

# 紫外線誘発DNA損傷の定量と メラニン色素のサンスクリーン効果

奈良県立医科大学

小林 信彦

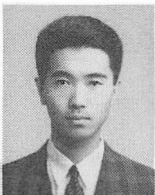
Melanin is believed to protect cells against ultraviolet (UV)-induced damage formation. It, however, has not been experimentally proved, because published results have been inconclusive. The present study was carried out to determine whether intracellular melanin protected cells against UV-induced photoproduct type DNA damage formation and killing. Three human melanoma cell lines containing different amounts of melanin were used. Absorption spectrum, subcellular localization of melanin, and melanin concentration were examined in the three cell lines. Two types of DNA damage, cyclobutane pyrimidine dimers and (6-4)photoproducts, were detected by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with monoclonal antibodies specific for these photolesions. We found that melanin reduced the induction rates of both types of DNA damage in pigmented cells irradiated with UVC in a melanin concentration-dependent manner. Almost no differences in repair capacity for the two types of photolesions were observed among the three cell lines. We also found that the more highly melanotic cell lines were more resistant to UVC than the less melanotic cell lines. These results suggest that intracellular melanin plays an important role in preventing UV-induced cell killing by reducing the formation of two types of DNA damage. The three cell lines, however, might have different induction rates of UV-damage and different UV sensitivities, under identical conditions with equal amounts of melanin, since they stemmed from melanomas of three different patients. Besides, we have not ascertained whether melanin protects cells against sunlight, since we used UVC only. Thus, we treated highly melanotic HM3KO cells with docosahexaenoic acid (DHA) to reduce the amount of melanin to about half, and prepared two types of cells with the same genetic background, with different melanin levels. We carried out similar experiments using UVC and UVB, and ascertained that melanin protected melanoma cells from the two types of DNA damage formation and killing both after UVC and after UVB irradiation. Data obtained from the two studies in series suggest that the protective effect of intracellular melanin increases in a melanin concentration-dependent manner and reaches a plateau.

## 1 緒言

小麦色に日焼けした肌は健康的かつ魅力的である。また、太陽の下で遊んだり休息することは実に気持ちのいいものである。しかしながら、太陽光中の紫外線によって、日焼け（紅斑・水疱・色素沈着）、光老化（しわ・しみ・そばかす）、皮膚良性・悪性腫瘍、免疫能の低下、白内障などのさまざまな障害が生ずることも事実である。とりわ

け、近年、皮膚癌の患者数が増加傾向にある。オゾン層の破壊に伴って地表に到達する紫外線量が増加し、患者数は今後さらに増加すると警告されている。生活習慣の変化や屋外でのレジャーの多様化も皮膚癌の増加の重要な原因のひとつであると推測されている。それゆえ、紫外線をよく知り、太陽光と上手に付き合うことが必要となる。紫外線により表皮細胞の核にDNA損傷が生じ<sup>1)</sup>、発癌の引き金となる<sup>2)</sup>。また、DNA損傷が紫外線による紅斑・sunburn cell生成・免疫抑制などのさまざまな障害の直接の原因となるという報告もある<sup>3-5)</sup>。紫外線による主なDNA損傷として、シクロブタン型ダイマー・(6-4)型ダイマーおよび後者のDewar型異性体が知られている。これらの損傷の生成量を定量することは、紫外線による障害とその防御を考える上で重要である。しかし、従来これらの損傷を直接定量する方法がなかった。

Determination of UV-induced DNA damage  
and photoprotection by melanin



Nobuhiko Kobayashi

Nara Medical University

共同研究者の森らは、これら3種類のDNA損傷に対するモノクローナル抗体を世界に先駆けて樹立することに成功した<sup>6-11)</sup>。そこで、本研究では、これらのモノクローナル抗体を用いたELISA法および免疫組織化学的染色法によってDNA損傷の定量を試みた。

