

# フリーラジカルとポルフィリン代謝に関連する 皮膚の老化機構解明に関する基礎的研究

国立公衆衛生院 労働衛生学部

栄養生化学部

市川 勇・近藤 雅雄

Basic experimental studies on production of active oxygens from porphyrin compounds by UV irradiation in relation to aging of the skins were carried out.

Detailed conditions in analytical methods with electron spin resonance(ESR) for species and intensity of the active oxygens were examined. Production of hydroxyl radical was observed from only uroporphyrins at pH7.8. Singlet oxygen was produced more from coproporphyrins than others at the same pH. Production of superoxide anion was shown from uroporphyrins and coproporphyrin III after 120 s. of the UV irradiation.

It was shown clearly with two UV-cut filters that hydroxyl radical from uro- and coproporphyrins and singlet oxygen from coproporphyrins were produced by UV-A from a xenon lamp having a similar spectrum from sunlight.

In blood of rats administrated orally with griseofluvin for one week, which is an inducer of protoporphyria, the concentration of protoporphyrin IX was increased twice, but any active oxygens from this porphyrin were not detected.

## 1 緒言

皮膚の老化現象は、長期間日光、特に紫外線による被曝と血液中の因子により皮膚細胞の増殖が抑制され、また壊死が生じるなど多くの加齢段階を経た結果であると考えられる。本研究では、皮膚と光との関連性において血液因子としてのポルフィリンの代謝異常およびそれに伴う活性酸素種の発生に注目し、老化機構の一部分について解明を行うことを目的とした。

ポルフィリン類は、ヘム合成の中間代謝物あるいは副生成物として骨髄、肝臓、皮膚等多くの組織、細胞内に存在し、ヘモグロビン、ミオグロビ

ン、チトクロームP-450、カタラーゼ、ペルオキシダーゼ等多くの蛋白や酵素の補欠分子族として重要な役割を果たしている<sup>1)</sup>。また、光増感作用を有するが、この作用が強いヘマトポルフィリン誘導体等を投与後、集積し易い癌細胞に光照射することにより生成する活性酸素がその細胞を酸化壊死に到らしめる光化学療法が行われている<sup>2-4)</sup>。その際発生する活性酸素種は、一重項酸素( $^1O_2$ )だけでなく、スーパーオキシドラジカル( $O_2^-$ )やヒドロキシルラジカル( $\cdot OH$ )も報告されている<sup>5)</sup>。

一方、ポルフィリン類は、光等外因性刺激および種々の内因性刺激に対して微妙に変化して、皮膚および造血組織に多くの障害を引き起こすことも知られている。光照射による障害は、ポルフィリンから発生した $^1O_2$ や $\cdot OH$ が生体成分に作用し、生体膜脂質過酸化等を経て種々の炎症を引き起こすことによると考えられているが<sup>6)</sup>、詳細な機序に関する研究報告はまだ少ない。また、健康な皮膚に対して紫外線を照射し、電子スピン共鳴(electron spin resonance, ESR)による測定を



Relationship between Production of Active Oxygens from Porphyrins and Aging of Skin

Isamu Ichikawa

Department of Industrial Health  
The Institute of Public Health

行った結果、 $^1O_2$ 、 $O_2^-$ 、 $\cdot OH$ の発生を検出している<sup>7)</sup>が、ポルフィリンとの関連性の検討はされていない。

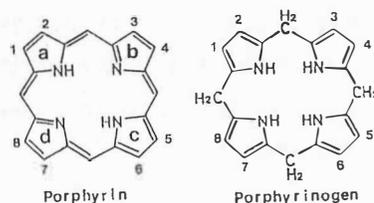
ポルフィリン患者では、ポルフィリンが皮膚や血液中に蓄積されるばかりでなく、尿中に多量排泄される。患者の皮膚を光に曝すと、発疹、水疱、腫瘍ができ、その程度は、蓄積するポルフィリンの構造に依存すると言われている<sup>8, 9)</sup>。ヒトのポルフィリン症は比較的希な疾患であるので、その研究を行う場合には動物に実験的ポルフィリン症を起こさせる必要がある<sup>10)</sup>。代表的なものとして抗黴剤であるgriseofulvin (GF)を経口的に投与することで、骨髄性プロトポルフィリン症を誘発出来ることが報告されている<sup>11)</sup>。

本研究では、5種類のポルフィリン化合物、uroporphyrin I及びIII (UP-I及びIII), coproporphyrin I及びIII (CP-I及びIII)及びprotoporphyrin IX (PP-IX) に対して紫外線 (ultraviolet, UV) を照射し、発生する活性酸素の種類及び量を電子スピン共鳴 (electron spin resonance, ESR) 装置を用いて、スピン捕捉剤などの試薬の濃度並びにpH等の測定条件について検討した。更に、波長の違いに基づくUVの種類 (UV-A, B, C) による活性酸素種の発生に関して検討を行った。また、ラットにGFを経口投与して、実験的ポルフィリン症の誘発を試みたので報告する。

## 2 実験

### 2.1 化合物

ポルフィリン化合物 (UP-I 及び III、並びに CP-I 及び III の二塩酸塩、PP-IX) は、PORPHYRIN PRODUCTS社 (USA) から購入した。その構造式を図1に示した。スピン捕捉剤の5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) は同仁化学研究所から、また2, 2, 6, 6-tetra-methyl piperidone (TMPD)一塩酸塩及び安定化剤のdiethylene-triaminepentaacetic acid (DETAPAC) はシグマ社 (USA) から、またdimethyl sulfoxide (DMSO)



Porphyrin	a		b		c		d	
	1	2	3	4	5	6	7	8
Uroporphyrin I (UP-I)	A	P	A	P	A	P	A	P
Uroporphyrin III (UP-III)	A	P	A	P	A	P	P	P
Coproporphyrin I (CP-I)	H	P	M	P	H	P	H	P
Coproporphyrin III (CP-III)	H	P	H	P	H	P	P	H
Protoporphyrin IX (PP-IX)	H	V	H	V	H	P	P	H

A = -CH<sub>2</sub>COOH, P = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH, H = -CH<sub>3</sub>, V = -CH=CH<sub>2</sub>

図1 使用したポルフィリン化合物の構造式

は和光純薬工業から購入した。 $O_2^-$ 発生用の酵素基質hypoxanthine (6-hydroxy-purine, HPX) はシグマ社から、またキサンチンオキシダーゼ (XOD、牛ミルク由来) はベーリンガーマンハイム社 (ドイツ) から購入した。和光純薬工業から購入したりん酸ニナトリウム一水素・12水和物及びりん酸一ナトリウム二水素・2水和物によりpH7.8のりん酸緩衝液を、またクエン酸ナトリウム・2水和物及びりん酸ニナトリウム一水素・12水和物によりpH3.0のクエン酸りん酸緩衝液を調製した。

### 2.2 装置

ESR装置は、日本電子のJES-FR80型を使用した。測定条件は、マイクロ波出力及び共鳴マイクロ波周波数8mW及び9.41GHz、中心磁場及び磁場掃引幅335.1±5.0mT、掃引時間2分、変調周波数及び磁場変調100kHz及び0.1mT、増幅 2×100、応答時間0.1秒、測定温度は室温であった。

UV照射装置はES-UXL10 (ランプ: ULX-1000D-0 キセノン、ウシオ電機) を使用した。発生したUVの試料に対する照度の実測値は、感度波長域が200-320nmであるUIT-110 (受光器UVD-254P、ウシオ電機) により5.5 (直読式) 及び6.5 (算出式) mW/cm<sup>2</sup>であった。紫外線透過フィルターは、東芝硝子社のUV-35 (315nm以上)、また紫外線透過可

視光線吸収フィルターとしてUV-D3S(230-440nm)を使用した。実際に透過した紫外線の量は、それぞれのフィルター使用で3.57及び5.49mW/cm<sup>2</sup>(算出式)であった。

### 2.3 活性酸素測定<sup>5)</sup>

ポルフィリン化合物それぞれを蒸留水に溶解し、pH6-7に水酸化ナトリウム溶液で調整し、最終濃度を1mMとした。

#### 2.3.1 ・OHの測定

pHの影響は、2% (18mM) DMPO水溶液50μlに20mMのクエン酸・りん酸緩衝液pH3.0またはりん酸緩衝液pH7.8を100μl、ポルフィリン溶液50μlを加え攪拌混合して検討した。次に、pH7.8における・OH発生量の検討は、3種類の反応液を用いて行った。即ち、ポルフィリン溶液50μlに9.2mM-DMPO溶液15μl、5.5mM-DETAPAC溶液35μl、りん酸緩衝液100μlを加えて(a)反応液とし、DMPOとDETAPAC溶液に2mM-HPX溶液50μlを加えた場合は、りん酸緩衝液を50μlを加えて(b)反応液とした。また、DMPO、DETAPAC、HPX溶液に50%DMSO溶液及びりん酸緩衝液25μlずつ加えて(c)反応液とした。

#### 2.3.2 O<sub>2</sub><sup>-</sup>の測定

pHの影響は、ポルフィリン溶液に2%DMPO溶液、50%DMSO溶液、クエン酸りん酸緩衝液またはりん酸緩衝液をそれぞれ50μl加え攪拌混合して検討した。また、pH7.8におけるO<sub>2</sub><sup>-</sup>発生量の検討は、ポルフィリン溶液50μl、9.2mM-DMPO溶液15μl、5.5mM-DETAPAC溶液35μl、2mM-HPX溶液50μl、50%DMSO溶液25μlにりん酸緩衝液25μlを加えた後、攪拌して行った。

#### 2.3.3 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>の測定

ポルフィリン溶液に50mM-TMPD溶液、50%DMSO溶液、りん酸緩衝液をそれぞれ50μlずつ加え攪拌混合して発生量を測定した。

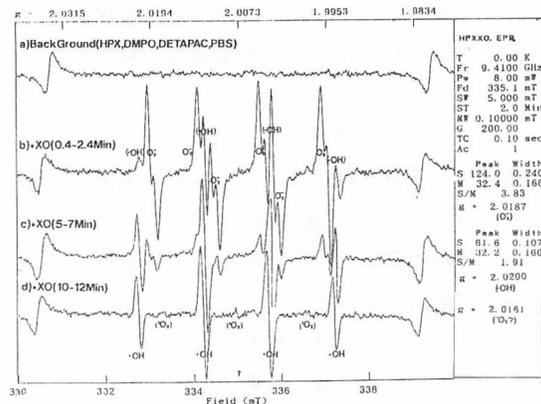


図2 ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ反応によるスーパーオキシドアニオン及びヒドロキシルラジカル発生に関するDMPO付加体のESRスペクトルにおける経時的変化

以上の反応混合液を、ESR用偏平セル(200μl容量、有効測定部160μl、ラボテック社)に採り、ESR装置の空洞共振器(キャビティ)部分に挿入設定し、反応液を混合してから40秒後に測定を開始した。図2にO<sub>2</sub><sup>-</sup>及び・OHの経時的発生状態をDMPOのスピン付加体スペクトルとして示した。また、図3に<sup>1</sup>O<sub>2</sub>の発生をTMPDの付加体スペクトルとして示した。

それぞれのラジカルの強さ(量)は、最初に現れる(共鳴位置g値:・OH 2.0200、O<sub>2</sub><sup>-</sup> 2.0187、<sup>1</sup>O<sub>2</sub> 2.0161)スペクトルの高さをラジカルの強さ(radical intensity, RI)とし、キャビティ内に設定したESRマーカーとしてのMn0の左端のスペ

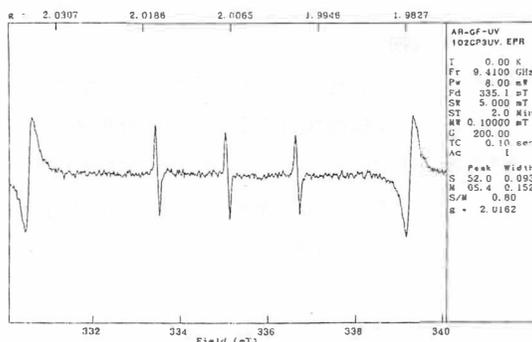


図3 コプロポルフィンから紫外線照射により発生する一重項酸素のTMPD付加体のESRスペクトル

クトルの高さとの比の値（試料のRI/MnOのRI）で表わした。なお、ESRのデータ処理は、ESR DATA ANALYZER SYSTEM（ラボテック社）により行われた。

## 2.4 実験的ポルフィリン症誘発

Jcl:Sprague-Dowley系雄ラットにgriseofulvin (GF、和光純薬工業)の生理食塩水懸濁液を50mg/ml/kg体重で1日おきに経口ゾンデにより投与を行った。1週間後にラットをネブタール麻酔下、右腋窩静脈切断によりヘパリン加採血した。全血について前述のESR法により発生する活性酸素の種類及び量を測定した。また、近藤等の方法<sup>12)</sup>で、高速液体クロマトグラフィ(HPLC)によりポルフィリンの種類と量を測定した。即ち、ポンプ、イジェクター及びプログラムはTRIRO-TAR SR 2HPLCシステム、検出器はFP-110D蛍光検出器(励起波長404nm、蛍光波長620nm)、脱気装置DG-3510を用いた(以上日本分光工業社)。溶離液はアセトニトリル-酢酸-水(80:7:13, v/v/v、50mM酢酸アンモニウムを含む)を用いた。カラムはODS-H-1151(4.6φx50mm、センシウ科学)に0.45μmメンブランフィルターをプレフィルターキット(医理化機器社)に装着した。流速は1.0ml/min、温度25°Cで行った。

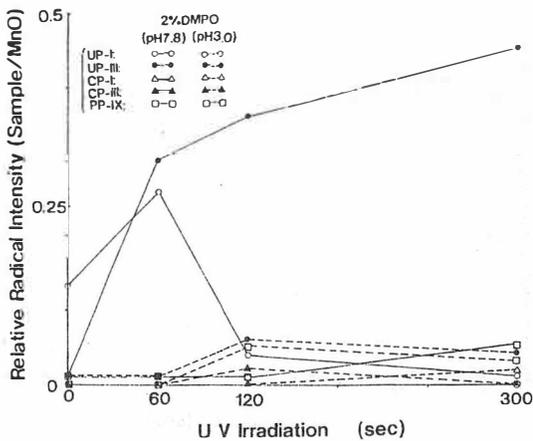


図4 紫外線照射によるポルフィリン化合物からのヒドロキシルラジカル発生に及ぼすpHの影響

## 3 結果及び考察

### 3.1 ポルフィリンからのUV照射による・OH発生

#### 3.1.1 pHの影響

図4に示した様に、スピン捕捉剤2%DMPO及びpH3.0またはpH7.8の緩衝液存在下、それぞれのポルフィリン化合物にUV照射を行うと、pH3.0ではいずれの化合物からも・OHの発生は殆ど見られなかった。pH7.8ではウロポルフィリン(UP)類のみに・OHの発生が見られた。UP-IはUV照射時間60秒を最高に減少してしましたが、UP-IIIではそれ以降も増加を続けた。

生理的環境の中性下で、ポルフィリン代謝の初期の産物であるUP類のみから、特にヘム合成に関与するUP-IIIから多くの・OHが発生したことは興味深いことである。

生理的環境の中性下で、ポルフィリン代謝の初期の産物であるUP類のみから、特にヘム合成に関与するUP-IIIから多くの・OHが発生したことは興味深いことである。

#### 3.1.2 中性下での発生条件の検討

9.2M-DMPOにDETAPAC存在下、ポルフィリンにUV照射を行うと、UP類のみから照射30秒後に最高値を示した(図5-a)。この反応液(a)にHPXを加えてUV照射を行うと、UP類からの・OH発生は照

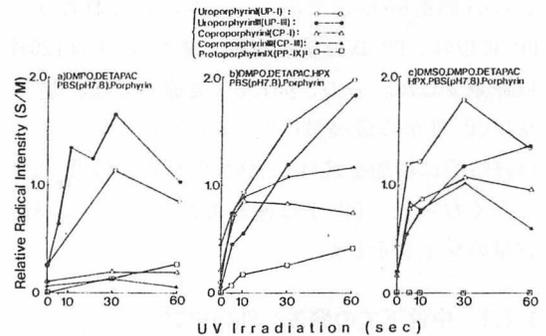


図5 中性における紫外線照射によるポルフィリン化合物からのヒドロキシルラジカル発生に関する測定条件の検討

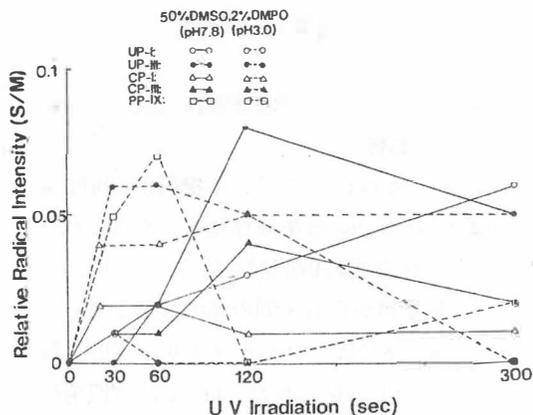


図6 紫外線照射によるポルフィリン化合物からのスーパーオキシドアニオン発生に及ぼすpHの影響

射後60秒後も増加を続け、CP類からも照射10秒後はUP類の約半分量の $\cdot\text{OH}$ が、またPP-IXからも徐々に発生の増加が見られた(図5-b)。更に、 $\cdot\text{OH}$ の消去作用を持つDMSOを加えると、PP-IXからの $\cdot\text{OH}$ の発生は見られず、他のポルフィリン化合物からの発生も60秒後には抑制された(図5-c)。

### 3.2 ポルフィリンからのUV照射による $\text{O}_2^-$ 発生

#### 3.2.1 pHの影響

図6に示した様に、2%DMPOに $\text{O}_2^-$ 経路の $\cdot\text{OH}$ を消去する50%DMSOを加え、pH3.0またはpH7.8の緩衝液存在下、それぞれのポルフィリンにUV照射を行うと、pH3.0(破線)ではUP-III、CP-I、PP-IXからUV照射60秒まで $\text{O}_2^-$ の発生が見られたが、UP-III以外、PP-IXは60秒以降、またCP-Iは120秒以降減少した。一方、pH7.8(実線)では、UP-III及びCP-IIIから最高量の $\text{O}_2^-$ が発生したが、UP-Iは経時的に増加を続け、照射300秒後にはUP-IIIより多くなった。CP-Iは僅かであったが、ほぼ一定量の発生を示した。

#### 3.2.2 中性下での発生条件の検討

$\text{O}_2^-$ の測定では、 $\cdot\text{OH}$ 測定用反応液(c)と同じものを用いたが、短い照射時間で発生を示した(図7)。即ちPP-IXはUV照射5秒後、CP-IIIは30秒

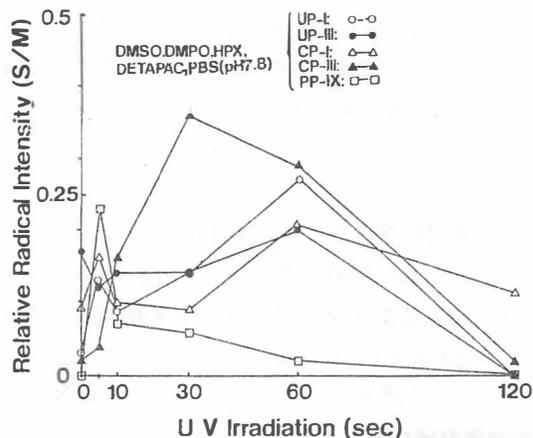


図7 中性における紫外線照射によるポルフィリン化合物からのスーパーオキシドアニオンの発生

後、UP類及びCP-Iは60秒後に最高値を示したが、UP-IとCP-Iは照射5秒後、またUP-IIIでは照射開始時に小さなピークがある二相性を示した。

### 3.3 ポルフィリンからのUV照射による $^1\text{O}_2$ 発生

スピン捕捉剤TMPDに $\cdot\text{OH}$ 消去剤DMSOを加え、中性条件下でUV照射を行うと、ポルフィリンではCP類のみから $^1\text{O}_2$ 発生が多く、UP類からは僅かな発生しか観察されなかった(図8)。なお、pH3.0ではいずれのポルフィリンからも $^1\text{O}_2$ は検出できなかった(図8の300秒時点に表示)。

