

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）
OECDプロジェクトでの成果物を厚生労働行政に反映させるための研究

令和3年度 分担研究報告書

光毒性のAOP 及び 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

光線過敏症とは特定の化学物質摂取後、太陽光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おり、新規化合物ならびに製品開発における光毒性リスクの回避は重要な課題となっている。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。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。

また、OECD 専門家とともに、光安全性の AOP 及び IATA 案の作成を進めた。

A. 研究目的

地球上に降り注ぐ太陽光は生態系に多くの恵みを与え、太陽光のうち UVC 領域は DNA 損傷などの有害事象を惹起するものの、高エネルギーな短波長光を除けば本来は人体に対してほとんど無害である。しかし、ヒトに投薬された医薬品が体内で光と相互作用を起こすことによって、主に皮膚や眼において炎症、角質化、色素沈着などの有害反応を誘発することがあり、これを広義の光毒性と定義する。対象となるのが薬剤であった際にはこの有害事象を薬剤性光線過敏症と呼称するが、医薬品以外でもこれまでに多くの食品、化粧品等においても同様の光毒性反応が認められている。近年のオゾン層破壊に伴う紫外線量の著しい増加の背景もあって光毒性リスクへの注目が高まっており、光毒性発症機

序解明ならびに評価系開発が精力的に進められている。ICH S10 ガイドラインでは、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 reactive oxygen species (ROS) 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 ならびに光安全性評価に関する IATA 案構築を試みている。

B. 研究方法

B.1. 光安全性評価ツールの予測精度

B.1.1. ROS アッセイ

研究分担者らが既に公表している ROS assay 推奨プロトコルに基づき、acridine (ACD)、furosemide (FSM)、hexachlorophene (HCP)、8-methoxypsoralen (MOP)、norfloxacin (NFX) 及び promethazine (PMZ) について ROS assay を行った。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/m^2 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 acceptor 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 ($200 \mu\text{M}$)、RNO ($50 \mu\text{M}$) 及び imidazole ($50 \mu\text{M}$) を含む $20 \text{ mM NaPB (pH7.4) 200 } \mu\text{L}$ 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、疑似太陽光を 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 nitroblue tetrazolium chloride (NBT) 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 $200 \mu\text{M}$ 、NBT 50 mM を含む $20 \text{ mM NaPB (pH7.4) 200 } \mu\text{L}$ 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、疑似太陽光を 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。

B.1.2. *In vitro* 皮膚内動態実験

上記 5 種の被験物質について、フランツ型拡散セルを用いて人工膜 Strat-M における *in vitro* 皮膚透過性試験を実施した。まず、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。ドナー側に被験物質 (各 1 mg/mL) を入れ、経時的に皮膚を透過したレセプター液中の被験物質の量を High performance liquid chromatography equipped with electrospray ionization mass spectrometry (HPLC/ESI-MS) にてモニタリングし、*in vitro* 皮膚透過性のデータを得た。得られたデータを基に定常状態における各

被験物質の皮膚内濃度 (C_{ss}) を算出した。得られた C_{ss} の値と光化学的特性データを併せて考慮することで光毒性予測を実施した。

B.1.3. ラット *in vivo* 光毒性試験

前日に腹部を剃毛した雄性ラットに各被験物質 (10 mg/site) を塗布し、塗布後 3 h で black light にて UVA (30 J/cm²) を照射した。照射終了後 24 h に色差計にて皮膚表面の色調を計測し、光毒性の指標とした。

B.2. AOP 及び IATA 案の作成

OECD の専門家の協力を得て、光安全性の AOP 及び IATA 案の作成を進めた。

C. 研究結果

C.1. 光安全性評価ツールの予測精度

被験物質である ACD、FSM、HCP、MOP、NFX 及び PMZ の光毒性リスクを予測し、本評価系の適用可能性を精査した。Strat-M[®] を二層膜モデル、30 min の間 methanol 処置した Strat-M[®] を単層膜モデルとして用

い、レセプター液中に到達した被験物質量を経時的に測定することにより各被験物質のそれぞれの膜に対する透過性を評価した (Table 1)。本試験では、Strat-M[®] の薄さを鑑みて試験開始から 8 h で膜透過速度定常状態に達すると考えた。全被験物質の透過量について、単層膜モデルの方が二層膜モデルと比較して高かった。二層膜及び単層膜モデルのどちらにおいてもレセプター液中 PMZ 量は全被験物質中最も高く、試験開始 8 h 後における値はそれぞれ 0.4 及び 1.3 µg/cm² であった。被験物質の累積量プロファイルに基づき、 P_{TLM} は 5.0×10^{-5} (ACD)、 5.0×10^{-5} (FSM)、 6.0×10^{-5} (HCP)、 4.0×10^{-5} (MOP)、 2.0×10^{-5} (NFX) 及び 1.0×10^{-4} (PMZ) cm/s であり、 P_{OLM} は 4.0×10^{-4} (ACD)、 1.7×10^{-4} (FSM)、 1.8×10^{-4} (HCP)、 1.1×10^{-4} (MOP)、 1.2×10^{-4} (NFX) 及び 3.9×10^{-4} (PMZ) cm/s であった。全被験物質の P_{OLM} は P_{TLM} と比較して高く、その差は 2.9 から 7.4 倍であった。二層膜モデルに対する透過性は Clog P 値が -0.78 と被験物質中で唯一負の値を持つ NFX が最も低

Table 1 Integrated data with photoreactivity and skin deposition

	ACD	FSM	HCP	MOP	NFX	PMZ
<i>ROS assay</i> ^{a)}						
¹ O ₂ ($\Delta A_{440 \text{ nm}} \cdot 10^3$)	271	250	335	120	251	127
O ₂ ⁻ ($\Delta A_{560 \text{ nm}} \cdot 10^3$)	288	151	N.D.	92	158	100
<i>In vitro skin permeation test: C_{ss} (µg/mL)</i>						
Strat-M [®]	23.4	19.6	20.5	9.4	5.9	38.1
Rat skin	69.1	2.8	57.3	50.1	3.2	59.2
<i>In vivo cassette-dosing pharmacokinetic study</i>						
C _{max} (µg/g skin)	15.9	4.4	23.8	10.4	5.9	19.0
MRT (h)	6.4	10.0	8.5	8.8	5.6	9.5

The risk level was divided into two grades. Black cells indicate high risk for phototoxicity. ^{a)} $\Delta A_{440 \text{ nm}}$ and $\Delta A_{560 \text{ nm}}$ represent a decrease in $A_{440 \text{ nm}}$ and increase in $A_{560 \text{ nm}}$, respectively.

かった。HCP 及び PMZ の Clog P 値はそれぞれ 7.0 及び 4.6 であり、Clog P を基準とした脂溶性は HCP が最も高い一方で、PMZ の P_{TLM} は HCP より高く全被験物質中最も高値であった。これら Strat-M[®] に対する各被験物質の透過性を基に C_{ss} を算出したところ、ACD、FSM、HCP、MOP、NFX 及び PMZ の C_{ss} はそれぞれ 23.4、19.6、20.5、9.4、5.9 及び 38.1 µg/mL であった。すなわち、PMZ が最も高く、次いで ACD、HCP 及び FSM の順であった。MOP 及び NFX の C_{ss} は他の被験物質と比較し低かった。

UV/VIS 吸収スペクトル測定及び ROS assay を 6 種被験物質に対して実施することで、それらの光化学的特性を評価した。全被験物質は UV 領域に強い吸収を持ち、その範囲で吸収が極大となる波長での MEC 値は 19,500 (ACD)、14,900 (FSM)、11,200 (HCP)、24,900 (MOP)、24,900 (NFX) と 6,600 (PMZ) $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ であった。つまり、6 種類の被験物質は高い光励起性を持つと判断できる。ROS assay において、HCP を除く全被験物質が擬似太陽光照射により産生した singlet oxygen 及び superoxide anion はガイドラインによって定められた criteria を超えていた。HCP は singlet oxygen の産生量のみ criteria を超え、その産生量は全被験物質中最も多かった。したがって、6 種の被験物質全てが criteria を超えており、光反応性を持つことが明らかになった。特に、ACD は singlet oxygen 及び superoxide anion のどちらの産生量も非常に多く、被験物質中で最も高い光反応性を有していた。

提案した光安全性評価系の適用可能性の検証には、本評価系により予測した結果と実際に生体内で起こる光毒性反応との関連性を評価する必要がある。したがって、各被験物質の *in vivo* 光毒性を評価すべく、ラッ

