

# LLNA をベースにした 新規光アレルギー性試験法の開発と応用

発表者：前田 洋祐 (安全性評価技術研究所)

## 1. 背景及び目的

光アレルギー性皮膚炎は、化学物質にばく露されたのち、紫外線に曝されたときに生じるアレルギー反応のことであり、主に皮膚適用後の化粧品、医薬品等の化学物質によって生じることがある。また、近年、国内外でウェアラブル医療機器による接触性皮膚炎が複数報告されており、報告のあった医療機器材料には光アレルギー性物質の含有が確認されたものもある。このように、光アレルギー性はヒトにとって非常に重要な健康問題である。

化学物質の光アレルギー性を予測するために、Adjuvant and Strip 法<sup>1)</sup>のようなモルモットを用いた試験法が一般的に用いられてきた。しかし、実験動物を用いた既存の光アレルギー性試験法は、炎症反応を観察して評価するため、実験動物の苦痛が強い上、長期の実験期間が必要であった。さらに、医薬品規制調和国際会議 (ICH) による「医薬品の光安全性評価ガイドライン」<sup>2)</sup>では、既存の光アレルギー性試験法は、ヒトに対する予測可能性が未知であることから、経皮ばく露される光アレルギー性評価に用いることは推奨されていない。

以上のことから、化学物質の光アレルギー性の評価は、ヒトの健康にとって重要であるものの、効果的な予測方法及び公定法は存在しない。

そこで本研究では、定量的に皮膚感作性を評価できる Local Lymph Node Assay (LLNA)<sup>3)</sup>を応用し、光アレルギー性を高精度かつ定量的に評価可能であり、ヒトでの予測可能性が高い試験法を開発を行った (研究①)。また、光アレルギー性が陽性となる標準試料を作製し、その抽出液の光アレルギー性を評価することで開発した試験法の医療機器への応用も試みたので報告する (研究②)。

## 2. 方法

### 2.1 研究① 光安全性 LLNA の開発

実験には雌性 CBA/Ca マウス (日本エスエルシー) を用い、被験物質にはヒトで光アレルギー性を有することが既知の 7 物質及び光アレルギー性陰性と推定される 6 物質の合計 13 物質を用いた。

光アレルギー性評価を行うために図 1 に示すフローからなる光安全性 LLNA を考案した。ステップ 1 で光アレルギー性を評価する判断のため、被験物質の UV 吸収の程度か

ら、モル吸光係数 ( $\epsilon$ ) 1,000 未満で光アレルギー性陰性と評価<sup>1)</sup>し、1,000 以上でステップ 2 へ進むフローとした。ただし、本研究では、検証のため全 13 物質について、全ステップを実施した。

ステップ 2 では、光アレルギー性評価を行うための被験物質の用量設定に必要な情報として、LLNA による皮膚感作性評価を実施し、陽性の場合には皮膚感作性を示す最小濃度 (EC3) を求めた。また、耳介厚さの変化を指標とした光毒性を実施した。

ステップ 3 では、ステップ 2 で求めた皮膚感作性及び光毒性の認められなかった最高用量を試験濃度として用い、媒体対照群及び被験物質群にそれぞれ UV 照射群 (UV+) と UV 非照射群 (UV-) を設定し、光アレルギー性の評価を行った。その他の試験条件は LLNA に従った。また、被験物質群の各個体の H<sup>3</sup>-thymidine 取込量を媒体対照群の平均 H<sup>3</sup>-thymidine 取込量で除した値である photo Stimulation Index (pSI) を求めた。光アレルギー性評価は被験物質の pSI について UV (+/-) 群間で有意差検定 ( $p < 0.05$ ) を実施し、有意差が生じた場合を陽性と判断した。

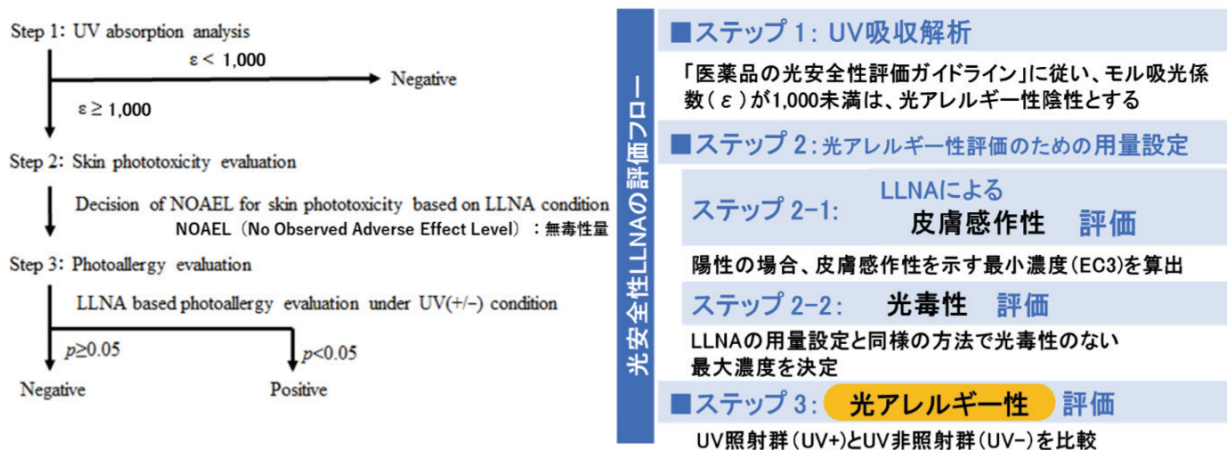


図 1 考案した光安全性 LLNA のフローチャート

## 2.2 研究② 医療機器への応用

母材となるポリマーとして、低温で成形が可能な直鎖状低密度ポリエチレン (LLDPE) を用いた。85°C に設定した熱ロール機で LLDPE のペレットを可塑化させ、光アレルギー性陽性物質である 3,3',4',5-Tetrachlorosalicylanilide (TCSA)、8-Methoxypsoralen (8-MOP) 及び Chlorpromazine hydrochloride (CPZ) の配合剤を混練した後に 120°C で圧縮成形することで、シート状の陽性材料を作製した。作製した陽性材料を細断し、材料/溶媒比が 0.2 g/mL になるようエタノールを加え、25°C で 24 時間振とうした。得られた抽出液を光安全性 LLNA に供した。

## 3. 結果

## 3.1 光安全性 LLNA の開発

各物質の光安全性 LLNA の結果を表 1 に示す。光アレルギー性陽性の 7 物質についてはいずれも陽性と判定された。また、光アレルギー性陰性と推定される 6 物質については陰性と判定され、既報の情報と合致した。同じテトラサイクリン系抗生物質であり、共に UV 吸収を有するが、光アレルギー性が陽性の Doxycycline Hydrochloride と陰性予想の Minocycline hydrochloride を明確に区別できた。

表 1 各被験物質の光安全性 LLNA による光アレルギー性評価結果

被験物質	試験濃度 (%)	UV +/-	pSI		光アレルギー性	
			平均	SE	判定	既報
Ethanol	100	-	0.8	0.1	N	EN
		+	0.6	0.0		
Propyleneglycol	100	-	1.0	0.2	N	EN
		+	0.7	0.1		
1,3-Butyleneglycol	100	-	1.0	0.1	N	EN
		+	0.7	0.1		
2-Propanol	100	-	0.8	0.1	N	EN
		+	0.7	0.1		
2-Ethylhexyl methacrylate	6.5	-	3.2	0.2	N	EN
		+	3.7	0.3		
Minocycline hydrochloride	5	-	1.8	0.4	N	EN
		+	1.5	0.2		
Ketoprofen	1	-	2.4	0.2	P	P
		+	4.1 **	0.4		
Piroxicam	0.25	-	1.8	0.2	P	P
		+	3.6 **	0.6		
Doxycycline hydrochloride	5	-	1.9	0.1	P	P
		+	3.0 **	0.4		
Promethazine hydrochloride	25	-	1.3	0.2	P	P
		+	12.7 **	2.0		
8-Methoxypsoralen	0.025	-	1.4	0.1	P	P
		+	3.9 **	0.6		
3,3',4',5-Tetrachlorosalicylanilide	0.006	-	1.6	0.3	P	P
		+	3.5 **	0.3		
Chlorpromazine hydrochloride	0.1	-	1.3	0.2	P	P
		+	13.3 **	2.3		

pSI: photo Stimulation Index, N: Negative, EN: Expected Negative,

P: Positive, SE: Standard Error, \*\*:  $P < 0.01$  (Unpaired  $t$ -test)

### 3.2 医療機器の光アレルギー性評価への応用

材料抽出液を用いた光安全性 LLNA の結果を図 2 に示す。光アレルギー性物質を含む 3 種の材料抽出液はいずれにおいても UV 照射群で pSI が有意に増加し、抽出液においても光アレルギー性陽性と判定することができた。

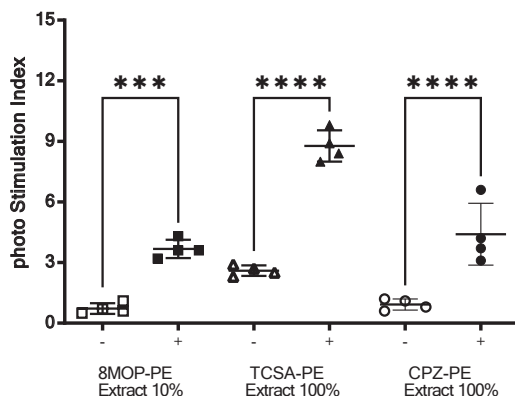


図 2 各陽性材料抽出液の光安全性 LLNA による光アレルギー性評価結果

\*\*\* :  $P < 0.005$ , \*\*\*\* :  $P < 0.0001$  (Unpaired  $t$ -test)

### 4. まとめ

本研究では LLNA を適用して、光アレルギー性を高精度かつ定量的に評価可能であり、ヒトでの予測可能性が高い試験法として、光安全性 LLNA を開発した。本法の予測精度を検証した結果、13 物質について光アレルギー性の陽性/陰性の判定が既報と全て合致した。共に UV 吸収を有するものの光アレルギー性が異なるテトラサイクリン系抗生物質についても明確に光アレルギー性を区別できた。これらのことから、本法はヒトの光アレルギー性に対して高い予測精度を有し、定量的に評価可能であることが示唆された。さらに本法は炎症反応までの観察を必要としないため、従来法と比較して短期間かつ動物への苦痛も少なく、3R (代替、削減、苦痛の軽減) に配慮された試験法である。

さらに、開発した試験法の医療機器への応用として、光アレルギー性陽性の物質を含有する材料を開発し、抽出操作を含む抽出液の光安全性 LLNA への適用可能性について検討した。その結果、開発した材料の抽出液を全て陽性と判定できたことから、光安全性 LLNA の医療機器材料抽出液の光安全性評価への適用可能性が示唆された。

### 4. 参考文献

- 1) Sato, Y. et al. The Nishinohon journal of dermatology. 1980, 42(5), 831-837.
- 2) ICH (2013) Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals S10
- 3) OECD (2010) Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay No. 429