

## ブタ膵 elastase-1 の人線維柱組織内 elastin に及ぼす影響

—免疫組織化学的研究：第1報—

保谷 卓男

信州大学医学部眼科学教室

## 要 約

正常屍体摘出眼および原発開放隅角緑内障 (POAG) 眼から得た線維柱組織を Lowicryl K 4 M に包埋し、電子顕微鏡試料を作製した。Elastin を protein A-gold 法により免疫染色し、電子顕微鏡にて観察した。また、高濃度から低濃度まで希釈したブタ膵 elastase-1 (PPE) および循環形態の一型である  $\alpha_1$ -antitrypsin-elastase complex ( $\alpha_1$ A-EL) を試料に作用させた後、上述の如く免疫染色し、金粒子の集積の変化を検討した。結果は、①正常屍体摘出眼および POAG 眼とも対照では、elastic fiber 内に elastin の存在を示す金粒子の集積が認められた。② PPE および  $\alpha_1$ A-EL はかなり低濃度でも金粒子の集積を減少させた。本研究結果から、elastin は人線維柱組織の elastic fiber 内に存在し、かなり低濃度の PPE および  $\alpha_1$ A-EL でも、人線維柱組織内の elastin を分解することが示された。(日眼会誌 97: 1011—1027, 1993)

キーワード：人線維柱組織, Protein A-gold, Elastin, ブタ膵 elastase-1,  $\alpha_1$ -antitrypsin-elastase complex

Effects of Porcine Pancreatic Elastase-1 on the Elastin  
in Human Trabecular Meshwork

—Immunohistochemical Studies: Report 1—

Takuo Hoya

Department of Ophthalmology, Shinshu University School of Medicine

## Abstract

The aim of this study was to determine the localization of elastin and to estimate the influence of porcine pancreatic elastase-1 (PPE) and  $\alpha_1$ -antitrypsin-elastase complex ( $\alpha_1$ A-EL), a circulating form of PPE, on the elastin in human trabecular tissue. Trabecular tissues obtained from normal post-mortem eyes and trabeculectomy specimens of primary open angle glaucoma (POAG) were used in this study. The tissues were embedded in Lowicryl K4M and sectioned for electron microscopy. Then the sections were subjected to protein A-gold immunohistochemical staining to determine the localization of elastin in the tissues. The sections were exposed to varying concentrations of PPE or  $\alpha_1$ A-EL, before immunolabeling, to evaluate the density of the gold particles in the tissue. The gold particles were localized in the elastic fibers of normal and POAG specimens. The density of gold particles was reduced by relatively low concentrations of PPE and  $\alpha_1$ A-EL in both normal and POAG specimens. These results suggest that elastin is localized in the elastic fibers of human trabecular tissues, and relatively low concentrations of PPE or  $\alpha_1$ A-EL dissolve the elastin in the tissues. (J Jpn Ophthalmol Soc 97: 1011—1027, 1993)

Key words: Human trabecular tissue, Protein A-gold, Elastin, Porcine pancreatic elastase-1,  $\alpha_1$ -antitrypsin-elastase complex

別刷請求先: 390 松本市旭3-1-1 信州大学医学部眼科学教室 保谷 卓男

(平成5年2月26日受付, 平成5年4月28日改訂受理)

Reprint requests to: Takuo Hoya M.D. Department of Ophthalmology, Shinshu University School of Medicine, 3-1-1 Asahi, Matsumoto 390, Japan.

(Received February 26, 1993 and accepted in revised form April 28, 1993)

## I 緒 言

弾性組織における重要な構成要素である elastic fiber には, elastin が存在することはよく知られている<sup>1)~4)</sup>。人線維柱組織の elastic fiber は通常のそれとは微細構造が異なる<sup>5)~7)</sup>ため, “elastic-like fiber”と呼ばれ<sup>8)7)</sup>, 本来の elastic fiber とは異なるものとして考えられていた。最近, 免疫組織化学的研究により, 人線維柱組織内の“elastic-like fiber”にも elastin が存在することが確認され<sup>8)9)</sup>, また, 培養人線維柱組織細胞にステロイドを投与すると elastin が産生されることが報告される<sup>10)</sup>とともに, 原発開放隅角緑内障(POAG)でも線維柱組織内に elastin の増加が観察されており<sup>11)</sup>, elastin が房水流抵抗増大に関与している可能性が示されている。

“Elastase”は, elastin 分解作用をもつ<sup>12)</sup>酵素である。ブタ脛 elastase-1(PPE)は, 動脈硬化症, 高血圧症, 糖尿病, 高脂血症に伴う血清脂質異常の改善薬として広く臨床で経口投与されており, 腸管から吸収され血液中へ移行し<sup>13)</sup>, 血液中では  $\alpha_1$ -antitrypsin および  $\alpha_2$ -macroglobulin といった血清蛋白質と結合して複合体をつくり<sup>14)</sup>, 組織に移行する<sup>15)</sup>ことが明らかにされている。しかし, この PPE が線維柱組織の elastin を分解するか否かについては不明である。

そこで今回, まず, ①正常眼および POAG 眼の線維柱組織の elastic fiber における elastin の局在を protein A-gold 法を用いた免疫染色を行い検討した上で, ②高濃度から低濃度までの各種濃度の PPE および  $\alpha_1$ -antitrypsin-elastase complex ( $\alpha_1$ A-EL) を作用させ, 線維柱組織内の elastin が分解されるか否かを, elastic fiber 内の金粒子の集積の変化により検討した。その結果, 人線維柱組織の elastic fiber 内には elastin が存在することが確認され, かなり低濃度の PPE および  $\alpha_1$ A-EL でも同組織内の elastin を分解することが判明したのでここに報告する。

## II 実験方法

### 1. 電子顕微鏡試料作製

アイバンクから提供された緑内障の既往のない 51~88 歳の正常屍体摘出眼 6 例 6 眼を, 遺族の同意を得た上で使用した。死亡から摘出まで 2~10 時間であり, 眼球は摘出後ただちに眼球保存液(EP-II®, 科研製薬, 東京)中に 4°C で保存した(表 1)。角膜移植に供した後, ただちに実体顕微鏡(Wild M 3 Z, Heerb-

ugg, Switzerland)を使用し, 眼球をまず赤道部で前後に分け, 硝子体, 水晶体, 虹彩, 毛様体, 余分な角強膜を注意深く除去し, 線維柱組織を含む 4 mm 角の隅角組織片を作製した。また, 42~67 歳の原発開放隅角緑内障患者 6 例 6 眼(表 2)から trabeculectomy で得られた 3×4 mm の隅角組織を含む角強膜組織片を使用した。組織片は, 切除後ただちに 4% paraformaldehyde/0.1% glutaraldehyde/0.1 M sodium phosphate (pH 7.4) 混合液にて 4°C で 24 時間固定した。

組織固定後, 0.1 M sodium phosphate (pH 7.4)/0.1 M lysine/0.15 M NaCl 混合液にて 20 分毎 3 回洗浄後, 30% から 100% に至る ethanol 系列で脱水し(-20°C), Lowicryl K 4 M (Chemische Werke Lowi GMBM & Co. Waldkraiburg, Germany)に浸し, -20°C で 48 時間紫外線重合し包埋した。

包埋した試料から超ミクロトーム(Ultratome III, LKB, Sweden)を用いて 1  $\mu$ m の薄切片を作製し toluidine blue にて染色し, 光学顕微鏡にて線維柱組織の存在を確認した後, ダイヤモンドナイフを使用して厚さ 0.1  $\mu$ m の超薄切片を作製し, 支持膜処理した nickel grids に載せた。通常の電子顕微鏡像は, 超薄切片を酢酸ウラン, クエン酸鉛の二重電子染色を行い, 日立 HS-9 型透過電子顕微鏡にて観察した。

### 2. 実験物質

- (1) ブタ脛 elastase-1<sup>13)</sup> (PPE) (エーザイ, 東京)
- (2)  $\alpha_1$ -antitrypsin-elastase complex<sup>16)</sup> ( $\alpha_1$ A-EL)

表 1 正常屍体摘出眼

症例	死 因	年 齢	性 別	死亡から摘出までの時間
1	小脳出血	51	女	4 時間
2	大腸癌	63	女	5.5 時間
3	胃癌	74	男	2 時間
4	腹膜炎	75	女	2 時間
5	心不全	85	男	10 時間
6	肺炎	88	男	2 時間

