

광감작성 시험에서의 동물대체 시험법

이 호, 남 기택, 고 재숙, 박 원재
태평양 기술연구원, 분석/안전성 센터
449-900, 경기도 용인시 기흥읍 보라리 314-1

In-vitro Alternatives to Photosensitization Test

Lee Ho, Nam Ki Taek, Koh Jae-Sook and Park Won-Jae
Pacific R&D Center
314-1, Bora-Ri, Kiheung-Eup, Yongin-Si, Kyounggi-Do, 449-900, Korea

요 약

동물시험을 최소화하고, 동물시험에 사용되는 노력과 비용을 줄이기 위해 동일한 동물에서 광독성과 광알러지성을 함께 보는 새로운 방법을 제안하고, in vitro alternatives로서 photostability와 spectrophotometric carbonyl assay의 유용성을 검토하였다. Modified photosensitization model에서는 Ichikawa 방법과는 달리 동물수, 휴식 기간, 첩포 횟수를 단순히하고 폐쇄 첩포를 추가하였다. 방법의 유용성을 보기 위해 Benzocaine, 6-methyl coumarine을 Ichikawa 방법 및 본 시험 방법으로 결과를 비교한 결과 macroscopic, histologic examination에서 비슷한 결과를 얻었다.

Photostability 시험에서는 photoreactive agent 들이 모두 20%이상의 흡광도 감소를 보여 photosensitization potential을 측정하기 위한 전 단계 실험으로서의 가능성을 보여주었고, spectrophotometric carbonyl assay에서는 salmonella를 이용한 광독성 실험에서는 나타나지 않았던 저농도의 Anthracene, Hematoporphyrin에서조차도 phototoxic potential을 보여주어 in vitro alternatives로서의 가능성을 보여주었다.

I. 서론

태양광은 생물체가 생명을 유지하기 위한 기본적인 필수조건이지만 여러 가지 피부 질병에 관여하기도 한다. 태양광에 의한 직접적인 피해는 내.외인자에 의해 유발될 수 있고 외부적 인자에 의해서는 Photosensitization에 의한 local disorders나 lupus erythematosus와 같은 systemic disorders를 유발한다. Photosensitization은 Phototoxicity와 Photoallergy를 통칭한 광범위한 용어로서 물질이 활성산소와 함께 생체에 영향을 주는 type II와 물질이 직접 작용하는 type I 으로 구분될 수 있고 물질에 전달된 energy는 electron transfer, hydrogen abstraction, cis-trans isomerization, bond cleavage, cycloaddition 등의 기작을 통해 세포를 구성하는 macromolecule에 영향을 준다. 태양광에 의해 문제를 야기시킬 수 있는 물질을 검색하는 수단은 주로 동물시험에 의존해왔으나 동물에 대한 윤리적 측면, 작용기작에 대한 정보, 방법의 정확성 및 재연성 등을 이유로 Table 1과 같은 in vitro alternatives가 현재 연구되고 있다.

Table 1. In vitro alternatives to phototoxicity

Methods	Mechanism	Reference
Red blood cell photohemolysis assay	Membrane hemolysis	(1)
Yeast, Salmonella using assay	Growth inhibition	(2)(3)
Skin ^{2TM} assay	Cytotoxicity	(4)
NR uptake assay	Cytotoxicity	(5)
Complement photoactivation assay	Complement activation	(6)
Solatex-PI phototoxicity test	Macromolecular change	(7)
Photosensitized oxidation of histidine	Photooxidation of histidine	(8)

In vitro alternatives의 한계는 작용기작의 단순성으로서 한가지 시험만으로 인간과 생리적으로 유사한 동물을 이용한 시험을 대체하기는 어려우므로 다양한 작용기작을 갖는 실험모델을 갖추는 것이 중요하다. protein이 내.외부적 요인에 의해 Photooxidation되면 amino side chains에 carbonyl group 이 도입되어 specific proteinase에 의해 선택 분해되어 단백질 turn over, 백혈구 살균 작용, aging process 등의 생리적 현상외에 여러 가지 질병에도 관여한다(11). carbonyl group의 정량적 측정은 HPLC(11), Boro[3H] hydride labeling(12), DNPH 이용 Spectrophotometry method(13) 등에 의해 측정되고 있고 감도와 방법의 편이성에 따라 약간씩 차이가 있다.

Photoallergy에 대한 실험방법은 Table 2에 소개된 방법이 대표적인 것인데 Ichikawa와

Kaidbey의 방법은 시간과 노력이 많이드는 시험법이며 장시간에 걸친 실험결과도 Photoallergy potential만을 보는 것으로 단편적이다. 따라서 같은 감도를 가지면서, 보다 시간과 노력이 적게들며 동물수도 줄일 수 있는 방법이 필요하다. 본 논문에서는 one system에서 primary irritation, phototoxicity, photosensitization, sensitization potential을 측정하는 protocol과 새로운 in vitro alternatives로서 photostability와 carbonyl assay의 유용성을 살펴보았다.

