

人眼前房隅角の発達に関する研究

—胎生期線維柱帯におけるグリコシアミノグリカンの検索—

杉浦 寅男

神戸大学医学部眼科学教室

要 約

胎生 26 週, 36 週および 2 歳の人眼各 1 眼の前房隅角組織をルテニウム・レッドで染色し, グリコシアミノグリカン (GAG) の電顕組織化学的検索を行った。胎生 26 週以降, Schlemm 管内壁内皮細胞の管腔側表面, 傍 Schlemm 管結合組織における無定型物質, 内皮細胞に沿った基板, 基板様物質, および膠原線維周囲に染色物を認めた。2 歳では, 内壁内皮細胞に沿った基板の染色物は不明瞭で, 基板様物質が多く染色されていた。放線菌ヒアルロニダーゼ, コンドロイチナーゼ AC, コンドロイチナーゼ ABC による酵素消化の結果, 各細胞外成分にヒアルロン酸が, 内壁内皮細胞の管腔側表面以外にはコンドロイチン硫酸が, 膠原線維周囲および無定型物質にデルマトン硫酸が含まれると考えられた。以上より, 胎生期より既に線維柱帯に GAG が存在して房水流出抵抗を形成しており, 発達に伴い各種 GAG の分布が変化を遂げる事が示唆された。(日眼会誌 96: 57-66, 1992)

キーワード: グリコシアミノグリカン, 線維柱帯, 胎生期人眼, ルテニウム・レッド, 酵素消化

Demonstration of Glycosaminoglycans (GAGs) in Fetal Human Trabecular Tissue

Torao Sugiura

Department of Ophthalmology, School of Medicine, Kobe University

Abstract

The ultrastructural localization of glycosaminoglycans (GAGs) in the developing human outflow apparatus was investigated. The aqueous outflow system from human eyes at 26th and 36th fetal week and 2 years of age was stained with ruthenium red to identify GAGs with the transmission electron microscope. Luminal surface of the inner wall of the Schlemm's canal, basal lamina of the endothelial cells, basal lamina-like material, amorphous substances and collagen fibrils in juxtacanalicular tissue were associated with ruthenium red-stainable material. The basal lamina of the endothelial cells of Schlemm's canal was stained less obviously in 2-year-old trabecular tissue. The composition of the ruthenium red-stainable material was determined by treatment of each tissue with streptomyces hyaluronidase, chondroitinase AC, and chondroitinase ABC respectively. Hyaluronic acid was identified in each ruthenium red-stainable extracellular component. Chondroitin sulfate was identified in all ruthenium red-stainable components except luminal surface of the canal. The presence of dermatan sulfate was confirmed in the amorphous components and collagen fibrils of juxtacanalicular

別刷請求先: 650 神戸市中央区楠町 7-5-2 神戸大学医学部眼科学教室 杉浦 寅男

(平成 3 年 3 月 1 日受付, 平成 3 年 5 月 23 日改訂受理)

Reprint requests to: Torao Sugiura, M.D. Department of Ophthalmology, School of Medicine, Kobe University.

7-5-2 Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe 650, Japan

(Received March 1, 1991 and accepted in revised form May 23, 1991)

tissue. The results suggest that GAGs in fetal trabecular tissue already contribute to the outflow resistance and that alterations of the pattern of GAGs may take place as development proceeds. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96 : 57-66, 1992)

Key words : Glycosaminoglycan, Trabecular meshwork, Fetal human eye, Ruthenium red, Enzyme digestion

I 緒 言

房水流出抵抗は、主として Schlemm 管内壁直下の傍 Schlemm 管結合組織に存在すると考えられている¹⁾²⁾。房水流出抵抗がヒアルロニダーゼの前房内灌流によって減少すること^{3)~5)}から、ヒアルロニダーゼ感受性のグリコサミノグリカン (GAG) がこの抵抗を形成する重要な細胞外成分として注目されるようになり、正常成人眼および緑内障の房水流出系における GAG の組織化学的検索が行われてきた^{6)~12)}。Mizokami⁶⁾は正常成人眼の傍 Schlemm 管結合組織において GAG-蛋白複合体として封鎖された GAG を顕示化し、ヒアルロン酸およびデルマタン硫酸-蛋白複合体が房水流出抵抗と関連を持つことを示した。Segawa¹¹⁾は、原発開放隅角緑内障の傍 Schlemm 管結合組織の細胞外無定型物質にコンドロイチン硫酸-蛋白複合体が存在することを示し、房水流出能の低下との関連を示唆した。また、最近 Tawara ら¹²⁾は、クプロメロニックブルー染色を用いて正常成人眼の線維柱帯における硫酸系プロテオグリカンの局在を明らかにし、特にヘパラン硫酸タイプのプロテオグリカンが房水流出抵抗の形成に重要であると報告している。

一方、発育異常緑内障においては、傍 Schlemm 管結合組織が組織学的に正常より厚く存在しており、このため大きな房水流出抵抗を有することが主要な病因であると考えられている^{13)~15)}。これは胎生期の線維柱帯の構造に類似していることから¹⁴⁾¹⁶⁾、発達過程における分化障害によるものと考えられる。しかし、胎生期の線維柱帯における GAG の存在については知られておらず、また発育異常緑内障の発症に線維柱帯の発達の未熟性が GAG のレベルでどのように関与しているかは明確でない。

