

凍結保存羊膜組織のビタミン A 定量分析

野崎まゆみ¹⁾, 川原 純一²⁾, 村松 隆次¹⁾, 臼井 正彦¹⁾¹⁾東京医科大学眼科学教室, ²⁾川原眼科医院

要 約

目的：細胞の増殖や分化に關与するビタミン A 誘導体が羊膜移植における創傷治癒過程に貢獻しているかを調べるため、羊膜組織におけるビタミン A の存在とその定量分析を行った。

対象と方法：3 症例の帝王切開手術から得られた凍結ヒト胎膜を使用した。羊膜の抽出を行い、逆相高速液体クロマトグラフィ、多波長検出器、そして蛍光検出器を用いて、ビタミン A 誘導体である retinol (ROL), retinaldehyde (RAL), retinoic acid (RA), ならびに retinyl palmitate (RP) を測定した。

結果：ROL は羊膜には平均 9.42 ± 2.75 (平均値 \pm

標準偏差) ng/g wet tissue で検出された。RAL, RA, ならびに RP は検出されなかった。

結論：羊膜組織中に検出されたビタミン A は retinol のみであり、その含有量はごく微量であった。これらの結果から、羊膜組織に存在するビタミン A が羊膜移植における角結膜上皮の創傷治癒に關与している可能性は少ないことが考えられた。(日眼会誌 109 : 727-735, 2005)

キーワード：羊膜, ビタミン A, 高速液体クロマトグラフィ

Quantitative Determination of Vitamin A Levels in Frozen Preserved Human Amniotic Membrane

Mayumi Nozaki¹⁾, Junichi Kawahara²⁾, Ryuji Muramatsu¹⁾ and Masahiko Usui¹⁾¹⁾Department of Ophthalmology, Tokyo Medical University, ²⁾Kawahara Eye Clinic

Abstract

Purpose : Retinoids are associated with cell proliferation and differentiation. The levels of retinoids (vitamin A and its derivatives) in human amniotic membrane (AM) were measured to investigate whether endogenous retinoids in AM might contribute to the process of wound healing of the keratoconjunctival epithelium in AM transplantation.

Subjects and methods : Retinoids were extracted from AM obtained from three patients following cesarean section. Retinoids including retinol (ROL), retinaldehyde (RAL), retinoic acid (RA), and retinyl palmitate (RP) were analyzed using a reverse-phase high performance liquid chromatograph equipped with a multi-wavelength detector or fluorescence detector.

Results : ROL was identified and detected in AM at a concentration of 9.42 ± 2.75 (mean \pm standard deviation) ng/g wet tissue. No other retinoids, were detected.

Conclusion : Among the retinoids tested, only retinol was detected at low levels in human AM tissues. Based on these results, endogenous retinoids in AM probably have little effect on wound healing of the keratoconjunctival epithelium in AM transplantation.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 109 : 727-735, 2005)

Key words : Amniotic membrane, Vitamin A, High-performance liquid chromatography

I 緒 言

近年、重症の Stevens-Johnson 症候群、化学腐食や類天疱瘡といった難治性の瘢痕性角結膜疾患に対して、

羊膜移植術を併用した再建術の有用性が報告されている。残存する角結膜上皮細胞や移植された角膜幹細胞が羊膜を基質として、遊走、増殖、分化という一連の創傷治癒過程を経て、著明な線維化瘢痕を来さずに眼表面の

別刷請求先：160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学眼科学教室 野崎まゆみ
(平成 16 年 8 月 2 日受付, 平成 17 年 2 月 16 日改訂受理)

Reprint requests to : Mayumi Nozaki, M. D. Department of Ophthalmology, Tokyo Medical University, 6-7-1 Nishishinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 160-0023, Japan

(Received August 2, 2004 and accepted in revised form February 16, 2005)

再建を得られることが臨床的に報告¹⁾⁻⁵⁾されている。

羊膜組織の細胞外基質には Type IV コラーゲンやラミニンが含まれていることから、角結膜上皮細胞に対する基質供給として作用していると推測されている⁶⁾⁷⁾。一方、epidermal growth factor (EGF), keratinocyte growth factor (KGF) など角膜上皮の創傷治癒を促進する増殖因子⁸⁾⁹⁾が羊膜上皮に存在することや¹⁰⁾、インターロイキン-10 (IL-10) などの免疫抑制因子が羊膜上皮細胞に存在すること¹¹⁾など、羊膜上皮細胞の存在が羊膜移植術の奏効機序に関与する報告もある。さらに、角膜の線維芽細胞を羊膜上で培養すると角膜の transforming growth factor (TGF- β) およびそのレセプターの発現が抑制されることが報告¹²⁾されている。また、移植羊膜上に再生した結膜上皮が通常よりも高密度の杯細胞を有していることも確認されている¹³⁾。しかしながら、奏効機序に関する羊膜の因子については十分明らかではない。

ビタミン A とその誘導体、すなわちレチノイドは細胞の分化と増殖に重要な役割を果たしている¹⁴⁾⁻¹⁷⁾。角結膜上皮細胞においては、ビタミン A の欠乏が起こると、杯細胞の著明な低下や消失といった角結膜の分化異常が始まる¹⁸⁾。さらに、この進行に伴う角膜上皮の角化現象や杯細胞の消失による乾燥などの臨床所見がレチノイド局所投与により著明に改善することが知られていることから¹⁹⁾²⁰⁾、レチノイドは少なからず角結膜上皮の分化の恒常に貢献していると考えられている。

レチノイドは発生過程においては、胎児の正常な形態形成作用を誘導することが知られている²¹⁾²²⁾。胎児環境を構成する胎盤ならびに羊水中にレチノイドやその結合蛋白が検出されること²³⁾²⁴⁾などから、羊膜組織においても同様にレチノイドが存在する可能性が考えられる。しかし、ヒト羊膜におけるレチノイドの直接的な検出は現在までなされていない。そこで、今回ヒト羊膜組織中のレチノイドを逆相高速液体クロマトグラフィ (reverse-phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC) を用いて定量分析した。

II 実験方法

1. 標準試料

標準試料として、all-trans retinol (at-ROL, ACROS), all-trans retinoic acid (at-RA, ACROS), 13-cis retinoic acid (13-cisRA, ACROS), all-trans retinal (at-RAL, SIGMA), all-trans retinyl palmitate (at-RP, SIGMA), そして 9-cis retinoic acid (9-cis RA, WAKO) を使用した。内部標準試料として、all-trans-9-(4-Methoxy-2,3,6-trimethylphenyl)-3,7-dimethyl-2,4,6,8-nonatetraen-1-ol (TMMP-ROL) と all-trans-9-(4-Methoxy-2,3,6-trimethylphenyl)-3,7-dimethyl-2,4,6,8-nonatetraenoic acid (Acitretin) を使用した。

これらは、Hoffman-Roche 研究所 (スイス) から提供された。TMMP-ROL は ROL ならびに RAL, Acitretin は RA に対する内部標準試料として使用した。

2. ヒト組織

ヒト胎膜を試料として使用した。3 症例の帝王切開手術から得られた胎膜を 0.005% オフロキサシン添加生理食塩水で洗浄した後、0.5 M, 1.0 M, 1.5 M dimethyl sulfoxide (DMSO) 液でそれぞれ洗浄し、遮光し -80°C で凍結保存した。なお、ヒト羊膜はインフォームド・コンセントを行った上で使用した。

3. レチノイド測定

1) 試料

凍結保存された試料は採取後 3 週間以内に解凍した。約 10×10 cm の胎膜を実体顕微鏡で羊膜と絨毛膜に分離後、各々の湿重量を測定した。実体顕微鏡下での光異性を最小限にするため、実体顕微鏡に紫外線吸収レンズ (CCG G-YL, 東海光学) を装着した。これらの試料に n-propyl gallete (50 μ g/l, SIGMA) 含有リン酸緩衝液 (PBS) を 2 ml 加え、ガラス製ホモジネーターで磨砕した。その懸濁液を 10 ml ガラス試験管に移し、各々に TMMP-ROL (60 pmol/10 μ l), Acitretin (60 pmol/10 μ l) の内部標準試料を混和し、レチノイドの抽出を行った。

2) レチノイド抽出

① at-ROL, at-RAL, at-RA

抽出方法は、Napoli²⁵⁾ の alkaline ethanol/hexane ; acidic ethanol/hexane 法に準じた。すなわち、試料に塩化ナトリウム 0.5 g, 0.025 規定水酸化カリウムと 50 μ g/ml BHT (t-butyl hydroxy toluene, SIGMA) 含有エタノール 2 ml を加えた。そして、50 μ g/ml BHT 含有 n-ヘキサン 4 ml を加えた上で遠心分離 (3,000 rpm, 5 分間) を行った。この抽出操作を 2 回行い、合計 8 ml のアルカリン・ヘキサン抽出液を窒素気流中で溶媒留去を行った。さらに、水相に 4 規定塩酸 167 μ l を加えた後、50 μ g/ml BHT 含有 n-ヘキサン 4 ml を加え遠心分離を行う同様な抽出操作を 2 回行い、合計 8 ml の酸性ヘキサン抽出液を溶媒留去した。

② at-RP

抽出は Smith²⁶⁾ の方法に準じた。すなわち、試料に蒸留水を 2 ml 加え、磨砕後ガラス試験管に移し、1 g/l n-propyl gallete 含有エタノールを 1 ml, 10.1 mol/l 水酸化カリウム 0.5 ml を加え、50°C の水槽 (30 分) でけん化を行った。その後、氷上で 10 分間冷却し、蒸留水 1 ml を加えた。これに n-ヘキサン 4 ml を加え遠心分離 (1000 rpm, 10 分間) を 2 回行った。合計 8 ml のヘキサン抽出液は同様に溶媒留去を行った。

3) RP-HPLC 測定

レチノイド測定には、JASCO 社製 intelligent HPLC ポンプモデル PU-1580, MD-1510 検出機, multichan-

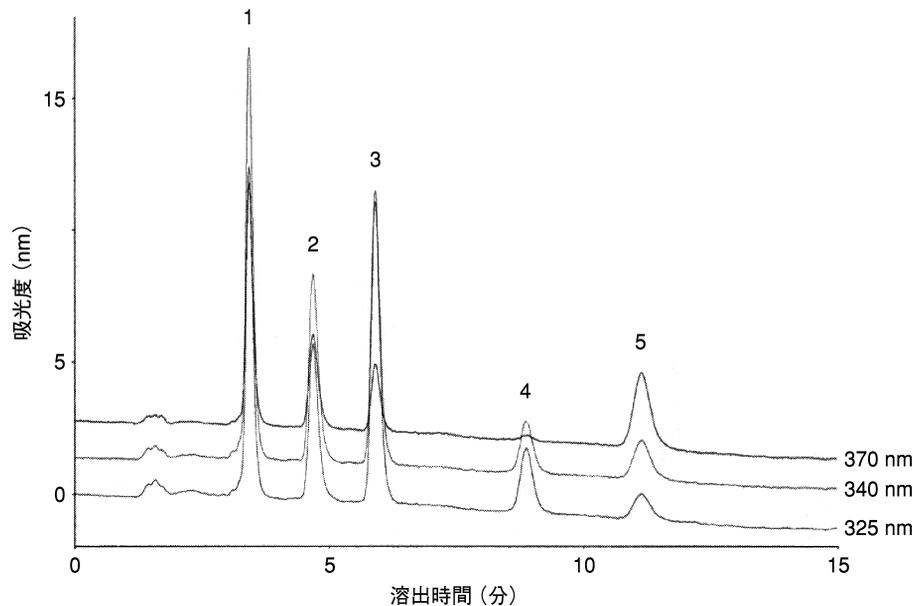


図 1 All-trans retinol(at-ROL)の標準サンプルクロマトグラフィを示す。

検出条件は、カラム Waters 社製 μ Bondapak (C 18 カラム, 3.9×300 mm), 移動相は 70% アセトニトリル; 20% 蒸留水, 流速は 1.5 ml/分であり, at-ROL が 325 nm に, all-trans retinol(at-RAL)が 370 nm に検出された。

1. all-trans-9-(4-Methoxy-2,3,6-trimethyl-phenyl)-3,7-dimethyl-2,4,6,8-nonatetraenoic acid (Acitretin)
2. all-trans retinoic acid(at-RA)
3. all-trans-9-(4-Methoxy-2,3,6-trimethylphenyl)-3,7-dimethyl-2,4,6,8-non-atetraen-1-ol(TMMP-retinol)
4. at-ROL
5. at-RAL

nel program JASCO-PDA, FP 2020 蛍光検出器を使用した。HPLC カラムには Waters 社製 μ Bondapak (C 18 カラム, 3.9×300 mm)を使用した。

① at-ROL, at-RAL

移動相は 70% アセトニトリル:30% 蒸留水(10 mM $C_2H_3CO_2NH_3$ 含有), 流速 1.5 ml/分, 紫外線吸光度 (at-ROL は 325 nm, at-RAL は 370 nm)の条件とし, 試料を 150 μ l 移動相に溶解後, その 100 μ l をカラムに注入して測定を行った(図 1)。標準試料のクロマトグラムで得られた各レチノイドの平均溶出時間から, 試料に含まれるレチノイドのピークを割り出し, そのピーク分析はスペクトル解析により同定を行った。また, 定量は, 内部標準試料と標準試料のピークの高さ比から検量直線を作成し, 組織湿重量当りの含有量として定量した。

② at-RA, 13-cis RA, 9-cis RA

移動相は 70% メタノール:30% 蒸留水(10 mM $C_2H_3CO_2NH_3$ 含有), 流速 1.5 ml/分, 紫外線吸光度 340 nm の条件とし, 試料を 150 μ l 移動相に溶解後, その 100 μ l をカラムに注入して測定を行った(図 2)。また, 同定は同様にスペクトル解析で行った。

③ at-RP

移動相は 100% メタノール, 流速は 1.5 ml/分, 蛍光測定(励起波長 325 nm, 蛍光波長 370 nm)の条件で, 試料を 50 μ l 移動相に溶解後, その 20 μ l をカラムに注入

し測定を行った(図 3)。

III 結 果

1. at-ROL

羊膜と絨毛膜のクロマトグラムは標準試料の at-ROL とほぼ同じ溶出時間にピークが検出され, そのスペクトル解析で紫外線吸光度 325 nm にピークを認めたことから, 両組織に retinol が存在することが示された(図 4)。そして, 羊膜と絨毛膜に含有する at-ROL 濃度は, それぞれ 9.42 ± 2.75 (平均値 \pm 標準偏差) ng/g wet tissue weight (n=3) と 13.73 ± 1.22 ng/g wet tissue weight (n=3) であった。

2. at-RAL

羊膜と絨毛膜のクロマトグラムで, 標準試料の at-RAL と溶出時間が一致するピークは認められず, 両組織に at-RAL は検出されなかった。

3. RP

羊膜のクロマトグラムで, 標準試料の溶出時間に一致する RP のピークは認められず, 羊膜に RP は検出されなかった(図 5)。

4. at-RA

羊膜と絨毛膜のクロマトグラムで, 標準試料の at-RA とほぼ同じ溶出時間にピークが検出されたが, スペクトル解析では紫外線吸光度 340 nm にピークを認められず, 両組織には at-RA は検出されなかった(図 6)。

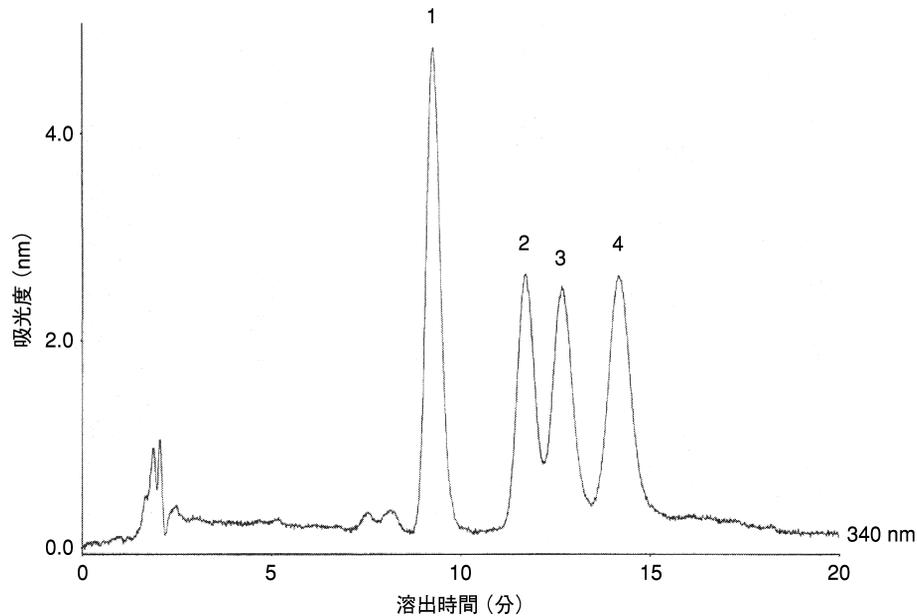


図 2 At-RA の標準サンプルクロマトグラフィを示す。

検出条件は、カラム Waters 社製 μ Bondapak (C18 カラム, 3.9×300 mm), 移動相は 70% メタノール; 30% 蒸留水, 流速は 1.5 ml/分であり, 340 nm で検出された。

1: Acitretin 2: 13-cis retinoic acid (13-cis RA) 3: 9-cis retinoic acid (9-cis RA) 4: at-RA

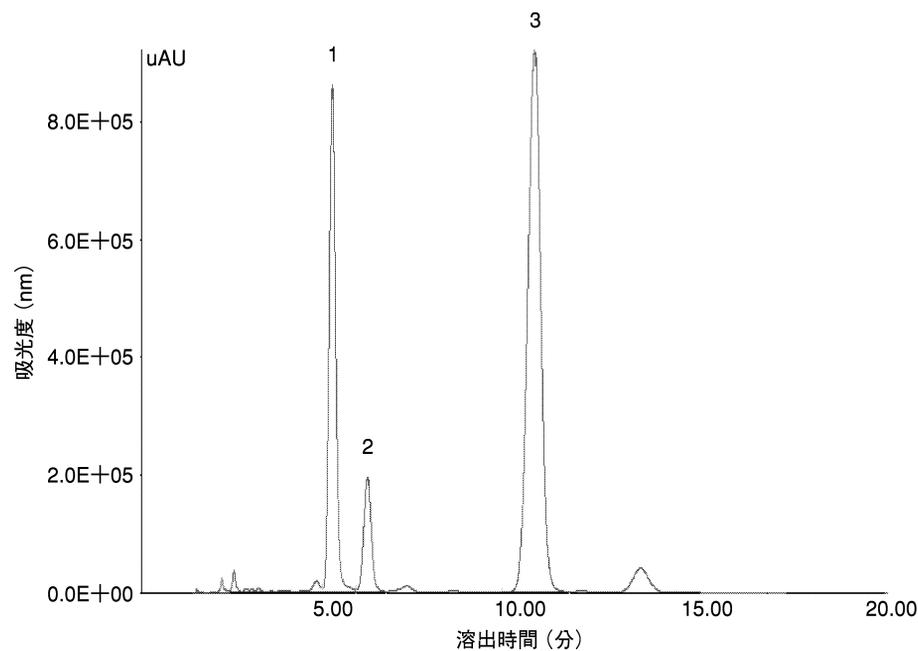


図 3 All-trans retinyl palmitate (at-RP) の標準サンプルクロマトグラフィを示す。

検出条件は、カラム Waters 社製 μ Bondapak (C18 カラム, 3.9×300 mm), 移動相は 100% メタノール, 流速は 1.5 ml/分であり, 励起波長 325 nm, 蛍光波長 370 nm で検出された。

1: α -tocopherol 2: α -tocopherol acetate 3: at-RP

IV 考 按

今回、凍結保存された羊膜組織中のビタミン A 測定を行った。稲富ら²⁷⁾は凍結保存方法は DMSO, グリセロール, いずれの方法においても羊膜上皮の形態は良好

に保たれ, 羊膜上皮は移植後も眼表面に生着すると報告していることから, 今回の測定結果は, 移植時における羊膜組織のビタミン A の含有量を反映していると考えられた。また, 胎膜は -80°C で凍結保存され, 採取後 3 週間以内に定量分析が行われたことを加味し, 凍結保存

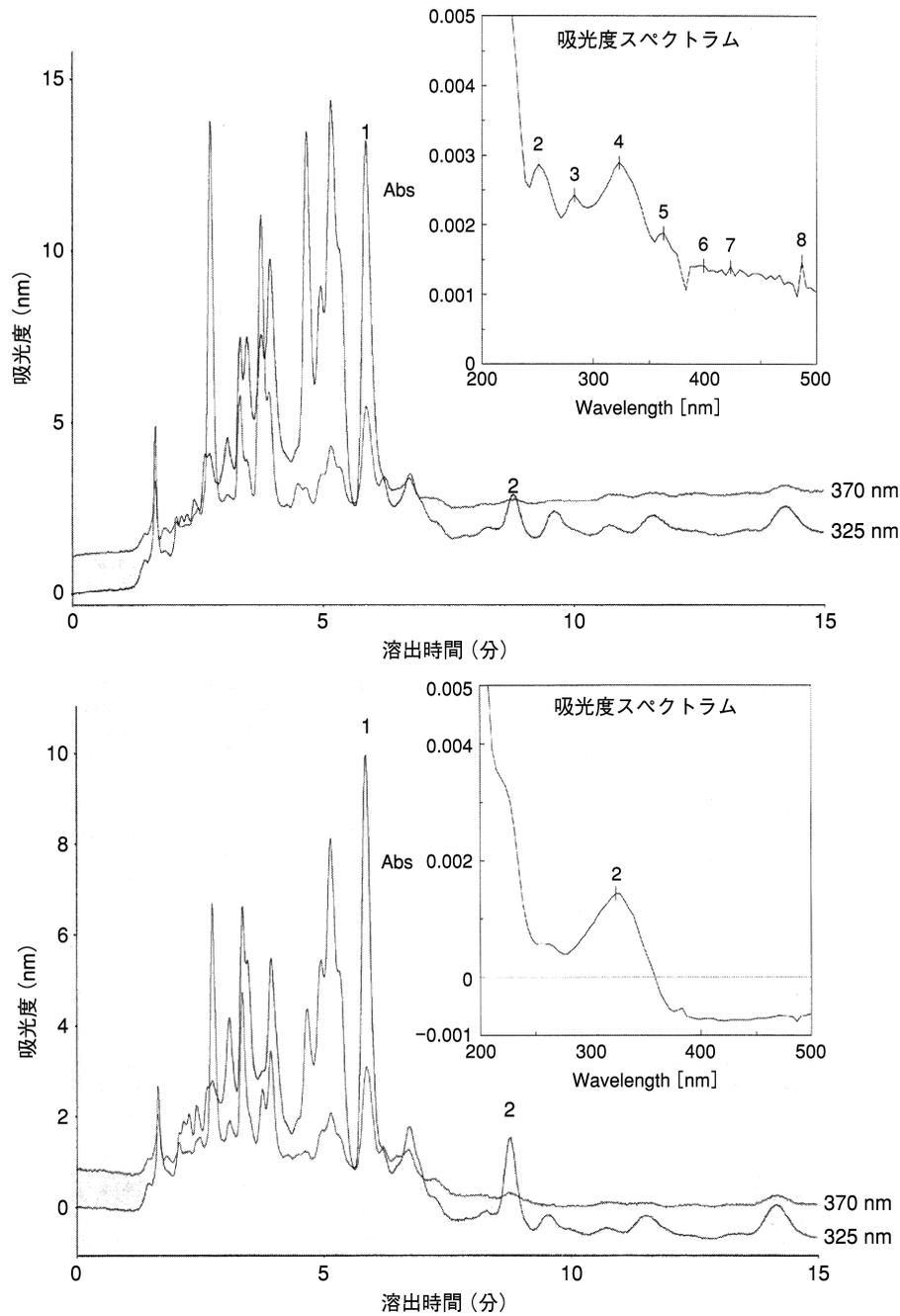


図 4 羊膜, 絨毛膜における at-ROL の検出クロマトグラフィを示す。
標準試料と同じ溶出時間のピーク(2)はスペクトル解析により紫外線吸光度 325 nm にピークを認め、at-ROL と同定された。

1 : 60 pmol TMMP-retinol 2 : 内因性 at-ROL

によるビタミン A 影響は著しくないものと推測した。

羊膜組織におけるビタミン A に関する報告では、Wallingford ら²³⁾や Koskinen ら²⁴⁾は羊水における at-ROL の存在を報告している。また、Gao ら²⁸⁾はウシ胎膜由来の retinol-binding protein (RBP) が羊膜組織のうち上皮細胞のみに局在を認め、羊膜上皮細胞における at-ROL の存在を間接的に証明している。今回の研究において、羊膜組織の at-ROL を検出したが、その RBP の局在を考慮すると、検出された at-ROL は羊膜基質よ

りもむしろ羊膜上皮細胞層に存在しているものと考えられた。一方、絨毛膜では羊膜と比較し、より多くの at-ROL が含まれていた。これは、絨毛膜は豊富な血管を有することから、血液の混入による結果と判断した。これらのことから、at-ROL は絨毛膜の血管系より絨毛膜ならびに羊膜の其質を經由し、羊膜上皮へ輸送される可能性が考えられるが、これら組織間における at-ROL の輸送蛋白である retinol-binding protein の存在は現在のところ明らかではない。また、羊水には at-ROL が存在

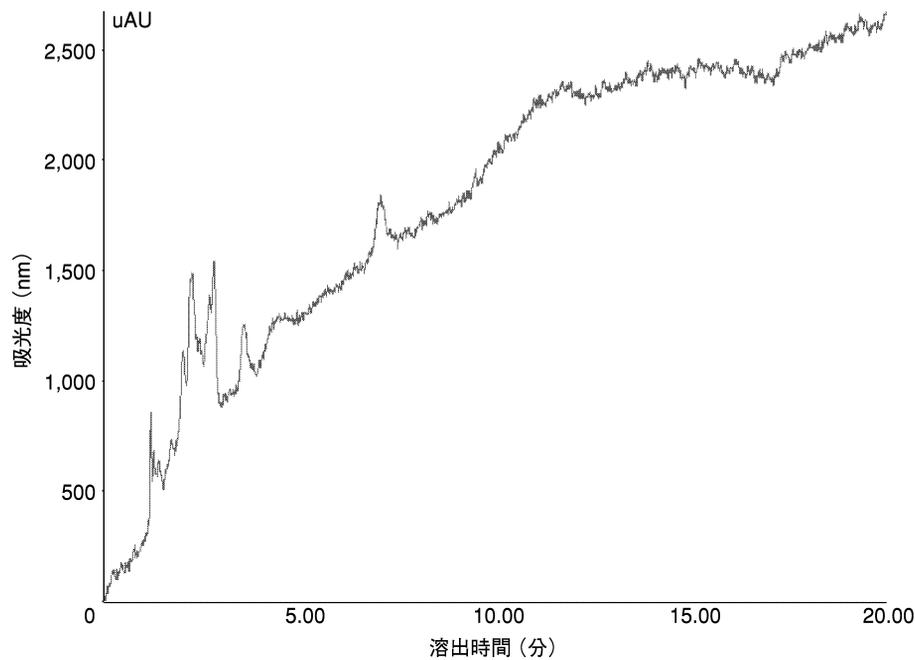


図 5 羊膜組織における RP の検出クロマトグラフィを示す。
標準試料溶出時間と一致する RP のピークは認められず、羊膜中に RP は認められなかった。

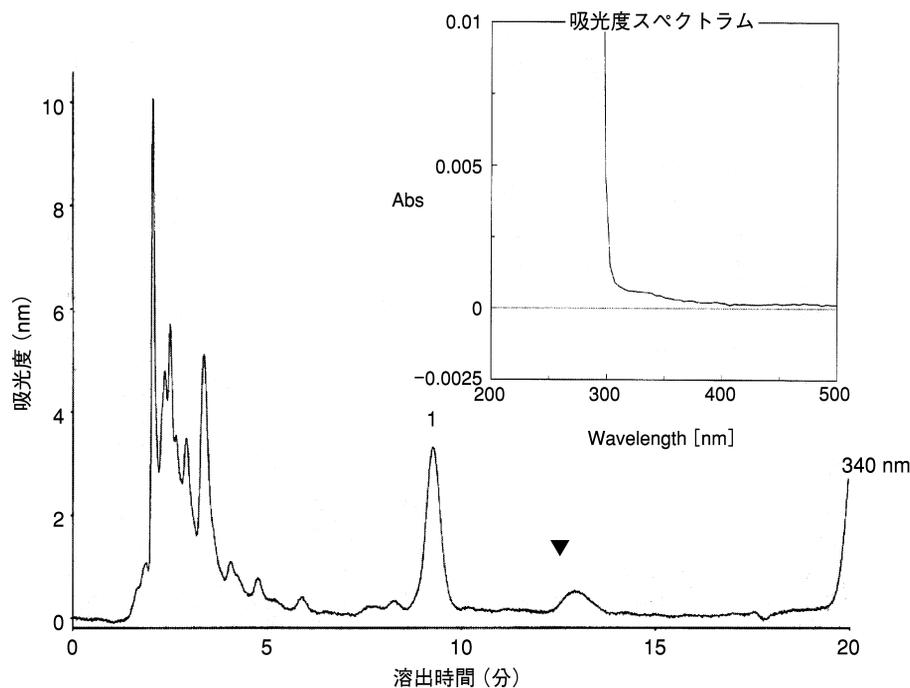


図 6 羊膜組織における at-RA の検出クロマトグラフィを示す。
標準試料とほぼ同じ溶出時間のピーク(▼)はスペクトル解析により、紫外線吸光度 340 nm にピークを認めず at-RA ではないことが同定された。

1 : 60 pmol Acitaretin(▼)未知のピーク

することを考慮すれば、羊水から羊膜上皮への at-ROL の輸送の存在も考えられた。

生体内では、at-ROL は主に肝臓、網膜色素上皮、涙腺、肺、大腸、皮膚などの組織で貯蔵され^{29)~31)}、at-ROL は血中へ動員される¹⁸⁾³²⁾³³⁾。これら at-ROL を貯

蔵する組織において at-ROL と貯蔵型の retinyl ester 含有量の比は、肝臓で約 1 : 2~1 : 6 と後者の含有量が多い³⁴⁾。我々は at-ROL の貯蔵型である at-RP の定量を行ったが羊膜組織には検出されず、羊膜上皮細胞はビタミン A 貯蔵細胞³⁵⁾³⁶⁾である可能性はないと推測した。

at-RA は at-ROL のカルボン酸誘導体であり、網膜ミュラ細胞をはじめ、精巣、肝臓、肺、腎臓、小腸粘膜、子宮脱落膜の細胞では at-ROL や at-RAL から生合成され³⁷⁾³⁸⁾³⁹⁾、血液中でアルブミン¹⁸⁾³²⁾、細胞内では cellular retinoic acid binding protein (CRABP) と結合している⁴⁰⁾⁴¹⁾。at-RA は代謝がきわめて速やかであり、肝臓でグルクロン酸抱合により代謝されるか、もしくは細胞内の cytochrome P-450 依存性 monooxygenase によりさらに極性の高いレチノイドへ代謝されるため³³⁾、血清においては at-RA は at-ROL の約 100 分の 1 というごく微量の濃度でしか存在しない⁴²⁾⁴³⁾。胎膜組織では、ヒト胎盤や周囲脱落膜組織中に CRABP の存在が確認されており、これらの組織に at-RA の存在が示唆される³⁹⁾⁴⁴⁾⁴⁵⁾。一方、ヒト羊膜上皮細胞における CRABP の存在は不明であるが、今回の結果ではヒト羊膜には at-RA は検出されなかった。RP-HPLC の検出限界に満たない微量の at-RA が、羊膜周囲組織から輸送され、もしくは羊膜上皮で生合成された結果存在している可能性も考えられた。しかし、胎生早期や胎生後期における羊膜上皮細胞の at-RA 生合成については現在のところ不明であり、その生合成の前段階である at-RAL が本研究で検出されなかったことから、胎生後期には少なくとも生物学的活性を有する at-RA の役割は既に終了している可能性も推測された。

ビタミン A は角結膜上皮細胞の分化の恒常性を目的に、眼局所投与が試みられてきた。Kaz Soong ら⁴⁶⁾は角化性角結膜上皮疾患の症例に 0.01% at-RA 眼軟膏を投与し、角化の抑制を認めている。また、Ohashi ら⁴⁷⁾は 1500 IU/ml の RP 点眼液を上輪部角結膜炎の症例に投与し有効であったことを報告している。この RP 点眼液を重量 % 濃度に換算すると 0.082% となる。本研究における羊膜組織の at-ROL 含有量を比重 1 として重量 % 濃度に換算すると $9.42 \pm 2.75 \times 10^{-9}$ % となる。移植された羊膜組織が drug delivery system として at-ROL を持続的に放出すると仮定しても、上記の RA 眼軟膏や RP 点眼液と比較しても極めて微量であることから、移植眼に有効性は期待しにくいものと推察した。さらに、羊膜上皮が移植後生着し涙液に存在する at-ROL⁴⁸⁾を取り込むとしても、今回の結果から at-ROL をエステルとして羊膜上皮細胞内に貯蔵しながら、細胞外へ at-ROL を動員することは考えにくく、移植後の角結膜上皮細胞の分化の維持や脱分化の抑制に期待できないものと考えられた。また、各臓器の凍結組織における at-ROL の濃度の比較においては、結腸が 340.9 ± 57.3 ng/g tissue weight、乳房が 965.5 ± 83.1 ng/g tissue weight²⁹⁾と、今回検討した凍結保存羊膜における at-ROL の含有量は、これらと比較してもごく微量であった。以上から、羊膜組織に存在するビタミン A は、難治性眼表面疾患に対する羊膜移植における上皮層の構築

に対して、大きな役割を果たしていないと考えた。

本研究は第 24 回角膜カンファレンス：P-27, P 92 ならびに 2000 年 ARVO meeting：No 2398, P 453 で発表した。

文 献

- 1) **Tseng SCG, Prabhasawat P, Barton K, Gray T, Meller D** : Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. Arch Ophthalmol 116 : 431—441, 1998.
- 2) **Kim JC, Tseng SCG** : Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. Cornea 14 : 473—484, 1995.
- 3) **Lee SH, Tseng SCG** : Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. Am J Ophthalmol 123 : 303—312, 1997.
- 4) **Tsubota K, Satake Y, Ohyama M, Toda I, Takano Y, Ono M, et al** : Surgical reconstruction of the ocular surface in advanced ocular cicatricial pemphigoid and Stevens-Johnson syndrome. Am J Ophthalmol 122 : 38—52, 1996.
- 5) **Shimazaki J, Yang HY, Tsubota K** : Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in patients with chemical and thermal burns. Ophthalmology 104 : 2068—2076, 1997.
- 6) **Modesti A, Scarpa S, D'Orazi G, Simonelli L, Caramia FG** : Localization of type IV and V collagens in the stroma of human amnion. Prog Clin Biol Res 296 : 459—463, 1989.
- 7) **Fukuda K, Chikama T, Nakamura M, Nishida T** : Differential distribution of subchains of the basement membrane components Type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea, and conjunctiva. Cornea 18 : 73—79, 1999.
- 8) **Sotozono C, Inatomi T, Nakamura M, Kinoshita S** : Keratinocyte growth factor accelerates corneal epithelial wound healing *in vivo*. Invest Ophthalmol Vis Sci 36 : 1524—1529, 1995.
- 9) **Wilson SE, He YG, Weng J, Zieske JD, Jester JV, Schultz GS** : Effect of epidermal growth factor, hepatocyte growth factor, and keratinocyte growth factor, on proliferation, motility and differentiation of human corneal epithelial cells. Exp Eye Res 59 : 665—678, 1994.
- 10) **Koizumi N, Inatomi T, Sotozono C, Fullwod NJ, Quantock AJ, Kinoshita S** : Growth factor in RNA and protein in Preserved human amniotic membrane. Curr Eye Res 20 : 173—177, 2000.
- 11) **Hao Y, Ma Kang DH, Hwang DG, Kim W, Zhang F** : Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. Cornea 19 : 348—352, 2000.
- 12) **Tseng SCG, Li DQ, Ma X** : Suppression of trans-

- forming growth factor-beta isoforms, TGF-beta receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell Physiol* 179 : 325—335, 1999.
- 13) **Prabhasawat P, Tseng SCG** : Impression cytology study of epithelial phenotype of ocular surface reconstructed by preserved human amniotic membrane. *Arch Ophthalmol* 115 : 1360—1367, 1997.
 - 14) **Brar AK, Kessler CA, Meyer AJ, Cedars MI, Jikihara H** : Retinoic acid suppresses *in-vitro* decidualization of human endometrial stromal cells. *Molecular Human Reproduction* 2 : 185—193, 1996.
 - 15) **Voigt A, Zintl F** : Effects of retinoic acid on proliferation, apoptosis, cytotoxicity, migration, and invasion of neuroblastoma cells. *Med Pediatr Oncol* 40 : 205—213, 2003.
 - 16) **Johst U, Betsch A, Wiskirchen J, Schober W, Vonthein R, Rinkert N, et al** : All-trans and 9-cis retinoic acids inhibit proliferation, migration, and synthesis of extracellular matrix of human vascular smooth muscle cells by inducing differentiation *in vitro*. *J Cardiovasc Pharmacol* 41 : 526—535, 2003.
 - 17) **Buzzard JJ, Wreford NG, Morrison JR** : Thyroid hormone, retinoic acid, and testosterone suppress proliferation and induce markers of differentiation in cultured rat sertoli cells. *Endocrinology* 144 : 3722—3731, 2003.
 - 18) **大橋裕一** : 脂溶性ビタミン木下茂(編) : 眼科 New Insight 6 角膜疾患の細胞生物学. Medical View, 東京, 132—143, 1995.
 - 19) **渡邊 潔** : ビタミン A 欠乏症と角膜. あたらしい眼科 6 : 1627—1633, 1989.
 - 20) **久保慶和, 有村秋子, 渡部保男, 中安清夫, 金井淳** : ビタミン A 欠乏食飼育家兔に対するビタミン A パルミテートの点眼効果. 日眼会誌 103 : 729—733, 1999.
 - 21) **松原修一郎** : レチノイン酸の分化誘導能と脱癌作用. 実験医学 9 : 857—862, 1991.
 - 22) **尾関年則** : レチノイン酸によるマウス眼形成異常の成立臨界期. 日眼会誌 102 : 95—100, 1997.
 - 23) **Wallingford JC, Milunsky A, Underwood B** : Vitamin A and retinol-binding protein in amniotic fluid. *Am J Clin Nutr* 38 : 377—381, 1983.
 - 24) **Koskinen T, Valtonen P, Lehtovaara I, Tuimala R** : Amniotic fluid retinol concentrations in late pregnancy. *Biol Neonate* 49 : 81—84, 1986.
 - 25) **Napoli JL** : Quantification of physiological levels of retinoic acid. *Methods Enzymol* 123 : 112—124, 1986.
 - 26) **Smith SB, Duncan T, Kutty G, Kutty RK, Wiggert B** : Increase in retinyl palmitate concentration in eyes and livers and the concentration of interphotoreceptor retinoid-binding protein in eyes of vitiligo mutant mice. *Biochem J* 300 : 63—68, 1994.
 - 27) **稲富 勉, 小泉範子** : 羊膜の採取と保存. 眼科 42 : 251—256, 2000.
 - 28) **Gao K, Liu KH, Godkin JD** : Immunohistochemical localization of bovine placental retinol-binding protein. *Int J Dev Biol* 35 : 485—489, 1991.
 - 29) **Lunetta JM, Zulim RA, Dueker SR, Lin Y, Flaig V, Schneider PD, et al** : Method for the simultaneous determination of retinol and β -carotene concentrations in human tissues and plasma. *Analytical Biochemistry* 304 : 100—109, 2002.
 - 30) **Got L, Gousson T, Delacoux E** : Simultaneous determination of retinyl esters and retinol in human livers by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* 668 : 233—239, 1995.
 - 31) **Nierenberg DW, Nann SL** : A method for determining concentrations of retinol, tocopherol, and five carotenoids in human plasma and tissue samples. *Am J Clin Nutr* 56 : 417—426, 1992.
 - 32) **Murray RK** : 脂溶性ビタミンの構造と機能. ハーパー・生化学. 丸善, 東京, 644—647, 2001.
 - 33) **四童子好廣** : ビタミン A. 日本臨床 57 : 2181—2186, 1999.
 - 34) **Raica N, Jr. J. Scott, L Lowry, HE Sauberlich** : Vitamin A concentration in human tissues collected from five areas in the United States. *Am J Clin Nutr* 25 : 291—296, 1972.
 - 35) **Ubels JL, Osgood TB, Foley KM** : Vitamin A is stored as fatty acyl esters of retinol in the lacrimal gland. *Current Eye Research* 7 : 1009—1016, 1988.
 - 36) **Yamada E** : Vitamin A storing cell. *Methods in Enzymology* 81 : 834—839, 1982.
 - 37) **Edwards RB, Adler AJ, Dev S** : Synthesis of retinoic acid from retinol by cultured rabbit muller cells. *Exp Eye Res* 54 : 481—490, 1992.
 - 38) **Napoli JL, Race KR** : The biosynthesis of retinoic acid from retinol by rat tissues *in vitro*. *Arch Biochem Biophys* 255 : 95—101, 1987.
 - 39) **Zheng WL, Sierra-rivera E, Luan J, Osteen KG, Ong DE** : Retinoic acid synthesis and expression of cellular retinol-binding protein and cellular retinoic-acid binding protein type II are concurrent with decidualization of rat uterine stromal cells. *Endocrinology* 141 : 802—808, 2000.
 - 40) **月田 潔** : レチノイド. 日本臨床 51 : 886—892, 1993.
 - 41) **武山健一, 加藤茂明** : ビタミン A, D 結合タンパク, レセプターの遺伝子構造, 転写調節. 日本臨床 57 : 2284—2294, 1999.
 - 42) **須原 聡, 金井正光** : レチノイドとレチノール結合蛋白. 日本臨床 51 : 926—931, 1993.
 - 43) **Muindi JRF, Frankel SR, Huselton C, Grazia FD, Garland WA, Young CW, et al** : Clinical pharmacology of oral all-trans retinoic acid in

- patients with acute promyelocytic leukemia. *Cancer Reseach* 52 : 2138—2142, 1992.
- 44) **Okuno M, Kato M, Moriwaki H, Kanai M, Muto Y** : Purification and partial characterization of cellular retinoic acid-binding protein from human placenta. *Biochimica et Biophysica Acta* 923 : 116—124, 1987.
- 45) **Zheng WL, Ong DE** : Spatial and temporal patterns of expression of cellular retinol-binding protein and cellular retinoic acid-binding proteins in rat uterus during early pregnancy. *Biology of Reproduction* 58 : 963—970, 1998.
- 46) **Soong HK, Martin NF, Wagoner MD, Alfonso E, Mandelbaum SH, Laibson PR**, et al : Topical retinoid therapy for squamous metaplasia of various ocular surface disorders. *Ophthalmology* 95 : 1442—1446, 1988.
- 47) **Ohashi Y, Watanabe H, Kinoshita S, Hosotani H, Umemoto M, Manabe R** : Vitamin A eye-drops for superior limbic keratoconjunctivitis. *Am J Ophthalmol* 105 : 523—537, 1988.
- 48) **Ubels JL, Macrae SM** : Vitamin A is present as retinol in the tears of humans and rabbits. *Curr Eye Res* 3 : 815—822, 1984.
-