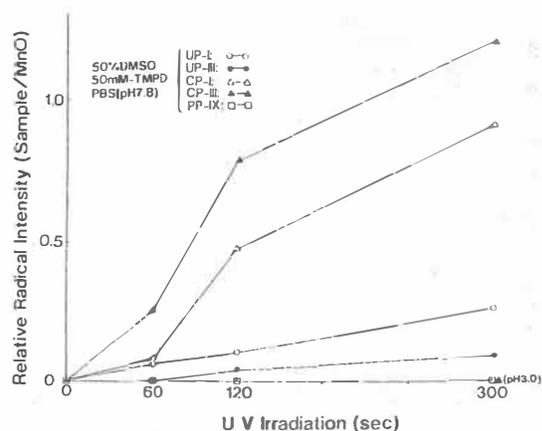


図8 紫外線照射によるポルフィリン化合物からの一重項酸素の発生

### 3.4 UV照射によるポルフィリンから発生する活性酸素の測定に関する考察

中性条件下では、検出された・OH量が3.1.1で行った実験より約4倍多かったのは、使用したDMP0の濃度も50倍高かったためと思われる。また、加えたHPXは、図2に示した様に $O_2^-$ を発生するXODの基質であり、この $O_2^-$ は更に・OHに移行するので、UV照射によりポルフィリンから発生した $O_2^-$ を経由での・OHを捕捉している可能性も考えられる。

UV照射によるポルフィリン類からの $O_2^-$ 発生は、用いた化合物の構造式との関係を明確に説明出来ない部分も示されたので、今後他の誘導体を用いて実験を重ねる必要がある。

以上の試験管内実験で、UV照射によりポルフィリン化合物から活性酸素種の発生が観察されたが、酸性域よりも生理的条件の中性域でラジカル発生量が多いことは、皮膚組織にそれら化合物が多く存在している場合にUV照射があると、影響も大きいことが推測できる。

試験管内の単純系反応（図5-a、6、8）では、いずれもポルフィリンのⅢ型がⅠ型よりやや多目に発生していたことは、Ⅲ型がヘム代謝では主経路であるので、UV照射によるヘム代謝に対する影響も大きい可能性を示唆している。また、使用したポルフィリン化合物は図1に示した様に酸化型であり、UV照射は生体内で還元型の化合物に対し

てより多くのラジカルを発生させ易いと考えられるので、ここで得られた結果より一層明瞭な変動が予想される。

### 3.5 ポルフィリンからの活性酸素発生に関わるUVの波長

キセノンランプによるUV照射は、270nm以上の波長スペクトラムとして示され（図9、実線）、地上の日光（破線）と類似している。UVの種類を波長により分類すると、400-315nmはUV-A、315-280nmはUV-B及び280-200nmはUV-Cであり、面積比からそれぞれ76.5、20.7、2.8%となる。キセノンランプによる照度（UV照度計UIT-110、受光器UVD-254P）は、平均値5.63mW/cm<sup>2</sup>であり、またフィルタ-UV-35（- - -）及びUV-D33S（- · - · -）を使用してUV照射した場合のそれぞれの照度は、3.57及び5.49mW/cm<sup>2</sup>を示した。

ESR装置のキャビテイ部分に設定した偏平セル内のポルフィリン溶液にUV照射を行い、発生した活性酸素の種類と量を測定した。図10に示した様に、UP類とCP類からの・OH及びCP類からの $^1O_2$ の発生が多いことが明らかであるが、2種類のフィルターを用いた場合、活性酸素発生にはUV-Aが主たる要因になっていることが示された。

### 3.6 実験的ポルフィリン症誘発

GFを1日おきに1週間経口投与したラットから採

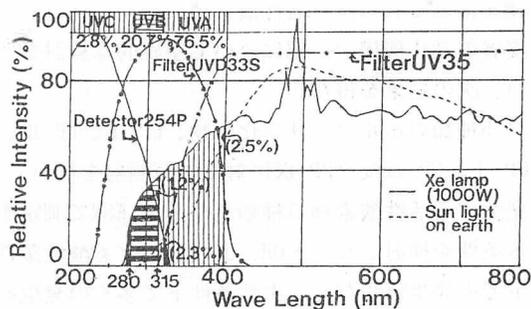


図9 キセノンランプによる照射紫外線波長スペクトルとUVカットフィルター及び検出器の有効領域

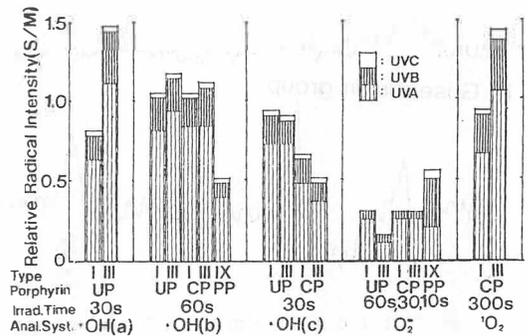


図10 UVカットフィルターによるポルフィリン化合物からの活性酸素種発生に関わる紫外線波長領域

取した血液について、HPLCによりポルフィリン類の種類及び量を測定したクロマトグラムを図11に示す。既知濃度の標準物質CP、亜鉛PP (ZPP) 及びPPにより、溶出位置 (A、B、C) から順次CP、ZPP、PPである種類を確定した。また、それぞれのピークの面積から量を算出したが、対照群 (a) のそれぞれの濃度 (2.33、98.6、11.3  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ) に比較して、GF投与群 (b) は2.09、103.9、22.1  $\mu\text{g}/\text{dl}$ であり、PPのみが2倍に増加していた。

更に、これらの血清中にUVを照射した場合、含まれるポルフィリン化合物から発生する活性酸素の種類と量をESRを用いて調べ、その結果を図12に示した。GF投与により発生量が増加した活性酸素種としては、UV30秒照射による $\cdot\text{OH}$  (a反応系) 及び60秒照射による $\text{O}_2^-$ であり、それぞれUP類及びUP類とCP類からのものであることが示唆された。

従って、ここでラットを用いて行った短期間の実験において、PP-IXの増加がクロマトグラフィにより確認されたので、ポルフィリン症が誘発された可能性が示唆された。しかしながら、発生増加した活性酸素種からはPPの関与が示されなかったことから、ポルフィリン症を実験的に十分誘発

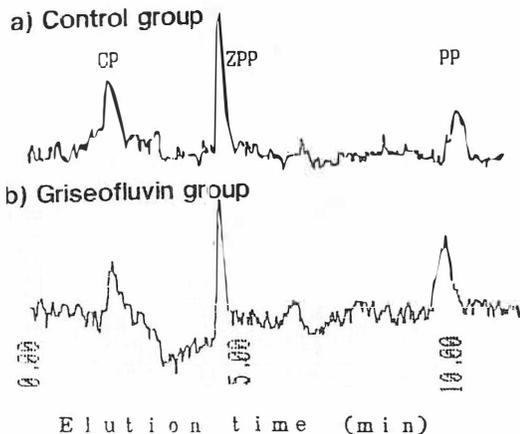


図11 グリセオフルビン投与ラット血液中ポルフィリンの高速度液体クロマトグラム

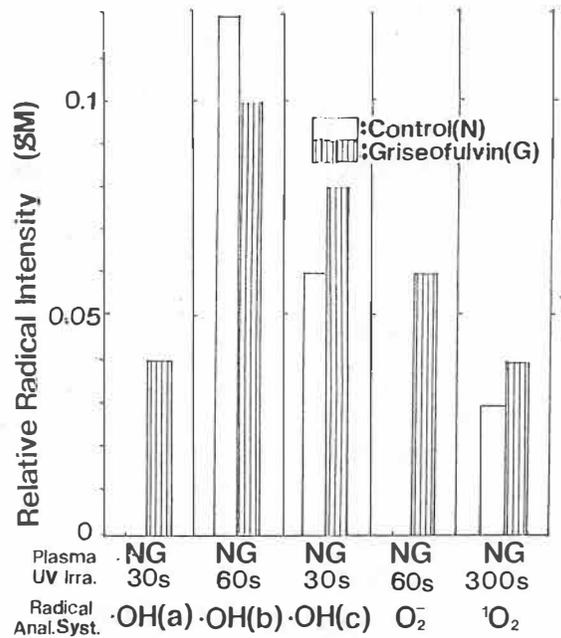


図12 グリセオフルビン1週間経口投与ラット血漿ポルフィリンからの紫外線照射による発生活性酸素種

したとは言えず、今後、GFの投与期間を延長することが必要であると考えられる。実験的ポルフィリン症が誘発された後、UV照射による皮膚の障害を防止するための抗酸化作用物質等を用いての実験を行う予定である。

#### 4 総括

皮膚と光との関連性においてポルフィリンの代謝異常とそれに伴う活性酸素種の発生に注目し、皮膚の老化機構の一部について基礎的な検討を行い、次の結果を得た。

1) 5種類のポルフィリン化合物、UP-I、UP-III、CP-I、CP-III及びPP-IXに対してUV照射を行い、発生する活性酸素種の種類及び量をESRで測定する条件を検討した。 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^-$ 、 $^1\text{O}_2$ とも酸性条件下での発生は少なく、中性条件下で多くの発生を示した。

2) 中性下、 $\cdot\text{OH}$ はUV照射30秒でUP類から多く発生し、HPXが存在すると60秒照射でCP類からも発生

が見られた。 $O_2^-$ は5秒の照射によりPP-IXやCPとUPのI型から、また、60秒後にはCP類やUP類から発生が見られた。 $^1O_2$ はCP類から照射が120秒以後多く発生し始め、300秒後でも増え続けた。これらの結果を基に、それぞれの活性酸素種の適切な測定条件を選んだ。

3) 太陽光線の波長パターンに類似し、UV-A (315-400 nm) が全UVの約77%を占めるキセノンランプによるUV照射時、UV-A及びUV-A+UV-Bの波長領域を透過させる2種類のフィルターを使用した場合、CP類とUP類からの $\cdot OH$ 及びCP類からの $^1O_2$ の発生が観察された。

4) GF投与による実験的ポルフィリン症をラットに試みたが、1週間程度の投与ではPP-IXの量が2倍に増加しても、UV照射ではPP-IXから発生する特徴的な活性酸素種が検出出来なかったことから、投与期間を更に延長する必要性が提示された。

## 文 献

- 1) 近藤雅雄、青木洋祐：ポルフィリン代謝に関する最近の知見. 医学のあゆみ 155 859-863 1990
- 2) 中島 進、林 秀雄、竹村 健、阪田 功、  
：ポルフィリン誘導体腫瘍組織集積性のメカニズムと新しい癌診断、治療法への応用. ポルフィリン 1 223-228 1992
- 3) 阪田 功、丸山 泉、高田弘之、池内昌子、乾 裕史、中島 進、竹村 健、小清水弘一、  
：ポルフィリン関連化合物と腫瘍組織親和性に関する研究(Ⅲ)光線力学的治療 (PDT) のための光増感剤の簡単な評価法. 同上誌 1 235-242 1992
- 4) A. Ando, M. Omote, I. Kumadaki,   
：Synthesis of fluorine analogs of porphyrins potentially useful for diagnosis and therapy of tumors. 同上誌 1 243-248 1992
- 5) 石原聖也、沼田道一、三好憲雄、岡本博明、新井達郎、徳丸克己、市村厚一、小林孝嘉、光田慶一、山田真砂子、河野雅弘、福田優、  
：光励起により生成する種々の光増感剤からの活性酸素系検出. 小倉良平、吉川敏一編集、磁気共鳴と医学 3 86-90 日本医学館、東京、1992
- 6) 上出良一、ポルフィリンによる光線過敏の発生機序. 今村貞夫、田上八朗、西川武二、吉川邦彦 編、現代皮膚科体系、年刊版、89-A, pp229-234, 中山書店、東京、1989
- 7) 小倉良平、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
- 8) 野中薫雄、大神太郎、村山史男：代謝異常と皮膚-ポルフィリン. 皮膚科MOOK 10 153-160 1987
- 9) 市橋正光：光線過敏症分類、佐藤吉昭編、光線過敏症、pp40-41, 金原出版、東京、1991
- 10) 野中薫雄、大神太郎：実験的ポルフィリン症、同上誌 pp129-136 1991
- 11) 野中薫雄、下山時生、本多哲三、広渡徳治、堀 貞、野北通夫：実験的ポルフィリン症マウスの光線過敏症-グリセオフルビン投与时におけるポルフィリンの動態と実験的ポルフィリン症マウスに対する光照射時における皮膚老化. 日皮会誌 87 585-598 1977
- 12) 近藤雅雄、広沢実一：高速液体クロマトグラフィーによる赤血球ポルフィリンの高感度迅速定量法. 臨床化学 17 36-39 1988