[Jpn. J. Toxicol. Environ. Health]
[衛生 化学]
40 (6) 550-557 (1994)

ヘマトポルフィリン等の UVA 増感による過酸化脂質生成と赤血球の 溶血反応との関連

内野 正, 木嶋敬二, 安藤正典
国立衛生試験所環境衛生化学部

The Relation between Formation of Lipid Hydroperoxides and Hemolysis of Erythrocytes by UVA-sensitization of Hematoporphyrins

TADASHI UCHINO, KEIJI KIJIMA and MASANORI ANDO

*Division of Environmental Chemistry, National Institute of Health Sciences, 1-18-1
Kamigyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158, Japan*

(Received July 6, 1994)

To examine biological effects of UVA, we investigated effects of UVA-sensitization with hematoporphyrin (HP) or riboflavin (RF) on the hemolysis and lipid hydroperoxide levels of rabbit erythrocytes. We irradiated UVA (365 nm) at r.t. for certain time, and after the end of irradiation measured hemolysis keeping erythrocytes at r.t. or at 0°C. As the result, though erythrocytes hemolyzed almost 100% at r.t., hemolysis was almost 0% at 0°C. It is evident that HP was a much stronger sensitizer than RF. Moreover, we measured contents of hydroperoxide of phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE), most of which constructed lipid cellular membrane, after or before UVA irradiation by the chemiluminescence-HPLC method. As the result, before hemolysis, hydroperoxide levels per lipid significantly increased after the end of irradiation, compared with control (1.75 → 4.57 nmol/mg PC, 6.13 → 12.9 nmol/mg PE, respectively). These results suggest that cellular membrane lipid hydroperoxide which was formed with singlet oxygen produced by UVA sensitization, might be concerned with hemolysis.

Keywords — UVA ; lipid hydroperoxide ; hematoporphyrin

緒 言

太陽から放射される紫外線のうち、波長の長い (320—400 nm) UVA の生体に与える影響が注目されている。これまで UVA は UVB に比べてエネルギーが低いので直接的な生体影響は UVB より小さいと考えられ、生体影響に関する報告は UVB に比べて少なかった。しかし、生体内にはヘマトポルフィリン (HP)、リボフラビン (RF) など、光増感物質となり得るものが存在し、これらを介した間接作用が生体影響に関与していることも考えられる。HP は血色素の前駆物質であり、RF は生体内で FMN 及び FAD となり、ミトコンドリアの呼吸鎖—電子伝達系や ATP 合成酵素の補酵素として重要である。

UVA 照射によって皮脂に過酸化が起こり、またポルフィリン、RF、8-メトキシソラレン、グリセオフルビンなどの光増感物質の共存は過酸化を著しく増強することが知られている。¹⁻⁶⁾ また赤血球の脂質が過酸化されると溶血が起こると言われており、⁷⁾ 佐々木ら⁸⁾ は RF を増感剤としてウサギ赤血球に UVA を照射し、照射後に 2-thiobarbituric acid reactive substance (TBA-RS) 値が上昇する傾向が見られることを報告しているが、詳細は不明な点が多い。

一方、宮澤ら^{9,10)} は健康人の血漿及び赤血球の膜脂質の主要成分であるホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE) の過酸化物の含量を化学発光—HPLC (CL-HPLC) 法で測定し、疾患では増加することを見い出している。そ

こで HP の UVA 増感がウサギ赤血球のホスファチジルコリンヒドロペルオキシド (PCOOH), ホスファチジルエタノールアミンヒドロペルオキシド (PEOOH) に与える影響について, *in vitro* で検討し, 溶血現象との関連についても検討を行った。

実験方法

1. 試薬 PCOOH, PEOOH の標品は東北大学農学部宮澤助教授より譲り受けた。マンニトールは関東化学特級, アジ化ナトリウム (NaN_3) は関東化学一級を用いた。RF は和光試薬一級, その他の試薬はすべて和光特級を用いた。

2. 溶血試験 ウサギ (日本白色雄性ウサギ: 約 2.5—3 kg, 日本生物材料センター) 耳静脈より採血した血液から赤血球を常法により分離して 0.85% 塩化ナトリウム含有 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で 4 回洗浄した後, この等張緩衝液で 500 倍に希釈した。この 0.2% 赤血球懸濁液 2 ml と HP あるいは RF リン酸緩衝溶液 4 ml を外径 3 cm の試料ビンに入れ, 室温下で UVA (365 nm) を紫外線照射装置 (イーグル商事 (株) 製紫外線均一照射光源装置) を用いて一定時間照射した。なお高さ 18 cm から照射した時の平均照射強度 (365 nm) は 7.0 mW/cm^2 であった。照射前後に 740 nm における吸光度を測定し, 吸光度の減少から溶血率を求めた。照射終了

後の経過時間の溶血への影響をみる際は UVA 照射終了直後に溶血率を測定した後, 試料を室温あるいは 0°C で暗所に放置して 10 分ごとに溶血率を測定した。

3. PCOOH, PEOOH 及び PC, PE の定量 PCOOH, PEOOH 及び PC, PE は宮澤らの CL-HPLC 法¹¹⁾に準じて定量を行った。PCOOH, PEOOH は化学発光検出器で, また PC, PE は 210 nm の吸収でパラニトロフェノールを内標として定量を行った。今回使用した HPLC 装置のシステムブロック図及び HPLC の分析条件を Fig. 1 に示す。

4. ウサギ赤血球中の PCOOH, PEOOH の定量 20% 赤血球懸濁液 2 ml と 0.85% 塩化ナトリウム含有 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) に HP $50 \mu\text{M}$ を加えた溶液 4 ml を外径 3 cm の試料ビンに入れ, 室温下で UVA (365 nm) を 15 分間照射し, 照射終了後室温あるいは 0°C で最高 30 分間放置した。放置後 6 ml の冷クロロホルム/2-プロパノール (1:1, v/v; 抗酸化剤として 10 ppm のブチルヒドロキソトルエンを含む) を加え, これを遠心して得たクロロホルム層 (総脂質画分) を集めた。同様にもう一度操作し, 集めた総脂質画分を無水硫酸ナトリウムで脱水した後, クロロホルム層をロータリーエバポレーターで濃縮乾固した。これに $100 \mu\text{l}$ のクロロホルム/メタノール (1:1, v/v; 内標として $100 \mu\text{g/ml}$ のパラニトロフェノールを含む) を加え, この $10 \mu\text{l}$ を CL-HPLC で定量した。

Fig. 1. Schematic Flow Diagram of CL-HPLC System for Assay of PCOOH and PEOOH

CL-HPLC conditions

Pump (P1, P2): P₁ Shimadzu LC-6A, P₂ Shimadzu LC-8A, Detector (U) (CL): U Shimadzu SPD-M6A (210 nm), CL Soma S-3400, Column (C): Hibar LiChrosorb NH₂ (250 × 4.6 mm i.d.), Mobile phase (A): hexane: 2-propanol: H₂O: MeOH (9:27:4:5, v/v, flow rate 1.0 ml/min), Luminescent reagent (B): 10 $\mu\text{g/ml}$ cytochrome c and 2 $\mu\text{g/ml}$ luminol in 50 mM, borate buffer (H₃-BO₃·KCl-Na₂CO₃ pH 10) (flow rate 1.1 ml/min), Sample solution (S): 10 μl , Recorder (R).

結果

1. 溶血試験

まず UVA の照射時間及び RF 濃度による影響を検討した。

RF $60 \mu\text{M}$ を用いた時の照射終了直後の溶血率は照射時間が 40 分までは 0% だったが, 45 分では 68%, 60 分では 86.5% と, 著しく値が上昇し, 佐々木らの報告⁸⁾ とほぼ同様の結果を得た。

そこで照射時間を 45 分とし, RF 濃度を変化させたところ, 30 μM までは 0% で以降は急激に上昇し 40 μM で 20%, 60 μM では 68% に達した。

次に HP $10 \mu\text{M}$ を用いて UVA を照射したところ, 15 分照射時で照射終了直後の溶血率がほぼ 100% に達した。そこで照射時間を 15 分とし, HP 濃度を $0.5 \mu\text{M}$ から $10 \mu\text{M}$ まで変化させたところ $2 \mu\text{M}$ まではほぼ 0% で以降は急激に増加し, $5 \mu\text{M}$ ではほぼプラトーに達して 97% の溶血率を示した (Fig. 2)。

Fig. 2. Hemolysis of Erythrocyte by UVA-sensitization with HP

Erythrocytes were irradiated with UVA (365 nm) for 15 min.

