

# 化粧品素材の皮膚アレルギーにおける新規スクリーニング法の開発

京都大学医学研究科皮膚科学

梶島 健治

Allergic contact dermatitis, one of the most common occupational and environmental diseases, is caused by foreign antigen exposed to the skin. The contactant diverges into wide range of materials, such as metal, chemical, and resin. Photo contact dermatitis is caused by ultraviolet exposure in addition to exogenous materials, such as NSAIDs.

For evaluating the safety of each material, it has been requested to use *in vitro* systems instead of using animal models these days. Since contact dermatitis and photo contact dermatitis are based on the chain reaction of immune cells, it is not satisfactory to assess these issues only using single cell line. Therefore, we sought use several cell lines in combination and estimate the safety and effect on each immunological step in contact and photo-contact dermatitis.

## 1. 緒言

接触皮膚炎(いわゆるかぶれ)は皮膚に外因性抗原物質が塗布されて起こる職業性・環境性疾患全体の中でも最も頻度の多い疾患であり、化粧品を原因とするのもまれではない。接触皮膚炎は一次刺激性あるいは単に刺激性と呼ばれる接触皮膚炎と、アレルギー性接触皮膚炎とに分けられる。一方、アレルギー性接触皮膚炎は免疫学的機序を介する反応であり、感作・惹起の複雑な各ステップの解明は免疫学の大きなテーマである<sup>1,2)</sup>。

光接触皮膚炎は外因性物質塗布に紫外線(UVとくにUVA)照射が加わって生じる反応で、光毒性と光アレルギー性がある。現在頻度が高いものは、非ステロイド系消炎外用薬、サンスクリーン製剤などであり、ほとんどが光アレルギー性である。化粧品などを原因とする光接触皮膚炎もまれではなく、化粧品に含まれる物質の光アレルギー誘導能の評価は重要な課題であると思われる。

ところがこれらのスクリーニング方法としては、皮膚炎反応がそもそも生体反応であるため、ある物質が毒性、アレルギー性があるかを評価するのは歴史的には動物モデルが用いられることが多かった。しかし近年、動物を用いない*in vitro*実験を用いた代替法による評価が望まれている。これまで毒性・光毒性の*in vitro*評価は、細胞毒性評価など多くの方法があり、ある程度満足を与えるものとなっている。それに比較し、アレルギー性・光アレルギー性の反応は、免疫担当細胞の連鎖反応を基礎としているために、*in vitro*の評価を困難なものとしている。また、光

アレルギーにはプロハプテン(prohapten)と光ハプテン(photohapten)の2種類のメカニズムが存在する(図1)<sup>2)</sup>。各物質の光アレルギーにおける両者の関与を検討することも重要な課題である。

一方、免疫学の進歩に伴い、接触過敏症あるいは光接触過敏症のメカニズムが明らかになり、その各ステップを*in vitro*で検証することが可能となりつつある。そこで、アレルギー反応という多くの細胞・液性因子の関わる反応においては、*in vitro*試験で評価しうるステップをいくつか駆使し、統括的に行うことが理想的と考えられ、その実現を図ることが当研究の目的である。

## 2. 実験

接触過敏症のメカニズムは、外因性物質に対する抗原異質的なT細胞を生み出す相(感作相)と、再び侵入した当該外因性物質にT細胞が反応し皮膚炎を形成する相(惹起相)とに分かれる。特に感作相は、外因性物質が過敏症を起こしうるかを決定する最も重要な段階であると考えられる。

そこで化学物質の抗原提示細胞に対する成熟化誘導をヒト単球細胞株であるTHP-1細胞を用いて検討する。THP-1細胞はヒト単球性白血病由来の細胞株であり、単球としての性格を有する。そこで被検物質とのインキュベーションの後、フローサイトメーターによりCD54, CD86などの発現を測定することにより評価する。この際、prohaptenの検討の際にはUVA(1 J/cm<sup>2</sup>)を被検物質に直接照射し、その後THP-1と混合する。一方、photohaptenの検討の際には被検物質をTHP-1と混合培養した後にUVAを照射する(図2)。

## 3. 結果

光接触皮膚炎を誘発させる代表的な物質であるketoprofen<sup>3,4)</sup>, 3,3,4,5-tetrachlorosalicylanilide(TCSA)<sup>5,6)</sup>, sparfloxacin<sup>7,8)</sup>を各濃度で混合培養し、細胞表面上のCD54, CD86, HLA-DRの発現をflowcytometryにて解析した。すると



The development of screening method for evaluating safety on materials used for cosmetics

Kenji Kabashima

Kyoto University Graduate School of Medicine, Department of Dermatology

図3から図5のように ketoprofen では photohaptten 刺激による CD54 の上昇 (図3)、TCSA では photohaptten 刺激による CD86, HLA-DR の上昇 (図4)、sparfloxacin では

photohaptten 刺激による HLA-DR の上昇 (図5) が認められた。

### 光アレルギー性に関する2つの説

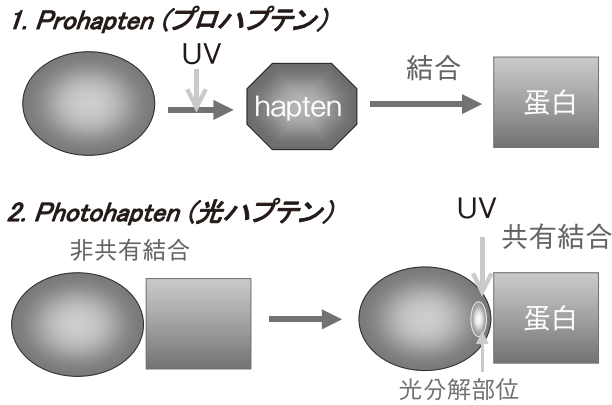


図1 prohaptten と photohaptten の違い

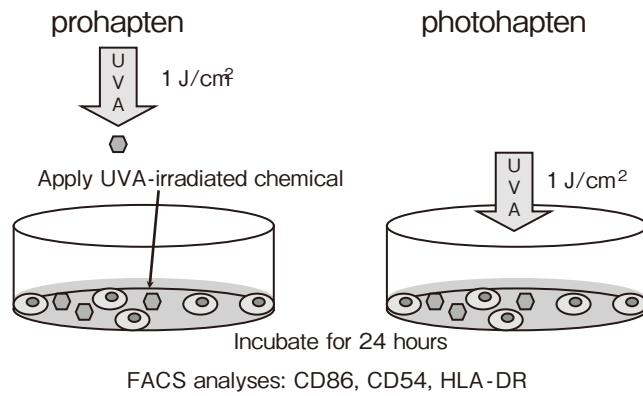


図2 THP-1 と UVA 照射による prohaptten と photohaptten 誘導方法

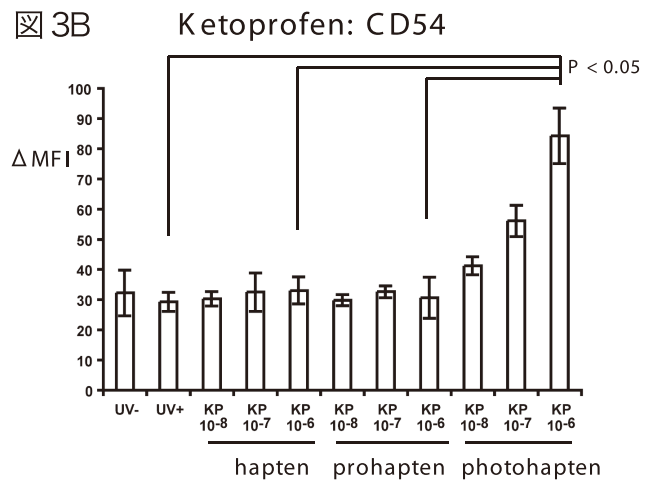
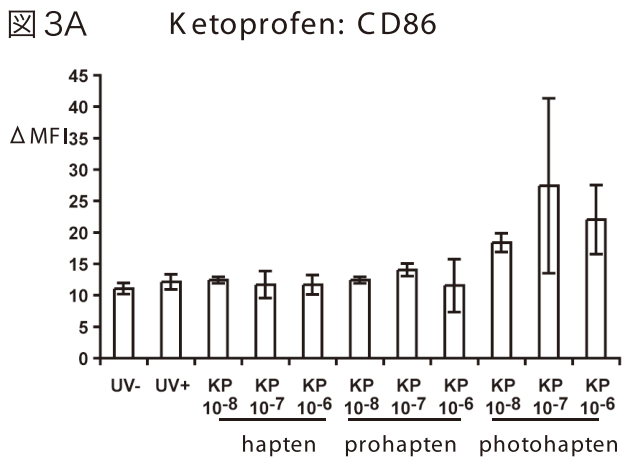


図4 Ketoprofen による prohaptten と photohaptten 誘導に対する CD86、CD54 発現

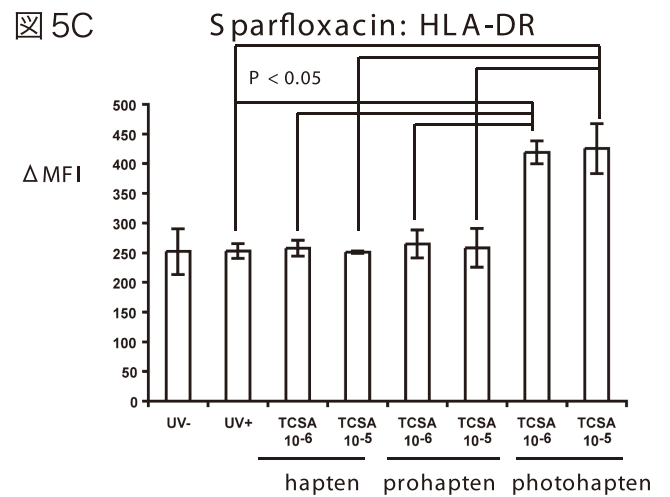
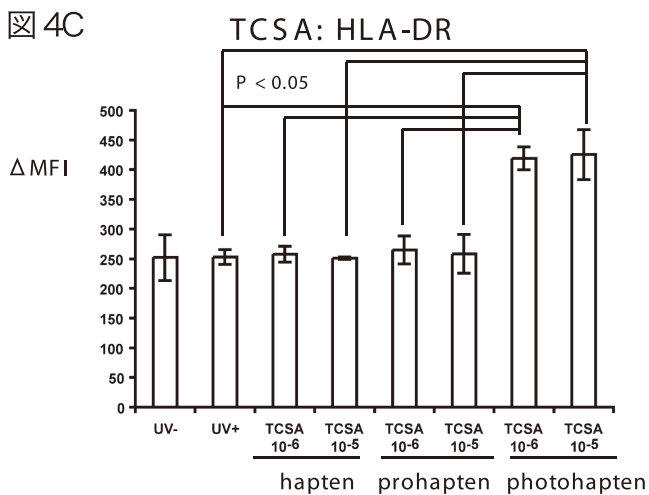
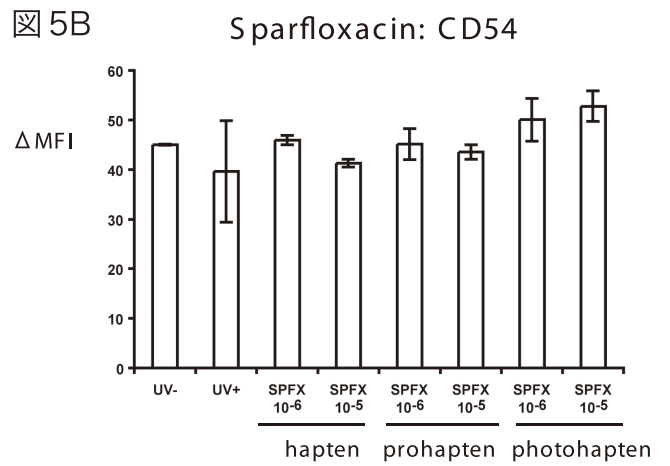
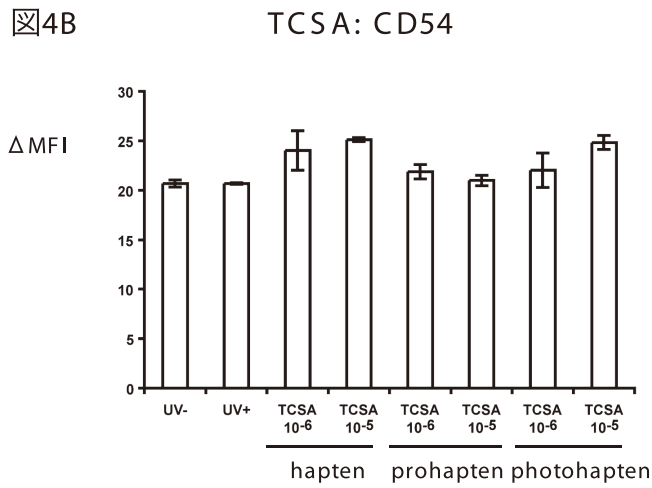
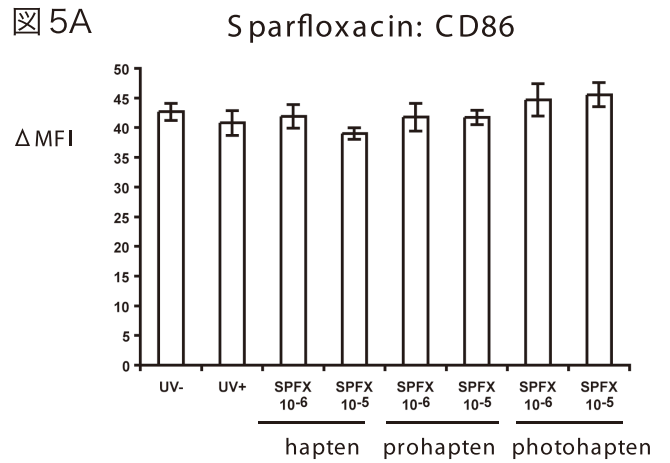
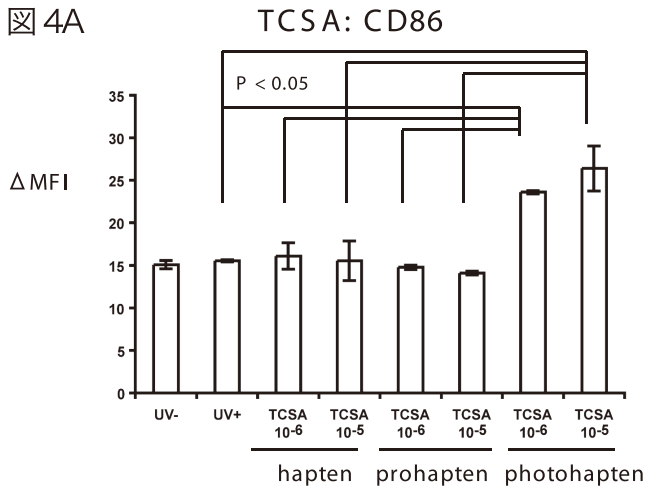


図4 TCSAによるprohaptenとphotohapten誘導に対するCD86, CD54, HLA-DR発現

図5 Sparfloxacinによるprohaptenとphotohapten誘導に対するCD86, CD54, HLA-DR発現

#### 4. 考 察

光アレルギーがあることの知られている ketoprofen, TCSA, sparfloracin による光アレルギー誘導能を prohapten, photohapten 刺激により検証した。すると 3 剤全てにおいて THP-I の co-stimulatory molecule である CD86、接着因子である CD54、あるいは HLA-DR の上昇が認められた。ところが、これらの上昇を示すパターンは各物質によって異なることが判明した。ここには記さなかったが、photohapten 刺激によるこれらの因子の誘導は他の photoallergy を起こさない物質では認められなかった。以上より、THP-I を用いた in vitro の検査により、物質の光アレルギー誘導能を評価できる可能性が示唆された。

今後はさらに被検物質を増やし、光アレルギー誘導能の定量化を図ること、各光接触アレルギーの臨床型と CD86, CD54, HLA-DR の発現パターンにおける相関の有無の検討を行いたいと考えている。

#### (文 献)

- 1) Lanckerani L, Baron ED. 2004. Photosensitivity to exogenous agents. *J Cutan Med Surg* 8: 424-31
- 2) Tokura Y. 2000. Immune responses to photohaptens: implications for the mechanisms of photosensitivity to exogenous agents. *J Dermatol Sci* 23 Suppl 1: S6-9
- 3) Atarashi K, Kabashima K, Akiyama K, Tokura Y. 2007. Stimulation of Langerhans cells with ketoprofen plus UVA in murine photocontact dermatitis to ketoprofen. *J Dermatol Sci* 47: 151-9
- 4) Imai S, Atarashi K, Ikesue K, Akiyama K, Tokura Y. 2006. Establishment of murine model of allergic photocontact dermatitis to ketoprofen and characterization of pathogenic T cells. *J Dermatol Sci* 41: 127-36
- 5) Nishijima T, Tokura Y, Imokawa G, Takigawa M. 1999. Photohapten TCSA painting plus UVA irradiation of murine skin augments the expression of MHC class II molecules and CD86 on Langerhans cells. *J Dermatol Sci* 19: 202-7
- 6) Tokura Y, Yagi H, Ihda H, Takigawa M. 1994. Evaluation of ultraviolet-A protection by sunscreen agents using a mouse model of contact photoallergy. *J Dermatol Sci* 7: 39-44
- 7) Neumann NJ, Blotz A, Wasinska-Kempka G, Rosenbruch M, Lehmann P, Ahr HJ, Vohr HW. 2005. Evaluation of phototoxic and photoallergic potentials of 13 compounds by different in vitro and in vivo methods. *J Photochem Photobiol B* 79: 25-34
- 8) Tokura Y, Seo N, Ohshima A, Yagi H, Furukawa F, Takigawa M. 1999. Lymphocyte stimulation test with drug-photomodified cells in patients with quinolone photosensitivity. *J Dermatol Sci* 21: 34-41