

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
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

今年度は、次に述べる3つの課題を中心にして研究を遂行した。(1)多施設バリデーション研究において統計的に最適な被験物質割り付け法の研究(2)バリデーションにおける技術易移転性(transferability)の評価法の研究(3)実験家が容易にET50の信頼区間を求められるような手順の考案。課題(1)に関しては、施設のそれぞれに扱える物質数が定められているという制約と、被験物質数が一定であるという条件を設定したときの、可能な割付の全列挙手順を考案し、母数模型の下での最適化基準をD-最適化とした場合の算法を作成した。それに基づいて、すでに行われていたLLNA-DA法のバリデーション研究における割付の評価に用いたところ、実際の割付は最適では無かったが、最適なものに近いことを確かめることができた。課題(2)に関しては、用語の定義に基づいて、実験施設の基礎能力の確認という段階と、主導施設の能力との比較という2段階判定法を考案した。それを、すでに行われていたLLNA-DA法のバリデーション研究のデータに適用して、多くの実験参加者が容認できる判定を下すことを確かめた。課題(3)に関しては、毒性試験の実験家が非線形最小二乗法を使いこなせていないことに配慮して、対数時間直線法が適用可能な条件を調べた。その調査結果に基づいて、非線形最小二乗法が必須という条件のときには再実験を行って対数時間直線法で信頼区間を求めることを提案することとした。今後はこれらの提案を他のバリデーション研究で活用できるものと思われる。

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3Rs原則を実現できているか、研究するのがバリデーション研究である。

バリデーション研究では、実際に多くの施設で当該試験法での実験を行い、得られたデータを解析することが必要である。その際、実験をどのように行うのがよいか、どういう評価基準を用いるのがよいか、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、ということについて統計学的方法論を確立することが重要である。

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)多施設バリデーション研究において統計的に最適な被験物質割り付け法を実現

するにはどのような方法を用いるのがよいか、(2)バリデーションにおける技術易移転性(transferability)をどのような手法で評価するのがよいか、(3)実験家が容易にET50の信頼区間を求められるようにするにはどのようなやり方を用意すればよいか。

B. 研究方法

B-1) 最適割付法

バリデーション研究の実験では、複数の施設が複数の被験物質を用いて、当該試験法で毒性を調べる。実験を通して知りたいことは、施設間再現性と予測性(代替可能性)である。

各施設では、実験の費用負担と利用可能装置・労力・時間について制約がある。その制約を満たすような条件下で、目的について最も効果的な被験物質割付がデザイン

C-2) 技術易移転性の評価法

試験法提案施設では、5~10回の反復実験のデータが背景データとして存在することを前提とした。技術易移転性を評価するのに、1段階目で能力が格段に劣る外れ施設を検出する方法を取り入れた。これには背景データにおける施設内ばらつきを標準的変動とした3シグマ法を用いた。3シグマ法で限界値を超えた外れ施設が少数(2割以下)であった場合、その施設を技術水準の低い施設とし、その施設のデータを施設間再現性の評価に用いないという方法を考案した。もし、外れ施設が多い場合は、無条件に、技術易移転性がないと評価することとした。第2段階目では、混合モデルで施設間再現性を評価する方法を考案した。多数の場合は試験法の問題とした。指標としては、次式で定義される分散成分比 r を用いることとした。

$$r = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_a^2 + \sigma_b^2 + \sigma_c^2}$$

添え字の a, b, c はそれぞれ、施設間変動、実験間変動、誤差変動を表している。すなわち、 r は、総分散(施設間分散成分、実験間分散成分、繰り返し誤差)に占める施設間分散成分の割合である。

実際の LLNA-DA 法バリデーション研究に即したシミュレーション実験を設定して、 r とその 95% 信頼区間を算出した。 r は 0 から 1 までの値をとり、値が小さいことが、技術易移転性の高さを意味している。

r がどの程度であれば技術易移転性が十分であるかを調べるために、 r のいろいろな値について、シミュレーションデータを作成し、実験家の目での評価を試みた。その結果、 r が 0.5 以下であれば、技術易移転性が高いとは判断できると考えられた。

C-3) 簡便な ET50 推定法

現実のバリデーション研究の実験データ及びそれを模したシミュレーションデータについての検討によって、(1) 予備実験の結果皮膚刺激性が強いと判定されて本実験を行ったところ時間反応関係が明瞭でなかった場合は、時点を皮膚刺激性が中程度とした 5 時点の再実験を行う、(2) 予備実験の結果皮膚刺激性が中程度と判定されて本

実験を行ったところ時間反応関係が明瞭で無かった場合は、実験時点を新しい 5 時点として再実験を行う、(3) 予備実験の結果皮膚刺激性が弱と判定されて本実験を行った結果細胞生存率が 50%以下となった場合は、皮膚刺激性が中程度として再実験を行う、(4) それ以外の場合は対数時間直線法を採用して皮膚刺激性を評価する、という手順を考案した。その適用可能性を実際のバリデーションデータとそれを模したシミュレーションデータに適用したところ、その性能は、昨年の研究で提案した 2 段階法とほぼ同等であった。

D. 考察

D-1) 最適割付法

混合効果モデルを想定して、真値からの偏りと平均二乗誤差の評価をモンテカルロシミュレーション法で行ったところ、D-最適化規準を満たす割付計画が、混合効果モデルにおいても良い性能があることが確認できた。

D-2) 技術易移転性の評価法

提案法を LLNA-DA 法バリデーション研究のデータに適用したところ、参加した施設には外れ施設がなかった。評価指標 r の値は 0.24 であった。バリデーション研究に参加した実験家に各施設の平均と標準偏差を示したグラフで主観的評価を求めたところ、全員が施設間差が非常に小さいことを認めた。バリデーションの対象となった LLNA-DA 法は高い技術易移転性を持った代替試験法であることが示唆された。

提案した評価法は、提案施設が十分な背景データを持ち、しかもそれが利用できるという条件の下でのものである。そうでない場合は、参加施設での実験反復回数を多くした上での判定法が必要である。これは今後の課題である。

D-3) 簡便な ET50 推定法

方法を考案するのに参考とした実験に対しては提案法の適切性が認められたが、その一般化可能性は今後吟味されるべきである。

E. 結論

E-1) 最適割付法

本研究で、考案した全列挙算法を用いると、母数モデルの下でD-最適な割付が実現できる。定性的には、各施設に組み合わせの異なる被験物質を割り付けるという指針がD-最適な割り付け法をもたらしている。こうして得られる割付計画は混合モデルの下でも良い性質を持っている。