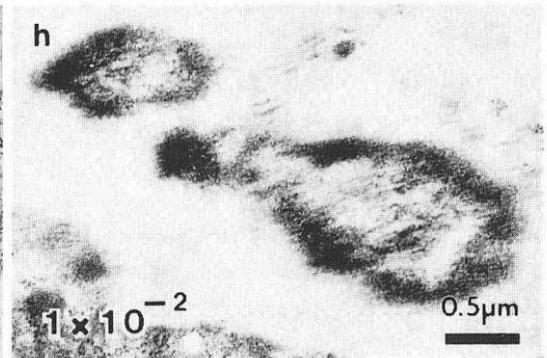
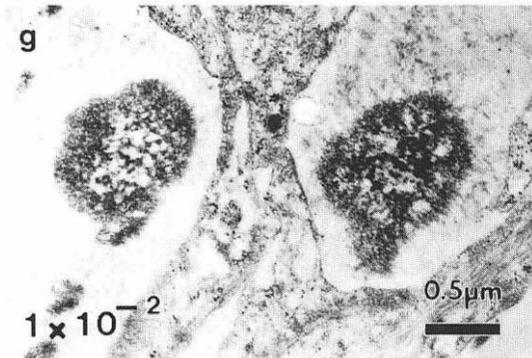
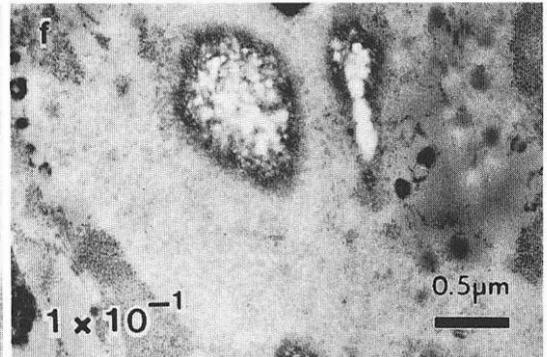
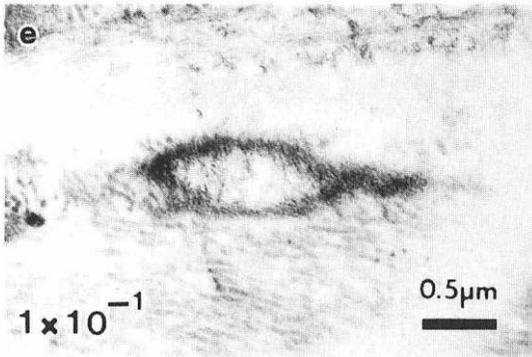
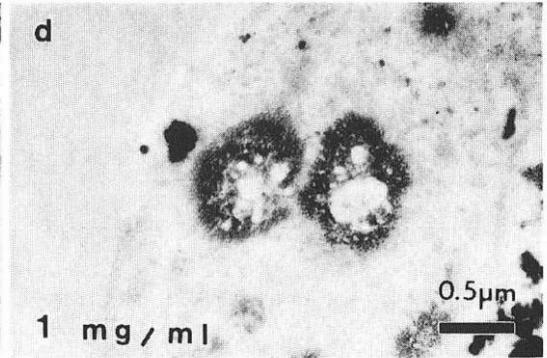
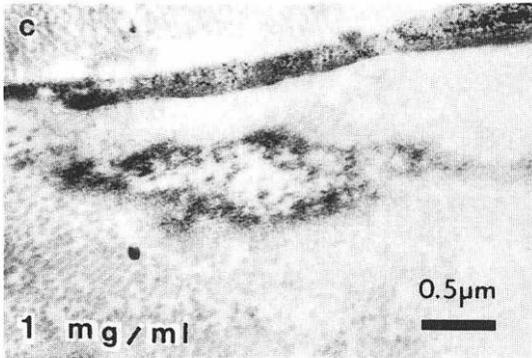
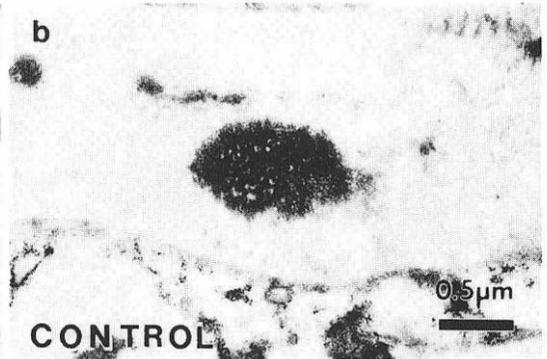
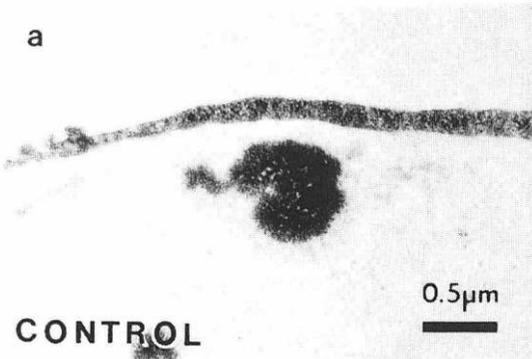
表 2 原発開放隅角緑内障眼

症 例	年 齢	性 別
1	42	女
2	52	男
3	52	男
4	60	男
5	62	男
6	67	女

# 1A

## NORMAL

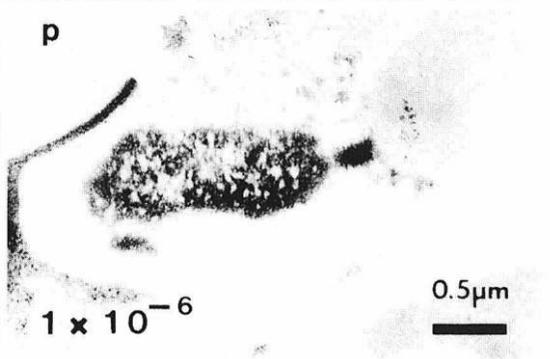
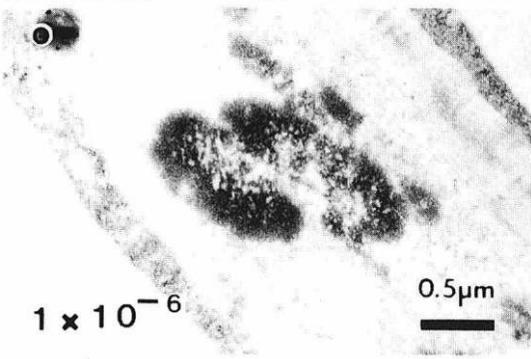
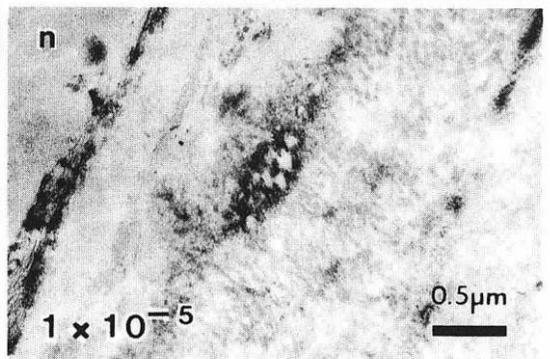
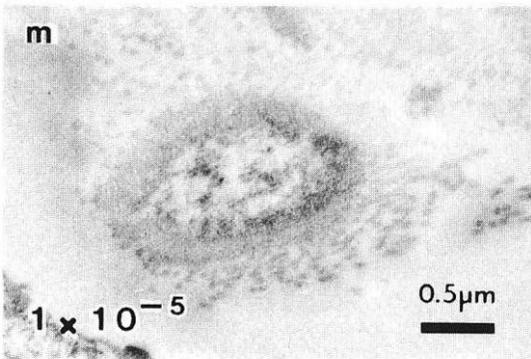
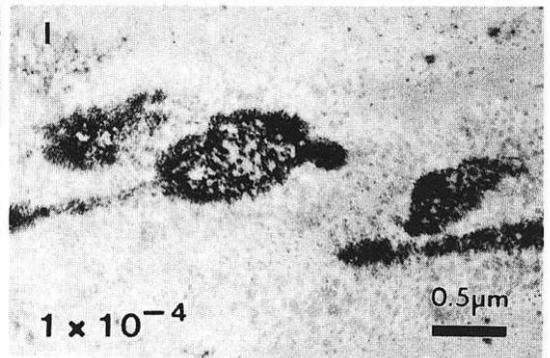
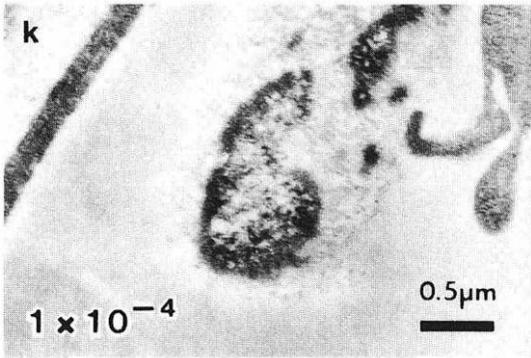
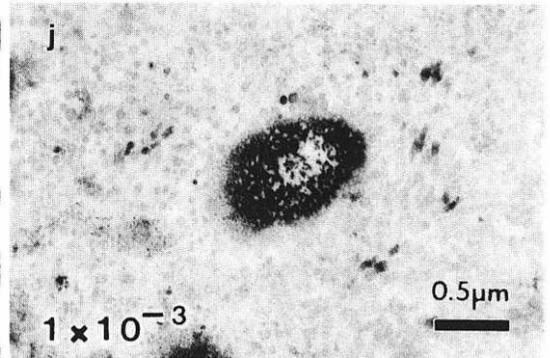
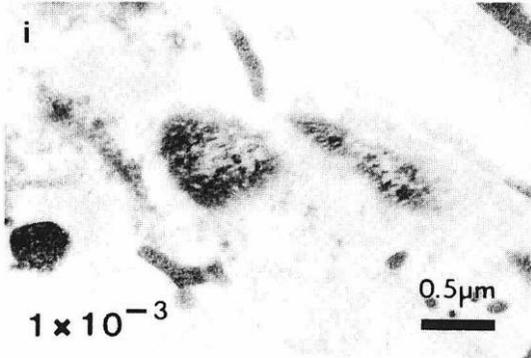
## POAG



