

ステロイドの培養豚眼線維柱組織に与える影響

—形態学的, 生化学的, レクチン電子顕微鏡組織化学的検討—

天谷 次郎

信州大学医学部眼科学教室

要 約

器官培養した豚眼線維柱組織に対する副腎皮質ステロイド薬(ステロイド)の影響を形態学的, 生化学的に(さらにレクチン電子顕微鏡組織化学的に)検討した。電子顕微鏡による観察では, ステロイド投与により弾性線維の構成要素である細線維の増加が認められた。二次元電気泳動の結果, ステロイド投与により70 kDaと66 kDaと52 kDa付近の蛋白が増加した。レクチンブロットの結果, 66 kDa付近の蛋白はTriticum vulgare (WGA)・Datura stramonium (DSA)によく染色されることから, N-Acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) を含

む糖蛋白であると推測された。さらに, レクチン電子顕微鏡組織化学の結果, 弾性線維の細線維はWGA・DSAに反応陽性で, その反応性はステロイド投与により増強していた。以上の結果から, ステロイド投与により線維柱組織の超微形態と成分に変化が起こり, 弾性線維を構成する糖蛋白成分が増加することが示された。(日眼会誌 99:995-1004, 1995)

キーワード: 豚眼線維柱組織, ステロイド, レクチン, 糖蛋白, 弾性線維

The Effect of Steroids on Organ-Cultured Porcine Trabecular Meshwork —An Ultrastructural, Biochemical, and Lectin Histochemical Study—

Jiro Amaya

Department of Ophthalmology, Shinsyu University School of Medicine

Abstract

The effect of corticosteroid administration on porcine trabecular meshwork (PTM) was studied by ultrastructural and biochemical analysis. Electron microscopic observations showed an increase of elastic fibers in PTM treated with steroids. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with silver staining showed an increase of proteins with molecular weights of 52 kDa, 66 kDa and 70 kDa. The 66 kDa protein was assumed to be a glycoprotein containing N-acetyl-D-glucosamine, as it was stained positively in the lectin blot analysis with Triticum vulgare (WGA) and Datura stramonium

(DSA). The elastic fibers reacted positively to WGA and DSA, and the degree of this reaction was strengthened by steroid treatment. These results demonstrated that steroid treatment induces ultrastructural and biochemical changes in PTM, and an increase of elastic fibers containing glycoprotein with N-acetyl-D-glucosamine. (J Jpn Ophthalmol Soc 99:995-1004, 1995)

Key words: Porcine trabecular meshwork, Steroid, Lectin, Glycoprotein, Elastic fiber

I 緒 言

近年, ヒト線維柱組織における房水流出抵抗の増大が各種開放隅角緑内障の病因とみなされており¹⁾, 線維柱組織内における種々の細胞外基質が房水流出抵抗に関与しているものと考えられている^{1)~7)}. 最近, 実験的に緑内

障の病因病態を明らかにするため, ステロイド緑内障のモデル実験が行われてきている^{8)~14)}. すなわち, ヒトまたはブタなどの動物の線維柱組織に副腎皮質ステロイド薬(ステロイド)を投与しつつ細胞培養, または器官培養し線維柱組織の変化を解析するという手法である。これらの研究により, ステロイドは線維柱組織における蛋白お

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 天谷 次郎

(平成7年2月21日受付, 平成7年4月17日改訂受理)

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

(Received February 21, 1995 and accepted in revised form April 17, 1995)

よび糖の合成に何らかの影響を及ぼし、房水流出抵抗を増大させるものと考えられつつある。しかし、ヒト線維柱組織は非常に微細な組織であり、また、大量に入手することは困難であることなどから、数多くの研究にもかかわらず、この房水流出抵抗を増大させる物質の正体には未だ不明の点が多い。そこで、本研究では比較的少量に入手することが容易であり、また、線維柱帯の構築や抗原性などが人眼に比較的近いといわれている豚眼の線維柱組織¹³⁾を材料として使用した。培養は対照群とステロイド投与群とに分けて行い、多くの研究で用いられている細胞培養ではなく、より生体に近い状態で培養可能な器官培養を採用した。こうして得られた豚眼線維柱組織を試料として用いて、ステロイド投与により引き起こされる形態と糖蛋白成分の変化について検討した。形態学的解析法として、光学顕微鏡、透過型電子顕微鏡、レクチン電子顕微鏡組織化学的手法を用いた。また、生化学的解析法としては、一次元、二次元電気泳動とそのレクチンプロットを行った。

II 実験方法

1. 器官培養法

材料としては豚眼(ランドレース, 1歳)を摘出後、氷冷保存し12時間以内に使用した。器官培養の方法は既報¹⁵⁾に準じて行った。すなわち、実体顕微鏡下で線維柱組織を含む6mm角の6個の強角膜組織片を作製し、これらの組織片を対照群とステロイド投与群とに分けて器官培養した。Eagle's minimum essential medium (GIBCO)に10%ウシ胎児血清(GIBCO)と200UペニシリンGを加えたものを対照群の液体培地とし、さらに、これにステロイドを加えたものをステロイド投与群の液体培地とした。ステロイドの濃度はリン酸デキサメタゾン(オルガドロン®, 三共) 10^{-4} Mとした。培養はすべて5%CO₂, 湿度100%, 37°Cの条件下で3週間行い、培地は3日毎に交換した。

2. 形態学的解析法

光学顕微鏡および電子顕微鏡試料作製と観察

器官培養後、組織片は直ちに2.5%グルタルアルデヒドで固定した後、既報¹⁵⁾に準じてエポキシ樹脂で包埋した。次に、包埋された試料から超マイクロームを用いて1μmの薄片を作製し、トルイジンブルーで染色した後、光学顕微鏡で線維柱組織を観察した。さらに、0.1μmの超薄切片を作製した後、酢酸ウランとクエン酸鉛で電子染色を行い、日立HS-9透過型電子顕微鏡(加速電圧75kV)で線維柱組織を観察した。