E-2) 技術易移転性の評価法

試験法提案施設が十分な背景データを提供した場合には、第1段階で外れ施設を検出し、第2段階で施設間差を指標 r で評価する方法を提案して、実際のバリデーション研究のデータに適用したところ、実験家が容認できる結果が得られた。この評価法は実用可能と思われる。

E-3) 簡便なET50推定法

対数時間直線法でET50の区間推定を行うために、それが困難な実験データについての考察を行い、その場合には再実験を行うという方法を提案した。モンテカルロシミュレーションの結果では、十分な性能が得られていた。簡便法としては実用可能と思われる。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

G-1) 論文発表

- 1) Seok KJ, Wanibuchi H, Morimura K, Totsuka Y, Wakabayashi K, Yoshimura I, Fukushima S. Existence of a no effect level for MelQx hepatocarcinogenicity on a background of thioacetamide-induced liver damage in rats, *Cancer Science*, 37, 453-458, 2006.
- 2) Sato Y, Suganami H, Hamada C, Yoshimura I, Sakamoto H, Yoshida T, Yoshimura K. The confidence interval of allelic odds ratios under the Hardy-Weinberg disequilibrium. *Journal of Human Genetics*, 51, 772-780, 2006.
- 3) Moore MM, Honma M, Clements J, Bolcsfoldi J, Burlinson B, Cifone M, Clarke J, Delongchamp R, Durward R, Fellows M, Gollapudi B, Hou S, Jenkinson P, Lloyd M, Majeska J, Myhr B, O'Donovan M, Omori T, Riach C, San R, Stankowski LF, Thakur AK, Van Goethem F, Wakuri S, Yoshimura I.

Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: Follow-up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests-Aberdeen, Scotland, 2003. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 47, 1-5, 2006.

- 4) Negoro T, Orihara K, Irahara T, Nishiyama H, Hagiwara K, Nishida R, Takagi H, Satoh K, Yamamoto Y, Shimizu S, Hagiwara T, Ishii M, Tanioka T, Nakano Y, Takeda K, Yoshimura I, Iikura Y, Tobe T. Influence of SNPs in cytokine-related genes on the severity of food allergy and atopic eczema in children. *Pediatric Allergy and Immunology*, 17, 583-590, 2006.
- 5) 吉村功. (2007) 医薬統計の原理原則. 医薬安全性研究会第110回定例会資料, 1-10, 23-28, March 10, 2007.
- 6) Sozu T, Shiraishi A, Hyodo Y, Hamada C, Yoshimura I. (2007) Interval estimation of the 50% effective time in small sample assay data. *Alternatives to Animal Testing and Experimentation*, (Accepted).

G-2) 学会発表

- 1) Yoshimura I, Idehara K, Omori T, et al. Validation of LLNA-DA assay for assessing skin sensitization potential. SOT2007, March 25-29, Charlotte, USA.
- 2) 寒水孝司, 白石亜矢子, 兵頭洋平, 浜田知久馬, 吉村功. (2006) 皮膚刺激性試験代替法におけるET50推定法. 日本動物実験代替法学会第20回大会, 2006年12月8日, 東京.
- 3) 兵頭洋平, 寒水孝司, 大森崇, 浜田知久馬, 吉村功. (2006) 動物実験代替法のバリデーションにおけるtransferabilityの統計的評価法に関する研究. 日本動物実験代替法学会第20回大会, 2006年12月8日, 東京.
- 4) 高沼正幸, 寒水孝司, 大森崇, 浜田知久馬, 吉村功. (2006) 動物実験代替法バリデーション研究における被験物質割付の最適性に関する検討. 日本動物実験代替法学会第20回大会, 2006年12月8日, 東京.
- 5) 大森崇, 出原賢治, 小島肇, 寒水孝司, 吉村功他. (2006) 皮膚感作性試験代替法(LLNA-DA法)バリデーション研究. 日本動物実験代替法学会第20回大会, 2006年12月8日, 東京.

- 6) 平川晃弘, 佐藤泰憲, 寒水孝司, 浜田知久馬, 吉村功. (2006) マイクロアレイデータにおける FDR に基づくカットオフ値の選定方法に関する検討. 2006 年度統計関連学会連合大会, 2006 年 9 月 7 日, 仙台, 東北大学.
- 7) 吉村功. (2006) 統計科学と医・薬・生物・健康科学との相互寄与を未来に向けて思量する. 2006 年度統計関連学会連合大会, 2006 年 9 月 7 日, 仙台, 東北大学.
- 8) Sato Y, Hirose M, Ando H, Suganami H, Hamada C, Yoshimura I. (2006) Modified multifactor dimensionality reduction method for detecting Gene-Gene interaction for an unbalanced sample size. 27th Annual Conference of the International Society for Clinical Biostatistics, August 28, 2006, Geneva, Switzerland.
- 9) Sato Y, Suganami H, Hamada C, Yoshimura I, Sakamoto H, Yoshida T, Yoshimura K. (2006) The confidence interval of allelic odds ratios under the Hardy-Weinberg disequilibrium. International Biometric Conference 2006, June 17, 2006, Montreal, Canada.
- 10) Aoki Y, Hamada C, Yoshimura I. (2006) Estimation of Drug-Receptor Model Parameters; Comparing the Performances of Traditional Methods with a Nonlinear Least Square Method. (2006) International Biometric Conference, June 17, 2006, Montreal, Canada.

G-3) 参考文献

- 1) Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology. (2005) Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment. OECD Series on Testing and Assessment No. 34,
- 2) Motulsky H, Christopoulos A. (2004) Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression. Oxford University Press, New York.
- 3) Lindsey JK. (2001) Nonlinear Models in Medical Statistics. Oxford University Press, New York.

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、大阪大学大学院臨床医工学研究科寒水孝司助教授、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、東京理科大学大学院工学研究科経営工学専攻学生の高沼正幸氏、兵頭洋平氏、石川公平氏、東京理科大学工学部第二部経営工学科の園家絵里奈氏の協力を得た。ここに記して感謝の意を表す。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

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
Seok KJ, Wanibuchi H, Morimura K, Totsuka Y, Wakabayashi K, Yoshimura I, Fukushima S.	Existence of a no effect level for MelQx hepatocarcinogenicity on a background of thioacetamide-induced liver damage in rats	Cancer Science,	37	453-458	2006
Sato Y, Suganami H, Hamada C, Yoshimura I, Sakamoto H, Yoshida T, Yoshimura K.	The confidence interval of allelic odds ratios under the Hardy-Weinberg disequilibrium	Journal of Human Genetics	51	772-780	2006
Moore MM, Honma M, Clements J, Bolcsfoldi J, Burlinson B, Cifone M, Clarke J, Delongchamp R, Durward R, Fellows M, Gollapudi B, Hou S, Jenkinson P, Lloyd M, Majeska J, Myhr B, O'Donovan M, Omori T, Riach C, San R, Stankowski LF, Thakur AK, Van Goethem F, Wakuri S, Yoshimura I.	Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: Follow-up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests-Aberdeen, Scotland, 2003	Environmental and Molecular Mutagenesis	47	1-5	2006
Negoro T, Orihara K, Irahara T, Nishiyama H, Hagiwara K, Nishida R, Takagi H, Satoh K, Yamamoto Y, Shimizu S, Hagiwara T, Ishii M, Tanioka T, Nakano Y, Takeda K, Yoshimura I, Iikura Y, Tobe T.	Influence of SNPs in cytokine-related genes on the severity of food allergy and atopic eczema in children.	Pediatric Allergy and Immunology,	17	583-590	2006
吉村功.	医薬統計の原理原則.	医薬安全性研究会 第110回定例会資料,	1-10	23-28	2007
Sozu T, Shiraishi A, Hyodo Y, Hamada C, Yoshimura I.	Interval estimation of the 50% effective time in small sample assay data.	Alternatives to Animal Testing and Experimentation			(Accepted).

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト (参考)

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	内服テストと内服照射テスト	宮地良樹、 滝川雅浩 編	皮膚科診療プラクティス. 19. 蕁麻疹を極める	文光堂	東京	2006	125-127
戸倉新樹	後天性光線過敏症の病態	斎田俊明, 飯塚一編	先端医療シリーズ38 皮膚疾患の最新医療	先端医療技術研究所	東京	2007	221-224

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
Imai S, Atarashi K, Ikeshue K, Akiyama K, Tokura Y	Establishment of murine model of allergic photocontact dermatitis to ketoprofen and characterization of pathogenic T cells.	J Dermatol Sci	41	127-136	2006
Orimo H, Tokura Y, 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
Kabashima K, Nagamachi M, Honda T, Nishigori C, Miyachi Y, Tokura Y, Narumiya S.	Prostaglandin E(2) is required for ultraviolet B-induced skin inflammation via EP2 and EP4 receptors.	Lab Invest	87	49-55	2007
Hino R, Kobayashi M, Mori T, Orimo H, Shimauchi T, Kabashima K, Tokura Y.	Inhibition of Thelper 2 chemokine production by narrowband ultraviolet B in cultured keratinocytes.	Br J Dermatol	In press		2007
戸倉新樹	光アレルギーの発症機序と対策	アレルギー	55	1382-1389	2006

戸倉新樹	薬剤性光線過敏症	臨床と研究	83	87-90	2006
荒川京子、田中憲穂、高鳥浩介、澤田拓士	飼料から分離した代謝産物の遺伝毒性	Mycotoxins,	56 (2)	7-64	2006
Ayako Sakai, Chihiro Suzuki, Yasuhiko Masui, Kousuke Takatori and <u>Noriho Tanaka</u>	The activities of Mycotoxins derived from Fusarium and related substances in a short-term transformation assay using v-Ha-ras-transfected BALB/3T3 cells (Bhas 42 cells)	Mutation Res			In press
Yoshitaka HIGA, Mayumi KAWABE, Kyoko NABAE, Yosuke TODA, Sachiko KITAMOTO, Takumi HARA, <u>Noriho TANAKA</u> , Kimio KARIYA and Michihito TAKAHASHI	Kojic acid - absence of tumor-initiating activity in rat liver, and of carcinogenic and photo-genotoxic potential in mouse skin	The Journal of Toxicological Sciences			In press
Takumi Hara, Takashi Nishikawa, Hajime Sui, Kumiko Kawakami Hirota Matsumoto and <u>Noriho Tanaka</u>	In vivo photo skin micronucleus test using a sunlight simulator: Detection of 8-methoxypsoralen and benzo[a]pyrene	Mutation Res			In press
Hayashi, K., Sasaki, K., Asada, S., Tsuchiya, T., <u>Tanaka, N.</u>	Umeda, M.: Detection of initiating and promoting activities of chemicals by two-stage model of Balb/c 3T3 cell transformation assay with optimized protocol.	ATLA			In press
Hirota, M., Kitagaki, M., <u>Itagaki, H.</u> , and Aiba, S.	Quantitative measurement of spliced XBP1 mRNA as an indicator of endoplasmic reticulum stress.	J. Toxicol. Sci.		149-156	2006
Ashikaga, T., Yoshida, Y., Hirota, M., Yoneyama, K., <u>Itagaki, H.</u> , 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,		767-773	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		774-784	2006
Seok KJ, Wanibuchi H, Morimura K, Totsuka Y, Wakabayashi K, Yoshimura I, Fukushima S.	Existence of a no effect level for MeIQx hepatocarcinogenicity on a background of thioacetamide-induced liver damage in rats	Cancer Science,	37	453-458	2006
Sato Y, Suganami H, Hamada C, Yoshimura I, Sakamoto H, Yoshida T, Yoshimura K.	The confidence interval of allelic odds ratios under the Hardy-Weinberg disequilibrium	Journal of Human Genetics	51	772-780	2006
Moore MM, Honma M, Clements J, Bolcsfoldi J, Burlinson B, Cifone M, Clarke J, Delongchamp R, Durward R, Fellows M, Gollapudi B, Hou S, Jenkinson P, Lloyd M, Majeska J, Myhr B, O'Donovan M, Omori T, Riach C, San R, Stankowski LF, Thakur AK, Van Goethem F, Wakuri S, Yoshimura I.	Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: Follow-up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests -Aberdeen, Scotland, 2003	Environmental and Molecular Mutagenesis	47	1-5	2006
Negoro T, Orihara K, Irahara T, Nishiyama H, Hagiwara K, Nishida R, Takagi H, Satoh K, Yamamoto Y, Shimizu S, Hagiwara T, Ishii M, Tanioka T, Nakano Y, Takeda K, Yoshimura I, Iikura Y, Tobe T.	Influence of SNPs in cytokine-related genes on the severity of food allergy and atopic eczema in children	Pediatric Allergy and Immunology,	17	583-590	2006
吉村功.	医薬統計の原理原則.	医薬安全性研究会第110回定例会資料,	1-10	23-28	2007
Sozu T, Shiraishi A, Hyodo Y, Hamada C, Yoshimura I.	Interval estimation of the 50% effective time in small sample assay data.	Alternatives to Animal Testing and Experimentation			(Accepted).
Takashi Omori	A measure evaluating relevance of a validation study of alternatives to animal testing	AATEX	12	25-31	2006

Ohtake E, Kakahara F, Matsumoto N, Ozawa S, Ohno Y, Hasegawa S, Suzuki H, Kubota T.	Frequency distribution of p henol sulfotransferase 1A1 activity in platelet cells fro m healthy Japanese subjects	<i>Eur. J. Pharm. S ci.</i> ,			In press
大野泰雄	日本薬理学会の奨める動 物実験-苦痛の評価と軽 減-「はじめに」および日 本薬理学会の新動物実験 指針	に本薬理学雑誌	129	5-9	2007

皮膚免疫 ハンドブック

改訂2版

東京大学教授 玉置邦彦
杏林大学教授 塩原哲夫

編著

中外医学社

光線過敏症は日光などの照射を受けた皮膚に生じる皮膚炎の総称であり、顔面、項部、上胸部V領域（襟開胸部）、手背、前腕伸側、足背などの露光部位に局限して皮疹がみられる。表 24-1 に示すように本症は種々多様な原因で起こり、一人の研究者が光線過敏症全体を扱うというのはほとんど困難なくらいである。臨床的には表 24-2 に示すように、年齢層別に個々の特徴を頼りに診断していくのが実践的である。免疫学的な機序が関与する疾患には、薬剤性光線過敏症、光接触皮膚炎、日光蕁麻疹があり、慢性光線過敏性皮膚炎もおそらく免疫が関与するであろう。ここ

表 24-1 光線過敏症の原因別分類

1. 外因性物質によるもの：
 - 光毒性または光アレルギー性機序
 - 経皮：光接触皮膚炎
 - 経口：薬剤性光線過敏症（光線過敏型薬疹）
2. 内因性物質によるもの：光毒性
 - ポルフィリン症，ペラグラ，Hartnup 病
3. DNA 修復機構の異常
 - 色素性乾皮症，Cockayne 症候群
4. EB ウイルス感染リンパ球反応
 - 種痘様水疱症
5. メラニン色素減少による閾値低下
 - 白皮症，フェニルケトン尿症
6. 日光により増悪ないし誘発される疾患
 - エリテマトーデス
7. 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（CAD）

表 24-2 光線過敏症の分類

好発年齢	疾患	注意事項
乳児・小児期	色素性乾皮症 骨髄性プロトポルフィリン症（EPP）	A～G 群とバリエーション。培養線維芽細胞を用いた不定期 DNA 合成の検査 蛍光赤血球，赤血球ポルフィリンの検査。皮疹多形
小児期	種痘様水疱症	顔面を中心とする小水疱，癩痕。
成人期	薬剤性光線過敏症 光接触皮膚炎 晩発性皮膚ポルフィリン症（PCT） ペラグラ 慢性光線過敏性皮膚炎（CAD） 日光蕁麻疹 多形日光疹	頻度が高く，とくに高齢者に多い。キノロン製剤など。特に非ステロイド外用剤，サンスクリーンに注意 飲酒歴，尿中ポルフィリンの検査 3D（dermatitis, diarrhea, dementia），飲酒歴 最小紅斑量（MED）の低下。作用波長：UVA，UVB が多い。除外診断的。 膨疹。作用波長：本邦では可視光線が多い。小児期にみられることもあり MED の低下なし。多くは小丘疹性日光疹。

下線は免疫学的機序で発症しうる疾患

では本書の意図する観点から、免疫学的機序がかなり判明している薬剤性光線過敏症¹⁾、光接触皮膚炎^{2,3)}について総括的に概説したい。

a. 光線過敏症を起こす物質: 光毒性と光アレルギー性

表 24-3 に示すように、薬剤性光線過敏症や光接触皮膚炎の原因物質は非常に種類が多い。一般に光感受性物質による反応は光毒性と光アレルギー性に分けられている。

光毒性とは物質に紫外線 (UV) があ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

表 24-3 光線過敏症 (薬剤性光線過敏症, 光接触皮膚炎) の原因物質

抗菌薬	
quinolone 系	(sparfloxacin, enoxacin, fleroxacin, lomefloxacin, norfloxacin, tosufloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin)
tetracycline 系	(demethyltetracycline, doxycycline, tetracycline, oxycycline)
筋弛緩薬	afloqualone
消炎鎮痛薬	piroxicam, ampiroxicam
抗真菌薬	griseofulvin
抗癌薬	5-FU, tegafur, fultamide
降圧利尿薬	hydrochlorothizide, trichlormethiazide, clofenamide, meticrane
β -遮断薬	tilisolol
抗ヒスタミン薬	mequitazine
トランキライザー	chlorpromazine
殺菌剤	tetrachlorosalicylanilide (TCSA), dibromosalicylanilide (DBS: dibromosalan), tribromosalicylanilide (TBS), bithionol (thiobisdichlorophenol), trichlorocarbanilide (TCC: triclocarban), trifluoromethyldichlorocarbanilide (TFC), hexachlorophene, chloro-2-phenylphenol (Dowicide 32), fenticlor (thiobischlorophenol), multifingin (bromochlorosalicylanilide: BCSA), jadit (buclosamide, butylchlorosalicylamide), triclosan, chlorhexidine, dichlorophene, sulfanilamide
香料	musk ambrette, 6-methylcoumarin, sandalwood oil
サンスクリーン	para-amino-benzoic acid (PABA), octyl-dimethyl PABA (padimate O), amyl-dimethyl PABA (padimate A), glycerol PABA, benzophenone (とくに benzophenone-3 [oxybenzone]), butyl-methoxydibenzoylmethanes (Parsol 1789), digalloyl trioleate, cinnamates (cinoxate)
治療用外用剤	suprofen
毛染め	paraphenylenediamine (PPD)
治療用外用剤	psoralens, coal tar
生薬	クロレラ

らすものであり、細胞の構成成分的には 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のであろうが、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。例えばポルフィリン症は内因性ポルフィリン体の光毒性反応の結果生じた皮膚炎である。一方、光アレルギー性反応は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、多くの場合 T 細胞が媒介するものである。

皮膚の反応としては、光毒性ではサンバーン様であり、光アレルギー性では紅斑のみならず水疱、扁平苔癬など種々の皮疹形態をとる。反応を起こす光の波長（作用波長）は、光毒性ではその物質の吸収に一致し、光アレルギー性では吸収波長の長波長側にずれる。作用波長は多くの場合 UV それも長波長紫外線（UVA）であり、スルファニルアミド、ラニチジンなど例外的に UVB であるものも存在する。

それぞれの物質が光毒性、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。たとえば薬剤性光線過敏症の代表であるキノロン系抗菌薬は、光毒性⁴⁾も光アレルギー性⁵⁾も併せもつ。症例によってはサンバーン様皮疹に始まり、徐々に扁平苔癬様に変化することもあり、光毒性反応の結果、光アレルゲンが形成されたことを示唆させる。また過去、アレルギー性光接触皮膚炎の重要な原因物質であったテトラクロロサリチルアニリド（TCSA）は光毒性も強い⁷⁾。しかしそれぞれの物質において両性質に偏重はあり、たと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、その主な分子ターゲットが蛋白ではなく DNA であるために⁸⁾、光アレルギー性反応は起こしにくい。これは治療薬としての優秀性を示している。

b. 光毒性試験、光アレルギー性試験

光毒性あるいは光アレルギー性を検討する試験は表 24-4 のように種々ある。光毒性試験は従来からさまざまな方法が試みられてきた。これらは細胞光毒性を利用したものと、分子への毒性障害を利用したものとに大別される。前者の細胞毒性試験には、赤血球、線維芽細胞、リンパ球などがターゲット細胞として使われてきた。後者の分子への障害は、脂質過酸化反応、DNA への損傷あるいは光共有結合、さらには蛋白との光共有結合（これは光アレルギー性にもかかわる）などが利用されてきた。光アレルギー性試験に比較すると光毒性試験は簡単であるために、多くの光感受性物質はまずこの光毒性試験の検討に供された。そのために光感受性物質の多くは光毒性物質であるという誤った通念さえできあがってしまった経緯がある。しかし比較的容易な光毒性試験とはいえ、各施設が同じ実験系を用いて同じ結果を出すのは困難な点も多い。そのため共通の実験系作り・基準作りが試みられている。

光アレルギー性試験は、光毒性試験に比べて実験系の確立がむずかしく、現在世界的にみてもいくつかの施設が行っているにすぎない。アレルギーはどうしても *in vivo* の実験系が必要となり、具体的にはマウスあるいはモルモットが使われている。こうした動物に光感受性物質を塗布するかあるいは経口投与し、皮膚に UVA を照射して感作する。マウスの場合、約 1 週間後に同

表 24-4 光毒性試験と光アレルギー性試験

光毒性試験

1) *In vitro* 試験

1. 細胞毒性: 細胞の光致死あるいは DNA 合成抑制
 - 1) 赤血球 (光溶血): 古典的手法
 - 2) 線維芽細胞: BALB/c 3T3 線維芽細胞の neutral red の取り込み
 - 3) リンパ球: トリチウム-チミジンの取り込み
 - 4) *Candida albicans*
 - 5) マクロファージ
2. プラスミド DNA の切断活性
3. 蛋白との光結合
4. ヒスチジンの光分解
5. ミトコンドリア酵素のアッセイ

2) *In vivo* 試験

動物に物質を全身投与あるいは皮膚に塗布したのち皮膚に UV を照射。
モルモット, マウス, またはラビットを用いる。

光アレルギー性試験

In vivo 試験

動物に物質を全身投与あるいは皮膚に塗布したのち皮膚に UV を照射。
これを感じと惹起の 2 つの段階で行う。
モルモットまたはマウスを用いる。

様に物質を投与し, 耳翼皮膚に UVA を照射して惹起する。この惹起に際し, 皮膚反応が起こったか否かをみることにより光アレルギー能の程度を評価することになる。光アレルギーは T 細胞が介する細胞性免疫学的機序によって起こる。光毒性試験が試験管内の *in vitro* の実験系のできるのに対し, 光アレルギー能の検討は当然ながら, 実施者の熟練を要することになる。

光アレルギー性物質は多かれ少なかれ光毒性を有している。したがって希望的には, 光毒性を検討すれば光アレルギー性物質を含めた光感受性物質のスクリーニングになるともいえる。しかしそれが同時にすべての光アレルギー能のスクリーニングになっていると考えるのは早計である。事実, 光毒性能試験が陰性の物質であっても臨床的に光アレルギーを起こす物質は珍しくない。また臨床的には光アレルギー機序で起こる外因性光線過敏症の方が光毒性で起こるものよりも頻度が高い事実も銘記されるべきである。*in vitro* での光アレルギー能の類推方法として, 蛋白との光共有結合がある。光アレルギー性物質はほとんどの場合, 次項で解説するように光ハプテン photohapten としての性格をもっているため, 蛋白と溶液中で UVA 照射すると光共有結合する。この光結合能を検討することにより, かなりの確率で光アレルギー能を予知できると考える。

