

# ヒト皮膚培養線維芽細胞に対する紫外線 (UVA) 照射が不定期 DNA 合成および Collagen 合成に対する影響に関する検討 — 年齢別の細胞応答 —

秋山純一 中嶋正明 平上二九三 小幡太志  
野中紘士\* 龍田尚美\* 速水明香\* 進藤泰子\*\*

## A study of unschedule DNA synthesis and Collagen synthesis influence for having irradiated ultraviolet rays (UVA) to cultured human skin fibroblasts.

— Response of cell that depends on age of donor —

Junichi AKIYAMA, Masaaki NAKAJIMA, fukumi HRAGAMI, Futosi OBATA  
kouji NONAKA\*, naomi TATUTA\*, sayaka HAYAMIZU\*, Yasuko SINDO\*\*

### 要旨

我々が生活紫外線として通常最も多く浴びる紫外線である長波長紫外線 (UVA) の皮膚真皮の主要構成細胞 (Fibroblast) に対する影響について検討を行った。照射エネルギー設定のため、ヒトが日常生活で表皮を透過し、皮膚の構成細胞に浴びる種々の光電磁波を測定する目的で、50  $\mu$ m のヒト新鮮皮膚を用い、波長特性格光源の皮膚透過率を測定した。UVA 光源ランプの表皮層を透過するエネルギーは56.6%、UVB 光源ランプでは 45.7%であった。若年者と高齢者に与える UVA 照射の影響の違いについて検討するため、若年者 (4ヶ月, 8ヶ月, 2才) 由来細胞3種と高齢者 (63才, 85才, 88才) 由来細胞3種の非露光部の皮膚真皮より樹立し、継代培養した細胞を使用して実験を行った。UVA のエネルギー強度は、通常我々が晴天時に暴露されると推定される最大量 (4000  $\mu$ w/cm<sup>2</sup>/sec) を各細胞に照射した。細胞への UVA 照射による影響の測定は、DNA 合成の変化を見るため、<sup>3</sup>H-thymidine の取り込みにより、総 DNA 量の測定およびラジオオートグラフィによる不定期 DNA 合成測定試験を行った。また、Collagen 合成の変化を見るため、<sup>3</sup>H-Propine の取り込みと Collagenase 消化法による Collagen 合成活性試験を行った。若年者と高齢者の比較では、高齢者細胞に有意な DNA の合成量と合成率の低下が見られ、UVA 照射による不定期 DNA 合成応答も低下していた。Collagen 合成に関する比較で、高齢者細胞に有意な Collagen 合成活性の低下が見られた。若年者細胞には照射後に有意な Collagen 合成の増加応答が見られたが、高齢者細胞ではほとんど見られなかった。これらの結果より、皮膚が UVA 暴露により障害を受けた場合、その真皮細胞の不定期 DNA 合成応答と、一時的 Collagen 合成増加の反応性応答は、高齢者は若年者と比べ、細胞単位レベルでの低下が明らかとなった。

キーワード : 線維芽細胞, 培養, 紫外線, DNA 合成, コラーゲン合成

Keywords : fibroblast, culture, UVA, DNA synthesis, collagen synthesis

---

吉備国際大学 保健科学部理学療法学科 Department of Physical Therapy, School of Health Science, KIBI International University

\*吉備国際大学 保健科学研究科

Graduate School of Health Science, KIBI International University

〒716-8508 岡山県高梁市伊賀町8

8, Iga-machi, Takahashi-City, Okayama (716-8508)

\*\*信州大学医学部 皮膚科

Department of Dermatology, Shinshu University of School of Medicine

〒390-0802 松本市旭 3-1-1

3-1-1, Asahi, Matsumoto-City, Nagano (390-0802)

## はじめに

太陽から注がれる電磁波は生命に対する障害をもたらす反面、地球という惑星に生命を誕生させ、その生命活動を支えるという両面をもつなど、その作用は功罪多岐にわたる。地球の地表に届く電磁波は波長の違いにより分類され、短い波長側の紫外線から可視光線、長い波長の赤外線から、さらに電波に分類される。その中で特に生体に対する種々の作用をもつものが紫外線 (200 ~ 400nm) である。紫外線はその作用の違いから、短波長紫外線 UVC (200 ~ 290nm)、中波長紫外線 UVB (290 ~ 320nm) および長波長紫外線 UVA (320 ~ 400nm) に分類されている。その紫外線の中での特別に UVA をさらに生物学的な作用の差により UVA-I (360 ~ 400nm) と UVA-II (320 ~ 360nm) に最近分類されている。UVA は UVB に比べて皮膚に対する紅斑を発生させる作用は極端に弱いものの、皮膚表皮から真皮へ至る透過性が高く、皮膚構築に対する影響が大きいと皮膚老化と関連が深いといわれている。また UVA は日常生活紫外線から年間を通じて照射暴露されるエネルギーが高いことより、最近、特にその障害が光老化発症との関連性において注目されている<sup>1)-5)</sup>。本研究ではその UVA の皮膚真皮細胞に対する作用を検討することを目的として実験を行った。細胞照射実験をするにあたり、ヒト皮膚に対する紫外線~可視光線の分類別の透過性を測定し、その測定結果から我々が太陽光から表皮を通じて被曝すると予想される UVA のエネルギー強度を算出した。真皮の主要結合組織構築細胞である皮膚線維芽細胞の若年者由来組織培養細胞及び高齢者由来組織培養細胞に対し、人工光源を用いて我々が日常生活で浴びると予想される UVA エネルギー強度を照射し、照射後の DNA 合成、Collagen 合成に対する影響について検討し、考察を加えたので報告する。