3. 生化学的解析法

1) 二次元電気泳動

器官培養終了後の組織片から実体顕微鏡下で線維柱組織を切り出し、8M尿素およびNonidet P-40を含む試料抽出液を加えてホモジネートした。次に、遠心分離を

行い不溶性成分を除去し、その上清を泳動試料として使用した。二次元電気泳動はO'Farrell法¹⁶⁾で行い、一次元目の等電点電気泳動は内径1mmのガラス管内に作られたポリアクリルアミドゲル中で行った。この際、対照群とステロイド投与群との間で泳動する組織量が異ならないように調整した。等電点電気泳動後ポリアクリルアミドゲルを取り出し、スラブゲル上に固定し二次元目のsodium dodecyl sulfate (SDS) 電気泳動を施行した。クマシー染色およびMorrisseyの方法¹⁷⁾による銀染色を用いて泳動パターンを分析した。

2) 一次元レクチンプロット

前述のごとく、抽出した試料に1% SDSを含むサンプルバッファーを加え100°Cで5分間煮沸した。それらを対照群とステロイド投与群との間で泳動する組織量が異ならないように調整した後に、Laemmliの方法¹⁸⁾に従って7.5% SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。次に、Towbinら¹⁹⁾の方法に従い、トランスファープロットを行い、ニトロセルロース膜に転写した。次に、花井ら²⁰⁾の方法を用いてレクチン染色を行った。すなわち、ニトロセルロース膜を2% Tween/0.15 M sodium phosphate buffer (PBS) pH 7.2で洗浄後、3% Bovine Serum Albumin (BSA)/0.15 M PBS pH 7.2でブロッキングを行った。Tween-PBSで再び洗浄後、4°Cの条件下でペルオキシダーゼ標識レクチンに一晩反応させた。さらに、0.05 M トリス塩緩衝液で洗浄した後にナフトールで発色させた。レクチンは表1にある10種類を使用した。

3) 二次元レクチンプロット

前述のごとく、二次元電気泳動後ニトロセルロース膜に転写し、一次元のものと同様にレクチン染色を行った。レクチンは一次元レクチンプロットの結果から、Canavalia ensiformis (ConA), Triticum vulgare (WGA), Datura stramonium (DSA)を使用した。

4. レクチン電子顕微鏡組織化学

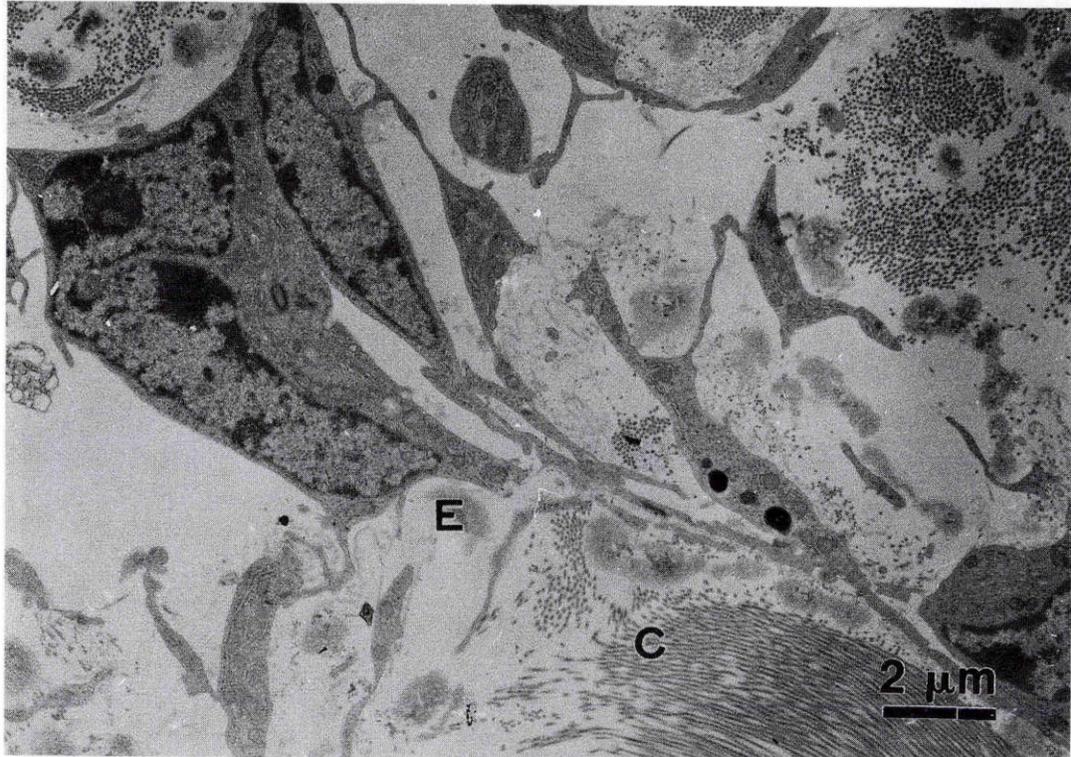
器官培養終了後、既報²¹⁾²²⁾に従い組織片は直ちにLowicryl K 4 M (Chemische Werke Lowi GmbH & Co. Waldkraiburg, Germany)に冷包埋した。包埋した組織から厚さ0.1μmの超薄切片を作製し、既報²¹⁾に従いレクチン染色を行った。一次元レクチンプロットの結果から、ConA, WGA, DSA(生化学工業)の三種のビオチン標識レクチンを使用し、15nmコロイド金標識ストレプトアビジン(Amersham, UK)の30倍希釈液で染色した。酢酸ウランとクエン酸鉛で電子染色をした後に、日立HS-9透過型電子顕微鏡(加速電圧75kV)で観察した。

III 結果

1. 光学顕微鏡所見

光学顕微鏡レベルでは、対照群とステロイド投与群の

CONTROL



STEROID

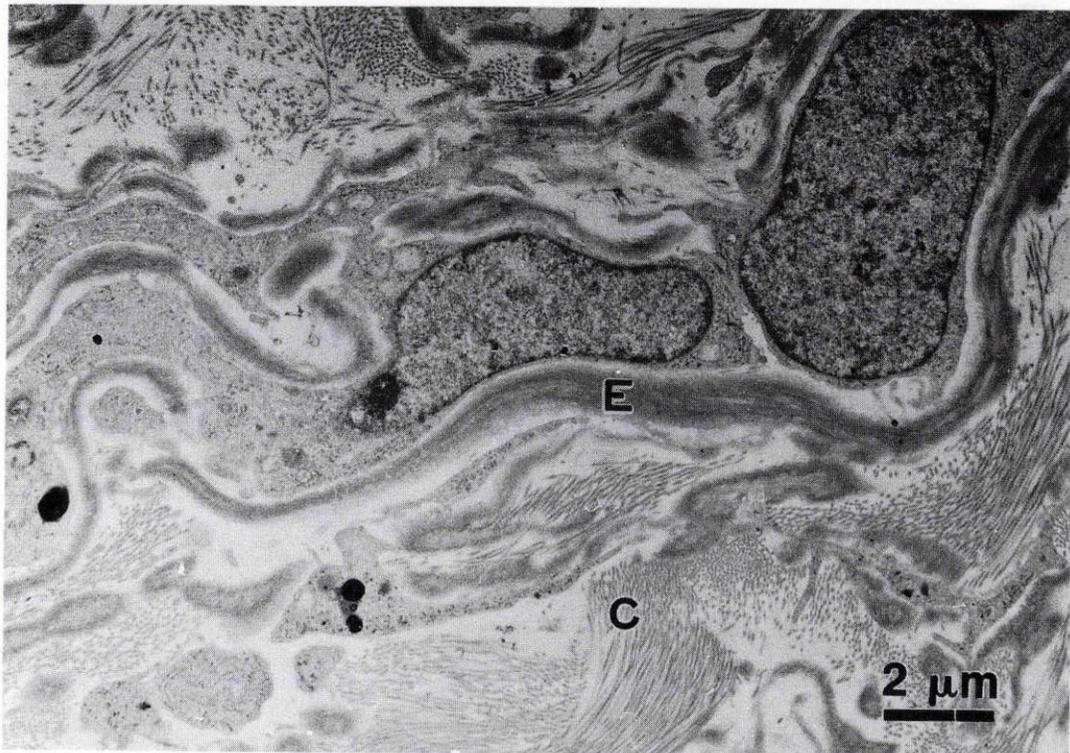


図1 器官培養後の豚眼線維柱組織の電子顕微鏡写真。
ステロイド投与群では弾性線維の構成要素である細線維の増加が認められる。
CONTROL：対照群，STEROID：ステロイド投与群，E：弾性線維の細線維，C：膠原線維

線維柱組織の間に形態的な差は認められなかった。

2. 電子顕微鏡所見

ステロイド投与群の線維柱組織では対照群のそれに比して、弾性線維の構成要素である細線維が著明に増加していた(図1)。

3. 二次元電気泳動

クマシー染色では対照群とステロイド投与群との間に泳動パターンの差は認められなかった。銀染色を行うと、ステロイド投与群では分子量 70 kDa (PI 5.4) と 66 kDa (PI 4.5) および 52 kDa (PI 5.6) の付近に対照群

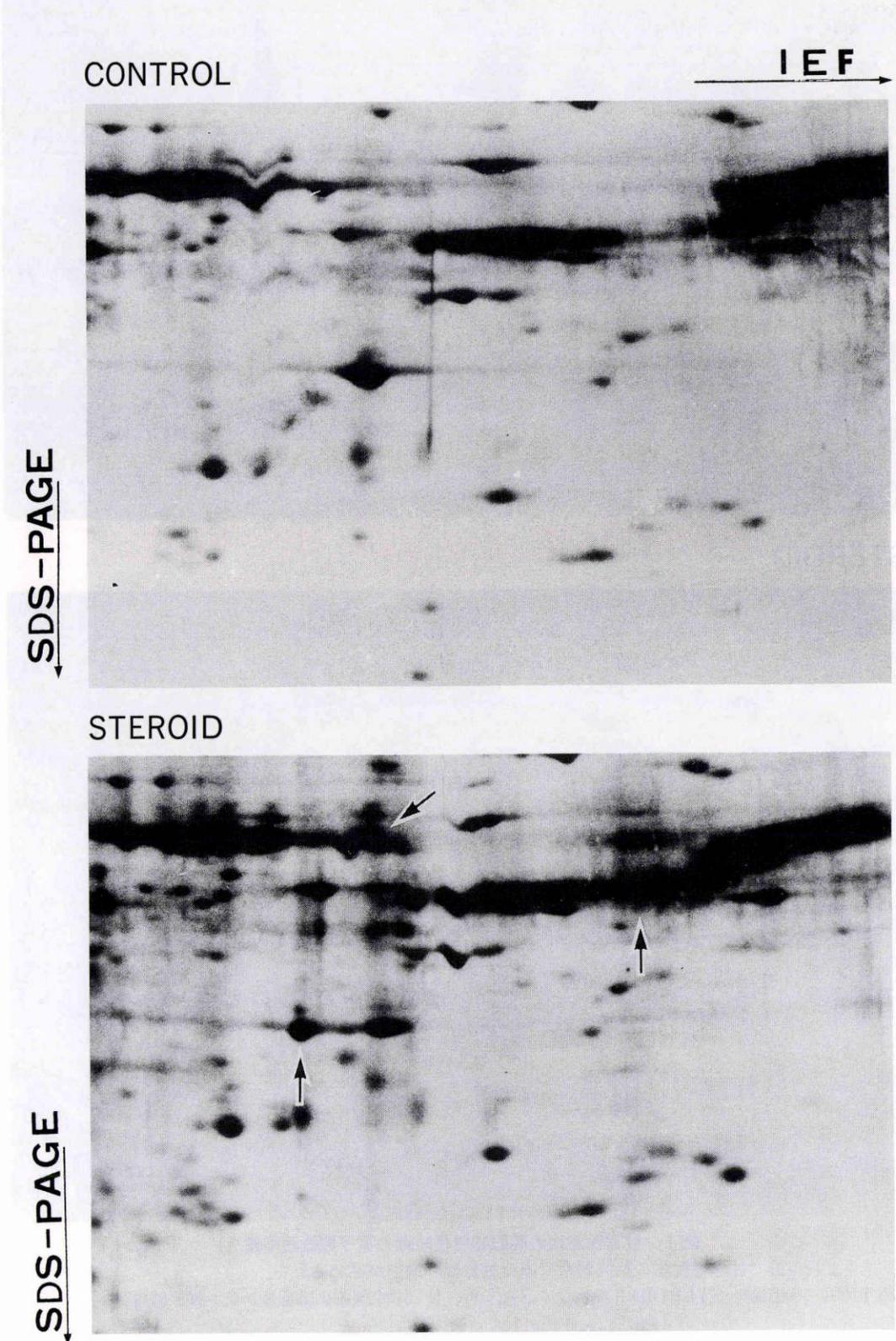


図2 器官培養後の豚眼線維柱組織の二次元電気泳動所見(銀染色).
 矢印で示した部分はステロイド投与群でのみ認められる泳動スポットである.
 SDS-PAGE: SDS 電気泳動, IEF: 等電点電気泳動

では認められないスポットが認められた (図2).

4. 一次元レクチンプロット

各種レクチンの染色性は対照群とステロイド投与群ともに, ConA, WGA, DSA, Lens culinaris (LCH), Phaseolus vulgaris E 4 (PHA-E 4) で強陽性を示し, Sambucus nigraagglutinin (SNA), PHA-L 4 で弱陽性

を示し, Ulex europaeus (UEA-I), Arachis hypogaea (PNA), Maackia amurensis (MAM) ではほとんど染色されなかった. WGA と DSA および PHA-E 4 において染色性に变化がみられ, 他のレクチンでは対照群とステロイド投与群との間に差は認められなかった. WGA, DSA の染色性はステロイド投与群では, 対照群に比べて

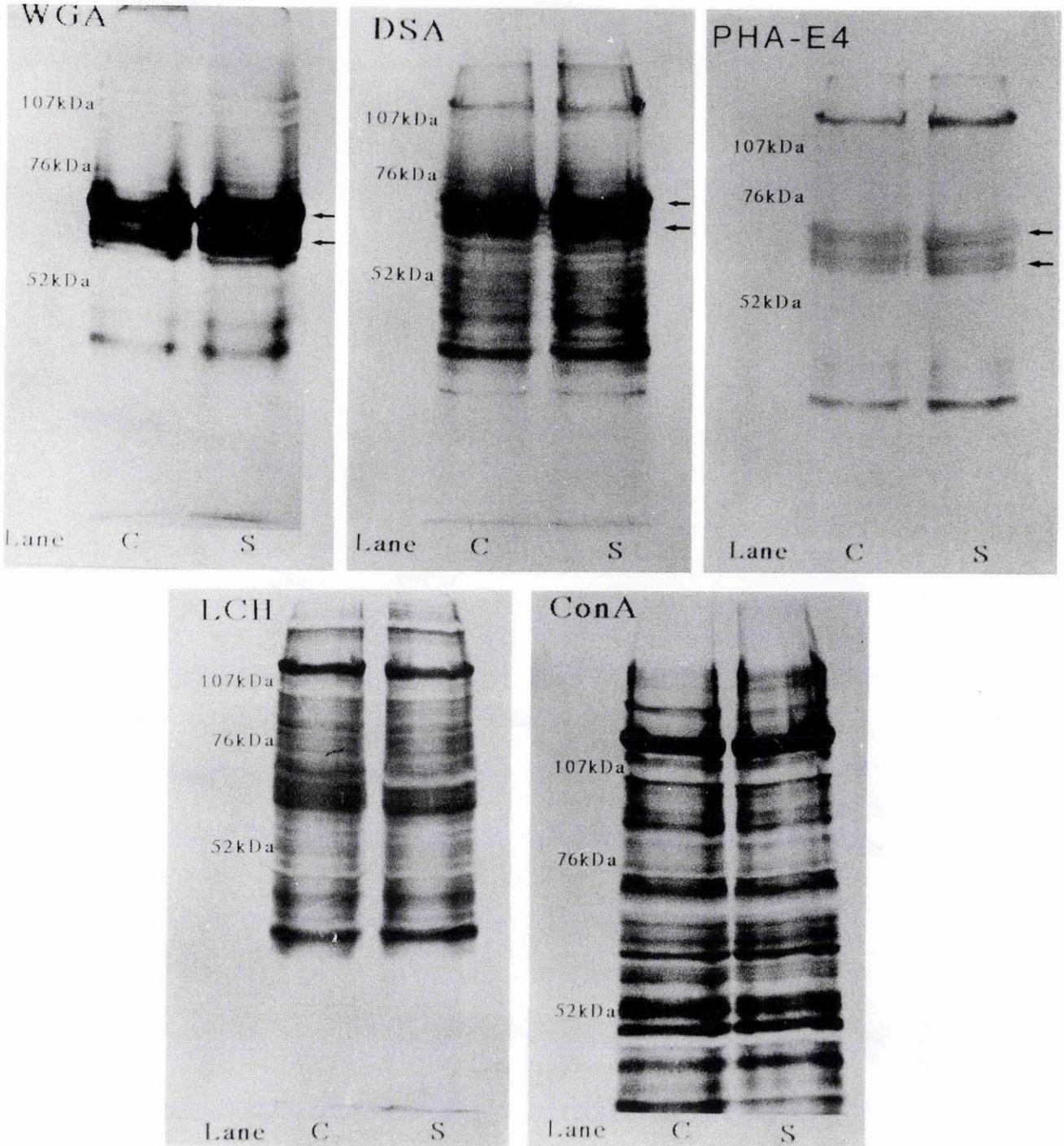


図3 器官培着後の豚眼線維柱組織の一次元レクチンプロット所見.

Triticum vulgaris (WGA), Datura stramonium (DSA) では矢印で示した部位でステロイド投与群にバンドの染色性の増強が著明に認められる. Phaseolus vulgaris E 4 (PHA-E 4) では矢印で示した部位でステロイド投与群にバンドの染色性の増強がわずかに認められた. ConA, LCH では対照群とステロイド投与群の間に差は認められない.

Lane C: 対照群, Lane S: ステロイド投与群

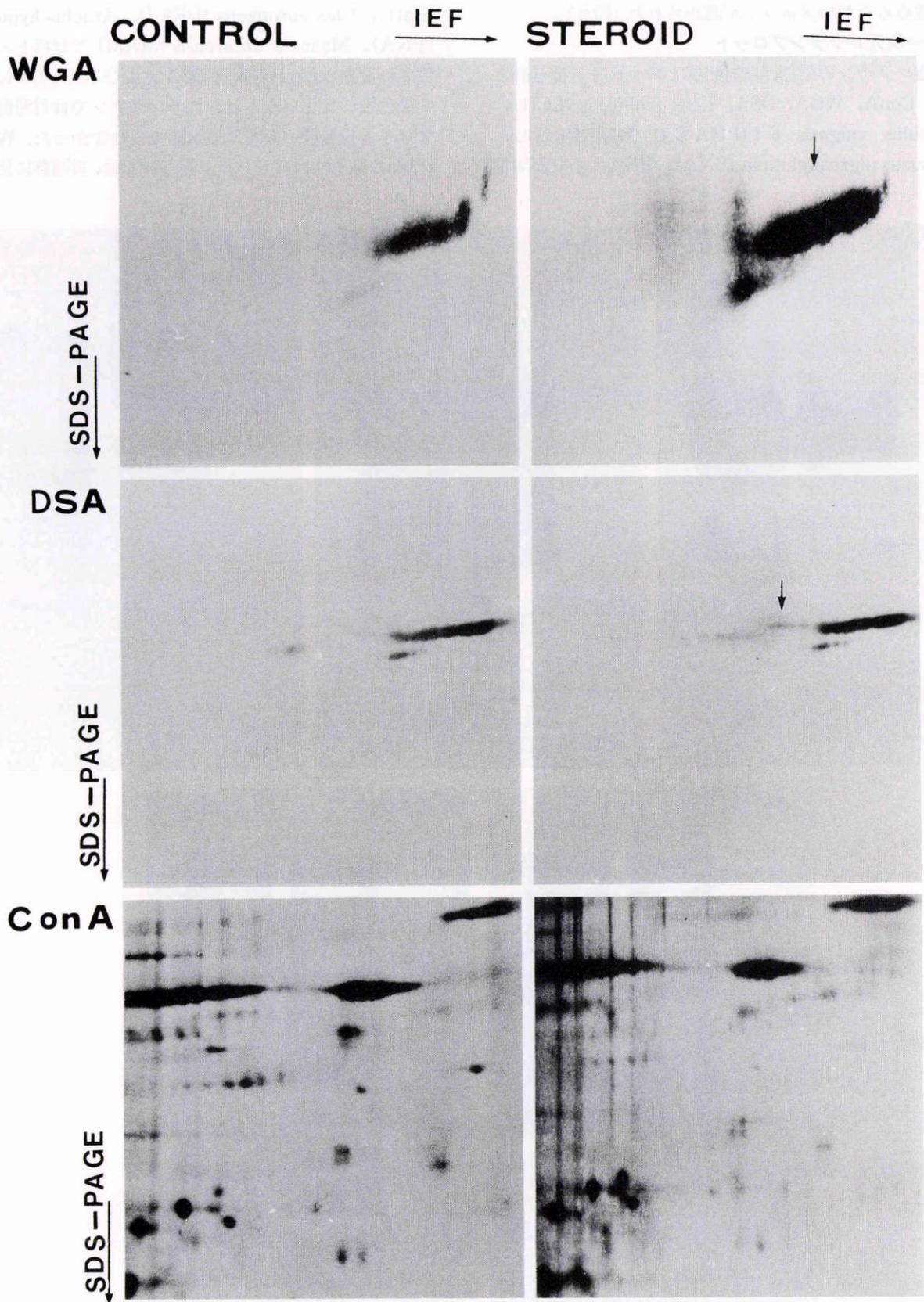


図4 器官培養後の豚眼線維柱組織の二次元レクチンプロット所見。
 WGA, DSA は矢印に示した部分で泳動スポットの増強が認められた。
 CONTROL: 対照群, STERIOD: ステロイド投与群

