

Zn化合物の局所投与による紫外線誘導皮膚傷害の抑制

— *In vivo* real-time chemiluminescent assay —

安井 裕之, 三品 和弘, 桜井 弘

(京都薬科大学・代謝分析学教室*)

Suppression of UVA-induced skin damage by topical application of zinc(II) chloride

— *In vivo* real-time chemiluminescent assay —

Hiroyuki YASUI and Hiromu SAKURAI

Department of Analytical and Bioinorganic Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University

Recent increase of ultraviolet (UV) lights owing to the increase of ozone hole may induce enhancement of the skin damage in all living systems on the earth. The harmful effects of UV exposure on the skin are supposed to associate with the generation of reactive oxygen species (ROS), however, no direct proof of ROS production in the skin under UV exposure was established. Recently, we reported first the *in vivo* detection and imaging of ROS generation in the skin of live hairless animals following UVA exposure, using both the sensitive chemiluminescent probe (CLA) and the ultralow-light imaging apparatus with a CCD camera. It was proposed that $\cdot\text{O}_2^-$ is formed spontaneously and $^1\text{O}_2$ is generated by UVA exposure in the skin of live mice. The method was applied to find suppressive agents against skin damage by UVA exposure. The topical application of zinc(II) chloride suppressed the ROS generation induced by UVA exposure even after the removal of Zn(II) from the skin. The mechanism for suppression of skin damage by Zn(II) is now under investigation.

オゾン層の破壊により形成されたオゾンホールは、2000年9月に観測史上最大の大きさ（2830万 km²）となった。オゾンホールの拡大は紫外線量の上昇を伴い、皮膚傷害や皮膚ガンの発生が懸念される。皮膚は、太陽紫外線の影響を最も顕著に受ける器官であり、また大気中の酸素に常に接触しているため、皮膚での活性酸素種（ROS）の形成は避けることのできない化学反応である。最近、皮膚で発生するROSが、紫外線による過度の日焼けや光アレルギーなどの皮膚損傷だけでなく、皮膚ガンの発症やアトピー性皮膚炎などの皮膚疾患に関与することが提案されている。しかし、生きている動物皮膚中でROSが実際に検出された報告はなく、ROSの生成機構と皮膚傷害との関係については未解明であった。そこで、我々は、紫外線を浴びたヒト皮膚中で発生するROSを直接検出することを目指して、まず、生きている動物皮膚中でROSの化学発光にもとづいた画像化分析法を研究した。その結果、微弱光測定装置を用いることにより、生きているマウスの皮膚で生成されるROSをリアルタイムで検出および定量化することに初めて成功した^{1, 2)}。そこで、次の段階として、紫外線照射により皮膚組織で誘導されるROSを指標として、皮膚傷害抑制物質を探索することとした。本論文では、Zn(II)が紫外線により誘導されるROSの生成を抑制して、皮膚傷害を抑制する研究成果を報告する。

*所在地：京都市山科区御陵中内町5（〒607-8414）

実験方法

微弱光測定は、すでに報告¹⁾した方法を用いた。すなわち、ROSとの反応により発光する高感度の化学発光プローブ (CLA)³⁾を用い、化学発光の測定には高感度CCDカメラを装備した微弱光測定装置 (NIghtOWL LB981, ワラックベ ルトールド)を用いた。実験動物には、6週令の雌性ヘアレスマウスを用いた。紫外線 (UVA) 照射 ($100 \text{ mW/cm}^2 \times 3 \text{ min}$; 18 J/cm^2) には、Supercure RUVF-203S (三永電子)を用いた。

ヘアレスマウスをペントバルビタールで麻酔し、腹部皮膚に塩化亜鉛(II) (ZnCl_2) を塗布した。 Zn(II) の塗布量として、薬局方によるZn軟膏の1回塗布量の1/2に相当する $40 \mu\text{g Zn}/5 \text{ cm}^2$ を用いた。 ZnCl_2 塗布30, 60, および180分後に皮膚表面上に残存する ZnCl_2 をガーゼで除去した。さらに、UVAを照射した後、直ちにCLAを照射部の皮膚に塗布して微弱光の測定を開始した。ROSの生成量に依存した化学発光量の変化から、 Zn(II) の抑制効果を評価した。

また、UVA照射1日後の肉眼的観察により、皮膚表面の浮腫に対する Zn(II) の抑制効果を測定した。

結果と考察

UVA照射による化学発光量の増大 (Fig. 1) と皮膚表面の浮腫 (data not shown) はともに ZnCl_2 を塗布することにより有意に抑制された。 Zn(II) による発光抑制の効果は、 ZnCl_2 塗布後の時間経過に依存した。すなわち、 ZnCl_2 塗布30分後に ZnCl_2 を除去するとUVA照射時における発光抑制効果は消失するため、 ZnCl_2 塗布30分後では皮膚表面上にわずかに残存する Zn(II) がフィルター効果を示し皮膚を保護していると推定した。一方、 ZnCl_2 塗布60分および180分後に ZnCl_2 を除去すると発光抑制効果は持続するため、 ZnCl_2 塗布60分および180分では皮膚組織中に浸透した Zn(II) がROSの生成を減少させ皮膚傷害を抑制していると考えた (Fig. 2)。

Zn(II) が抗酸化性⁴⁻⁶⁾や抗炎症性を有することはすでに報告されている。今回のUVA誘導-ROS生成に対する Zn(II) の抑制機構は、現在のところ明らかでないため、今後の研究課題にする予定である。

以上の結果から、化学発光にもとづいたROS生成を指標として画像解析する本法を用いれば、皮膚傷害抑制物質の探索は可能ではないかと提案する。

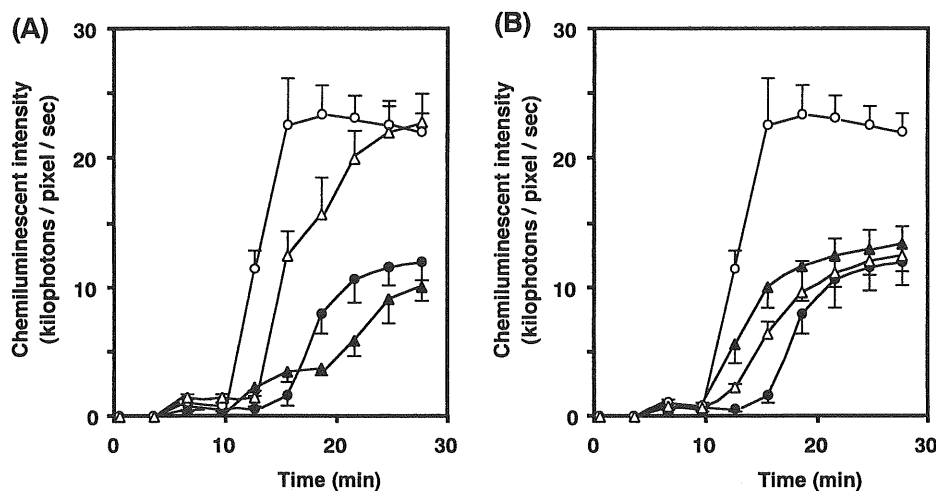


Fig. 1 Suppressive effect of ZnCl_2 application on ROS generation in the skin of hairless mice (A) removal effect of ZnCl_2 after ZnCl_2 application ($40 \mu\text{g Zn}/5 \text{ cm}^2$) for 30min and (B) removal effect of ZnCl_2 after ZnCl_2 application ($40 \mu\text{g Zn}/5 \text{ cm}^2$) for 60min ($n=3-7$). Each symbol represents as follows: (○): UVA-exposure, (△): ZnCl_2 application and UVA-exposure, (●): no UVA-exposure (intrinsic level), and (▲): ZnCl_2 application alone.

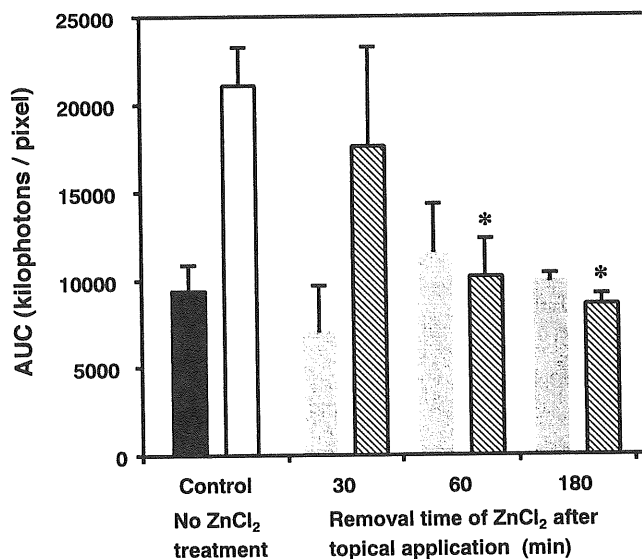


Fig. 2 Area under the curve (AUC) of the chemiluminescent intensity due to ROS generation in the skin of hairless mice treated with ZnCl₂ and UVA-exposure. Control groups represent the data in the skin of hairless mice without treatment of ZnCl₂. The skin was exposed to UVA light after removal of ZnCl₂ (40 μg Zn/5 cm²) applied for 30, 60, and 180 min (n=3-7). Each column represents as follows: (■): no UVA-exposure (intrinsic level), (□): UVA-exposure, (▨): ZnCl₂ application alone, and (▩): ZnCl₂ application and UVA-exposure. Significance level; *p<0.01 vs control group.

文 献

- 1) H. Yasui and H. Sakurai (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. **269** : 131.
- 2) 桜井 弘, 安井裕之 (2001) 現代化学 **8** : 45.
- 3) N. Gotoh and E. Niki (1994) Methods Enzymol. **233** : 154.
- 4) T.M. Bray and W.J. Bettger (1990) Free Rad. Biol. Med. **8** : 281.
- 5) D. Bagchi, M. Bagchi, and S.J. Stohs (1997) Gen. Pharmacol. **28** : 85.
- 6) S.R. Powell (2000) J. Nutr. **130** : 1447S.
- 7) M.P. Zago and P.I. Oteiza (2001) Free Rad. Biol. Med. **31** : 266.