

## 創傷治癒過程における角膜上皮基底細胞の増殖, 分化動態

山田 昌和, 真島 行彦

慶應義塾大学医学部眼科学教室

### 要 約

白色ウサギに n-heptanol を用いて作製した径 7 mm の角膜上皮欠損の創傷治癒過程について, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) と anti-epithelial keratin 1 (AE 1) を指標として免疫組織化学的に検討した. 対照では基底細胞中の PCNA 陽性頻度は約 4% であり, AE 1 には表層細胞のみが陽性を示した. 受傷後 1 日に上皮欠損部に遊走した 1 層の上皮細胞にはほとんど PCNA 陽性所見はみられなかったが, 残存した周辺上皮の PCNA 陽性細胞の頻度は 12.1% に増加しており, 受傷後 3 日, 7 日には, 中央部, 周辺部ともに対照の 3 倍

以上の高い頻度を示した. これらの時期の再生角膜上皮の基底細胞は AE 1 に陽性を示した. 14 日後には PCNA, AE 1 ともに対照と差を認めなくなった. 創傷治癒過程において, 角膜上皮基底細胞は細胞増殖の役割を担っており, この過程には分化の変化を伴っていることが示唆された (日眼会誌 99:10-16, 1995)

キーワード: 角膜上皮, 基底細胞, 細胞増殖, PCNA, 分化

## Changes in Proliferation and Differentiation of Basal Cells during Wound Healing of Rabbit Corneal Epithelial Abrasions

Masakazu Yamada and Yukihiko Mashima

Department of Ophthalmology, School of Medicine, Keio University

### Abstract

Changes in the mitotic rate and epithelial keratin expression of corneal epithelial basal cells following corneal abrasion (7.0 mm in diameter) in rabbits were studied immunohistochemically using anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA) monoclonal antibody and anti-epithelial keratin 1 (AE1). In the non-wounded control, the mitotic rate (PCNA positive cells in the basal cell layer) was approximately 4%, and only the superficial cells were stained by AE1 monoclonal antibody. One day after wounding, migrating epithelial cells at the leading edge, which reacted to AE1, showed low mitotic activity. At days 3 and 7, the mitotic rates of basal cells of regenerating epithelium were 3 times

higher than that of controls. These basal cells displayed intensive staining with AE1, while the epithelium over the unwounded cornea exhibited a normal pattern limited to superficial cells. By 14 days after injury, the mitotic rate returned to normal and all epithelial cells expressed a normal AE1 staining pattern. These results suggest that regeneration of corneal epithelial basal cells involves changes in keratin expression, which might correlate with changes in the mitotic rate. (J Jpn Ophthalmol Soc 99:10-16, 1995)

Key words: Corneal epithelium, Basal cell, Proliferation, PCNA, Differentiation

### I 緒 言

角膜上皮欠損は様々な原因により生じ, 临床上よく見られる疾患の 1 つであり, その創傷治癒過程は様々な角度から検討されている. この過程は, 角膜上皮細胞の移動, 細胞増殖, 分化の変化などにより成り立っていると

考えられている<sup>1)</sup>. 角膜上皮が創傷を受けた後に, 最初に生じる変化は残存した創傷縁の上皮細胞の形態の変化と移動, 遊走であり<sup>2)~6)</sup>, これにはアクチンフィラメントを中心とした細胞骨格の変化<sup>7)</sup>やフィブロネクチン, ラミニンなどの上皮細胞と細胞外基質との接着に働く因子<sup>8)~10)</sup>が関与していることが知られている. ごく小さな

別刷請求先: 160 東京都新宿区信濃町 35 慶應義塾大学医学部眼科学教室 山田 昌和  
(平成 6 年 5 月 13 日受付, 平成 6 年 8 月 10 日改訂受理)

Reprint requests to: Masakazu Yamada, M.D. Department of Ophthalmology, School of Medicine, Keio University, 35 Shinano-machi, Shinjuku-ku, Tokyo 160, Japan

(Received May 13, 1994 and accepted in revised form August 10, 1994)

上皮欠損の場合を除いて、続いて細胞増殖の増加が起こる<sup>11)~13)</sup>。これには角膜上皮だけでなく、その幹細胞<sup>14)~16)</sup>が存在するとされる輪部上皮や、さらには結膜上皮も関与する<sup>13)17)</sup>とされている。また、このような創傷治癒過程においては、角膜上皮細胞の分化の指標として用いられているケラチンの発現にも変化が生じることが報告されている<sup>18)</sup>。

