

老化促進モデルマウスにおける Bruch 膜の加齢性変化

—プロテオグリカンの局在と変化—

高田百合子, 大熊 紘, 緒方奈保子, 松島 正史, 菅澤 啓二, 宇山 昌延

関西医科大学眼科学教室

要 約

老化促進モデルマウス (SAM) を用いて, 加齢によるブルッフ膜 (Bruch's membrane) の変化を観察し, さらにクプロリニック・ブルー染色を行うことにより, プロテオグリカンの分布, 量などに変化がみられるかどうかを明らかにするとともに, 化学的および酵素学的処理を行ってプロテオグリカンの種類の同定を行った. 2 か月齢では, 網膜色素上皮細胞および脈絡膜毛細血管板側の基底膜の肥厚はみられず, 染色性の等しいフィラメント (長径平均 25 nm) が膜の両側に配列していた. また, 膠原線維には 2 種類の異なったフィラメントがみられた (長径平均 32 nm, 11 nm). 8 か月齢以降になると, 脈絡膜毛細血管板側の基底膜には著明な肥厚をみ, 網膜色素上皮細胞側の基底膜も肥厚していた. また, 両基底膜の外側にはより染色性の高いフィラメントがみられた. 加齢に伴い膠原線維では, 線維の直径は大小不同がみられ, 線維の染色性は低下し, 線維にみられるフィラメントの配列も乱れ, その染色性も低下していた. 亜硝酸で組織

消化を行うと, 加齢とともに肥厚した基底膜に存在したフィラメントは消化された. また, 同時に膜の外側に多数みられたフィラメントもすべて消化され, これらが同一のものであり, ヘパラン硫酸であることが証明された. また, コンドロイチナーゼ ABC, AC で酵素処理を行うと, 膠原線維にみられた 2 種類のフィラメントが処理され, これらがコンドロイチン硫酸, デルマトン硫酸であることが確認された. 加齢に伴うこのようなブルッフ膜およびその構成要素であるプロテオグリカンの変化は, 網膜色素上皮細胞や脈絡膜毛細血管内皮細胞の機能異常を間接的に示し, 加齢によるブルッフ膜の脆弱性を反映すると思われた. (日眼会誌 98: 469—476, 1994)

キーワード: ブルッフ膜, クプロリニック・ブルー, プロテオグリカン, 老化促進モデルマウス, 加齢

Proteoglycan in Bruch's Membrane of Senescence Accelerated Mouse: Localization and Age-Related Changes

Yuriko Takada, Hiroshi Ohkuma, Nahoko Ogata,
Masashi Matsushima, Keiji Sugawara and Masanobu Uyama
Department of Ophthalmology, Kansai Medical University

Abstract

We demonstrated the distribution of sulfated proteoglycans in Bruch's membrane of Senescence Accelerated Mouse histochemically and ultrastructurally using cuprolinic blue in conjunction with specific enzyme treatments and nitrous acid digestion. Two kinds of proteoglycan filaments were observed in the inner and outer collagenous layers, i.e., small collagen fibril-associated filaments (11 nm in average length), and large filaments (32 nm in average length). Intermediate size filaments (25 nm

in average length) were seen in the basement membranes of the retinal pigment epithelium and choriocapillaris. Chondroitinase AC treatment eliminated the staining of filaments in the collagenous layers (chondroitin sulfate). Chondroitinase ABC treatment also eliminated the staining of filaments in the collagenous layers (chondroitin sulfate and dermatan sulfate). Nitrous acid eliminated the staining of filaments in both basement membranes (heparan sulfate). Proteoglycans

別刷請求先: 570 大阪府守口市文園町1 関西医科大学眼科学教室 高田百合子
(平成5年10月25日受付, 平成6年1月18日改訂受理)

Reprint requests to: Yuriko Takada, M.D. Department of Ophthalmology, Kansai Medical University, 1 Fumizono-cho, Moriguchi-shi, Osaka-fu 570, Japan

(Received October 25, 1993 and accepted in revised form January 18, 1994)

containing chondroitin sulfate and dermatan sulfate were associated uniquely with collagen fibrils. Heparan sulfate proteoglycans were associated with the basement membranes of the pigment epithelium and choriocapillaris. With aging, the thickness of the basement membrane of the choriocapillaris and the staining of the filaments in the basement membranes of the pigment epithelium and choriocapillaris (heparan sulfate proteoglycans) increased.