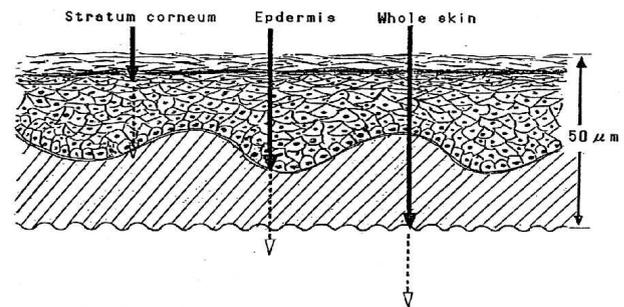
## 方法

### 1. 人工光源の皮膚透過性の測定

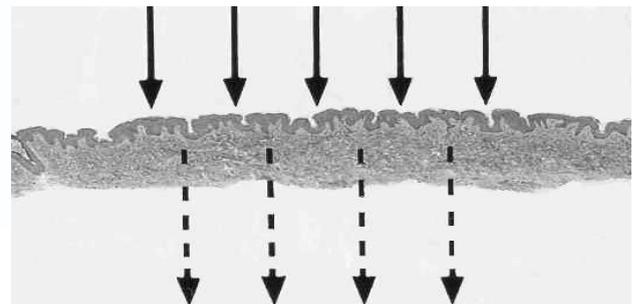
5才男子の体幹部よりデルマトームにより薄切採取した厚さ約 50  $\mu$ m 新鮮組織を用い、「角質層」「表皮層」および「表皮+真皮層」について、光源別の透過性とそのエネルギー量を測定した。表皮細胞層の透過性は 4  $^{\circ}$ Cにて 12 時間 0.25 % Trypsin にて処理し、基底膜から剥離した表皮細胞膜の約 15  $\mu$ m と有棘細胞層を除いた角質細胞層膜の約 5  $\mu$ m と

表皮+真皮の全層皮膚の約 50  $\mu$ m の透過光を測定した (図 1)。照射光源として用いたものは、そのピーク波長が短い順に (FL-15GL: Predominantly 254nm), (FL-20SE: 275 ~ 410nm), (FL-20BLB: 300 ~ 420nm), (FL20B: 310 ~ 650nm), (FL-20SD: 370 ~ 700) (FL-20PK: 530 ~ 760nm) [すべて (株) 東芝社製] を用いた。エネルギー強度の測定はトプコン 200 及び UV ラジオメーター: (株) 東芝社製により行った。

図 1 Schema and Section Specimen by Human Fresh Skin Tissue for Light Transmission Test).



(5yr-old, HE  $\times$ 20)



### 2. 被験細胞ならびに培養方法

[正常皮膚Fibroblast株の培養]

正常非露光部の切除皮膚組織を用いて培養を行った。培養した細胞の由来組織のドナーは若年者皮膚由来細胞 3 例 (男子 4 ヶ月, 男子 8 ヶ月, 女子 2 才), 高齢者皮膚由来細胞 3 例 (女性 63 才, 女性 85 才, 男性 88 才) であった。各ドナー又は家族より培養細胞実験の主旨を説明して了解の後、正常皮膚真皮組織より Explant Culture 法により培養し増殖させた。培養した各Fibroblastを常法により継代培養し継代数 3 代目から 5 代目の細胞を用いて本実験を行った。

### 3. UVA 照射 DNA 合成 (合成量, 標識率)

各ドナー年代別培養線維芽細胞の UVA 照射後の DNA 合成の変化の違いについての検討を目的とし、 $[^3\text{H}]$ thymidine (比放射能 814GBq/mmol) [Amersham]

の取り込みにより実験を行った。confluent に増殖した各細胞を 0.02% EDTA / 0.25% Trypsin で単離し、 $1 \times 10^4$  cell/ml の細胞浮遊液を調整した。10% 牛胎児血清添加 Eagle MEMにより調整した細胞浮遊液を培養皿 (culture dish # 153066) に入れた滅菌カバーガラス 13mm  $\phi$  に 200  $\mu$  l ずつ分注し、6 時間炭酸ガス培養器で培養後、Eagle MEMを 2ml 添加、48時間培養した。培養液を除き人工光源 (FL-20BLB : 300 ~ 420nm, 4 本並列) にて UVA 照射を実施し、再び培養液を添加して 24 ~ 72 時間の培養後、それぞれ続いて 21kBq/ml [ $^3$ H] thymidine を加えさらに 24 時間の培養を行った。その後、カバーガラス上に着床し増殖した細胞を冷Canoy液で5分間固定、5%TCAにて除蛋白を行い、カウンティングバイアルビンに細胞付着カバーガラスを入れ、Scintillaterを添加した。各カバーガラスに着床した細胞の総DNA合成量を Scintillation Spectrometer [Packard] により測定した。またラジオオートグラフィィを行うため測定した標本を取り出し、水・エタノールで洗浄後、ラジオオートグラフ乳剤(サクラNR-M2)の等量水希釈溶液にて dipping して、4 $^{\circ}$ C 7日間の露出、現像液(フジフィルム)、定着液(フジフィルム)により現像を行った。HE 染色後、100倍の顕微鏡写真を作成し、全細胞数に対する核中に5個以上銀粒子をもつ細胞の割合を計測し、全細胞数200個に対する各細胞の [ $^3$ H] thymidine による細胞核の DNA 合成標識率 labeling index(LI)を測定・算出した。

