

Fig.4 Near-Infrared Singlet Oxygen Emission Spectrum in P.acnes Porphyrin Aceton Solution Excited by Ar Laser Light at UV-A Region with 40 mW Output Power

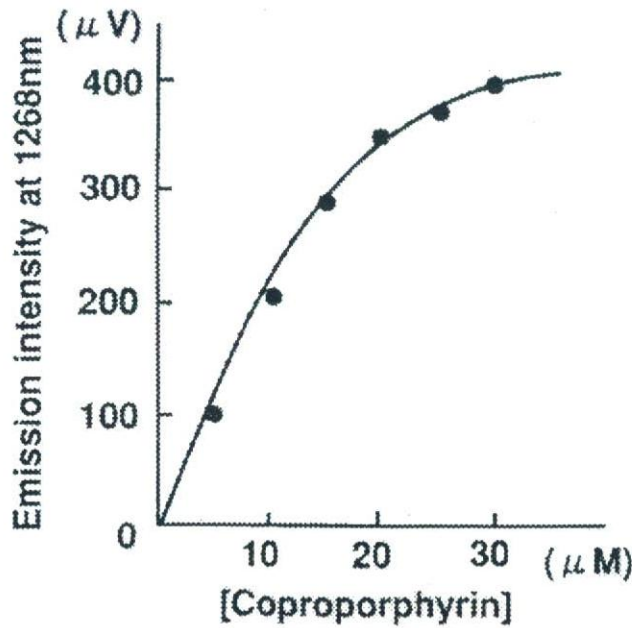


Fig.5 Effect of Coproporphyrin Concentration on the Singlet Oxygen Emission at 1268 nm
Singlet oxygen generation in coproporphyrin methanol solution (5-30 μM) excited by Ar laser light at UV-A region with 100 mW output power was monitored by measuring the emission intensity at 1268 nm

さらに紫外線領域におけるその発光強度は、光増感剤として良く用いられているリボフラビンやローズベンガルより極めて多く、ヘマトポルフィリンと同等量であることから、一重項酸素発生能が

極めて高い光増感剤が実際に皮膚表面に存在していると言える (Fig. 6)。

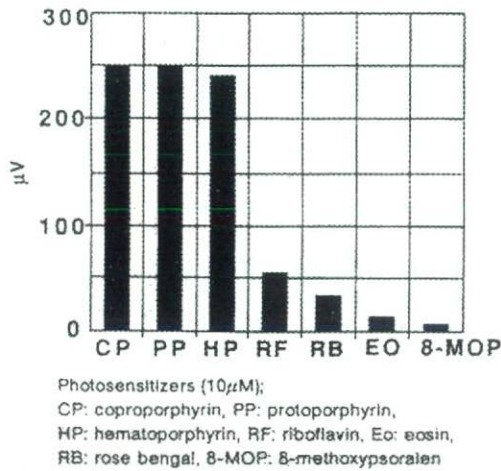


Fig.6 Comparison of Emission Intensities of Singlet Oxygen Produced by Various Photosensitizers under UV-A

The emission intensity at 1268 nm was measured in the chloroform/methanol solution of a photosensitizer at the concentration of 10 μM, excited by Ar laser light at UV-A region with 35 mW output power

これまでポルフィリア症等の特殊な場合にのみ一重項酸素の関与が証明されていたが、*P.acnes*由来のポルフィリンが紫外線照射により一重項酸素を発生するという事は、生理的条件下の健康人皮膚においても一重項酸素が発生し得ることを示唆するものであり、皮膚を反応の場とする様々な生理現象や疾病への一重項酸素の関与が考えられる。

3. 一重項酸素による皮表脂質の過酸化⁷⁾

3-1. 一重項酸素とスクワレンとの反応速度定数の測定

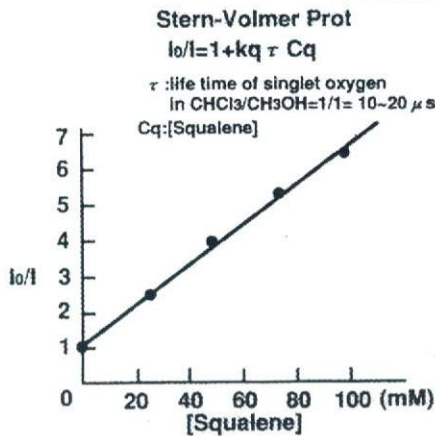
*P.acnes*の産生したポルフィリンは皮脂の分泌とともに皮膚表面に移動することは既に述べた。また皮脂腺は掌や足の裏を除く身体全体に分布し、特に顔面には多くその数は400-900個/cm²にもものぼると報告されている。皮表脂質のほとんどはこの皮脂腺由来の脂質であり、その構成はトリグリセライドとその分解物である脂肪酸等が

