

4-2-2-1) バリデーションデータの質	28
4-2-2-2) 試験結果のピア試験結果の対応性	35
4-2-2-3) 試験法の信頼性	43
4-2-2-4) 総合評価	48
<b>4-3) 3T3-NR 法以外の方法について</b>	<b>49</b>
4-3-1) 各種 in vitro 光毒性試験法のまとめ(文献調査)	
4-3-1-1) 単層培養細胞を用いた試験法	
4-3-1-2) その他の細胞を用いた試験法	
4-3-1-3) 培養皮膚モデルを用いた試験法	
4-3-1-4) 生体膜損傷を指標とした試験法：光溶血性試験	
4-3-1-5) タンパク質に対する作用を指標とした試験法	
4-3-1-6) その他の化学物質を用いた試験法	
4-3-1-7) 試験法の組み合わせ (battery) による評価	
4-3-2) 各種 in vitro 光毒性試験法の評価	
<b>4-4) 考慮すべき事項</b>	<b>54</b>
4-4-1) 試験法の普及性	
4-4-1-1) 若干の修正に対する頑健性	
4-4-1-2) 教育訓練及び専門性	
4-4-1-3) 必要な装置や材料の入手	
4-4-2) コストとそれに見合う有用性	
4-4-3) 試験法導入に要する時間	
4-4-4) 3 R s の面からの考察	
4-4-4-1) Replacement	
4-4-4-2) Refinement	
4-4-4-3) Reduction	
4-4-5) 結論	
4-4-6) 要望事項	
<b>4-5) 関連項目</b>	<b>62</b>
4-5-1) EU/COLIPA 及び OECD により提案された試験プロトコールの一部変更について	
4-5-1-1) 細胞毒性評価指標の変更について	
4-5-1-2) 細胞種差の変更に関して	
4-5-1-3) 光照射に関すること	
4-5-1-4) 光毒性の有無を判定するためのパラメーターとカットオフ値	

4-5-2) ワークショップとバリデーションの必要性とその内容

4-5-2-1) 概要

4-5-2-2) 試験条件の最適化

4-5-2-3) 他の試験法における活用

4-5-3) 関連項目に関する要約

4-5-3-1) 将来検討すべき項目

4-5-3-2) 将来要望される Workshop

## **第 5 章 標準的試験法の提案 73**

### **5-1) 標準的試験法 73**

### **5-2) OECD 試験法ガイドライン案(2002年3月15日)との関係 76**

5-2-1) 用量選択手順

5-2-2) 用量段階(用量数)

5-2-3) 試験に用いる材料、装置、使用細胞

5-2-4) データ収集手順

5-2-5) データ解析、評価、判断基準

5-2-6) 陽性、陰性、対照物質について

5-2-7) 用量反応の説明

5-2-8) 試験法プロトコールの精密度と完全性

5-2-9) 本試験系の限界

5-2-10) 結論

### **5-3) 光毒性評価パラメーターについて 80**

5-3-1) はじめに

5-3-2) PIF について

5-3-3) MPE

5-3-3-1) MPE の導出の背景

5-3-3-2) MPE の求め方

5-3-3-4) 用量反応曲線

5-3-3-5) 性能の比較

5-3-3-6) 議論

## **第 6 章 まとめ 86**

- 6-1) 動物での光毒性試験について
- 6-2) In vitro 光毒性試験一般について
- 6-3) 3T3-NR 法の施設間バリデーションについての Spielmann らの報告結果について
  - 6-3-1) バリデーションデータの質について
  - 6-3-2) 被験物質の選択について
  - 6-3-3) in vivo 試験結果との対応性について
  - 6-3-4) 3T3-NR 法の信頼性について
  - 6-3-5) 総合評価
- 6-4) 3T3-NR 法の受け入れに関して
- 6-5) 標準的試験法について
- 6-6) その他
- 6-7) 結論

## 添付資料

- 1) Spielmann et al. (1994) EEC/COLIPA Project on In Vitro Phototoxicity Testing: First Results Obtained with A BALB/C 3T3 Cell Phototoxicity Assay, *Toxicology in Vitro* 8 793-796.
- 2) Spielmann et al. (1998) The International EU/COLIPA In Vitro Phototoxicity Validation Study: Results of Phase II (Blind Trial). Part 1 :The 3T3 NRU Phototoxicity Test, *Toxicology in Vitro* 12, 305-327.
- 3) Spielmann et al. (1998) A Study on UV Filter Chemicals from Annex VII of European Union Directive 76/768/EEC, in the In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test, *ATLA* 26, 679-708.
- 4) OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS, DRAFT PROPOSAL FOR A NEW GUIDELINE: 432, *In Vitro* 3T3 NRU phototoxicity test (2002,3,15)
- 5) Comments on Draft TG 432
- 6) 厚生科学研究班における光毒性試験代替法の評価

## Balb/c 3T3 細胞を用い neutral red 取り込みを指標とした光毒性試験代替法の評価について

### 第1章 序

#### 1-1) 序

医薬品や化粧品の安全性評価においては単回・反復投与毒性試験、発がん性試験、生殖発生毒性試験、特殊毒性試験などの結果が必要により要求されている。一方、動物愛護の立場からは、これらの安全性試験をなるべく実験動物を使用しない試験法に置き換える事が要求されている。しかし、新しい方法に置き換えることにより臨床試験志願者や患者、また、一般消費者に不必要なリスクを負わせることは許されない。安全性評価の観点から、新しい方法が少なくとも従来の方法と同等か、あるいはそれ以上の能力をもつことが客観的に示されていなくてはならない。そこで、EU では代替法センター(ECVAM)を設立し、代替法研究とバリデーションを行っている。同様の目的のために米国では ICCVAM を設立し、代替法を文献的に評価している。また、OECD では代替法を用いた試験法ガイドラインを複数作成中である。