Each point represents the mean of three data.

Fig. 3. Hemolysis of Erythrocyte after UVA Irradiation

Erythrocytes were irradiated with UVA (365 nm) in the presence of $0.5 \mu\text{M}$ HP for 15 min.

Hemolysis was determined at r.t. (○) or 0°C (●) after the end of irradiation.

Each point represents the mean of three data.

UVA 増感による溶血力は $\text{HP} \gg \text{RF}$ であった。これより、以降増感剤は HP を用いた。

次に照射終了後の時間経過と溶血の関係を検討した。

HP $0.5 \mu\text{M}$ 存在下 UVA を 15 分照射した時の溶血率は照射終了直後は 0% だったが、室温放置すると溶血が起り、30 分までは急激に上昇し、放置 50 分後にはほぼプラトーに達して 95% の溶血率を示した。これに対し、放置温度を 0°C にして同様に実験を行った場合は放置 50 分後でも溶血率は 20% 以下

Fig. 4. Effect of HP Concentration on Hemolysis

Erythrocytes were irradiated with UVA (365 nm) for 15 min.

Hemolysis was determined at 50 min after the end of irradiation.

Each point represents the mean of three data.

Fig. 5. Effect of Irradiation Time on Hemolysis

Erythrocytes were irradiated with UVA (365 nm) in the presence of $0.5 \mu\text{M}$ HP.

Hemolysis was determined at 50 min after the end of irradiation.

Each point represents the mean of three data.

と、溶血率の増加の著しい抑制が見られた (Fig. 3).

そこで HP の濃度を変化させ室温放置 50 分後の溶血率を測定したところ、HP の濃度に比例して溶血率が上昇し、HP 無添加では 5% であったが $0.5 \mu\text{M}$ では 100% の溶血が見られた (Fig. 4).

今度は、HP $0.5 \mu\text{M}$ 存在下 UVA 照射時間を 30 分まで変化させ室温放置 50 分後の溶血率を測定したところ、照射時間に比例して溶血率が上昇し、15 分照射で 98%、20 分以上の照射で 100% に達した (Fig. 5).

さらに $^1\text{O}_2$ のクエンチャーである NaN_3 とヒスチジン, OHラジカルのスカベンジャーであるマンニトール, 生体内抗酸化剤のアスコルビン酸のHPのUVA増感による溶血への影響を検討した。

まずHP $5\text{ }\mu\text{M}$ 存在下UVAを15分照射時の照射終了直後の溶血率を測定したところ, NaN_3 1 mM では96%の溶血率を示し全く阻害が見られなかった。そこで濃度を増加させて同様に実験を行った。その結果 NaN_3 50 mM では約50%の阻害が見られ, ヒスチジンでは 10 mM で92%と非常に強い抑制が見られた。またアスコルビン酸では 10 mM で96%と, ほぼ完全に溶血が抑制された。一方, マンニトールでは 50 mM でも阻害は全く見られなかった。そのことより $^1\text{O}_2$ の関与が示唆された (Table I)。

次に $0.5\text{ }\mu\text{M}$ HP存在下UVAを15分照射時の室温放置50分後の溶血率を測定したところ, NaN_3 10 mM では55%, 50 mM では81%と, 強い阻害が見られ, またアスコルビン酸では 10 mM で97%と, $5\text{ }\mu\text{M}$

HP存在下の場合と同様にほぼ完全に溶血が抑制された。一方, ヒスチジンでは 50 mM で17%と, 弱い阻害しか見られず, マンニトール 50 mM では81%と, 強い阻害が見られ, $5\text{ }\mu\text{M}$ HP存在下の場合と異なる結果が得られた (Table II)。