さて、紫外線から身体を守る方法として、日傘・帽子・サングラス・長袖のシャツ・長ズボンなどの着用やサンスクリーン剤の外用などが考えられる。現在、サンスクリーン剤などの紫外線防御効果の判定には、紅斑抑制効果を指標としたSun Protection Factor (SPF) が用いられている。この評価に、DNA 損傷生成に対する抑制効果を用いれば、紅斑のみならず、皮膚癌などさまざまな紫外線障害に対する防御効果を反映することができると考えられる。さらに、我々はメラニン色素を用いて紫外線防御することを提唱している。しかし、メラニン色素のDNA 損傷生成抑制効果は実験的には未だ証明されておらず<sup>12-18)</sup>、さらに逆にメラニン色素が光増感作用を持つという報告もあり<sup>19)</sup>、メラニン色素の光防御への応用の可否についても決着がついていないのが現状である。紫外線とメラニン色素の関係については、総説を参照されたい<sup>20)</sup>。本研究では、実験材料と実験方法を厳選することによって、メラニン色素の生物学的な差異を際立たせる工夫を行い、メラニン色素が紫外線誘発 DNA損傷の生成を抑制することを証明した。

## 2 実験

### 2.1 3種類の培養ヒトメラノーマ細胞を用いた実験<sup>21)</sup>

実験材料として、細胞内のメラニン色素と核との位置関係が明確である培養細胞が優れていると考えられた。そこで、ベレットの色調の黒いHM3KO(神戸大・市橋教授より供与された)、茶色いG-361および白いMewo(ともにJCRB細胞バンクより供与された)の3種類の細胞株を選んだ。メラノーマ細胞を1N NaOHにて可溶化し、400nmにお

ける吸光度から細胞内のメラニン色素量を定量した。また、顕微鏡写真から各細胞の直径を測定し、細胞内のメラニン色素の濃度を算出した。その結果、細胞内のメラニン色素量は、ベレットの色調から予想されるように、HM3KO・G-361・Mewoの順に多かった (Table 1)。

Table 1 Melanin concentration in three melanin cell lines

Cells	HM3KO	G-361	Mewo
Melanin content (pg/cell)	26.0 ± 1.1	5.5 ± 0.5	0.8 ± 0.2
Cell diameter (μm)	21.2 ± 3.4	20.0 ± 3.8	13.9 ± 2.7
Melanin concentration (μg/mm <sup>3</sup> )	5.2 ± 0.2	1.3 ± 0.1	0.6 ± 0.2

Each value shows the mean ± SD.

次に、これらのメラノーマ細胞をホモジナイズし、遠心分離によってメラノソームを含む分画を抽出し、紫外線領域における吸光曲線を比較した。3種類のメラノーマ細胞株に含まれるメラノソーム分画の吸光曲線は同じパターンを示し、波長が短くなるほど吸光度が増加し、200nm付近に吸収極大を持つというメラニン色素に典型的なものであった (Fig. 1; データは真の吸収に加え、散乱による効果も含む)。

また、これらのメラノーマ細胞をプラスチック・プレート上で培養し、その垂直切片をFontana-Masson染色してメラニン色素の細胞内局在を調べた。すべての細胞株でメラニン色素の局在には差がなく、メラノソームは細胞質全体に分布していた。以上の結果より、これら3種類のメラノーマ

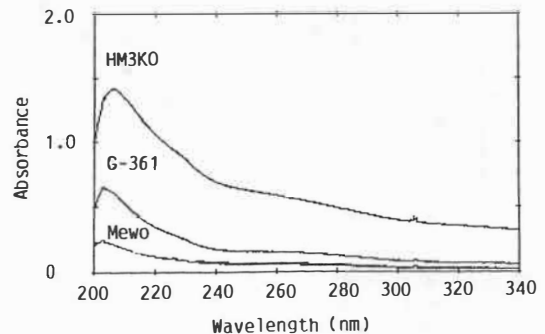


Fig. 1 Absorption spectra of melanosomal fractions from human melanoma cells.

