

デキサメサゾンの培養ヒト線維柱組織のタンパク質合成に及ぼす影響

—オートラジオグラフィの検討, 生化学的ならびに免疫組織化学的検討—

藤 沢 昇

信州大学医学部眼科学教室

要 約

器官培養されたヒト線維柱組織に対するデキサメサゾンの影響をオートラジオグラフィ, 生化学的ならびに免疫組織化学的に検討した。11例中2眼ではデキサメサゾン投与により対照では認められなかった40, 55, 66 kDの³⁵S-メチオニンでラベルされた細胞タンパク質が出現した。同じ例の電子顕微鏡オートラジオグラフィでは多数の細胞内空胞を含有する線維柱細胞が認められ, 現像銀はその細胞内空胞の細線維に局在が認められた。加えて, 同じ例の抗 α エラスチンによる免疫酵素抗体法では72 kDのバンドが認められ, 対照に比しデキサメサゾン

投与の方が強い反応が認められた。同じ例の免疫電子顕微鏡では, エラスチンは多数の細胞内空胞を含有する線維柱細胞の細胞表面に局在が認められた。ヒト線維柱組織においてデキサメサゾン投与によって出現するタンパク質/糖タンパク質そしてエラスチンは, ステロイド緑内障の房水流出抵抗について重要な役割を演じるものと考えられる。(日眼会誌 98:31-37, 1994)

キーワード: 線維柱組織, デキサメサゾン, タンパク合成, ³⁵S-メチオニン, エラスチン

Dexamethasone Effects of Protein Synthesis on Organ-Cultured Human Trabecular Meshwork

—Autoradiographical, Biochemical, and Immunohistochemical Study—

Noboru Fujisawa

Department of Ophthalmology, Shinshu University School of Medicine

Abstract

The effect of dexamethasone (DEX) on organ-cultured human trabecular meshwork (HTM) was evaluated autoradiographically, biochemically, and immunohistochemically. The tissues were obtained from 11 normal postmortem individual eyes, aged 51-84 years. In 2 individuals, 2-week treatment of cultured HTM with DEX (1×10^{-4} M, 1×10^{-5} M, 1×10^{-6} M) induced the expression of ³⁵S-methionine-labelled cell proteins of 40, 55, and 66 kD which were not present in HTM cultures with out DEX treatment. In electron microscopic autoradiography of the same cases, trabecular cells containing numerous intracytoplasmic vacuoles were seen and silver grains were found on microfibrils in the intracytoplasmic vacuoles. In addition, in immunoblot analysis of anti- α elastin of the same cases, a 72 kD band representing elastin was seen and DEX treatment

showed stronger reactivity than the control. In immuno-electron microscopy of the same cases, elastin was localized on the surface of trabecular cells containing numerous intracytoplasmic vacuoles. In the remaining 9 individuals, there were no significant differences between control and DEX treatment. The alterations in the proteins/glycoproteins and elastin produced by DEX observed in organ-cultured HTM may play a role in the reduction in aqueous outflow facility observed clinically in steroid glaucoma. (J Jpn Ophthalmol Soc 98:31-37, 1994)

Key words: Trabecular meshwork, Dexamethasone (DEX), Protein synthesis, ³⁵S-methionine, Elastin

別刷請求先: 〒390 長野県松本市旭3-1-1 信州大学医学部眼科学教室 藤沢 昇

(平成5年7月6日受付, 平成5年8月18日改訂受理)

Reprint requests to: Noboru Fujisawa, M.D. Department of Ophthalmology, Shinshu University School of Medicine, 3-1-1 Asahi, Matsumoto-shi, Nagano-ken 390, Japan

(Received July 6, 1993 and accepted in revised form August 18, 1993)

I 緒 言

ステロイド線内障の病因については、ステロイド投与により生じるタンパク質が房水流出抵抗増大の原因として最近注目されている。Weinreb ら¹⁾は線維柱細胞の核にはステロイドのリセプターが存在し、細胞の代謝に影響を与えていることを報告し、Partridge ら²⁾と Polansky ら³⁾は線維柱組織の細胞培養ではデキサメサゾン (dexamethasone, DEX) を投与すると、³⁵S-メチオニンでラベルされるタンパク質が合成されると報告している。一方、Yun ら⁴⁾は線維柱組織の細胞培養では DEX を投与すると、エラスチンが産生されることを報告しており、DEX は線維柱組織のタンパク質合成に影響を及ぼすことが明らかとなっている。

