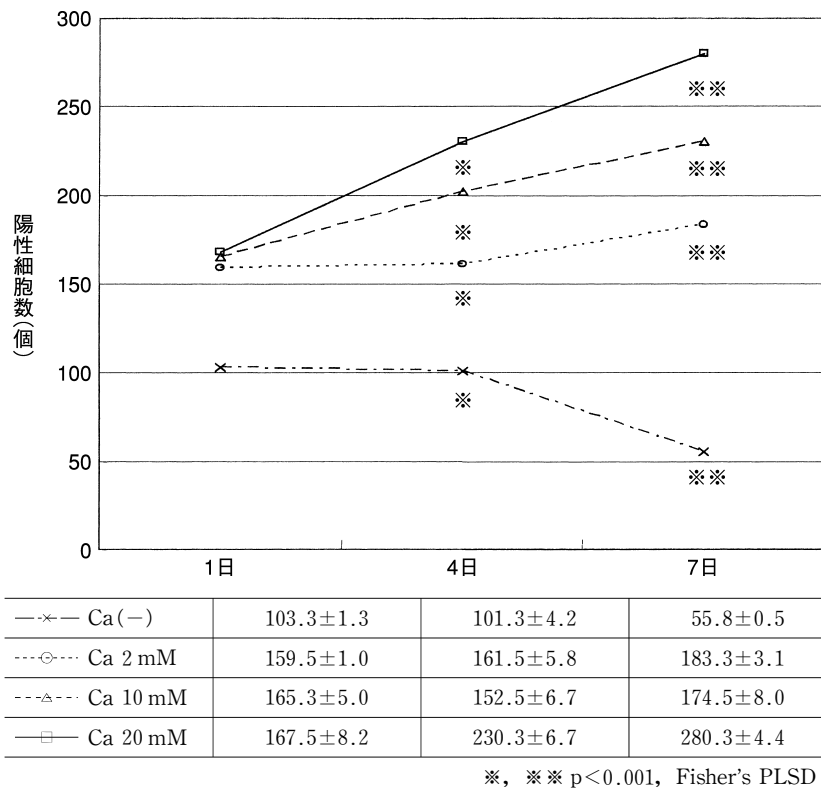


図 5 家兎水晶体上皮細胞 BrdU 陽性細胞の推移.

細胞増殖能を示す BrdU 染色細胞をカウントすると, 細胞数の増加した 20 mM, 10 mM の高濃度カルシウム培地で, 陽性細胞が軽度の増加である 2 mM カルシウム濃度培地に比べ統計的に有意に増加していて, 水晶体上皮細胞の増殖能が亢進している様子が分かった ($p < 0.001$, Fisher's PLSD). カルシウム(-)培地では陽性細胞が培養 1 日目で他の 3 群と比べて少なく, 7 日目で減少した.

