

C. 研究結果

示した。

各照射線量における生菌数への影響と変異コロニー数への影響を図1、2および表1に

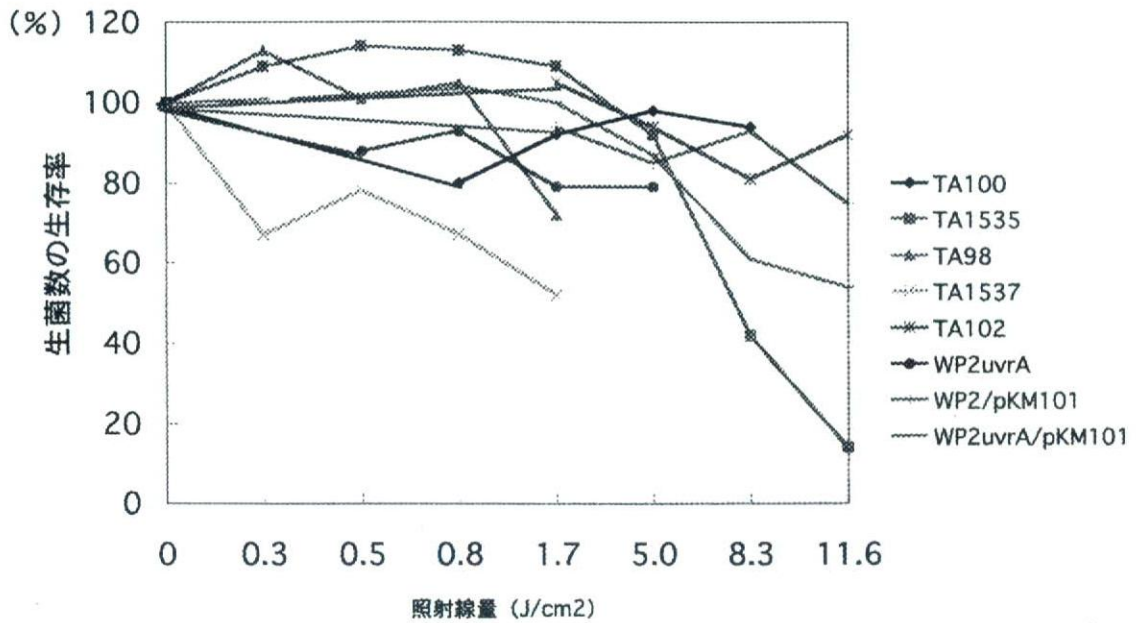


図1 各照射線量における生菌数への影響

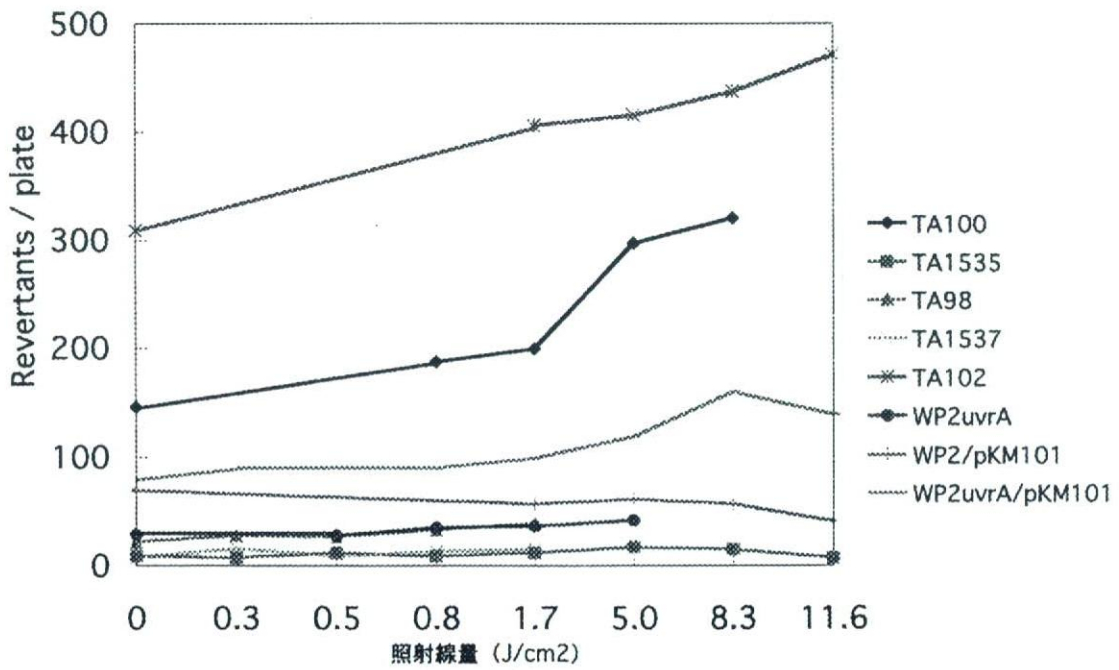


図2 照射による変異コロニー数への影響

表1 各菌株における照射線量の検討

照射線量 (J/cm ²)	<i>S. typhimurium</i>					<i>E. coli</i>		
	塩基対置換型			フレームシフト型		塩基対置換型		
	TA100	TA1535	TA102	TA98	TA1537	WP2uvrA	WP2uvrA /pKM101	WP2/pKM101
0.3		○		○	○		○	
0.5		○		○	○	○		
0.8	○	○		○	○	○	○	
1.7	○	○	○	△	△	△	○	○
5.0	○*	○	○	×	×	△	○*	○
8.3	○*	×	○*	×	×	△	△*	○
11.6	△	×	○*	×	×	×	△*	△

○：生菌数に変化なし

△：生菌数が80%以下に減少

×：生菌数が50%以下に減少

*：変異コロニー数が高くなった線量

(UVA 測定器：Topcon 1.6~1.7J/cm² =Dr.K.Honle 1J/cm²に換算)

TA102とWP2/pKM101はUV耐性菌株であるため、比較的高い線量すなわち8.3J/cm²および11.6J/cm²においても生菌数の減少は少なかった。その他の菌株はUV感受性であることから、照射線量を下げてさらに検討を行ったところ、1.7J/cm²以下に下げることにより生菌数の生存率にも大きな影響を与えず、それらの線量での試験が可能となった。変異コロニー数は、TA100、TA102およびWP2uvrA/pKM101において照射線量が高くなるとともに増加し、非照射群のコントロール値に比べて約1.5~2倍高くなった。

8-MOP、CPZおよびMBの3種の陽性物質について、それぞれの菌株に対する感受性を比較検討した。それらの結果を図3~5および表2に示した。8-MOPにおいては、TA102とWP2/pKM101でのみ、明らかな変異コロニー数の増加が認められた。CPZにおいては、TA100、TA1535、TA98、TA1537、WP2uvrA、

WP2uvrA/pKM101およびWP2/pKM101で変異コロニー数の増加が認められ、特にTA100、TA98およびTA1537で明らかな増加がみられた。MBにおいては、TA100、TA1535、TA98、TA102、WP2uvrA、WP2uvrA/pKM101およびWP2/pKM101で変異コロニーの増加が認められたが、8-MOPやCPZに比べて、変異コロニー数はそれほど増加しなかった。

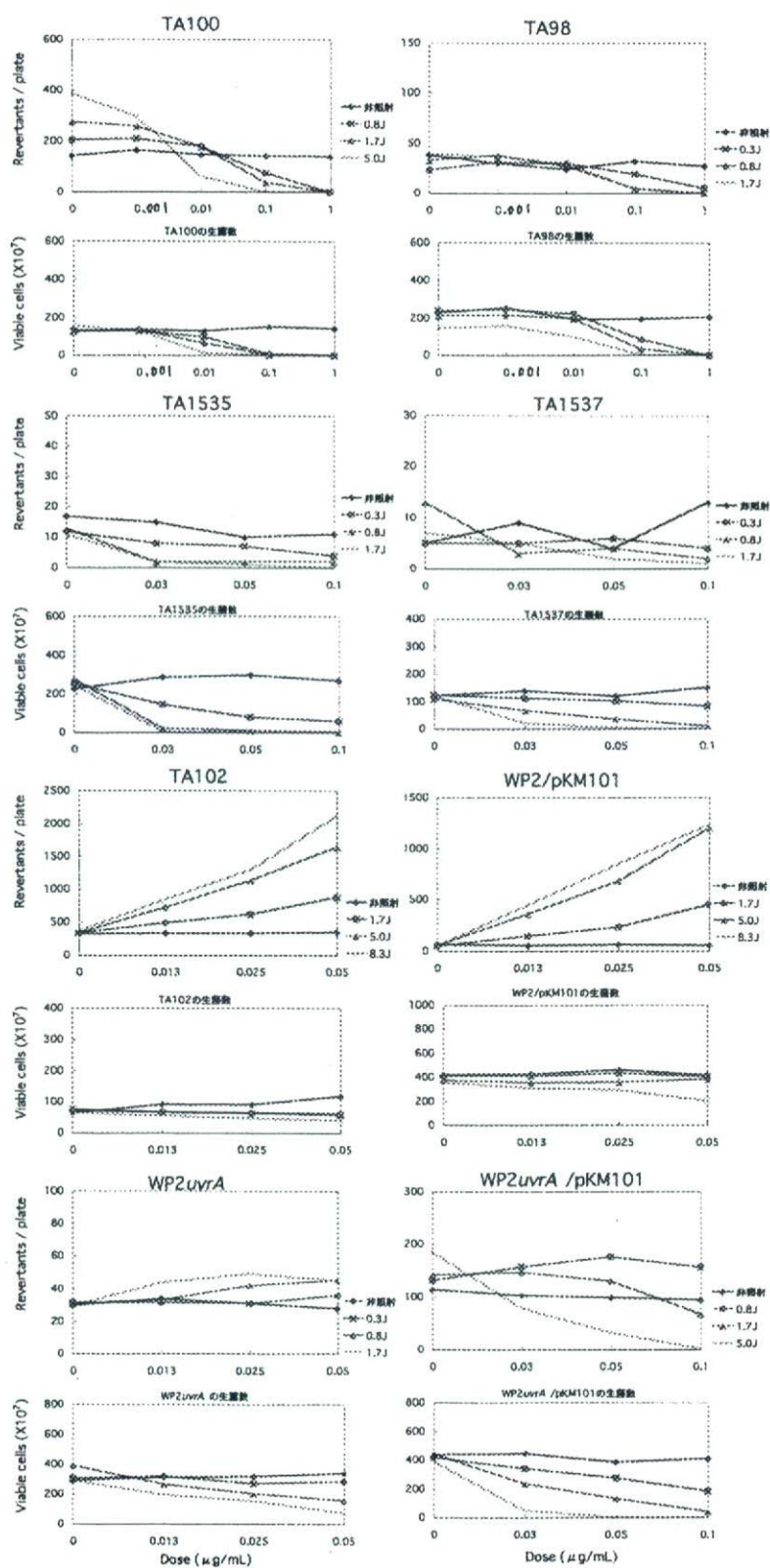


図3 8メトキシソラレンの光遺伝毒性

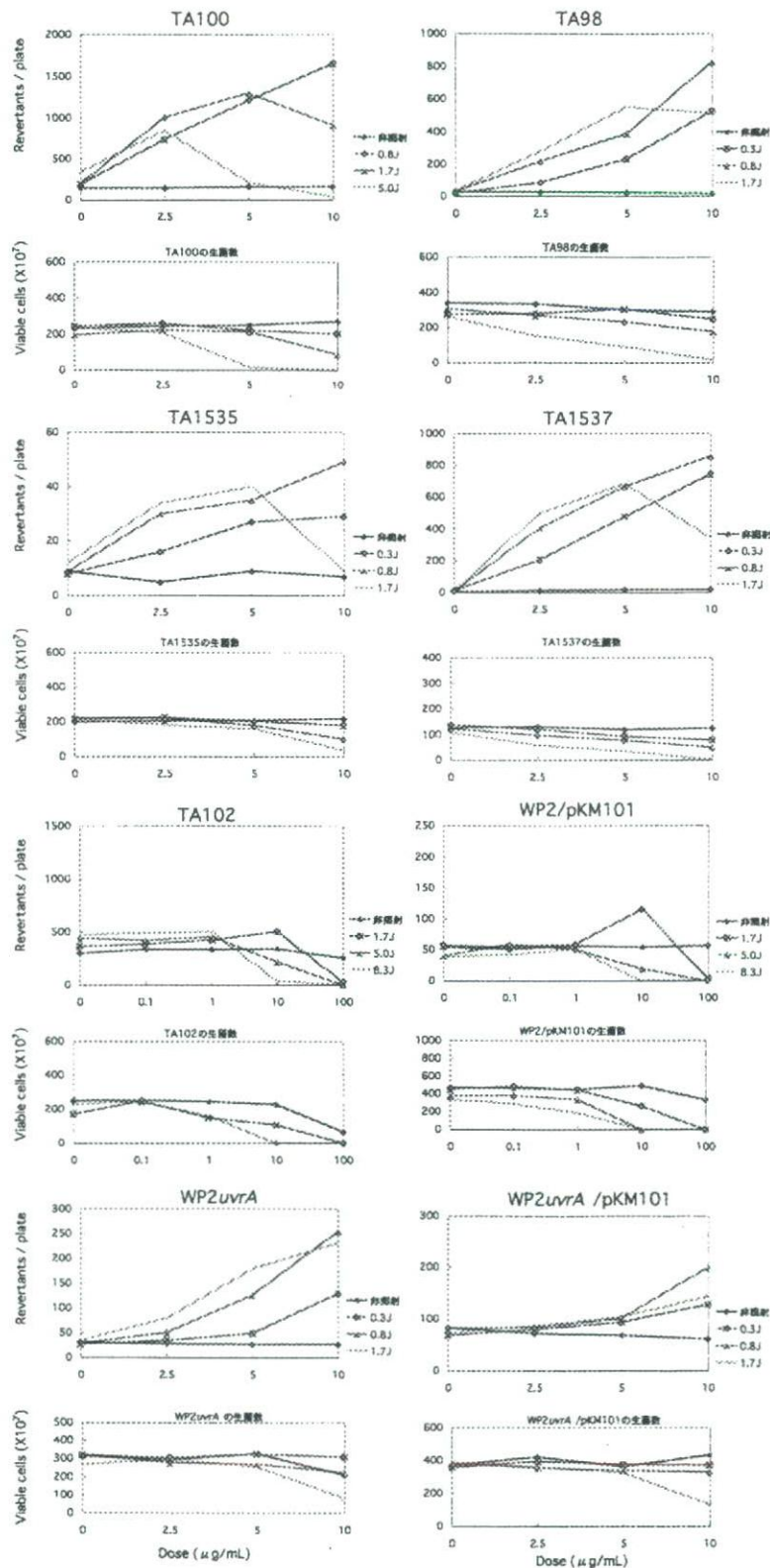


図4 クロプロマジンの光遺伝毒性

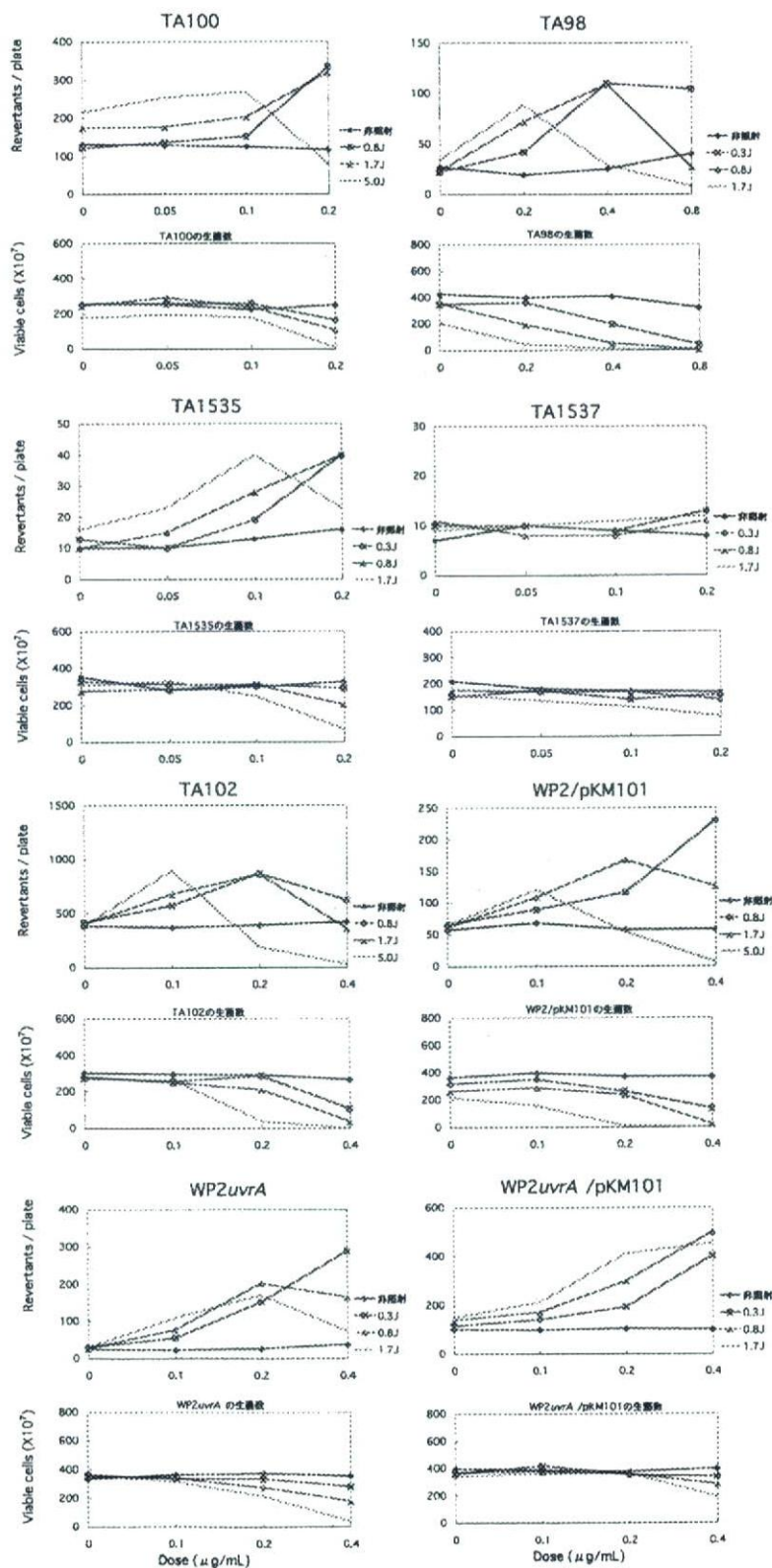


図4 メチレンブルーの光遺伝毒性

表2 各菌株に対する 8-MOP, CPZ, MB の光遺伝毒性

物質名	<i>S. typhimurium</i>					<i>E. coli</i>		
	塩基対置換型			フレームシフト型		塩基対置換型		
	TA100	TA1535	TA102	TA98	TA1537	WP2 <i>uvrA</i>	WP2 <i>uvrA</i>	WP2/pKM101/pKM101
8-MOP	—	—	+	—	—	—	—	+
CPZ	+	+	—	+	+	+	+	+
MB	+	+	+	+	—	+	+	+

D. 考察

この試験を行うにあたり、それぞれの菌株により特性が異なること、UV に対する感受性が異なることを考慮して、まずそれぞれの菌株に適した照射線量を検討することが必要と考えられた。また、照射線量の違いにより菌株の生存率が大きく変わること、さらに陽性物質の持つ抗菌作用なども考慮に入れて、照射線量を 1 線量のみでなく、複数設定し、いくつかの条件で比較検討することが望ましいと考えられた。

また今回の結果から、8-MOP は、活性酸素生成物質が検出できる TA102 および WP2/pKM101 においてのみ陽性となることが明らかとなった。CPZ は、TA98 と TA1537 で特に強い陽性を示すことから、光照射によって主にフレームシフト型の突然変異が誘発されていることがわかった。MB は、光照射により遺伝毒性を示すが、8-MOP や CPZ に比べるとその誘発作用は弱かった。