正常状態での角膜上皮の基底細胞は、上皮細胞層全体を基底膜、ボウマン膜に繋ぎ止める役割を果たしている<sup>19)20)</sup>以外に、その増殖により角膜上皮を動的に維持していると考えられる<sup>21)22)</sup>。分化の上からは角膜上皮の基底細胞は、輪部上皮の基底細胞層に存在する幹細胞から分化した transient amplifying cell であると位置付けられている<sup>23)</sup>。創傷治癒過程においても角膜上皮の基底細胞が果たす役割は大きい。最初に上皮欠損部を覆うべく遊走する細胞の由来が表層細胞であるか、基底細胞であるかは議論があり<sup>4)5)11)24)</sup>確定されていないが、少なくとも細胞増殖により上皮の層構造を再構築することは基底細胞の重要な役割と考えられる。今回、著者らは、創傷治癒過程における角膜上皮基底細胞の細胞増殖動態に着目し、さらにこれに伴う基底細胞の分化の変化について検討した。

細胞増殖の指標としては、proliferating cell nuclear antigen (以下、PCNA) を用いた。PCNA は細胞周期の G1 後期から S 期にかけて増加する 37 kd の核蛋白で<sup>25)26)</sup>、DNA polymerase  $\delta$  の付随蛋白として DNA 合成に密接に関与していることが知られている<sup>27)</sup>。従来、細胞増殖の指標として用いられてきた標識物質には S 期に DNA に取り込まれる物質である <sup>3</sup>H-thymidine<sup>11)17)28)29)</sup> や bromodeoxyuridine<sup>13)</sup> (以下、BrdU) が挙げられるが、いずれも生体の前房内に前投与したり、摘出した角膜片を標識物質とともに培養する必要があった。抗 PCNA モノクローナル抗体による染色のパターンは、BrdU と類似している<sup>25)</sup>ことから細胞増殖の内因性のマーカーとして用いることが可能である。分化の指標としてはケラチンに対するモノクローナル抗体の一つである anti-epithelial keratin 1 (以下、AE 1) を用いた。AE 1 は少なくとも K 14, K 16, K 19 の 3 種類の酸性ケラチンを認識し<sup>30)31)</sup>、正常角膜上皮では基底細胞は染色されないが、細胞増殖が亢進した正常皮膚および皮膚疾患<sup>32)</sup>や培養角膜上皮細胞<sup>33)34)</sup>でも陽性を示すことから細胞増殖の盛んな状態を反映している可能性があると考えられている。創傷治癒過程におけるこれらの増殖、分化のマーカーの変化を白色ウサギに n-ヘプタノールを用いて作製した角膜上皮欠損モデルにより免疫組織化学的に検討したので報告する。

## II 方 法

### 1. 角膜上皮欠損の作製

実験には体重 2~3 kg の白色ウサギ 12 匹 24 眼を用いた。キシラジン塩酸塩 (セラクター®) (25 mg) と塩酸ケタミン (ケタラール®) (50 mg) の筋肉内注射による全身麻酔と 0.4% 塩酸オキシプロカイン (ペノキシル®) の点眼麻酔を施した後に処置を行った。角膜上皮欠損の作製のために手術用顕微鏡下で、n-ヘプタノールを浸した直径 7 mm の濾紙を 30 秒間角膜中央部に乗せて圧迫した<sup>35)</sup>。その後角膜中央部を綿棒で擦過して上皮欠損を作製し、約 100 ml の生理食塩水で洗浄した。円形の上皮欠損が作製されたことを 0.5% フルオレセイン溶液で確認し、0.3% オフロキサシン眼軟膏を点入した。その後は抗生剤などの投与は一切行わなかった。

上皮欠損作製後、1, 3, 7, 14 日後に、キシラジン塩酸塩 (25 mg) と塩酸ケタミン (50 mg) の筋肉内注射後に、0.5% フルオレセイン溶液を用いて生体染色を行い、上皮欠損の範囲を確認し、スリットカメラ (SC-1200, コーワ) で写真撮影を行った。その後、過量のペントバルビタールナトリウム (ネンブタール®) を静脈内投与してウサギを屠殺し、直ちに眼球を摘出した。同様にして無処置の白色ウサギ 3 匹 6 眼の眼球を摘出し、対照とした。なお、角膜上皮の細胞増殖には日内リズムがあることを考慮し<sup>28)29)36)</sup>、本実験では午前 9 時に摘出された眼球を用いた。

### 2. 試料の作製

対照を含む各時期の摘出眼球、各 6 眼を手術用顕微鏡下で強角膜切片とし、これを半切した。半切した強角膜片を各々、同一眼球からのものが含まれないように配慮しつつ 4 片ずつ 3 つの組に分けた。最初の 4 片は 5% パラホルムアルデヒド中で、次の 4 片は 100% エタノール中でただちに固定した。強角膜片はいずれもメタノール系列で脱水、パラフィン包埋し、3  $\mu$ m の切片を作製した。

残りの強角膜片は、さらに半切し、Gipson ら<sup>37)</sup>の報告した方法に準じて ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を用いることにより上皮細胞層全体を基底膜から剝離し、これをスライドガラス上で伸展して角膜上皮の伸展標本作製した。標本作製時には、基底細胞側を上にして伸展することと、100% エタノールで固定する際にできるだけ皺が寄らないようにして固定することに留意した。なお、背景染色の強さを見るために各時期 1 枚ずつ、表層細胞側を上にして伸展、固定した標本も作製した。

### 3. 免疫組織染色

パラホルムアルデヒド固定の組織切片と伸展標本を抗 PCNA モノクローナル抗体を用いた細胞増殖頻度の検討に、エタノール固定の組織切片を AE 1 を用いたケラ

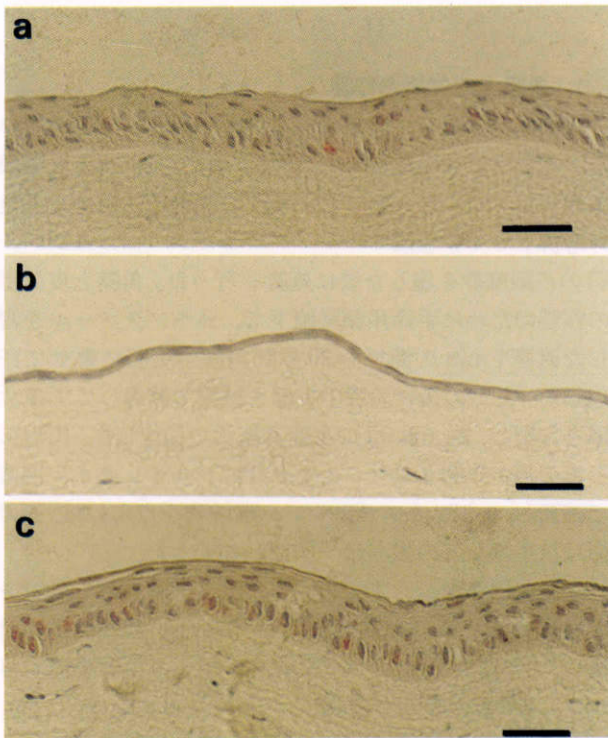


図1 角膜中央部の組織切片の抗 proliferating cell nuclear antigen (PCNA) モノクローナル抗体による免疫組織染色所見。

a: 対照, b: 受傷後1日, c: 7日後. バーは50  $\mu\text{m}$

チンの染色に用いた。組織切片は脱パラフィン後に、伸展標本はそのまま、エタノールの下降系列で水和し、3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  を含む90% メタノール中でペルオキシダーゼのブロッキングを行った後に、ABC法による免疫組織染色をHistostain-SAP Kit (Zymed Laboratories) を用いて行った。一次抗体には抗 PCNA monoclonal antibody (Oncogene Science), または AE1 (ICN) を用い、発色基質には AEC を、対比染色にはヘマトキシリンを用いた。陰性対照として一次抗体を用いない標本を用いた。

組織切片の染色所見により、PCNA または AE1 陽性細胞の頻度や分布の定性的解析を行った。また伸展標本を用いて、角膜中央部と周辺部で各々3か所ずつで約1,000個の基底細胞中のPCNA陽性細胞数を光学顕微鏡下で数え、細胞増殖頻度の定量的解析を行った。ここでは角膜の中央から3mm以内の部分(角膜上皮欠損を作製した部位)を角膜中央部、4mm以上の部分(残存した角膜上皮の部分)を角膜周辺部とした。また、輪部上皮はEDTAを用いても全体を剥離するのが困難であったため検討から除外した。結果は各時期4眼ずつの値を平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。

