

厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）
AOPおよびIATAに立脚した国際的な安全性評価手法の確立
平成28年度分担研究報告書

光毒性試験の AOP および IATA の開発

研究分担者 尾上 誠良
静岡県立大学 薬学部 教授

研究要旨

外因性光線過敏症は近年注目を集める有害事情の一つであり、本毒性リスク回避のために効果的な予測方法の開発が国内外で急務の課題となっている。本研究では *in vitro* 光化学的試験方法である ROS アッセイを主軸とした AOP を作成するため、光毒性物質の光生物化学的ならびに光化学的特性を精査することで光毒性反応機序のさらなる解明を行った。また、得られた科学的根拠をベースにした ROS アッセイの OECD test guideline 案を作成した。

研究協力者

世戸 孝樹（静岡県立大学 薬学部 助教）

A．研究目的

近年、化合物の光安全性に対する関心の高まりから光毒性リスク評価に関する数多くの研究が行われている。ICH S10 では、光毒性化合物の特徴として、i) 光反応性が高いこと、ii) 露光部位である皮膚や眼に分布しやすいことを挙げており、化合物の光安全性評価において光化学的特性および薬物動態学的特性を評価することは非常に重要である。当研究室では既に光化学的評価方法として Reactive oxygen species (ROS) assay を開発し、本データと薬物動態情報を組み合わせることで信頼性ある光安全性評価が可能となることを明らかにしてきた。この知見を検証すべく、本研究では、多数の光毒性物質を対象とし、UV/VIS 吸収測定、ROS assay ならびに 3T3 NRU PT

による光化学・光生物学的特性評価および経皮的 cassette-dosing PK study による皮内動態評価によって得られるデータを統合的に解析することで、経皮適用化合物の光毒性リスクを効果的に予測できるか検証を行った。また、これらの検証結果をもとに光毒性に関する AOP ならびに ROS assay に関する OECD test guideline 案を作成した。

B．研究方法

B-1) ROS アッセイ

研究分担者らが既に公表している ROS assay 推奨プロトコールに基づき、各検体（6 化合物、Benzophenone (BZ)、dioxybenzone (DO)、ketoprofen (KT)、mexenone (MX)、oxybenzone (OX)、sulisobenzene (SB)）について ROS assay を行った。

B-2) 薬物動態実験

Sprague-Dawley 系の雄性ラットを用いて薬物動態試験を実施した。全ての動物実験は静岡県立大学内の動物委員会の承認を得て実施した。血中および皮膚中薬物濃度は UPLC/ESI-MS システムを用いて評価した。

B-3) 3T3 NRU PT

マウス由来不死化線維芽細胞である Balb/c 3T3 cells (CloneA-31) を用い、OECD TG432 に基づいて 3T3 NRU phototoxicity test (3T3 NRU PT) を実施した。

B-4) ラット in vivo 光毒性試験

あらかじめ腹部を剃毛したラットに被検物質を塗布し、black light (FL15BL-B, National, 東京, 日本) を用いて UVA 照射量が 30 J/cm² となるまで照射した。照射終了後 24 h において色差計 (NF333, 日本電色工業, 東京, 日本) を用いて皮膚表面の色調を計測し、光毒性の指標とした。

C. 研究結果

C-1) 光安全性評価

化合物が太陽光に含まれる UV もしくは VIS (λ=290-700 nm) の一部を吸収し、励起状態になることは各種光毒性の引き金となる。そこでモデル化合物である BZPs に対して UV/VIS 吸収測定を実施した。全ての BZPs は UVA/B 領域において高い光吸収を示したが、可視光領域の光吸収は観察されなかった。また、ICH S10 では、「290 から 700 nm の波長において MEC が 1,000 M⁻¹・cm⁻¹ を上回らない化合物については、

直接的な光毒性反応を引き起こすほどの光反応性がないと考えられる」と明記されている。この波長領域における BZPs の MEC の最大値は 2,317 (BZ), 10,833 (D0), 4,350 (KT), 2,850 (MX), 6,817 (OX) および 11,700 (SB) M⁻¹・cm⁻¹ であった。すなわち 6 種の BZPs はそのすべてが高い光励起性を有しており、光化学的反応を引き起こす可能性がある。

また、光照射時における化合物からの ROS 産生は光毒性の指標として有用である。この性質を評価すべく、ROS assay を実施した。陽性対照である QN は擬似太陽光照射時に ¹O₂ および O₂⁻ を産生し、陰性対照である EM では両者の産生を認めなかった。以前の研究から ROS assay には明確な criteria [¹O₂ (ΔA_{440 nm} × 10³): > 25; and O₂⁻ (ΔA_{560 nm} × 10³): > 20] が定められており、この値を下回る化合物に関しては光毒性の懸念が非常に低いと判断できる。6 種の BZPs の内、BZ, KT および OX は露光時に非常に強い ROS 産生を認め、その光反応性は高いと判断した。MX に関しては ROS assay における被験物質濃度 (200 □M) では反応液中において析出が生じたため、希釈した状態 (100 □M) で同様の試験を実施した結果、ROS 産生を認めた [¹O₂ (ΔA_{440 nm} × 10³): 67; および O₂⁻ (ΔA_{560 nm} × 10³): Not detected]。すなわち、BZ, KT, MX および OX は高い光反応性を有しており、D0 および SB は光反応性が低いと判断した。

C-2) 薬物動態学的評価

経皮投与された化合物は皮膚へ直接曝露されるため、化合物の皮膚透過性や皮膚滯

留性の高さが光毒性のリスクファクターとなる。そこで、経皮投与された BZPs の皮膚透過性や滞留性を評価すべく、BZPs 経皮投与後における皮内動態を評価した。本検討では、PK study におけるスループット改善および動物資源削減を実現すべく、経皮的 cassette-dosing PK study を実施した。得られたデータをもとに皮膚における薬物動態学的パラメーターを算出することで皮膚滞留性を評価した。BZ は経皮共投与後 4 h において最高皮膚中濃度 (C_{max} : 6.1 $\mu\text{g/g tissue}$) に到達し、その後は速やかに消失した。DO, MX および OX は経皮共投与後、約 4 h で C_{max} に到達したが、投与後 8 h まで皮膚中に高濃度で滞留し、その後消失した。本知見から、この 3 化合物は経皮投与後 4-8 h において最も光毒性のリスクが高いと見積もることができる。一方で、KT および SB は経皮共投与後 24 h で C_{max} を迎え、消失相は本実験条件内では観察されなかった。特に KT の皮膚中濃度は投与後 8-24 h において C_{max} (8.7 $\mu\text{g/g tissue}$) とほぼ同程度の値を維持し、その $AUC_{0-24 h}$ および MRT の値はそれぞれ、160.0 h $\cdot \mu\text{g/g tissue}$ および >14.2 h と、他の BZPs と比較して非常に高値であり、KT の皮膚滞留性は非常に高いと判断できた。また、SB は皮膚中濃度の立ち上がりが緩やかであったが、MRT が高値 (>14.9 h) であり、高い皮膚滞留性を示した。

C-3) 光毒性試験

BZPs の *in vitro* 光毒性を評価するため、3T3 NRU PT を実施した。3T3 NRU PT では被験物質を濃度依存的に Balb/c 3T3 細胞に曝露後、UVA 照射/非照射時におけるそれ

ぞれの細胞生存曲線から IC_{50} 値を計算し、それらの比である PIF 値によって *in vitro* 光毒性を評価する。PIF の値に関して、OEDG TG 432 では i) phototoxicity: $PIF > 5$, ii) probable phototoxicity: $2 < PIF < 5$ および iii) non-phototoxicity: $PIF < 2$ としている。BZPs のUVA 照射時/非照射時における細胞生存曲線によると、BZ および KT については UVA 照射によって細胞生存曲線が低濃度側へシフトし、DO, OX および SB の生存曲線は UVA 照射による変化をほとんど認めなかった。BZ および KT の PIF 値はそれぞれ 49.5 および 68.9 と算出され、この値は光毒性の基準値を大きく超えており、すなわち BZ および KT は非常に強い *in vitro* 光毒性を示した。DO, OX および SB の PIF 値は約 1.0 であり、これら 3 化合物は *in vitro* 光毒性を示さなかった。また、MX についてはその溶解度の低さから、調製した濃度において析出が生じ、3T3 NRU PT では評価不能であった。

BZPs の *in vivo* 光毒性を評価すべく、BZPs に対してラットを用いた *in vivo* 光毒性試験を実施した。本試験では各化合物をラットに経皮投与 (10 mg/site) 後、UVA を照射し、UVA 照射前後における皮膚表面の色調変化を *in vivo* 光毒性の指標とした。陽性対照である QN の UVA 照射後における ΔE 値は UVA 非照射群と比較して有意に増大し ($P < 0.05$)、陰性対照である EM については UVA 照射群/非照射群の間において ΔE 値に有意な差はなかった。すなわち、本試験では UVA 照射群/非照射群における ΔE 値の差に基づき、化合物の *in vivo* 光毒性評価が可能であると考えられる。

UVA 照射後における BZ および KT の $\square E$ 値は UVA 非照射群と比較して有意に増大し ($P < 0.05$), 特に BZ の $\square E$ 値には UVA 照射群/非照射群の間に大きな差があった。MX の $\square E$ 値は UVA 照射群/非照射群の間に有意な差はなかったが, その値には増加傾向があった ($P = 0.0607$)。つまり, BZ および KT はラットに対して非常に強い *in vivo* 光毒性を惹起し, MX では中程度の *in vivo* 光毒性を観察した。一方で, D0, OX および SB については EM と同様, UVA 照射群/非照射群における $\square E$ 値の間に差がなく, ラットにて *in vivo* 光毒性を示さなかった。

C-4) AOP および OECD TG 案の作成

化学物質の光化学的反應を中心とした光毒性に関する AOP を OECD に提案した。また, ROS assay の OECD TG 化のため SPSF を提出し, OECD からのコメントに対応した。続いて ROS assay の TG 案を提出した。現在は本 TG 案に関するパブコメを収集中である。

D. 考察

本研究ではモデル化合物である 6 種の BZPs の *in vivo* 光毒性リスクを予測すべく, 光化学・光生物学的試験および経皮的 cassette-dosing PK study を実施した。まず, 光化学的特性について, 全 6 種の BZPs は UV 領域において非常に高い光吸収特性を有しており, その MEC 値は ICH S10 で定められる基準値 (Non-phototoxicity: $MEC < 1000$) を大きく超えていた。一方で, ROS assay では BZ, KT, MX および OX のみが擬似太陽光照射時に ROS を産生し, D0

および SB は ROS 産生を認めなかった。すなわち, BZ, KT, MX および OX は高い光反応性を有しており, 光毒性を誘発する可能性があると考えられる。一方で, D0 および SB は ROS assay の結果から光毒性を発現するほどの光反応性がないと判断できた。6 種の BZPs の光反応性を比較すると, 以下のような順となった。

光反応性:

KT > BZ > OX > MX SB D0

また, 光生物学的試験である *in vitro* 3T3 NRU PT では BZ および KT において UVA 照射によって細胞毒性は増強し, すなわちこの 2 化合物は *in vitro* 光毒性を示した。MX についてはその水溶性の低さから試験条件下で析出を認め, 3T3 NRU PT によって *in vitro* 光毒性評価ができなかったが, 他の 5 種の BZPs の *in vitro* 光毒性は以下のような順であった。

in vitro 光毒性:

KT > BZ OX SB D0

経皮的 cassette-dosing PK study では, 経皮投与された KT および SB は他の BZPs と比較して高濃度かつ長期間, 皮膚中で滞留する事を確認し, これら 2 化合物の皮膚曝露リスクは高いと考える。薬物動態学的パラメーターである C_{max} および MRT を指標として皮膚滞留性を評価すると以下のような順となった。

皮膚滞留性:

KT > SB OX > MX > BZ > D0

ICH S10 では光毒性化合物の特徴について, 化合物が i) 太陽光 ($\square = 290-700$ nm) を吸収すること, ii) ROS を含む反応性の高い分子種を生成すること, iii) 露光部位である皮膚や眼に分布しやすいことを挙げ

ている。したがってこの 3 点を評価し、これらのデータを統合的に解析することによる効果的な光毒性リスク予測が可能であると考えられる。そこで、光化学・光生物学的試験および経皮的 cassette-dosing PK study から得られたデータを用いて decision matrix を作成し、BZPs の光毒性リスクを予測した。一般的に、decision matrix は多数の実験から得られたデータを系統的に分析し、判断するために用いられる模式的なデータ表である。ICH S10 にも記載されているように、高い光反応性を有し、露光部位である皮膚や眼への曝露リスクが高い化合物は、光反応性が低く、曝露リスクが低いものと比較して光毒性を引き起こしやすい。つまり、decision matrix による BZPs の光毒性リスク判定においては、光化学・光生物学的試験および PK study の両データにおいて高レベルと判断された化合物は、その光毒性リスクが高いことを表し、どちらか一方、あるいは両方のレベルが低い化合物はその光毒性リスクは中程度または低いと予測できる。しかしながら、化合物の光反応性が低ければ、たとえそれが露光部位に長時間、多量に曝露されたとしても光毒性を起こす可能性は非常に低くなるため、光反応性が低い化合物は光毒性リスクも低いと判定する。Decision matrix を用いた光毒性リスク予測において、光化学・光生物学的特性については MEC 値、ROS データおよび PIF 値を用い、皮膚蓄積性の指標として C_{max} および MRT を採用した。Decision matrix から、KT は光反応性、*in vitro* 光毒性および皮膚蓄積性の全てで高い光毒性リスクを示し、KT の光毒性リスクは非常に高いことが予測できた。加えて、

KT の MRT は他の BZPs と比較して非常に長く、KT は経皮投与後、皮膚中で長時間滞留するために、その光毒性リスクは長時間にわたると考える。BZ については高い光反応性および *in vitro* 光毒性を認めたと、皮膚への蓄積性は比較的であった。MX および OX は ROS assay において高い光反応性を認め、皮膚蓄積性は中程度であった。OX は *in vitro* 光毒性を示さず、MX の *in vitro* 光毒性は評価不能であったが、この 2 化合物の光反応性は高いことから中程度の光毒性リスクがあると予測した。SB は高い皮膚蓄積性を有していたが、光反応性が非常に低く、*in vitro* 光毒性も観察されなかったため、光毒性リスクは低いと判断した。D0 は光反応性、*in vitro* 光毒性および皮膚蓄積性のすべてにおいて他の化合物と比較して低レベルであったことから、その光毒性リスクは最も低いと予測した。予測した BZPs の光毒性リスクは以下の順であった。

光毒性リスク予測：

KT BZ > MX > OX SB D0

続いて、被験物質である 6 種の BZPs の *in vivo* 光毒性を明らかにするため、ラット光毒性試験を実施した。その結果、UVA 照射によって、BZ、KT および MX はラットに対して光毒性反応を惹起し、他の 3 化合物は *in vivo* 光毒性を認めなかった。実際に観察した *in vivo* 光毒性反応は以下のようであった。

In vivo 光毒性：

BZ > KT MX SB OX D0

本評価系の予測精度を検証すべく、本評価系で予測した 6 種の BZPs における光毒性リスクとラットにおいて実際に観測さ

れた *in vivo* 光毒性を比較した。

光毒性リスク予測：

KT BZ > MX > OX SB DO

In vivo 光毒性：

BZ > KT MX SB OX DO

Matrix decision により得られた光毒性リスク予測とラット光毒性試験で観察した *in vivo* 光毒性の順序は良好に対応し、すなわち本評価系が高い予測性を有することを示唆した。しかしながら、OX については光毒性リスク予測と観察された *in vivo* 光毒性の間に乖離があった。今回実施した *in vivo* 光毒性試験では OX の光毒性反応は観察されなかったが、OX は光アレルギー化合物であるという臨床的報告がされている。光アレルギーは光によって励起された化合物が生体内タンパク質などへの付加を介し、抗原性を獲得することで誘発される免疫反応である。光アレルギーの発現には生体における複雑な免疫反応が関与していることから、光アレルギー性化合物は評価が難しく、各種光毒性試験において偽陰性となる場合もあるという報告もされている。今回実施した 3T3 NRU PT およびラット *in vivo* 光毒性試験も例外ではなく、OX の光アレルギーを正確に評価できなかった可能性がある。一方で、ROS assay は各種光毒性反応の発現機序上流部に共通して存在する化合物の光化学的反応 (ROS 産生) を光毒性の指標とするため、理論的には光アレルギーを含む各種光毒性リスクを包括的に予測することができる。そのため、本評価系では化合物の光反応性評価 (ROS assay) を実施することで、OX の光毒性 (光アレルギー) リスクを示唆するデータが得られたと考える。また、3T3 NRU PT は

難水溶性化合物の評価が難しいことが課題として挙げられており、MX はその水溶性低さから評価不能であった。3T3 NRU PT では OX および MX の光毒性リスクを適切に評価できなかった一方で、ROS assay では、BZ, KT, OX および MX の光毒性リスクを正確に予測することができ、光反応性のデータは光毒性リスクを予測する上で非常に重要な指標であり、ROS assay を光安全性評価系に取り入れることで包括的な光毒性リスク予測が可能であると考えられる。

E. 結論

今回の検討では、化合物の光化学・光生物学的特性評価並びに経皮的 cassette-dosing PK study の結果を統合的に解析することにより、BZPs の *in vivo* 光毒性リスクを効果的に予測することができた。また、化合物の光反応性を評価することで、光アレルギーを含む各種光毒性リスクを包括的に予測できる事を示唆した。さらに、本評価系では薬物動態学的評価 (皮膚蓄積性評価) に cassette-dosing 法を用いているため、PK study におけるスループットが大幅に向上するだけでなく、使用実験動物数およびコストの大幅な削減が可能である。近年では規制当局から基礎研究や製品開発研究において、3Rs (refinement, reduction, replacement) への貢献を求める動きが強まっており、cassette-dosing 法は、reduction の面からこの要求に応えることが可能であろう。以上より、本評価系は実験動物福祉の向上に貢献しつつ、高い信頼性およびスループットを有する経皮適用化合物の光毒性リスク評価系としての発展が期待できる。実用に向けては、本評

価系に対する他の化合物を用いたバリデーション研究が必要であると考えが、本評価系は創薬を含む製品開発段階における光安全性評価への貢献が期待できる。

また、本検討で得られた知見は現在提案中の光毒性に関する AOP および ROS assay の OECD TG 化の実現に大きく貢献できると期待する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Satomi Onoue, Yoshiki Seto, Hideyuki Sato, Hayato Nishida, Morihiko Hirota, Takao Ashikaga, Anne Marie Api, David Basketter, Yoshiki Tokura [Chemical photoallergy: photobiochemical mechanisms, classification, and risk assessments] *Journal of Dermatological Science*, 85(1): 4-11 (2017)
- 2) Hiroto Ohtake, Yukiko Suzuki, Masashi Kato, Yoshiki Seto, Satomi Onoue [Photosafety testing of dermally-applied chemicals based on photochemical and cassette-dosing pharmacokinetic data] *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(1): 237-8 (2016)
- 3) Yoshiki Seto, Hiroto Ohtake, Satomi Onoue [Development of fluorometric reactive oxygen species assay for photosafety evaluation] *Toxicology in Vitro*, 34: 113-9 (2016)
- 4) Satomi Onoue, Hiroto Ohtake, Gen Suzuki, Yoshiki Seto, Hayato Nishida,

Morihiko Hirota, Takao Ashikaga, Hirokazu Kouzuki [Comparative study on prediction performance of photosafety testing tools on photoallergens] *Toxicology in Vitro*, 33: 147-52 (2016)

- 5) Yoshiki Seto, Gen Suzuki, Sharon Shui Yee Leung, Hak-Kim Chan, Satomi Onoue [Development of an Improved Inhalable Powder Formulation of Pirfenidone by Spray-Drying: In Vitro Characterization and Pharmacokinetic Profiling] *Pharmaceutical Research*, 33(6): 1447-55 (2016)

2. 学会発表

- 1) 世戸孝樹, Hak-Kim Chan, 尾上誠良: 体内動態制御により患者の QOL 改善に寄与する新規 pirfenidone 粉末吸入製剤の開発. 2016 年, 第 32 回 日本 DDS 学会学術集会
- 2) 世戸孝樹, 佐藤秀行, 尾上誠良: 安全性向上を指向した pirfenidone の DDS 研究. 2016 年, 第 2 回 日本医薬品安全性学会学術大会
- 3) Yoshiki Seto, Satomi Onoue: An improved reactive oxygen species assay for photosafety assessment of chemicals with limited aqueous solubility. 2016, EUSAAT 2016, 17th Annual Congress of EUSAAT
- 4) Yosuke Iyama, Hiroto Ohtake, Hideyuki Sato, Yoshiki Seto, Satomi Onoue: Verification study on applicable domain of photosafety

- assessment by combined use of photochemical and pharmacokinetic data. 2016, 31st JSSX Annual Meeting
- 5) 尾上誠良:光毒性リスク評価の開発と課題, 2016年, 日本動物実験代替法学会第29回大会
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし