(昭和63年度 第92回総会)

宿 題 報 告 黄斑部疾患の基礎と臨床

4. 黄斑疾患に対する生化学的研究(リポフスチン, ライソゾーム, メラニンの関連について)(図9. 表1)

早 坂 征 次(島根医大眼科)

共同研究者

原 敏 石黒 誠一 塩野 貴 岡部 仁 中沢 満 土屋 牧雄 山本由香里 野田佐知子 増田寛次郎 遠藤 正彦 Yin-Lok Lai

A Biochemical Approach to Macular Diseases: Lipofuscin, Lysosomes, and Melanin in the Human Retina and Choroid

Seiji Hayasaka

Department of Ophthalmology, Shimane Medical University

要 約

リポフスチン,ライソゾーム,メラニンが黄斑部で多いことが組織学的に示されているので、これらの物質を生化学的に検討した。リポフスチンは人眼の黄斑部に多く、加齢とともに増加していた。ライソゾーム酵素活性も黄斑部で高かったが、年齢とは相関しなかった。メラニンは黄斑部網膜色素上皮・脈絡膜に多かったが、年齢により増減しなかった。我々がこれまでに発表した報告と他の研究者の報告をもとに、最近のこの方面の研究をまとめた。リポフスチン、ライソゾーム、メラニンは互いに関連しあっており、老人性黄斑変性症、黄斑ジストロフィ、錐体ジストロフィ、黄斑部桜実紅斑、薬物による網膜症の発症機構に関与していることが強く示唆された。(日眼 92:1104—1111、1988)

キーワード:リポフスチン、ライソゾーム酵素、メラニン、加齢、黄斑疾患

Abstract

I examined biochemically the lipofuscin content, lysosomal exzyme activities, and melanin level in the retina and choroid of normal human eyes. Lipofuscin content, expressed as fluorescence intensity, in the macular retinal pigment epithelium (RPE) and choroid was higher than that in other areas, and increased with age. High activities of lysosomal enzymes in the macular area were found, but did not change with age. Melanin level was higher in the macular RPE and choroid than in other areas, and showed no alteration with age. In a review of the recent literature, it was found that lipofuscin, lysosomes, and melanosomes were interrelated, and may be involved in the pathogenesis of age-related macular degeneration, macular dystrophies such as Best's vitelliform dystrophy and Stargardt disease with fundus flavimaculatus, cone dystrophy, macular cherry-red spot, and drug-induced retinopathy.

別刷請求先: 693 出雲市塩冶町89—1 島根医科大学眼科学教室 早坂 征次 (昭和63年4月30日受付) Reprint requests to: Seiji Hayasaka, M.D. Dept. of Ophthalmol., Shimane Medical Univ.

89-1 Enya-cho, Izumo 693, Japan

(Accepted for publication April 30, 1988)

(Acta Soc Ophtholmol Jpn 92:1104-1111, 1988)

Key words: lipofuscin, lysosomal enzymes, melanin, macula, aging, macular diseases

I 緒 言

1978年 Feeney はヒト網膜色素上皮細胞(RPE)のリポフスチン、ライソゾーム、ファゴゾーム、メラノソームが、相互に関連し合っていることを報告した 10 、同年、Wing らは人眼後極部の RPE でリポフスチンが加齢とともに増加することを示した 20 . 1981年早坂らはライソゾーム酵素活性が人眼網脈絡膜内の黄斑部で特に高いことを示した(図 1) 30 . 1986年 Weiter 6^{40} および Schmidt 6^{50} は、人眼黄斑部で RPE メラニン量は少ないが、脈絡膜メラニン量は多いことを報告した。

このように、黄斑部のリボフスチン、ライソゾーム、メラニン量は眼底他領域とは異っており、これらの細胞内小器官や物質が或る種の黄斑疾患の病因と深く関与している可能性がある。それ故、人眼、とくに黄斑部網脈絡膜のこれらの物質と加齢との関連について生化学的に検討した。

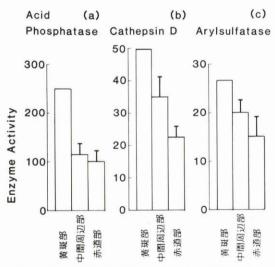


図 1 人眼の網膜・脈絡膜のライソゾーム酵素活性. 34歳, 男;51歳, 男. 正常眼底よりのホモジネート, (a) μg p-nitrophenol released per hr per mg protein; (b) μg tyrosine released per hr per mg protein; (c) μg p-nitrocatechol released per he per mg protein, 文献3) より改変した.

