走査型電子顕微鏡によるラット角膜の内皮基底面と デスメ膜実質側・内皮側表面の観察

佐々木慶子¹¹,福留 初子²¹,井上 貴央²² ¹¹鳥取大学医学部眼科学教室,²¹鳥取大学医学部解剖学第二教室

要 約

目 的:ラットの角膜を用いて,内皮の基底面や実質 側と内皮側のデスメ膜表面の微細形態を走査型電子顕微 鏡(走査電顕)で観察した.

方 法:デスメ膜の超微細形態の観察には,金属コー ティングを施したものと,蒸着せずに,300℃に熱しなが ら無蒸着観察したものを比較検討した.

結果:内皮の基底面を走査電顕で観察すると,基底 細胞膜が波状に入り組んでいる様子や,飲み込み小胞の 開口部が観察できた.金属コーティングを施したデスメ 膜は粒状構造物から成っているように観察され,その粒 子の大きさは内皮側よりも実質側の方が大きかった.無 蒸着で,デスメ膜を観察するとデスメ膜は細い線維状構 造物から構成されていることがわかり,内皮側と実質側 ともに全体としてフェルト状を呈していた.実質側の線 維は,内皮側のものよりも太かった.

結 論:これらの所見は,デスメ膜両側のコラーゲン の型の相違を反映しているように思われる.(日眼会誌 103:92-98,1999)

キーワード:ラット角膜内皮,デスメ膜,金属コーティン グ,無蒸着観察法,走査型電子顕微鏡

Scanning Electron Microscopic Studies of the Basal Surface of the Corneal Endothelium and the Stromal and Endothelial Surfaces of Descemet's Membrane in Rats

Keiko Sasaki¹⁾, Hatsuko Fukudome²⁾ and Takao Inoué²⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Tottori University ²⁾Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Tottori University

Abstract

Purpose: The basal surface of the corneal endothelium and the stromal and endothelial surfaces of Descemet's membrane in rats were studied by scanning electron microscopy.

Methods: We compared the fine structures of the two surfaces of Descemet's membrane both after sputter-coating with platinum and without sputter-coating.

Results : Fine structures were made clearly visible without metal coating by heating specimens to 300°C during observation. On the basal surface of th endothelium, pinocytotic vesicles and invagination of the basal cell membrane were visible. After sputtercoating, Descemet's membrane appeared to be composed of granular substances. The size of the granules was larger on the stromal side than on the endothelial side. Descemet's membrane observed without sputter coating was composed of fine fibrous structures, showing a felt-like appearance on both stromal and endothelial sides. The diameter of the fibers on the stromal surface was thicker than on the endothelial side.

Conclusion: These results may indicate a characteristic difference between the collagen types existing on the two sides of Descemet's membrane. (J Jpn Ophthalmol Soc 103: 92–98, 1999)

Key words: Rat corneal endothelium, Descemet's membrane, Sputter-coating with platinum, Non-coating observation method, Scanning electron microscopy

別刷請求先:683-8504 米子市西町36-1 鳥取大学医学部眼科学教室 佐々木慶子

(平成 10 年 5 月 30 日受付, 平成 10 年 8 月 26 日改訂受理)

Reprint requests to: Keiko Sasaki, M.D. Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Tottori University. 36–1 Nishimachi, Yonago 683–8504, Japan

⁽Received May 30, 1998 and accepted in revised form August 26, 1998)

I 緒 言

走査型電子顕微鏡法(以下,走査電顕法)は,組織や細胞 の三次元構造を研究するうえで有用な方法である.1967 年にBlümckeら¹¹が角膜内皮の三次元的構造を観察して 以来,Svedberghら²¹などの多くの研究者が走査電顕を 用いて角膜の正常像や病理所見の三次元的な研究を行っ てきた.しかし,これらの観察は,内皮の前房側の表面観 察に限られていた.内皮基底側にはデスメ膜が存在し,内 皮と結合している.そのため,通常の試料作製法では内皮 基底側やデスメ膜の表面構造の観察は困難であり,これ らの三次元的微細形態は切片像による透過型電子顕微鏡 (以下,透過電顕)所見から推測されてきた.

今回,我々はこれまでに開発された走査電顕試料作製 法を角膜に応用し,これまで観察不可能であった面の剖 出を試みた.すなわち,機械的剝離法を用いて内皮基底面 とそれに対応するデスメ膜の内皮側を観察し,また Inouéら³の表面張力法を用いて,デスメ膜の実質側と内 皮側の表面微細形態を三次元的に観察した.

さらに,従来から行ってきた金属コーティングを施し て観察する方法と,最近開発された試料加熱による無蒸 着観察法⁴によって得られたデスメ膜の超微細形態を比 較検討した.その結果,角膜内皮基底側やデスメ膜の超微 細形態について若干の所見を得ることができたので報告 する.

Ⅱ 実験方法

材料として,雄雌のWistar系の成熟ラット(体重170 ~270g)を7匹用い,取り扱いは総理府「実験動物の飼育 および保管等に関する基準」(昭和55年3月)に基づく 「鳥取大学医学部実験動物指針」(昭和63年12月)に従っ た.すなわち,ペントバルビタールナトリウム(ネンブ タール[®])を腹腔内に投与(0.4~0.5 mg/kg)して麻酔し た後,ラットを開胸し,心尖部から生理食塩液を灌流して 脱血した.その後,直ちに1%グルタールアルデヒドと2 %パラホルムアルデヒドの混合液(0.1 M カコジル酸緩 衝液,pH7.2,160 mOsm)を全身灌流して固定した.次い で,眼球を摘出し,角膜を輪部から切り出し,角膜をさら に同固定液で数日間浸漬固定を行った.

角膜の各層の三次元的構造を剖出するため,固定した 試料を0.1 M 燐酸緩衝液(pH7.2,210 mOsm)で洗浄し た後,微針を用いて用手的に角膜表面を擦過した.その 後,1%四酸化オスミウムで1時間後固定した後,2%タ ンニン酸と1%四酸化オスミウムによる導電染色⁵⁰を施 し,上昇エタノール系列で脱水,t-ブチルアルコールに置 換して凍結乾燥⁶⁰を行った.乾燥した試料は金属性の試料 台に銀ペーストで接着し,白金を厚さ4nmにスパッタ コーティングして,電界放射型走査電顕(日立 HFS-2 ST)を用いて25 kVの加速電圧で観察した.



図1 角膜内皮とデスメ膜の透過型電子顕微鏡像. 左上挿入図は内皮基底面の拡大像(バーは0.5 µm) AC:前房, En:内皮, DM:デスメ膜, ST:固有層. 矢印:飲み込み小胞, 小矢印:デスメ膜内部にあった線 維構造, 矢じり:内皮基底面の細胞膜の波状の構造. 挿入 図の矢印:飲み込み小胞の拡大像.(バーは1 µm)

デスメ膜の観察には表面張力による解離法³⁰を応用し た、同様に眼球を摘出し、角膜を輪部から切除して1%四 酸化オスミウム(0.1 M 燐酸緩衝液, pH 7.2, 210 mOsm) で室温下に2時間固定し,0.1M燐酸緩衝液(pH7.2, 210 mOsm)で洗浄した後,30℃の0.1%四酸化オスミ ウムに12時間浸漬し浸軟処理を施した.次いで,試料を 蒸留水で洗浄し,上昇エタノール系列で脱水した後,試料 を蒸留水に 30~60 秒間投入した.この時, 試料の表面に は表面張力が働き,内皮を剝離することができ,デスメ膜 の剖出が期待された. 試料は1%四酸化オスミウム(0.1 M 燐酸緩衝液, pH 7.2, 210 mOsm) で 20 分間にわたっ て再固定した後,前記と同様に,試料を作製した.一部の 試料は,従来通り白金のスパッタコーティング(厚さ1 nm)を施して,上記の走査電顕で観察し,一部の試料は蒸 着せずに,加熱ホルダーを使用して 300℃ に加熱しなが ら電界放射型超高分解能走査電顕(日立 UHS-T 1)で観 察した4.

透過電顕の試料は,固定した角膜を細切し,0.2 M 蔗 糖加燐酸緩衝液 (pH 7.2,430 mOsm) で洗浄した後,1 % 四酸化オスミウムによる後固定を1時間施した.その後,



図2 機械的剝離によって剖出されたデスメ膜内皮側表面と固有層の表面の走査型電子顕微鏡像. En:内皮,DM:デスメ膜(デスメ膜内皮側),ST:固有層.バーは10 μm

1%酢酸ウラニルを用いて2時間ブロック染色を行い, 上昇エタノール系列で脱水した後,エポキシ樹脂に包埋 した.ウルトラミクロトーム(RMCMT 6000-XL)で超薄 切片を作製し,得られた切片はタンニン酸を含む結合組 織染色液"で電子染色を施し,透過電顕(日本電子 100 CXII)を用いて加速電透 80 kV で観察した.

