

Title	低酸素下におけるUVA照射リボフラビン溶液の細胞障害性
Author(s)	南, 宏典
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40002">https://hdl.handle.net/11094/40002</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	南 宏 典
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 13030 号
学位授与年月日	平成9年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学位論文名	低酸素下におけるUVA照射リボフラビン溶液の細胞障害性
論文審査委員	(主査) 教授 吉川 邦彦  (副査) 教授 谷口 直之 教授 森本 兼曩

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

中波長紫外線(UVB)の皮膚障害性については種々検討がなされているが、より深達性のある長波長紫外線(UVA)のそれについてはあまり研究されていない。特に光老化に対する影響や、その際に光感作物質となりうる内因性の物質は、まだ同定されていない。リボフラビンがUVAを吸収しうることから、過酸化水素などの活性酸素を生じさせ皮膚組織に障害性を示すのではないかと考えた。UVA照射リボフラビン溶液の細胞障害性が主として過酸化水素による可能性はすでに報告した。皮膚組織中の酸素分圧は大気中より低い。そこで低酸素下では活性酸素の生成が減少して細胞障害性が小さくなると予想して実験を始めたが、予想に反して細胞障害性は大きくなった。低酸素下での細胞障害性の原因を調べるため、過酸化水素生成と一重項酸素の関係を調べた。

#### 【方法ならびに成績】

##### 1. リボフラビンへのUVA照射

コロニー形成能に影響を与えない濃度である $266 \mu\text{mol/l}$ のリボフラビン溶液をシャーレに入れてガラス板の上に置き、 $1.2\sim 38.4 \text{kJ/m}^2$ のUVAをガラス板を通して照射した。低酸素状態を得るためには、窒素ガスを灌流した。細胞障害性を示さない濃度であることをあらかじめ確認したうえで、一重項酸素消去剤である $500 \mu\text{mol/l}$ のアジ化ナトリウムを加えて同様に照射した。

##### 2. 細胞障害性

正常ヒト皮膚培養線維芽細胞をシャーレにまき、UVAを照射したリボフラビン溶液に一定時間(8分間)浸した。処理終了後ウシ胎児血清添加ダルベッコ培地でコロニーを形成させ、固定後に計数し、生存率を算出した。

照射量が増すにつれて生存率は低下し、 $9.6 \text{kJ/m}^2$ で最小となり、それ以上の照射量でも生存率に変化は見られなかった。低線量では空気下に比べて低酸素下のほうが生存率が低かったが、高線量では差が見られなかった。アジ化ナトリウムを加えた場合は、無添加の場合に比べて生存率は高くなり、線量にかかわらず空気下と低酸素下で同じ生存率となった。

##### 3. 過酸化水素濃度測定

過酸化水素溶液に、セイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRP)溶液を少量ずつ添加し、 $350\sim 450 \text{nm}$ の吸収スペクトルを測定した。HRPの吸収の $400 \text{nm}$ でのピークは、HRPが過酸化水素と結合すると $420 \text{nm}$ に移動する。HRPを

過剰に加えるとピークが400nmに復帰する。過酸化水素の量とそれと反応した HRP の量とは直線関係を示したため、HRP の添加量からリボフラビン溶液中の過酸化水素濃度を求めた。

UVA 照射リボフラビン溶液の過酸化水素量を測定した。低線量では空気下に比べて低酸素下のほうが生成量が多かったが、高線量では低酸素下でも空気下と同じ生成量が見られた。アジ化ナトリウムを加えると生成量は減少し、線量にかかわらず空気下と低酸素下での差が見られなくなった。

#### 4. 溶存酸素測定

溶存酸素測定装置を用いて、溶液の酸素濃度を測定した。

リン酸緩衝液に UVA を照射しても溶存酸素量は変化しなかったが、リボフラビン溶液では空気下・低酸素下ともに溶存酸素は無照射時よりも  $75 \mu\text{mol}/\text{l}$  減少した。アジ化ナトリウムを加えた場合の減少は  $46 \mu\text{mol}/\text{l}$  であった。

#### 【総括】

リボフラビンは紫外線領域に強い吸収スペクトルを示すため、紫外線による皮膚障害に関与していると考えられる。皮膚組織中の酸素分圧に近い低酸素下でリボフラビン溶液に UVA を照射して細胞障害性と過酸化水素濃度を測定し、過酸化水素生成の過程を調べた。

照射量が少ない場合は空気下に比べて低酸素下のほうが過酸化水素生成量が多く、細胞障害性も大きかったが、照射量が多い場合は過酸化水素生成量・細胞障害性は等しくなった。アジ化ナトリウムによって過酸化水素生成量・細胞障害性はどちらの条件下でも同程度まで減少した。このことから、低酸素下では過酸化水素の生成が早いこと、また低酸素下で早く生成した過酸化水素のほとんどが一重項酸素を介していることがわかる。

照射量が  $38.4 \text{kJ}/\text{m}^2$  の場合は、空気下でも低酸素下でも、リボフラビン  $266 \mu\text{mol}/\text{l}$  から過酸化水素が  $190 \mu\text{mol}/\text{l}$  生成し溶存酸素が  $75 \mu\text{mol}/\text{l}$  減少したのであるから、それらの比はおおよそ  $70 : 50 : 20$  である。アジ化ナトリウム存在下では、過酸化水素が  $110 \mu\text{mol}/\text{l}$  生成し溶存酸素が  $46 \mu\text{mol}/\text{l}$  減少したのであるから、その比はおおよそ  $70 : 30 : 12$  である。一重項酸素の消去剤であるアジ化ナトリウムにより過酸化水素の生成と溶存酸素の減少がともに 0.6 倍になったため、生成過酸化水素のうち約半分は一重項酸素を介しており、その反応には酸素が必要であることが推測される。

### 論文審査の結果の要旨

近年オゾンホール の出現と共に、地表での紫外線量の増加が危惧され、紫外線の皮膚への影響が関心を集めている。中波長紫外線 (UVB) の皮膚への作用は比較的良好に解明されているが、量的には圧倒的に多く、透過性が高い長波長紫外線 (UVA) は、それ自体に細胞障害性が殆ど見られないため皮膚への影響は不明である。本研究は培養線維芽細胞を用いた実験により、UVA が riboflavin を励起して singlet oxygen の産生を介して過酸化水素を産生させることによって細胞障害性を示すことを明らかにしたものである。これは riboflavin による光毒性反応を説明すると共に、日光による皮膚老化のメカニズムの一部を説明し得るものとして、皮膚科学的に価値ある研究と思われる。