

小眼球症マウスの眼瞼発生過程における グリコサミノグリカンの組織化学的検索

野崎 実穂¹⁾, 馬嶋 昭生¹⁾, 池田 晃三²⁾, 平林 義章³⁾

¹⁾名古屋市立大学医学部眼科学教室, ²⁾公立尾陽病院眼科, ³⁾名古屋市立大学医学部第二解剖学教室

要 約

目 的：先天白内障とそれに伴う小眼球症を自然発症する *Cts* マウスを用い, ホモ接合体 (*Cts/Cts*) と正常マウス (+/+) の眼瞼発生過程を組織化学的に検索した。

方 法：胎生 14 日から生後 14 日までのホモ接合体ならびに正常マウスを使用した。Chondroitinase B 消化法および chondroitinase B-testicular hyaluronidase 二重消化法を行った後に増感高鉄ジアミン染色を, また *Streptomyces* hyaluronidase 消化法を行った後に増感低鉄ジアミン染色を行い, 光学顕微鏡で観察した。

結 果：眼瞼真皮に含まれる主要なコンドロイチン硫酸異性体は, 正常マウスでは生後 0 日に, ホモ接合体で

は生後 4 日にコンドロイチン硫酸 A/C からコンドロイチン硫酸 B へ変わった。また, 両マウスの眼瞼真皮内に分布するヒアルロン酸は, 胎生 14 日からみられ, 生後 0 日まで徐々に増加したが, 生後 4 日まではホモ接合体の方が僅かに多かった。

結 論：今回の結果から, ホモ接合体の眼瞼は, 正常マウスと比べ, 構成分子レベルにおいて成熟が遅れていることが推測された。(日眼会誌 103: 425—431, 1999)

キーワード：*Cts* マウス, 小眼球症, 眼瞼発生, コンドロイチン硫酸, ヒアルロン酸

Histochemical Studies of Glycosaminoglycans in the Developing Eyelids of Experimental Microphthalmic (*Cts*) Mice

Miho Nozaki¹⁾, Akio Majima¹⁾, Kozo Ikeda²⁾ and Yoshifumi Hirabayashi³⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Nagoya City University Medical School

²⁾Department of Ophthalmology, Biyoh Hospital

³⁾Department of Anatomy, Nagoya City University Medical School

Abstract

Purpose : The *Cts* mouse is a mutant strain which induces congenital cataract and small eyes in homozygotes. The process of eyelid development in *Cts* mice was examined histochemically.

Materials and Methods : Prenatal (from day 14 of gestation) and postnatal (to day 14) animals of unaffected and homozygous mice were examined. Sensitized high iron diamine staining was done after chondroitinase B/testicular hyaluronidase double digestion, and sensitized low iron diamine staining was done after *Streptomyces* hyaluronidase digestion.

Results : The main chondroitin sulfate isomer in the dermis of the eyelid changed from chondroitin sulfate A/C to chondroitin sulfate B at birth in the

unaffected mice. In the homozygotes, the same change took place 4 days after birth. In the dermis of the eyelid, hyaluronic acid was first detected on day 14 of gestation and gradually increased until birth in both unaffected and homozygous mice. There was slightly more hyaluronic acid in homozygous mice until 4 days after birth.

Conclusion : The present study showed that the maturation of glycosaminoglycan molecular species in the eyelid was retarded in *Cts* homozygotes. (J Jpn Ophthalmol Soc 103: 425—431, 1999)

Key words : *Cts* mouse, Microphthalmos, Eyelid development, Chondroitin sulfate, Hyaluronic acid

別刷請求先：467-8601 名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄1 名古屋市立大学医学部眼科学教室 野崎 実穂
(平成 10 年 3 月 11 日受付, 平成 11 年 1 月 26 日改訂受理)

Reprint requests to: Miho Nozaki, M.D. Department of Ophthalmology, Nagoya City University Medical School,
1-Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467-8601, Japan

(Received March 11, 1998 and accepted in revised form January 26, 1999)

I 緒 言

眼球の発生には組織相互作用が重要であることが知られている¹⁾が、眼瞼の発生・分化・成熟は神経外胚葉の関与を受けずに、独自に発生すると考えられており、Mann²⁾は眼窩・眼瞼・涙器・結膜囊および外眼筋とその神経の発生は self-determining と述べている。著者らは先天白内障とそれに伴う小眼球症を呈するマウスを用いて、胎生から生後の眼瞼発生過程および生後の瞼裂幅を検索し、正常マウスと比較して小眼球症マウスの瞼裂幅は有意に狭いものの、両者に組織学的な差はないことを確認した³⁾。

しかし、今まで当教室の小眼球症マウスに関する研究によれば、眼球被膜である角膜⁴⁾や強膜⁵⁾ならびに物質交換の場である Bruch 膜⁶⁾において組織学的な違いはないが、組織化学的にはコンドロイチン硫酸の質的な異常がみられ、水晶体だけでなく他の眼組織も障害されていることを明らかにしてきた。また、同マウスにおいて、ヒアルロン酸に関する検討および眼瞼を含む皮膚に関する組織化学的検索はなされていない。そこで、今回は小眼球症マウスの眼瞼発生過程のコンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸について組織化学的に検索し、小眼球症の発生機序ならびに瞼裂幅の相違と関連性がみられるかどうかを検討したので報告する。

II 実験方法

1. 実験動物

Cts マウスを交配した子孫のうち、ホモ接合体(*Cts/Cts*)を用い、正常マウス(+ / +)を対照とした。成熟した雄1匹と未経産で発情期の雌1匹を一晩同一飼育箱に入れ、翌日陰栓のあったものを妊娠0日とした。妊娠14, 16, 18日の母獣をそれぞれ5匹頸椎脱臼により屠殺して胎仔を剖出し、胎生14, 16, 18日齢として実験に使用した。生後は、出生日を0日とし、生後0, 4, 7, 14日のマウスをそれぞれ5匹を屠殺して実験に使用した。

2. 試料調製法

得られた動物の頭部組織塊を直ちに Bouin 液に浸漬し、24時間室温(18~21℃)で固定した。固定後、眼部を切

り出し、その後、約1週間同固定液に浸漬した。組織をエタノール系列で脱水後、キシレンで透徹してパラフィンに包埋した。厚さ2.0μmで前頭断の連続切片を作製し、ゼラチン処理をしたスライドガラスに貼布した。

3. 増感高鉄ジアミン(sensitized high iron diamine, S-HID)法^{4)~8)}

硫酸基含有酸性複合糖質を検出するための染色法として S-HID 染色を用いた。脱パラフィン、水和した切片を高鉄ジアミン液に37℃で60分間浸漬した後、0.5 mM トリクロロ(エチレン)白金酸カリウム溶液に20℃で60分間浸漬した。同切片を0.1~0.5%水素化ホウ素ナトリウム液で10~30秒間還元し、20℃で5~10分間物理現像を行った。水洗してエタノール系列で脱水し、キシレンで透徹した後、Harleco synthetic resin (HSR) 液(国際試薬)で封入した。

4. コンドロイチナーゼ B(chondroitinase B, Chase B)/睾丸ヒアルロニダーゼ(testicular hyaluronidase, T-Hylase)二重消化法^{4)5)8)~11)}

表1にあるように、ChaseBはコンドロイチン硫酸Bを、T-Hylaseは主にコンドロイチン硫酸A/Cを分解する酵素である。これらの酵素消化法およびS-HID染色とを組み合わせるにより、コンドロイチン硫酸BおよびA/Cの局在を検出することができる。水和した連続切片を3枚(切片①, ②, ③)準備し、切片①は対照切片として0.1 M トリス塩酸緩衝液(pH 8.0)に30℃で22時間浸漬した。切片②は同緩衝液1.0 mlにChaseB(*Flavobacterium heparinum*, 生化学工業)を0.15単位溶解した酵素消化液に切片①と同条件下で浸漬し、切片③は切片②と同条件下でChaseB消化後、0.1 M リン酸塩緩衝液(pH 5.5)1.0 mlにT-Hylase(*Bovine testis*, type VIII, Sigma Chem)を1.0 mg溶解した酵素消化液に37℃で22時間浸漬した。

5. 増感低鉄ジアミン(sensitized low iron diamine, S-LID)法⁷⁾⁸⁾

カルボキシル基含有の酸性複合糖質を検出するために、S-LID染色を用いた。脱パラフィン後、水和した切片を低鉄ジアミン液に37℃で120分間浸漬した後、以下S-HID染色と同条件で、トリクロロ(エチレン)白金酸カ

表1 酵素消化法

酵素	由来	特異基質	消化条件
chondroitinase B (Chase B)	<i>Flavobacterium heparinum</i> (生化学工業)	CS-B	0.15単位/mlのChase Bを0.1M トリス塩酸緩衝液(pH8.0)に溶解し、30℃ 22時間浸漬
testicular hyaluronidase (T-Hylase)	Bovine testis (Type VIII) (Sigma, Chemical)	CS-A/C, CH, HA	1.0mg/mlのT-Hylaseを0.1M リン酸塩緩衝液(pH5.5)に溶解し、37℃ 22時間浸漬
<i>Streptomyces</i> hyaluronidase (ST-Hylase)	<i>Streptomyces hyalurolyticus</i> (生化学工業)	HA	100TRU(濁度減少単位)/mlのST-Hylaseを0.1M リン酸塩緩衝液(pH6.0)に溶解し、40℃ 2時間浸漬

