

紫外線及び化学合成化合物のヘアレスラット皮膚に対する障害作用及びその防御

城西大学 薬学部城西大学生命科学研究センター

谷 覺

The protection of the skin from ultraviolet rays is the urgent issue, because the harmful sun's rays increase recently. However, there is no good and simple method for the evaluation of effects of ultraviolet rays on the skin. Then, I improved an animal model using the hairless rats, that were breeding in Life Science Research Center, Josai University.

After irradiation with ultraviolet rays on the back of hairless rats, the skin was turned to reddish like sunburn with passage of days. The skin color was recorded with a digital camera, and analyzed as the density by the NIH image software, after the images were changed to gray. The skin color increased during 3 days, and after 4 days the skin was gradually recovered from the lesion. Therefore, the degree of skin lesion was evaluated by measuring the skin color at 3rd day after irradiation with ultraviolet rays.

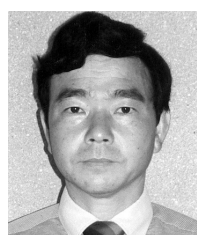
Using this method I investigated the fundamental study on hairless rat skin lesion induced by ultraviolet ray. In conclusion the skin lesion of hairless rat were different in each rat and the part of the back. Therefore, it is possible to evaluate the protective or accelerated effect of the chemical against ultraviolet ray by comparing the right and left skin lesion after one side treatment by the chemical. However, in cases of general administration of the chemical, we must statistically evaluate the results with enough amount of rats.

1 緒言

近年、大気圏におけるオゾン層の破壊による紫外線の増加が心配されるなか、紫外線が皮膚に多大の障害を及ぼす可能性が示唆され、サンスクリーン効果を持つ化粧品の開発が望まれている。

現在、化粧品に表示される UVB 領域の紫外線防止効果を示すものとして Sun Protection Factor が用いられ、この測定法は極めて厳密で、かつ煩雑であるが、ヒトにおける効果を見る上では信頼性も高く優れた方法である。しかし、化粧品の開発の観点に立てば、ひとつ一つの化合物の効果をヒト皮膚で検討するには、時間的にも経済的にも効率が悪く、また安全性の面でも問題がある。そこでヒトの皮膚に近く、更に均一な結果が得られる実験動物を用いた方法の開発が望まれる。

城西大学生命科学研究センターでは、Wistar 系ラットの突然変異種であるヘアレスラットを specific pathogen free 化し繁殖、供給している。このラットは貧毛以外はほとんど正常のラットと変わりなく、生化学的異常も見出されていない¹⁾。当研究センターでは、従来よりヒト皮膚のモデルとしてヘアレスラットの皮膚を用いて経皮吸収などの実験を進展させてきた。そこで、今回は化粧品開発の分野においても、様々な面でこのヘアレスラットが利用でき



Skin Lesion by Ultraviolet Ray and Chemicals on the Hairless Rats, and its Protection

Satoru Tani

Faculty of Pharmaceutical Science, and Life Science Research Center, Josai University

るのではないかと考えた。先ず化粧品は皮膚に直接塗布して用いることから、皮膚に対する刺激性や毒性などの作用が観察できると考えられる。しかし、この分野では既に多くの知見が得られているので、紫外線からの防御を中心として検討することを試みた。その為にはヘアレスラットの皮膚に対して、紫外線がどのような効果をもたらすのかを基礎的に検討することが必要がある。今回は上記の目的で若干の検討を行い結果を得たので報告する。さらに、尋常性白斑症の治療薬であるメトキサレンの紫外線増感効果についても検討したので合わせて報告する。

2 実験

2.1 実験材料

雌のヘアレスラットは城西大学生命科学研究センターで飼育されているものを用い、週齢は特に選ばなかったが、概ね 8 週齢以後のものを用いた。メトキサレン (Methoxalen) は和光純薬 (大阪) から購入して用いた。

2.2 紫外線照射法

ヘアレスラットをペントバルビタール麻酔下、頸部から背部にかけてバリカン (ナショナル丸刈り用) で毛を刈り、腹位に固定し、背部に 1.0×2.0 cm に切り抜いたアルミ箔を両面テープで貼り付け、そこ以外の場所には光が当たらないようにアルミ箔で覆って健康紫外灯 (ナショナル PL20 もしくは同等品) 2 本で照射した。ラットは紫外線蛍光灯の下に光がなるべく均等に当たるように固定した。2 匹を用いる場合は対称に並べ、比較検討する場合は、片側を対照とした。紫外線蛍光灯と背部皮膚との距離は 5 及び 10 cm とし 2 本の蛍光灯の距離も 5 及び 10 cm とし、必要に応じ 15 cm も用いた。照射時間はそれぞれ 10 及び 20 分とした。

2.3 皮膚変化の数値化

紫外線照射後1～4日のラットをペントバルビタール麻酔し、腹位に固定し、紫外線照射部、非照射部位、及び約1×1cmの標準色（財団法人日本色彩研究所発行の新配色カード199aのPI-8）を約1cm程度の距離で配置し、デジタルカメラで記録した。写真をグレイスケールに変換し、NIH imageにより紅斑を灰色の濃淡の変化として数値化した。更に、標準色と紫外線照射部位の数値から紫外線照射をしていない部位の数値を差し引き、紫外線照射部位を、標準色を100にした時の相対値で表した。

2.4 メトキサレンの投与

メトキサレン（5mg/ml of propylene glycol）（1, 5, or 25 mg/kg）を腹腔内注射し、約1時間後に紫外線を照射した。

3 結果

3.1 紫外線照射による皮膚の経日変化

紫外線を照射した直後の皮膚は、若干赤みを帯びヒトの日焼けと類似する所見であった。この皮膚は1日後では赤みを帯びているが、まだほとんど変化が見られなかった。しかし、2、3日と経過するに従い皮膚が赤褐色に変化し、4日目には皮膚の下部に新たな皮膚の再生が見られ、かさぶた様に変化した。

Fig. 1に紫外線を照射して3日後のラットを示した。この写真のように紫外線照射部位が紅斑として認められる。

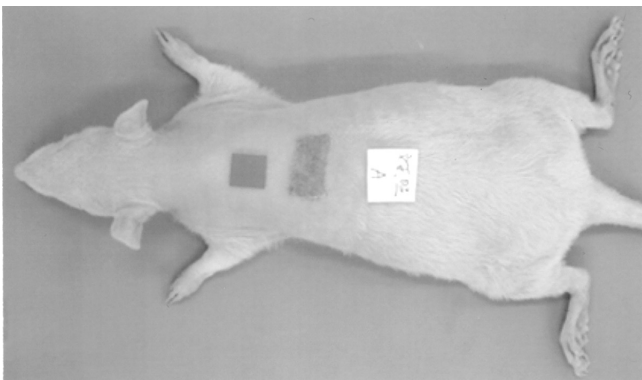


Fig. 1 紫外線照射3日後のヘアレスラットの皮膚
麻酔したラットの背部皮膚の真。頭方に標準色を配置し、尾方に説明の紙片を置き、デジタルカメラで撮影した。

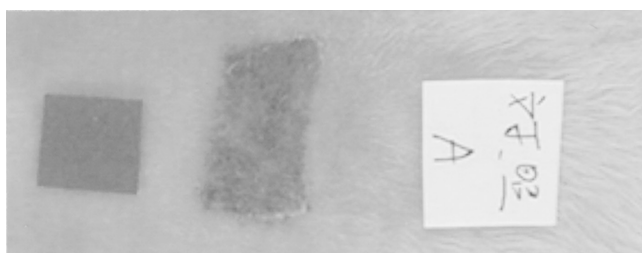


Fig. 2 皮膚紅斑の測定法
皮膚の真をデジタルカメラで記録し、標準色を100としたときの数値を紅斑強度とした。

このラットを毎日、麻酔下でデジタルカメラで記録し、それをグレイスケールで濃淡として測定した（Fig. 2）。4日間の紅斑の変化を示したのがFig. 3である。Fig. 3には2本の紫外線灯間及び皮膚との距離を10cm、照射時間10分にしたものを示した。全ての場合に3日目に最大値を示し、以後色調は持続するものの毛が生え、それが無視できなくなったり、皮膚にかさぶた様の剥離が生じ、定量には耐えられなくなった（Fig. 4）。光源からの距離10cm、照射時間10分あるいは20分とし、照射3日後に測定することにしたが、また実験によっては様々な検討も加えた。

3.2 ヘアレスラットの紫外線による皮膚障害の個体差

上記実験の過程でヘアレスラット間で紫外線に対する感受性に個体差が観察されたので、同一個体で時期を変えて紫外線照射を行い、紅斑の程度を調べ、その結果をFig. 5に示した。紫外線照射を始めた週齢は8週齢以降であるが、必ずしも同じではなく、また初回と次の照射との間隔も一定ではない。しかし、同一の個体であっても照射回数に従い上昇するものと、下降するものがあり、また紅斑の程度も個体により全く異なっていた。そこで更に、同一個体で同時に照射距離を変え紅斑の程度を観察した。結果をFig. 6に示すが、程度に差はあるものの同一個体では光源からの距離が近いほど紅斑の程度が強いことが確認された。しかも紅斑の程度は実測した紫外線の強度と近似していた。

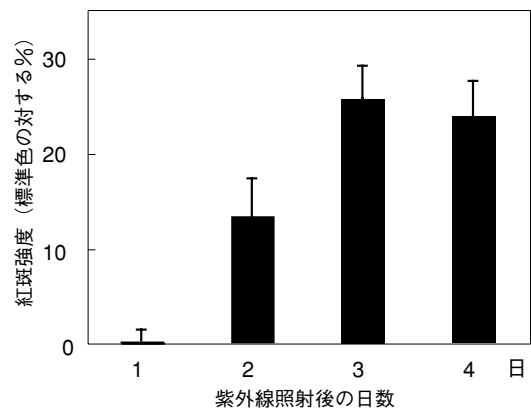


Fig. 3 紫外線照射による紅斑の経日変化
二本の紫外線灯間及びラットとの距離を10cmとし、照射時間を10分間としたときの紅斑の強度

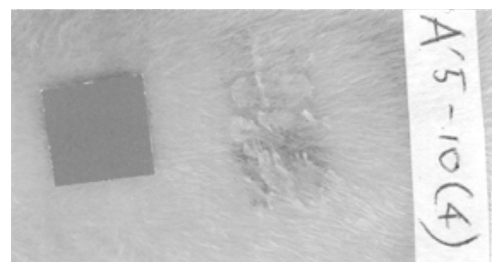


Fig. 4 紫外線照射4日後の皮膚
皮膚の再生が起こり、かさぶた状に皮膚が剥がれている。

3.3 背部皮膚の部位による差

より均一な結果を得るために、背部部位の違いにより紫外線に対する感受性の違いがあるのかどうかを観察した。ヘアレスラットの背部皮膚の毛を全て刈り、全面を紫外線で照射し、紅斑の程度を調べた (Fig. 7)。ラットの背部の形状から頸部及び尾部は凹凸があり、均一な部位が見つからなかった。比較的均一な背部を観察すると、中心に近い部分が左右、前後共に均一な紅斑の程度を示していた。

3.4 紫外線照射による皮膚紅斑に対するメトキサレンの効果

尋常性白斑症の治療薬であり、紫外線増感剤であるメトキサレンの効果を検討した。メトキサレンをプロピレングリコールに溶解し、ラットに1, 5, 及び25 mg/kgをそれぞれ腹腔内に投与し、約1時間後にペントバルビタール麻酔下紫外線照射した。紫外線蛍光灯による紅斑強度のバラツキを小さくする目的で、実験は同じ紫外灯の左右対称にラットを配置し、一方を対照、他方にメトキサレンを投与し、対照ラットとの紅斑の強度を比較した。その結果 Fig.

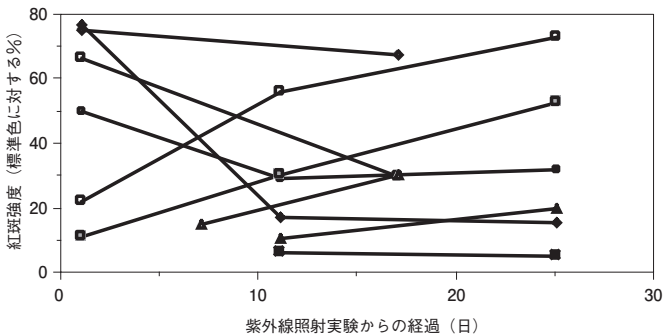


Fig. 5 同一ラットの紫外線照射による紅斑強度のばらつき
動物に紫外線を照射し、3日後に紅斑を測定し、同様の操作を間隔をあけて実施し、その値を示した。同じ動物は同一線で示してある。

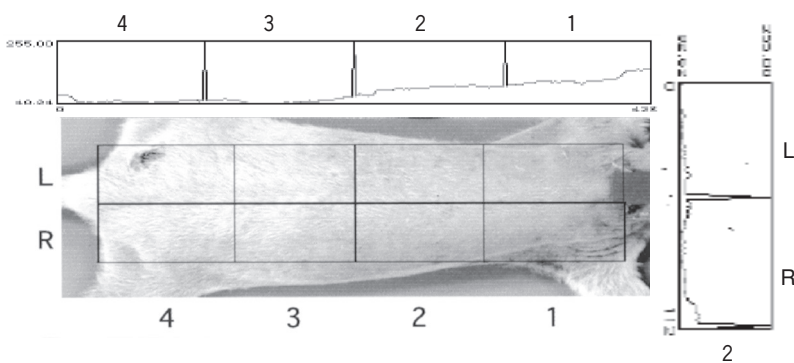


Fig. 7 背部皮膚の紫外線感受性の違い
ラット背部全に紫外線を照射し、脊椎に頭方から尾方に線を引き、全身を約4等分し、それぞれの部分の紅斑強度を測定した。

8に示したように、メトキサレンの投与により、紅斑強度の増加が観察された。しかし、紅斑の程度はメトキサレンの投与量に比例せず、むしろ高用量で紅斑強度の減少が見られた。

4 考察

4.1 紫外線による皮膚障害の指標としての紅斑

紫外線による皮膚障害が紅斑の強度と比例すると仮定した場合、紅斑をどのように定量化するかという問題がある。今回は、紅斑をグレイスケールに変換し、黒化度として NIH image で定量化したが、実際の濃さと若干相違すると考えられる。今回のグラフでも1日目はほとんど紅斑強度が認められないが、肉眼的にはわずかではあるが、紅斑が認められる。このことは例えば500nm付近の波長で測定すれば、もっと良い定量性が得られる可能性が考えられる。しかし、紫外線照射後は薄いピンク色をしているが、3日

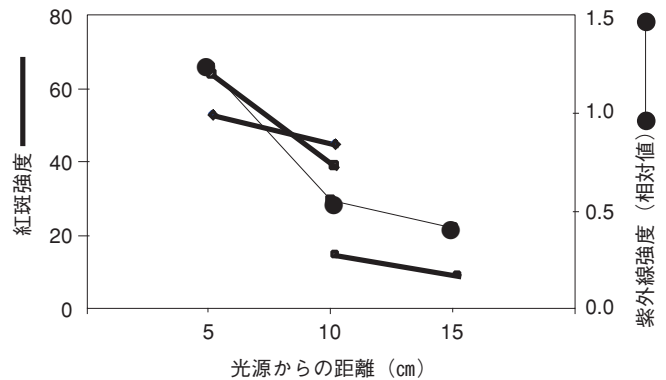


Fig. 6 紫外線強度と紅斑強度の関係
同一ラットの同一時期に異なった紫外線光源からの距離からの照射による紅斑強度の変化。同一ラットは同一線で示してある。

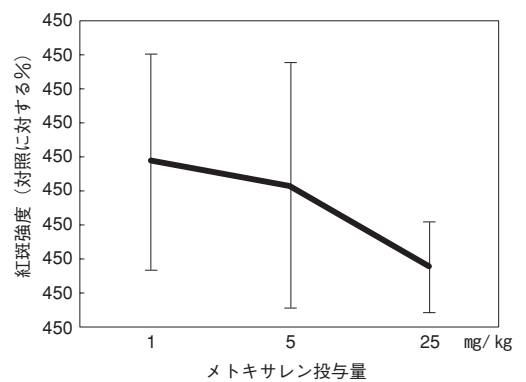


Fig. 8 メトキサレンの用 反応曲線
メトキサレンを腹腔内投与し、紫外線を照射した後、3日後の対照に対する相対的紅斑強度の変化。同一条件でメトキサレンを投与しなかったもの(対照)を、100としたときの相対値で示してある。

目には赤褐色に変化する。今回は3日目の紅斑になるべく近い色調を選んだが、ラットの状態によっても少しずつ色調が変化するので、どの標準色を用いるかによっても測定値が変わる可能性がある。

次に、紫外線照射後の皮膚傷害を、皮膚の紅斑の強度によって評価できるのかどうかについて検討した。太陽光線による皮膚の変化として、ヒトでは黒化と皮膚障害が総合して現れると考えられる。ラットの皮膚に対する紫外線の作用として、皮膚の紅斑を指標とすると、皮膚に紅斑が生じる機序として、紫外線の細胞に対する障害作用によって、細胞から様々な起炎物質が放出され、それにより毛細血管の拡張が起こったと考えられる。著者は紫外線による皮膚障害の強度を紅斑の強度で評価できるという作業仮説を立て、実験を進めた。今回用いた紫外灯の紫外線の強度はFig.6に示すように、ほぼ光源からの距離の二乗に反比例する変化を示した。例数が少なく確定的なことは言えないが、ラットの皮膚の紅斑強度は紫外線の強度の曲線と概ね一致した。このことは、紫外線による皮膚の紅斑は定量的評価は困難であるが、少なくとも傷害がどのように生じるのかの検討には用いることが出来るのではないかと考えられる。

4.2 紫外線照射による紅斑の個体差

ラットの個体間の差に関しては、同一条件下で紫外線を照射しても紅斑の程度がラットによって異なる等の個体差が見られた。現在は、同腹のラットを用い、同一条件下の片方を対照とするなどの工夫をおこなっているが、バラツキが大きい。そこで同一のラットを用い、数回の紫外線照射を行い、紅斑強度を比較した。ラットの個体によっては、紅斑の程度が強くなるもの、あるいは弱くなるものなどが観察され、必ずしも同じ程度の紅斑の強度を示さなかった。このことは、個体差のみでなくラットの状態や、年齢などによっても紅斑の程度が変化することを示している。即ち、紫外線による紅斑の変化は個体間では比較できないことを示している。

紫外線照射による紅斑は4日程でかさぶた様になり5～6日後には剥離して、障害のない皮膚が再生してくる。このことから、皮膚の紫外線による障害で、皮膚の細胞がアポトーシスを起こしたことを示している。今後は個体間で差が見られない他の生化学的パラメータ、例えばアポトーシスの程度なども検討することが必要であろう。

前項の検討から紅斑を個体間で比較するのでは、個体差が大きく困難が予想されたので、同一個体で比較する場合を想定し、どの部分を用いれば比較検討が可能かを調べた。その結果、背部の頸部と尾部の中間点がほぼ均等な紅斑の程度を示すことが明らかとなった。即ち、仮に紫外線防御物質などの検討を行う場合は背部の中心あたりを選び、更

に脊柱の左右に対称に同一の範囲で紫外線を照射することにより、防御物質などの効果を比較することができると考えられる。

4.3 メトキサレンの光増感作用

前節で、紫外線の感受性に個体差があることから、紅斑を個体間で比較することは困難であるという結論を導いた。他方、紫外線の皮膚に対する作用を薬剤が増感あるいは減弱させる作用を検討する場合は、同一個体で検討するのは困難である。光過敏症を生じさせる薬物は、一般に全身投与される。即ち、光増感物質などの作用を検討する場合は薬物を皮膚適用するのではなく、全身投与して検討する必要がある。この検討のため、紫外線増感物質であるメトキサレンをモデル薬物として検討した。メトキサレンは尋常性白斑症の治療薬として用いられる光増感物質であるが、Fig. 8に示すように、例数を重ねることで光増感作用を検出することはできるが、用量反応曲線は得られず、かえって高濃度で紅斑の減少が見られた。これは個体差による見かけ上の反応なのか、何か原因があってこのような反応が起こっているのか、今回は判断がつかなかった。メトキサレンは、ヒトにおける作用では皮膚に存在するメラニン細胞の活性化を起こすが、アルビノ化したラットではメラニン細胞が存在しないため別の機構が働いて皮膚障害を増強した可能性がある。即ち、ヒトの皮膚の黒化をもたらす効果がヘアレスラットの皮膚に対する紅斑強度の増強で表されることが判明した。このことは光線過敏症を起こす化合物の検出などには多くの動物を用いて統計処理を行うことによりある程度可能になることが考えられた。

5 総括

1. ヘアレスラットを用いて、紫外線防御物質などの効果を検討する場合は、同一ラットの背部の中心を用い左右の片方を対照とし、もう一方に検体を塗布して、紫外線を照射することで検査が可能である。
2. 光過敏症などを起こす物質の検討には、薬物投与したラットと無処理のラットを左右対称に並べ、紫外線を均等に照射し、多数の動物を用い統計処理をすることで検出可能である。ただし、この場合は個体差にかなりのバラツキがあるため、対照となるラットには同腹、同齡のラットを用いることが望ましい。
3. ヒトのメラニン細胞刺激による黒化をラットの皮膚紅斑という反応で評価できる可能性がある。

参考文献

- 1) Tani S, Noguchi M, Hosoda Y, Sugibayashi K, Morimoto Y, : Characteristics of Spontaneous Erythema Appeared in Hairless Rats. Exp. Anim. 47, 253 - 256, 1998.