

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07158

研究課題名(和文) 光線過敏症発症機序の統合的理解ならびにリスク評価方法論の戦略的構築

研究課題名(英文) Strategic establishment of photosafety testing tool

研究代表者

尾上 誠良 (Onoue, Satomi)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：00457912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、オゾン層の破壊に伴って光線過敏症に注目が集まり、創薬段階での本副作用回避が強く望まれているが、その発症機序解明は不完全であり、光線過敏症に関する有用な *in vitro* 評価系は未だに乏しい。研究代表者は独創的な着想によって光反応性評価ツールとして reactive oxygen species (ROS) assay を開発し、ROS assay データを基盤とする医薬品の物性と皮膚内動態を中心とする生物薬学的情報に着目して光毒性物質の特性を解析するとともに、得られる知見を基盤とした新規評価系構築を戦略的に進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

応募者らが独自に開発し各種国際試験法ガイドラインに採用された ROS assay を発展的に改良することでこれまでに評価が難しかった難溶性薬物や分子量不明素材への適用性を向上させる。ROS assay データと被験物質の体内動態情報 (*in silico* ならびに *in vivo* データ) を融合することで効率良く光毒性リスクを予測できると確信する。これらの試みにより、光毒性リスクを化学物質(化粧品、医薬品、食品等)開発初期段階で高効率的に予測し、より安全な化学物質の創製に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Drug-induced phototoxicity is elicited after exposure of the skin and/or eyes to topically or systemically administered pharmaceutical substances, followed by exposure to sunlight. This undesirable side effect is one of the impediments in drug discovery and development, and a number of efforts have been made to avoid drug-induced phototoxic reactions. A reactive oxygen species (ROS) assay was designed for the *in vitro* photoreactivity assessment of pharmaceuticals on the basis of ROS generation from photoirradiated chemicals, including singlet oxygen and superoxide. We could establish a non-animal photosafety assessment approach using *in vitro* photochemical and photobiochemical screening systems, including ROS assay.

研究分野：動物実験代替法

キーワード：光線過敏症 リスク予測

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

光線過敏症(光毒性)とは、特定の化粧品、医薬品、食品等を摂取後に含有成分が体内で太陽光によって光化学的に活性化され、皮膚や目において誘発される有害反応(光刺激性、光アレルギー性、光癌原性)である。化粧品、医薬品、食品をはじめとする化学物質の製造従事者にとって、国際的なレベルで標準化された光安全性評価方法の開発が急務の課題となっている。また、欧州では化粧品成分に対する動物実験禁止(2009年)および化粧品の販売禁止(2013年)が適用され、このような動物実験倫理の急速な変化を鑑み、動物実験代替法を用いた安全性評価ツール開発を急がねばならない。さて、応募者は「被験物質の光化学反応性が薬剤性光線過敏症リスクの指標になる」と作業仮説をたて、光毒性発症における極めて初期のイベントをモニタリングする ROS assay を新規に創出した[Onoue, Pharmaceutical Research, 23 (1): 156-64 (2006) 他]。本試験法は光照射下で薬物から放出される活性酸素種を測定することにより被験物質の光化学的挙動を評価する革新的な手法であり、2006年の論文公表以降、国内外の製薬企業で使用されてきた。日本製薬工業協会(JPMA)・医薬品医療機器総合機構(PMDA)との協力による国際協調活動により、ROS assay は本邦初の ICH 推奨光安全性試験法として 2013 年に ICH S10 ガイドラインに、2014 年には化粧品の国際試験法ガイドラインである Personal Care Products Council (PCPC) guidance “Evaluation of Photoirritation and Photoallergy Potential” に採用され、そして 2019 年には OECD test guideline 495 としてガイドライン化に成功している[Onoue, Toxicology in Vitro, 28: 515-23 (2014) 他]。現状では、このように剤性光線過敏症リスクに関する評価系は提案されているものの、臨床における光毒性発症を正確に予測する手法は未だ乏しく、創薬段階で光毒性リスクを完全に回避することは極めて困難な状況である[Onoue, Current Drug Safety, 4 (2): 123-36 (2009) 他]。本課題に対して本研究では動物実験の 3Rs (Reduction, Refinement, Replacement) の促進を前提とした in vitro 評価系ならびに信頼性の高い in vitro/in vivo 融合評価系の開発を行う必要があるものと考えられる。