### III 結 果

#### 1. 上皮欠損の修復

0.5% フルオレセイン溶液で生体染色を施すことによ

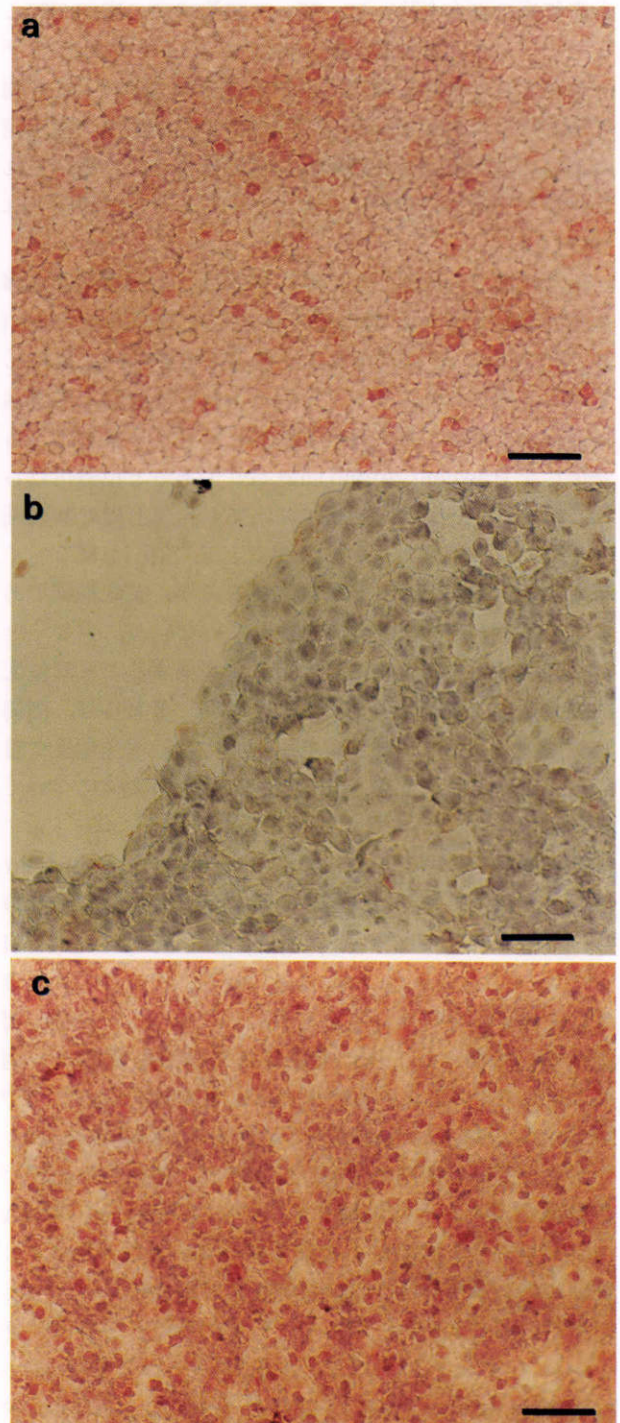


図2 角膜上皮伸展標本の抗 PCNA モノクローナル抗体による免疫組織染色所見。

a: 対照の角膜中央部, b: 受傷後1日の中央部, c: 受傷後1日の周辺部. バーは50  $\mu\text{m}$

り、上皮欠損作製直後には径約7mmの円形の上皮欠損が生じていることが確認された。上皮欠損は受傷後1日にはやや縮小し、辺縁が不鮮明な不整形の形状を示し、3日後には中央部までほぼすべて上皮化した。受傷後7、14日では細隙灯顕微鏡では異常所見は認められなくなった。

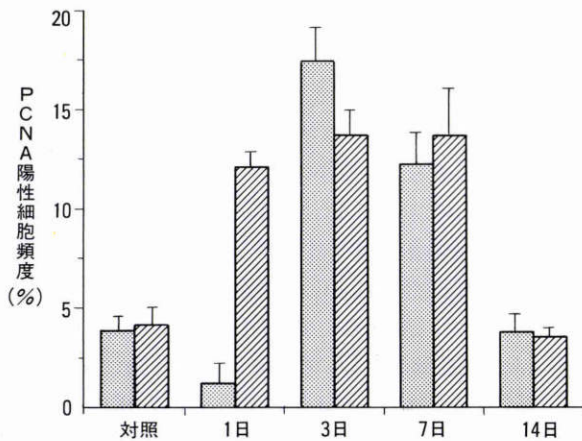


図3 基底細胞中に占めるPCNA陽性細胞頻度の経時的変化(平均値±標準偏差, n=4). 各時期ともに中央部(網)と周辺部(斜線)の陽性頻度を%で示す. 受傷後1日後の中央部は欠損部を覆う上皮の先端部分の値を示す.

## 2. PCNA陽性細胞の変化

対照と角膜上皮欠損作製後各時期の組織切片の抗PCNAモノクローナル抗体による免疫組織染色所見を図1に, 伸展標本の所見を図2に示す. 組織切片はいずれも角膜中央部の所見(受傷後1日は再生した上皮の先端の部分の所見)を示してある. 対照では, PCNA陽性所見は基底細胞の一部と翼状細胞のごく一部に散在性に認められるのみであった(図1a). 伸展標本でもPCNA陽性細胞は基底細胞中に散在しており, 陽性細胞の頻度には角膜中央部と周辺部で部位による差はなかった(図2a). なお, 表層細胞期を上にして固定した上皮伸展標本ではPCNA陽性所見は認められず, これらの所見は組織切片の所見と相応するものと考えられた.

受傷後1日では, 上皮欠損部に遊走した上皮細胞は平坦な形状を呈し, 単層となっていたが, この部分には陽性所見は認められなかった(図1b). 伸展標本でも, 中央部に向かう上皮の先端の部分にはほとんど陽性所見がみられなかった. 一方, 周辺部の残存した上皮の部分では対照と比較して明らかに陽性細胞の頻度が増加していた(図2b, c). 受傷後3日には, 角膜中央部に再生した上皮は2~3層の層構造を有するようになり, 周辺部だけでなく, この部分の上皮の基底細胞層にも多くのPCNA陽性所見が見られるようになった. 7日後には中央部に対照と同程度の5~6層の上皮細胞層が形成されていたが, 中央, 周辺ともになお多くのPCNA陽性細胞を認めた(図1c). これらのPCNA陽性細胞はほとんど基底細胞層に位置し, 翼状細胞層には稀に認められるに過ぎなかった. 受傷後14日では組織切片, 伸展標本ともに対照と比較して明らかな染色性の差は認められなくなった.

