

#### A-4. 紫外線の増加が人の健康に及ぼす影響に関する研究

##### (2) 紫外線による免疫機能等生体防御機能の低下に関する研究

###### ③ 光感作アレルギー反応の促進影響

労働省産業医学総合研究所 職業病研究部

山田博朋

研究期間 平成2年度～4年度

合計予算額 29,370千円

#### 要旨

本研究は、紫外線による細胞内タンパクの変化を調べることにより、光アレルギー性の抗原生成を含む細胞傷害のリスクを評価することを目的とする。ヒト皮膚由来の細胞に紫外線を照射しタンパクの変化を調べたところ、短波長 UVB の照射が多くのタンパクの変化を引き起こすことが明らかになった。しかし皮膚は静的なものではなく、体内や皮膚表面から物質が浸透し、生理条件が変わることがある。このような場合に紫外線がどのような影響を与えるか、ほとんど研究されていない。そこで皮膚に影響を与える物質の例として重金属を取り上げ、紫外線との複合曝露の影響を調べた。毒性を示さない低濃度の重金属に曝した細胞に、細胞を余り傷つけない条件の紫外線を照射すると、単純な加算的予想を上回る大きな損傷を細胞に与え、さらに複合曝露に特異的なタンパクの変化が認められた。このことは生体に対する紫外線の影響を考慮する場合、紫外線の波長やエネルギーだけが問題となるのではなく、紫外線を浴びる側の生理的な状態が極めて重要であることを示唆している。また紫外線照射後に標識されてくるタンパクを調べたところ、既知のストレス（熱ショック）・タンパクの大きさと一致するタンパクが幾つも合成されており、細胞が紫外線の与えるストレスに対して敏感に反応している事が推定される。

キーワード： 光アレルギー、ヒト皮膚由来細胞、電気泳動、タンパク、重金属

## 1. 序

これまで紫外線の大部分は、地表から 10-45 km に存在する成層圏のオゾン層によって遮られ、ヒトの健康への影響は深刻な問題ではないとされていた。しかし南極上空のオゾン層は 1980 年代以降、一貫して減りつづけ、今やフロンによるオゾン層破壊は理論の段階ではなく、一般社会においても健康に対する現実の脅威として認識されるようになってきた。極地上空ではオゾンのない領域が広がり<sup>1)</sup>、それ以外の地域でも地表に達する紫外線が増加することによるヒトの健康への被害が心配されるようになった。オゾン層の減少で透過量が大きく影響されるのは UVB (Mid UV) という 315-280 nm の波長のものである。それより波長の長い UVA (Long UV、400-315 nm) はオゾンに吸収されにくく、またより短波長の UVC (Far or Short UV、280-200 nm) は逆にオゾンに効率よく吸収されるので、どちらも多少オゾン層の厚さに変動があっても地表に達する量にあまり変化はない。紫外線は浸透力が弱く、UVB は真皮乳頭の血管層までしか到達しないが、体表面の角層と違い、そこでは生きた細胞が生命活動を営んでおり、場合によっては複雑な生体反応を惹起することがある。生理的レベルにおける光による有害性はその発症機序の違いから、光毒性 Phototoxicity と光アレルギー性 (光感作アレルギー) Photoallergy に分類されている。どちらの反応も照射された光のエネルギーがまず物質に吸収され光学的 Photodynamic な変化を起こし、そのエネルギーが近傍に存在する他の分子を活性化することによって惹起される。

光毒性は、光に対して増感剤として働く光感作物質 Photosensitizer が皮膚に存在しているときに光の照射を受けると、光感作物質から細胞成分にエネルギーが渡されつづけ細胞内で傷害が起こることである。光感作物質というのは蛍光あるいは燐光物質であり、各物質により傷害部位が異なることが知られている。

光アレルギー性は、光学的反応に続いて免疫学的機序が関与して起こる現象である。即ち、光感作物質に吸収された光のエネルギーを受けわたされた分子が、化学変化や代謝を受けたのち

表 1. 光毒性・光アレルギー性の比較

	光毒性	光アレルギー性
発症	全てのヒトに起こりうる	希
原因物質の量	比較的多い	微量でよい
原因物質の変化	-	+
原因物質の除去	症状の快方	即座には快方せず
症状	日光火傷	多様
発症部位	照射部位のみ	遠隔部位にも
最初の曝露での反応	+	-
潜伏期	-	+
色素沈着	+	-
類似物質による交差反応	希	多

抗原性を持つ物質になって生体感作する。その後再び同一物質が作用し光の照射が加えられたとき抗体が大量に産生されアレルギー反応が起こる。この場合、抗原となる化合物は必ずしも自分自身が光感作物質である必要はない。

光毒性と光アレルギー性の違いを一覧表にした表1に示すように、光毒性は原因となる物質と症状には直接的な関係が成立しており治療の方針もたてやすいが、光アレルギー性は抗原そのものが判かっている場合もほとんどなく治療しにくい。また現在のところは希であっても今後地表に達する紫外線が増加する事態となると、光アレルギー性も増えることが心配される。

## 2. 研究目的

本研究は紫外線の増加がヒトの健康に及ぼす影響に関する研究の一環として、紫外線による細胞内タンパクの変化を調べることにより、抗原の生成を含む細胞傷害のリスクを評価することを目的としている。ヒト皮膚由来の培養細胞が紫外線照射を受けたとき、修飾等によりタンパクになんらかの変化が起これば電気泳動におけるバンドの差に現われることに着目し、紫外線増加に起因するリスクについて考察しようというものである。研究初年度は実験系の確立を目的とし、紫外線曝露装置を中心とする培養細胞曝露システムの構築、それを用いた曝露条件と被検細胞の検討、及びタンパクの変化を鋭敏に検出するための分析法の検討を行なった。次年度は、初年度に策定した曝露条件を用い、波長とエネルギーの両方を正確に規定して細胞内タンパクの変化を調べ、波長とタンパクの変化の関連を探った。次年度までは紫外線のみに着目して、紫外線の影響を探ってきた。しかし皮膚は静的なものではなく、体内からの有害因子が運ばれてくることもあれば、皮膚表面から日焼け止めや化粧品その他の化学物質が浸透してくることもある。このような場合に紫外線がどのような影響を与えるかはほとんど研究されていない。最終年度は細胞に生理的变化をもたらす、かつ環境汚染物質としても知られる重金属を取り上げ、それが存在しているときにどのような変化を与えるかを調べた。

## 3. 研究方法

### (1) 紫外線照射

初年度に作製した紫外放射細胞曝露装置(後述)は300 Wのキセノンランプの光を分光器によって分光させ、必要な波長の紫外線をφ35 mmのビームとして取り出す仕組みである。PBS(-) (NaCl 8 g/l, KCl 0.2 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O 2.9 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g/l)で二回洗ったφ35 mm培養皿上の細胞に紫外線を照射した。

### (2) 細胞とその培養

表2は紫外線照射実験に用いた細胞の由来や形態を示している。細胞はφ35 mm培養皿を用いて37℃、5% CO<sub>2</sub>存在下において、表に示すような培地中で培養した。これらの培地は10%牛胎児血清(FCS)または10%子牛血清(CS)、100単位/mlペニシリン、100 μg/mlストレプトマイシン、0.25 μg/mlファンジゾンを含んでいる。

表 2. UVB 照射実験に用いた細胞株

細胞株	由来	形態	染色体数	培地
HeLa S3	31歳黒人子宮頸部 (♀)	上皮細胞	56-271	MEM + 10 % CS
NCTC 2544	52歳白人皮膚 (♂)	上皮細胞	53-136	NCTC 135 + 10 % FCS
NB1RGB	日本人新生児皮膚 (♂)	繊維芽細胞	46 (90 %)	MEM $\alpha$ + 10 % FCS
WS 1	12週齢黒人胎児皮膚 (♀)	繊維芽細胞	46 (78 %)	MEM + 10 % FCS
BUD 8	56歳白人皮膚 (♀)	繊維芽細胞	未定	MEM + 10 % FCS

### (3) 細胞抽出液の調製

紫外線照射後、適当な時間培養を行なった細胞は PBS(-) (NaCl 8 g/l, KCl 0.2 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O 2.9 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g/l) で2回洗い、200  $\mu$ l の TEN (40 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1mM EDTA, 0.15 M NaCl) を加え室温で5分放置後、 $\phi$ 35 mm 培養皿から擦り落としマイクロチューブに集め、低速遠心で細胞のみを回収し、それを一旦 -20 °C で凍結した。その細胞に 20  $\mu$ l の 0.25 M Tris-HCl, pH 7.5 を加え、懸濁させた後、超音波処理によって細胞を破壊し、マイクロ遠心機で 4 °C、5 分間、15 krpm 遠心して細胞抽出液を得た。

### (4) 細胞内タンパクの標識

紫外線照射の前または後に、20  $\mu$ C の <sup>35</sup>S-Methionine を含む培地中で 20 時間培養を行うことによって細胞内タンパクを標識した。照射前に標識した実験をプレラベル、照射後に標識したものをポストラベルとする。このような処理を行なった細胞は PBS(-) で2回洗い、50  $\mu$ l の Lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 % NP-40) を加え 0 °C で5分放置後、 $\phi$ 35 mm 培養皿から擦り落としマイクロチューブに集めた。再度 50  $\mu$ l の Lysis buffer を加えて、培養皿を洗った後、マイクロ遠心機で 4 °C、5 分間、15 krpm 遠心して細胞抽出液を得た。

### (5) 一次元 SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)

厚さ 1 mm の平板 SDS-PAGE を Laemmli の方法にしたがって調製、泳動した<sup>2)</sup>。ゲルの濃度は 7.5 % であった。サンプルは 5  $\mu$ g タンパクに相当する細胞抽出液を用いた。

タンパクの標識をみる場合、泳動終了後、増感剤処理を行い、X線フィルムに密着感光させ、オートラジオグラフィ像を得た。

### (6) 銀染色

電気泳動を終えた平板ゲルは、大塚らの方法により銀染色を行なった<sup>3)</sup>。

## 4. 実験結果

先ず最初に UVB 領域の紫外線の影響を詳細に検討するために必要な紫外線曝露装置の設計・製作を行なった。光源には 300 W のキセノンランプを用い、その光を焦点距離 100 mm、波長範囲 200-400 nm の分光器によって分光させ、必要な波長の紫外線を  $\phi$ 35 mm のビームとして取り出せる構造とした。光は半値巾が  $\pm$ 5 nm の単色光として取り出されるので、波長は 10 nm 間隔

図 1

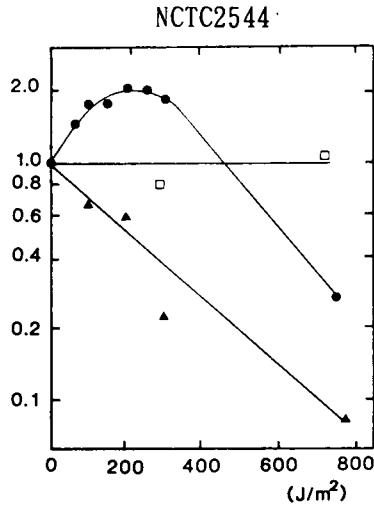
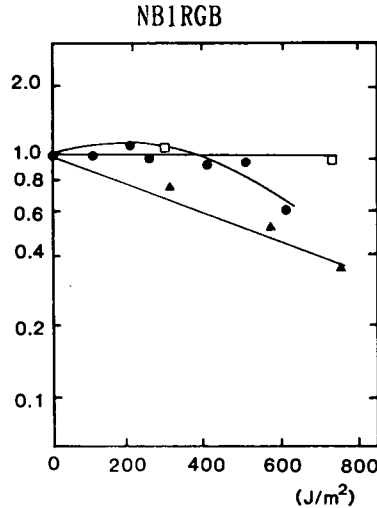


図 2



で設定可能で、ビームの中での光の均一性は  $\pm 20\%$  以内に抑えた。光源から 2 つの光路によって光を取り出し異なる波長の紫外線を 2 枚の 35 mm 培養皿上の細胞に照射できるようにした。

