

Reactive oxygen species (ROS) assay ー試験法の開発と今後の展開ー

尾上 誠良

静岡県立大学 薬学部 薬物動態学分野

光線過敏症は特定の化学物質摂取後に露光することによって誘起される皮膚の異常反応であり、紅斑、小水疱、丘疹、色素沈着等を特徴とする。近年、薬剤、食品、化粧品等によって引き起こされる光線過敏症に注目が集まり、新規物質創製において本毒性リスクの回避は重要な課題の一つとなっている。我々は先に、医薬品の光化学的特性を指標とした光安全性評価法として簡便で多検体処理可能な reactive oxygen species (ROS) アッセイを提案し、光線過敏症誘発の可能性を創薬初期過程においても予測し得ることを明らかにした。さらに、ROS 産生を簡便かつ迅速に評価するためにマルチウェルプレートを用いて ROS アッセイを改良するとともに、既存医薬品ならびに医薬品候補化合物のデータ蓄積によって薬剤性光線過敏症リスク予測のための暫定的な threshold を算出した。光安全性予測におけるその活用が期待されるなか、日本動物実験代替法評価センター主催による ROS アッセイの多施設バリデーションを実施し、施設間再現性ならびに光毒性予測性について検証を行った。また、医薬品候補化合物の体内動態、特に皮膚移行性と ROS アッセイの結果を併せて考察することによって、より高い臨床的関連性を有する毒性リスク予測が可能となりつつある。特にカセットドージング法による網羅的動態解析と ROS アッセイの併用は高いスループットの光安全性評価を可能とし、動物資源を削減することから 3Rs の観点からも有用と考える。

2014 年に step 5 に到達した ICH S10 ガイドラインにおいて「ROS アッセイは全身適用薬における光毒性試験の要否判断に使用できる」と記述され、光安全性予測における更なる活用が期待される。同評価系を医薬品以外の化学物質に対しても発展的に応用すべく、化粧品や食品素材の光安全性評価を検討したところ、ROS アッセイは医薬品以外の化学物質に対しても高い予測精度と再現性を示した。本発表では ROS アッセイの測定原理、開発の経緯に加えて、ROS アッセイをベースにした各種化学物質の光安全性評価アプローチも併せて紹介する。

Reactive oxygen species (ROS) assay

用途

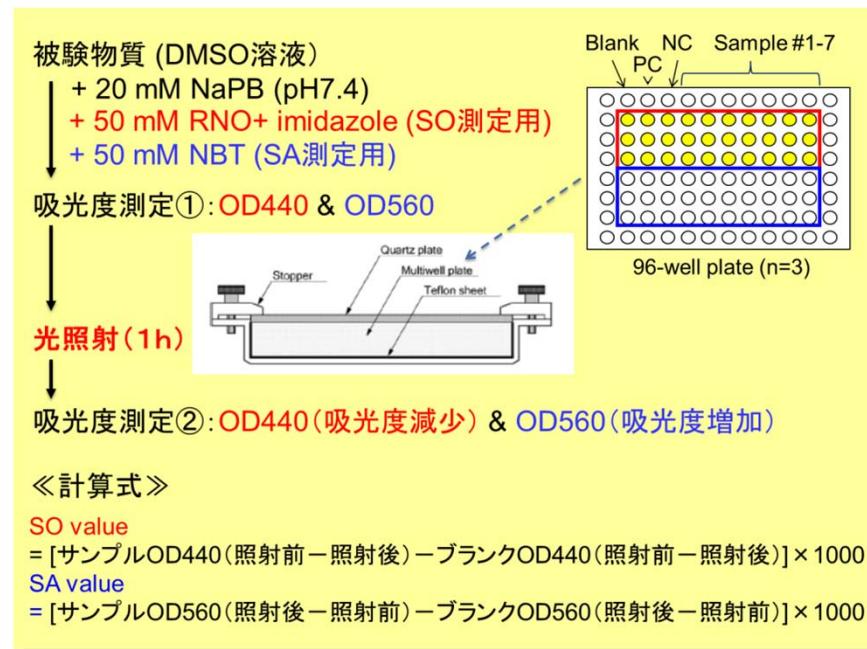
医薬品原料、食品素材、化粧品原料等の光毒性試験

原理

被験物質に擬似太陽光を照射を照射した際の reactive oxygen species (ROS) 産生能を評価することで被験物質の光毒性リスクを予測する。

試験手順

以下の手順に従い、被験物質から產生される Singlet Oxygen (SO) 及び Superoxide anion (SA) を同時に検出する。被験物質の終濃度は 200 μM を標準とするが溶解性が低い場合には希釈する。



留意点

- ✓ 20 μM で反応液中に析出する化合物は評価できない
- ✓ 440 及び 560 nm に吸収をもつ化合物は評価できない
- ✓ 対照物質を用いて照射条件を適切に設定することが重要

特徴

- 1) 細胞培養や動物実験を用いることなく光毒性リスクを評価することが可能である。
- 2) 約 1 時間でアッセイが終了し、使用サンプル量も極めて少ない。
- 3) Validation study を実施し、頑健性・予測信頼性を検証した。
 - ・陽性対照物質の日内・日間変動は小さく、良好な施設間再現性
 - ・難溶性被験物質を除き、光毒性物質の陽性検出率は全施設とも 100%
 - ・偽陰性予測を認めず、初期スクリーニング法としての有用
 - ・異なる solar simulator を用いても光毒性予測が可能
- 4) ICH S10 guideline "Photosafety evaluation of pharmaceuticals" に記載されている。

参考資料

- 1) Onoue et al., *Toxicology in Vitro*, **28**: 515–23 (2014)
- 2) Onoue et al., *Journal of Applied Toxicology*, **33**: 1241–50 (2013)
- 3) ICH S10 guideline "Photosafety evaluation of pharmaceuticals"
http://www.pmda.go.jp/ich/s/step4_s10_e.pdf
- 4) ROS assay validation management team, ROS assay 推奨プロトコール
http://www.jacvam.jp/files/news/ROS_protocol_v3.1_130920_clean.pdf