

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
該当なし					

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）
分担研究報告書

代替法開発のための統計解析手法の研究

分担研究者 吉村功（東京理科大学工学部経営工学科，教授）

研究要旨

次に述べる3つの課題を中心にして研究を遂行した。(1) 3次元ヒト皮膚モデルの実験データに基づくET50の区間推定法の検討(2) アガールMLA法の性能がマイクロウエルMLA法より悪いことの理由の明確化(3) 光毒性試験代替法のバリデーションにおける施設間差の評価法とカットオフ値の妥当性の検討。課題(1)に関しては、時間-反応データが少量であるという条件下では、ロジスティック曲線を当てはめる非線形最小二乗法では、信頼区間が求まらないことがあることを示し、その場合について対数直線法を用いると信頼区間の被覆確率が名義信頼水準を少し下回ることを、シミュレーション実験で確かめた。その補正法は未解決の課題である。課題(2)に関しては、欧米の実験施設からの過去の実験データから被験物質の遺伝毒性を評価した場合、有意水準を0.3%程度に小さくした方が試験家の判定と似た統計学的判定が得られるが、その場合でもアガールMLA法はマイクロウエルMLA法より性能が悪いことを確かめた。その原因として、アガール法での変異強度の分散推定法に問題があることを理論とデータで示した。課題(3)に関しては、陽性対照における測定値のばらつきをCochran検定で評価することで外れ施設を検出した。それを除外した場合の施設間差は、被験物質の主効果に比べて小さかった。カットオフ値は酵母試験について、4, 5mm, 赤血球試験で2, 3%が妥当であった。

A. 研究目的

多くの *in vitro* 試験が動物実験代替法として開発されている。そのどれがどの程度動物実験を代替できるか、ということについては、吟味すべきこと、改善すべきことが多く存在している。

その一つが、試験で得られたデータについてどのような統計学的モデルを想定すべきか、どういう指標を用いてどのような統計解析法で被験物質の毒性についての判定を行うべきか、その判定が正しく行われるためにはデータをどのように取得すべきか、という統計学的方法論を確立することである。

本分担者は従来からこれについて、研究を行ってきたが、本年度は、次に述べる3つの課題を中心にして研究を遂行した。

- (1) 3次元ヒト皮膚モデルの実験データに基づくET50の区間推定法の検討
- (2) アガールMLA法の性能がマイクロウエルMLA法より悪いことの理由の明確化
- (3) 光毒性試験代替法のバリデーション

における施設間差の評価法とカットオフ値の妥当性の検討。

B. 研究方法

B-1) ET50の区間推定法

3次元ヒト皮膚モデルで、測定時点がたかだか5時点の場合を想定した。反応は吸光度で、反応・時間関係をロジスティック関数としたシミュレーションモデルを設定した。測定値は、吸光度に正規誤差が加わると想定した。推定のための提案法としては、第1段階でロジスティック回帰法での推定を行い、それで信頼区間が求まらなかったときに第2段階で対数直線法を用いることとした。信頼区間を求める方法としては、デルタ法、フィーラー法、尤度比法を検討対象とした。従来のヒト皮膚モデルのキットメーカーが推奨している補間法が基本的に直線回帰法であるので、これを提案法の対照として、モンテカルロシミュレーションで性能評価を行った。

B-2) アガール MLA 法の性能評価

MLA にはアガール MLA 法とマイクロウェル MLA 法の二つの方法がある。前者は、変異を起こした細胞のみが生存できるプレート寒天培地で細胞を培養し、生じるコロニー数で変異強度を測定するのに対し、後者は、96 穴ウェル中で細胞を培養し、コロニーが生じないウェル数で変異強度を測定するものである。

これらの変異強度データから被験物質の遺伝毒性を評価する統計手法としては、昨年度の研究によって、大森法が良いことが分かっている。それを世界的な MLA ワーキンググループが集めたデータに適用して変異原性を評価したところ、マイクロウェル法に比べて、アガール法の方が実験家の考える判定との一致率が、約 94% に対する約 83% と低かった。この傾向はシミュレーションモデルを想定したモンテカルロ実験でも同じであった。

その原因を理論的吟味と実験データの吟味で検討した。すなわち、大森法を適用するときには、変異強度の推定値について分散を評価する必要があるが、その分散の評価式を理論的に吟味した。さらに、実験データから得られる分散の推定値が妥当であるかを統計的に吟味した。

B-3) 光毒性試験代替法の吟味

昨年度の報告にあるように、酵母光生育阻害試験（酵母試験）と赤血球溶血性試験（赤血球試験）のバッテリー（酵母・赤血球試験）は、一応の性能があることが分かっている。しかし、そのバリデーション研究の中で、施設間再現性を定量的に評価するにはどうすればよいか、酵母・赤血球試験でのカットオフ値は妥当であるか、という二つの課題が残った。

すなわち、バリデーション研究では、表 1 のように、陽性、擬陽性、陰性の 3 段階で判定されたが、これを vivo の結果と対比するときには、擬陽性をどう扱うか、考え直す必要がある。また、施設間変動を 3 値で評価するのは定性的すぎるので、定量化する方が望ましい。その際は、施設の中の外れ値的存在を除外する必要がある。

実際、ECVAM (ECVAM-Glossay を参照) では、Transferability (易技術移転性) を、「The ability of a test method or of a procedure

to be accurately and reliably performed in different, competent laboratories.」と定義して、あるレベル以上の施設で妥当な結果を出せることを条件にしている。そういう意味での外れ施設検出には、定量的評価が不可避である。

表 1. 9 物質への 6 施設での判定と vivo 判定. P:陽性, E:擬陽性, N:陰性

Chem Code	Laboratory						Vivo
	1	2	3	4	5	6	
A	P	E	E	P			P
B	P	N	P	E			P
C	P	P	P	P			N
D	P	E			E	P	P
E	P	P			P	P	N
F	E	P			N	N	N
G			P	P	P	P	P
H			N	E	E	E	N
I			N	N	N	N	N

その検出法として、本研究では陽性対照での分散を考えた。すなわち、酵母試験では、阻止帯の径が測られているので、これより分散を計算し、Cochran 検定で分散性が否定された施設を外れ施設とした。

次に、被験物質を固定効果、施設を変量効果とした混合モデルで各施設がどのように偏っているかを評価した。測定値としては、酵母試験では阻止帯の差 Z、赤血球試験では溶血度の差 L を用いた。

バリデーション研究では、カットオフ値として、表 2 の規準が用いられてきた。

表 2 バリデーション研究での判定基準

記号	判定	酵母規準 mm	赤血球規準 %
N	陰性	Z<2	L<5
E	擬陽性	2=<Z<5	5=<L<10
P	陽性	5=<Z	10<L

本研究では、擬陽性という分類をせず、陽性と陰性を分けるカットオフ値のみを決定することとした。

カットオフ値を変えることは、感度と特異度が取引関係で増減することである。そのバランスをどのようにするかでカットオフ値を変えなければならない。その際問題

になるのは、vivoの結果を真として良いかどうかである。昨年の報告書で述べたように、被験物質 C と E では、vivoの結果と酵母・赤血球試験の結果が完全に逆になっている。その原因は、代替法の方ではなく、vivoのデータにあると考えられた。そこで、本研究では、この2物質を除外して感度と特異度を考え、“1-特異度”を横軸、感度を縦軸に取ったROC曲線を描き、少なくとも特異度を60%以上にするという条件下で感度を大きくするカットオフ値を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、統計学的方法論の研究なので、倫理面で特に問題になることはなかった。

C. 研究結果

C-1) ET50 の区間推定法

シミュレーションモデルに基づいてモンテカルロ実験の結果、真値近くにデータがある場合には、直線法に比べて対数直線法を用いた方が真値からの偏りが小さかった。提案法では、真値からの偏りが0.3時間程度に収まっていた。区間推定法としては、デルタ法であれば区間推定可能な割合がほぼ100%だったが、他の方法では区間推定ができない場合がある程度生じていた。しかし、被覆確率は目標信頼水準95%に対して、最大で4%程度小さくなる傾向があった。

C-2) アガール MLA 法の性能評価

アガール法での変異強度 MF は $(c_m/c_s) \times (f_s/f_m)$ で与えられる。 c_m は変異を観測するプレートにおけるコロニー数、 c_s は生存を観測するプレートにおけるコロニー数、 f_m 、 f_s はそれに対応する播種細胞数である。

これにポアソン分布を仮定してデルタ法を適用して MF の漸近的分散を求めると、 $(\pi_m/\pi_s)^2 (1/(f_m \pi_m) + 1/(f_s \pi_s))$ となる。 π_m 、 π_s はそれぞれ 真の変異確率、生存確率である。この式において、変異に関するコロニー数にポアソン分布を仮定することには問題ないと思われるが、生存コロニー数にポアソン分布を仮定することは、必ずしも適当でないと考えられる。実際、播種細胞数は理論的には例えば 600 という定数であるが、現実には各プレートに正確に 600 の細胞を播種しているわけではない。誤差が生じている。実際、観測コロニー数が 600

を超えているデータが存在する。しかも変異確率は 1/100,000 というオーダーできわめて小さいのに対し、生存確率は 95%あるいはそれより大きいことが稀でない。このような条件での漸近分散の近似はかなり悪いと考えられる。実際、シミュレーションモデルで確認したところでも、その推定精度は、マイクロエル法に比べてかなり悪かった。これらのことが、アガール法の性能を悪くしているものとするのが合理的であろう。

C-3) 光毒性試験代替法の吟味

6施設のうち第2施設は陽性対照のばらつきが他の施設に比べて有意に大きかった。従って、この施設は最低必要な技術レベルに達していなかったと考えられた。第2施設を除いた5施設について、9被験物質の主効果を混合モデルで推定した結果、おおむね合理的で安定した結果が得られた。施設間差は被験物質の主効果に比べて小さかった。

カットオフ値については、被験物質 C, E を含めて評価している限り、どのようにカットオフ値を定めても、特異度を60%以上にすることができなかった。

そこで C, E を除いて特異度60%以上を確保しようとしたところ、

酵母試験で、4mm または 5mm

赤血球試験で、2% または 3%

という値が最適という結果であった。ROC曲線を吟味したところ、このときの特異度は約92%、感度は約94%であった。

D. 考察

D-1) ET50 の区間推定法

測定時点数を4, 5時点しか取れないという制約条件の下では、ロジスティック回帰直線を当てはめた上でデルタ法で信頼区間を計算し、計算ができないデータに対しては、対数直線を当てはめてデルタ法を適用するという提案法が従来の方法より、偏り少なく推定値と信頼区間が得られることが数値実験を通じて確かめられた。しかし、被覆確率は目標値より小さい傾向があった。これの修正は今後の研究課題である。

D-2) アガール MLA 法の性能評価

ワーキンググループのデータベースから

見ると、欧米では、両方法が混在して使われているが、ややマイクロウェル MLA 法の方が多くである。日本では、アガール MLA 法が全く使われていない。ICH でもマイクロウェル MLA 法を勧めている。日本の実験家にその理由を聞いたところ、実験結果の安定性がマイクロウェル MLA 法の方がよいためである、という意見が多かった。実験手技上の理由であろう。これに対して本研究は、統計的データ解析の側面から同じ結論を導いたものと言える。実験手技とデータ解析の両面でマイクロウェル MLA 法の優越性が導かれたことは、有用な知見であろう。

D-3) 光毒性試験代替法の吟味

バリデーション研究で得られたデータの一部を、任意に除外して結論を導くことは、一般に認められない。しかし、合理的な理由があれば、それが許されることがある。

本研究ではその根拠として、あるレベル以上の能力のある施設の検出法として、陽性対照でのばらつきを Cochran 検定で評価する、という方法論を採用した。これに基づいて検出した外れ施設は、個別の吟味においても温度コントロールの不十分さが考えられ、除外は不合理でないと考えられた。

さらに、すべての施設での結果と反する vivo での結果が存在する被験物質 C, E についても、動物実験とヒトでの結果が整合していないこと、光毒性ではなく光感作性が vivo の結果をもたらした可能性がある、等の理由が考えられたので、これを除外した場合と除外しなかった場合の両方で結果を評価した。

E. 結論

E-1) ET50 の区間推定法

3次元ヒト皮膚モデルのように、観測値が少数時点でのみ得られるような条件下のデータから ET50 の区間推定を行う場合は、上記の提案法を用いるのが現時点では、合理的と考えられる。

E-2) アガール MLA 法の性能評価

アガール MLA 法では、変異強度の分散の合理的な推定が困難であるため、被験物質の遺伝毒性評価の性能がマイクロウェル MLA 法に比べて劣る。アガール MLA 法では

なく、マイクロウェル MLA 法を標準試験法とすべきである。

E-3) 光毒性試験代替法の吟味

酵母・赤血球試験で、擬陽性という分類を採用しないで、被験物質の陽性・陰性を評価するときには、カットオフ値として、

酵母試験では、4mm または 5mm

赤血球試験では、2% または 3% を採用するのが合理的と思われる。このとき特異度は約 92%、感度は約 94%である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1) 吉村功. 統計家からの疑問: In vitro 試験のデータから定量的結論を導くのは邪道か?. 環境変異原研究, 27, 2, 57--60, 2005.

2) Chiba Y, Matsuyama Y, Sato T, Yoshimura I. A simulation study for a linear measurement error model when error variances vary between measurements. J. Agricultural, Biological, and Environmental Statistics, 10, 1, 118--130, 2005

G-2. 学会発表

1) 青木保典, 浜田知久馬, 吉村功. 薬物-受容体モデルパラメータの統計的推定. 日本薬理学会年会, 2006年3月10日, 横浜.

2) 吉村功. アガール法マウスリンフォーマ試験における統計解析法の検討. 日本動物実験代替法学会第19回大会, 2005年12月1日, 伊勢原.

3) 白石亜矢子, 兵頭洋平, 寒水孝司, 浜田知久馬, 吉村功. 少量データから ET50 を推定するための統計学的方法. 日本動物実験代替法学会第19回大会, 2005年12月1日, 伊勢原.

4) 寒水孝司, 高沼正幸, 白石亜矢子, 浜田知久馬, 吉村功. 三次元ヒト皮膚モデルを用いた ET50 の推定における測定時点・時点数の選択に関する統計学的考察. 日本動物実験代替法学会第19回大会, 2005年12月1日, 伊勢原.

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
吉村功	統計家からの疑問: In Vitro 試験のデータから定量的結論を導くのは邪道か?	環境変異原研究	27	57-60	2005
Chiba Y, Matsuyama Y, Sato T, Yoshimura I	A simulation study for a linear measurement error model when error variances vary between measurements.	J. Agricultural, Biological, and Environmental Statistics	10, 1	118-130	2005

- 5) 松永信人, 菅野純, 浜田知久馬, 吉村功. 動物実験で相乗作用を評価する際の実験計画に関する検討. 2005年度統計関連学会連合大会, 2005年9月14日, 広島.
- 6) 佐藤泰憲, 菅波秀規, 浜田知久馬, 吉村功, 坂本裕美, 吉田輝彦, 吉村公雄. A new method for calculating the confidence interval of allelic ORs. 2005年度統計関連学会連合大会, 2005年9月13日, 広島.
- 7) Yoshimura I, Omori T, Ohno Y, Hoya M, Mori M, Doi T, Fujita Y, Itagaki H, Kawabata R, Kojima H, Hasegawa S, Okamoto Y, Tanaka N, Tanigawa K, Wakuri S. Validation study on the battery evaluation system for prediction of phototoxicity in Japan: The overview of the results. 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, 2005年8月22日, Berlin.
- 8) Shiraishi A, Hyodo Y, Sozu T, Hamada C, Yoshimura I. A Statistical method for estimating ET50 under the condition of small volume of data. 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, 2005年8月22日, Berlin.
- 8) Sozu T, Takanuma M, shiraishi A, Hamada C, Yoshimura I. Statistical considerations for positioning time points in ET50 estimation using three dimensional human skin model. 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, 2005年8月22日, Berlin.
- 9) 吉村功, 佐藤真理. マウスリンフォーム試験のためのデータ解析法の検討. 日本計量生物学会, 2005年5月21日, 日吉.

G-3. 参考文献

1. Omori T, et al. Validation study on five cytotoxicity assays by JSAAE-II, Statistical analysis. Alternatives to Animal Testing and Experimentation, 5, 39--58, 1998.
- 2) Moore MM, et al. Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing—Aberdeen, Scotland, 2003. Environmental and Molecular Mutagenesis (to appear.)
- 3) 日本動物実験代替法学会バリデーション委員会. 酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験を組み合わせた光毒性試験バッテリーシステムバリデーション研究. 2004年8月27日. (平成16年度厚生労働科学研究H16-医薬-005 報告書に採録.)
- 4) ECVAM. Glossary.

H. 知的所有権の取得状況
無

I. 謝辞

本研究の遂行にあたっては、京都大学大学院医学系研究科の大森崇助教授、東京理科大学理学部の宮岡悦良教授、瀬尾隆助教授、東京理科大学工学部経営工学科の浜田知久馬助教授、寒水孝司助手（現大阪大学助教授）、東京理科大学大学院工学研究科経営工学専攻学生の白石亜矢子氏（現ヤンセンファーマ株式会社）、高沼正幸氏、兵頭洋平氏、東京理科大学工学部学生の石川公平氏、馬場晋司氏の協力を得た。ここに記して感謝の意を表する。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
戸倉新樹	光科学療法	「光科学研究の最前線」編集委員会編	光科学研究の最前線	強光子場科学研究懇談会出版	東京	2005	366-367
戸倉新樹	後天性光線過敏症の病態	斎田俊明, 飯塚一編	皮膚疾患の最新医療	先端医療技術研究所	東京	2006	221-224
戸倉新樹	新・皮膚悪性リンパ腫アトラス	瀧川雅浩他編.	光化学療法	文光堂	東京	2006	185-187
戸倉新樹	内服テストと内服照射テスト・皮膚科診療プラクティス. 19.		薬疹を極める	文光堂	東京	2006	125-127

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
大野泰雄	動物実験代替法研究の重要性とその課題—薬理学会における動物実験の問題点—	日薬理誌	125	325-329	2005
大野泰雄、酒見和枝、簾内桃子	ヒト組織の研究利用体制の構築と研究応用、4. 手術摘出肝組織からの肝細胞調製とヒト肝細胞を用いた試験系のバリデーション.	臨床薬理	36	127-128	2005
Hirota, M., Kitagaki, M., Itagaki, H., and Aiba, S	Quantitative measurement of spliced XBP1 mRNA as an indicator of endoplasmic reticulum stress	J. Toxicol. Sci	accepted		2006
Ashikaga, T., Yoshida, Y., Hirota, M., Yoneyama, K., Itagaki, H., Sakaguchi, H., Miyazawa, M., Ito, Y., Suzuki, H., and Toyoda, H	Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol	Toxicol In Vitro	accepted		2006

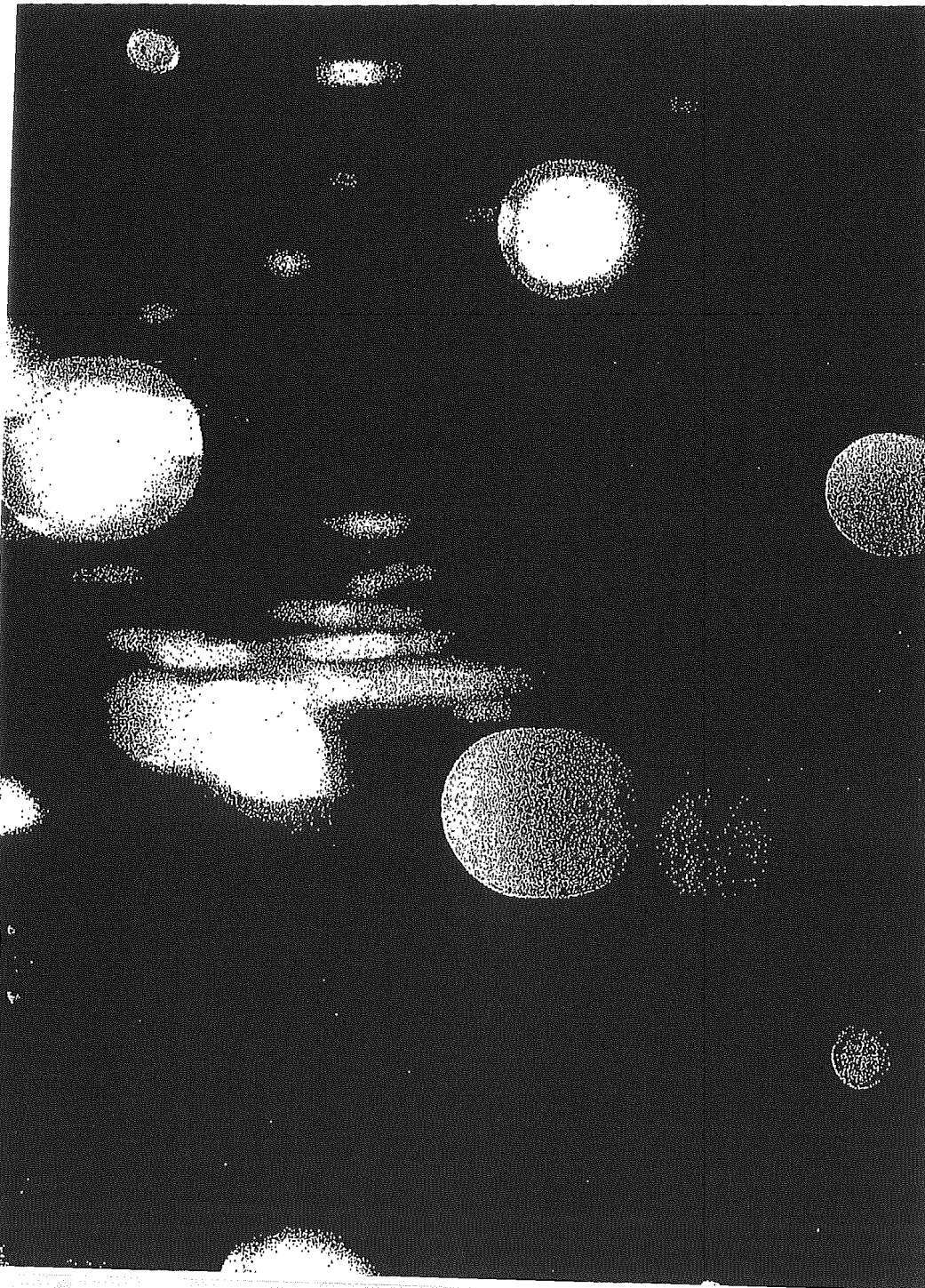
Sakaguchi, H., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Yoshida, Y., Ito, Y., Yoneyama, K., Hirota, M., Itagaki, H., Toyoda, H., and Suzuki, H	Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT) II. An inter-laboratory study of the h-CLAT	Toxicol In Vitro	accepted		2006
<u>Tokura Y</u>	Photocontact dermatitis: from basic photobiology to clinical relevance	J Environ Dermatol	12	71-77	2005
Misawa J, Moriwaiki SI, Kohno E, Hirano T, <u>Tokura Y</u> , Takigawa M	The role of low-density lipoprotein receptors in sensitivity to killing by Photofrin-mediated photodynamic therapy in cultured human tumor cell lines.	J Dermatol Sci	40	59-61	2005
Sayama K, Kobayashi Y, Fujita H, Ito A, <u>Tokura Y</u> , Sasaki M	Determination of action spectrum for sparfloxacin-photosensitized single-strand breaks in plasmid pBR322 DNA.	Photodermatol Photoimmunol Photomed	21	287-292	2005
Imai S, Atarashi K, Ikesue K, Akiyama K, <u>Tokura Y</u>	Establishment of murine model of allergic photocontact dermatitis to ketoprofen and characterization of pathogenic T cells.	J Dermatol Sci	41	127-36	2006
Orimo H, <u>Tokura Y</u> , Hino R, Kasai H.	Formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the DNA of cultured human keratinocytes by clinically used doses of narrowband and broadband ultraviolet B and psoralen plus ultraviolet A.	Cancer Sci	97	99-105	2006
戸倉新樹	光線過敏症における光アレルギーの位置	皮膚アレルギーフロンティア	3	7-10	2005
戸倉新樹	光アレルギーの臨床をどうするか	皮膚アレルギーフロンティア	3	32-40	2005
戸倉新樹	薬剤性光線過敏症	MB Derma	96	13-19	2005
戸倉新樹	後天性の光線過敏症はなぜ起こる？	マルホ皮膚科セミナー	174	28-32	2005
戸倉新樹	内服薬で起きる皮膚炎：薬剤性光線過敏症	毎日ライフ	6	52-55	2005
西尾大介, 戸倉新樹	薬剤性光線過敏症	アレルギーの臨床	25	774-778	2005

<p>Kiyomi Ohmori, Makoto Umeda, <u>Noriho Tanaka</u>, Hiroki Takagi, Isao Yoshimura, Kiyoshi Sasaki, Shin Asada, Ayako Sakai, Harumi Araki, Masumi Asakura, Hiroshi Baba, Youichi Fushiwaki, Shuichi Hamada, Nobuyui Kitou, Tetsuo Nakamura, Yoshiyuki Nakamura, Hidetoshi Oishi, Satoshi Sasaki, Sawako Ahimada, Toshiyuki Tsuchiya, Yoshifumi Uno, Masataka Washizuka, Satoshi Yajima, Yasuhito Yamamoto, Eiji Yamaura and Tomoko Yatsushiro: An inter-laboratory collaborative study by the Non-Genotoxic Carcinogen Study Group in Japan, on ATLA 33, 619-639 (2005)</p> <p>Ryo Kurihara, Fujio Shiraiishi, <u>Noriho Tanaka</u>, Shinya Hashimoto</p>	<p>An inter-laboratory collaborative study by the Non-Genotoxic Carcinogen Study Group in Japan, on a cell transformation assay for tumour promoters using Bhas 42 cells</p>	<p>ATLA</p>	<p>33</p>	<p>619-639</p>	<p>2005</p>
<p>吉村功</p>	<p>統計家からの疑問: In Vitro 試験のデータから定量的結論を導くのは邪道か?</p>	<p>環境変異原研究</p>	<p>27</p>	<p>57-60</p>	<p>2005</p>
<p>Chiba Y, Matsuyama Y, Sato T, Yoshimura I</p>	<p>A simulation study for a linear measurement error model when error variances vary between measurements.</p>	<p>J. Agricultural, Biological, and Environmental Statistics</p>	<p>10, 1</p>	<p>118-130</p>	<p>2005</p>

杉田和成, 戸倉新樹	慢性光線性皮膚炎と免疫抑制状態	アレルギーの臨床	25	784-788	2005
戸倉新樹	抗生剤・抗菌薬による光線過敏症	Topics in Atopy	4	44	2005
Kurita M, Shimachi T, Kobayashi M, Kabashima K, Tokura Y	Induction of keratinocyte apoptosis by photosensitizing chemicals plus UVA.				投稿中
Ryo Kurihara, Fujio Shiraishi, Norihiko Tanaka, Shina Hashimoto	Presence and estrogenicity of anthracene derivatives in coastal Japanese waters	Environmental Toxicology and Chemistry	24	1984-1993	2005
Agneta Posengre, Linda Faxius, Noriho Tanaka, Mika Watanabe, Lars Magnus Bjursten	Comparison of implantation and cytotoxicity testing for initial toxic biomaterials	Journal of Biomedical Materials Research	75A Issue 1	115-122	2005
Shin Asada, Kiyoshi Sasaki, Noriho Tanaka, Ken Takada, Makoto Hayashi and Makoto Umeda	Detection of initiating as well as promoting activity of chemicals by a novel cell transformation assay using v-Ha-ras-transfected BALB/c 3T3 Cells (Bhas 42 Cells)	Mutation Res	588	7-12	2005

Frontiers in Optical Science

光科学研究の 最前線



VI 2-8

光化学療法

産業医科大学皮膚科学 戸倉新樹

1. 本研究分野の概要

光化学療法は、光感受性のある化学物質を投与した後、患部に光線を照射する治療である。

感受性物質にソラレン（とくに8-メトキシソラレン）を使う場合はPUVA療法と呼ばれ、同物質を内服または外用した後、UVAを照射する。適応疾患には、乾癬、掌蹠膿疱症、皮膚T細胞性リンパ腫などがある。これを体外循環として行うこともあり、体外循環光化学療法またはフォトフェレーシスと呼ばれている。適応疾患は、皮膚T細胞性リンパ腫をはじめとして移植片対宿主反応、各種自己免疫疾患などがある。

光線力学的療法(PDT)と呼ばれる治療には、光感受性物質にポルフィリン体が使われる。主に悪性腫瘍の治療に使われている。静注したポルフィリンが腫瘍内に選択的に取り込まれることを利用し、腫瘍にレーザーを照射して腫瘍細胞を傷害する。消化器、泌尿器、呼吸器、子宮、皮膚、眼などさまざまな癌に対して使われている。皮膚癌ではδアミノレブリン酸を直接皮膚に塗布し、同部に光照射を行うことによって、局所PDTが可能である。すでに前癌病変である日光角化症や表皮内癌であるBowen病に適応されている。

2. 本研究分野の現状と最近の進歩

ソラレンを用いたPUVA療法は、すでに世界的に広く行われ、一般皮膚科医も日常診療で使うまでになっている。体外循環PUVA療法は、米国、欧州では国が認可する治療となっており、血液悪性腫瘍や自己免疫疾患に適用されている。しかし我が国では認可されていない。

PDTはここ十数年間に飛躍的に行われるようになった。当初、一部の特殊な施設のみで行われていたが、現在その施設数がかなり伸びている。ポルフィリン体の種類も増えつつあり、それぞれ目的に応じて使われている。ポルフィリン体を静脈投与した時の大きな問題として、全身皮膚の光線過敏状態が2~3週間続くことがあげられる。このために各施設は、遮光の徹底した病室を作らなければならない。もうひとつの問題は照射装置であり、高価なレーザーを容易に購入することができない点である。これらの問題をクリアした施設のみが治療を行っているのが現状である。

3. 本研究分野の将来性・応用

光化学療法は、新規の光感受性物質を使用することにより、新たなあるいはより明確な臨床効果を上げうる可能性を秘めている。現在、腫瘍細胞の破壊、栄養血管の破壊、腫瘍免疫の誘導が奏効機序の主要なものとなされている。これら3つのそれぞれによ

り特化した物質が見いだされれば、今後の研究開発に大きな展開をもたらさう。また照射装置について、現在のところ高価なレーザーか安価な波長域の広い光源が使われている。両者とも一長一短であり、経済面も含めた今後の装置開発が望まれる。光感受性物質としては、ソラレン、ポルフィリン体のほか、アクリジンオレンジなども試行されている。

皮膚局所に光感受性物質を塗布し光照射を行う局所 PDT は、現在のみならず将来的にも広く使われるようになる。皮膚腫瘍の治療のみならず、炎症性皮膚疾患にも使われるようになっており、乾癬、ニキビ、イボなど広く応用されつつある。より一般的な普及には、安価なポルフィリン体、安価な光源の開発が必須である。

参考文献

- 室谷哲弥, 他: 日本臨床, 増刊 10, 62, 158-168 (2004).
中西京子, 他: 日本レーザー医学会誌, 24, 293-297 (2003).
奥仲哲弥, 加藤治文: 癌の臨床, 49, 1255-1261 (2003).
森脇真一, 他: 臨床皮膚科, 56, 112-117 (2002).
Tokura, Y.: J. Dermatol. Sci., 19, 114-122 (1999).

先端医療シリーズ 38 皮膚科

皮膚疾患の最新医療

編集主幹

信州大学医学部皮膚科学教授

齋田 俊明

旭川医科大学医学部皮膚科学教授

飯塚 一

編集委員

北海道大学大学院医学研究科皮膚科学教授

清水 宏

金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学教授

竹原 和彦

九州大学大学院医学研究院皮膚科学教授

古江 増隆

順天堂大学医学部皮膚科学教授

池田 志孝

群馬大学大学院医学系研究科皮膚病態学教授

石川 治

大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学助教授

玉井 克人

 先端医療技術研究所

6. 眼皮膚白皮症の最新情報	鈴木民夫	195
6.1 はじめに		195
6.2 OCA を呈する疾患		195
6.3 日本人における OCA の特徴		197
6.4 おわりに		198

第10章 その他の非腫瘍性皮膚疾患

1. 乾癬の病態・病因論	照井 正	199
1.1 はじめに		199
1.2 乾癬の臨床		199
1.3 乾癬の病因		199
1.4 乾癬の治療とその作用機序		200
1.5 乾癬の病態		200
1.6 おわりに		202
2. Behçet 病研究の最新情報	金子史男	203
2.1 はじめに		203
2.2 BD の皮膚粘膜症状		203
2.3 皮膚症状		204
2.4 診断		205
2.5 BD の治療		206
2.6 おわりに		207
3. 重症薬疹の病型・診断・治療	池澤善郎	208
3.1 はじめに		208
3.2 重症薬疹の病型		208
3.3 重症型薬疹の病態		209
3.4 重症薬疹におけるステロイド大量療法の有用性と問題点		211
3.5 重症型薬疹の治療指針 (試案)		212
4. 男性型脱毛の病態と治療	板見 智、乾 重樹	213
4.1 はじめに		213
4.2 男性型脱毛の病態		213
4.3 多様な毛の男性ホルモン感受性		213
4.4 標的細胞における男性ホルモン作用機序		213
4.5 毛包における男性ホルモン標的細胞		214
4.6 毛成長の <i>in vitro</i> モデル		214
4.7 男性型脱毛の治療		215
4.8 おわりに		215

第11章 光線と皮膚

1. 光老化のメカニズム、治療、予防	川田 暁	217
1.1 光老化とは		217
1.2 光老化皮膚の臨床症状と病理組織学的特徴		217
1.3 光老化のメカニズム		217
1.4 光老化の治療		218
1.5 光老化の予防		219
1.6 近畿大学医学部皮膚科における取り組み		219
1.7 おわりに		219
2. 後天性光線過敏症の病態	戸倉新樹	221
2.1 はじめに		221
2.2 外因性光感受性物質による光線過敏症		221
2.3 光接触皮膚炎、薬剤性光線過敏症の病態		221
2.4 慢性光線性皮膚炎 (CAD) の機序		223
3. 光発癌機構	久保宜明	225
3.1 はじめに		225
3.2 UV による皮膚発癌作用		225
3.3 皮膚癌の発症機構		226

2. 後天性光線過敏症の病態

2.1 はじめに

光線過敏症は、太陽光線に当たった皮膚が赤くなるなどの異常な反応を起こす疾患の総称である。光線過敏症の原因は多種多様であり、1) 内因性の光感受性物質生成によるもの（ポルフィリン症、ペラグラ、Hartnup 病）、2) 外因性光感受性物質投与によるもの（光接触皮膚炎、薬剤性光線過敏症）、3) DNA 修復機序の異常によるもの（色素性乾皮症）、4) EB ウイルスの関与により起こるもの（種痘様水疱症）、5) その他原因不明のもの（日光蕁麻疹、多形日光疹、慢性光線性皮膚炎〔chronic actinic dermatitis ; CAD〕）などに分けられる。

これらのうちで後天性のものは、ペラグラ、光接触皮膚炎、薬剤性光線過敏症、種痘様水疱症、日光蕁麻疹、多形日光疹、慢性光線性皮膚炎である。ペラグラは先天性の Hartnup 病と同じようにニコチン酸欠乏による代謝性疾患である。種痘様水疱症は、発症以前に慢性の EB ウイルス感染が存在することを土台とする疾患と考えられている。多形日光疹は我が国では小丘疹性日光疹という軽い光線過敏性疾患である。したがってここで論じようとする“後天性の光線過敏”を起こす疾患は、外因性光感受性物質による疾患（光接触皮膚炎、薬剤性光線過敏症）、慢性光線性皮膚炎が中心となる。ここでは外因性光感受性物質による疾患のメカニズムを述べ、加えて慢性光線性皮膚炎のメカニズムを推論したい。

2.2 外因性光感受性物質による光線過敏症

光線過敏を獲得する際に、明瞭な光線過敏性物質が存在する場合と、そうでない場合とがある。明瞭な物質が存在する場合には、光毒性機序によって生じるものと、光アレルギー性機序によって生じるものがある。臨床的には光アレルギー性による頻度の方が高いと考えられる。

通常のアレルギーには、蕁麻疹、接触皮膚炎を代表とするように抗原物質が明瞭なものと、アトピー性皮膚炎、蕁麻疹などのように必ずしもアレルゲンを決定し得ないものがある。この事情はまさに光アレルギーについても同様であり、薬剤性光線過敏症、光接触皮膚炎は抗原となる光感受性物質が明らかであり、その他の疾患は明確でない^{1,2)}。

光アレルギーの1つの特殊性として、光がアレルギー一症状発現に必須であるため、光が当たる臓器すなわち皮膚だけが病変形成の場となることがある。すなわち、光アレルギーの症状は皮膚炎のみである。別の見方をすれば光アレルギーはアレルギー獲得のメカニズムを比較的純粋に調べることのできるシステムということもできる。以後、外因性物質による光アレルギー、すなわち光接触皮膚炎、薬剤性光線過敏症のメカニズムをまず述べ、次いで慢性光線性皮膚炎の想定される病態を述べたい。

2.3 光接触皮膚炎、薬剤性光線過敏症の病態

光接触皮膚炎は抗原が皮膚に塗られて、紫外線が当たって発症する。薬剤性光線過敏症は抗原が薬剤という形で経口投与されて、紫外線が当たって発症する。

2.3.1 光接触皮膚炎

接触皮膚炎はある物質が皮膚に接触し、それによって生じる皮膚炎であり、俗にいう“かぶれ”である。皮膚炎が惹起されるのに、光を必要とするタイプのかぶれがあり、これを光接触皮膚炎と呼称している。すなわち、この“光かぶれ”ではある物質が接触した皮膚に太陽などの光が照射され、皮膚炎が生じる。

通常の接触皮膚炎に、一次刺激性（毒性機序）とアレルギー性（免疫学的機序）のものがあるように、光接触皮膚炎にも2つの型があり、それぞれ光毒性接触皮膚炎、光アレルギー性接触皮膚炎と呼んでいる。光毒性とは物質に紫外線が当たり、それによって活性酸素が発生し組織・細胞傷害をもたらすものである。細胞の構成成分別には、DNA への損傷あるいは結合、脂質過酸化反応、蛋白への結合あるいは変性を起こす。したがって炎症は起こるであろうが、特異的免疫反応が起こったわけではなく、感作も必要としない。一方、光アレルギー性接触皮膚炎は光抗原特異的な免疫反応機序によって起こったものであり、感作を必要とし、T 細胞が媒介するものである。光アレルギー機序で起こる方が光毒性より頻度が高いと考えられる。

光接触皮膚炎の原因物質は多様である。歴史的には殺菌剤として使われたサリチルアニリド、特にハロゲン化サリチルアニリドが原因物質となり、TCSA が代表的なものであった。サリチルアニリドはソープ剤、シャンプーに含まれて過去広く使用された。香料であ

るムスクアンブレットによる患者も、一時期、主要な原因となった。日光から保護する目的で使用されるサンスクリーン剤は、皮肉なことに光接触皮膚炎の原因になり、現在でも時としてこうした患者をみかける。歴史的にはベンゾフェノンが有名であった。現在、このサンスクリーン剤以上に問題となっているのが、治療用の非ステロイド外用剤であり、特に湿布薬として使われるケトプロフェンや塗布薬としてのスプロフェンによるものが多い。

それぞれの光感受性物質が光毒性、光アレルギー性物質に排他的に分けられるものではない。TCSAは光アレルギー能が高いが、光毒性も強い。しかしそれぞれの物質において両性質の強さに偏重はあり、例えば光化学療法であるPUVA療法に使われるソラレンは、光毒性は強いが光アレルギー性反応は起こしにくい。光アレルギー性物質がアレルゲンすなわち抗原性を發揮するためには紫外線照射による構造の変化と蛋白との結合が必要であり、この変化に伴い多かれ少なかれ光毒性反応が起こる。したがって一般に光アレルギー性物質は光毒性も有している。しかし逆に光毒性物質が光アレルギーを惹起するとは限らない。

2.3.2 薬剤性光線過敏症

内服薬剤と紫外線照射によって起こる光線過敏症である。この薬剤性光線過敏症は一方では、薬疹という分類の観点からもとらえることができる。すなわち皮膚疹が起こるために光照射を必要とするタイプの薬疹があり、これを光線過敏型薬疹と呼ぶ。したがって、薬剤性光線過敏症は光線過敏症からみた分類、光線過敏型薬疹は薬疹からみた分類であり、両者は同義語である。通常、薬剤内服中に戸外で日光に曝露されたというエピソードがあって発症する。年齢分布では60～

70代の高齢者に多い。

光毒性反応は日焼け（サンバーン）様発疹をとり、光アレルギー性の場合には、浮腫性紅斑、水疱、扁平苔癬様皮膚疹、白斑黒皮症などさまざまである。時には光毒性反応を思わせる浮腫性紅斑で始まり、経過とともに扁平苔癬様皮膚疹に変化する症例もある。このことは同一患者内、同一エピソード内でも光毒性反応と光アレルギー性反応が連続的に起こり得ることを推察させる。扁平苔癬様皮膚疹の性状は、紅斑ではあるが色が紫がかっていることにある。急性反応的でないため、しばしば光線過敏症を思い浮かべることが難しい。色素沈着と色素脱失が混在する病変は、白斑黒皮症と称される。原因である薬剤内服を中止することが遅れ、長期に光線過敏性皮膚炎を患った患者に多い。すでに完成してしまっている状態では難治である。

原因薬剤のランキングは数年単位で大きく変化することがある。例えば1980年代後半はアフロクアロンによる光線過敏症が多くみられたが、使用の低下に伴い頻度は減少した。古典的ではあるがピロキシカム、降圧利尿薬も頻度的に重要であり、5-FU、クロールプロマジン、トルブタミドなども併せ、現在でも原因となり得る光線過敏性薬剤である。グリセオフルビンは最近使用されなくなり、ほとんど同薬による光線過敏症をみない。チリソロール、メチ克蘭は最近10年以内に話題になった。最近ではニューキノロン系抗菌剤によるものが多くみられている。

2.3.3 光抗原形成機序

通常の抗原とは異なり、光アレルギー性物質が抗原となるには紫外線照射が必要となる。この紫外線の作用による抗原性の獲得については古くよりいくつかの考えが提唱されてきたが、大きく2つの説に集約される^{1,2)}。1つはプロハプテンであり、もう1つは光ハプテンという概念である（図11.2.1）。プロハプテン説は、光アレルギー性物質は紫外線照射により化学構造の変化が起き、通常のアレルゲンのように、蛋白

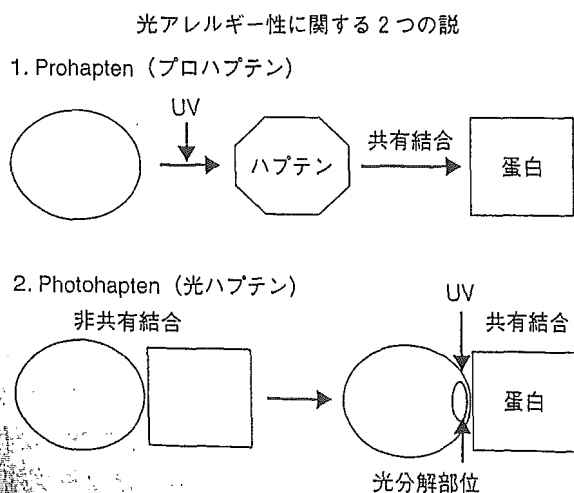


図 11.2.1 光抗原の生成機序

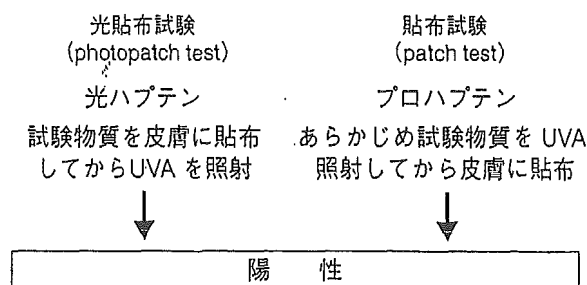


図 11.2.2 貼布試験、光貼布試験でのプロハプテンと光ハプテンの違い

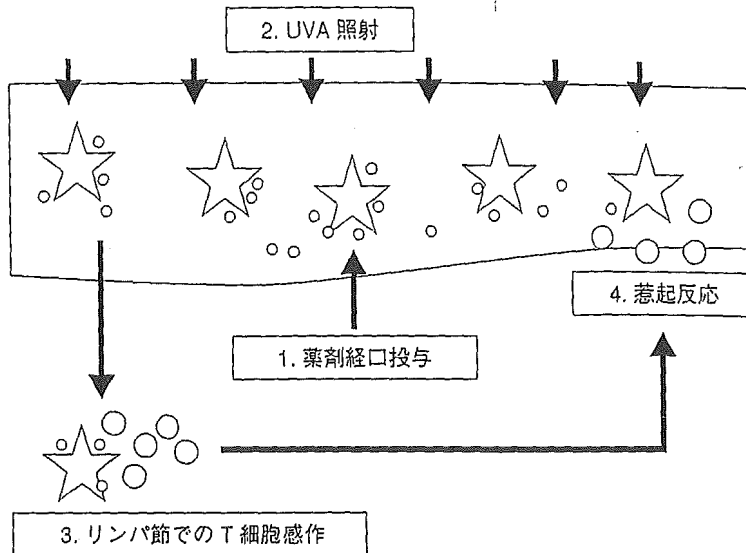


図 11.2.3 キノロン光線過敏症での光抗原提示機構

との結合能力を獲得する、という単純明快な説である。一方、光ハプテン説は、紫外線照射がなされるとその化学構造の一部が光分解され、その分解と同時に近傍の蛋白と共有結合し完全抗原ができあがるという考えである。したがってあらかじめ UVA を照射した物質が蛋白と結合すればプロハプテン、一方、その物質と蛋白との共存下で UVA を照射し両者が共有結合すれば光ハプテンということになる。

多くの光抗原は光ハプテンとしての性格を持っている。したがって、当該物質が光線過敏症の原因になっているかを検証する時は、まず物質を皮膚に塗って置いて、そこに紫外線を当てる方法、すなわち光貼布試験を行う。またあらかじめ当該物質に紫外線を当てておいたものを通常の貼布試験に用いる方法がある。これはプロハプテンの証明方法であるが、この方法は通常とらない (図 11.2.2)。

2.3.4 光接触皮膚炎、薬剤性光線過敏症の免疫学的機序

ランゲルハンス細胞はプロフェッショナルな抗原提示細胞であり、通常の接触皮膚炎と同様に、光接触皮膚炎においても抗原提示細胞として働き、薬剤性光線過敏症においても光抗原を提示する細胞として機能している^{4,5)} (図 11.2.3)。ランゲルハンス細胞による光抗原の提示において、光ハプテンがランゲルハンス細胞上の主要組織適合抗原複合体 (MHC) クラス II 分子あるいはクラス II 分子によって表出された自己ペプチドに直接光結合するのか、あるいは紫外線照射によってできた光ハプテンと蛋白の複合体がランゲルハンス細胞にいったん取り込まれ、クラス II 分子とともに

再表出されるのかは不明である。しかし我々は、直接、MHC クラス II 分子と自己ペプチドとの複合体に光共有結合とする実験結果を得ている⁶⁾。こうして光アレルギー性物質は T 細胞を感作することになる。

2.4 慢性光線性皮膚炎 (CAD) の機序

CAD は、外因性光抗原を原因としない自己免疫性光線過敏症と呼ぶべき疾患である。この中にはある物質に光貼布試験陽性を示す患者がおり、光線過敏症は以前その物質に対する光接触皮膚炎であったものが、光アレルギーなしに紫外線に感受性を持つようになってしまった状態と解される。同様に、ある薬剤による光線過敏症を示していた患者が、薬剤を中止しても光線過敏症が治癒することなく存続することもある。つまり引き金は光接触皮膚炎や薬剤性光線過敏症であったものが、光抗原が除去されても存続してしまうことがある。

こうした光抗原なくして光線過敏が起こるようになる機序は未だ明瞭ではない。古典的には光感受性物質が微量に皮膚に残っている可能性がいわれてきた。しかしむしろ現在では紫外線が表皮細胞の表面に何らかの物質を誘導し、それを自己反応性 T 細胞が認識して皮膚炎を起こす可能性が考えられている。あるいは紫外線照射が自己蛋白の修飾を行い、それがアジュバント効果を発揮することも考えられる。しかし、そもその過敏症を引き起こした光抗原反応性 T 細胞と自己反応性 T 細胞にはどんな関係があるのかは未だ不明である。

もう 1 つ重要な臨床的観察がある。それは CAD が、

HIV陽性患者に多く報告されていることである。CADの病変組織にはCD8陽性T細胞が浸潤し、苔癬型組織反応を形成していることがしばしばある。一般にCD4陽性細胞の中には、Th2やregulatory T細胞といったCD8陽性細胞傷害性T細胞の機能を抑制する細胞が備わっている。HIV陽性者ではCD4陽性T細胞の数が減少するが、これが結果的にCD8陽性細胞傷害性T細胞を活性化させてしまい、CADを誘導してしまうのかもしれない。成人T細胞性白血病に伴ったCADもある⁷⁾。この場合でもCD4陽性T細胞の機能障害を下地として、CD8陽性細胞傷害性T細胞を活性化させてしまい、CADを生じたと考えられる。

以上のように、CADの発症には、自己反応性T細胞の抑制の解除が重要な因子となっているのであろう。

文献

- 1) 戸倉新樹：光線過敏型薬疹、最新皮膚科学体系 第5巻。中山書店、東京、75-82, 2004
- 2) 戸倉新樹：光アレルギーの基礎と臨床。日皮会誌 111: 1-12, 2001
- 3) Tokura Y, et al: Photohaptenic properties of fluoroquinolones. *Photochem Photobiol* 64: 838-844, 1996
- 4) Ohshima A, et al: Formation of antigenic quinolone photoadducts on Langerhans cells initiates photoallergy to systemically administered quinolone in mice. *J Invest Dermatol* 114: 569-575, 2000
- 5) Tokura Y, et al: Cross-reactivity in murine fluoroquinolone photoallergy: exclusive usage of TCR V β 13 by immune T cells that recognize fluoroquinolone-photomodified cells. *J Immunol* 160: 3719-3728, 1998
- 6) Tokura Y, et al: Quinolone-photoconjugated major histocompatibility complex class II-binding peptides with lysine are antigenic for T cells mediating murine quinolone photoallergy. *J Invest Dermatol* 117: 1206-1211, 2001
- 7) Sugita K, et al: Chronic actinic dermatitis associated with adult T-cell leukemia. *J Am Acad Dermatol* 52: S38-40, 2005

(戸倉新樹)