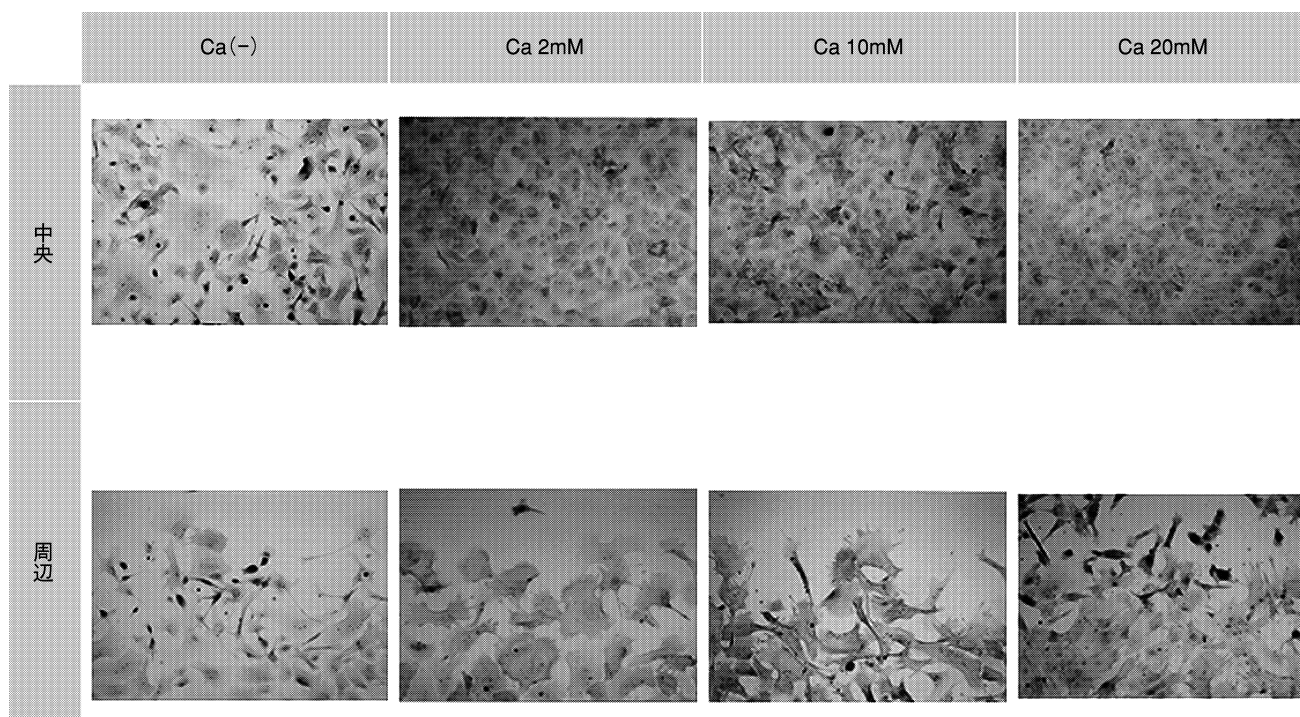


図 6 カルシウム濃度変化による α -平滑筋アクチンの発現。

4 日間培養した各群を抗 α -SMA 抗体で免疫染色した。高濃度カルシウム培地およびカルシウム(-)培地を使用すると周辺部の免疫染色陽性細胞が増加していた。2 mM 培地に対して 20 mM で約 6 倍、10 mM で約 4 倍、カルシウム(-)培地で約 2 倍増加し、線維芽細胞が増加していることが分かった。