なお、用いた 8 種類すべての菌株でいずれかの陽性物質で陽性反応が得られたことから、上記の菌株を用いて光遺伝毒性試験を行う

際に、至適な物質を陽性対照物質として用いれば、微生物を用いた光遺伝毒性試験が実施出来るものと考えられた。

E. 結論

以上の結果から、微生物を用いる光遺伝毒性試験を実施する場合には、まずそれぞれの菌株に適した照射線量を検討すること、また照射線量は複数設定することが推奨される。なお、用いた 8 種類すべての菌株において、8-MOP、CPZ および MB いずれかの物質を陽性対照物質として光遺伝毒性試験を行うことが可能となった。

F. 引用文献

- 1) Chetelat, A., Albertini, S., Dresp, J.H., Strobel, R. and Gocke, E. Photomutagenesis test development: I. 8-Methoxypsoralen, chlorpromazine and sunscreen compounds in bacterial and yeast assays., *Mutat. Res.*, 292, 241-250, 1993.
- 2) Henderson, L., Fedyk, J., Bourner, C.,

Windebank, S., Fletcher, S. and Lovell, W.
Photomutagenicity assays in bacteria:
factors affecting assay design and
assessment of photomutagenic potential of
para-aminobenzoic acid., *Mutagen*, vol.9,
459-465, 1994.

- 3) Jose, J.G. Photomutagenesis by
chlorinated phenothiazine tranquilizers.,
Med. Sci., vol.76, 469-472, 1979.

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 川上久美子、原 巧、須井 哉、中川ゆづ
き、田中憲穂、澁谷 徹:微生物を用いる
光遺伝毒性試験の確立、第 28 回日本環
境変異原学会

分担研究報告書

5. モルモットにおける急性皮膚刺激性試験(適用経路の検討)

分担研究者 大原 直樹 食品薬品安全センター 秦野研究所 薬理学研究室室長
研究協力者 森村 智美 食品薬品安全センター 秦野研究所 一般毒性学試験班

研究要旨

モルモットにおける急性皮膚光刺激性試験方法の検討の一環として昨年度有用性が示唆された、角質層の剥離層を除去してから検体を2度に分けて適用するという方法を用いて幾つかの被験物質について急性皮膚光刺激性を検討した。その結果、適用方法の改良により若干感度を上げることが出来たが、さらに経皮吸収促進剤も考慮に入れ、より適した溶媒の選択方法を検討する必要があると考えられた。そのため、経皮吸収促進剤を含めた媒体を検討する追加試験を実施し、光毒性を *in vivo* においてスクリーニング的に検討する試験法としての急性皮膚光刺激性の試験法をまとめた。

A. 研究目的

モルモットにおける急性皮膚光刺激性試験の検討の一つとして、昨年度有用性が示唆された角質層の剥離層を除去して検体を2度に分けて適用する方法で、幾つかの被験物質について急性皮膚光刺激性を検討する。また、光毒性を *in vivo* においてスクリーニング的に検討する試験法としての急性皮膚光刺激性の試験法をまとめるため、経皮吸収促進剤を含めた媒体の検討を行う。

B. 研究方法および研究結果

1. 使用動物

5週齢の雄の Hartley 系(Std:Hartley、クリーン動物)モルモット(日本エスエルシー)を購入し、検疫と飼育環境への順化を兼ねて5日間飼育した後、一般状態に異常の認められなかった動物22匹を使用した。動物は、温度21

～25℃、湿度45～65%、換気回数約15回/時、照明12時間(7時～19時)に設定した飼育室内で、金属製金網床ケージ(350W×500D×210H mm)に1匹ずつ収容し、固型飼料(RC4、オリエンタル酵母)と水道水を自由に摂取させて飼育した。

2. 適用物質

陽性対照物質として、0.005% 8-メソキシソラレン(8-methoxypsoralen、以下8-MOPと略す)を使用した。また、各被験物質には、0.5および4.0%の濃度となるように注射用水に溶解したニュートラルレッド(Neutral red、以下NRと略す)、0.5および5.0%の濃度となるように注射用水に溶解したローズベンガル(Rose bengal、以下RBと略す)、20%の濃度となるようにエタノールに、25%の濃度となるように注射用水に溶解した塩酸クロルプロマ

ジン(Chlorpromazine HCl、以下 CP と略す)、0.5 および 5.0%の濃度と・なるようにエタノールに溶解したテトラサイクリン(Tetracycline、以下 TC と略す)、0.5 および 5.0%の濃度となるように注射用水に溶解したピロキシカムとなるようにエタノールに、0.5 %の濃度となるように注射用水に溶解したオフロキサチン(Ofloxacin、以下、OX と略す)を使用した。

3. 群構成

8-MOP を投与する群を陽性対照群として4匹の動物を使用した。その他は1群3匹とし、それぞれ被験物質A群(NR)、B群(RB)、C群(CP)、D群(TC)、E群(PO)およびF群(OX)とした。

4. 適用および照射

あらかじめ(検体適用前 24 時間以内)バリカンとシェーバーを用いて剪毛した動物の背部皮膚に 1.5×1.5cm の検体適用部位を4か所(左右各2段)設け、表層の角質層をセロファンテープで剥離した。各群とも、照射前約 20 分および 40 分に相当する時間に、マイクロピペットを用いて検体を1回につき 25 μL/site 適用した。適用検体を自然乾燥させた後、背部左側をアルミホイルで覆い遮光して(非照射対照)UV 照射を開始した。光源には UV-A 灯を 14 本(医療用紫外線照射装置デルマレイ、東芝)用い、照射線量(UV-A)が 10 J/cm² となるように照射時間を設定して照射した。なお、被験物質の色調が皮膚反応の妨げとなる可能性が示唆されたので、照射後 48 時間の観察時に各被験物質の溶媒で清拭した。また、同時にシェーバーを用いた剪毛を行った。

5. 皮膚反応の判定

照射前(検体適用後)、照射後1、24 および 48 時間にそれぞれの適用部位について以下の基準により判定を行った。

A. 紅斑および痂皮形成

- 0 紅斑なし
- 1 ごく軽度の紅斑(微かに認められる程度)
- 2 軽度の紅斑(紅斑が明瞭)
- 3 中程度の紅斑
- 4 重度の紅斑および焼痂形成(赤紫色の紅斑、皮膚の深部にまで損傷:虚血・出血・痂皮形成)

B. 浮腫形成

- 0 浮腫なし
- 1 ごく軽度の浮腫(微かに認められる程度)
- 2 軽度の浮腫(隆起がわかる程度)
- 3 中程度の浮腫(およそ1mm 程度の隆起)
- 4 重度の浮腫(隆起が1mm 以上)

6. データの解析

各動物の適用部位毎に、照射後 24 および 48 時間における検体適用部位の評点を合計し、2で除して刺激性指数(照射部位:光刺激性指数、非照射部位:一次刺激性指数)を算出した。さらに、各群の刺激性指数の平均値を算出した。

<実験1>

Table 1 に示したように、適用方法を改良し、若干感度を上げることが出来たが、さらに経皮吸収促進剤も考慮に入れ、より適した溶媒の選択方法を検討する必要があると考えられた。

Table 1

Group	Test substance	Vehicle	Concentration (w/v %)	Mean scores ^{a)} - of skin reaction-		Positive ^{b)} number of animals
				UV (-)	UV (+)	
Control	-	DW	-	0	0	0/2
	-	ethanol	-	0	0	0/2
A	8-MOP	ethanol	0.005	0	2.9	4/4
	NR	DW	0.5	0	0	0/3
B	↑	↑	4.0	0	0	0/3
	RB	DW	0.5	0	0	0/3
C	↑	↑	5.0	0	0	0/3
	CP	ethanol	20	0	0	0/3
D	↑	DW	25	0	1.0	3/3
	TC	ethanol	0.5	0	0	0/3
E	↑	↑	5.0	0	0	0/3
	PO	DW	0.5	0	0	0/3
F	↑	↑	5.0	0	0	0/3
	OX	ethanol	0.5	0	0	0/3
	↑	D. W.	0.5	0	0	0/3

a) Add up the scores of each observation time, and then, divided by frequency of observation

b) Number of animals with photoirradiated response/total number of animals of each group

<実験2>

先の実験から、試験感度の向上を目的として、経皮吸収促進剤の効果を検討した。あわせて、皮内投与法を再検討した。

1. 使用動物

先の実験と同様の雄の Hartley 系モルモット 24 匹を使用した。

2. 適用物質

先の実験で用いた 8-MOP を塗布適用検体として 95 w/w% エタノールまたはジメチルスルホキシド(以下 DMSO と略す)に 0.005 %となるように溶解し、皮内投与用検体としてカルボキシメチルセルロースナトリウム(以下 CMC Na と略す)に 0.005 %となるように懸濁した。また、擬陽性となった CP HCl を、同様に注射用水、DMSO または CMC Na に 20%となるよ

うに溶解または懸濁した。

3. 群構成、適用および照射

先の実験と同様、あらかじめバリカンとシェーバーを用いて剪毛した動物の背部皮膚に 1.5 × 1.5cm の検体適用部位を6か所(左右各3段)設け、角質層剥離処置を施した。その後、各適用検体を塗布ないし皮内投与し、塗布した適用検体を自然乾燥させた後、背部左側をアルミホイルで覆い遮光して(非照射対照)UV 照射を開始した。光源には先の実験と同様の UV-A 灯を 14 本用い、照射距離約 50 cm で照射線量(UV-A)が 10 J/cm²となるように照射した。なお、SLS 前処置群では、適用前日(剪毛時)、左右の適用部位に SLS を塗布した。また、CP はいずれの群でも照射後、褐色に変色し、皮膚反応の判定の妨げとなったため、皮内投与群を除く各 CP 適用群の適

用部位を照射後 24 時間の観察時に注射用水で清拭し、溶媒対照群を含めた全群のシェーパーによる剪毛を行った。

照射前(検体適用後)、照射後 1、24、48 および 72 時間にそれぞれの適用部位について先の試験と同様の方法で判定を行い、刺激性指数を算出した。

4. 皮膚反応の判定

Table 2

Test substance	Vehicle	Concentration (w/v %)	Mean scores ^{a)} - of skin reaction -		Positive ^{b)} number of animals	
			UV (-)	UV (+)		
8-MOP	ethanol	-	0.005	0.0	4.9	3/3
↑	↑	+SLS	↑	0.0	5.3	3/3
↑	DMSO	-	↑	0.0	1.8	3/3
↑	CMC Na	i. d.	↑	0.0	1.2	2/3
CP	DW	-	20	0.0	0.9	3/3
↑	↑	+SLS	↑	0.6	0.7	ND
↑	DMSO	-	↑	0.0	1.8	3/3
↑	CMC Na	i. d.	↑	(3.9)	(4.0)	ND

a) Add up the scores of each observation time, and then, divided by frequency of observation

b) Number of animals with photoirradiated response/total number of animals of each group

() Oedema formation was not judged due to the test substance lingered on
ND Not determined

陽性対照物質である 8-MOP は、OECD 化学物質試験法ガイドライン案[第7号、急性皮膚光刺激性試験(B)、1994年3月25日]で媒体として定められているエタノール以外では、良好な結果は得られなかった。一因として、表には示さなかったが、DMSO または CMC Na を媒体とした場合の反応を適用部位別に比較するとばらつきが大きかったことから、媒体中の均一性が得られなかった可能性が考えられた。しかし、この均一性が得られれば、今回の照射条件で、皮内投与による光刺激性の検出も可能であることが示唆された。この他、SLS 前処置により、光刺激性が増す傾向にあった。

塩酸クロルプロマジン は、DMSO を媒体とした場合に最も強い光刺激性が認められた。表

には示さなかったが、この DMSO を媒体とした場合には浮腫も認められた(過去の検討では、いずれも表層の発赤および痂皮形成反応が認められたのみであった)。一方、SLS を前処置した場合は、非照射部位でも皮膚刺激性が認められ、被験物質の有する刺激性が増強された可能性が示唆された。皮内投与では、非照射部位でも刺激性が認められ、照射部位との差はなかった。

C. 考察

以上の結果および過去に実施した一連の検討から、前述の OECD 化学物質試験法ガイドライン案をもとに Table 3 のように急性皮膚光刺激性の試験方法をまとめた。

今後は、in vivo 試験をより有用なものとする

ために全身暴露を視野に入れて試験法を検討する必要があると考えられ、第一段階として、経口投与による皮膚光毒性試験法、殊に陽性対照物質および光毒性の評価方法について検討する。

Table 3

(1) 使用動物

ハートレイ系モルモット 体重 300~500 g

(2) 陽性対照物質

0.005 w/v % 8- メソキシソラレン (媒体 95 %エタノール)

(3) 被験物質の調製

可能な限りエタノールを溶媒とする。不可能な場合は、DMSO、注射用水の順序で溶媒を検討する。いずれの媒体でも溶解しない場合は、その他の溶媒を検討するか、CMC Na等で懸濁液を調製して皮内投与する。いずれの場合も皮膚一次刺激性が現れない用量を設定する。

(4) 群構成

8-MOP を投与する群を陽性対照群として設定する。被験物質投与群は可能な限り、1用量につき1群とする。ただし、媒体対照の適用部位を被験物質投与群に設けても問題ないと考えられる。

(5) 適用および照射

- ①適用前日 (検体適用前 24 時間以内)バリカンとシェーバーを用いて剪毛した動物の背部皮膚に 1.5×1.5cm の検体適用部位を4ないし6か所 (左右各2ないし3段) 設ける。媒体として注射用水を用いた場合は、剪毛時に SLS を塗布する。ただし、刺激性を有する被験物質の場合は、SLS を塗布した場合でも適用用量で刺激性が現れないことを確認する。
- ②適用直前に表層の角質層をセロファンテープ等で剥離する。
- ③検体は2回に分けて適用する。即ち、照射前約 20 分および 40 分に相当する時間に、適用検体を1回につき 25 μL/site 適用する。
- ④照射線量 (UV-A) が 10 J/cm² となるように照射時間を設定して照射する。

(6) 皮膚反応の判定

OECD 化学物質試験法ガイドライン案に従って評点化する。なお、評点化の際に残留検体が観察の妨げとなる場合は、照射後 24 ないし 48 時間の観察時に媒体で検体を清拭する。また、必要に応じてシェーバーで剪毛する。

分担研究報告書

6. ショウジョウバエを用いる光遺伝毒性試験の研究

分担研究者 原 巧 食品薬品安全センター秦野研究所 上級研究員

研究要旨

本研究は、*in vivo* の変異原性試験の中では検出感度が高く、比較的簡便なショウジョウバエ翅毛スポットテストを、光遺伝毒性試験として確立することを目的としている。昨年度は、UVA を含むサンライトシュミレーター (SOL500, Dr Hönle) を用いて、照射条件等の基礎的な検討を行った。今年度は、光遺伝毒性物質として知られる8-メトキシソラレン (8-MOP) を用いて、実験方法の確立を目指した。実験にはキイロショウジョウバエの多翅毛系統の雌と、炎毛系統の雄を交配して得られた F1 個体を用いた。産卵後約72時間の3齢幼虫を培地から分離し、8-MOP 懸濁液の入ったプラスチックシャーレに移して、サンライトシュミレーターの照射を行った。照射後の幼虫はインスタント培地に移して飼育を続け、羽化した成虫の翅を顕微鏡で観察した。幼虫期に染色体組換えや遺伝子突然変異等の遺伝的損傷が生じると、成虫の翅に異常な翅毛 (翅に生えている微毛) の集まりである、翅毛スポットが生じる。翅毛スポットには、多翅毛または炎毛の小シングルスポットおよび大シングルスポットと、多翅毛と炎毛のスポットが隣接したふたごスポットがある。サンライトシュミレーター非照射の場合は、8-MOP 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 処理では各種の翅毛スポットの頻度は増加しなかったが、UVA の照射強度 $1 \text{ mW}/\text{cm}^2$ で5時間の照射 ($18 \text{ J}/\text{cm}^2$) を行った場合は、8-MOP の用量に依存したスポット頻度の増加が認められ、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では全種類のスポットの合計 (全スポット) で約16倍の増加を示した。誘発されたスポットのうち77%が大シングルスポット、20%がふたごスポットであり、小シングルスポットは3%に過ぎなかった。この結果は、誘発されたスポットが主に染色体組換えによって生じたことを示唆している。

これらの結果から、今回実施した翅毛スポットテストの実験方法によって、*in vivo* 光遺伝毒性物質の、十分に高い検出感度が得られることが明らかとなった。今後は、*in vivo* での効果が不明な *in vitro* 光遺伝毒性物質の評価を行っていく予定である。

A. 研究目的

これまで *in vitro* の各種の試験系を用いて、多くの光遺伝毒性物質が検出されてきたが、これらの化合物の人間における安全性を評価するためには、*in vivo* の組織における作用を調べるのが重要である。しかし、

今までに *in vivo* の試験系により光遺伝毒性を評価された化合物は少ない。Negishi ら¹⁾ はショウジョウバエの翅毛スポットテストにより、8-methoxypsoralen が *in vivo* でも光遺伝毒性を示すことを明らかにした。この試験系は *in vivo* の変異原性試験の中では検出感

度が高く、比較的簡便である²⁾。

本研究は、光遺伝毒性試験としてのショウジョウバエ翅毛スポットテストを確立し、*in vitro* 光遺伝毒性物質について、*in vivo* での光遺伝毒性作用を調べることを目的として行っている。昨年度は、UVA を含むサンライトシュミレーター (SOL500, Dr Hönle) を用いて、照射条件等の基礎的な検討を行った。今年度は、光遺伝毒性物質として知られる8-メトキシソラレン (8-MOP) を用いて、実験方法の確立を目指した。

B. 研究方法

1. ショウジョウバエの系統および飼育方法

キイロショウジョウバエの多翅毛系統 (mwh, jv; spa^{pol}) の雌と、炎毛系統 (flr3/TM3, Ser) の雄を交配し F1 個体を実験に用いた (図1)。インスタント培地に 10 時間産卵させ、72±5 時間後に3齢幼虫を培地から分離して8-MOPの入ったシャーレに移して光照射を行った。飼育温度は 25±1°Cであった。光照射時を除いて幼虫の飼育は暗所で行った。

2. 8-MOP 処理および光照射

上記の幼虫を、1.5 mL の 0.25M スクロース液 (媒体) または 8-MOP 懸濁液が入ったプラスチック製シャーレ (直径約 3cm) に移して光照射を行った。照射には UVA を含むサンライトシュミレーター (SOL500, Dr Hönle) を用いた。UVA の照射強度は Dr Hönle の測定器では 1 mW/cm² (Topcon 製の測定器では 1.6-1.7 mW/cm²) とし、非照射群と 5 時間照射群を設けた。5 時間照射群の照射量は 18 J/cm² に相当する。

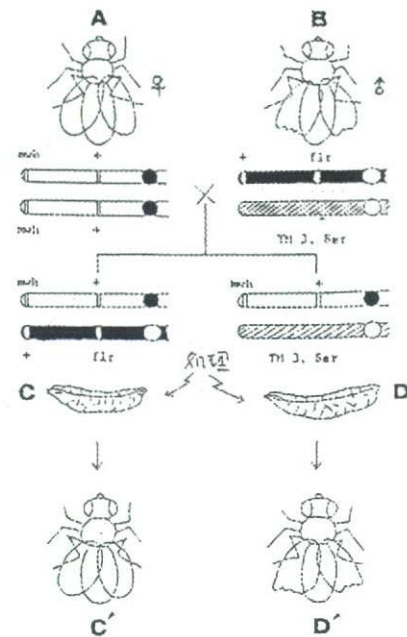


図1 ショウジョウバエの交配

3. 標本作製

照射後の幼虫をインスタント培地に移して飼育を続けた。羽化した成虫は、70%エタノール中で保管した。成虫には翅形が丸い個体と、翅形が切れ込んだ個体がある (図1)。翅形が丸い個体は、マーカー遺伝子である多翅毛 (mwh) および炎毛 (flr3) の突然変異に関して、共にヘテロ接合になっていて、幼虫期に突然変異が起きると翅毛スポットを生じる。この個体の翅を先の細いピンセットで切り離し、スライドガラス上に並べて Faure 液で封入した。

4. 標本観察

400 倍の顕微鏡下で、異常な翅毛の集まりである翅毛スポットの観察を行った。翅毛スポットには、多翅毛または炎毛の小シングルスロット (SS) および大シングルスロット (LS) と多翅毛と炎毛のスポットが隣接したふたごスポット (TS) がある (図2)。SS と LS は

染色体組換え、遺伝子突然変異および染色体の小欠失により生じるが、TS は染色体組換えのみから生じる。観察結果はスポットの種類ごとに集計した。

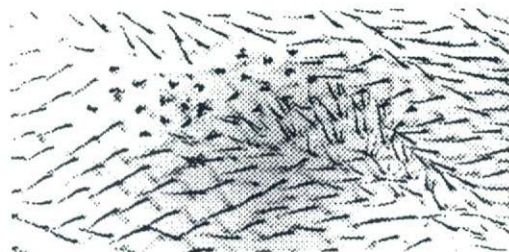


図2 ふたごスポット

5. 有意差検定

スポットの種類ごと、および全種類のスポットの合計(全スポット)について、非照射群と各照射群の間で、Kastenbaum and Bowman の表(1970)により有意差検定を行った。

C. 研究結果

翅毛スポットの観察結果を表に、用量反応曲線を図3に示す。サンライトシュミレーター非照射の場合は、陰性対照群と比較して8-MOP 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 処理で各種の翅毛スポットの頻度は増加しなかった。

表 翅毛スポットテストによる8-メトキシソラレンの光遺伝毒性試験

照射量	用量	観察枚数	小シングルスポット		大シングルスポット		ふたごスポット		全スポット	
			数	頻度	数	頻度	数	頻度	数	頻度
0	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	30	10	0.33	0	0.00	0	0.00	10	0.33
0	20 $\mu\text{g}/\text{mL}$	30	8	0.27	1	0.03	3	0.10	12	0.40
1 mW/cm^2 5時間	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	30	11	0.37	6	0.20 *	0	0.00	17	0.57
1 mW/cm^2 5時間	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	30	19	0.63	39	1.30 **	15	0.50 **	73	2.43 **
1 mW/cm^2 5時間	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	30	5	0.17	80	2.67 **	16	0.53 **	101	3.37 **
1 mW/cm^2 5時間	20 $\mu\text{g}/\text{mL}$	30	18	0.60	209	6.97 **	53	1.77 **	280	9.33 **

*: Significantly higher than negative control ($p < 0.05$)

** : Significantly higher than negative control ($p < 0.01$)

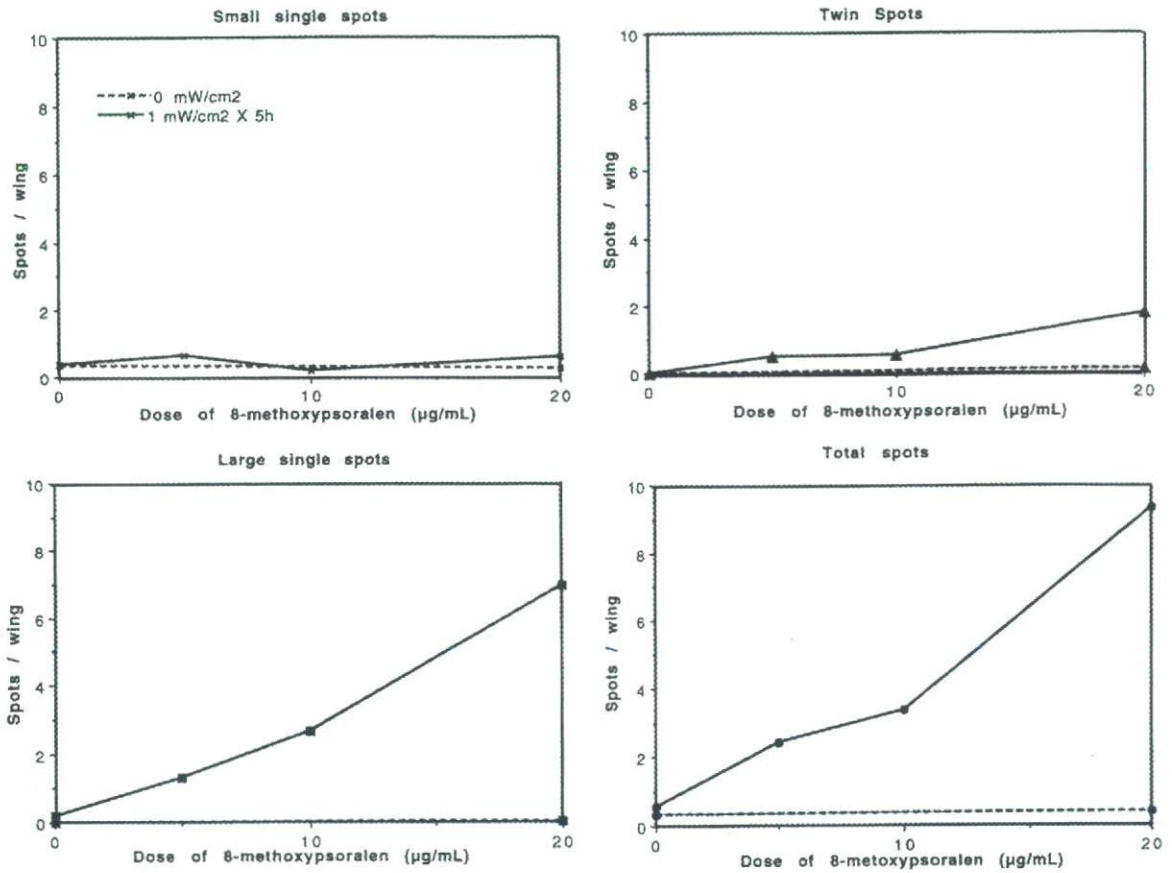


図3 翅毛スポットの用量反応曲線

サンライトシュミレーターで、UVA の照射強度を 1 mW/cm^2 として、5 時間の照射 (18 J/cm^2) のみを行った場合は、各種のスポット頻度は陰性対照群と比較してほとんど増加しなかった。照射と 8-MOP 処理を組み合わせた場合は、全種類のスポットの合計 (全スポット) で、8-MOP の用量に依存した直線的な頻度の増加が認められ、照射のみを行った群と比較して約 16 倍となった。したがって、8-MOP は本実験条件下で極めて強い光遺伝毒性を示すことが明かとなった。スポットの

種類ごとにみると、大シングルスポットおよびふたごスポットは用量依存的に増加したが、小シングルスポットには用量依存性はみられなかった。また、処理群のスポット頻度から陰性対照群のスポット頻度を差し引いた誘発スポット頻度のうち、77%が大シングルスポット、20%がふたごスポットであり、小シングルスポットは 3%に過ぎなかった。これらの結果から、誘発されたスポットは大部分が染色体組換えによって生じたものと考えられる。

D. 考察

本研究の結果、誘発されたスポットの大部分が大シングルスポットとふたごスポットであったのに対して、8-MOP の光遺伝毒性に関する Negishi ら¹⁾の報告では小シングルスポットが主であった。本研究では、UVB や UVC の少ないサンライトシミュレーター (SOL500, Dr Hönle) を使っているが、Negishi らの実験では、ブラックライトで照射し軟質ガラスでカバーしているため、UVB の比率がやや大きい。この紫外光の波長構成の違いが、生じたスポットの種類の違いに反映された可能性が高い。光照射のみの実験では、UVB が主として小シングルスポットを、UVA が主として大シングルスポットとふたごスポットを誘発することが知られている。この結果は、UVB が染色体の小欠失ないしは遺伝子突然変異を、UVA が染色体組換えを生じるためと解釈されている。8-MOP が光遺伝毒性を示す場合にも、同様のメカニズムの違いがあることが推察される。

本研究の結果、今回実施した翅毛スポットテストの実験方法によって、*in vivo* 光遺伝毒性物質の、十分に高い検出感度が得られることが明らかとなった。これまでに、*in vitro* で強い光遺伝毒性が確認された物質は多数知られているが、これらの大部分が *in vivo* での効果が不明なままである。今後は、本研究で確立した方法によって、これらの物質の *in vivo* における光遺伝毒性の評価を行っていく予定である。

E. 結論

今年度の研究成果により、光遺伝毒性物質をショウジョウバエ翅毛スポットテストによって高感度に検出する方法が確立された。

F. 引用文献

- 1) Negishi, T., Tanabe, F. and Hayatsu, H., The genotoxicity of UVA irradiation in *Drosophila melanogaster* and the synergistic action of 8-methoxypsoralen and UVA., *Carcinogenesis*, Vol. 13, 1433-1436, 1992.
- 2) Graf, U., Würigler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B. and Kale, P.G., Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*, *Environ. Mutagen.*, Vol. 6, 153-188, 1984.

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 川上久美子、原 巧、須井 哉、中川ゆづき、田中憲穂、澁谷 徹: 微生物を用いる光遺伝毒性試験の確立、第 28 回日本環境変異原学会

分担研究報告書

7. 一重項酸素による皮膚障害

分担研究者 長野 哲雄 東京大学大学院薬学研究科 教授

研究協力者 荒金 久美 (株)コーセー 基礎研究所 主任研究員

研究要旨

一重項酸素は光毒性における重要な活性種であると考えられているが、この反応種を特異的かつ高感度で検出する方法が確立していないため、作用機構については混沌とした状態にあった。我々は特異的な検出法として近赤外発光検出器を作製し、一重項酸素による特異的発光である 1268 nm を捉えることによりこの問題を解決した。更にこれを用いて皮膚障害における一重項酸素の関与と分子レベルでの障害機構の解析を行った。

A. 研究目的

活性酸素は、炎症、癌、虚血後の酸化障害などの疾患に深く関与していることが知られているが、近年では日焼け、光毒性、光アレルギーといった紫外線による皮膚障害やアトピー性皮膚炎、乾せんなどの皮膚疾患への関与も示唆されており、皮膚科領域においても活性酸素による障害が注目されてきている。皮膚は身体の最外層にあり、常に酸素に接触し紫外線に暴露される上に皮脂や光感作物質が存在するため、紫外線により発生する活性酸素やそれにより生成した過酸化脂質を巻き込んだ酸化的損傷が起こりやすい^{1, 2, 3)}。

紫外線により発生する活性酸素は種々知られているが、常に紫外線を浴びている皮膚での反応を考える場合、光増感反応により容易に発生する一重項酸素は他の活性酸素に比べ、皮膚障害へ深く関与していると考えられる^{1, 4)}。一重項酸素は、ヒドロキシラジカル、スーパーオキド、過

酸化水素等の活性酸素種には見られない特異的な反応性を示すため、生体で発生した場合にも他の活性酸素とは異なる作用を引き起こすと考えられる。特に光が関与する様々な反応において一重項酸素は、その高い反応性と毒性の面から光化学的ダメージの重要な活性中間体と推定される例も多く、例えばポルフィリアの光過敏症、テトラサイクリンによる光毒性、癌の光療法などの活性種として重視されている。

しかし、これまで一重項酸素は他の活性酸素に比べると、その生体での反応性については明確な研究成果がほとんど報じられていない。その大きな原因の一つは、一重項酸素の検出方法として特異性、感度を兼ね備えた信頼性の高いものが確立されていなかったことが挙げられる^{5, 6)}。

実際、前述のポルフィリアの光過敏症、テトラサイクリンによる光毒性等の特別な例を除いては、生体で一重項酸素が検出されたり、明確な反応活性種であることが証明された例はほとんどなか

った。これは従来の一重項酸素の検出のほとんどが化学発光法や消去剤を用いた間接的な方法に基づいており、必ずしも他の活性酸素種の関与を否定できる特異性の高いものではなかったことに起因している。これらに対して、一重項酸素の $^1\Delta_g \rightarrow ^3\Sigma_g^-$ 遷移に伴う 1268 nm の発光を直接検出する方法は最も信頼性の高い方法である。我々は一重項酸素の高感度近赤外検出装置を製作し、種々の化合物からの一重項酸素の直接的検出を試みた。

今回、健康人皮膚表面で一重項酸素の発生源となる光増感物質について述べ、さらに一重項酸素が関与する皮膚障害機構を明らかにするこ

とを目的に種々検討を行った。以下にその概略を報告する。

B. 研究方法、研究結果

1. 一重項酸素の測定

光増感剤溶液にレーザー光を照射すると一重項励起状態 ($S_1, ^1\Delta_{g(0)}$) になる。その一部は系間交差により三重項励起状態 (T_1) になり、基底状態の三重項酸素 (3O_2) にエネルギーを移動させ一重項酸素を発生させる。一重項酸素はすぐに安定な基底状態に戻るが、このときに発する光を直接検出するのが我々の製作した装置の原理である (Fig. 1)。

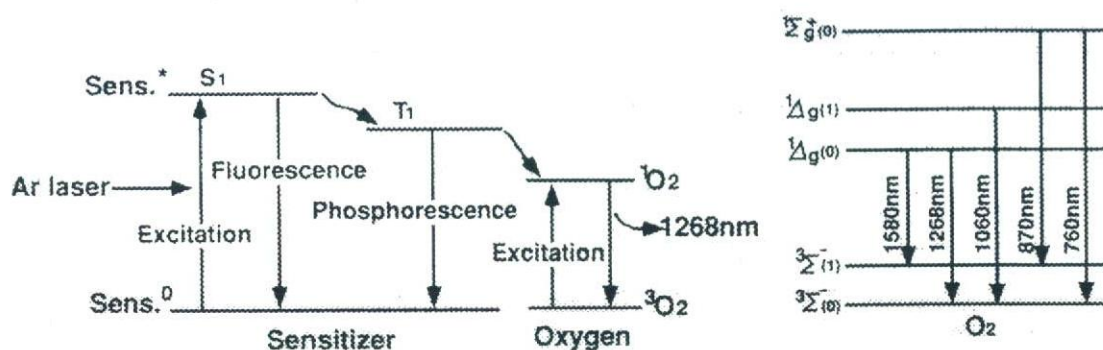


Fig.1 Detection of Singlet Oxygen at 1268 nm

Singlet oxygen was generated by photosensitized reaction and a near-infrared emission spectrum was obtained corresponding to the $O_2(^1\Delta_g) \rightarrow O_2(^3\Sigma_g^-)$ transition.

一重項酸素の発光には種々の波長の光があるが、その中でも比較的強度が高く他の生体成分由来の発光との区別が可能な 1268nm の発光をゲルマニウムダイオードを用いた検出器で検出した。

2. ポルフィリンによる一重項酸素発生検出²⁾

ヒトの皮膚表面には多くの細菌が棲息し、皮膚細菌叢を形成している。その中でも常に高頻度で検出される常在菌は、皮膚に対して何らかの作用を及ぼし皮膚状態とも深く関連していることが

推測される。皮膚の常在菌である *Propionibacterium acnes* (*P.acnes*) は、嫌気性菌で脂腺の中に棲息し、にきびの発生に深く関与しているとともに、代謝産物としてコプロポルフィリンとプロトポルフィリンのポルフィリン類を皮膚表面に排出することが知られている。これらのポルフィリンは皮脂の分泌とともに、皮膚表面へ移動するが、実際に健康人顔面に暗室下で紫外線ランプを照射するとポルフィリン由来の蛍光が観察され、その存在が確認できる (Fig. 2)。

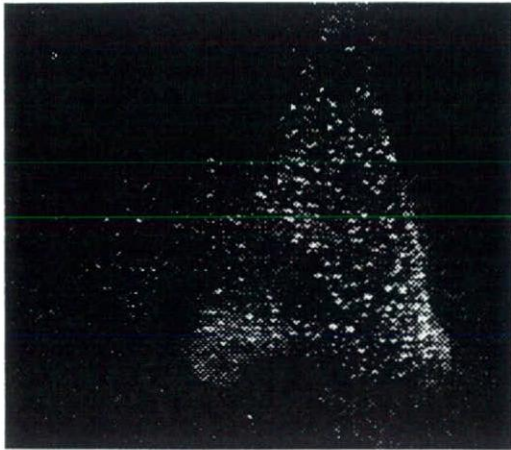


Fig.2 Observation of Fluorescence of *P.acnes* Porphyrin on the Skin Surface by Wood's Ultraviolet Light

皮膚から採取した *P.acnes* を培養して代謝産物として排出されたポルフィリンの抽出、分離を行ったところ、吸収スペクトルの λ_{max} が 400nm であ

り、500~600nm にポルフィリンに特徴的な吸収ピークを有すること、最大励起波長で励起したときの蛍光スペクトルがコプロポルフィリンのそれと一致することから、得られたポルフィリンの殆ど全てがコプロポルフィリンであることがわかった (Fig. 3)。

この *P.acnes* 由来のポルフィリンの皮膚表面での蛍光は、*P.acnes* の分布状態やアクネ患者に対する抗生物質投与の効果を観察する非破壊的な手段としては皮膚科領域でも利用されていたが、活性酸素の発生源としてはこれまで捉えられていなかった。しかし、このコプロポルフィリン溶液を一重項酸素発生測定試料とし、この溶液に紫外部のレーザー光を照射したところ、一重項酸素由来の 1268nm における発光が検出され (Fig. 4)、その発光強度はコプロポルフィリンの濃度に依存した (Fig. 5)。

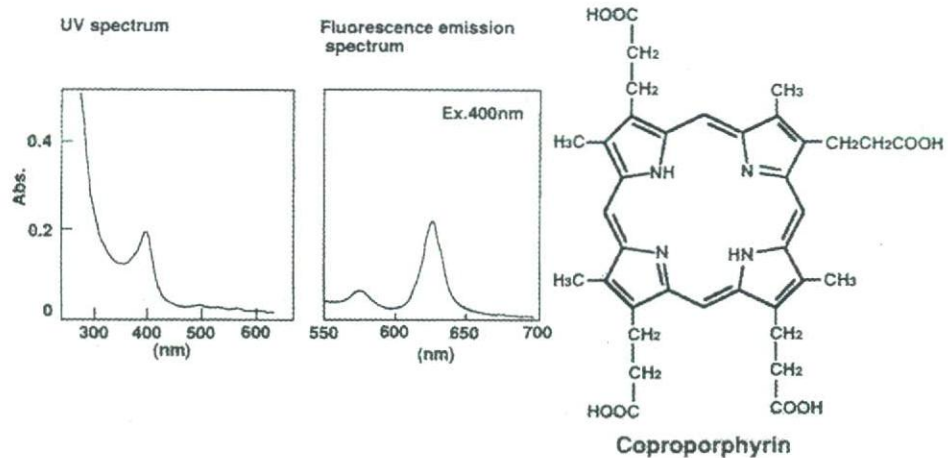


Fig.3 UV Spectrum and Fluorescence Emission Spectrum from *P.acnes* Porphyrin
P.acnes from the skin surface was cultured under the anaerobic condition and porphyrin produced by *P.acnes* was extracted by acetone.