

培養家兎角膜上皮細胞の増殖能に関する諸因子

酒見 文人, 中安 清夫, 沖坂 重邦

防衛医科大学校眼科学教室

要 約

培養家兎角膜上皮細胞の増殖能に関連して, 1) 中央部および周辺部の伸展の違い, 2) **Epidermal growth factor (EGF)**, **Cholera toxin (CTX)** および **Insulin** の上皮細胞増殖能に対する影響, 3) **c-AMP** の上皮細胞増殖能に対する影響について検討した。角膜周辺部の上皮細胞の増殖能は, 中央部上皮細胞に比べ有意差は認められなかったもののやや亢進しているものと思われた。**Supplemented hormonal epithelial medium (SHEM)** 中に含有されている **EGF**, **CTX**, **Insulin** のうち, 角膜上皮細胞の増殖能を有意に亢進させたものは **EGF** のみであり, **CTX** は逆に **c-AMP** の上昇を介して増殖能を抑制しているものと考えられた。(日眼会誌 95: 721-727, 1991)

キーワード: 角膜, 上皮細胞, 増殖因子, 細胞培養, 家兎

Mitotic Activity of Rabbit Corneal Epithelium in Vitro

Fumito Sakemi, Kiyoo Nakayasu and Shigekuni Okisaka

Department of Ophthalmology, National Defense Medical College

Abstract

It is difficult to maintain corneal epithelial cells for several passages in culture. At a first step to establish a culture system for corneal epithelium, the authors evaluated factors which seemed to be involved in the growth kinetics and mitotic activity of rabbit corneal epithelium in vitro. First of all, to compare the growth kinetics of peripheral and central epithelium, we measured the areas and distances of the epithelium that outgrew from peripheral and central explants in culture. The peripheral corneal epithelium grew 1.2-to 1.6-fold better than the central corneal epithelium. However, there was no significant difference between them. Secondly, we evaluated the effects of epidermal growth factor (EGF), cholera toxin (CTX) and insulin, which were contained in supplemented hormonal epithelial medium (SHEM) developed by Jumblatt et al, on the mitotic activity of rabbit corneal epithelium. Among these drugs, only EGF had the ability to increase the epithelial cell number after 10 days of incubation. By contrast, CTX which elevated the level of cyclic AMP inhibited the proliferation of the epithelium. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 95: 721-727, 1991)

Key words: Cornea, Epithelium, Growth factor, Cell culture, Rabbit

別刷請求先: 359 所沢市並木3-2 防衛医科大学校眼科学教室 中安 清夫

(平成2年8月17日受付, 平成2年12月12日改訂受理)

Reprint requests to: Kiyoo Nakayasu, M.D. Department of Ophthalmology, National Defense Medical College.

3-2 Namiki, Tokorozawa-shi 359, Japan

(Received August 17, 1990 and accepted in revised form December 12, 1990)

I 緒 言

角膜上皮細胞は細菌・ウィルスなどの眼内侵入に対する防御機構としての働きおよび涙液層の安定化などを介して角膜の透明性維持のために重要な役割を果たしている。また、近年では角膜創傷治癒過程における上皮細胞と多核白血球との関係¹⁾、実質細胞²⁾や末梢神経組織³⁾との相互作用などが指摘されている。更に角膜上皮細胞の移植術ともいえる Keratoepithelioplasty への臨床応用など、in vitro, in vivo を問わず、角膜上皮細胞に関する様々な研究がさかんに行なわれつつある。しかし、角膜上皮細胞を用いた in vitro の実験の際、常に我々を悩ませてきたことは、上皮細胞の長期培養・継代培養の困難さである。我々の初歩的な実験では、比較的容易であるとされる家兎の角膜上皮細胞の継代培養においてすら、第3代目までの継代がやっと可能な程度であった。また、ヒトの上皮細胞を用いた場合は第2代で急激な増殖能の低下を認め、実験に供する程の細胞は得難くなってしまった。何故に角膜上皮細胞の継代培養がそれほど困難であるのか。今日まで角膜上皮細胞の培養法や増殖能に影響を与える諸条件・諸因子について種々の議論がなされている。今回我々はその中で、近年注目を集めている Schermer ら⁴⁾の仮説である“stem cell theory”について家兎角膜を用いて検討を試みた。また Jumblett & Neufeld⁵⁾の開発した上皮細胞のための新しい培養液 Supplemented hormonal epithelial medium (SHEM) 中に含有される3つの薬剤の各々についても、家兎角膜上皮細胞の増殖能亢進に真に有効であるか否かについて再検討し、角膜上皮細胞の増殖能に影響を与えるいくつかの因子について若干の考察を加えたので報告する。

II 実験方法

1. 角膜上皮細胞の中央部および周辺部における伸展の違い

体重600gの幼若家兎および体重2kgの成熟家兎の角膜中央部および周辺部から直径5mmのトレパンを用いて、実質前層を含む角膜上皮細胞を剝離し、10% Fetal calf serum (FCS)加 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)中で組織培養した。培養10日目に、組織片から伸展した上皮細胞層の面積を画像処理装置を用いて測定した。

また、成熟家兎の角膜の輪部で半層切開して得られ

た実質浅層を含む上皮細胞層を中央部および周辺部を含むように扇状に1/4分割し、10%FCS加DMEM中で組織培養した。3日後、角膜片の中央部および周辺部の両断端から伸展した上皮細胞層を写真撮影し、角膜片から伸展した最大伸展距離を36倍に拡大した印画紙上で測定した。

2. Epidermal growth factor (EGF), Cholera toxin (CTX) および Insulin の角膜上皮細胞の増殖能に対する影響

成熟家兎由来の第2代培養角膜上皮細胞を $5.0 \times 10^4/35\text{mm well}$ 播き、DMEMとHam F12を1:1で混合し、10%FCSを加えたBasal epithelial medium (BEM培地)に下記の(1)から(7)の薬剤を添加した培地で培養した。培養液は2日毎に交換し、10日目に各々の培地についてそれぞれの細胞数を自動細胞数測定装置を用いて測定し、薬剤無添加の対照と比較した。本実験に使用したEGFは、湧永製薬のhuman EGFを用いた。またCTX, Insulinはシグマ社より購入した。

(1) EGF 10ng/ml, (2) CTX 100ng/ml, (3) Insulin 5 $\mu\text{g/ml}$, (4) EGF 10ng/ml+CTX 100ng/ml, (5) EGF 10ng/ml+Insulin 5 $\mu\text{g/ml}$, (6) CTX 100ng/ml+Insulin 5 $\mu\text{g/ml}$, (7) EGF 10ng/ml+CTX 100ng/ml+Insulin 5 $\mu\text{g/ml}$

3. c-AMP と角膜上皮細胞の増殖能

CTX添加培地におけるcyclic AMP (c-AMP)濃度の上昇を確認する目的で、 $5 \times 10^4/35\text{mm well}$ の家兎角膜上皮細胞を2mlのBEM培地で培養した。細胞がSubconfluentとなった後、100ng/mlのCTXを添加し、1時間後に各培養上清を採取し、c-AMP測定用検体とした。また、CTXと同様にc-AMPを上昇させると考えられているForskolin (Calbiochem社) (0.1mM)およびInsulin (5 $\mu\text{g/ml}$)についても同様の測定を施行した。また、対照を含めた全培地にPhosphodiesterase阻害剤である3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) (0.1mM)を添加した。c-AMPの測定はエスアールエル社に依頼し、ラジオイムノアッセイ法によって測定された数値をもとに 1×10^5 の上皮細胞数当たり換算した。

またForskolinおよびc-AMPの類似物質であるN⁶, O²-dibutyryl adenosine-3',5'-c-AMP (DBc-AMP) (シグマ社)についても角膜上皮細胞の増殖能に対する影響を調べた。すなわち成熟白色家兎由来の第2代培養角膜上皮細胞を、 $2.0 \times 10^4/12\text{穴 well}$ 播き、BEM培地に0.1mMのForskolin, 0.3mMのDBc-AMPを

各々3 well に添加した。培養液は2日目に交換し、4日間培養後、各々の細胞数を測定し無添加の対照と比較した。

III 結 果

1. 角膜上皮細胞の中央部および周辺部における伸展の違い

伸展した角膜上皮細胞層の面積は、幼若家兎の中央部では $4.84 \pm 1.51 \text{ cm}^2$ 、周辺部では $7.69 \pm 2.14 \text{ cm}^2$ と、平均値では中央部に比べ周辺部が約1.6倍大きくなっていた。一方、成熟家兎においては中央部 $3.93 \pm 0.37 \text{ cm}^2$ 、周辺部 $5.20 \pm 1.10 \text{ cm}^2$ と、幼若家兎同様、中央部に比べ周辺部で約1.3倍の面積であった。しかし、統計学的にはいずれも両者の間に有意な差は認められなかった。

1/4分割された16個の角膜片のうち、周辺部断端から上皮細胞層の伸展距離が、中央部からの伸展距離に比べわずかでも長くなっていたものは11個であった。この11個のうち、8個は両者の差はごくわずかであり、

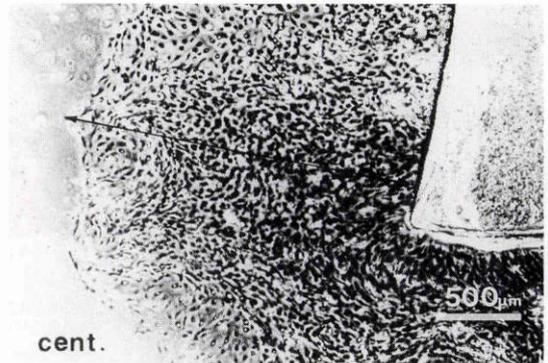


図2 1/4分割した角膜片の中央部断端から伸展した上皮細胞。矢印：測定した最大伸展距離。倒立顕微鏡写真(×36)

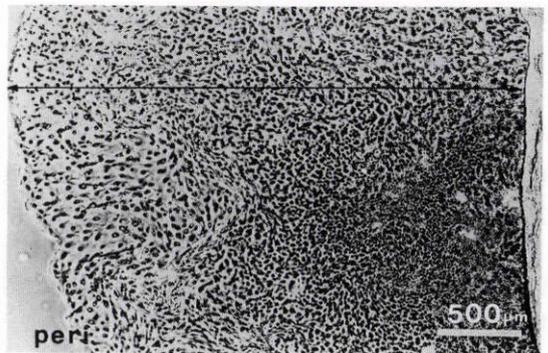


図3 1/4分割した角膜片の周辺部断端から伸展した上皮細胞。矢印：測定した最大伸展距離。倒立顕微鏡写真(×36)

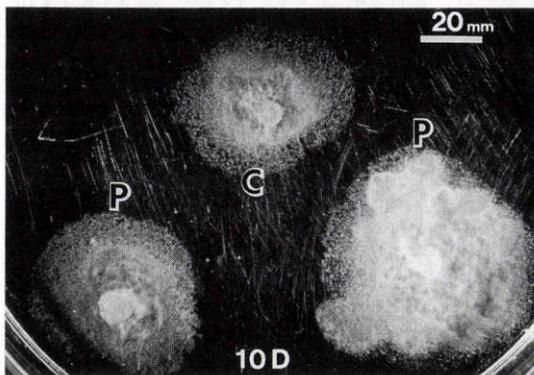


図1 成熟家兎角膜の中央部(C)および周辺部(P)の組織片から培養皿底に伸展した10日目の上皮細胞層。倒立顕微鏡写真(×1.6)。

表1 家兎角膜上皮細胞層の伸展面積。(×1, cm^2)
幼若, 成熟家兎ともに, 中央部と周辺部との間に有意差は認められない。

	(cm ²)	
	中央部	周辺部
幼若家兎 (体重600g)	4.84 ± 1.51 (n=5)	7.69 ± 2.14 (n=11)
成熟家兎 (体重2kg)	3.93 ± 0.37 (n=6)	5.20 ± 1.10 (n=13)

(中央部と周辺部との間に有意差は認めない)

明らかに中央部に比べ周辺部の伸展距離がより長くなっていたものは3個のみであった。逆に、中央部からの伸展距離がより長くなっていたものも5個あった。平均値の比較では、中央部からの伸展距離が36倍の印画紙上で $63.5 \pm 24.0 \text{ mm}$ に対し、周辺部のそれは $75.2 \pm 26.0 \text{ mm}$ で、周辺部がやや長くなっていたものの、両者の間に有意差は認められなかった。しかし、周辺部から伸展した上皮細胞層を倒立顕微鏡で観察すると、細胞面積の均一で小さな幼弱と思われる上皮細胞が認められた。

2. EGF, CTX, Insulin の角膜上皮細胞の増殖能に対する影響

成熟家兎角膜由来の第2代培養上皮細胞の10日目の細胞数は、薬剤無添加のBEM培地で培養した対照群では $14.2 \pm 1.2 \times 10^4$ であった。一方、EGF 10ng/mlのみを添加した(1)の培地では $54.8 \pm 10.0 \times 10^4$ と、対照

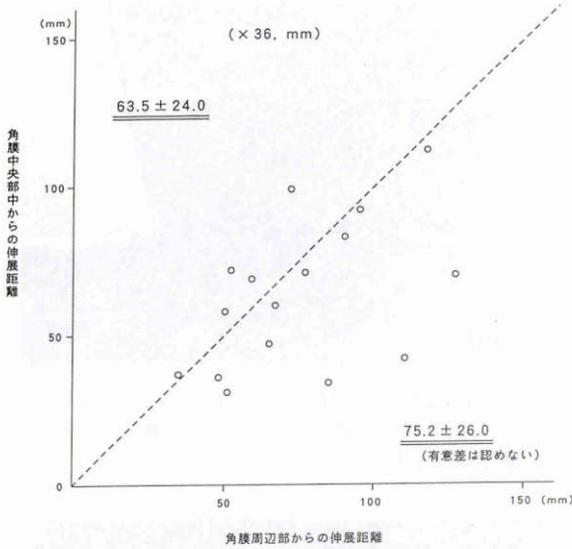


図4 家兎角膜上皮細胞層の伸展距離。(×36, mm)
中央部および周辺部からの伸展距離に有意差は認められない。

に比べ約4倍に達していた ($p < 0.05$)。しかし、CTX 100ng/ml のみを添加した培地(2)では $8.9 \pm 0.6 \times 10^4$ と EGF 添加群とは逆に、対照に比べ有意に低下していた ($p < 0.01$)。また Insulin 5.0 μ g/ml のみの添加培地(3)の細胞数は $14.9 \pm 0.2 \times 10^4$ で、対照との間に有意

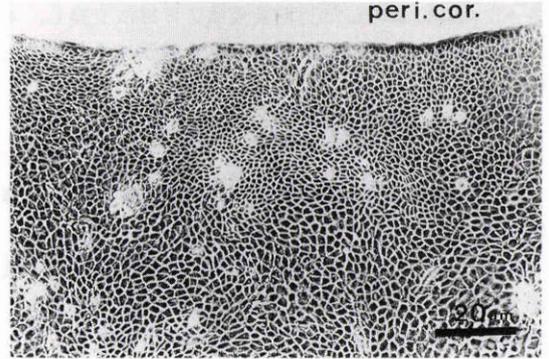


図5 周辺部断端より伸展した上皮細胞。細胞面積の小さな幼若と思われる細胞が多数観察される。倒立顕微鏡写真。(×90)

差は認められなかった。すなわち、3種類の各薬剤の単独添加群では、EGFのみが角膜上皮細胞の増殖能を有意に亢進させていた。この結果は2種類以上の薬剤添加群(4)~(7)においても同様の結果であった。つまり、(4) EGF+CTX, (5) EGF+Insulin, (7) EGF+CTX+Insulin と、EGF (10ng/ml) の含まれている添加群では、それぞれ $41.9 \pm 6.3 \times 10^4$, $39.2 \pm 6.1 \times 10^4$, $33.2 \pm 5.5 \times 10^4$ と、対照に比べ有意に増加していた ($p < 0.01$) が、EGF を含まない CTX+Insulin 添加群(6)では、 $8.1 \pm 2.0 \times 10^4$ と、対照に比べ細胞数は有意に

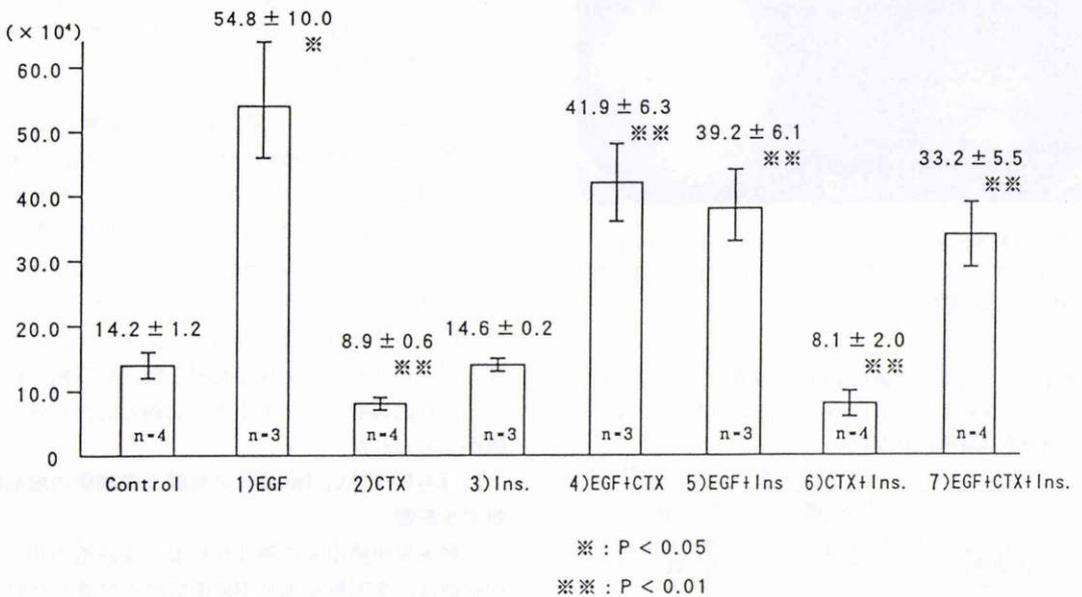


図6 EGF, CTX, Insulin の家兎角膜上皮細胞の増殖能に対する影響。培養10日目の上皮細胞数。

表2 各薬剤添加1時間後の角膜上皮細胞培養上清中のc-AMP濃度. いずれの培地にもIBMX (1.1 mM)を添加している. CTX, Forskolin 添加培地のc-AMPの上昇が認められる.

Control	1	0.63
	2	3.23
CTX	1	19.14
	2	26.02
Insulin	1	1.06
	2	1.42
Forskolin	1	5.24
	2	6.98

(pmol/1×10⁵cell)

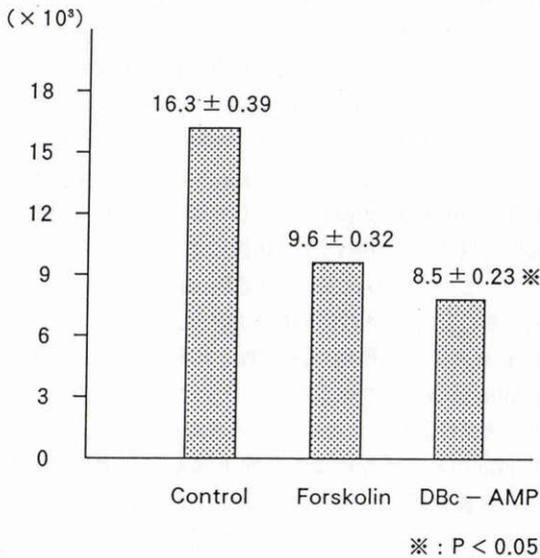


図7 Forskolin, DBC-AMPの家兎角膜上皮細胞の増殖能に対する影響. 培養4日目の上皮細胞数.

減少していた (p<0.01).

3. c-AMPと角膜上皮細胞の増殖能

c-AMP濃度は各々2検体について測定した. 無添加の対照は0.63 (pmol/1×10⁵cell, 単位は以下省略), 3.23であったのに対し, CTX添加培地では19.14, 26.02, Insulin添加培地では1.06, 1.42, Forskolin添加培地では5.24, 6.98であった. 検体数が少なく有意差検定は行なえなかったものの, CTXおよびForskolinを加えた培地におけるc-AMP濃度は対照に比べ, 明らかな上昇が認められた.

また, Forskolin, DBC-AMP添加培地における培養4日目の角膜上皮細胞数は, それぞれ9.6±0.32×10⁵/

well, 8.5±0.23×10⁵/wellであったのに対し, 対照は16.3±0.39×10⁵/wellであり, いずれも細胞数の低下が観察された (有意差検定ではDBC-AMPのみp<0.05).

IV 考 按

1986年, Schermerら⁴⁾は, 家兎角膜上皮層における64Kケラチンの分布の違いから, 角膜輪部の上皮基底細胞が角膜全体の上皮細胞の幹細胞 (stem cell) ではないかと推論した. この“stem cell theory”は, 角膜上皮細胞培養法やKeratoepithelioplastyをはじめとする角膜上皮移植術への臨床応用においても, 極めて注目すべき報告であったと思われる. しかし, この推論を実際的方法で確認した追実験は我々の知る限り, Ebatoらのヒト角膜での報告⁶⁾のみである. 我々は, 家兎角膜上皮細胞の増殖能に影響を与える因子の一つとして, 先ずこのstem cell theoryに注目して角膜の中央部と周辺部における上皮細胞の伸展の違いについて検討してみた. 実験1の2つの実験では, 周辺部上皮細胞の伸展面積あるいは伸展距離は, 中央部上皮細胞のそれと比べ, 約1.2倍から1.6倍程度にとどまっていた. Ebatoら⁶⁾は, ヒト角膜上皮細胞の初代培養細胞を用いて, 上皮層の伸展面積, mitotic indexなどを測定している. それによると角膜周辺部は中央部に比べ, 伸展面積で約6.8倍, mitotic indexで約18倍と両者の間に大きな増殖能の差が認められたとしている. さらに, 彼ら⁷⁾は, 角膜周辺部と輪部を比較し, 輪部の上皮細胞が周辺部のものに比べより増殖能が強かったと報告している.

我々の今回の実験結果とEbatoらの結果の相違について, いくつかの問題点が考えられる. まず第1に, Ebatoらはヒト角膜を用いており, 一方我々は家兎角膜を使用したことから, 実験に供した動物種による違いがあげられる. 次に, 我々が周辺部角膜として採取した角膜片の中に, Schermerら⁴⁾の言うstem cellと呼ばれるべき基底細胞が含まれていたかどうか, という問題である. 5mm径の角膜片についても1/4分割角膜片についても, 可能な限り輪部に接して採取したつもりであるが, 今回の実験では, Schermerらのように組織化学的手法を用いた実際の確認はなされていない. 今一つの問題は, 角膜片個々の増殖能の差がかなり大きく, 得られた値にばらつきがあり, 統計学上有意差を認め難くなった点である. これは角膜片の組織培養における技術的な問題が原因の一つと考えられ

る。すなわち、角膜片を培養皿底に置いた場合、角膜片が皿底に十分接着しているかどうかによって、角膜片からの上皮細胞の伸展面積・伸展距離が変わってしまうように思われた。以上の問題点を考慮に入れても、我々の実験からは、Ebatoらのようにstem cell theoryを積極的に肯定する結論は得られ難いものと考えられた。しかし、倒立顕微鏡による観察では、周辺部から伸展した上皮細胞の中に非常に幼若と思われる細胞面積の小さな上皮細胞が多数含まれていたことなども考慮に入ると、少なくとも周辺角膜上皮細胞の増殖能は、中央部のそれに比べ、多少なりとも亢進しているものと推測された。

EGF, CTX, Insulinの角膜上皮細胞の増殖能に対する影響を調べた2番目の実験において、各薬剤の濃度は、Jumblattら⁹⁾の開発した角膜上皮細胞のための培養液(SHEM)中に含有されている濃度と同量とした。この3つの薬剤のうちEGFのみが家兎角膜上皮細胞の増殖能を亢進させており、EGFの上皮細胞に対する増殖効果については過去の報告⁸⁾⁹⁾と一致していた。一方、CTXを添加した場合には、上皮細胞の増殖能に対し抑制的に働く傾向が認められた。CTXが種々の細胞に対して細胞内c-AMPを著明に上昇させることは周知の事実である。しかし、上昇したc-AMPが各細胞の増殖能に与える影響については細胞の種類によって促進的に働く場合、あるいは逆に抑制的に作用する場合がある。皮膚組織においては、真皮由来の線維芽細胞に対してはその増殖を抑制するが、表皮細胞に対しては逆に著明な増殖亢進作用を有していると報告されている^{10)~12)}。角膜上皮細胞についてもc-AMPを上昇させる作用に関しては実験3で示した通り、過去の報告¹³⁾と一致するところであった。Jumblattらの1983年の報告⁹⁾では、CTX添加培地で家兎角膜上皮細胞を14日間培養すると、無添加のものに比べ細胞数は4.3倍であったと述べている。また、1986年の彼らの報告¹⁴⁾によると、CTXは家兎角膜上皮細胞の創傷治癒(wound closure)を遅延させたとしながらもその理由として、CTXはc-AMPを介して糖タンパクの産生分泌を亢進させ、細胞の接着性が強化されたためではないかと推測している。我々の実験結果とJumblattらの報告とは、CTXの角膜上皮細胞増殖能に対する影響が明らかに相反していた。このため我々はc-AMPを上昇させるとされている他の薬剤であるForskolinおよびc-AMP類似薬剤であるDBc-AMPの上皮細胞の増殖能に対する影響も調べてみた。実験3で示したように

Forskolin, DBc-AMPを添加した培地の4日目の細胞数は対照に比べ、CTXと同様にやはり減少する傾向を認めた。Jumblattらの結果と相反する理由を現在のところ、説明することはできない。しかし、我々は上記の実験結果からCTXは角膜上皮細胞に対し、c-AMPの上昇を介してその増殖能を抑制していると考えている。Insulinについても角膜上皮細胞の増殖能を積極的に亢進させているとは言い難い結果であった。Insulin receptorは生体内のほとんど全ての細胞に見い出されており、その一般的な作用としてDNA, RNAの合成促進、Adenylate cyclaseの阻害・Phosphodiesteraseの活性化を介して細胞内c-AMP濃度を低下させることが知られている¹⁵⁾。これらの作用を考えると、Insulinは角膜上皮細胞に対してその増殖能を亢進させると考えてもよいはずである。しかし、今回の実験では、角膜上皮細胞の増殖能を有意に亢進させることは出来なかった。また、InsulinはEGFなどの他の成長因子と併用することにより、細胞成長因子作用を発揮するとも考えられている。Jumblattら⁹⁾の報告でもEGFとInsulinを同時に添加した場合、角膜上皮細胞は培養14日目で対照に比べ10倍に増加していたと報告している。今回の結果でもEGF+Insulin添加培地の細胞数は10日目で対照の約2.8倍であった。しかし、EGF単独の添加培地の細胞数と比較すると、EGF+Insulin添加培地の細胞数は低下しており、EGFとの併用効果は認められないと考えざるを得ない。また、Insulinのみの添加による角膜上皮細胞の増殖能に対する影響を調べた報告は前述のJumblattら⁹⁾の報告を含め、我々の知る限り見当たらない。しかし、家兎水晶体上皮に対する影響はReddanら¹⁶⁾によって報告されている。彼らは、無血清培地で水晶体上皮を培養するとInsulin添加によって有意に水晶体上皮の増殖能が亢進すると報告している。筆者らも牛の水晶体上皮をBEM培地(10%FCSを含む)で培養し、0.5~50 $\mu\text{g/ml}$ のInsulinを添加し、増殖能に対する効果を調べてみた(Date未提示)。しかし、10%の血清を含んだBEM培地ではいずれの濃度のInsulinにおいても角膜上皮同様、水晶体上皮も増殖能の亢進は認められなかった。このことより、今回の実験で用いた培地のように、血清を高濃度に添加した培地においては、血清中の様々な増殖因子がすでに作用しており、Insulinを新たに添加してもその増殖効果は認められないのではないかと考えられた。以上の結果より、家兎角膜上皮細胞の培養には、細胞増殖という点から考えると、

SHEMを用いなくても、BEM培地にEGFのみを添加した培地で十分ではないかと思われた。

今回の検討された諸因子のうち、EGFのみが角膜上皮細胞の増殖能を有意に亢進させることが再確認できた。しかし、残念ながら他の因子については従来考えられていたほどの効果は期待できないものと思われた。角膜上皮細胞の安定した培養法の開発は、実験系の確立のみならず、臨床面においてもすぐにでも応用可能な重要な課題と考えられる。今後EGF以外にも角膜上皮細胞の増殖能を飛躍的に亢進させ得る薬剤、諸因子の開発が望まれる。

本論文の一部は第14回角膜カンファレンスにおいて報告した。

文 献

- 1) **Gradner G, Luger TA, Luger BM, et al:** Biologic properties of the thymocyte-activating factor (CETAF) produced by a rabbit corneal cell line (SIRC). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 589-595, 1983.
- 2) **Chan KY, Haschkel PG:** Epithelial-stromal interactions. Specific stimulation of corneal epithelial cell growth in vitro by a factor (s) from cultured stromal fibroblasts. *Exp Eye Res* 36: 231-246, 1983.
- 3) **Chan KY, Haschke RG:** Isolation and culture of corneal cells and their interactions with dissociated trigeminal neurons. *Exp Eye Res* 35: 137-156, 1982.
- 4) **Schermer A, Galrin S, Sun T:** Differentiation related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* 103: 49-62, 1986.
- 5) **Jumblatt MM, Neufeld AH:** β -adrenergic and serotonergic responsiveness of rabbit corneal cells in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 1139-1143, 1983.
- 6) **Ebato B, Friend J, Thoft RA:** Comparison of central and peripheral human corneal epithelium in tissue culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28: 1450-1456, 1987.
- 7) **Ebato B, Friend J, Thoft RA:** Comparison of limbal and peripheral human corneal epithelium in tissue culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29: 1533-1537, 1988.
- 8) **Fрати L, Dariele S, Delogu A, et al:** Selective binding of EGF and its specific effects on the epithelial cells of the cornea. *Exp Eye Res* 14: 135-141, 1972.
- 9) **Gospodarowicz D, Mescher AL, Brown KD, et al:** 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.
- 10) **Green H:** Cyclic AMP in relation to proliferation of the epidermal cell. A new view. *Cell* 15: 801-811, 1978.
- 11) **Kuroki T, Itoh T, Hosomi J, et al:** Cyclic AMP as a mitotic signal for epidermal keratinocytes but not for dermal fibroblasts. *Cell Structure and Function* 7: 295-305, 1982.
- 12) **黒木登志夫:** 増殖因子としてのコレラ毒素. *Med Immunol* 13: 451-456, 1987.
- 13) **Jumblatt MM, Fogle JA, Neufeld AH:** Cholera toxin stimulates adenosine 3',5'-minophosphate synthesis and epithelial wound closure in the rabbit cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19: 1321-1327, 1980.
- 14) **Jumblatt MM, Neufeld AH:** A tissue culture assay of corneal epithelial wound closure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 8-13, 1986.
- 15) **菊池九二三:** インスリンの構造と機能. *生化学* 54: 293-310, 1982.
- 16) **Reddan JR, Unakar NJ, Harding CV, et al:** Induction of mitosis in the cultured rabbit lens initiated by the addition of insulin to medium KEI-4. *Exp Eye Res* 20: 45-61, 1975.