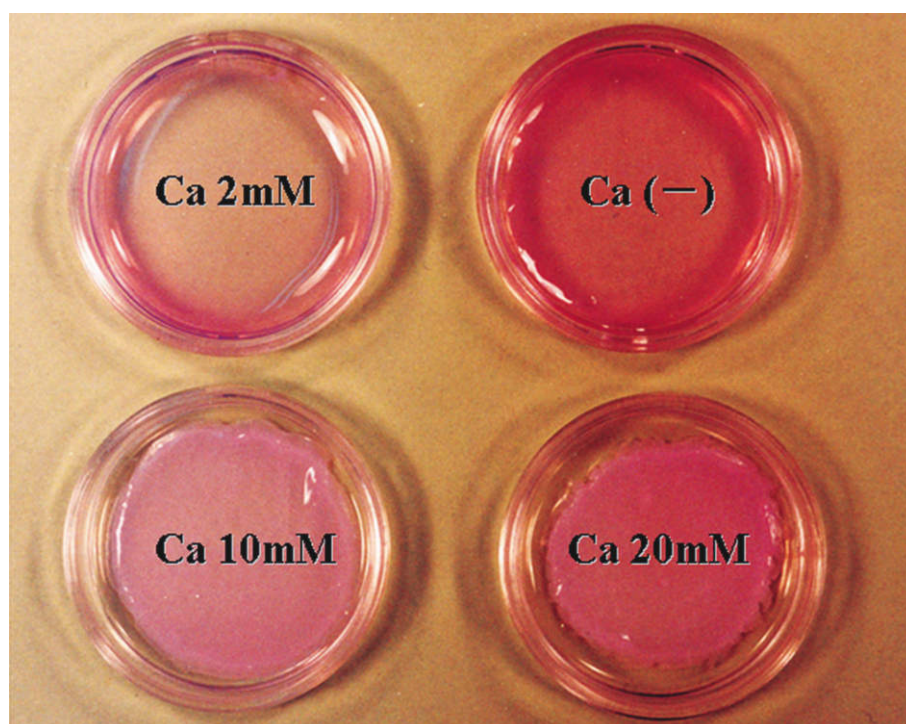


図 7 水晶体上皮細胞添加コラーゲンゲルへのカルシウムの影響。

水晶体細胞の囊収縮に対する影響を検討するために、コラーゲンゲルに水晶体上皮細胞を加え、異なる濃度のカルシウム添加培地で培養した。高濃度カルシウム培地ではゲルの収縮が高度であった。

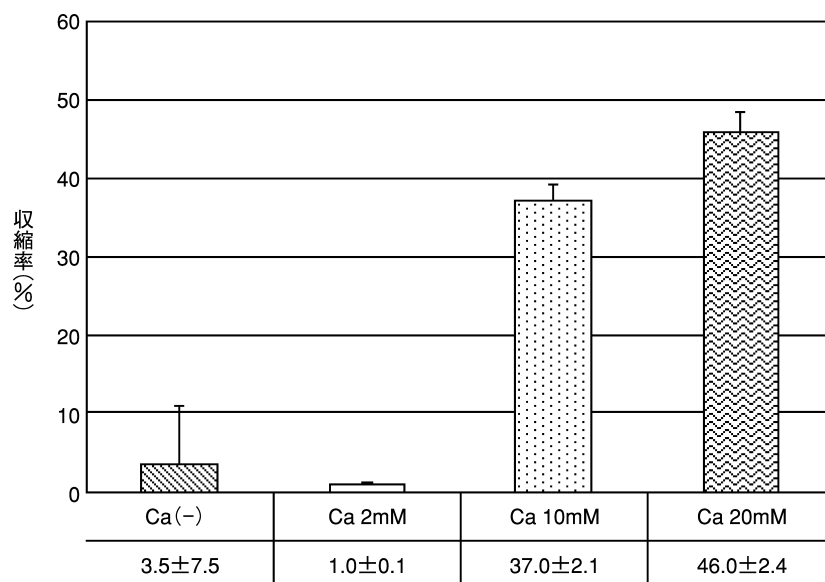


図 8 カルシウム濃度変化によるコラーゲンゲル収縮率。

図 7 の結果を収縮したゲルの面積を測定することでコラーゲンゲルの収縮率を算出した。カルシウム(-)培地, 2 mM カルシウム培地ではゲルの収縮がほとんど無いが, 高濃度カルシウム培地を使用すると顕著に収縮していた。

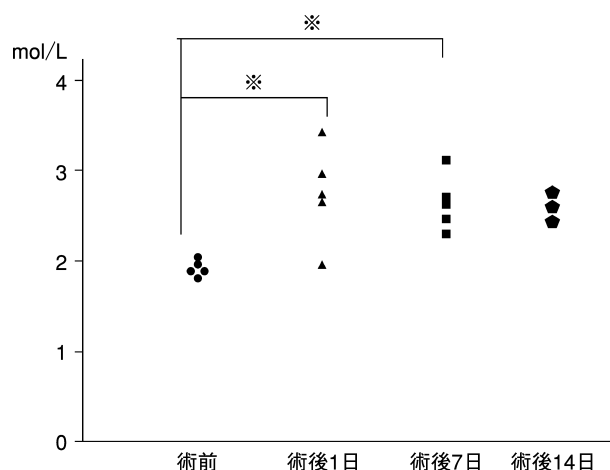


図 9 白色家兎による超音波白内障手術後の前房内カルシウム測定。

手術後の前房内カルシウム変化をみるために, 超音波吸引手術後 14 日までの前房内のカルシウム濃度を測定した。術前に比べて術後 1 日, 7 日目で平均約 1 mM のカルシウムが統計的に有意に上昇していた ($p < 0.03$, Fisher's PLSD)。

示す(図 7)。生理的濃度の 2 mM カルシウム群およびカルシウム(-)群ではゲルの収縮はほとんどみられなかった。カルシウム濃度が高くなるとコラーゲンゲルは収縮した。また, カルシウム濃度の上昇によってゲル収縮が著しい傾向にあった。結果を明示化するためにゲルの収縮率を計算(図 8)するとカルシウム 0 mM 群および 2 mM 群においてゲルの収縮は認められなかった。一方で, カルシウム 10 mM 群では 37%, 20 mM 群では 46 % コラーゲンゲルが収縮していた。

4. 白色家兎による超音波白内障手術後の前房内カルシウム測定

超音波吸引手術後 14 日までの前房内のカルシウム変化を示す(図 9)。術前では平均 1.99 ± 0.03 mol であるのに対し, 術後 1 日で 2.74 ± 0.48 , 7 日目で 2.69 ± 0.14 と術後早期で統計学的に有意に前房内カルシウムの上昇が生じていた ($p < 0.03$, Fisher's PLSD)。

IV 考 按

白内障には様々なタイプ(前嚢下白内障, 皮質白内障, 核白内障, 後発白内障など)があり, 様々な原因が関与している。中でも, 水晶体カルシウム濃度の異常は様々な水晶体の変化を生じる^{1)~3)}。通常, 細胞外のカルシウム濃度が増加すると, 細胞内にカルシウムが取り込まれ中間系フィラメント蛋白質がリン酸化され重合し, 細胞の形態が変化する¹⁰⁾。また, 水晶体内でカルシウムによりタンパク質分解酵素が活性化されると, クリスタリンや細胞骨格蛋白質などの蛋白質分解を生じ, 蛋白質間の均衡が乱れて, 不溶性蛋白質が増加することで蛋白質が凝集し白内障を生じること^{11)~13)}が知られている。他方, 前嚢下白内障や後発白内障といった一部の白内障の発生前に水晶体上皮細胞の異常増殖が関与していることが報告^{14)~16)}されている。他分野では細胞内カルシウムの増加が細胞の増殖能を亢進させることが報告¹⁷⁾されているが, 水晶体上皮細胞については, カルシウムと細胞増殖能を検討した報告はない。今回我々は水晶体上皮細胞の形態や増殖能に対するカルシウムの影響に着目した。実験にあたり, 水晶体内の正常カルシウム濃度が 0.5 mM から 3 mM と報告¹⁸⁾されていることから 2 mM を生理

的カルシウム濃度とした。また、皮質白内障では 20 mM 以上にカルシウム濃度が上昇していること¹⁹⁾から、20 mM までの高カルシウム濃度を設定して上皮細胞の変化を観察した。他方、低カルシウム状態でも白内障発生の報告²⁰⁾²¹⁾があることからカルシウムを除いた MEM を作製し、低カルシウム濃度についても検討した。