2. ウサギ赤血球中のPCOOH, PEOOHの定量

まずPCOOH, PEOOH及びPC, PEの標品のクロマトグラムをFig. 6に示す。

Fig. 6AがUV検出器, Fig. 6Bが化学発光検出器によるクロマトグラムであるが, UV検出器には

TABLE I. Effects of Some Chemicals on UVA-sensitized Hemolysis with $5\text{ }\mu\text{M}$ HP

Chemicals	(mM)	Hemolysis (%)	Inhibition (%)
—	—	97	—
NaN_3	10	87	10
	50	48	51
Histidine	1	97	0
	10	8	92
Mannitol	50	94	3
Ascorbic acid	1	24	75
	10	4	96

Erythrocytes were irradiated with UVA in the presence of $5\text{ }\mu\text{M}$ HP for 15 min. Hemolysis was determined at 0 min after the end of irradiation.

TABLE II. Effects of Some Chemicals on UVA-sensitized Hemolysis with $0.5\text{ }\mu\text{M}$ HP

Chemicals	(mM)	Hemolysis (%)	Inhibition (%)
—	—	95	—
NaN_3	10	43	55
	50	18	81
Histidine	10	94	1
	50	79	17
Mannitol	10	77	19
	50	18	81
Ascorbic acid	1	24	75
	10	3	97

Erythrocytes were irradiated with UVA in the presence of $0.5\text{ }\mu\text{M}$ HP for 15 min. Hemolysis was determined at 50 min after the end of irradiation.

Fig. 6. Chromatogram of a Mixture of Phosphatidylcholine Hydroperoxide (PCOOH, 200 pmol), Phosphatidylethanolamine Hydroperoxide (PEOOH, 200 pmol), Phosphatidylcholine (PC, 134 nmol), Phosphatidylethanolamine (PE, 16.0 nmol) and *p*-Nitrophenol (IS, 1 μmol) with CL-HPLC

(A) UV (210 nm) detection. (B) Chemiluminescence detection.

The CL-HPLC conditions are given in Fig. 1.

PC, PEが検出され, リテンションタイムはそれぞれ, 12.6分, 8.7分であった。一方, 化学発光検出器にはそれより約1分遅れてPCOOH, PEOOHが検出され, リテンションタイムはそれぞれ, 14.0分, 9.6分と, 宮澤ら¹¹⁾の報告とは逆にPEOOHの方が先に検出された。

次に0.2%ウサギ赤血球懸濁液を用いてPCOOH, PEOOH含量を測定しようとしたが, いずれも検出限界以下であったので, 20%ウサギ赤血球懸濁液を用いて測定を行った。UVAを照射しないもの(コントロール)のクロマトグラムをFig. 7に示す。PCOOH, PEOOH及びPC, PEはそれぞれ標品との比較によって同定及び定量を行った。Fig. 7AではPCの後に未同定のピークが検出された。

さらに20%赤血球にUVAを15分照射し照射終了後の放置時間と放置温度のPCOOH, PEOOH含量への影響を検討した。PEOOHの方がPCOOHより約3.5倍含量が高かった。照射終了直後にはPCOOHはコントロールに比べて有意な増加, PEOOHは増加傾向が見られた。室温放置した場合はPCOOHは経時的に減少する傾向が見られ, 20分後にはコントロールレベルに回復した。またPEOOHは20分後まで有意な増加が見られたが, 30分後にはコントロールレベルまで減少した(Table III, Fig. 8)。一方, 0℃放置時はPCOOH, PEOOHとも10分後にコントロールレベルにまで減少した(Table IV, Fig. 8)。

なお, 照射後のPC, PEの含量は放置時間や放置温度によらず, コントロールより有意に減少していた(データは示していない)。

考 察

佐々木ら⁸⁾はウサギ保存血を用い, RF濃度を5–60 μM と変化した時のUVA (365 nm)照射終了直後の溶血率は30分以内の照射では0%だったが, 60分照射時では30 μM , 120分照射時では20 μM でほぼプラトーに達し, それぞれ約80%, 約95%であったと報告している。これに対し, HPは5 μM 存在下わずか15分照射時ではほぼ100%の溶血率を示し, HPはRFより10倍以上増感力が強いことが明らかになった。HPの365 nmにおけるモル吸光係数はRFの約8倍であり, このことが主な原因であると思われる。

佐々木ら⁸⁾はRF 10 μM 存在下UVAを照射し, 照射終了直後及び5時間後の溶血率を測定し, 対照では差がみられなかったが, RF添加群では照射終

了から5時間後の方が照射終了直後より高くなったと述べている。そこで照射終了後の時間経過と溶血の関係を検討した。0.5 μM HP増感時には室温放置時は30分後に90%以上溶血したが, 0℃放置時にはほとんど溶血が起こらず, また5 μM HP増感時に

Fig. 7. Chromatogram of Phosphatidylcholine Hydroperoxide (PCOOH), Phosphatidylethanolamine Hydroperoxide (PEOOH), Phosphatidylcholine (PC), Phosphatidylethanolamine (PE) and *p*-Nitrophenol (IS, 1 μmol) Recorded in the CL-HPLC of Erythrocyte Total Lipids Obtained from Rabbit

(A) UV (210 nm) detection. (B) Chemiluminescence detection.

The CL-HPLC conditions are given in Fig. 1. Erythrocytes were not irradiated.

X: unknown peak.

Fig. 8. Effect of UVA Irradiation on Phosphatidylcholine Hydroperoxide (PCOOH) and Phosphatidylethanolamine Hydroperoxide (PEOOH) Contents of Erythrocytes of Rabbits as Determined by CL-HPLC

○ R.T. (PEOOH), ● 0°C (PEOOH), △ R.T. (PCOOH), ▲ 0°C (PCOOH).

Data are means±S.E. from the experiment of four erythrocytes.

Significantly different from control, a) $p < 0.05$.

は照射終了直後にほぼ100%溶血した (Fig. 2, 3). このことから溶血にはある一定量の損傷が必要で $0.5 \mu\text{M}$ HP 存在下では照射終了直後にはその量に達していないが、その後時間と共に増幅されてその量に達し、溶血に至ったのではないと思われる。

照射前後の PCOOH, PEOOH 含量を測定したところ、室温放置時では照射後に有意に増加し、PCOOH では照射終了直後、PEOOH では照射終了20分後にピークに達し、PCOOH では20分後、PEOOH では30分後にはコントロールレベルにまで減少した (Table III, Fig. 8). 室温放置時には放置30分後までに溶血率が急激に上昇し、90%以上が溶血したことから、UVA 照射による脂質ハイドロペルオキシド量の増大によって溶血が起こったものと思われる。また、PEOOHの方がPCOOHより多く、PCOOHの量がピークに達する照射終了直後には溶血は起こらないことから、PEOOHが主として溶血に関与していると思われる。このように PEOOH と PCOOH は異なる挙動を示したが、その原因として PE と PC の $^1\text{O}_2$ との反応性の違いや膜に局在化している部位の違い、などが考えられるが不明である。一方、0°C 放置時ではほとんど溶血が

TABLE III. Effect of UVA Irradiation on PCOOH, PEOOH Contents of Erythrocyte of Rabbits

	Control	UVA 15 min irradiation ^{a)}			
		After 0 min	After 10 min	After 20 min	After 30 min
PCOOH (nmol/mg PC)	1.75 ± 0.18	$4.57 \pm 1.57^b)$	$2.89 \pm 0.61^b)$	1.77 ± 0.32	1.73 ± 0.65
PEOOH (nmol/mg PE)	6.13 ± 1.24	7.99 ± 1.78	$10.7 \pm 2.8^b)$	$12.9 \pm 3.7^b)$	5.15 ± 1.50
PCOOH+PEOOH (nmol/mg PC+PE)	7.88 ± 1.42	$12.6 \pm 3.4^b)$	$13.6 \pm 3.4^b)$	14.7 ± 4.0	6.88 ± 2.15

Each value is mean±S.E. of four erythrocytes.

a) Erythrocytes kept at r.t. after the end of irradiation.

b) Significantly different from control ($p < 0.05$).

TABLE IV. Effect of UVA Irradiation on PCOOH, PEOOH Contents of Erythrocyte of Rabbits

	Control	UVA 15 min irradiation ^{a)}			
		After 0 min	After 10 min	After 20 min	After 30 min
PCOOH (nmol/mg PC)	1.75 ± 0.18	$4.57 \pm 1.57^b)$	2.30 ± 0.74	1.96 ± 0.25	1.35 ± 0.23
PEOOH (nmol/mg PE)	6.13 ± 1.24	7.99 ± 1.78	6.83 ± 1.50	4.37 ± 0.48	5.04 ± 0.61
PCOOH+PEOOH (nmol/mg PC+PE)	7.88 ± 1.42	$12.6 \pm 3.4^b)$	9.13 ± 2.24	6.33 ± 0.73	6.39 ± 0.84

Each value is mean±S.E. of four erythrocytes.

a) Erythrocytes kept at 0°C after the end of irradiation.

b) Significantly different from control ($p < 0.05$).

起こらず、放置 10 分後に PCOOH, PEOOH 量がコントロールレベルに減少していた。このことより UVA 照射によって生じた $^1\text{O}_2$ によって生成した脂質ヒドロペルオキシドが遷移金属イオンによって還元されヒドロペルオキシドラジカルを生じ、それが自動酸化反応によって増加し、膜に一定量以上の損傷を与えて溶血に至らせたと考えられる。0 °C 放置時ではこの自動酸化反応が阻害されたために、生体内抗酸化物質等による過酸化脂質を消去する反応の方が優勢になり、溶血を起こすのに十分な量に達することなく速やかに減少したと思われる。

Suzuki ら¹²⁾ は RF 光増感による溶血は NaN_3 やジメチルフランで抑制され、マンニトールやスーパーオキシドジスムターゼで阻害されないことから一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) が関与していると結論している。また佐々木ら⁸⁾ も RF 20 μM を用いて同様の実験を行い、マンニトールでは阻害が起こらず、 $^1\text{O}_2$ のクエンチャーであるヒスチジンでは抑制されたことから $^1\text{O}_2$ の関与を認めているが一方、 NaN_3 1 mM では阻害が認められないどころか溶血を促進すると報告している。そこで $^1\text{O}_2$ のクエンチャーである NaN_3 とヒスチジン、OH ラジカルスカベンジャーであるマンニトール、生体内抗酸化剤のアスコルビン酸の溶血への影響を検討した。

まず 5 μM HP 存在下での実験では NaN_3 、ヒスチジンで阻害が見られ、マンニトールでは阻害が見られなかったことから、この場合は主として光酸化反応によって生成した $^1\text{O}_2$ によって過酸化脂質が増大し、溶血が起こったと考えられる (Table I)。荒金ら^{13,14)} は HP などのポルフィリン類存在下皮脂に UVA を照射し、 $^1\text{O}_2$ の発生をゲルマニウムフォトダイオードアレイにより直接確認している。さらに、発生する $^1\text{O}_2$ の量に比例して過酸化脂質が生成することを明らかにしている。これらのことも上記のことを支持している。

一方、0.5 μM HP 存在下での実験ではマンニトールでは阻害が見られ、ヒスチジンではあまり阻害が見られなかったことから、主として自動酸化反応によって過酸化脂質が増大し、溶血が起こったと思われる (Table II)。しかし、この場合でも UVA 非照射時には溶血が起こらないことから、UVA 照射によってある程度の過酸化脂質が生成している必要があるようである。いずれにせよ、溶血に対する $^1\text{O}_2$ の関与が明らかとなった。また、アスコルビン酸はいずれの場合でも強い阻害を示したことから、アスコルビン酸はラジカルスカベンジャーとしての働きの

ほかに還元作用も持つため、ヒドロペルオキシドを速やかに還元するためと思われる。

溶血の機序について佐々木ら⁸⁾ は RF 濃度を高くしても 30 分以下の照射ではほとんど溶血しなかったことから、赤血球膜が UVA 照射の影響を受けてから溶血を起こすまでは一定の時間が必要だとしている。しかし、RF は HP に比べると増感力が非常に弱く、すぐに飽和状態に達し、それ以上濃度を上げても生成する $^1\text{O}_2$ の量がほとんど増えなかったためと思われ、HP 5 μM では 15 分照射終了直後にほぼ 100% 溶血することから、UVA を照射してから溶血が起こるまでの時間は膜にある一定量以上の損傷が蓄積されるのにかかる時間と考えた方がより正確なようである。しかし、タンパク変性は脂質過酸化より低線量の紫外線で起こるといわれている¹⁵⁾ ことなどから、膜タンパク質の変性も溶血に寄与している可能性がある。また今回は溶血率は 0.2% 赤血球を用い 0.5 μM HP 存在下で測定し、過酸化脂質量は 20% 赤血球を用い 50 μM HP 存在下で測定しており、過酸化脂質量の変動が単純には溶血と相関しない可能性もある。いずれにせよ、HP-UVA 増感によって発生した $^1\text{O}_2$ によって生成した PEOOH 及び PCOOH と溶血には密接な関係があることが示唆されるので、同一条件下での PEOOH, PCOOH 生成量と溶血との関係、HP 濃度による PEOOH, PCOOH 生成量及び TBA-RS 値の変動と溶血との関係、また NaN_3 やマンニトールなどの PEOOH, PCOOH 生成に与える影響等について、今後さらに検討する必要があると思われる。

HP 及び RF の UVA 増感赤血球のみならず、あらゆる生体組織を酸化的に傷害する可能性があるため UVA の生体影響を評価する際の一つの注目点と思われる。

結 論

HP 又は RF の UVA 増感が PCOOH, PEOOH 及び赤血球の溶血に及ぼす影響を *in vitro* で検討した結果、以下の知見を得た。

- 1) HP は RF より非常に強い増感剤であることがわかった。
- 2) UVA 増感により PCOOH, PEOOH 量が溶血に先立って増加した。
- 3) 赤血球膜に生じた損傷がある一定量以上になると溶血が起こった。
- 4) UVA 増感によって生成した $^1\text{O}_2$ が溶血に関与していることが明らかになった。

謝辞 PCOOH, PEOOH の標品を譲って下さった東北大学農学部宮澤助教授に感謝します。

引用文献

- 1) J.G. Peak, M.J. Peak, M. MacCos, *Photochem. Photobiol.*, **39**, 713 (1984).
- 2) 松尾隼朗, フレグランスジャーナル, **21**, 30 (1993).
- 3) 寺尾純二, フレグランスジャーナル, **21**, 48 (1993).
- 4) 伊藤 敦, 伊藤 隆, 蛋白質・核酸・酵素, **33**, 2795 (1988).
- 5) 浅田浩二, 中野 稔, 藺田 勝, 蛋白質・核酸・酵素, **33**, 2776 (1988).
- 6) 坂岸良克, 生化学, **60**, 21 (1988).
- 7) 寺尾純二, 油化学, **41**, 64 (1992).
- 8) 佐々木久美子, 木嶋敬二, 小嶋茂雄, 衛生試験, **111**, 57 (1993).
- 9) 宮澤陽夫, 農化, **62**, 1491 (1988).
- 10) T. Miyazawa, R. Saeki, H. Inaba, *J. of Biolumin. Chemilumin.*, **4**, 475 (1989).
- 11) T. Miyazawa, T. Suzuki, K. Fujimoto, K. Yasuda, *J. Lipid Res.*, **33**, 1051 (1992).
- 12) Y. Suzuki, T. Miura, T. Ogiso, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **5**, 568 (1982).
- 13) 荒金久美, 林千賀子, 笠 明美, 増永卓司, 新本浩一, 長野哲雄, 廣部雅昭, 益子信朗, 日本薬学会第114年会要旨集, 168 A, 東京, 1994年3月.
- 14) 笠 明美, 荒金久美, 林千賀子, 増永卓司, 新本浩一, 長野哲雄, 廣部雅昭, 益子信朗, 日本薬学会第114年会要旨集, 168 B, 東京, 1994年3月.
- 15) I.E. Kochevar, *Photochem. Photobiol.*, **52**, 795 (1990).