



## Photodynamic DNA-breaking activity of sera from patients with various photosensitivity dermatoses

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 橋爪, 秀夫 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1486">http://hdl.handle.net/10271/1486</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 209号	学位授与年月日	平成 7年 6月16日
氏 名	橋 爪 秀 夫		
論文題目	Photodynamic DNA-breaking activity of sera from patients with various photosensitivity dermatoses (日光過敏症皮膚疾患患者血清の光誘発性 DNA 切断活性)		

博士(医学) 橋 爪 秀 夫

## 論文題目

Photodynamic DNA-breaking activity of sera from patients with various photosensitivity dermatoses

(日光過敏症皮膚疾患患者血清の光誘発性DNA切断活性)

## 論文の内容の要旨

### 【目的】

日光過敏症をおこす原因物質を特定する未だ確立された方法はない。種々の薬剤または化学物質が、紫外線照射下でDNAを切断することが報告されており、これらが生体内においても光毒性を示すことが知られている。プラスミドDNAは、閉環状(closed circular:CC)型の2本鎖DNAからなるが、そのうちの1本鎖の開裂が起きると円形(open circular:OC)型の構造的変化が生じ、その構造の変化により電気泳動度が異なり、両者を判別することが容易である。この方法を用いて光毒性物質のスクリーニングが可能であれば、日光過敏症誘発性薬剤の特定法として用いることができる。そこで、種々の日光過敏症患者血清の光誘発性DNA切断活性を調べることにより、日光過敏症患者血清に光毒性物質が存在するか、また、その原因鑑別の一助になり得るか否かを調べた。

### 【方法】

血清は、日光過敏症を伴う膠原病14名、ポルフィリア4名(遅発性皮膚ポルフィリア2名、骨髄性プロトポルフィリア2名)、種痘様ヒドロア1名、薬剤性日光過敏症5名、ペラグラ1名、小丘疹性日光疹2名、慢性日光皮膚炎12名、計39名の患者、およびコントロールとして健常者8名より採取した。また、光毒性をもつことで知られている3、3'、4'、5-tetrachlorosalicylanilide (TCSA)を、陽性対照物質として用いた。

血清中の30kDa以上の蛋白は、電気泳動上DNA移動を著しく阻害するため、ultra-filtration tube (Centricon-30)を用いて遠心濾過して除去した。血清中のDNaseを不活性化させるため、各々の検体は10分間煮沸した。CC型プラスミドDNAと検体または種々の濃度のTCSAを混和し、3本の紫外線Aランプ(20 SBLB;東芝電機)を用いて45分間、紫外線の照射後、アガロースゲル上に電気泳動した。OC型プラスミドDNAの産生率をDNA切断活性(DNA-breaking activity: DBA)として求めた。

また、DBAの高い検体の一部については、scavengerとしてsuperoxide dismutase (SOD)、sodium azide (NaN<sub>3</sub>)、catalase、dimethylethanol sulfone (DMSO)を用いてDBAの抑制効果を調べ、各々のDBAに関与している活性酸素属を推定した。

### 【結果】

39名の日光過敏症患者のうち高いDBAを認めた者は8名であった。これらは、薬剤性日光過敏症3名、ポルフィリア2名、ヒドロア、慢性日光皮膚炎、膠原病、各々1名であった。とくに薬剤性日光過敏症患者の中で高いDBAを認めたのは、afloqualone、tetracycline、tiaprofenic acidを投与されていたもので、骨髄性プロトポルフィリアでは全例高いDBAを認めた。一方、遅発性皮膚ポルフィリアではDBAを認めなかった。健常者8名の血清はDBAが低かった。

TCSAは光毒性をもつ化学物質として知られており、光誘発性DBAはTCSA濃度依存性に増加し、NaN<sub>3</sub>によって著明に抑制された。この反応はsinglet oxygenを介するものであることが推測

された。同様に、DBAの高い患者3名（afloqualone、または tetracycline による日光過敏症、および慢性日光皮膚炎患者各1名）のDBAに対する活性酸素 scavengers による抑制効果は様々で、その inhibition profile は多様であった。

#### 【結論】

本法は、血清中の光毒性物質を調べる簡便で鋭敏な方法であり、日光過敏症の病因を探る上で有用と考えられた。さらに、本方法を用いることにより、日光過敏症誘発物質のスクリーニングが可能であると考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

種々の薬物は紫外線の照射下でDNAを切断することが知られており、これが光毒性と関係があるとされている。この研究はプラスミドDNAが紫外線と光感作物質により切断されて閉環状（CC型）から開環状（OC型）に構造的に変化すること、そしてこのDNA切断活性（DBA）が電気泳動法的に検出されることを利用して、日光過敏症患者の血清中の物質にDBAがみられるかどうかを調べて、この方法が日光過敏症誘発性薬剤のスクリーニング法として応用出来る可能性を検討したものである。

調べた血清は日光過敏症を伴う膠原病14名、ポリフィリア4名、種痘様ヒドロア1名、薬剤性日光過敏症5名、ペラグラ1名、小丘疹性日光疹2名、慢性日光皮膚炎12名、計39名の患者のものと健常者8名のものである。

調べた日光過敏症患者の血清で高いDBAを認めた者は8名であった。これらは薬剤性日光過敏症3名、ポリフィリア2名、種痘様ヒドロア、慢性日光皮膚炎、膠原病の各々1名であった。一方、健常者8名と他の疾患患者では高いDBAを認めなかった。

さらにこの光誘発性のDBAの性状を知るために、光毒性物質であるTCSAによるDBAを調べたが、かなり低い濃度においてもDBAに影響を与え、DBAは濃度依存性に増加した。また、これはsinglet oxygenの抑制剤である $\text{NaN}_3$ によって著明に抑制された。したがって光誘発性のDBAはsinglet oxygenを介したものであると推測された。しかしながら、高いDBAを示した患者の血清について同様に種々の活性酸素、フリーラジカルのスカベンジャーの影響を調べたが、DBAに対する抑制作用は様々であり、各疾患の血清のDBAに作用する活性酸素種は一様ではなかった。

この研究によって日光過敏症患者の内血清のDBAが高値を示した割合は低かったが、現在、患者からの検体についての光毒性のスクリーニング法は確立されていないので、患者の病期、症状の程度を限定すれば、将来、日光過敏症の誘発物質の新たなスクリーニング法として応用され得る可能性が示唆された点が評価された。

本研究に関して次のような質疑がなされた。

- 1) プラスミドDNAの2本鎖がともに切断されることはないか
- 2) 血清の最適濃度はどのように決めたか
- 3) 紫外線のDNAに対する影響は開裂のみか
- 4) 日光過敏症を引き起こす物質はなにか
- 5) 薬剤性日光過敏症での寛解期では発症期と比べて結果はどう違うと考えられるか
- 6) ポリフィリン症での陽性率の差はどう説明するのか
- 7) 光誘発性DNA切断活性は日光過敏症の程度と関係するか
- 8) TCSAを選んだ理由

- 9) この方法は日光過敏症のスクリーニング・テストとなり得るか
- 10) SODとカタラーゼの抑制効果にはタンパク質としての効果が含まれていないか
- 11) DNA切断効果がある薬物は日光過敏症をきたすか
- 12) 薬剤性日光過敏症の起因は薬物其自体か代謝産物か

以上の質問に対する申請者の解答は、おおむね適切であり、本論文は博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 平 光 忠 久

副査 教授 寺 川 進 副査 教授 吉 田 孝 人

副査 助教授 古 川 福 実 副査 講師 上 野 真