

# 太陽光紫外線変異原性の作用スペクトラムとサンスクリーンの効果

岡山大学 薬学部

根 岸 友 恵、豊 島 め ぐ み

The use of sunscreen seems to be important to avoid the damage caused by sunlight. There are numerous epidemiological investigations showing that the sunlight is carcinogenic to humans. The biological activity of sunscreen is evaluated by its ability to protection from erythema. However, we consider that the sunscreen's protective effect against sunlight induced-mutation should also be taken into account. In this study we examined the protective effect of two commercial sunscreens against the mutagenicity induced by natural sunlight and against the DNA damage induced by sunlight or UVB-irradiation. The mutagenicity was detected by the Drosophila wing spot test and DNA damaging activity was estimated by the Drosophila in vivo DNA repair test. When the sunscreen was pasted on the cover of petri dish in which Drosophila larvae were exposed to the sun, the mutagenicity was suppressed down to almost the control level. We prepared by ourselves sunscreens containing UVB absorbents at various concentrations, and measured the transmittance. From the results, it is suggested that the protection against the light of wavelength was shorter than 320 nm may be important to avoid the genotoxicity of sunlight.

## 1. 緒 言

太陽光紫外線はヒトの皮膚にさまざまな影響を与える重要な因子であり、その作用は波長により大きく異なっていることは知られているが、その詳細な波長特性は未だ不明である。従来、地表に届いている太陽光紫外線は波長によってUVB (290-320nm)、UVA (320-400nm) に分けられている<sup>1)</sup>。一般にUVBは紅斑生成作用、UVAは黒化作用があると言われている。しかしながら、紫外線のスペクトラムが連続的なものである以上、このような分類は不完全なものである。太陽光紫外線の作用を解析するには、太陽光そのものを材料とする研究と合わせて、単色光照射により個々の波長における作用を調べる詳細な実験が必要である。また、従来UVA領域の光はUVBあるいはそれ以下の波長の光に比べてあまり研究されてこなかったが、短波長紫外線と違って大気や窓ガラスなどで吸収されず、ヒトの皮膚においてもUVBに比べて表皮の内部まで透過する<sup>2)</sup>ことから、その重要性が見直されてきている。太陽光紫外線の最も重大な作用は発がん作用であるが、発がん作用のスクリーニング法として、変異作用を指標とすることは広く認められている。そこで本研究では、UVBからUVA領域の種々の波長の光の変異作用と自然太陽光の変異作用を詳細に検討すると同時に、サンスクリーン塗布による変異抑制の実験を行った。

## 2. 実 験

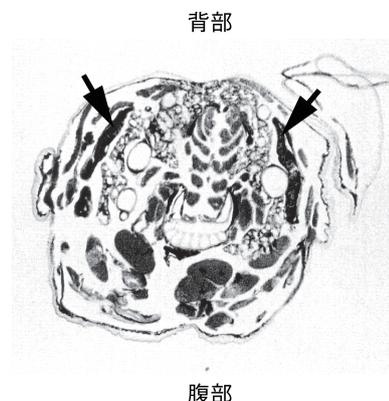
### 2.1 ショウジョウバエ体細胞突然変異検出系

ショウジョウバエは卵、幼虫、蛹、成虫と約10日間で完全変態する昆虫である。孵化後の体細胞分裂は幼虫期の4日間、成虫原基(将来成虫の器官となる組織)でしか行なわれない。したがって突然変異を検出できるのはこの時期に幼虫を処理したときに限られる。体細胞突然変異を検出する系として、ショウジョウバエ翅毛スポットテストを用いた<sup>3)</sup>。これは翅毛形態マーカーとして炎毛(*flr*)を持つ雄(*y; Dp (1;3) sc<sup>4</sup>, y<sup>+</sup> flr/TM1, Me ri Sbd<sup>2</sup>*)と多翅毛(*mwh*)を持つ処女雌(*y; mwh j v*)を交配させて得た三齢幼虫を被験体として用い、成虫になったときのハネ翅毛に現れる形態の変化を指標として調べる方法である。すなわち標的器官とする成虫原基は翅原基である。この翅原基は図1のように成虫原基としては表皮近くに存在し、紫外線への曝露が可能と考えられる。この試験系では遺伝子突然



Mutagenicity of solar UV in Drosophila and its protection by sunscreen  
Tomoe Negishi, Megumi Toyoshima

\*  
Faculty of Pharmaceutical Sciences,  
Okayama University



矢印で示した部分が翅原基。左右1対の翅原基を持つ。

図1 ショウジョウバエ3齢幼虫の横断面

変異のみでなく、組換え、端部欠失、不分離等真核生物特有の染色体レベルでの変化も検出される。処理した三齢幼虫はインスタント培地 (Formula 4-24, Carolina Biological Supply Co.) に移し、成虫になるまで25°Cで飼育する。羽化したハエのハネを集め、スライド標本とした後、翅毛の形態変化を顕微鏡で観察する。変異した翅毛の集団をスポットと呼び、染色体組換えによってのみ生じる双子スポット (炎毛と多翅毛のスポットが隣接して存在するもの)、どちらか一種類のみのスポットであるシングルスポットに分類して計数する<sup>3)</sup>。

## 2.2 ショウジョウバエ DNA 傷害修復試験<sup>4)</sup>

この試験系に用いる株 (*sc z<sup>1 w+(TE)</sup> mei-9<sup>a</sup> mei-41<sup>D5</sup>/C(1)DX, y f*) は図2に示したように常に雄は除去修復欠損、複製後修復欠損となるように工夫された株である。したがって雄はその体細胞DNAに何らかの損傷を受けた場合、修復ができずに生存率が減少する。それに反して雌は正常に損傷を修復できるので生存数に変化は見られない。そこで成虫での雌雄の比を求めることによってDNA損傷の程度を知ることができる。スポットテスト同様に処理し、羽化してきた成虫の雌雄の個体数を計数して性比を得る。

本研究で用いたショウジョウバエは梁治子博士 (大阪大学医学部) 並びに藤川和男博士 (近畿大学原子力研究所) に分与していただいた。

## 2.3 太陽光曝露方法<sup>5)</sup>

ショウジョウバエ三齢幼虫を集め、1.5mL ショ糖溶液の入ったプラスチックシャーレ (ADVANTEC) におよそ150匹の幼虫を入れ、曝露に用いた。長時間曝露中の幼虫の逃亡を避けるために、嫌気性菌培養用シャーレを用い、通気用にフタに径5mmの穴を開けメッシュを張った。岡山大学のキャンパス草地に図3のような装置を組み、曝露中の温度を一定に保つために循環装置付きの恒温水槽の水面すれすれにシャーレを置いた。曝露中の温度はシャーレ内に張ったサーモテープでチェックし、25±2°Cに保った。日射量はMED (minimum erythema dose) をErythema UV Intensity & Dose Meter (Solar Light Co.) で測定した。UVBはUVX radiometer (UVP, Inc.) にUVX-31センサーを付けて測定

し、UVA量はUVX-36センサーで測定した。曝露後、幼虫をインスタント培地に移し暗所で成虫まで飼育し、翅毛スポットの観察あるいは性比の計数を行った。曝露後の幼虫の取扱は光回復の影響を避けるために黄色ランプの下で行った。サンスクリーンの効果を調べる時は、原則として日本化粧品工業SPF測定法基準及びUVA防止効果測定法基準に従い、シャーレのフタに2mg/cm<sup>2</sup>あるいは2μL/cm<sup>2</sup>になるように塗布した。サンスクリーンとしては市販のものを用い、SPF16とSPF87の製品の効果を比較した。サンスクリーン塗布時の透過波長、透過率は分光光度計 (Hewlett Packard 8452A Diode Array Spectrophotometer) を用いて、フタを光路上において測定した。

## 2.4 健康線用蛍光ランプ照射

ブロードな波長域を持つ実験光として健康線用蛍光ランプ (FL20S・E, Toshiba, 波長275-400nm、ピーク波長310nm) (健康ランプ) を用いた。照射装置は図4に示

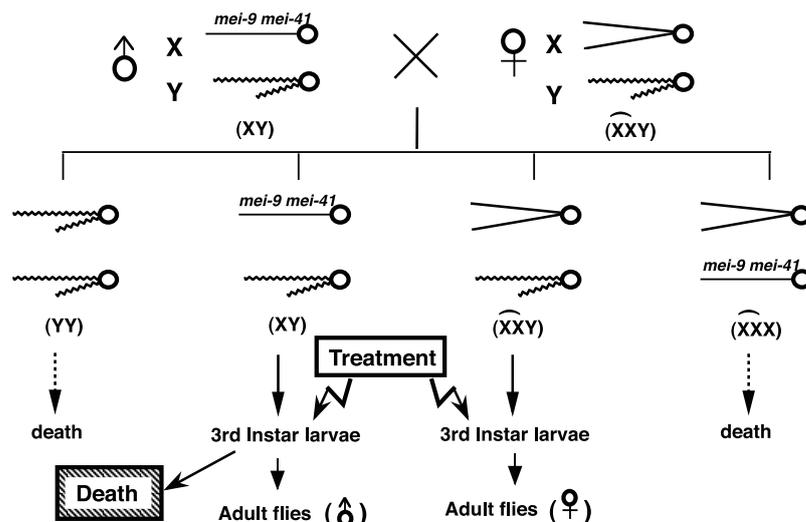


図2 ショウジョウバエ DNA 傷害修復試験



図3 太陽光曝露装置

した。2.3で述べたものと同様のシャーレを用いて照射し、線量測定はシャーレのフタの下で行なって、約3mW/m<sup>2</sup>であった。サンスクリーンの実験は太陽光曝露と同様にシャーレのフタに塗布して行なった。市販の製品に加えて、UVB吸収剤として4-dimethylaminobenzoic acid (東京化成)を吸水軟膏(Merk)を基剤として一定量混和したものを用意した。また、UVA吸収剤として2-(2-benzotriazolyl)-p-cresol (東京化成)を吸水軟膏製剤としたものを作製して効果を比較した。それぞれの吸収剤の紫外外部吸収曲線は図5のようである。吸収剤：基剤が1：40、1：4、5：4の製剤を調製した。また、吸水軟膏の代わりに紫外部に吸収が無い流動パラフィン(シオエ製薬)を溶剤として用いた製品を調製し、効果の検討を行なった。

## 2.5 単色光照射の変異原性

太陽光紫外線の波長による生物活性を見るために単色光照射による変異原性及びDNA傷害性を検察した。かなり広い範囲に一定波長の光が照射できる装置が必要であり、この実験は国立岡崎共同研究機構基礎生物学研究所にある大型スペクトログラフ<sup>6)</sup>を用いる共同研究グループ(代表者：檜枝光太郎(立教大学))で行った。水平方向に分光された光を鏡を使って垂直方向に方向を変え、先の実験と同様にプラスチックシャーレの上方から光が照射されるようにした。光強度はフォトダイオード(S1337-66BQ, Hamamatsu Photonics)でモニターしながら光電子密度計(photon density meter HK-1)を用いて測定した。照射時の室温は25℃に保たれるように空調した。照射および照射後の操作は太陽光ならびに健康ランプの実験と同様に行なった。

## 3. 結果

### 3.1 太陽光および健康線用蛍光ランプの活性とサンスクリーンの効果

翅毛スポットテストを用いた太陽光変異原性の2年間のモニター実験により、年間を通じて太陽光に変異原性が観察された。その強さは日射量に比例しており、冬期は夏期の1/3～1/5であった<sup>5)</sup>。今回、日差しの強くなる4月末にサンスクリーンによる効果を調べた。太陽光の変異原性と曝露時にサンスクリーンをフタ全体に約40mg塗布した場合の結果を図

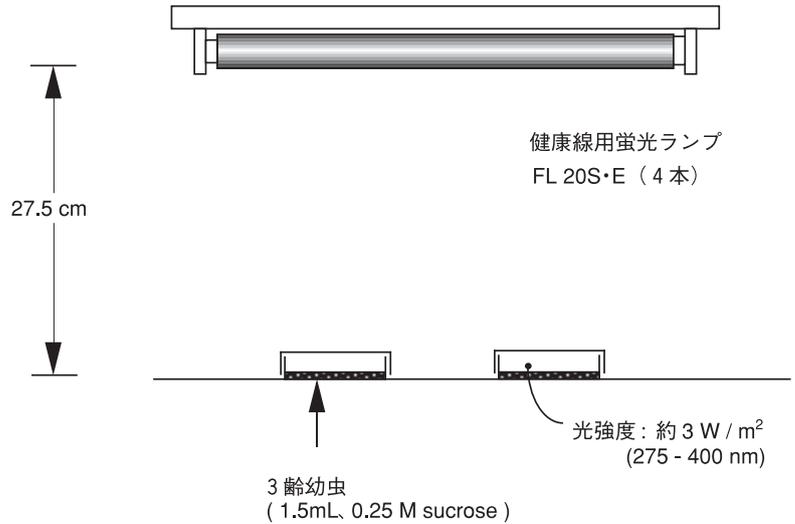
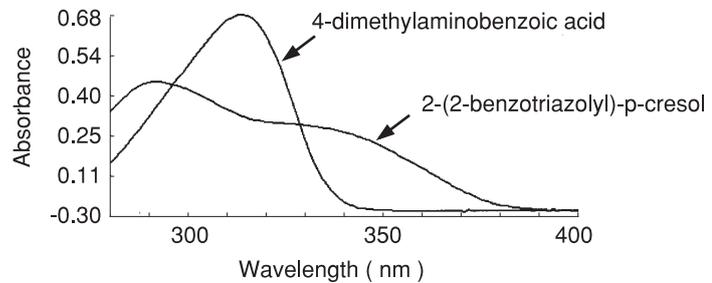
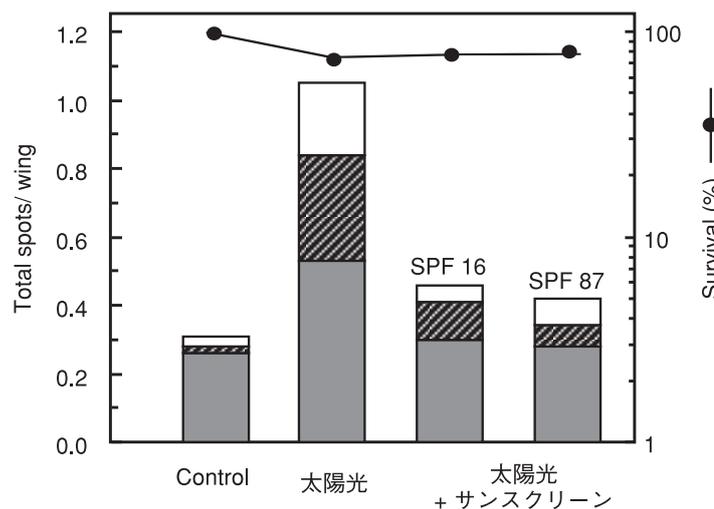


図4 健康線用蛍光ランプ照射装置



各吸収剤の濃度は4mg/L、溶媒としてはDMSOを用いた。

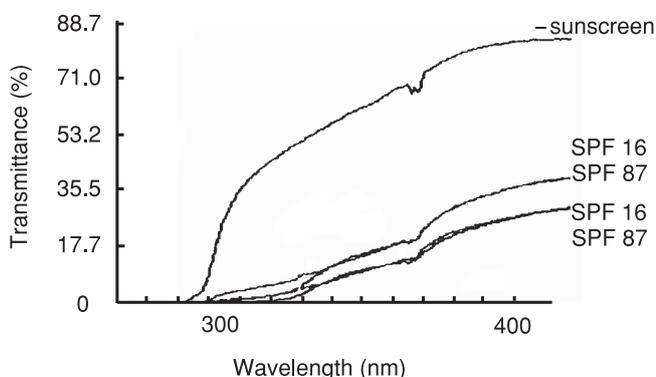
図5 紫外線吸収剤の紫外外部吸収曲線



太陽光曝露時(1998年4月29日午前10時～14時)の変異原性とその時シャーレのフタに各SPF値のサンスクリーンを40mg/20cm<sup>3</sup>塗布したときの変異原性。変異原性はtwin spots (□)、large single spots (▨)、small single spots (■)を合わせてハネ1枚あたりのスポット数で表した。生存率(●)は暗所で4時間置いた幼虫から羽化した成虫数を1として曝露処理後の成虫数から求めた。

図6 太陽光の変異原性に対するサンスクリーンの阻害効果

6に示した。4時間曝露時のMEDは8、UVAは170kJ/m<sup>2</sup>、UVBは57kJ/m<sup>2</sup>であった。サンスクリーンの塗布により、ほぼコントロールレベルまで変異原性が抑えられた。このときサンスクリーンを塗布したシャーレのフタの紫外線透過率は、SPF値に関わらず、図7のように300nm以下の光はほとんど透過せず、また320nm以上の紫外光でも80%以上の遮光効果が見られた。このことは変異原活性がいずれのサンスクリーンでもほぼ15-20%になったことと良く一致していると言える。一方、太陽光の細胞傷害はDNA傷害修復試験を用いることにより、より高感度に検出されることがわかったので、この試験系を用いてサンスクリーンの効果の検討を行なった。少し天候の違う日に2回の実験を行なったところ、図8のような結果



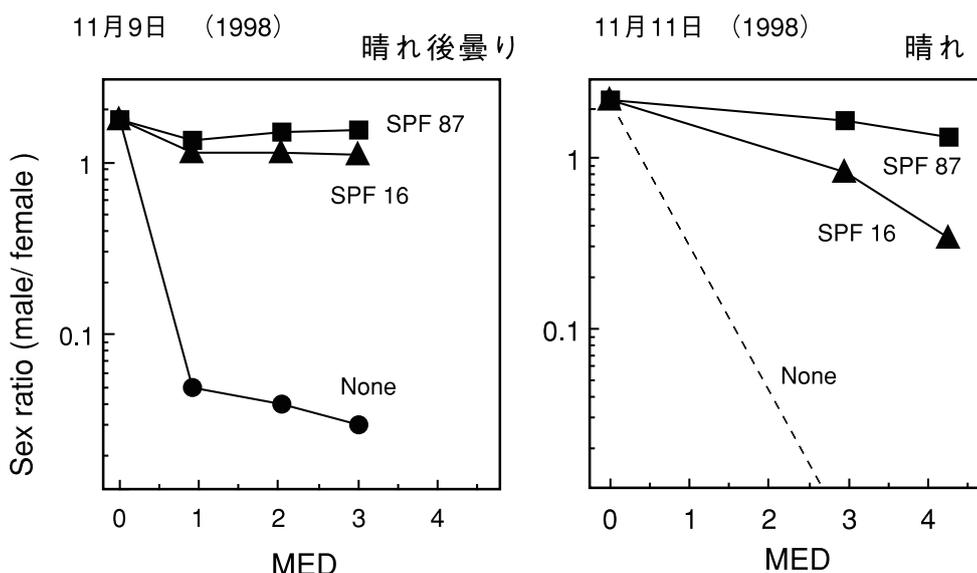
市販サンスクリーンは約 40mg/20cm<sup>2</sup>をプラスチックシャーレのフタに塗布し、キムワイプで薄く延ばした。フタを分光光度計の光路上に置き、数箇所まで透過率を測定した。

図7 市販サンスクリーン塗布時の透過光波長と透過率

が得られた。ここでMED3に相当する積算紫外線量は11月9日では5時間、11月11日では3時間で達成されており、同じMEDでも短時間で曝露されたときの方が致死作用が強いことが示された。この時のUVAおよびUVBは11月9日がそれぞれ、60.4kJ/m<sup>2</sup>、19.6kJ/m<sup>2</sup>、11日は89.3kJ/m<sup>2</sup>、25.5kJ/m<sup>2</sup>となり、UVでも11日の方が高かった。天候が良好で紫外線量が多いときにはSPF値の違いによる効果の差が明らかであり、紫外線量が多いときは高いSPF値のサンスクリーンを用いる必要があると言える。このとき用いたサンスクリーンは5mg/20cm<sup>2</sup>とした。このSPF値の違いによる効果の違いは健康ランプを用いたUVB照射実験においてより顕著に見られた。図9に見られるように線量が高くなるとSPF16のサンスクリーンを塗布した場合は雄に顕著な致死作用が観察された。それぞれのサンスクリーン塗布状態での透過光の波長と透過率に差がある(図10)のでこれらのどちらの違いがこの致死作用に寄与しているか調べる必要がある。

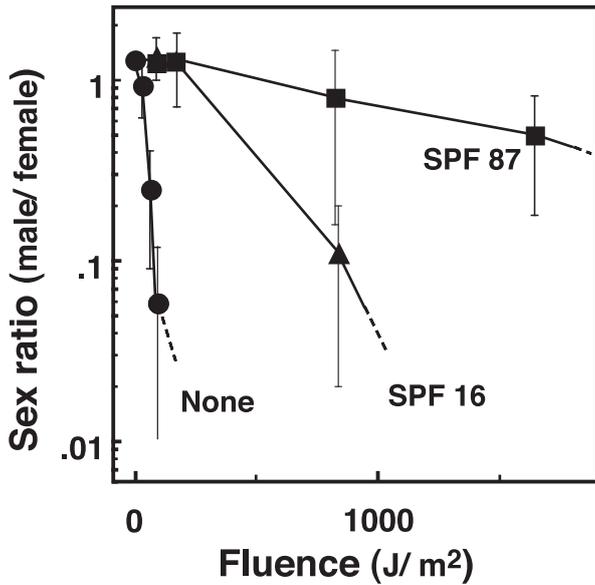
### 3.2 紫外線吸収剤を用いた実験

市販のサンスクリーンではUV吸収剤の成分が不明なので、吸収される紫外線領域と活性抑制の関係が明らかにしにくい。そこで、サンスクリーンの成分として使用されているUVAおよびUVB吸収剤を用いて、研究室でサンスクリーンを調製して健康ランプのDNA傷害作用に対する効果を調べた。基剤に吸水軟膏を使用して、UVB吸収剤の製剤を調製したところ図11のような結果を得た。UVA吸収剤ではいずれの混合比でも健康ランプによる致死傷害を抑制できなかった。UVB吸収剤では吸収剤が20%以上



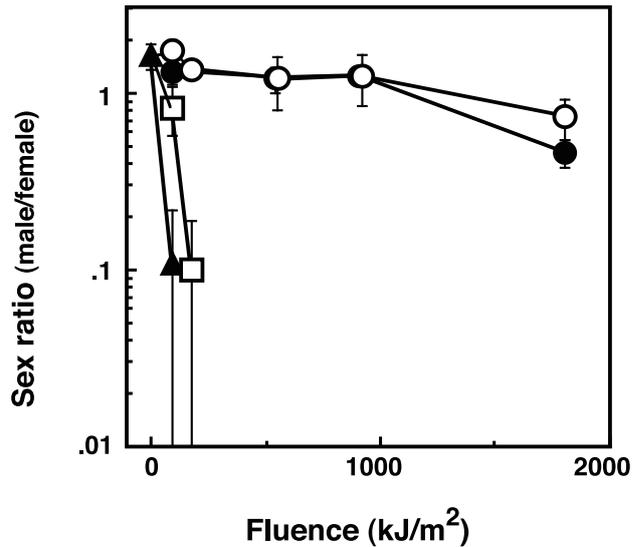
シャーレのフタにSPF87(■)あるいはSPF16(▲)のサンスクリーンを塗布した場合と何も塗布しなかった場合(●)の性比の減少を示す。

図8 太陽光曝露により誘導されるDNA傷害致死作用に対する市販サンスクリーンの効果



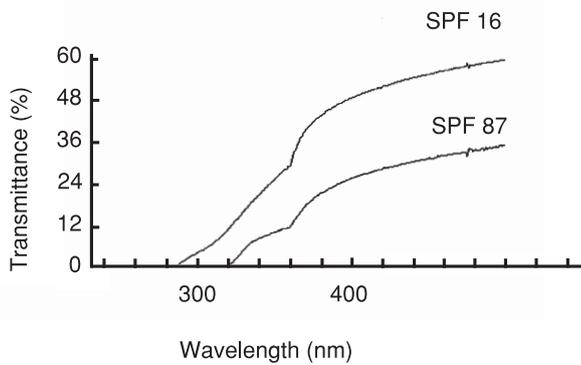
シャーレのフタに SPF87 (■) あるいは SPF16 (▲) のサンスクリーンを塗布した場合と何も塗布しなかった場合 (●) の性比の減少を示す。

図9 健康ランプ照射により誘導される DNA 傷害致死作用に対するサンスクリーンの抑制効果



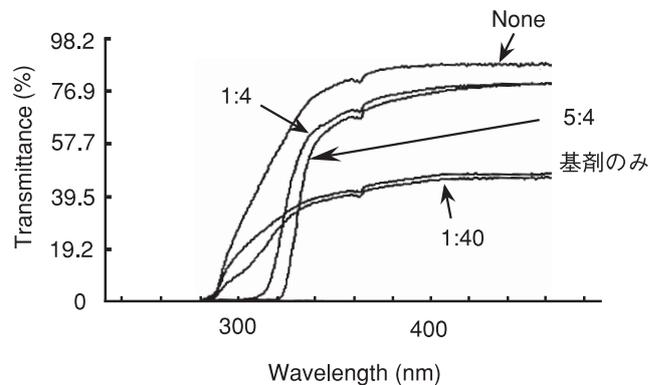
UVB吸収剤として使用される 4-dimethylaminobenzoic acid を用いて調製した紫外線吸収剤の効果を DNA 傷害修復試験を用いて検討した。吸水軟膏を基剤として紫外線吸収剤と吸水軟膏との比を1:40 (□)、1:4 (●)、5:4 (○) の割合で混合して作製し、基剤のみ (▲) を塗布したときの傷害性と比較した。3回の実験から平均値と偏差値を求めた。

図11 UVB誘導 DNA 傷害性に対する調製紫外線吸収剤の効果



それぞれのサンスクリーンを 5mg/20cm<sup>2</sup>塗布したシャーレのフタの透過波長と各波長での透過率を分光光度計を用いて測定した。

図10 サンスクリーン塗布による健康ランプの透過率



図中の比はUVB吸収剤：基剤の比を表す。また、None はプラスチックシャーレのフタの透過波長ならびに透過率を示している。

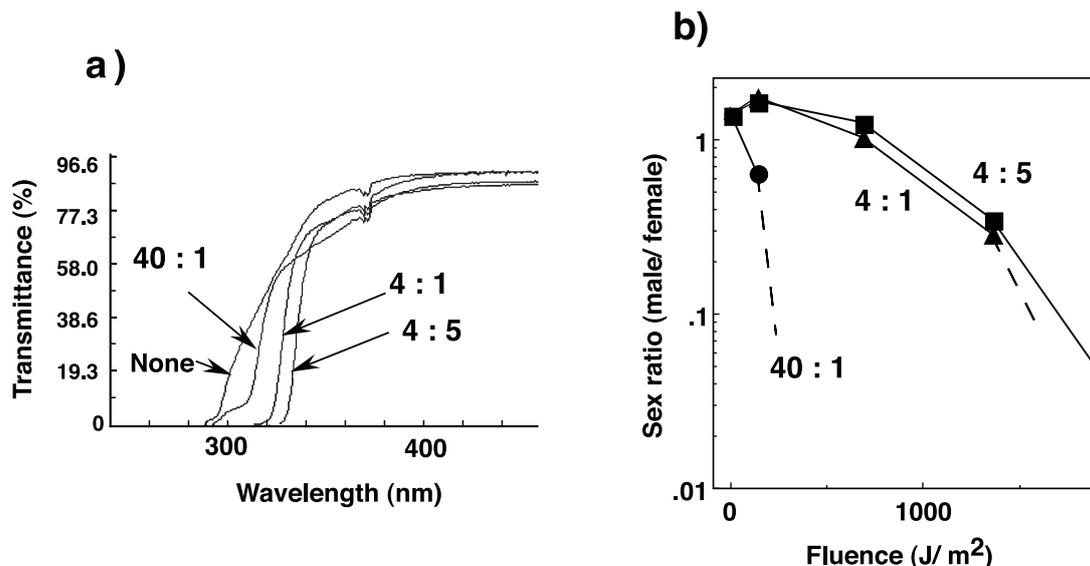
図12 UVB吸収剤と吸水軟膏で調製したサンスクリーンの透過波長と透過率

混合されることで顕著な抑制効果がみられた。しかしながらこの時、塗布されたシャーレにおける各波長の光の透過率を見ると、図12のように20%以上混合した場合は波長と透過率に差が見られた。長波長側での透過率の差を無くするために流動パラフィンを用いて製剤したところ、図13のような透過率になり、長波長側での透過率の差は解消された。それぞれの製剤の差は透過波長の違いと考えることができた。その時の致死傷害抑制作用は図11とほぼ同様な結果を示した。すなわちUVB吸収剤20%以上の混合によ

り抑制作用が見られた。従って抑制作用は320nm以下の紫外線を透過しなくなることによって発現すると考えられる。

### 3.3 単色光照射の変異原性と致死傷害性

サンスクリーンの吸収剤の吸収波長と作用スペクトルの関係を調べるため、まず単色光照射による変異原性と致死傷害性を調べた。310nm、320nm、330nm、340nm、360nm、380nm、400nmの光を照射し変異原性を調べ



流動パラフィン：4-dimethylaminobenzoic acidを 40:1で混合した製剤 (●)、4:1で混合した製剤 (▲)、4:5で混合した製剤 (■) をシャーレのフタに塗布した場合の紫外外部透過波長と透過率および DNA 傷害性抑制効果を示す。

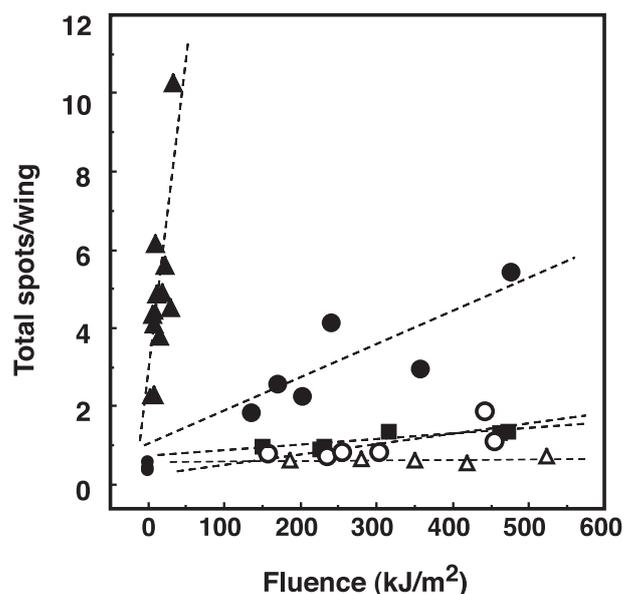
図13 流動パラフィンを基剤として調製したサンスクリーンの紫外外部透過曲線 a) と健康ランプ誘導致死傷害抑制作用 b)

たところ、340nm までの光で線量依存的に有意に突然変異を検出できた (図 14) <sup>7)</sup>。DNA 傷害性は図 15 のようになった。320nm の光は修復欠損の雄に致死作用を示した。330nm、340nm の光は長時間照射することによって傷害が発現した。しかし 360nm 以上の長波長の紫外線では傷害は観察されず、突然変異が 360nm 以上の光でほとんど誘発されなかったことと一致した。

#### 4. 考 察

本研究においてわれわれは、太陽光紫外線の生物影響のうち発がんに関わるとされる体細胞突然変異について、ショウジョウバエの系を用いて検討した。さらに太陽光の生物活性障害を防御するために使用されるサンスクリーンの活性評価に抗変異原性を加えることができるかどうかを検討した。

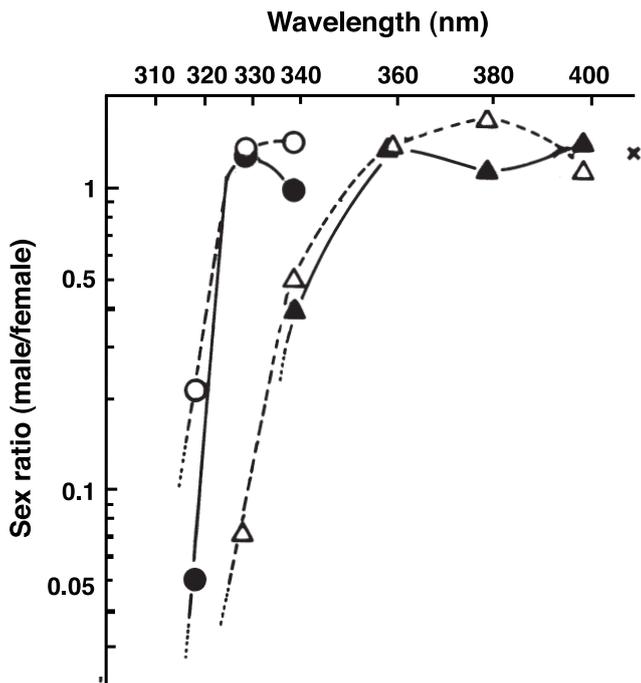
太陽光曝露時におけるサンスクリーンの効果は SPF 値に関わらず、基準量の 40mg/20cm<sup>2</sup> (20cm<sup>2</sup> はおよそのシャーレフタの面積) を塗布することによって顕著な防御効果が見られた (図 6)。しかしながらこの時、図 3 からわかるように、シャーレの表面は白塗りの状態で肉眼的にも光を透過しない状態と予想された。実際に図 7 に示したように 320nm 以下の光はほとんど透過していない。そこで、以後の DNA 傷害修復試験を用いた実験には 5mg/20cm<sup>2</sup> のを塗布し、肉眼的には透明感が残った状態で効果を調べた。DNA 傷害修復試験は翅毛スポットテストによる突然変異検出より高感度であり、雄に対す



各波長における照射線量と変異原性の関係。それぞれシンボルは、▲：310 nm、●：320 nm、■：330 nm、○：340 nm、△：360 nmを示す。

図14 単色光照射による変異原性

る致死作用は曝露約 1.5 時間 (MED 1) で顕著に見られた。DNA 傷害修復試験では紫外線量の違いに対する SPF 値の差が一層はっきり観察された (図 9)。すなわち線量が強いときには SPF 値の低いサンスクリーンでは効果が弱いことが示された。この時サンスクリーンを塗布したフタの紫外線透過の状況は図 10 に示したように、それぞれのサンスクリーンで透過波長と透過率いずれも違っていた。サ



320nm, 330nmの光では高線量 (23.1W/m<sup>2</sup>, 28.5W/m<sup>2</sup>) (●) および低線量 (11.6 W/m<sup>2</sup>, 14.8W/m<sup>2</sup>) (○) で30分照射を行なった。330nm以上の波長の光については高線量 (330nm:28.5W/m<sup>2</sup>, 340nm: 35.0W/m<sup>2</sup>, 360nm: 33.2W/m<sup>2</sup>, 380nm: 33.6W/m<sup>2</sup>, 400nm: 35.9W/m<sup>2</sup>) (▲) および低線量 (330nm: 14.8W/m<sup>2</sup>, 340nm: 17.5W/m<sup>2</sup>, 360nm: 16.7W/m<sup>2</sup>, 380nm: 16.8W/m<sup>2</sup>, 400nm: 17.8W/m<sup>2</sup>) (△) で6時間照射を行なった。暗所で6時間置いたもの (x) を陰性対照とした。

図15 単色光照射によるDNA傷害致死作用

ンスクリーンの防御効果は、透過率をさげることによるのか、透過波長が長くなるのが原因なのかは興味深い問題である。そこで、紫外部に吸収の無い流動パラフィンを用いた実験を行ったところ、サンスクリーンの効果は主に短い波長の光 (320nm以下) を透過しなくなることによって示されることが示唆された (図12, 13)。またここではデータを示していないが、UVA吸収剤 (2-(2-benzotriazolyl)-p-cresol) を用いて調製した製剤では透過率のみ変化し、いずれの混合比でも290nm以上の光を透過しており、DNA傷害作用の抑制効果が全く見られなかったことは、先の考察を支持するものであろう。従ってサンスクリーン製剤としては320nm以下の紫外線を透過しないものが望ましいと考えられる。

本研究のこのような結果は、紅斑生成に対する効果だけでなく、DNA傷害性あるいは変異原性の防御作用の強さを考慮してサンスクリーンの評価を行う必要があることを支持するものである。

さらに太陽光紫外線のどの領域の波長が変異原活性やDNA傷害性発現に寄与しているかを調べ、サンスクリーンの各波長での効果を検討するため、単色光照射による変異原性とDNA傷害作用の検出を行った。その結果ショウ

ジョウバエ幼虫に対して紫外線は、波長が長くなるに従って変異原性が指数関数的に減少し、360nm以上の光はほとんど傷害を示さなかった<sup>7, 8)</sup>。培養細胞やある種の魚を用いた研究で360nm付近に変異原性や発がん性が見られるという報告<sup>9, 10)</sup>があるが、ショウジョウバエ翅原基ではそのような活性は観察されなかった。これは生物材料の感受性の違いや、用いた検出方法においてどのような変化が検出されるのか、等の条件によるものと考えられる。

サンスクリーンを用いた太陽光やUVBの実験において示唆された、320nm以下の光をカットすることが傷害を防御するために必要である可能性を確かめ、SPF値との相関性を明らかにしていくために、さらに単色光での研究を進める必要がある。

なお、今回の実験ではサンスクリーンの適用をシャーレのフタに塗布するという方法で行ったが、実際にヒトに適用する場合は細胞に直接サンスクリーンが接触することになる。したがってショウジョウバエの系でも直接接触した場合の効果および有害性についても検討していく必要がある。

## 5. 謝辞

本研究は岡山大学遺伝子実験施設根岸和雄博士、ならびに岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所大型スペクトログラフにおける檜枝光太郎博士 (立教大学)、古澤佳也博士 (放射線医学総合研究所) との共同研究であります。関係諸氏に深く感謝致します。また、本研究の遂行を可能にし御援助いただいた岡山大学薬学部早津彦哉教授並びにコスメトロジー研究振興財団研究助成に感謝致します。

## (引用文献)

- 1) Roy CR, Gies HP, Lugg DJ, et al. : The measurement of solar ultraviolet radiation, *Mutation Res.*, 422, 7-14, 1998.
- 2) Bruls WAG, Slaper H, van der Leun JC, et al. : Transmission of human epidermis and stratum corneum as a function of thickness in the ultraviolet and visible wavelength, *Photochem. Photobiol.*, 40, 485-494, 1984.
- 3) Graf U, Wügler FE, Katz AJ, et al. : Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*, *Environ. Mutagen.*, 6, 153-188, 1984.
- 4) Negishi T, Shiotani T, Fujikawa K, et al. : The genotoxicities of N-nitrosamines in *Drosophila melanogaster* in vivo: the correlation of mutagenicity in the wing spot test with the DNA damages detected by the DNA-repair test, *Mutat. Res.*, 252, 119-128, 1991.
- 5) Negishi T, Takinami S, Nikaido O, et al. : Somatic cell

- mutation induced by sunlight in *Drosophila*, *J. Epidem.*, 9, s66-s71, 1999.
- 6) Watanabe M, Furuya M, Miyoshi Y, et al., : Design and performance of the Okazaki large spectrograph for photobiological research, *Photochem. Photobiol.*, 36, 491-498, 1982.
- 7) Takinamai S, Mochizuki M, Hayatsu H, et al., : Somatic cell mutation and photoproduct formation induced by solar UV-radiation in *Drosophila*, *Environmental Toxicology*, in press.
- 8) Negishi T, Nagaoka C, Hayatsu H, et al., : Somatic cell mutation induced by UVA- and monochromatic UV-radiation in repair-proficient and -deficient *Drosophila melanogaster*. in preparation.
- 9) Coohill TP, Peak MJ, Peak JG, : The effects of the ultraviolet wavelength of radiation present in sunlight on human cells in vitro. *Photochem. Photobiol.*, 46, 1043-1050, 1987.
- 11) Setlow RB, Grist E, Thomson K, et al., : Wavelengths effective in induction of malignant melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 6666-6670, 1993.