

正常角膜上皮の維持における基底細胞の役割

山田 昌和, 真島 行彦

慶應義塾大学医学部眼科学教室

要 約

Digitonin により角膜上皮を1層ずつ剝離していく方法を用いて, ウサギ角膜上皮の基底細胞層を走査型電子顕微鏡により観察するとともに, 細胞増殖の内因性のマーカーとして proliferating cell nuclear antigen (PCNA) を用い, 免疫組織化学的に基底細胞の増殖動態の検討を行った。基底細胞層は表層細胞よりかなり小さい円柱上の細胞として観察された。画像解析の結果, 表層細胞の平均細胞面積は $507.3 \pm 46.6 \mu\text{m}^2$, 基底細胞の平均細胞面積は $39.5 \pm 2.8 \mu\text{m}^2$ であり, 基底細胞と表層細胞の面積比は約 13 : 1 であった。PCNA 陽性細胞は

基底細胞にほぼ限局して見られ, 角膜上皮伸展標本を用いて求めたその陽性頻度は角膜中央部で $3.9 \pm 0.7\%$, 周辺部で $4.2 \pm 0.8\%$ であり, 部位差を認めなかった。これらの方法は角膜上皮基底細胞の形態や機能を知るうえで有力な手段となり得るものと考えられた。(日眼会誌 99 : 3-9, 1995)

キーワード : 角膜上皮, 基底細胞, Proliferating cell nuclear antigen, 細胞増殖, 走査型電子顕微鏡

The Role of the Basal Cell Layer in the Maintenance of Normal Corneal Epithelium

Masakazu Yamada and Yukihiko Mashima

Department of Ophthalmology, School of Medicine, Keio University

Abstract

A method of desquamating single layers of corneal epithelial cells through the use of digitonin allowed the observation of the basal cell layer by scanning electron microscope. Basal cells of normal rabbit corneal epithelium were observed as small, round, and columnar-shaped cells, and the mean cell areas of superficial and basal cell layers were $507.3 \pm 46.6 \mu\text{m}^2$, and $39.5 \pm 2.8 \mu\text{m}^2$, respectively. The mitotic rate of basal cells was also evaluated immunohistochemically using anti-PCNA (proliferating cell nuclear antigen) monoclonal antibody and the flat preparations of corneal epithelium. The

mitotic rate (PCNA positive cells in the basal cell layer) was approximately 4%, and showed no difference between the center and peripheral portion of the cornea. We think these two new methods are useful for the analysis of morphological and functional characteristics of corneal epithelial basal cells. (J Jpn Ophthalmol Soc 99 : 3-9, 1995)

Key words : Corneal epithelium, Basal cell, Proliferating cell nuclear antigen, Proliferation, Scanning electron microscopy

I 緒 言

角膜上皮には正常状態においても turnover が見られ¹⁾, 分化と増殖, 脱落の過程を経ながら動的に維持されていると考えられる²⁾。近年, 角膜上皮の幹細胞は輪部上皮の基底細胞層に存在することが明らかにされてきている³⁾⁻⁵⁾。幹細胞は潜在的には高い増殖能を有しているが⁶⁾, 正常の状態ではあまり細胞分裂を行わず, 増殖の役

割は transient amplifying cell が担っていると考えられており, 角膜上皮では基底細胞がこれに相当するとされている⁷⁾。このような正常状態での角膜上皮の維持は概念的には x, y, z hypothesis として知られており²⁾, その理論モデルも報告されている⁸⁾が, 角膜上皮の基底細胞に関して transient amplifying cell という位置付けからその役割を検討した報告は少ない。

今回, 著者らは正常角膜上皮の維持に果たす基底細胞

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4月18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 April 18, 1994 and accepted in revised form August 10, 1994)

