

A-4 紫外線の増加が人の健康に及ぼす影響に関する疫学的視点を中心とした研究

(6) B 領域紫外線の照射条件による組織障害の差異に関する研究

労働省産業医学総合研究所 健康障害予防研究部 岩田豊人

平成 8～10 年度合計予算額 9、858 千円

(平成 10 年度予算額 3、196 千円)

[要旨] アポトーシスに対応すると考えられる KB 細胞の剥離現象を指標として、B 領域紫外線の照射条件による組織障害の差異を検討した。剥離現象は、紫外線照射後 3-12 時間で完了し、剥離する細胞の割合は、狭い用量範囲において用量依存性が認められた (290 nm において 1.5-6mJ/cm²)。この剥離現象は、B 領域紫外線のなかでも短波長の領域で認められた。剥離をおこした暴露後試料においては、過酸化代謝生成物と考えられるチオバルビツール酸反応物質 (TBA-RS) が培地中に増加していることが観察された。つぎに、290nm 3mJ/cm² において照射強度および照射時間を変化させて剥離現象を観察したところ、かなり弱い強度の 0.6 μW/cm² においても、それより強い線量による暴露との間に照射効果に大きな差はみとめられなかった。また、この条件で、2 秒照射 5 秒休止のパターンを 150 回繰り返したものと 300 秒連続照射をおこなったものとの差は認められなかった。これらのことから、今回検討した範囲の強度においては照射線量の時間的変動は、剥離現象としてとらえた組織障害効果に影響を与えないであろうと考えられた。TBA-RS 分泌の定量、時間的変化の観察、健康への意義、についてはさらに検討が必要である。

[キーワード] UVB, 細胞傷害、酸化ストレス、チオバルビツール酸反応物質(TBA-RS)

1. 序

成層圏のオゾン層破壊によって地表付近に増加する紫外線が人の健康に与える影響を見積もるための研究が進められている。¹⁾ 当研究は、これを細胞生物学的方法によって支援することを目的として行なった。培養細胞について紫外線暴露の効果を観察する方法は、1) 紫外線に影響を受ける素過程を検索し障害の機序をさぐる、2) 生体またはその組織への暴露効果に外挿できるようなモデルを構築する、などの目的に有効であると予想される。当研究でとりあげた第一の課題は、屋外で太陽光線に暴露するような時、組織に照射される紫外線強度が時間的に変化することが多いと考えられるが、このような時に全体として吸収されるエネルギー積算値が同じであっても障害の程度が変わるようなことがあるか、ということであった。第二の課題として、とくに、紫外線によって生ずる酸化ストレスが、遺伝子以外の障害を、照射部位以外においてもひきおこす可能性が考えられることから、紫外線による過酸化代謝生成物の蓄積とその時間経過を検討することを試みた。

2. 研究目的

培養細胞を、強度・時間の異なる様々な照射条件によって紫外線に暴露し、その効果の違いを検討する。照射効果をとくに酸化ストレスの点から評価し、生体が受ける影響を定量・比較するための基礎的な知見を得、照射部位以外の臓器に対する影響がおよぶ可能性を検討する。

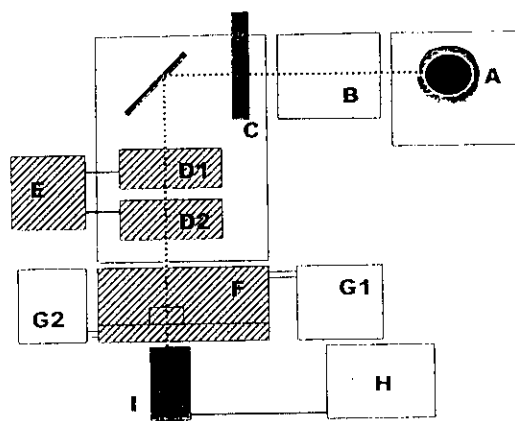
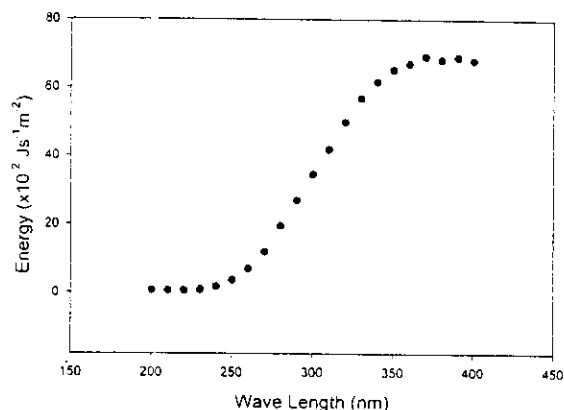


Fig. 1 Diagram of the UV Applicator
 A, Xenon Lamp (Ushio, UXL-300D); B, Monochromator (Soma Kogaku, S-10);
 C, ND Filter; D1, D2 and E, Shutter controlled with computer; H, Dose
 Monitor (UDT Instruments, 370).

Fig. 2 Maximum Output of the UV Applicator



3. 研究方法

(1) 暴露試料の調製 ヒト類上皮がん由来の KB 細胞は、牛胎児血清 10% 含有 MEM 中にて培養し、暴露 2 日前に $\phi 3.5 \text{ mm}$ シャーレに蒔き、ほぼ定常期に達したものを暴露に用いた。暴露直前に二度 Hanks 液で洗浄し、 0.7 ml Hanks 液中にて、シャーレのふたをとったまま、暴露装置にて紫外線を照射した。暴露後、再び培地に置き換えて、 CO_2 インキュベータに移した。一定時間の後に光学顕微鏡による形態の観察、細胞ペレットおよび培養上清について下記の検討を行なった。

(2) 細胞暴露装置 旧株式会社オプトサイエンス社製暴露装置 (第 1 図) は、 $\phi 3.5 \text{ mm}$ シャーレ二枚を独立の条件で一度に照射する装置である。第 2 図は、装置の出力特性である。照射する波長は相馬光学製 S-10 コリメータにて波長分解能 17 nm で選定できる。強度は、線量計 (370, UDT Instruments) を参照しつつ ND フィルタにて調節する。強度の時間的変化は 2% 以内であり、照射野内の強度のばらつきは 7% 以内であった。光路内に電磁シャッターを設定して照射時間を自動的に制御し、一秒まで短時間の開閉をおこなえるようにした。

(3) TBA-RS および蛋白質濃度測定 細胞を培養したシャーレから培地を回収し、これを 3000 rpm にて 5 分間遠沈し、上清を培地試料とした。細胞試料は、二度 PBS(-) で洗浄し、蒸留水、1% SDS 各 $300 \mu\text{l}$ を加え、ポリスマン、パストゥールピペットを用いて細胞破碎液を回収し、10 秒間ソニケート後、蛋白質濃度測定用サンプル $100 \mu\text{l}$ をとり、2% ブチルヒドロキシトルエン (BHT) エタノール溶液 $100 \mu\text{l}$ を加え、さらに 10 秒間ソニケートし、TBA-RS 測定用試料とした。

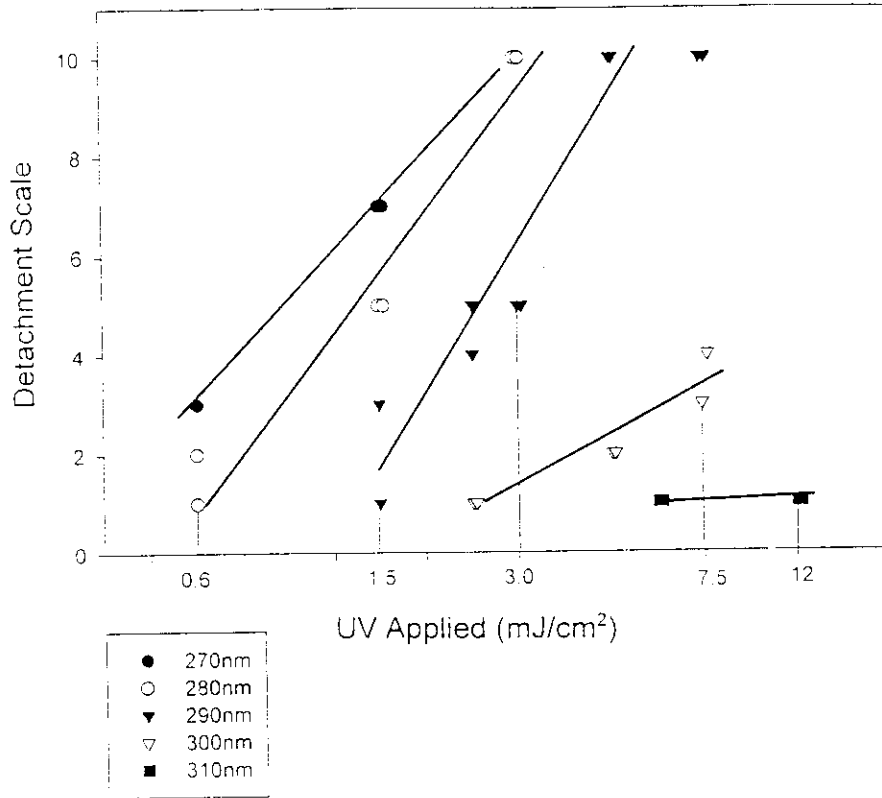
TBA-RS 測定は、Morlière らの方法²⁾ によって、0.375% TBA, 15% TCA を含む 0.25 M 塩酸を加え、 80°C 15 分加熱し、クロモフォアをブタノールで抽出して、蛍光光度計 (Ex 515 nm , Em 550 nm) にて測定した。蛋白濃度測定は、ビュレット反応生成物を高感度に測定する市販キット (BCA 蛋白アッセイ、Pierce) によった。すべての測定値は、2 試料の平均値として得た。

4. 結果・考察

(1) KB 細胞の剥離現象

付着性の KB 細胞に紫外線を照射すると、この細胞の剥離が生ずることが見出された (Fig. 3 図

Fig. 3 Dose and Wave Length Dependency of the Effect



Examples of the Detachment Scale

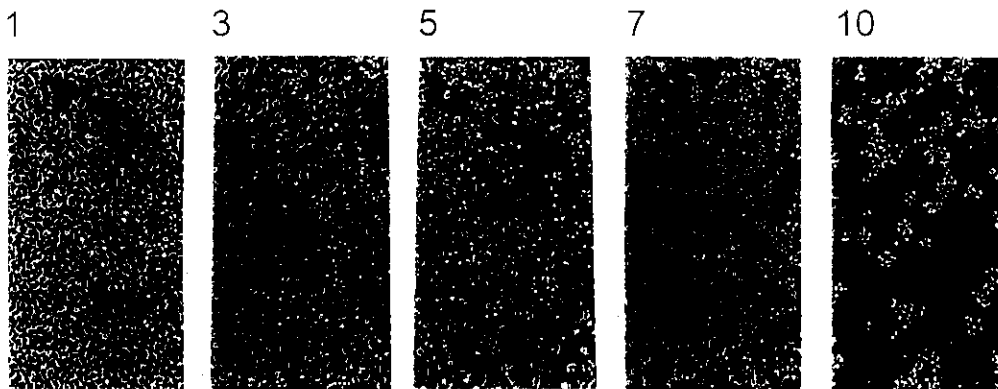


Fig. 4 Cell Detachment Caused by 290nm 30J/m UV with Various Intensities and Durations

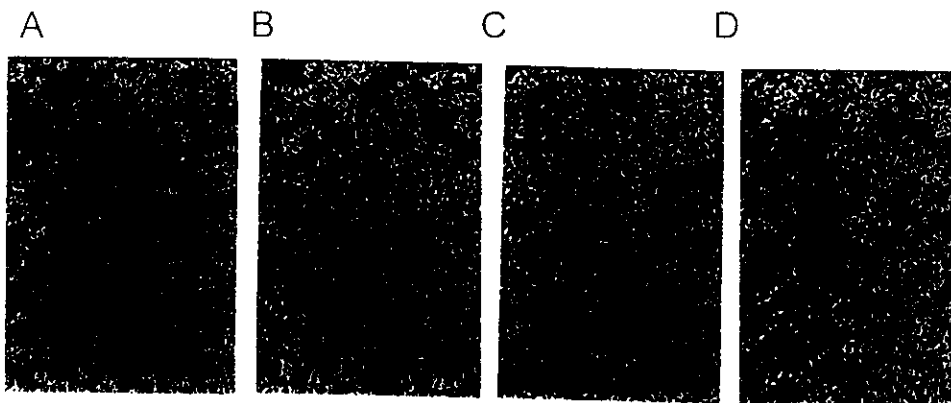
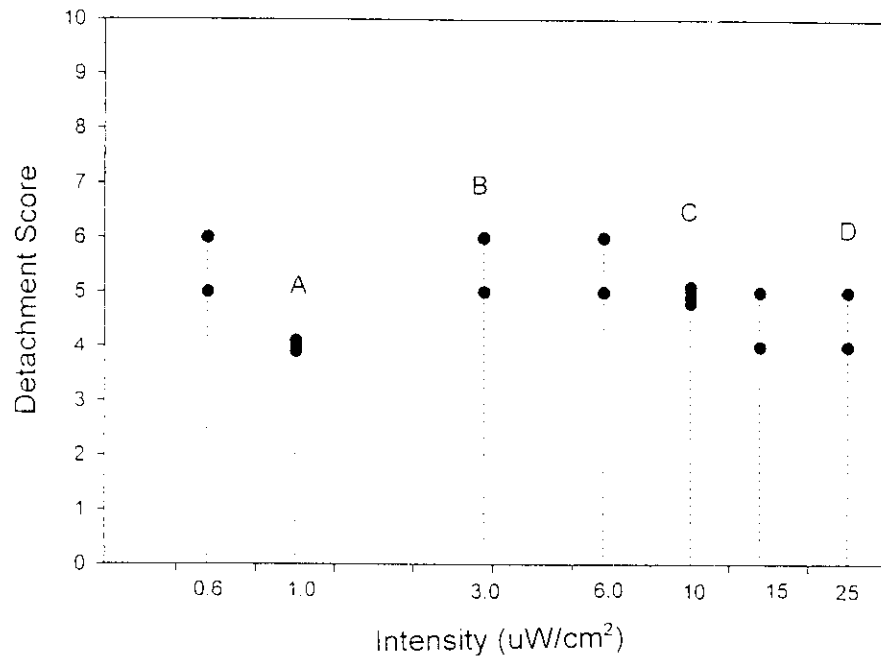


Fig. 5 Estimation of 1,1,1,3,3-Tetraethoxy Propane

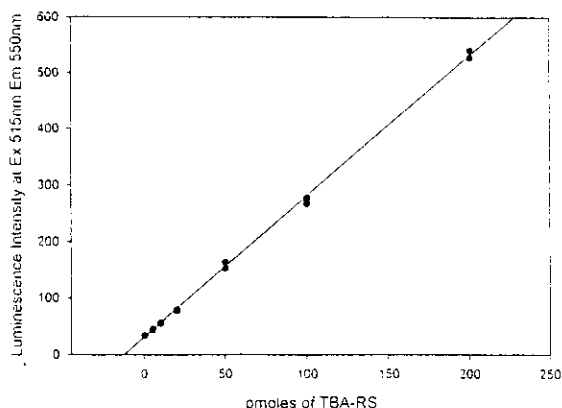
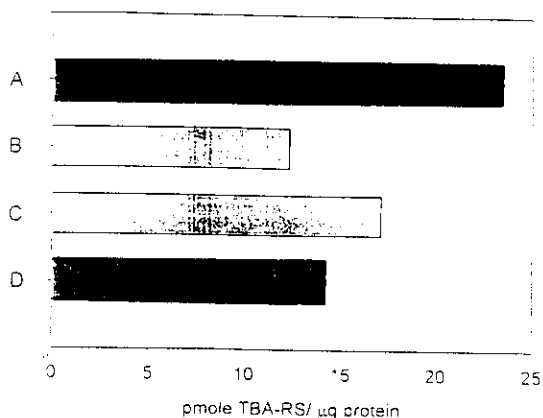


Fig. 6 Chrysotile Induces TBA-RS Production



- A. Incubated with Amosite (40 μ g/cm²);
- B. control (without Amosite);
- C. Amosite added after cell harvest;
- D. Amosite and BHT added after cell harvest.

の実験では暴露時間はすべて5分間であった。これは、照射後3時間ころから明確になり、12時間までに完了すると思われた。十分な確認を終えてないが、この剥離は、アポトーシスによるものと予想された。^{3), 4)} 剥離は、B領域のなかでも短波長の成分によっておこり、剥離をおこす細胞の割合は、狭い照射量の範囲のなかで、用量依存的に生じた。その再現性もかなりよかった。Fig. 3においては、剥離の程度は、すべての細胞の剥離が観察される場合を10、正常において分裂期及びその直後の細胞のみが円形を呈する1との間を剥離細胞の割合によって分割する「Detachment Scale」を設定して記述した。この紫外線によっておこる剥離の現象の本態および発生機構解明は、今後に残された重要な課題と考えられる。

(2) 照射条件の違いによる細胞傷害効果

上記の剥離現象が、再現性にすぐれ、判定が容易であったことから、これを利用して、照射条件の影響の差を検討することとした。Fig. 4に、290nm 3mJ/cm² 紫外線を種々の暴露時間によって照射したとき、剥離現象に及ぼす影響をまとめた。暴露時間の短い(すなわち照射線量の大きい)ものも含むすべての試料において、Hanks液中におかれた期間は83分であった。これによると、照射線量がすくなくとも6mW/m²を越える場合には、照射線量が大きく照射時間が短い場合も、照射線量が小さいかわりに照射時間が大きい場合も影響は変わらないであろうと考えられた。また、Fig. 3, 3 μ Wとの比較から、Hanks液中でこの程度の時間室温に放置しても剥離現象には効果がないことがわかる。

さらに、連続照射と断続照射の効果についても比較をおこなった。たとえば290nm 10 μ W/cm²にて300秒照射したのち750秒静置した試料と、2秒照射5秒休止を150回繰り返した試料とでは、剥離現象への効果に違いは認められなかった。

以上から、アポトーシスと関連すると予想される「剥離現象」については、照射強度の時間的変動の効果は、あるとしてもさらに低い線量においてであることが考えられる。

(3) 過酸化代謝生成物の検討

紫外線によって生ずると考えられる酸化ストレスの定量を試みるために、細胞内酸化型グルタチオン⁵⁾、カルボニル化蛋白質⁶⁾、プロスタグランジン F_{2 α} ⁷⁾の測定を試みたが、測定感度の点

Fig. 7 TBA-RS Production after Exposure to the 200J/m² UV

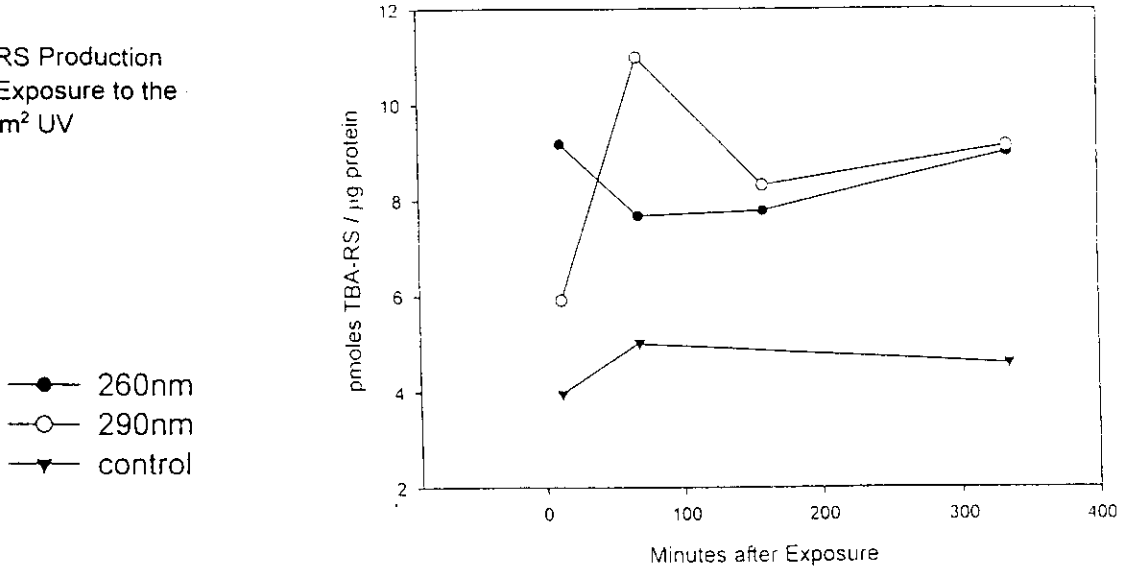


Fig. 8 TBA-RS Excreted into Medium from KB Cells at 12 hours after UV Exposure

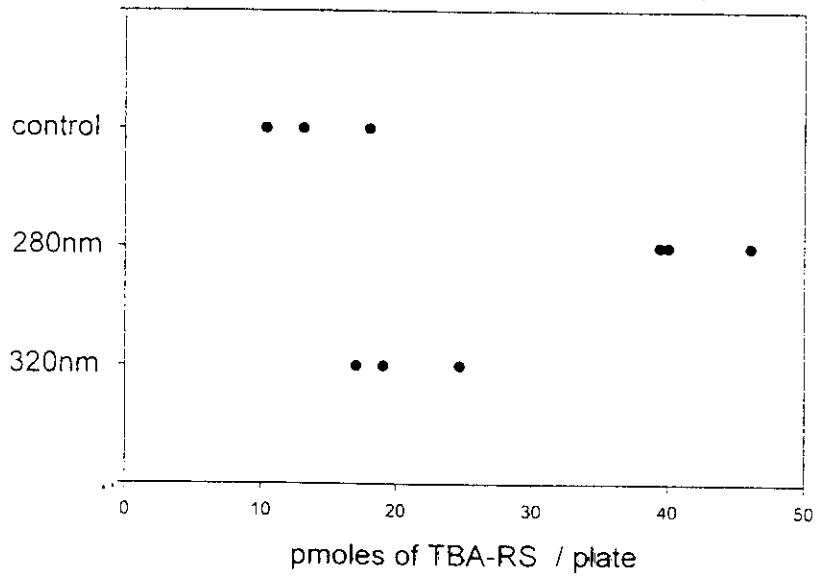
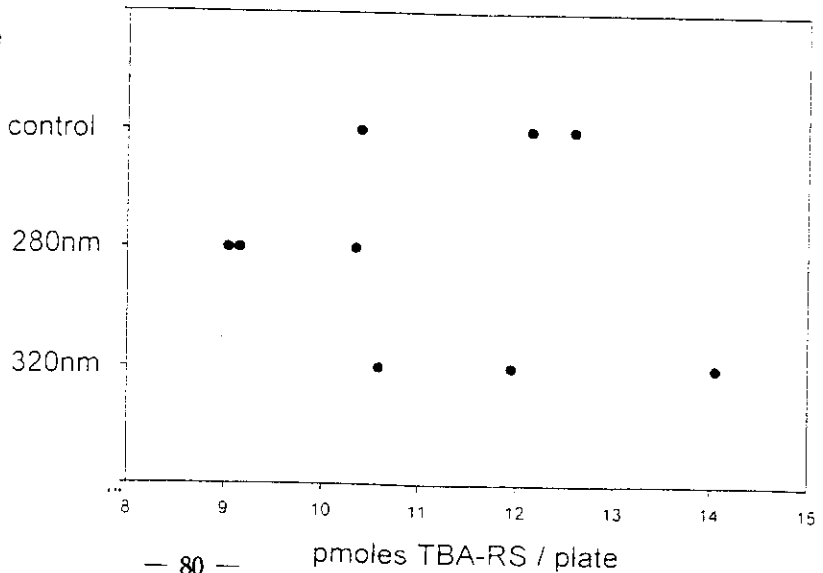


Fig. 9 TBA-RS Content in KB Cells at 12 hours after UV Exposure



から、最終的にチオバルビツール酸反応物質(TBA-RS)の定量にもとづく比較をおこなった。これは過酸化脂質より生成するマロンジアルデヒドを主に測定しようとする方法であり、問題点も指摘されているが⁹⁾、十分な注意をはらえば極めて感度にすぐれ、かつ簡便な測定法であることが示されている⁹⁾。

TBA-RS 測定は、Fig. 5 に示すように感度にすぐれているため、35mm シャーレー一枚について、過酸化脂質生成に対応すると考えられる変化をとらえることができた。たとえば、細胞に過酸化脂質を生成することが知られているアスベスト繊維(アモサイト)と細胞を二日間共存させておくと、Fig. 6 のように細胞内 TBA-RS は増加することが観察される。この方法をもちいて紫外線の照射効果を観察した。

Fig. 7 は、20mJ/cm² のかなり強い紫外線を照射したのち数時間後までの細胞中に TBA-RS が増加することを示している。点はシャーレ二枚についての測定の平均値である。照射直後についての TBA-RS の動きについて検討することは、今後の課題である。Fig. 8, Fig. 9 は、3 mJ/cm² の紫外線を照射したのち、剥離現象が完了したと考えられる 12 時間後に TBA-RS を測定したものである。TBA-RS は、細胞内では若干減少し (Fig. 9)、培地内でかなり上昇していた (Fig. 8)。生体が紫外線の照射を受けたとき、これに対応する変化がおこったとすると、TBA-RS は、近傍の組織、ないし血流等によって全身に運搬されて照射をうけない部位にも酸化ストレスをひきおこす可能性があると考えられる。このように生成される過酸化代謝物の同定、定量、時間的変化の検討を綿密に行なう必要がある。

5. 本研究により得られた成果

アポトーシスに対応すると考えられる細胞剥離現象を指標として観察したところ、少なくとも 0.6 μ W/cm² 程度まで低い強度であっても、紫外線暴露の効果は積算した総エネルギー量に依存すると考えられる結果を得た。また、これらの暴露を受けた試料において、培養上清中に、過酸化代謝物質生成を反映すると考えられる TBA-RS が増加していた。

6. 参考文献

- 1) 「紫外線の増加が人の健康に及ぼす影響に関する研究」地球環境研究総合推進費平成7年度研究成果報告集 (I)、環境庁企画調整局地球環境部環境保全対策課研究調査室。
- 2) Morlière P, Moysan A, Santus R, Hüppe G, Mazière JC, Dubertret L. (1991) UVA-induced lipid peroxidation in cultured human fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1084, 261-268.
- 3) Zhuang L, Wang B, Shinder GA, Shivji GM, Mak TW, Sauder DN (1999) TNF receptor p55 plays a pivotal role in murine keratinocyte apoptosis induced by ultraviolet B irradiation. *J Immunol* 162, 1440-1447.
- 4) Barber LA, Spandau DF, Rathman SC, Murphy RC, Johnson CA, Kelly SW, Hurwitz SA, Travers JB (1998) Expression of the platelet-activating factor receptor results in enhanced ultraviolet B radiation-induced apoptosis in a human epidermal cell line. *J Biol Chem* 273, 18891-18897.
- 5) Anderson ME (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods in Enzymol* 113, 548-555.

- 6) Levine RL et al. (1985) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymol* 113, 464-478.
- 7) Farman N, Pradelles P, Bonvalet JP (1987) PGE₂, PGF_{2α}, 6-keto-PGF_{1α}, and TxB₂ synthesis along the rabbit nephron. *Am J Physiol* 252, F53-F59.
- 8) Winterbourn CC, Carr AC (1993) Myeloperoxidase-dependent loss of malondialdehyde: a limitation for detecting neutrophil-mediated lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 302, 461-467.
- 9) Liu J, Yeo HC, Doniger SJ, Ames BN (1997) Assay of aldehydes from lipid peroxidation: gas chromatography-mass spectrometry compared to thiobarbituric acid. *Anal Biochem* 245, 161-166.

[研究成果の発表状況]

(1) 口頭発表

岩田豊人、中西良文、神山宣彦：細胞-間質相互作用に及ぼす鉱物繊維の影響、産衛誌 40, p 693, 1998.

岩田豊人、神山宣彦：JFM標準試料の細胞増殖抑制作用について、産衛誌 41, p 341, 1999.

平成 11 年 International Workshop on the Health Effects of Ultraviolet Radiation

(2) 論文発表

Koizumi S, Suzuki K, Yamada H. Inhibition of metallothionein induction by ultraviolet light irradiation. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health* 1995

○Iwata T, Shinohara Y, Kohyama N(1998) Protein adsorption to the mineral fibers. *APORD* 631-634.

(3) 出願特許、受賞等 「なし」