我々の教室では、正常ヒト線維柱組織を器官培養することに成功しており⁵⁾、DEX を投与して器官培養すると、対照に比して内皮網内の細胞外要素が有意に増加し、線維柱層板に細胞融合が生じる群、すなわちステロイドに反応する群が生じ、反応する群の割合が 36% となることが判明している⁷⁾。今回、正常屍体摘出眼 13 眼の器官培養を用いて、オートラジオグラフィと抗エラスチン抗体による酵素抗体法により、DEX 投与群と対照群を形態学的ならびに生化学的に比較検討し、興味ある知見を得たので報告する。

II 材料と方法

1. 器官培養

死後 12~36 時間経過した 51 歳女性、55 歳男性、55 歳女性、56 歳男性、56 歳女性、57 歳男性、61 歳男性、65 歳女性、66 歳女性、70 歳男性、74 歳男性、77 歳男性、84 歳女性から摘出された正常眼 13 例 13 眼を遺族の同意を得た上で使用した。器官培養の方法は既報⁶⁾に従って、実体顕微鏡鏡下で大きさ約 4×4 mm の線維柱組織を含む組織片 8 個を各々の眼球から切り出し、1% 精製寒天培地上に組織片を線維柱組織に上にして静置し、これに 10% fetal bovine serum (GIBCO, NY, USA)/90% Eagle's minimum essential medium (GIBCO)/penicillin G 200 U/ml の液体培地を加えて、5% CO₂、湿度 100%、37℃で器官培養した。

2. Fluorography

正常屍体摘出眼 13 例 13 眼を使用した。そのうち 2 例 2 眼は上、下、耳側、鼻側の部位により差異があるかどうかについての検討に使用した。11 例 11 眼の各々の眼球から 4 個ずつ組織片を切り出し、①対照群 1 個と②DEX 投与群 3 個 (dexamethasone sodium phosphate Orgadron[®] Sankyo Co. Tokyo, 1.0×10⁻⁴M, 1.0×10⁻⁵M, 1.0×10⁻⁶M の 3 種類) とに分け、2 週間器官培養後メチオニンを含まない Eagle MEM 培地を用い、DEX 投与群と対照群に³⁵S-メチオニン 1.85 MBq/ml を

24 時間投与した後、線維柱組織を切り出し、重量を 0.8~1.0 mg となるよう調整した。次に線維柱組織を均質化し⁸⁾、1% sodium dodecyl sulfate (SDS)/40% urea 混合液で溶解させて -20℃で冷凍保存したものならびに培地を電気泳動の試料とした。電気泳動に負荷する試料に 10% trichloroacetic acid を加えて沈澱させ、liquid scintillation spectrometer (Packard Instrument Inc., ILL, USA) を用いて放射性活性を計測し、lane 毎に等量となるよう調整した。次に、試料に同量の SDS 化試薬 (10% glycerol/5% 2-mercaptoethanol/2.3% SDS/0.0625 M tris HCl pH 6.8) を加え、100℃ 3 分で処理し、遠心分離後上清を実験に使用した。Laemmli ら⁹⁾の方法に従って電気泳動は 10% SDS polyacrylamide gel を用い、30 mA/gel、1 時間で施行された。Fluorography は Bonner と Lasky ら¹⁰⁾¹¹⁾の方法に従って、得られた gel を 30% methanol/10% acetic acid 混合液で固定し、scintillater (EN³HANCE[®], Du Pont NEN Research products, MA, USA) で浸透させた。次に蒸留水で沈澱させた後乾燥させ、film (X-Omat AR, Eastman Kodak Co., NY, USA) を接触させ -80℃、24 時間露出し、現像した。

3. 電子顕微鏡オートラジオグラフィ

2 で用いた 11 例 11 眼を同様に 2 週間器官培養し、メチオニンを含まない Eagle MEM 培地を用いて両群に³H-メチオニン 185 kBq/ml を 24 時間投与し、組織片を取り出し、2.5% glutaraldehyde/0.1 M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) 混合液にて固定した後、1% osmium tetroxide (O₅O₄)/0.1 M PBS 混合液にて後固定した。組織片は ethanol 系列で型の如く脱水した後、Quetol 812 (Nissin EM Co., Tokyo) に包埋した。透過電子顕微用経線超薄切片 (90 nm) は、Ultratome III (LKB, Sweden) と diamond knife (Du Pont, Swiss) で作製し、多孔 mesh (50 slot, EM shizai Co., Tokyo) にのせ、まず、uranyl acetate と lead citrate にて染色し、透過型電子顕微鏡 (HS-9, Hitachi Co., Tokyo) にて観察した。次に、切片に乳剤 (sakura NR-H 2, Konica, Co., Tokyo) をかぶせ、-4℃で 3 週間露出し、塩化金増感液を用いて phenidon 現像液で現象し同様に染色後、電子顕微鏡にて観察した。

4. 抗エラスチン抗体による western blotting

2 で用いた 11 例 11 眼を器官培養後得られた両群の線維柱組織と培地を試料とした。電気泳動に負荷する試料は spectrophotometer (Hitachi Co., Tokyo) を用いて、lane 毎に等量となるよう調整した。次に、同様に試料に SDS 化試薬を加え処理し実験に使用した。Western blotting は Towbin ら¹²⁾の方法に従い、SDS-PAGE 後、gel を semi-dry transfer unit (KabiPharmacia LKB Biotechnology, Sweden) にて 0.8 mA/cm² で polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Millipore Co., MA, USA)

に転写した, PVDF膜を0.1 M PBS/3% skim milk® (Yukijirushi Nyugyo Co., Tokyo)/0.1% Tween 20 混合液 (skim milk/PBS-Tween) で浸漬し, 非特異的反応を除去した, この後 PVDF膜を skim milk/PBS-Tween で100倍に希釈した anti-human aortic α -elastin rabbit serum (Elastin Products Co., MO, USA) で反応させた, PVDF膜を洗浄後, skim milk/PBS-Tween で100倍に希釈した HRP (Horse radish peroxidase) conjugated goat anti-rabbit IgG Fab' (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) で反応させた, PVDF膜を洗浄後, 0.025% 3,3'-diaminobenzidine (DAB)/0.01% H_2O_2 /0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.6) 混合液で発色させ, 水洗した.

5. 抗エラスチン抗体による電子顕微鏡酵素抗体法

2で用いた11例11眼を両群に分けて2週間器官培養した. 電子顕微鏡酵素抗体法は Nakane ら¹³⁾の Pre-embedding method に従って, 4% paraformaldehyde/0.1 M PBS 混合液にて固定後, sucrose 系列に浸漬し, O.C.T. compound (Miles Inc., IN, USA) にて凍結包埋した. この凍結組織から Cryostat (1720 Leitz Co. Germany) にて $6\mu\text{m}$ の凍結切片を slide に作製し, 10% normal rabbit serum で非特異的反応の阻止を行い, 次いで1% bovine serum albumin (BSA)/0.1 M PBS 混合液 (BSA/PBS) にて100倍に希釈した anti-human aortic α -elastin rabbit serum (Elastin Products Co.) と反応させた. 続いて BSA/PBS にて100倍に希釈した HRP conjugated goat anti-rabbit IgG Fab' (Bio-Rad Laboratories) と反応させた. 次に, 2.5% glutaraldehyde 固定を行い, 0.025% DAB/0.01% Tris HCl buffer (pH 7.6)/1% dimethylsulfoxide 混合液, 0.025% DAB/0.01% Tris HCl buffer (pH 7.6)/0.005% H_2O_2 混合液で順次浸漬し発色させた. 2% O_3 で後固定を行い ethanol 系列で脱水し, propyleneoxide に浸漬し, Quetol 812 樹脂 (Nissin EM Co.) を満たした gelatin capsule を slide 上の切片にかぶせ重合し, 切片を樹脂ごと slide から剝離した. この block から電子顕微鏡用超薄切片 (90 nm) を作製し, 無染色で電子顕微鏡にて観察した. 対照実験としては, 一次抗体との反応を省略し, 免疫染色を行った試料を観察した.

III 結 果

まず, ^{35}S -メチオニンを取り込むタンパク質の合成能に上, 下, 耳側, 鼻側の部位による差異があるかどうかについては, fluorography では2例ともに差異は認められなかった.

次に対照群と DEX 投与群については, fluorography では線維柱組織および培地で11例ともに200 kD から16 kD に至るタンパク質バンドが得られた. 11例中9例は両群で明らかな差は認められなかったが, 61歳男性と

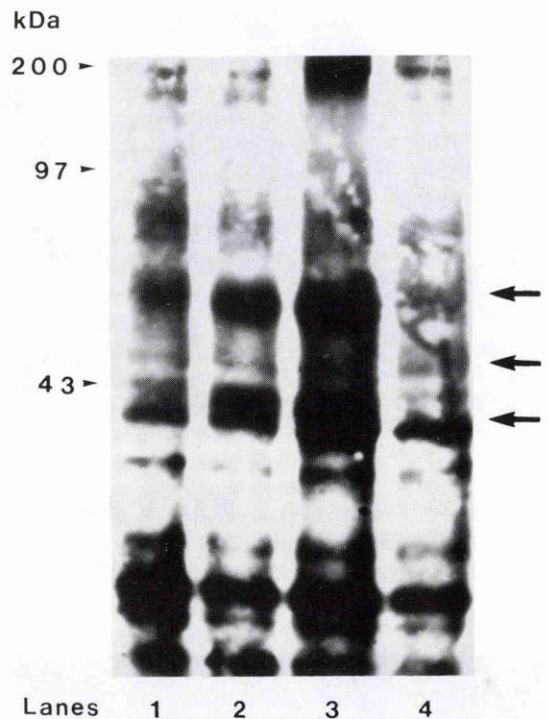


図1a 84歳女性の例の線維柱組織の fluorography. DEX 投与群 ($1 \times 10^{-6}\text{M}$, $1 \times 10^{-5}\text{M}$, $1 \times 10^{-4}\text{M}$, lane 1-3), 対照群 (lane 4). 線維柱組織の40, 55, 66 kD の部分で DEX の濃度依存性効果が認められる (矢印).

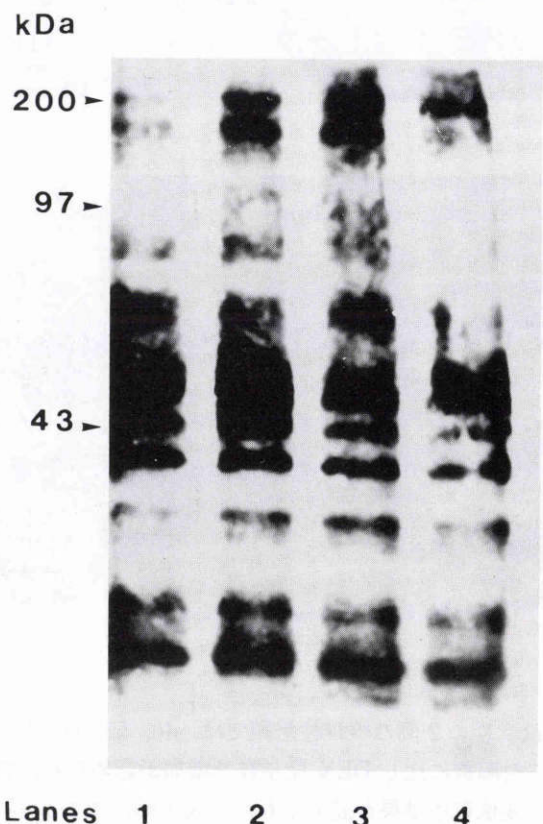
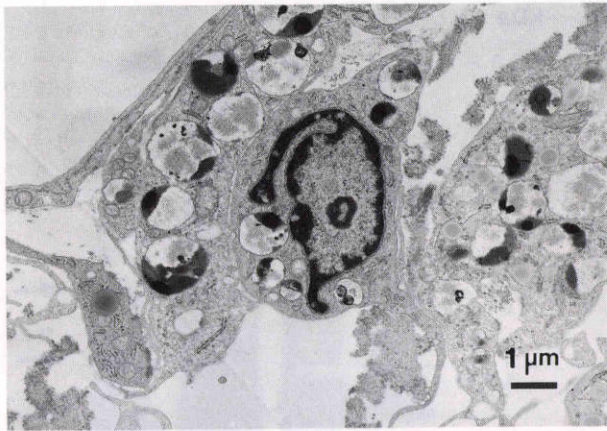
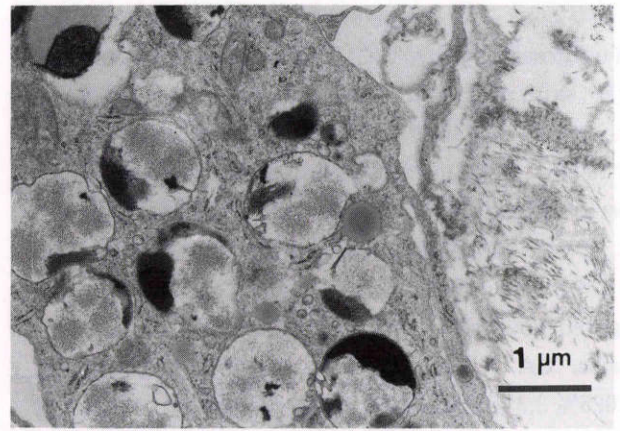