このように欧米では代替法の開発・評価を着実にやってきており、我が国でもこれに対応する体制を整える必要がある。そこで本研究では科学的根拠に基づいて可能ならば化粧品や医薬品等の評価のために動物実験代替法を導入するために、代替法の開発研究と調査を行って来た。また、今年度は動物実験代替法として提案された方法について行政的に取り入れることが可能か否か検討するために、評価委員会と評価会議を設定し、基礎の研究者および臨床医師により多面的に評価することとした。

#### 1-2) 本プロジェクトによる代替法評価の意図

代替法においては広い範囲の被験物質についてバリデーションを行い、それから得られる情報の種類や適用可能物質などについて明らかにしておくことがその適正利用に必要であり、我々も眼刺激性試験代替法についてバリデーションを行った。しかし、国際的な基準に従ったバリデーションを行うには多くの研究者の協力と多大な費用および時間がかかることから、全ての試験法についてわが国でフルバリデーションを実行することは不可能であると考えた。そこで、本研究においては海外でのバリデーション情報を収集し、それを関連科学分野の専門家と行政担当者を含めた会議により総合的に評価することを意図している。また、

欧米あるいは OECD で承認された代替法の利点・欠点を明らかにし、それらの採用の可否の決定ならびに適正利用に資することを意図している。

### 1-3) 代替法の評価の手順

安全性評価のための動物実験代替法として報告されている試験法を客観的、科学的に評価することにより、その利点と問題点、限界を明らかにし、試験法としての妥当性の範囲を明らかにし、認定することにより、動物実験代替法の使用を促進する。この目的のために評価委員会と評価会議を設置した。

評価委員会は代替法について具体的に調査し、評価するための機関であり、代替法の評価および評価の対象となる試験法の専門家から構成した。一方、評価会議はより広い知識・経験・視野のもとで代替法を行政的な目的のための使用における妥当性について評価する。評価会議は臨床医師、統計の専門家、行政官、および厚生科学研究の班員、班友により構成されている。評価委員会は提出された代替法の申請書を評価し、評価文書を作成し、試験法が特定の目的のために妥当とされた場合には厚生科学研究班に設置された評価会議に上げ、更に評価する。ここで申請された代替法が妥当とされた場合には公開のシンポジウムを開催し、広く意見を求め、その結果に基づいて最終評価を行う。

評価委員会の委員は平成13年度は光刺激性試験代替法を評価するとして、以下の委員を選考した。金子豊蔵（委員長：国立衛研 毒性部）、田中憲穂（副委員長：食品薬品安全センター 秦野研究所）、板垣 宏（資生堂 ライフサイエンス研究センター安全性研究所）、今井弘一（大阪歯科大学 中央歯学研究所組織培養実験施設）、大野泰雄（国立衛研：薬理部）、大森 崇（国立衛研 審査センター）、岡本裕子（コーセー 基礎研究所）、小島肇夫（日本メナード化粧品 総合研究所）、畑尾正人（資生堂 基盤研究センター 薬剤開発研究所）、若栗 忍（食品薬品安全センター 秦野研究所）

評価会議の委員は以下のとおり。大野泰雄（委員長：国立衛研 薬理部）、金子豊蔵（国立衛研 毒性部）、田中憲穂（食品薬品安全センター 秦野研究所）、豊田英一（日本化粧品工業連合会・技術委員会）、西岡 清（東京医科歯科大学医学部）、林 憲一（厚生労働省医薬局審査管理課）、溝口 昌子（聖マリアンナ医科大学皮膚科学）、宮地 良樹（京都大学大学院医学研究科）、森本雅憲（城西大学薬学部）、吉村 功（東京理科大学工学研究科経営工学）

### 1-4) 評価する試験法について

評価する試験法については、バリデーショナルデータの蓄積、国際的な受け入れあるいは受け入れ見込みの状況、および我が国における必要性等を勘案して決定する。

## 第2章 光毒性試験代替法について

### 2-1) 光毒性試験代替法を選択した理由

太陽光は地上の生物の生命の基盤となるものであるが、その強い紫外線は遺伝子を破壊し、強い熱線は気候を変動させ、環境に大きな影響を及ぼす。ヒトに対する直接作用においても光は大きな影響を及ぼす。即ち、強い光照射は上皮細胞や真皮細胞やその構成成分に障害を与え、しわ wrinkling、角化症 keratosis、毛細管拡張症 telangiectasia、皮膚ガン skin cancer を発生させる。一方、上皮にはメラニン細胞が存在し、中性密度フィルター neutral density filter として光を遮り、光の影響を緩和するのに役だっている。我々有色人種はこの自然の機構が白人よりは備わっているが、それでも光が主な原因となっていると思われる皮膚癌は多く発生している<sup>1)</sup>。

一方、光は直接生体構成成分に作用して毒性を現すだけでなく、化粧品や皮膚塗布或いは体内に投与され体内に循環している薬物或いはその代謝物と反応し、毒性を起こすことが多い(表3)。例えば、キノロン系抗菌剤の内には光毒性を現す薬物が多くある。また、石鹼や洗浄剤に光毒性を示す物質が入っていたこともあった。このような場合には黒人のようにメラニン色素の多い者でも重篤な光毒性を起こす事がある。Lupus Erythematoses, polymorphic light eruptions のように原因不明の光感受性異常を有する疾患もある。また、医薬品の副作用には Steven Johnson 症候群のように医薬品の副作用として重篤なアレルギー性皮膚症状を現す物も多く、これらの原因の一つとして光毒性の結果として副作用が現れている可能性も考えられる。また、色素性乾皮症患者のように遺伝的に DNA 修復酵素の異常を有するものでは光毒性が一般のヒトよりも強く現れる。このように、光毒性の有無の評価は化粧品や医薬品の安全性評価において極めて重要な位置を占めている。

アウトドアアレルギーの増加による光曝露の増加、オゾン層破壊による紫外線の増加が問題を更に深刻にしている。一方、長波長領域で光細胞毒性を起こす物質をがん治療に利用する試みも多く報告されている。

最近 OECD では光毒性試験代替法についてのガイドライン案が提示され、近い将来において採用される可能性が高い。しかし、特に *in vitro* の試験法においては、試験法の能力や限界についてのバリデーショナルデータを基にした十分な知識を有さない者が使用したり、その結果を評価すると大きな過ちを犯す可能性が高い。

このような状況から、平成13年度は光毒性試験代替法についてとりあげ、広く文献調査を行い、総合的に評価することにより、早急にその能力と限界を明らかにすることとした。

## 2-2) 光毒性の定義

広義の光毒性とは光が原因となって起こる、生体において不都合な作用全般を指す。しかし、ここでは人間を含む動物が使用、摂取あるいは投与された薬物や化学物質等と光が相互作用を起こした結果生体に不都合な作用が現れる事象を狭義の光毒性と定義する。このような光毒性には現れる生体影響をもとに光刺激性、光感作性、光遺伝毒性、光発がん性などに分類される。

ここでは光、物質、生体組織が同時に存在するときにおこる急性の一次刺激反応であり、用量（濃度）依存的な応答として検出される光刺激性の代替法についてのみ言及する。

## 2-3) 光毒性発現機序

太陽はエックス線から中波に及ぶ巾広い電磁波を放射しているが、地上に降り注ぐ光の波長はその一部であり、290nm以下の波長の光は地表に到達しない（図1）。

光吸収性物質は光線の照射により基底状態から励起状態に電子が遷移し、燐光、蛍光、熱あるいは振動エネルギーとして放出し、再び基底状態に移行するが、光毒性物質はその過程でラジカルを形成したり、charge transferを起こすことを通じて、生体に障害を与える。逆に言えば、光吸収を示さない物質は直接光毒性物質になり得ない。

光毒性の見地から検討の対象となる光はUV-B、UV-A、可視光、赤外光に分けられる（表1）。これらの内、1光量子当たりのエネルギーはUV-B領域の光が最も強く、分子中の電子を励起し、各種の化学反応を誘因し、結果として皮膚組織に障害を与え、紅斑をはじめとする生体反応を惹起する。一方、赤外線は単位エネルギーは相対的に低く、分子の振動や回転状態を変化させることはあっても、電子状態に影響することはなく、直接化学反応を誘因することはない。表2に照射光の波長とその生体影響に関する関係を示した。

表1：地上に到達する光の分類と照射エネルギー分布

	波長	照射エネルギー(mW/cm <sup>2</sup> )
UV-B	280-320 nm	0.4
UV-A	320-400 nm	6.4
可視光	400-780 nm	58.0
赤外光	0.78-1000 μm	49.2
合計		114.0

(Kampf, G. Farben, Lacke., 82, 194, 1976. 小林ら(1989)<sup>2)</sup>より引用)

表2：ヒトに正常あるいは異常反応を起こす光の波長領域

反応	作用発現波長(nm)	最大作用波長(nm)
正常の日焼け	290-320	297-307
メラニン色素化	290-320, 320-480	290-310
ビタミンD形成	290-310	290
未熟児の高ビリルビン血症治療	青色可視光	440-470
UV発がん	290-320	290-310
光蕁麻疹	290-320, 320-400, 400-600	varying
ポルフィリン症での光感受性	380-600	400-410
色素性乾皮症	290-340	293-307
多形性光線性皮膚症	290-320, 320-400	290-320
紅斑性狼そう(LE)及び円盤状LE	290-320	
光壊死	290-400	?
ハロゲン化サリシレートや他の関連薬物における光アレルギー反応	320-380	330-360
薬物による光毒性	320-400, 290-320	320-400
乾せん	320-380	330-360

Fitzpatrick et al (1974)<sup>1)</sup>より引用



## 2-4) 光毒性誘発薬物

光毒性誘発物質には Psoralen のような植物や生薬成分や、コールタールの成分である acridine や anthracene のような産業生成物、抗菌剤、抗生物質やフェノチアジン系薬物など、様々な物がある (表 3、4)。

表 3 : ヒトで接触性光毒性を起こす物質

名 称	用 途	臨床的症状
halogenated salicylanilides, TCSA (tetrachlorosalicylanilide)	石鹼消臭・殺菌薬	光毒性、湿疹様光アレルギー反応、やけど、かゆみ、交差光感受性反応 cross photosensitivity reactions
hexachlorophene	消毒用抗菌剤	光毒性
bithionol, bis-(2-hydroxy-3,5-dichlorophenyl) sulfide	消毒用抗菌剤	光毒性
fentichlor (2,2'-dihydroxy-5,5'-dichlorodiphenyl sulfide), multifungin (bromchlorsalicylanilid), jadit (4-chloro-2-hydroxybenzoic acid-N-n-butylamide)	抗真菌剤	光毒性、光アレルギー反応
5-fluorouracil	抗悪性腫瘍薬	炎症過程の促進
p-aminobenzoic acid とそのエステル類	光線防御剤	光アレルギー反応
4,4'-bis(3-phenylureido)-2,2'-stilbenedisulfonic acid) および blankophor	繊維用蛍光剤	光毒性、光アレルギー反応
フロクマリン類 psoralen, 8-methoxypsoralen, 5-methoxypsoralen, 4,5',8-trimethylpsoralen	白斑症時の色素産生増加と光線耐性獲得のため	著明な紅斑、小水疱、水疱、色素沈着
精油 ベルガモット油、ライム油、ceder 油、ラベンダー油、シトロン油、sandalwood 油	化粧品	光毒性、炎症後色素沈着
植物 umbelliferae, Rutaceae	香水や香料、スパイス	光線性皮膚炎、色素沈着、小水疱、水疱
色素 fluorescein, rose bengal, eosin, erythrocin, tryptaflavin, orange red, para-phenylenediamine, methylene blue, toluidine blue, trypan blue	化粧品、色素産業	紅斑、浮腫、小水疱、色素沈着、光毒性
コールタール成分、誘導体 phenanthrene, naphthalene, thiophene, acridine, anthracene, phenanthrene, phenol 性化合物、pitch	乾せんや慢性湿疹治療のためにシャンプーに添加	smarting, 日焼け増強、蕁麻疹性膨疹、タール性黒皮症

Fitzpatric et al (1974)<sup>1)</sup>より引用

表5：全身性光毒性物質

名 称	用 途	臨床症状
スルフォンアミド類(3,4) sulfanilamide, sulfathiazole, fulfapyridine, sulfamethazine, sulfaguanidine, sulfisoxazole, monochlorphenamide	抗菌薬	光毒性、光アレルギー 反応
スルホニルウレア carbutamide, tolbutamide, chlorpropamide	血糖低下薬	光毒性
クロロチアジド類(5) 6-chlor-2H-1,2,4-benzothiadiazine-7- sulfonamide-1,1-dioxide	利尿薬、降圧薬	papular and 浮腫性発 疹、プラーク
quinethazone	高血圧薬	光毒性、光アレルギー 反応
フェノチアジン類(6,7) chlorpromazine(8), promethazine, mepazine, stelazine, trimeprazine, compazine, promazine	トランキライザー、線 虫駆除薬, infestation agent, 尿路殺菌薬、抗 ヒスタミン薬	日 焼 け 増 強 、 maculopapular and 蕁 麻疹様発疹、灰青色色素 沈着過多
抗生物質(9) declomycin, chlortetracycline, oxytetracycline, doxycycline	広スペクトル抗生物質	日焼け増強、光毒性
グリセオフルピン	細胞分裂阻害薬	日焼け増強、光毒性、 光アレルギー
Nalidixic 酸(10)	抗菌薬	紅斑、水疱
フロクマリン類 4,5,8-trimethylpsoralen, 8-methoxypsoralen (11-13), psoralen	白斑症時の色素産生増 加と光線耐性獲得のため	紅斑、水疱、色素沈着 過多
女性ホルモン類 mestranol and norethynodrel, diethylstilbesterol	経口避妊薬	黒皮症 光毒性
chlordiazepoxide	トランキライザー、向 精神薬	湿疹様発疹
triacytyldiphenolisatin	緩下剤	湿疹様光アレルギー
cyclamates, calcium cyclamate, sodium cyclohexylsulfamate	人工甘味料	光毒性、光アレルギー

( ) 内の数字は文献番号。これの無いものは Fitzpatrick et al (1974)より引用

その後、表4に示した薬物以外にも多くの薬物が In vitro あるいは In vivo で光毒性を有することが示されている。それらの一部を表5に示した。最も多く報告されているのはキノロン系抗菌剤であり、その内には clinafloxacin や sparfloxacin のように光毒性が原因となって販売停止あるいは使用制限されたものもある<sup>14,15)</sup>。なお、in vitro で光毒性が示された薬物でも、血中濃度等の関係で、必ずしも in vivo で光毒性を示さない場合がある<sup>16,17)</sup>。一方、可視光で光毒性を現す薬物もある<sup>18)</sup>。また、より長波長領域で光照射による細胞毒性を現す薬物を利用してガンなどの治療への応用研究も広く行われている。

表5：最近の論文に現れた光毒性薬物

キノロン系抗菌剤：clinafloxacin (14), pefloxacin (19), sparfloxacin(14, 20, 21,22\*), enoxacin (21), lomefloxacin (23)  
 3環系抗うつ薬：amitriptyline (24), imipramine (24)  
 ベンゾジアゼピン系抗鬱薬：tetrazepam (25)  
 抗精神病薬：promethazine, trimeprazine, mequitazine, chlorpromazine, trifluoperazine, ethopropazine and thioridazine (26), chlorpromazine, dixyrazine, fluphenazine, perazine, perphenazine, promazine, promethazine, prothipendyl, trifluoperazine, triflupromazine, chlorprothixene, thiothixene (27), clozapine (28\*)  
 抗生物質：doxycycline, emodin (29)  
 抗マラリア薬：chloroquine (30\*)  
 抗菌薬：pyrazinamide (31\*)  
 糖尿病薬：glipizide (32), glibenclamide (33,34\*), gliquidone (33)  
 利尿薬：furosemide (35), bemetizide, bendroflumethiazide, benzylhydrochlorothiazide, bumetanide, butizide, hydrochlorothiazide, hydroflumethiazide, piretanide, polythiazide and trichlormethiazide (33)  
 抗炎症薬：diclofenac (36), carprofen, naproxen, phenylbutazone (18+)  
 抗ガン薬：flutamide (37)  
 その他の医薬品：pantoprazole (38\*), felodipine (39\*), melatonin (40), fenofibrate (41)  
 植物成分：fluorocoumarins (42, 43\*), xanthotoxin (8-MOP), heraclenol, trichoclin, imperatorin (42), berberine (44), bergamot aromatherapy oil (45), hypericin (46\*, 16, 17#), thiopsoresalen (47)  
 医療用色素：Methylene-blue (48\*), sodium fluorescein (49\*)  
 その他の化学物質：pyrene, anthracene, retene (50)  
 ガン治療薬としての開発：Dimegin (51), aluminum phthalocyanine (52), 2-butylamino-2-demethoxy-hypocrellin A (2-BA-2-DMHA), (53), photofrin II-, mTHPC-, mTHPC-PEG- and mTHPCnPEG (54), 5-aminolevulinic acid (55), Hematoporphyrin derivatives (HpD) (56), ursodeoxycholic acid, etiopurpurin SnET2, (57), benzoporphyrin (58, 59)

\*: 臨床で光毒性、#: in vivo では光毒性陰性、+: 可視光で細胞毒性

#### 引用文献

- 1) Fitzpatrick et al. (1974) An introduction to the problem of normal and abnormal responses of man's skin to solar radiation. In Sunlight and Man, Ed. by thomas B. fitzpatrick, University of Tokyo Press, p3-14.
- 2) 小林敏明、市川秀之、板垣 宏 (1989) 皮膚毒性、毒性試験講座 7 機能毒性学、福原武彦、小野 宏編集、地人書館、p268-302.
- 3) Stratigos, J.D., Magnus, I.A. (1968) Brit. J. Dermatol. 8, 391.
- 4) Epstein, S. (1939) J. Invest. Dermatol. 2, 43.
- 5) Sams, W.M., Epstein, J.H. (1967) J. Invest. Dermatol., 48, 80.
- 6) Ljunggren, B. (1977) J. Inves. Dermatol., 69, 383.
- 7) Sidi, E. Hincky, M., Gervais, A. (1955) J. Invest. Dermatol. 24, 345.
- 8) Epstein, J.H., Brunsting, L.A., Petersen, M.C. (1957) J. Invest. Dermatol. 28, 329.

- 9) Harber, L.C., tromovich, T.A. Baer, R.L. (1961) *J. Invest. Dermatol.*, 15, 317.
- 10) Birkett, D.A., Garrentt, M., Stevenson, L. J. (1969) *Brit. J. Dermatol.*, 81, 342.
- 11) Pathak, M.a., Worden, L.R., Kaufman, K.D. (1967) *J. Invest. Dermatol.* 48, 103.
- 12) Musajo, L., Rodighiero, G. (1962) *Experientia* 15, 153.
- 13) Pathak, M.A. (1973) 植物起因性日光皮膚炎、光と皮膚、金原出版
- 14) Zhanel GG, Ennis K, Vercaigne L, Walkty A, Gin AS, Embil J, Smith H, Hoban, A critical review of the fluoroquinolones: focus on respiratory infections. *Drugs.* 2002;62(1):13-59. Comparison of the in vivo efficiency of photofrin II-, mTHPC-, mTHPC-PEG- and mTHPCnPEG-mediated PDT in a human xenografted head and neck carcinoma. *Lasers Surg Med.* 2001;29(4):314-22.
- 16) Bernd A, Simon S, Ramirez Bosca A, Kippenberger S, Diaz Alperi J, Miquel J, Villalba Garcia JF, Pamies Mira D, Kaufmann R. Phototoxic effects of Hypericum extract in cultures of human keratinocytes compared with those of psoralen. *Photochem Photobiol.* 1999 Feb;69(2):218-21.
- 17) Brockmoller J, Reum T, Bauer S, Kerb R, Hubner WD, Roots I. Hypericin and pseudohypericin: pharmacokinetics and effects on photosensitivity in humans. *Pharmacopsychiatry.* 1997 Sep;30 Suppl 2:94-101.
- 18) Becker L, Eberlein-Konig B, Przybilla B. Phototoxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs: in vitro studies with visible light. *Acta Derm Venereol* 1996 Sep;76(5):337-40
- 19) Sun YW, Heo EP, Cho YH, Bark KM, Yoon TJ, Kim TH. Pefloxacin and ciprofloxacin increase UVA-induced edema and immune suppression. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2001 Aug;17(4):172-7.
- 20) Yagawa K. Latest industry information on the safety profile of levofloxacin in Japan. *Chemotherapy.* 2001;47 Suppl 3:38-43; discussion 44-8. Review.
- 21) Carbon C. Comparison of side effects of levofloxacin versus other fluoroquinolones. *Chemotherapy.* 2001;47 Suppl 3:9-14; discussion 44-8.
- 22) Tokura Y, Iwamoto Y, Mizutani K, Takigawa M. Sparfloxacin phototoxicity: potential photoaugmentation by ultraviolet A and B sources. *Arch Dermatol Res* 1996;288(1):45-50
- 23) Klecak G, Urbach F, Urwyler H. Fluoroquinolone antibacterials enhance UVA-induced skin tumors. *J Photochem Photobiol B* 1997 Feb;37(3):174-81
- 24) Viola G, Miolo G, Vedaldi D, Dall'Acqua F. In vitro studies of the phototoxic potential of the antidepressant drugs amitriptyline and imipramine. *Farmaco.* 2000 Mar;55(3):211-8.
- 25) Schwedler S, Mempel M, Schmidt T, Abeck D, Ring J. Phototoxicity to tetrazepam - A new adverse reaction. *Dermatology.* 1998;197(2):193-4.
- 26) Mio M, Yabuta M, Kamei C. Ultraviolet B (UVB) light-induced histamine release from rat peritoneal

- mast cells and its augmentation by certain phenothiazine compounds. *Immunopharmacology* 1999 Jan;41(1):55-63
- 27) Eberlein-Konig B, Bindi A, Przybilla B. Phototoxic properties of neuroleptic drugs. *Dermatology* 1997;194(2):131-5
  - 28) Howanitz E, Pardo M, Losonczy M. Photosensitivity to clozapine. *J Clin Psychiatry* 1995 Dec;56(12):589
  - 29) Sortino S, Giuffrida S, Scaiano JC. Phototoxicity of naphazoline. Evidence that hydrated electrons, nitrogen-centered radicals, and OH radicals trigger DNA damage: a combined photocleavage and laser flash photolysis study. *Chem Res Toxicol.* 1999 Oct;12(10):971-8.
  - 30) Selvaag E. Vitiligo caused by chloroquine phototoxicity. *J R Army Med Corps.* 1998 Oct;144(3):163-5.
  - 31) Choonhakam C, Janma J. Pyrazinamide-induced lichenoid photodermatitis. *J Am Acad Dermatol.* 1999 Apr;40(4):645-6. No abstract available.
  - 32) Vargas F, Mendez H, Tropper E, Velazquez M, Fraile G. Studies on the in vitro phototoxicity of the antidiabetes drug glipizide. In *Vitr Mol Toxicol.* 2000 Spring;13(1):17-24.
  - 33) Selvaag E, Anholt H, Moan J, Thune P. Inhibiting effects of antioxidants on drug-induced phototoxicity in cell cultures. Investigations with sulphonamide-derived oral antidiabetics and diuretics. *J Photochem Photobiol B* 1997 Mar;38(1):88-93
  - 34) Fujii S, Nakashima T, Kaneko T. Glibenclamide-induced photosensitivity in a diabetic patient with erythropoietic protoporphyria. *Am J Hematol* 1995 Nov;50(3):223
  - 35) Vargas F, Martinez Volkmar I, Sequera J, Mendez H, Rojas J, Fraile G, Velasquez M, Medina R. Photodegradation and phototoxicity studies of furosemide. Involvement of singlet oxygen in the photoinduced hemolysis and lipid peroxidation. *J Photochem Photobiol B.* 1998 Mar;42(3):219-25.
  - 36) Encinas S, Bosca F, Miranda MA. Phototoxicity associated with diclofenac: a photophysical, photochemical, and photobiological study on the drug and its photoproducts. *Chem Res Toxicol.* 1998 Aug;11(8):946-52.
  - 37) Vargas F, Rivas C, Mendez H, Fuentes A, Fraile G, Velasquez M. Photochemistry and phototoxicity studies of flutamide, a phototoxic anti-cancer drug. *J Photochem Photobiol B.* 2000 Nov;58(2-3):108-14.
  - 38) Correia O, Lomba Viana H, Azevedo R, Delgado L, Polonia J. Possible phototoxicity with subsequent progression to discoid lupus following pantoprazole administration. *Clin Exp Dermatol.* 2001 Jul;26(5):455-6.
  - 39) Silvestre JF, Albares MP, Camero L, Botella R. Photodistributed felodipine-induced facial

- telangiectasia. *J Am Acad Dermatol*. 2001 Aug;45(2):323-4. No abstract available.
- 40) Kim YO, Chung HJ, Chung ST, Kim JH, Park JH, Kil KS, Cho DH. Phototoxicity of melatonin. *Arch Pharm Res*. 1999 Apr;22(2):143-50.
  - 41) Diemer S, Eberlein-Konig B, Przybilla B. Evaluation of the phototoxic properties of some hypolipidemics in vitro: fenofibrate exhibits a prominent phototoxic potential in the UVA and UVB region. *J Dermatol Sci* 1996 Nov;13(2):172-7
  - 42) Colombain M, Goll V, Muyard F, Girard C, Bevalot F, Richert L. A bioassay using the human hepatoblastoma cell line HepG2 for detecting phototoxicity of furocoumarins. *Planta Med*. 2001 Oct;67(7):644-6.
  - 43) Lagey K, Duinslaeger L, Vanderkelen A. Burns induced by plants. *Burns* 1995 Nov;21(7):542-3
  - 44) Inbaraj JJ, Kukielczak BM, Bilski P, Sandvik SL, Chignell CF. Photochemistry and photocytotoxicity of alkaloids from Goldenseal (*Hydrastis canadensis* L.) 1. Berberine. *Chem Res Toxicol*. 2001 Nov;14(11):1529-34.
  - 45) Kaddu S, Kerl H, Wolf P. Accidental bullous phototoxic reactions to bergamot aromatherapy oil. *J Am Acad Dermatol*. 2001 Sep;45(3):458-61.
  - 46) Phase I studies of hypericin, the active compound in St. John's Wort, as an antiretroviral agent in HIV-infected adults. AIDS Clinical Trials Group Protocols 150 and 258. *Ann Intern Med*. 1999 Mar 16;130(6):510-4.
  - 47) Vedaldi D, Piazza G, Moro S, Caffieri S, Miolo G, Aloisi GG, Elisei F, Dall'Acqua F. 1-Thiopsoralen, a new photobiologically active heteropsoralen. Photophysical, photochemical and computer aided studies. *Farmaco*. 1997 Nov;52(11):645-52.
  - 48) George M. Methylene-blue-induced hyperbilirubinemia and phototoxicity in a neonate. *Clin Pediatr (Phila)*. 2000 Nov;39(11):659-61.
  - 49) Danis RP, Wolverson S, Steffens T. Phototoxicity from systemic sodium fluorescein. *Retina*. 2000;20(4):370-3.
  - 50) Huovinen PS, Soimasuo MR, Oikari AO. Photoinduced toxicity of retene to *Daphnia magna* under enhanced UV-B radiation. *Chemosphere*. 2001 Nov;45(4-5):683-91.
  - 51) Fickweiler S, Szeimies RM, Abels C, Ponomarev GV, Hofstadter F, Wolfbeis OS, Landthaler M. Photosensitization of skin-derived cell lines by Dimegin [2,4-di-(alpha-methoxyethyl)-deuteroporphyrin IX] in vitro. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 1998 Jun-Aug;14(3-4):125-31.
  - 52) Daziano JP, Humeau L, Henry M, Mannoni P, Chanon M, Chabannon C, Julliard M. Preferential photoinactivation of leukemia cells by aluminum phthalocyanine. *J Photochem Photobiol B*. 1998

May 15;43(2):128-35.

- 53) A novel photosensitizer, 2-butylamino-2-demethoxy-hypocrellin A (2-BA-2-DMHA). 1. Synthesis of 2-BA-2-DMHA and its phototoxicity to MGC803 cells. *J Photochem Photobiol B.* 1998 Jun 15;44(1):21-8.
- 54) Reuther T, Kubler AC, Zillmann U, Flechtenmacher C, Sinn H. Comparison of the in vivo efficiency of photofrin II-, mTHPC-, mTHPC-PEG- and mTHPCnPEG-mediated PDT in a human xenografted head and neck carcinoma. *Lasers Surg Med.* 2001;29(4):314-22.
- 55) Zoepf T, Jakobs R, Rosenbaum A, Apel D, Arnold JC. Photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid is not effective in bile duct cancer. *Gastrointest Endosc.* 2001 Dec;54(6):763-6.
- 56) Maier A, Tomaselli F, Matzi V, Rehak P, Pinter H, Smolle-Juttner FM. Photosensitization with hematoporphyrin derivative compared to 5-aminolaevulinic acid for photodynamic therapy of esophageal carcinoma. *Ann Thorac Surg.* 2001 Oct;72(4):1136-40.
- 57) Kessel D, Caruso JA, Reiners JJ Jr. Potentiation of photodynamic therapy by ursodeoxycholic acid. *Cancer Res.* 2000 Dec 15;60(24):6985-8.
- 58) Gonzalez S, Vibhagool C, Sherwood M, Flotte TJ, Kollias N. The phototoxicity of photodynamic therapy may be suppressed or enhanced by modulation of the cutaneous vasculature. *J Photochem Photobiol B.* 2000 Sep;57(2-3):142-8.
- 59) Lin GC, Tsoukas ML, Lee MS, Gonzalez S, Vibhagool C, Anderson RR, Kollias N. Skin necrosis due to photodynamic action of benzoporphyrin depends on circulating rather than tissue drug levels: implications for control of photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 1998 Oct;68(4):575-83.

図1： 地表に到達する太陽光線スペクトル (Photosensitivity Disease, 小林ら(1989)<sup>2)</sup> より引用)

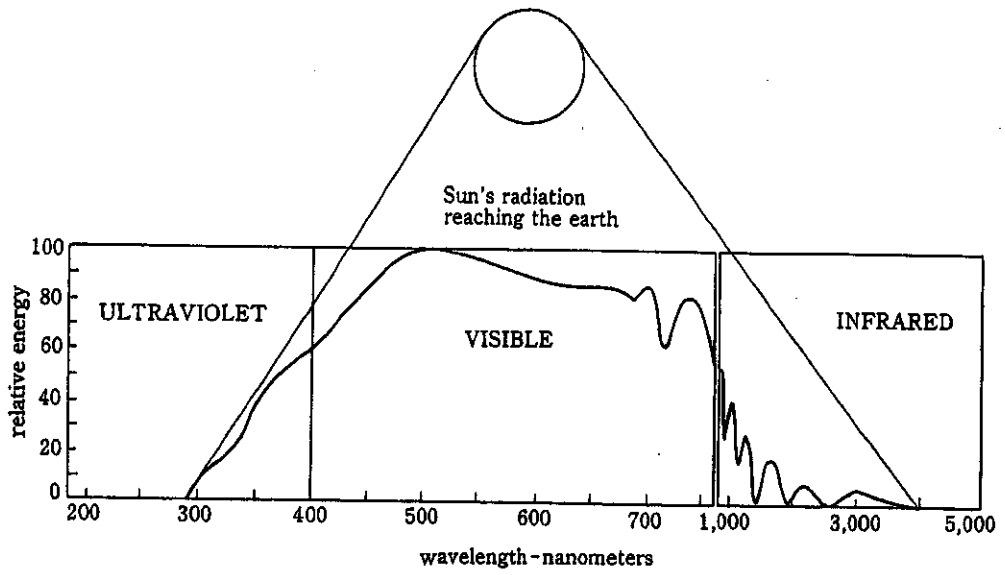


図 11.4.1 地表に到達する太陽光線スペクトル ["Photosensitivity Disease" より引用]



## 第3章 In vivo で光毒性試験法について

担当：板垣 宏

### 3-1) はじめに

in vivo で光毒性を評価する方法については、かなり古くから研究がなされてきたが、ガイドラインとして正式に認められたものは未だ存在していない。1995年にOECD毒性試験ガイドラインドラフトとして、白色ウサギまたは白色モルモットを用いる「Acute Dermal Photoirritation Screening Test」及び「Acute Dermal Photoirritation Dose-Response Test」が提案されているがまだ採用には至っていない。

本邦においては、昭和63年～平成元年度に「新化粧品等安全性評価指針」の検討班（黒川雄二班長）により「化粧品毒性試験法ガイドライン案」が作成され、動物を用いる光毒性試験の案が示されている<sup>1)</sup>。この「化粧品毒性試験法ガイドライン案」には、当時文献で報告されている光毒性試験法を記載したため、動物種や投与方法の違いを考慮し、3種の提案がなされていた。この研究班の成果は「化粧品・医薬部外品製造ガイドブック」に活用されている<sup>2)</sup>。さらに2001年に出版された「化粧品の安全性評価に関する指針2001」<sup>3)</sup>では、「化粧品・医薬部外品製造ガイドブック」に比較し、より具体的な記述として、白色ウサギまたは白色モルモットを用いる方法が記載されている。

これらの試験法のガイドライン化が進展しない理由の一つとして動物愛護運動が考えられるが、その他の理由としては、古くから各種の試験法の検討がなされてきたため、一つの試験法に集約することもしくは一つの試験法を選択することが困難なためと考えられる。このように数多くの試験法が検討されてきた背景には、光毒性を示す化合物が多岐にわたっていることがある。例えば、抗生物質やサルファ剤等では、全身適用後、光があたった皮膚に毒性が発現し、光毒性があるとされ、それを動物実験で再現する試験系として、経口投与や腹腔内投与が検討され、さらにその投与経路に適した動物種が選択されてきたものと考えられる。一方、植物から抽出された精油や香料等の外用により発現する光毒性も古くから知られており、これを再現する試験系として、経皮適用に適した動物種が検討されてきた。

ヒトにおいては、光アレルギー性を検討する光パッチテストは存在しているが、光毒性を評価する試験法はまだない。現在、EUでは光パッチテスト研究グループが、光毒性を評価するプロトコールを検討している。

以下に個々の試験法の内容を詳述する。

### 3-2) 動物を用いる試験法における要因

これまで報告されている動物試験法を概観してみると、社会で問題となっている被験物質の光毒性を動物実験で検出することを目的に開発されたものであることがわかる。即ち、問題となった被験物質を問題となった投与経路で投与し、一定時間の後に光照射を行い、

光毒性による生体反応を評価している。それらは以下の条件の異なる様々なものがある。

●動物

- ・種（ウサギ、モルモット、マウス）・性、週令・体重

●被験物質の適用方法

- ・適用経路（全身あるいは局所）、暴露時間、適用量、媒体、被験物質適用から照射までのラグタイム

●光照射方法

- ・光源の種類、照射強度、照射量、照射部位

●評価方法

- ・観察の指標（皮膚反応、重量測定、膨潤測定）、観察期間

なお、光照射に関する要因については、in vitro 試験も含め光毒性を評価する試験法全般に係わり、種々の総説にも記載されているので詳細な議論は本報告では割愛する。

### 3 3) 経皮投与による試験法

経皮投与は、化粧品や外用薬のように皮膚に塗布される製品に配合される原料の評価に重要であり、過去には種々の動物の使用が検討されてきた。Marzulli ら(1970)は、bergamot oil や bergapten (5-methoxypsoralen; 5-MOP)の光毒性について、ウサギやヘアレスマウスは、モルモット、ブタに比較し感度が良いこと及びハムスターやサルはそれらより感度が低いことを報告している<sup>4)</sup>。また Girard ら(1979)は、bergamot oil を用いてモルモットとヒトの光毒性反応を比較し、モルモットは若干反応が低いことを報告している<sup>5)</sup>。Morikawa ら(1974)は、8-MOP を用いた検討から、感受性はウサギが最も高く、以下ラット、モルモット、ヘアレスマウス、マウス、ミニブタの順であったと報告している (Table 1)<sup>6)</sup>。さらに被験物質を増やした検討によりモルモットよりウサギの方が検出感度が高いことを報告している (Table 2)<sup>6)</sup>。

しかし、ウサギには、毛周期があるため休止期のものを選択しなければならないという欠点を有しており、検出感度はウサギより低いが取扱いの容易なモルモットを用いる試験が普及したものと考えられた。

モルモットを用いる経皮投与の試験としては、1975 年に出版された「新しい毒性試験と安全性の評価」に森川(1975)が記述したものがあり<sup>7)</sup>、一部修正した試験法を含め化粧品および化粧品原料の光毒性評価に広く用いられている<sup>8~11)</sup>。この試験方法の概略を以下に記す。

- ・体重約 400 g の正常な Hartley 系白色モルモットまたは体重 2.5kg~3.0kg の白色ウサギ 10 匹を使用する。
- ・モルモットは背部を毛刈し、チオグリコール酸を含む脱毛クリームにて脱毛後、24 時間に試験に供する。
- ・動物は固定器に腹位に固定し、背部脱毛部位 2 x 2 cm<sup>2</sup> に、適切な溶媒に溶解した被験物

Table 1. Species difference in phototoxic reaction to 8-methoxypsoralen and in minimal erythema doses.

Species	Phototoxic Reaction to 8-MOP					MED (ergs./cm <sup>2</sup> )
	0.0025%	0.001	0.0005	0.00025		
Rabbit *	10/10(4.0)	8/10(2.9)	3/10(1.8)	0/10	0/10	3.5 × 10 <sup>6</sup> (±1.4 × 10 <sup>6</sup> )
**	8/10(2.6)	1/10(1.3)	0/10	0/10	0/10	3.0 × 10 <sup>6</sup> (±1.8 × 10 <sup>6</sup> )
Rat *	10/10(3.0)	9/10(1.9)	2/10(1.5)	0/10	0/10	3.3 × 10 <sup>6</sup> (±1.0 × 10 <sup>6</sup> )
Mouse *	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	
Hairless Mouse	1/6(1.2)	0/6	0/6	0/6	0/6	
Guinea Pig	10/10(2.1)	2/10(1.2)	0/10	0/10	0/10	7.2 × 10 <sup>6</sup> (±3.1 × 10 <sup>6</sup> )
Miniature Swine	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	5.9 × 10 <sup>6</sup>
Human			Not done			4.4 × 10 <sup>6</sup> (±1.3 × 10 <sup>6</sup> )

Phototoxic reaction to 8-methoxypsoralen (8-MOP) was read at 48 hr and minimal erythema dose was determined at 24 hr. The hair cycle was at the telogen\* and anagen\*\* phase.

Table 2. Phototoxic reaction to photosensitizers  
in rabbit and guinea pig.

Compound	Rabbit		Guinea Pig	
	no UVL	UVL	no UVL	UVL
Chlortetracycline	** 0/10	0/10	0/5	0/5
Demethyltetracycline	* 0/5	0/5	0/10	0/10
Phenothiazine	0/10	10/10(2.7)	8/10(1.8)	10/10(2.5)
Chlorpromazine	* 0/10	8/10(2.3)	0/10	0/10
Prochlorperazine	** 0/10	3/10(2.0)	0/10	0/10
Sulfanilamide	0/10	0/10	0/10	0/10
Tolbutamide	* 0/10	0/10	0/5	0/5
Stilben	0/6	0/6		
Griseofulvin	0/10	0/10	0/5	0/5
Quinacrine	0/4	0/4		
Coal tar derivate	1/4(1.0)	4/4(2.8)	0/5	5/5(1.8)
Acridine	0/5	5/5(2.6)	0/10	10/10(2.1)
Dibromofluorescein	0/4	0/4	0/10	0/10
Eosin Y.S.	0/6	0/6	0/10	0/10
Rose Bengal	0/6	0/6	0/10	0/10
Hexachlorophene	8/10(2.0)	9/10(2.0)	6/8(1.7)	6/8(1.3)
Bithionol	0/7	8/11(2.0)	0/10	0/10
Fenticlor	0/13	4/13(1.5)	0/10	0/10
Irgasan CF <sub>3</sub>	0/10	0/10	0/10	0/10
3,3',4',5 TCSA	2/8(2.0)	10/10(3.6)	0/10	12/12(1.5)
3,4',5 TBS	0/10	0/10	0/12	0/12

Materials were tested in 1% concentration in appropriate solvents such as acetone, ethanol\*, petrolatum\*\*, and water\*\*\*.