

ヒト角膜におけるエストロゲンレセプター α , β , アンドロゲンレセプター, プロゲステロンレセプターの発現

羽出山 勉¹⁾, 中安 清夫¹⁾, Ha NT¹⁾, 中村 眞二²⁾

¹⁾順天堂大学医学部眼科学教室, ²⁾順天堂大学医学部共同病理

要 約

目的: エストロゲンレセプター α , β (以下, ER α , β), アンドロゲンレセプター(以下, AR), プロゲステロンレセプター(以下, PR)のヒト角膜における局在を免疫組織化学的手法および reverse transcription polymerase chain reaction(以下, RT-PCR)を用いて検討した。

対象と方法: 剖検眼から得られたヒト角膜をホルマリン固定し, 切片作製後, 免疫染色を行いレセプターの局在を検討した。また, ヒト角膜上皮, 実質の初代培養細胞および角膜上皮層, 内皮細胞層から mRNA を抽出し, RT-PCR を行いレセプターの発現を検討した。

結果: 免疫染色の結果, ER α は角膜上皮および実

質細胞に, また, ER β , AR, PR は, 上皮, 実質, 内皮細胞で陽性を示した。RT-PCR で, ER α , β , AR の mRNA が培養上皮, 上皮細胞, 培養実質細胞で発現していた。また, PR の mRNA は, 培養上皮, 上皮層, 培養実質細胞の他, 内皮細胞でも発現していた。

結論: ER α , β , AR, PR のヒト角膜における局在が確認された。(日眼会誌 106 : 557-564, 2002)

キーワード: ヒト角膜, エストロゲンレセプター α , β , アンドロゲンレセプター, プロゲステロンレセプター

Expression of Estrogen Receptors α and β , Androgen Receptors and Progesterone Receptors in Human Cornea

Tsutomu Hadeyama, Kiyoo Nakayasu, Ha NT and Shinji Nakamura

¹⁾Department of Ophthalmology, Juntendo University School of Medicine

²⁾Department of Pathology, Juntendo University School of Medicine

Abstract

Purpose: Using immunohistochemical techniques and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), we examined the localization of estrogen receptors α and β (ER α , β), androgen receptor (AR), and progesterone receptor (PR) in human corneas.

Materials and Methods: Using formalin-fixed donor human cornea, we did immunohistochemical staining after making transverse sections, and examined the localization of receptors. Also, we extracted mRNA from primary culture cells of the corneal epithelium and stroma as well as the endothelial cell layer and epithelial layer of the cornea, and we performed RT-PCR and examined the expression of each receptor.

Results: Immunohistochemical staining revealed

that ER α was localized in corneal epithelial cells as well as in corneal stromal cells, and ER β , AR and PR were localized in corneal epithelial, stromal, and endothelial cells. ER α , ER β , and AR mRNA expression was observed in cultured and *in vivo* epithelium and cultured stroma cells. PR mRNA was expressed not only in cultured and *in vivo* epithelium and in cultured stroma cells but also in endothelium.

Conclusions: We detected the localization of estrogen receptors α and β , androgen receptors, and progesterone receptors in the human cornea. (J Jpn Ophthalmol Soc 106 : 557-564, 2002)

Key words: Human cornea, Estrogen receptors α and β , Androgen receptors, Progesterone receptors

別刷請求先: 113-8421 東京都文京区本郷 2-1-1 順天堂大学医学部眼科学教室 羽出山 勉

(平成 13 年 12 月 28 日受付, 平成 14 年 3 月 27 日改訂受理)

Reprint requests to: Tsutomu Hadeyama, M.D. Department of Ophthalmology, Juntendo University School of Medicine, 2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421, Japan

(Received December 28, 2001 and accepted in revised form March 27, 2002)

I 緒 言

エストロゲン, アンドロゲン, プロゲステロンの性ステロイドホルモンは, 生殖組織への作用のみならず, 生殖器以外の組織に対し, 細胞の増殖, 分化, 機能の調節など多彩な生理的作用を有することがわかってきた。さらに, これらのステロイドホルモンは眼組織においても, その構造や機能的活性に大きな影響を及ぼすことが明らかにされつつある^{1)~8)}。眼組織に対する具体的な生理作用としては, 蛋白質や脂質の合成と分泌, 涙液層の保持, 免疫能の亢進, 房水流出路の確保と眼圧調節, 血管の透過性に関与している可能性が推定されており^{1)~2)8)}, さらにエストロゲンは高齢者女性のドライアイに対し, 涙液分泌亢進作用が期待されており, また, 角膜の創傷治癒促進作用, さらに緑内障に対する眼圧下降作用など, 局所的治療薬としての有効性も報告³⁾⁶⁾⁸⁾⁹⁾されている。また, 角膜においては, 月経周期, 妊娠期, 閉経後に角膜形状が変化することが知られており^{10)~14)}, これらの現象もステロイドホルモンとの関連が指摘されている。しかし, これらのホルモンの眼組織に対する生理作用の正確なメカニズムに関してはほとんど明らかにされていない。そこで今回, 我々はこれらのステロイドホルモンのヒト角膜に対する作用機序解明を最終的な目的に, その第一段階としてエストロゲンレセプター α , β (以下, $ER\alpha$, β), アンドロゲンレセプター (以下, AR), プロゲステロンレセプター (以下, PR) の角膜における局在を免疫組織化学的に蛋白レベルで, および reverse transcription polymerase chain reaction (以下, RT-PCR) を用いて mRNA レベルで検索した。

II 実験方法

1. 免疫組織化学的検索

剖検眼から得られたヒト角膜 (24, 64 歳の男性, 2 眼) の一部を 4% パラホルムアルデヒドで固定した後, パラフィンに包埋し, 4 μ m の切片を作製した。脱パラフ

イン後, 抗原性の亢進を目的に切片を 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) に浸し, 121°C 10 分間オートクレーブで熱処理した。切片を流水中で冷却後, 2% ウシ胎仔血清 (FCS) アルブミンに 30 分間反応させ, 非特異吸着阻止を行った。免疫染色として Labeled StreptAvidin-Biotin (LSAB) 法を用い, 以下に示す一次抗体を 4°C, オーバーナイトで反応させた。抗 $ER\alpha$ モノクローナル抗体 (mouse 1:200, Santa Cruz, 米国), 抗 $ER\beta$ ポリクローナル抗体 (rabbit 5 μ g/ μ l Affinity BioReagents, 米国), 抗 AR モノクローナル抗体 (mouse 1:50 DAKO, 米国), 抗 PR ポリクローナル抗体 (mouse 1:200 Santa Cruz, 米国) を一次抗体として用いた。

二次抗体としてビオチンラベル抗マウスおよびラビット IgG 抗体 (1:300 DAKO) を 40 分間作用させ, さらにペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (1:300 DAKO) を 40 分間作用させた後, 基質溶液 (0.02% 過酸化水素水 + ジアミノベンチジン) を滴下し発色反応を行った。切片はメチルグリーンで核染色した後, 脱水, 封入し光学顕微鏡で観察した。陰性対照としては一次抗体の代わりにマウスまたはラビット血清を用いた。

2. RNA の抽出

剖検眼ヒト角膜 (45 歳, 男性) から上皮細胞層を含む前層 1/4 の角膜ブロックを作製し, ブロックから out growth させて初代培養上皮細胞を得た。また, 同様の角膜から, 上皮層および内皮層を剝離除去した実質ブロックから out growth させて初代培養実質細胞を得た。得られた細胞は 37°C 5% CO₂ インキュベーター内で 10% FCS 含有 Dulbecco 変法 Eagle's minimal essential medium (DMEM) で培養し, 初代培養細胞 (以後, それぞれ培養上皮細胞, 培養実質細胞) から TRIZOL Reagents (Gibco-BRL) で, プロトコールに従い, 全 RNA を抽出した。同様にヒト角膜上皮細胞層 (83 歳, 女性: 以下, 上皮細胞) 内皮細胞層 (45~83 歳, 男女混合: 以後, 内皮細胞) を直接角膜片から剝離した後, TRIZOL Reagents で全 RNA を抽出した。

表 1 Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) に用いたプライマー

プライマー	シーケンス (5' → 3')	ポジション	Expected Size
$ER\alpha$	F AATTCAGATAATCGACGCCAG	457-477	345 bp
	R CTCCTCCCTCTTACAACCTTTGTG	779-801	
$ER\beta$	F TAGTGGTCCATCGCCAGTTAT	125-145	393 bp
	R TACCACTTCACACCGAGGG	499-517	
AR	F CTCTCTCAAGAGTTTGGATGGCT	2896-2918	342 bp
	R CACTTGACAGAGATGATCTCTGC	3214-3237	
PR	F GATTTCAGAAGCCAGCCAGAG	1817-1836	533 bp
	R TGCCTCTCGCCTAGTTGATT	2330-2349	
G 3 PDH	F ACCACAGTCCATGCCATCAC		432 bp
	R TCCACCACCTGTTGCTGTA		

ER: エストロゲンレセプター, AR: アンドロゲンレセプター, PR: プロゲステロンレセプター
F: Forward R: Reverse

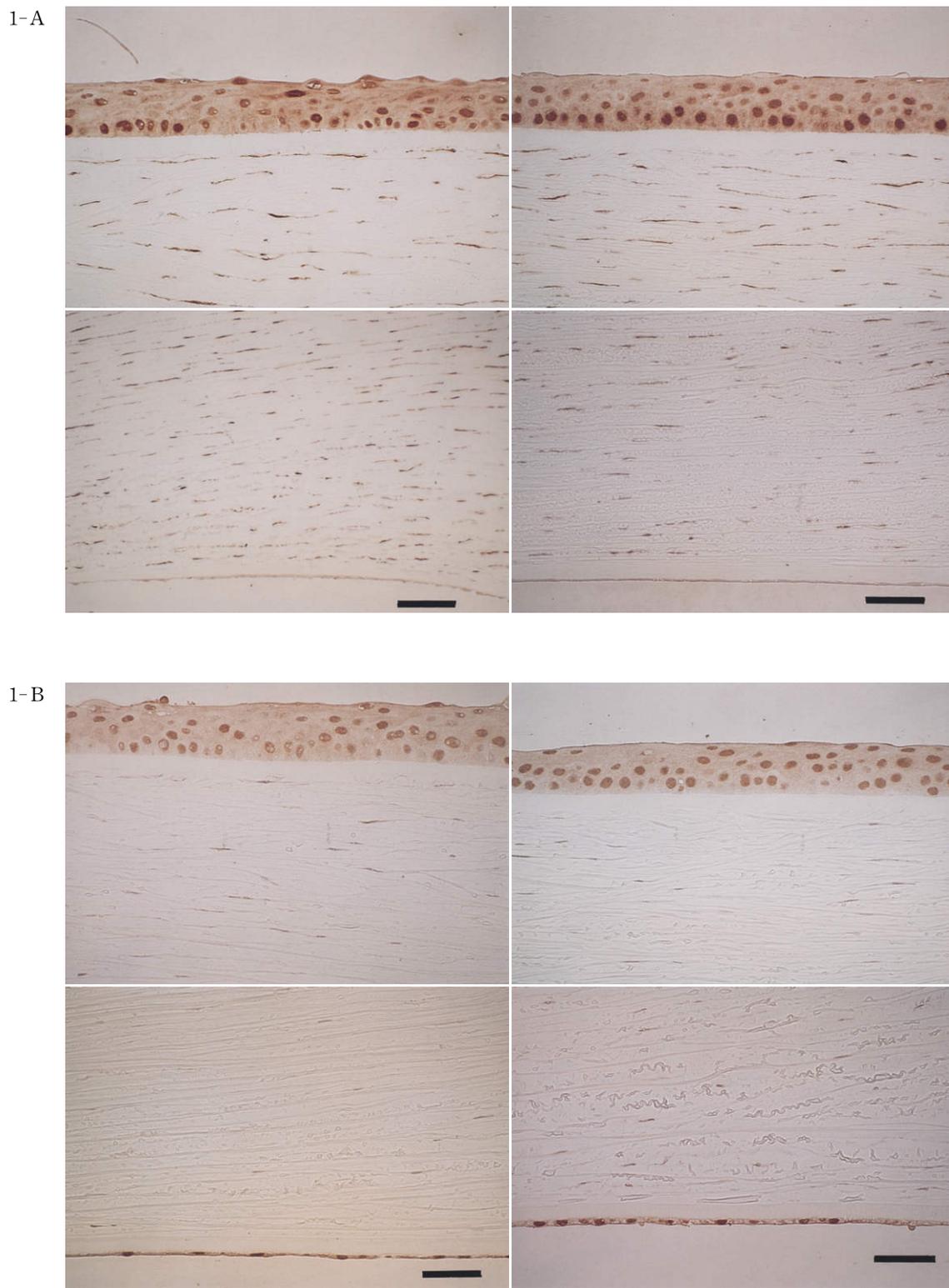
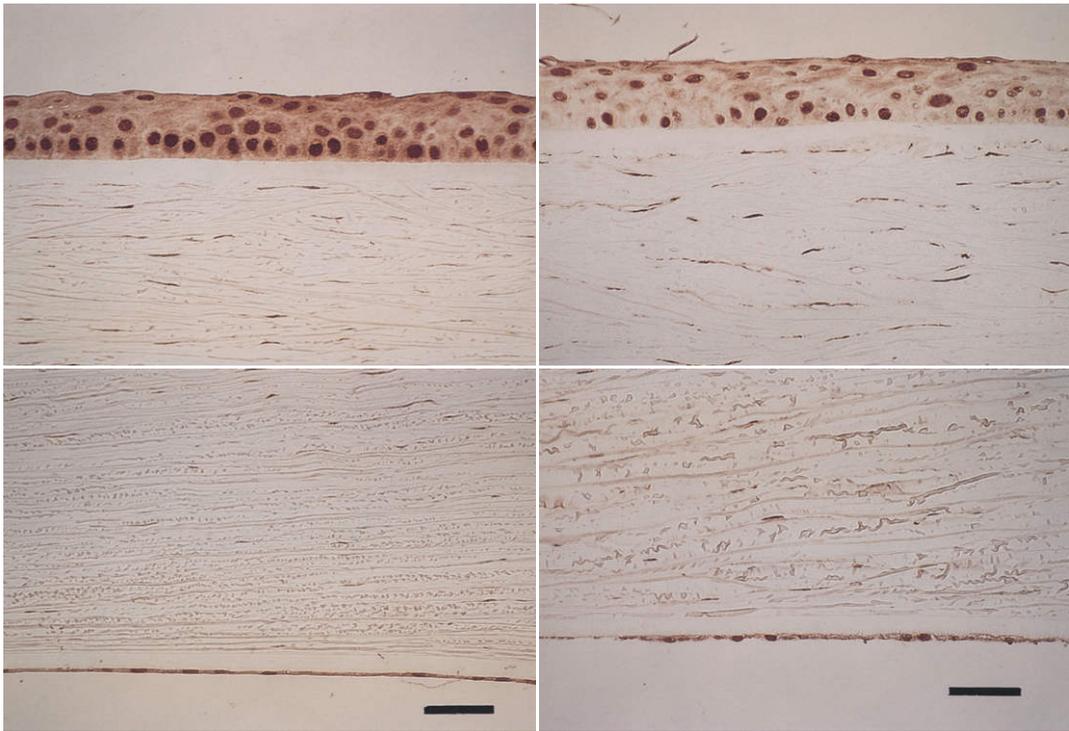


図 1 ヒト角膜におけるエストロゲンレセプター α , β (ER α , β), アンドロゲンレセプター(AR), プロゲステロンレセプター(PR)免疫染色後の光学的顕微鏡所見(核染色).

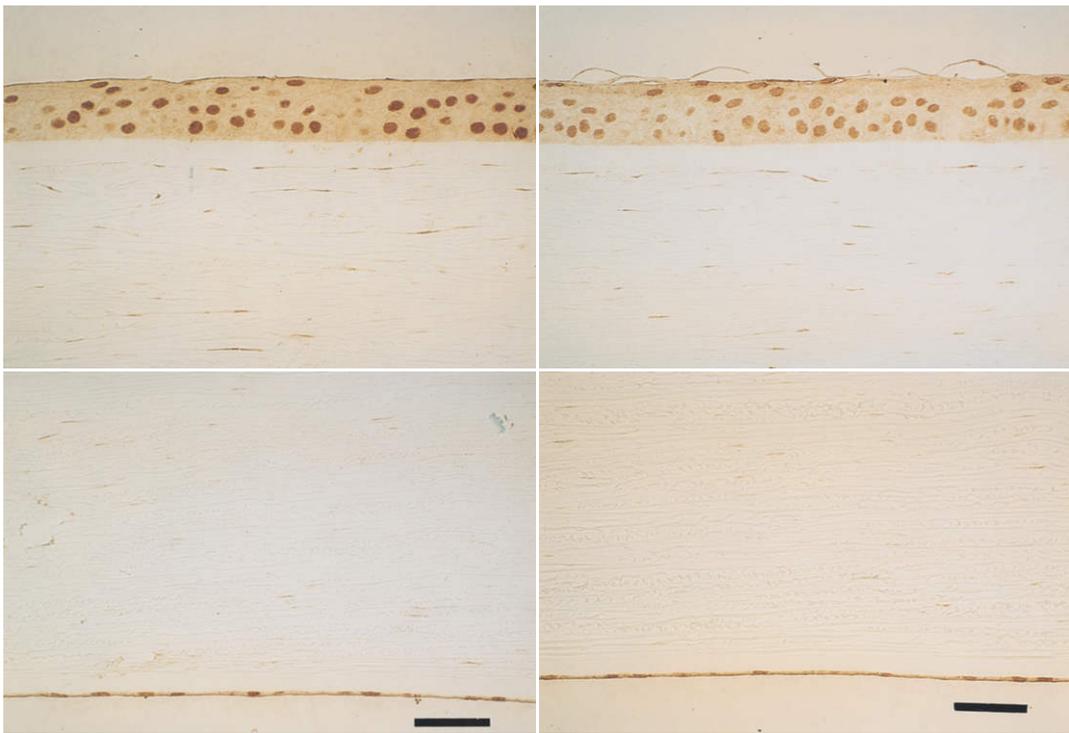
左：24 歳男性 右：64 歳男性

A：ER α , 角膜上皮, 実質に強く染色された. B：ER β , 角膜上皮, 内皮に強く染色された. C：AR, 角膜上皮, 実質および内皮に染色された. D：PR, 角膜上皮, 実質および内皮に染色された. E：マウス血清を用いた陰性対照. 角膜は全く染色されなかった. ラビット血清を用いた対照も同様の結果であった. バーは 50 μ m

1-C



1-D



1-E



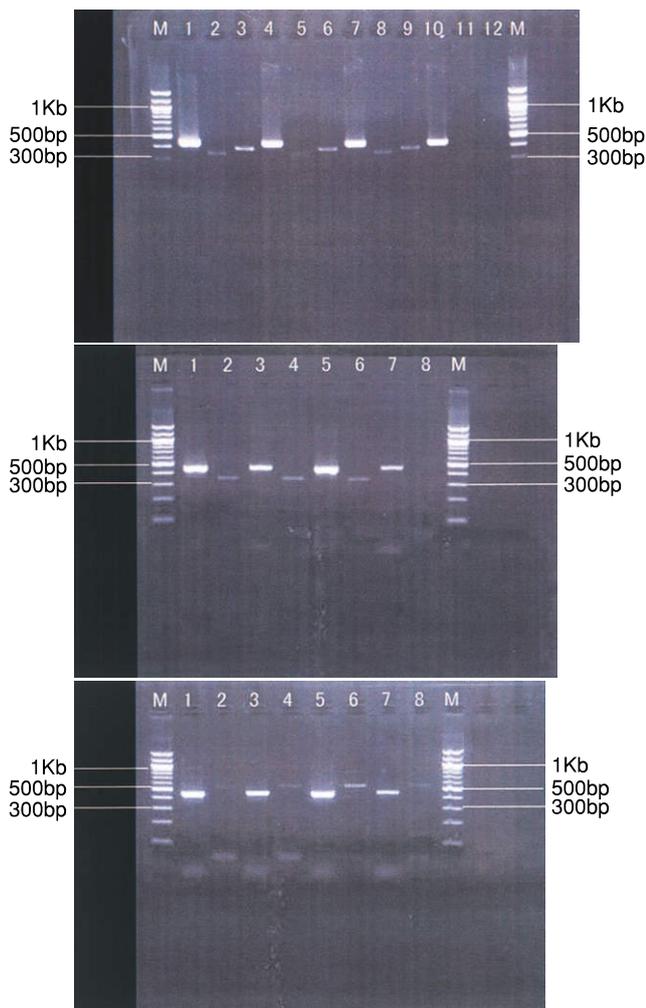


図 2 ヒト角膜における ER α , β , AR, PR の RT-PCR の結果.

上：ER α , β レーン 1~3：角膜上皮培養細胞
 1. G3PDH 2. ER α 3. ER β
 レーン 4~6：角膜上皮細胞
 4. G3PDH 5. ER α 6. ER β
 レーン 7~9：角膜実質培養細胞
 7. G3PDH 8. ER α 9. ER β
 レーン 10~12：角膜内皮細胞
 10. G3PDH 11. ER α 12. ER β
 M：マーカー 100 bp ladder

中：AR
 レーン 1.2：角膜上皮培養細胞
 1. G3PDH 2. AR
 レーン 3.4：角膜上皮細胞
 3. G3PDH 4. AR
 レーン 5.6：角膜実質培養細胞
 5. G3PDH 6. AR
 レーン 7.8：角膜内皮細胞
 7. G3PDH 8. AR
 M：マーカー 100 bp ladder

下：PR
 レーン 1.2：角膜上皮培養細胞
 1. G3PDH 2. PR
 レーン 3.4：角膜上皮細胞
 3. G3PDH 4. PR
 レーン 5.6：角膜実質培養細胞
 5. G3PDH 6. PR
 レーン 7.8：角膜内皮細胞
 7. G3PDH 8. PR
 M：マーカー 100 bp ladder

表 2 免疫染色および RT-PCR の結果

細胞		培養上皮	上皮	培養実質	実質	内皮
免疫染色 (核染色)	ER α	×	+	×	+	-
	ER β	×	+	×	+ (弱)	+
	AR	×	+	×	+	+
	PR	×	+	×	+ (弱)	+
RT-PCR	ER α	+	+	+	×	-
	ER β	+	+	+	×	-
	AR	+	+	+	×	-
	PR	+	+	+	×	+

×：未検索

25 mM MgCl₂, 10 mM dNTP, Taq ポリメラーゼ (5 U/ μ l) (Gibco-BRL) を用いた。ER α , β , AR, PR および G3PDH のプライマーを表 1 に示す。プライマーはそれぞれ既存のもの¹⁵⁾¹⁶⁾を用い、G3PDH を陽性対照とした。PCR は、denature：94°C, 60 秒, annealing：55~58°C, 30~60 秒, extension：72°C, 60 秒, re-extension：72°C, 600 秒, PCR のサイクル数は 35 回で行った。PCR 産物をエチジウムブロマイド入り 2% アガロースゲルで電気泳動し、目的とするバンドを確認した。また、オートシーケンサーで塩基配列を確認した。

III 結 果

1. 免疫組織化学的検索

剖検眼から得られた角膜片の免疫染色後の光学的顕微鏡所見を図 1 に示す。24 歳男性, 64 歳男性の角膜片ともに ER α は角膜上皮細胞および実質細胞の核で強く染色され, 内皮細胞はほとんど染色されなかった (図 1 A)。ER β は角膜上皮細胞および内皮細胞の核で強い染色性を示したが, 実質細胞はわずかな陽性染色を示すにとどまった (図 1 B)。AR (図 1 C) および PR (図 1 D) は角膜上皮, 実質, 内皮細胞すべての核で染色された。マウス血清を用いた陰性対照では角膜は全く染色されず

3. RT-PCR

全 RNA 量を 1 μ g に合わせた後, ゲノム DNA の混入をなくすため RNA を DNase で処理し, oligo(dt) primer (Gibco-BRL) および逆転写酵素 (Superscript II reverse transcriptase, Gibco-BRL) で逆転写反応を行い, cDNA を合成した。RNase H 処理をした後, このうち 2 μ l をテンプレート DNA とし, ER α , β , AR, PR およびグリセロールアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (以下, G3PDH) に対する特異的なプライマーを用いて PCR を行った。PCR 反応液は, 10 \times PCR バッファー,

(図 1 E), ラビット血清を用いた陰性対照でも同様に染色されなかった。また, 上記の結果は, 24 歳男性および 64 歳男性の両角膜片で明らかな差はなかった。

2. RT-PCR

PCR 産物のアガロースゲル電気泳動後の結果を図 2 に示す。ER α , β は, 培養上皮細胞, 上皮細胞および培養実質細胞でそれぞれ, 345 bp, 393 bp の目的とするバンドがあった(図 2 上)。しかし, 内皮細胞では, ER α , β のバンドのいずれもみられなかった。AR も培養上皮細胞, 上皮細胞および培養実質細胞で 342 bp のバンドがあり(図 2 中), PR は角膜培養上皮細胞, 上皮細胞, 培養実質細胞および内皮細胞で 533 bp のバンドがあった(図 2 下)。

免疫染色と RT-PCR の結果のまとめを表 2 に示す。

IV 考 按

今回の結果を角膜の部位別にまとめてみる。上皮細胞における免疫組織化学的検索では, 角膜片の上皮細胞の核に, また, RT-PCR では培養上皮細胞, 上皮細胞ともにすべてのレセプターの局在を確認した。RT-PCR に用いた細胞は, 培養上皮細胞が 45 歳男性の角膜から, また, 上皮細胞は 83 歳女性の角膜から得られたものである。どちらの細胞を用いても, ER α , β , AR, PR のいずれも mRNA レベルでその発現を確認できた。すなわち, ヒト角膜上皮細胞には, 男女を問わず α , β 2 種類の ER, AR, そして PR のいずれもが局在していることが明確となった。しかし, 性差, 年齢差による量的相異については, さらに詳細な検討が必要と考えられた。実質細胞に対する検索は, 免疫組織化学的には *in vivo* の角膜片を用いて検索し, RT-PCR では培養実質細胞を用いた。組織学的検索で ER β および PR に対する陽性反応が, ごく弱い反応であったものの, 両者の結果は, いずれもすべてのレセプターの局在を示していた。本実験に用いた実質細胞はいずれも男性角膜由来のものであり, 本実験では実質細胞についても性差を問うことはできなかった。内皮細胞では, 組織学的検索と RT-PCR での検索で, いずれも陰性であったものは ER α であった。一方, ともに陽性であったものは PR であった。また, ER β と AR は, 組織学的検索では陽性であったものの RT-PCR では陰性となり, 両者の結果は一致しなかった。一般的には, 上述の 2 つの方法のうち, RT-PCR がより高感度と考えられる。その RT-PCR で陽性バンドを確認できなかった原因として, 実験手技上の問題も考えられたため, 同様の実験を 3 回行ったが, いずれも陰性であった。内皮細胞における ER β , AR の局在について両方法による結果の違いを説明することはできず, 今回の実験では結論を出すことができなかった。この点について, 今後さらに追及する必要があると思われる。

エストロゲン, アンドロゲン, プロゲステロンのステロイドホルモンは, 涙腺, マイボーム腺, 結膜, 角膜, 水晶体, ぶどう膜および網膜などの眼内組織に対し, 構造的, 機能的に重要な影響を及ぼしていることが明らかにされつつある。これらのホルモンは, マイボーム腺の脂質産生, 房水流出路, 水晶体の透過性や網膜, ぶどう膜の血管透過性に間接的に作用し, 緑内障, 水晶体混濁, 糖尿病網膜症などに関与している可能性が報告¹¹⁻⁵⁾されている。角膜では, 月経周期, 妊娠や閉経期でこれらのホルモンが影響を及ぼしていると報告¹⁰⁻¹³⁾されている。月経周期における角膜の曲率半径の変化は, 月経の始めに水平, 垂直方向で曲率が急峻化し, 排卵後に平坦化する。また, 角膜の厚さは, 月経の始まりと終了時に増し, 排卵直前に最も薄くなるといった変化を呈する。これらの変化はエストロゲン血中濃度と特に良く相関している。また, 妊娠期や閉経期におけるホルモン療法としてのエストロゲンやプロゲステロンの投与時に, 角膜は厚さを増す¹²⁻¹⁴⁾。これらの事実も角膜厚に対するステロイドホルモンの影響がいかに大きいかを物語っている。また, 皮膚においても同様な変化を起こすことが知られており, 閉経後の女性の皮膚, 特に真皮の菲薄化は, エストロゲンの投与で回復することが知られている。この真皮の厚さはコラーゲン線維の増減によると考えられている¹⁷⁾¹⁸⁾。これは特に I, III 型コラーゲンの増減によるものであり, エストロゲンとの関連が報告¹⁹⁾されている。I, III 型コラーゲンは, 角膜実質の主要な構成成分であり, 上述の角膜の変化は, 真皮同様, I, III 型コラーゲン線維の増減を介したエストロゲンの影響があるものと考えられる。また, エストロゲンが皮膚におけるヒアルロン酸の合成をも増加させることが報告²⁰⁾されている。角膜におけるヒアルロン酸は, 傷害を受けた実質内に出現し, フィブロネクチンとともに, 上皮の移動や接着を誘導し, 角膜創傷治癒を促進させるが, 創傷が治癒するとほとんど消失してしまう。エストロゲンがヒアルロン酸を介して創傷治癒を促進していることは十分に考えられる。

近年, エストロゲンに対するレセプターには, α と β の 2 種類が存在することが種々の動物で確認されつつある。ER は, 核内レセプターの 1 つで, エストロゲンが核内に入って α または β レセプターと結合すると, $\alpha\alpha$, または $\beta\beta$ の 2 量体(ホモダイマー)か, α , β の 2 量体(ヘテロダイマー)となって標的遺伝子の転写を調節すると考えられている。ER α と β の発現部位は種によって異なっているらしい。ヒトでは ER α は子宮に強く発現しているのに対し, ER β は精巣での発現が強いと考えられている。両者の生理作用の相違については, まだ十分解明されていないのが現状である²¹⁾。

アンドロゲンの眼組織に対する生理作用としては, マイボーム腺の機能調節を介した涙液脂質層の安定化¹⁾,

家兎におけるアレルギー性結膜炎の抑制⁷⁾、角膜上皮の創傷治癒促進および血管新生の抑制などが報告⁵⁾⁸⁾されている。また、アンドロゲンは眼以外の組織ではあるが、プロテオグリカンの欠乏を招くような炎症を抑制すると報告²²⁾されている。プロテオグリカンはコラーゲン線維の間隙に存在し、線維の配列、線維間距離の調整に関与し、角膜の透明性維持に重要な役割を果たしている。アンドロゲンが角膜でも同様に作用し、角膜の透明性に影響を及ぼすことが今後明らかにされるかも知れない。

プロゲステロンは、妊娠中、その血中濃度が角膜厚と相関しており²³⁾、エストロゲンと同様の角膜に対する影響を有しているものと思われる。

Tachibana ら²⁴⁾はマウスを用いた実験で、ER α , β の局在を雄・雌ともに角膜上皮、実質、内皮のすべての細胞にみられている。この報告と今回の我々の結果の違いは内皮における局在である。我々は前述の通り、ER α は確認できず、また ER β についても明確な結論は得られていない。動物種による違い、抗体やプライマーによる違いなどが考えられるが、今後さらに実験を重ね検討する必要がある。さらに、Suzuki ら²⁵⁾は 49 歳の男性ヒト角膜において ER α , AR, PR の免疫組織化学的検索で角膜上皮、実質、内皮で陽性染色があり、さらに、74 歳男性および 68 歳女性の角膜から得られた上皮細胞で RT-PCR を行い、各レセプターの mRNA の発現を報告している。今回の我々の検討では、組織学的検索に 24 歳と 64 歳の男性角膜片を用いて年齢的な相違についても検討した。また、ER については ER α のみならず、ER β についても検討している。さらに、RT-PCR による mRNA の発現は上皮細胞のみならず、培養実質細胞、内皮細胞についても行っている。表 2 に示した我々の結果と、Suzuki らの結果との相違点は、内皮細胞における ER α の局在である。Suzuki らは ER α の内皮細胞における局在を示しているものの、我々は内皮細胞における ER α の局在を確認することができなかった。組織学的検索に用いた抗体による違いと考えることもできるが、我々の RT-PCR の結果でも、内皮細胞における mRNA の発現が確認されず、我々は ER α は内皮細胞には局在していないと結論した。また、ER β の角膜における蛋白質レベル、mRNA レベルにおける局在、培養実質細胞、内皮細胞における各ホルモンのレセプターを mRNA レベルで検索したのは我々のこの報告が初めてと思われる。

Wickham ら²⁶⁾は角膜以外、ラット、家兎、ヒトの涙腺、マイボーム腺、眼瞼、結膜、虹彩・毛様体、網膜・脈絡膜にも ER α , AR, PR の mRNA が発現していることを報告している。また、エストロゲン、アンドロゲン、プロゲステロンは涙腺、房水、硝子体や網膜に存在することが確認されており^{27)~30)}、角膜、虹彩、毛様体、

水晶体や網膜で代謝されることが示されている^{31)~33)}。このように眼組織は、角膜を含めた大部分の組織がステロイドホルモンの標的組織であり、ステロイドホルモンの作用を多様な形で受けている可能性がある。今回の結果から、ヒト角膜においては ER, AR, PR が局在していることが判明した。今後は、それぞれのステロイドホルモンの角膜局所における生理作用を解明をしていく必要があると思われる。また、前述した通り、上記の性ステロイドホルモンは特に角膜厚の調節と強く関連していることが知られている。その点に注目すると、角膜中央部分が菲薄化する円錐角膜などの疾患の病因に関与していることも十分に考えられる。その点についても今後の検討課題と考えている。

文 献

- 1) Sullivan DA, Rocha EM, Ullman MD, Krenzer KL, Gao J, Toda I, et al : Androgen regulation of the Meibomian gland. *Adv Exp Med Biol* 438 : 327-331, 1998.
- 2) Kambert BW : The effects of progestins and estrogens on the permeability of the lens. *Arch Ophthalmol* 80 : 230-234, 1968.
- 3) Knepper PA, Collins JA, Frederick R : Effect of dexamethasone, progesterone, and testosterone on IOP and GAGs in the rabbit eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26 : 1093-1100, 1985.
- 4) Haffner SM, Klein R, Dunn JF, Moss SE, Klein BE : Increased testosterone in type I diabetics with severe retinopathy. *Ophthalmology* 97 : 1270-1274, 1990.
- 5) Hitawari S : Protein anabolic steroids in ophthalmology. *Ber Dtsch Ophthal Ges* 65 : 424-426, 1963.
- 6) Tsai TH, Scheving LE, Scheving LA, Pauly JE : Sex differences in circadian rhythms of several variables in lymphoreticular organs, liver, kidney, and corneal epithelium in adult CD 2 F₁ mice. *Anat Rec* 211 : 263-270, 1985.
- 7) Saruya S : Studies on allergic conjunctivitis. Effect of castration and sex hormone administration on experimental allergic conjunctivitis. *Acta Soc Ophthalmol Japonicae* 72 : 833-845, 1968.
- 8) Schumacher H, Macherer R : Experimental investigations on the treatment of cortisone lesions of the cornea. *Clin Monatsbl Augenheilkd* 148 : 121-126, 1966.
- 9) Sullivan DA, Wickham LA, Rocha EM, Krenzer KL, Sullivan BD, Steagall R, et al : Androgens and dry eye in Sjögren's syndrome. *Ann NY Acad Sci* 876 : 312-324, 1999.
- 10) Guttridge NM : Changes in ocular and visual variables during the menstrual cycle. *Ophthalmic Physiol Opt* 14 : 38-48, 1994.
- 11) Kiely PM, Carney LG, Smith G : Menstrual cycle

- variations of corneal topography and thickness. *Am J Optom Physiol Opt* 60 : 822—829, 1983.
- 12) **Imafidon CO, Imafidon JE** : Contact lenses in pregnancy. *Br J Obstet Gynecol* 99 : 865—868, 1992.
 - 13) **Park SB, Lindahl KJ, Temnycky GO, Aquavella JV** : The effect of pregnancy on corneal curvature. *CLAO J* 18 : 256—259, 1992.
 - 14) **Sorrentino C, Affinito P, Mattace RF, Loffredo M, Merlino P, Loffredo A, et al** : Effect of hormone replacement therapy on postmenopausal ocular function. *Minerva Ginecol* 50 : 19—24, 1998.
 - 15) **Lau KM, Mok SC, Ho SM** : Expression of human estrogen receptor- α and- β , progesterone receptor, and androgen receptor mRNA in normal and malignant ovarian epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 : 5722—5727, 1999.
 - 16) **Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, et al** : Human estrogen receptor β -gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 82 : 4258—4265, 1997.
 - 17) **Brincat M, Moniz CF, Studd JW, Darby AJ, Mogos A, Cooper D** : Sex hormone and skin collagen content in postmenopausal women. *Br Med J (Clin Res ED)* 5 : 1337—1338, 1983.
 - 18) **Brincat M, Moniz CF, Kabalan S, Versi E, O'Dowd T, Mogas AL, et al** : Decline in skin collagen content and metacarpal index after the menopause and its prevention with sex hormone replacement. *Br J Obstet Gynaecol* 94 : 126—129, 1987.
 - 19) **Affinito P, Palomba S, Sorrentino C, Di Carlo C, Bifulco G, Arienzo MP, et al** : Effects of postmenopausal hypoestrogenism on skin collagen. *Maturitas* 33 : 239—247, 1999.
 - 20) **Uzuka M, Nakajima K, Ohta S, Mori Y** : The mechanism of estrogen-induced increase in hyaluronic acid biosynthesis, with special reference to estrogen receptor in the mouse skin. *Biochim Biophys Acta* 17 : 199—206, 1980.
 - 21) **藤田雅代, 福岡秀興, 井上 聡** : エストロゲン受容体の組織特異性. *Annual Review 内分泌. 代謝* 2001. I. トピックス C. 内分泌 : 68—73, 2001.
 - 22) **Da Silva JA, Larbre JP, Seed MP, Cutolo M, Villaggio B, Scott DL, et al** : Sex differences in inflammation induced cartilage damage in rodents. The influence of sex steroids. *F Rheumatol* 21 : 330—337, 1994.
 - 23) **Ziai N, Ory SJ, Khan AR, Brubaker RF** : Beta-human chorionic gonadotropin, progesterone, and aqueous dynamics during pregnancy. *Arch Ophthalmol* 112 : 801—806, 1994.
 - 24) **Tachibana M, Kasukabe T, Kobayashi Y, Suzuki T, Kinoshita S, Matsushima Y** : Expression of estrogen receptor α and β in the mouse cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 668—670, 2000.
 - 25) **Suzuki T, Kinoshita S, Tachibana M, Matsushima Y, Kobayashi Y, Adachi W, et al** : Expression of sex steroid hormone receptors in human cornea. *Curr Eye Res* 22 : 28—33 2001.
 - 26) **Wickham LA, Gao J, Toda I, Rocha EM, Ono M, Sullivan DA** : Identification of androgen, estrogen and progesterone receptor mRNA in the eye. *Acta Ophthalmol* 8 : 146—153, 2000.
 - 27) **Coles N, Lubkin V, Kramer P, Weinstein B, Southren L, Vittek J** : Hormonal analysis of tears, saliva, and serum from normals and postmenopausal dry eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci (Suppl)* 29 : 48, 1988.
 - 28) **Lanthier A, Patwardhan VV** : Sex steroids and 5-en-3 β -hydroxysteroids in specific regions of the human brain and cranial nerves. *J Steroid Biochem Mol Biol* 25 : 445—449, 1985.
 - 29) **Starka J, Obenberger J** : Identification and radioimmunologic estimation of sexual steroid hormones in aqueous humor and vitreous of rabbit eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 199 : 261—266, 1976.
 - 30) **Ploc I, Starka L** : Testosterone binding in the cytosol of bovine corneal epithelium. *Exp Eye Res* 28 : 111—119, 1979.
 - 31) **Lanthier A, Patwardhan VV** : *In vitro* steroid metabolism by rat retina. *Brain Res* 463 : 403—406, 1988.
 - 32) **Southren AL, Altman K, Vittek J, Boniuk V, Gordon GG** : Steroid metabolism in ocular tissues of the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 15 : 222—228, 1976.
 - 33) **Starka L, Obenberger J** : *In vitro* estrone-estradiol-17 b interconversion in the cornea, lens, iris and retina of the rabbit eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 196 : 199—204, 1975.