

New Atlas: Malignant Lymphoma of the Skin

# 新・皮膚悪性リンパ腫 アトラス

編集▶

瀧川雅浩  
岩月啓氏  
大島孝一  
島田眞路  
瀬戸山充  
中村栄男

文光堂

## 4. 光化学療法

戸倉新樹

はじめに

菌状息肉症 (MF), Sézary 症候群 (SS) をはじめとする皮膚 T 細胞リンパ腫 cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) に対する光化学療法は, ソラレン psoralen を投与したのちに紫外線 A (UVA) を照射する PUVA 療法を基本として発展した。そののちにこれを体外循環で行う方法が開発され, 欧米では広く利用されるようになった。現在では narrowband UVB 療法も広く行われつつある。一方では他領域の固形腫瘍の治療として開発された光力学療法も応用されるようになり, 光を利用した方法も幅を広げつつある。

### 1. PUVA 療法

#### 1) 概略

ソラレンの光毒性作用を利用して UVA 照射と組み合わせた治療である。ソラレンのなかでは 8-methoxypsoralen (8-MOP) が専ら使われる。PUVA 療法は皮膚科の基本的治療の 1 つであり, 乾癬, 掌蹠膿疱症, 尋常性白斑, アトピー性皮膚炎など種々の皮膚疾患に対して使用される。MF をはじめとする CTCL に対しても広く使われている。

#### 2) 治療の実際

ソラレンを外用して同部に UVA を照射する外用 PUVA と, 同剤を内服して UVA 照射する内服 PUVA とに分けられる。外用 PUVA での塗布薬にはクリームのものと同剤のローションのものがある。浴用バスにソラレンを溶かし, その中に全身浸かる bath-PUVA とよばれる方法も行われる。入院患者では隔日ないし週 4 日程度照射し, 外来通院では 1~2 週に 1 度行う。

ソラレンの光反応には個人差があるため, あらかじめ各患者の感受性を調べる。背部に直径 1~2cm 程度のいくつかの穴の開いたアルミ紙を貼る。外用 PUVA の場合は, 穴から覗いた皮膚にオクソラレン®を塗布し, 30 分後に 0.5, 1, 1.5, 2 分 (0.2

~0.8J/cm<sup>2</sup>) と UVA を照射する。内服 PUVA ならば, オクソラレン®内服 2 時間後に 10, 15, 20, 25 分 (4~10J/cm<sup>2</sup>) と照射する。照射 48, 72 時間後に判定し, 紅斑のみられた最小量を MPD (minimal phototoxic dose) とする。

外用 PUVA では外用 30 分~1 時間後に, 内服 PUVA なら内服 2 時間後に UVA を照射する。最初の照射量は 1/2 MPD とし, 数回ごとに 2 割程度照射量を増やしていく。

MF/SS における PUVA 療法の有効性は多くの報告で認められているが, その際 UVA の総量の目安をどの程度にするべきか問題となる。UVA の全照射量は, 浜松医大皮膚科で測定し得た 15 例の平均 (±SD) は 18.4 ± 10.4J/cm<sup>2</sup> (3~37J/cm<sup>2</sup>) であった<sup>1)</sup>。SS に対しても行われるが, その効果は MF ほどではない。照射前後の組織学的検討では, 浸潤リンパ球の数は 1/5 以下に減少しており, この程度の総量が紅斑期, 扁平浸潤期の MF 病変を治療するのに必要であると考えられる。

#### 3) 適応条件

MF あるいは SS に対して行われ, MF/SS 以外の皮膚リンパ腫には通常行われない。MF の低リスク群 (扁平浸潤期まで) は PUVA 療法のよい適応期であり, 第一選択的に行われる。narrowband UVB が出現する前の 1995 年の統計では, 全 MF 患者の 84% に PUVA 療法が行われていた<sup>1)</sup>。

#### 4) 効果機序

PUVA 療法の最も明確に判明している分子的なターゲットは DNA である。8-MOP は UVA 照射によりチミンに共有結合する。これを monoadduct とよぶ。この際, チミンの隣にアデニンがあるとより結合しやすい。UVA の照射量が高くなれば二本鎖 DNA の両チミンを橋渡しするように 8-MOP が結合する。これを crosslink とよぶ。すなわち, PUVA 療法は DNA 損傷をもたらす。この損傷は 20 時間で約半数が DNA 修復で除去される<sup>2)</sup>。

MF を念頭においた PUVA 療法のターゲット細

4. 光化学療法

は、浸潤リンパ球と表皮ケラチノサイトである。腫瘍細胞を含むリンパ球はソラレンの光毒性作用で傷害され、またケラチノサイトはサイトカイン産生が低下する<sup>3)</sup>。こうした腫瘍細胞自身に対する作用のみならず皮膚微小環境が修飾されることにより、浸潤リンパ球は効果的に低下する。PUVA療法は免疫学的修飾作用ももつ。T細胞においてTh1サイトカイン、とくにIFN- $\gamma$ 誘導作用があり、逆にTh2サイトカインの産生は抑制される<sup>4)</sup>。CTCLではTh2に変調したサイトカイン環境の異常があり、これが細胞傷害性T細胞(CTL)の抑制、ひいては腫瘍免疫の抑制になっている。こうした点からもPUVA療法の治療効果は発揮されると考えられる。

PUVA療法が局所皮膚病変の改善という意味のみをもつのか、あるいはリンパ節浸潤、内臓浸潤を遅らせる効果も持ち合わせるのかは明らかではない。次項の体外循環PUVA療法[extracorporeal photochemotherapy(ECP), フォトフェレーシス(photopheresis)]においてみられるように、PUVA療法が腫瘍性T細胞に対する腫瘍免疫を惹起するのであれば、その治療効果は皮膚病変にとどまるものではないであろう。

2. 体外循環PUVA療法(ECP, フォトフェレーシス)

1) 概略

SS, MFを主とするCTCLに対して、米国エール大学のEdelsonら<sup>5)</sup>が開発した治療法である。1978年の試行そして1987年の最初の論文以来、米国、欧州、南アメリカなどで150以上の施設がこの治療を行っている。しかし、わが国では保険認可がなされていない。その後、全身性強皮症や天疱瘡などの自己免疫疾患、graft-versus-host disease(GVHD)、移植拒絶反応などの治療にも広く用いられている。ソラレン内服後、血液を取り出し、白血球分画にUVAを体外で照射し、また体内に戻す方法である(図1)。ソラレン(8-MOP)とUVAで処理されたT細胞はその抗原性が增强されるために、再び体内に移入することにより当該T細胞への免疫が高まり治療効果をもたらす、一種のワクチン療法である。

2) 効果機序

SSに対するECPを代表例として機序を述べたい。白血球分画のなかで奏効機序にかかわる細胞は腫瘍性T細胞と単球である(図2)。PUVA処理された腫瘍細胞はまずアポトーシスに陥る、併行して

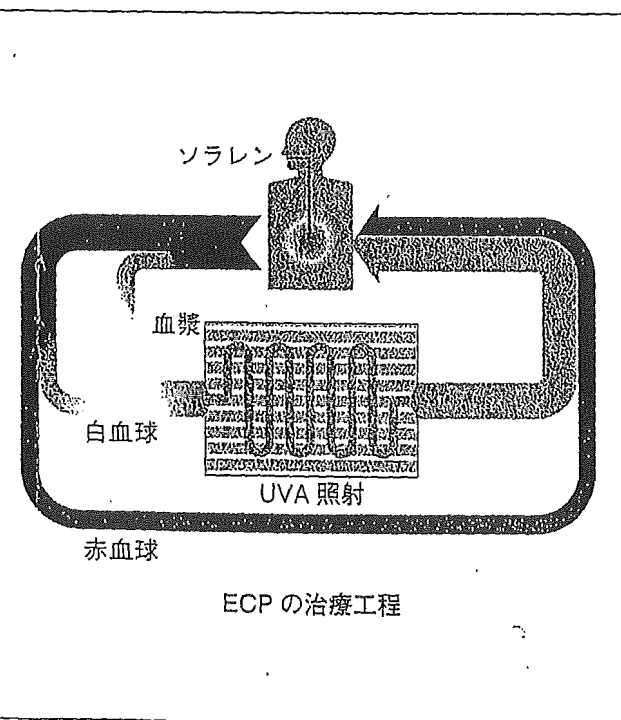


図1 ECPの実際(原図Edelson RL)

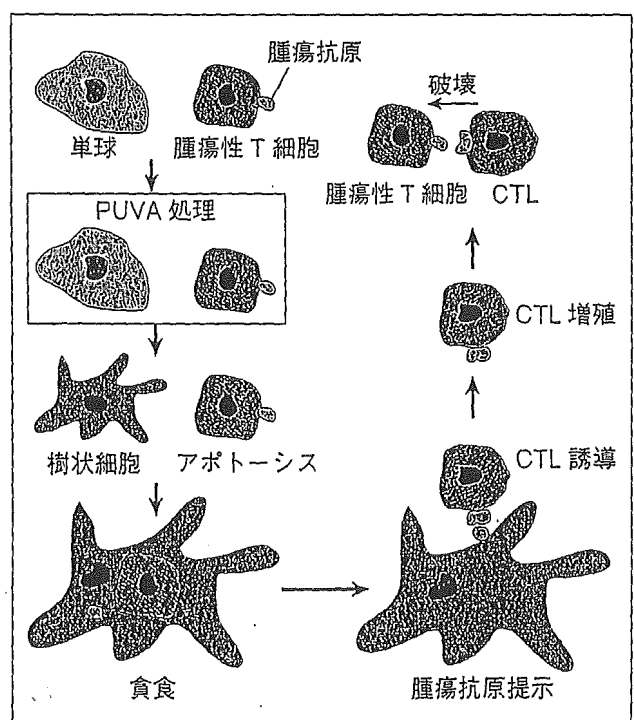


図2 ECPの効果機序

近傍に存在する単球は樹状細胞に変化していく。生起した樹状細胞は腫瘍細胞を貪食し、その抗原ペプチドを提示する。こうして腫瘍抗原を担った樹状細胞は患者に返され、体内で CD8 陽性 CTL が有効に誘導される。CTL は腫瘍細胞を傷害する<sup>6)</sup>。

PUVA 処理された腫瘍性の T 細胞が抗原性を増強する機構はさまざまな方向から検討されている。CTL が特異的に腫瘍 T 細胞を認識することから、抗原性は T 細胞受容体 (TCR) にあると考えられる。ECP は新たな腫瘍細胞の新生も抑制する可能性が高いことから、ソラレン自身は抗原性にかかわっていないと推察され、TCR の構造変化をもたらし抗原性を高めると考えられる<sup>7)</sup>。

TCR の断片ペプチドが MHC クラス I 分子に提示され、それを CTL が認識し、腫瘍細胞の破壊が起こる。この際、PUVA 処理は腫瘍細胞上の MHC クラス I 分子発現を亢進させ、さらに破壊に貢献する。

CTL を活性化させるためには Th1 サイトカインが必要であり、逆に Th2 サイトカインは CTL 活性を減弱させる。MF, SS などの CTCL は Th2 細胞としての性格をもつため、患者のサイトカイン環境は Th2 に偏重し、CTL が働きにくい環境設定をしている<sup>8)</sup>。PUVA 処理は Th2 細胞のサイトカイン産生を抑え、逆に Th1 細胞のサイトカイン産生を増強させる。結果的に CTL 活性は増強し、治療効果を側面から補助する<sup>4)</sup>。

以上のように、ECP が働く中心的なメカニズムは腫瘍細胞特異的 CTL の誘導と活性増強であるが、それに付随する免疫学的な環境にも種々の方向から影響を与えている。

### 3) 有効率と ECP の現在

1987～2002 年に発表された 20 編の臨床効果に関する論文をまとめると、532 例の CTCL 患者において complete response が 20%、overall response が 62%、no response が 25% であった<sup>6)</sup>。この間、装置や治療法が改善され次第に新しいものになっている。おそらく ECP により CTCL の生存期間は 2 倍に延長していると推定される。

ECP が奏効する CTCL の特徴として、病期が短いこと (2 年以内が望ましい)、顕著なリンパ節腫脹がなく内臓浸潤がないこと、白血球数が 2 万/ $\mu\text{L}$  以内で Sézary 細胞の数が 10～20% あること<sup>6)</sup>、などである。ECP の併用療法として、全身電子線照射、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-12、bexarotene などが

### 3. その他の治療法

#### 1) narrowband UVB 療法

PUVA 療法に代わる治療法として、乾癬ではすでに広く行われている治療である。通常の broadband UVB 装置が 290～320nm の光を照射するのに対し、narrowband UVB は 311nm 付近の非常に狭い範囲の紫外線を照射する。Stage I の MF に対して、54.2% に complete response、29.2% に partial response、16.7% に no response をみたと報告されている<sup>9)</sup>。

PUVA 療法と比較しての検討では、両者は同様に stage I の MF に対して有効であった。この結果を踏まえ、まず初めに narrowband UVB を行い、効果がなければ PUVA 療法に変更するのがよいとする意見もある<sup>10)</sup>。

#### 2) 光力学療法 photodynamic therapy (PDT)

PDT は光感受性物質であるポルフィリン体の光毒性を利用して癌組織を破壊する治療として発展した。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  $\delta$ -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 が可能であり、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。局所 PDT は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、アクネ、疣贅など広く応用されつつある。MF に対しても扁平浸潤期に行われ、細胞浸潤の顕著な低下が確認されている<sup>11)</sup>。

#### ◎文献

- 1) 戸倉新樹：皮膚のリンフォーマ XIV：18-21, 1995.
- 2) Tokura Y, et al：J Invest Dermatol 96：942, 1991.
- 3) Tokura Y, et al：Photochem Photobiol 53：517, 1991.
- 4) Tokura Y, et al：J Invest Dermatol 113：202, 1999.
- 5) Edelson R, et al：N Engl J Med 316：297, 1987.
- 6) Girardi M, et al：Hematol Oncol Clin N Am 17：1391, 2003.
- 7) Berger CL, et al：Adv Dermatol 20：217, 2004.
- 8) Vowels BR et al：J Invest Dermatol 99：90-94, 1992.
- 9) Gathers RC, et al：J Am Acad Dermatol 47：191, 2002.
- 10) Diederer PV, et al：J Am Acad Dermatol 48：215, 2003.
- 11) Edstrom DW, et al：Acta Derm Venereol 81：184, 2001.

検印省略

新・皮膚悪性リンパ腫アトラス

定価(本体 16,000 円十税)

2006年 4月 24日 第 1 版第 1 刷発行

編者

た き い わ お お し ま せ な か 中	が わ つ き し ま だ た と 戸 む ら 村	ま ま け い こ う し ん や ま 山 し げ 栄	ひ ろ 浩 じ 氏 い ち 一 じ 路 み つ る 充 お 男
--	---	--	--

発行者 浅井宏祐

発行所 株式会社 文光堂  
〒113-0033  
東京都文京区本郷7-2-7  
電話 (03) 3813-5478 (営業)  
(03) 3813-5411 (編集)

© 瀧川雅浩ほか, 2006

印刷: 公和図書 / 製本: 福島製本

Printed in Japan

乱丁・落丁の際はお取り替えいたします。

ISBN4-8306-3449-9

本書の複製権・上映権・譲渡権・公衆送信権(送信可能化権を含む)は株式会社文光堂が保有します。

・JCLIS(株)日本著作出版権管理システム委託出版物

本書の無断複写は著作権法上での例外を除き禁じられています。複写される場合は、そのつと事前に、(株)日本著作出版権管理システム(電話 03-3817-5670, FAX 03-3815-8199, e-mail: info@jcls.co.jp)の許諾を得てください。



