

A-4 紫外線の増加がヒト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低下の評価とそれに基づく感染症の疾病構造変化の予測に関する研究

研究代表者 国立予防衛生研究所 ウイルスI部 山本紀一

厚生省国立予防衛生研究所	ウイルスI部	山本 紀一
	獣医科学部	浅野 敏彦
	ウイルス製剤部	小長谷昌功
	生物活性部	鈴木 和男

研究協力機関	千葉大学医学部第一微生物学教室	白澤 浩
	日本医科大学微生物・免疫学教室	渡理 英二

研究委託機関	九州大学医学部皮膚科学教室	堀 嘉昭、安元慎一郎
--------	---------------	------------

平成5年—平成7年度合計予算額 26、891千円
(平成7年度予算額 8、853千円)

[要旨]

この3年間に免疫及び感染症の分野における紫外線の生物作用について以下のことが明らかになった。紫外線の生物作用は単に照射を受けた皮膚でのみ起こる現象ではなく、全身に影響が及ぶことがこの分野の特徴であるが、その背景には照射を受けた皮膚から、然るべき器官に情報を伝える何らかのメディエーターが放出されると考えられている。我々の研究でも炎症性のサイトカインが発現・誘導されその後の生体に大きな生理変化をもたらすことが判った。

また個体レベルにおける紫外線の影響には、up-regulation と down-regulation の両作用があり、調べるパラメーターに何を選ぶかでどちらの結果が得られるかが異なってくる。また、ウイルス感染のような状態が、照射の前に起こっているかそれとも照射の後で感染が成立するかでも得られる結果が左右されるらしいことも判ってきた。

これらの免疫系の研究と平行して In vitro での生物活性を、ウイルス感染に及ぼす影響について調べてきたがその結果、UV-B 照射された宿主細胞内での、不活化ウイルスの再活性化や遺伝子（プロモーター）の活性化が確認された。細胞レベルからも UV-B の重要性が示唆されてきている。

[キーワード] サイトカイン、急性期応答、液性免疫、ウイルス感染、遺伝子活性化

[序]

成層圏のオゾン層破壊に伴い、有害な紫外線（UV-B）の地上への照射量が増加すると予測されており、人類の将来に深刻な影響が懸念されている。特に免疫機能への影響（免疫毒性）は、皮膚がんを引き起こすよりはるかに少ない照射量で影響が出る、とも云われている。免疫機能低下は感染症拡大のリスクファクターとしての意味を持ちその実態解明は急を要する課題となってきた。免疫系に及ぼす影響についての研究は高度に専門レベルの研究が蓄積してきているが、実際の感染症との結びつき、という点では得られた情報が実際の感染症に必ずしも還元されてこなかった。このプロジェクト研究においては感染症を念頭におき、より直接的な免疫機能への影響を調べることを目的とする。感染症はこの10数年で大きく様変わりしたが、紫外線の増加によってその疾病構造の変化が更に加速される可能性が考えられる。

紫外線の免疫毒性と平行して病原微生物に対する紫外線の直接作用も見逃せない。紫外線の総合的な生物作用を理解するには、宿主に共存しているウイルス遺伝子に与える直接的影響や照射の傷害から逃れるための細胞の修復機構の活性化がウイルスの増殖性に与える影響等の細胞レベルでの研究も欠かせない。

(A) 細胞レベルでのウイルス感染系に及ぼす UV-B の影響

(1) 紫外線 (UV-B) 不活化ヘルペスウイルス (HSV) の UV-B 前処理細胞における再活性化

[要約] 中波長の UV-B によっても HSV の再活性化が起こることが判った。最大活性化は $3\text{mJ}/\text{cm}^2$ という低い線量のところにある。

[目的] 紫外線不活化した DNA 型バクテリオファージが UV 前処理細胞で再活性化する現象は Weigle reaction として古くから知られ、HSV 等の動物ウイルスでも確認されているが、全て短波長の UV-C を用いた研究であった¹⁾。我々は地球環境で問題になっている UV-B によっても同様の現象がみられるかについて、これまで検討を重ねてきたが今回 Assay 法を改良し UV-B による再活性化を検討した。

[材料と方法] 細胞はメラノーマ由来の HMV-I で、35mm ペトリ皿に播き一晚培養し翌日 UV-B を（東芝 FL20S・E）照射した。照射後 12 時間以上（通常は一晚置いて）UV で不活化した HSV（1 型）を感染させ、メチルセルロースを含む培地で重層しブラック法で判定した。ウイルスの不活化は UV-B ランプから約 15cm の距離で約 10 分間照射し 3 log 以上の感染化価の低下を確認して使用した。