# 1B

## NORMAL

## POAG



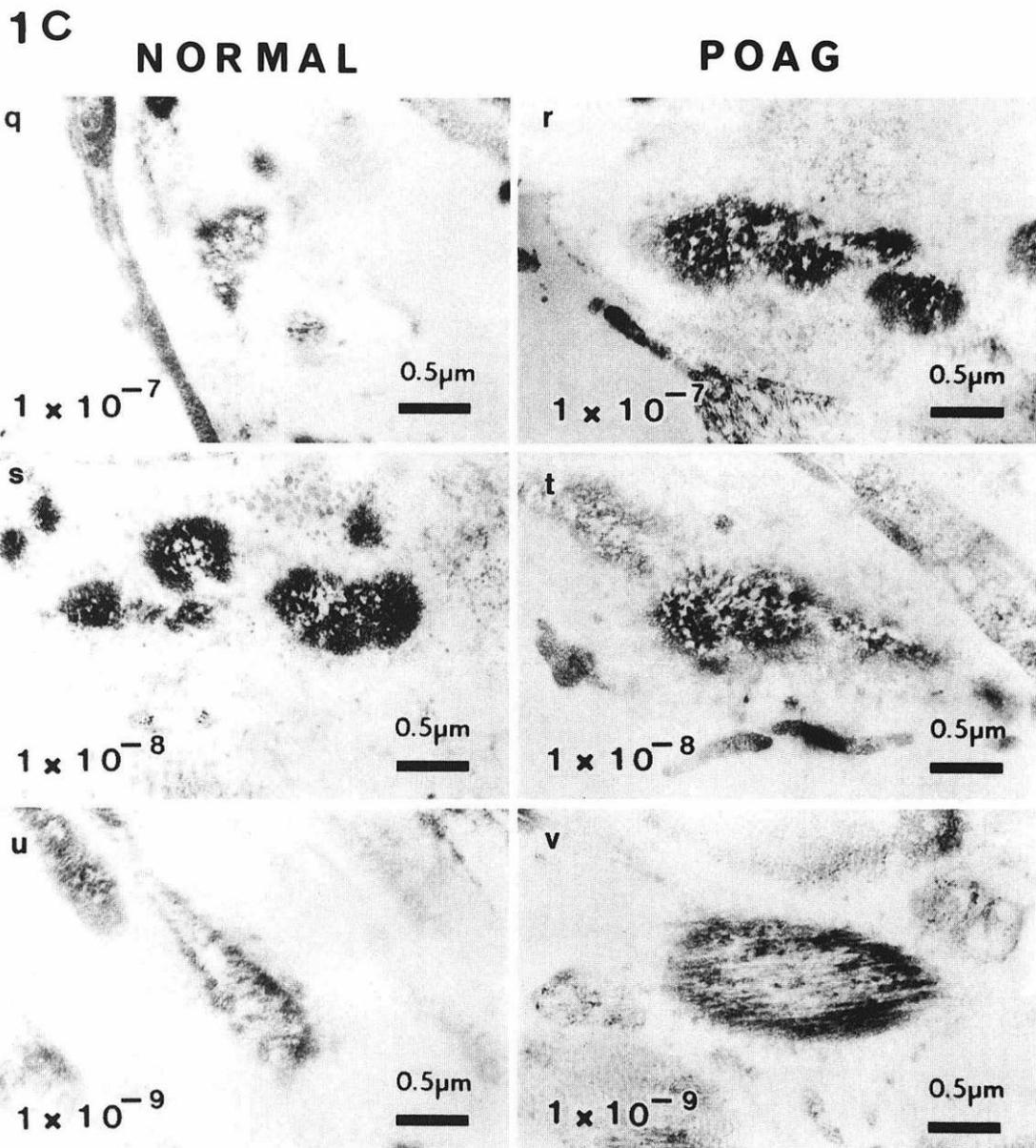


図1A.1B.1C.: PPEを作用させた elastic fiber.

NORMAL: 正常眼, POAG: 原発開放隅角緑内障, a. b. CONTROL: 対照, c~v.  $1 \sim 1 \times 10^{-9}$ : PPE濃度 (mg/ml).

(エーザイ, 東京)

PPEおよび $\alpha_1$ A-ELをそれぞれ0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.5)に溶解し, 1 mg/mlから $1 \times 10^{-9}$  mg/mlに至る希釈液を10種類作製した. 各希釈液に超薄切片を載せた gridsを, 37°Cで2時間浸漬した. その後, 後述の如く elastin 免疫染色し, 透過電子顕微鏡に

て観察した. また, 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.5)に37°Cで2時間浸漬した試料を対照とした.

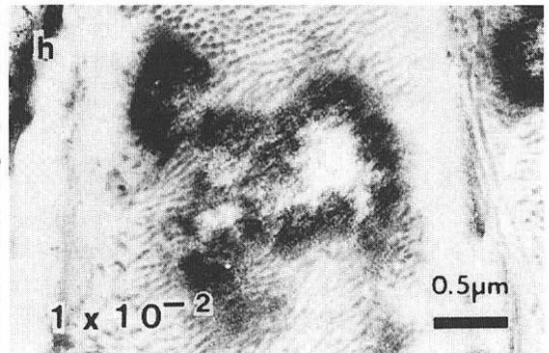
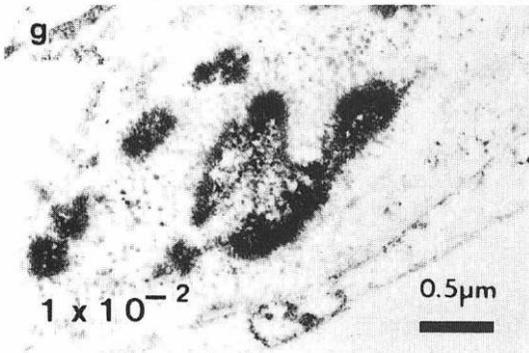
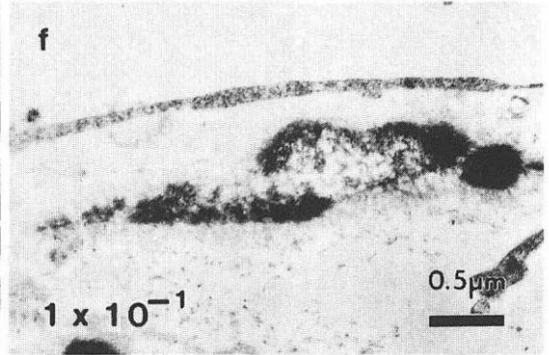
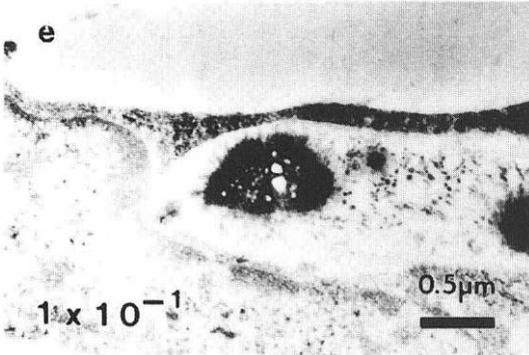
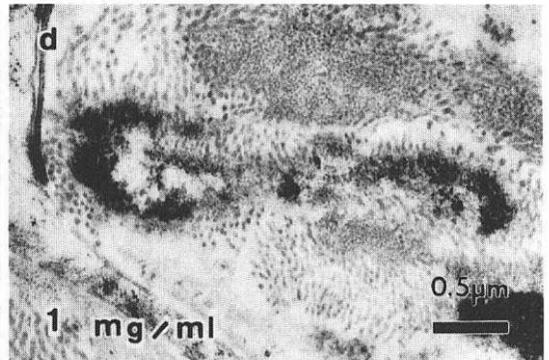
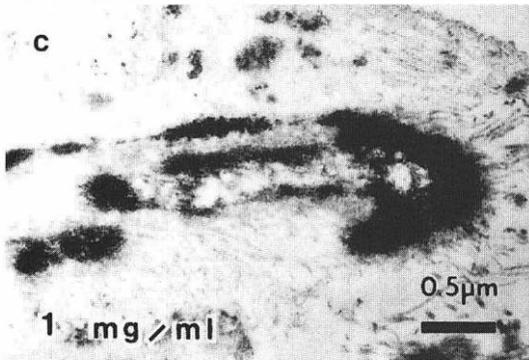
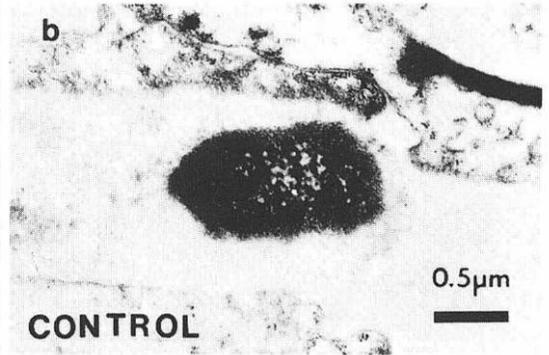
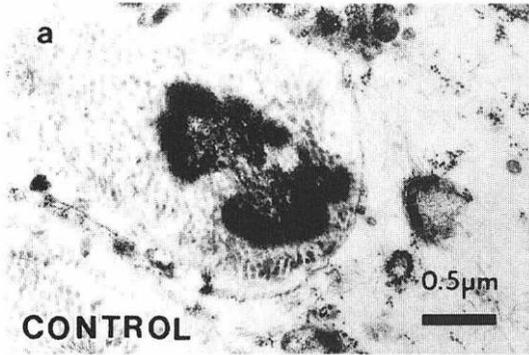
### 3. Elastin 免疫染色

Roth<sup>17)</sup>の protein A-gold 法をもとに以下の手技で行った. 超薄切片を載せた gridsを0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.5)/bovine serum albumin (BSA) (5

