Difluprednateの抗原性試験

—抗原性試験およびその製剤の光毒性，光接触感作性試験—

長谷川隆司，大谷 勇作，藤野 明治
落合 忍仁，宇田 文昭，高橋 和雄*

株式会社 野村生物科学研究所

*三菱油化薬品株式会社 研究所

STUDIES ON ANTIGENICITY OF DIFLUPREDNATE

—ANTIGENICITY OF DIFLUPREDNATE, PHOTOTOXICITY AND
PHOTOCONTACT SENSITIVITY OF DIFLUPREDNATE
OINTMENT AND CREAM—

Takashi HASEGAWA, Yusaku OHTANI, Akiharu FUJINO,
Taehito OCHIAI, Fumiaki UDA and Kazuo TAKAHASHI*

NRI Life Science, 4-7-1 Kajiwara, Kamakura, Kanagawa, 247, Japan

*Research Laboratories, Mitsubishi Yuka Pharmaceutical Co. Ltd.,
Wakaguri, Amicho, Inashiki, Ibaraki, 300-03, Japan

Accepted April 1, 1985

Abstract.....The antigenicity of difluprednate, phototoxicity and photo-contact sensitivity of difluprednate ointment and cream were studied in guinea pigs and mice. The results in this study were as follows.

- 1) Guinea pigs immunized with difluprednate emulsified with Freund's complete adjuvant did not exhibit the systemic anaphylaxis and the delayed type hypersensitivity by the elicitation with either difluprednate alone or difluprednate-BSA conjugate. The antisera obtained from these guinea pigs did not show the positive response in the homologous 4-hour PCA reaction and the passive hemagglutination test against the challenge of the same antigens described above.
- 2) In the maximization test, guinea pigs immunized with difluprednate did not show the contact sensitivity when elicited with difluprednate suspended in saline.

- 3) Guinea pigs applied difluprednate ointment did not show positive contact sensitivity by the elicitation with difluprednate ointment and ointment base.
- 4) The antisera obtained from mice immunized with difluprednate and difluprednate-OVA conjugate absorbed to Al (OH)₃ gel did not give the positive response in the 72-hour PCA reaction against the challenge of either difluprednate alone or difluprednate-BSA conjugate.
- 5) In the phototoxicity and photocontact sensitivity test, 0.05% difluprednate ointment and 0.05% difluprednate cream did not show positive reactions in guinea pigs, although very slight erythema was caused by the primary irritancy of cream base, with or without irradiation of ultraviolet ray (320-400 nm).

Key words: Difluprednate, antigenicity, phototoxicity, photocontact sensitivity.

緒 言

Difluprednate (6 α , 9 α -difluoroprednisolone 21-butyrate)は、Fig. 1の構造を有する外用抗炎症ステロイド薬である。Difluprednateの結晶末は、皮下投与および局所投与で強い抗炎症作用を示し(Navarro ら1973, 高橋ら1985a), difluprednate 配合軟膏は炎症部位への塗布で強い抗炎症作用を示した(高橋ら1985b)。臨床においても difluprednate 配合外用薬は湿疹, 乾癬, アトピー性皮膚炎等に著明な効果を示している。今回、薬物使用の安全性の立場から difluprednate の抗原性試験および difluprednate 配合軟膏, クリームの光毒性, 光接触感作性について検討したので報告する。

Fig. 1. Structure of Difluprednate

実験材料および方法

1. 検体および試薬

Difluprednate, 0.05% difluprednate 配合軟膏(以下, difluprednate 軟膏と略す), 軟膏基剤, 0.05% difluprednate 配合クリーム(以下, difluprednate クリームと略す) およびクリーム基剤は三菱油化薬品株式会社より提供を受け, 実験に用いた。Difluprednate は白色結晶性の粉末であり, 密栓, 遮光下で室温にて保存した。

陽性対照物質として, maximization test には, 2, 4-dinitrochlorobenzene (DNCB, 和光純薬) を, 光毒性試験には, 8-methoxypsoralen (8-MOP) の 1% 溶液 (Oxsoralen[®] lotion, 大正製薬) を, 光接触感作性試験には, 3, 3', 4', 5-tetrachlorosalicylanilide (TCSA, 関東化学) を用いた。

Difluprednate とタンパク質との結合物を調製する為の $6\alpha, 9\alpha$ -difluoroprednisolone は三菱油化薬品株式会社から提供されたものを用いた。その他の試薬として, Freund's complete adjuvant (FCA, ヤトロン), bovine serum albumin fraction V (BSA, Sigma), egg albumin chicken (OVA, 生化学工業) を用いた。

2. 実験動物

Hartley 系 (クリーン) 雌性モルモット (3 週齢) と Slc: SD 雄性ラット (12 週齢) は静岡県実験動物農業協同組合より, BALB/c および C3H/He マウス (10 週齢) は日本チャールスリバー株式会社より購入し, 温度 $22 \pm 3^\circ\text{C}$, 湿度 45~70%, 明暗各 12 時間に設定した動物室で 1 週間以上の予備飼育の後実験に供した。