の役割を検討するために、2つの方法を用いることを試みた。1つは走査型電子顕微鏡(以下、SEM)による基底細胞の観察であり、もう1つは角膜上皮伸展標本を用い、proliferating cell nuclear antigen(以下、PCNA)を指標とした基底細胞の増殖動態の検討である。角膜上皮は正常の状態では5~6層の細胞層から成り立っているので、通常の条件では基底細胞をSEMで観察することは不可能である。このため、界面活性剤の一種であるdigitoninにより角膜上皮を1層ずつ剥離して基底細胞層を露出する方法⁹⁾¹⁰⁾を用いた。この方法によりSEMによる基底細胞層の観察が可能となり、画像解析も行うことができた。また、PCNAはDNA polymerase- δ の付随蛋白としてDNA合成に密接に関連し、細胞周期のG1後期からS期にかけて増加することが知られており^{11)~13)}、細胞増殖の内因性のマーカーとして用いられている。組織切片と角膜上皮伸展標本の双方を用いることにより、PCNA陽性細胞の分布と頻度をより定量的に評価することが可能であった。これらの検討から得られた結果に若干の考案を加えて報告する。

II 方 法

1. 実験動物

実験には体重2~3kgの白色ウサギ9匹18眼を用いた。白色ウサギはキシラジン塩酸塩(セラクター®)(25mg)と塩酸ケタミン(ケタラール®)(50mg)の筋肉内注射による全身麻酔後に、過量のペンドバルビタールナトリウム(ネンプタール®)を静脈内投与して安楽死させ、直ちに眼球を摘出した。なお、角膜上皮の細胞増殖には日内リズムがある¹⁴⁾¹⁵⁾ことを考慮し、本実験では午前9時に眼球を摘出した。

2. 細胞増殖頻度の検討

摘出眼球のうち、6眼は手術用顕微鏡下で強角膜切片とし、これを半切した。半切した強角膜片のうち、半分は5%パラホルムアルデヒド中で固定し、メタノール系列で脱水、パラフィン包埋し、3 μ 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¹⁶⁾の報告した方法に準じて上皮細胞層全体を基底膜から剥離して伸展標本を作製した。簡潔には2.5mMのethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)を含むリン酸緩衝液に強角膜片を入れ、37°Cで2時間incubateした後、手術用顕微鏡下で2本の無鉤摂子を用いて上皮を実質から1枚のシート状に剥離し、スライドガラス上で基底細胞側を上にして伸展した。標本はそのまま100%エタノール中で2時間固定し、伸展標本とした。

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%過酸化水素を含む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法により免疫組織染色をHistostain-SAP Kit(Zymed Laboratories)を用いて行った。

一次抗体には抗PCNA monoclonal antibody(Oncogene Science)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。陰性対照には一次抗体を用いない標本と表層細胞側を上にして伸展、固定した標本を用いた。

組織切片は、PCNA陽性細胞の頻度と分布の定性的解析に用いた。伸展標本は、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、これを細胞増殖頻度とした。結果は平均値±標準偏差で示した。

3. SEMによる形態学的検討

角膜上皮の基底細胞をSEMで観察するために、4眼をSokolら⁹⁾の報告に準じた方法を用いて1層ずつ角膜上皮を剥離して行き、基底細胞層を露出した。角膜上皮を1層ずつ剥離する方法は以下の手順によった。まず、摘出眼球を角膜側を下にして20 μ Mのdigitonin(Sigma)を含む生理食塩水に浸し、37°Cでincubateした。時間は、1回目は8分、2回目で14分、3回目は14分と8分の2回とした。これを0.4%トリパンブルーで2分間染色し、37°Cのmoist chamber内で15分間incubateした。眼球を生理食塩水で洗浄したのちに、25mMのHEPES(Sigma)とD/F12(Sigma)の等量混合液中で37°Cでincubateすると、トリパンブルーに染色された細胞層が自然に剥離した。剥離に要した時間は、1回目で30分間、2回目で1時間、3回目で1時間半程度であった。この処理を3回目まで行い、基底細胞層を露出した。

Digitonin処理を行った摘出眼球と、表層細胞層を観察するためのdigitonin未処理の摘出眼球(4眼)を手術用顕微鏡下で強角膜切片とし、2%グルタルアルデヒドを含むpH7.4の100mMカコジル酸ナトリウム緩衝液中で2時間固定した。1%四酸化オスミニウムで1時間、後固定を行い、50~100%のエタノール系列で脱水し、42°Cで臨界点乾燥を行った。試料に金と白金を蒸着し、SEM(S-4000, Hitachi)を用いて作製された試料を観察し、写真撮影を行った。

得られた写真を用いて、セルアナリシスシステム(コーナン・メディカル)による画像解析を行った。各試料の角膜中央部付近の写真から40個以上の細胞輪郭を入力して、平均細胞面積を算出した。Digitonin未処理の試料の値を角膜上皮最表層の平均細胞面積、digitonin処理後の試料の値を基底細胞層の平均細胞面積とし、結果は各々の各時期4眼ずつの値を平均値±標準偏差で示した。なお、表層細胞に関しては、細胞のごく一部のみが露出していると思われる細胞は解析から除外した。また、基底細胞層の細胞輪郭の入力に際しては、基底膜上での細胞密度を知るために、細胞間の間隙はないものとして入力を行った。

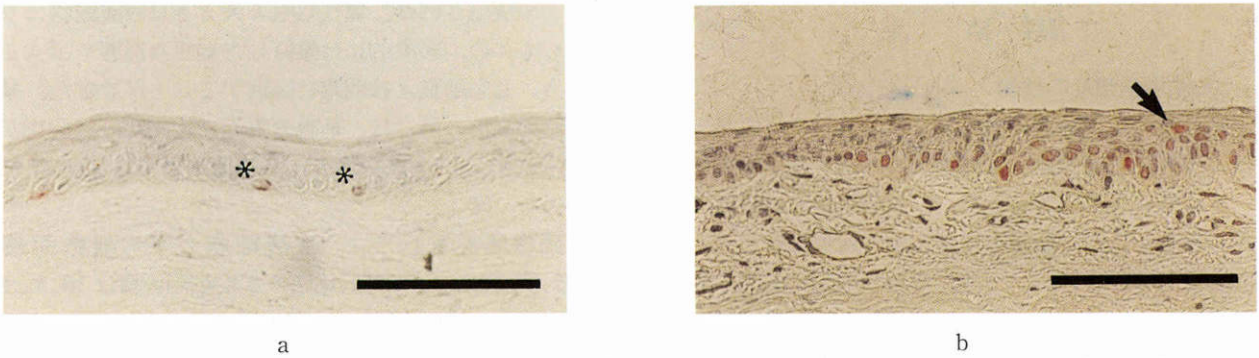
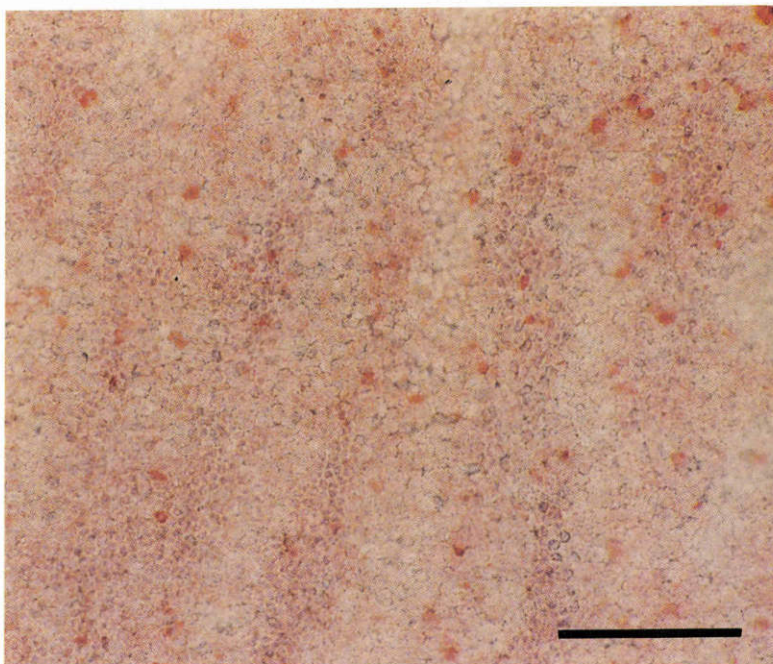
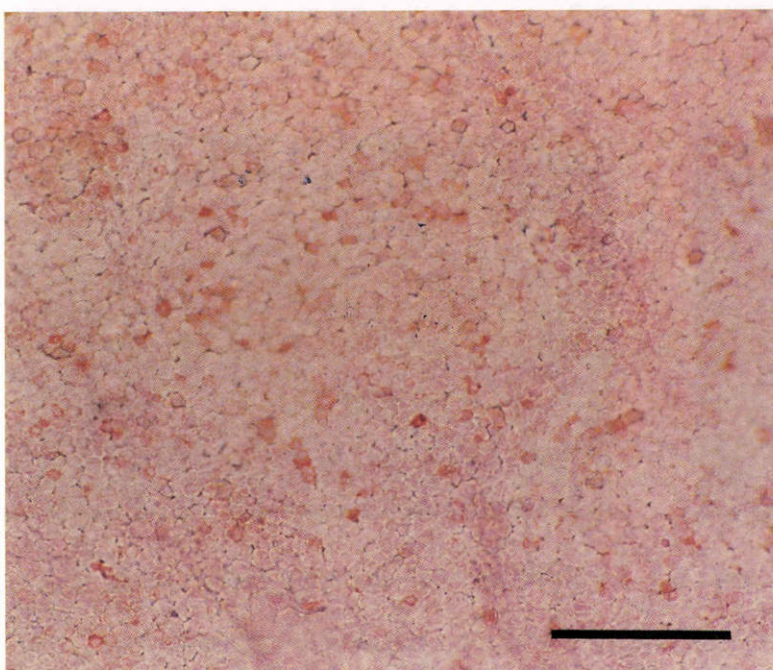