Collagen fibers became disarranged and the staining of both filaments in the collagenous layers decreased. The results of the staining characteristics probably reflect the aging of Bruch's membrane. (J Jpn Ophthalmol Soc 98 : 469-476, 1994)

Key words: Bruch's membrane, Cuproinic blue, Proteoglycan, Senescence accelerated mouse, Aging

I 緒 言

ブルッフ膜 (Bruch's membrane) は、脈絡膜毛細血管と網膜色素上皮細胞との間の物質輸送で重要な役割を担っている^{1)~4)}。また、ブルッフ膜を構成する線維性の細胞外基質は脈絡膜新生血管の侵入を阻止する役割をもっていると考えられる。そして、この部分には様々なプロテオグリカンがみられる^{5)~9)}。既に、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸、そしてヒアルロン酸が確認され報告されている。これらの細胞外基質は、網膜色素上皮細胞から産生され陰性に荷電している。一方、クプロメロニック・ブルーおよびクプロリニック・ブルーは、巨大分子の陰性側に結合する陽イオン銅フサロシアニン色素^{10)~12)}で、Scott¹⁰⁾により細胞外基質に存在する硫酸化した陰イオン物質を選択的に染色すると報告され、眼科領域でも田原ら¹³⁾¹⁴⁾や沢口ら¹⁵⁾により詳細に報告されている。また、ブルッフ膜に存在するプロテオグリカンについても Essner ら⁵⁾や Call ら⁶⁾によって報告された。

老化促進モデルマウス (senescence accelerated mouse, SAM) は竹田ら¹⁶⁾¹⁷⁾により開発され、促進老化とアミロイド症を呈する系統で、老化の動物モデルとして研究されている。SAM P 系の平均寿命は 11.9 か月、R 系では 15.3 か月で、特徴としては、行動性の低下、脱毛、被毛光沢の減退消失、被毛粗雑、脊椎前後彎増強、寿命の短縮などがある。

眼科領域でも様々な研究が行われ¹⁸⁾¹⁹⁾、我々も SAM P 1 を用い網膜色素上皮細胞、ブルッフ膜の加齢変化について、形態学的に検討し報告してきた²⁰⁾²¹⁾。

今回は、ブルッフ膜を構成する線維性の細胞外基質であるプロテオグリカンが加齢に伴ってどのように変わるかを報告する。

II 方 法

1. 実験動物

老化促進モデルマウス SAM P 1 の生後 2, 5, 8, 10, 12 か月齢と平均寿命を超えた 14 か月齢のものを全身状態、行動などを観察後眼球摘出した。それぞれ各時期について 3 匹 5 眼以上観察した。対照としては、同月齢の

BALB/c マウスを用いた。

2. 実験方法

灌流または浸漬で眼球固定 (2.5% グルタルアルデヒド, 2% パラフォルムアルデヒド, 0.1 M 燐酸緩衝液 pH 7.4~7.5) した後、細切し 4℃ で一昼夜保存した。そして、同一眼球組織の細切したものを以下のように区分して処理および消化を行った。

1) 無処理群

2) コンドロイチナーゼ AC 処理: Tris 緩衝液 (0.25 M Tris, 0.18 M NaCl, 0.05% 牛血清アルブミン, 5 mM benzamidine-HCl, 0.1 M 6-amino-caproic acid, pH 8.0, 4℃) に一昼夜保存。コンドロイチナーゼ AC 含 Tris 緩衝液 (1 U ml⁻¹ コンドロイチナーゼ AC) で 24 時間 37℃ 加温。

3) コンドロイチナーゼ ABC 処理: Tris 緩衝液 (0.25 M Tris, 0.18 M NaCl, 0.05% 牛血清アルブミン, 5 mM benzamidine-HCl, 0.1 M 6-amino-caproic acid, pH 8.0, 4℃) に一昼夜保存。コンドロイチナーゼ ABC 含 Tris 緩衝液 (1 U ml⁻¹ コンドロイチナーゼ ABC) で 24 時間 37℃ 加温。

4) 2), 3) に対する対照: Tris 緩衝液 (0.25 M Tris, 0.18 M NaCl, 0.05% 牛血清アルブミン, 5 mM benzamidine-HCl, 0.1 M 6-amino-caproic acid, pH 8.0, 4℃) に一昼夜保存。コンドロイチナーゼ AC, ABC を含まない Tris 緩衝液のみで 24 時間 37℃ 加温。

5) 亜硝酸による消化: 5% 亜硝酸と 33% 酢酸を同量混ぜ、90 分間室温で静置 (使用直前に 5 mM benzamidine-HCl と 0.1 M 6-amino-n-caproic acid を加えた)。組織を冷 0.2 M 酢酸で洗浄後、用意して置いた液で 90 分間室温で保存。組織を 0.2 M 酢酸 (5 mM benzamidine-HCl と 0.1 M 6-amino-n-caproic acid 含有液) で洗浄。

6) 5) に対する対照: 組織を冷 0.2 M 酢酸で洗浄。90 分間室温で 0.2 M 酢酸に保存。0.2 M 酢酸で洗浄。

上記の操作後、冷却した 0.1 M 燐酸緩衝液に一昼夜保存した。その後、酢酸ナトリウム含有固定液 (25 mM 酢酸ナトリウム, 0.1 M 塩化マグネシウム, 2.5% グルタルアルデヒド溶液 pH 5.7) で洗浄後、同液に 0.05% クプロリニック・ブルー (quinolinic phthalocyanine,

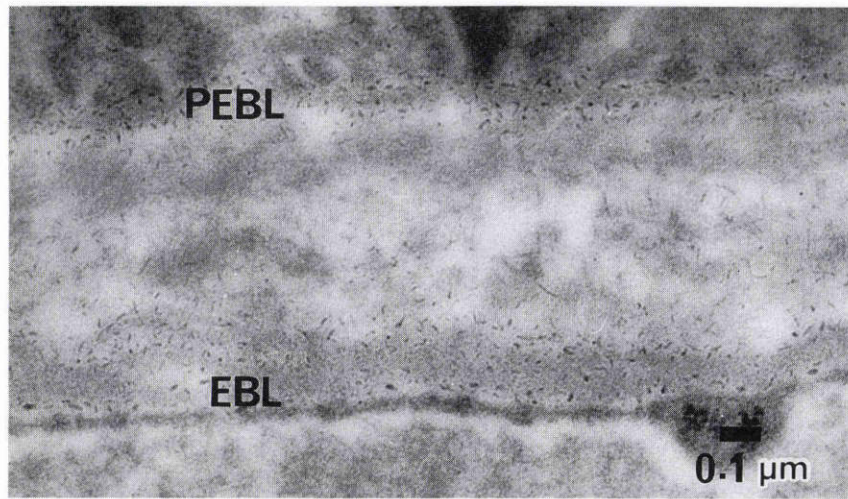


図1 5 か月齢 SAM ブルック膜 (Bruch's membrane).

成長するに従い、基底膜の肥厚がみられる。網膜色素上皮細胞側 (PEBL) と脈絡膜毛細血管板側の基底膜 (EBL) には長径平均 25 nm のフィラメントが多数みられる。両基底膜でフィラメントの染色性に差をみない。クプロロニック・ブルー染色

POLYSCIENCES INC)を加え染色を行った。酢酸ナトリウム含有固定液および 0.5% タングステン酸ナトリウム液 (水溶液, 50% エタノール溶液) でそれぞれ洗浄後、エタノール系列で脱水、プロピレンオキサイドで置換し、エポン樹脂で包埋した。そして、ウラニール酸のみで電

子顕微鏡染色を行い、眼底後極部のブルッフ膜を観察した。

III 結 果

1. ブルッフ膜の加齢性変化

2 か月齢 ~ 5 か月齢と月齢が増すに従い、基底膜は肥厚し、クプロロニック・ブルーにより染色された針状のフィラメントがみられた (図 1, 2)。これらをさらに詳しく観察すると、網膜色素上皮細胞側と脈絡膜毛細血管板側の基底膜に、長径平均 25 nm で両基底膜の両側に多

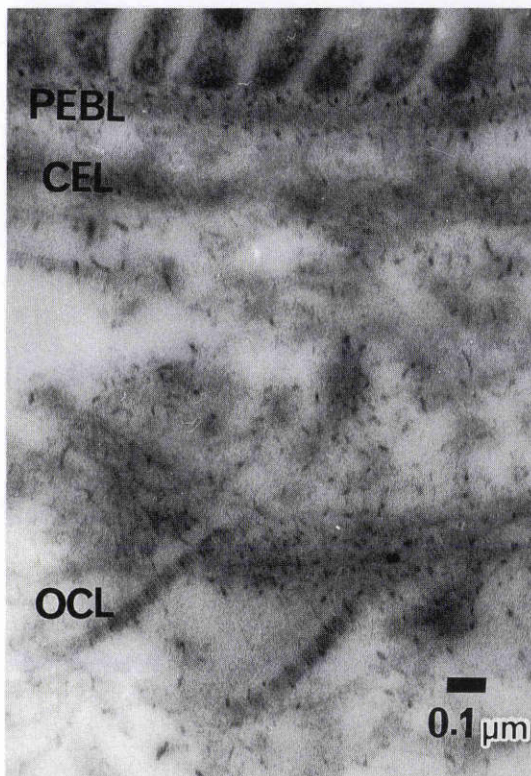


図2 5 か月齢 SAM ブルッフ膜。

膠原線維にもフィラメントがみられる。PEBL: 網膜色素上皮細胞側基底膜, CEL: 弾性線維層, OCL: 外側膠原線維層, EBL: 脈絡膜毛細血管板側基底膜。クプロロニック・ブルー染色