対照と角膜上皮欠損作製後1, 3, 7, 14日の基底細胞中に占めるPCNA陽性細胞の割合を上皮伸展標本を

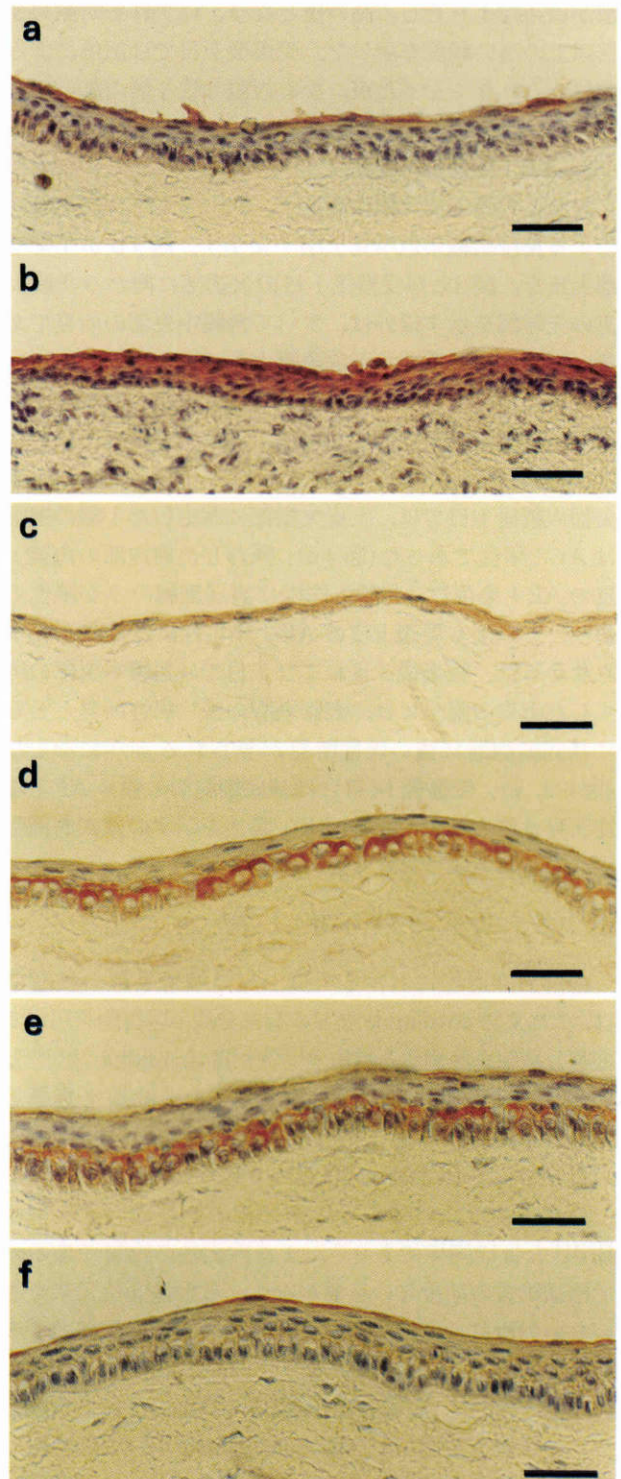


図4 角膜組織切片のanti-epithelial keratin 1(AE1)免疫組織染色所見. aが対照の角膜中央部, bが輪部を示す以外は, 欠損部に再生した上皮の所見を示す. バーは50µm c: 受傷後1日, d: 3日後, e: 7日後, f: 14日後.

用いて検討した結果を中央部と周辺部の部位別に示す(図3). 対照では, PCNA陽性細胞の割合は中央部で $3.9 \pm 0.7\%$ , 周辺部で $4.2 \pm 0.8\%$ であった. 受傷後1日では中央部は $1.2 \pm 1.0\%$ と低い値を示し, 逆に周辺部では $12.1 \pm 0.7\%$ と高い値を示した. 受傷後3日では中央

部が周辺部よりむしろ高い値となり、いずれも対照の3倍以上の高い頻度を示した。受傷後7日では部位による差はみられなくなったが、なお対照の約3倍の高い値を示した。受傷後14日では対照との差を認めなくなった。

### 3. AE1染色性の変化

対照と角膜上皮欠損作製後1, 3, 7, 14日後のAE1による免疫組織染色所見を図4に示す。図4bが正常輪部上皮を、図4cが受傷後1日の欠損部に向かう角膜上皮の先端部を示す以外は、すべて角膜中央部の所見である。対照として用いた正常角膜上皮では表層細胞のみが淡く染色されており、翼状細胞や基底細胞には陽性所見は見られなかった一方で、輪部上皮および結膜上皮では上皮細胞はすべてAE1陽性を示した(図4a, b)。上皮欠損作製後1日では、上皮欠損部に遊走した1層の細胞はAE1陽性であった(図4c)。残存した周辺部の角膜上皮のAE1染色性は対照と同様に表層細胞のみが陽性であり、この後も周辺上皮のAE1染色性には変化が見られなかった。受傷後3日および7日では角膜中央部の再生した上皮の部分には、表層細胞の淡い陽性所見とともに基底細胞層に強い陽性所見が見られるようになった(図4d, e)。受傷後14日には基底細胞層の強いAE1陽性所見は見られなくなり、AE1陽性を示すのは表層細胞層に限られるようになった(図4f)。

## IV 考 按

創傷治癒過程における角膜上皮の増殖動態の検討には、これまでcolcemideなどの有糸分裂の阻害剤を用いて細胞分裂像を計測する方法<sup>12)21)36)</sup>や<sup>3H-thymidine</sup><sup>11)17)28)29)</sup>, BrdU<sup>13)</sup>などS期にDNAに取り込まれる物質を指標とする方法が用いられてきた。今回の検討では、細胞増殖の指標としてPCNAを用いた。PCNAは厳密にS期にだけ発現するわけではないが、その染色のパターンはBrdUとほぼ同様であり<sup>25)</sup>、また内因性の物質であるので標識物質の前投与の必要がなく、放射性同位元素を用いないために、比較的簡便に細胞増殖動態を把握できる利点がある。

今回の検討では、細胞増殖頻度の算出のために角膜上皮の伸展標本を用いた。角膜伸展標本を用いて細胞増殖動態を検討した報告としては、Yanoら<sup>38)</sup>が<sup>3H-thymidine</sup>を用いてウサギ角膜内皮の細胞増殖動態を検討した報告があるが、角膜上皮は角膜内皮と異なり、重層扁平上皮であり、主に増殖を行う基底細胞層は内側に存在するために、同様のアプローチをそのまま行うことは不可能であった。しかし、伸展標本には、基底細胞層内のPCNA陽性細胞の分布を知ることができる点や、組織切片に比べ多くの細胞を検討できるので、より定量的に細胞増殖頻度を解析できる可能性がある点など、その長所も多いものと考えられる。このため、著者らは、上皮細胞層全体を基底膜から剝離し、これをスラ

イドグラス上で基底細胞側を上にして伸展する方法を試みた。その結果、非特異的な陽性所見はわずかであり、十分に陽性細胞を判定できる染色結果が得られた。

PCNAを指標とした方法で算出された細胞増殖頻度の結果をまとめると、以下のようになる。①正常の状態では周辺部と中央部でPCNA陽性細胞頻度には差がなかった。②受傷後1日では、中央の上皮欠損部に遊走する1層の上皮細胞にはPCNA陽性細胞はほとんど見られない一方で、残存した周辺上皮の基底細胞層ではPCNA陽性細胞頻度は正常の約3倍に増加していた。③中央部に2~3層の上皮細胞が再生された受傷後3日と正常とほぼ同程度の5~6層の細胞層が再生した7日後では、周辺部と同様に中央部でもPCNA陽性細胞頻度は大きく増加していたが、受傷後14日には対照と差を認めなくなった。以上の結果は、colcemideや<sup>3H-thymidine</sup>, BrdUを用いたこれまでの報告<sup>11)~13)</sup>とほぼ同様の結果であり、本法は角膜上皮細胞の増殖動態を検討する方法として有用性があるものと考えられた。ただし、輪部はEDTAを用いても剝離が難しく輪部上皮の細胞増殖動態は検討できなかった点や、正確な創傷縁の同定は困難であった点、翼状細胞層の細胞増殖は検出できない点などの問題点も明らかとなった。組織切片による観察方法を併用することで伸展標本の欠点を補い、より総合的な情報を得ることができると考えられた。

AE1に対する染色性は、創傷治癒過程において再生した角膜上皮の基底細胞層に大きな変化が見られた。正常角膜上皮では、AE1は表層細胞に淡い陽性所見を認めるのみであり、基底細胞層には陽性所見は見られなかったが、再生した上皮の基底細胞は強い陽性所見を示し、この所見は受傷後3日と7日に顕著であった。また、受傷後1日で上皮の先端部に相当する1層の細胞層も淡い陽性所見を示した。こうした再生上皮のAE1に対する反応性の変化は、穿孔創やfreeze injuryを用いたJesterら<sup>18)</sup>の報告と共通していた。

AE1は少なくともK14, K16, K19の3種類の酸性ケラチンを認識することが知られており<sup>30)31)</sup>、今回の検討ではどのケラチンの発現が変化したのかを特定することはできない。また、Jesterら<sup>18)</sup>も指摘しているように、新たなケラチンの発現ではなく、既に発現しているケラチンのunmasking<sup>39)</sup>が生じている可能性もある。しかしながら、K16のケラチンは細胞増殖と関連し、細胞増殖の盛んな皮膚疾患などでその発現が見られることが報告されている<sup>32)</sup>。また最近、Lauwerynsら<sup>40)</sup>は輪部の幹細胞と角膜上皮の基底細胞の移行型と考えられる細胞群について報告している。この細胞群ではピメンチンとともにK19の発現が見られ、ピメンチンは増殖の盛んな上皮細胞で発現されることがある<sup>41)</sup>ことから、これらの細胞群は高い増殖頻度を示すことが示唆されている。これらの報告からは、再生した上皮の基底細胞には細胞増殖