化学物質創製段階における光毒性リスク評価に関して、欧米の規制当局から数種のガイダンスが提示されている。すなわち、2002年に欧州医薬品審査庁(EMEA)/欧州医薬品委員会(CPMP)から、翌年の2003年には米国食品医薬品局(FDA)/医薬品評価研究センター(CDER)からそれぞれガイダンスが示され、2004年には経済協力開発機構(OECD)からより具体性を持った評価方法が提示された。これらは部分的に活用されているものの、それら単独では十分な光安全性の保証が難しいのが現状である。それ故、系統立った in vitro/in vivo 評価システムの開発が急務であり、2010年から ICH でトピック化され国際協調活動が推進されてきた。応募者らが独自に考案した ROS assay システムは 2014 年に ICH S10 ガイドライン、2019 年に OECD ガイドライン (TG 495) に採用され、今後の創薬における活用が大いに期待される場所である。ICH S10 による採用以降、ROS assay は日本から世界に向けて発信される評価系の一つとして注目を集めているが、本評価系のやや狭い適用限界は今後の改善課題として認識されている。特に近年の創薬や化粧品素材開発では、半数以上の新規化合物が難水溶性物質として新たに創出されており、そのことが光安全性評価においてもスループットの低下を招いている。そこで、応募者らは提案課題において ROS assay で難水溶性化合物を評価可能とすべく積極的な検討を計画し、

それによって ROS assay の信頼性と適用限界を共に著しく改善することが強く期待される。また、ROS assay データと体内動態情報を効果的に組み合わせることによって、ヒトへの外挿性の高い光毒性リスク予測が可能となる仮説を応募者らは先に提示しており、当該領域をリードする研究内容の一つとなっている。

2. 研究の目的

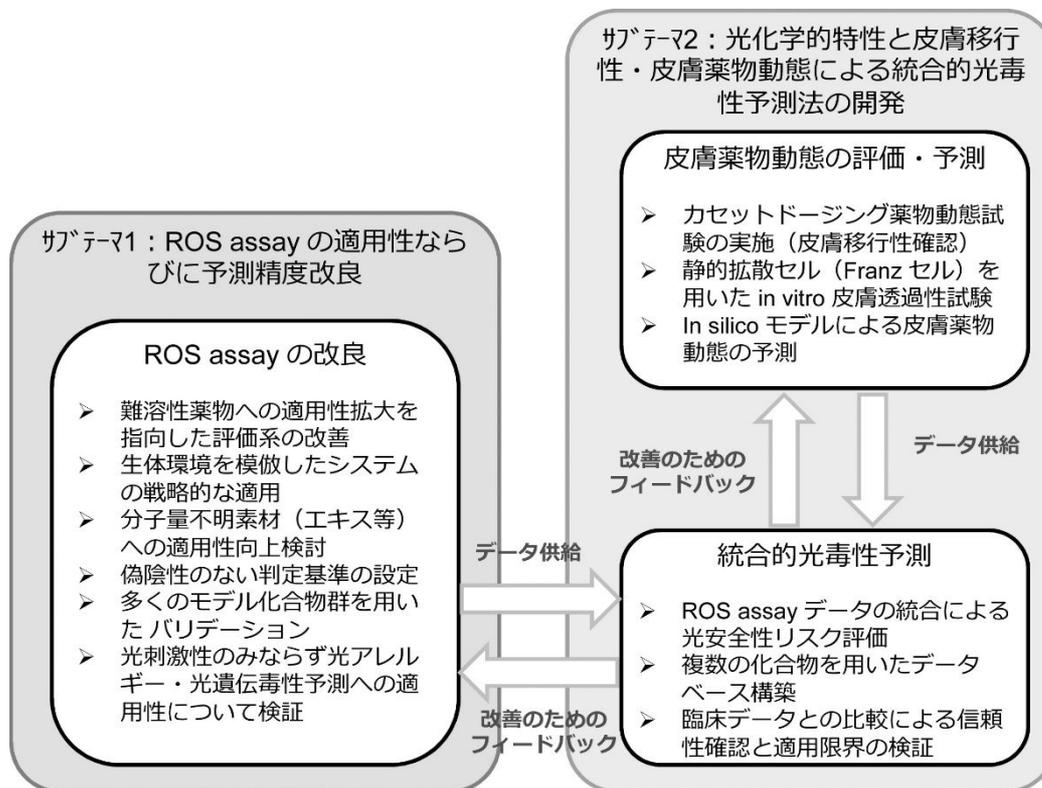
本研究の到達目標は、これまで現象論で捉えられる傾向にあった薬剤性光線過敏症の発症機序を統合的に理解することを可能とし、さらに未だ確実な評価系に欠ける光安全性評価に対して信頼性の高いツールを提供することにある。応募者のこれまでの研究の結果、光毒性リスクを予測する上で重要な要因は、(1) 化合物の光化学的反応性、(2) 化合物の体内動態（特に皮膚移行性）であり、この何れかが欠ければ光毒性発現リスクは低い [Onoue, Toxicological Sciences, 137(2): 469-77 (2014) 他]。応募者らが独自に開発し各種国際試験法ガイドラインに採用された光毒性予測ツールである ROS assay を発展的に改良することでこれまでに評価が難しかった難溶性薬物や分子量不明素材への適用性を向上させる。ROS assay は光照射下で被験物質から算出される活性酸素種を測定する *in vitro* 光毒性評価系であり、この改良は産業界における動物実験代替法推進を加速することが期待できる。さらに ROS assay データと被験物質の体内動態情報 (*in silico* ならびに *in vivo* データ) を融合することで効率良く光毒性リスクを予測できると確信する。これらの試みにより、光毒性リスクを化学物質（化粧品、医薬品、食品等）開発初期段階で高効率的に予測し、より安全な化学物質の創製に貢献できる。また、開発した試験法を多くの化合物に適用してデータを蓄積することで、各種光毒性反応を誘発しやすい化合物の構造上ならびに物性上の特性が明らかとなる。それによって各種光毒性反応に関する structural alert を新たに提示でき、医薬品・化粧品・食品をはじめとする新規化学物質の創製において極めて有用な情報を世界に向けて共有可能となる。これらの活動を通じて独創性の高い我が国発の新規光安全性試験アプローチを世界に発信していくことができるのである。

3. 研究の方法

応募者らによるこれまでの研究の結果、応募者らは次のような作業仮説を立てた。すなわち、光線過敏症発症には、「化合物の光化学的反応性」と「化合物の体内動態（特に皮膚移行性あるいは皮膚滞留性）」が共に必須である。この実験的事実から、被験物質の「光化学的反応性」と「体内動態（予測）情報」を戦略的に融合することによって、信頼性ある光安全性評価方法の開発に結実することを着想したのである。

被験物質の体内動態情報を得るためには既に確立された生物薬剤学的実験手法を用いることができるが、光化学的反応性を予測することが過去には大きな課題となっていた。この命題に答えるべく、応募者らが ROS assay を独自に開発した。ROS assay とは擬似太陽光照射下で被験物質から産生される singlet oxygen や superoxide をモニタリングすることで光化学的反応性を評価するものであり、ICH S10 (2014) や OECD ガイドライン (2019) に採用されている。この ROS assay による「光化学的反応性」情報とカセットドージング薬物動態学的試験や *in silico/in vitro* アプローチによって得られると「体内動態（予測）情報」を用いて、既知の光毒性物質を評価してデータベースを構築し、網羅的に解析することによってヒトでの光毒性リスクをより正確に予測可能な評価モデル構築に結実するものと確信する。「体内動態（予測）情報」を得るための生物薬剤学的実験を実施する基盤は既に有し

ており、さらに in vitro 試験のための Franz セルや in silico モデルを可能とする simulation software も既に導入済みであるため、提案の課題を遅延なく遂行することが出来る。



提案研究課題の概略図

4. 研究成果

応募者はこれまでの研究成果をベースに次の通り研究を計画し、実行した。本研究における到達目標をより迅速に達成するために、主として 2 つのサブテーマを提案し、すなわち、(i) ROS assay の適用性ならびに予測精度改良、(ii) 光化学的特性と皮膚移行性・皮膚薬物動態による統合的光毒性予測法の開発をそれぞれ鋭意検討し、最終的には OECD Test guideline 495 の改訂を視野に入れた国際協調活動に結実させることとした。

サブテーマ i: ROS assay の適用性ならびに予測精度改良

現在の ROS assay は高い陽性検出率が評価されて ICH S10 や OECD ガイドライン等に採用されたが、難溶性化合物への適用性はまだ完全には解決出来ていない。そこで、シクロデキストリンや PEG 等の可溶化剤、ミセル形成試薬、あるいは複数のリン脂質から構成されるリポソームを添加することで細胞膜模倣環境を作り出し、さらには化合物の溶解性を高めることを目的とした新しい ROS assay システムを構築することとした。約 50 種類の難溶性医薬品や医薬部外品に適用し、その予測精度、頑健性と適用限界について詳細に検証を進めたが、一部の化合物は評価が難航した。特に還元性を有する被験物質を ROS assay で評価するとき、基質との予期せぬ反応が起こることで、偽陽性を出すことが分かった。また、医薬部外品のなかにはエキスやポリマー等の分子量不明素材を含めて、分子量が不明な状況でも ROS assay を可能にするために暫定分子量を定義するなど条件設定を試みる。さらに既に開発済みの ROS assay との相違を明確にし、特に感度、信頼性、日内・日間変動についても比較することで改良型 ROS assay の優位性を検証した。ROS assay ならびに改良型 ROS assay による光刺激性物質 (60 個)、光アレルギー物質 (35 個)、光遺伝毒性物質 (15

個) の評価をそれぞれ実施し、評価系の特異性についても明らかにすることで、ROS assay 群が光刺激性だけでなく、光アレルギーや光遺伝毒性の予測にも使用可能であることを示すエビデンスを一部得ることができた。基礎検討をベースに、複数の構造類似化合物群 (フェノチアジン系、ベンズイミダゾール系、ジヒドロピリジン系) に ROS assay ならびに改良型 ROS assay を適用し、評価系の適用性を検証するとともに構造-光毒性相関情報を解析した。これまでも応募者らのグループによって種々の構造-光毒性相関研究は実施されているが、光反応性情報を基盤とした網羅的解析ははじめての試みであり、光安全性を確保するための新しいアプローチ提示が期待される。