II. 실험 재료 및 방법

1. Chemicals

실험에 사용된 8-MOP (8-Methoxypsoralen), Anthracene, Hematoporphyrin, 6-Methylcoumarine, Bovine serum albumin 등은 Sigma (St, Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였고, DNPH (2,4-Dinitro phenylhydrazine)은 ACROS에서 구입하였다.

자외선 차단제로서 Octyl methoxy cinnamate는 BASF에서 그리고 Butyl methoxy dibenzoyl methane은 Givaudan에서 구입하였고, 그외의 시약, 용매는 시약 특급을 사용하였다.

2. Animals and Care

건강한 Hartley Albino Guinea Pigs 수컷 (체중 280-350g)을 구입한 뒤 약 1주일간 순화하면서 3단 사육장내에 배열된 스테인레스 케이지에서 개별 수용하여 국내 시판 실험동물용 사료를 공급하고 음료수는 일반 수돗물을 자유 섭취시켰고, 순화후 등 부위를 제모하고 피부 상태가 양호한 개체를 선별하였다.

3. Primary irritation

시료의 피부 자극 지수를 구하고, Photosensitization 실험에서의 적용농도를 산출하기 위해 기니픽에서의 일차자극을 실시한다. 시험물질 적용 6시간전에 선별된 6마리의 기니픽을 제모하고, 3마리에 대해서는 찰과소와 비찰과소 각각 2개씩 모두 4개소를 처치 구획과 비처치 구획으로 구분하여 시료를 폐쇄 첩포하고 3마리에 대해서는 찰과없이 개방 첩포를 실시한 후 24시간후에 등 부위의 자극을 관찰하고 48시간, 72시간째에도 같은 방법으로 자극을 관찰한 뒤 국립 보건 안전 연구원 고시 94-3호 "의약품 등의 독성시험 기준"(14)에

준하여 평가하였다.

4. Modified Photosensitization model

기니픽을 이용한 광독성 시험은 Lovell 과 Sanders(15) 의 방법을 이용하였고 다만 사용 부위는 목부위에 한정하며 나머지 등 부위는 Photoallergy 시험을 위해 남겨둔다. 제모된 목 부위에 시료를 적용하고 한쪽옆은 aluminium foil 로 덮어 씌우고 광조사를 하며, 두께 22.5mm glass filter를 사용하여 소량의 UV B 영역 자외선을 여과시킨다.

. UV A Lamp : Philips TL (TL 40W/O9N) : Average UV 315-400nm 9.5W

. 측정 기기 : Waldmann UV meter

. 광 조 사 량 : UV A (16J/cm²), UV B (80mJ/cm²)

광조사 직후 및 광조사후 24시간, 48시간, 72시간에서의 피부 반응을 관찰하고 72시간까지의 반응중 최고치를 피부 반응으로 평가한다. 자극의 판정은 Draize의 산출 방법(16)에 따른다. 광독성 시험후 24시간후에 등 부위를 제모하여 광알러지 시험을 실시한다. 실험의 과정은 Fig.1 과 같다.

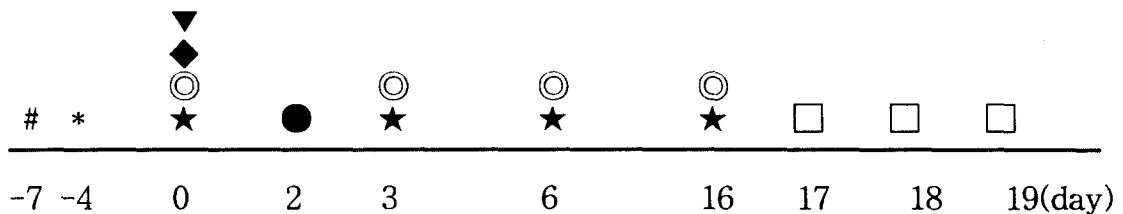


Fig.1. Study design of photosensitization test.

- | | | | |
|---|--------------------|---|-------------------------------|
| # | Primary irritation | * | phototoxicity |
| ▼ | FCA id injection | ◆ | FCA + TS(sample) id injection |
| ★ | UV irradiation | ● | occlusive patch |
| ◎ | open patch | □ | observation |

FCA와 FCA+시료의 주사는 광독성 부위 바로 아래에 대각선 모양으로 교차하여 주사하고 SLS 10%를 적용한 뒤 2시간후 생리 식염수로 잘 닦은 뒤 시료를 개방 적용한다.

기본적으로는 Ichikawa(10)의 방법과 비슷하나 동물수, 적용 횟수 및 방법, 휴식 시간등이 다르고 광조사 방법은 광독성에서의 방법과 동일하게 시행한다.

Experimental design

group	materials (maker)	Number of Animals	Concentration (%)		
			induction		Challenge
			intradermal	topical	
1.	8-MOP	6	0.02	0.1	0.1, 0.02, 0.005
1-1.	photocontrol	6	0.02	0.1	0.1, 0.02, 0.005
1-2.	control	4	-	-	0.1, 0.02, 0.005
2.	Benzocain	6	2.0	20	20, 5, 1
2-1.	photocontrol	6	2.0	20	20, 5, 1
2-2.	control	4	-	-	20, 5, 1
3.	6-Methyl coumarin	6	2.0	2	2.0, 1.0, 0.5
3-1.	photocontrol	6	2.0	2	2.0, 1.0, 0.5
3-2.	control	4	-	-	2.0, 1.0, 0.5
4.	Butyl methoxy dibenzoylmethane	6	1.0	10	5, 1
4-1.	photocontrol	6	1.0	10	5, 1
4-2.	control	4	-	-	5, 1
5.	Octyl methoxy cinnamate	6	1.0	10	5, 1
5-1.	photocontrol	6	1.0	10	5, 1
5-2.	control	4	-	-	5, 1

5. Histological examination

기니픽의 시료를 도포한 등 부위에서 biopsy를 실시한 후 10% neutral buffered formalin 에 고정한 후 paraplast에 포매, 3-4 μ m의 절편을 제작하여 hematoxylin-eosin 염색을 실시하여 광학 현미경으로 관찰하였다.

6. In vitro alternatives

1) Photostability

비휘발성 용매에 녹은 시료를 glass dish에 놓고 앞에서의 Philips lamp로 UV A (80J/cm²), UV B (3.5J/cm²)를 조사한 후 적당히 희석한 뒤 UV-spectra의 변화를 관찰하고 관측치는 mean \pm S.D로 나타낸다. (n=3)

2) Carbonyl value assay

Protein carbonyl content는 Dubey 등의 방법(17)을 이용하였다. 각 실험에서 시료를 적당한 비휘발성 용매에 희석한 뒤 50mM potassium phosphate buffer에 희석된 6mg/ml BSA를 glass dish에 넣고, UV B가 여과된 Philips UV A lamp로 UV A (60J/cm²), UV B (420mJ/cm²)를 조사한 후, DNPH(12.5mM) 4ml을 넣어 5ml이 되도록 한다. (대조군은 DNPH 대신 2.5M HCl을 사용한다.) 매 10분간 vortexing 하면서 암,실온에서 1시간동안 반응시킨 후 20% TCA 용액을 넣어 단백질을 침전시키고 3000g에서 10분간 원심분리하여 단백질을 분리한다. 10% TCA 용액으로 수세한 뒤 homgenizer를 사용하여 단백질 덩어리를 분쇄시키고 ethanol/ethyl acetate (1:1, V/V)로 1-3회 추출 세척한다. 최종 pellets은 6M guanidine-HCl (20mM potassium phosphate buffer) 용액으로 37°C에서 vortexing 하면서 30분간 용해시킨다.

불용성 물질은 3000g로 원심분리하여 제거한다. Carbonyl group은 355-390nm에서의 흡광도로 계산하는데 level은 extinction coefficient 계수를 사용하고 ($\epsilon = 22,000/106\text{nmol/ml}$) protein mg에 대한 carbonyl group level로 표시한다.

$$\text{Induction factor} = \frac{\text{CO level (difference value) by sample}}{\text{CO level (difference value) by solvent used in each test}}$$

III. 결과 및 고찰

1. Modified photosensitization model

Photoreactive agents 5종(8-MOP, Benzocaine, 6-Methylcoumarin, Butyl methoxy dibenzoyl methane, Octyl methoxy cinnamate)에 대한 일차자극지수(P.I.I), 광독성 및 광알러지 Potentials을 Table 3에 나타내었다. Benzocaine은 photoreactive agent이나 allergic potential이 더 높게 나타나는 물질인데, 이번 실험 결과에서도 photoallergic potential은 20% 농도에서 FR(fractional response)은 1/5인데 반해 allergic potential은 3/5로서 더 높게 나타났고 Ichikawa's Method에서 유발된 potentials과 비슷했다. 6-Methyl coumarin 역시 allergic potential과 photoallergic potential을 함께 가지고 있으나 photoallergic potential이 높은 물질로서 FR=4/6의 potential을 나타내어 Ichikawa's Method에서와 유사한 결과를 얻었다. 육안적 소견에서의 결과를 확증하기 위해 조직학적인 관찰을 하였고 그 결과를 Fig. 2 - Fig. 5에 나타내었는데 조직학적인 소견에서도 비슷

한 결과를 보이고 있다.

8-MOP은 전형적인 광독성 물질로써 광독성 및 광알러지 potential이 있는 것으로 나타나 있으나, 실제로는 photoallergic potential 역시 시료조사 후 광을 조사하는 것이므로 광독성과 구별할 수 없다. 따라서 광독성을 나타내는 물질에 대해 광알러지 potential을 측정하기 위해서는 조직, 면역학적 방법을 별도로 사용하여야 될 것으로 보인다.

대표적인 UV A 자외선 차단제인 Butyl methoxy dibenzoyl methane은 광독성과 광알러지 potential을 나타내지 않았고, UV B 자외선 차단제인 Octyl methoxy cinnamate는 광독성을 나타내지 않았으나 미약한 allergic, photoallergic potential을 나타내었으나 유의한 수준은 아니었다. 그러나 자외선의 유해한 측면이 자외선 차단제를 사용하는 것보다 강하다는 측면에서 자외선 차단제를 사용하는 것이지 결코 현재 사용되고 있는 자외선 차단제가 안전하다는 것은 아니다. 비록 물질 그 자체보다는 불순물이 의심이 되지만 일부 변이원성이 보고(18)되었고, 개개의 물질에 대해서는 규제가 있지만 혼합물에 대한 양적 규제가 없다는 측면에서 보다 신중한 접근이 필요한 것으로 보인다.

2. In vitro alternatives

UV를 조사한 후 UV spectrum이나 HPLC에 의한 photodegradation을 예측하는 방법은 새로운 자외선 차단제를 개발하기 위해 photostability를 확보하는 측면에서 사용되고 있다 (19). Photoreactive agents가 photosensitization을 나타내기 위해서는 대개는 UV induced molecular change를 나타내며 실제로 많은 photoreactive agents는 자외선에 의해 질적, 양적 변화를 나타낸다.

본 실험에서는 자외선에 의한 유해성을 입증하기 위한 예비 과정으로서 photostability test를 toxicity test의 부분으로 이용하였는데, 일정량의 자외선을 조사한 후 UV-spectrum 변화를 관찰하였다. (Table 4)

Octyl methoxy cinnamate를 제외한 모든 photosensitization 유발 물질들이 자외선 조사 후 흡광도가 20% 이상 감소하였고, 이 중 Hematoporphyrin을 제외한 4가지 물질들이 color 변화도 보였지만 Maximum peak의 shift는 보이지 않았다. 이상의 결과에서 photostability test는 photosensitization 유발물질 검색 위한 前 단계로서 유용한 것으로 보이고 HPLC, GC 등에 의한 분리분석으로 photodegradation의 질적인 변화도 예측 가능하리라 사료된다.

조직에서의 protein photooxidation에 의한 amino side change는 SH group, Met, His, Tyr. 등을 amino acid analyzer에 의해서 측정하지만 specific oxygen radicals에 의해서만

변화된다. 그러나 carbonyl group의 변화는 다양한 종류의 oxygen radicals에 의해 non specific하게 유발되어 oxidative stress 측정법으로써 널리 이용되고 있고, reactive oxygen 발생후의 변화이고 lipid peroxidation에 의해 생성된 organic peroxide에 의해 생성되므로 보다 down regulation 된 marker라고 생각된다. Fig.6에서와 같이 CO level은 조사된 자외선량에 따라 달라지며 UV A와 UV B의 조사량이 각각 60J/cm², 420mJ/cm² 이상에서 급증하므로 in vitro 실험에서는 UV A와 UV B는 각각 60J/cm², 420mJ/cm² 으로 하였다.

Table. 5에서 나타난 것처럼 Anthracene, 8-MOP, 6-MC 등은 농도 의존적으로 CO level이 높아지고 있으나 Hematoporphyrin은 농도간에 큰 변화를 나타내지 않고 있는데, 이는 시료 자체에 의한 영향을 고려해 볼 수 있을 것이다. 자외선 차단제 2종(Octyl methoxy cinnamate, Butyl methoxy dibenzoylmethane)은 CO level이 상대적으로 낮아 phototoxic potential이 거의 나타나지 않는 것으로 나타났다. 1993년도 자료(3)에 의하면 Salmonella를 이용한 phototoxicity 실험에서 Anthracene 약 50 μ M, Hematoporphyrin 약 1.5mM에서 non-phototoxic potential을 나타냈으나 본 실험에서는 phototoxic potential을 나타내어 본 실험방법의 민감성을 잘 설명해주고 있다. 그러나 본 실험방법에서의 최대의 단점은 측정방법이 spectrophotometer에 의한 흡광도 변화이므로 단백질 함량 측정과 CO level 측정에 사용되는 파장인 280nm과 355-390nm에서 각각 흡광도를 가지는 물질은 시료 자체의 흡광도 level이 단백질이나 CO level로 오인될 수 있다는 것이다. 시험 과정에서 시료는 washing 되나 잔여시료가 있을 수 있으므로 UV protected sample에서 충분히 흡광도 수치를 낮출 필요가 있다. 시료자체가 그 파장에서 흡광도를 갖지 않는 상태에서 UV protected sample에서의 CO level이 높게 나온다는 것은 시료 자체에 의한 oxidative stress 이므로 그 자체도 toxicity data로서 유용될 수 있을 것이다. 일반적으로 in vitro alternatives는 cell line, erythrocyte 등의 unicellular organism을 대개 사용하는데 지용성 물질의 경우 용해성 때문에 한계를 가지고 있지만 본 시험에서는 macromolecule을 사용하므로 보다 광범위한 시료를 대상으로 시험할 수 있다. Photosensitization 유발 물질 검색을 위해서는 보다 합리적인 in vitro alternatives의 포트폴리오를 형편에 맞게 구성해서 다양한 작용기작을 갖는 물질들을 포괄할 수 있어야 하고, in vivo에서 이를 확증하는 검색 flow system이 필요하고 또 이들 alternatives의 유용성은 실험실간의 교차 연구에 의해 추가적으로 평가되어야 할 것으로 보인다.

Abstract

To minimize the use of animals in toxicity testing, and to reduce the cost in vivo test, more rational test method was described which determines, in the same animal, phototoxic and photoallergic potential of a substance, and is adaptable to routine testing. The other purpose of this study was to investigate the usefulness of in vivo alternatives ; photostability and spectrophotometric carbonyl assay. In this modified photosensitization model, animal numbers and resting periods, the number and method of topical application were simplified. Two positive photoreactive agents, Benzocaine and 6-methyl coumarine, showed a similar photoallergic potential to that of Ichikawa's method.

Two sunscreens, Octyl methoxy cinnamate, Butyl methoxyl dibenzoyl methane, hardly showed photoallergic potentials. The photostability test could be used in the step of prescreening of photosensitization potential because most of the photoreactive agents represented the reduction of more than 20% in the absorbance. And photoreactive agents have a high potential of photosensitization in the assessment of spectrophotometric carbonyl level although two sunscreens have a low possibility of photosensitization. Therefore this method was assumed as a valuable in vivo alternatives in the respect of sensitivity that Anthracene and Hematoporphyrin have a phototoxic potentials even in the very low concentrations which phototoxicity test using salmonella showed no phototoxic potential.

IV. 참고 문헌

- 1) Sugiyama M, Itagaki H, Hariya T, In vitro assays to predict phototoxicity of chemicals, AATEX, 2, 183-191(1994)
- 2) Daniels, F.J., A simple microbiological method for demonstrating phototoxic compounds, JID, 44, 259-263(1965)
- 3) 이 호, 고재숙, 박원재, In vivo 와 In vitro 에서의 광독성 시험법의 비교에 대한 연구, 화장품학회지, 19, 57-76(1993)

- 4) Spielmann H, Lovell W.W., Holzle E, In vitro phototoxicity testing, ATLA, 22, 314-348(1994)
- 5) Manfred Liebsch, Invitox portocol list 8, protocol no 78 (1996)
- 6) Darek Sladowski, Invitox protocol list 8, protocol no 77 (1996)
- 7) Manfred Liebsch, Invitox protocol list 7, protocol no 84 (1996)
- 8) Lovell W.W., Sanders D.J., Screening test for phototoxins using solutions of simple biochemicals, Toxic, in vitro, 4, 318-320(1990)
- 9) Kaidbey K.H., Kligman A.M., The photomaximization test for identifying photoallergic contact sensitizer
- 10) Hideyuki Ichikawa, Armstrong, R.B., Harber L.C., Photoallergic contact dermatitis in guinea pig, JID, 76, 498-503(1981)
- 11) Guohua Cao and Cutler R.G., Protein oxidation and aging, Archives of biochemistry and biophysics, 320(1), 106-114(1995)
- 12) Winter M.L., Liehr J.G., Free radical induced carbonyl content in protein of estrogen treated hamsters assayed by sodium boro[3H] hydride reduction, JBC, 266(22), 14446-14450(1991)
- 13) Burcham P.C., Kuhan Y.T., Introduction of carbonyl groups into proteins by the lipid peroxidation product, Malondialdehyde, Biochemical and biophysical research communications, 220, 996-1001(1996)
- 14) 국립보건안전연구원, 의약품 등의 독성시험기준, 국립보건안전연구원 고시 94-3호 (1994)
- 15) Lovell W.W., Sanders D.J., Phototoxicity testing in guinea pigs, Fd. Chem. Toxic, 30, 155-160(1992)
- 16) Draize, J.H., Appraisal of the safety of chemical in foods, Drugs and Cosmetics, The staff of the Division of Pharmacology, Food and Drug Eduction and Welfare, Pub. (1959)
- 17) Dubey A., Forster M.J., Sohal R.S., Effect of the spin-trapping compound N-test-butyl- α -phenylnitron on protein oxidation and life span, Archives of Biochemistry and Biophysics, 324(2), 249-254(1995)
- 18) Bonin A.M., Arlanskas A.P., Angus D.S., Baker R.S.U., Gallagher C.H., Greenoak G., Lane Brown M.M., Meher-Homji K.M., and Reeve V., UV-absorbing and other

sun protecting substances, Mutation research, 105, 303-308(1982)

- 19) R. Schwarzenbach, L. Bertschi, Determination of photostability in diluted solutions, Determination of photostability in diluted solutions, IFSCC between congress conference, 277-282(1995)

Table 2. Comparison of various photoallergy screening methods.

Test	Photomaximization(Kaidbey)(9)	Ichikawa(10)	Modified	CTFA	OECD
Species	Guinea pig	Guinea Pig	Guinea Pig	not defined	not existed
No. in test groups	8	10	6-8		
No. in control groups	8	10	4-6		
Induction route	topical	id and topical	id and topical		
No. of exposure	9 topical : 3 weeks	1 id, 5 topical : 2 weeks	1 id, 4 topical		
exposure	occlusive, 5hr	open	closed, 24hr(1), open(3) : 10days		
test group	TS	FCA(id), TS(id,open)	FCA(id), FCA+TS(id), TS(open)		
control group	-	FCA(id), V(id,open)	FCA(id), FCA+V(id), V(open)		
UV	-	UV A 10.2J/cm ² (2weeks resting)	UV A (16J) and UV B (120mJ) (10days resting)		
Challenge route	topical	topical	topical		
exposure	open	open, 24hr	open		
test group	TS	TS	TS		
control group	TS	TS	TS		
UV	-	UV A 10.2J/cm ²	UV A (16J) and UV B (80mJ)		
evaluation	24, 48hr	24, 48hr	24, 48, 72hr		

* TS : Test Sample

* V : Vehicle

Table 3. The toxicity values by evaluation modified photosensitization model.

Materials	Primary Skin Irritation		Phototoxicity				Photoallergy(NEW)				Photoallergy(OLD)					
	P.I.I		UV -		UV +		allergic potential		photoallergic potential (control)		allergic potential (control)		photoallergic potential			
	FR	MR	FR	MR	FR	MR	FR	MR	FR	MR	FR	MR	FR	MR		
8-MOP	0.1%	0.05	0/6	0.00	5/6	1.58	0/6	0.00	6/6	2.00	0/4	0.00	3/4	1.50		
	0.02%	0.00					0/6	0.00	6/6	2.00						
	0.005%	0.00					0/6	0.00	4/6	0.50						
Benzocaine	20%	0.21	0/6	0.00	0/6	0.00	3/5	0.50	1/5	0.00	0/4	0.00	0/4	0.00	3/5	0.40
	5 %	0.12					0/5	0.00	0/5	0.00					0/5	0.00
	1 %	0.03					0/5	0.00	0/5	0.00					0/5	0.00
6-Methyl coumarin	2%	0.16	0/6	0.00	0/6	0.00	0/6	0.00	4/6	0.50	0/4	0.00	0/4	0.00	0/5	0.00
	1%	0.04					0/6	0.00	0/6	0.00					0/5	0.00
	0.5%	0.00					0/6	0.00	0/6	0.00					0/5	0.00
Butyl methoxy dibenzoyl methane	5%	0.12	0/6	0.00	0/6	0.00	0/8	0.00	0/8	0.00	0/4	0.00	0/4	0.00		
	1%	0.08					0/8	0.00	0/8	0.00						
Octyl methoxy cinnamate	5%	0.12	0/6	0.00	0/6	0.00	1/8	0.09	1/8	0.06	0/4	0.00	0/4	0.00		
	1%	0.04					0/8	0.00	0/8	0.00						

* New : modified Method

* Old : Ichikawa Method

Table 4. The photostability of various photosensitizing materials.

Materials	UV- (Color/Max./Abs.)	UV+ (Color/Max./Abs.)	Max.Abs.shift (Yes/No, variation.%)
6-methyl coumarine :0.002% in ethanol	colorless/280/1.312 ± 0.077 330/0.728 ± 0.072	pale yellow/280/0.739 ± 0.009, 330/0.407 ± 0.039	No (280/-43.7) (330/-44.1)
Hematoporphyrine :0.0002% in ethanol	red/400/0.684 ± 0.094	red/400/0.389 ± 0.009	No (-43.1)
8-MOP :0.0015% in ethanol	colorless/300/1.090 ± 0.084	yellow/300/0.808 ± 0.009	No (-25.9)
Anthracene :0.0015% in ethanol	colorless/340/0.444 ± 0.046 360/0.645 ± 0.023 380/0.586 ± 0.064	yellow/340/0.174 ± 0.009 360/0.078 ± 0.028 380/0.044 ± 0.004	Yes (340/-60.8) (360/-87.5) (380/-92.5)
TCSA :0.002% in ethanol	colorless/280/1.140 ± 0.124, 330/0.787 ± 0.068	pale red/280/0.156 ± 0.012, 330/0.172 ± 0.025	Yes (280/-86.3, 330/-78.2)
Octyl methoxy cinnamate :0.001% in ethanol	colorless/295/0.954 ± 0.180	coloreless/295/0.987 ± 0.009	No (+3.5)

Table 5. Protein carbonyl values for various compounds

Compounds	Conc.	Carbonyl content(nmol/mg protein)			Induction factor
		UV protected	UV exposed	difference value	
DMSO	-	1.29	1.49	0.20	1.00
DMSO	1%	1.42	1.62	0.20	1.00
DMSO	10%	1.20	1.48	0.28	1.00
DMSO	50%	1.17	3.22	2.15	1.00
Anthracene	50 μ M	3.51	12.37	8.85	4.12
	500 μ M	6.31	19.88	13.57	6.31
	1.5 mJ	6.56	31.43	24.87	11.57
	15 mJ	8.57	40.90	32.33	15.04
8-MOP	50 μ M	0.69	1.67	0.98	4.90
	500 μ M	0.93	5.08	4.15	20.75
Hematoporphyrin	150 μ M	4.60	24.97	20.37	101.85
	1.5 mM	24.65	51.50	26.85	134.25
6-MC	5 mM	0.13	8.63	8.5	3.95
	50 mM	3.14	21.31	18.17	8.45
Butyl methoxy dibenzoylmethane	15mM	0.29	3.66	3.37	1.57
	150 mM	0.87	3.61	2.74	1.27
Octyl methoxycinnamate	15 mM	0.44	0.82	0.38	0.18
	150 mM	0.48	0.70	0.22	0.10

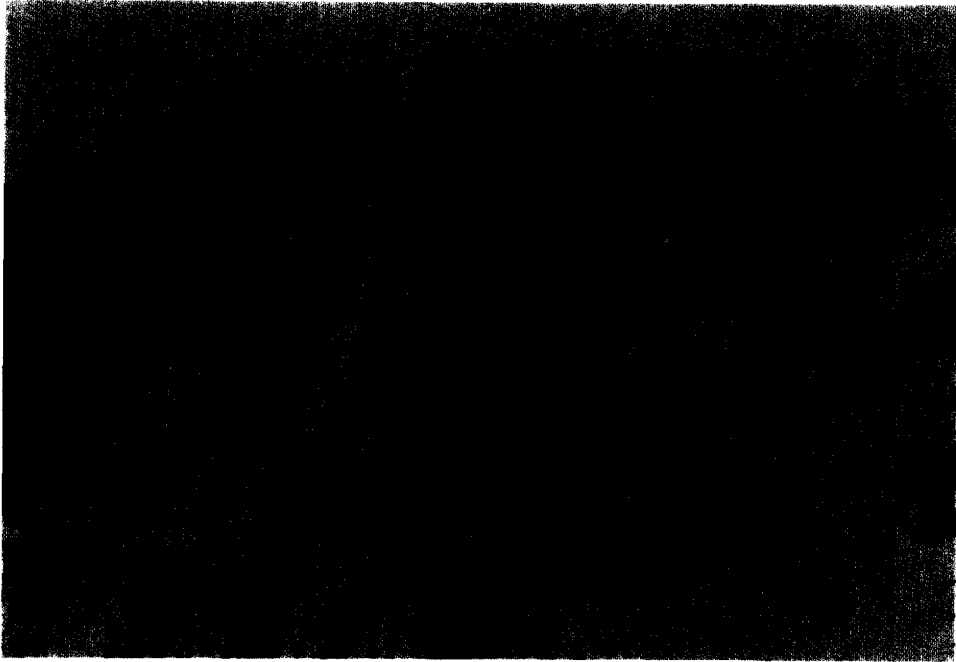


Fig.2. UV irradiated,Benzocaine 20% solution applied skin of Guinea Pig. (Ichigawa' Method) Note the broad infiltration of inflammatory cells in dermis . The capillary of dermis shows dilation filled with blood and inflammatory cell(arrow head)



Fig.3. UV irradiated,Benzocaine 20% solution applied skin of Guinea Pig. (Modified Method) Note the infiltration of inflammatory cells in dermis.



Fig.4. UV irradiated, 6-MC 2% solution applied skin of Guinea Pig.
(Ichigawa' Method) inflammatory cells are scattered in dermis.



Fig.5. UV irradiated, 6-MC 2% solution applied skin of Guinea Pig.
(Modified Method) inflammatory cells are scattered in dermis.
Note the dilation of capillary filled with inflammatory cell.

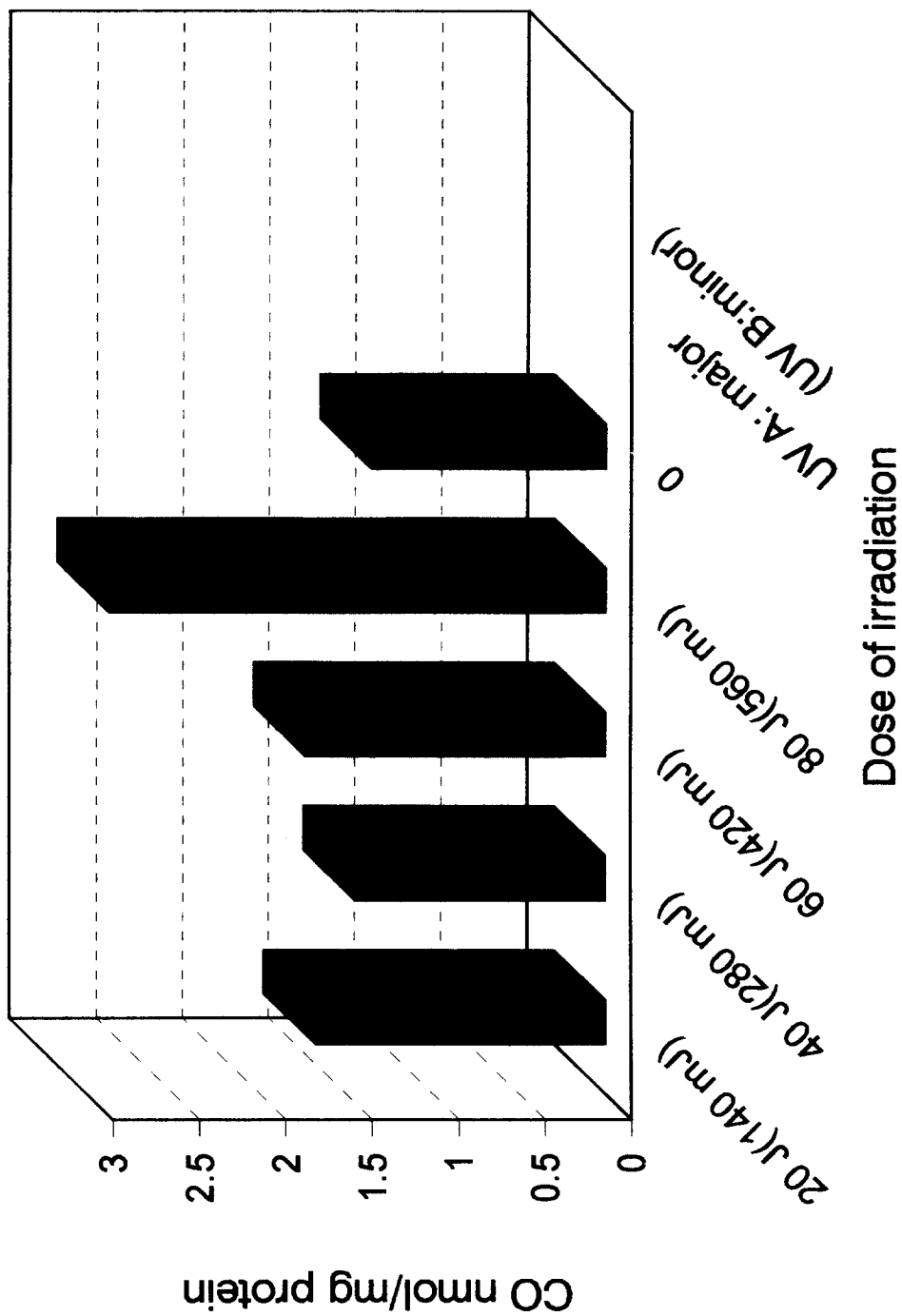


Fig.6. Carbonyl formation in BSA by UV irradiation. The spectrophotometry method was tested using UV irradiation in the presence of 6 mg/ml BSA . In a separate incubation, BSA was exposed to various dose of UV. The value was represented by mean+SD.