[結果] 宿主細胞への UV-B 照射で、未処理 HSV はそのブラック数を減ずるが、UV-B で予め不活化した HSV では照射に伴いその数は 3 倍近くに増加した(表1)。活性化は 15 sec ($1.5\text{mJ}/\text{cm}^2$) と云う低い線量から認められ その最大再活性は 30sec ($3\text{mJ}/\text{cm}^2$) のところに在った。1 型のみでなく 2 型でもほぼ同様の傾向を示した（表省略）。成績は省略するが

細胞とウイルスの不活化を UV-B と UV-C の交叉した組合せでも、ほぼ似たような結果であった。

[考察] この線量は増殖期の細胞に毒性があるものの resting cell には致死作用がないことから細胞の修復に関連していることが推測された。自然界では実験に使ったような UV-B 不活化ウイルスが普遍的に存在する訳ではないが、薬剤や環境汚染物質等による損傷ウイルスが UV-B により再活性化される可能性は充分考えられる。特に再活性の至適線量が $3\text{mJ}/\text{cm}^2$ という低い dose にあったことは、今後太陽紫外線中の UV-B の増加を考えたとき重要な問題となる可能性がある。

(Table 1)

Reactivation of UV-inactivated HSV* on UV preirradiated cells

Viral sample	Irradiation time (sec)**				
	0	15	30	60	90
Unirradiated HSV-1	87***	88	86	36	11+ α
UV B-inactivated HSV-1	109	271	310	235	33+ α

* HSV-1 was inactivated by irradiation of UV-B lamp (20W) for 12 min.

** HMV-I cells were irradiated with UV-B lamp at 1 day before HSV-I infection.

*** Plaque number

(2) UV-B によるエイズ原因ウイルス(HIV)のプロモーター(LTR)の活性化

[要約] HIV の LTR は 中波長の UV-B によって活性化されることが示された。活性化は最大約 3.8 倍である。

[目的] HIV の子孫ウイルス産生は LTR の活性化に依存すると考えられている。紫外線はこの活性化因子の一つであるがそのメカニズムは解明されていない。また、その波長域に関しては Steinらのグループは 250nm を中心に290nmまでとし、それ以上の波長域での活性化を確認していない²⁾。ここでは実験系を確立して、通常 UV-B として用いている 314nm の波長による活性化の有無を調べ直すことを目的とした。

[材料と方法] HIV の LTR 活性は LTR の下流にルシフェラーゼの遺伝子をつないだ組

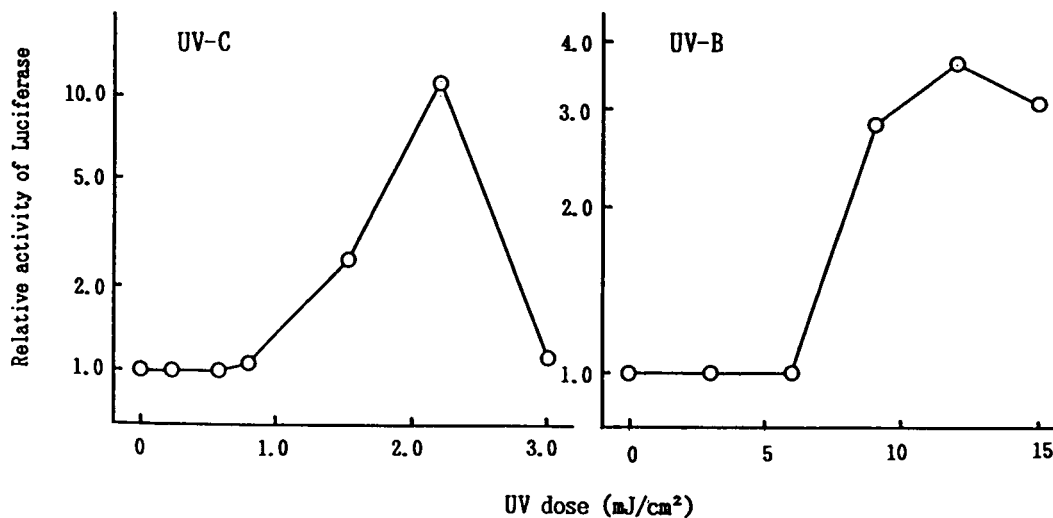
み替えプラスミドを構築して大腸菌に発現させた。大腸菌は大量培養した後、キアゲンカラムを用いて所定の方法にしたがってDNAプラスミドを精製し実験に供した。実験は1晩培養した 10^6 個(35mmペトリ皿)のHeLa細胞に上記プラスミドをリポソーム法で導入し、翌日UV-Bランプを照射した。8時間後の細胞溶解液を基質(ピッカジーン)と混ぜてその蛍光量をルミノメーターで測定し、総タンパク量1,000 ng/mlあたりのルシフェラーゼ活性量からLTRプロモーター活性量を算出した。