発達過程の房水流出系における GAG の局在を解明することは発育異常緑内障等の発症機序を考える上でも重要と思われる。今回、胎生期および生後の発達過程にある正常成人眼を用いて前房隅角組織のルテニウム・レッド (以下 RR) 染色を行い、酵素消化による

GAG の電顕組織化学的検索を行ったので報告する。

II 対象および方法

1. 対象

胎生 26 週、胎生 36 週および 2 歳の人眼を各 1 例 1 眼ずつ用いた。胎生期の眼球は、出生後間もなく死亡し得られたもので、死因は胎生 26 週の児では超未熟児による重症仮死、胎生 36 週の児では呼吸不全であり、両者とも先天奇形は認めなかった。死亡より眼球の固定までに要した時間は 4 時間以内であった。眼軸長は、胎生 26 週眼では 12 mm、36 週眼では 17.4 mm であり、胎生週数に比して小眼球や明らかな形態異常は認めなかった。2 歳の眼球は、網膜芽細胞腫のため摘出後、速やかに固定されたもので、腫瘍は後極部のみに局在しており、前眼部への浸潤や、眼圧上昇は認めていなかった。眼球摘出はすべて家族の同意のもとに行われた。

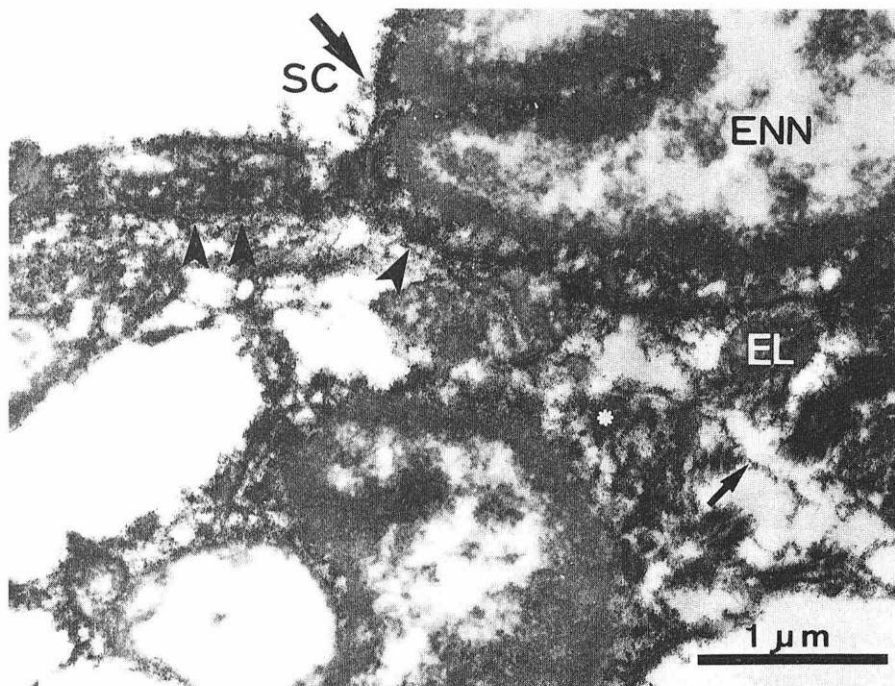
2. 方法

各摘出眼球を赤道部のやや前方で半切後、1%セチル・ピリミジニウム・クロライドを含む 4%グルタル・アルデヒド、0.1 M カコジレイト緩衝液 (pH 7.4) 中に 1 時間保存し、同液中で実体顕微鏡下に前房隅角部の組織を眼球の子午線方向に厚さ約 1 mm のブロックとして前眼部の 4 象限から少なくとも 4 つずつを切り出した。その後、以下の群に分けて検討した。

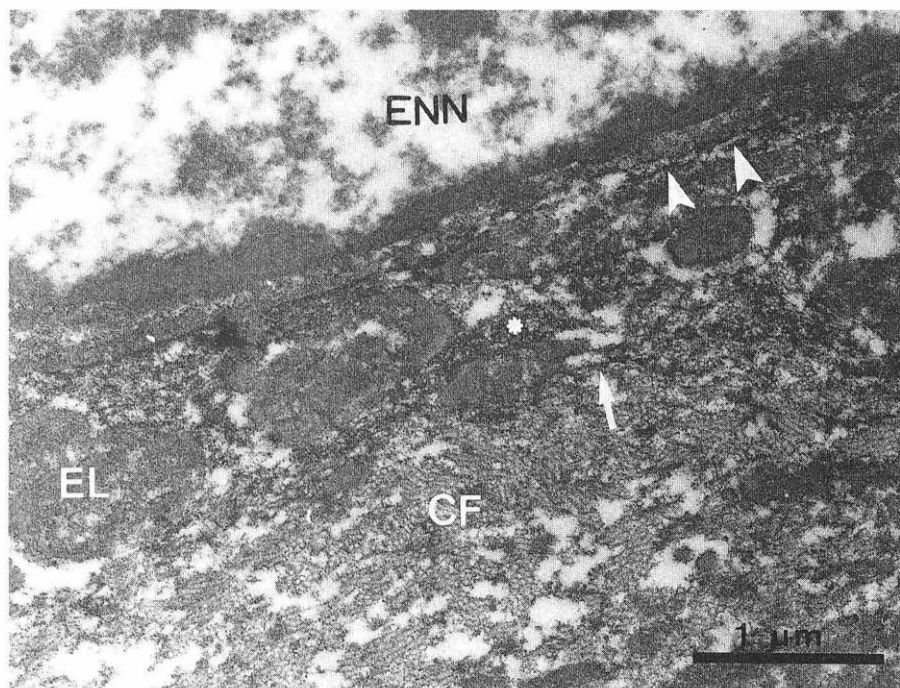
1) ルテニウム・レッド (RR) 染色

1,000 ppmRR を含む 4%グルタル・アルデヒド、0.1 M カコジレイト緩衝液 (pH 7.4) で 2 時間室温にて固定および染色を行った。0.1 M カコジレイト緩衝液で洗浄後、1,000 ppmRR を含む 1%オスミウム酸、0.1 M カコジレイト緩衝液で 3 時間後固定し、エタノール系列で脱水、アラルダイト包埋を行った。眼球の子午線方向に厚さ 80~90 nm の超薄切片を作製後、電子染色を行わずに電子顕微鏡的に観察した。観察部位はすべて、Schlemm 管内壁の中央部と、それに隣接する傍 Schlemm 管結合組織とした。

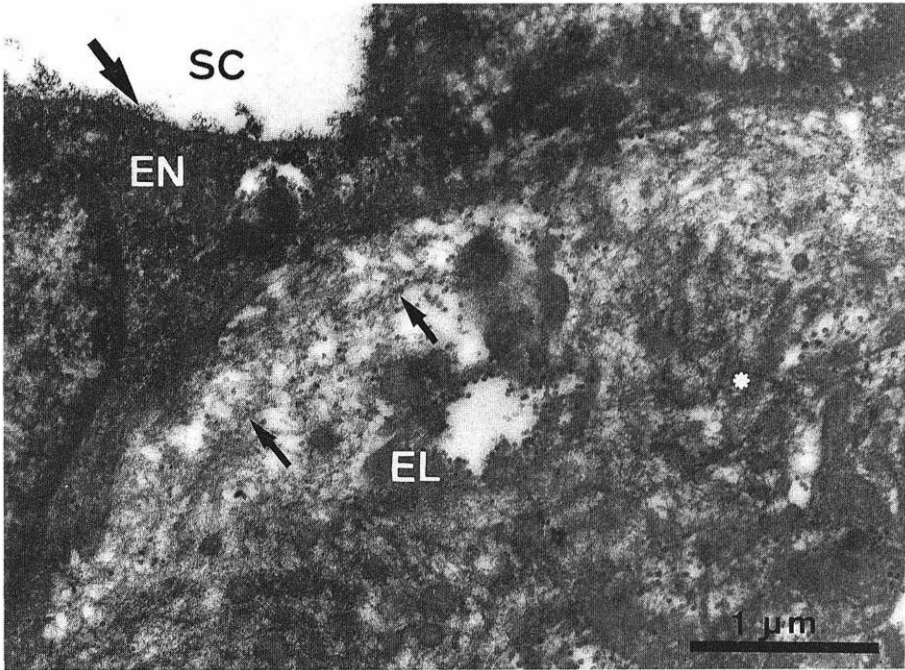
2) 酵素消化による GAG の成分検索



1a



1b



1c

図1 ルテニウム・レッド染色した傍 Schlemm 管結合組織の電顕像, 1a: 胎生 26 週, 1b: 胎生 36 週, 1c: 2 歳.
胎生 26 週, 36 週では Schlemm 管内壁内皮細胞に沿った基板(矢じり)の部位に, 断続的にルテニウム・レッド陽性を示したが, 2 歳の同部位では不明瞭であった. 基板様物質(矢印小), 無定型物質(*), 膠原線維(CF) 周囲にルテニウム・レッド陽性を示した. Schlemm 管内壁内皮細胞の管腔側表面(矢印大)にもルテニウム・レッド陽性物質を認めた. SC: Schlemm 管内腔, EN: Schlemm 管内壁内皮細胞, ENN: Schlemm 管内壁内皮細胞の核, EL: 弾性様線維 (×25,000, ルテニウム・レッド染色).

下記の酵素による消化実験を行った.

a) 放線菌ヒアルロニダーゼ: 隅角組織を 0.1 M 磷酸緩衝液で洗浄後, 放線菌ヒアルロニダーゼ (生化学工業)100 TRU/ml を含む 0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 5.5) で消化した.

b) コンドロイチナーゼ AC: 隅角組織を 0.05 M トリス塩酸緩衝液に 24 時間保存した後, 2.5 U/ml のコンドロイチナーゼ AC (生化学工業) を含む 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) で消化した.

c) コンドロイチナーゼ ABC: 隅角組織を 0.05 M トリス塩酸緩衝液に 24 時間保存した後, 2.5 U/ml のコンドロイチナーゼ ABC (生化学工業) を含む 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で消化した.

酵素による消化はすべて 37°C で 2 時間行った. また, a) および b) c) に対し, 酵素を含まない液での対照実験を行った. 以上の処理後, 0.1 M カコジレイト緩

衝液で洗浄し, 1) に従って RR 染色を行った.

RR は組織浸透性が極めて悪く, 同一資料でも切片によって染色性が異なる可能性があるため, それぞれの資料表面から約 5 μm の部位について比較検討した.

III 結 果

1. 通常のルテニウム・レッド (RR) 染色

1) 胎生 26 週: 通常の電子染色を施した電顕像においては, Schlemm 管内壁内皮細胞に沿って基板がほぼ連続的に認められた¹⁷⁾が, RR 染色を行うと, この部位は断続的に RR 陽性を示した. また傍 Schlemm 管結合組織の基板様物質, 無定型物質, 膠原線維周囲に RR 陽性を示した. Schlemm 管内壁内皮細胞の管腔側表面にも RR 陽性物質を認めた (図 1 a).

2) 胎生 36 週: Schlemm 管内壁内皮細胞に沿った

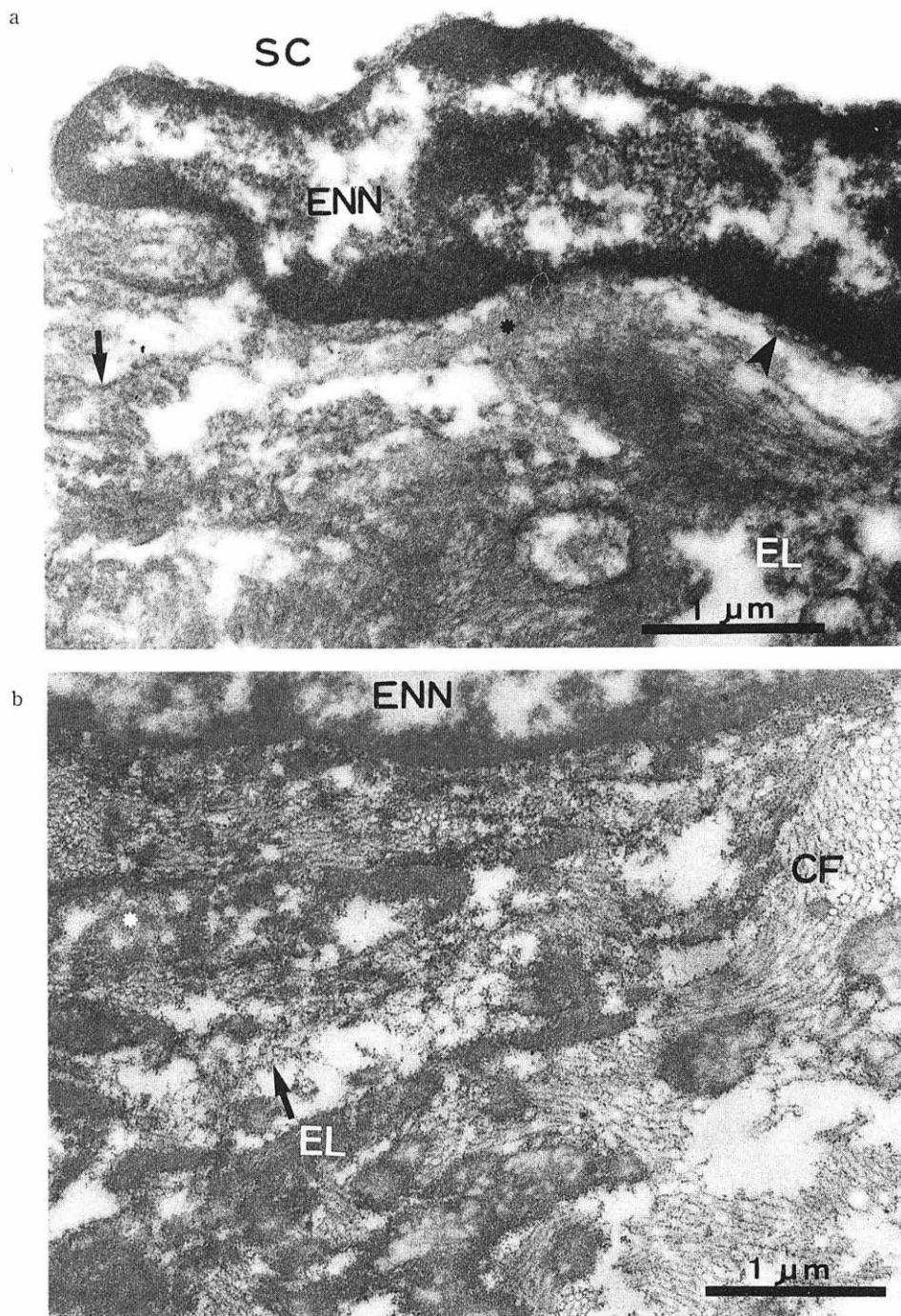
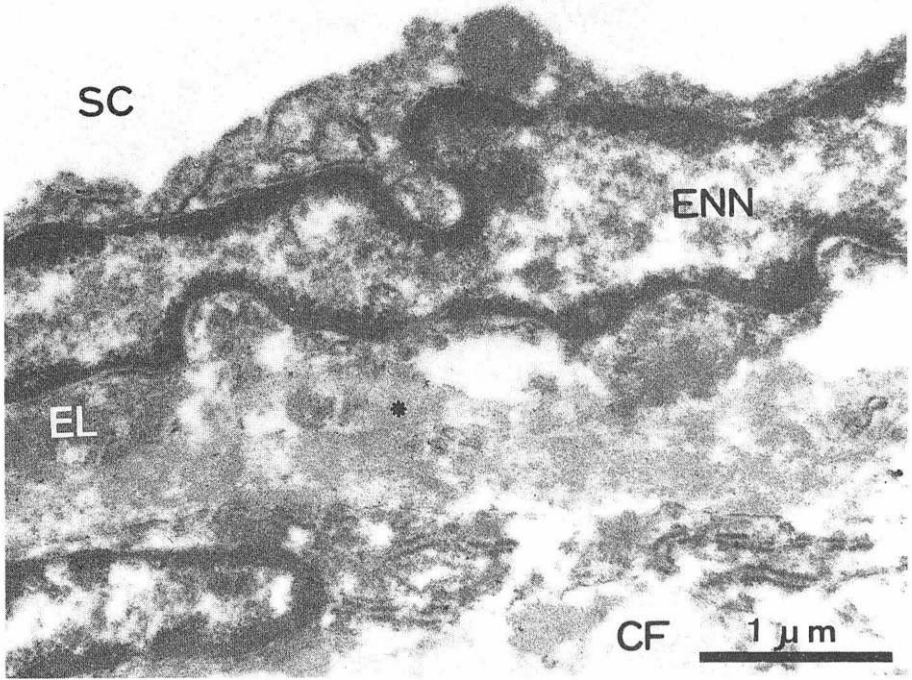


図2 放線菌ヒアルロニダーゼで消化した傍 Schlemm 管結合組織。a：胎生 26 週，b：胎生 36 週。内壁内皮細胞に沿った基板（矢じり），基板様物質（矢印），膠原線維（CF）周囲の染色性はいずれも軽度低下していた。無定型物質（*）の染色性は著明に低下していた。Schlemm 管内壁内皮細胞の管腔側表面に認められた染色物は消失していた。SC：Schlemm 管内腔，ENN：Schlemm 管内壁内皮細胞の核（ $\times 25,000$ ，ルテニウム・レッド染色）。

a



b

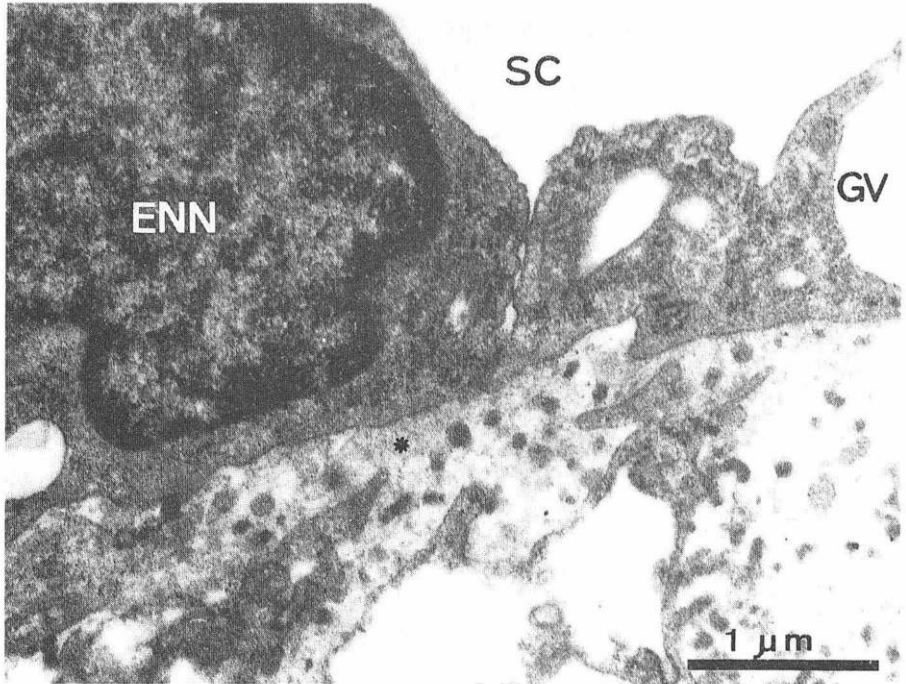


図3 コンドロイチナーゼ AC で消化した傍 Schlemm 管結合組織。a: 胎生 26 週, b: 2 歳。
 無定型物質 (*) および膠原線維 (CF) 周囲の染色性は、放線菌ヒアルロナーゼによる消化を行った
 場合よりも低下していた。また、内壁内皮細胞に沿った基板、基板様物質の染色性は消失していた。
 SC: Schlemm 管内腔, GV: 巨大空胞, ENN: Schlemm 管内壁内皮細胞の核 ($\times 25,000$, ルテニウム・
 レッド染色)。

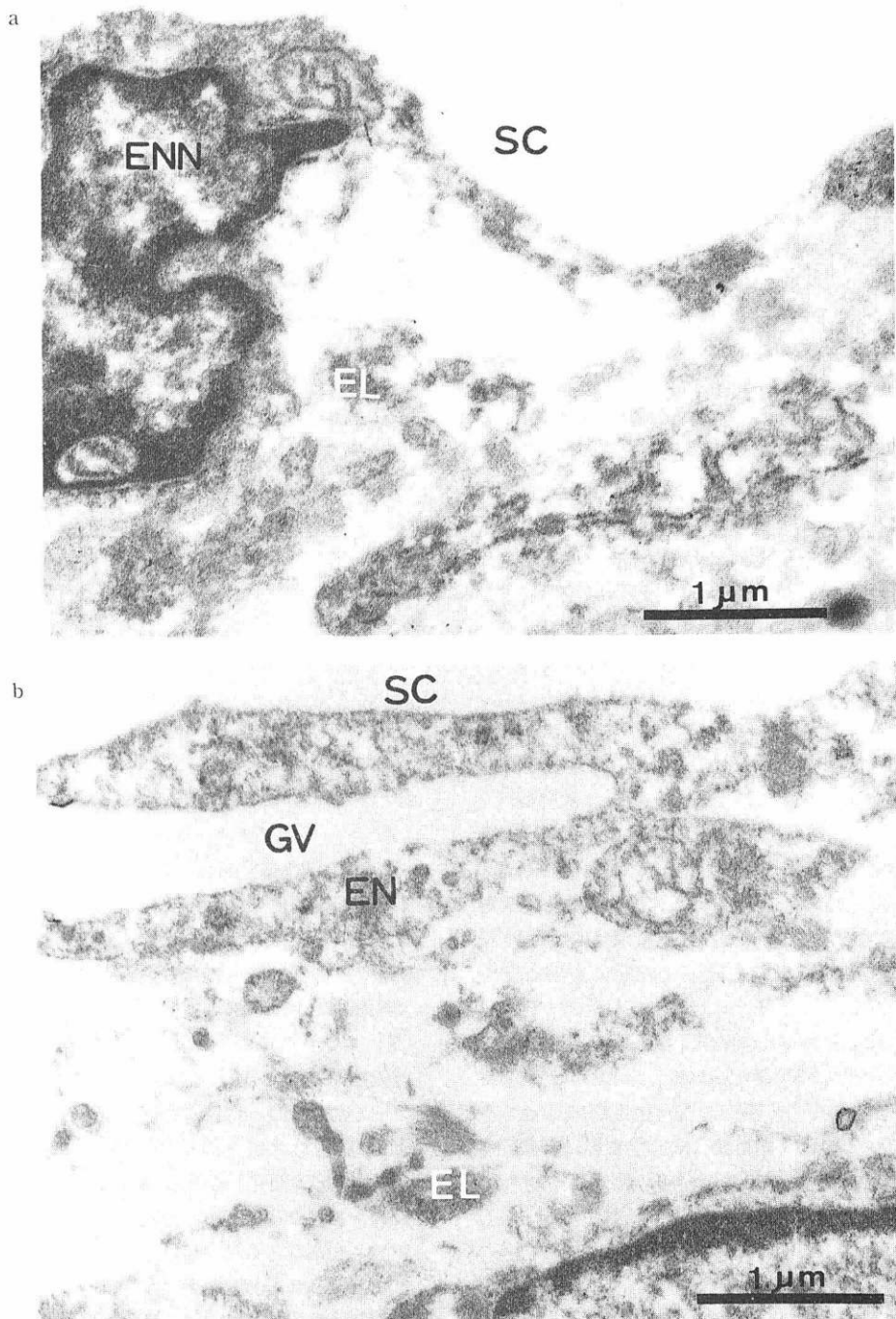


図4 コンドロイチナーゼ ABC で消化した傍 Schlemm 管結合組織。a: 胎生 26 週, b: 胎生 36 週。無定型物質, 内壁内皮細胞に沿った基板, 基板様物質, 膠原線維周囲の染色性は消失していた。SC: Schlemm 管内腔, GV: 巨大空胞, EN: Schlemm 管内壁内皮細胞, ENN: Schlemm 管内壁内皮細胞の核, EL: 弾性様線維 (×25,000, ルテニウム・レッド染色)。

表1 酵素消化後のルテニウム・レッド染色性の変化

RR-stainable component	Streptomyces hyaluronidase	Enzyme	
		Chondroitinase AC	Chondroitinase ABC
Luminal surface of SC	(-)	(-)	(-)
Basal lamina	↓	(-)	(-)
Basal lamina-like material	↓	(-)	(-)
Amorphous substances	↓	↓	(-)
Collagen fibrils	↓	↓	(-)

消化に用いた酵素を上段に、ルテニウム・レッドで染色された細胞外成分を左端に示す。
↓: 低下, (-): 消失, RR: ruthenium red, SC: Schlemm's canal

表2 胎生期, 発達過程の線維柱帯における GAG の分布

RR-stainable component	Glycosaminoglycans		
	Hyaluronic acid	Chondroitin sulfate	Dermatan sulfate
Luminal surface of SC	+	-	-
Basal lamina	+	+	-
Basal lamina-like material	+	+	-
Amorphous substances	+	+	+
Collagen fibrils	+	+	+

GAG のタイプを上段に、ルテニウム・レッドで染色された細胞外成分を左端に示す。
RR: ruthenium red, SC: Schlemm's canal

基底板の部位に、断続的に RR 陽性を示した。傍 Schlemm 管結合組織の無定型物質および膠原線維は胎生 26 週に比してやや多く分布しており、基底板様物質、無定型物質、膠原線維周囲に RR 陽性を示した。Schlemm 管内壁内皮細胞の管腔側表面にも RR 陽性物質を認めた (図 1b)。

3) 2 歳: 胎生期眼球と異なり、基底板が不明瞭であり、RR の染色性も不明瞭であった。Schlemm 管内壁内皮細胞より離れて基底板様物質が胎生期に比して多く認められ、RR 陽性を示した。無定型物質、膠原線維周囲、Schlemm 管内壁内皮細胞の管腔側表面の物質に RR 陽性を示した (図 1c)。

2. 酵素消化による GAG の成分検索

1) 放線菌ヒアルロニダーゼ

胎生 26 週, 36 週, および 2 歳とも、内壁内皮細胞に沿った基底板, 基底板様物質, 膠原線維周囲の染色性はいずれも軽度低下していた。無定型物質の染色性は著明に低下していた。Schlemm 管内壁内皮細胞の管腔側表面に認められた染色物は消失していた (図 2a, b)。

2) コンドロイチナーゼ AC

胎生 26 週, 36 週, および 2 歳とも、無定型物質および膠原線維周囲の染色性は、放線菌ヒアルロニダーゼによる消化を行った場合よりも低下していた。また、内壁内皮細胞に沿った基底板, 基底板様物質の染色性は消失していた (図 3a, b)。

3) コンドロイチナーゼ ABC

胎生 26 週, 36 週, および 2 歳とも、無定型物質、内壁内皮細胞に沿った基底板, 基底板様物質, 膠原線維周囲の染色性は消失していた (図 4a, b)。

以上の酵素消化の結果を表 1 に示す。

IV 考 按

Thornfeldt ら¹⁸⁾は、胎生期人眼における GAG の光顕組織化学的検索を行い、胎生期の強膜や角膜には GAG が存在するが、線維柱帯にはどの胎生週数においても認められなかったとしており、それ以後胎生期の前房隅角における GAG についての詳細な検討は行われていなかった。

今回の検討で、胎生期人眼の前房隅角組織を RR で

染色し、電顕的に観察したところ、線維柱帯にRR陽性の細胞外成分を認めた。RRは、GAGと強い親和性を持つことが知られているが、一部の糖蛋白や糖脂質をも染色する¹⁹⁾²⁰⁾ため、GAGに特異的でないこと、組織浸透性が悪いことが欠点としてあげられる。そのため、RR染色の前に放線菌ヒアルロニダーゼ、コンドロイチナーゼAC、コンドロイチナーゼABCの各酵素による消化実験を行い、それぞれの資料表面から約5 μ mの部位について比較検討した。その結果、RR陽性の種々の細胞外成分は、それぞれの酵素により染色性の低下または消失を示したことから、胎生期の線維柱帯に既にGAGが存在することが示された。

RR染色の前に放線菌ヒアルロニダーゼで消化を行うと、胎生26週、36週、および2歳とも、内壁内皮細胞に沿った基底板、基底板様物質、膠原線維の染色性は軽度低下し、無定型物質の染色性は著明な低下を示した。またSchlemm管内壁内皮細胞の管腔側表面に認められた染色物は消失していた。放線菌ヒアルロニダーゼはヒアルロン酸を特異的に分解し、種々のコンドロイチン硫酸、コンドロイチンは分解されないことが知られている²¹⁾。従ってヒアルロン酸は、内壁内皮細胞に沿った基底板、基底板様物質、膠原線維周囲に存在し、また無定型物質に含まれる主なGAGであり、Schlemm管内壁内皮細胞の管腔側表面に認められた染色物の本体であると考えられる。

コンドロイチナーゼACによる消化を行うと、胎生26週、36週、および2歳とも、無定型物質および膠原線維周囲の染色性は、放線菌ヒアルロニダーゼによる消化を行った場合よりも低下していた。また、内壁内皮細胞に沿った基底板、基底板様物質の染色性は消失していた。コンドロイチナーゼACは、ヒアルロン酸、コンドロイチンとコンドロイチン硫酸(4, 6)を分解することから、これらの細胞外成分にはコンドロイチン硫酸も含まれると考えられる。Tawaraら¹²⁾は正常成人眼の検討で、基底板、および基底板様物質にヘパラン硫酸の存在を示しているが、今回の対象においてはコンドロイチナーゼACによる消化で染色性が消失したことから、ヘパラン硫酸が存在しているにもかかわらずであったか、あるいはin vivoでは存在しているにもかかわらずの可能性が考えられる。

コンドロイチナーゼACによる消化で残存していた無定型物質および膠原線維周囲の染色性は、コンドロイチナーゼABCによる消化で消失していた。コンド

ロイチナーゼABCは、ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸(4, 6)、さらにデルマタン硫酸を分解する。従って、これらの細胞外成分にはデルマタン硫酸も含まれると考えられる。以上より、発達過程の線維柱帯におけるGAGの分布は、表2のようになる。

今回の検討から、胎生26週には既に各種GAGが産生されており、これらは成人眼の房水流出系におけると同様に、胎生期より房水流出抵抗を形成していることが示唆された。さらに、胎生期眼のSchlemm管内壁内皮細胞に沿った基底板は、断続的にRR陽性を示していたのに対し、2歳の眼の同部位では不明瞭であったこと、2歳の眼では胎生期眼よりも基底板様物質が比較的多く染色されていたことから、正常眼の発達に伴って傍Schlemm管結合組織におけるGAGの分布が変化することが推察された。

また、培養された線維柱帯細胞が産生するGAGの組成は、培養初期では大部分がヒアルロン酸であるのに対し、長期培養すると相対的にヒアルロン酸は減少し、硫酸系のGAGが増加すること²²⁾²³⁾や、同様の現象が角膜の発達段階²⁴⁾においても起こることからも、発達、加齢など、ある状況下では産生されるGAGの成分比が変化する可能性もあると考えられる。

線維柱帯におけるGAGの量および組成は、線維柱帯細胞によって調整されていると考えられる。線維柱帯細胞の発達過程で分化障害があると、その調整機能が未熟であるために、1) GAGが過剰に産生される、2) GAGの代謝が悪いため多量に蓄積する、3) 産生されるGAGの組成が正常眼と異なるなどの理由で、正常眼より房水流出抵抗が増大することが考えられる。正常眼においては発達に伴って傍Schlemm管結合組織のGAGの分布が変化することが示唆されたが、発育異常緑内障では、線維柱帯細胞の発達過程で分化障害があるために、胎生期のGAGの分布が正常の変化を遂げず、大きな房水流出抵抗を生じることが発症と関連を持つ可能性があると考えられた。

稿を終えるにあたり、御校閲を賜った山本 節教授に深謝致します。また、御指導を賜った溝上義助教授に感謝致します。

文 献

- 1) Bill A, Svedbergh B: Scanning electron microscopic studies of the trabecular meshwork and the canal of Schlemm: An attempt to localize the main resistance to outflow of aqueous humor in man. *Acta Ophthalmol* 50: 295-320,

- 1972.
- 2) **Inomata H, Bill A, Smelser GK**: Aqueous humor pathways through the trabecular meshwork and into Schlemm's canal in the cynomolgus monkey (*Macaca irus*): An electron microscopic study. *Am J Ophthalmol* 73: 760—789, 1972.
 - 3) **Bárány EH, Scotchbrook S**: Influence of testicular hyaluronidase on the resistance to flow through the angle of the anterior chamber. *Acta Physiol Scand* 30: 240—248, 1954.
 - 4) **Bárány EH**: In vitro studies of the resistance to flow through the angle of the anterior chamber. *Acta Soc Med Uppsala* 59: 260—276, 1953.
 - 5) **Knepper PA, Farbman AI, Telser AG**: Exogenous hyaluronidases and degradation of hyaluronic acid in the rabbit eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25: 286—293, 1984.
 - 6) **Mizokami K**: Demonstration of masked acidic glycosaminoglycans in the normal human trabecular meshwork. *Jpn J Ophthalmol* 21: 57—71, 1977.
 - 7) **Grierson I, Lee WR**: Acid mucopolysaccharides in the outflow apparatus. *Exp Eye Res* 21: 417—431, 1975.
 - 8) **Armaly MF, Wang Y**: Demonstration of acid mucopolysaccharides in the trabecular meshwork of the rhesus monkey. *Invest Ophthalmol* 14: 507—516, 1975.
 - 9) **Grierson I, Lee WR, Abraham S**: The appearance of the outflow apparatus of the eye after staining with ruthenium red. *Acta Ophthalmol* 55: 827—836, 1977.
 - 10) **Richardson TM**: Distribution of glycosaminoglycans in the aqueous outflow system of the cat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 22: 319—329, 1982.
 - 11) **Segawa K**: Ultrastructural changes of the trabecular tissue in primary open angle glaucoma. *Jpn J Ophthalmol* 19: 317—338, 1975.
 - 12) **Tawara A, Varner HH, Hollyfield JG**: Distribution and characterization of sulfated proteoglycans in the human trabecular tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 2215—2231, 1989.
 - 13) **Tawara A, Inomata H**: Developmental immaturity of the trabecular meshwork in congenital glaucoma. *Am J Ophthalmol* 92: 508—525, 1981.
 - 14) **Tawara A, Inomata H**: Developmental immaturity of the trabecular meshwork in juvenile glaucoma. *Am J Ophthalmol* 98: 82—97, 1984.
 - 15) **Tawara A, Inomata H**: Congenital abnormalities of the trabecular meshwork in primary glaucoma with open angle. *Glaucoma* 9: 28—34, 1987.
 - 16) 杉浦寅男, 溝上國義, 山本 節: 人眼前房隅角の発達に関する研究—線維柱帯の発達—. *日眼会誌* 95: 650—656, 1991.
 - 17) 杉浦寅男, 溝上國義, 山本 節: 人眼前房隅角の発達に関する研究—Schlemm管の発達—. *日眼会誌* 95: 650—656, 1991.
 - 18) **Thornfeldt PR, Reeh MJ, Kodama J**: Investigation of acid mucopolysaccharide in fetal chamber angles. *Am J Ophthalmol* 50: 801—804, 1960.
 - 19) **Luft JH**: Ruthenium red and violet: I. Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. *Anat Rec* 171: 347—368, 1971.
 - 20) **Luft JH**: Ruthenium red and violet: II. Fine structural localization in animal tissues. *Anat Rec* 171: 369—416, 1971.
 - 21) **Ohya T, Kaneko Y**: Novel hyaluronidase from streptomyces. *Biochim Biophys Acta* 198: 607—609, 1970.
 - 22) **Schachtschabel DO, Rohen JW, Wever J, et al**: Synthesis and composition of glycosaminoglycans by cultured human trabecular meshwork cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 218: 113—117, 1982.
 - 23) **Crean EV, Tyson SL, Richardson TM**: Factors influencing glycosaminoglycan synthesis by calf trabecular meshwork cell cultures. *Exp Eye Res* 43: 365—374, 1986.
 - 24) **Hart GW**: Biosynthesis of glycosaminoglycans during corneal development. *J Biol Chem* 251: 6513—6521, 1976.