60%、ワックスエステルが25%そしてスクワレンが10%である⁸⁾。これらの構成脂肪酸のほとんどは飽和あるいは二重結合が一つであり酸化安定性に優れているため、スクワレンが最も酸化されやすいと考えられる。そこで、まず一重項酸素とスクワレンとの反応速度定数を求め、他の皮表脂質成分のそれと比較した。コプロポルフィリン溶液に紫外線を照射すると一重項酸素が検出され、その発光強度はスクワレンの添加濃度に依存して減少した。その結果をStern-Vormer式に従いプロットし、得られた直線の傾きから反応速度定数を求めた結果、他の皮表脂質構成成分と比較するとスクワレンは極めて一重項酸素と反応しやすいことが明らかになった(Fig. 7)。

3-2. スクワレンペルオキシドの定量

慢性障害と関係が深い過酸化脂質の生成と蓄積は、紫外線照射後や日光露光部、また老化によっても増加することが報告されている。また、皮膚表面での過酸化脂質の生成や、過酸化脂質と疾病との関連を示唆する報告は古くからなされているが、その生成メカニズムに関する報告はほとんど見られない。

筆者らの実験では、過酸化脂質は紫外線照射のみでは生成せず、コプロポルフィリン存在下、発生する一重項酸素によって速やかに生成することがわかった(Fig. 8)。



Substrate	$k_q \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$
Squalene	$2.8\text{--}5.6 \times 10^6$
Oleic acid	1.3×10^5
Cholesterol	1.8×10^4

Fig.7 Determination of Rate Constant of the Reaction of Singlet Oxygen with Squalene
 Singlet Oxygen generation in coproporphyrin (100 μM) chloroform/methanol solution was monitored with or without squalene (0–97 μM) by measuring the emission at 1268 nm, excited by Ar laser light at UV-A region with 40 mW output power. Stern-Volmer plot for the ratio of the emission intensity with (I) or without (I₀) squalene is $I_0/I = 1 + k_q \tau C_q$.

紫外線による脂質の過酸化反応は一重項酸素を介する反応だけではないが、これまでに報告されている皮膚表面のスクワレンペルオキシドの量と筆者らの実験で生成したスクワレンペルオキシドの量がほぼ等しいことや、実際皮膚表面ではスクワレンのような脂質と *P.acnes* 由来のコプロポルフィリンが共存していることを考えると、紫外線による皮膚脂質の過酸化反応には一重項酸素の寄与が大きいと予想される。

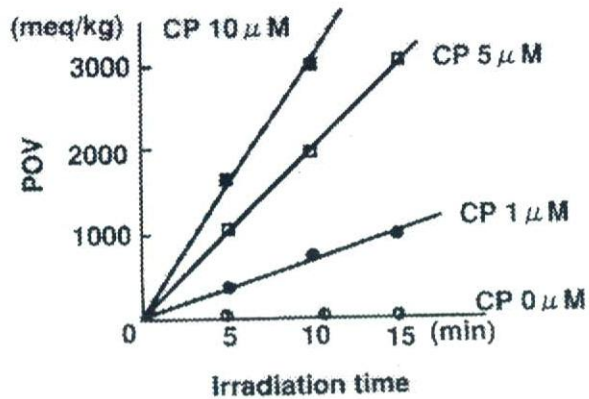


Fig.8 Peroxidation of Squalene by Singlet Oxygen Produced by Coproporphyrin
 Squalene chloroform/methanol solution (5 mM) was irradiated with UV-A (1.7 mW/cm²) by solar simulator with coproporphyrin (0–10 μM) and POV was measured at the indicated time.