III 結 果

角膜内皮の超薄切片を透過電顕で観察すると,内皮細胞の基底側には隣接する内皮細胞が嵌入し,それらの細胞境界は入り組んだ構造を成していた(図1).デスメ膜に面した内皮細胞基底側の細胞膜は波状を呈し,飲み込み小胞が散在性に観察された(図1左上).デスメ膜は厚さが2.5~3.0µmで,均一無構造な物質として観察された.デスメ膜の内皮側は平坦ではなく,内皮細胞基底側の波状構造に対応してやや突出しているように観察された.デスメ膜の大部分は均一無構造であったが,実質側には電子密度がやや高い線維状構造物が埋没していた.デスメ膜の実質側には,膠原線維を主体とする固有層が存在するが,この膠原線維の一部はデスメ膜に付着しているように観察された.しかし,境界は不明瞭であった.

走査電顕で角膜を観察すると,内皮細胞は六角形をし ており,デスメ膜の上に存在していた.固定した角膜を小 針を用いて機械的に引っかくと,内皮細胞やデスメ膜の 一部を除去することができ,デスメ膜の内皮側の表面や デスメ膜の下に存在する固有層の表面が観察できた(図 2).また,角膜表面を擦過した試料では,試料作製中に内 皮細胞が剝離して反転することがあり,その場合は,内皮 の基底側を観察することができた(図3a).そこには多数 の浅い陥凹構造と小窩が存在した.浅い陥凹構造の直径 は100~150 nm,小窩の直径は200 nm で,基底側の細胞 膜は全体的にちりめん状構造を呈していた.内皮細胞を 剝離して得られたデスメ膜内皮側の表面を走査電顕で観 察すると,2種類の大きさの突出構造物がみられ,表面は 全体として凸凹していた(図3b).

微針を用いた機械的な方法によってもデスメ膜を剝離 反転させることができ、デスメ膜の実質側が観察できた が、広範囲に膠原線維が付着していてデスメ膜そのもの の微細形態は観察できなかった.しかし、表面張力による 解離法を用いて試料を作製すると、角膜内皮や膠原線維 はデスメ膜から完全に剝離除去され、デスメ膜そのもの も実質から剝離することができた(図 4).

常法に従って金属コーティングを施し、デスメ膜内皮 (図5a)とデスメ膜実質側(図5b)の超微形態を観察 すると、デスメ膜の表面はいずれも顆粒状の構造物で構 成されているように思われた、内皮側の顆粒状構造物は、 実質側のものより小さかった、両側の顆粒状構造物の直 径を全金属コーティング試料を対象に計測し、その計測 頻度をヒストグラムに示した(図6).その結果、両者のヒ ストグラムに明らかな違いがみられた、すなわち、実質側 の顆粒状構造物の大きさは内皮側よりも大きく、その大 きさにばらつきがあった、これに対し、内皮側の顆粒構造



図3 内皮細胞基底面(a)とデスメ膜内皮側表面(b)の走査型電子顕微像. a:全体的にちりめん状構造を呈する.矢印:小窩.バーは2µm b:デスメ膜の内皮側表面には,内皮細胞基底面のちりめん状構造に対応する凹凸構造が観察される.矢印: 小窩に対応する突出構造.バーは1µm



図 4 表面張力を用いて解離させたデスメ膜の走査型電子顕微像.

デスメ膜から内皮細胞層はきれいに剝離除去され、デ スメ膜自体も実質から剝離されている.DM:デスメ 膜,ST:固有層.バーは1mm

物の大きさは小さく,実質側よりも比較的均一であるこ とが示された.ちなみに,内皮側の顆粒状構造物の直径の 平均は 30.0±8.0 nm(平均値±標準偏差)であり,実質 側のそれは 50.0±12.8 nm であった.

デスメ膜の本来の構造を観察するため、金属コーティ ングを施行せずに、300℃に加熱しながら観察した.この 方法によって試料の導電性を高めることができ、超高倍 率でデスメ膜の微細形態を観察することができた.加熱 を継続しながら試料を観察したが,加熱による試料の変 形や損傷は全くなかった.デスメ膜内皮側は,直径15~ 20 nmの細い線維と無定型の物質が絡み合って全体と してフェルト状を呈していた(図5c).一方,デスメ膜実 質側(図5d)では,内皮側よりも太い直径30~50 nmの 索状構造物が絡み合ってフェルト状を呈していた.

IV 考 按

走査電顕法は,組織や細胞の三次元的微細構造を観察 するうえで有用な方法で,走査電顕が開発された比較的 早い時期から眼組織に応用されてきた.角膜内皮におい ては、1967年に Blümcke ら¹が家兎の角膜の前房側の表 面構造を観察し、角膜内皮が六角形を呈し、前房側には微 絨毛が散在していることを報告した.その後, Svedbergh ら²⁰は角膜中央から輪部までを4つのゾーンに分けて,走 査電顕法で内皮細胞の前房側表面形態を比較観察し,孤 立線毛の出現頻度に差があることや, Hassal-Henle 結節 の三次元的な存在部位を明らかにした.その後も走査電 顕法は数多くの研究者^{8)~11}によって用いられてきたが, 角膜内皮の観察は前房側の表面形態に限られており,内 皮基底側を観察した報告はない.また,デスメ膜は角膜内 皮によって覆われているので,これまではその微細形態 を走査電顕で観察することは困難であった.角膜の三次 元的微細形態は主に透過電顕像や光学顕微鏡像から類推 するにとどまっており, Hogan ら¹²⁰の内皮, デスメ膜, 固 有層の三次元的模式図も角膜の切片像をもとに描かれた



図5 蒸着(1 nm)後のデスメ膜(a, b)および無蒸着(加熱処理後)のデスメ膜(d, e). a:デスメ膜内皮側の表面.顆粒状の構造物がある.バーは 10 nm b:デスメ膜実質側の表面.aに対して、やや大きめの顆粒状の構造物がある.バーは 100 nm c:デスメ膜内皮側の表面.細かい線維が絡み合ってフェルト状を呈している.バーは 100 nm d:デスメ膜実質側の表面.cよりも太い線維が密に集まりフェルト状を呈している.バーは 100 nm

ものである.

今回,我々は剥離法,表面張力による解離法を組み合わ せて用いることにより,これまで直接的な観察が困難で あった内皮基底面や,デスメ膜内皮側と実質側を効果的 に剖出し,若干の知見を得ることができた.超薄切片で観 察された内皮基底面の細胞膜の波状構造(図1)は,走査 電顕法で図3aに示されたちりめん状構造とよく対応し ていた.内皮基底面にみられた小窩は,透過電顕で観察さ れた飲み込み小胞(図1左上)の開口部に相当する構造と 考えられ,実質からの過剰な水分を前房に吸み出し,角膜 実質の浮腫防止に関与しているものと思われる.

内皮細胞とデスメ膜との間には、ヘミデスモゾームな どの接着装置が存在しないといわれている¹³.今回,超薄 切片で観察された内皮基底面の波状構造のうち、デスメ 膜に向かって突出している部分は電子密度が高い.この 電子密度の高い突出構造は、内皮細胞とデスメ膜との間 の何らかの結合に関与しているのではないかと考えられ る.生体内の結合蛋白として知られているフィブロネク チンには、細胞性フィブロネクチンと血漿性フィブロネ クチンがあるが、細胞性フィブロネクチンは、眼組織の 様々な部位に局在していることが明らかにされてきた. 螢光抗体法を用いてヒトやラットのデスメ膜にフィブロ ネクチンが存在することが明らかになっている¹⁰¹⁵.今回 観察された電子密度の高い部分にこのような結合蛋白が 存在するのではないかと考えられるが、詳細な検討は今 後の課題としたい.

デスメ膜と固有層の境界はデスメ膜と内皮との境界ほ ど明瞭でなく,固有層とデスメ膜の間には膠原細線維が 存在し,デスメ膜の固有層側にも膠原線維が埋没してい るといわれている¹⁶.駒井ら¹⁶はこの膠原線維が,固有層 とデスメ膜の結合を強固にする役割を果たしていると考 えている.今回の超薄切片像においても,デスメ膜の実質 側には電子密度の高い線維構造や,デスメ膜に埋没して いる膠原細線維があり,固有層側でデスメ膜が強固に結 合している様子を観察することができた.