#### 4. UVA 照射 Collagen 合成 (非 Collagen 合成量, Collagen 合成量, 合成率)

##### 3) Collagen 産生能

培養条件下にて細胞が産生する Collagen の合成活性を各細胞株について検討した。培養シャーレで confluent の状態となった細胞を用い、アスコルビン酸および  $\beta$ -aminopropionitrile を添加、24 時間の培養後、同培養液に L- [2, 3- $^3$ H] proline 比放射能 1110GBq / mmol [NEN], 74kBq / ml を加えさらに 24 時間の培養を行った。

Collagen の測定は Peterkofsky と Diegelmann<sup>6)</sup> および Hata ら<sup>7)</sup> の方法を部分改良して行った。酸不溶性 Collagen の回収、Tris-HCl 緩衝液に再溶解、冷エタノールによる再回収を行い、アルカリで可溶化した後、中和を行い測定 Sample とした。消化酵素として Clostridium histolyticum 由来の Collagenase

[Advance] を用い、37  $^{\circ}$ C 90 分間行い、アルブミン添加の後、タンニン酸を含む 5 % 冷 TCA にて酵素抵抗性の不溶性の非 collagen 性タンパクと上清の消化 collagen 性タンパク部分に分画し、不溶性タンパクは Tris-HCl 緩衝液 5mM ジチオスレイトール/0.5 % ラウリル硫酸ナトリウム溶液を加え、加熱溶解させ測定 Sample とした。常法により Scintillater を加え、Scintillation Spectrometer [Packard] により放射活性を測定し、Collagen の相対合成活性を算出した。

## 結果

### 1. 人工光源の皮膚透過性

「角質層」「表皮層」および「表皮+真皮層」についての光源別の透過性測定結果を (表 1) にまとめて示した。いわゆる殺菌灯の光源である FL-15GL (peak 254nm) 波長が短いため最も透過率が低く約 50  $\mu$  m 「表皮+真皮層」は全く通過しないことが確認された。しかし角質細胞層は 64.4 % の透過性が見られた。また最も長い波長の光源である FL-20PK (530 ~ 760nm) の赤外線に近い波長の光源では角質細胞層で 83.3 %、「表皮+真皮層」でも 31.2 % の透過性が観察され光源波長が短いと皮膚透過率が明らかに低くなる傾向が観察された。

表 1 Results of Light Transmission Test to Human Raw Skin Tissue by Various Light Sources.

Light Source (Emission Spectrum)	Transmittance(%)		
	stratum corneum (5 $\pm$ 1 $\mu$ m)	Epidermis (15 $\pm$ 3 $\mu$ m)	Whole skin (50 $\pm$ 9 $\mu$ m)
TOSIBA FL-15GL (predominantly 254nm)	64.4	1.4	0
TOSIBA FL-20SE (275nm~410nm)	71.4	45.7	1.7
TOSIBA FL-20BLB (300nm~420nm)	75.3	56.6	3.2
TOSIBA FL-20B (310nm~650nm)	69.4	64.3	4.4
TOSIBA FL-20SD (370nm~700nm)	73.9	66.7	10.4
TOSIBA FL-20PK (530nm~760nm)	83.3	72.7	31.2

本実験で用いた光源である FL-20BLB (300 ~ 420nm) の表皮細胞層を通過して真皮に届く UVA の透過率は 56.6 % であった。この結果より、太陽光から浴びる想定エネルギーより、線維芽細胞へ照射する人工光源 UVA のエネルギー強度の幅を設定し、1.6 ~ 9.6J / c m<sup>2</sup> のエネルギー量を細胞に照射した。

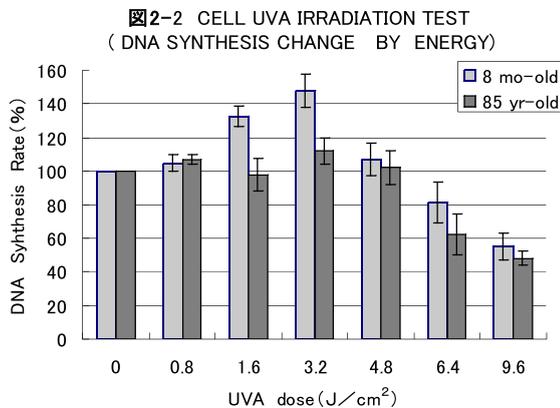
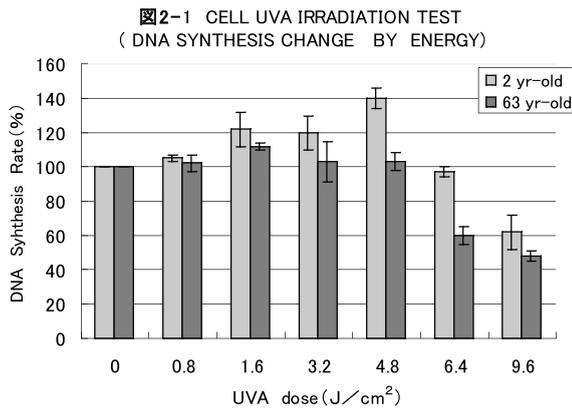
### 2. 被験細胞ならびに培養方法

正常非露光部の切除皮膚組織を用いて培養を行っ

た。若年者皮膚由来細胞 3 例は高齢者皮膚由来細胞 3 例に比べ、明らかに増殖が遅い傾向が見られた。また、細胞の形態は若年者皮膚由来細胞は小型で細長いコンパクトな胞体の形の均一な細胞であったのに対し、高齢者皮膚由来細胞は大型で不揃いの形の細胞が混ざり、胞体が広く多極性の突起をもつ細胞や核周囲に変性顆粒と思われる空胞状の構造物をもつ細胞がより多く観察された。継代を重ねる毎に高齢者皮膚由来細胞ではその出現率が増加した。

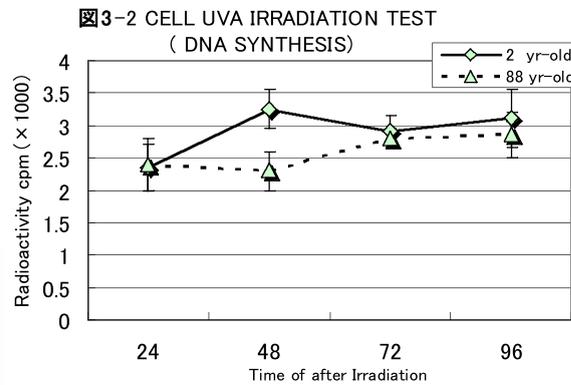
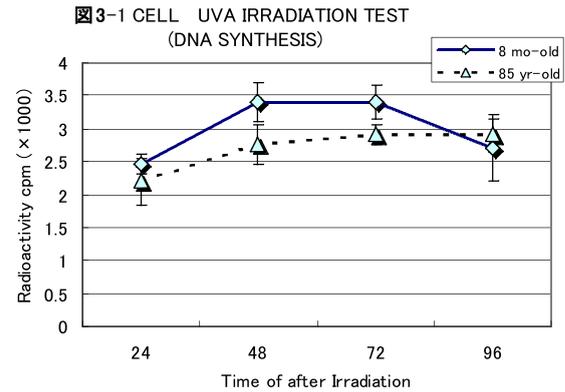
### 3. UVA 照射 DNA 合成（合成量，標識率）

$[^3\text{H}]$ thymidine の取り込みによる DNA 合成活性の比較で無照射細胞に対するエネルギー別 UVA 照射細胞の DNA 合成量の比較を（図 2-1、図 2-2）に示した。若年者皮膚由来細胞は照射後の DNA 合成は高齢者皮膚由来細胞よりも明らかに多く、また照射エネルギーが  $3.2\text{J}/\text{cm}^2$  または  $4.8\text{J}/\text{cm}^2$  付近で DNA 合成が増加する傾向が見られた。両細胞とも  $6.4\text{J}/\text{cm}^2$  以上では大きく DNA 合成量が減少した。



$1.2\text{J}/\text{cm}^2$  照射後の DNA 合成量の経時的変化の比較を（図 3-1、図 3-2）に示した。若年者皮膚由来細胞では DNA 合成量が特に 48 時間後に増加す

る傾向が見られた。高齢者皮膚由来細胞では照射による DNA 合成の増加はほとんど見られなかった。



ラジオオートグラフィーによる UVA 照射後の DNA 合成陽性細胞比（Labelling Index : LI）の比較を（図 4-1、図 4-2）に示した。DNA 合成量と同じく若年者皮膚由来細胞の LI 値は高齢者皮膚由来細胞よりも明らかに高い傾向が見られ、また照射後の明らかな増加を示したのは若年者皮膚由来細胞であり高齢者皮膚由来細胞のいずれの照射エネルギーにおいても有意な LI 値の増加は見られなかった。

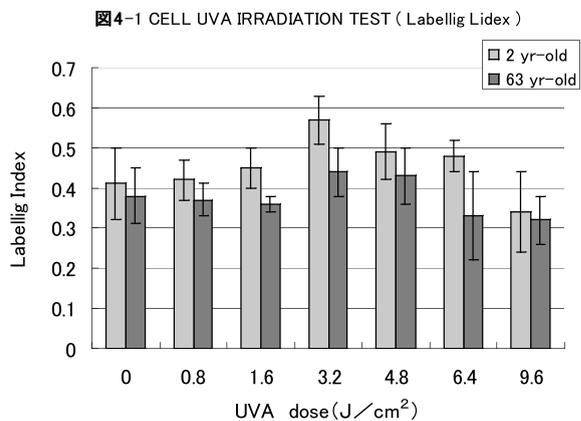
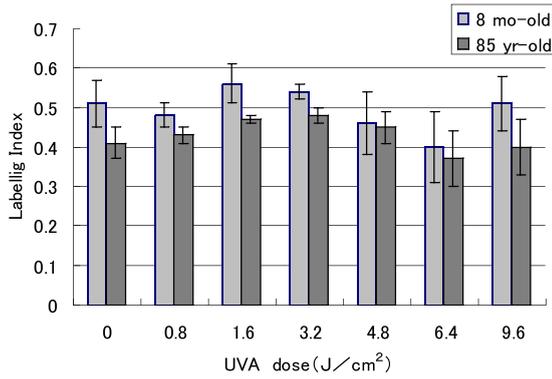