に関連して, 何らかのケラチンの発現の変化を伴っている可能性は十分あるものと推測される。ただし, 創傷治癒過程において再生した上皮の基底細胞とともに高い増殖頻度を示した周辺部の角膜上皮基底細胞には AE 1 に対する反応性の変化は経過を通じて認められなかった。また, 上皮欠損部に向かって遊走した 1 層の上皮細胞も AE 1 陽性を示したが, PCNA を指標とした検討結果からは, この部分の上皮細胞はほとんど細胞増殖を行っていないものと考えられた。これらの詳細については, AE 1 だけを用いた検討では解明できないと考えられた。今後, K 16 や K 19 に特異的なモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的検討や電気泳動, western blotting などの手法を用いた検討が必要と考えられる。

今回の検討では, 角膜上皮細胞の創傷治癒過程の中で, 基底細胞の果たす細胞増殖の役割を PCNA を指標として示すことができた。また, この過程で再生した角膜上皮基底細胞は, ケラチンの発現の変化を伴っている可能性が示唆された。今回, 著者らが作製した創傷モデルは, 角膜中央部の上皮欠損で基底膜の損傷も少ないとされているモデルであるが, この場合でも基底細胞の増殖, 分化動態の正常化にはかなりの時間を要することが示された。上皮欠損の範囲が大きい場合や基底膜に障害が及んでいる場合, 細胞増殖が抑制されている場合などの病態では, 創傷治癒の完了にはさらに長期を要するものと推測され, 臨床的にも留意すべきと考えられた。

本論文の要旨は第 97 回日本眼科学会総会において講演した。

稿を終えるにあたり御校閲を賜りました小口芳久教授に感謝いたします。

#### 文 献

- 1) 山田昌和, 坪田一男: 角膜上皮の病態生理. 臨眼 45: 205—210, 1991.
- 2) Kuwabara T, Perkins DG, Cogan DG: Sliding of the epithelium in experimental corneal wounds. Invest Ophthalmol Vis Sci 15: 4—14, 1976.
- 3) Haik BG, Zimmy ML: Scanning electron microscopy of corneal wound healing in the rabbit. Invest Ophthalmol Vis Sci 16: 787—796, 1977.
- 4) Buck RC: Cell migration in repair of mouse corneal epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 18: 767—784, 1979.
- 5) Cintron C, Kublin CL, Covington H: Quantitative studies of corneal epithelial wound healing in rabbits. Curr Eye Res 507: 516, 1981/1982.
- 6) Crosson CE, Klyce SD, Beurman RW: Epithelial wound closure in the rabbit cornea. Invest Ophthalmol Vis Sci 27: 464—473, 1986.
- 7) Jester JV, Rodrigues MM: Actin filament localization in normal and migrating rabbit corneal epithelium. Curr Eye Res 3: 955—960, 1984.
- 8) Nishida T, Nakagawa S, Nishibayashi C, Tanaka H, Manabe R: Fibronectin enhancement of corneal epithelial wound healing of rabbits *in vivo*. Arch Ophthalmol 102: 455—456, 1984.
- 9) Fujikawa LS, Foster CS, Gipson IK, Colvin RB: Basement membrane components in healing rabbit corneal epithelial wounds: Immunofluorescence and ultrastructural studies. J Cell Biol 98: 128—138, 1984.
- 10) Ohji M, Mandarino L, SundarRaj N, Thoft RA: Corneal epithelial cell attachment with endogenous laminin and fibronectin. Invest Ophthalmol Vis Sci 34: 2487—2492, 1993.
- 11) Hanna C: Proliferation and migration of epithelial cells. During corneal wound repair in the rabbit and the rat. Am J Ophthalmol 61: 55—63, 1966.
- 12) Haskjold E, Bjerknes R, Refsum SB: Cell kinetics during healing of corneal epithelial wounds. Acta Ophthalmol 67: 174—180, 1989.
- 13) Kitazawa T, Kinoshita S, Fujita K, Araki K, Watanabe K, Ohashi Y, et al: The mechanism of accelerated corneal epithelial healing by human epidermal growth factor. Invest Ophthalmol Vis Sci 31: 1773—1778, 1990.
- 14) Rodrigues M, Ben-Zvi A, Krachmer J, Schermer A, Sun T-T: Suprabasal expression of a 64-kilodalton keratin (no. 3) in developing human corneal epithelium. Differentiation 34: 60—67, 1987.
- 15) Cotsarelis G, Cheng S-Z, Dong G, Sun T-T, Lavker RM: Existence of slowcycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: Implication of epithelial stem cells. Cell 57: 201—209, 1989.
- 16) Schermer A, Galvin S, Sun T-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.
- 17) Danjo S, Friend J, Thoft RA: Conjunctival epithelium in healing of corneal epithelial wounds. Invest Ophthalmol Vis Sci 28: 1445—1449, 1987.
- 18) Jester JV, Rodrigues MM, Sun T-T: Change in epithelial keratin expression during healing of rabbit corneal wounds. Invest Ophthalmol Vis Sci 26: 828—837, 1985.
- 19) Buck RC: Hemidesmosomes of normal and regenerating mouse corneal epithelium. Virchows Arch Cell Pathol 41: 1—16, 1982.
- 20) Gipson IK: Adhesive mechanisms of the corneal epithelium. Acta Ophthalmol 70: 13—17, 1992.
- 21) Lamprecht J: Symmetric and asymmetric cell division in rat corneal epithelium. Cell Tissue Kinet 23: 203—216, 1990.
- 22) 山田昌和, 真島行彦: 正常角膜上皮の維持における基底細胞の役割. 日眼会誌 99: 3—9, 1995.
- 23) Tseng SCG: Concept and application of limbal stem cells. Eye 3: 141—157, 1989.
- 24) Brewitt H: Sliding of epithelium in experimental corneal wounds. A scanning microscopic

- study. *Acta Ophthalmol* 57: 945—958, 1979.
- 25) **Bravo R, Bravo-Macdonald Heather**: Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: Association with DNA replication sites. *J Cell Biol* 105: 1549—1554, 1987.
  - 26) **Wassem NH, Lane DP**: Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form. *J Cell Science* 96: 121—129, 1990.
  - 27) **Bravo R, Frank R, Blundell PA, Bravo-Macdonald Heather**: Cyclin/PCNA is the auxillary protein of DNA polymerase- $\delta$ . *Nature* 326: 515—517, 1987.
  - 28) **Fogle JA, Yoza BK, Neufeld AH**: Diurnal rhythm of mitosis in rabbit corneal epithelium. *Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* 213: 143—148, 1980.
  - 29) **Haskjold E, Refsum SB, Bjerknes R**: Circadian variation in the circadian variations in the DNA synthesis of the rat corneal epithelium. *Virchows Archiv B Cell Pathol* 58: 229—234, 1990.
  - 30) **Woodcock-Mitchell J, Eichner R, Nelson WG, Sun T-T**: Immunolocalization of keratin polypeptides in human epidermis using monoclonal antibodies. *J Cell Biol* 95: 580—588, 1982.
  - 31) **Tseng SCG, Jarvinen JJ, Nelson WG, Huang JOW, Woodcock-Mitchell J, Sun T-T**: Correlation of specific keratins with different types of epithelial differentiation: Monoclonal antibody studies. *Cell* 30: 361—372, 1982.
  - 32) **Weiss RA, Eichner R, Sun T-T**: Monoclonal antibody analysis of keratin expression in epidermal diseases: A 48- and 56-kdalton keratin as molecular markers for hyperproliferative keratinocytes. *J Cell Biol* 98: 1397—1406, 1984.
  - 33) **Kiritoshi A, SundarRaj N, Thoft RA**: Differentiation in cultured limbal epithelium as defined by keratin expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 3073—3077, 1991.
  - 34) **Wei Z-G, Wu R-L, Lavker RM, Sun T-T**: In vitro growth and differentiation of rabbit bulbar, fornix, and palpebral conjunctival epithelia. Implications on conjunctival epithelial transdifferentiation and stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 1814—1828, 1993.
  - 35) **Cintron C, Hassinger L, Kublin CL, Friend J**: A simple method for the removal of rabbit corneal epithelium utilizing n-heptanol. *Ophthalmic Res* 11: 90—96, 1979.
  - 36) **Haskjold E, Refsum SB, Bjerknes R**: Circadian variation in the mitotic rate of the rat corneal epithelium. *Virchows Archiv B Cell Pathol* 58: 123—127, 1989.
  - 37) **Gipson IK, Grill MR**: A technique for obtaining sheets of intact rabbit corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 23: 269—273, 1982.
  - 38) **Yano M, Tanishima T**: Wound healing in rabbit corneal endothelium. *Jpn J Ophthalmol* 24: 297—309, 1980.
  - 39) **Franke WW, Schmid E, Wellsted J, Grund C, Gigi O, Geiger B**: Change of cytokeratin filament organization during the cell cycle: Selective masking of an immunologic determinant in interphase PtK<sub>2</sub> cells. *J Cell Biol* 97: 1255—1260, 1983.
  - 40) **Lauweryns B, van den Oord JJ, De Vos R, Missotten L**: A new epithelial cell type in the human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 1983—1990, 1993.
  - 41) **Cornell ND, Rheinwald JG**: Regulation of the cytoskeleton in mesothelial cells: Reversible loss of keratin and increase in vimentin during rapid growth in culture. *Cell* 34: 245—253, 1983.