細胞株を用いて、細胞内のメラニン色素量と紫外線によって誘発されるDNA損傷量とを比較することによって、メラニン色素の紫外線防御効果を定量できることが推測された。さて、従来の報告では、メラニン色素の紫外線誘発DNA損傷生成に対する防御効果はシクロブタン型ダイマーについてのみ論じられてきた<sup>12-19)</sup>。しかし、最近では(6-4)型ダイマーも紫外線によって誘発され、シクロブタン型ダイマーと同様に細胞死や突然変異の原因となっていることが知られており、(6-4)型ダイマー生成量の定量も必須となっている。そこで本研究では両DNA損傷の生成量を定量するために、シクロブタン型ダイマーあるいは(6-4)型ダイマーに特異的なモノクローナル抗体を用いたELISA法を採用した<sup>10)</sup>。この定量法は、現在のところ最も感度の高い方法のひとつであり、さらに、両ダイマー量を同時に定量できる唯一の方法である。本実験では5-20J/m<sup>2</sup> (254nm)という低線量の紫外線照射によって生成する両ダイマー量を定量することができた。また、この線量は生物学的に十分に低い線量であったため、メラノーマ細胞株の紫外線感受性の比較にも用いることができた。メラノーマ細胞に紫外線を照射した後、細胞からDNAを抽出し、1%硫酸プロタミンで前処理した96穴プレートを用いてDNA上の両ダイマー

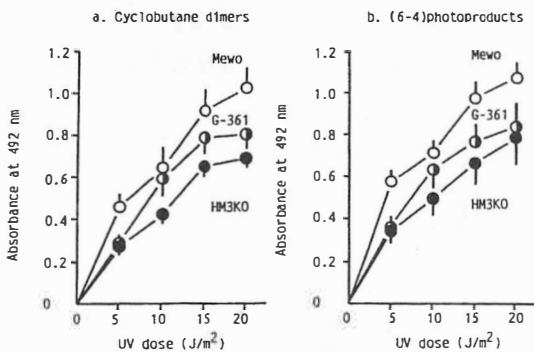


Fig. 2 Induction of cyclobutane pyrimidine dimers(a) and (6-4)photoproducts(b) in DNA from UV-irradiated human melanoma cells. DNA damage was measured by the ELISA with monoclonal antibodies against photolesions.

量を測定した。2%牛胎児血清にて抗体の非特異的な吸着を阻害した上で、シクロブタン型あるいは(6-4)型ダイマーに対するモノクローナル抗体を反応させた。つづいて、ビオチン標識抗マウスIgG抗体、さらに、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを反応させた。o-フェニレンジアミンを基質として、その発色度を492nmにおける吸光度として測定し、両ダイマーの生成量とした。シクロブタン型ダイマーおよび(6-4)型ダイマーともに、その生成量は紫外線照射線量に依存して増加していた。また、メラニン色素量の多い細胞株ほど両ダイマーの生成量が少なかった。この結果より、細胞内のメラニン色素は、その量に依存して紫外線によるDNA損傷の生成を抑制していることがわかった(Fig. 2 a, b)。さらに、各々の細胞株の両ダイマー修復能を比較したところ、ほとんど差が見られなかった(Fig. 3 a, b)。

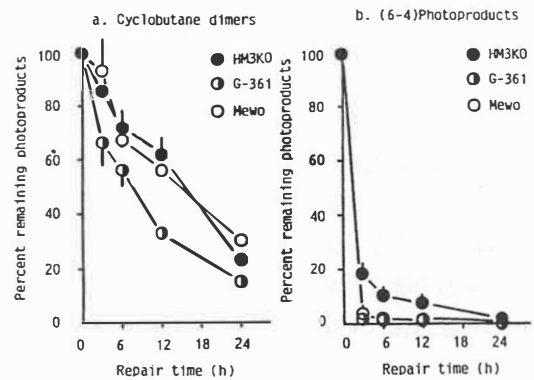


Fig. 3 Repair capacity for cyclobutane pyrimidine dimers(a) and (6-4)photoproducts(b) in melanoma cells. HM3KO, G-361, and Mewo cells were UV irradiated at 20, 15, and 10J/m<sup>2</sup>, respectively, to induce similar numbers of photolesions. The percentage of the initial number of photolesions was determined at various times after UV irradiation.

また、3種類のメラノーマ細胞株の紫外線感受性をコロニー形成法によって比較したところ、メラニン色素量の多い細胞株ほど紫外線に抵抗性であった。この結果より、細胞内のメラニン色素は、

その量に依存して紫外線による細胞死を抑制していることがわかった (Fig. 4)。

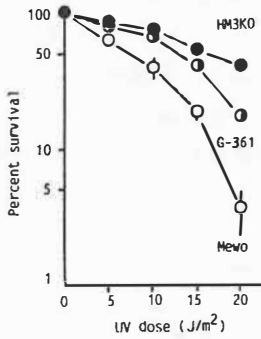


Fig.4 UV-survival curves of cultured human melanoma cells. Survival after UV irradiation was determined by the colony-formation method.

次に、メラニン色素による両ダイマー生成抑制効果と細胞死抑制効果の関連を検討するために、UV-protection factor (UPF; 紫外線防御能を比で表したものを) を算出した (Table 2)。

Table 2 UV-protection factors (UPFs) in three melanoma cell lines

Cells	HM3KO	G-361	Mewo
UPFs for cyclobutane dimers*	2.4 ± 0.6	1.6 ± 0.5	1.0
for (6-4)photoproducts*	2.3 ± 0.5	1.7 ± 0.1	1.0
for cell killing <sup>§</sup>	2.2 ± 0.3	1.7 ± 0.3	1.0
Relative melanin concentration <sup>¶</sup>	8.7 ± 0.4	2.2 ± 0.2	1.0

\* Calculated from UV doses showing 0.5 of absorbance at 492 nm in Figs. 2a, b (the mean ± SD). The value of Mewo was expressed as 1.0.

<sup>§</sup> Calculated from UV doses showing 50 of percent survival in Fig. 4 (the mean ± SD). The value of Mewo was expressed as 1.0.

<sup>¶</sup> Calculated from melanin concentration in Table 1 (the mean ± SD). The value of Mewo was expressed as 1.0.

各細胞株においてシクロブタン型ダイマーおよび(6-4)型ダイマーの生成抑制に対するUPF値がほぼ等しかったことより、メラニン色素は紫外線を遮蔽することにより両ダイマーの生成を同様に抑制していると考えられた。さらに、これら両ダイマー生成抑制に対するUPF値と細胞死抑制に対するUPF値もほぼ等しいことがわかった。各々の細胞株の間で両ダイマー修復能に差が見られなかったことも勘案すると、細胞内のメラニン色素は、両ダイマーの生成を抑制し、その結果として細胞

死をも抑制していると考えられた。以上の実験結果より、細胞内のメラニン色素が紫外線によるDNA損傷の生成および細胞死を抑制することが証明された。

## 2.2. ドコサヘキサエン酸(DHA)によってメラニン色素量を減少させた細胞を用いた実験<sup>23)</sup>

前実験では、3人の異なる患者さんから樹立されたメラノーマ細胞株を用いた。このため、細胞内のメラニン色素量が同じであっても細胞株ごとにDNA損傷生成量や紫外線感受性に差があった可能性を否定できない。また、紫外線としてUVCを照射したが、UVCは大気中でほぼ吸収されるため、メラニン色素が実際に地表に到達する太陽光に対しても防御作用を持つかどうかを確かめる必要がある。これらの疑問点を解決するために、遺伝的背景が等しく、メラニン色素量のみ異なるようなメラノーマ細胞株を作り、メラニン色素自体のUVCおよびUVBに対する防御効果の証明を行った。

我々は、多価不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸(DHA)にメラニン色素合成阻害作用のあることを発見している<sup>23)</sup>。そこで、メラニン色素を多量に含むヒトメラノーマ細胞株HM3KOにDHAを処理して、細胞内のメラニン色素量をコントロールすることにした。まず、DHAの細胞毒性をコロニー形成法で調べた。DHA50 μM 6日間処理では細胞毒性はほとんど認められなかった(Fig. 5)。

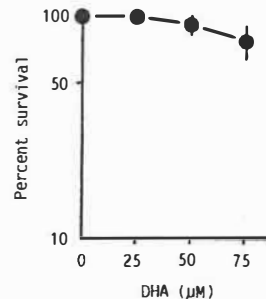


Fig.5 Cytotoxicity of DHA. Cytotoxicity was determined by the colony-formation method.

また、この処理条件では、細胞内のメラニン色素量は、溶媒のDMSOのみで処理したコントロール細胞株の約半分に減少した (Fig. 6)。

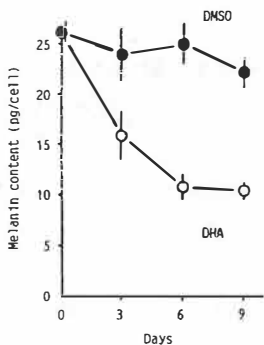


Fig. 6 Inhibitory effect of DHA on melanogenesis. Melanin content in DHA- and DMSO-treated cells was determined.

DHAを処理したメラニン色素量の少ない細胞株とコントロールのメラニン色素量の多い細胞株を用いて前回と同様の実験を行なった。2種類の細胞株は、細胞形態・メラニン色素の吸光曲線・細胞内局在がほぼ等しく、メラニン色素量が異なる以外には紫外線防御に関してほぼ等しい性質を持っていた (Fig. 7)。

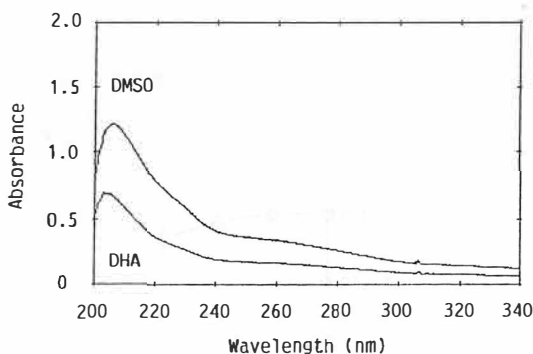


Fig. 7 Absorption spectra of melanosomal fractions from DHA- and DMSO treated cells.

この結果より、この2種類のメラノーマ細胞株を用いることによって、メラニン色素自体の紫外

線防御効果を判定できると考えられた。次に、メラノーマ細胞に紫外線(UVCおよびUVB)を照射し、生成するDNA損傷量をELISA法にて測定した。その結果、シクロブタン型ダイマーおよび(6-4)型ダイマーの生成量は、UVC照射後およびUVB照射後ともに、メラニン色素量の多いコントロール細胞株の方が、DHA処理したメラニン色素量の少ない細胞株よりも若干少なかった (Fig. 8, 9)。

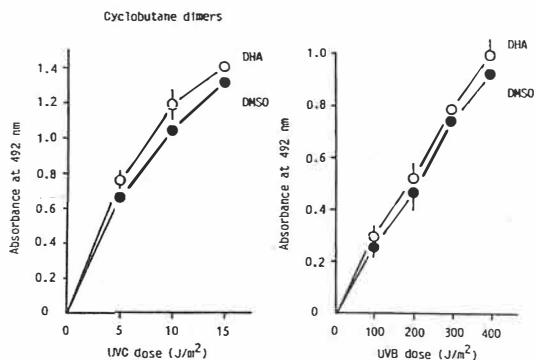


Fig. 8 Induction of cyclobutane pyrimidine dimers in DHA- and DMSO-treated cells irradiated with UVC (left) and UVB (right). Cyclobutane dimers were measured by the ELISA method.

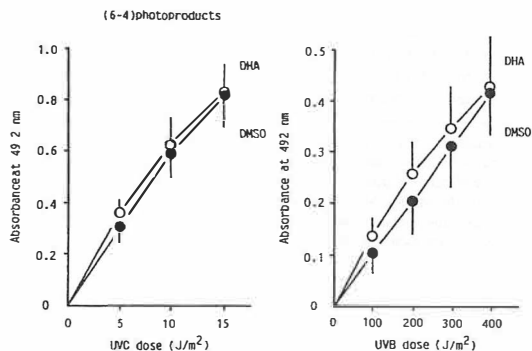


Fig. 9 Induction of (6-4) photoproducts in DHA- and DMSO-treated cells irradiated with UVC (left) and UVB (right). (6-4) photoproducts were measured by the ELISA method.

また、UVCおよびUVBに対する感受性も、メラニン色素量の多いコントロール細胞株の方が若干抵抗性であった (Fig. 10)。

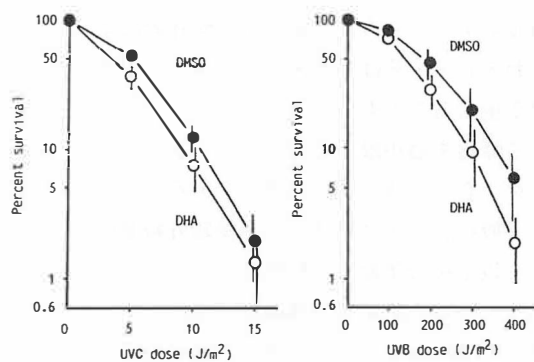


Fig. 10 UV-survival curves of DHA- and DMSO-treated cells. Survival after UVC (left) and UVB (right) irradiation was determined by the colony-formation method.

UV-protection factor (UPF; 紫外線防御能の比)を算出したところ、UVCおよびUVB照射後ともに、メラニン色素による両ダイマー生成抑制および細胞死抑制に対するUPF値がほぼ等しい値をとった。この結果より、メラニン色素はUVCおよびUVBの両方に対して防御効果を持つこと、メラニン色素は紫外線を遮蔽することによって両ダイマーの生成を同様に抑制すること、そして、その結果として紫外線による細胞死をも抑制することが示唆された (Table 3)。

Table 3 UV-protection factors between DNA- and DMSO-treated cells

HM3KO cells treated by	DMSO	DHA
UVC-induced cyclobutane dimers <sup>a</sup>	1.18 ± 0.11	1.0
(6-4) photoproducts <sup>b</sup>	1.14 ± 0.10	1.0
cell killing <sup>c</sup>	1.19 ± 0.08	1.0
UVB-induced cyclobutane dimers <sup>d</sup>	1.12 ± 0.07	1.0
(6-4) photoproducts <sup>e</sup>	1.24 ± 0.15	1.0
cell killing <sup>c</sup>	1.21 ± 0.02	1.0
Relative melanin concentration	2.33 ± 0.37	1.0

<sup>a</sup> <sup>b</sup> <sup>c</sup> <sup>d</sup> <sup>e</sup> Calculated from UV doses showing 0.7<sup>a</sup>, 0.4<sup>b</sup>, 0.5<sup>d</sup>, or 0.2<sup>e</sup> of absorbance at 492 nm (the mean ± SD). The values of DHA-treated cells were expressed as 1.0.

<sup>c</sup> Calculated from UV doses showing 10 of percent survival (the mean ± SD). The values of DHA-treated cells were expressed as 1.0.

しかし、2つの細胞株間の相対的なメラニン色素量の差が2.33倍あったにも関わらず、その紫外線防御効果 (UPF値) は非常に小さな値 (1.12-1.24) にとどまった。この理由を検討するために、先の

実験から得られたデータも加えて、細胞内のメラニン色素量と紫外線防御効果 (UPF値) との関係を検討した (Fig. 11)。

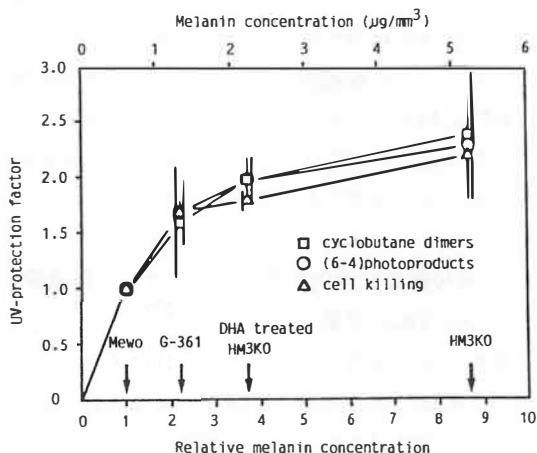


Fig. 11 Photoprotective effect of melanin in melanoma cells with different pigment levels. The relationship between relative melanin concentration (or melanin concentration) and UV-protection factor among four types of melanoma cells was shown using the present and previous results. Only results of UVC were plotted. Each point shows the mean (±SD).

そして以下のことが明らかとなった。

- 1) 細胞内のメラニン色素量が増加するほど、シクロブタン型ダイマー生成抑制・(6-4)型ダイマー生成抑制および細胞死抑制に対するUPF値が増加すること。
- 2) 3種類のUPFについて、各細胞株のUPF値を結びと、ほぼスムーズな3本の曲線が描けること。
- 3) 3種類のUPFの曲線がほぼ重なること。

これらの結果より、メラニン色素が紫外線を遮蔽することによって両DNA損傷の生成を抑制し、その結果として紫外線による細胞死をも抑制することが推測された。さらに、メラニン色素の紫外線防御作用が強力であるため、メラニン色素量が比較的少ない状態でもある程度の防御効果が認められるが、その効果はメラニン色素量が中等度 (2 μg/mm<sup>3</sup>) の状態で飽和してしまう事が推測され

た。2つの実験で細胞内のメラニン色素量の比とUPF値が並行していなかったこと、および2番目の実験でメラニン色素の紫外線防御効果が非常に小さかったことは、このメラニン色素の紫外線防御効果の飽和のためであったと考えられた。この結果より、培養細胞を用いてメラニン色素の紫外線防御効果を証明する場合には、細胞内のメラニン色素量の差と同時に、メラニン色素の絶対的な量も非常に重要であることがわかった。

### 2.3 免疫組織化学的染色法を用いた紫外線誘発DNA損傷の定量

現在、培養細胞レベルで認められたメラニン色素の紫外線防御作用が、皮膚でも実際に見られることの証明を試みている。多層構造をとる表皮では、メラニン色素と核との位置関係が培養細胞に比べてより複雑である。そこで、シクロブタン型および(6-4)型ダイマーに対するモノクローナル抗体を用いた蛍光抗体間接法を用いて、紫外線照射した表皮細胞内の両ダイマー生成量を定量する系を作製している。この方法を用いると、メラニン色素の分布などの組織学的な検討とDNA損傷の定量を同時に行うことが可能となる。また、表皮各層ごと、あるいは細胞1個ごとについての両ダイマー生成量を定量することができるようになる。皮膚癌の発生には、幹細胞の性質を持つ基底細胞におけるDNA損傷が引き金となると考えられている。この方法を用いれば、基底細胞に生じた両ダイマーの生成量も定量できる。それゆえ、メラニン色素やサンスクリーン剤などの皮膚癌予防効果についての予測も可能となる。現在のところ、蛍光抗体間接法の基礎実験はほぼ終了し、まもなく本学に導入されるレーザー顕微鏡を用いて定量化する予定である。

## 3 総括

太陽光にあたることは、人類にとっての基本的な欲求のひとつである。また、海水浴・スキー・ゴルフ・テニス・釣りなどの屋外でのレジャーも

盛んである。一方、太陽光中の紫外線によって、しわ・しみ・そばかす・皮膚癌などさまざまな障害が生ずることも事実である。しかし、紫外線による障害を最小限に予防しながら、太陽光と上手に付き合っていくことは可能であろう。

一般に、一生に被ばくする総紫外線量のうち、半分以上を青年期までに被ばくすると言われている。このことから、紫外線対策をなるべく早い年齢(幼少時)から、特に戸外での運動の際に行うことが大切である。紫外線から皮膚を守る方法として、帽子・長袖のシャツ・長ズボンなどの着用やサンスクリーン剤の外用などが考えられる。日本人の皮膚には、メラニン色素が比較的多量に含まれている。そこで、我々はメラニン色素も利用して紫外線防御することを提唱している。具体的には、1)急に強い紫外線にあたらないこと。あたる場合にはサンスクリーン剤などを使用して強力にブロックすること。2)慢性的に紫外線にあたる場合、日光にあたった後に皮膚が色素沈着しやすい人は、紫外線量の少ない季節あるいは時間から少しずつ日光にあたる時間を延ばしていったり、あるいはサンスクリーン剤を併用して徐々に日焼け(色素沈着)し、内因性サンスクリーン剤であるメラニン色素の量を徐々に増加させて紫外線防御を行なう。3)日光にあたってほとんど色素沈着しない人は、常にサンスクリーン剤などを用いて紫外線防御を行う。この方法ならば、サンスクリーン剤の副作用・経済的負担・わずらわしさなどの問題を最小限にとどめ、子供にも応用できると思われる。さらに、我々はサンスクリーン剤などの紫外線防御効果の判定を、表皮細胞に生ずるDNA損傷に対する防御効果(SPF)で表すことを提唱している。現在は、紅斑反応の抑制効果を指標として評価されているが、紅斑反応は生物学的な反応であるため、被検者間の個人差が大きく、最適とは言えない。一方、DNA損傷は光化学的反応の結果として、紫外線照射線量に依存して生成するため、検査のばらつきが少ない。また、紅斑のみならず、皮膚癌やその他さまざまな紫外線障害に対する防御効果を反映することができる。我々

のモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的染色法が確立されれば、紅斑をおこさない程度の低線量の紫外線によって誘発されるDNA損傷の定量が、組織レベルで可能となるであろう。さらに、人工的に再構成した皮膚を用いて統一した規格を作製すれば、被検者も不要になる。このことから、被検者によるばらつきも無くなり、さらに精度・再現性に優れた方法となることが期待される。本研究は、現実的な紫外線予防方法の確立およびその効果の評価に大きく貢献するものと確信している。

## 文 献

- 1) Muramatsu T., Kobayashi N., Tada H., Yamaji M., Shirai T., Mori T., Ohnishi T. *Arch. Dermatol. Res.*, 284 : 232-237 (1992)
- 2) Yarosh D., Alas L. G., Yee V., Oberyszyn A., Kibitel J.T., Mitchell D., Rosenstein R., Spinowitz A., Citron M. *Cancer Res.*, 52 : 4227-4231 (1992)
- 3) Ley R. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 : 2409-2411 (1985)
- 4) Ley R. D., Applegate L. A. *J. Invest. Dermatol.*, 85 : 365-367 (1985)
- 5) Kripke M. L., Cox P. A., Alas L. G., Yarosh D. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 : 7516-7520 (1992)
- 6) Mori T., Matsunaga T., Hirose T., Nikaido O. *Mutation Res.*, 194 : 263-270 (1988)
- 7) Matsunaga T., Mori T., Nikaido O. *Mutation Res.*, 235 : 187-194 (1990)
- 8) Mizuno T., Matsunaga T., Ihara M., Nikaido O. *Mutation Res.*, 254 : 175-184 (1991)
- 9) Mori T., Matsunaga T., Chang C. - C., Trosko J. E., Nikaido O. *Mutation Res.*, 236 : 99-105 (1990)
- 10) Mori T., Nakane M., Hattori T., Matsunaga T., Ihara M., Nikaido O. *Photochem. Photobiol.*, 54 : 225-232 (1991)
- 11) Matsunaga T., Hatakeyama Y., Ohta M., Mori T., Nikaido O. *Photochem. Photobiol.*, 57 : 934-940 (1993)
- 12) London D. A., Carter D. M., Condit E. S. *J. Invest. Dermatol.*, 67 : 261-264 (1976)
- 13) Chalmers A. H., Lavin M., Atisoonornkul S., Mansbridge J., Kidson C. *Cancer Res.*, 36 : 1930-1934 (1976)
- 14) Hill H. Z., Setlow R. B. *Cancer Res.*, 40 : 1867-1872 (1980)
- 15) Hill H. Z., Setlow R. B. *Photochem. Photobiol.*, 35 : 681-684 (1982)
- 16) Niggli H. J. *Photochem. Photobiol.*, 52 : 519-524 (1990)
- 17) Schothorst A. A., Evers L. M., Noz K. C., Filon R., van Zeeland A. A. *J. Invest. Dermatol.*, 96 : 916-920 (1991)
- 18) Yohn J. J., Lyons M. B., Norris D. A. *J. Invest. Dermatol.*, 99 : 454-459 (1992)
- 19) Huselton C. A., Hill H. Z. *Environmental Mol. Mutag.*, 16 : 37-43 (1990)
- 20) 小林信彦、村松 勉、山科幸夫、白井利彦、大西武雄、森 俊雄 放射線生物研究 28 (4) : 20-37 (1993)
- 21) Kobayashi N., Muramatsu T., Yamashina Y., Shirai T., Ohnishi T., Mori T. *J. Invest. Dermatol.*, 101 : 685-689 (1993)
- 22) Kobayashi N., Muramatsu T., Yamashina Y., Shirai T., Hashizume R., Ohnishi T., Mori T. "Photoprotection by melanin against photoproduct type DNA damage formation and cell killing." In: Zeise L., Chedekel M. R., Fitzpatrick T. B. (eds.) *Melanin; Its role in human photoprotection*. Valdenmar Publishing Company, pp 141-150 (1995)
- 23) Hashizume R., Doi H., Hirano J., Fukushima S., Kobayashi N., Mori T. *J. Dermatol. Sci.*, 4 : 115 (1992) (abstr.)