還元型ネオプテリン(NPH4)の紫外線照射皮膚傷害に対する効果

東京理科大学　生命科学研究所
小　島　周　二

Effect of the reduced form of neopterin (NPH4) on human fibroblast cell and mouse melanoma (B-16) cell injuries induced by long-wave length ultraviolet light (UV-A) irradiation was examined.

The reduced form of neopterin, NPH4, didn't inhibit the incorporation of ^{3}H-proline into collagen of human fibroblast cells induced by UV-A irradiation, but dose-dependently did the lowering of ^{3}H-thymidine (^{3}H- TdR) incorporation into DNA fraction of the B-16 cell injury. On the other hand, the oxidized form of neopterin, NP, drastically elevated the reduction of both precusors induced by UV-A irradiation at a high concentration. Radical oxygen species (ROS) which induced the cell injuries in B-16 cell. Among various kinds of ROS, scavengers, only catalase, a scavenger for hydrogen peroxid, protected the cells from the injury, suggesting that hydrogen peroxide may involve in the cell injury induced by UV-A irradiation. In the in vitro analysis of chemiluminescence induced by hydrogen peroxide, NPH4 reduced the siginal intensity in dose-dependent manner, while NP dramatically enhanced the signal intensity at a high concentration. In hydrogen peroxide-induced B-16 cell injury model, almost the same data were obtained as well as in UV-A irradiation. These results suggest that neopterin would be applicable to protecting skin from ultraviolet-induced injury and skin cancer therapy.

1　緒　言

ネオプテリンは分子量253の2-アミノ-4-ヒドロキシプテリジン誘導体の1つで、核酸（GTP）由来の補酵素（ビオプテリン）の前駆体であり、食細胞の1つであるマクロファージより、インターフェロンγの刺激により遊離されることが明らかとなっている。ネオプテリンの生理活性については、いまだ解明されていないが、これまで、AIDSをはじめとする種々の感染症、悪性腫瘍、自己免疫疾患、異種臓器移植の拒絶反応、川崎病、糖尿病等の患者血中および尿中に顕著に増加することことから、これら疾患の診断に用いる試みがなされている。

Effect of the reduced form of neopterin (NPH4) on the skin injury induced by ultraviolet light

Shuji Kojima

Research Institute for Biosciences, Science University of Tokyo

一方、近年、心筋梗塞、動脈硬化、糖尿病、アルツハイマー病、癌、自己免疫疾患等の成人病・難病の発症に生体内で産生される活性酸素種（ROS）が関与していることが明らかとなってきた。これらの多くは、先に述べたネオプテリン高値を示す疾患であり、かつ、同一細胞より両物質が遊離されることから、ネオプテリンが食細胞での活性酸素の産生・遊離の制御に関与している可能性か示唆された。すなわち、我々は本物質を食細胞での活性酸素の産生および遊離活性酸素に対するスカベンジャー（抗酸化剤）と推定した。この仮定の下で、ネオプテリンの抗酸化能を種々の系で測定したところ、本物質の還元体である5、6、7、8-テトラハイドロネオプテリン（NPH4）に極めて強い活性があることを見いだした[1-3]。また、酸化型ネオプテリン（NP）もマクロファージの活性酸素産生過程に作用し、この発生を抑制することを既に明らかにしている[4]。これらの結果は、過剰生産されたROS、あるいは、これらに対する生体の防御系の低下・欠損等による正常細胞の傷害、いわゆる「活性酸素ストレス」に対する

生体の持つ「巧みな防御機構」の発見につながるばかりでなく、先に記載した活性酸素関連疾患に対する治療薬への応用も大いに期待される。

ところで、紫外線暴露による皮膚の炎症あるいは皮膚癌等の発生についても、その詳細については明らかではないが、紫外線照射により発生するROSの関与が示唆されている[5-7]。そこで、本研究では紫外線による皮膚傷害に対するネオプテリンの効果を抗酸化活性と関連付け、ヒト線維芽細胞およびマウス・メラノーマ（B-16）細胞を用い検討した。

2 実 験

2.1 ESRによるネオプテリンの抗酸化活性の解析

スピントラップ剤としては5,5-dimethyl-pyrroline-1-oxide（DMPO）を用い、日本電子製RADICAL Bio-SENSOR（JES-FR80）にて解析した。スーパーオキサイドアニオンはヒポキサンチン（HPX）（0.5mM）とキサンチンオキシダーゼ（XOD）（0.25V／ml）の反応にて生成させた。ヒドロキシルラジカルは、予め、硫酸第一鉄と金属キレータであるDiethylenetriaminepentaaceticacid（DETAPAC）を等モル（1mM）反応させておいた水溶液（Fe-DETAPAC）と過酸化水素の反応で生成させた。

2.2 細胞の培養

マウスメラノーマ細胞を理研細胞バンクより入手し、イーグルMEM（10%FCS含有）培地を用い、37℃のCO_2インキュベータ（5%CO_2／95%Air）中で、コンフルエントあるいはセミコンフルエント、になるまで培養した。つぎに、0.25%トリプシン／0.02% EDTA溶液を用い細胞を回収し、PBS（－）で3回洗浄後、2×10^6 cells／ml MEM細胞懸濁液を調製し、1mlを24穴プレートにまく。さらに、12時間培養したのもに、ネオプテリンを加え、紫外線（UV-A）を照射した。

2.3 紫外線の照射

UV-A（東芝、FL-20S、BL／DMR）の照射はカバープレートを付けた状態で、2.0mW／cm^2の線量率で所定の時間照射した。

2.4 ヒト線維芽細胞の紫外線照射によるコラーゲン生成量の測定

ヒト真皮線維芽細胞(森永乳業製）を、ハムF12(10% FCS含有）培地に懸濁し、24ウェルに$2x10^4$個ずつまき、37℃のCO_2インキュベータ(5%CO_2／95%Air）中で、4～5日コンフルエントになるまで培養する。UV-A照射（0、80、160、および240分）後、培地を除き、PBSで3回洗浄、^{3}H-プロリン（0.2μCi／ml）を各ウェルに入れ、さらに24時間培養する。培地を除去し、PBSで細胞を3回洗後、50μg／mlプロテアーゼK（含0.25%N-ラウリルザルコシン・25mM EDTA)を各ウェルに100μl加える。細胞が完全に溶解した後、ピペッテングし、100μlを液体シンチレーションカウンター用バイアルに取り、シンチレータ（10ml）を入れ、放射能を測定した。つぎに、本合成を約30%抑制する照射線量（29J／cm^2＝240分照射）にて、NPH4およびNPのコラーゲン合成に対する作用を検討した。

2.5 細胞傷害の測定

細胞傷害の程度は、照射細胞をPBS（－）で3回洗浄後、^{3}H-チミジン（^{3}H-TdR）のDNA画分への取込活性から評価した。すなわち、UV-A照射後の洗浄B-16細胞に^{3}H-TdRを各ウエルに18.5KBq／mlになるように加え、1時間CO_2インキュベータで培養する。ハンクス液で2回洗浄した後、0.25%トリプシン／0.02%EDTA溶液50μlを各ウエルに加え、1～2分インキュベータ内に放置し、1mlのハンクス液を加え、細胞をガラスチューブに回収する。各チューブに10% TCA 1mlを加え、30分間氷上に放置する。ガラスフィルター（Whatman、GF／C）をセットした濾過器で、TCA不溶画分を回収し、5%TCA、エタノール／エーテル（1：1）およびエ

ーテルの順で各々2回ずつ洗浄する。フィルターを室温で放置し、十分乾燥後、バイアルビンに移し、トルエンシンチレータ10mlを加え、放射能を測定する。なお、各々の活性はDNAに取り込まれた放射能（CPM／well)あるいは、非照射群に対する割合（%）として表示した。

2.6 抗酸化酵素・酸化剤の細胞傷害活性に対する作用

B-16細胞でのUV-A傷害および酸化型ネオプテリン（NP）によるこの促進効果に関与するROSを同定する為、SOD（1000U／ml)、カタラーゼ（CAT、200U／ml)、α-フェニール-N-t-ブチールニトロン(PBN、100μM)およびマニトール(MAN、100μM)を培地に添加した細胞について、UV-Aを2.0mW／cm²の線量率で、10分間照射し、傷害活性を比較した。

2.7 過酸化水素によるB-16細胞傷害に対するネオプテリンの作用

1、10、および100μMの過酸化水素を含むMEM培地を調製し、B-16細胞を10分間過酸化水素に暴露させた後、PBS（－）で十分洗浄、^{3}H-TdRを含む培地を各ウエルに加え、1時間CO_2インキュベータで培養する。その後の操作は2.5に従い、過酸化水素によるB-16細胞に対する傷害を検討した。さらに、過酸化水素濃度を10μMに固定し、先に述べたUV-A照射と同様の方法でNPの作用を検討した。

2.8 ケミルミネッセンスによる過酸化水素の反応性の検討

Weissらの方法[8]に従い、濃度のことなるNPH4およびNPを0.1M PBS（pH7.5）にとかし調製した。蛍光体として、10mM 5-アミノ-2,3-ジヒドロ-1,4-フタラジンジオンをDMSOに溶かしたのもをストック溶液とし、用時、PBSで40μMに希釈したものを用いた。650μlのPBS、150μlの蛍光体溶液およびネオプテリンを含む反応溶液に100μlの1% H_2O_2を加え反応を開始した。蛍光体からの蛍光をルミネッセンスリーダ（Aloka BLR102）で連続的に記録した。

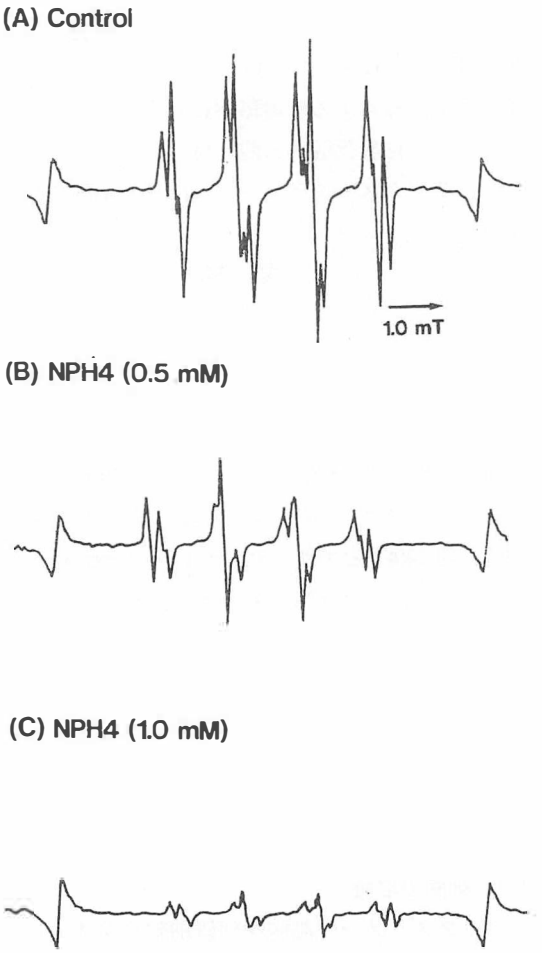

Fig.1[A]. ESR spectra of DMPO spin adducts formed in a hypoxanthine/xanthine oxidase (HPX/XOD) system without (A) or with NPH4 of 0.5mM (B) and 1.0mM (C).
Each spectrum was obtained at 60 sec after adding XOD.
Signals appearing both at high and low field are due to Mn(II) installed in the cavity as a reference.
the main species present include DMPO-OOH and DMPO-OH.

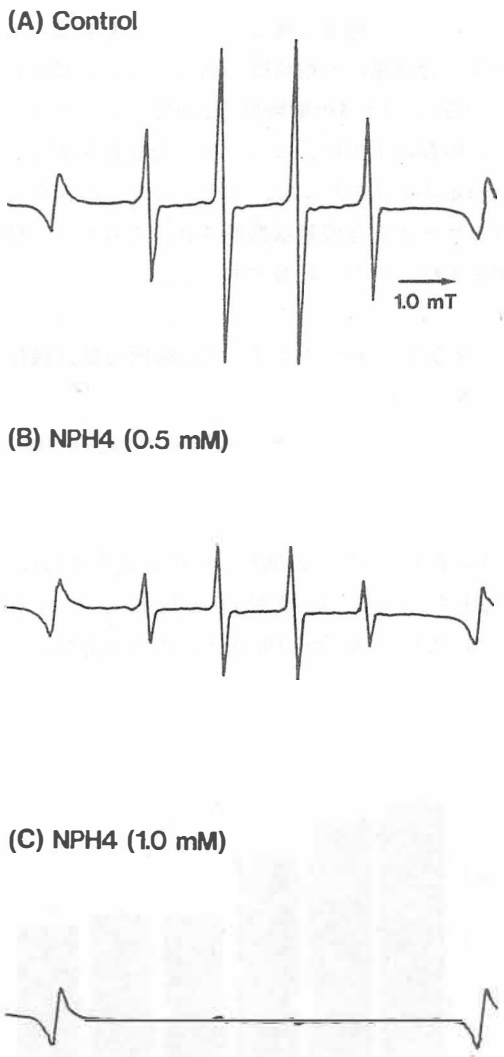

Fig.1[B]. ESR spectra of DMPO spin adducts formed in the Fenton reaction without (A) or with NPH4 of 0.5mM (B) and 1.0mM (C).
Each spectrum was obtained at 60 sec after adding hydroperoxide.
Signals appearing both at high and low field are due to Mn (II) installed in the cavity as a reference. the main species present is DMPO-OH.

2.9 ネオプテリンのUV-Aに対する安定性

NPを100ng／ml PBSに調製、2.0mW／cm²の線量率でUV-Aを時間を変えて照射した。残存NP量はNeopterin Kit（INCSTAR）を用い定量した。残存NP量は照射前のNP量を100とした際の割合（%）で表示した。

2.10 チロシナーゼ活性の測定

50mM PBS(pH6.8) 0.8ml、チロシナーゼ(Sigma社製、750μg／ml) 0.5ml、ネオプテリン0.5mlをガラス製セルに入れ、2分間プリインキュベートする。この反応液に0.05%L-DOPA 0.5mlを添加し、反応を開始する。反応開始後、37℃でインキュベートしながら475nmの吸光度の変化を2分間記録し、初速度より活性を求めた。

3 結 果

3.1 ESRによるネオプテリンの抗酸化活性の解析

HPX／XOD反応系及びFe-DETAPAC／H_2O_2反応系により、それぞれ、O_2^-ラジカルおよび・OHラジカ

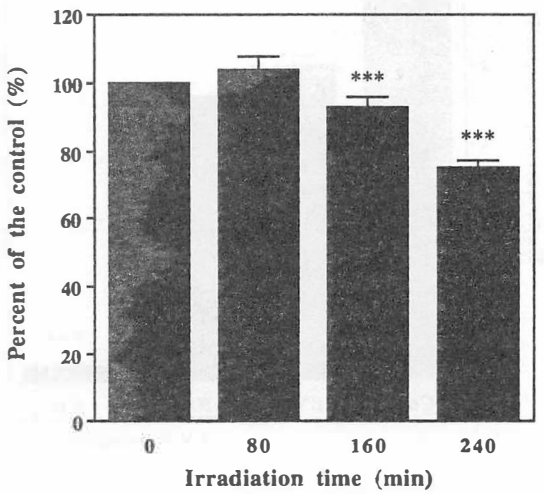

Fig.2. Effect of UV-A irradiation times on the incorporation of ^{3}H-prolin into human fibroblast cell.
Results were expressed as relative percent of UV-A-irradiated cells to the onirradiated cells.
***Statistically significant diffrence from the nonirradiated group ($p<0.001$, Student, t-test).

ルを発生させ、還元型ネオプテリン（NPH4）との反応性をESRにて検討した。この結果、Fig.1に示すように、NPH4は、いずれのラジカルに対しても、極めて高い反応性を示し、濃度依存的にDMPO-OOH（Fig.1[A]）およびDMPO-OH（Fig.1[B]）のピークを低下させた。一方、酸化型ネオプテリンには、これらラジカルとの反応性は認められなかった。

3.2 ヒト線維芽細胞のUV-A照射によるコラーゲン生成量の変化

コラーゲンは、主としてプロリンとハイドロプロリンからなるアミノ酸配列の規則的な繰り返しから構成されている。そこで、^{3}H標識プロリンの細胞内取り込みにより、UV-Aによるコラーゲンの生合成の変化を測定した。この結果、Fig.2に示すように、ヒト線維芽細胞にUV-Aを照射するとコラーゲン合成量は照射時間の増加と共に、減少した。つぎに、UV-A照射時間を240分とし、ネオプテリンの存在下での、コラーゲン合成量を測定した。Fig.3に示すように、ネオプテリンの存在によりコラーゲン合成量は抑制され、とりわけ、酸化型ネオプテリンに顕著であった。

3.3 マウス・メラノマ（B-16）細胞の紫外線傷害に対するネオプテリンの作用

つぎに、細胞を紫外線に対しより感受性の高いマウス・メラノマ（B-16）細胞にかえ、UV-Aの細胞傷害に対するネオプテリンの作用を検討した。Fig.4に示すように、2.0mW／cm^{2}の線量率で5分以上照射すると、非照射群と比較し、有意（$p<0.05$）な^{3}H-Tdrの取り込み活性の抑制がみ

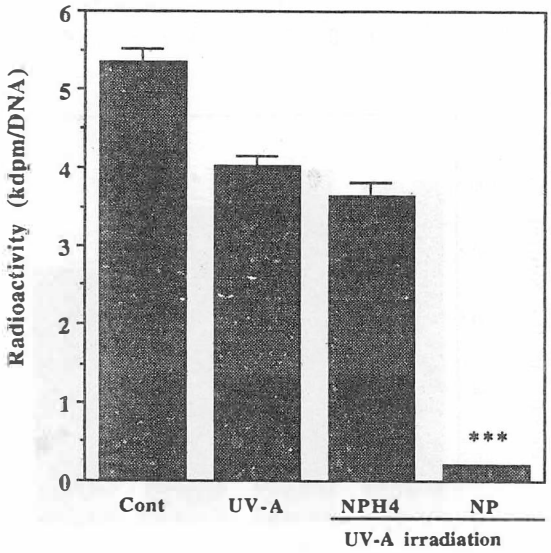

Fig.3. Effects of the reduced and the oxidized form of neopterin on the ^{3}H-prolin incorporation into human fibroblast cell irradiated with UV-A. The cells were exposured for 240 min in the presence of NPH4 and NP at 300μM by UV-A. ***Statistically significat difference from the non-irradiated control group ($p<0.001$, Student, t-test).

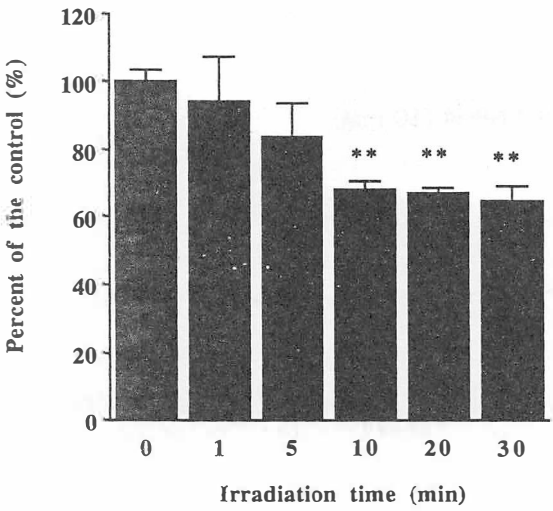

Fig.4. Effect of UV-A irradiation times on the mouse melanoma(B-16) cell injury. The cell damages were evaluated in viyro by measuring ^{3}H-thymidine (^{3}H-TdR) incorporation into cellular DNA of the cells. Results were expressed as relative percent of UV-A-irradiated cells to the nonirradiated cells. **Statistically significat difference from the nonirradiated control group ($p<0.01$, Student, t-test).

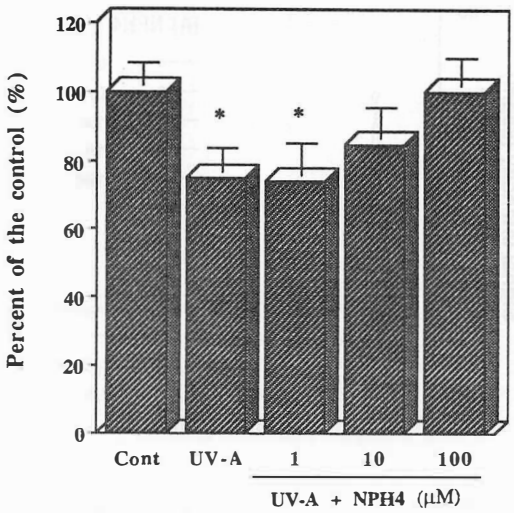

Fig.5. Effect of doses of the reduced from of neopterin (NPH4) on the UV-A-inducued B-16 cell injury.
The cell damages were evaluated in vitro by measuring ^{3}H-thymidine (^{3}H-TdR) incorporation into cellular DNA of the cells.
Results were expressed as relative percent of UV-A-inraddated cells with or without NP to the nonirradiated cells.
*Statistically significat difference from the nonirradiated control group ($p<0.05$, Student, t-test).

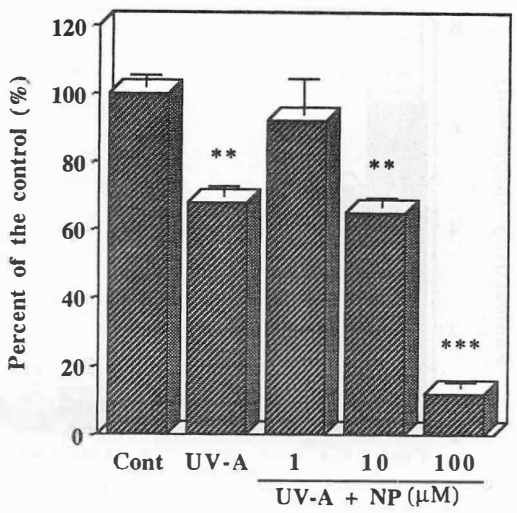

Fig.6. Effect of doses of the oxidized from of neopterin(NP) on the UV-A-induced B-16 cell injury.
The cell damages were evaluated in vitro by measuring ^{3}H-thymidine (^{3}H-TdR) incorporation into cellular DNA of the cells. Results were expressed as relative percent of UV-A-inradiated cells with or without NP to the nonirradiated cells. **Statistically significat difference from the nonirradiated control group ($p<0.01$, Student, t-test). ***Statistically significat difference from the nonirradiated group
($p<0.001$, Student, t-test).

られ、10～30分の照射で非照射群の約70%の値を示した。次に、照射時間を10分（1.2J／cm^2）に固定し、この細胞傷害に対するNPH4およびNPの作用を、検討した。Fig.5に示すように、還元型ネオプテソンであるNPH4は濃度依存的にこの細胞傷害を抑制した。一方、酸化型ネオプテリンは、10μMまでは顕著な作用を示さないものの、100μMでは、この傷害を顕著に促進した(Fig.6)。還元型ネオプテリンの抗酸化活性については、すでに、明らかにしたように、極めて強い抗酸化活性があること、および本実験にて明らかとなったように、NPH4がUV-Aによる細胞障害を抑制することより、この障害の発生に活性酸素の関与が推定された。そこで、酸化型ネオプテリンによる細胞傷害を促進する結果について、種々のラジカル・スカベンジャーを用い、さらに検討を加えた。この結果、Fig.7に示すように、それぞれ、$^1O_2$、O_2^-および・OHに対するスカベンジャーであるPBN、SOD、およびMANには細胞傷害の抑制は全く見られず、過酸化水素に対するスカベンジャーであるCATにのみ顕著な傷害活性の解除がみられた。この結果、このUV-AによるB-16細胞傷害の発生には、紫外線照射により発生するROSのうち、主として、過酸化水素が関与することが示唆された。

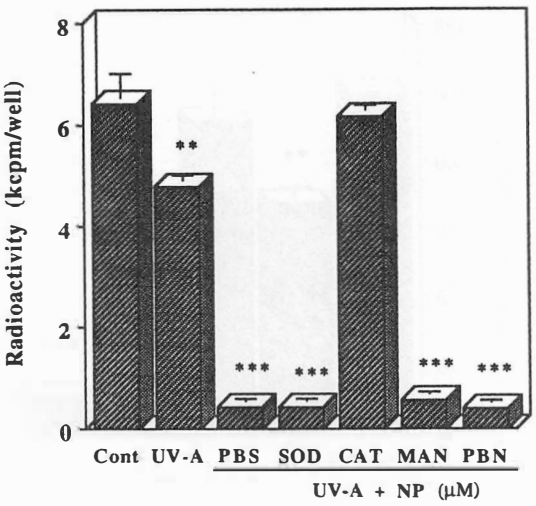

Fig.7. Effect of radical scavengers on the UV-A-induced B-16 cell injury.
The cell damages were evaluated in vitro by measuring ^{3}H-thymidine (^{3}H-TdR) incorporation into cellular DNA of the cells.
Results were expressed as radioactivity (cpm) incorporated into the cell/well. PBS, PBS(−); SOD, superoxide dismutes (1000U/ml); CAT, catalase (200U/ml); MAN, mannitol (100μM); PBN, α-phenyl-N-t-butylnitrone (100μM),
**Statistically significat difference from the nonirradiated control group ($p<0.01$, Student, t-test).
***Statistically significat difference from the nonirradiated control group ($p<0.001$, Student, t-test).

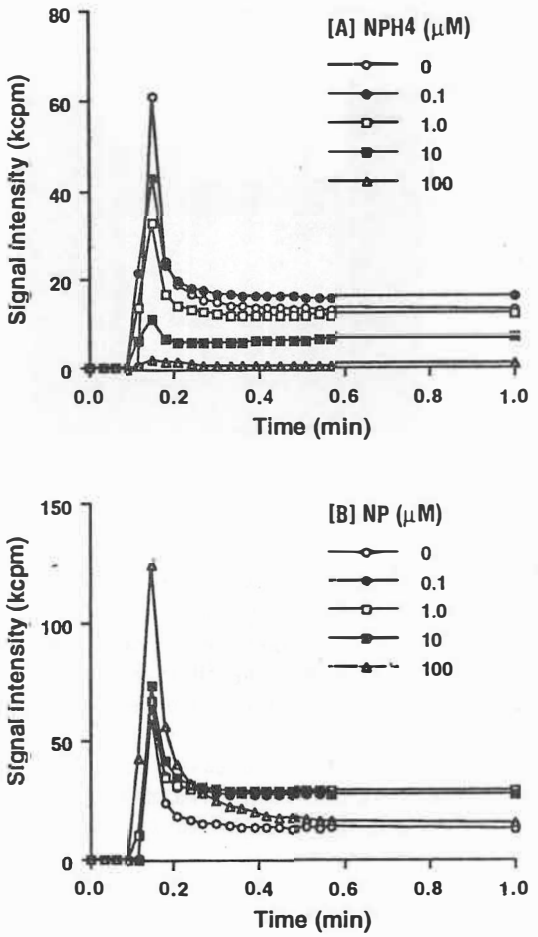

Fig.8. Effect of neopterins on the signal in tensity induced by hydrogen peroxide.
The signal intensity was measured by luminoldependent chemiluminescence.
The light output after addition of hydrogen peroxide containing luminol with or without neopterins was continuously record for 1 min.
The signal intensity was expressed as counts per minut (cpm) at each time interval.
[A]NPH4, reduced form of neopterin;
[B]NP, the oxidized form of neopterin.

3.4 ネオプテリンの過酸化水素の反応性に対する作用

UV-A照射によるB-16細胞傷害の発生に過酸化水素の関与が示唆され、酸化型ネオプテリンによる傷害の増強が過酸化水素の細胞傷害活性の促進を介する事が推定された。そこで、過酸化水素の反応性に対するネオプテリンの作用をケミルミネッセンス法により検討した。この結果、Fig.8に示すように、NPH4が過酸化水素によるシグナル強度を濃度依存的に抑制するのに対し、NPは0.1～10μMの濃度範囲では顕著な作用を示さないものの、100μMでは、著しくこのシグナル強度を高めた。この結果は、先に示したUV-A照射による細胞傷害に対するNPの傷害促進効果の発現結果と良く一致した。

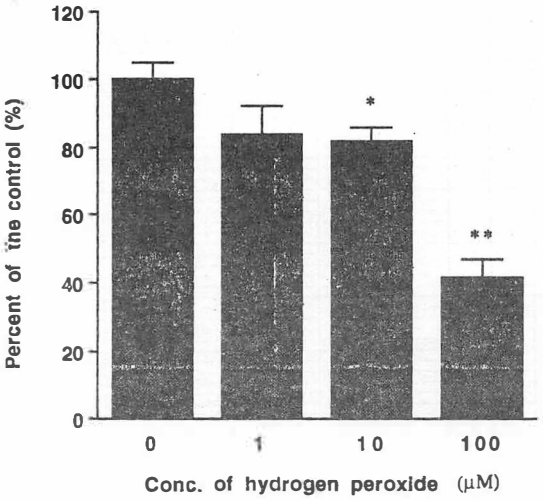

Fig. 9. Effect of doses of hydrogen peroxide on B-16 cell injury.
The cell damages were evaluated in vitro by measuring ^{3}H-thymidine (^{3}H-TdR) incorporation into cellular DNA of the cells.
Results were expressed as relative percent of hydrogen peroxide-treated cells to the untreated cells.
*Statistically significat difference from the untreated group ($p<0.05$, Student, t-test).
**Statistically significat difference from the untreated group ($p<0.01$, Student, t-test).

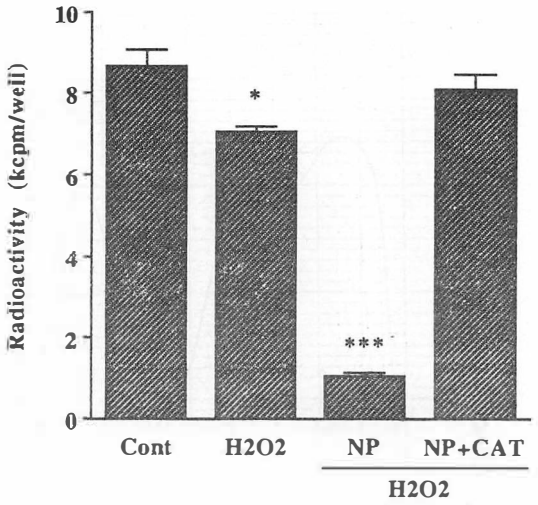

Fig. 10. Effect of doses of hydrogen peroxide-induced B-16 cell injury by the oxidized form of neopterin and its abolishment by catalase.
The cell damages were evaluated in vitro by measuring ^{3}H-thymidine (^{3}H-TdR) incorporation into cellular DNA of the cells.
The cells were treated with 10 μM hydrogen peroxide 10 min with or without NP. Results were expressed as radioactivity (cpm) incorporated into the cells/well. Catalase (CAT, 200U/ml)was added to 10 μM hydrogen peroxide-treated cells with NP,
*Statistically significat difference from the untreated group ($p<0.05$, Student, t-test).
**Statistically significat difference from the untreated group ($p<0.01$, Student, t-test).

3.5 過酸化水素によるB-16細胞傷害とネオプテリンの作用

これまでの結果より、UV-A照射によるB-16細胞傷害の発生に過酸化水素が関与し、NPH4はこの反応性を抑制、一方、NPはこれを増強することにより、それぞれ、UV-A傷害の抑制及び促進をする事が示唆された。これらの仮定を確認する目的で、本実験では、過酸化水素による細胞傷害を作成し、この傷害に対するNPH4及びNPの作用を検討した。Fig. 9に示すように、10 μM以上の過酸化水素により有意な細胞傷害が惹起された（$p<0.05$)。つぎに、過酸化水素の濃度を10 μMとし、NP(100 μM)およびCAT（200U／ml）の作用を検討した。この結果、Fig. 10より明らかなように、過酸化水素によるB-16細胞傷害はUV-Aによる細胞傷害と同様、NPにより促進され、当然の事ながら、この促進効果はCATにより完全に解除された。

3.6 ネオプテリンの吸収スペクトルと紫外線に対する安定性

還元型ネオプテリン（NPH4）が、ヒト線維芽細胞での紫外線によるコラーゲン合成の抑制に対しては促進的に、メラノーマ細胞でのDNA合成の抑

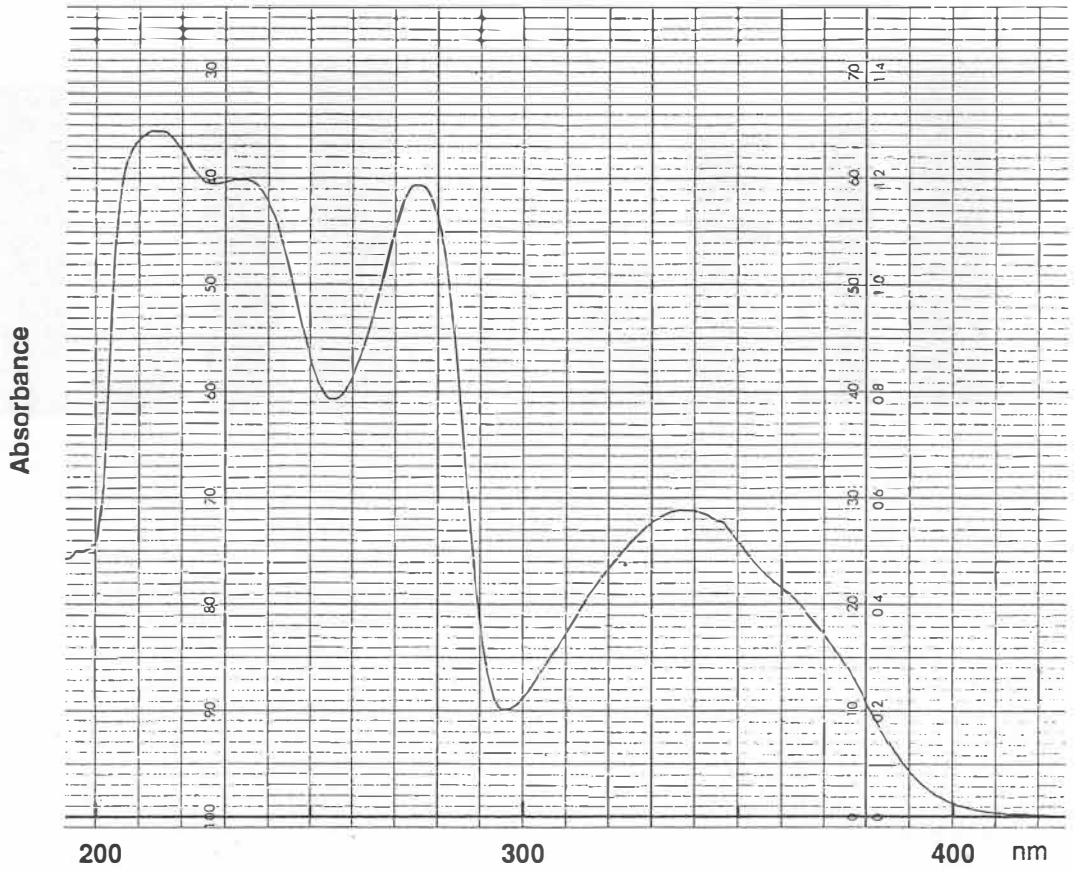

Fig.11 Absorption spectrum of the reduced form of neopterin

制に対しては防御的に作用すると言う、矛盾した結果を示した。紫外線の傷害活性が活性酸素に起因することから、線維芽細胞での紫外線によるコラーゲン合成の抑制に対しても、当然、NPH4が防御的に作用することが期待された。この実験では、紫外線のメラノーマ細胞でのDNA合成抑制作用と比較し、コラーゲン合成に対し紫外線が抑制作用を示すのに、大線量の照射を要することから、NPH4が照射中に酸化型ネオプテリン（NP）に変化した、あるいは紫外線を吸収し、コラーゲン合成に対し抑制作用を有する他の化合物に変化したことが考えられる。そこで、本実験では、NPH4の吸収スペクトルおよび紫外線に対する安定性を検討した。Fig.11より明らかなように、紫外部（300～400nm）に吸収波長を有するスペクトルを示した。また、Fig.12に示すように、UV-A照射に対するNPの安定性は極めて低く、2.0mW／cm²の線量率で10分間の照射により、大部分のNPは分解消失した。また、NPH4についてもUV-Aに対し、極めて不安定であった。なお、分解産物については不明である。

3.7 ネオプテリンのチロシナーゼ活性に対する作用

ネオプテリンのチロシナーゼ活性に対する作用を検討したところ、酸化型および還元型ネオプテリン、いずれも1.0～1000μMの濃度範囲では、本活性には何ら作用しなかった。

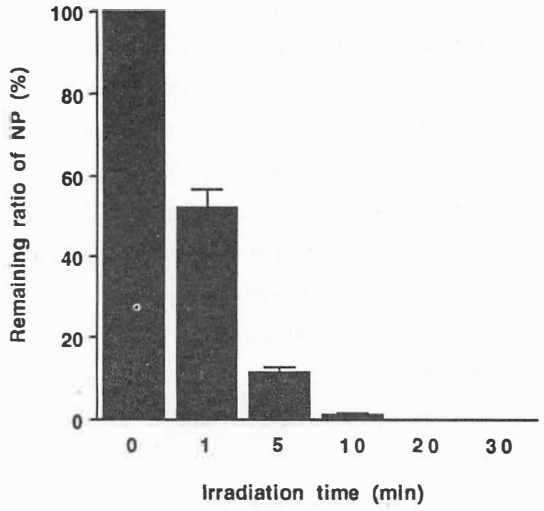

Fig.12. Decomposition of the oxidized form of neopterin by UV-A irradiation as a function of time.
One μM of the oxidized form of NP was irradiated for different times by UV-A at a dose of 2.0mW/cm².
Remaining NP at each time interval was assayed by Neopterin RIA kit.
Each point was expressed as relative percent(%) of UV-A-irradiated sample to the non-irradiated sample and the mean ± S.E.M. for 3 independent assays.

4 考 察

これまで、紫外線による皮膚の炎症をはじめ、皮膚癌の誘発・憎悪化等に、照射後、皮膚内に発生する種々のROSが関与することが報告されている。すなわち、細胞に紫外線が照射されることにより細胞内の水分子は励起され、この後に続く連鎖反応により、種々のROSを生成、細胞膜の脂質過酸化等を介し、先に述べた種々の皮膚障害を発生するものと考えられている[5-7]。

一方、ネオプテリンの抗酸化活性については、これまで私共が報告してきた通りである[1-4]。そこで本研究では、紫外線の中でも、比較的、細胞に対する傷害活性が低い長波長紫外線（UV-A）を用い、ヒト線維芽細胞でのコラーゲン合成およびマウス・メラノマ（B-16）細胞でのDNA合成抑制に対するネオプテリン（NPH4およびNP）の作用を検討した。

ヒト線維芽細胞でのコラーゲン合成は大線量（29J／cm²）の紫外線照射により、非照射群に対し約30%の抑制がみられた。この抑制は還元型および酸化型ネオプテリンの、いずれによっも解除されず、むしろ増強された。一方、B-16細胞でのDNA合成は、1.2J／cm²（2.0mV／cm²で10分間照射）と極めて少線量の紫外線で非照射群に対し約30%の抑制が得られた。この紫外線傷害に対し、還元型ネオプテリンであるNPH4は用量依存的に抑制作用を示した。一方、酸化型ネオプテリンであるNPは低濃度領域では顕著な作用を示さないものの、高濃度（100μM）では、その傷害をさらに一層促進した。紫外線の傷害活性が活性酸素に起因することから、線維芽細胞での紫外線によるコラーゲン合成の抑制に対しても、当然、NPH4が防御的に作用することが期待されたが、本実験では、反対にコラーゲン合成の抑制をさらに増強した。この理由としては、紫外線のメラノーマ細胞でのDNA合成抑制作用と比較し、コラーゲン合成に対する紫外線の抑制実験では、照射線量が29/Jcm²と大線量の紫外線を用いるため、NPH4が照射中に酸化型ネオプテリン（NP）に変化した、あるいは紫外線を吸収し、コラーゲン合成に対し抑制作用を有する他の化合物に変化したことに起因するとが考えられる。NPH4が極めて強い抗酸化剤であること、および、NPが活性酸素種を介した細胞毒性を高めると言うこれまでの報告[8]から、本紫外線傷害モデルにおいても、これまでの報告のように、この傷害の発生にROSの関与が示唆された。そこで、B-16細胞での紫外線傷害に対する種々のラジカル・スカベンジャーの抑制作用を検討し、本傷害に関与するROSを推定した。この結果、過酸化水素に対するスカベンジャーであるカタラーゼのみに本傷害に対する回復作用がみられ、過酸化水素を介した細胞傷害が示唆された。この仮定は、紫外線に代えて、過酸化水素により惹起した

細胞傷害に対しても、ほぼ同様な結果を示したことからも支持されると思われる。さらに、酸化型ネオプテリンの紫外線細胞傷害促進の機序としては、NPが紫外線照射により発生した過酸化水素の細胞傷害活性を上昇させた結果によると考えられる。

紫外線の細胞傷害に対するNPH4の抑制作用、およびNPの細胞傷害促進作用が明らかとなり、それぞれ紫外線暴露による皮膚炎症に対する防護剤、及び皮膚癌に対する紫外線治療の際には、その安定性が問題となる。そこで、ネオプテリンの紫外線に対する安定性を検討した。この結果、ネオプテリンはUV-Aの発光スペクトル領域である320～400nmに吸収スペクトルを有し、かつ本紫外線に対し極めて不安定であり、照射後、直ちに分解あるいは他の化合物に変化する事が明らかとなった。

以上、還元型ネオプテリンが紫外線傷害を抑制すること、一方、酸化型ネオプテリンがその傷害を促進することが明らかとなった。これらの作用は、それぞれ、皮膚の紫外線によるsunburnあるいはsuntun等の急性傷害に対する防護剤として、またNPを紫外線と組み合わせることにより、皮膚癌等の局所疾患の治療へ応用することが可能と思われる。

謝　辞

コスメトロジー研究振興財団より研究支援頂き、基礎研究を進める機会が与えられましたことを厚く御礼申し上げます。お蔭様で、当初の研究予定内容以外に、新たな結果を見出す事ができました。今後も、皆様方の御指摘ならびに、なお一層の御支援頂ければ幸いです。

引用文献

1) Kojima S, Icho T, Kajiwara Y, and Kubota K:Neopterin as an endogenous antioxidant. *FEBS letters* 304 163-166 1992.

2) Kojima S, Icho T, Hayashi M, Kajiwara Y Kitabatake K, and Kubota K, : Inhibitory effectof 5, 6, 7, 8-tetrahydroneopterin on adriamycin-induced cardiotoxicity. *J Exp Pharmcol Ther* 226 1699-1704 1993.

3) Icho T, Kojima S, Shinohara N, Kajiwara Y, Kitabatake K and Kubota K : Protective effect of tetrahydroneopterin against free radical-induced injury. *Biochem Pharmacol* 45 1953-1958 1993.

4) Kojima S, Nomura T, Icho T, Kajiwara Y, Kitabatake K and Kubota K : Inhibitory effect of neopterin on NADPH-dependent-superoxide generating oxidase of rat macrophages. *FEBS letters* 329 125-128 1993.

5) Ogura R, Sugiyama M, Sakanoshita T, and Hidaka T : Role of oxygen in lipid peroxide of skin exposed ultraviolet light. In : Hayashi O, Imamura S and Hiyachi Y (eds). The Biological RoleofReactive Oxygen Species in Skin, University of Tokyo Press, Tokyo, 1988, pp 495-471.

6) Ogura R and Sugiyama H:Cellular membrane damage and lipid peroxide following exposure of the skin to ultraviolet rays. In : Kligman AM and Takase Y (eds). Cutaneous Aging. University of Tokyo Press, Tokyo, 1988, pp 495-471.

7) Schellreuter KU and Wood JM:Free radical reduction in the human epidermis. *Free Rad Boil Med* 6 519-532 1989

8) Weiss G, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G Werner ER, Werner-Fellmayer G, Semenitz E, Dierich H and Wachter H : Neopterin modulates toxicity mediated by reactive oxygen and chloride speces. *FEBS letters* 321 89-92 1993.