c. 光アレルギー性物質が抗原となるメカニズム: 光ハプテン

薬剤性光線過敏症にしても光接触皮膚炎にしても, 皮膚に光が当たらなければ起きない。すな

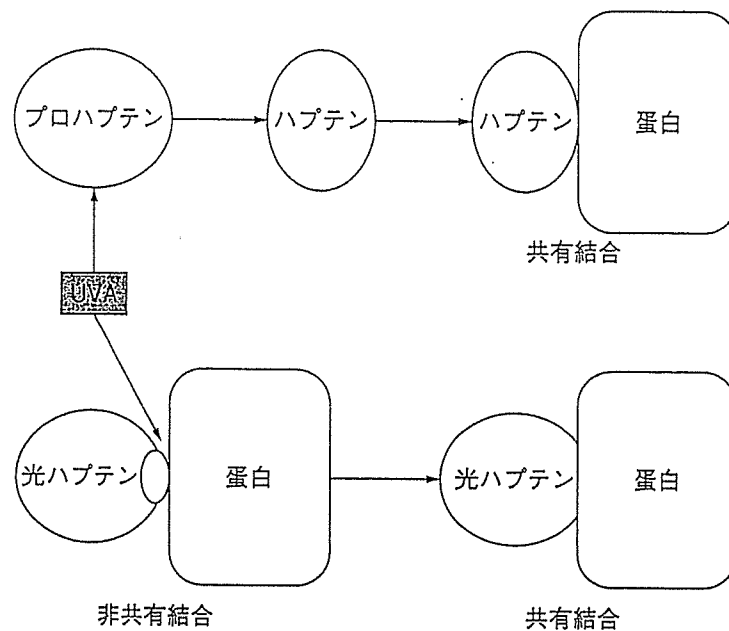


図 24-1 光ハプテンとプロハプテン

わち通常の抗原と異なり，光アレルギー性物質が抗原となるには UV 照射が必要となる．このことについては古くよりいくつかの説が提唱されてきたが，大きくは 2 つの機序に集約される．一つは光ハプテン photohaptens であり，もう一つはプロハプテン prohaptens である (図 24-1)．プロハプテンは UV 照射により化学構造の変化が起き，通常のハプテンと同じように蛋白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，UV 照射がなされるとそ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⁹⁾．したがって，おそらく光ハプテンと蛋白とは UV 照射の前に予め非共有結合していなければならず，UV はこれを共有結合に変えるのであろう．また物質によっては光ハプテンになるために，生体内で代謝を受ける必要があるかもしれない，プロ光ハプテン prophotohaptens というべき性質のものも存在すると考えられる．

代表的な光ハプテンは TCSA であり¹⁰⁾，UVA 照射により 4 つある塩素のうち一つがはずれると同時にフリーラジカルが形成され，共存する蛋白と光共有結合する．しかし予め UVA 照射した TCSA (多くは光分解産物であるトリクロロサリチルアニリドになっている) と蛋白を共存させても，両者の共有結合は認められない．さらに TCSA を塗布し UVA を照射した免疫マウスにトリクロロサリチルアニリドを塗布しても，惹起反応は起こらない．スルファニルアミドなどではプロハプテンであることが示唆されているが，光アレルギー性物質のかなりの部分は光ハプテンであろうと考えられる．事実，アレルギー性の薬剤性光線過敏症の原因物質であるアフロクェロン¹¹⁾ やキノロン⁵⁾ も光ハプテンであり，ピロキシカムもこうした性質をもつが，不思議なことにアンピロキシカムはプロハプテンである．さらにサンスクリーン剤であるベンゾフェノン-3⁹⁾ も光ハプテン能を有する．プロ光ハプテンである物質の存在はまだ明らかではないが，フロタミドはこれにあたるかもしれない¹²⁾．いずれにしろ，光ハプテン能は光アレルギー性物質の性格を検討す

る上で最も重要な点である。

光ハプテンと蛋白の光結合様式の詳細は明らかではない。しかしニューキノロンであるオフロキサシンはリジンに光結合する選択性が高く¹³⁾、おそらくアミノ基に結合することが示唆される。したがって、リジン側鎖やN末端のアミノ基に光結合しその抗原性を発揮すると考えられる。

d. 光ハプテンの細胞への光結合: 光ハプテン修飾細胞

マウスの剃毛皮膚に光ハプテンを塗布し、同部に UVA を照射すると感作が成立し、耳翼を光ハプテン塗布・UVA 照射することにより惹起反応をみる。これはアレルギー性光接触皮膚炎のモデルである。光ハプテン溶液に浮遊させた表皮細胞を UVA 照射すると光ハプテン修飾表皮細胞が形成される。この修飾細胞をマウスの皮下に投与することにより、やはり感作、惹起を行うことができる。前者の経皮的な感作、惹起と後者の光ハプテン修飾細胞を用いた感作、惹起には互換性があり、光ハプテン修飾細胞は光抗原を担った *in vivo* で形成される細胞の擬態ということが出来る (図 24-2)。こうした抗原性をもった光修飾細胞は、TCSA¹⁴⁾、アフロクァロン¹¹⁾、キノロン⁵⁾、ベンゾフェノン-3⁹⁾で作製可能であることが明らかとなっている。

Langerhans 細胞 (LC) は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く^{2,3)}。さらに薬剤性光線過敏症においても光抗原を提示しうる細胞として機能している^{15,16)}。光ハプテンで感作したマウスより得た感作 T 細胞を光ハプテン化した LC と培養すると、T 細胞の増殖反応が起こる。したがって光ハプテン修飾細胞は *in vitro* でも抗原性を発揮する。しかしこの *in vitro* の系では、光ハプテンの種類によって、その光修飾細胞が T 細胞を刺激しやすいものとそうでないものがある。たとえば TCSA の場合、ただ単に TCSA 光修飾 LC を刺激細胞として用いただけでは T 細胞の増殖反応は得られず、抗原提示細胞としてマクロファージを共存させた場合に T 細胞は刺激される¹⁴⁾。光修飾 LC のみで T 細胞刺激を行おうとすると、狭い範囲での適度の TCSA 濃度、UVA 照射量を用いた処置が必要となる。これは TCSA は光アレルギー性ととも強い光毒性を有しているため⁷⁾、TCSA 光修飾表皮細胞の viability は非常に低くなり、他の生きた抗原提示細胞に新たにプロセッシング、提示されないと感作 T 細胞を増殖できないことによる。*in vivo* では恐らくこの再プロセッシングも起こっており、光修飾細胞の皮下投与によって過敏症が誘導、惹起できるのであろう。一方キノロンをはじめとする薬剤は TCSA に比べると細胞毒性は弱く、その光修

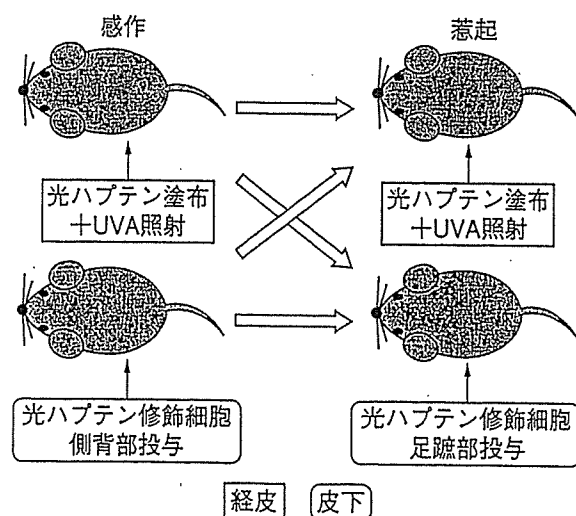


図 24-2 マウスにおける光ハプテンに対する光線過敏症の感作、惹起方法

飾表皮細胞の viability は高く保たれている⁵⁾。したがって他の抗原提示細胞を添加しなくても *in vitro* での T 細胞増殖反応を誘導することができると考えられる¹⁶⁾。

e. 光ハプテンと UVA による LC 上の光抗原形成と LC の抗原提示能促進

LC による光抗原の提示において、光ハプテンが LC 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 UVA 照射によってできた光ハプテン-蛋白複合体が LC 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 LC を *in vitro* で光ハプテン化し感作 T 細胞と培養した場合、通常の 3 日間培養で T 細胞増殖反応がみられることから、光ハプテンは直接 MHC クラス II 分子-自己ペプチド複合体に光共有結合すると想像される (図 24-3)。事実、キノロン光線過敏症において、クラス II

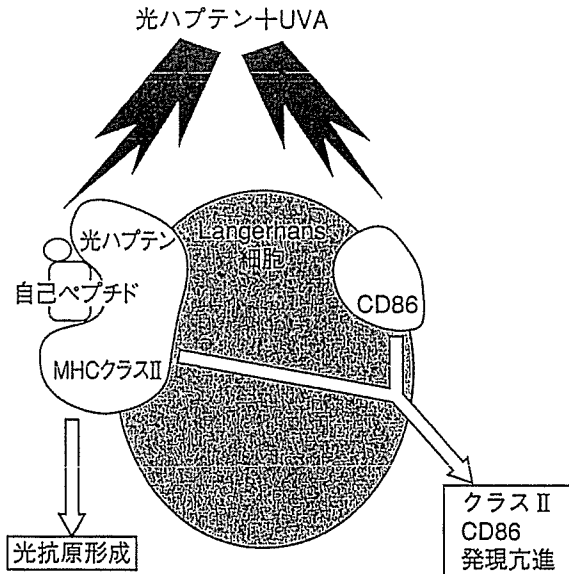


図 24-3 光ハプテンと UVA が LC に与える変化

に親和性のあるリジンを含むペプチドをキノロンと光共有結合させ、これを LC に負荷し、その抗原提示の有無を感作 T 細胞反応としてみると、T 細胞は増殖する¹³⁾。

加えてハプテンと同様に、光ハプテンも UVA 照射下で LC に作用してその抗原提示能を促進させる変化を起こす。LC を TCSA 溶液に浮遊させ UVA を照射すると、適当量では LC の MHC クラス II および CD86 発現が増す。この両表面分子の発現亢進は一部の LC に同時にみられる。また TCSA のみあるいは UVA のみではこうした LC 上の変化は起こらないため、TCSA が UVA の作用により LC の表面に共有結合した結果、シグナル伝達が起こったものと考えられる。すなわち UVA 照射下で光ハプテンは光アレルゲンとして作用するばかりではなく、LC の抗原提示にかかわる機能も亢進させる¹⁷⁾。

f. 光ハプテンに対する T 細胞反応

光ハプテンに対する T 細胞の反応には当然ながら MHC 拘束性があり、また過敏症の起こりやすさは MHC クラス II のハプロタイプに依存している。たとえばマウスの TCSA 光線過敏症では、ハプロタイプが d, b の場合、高反応性であり、k では低反応性となる¹⁰⁾。k ハプロタイプが低反応性となるのは、サプレッサー細胞である Th2 細胞が I-E 拘束性に誘導されやすいことによ

ると考えられる。あるいは現在の概念によれば調整性 T 細胞 (regulatory T 細胞) に相当するかもしれない。光ハプテン修飾 LC による光抗原特異的 T 細胞の反応には、クラス II 分子と T 細胞受容体の結合以外に、LC 上の CD86 と T 細胞上の CD28 が co-stimulatory 分子として重要である¹⁶⁾。

一つの光ハプテンが 1 クローンの T 細胞を刺激するか、複数の T 細胞クローンを増殖させるかは、光ハプテンの抗原決定基の個数や蛋白光共有結合部位の数によるだろう。マウスのキノロン反応性 T 細胞は T 細胞受容体 $V\beta 13$ を有し¹⁶⁾、TCSA 反応性 T 細胞は $V\beta 7$ をもつ¹⁸⁾。ヒトでの反応も薬剤性光線過敏症患者での末梢血単核球を用いて、一部の薬剤で確認しうる¹⁹⁾。

g. 光接触皮膚炎と薬剤性光線過敏症の違い

両者とも光ハプテンの投与によって起こる疾患としても、その投与経路は異なる。光接触皮膚炎では経皮的であり、薬剤性光線過敏症では経口的である。皮膚に UV が当たり表皮細胞が光ハプテン化され、その過敏症の誘導に LC が関与するのは共通であろう (図 24-4)。しかし、アレルギー性光接触皮膚炎の組織学的反応は湿疹型であるが、薬剤性光線過敏症のそれは多様であり、苔癬型組織反応をとることすらある。光ハプテンの表皮への到達経路は、光接触皮膚炎の場合は角層側からであり、薬剤性光線過敏症では基底層側からである。したがって表皮細胞の光ハプテン化の分布には両者間で差が生じることになる。こうした密度勾配が組織反応の違いを生ずるかもしれない。両者とも光ハプテン特異的 CD4 陽性細胞が過敏症発症にかかわるが、病変誘発には