3. Difluprednate とタンパク質との結合物の調製方法

Erlanger ら (1959) の方法により, $6\alpha, 9\alpha$ -difluoroprednisolone を $6\alpha, 9\alpha$ -difluoroprednisolone-21-hemisuccinate に変換後, この化合物とタンパク質との結合物を調製した。すなわち, $6\alpha, 9\alpha$ -difluoroprednisolone 1.0 g (2.5 m moles) および succinic anhydride 1.0 g (10.0 m moles) を 10 ml の pyridine に溶かし, 環流冷却しながら, 約 4.5 時間加熱した。反応終了後, 反応液を減圧濃縮し, 残渣を chloroform に溶かし, 水で 3 回洗った後, sodium sulfate, anhydride を加えて脱水後, 減圧乾固した。残渣は acetone-methyl alcohol 混液により再結晶を繰り返し, 876 mg の $6\alpha, 9\alpha$ -difluoroprednisolone-21-hemisuccinate の結晶 (m. p. $222-225^\circ\text{C}$) を得た。この化合物の 380 mg を 10 ml の dioxane に加えて溶かし, tri-n-butylamine 0.24 ml (0.19 g, 1 m mole) を加えて 4°C に冷した後, isobutylchlorocarbonate 0.127 ml (0.14 g, 1 m mole) を加えた。 4°C でさらに 30 分間攪拌した。この間, 凍結した dioxane を数回加温して解かした。この溶液を, BSA 1.4 g を dioxane-water (1: 1) 90 ml と 1 N NaOH 1.8 ml との混液に溶かして 4°C に冷却した溶液に, 攪拌しながら加えた。その後徐々に室温に戻し, pH7~8 に保ちながら 6 時間反応させた。反応終了後, 生理食塩液で透析し不溶物を除いて Sephadex G-50 のカラムに通し, difluprednate と BSA の結合物 (以下 difluprednate-BSA) を得た。Difluprednate と OVA の結合物 (以下, difluprednate-OVA) も前述の方法に準じ調製した。蛋白と diflu-

prednate の結合数は結合物のタンパク濃度と紫外吸収の測定により推定した。

4. モルモットを用いた抗原性試験

1) 感作方法

Difluprednate をメノウ乳鉢中で十分に磨碎して、少量の FCA に溶解後、生理食塩液を加えて混和した。さらに、生理食塩液と等量に FCA を加え乳濁液を作製した。この乳濁液を週 1 回、5 回にわたり皮下注射 (0.5 mg/0.5 ml/animal) してモルモットを感作した。

2) IgG type 抗体の測定方法

(1) 能動性全身アナフィラキシー反応による免疫応答

能動性全身アナフィラキシー反応は木村ら (1971) の方法により行った。Difluprednate で能動感作したモルモットに対して最終感作終了から 2 週間後に、惹起抗原として 70% DMSO に溶解した difluprednate (0.5 mg/ml/animal) および生理食塩液に溶解した difluprednate-BSA (1.0 mg/ml/animal) をそれぞれ 5 匹のモルモットに静注して、アナフィラキシー反応の誘発を試み、その後 4 時間にわたりモルモットの症状を観察した。なお、3 匹の無処置モルモットを対照として用いた。アナフィラキシー反応の症状の判定は、次の 6 段階に分類して表示した。

(-) : 何ら異常を示さないもの, (±) : 立毛, 搔鼻, 不安感および耳の充血を示すもの, (+) : 上記の症状にふるえ, くしゃみおよび呼吸の促進を示すもの, (++) : 上記に排尿, 排便, 呼吸困難, 歩行不安定が加わったもの, (+++) : 上記の症状に痙攣が加わったもの, (++++) : 死亡したもの。

(2) PCA 反応による免疫応答

能動性全身アナフィラキシー反応惹起前日に採血した感作血清を用いて、Ovary (1964) の方法に準じて PCA 反応を行った。生理食塩液で段階希釈 (5, 25, 125 倍希釈) した 0.05 ml の感作血清を予め除毛したモルモット背部に皮内感作した。皮内感作から 4 時間後に difluprednate または difluprednate-BSA (3.75 mg Evans blue を含む) を静注して PCA 反応を惹起した。30 分後にモルモットを致死させ、ただちに皮膚を剥離し、皮膚の反応局所内面に生じた色素斑を測定した。PCA 反応の強さは 5 mm 以上の色素斑のみられる感作血清の最終希釈度で示した。

(3) 遅延型皮膚アレルギー反応による免疫応答

能動性全身アナフィラキシー反応試験と同じ方法で感作した 5 匹のモルモットの背部を剃毛した後、difluprednate または difluprednate-BSA および BSA の 0.1, 1, 10 μ g を含む抗原液 (0.1 ml/animal) を皮内注射した。皮内注射後、3, 24 および 48 時間後に注射部位の発赤, 腫脹などの有無および程度を観察して記録した。なお、3 匹の無処置モルモットを対照動物として用いた。皮膚反応の判定基準は発赤の直径をもとに以下のように定めた。(-) : 肉眼的変化なし, (+) : 1~5.0 mm, (++) : 5.1~10.0 mm, (+++) : 10.1~15.0 mm, (++++) : > 15.0 mm

(4) 間接赤血球凝集 (PHA) 反応による抗体の検出

マイクロタイタープレートの上に、あらかじめ、0.025 ml の 1% Rabbit serum in PBS を滴下し、0.025 ml 用のマイクロダイリ्यूーターで感作血清を取り、感作血清の 2 倍段階希釈列をつ

Studies on antigenicity of difluprednate

くった後、希釈感作血清の各ウェルに 0.025 ml の 2.5% 抗原吸着血球浮遊液を加えた。別に、感作血清の倍数希釈に 2.5% tannic acid 処理ヒツジ赤血球浮遊液を加えたものを陰性対照とした。

数分間マイクロプレートを振盪したのち、室温に静置し、翌日、赤血球凝集反応の有無を判定した。

3) Maximization test による抗原性試験

Maximization test は Magnusson ら (1969) の方法により行った。

(1) 感作群の種類

Difluprednate 懸濁液感作群および 0.1% DNCB 感作群の 2 群とし、各群は 12 匹で構成し、別にこれらの感作群に対応した無処置群 (各 5 匹) を設けた。

(2) 感作方法

i) 皮内注射による第 1 回感作

除毛したモルモットの肩甲骨部の左右 3 箇所 に検体を皮内注射して感作した。すなわち、肩甲骨の感作部位の上段左右に FCA のみを各 0.05 ml、中段左右に生理食塩液に懸濁した difluprednate を 0.5 mg/0.05 ml または olive oil に溶解した 0.1% DNCB 0.05 ml および下段左右に FCA で乳化した difluprednate を 0.5 mg/0.1 ml または 0.1% DNCB 0.1 ml を 1 回皮内注射して感作した。

ii) 塗布による第 2 回感作

皮内注射による感作から 1 週間後に皮内注射した感作部位を再び除毛した後、生理食塩液に懸濁した 1 mg/0.2 ml の difluprednate、または 0.2 ml の 0.1% DNCB を塗布したビニール濾紙 (2×3 cm) を感作部位にあて、その上から粘着テープで固定して 48 時間閉塞貼布して感作した。

(3) 誘発方法

塗布による感作から 2 週間後に除毛した各 12 匹のモルモットの側腹部に生理食塩液に懸濁した 1 mg/0.2 ml の difluprednate (または 0.2 ml の 0.1% DNCB) を塗ったビニール濾紙 (2×3 cm) をあて、その上から粘着テープで固定して 24 時間閉塞貼布してアレルギー反応を誘発した。なお、誘発時の対照として無処置のモルモット (5 匹) の側腹部に 1 mg/0.2 ml の difluprednate および 0.2 ml の 0.1% DNCB を塗布し、発赤、浮腫などの一次刺激による症状が塗布部位にみられるか否かを検討した。

反応の強さは閉塞貼布時から 48 時間後に塗布部位を観察し、その所見を次の 4 段階の判定基準に従って表示した。(0)：肉眼的に変化なし、(1)：軽度または散在性の紅斑、(2)：中程度の紅斑、(3)：強度の紅斑および浮腫

4) 塗布による抗原性試験

(1) 感作方法

Difluprednate 軟膏感作群には 12 匹、無処置群には 5 匹のモルモットを使用した。12.5 μ g/50 mg の difluprednate 軟膏を週 2 回、総計 8 回にわたって塗布による感作を行った。

(2) 誘発方法

最終塗布感作から2週間後に右側腹部に12.5 µg/50 mgのdifluprednate軟膏および左側腹部に50 mgの軟膏基剤を6時間閉塞貼布して皮膚反応を誘発した。閉塞貼布終了から24, 48時間後に側腹部を観察し、その判定をmaximization testと同じ基準に従って行った。

5. マウスを用いた抗原性試験

1) IgE 抗体の作製

(1)感作方法

生理食塩液に懸濁したdifluprednate (10 µg/animal)および生理食塩液に溶解したdifluprednate-OVA (10 µg/animal)とOVA (10 µg/animal)の感作用抗原液にAl(OH)₃ gel (2 mg/animal)を加えた後、その混液をC3H/HeマウスおよびBALB/cマウスに1回腹腔内注射して感作した。

感作開始から2週間後に各マウスの大腿部大動脈より全採血し、得られた感作血漿を用いてIgE抗体検出を行った。

2) PCA 反応による抗体の検出

Motaら(1968, 1969)の方法に準じ、IgE抗体の測定を行った。すなわち、生理食塩液で段階希釈(5, 25, 125倍希釈)した各感作血漿0.05 mlを除毛したラットの背部皮内に感作し、72時間後に各感作血漿に対応した抗原液(3.75 mg Evans blueを含む)を静注してPCA反応を惹起した。30分後にラットを致死させ、ただちに皮膚を剝離し、皮膚の反応局所内面に生じた色素斑の直径を測定した。PCA反応の強さは直径5 mm以上の色素斑を生ずる感作血漿の最高希釈度で示した。

6. 光毒性試験

モルモットの背面部を約4×7 cmの範囲で剃毛し、左右両側に3箇所ずつ1.5×1.5 cmの塗布部位を設定した。Difluprednate軟膏, difluprednateクリームおよび各基剤0.03 g, 1% 8-MOP 0.03 mlをモルモット1匹につき2～3検体ずつ、左右両側の塗布部位に塗布した。30分後、脱脂綿で検体を軽く拭き取り、片側をアルミホイルと粘着テープで被覆して、東芝FL20S・BLB型蛍光灯(“Black Light”波長300～400 nm, 極大波長352 nm)13灯を5.5 cm間隔に並列に配置した照射装置(2 mmのガラスフィルター付)を用い、皮膚面で5～7 mW/cm²の強度となる条件で120分間照射した(照射総エネルギー量; 3.6～5.0×10⁸ erg/cm²)。照射後24, 48および72時間後に照射側および非照射側の紅斑および痂皮形成をDraize(1959)の判定基準に準じて、5段階評価した。(0):紅斑を認めない, (1):ごく軽度の紅斑, (2):明らかな紅斑, (3):中等度～強度の紅斑, (4):強度の紅斑～軽度の痂皮形成, なお、明らかな紅斑を認める評点2以上を陽性とし、照射側と非照射側との評点差より光毒性の有無を判定した。

7. 光接感受作性試験

1) 感作方法

頸背部を剃毛したモルモットを各群12匹ずつ用いた。Difluprednate軟膏(0.1 g), difluprednateクリーム(0.1 g)あるいは2% TCSA alcohol溶液(0.1 ml)を2×4 cmの区画に塗布した。30分後、脱脂綿で検体を軽く拭き取り、光毒性試験と同様の照射装置を用いて60分間紫外線を

Studies on antigenicity of difluprednate

照射した（照射総エネルギー量； $1.8\sim 2.5\times 10^8$ erg/cm²）。塗布および照射を48時間ごとに5回繰り返し感作した。

2) 誘発方法

最終感作の2週間後、背面左右両側を剃毛し1～3箇所ずつ1.5×1.5 cmの塗布部位を設定した。Difluprednate 軟膏感作群および difluprednate クリーム感作群では、それぞれ対応する製剤、基剤および0.05% difluprednate alcohol 溶液を0.03 g または0.03 ml 塗布した。TCSA 感作群には、2% TCSA alcohol 溶液を0.03 ml 塗布した。塗布30分後、脱脂綿で検体を軽く拭き取り片側を遮光して、感作時と同じ条件で紫外線を照射して光接触感作性反応を誘発した。照射24, 48, 72および96時間後に照射側および非照射側との皮膚反応を光毒性試験と同様に5段階評価した。

3) 病理組織学的検査

誘発96時間後、各群の代表例2例の試験部位の皮膚を採取して10%中性緩衝 formalin 液で固定し、常法に従って paraffin に包埋し組織切片を作製して、hematoxylin-eosin 染色を行い病理組織学的検査に供した。判定は次の基準によった。(0)：変化なし,(1)：軽度の変化,(2)：中等度の変化,(3)：強度の変化

4) 判定

光接触感作性成立の判定にあたっては、評点2以上を示す明らかな紅斑を認めた動物について、照射側と非照射側との評点差、誘発試験における反応の消長や病理組織学的所見を総合して判断した。

結 果

1. モルモットを用いた抗原性試験

1) 能動性全身アナフィラキシー反応による免疫応答

Difluprednate と FCA との乳濁液で感作したモルモットに対して、モルモット1匹あたり0.5 mg の difluprednate 単独および1 mg の difluprednate と BSA の結合物 (difluprednate-BSA, 1分子の BSA 当り約4分子の difluprednate が結合)を静注してアナフィラキシー反応を誘発したが反応は全例陰性であった (Table 1)。

2) PCA 反応および PHA 反応による抗体の検出

Difluprednate 感作血清 (10匹)を別のモルモットに受動皮内感作後、抗原として0.5 mg の difluprednate または1 mg の difluprednate-BSA をそれぞれ静注して PCA 反応を惹起したが、いずれの感作血清も difluprednate に対し、PCA 反応は陰性であった (Table 1)。同様に、difluprednate モルモット感作血清に difluprednate-BSA 吸着血球抗原を加えて PHA 反応を行ったが、同反応はすべて陰性であった (Table 1)。

3) 遅延型皮膚アレルギー反応による免疫応答

Difluprednate と FCA との乳濁液で感作したモルモットに、抗原として difluprednate, difluprednate-BSA および BSA の各0.1, 1.0, 10 μ g/0.1 ml を皮内注射して、遅延型皮膚アレルギー

Table 1 Immune response to Difluprednate in guinea pigs.
—Active Anaphylaxis, PCA and PHA—

Immunogen	Dose	Animal No.	Active anaphylaxis to ^{a)}		PCA titer to ^{b)}		PHA titer to ^{b)}
			Difluprednate	Difluprednate-BSA	Difluprednate	Difluprednate-BSA	Difluprednate-BSA
Difluprednate + FCA	0.5 mg×5 (once a week)	1 - 5	-		< 5	< 5	< 4
		6 -10		-	< 5	< 5	< 4
Non-treated		11-12	-				
		13		-			

FCA : Freund's complete adjuvant, BSA : bovine serum albumin, PCA : passive cutaneous anaphylaxis, PHA : passive hemagglutination.

a) Grades of active anaphylaxis were expressed as follows :

-: normal, ±: piloerection, nose scratching and anxiety, +: above symptoms plus shakes, anheration and sneeze, ++: above symptoms plus defecation micturition, dyspnea and dysbasia, +++: above symptoms plus convulsion, ++++: fatal, death.

b) Titers were expressed as the highest dilution of antisera giving a positive reaction.

Table 2 Immune response to Difluprednate in guinea pigs
—Maximization test—

Immunogen	Elicitor	No. of animals	Time ^{a)} (hr)	Score ^{b)}			
				0	1	2	3
Difluprednate	Difluprednate	12	24	12	0	0	0
			48	12	0	0	0
DN CB	DN CB	12	24	0	0	0	12
			48	0	0	0	12
Non-treated	Difluprednate	5	24	5	0	0	0
			48	5	0	0	0
	DN CB	5	24	5	0	0	0
			48	5	0	0	0

DN CB: 2,4-dinitrochlorobenzene

a) Observation time after topical application.

b) Grades of skin reactions were expressed as follow : 0 : normal, 1 : slight erythema, 2 : moderate erythema, 3 : severe erythema and edema.

Studies on antigenicity of difluprednate

Table 3 Immune response to Difluprednate in guinea pigs
—Contact sensitivity—

Immunogen	Elicitor	No. of animals	Time ^{a)} (hr)	Score ^{b)}			
				0	1	2	3
Difluprednate Ointment	Difluprednate Ointment	12	0	12	0	0	0
			24	12	0	0	0
			48	12	0	0	0
	Ointment Base		0	12	0	0	0
			24	12	0	0	0
			48	12	0	0	0
Non-treated	Difluprednate Ointment	5	0	5	0	0	0
			24	5	0	0	0
			48	5	0	0	0
	Ointment Base		0	5	0	0	0
			24	5	0	0	0
			48	5	0	0	0

a) Observation time after the removal of elicitor.

b) Grades of skin reactions were expressed as follows: 0: normal, 1: slight erythema, 2: moderate erythema, 3: severe erythema and edema.

Table 4 Detection of IgE antibody formation to Difluprednate in mice.

Antisera	Elicitor	C3H/He		BALB/c	
		Animal No.	PCA titer ^{a)}	Animal No.	PCA titer
Difluprednate + Alum (10 μ g)	Difluprednate (400 μ g)	1- 6	< 5	1- 6	< 5
	Difluprednate- BSA (400 μ g)	1- 6	< 5	1- 6	< 5
Difluprednate-OVA + Alum (10 μ g)	Difluprednate (400 μ g)	7-12	< 5	7-12	< 5
	Difluprednate- BSA (400 μ g)	7-12	< 5	7-12	< 5
OVA + Alum (10 μ g)	OVA (400 μ g)	13-15	5	13-15	5

PCA: passive cutaneous anaphylaxis, BSA: bovine serum albumin, OVA: ovalbumin

a) PCA titers were expressed as the highest dilution of antisera giving a positive reaction.

Table 5 Phototoxicity test of Difluprednate preparations in guinea pigs.

Preparations	No. of animals	Time ^{a)} (hr)	UV	Score ^{b)}					Positive/ Total ^{c)}
				0	1	2	3	4	
Non-treated	10	24	+	10	0	0	0	0	0/10
			—	10	0	0	0	0	
		48	+	10	0	0	0	0	
			—	10	0	0	0	0	
		72	+	10	0	0	0	0	
			—	10	0	0	0	0	
Ointment Base	10	24	+	10	0	0	0	0	0/10
			—	10	0	0	0	0	
		48	+	10	0	0	0	0	
			—	10	0	0	0	0	
		72	+	10	0	0	0	0	
			—	10	0	0	0	0	
Difluprednate Ointment	10	24	+	10	0	0	0	0	0/10
			—	10	0	0	0	0	
		48	+	10	0	0	0	0	
			—	10	0	0	0	0	
		72	+	10	0	0	0	0	
			—	10	0	0	0	0	
Cream Base	10	24	+	5	5	0	0	0	0/10
			—	10	0	0	0	0	
		48	+	9	1	0	0	0	
			—	10	0	0	0	0	
		72	+	10	0	0	0	0	
			—	10	0	0	0	0	
Difluprednate Cream	10	24	+	10	0	0	0	0	0/10
			—	10	0	0	0	0	
		48	+	10	0	0	0	0	
			—	10	0	0	0	0	
		72	+	10	0	0	0	0	
			—	10	0	0	0	0	
8-MOP(1%)	10	24	+	0	0	0	10	0	0/10
			—	10	0	0	0	0	
		48	+	0	0	0	10	0	
			—	10	0	0	0	0	
		72	+	0	0	10	0	0	
			—	10	0	0	0	0	

8-MOP: 8-Methoxypsoralen

a) Observation time after UV irradiation.

b) Grades of skin reactions were expressed as follows:

0: no erythema, 1: very slight erythema, 2: well defined erythema,

3: moderate to severe erythema, 4: severe erythema to slight eschar formation.

c) Positive reaction of phototoxicity was expressed as follows: more than 2.

反応を誘発したが、反応はすべて陰性であった。

4) Maximization test による抗原性試験

Difluprednate で感作したモルモット (12匹) に対して、モルモット 1 匹あたり 1 mg/0.2 ml の difluprednate を側腹部の誘発部位に24時間閉塞貼布し、続いて貼布終了時から24時間後に誘発部位を観察したが、全例に接触アレルギー反応はみられず、評点 0 であった (Table 2)。

一方、陽性対照として用いた 0.1% DNCB で感作したモルモットに対して 0.1% DNCB を塗布すると、全例に評点 3 に相当する強度の紅斑がみられた。なお、各 5 匹の無処置モルモットの側腹部に 1 mg/0.2 ml の difluprednate および 0.1% DNCB を塗布したが、いずれの塗布部位にも発赤は認められなかった。

5) 塗布による抗原性試験

Difluprednate 軟膏で感作したモルモットに対して、モルモット 1 匹あたり 12.5 μ g/50 mg の difluprednate 軟膏および 50 mg の軟膏基剤を 6 時間閉塞貼布した。貼布終了から24, 48時間後に側腹部を観察したが、いずれの部位も評点 0 で接触アレルギー反応は陰性であった (Table 3)。なお、無処置モルモットに対して 12.5 μ g/50 mg の difluprednate 軟膏および 50 mg の軟膏基剤を側腹部に塗布したが変化はみられなかった。

2. マウスを用いた抗原性試験

C3H/He および BALB/c マウスの difluprednate 感作血漿, difluprednate-OVA 感作血漿および OVA 感作血漿を除毛した SD ラットの背部に皮内感作し、72時間後に各感作血漿に対応した抗原として各々 0.4 mg の difluprednate, difluprednate-BSA, または OVA を静注して PCA 反応を惹起した。Difluprednate および difluprednate-OVA 感作血漿に対して惹起抗原に difluprednate および difluprednate-BSA を用いると PCA 反応はいずれも陰性であった (Table 4)。一方陽性対照である OVA 感作血漿に対して OVA を惹起抗原として用いると、PCA 反応は陽性 (抗体価 5) を示した。

3. 光毒性試験

Difluprednate 軟膏, difluprednate クリームおよび各基剤とも、UV 照射側および非照射側のいずれも評点 2 以上を示すものはなく、陽性反応率はいずれも 0% であった (Table 5)。なお、クリーム基剤では、照射部位において評点 1 を示す例が認められたが、非照射部位にも弱い反応 (評点 1 以下) が認められた (Photo 1)。

一方、陽性対照の 8-MOP では照射側においてのみ全例評点 3 の反応を示し、陽性反応率は 100% であった。

4. 光接触感作性試験

Difluprednate 軟膏感作群に対して、difluprednate 軟膏, 軟膏基剤および 0.05% difluprednate alcohol 溶液により誘発した場合は、照射側, 非照射側とも評点 0 であった (Table 6)。Difluprednate クリーム感作群においては、クリーム基剤で誘発したとき、24時間後の観察で、UV 照射の有無にかかわらず評点 1 を示す例が認められたが、difluprednate クリームおよび 0.05% difluprednate alcohol 溶液による誘発ではいずれも評点 0 であった (Table 7, photo 2)。

一方、陽性対照である2% TCSA 感作群では、2% TCSA の誘発により、24時間後、照射側の10例中8例に、評点2以上の紅斑が認められ、評点1が1例の非照射側に比べ、明らかに強い反応を示した (Table 8, photo 3)。

誘発96時間後に各群の代表例2例の試験部位皮膚を採取して、病理組織学的検査に供したところ、difluprednate 軟膏感作群では、表皮および真皮とも変化のある所見は認められなかった。Difluprednate クリーム感作群においては、クリーム基剤による誘発部位に、軽度の表皮の肥厚が2例 (1例は照射側、非照射側の両方、1例は照射側のみ) にみられたが、difluprednate クリームおよび difluprednate alcohol 溶液による誘発部位では変化はみられなかった。陽性対照の2% TCSA 感作群においては2% TCSA での誘発により、2例とも照射側に中等度の、非照射側に軽度の表皮の肥厚がみられた。さらに1例の照射側には、軽度の角質層の肥厚がみられた。

Photo 1. Phototoxicity test of difluprednate cream : 24 hr after UV irradiation.

Studies on antigenicity of difluprednate

Photo 2. Photocontact sensitivity test of difluprednate cream : 24 hr after UV irradiation.

Photo 3. Photocontact sensitivity test of TCSA : 24 hr after UV irradiation.

Table 6 Photocontact sensitivity test of Difluprednate Ointment in guinea pigs

Preparations		No. of animals	Time ^{a)} (hr)	UV	Score ^{b)}					Positive/ Total ^{c)}
Immunogen	Elicitor				0	1	2	3	4	
	Ointment Base	10	24	+	10	0	0	0	0	0/10
				-	10	0	0	0	0	
			48	+	10	0	0	0	0	
				-	10	0	0	0	0	
			72	+	10	0	0	0	0	
				-	10	0	0	0	0	
			96	+	10	0	0	0	0	
				-	10	0	0	0	0	
			24	+	10	0	0	0	0	
				-	10	0	0	0	0	
			48	+	10	0	0	0	0	
				-	10	0	0	0	0	
Difluprednate Ointment	Difluprednate Ointment	10	72	+	10	0	0	0	0	0/10
				-	10	0	0	0	0	
			96	+	10	0	0	0	0	
				-	10	0	0	0	0	
			24	+	10	0	0	0	0	
				-	10	0	0	0	0	
			48	+	10	0	0	0	0	
				-	10	0	0	0	0	
			72	+	10	0	0	0	0	
				-	10	0	0	0	0	
			96	+	10	0	0	0	0	
				-	10	0	0	0	0	
	Difluprednate Ethanol Solution	10	24	+	10	0	0	0	0	0/10
				-	10	0	0	0	0	
			48	+	10	0	0	0	0	
				-	10	0	0	0	0	
			72	+	10	0	0	0	0	
				-	10	0	0	0	0	
			96	+	10	0	0	0	0	
				-	10	0	0	0	0	

a) Observation time after UV irradiation.

b) Grades skin reactions were expressed as follows: 0: no erythema, 1: very slight erythema, 2: well defined erythema, 3: moderate to severe erythema, 4: severe erythema to slight eschar formation.

c) Positive reaction of photocontact sensitivity was expressed as follows: more than 2.

Studies on antigenicity of difluprednate

Table 7 Photocontact sensitivity test of Difluprednate Cream in guinea pigs.

Preparations		No. of animal	Time ^{a)} (hr)	UV	Score ^{b)}					Positive/ ^{c)} Total
Immunogen	Elicitor				0	1	2	3	4	
	Cream Base	10	24	+	1	9	0	0	0	0/10
				-	6	4	0	0	0	
			48	+	10	0	0	0	0	
				-	10	0	0	0	0	
			72	+	10	0	0	0	0	
				-	10	0	0	0	0	
			96	+	10	0	0	0	0	
				-	10	0	0	0	0	
			24	+	10	0	0	0	0	0/10
				-	10	0	0	0	0	
			48	+	10	0	0	0	0	
				-	10	0	0	0	0	
Difluprednate Cream	Difluprednate Cream	10	72	+	10	0	0	0	0	0/10
				-	10	0	0	0	0	
			96	+	10	0	0	0	0	
				-	0	0	0	0	0	
			24	+	10	0	0	0	0	0/10
				-	10	0	0	0	0	
			48	+	10	0	0	0	0	
				-	10	0	0	0	0	
			72	+	10	0	0	0	0	
				-	10	0	0	0	0	
			96	+	10	0	0	0	0	
				-	10	0	0	0	0	
	Difluprednate Ethanol Solution	10	24	+	10	0	0	0	0	0/10
				-	10	0	0	0	0	
			48	+	10	0	0	0	0	
				-	10	0	0	0	0	
			72	+	10	0	0	0	0	
				-	10	0	0	0	0	
			96	+	10	0	0	0	0	
				-	10	0	0	0	0	

a) Observation time after UV irradiation.

b) Grades of skin reactions were expressed as follows: 0: no erythema, 1: very slight erythema, 2: well defined erythema, 3: moderate to severe erythema, 4: severe erythema, to slight eschar formation.

c) Positive reaction of photocontact sensitivity was expressed as follows; more than 2.

Table 8 Photocontact sensitivity test of TCSA in guinea pigs.

Preparations		No. of animals	Time ^{a)} (hr)	UV	Score ^{b)}					Positive/ Total ^{c)}
Immunogen	Elicitor				0	1	2	3	4	
2% TCSA	2% TCSA	10	24	+	0	2	7	1	0	8/10
				—	9	1	0	0	0	
			48	+	0	5	4	1	0	
				—	8	2	0	0	0	
			72	+	1	6	3	0	0	
				—	9	1	0	0	0	
			96	+	1	6	3	0	0	
				—	9	1	0	0	0	

TCSA : 3, 3', 4', 5-tetrachlorosalicylanilide

a) Observation time after UV irradiation.

b) Grades of skin reactions were expressed as follows: 0: no erythema, 1: very slight erythema, 2: well defined erythema, 3: moderate to severe erythema, 4: severe erythema to slight eschar formation.

c) Positive reaction of photocontact sensitivity was expressed as follows; more than 2.

考 察

一般に低分子化合物が生体内において、全身性のショック、薬疹、接触性皮膚炎等の薬剤アレルギーを生ずるには、担体となりうる高分子物質と結合するか、互いに重合する必要があると考えられている（堀内，1976）。藤野ら（1984a）によれば，difluprednate の *in vitro* における血清タンパク質との結合率は動物の種により差がみられるが，70～90%であり，他の glucocorticoide と同程度（沼田ら，1979，新藤ら，1984）であった。また，*in vivo* における difluprednate の血清タンパク質との結合率は，投与2時間後のラットおよびウサギ血清においていずれも約80%であった。一方，difluprednate の代謝物の分析（藤野ら，1984b）により，同時点のラット血漿中には，主に21位 acetate や17位 butylate の加水分解された化合物が認められ，さらに，ラットおよびウサギの尿および糞中には，これらの代謝物のほか 6β -水酸基を持つ代謝物が認められた。Difluprednate およびその代謝物は，その構造から生体内においてタンパク質と不可逆的結合を形成する可能性は少なく，従って，それらをハプテンとする抗原性を獲得する可能性も低いと推察されるが，薬物使用の安全性の立場から，difluprednate の抗原性の有無を検討するとともに difluprednate が臨床では外用剤として皮膚に塗布されるので，difluprednate 原体

の接触感作性とその製剤の光毒性および光接触感作性についても検討を加えた。

Difluprednate と Freund's complete adjuvant との乳濁液でモルモットを感作（皮下注射，週 1 回，計 5 回）して能動性全身アナフィラキシー反応および遅延型皮膚アレルギー反応を行い，また別に感作されたモルモットの血清を用いて PCA 反応および間接赤血球凝集反応 (PHA) 法により体液性抗体の IgG type 抗体の検出を行った。また，difluprednate と Al (OH)₃ gel でマウスを感作し，得られたマウス感作血漿を用いてラットによる PCA 反応法により IgE 抗体の検出を試みた。その結果，誘発抗原として difluprednate 単独および difluprednate と蛋白との結合物のいずれを用いた場合にも，difluprednate をハプテンとする IgG または IgE 抗体の産生および全身性のアナフィラキシー反応は全く認められなかった。このように，免疫補助剤とともに，difluprednate で動物を免疫しても，それ自身は免疫原性を発揮しないものと考えられる。さらに difluprednate の 21 位にタンパク質を化学的に共有結合させた difluprednate-BSA もしくは difluprednate-OVA を合成し，免疫原性およびアレルギー原性について検討した。この結果，difluprednate-OVA を免疫原とし，difluprednate-BSA をアレルギー誘発原として検討したマウスの IgE 抗体の産生は認められなかった。

一方，difluprednate は外用剤として臨床応用されるので，検体の皮膚への直接塗布による免疫方法で difluprednate の免疫原性について検討を加えた。すなわち，difluprednate を含有する軟膏の反復塗布（週 2 回，総計 8 回）による感作を行い，difluprednate の皮膚組織中でのアレルギー反応の有無を検討したところ difluprednate の反応は陰性であった。ヒトにおける接触性皮膚アレルギーとの相関性が高いことが報告されている maximization test においても陽性対照の DNCB が強い陽性反応を示したのに対し，difluprednate は全く反応を示さなかった。その結果，これらの免疫方法において difluprednate が皮膚から吸収されて遅延型皮膚アレルギー反応を誘発する免疫原になり得ないことが判明した。

つぎに，長波長紫外線 (320～400 nm) を照射する条件 (Morikawa ら 1974) 下において，difluprednate の軟膏およびクリーム製剤を用いて，光毒性および光接触感作性試験を行った。

光毒性試験においては，陽性対照の 8-MOP は評点 3 の強い陽性反応を示したが，difluprednate 軟膏，difluprednate クリームおよび各基剤のいずれの場合も照射側，非照射側のいずれにも評点 2 以上の陽性反応を示す個体は認められなかった。クリーム基剤では，照射側に評点 1 を示す例が認められたが，非照射側に評点 1 以下ではあるが弱い一次刺激性反応が認められており，この刺激性が紫外線によって若干増強されたものと推定される。

光接触感作性試験では，difluprednate 軟膏および difluprednate クリーム感作群に対し，それぞれ対応する製剤，基剤および difluprednate alcohol 溶液で誘発したが，いずれも評点 2 以上の陽性反応を示す個体は認められなかった。Difluprednate クリーム感作群をクリーム基剤で誘発したとき，照射側，非照射側ともに軽度の反応が認められたが，①陽性対照の TCSEA の反応が評点 3 であることと比較するとクリーム基剤による反応は弱く，照射，非照射部位での反応差も少ないこと，②その反応の消失時間も速いこと，③病理組織学的所見にも表皮の軽度の変化以外みられないことの 3 点より，光接触感作性の反応ではないと判断した。クリーム基剤

についてはウサギで皮膚刺激性が認められており(藤井ら, 未発表), また, ほかのステロイド含有クリームにも刺激性による同様の反応がみとめられている(名古屋ら, 1980)ことから, 上記変化は主にクリーム基剤に見られる弱い一次刺激性に起因するものと推測される。difluprednate を配合したクリームで上記のような反応が認められなかったのは, difluprednate 原体に光接触感作性反応は認められず, 原体自体が抗炎症作用を有することから, 一次刺激反応が抑制されたものと考えられる。

一般にヒトと動物では薬物の代謝様式, 薬物の生体内成分との結合性, アレルギー反応性に違いがみられるものであり, 動物での結果をそのままヒトに適用することはできないが, 本実験の結果から difluprednate が臨床で用いられるに際しても, アレルギー症状を誘引する可能性は極めて少ないものと推察される。

要 約

Difluprednate の抗原性と difluprednate 軟膏およびクリームの光毒性, 光接触感作性について検討し, 以下の結果を得た。

- 1) Difluprednate と FCA の乳濁液で感作したモルモットを用い, difluprednate あるいは, difluprednate-BSA により誘発したが, 能動性全身アナフィラキシー反応および遅延型皮膚反応は認められなかった。また, これらのモルモットから採取した感作血清を用いて, PCA 反応および PHA 反応を行ったが, いずれの反応も陰性であった。
- 2) Maximization test では, difluprednate を皮内注射および塗布してモルモットを2段階感作した後, difluprednate の塗布により誘発したが, 接触アレルギー反応は認められなかった。
- 3) Difluprednate 軟膏で感作したモルモットを用い, difluprednate 軟膏および軟膏基剤の塗布により接触アレルギー反応を誘発したが, いずれも反応は陰性であった。
- 4) Difluprednate あるいは difluprednate-OVA とアラムとの懸濁液でマウスを感作し, 得られた感作血漿を用いて, difluprednate および difluprednate-BSA を惹起抗原とし, ラットによる PCA 反応を行ったが, 反応は陰性であり, 感作血漿中に IgE 抗体は認められなかった。
- 5) モルモットに長波長紫外線を照射する条件による difluprednate 軟膏およびクリームの光毒性, 光接触感作性試験では, クリーム基剤にその一次刺激性反応に起因すると考えられる反応が認められたが, difluprednate 軟膏およびクリームに, 光毒性および光接触感作性反応は認められなかった。

文 献

- Draize, J. H. (1959): Appraisal of the safety of chemicals in foods, drugs and cosmetics, by the staff of the Division of Pharmacology Food and Drug Administration, Department of Health Education and Welfare, Pub. 1959, by F. D. A. officials of U. S. Business office, Topeka, Kansas, p. 46
- Erlanger, B. F., Borek, F., Beiser, S. M. and Lieberman, S. (1959): Steroid-protein conjugates. J. Biol. Chem., **234**, 1090-1094.
- 藤野明治, 太田真一, 篠沢直子, 向山裕子, 柳田由紀, 林 良夫, 内出政之(1985 a): Difluprednate (DFBA)の生体内動態 (第1報). ラット, ウサギにおける皮下投与後の吸収, 分布および排泄, 応用薬理, 投稿中.
- 藤野明治, 太田真一, 柴田邦彦, 市原典子, 後藤朱美, 嶋津美幸, 内出政之, 小川 茂, 林 良夫(1985 b): Difluprednate (DFBA)の生体内動態 (第3報). ラットおよびウサギにおける皮下投与時の代謝, 応用薬理, 投稿中.
- 堀内叔彦(1976): 薬剤アレルギーの発生機序, 薬剤アレルギー, P3, 朝倉書店, 東京.
- 木村義民(1971): 免疫学・アレルギー学実験法, 進藤宙二監修, pp 439~446, (東京), 文光堂.
- Magnusson, B. and Kligman (1969): The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test., J. Investigative Dermatology, **52**, 268-276.
- Morikawa, F., Nakayama, Y., Fukuda, M., Hamano, M., and Yokoyama, Y. (1974): Techniques for evaluation of phototoxicity and photoallergy in laboratory animals and man. Sunlight and Man. pp. 529~557, University of Tokyo Press.
- Mota, I., Wong. D. and Sadum, E. H. (1968): Mouse hemocytotropic antibodies I. Specific differentiation between mouse 7s, and mouse reagin-like antibodies., Life Science, **7 (II)**, 1289-1293.
- Mota, I. and Wong. D. (1969): Homologous and heterogous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization, Life Science, **8 (II)**, 813-820.
- 名古屋隆夫, 小林富二男(1980): Prednisolone 17-Valerate 21-Acetate軟膏及びクリーム of 光毒性, 光感作性及び皮膚感作性試験, 応用薬理, **20**, 99-108.
- 沼田弘明, 三ツ木真理子, 津田敏活(1979): Betamethasone, 17, 21-dipropionateの抗原性および血清蛋白結合に関する試験, 実中研・前臨床, **5**, 53~61.
- Navarro, J., Girard, J., Lacour, C., Unkovic, J., Lafille, C. (1978): Pharmacological study of a new anti-inflammatory steroid, difluprednate (CM9155), Arzneim. Forsch. Drug Rs., **28**, 2302-2311.
- Ovary, Z. (1964): Passive cutaneous anaphylaxis. Immunological Methods (Blackwell Scientific Publications), 259~283, 1964.
- 新藤恭司, 塚本雄次, 安田行寛, 丸中照義(1984): Dexamethasone 17, 21-dipropionate (THS-101)の体内動態 (第4報), **27**, 1073-1083.
- 高橋和雄, 荒井安洋, 門脇修一郎(1985 a): 新規合成ステロイドdifluprednateの抗炎症作用第一報, 皮下投与および局所投与による作用, 応用薬理, **29**, No. 2 投稿中.
- 高橋和雄, 門脇修一郎, 荒井安洋, 菅原久美子(1985 b): 新規合成ステロイドdifluprednateの抗炎症作用, 第2報, 軟膏塗布による作用, 応用薬理, **29**, No. 2 投稿中.