

# 培養細胞に対する紫外放射の殺細胞効果の作用スペクトル

奥野 勉<sup>\*1</sup> 宇高 結子<sup>\*2</sup> 青木 馨代<sup>\*2</sup> 中西 孝子<sup>\*2</sup>

紫外放射は、角膜炎、結膜炎、白内障、翼状片、紅斑（日焼け）、皮膚の老化、皮膚がんなど多くの障害を引き起こす。作業現場における紫外放射のリスクマネジメントの前提として、それぞれの障害に関して、紫外放射の許容基準を制定することが望まれる。紫外放射の許容基準では、紫外放射の波長によって有害性の強さが異なることを考慮に入れる必要がある。本研究では、培養ヒト表皮角化細胞および培養ヒト結膜上皮細胞に対する紫外放射の殺細胞効果の作用スペクトル（波長依存性）を求めた。培養細胞に異なった波長と量の紫外放射を照射し、その2日後に、細胞のクリスタルバイオレット染色の濃度、および、乳酸脱水素酵素の培地への放出量を測定し、細胞生存率を評価した。各波長について、細胞生存率と照射量の関係から、細胞生存率50%に対応する照射量（50%致死量）を求めた。この50%致死量が有害性の強さを表すとした。紫外放射の有害性の相対的な作用スペクトルは、ヒト表皮角化細胞とヒト結膜上皮細胞のどちらに対しても、また、どちらの測定指標を使用して求めた場合にも、ほぼ同じであった。紫外放射の有害性は、約250 nmから約280 nmまでの波長域でもっとも高く、それより波長が長く、または、短くなるにつれて、急速に低下した。本研究の結果は、皮膚障害および結膜障害に関する紫外放射の許容基準を制定する際の基礎データになるとと思われる。

**キーワード:** 紫外放射, 作用スペクトル, 許容基準, 50%致死量, 波長依存性

## 1 はじめに

作業現場では、多くの作業者が、アーク溶接、プラズマ切断、太陽、各種のアークランプ、殺菌灯などが発生する紫外放射へばく露している。紫外放射は、角膜炎、結膜炎、翼状片、紅斑（日焼け）、皮膚がん、皮膚の老化など、多くの障害を引き起こす<sup>1,2)</sup>。実際、アーク溶接が行われている作業現場では、角膜炎<sup>3-5)</sup>と紅斑<sup>3)</sup>が、多く発生している。また、太陽からの紫外放射へのばく露量が多いと考えられる屋外作業の間で、白内障<sup>6,7)</sup>と皮膚がん<sup>8-11)</sup>が多く発生している。作業者をこれらの障害から保護するための第一歩として、作業現場における紫外放射の有害性を評価する必要がある。

一般に、異なった波長の紫外放射は、異なった作用の強さをもつため、紫外放射の有害性の評価では、有害性の波長依存性を考慮しなければならない。この波長依存性は、作用スペクトルまたは障害関数によって表される。

一般に、作用スペクトルは、単一の波長の光学放射（紫外放射を含む）が、一定の光化学的または光生物学的効果を引き起こすばく露量（または、その逆数）を、波長の関数としてプロットしたものである。特に、ヒトの障害の発生に関する作用スペクトルで、有害性の評価に使用されるものは、障害関数と呼ばれる。障害関数は、障害によって異なるため、特定の障害に関する光学放射の有害性を評価するためには、その障害に対する障害関数が必要となる。

動物の角膜炎に関する作用スペクトルとヒトの紅斑に関する作用スペクトルから、障害関数が決められており<sup>12)</sup>、これに基づき、紫外放射の許容基準が制定されている<sup>13-15)</sup>。これらの許容基準によって、作業現場における紫外放射の、眼と皮膚の急性障害に関する有害性を評価することができる。しかし、紫外放射による他の障害に

ついては、関連する作用スペクトルのデータが十分にないため、障害関数が決められていない。したがって、そうした障害については、紫外放射の有害性を評価することができない。

本研究では、培養ヒト表皮角化細胞および培養ヒト結膜上皮細胞に異なった波長の紫外放射を照射し、その後の細胞生存率を測定することによって、紫外放射の殺細胞作用の作用スペクトルを調べた。その目的は、皮膚障害および結膜障害に関する紫外放射の許容基準を制定する際の基礎データを提出することである。