Dermatology Practice

皮膚科診療プラクティス

19  
薬疹を極める

ゲスト編集

塩原哲夫

常任編集

宮地良樹・瀧川雅浩

文光堂

255

## 4. 内服テストと内服照射テスト

戸倉新樹 [産業医科大学皮膚科]

### I. 最も確実な診断方法

薬疹を診断するのは、確実な生体への代替試験や in vitro 試験がないため、必ずしも容易ではない。パッチテストも皮内テストも、さらにはリンパ球幼若化反応も陽性率が低い。これは、薬疹が単一の機序で起きているわけではなく、その多様な病態を一つのテストで看破することができないこと、さらには薬の代謝物が原因となることがあること、などの原因による。

最も確実な診断方法は、被疑薬をもう一度内服することである。これを内服テストと呼ぶ。光線過敏型薬疹のときには、内服して皮膚に紫外線 (UV) を照射する内服照射テストを行う。いわば患者が実際に内服して起こした薬疹を、同じ経路で追体験する方法であり、use test に属する。内服テストは疾患をもう一度起こすことになり、人道的に問題を含む。

### II. 危険性

内服テストは薬疹の診断にとって最も重要かつ確実なものにもかかわらず、現在は行われることが少なくなりつつある。それは薬疹が重篤な場合、試験が生命すら脅かすことがあるからである。診断を確実にすることはその反面、危険を与えることになり、リスクー利益を天秤にかけることになる。最近の考え方はこのジレンマのバランスに対して、リスク回避の方向に傾いている。すなわち患者に危険になることは極力避けることに、プライオリティがおかれるようになった。内

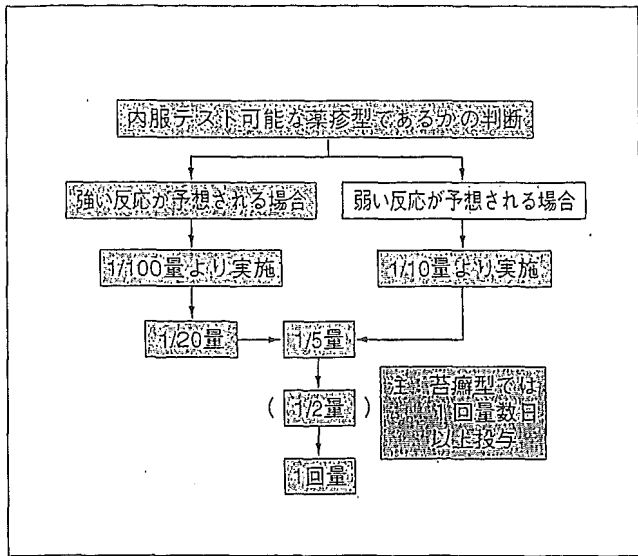
[表1] 各薬疹型と内服テスト(内服照射テスト)の実施の可否

薬疹型	実施の可否
TEN	不可
Stevens-Johnson 症候群	不可
多型滲出性紅斑型	不可(回避)
固定薬疹	可能、ただし多発型は要注意
苔癬型	可能
播種状紅斑丘疹型	可能
即時型	回避(ショックに対処)
光線過敏型	可能

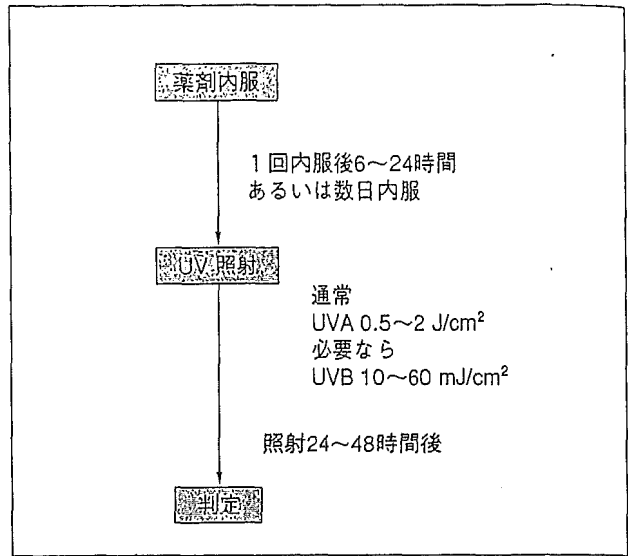
服テストの危険性は、各薬疹型によってかなり異なるため、どんな型の薬疹であるかを考慮し、その実施を判断する(表1)。

まず TEN, Stevens-Johnson 症候群, 多型滲出性紅斑を示す薬疹での、内服テストは禁忌とすべきである。前二者はたとえ少量投与であっても、強い免疫学的反応が惹起され、広範な表皮壊死かつ粘膜疹を起こし、大きな危険を伴う。多型滲出性紅斑の軽いタイプであっても、度重なる原因薬の投与は前回よりもより強い皮膚炎や粘膜疹を引き起こすことが予想され、思わぬ重症化をきすことがある。

固定薬疹は内服テストを行いやすい型である。皮疹が局所のみ誘発されるので危険性が少ない。しかし多発型の固定薬疹は度重なる誘発により、皮疹の数と程度が増し、多型滲出性紅斑類似になることがあり注意を要する。さらには口唇での皮疹の色素沈着が高度となり、色の改善までに長期間を要するようになることも十分患者に説明すべきである。この型の場合は皮疹部でのパッチテストという診断のためのよい戦略があり、内服



【図1】内服テストの手順



【図2】内服照射テストの手順

テストはそののちに行う順序でよいであろう。

苔癬型は危険度からいえば安全で、内服試験に適している。しかし1回投与では皮疹の誘発はむずかしく、数日以上の内服が必要となる。

I型アレルギーの機序による即時型では、ショックを起こすこともあり避けるべきである。行う必要性がどうしてもあるときには、血管確保して昇圧剤、ステロイド、抗ヒスタミン剤をベッドサイドに準備したうえでの投与が必要となる。

播種状紅斑丘疹型においては少量投与から行うことが可能であるが、注意は十分払うべきである。

光線過敏型薬疹に対しては内服テストでは誘発できず、内服照射テストを行う。UVを照射しない限り皮疹はみられないので、危険性は非常に低い。しかしニューキノロン剤など多種の薬剤が存在し、しかもそれらの薬剤間に光交叉反応性がある場合、内服光誘発に伴うT細胞クローンの拡大により感作度を上げ、原因薬以外の薬剤も今後の投与を不可能にすることが考えられる。

### ▶ III. 内服テストの実際

内服試験の薬剤使用量は、誘発が可能でしかも安全性が高い量が理想的である。誘発量に関して、中山ら<sup>2)</sup>は、成人の1日内服量の1/200から1/3で大部分の誘発ができたと報告している。実際的には、反応が強いことが予想される場合は1

回量の1/100より、反応が比較的軽い場合には1/10より開始し、1/5, 1/2, 1回量と増量するのがよい(図1)。播種状紅斑丘疹型では、各量の実施は2日以上の間をおくことが望まれる。固定薬疹では数時間経てば判定可能である。多剤を内服している患者で複数の薬剤をテストする場合、陽性反応が出てさらに他の薬剤の試験を行いたいときには、1週間程度実施期間をおくことが望ましい。

### ▶ IV. 内服照射テストの実際

光線過敏型薬疹の診断に使われ、薬剤投与後、UV照射を皮膚に行う<sup>2)</sup>。薬剤内服後、皮膚での濃度が最高値に達するまでの時間についてのデータは、ほとんどの薬剤で存在しない。したがって、薬剤内服後、血中濃度が最高になる時間を参考に、内服から照射までのタイミングを決める。通常、朝に内服して午後に照射する。照射はUVAとUVBそれぞれの人工光源を用いて行うが、UVAが作用波長であることがほとんどであり、実際にはUVA照射を行う。通常UVAを0.5~2 J/cm<sup>2</sup>照射する(図2)。UVBが作用波長である薬剤、例えばスルファニルアミド、ラニチジンでは、10~60 mJ/cm<sup>2</sup>のUVB照射を行う。スパルフロキサシンなどにおいて、UVAとUVBの両者を、順序に依存することなく連続的に照射することにより、紅斑が誘発されることが



ある<sup>3)</sup>。これを photoaugmentation と呼んでおり、臨床症状の強さに比べ、皮疹が誘発されにくいときは UVA と UVB の連続照射を行う必要がある。

## V. 結果に影響を与える因子

臨床的投与を再現するという点から、内服テスト、内服照射テストは確実な診断方法と思えるが、実際は 100% 再現することはできない。それは以下の因子が結果に影響を与えるためである。

### 1. 投与期間

常用量を内服したとしても、投与期間が不十分なために皮疹を誘発できないことがある。特に毒性反応で起こっている場合には、薬剤の蓄積量に依存するため皮疹再現に重要な因子となる。光線過敏型薬疹で光毒性機序で起こっている場合には、皮膚での薬剤濃度が光毒性を発揮するまで上昇させないと、内服照射試験で陽性結果は得られない。アレルギー機序が介在する薬疹の場合は、投与期間が影響を与える可能性は少なく、1 回投与で誘発できることが多い。しかし苔癬型薬疹の場合には、T 細胞の活性化、表皮細胞への攻撃という過程が必要であり、数日以上投与、あるいは 1 回投与でも数日間の観察が必要となる。

### 2. 実施時期

薬疹が治癒した後に内服テスト、内服照射テストが行われるが、治癒後から実施までの期間をどれくらいにすべきかが問題となる。例えば薬疹発現に T 細胞が介在する場合、T 細胞がアレルギーに陥っていると反応は出にくいことが予想される。また T 細胞クローンがある程度拡大した状態が必要であり、期間を置き過ぎた場合、少量の薬剤での誘発が困難になるであろう。

### 3. ウイルス感染

薬疹はウイルス感染の影響を受けて起こることがある(詳細は 226~251 頁参照)。典型的には、HHV-6 やサイトメガロウイルスによる DIHS や EB ウイルスによるアンピシリン疹がこれに当た

る<sup>4)</sup>。特にアンピシリン疹では、薬剤と感染の両者が必須であるため、伝染性単核球症という EB ウイルス感染状態がないと発症しない。このような典型的な場合以外にも、薬疹発症にウイルスがかかわっている可能性もあり、内服テスト陰性が必ずしも原因薬否定にならないことを示唆する。

## VI. 被疑薬の選定と試験の実施手順

薬疹を起こす患者は多くの場合、複数の薬剤を内服している。高齢者の場合はときに 10 を越える種類の薬剤を摂取している。皮疹型とその原因薬剤の頻度から被疑薬をあげるのが容易な場合もあるが、多くの場合複数の被疑薬が選定される。内服テストを実施する際、複数の中でどの薬剤から行うかは一定の決まりはなく実施者の判断に委ねられるが、大きくは二つに分けられる。

一つは、可能性が少ないと考えられる薬剤から実施し、最も疑わしいものを最後に行う方法である。この方法の利点は、どうしても今後も内服しなければならぬ薬剤の安全を確認した時点で内服テストを止めてしまい、第一の被疑薬の内服を行うことなく危険を回避できることである。

他の方法は最も疑わしい薬剤から内服テストを行う方法である。この場合、実施期間を大幅に短縮できる利点がある。しかしその投与は少量から慎重に行う必要がある。

内服テストは、知らずに同じ薬を処方され内服してしまった、というようなむしろ偶然の再投与によってなされていることも多い。複数の皮疹誘発経験をもつ患者においては、その時々内服した薬剤や成分を十分調査することも、内服テストを実施すると同様に重要なこととなる。

### 文献

- 1) 中山秀夫ほか：薬疹における比較的安全的な誘発方法—仮称 test tablet の使用経験。治療 60 : 1352-1354, 1978
- 2) 戸倉新樹：光線過敏型薬疹。最新皮膚科学大系 5, 75-82, 2004
- 3) Tokura, Y et al : Sparfloxacin phototoxicity : potential photoaugmentation by UVA and UVB sources. Arch Dermatol Res 288 : 45-50, 1996
- 4) 塩原哲夫：薬疹。EBM 皮膚科, 文光堂, 125-135, 2001

# 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—

大野 泰雄

要約：薬理学は薬物の生体作用とその機序を明らかにすることを主要な目的とする学問であり、そのための多くの *in vitro* 試験方法が開発されてきた。一方、動物愛護の立場からも生命科学研究に用いる試験法をなるべく動物を使用しない方法に置き換え (Replacement)、使用動物数を削減し (Reduction)、動物に与える苦痛を少なくする (Refinement) という 3R の原則が求められている。1999 年にポロニアで開催された生命科学のための動物使用と動物実験代替法に関する世界会議でポロニア宣言が採択され、3R の原則を法律に組み込むこと、動物実験に関係する全ての者に教育や訓練を行う機構を設置すること、また、動物実験の科学的、倫理的妥当性を審査委員会で審査を受けるべきと勧告された。なお、薬理学会員の所属する施設での動物実験委員会の設置や倫理的な動物実験の教育には施設により差がある。第三者による評価が必要であろう。一方、動物実験代替法の開発とバリデーションを促進するため、EU では European Center for the validation of Alternative Methods (ECVAM) を 1994 年に、米国では Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) を 1993 年に設立した。わが国においても平成 17 年度予算で国立医薬品食品衛生研究所に代替法を中心とする新規安全性試験法を評価するための室が認められた。

### 1. 序 (3R の原則と世界の流れ)

生命科学の発展は多くの動物実験に支えられてきたし、近未来においてもその状況は変わらない。一方、実験動物の使用については古くから動物福祉と人道の立場からの批判がある。生命科学研究が社会に受け入

れられ、その支持を得、意味のない摩擦を避けるためには、不必要な動物実験を止め、やむを得ず行う動物実験においては適切な手続きと厳密な科学的根拠に従い、動物使用数と動物に与える苦痛を最小限にする必要がある。欧米ではこのような認識は古くからあり、1954 年には Russel と Burch により動物実験代替法 (代替法) についての 3R の原則が提案された(1)。これは研究や教育、生産などに使用される動物を用いる方法を他のものに置き換え、当初の目的を達すること (Replacement)、特定の量と質を有するデータを得るために使用する動物を必要最小限にすること、また、同じ数の動物からより多くの情報をうること (Reduction)、また、避けられない動物実験にあっては痛みや苦痛、および不快感を最低限にし、動物の福祉を向上させること (Refinement) を意味している。なお、ここで言う動物とは意識を持ち、生きている脊椎動物を意味する。3R 原則は 1980 年代以後 EU (2, 3) や米国(4) において受け入れられていった。また、3R 原則の再確認と更なる促進を目的に、1999 年に開催された第 3 回国際動物実験代替法会議 (3<sup>rd</sup> World Congress on Alternatives and Animal use in Life Sciences) で動物使用と動物実験代替法についてのポロニア宣言が採択された(5-7)。この法的、科学的、倫理的な部分を表 1 に要約した。

ポロニア宣言が採択された時点では、実現困難に思われたところも多かった。しかし、その後、EU は化粧品指令第七改正 (2003.3) を行い(8)、2009 年以後は原則として化粧品の安全性評価のための動物実験を禁止した。また、EU 域外において動物を用いて安全性評価を行った化粧品の輸入を禁止する事とした。ま

キーワード：動物実験代替法、動物実験委員会、3R、バリデーション、ポロニア宣言

国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 (〒158-0098 東京都世田谷区上用賀 1-18-1)

e-mail: ohno@nihs.go.jp

原稿受領日：2005 年 3 月 28 日、会誌編集委員会依頼原稿

Title: Importance of research on alternatives to animal experiments and its current issues: animal experiments in The Japanese Pharmacological Society

Author: Yasuo Ohno

表1 ポロニア宣言の要旨

- 1) 全ての国が全ての研究・試験・教育に3Rの原則を積極的に組み入れるための法的な枠組みを作るべきである。
- 2) いずれの動物実験においても、関係する科学者や行政官の全てに教育や訓練を行う公式あるいは非公式の機構が無くてはならない。
- 3) 全ての動物実験は事前に専門家により科学および倫理の両面について、独立した審査を受けなくてはならない。
- 4) 動物実験の結果得られる利益と想定される動物の苦痛の両方を評価し、計ることが審査委員会の重要な機能の一部である。
- 5) どのような状況においても許されるべきでない動物の苦痛のレベルについての国際的な合意があるべきである。
- 6) より厳しい実験動物に対する規制を避けるために動物実験を他の国に依頼することを受け入れるべきではない。

表2 安全性評価のための動物実験代替法の行政的受け入れ基準の要約 (OECD 1996) (12)

- 1) 関心のある毒性指標を十分に predict できるデータが提示されている。また、新しい方法と既存の方法との間の関係や、新しい方法と標的動物種との関係について示されている。
- 2) リスクアセスメントの目的のために、既存の方法と比較し同等以上、望むらくはそれ以上の価値を有するデータが得られる。
- 3) 行政的に取り扱われる化学物質や製品の代表例についての十分なデータがある。
- 4) 試験法は堅牢なものであり、移転可能である。高度に特異化された機器や物質、専門的知識が必要な場合は、移転性を高める努力がなされている。
- 5) 経済的であり、使用される可能性が高い。
- 6) 既存の方法と比較し、科学的、倫理的、経済的である。

た、OECD は動物実験に関する人道的なエンドポイントに関するガイドライン(9)を2000年に通知した。現在改訂作業が進んでいるわが国の「動物の愛護および管理に関する法律」にも3Rの原則が盛り込まれることが予想される。更に、日本学術会議は動物実験施設とその運営の妥当性を評価するため、第三者による動物実験と施設運営の第三者評価機構設置の必要性に関する提言を行った(2004)(10)。

## 2. 新規安全性試験代替法の行政的受け入れとバリデーション

医薬品や農薬、化学物質の安全性評価においては、行政やOECDのような国際機関の定めた毒性試験法ガイドラインに基づいて各種の試験が実施される。これらの試験法についても、動物福祉への配慮が求められる。単回投与毒性試験においては統計的に厳密なLD<sub>50</sub>値を求めないとされ、OECDでは10匹程度の動物でLD<sub>50</sub>を推定する試験法(OECDガイドライン420(Fixed Dose Method), 423(Acute Toxic Class Method), 425(Up-and-Down Procedure))を採用し(2001)、従来の多数の動物を用いてLD<sub>50</sub>値を求める試験法(同401)を2002年12月に廃止した。また、皮膚腐食性試験として皮膚の導電度を測定する方法や培養細胞を用いて作成した皮膚三次元モデルを用いる試験法(同430(Transcutaneous Electrical Resistance Test), 431(Human Skin Model Test))や動物の苦痛が少ない皮膚感作性試験法(同429(Local Lymph Node Assay))が採用されるなど、多くの改訂がなされた。今後もin vitroの限刺激性試験や皮膚刺激性試験、感作性試験などの開発が期待されている。これらの試

験法については別に解説した(11)。

しかし、いくら動物愛護の声が大きくとも新しい方法を導入することにより、社会に不必要なリスクを負わせることは許されない。新たに開発された代替法を科学的に評価し、可能なものについては取り入れていくとの姿勢が重要である。一般にin vitro試験は動物愛護に寄与するとか、多数の被験物質を迅速かつ経済的に評価できる、感度が高い、再現性が良い、閉鎖系での研究が容易なため、実験者や環境の安全確保に有利である、また、実験条件の設定が容易であることから作用機序解明に便利であるといった利点を有するが、その一方、試験法の能力や限界について、十分な知識を持た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。新しい試験法の導入に際しては、適切なバリデーションを行い、その有効性と限界を明確にした上で試験を行う目的との整合性を評価しておかなければならない。

行政目的のための安全性試験法バリデーションと受け入れの基準については、OECDで合意されている(12)。その要点を表2と表3に示した。バリデーションの詳細については別に報告した(13)。

これらの要求を満たすことは一研究室や施設では困難である。そこで、EUは代替法開発の拠点とし、代替法についてのデータベースを設置・維持するため、また、行政、産業、生物・医学分野の科学者、消費者、および動物愛護運動グループの対話を促進することを目的に1991年に代替法バリデーションセンター(European Center for the Validation of Alternative Methods: ECVAM)を設立した(1994年開所)。また、米国は毒性試験法の開発、バリデーション、受け入れ、

表3 安全性評価のための動物実験代替法の最低基準の要約 (OECD 1996) (12)

- 1) 試験法の適切性に関する情報がある (科学的必要性, 行政目的)
- 2) 測定される指標と in vivo での作用や毒性との関係, および代謝能のような試験法の限界について記述されている。
- 3) 正式かつ詳細なプロトコルがあり, データの分析法や意志決定基準が示されている。また, 一般のものが入手可能である。
- 4) 試験法とその結果は独立した科学者により査読された出版物として得られることが望ましい。
- 5) 試験施設内外における反復性や再現性が示されている。
- 6) コード化被験物質を用いて試験法の performance が示されている。
- 7) 既存の毒性試験結果と対応する標的動物種からの情報との関係において試験法の performance が示されている。
- 8) 試験法の妥当性を評価するため全データが査読可能である。
- 9) 理想的にはデータは GLP principle に則って得られたものである。

表4 第77回日本薬理学会でのポスター発表で用いられた試験系

試験系の種類	例数		
In vivo 実験	185	335	69.6%
薬物等で処理した動物から組織試料を採取して研究	32		
動物から抽出した試料を用いて研究	118		
In vitro 研究 (細胞株等を用いた研究)	95	138	28.7%
屠殺場から入手した試料を用いて研究	17		
ヒト試料を用いて研究	19		
アフリカツメガエル卵母細胞を用いた研究	7		
その他 (臨床試験, 情報研究等)	8	8	1.7%
合計	481	481	

2004年3月8日および9日の2日間のポスター発表についての調査結果

および国内・国際レベルでのハーモナイゼーションに関する問題を連邦政府内で調整するために NICEATM (NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) の下に NIEHS (National Institute of Environmental Health Sciences) を含む 14 の行政機関および研究機関により ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) を 1993 年に設置した。

なお, ECVAM や ICCVAM では従来の安全性試験の代替法のみならず, 定量的構造活性相関や内分泌かく乱化学物質検索のような新たな毒性評価の要請やトキシコゲノミクスのような新しい技術を行政的試験として, 取り入れるための検討も視野に入れている。また, ECVAM と ICCVAM は評価結果の相互承認や共同バリデーションの実施などの協力を行っている。

一方, 日本では, 今まで厚生労働科学研究費の支援により, また, 日本動物実験代替法学会が中心となって, 代替法の開発とバリデーション研究が行われ, 眼刺激性試験代替法のバリデーションと指針案の作成 (14) や 3T3 細胞を用いる光毒性試験代替法の評価 (15) が行われた。また, 光毒性試験代替法改良法のバリデーションと評価, 皮膚腐食性試験代替法のバリデーションと評価, 皮膚刺激性試験代替法のバリデーション, LLNA 改良法の評価が進行中である。しかし,

ECVAM や ICCVAM のような代替法に特化した機関が無かったことから, 公的機関同士の国際協力は行えなかった。しかし, 平成 17 年度において国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター内に新規安全性試験法の評価のための室の設置が, 5 年間の期限つきではあるが, 認められた。これを期にわが国における代替法の評価が促進されることが期待される。

### 3. 薬理学会における動物実験の状況と問題点

薬理学会においても多くの動物実験が行われている。2004 年春に開催された年会においてポスター発表された研究によれば, 表 4, 5 に示したように発表の約 7 割が何らかの形で生きている動物を用いた研究であり, 細胞株や屠殺場から入手した試料やヒト試料を用いた in vitro 研究が約 3 割であった。動物実験を行った 16 施設の発表者に動物実験委員会 (ICACU) の設置状況と動物実験実施手続きについてインタビューした結果, 2 つの大学で ICACU が設置されていない, また, 1 大学で試験計画書の提出は行われていないとの回答があった。文部省は昭和 62 年に動物実験委員会の設置を求めている (16) ことから, 実際はこれらの大学においても設置されているものと推定されるが, 研究者や学生に適切な動物実験教育が行われておらず, また, 動物実験委員会が適切に機能していないものと

表5 実験動物委員会についてのポスター発表者へのインタビュー結果

施設	動物実験委員会の有無	申請手順	備考
医学部 1	有	実験計画毎に予想される動物の痛みと苦痛, および研究から得られる成果を含む計画書を提出	
医学部 2	有	同上	ポスターに明記
医学部 3	有	同上	
医学部 4	有	同上	
医学部 5	有	同上	
医学部 6	有	同上	
医学部 7	有	同上	ポスターに明記
医学部 8	有	同上	講習を受ける
医学部 9	有	同上	
薬学部 1	有	同上	
薬学部 2	有	同上	テーマは書くが詳しい事は書かない
薬学部 3	有	同上	年に1回まとめて申請
薬学部 4	有	動物購入毎に申請, 他は同上	
薬学部 5	無	動物購入毎に書類を提出	
薬学部 6	無		
農学部	有	個別テーマ毎に動物に与える予想苦痛と予想研究成果を記載して申請	
受託機関	有	同上	
その他	有	動物購入毎に申請, 他は同上	

第77回日本薬理学会年会(2004年3月)で動物実験結果についてポスター発表を行っていた若い研究者および学生へのインタビュー結果であり, 事実とは異なる可能性がある。

推定された。一方で, 委員会の承認を得たことをポスターに明記した発表者, 学内で動物実験の倫理的側面について講習を受けたと答えた発表者もあり, 実際の運用には施設により大きな差がある。日本薬理学会企画教育委員会では薬理学研究における動物実験が国際的水準で行われることが必要と考え, 現在, 動物実験指針の見直しを進めているが, 改訂されても実行されなければ意味が無い。薬理学研究が社会に受け入れられ, 支持を受けるためには, また, 会員が研究のためのファンドを獲得し, 研究成果を世界に発信するためには倫理的に適切な動物実験が行われるよう研究者と施設管理者が一体となって取り組むことが不可欠である。AALAC international (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International) (17) や学術会議の提言(10) で示されたような第三者による動物実験施設とその運営の妥当性評価が我が国でも必要であろう。

#### 4. 最後に

日本動物実験代替法学会では設立以来, 動物実験代替法のバリデーションや評価を行うとともに, 補助金を通じた研究支援, 大会やシンポジウムを通じた研究発表と代替法や倫理的な動物実験に関する教育を行い, また, 市民講座等を開催し, 研究者間の情報交換や市民との交流を深めてきた。また, 2007年8月に第6回国際動物実験代替法会議を日本トキシコロジー学会日本実験動物学会, 日本実験動物環境研究会, 日本環境変異原学会, 国際トキシコロジー学会の協賛を得て東京都江戸川区のタワーホール船堀で開催する予定である。本大会は2009年のEUの化粧品の安全性評価のための動物実験の原則廃止に向けて, それまでの研究成果をまとめ, 必要な研究計画を立てる重要な時其にあたる。薬理学会からも多数の参加を期待している。



文 献

- 1) Russel WMS, et al. The Principles of Human Experimental Technique. Methuen; 1959.
- 2) Council of Europe. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. 1986. p.51.
- 3) EEC. Official Journal of the European Communities. 1986. L358, p.1-29.
- 4) US Congress. Alternatives to Animal Use in Research, Testing and Education. US Congress Office of Technology Assessment. 1986. p.441.
- 5) Progress in the Reduction, Refinement and Replacement of Animal Experimentation. Developments in animal and veterinary sciences. Elsevier; 2000. 31A. p.15.
- 6) Progress in the Reduction, Refinement and Replacement of Animal Experimentation. Developments in animal and veterinary sciences. Elsevier; 2000. 31A. p.17.
- 7) 日本動物実験代替法学会ホームページ  
http://wwwsoc.nii.ac.jp/jsaae/
- 8) Official Journal of the European Union. L66, 11/03/2003; P0026-0035.
- 9) OECD. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. 2000. No.19.
- 10) 日本学術会議第7部報告. 動物実験・施設運営の第三者評価機構の設置について(提言)平成16年.
- 11) 大野泰雄. 皮膚と美容. 2003;35:2-8.
- 12) OECD. Final report of the OECD workshop on harmonization of validation and acceptance criteria for alternative toxicological test methods, OECD: ENV/MC/CHEM/TG(96)9. 1996.
- 13) 大野泰雄. 動物実験代替法のバリデーション方法と行政的受け入れの現状. 国立医薬品食品衛生研究所報告. 2004;122:1-9.
- 14) 大野泰雄. フレグランスジャーナル. 1999;7:21-26.
- 15) Ohno Y, et al. 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結果. AATEX. 2005;10:50-157.
- 16) 文部省学術国際局長通知. 大学等における動物実験について(通知). 文学情第141号(昭和62年5月25日). 1987.
- 17) AALAC international ホームページ, <http://www.aalac.org/>

著者プロフィール

大野 泰雄 (おおの やすお)

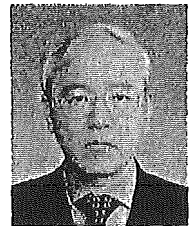
資格：薬学博士，薬剤師，日本トキシコロジー学会認定トキシコロジスト

学歴：昭和51年3月 東京大学薬学系大学院博士過程修了

現職：国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター薬理部長

学会役員：日本薬理学会（学術評議員 企画教育委員会委員），日本トキシコロジー学会（教育委員会委員），日本動物実験代替法学会（前会長），HAB協議会（評議員），日本薬物動態学会（理事）

その他：薬事食品衛生審議会 第一部会 臨時委員，食品安全委員会 専門委員



洞穴の彩色画（サンタバーバラ）

X.H

第 25 回 日本学術会議薬理学研連 臨床薬理シンポジウム 2004 年 9 月 16 日 (木) 静岡  
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

大野 泰雄\* 酒見 和枝\* 籾内 桃子\*

### 1. 序

ヒトと実験動物との間には様々な種差があり、医薬品開発において臨床試験段階で思わぬ副作用が現れ、開発停止に至ることが多い。このような種差には投与後の血中濃度や標的臓器での分布量で代表される薬物動態面と標的臓器/組織での薬物の作用に関わる薬力学的面がある。この前者による障害を克服するため、ヒト肝臓由来標本を用いた試験が広く行われるようになった。しかし、日本人由来ヒト組織を入手することは、一般に困難であったことから、ヒューマンサイエンス財団の支援を受け、1) 公的ガイドラインに従い、外科手術切除ヒト組織の医学研究利用ネットワーク体制を構築するための一環として、獨協医科大学において肝臓手術したときに得られる肝臓片の病巣部以外の部分から薬物代謝研究のための遊離肝細胞調製を行い、配布を試みた。また、2) 外国よりヒト肝細胞を入手し、薬物代謝研究への応用の妥当性を検討した。

### 2. 手術摘出肝組織からのヒト肝細胞調製

獨協医科大学において、HIV、HBV、HCV、梅毒感染の無い患者から肝臓手術時に摘出した肝切除片の病巣部以外の部分を切り出し、氷冷ヘパリン含有生理食塩水を灌流・脱血した後、氷冷 L-15 培地に交換し、氷冷下バイク便で約 2 時間かけ、国立衛研へ輸送した。この肝臓切片より、2 段階コラゲナーゼ灌流法による肝細胞を調製した。なお、遠距離輸送されたヒト肝臓より肝細胞を調製するための技術を確認するために、類似した条件下においたウサギおよびイヌ肝臓片より肝細胞を調製し、十分な viability と収量が得られることを確認したのち、ヒト肝臓からの肝細胞調製を試みた。なお、国立医薬品食品衛生研究所および獨協医科大学の倫理委員会で承認を得て研究を実施した。

獨協医科大学病院より提供された肝臓は平成 14 年 3 月より平成 16 年 1 月まで総数 27 件で、その内肝細胞

調製を試みられるようなブロック試料の提供は 12 例であった。なお、提供患者の多くは転移性肝臓癌であったが、胆管癌、肝細胞癌の患者もいた。これらの肝臓より肝細胞を調製したのは 12 例で、実際に肝細胞調製できたのは 7 例、得られた肝細胞の viability は平均 57.0% で、その収量は平均  $0.37 \times 10^6$  cell/g liver と少なかった。これらの内、代謝活性測定に利用できたのは 4 例であった。なお、提供された肝はいずれも線維化や黄疸が著しく、正常と思われる肝臓はわずかであった。これらの細胞の薬物代謝活性を測定したところ、testosterone  $6\beta$ -hydroxylation 活性は  $512 \pm 367$  (n = 4) であり、Gentest 社より購入したものとほぼ従来の報告と同じ活性であった。

### 3. 凍結融解ヒト肝細胞での代謝経路の *in vivo* との比較

凍結ヒト肝細胞を米国 Xenotech, LLC 社より 3 ロット購入し、HEPES-Krebs Henseleit Buffer (pH 7.4) で生細胞数が約  $6.0 \times 10^6$  cells/mL となるように調製し、24-well plate に播種した後、37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーター内で薬物代謝活性を測定した。その結果、表に示したように、3 ロットの結果を総合的に評価すると、第一相および第二相の代謝物が、ほぼ *in vivo* と対応して認められた。なお、イミダプリルの代謝物 M2, M3, M4 は消化管で主に生成する加水分解代謝物である。また、ニトラゼパムの還元代謝物は肝細胞を低酸素状態におくことにより多く生成した。なお、ロットによっては代謝活性が低い場合があり、注意が必要である。

### 4. Poor metabolizer (PM) および Extensive metabolizer (EM) 由来の凍結ヒト肝細胞を用いた代謝

遺伝多型が知られている薬物代謝酵素チトクロム P450 のうち、CYP2D6 の欠損した PM 凍結遊離肝細胞を用い、PM の薬物動態 (代謝) が予見できるかどうかを dextromethorphan (DEX) をプローブとし、N-脱メチル化体 (3-MEM, 主に CYP3A4 による代謝)、O-脱メチル化体 (DXO, 主に CYP2D6 による代謝) とそれに続くグルクロン酸抱合体生成で検討した。

\* 国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター薬理部  
〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

表 ヒト凍結ヒト肝細胞によるヒト代謝経路の推定

薬物	担当企業	<i>in vivo</i> 代謝及び代謝物	<i>in vivo</i> 生成比	ヒト肝細胞での代謝物	備考
エノキサシン	三菱ウェルファーマ	ピペラジン環の酸化 (M2), ピペラジン環の開裂 (M5)とN-脱アルキル化 (M1), ピペラジン環のN-アセチル化 (M4)と酸化 (M3)	M2 > M5 > M4 = M1 > M3	M3, M5, M2, M4	
アザセトロン	三菱ウェルファーマ	N-脱メチル (M1), N-酸化 (M2)	M2 > M1	M2 > M1	M2はFMOによる代謝産物
トログリタゾン	三共	Sul (M1), Glu (M2), Quinon (M3)	M1 > M3 > M2	M1, M3 > M2	
エストリオール	第一製薬	16-Glu (M1), 3-Glu (M2), Glu-Sul (M3), 3-Sul (M4)	M1 > M2 > M3 > M4	M4, M1	
イミダプリル	第一製薬	イミダゾリン環の開裂 (M1), ペプチド結合の加水分解 (M2, M3, M4)	M2 > M1 > M4 > M3	M1	加水分解は消化管で起こる
エトドラク	日本新薬	Glu (M1), 6-OH (M2), 7-OH (M3), 6-OH-Glu (M4), 7-OH-Glu (M5)	M1 > M5 > M3 > M2 > M4	M1 > M3, M5, M2	S体 > R体
リルマザホン	塩野義製薬	ペプチド結合の加水分解 (DG), DGの縮合 (M1), M1の脱メチル (M2, M3), M1-M3の加水分解 (M4)	M4 > M2 > M1 > M3	M4 > M2 > M3	
ニトラゼパム	塩野義製薬	ニトロ基還元 (M1), M1のアセチル化 (M2)	M1 > M2	M1	嫌気的条件下でM1生成増加

Glu: glucuronide, Sul: sulfate, OH: hydroxy

CYP2D6のPMとEMの凍結ヒト肝細胞はIVT社で調製されたものから選択し、遺伝多型を第一製薬(株)で確認したものをを用いた。

DEXのN-脱メチル化代謝物3-MEMとO-脱メチル化代謝物DXOの生成量を測定した結果、両代謝物の比(3-MEM/DXO)は、EM-PM間で大きな差が見られた。また、DXOの抱合体(glucuronide)も観察された。これらの結果は、定性的にヒトの臨床結果とよく一致していた。

同様の検討を、warfarin, bufuralol, mephenytoin, diclofenac, tramadolについても行った。その結果、いずれも変異の影響を確認できた。

##### 5. まとめ

- 1) 手術摘出肝ブロックから肝細胞を調製できたが、肝臓の多くは病変が著しく、肝細胞の収量は少なかった。
- 2) ヒト肝細胞を用いることにより、① *in vivo*と同様の代謝物を半定量的に検出できる。第一相代謝と抱合反応の両方を検討できる。② 肝特異的代謝を検討できる。③ 立体特異的な代謝を検討できた。④ 嫌気的条件下での代謝を検討できた。⑤ ロットにより大きなばらつきがあり、複数のロットでの検

討が必要である。

- 3) PM凍結ヒト肝細胞を用いた代謝評価試験は、PM患者のヒトの代謝パターンを把握するのに有用と考えられる。
- 4) データは示さなかったが、非凍結肝細胞を用いることにより、CYP1A, CYP3Aの誘導能を検討できる。但し、ロット差が大きいことから、陽性対照物質との比較の上で評価する必要がある。

本研究はヒューマンサイエンス振興財団の援助を受け、以下の施設の協力により行った。この場で感謝したい。また、Lanfordsの培養液を調製してくれた日水製薬(株)に感謝する。

獨協医科大学薬理学 上川雄一郎, 獨協医科大学消化器外科 窪田敬一, アベンティスファーマ(株) 森田繁浩, 協和発酵工業(株) 藤岡弘之, 三共(株) 徳井太郎, 塩野義製薬(株) 馬場隆彦, 第一製薬(株) 岡崎治, 第一化学薬品(株) 二宮真一, 大日本製薬(株) 寺内嘉章, 武田薬品工業(株) 朝日知, 田辺製薬(株) 山田泰弘, 中外製薬(株) 加藤基浩, 日本新薬(株) 東郷克爾, ファイザー(株) 嶋田薫, 万有製薬(株) 安盛俊雄, 三菱ウェルファーマ(株) 藤崎浩, 明治製薬(株) 奥平典子, 持田製薬(株) 大西修平

# Photocontact Dermatitis: From Basic Photobiology to Clinical Relevance

Yoshiki TOKURA

*Department of Dermatology, University of Occupational and Environmental Health,  
Isegaoka 1-1, Yahatanishi-ku, Kitakyushu 807-8555, Japan*

JOURNAL OF ENVIRONMENTAL DERMATOLOGY

VOL. 12 NO. 2

April 2005

## Review

# Photocontact Dermatitis: From Basic Photobiology to Clinical Relevance

Yoshiki TOKURA

*Department of Dermatology, University of Occupational and Environmental Health, Isegaoka 1-1, Yahatanishi-ku, Kitakyushu 807-8555, Japan*

Correspondent : Tokura Y

Accepted for publication : February 10, 2005

### Abstract

Photocontact dermatitis is one of the major occupational and environmental skin diseases, which is adversely induced by chemicals. This dermatitis is evoked by skin application of photosensitive agents plus ultraviolet light irradiation. There are phototoxic and photoallergic mechanisms in this dermatosis. It is thought that the incidence of the latter is higher than that of the former. The photoallergic type is mediated by Langerhans cells, T cells, and various cytokines and chemokines, and thus occurs *via* a well-organized immunological mechanism. Photoconjugation of epidermal cells with a photohaptenic chemical is the initial step, and Langerhans cells serve as antigen-presenting cells. Causative photohaptens are bound to MHC class II molecules/self peptide on Langerhans cells upon exposure to UVA. The photomodified Langerhans cells sensitize and elicit antigen-specific T cells that mediate photoallergy.

*Key words : photoallergy, contact dermatitis, UVA, contact hypersensitivity, Langerhans cells*

### Introduction: Phototoxicity and photoallergenicity

In occupational skin disorders, contact dermatitis is the major skin disorder (1), and photocontact dermatitis is a specialized form of this skin disease (2). Eczematous eruptions that patients develop include erythema and papules/vesicles, and occasionally bullae, at the skin

sites where a photocontactant is applied and solar light is irradiated. Histologically, the skin lesion is an eczematous tissue reaction characterized by epidermal spongiosis, exocytosis, and a dense mononuclear cell infiltrate in the dermis (3). Since the dermatitis is induced by a combination of application of a chemical to the skin and irradiation of the same site with ultraviolet (UV) light, it is sometimes difficult to diagnose this photosensitivity. The action



spectrum of this photosensitivity is mainly UVA.

Photocontact dermatitis is divided into two subtypes: phototoxic and photoallergic contact dermatitis. The phototoxicity is mediated by oxygen radicals, and the resultant cellular damage is caused by photoreaction of chemicals with lipid, DNA, and amino acids. Recently, the cellular phototoxicity against 3T3 fibroblasts has been used for evaluation of phototoxicity, and a study to validate this *in vitro* system is being performed in Japan as well as in some European countries. In contrast, the

photoallergenicity is induced and elicited by immunological sequences involving many immunocompetent cells and molecules. Therefore, evaluation of photoallergenicity is more difficult than that of phototoxicity.

In photocontact dermatitis, the incidence of photoallergy is thought to be higher than that of phototoxicity. Thus, great attention must be paid to photoallergic contact dermatitis (4, 5). This review aims to highlight photocontact dermatitis focusing on its immunological and molecular mechanisms.

Table 1. Causative agents of photocontact dermatitis

Antimicrobial agents (mainly halogenated salicylanilides)

- tetrachlorosalicylanilide (TCSA)
- dibromosalicylanilide (DBS, dibromosalan)
- tribromosalicylanilide (TBS)
- bithionol (thiobisdichlorophenol)
- trichlorocarbanilide (TCC, triclocarban)
- trifluoromethyldichlorocarbanilide (TFC)
- hexachlorophene
- chloro-2-phenylphenol (Dowicide 32)
- fenticlor (thiobischlorophenol)
- multifingon (bromochlorosalicylanilide, BCSA)
- jadit (buclosamide, butylchlorosalicylamide)
- triclosan
- chlorhexidine
- dichlorophene
- sulfanilamide

Perfumes

- musk ambrette
- 6-methylcoumarin
- sandalwood oil

Sunscreens

- para-amino-benzoic acid (PABA)
- octyl-dimethyl PABA (padimate O)
- amyl-dimethyl PABA (padimate A)
- glycerol PABA
- benzophenone (especially benzophenone-3=oxybenzone)
- butyl-methoxydibenzoylmethanes (Parsol 1789)
- digalloyl trioleate
- cinnamates (cinoxate)

Hair dye

- paraphenylenediamine (PPD)

Non-steroidal anti-inflammatory drugs

- Ketoprofen
- Suprofen

Phototoxic therapeutic chemicals

- Psoralen
- Coal tar

### Causative chemicals

As shown in Table 1, various agents have been reported to evoke photocontact dermatitis. Historically, halogenated salicylanilide and related compounds, which were contained in soaps/detergents and used as topical antimicrobial agents, yielded a large number of patients with photocontact dermatitis (6-8). The elimination of these germicides from the market reduced the number of such patients. Perfumes, such as musk ambrette and 6-methylcoumarin, and sunscreen agents, especially benzophenone-3 (oxybenzone) (5), became causative thereafter. However, recent causative agents of photocontact dermatitis are topical non-steroidal, anti-inflammatory drugs, such as ketoprofen (9) and suprofen (10).

Almost all chemicals listed in Table 1 clinically evoke photoallergic dermatitis. However, when tested in their phototoxicity, they exhibit various degrees of phototoxicity. Therefore, it had been misestimated that phototoxicity is the mechanism of photocontact dermatitis in most cases. The agents that cause only phototoxicity with rare exceptions include psoralen and coal tar, which have thus far been used for therapy.

### Photoantigen formation in photoallergic type

Since photoallergic contact dermatitis is an immunological disorder, it is necessary for causative chemicals to become antigens or photoallergens upon exposure to UVA. As illustrated in Fig. 1, two hypotheses have been put forward to explain the formation of photoallergen (5). One is that the photosensitizer is a prohaptens, which is converted to a complete hapten by UV irradiation, and the hapten can bind to protein. In another theory, the photosensitizer is a photohaptens, which, in advance, binds noncovalently to the carrier protein, and upon UV irradiation, a covalent bond occurs *via* the formation of free radicals. In the case of photohaptens, therefore, UVA-preirradiated chemicals are incapable of binding to protein, and a non-covalent bond between photohaptens and protein is required before irradiation of them with UVA.

This is in accordance with clinical photopatch test, in which a causative chemical is applied to the skin and UVA is irradiated to the same site. This method is for testing the photohaptenic property. When the prohaptenicity is examined, a UVA-preirradiated chemical should be ap-

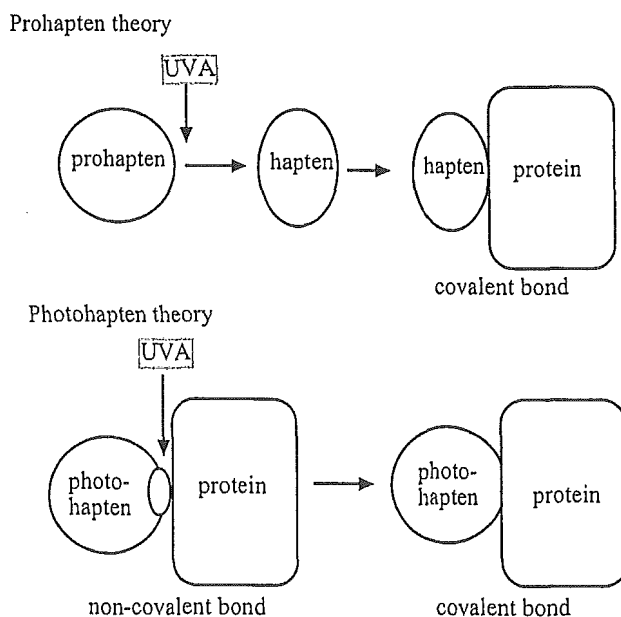


Fig. 1 Two theories for the formation of photoantigen