

## A-4 紫外線の健康影響のリスク評価と効果的な予防法の確立に関する研究

### (4) 紫外線とその他の環境因子による細胞内酸化ストレスの複合影響に関する研究

独立行政法人産業医学総合研究所 作業環境計測研究部 奥野 勉

#### 研究協力者

秋田大学医学部

岩田豊人

金沢医科大学医学部

幡 育穂・小島正美・佐々木一之

平成 11～13 年度合計予算額 4,061 千円

(うち、平成 13 年度予算額 1,041 千円)

[要旨] 紫外放射(紫外線)は多くの種類の障害を引き起こすが、そのほとんどの場合、実際に、正確なリスク評価を行うことは難しい。その原因は、どの程度の紫外放射へ曝露したときに障害が発生するのか(量-反応関係)、あるいは、どの波長の紫外放射がどの程度の作用をもつのか(作用スペクトル)、障害を発生させる紫外放射の強度と曝露時間は反比例するのか(相反則)などの基礎データが不足しているためである。一般に、このような高度に定量的なデータを得る目的には、培養細胞を用いた実験が適している。そこで、本研究では、波長と強度、時間を正確に制御した紫外放射へ培養細胞を曝露させ、その影響を定量的に調べる 2 種類の実験を行った。

(1) 表皮細胞のモデル系である KB 細胞を用い、紫外放射曝露後のアポトーシス(細胞死)を、細胞の剥離の観察、および、テトラゾリウムアッセイ法の 2 種類の方法で定量化した。アポトーシスの割合は、紫外放射の照度ではなく、その時間的な積算値(radiant exposure)によって決まること、波長 270nm から 330nm の間では波長が短いほどアポトーシスの割合が高いこと、酸化ストレス性因子の例としての過酸化水素と紫外放射へ複合曝露したときには両者の影響は相加的であることなどを明らかにした。

(2) 紫外放射曝露後のヒト水晶体上皮細胞の生存率をクリスタルバイオレット染色によって定量化した。その量-反応曲線をマルチヒットモデルに基づいて解析し、LD<sub>50</sub>を求めた。これを 260.5nm から 301nm までの 8 種類の波長の紫外放射について行うことにより、正確な作用スペクトルが得られた。本研究で得られたデータは、紫外放射の有害性の評価方法を定める際の基礎になるとと思われる。その例として、この作用スペクトルに、ヒトの角膜と房水の分光透過率をかけることにより、白内障に関する作用スペクトルを求めた。白内障発生に関する紫外放射の有害性は、波長 300nm 以上で強くなることが示唆された。

[キーワード] 紫外放射、紫外線、培養細胞、量-反応関係、作用スペクトル

#### 1. はじめに

紫外放射(紫外線)は、角結膜炎、皮膚炎、白内障、皮膚がん、皮膚の老化など、実際に多くの種類の障害を引き起こしている<sup>1,2)</sup>。紫外放射の有害性の評価方法は、急性障害である角結膜炎と皮膚炎に関しては確立されている<sup>3,4,5,6)</sup>が、ほかの障害に関しては未だ確立されていない。した

がって、これらの障害については、紫外放射の有害性の強さを表す量も定義されておらず、リスク評価を行うことができない状況にある。その原因は、どの程度の紫外放射へ曝露したときに障害が発生するのか(量-反応関係)、あるいは、どの波長の紫外放射がどの程度の作用をもつのか(作用スペクトル)、障害を発生させる紫外放射の強度と曝露時間は反比例するのか(相反則)などの基礎データが不足しているためである。このような高度に定量的なデータを得るためには、生体側と曝露側の両方の条件を、正確に制御する必要がある。このため、一般に、動物実験よりも培養細胞を用いた実験(in vitro 実験)の方が適している。実際、そのような in vitro 実験が行われてきている<sup>7,8)</sup>が、その数は少なく、得られているデータも、紫外放射の有害性の評価方法を決めるためには、質量とも不十分である。そこで、本研究では、波長と強度、時間を正確に制御した紫外放射へ培養細胞を曝露させ、細胞死に関する指標を用いて、その影響を定量的に調べた。培養細胞としては、表皮細胞のモデル系である KB 細胞およびヒト水晶体上皮細胞を用いる 2 種類の実験を行った。

## 2. 研究目的

紫外放射の有害性の評価方法の基礎データを求めるため、紫外放射の培養細胞に対する有害性を定量的に調べる。特に、量-反応関係、作用スペクトル、相反則について明らかにする。

## 3. 研究方法

### (1) KB 細胞

ほぼ定常期まで増殖した KB 細胞を、Hanks 液中で、波長範囲 270-330nm 内の単一波長(波長幅 17nm)の紫外放射へ曝露した。12 時間後に、シャーレの基質から剥離し、円形となった細胞(アポトーシスに相当)の割合を観察した。約 0%、10%、20%、...、100%の細胞が剥離している状態を、それぞれ、Scale 0、Scale 1、Scale 2、...、Scale 10 として、剥離の程度を数値化した。紫外放射の波長、照度(強度)、曝露時間を変えることによって、量-反応関係、作用スペクトル、相反則について調べた。

同様に KB 細胞を紫外放射へ曝露させ、18-20 時間後のアポトーシスを、テトラゾリウムアッセイ法<sup>9)</sup>を用いて定量化した。この方法は、3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide が還元され、ホルマザンを生成する反応を用いて、細胞増殖を検討するものである。この場合、細胞生存率は、 $OD_{574}/OD_{660}$  によって、相対的に表される。紫外放射の波長、照度、曝露時間を変えることによって、量-反応関係、作用スペクトル、相反則について調べた。さらに、酸化ストレス性因子の例としての過酸化水素と紫外放射へ複合曝露したときの影響についても調べた。

### (2) ヒト水晶体上皮細胞

ヒト水晶体上皮細胞(SRA01-04)を、20%ウシ胎児血清を含む DMEM を培養液として、96 ウェルプレート(約  $1 \times 10^4$  個/ウェル)に播種した。37°C、5%CO<sub>2</sub>の条件下で約 2 日間培養後、70-80%コンフルエントに達した時点で、紫外放射の照射を行った。照射時には、培養液を、目的波長域の紫外放射に対する吸収の無い PBS(+)に置換した。照射後、ただちに元の培養液に置換し、

細胞をさらに4日間培養した後、2.5%グルタルアルデヒドで固定、0.4%クリスタルバイオレットで染色、細胞生存率を相対的に表す量である590 nmにおける吸光度を測定した。なお、予備実験において、曝露および観察の時点では、細胞は対数増殖期にあることを確認している。

照射紫外放射は、500 Wキセノンランプ光源装置(ウシオスペックス、SXUI500XQ)の出力を、可視光を減衰させるフィルター(入江製作所、UV-D33S)、特定波長のみを取り出すバンドパスフィルター(Andover、254、260、270、280、289、297、313、334FS10-50)、照射面における照度分布を一様にする拡散板(片面を擦った石英板、500番)を透過させたものを用いた(図1)。照射紫外放射は、中心波長が260.5、265.5、268.5、273.5、283.0、290.0、298.5、301.0nmの8種類、半値幅はすべて約10nmである(図2)。

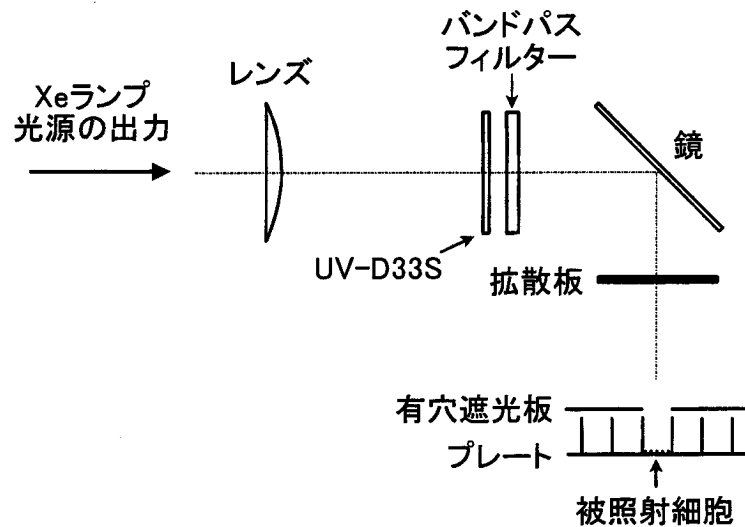


図1 紫外放射の照射

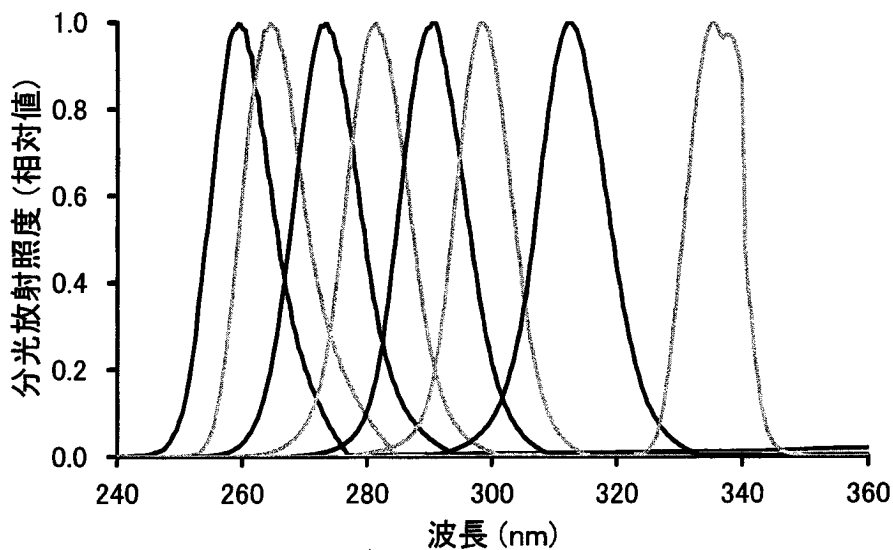


図2 照射紫外放射の分光分布

予備実験において、紫外放射の作用の強さが、radiant exposure(照度と曝露時間の積)で決まること、すなわち、相反則が成り立つことを確認している。したがって、紫外放射の量(曝露量)としては、radiant exposure を用いることにした。照射直前に、紫外放射の照度を測定し、その測定値に応じて曝露時間を調整することによって、おおまかな曝露量を設定した。照射直後にも、照度の測定を行い、照射前後の測定値の平均を実際の曝露照度として、正確な曝露量を計算した。照度の測定には、放射計(International Light、IL1400A、SEL033)を用いた。放射計は、製造会社による校正の有効期限(1年)内に使用した。

照射波長ごとに、ゼロを含む6種類の曝露量、それぞれの曝露量について4つのウェルを使用して細胞生存率を調べた。予備実験において、量-反応関係が、マルチヒットモデルから予測される理論曲線とよく一致することが確認されている。マルチヒットモデルとは、ひとつの細胞は、ある特定の数以上の障害を受けたときに死ぬと仮定するモデルであり、その場合、生存率  $R$  と曝露量  $D$  の間には次の関係がある。

$$R = 1 - (1 - e^{-\alpha D})^n$$

ここで、 $\alpha$  と  $n$  はパラメータであり、それぞれ、細胞がひとつの障害を受ける確率、および、細胞を死に至しめる障害の数を表している。測定データに、上の式が可能な限り一致するよう、最小自乗法によってパラメータの値を決めた(図3)。その際の収束計算には、Microsoft Excel 2000 とそのアドインであるソルバーを使用した。

このパラメータの値から、次式によって  $LD_{50}$  を求め、その逆数を有害性の強さとした。

$$LD_{50} = -\frac{1}{\alpha} \log \left( 1 - \frac{1}{\sqrt[n]{2}} \right)$$

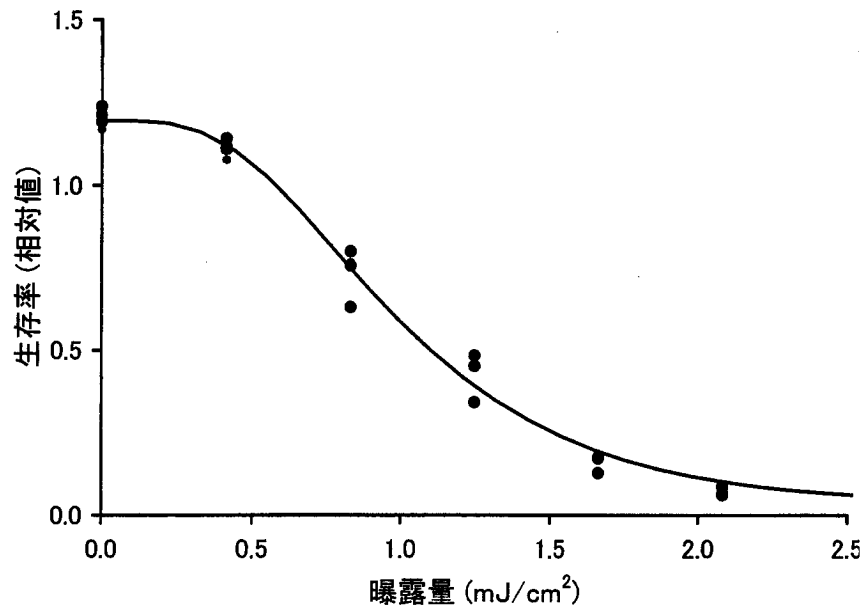


図 3 測定データと理論曲線の例

なお、実験は、上に述べた細胞の準備から最後の観察までの手順全体を 3 回繰り返した。

#### 4. 結果・考察

##### (1) KB 細胞

同じ radiant exposure  $3\text{mJ}/\text{cm}^2$  の波長  $290\text{nm}$  の紫外放射を、7 種類の照度  $0.5$ 、 $1.0$ 、 $3.0$ 、 $5.0$ 、 $10$ 、 $15$ 、 $25\mu\text{W}/\text{cm}^2$  とこれに対応する時間(2分から約 90 分間)で照射した場合には、同じ程度の剥離が観察された。これは、相反則が成り立つこと、したがって、紫外放射の量(曝露量)として、radiant exposure を使用することが適切であることを示している。