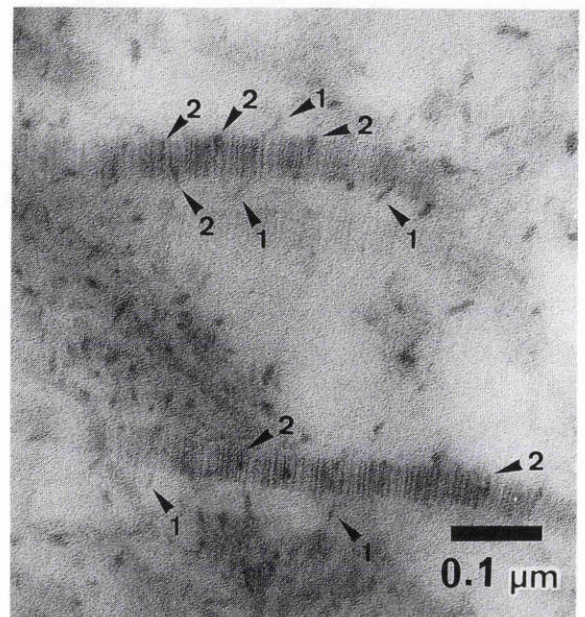


図3 5 か月齢 SAM ブルッフ膜の膠原線維。

膠原線維には 2 種類の異なったフィラメントがみられる。矢尻 1: Type 1, 矢尻 2: Type 2) クプロロニック・ブルー染色

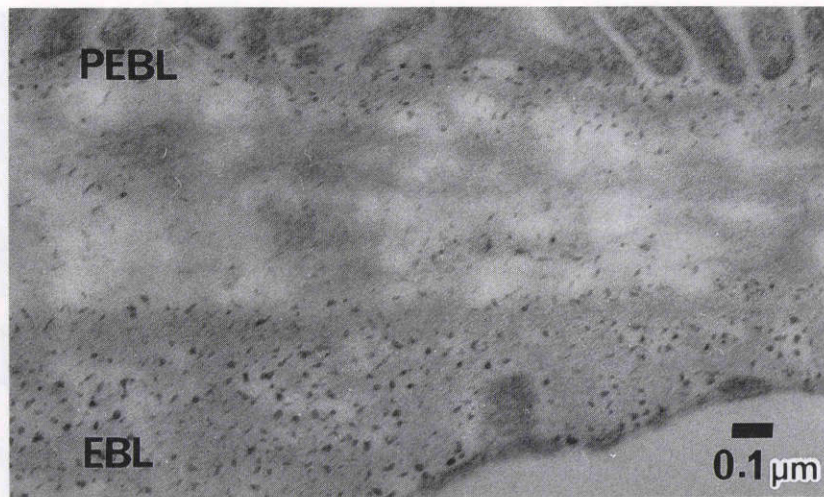


図4 12か月齢SAMブルッフ膜。

基底膜は、網膜色素上皮細胞側 (PEBL), 脈絡膜毛細血管板側 (EBL) ともに肥厚している。両基底膜ともに染色性の増強したフィラメントが多数みられ、密に配列している。クプロロニック・ブルー染色

数みられ、両基底膜でフィラメントの染色性に差をみなかった。また、弾性線維層にもフィラメントをみたが、少数で特徴的所見をみなかった。

膠原線維には2種類の異なったフィラメントがみられた (図3)。Type 1は長径平均32 nmで、膠原線維の外側に線維の長軸と急な角度をもってみられ、type 2は長径平均11 nmで、膠原線維に沿って横紋と平行にみられた。

8か月齢以降になると、基底膜は網膜色素上皮細胞側と、脈絡膜毛細血管板側ともに肥厚していた。とくに、脈絡膜毛細血管板側の基底膜は2か月齢に比べ2倍の厚さになっていた。基底膜に存在するフィラメントをみると、両基底膜ともに染色性の増強したものが多数みられ、密に配列していた。また、これらフィラメントは基底膜の外側において、とくに染色性が増強しているように思われた (図4)。膠原線維の直径は大小不同がみられたが、膠原線維にみられるフィラメントの配列、染色性はtype 1, 2ともに低下していた。また、膠原線維間には微細線維様物質が増加していたが、これらには染色性の高いフィラメントはみられなかった (図5)。

一方、対照のBALB/cマウスの8か月齢では、基底膜、膠原線維ともに形態学的変化は少なかった。また、フィラメントの染色性、配列に変化はなかった (図6)。そして12か月齢以降になり初めて、基底膜の肥厚、フィラメントの染色性の増強が始まった (図7)。

2. 酵素処理および亜硝酸消化

1) コンドロイチナーゼ AC 処理

膠原線維にみられたフィラメントのうち、type 1は消去され、type 2のみみられた (図8)。

2) コンドロイチナーゼ ABC 処理

膠原線維にみられた2種類のフィラメントは両方ともに処理された (図9 a, b)。しかしながら、膠原線維以外



図5 12か月齢SAMブルッフ膜

膠原線維の直径は大小不同がみられるが、線維にみられるフィラメントの配列、染色性はType 1, 2ともに著明な変化をみない。膠原線維間には微細線維様物質 (*)が増加しているが、これらには染色性の高いフィラメントはみられない。クプロロニック・ブルー染色

に存在するフィラメントは残存していた。また、2~5か月齢のものに比べ、加齢した12か月齢のものでは内外側膠原線維層の膠原線維が酢酸ウランによる電子顕微鏡染色では不明瞭となった (図10)。

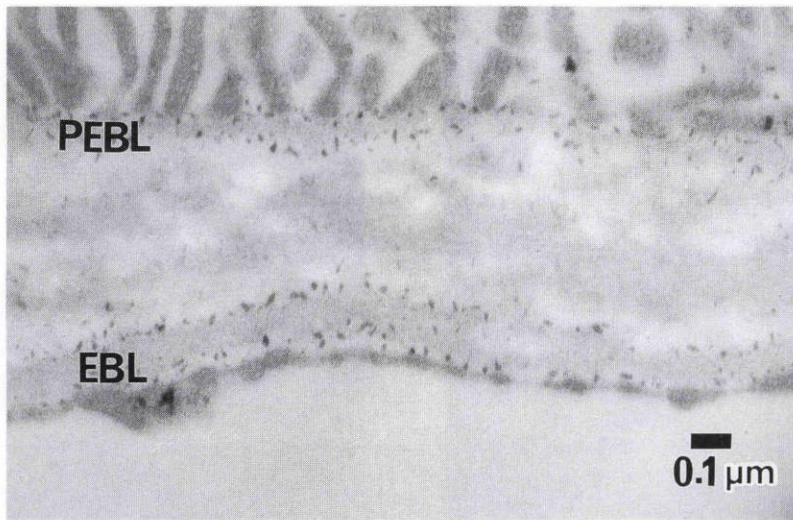


図6 8か月齢 BALB/c マウスのブルッフ膜。

基底膜，膠原線維ともに形態学的変化が少ない，フィラメントの染色性，配列に変化はない，クプロロニック・ブルー染色

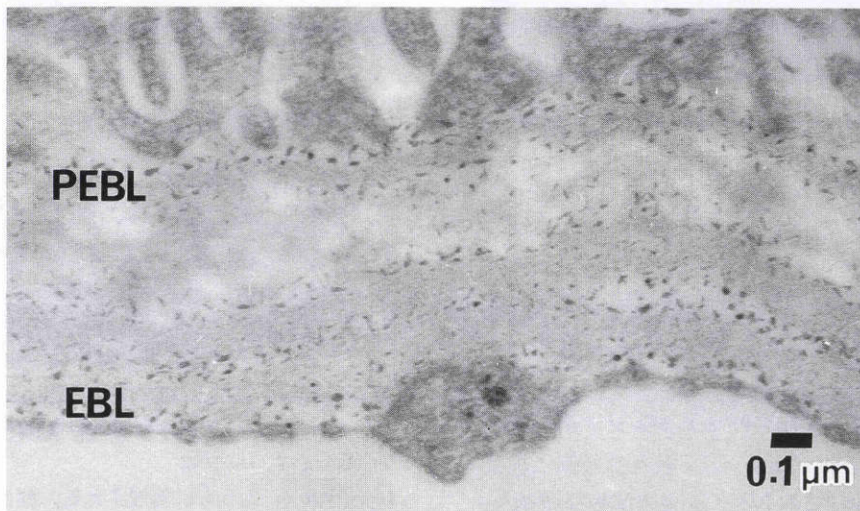


図7 12か月齢 BALB/c マウスのブルッフ膜。

基底膜の肥厚，フィラメントの染色性の増強がみられる，クプロロニック・ブルー染色

3. 亜硝酸消化

網膜色素上皮細胞側と脈絡膜毛細血管板側の基底膜に沿ってみられたフィラメントはすべて消失していた(図11)，とくに，脈絡膜毛細血管板側にみられた染色性の増強したフィラメントもすべて消失していた。しかし，基底膜以外の膠原線維などにみられるフィラメントはそのまま残存していた。

IV 考 按

ブルッフ膜に存在するプロテオグリカンについては Essner ら⁵⁾や Call ら⁶⁾によって報告された。クプロロニック・ブルーおよびクプロロニック・ブルー染色を行うことによりプロテオグリカンは針状のフィラメントとしてみられるが，ブルッフ膜にみられる所見は以下のように分類され報告されている。膠原線維には2種類の

フィラメントがみられ，線維の外側に存在している。Type 1 は線維の長軸に沿って急な角度で，type 2 は線維の長軸に直角に配列している。また，弾性線維層にも1種類のフィラメントが見出された。そして，これを type 3 と分類された。基底膜には2種類のフィラメントがみつけられ，両基底膜に同様に存在する type 4 と，他のフィラメントに比べ長径，横径ともに2～3倍と非常に大きなフィラメントの type 5 をみた。

我々は以前から，老化促進モデルマウスを用いて網膜色素上皮細胞，ブルッフ膜の加齢性変化を観察している²⁰⁾²¹⁾。ブルッフ膜については，加齢により網膜色素上皮細胞側および脈絡膜毛細血管板側の基底膜の肥厚がみられ，とくに脈絡膜毛細血管板側で著明であった。また，膠原線維間の離間が大きくなり，間隙には微細線維様物質を多数みた。

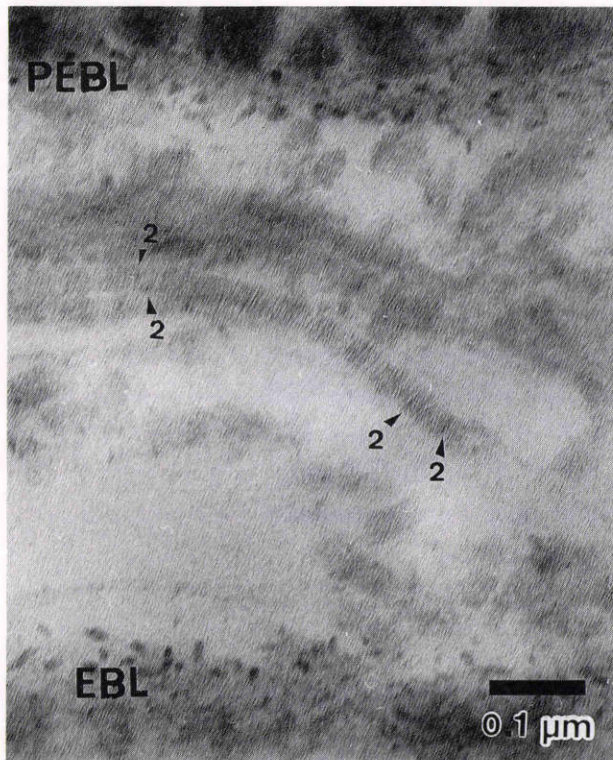


図8 コンドロイチナーゼ AC 処理後, 5 か月齢 SAM ブルッフ膜.

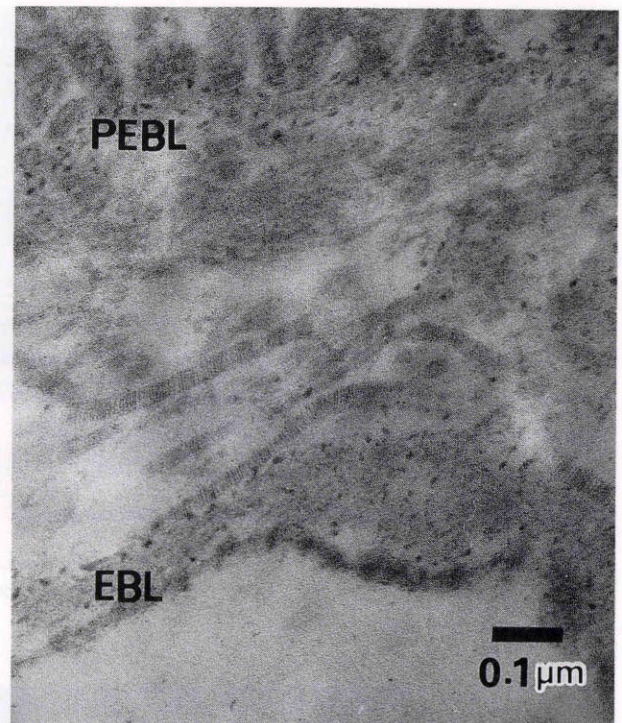
Type 1 は酵素処理され, type 2 のみみられる. (矢尻 2) クプロリニック・ブルー染色

そこで今回は, これらブルッフ膜の変化をブルッフ膜を構成する細胞外基質に注目し, 従来の報告に基づいて分類の上, 加齢による変化を検討した.

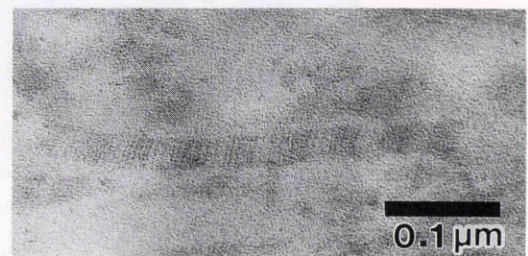
膠原線維には2種類の異なったフィラメントがみられた. Type 1 は長径平均 32 nm で, 膠原線維の外側に線維の長軸と急な角度をもってみられ, type 2 は長径平均 11 nm で, 膠原線維に沿って横紋と平行にみられた. 加齢に伴って, 膠原線維にみられたフィラメントの配列, 染色性は type 1, 2 ともに低下していた. また, 膠原線維間には微細線維様物質が増加していたが, これらには染色性の高いフィラメントはみられなかった.

コンドロイチナーゼ AC で処理を行うと, 膠原線維にみられたフィラメントのうち, type 1 は酵素処理され, type 2 のみみられた. コンドロイチナーゼ AC はヒアルロン酸だけでなく, コンドロイチン硫酸を選択的に処理する. そして, クプロリニック・ブルーは硫酸化した陰イオン物質を選択的に染色することを考え合わせると, type 1 はコンドロイチン硫酸であることがわかった.

コンドロイチナーゼ ABC で処理を行うと, 膠原線維にみられた2種類のフィラメントは処理された. 一方, コンドロイチナーゼ ABC はコンドロイチン硫酸, デルマトン硫酸, ヒアルロン酸を処理する酵素である. コンドロイチナーゼ AC の結果と合わせて考えると, type 2 はデルマトン硫酸であることがわかった. また, 膠原線



a



b

図9 a, b コンドロイチナーゼ ABC 処理後, 5 か月齢 SAM ブルッフ膜.

Type 1, 2 ともに処理される. 膠原線維以外に存在するフィラメントは残存している. クプロリニック・ブルー染色

維以外に存在するフィラメントは残っており, コンドロイチン硫酸, デルマトン硫酸が膠原線維に存在するプロテオグリカンでコンドロイチナーゼ ABC により選択的に処理されたことがわかった.

また, 2~5 か月齢のものに比べ, 12 か月齢のもではコンドロイチナーゼ ABC によく処理され, 内外側膠原線維層は不明瞭になった. このことから, 加齢による膠原線維の脆弱性およびプロテオグリカンの易消化性が示唆された.

一方, 基底膜は2か月齢~5か月齢と成長するに従い, 肥厚した. これらをさらに詳しく観察すると, 網膜色素上皮細胞側と脈絡膜毛細血管板側の基底膜には長径平均 25 nm のフィラメントが基底膜の両側に多数みられ, 両基底膜でフィラメントの染色性に差をみなかった. 弾性線維層にもフィラメントをみたが, 少数で特徴的所見を

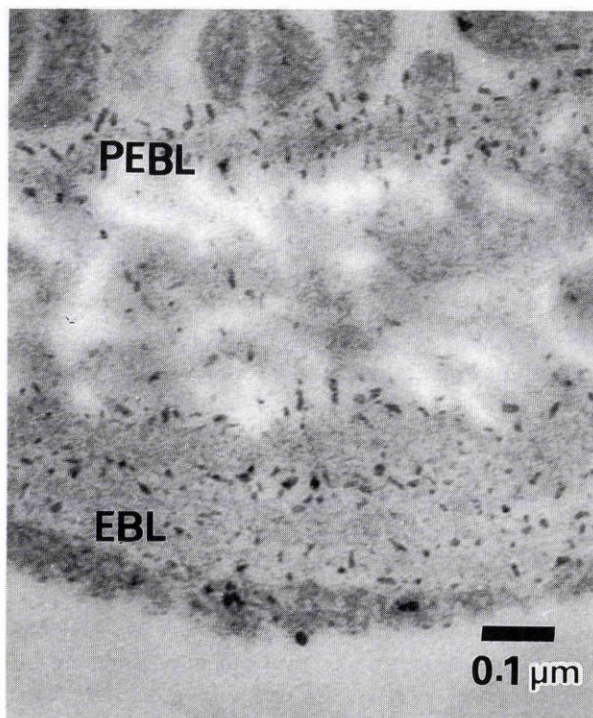


図 10 コンドロイチナーゼ ABC 処理後, 12 か月齢 SAM ブルッフ膜。

5 か月齢のものに比べ消化が著しく, 内外側膠原線維層は不鮮明となる。クプロリニック・ブルー染色

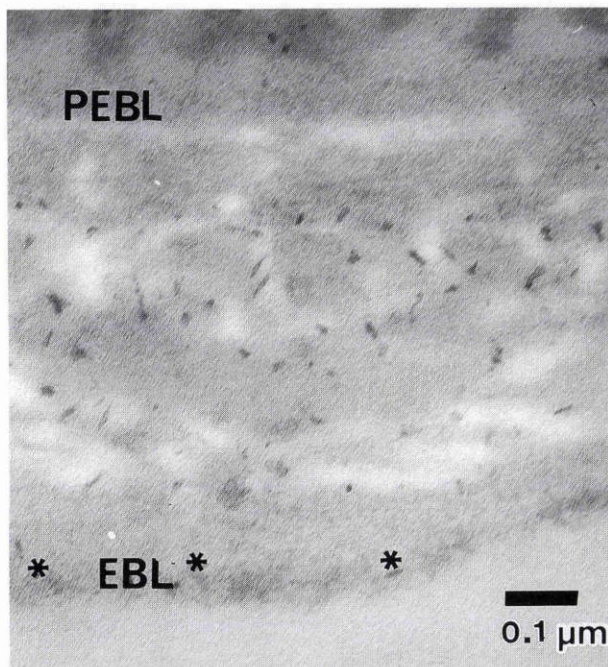


図 11 亜硝酸消化後, 12 か月齢 SAM ブルッフ膜。基底膜に沿ってみられたフィラメントはすべて消失している。とくに, 脈絡膜毛細血管板側にみられた染色性の増強したフィラメントもすべて消失している (*). 基底膜以外の膠原線維などにみられるフィラメントはそのまま残存している。クプロリニック・ブルー染色

みなかった。8 か月齢以降になると, 基底膜は, 網膜色素上皮細胞側, 脈絡膜毛細血管板側ともに肥厚していた。とくに, 脈絡膜毛細血管板側の基底膜は 2 か月齢に比べ 2 倍の厚さになっていた。基底膜に存在するフィラメントをみると, 両基底膜ともに, 染色性の増強したものが多数みられ, 密に配列していた。

亜硝酸はヘパラン硫酸を選択的に消化することができる。そこで, 亜硝酸で組織消化を行うと, 網膜色素上皮細胞側, 脈絡膜毛細血管板側基底膜に沿ってみられたフィラメントはすべて消失していた。とくに, 脈絡膜毛細血管板側にみられた染色性の増強したフィラメントもすべて消失しており, これらがすべてヘパラン硫酸であることが確認された。しかし, 基底膜以外の膠原線維などにみられたフィラメントはそのまま残っており, ヘパラン硫酸だけが選択的に消化されたことがわかった。すなわち, 加齢による膜の高度の肥厚とそれに伴うヘパラン硫酸プロテオグリカンの増加が示された。

対照の BALB/c マウスでも同様の加齢性変化を認めしたが, 12 か月齢以降で著明で, 基底膜の肥厚, フィラメントの染色性の増強が始まり, SAM に比べると老化速度はかなり遅いと思われた。そしてこのことは, SAM が対照動物と比べて早期から加齢変化がみられ, 老化の動物モデルとして有用であると思われた。

ブルッフ膜は成長に伴って線維成分が増加し, また脈絡膜毛細血管内皮細胞および網膜色素上皮細胞の細胞外基質産生が活発となる。このため, 基底膜の肥厚とともに膠原線維が成長し, それらに存在するプロテオグリカンも増加していくと思われた。しかしその一方で, 加齢が進むと線維自体は脆弱化し, コンドロイチン硫酸, デルマタン硫酸, ヘパラン硫酸などのプロテオグリカンの組成に変化を来し, 網膜色素上皮細胞と脈絡膜毛細血管板との間の代謝機能が変化しているとみられる。

本論文の要旨は, 第 96 回日本眼科学会総会(1992 年 5 月 7 日, 横浜)および第 58 回中部眼科学会(1992 年 10 月 9 日, 大阪)において高田が発表した。

稿を終えるにあたり, 老化促進モデルマウスを配布して頂きました京都大学胸部疾患研究所竹田俊夫教授に感謝いたします。

文 献

- 1) Hogan MJ, Alvarado JA, Weddel JE: Histology of the Human Eye: An Atlas and Textbook. WB Sanders Company, Philadelphia PA, 1971.
- 2) Tso MO, Friedman E: The retinal pigment epithelium. III. Growth and development. Arch Ophthalmol 80: 214-216, 1968.
- 3) Friedman E, Tso MO: The retinal pigment epithelium. II. Histologic changes associated with age. Atch Ophthalmol 79: 315-320, 1968.
- 4) Garron LK: The ultrastructure of the retinal pigment epithelium with observations on the cho-

- riocapillaris and Bruch's membrane. *Trans Am Ophthalmol Soc* 61: 545-588, 1963.
- 5) **Essner E, Gordon SR**: Demonstration of microfibrils in Bruch's membrane of the eye. *Tissue Cell* 16: 779-788, 1984.
 - 6) **Call TW, Joe GH**: Sulfated proteoglycans in Bruch's membrane of the human eye: Localization and characterization using cupromeronic blue. *Exp Eye Res* 51: 451-462, 1990.
 - 7) **Hassel JR, Robey PG, Barrach HJ, Wilczek J, Rennard SI, Martin GR**: Isolation of heparan sulfate containing proteoglycan from basement membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 4494-4498, 1980.
 - 8) **Hewitt AT, Nakazawa K, Newsome DA**: Analysis of newly synthesized Bruch's membrane proteoglycans. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 478-486, 1989.
 - 9) **Pino RM, Essner E, Pino LC**: Location and chemical composition of anionic sites in Bruch's membrane of the rat. *J Histochem Cytochem* 30: 245-252, 1982.
 - 10) **Scott JE**: Affinity, competition and specific interactions in the biochemistry and histochemistry of polyelectrolytes. *Biochem Soc Trans* 1: 787-806, 1973.
 - 11) **Scott JE**: Collagen proteoglycan interactions. Localization of proteoglycans in tendon by electron microscopy. *J Biochem* 187: 887-891, 1980.
 - 12) **Scott JE**: Proteoglycan histochemistry. A valuable tool for connective tissue biochemistry. *Collagen Rel Res* 5: 541-575, 1985.
 - 13) **Tawara A, Verner H, Hollyfield JG**: Proteoglycans in the mouse interphotoreceptor matrix. II. Origin and development of proteoglycans. *Exp Eye Res* 48: 815-839, 1989.
 - 14) **Tawara A, Verner H, Hollyfield JG**: Distribution and characterization of sulfated proteoglycans in the human trabecular tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 2215-2231, 1989.
 - 15) **Sawaguchi S, Yue BYJT, Iwata K, Fukuchi T, Kaiya T**: Sulfated proteoglycan in the human lamina cribrosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 2388-2398, 1992.
 - 16) **Takeda T, Hosokawa M, Takeshita S, Irino M, Higuchi K, Matsushita T, et al**: A new murine model of accelerated senescence. *Mech Aging Dev* 17: 183-194, 1981.
 - 17) **Takeda T, Hosokawa M, Higuchi K**: Senescence-accelerated mouse (SAM): A novel murine model of accelerated senescence. *J Am Geriatr Soc* 39: 911-919, 1991.
 - 18) **Hosokawa M, Ashida Y, Tsuboyama T, Chen WH, Takeda T**: Cataract in senescence accelerated mouse (SAM). 2. Development of a new strain of mouse with late-appearing cataract. *Exp Eye Res* 47: 629-640, 1988.
 - 19) 西本浩之, 宇賀茂三, 宮田幹夫, 石川 哲: 10か月齢から13か月齢老化促進マウス水晶体の加齢性変化. *あたらしい眼科* 6: 1851-1853, 1989.
 - 20) 緒方奈保子, 大熊 紘, 金井清和, 南後健一, 高田百合子, 宇山昌延: 老化促進モデルマウスの網膜色素上皮, ブルッフ膜の加齢性変化. *日眼会誌* 96: 180-189, 1992.
 - 21) 高田百合子, 緒方奈保子, 大熊 紘, 宇山昌延: 老化促進モデルマウスにおけるブルッフ膜の加齢性変化. *日眼会誌* 97: 595-601, 1993.