# 2A

## NORMAL

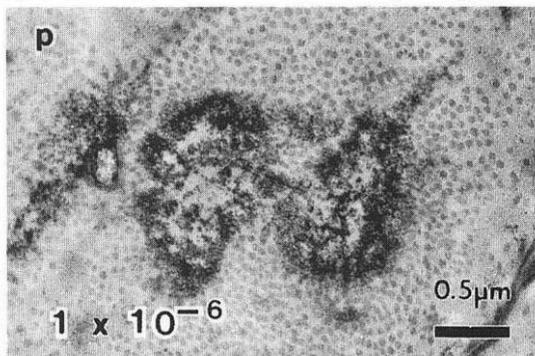
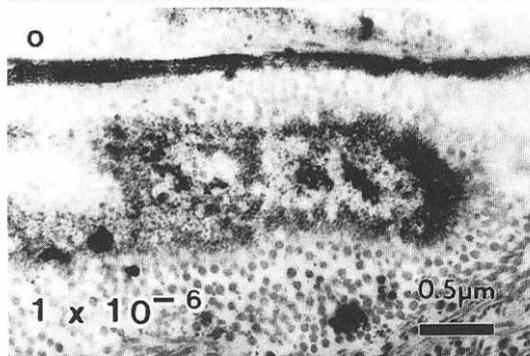
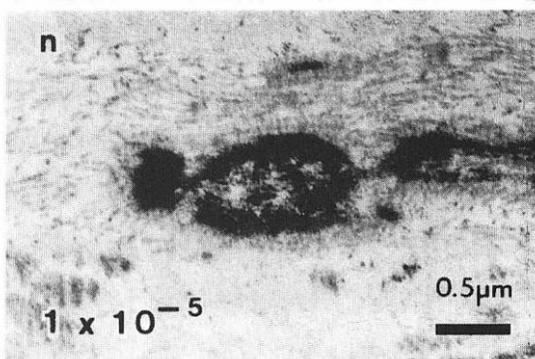
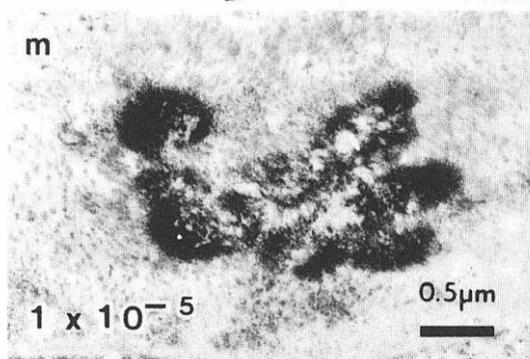
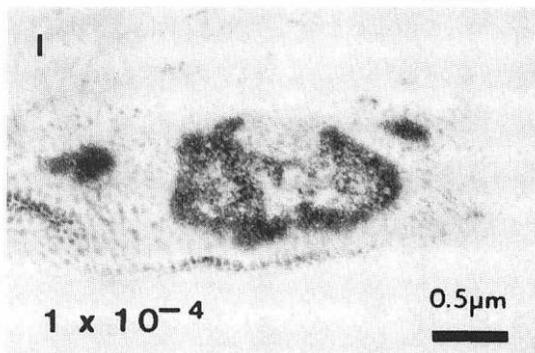
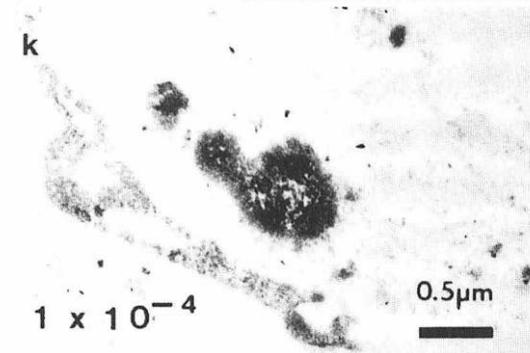
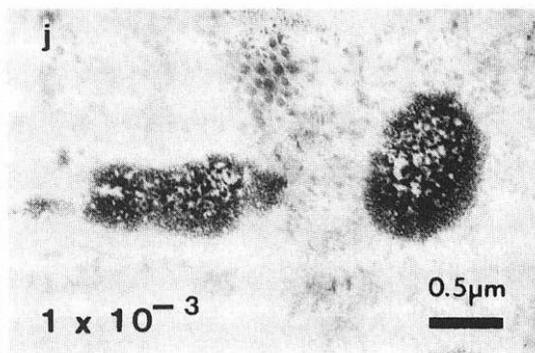
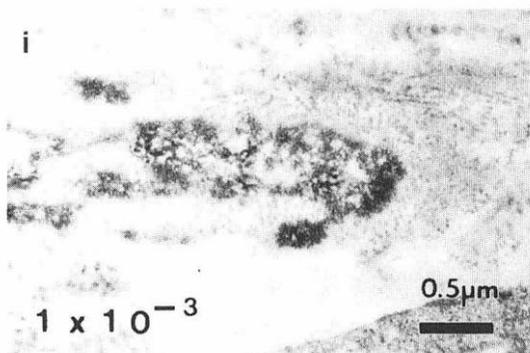
## POAG



# 2B

## NORMAL

## POAG



2C

NORMAL

POAG

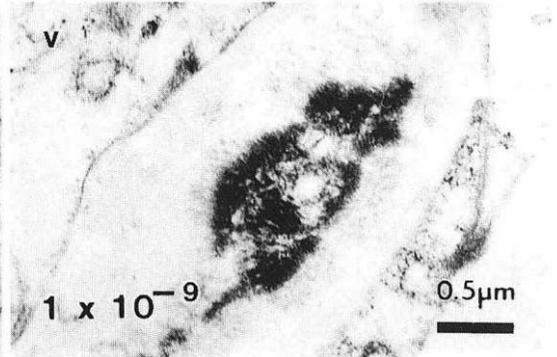
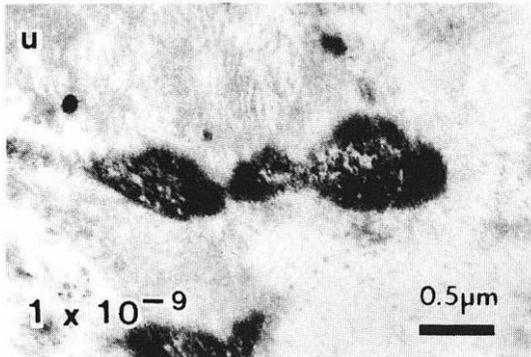
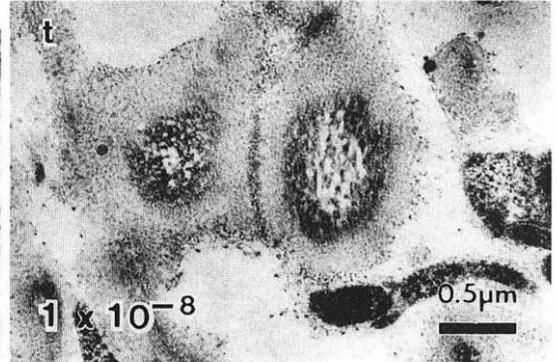
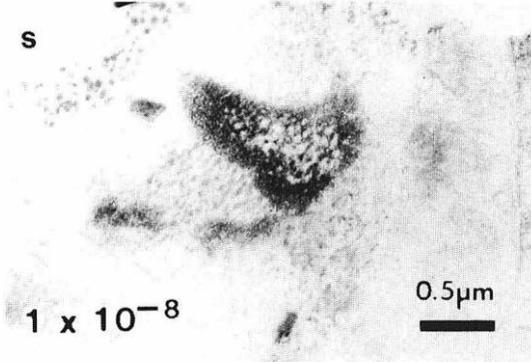
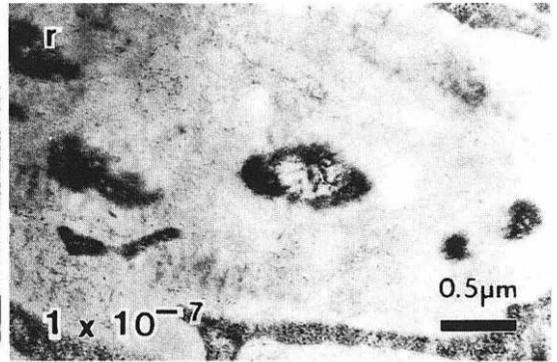
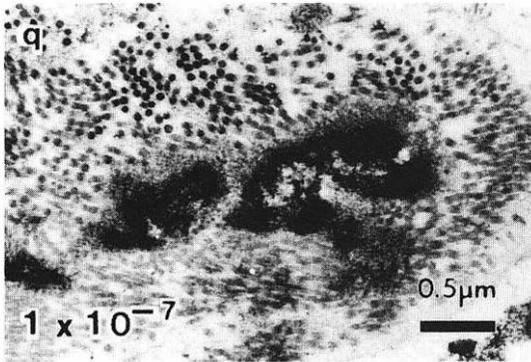


図2 A. 2 B. 2 C.:  $\alpha_1$ A-EL を作用させた elastic fiber.

NORMAL: 正常眼, POAG: 原発開放隅角緑内障, a. b. CONTROL: 対照, c~v.  $1 \sim 1 \times 10^{-9}$ :  $\alpha_1$ A-EL 濃度 (mg/ml).

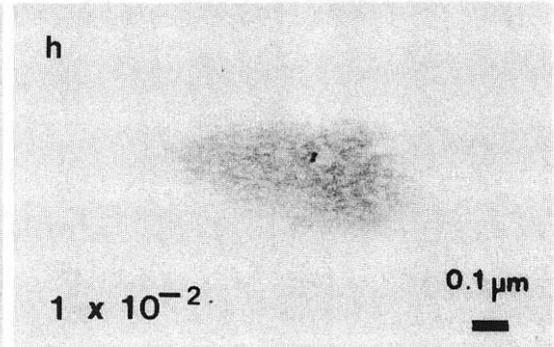
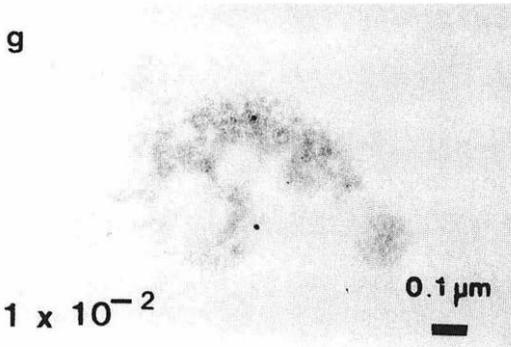
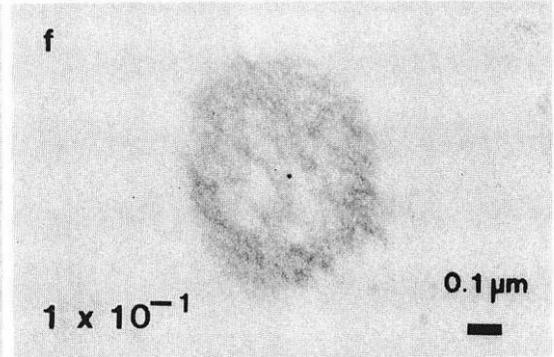
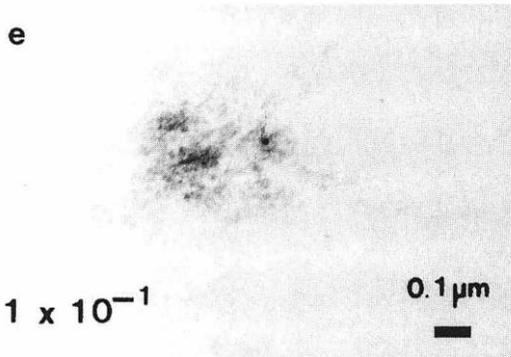
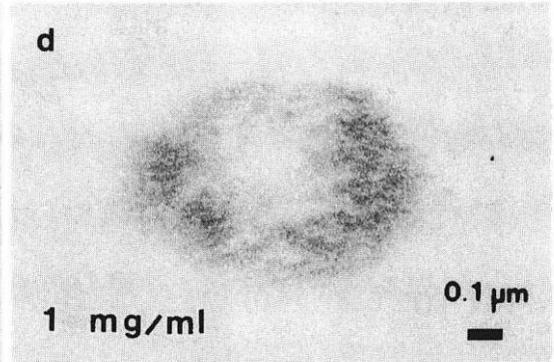
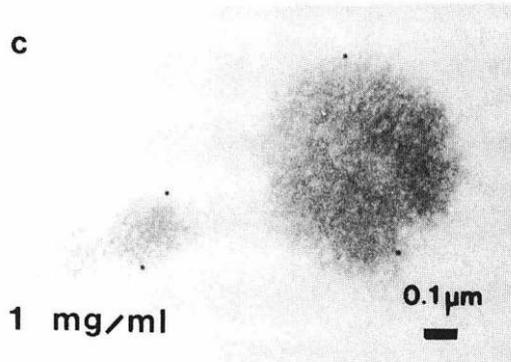
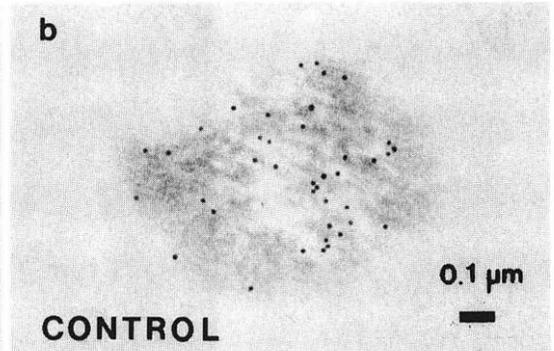
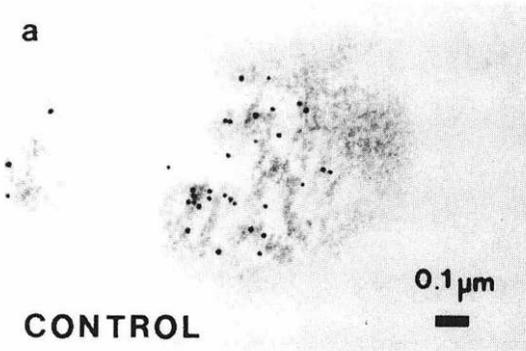
mg/ml) 混合液に室温で1時間浸漬し, 非特異的の反応を除去した. この後, 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.5)/BSA (5 mg/ml) 混合液にて100倍に希釈した anti human aortic  $\alpha$ -elastin rabbit serum (Elastin Products Co., St. Louis, MO, USA) に室温で4時間反応させた, 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) で

洗浄後, 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.5)/BSA (5 mg/ml) 混合液にて30倍に希釈した 15 nm protein A-gold (EY Laboratories, Inc., CA, USA) 溶液に室温で2時間浸漬した, 再度, 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) で洗浄後, 超薄切片を酢酸ウラン, クエン酸鉛染色し, 電子顕微鏡にて観察した.

### 3A

## NORMAL

## POAG



### 3B NORMAL

### POAG

i

j

$1 \times 10^{-3}$

0.1  $\mu$ m

$1 \times 10^{-3}$

0.1  $\mu$ m

k

l

$1 \times 10^{-4}$

0.1  $\mu$ m

$1 \times 10^{-4}$

0.1  $\mu$ m

m

n

$1 \times 10^{-5}$

0.1  $\mu$ m

$1 \times 10^{-5}$

0.1  $\mu$ m

o

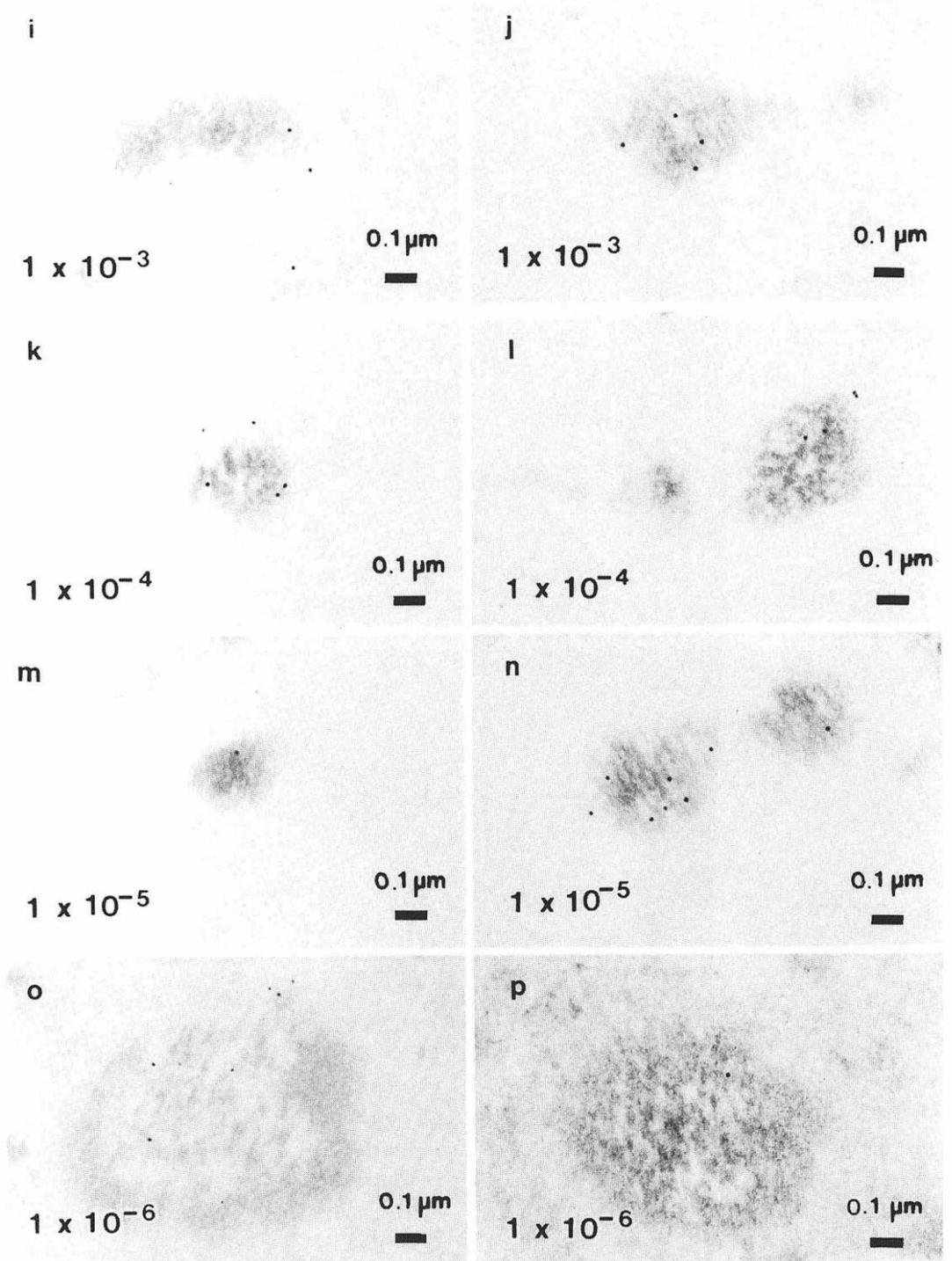
p

$1 \times 10^{-6}$

0.1  $\mu$ m

$1 \times 10^{-6}$

0.1  $\mu$ m



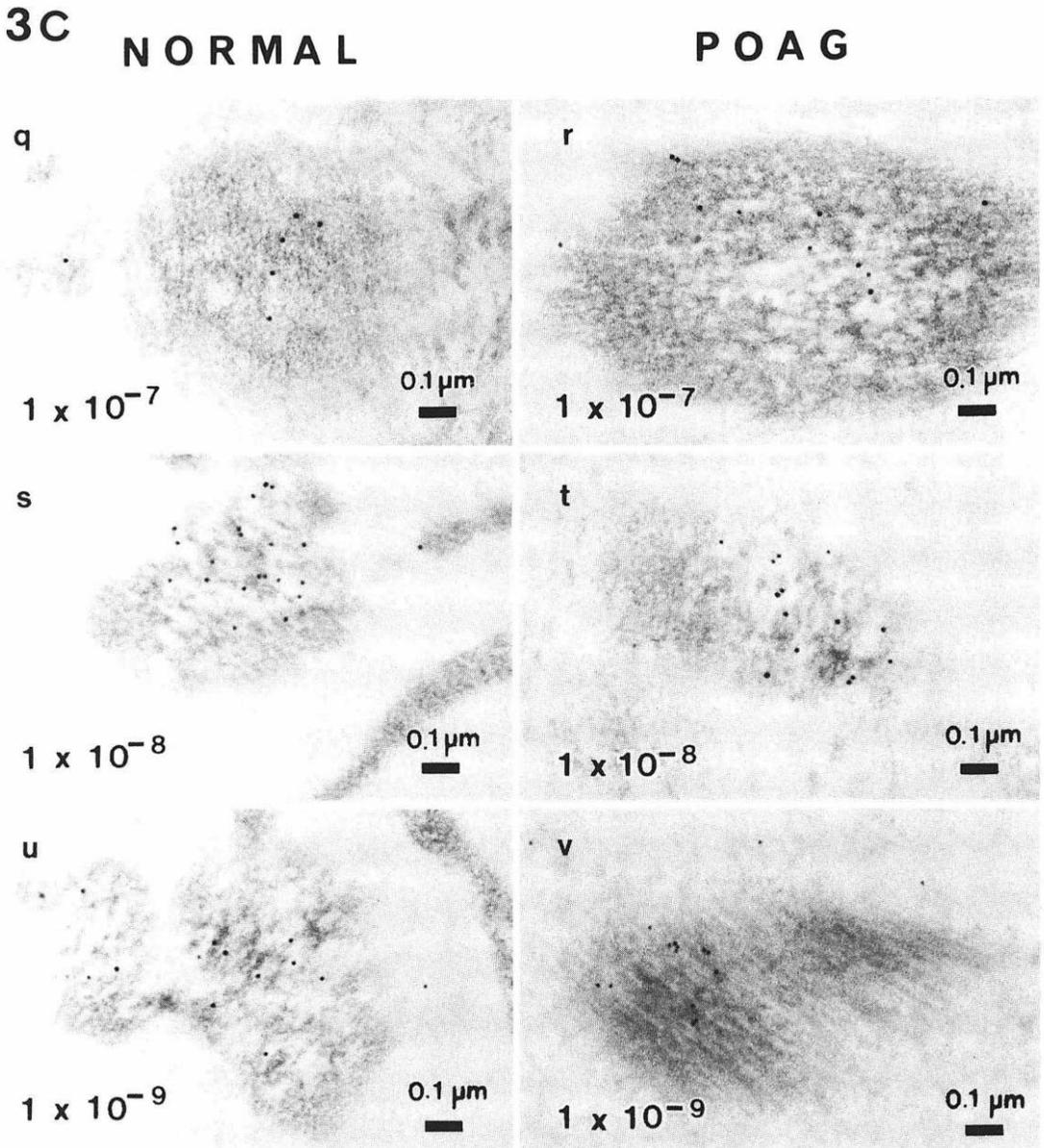


図3 A. 3 B. 3 C.: PPE を作用させた elastic fiber の protein A-gold 集積像.

NORMAL: 正常眼, POAG: 原発開放隅角緑内障, a, b. CONTROL: 対照, c~v.  $1 \sim 1 \times 10^{-9}$ : PPE 濃度 (mg/ml).

### III 結 果

#### 1. 透過電子顕微鏡所見

線維柱組織の elastic fiber は、ぶどう膜網、角強膜網、内皮網のすべてに存在しており、正常眼および POAG 眼ともほぼ同様の所見を呈した。

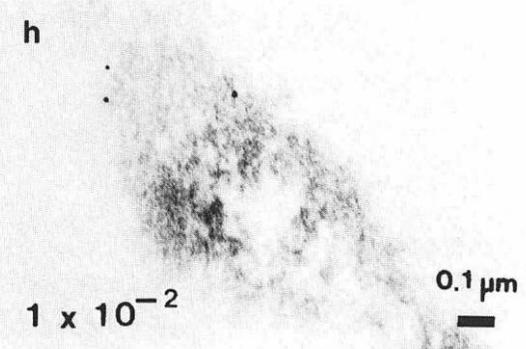
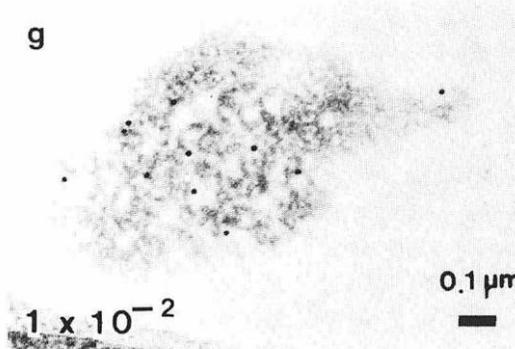
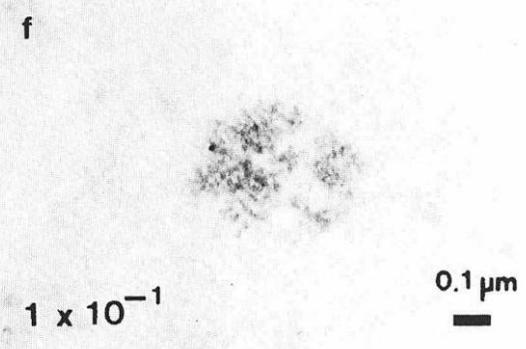
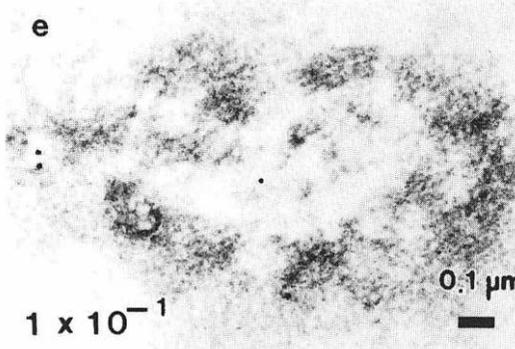
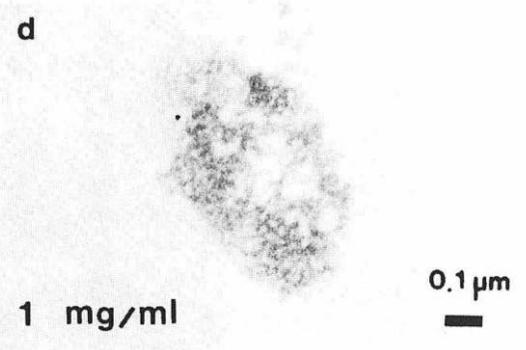
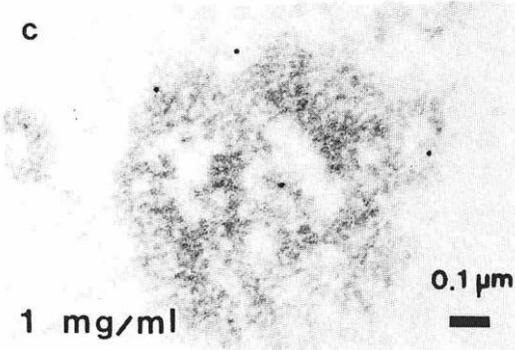
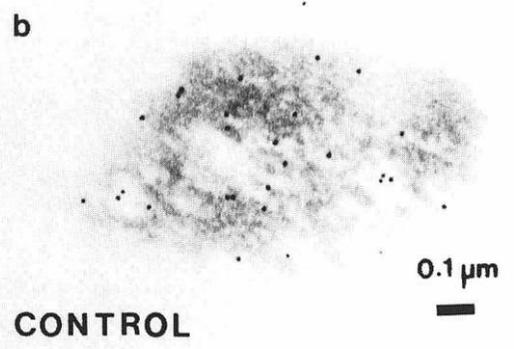
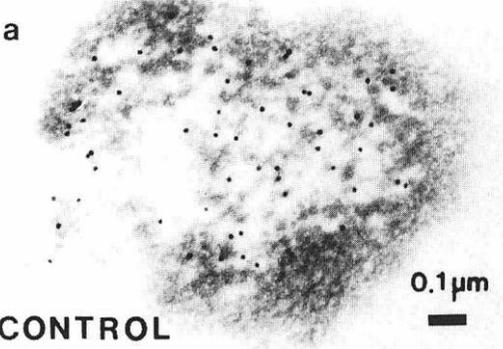
対照の elastic fiber は、内部のやや低電子密度の amorphous な部分はわずかで、それを取り囲む、高電子密度の細線維成分がほとんどを占めていた(図1 A, a, b, 図2 A, a, b)。

PPE および  $\alpha_1$ A-EL を作用させた試料では、elastic fiber の、高電子密度の細線維には変化を認めず、内部

4A

NORMAL

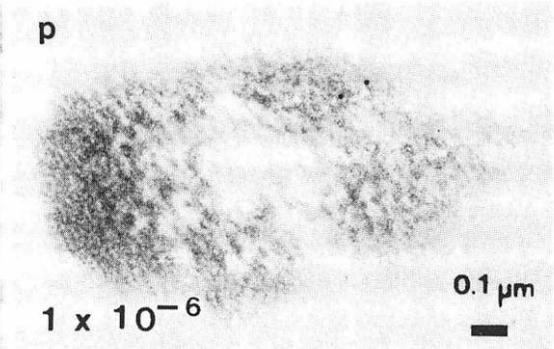
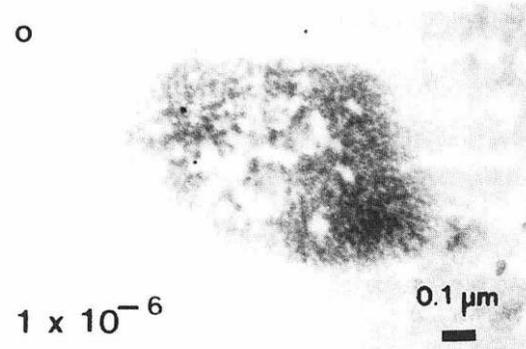
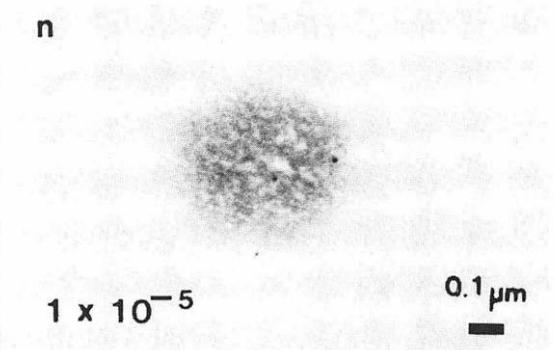
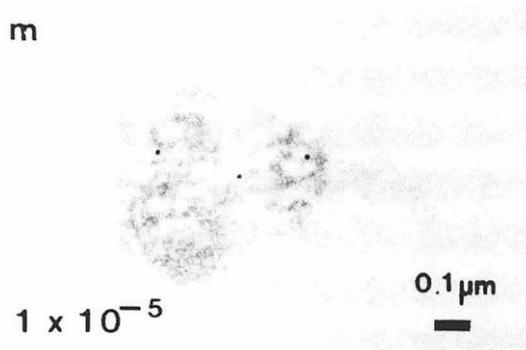
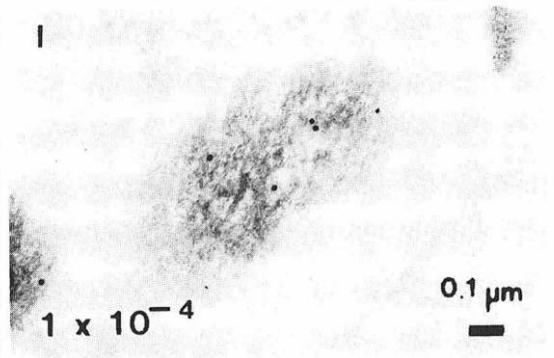
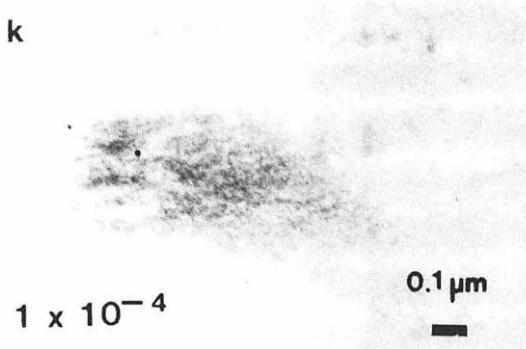
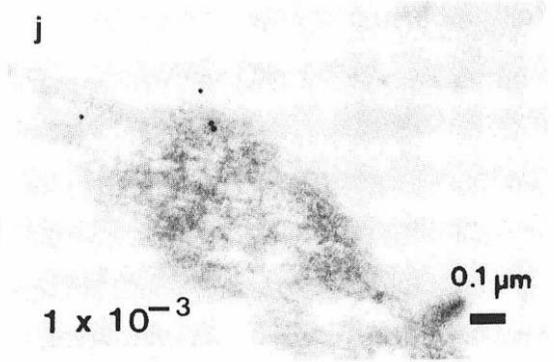
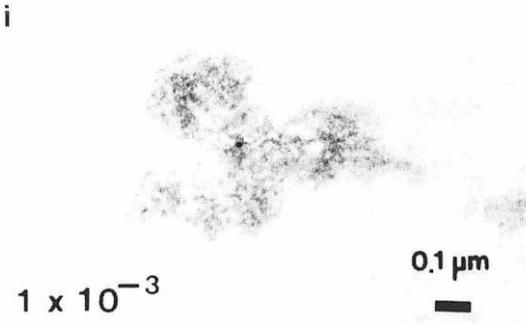
POAG



# 4B

## NORMAL

## POAG



# 4C NORMAL

# POAG

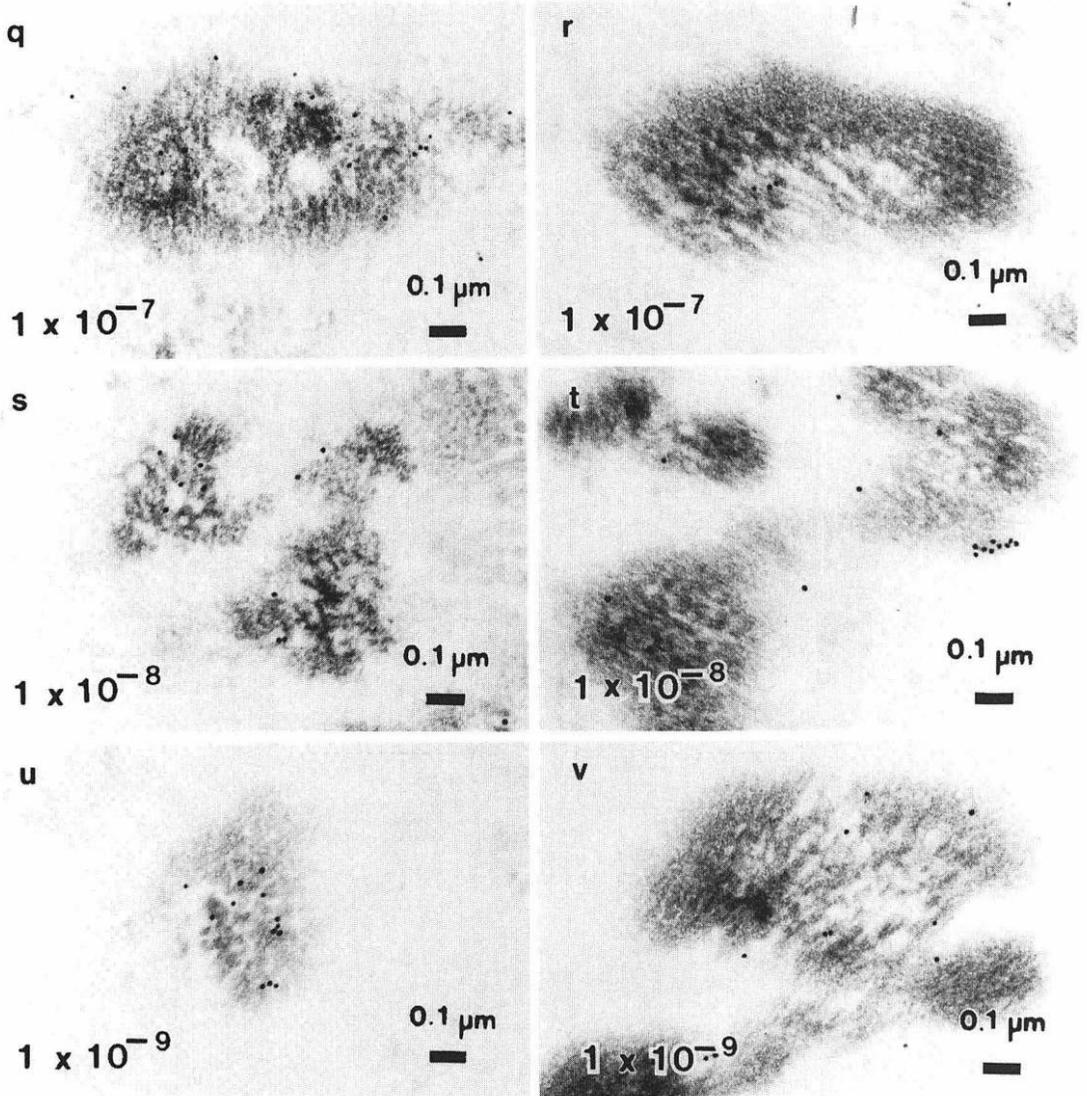


図4 A. 4 B. 4 C. :  $\alpha_1A$ -ELを作用させた elastic fiber の protein A-gold 集積像。  
 NORMAL : 正常眼, POAG : 原発開放隅角緑内障, a. b. CONTROL : 対照, c~v.  $1 \sim 1 \times 10^{-9}$  :  
 $\alpha_1A$ -EL 濃度 (mg/ml).

のやや低電子密度の amorphous な部分が、より低電子密度となり拡大したものが認められ、その所見を呈する elastic fiber は、高濃度ほど多数認められた (図 1 A, 1 B, 1 C, 2 A, 2 B, 2 C).

## 2. Elastin 免疫染色所見

正常眼および POAG 眼ともほぼ同様の所見を呈した。

① 対照では、elastin の存在を示す金粒子の集積は、線維柱組織内のすべての elastic fiber 内に多数認められ (図 3 A, a, b, 図 4 A, a, b), 高電子密度な細線維で囲まれたやや低電子密度の amorphous な部分にのみ集積していた。

②  $1 \text{ mg/ml} \sim 1 \times 10^{-6} \text{ mg/ml}$  の PPE を作用させた試料では、ほとんどすべての elastic fiber において、

内部の金粒子の数は、対照(図3A, a, b)に比べ明らかに減少していた(図3A, c~h, 図3B, i~p),  $1 \times 10^{-7}$ mg/ml~ $1 \times 10^{-9}$ mg/mlのPPEを作用させた試料でも、elastic fiber内の金粒子の集積が減少しているものが散見された(図3C, q~v)。

③  $1 \text{ mg/ml} \sim 1 \times 10^{-5} \text{ mg/ml}$ の $\alpha_1\text{A-EL}$ を作用させた試料では、ほとんどすべてのelastic fiberにおいて、内部の金粒子の数は、対照(図4A, a, b)に比べ明らかに減少していた(図4A, c~h, 図4B, i~n),  $1 \times 10^{-6} \text{ mg/ml} \sim 1 \times 10^{-9} \text{ mg/ml}$ の $\alpha_1\text{A-EL}$ を作用させた試料でも、elastic fiber内の金粒子の集積が減少しているものが散見された(図4B, o, p, 図4C, q~v)。

