

# 紫外線の皮膚慢性毒性に対するサンスクリーン剤の 防御効果を高速・高感度に評価する方法の開発

東北大学大学院医学系研究科ゲノム生物学分野

池畑 広伸

Sunscreens are widely used to protect our skin from harmful chronic effects of the sunlight such as photoaging and cancer induction, which are known to result from oxidative and genotoxic effects of the ultraviolet light (UV) included in the sunlight. The ability of sunscreens to prevent those chronic UV toxicities has been assessed using their capacities to suppress sunburn (erythema) after sunlight or UV irradiation, and is evaluated by indices such as sun protection factor (SPF). However, any direct correlation has not been established between the skin inflammation (erythema) and those chronic UV skin toxicities. We developed a rapid and sensitive method to evaluate the protecting ability of sunscreens for those chronic UV effects by assaying mutation and/or DNA damage induction in the skin after UV irradiation, using a transgenic mouse line, Muta Mouse, developed specifically for mutation analysis. Here, we show that the newly developed method is highly useful to evaluate the protection ability of sunscreens against the skin genotoxicity of UV by assaying mutation induction, and can assess their capacity to prevent the photoaging by quantifying oxidative DNA damage. Moreover, we found an inconsistency between the SPF and the mutation-suppressing ability for some of the sunscreens we tested, and those sunscreens had formulations that UV scatterers, instead of absorbers, were main components of their UV protectors. These findings indicate that SPF is not the index appropriate to evaluate the ability of sunscreens to prevent the genotoxicity of UV. We introduced a new index of mutation protection factor (MPF), which can be determined by the method developed here, for the appropriate evaluation of sunscreen's protecting ability against the UV skin genotoxicity.

## 1. 緒言

日光紫外線の有害作用を防ぐためにサンスクリーン剤は日常的に一般に広く使用されているが、その性能は主に皮膚の日焼け（紅斑反応 burning と黒化反応 tanning）に基づく SPF や PA といった指数によって評価されている。SPF や PA が高いほど日焼けを防ぐ効果が高いわけだが、紫外線の有害作用には日焼けのような急性のもの他に、皮膚癌（ゲノム毒性）やシミ・しわ（光老化）のような慢性のものもあり、こちらの方が不可逆的で美容・医学的により深刻な影響を皮膚に与える。紅斑・黒化反応と皮膚の癌化・光老化の間には直接的因果関係は認められておらず、SPF や PA が高いからといって、そのサンスクリーン剤が皮膚癌や光老化の予防にも有効と判断できる科学的根拠は乏しい。本研究では個々のサンスクリーン剤についてこのような紫外線の皮膚への慢性毒性に対する抑止性能を直接評価できる指数の開発を試みた。

皮膚癌や光老化は紫外線の皮膚のゲノムや構造に対する直接的（生体高分子の光化学反応）・間接的（活性酸素生成を介した反応）な毒性によることが多くの研究から示されている。紫外線のこうした直接・間接作用はゲノム

DNA を傷つけ突然変異を高頻度で誘発することが多くの生物で証明されている。そこでこの突然変異を指標として紫外線の皮膚慢性毒性を高感度で検出できるアッセイ系をマウスで開発し、その有効性を実際のサンスクリーン剤を用いて検証した。通常、慢性毒性の検証には長い試験期間を必要とするが、突然変異を指標とすることにより短期間に検出することが可能となる。また評価用の検体に突然変異検出用トランスジェニックマウスを用いることにより検出法そのものも効率化・迅速化を図った。

## 2. 実験

### 2・1 紫外線源

紫外線源としてナローバンド UVB (NB-UVB; Philips TL/01, 308-313 nm, 312 nm peak) と UVA1 レーザ (364 nm) を利用した。それぞれ約 25-28 W/m<sup>2</sup>, 300 W/m<sup>2</sup> の線量率で照射した。UVA1 レーザは自然科学研究機構基礎生物学研究所に設置されている装置を利用した。線量計として NB-UVB には UVP 社 (米国) の UVX Radiometer と UVX-31 Sensor を、UVA1 レーザにはシリコンフォトダイオード (浜松ホトニクス) を使用した。

### 2・2 トランスジェニックマウスによる紫外線誘発突然変異頻度の解析

突然変異検出用トランスジェニックマウスとして Muta マウスを用いた<sup>1)</sup>。このマウスはトランスジーンとして大腸菌 *lacZ* 遺伝子を有し、この遺伝子を突然変異検出マーカーとして利用する。*lacZ* トランスジーンは  $\lambda$  ファージベクターに組み込まれているので、容易にゲノム DNA からファ



Development of a rapid and sensitive method to evaluate the ability of sunscreens for protection of the chronic skin genotoxicity by ultraviolet lights.

Hironobu Ikehata

Department of Cell Biology, Graduate School of Medicine, Tohoku University

ージ粒子として回収できる。

Muta マウスを用いた皮膚における紫外線誘発突然変異の解析法は既に発表済みである<sup>2, 3)</sup>。簡単に紹介すると、Muta マウスの背中をバリカンと脱毛クリームを用いて麻酔下で除毛する(除毛範囲: 約 3 × 6 cm<sup>2</sup>)。3日後、麻酔下で除毛部皮膚に紫外線照射する。皮膚の突然変異を十分発現させるため照射マウスの飼育を4週間続けた後、照射部皮膚を採取する。酵素処理により表皮と真皮に分離後、各組織からゲノム DNA を抽出する。ゲノム DNA から lacZ トランスジーンをファージ粒子として回収し、大腸菌に感染させて、lacZ 遺伝子の突然変異を検出する。総ファージ数と変異ファージ数より突然変異頻度を計算する。

### 2・3 サンスクリーン剤

3社(甲・乙・丙)から発売されている5種のサンスクリーン剤(A~E)を使用した。甲社からはSPF値の異なる3種類のサンスクリーン剤(A, D, E)を選んだ。各サンスクリーン剤の性能及び成分表示を表1に示す。

サンスクリーン剤は照射15分前に、皮膚脱毛部にマウス1頭あたり約0.2 mlを均一に塗布した。

### 2・4 DNA 損傷の検出・定量

紫外線により誘発されるDNA損傷の検出・定量法は既に発表済み<sup>4)</sup>。簡単に説明すると、マウスに紫外線を照射後、直ちに照射部皮膚を採取する。組織内の酵素反応を

表1 使用サンスクリーン剤

サンスクリーン	A	B	C	D	E
メーカー	甲	乙	丙	甲	甲
SPF	23	24	32	35	50+
PA	++	++	++	++	+++
剤型	クリーム	乳液	乳液(2層型)	乳液	乳液(2層型)
表示配合成分 (下線は紫外線吸収剤、 太字は紫外線散乱剤を示す。)	水, エタノール, <u>メトキシケイヒ酸エチルヘキシル</u> , DPG, イソノナン酸イソトリデシル, BG, オクチルトリアゾン, セテアリアルアルコール, シクロペンタシロキサン, トリメチルシロキシケイ酸, セイヨウハッカ葉エキス, ハトムギエキス, ブドウ葉エキス, BHT, (アクリル酸/アクリル酸アルキル(C10-30))コポリマー, カルボマー, <u>ジエチルアミノヒドロキシベンゾイル安息香酸ヘキシル</u> , ジメチコン, ステアロイルメチルタウリン Na, セテアリアルグルコシド, ヒドロキシプロピルメチルセルロース, ポリイソブレン, ポリソルベート 80, メタクリル酸メチルクロスポリマー, 水酸化 Na, メチルパラベン, 香料	水, <u>メトキシケイヒ酸エチルヘキシル</u> , BG, <u>エチルヘキシルトリアゾン</u> , シクロメチコン, PEG-60 水添ひまし油, ヒアルロン酸 Na, 加水分解コラーゲン, アルギニン, スクワラン, ポリクオタニウム -51, トリエチルヘキサノイン, 1,2-ヘキサンジオール, セタノール, (アクリレーツ/アクリル酸アルキル(C10-30))クロスポリマー, キサンタンガム, <u>ジエチルアミノヒドロキシベンゾイル安息香酸ヘキシル</u> , フェノキシエタノール, TEA, EDTA-2Na, プロピルパラベン, メチルパラベン	水, エチルヘキサン酸セチル, イソノナン酸エチルヘキシル, <b>酸化亜鉛</b> , DPG, シクロペンタシロキサン, ミリスチン酸オクチルデシル, <u>メトキシケイヒ酸エチルヘキシル</u> , セテスリン酸 Na, ベヘニルアルコール, テトラヘキシルデカン酸アスコルビル, カンゾウ根エキス, ペンタステアリン酸ポリグリセリル -10, ジメチコン, PPG-8 セテスリン酸 -20, ステアロイル乳酸 Na, ポリシリコーン -14, 酢酸トコフェロール, キサンタンガム, セテアリアルアルコール, ミリスチン酸, BG, エチドロン酸, BHT, メチルパラベン, プロピルパラベン, フェノキシエタノール, 香料	水, シクロメチコン, <b>酸化亜鉛</b> , ジメチコン, <b>酸化チタン</b> , エタノール, DPG, PEG-9 ポリジメチルシロキシエチルジメチコン, セイヨウハッカ葉エキス, ハトムギエキス, BG, PEG/PPG-19/19 ジメチコン, (ジメチコン/メチコン)コポリマー, シリカ, ステアリン酸, 塩化 Na, メチルパラベン, 香料, <b>酸化(Ca/セリウム)</b> , 水酸化 Al	シクロメチコン, <b>酸化亜鉛</b> , 水, <u>メトキシケイヒ酸エチルヘキシル</u> , セチルジメチコン, ジメチコン, エタノール, ミネラルオイル, セスキイソステアリン酸ソルビタン, ポリメチルシロキサン, エチルヘキサン酸セチル, <u>フェニルベンズイミダゾールスルホン酸</u> , イソノナン酸イソトリデシル, TEA, オウゴンエキス, トコフェロール, 白金, BG, BHT, グリセリン, ポリアクリル酸 Na, メチコン, ラウリルポリグリセリル -3 ポリジメチルシロキシエチルジメチコン, メチルパラベン, 香料, <b>酸化(Ca/セリウム)</b>

止めるため 55℃で 5 分間熱処理した後、表皮・真皮に分離してそれぞれからゲノム DNA を抽出する。この DNA について、シクロブタン型ピリミジンダイマー (CPD) と 6-4 型光産物 (64PP) はモノクローナル抗体を利用した ELISA 法により、8 ヒドロキシグアニン (8OHdG) は HPLC/ECD 法により検出・定量する。

### 3. 結果

#### 3・1 NB-UVB による突然変異の誘発動態

サンスクリーン剤の紫外線慢性毒性に対する防御効果の評価を突然変異検出用トランスジェニックマウス実験系 (Muta マウス) で試みる前に、紫外線誘発突然変異に対するこの実験系の感度を確認した。サンスクリーン剤の評価に使用する紫外線としては UVB を利用したが、自然の日光には含まれない短波長 UVB 成分を出さない NB-UVB ランプを光源として用いることにし、NB-UVB ランプによってマウス皮膚に誘発される突然変異頻度の線量依存性を解析した。結果は図 1 に示すとおりになり、真皮では調べた範囲の紫外線量に対しほぼ直線的に突然変異頻度が上昇した。表皮では低線量域 (3 kJ/m<sup>2</sup>まで) では線量依存的に直線的な変異頻度増加が見られ、その傾きは真皮の 4 倍程度を示したが、それより大きい線量域では変異頻度の上昇が止まり一定値を示した。こうした表皮・真皮各々に特有の変異誘発動態はブロードバンド UVB ランプでも既に報告している<sup>2)</sup>。また 3 kJ/m<sup>2</sup>以上では皮膚に炎症の誘発が見られ、3 kJ/m<sup>2</sup>が NB-UVB に対するマウス皮膚の最小紅斑線量 (minimal erythema dose, MED) と見積もられた。

誘発変異頻度を見ると、3 kJ/m<sup>2</sup>で表皮では非照射群 (約  $1.2 \times 10^{-4}$ ) の 30 倍以上、真皮で 7 倍以上の変異誘発が見られた。10 kJ/m<sup>2</sup>では真皮でも 20 倍以上の誘発が見られた。以上の結果より、我々の使用する実験系はサンスクリーンの性能評価に十分な感度を有すると判断し、最小紅斑線量よりも大きく真皮でも十分な変異誘発の見られる 10 kJ/m<sup>2</sup> (約 3 MED) でサンスクリーン剤の評価を行うことにした。

#### 3・2 サンスクリーン剤の紫外線誘発突然変異の抑制効果

SPF 表示の異なる 3 社 (甲、乙、丙) 5 種 (A, B, C, D, E) のサンスクリーン剤 (詳細は表 1 参照) について、紫外線による皮膚突然変異誘発に対する防御効果を、Muta マウスを用いて評価した。結果を図 2 に示す。サンスクリーン剤は SPF の低いもの 2 種 (A, SPF23; B, 同 24)、中程度のもの 2 種 (C, 同 32; D, 同 35)、高いもの 1 種 (E, 同 50+) を選んだ。まずサンスクリーン単独の影響について調べたところ、いずれのサンスクリーン剤も皮膚に対す

る変異誘発の影響は認められなかった (図 2、黒棒)。

次に NB-UVB 10 kJ/m<sup>2</sup>照射に対する効果 (照射時間は約 6 分) を調べた。まず皮膚の急性反応であるが、サンスクリーン未塗布のものでは照射 2 日後より皮膚全体の発赤が出現し、3 日目には炎症・むくみが強く現れ、痒みによる掻き傷と思われるものが局所的に認められた。傷の一部は後に潰瘍化し、完治するのに 3 週間程度を要した。一方、サンスクリーン塗布群では E を除き、炎症などの変化は照射後 4 週目まで全く認められなかった。E では照射後 3 日目に皮膚の一部で軽い炎症が認められたが、照射 4 日後には消えた。

突然変異誘発に対するサンスクリーンの抑制効果を図 2 (白棒) に示す。サンスクリーン未塗布のものでは非照射群と比較して表皮で 34 倍、真皮で 20 倍の変異誘発が認められた。塗布群ではいずれのサンスクリーン剤でも UVB による変異誘発の抑制効果が表皮・真皮ともに認められた。しかしその結果は必ずしも表示 SPF 値とは対応しなかった。最も SPF 値の高いサンスクリーン E (SPF50+) では表皮・真皮ともにほぼバックグラウンドレベルまで変異誘発が抑制された。SPF 値の低いサンスクリーン A, B (SPF23 ~ 24) でも表皮で 80 ~ 90% の抑制効果を示し、真皮ではほぼバックグラウンドレベルまで抑制された。ところが中程度の SPF 値を持つサンスクリーン C, D (SPF32 ~ 35) では A, B よりも成績が悪く、表皮で 70 ~ 80%、真皮で 80 ~ 90% 程度の抑制効果であった。特にサンスクリーン C の成績の悪さが目立った。また同じメーカーの製品である A と D の間でも SPF が低い方の変異抑制効果が高いという逆転現象が認められた。

サンスクリーン剤の突然変異誘発に対する抑制効果を

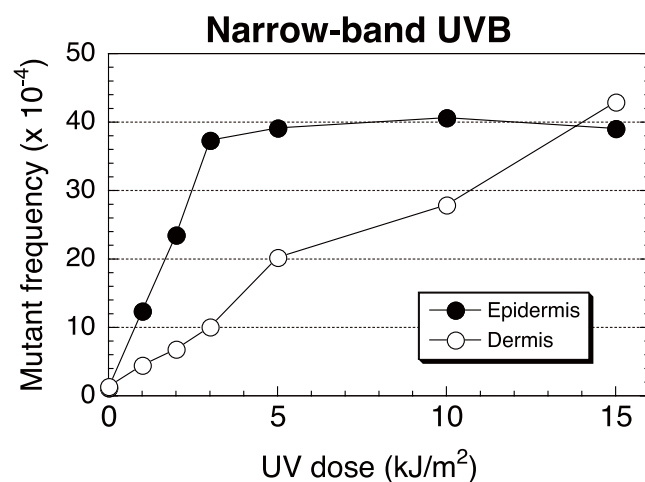


図 1 ナローバンド UVB によるマウス皮膚における突然変異誘発動態:

NB-UVB によってマウス皮膚表皮 (●) 及び真皮 (○) で誘発される突然変異頻度の紫外線量依存性を示す。各データポイントはマウス 2 ~ 3 個体の平均。但し 15 kJ/m<sup>2</sup>のポイントは 1 個体からのデータ。

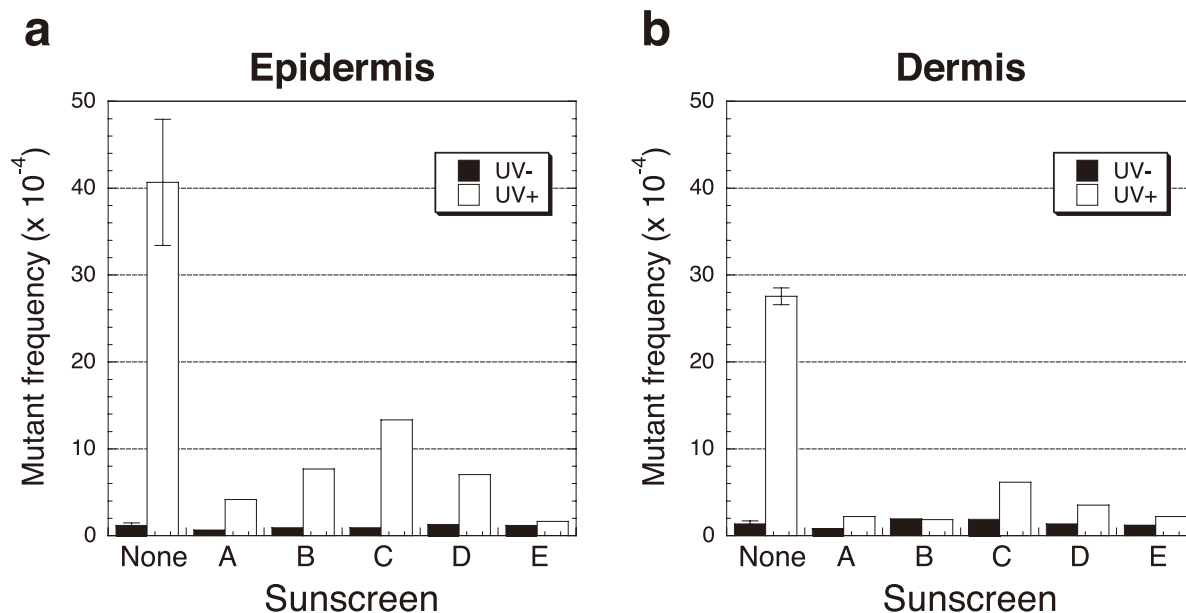


図2 NB-UVBによる皮膚突然変異誘発に対するサンスクリーンの抑制効果：

サンスクリーンを塗布したマウス皮膚にNB-UVB 10 kJ/m<sup>2</sup>を照射し、誘発される突然変異の頻度を表皮(a)と真皮(b)で調べた。各サンスクリーンの紫外線非照射(黒棒)・照射(白棒)のデータはそれぞれマウス1個体由来する。サンスクリーンを塗布しない対照群は3個体のデータの平均。

表2 使用サンスクリーン剤のMPF(突然変異防御係数)の見積もり

Sunscreen	SPF	Epidermis			Dermis		
		Repressed MF <sup>a</sup> (×10 <sup>-4</sup> )	Effective UV dose (kJ/m <sup>2</sup> )	MPF <sup>b</sup>	Repressed MF <sup>a</sup> (×10 <sup>-4</sup> )	Effective UV dose (kJ/m <sup>2</sup> )	MPF <sup>b</sup>
A	23	4.18	0.26	39	2.22	0.29	34
B	24	7.68	0.55	18	1.85	0.16	61
C	32	13.33	1.04	10	6.17	1.66	6
D	35	7.03	0.50	20	3.52	0.74	13
E	50+	1.65	0.04	250	2.22	0.29	34

a) MF, mutant frequency.

b) MPF, mutation protection factor; MPF = (Irradiated UV dose) / (Effective UV dose).  
The irradiated UV dose in the present study is 10 kJ/m<sup>2</sup>.

数値化するため、突然変異防御係数 (mutation protection factor, MPF) という新たな指数を導入した。MPFの定義は以下のとおり。

$$MPF = (\text{照射紫外線量}) / (\text{実効紫外線量})$$

定義により計算したMPF値を表2に示す。ここで「照射紫外線量」は本実験では10 kJ/m<sup>2</sup>になる。「実効紫外線量」(effective UV dose, 表2)は紫外線照射したサンスクリーン剤塗布群で観測された突然変異頻度を未塗布群で誘発するのに必要な紫外線量のこと、図2の白棒で示される塗布群の変異頻度 (repressed MF, 表2)と同じ変異頻度を誘発するのに必要な紫外線量を図1の線量効果曲線を用いて求める。MPF値が大きいほどサンスクリーン剤の突然変異防御能が高いことになるが、今回の実験は各観測値がマウス1個体からのデータであるので、統計的ばらつきの影響に注意する必要がある。図2の結果から考えて紫外

線非照射群とあまり差のない表皮のサンスクリーンE、真皮のサンスクリーンA, B, EのMPF値は「極めて大きい」という程度に解釈し、計算値を使用しての相互比較はあまり意味がないと思われる。この点に注意して表2のMPF値を比較しても、やはりサンスクリーンC, Dの変異抑制に関する成績がその表示SPF値の割に低いことが、表皮・真皮ともに明らかに見て取れる。

### 3・3 酸化ストレスによる影響の検出法の検討

我々が今回使用したトランスジェニックマウスの検出系で紫外線による酸化ストレスの影響を検出できるか確認するため、主に酸化ストレスを誘発すると思われるUVA1をMutaマウス皮膚に照射し、誘発される突然変異を解析した。UVA1光源として364 nmレーザを用い、最大2.56 MJ/m<sup>2</sup>まで照射した。図3cに示すように、表皮・真皮ともにバックグランドレベルの最大3~4倍程度の変異誘発

が認められた。回収された変異トランスジーン DNA 塩基配列変化を解析したところ、誘発された突然変異はほとんどが紫外線型の突然変異で、ピリミジン塩基が連続して並ぶ配列中でのシトシンからチミンへの塩基置換が主であった。酸化ストレスで誘発されるといわれるグアニンからチミンへの塩基置換の誘発は認められず、Muta マウスによる突然変異アッセイ法では紫外線による酸化ストレスの影響を評価するのは困難であることが明らかとなった。

そこで代替法として UVA1 照射により皮膚ゲノム DNA に生成する酸化型 DNA 損傷の検出・定量を試みた。その結果、図 3a に示すとおり代表的酸化型 DNA 損傷である 8OHdG の照射線量に応じた直線的な生成量増加が表皮・真皮の両方で認められた。生成量に表皮と真皮で差は認められなかった。比較として CPD, 64PP の生成も解析したところ、CPD のみ照射線量に依存した生成の誘発が表皮・真皮で認められた。この結果より、DNA 損傷誘発量を指標とすることにより、紫外線による酸化ストレスに対するサンスクリーン剤の防御効果を評価することが可能であることが示唆された。

#### 4. 考察

##### 4・1 皮膚癌防止効果の評価法の開発

突然変異を指標として、紫外線の慢性毒性のひとつである皮膚癌誘発に対するサンスクリーン剤の防御効果を評価するアッセイ法の開発を、トランスジェニックマウスを利用して行った。その結果、図 2 のとおり高い感度でサンスクリーンの効果を検出・評価できるアッセイ系であることが確認できた。しかもここで開発した方法で得られた各サンスクリーンの紫外線突然変異誘発の防御能 (MPF 値で示される) は、表示 SPF 値とは必ずしも対応しない場合があることが明らかとなった (サンスクリーン C, D)。この結果はサンスクリーンの皮膚癌防御能を正しく評価するには、従来の紅斑反応に基づく方法では不十分であり、今回開発したような方法で直接ゲノム毒性をアッセイする必要があることを示唆している。紫外線の皮膚慢性毒性、特にそのゲノム毒性に対するサンスクリーン剤の防御能を示す新たな評価指数として、突然変異アッセイ法に基づく MPF の導入を提案したい。

##### 4・2 光老化防止効果の評価法の開発

紫外線のもうひとつの慢性毒性である光老化は酸化ストレスの誘発にあるとされているが、今回の研究で突然変異を指標にしてこの酸化ストレスを直接皮膚で検出する試みは成功しなかった。これには、紫外線による突然変異誘発では CPD などの紫外線特異的 DNA 損傷によるもの影響が大き過ぎて酸化ストレスによるものはマスクされ検出されにくいこと、酸化ストレスによる DNA 損傷はすぐに

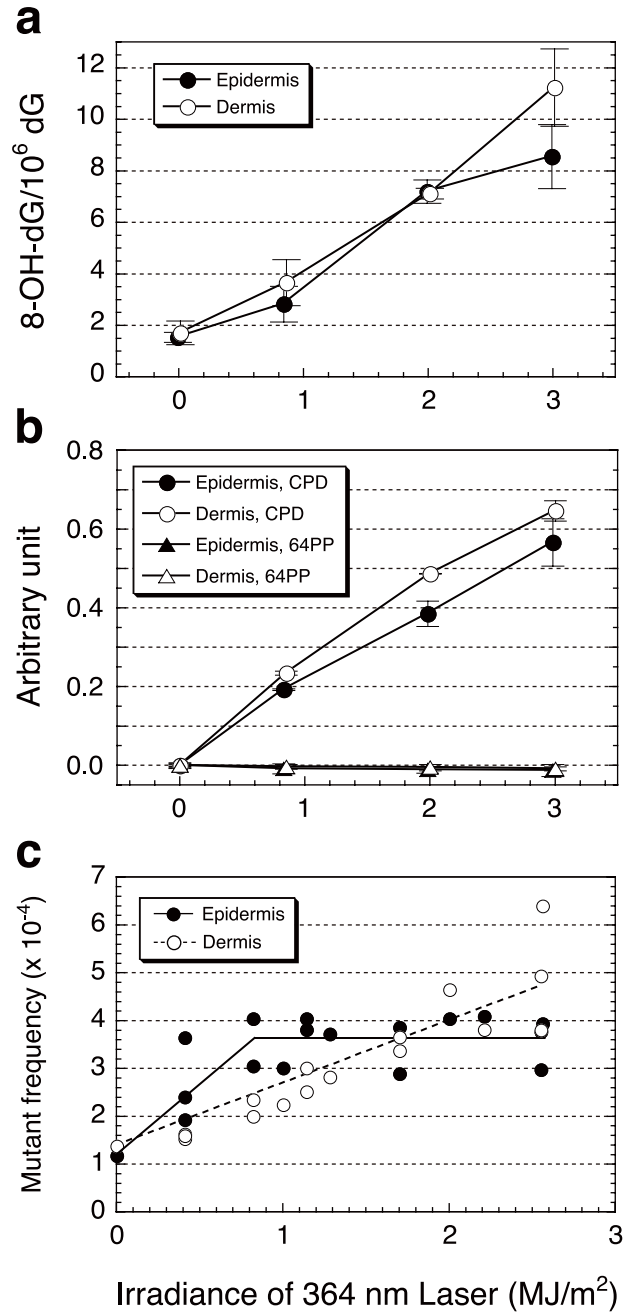


図 3 UVA1 レーザによる DNA 損傷及び突然変異の誘発動態: 364 nm レーザ光によりマウス皮膚表皮 (●▲) 及び真皮 (○△) に生成する DNA 損傷の誘発動態 (a, b) と突然変異誘発動態 (c) の線量依存性を示す。a: 8 ヒドロキシグアニンの誘発動態。b: シクロブタン型ピリミジンダイマー (●○) と 6-4 型光産物 (▲△) の誘発動態。DNA 損傷誘発動態の各データポイントはマウス 2 個体の平均値、突然変異誘発動態の各データポイントはマウス 1 個体からの実測値を示す。

修復されて突然変異になりにくいことなどが影響していると推測される。しかしながら本研究により紫外線で酸化型 DNA 損傷が生成することは確認された (図 3a 参照)。このことは突然変異ではなく、DNA 損傷を指標とすることにより、紫外線の酸化ストレスを評価することが可能であることを示している。紫外線照射直後の皮膚 DNA 中の酸

化型DNA 損傷を検出・定量することにより、サンスクリーンの酸化ストレス防御能、即ち光老化防御能をマウス皮膚で評価することが可能と考えられる。

#### 4・3 紫外線の皮膚慢性毒性防御能指数としての SPF 表示の限界

今回使用したサンスクリーン剤の表示 SPF 値から、突然変異誘発抑制能は、(数値的には必ずしも一致しないとしても) 少なくとも A, B, C, D, E の順番で高くなると予想していた。しかし実際には SPF 値の低いものの方(サンスクリーン A, B) が、それより高い SPF 値を有するもの(サンスクリーン C) より高い変異誘発防御能を示した。こうした逆転は同じメーカーの製品間でも認められた(甲社 A, D)。成績が悪かった中程度の SPF 値を持つサンスクリーン C, D は、紫外線防御剤として散乱剤を主とした組成となっており、他のサンスクリーン剤に比べ紫外線吸収剤の配合が少ない(表 1 参照)。散乱剤は凝集を起こしやすく、サンスクリーン皮膜内で紫外線防御効果のムラができやすいと言われており、これらのサンスクリーン剤が期待どおりの成績を示さなかったことに影響しているかもしれない。またサンスクリーン C は散乱剤として酸化亜鉛の 1 種類しか配合されておらず、吸収剤はメトキシケイヒ酸エチルヘキシルの 1 種類だけでしかもカプセルコーティングされて配合されており、こうした点が特に悪かった実験成績に影響している可能性がある。

その一方で、これら C, D を含む今回テストしたサンスクリーン剤のいずれも、UVB による皮膚炎症の誘発はほぼ完全に抑え込んでおり、突然変異抑制効果の評価結果とは必ずしも一致しなかった。照射した UVB 量はほぼ 3 MED に相当するので、炎症抑制効果の結果は使用したサンスクリーン剤の表示 SPF 値 (23 ~ 50+) とよく一致している。しかし突然変異について完全に抑えることができたのはサンスクリーン E だけであり、A ~ D のサンスクリーンは表皮で多少の変異誘発が認められた。紅斑反応を誘発する紫外線量には閾値があり、それが一般には MED として知られている訳だが、突然変異や癌などの誘発に必要な紫外線量には閾値はないと考えられている。こうした違いが今回の評価結果の不一致の背後にあると考えられる。皮膚炎症と突然変異に対する防御効果が必ずしも一致しないという結果は、ひとつの重要な事実を明らかにしている。即ち皮膚に炎症(紅斑)は認められなくても、突然変異の誘発は起きていること、即ち将来の皮膚癌発生への変化が蓄積されているということである。

### 5. 総括

紫外線の皮膚慢性毒性に対するサンスクリーン剤の防御効果を評価するため、突然変異を指標にし、マウス皮膚で

直接評価できるアッセイ系の開発を試みた。紫外線の慢性毒性のうち、将来の皮膚癌発生につながる突然変異の抑制効果については、本研究で検討した方法で鋭敏に評価できることを明らかにした。一方もうひとつの慢性毒性である光老化については、酸化ストレスの検出を意図して突然変異の解析を行ったが、酸化ストレスによると思われる変異はほとんど誘発されず、うまく行かなかった。しかしながら照射直後の皮膚ゲノム DNA を利用することにより酸化型 DNA 損傷を検出・定量できることが明らかとなり、これを指標にすれば光老化抑制効果の評価が可能であることを示した。

サンスクリーン剤の有する SPF 値と本研究で開発したアッセイ法で得られる突然変異誘発防御係数(MPF)は必ずしも対応しないことを明らかにした。実際に各サンスクリーンは表示どおりに紫外線誘発炎症(紅斑)に対する抑制効果を示したが、完全な炎症防御を示していても SPF50+ のもの以外は突然変異を完全に抑え込むことはできなかった。このように紫外線の皮膚慢性毒性に対する防御能を評価するには、少なくとも皮膚癌防御能に関しては、従来の紅斑反応を指標とした方法では不十分であり、本研究で開発したような皮膚ゲノム毒性(突然変異、DNA 損傷など)を直接指標とする評価法が必要であることが示された。またサンスクリーン剤の配合成分によっては、SPF 値と MPF 値のあいだで紫外線毒性防御能の評価に逆転が起こる可能性があり、特に散乱剤中心の配合の場合は注意する必要があることも示唆された。紫外線の皮膚慢性毒性、特にそのゲノム毒性に対するサンスクリーン剤の防御能を示す新たな評価指数として、突然変異アッセイ法に基づく MPF の導入を提案したい。

#### (参考文献)

- 1) Gossen JA, De Leeuw WJF, Tan CHT, *et al.* Efficient rescue of integrated shuttle vectors from transgenic mice: a model for studying mutations *in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA 86: 7971-7975, 1989.
- 2) Ikehata H, Ono T. Mutation induction with UVB in mouse skin epidermis is suppressed in acute high-dose exposure. Mutat Res 508: 41-47, 2002.
- 3) Ikehata H, Saito Y, Yanase F, *et al.* Frequent recovery of triplet mutations in UVB-exposed skin epidermis of Xpc-knockout mice. DNA Repair 6: 82-93, 2007.
- 4) Ikehata H, Kawai K, Komura J, *et al.* UVA1 genotoxicity is mediated not by oxidative damage but by cyclobutane pyrimidine dimers in normal mouse skin. J Invest Dermatol 128: 2289-2296, 2008.