図1 角膜上皮(図1a)と輪部上皮(図1b)の組織切片の抗proliferating cell nuclear antigen(PCNA)モノクローナル抗体による免疫組織染色所見。

角膜上皮では基底細胞の一部にPCNA陽性細胞が見られる(*). 輪部上皮では陽性細胞の割合が高く、そのほとんどは基底細胞層に位置しているが翼状細胞にも陽性細胞が見られる(→). バーは100 μm



a



b

図2 角膜上皮中央部(図2a)と周辺部(図2b)の伸展標本の抗PCNAモノクローナル抗体による免疫組織染色所見。

PCNA陽性細胞は散在性に分布しており、部位による陽性細胞頻度に差はない。

バーは100 μm

III 結 果

1. 細胞増殖頻度の検討

組織切片の免疫組織染色所見を図1に示す。角膜上皮では、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が認められたが、表層細胞には陽性所見は見られなかった。輪部上皮でも陽性所見はほとんど基底細胞に認められたが、一部には翼状細胞にも陽性所見を認めた。

上皮伸展標本のPCNA染色所見を図2に示す。角膜中央部と周辺部ともに、PCNA陽性細胞が散在しており、中央部と周辺部で部位による差を認めなかった。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。輪部はEDTA処理によってもきれいに剝離することが困難であったこと、伸展標本中で輪部の同定が正確に行えなかったことから、伸展標本での検討から除外した。なお、一次抗体を用いなかった標本と表層細胞側を上にして固定した伸展標本では、わずかな非特異的陽性所見が認められるのみであった。

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用いて検討した結果、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。両者の間に統計学的に有意差はなく、角膜上皮の中では部位差はないものと考えられた (paired t-test)。

2. SEMによる形態学的検討

Digitonin未処理(表層細胞層)とdigitonin処理後(基底細胞層)のSEM所見を図3に示す。表層細胞は3種類の明るさ(dark cell, medium cell, bright cell)を持つ多角形の細胞として観察された。一方、基底細胞は表層細胞よりかなり小さい円柱状の形態を示し、各細胞間の輝度はほぼ均一でコントラストに乏しかった。これらの細胞が基底細胞であることは、標本の一部に基底膜が露出している部分や翼状細胞が残存している部分があった