4. 一重項酸素によるコラーゲンの架橋形成⁹⁾

コラーゲンは肌の弾力性や柔軟性に関与している真皮の重要な構成成分である。しかし、コラーゲンは生体内での代謝回転が遅いため、様々な化学修飾を受けやすい。そのため加齢と共に形成される架橋が老化現象の一因ではないかとも言われており、メイラード反応生成物の蓄積等と共に老化の指標として取り上げられている。その架橋の種類についてはピリノリジン等の非還元性架橋やメイラード反応生成物類似の蛍光特性を持つ物質等の存在が報告されているが、著者らの実験では一重項酸素がこれらの架橋とは異なる架橋を速やかに形成することがわかった。

すなわち、紫外線を照射しただけではコラーゲンに架橋は形成されないが、光増感剤存在下紫外線を照射すると光増感剤の濃度に依存して、つまり発生している一重項酸素の量に依存して速やかに架橋が形成されることがわかった (Fig. 9)。

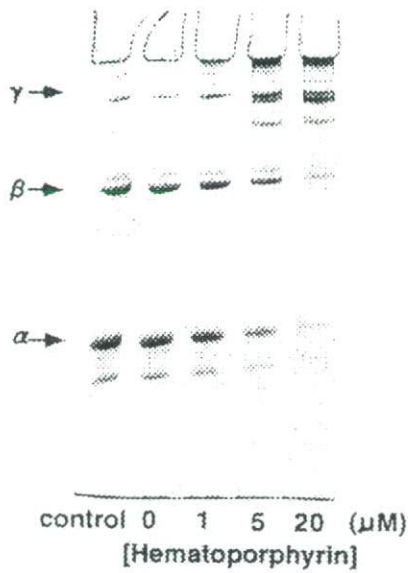


Fig.9 Cross-linking of Collagen by Hematoporphyrin-photosensitized Singlet Oxygen

また紫外線は一重項酸素以外にもスーパーオキシドなどの活性酸素を発生しうることが知られており、それらの活性酸素もコラーゲンの架橋形成に関与している可能性があると考えられる。そこで一重項酸素以外の活性酸素の関与について検討したところ、スーパーオキシドの消去酵素であるSODやヒドロキシラジカルの除去剤であるマンニトールを加えても架橋形成は阻害されなかった。従って、この架橋形成には一重項酸素以外の活性酸素種であるスーパーオキシドやヒドロキシラジカルは関与していないといえる (Fig. 10)。

スーパーオキシドやヒドロキシラジカルはタンパクの断片化を引き起こすことがこれまでに報告されているが、一重項酸素はこれらとは異なり架橋形成を起こすという興味深い結果であった。

C. 考察

紫外線による皮膚障害については、紫外線のエネルギーによる直接的な障害も種々の共同作

用で間接的に起こるものも一様に扱われてきたが、その障害の原因に実際は紫外線により発生する一重項酸素を中心とした活性酸素が関与している場合も多いのではないかとと思われる。今後紫外線による皮膚障害や皮膚老化の解明及びその防御についての研究を進めるにあたり、ますます活性酸素の重要性が増すと考えている。

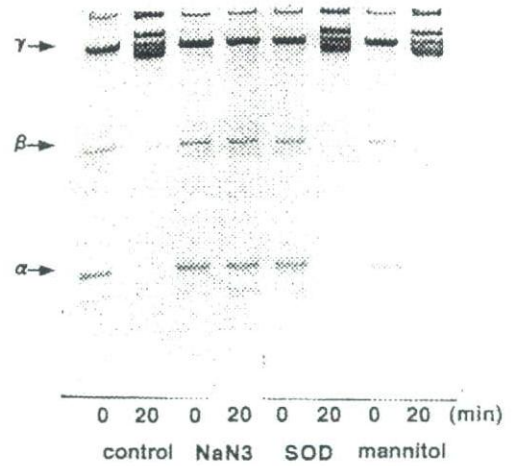


Fig.10 Effect of Various Quenchers for Active Oxygen Species on Cross-Lin

E.. 引用文献

- 1) 伊藤敦: 紫外線による活性酸素の生成, 活性酸素・フリーラジカル, 4:6-12, 1993.
- 2) 小倉良平, 杵山正康: 紫外線と活性酸素・フリーラジカル, 活性酸素・フリーラジカル, 3:270-277, 1992.
- 3) 上田宏: 過酸化脂質と皮膚疾患, 活性酸素・フリーラジカル, 3:291-297, 1992.
- 4) 松尾幸朗, 大城戸宗男: 皮表脂質の光増感酸化と光線過敏症, 日本化粧品科学会誌, 10:138-140, 1986.
- 5) 牛島義雄: 一重項酸素の測定法, 活性酸素-科学・生物学・医学, 医歯薬出版社, 127-138, 1987.

- 6) 中野稔:一重項酸素と発光, 活性酸素と発光, 日本医学館, 47-54, 1990.
- 7) 笠明美, 荒金久美, 林千賀子, 増永卓司, 新本浩一, 長野哲雄, 廣部雅昭, 益子信郎: Propionobacterium acnes 由来ポルフィリンによる一重項酸素の産生と皮表脂質の過酸化, 日本化粧品科学会誌, 19:1-6, 1995.
- 8) 旭正一:皮膚の機能, 皮膚科学, 南山堂, 26, 1990.
- 9) 笠明美, 荒金久美, 増永卓司, 新本浩一, 長野哲雄, 廣部雅昭, 益子信郎:一重項酸素によるコラーゲンの重合, 粧技誌, 28:163-171, 1994.
- Omata M, Hypertension, 33, 467-471 (1999).
4. "Dipeptides Containing L-Arginine Analogs: New Isozyme-selective Inhibitors of Nitric Oxide Synthase" Nobutaka Kobayashi, Tsunehiko Higuchi, Yasuteru Urano, Kazuya Kikuchi, Masaaki Hirobe and Tetsuo Nagano, Biol. Pharm. Bull., 22, 936-940 (1999).
5. "Synthesis and Evaluation of 1-Position-modified Inositol 1,4,5-Trisphosphate Analogs" T. Inoue, K. Kikuchi, K. Hirose, M. Iino and T. Nagano, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letter, 9, 1697-1702 (1999).
6. "Novel Fluorescent Probes for Singlet Oxygen" Naoki Umezawa, Kumi Tanaka, Yasuteru Urano, Kazuya Kikuchi, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano, Angewandte Chemie Int. Ed., 38, 2899-2901 (1999).
7. "Imaging of Caspase-3 Activation in HeLa Cells Stimulated with Etoposide Using a Novel Fluorescent Probe" Shin Mizukami, Kazuya Kikuchi, Tsunehiko Higuchi, Yasuteru Urano, Tetsuo Mashima, Takashi Tsuruo and Tetsuo Nagano, FEBS Lett., 453, 356-360 (1999).
8. "Absolute Configuration of Cathine" Kentaro Yamaguchi, Yukiko Makino, Yasuteru Urano and Tetsuo Nagano, Analytical Science, 15, 1039-1040 (1999).
9. "Fluorescent Indicators for Imaging Nitric Oxide Production" Hirotatsu Kojima, Yasuteru Urano, Kazuya Kikuchi, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano, Angewandte Chemie Int. Ed., 38, 3209-3212 (1999).
10. "Novel Iron Porphyrin-alkanethiolate

F. 研究発表

1. 論文発表

1. "Effects of Hypertension, Diabetes Mellitus and Hypercholesterolemia on Endothelin Type B Receptor-Mediated Nitric Oxide Release From Rat Kidney" Kakoki M, Hirata Y, Hayakawa H, Tojo A, Nagata D, Suzuki E, Kimura K, Goto A, Kikuchi K, Nagano T, Omata M, Circulation, 99, 1242-1248 (1999).
2. "Role of Nitric Oxide-cGMP Pathway in Adrenomedullin-induced Vasodilation in the Rat" Hayakawa H, Hirata Y, Kakoki M, Suzuki Y, Nishimatsu H, Nagata D, Suzuki E, Kikuchi K, Nagano T, Kangawa K, Matsuo H, Sugimoto T, Omata M, Hypertension, 33, 689-693 (1999).
3. "Effects of Vasodilatory β -Adrenoceptor Antagonists on Endothelium-Derived Nitric Oxide Release in Rat Kidney" Kakoki M, Hirata Y, Hayakawa H, Nishimatsu H, Suzuki Y, Nagata D, Suzuki E, Kikuchi K, Nagano T,

- Complex with Intramolecular NH...S Hydrogen Bond: Synthesis, Spectroscopy and Reactivity" Noriyuki Suzuki, Tsunehiko Higuchi, Yasuteru Urano, Kazuya Kikuchi, Hidehiko Uekusa, Yuji Ohashi, Takeshi Uchida, Teizoh Kitagawa and Tetsuo Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 11571-11572 (1999).
11. "Inhibition of E. coli Growth by Fullerene Derivatives and Inhibition Mechanism" *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 9, 2959-2962 (1999).
 12. "Practical methods for Detection of Nitric Oxide" Tetsuo Nagano, *Luminescence*, 14, 283-290 (1999).
 13. "Mechanism of Superoxide Dismutase Activity of Fe(II) and Fe(III) Complexes of Tetrakis-N,N,N', N' (2-pyridylmethyl) ethylenediamine" Tomohisa Hirano, Masaaki Hirobe, Kazuo Kobayashi, Akira Odani, Osamu Yamauchi, Masanori Ohsawa, Yoshinori Satow and Tetsuo Nagano, *Chem. Pharm. Bull.*, 48, 223-230 (2000).
 14. "Effects of Tetrahydrobiopterin on Endothelial Dysfunction in Rats with Ischemic Acute Renal Failure" Masao Kakoki, MD, Yasunobu Hirata, MD, Hiroshi Hayakawa, MD, Etsu Suzuki, MD, Daisuke Nagata, MD, Akihiro Tojo, MD, Hiroaki Nishimatsu, MD, Kazuya Kikuchi, Ph D, Tetsuo Nagano, Ph D, Masao Omata, MD, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 11, 301-309 (2000).
 15. "Fluorecent indicators for nitric oxide based on rhodamine chromophore" Hirotatsu Kojima, Miki Hirotani, Yasuteru Urano, Kazuya Kikuchi, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano, *Tetrahedron Lett.*, 41, 69-72 (2000).
 16. "Synthesis of Various Water-Soluble C60 Derivatives and Their Superoxide-Quenching Activity" *Fullerene Science and Tecnology*, in press.
 17. "Novel zinc fluorescent probe excitable with visible light" Tomoya Hirano, Kazuya Kikuchi, Yasuteru Urano, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano, *Angewandte Chemie Int. Ed.*, in press.
 18. "Fluorescent Indicators for Nitric Oxide" Hirotatsu Kojima and Tetsuo Nagano, *Advanced Materials*, in press.
 19. "Synthesis and Superoxide Dismutase Activity of Novel Iron Complexes" Masakazu Tamura, Yasuteru Urano, Kazuya Kikuchi, Tsunehiko Higuchi, Masaaki Hirobe and Tetsuo Nagano, *J. Organomet. Chem.*, in press.
 20. "神経系における機能解明を志向した NO のバイオイメージング" 小島宏建, 長野哲雄, *神経研究の進歩*, 43, 179-186 (1999).
 21. "一酸化窒素の分析法" 小島宏建, 長野哲雄, *ぶんせき*, 291, 239-245 (1999).
 22. "生理活性解明へ向けた NO 測定法" 小島宏建, 長野哲雄, *脳の科学*, Vol. 21, No. 3, 303-307 (1999).
 23. "NO 測定系とその問題点, 特集: 消化器疾患とNO" 小島宏建, 菊地和也, 長野哲雄 *臨床消化器内科*, Vol. 14, No. 6, 655-661 (1999).
 24. "NO 測定法の新展開 ~NO をみる~" 小島宏建, 長野哲雄, *実験医学*, Vol. 17, No. 8, 946-950 (1999).
 25. "NO を測る" 長野哲雄, 小島宏建, *化学と教*

育、47,10月号, 665-669, 1999年.

26. "「科学技術創造立国に向けて」大学研究室からの発信 ～生細胞プローブの開発研究～" 長野哲雄、ファルマシア、10月号, 1026-1030 (1999).
27. "生細胞プローブの分子設計 ～一酸化窒素(NO)蛍光プローブ DAFの開発～" 長野哲雄, 小島宏建, 現代化学, 9月号, No. 342, 23-30, (1999).

8. 光照射による皮膚細胞突然変異の検出

分担研究者 林 真 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部部長

研究協力者 鈴木孝昌 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部

研究要旨

紫外線特異的変異である CC から TT への変化を、ヒト癌抑制遺伝子 *p53* およびミトコンドリア遺伝子を指標として検出するための変異アレル特異的 PCR 法の確立を行った。変異を持つ DNA サンプルを一定濃度で含むサンプルを用いた条件検討の結果、*p53* 遺伝子に対しては 10^{-4} から 10^{-5} 、ミトコンドリア遺伝子に対しては 10^{-6} から 10^{-7} レベルの検出感度を得ることができた。この方法を用いて培養ヒト皮膚細胞およびヒト皮膚組織を材料として解析を行った結果、*p53* 遺伝子上には変異は検出できなかったが、ミトコンドリア上の変異を 10^{-6} レベルで検出することができた。

A. 研究目的

突然変異の検出には通常表現形質の変化として選択できる標的遺伝子が必要となるため使える遺伝子は限られ、その目的で外来遺伝子を導入したトランスジェニックマウスが用いられたいしている。ヒトにおける紫外線等の環境変異原物質による発癌のリスクを早い段階から評価するためには、癌抑制遺伝子など、その遺伝子上の変異が重要な意味を持つ内在性の遺伝子を標的として、高感度に変異を検出する必要がある。そのためには、突然変異の検出を表現形質にたよらず、直接遺伝子を調べ遺伝子型に基づく変異の検出が必須となる。光毒性を考える上で基本となる紫外線の作用に関しては、隣接するピリミジン塩基部位での C から T への変異を誘発する事が

知られており、特に CC から TT へのタンデム変異は紫外線特異的な変異として遺伝子型に基づく変異の検出に適している。本研究では、アレル特異的 PCR を利用して、この紫外線特異的突然変異を高感度に検出する手法の確立を行い、紫外線によるリスク評価への応用をめざすとともに、光毒性発現の際のメカニズム解析に役立てること目的とする。

B. 研究方法

1. ヒト *p53* 遺伝子上の紫外線特異的変異の検出

p53 遺伝子の変異のホットスポットであるコドン 247-8 部位に CC から TT の変異を持つ DNA (色素性乾皮症(XP)患者の皮膚癌組織由来)を陽性対照とし、この変異に特異的なブ

ライマーをデザインし、変異配列が特異的に増幅されるPCRの条件検討を行った。条件検討の後、*in vitro*で紫外線(UVB)を照射した正常およびXP由来繊維芽細胞、UVB照射をしたボランティアなどから得られた皮膚のバイオプシーサンプルを用いて、p53コドン247-8CC→TT変異の検出を試みた。

2. ヒトミトコンドリア遺伝子上の紫外線特異的変異の検出

ヒトミトコンドリア遺伝子上に紫外線特異的なCC→TT変異を持つサンプルは入手できないため、まずヒトミトコンドリア tRNA^{Lys}とNADH dehydrogenase-1 遺伝子を含む断片(bp 2932-4161)をベクター上にクローニングし、bp 3351-2のCC配列を標的として部位特異的変異導入法によりTTへと変異させ、陽性対照サンプルを作製した。これを用い、この変異に特異的なプライマーによるアレル特異的PCRの反応条件の検討を行った。そして、ヒト皮膚バイオプシーサンプル由来のDNAにおける紫外線特異的変異の検出を試みた。

(倫理面への配慮)

ボランティア(英国 ICRF)および皮膚癌患者(神戸大学医学部)より提供されたバイオプシーサンプルは、当該研究に関する十分な説明を行い、本人の承諾を得た上で入手している。本研究により得られる変異に関する情報は、提供者が本来持つ遺伝情報とは異なるため、得られた結果が本人に不利益をもたらす可能性はない。

C. 研究結果

1. ヒト p53 遺伝子上の紫外線特異的変異の検出

正常ヒトリンパ球より抽出したゲノムDNA 5mgに陽性対照DNAを 10^{-3} から 10^{-7} の頻度で添加したものを鋳型とし、まずp53遺伝子のexon7を増幅後、アレル特異的PCRを行うことにより、 10^{-4} から 10^{-5} 程度の変異検出感度を得る事ができた。この条件を用いて、紫外線照射した紫外線(UVB)を照射した正常およびXP由来繊維芽細胞などにおけるコドン247-8のCCからTTの変異の検出を行ったところ、いずれの場合にも陽性結果を示すサンプルは得られなかった。