II 材料と方法

化学物質

酵素活性測定の基質に用いた, p-nitrophenyl 誘導体, p-nitrocatechol sulfate, およびtrinitrophenylaminododecanoylsphingosylphosphorylcholine(TNPAL-SM)は米国 Sigma 社より購入した。

材料

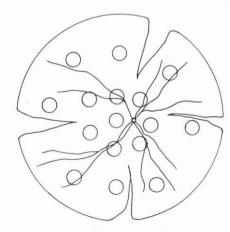
死後2~4時間で,正常人眼を摘出した.

組織抽出液調製法

眼球を輪部より6mm後方で切開し,前眼部と後眼部に分けた。後眼部より硝子体を除き、4ヵ所放射状切開し、強膜一脈絡膜一網膜の伸展標本を作製した。網膜と脈絡膜を4mmのトレフィンでうちぬき,組織を得た(図2)。 黄斑部、中間周辺部、赤道部より神経網膜を得、次に RPE と脈絡膜を分離した。組織調製法は実体顕微鏡下で、4℃で行った。

リポフスチン測定用に、組織を1ml のクロロホルム -メタノール溶液(2:1, v/v)に入れ、ホモジナイズし、クロロホルム相を分離し、水で洗い、クロロホルム-メタノール抽出液とした。

ライソゾーム酵素活性測定用に、組織を0.1%トリト



trephine (4 mm in diameter)

図2 人眼網脈絡膜伸展標本からの組織の調製法. 直 径4mmのトレフィンでうちぬく.

ン X-100を含む5mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.0)に入れ、ホモジナイズし、5,000g 10分間遠心した上清を組織粗抽出液とした。

メラニン測定用に、組織を11N 塩酸1ml に入れ、室温で1 カ月放置し、さらに55 $\mathbb C$ 2 分間加熱した。それを10,000 g 20分遠心し、粗色素を得、水で20 回洗い、酸不溶性メラニンを得た。最後に洗った液の上清は、440nm に吸光度を示さず、Lowry 法6 で蛋白は検出されなかった。酸不溶性メラニンを0.5N アンモニア水に溶解し、酸不溶性メラニンのアルカリ抽出液とした。

リポフスチン量測定

Feeney-Burns らⁿの方法に従い, クロロホルム-メ タノール抽出液の蛍光強度(励起波長365nm, 発光波長 435nm) を測定し, リポフスチン量とした.

ライソゾーム酵素活性測定

酸フォスファターゼ (EC 3.1.3.2)活性は前報³⁾のように, p-nitrophenyl phosphate を基質とし, 遊離された p-nitrophenol を410nm で比色定量して測定した.

アリルスルファターゼ (EC 3.1.6.1) 活性は前報³のように、p-nitro catechol sulfate を基質とし、遊離された p-nitro catechol を410nm で比色定量した。

ヘキソサミニダーゼ (EC 3, 2, 1, 30) 活性は前報 80 のように、p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide を基質とし、遊離された p-nitrophenol を410nm で比色定量した。

スフィンゴミエリナーゼ (EC 3.1.4.12) 活性は前

報⁹⁾のように、TNPAL-SM を基質とし、遊離された TNPAL-ceramide を330nm で比色定量した。

対照として、基質または組織粗抽出液のみをインキュベートした。酵素活性測定は通常デュブリケートで行った。蛋白量は牛血清アルブミンを標準としてLowry 法⁶⁾で比色定量し、酵素活性/mg蛋白量を比活性とした。

メラニン量測定

酸不溶液メラニンのアルカリ抽出液を440nmで比

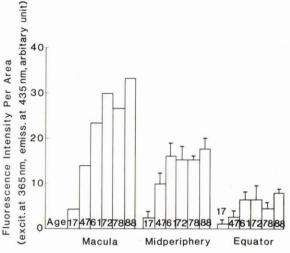


図3 人眼の網膜色素上皮層・脈絡膜のクロロホルム -メタノール抽出液中のリポフスチン量。

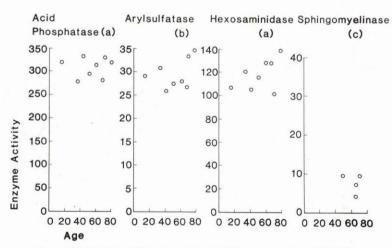


図4 人眼黄斑部の網膜色素上皮層と脈絡膜のライソゾーム酵素活性.

(a) μg p-nitrophenol released per hr per mg protein, (b) μg p-nitrocatechol released per hr per mg protein, (c) n mol TNPAL-ceramide released per hr per mg protein.

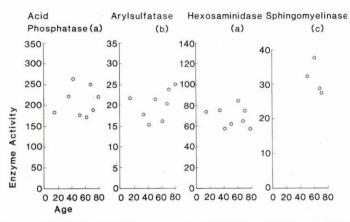


図5 人眼黄斑部の神経網膜のライソゾーム酵素活性。単位は図4を参照。

色定量した.

III 結 果

ヒト RPE と脈絡膜のリポフスチン量を蛍光強度であらわした(図3). 黄斑部の蛍光強度は中間周辺部や赤道部より高く、加齢とともに増加した.

酸フォスファターゼ, アリルスルファターゼ, ヘキソサミニダーゼおよびスフィンゴミエリナーゼ活性は, 黄斑部 RPE と脈絡膜(図 4), 黄斑部神経網膜(図 5) で測定された. これらライソゾーム酵素の比活性は加齢で変化しなかった.

ヒト RPE と脈絡膜のメラニン量は440nm の吸光度 であらわした(図 6)。 黄斑部 RPE と脈絡膜のメラニン量は中間周辺部や赤道部より高く,加齢で変化しなかった。

IV 考 按

ヒト網脈絡膜のリポフスチン, ライソゾーム, メラニンに関する最近の文献をまとめて考察する.

IV-1. 黄斑部 RPE のリポフスチン

Streeten¹⁰⁾が組織化学的にヒト RPE のズダン好性 顆粒はリポフスチンに類似することを報告した。リポフスチン(またはリポフスシン)は多くの細胞内で加齢とともに蓄積する色素顆粒で,加齢色素,老化色素,消耗色素と呼ばれている^{11)~13)}. それは過酸化脂質と蛋白質の混合物より構成されていると考えられており¹⁴⁾,特異的な蛍光¹⁵⁾またはマロンジアルデヒド法¹⁶⁾で測定される。リポフスチンは人眼の黄斑部 RPE に加齢とともに出現し,組織化学的方法で検出される¹⁰¹⁷⁾.

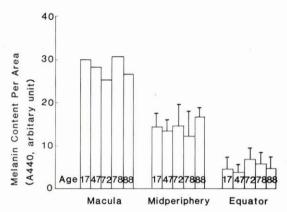


図6 人眼の網膜色素上皮層と脈絡膜の酸不溶性色素 のアルカリ抽出液のメラニン量

今回の研究で測定された蛍光強度(図3)は RPEのリボフスチンによるものと思われる。何故なら脈絡膜は組織化学的にはほとんど蛍光を発しないから¹⁸⁾。 RPEのリボフスチンの435nmの吸光度は神経網膜の黄斑色素のそれに類似している¹⁹⁾。しかし、それらの分布は異っている。 RPE 細胞は視細胞外節の更新過程に大きな役割りを演じており²⁰⁾, 老年者ではファゴゾームが残余体すなわちリボフスチンに転換すると考えられている²¹⁾。 老年者では RPE 内で、ライソゾーム酵素による分解過程が不完全になることが推測されている²²⁾。

RPE の変性が初発し、老人性黄斑変性症が続発すると考えられ、老年者の RPE の変性はリポフスチンの蓄積と関連するものと思われる²²⁾。リポフスチンが細胞の機能や運命にどこまで関与しているかは不明であるが²³⁾、老人性黄斑変性症の病因におけるリポフスチ

ン蓄積の影響はより詳細に検討されるべきものと思われる。

RPE における加齢と無関係のリポフスチンの蓄積 も或る種の病的状態や疾患でみられる。ビタミン E 欠 乏症^{24)~26)}, Best 卵黄様黄斑ジストロフィ^{27)~29)}, Stargardt 病³⁰⁾, adult-type foveomaclar vitelliform dystrophy³¹⁾, Sjögren-Larsson 症候群³²⁾, 脈絡膜悪性 黒色腫³³⁾などでみられる。脈絡膜悪性黒色腫でみられ

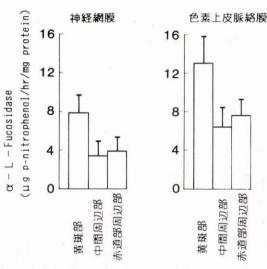


図7 人眼の α -L-フョシダーゼ活性. 文献37より改変.