[結果] 図1に示した。活性化は紫外線量に応じて上昇し、UV-Cでは $2.2\text{mJ}/\text{cm}^2$ で最大活性が確認されたほか、UV-B領域でも明らかに活性化が認められ、その最大活性化は $12\text{mJ}/\text{cm}^2$ 付近にあった。一方、プラスミドのみをUV前照射して細胞に導入した場合には弱い活性化が認められたが、細胞のみの前照射ではLTRを活性化できなかった。

[考察] 活性化それ自体は大きなものでないが、生体においてはほんの僅かの変化が閾値を越えるとそれまでの制御の枠が外れ大きな変化の引き金になることは少なくない。太陽紫外線に含まれる波長域でHIVの遺伝子が活性化することは医学的にも社会的にも重要で、活性化のメカニズムと共に今後この研究はより進展させる必要がある。

(Figure 1)

Activation of HIV-LTR (promoter gene) by UV irradiation



(B) 紫外線の免疫系に及ぼす影響

(1) UV照射マウスにおける抗体産生の早期立ち上がり現象

[要約] 約 $230\text{mJ}/\text{cm}^2$ のUV-B照射を受けたマウスは抗体産生の立ち上がりが正常マウスに比べて有意に早いことが判った。紫外線による免疫系の活性化はこれまで報告をみない非常に興味ある現象である。

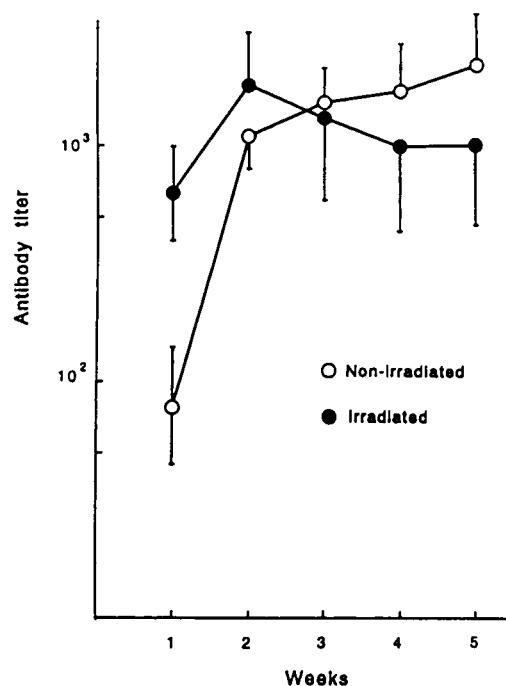
〔目的〕 UVの免疫系に及ぼす影響はこれまで免疫毒性として位置付けられ多くの免疫機能障害が報告されている。しかし、免疫ネットワークとくにサイトカインネットワークは相互に関連し合っテホメオスタシスを維持しており一部機能の抑制の裏に up-reguration (広義の活性化) が動いている可能性が少なくない。事実これまで調べた液性免疫 (ワクチン免疫による抗体産生) に於いては UV-B 照射は何らの影響を及ぼさないばかりか、むしろ抗体産生が高い傾向さえ示した³⁾。この点をより詳細に調べる目的で、従来使用していた不活化インフルエンザウイルス自家ワクチンに代えて精製破傷風トキソイドを用いた ELISA 法を導入した。

〔材料と方法〕 マウスの紫外線照射は既に記載した方法に準じて行った。簡単には、ddy ♀ 8週マウスの背部を電気バリカンと除毛クリームで除毛し、1晩置いて UV-B (東芝 FL20S・E) を無拘束で照射した。精製破傷風トキソイドを 5 Lf 単位 (約 1.92 μ g 相当) を、原則として UV 照射 (230 mJ/cm²) の翌日照射部位の皮下に接種し、経時的に採血して ELISA 抗体価を測定した。ELISA は 1.7 Lf (約 0.16 μ g)/well で 1 晩コーティングした Dynatech ELISA プレートで型通り行い、0.15 のカットオフ値を示す血清の希釈倍数をグラフから計算し、プレート毎のバラツキを最終的に標準血清の ELISA 値をそろえることで補正した。

〔結果〕 ①トキソイド免疫 1 週後と云う抗体産生の未熟な早い段階で、照射群は高い抗体価を示す。その後②照射マウスの抗体価は 2 週で対象とほぼ同等価を示し (換言すれば対象の抗体産生が追いついて) その後はむしろ照射群の方が低い傾向を示した (図 2)。③立ち上がりの本体は IgM ではなく IgG 抗体である。④線量は 58mJ/cm²、15 分照射で有意差

(Figure 2)

Antibody response of UV irradiated mice to Tetanus toxoid



がみられる。⑤照射部位と接種部位の関係は UV 照射部位の皮下又は皮内で 影響が出るほか尾静脈内接種（非照射部位）でも対象に較べ有意に高い（表 2）。⑥照射と接種の時間的關係は、前日照射、同日（同時）照射が有効である他ワクチン免疫を先行させ翌日照射した場合にも弱いながら活性化がみられた。

[考察] 免疫後期の抗体価が照射群で低い傾向にあることは、不活化インフルエンザウイルスを用いた同様の実験でも示されており³⁾ 紫外線照射による一種の免疫抑制と見ることもできる。表 2 で示したように照射部位の皮内接種においても対象より有意の抗体産生を示すことは皮内のランゲルハンス細胞の照射による動向との関連で今後の検討課題である。B 細胞が抗体を産生する迄には B 細胞の活性化、増殖、分化の 3 段階を経る必要がある。今回見つかった早期の抗体産生の現象はどの段階の刺激が働いているのか、Th2 ヘルパー T 細胞活性化との関連も含めて検討する必要がある。

(Table 2)

Effect of various injection route on antibody response of UV-irradiated mice

Injection Route	Injection route (UV was irradiated from Dorsal skin)	Antibody (ELISA) titer *	Activation
Sub-cutaneous	same	1831 (1115-3007)	7.74
Intra-cutaneous	same	1143 (849-1540)	4.65
Sub-cutaneous	different (inguinal)	352 (198-626)	1.43
Intra-peritoneal	different	472 (280-798)	1.92
Intra-venous	different	1017 (518-1997)	4.13
Sub-cutaneous	same but no-irradiation	246 (191-316)	1.00

* 1 week after irradiation () 95% Confidential limit

(2) UV照射による炎症性サイトカイン IL-6 の発現誘導と血中シアル酸の上昇との
相関関係

[要約] マウスに UV-B を照射すると照射部位の皮膚に IL-6 と IL- β の mRNA が発現される。共にサイトカインタンパクに翻訳されるが血中には IL-6 だけが放出されてくる。この出現に合わせて血中のシアル酸が上昇してくる。

[目的] 我々は先に UV 照射を受けたマウスの血中シアル酸が上昇することを報告した⁴⁾が、血中シアル酸は急性期応答のマーカーであるところから⁵⁾シアル酸の動態に炎症性サイトカインの関与が考えられたので、UV-B照射によるサイトカインの発現・誘導をシアル酸上昇との関連において調べた。

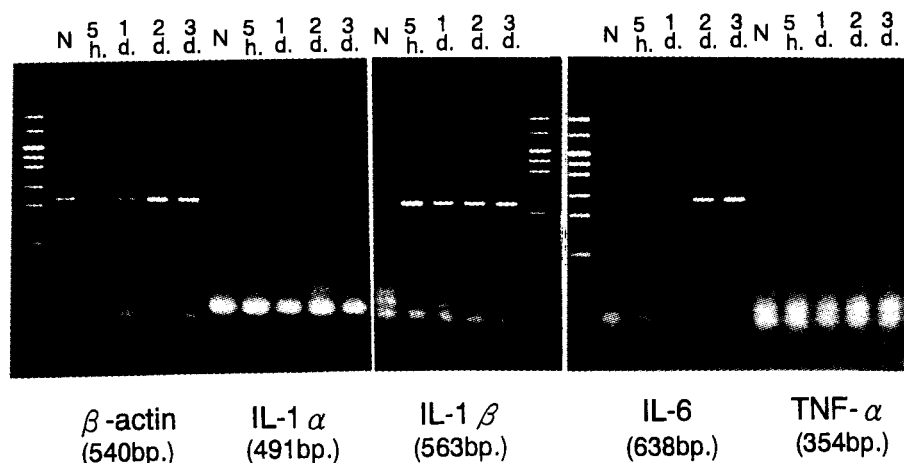
[材料と方法] 除毛したマウスの背部に UV-B ランプで 230 mJ/cm² 相当量を照射した。照射マウス皮膚からアイソジェンにより RNA を抽出し、逆転写酵素を用いた RT-PCR 法によりサイトカイン (IL-1 α 及び β , TNF α , IL-6) の mRNA を検索した。また同一サンプル中の 10%皮膚乳剤、または血中のサイトカイン量を ELISA により測定した。シアル酸は市販のキットを用いて測定した。

[結果] 未照射の背部皮膚はいずれのサイトカインの mRNA も発現していなかったが (図 3 N)、照射によって IL- β は照射 5 時間後という早い段階から、また IL-6 はそれよりやや遅れて 2 日目から mRNA の強い発現がみられた。しかし IL-1 α 及び TNF α は実験期間の 3 日間を通じて発現は見られなかった (図 3)。

発現の強く見られた IL- β と IL-6 について 10 %皮膚乳剤中のサイトカイン量を測定した (表 3)。照射の翌日は両サイトカイン共に低いタンパク量でしかなかったが 2 日目に上昇し、特に IL-6 は高い値を示した。このことは先の mRNA の発現量を良く反映している。

(Figure 3)

Detection of cytokine m-RNA in dorsal skin of UV irradiated mouse.



(Table 3)

Cytokine production at UV irradiated region of dorsal skin

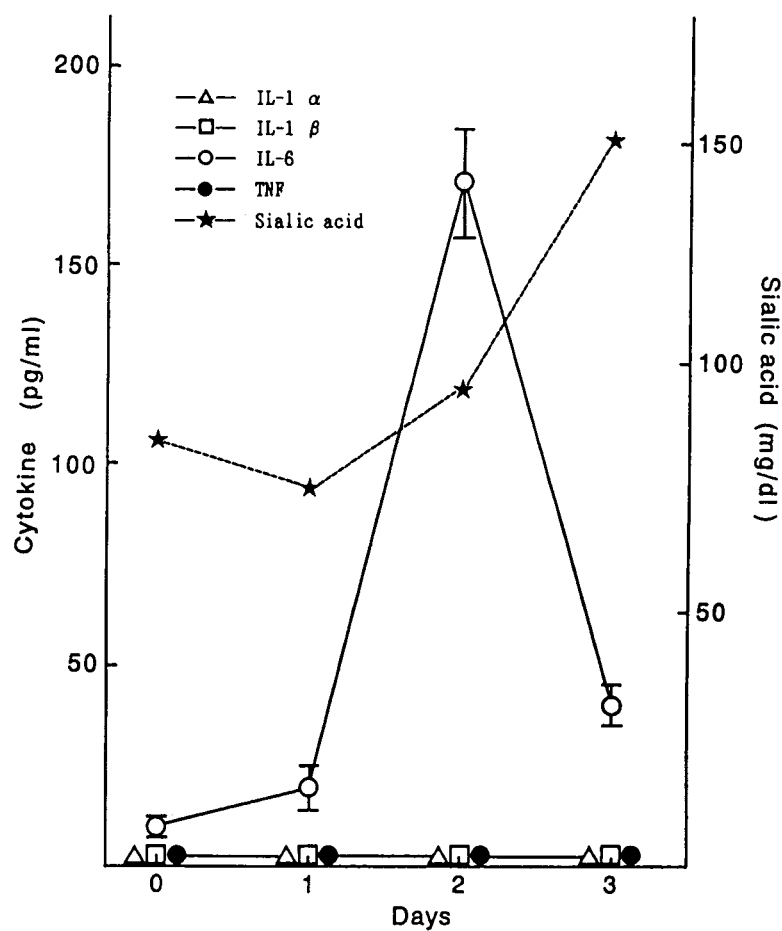
Sample*	IL-1 β	IL-6
Normal	0**	0
UV 1 day	8	24
UV 2 day	53	712

* 10% homogenate of skin

** pg/ml

(Figure 4)

Cytokine release into and sialic acid increase in mice blood after UV irradiation.



更にこの In situ のサイトカインタンパクの産生量を反映して、血中サイトカイン量の変動が見られた。IL-6 は照射の翌日までは殆ど検出されなかったが、2日目にいきなり高い濃度で検出された。しかし3日目には速やかに低下した。一方 mRNA の発現が見られなかった IL- α と TNF α は勿論のこと、強い発現及び In situ でのタンパク産生の見られた IL-1 β のいずれもが血中には検出されなかった。血中のシアル酸量は IL-6 の出現に続く形で2日目より立ち上がりはじめ、3日目にピークに達した(図4)。照射2日目の血清について、照射量と IL-6 の血中濃度を調べたところ血中 IL-6 は照射線量依存的に上昇し照射との相関性が裏付けられた(図省略)。

[考察] IL-6 は肝細胞に作用して急性期タンパクの誘導を促すとの報告がある⁶⁾。今回我々の実験でもシアル酸の上昇に先立って血中への出現を確認したことは、マウスのUV照射による血中シアル酸の上昇には IL-6 が関与していることを強く示唆している。またこの実験から血中の IL-6 は IL-1 α や TNF α といった他の炎症性サイトカインを介して二次的に IL-6 が誘導されるのではなく、照射を受けて発現した IL-6 mRNA から直接産生されたサイトカインタンパクが血流に流れでたものと考えられた。IL-6 はこの他にB細胞の分化・活性化にも深く関わっており、前述の液性免疫の早期立ち上がり現象との関連で興味もたれる。

(C) 個体レベルでの感染症に及ぼすUV-Bの影響

(1) 単純ヘルペスウイルス(HSV)の感染(マウス)におけるサイトカインの変動

[要約] HSV 誘導性の IFN- γ はUV照射によって大幅に低下しその影響は脾臓よりもリンパ節に強く現れた。同様の傾向は IL-2 でも見られたが IL-4 はむしろ照射によって高まる傾向を示した。

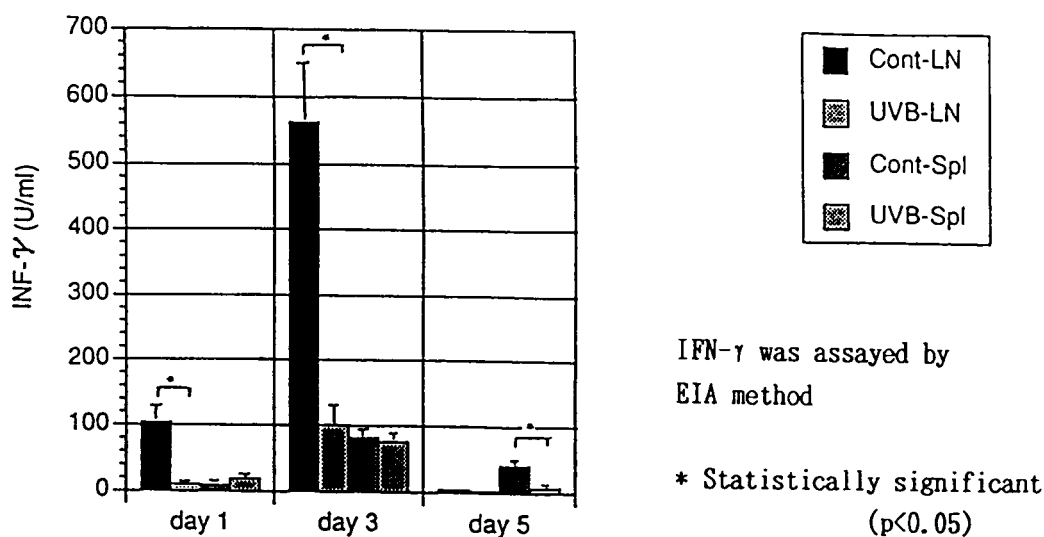
[目的] これまでに紫外線照射が宿主の抗原提示能や HSV に対するリンパ球感作を抑制すること、またそのことが帯状皮疹形成と密接に関連あることを示してきた^{7) 8) 9)}。一方、HSV 感染によって宿主細胞は種々のサイトカインを産生するが、そのサイトカインが HSV の感染成立及び発病病理と深い関連を持つと予測されている¹⁰⁾。HSV 感染によって誘導されるサイトカインのうち、リンパ球の分化・増殖に関与するとされる IFN γ , IL-2 および IL-4 についてUV照射の影響を調べた。

[材料と方法] UV照射(120 mJ/cm²) 2日目に HSV 5x10⁴ PFU を照射部位の皮内に接種し8日後にリンパ節(LN)および脾臓細胞(Spl)を取出し、UV不活化HSVと共に培養した。培養上清について IFN- γ は ELISA 法によって、またIL-2/IL-4 活性を CTLL-2 細胞の増殖性(³Hチミジンの取込)で調べた。

[結果] IFN γ 産生量は、培養1日照射マウスのLNにおいて対象に較べて大幅に低下していたが3日目でその差は更に拡大した(図5)。これに対して Spl の産生する IFN γ 量は培養1、3日共対象と差は無くむしろLN産生が低下する5日目で有意の差を示した。一方、HSV感染に伴う IL-2/IL-4 の産生はLNに於いては全ての培養サンプルで照射の影

(Figure 5)

Activity of IFN- γ in the supernatant from cultures of HSV-stimulated immune lymphocytes.