2. ヒトミトコンドリア遺伝子上の紫外線特異的変異の検出

部位特異的変異導入法により作成した変異DNAサンプルを一定量含む標品を用いてアレル特異的PCR法の条件検討を行ったところ、1段階のPCR反応で 10^{-4} から 10^{-5} の検出感度が得られた。さらに検出感度を上げるため、変異配列に対しさらに一塩基のミスマッチを導入したプライマーを使用したところ、検出感度を 10^{-7} まで高めることができた。この方法を用いヒト癌および正常皮膚組織由来111サンプルについて解析を行ったところ、17サンプルで陽性の結果が得られた。このうち大部分は顔、手などの紫外線暴露が考えられる部位由来であった。しかし、癌と正常組織の間には明らかな差は認められなかった。一方、皮膚以外の紫外線暴露が起らない組織由来の50サンプルを用いた解析の結果、陽性結果を示すものはなかった。

D. 考察

今回のp53遺伝子に関する変異解析の結果から、実験的に紫外線を照射した場合でも、特定部位に起こる特定の突然変異頻度はか

なり低い(10^{-6} 以下)ことが予想された。アレル特異的 PCR 反応に使用できる DNA 量は最大 5mg 程度であり、これは細胞約 1.5×10^6 個のゲノム DNA 量に相当するため、p53 などゲノム DNA を標的とした場合の理論的検出限界は 10^{-6} 程度となる。一方、ミトコンドリア DNA は細胞中に数千コピー存在するため、標的数が増え、理論的な検出限界が上がる。またミトコンドリアでは DNA 修復能が低いいため、変異が起りやすいと考えられる。ミトコンドリア遺伝子を標的としたアレル特異的 PCR 法の検討により、 10^{-7} レベルの検出感度が得られ、これにより実際のヒトサンプルで紫外線特異的変異が検出可能となったことにより、ミトコンドリア遺伝子を標的とする有効性が示された。さらにここで、紫外線暴露との関係が深い部位で陽性結果が得られたことより、指標とした変異が紫外線暴露を反映するものであると考えられる。また、この変異は細胞の機能に与える影響は小さいと予想され、発癌とは直接的に関連しないため、癌と正常組織の間の変異陽性率に差がなかったと考えられる。このことより、ミトコンドリア DNA を指標とした解析は、直接発癌リスクとは結びつかないものの、紫外線への暴露量を反映する指標として間接的なリスク評価に役立つと期待できる。

E. 結論

p53 遺伝子の特定部位に起こる紫外線特異的な変異の頻度はかなり低く、アレル特異的 PCR 法による検出が難しかった。

一方ミトコンドリア DNA を標的とすることによりより高感度な検出が可能となり、紫外線暴露を反映した陽性結果が得られた。この結果より、ミトコンドリア DNA 上の紫外線特異的変異の検出は、生体の紫外線暴露の指標として皮膚

癌発生のリスク評価に応用できると期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kawasaki K., Suzuki T., Ichihashi M., Reguer G., Yamasaki H.,
CC to TT mutation in the mitochondrial DNA of normal skin: Relationship to ultra-violet exposure.
Mutation Res. in press (2000)

Suzuki T, Itoh S, Nakajima M, Hachiya N, Hara T,
Target organ and time-course in the mutagenicity of five carcinogens in MutaTM Mouse: a summary report of the second collaborative study of the transgenic mouse mutation assay by JEMS/MMS
Mutation Res. 444: 259-268 (1999)

Suzuki T, Uno Y, Idehara K, Baba T, Maniwa J, Ohkouchi A, Wang X, Hayashi M, Sofuni T, Tsuruoka M, Miyajima H, Kondo K,
Procarbazine genotoxicity in the MutaTM Mouse; strong clastogenicity and organ-specific induction of lacZ mutations.
Mutation Res. 444: 269-281 (1999)

2. 学会発表

鈴木孝昌, 小原有弘, 王 雪, 本間正充, 林 真
トランスジェニックマウスを用いる突然変異スペクトルの解析における λ cII 遺伝子の有用性
環境変異原学会 第 28 回大会(岐阜)1999

小原有弘, 鈴木孝昌, 平野紀子, 大澤浩一,
大和田智彦, 本間正充, 林 真
o-Aminoazotoluene により誘発される突然変
異のスペクトル
環境変異原学会 第 28 回大会(岐阜)1999

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし