

# 紫外線が水晶体上皮細胞 DNA に与える影響およびその機序

庄子英一

獨協医科大学越谷病院眼科

## 要約

ウシ水晶体上皮細胞 DNA に及ぼす紫外線 B 波 (UV-B) の影響ならびに傷害の機序について、DNA スtrand ブレイクの程度を DNA 移動度として定量的に測定することにより検討した。DNA 移動度は、対照の UV-B 未照射群が  $0.14 \pm 0.34$  (平均値  $\pm$  標準偏差) であったのに対し、 $0.5 \text{ kJ/m}^2$  照射群で  $1.10 \pm 0.89$ 、 $1 \text{ kJ/m}^2$  照射群で  $1.61 \pm 1.05$ 、 $3 \text{ kJ/m}^2$  照射群で  $4.65 \pm 1.18$ 、 $5 \text{ kJ/m}^2$  照射群で  $6.10 \pm 0.93$  と UV-B 照射量依存的に増加した。

また、DNA スtrand ブレイクは鉄キレート剤である 1.10-フェナンスロリン添加により有意に抑制されたことから、正常水晶体上皮細胞の DNA の UV-B による傷害には Fenton 反応が関与していることが示唆された。(日眼会誌 101: 40-45, 1997)

キーワード: 水晶体上皮細胞, DNA 傷害, UV-B, フリーラジカル, Fenton 反応

## DNA Damage and the Mechanism Cells Following UV-B Irradiation in Lens Epithelial

Eiichi Shoji

Department of Ophthalmology, Koshigaya Hospital, Dokkyo University School of Medicine

### Abstract

DNA damage and its mechanism following ultraviolet-B (UV-B) irradiation were investigated in quantifying DNA strand break in bovine lens epithelial cells. In contrast, the DNA relative migration distance was as little as  $0.14 \pm 0.34$  (mean  $\pm$  standard deviation) in controls,  $1.10 \pm 0.89$  at  $0.5 \text{ kJ/m}^2$  irradiation,  $1.61 \pm 1.05$  at  $1 \text{ kJ/m}^2$ ,  $4.65 \pm 1.18$  at  $3 \text{ kJ/m}^2$ , and  $6.10 \pm 0.93$  at  $5 \text{ kJ/m}^2$ . The degree of DNA strand break increased with the intensity of

the UV-B irradiation. 1.10-phenanthroline, an iron ion chelator, significantly reduced DNA strand break. These results suggest that the Fenton reaction might participate in DNA damage of normal lens epithelial cells following UV-B exposure. (J Jpn Ophthalmol Soc 101: 40-45, 1997)

Key word: Lens epithelial cells, DNA damage, UV-B, Free radicals, Fenton reaction

## I 緒言

糖尿病白内障<sup>1)</sup>および網膜症<sup>2)</sup>における過酸化脂質の関与などから、フリーラジカル・活性酸素と眼疾患発症の関係が明らかにされつつある。したがって、白内障の発症および進行と酸化的ストレスの関係を明らかにすることは、白内障の機序解明に重要である。従来から、疫学的に白内障の発症や進行に紫外線が関与していることが指摘されている<sup>3,4)</sup>。紫外線は一般に、長波長紫外線 (UV-A: 320~400 nm)、中波長紫外線 (UV-B: 290~320 nm) および短波長紫外線 (UV-C: 190~290 nm) に分類されており、そのうち UV-C はオゾン層で吸収されるため地表

には到達しないとされている。しかし、近年のオゾン層の破壊によって紫外線照射量の増加が眼に及ぼす影響が懸念されており、これまでに紫外線照射による水晶体の膜障害<sup>5)</sup>やタンパク質変性<sup>6)</sup>などが報告されている。また、紫外線照射群の水晶体中の過酸化脂質量が非照射群に比べ変動が大きいこと、および酸化的ストレスに対する防御機構であるスーパーオキシド消去活性が低下することが明らかとされている<sup>7)</sup>。水晶体上皮細胞 DNA に及ぼす紫外線の影響については、Kleiman ら<sup>8)</sup>の紫外線照射によるウシ水晶体上皮細胞 DNA のピリミジン二量体の形成について、また、Sidjanin ら<sup>9)</sup>の紫外線 A 波照射によるウサギ水晶体上皮細胞 DNA の断片化についての報告な

別刷請求先: 343 埼玉県越谷市南越谷 2-1-50 獨協医科大学越谷病院眼科 庄子 英一  
(平成 8 年 3 月 13 日受付, 平成 8 年 8 月 5 日改訂受理)

Reprint requests: Eiichi Shoji, M.D. Department of Ophthalmology, Koshigaya Hospital, Dokkyo University School of Medicine, 2-1-50 Minamikoshigaya, Koshigaya-shi, Saitama-ken 343, Japan  
(Received March 13, 1996 and accepted in revised form August 5, 1996)

どがあるのみにすぎない。水晶体上皮細胞 DNA に傷害が生じ、その程度が生体の修復能を超えた場合、異常なタンパク質の産生や線維細胞への分化・誘導に異常が生じ、これらの変化が白内障発症の一因となる可能性があり、紫外線照射と DNA 傷害の程度ならびにその発生機序の解明が重要となってくる。過酸化水素による酸化的傷害には、鉄や銅などの遷移金属イオンが関与していることが明らかにされている<sup>10)</sup>。そこで、水晶体上皮細胞の DNA に及ぼす紫外線 B 波(以下、UV-B)の影響、特に鉄イオンとの関係を明らかにする目的で、DNA の断片化、すなわち、ストランドブレイクを指標に検討を行った。

## II 実験方法

### 1. 実験材料

屠殺直後の摘出ウシ眼球を用い、実験に供するまで 4°C で保存した。また、水晶体は輪部で角膜を 360 度切開し虹彩を除去した後に、剪刀を用いてチン小体を切断し摘出した。

### 2. UV-B 照射方法

UV-B 光源(ATTO 社製, HP-15 M, ピーク 312 nm)を用い、摘出した水晶体を培養液(リン酸緩衝液, PBS)または鉄イオンキレート剤を含む培養液で満たした 35 mm 径 6 穴マルチウェル中で器官培養し、4°C で表 1 に示した UV-B 強度ならびに照射時間の条件で、各線量の UV-B を水晶体前囊側から照射した。

なお、UV-B はリン酸緩衝液中で器官培養を行いながら同時に照射した。すなわち、表 1 に示した各 UV-B 強度における照射時間が水晶体の器官培養時間と一致する。

### 3. DNA ストランドブレイクの測定

DNA ストランドブレイクは single cell gel assay (SCGA) 法<sup>11)</sup>により測定した。紫外線照射直後の水晶体から中央部直径約 1.5 cm の前囊を採取した後、ピペティングによって水晶体上皮細胞を単離し、37°C、0.5% low melting temperature (LMT) アガロース中に浮遊させた。細胞浮遊 LMT アガロース 50  $\mu$ l を、あらかじめ 0.5% アガロースでコーティングした白縁磨スライドグラス上に滴下し、カバーグラスをのせた後、4°C、5 分間静置し、細胞浮遊 LMT アガロースを硬化させた。その後、カバーグラスを除去し、37°C、0.5% LMT アガロース 100  $\mu$ l で細胞層を覆い、再度カバーグラスをのせた後、

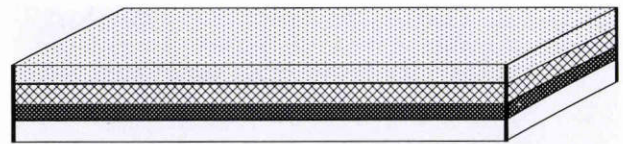


図1 DNA ストランドブレイクの測定。

水晶体上皮細胞を含む 0.5% LMT アガロースをストランドグラス上で 0.5% アガロースと 0.5% LMT アガロースにより上下から挟み込む形となる。

●: 0.5% LMT アガロース層, ■: 細胞浮遊 0.5% LMT アガロース層, ■: 0.5% アガロース層, □: 白縁磨スライドグラス



図2 ストランドブレイクが生じていない DNA の蛍光顕微鏡写真。

DNA は球形を保っている。

4°C、5 分間静置し LMT アガロースを硬化させた。すなわち、細胞浮遊 0.5% LMT アガロースを 0.5% LMT アガロースと 0.5% アガロースにより上下から挟み込む形となる(図 1)。カバーグラスを除去し、細胞溶解液(1% sarkosyl, 2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton-X, pH 10.0)中に遮光下で 4°C、60 分間浸し、細胞膜および核膜を溶解させ、DNA を露出させた。その後、泳動用緩衝液(1 mM EDTA, 300 mM NaOH, pH 13.0)に 20 分間浸した。強アルカリによって DNA の螺旋構造を解除した後、サブマリン型泳動装置(Bio-Rad 社製, サブセル®)を用いて、25 V、20 分間泳動した。中和緩衝液(0.4 M Tris, pH 7.5)中に 5 分間浸した後、20  $\mu$ g/ml 臭化エチジウムで DNA を染色し、蛍光顕微鏡(オリンパス社製 BX 50: 励起光: 515~560 nm, フィルター: 590 nm)を用い、写真撮影を行った。ストランドブレイクが生じていない細胞では、図 2 のごとく DNA は球形を保っているが、ストランドブレイクが生じた細胞では、負に荷電した DNA 断片が分子量に応じて泳動距離が変化し、より細かく切断された DNA 断片ほど泳動距離が長くなるため、図 3 のごとく陽極に向かってコメット状に泳動される。図 4 に示した方法により、写真上で DNA の相対的移動度を測定し、この移動度を DNA 傷害の程度の指標とした。

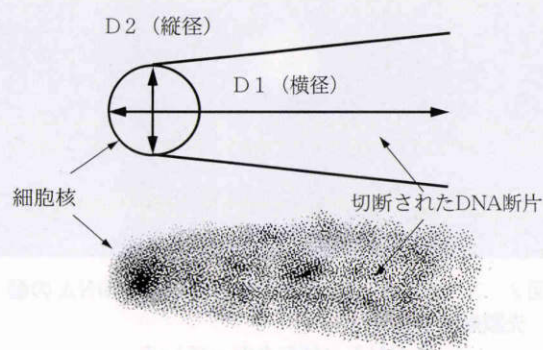
表 1 紫外線 B 波(UV-B)照射量

| UV-B 照射量<br>(kJ/m <sup>2</sup> ) | UV-B 強度<br>( $\mu$ W) | 照射時間<br>(秒) |
|----------------------------------|-----------------------|-------------|
| 0.5                              | 250                   | 200         |
| 1.0                              | 250                   | 400         |
| 3.0                              | 1,000                 | 300         |
| 5.0                              | 1,000                 | 500         |



図3 ストランドブレイクが生じた DNA の蛍光顕微鏡写真。

切断された DNA は陽極に向かってコメット状に泳動される。



$$\text{移動度} = (D1 - D2) / D2$$

図4 DNA 移動度の測定方法。

写真上で DNA の泳動距離: D1(横径)および DNA の直径: D2(縦径)を計測し, DNA 移動度は  $(D1 - D2) / D2$  とした。

#### 4. UV-Bによる DNA 傷害の検討

ウシ水晶体に UV-B を 0.5, 1.0, 3.0, 5.0 kJ/m<sup>2</sup> 照射後, 直ちに SCGA 法を行い, DNA ストランドブレイクを観察した。対照は UV-B を照射していない水晶体とした。対照および各線量につき 3 個の水晶体を用いた。水晶体 1 個につき 100 個の水晶体上皮細胞の移動度を測定し, UV-B 照射量と DNA 傷害との関係について検討した。

#### 5. 鉄イオンキレート剤による DNA 傷害抑制作用

鉄体キレート剤は 1,10-フェナンスロリン (Sigma 社製) を用いた。濃度は 100, 200, 500, 1,000 μM とし, 対照はキレート剤を含まないリン酸緩衝液を用いた。

ウシ水晶体を 1,10-フェナンスロリンを含有したリン酸緩衝液中で 5 分間 (300 秒) プレインキュベーションした後, 水晶体を 1,10-フェナンスロリンを含まないリン酸緩衝液中へ移し, UV-B を 5 kJ/m<sup>2</sup> 照射 (器官培養時間: 500 秒) した後, 直ちに SCGA 法を行い, DNA ストランドブレイクを観察した。対照および各鉄イオンキ

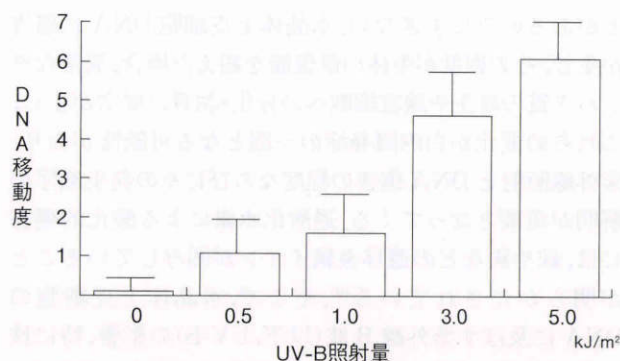


図5 紫外線 B 波 (UV-B) 照射量と DNA 移動度。DNA 移動度は UV-B 照射量依存的に増加した。

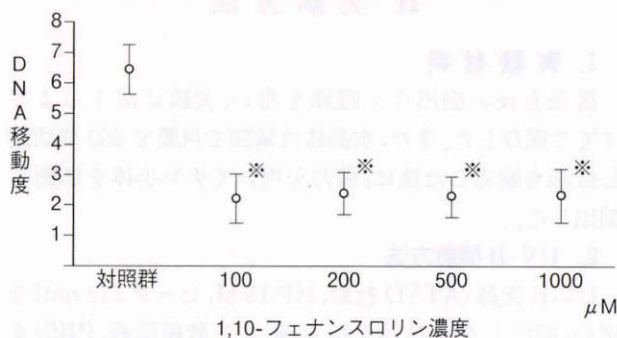


図6 1,10-フェナンスロリンによる DNA ストランドブレイクの抑制作用。

DNA 移動度は 1,10-フェナンスロリン添加により有意に抑制された。

※:  $p < 0.05$

レート剤濃度につき 6 個の水晶体を用い, 水晶体 1 個につき 100 個の水晶体上皮細胞の移動度を測定した。各群間で水晶体上皮細胞の DNA 傷害の程度を比較し, UV-B による DNA 傷害の, 鉄イオンキレート剤による抑制作用について検討した。

測定値はすべて平均値 ± 標準偏差で表し, 各群間の平均値の有意差の検定には t-test を使用し, 5% の危険率で有意とした。

### III 結 果

#### 1. UV-Bによる DNA 傷害の検討

水晶体上皮細胞 DNA の移動度は, 図 5 に示すごとく未照射群が  $0.14 \pm 0.34$  であったのに対し, 0.5 kJ/m<sup>2</sup> 照射群で  $1.10 \pm 0.89$ , 1.0 kJ/m<sup>2</sup> 照射群で  $1.61 \pm 1.05$ , 3.0 kJ/m<sup>2</sup> 照射群で  $4.65 \pm 1.18$ , 5.0 kJ/m<sup>2</sup> 照射群で  $6.10 \pm 0.93$  と, DNA 移動度は UV-B 照射量依存的に増加した。

#### 2. 鉄イオンキレート剤による DNA 傷害抑制作用

キレート剤を含まない対照群の水晶体上皮細胞 DNA 移動度が  $6.46 \pm 0.82$  であったのに対し, 1,10-フェナンスロリンを 100, 200, 500, 1,000 μM 添加した群の水晶体上皮細胞 DNA の移動度はそれぞれ  $2.22 \pm 0.81$ ,  $2.36 \pm 0.72$ ,  $2.29 \pm 0.58$ ,  $2.28 \pm 0.90$  と, 対照群と比較し有意に

低下した(図6).

#### IV 考 按

酸化的ストレスが白内障の発症や進行をはじめ,老化,発がんなどに深く関与していることが知られており, DNAにも傷害を及ぼすことが容易に推察できる.酸化的ストレスによるDNAの傷害は,①DNA塩基や糖鎖の修飾,②DNA-DNA間の架橋結合,③DNA-タンパク質間の架橋結合,④DNAストランドブレイクが生ずることが知られている<sup>12)</sup>.Kleimanら<sup>13)</sup>は過酸化水素による水晶体上皮細胞のDNA傷害について報告しており,過酸化水素濃度が25 $\mu$ M以下ではDNAに対する影響はないものの,50 $\mu$ M以上では過酸化水素濃度依存的にストランドブレイクが生ずるとしている.一方,重要な酸化的ストレスの一つである紫外線と,白内障の発症および進行との関係については古くから注目されており,Zigmanら<sup>3)</sup>やTaylorら<sup>4)</sup>は紫外線が白内障の重要な進行因子であると疫学的見地から指摘している.紫外線が水晶体上皮細胞DNAに及ぼす影響は,Kleimanら<sup>8)</sup>がピリミジン二量体の形成の面から検討しており,UV-BがUV-Aに比べDNA傷害の程度が強いこと,また,紫外線によるDNA傷害の修復は,過酸化水素による傷害に比較して著しく遅延していたことを報告している.しかし,紫外線照射による水晶体上皮細胞のDNAストランドブレイクの発生機序については未だ明らかにされていない.本研究ではUV-BとDNAストランドブレイク形成との関係,およびその機序,特に鉄イオンの関与についてSinghら<sup>11)</sup>によって開発された個々の細胞のストランドブレイクの程度を定量的に測定できる方法であるSCGA法を用いて検討した.その結果,水晶体上皮細胞のDNAストランドブレイクの程度はUV-B照射量に依存して増加していた.また,ストランドブレイクは鉄イオンキレート剤によって有意に抑制された.すなわち,UV-Bによる正常水晶体上皮細胞のストランドブレイクには,鉄イオンが深く関与していることが明らかとなった.可視光線や紫外線照射によって細胞内に存在するリポフラビン,NADH,NADなどの光増感物質から活性酸素種が発生し,光酸化が起きることが知られている.一生涯,可視光線および紫外線に曝される組織である水晶体には,トリプトファンやキヌレン誘導体が光増感物質として存在しており<sup>14)</sup>,光酸化によって活性酸素種が発生しているとされている.Andleyら<sup>6)</sup>は*in vitro*で $\beta$ -クリスタンへのUV-B照射によって過酸化水素が発生したことを報告しており,水晶体皮質部や核部で恒常的に過酸化水素が生成されていることが示唆される.これらの活性酸素種のうち,過酸化水素およびスーパーオキシド( $O_2^-$ )は鉄や銅などの遷移性金属イオンとHaber-Weiss反応を起こし,極めて反応性が高いヒドロキシルラジカルを生ずる(図7).特に,鉄イオンを介する場合に

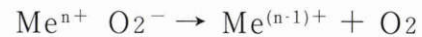


図7 Haber-Weiss反応.

はFenton反応と呼ばれているが,本実験で鉄イオンキレート剤である1.10-フェナンスロリンによりDNAストランドブレイクが有意に抑制されたことから,UV-B照射によって水晶体中でFenton反応が生じ,発生したヒドロキシルラジカルがDNAにストランドブレイクを起こすものと推察された.本実験で用いた1.10-フェナンスロリンは,主に2価および3価の鉄イオンとキレート化合物を形成する.鉄イオンのキレート剤としては,1.10-フェナンスロリンの他にEDTA(ethylenediamine tetraacetic acid)やdeferoxamine mesilate(Desferal®)が知られている.

しかし,①EDTAは主に2価の金属イオンとキレート化合物を形成するが,鉄イオンの他にマグネシウムイオンやカルシウムイオンなども結合するため,鉄イオンに対する特異性が乏しいこと,②細胞内の鉄イオンは主に2価イオンとして存在しており,核膜を通過してDNAと結合するのも主に2価の鉄イオンであると考えられている<sup>15)</sup>.このため,DNAに対する鉄イオンの影響を検討する場合,3価の鉄イオンと特異的にキレート化合物を形成するDesferal®(チバガイギー)と比較して1.10-フェナンスロリンの方が,より強い鉄イオンキレート作用を持つと考えられること.また,de Mello Filhoら<sup>16)</sup>は各種薬物添加によるマウス線維芽細胞のDNAストランドブレイクの抑制作用を検討しており,過酸化水素をマウス線維芽細胞に負荷した場合,Desferal®によるDNAストランドブレイクの抑制効果がほとんどなかったのに対し,1.10-フェナンスロリンはほぼ100%DNAストランドブレイクを抑制し得たとしている.本研究はUV-B照射によるDNA傷害の検討であり,de Mello Filhoら<sup>16)</sup>の過酸化水素負荷とは酸化的ストレスの種類が異なるものの,活性酸素種によるDNAストランドブレイクに対する抑制効果が期待できること.以上の理由から,本研究では鉄イオンキレート剤として1.10-フェナンスロリンを用いた.

水晶体上皮細胞DNAに傷害を及ぼすラジカルの発生部位に関しては,ヒドロキシルラジカルの寿命は約70 $\mu$ secと非常に短く,この寿命内での拡散距離は約20nmとほとんど拡散できず<sup>17)</sup>,水晶体皮質部や核部で生じたヒドロキシルラジカルが上皮細胞DNAに傷害を引き起こすとは思われないことから,光酸化によって上皮細胞内で発生した活性酸素種が,上皮細胞DNAに極めて近

い部位において Fenton 反応を起こしているものと推察される。本実験は、透明な正常水晶体へ高線量の紫外線を短時間照射した場合の DNA の傷害を観察したものであるが、近年のオゾン層の破壊により地表へ到達する紫外線量が増加しており、環境庁の調査<sup>18)</sup>ではつくば市における 1 日当たりの総紫外線量は、年間を通じ最も多い 8 月では平均 28 kJ/m<sup>2</sup>、最も少ない 1 月でも平均 5 kJ/m<sup>2</sup>に達している。慢性的な紫外線照射が細胞に及ぼす影響については不明な点が多く、生涯紫外線の曝露を受ける水晶体では低線量の長期間照射による蓄積作用も否定できない。このことから、*in vivo* においても本実験で用いた量に近い紫外線量が長期間のうちに水晶体に到達し、恒常的な DNA 傷害が生じる可能性がある。また、Sidjanin ら<sup>9)</sup>はストランドブレイクの定量方法が本報とは異なるものの、UV-A 照射量に依存して DNA ストランドブレイクが生ずることを報告している。しかし、DNA ストランドブレイクが検出される最小 UV-A 照射量が 180 kJ/m<sup>2</sup>と、本研究で照射した UV-B 照射量 0.5~5.0 kJ/m<sup>2</sup>と比較して極めて強い線量を要することから、DNA ストランドブレイクの発生において、UV-A と UV-B との間には、DNA 傷害に対する大きな感受性の差があるものと思われる。傷害を受けた DNA は生体を持つ修復機構によって修復される。水晶体上皮細胞においても、UV-B による DNA 傷害に対する修復機構の存在が証明されている<sup>19)20)</sup>が、老化や病的状態などで修復能が低下した場合や、高度な傷害の場合には error-prone repair (誤りがちの修復)が生じ、DNA 修復が困難となって高率に突然変異の誘発や細胞死が起こる<sup>21)</sup>。水晶体では、上皮細胞が透明性維持のうえで重要な位置を占めており、DNA の傷害による上皮細胞の機能低下や細胞死は、水晶体の恒常性維持能の低下、すなわち、白内障の発生や進行をもたらすことが容易に推察される。一方、DNA に対する酸化的ストレスの影響は動物種により異なるとの報告<sup>22)</sup>もあり、ウシ水晶体を用いた今回の結果を直接ヒト白内障の発症や進行に結び付けることはできないが、ヒト水晶体を用いて同様の実験を行うことはできないことから、本研究は有意義なものである。今後は遷移性金属イオン濃度の変化が DNA に及ぼす影響、DNA 傷害の程度と水晶体透明性維持機構破綻の程度との関係、および紫外線照射や加齢による DNA 修復能の変化などの検討が必要であろう。

以上、正常水晶体上皮細胞 DNA ストランドブレイクが UV-B 照射量依存的に生ずること、また、傷害の機序に鉄イオンが深く関与していることを明らかとした。本研究により、UV-B による水晶体上皮細胞 DNA の傷害に鉄イオンの関与が明らかとなったことから、白内障の発症予防における薬物治療への応用が期待される。

本論文の要旨は第 99 回日本眼科学会総会(1995 年、名古屋)において発表した。

稿を終えるに当たり、本研究に際してご指導ならびにご校閲を賜りました恩師小原喜隆教授に深甚なる謝意を表します。直接ご指導ならびにご助言を賜りました共立薬科大学生理解剖学教室竹鼻 眞講師に感謝いたします。また、ご協力をいただきました獨協医科大学越谷病院眼科の諸兄に感謝いたします。

#### 文 献

- 1) 小原喜隆, 一迫 浄, 油井秀夫, 堀内三郎, 佐藤芳行: 糖尿病白内障における過酸化反応. 日眼会誌 84: 1972-1978, 1980.
- 2) 門屋講司: 糖尿病兔網膜の過酸化脂質とその消去機構. 日眼会誌 85: 646-655, 1981.
- 3) Zigman S, Datiles M, Torczynski E: Sunlight and human cataracts. Invest Ophthalmol Vis Sci 18: 462-467, 1979.
- 4) Taylor HR, West SK, Rosenthal FS, Muñoz B, Newland HS, Abbey H, et al: Effect of ultraviolet radiation on cataract formation. N Engl J Med 319: 1429-1433, 1988.
- 5) Hightower KR, Reddan JR, McCready JP, Oziedic DC: Lens epithelium: A primary target of UVB irradiation. Exp Eye Res 59: 557-564, 1994.
- 6) Andley UP, Clark BA: The effects of near-UV radiation on human lens  $\beta$ -crystallins: Protein structural changes and the production of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Photochem Photobiol 50: 97-105, 1989.
- 7) 小原喜隆: 活性酸素・フリーラジカルと白内障. 日眼会誌 99: 1303-1341, 1995.
- 8) Kleiman NJ, Wang RR, Spector A: Ultraviolet light induced DNA damage and repair in bovine lens epithelial cells. Curr Eye Res 9: 1185-1193, 1990.
- 9) Sidjanin D, Zigman S, Raddan J: DNA damage and repair in rabbit lens epithelial cells following UVA radiation. Curr Eye Res 12: 773-781, 1993.
- 10) Imlay JA, Chin SM, Linn S: Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction *in vivo* and *in vitro*. Science 240: 640-642, 1988.
- 11) Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res 175: 184-191, 1988.
- 12) Dizdaroglu M: Chemistry of free radical damage to DNA and nucleoproteins. In: Halliwell B, et al (Eds): DNA and Free Radicals. Ellis Horwood, England, 19-39, 1993.
- 13) Kleiman NJ, Wang RR, Spector A: Hydrogen peroxide-induced DNA damage in bovine lens epithelial cells. Mutat Res 240: 35-45, 1990.
- 14) Bando M, Mikuni I, Obazawa H: Calcium-induced lens protein aggregation accelerated by reactive oxygen species photosensitized in the presence of hydroxykynurenines. Exp Eye Res 40: 813-818, 1985.
- 15) Meneghini R, Martins EL: Hydrogen peroxide and DNA damage. In: Halliwell B, et al (Eds):

- DNA and Free Radicals. Ellis Horwood, England, 86—93, 1993.
- 16) **de Mello Filho AC, Meneghini R**: Protection of mammalian cells by *O*-phenanthroline from lethal and DNA-damaging effects produced by active oxygen species. *Biochim Biophys Acta* 847: 82—89, 1985.
- 17) **小林一雄**: 活性酸素の寿命とその生理的意義. 中野稔, 他(編): 活性酸素, 生物での生成・消去・作用の分子機構, 共立出版, 東京, 26—31, 1988.
- 18) **Ito T**: UV-B observations by Japan Meteorological Agency. In: Center for Global Environmental Research (Ed): Proceedings of the Tsukuba Ozone Workshop. National Institute for Environmental Studies Environmental Agency of Japan, Tokyo, 82—84, 1994.
- 19) **Jose JG, Yielding KL**: “Unscheduled” DNA synthesis in lens epithelium following ultraviolet irradiation. *Exp Eye Res* 24: 113—119, 1977.
- 20) **Söderberg PG, Philipson BT, Lindström B**: Unscheduled DNA synthesis in lens epithelium after *in vivo* exposure to UV radiation in the 300 nm wavelength region. *Acta Ophthalmol* 64: 162—168, 1986.
- 21) **Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM**: Principles of Biochemistry. Worth Publishers, Inc, New York, 831—839, 1993.
- 22) **Hoffmann ME, Mello-Filho AC, Meneghini R**: Correlation between cytotoxic effect of hydrogen peroxide and the yield of DNA strand breaks in cells of different species. *Biochim Biophys Acta* 781: 234—238, 1984.
-