

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月17日現在

機関番号：82602

研究種目：基盤C 一般

研究期間：H22～H24

課題番号：22590570

研究課題名（和文）紫外線B波による皮膚微小循環障害の生理機序解明とその予防に関する研究

研究課題名（英文）The bioimaging of acute effects on the cutaneous microcirculation by UVB exposure

研究代表者

牛山 明 (AKIRA USHIYAMA)

国立保健医療科学院 生活環境研究部・上席主任研究官

研究者番号：60291118

研究成果の概要（和文）： 太陽光に含まれる紫外線 B 波(UVB)は、オゾン層の減少に伴い地表への到達量が増加しており、UVB からの保護は保健衛生学上、非常に重要である。本研究では蛍光指示薬を用いて、一酸化窒素 (NO) と活性酸素種 (ROS) の生体内リアルタイムイメージングを行い、その発生機序や皮膚における産生部位などについて調べた。蛍光指示薬については *in vitro* 実験では多くの活用例が示されているものの、動物の生体内イメージングではほとんど例がなく新規な知見が得られた。また、UVB によって亢進する白血球の内皮への相互作用については、P-セレクチンがその主要な役割を担っていることを明らかにした。さらに、ビタミン E、緑茶由来カテキン混合物の事前経口投与により、ROS の発生や白血球内皮間相互作用が抑制され、これらの事前投与が紫外線の短期影響に抑制効果を持つことを示した。

研究成果の概要（英文）： OBJECTIVE: We previously demonstrated that ultraviolet B (UVB: wave length 280 - 315 nm) irradiation to mouse skin induced acute microcirculatory effects, i.e., vascular dilation, increase in vascular permeability and leukocyte-endothelial interaction, which was caused by reactive oxygen due to UVB. The objective of the present study was to evaluate effects of anti-oxidants such as vitamin E (VE) and green tea catechins (GTC) on leukocyte-endothelial interactions by UVB irradiation (UVBIR) using the mouse-dorsal skin chamber (DSC) as an experimental model.

METHODS: DSCs were installed to female hairless HR-1 mice by surgical procedure at least 72 hours prior to the experiment. We examined 4 experimental conditions; UVBIR only, anti P-selectin antibody treatment+UVBIR, VE administration+UVBIR and GTC administration+UVBIR. To visualize the leukocytes behaviors *in vivo*, a bolus of rhodamine 6G solution was injected into tail vein prior observation. Before and after UVBIR (240 mJ/cm²) to the skin within the chamber, fluorescent images at the same microvasculature were recorded by using a fluorescence microscopy under conscious conditions. Off-line analysis of the leukocyte-endothelial interaction was done by counting numbers adhering and rolling leukocytes within venules for 30 sec per unit area. VE was administrated twice a day (25 μ l/each) for 3 days and 1 hour before the UVBIR via feeding tube. Dissolved GTC in water (10mg/each) was administrated 1 hour before the UVBIR via feeding tube. RESULTS: The mean value of rolling leukocytes number was significantly higher in the venules at 6 hours after UVBIR than that in pre-UVBIR. This increase was suppressed when anti-mouse P-selectin antibody was injected into tail vein prior to UVBIR. When VE or GTC was administrated prior to UVBIR, increase of rolling leukocytes number was also suppressed.

CONCLUSIONS: Our findings suggest that the administrations of anti-oxidants show the preventive effect on UVB induced leukocyte-endothelial interaction which is mainly mediated by P-selectin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	0	1,400,000
2011年度	1,100,000	0	1,100,000
2012年度	1,000,000	0	1,000,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	0	3,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：(1) 衛生 (2)環境生理 (3) 微小循環 (4) 紫外線 (5) バイオイメージング (6) 抗酸化物質

1. 研究開始当初の背景

太陽光に含まれる紫外線(UV)は、その波長により UVA (320~400nm)、UVB (280~320nm)、UVC (280nm 以下)に分類される。このうち、UVA はオゾン層に吸収されることなく地表に届き、UVC は大気を通過できず地表に届かない。一方、UVB はオゾン層量によって地表に届く量変動し、近年ではオゾン層減少に伴いUVBが増加している。国連環境計画の試算では、1%のオゾン層減少はUVBを2%増加させ、その結果皮膚がん、白内障等が3~6%増加するとされており、UVBの防護は非常に重要である。しかしUVBによる皮膚障害の機序に関しては不明な点も多い。

UVBは波長が短く高エネルギーを持つため、一般的に強い皮膚細胞障害を生じることが知られている。UVB照射で惹起される障害作用としては、DNA傷害、皮膚がんの発生、活性酸素の産生、細胞アポトーシスの誘導、一酸化窒素の産生などに関する知見が数多く報告されてきた。これらの研究の実験系としてはケラチノサイト培養細胞を用いたものが比較的多い。しかし実際の生体内では多くの分化細胞が組織を形成しており、それらの細胞間のクロストークを明らかにするためには動物実験は必要不可欠である。とりわけ、個体でしか観察できない高次元の機能である血液循環については、動物実験の果たす役割は大きい。血液循環研究分野において、「生体顕微鏡的観察法(intravital microscopy)」と呼ばれる手法の一つである「背側皮膚透明窓(Dorsal Skinfold Chamber:DSC)」は、皮膚の同一血管床を長期間に亘って観察が可能である点で優れている(Jain RK et al., Nat Rev Cancer. 2002)。申請者らは従来の金属製のDSC用フレームを改良し、軽量の樹脂製のDSC用フレームを作成し、そのDSC内の毛細血管レベルの微細な血液循環(微小循環)の動態について基礎的なデータを取得し

てきた(Ushiyama A. et al., Microvascular Res., 2004)。また、従来の顕微鏡に様々な装置を組み合わせ、DSC内微小血管の形態的観察のみならず微小生理環境をイメージングの手法で明らかにする技術を導入している。また申請者は紫外線研究に多く利用されているヘアレスマウス(HR-1)に本DSCを装着し、皮膚にUVBを照射した際の影響について検討を行ってきた。申請者はこれまでに、DSC内の皮膚にUVBを直接照射することにより、照射後短時間(数分以内)のうちにDSC内の細静脈の一部の血管透過性が大きく亢進することを観察した。一般的に紫外線による(マクロな所見としての)紅斑反応が照射後数時間以降に起こるとされている点から考えると、この短時間の反応がどのように惹起されているのか、さらに紅斑反応との因果関係について考えることは興味深い。この血管透過性反応については、一酸化窒素(NO)合成酵素阻害剤または、活性酸素種(ROS)のスカベンジャーの投与により顕著な抑制効果が見られるという予備的な知見を得ている。このことから、NOおよびROSが血管の透過性に関与をしていることが示唆されるが、その詳細な機序、および、NOやヒドロキシラジカルの皮膚における産生部位や産生能の局在などに関してはこれまでも報告がなく、これをより詳細に明らかにすることは重要である。また、同様の照射で細動脈・細静脈においては数時間にわたる血管の拡張反応ならびに内皮細胞傷害によると考えられる白血球-内皮相互作用の亢進が観察された(2008年日本バイオレオロジー学会)。

本研究ではこれらの科学的・技術的背景を元に、紫外線B波による皮膚微小循環障害の生理機序解明とその予防に関する研究を進めることとした。

2. 研究の目的

本研究では、DSC 法の特徴を活かし、顕微鏡イメージングの技術を用いて、皮膚において UVB 照射により惹起される微小循環系における病態生理的な反応をリアルタイムに観察することにより、生体内 NO および ROS の発生を生体イメージングにより明らかにすることを目的とする。また UVB で惹起されるこれらの反応を抑制する予防的方法について検討し、予防衛生的見地からの科学的知見の集積に資することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究においては、マウス皮膚を紫外線 B 波 (UVB) で刺激した時に見られる生体反応を、生体顕微鏡イメージングによって観察し、反応の機序ならびに障害の予防について検討をおこなった。

本研究ではマウス皮膚微小循環領域の生体顕微鏡的観察を可能にするため、背側皮膚透明窓 (DSC) 法を用いて可視化をおこなった。DSC の装着にあたっては、申請者が開発した樹脂製のフレームを使用した (Ushiyama et al. 2004)。マウスは紫外線研究分野で、多くの研究で使用されているヘアレスマウス (HR-1) を用いた。主たる測定項目は、生体内で発生する一酸化窒素 (NO)、活性酸素種 (ROS)、シグナル、および血管の透過性、白血球-内皮相互作用である。

生体内で発生する NO は DAF-2 (Molecular Probes Inc.) を、活性酸素種は Dihydrorhodamine 123 (Molecular Probes Inc.) を用いた。また血管の透過性は、DITC-Dextran70 (平均分子量 70kDa, Sigma-Aldrich Inc.) で血管造影を行い蛍光色素の漏出により定量化し、また、白血球-内皮相互作用は、Rhodamine 6G を血管内に投与し白血球を選択的に蛍光染色し、一定時間内の血流画像において血管内皮と粘着性を示す白血球をカウントして定量化した。

なお、動物実験の実施にあたっては、国立保健医療科学院動物実験委員会の承認を得ると共に、動物実験に関連する法令、指針、規程を遵守した。

4. 研究成果

(1) UVB 照射後短時間 (数分以内) のうちに DSC 内の細静脈の一部の血管透過性が大きく亢進する現象について、一酸化窒素 (NO) 合成酵素阻害剤または、活性酸素種 (ROS) のスカベンジャー (消去剤) の前投与により濃度依存かつ顕著な抑制効果が見られることを見いだした。このことから、NO および ROS が血管の透過性に関与をしていることが示唆された。また、シクロオキシゲナーゼ阻害剤の投与によっても同反応は抑制された。以上の結果は、照射後短時間で起こる現象において、いわゆる紅斑反応の発生機序として

提唱されているシグナルカスケードと同様のカスケードが作用している可能性が高いことを示した。

(2) 蛍光指示薬を用いて、NO と ROS の生体内リアルタイムイメージングを行い、その発生機序や皮膚における産生部位などについて調べた。蛍光指示薬については *in vitro* 実験では多くの活用例が示されているものの、動物の生体内イメージングではほとんど例がなく、様々な指示薬ならびに投与の方法を検討し以下の点を明らかにした。

NO の産生イメージングには DAF-2DA を尾静脈から投与することが最適であった。設定した条件下において、紫外線を照射すると即時的に血管径 $80\mu\text{m}$ 程度の細動脈の血管内皮で局所的に NO が産生されることがわかった。

ROS の産生イメージングには実験直前に Dihydrorhodamine 123 (DHR) を DSC 内に滴下し過剰な試薬を洗浄除去する方法が最適であった。設定した条件下において、紫外線を照射すると即時的に皮膚組織で ROS が産生することを蛍光シグナルの増強として捉えることができた。またこのシグナルは活性酸素消去剤の投与により抑制されることから、活性酸素特異的なシグナルであることが示唆された。

(3) UVB 照射後に照射部位の皮膚の微小血管において、粘着白血球数の増加がみられ、紫外線照射後 6 時間で有意な増加として検出が可能であった。エックス線照射の実験で P-selectin 分子が照射後に内皮に発現し白血球と血管内皮間の粘着現象を司ることが知られている。本研究では、抗 P-selectin 抗体をマウス血管内に事前投与し、UVB 照射をおこなった場合に粘着白血球数の増加が阻害された。このことから UVB による粘着白血球数の増加は、UVB 照射後に血管内皮上に発現する P-selectin が大きく関係している可能性が明らかになった。

(4) UVB 照射に関連して増加する ROS の蛍光シグナル、および粘着白血球数の増加が、抗酸化物質の事前投与で予防できるかを検討した。抗酸化物質としては、ビタミン E ((±)- α -トコフェロール (和光純薬))、緑茶由来カテキン混合物 (和光純薬) に関して検討をおこなった。紫外線照射により DHR123 の蛍光輝度値が対照群に比べて有意に上昇するが、ビタミン E 投与群では対照群に比して蛍光輝度値の上昇が抑制される例が観察された。またカテキン混合物投与群でも同様であった。

また、UVB 照射による粘着白血球数の増加について、ビタミン E 投与群、カテキン混合物投与群ではその増加の抑制が認められた。以

上よりビタミンEの投与は紫外線の初期反応に対して十分な予防効果があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

(1) 中込 哲, 牛山 明, 小笠原裕樹, 石井一行, 浅野牧茂, 大久保千代次. UVB 照射によるマウス皮膚微小血管床における急性炎症反応に関する研究. 生体医工学学会誌 48(1):42-8, 2010 (査読有)

[学会発表] (計3件)

(1) 牛山 明, 大澤知佳, 藤田詩織, 諏訪朋美, 大澤正子, 石井一行, 浅野 牧茂. Effects of the administration of anti-oxidants on ultraviolet B-induced leukocytes adhesion in the mouse dorsal skinfold chamber, 第38回日本微小循環学会総会, 2013. 2. 8-9, 東京, . 同予稿集

(2) 牛山 明, 大澤知佳, 藤田詩織, 諏訪朋美, 石井一行, 浅野 牧茂. マウス皮膚微小血管床のUVB照射即時反応におけるビタミンEの予防効果. 第24回ビタミンE研究会, 2013. 1. 11-12, 東京, 同予稿集

(3) 牛山 明, 中込 哲, 小笠原裕樹, 石井一行, 浅野牧茂, 大久保千代次. 紫外線B波照射で惹起されるマウス皮膚微小血管の急性炎症反応に関する研究. 第47回全国衛生化学技術協議会年次総会. 2010. 11. 11-12, 神戸, 同要旨集, p. 264-265

[図書] (計1件)

牛山 明 電磁波・放射線 (項目分担), 室内環境学会 編, 室内環境学概論, 東京電機大学出版局, 2010年11月, p146-152

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牛山 明 (国立保健医療科学院・生活環境研究部・上席主任研究官)

研究者番号: 60291118

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし