

原 著

培養細胞を用いた xanthene 系色素の光毒性研究

小 西 宏 明

信州大学医学部皮膚科学教室

(主任: 高瀬吉雄教授)

PHOTOTOXICITY OF XANTHENE DYES ON CULTURED HUMAN SKIN CELLS

Hiroaki KONISHI

Department of Dermatology, Shinshu University School of Medicine

(Director: Prof. Yoshio TAKASE)

KONISHI, H. *Phototoxicity of xanthene dyes on cultured human skin cells*. Shinshu Med. J., 29: 386-410, 1981

Phototoxic effects of eleven xanthene dyes were evaluated on mitotic cells of human skin cell line (XX-male), with colony-forming abilities. The cells were incubated with dyes in Hanks-Wallace salt solution, and irradiated with deluxe type fluorescent lamps ($T_c=5000\text{ K}$, $R_a=98$). Phototoxic effects of these dyes were arranged in the following order: rose bengal > phloxine B > erythrosine B \approx erythrosine Y \approx 4,5-dibromofluorescein Na > eosine IB \approx eosine Y > rhodamine B > 2,7-dichlorofluorescein Na \approx fluorescein Na. Acid red showed little effect under this condition. Action spectrum of phototoxicity of these dyes agreed with maximum absorption wavelength of visible range of each dye, and other wavelengths between 300-600 nm were less effective. On the contrary, when 292 nm UV was irradiated with phloxine B and erythrosine Y, the cells were protected. Relations between cell stages and sensitivity to phototoxicity of dyes (rose bengal, phloxine B and erythrosine Y) were examined with synchronously cultured cells. Cells were most sensitive in early S phase, a little more sensitive in M, and less sensitive in G_1 and middle S to G_2 . The order of cytotoxic effects of these dyes without irradiation were as follows: rose bengal > phloxine B \approx rhodamine B. Other dyes showed little effects at the concentration of 10^{-8} M .
(Received for publication; March 14, 1981)

Key words ; 光毒性 (phototoxicity)

キサントン系色素 (xanthene dyes)

同調培養 (synchronized culture)

JTC-17

I 序

光照射なしには生体に何ら影響を及ぼさないある濃度の化学物質が、光線照射によりその濃度でも生体に影響を及ぼす現象の研究は、おそらく1900年にさかのぼる。Raab¹⁾は、acridine orange が、可視光線の照射を伴った場合のみ、ゾウリムシを殺すが、暗室内ではこの作用を現さないと報告している。これが化学物質の光毒性 (phototoxicity) に関してのおそらく最初の報告である。この方面の知見が進むにつれ、光感作物質 (photosensitizing substance) である acridine orange の作用が発現するには、分子状酸素の消費を必要とすることが判明し、物理学的には広義の光毒性作用 (phototoxic action) のなかに、さらに酸素を必要とする光力学作用 (photodynamic action) が組み込まれ、区別されるようになった。そして光感作物質が皮膚に招来する種々の病的プロセスのメカニズムは、皮膚科学的には光毒性反応 (photo-toxic reaction) と光アレルギー反応 (photoallergic reaction) に分けられる²⁾。

光毒性反応とは、充分量の光感作物質の皮膚組織内の存在と、その励起波長を含む光線の充分量の照射により、皮膚に炎症反応を生じる場合をいう。

光アレルギー反応とは、化学物質が光エネルギーを得てはじめて抗原化し、アレルギー反応を生体に誘導して炎症反応を生じる場合をいい、広義のアレルギー反応のカテゴリーに含められる。

光毒性反応は前記の条件を満足すればおおむね個体差なく現れるが、光アレルギー反応は他の免疫と同じくすべての個体に現れるとは限らない。

報告されている光感作物質は実に多岐にわたり、代表的なものを以下に列挙する。Pitch や tar 中に含まれる acridine, anthracene, phenanthrene など³⁾⁻⁵⁾, 8-methoxy psoralen, 4,5',8-trimethyl-psoralen などの furocoumarin 類⁶⁾⁷⁾, bergamot oil, lime oil, lemon oil などの精油類⁸⁾⁹⁾, rose bengal, eosine などの xanthene 系色素や methylene blue, trypan blue などの色素類⁹⁾¹⁰⁾, pheophorbide¹¹⁾¹²⁾, hematoporphyrin¹³⁾⁻¹⁵⁾ などの porphyrin 類, phenothiazine¹⁶⁾ およびその誘導体である chlorpromazine¹⁶⁾⁻²⁰⁾, prochlorperazine²⁰⁾, thioridazine¹⁹⁾, promethazine²¹⁾²²⁾ などの抗ヒスタミン, 制吐および精神安定剤, 同じく精神安定剤である chlorthalidoxepoxide²³⁾, 降圧利尿剤であ

る chlorothiazide³⁾¹⁸⁾ および quinethazone²⁴⁾, 抗ヒスタミン剤である diphenhydramine²⁵⁾, サンスクリーン剤である glyceryl p-aminobenzoate²⁶⁾²⁷⁾, 人工甘味料である cyclamate²⁸⁾, 抗マラリア剤の quinoline methanol²⁹⁾, 抗生物質である tetracycline³⁾, chlortetracycline³⁰⁾³¹⁾, demethyl-chlortetracycline¹⁸⁾²⁰⁾³²⁾, griseofulvin³³⁾, 抗菌剤である sulfanilamide³⁴⁾³⁵⁾, fenticlor³⁶⁾, bithionol³⁾⁹⁾³⁷⁾³⁸⁾, hexachlorophene³⁸⁾³⁹⁾, monobromomonochloro-³⁶⁾, dibromo-³⁸⁾⁻⁴⁰⁾, tribromo-³⁶⁾³⁸⁾³⁹⁾⁴¹⁾, tetrabromo-³⁸⁾³⁹⁾, tetrachloro-salicylanilide³⁹⁾⁴²⁾⁴³⁾ などの salicylanilides, そして trichlorocarbanilide³⁹⁾⁴⁴⁾⁴⁵⁾ などが報告されている。これらのうち、光毒性物質として報告されているのは pitch や tar およびその成分, furocoumarine 類, 色素類, porphyrin 類, tetracycline 類であり, 光アレルギーの抗原性物質と報告されているのは chlorpromazine, chlorthalidoxepoxide, quinethazone, salicylanilides, carbanilide, その他の phenol 系抗菌剤, cyclamate, diphenhydramine, griseofulvin などである。さらに光毒性および光アレルギーの両反応を生ずる物質として sulfonamide, p-amino benzoic acid のエステル, chlorthiazide, promethazine などが報告されている。ただしこれらのメカニズムの区分は、いちいちの物質において必ずしも確定されているとはいえない⁴⁶⁾⁴⁷⁾。

上記の物質のうち, xanthene 系色素とは, 分子内に xanthene 構造をもつ色素をいう。この色素は食品, 医薬品錠剤や香粧品などに広く用いられてきた。しかし光毒性の報告が漸増し, われわれの注目をあびている。Xanthene 系色素のヒト皮膚への光毒性作用について, 塩原と小西⁴⁸⁾は rose bengal を皮内注射後, 本色素の可視部最大吸光波長域を含む可視光線照射により強い浮腫性紅斑と掻痒が発生することを報告した。また Morikawa ら⁴⁹⁾は rose bengal, eosine Y, dibromofluorescein を家兎に皮内注射, または abraide ないし scratch した皮膚に塗布し, 400~600nm の可視光線を照射して光毒性反応を導入し, そして eosine Y の可視部作用波長は最大吸光波長である 525nm と一致したと報告している。

著者らはヒト皮膚由来培養細胞株を用いて, ヒト皮膚への化学物質の一次刺激性を *in vitro* でしるべ, 界面活性剤のヒト皮膚由来細胞株への障害性効果と実験動物皮膚への障害性効果がよく相関すること⁵⁰⁾⁵¹⁾,

一部の xanthene 系色素を用い、それらの光毒性作用のチェックに用い得ること⁵²⁾、また同調培養した同細胞株の紫外線に対する感受性が細胞周期の段階 (cell stages of generation cycle) によって変動すること⁵³⁾などを研究、発表してきた。

本報では、同じ培養細胞株のM期細胞 (分裂期細胞) を用い、11種の xanthene 系色素の光毒性作用に関して、そのスクリーニング方法、化学構造との関係、主作用波長および同調培養をおこなっての細胞周期各段階の感受性変動などの研究結果を報告する。

II 実験材料および方法

A 色素

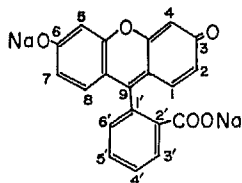
用いた11種 xanthene 系色素の詳細を Table 1 に示す。滅菌は Sartorius 社 0.2 μ membrane filter を用いた加圧濾過滅菌によった。また特別な精製はおこなわなかった。

B 培養細胞株

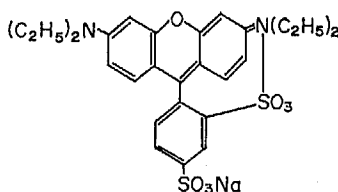
XX-male ヒト健常皮膚由来培養細胞株 (JTC-17)⁵⁴⁾⁵⁵⁾ から採集法⁵⁶⁾⁵⁷⁾ により集めたM期細胞を、著者

Table 1. List of xanthene dyes tested

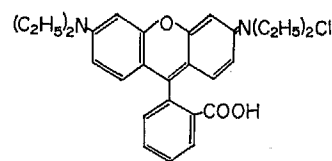
Dyes	Suppliers	Lot. No	Chemical formula	λ max** (nm)
Fluorescence Na (FL-Na)*	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	AN01	Shown on the margin	490
4,5-Dibromo-fluorescence Na (dBF)*	Katayama Chemical Industry Co., Ltd.		4,5-Di-bromo-FL-Na	505
2,7-Dichloro-fluorescence Na (dCF)*	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	FCJ-01	2,7-Di-chloro-FL-Na	504
Erythrosine Y	Croma		4,5-Di-iodo-FL-Na	525
Eosine IB	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	AL-01	4,5-Di-bromo-2,7-dinitro-FL-Na	518
Eosine Y	National Institute of Hygienic Science	631-215	2,4,5,7-Tetra-bromo-FL-Na	518
Erythrosine B	The same above	631-265	2,4,5,7-Tetra-iodo-FL-Na	528
Phloxine B	The same above	751-495	2,4,5,7-Tetra-bromo-3',4',5',6'-tetra-chloro-FL-Na	540
Rose bengal	The same above	631-365	2,4,5,7-Tetra-iodo-3',4',5',6'-tetra-chloro-FL-Na	550
Acid red	The same above	661-75	Shown on the margin	568
Rhodamine B	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	AP-01	Shown on the margin	556



Fluorescence Na



Acid red



Rhodamine B

* Abbreviation. **Measured in Hanks-Wallace salt solution (pH 7.2).

はこの実験シリーズに用いた。定量的な扱いに都合のよい単細胞はトリプシン処理でも得られるが、この処理で得られる単細胞は：

(1) 細胞表面がトリプシンの作用により変化を受けるのみならず、この変化の程度を常に一定にすることが困難である。

(2) トリプシンの作用停止のために血清添加を必要とするが、血清やトリプシンなどの蛋白質は xanthene 系色素と結合して光毒性作用の細胞への誘起を阻害する⁵²⁾ため遠沈洗浄操作を必要とし、調製に時間がかかる。

などの問題がある。他方、採集法で得られる細胞は、細胞周期の段階がM期に固定されるが、トリプシン処理をしないので native な単細胞群であるといえる。採集操作も比較的容易で遠沈洗浄操作も不要である。これらの理由で著者は採集法によるM期細胞を用いることにした。

ただし、細胞周期各段階の光毒性作用への感受性変動をみる実験では、同調度を上げるために XX-male より分離したクローンを用いた。分離方法は次の通りである。XX-male をトリプシン処理 (Difco 1:300, 0.1%のイーグルMEM溶液) して得た単細胞浮遊液を、9cmシャーレ1枚当たり50細胞程度ずつ分注、炭酸ガス細胞培養器 (5%CO₂ in air, 37°C) 中で2週間培養してコロニーを形成させた。検鏡下で完全に独立したコロニーを選び、培養液を捨て Hanks 塩溶液で洗浄後、底面にシリコングリースを塗布した内径5.5mm、外径8mm、高さ10mmのステンレスシリンダーを置きその中でトリプシン処理、独立コロニーのみの細胞分散液を得た。これを培養し、顕微鏡による細胞形態および世代時間の測定から3種のクローンを区別した。このうち最も世代時間の短い(約22時間)、やや鋭角的ではあるが上皮性形態を示すクローンを XE 細胞株と呼ぶことにし、この実験に用いた。

XX-male, XE 細胞株とも仔牛血清 (MBL および阪大微研) 7%添加したイーグル MEM (日水製薬, 高圧蒸気滅菌可能粉末培地より調製) で継代培養された。その場合の対数増殖期における平均世代時間は、XX-male 株で約28時間、XE 株で前述の通り約22時間であった。

M期細胞採集法: Terashima と Tolmach⁵⁵⁾ の M期細胞採集法を改良した Robbins と Marcus⁵⁷⁾ の方法に、著者は若干の工夫を加えつつ従った。継代培養されている細胞株をトリプシン処理後、綿栓した培

養ビン (三春製作所, MA 60型) におよそ600~700万ケの細胞を植え込み、CaCl₂ を除去し仔牛血清 7%を添加したイーグル MEM (日水製薬, イーグル MEM アミノ酸ビタミン培地より調製) 15ml を加え、炭酸ガス細胞培養器中で24時間培養した。培養液を捨て、Hanks-Wallace 塩溶液 (試薬から調製, pH 7.2, phenol red 無添加) で3度洗浄して培養液を完全に除去した。次いで新しい同塩溶液を加え、振盪してM期細胞を採集、380Me ナイロンメッシュ (NBC 工業) を通して混入するM期以外の細胞および細胞集塊を除去、M期細胞の分散した同塩溶液を得た。細胞数を血球計算盤にて計数し、照射サンプルとした。なお混入する有糸分裂終期の細胞も1ケとして計数した。

C 光照射と細胞生存率

Hanks-Wallace 塩溶液中に集めたM期細胞を同塩溶液で600~800cells/ml に希釈、遮光のためアルミ製シャーレ (直径70mm、深さ19mm、0.5mm厚のアルミ板を用いて注文製作) 中におさめた6cmシャーレの皿部分 (Lux plastic disposable dish, またはガラス製(株)フラットのフラットシャーレの皿部分) に、分注器 (硝英製作所, Excel Tripette 250III型) を用いて1ml ずつ正確に分注した。これに濾過滅菌した xanthene 系色素 $2 \times 10^{-3} \sim 2 \times 10^{-6} M$ の同塩溶液を暗幕遮光下で1ml ずつ添加し、ただちにアルミシャーレのふたをして充分混和し、37°C で10分間 pre-incubate した。この後アルミシャーレのふたをとって室温にて直接光照射、牛血清アルブミン (Armour 社, BPA fraction V) 0.5%, 仔牛血清20%, L-serine (和光純薬) 20mg/l を添加したイーグル MEM 6ml を加え、アルミシャーレに入れたまま炭酸ガス細胞培養器中で8~10日間培養、10%中性ホルマリン固定、Giemsa 染色によりコロニーを計数し、色素添加、非照射でのコロニー生成数を100とした百分率を求め、これを照射実験での細胞生存率とした。なお色素の最終濃度は、添加色素液濃度の1/2である。照射後に加える培養液にアルブミンを添加したのは、細胞のコロニー生成数および生育が多少よくなるためである。予備試験として細胞を phloxine B ($5 \times 10^{-6} M$) と光照射後、加える培養液に牛血清アルブミン 0.1 および0.5%, Bactopeptone (Difco) 0.1 および0.5%を添加してコロニー生成への影響を調べた。そして牛血清アルブミン 0.5%添加の場合にコロニーの生成数およびサイズが最も大きく、その他はむしろ無添加 (仔牛血清20%と L-serine 20mg/l を加えたイーグ

ルMEMのみ)の場合よりもコロニーの生成数、サイズともに劣る結果を得た。

D 同調培養とオートラジオグラフィ

同調培養と光照射: M期細胞採集前までの操作はM期細胞採集方法の項で述べた通りである。ただ採集2時間前に37°Cでこれまでと同じCaCl₂抜きの培養液を新しいものに交換し、M期細胞の採集はこの中でおこなった。採集後牛血清20%添加イーグルMEMで希釈し、細胞数500/mlの分散液とした。希釈に用いたと同じ培養液3mlをあらかじめ分注し炭酸ガス細胞培養器中で温度およびpHを調整した6cm disposable dish 皿部分入りの、アルミシャーレ100~250枚にこの細胞分散液を正確に1mlずつ分注し、同調培養を開始した。これら採集から培養開始まで、すべての操作は37°Cでおこない、また短時間にすませてpHの変動を可及的に抑えた。

培養開始後、おおむね3時間ごとに培養液を捨て、Hanks-Wallace 塩溶液で着生細胞を3度洗浄後、色素の同塩溶液1mlを加え、37°C、10分間遮光下でincubateした。この後の光線照射、培養液添加、培養継続、生存率の求め方は、光照射の項で述べた通りである。

オートラジオグラフィ⁵⁶⁾⁵⁸⁾: おおむね3時間ごとにdisposable dish中の同調培養細胞を0.05μCi/mlの³H-thymidine 6T(比放射能24.7Ci/mM, New England Nuclear Corp.,)を含む牛血清20%添加イーグルMEMにて37°C、20分pulse-labelした。Hanks-Wallace 塩溶液でラベルした細胞を洗浄後、酢酸アルコール(1:3)で20分固定し、水洗風乾後、dishの細胞着生部分を切りとりスライドガラスに貼布、原子核乳剤サクラNR-M2(小西六写真工業、東京)の2倍希釈液で40°Cでdippingした。5°C、1ヵ月暗所保存後、それらをコニドールXで現像、コニフィクスXにて定着、Giemsa 後染色後400~1,200ヶの細胞核を検鏡してラベルされた細胞核の全細胞核に対する標識率を求め、細胞周期の段階を同定した。

E 色素の一次細胞毒性

非照射条件下での色素の細胞毒性を調べるため、アルミシャーレ内のdisposable dish中でHanks-Wallace 塩溶液中に採集したM期細胞を、色素と37°C、20分incubateした。

この後の培養液添加、培養、コロニー計数は光照射の項で述べた通りである。色素の一次細胞毒性は、色素を添加せず、ほかはまったく同様に処理したコント

ロールのコロニー生成数を100とした場合の百分率で示した。

細胞と色素が混和されたのちの操作はすべて暗幕遮光下でおこない、またアルミシャーレのふたを開ける操作も可能な限り短時間とした。暗幕遮光下での光の混入の程度は、Lambda社LI-185型Radiometer/Photometerによる測定で $3 \times 10^{-4} \text{mJ/cm}^2 \cdot \text{sec}$ 以下であった。

F 光照射条件

1 光源

光毒性実験の光源には、高演色形蛍光灯(ナショナルEDL-50、色温度Tc=5,000K、平均演色評価数Ra=98)を用いた。その分光スペクトル分布をFig.1に示す。本蛍光灯を光源として選んだ理由は、可視部の分光特性が太陽光のそれに近く、また実験に用いるxanthene系色素の可視部最大吸光波長域が存在する460~630nmでのエネルギー分布がほぼflatであるためである。20W直管4灯を天井部に5cmの間隔をあけて並列に取りつけた内面黒色塗装のボックス型照射装置を作成してこれを暗幕遮光下に置き、管球面より15cmの距離にシャーレを置いて落射で照射した。

作用波長の測定光源には、1KWキセノンランプを用いた。銀干渉フィルター(東芝KLシリーズ)および色ガラスフィルター(東芝VおよびUVシリーズ)を組み合わせて単色光を取り出し、落射で照射した。銀干渉フィルターは透過中心波長の半値幅18nm以下、主透過帯波長のほぼ2倍の長波長側に1次の透過帯、さらに短波長側には主透過帯波長のほぼ2/3の波長位置に3次の透過帯、同じくほぼ1/2の位置に4次の透

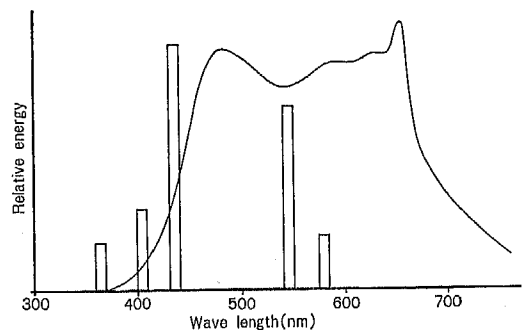


Fig. 1. Spectral distribution of the deluxe type fluorescent lamp (National EDL-50) supplied from National Electric Co., Ltd.

過帯をもつ⁵⁹⁾。よって短波長側の3次、4次透過帯をマスクするために色ガラスフィルターを組み合わせた。またキセノンアークの機構上、照射野線量率分布に多少の不均一が避けられないため、シャーレを turn table に乗せ、33rpm で回転させながら照射した。この場合も蛍光灯照射の場合と同様、内面黒色塗装の照射ボックスを用い外光を遮断した。

2 照射線量率の測定

可視部の測定には、400~700nm に感度を持つ Lambda 社 LI-185 型 Radiometer/Photometer を用いた。

紫外部の 355.0nm の測定には東芝紫外線強度計 UVR-365, 292.0nm の測定には蔭酸第2鉄カリウム光量測定法⁶⁰⁾を用いた。

いずれも照射シャーレが置かれる位置での線量率を測定した。キセノン光源の場合は照射野内の数カ所を測定し、その平均値を求めた。

III 結 果

A Hanks-Wallace 塩溶液中での incubation period の影響

Hanks-Wallace 塩溶液中で採集したM期細胞をただちに数十枚のシャーレに分注する。照射実験完了までに30~60分の時間を要するが、この間細胞は無血清、貧栄養の同塩溶液中にある。こうした条件が細胞のコロニー生成率や色素への感受性に影響を及ぼすか否か

を調べた。塩溶液中に採集した XX-male のM期細胞を disposable dish に分注後 37°C の炭酸ガス細胞培養器中におさめ、約30分、60分、120分後にとり出し、一部は培養液を加え、一部は phloxine B 溶液を 10^{-4} M 濃度になるように加えて10分間遮光下で incubate 後培養液を加え、いずれもコロニー生成数を求めた。

結果を Table 2 に示す。シャーレ4枚の平均値でみる限り、Hanks-Wallace 塩溶液中での incubation period が長くなるほどコロニー生成数は次第に増加し、123分後は122.5%となった。これは時間の経過により細胞がM期を通過し、分裂する細胞の割合が増加するためと考えられる。ただ phloxine B の一次細胞毒性への感受性は、細胞生存率93.3~96.9%とほぼ一定の値を示した。よって xanthene 系色素の光毒性試験に非照射コントロールを設ければ、M期細胞採集後試験完了までの時間が2時間程度ずれても結果に影響を及ぼさないと判断した。

B 色素の一次細胞毒性

結果を Table 3 に示す。実際の照射実験での incubation period は10分間であるが、その2倍の20分間 incubate した。

本条件下で細胞毒性の出ない限界濃度は rose bengal で 10^{-5} M, phloxine B および rhodamine B で 10^{-4} M, その他の色素では 10^{-3} M でも細胞毒性を認めなかった。ただ、色素添加群の細胞生存率は無添

Table 2. Influence of incubation periods in Hanks-Wallace salt solution on the cell survivals

Incubation periods (min)	Cell survivals ('1) (mean±SD %)	Cell survivals after incubation with phloxine B 10^{-4} M('2) (mean±SD %)
0	100 ±0.9	93.3± 3.3
33	106.7±2.4(**)	96.8± 0.4
62	112.2±6.2(*)	
123	122.5±6.6(**)	93.9±13.4

Collected M phase of XX-male cells were incubated in Hanks-Wallace salt solution (pH 7.2) at 37°C. After the various incubation periods, in ('1) experimental series, medium was added immediately to the cell suspension, while in ('2) series, the cells were incubated more 10 minutes with phloxine B solution and medium was added. The cell survivals of both series were determined with colony-forming abilities. The survivals of ('1) series were shown as % against the 0 min control, and that of ('2) series as % against the colony numbers of the same incubation period samples of the ('1) series. Significant differences from the results of 0 min incubation were shown as *($P<0.05$), or **($P<0.01$).

Table 3. Cytotoxicity of xanthene dyes on XX-male (M) cells

Dyes	Conc. (M)	Cell survival (Mean±SD %)
Control	—	100
Fluorescene Na	10 ⁻³	113.2±12.3
	10 ⁻⁴	115.9± 4.6
4,5-Dibromo-fluorescene Na	10 ⁻³	104.8±10.9
	10 ⁻⁴	110.9± 7.5
2,7-Dichloro-fluorescene Na	10 ⁻³	113.5± 4.3*
	10 ⁻⁴	111.8± 3.4
Erythrosine Y	10 ⁻³	128.0±13.7
	10 ⁻⁴	111.5± 9.3
Eosine IB	10 ⁻³	130.9±11.1*
	10 ⁻⁴	110.6± 2.8
Eosine Y	10 ⁻³	114.7±14.3
	10 ⁻⁴	111.6± 5.1
Erythrosine B	10 ⁻³	117.3± 8.6*
	10 ⁻⁴	124.0± 8.5
Phloxine B	10 ⁻³	0**
	10 ⁻⁴	111.4±16.9
	5×10 ⁻⁵	112.9±16.7
Rose bengal	10 ⁻⁴	0**
	5×10 ⁻⁵	33.3±10.8**
	10 ⁻⁵	117.7± 8.8
Acid red	10 ⁻³	121.0± 9.0
	10 ⁻⁴	110.5± 8.1
Rhodamine B	10 ⁻³	0**
	5×10 ⁻⁴	109.6± 5.4*
	10 ⁻⁴	104.8±11.9

The cells were incubated for 20 min with dyes at 37°C in Hanks-Wallace salt solution. Significant differences from the control were shown as *(P<0.05), or **(P<0.01).

加のそれを上まわるものもあるが、必ずしも推計学的有意差があるとはいえない。採集したM期細胞にはおよそ10~20%の有糸分裂終期の細胞が含まれ、植込み時1ヶとして数えられるが、色素により解離が促進される可能性があり、コントロールに比べ色素添加群の細胞生存率が上昇する一因ともなり得よう。位相差顕微鏡下でこれら色素の光毒性作用の発現を観察すると、各色素の可視部最大吸光波長光線の照射を受けた細胞は、細胞間結合がはずれ、細胞質は突出し、また小胞を持ち、ガラス面から容易に剝離する⁵²⁾。この現象は rose bengal でほぼ瞬時におきる。有糸分裂終期の

細胞が操作中わずかな露光を受け2ヶに解離する可能性もある。

C 色素の光毒性作用

照射光源として用いた高演色形蛍光灯の細胞照射位置での照射線量率は2.3~2.5mJ/cm²・secである。光照射のみのコントロールおよび11種 xanthene 系色素による結果を Fig. 2 から Fig. 15 に示す。色素濃度は Table 3 の非照射条件下で細胞毒性のほとんど現れない濃度を用いた。

ガラス製シャーレを用いての結果を Fig. 2 Fig. 3 に示す。この場合、特に eosine IB, erythrosine B でのデータのばらつきが目につく。よって照射線量(照射線量率×照射時間)がある程度以上になると生存率の対数と照射時間(または照射線量)との間に直線関係が成立すると仮定し、最小2乗法により求めた回帰直線を図示してある。Rose bengal (5×10⁻⁵M) が最も強く、次に phloxine B (10⁻⁴M), さらに dBF (10⁻³M) がこれに次いで高度の光毒性を示した。Erythrosine B (10⁻³M), erythrosine Y (10⁻³M), そして eosine IB (10⁻³M) は中等度, eosine Y (10⁻³M)

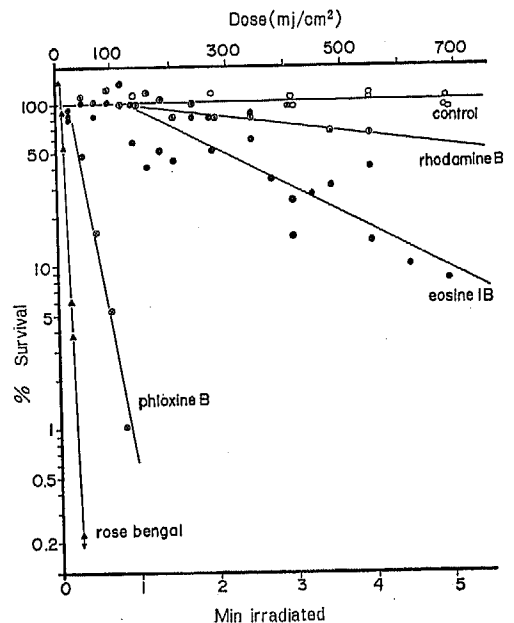


Fig. 2. Phototoxicity of xanthene dyes (I)

▲ Rose bengal (5×10⁻⁵M), ⊗ phloxine B (10⁻⁴M), ● eosine IB (10⁻³M), ⊙ rhodamine B (10⁻⁴M), ○ control. XX-male (M) cells. Light source: deluxe type fluorescent lamp, dose rate: 2.3 mJ/cm²・sec. Glass dish.

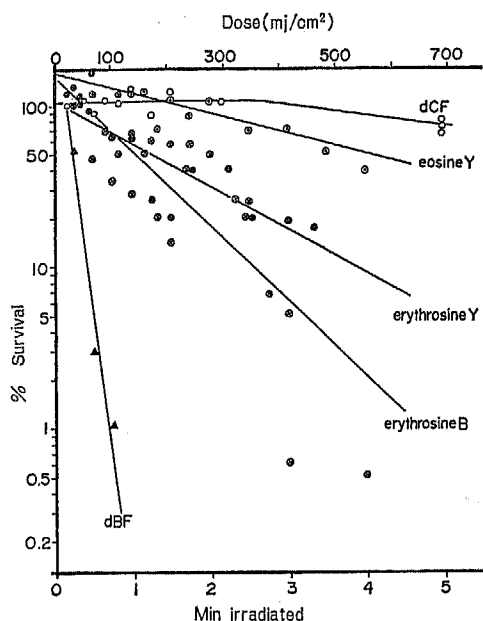


Fig. 3. Phototoxicity of xanthene dyes (II)

▲ Dibromofluorescene Na (10^{-8} M), ⊗ erythrosine B (10^{-8} M), ● erythrosine Y (10^{-8} M), ⊙ eosine Y (10^{-8} M), ○ 2,7-dichlorofluorescene Na (10^{-8} M), XX-male (M) cells. Light source: deluxe type fluorescent lamp, dose rate: $2.3 \text{ mJ/cm}^2 \cdot \text{sec}$. Glass dish.

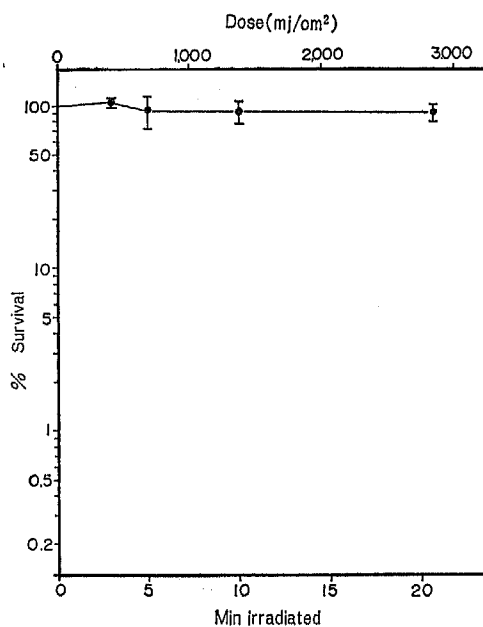


Fig. 4. Irradiation control. XX-male (M) cells. Light source: deluxe type fluorescent lamp, dose rate: $2.3 \text{ mJ/cm}^2 \cdot \text{sec}$. Disposable dish, Mean \pm SD.

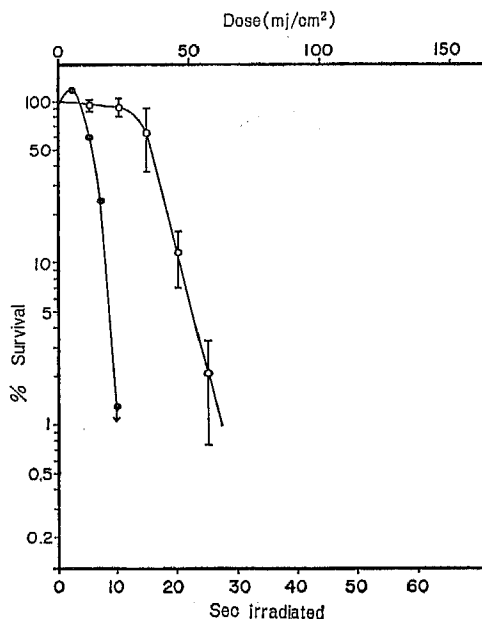


Fig. 5. Phototoxicity of rose bengal

○ (10^{-5} M), ● 5×10^{-5} M. XX-male (M) cells. Light source: deluxe type fluorescent lamp, dose rate: $2.3 \text{ mJ/cm}^2 \cdot \text{sec}$. Disposable dish, Mean \pm SD.

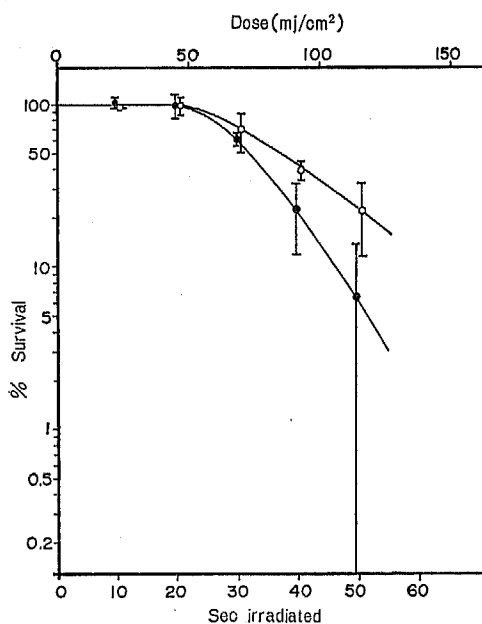


Fig. 6. Phototoxicity of phloxine B

○ 5×10^{-5} M, ● 10^{-4} M. XX-male (M) cells. Light source: deluxe type fluorescent lamp, dose rate: $2.3 \text{ mJ/cm}^2 \cdot \text{sec}$. Disposable dish, Mean \pm SD.

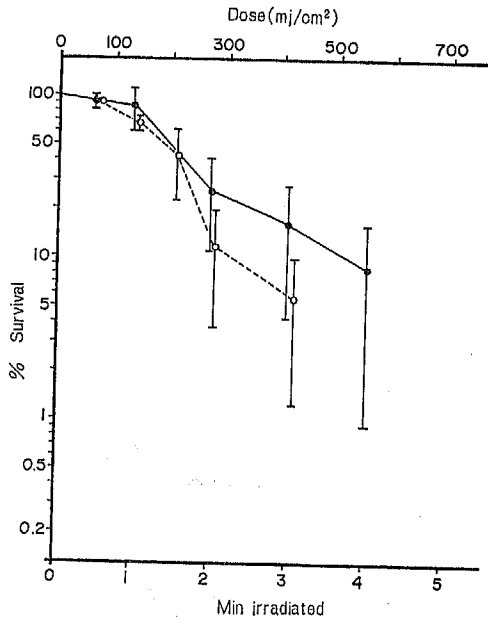


Fig. 7. Phototoxicity of erythrosine B
○ 10⁻⁴M, ● 10⁻³M, XX-male (M) cells.
Light source : deluxe type fluorescent lamp,
dose rate : 2.3 mJ/cm² · sec. Disposable
dish. Mean ± SD.

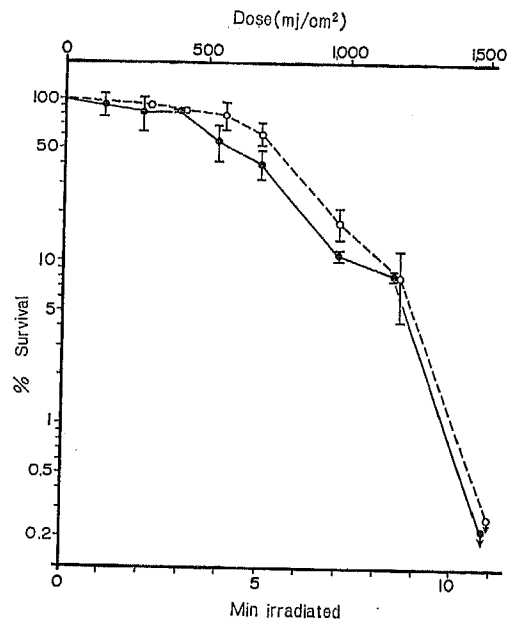


Fig. 9. Phototoxicity of eosine IB
○ 10⁻⁴M, ● 10⁻³M, XX-male (M) cells.
Light source : deluxe type fluorescent lamp,
dose rate : 2.3 mJ/cm² · sec. Disposable
dish. Mean ± SD.

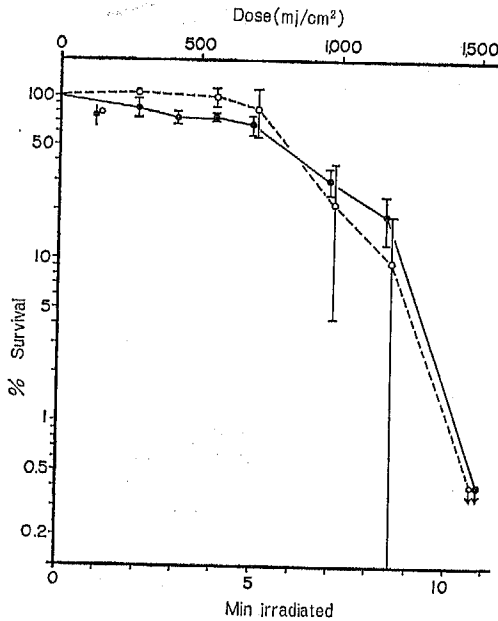


Fig. 8. Phototoxicity of eosine Y
○ 10⁻⁴M, ● 10⁻³M, XX-male (M) cells.
Light source : deluxe type fluorescent lamp,
dose rate : 2.3 mJ/cm² · sec. Disposable
dish. Mean ± SD.

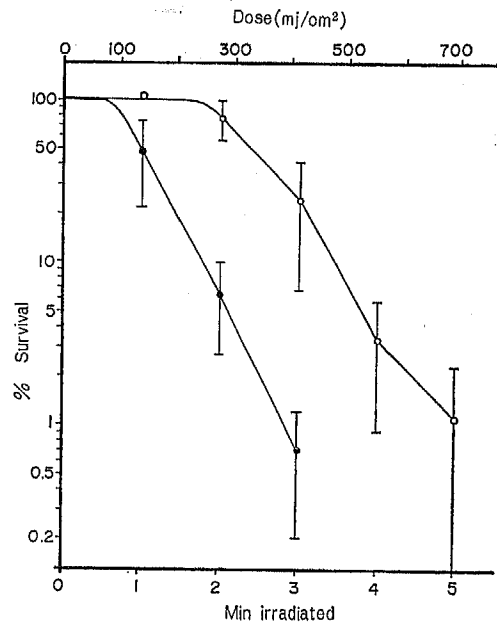


Fig. 10. Phototoxicity of erythrosine Y
○ 10⁻⁴M, ● 10⁻³M, XX-male (M) cells.
Light source : deluxe type fluorescent lamp,
dose rate : 2.3 mJ/cm² · sec. Disposable
dish. Mean ± SD.

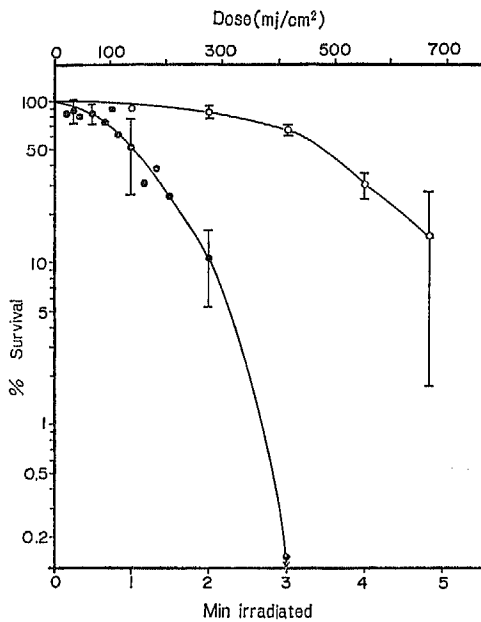


Fig. 11. Phototoxicity of 4,5-dibromofluorescein Na
○ 10⁻⁴M, ● 10⁻³M. XX-male (M) cells.
Light source : deluxe type fluorescent lamp,
dose rate : 2.3 mJ/cm² · sec. Disposable
dish. Mean ± SD.

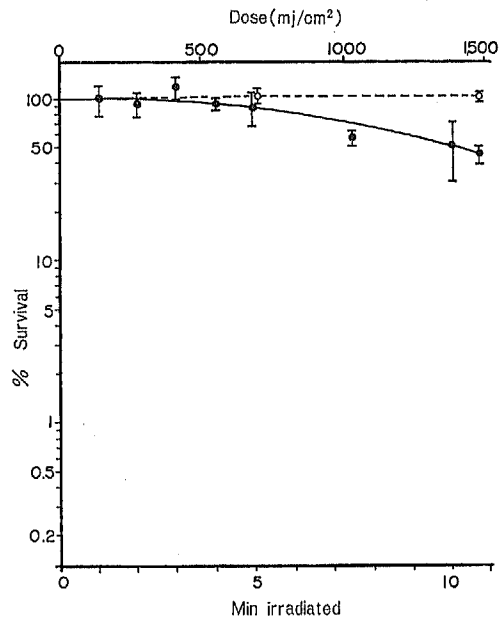


Fig. 13. Phototoxicity of fluorescein Na
○ 10⁻⁴M, ● 10⁻³M. XX-male (M) cells.
Light source : deluxe type fluorescent lamp,
dose rate : 2.3 mJ/cm² · sec. Disposable
dish. Mean ± SD.

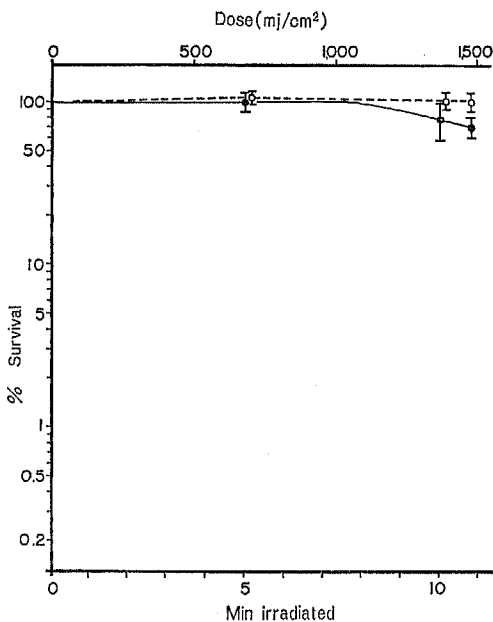


Fig. 12. Phototoxicity of 2,7-dichlorofluorescein Na
○ 10⁻⁴M, ● 10⁻³M. XX-male (M) cells.
Light source : deluxe type fluorescent lamp,
dose rate : 2.3 mJ/cm² · sec. Disposable
dish. Mean ± SD.

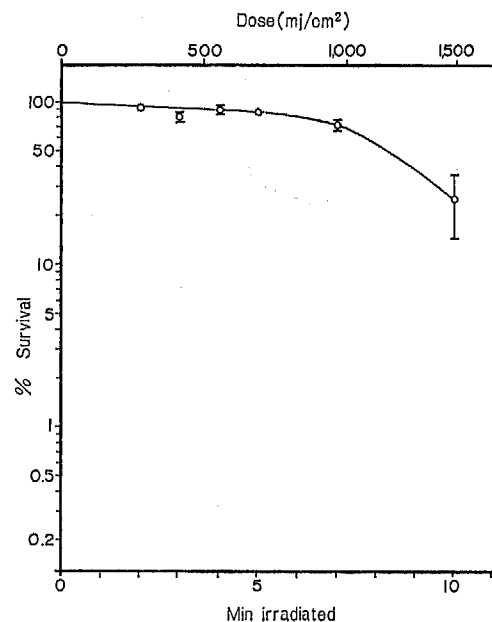


Fig. 14. Phototoxicity of rhodamine B
○ 10⁻⁴M, ● 10⁻³M. XX-male (M) cells. Light source :
deluxe type fluorescent lamp, dose rate :
2.3mJ/cm² · sec. Disposable dish. Mean ±
SD.

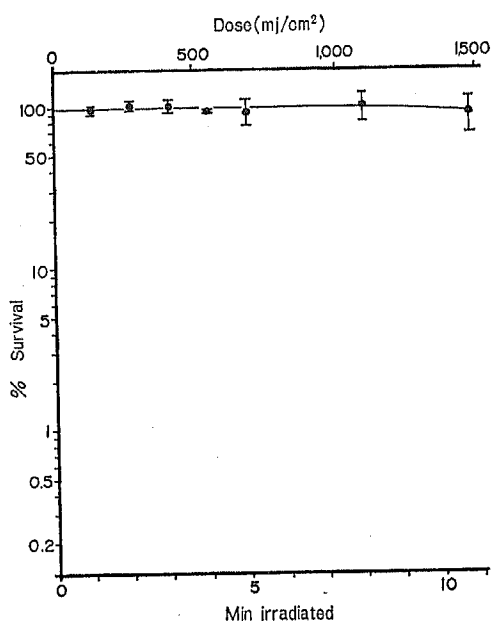


Fig. 15. Phototoxicity of acid red

10^{-8} M, XX-male (M) cells. Light source : deluxe type fluorescent lamp, dose rate : $2.3\text{mJ}/\text{cm}^2\cdot\text{sec}$. Disposable dish. Mean \pm SD.

および rhodamine B (10^{-4} M) は軽度、そして dCF (10^{-8} M) は最も軽度の光毒性を示した。

Disposable dish を用いての結果を Fig. 4 から Fig. 15 までに示す。

光照射のみでは20分照射 (照射線量 $2,900\text{mJ}/\text{cm}^2$) でも生存率は80%以上を保った (Fig. 4)。

色素を添加した場合の生存率を求めるに当たって少なくとも5分ないしそれ以上の長時間照射を行う場合は、常に光照射のみのコントロール実験を同時に行い、この照射コントロールの生存率に対する百分率を色素添加の場合の生存率とした。

Rose bengal では 10^{-8} M 添加20秒照射 ($46\text{mJ}/\text{cm}^2$) で生存率は約10%と有意に減少 ($P<0.01$) した (Fig. 5)。

Phloxine B では 10^{-4} M 添加20秒以上の照射で生存率は減少し始め、50秒照射 ($115\text{mJ}/\text{cm}^2$) での生存率は6.5%に減少 ($P<0.01$) した (Fig. 6)。

Erythrosine B では 10^{-8} M, 10^{-4} M 添加ともに、60秒以上の照射で生存率は減少し始め、80秒照射 ($184\text{mJ}/\text{cm}^2$) ではほぼ半減し、180秒照射 ($414\text{mJ}/\text{cm}^2$) で 10^{-8} M 添加の生存率は16%, 10^{-4} M 添加のそれは5.5%に減少 ($P<0.01$) した。本色素では 10^{-4} M 添加

の生存率は、 10^{-8} M 添加のそれを下まわったが、推計学的有意差はない ($P>0.05$) (Fig. 7)。

Eosine Y では光毒性は軽度で、 10^{-8} M, 10^{-4} M 添加ともに300秒照射 ($690\text{mJ}/\text{cm}^2$) でも生存率は60%を上まわった。そして480秒照射 ($1,100\text{mJ}/\text{cm}^2$) 以上では、 10^{-4} M 添加の生存率は 10^{-8} M 添加のそれをやや下まわったが、推計学的有意差はない ($P>0.05$) (Fig. 8)。

Eosine IB も光毒性は軽度で、300秒照射 ($690\text{mJ}/\text{cm}^2$) で 10^{-8} M 添加では40%, 10^{-4} M 添加では約60%の生存率を示した (Fig. 9)。

Erythrosine Y は中等度の光毒性を示し、 10^{-8} M 添加では60秒照射 ($138\text{mJ}/\text{cm}^2$) で生存率ははじめて減少 ($P<0.05$) し、180秒照射 ($414\text{mJ}/\text{cm}^2$) での生存率は0.7%, 10^{-4} M 添加では300秒照射 ($690\text{mJ}/\text{cm}^2$) でも生存率は1.1%であった (Fig. 10)。

dBf は中等度の光毒性を示し、 10^{-8} M 添加では120秒照射 ($276\text{mJ}/\text{cm}^2$) での生存率は約10.5%, 10^{-4} M 添加では300秒照射 ($690\text{mJ}/\text{cm}^2$) でも生存率は10%を上まわった (Fig. 11)。

dCF は軽度の光毒性を示し、 10^{-8} M 添加では300秒照射 ($690\text{mJ}/\text{cm}^2$) で生存率の減少を認めないが、600秒照射 ($1,380\text{mJ}/\text{cm}^2$) で生存率は約80%であった。 10^{-4} M 添加では645秒照射 ($1,480\text{mJ}/\text{cm}^2$) でも生存率は減少しなかった (Fig. 12)。

FL-Na は軽度の光毒性を示し、 10^{-8} M 添加では600秒照射 ($1,380\text{mJ}/\text{cm}^2$) での生存率は50%に減少した。 10^{-4} M 添加では645秒照射 ($1,480\text{mJ}/\text{cm}^2$) でも生存率は減少しなかった (Fig. 13)。

Rhodamine B は軽度の光毒性を示し、 10^{-4} M 添加では300秒照射 ($690\text{mJ}/\text{cm}^2$) で86%, 600秒照射 ($1,380\text{mJ}/\text{cm}^2$) で25%に生存率は減少した (Fig. 14)。

Acid red は光毒性を見出し得ず、 10^{-8} M 添加で645秒照射 ($1,484\text{mJ}/\text{cm}^2$) の生存率は86%であり、Fig. 4 に示す照射コントロールのそれと有意差はなかった ($P>0.05$) (Fig. 15)。

放射線の生物効果 (致死効果) を表現するとき、生存率は37% ($100/e$, ただし e は自然対数の底) に下げるに要する照射線量 D_{37} ⁶¹⁾⁶²⁾, 致死効果の現れない限界線量 D_Q (quasithreshold dose)⁶²⁾, ヒット数 n ⁶¹⁾⁶²⁾ などが用いられる。色素の光毒性作用によって XX-male M期細胞の disposable dish 中での生存率を37%まで下げるに要する照射線量 D_{37} を Fig. 4~15 より求め、Table 4 に示した。実験値が

Table 4. D_{37} values of phototoxicity of xanthene dyes on XX-male (M) cells

Dyes	Conc. (M)	10^{-8}	10^{-4}	5×10^{-5}	10^{-5}
Control		23,000*mJ/cm ²			
4,5-Dibromo-fluoresce Na		166	515		
2,7-Dichloro-fluoresce Na		2,100*			
Erythrosine Y		154	360		
Eosine IB		708	800		
Eosine Y		883	860		
Erythrosine B		228	218		
Phloxine B		ND	80	96	
Rose bengal		ND	ND	14	38
Rhodamine B		ND	1,250		
Acid red		4,065*			
Fluoresce Na		1,700*			

Light source : deluxe type fluorescent lamp, dose rate : 2.3mJ/cm² · sec. Plastic disposable dish. ND : not done because of cytotoxicity. * : calculated.

D_{37} に達していない場合は、照射線量-生存率曲線をそのまま延長して求めた。色素無添加で蛍光灯照射のみのコントロールでは、生存率は37%に下げられる。11種の xanthene 系色素の光毒性は、rose bengal が最も強く 5×10^{-5} M での D_{37} は 14mJ/cm² であり、次に強い phloxine B のそれ (96mJ/cm²) の 1/7 程度である。これら D_{37} 値からみた光毒性の強さは rose bengal > phloxine B > erythrosine B \approx erythrosine Y \approx dBF > eosine IB \approx eosine Y > rhodamine B > dCF \approx FL-Na の順となり、acid red にはほとんど認められなかった。

D 色素光毒性の主作用波長について

光毒性を強く示す phloxine B と中等度に示す erythrosine Y について、主作用波長を求めた。細胞毒性がなく光毒性のみが発現する最高濃度を試験濃度としたが、phloxine B は 10^{-4} M, erythrosine Y は 10^{-8} M である。キセノンランプ光源より単色光取出しに用いた波長別フィルターの組合せと細胞照射位置での照射線量率を Table 5 に、分光光度計で測定した組合せフィルターの光透過特性を Fig. 16 に、phloxine B, erythrosine Y の吸光スペクトルを Fig. 17 に示す。

1 可視領域

可視領域の両色素の最大吸収スペクトルは phloxine B は 540nm に、erythrosine Y は 525nm に

存在する。したがってこれらを含め、その前後の波長域の光線照射を行った。

照射時間とともに、410.8nm から 603.0nm の単色光照射による生存率を phloxine B は Fig. 18に、

Table 5. Used filters and dose rates at each wavelength

Wave length (nm)	Used filters	Dose rate (mJ/cm ² ·sec)
292.0	KL-29+UV-25	0.16*
355.0	UV-D2+UV-25	5.8**
410.8	KL-41+UV-35	0.56
428.0	KL-43+UV-35	2.28
454.0	KL-45+UV-39	1.34
487.6	KL-49+VY-42	1.06
496.0	KL-50+VY-45	0.53
518.5	KL-52+VY-45	0.51
528.5	KL-53+VY-45	0.67
539.0	KL-54+VY-45	0.76
548.0	KL-55+VY-47	0.94
557.5	KL-56+VY-47	0.92
603.0	KL-60+VY-50	0.92

Light source : 1KW xenon arc. Dose rates were measured with * : potassium ferric oxalate actinometer, ** : Toshiba UV intense meter, and no symbol : Lambda LI-185 Radiometer/Photometer.

erythrosine Y は Fig. 19 に示す。いずれも最小 2 乗法により求めた直線をも図示してある。図には示していないが色素無添加の光照射のみでは、これらの波長光線は少なくとも両図に示す範囲内の時間照射は、生存率を減少させないことを確かめてある。Fig. 18 に示す phloxine B の場合、528.5 から 557.5nm 間の単色光は、60 秒照射で生存率を 10% 以下、90 秒照射で

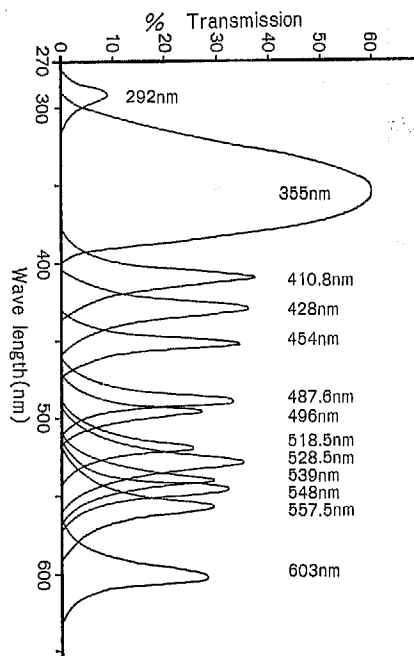


Fig. 16. Spectral distributions of monochromatic rays

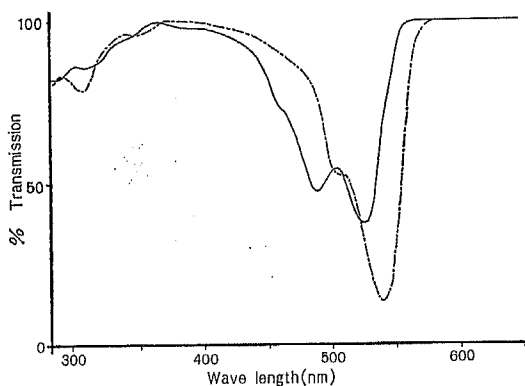


Fig. 17. Absorption spectra of phloxine B and erythrosine Y
 ----- phloxine B ($10^{-5}M$), — erythrosine Y ($10^{-5}M$) in Hanks-Wallace salt solution at pH 7.2, 10mm.

1% 以下に減少させた。一方 410.8 および 603.0nm は、90 秒照射でも 90% 以上、487.6nm は同じく 90 秒照射で 45% の生存率を示した。Table 5 に示す通り、528.5 から 557.5nm の照射線量率は 0.67~0.92mJ/

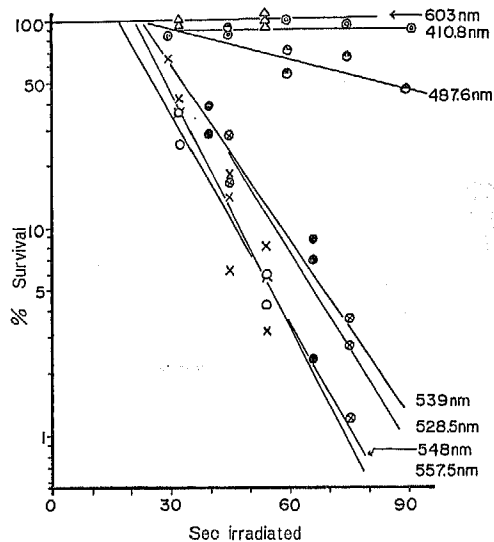


Fig. 18. Phototoxicity of phloxine B with visible monochromatic rays

$10^{-4}M$. XX-male (M) cells. Light source : xenon arc, dose rate : shown in Table 5. λ max : 540nm.

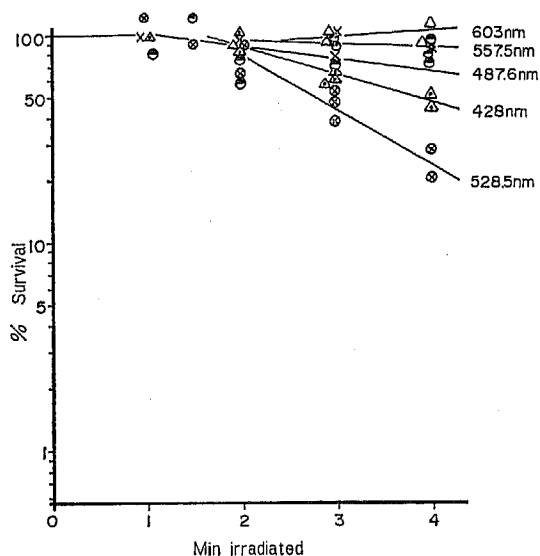


Fig. 19. Phototoxicity of erythrosine Y with visible monochromatic rays

$10^{-8}M$. XX-male (M) cells. Light source : xenon arc, dose rate : shown in Table 5. λ max : 525nm.

$\text{cm}^2 \cdot \text{sec}$, 410.8nm のそれは $0.56 \text{mJ}/\text{cm}^2 \cdot \text{sec}$, 603.0 nm では $0.92 \text{mJ}/\text{cm}^2 \cdot \text{sec}$, 487.6nm では $1.06 \text{mJ}/\text{cm}^2 \cdot \text{sec}$ である。この照射線量率を考慮に入れてもほぼ Fig. 18 に示されるごとく, 528.5~557.5nm の光線は phloxine B を励起させ, その光毒性を誘起させる作用は大きい。同様に 410.8 および 603.0nm のそれは小さく, 487.6nm はその間に位置するということができる。

Fig. 19 に示す erythrosine Y の場合, 光毒性は中等度であるため, phloxine B に比べ照射時間を 240秒までとより長く設定した。528.5nm は 240秒照射で生存率を約 22% に減少させるが, 同じ 240秒照射でも 557.5nm では生存率は 85%, 603.0nm ではほとんど減少させなかった。428.0nm の照射線量率は $2.28 \text{mJ}/\text{cm}^2 \cdot \text{sec}$ ときわ立って大きい, それ以外は 528.5nm の $0.67 \text{mJ}/\text{cm}^2 \cdot \text{sec}$ を最小とし, おおむね $0.92 \sim 1.06 \text{mJ}/\text{cm}^2 \cdot \text{sec}$ の間にある。528.5nm の光線は erythrosine Y を励起させるが, その光毒性を誘起させる作用はさして大きいとはいえない。同様に 487.6, 557.5 および 603.0nm のそれは小さいか, ほとんど証明できなかった。428.0nm は照射線量率が他の波長のそれらの 2 ないし 3.5 倍と大きいので, 240秒照射での生存率は 50% 弱と低い成績を得ているが, この図からのみでは光毒性誘起作用の比較検討はできない。

Fig. 18 の照射線量 (照射線量率 \times 照射時間) のうち 30 および $50 \text{mJ}/\text{cm}^2$ の場合の波長別生存率を phloxine B の吸光スペクトルとともに Fig. 20 に示してある。Erythrosine Y は同じく $200 \text{mJ}/\text{cm}^2$ 照射時のそれを Fig. 21 に示す。Fig. 20, Fig. 21 より明らかな通り, 同一照射線量における生存率から求めた主作用波長は phloxine B, erythrosine Y ともに各々の色素の可視部最大吸光波長にほぼ一致した。

2 紫外領域

太陽光線に含まれる紫外線は, 290nm より短い波長が地上 25km 付近に密度中心のあるオゾン層で吸収されてしまうため, 地表には 290nm より長い波長のみに到達するとされている²⁾⁶³⁾。色素の紫外部吸光波長域のうち, 地表に到達する最短波長に近い 292.4nm および長波長紫外線の代表波長として 355.0nm の 2 波長を選び, その xanthene 系色素光毒性誘起効果を調べた。

Phloxine B ならびに erythrosine Y 添加後, 292.4nm 紫外線照射による細胞生存率変化を Fig. 22

に示す。色素無添加で紫外線照射のみのコントロールでは 30秒照射では生存率は 0, phloxine B 添加群は 60秒照射で同じく 0 であるが, erythrosine Y 添加群は 120秒照射でも生存率は 20% を保つ。すなわち

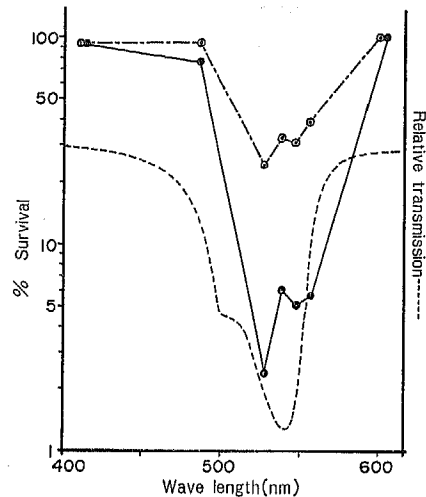


Fig. 20. Action spectra of phloxine B phototoxicity

10^{-4}M , XX-male (M) cells. Dose: $30 \text{mJ}/\text{cm}^2$ (○), $50 \text{mJ}/\text{cm}^2$ (●). ----- Absorption spectrum of phloxine B.

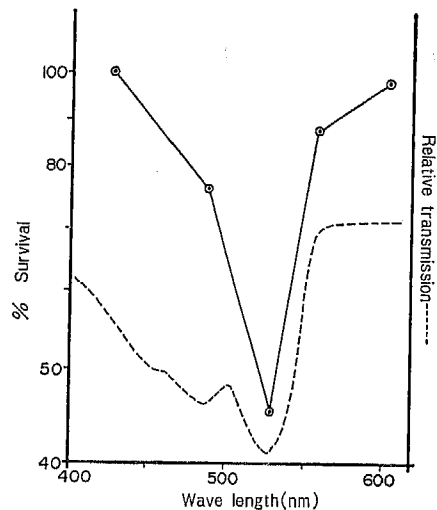


Fig. 21. Action spectra of erythrosine Y phototoxicity

10^{-3}M , XX-male (M) cells. Dose: $200 \text{mJ}/\text{cm}^2$ (○). ----- Absorption spectrum of erythrosine Y.

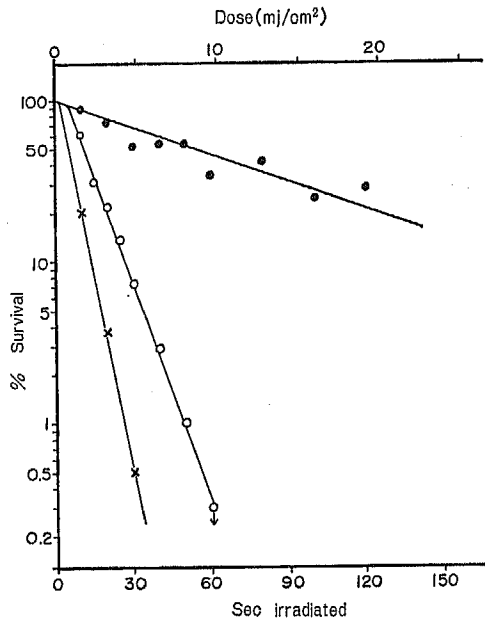


Fig. 22. Phototoxicity of xanthene dyes with 292nm UV

○ Phloxine B (10^{-4} M), ● erythrosine Y (10^{-8} M), × control. XX-male (M) cells. Dose rate: $0.16\text{mJ}/\text{cm}^2\cdot\text{sec}$.

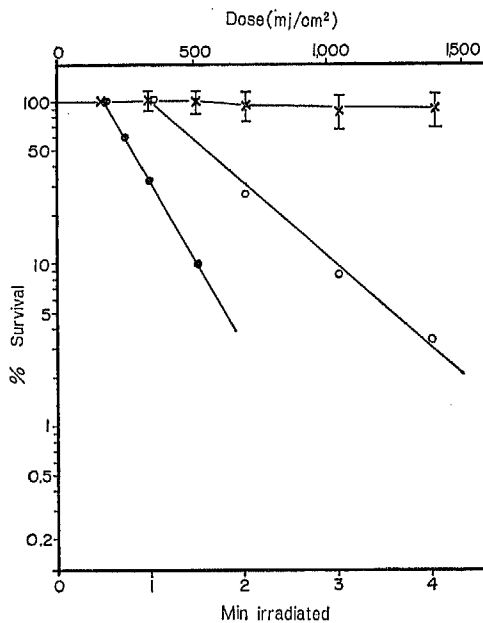


Fig. 23. Phototoxicity of xanthene dyes with 355nm UV

○ Phloxine B (10^{-4} M), ● Erythrosine Y (10^{-8} M), × control (mean \pm SD). XX-male (M) cells. Dose rate: $5.8\text{mJ}/\text{cm}^2\cdot\text{sec}$.

照射のみのコントロールに比べ色素を添加しての照射では, erythrosine Y に著明に, phloxine B に僅かに, 細胞生存率はより大きかった。

同じく phloxine B, erythrosine Y 添加後, 355.0nm 紫外線照射による細胞生存率変化を Fig. 23 に示す。紫外線照射のみのコントロールでは4分間照射しても生存率はほとんど低下しないが, phloxine B 添加群では90秒照射での生存率は10%, erythrosine Y 添加群では180秒照射で8.5%と減少した。すなわち両色素ともに, 355.0nm 照射で光毒性を示した。

E 同調培養による細胞周期の段階と光毒性感受性 採集した XE 細胞株のM期細胞を同調培養し, 約3時間ごとに色素と incubate 後, 蛍光灯照射により得た照射線量—生存率曲線を Fig. 24, 25, 26 に示す。用いた色素は光毒性作用の強い rose bengal ならびに phloxine B, 作用の中等度である erythrosine Y の計3種, 濃度は各色素の細胞毒性の発現しない最大濃度付近を選び rose bengal では $5 \times 10^{-5}\text{M}$, phloxine B 10^{-4}M , erythrosine Y 10^{-8}M とした。

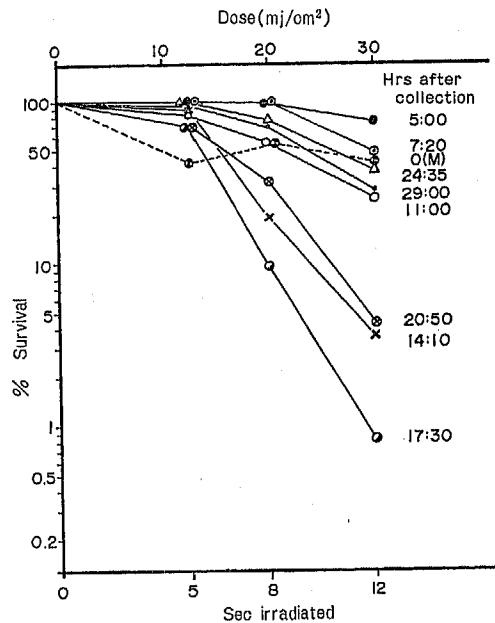


Fig. 24. Phototoxicity of rose bengal on synchronized cells

$5 \times 10^{-5}\text{M}$, XE (M) cells, Light source: deluxe type fluorescent lamp, dose rate: $2.5\text{mJ}/\text{cm}^2\cdot\text{sec}$.

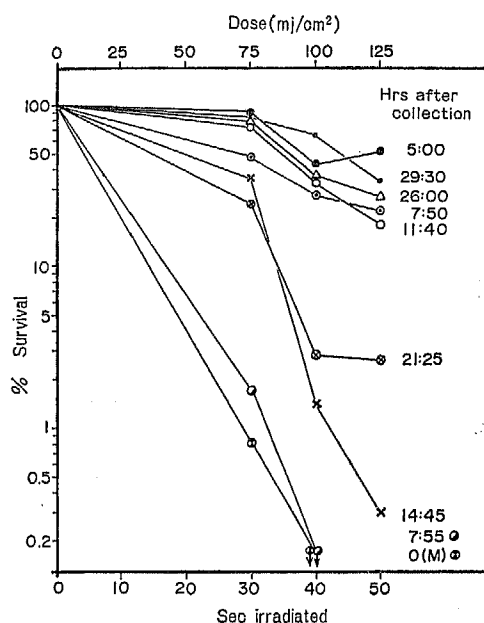


Fig. 25. Phototoxicity of phloxine B on synchronized cells

10^{-4} M. XE (M) cells. Light source : deluxe type fluorescent lamp, dose rate : 2.5 mJ/cm²·sec.

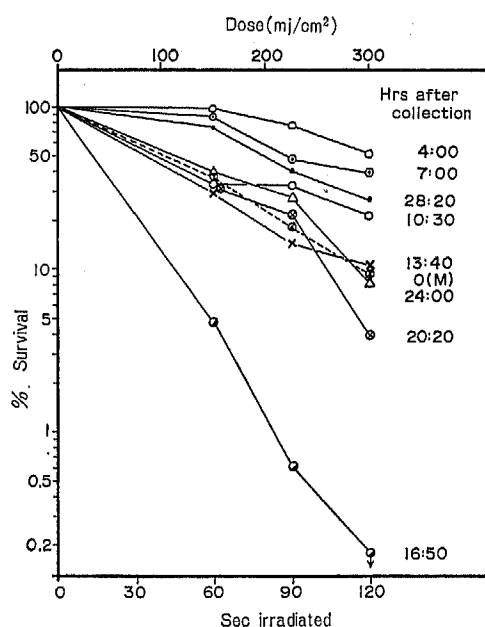


Fig. 26. Phototoxicity of erythrosine Y on synchronized cells

10^{-8} M. XE (M) cells. Light source : deluxe type fluorescent lamp, dose rate : 2.5mJ/cm²·sec.

Fig. 24 に示す rose bengal の場合、12秒照射での生存率はM期細胞採集後の培養時間5時間で70%、以後7時間20分、11時間、14時間10分と培養時間が長くなるに従ってその生存率は順次低下し、17時間30分で最小値0.8%を示した。20時間50分、24時間35分と再び生存率は上昇し、29時間で27%を示した。

Fig. 25 に示す phloxine B の場合、30秒照射での生存率は同じく5時間で90%、7時間50分で48%と減少し、11時間40分で72%に上昇するが、14時間45分で35%と再び低下し、17時間55分で最小値0.8%を示した。以後21時間25分、26時間と順次上昇し29時間30分で80%を示した。培養時間0のM期細胞の30秒照射生存率も、生存率最小を示した17時間55分のそれに近かった。

Fig. 26 に示す erythrosine Y の場合、90秒照射の生存率は、培養時間4時間、7時間、10時間30分、13時間40分と培養時間が長くなるほど順次低下し、16時間50分で最小値0.6%を示した。以後20時間20分、24時間、28時間20分とほぼ順次上昇した。

Rose bengal では培養時間5時間のものが、ph-

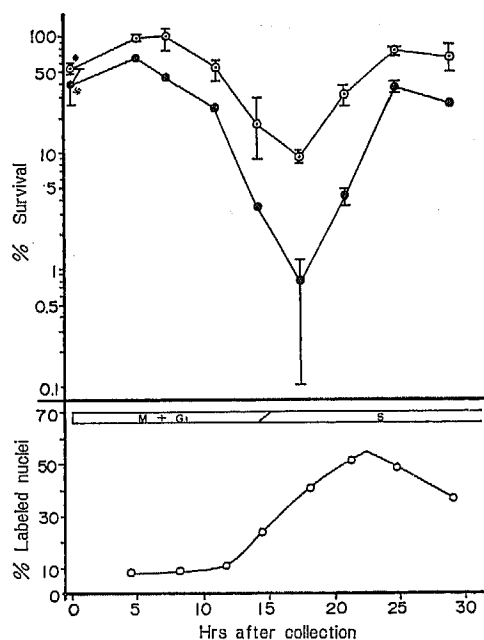


Fig. 27. Relations between cell stages and the sensitivity to rose bengal phototoxicity

5×10^{-5} M. XE (M) cells. Light source : deluxe type fluorescent lamp, dose : 20mJ/cm² (○), 30mJ/cm² (●). Mean \pm SD.

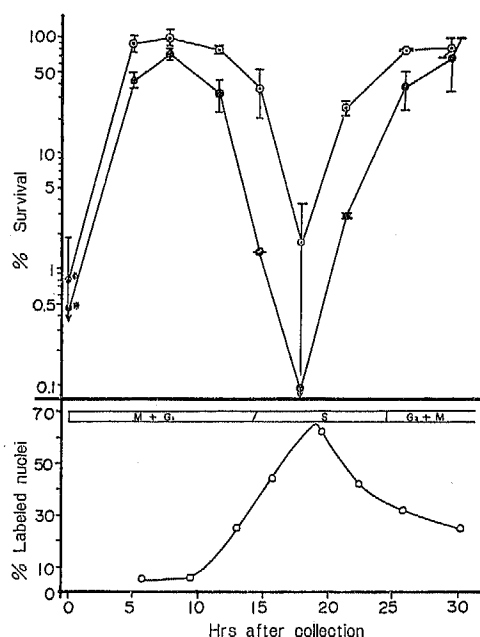


Fig. 28. Relations between cell stages and sensitivity to phloxine B phototoxicity 10^{-4} M, XE (M) cells. Light source : deluxe type fluorescent lamp, dose : $75\text{mJ}/\text{cm}^2$ (○), $100\text{mJ}/\text{cm}^2$ (●). Mean \pm SD.

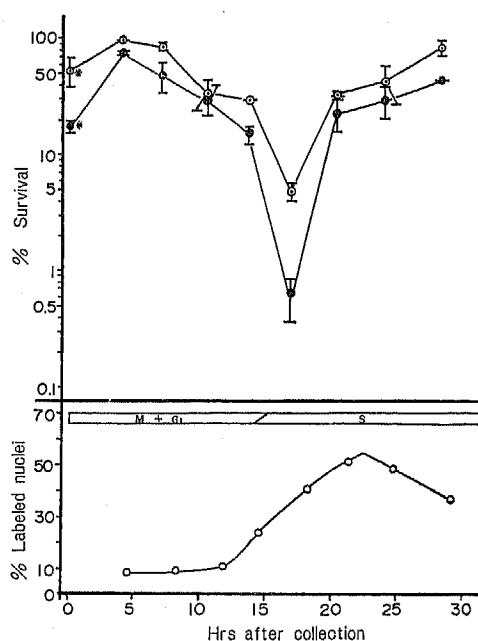


Fig. 29. Relations between cell stages and the sensitivity to erythrosine Y phototoxicity 10^{-5} M. Light source : deluxe type fluorescent lamp, dose : $150\text{mJ}/\text{cm}^2$ (○), $225\text{mJ}/\text{cm}^2$ (●). Mean \pm SD.

loxine B では同じく5時間が、そして erythrosine Y では4時間のものが、それぞれ最も低い感受性を示した。

また Fig. 24, 25, 26 より得た同一照射線量における生存率の変化とオートラジオグラフィの結果との関係を、Fig. 27, 28, 29 に示す。

Fig. 27 の rose bengal では 20 および $30\text{mJ}/\text{cm}^2$, Fig. 28 の phloxine B では 75 および $100\text{mJ}/\text{cm}^2$, Fig. 29 の erythrosine Y では 150 および $225\text{mJ}/\text{cm}^2$ の照射線量での結果を示してある。分注枚数が各色素で100枚以上と多かったためか、細胞周期は通常約22時間であるが、この場合はやや延長した。Rose bengal の場合、オートラジオグラフィの結果から、細胞周期の段階は培養時間0～15.5時間がM期の一部を含む G_1 期 (DNA 合成前期), 15.5時間以上はS期 (DNA 合成期) で22時間付近がS中期と同定できるが、 G_2 期 (DNA 合成後期) は30時間以後にあると考えられる。そして rose bengal の光毒性に最も感受性の高い時期は培養時間17.5時間付近であり、これはS初期に該当する。培養時間0、すなわちM期細胞

もやや高い感受性を示した。そのほかには感受性の高い段階を認めなかった。

Phloxine B の場合、培養時間0～14.3時間がM期の一部を含む G_1 期, 14.3～24.5時間がS期, 24時間付近がS中期、そして24.5時間以後が G_2 期であり、その後期には次のM期の一部を含むと同定できる。そして phloxine B の光毒性に最も感受性の高い時期は培養時間18時間付近であり、これはS中期前に該当する。培養時間0のM期細胞も高い感受性を示した。そのほかには感受性の高い段階を認めなかった。

Erythrosine Y の場合、培養時間0～14.5時間がM期を含む G_1 期, 14.5時間以後がS期、そして22時間付近がS中期と同定できるが、 G_2 期は30時間以後にあると考えられる。そして erythrosine Y の光毒性に最も感受性の高い時期は培養時間17時間付近であり、これはS初期に該当する。M期細胞もやや高い感受性を示した。そのほかには感受性の高い段階を認めなかった。

同調培養された XE 細胞株は、DNA 合成開始とともにこれら色素の光毒性に感受性は増し、DNA 合

成ピークを過ぎると感受性は減少した。またM期細胞は感受性がやや高い。ただ培養時間0のM期細胞はHanks-Wallace 塩溶液中に集めたものを使うし、0時間以外のものは、M期細胞は培養液中に集めるので採集条件は同一ではない。したがって0時間のM期細胞の感受性を、他の時期の細胞群とただちに比較するのは疑問もないわけではない。

IV 考 察

ヒトが太陽光線の過剰照射にさらされると、紫外線皮膚炎を生じる。照射線量が大きいときは、浮腫性紅斑のうえに丘疹—水疱を生じ灼熱感を訴える。照射線量が小さいときは、軽い発赤のみあるいは僅かな丘疹を生じ、軽い搔痒を訴える。こうした現象は海、山、雪上などで一般に認められ、紫外線の細胞毒性によるとされている²⁾。

角質層およびメラニンとともに健常なヒト皮膚には何ら炎症を生じない程度の太陽光線照射で上記の炎症が生じるとき、その皮膚は光線過敏であるという²⁾。その際、皮膚の表皮または真皮内に、光線エネルギーを受けて励起する化学物質によって光線過敏が導入されるとき、その物質を光感作物質と呼ぶ²⁾。励起した物質の直接効果として炎症が生じる場合を光毒性効果と呼び、それらを光毒物質と呼ぶ。また励起に酸素消費を必要とするものは、さらに光力学性物質 (photo-dynamic substance) と区別する²⁾。励起した物質がそれ自体または蛋白質と結合してから、生体を免疫しアレルギー機序を導入し炎症を生じる場合を光アレルギー効果、それらを光抗原性物質 (photoallergen) と呼ぶ²⁾⁴⁶⁾。臨床的には光アレルギーはまれな疾患であるが、光力学性を含めた広義の光毒性疾患は珍しくない。

皮膚科領域では、太陽光線照射により発症する光線過敏症は古くから知られており、先天性ヘマトポルフィリン症 (congenital hematorporphyria, Hans Günther, 1911)⁶⁴⁾ などが命名され、ポルフィリンが原因物質として知られ、励起する光線の波長領域すら記載されている。このように生体内由来の光感作物質の研究は、やがて1930年代以後生体外の化学物質として特に xanthene 系色素⁹⁾⁶⁵⁾⁶⁶⁾、サルファ剤³⁴⁾³⁵⁾、クロロフィル¹¹⁾¹²⁾、ビタミン⁶⁷⁾、抗生物質³⁾¹⁸⁾²⁰⁾³⁰⁾³²⁾などの研究に移行した。特に Blum⁶⁵⁾ の xanthene 系色素を用いての一連の研究は、それら色素が広く使用されていることと合わせて、今日まで xanthene

系色素に代表的な光感作物質の地位を与えている。

Blum と Hyman⁶⁵⁾⁶⁶⁾ は家兎赤血球溶血作用の研究から、xanthene 系色素の光毒性作用は分子酸素消費を必要とする光力学作用であるという。これに対し、酸素消費を必要としない光毒性作用物質としては、8 MOP などの furocoumarin 類や riboflavin などがあげられる⁶⁷⁾。そして一応光毒性と光力学性物質による皮膚炎症の型は異なった表現をとるとされている。

一般の皮膚科学の成書には次のごとく記述されている²⁾⁶⁸⁾。

光毒性機序による皮膚炎症は、発赤—丘疹を主とする湿疹型で、ひとたび発症すると最小限度2—3日はその症状を持続し、長期間経過すれば多少とも色素異常を残す。

光力学性機序による皮膚炎症は、浮腫性紅斑または膨疹を主とする滲出性紅斑または蕁麻疹型で、発症しても短時間に消失して正常皮膚に戻り、これを反復するが、原則として色素異常は残さない。

皮膚科学のみならず医学で最も古くから、かつ広く注目された光感作物質は porphyrin である。Porphyrin はその後光力学性物質に分類された代表的な物質である。その症状は上記の膨疹—紅斑型であることが臨床型分類のもとになったことは否定できない。

紫外部領域で励起する物質は、たとえ血管の豊富な真皮内に存在しても光により励起される可能性は小であり、したがって蕁麻疹紅斑型を現しにくい。しかしその物質も表皮内にあれば容易に励起され、表皮炎としての炎症を発赤—丘疹型として現し得る。可視領域で励起される物質は、真皮内に存在しても励起される可能性は大で、その場合は当然浮腫性紅斑—膨疹型として現れ得る。このように臨床型の違いから、光毒性および光力学性機序を安易に推定するのは危険が多い。

こうした理由から光力学性と光毒性を合わせて広義の光毒性反応とし、通常は特に光力学性という表現を区別しない。

光感作での基礎的な細胞における諸変化の報告は、比較的少ない。

それらのほとんどすべてがいわゆる光力学性物質を光感作物質として研究している⁶⁹⁾⁷¹⁾。それらを概略すると、細胞の反応するもしくは変化する部位は、(1)細胞膜の外側部分、(2)細胞質、(3)DNA に大別される。

細胞膜外側部分に作用するものとして porphyrin⁷⁰⁾ および toluidine blue などの thiazine 系色素⁷⁰⁾⁷¹⁾ があげられ、細胞膜透過性の変化や succinic dehydrogenase などの膜結合酵素系の変性⁷⁰⁾ をもたらす。

細胞質に作用するものとして anthracene⁶⁹⁾, thiopyronine⁷¹⁾ などがあげられ、特に anthracene はライゾゾームに作用すると報告されている。

DNA に作用するものとして acridine orange などの acridine 系色素があげられ⁷¹⁾, furocoumarin 類も DNA に作用する⁶⁷⁾。

Xanthene 系色素については、細胞膜外側部のみに作用するとの説⁶⁹⁾⁷²⁾ と細胞質に作用するとの説⁷¹⁾ がある。

著者⁵³⁾は、XX-male 皮膚、ターナー皮膚、Chang 肝培養細胞株の同調培養細胞に 290nm および 250nm の紫外線照射が、S 期前半の細胞を最も強く障害することを報告している。そのことより、今回の xanthene 系色素を用いての光毒性試験でもはたして S 期前半の細胞が感受性が高いかとの強い興味を抱き、xanthene 系色素の細胞毒性ならびに光毒性作用(光力学性作用)を、ヒト健常皮膚由来培養細胞株の M 期細胞を用いて定量的に検査した。

光毒性物質の研究対象として xanthene 系色素を選んだのは次の理由による。

- (1) 基本化学構造が同一で、I, Br, Cl のハロゲン原子置換度のみ異なった誘導体を容易に入手できる。
- (2) ハロゲン置換基をまったく持たない FL-Na と、種々の程度のハロゲン置換基をもつ誘導体との光毒性の強さを定量的に比較できる。
- (3) したがって光毒性と置換基の関係を明らかにできる。

またヒト健常皮膚由来培養細胞株 XX-male を用いたのは次の理由による。

- (1) 多数の、しかも同一感受性をもつヒトの皮膚サンプルを集め難い。したがって、同一サンプルでの反復試験を行い難い。
- (2) 実験動物での光毒性試験は、その結果をヒト皮膚に当てはめ難い。
- (3) Native な単細胞として得られる M 期細胞を用い、照射線量-細胞生存率曲線から D_{50} を求めることにより、色素の光毒性作用の強さを定量できる。
- (4) *In vitro* 試験によく使われるゾウリムシや酵母などの単細胞生物は、ヒト細胞と機能、構造、代謝を

異にするため、ヒト皮膚への影響を窺うには適当と思えない。

XX-male 細胞株への界面活性剤の細胞障害性と、実験動物への皮膚障害性とがよく相関することを、著者ら⁵⁰⁾⁵¹⁾はすでに報告した。ヒト XX-male 表皮細胞株を用いてのある化学物質の *in vitro* 試験は、ある条件下においては *in vivo* の結果と相関し得ると著者は考えている。また調べた限りでは、ヒト健常表皮由来培養細胞株を用いての光毒性～光力学性検査をした報告はない。

これまでに皮膚光線過敏症の歴史と化学物質の関与の仕方による分類、ポルフィリンおよび xanthene 系色素を中心とした研究の概略と成績を紹介した。また今回の実験に xanthene 系色素とヒト健常表皮細胞株 XX-male を用いる理由をも説明した。以下著者の得た結果についての考察をしたい。

色素の一次細胞毒性すなわち非照射条件下での色素の細胞毒性 (Table 3) は、rose bengal が最も強く、phloxine B, rhodamine B がこれに次ぎ、他の 8 種色素は $10^{-3}M$ でも細胞毒性を示さなかった。細胞毒性を示したこれら 3 種色素のうち、rhodamine B は分子内にハロゲン置換基をもたず alkylamino 基をもつが、他の 2 色素は FL-Na にハロゲンのみが置換した構造をもつ。後者 2 色素はともに 8 原子のハロゲン置換基を分子内にもつが、rose bengal は 4 原子の Cl と同じく 4 原子の I を、そして phloxine B は 4 原子の Cl と 4 原子の Br をもつ。その他の試験した色素のハロゲン置換基は、すべて 4 原子またはそれ以下である。したがって FL-Na にハロゲンのみが置換した構造の xanthene 系色素が $10^{-8}M$ ないしそれ以下の濃度で一次細胞毒性を示すためには、8 原子のハロゲン置換基を必要とする。また同じ 8 原子の置換基をもちながら、rose bengal の細胞毒性は phloxine B のそれを上まわった。この事実は、Br 原子置換に比べ I 原子置換が色素の細胞毒性をより強めることを示す。また rose bengal, phloxine B などは蛋白質との結合力は大きい⁵²⁾。一方 rhodamine B は蛋白質との結合力は小さく⁷³⁾、ハロゲン置換基をもたないにもかかわらず、細胞毒性は大きい。Rhodamine B の rat への経口亜急性毒性が xanthene 系色素のうちでは大きいとの報告⁷⁴⁾ がある。単細胞レベルでの試験と生体レベルでの試験の相違が、こうした一見矛盾する結果に結びついていよう。Rhodamine B と類似構造をもつ acid red が一次

毒性、光毒性作用ともにほとんど示さないのは興味がある。

一方蛍光灯照射による光毒性は、XX-male のM期細胞に対し、rose bengal が最も強く、phloxine B がこれに次ぎ、erythrosine B (4I), erythrosine Y (2I), dBF (2Br) が中等度、eosine IB (2Br, 2NO₂), eosine Y (4Br), rhodamine B が軽度、dCF (2Cl), FL-Na は微弱で、acid red は示さなかった。一次細胞毒性を強く示した8原子のハロゲン置換基をもつ rose bengal と phloxine B は、光毒性も最も強い。そして4ないし2原子のハロゲン置換基をもつ色素は、中等度から軽度の光毒性作用を示す。そしてハロゲン置換基をもたない FL-Na も微弱ながら光毒性作用を示し、その程度は dCF (2Cl) とほぼ同様であった。また、ハロゲン置換基が2原子の dBF がかなり強い光毒性を示したのに4原子の eosine Y のそれが強くなかった。したがって、ハロゲン置換基の多い色素ほど光毒性作用も強いとは必ずしもいい切れない。色素の光毒性の強さを同数置換基のものについて比較すると rose bengal (4Cl, 4I) > phloxine B (4Cl, 4Br), dBF (2Br) > dCF (2Cl) ≈ FL-Na (ハロゲンなし), erythrosine B (4I) > eosine Y (4Br) の順であり、したがってこれらの光毒性作用を強めるハロゲンの順序は I > Br > Cl である。しかも dCF と FL-Na の光毒性にほとんど差のないことから、2原子の Cl は光毒性作用に関与しないと見なすことができる。

Xanthene 系色素の光毒性の有無とその強さの順位についての報告は少なくはない。

家兎赤血球の photo-hemolysis 作用は rose bengal > erythrosine B > eosine Y > FL-Na の順である⁶⁵⁾との報告がある。さらに *Flavobacterium aquatile* への光毒性は rose bengal > phloxine B > eosine Y ≈ erythrosine B > rhodamine B といわれる⁷⁵⁾。

ザリガニ (*Homarus americanus*) 巨大神経軸索の Na⁺ channel の光ブロック作用は、量子収率より計算して rose bengal > erythrosine B > phloxine B > 2,4,5,7-tetra-bromo-3',6'-dichloro-fluorescence Na > eosine Y > dBF > eosine IB > 4,5-dCF > FL-Na⁷⁶⁾と報告されている。筋小胞体小胞膜の ATPase 活性と Ca²⁺ up take への光不活性化作用は rose bengal > erythrosine B > erythrosine Y > phloxine B > eosine Y ≈ eosine IB > dBF の順

で FL-Na と rhodamine B は無作用⁷⁷⁾という。Trypsin への光不活性化作用は phloxine B > rose bengal > eosine Y > erythrosine B の順で、FL-Na と acid red は無作用⁷⁸⁾といわれる。

ヒト培養細胞株での報告は、単層培養した喉頭ガン由来培養細胞株 Hep-2 を用い光毒性物質の screening を行い、phloxine B, eosine Y の光毒性作用を認める報告がある⁷⁹⁾。

これらの報告はそれぞれ実験条件が相違しているので、単純に色素の光毒性順位をそのまま比較はできない。ただ FL-Na の光毒性作用が、ないかもしくは微弱である点で共通している。

次に今回の実験で、光毒性を誘起する可視光領域の主作用波長を同一照射線量における細胞生存率から求めると、phloxine B, erythrosine Y では各色素の可視部最大吸光波長域にほぼ一致した。

Phloxine B のみに、その主蛍光励起波長の 403~405nm⁵²⁾を含む波長領域の照射を Table 5 に示した条件で行った。その照射線量-生存率曲線をすでに Fig. 18 に示してある。この条件では、phloxine B の光毒性は僅かに認められるにすぎなかった。しかし Fig. 16 に示す通り、照射時に用いたフィルターは 410.8nm に最大透過波長をもち、403~405nm の線量は、計算上全体の 1/4 程度にすぎない。したがって phloxine B では、主蛍光励起波長領域が果たして光毒性を誘起するか否かを検討するには、本フィルターの使用は適当ではなかった。403~405nm に主透過波長をもつフィルターを用いて検討する必要がある。

他方、光感作性物質のほとんどすべては蛍光物質でもある。高演色形蛍光灯を用いての照射実験では、試験した11種の xanthene 系色素は acid red を除き程度の差こそあれ光毒性を誘起したが、このうち最も強い蛍光を発する FL-Na は最も弱く誘起した。

次に紫外線領域に色素の光毒性を誘起する波長域を求めてみた。色素を添加して照射した紫外線のうち、355.0nm の照射は、かなり微弱ではあるが細胞生存率を低下せしめた。一方、地表に到達し得る最短波長に近い 292.0nm の照射は、溶液中の色素の存在がむしろ細胞生存率の低下を抑制した。Hanks-Wallace 塩溶液中の色素分子が光線の通過を妨げ、その光毒性誘起を阻害したものと考えられる。これと似た現象は Fig. 7 に示したように erythrosine B を添加して可視光線を照射した場合にも認められ、照射線量が増加するに従い 10⁻⁴M 添加群の細胞生存率はより高濃度

である 10^{-8} M 添加群のそれよりも下まわったが、推計学的な有意差はなかった ($P>0.05$)。

理論的には色素と incubate 後培養細胞を洗浄し、細胞膜上または細胞内に侵入した色素のみを残し、溶液中に色素の存在を認めない条件で光照射すべきであろう。高瀬⁸⁰⁾は *Staphylococcus aureus* 209P と色素を incubate 後遠沈洗浄し、洗浄後の菌体に光照射して光毒性を調べている。しかし培養細胞のM期を採集しての実験では、数度の遠沈洗浄操作は露光機会を与え、細胞の着生率を低下させる。またシャーレに着生している同調培養細胞の実験でも、洗浄操作は細胞を剥離流失させやすい。このように遠沈または洗浄は、少なくとも培養細胞への xanthene 系色素の光毒性実験では行えない。

次にいかなる機序で、xanthene 系色素が光毒性作用を現すかを研究した。Xanthene 系色素の rose bengal, phloxine B, そして erythrosine Y の光毒性に対して、同調培養した XX-male 表皮細胞株よりの clone である XE 細胞株ではS期前半に最も高い感受性を示した。採集条件が多少異なるが、M期細胞もわずかに感受性を示した。Xanthene 系色素は結合試験で牛胸腺よりの DNA と結合しないので、DNA に傷害を与えないとの推測がある⁷¹⁾。著者は DNA と xanthene 系色素での直接の光毒性試験を行っていない。しかし DNA 合成期前半にきわめてシャープな細胞生存率の低下を認めたので、DNA 合成過程のいずれかの点に作用すると考えている。ただ、その作用機序については研究していない。

前述のごとく、xanthene 系色素は最もよくその光毒性を研究された化学物質であるが、ヒト表皮培養細胞での報告はなく、著者の得た成績のみである。大方のご批判と追試を望みたい。今後、xanthene 系色素の皮膚内部位と、病型の相違を引き続き研究したい。

V 結 論

(1) ヒト健常皮膚由来培養細胞株 XX-male から採集法によりM期細胞を集め、11種の xanthene 系色素の非照射条件下での一次細胞毒性を細胞生存率より調べた。

一次毒性は rose bengal が最も強く、phloxine B, rhodamine B がこれに次ぎ、その他の色素では 10^{-8} M でも認められなかった。やや置換基の異なる rhodamine B を除いて、xanthene 系色素が 10^{-8} M で毒性を示すためには1分子中に8原子のハロゲン置換を必要とした。

(2) 同じく11種の色素について 10^{-8} ~ 10^{-5} M を添加し、高演色形蛍光灯を光源とする光照射を加えてM期細胞の生存率より光毒性を調べた。

同一照射線量による光毒性の強さは、rose bengal > phloxine B > erythrosine B \approx erythrosine Y \approx dBF > eosine IB \approx eosine Y > rhodamine B > dCF \approx FL-Na の順であり、acid red には光毒性を認めなかった。

ハロゲン置換数8原子の色素は、4ないし2原子の色素と比べ光毒性作用は強かった。また色素の光毒性作用は置換ハロゲンの種類によっても異なり、その色素光毒性増強効果は I > Br > Cl の順であり、Cl の効果はごく小さく、2原子程度の関与はほとんど影響を与えなかった。

(3) 292.0~603.0nm の単波長光線を照射して、phloxine B および erythrosine Y の光毒性を誘起させる主波長を調べた。

各色素の光毒性誘起波長は、それぞれの可視部最大吸光波長とはほぼ一致した。また 292.0nm の紫外線照射では、塩溶液中の色素が紫外線の通過を防げるためか細胞生存率の低下を抑制した。

(4) 細胞を同調培養し、細胞周期の各段階における rose bengal, phloxine B, erythrosine Y の光毒性感受性を調べた。DNA 合成期前半で最も細胞の感受性が高く、分裂期がこれに次いだ。

おわりにあたり、ご指導とご校閲を賜りました恩師高瀬吉雄教授、さらにご校閲ならびに貴重なご指摘を賜りました本学医学部第一解剖学教室永田哲士教授、同順応生理学教室上田五雨教授に深く謝意を表します。

本論文の要旨は、日本香粧品科学会第6回学術大会(1981年6月、東京)にて発表した。

文 献

- 1) Raab, O. : Ueber die Wirkung fluorescirender Stoffe auf Infusorien. Z Biol, 39 : 524-546, 1900
- 2) 高瀬吉雄 : 光と皮膚, 小堀辰治, 安田利顯監修, pp.5-15, 金原出版, 東京, 1973
- 3) Gloxhuber, C. : Prüfung von Kosmetik-Grundstoffen auf fototoxische Wirkung. J Soc Cosmet Chem, 21 : 825-833, 1970
- 4) Foerster, H. R. and Schwartz, L. : Industrial dermatitis and melanosis due to photosensitization. Arch Dermatol, 39 : 55-68, 1939
- 5) Crow, K. D. : Photosensitivity due to pitch. Br J Dermatol, 73 : 220-232, 1961
- 6) Fitzpatrick, T. B., Hopkins, C. E., Blickestaff, D. D. and Swift, S. : Augmented pigmentation and other responses of normal human skin to solar radiation following oral administration of 8-methoxypsoralen. J Invest Dermatol, 25 : 187-190, 1955
- 7) Pathak, M. A., Krämer, D. M. and Fitzpatrick, T. B. : In "Sunlight and man", Fitzpatrick, T. B. (ed.), pp.335-368, University of Tokyo Press, Tokyo, 1974
- 8) Sams, W. M. : Photodynamic action of lime oil (*Citrus aurantifolia*). Arch Dermatol, 44 : 571-584, 1941
- 9) Kaidbey, K. H. and Kligman, A. M. : Identification of topical photosensitizing agents in humans. J Invest Dermatol, 70 : 149-151, 1978
- 10) Mathews, M. M. and Siström, W. R. : The function of the carotenoid pigments of *Sarcina Lutea*. Arch Microbiol, 35 : 139-146, 1960
- 11) Tapper, B. A., Lohrey, E., Hove, E. L. and Allison, R. M. : Photosensitivity from chlorophyll-derived pigments. J Sci Food Agric, 26 : 277-284, 1975
- 12) 田村行広, 真木俊夫, 嶋村保洋, 西垣 進, 直井家壽太 : クロレラの衛生学的研究. I. クロレラ錠摂取による光過敏性皮膚炎の原因物質とその生成過程. 食衛誌, 20 : 173-180, 1979
- 13) Boehm, G. : Photodynamische Wirkung von Laktoflavin und Hämatoporphyrin am nervenfreien glatten Muskel (Vogelamnion). Helv Physiol Pharmacol Acta, 4 : C8-C9, 1946
- 14) Zalar, G. L., Poh-Fitzpatrick, M., Krohn, D. L., Jacobs, R. and Harber, L. C. : Induction of drug photosensitization in man after parenteral exposure to hematoporphyrin. Arch Dermatol, 113 : 1392-1397, 1977
- 15) 高島 巖, 平山晃也 : 光線過敏症におけるポルフィリンの意義. 皮の臨, 10 : 711-718, 1968
- 16) Schulz, K. H., Wiskemann, A. and Wulf, K. : In "1956-1957 Year Book of Dermatology", Baer, R. L. and Witten, V. H. (eds.), pp. 148-150, Year Book Medical Publishers, Inc., Chicago, 1957
- 17) Epstein, J. H. and Brunsting, L. A. : Topical application of chlorpromazine : Its effect on the erythema response to ultraviolet light. J Invest Dermatol, 30 : 91-92, 1958
- 18) Sams, W. M. and Epstein, J. H. : The experimental production of drug phototoxicity in guinea pigs, I. Using sun light. J Invest Dermatol, 48 : 89-94, 1967
- 19) Satanove, A. and McIntosh, J. S. : Phototoxic reactions induced by high doses of chlorpromazine and thioridazine. J A M A, 200 : 209-212, 1967
- 20) Stott, C. W., Stasse, J., Bonomo, R. and Campbell, A. H. : Evaluation of the phototoxic potential of topically applied agents using long-wave ultraviolet light. J Invest Dermatol, 55 : 335-338, 1970
- 21) Sidi, E., Hincky, M. and Gervais, A. : Allergic sensitization and photosensitization to phenegran cream. J Invest Dermatol, 24 : 345-352, 1955
- 22) Stevanovic, D. V. : Photosensitivity due to certain drugs. Br J Dermatol, 73 : 233-237, 1961
- 23) Luton, E. F. and Finchum, R. N. : Photosensitivity reaction to chlordiazepoxide. Arch Dermatol, 91 : 362-363, 1965
- 24) Miller, R. C. and Beltrani, V. S. : Quinethazone photosensitivity dermatitis. Arch Dermatol,

- 93 : 346-347, 1966
- 25) Emmett, E. A. : Diphenhydramine photoallergy. Arch Dermatol, 110 : 249-252, 1974
 - 26) Satulsky, E.M. and Elizabeth, N. J. : Photosensitization induced by monoglycerol paraaminobenzoate. Arch Dermatol, 62 : 711-713, 1950
 - 27) Goldman, G. C. and Epstein, F. Jr. : Contact photosensitivity dermatitis from sun-protective agents. Arch Dermatol, 100 : 447-449, 1969
 - 28) Lamberg, S. I. : New photosensitizer : The artificial sweetener cyclamate. JAMA, 201 : 747-750, 1967
 - 29) Ison, A. E. and Davis, C. M. : Phototoxicity of quinoline methanols and other drugs in mice and yeast. J Invest Dermatol, 52 : 193-198, 1969
 - 30) Jirásek, L. and Schwank, R. : In "1960-1961 Year Book of Dermatology", Baer, R. L. and Witten, V. H. (eds.), pp. 170-171, Year Book Medical Publishers, Inc., Chicago, 1961
 - 31) Krauskopf, J., Marek, J. and Kruch, R. : In "1960-1961 Year Book of Dermatology", Baer, R. L. and Witten, V. H. (eds.), pp. 171, Year Book Medical Publishers, Inc., Chicago, 1961
 - 32) Harber, L. C., Tromovitch, T. A. and Baer, R. L. : Studies on photosensitivity due to demethylchlortetracycline. J Invest Dermatol, 37 : 189-193, 1961
 - 33) Watson, C. J., Lynch, F., Bossenmaier, I. and Cardinal, R. : Griseofulvin and porphyrin metabolism. Arch Dermatol, 98 : 451-468, 1968
 - 34) Epstein, S. : Photoallergy and primary photosensitivity to sulfanilamide. J Invest Dermatol, 2 : 43-51, 1939
 - 35) Blum, H. F. : Studies of photosensitivity due to sulfanilamide. J Invest Dermatol, 4 : 159-173, 1941
 - 36) Burry, J. N. : Photoallergies to fenticlor and multifungin. Arch Dermatol, 95 : 287-291, 1967
 - 37) Jillson, O. F. and Baughman, R. D. : Contact photodermatitis from bithionol. Arch Dermatol, 88 : 409-416, 1963
 - 38) Harber, L. C., Harris, H. and Baer, R. L. : Structural features of photoallergy to salicylanilides and related compounds. J Invest Dermatol, 46 : 303-305, 1966
 - 39) Epstein, J. H., Wuepper, K. D. and Maibach, H. I. : Photocontact dermatitis to halogenated salicylanilides and related compounds. Arch Dermatol, 97 : 236-244, 1968
 - 40) Molloy, J. F. and Mayer, J. A. : Photodermatitis from dibromsalan. Arch Dermatol, 93 : 329-331, 1966
 - 41) Emmett, E.A. : The nature of tribromosalicylanilide photoallergy. J Invest Dermatol, 63 : 227-230, 1974
 - 42) Wilkinson, D. S. : Photodermatitis due to tetrachlorosalicylanilide. Br J Dermatol, 73 : 213-219, 1961
 - 43) 堀尾 武 : Halogenated salicylanilides による光接触アレルギーに関する実験的研究. 皮紀, 71 : 1-25, 1976
 - 44) Freeman, R. G. and Knox, J. M. : The action spectrum of photocontact dermatitis, caused by halogenated salicylanilides and related compounds. Arch Dermatol, 97 : 130-136, 1968
 - 45) 水野信行, 菅野英男, 生駒元彦, 木村鈴代, 鈴木和幸, 大野盛秀, 松下信子, 定井正直, 加藤武嗣, 森川藤鳳, 中川靖久, 河本康太郎 : 光パッチテストの理論と実際. 日皮会誌, 82 : 779-788, 1972
 - 46) Epstein, J. H. : In "Sunlight and man", Fitzpatrick, T. B. (ed.), pp. 459-477, University of Tokyo Press, Tokyo, 1974
 - 47) Harber, L. C. and Baer, R. L. : Pathogenic mechanisms of drug-induced photosensitivity. J Invest Dermatol, 58 : 327-342, 1972
 - 48) 塩原貞子, 小西宏明 : タール系色素による光毒性作用の基礎的研究 (学会抄録). 日皮会誌, 82 : 196, 1972
 - 49) Morikawa, F., Fukuda, M., Nagamura, M. and Nakayama, Y. : Phototoxic reaction to xanthene dyes induced by visible light. J Dermatol (Tokyo), 3 : 59-67, 1976

- 50) 小西宏明, 井上佳子, 安藤寛治, 小林正久, 徳田安章, 高瀬吉雄: 培養細胞試験を中心とした界面活性剤の皮膚障害性試験, I. 非イオン型界面活性剤. 信州医誌, 25: 246-258, 1977
- 51) 小西宏明, 井上佳子, 渥美隆正, 安藤寛治, 小林正久, 高瀬吉雄: 培養細胞試験を中心とした界面活性剤の皮膚障害性試験, II. 陰イオン型界面活性剤. 信州医誌, 25: 259-270, 1977
- 52) Takase, Y., Nijo, S. and Konishi, H.: In "Sunlight and man", Fitzpatrick, T. B. (ed.), pp. 445-457, University of Tokyo Press, Tokyo, 1974
- 53) 小西宏明: 同調培養したヒト由来培養細胞株の細胞周期各段階における紫外線感受性の研究. 信州医誌, 29: 20-29, 1981
- 54) Furuyama, J., Mori, Y. and Kikkawa, H.: A male bearing XX sex chromosome constitution in human. Proc XII Intern Congr Genet, 1: 216, 1968
- 55) Sato, A.: Changes in chromatin pattern during long term of tissue culture of human male skin cells exhibiting XX chromosome. 26th Meeting of Japan. Tissue Culture Assoc., 1968
- 56) Terashima, T. and Tolmach, L. J.: Growth and nucleic acid synthesis in synchronously dividing populations of HeLa cells. Exp Cell Res, 30: 344-362, 1963
- 57) Robbins, E. and Marcus, P. I.: Mitotically synchronized mammalian cells: a simple method for obtaining large populations. Science, 144: 1152-1153, 1964
- 58) 松沢大樹編: ラジオオートグラフ—手技と応用. 朝倉書店, 東京, 1969
- 59) 東芝資料: 東芝干渉フィルター
- 60) Jagger, J. 著, 武部 啓訳: 紫外線光生物学, pp. 152-155, 共立出版, 東京, 1969
- 61) 近藤宗平: 分子放射線生物学, pp. 63-72, 東京大学出版会, 東京, 1972
- 62) Hall, E. J. 著, 浦野宗保訳: 放射線科医のための放射線生物学, pp. 33-36, 篠原出版, 東京, 1980
- 63) Moon, P.: Proposed standard solar-radiation curves for engineering use. J Franklin Inst, 230: 583-617, 1940
- 64) Günther, H.: Die Haematoporphyria. Deutsch Arch Klin Med, 105: 89-146, 1911 (Harber, L. C.: In "Clinical dermatology, Vol. 2," Demis, D. J., Dobson, R. L. and McGuire, J. (eds.), Unit 12-14, Harper and Row, Hagerstown, 1979 より引用)
- 65) Blum, H. F.: Photosensitization of living systems. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol, 3: 318-327, 1935
- 66) Blum, H. F. and Hyman, C.: Photodynamic hemolysis V. The effect of concentration of dye on hemolysis time. J Cell Physiol, 13: 287-296, 1939
- 67) Hanawalt, S. 著, 伊藤 隆, 土門正治訳: 不活性化と回復, p. 176, みすず書房, 東京, 1972
- 68) Harber, L. C., Baer, R. L. and Bickers, D. R.: 光と皮膚. 小堀辰治, 安田利顯監修, pp. 27-34, 金原出版, 東京, 1973
- 69) Allison, A. C., Magnus, I. A. and Young, M. R.: Role of lysosomes and of cell membranes in photosensitization. Nature, 209: 874-878, 1966
- 70) Harber, L. C., Baer, R. L. and Bickers, D. R.: In "Sunlight and man", Fitzpatrick, T. B. (ed.), pp. 319-333, University of Tokyo Press, Tokyo, 1974
- 71) Ito, T. and Kobayashi, K.: A survey of *in vivo* photodynamic activity of xanthenes, thiazines, and acridines in yeast cells. Photochem Photobiol, 26: 581-587, 1977
- 72) Cohn, G. E. and Tseng, H. Y.: Photodynamic inactivation of yeast sensitized by eosine Y. Photochem Photobiol, 26: 465-474, 1977
- 73) 小西宏明: 未発表データ
- 74) Hansen, W. H., Fitzhugh, O. G. and Williams, M. W.: Subacute oral toxicity of nine D and C coal-tar colors. J Pharmacol, 122: 29A, 1958
- 75) 稲田邦子, 宮沢文雄: 食用色素の細菌に対する光力学的作用について. 食衛誌, 10: 344-347, 1969
- 76) Pooler, J. P. and Valenzano, D. P.: Physicochemical determinants of the sensitizing effectiveness for photooxidation of nerve membranes by fluorescein derivatives. Photochem Photobiol, 30: 491-498, 1979
- 77) Kondo, M. and Kasai M.: Photodynamic inactivation of sarcoplasmic reticulum vesicle

membranes by xanthene dyes. Photochem Photobiol, 19: 35-41, 1974

- 78) 村上浩紀, 坂田幸平, 波多野昌二, 渡辺忠雄: キサンテン系食用色素の光化学反応によるトリプシン失活の機構, 1. 酸素の影響について. 食衛誌, 13: 12-18, 1972
- 79) Freeman, R. G., Murtishaw, W. and Knox, J. M.: Tissue culture techniques in the study of cell photobiology and phototoxicity. J Invest Dermatol, 54: 164-169, 1970
- 80) 高瀬吉雄: 紫外線と皮膚とくにタール系色素と光毒性. J Soc Cosmet Chem Jpn, 3: 135-144, 1969
(56.3.14 受稿)
-