

接触光過敏症のマウスモデルを用いた化粧品による光アレルギーのスクリーニングおよびサンスクリーンの効果の評価

浜松医科大学

滝川 雅 浩

Contact photosensitivity (CPS) is successfully induced in mice by application of photosensitizing agents plus irradiation with ultraviolet A (UVA). By using this mouse model, we evaluated the photoallergenicity of cosmetic agents and the protective-ness by sunscreens. Photoallergic cutaneous responses were induced by photosensitizing agents, including tetrachlorosalicylanilide (TCSA), tribromosalicylanilide, bithionol, musk ambrette, and methylcoumarin. In CPS to TCSA, two UVA-absorbing sunscreens, benzophenone-3 and Parsol 1789, dramatically inhibited the CPS response, whereas the two UVB-absorbers, p-aminobenzoic acid and 2-ethyl-hexyl-p-methoxycinnamate, exhibited much less suppressive effect. These findings indicated that the murine CPS model is useful for screening of photoallergenicity of cosmetics and evaluation of photoprotectiveness by sunscreens.

1. 緒 言

我々はマウスを用いた接触光過敏症の実験モデルを確立し、テトラクロロサリチルアニリド (TCSA) の光アレルギー反応を、剃毛腹部にTCSAを塗布し同部に長波長紫外線 (UVA) を照射することにより誘導しうることを示した^{1, 2)}。この過敏症反応はT細胞による遅延型反応であり¹⁻³⁾、主要組織適合抗原遺伝子複合体に支配されている^{1, 4)}。このマウスの実験系を化粧品の光アレルギー能のスクリーニングおよびサンスクリーンのUVAに対する遮断効果の評価に利用することは可能である。

化粧品には古くは殺菌剤であるハロゲン化フェノールや人工香料であるマスクアムブレットを含

んだものが使われ、それらが光接触皮膚炎の原因となった。現在使われているあるいは将来使われる化粧品にも光アレルギーを惹起する新たな物質が含まれている可能性があり、個々の化粧品における光アレルギー能のスクリーニングが必要とされる。また一方では現在サンスクリーンの使用が注目されており、その遮断波長として中波長紫外線 (UVB) のみならずUVAの遮断が期待されている。遮断効果の評価において生体系を用いての検討が望まれるが有用な方法は確立していない。本研究ではこうした化粧品による光アレルギー能のスクリーニングとサンスクリーンの効果の評価という2点について、接触光過敏症のマウスモデルを用いて検討した。

2. 実 験

2.1 光アレルギー能のスクリーニング

基本となる接触光過敏症の感作と惹起のプロトコールは、マウス剃毛腹部に試験物質を塗布しUVA照射を行い光感作し (day 0, 1)、day 5に耳翼に試験物質塗布プラスUVA照射を行い光惹起する方法である¹⁾。過敏症の程度は光惹起

Screening for photoallergenicity of cosmetic agents and evaluation of photo-protection by sunscreen agents using a mouse model of contact photosensitivity



Masahiro Takigawa
Hamamatsu University
School of Medicine

の翌日耳翼腫脹を測定し、耳翼厚の増加分をもって表した。光アレルギーを通常の接触アレルギーと区別考慮するために、惹起の際、左耳翼に光惹起、右耳翼に単に試験物質を塗布するだけの惹起を行った¹⁾。また過敏症反応を増強させるために光感作の2日前にシクロフォスファミドを腹腔内投与する群をも併せて検討した^{5, 6)}。試験物質としては、TCSA、トリプロモサリチルアニリド(TBS)、ピチオノール、マスクアムプレットを検討した。

2.2 サンスクリーン剤の効果の評価

TCSAを光ハプテンとする接触光過敏症において、光惹起の際、UVA照射前に耳翼にサンスクリーン剤を塗布し、耳翼腫脹の抑制度を調べた⁷⁾。サンスクリーン剤としてはbenzophenone-3, Parsol 1789, p-aminobenzoic acid (PABA), 2-ethyl-hexyl-p-methoxycinnamate (EHMC)を用い、1%および5%にエタノールにて溶解したものを検討した⁷⁾。

TCSAと表皮細胞との結合物の定量は、TCSA塗布、UVA照射した耳翼より表皮細胞浮遊液を作製、これをfreezing/thawing, sonicationして抽出物を得、TCSA結合物の吸収波長である260nm付近での吸光度を測定することによって行った⁸⁾。結果は無処置表皮細胞抽出物の吸光度でサブトラクションして表した。

3. 結果

3.1 光接触性皮膚炎を起こす種々の物質の光アレルギー能

マウス剃毛腹部に試験物質であるTCSA、トリプロモサリチルアニリド、ピチオノール、マスクアムプレットを塗布後UVAを照射し、耳翼に当該物質プラスUVA照射にて惹起した。この結果、全ての検討物質において有意な耳翼腫脹が認められ、光アレルギー能が確認された⁹⁾。特にTCSAは強い光接触性皮膚炎反応を示した。UVA照射無しに感作物質塗布のみを行った右耳の腫脹は非常に弱く、得られた反応が光アレルギー反応であることが確認された¹⁾。光感作の2日前にシクロフォスファミドを腹腔内投与することにより、耳翼腫脹反応の比較的弱い物質でも実質的な耳翼腫脹を得ることができた⁶⁾。

3.2 TCSA接触光過敏症におけるサンスクリーン剤の抑制効果

TCSAを光ハプテンとする接触光過敏症において、光惹起の際、UVA照射前に耳翼にサンスクリーン剤であるbenzophenone-3, Parsol 1789, PABA, EHMCを塗布し、耳翼腫脹の抑制度を検討した。Figure 1に示すように、benzophenone-3, Parsol 1789はUVAサンスク

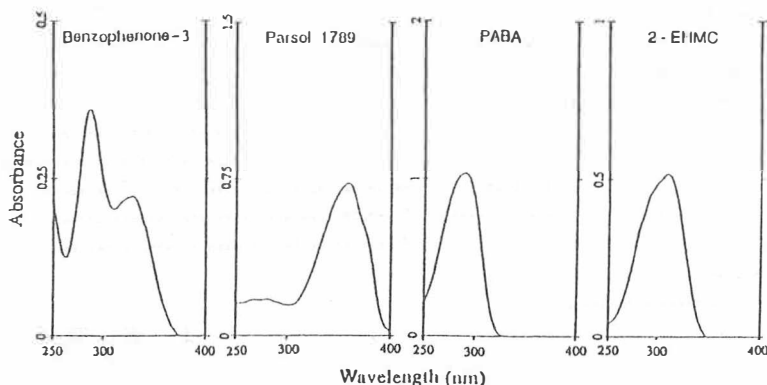


Fig.1 Absorption spectra of four sunscreen ingredients

リーンであり、PABA, EHMCはUVBサンスクリンである。Table 1に結果を掲げる。5%溶液においてはbenzophenone-3, Parsol 1789は強い抑制効果を示し、PABA, EHMCの抑制は中等度であった(experiment 1)。1%溶液ではbenzophenone-3, Parsol 1789は依然強く接触過敏症を抑制し、PABA, EHMCは影響を与えなかった(experiment 2)。よってUVAサンスクリンはUVBサンスクリンより明らかに強いサンスクリン効果を示した。またこのサンスクリンの抑制効果は通常の接触過敏症であるDNFB接触過敏症には何ら影響を与えなかった(experiment 3)。

Table 1 Effects of sunscreens on the elicitation of contact photoallergy and ordinary contact allergy

Group	Sensitization	Challenge	Sunscreen agent	Ear swelling response \pm SE ($\times 10^{-2}$ cm)
Experiment 1 (5% sunscreen solution)				
A	TCSA/UVA	TCSA/UVA	Benzophenone-3	0.3 \pm 0.22 ^{a, b}
B	TCSA/UVA	TCSA/UVA	Parsol 1789	0.5 \pm 0.20 ^{a, b}
C	TCSA/UVA	TCSA/UVA	PABA	2.0 \pm 0.14 ^a
D	TCSA/UVA	TCSA/UVA	2-EHMC	2.1 \pm 0.17 ^a
E	TCSA/UVA	TCSA/UVA	Vehicle	4.5 \pm 0.59
F	-	TCSA/UVA	-	0.5 \pm 0.18
Experiment 2 (1% sunscreen solution)				
A	TCSA/UVA	TCSA/UVA	Benzophenone-3	1.0 \pm 0.46 ^a
B	TCSA/UVA	TCSA/UVA	Parsol 1789	0.8 \pm 0.25 ^a
C	TCSA/UVA	TCSA/UVA	PABA	3.3 \pm 0.46 ^c
D	TCSA/UVA	TCSA/UVA	2-EHMC	3.5 \pm 0.18 ^c
E	TCSA/UVA	TCSA/UVA	Vehicle	4.3 \pm 0.25
F	-	TCSA/UVA	-	0.8 \pm 0.25
Experiment 3 (5% sunscreen solution)				
A	DNFB	DNFB	Benzophenone-3	8.1 \pm 0.51 ^c
B	DNFB	DNFB	Parsol 1789	9.0 \pm 0.70 ^c
C	DNFB	DNFB	PABA	8.5 \pm 0.96 ^c
D	DNFB	DNFB	2-EHMC	8.5 \pm 0.87 ^c
E	DNFB	DNFB	Vehicle	8.9 \pm 0.88
F	-	DNFB	-	1.8 \pm 0.25

^a $p < 0.01$, compared with Group E.

^b $p < 0.01$, compared with Groups C and D.

^c statistically not significant, compared with Group E.

UVAサンスクリンであるbenzophenone-3, Parsol 1789はUVBサンスクリンである

PABA, EHMCより顕著なTCSA表皮細胞結合物生成に対する抑制を示し(Figure 2)、サンスクリンがTCSAと表皮細胞の結合を阻止することによって接触光過敏症の惹起反応を抑えることが示された⁷⁾。各サンスクリンの抑制度をTable 2に掲げる。

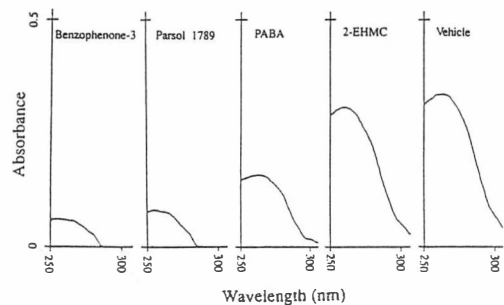


Fig. 2 Absorbance spectrum of TCSA-epidermal cell photoadducts formed in earlobes. Five % solutions of sunscreen were applied to earlobes before irradiation. The values represent the absorbance of extracts equivalent to 2×10^7 cells/ml. The data were expressed by subtracting the absorbance of extracts from the same number of epidermal cells obtained from mice untreated with TCSA and sunscreens.

Table 2 Amounts of TCSA-epidermal cell photoadducts formed in earlobes

Sunscreen agent ^a	Absorbance at peak absorption wavelength \pm SE ^b ($\times 10^{-2}$)
Benzophenone-3	5 \pm 1 ^c
Parsol 1789	10 \pm 1 ^c
PABA	21 \pm 4 ^d
2-EHMC	26 \pm 3 ^d
Vehicle	27 \pm 4

^a Five % solutions were applied to earlobes before irradiation.

^b The data represent the mean of peak absorbance between 254-262 nm in extracts equivalent to 2×10^7 cells/ml.

^c $p < 0.05$, compared with the vehicle group.

^d statistically not significant, compared with the vehicle group.

4. 考 察

今回の実験結果はマウス接触光過敏症が化粧品

の光アレルギー能のスクリーニングおよびサンスクリーンのUVAに対する遮断効果の評価に利用できることを示した。各光感作物質の耳翼腫脹度には差があり、惹起反応の弱いものもあったがシクロフォスファミドを前投与することにより反応をより顕現化することができた。化粧品に含まれる香料、植物由来の成分は、現在においても光アレルギー能を有するものが存在すると考えられ、さらにはサンスクリーン、ボディローションはそれ自体日光暴露を前提として使用されるため、本モデルを用いた光アレルギー能のスクリーニングは利用価値が高いと考えられる。またマウスを用いるため個々の化粧品における接触光過敏症の免疫学的な機序解明を可能とする。

TCSA 接触光過敏症モデルはUVA サンスクリーンの光遮断能を評価するうえで、有用であることも明らかとなった。この遮断効果は光ハプテンが表皮細胞に光結合するステップを抑えることによって起こされる。TCSA は蛋白と光結合することが明らかとなっており、恐らく接触光過敏症の initial step はTCSA が表皮ケラチノサイトの膜あるいは細胞質の蛋白に光結合することによって生じると考えられる⁸⁾。サンスクリーンはUVAを吸収することにより、このstepを抑制するといえる⁷⁾。サンスクリーンによるUVAの遮断は、臨床的にUVAを作用波長とする皮膚疾患が多いこと、UVAが色素沈着の原因波長となることなどより注目を集めている。この意味において、本系は従来の物理学的計測法に加えて、in vivoの系でのサンスクリーンの効果の評価を可能とする。

文 献

- 1) Takigawa M, Miyachi Y : Mechanisms of contact photosensitivity in mice. I. T cell regulation of contact photosensitivity to tetrachlorosalicylanilide under the genetic restrictions of the major histocompatibility complex. *J Invest Dermatol* 79 : 108-115, 1982.
- 2) Tokura Y, Takigawa M : Immunological Mechanisms of contact photosensitivity. *Eur J Dermatol* 3 : 87-91, 1993.
- 3) Tokura Y, Takigawa M, Yamada M : Induction of contact photosensitivity to TCSA using photohapten-modified syngeneic spleen cells. *Arch Dermatol Res* 280 : 207-213, 1988.
- 4) Tokura Y, Satoh T, Takigawa M, Yamada M : Genetic control of contact photosensitivity to tetrachlorosalicylanilide. I. Preferential activation of suppressor T cells in low responder H-2k mice. *J Invest Dermatol* 94 : 471-476, 1990.
- 5) Takigawa M, Miyachi Y, Toda K, Yoshikoka A : Mechanisms of contact photosensitivity in mice. IV. Antigen-specific suppressor T cells induced by preirradiation of photosensitizing site to UVB. *J Immunol* 132 : 1124-1129, 1984.
- 6) Miyachi Y, Takigawa M : Mechanisms of contact photosensitivity in mice. III. Predictive testing of chemicals with photoallergenic potential in mice. *Arch Dermatol* 111 : 736-739, 1983.
- 7) Tokura Y, Yagi H, Ihda H, Takigawa M : Evaluation of ultraviolet-A protection by sunscreen agents using a mouse model of contact photoallergy. *J Dermatol Sci* 7:39-44, 1994.
- 8) Tokura Y, Yagi H, Satoh T, Takigawa M : Inhibitory effect of melanin pigment on sensitization and elicitation of murine contact photosensitivity : Mechanism of low responsiveness in C57BL/10 background mice. *J Invest Dermatol* 101 : 673-678, 1993.