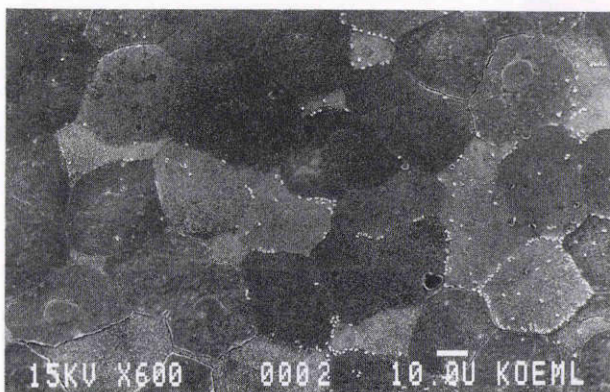
ことで確認された。翼状細胞の大きさは表層細胞より小さいものの、形態的には類似した扁平な形態を示すことから、基底細胞とは明瞭に区別することができた。基底細胞の高倍の像では、細胞の表面に突起状の構造物が認められた。この表面構造には細胞間でほとんど差はなかった(図4)。

画像解析を行うと、表層細胞の平均細胞面積は $507.3 \pm 46.6 \mu\text{m}^2$ 、基底細胞の平均細胞面積は $39.5 \pm 2.8 \mu\text{m}^2$ であり、基底細胞は表層細胞の約13分の1の大きさであった。

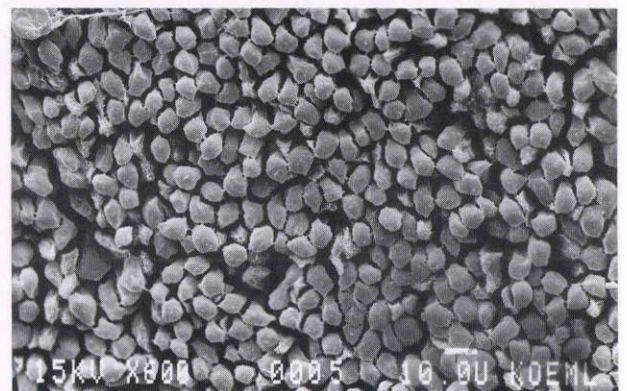
IV 考 按

角膜上皮の細胞増殖頻度については、これまでは主として ^3H -thymidine¹⁷⁾¹⁸⁾やBrdU(bromodeoxyuridine)¹⁹⁾²⁰⁾の取り込みを用いて検討されており、最近ではフローサイトメトリーを用いた細胞周期の検討²¹⁾も報告されている。今回は、細胞増殖のマーカーとしてPCNAを用い、増殖頻度をより定量的に評価するために、伸展標本を用いた検討を行った。PCNAはDNA polymerase- δ の付随蛋白としてDNA合成に密接に関連し、細胞周期のG1後期からS期にかけて増加することが知られている^{11)~13)}。PCNAは、厳密にはS期に特異的に発現するわけではないが、その染色のパターンはBrdUとほぼ同じであることが報告されている¹¹⁾。

今回の組織切片の免疫組織染色所見では、PCNA陽性所見は角膜上皮では基底細胞のごく一部の翼状細胞に認められ、従来の ^3H -thymidineやBrdUの取り込みを指標とした報告^{17)~20)}とほぼ相応するものと考えられた。また、細胞増殖頻度の測定には、より多くの細胞を評価して定量性を高めるために伸展標本を用いた。従来の報告^{17)~21)}では正常角膜上皮の細胞増殖頻度(S期の細胞の頻度)は1.0~3.1%とされているが、これらの報告では全角膜上皮細胞中の増殖頻度が示されている。今回の検



a



b

図3 角膜上皮の表層細胞層(digitonin未処理:図3a)と基底細胞層(digitonin処理後:図3b)の走査型電子顕微鏡所見。

表層細胞は3種類の明るさを持つ多角形の扁平な細胞として観察された。基底細胞の平均細胞面積は表層細胞に比べ約13分の1で、円柱状の形態を呈し、細胞間のコントラストに乏しい。バーは10 μm

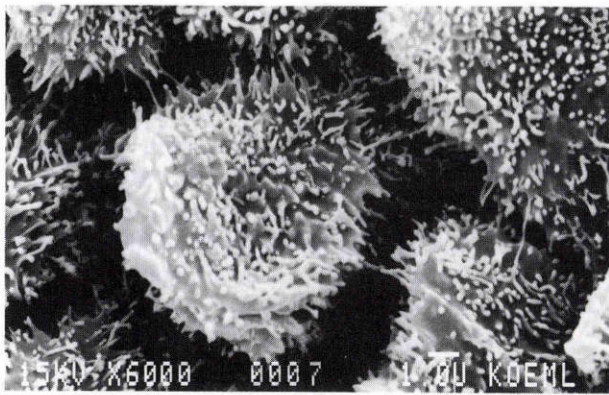


図4 基底細胞膜 (digitonin 処理後) の走査型電子顕微鏡による強拡大所見。バーは1 μm

討では基底細胞中の PCNA 陽性細胞頻度を細胞増殖頻度としたことを考慮すると、約4%という値はこれまでの報告に相応するものと考えられた。ただし、今回の検討では角膜中央部と周辺部で PCNA 陽性細胞頻度に部位差を認めなかった。Haaskjold ら²²⁾²³⁾は細胞増殖の指標として³H-thymidine による labelling index を用いた場合 (S 期) と colcemid を用いて細胞分裂像 (M 期) を用いた場合を比較し、実際の細胞分裂率は周辺部と中央部で差がないにもかかわらず、labelling index では角膜周辺部や輪部の値が中央部よりも高いことを示し、labelling index の結果の解釈には慎重になる必要があると報告している。PCNA 陽性細胞頻度にはこのような部位差が見られなかったことは、標識物質の前投与の必要がないことに加えて、実際の細胞増殖頻度を反映する指標として有利に働く可能性があるものと考えられた。

本研究では、界面活性剤の一種である digitonin を用いて、角膜上皮を1層ずつ剝離する方法⁹⁾¹⁰⁾を用いることにより、従来の SEM では不可能であった基底細胞層の観察を行うことができた。この方法では、digitonin が作用するのは一番表層に位置する1層の細胞層に限られ、これが剝離した後の残存した細胞層の構造は表面構造を含めて良く保存されると報告⁹⁾されている。基底細胞は、これまで SEM で観察されてきた表層細胞とは大きく異なる形態を呈し、表面積が小さく縦長で円柱状の形態を示した。基底細胞の形態は、光学顕微鏡や透過型電子顕微鏡などによる cross sectional な観察でも推測されるが、SEM による像はこれらの点を明瞭に示すことができる点で意義があるものと思われた。また、細胞の表面に認められた構造物は、その長さや密度から未発達な microvilli とも考えられた。Sokol ら⁹⁾は digitonin 処理後に表面に露出した翼状細胞に microvilli が存在し、その発達の程度が上皮細胞の maturation の程度を示していると報告している。ただし、基底細胞の microvilli の存在に関しては明らかにされておらず、今回認められた表面構造が microvilli であるのか、interdigitation である

のかについては、検討の余地があるものと思われる。

今回の検討では、基底細胞の平均細胞面積は $39.5 \pm 2.8 \mu\text{m}^2$ であり、基底細胞は表層細胞の約13分の1の大きさであった。この数字自体は固定による収縮の影響や digitonin 処理による影響、SEM による観察系の誤差などを含んでいると考えられ、*in vivo* の値をそのまま示すものと考えすることはできない。中でも最も影響が大きいと思われるのは固定による収縮の影響である。ただし、固定による組織収縮の程度は同一の固定条件を用いた場合にはほぼ一定であるとされている²⁴⁾ので、表層細胞と基底細胞の面積比は大まかな値として用いることができると考えられる。

近年、specular microscopy^{25)~27)}や confocal microscopy²⁸⁾²⁹⁾を用いて *in vivo* の角膜上皮を細胞レベルで観察する試みがなされている。Specular microscopy により表層細胞の形態を観察することは比較的容易であり、角膜移植術後や円錐角膜、コンタクトレンズ装用者など様々な病態でその形態に変化が見られることを著者らは報告^{25)~27)}してきた。ただし、specular microscopy では基底細胞の形態を観察することは特殊な場合に限定されていた。一方、confocal microscopy は基底細胞層を観察することが可能な方法として注目されている²⁸⁾²⁹⁾が、明瞭な画像を得ることがやや難しい点や SEM など組織学的な方法との比較がなされていない点が問題点として残されている。今回示した基底細胞層の SEM 像は、specular microscopy や confocal microscopy で *in vivo* で得られる基底細胞の像と相応しており、これらの方法により得られる所見を把握する上でも良い資料になり得るものと考えられた。

今回得られた結果から、正常角膜上皮の維持に果たす角膜上皮基底細胞の役割について X, Y, Z hypothesis²⁾の観点から考察する。表層細胞の脱落 (Z 成分) がどの位の割合で起こるかは正確には知られていないが、³H-thymidine を用いた検討により大まかには1日1層の割合で turnover が起こると報告されている¹⁾。また、X, Y, Z hypothesis に基づいた角膜上皮の維持に関する理論モデル⁸⁾では、正常状態では細胞の周辺部から中央部への移動の速度は1週間に150 μm 程度とあまり大きくなく、短期的には基底細胞の増殖を表す X 成分と表層細胞の脱落を表す Z 成分がほぼ釣り合うとされている。したがって、表層細胞の損失 (Z 成分) を基底細胞の増殖 (X 成分) ですべて補うためには、少なくともこれと同数の基底細胞が増殖する必要がある³⁰⁾。これらに従うと、今回の検討で求めた表層細胞と基底細胞の面積比から、1日に基底細胞のうち7.8%が増殖する必要がある計算となる。

一方、基底細胞中の PCNA 陽性細胞頻度は約4%であった。この値は日内リズムでは増殖が盛んな時間帯に相当する午前9時のものである¹⁴⁾ので、Fogle ら¹⁴⁾の報告

を基に1日の平均を換算すると3.1%となる。また、角膜上皮細胞の *in vivo* での細胞周期は知られていないが、一般には細胞周期のうち、S期の長さは細胞の種類によらずほぼ一定であり、8時間程度であるとされている³¹⁾。したがって、3.1%という値をある時点でS期にある細胞の頻度とすると、24時間のうちではその3倍の約9~10%の基底細胞がS期に入る、つまり細胞増殖のサイクルに入るものと考えることができる。この値は先に計算された表層細胞の脱落分を補うために必要な基底細胞の細胞増殖頻度の7.8%という値よりやや大きく、正常状態での基底細胞の増殖頻度は角膜上皮の維持に十分であることが示唆された。長期的には幹細胞が存在する輪部からの上皮細胞の供給が必要であるが、基本的に角膜上皮細胞層を細胞数の上から維持しているのは transient amplifying cell としての角膜上皮基底細胞であることを改めて示唆するものと思われる。

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深謝いたします。また、慶応義塾大学医学部電子顕微鏡室、藤原達司先生に心から感謝いたします。

本論文の要旨は第17回角膜カンファレンスにおいて発表された。

文 献

- 1) **Cenedella RJ, Fleschner CR**: Kinetics of corneal epithelium turnover *in vivo*. Invest Ophthalmol Vis Sci 31: 1957-1962, 1990.
- 2) **Thoft RA, Friend J**: The X,Y,Z hypothesis of corneal epithelium maintenance. Invest Ophthalmol Vis Sci 24: 1442-1443, 1983.
- 3) **Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G, Sun T-T**: Existence of slow cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: Implication of epithelial stem cells. Cell 57: 201-209, 1989.
- 4) **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.
- 5) **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.
- 6) **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.
- 7) **Tseng SCG**: Concept and application of limbal stem cells. Eye 3: 141-157, 1989.
- 8) **Sharma A, Coles WH**: Kinetics of corneal epithelial maintenance and graft loss; a population balance model. Invest Ophthalmol Vis Sci 30: 1962-1971, 1989.
- 9) **Sokol JL, Masur SK, Asbell PA, Wolosin JM**: Layer-by-layer desquamation of corneal epithelium and maturation of tear-facing membranes. Invest Ophthalmol Vis Sci 31: 1773-1778, 1990.
- 10) **山田昌和, 大竹雄一郎, 佐藤直樹, 坪田一男, 島崎潤, 上田俊介**: 角膜上皮の層別の細胞形態について. あたらしい眼科 8: 1435-1439, 1991.
- 11) **Bravo R, Macdonald-Bravo H**: 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.
- 12) **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.
- 13) **Bravo R, Frank R, Bundell PA, Macdonald-Bravo H**: Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- δ . Nature 326: 515-517, 1987.
- 14) **Fogle JA, Yoza BK, Neufeld AH**: Diurnal rhythm of mitosis in rabbit corneal epithelium. Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol 213: 143-148, 1980.
- 15) **Refsum SB, Haaskjold E, Iversen OH**: Circadian variation in cell proliferation and maturation. A hypothesis for the growth regulation of rat corneal epithelium. Virchows Archiv B Cell Pathol 60: 225-230, 1991.
- 16) **Gipson IK, Grill MR**: A technique for obtaining sheets of intact rabbit corneal epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 23: 269-273, 1982.
- 17) **Kinoshita S, Friend J, Thoft RA**: Biphasic cell proliferation in transdifferentiation of conjunctival to corneal epithelium in rabbits. Invest Ophthalmol Vis Sci 24: 1008-1014, 1983.
- 18) **林 達也, 多田豊広, 岸本英正**: 酸素透過性ハードコンタクトレンズ連続装用による家兎角膜上皮細胞の3H-チミジンの取り込みに及ぼす影響. 日コ・レ誌 27: 153-158, 1985.
- 19) **Kitazawa T, Kinoshita S, Fujita K, Araki K, Watanabe H, Ohashi Y, et al**: The mechanism of accelerated corneal epithelial wound healing by human epidermal growth factor. Invest Ophthalmol Vis Sci 31: 1773-1778, 1990.
- 20) **壇上真次, Friend J, Thoft RA**: 結膜上皮創傷治癒時における胚細胞と結角膜上皮の mitosis について. 眼紀 38: 1420-1425, 1987.
- 21) **根津永津, 大橋裕一, 木下 茂**: *In vivo* 角膜上皮細胞のフローサイトメトリーを用いた細胞周期分析法の研究. 日眼会誌 96: 283-287, 1992.
- 22) **Haaskjold E, Refsum SB, Bjerknes R, Paulsen T**: The labelling index is not always reliable. Discrepancies between the labelling index and the mitotic rate in the rat corneal epithelium after intraperitoneal and topical administration of tritiated thymidine and colcemid. Cell Tissue

- Kinet 21: 389—394, 1988.
- 23) **Haaskjold E, Refsum H, Refsum SB, Bjerknes R**: Cell kinetics of the rat corneal epithelium. *APSIM* 100: 1123—1128, 1992.
 - 24) **Doughty MJ**: On the observation of the corneal epithelial surface by scanning electron microscopy. *Optom Vis Sci* 67: 735—756, 1990.
 - 25) **Tsubota K, Yamada M, Naio S**: Specular microscopic observation of human corneal epithelial abnormalities. *Ophthalmology* 98: 184—191, 1991.
 - 26) **Tsubota K, Yamada M, Naio S**: Specular microscopic observation of normal human corneal epithelium. *Ophthalmology* 99: 89—94, 1992.
 - 27) **Tsubota K, Yamada M**: Corneal epithelial alterations induced by disposable contact lens wear. *Ophthalmology* 99: 1193—1196, 1992.
 - 28) **Lemp MA, Dilly PN, Boyde A**: Tandem scanning (confocal) microscope of the full-thickness cornea. *Cornea* 4: 205—209, 1986.
 - 29) 富井 聡, 木下 茂, 大橋裕一, 中内正海: Tandem Scanning Confocal Microscope による角膜組織の観察. *臨眼* 47: 629—631, 1993.
 - 30) **Lamprecht J**: Symmetric and asymmetric cell division in rat corneal epithelium. *Cell Tissue Kinet* 23: 203—216, 1990.
 - 31) 岡田重文: 動物細胞の細胞分裂調節機構—特に細胞周期からのアプローチ. *科学* 41: 58—67, 1971.
-