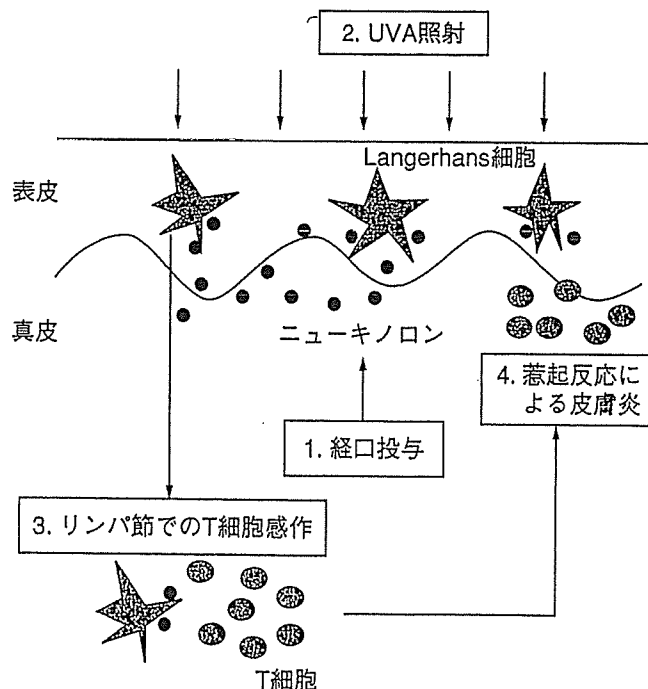


図 24-4 薬剤性光線過敏症の発症機序

CD8 陽性の参加も重要であろう。この CD8 陽性 T 細胞関与の軽重も表皮細胞での光抗原の密度勾配によって生ずるかもしれない。

h. 自己免疫性光線過敏症: 光抗原によらない光線過敏症の存在

慢性光線過敏性皮膚炎 chronic actinic dermatitis (CAD) はそれまで、呼称されていたいくつかの光線過敏症の名称を統合する形で生まれた疾患概念であり、基本的に慢性であって原因が不明の疾患を念頭にこう呼称している²⁰⁾。persistent light reaction, actinic reticuloid もこの疾患概念に含まれ、光抗原の投与なくして持続的に光線過敏症を引き起こす状態を指し、患者自身を persistent light reactor とよんでいる。persistent light reactor 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 UV に感受性をもつようになってしまった状態と解される。しかしその機序はいまだ明瞭ではなく、光感受性物質なしに UV が自己反応性 T 細胞を何らかの機序で活性化させてしまう可能性、また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、など考えられている。

いずれにしても、こうした光線過敏症は光ハプテンやプロハプテンによらないアレルギー性光線過敏症が存在することを示唆している。UV 照射がいかにかこうした過敏症のもとになる自己抗原(?)の修飾を行うか、あるいはアジュバント効果を発揮するのか、またそもそも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不明であり、今後解明されなければならない問題である。

- 文献
- 1) Tokura Y. Quinolone photoallergy: photosensitivity dermatitis induced by systemic administration of photohaptenic drugs. *J Dermatol Sci* 1998; 18: 1-10.
 - 2) Tokura Y, et al. Immunological mechanisms of contact photosensitivity. *Eur J Dermatol* 1993; 3: 87-91.
 - 3) Tokura Y. Immunological and molecular mechanisms of photoallergic contact dermatitis. *J UOEH* 2003; 25: 387-95.
 - 4) Tokura Y, Iwamoto Y, Mizutani K, et al. Sparfloxacin phototoxicity: potential photoaugmentation by ultraviolet A and B sources. *Arch Dermatol Res* 1996; 288: 45-50.
 - 5) Tokura Y, Nishijima T, Yagi H, et al. Photohaptenic properties of fluoroquinolones. *Photochem Photobiol* 1996; 64: 838-44.
 - 6) Yamamoto O, Tokura Y. Photocontact dermatitis and chloracne: two major occupational and environmental skin diseases induced by different actions of halogenated chemicals. *J Dermatol Sci* 2003; 32: 85-94.
 - 7) Hashizume H, Tokura Y, Oku T, et al. Photodynamic DNA-breaking activity of serum from patients with various photosensitivity dermatoses. *Arch Dermatol Res* 1995; 287: 586-90.
 - 8) Tokura Y, Edelson RL, Gasparro FP. Formation and removal of 8-MOP-DNA photoadducts in keratinocytes: effects of calcium concentration and retinoids. *J Invest Dermatol* 1991; 96: 942-9.
 - 9) Tokura Y. Immune responses to photohaptens: implications for the mechanisms of photosensitivity to exogenous agents. *J Dermatol Sci* 2000; 23 suppl: 6-9.
 - 10) Tokura Y, et al. Genetic control of contact photosensitivity to tetrachlorosalicylanilide. I. Preferential activation of suppressor T cells in low responder H-2k mice. *J Invest Dermatol* 1990; 94: 471-6.

- 11) Tokura Y, Ogai M, Yagi H, et al. Afloqualone photosensitivity: immunogenicity of afloqualone-photomodified epidermal cells. *Photochem Photobiol* 1994; 60: 262-7.
- 12) Yokote R, Tokura Y, Igarashi N, et al. Photosensitive drug eruption induced by flutamide. *Eur J Dermatol* 1998; 8: 427-9.
- 13) Tokura Y, Seo N, Fujie M, et al. Quinolone-photoconjugated MHC class II -bearing peptides with lysine are antigenic for T cells mediating murine quinolone photoallergy. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 1206-11.
- 14) Tokura Y, Satoh T, Yamada M, et al. In vitro activation of immune lymph node cell proliferation by photohaptens-modified cells in murine contact photosensitivity. *Arch Dermatol Res* 1991; 283: 203-9.
- 15) Ohshima A, Seo N, Takigawa M, Tokura Y. Formation of antigenic quinolone photoadducts on Langerhans cells initiates photoallergy to systemically administered quinolone in mice. *J Invest Dermatol* 2000; 114: 569-75.
- 16) Tokura Y, Seo N, Yagi H, Furukawa F, Takigawa M. Cross-reactivity in murine fluoroquinolone photoallergy: exclusive usage of TCR V β 13 by immune T cells that recognize fluoroquinolone-photomodified cells. *J Immunol* 1998; 160: 3719-28.
- 17) Nishijima T, Tokura Y, Imokawa G, et al. Photohaptens TCSA painting plus UVA irradiation of murine skin augments the expression of MHC class II molecules and CD86 on Langerhans cells. *J Dermatol Sci* 1999; 19: 202-7.
- 18) Yagi H, Tokura Y, Wakita H, et al. TCRV β 7 + Th2 cells mediate UVB-induced suppression of murine contact photosensitivity by releasing IL-10. *J Immunol* 1996; 156: 1824-31.
- 19) Tokura Y, Seo N, Ohshima A, et al. Lymphocyte stimulation test with drug-photomodified cells in patients with quinolone photosensitivity. *J Dermatol Sci* 1999; 21: 34-41.
- 20) Menage HP, Breathnach SM, Hawk JLM. Chronic actinic dermatitis. In: Krutmann J, Elmetts CA, editors. *Photoimmunology*. London: Blackwell Science Ltd; 1995. p.187-98.

〈戸倉新樹〉