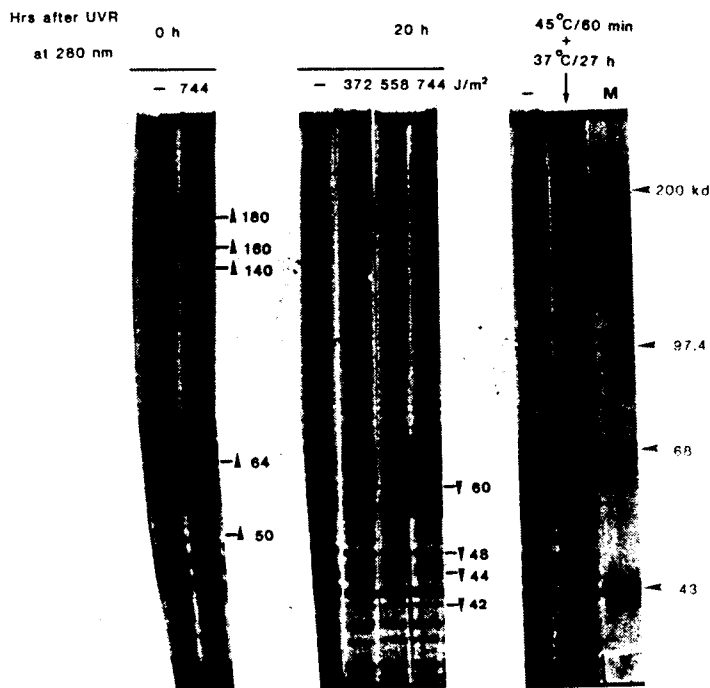
まず表 2 に示す細胞に紫外線を照射して、その生存率やタンパクの回収、増殖能力などを検討した。また、細胞の由来などを考慮にいられた結果、実験には NCTC

2544 と NB1RGB を主として用いた。

紫外線照射 20 時間培養後のタンパク量を図 1、2 に示した。各々、NCTC 2544 と NB1RGB のデータを示す。紫外線によって死滅した細胞は培養皿から剥離し、細胞を回収する際の洗いで取り除かれるので、タンパク量は生存している細胞数を反映していると考えられる。横軸は紫外線のエネルギー量 (joule(J)/m<sup>2</sup>) であり、縦軸は紫外線照射を行わないときの値を 1 とした時の各線量照射時のタンパク量を対数で示したものである。波長 280 nm (▲) の紫外線では回収されるタンパクは直線的に減少するが、300 nm (●) ではほぼ 400 J/m<sup>2</sup> を越えないとタンパクの減少はみられず、NCTC 2544 の場

図 3

NB1RGB



合はむしろ 400 J/m<sup>2</sup> 以下ではタンパクが多く回収されている。320 nm (□) の照射はタンパク量に何の変化も及ぼさなかった。このことは、紫外線というものはその波長によって性質が大きく異なり、便宜上 UVB とまとめられていても生命に及ぼす効果は、波長ごとに検討する必要があることを示している。

データとしてはここに示さないが NCTC 2544 に 280、300、320 nm の各波長で 200、480、720 J/m<sup>2</sup> の照射を行った直後、及び 20 時間後に細胞から調製したタンパクを一次元電気泳動で比

較した。図1では NCTC 2544 はNB1RGB に比べて紫外線照射に対しタンパク量が大きく変化しているが電気泳動的には、ほとんど特定のタンパクの変化というものは認められなかった。NCTC 2544 に紫外線を照射した場合、生存率が低いとことと考え合わせると、多少なりとも損傷を蒙った場合は培養皿から剥離し細胞として回収されないことによるのかもしれない。

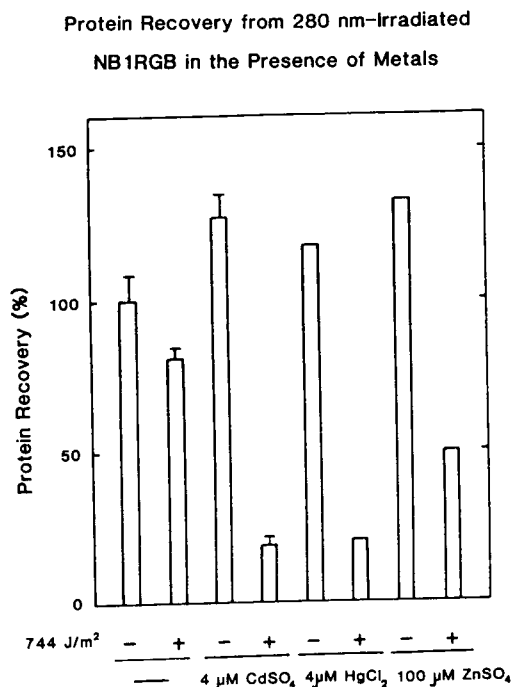
図3は 280 nm の照射を NB1RGB に行った時の結果をしめしている。各サンプルは電気泳動の直前に SDSと dithiothreitol 共存下に 100 °C、5 分間の処理を行った。左側のレーンは 744 J/m<sup>2</sup> の照射を行った直後のタンパクの変化を調べたものであるが、180、160、140、64、50 kd と比較的大きい分子量のものが照射によって現れているのがみられる。中央のレーンは、照射量を変えた場合の 20 時間後に見られるタンパクの変化を示している。照射直後に現れた大きなタンパクは消えている。また 60、48、44 kd の各バンドと、42 kd 以下のバンドが照射量の増加に反比例するように減少してくるのが観察される。右側のレーンは NB1RGB を高温にさらしたときの結果であるが、紫外線照射による変化とは異なることが判る。

図4は各々 4 μM CdSO<sub>4</sub>, 4 μM HgCl<sub>2</sub>, 100 μM ZnSO<sub>4</sub> の存在下に NB1RGB のプレラベルを行なった後、280 nm、744 J/m<sup>2</sup> の紫外線照射を行い、その直後の細胞タンパクの回収量を、処理を行わなかった培養皿からのタンパク量を 100 % として示している。単一の有害因子に曝露された場合、即ち、紫外線照射のみや重金属のみの場合、タンパクの回収は無処理の細胞と差はあまりないが、重金属に曝した細胞に紫外線を当てると、細胞は著しく損傷される。この事実は紫外線の毒性が重金属との複合曝露により著しく増幅されることを示している。

図5は図4の実験で得た細胞上清を SDS-7.5 % PAGE で分析したものである。各レーンは 11 μg のタンパクを含む抽出液を泳動した。重金属と紫外線の複合曝露を行った場合、特異的なタンパクとして 70 kd と 53 kd バンド (△) の出現が認められた。同じサンプルを SDS-15 % PA

図4

図5



Pre-labeled Proteins in 280 nm-Irradiated NB1RGB in the Presence of Metals

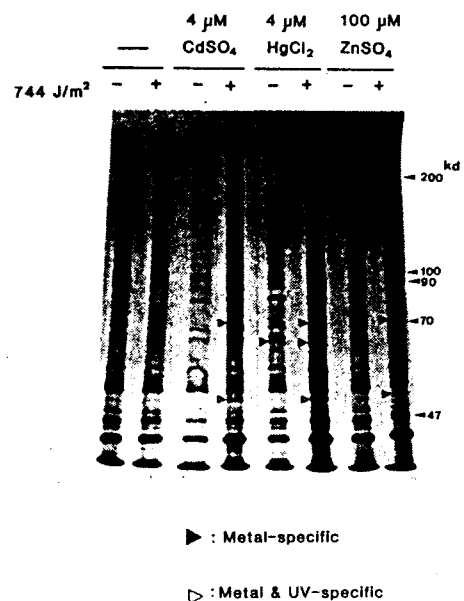
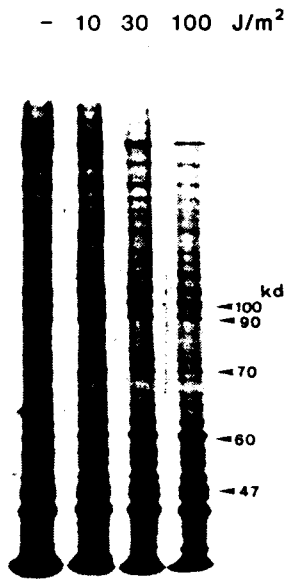


図 6

Protein Synthesis in  
280 nm-Irradiated NB1RGB



GE で分析した場合、紫外線と、カドミウムまたは水銀の複合曝露において、特異的な 32 kd のバンドが検出された。

次に NB1RGB を用いてポストラベルの実験を行った。この条件は紫外線照射後に新たに合成されてくるタンパクのみを検出することになる。総タンパク合成の障害は図 6 に示すように、既存のタンパクへの影響とは違い、30 J/m² というはるかに低い線量で起こっているのが観察される。

5. 考察

紫外線はヒトの生理的なレベルにおいては光アレルギー性等を引き起こすが、その原因や機序に関してはよくわかっていない。本研究は UVB の照射を受けた細胞の中で、光アレルギーの原因（抗原）となり得る可能性のある新しいタンパクの形成をしらべ、紫外線の質と量とどの様な関係があるか検討した。これまでの研究から明らか

かになった種々の波長・エネルギー量の UVB 領域紫外線による細胞タンパクの変化を表 3 にまとめた。このうち既存タンパクの変化には光アレルギー性の直接の原因、即ち抗原生成が含まれると考えられる。NCTC 2544 のタンパク量は紫外線照射により大きく変動したが（図 1）、生き残った細胞中のタンパクは大きな変化を示さなかった（表 3）。これは損傷を受けた NCTC 2544 が速やかに培養皿から剥離し、正常な細胞だけが回収されるためであろう。紫外線照射後も簡単に培養皿から剥離しない NB1RGB を用いた実験では、便宜上、UVB とまとめて扱われている波長範囲も、詳しく調べてみると表 3 のように、最短波長側の 280 nm でのみ細胞タンパクの変化がみ

られ、光感作アレルギーやその他の細胞傷害を引き起こす危険度の高い紫外線はこの波長のものであると考えられる。筑波における観測<sup>4)</sup>では太陽からの UVB に占める 300 nm 以下の成分は 3% である。夏の快晴の日の正午前後の UVB 照射量は現在のところ 3 KJ/m²/10 min であるから、300 nm 以下の照射量は 90 J/m²/10 min となる。280 nm 付近の光線はそ

紫外線照射による細胞タンパクの変化

波長	254 nm	280 nm	300 nm	320 nm			
線量	40 J/m²	144 J/m²	144 J/m²	144 J/m²			
照射後の培養時間	20 h	0 h	20 h	0 h	20 h	0 h	20 h
NCTC 2544 (ヒト皮膚 上皮細胞)	70 kd ↑ 88 kd ↑ 58 kd ↑ (2B) 48 kd ↓ (2B)	-	-	-	-	-	-
<sup>35</sup> S-Methionine	ND	50 kd ↓ (400 J/m²)	-	50 kd ↓ (400 J/m²)	-	ND	ND
NB1RGB (正常ヒト皮膚 基底芽細胞)	ND	100 kd ↑ 100 kd ↑ 140 kd ↑ 54 kd ↑ 50 kd ↑ 47 kd ↑ (2B) 32 kd ↑ (2B)	60 kd ↓ 48 kd ↓ 44 kd ↓ 42 kd ↓	-	-	-	-
<sup>35</sup> S-Methionine	ND	70 kd ↑ (out) 53 kd ↑ (out) 38 kd ↑ (out)	100 kd ↓ 90 kd ↓ 70 kd ↓ 47 kd ↓	-	-	ND	ND

れよりかなり少ないとしても、図6の実験で用いた照射量を達成することは困難な事ではないと考えられる。今後オゾン層の減少により地上のUVBが増加するようになれば、より少ない時間でタンパクに変異が起こる可能性が高くなると予想される。この短波長のUVBはオゾン層の減少により地表に達する量の増加率が大きいとされ<sup>4)</sup>、今後ますます注意を払う必要があるであろう。照射直後にだけみられる特定のサイズのタンパクの増加は新たなタンパク合成によるものとは考えにくく、紫外線によって既存のタンパクが何らかの修飾を受けた結果、今までとは異なる移動度を持つようになったと考えられる。このような紫外線照射によって形成される、タンパク合成を伴わない新しいタンパクというものは、細胞が生きていれば大部分細胞内で変性タンパクとして分解されるであろうが、細胞から漏れてたり、細胞の死により体内に放出されるようなことになると、免疫系を刺激して抗原として作用することになると考えられる。

ところで、皮膚は身体を外界から単に隔離保護する容器の役目をはたしている静的なものではなく、生命の保持に不可欠の機能を営む重要な臓器である。皮膚には身体内部から血流等を介して様々な生理的に活性のある物質が運ばれて来るが、また皮膚表面からも日焼け止めや化粧品その他の物質が浸透して来る。皮膚細胞が種々の物質の影響下にある状態で紫外線を浴びると、どのような変化が起こるかは全く判っていない。そのような場合の一つのモデルとして、環境汚染物質として知られているカドミウムや水銀、化粧品などに使用されている亜鉛などの重金属が細胞内に存在するとき、どのような影響を与えるか<sup>5)</sup> <sup>35</sup>S-Methionineにより細胞内タンパクを標識して調べた。

単独では毒性をほとんど示さないような低い濃度の重金属に曝した細胞に、これもまた単独では細胞を余り傷つけない条件の紫外線を照射すると、単純な加算的予想を上回る大きな損傷を細胞に与えた(図4)。このことは生体に対する紫外線の影響を考慮する場合、紫外線の波長やエネルギーだけが問題となるだけではなく、紫外線を浴びる側の生理的な状態が極めて重要であることを示している。健康状態の良好な時と、何らかの理由で抵抗力が低下している時とでは、紫外線の影響が全く異なる可能性もあると思われる。重金属と紫外線の両方に曝露された細胞内タンパクを電気泳動で分析すると、特異的なタンパクの変化が明らかに認められた(図5)。

本研究は主に非誘導性のタンパクの変化を追ってきたが、図6は紫外線照射後20時間標識(ポストラベル)により誘導性のタンパク調べた結果である。総タンパク合成は、既存のタンパクへの影響とは違い30 J/m<sup>2</sup>というはるかに低い線量で起こっているのが観察される。鍍印は既知のストレス(熱ショック)・タンパクのサイズを示しているが、これらのバンドは総タンパク合成が紫外線の照射量に従って低下してゆく状況でも、比較的合成が維持されているバンドに含まれている。ストレス・タンパクは、変性タンパクによって誘導され、その生理的役割は変性タンパクを再び未変性タンパクに戻すこととされている<sup>5)</sup>。低エネルギー量の紫外線照射によるストレス・タンパクの合成維持は、紫外線に対する生体防御機能の発現を示すものと考えられる。

## 6. 本研究によって得られた成果

通例、UVBはまとめて扱われているが、表3の既存のタンパクの変化で見られる様に、オゾン層の減少により地表に達する量の増加率が多いと言われる短波長のUVBほど多様なタンパク変化を引き起こす傾向が観察された。重金属に細胞が曝されると紫外線に対する感受性が著しく高められた。このことは生体に対する紫外線の影響を考慮する場合、紫外線の波長やエネルギーだけ



が問題となるだけではなく、共存する因子を考慮することが極めて重要であることを示している。

## 7. 引用文献

- 1) M. R. Schoeberl and D. L. Hartmann (1991) *Science* 251, 46-52
- 2) U. K. Leamli (1970) *Nature* 227, 680-685
- 3) F. Otsuka, S. Koizumi, M. Kimura and M. Ohsawa (1988) *Anal. Biochem.* 168, 184-192
- 4) T. Ito, T. Ueno, R. Kajihara, M. Shitamichi, T. Uekubo, M. Ito and M. Kobayashi (1991) *J. Meteorolog. Res.* (気象庁研究時報) 43 213-273
- 5) R. I. Morimoto, A. Tissieres and C. Georgopoulos eds, (1990) in *Stress Proteins in Biology and Medicine*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.

## 研究発表の状況

1. Hiroto Yamada and Shinji Koizumi  
"Induction of a 70-kDa protein in human lymphocytes exposed to inorganic heavy metals and toxic organic compounds" (1993) *Toxicology* 79, 131-138
2. Hiroto Yamada, Kaoru Suzuki and Shinji Koizumi  
"Effect of UVB on cellular proteins" *Ind. Health*, manuscript in preparation
3. Hiroto Yamada, Kaoru Suzuki and Shinji Koizumi  
"Inhibition of Metallothionein synthesis by UVB irradiation" *J. Biol. Chem.* manuscript in preparation
4. 山田博朋、鈴木薫、小泉信滋  
「B領域紫外線によるヒト皮膚由来細胞でのメタロチオネイン誘導の阻害」  
日本薬学会第114年会にて発表
5. 山田博朋、鈴木薫、小泉信滋  
「UVBによる細胞障害」  
第67回日本生化学会大会発表予定