CS : chondroitin sulfate, CH : chondroitin, HA : hyaluronic acid

リウム液浸漬, 水素化ホウ素ナトリウム液還元, および物理現象を行い, 水洗, エタノール系列で脱水, キシレンで透徹して HSR 液で封入した。

6. 放線菌ヒアルロニダーゼ (*Streptomyces hyaluronidase*, ST-Hylase) 消化法^{12) 13)}

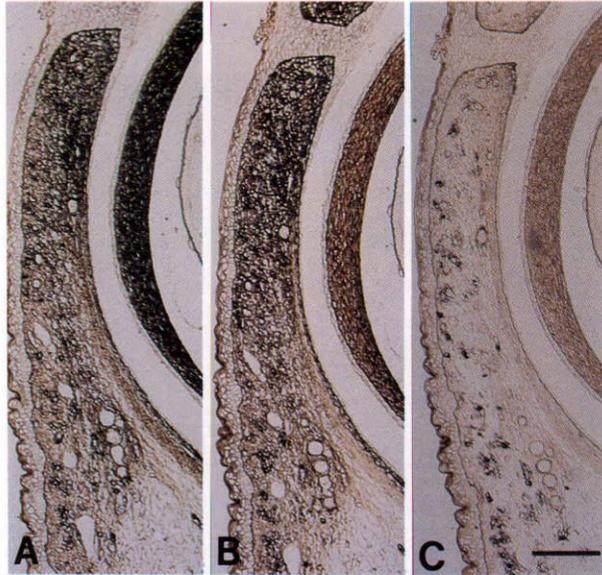


図1 胎生 16 日の正常マウス sensitized high iron diamine (S-HID) 染色の光学顕微鏡 (光顕) 写真。

S-HID 染色で眼瞼真皮は黒色の強陽性反応を示す (A)。Chondroitinase B (ChaseB) 消化後, 染色性の変化はほとんどみられない (B) が, さらに testicular hyaluronidase (T-Hylase) 消化すると, 眼瞼真皮の S-HID 染色性は顕著に減弱する (C)。バーは 60 μ m

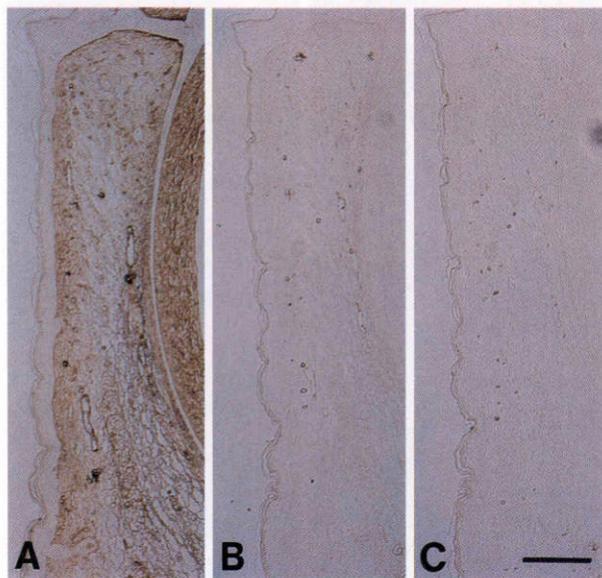


図2 生後 0 日の正常マウス S-HID 染色の光顕写真。

S-HID 染色で眼瞼真皮は褐色の中等度陽性反応を示す (A)。ChaseB 消化すると, S-HID 染色性は顕著に減弱する (B)。さらに T-Hylase 消化を行っても, 同染色性に変化はみられない (C)。バーは 60 μ m

表 1 にあるように, ST-Hylase はヒアルロン酸を分解する酵素である。本酵素消化法と S-LID 染色を組み合わせることによって, ヒアルロン酸の局在を検出することが可能である。水和した連続切片を 2 枚 (切片 ①, ②) 準備し, 切片 ① は対照切片として, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) に 40°C で 120 分浸漬した。切片 ② は 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 6.0) で hyaluronidase (*Streptomyces hyalurolyticus*, 生化学工業) を 100 TRU (濁度減少単位)

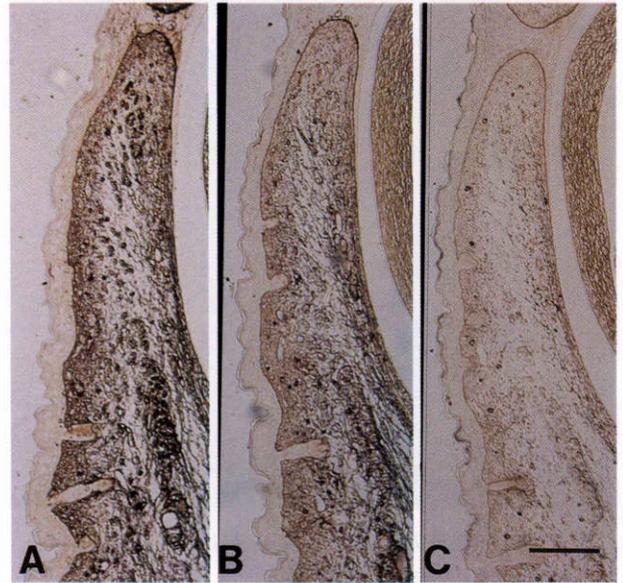


図3 胎生 18 日のホモ接合体 S-HID 染色の光顕写真。

S-HID 染色で眼瞼真皮は黒色の強陽性反応を示す (A)。ChaseB 消化を行っても, 染色性に変化はみられない (B) が, さらに T-Hylase 消化すると, S-HID 染色性は顕著に減弱する (C)。バーは 60 μ m

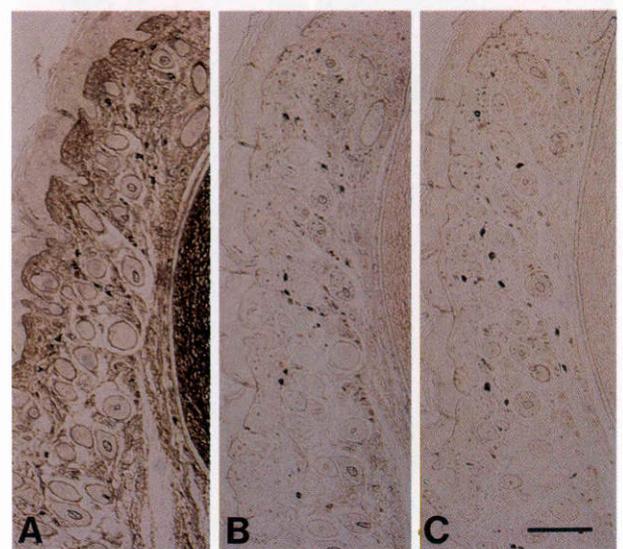


図4 生後 4 日のホモ接合体 S-HID の光顕写真。

S-HID 染色で眼瞼真皮は褐色の中等度陽性反応を示す (A)。ChaseB 消化すると, 同染色性は顕著に減弱する (B)。さらに, T-Hylase 消化しても変化はみられない (C)。バーは 60 μ m

/ml の濃度に溶解し, 同酵素液に 40°C で 120 分間浸漬した。

III 結 果

1. ChaseB/T-Hylase 二重消化法

1) 正常マウス

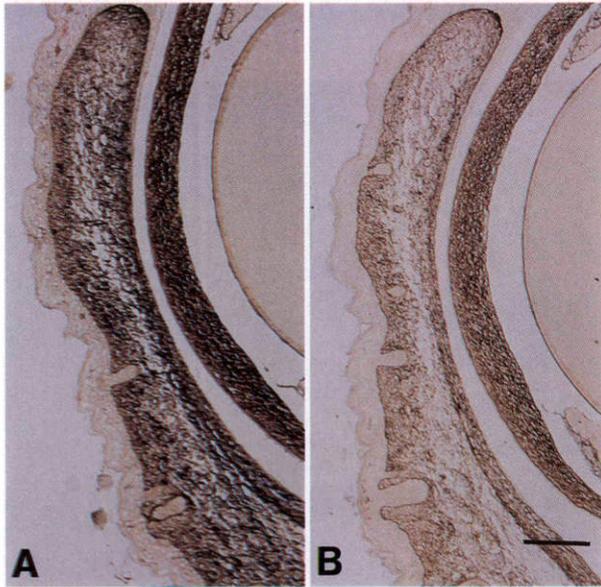


図5 胎生18日の正常マウス sensitized low iron diamine (S-LID) 染色の光顕写真。

S-LID 染色で眼瞼真皮は褐色の中等度陽性反応を示す(A). *Streptomyces hyaluronidase* (ST-Hylase) 消化すると, 同染色性は中等度に減弱する(B). バーは 60 μm

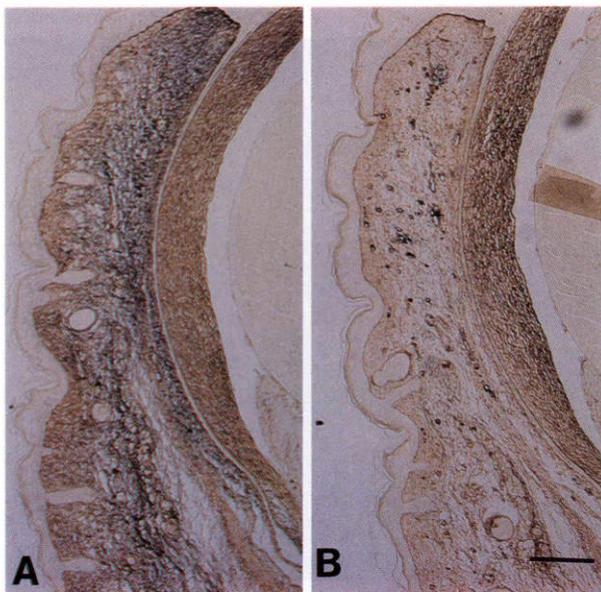


図6 生後0日の正常マウス S-LID 染色の光顕写真。

S-LID 染色で眼瞼真皮は黒色の強陽性反応を示す(A). ST-Hylase 消化を行うと, 同染色性は顕著に減弱する(B). バーは 60 μm

胎生 14, 16(図 1 A), 18 日の眼瞼真皮は, S-HID 染色で黒色の強陽性反応を示した. ChaseB 消化後, 眼瞼真皮の S-HID 染色性はほとんど変化しなかった(図 1 B). しかし, ChaseB/T-Hylase 二重消化により, 同組織の S-HID 染色性は顕著に減弱した(図 1 C). 生後 0 日(図 2 A), 生後 4, 7, 14 日の眼瞼真皮は, S-HID 染色により褐色の中等度陽性反応を示した. ChaseB 消化後, 眼瞼真皮の S-

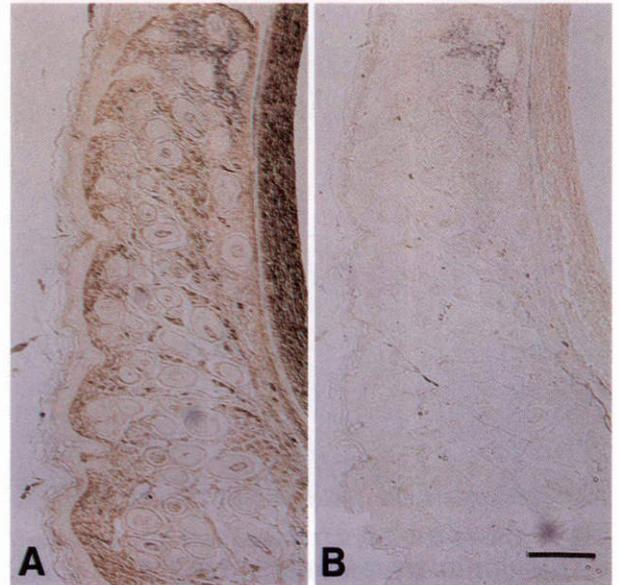


図7 生後4日の正常マウス S-LID 染色の光顕写真。

S-LID 染色で眼瞼真皮は褐色の中等度陽性反応を示す(A). ST-Hylase 消化後, 同染色性は軽度に減弱する(B). バーは 60 μm

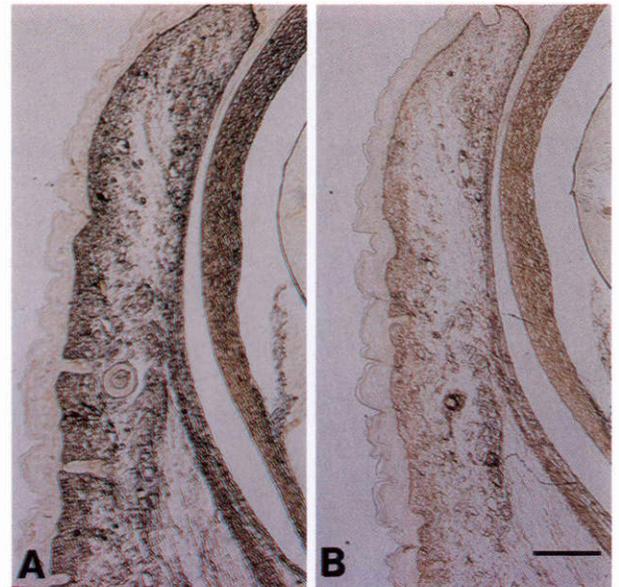


図8 胎生18日のホモ接合体 S-LID 染色の光顕写真。

S-LID 染色で眼瞼真皮は褐色の中等度陽性反応を示す(A). ST-Hylase 消化を行うと, 染色性は中等度に減弱する(B). 同時期の正常マウス(図5)と比較して, ホモ接合体の S-LID 染色性が強い. バーは 60 μm

HID 染色性は顕著に減弱した(図 2 B). また, ChaseB/T-Hylase 二重消化後, 同染色性は ChaseB 消化切片のそれと比較してほとんど変化がなかった(図 2 C). 以上の結果から, 胎生 14, 16, 18 日の眼瞼真皮では T-Hylase 感受性が ChaseB 感受性より高く, 一方, 生後では ChaseB 感受性が T-Hylase 感受性より高かった.

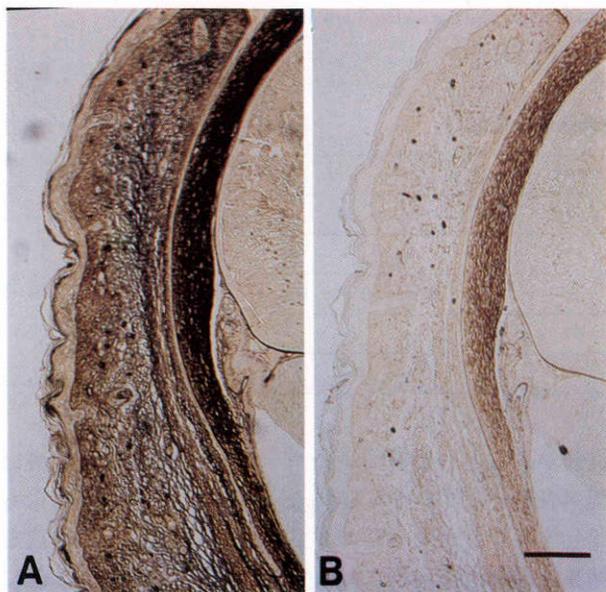


図 9 生後 0 日のホモ接合体 S-LID 染色の光顕写真. S-LID 染色で眼瞼真皮は黒色の強陽性反応を示す(A). ST-Hylase 消化後, 同染色性は顕著に減弱する(B). 同時期の正常マウス(図 6)と比較して, ホモ接合体の S-LID 染色性が強い. バーは 60 μ m

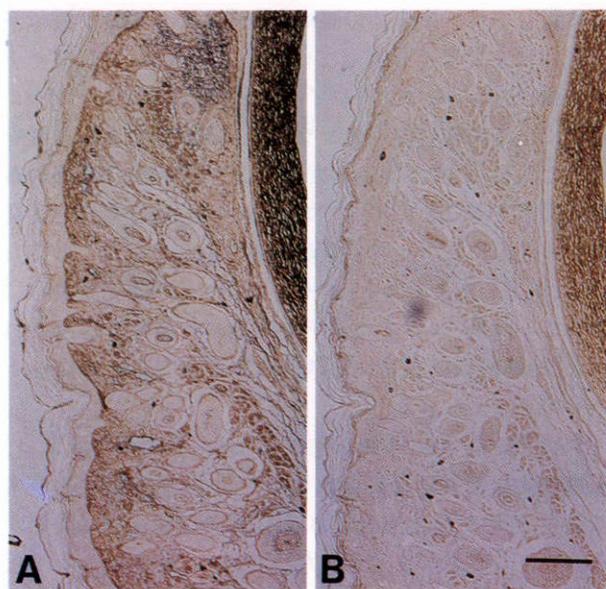


図 10 生後 4 日のホモ接合体 S-LID 染色の光顕写真. 眼瞼真皮の S-LID 染色性は褐色の中等度陽性反応を示す(A). ST-Hylase 消化すると, 同染色性は軽度に減弱する(B). 同時期の正常マウス(図 7)と比較して, ホモ接合体の S-LID 染色性が強い. バーは 60 μ m

2) ホモ接合体

胎生 14, 16, 18(図 3 A)日および生後 0 日の眼瞼真皮は, S-HID 染色で褐色から黒色の強陽性反応を示した. ChaseB 消化後, 眼瞼真皮の S-HID 染色性はほとんど変化がなかった(図 3 B). ChaseB/T-Hylase 二重消化により眼瞼真皮の S-HID 染色性は顕著に減弱した(図 3 C). 生後 4(図 4 A), 7, 14 日の眼瞼真皮は, S-HID 染色により褐色の中等度陽性反応を示した. ChaseB 消化後, 眼瞼真皮の S-HID 染色性は顕著に減弱した(図 4 B). ChaseB/T-Hylase 二重消化により, S-HID 染色性は ChaseB 消化切片のそれと比較してほとんど変化がなかった(図 4 C). 以上の結果から, 胎生 14, 16, 18 日および生後 0 日では, T-Hylase 感受性が ChaseB 感受性より強かった. また, 生後 4 日に初めて ChaseB 感受性が T-Hylase 感受性より優位になった.

2. ST-Hylase 消化法

1) 正常マウス

胎生 14, 16, 18(図 5 A)日の眼瞼真皮は, S-LID 染色で褐色の中等度陽性反応を示した. ST-Hylase 消化後, 眼瞼真皮の S-LID 染色性は中等度に減弱した(図 5 B). 生後 0 日の眼瞼真皮は, S-LID 染色で黒色の強陽性反応を示した(図 6 A). ST-Hylase 消化後により, 眼瞼真皮の S-LID 染色性は顕著に減弱した(図 6 B). 生後 4(図 7 A), 7, 14 日の眼瞼真皮は, S-LID 染色で褐色の中等度陽性反応を示した. ST-Hylase 消化後, 眼瞼真皮の S-LID 染色性は軽度に減弱した(図 7 B). 以上の結果から, 生後 0 日を最高として胎生 14 日から生後 14 日までの間に ST-Hylase 感受性がみられた.

2) ホモ接合体

胎生 14, 16, 18(図 8 A)日の眼瞼真皮は, S-LID 染色で褐色の中等度陽性反応を示した. ST-Hylase 消化後, 眼瞼真皮の S-LID 染色性は中等度に減弱した(図 8 B). 生後 0 日の眼瞼真皮は, S-LID 染色で黒色の強陽性反応を示した(図 9 A). ST-Hylase 消化により, 眼瞼真皮の S-LID 染色性は顕著に減弱した(図 9 B). 生後 4(図 10 A), 7, 14 日の眼瞼真皮は, S-LID 染色で褐色の中等度陽性反応を示した. ST-Hylase 消化後, 眼瞼真皮の S-LID 染色性は軽度に減弱した(図 10 B). 以上の結果から, 生後 0 日を最高として胎生 14 日から生後 14 日まで, ST-Hylase 感受性がみられた. また, 生後 4 日まで, 正常マウス(図 5~7)と比べてホモ接合体(図 8~10)の S-LID 染色性が強かったが, 生後 7 日以後は両者に差はなかった.

IV 考 按

当教室では従来から, 先天白内障とそれに伴う小眼球症を呈する *Cts* マウス¹⁴⁾を用いて, 水晶体¹⁵⁾, 角膜⁴⁾, 強膜⁵⁾, Bruch 膜⁶⁾などの眼組織を組織学および組織化学的に検索し, 小眼球症の成立機序について検討してきた. その結果, ホモ接合体の角膜, 強膜, Bruch 膜には組織学

表2 正常マウスの染色結果

	胎生14日	16日	18日	生後0日	4日	7日	14日
S-HID	+++	+++	+++	++	++	++	++
ChaseB/S-HID	+++	+++	+++	+	+	+	+
ChaseB/T-Hylase/S-HID	+	+	+	+	+	+	+
S-LID	++	++	++	+++	++	++	++
ST-Hylase/S-LID	+	+	+	0~+	+	+	+

S-HID : sensitized high iron diamine, ST : *Streptomyces*, S-LID : sensitized low iron diamine

表3 *Crs* マウスホモ接合体の染色結果

	胎生14日	16日	18日	生後0日	4日	7日	14日
S-HID	+++	+++	+++	+++	++	++	++
ChaseB/S-HID	+++	+++	+++	+++	+	+	+
ChaseB/T-Hylase/S-HID	+	+	+	+	0~+	0~+	0~+
S-LID	++	++	++	+++	++	++	++
ST-Hylase/S-LID	+	+	+	0	0~+	+	+

的な異常はみられなかったが、組織化学的に角膜と強膜ではコンドロイチン硫酸 A/C からコンドロイチン硫酸 B への変化の遅延, Bruch 膜ではコンドロイチン硫酸 B の欠損などが確認された。

Nakamura ら¹⁶⁾は発生過程のニワトリ皮膚に分布するグリコサミノグリカン分子種の変化について検討した。その結果、発育につれコンドロイチン硫酸 A/C が減少し、相対してコンドロイチン硫酸 B が増加する変化を観察した。近年、コラーゲンの産生およびコラーゲン会合には、コンドロイチン硫酸 A/C ならびに B が必須であることが報告されてきており、コラーゲンマトリックス形成にこれらの分子種が重要な役割を果たしていると考えられている¹⁷⁾。

本研究の結果を表 2, 3 にまとめた。正常マウスの眼瞼真皮に分布する主要なグリコサミノグリカン分子種は、胎生 18 日まではコンドロイチン硫酸 A/C で、生後 0 日からコンドロイチン硫酸 B となった。ホモ接合体では、生後 4 日に初めてコンドロイチン硫酸 B の割合がコンドロイチン硫酸 A/C の割合を上回った。以上のように、正常マウスと比較して、ホモ接合体の眼瞼真皮におけるコンドロイチン硫酸 A/C からコンドロイチン硫酸 B へ変化する時期が遅れていたことから、コラーゲン細線維形成に遅れがあることが推定された。

正常マウスおよびホモ接合体の両者において、胎生 14 日から眼瞼真皮内にヒアルロン酸が存在し、ともに生後 0 日に最も高いヒアルロン酸含有量を示した。正常マウスと比べて、ホモ接合体の眼瞼真皮に存在するヒアルロン酸量は生後 4 日まで多かった。従来、ヒアルロン酸には、保水作用、空隙分子作用、排除体積効果、電解質高分子作用、組織の構造維持作用といった多くの組織生理学的

機能があるといわれてきた^{18)~20)}。また、ヒアルロン酸は細胞表面レセプター (CD 44 など) を介して細胞移動にも関与することが知られてきている²⁰⁾。Oksala ら²¹⁾は口蓋粘膜の創傷治癒過程において、ヒアルロン酸が創傷部に増加し、線維芽細胞などの遊走に貢献し、結果としてコンドロイチン硫酸の分泌やコラーゲン再構築を促進することを報告している。今回、生後 0 日に観察された眼瞼真皮のヒアルロン酸量の増加は、羊水に包まれた胎内から胎外へという外部環境の変化にヒアルロン酸のもつ保水作用によって適応するためと推察される。また、正常マウスと比較してホモ接合体の眼瞼真皮内のヒアルロン酸量が生後 4 日まで多く存在していたが、これはコンドロイチン硫酸 A/C からコンドロイチン硫酸 B への移行時期の遅れによる眼瞼真皮内のコラーゲン細線維形成の遅延を補うために、組織の構造を維持し、さらに線維芽細胞の遊走を促進することによってコラーゲン細線維形成を活性化するためにヒアルロン酸が必要であったものと考えられる。以上をまとめると、ホモ接合体では眼瞼発生過程において一時期、コンドロイチン硫酸の質的異常がみられたが、最終的には正常マウスと同程度まで眼瞼が成熟したものと考えられる。

本研究結果から、小眼球症マウスホモ接合体の眼瞼は、組織学的な差異は見出されなかったが、組織化学的検索により、初めて発生過程において、生後 4 日までは成熟が遅れていることが推定された。ただし、*Cts* マウスホモ接合体も、生後 4 日以降はコンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸ともに正常マウスと同様な変化であったため、開瞼する生後 14 日以後に観察された瞼裂幅狭小は、眼窩眼瞼発育に対して眼球自体の発育が不良のため、眼球内容積が減少することが原因であると考えられる。

本論文は、第 101 回日本眼科学会総会で発表した。本研究は、平成 8 年度文部省科学研究費基盤研究 (A) (2)05404059 の援助を受けて行った。

文 献

- 1) **Coulombre AJ** : The eye. In : DeHaan RL, et al (Eds) : Organogenesis. Plenum Press, New York, 219—251, 1965.
- 2) **Mann I** : Developmental Abnormalities of the Eye. British Medical Association, London, 1957.
- 3) **野崎実穂, 馬嶋昭生, 池田晃三, 平林義章** : 小眼球症マウスにおける眼瞼発生過程の組織学的検索. 日眼会誌 102 : 540—544, 1998.
- 4) **馬嶋昭生** : 小眼球症とその発生病理学的分類. 日眼会誌 98 : 1180—1200, 1994.
- 5) **Ozeki H, Hirabayashi Y** : Histochemical studies on glycosaminoglycans in the developing sclera of experimental microphthalmic (*Cts*) mice. Nagoya Med J 38 : 89—97, 1993.
- 6) **宇野 真, 池田晃三, 馬嶋昭生, 平林義章, 山田和順** : 小眼球症マウス Bruch 膜に分布するグリコサミノグリカン分子種の組織学的検討. 日眼会誌 100 : 126—131, 1996.
- 7) **Hirabayashi Y** : Light - microscopic detection of acidic glycoconjugates with sensitized diamine procedures. Histochem J 24 : 409—418, 1992.
- 8) **平林義章, 磯貝文典, 山田和順** : 結合組織酸性複合糖質の光学組織化学における酵素消化法の活用法. Connective Tissue 24 : 193—197, 1992.
- 9) **Michelacci YM, Dietrich CP** : A comparative study between a chondroitinase B and a chondroitinase AC from Flavobacterium heparinum. Isolation of a chondroitinase AC-susceptible dodecasaccharide from chondroitin sulphate B. Biocem J 151 : 121—129, 1975.
- 10) **Ototani N, Yoshizawa Z** : Purification of chondroitinase B and chondroitinase C using glycosaminoglycan - bound AH - sepharose 4 B. Carbohydr Res 70 : 295—306, 1979.
- 11) **Leppi TJ, Stoward PJ** : On the use of testicular hyaluronidase for identifying acid mucins in tissue sections. J Histochem Cytochem 13 : 406—407, 1965.
- 12) **Yamada K** : Effects of novel hyaluronidase digestion upon some mucosaccharide stainings of the cartilages and aortas in the rabbit and rat. Histochemie 27 : 277—289, 1971.
- 13) **Ohya T, Kaneko Y** : Novel hyaluronidase from Streptomyces. Biochem Biophys Acta 198 : 607—609, 1970.
- 14) **大鳥 寛, 吉田豊彦, 狗田忠義** : マウスの小眼球症ともなう遺伝的白内障について. 実験動物 17 : 91—96, 1968.
- 15) **小林久生, 馬嶋昭生, 橋本 勝** : *Cts* マウスの小眼球症発現機序に関する研究 (第 1 報). 眼紀 32 : 680—685, 1981.
- 16) **Nakamura T, Nagai Y** : Developmental changes in the synthesis of glycosaminoglycans and collagen in embryonic chick skin. J Biochem 87 : 629—637, 1980.
- 17) **Vogel KG** : Glycosaminoglycans and proteoglycans. In : Yurchenco PD, et al (Eds) : Extracellular Matrix Assembly and Structure. Academic Press, San Diego, 243—279, 1994.
- 18) **Balazs EA, Gibbs DA** : The rheological properties and biological function of hyaluronic acid. In : Balazs EA (Ed) : Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix, Vol 3. Academic Press, London, 1241—1253, 1970.
- 19) **Ueno N, Watanabe M, Chakrabarti B** : Macromolecules of the vitreous body : A review. Folia Ophthalmol J 42 : 984—991, 1991.
- 20) **Laurent TC, Fraser JR** : Hyaluronan. FASEB J 6 : 2397—2404, 1992.
- 21) **Oksala O, Salo T, Tammi R, Hakkinen L, Jalakanen M, Inki P, et al** : Expression of proteoglycans and hyaluronan during wound healing. J Histochem Cytochem 43 : 125—135, 1995.