

新規光安全性試験法 (ESR-PT) の 検証と適用性拡大 ～重量法の導入 による混合物評価への応用～

発表者：樋下 万純 (大阪事業所)
共同研究者：阿部 高之 (高分子技術部門)
前田 洋祐 (安全性評価技術研究所)
武吉 正博 (安全性評価技術研究所)

1. 背景及び目的

光毒性や光アレルギー反応は、化学物質を経口摂取又は皮膚に塗布した後、太陽光にばく露されることで生じる有害作用である。医薬品や化粧品原料等においても発症例が報告されており、化学物質の光安全性を評価することは非常に重要である。しかし、光安全性に関する動物実験代替法として OECD テストガイドラインに収載されている Reactive oxygen species (ROS) assay 等の試験法は、水相での反応を要するため疎水性物質への適用が困難である。そこで我々は、電子スピン共鳴 (ESR) 法を利用した光安全性試験法 ESR-based photosafety test (ESR-PT)¹⁾ を開発してきた。ESR-PT は疎水性物質や有色物質にも適用可能かつ高い予測精度を有する有望な試験法である。しかしその後の研究で、一重項酸素生成量のみを指標とした従来の ESR-PT における偽陰性物質の存在²⁾や、モル濃度での試料調製を行うため分子量未知の物質や混合物の評価が出来ないという適用性の課題がみつかった。そこで本研究では、①評価パラメータの変更により一重項酸素生成以外に起因する信号も検出可能とした改良 ESR-PT の精度及び適用範囲の検証及び②重量法の導入による更なる適用性拡大の可能性を検討した。

2. 方法

2.1 評価パラメータの変更と精度・適用範囲の検証

従来の ESR-PT では、一重項酸素とその検出試薬である 4-Hydroxy-2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidine (4-Hydroxy-TEMP) との反応により生じた 4-Hydroxy-2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (4-Hydroxy-TEMPO) の信号増加量を評価パラメータの算出に用いていた。改良 ESR-PT では、4-Hydroxy-TEMPO の信号が観察される Mn マーカー-3rd から 4th の磁場全域の信号増加量を用いることで、一重項酸素生成以外に起因する信号も検出可能とした。定量再現性を向上するため、得られた信号強度を Mn マーカー-3rd の信号高さにより除して相対強度 (Relative Intensity, RI) として用い、新た

な光安全性評価パラメータ Photoreactivity index (PRI) を下式に従い算出した。

$$PRI = \frac{\text{試験混合液における } RI_{\text{照射後}} - RI_{\text{照射前}}}{\text{対照溶液における } RI_{\text{照射後}} - RI_{\text{照射前}}}$$

改良 ESR-PT の精度及び適用範囲の検証には、ROS assay の評価報告³⁻⁶⁾のある光安全性既知の医薬品・化粧品原料など計 56 物質を用いた。試験手順は既報¹⁾と同様とし、溶媒にエタノールを用いて被験物質及び 4-Hydroxy-TEMP を含む試験混合液を調製し、ESR 装置により照射前後の ESR スペクトルを測定した。被験物質を 3 濃度 (0.1, 1 及び 10 mmol/L) で測定し、最大 PRI を示す濃度 (C_{\max}) を決定した後、その濃度で追加 2 回の繰り返し測定を実施し、計 3 回の測定結果から平均 PRI 及び標準偏差 (SD) を求め、光安全性の判定に用いた。さらに、改良 ESR-PT 及び ROS assay の光安全性情報に対する感度、特異度、正確度及び適用性を算出し、予測精度を比較した³⁻⁶⁾。

2.2 重量法の導入による適用性拡大

2.1 で用いた 56 物質の平均分子量 324 (モル質量 324 g/mol) から従来法の最大測定濃度 10 mmol/L を重量濃度に換算した値が 3.24 mg/mL であったため、重量法の暫定的な最大測定濃度を 4 mg/mL に設定した。モル濃度から重量濃度へ変更した際に、測定濃度が従来法での濃度を下回る陽性物質及び上回る陰性物質は判定が変わる可能性があるため、該当する 7 物質のモル濃度 (10 mmol/L) 及び重量濃度 (4 mg/mL) での検証結果に基づき、重量法の測定濃度を 0.04, 0.4, 4 mg/mL に決定した。測定濃度以外は 2.1 同様の手順で、光安全性既知の混合物として植物油 12 種を測定した。

3. 結果及び考察

3.1 評価パラメータの変更と精度・適用範囲の検証

全被験物質の照射前後の ESR スペクトルを測定したところ、陽性物質のほとんどでは、一重項酸素の発生に伴う典型的な 3 本線が認められた (図 1(a))。一方、Bithionol 及び Fenticlor では 1 本線の信号 (図 1(b))、Doxycycline では 4 本以上に分裂した信号 (図 2(c))、Cilnidipine では微細かつ複雑な信号 (図 2(d)) が出現しており、これ

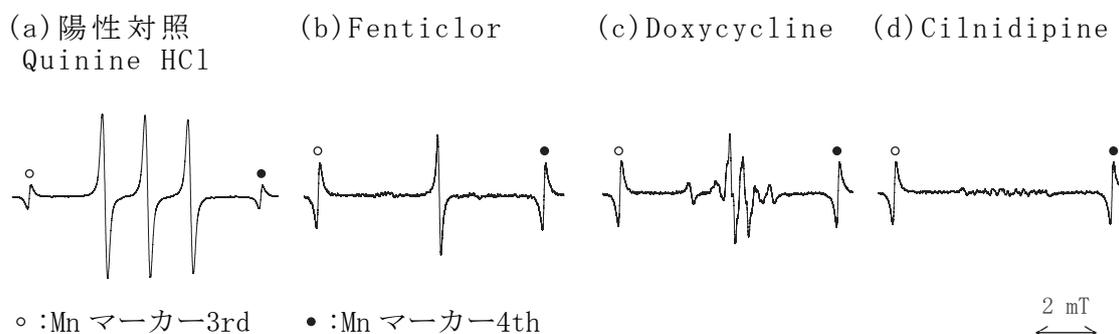


図 1 照射後の ESR スペクトル測定例

らは被験物質の光反応により生じたフリーラジカルに由来すると考えられる²⁾。56 物質の繰り返し測定で得られた平均 PRI は、陽性物質で 0.5-314.4、陰性物質で 0.5-15.3 となった。最も高い予測精度が得られる 2.0 を Cutoff 値に設定し、陽性/陰性判定を行った結果及び予測精度を表 1 に示す。Bithionol、Fenticlor 及び Doxycycline は物質由来のフリーラジカルの信号検出により陽性判定となったことから、新たに採用した評価パラメータ PRI は有効であると考えられる。また、既知の光安全性情報に対する予測精度は ROS assay と同等以上となり、疎水性物質を含む全物質に対して適用可能であった。

表 1 光安全性試験法の予測精度と適用性の比較

vs 光安全性 情報 ²⁻⁹⁾	改良 ESR-PT			ROS assay ³⁻⁶⁾		
	陽性	陰性	適用不可	陽性	陰性	適用不可
光反応性	37	1	0	26	3	9
	4	14	0	5	4	9
感度 (%)	97			90		
特異度 (%)	78			44		
正確度 (%)	91			79		
適用性 (%)	100			68		

3.2 重量法の導入による適用性拡大

重量法において光安全性既知の植物油を測定した結果及び判定を表 2 に示す。界面活性剤を用いた ROS assay である micellar ROS assay (mROS) において偽陽性判定であった Corn oil 及び Ginger oil を正しく陰性と判定でき、植物油 12 種中 10 種で正しい判定結果が得られた。一方、Grapefruit oil 及び Lime oil が偽陰性判定となり、その原因として、ロット差による植物油に含まれる光有害成分の変動もその一因と考えられる。

4. 結論

新たな光安全性評価パラメータ (PRI) を採用した改良 ESR-PT では一重項酸素及び被験物質由来のフリーラジカルが同時に検出可能となり、偽陰性判定を低減することができた。重量法の導入については、更なる検討が必要ではあるものの、重量濃度を用いることで混合物など分子量未知の物質に対する応用可能性が示唆された。以上より、改良 ESR-PT は既存試験法が適用困難な物質及び混合物を含む様々な化学物質を高精度に評価可能な光安全性試験法として期待される。

表 2 植物油の測定結果と判定

植物油	C_{\max} における 平均 PRI \pm SD	光安全性 情報 ¹⁰⁾	判定結果	
			重量法	mROS ¹⁰⁾
Bergamot oil	4.9 \pm 1.5	P	P	P
Cumin seed oil	26.6 \pm 14.3	P	P	P
Grapefruit oil	1.9 \pm 0.2	P	N	P
Lemon oil	2.0 \pm 0.4	P	P	P
Lime oil	1.2 \pm 0.4	P	N	P
St John' s wort powder	181.0 \pm 54.7	P	P	P
Corn oil	1.1 \pm 0.3	N	N	P
Ginger oil	1.1 \pm 0.2	N	N	P
Olive oil	1.1 \pm 0.1	N	N	N
Rapeseed oil	1.3 \pm 0.2	N	N	N
Safflower oil	1.1 \pm 0.1	N	N	N
Soybean oil	1.1 \pm 0.4	N	N	N

P : 陽性、N : 陰性

5. 参考文献

- Hinoshita, M., Abe, T., Sato, A., Maeda, Y., Takeyoshi, M. (2021). *Journal of Applied Toxicology*, 41(2), 247-255.
- Hinoshita, M., Abe, T., Sato, A., Maeda, Y., Takeyoshi, M. (2022). *The Journal of Toxicological Sciences*, 47(12), 503-506.
- ROS Assay Validation Management Team. (2013). http://www.jacvam.jp/files/news/ROS_Assay_full%2020130920%20atlas_fourth%20data.pdf (accessed on 16 January, 2020).
- Seto, Y., Kato, M., Yamada, S., Onoue, S. (2013). *Toxicology in Vitro*, 27, 1838-1846.
- Onoue, S., Suzuki, G., Kato, M., Hirota, M., Nishida, *et al.* (2013). *Toxicology in Vitro*, 27(8), 2316-2324.
- Onoue, S., Ohtake, H., Suzuki, G., Seto, Y., Nishida, H., *et al.* (2016). *Toxicology in Vitro*, 33, 147-152.
- Kaidbey, K. H., Allen, H. (1981). *Archives of Dermatology*, 117(2), 77-79.
- Kandarova, H., Liebsch, M. (2017). https://doi.org/10.1007/978-3-319-50353-0_35 (accessed on 18 December, 2022).
- Marmelzat, J., Rapaport, M. J. (1980). *Contact Dermatitis*, 6(3), 230-231.
- Nishida, H., Hirota, M., Seto, Y., Suzuki, G., Kato, M., Kitagaki, M., *et al.* (2015). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 72(3), 578-585.