トを用いた *in vivo* 光毒性試験を行った。一般に、露光部に分布した光毒性陽性化合物から産生された ROS 及び光励起された化合物自身的一方もしくは両方が細胞膜障害を引き起こし、発赤や紅斑を主徴とする光刺激反応を呈する。本試験では、UVA 照射前後のラット腹部の皮膚表面における色調変化を客観的に評価することで光毒性、特に光刺激性の強さを評価した。全被験物質は UVA 照射により有意に皮膚表面の色調が変化した。つまり、6 種の被験物質が光毒性反応を誘発した。UVA 照射群では、全 6 種被験物質で Δa 値が正の変化を示した。この結果は塗布部の赤みが UVA 照射により増したことを示しており、単回投与により紅斑反応を誘発することを認めた。つまり、全被験物質は光刺激性を有することが明らかとなった。特に、ACD 及び HCP 投与群の色調変化が他の 4 種被験物質と比較して大きかった。

以上、被験物質の *in vitro* 皮膚滞留性及び光反応性の統合的な解析により予測した光毒性リスク及び *in vivo* 光毒性の強さを以下に示す。

Predicted phototoxic risk:

ACD > HCP > PMZ > FSM > MOP > NFX

Observed phototoxicity:

ACD \approx HCP > PMZ > MOP > FSM > NFX

予測した光毒性リスクと *in vivo* 光毒性の順は良い対応を示した。人工膜を用いた統合的光安全性評価法は精度良く被験物質の光毒性リスク予測ができ、実験動物を用いずとも光安全性評価が可能であることを示唆した。

C.2. AOP 及び IATA 案の作成

2019年6月にOECD TG495としてガイドライン化された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。既にOECDの専門家会議にて共有し、専門家より修正に資する重要なコメントを頂いている。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

人工膜を用いた*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。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から頂いたコメントを基に修正していく予定である。特にdecision treeの構築を強く求められているので、draftを作成して関係者間で慎重な協議を進めている。専門家の意見を反映しつつ完成に向けて改訂作業を進めていく。

E. 結論

ROS assayを主軸とし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。従来法ではラットから摘出した皮膚組織を用いていたが、本検討では安価な人工膜を活用しており、これによって完全な*in vitro*評価系となった。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. Hayato Nishida, Toshiyuki Ohtake, Takao Ashikaga, Morihiko Hirota, Satomi Onoue, Yoshiki Seto, Yoshiki Tokura, Hirokazu Kouzuki: In chemico sequential testing strategy for assessing the photoallergic potential. *Toxicology in Vitro*, **77**: 105245 (2021)
2. Yoshiki Seto, Ryo Tonami, Yosuke Iyama, Hideyuki Sato, Satomi Onoue: An approach to evaluate metabolite-related phototoxicity with combined use of photochemical properties and skin deposition. *Toxicology Letters*, **350**: 91–97 (2021)
3. Satomi Onoue: Establishment and international harmonization of photosafety testing strategy. *Yakugaku Zasshi*, **141**: 807–812 (2021)

F.2. 学会発表

1. 増井 一樹, 桑原 菜摘, 徳吉 泰春, 山田 幸平, 佐藤 秀行, 尾上 誠良 [凍結皮膚を用いた光安全性予測: 被験物質の皮膚滞留性および光反応性を指標として] 第36回日本薬剤学会 (徳島, オンライン開催), 2021年5月13-15日
2. 桑原 菜摘, 袴田 雅俊, 三宅 健司, 山下 里恵, 山田 幸平, 佐藤 秀行, 尾上 誠良 [植物抽出物の有する光保護作用のスクリーニングおよび皮膚透過性改

善を指向した製剤の開発] 第 36 回日本薬剤学会 (徳島, オンライン開催), 2021年 5月13-15日

3. 増井 一樹, 桑原 菜摘, 徳吉 泰春, 山田 幸平, 佐藤 秀行, 尾上 誠良 [凍結皮膚を用いた光安全性予測 (2): スループット向上を目的として] 第 7 回日本医薬品安全性学会 (福岡, オンライン開催), 要旨集 p.104, 2021年 7月24-25日
4. 桑原 菜摘, 袴田 雅俊, 浅沼 俊倫, 山下 里恵, 山田 幸平, 佐藤 秀行, 菊池 洋, 尾上 誠良 [白びわ抽出物中のカフェ酸誘導体の光保護作用評価] 日本薬学会東海支部 (オンライン開催), 2021年 10月30日-11月7日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし