

令和 2 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 薬剤学分野 教授

研究要旨

外因性光線過敏症とは特定の化学物質摂取後、太陽光に含まれる紫外線 (UV :ultraviolet light) 及び可視光 (VIS :visible light) への曝露によって惹起される皮膚及び眼における異常反応である。光線過敏症は医薬品のみならず、食品及び化粧品等が原因となる場合も報告されている。近年オゾン層の破壊に伴う地表面に到達する紫外線量の増加から、外因性光線過敏症に注目が集まり、新規化合物開発における光毒性リスクの回避は重要な課題の 1 つとなっている。本研究では *in vitro* 光化学的試験方法である 活性酸素種 (ROS :reactive oxygen species) assay を主軸とした 有害性発現経路 (AOP: Adverse Outcome Pathway) 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。その研究の一環として、ラット凍結皮膚を人工膜に代替した *in vitro* 皮膚透過性試験及び ROS assay から得られたデータを併せて用いた光毒性リスク予測を行い、提案した評価系の適用可能性のさらなる精査ならびにヒトに対する外挿可能性を検証した。

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。医薬品規制調和国際会議 (ICH: International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for human use) S10 で化合物の i) 光反応性及び ii) 露光部位 (皮膚や眼) への分布が光毒性発現に重要な因子として明記されている。当研究室では既に光化学的評価方法として ROS (reactive oxygen species) assay を開発し、本データと皮膚内動態情報の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た。この知見を検証すべく、本研究では ROS assay による光化学的特性及び Franz

型拡散セルを用いた化学物質の *in vitro* 皮膚内動態の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を検証し、その予測データを用いることで動物実験代替法の開発を指向した検討を実施した。本研究では動物皮膚の代わりに人工膜を活用した実験を推進した。また、検証結果を基に光毒性に関する AOP(Adverse Outcome Pathway) ならびに光安全性評価に関する IATA(Integrated Approaches to Testing and Assessment) 案構築を試みている。

B. 研究方法

B.1. 被験物質

既報の副作用情報に基づき、CA

(carprofen)、EN (enzacamene)、SL (sulfanilamide)、TA (tiaprofenic acid) 及び TO (tolbutamide) を被験物質として選択した。

B.2. 人工膜による単層膜モデル作製

二層膜モデルとして選択した Strat-M® の角質模倣部位の除去を行った。Franz 型拡散セルに Strat-M® を角質模倣部位が上面になるように装着した。セットした Strat-M® に methanol 1 mL を添加し 25°C に保った温浴内にて 30 min 静置した。その後、取り外した膜表面の有機溶媒をふき取り、大気圧及び 25°C 環境下で膜の重量変化がなくなるまで乾燥した。

B.3. *In vitro* 皮膚透過性試験

Franz 型拡散セルを用いた *in vitro* 皮膚透過性試験を実施した。Propylene glycol 400 を 40% 含む PBS (pH7.4) をレセプター液として用いた。レセプター液は試験中 32°C に保った。被験物質濃度がそれぞれ 1 mg/mL となるよう propylene glycol に溶解した混合溶液を調製後、Franz 型拡散セルに装着した単層及び二層膜モデルに全被験物質を含む混合溶液を適用して透過性試験を開始した。試験開始後 0.5, 12, 15, 18, 21 及び 24 h 後にレセプター液を 100 mL 採取した。その後、等量の Propylene glycol 40% 含有 PBS をレセプター液に加え試験中の液量を一定に保った。得られたサンプルから 50 µL 分取し、内標準物質として使用した mefenamic acid (500 ng/mL) を含む acetonitrile を等量加えたのち Millex®-LG (Merck Millipore, MA, USA) にて濾過し測定用サンプルとした。各被験物質濃度を HPLC/ESI-MS (High performance liquid chromatography equipped with electrospray

ionization mass spectrometry) を用いて測定した。

B.4. UV-VIS スペクトル測定

各被験物質を最終濃度が 20 µL となるよう 20 mM sodium phosphate buffer (NaPB, pH7.4) に溶解し、光路長が 10 mm の石英セルに添加した。各被験物質の UV-VIS 吸収スペクトルは HITACHI U-2010 spectrophotometer (株式会社日立ハイテクノロジーズ、東京) により記録した。光源切替波長を 350 nm とし、290–350 nm の領域は D2 ランプ、351–700 nm の領域は W1 ランプを用いてサンプルに光を照射した。

B.5 ROS assay

疑似太陽光の照射には Xe arc lamp を備えた Atlas Suntest CPS+ (Atlas Material Technologies LCC, Chicago, IL, USA) を用いた。Atlas Suntest CPS+ では短波長の UV をカットし実際の太陽光を模するためのフィルターを用いて CIE85/1989 daylight simulation requirement に良好に対応した疑似太陽光を照射している。照射強度は 250 W/m² に設定し 1 h 照射を行った。Atlas Suntest CPS+ 内の温度は 28°C に保った。

ROS assay は被験物質が疑似太陽光照射下で産生する活性酸素種のうち singlet oxygen 及び superoxide anion を測定する試験法であり、被験物質の光反応性を評価する試験法である。Singlet oxygen はimidazole をsinglet oxygen の accepter に用いて、*p*-nitrosodimethylaniline (RNO) 水溶液の 440 nm における吸光度変化からその評価を行った。まず、被験物質 (200 µM)、RNO (50 µM) 及び imidazole (50 µM) を含む 20 mM NaPB (pH7.4) 200 µL を 96-well microplate (旭硝子、東京; code number: 3881-096; clear, untreated, flat-bottom) に分注し、析出物の有

無を確認後、440 nm の吸光値を SAFIRE microplate spectrophotometer (TECAN, Mannedorf, Switzerland) を用いて測定した。その後、プレートを reaction container に入れ石英の蓋を装着し、擬似太陽光を 1 h 照射した。照射後のプレートを振盪した後、440 nm の吸光値を再び測定した。Superoxide anion は NBT (nitroblue tetrazolium chloride) の還元によって生成される nitroblue diformazan を 560 nm における吸光度変化より評価した。被験物質 200 μ M、NBT 50 mM を含む 20 mM NaPB (pH7.4) 200 μ L を 96-well microplate に分注し、析出物の有無を確認後、560 nm の吸光値を SAFIRE microplate spectrophotometer を用いて測定した。その後、プレートを reaction container に入れ石英の蓋を装着し、擬似太陽光を 1 h 照射した。照射後のプレートを振盪した後、560 nm の吸光値を再び測定した。

C. 研究結果

C.1. 光安全性評価ツールの予測精度

本研究では従来使用されてきたラット凍結皮膚を人工膜である Strat-M[®] へと代替しさらなる動物福祉の向上を目指すとともに、ヒトへの外挿可能性について検証した。*In vitro* 皮膚透過性試験において被験物質中で唯一 Clog *P* が負の値を持つ SL が最も高い透過量を示した。Strat-M[®] を用いた透過性試験において、分子量が小さく Clog *P* が負の値を持つ化合物は Strat-M[®] への分配が大きくなることが報告されている。SL の分子量が 172.2 と他の被験物質と比較し小さかったこと及び SL の脂溶性が低いことが SL の高い C_{ss} 値に寄与したと考える。一般的に脂溶性の低い化合物は皮膚に存在する汗腺や毛嚢といった付属器官

を介したルートを通して体内へと吸収される。Strat-M[®] はポリマーが密に重なることで膜を形成しているために細孔が存在し、この細孔を介した SL の透過が皮膚の汗腺を介する透過より容易であった可能性がある。Strat-M[®] を用いた *In vitro* 皮膚透過性試験による皮膚滞留性予測は脂溶性が低い化合物の C_{ss} を過大評価する傾向にあり、SL を含む化合物の C_{ss} 予測は懸念がある。人工膜における細孔の大きさを最適化して脂溶性が低い化合物への適用性を高めることでより正確な滞留性評価が可能になると考える。UV/VIS スペクトル測定において全ての被験物質は UVA/B 領域での吸収を示したことから、光の吸収によって励起状態となり、光毒性反応を惹起する可能性を示唆した。ROS assay においてすべての被験物質は基準値を超える ROS を産生した。CA 及び TA は特に高い光反応性を有し、EN、SL 及び TO の光反応性は同程度であった。

被験物質の滞留性及び光反応性を統合的に評価し被験物質の光毒性リスクを分類した(Table 1)。TA は C_{ss} が中程度だったものの singlet oxygen の産生量が高値であり、なおかつ superoxide anion の産生量も中程度であったことから高い光毒性リスクを有していると判断した。CA は singlet oxygen の産生量は他の被験物質と比較し大きかったものの C_{ss} 量が低値であった。SL の光反応性は TA 及び CA と比較し乏しかったものの C_{ss} は全被験物質中最も高かった。以上より CA 及び SL の光毒性リスクは中程度であると判断した。EN 及び TO の光反応性はどちらも他の被験物質と比較し低く、 C_{ss} も中程度であったことから光毒性リスクは低いと判断した。

得られた光毒性リスク予測のヒトへの外

挿性を確認するため過去に実施された光パッチテストの結果と比較した。本光パッチテストでは各被験物質を濃度 5% にて 24 h 貼付後、UVA (320–400 nm) 領域の光を 10 J/cm² となるよう照射し、その後の皮膚表面の変化より光毒性症状を確認している。光パッチテストにおいて TA の光毒性発現頻度は 30.4% と最も高頻度であった。その他の被験物質に関して、その光毒性発現頻度はそれぞれ 5.28% (CA), 0.80% (EN), 0.56% (TO) 及び 0.44% (SL) であった。以上より、ヒトにおける実際の光毒性発現頻度は高頻度群：TA、中程度群：CA、低頻度群：EN、SL 及び TO と分類することができ、提案した光安全性評価系による光毒性リスク予測は光パッチテストの結果と良好に対応した。つまり、動物実験を用いない本評価系は実際にヒトにて起こりうる光毒性反応を予測できる可能性を示唆した。以上より人工膜に対する滞留性及び光反応性を併せて用いた本評価系は脂溶性や分子量などの物理化学的性質が極端に異なる化合物

群の同時評価に課題が残るもののヒトにおける光毒性リスクを予測可能であり、光安全性の高い新規化合物の創製に貢献すると期待する。

C.2. AOP 及び OECD TG 案の作成

令和元(2019)年6月に OECD TG495 として試験法ガイドライン (TG: Test Guideline) 化された ROS assay を主軸として、新たに光安全性評価のための IATA 構築を進めている。ICH S10 において推奨されているストレテジーをベースとし、(i) 被験物質の光化学的特性評価、(ii) 光生物化学的特性評価、そして (iii) 皮膚や眼への移行性・滞留性等体内動態評価の 3 段階のスクリーニングによる tiered approach を案として提示した。

D. 考察

In vitro 皮膚透過性試験及び ROS assay により構成された光安全性評価系は化合物の光毒性リスクを適切に予測可能であった。

Table 1 Data summary

	<i>in vitro</i> skin permeation test	ROS assay ^{a)}	
	C _{ss} (mg/mL)	¹ O ₂ ($\Delta A_{440 \text{ nm}} \cdot 10^3$)	O ₂ ⁻ ($\Delta A_{560 \text{ nm}} \cdot 10^3$)
CA	+	+++	+
EN	++	+	+
SL	+++	+	-
TA	++	+++	++
TO	++	-	++

Each data from ROS assay and *in vitro* skin permeation test was divided into four levels. +++, ++, + and - represent high, moderate, low and negligible respectively. a) $\Delta A_{440 \text{ nm}}$ and $\Delta A_{560 \text{ nm}}$ represent decrease in $A_{440 \text{ nm}}$ and increase in $A_{560 \text{ nm}}$, respectively.

さらには予測結果のヒトへの外挿可能性においても良い知見が得られた。以上より、*in vivo* 試験に依存しない本光安全性評価系は将来的に光安全性の高い新規化合物創製に貢献すると期待する。

また、構築した IATA 案については今後当該領域のエキスパートと意見交換を行いつつ調整していく予定である。

E. 結論

In vitro 皮膚透過性試験及び ROS assay により構成された光安全性評価系は化合物の光毒性リスクを適切に予測可能であり、ヒトへの外挿可能性においても良い知見が得られた。さらには *in vivo* 試験を伴わない本評価系はスループット性能の向上にも大きく寄与すると考える。以上より、動物実験を用いない本評価系は新規物質創製時において効率的かつ信頼性の高い光安全性評価を実施可能であり、将来的に本評価法が光安全性の高い新規化合物創製に貢献すると期待する。これらの知見は構築中の IATA にも導入し、信頼性ある光安全性評価系を提示していく。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

- 1) Iyama Y, Sato H, Seto Y, Onoue S: Strategic photosafety screening system consisting of in chemico photoreactivity and in vitro skin exposure for quinolone derivatives. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2020;146(15), 105257.
- 2) Seto Y, Ohtake H, Sato H, Onoue S: Phototoxic risk assessment of dermally-applied chemicals with structural variety based on photoreactivity and skin deposition. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*,

2020;113, 104619.

- 3) 尾上誠良：薬剤性光線過敏症：光生物学的特徴とリスク評価. 医薬品安全性学, 2020;6(1), 1.
- 4) 尾上誠良：薬剤性光線過敏症の原因薬剤と発生機序. 薬局, 2020;71(8), 30

F.2. 学会発表

- 1) 徳吉 泰春, 猪山 陽輔, 佐藤 秀行, 世戸 孝樹, 尾上 誠良. *In vivo* 試験に依存しない光安全性評価法の開発：ヒトへの外挿可能性について. 日本薬剤学会第 35 年会 (熊本), 2020年 5月14-16日
- 2) 望月 大吾, 世戸 孝樹, 佐藤 秀行, 尾上 誠良: ナノエマルジョン技術による fisetin の皮膚移行性および皮膚保護作用の向上. 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2020 (大垣), 2020年11月21-22日

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし