Calcipotriol (MC903) 軟膏の皮膚毒性試験
— 皮膚一次刺激性試験, 皮膚感作性試験, 光毒性試験
および皮膚光感作性試験 —

鈴木登志郎, 加藤 利博, 北垣 忠温,
小野 正博*, 白川 清美*, 永田 充宏*, 小西 良士*

株式会社 日本セイギケン総合研究所
〒433 静岡県浜松市葵町95-10
*帝國製薬株式会社 研究開発本部
〒769-26 香川県大川郡大内町三本松567番地

DERMATOTOXICITY STUDIES OF
CALCIPOTRIOL (MC903) OINTMENT
— Primary Skin Irritation, Skin Sensitization, Phototoxicity
and Skin Photosensitization —

Toshiro SUZUKI, Toshihiro KATO, Tadaharu KITAGAKI,
Masahiro ONO*, Kiyomi SHIRAKAWA*, Mitsuhiro NAGATA*
and Ryoji KONISHI*

*Japan Seigiken Research Center Co., Ltd.,
95-10 Aoi-cho, Hamamatsu, Shizuoka 433, Japan
*Research and Development Division, Teikoku Seiyaku Co., Ltd.,
567 Sanbonmatsu, Ochi-cho, Ohkawa-gun, Kagawa 769-26, Japan*

(Received November 7, 1995 ; Accepted March 13, 1996)

ABSTRACT — MC903 ointment was studied on primary skin irritation in rabbits and skin sensitization, skin photosensitization and phototoxicity in guinea-pigs.

1. MC903 ointment, ointment base and deteriorated MC903 ointment induced erythematous changes in rabbit skin. These erythematous changes were not so serious, and they were classified as a mild irritant.

2. MC903 ointment was almost negative in skin sensitization study.

3. MC903 ointment has no skin phototoxicity in guinea-pigs.

4. MC903 ointment has no skin photosensitizing activity in guinea-pigs.

連絡先：〒769-26 香川県大川郡大内町三本松567番地
帝國製薬株式会社 研究開発本部
小野 正博

KEY WORDS : Calcipotriol, MC903 ointment, Primary skin irritation, Skin sensitization, Phototoxicity, Skin photosensitization (rabbit, guinea-pig)

緒言

Calcipotriol（以下、MC903と略す）は、Leo Pharmaceutical Products Ltd. (Denmark)で開発された新規乾癬治療剤である。本剤は、ビタミンD₃の活性体である1 α ,25(OH)₂D₃の類縁化合物であり、表皮細胞に対する細胞増殖抑制作用および分化誘導作用を有し、カルシウム代謝に及ぼす作用は活性型ビタミンD₃の1/100～1/200と報告されている（Binderup and Bramm, 1988）。欧米では本剤の50 μ g/g濃度の軟膏が臨床適用されており、本邦においても安全な乾癬治療剤として有用性が期待されている。

今回、著者らは MC903 の皮膚安全性評価の一環として、臨床適用剤形である MC903 軟膏についてウサギを用いた皮膚一次刺激性、モルモットを用いた皮膚感作性ならびに光毒性および皮膚光感作性を検討したので、その成績を報告する。

実験材料および方法

1. 被験物質、比較対照物質および陽性対照物質

MC903 軟膏は、白色ワセリンを主体とし、添加剤としてプロピレングリコール、エデト酸二ナトリウム、dl- α -トコフェロールを含む油脂性軟膏である。MC903 の化学構造式を Fig. 1 に示した。

皮膚一次刺激性試験には、MC903の予定臨床適用濃度である50 $\mu\text{g/g}$ およびその2倍ならびに1/2濃度のMC903軟膏(25, 50, 100 $\mu\text{g/g}$, それぞれ Lot No. 9115311, 9225412, 9115612), MC903軟膏基剤(以下、軟膏基剤と略す: Lot No. 9225212), MC903軟膏劣化品(50 $\mu\text{g/g}$, 以下、軟膏劣化品と略す: Lot No. 253132)および比較対照物質として軟膏基剤の主体である日本薬局方白色ワセリン(以下、白色ワセリンと略す: 東海製薬(株))を使用した。なお、軟膏劣化品は、温度40℃の苛酷条件下で10ヶ月間保存したものをを用いた。

皮膚感作性試験，光毒性試験および皮膚光感作性試験には，予定臨床適用濃度の MC903 軟膏（50 $\mu\text{g/g}$ ，Lot No. 9225411）および軟膏基剤（Lot No. 9225211）を使用した。陽性対照物質として，皮膚感作性試験では 2,4-dinitrochlorobenzene（以下，DNCB と略す：和光純薬工業(株)），光毒性試験では 8-methoxypsoralen（以下，8-MOP と略す：東京化成工業(株)），皮膚光感作性試験では 6-methylcoumarin（以下，6-MC と略す：東京化成工業(株)）を使用した。アジュバントとして，Freund's Complete Adjuvant（以下，FCA と略す：Difco Lab.）を使用した。

試験期間中、MC903 軟膏、軟膏基剤および軟膏劣化品は気密・冷蔵（約 4℃）下で、また、比較対照物質および陽性対照物質は室温下で保管した。なお、MC903 軟膏は、20℃で保管した時に 2 年間は安定であることが Leo 社において確認されている。

2. 使用動物および飼育条件

1) 皮膚一次刺激性試験

日本エスエルシー(株)から23週齢の New Zealand

Fig. 1. Chemical structure of calcipotriol.

White 種 (Std: NZW) 雄性ウサギ (クリーン) を購入し、15日間予備飼育した後、健康状態の良好な動物を試験に用いた。被験物質適用日の体重は、2.84~3.66 kg であった。

飼育にあたっては、ウサギをアルミニウム製ケージ (40 W × 50 D × 33 H (cm)) に個別に収容し、試験期間を通して温度 23 ± 2 °C、湿度 55 ± 15 %、換気回数11~20回/時間、12時間照明 (7:00~19:00) に設定された飼育室で、市販固型飼料 (ラボ R ストック、日本農産工業㈱) の150 g を1日1回および塩素消毒した井戸水をポリエチレン製給水瓶で自由に摂取させた。

2) 皮膚感作性試験、光毒性試験、皮膚光感作性試験

日本エスエルシー㈱から3週齢のSlc: Hartley 系雄性モルモット (SPF) を購入し、1週間以上予備飼育を行い、健康状態の良好な動物を試験に用いた。試験開始日の体重は、皮膚感作性試験290.3~335.7 g、光毒性試験281.6~319.2 g、皮膚光感作性試験269.6~318.3 g であった。試験期間を通して温度 23 ± 3 °C、湿度 55 ± 15 %、換気回数11~20回/時間、12時間照明 (7:00~19:00) に設定された飼育室で、皮膚感作性試験では、網底ステンレススチール製網ケージ (37 W × 47 D × 19 H (cm)) に、光毒性試験および皮膚光感作性試験では、網底アルミニウム製ケージ (予備飼育期間: 40 W × 45 D × 25 H (cm)、群分け後: 30 W × 40 D × 24 H (cm)) に予備飼育期間中は3匹ずつ、群分け後は個別に収容した。市販固型飼料 (ラボ G スタンダード、日本農産工業㈱) および塩素消毒した井戸水を自由に摂取させた。

3. 試験方法

1) 皮膚一次刺激性試験

18匹のウサギを用いて、Federal Register (1978) の方法に準じて皮膚一次刺激性を検討した。

ウサギの背部被毛を、あらかじめ電気バリカンおよび電気シェーバーを用いて剪毛・剃毛し、アイランドスキンが少なく、皮膚の状態が良好な動物を試験に用いた。各動物の背部について、正中線を境界にして左右および頭・尾側にそれぞれ2分 (計4区

分) し、対角上にそれぞれ健常または損傷皮膚を設けた。損傷皮膚は投与直前に投与部皮膚を、蒸留水で濡らしたカミソリの刃で出血を認めない程度にこすることにより作成した。なお、5種類の被験物質および比較対照物質の適用にあたっては、特定の動物に偏ることなくそれぞれについて健常皮膚と損傷皮膚を6部位ずつ割り当てた。

被験物質0.5 g をリント布 (2.5 × 2.5 cm) に可能な限り均一に塗布した後、ウサギの背部皮膚の所定部位に貼付した。さらに、その上から約5 × 5 cm の絆創膏 (ブレンダーーム、スリーエム薬品㈱) で密封し、その上に粘着包帯を巻いた。なお、比較対照物質についても同様に処置した。

処置後24時間に、被験物質および比較対照物質を除去し、除去後約1時間 (処置後約24時間) および除去後48時間 (処置後72時間) に健常および損傷皮膚について、紅斑・痂皮形成および浮腫形成を観察した。処置後72時間の観察時に皮膚反応が認められた例については、最長、投与後7日まで皮膚反応を観察した。Table 1 に示す Draize の基準 (Draize, 1959) に従って皮膚反応の評点を付け、健常および損傷皮膚の処置後24および72時間における平均評点を求めた後、それらの平均値を算出し、皮膚一次刺激指数 (P.I.I.) として刺激の程度を表示した。

2) 皮膚感作性試験

1群6匹のモルモットを用いて、Maximization test 法 (Magnusson and Kligman, 1969) に準じて、皮膚感作性を検討した。

(1) 感 作

動物の頸部背側皮膚を、あらかじめ電気バリカンおよび電気シェーバーを用いて剪毛・剃毛し、一次感作として Fig. 2 に示した感作部位 (約2 × 4 cm) に、a) FCA と注射用蒸留水 (1:1) 乳化物、b) MC903 軟膏、軟膏基剤または0.1% DNCB オリーブ油溶液、c) MC903 軟膏、軟膏基剤と FCA と注射用蒸留水 (1:1:2) 乳化物または0.2% DNCB (FCA に混合) と注射用蒸留水 (1:1) 乳化物をそれぞれ左右2ヶ所に、0.05 ml/site ずつ皮内注射した。

皮内注射の6日後に、一次感作動物の頸部背側皮

Table 1. Evaluation of skin reactions

A. Erythema and Eschar formation	
No erythema	0
Very slight erythema (barely perceptible)	1
Well defined erythema	2
Moderate to severe erythema	3
Severe erythema (beet redness) to slight eschar formation (injuries in depth)	4
B. Edema formation	
No edema	0
Very slight edema (barely perceptible)	1
Slight edema (edges of area well defined by definite raising)	2
Moderate edema (raised approximately 1 mm)	3
Severe edema (raised more than 1 mm and extending beyond area of exposure)	4
Irritation grade	
Mild: P.I.I. < 2, Moderate: $2 \leq \text{P.I.I.} < 5$, Severe: $5 \leq \text{P.I.I.}$

Fig. 2. A row of three intradermal injections on each side:
 (a) 0.05 ml of water emulsified in FCA
 (b) 0.05 ml of the test agent alone
 (c) 0.05 ml of the test agent emulsified in FCA
 Seven days after the first sensitization, each ointment were applied for 48 hr. Two weeks later, each ointment were applied on a paper envelope (2×2 cm) of under a sealed dressing as of induction in shaved latus. Skin reaction were evaluated after 24 and 48 hr.

膚を再び剪毛・剃毛し、10%ラウリル硫酸ナトリウム・白色ワセリン軟膏を感作部位に開放塗布した。その翌日、二次感作として注射筒に充填したMC903軟膏、軟膏基剤または1%DNCB白色ワセリン軟膏を0.2 ml ずつ同部位に塗布した。さらに、塗布部に濾紙を被せ、その上をサージカルテープ（ブレンダーム、スリーエム薬品株）および粘着性伸縮包帯（シルキーテックス、東京衛材研究所）で覆い、48時間密封した。

(2) 惹起

二次感作の13日後に、無処置対照群を含むすべての動物の左右側腹部を、電気バリカンおよび電気シェーバーを用い剪毛・剃毛した。その翌日、Fig. 2に示したように側腹部（約2×2 cm）に注射筒に充填したMC903軟膏、軟膏基剤、0.1%DNCB白色ワセリン軟膏または白色ワセリンを0.1 ml ずつ塗布した。さらに濾紙、サージカルテープ、粘着性伸縮包帯を用いて上記と同様に処置し、24時間密封した。

密封塗布後24および48時間に塗布部位の皮膚状態を肉眼的に観察し、判定基準（Table 2）に従って評価した。

Table 2. Scores of skin reaction.

Score	Skin reaction
0	No visible change
1	Mild and scattered erythema
2	Moderate erythema
3	Intense erythema and / or edema

3) 光毒性試験

1 群 6 匹のモルモットを用いて、光毒性を検討した。

モルモットの背部を、電気バリカンおよび電気シェーバーを用いて剪毛・剃毛した。24時間後、正中線を対称軸として、 1.5×1.5 cm の区画を左右それぞれに 3 区分ずつ作成した。この区画内に、各被験物質 0.02 ml を左右一対ずつそれぞれ 30 分間開放塗布した後、正中線の片側をアルミホイルで遮光し、紫外線照射装置（㈱前田製作所）で約 11.2 J/cm^2 （光源から皮膚までの距離 30 cm，照射時間 66 分）の長波長紫外線（UV-A：320～400 nm）を照射した。UV-A 照射後 24 および 48 時間に照射または遮光部位の皮膚状態を肉眼的に観察し、判定基準（Table 3）に従って評価した。陽性対照物質である 8-MOP は、0.02% エタノール溶液として同様の処置を行った。なお、MC903 の紫外線吸収極大波長は 264 nm である。

4) 皮膚光感作性試験

1 群 6 匹のモルモットを用いて、Adjuvant and strip 法（佐藤ら，1980）に準じて光感作性を検討

した。

(1) 光感作

動物の頸部背側皮膚を、あらかじめ電気バリカンおよび電気シェーバーを用いて剪毛・剃毛し、Fig. 3 に示したように、約 2×4 cm の 4 隅に注射用蒸

Fig. 3. Sensitization: Each guinea-pig was given four intradermal injection of 0.1 ml of water emulsified in FCA on nuchal area and was stripped with cellophane tape before application of test sample and irradiation. The application of test sample and irradiation was repeated 5 times every day.

Challenge: Two weeks later, the test samples were applied on shaved back area (1.5×1.5 cm/each applied site). After 30 min, one side was irradiated with UV-A and another side was shielded with aluminum foil. Skin reaction were evaluated after 24 and 48 hr.

Table 3. Evaluation of skin reactions (Scale for scoring).

A. Erythema formation	
No erythema	0
Very slight erythema	1
Well defined erythema	2
Moderate to severe erythema	3
Severe erythema with eschar formation	4
B. Edema formation	
No edema	0
Slight edema	1
Moderate edema	2
Severe edema	3

留水と FCA (1:1) 乳化物を 0.1 ml ずつ皮内注射した。その囲まれた部分の角層をセロハンテープで剝離し、注射筒に充填した各被験物質 0.1 ml をそれぞれ開放塗布し、紫外線照射装置 (同前) で約 10.2 J/cm² (光源から皮膚までの距離 30 cm, 照射時間 56 分) の UV-A を照射した。角層剝離、被験物質塗布、UV-A 照射の操作を 1 日 1 回、計 5 日間連続して実施した。なお、陽性対照物質である 6-MC は、5 % アセトン溶液として同様の処置を行った。

(2) 光 惹 起

感作開始後 20 日に、無処置群を含むすべての動物の背部を電気バリカンおよび電気シェーバーを用いて剪毛・剃毛した。その翌日に、Fig. 3 に示したように背部正中線を対称軸として、1.5×1.5 cm の区画を左右それぞれ 2 あるいは 3 区分作成した。この区画内に、注射筒に充填した各被験物質 0.02 ml を左右一対ずつ開放塗布し、正中線の片側をアルミホイルで遮光した。塗布 30 分後に、紫外線照射装置で約 10.2 J/cm² (光源から皮膚までの距離 30 cm, 照射時間 60 分) の UV-A を照射し光惹起した。光惹起後 24 および 48 時間に、照射または遮光部位の皮膚状態を肉眼的に観察し、判定基準 (Table 3) に従って

評価した。なお、陽性対照物質である 6-MC は、1 % アセトン溶液として同様の処置を行った。

実 験 結 果

1. 皮膚一次刺激性試験 (Table 4)

MC903 軟膏、軟膏基剤および軟膏劣化品群では、健常および損傷皮膚ともに塗布後 24 時間においてごく軽度の紅斑～明らかな紅斑 (評点 1～2) が半数例ないし全例に、また、塗布後 72 時間において、ごく軽度の紅斑～明らかな紅斑が 0～4/6 例に認められた。なお、これらの反応はいずれも塗布後 7 日には観察されなかった。比較対照物質である白色ワセリンでは、健常皮膚において皮膚反応は認められなかったが、損傷皮膚でごく軽度の紅斑が 1/6 例に認められ、この反応は塗布後 7 日にも観察された。

ウサギ皮膚に対する P.I.I. は、MC903 軟膏 (25, 50, 100 μg/g) ではそれぞれ 0.5, 0.6, 0.8 であった。また、軟膏基剤、軟膏劣化品および白色ワセリンではそれぞれ 0.7, 0.8 および 0.1 であった。

2. 皮膚感作性試験 (Table 5)

MC903 軟膏および軟膏基剤で感作した動物なら

Table 4. Primary skin irritation of calcipotriol ointment in rabbits.

Test agent	No. of animals	Irritation score ¹⁾				P.I.I. ²⁾	Irritation grade
		Intact skin		Abraded skin			
		24 hr	72 hr	24 hr	72 hr		
Calcipotriol (0 μ g/g) ointment [placebo]	6	1.0	0.3	1.2	0.3	0.7	Mild
Calcipotriol (25 μ g/g) ointment	6	1.0	0.3	0.5	0.0	0.5	Mild
Calcipotriol (50 μ g/g) ointment	6	1.0	0.2	0.8	0.5	0.6	Mild
Calcipotriol (100 μ g/g) ointment	6	1.0	0.7	0.8	0.8	0.8	Mild
Calcipotriol (50 μ g/g) ointment deteriorated	6	1.0	1.2	0.7	0.3	0.8	Mild
Vaselineum album	6	0.0	0.0	0.2	0.3	0.1	Mild

¹⁾ : Mean score of 6 animals.

²⁾ : Primary irritation index.

びに無処置動物を各被験物質でそれぞれ惹起させた場合、いずれも惹起終了後24時間において、軽度の紅斑～中等度の紅斑（評点1～2）が半数例ないし全例に認められた。また、惹起終了後48時間においても同程度の皮膚反応が認められた。一方、陽性対照物質である DNCB で感作した動物を0.1% DNCB 白色ワセリン軟膏で惹起した場合、各観察時間において強度の紅斑と浮腫（評点3）が全例に認められた。しかし、同群において白色ワセリンで惹起した場合、皮膚反応は認められなかった。なお、無処置動物を0.1% DNCB 白色ワセリン軟膏および白色ワセリンでそれぞれ惹起した場合、いずれも皮膚反応は認められなかった。

3. 光毒性試験（Table 6）

MC903 軟膏および軟膏基剤を塗布した場合、UV-A 照射後24および48時間において、照射部および遮光部ともにわずかな紅斑（評点1）がそれぞれ1/6例に認められた。一方、陽性対照物質である 8-MOP では、UV-A 照射後24時間で照射部に明らかな紅斑（評点2）およびわずかな浮腫（評点1）が全例に認められた。また、UV-A 照射後48時間で明らかな紅斑が全例に認められた。遮光部では各観察時間において皮膚反応は観察されなかった。

4. 皮膚光感作性試験（Table 7）

MC903 軟膏および軟膏基剤で感作した動物を各被験物質でそれぞれ光惹起した場合、光惹起後24時間において照射部および遮光部のいずれにおいてもわずかな紅斑～明らかな紅斑（評点1～2）が全例に認められた。光惹起後48時間においても同程度の皮膚反応が観察された。

無処置動物を MC903 軟膏および軟膏基剤で光惹起した場合、照射および遮光部ともに光惹起後24時間では皮膚反応が認められなかった。光惹起後48時間ではわずかな紅斑が照射および遮光部ともにそれぞれ1/6あるいは2/6例に認められた。1% 6-MC で光惹起した場合、各観察時間において照射および遮光部ともに皮膚反応は認められなかった。

一方、陽性対照物質である 6-MC で感作した動物を1% 6-MC で光惹起した場合、各観察時間において、照射部ではわずかな紅斑～明らかな紅斑が全例

に認められた。また、光惹起後24時間の1例、48時間の半数例ではわずかな浮腫（評点1）を伴っていた。遮光部では各観察時間でわずかな紅斑がほぼ半数例に認められた。アセトンで光惹起した場合、各観察時間において照射および遮光部ともに皮膚反応は観察されなかった。

考 察

MC903 の皮膚安全性を明らかにするために、臨床適用剤形である MC903 軟膏のウサギを用いた皮膚一次刺激性試験、モルモットを用いた皮膚感作性試験、光毒性試験および皮膚光感作性試験を実施した。

1. 皮膚一次刺激性試験

MC903 軟膏（25, 50, 100 $\mu\text{g/g}$ ）および軟膏劣化品では、塗布後24時間においていずれも半数例ないし全例にごく軽度の紅斑～明らかな紅斑が認められ、軽度の皮膚一次刺激性を有することが示されたが、MC903 の濃度に相関した刺激性の程度の差はみられなかった。さらに、塗布後72時間では、いずれの投与群においても皮膚反応の発現例数および皮膚反応の程度は軽減した。

一方、軟膏基剤を塗布した健常および損傷皮膚においても、各被験物質とほぼ同程度の皮膚反応が認められた。

以上のことから、各被験物質によって示されたウサギ皮膚に対する一次刺激性は、MC903 に起因したものでなく、いずれも軟膏の基剤によるものと考えられた。比較対照物質である白色ワセリンと比較すると、刺激性は強いものではあったが、各被験物質の P.I.I. は0.5～0.8であり、いずれも弱い刺激物に区分された。

2. 皮膚感作性試験

Maximization test 法により、MC903 軟膏で感作した動物を MC903 軟膏あるいは軟膏基剤で惹起した部位では、塗布終了後24および48時間に軽度の紅斑～中等度の紅斑がほぼ全例に認められた。しかしながら、無処置動物を MC903 軟膏あるいは軟膏基剤で惹起した場合にも同程度の皮膚反応が認められ

Table 5. Contact sensitivity of calcipotriol ointment in guinea-pigs.

Sensitizing antigen	No. of animals	Challenging antigen	Time ¹⁾ (hr)	Grade of skin reaction			
				0	1	2	3
Calcipotriol (0 μ g/g) ointment [placebo]	6	Calcipotriol (0 μ g/g) ointment [placebo]	24	3	3	0	0
			48	0	3	3	0
		Calcipotriol (50 μ g/g) ointment	24	0	2	4	0
			48	0	1	5	0
Calcipotriol (50 μ g/g) ointment	6	Calcipotriol (0 μ g/g) ointment [placebo]	24	2	4	0	0
			48	1	5	0	0
		Calcipotriol (50 μ g/g) ointment	24	1	5	0	0
			48	0	4	2	0
DNCB ²⁾	6	0.1% DNCB	24	0	0	0	6
			48	0	0	0	6
		Vaselinum album	24	6	0	0	0
			48	6	0	0	0
Non-treatment	6	Calcipotriol (0 μ g/g) ointment [placebo]	24	2	2	2	0
			48	3	2	1	0
		Calcipotriol (50 μ g/g) ointment	24	1	4	1	0
			48	3	1	2	0
	6	0.1% DNCB	24	6	0	0	0
			48	6	0	0	0
		Vaselinum album	24	6	0	0	0
			48	6	0	0	0

¹⁾ : Reading time after the removal of calcipotriol ointment.²⁾ : DNCB, 2,4-dinitrochlorobenzene; 1st sensitization, 0.1% DNCB; 2nd sensitization, 1% DNCB.**Table 6.** Phototoxicity of calcipotriol ointment in guinea-pigs.

Test agent	No. of animals	Time ¹⁾ (hr)	UV ²⁾	Erythema score					Edema score			
				0	1	2	3	4	0	1	2	3
Calcipotriol (0 μ g/g) ointment [placebo]	6	24	+	5	1	0	0	0	6	0	0	0
			—	5	1	0	0	0	6	0	0	0
		48	+	5	1	0	0	0	6	0	0	0
			—	5	1	0	0	0	6	0	0	0
Calcipotriol (50 μ g/g) ointment	6	24	+	5	1	0	0	0	6	0	0	0
			—	5	1	0	0	0	6	0	0	0
		48	+	5	1	0	0	0	6	0	0	0
			—	5	1	0	0	0	6	0	0	0
0.02% 8-MOP ³⁾ ethanol sol.	6	24	+	0	0	6	0	0	0	6	0	0
			—	6	0	0	0	0	6	0	0	0
		48	+	0	0	6	0	0	6	0	0	0
			—	6	0	0	0	0	6	0	0	0

¹⁾ : Reading time after the irradiation of UV-A.²⁾ : Irradiation of UV-A.³⁾ : 8-MOP, 8-methoxypsoralen.

Table 7. Photocontact sensitivity of calcipotriol ointment in guinea-pigs.

Sensitizing antigen	No. of animals	Challenging antigen	Time ¹⁾ (hr)	UV ²⁾	Erythema score					Edema score			
					0	1	2	3	4	0	1	2	3
Calcipotriol (0 μ g/g) ointment [placebo]	6	Calcipotriol (0 μ g/g) ointment [placebo]	24	+	0	4	2	0	0	6	0	0	0
				—	0	5	1	0	0	6	0	0	0
			48	+	0	4	2	0	0	6	0	0	0
				—	0	4	2	0	0	6	0	0	0
		Calcipotriol (50 μ g/g) ointment	24	+	0	3	3	0	0	6	0	0	0
				—	0	4	2	0	0	6	0	0	0
Calcipotriol (50 μ g/g) ointment	6	Calcipotriol (0 μ g/g) ointment [placebo]	24	+	0	5	1	0	0	6	0	0	0
				—	0	5	1	0	0	6	0	0	0
			48	+	0	4	2	0	0	6	0	0	0
				—	0	4	2	0	0	6	0	0	0
		Calcipotriol (50 μ g/g) ointment	24	+	0	4	2	0	0	6	0	0	0
				—	0	3	3	0	0	6	0	0	0
5% 6-MC ³⁾ acetone sol.	6	1% 6-MC acetone sol.	24	+	0	1	5	0	0	5	1	0	0
				—	3	3	0	0	0	6	0	0	0
			48	+	0	1	5	0	0	3	3	0	0
				—	4	2	0	0	0	6	0	0	0
		Acetone	24	+	6	0	0	0	0	6	0	0	0
				—	6	0	0	0	0	6	0	0	0
Non-treatment	6	Calcipotriol (0 μ g/g) ointment [placebo]	24	+	6	0	0	0	0	6	0	0	0
				—	6	0	0	0	0	6	0	0	0
			48	+	5	1	0	0	0	6	0	0	0
				—	5	1	0	0	0	6	0	0	0
		Calcipotriol (50 μ g/g) ointment	24	+	6	0	0	0	0	6	0	0	0
				—	6	0	0	0	0	6	0	0	0
			48	+	4	2	0	0	0	6	0	0	0
				—	4	2	0	0	0	6	0	0	0
		1% 6-MC acetone sol.	24	+	6	0	0	0	0	6	0	0	0
				—	6	0	0	0	0	6	0	0	0
			48	+	6	0	0	0	0	6	0	0	0
				—	6	0	0	0	0	6	0	0	0

¹⁾ : Reading time after the irradiation of UV-A.²⁾ : Irradiation of UV-A.³⁾ : 6-MC, 6-methyl coumarin.

た。このように無処置動物（非感作動物）においても皮膚反応が認められていることから、各群で見られた皮膚反応は MC903 軟膏の皮膚一次刺激性に起因した変化と考えられた。

一方、陽性対照物質である DNCB で感作し、0.1%

DNCB 白色ワセリン軟膏で反応惹起した部位では24 および48時間後にそれぞれ明らかな皮膚反応が認められ、本試験による試験系の適正さが確認された。

今回用いた Maximization test 法がアジュバントを被験物質とともに併用感作して、感作性に対する

感受性を高めた試験法の一つであることを考慮すれば、MC903 軟膏はモルモット皮膚に対してほとんど感作性を示さないものと考えられた。

3. 光毒性試験

無処置動物に MC903 軟膏を塗布後、UV-A 照射による光毒性を検討した。照射部および遮光部でわずかな紅斑が各 1/6 例に認められたものの、照射部において皮膚反応が増強することはなく、遮光部と同程度の紅斑が観察されたにすぎなかった。したがって、皮膚に対する一次刺激性に起因した軽度の反応は認められたものの、MC903 軟膏はモルモット皮膚に対して光毒性を示さないものと考えられた。

一方、陽性対照物質である 8-MOP (0.02% 8-MOP エタノール溶液) を塗布し、紫外線を照射したところ全例に明らかな陽性皮膚反応が認められたのに対し、遮光部位では皮膚反応が認められなかったことから、本試験における光毒性検出試験系の適正さが確認された。

4. 皮膚光感作性試験

Adjuvant and strip 法により MC903 軟膏および軟膏基剤で光感作し、各被験物質で光惹起した動物では、光惹起後24および48時間に照射部において、わずか～明らかな紅斑が全例に認められた。しかし、当該群の遮光部においてもほぼ同程度の紅斑が観察され、紫外線照射の有無にかかわらず同程度の皮膚反応が認められた。したがって、皮膚に対する一次刺激性に起因した軽度の反応は認められたものの、MC903 軟膏はモルモットに対して皮膚光感作性を示さないものと考えられた。

一方、陽性対照物質である 6-MC で感作し、1% 6-MC アセトン溶液で光惹起した部位では24、48時間後で全例に明らかな陽性反応が認められたのに対し、遮光部位では UV-A 照射部と比較して明らかに弱い反応が認められたことから、本試験における皮膚感作性検出試験系の適正さが確認された。

要 約

MC903 軟膏の皮膚毒性としてウサギを用いた皮膚一次刺激性、モルモットを用いた皮膚感作性ならびに光毒性および皮膚光感作性の有無を検討した。

1. 皮膚一次刺激性試験では、MC903 軟膏、軟膏基剤、劣化品軟膏ともにごく軽度～明らかな紅斑が認められたが、その程度は弱い刺激物に区分された。

2. 皮膚感作性試験では、MC903 軟膏はほとんど皮膚感作性を示すことはない判断された。

3. 光毒性試験では、MC903 軟膏は光毒性を有しないと判断された。

4. 皮膚光感作性試験では、MC903 軟膏は皮膚光感作性を示すことはない判断された。

(試験期間：1992年11月～1994年9月)

文 献

- Binderup, L. and Bramm, E. (1988): Effects of a novel vitamin D analogue MC903 on cell proliferation and differentiation in vitro and on calcium metabolism in vivo. *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 889-895.
- Draize, J. H. (1959): Appraisal of the safety of chemical in foods, drugs and cosmetics (the Staff of the Division of Pharmacology Food and Drug administration, Department of Health Education and Welfare pub., ed.), p. 46, F.D.A. officials of U.S. Business office, Topeka. *Federal Register*, **43** (163), 81, Tuesday, Aug. 22 (1978).
- Magnusson, B. and Kligman, A. M. (1969): The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *J. Invest. Dermatol.*, **52**, 268-276.
- 佐藤悦久, 勝村芳雄, 市川秀之, 小林敏明, 中嶋啓介(1980): モルモットによる光接触感作性試験法 (Adjuvant-Strip 法). *西日皮膚*, **42**, 831-837.