

サンスクリーン剤の光ハプテンとしての性格

浜松医科大学

戸倉新樹

Sunscreen agents are widely used for photoprotection of patients with photosensitivity as well as normal individuals receiving intense sun exposure. However, some of these agents are also known to induce photoallergic contact dermatitis as an adverse effect. To evaluate the photoallergenicity of sunscreens, including benzophenone-3, Parsol 1789, p-aminobenzoic acid, and 2-ethyl-hexyl-p-methoxycinnamate, we examined the ability of epidermal cells photomodified with these sunscreen agents to evoke delayed-type hypersensitivity in mice. For preparation of sunscreen-photomodified epidermal cells, murine epidermal cells were suspended in aqueous solutions of these sunscreens and irradiated with ultraviolet A. Mice were sensitized with subcutaneous injection of the sunscreen-photomodified epidermal cells and challenged with the photomodified epidermal cells into hind pad. The footpad swelling was measured 24 h after injection of the photomodified cells. Benzophenone-3-photomodified epidermal cells successfully immunized and elicited delayed-type hypersensitivity in mice, whereas no significant footpad swelling was induced by the other three sunscreen agents. This suggests that some of sunscreen agents have a potential to induce photoallergic contact sensitivity and that the present method is useful to estimate the photoallergic potency of sunscreens.

1 緒言

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、原因的には、1) 内因性の光感受性物質生成（ポルフィリン症）、2) 外因性光感受性物質投与（薬剤性光線過敏症、光接触皮膚炎）、3) DNA修復機序の異常（色素性乾皮症）、4) その他原因不明のもの（日光蕁麻疹、種痘様水疱症、多形日光疹、慢性光線性皮膚炎）などに分けられる¹⁾。光接触皮膚炎はある物質が皮膚に塗布され、同部位に光が照射されて生ずる皮膚炎である²⁾。近年、光接触皮膚炎をおこす物質の種類は新しい化粧品や薬の登場とともに増加し、新製品開発の段階で光線過敏症をおこすポテンシャルがあるか否かの検討は重要となってきている^{3, 4)}。光接触皮膚炎には光毒性機序でおこる

場合と、より顕著な皮膚炎をおこす光アレルギー性機序でおこる場合とがある^{3, 4)}。光毒性は様々な *in vitro* の方法で検討しうることが知られているが、光アレルギー性を人体を使わず調べる方法は確立したものがなく重要な課題とされてきた。サンスクリーン製剤はそれ自体、日光照射を前提として使用されるため、その光線過敏性、特に光アレルギー能は検討されるべき課題である。事実、サンスクリーン剤によって生じた光接触皮膚炎の症例はかなり報告されており、臨床的に非常に注意を払うべき点となっている⁵⁻⁷⁾。今回我々はマウスの遅延型過敏症を用いてサンスクリーン剤の光アレルギー能を評価することを試みた。

2 実験

2.1 被験物質とその溶液の調整

サンスクリーン剤として、長波長紫外線（UVA）の吸収剤である 2-hydroxy-4-methoxy-benzophenone（benzophenone-3, oxybenzone, 和光純薬）、4-tertiary-butyl-4'-methoxydibenzoylmethane（Parsol 1789, 和光純薬）、中波長紫外線（UVB）の吸収剤である p-aminobenzoic acid（PABA,

Photohaptenic properties of sunscreen agents



Yoshiki Tokura

Department of Dermatology,
Hamamatsu University School
of Medicine

東京化成)、2-ethyl-hexyl-p-methoxycinnamate (2-EHMC, 和光純薬)を用いた⁸⁾。陽性コントロールとしてすでに光アレルギー性物質であることが明らかとなっている3, 4, 4', 5-tetrachlorosalicylanilide(TCSA)⁹⁾, afloqualone(AQ)¹⁰⁾、ニューキノロン系薬剤であるlomefloxacin(LFLX), ciprofloxacin (CPF), norfloxacin (NFLX), ofloxacin (OFLX), levofloxacin (LVFX), fleroxacin (FLRX), enoxacin(ENX), sparfloxacin (SPFX)を用い^{3, 11)}、陰性コントロールとしてnaproxen(NPX)を使用した。各製剤(0.4mM)をリン酸緩衝液(PBS, pH7.4)にて溶解した。

2.2 被験物質と表皮細胞との光結合

7-8週齢BALB/cマウス耳翼よりトリプシン処理にて作製した表皮細胞¹²⁾を各被験物質(0.4mM)のPBS溶液に 5×10^6 /mlで浮遊させた。これをプラスチックディッシュに移し、UVAを 1.5 J/cm^2 照射した。その後PBSで3回洗浄して薬剤光修飾表皮細胞として用いた。

2.3 被験物質光修飾表皮細胞による遅延型過敏症の感作と惹起

BALB/cマウス左下背部に被験物質光修飾表皮細胞(10^7 /0.2ml PBS/マウス)を皮下投与し感作後、5日目に同光修飾表皮細胞(4×10^6 /0.02ml PBS/マウス)を足蹠に皮内投与し惹起した。24時間後に足蹠腫脹を計測し遅延型過敏症の程度とした¹³⁾。

3 結果

3.1 被験物質と表皮細胞とのUVA光結合

マウス耳翼より作製した表皮細胞を各被験物質のPBS溶液に浮遊させ、これにUVAを照射した。一部の被験物質は紫外線照射下で蛍光を発するため、蛍光顕微鏡下で物質が表皮細胞に結合することを確認できた^{11, 14)}。TCSA, AQ, LFLX, CPF, NFLX, OFLX, LVFX, FLRX, ENX では光修飾表皮細胞

は強い蛍光が認められた。典型的な光ハプテンである TCSA は同時に強い光毒性を有しているため、TCSA光修飾細胞のviabilityは著しく低い¹⁵⁾、Benzophenone-3, Parsol 1789, PABA, 2-EHMC, AQ, LFLX, CPF, NFLX, OFLX, LVFX, FLRX, ENX, SPFXはUVA照射でも高いviabilityを示した(表1)。

表1. 各被験物質光修飾表皮細胞のviability
*トリパンブルー色素排除による

被験物質	Viability (%)*
Benzophenone-3	73
Parsol 1789	75
PABA	78
2-EHMC	81
TCSA	<1
AQ	71
NPX	87
LFLX	74
CPF	85
NFLX	71
OFLX	71
LVFX	72
FLRX	71
ENX	63
SPFX	53

3.2 被験物質光修飾表皮細胞による遅延型過敏症(delayed-type hypersensitivity, DTH)の誘導

各被験物質光修飾表皮細胞を皮下投与することによりマウスを感作、惹起し^{11, 14)}、誘導されたDTH反応の程度を調べた。アレルギー性光感作物質として知られるAQ, ニューキノロン系薬剤8種は有意な(p<0.05)DTH反応を誘導した(図1)。AQ, TCSAにおいて交叉反応があるか否かを検討したところ、感作と惹起の両方において同じ薬剤光修飾表皮細胞を用いた場合のみ有意なDTH反応がみられ、抗原特異的な反応であることが確認された。

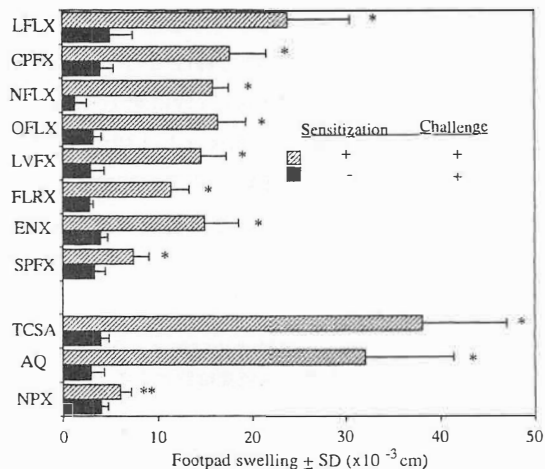


図1. TCSA, AQ, ニューキノロン剤の光修飾細胞によるDTH反応
* $p < 0.05$, ** $p > 0.1$, 惹起のみのグループと比較して。

以上の陽性コントロールにおいてマウスを被験物質修飾表皮細胞にて感作、惹起できることが明らかになったため、4種のサンスクリーン剤の光修飾細胞のDTH反応感作能を検討した。

図2に示すように、benzophenone-3はマウスを感作可能であったが、他の3種類のサンスクリーン剤を用いた場合には、有意なDTH反応は認められなかった。

考察

単純化学物質の光アレルギー性は、同剤が光ハプテンとしての性格、すなわち紫外線照射下で近傍の蛋白と共有結合し完全抗原となるという性質を持っているために起こると考えられる²⁾。代表的な例としてAQは297nmに吸収波長のピークを持つが、UVAを照射するとそのピークは長波長側に移動する。このAQ由来の吸収波長は牛血清アルブミン (BSA) と光結合したAQ-BSA複合体でもみられ、280nmにおいてはBSAとAQ-BSA複合体を、320nmにおいてはAQ-BSA複合体のみを検出することができる。スペクトロフォトメータを用いて Sephadex LH-20クロマトグラフィで分けた各溶出

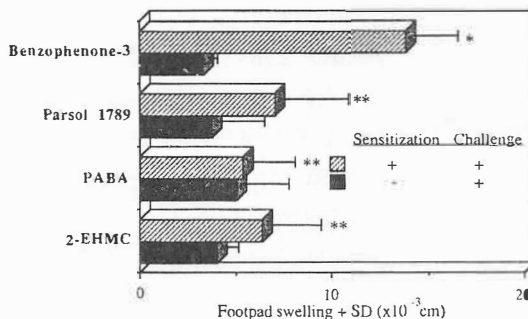


図2. サンスクリーン剤の光修飾細胞によるDTH反応 * $p < 0.05$, ** $p > 0.1$, 惹起のみのグループと比較して。

分画を、280nm、320nmの吸光度でモニタリングすると、UVAを照射したときのみAQはBSAとともに高分子フラクションに溶出され、UVAによりAQとBSAが光共有結合することを確認しうる¹⁰⁾。AQ以外にもニューキノロンをはじめとする光線過敏性薬剤はUVA照射により蛋白と共有結合し、薬剤-蛋白複合体を形成することが明らかとなっている^{3, 11)}。この性格はアレルギー性光線過敏性物質のかなりの部分に共通の特性と考えられる。この特質のため被験物質溶液中に浮遊させた表皮細胞にUVAを照射すると、同剤は表皮細胞の細胞膜、細胞質の蛋白に共有結合し、当該物質光修飾細胞を作ることができる。

光アレルギー性物質を光修飾した表皮細胞を同系マウスに皮下投与し感作後、同修飾細胞を足蹠に注入することにより、遅延型過敏症を誘導することができた。このことは同光修飾表皮細胞が高い抗原性を有していることを表しており、実際の光線過敏性皮膚炎でも光修飾表皮細胞上に、光アレルギー性物質がその一部を担う抗原が存在することを示唆する。光修飾細胞が抗原性を持つということは、代表的な光ハプテンであるTCSAの場合と同じであり^{2, 9)}、こうした物質が光ハプテンとしての性質を備えていることを示している。LFLX, CPFX, NFLXにおいて、それぞれの薬剤の光修飾表皮細胞で感作したマウスより得たリンパ節細胞をresponderとし、stimulatorとして対応す

るニューキノロン光修飾ランゲルハンス細胞を用い *in vitro* で培養すると、responderである感作リンパ球の増殖反応が得られる^{3, 11)}。このことは光修飾細胞が *in vitro* においても高い抗原性、すなわち光アレルギー反応を引き起こす性質を持っていることを示している。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TCSA光修飾表皮細胞のviabilityは1%以下となり、他の生きた抗原提示細胞に新たにプロセッシング、プリゼンテーションされないと responder T細胞を刺激できない¹⁵⁾。一方LFLX, CPFX, NFLXの光修飾表皮細胞のviabilityは高くTCSAに比べ細胞毒性は弱い。従って他の抗原提示細胞を添加しなくても *in vitro* での増殖反応を誘導することができると考えられる。

こうしたマウスDTHの実験系を用いた結果、サンスクリーン剤のあるものは光アレルギー能を有することが明らかとなった。今回の4種の検討ではbenzophenone-3が最も強い光ハプテンとしての性格を持っていた。このサンスクリーン剤はすでに臨床的にもアレルギー性光接触皮膚炎をおこすことが報告されており⁴⁻⁷⁾、今回のマウスを用いた検討と符号する。サンスクリーン剤は日光が照射される皮膚に用いられることが前提であり、その使用には注意が必要となる。

マウスの遅延型過敏症を利用したこの実験系は、ある物質が光アレルギー能を有するか否かを人体を用いずに調べうことを示している。また当該物質による光線過敏症が、光ハプテンとしての性格を持っているために起こっているか否かも検討可能である。さらには感作リンパ球を用いて *in vitro* の実験系でも可能であり今後有用な方法と考えられる。

文 献

1. 戸倉新樹：光線過敏症： *medicina* 32 606-607 1995
2. Tokura Y, Takigawa M : Immunological mechanism of contact photosensitivity. *Eur. J. Dermatol.* 3 87-91 1993
3. 戸倉新樹：ニューキノロンによる光線過敏症。 *臨皮* 49 17-21 1995
4. Thompson G, Maibach H, Epstein J : Allergic contact dermatitis from sunscreen preparations complicating photo-dermatitis. *Arch. Dermatol.* 113 1252-1253 1977
5. Holzle E, Plewig G : Photoallergische kontaktdermatitis durch benzophenonhaltige Sonnenschutzpreparate. *Hautarzt* 33 391-393 1982
6. Knobler E, Almeida L, Ruzkowski AM, Held J, Harber L, DeLeo V : Photoallergy to benzophenone. *Arch. Dermatol.* 125 801-804 1989
7. Deleo VA, Suarez SM, Maso MJ : Photoallergic contact dermatitis. *Arch. Dermatol.* 128 1513-1518 1992
8. 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
9. 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.* 9 4471-476 1990
10. Tokura Y, Ogai M, Yagi H, Takigawa M : Afloqualone photosensitivity : Immunogenicity of afloqualone-photomodified epidermal cells. *Photochem. Photobiol.* 60 262-267 1994
11. 戸倉新樹、西島貴史、八木宏明、滝川雅浩：薬剤の光アレルギー能：マウス遅延型過敏症による評価。 *臨床薬理* 26 219-220 1995
12. Tokura Y, Satoh T, Yamada M, Takigawa M

- : Genetic control of contact photosensitivity to tetrachlorosalicylanilide. II. Igh complex controls the sensitivity induced by photohaptten-modified spleen cells but not epidermal cells. *Cell. Immunol.* 135 195-207 1991
13. Tokura Y, Yagi, 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
14. Tokura Y, Takigawa M, Yamada M : Induction of contact photosensitivity to TCSA using photohapttenmodified syngeneic spleen cells. *Arch. Dermatol. Res.* 280 207-213 1988
15. Tokura Y, Satoh T, Yamada M, Takigawa M : In vitro activation of immune lymph node cell proliferation by photohapttenmodified cells in murine contact photosensitivity. *Arch. Dermatol. Res.* 283 203-209 1991