

# コンドロイチン硫酸の培養ヒト線維柱 組織に及ぼす影響

—生化学的ならびに形態学的研究—

李 俊 哉

信州大学医学部眼科学教室

(主任: 瀬川 雄三教授)

## The Effect of Chondroitin 6-sulfate on Organ-Cultured Human Trabecular Meshwork—Biochemical and Morphologic Study—

Toshiya LEE

Department of Ophthalmology, Shinshu University School of Medicine

(Director: Prof. Katsuzo SEGAWA)

The effect of chondroitin 6-sulfate on the glycosaminoglycan (GAG) synthesis of organ-cultured human trabecular meshwork was studied using radioactive precursors, the sequential enzymatic degradation method and transmission electron microscopy. The tissues were obtained from 12 normal postmortem individual eyes, aged 53-80 years. Two explants in the same quadrant were dissected from each of the eyes; one of them was cultured as a control specimen, and the other with chondroitin 6-sulfate. Chondroitin 6-sulfate was added to the culture medium for 2 weeks at a concentration of 1mg/ml. Radioactive precursors ( $^3\text{H}$ -glucosamine and  $^{35}\text{S}$ -sulfate) were administered to the culture medium for analyzing the GAG profile for the subsequent 72 hours. An aliquot of the cultured specimens was processed for transmission electron microscopy. The result of incorporation study revealed a significant increase in chondroitin sulfate and heparan sulfate in the specimens cultured with chondroitin 6-sulfate. In addition, by transmission electron microscopy, in the chondroitin 6-sulfate-treated specimens fine fibrillar-like materials and basal lamina-like materials were seen more prominently than in the control specimens in the endothelial meshwork. These results suggest that chondroitin 6-sulfate may affect the trabecular meshwork metabolism so as to cause an accumulation of the extracellular materials such as chondroitin sulfate, heparan sulfate, fine fibrillar-like materials and basal lamina-like materials. *Shinshu Med. J.*, 40: 577-584, 1992

(Received for publication July 10, 1992)

**Key words:** human trabecular meshwork, organ-culture, chondroitin sulfate, sequential enzymatic degradation method, electron microscopy

ヒト線維柱組織, 器官培養, コンドロイチン硫酸, 逐次酵素消化法, 電子顕微鏡の観察

### I 緒 言

Glycosaminoglycans (GAG) は線維柱組織において、房水流出抵抗に関与する重要な要素とされてい

る<sup>1)</sup>。現在まで線維柱組織における GAG の種類や分布に関する組織化学的な研究がなされているが、未だ一致した見解はみられていない<sup>2)-6)</sup>。近年、放射性前駆物質および細胞培養、器官培養法を利用した線維柱

組織のGAGについて生化学的な研究がなされ、量的に少ない線維柱組織のGAG分析に有効であることが示されている<sup>7-12)</sup>。Acottら<sup>13)</sup>は角強膜組織片の一定期間(7日~14日)の器官培養は、線維柱組織の細胞外要素の研究にとって満足すべき方法であるとし、<sup>3</sup>H-glucosamine, <sup>35</sup>S-sulfateの放射性前駆物質および逐次酵素消化法を利用した分析法で、ヒト線維柱組織のGAGの成分組成を調べている。

最近われわれは、ヒト線維柱組織の長期にわたる器官培養法を確立した<sup>14)</sup>。またその器官培養法およびAcottら<sup>13)</sup>のGAGの研究方法に基づき、兎眼ならびに人眼の一眼を8等分した培養組織片を用いて線維柱組織の生化学的な分析を行い、GAGの合成能や成分組成を検討することができた<sup>15)16)</sup>。この様な確立された器官培養法および生化学的な分析法がヒト線維柱組織のGAGに対する薬剤の影響の研究に有用であると考えられる。そこで今回われわれは、培養ヒト線維柱組織において、コンドロイチン硫酸(CS)の投与によるGAG合成能への影響を生化学的に調べ、さらに形態学的研究結果との関連についても考察した。

## II 材料と方法

### A 材料

アイバンクより得、死後8~39時間を経過した、53歳男、54歳男、55歳男、58歳男、60歳男、64歳男、66歳女、76歳男、78歳男、80歳女の非緑内障眼10例12眼を使用した。これらの眼球はすべて角膜移植に供された後に使用したもので提供時に家族の同意を得た。

### B 培養組織片作製

眼球をトブラマイシン0.3mg/mlを加えた0.1M Dulbecco's phosphate buffered saline (GIBCO, Grand Island, NY, USA)で2回、さらに同じ緩衝液で1回洗浄のち、結膜と角膜上皮を十分に取り除き、赤道部で前後に分けた。つづいて水晶体、硝子体、虹彩、毛様体を除去し、さらに余分な強膜を輪部から約2mmで切除して幅約4mmのリング状の組織とし、さらに子午線方向の切開を加え、線維柱組織を含む約4mm角の角強膜組織片を1眼から8個作製した。以上の操作はすべて培養用フード内で無菌的に行った。

### C 培養方法

器官培養の手技は既報<sup>14)</sup>の通りで、35mm径のプラスチック皿(Falcon Plastics Inc., Oxnard, CA, USA)に液体培地を満たし、その中心に寒天ブロック(10×10×3mm)を置いた。このブロックの中心

に少しくぼみを作り、ここに組織片を内側を上方にして置き、組織片の内側面が気相と液相の境界面に位置するように液体培地を満たした。液体培地として、Eagle's minimum essential medium (GIBCO)に10%ウシ胎児血清(GIBCO)と200単位/mlのペニシリンGを加えたものを使用した。寒天ブロックは液体培地と同じ成分に1%寒天(purified Agar, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)を加えて作製した。培養はすべて5%CO<sub>2</sub>、湿度100%、37°Cの条件下で行った。このようにして同一眼から得られたヒト線維柱組織片を対照群、CS投与群の2群に分け、すべて2週間器官培養した。CS投与群は、chondroitin 6-sulfate (3% Chondron®, 科研製薬)を1mg/mlになるように液体培地中に加え、液体培地は1週間で交換した。培養2週間後に、液体培地中に放射性前駆物質として<sup>3</sup>H-glucosamine (New England Nuclear, Boston, Mass., USA) 0.37MBq/mlならびに<sup>35</sup>S-sulfate (New England Nuclear) 0.74MBq/mlを加え、さらに72時間培養した。

### D GAGの分離および分析<sup>17)</sup>

#### 1 脱脂

培養終了後、実体顕微鏡下で各組織片から線維柱部分のみを切り出した。10倍量のクロロホルム2:メタノール1の割合の液に入れて12時間(この間に1回液交換)脱脂し、アセトンで洗ってから乾燥させた。

#### 2 タンパク除去

半井薬品工業社より購入した、5mM EDTA, 2mM cysteine hydrochloride, 200mM sodium acetateを含むpH5.5の緩衝液100μlあたりパバイン(和光純薬工業)を3mg入れ、48時間、65°Cでタンパクを消化した。消化されたタンパクは、最終濃度が10%になるようにtrichloro acetic acid(半井薬品工業)を加えて2時間、4°Cで沈殿させ、15分間、12,000×g, 4°Cで遠沈して除き、上清はBio-Gel P-6DGカラム(Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif., USA)でクロマトグラフを行って、さらに小さなタンパク等を除いた。こうして得られたGAGは12時間、-20°C、3倍量の100%エタノール(5%にpotassium acetateを含む)で沈殿させ、さらに90分間、12,000×g, 4°Cで遠沈して、その沈渣を乾燥させた。

#### 3 逐次酵素消化法

2の方法で得られたGAGを30μlの水に溶かし、そのうちの5μlはGAGに取り込まれた放射性同位元素(RI)のカウント用に取り除いた。残りの25μlの

表1 逐次酵素消化法の条件

ステップ	消化酵素	バッファー (最終濃度)	pH	消化条件
1	ストレプトマイセスヒアル ロニダーゼ (5/8単位)	20mM 酢酸ナトリウム 2mM EDTA 150mM 塩化ナトリウム	5.0	5hr, 60°C
2	コンドロイチナーゼ AC (1/8単位)	20mM Tris 50mM 酢酸ナトリウム 100mM 塩化ナトリウム	8.0	5hr, 37°C
3	コンドロイチナーゼ ABC (1/8単位)	ステップ2と同じ	8.0	5hr, 37°C
4	ケラタナーゼ (1/8単位)	50mM Tris 50mM 酢酸ナトリウム	7.4	5hr, 37°C
5	1N 塩酸 2.5μl+ 20% n-硝酸ブチル 2.5μl	添加なし*		5hr, 室温

EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid

Tris = tris (hydroxymethyl) aminomethane

最終容量が100μl になるようにバッファーを加えた。

\* 5のステップの消化に続いて、HClを中和するために1NのNaOHを2.5μl加え、さらに92.5μlの超純水を加えて最終容量を100μlとした。

GAGは表1に示す最初の酵素溶液を加え100μlとし、酵素消化を行った。酵素消化は3倍量の100%エタノール(5%にpotassium acetateを含む)を加えて停止させ、一晚、-20°Cで沈殿させ、90分間、12,000×g, 4°Cで遠沈して、その沈渣を集めた。この上清に含まれるRIを液体シンチレーションスペクトロメーター(バックード社製, TRI CARB)でカウントした。残留物は次の消化段階の酵素溶液100μlを加え、上記と同様に酵素消化を行い、上清を分離しRIをカウントした。表1に示したすべてのステップが終了するまでこれらの操作を繰り返し、GAGの各成分に取り込まれたRIをカウントした。但し、使用した酵素量は一眼を利用した場合<sup>13)</sup>の1/8とした。このように各GAGの成分ごとに特異的な消化酵素等を用いて逐次消化していき、GAGの各成分、すなわちhyaluronic acid (HA), chondroitin sulfate (CS), dermatan sulfate (DS), keratan sulfate (KS), heparan sulfate (HS), ならびに消化されず残ったGAG (REM)の割合をRIのカウントによって調べた。得られた対照群とCS投与群の各GAGの成分組成値について、t-testにより比較検討した。

#### E 電顕試料作製

2週間器官培養された対照群とCS投与群の組織片

の一部をpH7.3の0.1Mリン酸緩衝液で溶解した2.5%グルタルアルデヒド固定液にて24時間固定した後、リン酸緩衝液で洗浄後、同じ緩衝液で溶解した1%四酸化オスミウム固定液にて1時間固定の二重固定を行った。つづいて同じ緩衝液で洗浄し、アルコール系列による脱水後エポキシ樹脂(Queto 1812, 日新EM, 東京)に包埋した。これらの包埋試料よりLKB Ultratome III (8800)とダイヤモンドナイフ(DuPont, Swiss)を用いて経線方向の超薄切片(90nm)を作製し、酢酸ウラニウムとクエン酸鉛にて染色し、日立HS-9透過型電子顕微鏡(加速電圧75kV)にて観察した。

### III 結 果

#### A 培養組織片の合成GAGの酵素消化分析

<sup>3</sup>H-glucosamine, <sup>35</sup>S-sulfateの放射性前駆物質の取り込みおよび逐次酵素消化法によって得られた合成GAGの各成分割合の平均結果を<sup>3</sup>H-glucosamine, <sup>35</sup>S-sulfateそれぞれについて以下に示す。

##### 1 <sup>3</sup>H-glucosamineの取り込み(図1)

<sup>3</sup>H-glucosamineは対照群ではHA 25%, CS 47%, DS 11%, KS 4%, HS 4%, REM 9%, CS投与群ではHA 12%, CS 58%, DS 12%, KS 3%, HS

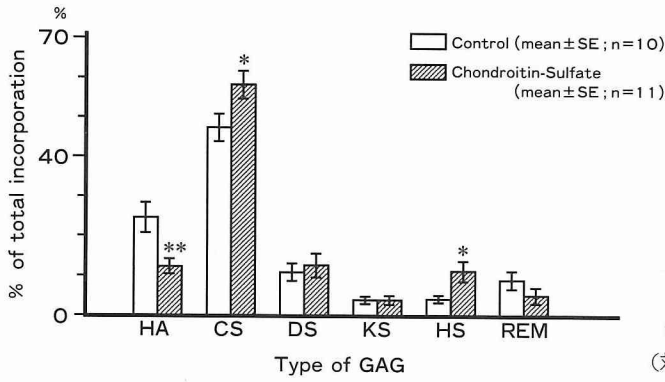


図1 <sup>3</sup>H-glucosamine

コンドロイチン硫酸投与群および非投与群(対照群)の培養ヒト線維柱組織片の合成GAGの各成分組成。放射性前駆物質を72時間投与した。

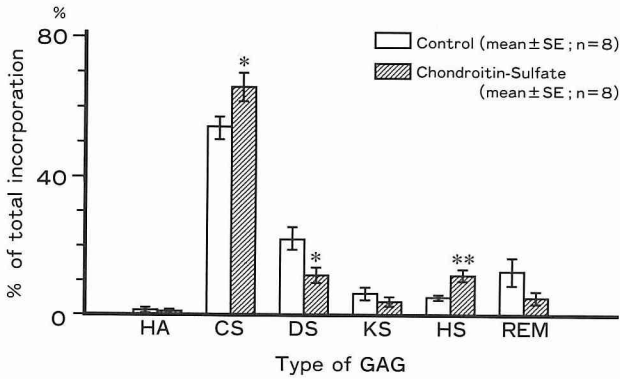


図2 <sup>35</sup>S-sulfate

<sup>3</sup>H-glucosamine (図1)

<sup>35</sup>S-sulfate (図2)