紫外放射の波長が同じ場合には、曝露量が多いほど細胞の剥離が多かった。また、波長  $270\text{nm}$ 、 $280\text{nm}$ 、 $290\text{nm}$ 、 $300\text{nm}$ 、 $310\text{nm}$  の結果を比較すると、曝露量が同じ場合には、波長が短いほど細胞の剥離が多かった(一部のデータを図 4 に示す)。

テトラゾリウムアッセイ法によって求めた細胞生存率( $\text{OD}_{574}-\text{OD}_{660}$ によって、相対的に表される)についても、同じ  $14.4\text{mJ}/\text{cm}^2$  の radiant exposure を照度  $24\mu\text{W}/\text{cm}^2$  6 分間の条件および照度  $4\mu\text{W}/\text{cm}^2$  曝露時間 36 分間の条件で照射し、その後 18 時間観察したところ、ほぼ同じ程度の生存率とその経時的変化が得られた。データ数は少ないが、これも、相反則が成り立つこと、したがって、この場合も紫外放射の量(曝露量)として、radiant exposure を使用することが適切であることを示唆している。

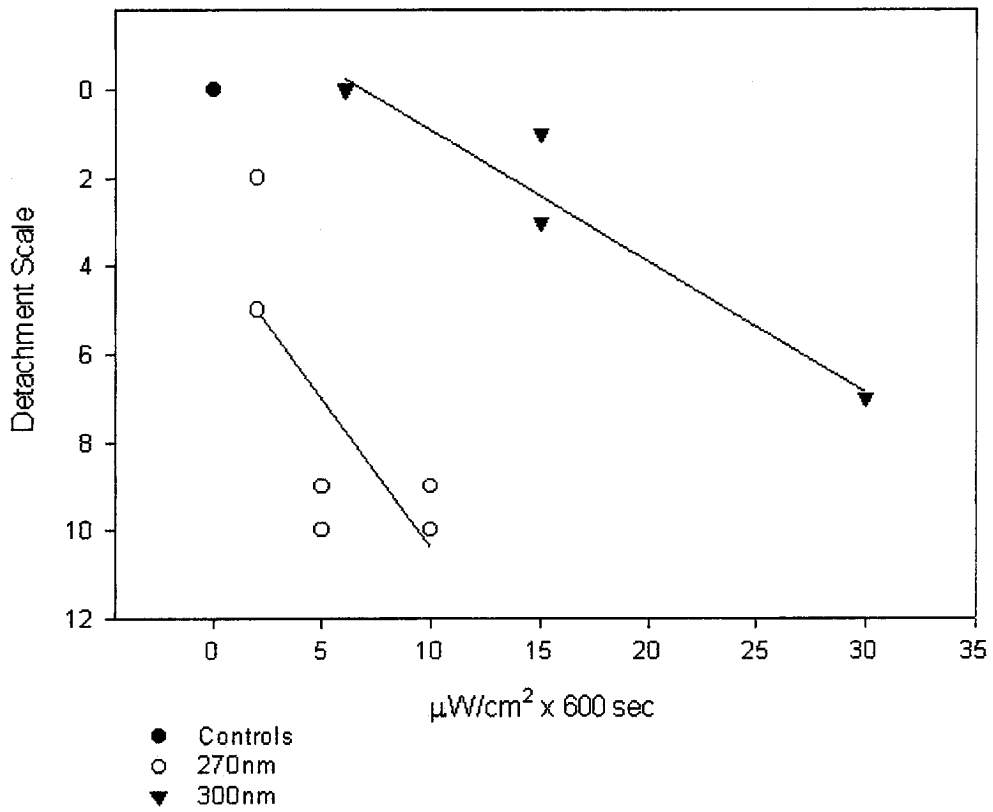


図4 紫外放射の波長と量の細胞の剥離に対する影響

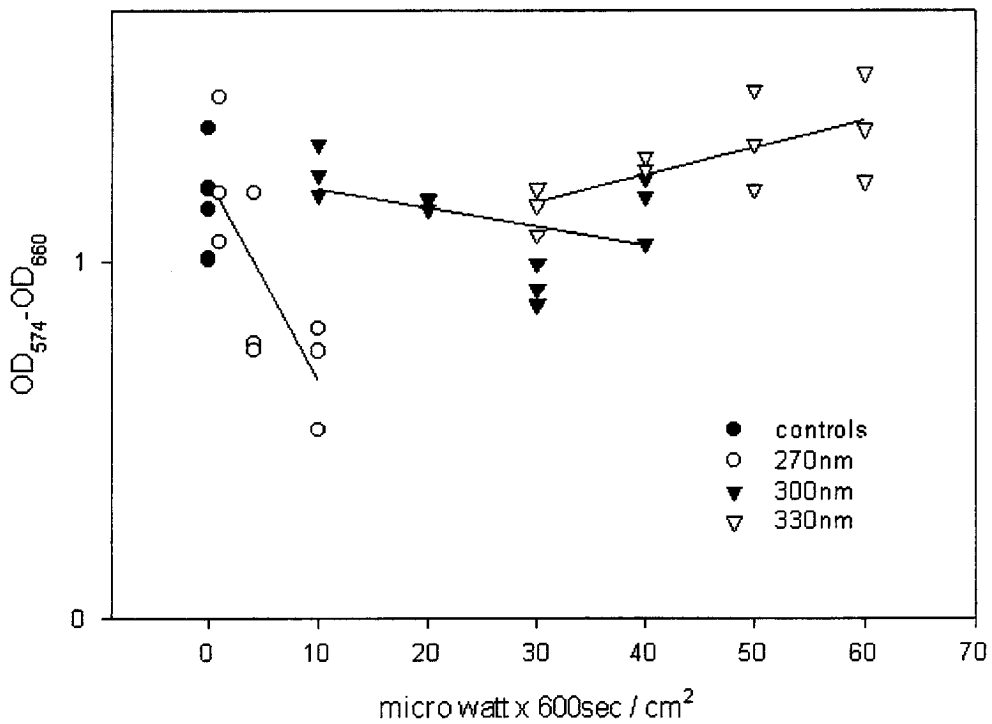


図5 紫外放射の波長と量の細胞生存率(OD<sub>574</sub>-OD<sub>660</sub>)に対する影響

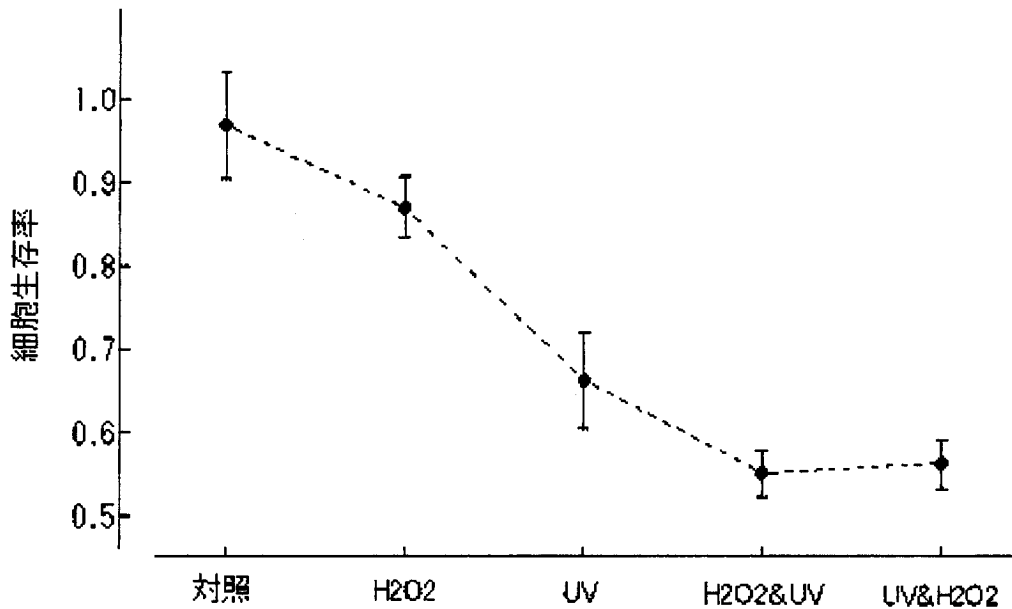


図 6 過酸化水素と紫外放射への複合曝露の細胞生存率(OD<sub>574</sub>-OD<sub>660</sub>)に対する影響

紫外放射の波長が 270nm または 300nm の場合には、曝露量が多いほど、細胞生存率(OD<sub>574</sub>-OD<sub>660</sub>)が低かった(図 5)。波長が 330nm の場合には、こうした関係は見られなかったが、これは、この波長の有害性が非常に弱いためだと考えられる。曝露量が同じ場合には、270nm、300nm、330nm の順に、細胞生存率が高くなる傾向が見られた。

過酸化水素と紫外放射への複合曝露の細胞生存率(OD<sub>574</sub>-OD<sub>660</sub>)に対する影響は相加的であった(図 6)。また、過酸化水素と紫外放射への曝露の順番を変えても、さらに、その時間間隔を 10 分から 4 時間まで変えても、細胞生存率は変わらなかった。これは、過酸化水素と紫外放射の作用が、お互いにまったく干渉しないことを示している。

## (2) ヒト水晶体上皮細胞

紫外放射の有害性(作用スペクトル)は、波長 270nm 付近で最大となり、そこから短波長、長波長の両側向かって小さくなった(図 7)。3 回の実験の変動は、わずか 10% 程度以下であり、この種の実験としては、よい再現性が得られた。作用スペクトルの形は、中心波長 269nm、半値幅 32 nm のガウス曲線で近似することができた。

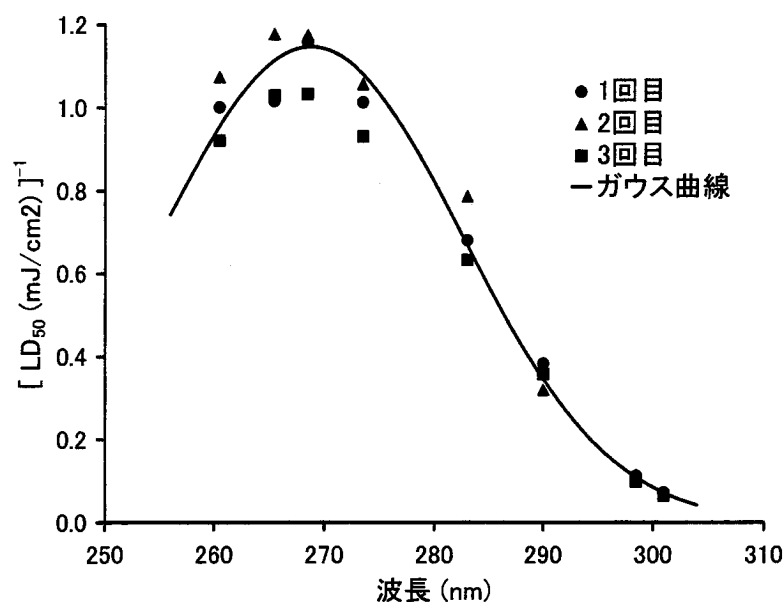


図7 作用スペクトル

本研究で得られた作用スペクトルの形は、急性障害に関する ICNIRP<sup>3,4)</sup>と ACGIH<sup>5)</sup>の相対分光効果値のスペクトル (図8)、および、これまでに得られている細胞レベルの他の指標や角膜障害に関する作用スペクトルとよく似ている。この波長域が、タンパク質に含まれる芳香族アミノ酸および核酸を構成する塩基の第一吸収帯と一致することから、一般に、紫外放射の生体影響は、これらの生体の主要な構成要素が、紫外放射を吸収することから始まると考えられる。したがって、生体影響の種類によらず、細胞レベルにおける作用スペクトルは、基本的に同じである可能性がある。これを確かめるため、今後は、さまざまな細胞および指標に対する作用スペクトルを調べることで、さらには、組織レベル、個体レベルにおいても同様な研究を行うことが望まれる。

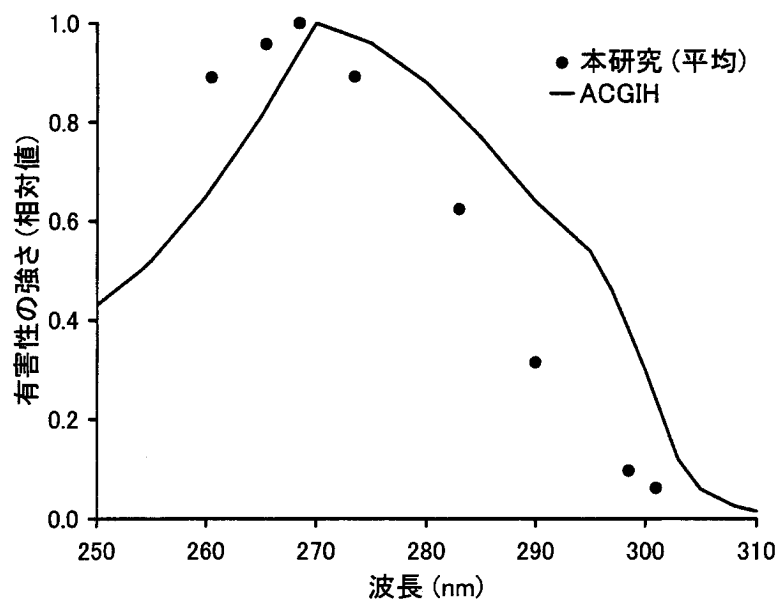


図8 ACGIHの相対分光効果値のスペクトルとの比較



生体内の水晶体は、角膜と房水を通して、外部から眼球に入射する紫外放射へ曝露する。この場合の水晶体に対する作用スペクトルは、裸の水晶体に対する作用スペクトルと角膜と房水の透過率の波長ごとの積となる。そこで、本研究で得られた作用スペクトル(ガウス曲線)を裸の水晶体に対する作用スペクトルとし、これに、Maherが報告している角膜と房水の透過率<sup>10)</sup>をかけることによって、生体内の水晶体に対する作用スペクトルを求めた(図9)。このようにして求められた水晶体に対する作用スペクトルは、波長約290nmから立ち上がり、約305nmで最大となり、その後はまた低下した。ただし、本研究の実験データは、長波長側は301nmまでしかないので、それ以上の波長の部分については、あまり信頼はできない。しかし、水晶体に対する作用スペクトルの最大値が、300nm以上の波長にあることは、間違いが無いと思われる。

白内障に関する作用スペクトルは、この作用スペクトルと同様な形をしており、300nm以上の波長で最大となると考えられる。したがって、白内障に関する紫外放射の有害性の評価を行う場合には、波長305nm付近の強度が重要である。一方、既存の紫外放射の有害性の評価方法<sup>3,4,5,6)</sup>は、すべて急性障害に関するものであり、主として波長270nm付近の紫外放射を評価する。したがって、たとえば、白内障の疫学研究において、紫外放射の量を既存の評価方法に従って表すことは、不適切であると考えられる。白内障に関する紫外放射の有害性の評価方法を、早急に確立する必要があると思われる。

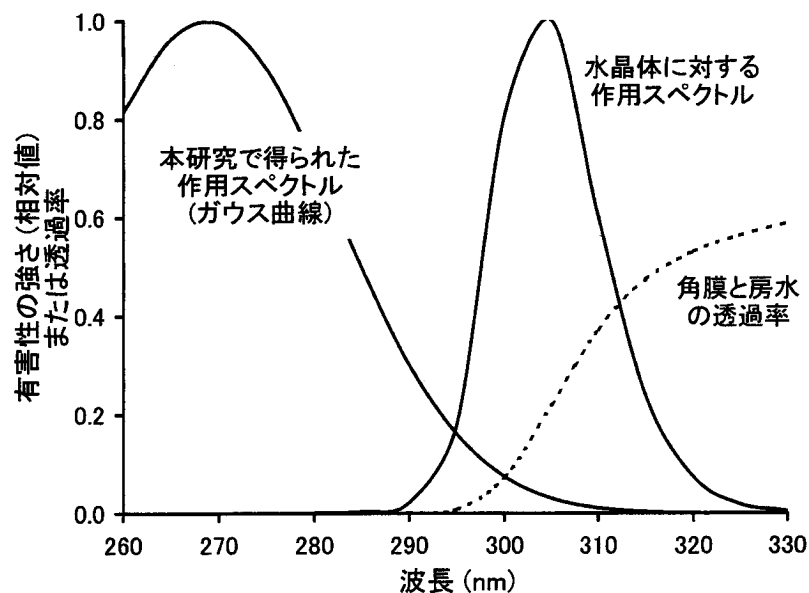


図9 水晶体に対する作用スペクトル

##### 5. 本研究により得られた成果

- (1) 紫外放射の細胞に対する作用は、照度と曝露時間の積、すなわち、radiant exposureによって決まる。したがって、紫外放射の曝露量としては、radiant exposureを使用するのが適切である。
- (2) 紫外放射の細胞に対する作用は、その波長によって大きく異なり、波長約270nmでもっとも強く、そこから短波長側、長波長側の両側に向かって急速に弱くなる。

- (3) 酸化ストレス性因子の例としての過酸化水素と紫外放射へ複合曝露した場合、その作用は完全に相加的である。
- (4) 生体内の水晶体に対する外部から眼球に入射する紫外放射の作用は、300nm以上の波長で最大となると考えられる。

## 6. 引用文献

- 1) 奥野 勉 (1992) 環境中の紫外放射、光、赤外放射による障害, 産業医学レビュー 4, 35-61.
- 2) WHO (1994) Environmental Health Criteria 160:Ultraviolet Radiation, WHO, Geneva, Switzerland, ISBN: 92-4-157160-8.
- 3) ICNIRP (1996) Guidelines on UV Radiation Exposure Limits, Health Phys. 71, 978.
- 4) ICNIRP (1985) Guidelines on Limits of Exposure to Ultraviolet Radiation of Wavelengths between 180 nm and 400 nm (Incoherent Optical Radiation), Health Phys. 49, 331-340.
- 5) ACGIH (2002) TLVs and BEIs, ACGIH, Cincinnati, USA, ISBN: 1-882417-46-1.
- 6) 日本工業標準調査会(1987) 有害紫外放射の測定方法 JIS Z 8812-1987, 日本規格協会.
- 7) Andley UP, Lewis RM, Reddan JR, Kochevar IE (1994) Action spectrum for cytotoxicity in the UVA- and UVB-wavelength region in cultured lens epithelial cells, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 35, 367-73.
- 8) Andley UP, Weber JG (1995) Ultraviolet action spectra for photobiological effects in cultured human lens epithelial cells, Photochem. Photobiol. 62, 840-6.
- 9) Alley MC, Scudiero DA, Monks A, et al (1988) Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay, Cancer Res. 48, 589-601.
- 10) 一般には入手が難しい資料であるため、必要なデータのみ、アメリカ合衆国ウォルターリード陸軍研究所所長スタック博士よりご提供いただきました。

## 【国際共同研究等の状況】

国際非電離放射防護委員会(ICNIRP)は、WHOの協力機関であり、紫外放射を含む非電離放射の有害性に関し、国際基準の制定などを任務とする国際機関であるが、本サブテーマの代表者(奥野)は、ICNIRPの第4科学委員会(SCIV、光学)の委員であり、1998年より、ICNIRPおよびSCIVから、紫外放射の作用スペクトルに関する研究を行うことを要請されていた。そこで、本研究の一部は、この要請に沿う形でデザインされている。

2002年5月にカナダのバンクーバーにおいて、ICNIRPの総会およびSCIVが開催されたが、その席上、本結果の一部を提示することにより、紫外放射の有害性の評価方法に関する審議に貢献した。また、SCIVより、同じ方向でさらに研究を進めることが強く要請された。

## 【研究成果の発表状況】

- (1) 誌上发表

なし

(2) 口頭発表

- ① 岩田豊人: 第 73 回日本産業衛生学会(2000)「紫外線の照射強度、照射時間の差異が KB 細胞に及ぼす影響について」
- ② Ikuho Hata, Hiroshi Sasaki, M.asam Kojima, Tsutomu Okuno, Ying-Bo Shui, Kazuyuki Sasaki: Asian Cataract Research Conference(2000) “Ultraviolet Action Spectra in Cultured Human Lens Epithelial Cells”
- ③ 幡育穂、小島正美、奥野勉、水迎波、佐々木洋、佐々木一之: 第 26 回水晶体研究会(2000)・「紫外線傷害作用波長の検索(1)樹立ヒト培養細胞」
- ④ 幡育穂、佐々木洋、小島正美、Kong Jun、奥野勉、佐々木一之: 第 66 回日本中部眼科学会関連研究会(2000)「ヒト水晶体上皮細胞に対する短波長紫外線傷害波長域」
- ⑤ 奥野勉、幡育穂、小島正美、佐々木一之: 第 41 回日本労働衛生工学会(2001)「ヒト培養水晶体上皮細胞の生存率に関する紫外放射の作用スペクトル」
- ⑥ 奥野勉、幡育穂、小島正美、佐々木一之: 第 42 回日本労働衛生工学会(2002)「ヒト培養水晶体上皮細胞の生存率に関する紫外放射の作用スペクトル(続報)」

(3) 出願特許

なし

(4) 受賞など

なし

(5) 一般への公表・報道等

なし

(6) その他成果の普及、政策的な寄与・貢献について

前述のように、2002年5月にカナダのバンクーバーにおいて、ICNIRPの総会およびSCIVが開催されたが、その席上、本結果の一部を提示することにより、紫外放射の有害性の評価方法に関する審議に貢献した。

さらに、平成13年度に開催されたしゃ光保護具等ISOと整合化したJIS原案作成委員において、本結果の一部を提示することにより、紫外放射に対するしゃ光保護具の遮光能力に関する審議に貢献した。