図4-2 CELL UVA IRRADIATION TEST ( Labellig Lidex )



UVA 照射後の若年者皮膚由来細胞および高齢者皮膚由来細胞のラジオオートグラフィー像を (図 5-1。図 5-2) に示した。

Radioautography of Cultured Skin Fibroblast Cells after UVA Irradiation. (HE × 100)

図 5-1 (2yr-old)

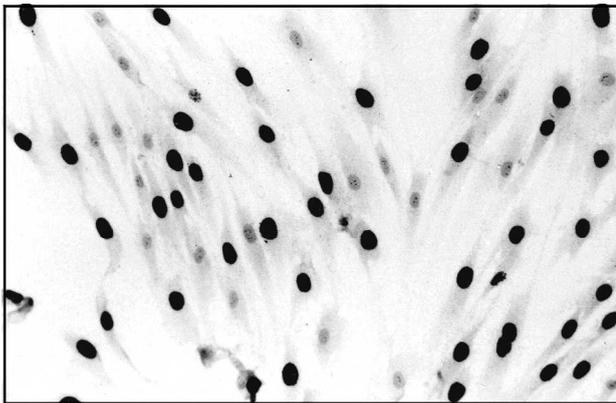
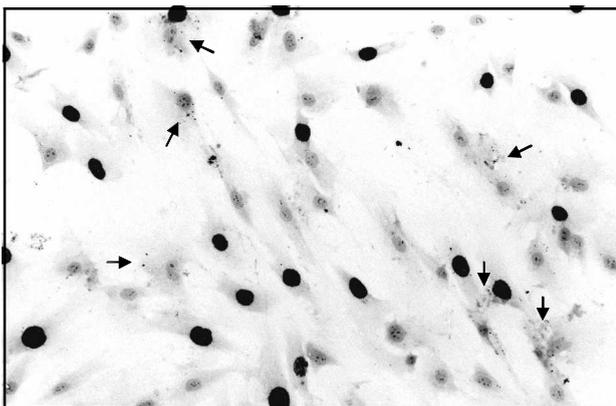


図 5-1 (63yr-old)



#### 4. UVA 照射 Collagen 合成 (Collagen 合成量, 非 Collagen 合成量, Collagen 合成率)

##### 1) collagen 産生能

L- [2, 3-<sup>3</sup>H] proline の取り込みによる若年者と高齢者各細胞のエネルギー別 UVA 照射細胞の Collagenous Protein 合成量の放射活性による比較

を (図 6-1。図 6-2) に示した。高齢者皮膚由来細胞の Collagenous Protein 合成の絶対量は若年者皮膚由来細胞と比べ明らかに低く、88yr-old の細胞では 40 %以下であった。UVA 照射後の Collagenous Protein 合成はいずれの細胞も照射エネルギーが 1.6J/cm<sup>2</sup>または 3.2J/cm<sup>2</sup>で増加が見られた。また、その増加率は若年者皮膚由来細胞では最大で約 1.5 倍であったのに対し、高齢者皮膚由来細胞では最大約 1.3 倍程度であった。各細胞とも 6.4J/cm<sup>2</sup>の照射で Collagenous Protein 合成量が大きく減少した。

図6-1 CELL UVA IRRADIATION TEST (collagenous protein)

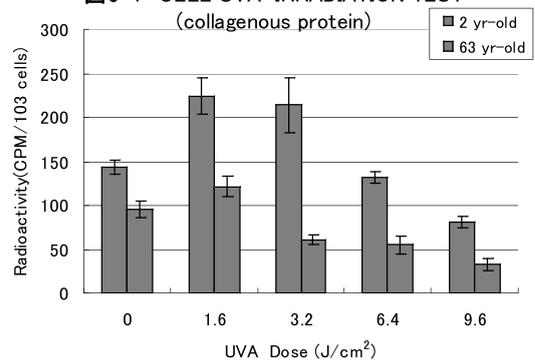
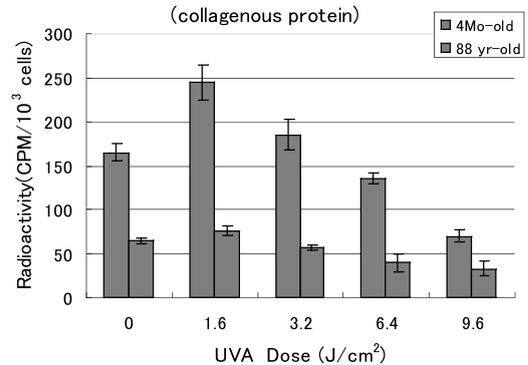
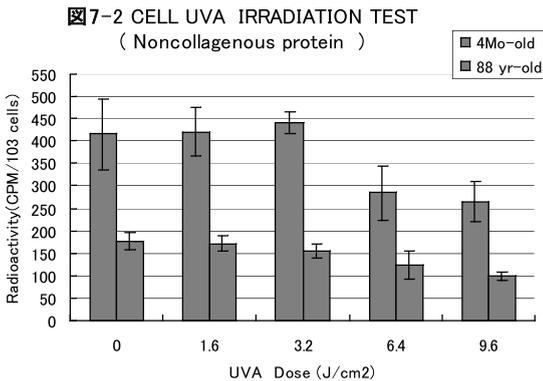
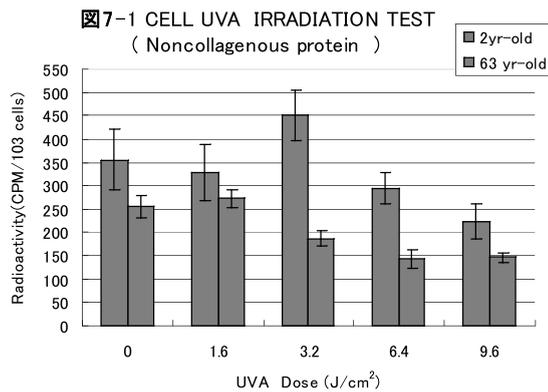


