

サンスクリーンの紫外線性表皮障害に対する 防御作用の免疫生物学的研究

浜松医科大学

古川 福実

UVB is well known to induce anti-ENA antibody binding on the surface of human cultured keratinocytes. In SLE-prone MRL/lpr mice, UVB irradiation accelerates the onset of skin lesions and augments the cytotoxicity of cultured cells. Based on our previous reports, we examined the preventive effects of sun screen on UVB-induced changes *in vitro* and *in vivo*.

Normal human cultured keratinocytes were purchased from Clonetics (EPI-PACK, San Diego). MRL/l mice were maintained in our laboratory. As the sun screen, di-(p-methoxycinnamoyloxy)-mono-(2'-ethylhexanolyloxy) propane was dissolved in acetone for *in vitro* test and in the base cream for the *in vivo* test.

In vitro MTT assay revealed the 1~2% sun screen solution in acetone blocked completely the UVB-induced cytotoxicity of EPI-PACK cells, mouse keratinocytes and mouse fibroblasts in culture. Anti-ENA antibody binding to cultured human keratinocytes was markedly suppressed by sun screen. Long-term exposure to 500mJ/cm² UVB light accelerated the development of skin lesions in MRL/l mice painted with base cream. In contrast, 2 or 4% sun screen painting blocked the early onset of skin lesions.

These results suggested the usefulness of sun screen in the prevention of photocytotoxicity in human and murine lupus dermatoses.

1. 緒言

近年、日光特に紫外線による皮膚障害が、有棘細胞癌や基底細胞癌などの悪性新生物、加齢および一部の自己免疫疾患の発症あるいは修飾因子として注目されている。主たる原因は皮膚を構成する表皮細胞や線維芽細胞の中波長紫外線（UVB、波長280-320nm）に対する細胞障害性や易感受性にある。このような紫外線による皮膚障害を防止する目的で多種のサンスクリーン剤が用いられ一定の効果をあげている。しかし、サンスクリーン剤の組織障害性に対する防御作用については、

未だ十分に解明されているとは言い難い面があるのも事実である。

紫外線の細胞障害性や易感受性の研究においては従来、地表に到達しない短波長紫外線（UVC、波長280nm以下）を用いた研究が主であった。しかし、実際の日常生活においては、UVBやUVA（長波長紫外線、波長320nm以上）の細胞障害性や易感受性が問題となる。この点については、国内外の研究成果は十分ではなく、易感受性の検索方法については確立した方法さえもないのが現状である。そこで、我々は今回下記の点を、主に免疫学ならびに生物学的手法により明らかにするために研究を行った。

Immunological Effects of Sun Screen on Human and Murine Keratinocytes Irradiated with UltraViolet B Light



Fukumi Furukawa
Hamamatsu University
School of Medicine

- 1) UVB照射に対する培養細胞の易感受性の検討
- 2) サンスクリーン剤の紫外線（特にUVB）による細胞毒性防御能は均一であるか否か。すなわち、各個人別の培養表皮細胞を得ることにより、その均一性の有無を検討する。

3) サンスクリーン剤の自己免疫疾患とくにエリテマトーデスにおける光線過敏性(易感受性)への有効性が指摘されている。紫外線に対する易感受性に対するサンスクリーン剤の有用性の解析を行う。

2. 実験と結果

2.1 細胞毒性への効果

培養細胞株として、マウス由来の Pam212、HSC-1 (人由来皮膚 squamous cell carcinoma) を用いた(京都大学医学部皮膚科井階幸一先生より分与)。また、成人あるいはマウスの表皮あるいは真皮線維芽細胞の培養を行った。

ヒト表皮培養細胞は、新生児包皮より得た皮膚組織を0.25%トリプシンで4℃20時間処理した後、表皮と真皮を剥離した。表皮細胞浮遊液は、MCDB153培地を基本とするKGM培地で無血清の条件下で型のごとく(37℃、5%CO₂インキュベーター内)行った。真皮組織はコラゲナーゼ処理で線維芽細胞浮遊液を得た後、10%FCSを含んだM199培地で培養した。また、正常人や光線過敏性を示す代表的疾患であるループスエリテマトーデス(LE)の患者の表皮細胞培養は、我々が開発した人工表皮水疱作製器^{1, 2)}と培養方法³⁾を用いて行った。

マウスの表皮細胞と真皮線維芽細胞の培養も、基本的には上記の方法によった⁴⁾。

サンスクリーン剤として、di-(p-methoxycinnamoyloxy)-mono-(2'-ethylhexanoyloxy) propane (サンガードB、以下SB)を用いた。実験によっては、SBのコントロールとしてbase cream (oil 13%, moisture 7%, UV absorbent 8%, P-25 3%, water 69%)を用いた。

線源として、Toshiba FL-20SE30 サンランプを用いた。同ランプは305nmの波長にピークを有し、UVR-305/365による測定で15cmの距離で2.4mW/cm²のenergy outputを示す。

細胞毒性の検定には既報⁴⁾のごとく、96穴ブ

レートを用いた発色法によるMTT法あるいは蛍光顕微鏡を用いたAO/EB法を用いた。詳細は、コスメトロジー研究振興財団研究業績中間報告集第2号p63-79, 1993に記載済みである。

Pam、HSCあるいはMRL/1マウスの線維芽細胞に対するUVB 50mJ/cm²の単照射において、2%SB(プラスチック皿にSB溶解液を入れ、皿越しに照射。照射線量は、溶解液を入れた皿越しに培養細胞面での測定値。)は、完全に細胞障害性を阻止した(表1)。HSCや線維芽細胞では、線量依存性の傾向が伺えた。

表1 Percent inhibition of UVB-induced cytotoxicity by sunguard B

Cell	Concentration of Sunguard B			
	0	0.5%	1.0%	2.0%
Pam 212	0%	0%	100%	100%
HSC-1	0	60 ± 11	100	100
MRL1 fibroblasts	0	43 ± 7	49 ± 21	100

Results are expressed as the mean (±1SD) of three experiments.

1) Sunguard B was dissolved in acetone.

2) A single 50mJ/cm² UVB light irradiation was performed.

ヒト培養表皮細胞へのUVB照射による細胞障害性は、包皮由来あるいは成人由来においても線量依存性に認められた。図1は、正常人(Control)と光線過敏性を有するLEの培養表皮細胞を用いた結果を示している。正常人はLE患者に比して高い細胞障害性を示し、新生児包皮の値³⁾より高値を示した。また、培養細胞の条件が安定すれば、個人差(細胞障害性)は新生児包皮の場合とほぼ同様であった。そして、2%SBによって、UVBによる包皮あるいは成人培養表皮細胞の障害性は阻止された。

自己免疫マウスのMRL/1では、我々はすでにコントロールのMRL/nマウスに比べてUVBに対する細胞障害性が高いことを報告した⁴⁾。今回の実験においては、例えば培養表皮細胞の場合、著明な抑制効果があることがMTT法を用いて明

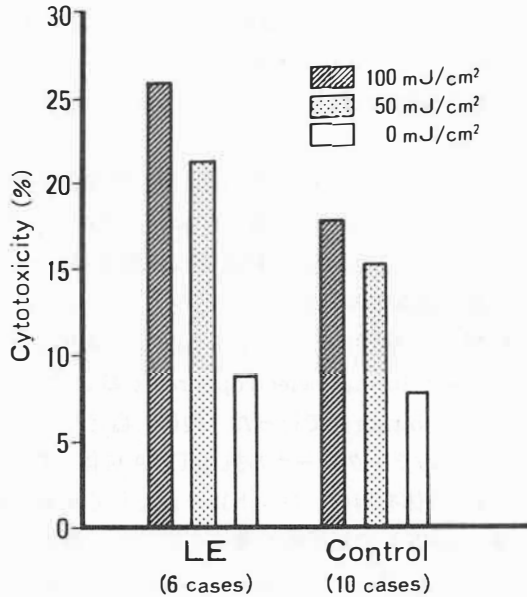


図1 Cytotoxicity of Cultured Keratinocytes to UVB

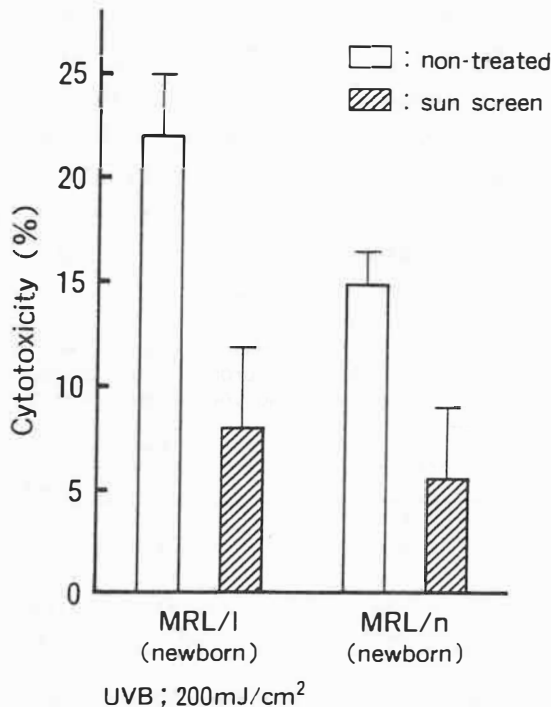


図2 Effects of sun screen on UVB-induced cytotoxicity of cultured keratinocytes

らかとなったが、抑制の程度には、両マウス間に有意な差は見られなかった。図2は、第2代培養表皮細胞にUVB 200mJ/cm²を照射したときの細胞毒性の結果を示している。

2.2 自己免疫現象に対する効果

2.2.1 MRL/lマウスの場合

MRL/lマウスは代表的な自己免疫マウスで、4-5ヶ月齢にみられる皮疹はヒトLEの皮疹モデルである⁵⁾。このマウスを用いて、図3の実験計画に沿って照射を二日ごとに総計28回行った。我々の従来の研究結果⁶⁾よりUVB 500mJ/cm² (図3のC)照射群で有意な肉眼的所見が得られることが判明していたので、今回の照射量を500mJ/cm²と設定した。処置群として1) 4%SB、2) 2%SB、3) base cream、4) 無処置の4つを設定した。肉眼的所見において、1) 2)群で著明な皮疹誘発抑制効果が見られるものの、他の免疫学的所見において差が見られないのは既報のごとくであった。そこで今回の実験では、表皮内の免疫担当細胞であるランゲルハンス細胞の動態を検索してみた。その結果、表2に示すようにSBはランゲルハンス細胞の減少を抑制すること

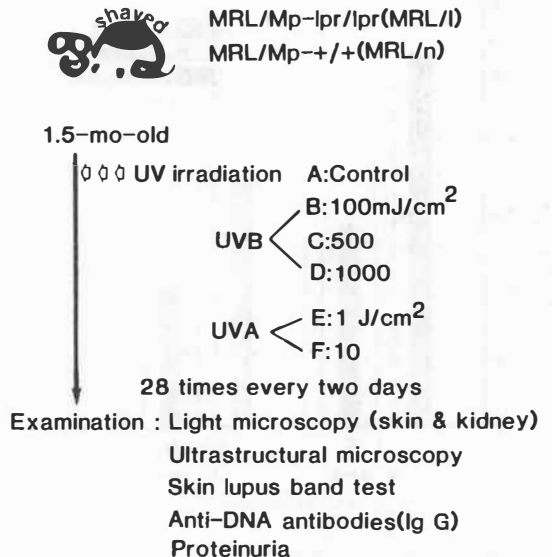


図3 In vivo UV light irradiation

表2 Ia⁺-Langerhans cells in the epidermis of MRL/l mice irradiated with UVB

Treatment	Number/mm
4% Sunguard B	37.5 ± 7.1
2% Sunguard B	34.7 ± 3.9
Base cream	31.7 ± 5.2
Non	23.9 ± 5.2
Non-irradiated control	33.7 ± 5.9

Results were expressed as the mean (± 1SD) of 5 examined mice.

が判明した。しかし、このような傾向はbase cream群でも見られたことからSB特異的と言えるか否か問題点として残っている。

2.2.2 抗ENA抗体結合誘導能

-UVB 易感受性モデルとして-

UVB照射によって、正常人培養表皮細胞表面にENA (extractable nuclear antigens) が発現されることを従来より認めてきた⁷⁻⁹⁾。光線過敏性を示すL.E.患者の表皮細胞では、コントロールに比べて高い発現性を示す(図4)。従っ

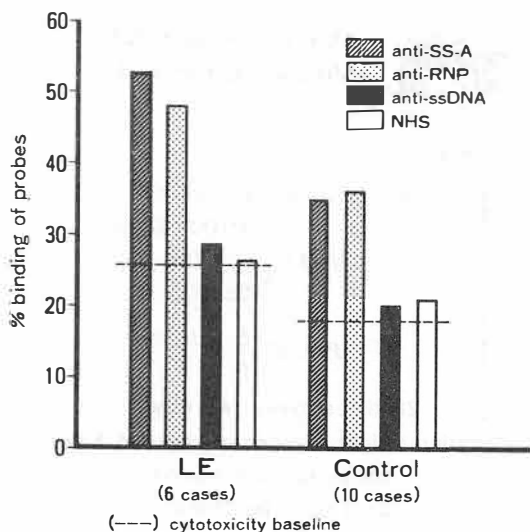


図4 Antibodies binding to cultured keratinocytes irradiated with UVB (100mJ/cm²)

て、この現象は、UVBに対する表皮細胞の易感受性のマーカーとして用いられ得る。この減少に対してSBがはたして、抑制的に働くか否かを検討した。

新生児包皮より得た第2継代目の培養表皮細胞を用いた。抗体として用いたSS-A/Ro, SS-B/La, RNP, Sm抗原に特異的な抗血清は、SLE患者の血清をスクリーニングすることにより得た。特異性の検索は、double immunodiffusion, counter immunoelectrophoresis および immunoblotting法で行った。他に、自己免疫マウス由来のモノクローナル抗dsDNA抗体と抗ssDNA抗体を用い、コントロールとして正常人血清(NHS)や無活性培養液を用いた。測定方法は、Lab-Tek chamber slideあるいは60mm培養用ディッシュに細胞を培養し、70~80%コンフルエンスに達した時、サンスクリーン処置を行った後50mJ/cm²のUVB照射し、さらに24時間後に免疫組織学的に検索に供した。

抗ENA抗体の培養表皮細胞への結合は、既報⁷⁾のごとく、Lab-Tek chamber slide用には、acetoneで、flow cytometry用には、2%パラホルムアルデヒドで後固定した細胞を用いて検討した。二次抗体としては、FITC抗ヒトIgGを用いた。表3に示すとおり、FACS解析にて明らかな抑制効果が認められた。また、通常の蛍光抗体法においても同様の結果を得た。

表3 Effects of sun screen on UVB induced binding of antibody probes on the surface of cultured keratinocytes by flow cytometry

Antibody specificities	% positive cells	
	Control	Sun screen
SS-A/Ro	23.5 ± 6.9	5.3 ± 1.2
SS-B/La	20.7 ± 6.6	3.7 ± 3.6
U ₁ RNP	24.6 ± 8.7	4.1 ± 5.1
Sm	14.2 ± 9.7	5.4 ± 4.9
NHS*	<1%	<1%

Results represent the mean (± 1SD) of at least three experiments. Cells were irradiated with a single UVB dose of 50mJ/cm².

*NHS; normal human serum

3. 考 察

培養表皮細胞を用いて紫外線、特にUVB照射による細胞障害性や易感受性を検討した。特に、UVB照射によって本来細胞内あるいは核内にあるU₁RNPやSS-A/Ro抗原が細胞表面に移動する現象は、UVBに対する細胞の易感受性を検出する方法として有用なものではないかと推察された。

そして、本研究は、このような*in vitro*系においてサンスクリーン剤がUVB照射による表皮細胞障害性あるいは易感受性に対してもまた皮膚を場とする自己免疫的現象に対しても抑制的あるいは予防的に働くことを示している。また、MRLマウスを用いた実験より本剤の予防的あるいは治療的有用性が明らかとなった。今後は、*in vitro*のUVBに対する易感受性の検索方法が、真に細胞表面であるか否か、あるいは*in vitro*のサンスクリーン剤の溶解性の問題等が解決されなければならない。前者においては、すでにconfocal蛍光顕微鏡によって、細胞表面の局在を確認したところである。このような問題点が、明らかになれば、サンスクリーン剤のさらに詳細な分子的作用機序をも知ることができるようになるだろう。

謝 辞

本研究に対するコスメトロジー財団の援助に感謝します。また、本研究は、京都大学医学部皮膚科今村貞夫教授をはじめ、同大学の多くの先生方のご協力により可能となったことを付記します。

文 献

- 1) 古川福実他：京大式人工表皮水疱作製器の紹介
I. 基本設計とその試作。皮紀要 84 : 5-9, 1989
- 2) 古川福実他：京大式人工表皮水疱作製器の紹介
II. 水疱表皮の組織学的検討。皮紀要 84 : 11-14, 1989
- 3) Furukawa F et al : Serum-free serial culture of adult human keratinocytes from suction-blister roof epidermis. J Invest Dermatol 89 : 460-463, 1989
- 4) Furukawa F et al : Susceptible cytotoxicity to ultraviolet B light in fibroblasts and keratinocytes cultured from autoimmune-prone MRL/Mp-lpr/lpr mice. Clin Immunol Immunopathol 52 : 460-472, 1989
- 5) Furukawa F et al : Dermatopathological studies on skin lesions of MRL mice. Arch Dermatol Res 276 : 186-194, 1984
- 6) Horiguchi Y, Furukawa F et al : Effects of ultraviolet light irradiation on the skin of MRL/l mice. Arch Dermatol Res 279 : 478-483, 1987
- 7) Furukawa F et al : Estradiol enhances binding to cultured human keratinocytes of antibodies specific for SS-A/Ro and SS-B/La. J Immunol 141 : 1480-1488, 1988
- 8) Furukawa F et al : Binding of antibodies to the extractable nuclear antigens SS-A/Ro and SS-B/La is induced on the surface of human keratinocytes by ultraviolet light (UVL). J Invest Dermatol 94 : 77-85, 1991
- 9) Furukawa F et al : Relationship between heat shock protein induction and the binding of antibodies to the ENA on cultured human keratinocytes. J Invest Dermatol 101 : 191-195, 1993