

Title	ラット硝子体中に投与したL-ドーパによる一酸化窒素の発生と組織学的変化： メラニン顆粒の有無による相違
Sub Title	
Author	小林, 幸(Kobayashi, Sachi) 小口, 芳久(Oguchi, Yoshihisa)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2003
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.80, No.3 (2003. 9) ,p.T239- T246
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20030901-0239

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

学位論文

ラット硝子体中に投与したL-ドーパによる一酸化窒素の発生と組織学的変化
—メラニン顆粒の有無による相違—

慶應義塾大学医学部眼科学教室

(指導：小口芳久教授)

小林 幸

(平成14年12月8日受付)

Key Word : L-DOPA, melanin, superoxide radicals, nitric oxide, vasodilation.

メラニンとは眼組織において虹彩、毛様体、網膜色素上皮、脈絡膜に存在し、光に対するフィルター、紫外線や可視光線の吸収、電子伝達系としての作用がある。また、特殊な環境下では活性酸素としての酸化作用を持つ^{1,2)}。生体内のカテコールアミンであるチロシンや、これがチロシナーゼにより変化して生成するドーパは重合して、さまざまなメラニン前駆物質を経て、ユメラニンやフェオメラニンといったメラニンになる³⁾。そして、最終的には蛋白質と重合して代謝される³⁾。このドーパの重合過程では、光照射や酸素負荷により、スーパーオキシド(O_2^-)⁴⁾や一酸化窒素(NO)⁵⁾が発生することが報告されている。さらに両者は非酵素学的に瞬時に反応しパーオキシナイトライト(ONOO⁻)という、細胞毒性を有する分子種を生成する。

L-ドーパはパーキンソン病に対して世界的に用いられている治療薬である。近年、L-ドーパを用いた小児の弱視に対する治療法が、Leguireらによって試みられた⁶⁾。弱視眼に対するL-ドーパの治療効果が視覚路のどの部分に働いているのか、現在のところ明確ではないが、Leguireらは、カテコールアミンに弱視眼の脳皮質支配領域の抑制を減弱させる効果があるためと推測している⁶⁾。一方で、Gottlobらは、それが網膜に対する直接効果であると推測している⁷⁾。もし、L-ドーパが網膜に直接作用するならば、その効果は一体、どのような化学作用によるものか、また、眼組織にどのような作用をもたらしているのか興味を持たれた。

AkeoらはL-ドーパの眼組織への影響について、牛の網膜色素上皮細胞(RPE)を用いて研究し、その結果、L-ドーパから発生する O_2^- がRPEに細胞毒性を発揮し、細胞周期に対してもメラニン顆粒を有するものと有しないものとで異なる影響を与えることを報告している⁸⁾。したがって前述したようなL-ドーパを介したNOの生成が実際に起こるとすれば、これを治療薬として投与する場合に O_2^- とNOの同時生成によるONOO⁻など細胞毒性の可能性を考慮する必要が生じる。しかしながらL-ドーパの自動酸化とメラニン生成過程でのNO生成過程については直接証明がなされていないため、*in vitro*および*in vivo*においてこの検出を行うことを本研究の主な目的とした。

方法

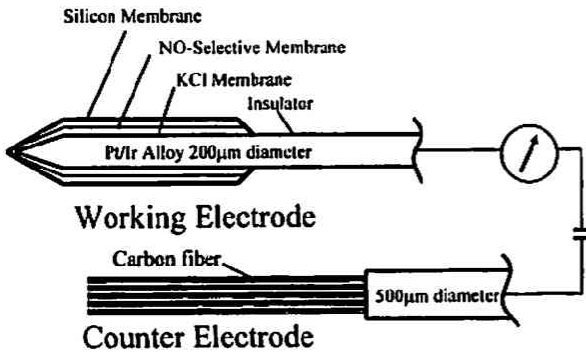
1. 実験1. *In vitro*におけるNOの発生

1) 実験材料

L-ドーパとphosphate buffered saline (PBS)は、Sigma Chemical Co. (St.Louis, MO)より入手した。NO消去薬の2-4-carboxyphenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide (carboxy-PTIO)、はDojindo Laboratories Co. (熊本)より購入した。

Dulbecco's Modified Eagle's Medium phenol red free (DMEM)はGibco Laboratories (Grand Island, NY)から、径35 mmの培養皿はCorning Glass

本論文は、Amaki SK, Oguchi Y, Ogata T, Suzuki T, Akeo Kiyoshi, Hiramitsu T : L-DOPA Produced Nitric Oxide in the Vitreous and Caused Greater Vasodilatation in the Choroid and the Ciliary Body of Melanotic Rats than in those of Amelanotic Rats. *Pigment Cell Research* 14 : 256-263. 2001の一部を含む。



第1図 NOの測定に用いた微小電極⁹⁾。不感電極(Counter Electrode)はカーボンでできている。感電極(Working Electrode)は径0.2mmのプラチナ(90%)とイリジウム(10%)から成り、3層の膜(塩化カルシウム膜、NO感受性膜、シリコン膜)でコーティングされている。(Amaki SK, et al: Pigment Cell Research 14: 256-263, 2001のFig. 1を、許可を得て転載)

Works (Corning, NY) から購入した。

NOモニターはInter Medical Co. 製 (NO-501) (東京) を用いた⁹⁾。

NOモニターの原理は感電極と不感電極の間で起こるピコアンペア (pA) 単位の電流を測定することにある(第1図)。測定された電流は増幅され、記録器により記録される。

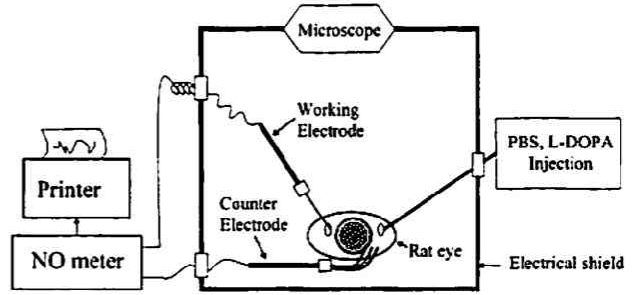
2) 培養皿中のNO測定

NO測定はDMEMの入った培養皿中で行われた。培養皿の蓋には、感電極と不感電極を通すガラスチューブを挿入するため、径2mmの孔を2つ開けた。さらに、L-ドーパ注入のための小孔を開けた。培養皿に感電極と不感電極を設置し、パラフィルム[®]により密閉し、ノイズ遮蔽装置内に置いた。DMEMで5段階(5, 29.9, 79.4, 152.7, 249 µM)に希釈したL-ドーパを、攪拌しながら、2分毎、濃度順に培養皿中に投与した。培養皿中に発生するNOを電極法で経時的にモニターし、記録した。79.4および249 µMのL-ドーパ注入による発生する電流測定は、追加5回の再検を行った。また、L-ドーパ(249 µM)投与6分後にNO消去薬であるcarboxy-PTIO¹⁰⁾(249 µM)を注入し、電流変化を記録した。

2. 実験2. *In vivo*におけるNOの発生

1) 実験材料

実験動物として生後6週令雌の有色ラット、Dark Agouti (DA) ラットを2匹、および、白色ラット、



第2図 硝子体腔におけるNO測定の方法。感電極を硝子体腔に挿入し、不感電極は下眼瞼結膜円蓋部に置いた。(Amaki SK, et al: Pigment Cell Research 14: 256-263, 2001のFig. 2を、許可を得て転載)

Wistar ラットを2匹用いた。いずれも日本 SLC 株式会社(静岡)から購入した。

NOモニターはInter Medical Co.製 (NO-501) (東京) を用いた¹⁰⁾。

2) ラット硝子体中のNO測定

DA ラット2匹(4眼)、Wistar ラット2匹(4眼)を対象とした。

ラットは塩酸ケタミン(5~10 µg/g)の筋注、および、塩酸オキシブプロカインの点眼により麻酔した。8倍希釈ピロドンヨードを点眼し、消毒した後、上方角膜輪部の1mm後極側に25ゲージ針で感電極とL-ドーパの挿入口を作成した。L-ドーパの挿入口から、30ゲージ針を用いて硝子体腔に20 µlのPBS、または、L-ドーパ(20 mM)を注入し、発生するNOを電極法で経時的にモニターし、記録した(第2図)。拡散電流が基線に戻るのを待ち、約5分毎、同薬剤連続3回の注入を1セットの実験とした。電極は非常に繊細であり、必要に応じて新しく取り替えた。従って、DAラット、Wistarラットともに1眼を2セットのPBS投与に用い、3眼を5セットのL-ドーパ投与に用いた。

3. 実験3. L-ドーパ投与による*in vivo*の組織学的変化

1) 実験材料

ラットは生後6週令雌のDAラット5匹、および、Wistarラット5匹を用いた。いずれも実験2と同様に得られた。

L-ドーパ、および、PBSは実験1と同様に得られた。

2) 組織学的検討

DAラット5匹(5眼)、Wistarラット5匹(5眼)を対象とした。両種ラットとも、2眼をPBS投与に用い、3眼をL-ドーパ投与に用いた。ラットは、塩酸ケ

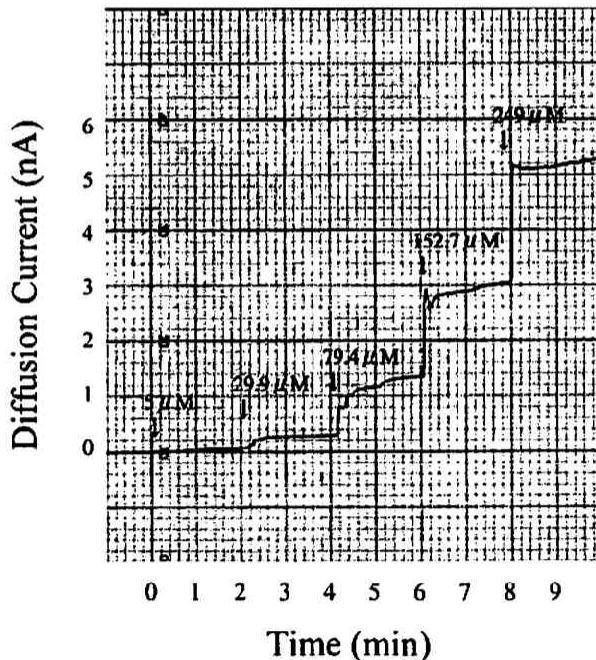
タミン (5~10 μg/g) の筋注、および、塩酸オキシブプロカインの点眼により麻酔した。8倍希釈ポビドンヨードを点眼し、消毒した後、上方の角膜縁より約1mm後部の位置から30ゲージ針を用いて、硝子体腔に20 μlのPBS、または、L-ドーパ (20 mM) を注入した。投与後、眼球表面にオフロキサシン眼軟膏を塗布し、感染を予防した。

投与は、第1日目、および、第3日目に行った。第5日目にクロロフォルムでラットを麻酔し屠殺した後、眼球を摘出した。眼球を摘出する際、薬剤を注入した穿刺部位に9~0シルク糸で印をつけた。眼球には水晶体を避けてメスで割を入れ、等張ホルマリンにより固定した。その後、パラフィンに包埋し、顕微鏡切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色 (HE染色) を行った。糸により印をつけた穿刺部位の反対側の毛様体や後極部網脈絡膜を観察した。

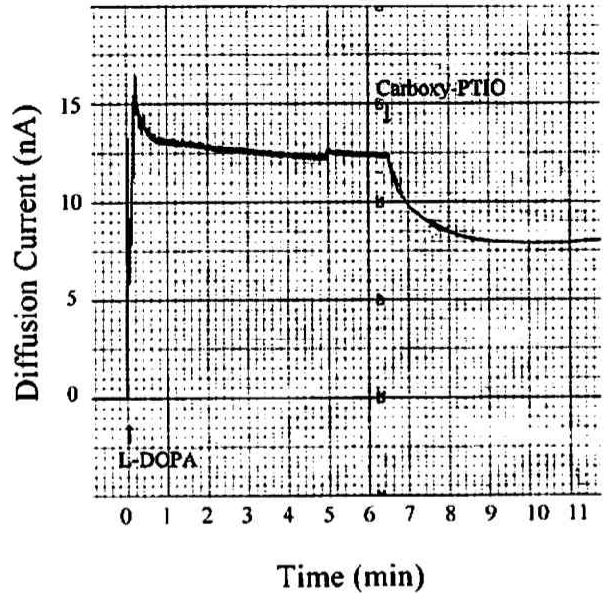
結果

1. 実験1. *In vitro* におけるNOの発生

密閉された培養皿中にL-ドーパを注入すると、注入



第3図 *In vitro* におけるL-ドーパによる非酵素学的NO生成の検出。L-ドーパを注入すると、NOが発生した(20%酸素下)。L-ドーパを加えていくと、濃度に依存して発生するNOは増加した。(Amaki SK, et al: Pigment Cell Research 14: 256-263, 2001のFig. 3を、許可を得て転載)



第4図 *In vitro* におけるL-ドーパによるNO生成に対するcarboxy-PTIOの抑制効果。L-ドーパ (249 μM) を注入後、carboxy-PTIO (249 μM) を加えると、2.5分後には電流が64%まで低下した。(Amaki SK, et al: Pigment Cell Research 14: 256-263, 2001のFig. 4を、許可を得て転載)

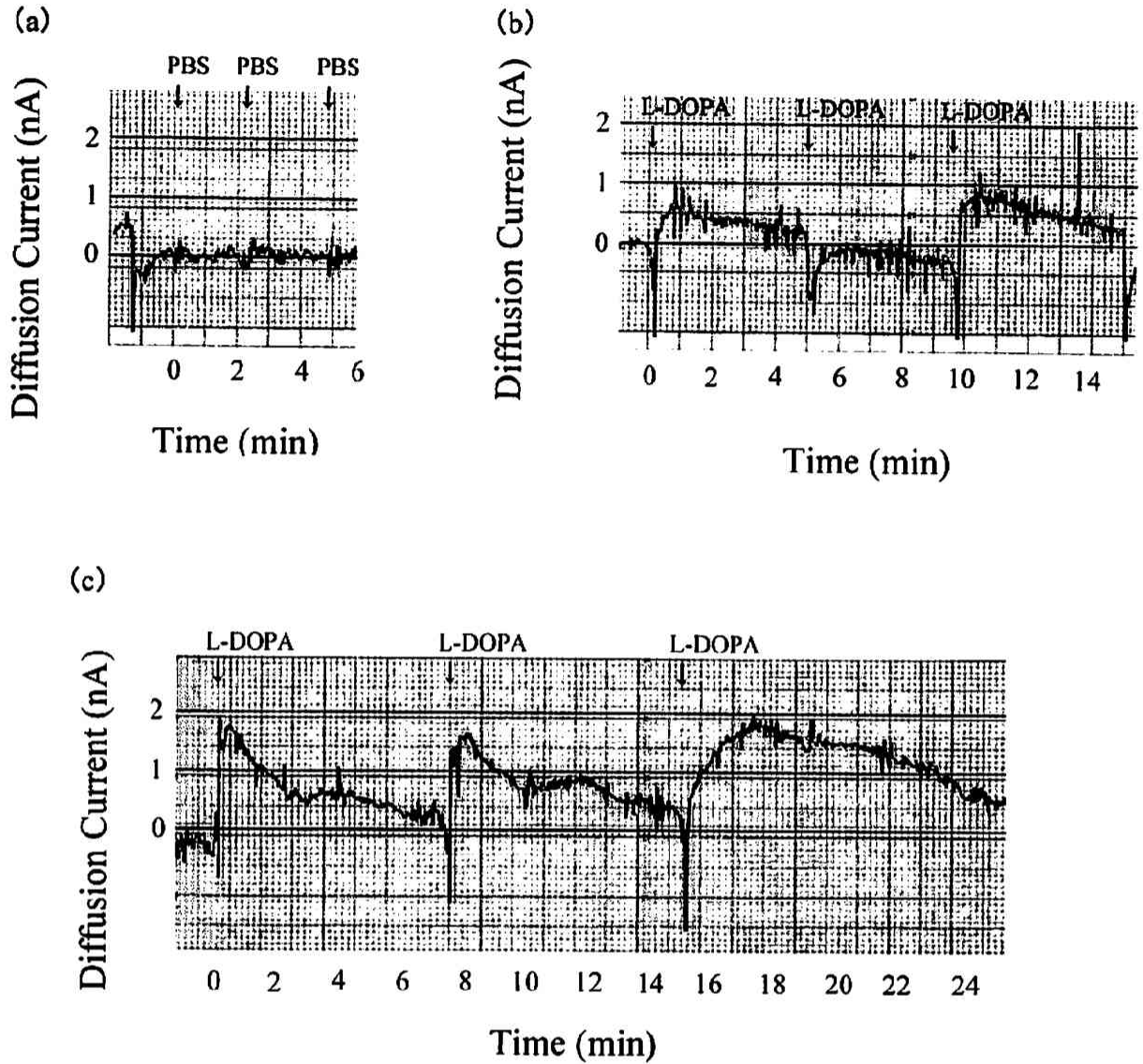
後2分で拡散電流が確認された。その拡散電流は注入したL-ドーパの濃度に比例して増加していた(第3図)。NO消去薬であるcarboxy-PTIO (249 μM) はL-ドーパ (249 μM) が発生する電流を64%に低下させた(第4図)。6回測定した79.4および249 μMのL-ドーパから発生した拡散電流の平均値は、それぞれ495および1670 pAであった(第1表)。

2. 実験2. *In vivo* におけるNOの発生

NOモニターの感電極と不感電極をラット硝子体中に挿入した後、20 mMのL-ドーパ、または、PBS (20 μl) を硝子体中に注入した。1眼あたり連続3回の投与を一連とし、発生する拡散電流を経時的にモニターし、記録した。

ノイズ遮蔽装置は設置されていたが(第2図)、顕微鏡による観察下での操作のために外部からの影響を十分に遮蔽できず、電流の波形にはartifactである振幅が多く捉えられた。小刻みな振幅は持続的に検出されていたartifactである。L-ドーパ、または、PBSやL-ドーパを硝子体に注入すると、大きな負のartifactが検出されたが、すぐに零点へ戻った。

PBSを硝子体中に注入した実験では、拡散電流は検



第5図 L-ドーパによる *in vivo* での NO 生成の検出。(a) PBS (DA ラット), (b) L-ドーパ 20 mM (Wistar ラット), (c) L-ドーパ 20 mM (DA rat). (Amaki SK, et al : Pigment Cell Research 14 : 256-263, 2001 の Fig. 5 を, 許可を得て転載)

第1表 74.9 および 249 μM の L-ドーパを注入した場合に生じる拡散電流の値

L-ドーパ (μM)	拡散電流 (pA)						平均値 (pA)
74.9	400	430	520	720	480	420	495 \pm 119
400	1490	1570	1600	2380	1580	1400	1670 \pm 356

74.9 および 249 μM の L-ドーパを注入する実験は, 各々 6 回ずつ再検された. 拡散電流の平均値は注入する L-ドーパの濃度に比例して上昇した. (Amaki SK, et al : Pigment Cell Research 14 : 256-263, 2001 の Table 1 を, 許可を得て転載)

出されなかった (第 5 図 a)。L-ドーパを硝子体中に注入した実験では、各眼とも同様なパターンで、拡散電流が 3 回とも検出され、一定の値まで発生し減衰していた (第 5 図 b, c)。その値は白色ラット (第 5 図 b) より有色ラット (第 5 図 c) に高く認められた。

3. 実験 3. L-ドーパ投与による *in vivo* の組織学的変化
L-ドーパの投与により、毛様体血管の拡張は有色ラット (第 6 図 a) と白色ラット (第 6 図 b) の両者に認められたが、有色ラットにおいて著しかった。有色ラットの脈絡膜血管は毛様体血管と同様に拡張していたが (第 7 図 a)、それと比較して、白色ラットの脈絡膜血管は拡張の程度が低かった (第 7 図 b)。

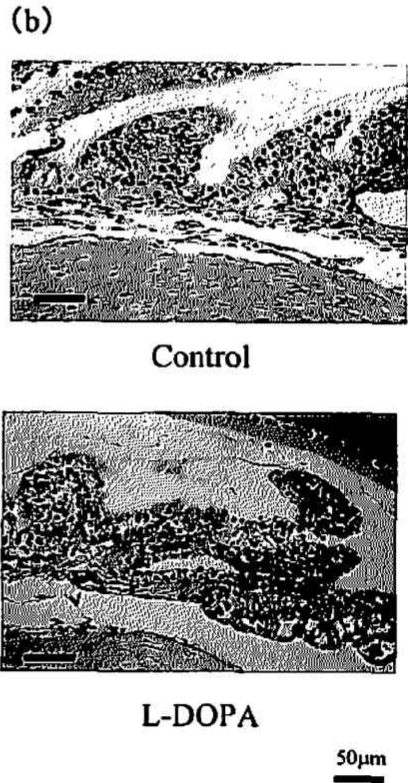
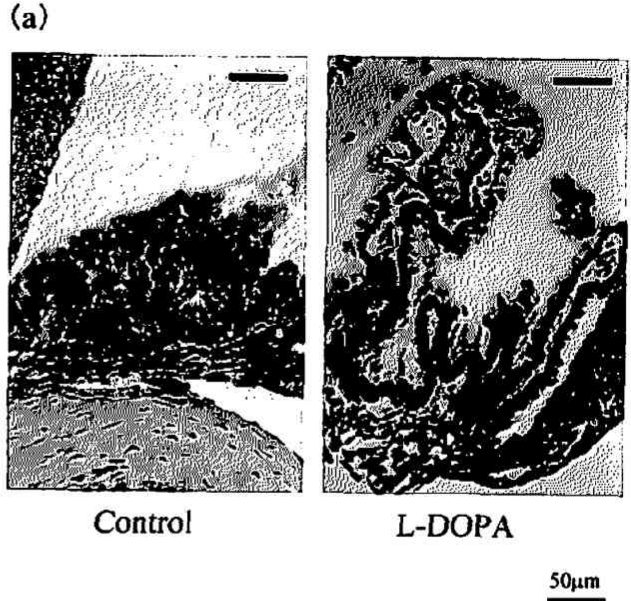
考 案

Akeo らは、*in vitro* の実験系において、L-ドーパを培養液中で攪拌することで酸素と反応し、非酵素学的にアミノ基から NO が発生することを示している⁹⁾。実験 1 において、密閉された培養皿中に L-ドーパを注入した場合、発生する電流は濃度に比例して増加していた。NO 消去薬である carboxy-PTIO¹⁰⁾ (249 μ M) は L-ドーパ (249 μ M) が発生する電流を 64% に低下させていた。

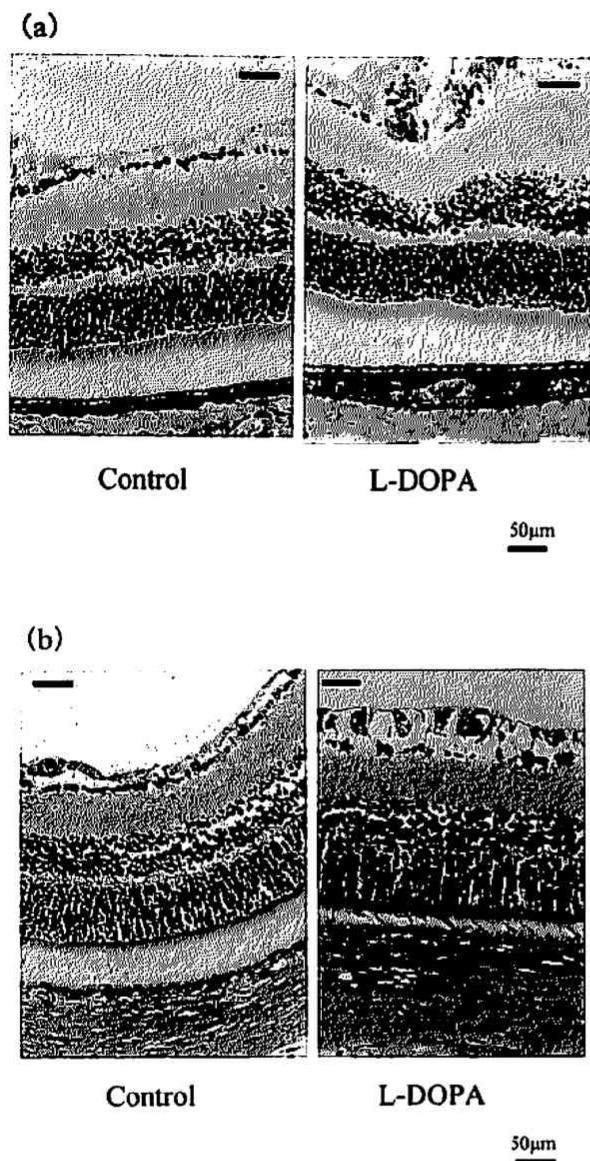
Ichimori ら⁹⁾ は 50 μ M の S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP) によって発生する 20 pA の電流が 70 nM の NO に相当し、30 μ M の carboxy-PTIO によって消去されると報告している。しかしながら、carboxy-PTIO そのものも 0.1 mM の SNAP によって発生する電流の 20% に相当する電流を生み出している⁹⁾ と言われている。温度、pH、酸素濃度を一定に行った本実験における電流の 36% は NO によるものであるが、残りの電流は非特異的なものと思われる。ただし、この実験結果に影響されるような窒素化合物 (NO₂⁻ や NO₃⁻) は、この電極には影響していないと考えられる⁹⁾。

実験 2 において、ラット眼内に L-ドーパを注入した場合、一定の NO が発生した後、減衰し、濃度依存적ではなかった。NO はガス分子であり、網膜と脈絡膜の間の関門を貫通し、迅速に眼組織に深く浸透していく可能性があり、密閉された容器中の場合と異なる結果を生じたと考えられる。

本研究では実験 2 に示すように、DA ラットと Wistar ラットを比較した場合、前者の方が後者よりも多く NO が発生していた。これに対し Akeo らは、*in vitro* の実験系において、培養 RPE は L-ドーパを取り



第 6 図 L-ドーパ注入後 5 日目の組織学的変化 (虹彩)。(a) DA ラット (b) Wistar ラット。L-ドーパ投与により、いずれにも血管拡張が認められたが、血管拡張の程度は、DA ラットの方が Wistar ラットより著明であった。(Amaki SK, et al : Pigment Cell Research 14 : 256-263, 2001 の Fig. 6 を、許可を得て転載)



第7図 L-ドーパ注入後5日目の組織学的変化(網脈絡膜)。(a) DA ラット (b) Wistar ラット。L-ドーパ投与により、いずれにも血管拡張が認められたが、前者のほうが後者よりも血管拡張が強かった。(Amaki SK, et al: Pigment Cell Research 14: 256-263, 2001 の Fig. 7を、許可を得て転載)

込み、発生する内因性のNOを抑制すること¹¹⁾、有メラニン培養RPEが無メラニンのものに比べて、内因性NOを抑制することを示している¹¹⁾。In vivoとin vitroの実験系で、このように対照的な結果が出た理由は不明であるが、外因性に投与されたL-ドーパがin vivoで生成するO₂⁻の量が、高酸素濃度に曝露された培養系より低く、NOの寿命が延長した可能性や、L-ドーパ自体

がin vivoでの代謝により生じるNO₂⁻、NO₃⁻などのNO前駆体が、培養系よりも多く生成した可能性などが考察される。

L-ドーパは10%酸素濃度下での培養RPEの増殖刺激をする¹⁾。また、低酸素濃度下でのL-ドーパの投与はG2+M期の細胞数を増やし、RNA/DNA比の増加を来す¹²⁾。これらの研究において、低酸素下や光刺激のない場合にはL-ドーパがアミンの酸化によって産生されたNOを介して細胞代謝を高めていることが推定された。一方、高酸素下¹⁾や光刺激¹³⁾のある場合には培養RPEに対して毒性を有することが報告されている。これらの成績はNOの細胞機能に及ぼす影響が酸素分圧に大きく依存しており、その分圧が高いほど細胞毒性が強くなることを示唆している。L-ドーパはメラニン形成過程で分子状酸素の存在に依存してO₂⁻を発生し¹⁴⁾、さらにO₂⁻はNOと結合することによりONOO⁻となり、Fenton反応に依存しないヒドロキシラジカルの発生源となることが知られている^{14,15)}。今回の組織学的所見では、L-ドーパ投与群で明確な組織変化は認められなかったが、ONOO⁻を介した蛋白質の変性、特にニトロロチロシンなどの生成などの微妙な変化がなかったかどうかについては、今後、免疫組織学的に考察する必要があると思われた。

本実験において、黒色ラットでNO生成が高く、血流増加所見が示唆された理由の全容は不明であるが、メラニン色素と活性酸素種の相互作用を考慮すると極めて興味深い所見である。メラニン色素にはチロシンからの生成過程が異なるユーメラニンとフェオメラニンの2種類がある¹⁶⁾。前者は黒色で後者は黄色や赤茶色である。生体内では混合した形でも存在する¹⁷⁾。一般的に前者は紫外線から人体の皮膚を守る役割をもち、一方で、後者はその機能を欠き、むしろ光障害を引き起こすと考えられている¹⁸⁾。2者のうち、ユーメラニンはO₂⁻に対する強力なスカベンジャーとして作用するのに対し、フェオメラニンはむしろprooxidantとして作用し脂質成分の過酸化反応を増悪させることが報告されている¹⁹⁾。これは恐らくフェオメラニンのprooxidantとしての反応と考えられた。つまり、ユーメラニンがO₂⁻に対する効果的なスカベンジャーとして働くのに対し、フェオメラニンのprooxidantとしての反応には、O₂⁻とNO関連物質が仲介として働くであろうと考えられている²⁰⁾。脈絡膜のメラノサイトはユーメラニンとフェオメラニンを混合した形で有し、その割合によって虹彩の色調が異なる¹⁶⁾。一方、興味深いことに、眼球の色素上皮細胞であるRPEはユーメラニンのみを主に含む¹⁶⁾。したがってこ

のような有色ラットと白色ラットにおける脈絡膜メラニンの組成に量的、質的な違いを勘案すると、本実験で前者においてより大きな NO シグナルを検出できたのは、L-ドーパの自動酸化で生成する O_2^- をユーメラニンが消去し、NO の実効濃度がみかけ上高くなった可能性を考える必要がある。また、黒色人種の脈絡膜メラニンの量が白色人種と比較して約 2 倍存在するのに対し、RPE のメラニン量に差は無かったという報告がある²¹⁾。つまり、黒色人種と白色人種では、脈絡膜メラニンの違いは量的にも質的にもあり、一方で RPE のメラニンの違いは量的にも質的にも殆どないということになる。この脈絡膜メラノサイトと色素上皮細胞のメラニンの違いは、発生学的にそれぞれ神経堤細胞と神経上皮細胞の 2 つの異なる起源を有することに起因する。脈絡膜メラノサイトの起源である神経堤細胞は、皮膚や毛髪にも分布する。これらの色素形成傾向は、人種間で異なる。一方で、黒質などの中枢神経系の色素構造へ分布する神経上皮細胞を起源とする RPE で人種間の違いが認められないことは、発生学的にも驚くことではない²²⁾。

パーキンソン病治療薬である L-ドーパや、緑内障関連薬としてのエピネフリンなどのカテコールアミンは、広く臨床的に用いられている。本実験により L-ドーパの自動酸化に伴う O_2^- や NO の生成が投与を受けた宿主のメラニン生成特性により異なることが明らかになった。本薬剤を臨床で使用する場合にその効果や副作用の出現の重要な決定因子になるかどうかを今後さらに検討すべきであると思われる。

総括

本研究では、ラット硝子体中に投与した L-ドーパによる NO の発生と組織学的変化を検討し、以下を明らかにした。

1. 密閉容器中に L-ドーパを注入すると、NO が発生した。
2. ラット硝子体中に L-ドーパを注入すると、NO が発生した。それは白色ラットより有色ラットの方が著明であった。
3. ラット硝子体中に L-ドーパを注入すると、毛様体および脈絡膜の血管が拡張した。それは白色ラットより有色ラットの方が著明であった。

以上の結果より、ラット硝子体中に L-ドーパを注入すると NO が発生し、毛様体および脈絡膜の血管が拡張することが明らかになった。

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました、慶應義塾大学医学部眼科学教室小口芳久教授、ならびに、浜松医科大学光量子医学研究センター平光忠久教授に深甚なる謝意を表します。また、御指導、御助言を賜りました川崎市立川崎病院福田純也先生、杉浦仁先生、尾形徹也先生、国立高崎病院眼科明尾潔先生に深謝いたします。さらに、適切な御助言、御協力をいただきました教室の諸先生に感謝いたします。

本研究の一部は、第 103 回日本眼科学会（千葉、1999 年）、1999 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (Fort Lauderdale, 1999 年) において発表した。

なお、本研究の一部は平成 10 年度～平成 12 年度科学研究費補助金の基盤研究 (c) (2) によった (課題番号：10671641)。

文献

- 1) Sealy RC, Puzyna W, Kalyanraman B, Felix CC : Identification by electron spin resonance spectroscopy of free radicals produced during autoxidative melanogenesis. *Biochim Biophys Acta* 800 : 269-276, 1984
- 2) 原一夫, 大橋勝 : メラノサイトとメラニン色素, メラノサイト病変-病理組織の見方と鑑別診断-, (財)名古屋大学出版会, p.1-4, 1997
- 3) Boulton M : Melanin and the RPE : The Retinal Pigment Epithelium. Oxford University Press, Oxford, p.68-85, 1998
- 4) Akeo K, Ebenstein DB, and Dorey CK : Dopa and oxygen inhibit proliferation of retinal pigment epithelial cells, fibroblasts and endothelial cells *in vitro*. *Exp. Eye Res* 49 : 335-346, 1989
- 5) Hollocher, TC, and Hibbs JB Jr : The nitrogen cycle. In : Feelisch M, and Stamler J. *Methods in Nitric Oxide Research*. Part III. John Wiley & Sons, New York, p.120-121, 1996
- 6) Leguire LE, Rogers GL, Bremer DL, Walson P, Hadjiconstantinou-Neff M : Levodopa and childhood amblyopia. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 29 : 290-298, 1992
- 7) Gottlob I, Stangler-Zuschrott E : Effect of levodopa on contrast sensitivity and scotomas in human amblyopia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31 : 776-780, 1990
- 8) Akeo K, Tanaka Y, and Okisaka S : A comparison between melanotic and amelanotic retinal pigment epithelial cells *in vitro* concerning the effects of L-DOPA and oxygen on cell cycle. *Pigment Cell Res* 7 : 145-151, 1994
- 9) Ichimori K, Ishida H, Fukahori M, Nakazawa H, and Murakami E : Practical nitric oxide measurement

- employing a nitric oxide-selective electrode. *Rev Sci Instrum* 65 : 2714-2718, 1994
- 10) Akaike T, Yoshida M, Miyamoto Y, Sato K, Kohno M, Sasamoto K, Miyazaki K, Ueda S, and Maeda H : Antagonistic action of imidazolineoxyl N-oxides against endothelium-derived relaxing factor/.NO through a radical reaction : *Biochemistry* 32 : 827, 1993
 - 11) Akeo K, Amaki S, Suzuki T, and Hiramitsu T : Melanin granules prevent the cytotoxic effects of L-DOPA on retinal pigment epithelial cells *in vitro* by regulation of NO and superoxide radicals. *Pigment Cell Res* 13 : 80-88, 2000
 - 12) Sarna T : Properties and function of the ocular melanin-a photophysical view. *J Photochem Photobiol B, Biol* 12 : 215-258, 1992
 - 13) Dorey CK., Delori FC, and Akeo K : Growth of cultured RPE and endothelial cells is inhibited by blue light but not green or red light. *Curr Eye Res.* 9 : 549-559, 1990
 - 14) Wittbjer A, Odh G, Rosengren E, Rorsman H : Enzymatic and non-enzymatic oxygenation of tyrosine. *Pigment Cell Res* 9 : 92-95, 1996
 - 15) Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, and Freeman BA : Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite : Implications for endothelial injury from nitrite oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 1620-1624, 1990
 - 16) Prota G, Hu DN, Vincenzi MR, McCormick SA, Napolitano A : Characterization of melanins in human irides and cultured uveal melanocytes from eyes of different colors. *Exp Eye Res* 67 : 293-299, 1998
 - 17) Kanda T, Akeo K, Murakami A, Karasawa Y, Okisaka : The effects of dopa and oxygen on RNA concentrations in cultured embryonal retinal pigment epithelial cells. *J Jpn Ophthalmol Soc* 99 : 1123-1126, 1995
 - 18) Krol ES, Liebler DC : Photoprotective Actions of Natural and Synthetic Melanins. *Chem Res Toxicol* 11 : 1434-1440, 1998
 - 19) Ezzahir A : The influence of melanins on the photoperoxidation of lipids. *J Photochem. Photobiol B3* : 341-349, 1989
 - 20) Sarna T, Menon IA, and Sealy RC : Photoinduced oxygen consumption in melanin systems II. Action spectra and quantum yields for pheomelanins. *Photochem Photobiol* 39 : 805-809, 1984
 - 21) Weiter JJ, Delori FC, Wing GL, Fitch KA : Retinal pigment epithelial lipofuscin and melanin and choroidal melanin in human eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27 : 145-152, 1986