

正常眼および角膜上皮障害眼におけるヒト涙液中の グリコサミノグリカンの分析

大矢 智博¹⁾, 小幡 博人²⁾, 宮田 和典²⁾, 水流 忠彦³⁾, 宮内 聡⁴⁾

¹⁾関東中央病院眼科, ²⁾東京大学医学部眼科学教室, ³⁾東京大学医学部附属病院角膜移植部, ⁴⁾生化学工業株式会社東京研究所

要 約

角膜上皮障害時におけるヒトの涙液中のグリコサミノグリカンの動態を検討するため, 機械的刺激によって生じた各種上皮疾患の涙液中のヒアルロン酸濃度とコンドロイチン硫酸の濃度を測定し, 正常眼と比較検討した。対象は, 正常眼 42 眼, 機械的刺激によるびまん性表層角膜炎 9 眼, 角膜びらん 13 眼とした。涙液は, 生食 100 μ l を点眼後マイクロピペットを用いて回収した。涙液中のヒアルロン酸とコンドロイチン硫酸は, コンドロイチナーゼ ABC により不飽和二糖に分解した後, 高速液体クロマトグラフィーを用いて分離, 定量した。正常人の涙液中ヒアルロン酸濃度は不飽和二糖として 0.07 ± 0.12 (n mol/mg Pr), 総コンドロイチン硫酸濃度は 6.91 ± 3.63 (n mol/mg Pr) であった。正常眼ではグリ

コサミノグリカン組成の約 1% がヒアルロン酸, 残りの 99% がコンドロイチン酸であった。びまん性表層角膜炎ではヒアルロン酸およびコンドロイチン硫酸の濃度は正常眼と比較して有意な差は認められなかったが, 角膜びらん群では涙液中のヒアルロン酸濃度が 0.61 ± 0.48 (n mol/mg Pr) と有意に増加し, 逆にコンドロイチン硫酸の濃度は 3.63 ± 2.74 (n mol/mg Pr) と有意に減少していた。ヒトの角膜上皮の創傷治癒過程において, 内因性のヒアルロン酸が涙液中に発現することが示唆された。(日眼会誌 99:302-307, 1995)

キーワード: グリコサミノグリカン, ヒアルロン酸, 角膜上皮障害, 涙液

Quantitative Analyses of Glycosaminoglycans in Tear Fluids in Normal Human Eyes and Eyes with Corneal Epithelial Disorders.

Tomohiro Oya¹⁾, Hiroto Obata²⁾, Kazunori Miyata²⁾,
Tadahiko Tsuru³⁾ and Satoshi Miyauchi⁴⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Kantou Central Hospital

²⁾Department of Ophthalmology, University of Tokyo School of Medicine

³⁾Section of Corneal Transplantation, University of Tokyo School of Medicine

⁴⁾Tokyo Research Institute, Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan

Abstract

The existence and pathophysiological role of glycosaminoglycans in the tear fluid in humans was investigated using quantitative analyses of hyaluronic acid and chondroitin sulfate in the tear fluid. The subjects were 42 eyes of 31 normal controls, 9 eyes of 9 patients with superficial punctate keratitis (SPK), and 13 eyes of 13 patients with epithelial defect. After an instillation of 100 μ l saline solution in the conjunctival sac, as much tear fluid as possible was collected from the lower cul-de-sac. The glycosaminoglycans in the tears were then treated with chondroitinase ABC to make fractions of

unsaturated disaccharides. The quantities of disaccharides were determined by high-performance liquid chromatography. Concentrations were expressed as nanomoles of unsaturated disaccharides per protein in the tears. The concentrations of hyaluronic acid and chondroitin sulfate in the normal controls were 0.07 ± 0.12 (n mol/mg protein) and 6.91 ± 3.63 (n mol/mg protein), respectively. The mean concentration of hyaluronic acid was significantly higher in patients with epithelial erosion than in normal controls, whereas the mean concentration of chondroitin sulfate was

別刷請求先: 113 東京都文京区本郷 7-3-1 東京大学医学部眼科学教室 大矢 智博
(平成 6 年 8 月 15 日受付, 平成 6 年 10 月 2 日受理)

Reprint requests to: Tomohiro Oya, M.D. Department of Ophthalmology, The University of Tokyo School of Medicine, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku Tokyo 113, Japan

(Received August 15, 1994 and accepted in revised form October 2, 1994)

significantly lower in patients with epithelial erosion than in normal controls. There was no significant difference in the concentration of glycosaminoglycans between the patients with SPK and normal controls. The results of our study suggest that glycosaminoglycans are synthesized and endogenously secreted into the tear fluids and, espe-

cially in the case of hyaluronic acid, may play an important role in corneal epithelial wound healing in patients with epithelial erosion. (J Jpn Ophthalmol Soc 99: 302-307, 1995)

Key words: Glycosaminoglycans, Hyaluronic acid, Corneal epithelial disorders, Tear fluid

I 緒 言

ヒアルロン酸は、N-アセチル-D-グルコサミンとグルクロン酸から成るグリコサミノグリカンで、細胞外マトリックスとして広く生体内に存在する¹⁾。生体内においてヒアルロン酸は、組織の発生、創傷治癒過程や炎症などで重要な働きを有することが知られている^{2)~4)}。近年、角膜上皮の創傷治癒にヒアルロン酸が治癒促進的な効果があると報告^{5)~8)}されている。また、ウサギ涙液中にヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸などのグリコサミノグリカンが存在することが確認され、角膜上皮創傷治癒と関連して、その濃度が変動することが示されている⁹⁾。我々は、ウサギ上皮剥離モデルで涙液中のグリコサミノグリカンを測定し、涙液中のヒアルロン酸濃度が上皮剥離後3~24時間をピークに増加することを報告¹⁰⁾した。これは、涙液中のグリコサミノグリカンが角膜の創傷治癒に関与していることを示唆するものである。これまでヒトの涙液中のグリコサミノグリカンの存在を詳細に分析した報告はなかった。そこで、今回我々は、ヒトの涙液中にグリコサミノグリカンが存在するか否かを定量し、また、角膜上皮障害時のグリコサミノグリカン動態を検討するため、正常眼および機械的刺激によって生じた各種上皮疾患の涙液中のヒアルロン酸濃度とコンドロイチン硫酸の濃度を測定し、比較検討した。

II 対 象

角膜疾患を有さない正常人31例42眼(37.9±13.2歳)(平均値±標準偏差、以下、正常群)、異物やコンタクトレンズによる機械的刺激によって生じたびまん性表層角膜炎9例9眼(42.3±20.8歳)(以下、SPK群)¹⁾、角膜びらん13例13眼(45.3±20.3歳)(以下、角膜びらん群)の3群を対象とした。涙液分泌低下が原因と考えられる superficial punctate keratitis (SPK)、角膜びらんは対象外とした。SPK群および角膜びらん群の原因別内訳を表1に示す。これらの症例はすべて、異物や外傷などの機械的刺激による受傷から遅くとも1~2病日後に涙液を採取し、点眼薬による治療が未施行のものとした。

表1 症例の内訳

原 因	びまん性表層角膜炎 (眼数)	角膜びらん (眼数)
ソフトコンタクトレンズ	2	4
ハードコンタクトレンズ	3	3
異物	4	3
外傷	0	3
計	9	13

III 方 法

1. 涙液の採取

涙液は個々の症例によって採取できる量に差があり、また、高速液体クロマトグラフィーによる分析が可能である十分な量を得ることができないため、以下の方法で涙液を希釈し、採取した。マイクロピペットで生理食塩水100μlを下眼瞼を牽引した結膜嚢内に点眼し、数回受動的に瞬目させた後、刺激を与えないようにマイクロピペットを用いてできるだけ涙液を回収した。

2. 検体の酵素消化・定量

詳細は既報¹⁰⁾に記した方法に従い、検体の酵素消化・定量を行った。以下、概略を述べる。回収した涙液にコンドロイチナーゼABC (chondroitinase ABC, 5 U/ml, 生化学工業)と100 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 8.0)を加え、37°Cで2時間消化し、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸を各々に対応する不飽和二糖を分解した。すなわち、ヒアルロン酸由来の不飽和二糖はΔDi-HAであり、コンドロイチン硫酸由来の不飽和二糖は硫酸基の位置により、ΔDi-0 S, ΔDi-6 S, ΔDi-4 Sの3種の異性体が得られる。Δとは不飽和、DiはDimer, 0 Sは0硫酸、6 Sは6硫酸、4 Sは4硫酸の略である。

次に、コンドロイチナーゼAC-II (chondroitinase AC-II, 5 U/ml, 生化学工業)と100 mM 酢酸ナトリウム緩衝液を加え、37°Cで2時間反応させた後、限外濾過膜で濾過した。濾液に回収された不飽和二糖を高速液体クロマトグラフィーで分離、定量した。また、涙液中のタンパク濃度をLowry法¹²⁾を用いて定量し、ヒアルロン酸とコンドロイチン硫酸の濃度を単位タンパク当たりの不飽和二糖量として算出した。

3. 高速液体クロマトグラフィーの条件

コンドロイチン硫酸由来の不飽和二糖を分離、定量す

るには、充填剤 YMC-GEL-PA-120-S 5(YMC), カラム (内径 7.6 mm×長さ 15 cm, ステンレス) を使用した。試料を 0 mM → 160 mM Na₂SO₄ のグラジェント (40 分間) により, 流速 0.5 ml/min で溶出した。カラムからの溶出液に 1% の 2-シアノアセアミドを含む 50 mM 四ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.0) を 0.5 ml/分の流速で加え, 140°C に設定してある反応槽 (DB-5, 島村計器製作所) を通過させた。反応液の蛍光を分光蛍光検出器 (821-FP, 日本分光工業) でモニターした。励起波長は 331 nm, 蛍光波長は 383 nm とした。上記の条件では ΔDi-HA と ΔDi-0 S は同一位置に溶出される。そのため, これらを分離, 定量するために, 充填剤, NH₂P-50 (旭化成), カラム (内径内径 7.6 mm×長さ 30 cm, ステンレス) を使用した。試料を 75 mM のテトラプロピルアンモニウム酢酸緩衝液 (pH 9.0) で溶出した。溶出時間は 50 分, 流速 0.5 ml/min とした。

IV 結 果

正常群の涙液中の ΔDi-HA 濃度は 0.07±0.12 (n mol/mg protein) (平均値±標準偏差, 以下同じ) であった。コンドロイチン硫酸の各異性体のうち, ΔDi-0 S 濃度は 4.18±2.82 (n mol/mg protein), ΔDi-6 S 濃度は 2.07±1.36 (n mol/mg protein), ΔDi-4 S 濃度は 0.66±0.39 (n mol/mg protein), 総コンドロイチン硫酸濃度は 6.91±3.63 (n mol/mg protein) であった (表 2)。涙液中の蛋白量の平均は 1.73±1.25 (n mol/mg) であった。これより, 正常人涙液中のグリコサミノグリカン組成を百分率で表すと, ヒアルロン酸が約 1% で, 99% がコンドロイチン硫酸であった。コンドロイチン硫酸の異性体の別ではコンドロイチンが 60% を占め, 以下コンド

表 2 正常群涙液中のグリコサミノグリカン組成

生成二糖	濃度 (n mol/mg protein)	割合 (%)
ΔDi-HA	0.07±0.12	1.0
ΔDi-0 S	4.18±2.82	60.0
ΔDi-6 S	2.07±1.36	29.7
ΔDi-4 S	0.66±0.39	9.3
小計 (ΔDi-CS)	6.91±3.63	99.0

平均値±標準偏差

表 3 びまん性表層角膜炎群と角膜びらん群における涙液中のグリコサミノグリカン組成

生成二糖	びまん性表層角膜炎群		角膜びらん群	
	濃度 (n mol/mg protein)	割合 (%)	濃度 (n mol/mg protein)	割合 (%)
ΔDi-HA	0.15±0.12	2.8	0.61±0.48	14.4
ΔDi-0 S	2.47±1.72	45.8	2.45±2.19	57.6
ΔDi-6 S	1.74±1.22	32.3	0.90±0.85	21.2
ΔDi-4 S	1.03±0.87	19.1	0.29±0.21	6.8
小計 (ΔDi-CS)	5.24±3.0	97.2	3.63±2.74	85.6

平均値±標準偏差

ロイチン 6 硫酸が約 30%, コンドロイチン 4 硫酸が約 9% であった (表 2)。

SPK 群の涙液中の ΔDi-HA 濃度は 0.15±0.12 (n mol/mg protein) であった。コンドロイチン硫酸の各異性体のうち, ΔDi-0 S 濃度は 2.47±1.72 (n mol/mg protein), ΔDi-6 S 濃度は 1.74±1.22 (n mol/mg protein), ΔDi-4 S は 1.03±0.87 (n mol/mg protein), 総コンドロイチン硫酸濃度は 5.24±3.0 (n mol/mg protein) であった (表 3)。涙液中の蛋白量は 1.03±0.76 (n mol/mg) であった。

角膜びらん群の涙液中の ΔDi-HA 濃度は, 0.61±0.48 (n mol/mg protein) であった。コンドロイチン硫酸の各異性体のうち, ΔDi-0 S 濃度は 2.45±2.19 (n mol/mg protein), ΔDi-6 S 濃度は 0.90±0.85 (n mol/mg protein), ΔDi-4 S 濃度は 0.29±0.21 (n mol/mg protein), 総コンドロイチン硫酸濃度は 3.63±2.74 (n mol/mg protein) であった (表 4)。涙液中の蛋白量は 2.02±1.89 (n mol/mg) であった。

正常群, SPK 群, 角膜びらん群の各定量結果を Dunn の多重比較検定によって検定した。涙液中の ΔDi-HA 濃度は角膜びらん群において正常群, SPK 群よりも有意に高かった (p<0.01) 正常群と SPK 群の間に有意な差はなかった (図 1)。涙液中のコンドロイチン硫酸濃度のうち, ΔDi-0 S 濃度は 3 群の間に有意な差はなかった (図 2)。ΔDi-6 S 濃度は角膜びらん群では正常群に比べ有意に低かった (p<0.01) が, 正常群と SPK 群の間には有

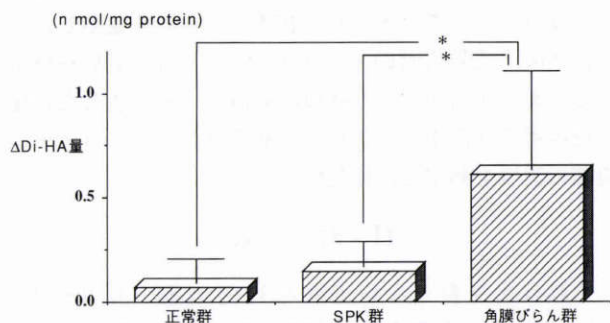


図 1 涙液中のヒアルロン酸 (HA) 量 (ΔDi-HA)。ΔDi-HA 量は角膜びらん群において正常群, びまん性表層角膜炎群 (SPK 群) よりも有意に増加した (p<0.01)。平均値±標準偏差 * : p<0.01

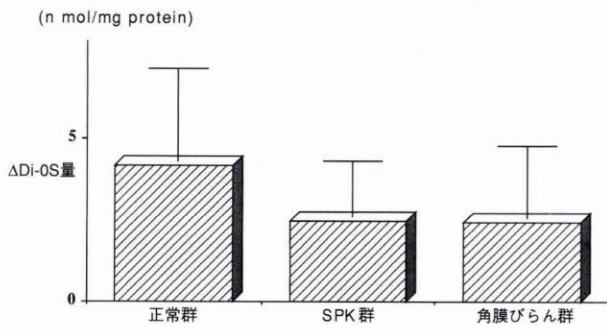


図 2 涙液中のコンドロイチン硫酸 (CS) 量 (Δ Di-0 S).
 Δ Di-0 S 量は 3 群の間に有意な差はなかった. 平均値 \pm 標準偏差

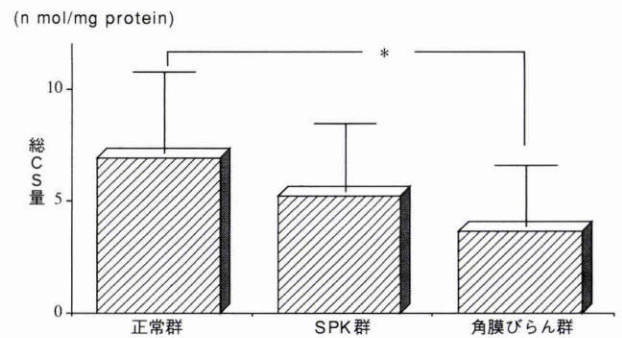


図 5 涙液中の総 CS 量 (0S+6S+4S).
 総コンドロイチン硫酸量は角膜びらん群が正常群に比べ有意に減少した ($p < 0.01$). 平均値 \pm 標準偏差 *: $p < 0.01$

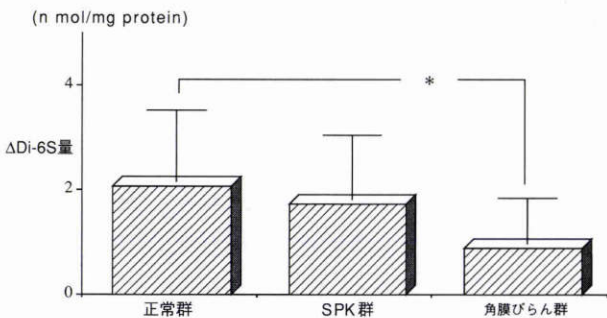


図 3 涙液中の CS 量 (Δ Di-6 S).
 Δ Di-6 S 量は角膜びらん群が正常群に比べ有意に減少した ($p < 0.01$). 平均値 \pm 標準偏差 *: $p < 0.01$

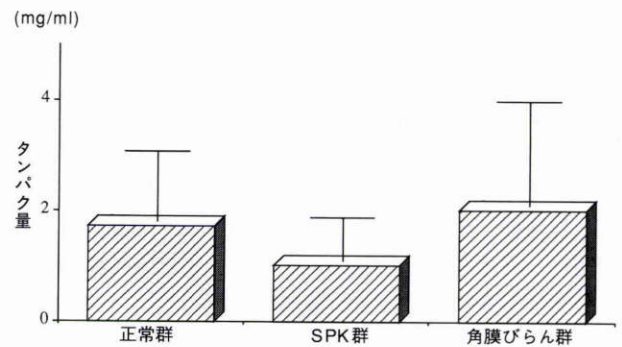


図 6 涙液中のタンパク量.
 涙液中の蛋白量は 3 群の間に有意な差はなかった. 平均値 \pm 標準偏差

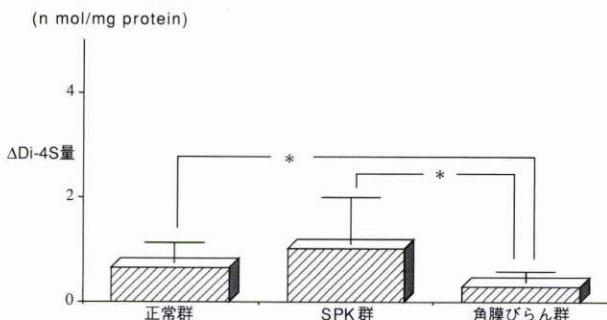


図 4 涙液中の CS 量 (Δ Di-4 S).
 Δ Di-4 S 量は角膜びらん群が正常群, SPK 群に比べ有意に減少した ($p < 0.01$). 平均値 \pm 標準偏差 *: $p < 0.01$

有意な差はなかった (図 3). Δ Di-4 S 濃度は角膜びらん群が正常群, SPK 群に比べ有意に低かった ($p < 0.01$) (図 4). 総コンドロイチン硫酸濃度は角膜びらん群が正常群に比べ有意に低かった ($p < 0.01$). 正常群と SPK 群の間には有意な差はなかった (図 5). 涙液中の蛋白量は 3 群の間に有意な差はなかった (図 6).

V 考 按

ヒアルロン酸は, これまで眼科領域では内眼手術時における角膜内皮細胞の保護と前房の維持の目的で使用さ

れている¹³⁾. Polack ら¹⁴⁾はヒアルロン酸の性質の一つである保水性を利用して, ドライアイにおける角膜上皮障害に対する点眼治療を試み, 良好な結果が得られたと報告している. それ以降, 角膜上皮障害に対するヒアルロン酸点眼の有効性が数多く報告されている^{15)~18)}. 一方, ヒアルロン酸が *in vivo* ならびに *in vitro* の実験で, 角膜上皮の創傷治癒を促進するとの報告がなされており^{5)~8)}, 保水効果に加えて薬理学的作用を期待して多施設で臨床的応用が行われている^{19)~22)}.

最近, ウサギ涙液中にヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸などのグリコサミノグリカンが存在することが確認され, 角膜上皮創傷治癒と関連して, その濃度が変動することが示されている⁶⁾. 我々もウサギ上皮剥離モデルで涙液中のグリコサミノグリカンを測定し, 上皮剥離後 3~24 時間をピークに涙液中のヒアルロン酸濃度が増加することを報告した¹⁰⁾. なお, 正常ウサギおよび角膜上皮剥離ウサギの涙液中にはケラタン硫酸とデルマタン硫酸は全く検出されなかった. これらから, 角膜上皮障害後, 涙液中に内因性のヒアルロン酸が発現し, 角膜の創傷治癒に関与している可能性が考えられる. そこで, 今回我々は, ヒトの涙液中におけるグリコサミノグリカンの存在を確認し, 角膜上皮障害時にヒアルロン酸を始めとする

グリコサミノグリカン涙液中の動態を検討するため、正常眼および機械的刺激によって生じた各種上皮疾患の涙液中のヒアルロン酸濃度とコンドロイチン硫酸濃度を測定し、比較検討した。今回の検討で正常人の涙液中にもグリコサミノグリカンが存在することが証明された。ヒアルロン酸の組成割合は約1%で、残り99%がコンドロイチン硫酸であった(表3)。機械的刺激による上皮障害では、特に障害の大きい角膜びらん群で涙液中のヒアルロン酸が有意に増加し、涙液中のグリコサミノグリカンの14.4%を占め、逆にコンドロイチン硫酸は85.6%と減少した。このことは、ヒトの角膜上皮の創傷治癒過程においても、内因性のヒアルロン酸が涙液中に発現したことを示唆する。角膜びらん群とSPK群で涙液中のヒアルロン酸の発現量に差がでた理由は、障害部の面積の違いおよび角膜びらん群では角膜上皮全層が剝離され¹⁾、基底膜が露出もしくは障害された状態であることが可能性として考えられる。

ウシ鼻軟骨から抽出した hyaluronic acid-binding region を用いて、ウサギ角膜のヒアルロン酸の局在を検討した報告では、ウサギ正常角膜のうち、角膜上皮(細胞間)と内皮の apical surface に強い染色性を認め、実質のケラトサイトには弱い染色性を認めている²³⁾。また、ウサギ角膜上皮の創傷治癒過程では、剝離後1日目に上皮欠損部周囲の上皮と欠損直下の実質細胞が hyaluronic acid-binding region で強く染色され、7日後においても染色性は正常より強かったと報告されている²⁴⁾。以上から、ウサギ角膜上皮創傷治癒過程におけるヒアルロン酸の発現機序は、上皮欠損部周囲と欠損部位下の実質細胞で生成され、その結果として涙液中に出現した可能性が考えられる。一方、ヒトの角膜上皮創傷治癒過程でのヒアルロン酸の組織学的な局在の報告はなく、前述のような機序でヒアルロン酸が発現している可能性もあるが、現在のところはどのような機序で涙液中に発現しているかは不明である。創傷治癒の局所で能動的に生成され、涙液中に分泌されていることが予想されるが、涙腺や結膜の杯細胞などから由来している可能性も否定できない。

正常人涙液中のコンドロイチン硫酸の各異性体の組成割合は、コンドロイチンが60%を占め、以下コンドロイチン6硫酸が約30%、コンドロイチン4硫酸が約9%の順であった(表3)。機械的刺激による上皮障害では、特に障害の大きい角膜びらん群で総コンドロイチン硫酸量、コンドロイチン6硫酸量、コンドロイチン4硫酸量が正常人に比べ有意に減少した。このコンドロイチン硫酸に関する結果は、先に我々が報告したウサギ上皮剝離モデルの結果と相反するものとなった。つまり、ウサギ角膜上皮剝離後ヒアルロン酸とコンドロイチン6硫酸の増加を認めたが、コンドロイチン4硫酸の変動は認めなかった¹⁰⁾。

一般に、ウサギ角膜実質の創傷治癒過程では、正常時に実質に豊富に認められるケラタン硫酸が減少し、コンドロイチン硫酸が増加すると報告されている²⁵⁾²⁶⁾。また、ウサギ耳軟骨に創傷を作成した実験では、治癒後の軟骨中のヒアルロン酸とコンドロイチン6硫酸は正常軟骨に比べ増加している²⁷⁾。また、ウサギやニトリの胎児軟骨は成人軟骨に比べ、コンドロイチン6硫酸量の増加とコンドロイチン4硫酸量の減少が認められるとの報告もある²⁸⁾²⁹⁾。これらから、ウサギ軟骨の創傷治癒過程や成長発達の過程ではコンドロイチン6硫酸が増加、コンドロイチン4硫酸が減少し、成熟軟骨への成長とともに増減がなくなると考えられる。ウサギ涙液中のヒアルロン酸、コンドロイチン6硫酸の増加は、この軟骨の創傷治癒過程の変化と一致しており、涙液中のグリコサミノグリカンは創傷治癒に関与している可能性が考えられた。では、なぜヒトの創傷治癒過程において涙液中のコンドロイチン硫酸が減少したかは現在のところ不明である。ただ単に、種差によるものかのかどうかをコンドロイチン硫酸の役割とともに今後検討する必要があると思われたが、少なくともヒアルロン酸に関しては両者で結果が一致しており、角膜上皮障害と内因性のヒアルロン酸の密接な関与が考えられた。

今回の研究で、正常人の涙液中にもグリコサミノグリカンが存在することが判明した。そして、角膜びらんでは涙液中のヒアルロン酸が有意に増加していた。このことは、角膜上皮の創傷治癒に内因性のヒアルロン酸が関与していることを示唆しており、涙液中のヒアルロン酸は創傷治癒を反映する良い指標となり得ると思われた。今後は各種上皮疾患と涙液中のヒアルロン酸量および創傷治癒との関係を踏まえた上で、上皮障害に対するヒアルロン酸点眼の適応、治療方針を決定していくことが重要であると考えられる。

文 献

- 1) Balazs EA: Amino sugar-containing macromolecules in the tissues of the eye and ear. In 'The Amino Sugars. II-A' In: Balazs EA, et al (Eds): 401-460, Academic Press, New York, 1965.
- 2) Weigel PH, Frost SJ, MaGary CT, LeBoeuf RD: The role of hyaluronic acid in inflammation and wound healing. *Int J Tissue React* 106: 355-365, 1988.
- 3) Toole BP, Gross J: The extracellular matrix of the regenerating newtlimb: Synthesis and removal of hyaluronate prior to differentiation. *Dev Biol* 25: 57-77, 1971.
- 4) Derby MA: Analysis of glycosaminoglycans within the extracellular environments encountered by migrating neural crest cells. *Dev Biol* 66: 321-336, 1978.
- 5) Miyauchi S, Sugiyama T, Machida A, Miyazaki K, Tokuyasu K, Nakazawa K: The effect of

- sodium hyaluronate on the migration of rabbit corneal epithelium. I. An *in vitro* study. J Ocular Pharmacol 6: 91—99, 1990.
- 6) **Nishida T, Nakamura M, Mishima H, Otori T:** Hyaluronan stimulates corneal epithelial migration. Exp Eye Res 53: 753—758, 1991.
 - 7) **Sugiyama T, Miyauchi S, Machida A, Miyazaki K, Tokuyasu K, Nakazawa K:** The effect of sodium hyaluronate on the migration of rabbit corneal epithelium. II. The effect of topical administration. J Ocular Pharmacol 7: 53—64, 1991.
 - 8) **Nakamura M, Hikida M, Nakano T:** Concentration and molecular weight dependency of rabbit corneal epithelial wound healing on hyaluronan. Curr Eye Res 11: 981—986, 1992.
 - 9) **Miyauchi S, Morita M, Kuramoto K, Horie K, Tokuyasu K:** Hyaluronan and chondroitin sulphate in the tear fluid of rabbit. Curr Eye Res (in press).
 - 10) **大矢智博, 小幡博人, 宮田和典, 水流忠彦, 澤 充, 宮内 聡:** ウサギ角膜上皮創傷治癒過程における涙液中のグリコサミノグリカンの分析. 日眼会誌 98: 1049—1055, 1994.
 - 11) **西田輝夫, 澤 充, 宮田和典, 三島 弘, 福田昌彦, 大鳥利文:** 角膜上皮障害の臨床的分類の提案. 臨眼 46: 738—743, 1992.
 - 12) **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ:** Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265—275, 1951.
 - 13) **Miller D, Stegmann R:** Use of sodium hyaluronate in human IOL implantation. Ann Ophthalmol 13: 811—815, 1981.
 - 14) **Polack FM, McNiece NT:** The treatment of dry eyes with Na hyaluronate (Healon®). Cornea 1: 133—136, 1982.
 - 15) **Stuart JC, Linn JG:** Dilute Sodium Hyaluronate (Healon®) in the treatment of ocular surface disorders. Ann Ophthalmol 17: 190—192, 1985.
 - 16) **Limberg MB, McCaa C, Kissling Ge, Kaufman HE:** Topical application of hyaluronic acid and chondroitin sulfate in the treatment of dry eyes. Am J Ophthalmol 103: 194—197, 1987.
 - 17) **Nelson JD, Farris RL:** Sodium hyaluronate and polyvinyl alcohol artificial tear preparations. Arch Ophthalmol 106: 484—487, 1988.
 - 18) **伏見典子, 吉村 久, 崎元 卓, 北野周作:** ヒアルロン酸あるいはムチンを主成分とする人工涙液の点眼効果について. 眼科 31: 747—756, 1989.
 - 19) **北野周作, 大鳥利文, 増田寛次郎:** 0.3%ヒアルロン酸ナトリウム点眼液の重症角結膜上皮障害に対する効果. あたらしい眼科 10: 603—610, 1993.
 - 20) **榛村重人, 真島行彦, 島崎 潤, 山田昌和, 深川和己, 小川葉子, 他:** 多施設二重盲検法によるドライアイに対するヒアルロン酸ナトリウム点眼液の臨床評価. あたらしい眼科 10: 611—616, 1993.
 - 21) **糸井素純, 金 玉順, 木村泰朗, 金井 淳, 百瀬隆行, 神吉和男:** 多施設二重盲検法によるコンタクトレンズ装用者における角膜上皮障害に対するヒアルロン酸ナトリウム点眼液の臨床評価. あたらしい眼科 10: 617—626, 1993.
 - 22) **北野周作, 大鳥利文, 増田寛次郎, 米虫節夫:** 角膜上皮障害に対するヒアルロン酸点眼液の臨床効果—グルタチオン点眼液との比較試験—. 眼紀 44: 487—497, 1992.
 - 23) **Asari A, Miyauchi S, Takahashi T, Kohno K, Uchiyama Y:** Localization of hyaluronic acid, chondroitin sulfate, and CD44 in rabbit cornea. Arch Histol Cytol 55: 503—511, 1992.
 - 24) **宮内 聡, 森田美香, 浅利 晃, 関口智子, 堀江克之, 徳安清親:** ウサギ角膜上皮の創傷治癒とヒアルロン酸. 第17回角膜カンファランス抄録集, p72, 1993.
 - 25) **Hassell JR, Cintron C, Kublin C, Newsome DA:** Proteoglycan changes during restoration of transparency in corneal scars. Arch Biochem Biophys 222: 362—369, 1983.
 - 26) **Funderburgh JL, Chandler JW:** Proteoglycans of rabbit corneas with nonperforating wounds. Invest Ophthalmol Vis Sci 30: 405—442, 1989.
 - 27) **Hasty KA, Smith GN, Kang AH:** Studies on glycosaminoglycans of regenerating rabbit ear cartilage. Dev Biol 86: 198—205, 1981.
 - 28) **Mathews MB:** Macromolecular evolution of connective tissue. Biol Rev 42: 499—551, 1967.
 - 29) **Robinson HC, Dorfman A:** The sulfation of chondroitin sulfate in embryonic chick cartilage epiphyses. J Biol Chem 244: 348—352, 1969.