#### IV 考 按

電子顕微鏡的にelastic fiberは低電子密度なamorphousな部分と、それを囲む構造で、約10~12 nmの高電子密度な細線維から構成されており、成熟したelastic fiberは、amorphousな部分が多くを占めている<sup>11-3)</sup>。一方、人線維柱組織のelastic fiberは細線維成分が主で、amorphousな部分はわずかしこ存在せず<sup>5)-7)</sup>、“elastic-like fiber”と呼ばれている<sup>67)</sup>。著者の所見でも同様な構造を示しており、amorphousな部分はわずかで、それを取り囲む高電子密度の細線維成分がほとんどを占めていた(図1A, a, b, 図2A, a, b)。Elastinは、elastic fiberの細線維に囲まれた低電子密度なamorphousな部分に存在すると言われており<sup>11-4)</sup>、このことは、免疫電子顕微鏡的にも確認されている<sup>18)-22)</sup>。本報告でも、elastic fiber内部の細線維に囲まれた低電子密度なamorphousな部分に多くの金粒子が認められ(図3A, a, b, 図4A, a, b)、この部分にelastinが局在することが確認された。これに対して、各種濃度のPPEおよび $\alpha_1\text{A-EL}$ を作用させると、低電子密度な部分が拡大し(図1A~C, 2A~C)、金粒子の沈着が減少した(図3A~C, 4A~C)。このことは、PPEおよび $\alpha_1\text{A-EL}$ によって、elastic fiber内のelastinが分解されたことを示しており、PPEおよび $\alpha_1\text{A-EL}$ とも $1 \text{ mg/ml} \sim 1 \times 10^{-9} \text{ mg/ml}$ まで濃度による差があるものの、かなりの低濃度までelastin分解作用を持つことが証明された。

人線維柱組織におけるelastinに関する研究は少ない。Lütjen-Drecollら<sup>6)</sup>は、elastic fiber内にpancreatic elastaseで分解される成分があり、elastinの存在を示唆した。また、Murphyら<sup>8)</sup>は免疫蛍光抗体法で、

光学顕微鏡レベルにおいて、線維柱層板のcentral coreにelastinの局在を証明した。金を標識とした免疫電子顕微鏡的研究では、Gongら<sup>9)</sup>がEpon-Aralditeに包埋した人線維柱組織において、elastic fiber内のelectron lucentな部分に特異的に金粒子の集積を認め、elastinがこの部分に局在することを証明し、さらに彼らは、porcine pancreatic elastase (Type III)を作用させるとelastic fiber内の金粒子の集積が明らかに減少することを示した。手法は異なるものの、これらの報告は、今回の著者の研究結果を支持するものである。また、Horstmannら<sup>23)</sup>は、人線維柱組織内のelastinは総蛋白質量の7%程度の微量な蛋白であることを示しているが、Yunら<sup>10)</sup>は、培養人線維柱組織細胞にステロイドを加えて培養すると、elastinが細胞内外に増加することを報告し、elastinがステロイド緑内障およびPOAGの眼圧上昇機序に関与している可能性を示唆した。瀬川<sup>11)</sup>は、POAG眼の線維柱組織では、内皮網内Schlemm管内壁直下の細線維様物質内に大量のelastinが存在することを確認し、POAGでは、elastinを含む細線維様無定形物質が房水流出抵抗増大の原因である可能性を示唆した。本研究においては、elastic fiber内のelastinにのみ着目しており、その結果、elastic fiberにおけるelastinの免疫局在性は、正常眼、POAG眼とも同様であることが明らかになった。今回、POAG眼の内皮網内Schlemm管内壁直下の細線維様物質内のelastinに関しては検討していないが、今後検討する予定である。“elastase”による消化実験で、Lütjen-Drecollら<sup>6)</sup>の使用したpancreatic elastaseの種類と濃度は不明であるが、Gongら<sup>9)</sup>は、600 U/mlと高濃度のporcine pancreatic elastase (Type III)を使用している。電子顕微鏡試料作製方法、“elastase”の種類、作用時間など条件が異なるため、単純に彼ら<sup>9)</sup>の結果と比較はできないが、本研究結果からも、高濃度のPPEが金粒子の集積を減少させることは明らかであるとともに、また、かなり低濃度のPPEが金粒子の集積を減少させており、elastinを分解することが証明された。

PPEは、腸管から吸収され<sup>13)</sup>、血液中では $\alpha_1$ -antitrypsinおよび $\alpha_2$ -macroglobulinと言ったinhibitorと結合して複合体をつくり循環しているが<sup>14)</sup>、Tsujiira<sup>16)</sup>は、 $\alpha_1\text{A-EL}$ も酵素活性を保持していることを示した。今回の研究で、PPEのみならず各種濃度の $\alpha_1\text{A-EL}$ を作用させた場合でも、elastic fiberへの金粒子の沈着が減少したことから、 $\alpha_1\text{A-EL}$ も

elastin 分解活性をもつことが明らかになった。

本研究結果から、PPE,  $\alpha_1$ A-EL とともにかなり低濃度まで elastin 分解作用を有することがわかり、生体において線維柱組織内の elastin を分解するに十分な濃度の PPE が移行すれば、同組織内の elastin を分解可能であると考えられる。また、線維柱組織内の elastin が分解されることによって、房水流出抵抗が減少するかどうかは、現在のところ不明であるが、elastin が POAG の房水流出抵抗増大の原因となっている可能性が報告されている<sup>10)11)</sup>ことから、経口投与された PPE が線維柱組織へ移行し、同組織内の elastin が分解されれば、POAG 眼において増大している房水流出抵抗が減少する可能性があることが示唆された。PPE の線維柱組織への移行、および PPE による房水流出率の変化に関しては、今後検討する予定である。

本論文の要旨は、第 97 回日本眼科学会総会（1993 年 6 月、札幌）において発表した。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った恩師、瀬川雄三教授、ならびに本学第一解剖教室、白田信光助教授に感謝いたします。

#### 文 献

- 1) **Ross R, Bornstein P**: The elastic fiber. I. The separation and partial characterization of its macromolecular components. *J Cell Biol* 40: 366—381, 1969.
- 2) **Ross R**: The elastic fiber. A review. *J Histochem Cytochem* 21: 199—208, 1973.
- 3) **Rosenbloom J**: Elastin: An overview. *Methods Enzymol* 144: 172—196, 1987.
- 4) **Hernandez MR, Neufeld AH**: The extracellular matrix of the trabecular meshwork and the optic nerve head. In: Ritch R, et al (Eds): *The Glaucomas* CV Mosby, St. Louis, 163—178, 1989.
- 5) **Iwamoto T**: Light and electron microscopy of the presumed elastic components of the trabeculae and scleral spur of the human eye. *Invest Ophthalmol* 3: 144—156, 1964.
- 6) **Lütjen-Drecoll E, Futa R, Rohen JW**: Ultra-histochemical studies on tangential sections of the trabecular meshwork in normal and glaucomatous eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 21: 563—573, 1981.
- 7) **Rohen JW, Futa R, Lütjen-Drecoll E**: The fine structure of the cribriform meshwork in normal and glaucomatous eyes as seen in tangential sections. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 21: 574—585, 1981.
- 8) **Murphy CG, Yun AJ, Newsome DA, Alvarado JA**: Localization of extracellular proteins of the human trabecular meshwork by indirect immunofluorescence. *Am J Ophthalmol* 104: 33—43, 1987.
- 9) **Gong H, Trinkaus-Randall V, Freddo TF**: Ultrastructural immunocytochemical localization of elastin in normal human trabecular meshwork. *Curr Eye Res* 8: 1071—1082, 1989.
- 10) **Yun AJ, Murphy CG, Polansky JR, Newsome DA, Alvarado JA**: Protein secreted by human trabecular cells. Glucocorticoid and other effects. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 2012—2022, 1989.
- 11) **瀬川雄三**: 原発開放隅角緑内障と前房隅角。あたらしい眼科 9: 1513—1522, 1992.
- 12) **Balo J, Banga I**: The elastolytic activity of pancreatic extracts. *Biochem J* 46: 384—387, 1950.
- 13) **Tsuji T, Akita M, Katayama K, Yamamoto S, Seno S**: Absorption of elastase through the jejunal mucosa of the rat. An immunocytochemical study. *Histochemistry* 81: 427—433, 1984.
- 14) **Katayama K, Fujita T**: Studies on biotransformation of elastase. III. Effects of elastase-binding proteins in serum on the disappearance of <sup>131</sup>I-labeled elastase from blood. *Biochim Biophys Acta* 336: 165—177, 1974.
- 15) **Katayama K, Fujita T**: Studies on biotransformation of elastase. IV. Tissue distribution of <sup>131</sup>I-labeled elastase and intracellular distribution in liver after intravenous administration in rats. *Biochim Biophys Acta* 336: 178—190, 1974.
- 16) **Tsuji T, Katayama K, Naito I, Seno S**: The circulating  $\alpha_1$ -antitrypsin-elastase complex attacks the elastic lamina of blood vessels. An immunohistochemical study. *Histochemistry* 88: 443—451, 1988.
- 17) **Roth J**: The protein A-gold (pAg) technique—A qualitative and quantitative approach for antigen localization on thin sections. In: Bullock GR, et al (Eds): *Techniques in immunocytochemistry*. Academic Press, New York, 108—133, 1982.
- 18) **Fukuda Y, Ferrans VJ**: The electron microscopic immunohistochemistry of elastase-treated aorta and nuchal ligament of fetal and postnatal sheep. *J Histochem Cytochem* 32: 747—756, 1984.
- 19) **Lethias C, Hartmann DJ, Masmajan M, Ravazzola M, Sabbagh I, Ville G, et al**:

- Ultrastructural immunolocalization of elastic fibers in rat blood vessels using the protein A-gold technique. *J Histochem Cytochem* 35:15-21, 1987.
- 20) **Li ZY, Streeten BW, Wallace RN**: Association of elastin with pseudoexfoliative material: An immunoelectron microscopic study. *Curr Eye Res* 7: 1163-1172, 1988.
- 21) **White JF, Hughes JL, Kumaratilake JS, Fanning JC, Gibson MA, Krishnan R, et al**: Post-embedding methods for immunolocalization of elastin and related components in tissues. *J Histochem Cytochem* 36: 1543-1551, 1988.
- 22) **Hernandez MR**: Ultrastructural immunocytochemical analysis of elastin in the human lamina cribrosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 2891-2903, 1992.
- 23) **Horstmann HJ, Rohen JW, Sames K**: Age-related changes in the composition of proteins in the trabecular meshwork of the human eye. *Mech Aging Dev* 21: 121-136, 1983.
-