\* p < 0.05, \*\* p < 0.02 : CS vs. control

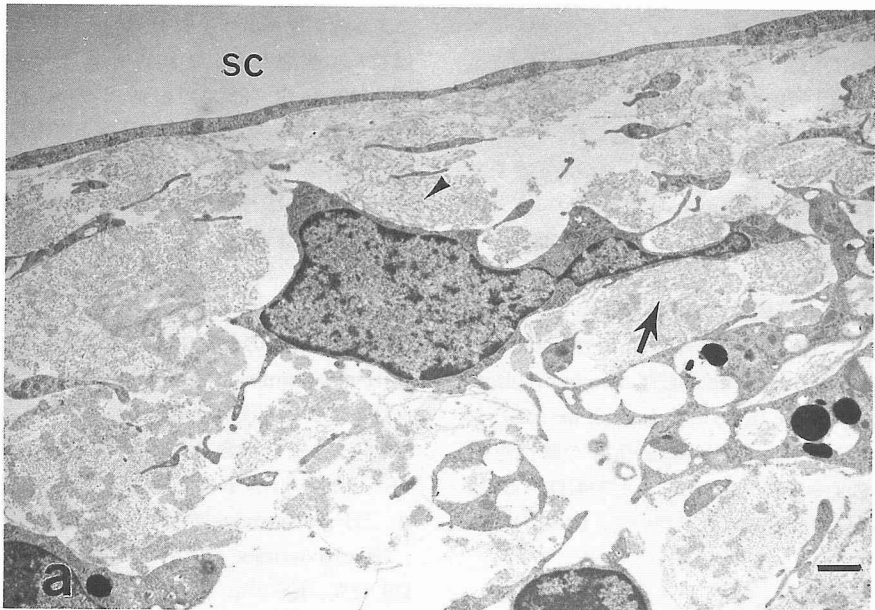


図3 a

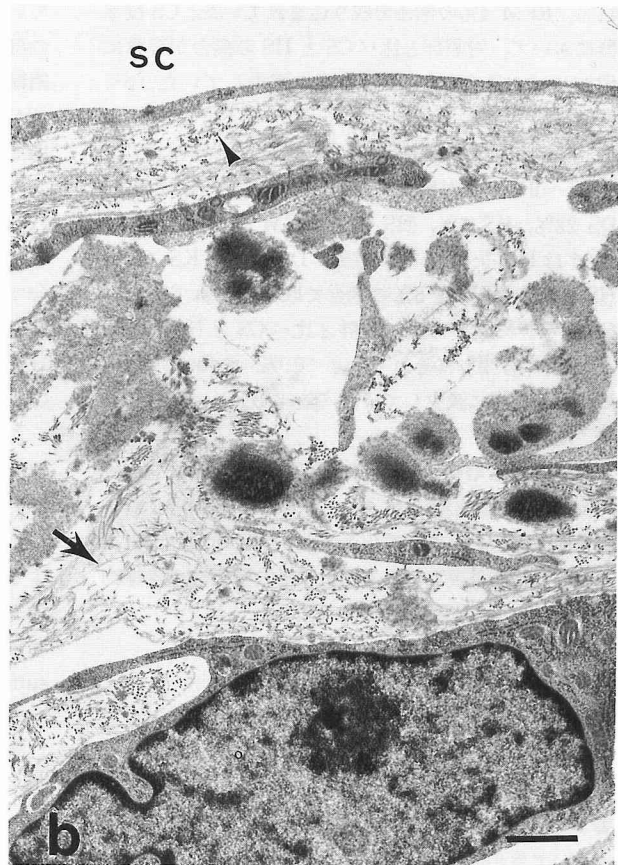


図3 a, b, c コンドロイチン硫酸を投与し, 2週間器官培養したヒト線維柱組織の内皮網の透過電顕写真 (a, b)。内皮網に細胞外要素の基底膜様物質 (矢印) と細線維様物質 (やじり) の増加が認められる。cは対照群の2週間器官培養したヒト線維柱組織の内皮網の透過電顕写真。

SC: シュレム管。a, c:  $\times 6,000$   
b:  $\times 10,000$   
バーは $1\mu\text{m}$ を示す。

図3 b

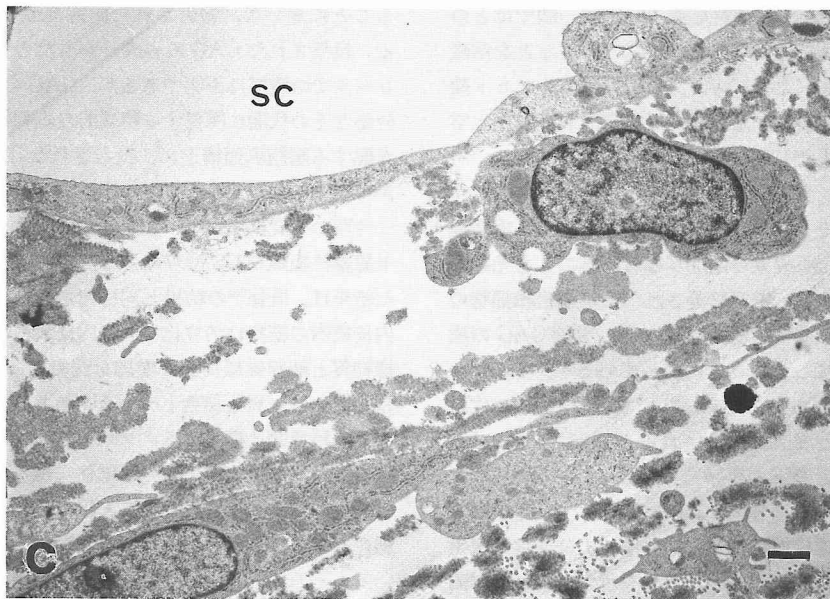


図3 c

11%, REM 4%の割合で取り込まれていた。CS投与群において、対照群と比べCSとHSの割合が有意に増加し ( $p < 0.05$ ), HAが有意に減少していた ( $p < 0.02$ )。

## 2 $^{35}\text{S}$ -sulfateの取り込み (図2)

$^{35}\text{S}$ -sulfateは対照群では、HA 0.7%, CS 54%, DS 22%, KS 6%, HS 5%, REM 12%, CS投与群ではHA 0.5%, CS 67%, DS 12%, KS 4%, HS 11%, REM 4.5%の割合で取り込まれていた。CS投与群において、対照群と比べCSとHSの割合が有意に増加し (それぞれ  $p < 0.05$ ,  $p < 0.02$ ), DSの割合が有意に減少していた ( $p < 0.05$ )。

## B 電顕所見

2週間器官培養されたCS投与群は、対照群と比べ内皮網内の細胞の核は大きく、仁および細胞内小器官の発達も認められて活性化された状態を示し、また、内皮網に細胞外要素である基底膜様物質と細線維様物質の著明な増加が認められた (図3)。

## IV 考 案

同一眼から得たヒト線維柱組織は、器官培養下ではどの部位においても、内皮網における細胞外要素の割合に差がないとされている<sup>10)</sup>。また、われわれは、培養ヒト線維柱組織のGAGの合成能ならびにその組成について生化学的に分析し、同一眼では組織片の部位による差がないことを報告した<sup>10)</sup>。これらのことは、器官培養されたヒト線維柱組織では、同一眼ではどの部位においても同程度の代謝を行っていることを示唆するものである。したがって、器官培養されたヒト線維柱組織は、薬剤による影響を形態学および生化学的に研究する上で有用であると考えられる。

Yueら<sup>10)</sup>は、家兎眼に繰り返しCSを前房内投与すると眼圧上昇をきたし、線維柱組織において、組織構造の変化や細胞外要素の増加がみられることを光顕的に観察した。また、器官培養された線維柱組織細胞の放射性前駆物質の取り込み実験では、硫酸GAGの産生が有意に増加したことを報告している<sup>10)</sup>。これらの結果から、長期のCS投与によって線維柱組織の代謝およびGAG合成能が影響されると述べている。Feiら<sup>20)</sup>は、上記と同様な実験方法により、CS投与によって眼圧上昇した家兎眼の線維柱組織について電顕的に観察し、線維柱組織細胞の活性化および細胞外要素のうち基底膜様物質の著明な増加を示し、ヒトの緑内障眼にみられる形態学的変化と類似することを指摘し

ている。またネコ眼において同様な実験を行い、CSの持続投与によって得られた眼圧上昇眼では、線維柱組織において膠原線維、弾力線維、基底膜様物質の増加がみられ、生化学的にもGAGや蛋白質の合成能の増加を確認し、これらの変化は家兎眼の場合と類似し、ネコ眼でもCS投与により線維柱組織の代謝が影響されることを示唆している<sup>21)</sup>。Biningerら<sup>22)</sup>は、細胞培養されたヒト線維柱組織細胞に対してGAGの各成分であるHA、CS、DSを投与すると、線維柱組織細胞のGAG合成能、主としてHAの合成が促進され、HAの成分組成が大きくなることを認めている。一方CSやDSの投与では、軽度CSの合成能が増加することを認めており、培養線維柱組織細胞にGAGを投与することにより、GAGの代謝が影響されることを明らかにしている<sup>22)</sup>。

今回のわれわれの研究でも、CSを投与することによって、 $^3\text{H}$ -glucosamine、 $^{35}\text{S}$ -sulfateいずれの取り込みにおいても、CSとHSの割合が有意に増加した。また $^3\text{H}$ -glucosamineの取り込みにおけるHA、 $^{35}\text{S}$ -sulfateの取り込みにおけるDSの割合が有意に減少した。 $^3\text{H}$ -glucosamine、 $^{35}\text{S}$ -sulfateの取り込みにおいて、割合が減少するGAGの種類に関しては、目下のところ機序は不明であり、さらに今後の検討を要する。いずれにしてもわれわれの研究結果は、種差や器官培養の利用などの実験条件の相違はあるものの、CS投与により線維柱組織のGAG合成能が影響されることにおいて、報告された研究結果<sup>19)-22)</sup>と一致する。投与されたGAGの各成分がもたらす影響の分子レベルでの機序は不明であるが、GAGの合成、分解、分泌などの代謝に関係する特異的な細胞膜関連反応を支配する細胞表面構造に、投与されたGAGの各成分が作用する結果であろうと推測されている<sup>22)</sup>。

今回の研究において、2週間器官培養された培養ヒト線維柱組織のCS投与による影響を電顕的に観察した結果は、既報<sup>23)</sup>の結果と同様であり、対照群と比べ内皮網内の細胞は活性化され、内皮網に著明な基底膜様物質と細線維様物質の増加を認めた。Tawaraら<sup>24)</sup>は、タンパク質と結合したGAGであるプロテオグリカンの特異的に染色するクプロメロニックブルーによって正常ヒト遺体摘出眼の線維柱組織を染色し、さらに種々のGAGの酵素消化法と組み合わせ、線維柱組織におけるプロテオグリカンの局在について検討している。そして、正常ヒト遺体摘出眼の線維柱組織の細胞外成分中には、CS、HS、DS系のプロテオグリカ

ンが存在し、膠原線維にはCSとDS系、基底膜および基底膜様物質にはHS系、細線維様物質にはCS、DS、HS系のプロテオグリカンが存在していることを示している<sup>24)</sup>。したがって、本研究で認められた培養ヒト線維柱組織でのCS投与によって増加した基底膜様物質および細線維様物質の細胞外要素は、CSならびにHS系のプロテオグリカンの増加を反映していると考えられ、同時に行った放射性前駆物質取り込みの実験結果とよく一致する。

われわれは、培養ヒト線維柱組織において、放射性前駆物質および逐次酵素消化法を利用し、CS投与による線維柱組織細胞のGAG合成能への影響を生化学的に分析することができた。さらに、形態学的研究結果との比較により、両結果が一致することが判明した。今後、CS投与によって惹起される培養ヒト線維柱組織の形態学的変化は、緑内障のモデル眼として利用でき、抗緑内障薬の開発に有用となりうること、および、われわれの培養ヒト線維柱組織を利用した形態学的および生化学的な分析法により、ヒト線維柱組織に対する各種薬剤の影響に関する分析が可能になることが期待される。

## V 結 語

正常ヒト遺体摘出眼を用いて、培養ヒト線維柱組織におけるコンドロイチン硫酸投与によるGAG合成能への影響を、放射性前駆物質および逐次酵素消化法を利用して生化学的に調べ、また形態学的研究結果との関連についても考察した。その結果、以下の知見を得

た。

- 1) 培養ヒト線維柱組織片の各種合成GAGへのRIの取り込みのうち、<sup>3</sup>H-glucosamine, <sup>35</sup>S-sulfateいずれの取り込みにおいてもCSとHSの割合が有意に増加した。
- 2) 培養ヒト線維柱組織におけるCS投与による影響を電顕的に観察した結果、対照群と比べ内皮網内の細胞は活性化され、内皮網に著明な基底膜様物質と細線維様物質の増加を認めた。
- 3) 培養ヒト線維柱組織でのCS投与によって増加した基底膜様物質および細線維様物質の細胞外要素は、CSならびにHS系のプロテオグリカンの増加を反映していると考えられた。
- 4) 培養ヒト線維柱組織でのCS投与による形態学的変化は緑内障のモデル眼として利用でき、抗緑内障薬の開発に有用となりうること、および、われわれの培養ヒト線維柱組織を利用した形態学的および生化学的な分析法により、ヒト線維柱組織に対する各種薬剤の影響に関する分析が可能になることが期待される。

本論文の要旨は、第95回日本眼科学会総会（1991年5月、京都）において発表した。

稿を終えるにあたり、終始懇切なる御指導と御校閲を賜りました恩師瀬川雄三教授に深甚なる謝意を表します。

## 文 献

- 1) Bárány, E. H. and 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
- 2) Segawa, K.: Ultrastructural changes of the trabecular tissue in primary open angle glaucoma. *Jpn J Ophthalmol*, 19: 317-338, 1975
- 3) Segawa, K.: Electron microscopic changes of the trabecular tissue in primary open-angle glaucoma. *Ann Ophthalmol*, 11: 49-54, 1979
- 4) Mizokami, K.: Demonstration of masked acidic glycosaminoglycans in the normal human trabecular meshwork. *Jpn J Ophthalmol*, 21: 57-71, 1977
- 5) Richardson, T. M.: Distribution of glycosaminoglycans in the aqueous out flow system of the cat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 22: 319-329, 1982
- 6) Knepper, P. A., Farbman, A. I. and Telsler, A. G.: Aqueous outflow pathway glycosaminoglycans. *Exp Eye Res*, 32: 265-277, 1981
- 7) Schachtschabel, D. O., Bigalke, B. and Rohen, J. W.: Production of glycosaminoglycans by cell cultures of the trabecular meshwork of the primate eye. *Exp Eye Res*, 24: 71-80, 1977

- 8) Schachtschabel, D.O., Rohen, J.W., Wever, J. and Sames, K.: Synthesis and composition of glycosaminoglycans by cultured human trabecular meshwork cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 218: 113-117, 1982
- 9) Crean, E. V., Tyson, S. L. and Richardson, T. M.: Factors influencing glycosaminoglycans synthesis by calf trabecular meshwork cell cultures. *Exp Eye Res*, 43: 365-374, 1986
- 10) Yue, B. Y. J. T. and Elvart, J. L.: Biosynthesis of glycosaminoglycans by trabecular meshwork cells in vitro. *Curr Eye Research*, 6: 959-967, 1987
- 11) Rohen, J. W., Schachtschabel, D. O., Lüttjen-Drecoll, E., Rohrbach, M. and Berghoff, K.: Morphological and biochemical studies on cell and tissue cultures of human trabecular meshwork. In: Krieglstein, G. K. and Leydhekker, W.(eds.), *Glaucoma Update II*. pp. 39-43, Springer, Amsterdam, 1983
- 12) Acott, T. S., Westcott, M., Passo, M. S. and Van Buskirk, E. M.: Trabecular meshwork glycosaminoglycans in human and cynomolgus monkey eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 26: 1320-1329, 1985
- 13) Acott, T. S., Kingsley, P. D., Samples, J. R. and Van Buskirk, E. M.: Human trabecular meshwork organ culture: Morphology and glycosaminoglycan synthesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 29: 90-100, 1988
- 14) Urakawa, Y., Miyazaki, M., Ishihara, A., Segawa, K., Watanabe, S. and Shimizu, Y.: Human trabecular meshwork organ culture. *Jpn J Ophthalmol*, 32: 401-411, 1988
- 15) Nishiyama, K.: Glycosaminoglycans of organ-cultured rabbit trabecular meshwork. *Ophthalmologica*, 204: 35-43, 1992
- 16) 田中紀子, 西山敬三, 佐藤雪雄, 李 俊哉, 裏川佳夫, 保谷卓男, 海平淳一, 瀬川雄三: 培養ヒト線維柱組織の Glycosaminoglycans 合成の生化学的分析. 第56回日本中部眼科学会, 神戸, 1990
- 17) Nishiyama, K.: Glycosaminoglycans of trabecular meshwork and adjacent tissues of rabbit eye. *Ophthalmologica*, 204: 27-34, 1992
- 18) Urakawa, Y.: Extracellular materials in the endothelial meshwork of organ-cultured human trabecular meshwork - morphologic and morphometric study -. *Ophthalmologica*, 202: 161-168, 1991
- 19) Yue, B. Y. J. T., Lin, C. C. L., Fei, P. F. and Tso, M. O. M.: Effects of chondroitin sulfate on metabolism of trabecular meshwork. *Exp Eye Res*, 38: 35-44, 1984
- 20) Fei, P. F., Yue, B. Y. J. T. and Tso, M. O. M.: Effects of chondroitin sulfate on trabecular meshwork in rabbit eyes: An electron microscopic study. *Exp Eye Res*, 39: 583-594, 1984
- 21) Fei, P. F., Yue, B. Y. J. T. and Tso, M. O. M.: Effects of chronic intracameral injections of chondroitin sulfate on cat eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 222: 1-8, 1984
- 22) Binninger, E. A., Schachtschabel, D. O. and Rohen, J. W.: Exogenous glycosaminoglycans stimulate hyaluronic acid synthesis by cultured human trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res*, 45: 169-177, 1987
- 23) Hoya, T., Urakawa, Y., Miyazaki, M., Ishihara, A., Amaya, J., Amari, F. and Segawa, K.: Influence of drugs on the human trabecular meshwork; 1. Vitamin A. *Jpn J Clin Ophthalmol*, 43: 539-543, 1989
- 24) Tawara, A., Varner, H. H. and Hollyfield, J. G.: Distribution and characterization of sulfated proteoglycans in the human trabecular tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 30: 2215-2231, 1989

---

(4. 7. 10 受稿)