図6-2 CELL UVA IRRADIATION TEST (collagenous protein)



##### 2) 非 Collagen protein 産生能

若年者と高齢者各細胞の L- [2, 3-<sup>3</sup>H] proline の取り込みによる、エネルギー別 UVA 照射細胞の非 Collagenous Protein 合成量の放射活性による比較を (図 7-1。図 7-2) に示した。高齢者皮膚由来細胞の非 Collagenous Protein 合成絶対量は若年者皮膚由来細胞と比べ明らかに低く、特に 88yr-old の細胞では Collagenous Protein 合成絶対量と同じく約 40 %であった。UVA 照射後の非 Collagenous Protein 合成は Collagen Protein のように照射エネルギーが 1.6J/cm<sup>2</sup>または 3.2J/cm<sup>2</sup>での有意な増加が見られず、各細胞とも 6.4J/cm<sup>2</sup>以上の照射で非 Collagenous Protein 合成量が大きく減少した。



### 3) Collagen 合成率

L- [2, 3-<sup>3</sup>H] proline が取り込まれて産生された総タンパク中の Collagen の相対合成活性を次の算式により求めた。

$$(C\%) = CP / (CP + 5.4 \times NCP) \times 100$$

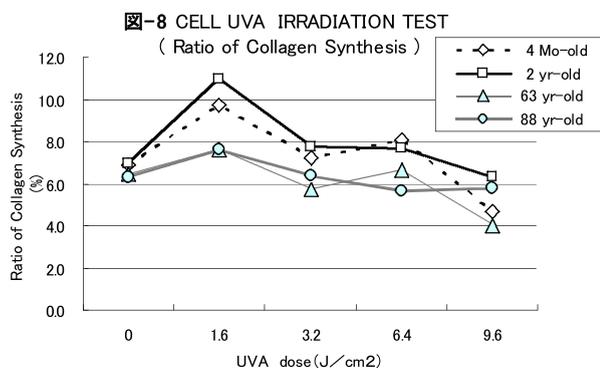
C%: 全タンパク室の合成量に対する collagen の相対合成活性

CP: collagen タンパクの放射活性

NCP: 非 collagen タンパクの放射活性

(5.4 はイミノ酸含有量の補正係数)

若年者および高齢者由来細胞の相対合成活 (C%) と UVA 照射後の変化を (図 8) にまとめて示した。



若年者および高齢者由来細胞とも UVA 照射なしでの Collagen の相対合成活性はいずれも 6.3 ~ 6.9

%であり、年代差による明らかな差は見られなかった。しかし、UVA 照射後の Collagen の相対合成活は若年者由来細胞では特に 1.6J/c m<sup>2</sup> 照射で約 40 ~ 60%の増加が見られた。3.2J/c m<sup>2</sup>と 6.4J/c m<sup>2</sup>照射では明らかな変化は見られなかったが、9.6J/c m<sup>2</sup>では減少傾向が見られた。これに対し、高齢者由来細胞は 1.6J/c m<sup>2</sup> UVA 照射で約 20%の増加が見られたが、3.2J/c m<sup>2</sup>に以上の照射では減少傾向が見られた。

## 考 察

20 世紀の後半に明らかとなった我々地球生物の生命維持に大きく関与する環境問題の一つにオゾン層の破壊が挙げられる。オゾン層は対流圏(0 ~ 約 11km)の更に上層の成層圏(約 11km ~ 50km)に存在し、高度が約 25km 付近が最大濃度であるとされているが、その厚みを 1 気圧の状態に換算すると僅か数ミリと極めて薄い層である。そのオゾン層は産業革命以降、人類が作り出した人工化学物質(主にフロンガス類)が成層圏まで達し、太陽紫外線との反応によりオゾンが連鎖的に破壊されて年々その厚みは減少し続けている。特定フロンは 1995 年から製造が禁止されているが、これまで製造されたガスにより今日でも破壊が進み、オゾンホール拡大のピークは 2020 年までに訪れるとされている。今日、我々が予防医学の観点から太陽紫外線の皮膚への作用を正しく捉え認識し、正しく対応することは皮膚癌、光皮膚炎やアレルギー、光老化(シミ、シワ)を予防し、若々しく健康に生きるために重要である。本研究では、ヒトの新鮮皮膚を用いて、各種人工光源を照射し、皮膚の真皮まで到達する最大強度の紫外線量を求め、そのエネルギー強度の光を照射光源に設定した。紫外線の照射抗原は中でも特に皮膚組織の透過性が高く、真皮組織の変性に関与するとされる UVA 光源 (Black Light) 用いた。使用した細胞は生体での紫外線暴露履歴の影響を考慮して非露光部位に限定し、若年者と高齢者の植皮部の余剰辺縁部や母斑切除周辺の健全部真皮より Fibroblast を培養し、その細胞を継代増殖させて検討した。この点、本実験に使用した細胞はドナーの癉年代を反映している正常細胞として考えられる。Berneburg<sup>8)</sup>らは健康人に紫外線 (UVA) の 2 週間反復照射を行い、皮膚と血液標本の RT-PCR 法変異遺伝子を調べている。その結果、特に細胞器官のミトコンドリア(mt)の DNA に変異が主に表皮細

胞に生じ、これが紫外線障害暴露の指標になると報告している。本実験で細胞への照射は1回のみ照射であるが、一次的に照射エネルギーが  $3.2\text{J}/\text{cm}^2$  または  $4.8\text{J}/\text{cm}^2$  付近で DNA 合成の増加が見られた。ラジオオートグラフィーでの細胞質内での露光は若年者の細胞ではほとんど観察されなかったが、高齢者由来細胞では散在性に銀粒子が観察された (図 5-1 矢印)。このことは若年者の細胞では mtDNA の変異を起こしにくい、高齢者では変異に関して起こし易く、紫外線障害が蓄積し易いと考えられた。生体が年をとるプログラムメカニズムはテロメラーゼ遺伝子が関与する部分であるが、皮膚が年をとる要素はそれに加え、大きく Physiopathological なメカニズムが大きく関与すると考える。その付随的な要素では紫外線の他に喫煙等により体内に取り込まれる活性酸素種、Free Radical が大きく関与しているとの報告がある<sup>9)</sup>。UVB は主に直接皮膚の細胞の DNA 鎖に障害を与えるが、UVA の細胞障害作用は主に活性酸素種、Free Radical による細胞障害であるとされており、その中でも特に一重項酸素の発生量が時間/線量で大きく変化し影響すると報告されている<sup>10)</sup>。特に活性酸素種、Free Radical は年齢が進むとその消去に関連する Antioxydant 系酵素等が減少することで、その防御機能や回復機能の衰退を引き起こすとされている。このことは、高齢者に紫外線障害が起こり易く皮膚癌の発症が多いことにそのまま関連するものであり、本検討結果の高齢者の細胞が UVA 照射後の DNA 合成量と Labelling Index の増加率が低かったことと関連して解釈できる。また、UVB でなく UVA で不定期 DNA 合成が増加したことは、裸の細胞という in vitro 条件であったこと、また、使用した光源 (Black Light) に特性波長域の裾にあたる僅かに含まれる UVB が関与したとが考えられる。

Wang ら<sup>11)</sup>は表皮に UVB が照射されると表皮角化細胞は UVA が照射された真皮 Fibroblast が MMP-1 (matrix metalloproteinase:主に I 型コラーゲンを分解する酵素)の産生を促進する Cytokine (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ )を分泌すると報告している。また Herrmann らは皮膚への UVA 照射がその MMP-1, 2, および 3 を活性化しそのアンバランスが皮膚の光老化につながるとしている<sup>12)</sup>。本研究では表皮細胞との相互作用や MMP 量の検討してないが、一定のエネルギー量の UVA を照射することで Collagen 合成および相対合成活性が上昇するメカニズムと

MMP-1 の産生が活性化されることは、紫外線による真皮組織に退行変性である架橋・変性等の処理という光老化の防衛を関連すると考える。

通常、我々は日常生活において長期間低エネルギー量の紫外線暴露を受け、その結果として光老化が皮膚に現れる。Kambayashi ら<sup>13)</sup>は慢性の低投与量 UV 照射の皮膚への効果を調査するため、ヘアレスマウスに 1/3MED の紫外線 (UVB ( $20\text{mJ}/\text{cm}^2$ ) と UVA ( $14\text{J}/\text{cm}^2$ )) を 10 週間投与し、24 週間観察している。その結果、4 週間の照射の後にシワが顕著に出現し、その真皮組織の Collagen や弾性線維の組織学的変性と Hydroxyprolin 量を調べた結果、明らかな変化はみられなかったとしている。そして、この点から慢性の低エネルギーの光老化は主に表皮構成組織細胞変化が原因であると報告している。この研究報告から考えると紫外線による真皮組織の変化は起こりにくく、光老化の主因からは除外される様にも思われる。しかし、高齢者の特に屋外労働者の真皮組織を組織学的に観察するとき、明らかな Collagen や弾性線維の組織学的変性像が観察される。Yamauchi ら<sup>14)</sup>は 60 歳以上の 9 人露光部皮膚と非露光部皮膚を生化学的に比較検討し、真皮組織の Collagen の分子架橋に関連する物質である酸性熱安定化合物 Histidinohydroxylysinonorleucine が露光部で増加していると報告している。この事実は本研究結果において、高齢者の真皮構成細胞では紫外線などの物理的刺激に対する応答が弱く、防御能が低下していた現象と併せると理解可能である。光老化に関して、動物実験系で行う場合は老齢動物を使用することで、その結果は異なると推察される。光老化現象の研究対象は主に高齢者であることから、個体レベルや細胞レベルにおいても高齢者の生理機能状態を考慮し、反映させた実験プログラムで行うことが重要であると考えられる。

## 結語

本検討結果より次の点が明らかとなった。

- 1) UVA 光源はヒトの表皮を通過して 50 %以上が真皮に到達する。
- 2) 我々が日常浴びるある閾値までの低エネルギーの UVA に真皮細胞が暴露された場合でも、不定期 DNA 合成が誘発され、また collagen 合成反応も活性化される。
- 3) 高齢者の真皮構成 Fibroblast は若年者と比べ、2) の応答が非露光部細胞でも低下しており、光老化の研究において、この点の考慮が必要である。

### Abstract

Light transmission test of the skin each level of ultraviolet rays was done by using a human fresh skin of 50  $\mu$  m for the irradiation energy setting, and it experimented based on the measurements. Moreover, youngs (2 yr-old old, 8 mo-old, 4 mo-old) and seniors (63 yr-old and 85 yr-old, 88 yr-old) explant culture of fibroblast is done from dermis and the cell has been proliferated. UVA was irradiated to the fibroblast to examine giving of the UVA irradiation to a young's cell and the senior's cell about the influence and the influence was researched. When the epidermal layer of the UVA source of light was transmitted energy was 56.6%. Energy strength 4000  $\mu$  w/cm<sup>2</sup>/sec of UVA of the maximum amount presumed for us to be exposed at fine weather was irradiated to each cell. To see the change in DNA synthesis, the measurement of the influence by the UVA irradiation to the cell did the measurement of the amount of total DNA and unschedule DNA synthesis measurement examination by the radioautograph by up-taking <sup>3</sup>H-thymidine. Additionally, to see the change in the collagen synthesis, the Collagen synthesis reaction by the Collagenase digestion method was examined with up-taking <sup>3</sup>H-Propine. As a result, a significant synthetic amount of DNA and the decrease at a synthetic rate are seen in the senior's cell in the comparison of the young's cell and the senior's cell, and unschedule DNA synthesis respons (labelling index) by the UVA irradiation has decreased too. The decrease in significant collagen synthesis revitalization was seen by the senior's cell in the comparison concerning the collagen synthesis. A clear increase response after it irradiated it was seen in the young's cell and, however senior's cell was not seen increase. When the skin received the trouble from this research results to UVA by the exposure, significantrly the senior's cell low became clear with senior's cell compared with young's cell as for unschedule DNA synthesis respons and collagen synthesis.

### 引用文献

1) Yokoyama Yoko and Ishikawa Osamu (2001) The effects of UVA irradiation on the metabolism of extracellular matrices in human dermal

fibroblast. *Photomedicine and Photobiology* 23: Page71-72

- 2) 横山洋子, 石川治, 宮地良樹 (2002) 三次元培養系を用いた UVA 照射によるヒト真皮由来線維芽細胞の I 型コラーゲン及びグリコサミノグリカンの変動の解析. *日皮会誌* 112(7):953-959
- 3) 芋川玄爾, 塚原和枝 (2002) 光老化によるシワの形成機序とその予防. *BIO Clinica* 17(12):1070-1074
- 4) 天野聡, 西山敏夫 (2003) 皮膚光老化における皮膚傷害とその制御. *細胞* 35(4):140-143
- 5) ChungJin Ho, SeoJin Young, ChoiHai Ryung, et al (2003) Modulation of skin collagen metabolism in aged and photoaged human skin in vivo. *基礎老化研究* 27(2):88
- 6) Peterkofsky B., Diegelmann R. (1971) Use of amixture of protease-free collagenase for the specific assay of radioactive collagen In the presence of other proteins. *Biochemistry* 10: 988-994
- 7) Hata R., Ninomiya Y., et al (1980) Biosynthesis of interstitial types of collagen by albumin-Producing rat liver parenchymal cell (hepatocyte) clones in culture. *Biochemistry* 19:169-176
- 8) Berneburg M, Plettenberg H, Medve-Konig K, et al (2004) Induction of the photoaging-associated mitochondrial common deletion in vivo in normal human skin. *J Invest Dermatol.* 122(5):1277-1283
- 9) Passeron T, Ortonne JP (2003) Skin ageing and its prevention. *Servicede dermatologie* 27;32(31):1474-1482.
- 10) Berneburg M, Grether-Beck S, Kurten V, et al (1999) Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging associated mitochondrial common deletion. *JBiol Chem.* 28;274(22):15345-15349.
- 11) Wang X, Bi Z, Chu W, et al (2005) IL-1 receptor antagonist attenuates MAP kinase/AP-1 activation and MMP1 expression in UVA-irradiated human fibroblasts induced by culture medium from UVB-irradiated human skin keratinocytes. *Int J Mol Med.* 16(6):1117-1124.
- 12) Herrmann G, Wlaschek M, Lange TS, et al (1993) UVA irradiation stimulates the synthesis of various

matrix-metalloproteinases (MMPs) in cultured human fibroblasts. *Exp Dermatol.* ;2(2):92-97.

- 13) Kambayashi H, Yamashita M, Odake Y, et al (2001) Epidermal changes caused by chronic low-dose UV irradiation induce wrinkle formation in hairless mouse. *J Dermatol Sci.* 27 (1):19-25.
- 14) Yamauchi M, Prisyanyh P, Haque Z, et al (1991) Collagen cross-linking in sun-exposed and unexposed sites of aged human skin. *J Invest Dermatol.* 97(5):938-941.