今回の検討により、生理的なカルシウム濃度で生じる水晶体上皮細胞の増殖に比べて、カルシウム濃度が増加することにより、水晶体上皮細胞の増殖が亢進することが明らかになった。田辺らは、ヒト表皮の培養細胞においてカルシウム濃度を急激に上昇させると、細胞増殖が亢進することを報告²²⁾している。水晶体上皮細胞においても、カルシウム濃度の変化は、上皮細胞の分化誘導に関係すると考えられる。また、過去の報告²³⁾では後発白内障やアトピーの前嚢下白内障などの水晶体上皮細胞増殖時に線維芽細胞様細胞への形質転換が生じ、その変化のマーカーとして α -SMA が関与することが述べられている。今回の実験において、高カルシウム濃度培地により上皮細胞の形状も線維芽細胞様に変化し、抗 α -SMA 抗体染色陽性細胞が増加していたことから、高濃度のカルシウム添加により、前嚢下白内障でみられる水晶体上皮細胞の重層化や後発白内障にみられる水晶体上皮細胞の筋線維芽細胞への形質転換などと類似した細胞増殖変化を生じていたことが考えられる。他方、カルシウムの無い状態では逆に細胞増殖能が低下し、生理的濃度群と比べると細胞の形状が膨化し、不均一化していた。増殖能の低下と反して、抗 α -SMA 抗体染色陽性細胞は増加していて、細胞増殖は低下し細胞の形態異常が生じたものと思われる。カルシウム低下については、プロテインキナーゼ C などの代謝障害を生じ、蛋白質のリン酸化と合成能低下から、細胞増殖異常を生じることが報告²⁴⁾されている。

白内障術後合併症には後発白内障のほかに嚢収縮も知られていて、ぶどう膜炎症例や網膜色素変性症などの白内障術後に発症しやすい。今回の検討で、コラーゲンゲルに細胞を播種し、濃度の異なるカルシウムを添加して、コラーゲンゲルの収縮測定実験を行ったところ、10 mM、20 mM の高濃度カルシウムを添加することにより、ゲルの収縮が亢進していた。高カルシウム状態では、増殖細胞が α -SMA への形質転換を生じた結果、増加した筋線維芽細胞が細胞収縮を生じる²⁵⁾ことが知られている。今回のコラーゲンゲルも高濃度のカルシウムが異常細胞増殖と水晶体上皮細胞の形質転換を生じた結果、発生した筋線維芽細胞がゲルの収縮を来したと考えられる。白内障術後の前嚢収縮に前房水中のカルシウム濃度異常が関係している可能性がある。

カルシウム濃度変化が白内障に関与することは考えられるが、実際には白内障症例や白内障手術前後の前房水中のカルシウム濃度を測定した報告はない。家兎を用い

超音波吸引術後の前房水カルシウム濃度を測定したところ、術後 1 日から 7 日目まで前房内のカルシウム濃度は統計学的有意に増加していた。白内障手術により血液房水嚢が破綻することや、虹彩・毛様体への侵襲が、前房水中のカルシウム濃度を増加させることが考えられる²⁶⁾²⁷⁾。今回の検討ではカルシウム濃度の増加は軽度であったが、皮質白内障では高濃度に増加³⁾していたことや、ぶどう膜炎など炎症を生じやすい状態では検討していないので、今後研究面、臨床面での前房水中のカルシウム濃度変化の検討が必要になってくると思われる。

今回の検討により、白内障・後発白内障の発生および白内障術後嚢収縮にカルシウム濃度異常に伴う、水晶体上皮細胞増殖能亢進、細胞形態変化が関連していることが分かった。研究解析を進めることで、白内障や白内障術後合併症の抑制効果が期待できると思われる。

文 献

- 1) Duncan G, Hightower KR, Gandolfi SA : Human lens membrane cation permeability increases with age. Invest Ophthalmol Vis Sci 30 : 1855—1859, 1989.
- 2) Duncan G, Bushell AR : Ion analyses of human cataractous lenses. Exp Eye Res 20 : 223—230, 1975.
- 3) Cekic O : Copper, lead, cadmium and calcium in cataractous lenses. Ophthalmic Res 30 : 49—53, 1997.
- 4) Shearer TR, David LL, Anderson RS, Azuma M : Review of selenite cataract. Curr Eye Res 4 : 357—369, 1997.
- 5) 松島博之, 向井公一郎, 吉田紳一郎, 小原喜隆 : ヒト白内障水晶体蛋白質に対するカルシウムの影響. あたらしい眼科 18 : 113—117, 2001.
- 6) Matsushima H, Mukai K, Yoshida S, Obara Y : Effects of Calcium on Human Lens Epithelial Cells *in vitro*. Jpn J Ophthalmology 48 : 97—100, 2004.
- 7) 長田正夫 : アトピー白内障の前嚢, 水晶体上皮細胞の組織病理, 免疫組織化学的検討. あたらしい眼科 13 : 1739—1743, 1996.
- 8) 浦住幸治朗, 君島伊造 : 乳癌腫瘍部および正常乳腺部の間質中線維芽細胞によるコラーゲン収縮効果. 日外会誌 94 : 501—504, 1993.
- 9) 黒木登志夫 : 分子生物学研究のための新細胞実験法. 羊土社, 東京, 175—177, 1995.
- 10) 宮元英七 : 蛋白質リン酸化反応とそのカスケード. 代謝 28 : 175—187, 1991.
- 11) Siew EL, Bettelheim FA : Light scattering parameters of the rat lenses with calcium-induced cataracts. Exp Eye Res 62 : 265—270, 1996.
- 12) Matsushima H : The role of calcium in lens cytoskeletons during cataract formation in rat. Dokkyo J MED Sci 26 : 369—376, 1999.
- 13) Sanderson J, Marcantonio JM, Duncan G : A

- human lens model of Cortical cataract : Ca^{2+} -induced protein loss, vimentin cleavage and opacification. Invest Ophthalmol Vis Sci 41 : 2255—2261, 2000.
- 14) **Novotony GEK, Pau H, Arnold G** : Organization of collagen and other extracellular material in anterior capsular cataract. Anat Anz Jena 168 : 127—133, 1989.
- 15) **McDonell PJ, Zarbin MA, Green WR** : Posterior capsular opacification in pseudophakic eyes. Ophthalmology 90 : 1548—1553, 1983.
- 16) **Apple DJ, Solomon KD, Tetz MR, Assia EI, Holland EY, Legler UF, et al** : Posterior capsular opacification.. Surv Ophthalmol 37 : 73—116, 1992.
- 17) **Seok Ho Cha** : Purinoceptor-Mediated Calcium Mobilization and Cellular Proliferation in Cultured Bovine Corneal Endothelial Cells.. J J Ophthalmol 3 : 181—187, 2000.
- 18) **Jedziniak JA, Nicoli DF, Yates EM, Benedek GB** : On the calcium concentration of cataractous and normal human lenses and protein fractions of cataractous lenses. Exp Eye Res 23 : 325—332, 1976.
- 19) **Duncan G, Jacob TJC** : Calcium and Physiology of cataract. In Human Cataract Formation. Ciba Found Symp 106 : 132—152, 1984.
- 20) **Simcock PR, Zambarakji HJ, Muller BR** : Cataract formation in the Cronkhite-Canada syndrome. J Cataract Refract Surg 22 : 1125—1126, 1996.
- 21) **松井英一郎, 松島博之, 小出義博, 寺田 理, 吉田紳一郎, 小原喜隆, 他** : Cronkhite-Canada 症候群に合併した白内障の 1 例. あたらしい眼科 19 : 497—500, 2002.
- 22) **田辺博子** : 移植前ヒト培養表皮シートの形態的評価. 日形会誌 10 : 855—869, 1990.
- 23) **Kurosaka D** : Presence of α smooth muscle actin in lens epithelial cells of aphakic rabbit eyes. Br J Ophthalmol 80 : 906—910, 1996.
- 24) **日高弘義** : カルシウムシグナリングの分子制御. 秀潤社, 東京, 82—93, 1987.
- 25) **黒坂大次郎** : 水晶体上皮細胞の線維性混濁形成における増殖因子. 日本白内障学会誌 11 : 15—21, 1999.
- 26) **Iwata S** : Biochemical studies on the use of sodium hyaluronate in the anterior eye segment. I. Variation of protein and ascorbic acid concentration in rabbit aqueous humor. Curr Eye Res 3 : 605—610, 1984.
- 27) **向井正直** : 前房蛋白質に関する研究, 主に正常房水と第 2 房水について. 日眼会誌 74 : 1269—1276, 1970.
-