## 2 方法

ヒト表皮角化細胞は、Lonza (Walkersville, MD, USA) から、ヒト結膜上皮細胞は、DS ファーマバイオメディカルから購入し、実験に使用した。

ヒト表皮角化細胞の培地は、ウシ脳下垂体抽出物、ウシインスリン、コルチゾール、ウシトランスフェリン、ヒト表皮成長因子、ゲンタマイシン、アムホテリシンを含むヒトケラチノサイト増殖サプリメント (HKGS Kit, Cascade Biologics) を添加した Epilife 培地 (Cascade Biologics, Portland, OR, USA) を使用した。ヒト表皮角化細胞の培地は、2 mM グルタミンと 10% ウシ胎児血清を含む Medium 199 (HBSS) を使用した。

200  $\mu$ l/well の培地とともに  $1 \times 10^4$  個/well の細胞を、96 ウェルプレートの 24 個のウェルに播種した。炭酸ガス培養器 (CPD-1700, ヒラサワ) を用い、温度 37°C、炭酸ガス濃度 5% の条件化で、サブコンフルエントに達するまで数日間培養した後、紫外放射を照射した。

照射の際には、一時的に、培地を、試験波長の紫外放射を吸収しないリン酸緩衝生理食塩水に置換した。照射した細胞を 2 日間培養した後、その細胞生存率を調べた。

紫外放射の発生源としては、キセノンランプ光源装置 (MAX-302, 朝日分光) に、特定の波長を取り出すバン

\*1 人間工学・リスク管理研究グループ

\*2 昭和大学医学部

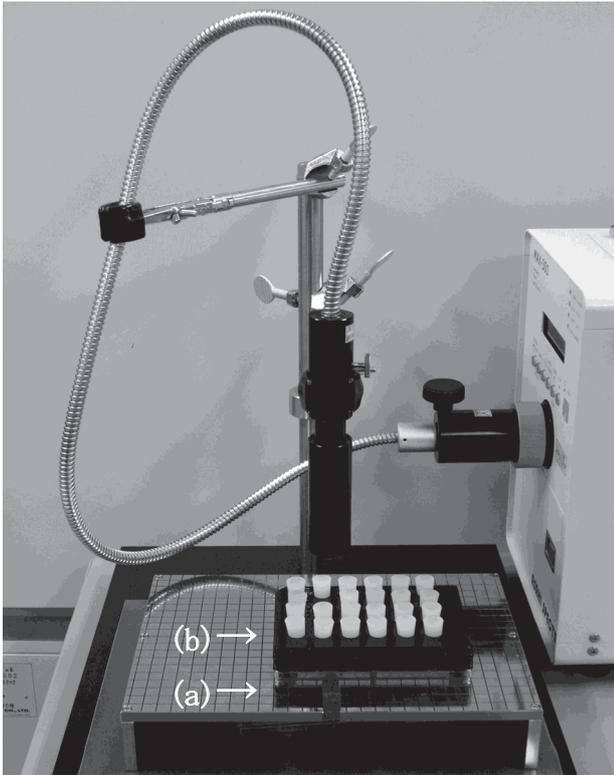


写真1 紫外放射の照射系

96ウェルプレート(a)の、1個おきに合計24個のウェルを使用した。照射の際には、その24個のウェルに対応する位置に穴の開いた蓋(b)をプレートにかぶせた。照射をしていないウェルの上の穴には、シリコンゴムの栓(蓋の上の白色のもの)をした。この写真では、蓋の1か所の穴には、栓がされておらず、その下のウェルに、紫外放射を照射している。

ドパスフィルター(朝日分光)を装着して使用した(写真1)。光源装置の光出力を、光ファイバーで導き、照射面における照度分布を一樣にするロッドレンズを通して、培養細胞に照射した。照射した紫外放射の中心波長は、ヒト表皮角化細胞の場合には、235 nm, 242 nm, 250 nm, 261 nm, 269 nm, 280 nm, 292 nm, 300 nm, 306 nm, 310 nmの10種類、ヒト結膜上皮細胞の場合には、234 nm, 241 nm, 250 nm, 261 nm, 269 nm, 280 nm, 291 nm, 300 nm, 306 nm, 310 nm, 315 nmの11種類である。半値幅は、8 nm から 12 nm である。紫外放射を照射する直前に、測定器(本体: IL1400A, International Light Technologies, シリコンフォトダイオードセンサー: SEL033, International Light Technologies)を用いて、細胞の位置における紫外放射の放射照度を測定した。紫外放射の測定器は、波長ごとの感度の較正を行った後、その有効期間内に使用した。

各波長について、照射時間を調節することにより4種類の量(radiant exposure)の紫外放射を細胞に照射した。照射量は、予備実験で求めた50%致死量の約2倍を最大とし、等間隔に設定した。96ウェルプレートの中の4個ずつのウェルを各照射量条件に、さらに、4個ずつ

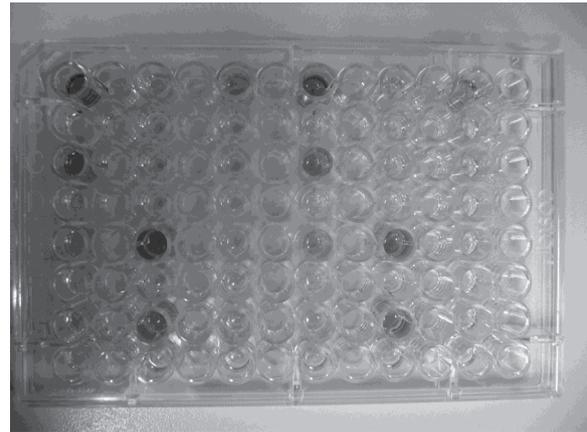


写真2 クリスタルバイオレット染色の例

のウェルを対照および陽性対照として使用した。陽性対照ウェルには、中心波長 269 nm, 30 mJ/cm<sup>2</sup>の紫外放射を照射した。

細胞生存率の評価は、細胞のクリスタルバイオレット染色の濃度、および、乳酸脱水素酵素の培地への放出量を測定することによって行なった。

紫外放射を照射した96ウェルプレートのウェルから培地を取り除いた後、細胞を生理食塩水で洗い、軽く乾燥させた。次に、0.1%のクリスタルバイオレット(和光純薬工業)と0.1%のメタノールを含むリン酸緩衝生理食塩水を50 μl/well 加え、室温で15分間保つことによって、細胞を染色した(写真2)。その後、細胞を水で洗い、乾燥させた。ドデシル硫酸ナトリウム(和光純薬工業)をウェルに加えた後、マイクロプレートリーダー(Model 680 XR, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)で570 nmにおける吸光度を測定した。この値が、細胞生存率に比例するとした。

対照ウェルおよび陽性対照ウェルの測定値の平均が、それぞれ細胞生存率100%および0%に対応すると仮定し、個々のウェルについて、直線補間によって、測定値から細胞生存率を求めた。

乳酸脱水素酵素の測定には、微量毒性試験用試薬キット(MTX-LDH, 極東製薬)を用いた。紫外放射を照射した96ウェルプレートのそれぞれのウェルから培地を50 μl/well 回収し、他の96ウェルプレートに入れ、試薬を加え、室温で45分間保った。その後、停止液を加え、マイクロプレートリーダー(Model 680 XR, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)で570 nmにおける吸光度を測定した。この値が、細胞死亡率に比例するとした。

対照ウェルおよび陽性対照ウェルの測定値の平均が、それぞれ細胞死亡率0%および100%に対応すると仮定し、個々のウェルについて、直線補間によって、測定値から細胞死亡率を求めた。最後に、1から細胞死亡率を引くことによって、細胞生存率を求めた。

各波長について、細胞生存率と照射量の関係に、最小自乗法によって、次の式を当てはめた。

$$V = 1 - \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \int_0^D \frac{1}{x} \exp\left(-\frac{(\log x - \mu)^2}{2\sigma^2}\right) dx \quad (1)$$

ここで、 $V$ は細胞生存率、 $D$ は照射量、 $\mu$ と $\sigma$ は、当てはめのパラメータである。この式の第2項は、プロビット関数と呼ばれ、経験的に生体影響の量反応関係をよく表すと言われている。当てはめを行った後の式(1)から、細胞生存率50%に対応する照射量(50%致死量, LD<sub>50</sub>)を計算した。各波長の50%致死量を元に、作用スペクトルを構築した。

実験は、細胞と波長ごとに3-7回繰り返し、その結果を平均した。

### 3 結果

ヒト表皮角化細胞とヒト結膜上皮細胞のどちらの場合にも、また、クリスタルバイオレット染色濃度または乳酸脱水素酵素放出量を指標としたどちらの評価でも、すべての照射波長について、細胞生存率は、照射量の増加と共に減少した(図1)。この量-影響関係から、50%致死量を求めることができた。

各波長の50%致死量を元に構築した作用スペクトルを

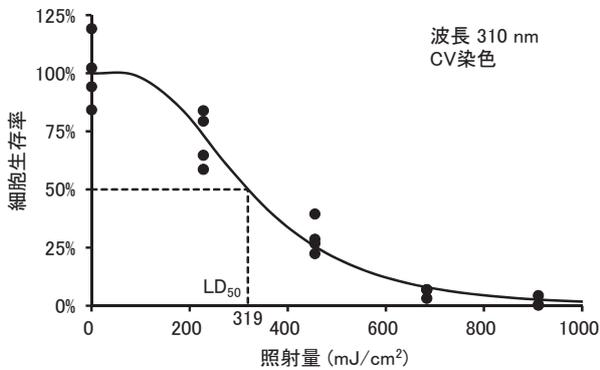


図1 量-影響関係と50%致死量の求め方の例

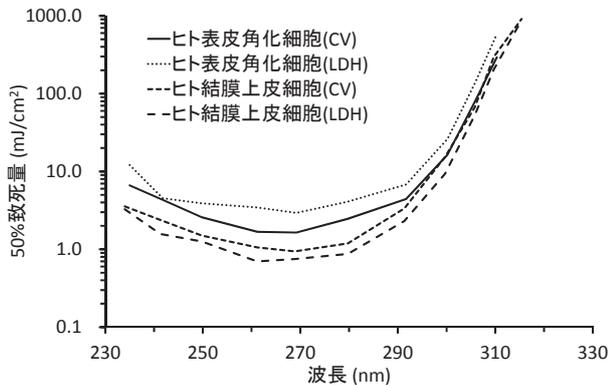


図2 作用スペクトル

図2に示す。

ヒト表皮角化細胞の場合、乳酸脱水素酵素放出量(LDH)よりも、クリスタルバイオレット(CV)染色濃度を指標として用いた方が、50%致死量の値は小さかった。ヒト結膜上皮細胞の場合には、逆に、クリスタルバイオレット染色濃度よりも、乳酸脱水素酵素放出量を指標として用いた方が、50%致死量の値は小さかった。

ヒト表皮角化細胞とヒト結膜上皮細胞のどちらの場合にも、また、クリスタルバイオレット染色濃度または乳酸脱水素酵素放出量を指標としたどちらの評価でも、相対的な作用スペクトルは、ほぼ同じであった。紫外放射の有害性は、約250 nmから約280 nmまでの波長域でもっとも高く、それより波長が長く、または、短くなるにつれて、急速に低下した。

### 4 考察

本研究の結果は、皮膚の老化、皮膚がんなどの皮膚障害、および、翼状片などの結膜障害に関する紫外放射の許容基準を制定する際の基礎データになると思われる。

著者らは、以前の研究において、ほぼ同じ方法を用いて、ブタ水晶体上皮細胞に対する紫外放射の殺細胞効果の作用スペクトルを求めている<sup>16)</sup>。本研究で求めたヒト表皮角化細胞とヒト結膜上皮細胞に対する作用スペクトルは、ブタ水晶体上皮細胞に対する作用スペクトルともよく一致している。これは、紫外放射の殺細胞効果の作用スペクトルは、細胞の種類には依らない可能性を示している。

本研究では、乳酸脱水素酵素放出量とクリスタルバイオレット染色濃度を指標とする2つの異なった方法を用いて50%致死量を求めた。しかし、得られた50%致死量の値が異なっていた。さらに、ヒト表皮角化細胞とヒト結膜上皮細胞では、その高低の関係が逆であった。これは、どちらか一方、または、両方の指標と細胞生存率との関係が線形ではないこと、また、この関係が細胞の種類に依存することを意味している。この2つの方法による50%致死量の測定値の差は、最大で2倍程度であるので、測定値と真の値との差も、同程度またはそれ以下で

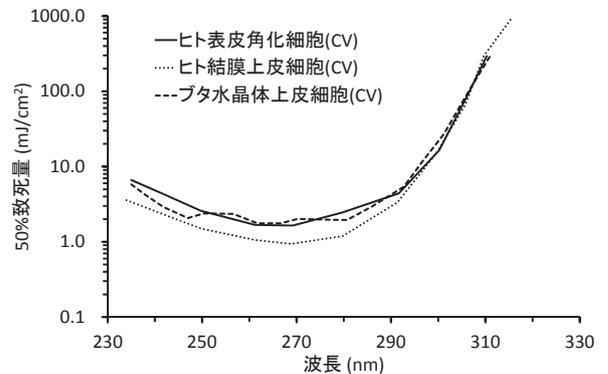


図3 異なった細胞に対する作用スペクトルの比較

あることが予想される。許容基準を策定する際の不確定性を考慮すると、十分な精度で作用スペクトルを求めることができたと考えられる。

#### 参 考 文 献

- 1) WHO. Ultraviolet Radiation. Environmental health criteria. Geneva: WHO; 1994.
- 2) Sliney DH, Wolbarsht M. Safety with lasers and other optical sources. New York: Plenum Press; 1980.
- 3) Emmett EA, Buncher CR, Suskind RB, Rowe KW. Skin and eye diseases among arc welders and those exposed to welding operations. *J. Occup. Med.* 1981; 23: 85-90.
- 4) 日本溶接協会. 溶接アークからの有害光線に関する調査研究 成果報告書. 東京: 日本溶接協会; 1984.
- 5) 沼野雄志. 溶接アークによる眼障害に関する調査結果. *労働衛生工学.* 1986; 25: 9-20.
- 6) The Italian-American Cataract Study Group. Risk factors for age-related cortical, nuclear and posterior subcapsular cataracts. *Am. J. Epidemiol.* 1991; 133: 541-553.
- 7) Burton M, Fergusson E, Hart A, Knight K, Lary D, Liu C. The prevalence of cataract in two villages of northern Pakistan with different levels of ultraviolet radiation. *Eye* 1997; 11: 95-101.
- 8) Atkin M, Fenning J, Heady JA, Kennaway EL, Kennaway NM. The mortality from cancer of the skin and lip in certain occupations. *Br. J. Cancer* 1949; 3: 1-15.
- 9) Beral V, Robinson N. The relationship of malignant melanoma, basal and squamous skin cancers to indoor and outdoor work. *Br. J. Cancer* 1981; 44: 886-891.
- 10) Vågerö D, Ringbäck G, Kiviranta H. Melanoma and other tumours of the skin among office, other indoor and outdoor workers in Sweden 1961-1979. *Br. J. Cancer* 1986; 53: 507-512.
- 11) el Khwsky F, Bedwani R, D'Avanzo B, et al. Risk factors for non-melanomatous skin cancer in Alexandria, Egypt. *Int. J. Cancer* 1994; 56: 375-378.
- 12) Sliney DH. The merits of an envelope action spectrum for ultraviolet radiation exposure criteria. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 1972; 33: 644-653.
- 13) ICNIRP. Guidelines on limits of exposure to ultraviolet radiation of wavelengths between 180 nm and 400 nm (incoherent optical radiation). *Health Phys.* 2004; 87: 171-186.
- 14) 許容濃度等の勧告 (2013 年度). 日本産業衛生学会. 産業衛生学会雑誌. 2013; 55: 182-208.
- 15) ACGIH. Light and near infrared radiation. TLVs and BEIs, Cincinnati: ACGIH; 2013: CD-ROM.
- 16) Tsutomu Okuno, Takako Nakanishi-Ueda, Toshihiko Ueda, Hajime Yasuhara, Ryohei Koide. Ultraviolet action spectrum for cell killing of primary porcine lens epithelial cells. *J. Occup. Health* 2012; 54: 181-186.