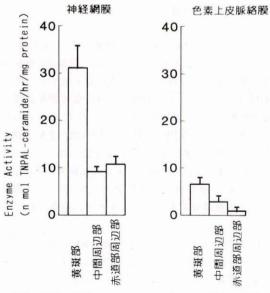


図8 人眼の酸性スフィンゴミエリナーゼ活性. 文献 38より改変.

るオレンジ色素はリポフスチンと考えられている33).

IV-2. 黄斑部 RPE のライソゾーム酵素

黄斑部疾患における RPE の役割,とくにライソゾーム酵素については,Hogan³⁴⁾により詳述されている.早坂³⁵⁾³⁶⁾は,先に牛眼組織内のライソゾーム酵素活性を検討し,RPE で最も高いことを報告した.人眼網脈絡膜組織において,酸フォスファターゼ,カテプシン D,アリルスルファターゼ, α -L-フョシダーゼ,酸性スフィンゴミエリナーゼの比活性は黄斑部で高い(図 1,7,8) $^{3)37)38}$.

黄斑部 RPE のライソゾーム酵素の高活性は或る種の黄斑部疾患に関与していると思われる。加齢においてライソゾームが関与しているという明らかな事実は未だない³⁹⁾. 我々の測定した黄斑部 RPE のライソゾーム酵素活性も加齢によって変化しなかった(図4). しかし,ライソゾームは RPE の加齢による変性に関与していると思われる。加齢色素リポプスチンはファゴライソゾーム系の未消化残余体と信じられており,多くの細胞のリポフスチンには電顕組織化学的にライソゾーム酵素活性が検出されている⁴⁰.

我々は先に、非定型錐体ジストロフィ患者の血清と白血球中の α -L-フコシダーゼ活性が低いことを報告した(図 9) 41 . α -L-フコシダーゼ活性は正常人眼の黄斑部 RPE で高い (図 7) 37 . Unoki 6^{42} によると、猿眼の黄斑部でフコシルトランスフェラーゼ活性が高いという。それ故、フコース代謝が黄斑部の生理と病態に重要な役割を担っていると思われる。我々は、白血

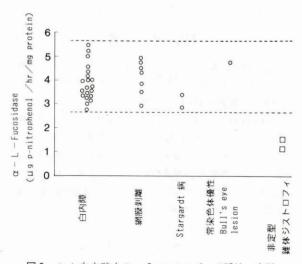


図9 ヒト白血球中の α -L-フコシダーゼ活性. 文献 41より改変.

球 α -L-フョンダーゼ活性低下を伴う非定型錐体ジストロフィ患者で、フョース含有グリコペプチドの尿中排泄が多いことを見い出している (Endo、未発表データ).

IV-3. 黄斑部神経網膜のライソゾーム酵素

ライソゾーム酵素活性は黄斑部 RPE のみでなく, 黄斑部神経網膜でも高い³⁸⁾。 黄斑部神経網膜のライソ ゾーム酵素の比活性は年齢により変化しなかった(図 5)。

黄斑部の桜実紅斑は神経節細胞また神経線維層レベルの灰白色病変によりひきおこされ、先天性ライソゾーム蓄積症等でみられる 43 . ヘキソサミニダーゼABの欠損によりひきおこされる Sandhoff 病でも黄斑部桜実紅斑がみられる 44 . しかし、ヘキソサミニダーゼ酵素活性は眼底内で黄斑部に高いということはなかった 37 . Niemann-Pick 病でも黄斑部桜実紅斑がみられるが、本症は酸性スフィンゴミエリナーゼ欠損によりひきおこされる。酸性スフィンゴミエリナーゼ活性は黄斑部神経網膜で高かった(図8) 37 .

IV-4. 黄斑部 RPE と脈絡膜のメラニン

人眼のメラニン量は、黄斑部 RPE で少く、黄斑部脈絡膜で多いことが組織学的に報告されている⁴⁾⁵⁾. 我々の生化学的研究で、黄斑部 RPE と脈絡膜でメラニン量が多いことが示された(図 6). Hunold と Malessa⁴⁵⁾は in vivo で人眼のメラニン量を測定したが、局在については検討しなかった。黄斑部のメラニンは光線の好ましくない作用から組織を保護するのに重要と思われる. Weiter ら⁴⁶⁾は眼球の色素量が増加すると老人性黄斑変性症の危険性が少なくなると報告している.

或る種の薬物はメラニンと親和性があり、眼の色素性組織に蓄積する。我々は47/48)、クロロキン、チオリダジン、ベフノロール、ピンドロール、ダウノマイシン、5-フルオロウラシル、クロールプロマジンがメラニンと親和性を有し、アシクロヴィル、ビンクリスチン、

表1 薬剤のメラニン親和性

親和性	菜 剤
親和性あり	クロロキン、チオリダジン、クロールプロマジン、ベニシリン、ベフノロール、ピンドロール、 ダウノマイシン、5 - フルオロウラシル、 インドメサシン
親和性なし	フルオレスセイン,アシクロヴィル, ヴィンクリスチン,コルヒチン
? (報告者や測定 条件により異るもの)	ピロカルピン、エビネフリン、メソトレキセート)

コルヒチンがメラニンと結合しないことを見い出した (表 1). クロロキンやチオリダジンが網膜症をおこす $^{49)50}$. これら網膜症の病因に薬物のメラニン親和性が大きく関与していると思われる. クロールプロマジンは高濃度で RPE ライソゾームから酵素を遊離させる 51 . β -ブロッカーは緑内障の治療薬として広く用いられている. 眼球常在電位のダイアモックス応答は眼球後極部の RPE 機能を反映しているとされている 52 . それ故, β -ブロッカー点眼使用者のダイアモックス応答を検討したところ,高濃度・長期間使用患者で障害されていた 53). 薬物のみでなくライソゾーム酵素蛋白もメラニンと親和性があり 54)黄斑部の代謝に影響を及ぼしていると思われる.

水野勝義先生(東北大名誉教授)と瀬戸川朝一教授(島根 医科大学)の御指導・御援助に感謝します。本研究は厚生省 網膜脈絡膜萎縮症調査研究班(中島 章教授班長)の御援助 によりました。

References

- Feeney L: Lipofuscin and melanin of human retinal pigment epithelium. Fluorescence, enzyme cytochemical, and ultrastructural studies. Invest Ophthalmol Vis Sci 17: 583—600, 1978.
- Wing GL, Blanchard GC, Weiter JJ: The topography and age relationship of lipofuscin concentration in the retinal pigment epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 17: 601—607, 1978.
- 3) Hayasaka S, Shiono T, Hara S, et al: Regional distribution of lysosomal enzymes in the retina and choroid of human eyes. Graefes Arch Ophthalmol 216: 269—273, 1981.
- Weiter JJ, Delori FC, Wing GL, et al: Retinal pigment epithelial lipofuscin and melanin and choroidal melanin in human eyes. Invest Ophthalmol Vis Sci 27: 145—152, 1986.
- Schmidt SY, Peisch RD: Melanin concentration in normal human retinal pigment epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 27: 1063 —1067, 1986.
- 6) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al: Protein measurement with Folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265—275, 1951.
- Feeney-Burns L, Berman ER, Rothman H: Lipofuscin of human retinal pigment epithelium. Am J Ophthalmol 90: 783—791, 1980.
- Hayasaka S, Shiono T: α-Fucosidase, α-mannosidase, and β-N-acetyl-glucosaminidase of the bovine retinal pigment epithelium. Exp Eye Res 34: 565—569, 1982.

- 9) Noda S, Hayasaka S, Setogawa T: Sphingomyelinase activity in the bovine retina and optic nerve. Presented at 91st Congress of Japanese Ophthalmological Society, Kyoto, May 1987.
- 10) **Streeten BW:** The sudanophilic granules of the human retinal pigment epithelium. Arch Ophthalmol 66: 391—398, 1961.
- 11) Strehler BL, Mark DD, Mildvan AS, et al: Rate and magnitude of age pigment accumulation in the human myocardium. J Gerontol 14: 430—439, 1959.
- 12) Reichel W: Lipofuscin pigment accumulation and distribution in five rat organs as a function of age. J Gerontol 23: 145—152, 1968.
- 13) Tappel A, Fletcher B, Deamer D: Effects of antioxidants and nutrients on lipid peroxidation fluorescent products and aging in the mouse. J Gerontol 28: 415—424, 1973.
- 14) Brunk UT, Collino VP: Lysosomes and age pigments is cultured cells, in Age Pigments, ed by Sohal RS, Amsterdam, Elsevier/North Holland, 1981, p243—264.
- 15) Fletcher BL, Dillard CJ, Tappel AL: Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. Analyt Biochem 52: 1—9, 1973.
- 16) Brown AM, Enesco HE: Lipofuscin in mouse placenta: Variations with age. Age 7: 36—41, 1984.
- 17) Feeney-Burns L, Hilderbrand ES, Eldridge S: Aging human RPE. Morphometric analysis of macular, equatorial, and peripheral cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 25: 195—200, 1984.
- 18) Eldred GE, Miller GV, Stark WS, et al: Lipofuscin, resolution of discrepant fluorescence data. Science 216: 757-759, 1982.
- 19) Snodderly DM, Brown PK, Delori FC, et al: The macular pigment. I. Absorbance spectra, localizaton, and discrimination from other yellow pigments in primate retinas. Invest Ophthalmol Vis Sci 25: 660—673, 1984.
- 20) Young RW, Bok D: Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. J Cell Biol 42: 392 -403, 1969.
- 21) Feeney-Burns L, Eldred GE: The fate of the phagosome: Conversion to age pigment and impact in human retinal pigment epithelium. Trans Ophthalmol Soc UK 103: 416—421, 1983.
- 22) Young RW: Pathophysiology of age-related macular degeneration. Surv Ophthalmol 31:291

- -306, 1987.
- 23) Davies I, Fotheringham AP: Lipofuscin, does it affect cellular performance? Exp Gerontol 16: 119—125, 1981.
- 24) Katz ML, Stone WL, Dratz EA: Fluorescent pigment accumulation in retinal pigment epithelium of antioxidant-deficient rats. Invest Ophthalmol Vis Sci 17: 1049—1058, 1978.
- 25) Robison WG Jr, Kuwabara T, Bieri JG: Vitamin E deficiency and the retina. Photorecepter and pigment epithelial changes. Invest Ophthalmol Vis Sci 18: 683—690, 1979.
- 26) Robison WG Jr, Kuwabara T, Bieri JG: The roles of vitamin E and unsaturated fatty acids in the visual process. Retina 2: 263—281, 1982.
- 27) Miller SA: Fluorescence in Best's vitelliform dystrophy, lipofuscin, and fundus flavimaculatus. Br J Ophthalmol 62: 256—260, 1978.
- 28) Weingeist TA, Kobrin JL, Watzke RC: Histopathology of Best's macular dystrophy. Arch Ophthalmol 100: 1108—1114, 1982.
- 29) Frangieh GT, Green WR, Fine SL: A histopathologic study of Best's macular dystrophy. Arch Ophthalmol 100: 1115—1121, 1982.
- 30) Eagle RC Jr, Lucier AC, Bernardino VB, et al: Retinal pigment epithelial abnormalities in fundus flavimaculatus. Ophthalmology 87: 1189—1200, 1980.
- 31) Patrinely JR, Lewis RA, Font RL: Foveomacular vitelliform dystrophy, adult type. Ophthalmology 92: 1712—1718, 1987.
- 32) Nilsson SEG, Jagell S: Lipofuscin and melanin content of the retinal pigment epithelium in a case of Sjögren-Larsson syndrome. Br J Ophthalmol 71: 224—226, 1987.
- 33) Font RL, Zimmerman LE, Armaly MF: The nature of the orange pigment over a choroidal melanoma. Histochemical and electron microscopical observations. Arch Ophthalmol 91: 359 —362, 1974.
- 34) Hogan MJ: Role of the retinal pigment epithelium in macular disease. Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol 76: 64—79, 1972.
- 35) Hayasaka S: Lysosomal enzymes in ocular tissues and diseases. Surv Ophthalmol 27: 245 —258, 1982.
- 36) Hayasaka S: Lysosomes and the eye, in Lysosomes in Biology and Pathology, Vol 7, ed by Dingle JT, Dean RT, Sly W, Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 1984, p421—441.
- 37) Hayasaka S, Noda S, Setogawa T: Regional distribution of N-acetyl-\(\theta\)-D-glucosaminidase

- and α -L-fucosidase activities in the human retina and choroid. Ophthalmic Res in press.
- 38) Noda S, Hayasaka S, Setogawa T: Acidic sphingomyelinase activity in human eyes. Presented at 92nd Congress of Japanese Ophthalmological Society, Kyoto, March 1988.
- 39) Wharton SA, Riley PA: Lysosomes and aging, in Lysosomes in Biology and Pathology, Vol 7, ed by Dingle JT, Dean RT, Sly W, Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 1984, p401—419.
- 40) Maslinka D, Boellaard JW, Schlote W: Acid phosphatase activity in human neuronal and glial lipofuscin. Acta Neuropathol 64: 222—228, 1984.
- 41) Hayasaka S, Nakazawa M, Okabe H, et al: Progressive cone dystrophy associated with low α-L-fucosidase activity in serum and leukocytes. Am J Ophthalmol 99: 681—685, 1985.
- 42) Unoki K, Uehara F, Ohba N: Sialyltransferase and fucosyltransferase in the monkey retina. Presented at Annulal Meeting of Koseisho-Momaku-Myakurakumaku-ishukusho-chosakenkyu-han, Tokyo, January 1988.
- 43) **Libert J, Kenyon KR:** Ocular ultrastructure in inborn lysosomal storagle diseases. in Goldberg's Genetic and Metabolic Eye Disease, ed by Renie WA, Boston, Little Brown Company, p111—1338, 1986.
- 44) Huang SS, Huang PC: Biochemical diagnosis of genetic and metabolic eye diseases. In Goldberg's Genetic and Metabolic Eye Disease, Second ed, ed by Renie WA, Boston, Little, Brown and Company, 1986, p27—80.
- 45) **Hunold W, Malessa P:** Spectrophotometric determination of the melanin pigmentation of the human ocular fundus in vivo. Ophthalmic Res 6: 355—362, 1974.

- 46) Weiter JJ, Delori FC, Wing GL, et al: Relationship of senile macular degeneration to ocular pigmentation. Am J Ophthalmol 99: 185—187, 1985.
- 47) Tsuchiya M, Hayasaka S, Mizuno K: Affinity of ocular acid-insoluble melanin for drugs in vitro. Invest Ophthalmol Vis Sci 28: 822—825, 1987
- 48) Hayasaka S, Tsuchiya M, Noda S, et al: Affinity of dopa-autooxidation melanin and tyrosinase-catalyzed dopa-melanin for drugs in vitro. Ophthalmic Res in press.
- 49) Bernstein H, Zvaifler N, Rubin M, et al: The ocular deposition of chloroquine. Invest Ophthalmol 2: 384—392, 1963.
- 50) Weekley RD, Potts AM, Reboton J, et al: Pigmentary retinopathy in patients receiving high does of a anew phenothiazine. Arch Ophthalmol 64: 65—76, 1960.
- 51) Shiono T, Hayasaka S, Mizuno K: Effect of chlorpromazine in vitro on release of enzymes from lysosomes of the bovine retinal pigment epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 25: 115 -117, 1984.
- 52) Yonemura D, Kawasaki K, Tanabe J, et al: Susceptibility of the standing potential of the eye to acetazolamide and its clinical application. Folia Ophthalmol Jpn 29: 408—416, 1978.
- 53) Yamamoto Y, Hayasaka S, Setogawa T: Effect of topical β-blocking agent on the function of the retinal pigment epithelium. Presented at the 41st Congress of Japanese Clinical Ophthalmology, Fukuoka, October, 1987.
- 54) Nakazawa M, Hayasaka S, Tsuchiya M, et al: Effects of melanin on lysosomal enzymes in bovine ciliary body and iris in vitro. Jpn J Ophthalmol 29:37—41, 1985.