(Table 4)

IL-2 and IL-4 activity in the supernatant from culture of HSV-immune cells

		[³ H] thymidine uptake by CTLL-2 cells (x10 ³ cpm) in					
		Lymph Node			Spleen		
Cytokine Source	UV	Culture day 1	3	5	1	3	5
Control	-	1.7	2.4	1.8	1.8	2.1	1.4
	+	2.1	2.1	1.9	1.9	2.3	2.3
Supernatant (1:2 dilution)	-	97.1	133.9	88.7	69.8	117.6	122.7
	+	36.3*	108.5	14.2*	53.1	110.8	46.4*

* Statistically significant (P<0.05) by Student's t-test compared to that of non-irradiated control

響を明瞭に受けること示されたが（表4、表中*）特に培養1、5日に於いて低下が顕著であった。脾臓細胞では LN 細胞に較べその低下は弱いもののやはり1、5日に有意な抑制がみられた。抗 IL-2 抗体を用いた予備的な実験から、この低下は主に IL-2 によるものであり、IL-4 は殆ど影響を受けないかむしろ相対的に照射によって増加する傾向を示すことが判った。

〔考察〕 調べたいずれものサイトカインも脾臓よりも局所のリンパ節において照射の影響をより強く受けることが示された。これらの HSV 感染マウス由来免疫細胞のサイトカイン産生パターンが IFN γ 及び IL-2 の抑制型であったことは Th1 ヘルパー T 細胞の抑制を意味している。ヘルペス感染における感染病巣から HSV の排除には Th1 T 細胞に依存した遅延型アレルギーの細胞性免疫が大きく関与するといわれ¹¹⁾、紫外線照射により恐らくは Th-1 T 細胞の抑制を介して、ヘルペス再活性化や皮膚病変の悪化にサイトカインの動態が関連していることを強く示唆するものである¹²⁾。

（2）マウスの日本脳炎ウイルス（J E V）感染における UV 照射の影響

〔要約〕 UV を前照射したマウスは J E V の末梢感染に対し抵抗性を示した。

〔目的〕 個体の感染実験ではこれまで H S V を用いて研究してきたが、得られた結果が一般的なものか否か他のウイルスについても検討する必要がある。この実験には経皮感染が可能なウイルスが必要であるが、J E V はこの目的に充分なものである。

〔材料と方法〕 3週令の若い ddy マウスを型通り除毛し 180 mJ/cm² の UV-B を照射した。ウイルス JEV JaGAR 株約 1.5 LD/50 を照射部位の皮下に接種し 2週間観察した。

〔結果〕 ウイルス接種と同時または感染翌日に UV 照射した場合は死亡率で対象と差は無かった。しかし、感染の前日に前照射した場合は死亡率 0% で対象の死亡率 4/6 (66.7%) と有意の差を示した（表5）。

(Table 5)

Resistance in UV B-irradiated mice to JEV infection

UV irradiation time from JEV infection	Number of death	Mortality (%)
1 day before	0/5	0
Same	2/5	40
1 day after	3/5	60
None (Control)	4/6	66.7

[考察] UVの免疫低下を述べた多くの報告や、HSVを用いた我々のこれまでの成績から予想された、個体の紫外線照射の影響は「病状悪化または死亡率の増大」と云うストーリーとは完全に正反対の結果になった。ウイルスの種類によっては紫外線は Up-Regulation に働く場合のある例が示された。実験は何度か行ったが、実験によって同時照射や後照射でも対象と有意差を示す場合があり、微妙なタイミングが関与していることを窺わせた。本報告の(B)で述べたような体液性免疫機構の一過性の活性化が働いている可能性も考えられ、この現象の免疫的背景を追求する必要がある。

[まとめ]

紫外線の免疫性細胞に与える影響は、サイトカイン産生のパターンから Th1 ヘルパー T細胞に抑制的に、また Th2 細胞には賦活的に作用した。Th1 系統のサイトカインの抑制は最終的に遅延型アレルギー (DTH) の低下を招くものと考えられる。ヘルペスウイルスの感染病理に於いては DTH が宿主体内での不顕性化に深く拘っているとされ、その中心となるサイトカインのUV照射による低下は、紫外線暴露によりヘルペス再活性化や皮膚病変の悪化する事実とサイトカイン動態も関連していることを示唆している。

一方、液性免疫においては照射の影響は抗体産生の早期立ち上がり現象として見られた。抗体産生に拘るB細胞が Th2 依存性であることを考えると前記のサイトカインの産生パターン (Th2活性化) と良く符合する。

皮膚細胞もまたサイトカイン産生の主要な組織であるが、こちらのほうは照射により炎症にかかわるネットワークを形成し、その中心は IL-6 であることが明らかになった。皮膚で産生された IL-6 は流血を介して肝に作用し、急性期応答としての血中シアル酸の増加を促した。

紫外線の作用を In vitro で見た場合、従来報告に見られるような短波長 (UV-C) のみならず中波長の UV-B にも、ウイルス遺伝子 (エイズの原因ウイルスである HIV のプロモーター) の活性化や不活化ヘルペスウイルスの再活性化が確認された。

[研究発表]

K. Yamamoto, Takano K. and Yamamoto M. Increase of plasma sialic acid upon UV irradiated mice. Biol. Pharm. Bull. 18:917-919, 1995.

S. Yasumoto, Mori Y., Koga T., Kawamura I., Mitsuyama M. and Moroi Y. Ultraviolet irradiation alters cytokine production by immune lymphocytes in herpes simplex virus infected mice. J. Dermatol. Sci. 8:218-223, 1994.

K. Yamamoto, Hirota N. and Kohase M. Acute phase response and inflammatory cytokine induction in mice following UV irradiation. (Submitted).

廣田紀子、山本紀一、マウスの液性免疫に及ぼす紫外線の影響—早期の抗体産生賦活化現象について、第16回日本光医学・光生物学会（平成6年7月、伊勢市）（口頭発表）

山本紀一、廣田紀子、小長谷昌功 マウスの紫外線（UV）照射による急性期応答と炎症性サイトカインの誘導について、第17回日本光医学・光生物学会（平成7年7月、大阪）（口頭発表）

[参考文献]

1. Shiomi, T. and Sato, K. Isolation of UV-sensitive variants of human FL cells by a viral suicide method. *Somatic Cell Genetics* 5:193-201, 1979.
2. Stein, B., Rahmsdorf, H.J. et al. UV-induced DNA damage is an intermediate step in UV-induced expression of human immunodeficiency virus type 1, collagenase, c-fos, and metallothionein. *Mol. Cell. Biol.* 9:5169-5181, 1989.
3. 山本紀一他 地球環境研究総合推進費 平成4年度研究成果報告集（I） p 72-75
4. Yamamoto, K., Takano, K. and Yamamoto, M. Increase of plasma sialic acid upon UV-B irradiation in mouse. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 18:917-919, 1995.
5. Winzlar, J.R. "Methods of Biochemical Analysis" Vol. II, ed by Glick D., Interscience Publishers, Inc, New York, 1995, p. 284.
6. Heinrich, P.C., Castell, J.V. and Andus, T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem. J.* 265:621-636, 1990.
7. 山本紀一他 地球環境研究総合推進費 平成3年度研究成果報告集（I） p 64-70
8. Yasumoto, S., Hayashi, Y. and Aurelian, L. Immunity to Herpes Simplex Virus type 2; Suppression of virus-induced immune response in ultraviolet B-irradiated mice. *The Journal of Immunology.* 139: 2788-2793, 1979.
9. Aurelian, L., Yasumoto, S. and Smith, C.C. Antigen-specific immune suppressor factor in Herpes Simplex Virus type 2 infection of UV B irradiated mice. *Journal of Virology* 62:2520-2524, 1988.
10. Sprecher, E. and Becker, Y. Detection of IL-1 γ , TNF- α and IL-6 gene transcription by the polymerase chain reaction in keratinocytes, Langerhans cells and peritoneal exudate cells during infection with herpes simplex virus-1. *Arch. Virol.* 126:253-269, 1992.
11. Howie, S.E.M., Norval, M. and Maingay, J. Exposure to low-dose ultraviolet radiation suppresses delayed-type hypersensitivity to herpes simplex virus in mice. *J. Invest. Dermatol.* 86: 125-128, 1986.
12. Yasumoto, S., Moroi, Y., et al. Ultraviolet-B irradiation alters cytokine production by immune lymphocytes in herpes simplex virus-infected mice. *Journal of Dermatological Science* 8:218-223, 1994.