図1b 84歳女性の例の培地の fluorography. DEX 投与群 ($1 \times 10^{-6}\text{M}$, $1 \times 10^{-5}\text{M}$, $1 \times 10^{-4}\text{M}$, lane 1-3), 対照群 (lane 4). 両群に差異は認められない.



a



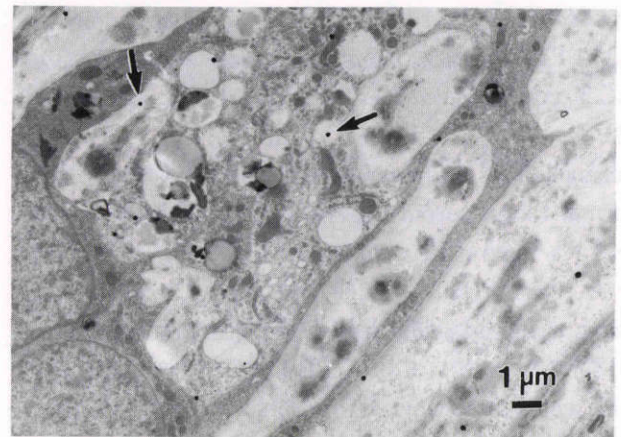
b

図 2 a, b 84 歳女性の例の DEX 投与群の電子顕微鏡写真。

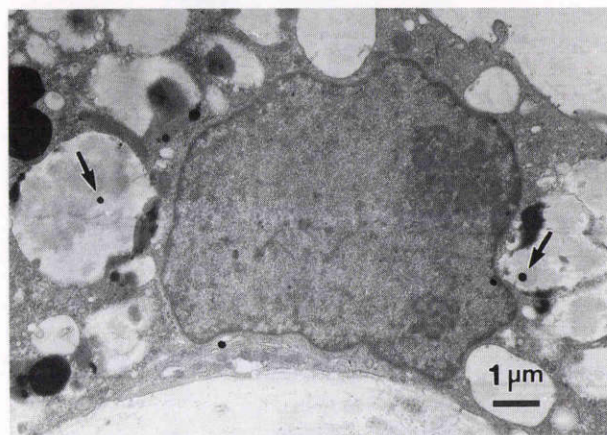
線維柱細胞は活性化しており、種々の電子密度の内容物質を含んだ細胞内空胞を多数持った細胞が認められる。細胞内空胞には microfibril が認められる。



c



d



e

図 2 c 84 歳女性の例の対照群の電子顕微鏡オートラジオグラフィ。

現像銀は線維柱組織の核、細胞質内ならびに細胞外要素内に認められる。

図 2 d, e 84 歳女性の例の DEX 投与群の電子顕微鏡オートラジオグラフィ。

線維柱細胞には多数の細胞内空胞が認められ、現像銀はその細胞内空胞内の microfibril に認められる (矢印)。

84 歳女性の 2 例の線維柱組織では、40, 55, 66 kD の部分で対照群に比し DEX 投与群で増加が認められ、DEX の濃度依存性効果が認められた (図 1 a)。この 2 例での培地では明らかな差は認められなかった (図 1 b)。

電子顕微鏡オートラジオグラフィでは両群ともに、現像銀は線維柱組織の核、細胞質内、ならびに細胞外要素

内に散在していた (図 2 c) が、前記の 2 例で DEX 投与群で、対照群とは異なり線維柱組織内に多数の細胞質内空胞を有する細胞が多数存在し (図 2 a~b)、その空胞内の microfibril が存在する部位に現像銀が認められた (図 2 d~e)。

抗エラスチン抗体による western blotting では、11 例

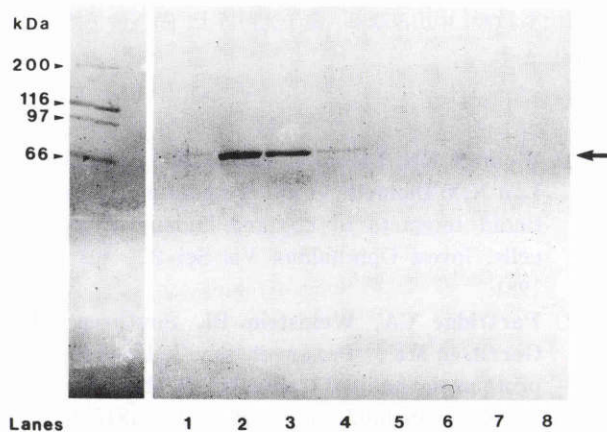


図3 84歳女性の抗エラスチン抗体による western blotting.

線維柱組織対照群 (lane 1), 線維柱組織 DEX 投与群 ($1 \times 10^{-4}M$, $1 \times 10^{-5}M$, $1 \times 10^{-6}M$, lane 2-4), 培地対照群 (lane 5), 培地 DEX 投与群 ($1 \times 10^{-4}M$, $1 \times 10^{-5}M$, $1 \times 10^{-6}M$, lane 6-8). 線維柱組織の 72 kD の部分で対照群に比し DEX 投与群で増加が認められ, DEX の濃度依存性効果が認められる. 培地ではバンドは得られなかった.

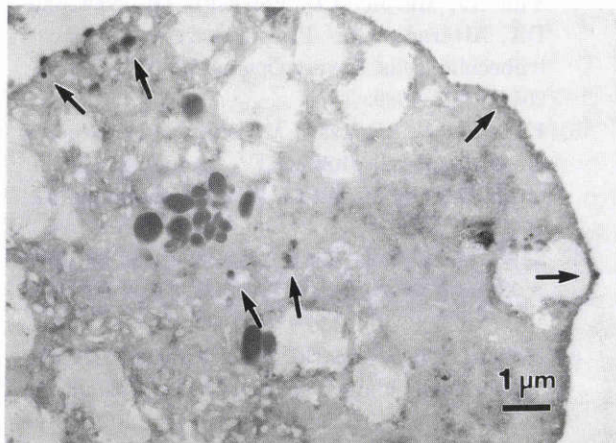


図4 84歳女性の例の抗エラスチン抗体による電子顕微鏡酵素抗体法.

線維柱組織内には多数の細胞内空胞を含む線維柱細胞が多数認められ, その細胞内および細胞表面にエラスチンの局在が認められた (矢印).

とも線維柱組織で 72 kD の部分でバンドが得られたが, 培地ではバンドは得られなかった. 対照群と DEX 投与群の比較では, 11 例中 9 例は両群で明らかな差は認められなかったが, 前記の 2 例の線維柱組織では 72 kD の部分で対照群に比し DEX 投与群で増加が認められ, DEX の濃度依存性効果が認められた (図 3).

抗エラスチン抗体による電子顕微鏡酵素抗体法では前記の 2 例では線維柱組織内に多数の細胞質内空胞を有する細胞が多数存在し, その細胞内および細胞表面に対照群には認められなかったエラスチンの局在が認められた (図 4).

IV 考 察

Tripathi ら¹⁴⁾は器官培養されたヒト線維柱組織に hydrocortisone を投与すると, ほとんどの細胞は核と核小体が腫脹し, いくつかの細胞では細胞質内に多数の空胞を有していたと報告している. 我々の器官培養法でも正常ヒト線維柱組織を培地に DEX を加えて器官培養すると, 対照に比して内皮網内の細胞外要素が有意に増加し, 線維柱層板に細胞融合が生じ, 線維柱細胞の活性化と種々の電子密度の内容物質を含んだ多数の空胞の出現が認められる群, すなわちステロイドに反応する群と反応しない群とに分かれることが明らかになっている. 教室での研究結果⁷⁾では反応する群の割合が 36% となり, この割合は報告¹⁵⁾された臨床例のステロイド反応群の割合とよく一致している. Johnson ら¹⁶⁾は眼圧を測定しながらヒト全眼の線維柱組織を器官培養する方法を用いて, DEX を投与すると, chondroitin sulfate, dermatan sulfate の合成が低下し, その代わりに ³⁵S-メチオニンでラベルされるタンパク質が合成されると報告している. Partridge ら²⁾は線維柱組織の細胞培養を用いて $10^{-7}M$ の DEX を 16 時間投与すると, ³⁵S-メチオニンでラベルされる 35, 65, 70 kD の細胞タンパク質と 90, 100 kD のタンパク質が細胞外に分泌されることを示した. Polansky ら³⁴⁾は線維柱組織の細胞培養を用いて $3 \times 10^{-9} \sim 10^{-6}M$ の DEX を 3 時間から 3 週間投与すると, ³⁵S-メチオニンでラベルされる 54~56 kD (55 kD) ならびに 64~68 kD (66 kD) のタンパク質が誘発あるいは産生増加することを示した. また, そのタンパク質は DEX の投与時間や投与量に比例し増加することを示し, 66 kD のタンパク質は 55 kD のタンパク質にシアル酸や硫酸残基が付加したものであるとしている³⁾. 本研究においても, 器官培養された線維柱組織は ³⁵S-メチオニンでラベルされるタンパク質を合成しており, fluorography では 200 kD から 16 kD に至るタンパク質バンドが線維柱組織と培地で得られることが明らかとなり, また, DEX 投与により線維柱組織で 40, 55, 66 kD の部分で対照群に比し増加する症例が 11 例中 2 例認められている. また, その 2 例では DEX の濃度依存性効果が認められたことから, DEX 投与により ³⁵S-メチオニンでラベルされるタンパク質が誘発あるいは過剰に合成される例が存在することが明らかになった.

また, 同じ例の DEX 投与群の電子顕微鏡オートラジオグラフィでは現像眼が線維柱細胞の空胞内ならびに細胞外要素に局在することが確認されたことから, 器官培養された線維柱組織は, DEX 投与によりメチオニンを取り込むタンパク質の合成を新しく誘発, あるいは既に合成しているタンパク質を過剰に産生しており, 細胞質内空胞に一次的に貯留させていることが考えられた. 一方, Yun ら⁵⁾は線維柱組織の細胞培養では DEX を投与して,

抗エラスチン抗体による免疫蛍光抗体法を施行すると、3日間のDEX投与で線維柱細胞内にエラスチンでラベルされた物質が認められ、1～2週間の投与で線維柱細胞表面にエラスチンでラベルされた物質の点状付着が認められたとしている。本研究では、DEX投与により線維柱組織のwestern blottingでは11例中前記の2例の線維柱組織では72 kDの部分で対照群に比しDEX投与群で増加が認められ、かつ、DEXの濃度依存性効果が認められたことから、DEX投与によりエラスチンが誘発あるいは過剰に合成される例が存在することが明らかになった。また、同じ例のDEX投与群の抗エラスチン抗体による電子顕微鏡酵素抗体法では前記の2例で線維柱組織内に多数の細胞質内空胞を有する細胞が多数存在し、その細胞内および細胞表面にエラスチンの局在が認められたことから、器官培養された線維柱組織は、DEX投与によりエラスチンの合成が誘発されることが明らかとなった。また、DEX投与で線維柱細胞内に多数の細胞質内空胞が出現する例のみが³⁵S-メチオニンでラベルされるタンパク質とエラスチンを誘発あるいは過剰に合成することが考えられ、器官培養のステロイド反応群は臨床例のステロイド反応群である可能性が示唆された。エラスチンにはメチオニンが含まれていないことから、DEX投与により増加するタンパク質にはエラスチンとエラスチン以外のタンパク質とが考えられる。これらのことから、ステロイド緑内障の眼圧上昇機序は次のように推測される。ステロイドは線維柱細胞の核のリセプターに働きタンパク質の合成分泌を行い、細胞内でエラスチンの構成要素であるトロポエラスチン(72 kD)ならびに細線維(40, 55, 66 kD)を合成し、細胞外へ分泌する。トロポエラスチンは細胞外で細線維束内で架橋が起り、エラスチンとなって弾力線維を形成し、ばらばらに走行する細線維に沿っても架橋が起りエラスチンを形成する。この細線維はシアル酸を有する糖タンパク質から構成されていると考えられる。このように、細胞外に増加したエラスチンおよび細線維様無定型物質が房水流出抵抗増大の原因となり、眼圧上昇を引き起こすと考えられる。最近行われた器官培養を用いた研究¹⁷⁾ではDEXを投与すると42%に眼圧の上昇が起り、ステロイドに反応した人眼の線維柱組織では層板の肥厚、細胞融合、細胞の活性化、細胞外要素の増加が認められており、本研究のステロイド反応群の電子顕微鏡所見とよく一致している。以上から、我々の器官培養法は眼圧は測定できないものの、DEX投与によって増加するタンパク質の影響を検討するにはきわめて有用な実験モデルということが出来る。

本論文の一部は、第96回日本眼科学会総会(1992年5月、横浜)において発表した。稿を終えるにあたり、本研究に際し御指導と論文の御校閲を頂いた瀬川雄三教授に深謝致します。また、実験の御指導を頂いた本学医学部附属病院中央検査

部勝山努教授、中山淳講師、亀子光明博士、熊谷俊子博士に深謝致します。

文 献

- 1) Weinreb RN, Bloom E, Baxter JR, Alvarado J, Lan N, O'Donnell, et al: Detection of glucocorticoid receptors in cultured human trabecular cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 21: 403-407, 1981.
- 2) Partridge CA, Weinstein BI, Southren AL, Gerritsen ME: Dexamethasone induces specific proteins in human trabecular meshwork cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 30: 1843-1847, 1989.
- 3) Polansky JR, Kurtz RM, Nguyen TD, Huang WD, Alvarado JA: *In vitro* model for steroid effects on IOP: Characterization of HTM protein/glycoprotein changes and molecular cloning approaches. Invest Ophthalmol Vis Sci 31(Suppl): 377, 1990.
- 4) Polansky JR, Kurtz RM, Fauss DJ, Kim RY, Bloom E: *In vitro* correlates of glucocorticoid effects on intraocular pressure. In: Krieglstein GK (Ed): Glaucoma Update IV. Springer-Verlag, Berlin, 20-29, 1991.
- 5) Yun AJ, Murphy CG, Polansky JR, Newsome DA, Alvarado JA: Protein secreted by human trabecular cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 30: 2012-2022, 1989.
- 6) Urakawa Y, Miyazaki M, Ishihara A, Segawa K, Watanabe S, Shimizu Y: Human trabecular meshwork organ culture. Jpn J Ophthalmol 32: 401-411, 1988.
- 7) 石原 淳: Dexamethasoneの培養ヒト線維柱組織に及ぼす影響—形態学的ならびに画像解析的研究—。信州医誌 40: 435-444, 1992.
- 8) Millard CB, Tripathi BJ, Tripathi RCPP: Age-related changes in protein profiles of the normal human trabecular meshwork. Exp Eye Res 45: 623-631, 1987.
- 9) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature 227: 680-685, 1970.
- 10) Bonner WM, Lasky RA: Film detection method for Tritium-labelled proteins and nucleic acid in polyacrylamide gels. Eur J Biochem 46: 83-88, 1974.
- 11) Laskey RA, Mills AD: Quantitative film detection of ³H and ¹⁴C in polyacrylamide gels by fluorography. Eur J Biochem 56: 335-341, 1975.
- 12) Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Biochemistry 76: 4350-4354, 1979.
- 13) Nakane PK: Recent progress in the peroxidase labeled antibody method. Ann N Y Acad Sci 254: 203, 1975.

- 14) **Tripathi BJ, Tripathi RC, Swift HH** : Hydrocortisone-induced DNA endoreplication in human trabecular cells *in vitro*. *Exp Eye Res* 49 : 259-270, 1989.
 - 15) **Becker B, Mills DW** : Corticosteroids and intraocular pressure. *Arch Ophthalmol* 70 : 500-507, 1963.
 - 16) **Johnson DH, Bradley JM, Acott TS, Fauss DJ, Polansky JR** : The effect of steroids on human trabecular meshwork in perfusion organ culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30(Suppl) : 223, 1989.
 - 17) **Clark AF, Wilson K, de Kater AW, Allingham RR** : Dexamethasone induced ocular hypertension in perfusion cultured human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32(Suppl 1) : 789, 1991.
-