1758 年に Jean Descemet が発見したデスメ膜は当初,





ガラス状で無構造な膜と考えられていた17が,1956年に, Jakus はデスメ膜の中に帯状や六角格子状の周期的な構 造を発見した18.多くの生物のデスメ膜は、ほぼ同じ構造 をしているといわれ¹⁸⁾, 六角形の格子構造はウシのデス メ膜で明瞭に観察される^{18)~22)}. Sawada²⁰⁾は SDS-メルカ プトエタノールや SDS-メルカプトエタノールウレア処 理を行ってデスメ膜に含まれる無定型物質を溶解し, VIII 型コラーゲンの六角形の構造を高い分解能を有す るレプリカ法で捕らえることに成功している. ラットで はこのような格子状構造は明瞭ではないが、六角格子が みられるとする見解もある¹⁸.今回得られた走査電顕像 は十分な分解能を有しているが,六角格子構造は観察で きなかった.これは VIII 型コラーゲンの周囲に何らかの 物質が存在するため、六角形構造を隠蔽しているのかも 知れない、Sawada²⁰⁾が行ったように、抽出処理を行うと 六角格子構造をとらえることができるかも知れないが, 今後の課題としたい.

Sawada²³は走査電顕法によって, 膵臓の腺房細胞, 毛 細血管, 心筋の基底膜の三次元的微細形態を初めて明ら かにした. その観察によると, 基底膜は様々な大きさの顆 粒状の構造物から成っているとされている. 本研究にお いて, 金属コーティングを施したデスメ膜は粒状構造物 で構成されているように観察され, この所見は Sawada²³の観察所見とほぼ一致する. しかし, 金属コーティン グを施すと金属粒子の集塊によって本来の超微形態が隠 蔽されてしまうのは承知の事実である. この粒状構造物 は内皮側と実質側でその大きさに明らかな差がみられ, 本来の構造にもデスメ膜の構成成分に大きさの相違があ ることが示唆された. 今回, 最近開発された加熱無蒸着観 察法を導入して, デスメ膜の超微形態を観察したところ, 従来の方法で観察した像とはかなり異なり, 細い線維状 物質や無定型物質が絡み合って全体としてフエルト状を 呈していることが明らかになった.さらにデスメ膜の実 質側は,内皮側表面よりも太い線維が密に集まっている ことが明らかになった.このような相違は,デスメ膜の実 質側に膠原線維が付着・埋没することによるかも知れな い.

デスメ膜のコラーゲンは、一般的に VIII 型コラーゲン が占め、一部 IV 型コラーゲンが存在し、わずかに VI 型 コラーゲンが存在するとされている²⁴. VIII 型コラーゲ ンはコラーゲン分子が規則的に配列して六角形の構築を とるが、IV 型コラーゲンは四量体がさらに複雑な網目 を、VI 型コラーゲンは四量体が線維状を成すことが知ら れている²⁴.

Marshall ら²⁰はデスメ膜内でのコラーゲンの型別の分 布を追求した結果, VIII 型コラーゲンは前層に多く存在 し, IV 型コラーゲンは後層に多く存在し, 前層と実質の 移行部にデスメ膜と実質の接着の役割をすると考えられ る VI 型コラーゲンが多く存在することを明らかにし た. Johnson ら¹⁹はデスメ膜の実質側が胎生5か月にす でに存在し, その後厚さが不変なのに対し, 内皮側は加齢 的に厚さが増すことを明らかにしており, このような発 生学的背景の相違が前層と後層のコラーゲンの分布の相 違を生み出していると考えられる.

今回の走査電顕所見で示されたデスメ膜表面にあった 線維がどの型のコラーゲンであるかを,形態学的特徴か らのみ同定することはできない.しかし,今回明らかに なったデスメ膜の両側の微細形態の相違は,コラーゲン の型の相違を反映しているように思われる.今回の試料 作製法では,オスミウムを固定剤として用いることで,抗 原性が失活しており,そのままでは免疫組織学的にコ ラーゲンの型を同定するのは不可能であると考えられ る.今後さらに新しい剝離法が開発され,デスメ膜の両側 を免疫電子顕微鏡的な手技によってコラーゲン型が決定 されることを望んでいる.

稿を終えるに当たり,御校閲をいただきました鳥取大学医 学部眼科学教室玉井嗣彦教授,電子顕微鏡試料の撮影に御協 力いただきました鳥取大学医学部解剖学第二教室長武 均技 官に深謝いたします.

文 献

- Blümcke S, Morgenroth K Jr: The stereo ultrastructure of the external and internal surface of the cornea. J Ultrastruc Res 18: 502-518, 1967.
- Svedbergh B, Bill A: Scanning electron microscopic studies of the corneal endothelium in man and monkeys. Acta Ophthalmol 50: 321–336, 1972.
- Inoué T, Osatake H, Tanaka K: Use of surface tension to enable observation of submembranous structures by scanning electron microscopy. J Electron Microsc 33: 258-260, 1984.
- 4) 長武 均, 井上貴央:加熱による走査電顕生物試料の無蒸着超高倍率観察.電子顕微鏡 33 (Suppl. 1): 207, 1998.
- Murakami T : A revised tannin osmium method for non-coated scanning electron microscope specimens. Arch Histol Jpn 36: 189–193, 1972.
- 6) Inoué T, Osatake H: A new drying method of biological specimens for scanning electron microscopy: The t-butyl alcohol freeze drying method. Arch Histol Cytol 51: 53-59, 1988.
- 7) Kajikawa K, Yamaguchi T, Katsuda S, Miwa A: An improved electron stain for elastic fibers using tannic acid. J Electron Microsc 24: 287–289, 1975.
- 8) Doughman DJ, Van Horn D, Rodman WP, Byrnes P, Lindstrom RL: Human corneal endothelial layer repair during organ culture. Arch Ophthalmol 94:1791-1796, 1976.
- 9) MacCallum DK, Bahn CF, Lillie JH, Meyer RF, Martony CL: Evidence for corneal endothelial cell hypertrophy during postnatal growth of the cat cornea. Invest Ophthalmol Vis Sci 24: 247-250, 1983.
- 10) Melamed S, Ben Sira I, Ben Shaul Y: Corneal endothelial changes under induced intraocular pressure elevation: A scanning and transmission electron microscopic study in rabbits. Br J Ophthalmol 64:164—169, 1980.
- 杉田 新:眼組織の走査電子顕微鏡的研究.第1報 角膜上皮および角膜内皮.日眼会誌 80:867-882, 1976.
- 12) Hogan MJ, Alvarado JA, Weddel JE: The cornea. In: Hogan MJ, et al (Eds) : Histology of the

Humann Eye. An Atlas of Textbook. WB Saunders, Philadelphia, 55—111, 1971.

- 13) Fine BS, Yanoff M: The cornea. In: Fine BS, et al (Eds): Ocular Histology. A Text and Atlas. Harper & Row, Hagerstown, 163—193, 1979.
- 14) Kohno T, Nino S, Ishibashi T, Randi G, Stephen JR : Immunofluorescent studies of fibronectin and laminin in the human eye. Invest Ophthalmol Vis Sci 28: 506—514, 1987.
- 15) Sramek SJ, Wallow IHL, Bindley C, Sterken G: Fibronectin distribution in the rat eye. Invest Ophthalmol Vis Sci 28:500-505, 1987.
- 16) 駒井好子, 牛木辰男, 井出千束:角膜を構成する膠 原細線維の配列一細胞消化/走査電顕による観察を 中心として一. 眼紀 41:499-504, 1990.
- 17) Waring GO, Laibson PR, Rodrigues MM : Clinical and pathological alterations of Descemet's membrane : With emphasis on endothelial metaplasia. Surv Ophthalmol 18: 325—368, 1974.
- 18) Jakus MA : Studies on the cornea. II. The fine structure of Descemet's membrane. J Biophys Biochem Cytol 2:243—255, 1956.
- 19) Johnson DH, Bourne WM, Campbell RJ: The ultrastructure of Descemet's membrane. I.Changes with age in normal corneas. Arch Ophthalmol 100: 1942—1947, 1982.
- 20) Sawada H : The fine structure of the bovine Descemet's membrane with special reference to biochemical nature. Cell Tissue Res 226 : 241-255, 1982.
- 21) Sawada H, Konomi H, Hirosawa K : Characterization of the collagen in the hexagonal lattice of Descemet's membrane : Its relation to type VIII collagen. J Cell Biol 110 : 219—227, 1990.
- 22) Sawada H, Konomi H, Nagai Y : The basement membrane of bovine cornea endothelial cells in culture with β - aminopropionitrile : Biosynthesis of hexagonal lattices composed of a 160 nm dumbbell -shaped structure. Eur J Cell Biol 35 : 226-234, 1984.
- 23) Sawada H : Structural variety of basement membranes : A scanning electron microscopic study. Biomed Res 2 (Suppl) : 125—128, 1981.
- 24) van Der Rest M, Garrone R : Collagen family of proteins. FASEB J 5 : 2814–2823, 1991.
- 25) Marshall GE, Konstas AGP, Lee WR : Collagens in ocular tissues. Br J Ophthalmol 77: 515-524, 1993.