66 kDa および 60 kDa 付近のバンドで著明に増強していた。PHA-E 4 でも、その染色性はステロイド投与群では対照群に比べて 66 kDa および 60 kDa 付近のバンドで僅かに増強していた (図 3)。

5. 二次元レクチンプロット

WGA, DSA, ConA の染色性はいずれも陽性であり、WGA, DSA とともに 66 kDa (PI 4.5) 付近のスポットで、対照群に比べてステロイド投与群のスポットの染色性が増強していた。しかし、ConA では対照群とステロイド投与群との間に差は認められなかった (図 4)。

6. レクチン電子顕微鏡組織化学所見

WGA および DSA による染色では、対照群、ステロイド投与群ともに、弾性線維の構成要素である細線維にレクチン結合を示す金粒子が認められ、ステロイド投与群では対照群に比べて金粒子数が増加していた (図 5)。

ConA による染色では、対照群、ステロイド投与群ともに、膠原線維の周囲および弾性線維の構成要素である細線維にレクチン結合を示す金粒子が多数認められたが、対照群とステロイド投与群の間に著明な差は認められなかった (図 5)。

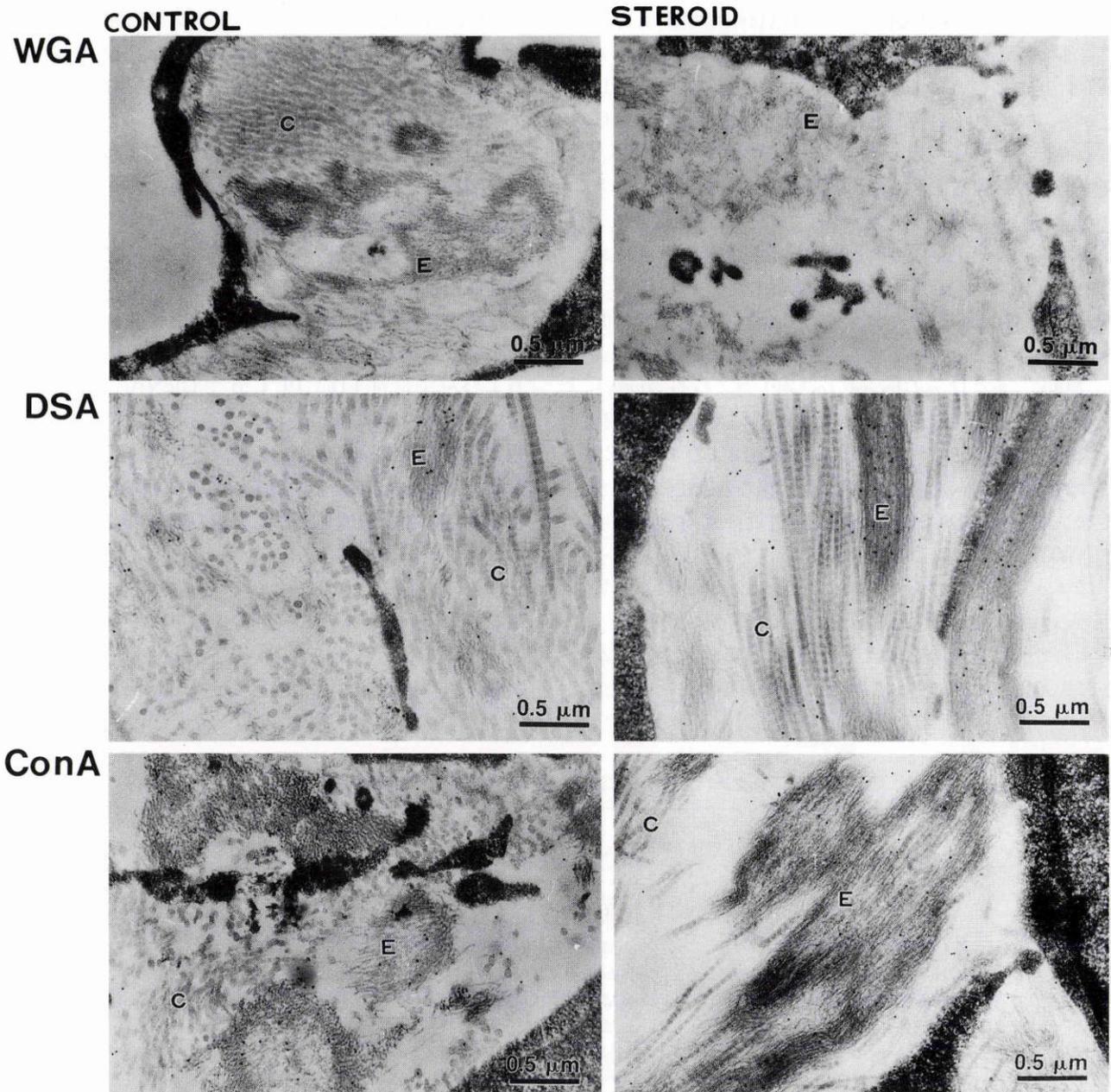


図 5 器官培養後の豚眼線維柱組織のレクチン電顕組織化学所見。
 WGA, DSA ではステロイド投与群で金粒子の付着が増加している。
 CONTROL: 対照群, STERIOD: ステロイド投与群, E: 弾性線維の細線維, C: 膠原線維

IV 考 按

本研究においては、豚眼の線維柱組織を対照群とステロイド投与群とに分けて器官培養したものを使用し、培養後の線維柱組織を形態学的、生化学的に検討して、対照群とステロイド投与群との間に変化のあることを示した。豚眼を用いたこのような研究は、細胞培養によるものがわずかに報告されているのみで、より生体に近い状態で培養可能な器官培養を用いた研究報告は今までほとんどなされていない。電子顕微鏡所見ではステロイド投与群における弾性線維の構成要素である細線維の著明な増加が認められているが、このような報告も過去にはなされていない。また、二次元電気泳動を行い、銀染色を行うとステロイド投与群において対照群では認められない泳動スポットが分子量 70 kDa (PI 5.4) と 66 kDa (PI 4.5) および 52 kDa (PI 5.6) 付近に認められる。以上から、ステロイド投与により豚眼の線維柱組織では極微量の蛋白の増加が起り、しかもそれが線維柱組織の弾性線維の細線維と何らかの関係のある可能性が示唆された。

次に、この変化をより詳細に生化学的に検討するために一次元のレクチンプロットを行った。その結果、ConA, WGA, DSA, PHA-E 4, LCA では染色性は強陽性であったことから、豚眼線維柱組織は α -Mannose (α -Man), または α -Glucose (α -Glc) および N-Acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) を糖鎖末端に持つ糖複合体を含むことが示唆される。WGA, DSA および PHA-E 4 では対照群に比べてステロイド投与群で染色性の増強するバンドが 66 kDa および 60 kDa 付近に認められている。WGA, DSA および ConA を用いて二次元のレクチンプロットを行って見たところ、ConA ではやはり差は認められないが、WGA, DSA では一次元レクチンプロットでも差の認められた分子量 66 kDa 付近で、しかも二次元電気泳動においてステロイド投与群に新たに

現した泳動スポットにほぼ一致する部位 (66 kDa, PI 4.5 付近) で、対照群に比べてステロイド投与群のスポットが増強していた。これらのことから、二次元電気泳動の銀染色の結果、差の認められた 70 kDa と 66 kDa および 52 kDa 付近の泳動スポットのうち、少なくとも 66 kDa 付近の泳動スポットは、WGA, DSA および PHA-E 4 と親和性のある GlcNAc を糖鎖末端に持つ糖蛋白である可能性が示唆された。一方、WGA, DSA, PHA-E 4 と同じく GlcNAc に特異的に結合する LCH では、一次元レクチンプロットにおいてステロイド投与群で増強するバンドは認められていない。これは同じ GlcNAc に結合するレクチンであっても、その結合特異性は表 1 に示したごとく異なっているためと思われる。

次に、線維柱組織におけるレクチン電子顕微鏡組織化学でもステロイド投与で変化がみられた。ConA, WGA, DSA とともに染色性は陽性であるが、ConA では対照群とステロイド投与群の間に著明な差は認められていない。一方、DSA, WGA では対照群に比べてステロイド投与群で増加した弾性線維の構成要素である細線維に対する金粒子の付着が増加している。

以上のことをまとめると、以下のことが推測される。線維柱組織にステロイドを加えて器官培養すると、線維柱組織の弾性線維の構成要素である細線維が増加し、また、分子量約 70 kDa (PI 5.4), 52 kDa (PI 5.6) の蛋白および分子量 66 kDa (PI 4.5) で GlcNAc を糖鎖末端に持つ糖蛋白が増加する。レクチン電子顕微鏡組織化学的方法を用いて検討したところ、これらの蛋白のうち、少なくとも GlcNAc を糖鎖末端にもつ糖蛋白は、ステロイド投与により増加した弾性線維の細線維の構成成分であることが示唆された。

過去の報告において、ステロイド投与により線維柱組織に生化学的变化が起り、特に糖蛋白の合成分泌が増加することが示されてきている。Johnson ら⁸⁾はヒト前眼部の器官培養においてステロイドを投与すると、グリ

表 1 レクチンプロットに使用した 10 種類のレクチン糖鎖特異性

レクチン(起源)	糖鎖特異性	製造
WGA(Triticum vulgare)	GlcNAc(β 1-4GlcNAc) ₁₋₂ Sia	生化学工業
DSA(Datura stramonium)	Gal β 1-4GlcNAc GlcNAc(β 1-4GlcNAc) ₁₋₃	生化学工業
LCH(Lens culinaris)	α -Man \cdot α -Glc \cdot Fuc α 1-6GlcNAc	
PHA-E4(Phaseolus vulgaris)	bisecting GlcNAc	生化学工業
PHA-L4(Phaseolus vulgaris)	α -Man を持つ複合型糖ペプチド	生化学工業
ConA(Canavalia ensiformis)	α -Man \cdot α -Glc \cdot GlcNAc	生化学工業
PNA(Arachis hypogaea)	Gal β 1-3GalNAc \cdot α -Gal \cdot β -Gal	生化学工業
UEA-I(Ulex europaeus)	L-Fuc	生化学工業
SNA(Sambucus nigraagglutinin)	β -Gal	EY ラボラトリーズ
MAM(Maackia amurensis)	Sia α 2-3Gal	EY ラボラトリーズ

Gal: Galactose, Man: Mannose, Fuc: Fucose, Lac: Lactose, Sia: Sialic acid, GlcNAc: N-Acetyl-D-glucosamine, GalNAc: N-Acetyl-D-galactosamine

コサミノグリカン合成は低下するが、³⁵S-メチオニンにラベルされる分子量約 29, 55 kDa の細胞内蛋白の増加と分子量約 48, 60~66, 105 kDa の蛋白の分泌が認められると報告している。Partridge ら⁹⁾はヒト線維柱組織を 16 時間細胞培養してステロイドを投与すると、³⁵S-メチオニンにラベルされた分子量約 35, 65, 70 kDa の細胞内蛋白が増加し、分子量約 40, 90, 100 kDa の蛋白が分泌されると報告している。また、Yun ら¹²⁾はヒト線維柱組織にステロイドを加えて細胞培養すると、細胞内外にエラスチンが増加し、これが房水流出抵抗増大に関与している可能性について述べている。Tripathi ら¹³⁾は豚眼線維柱組織の細胞培養を行い、ステロイドを加えると 56 kDa の蛋白が出現し、しかもそれはある種のレクチンと親和性をもつことから、シアル酸を含む糖蛋白であると指摘している。本研究の結果とこれら過去の報告では、ステロイドを投与するとある種の蛋白もしくは糖蛋白が増加するという点ではほぼ一致した。分子量およびレクチン結合性などの点で若干の相違点が認められるが、これらは実験に使用した眼球の種差および培養方法、解析方法の相違など、実験方法が異なることから、単純に比較することはできないと思われる。また、本研究では過去の研究ではなされていない二次元の電気泳動とそのレクチンプロットを行い、前述のごとくさらに詳しく、増加した蛋白・糖蛋白の性状を解析し得た。

本研究で増加の認められた蛋白は、どのようにして増加したのだろうか。これまでの多くの研究報告では、ステロイド投与により線維柱細胞における蛋白合成が増加するとしている。しかし一方で、Snyder ら²³⁾はヒト線維柱組織にステロイドを加えて細胞培養および器官培養すると、ある種のプロテアーゼが減少し、細胞外基質の turn over が長くなり、その結果、房水流出抵抗を増大させる物質の蓄積が起こるとしている。ステロイド投与による房水流出抵抗の増大は、線維柱細胞における蛋白合成の結果なのか、プロテアーゼ減少による細胞外基質の turn over の遅延によるものなのか、あるいはその両者によるものなのか、本研究からはこの問題に対する解答は得られない。また、これらの増加する蛋白・糖蛋白のアミノ酸配列などは未だ不明である。今後はこれらの問題を課題とし、研究をさらに進めて行きたいと思う。

稿を終えるにあたり、本研究の御指導と論文の御校閲をいただきました信州大学医学部眼科学教室教授瀬川雄三先生に深謝いたします。また、実験の御指導をいただきました解剖学第一講座白田信光先生ならびに寺沢 求先生に、さらに、実験に御協力をいただきました当眼科学教室野原雅彦先生ならびに小島秀伸先生に感謝いたします。

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 cyanomolgus monkey (*Macaca irus*): An electron microscopic study. *Am J Ophthalmol* 73: 760—789, 1972.

3) Segawa K: Ultrastructural changes of the trabecular tissue in primary open angle glaucoma. *Jpn J Ophthalmol* 19: 317—338, 1975.

4) Lutjen-Drecol E, Futa R, Rohen JW: Ultrahistochemical studies of tangential sections of the trabecular meshwork in normal and glaucomatous eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 21: 563—573, 1981.

5) Rohen JW: Why is the intraocular pressure elevated in chronic simple glaucoma? Anatomical considerations. *Ophthalmology* 90: 758—765, 1983.

6) Alvarado JA, Yun AJ, Murphy CG: Juxtacanalicular tissue in primary open angle glaucoma and in nonglaucomatous normals. *Arch Ophthalmol* 104: 1517—1528, 1986.

7) Lutjen-Drecol E, Shimizu E, Rohrbach M, Rohen JW: Quantitative analysis of plaque material in the inner- and outer wall of Schlemm's canal in normal and glaucomatous eyes. *Exp Eye Res* 42: 443—455, 1986.

8) 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.

9) Partridge CA, Weinstein BI, Southren AI, Gerriksen ME: Dexamethasone induces specific proteins in human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 1843—1847, 1989.

10) Polansky JR, Kurts RM, Nguyen TD, Huang WD, Alvarado JA: *In vitro* model for steroid effect on IOP: Characterization of HTM protein/glycoprotein changes and molecular cloning approaches. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 377, 1990.

11) Polansky JR, Kurts RM, Fauss DJ, Kim RY, Bloom E: *In vitro* correlates of gluco-corticoid effects on intraocular pressure. In: Krieglstein GK (Ed): *Glaucoma Update IV*. Springer-Verlag, Berlin, 20—29, 1991.

12) Yun AJ, Murphy CG, Polansky JR, Newsam DA, Alvarado JA: Protein secreted by human trabecular cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 2012—2022, 1989.

13) Tripathi BJ, Milland CB, Tripathi RC: Corticosteroids induce a sialated glycoprotein (Cort-GP) in trabecular cells *in vitro*. *Exp Eye Res* 51: 735—737, 1990.

14) 藤沢 昇: 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—, *日眼会誌* 98: 31—37, 1994.

- 15) 宮永和人: 豚眼線維柱組織の器官培養. 日眼会誌 97: 1151—1156, 1993.
- 16) O'Farrell PH: High-resolution two dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250: 4007, 1975.
- 17) Morrissey JH: Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal Biochem* 117: 307—310, 1981.
- 18) Laemlli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227: 680—685, 1970.
- 19) Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350—4354, 1979.
- 20) Hanai T, Usuda N, Morita T, Nagata T: Light microscopic lectin histochemistry in aging mouse kidney: Study of compositional changes in glycoconjugates. *J Histochem Cytochem* 42: 897—906, 1994.
- 21) 甘利富士夫: 水晶体囊緑内障の落屑物質における糖残基の電子顕微鏡組織化学的研究. 日眼会誌 98: 38—46, 1994.
- 22) Amari F, Nagata S, Umihira J, Nohara M, Usuda N, Segawa K: Lectin electron microscopic histochemistry of the pseudoexfoliative material in the skin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 3962—3966, 1994.
- 23) Snyder RW, Stamer WD, Kramer TR, Seftor EB: Corticosteroid treatment and trabecular meshwork proteases in cell and organ culture supernatants. *Exp Eye Res* 57: 461—468, 1993.