(ii) 光化学的特性と皮膚移行性・皮膚薬物動態による統合的光毒性予測法の開発

光毒性の発現部位は皮膚であり、すなわち投与した化合物の皮膚移行性評価は極めて重要である。しかし皮膚移行性評価は数多くの実験動物と時間を要するため、生産性の高いカセットドージング法の導入を検討した。応募者らがこれまでに構築してきた薬物動態技術を駆使し、ラットにおける被験物質の体内動態を UPLC/ESI-MS を用いて精査した。カセットドージングにおいて懸念される動態学上の相互作用の発現有無の確認や、それによる毒性予測への影響についても精査した。ROS assay データと体内動態情報を考慮して decision-matrix を構築することで統合的光毒性予測を試み、さらに複数の光毒性薬物群 (ニューキノロン系 7 種類、ジヒドロピリジン系 6 種類、テトラサイクリン系 6 種類) を用いて光毒性リスクを網羅的に評価し、臨床所見と比較することで本アプローチの予測性と信頼性を検証した。さらに経皮投与の際の光毒性リスク予測を実現するために、ROS assay データと皮膚内薬物動態情報を組み合わせることで新しい予測モデル構築を試みた。皮膚内薬物動態試験としてはラットを用いて詳細な評価を行うとともに、静的拡散セル (Franz セル) を用いてラット皮膚を対象とした *in vitro* 皮膚透過性試験を実施した。また、ヒト皮膚を模倣した人工膜を利用した *in vitro* 皮膚透過性試験を確立し、本試験法による結果が動物実験結果と対応するかどうか詳細に検証し、その結果、人工膜を利用した *in vitro* 皮膚透過性試験と ROS assay の戦略的な組み合わせによって、完全に動物実験に依存しない光安全性評価が可能になるものと結論した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ohtake Hiroto, Tokuyoshi Yasuharu, Iyama Yosuke, Nukaga Takumi, Nishida Hayato, Ohtake Toshiyuki, Hirota Morihiko, Yamada Kohei, Seto Yoshiki, Sato Hideyuki, Kouzuki Hirokazu, Onoue Satomi	4. 巻 47
2. 論文標題 Reactive oxygen species (ROS) assay-based photosafety screening for complex ingredients: Modification of the ROS assay protocol	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 483 ~ 492
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.47.483	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Hideyuki, Tabata Aiko, Moritani Tatsuru, Morinaga Tadahiko, Mizumoto Takahiro, Seto Yoshiki, Onoue Satomi	4. 巻 27
2. 論文標題 Correction: Sato et al. Design and Characterizations of Inhalable Poly(lactic-co-glycolic acid) Microspheres Prepared by the Fine Droplet Drying Process for a Sustained Effect of Salmon Calcitonin.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 6775 ~ 6775
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules27206775	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Kohei, Kambayashi Atsushi, Onoue Satomi	4. 巻 180
2. 論文標題 Quantitative assessment of disintegration rate is important for predicting the oral absorption of solid dosage forms containing poorly soluble weak base drugs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics	6. 最初と最後の頁 23 ~ 32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejpb.2022.09.017	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Halder Shimul, Mibe Yasuhiko, Rikimura Shingo, Kuromi Koichi, Sato Hideyuki, Onoue Satomi	4. 巻 48
2. 論文標題 Strategic application of liposomal system to R- -lipoic acid for the improvement of nutraceutical properties	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Drug Development and Industrial Pharmacy	6. 最初と最後の頁 239 ~ 246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/03639045.2022.2105865	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Banik Sujan, Yamada Kohei, Sato Hideyuki, Onoue Satomi	4. 巻 19
2. 論文標題 Development of Poly(lipoic acid) Nanoparticles with Improved Oral Bioavailability and Hepatoprotective Effects of Quercetin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 1468 ~ 1476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.molpharmaceut.2c00009	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Kohei, Hayashi Yuto, Sasaki Kenta, Higuchi Koji, Shindo Takeshi, Shikama Hiroshi, Sato Hideyuki, Onoue Satomi	4. 巻 43
2. 論文標題 Nanocrystal solid dispersion of fuzapladib free acid with improved oral bioavailability	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biopharmaceutics & Drug Disposition	6. 最初と最後の頁 89 ~ 97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bdd.2314	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishida Hayato, Ohtake Toshiyuki, Ashikaga Takao, Hirota Morihiko, Onoue Satomi, Seto Yoshiki, Tokura Yoshiki, Kouzuki Hirokazu	4. 巻 77
2. 論文標題 In chemico sequential testing strategy for assessing the photoallergic potential	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxicology in Vitro	6. 最初と最後の頁 105245 ~ 105245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tiv.2021.105245	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Seto Yoshiki, Tonami Ryo, Iyama Yosuke, Sato Hideyuki, Onoue Satomi	4. 巻 350
2. 論文標題 An approach to evaluate metabolite-related phototoxicity with combined use of photochemical properties and skin deposition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxicology Letters	6. 最初と最後の頁 91 ~ 97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.toxlet.2021.07.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Seto Yoshiki, Suzuki Gen, Aoki Asako, Kaneko Yuuki, Kato Masashi, Sato Hideyuki, Onoue Satomi	4. 巻 12
2. 論文標題 Novel approach for attenuation of pirfenidone-induced digestive symptoms: a respirable powder formulation of pirfenidone	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Therapeutic Delivery	6. 最初と最後の頁 515 ~ 522
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4155/tde-2021-0027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Onoue Satomi	4. 巻 141
2. 論文標題 Establishment and International Harmonization of Photosafety Testing Strategy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 807 ~ 812
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.20-00217-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Onoue Satomi, Kouzuki Hirokazu, Toyoda Akemi, Fueki Osamu, Hosoi Kazuhiro, Kojima Hajime, Ashikaga Takao, Onodera Hiroshi	4. 巻 141
2. 論文標題 Current Issues in Photosafety Evaluation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 111 ~ 124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.20-00148	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Onoue Satomi, Kouzuki Hirokazu, Toyoda Akemi, Fueki Osamu, Hosoi Kazuhiro, Kojima Hajime, Ashikaga Takao, Onodera Hiroshi	4. 巻 141
2. 論文標題 Current Issues in Photosafety Evaluation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 111 ~ 124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.20-00148	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Seto Yoshiki, Ohtake Hiroto, Sato Hideyuki, Onoue Satomi	4. 巻 113
2. 論文標題 Phototoxic risk assessment of dermally-applied chemicals with structural variety based on photoreactivity and skin deposition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regulatory Toxicology and Pharmacology	6. 最初と最後の頁 104619 ~ 104619
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yrtph.2020.104619	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iyama Yosuke, Sato Hideyuki, Seto Yoshiki, Onoue Satomi	4. 巻 146
2. 論文標題 Strategic photosafety screening system consisting of in chemico photoreactivity and in vitro skin exposure for quinolone derivatives	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 105257 ~ 105257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejps.2020.105257	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 徳吉 泰春, 猪山 陽輔, 佐藤 秀行, 世戸 孝樹, 尾上 誠良
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本薬学会第 35 年会 (熊本)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 望月 大吾, 世戸 孝樹, 佐藤 秀行, 尾上 誠良
2. 発表標題 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
3. 学会等名 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)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------