

動物実験の3Rsに寄与する化学物質の光安全性評価法の戦略的開発

静岡県立大学薬学部薬剤学分野

世戸 孝樹

Drug-induced phototoxicity is caused by exposure to sunlight after topical and/or systemic administration of photosensitive chemicals. Both photoreactivity of chemicals and its distribution to sunlight-exposed tissues are key determinants of drug-induced phototoxicity. Recently, 3Rs principle (replacement, reduction, refinement) tends to be compliance in pharmaceutical and cosmetic industries. In this study, a new photosafety screening strategy based on the combined use of a reactive oxygen species (ROS) assay and an *in vitro* skin permeation test was developed as an alternative to animal experiments. The phototoxic risk of 6 phototoxic compounds, acridine (ACD), furosemide (FSM), hexachlorophene (HCP), 8-methoxypsoralen (MOP), norfloxacin (NFX), and promethazine (PMZ), were evaluated based on photochemical and *in vitro* skin deposition properties. An *in vivo* phototoxicity test in rats was undertaken to verify the prediction capacity of the proposed system. All tested compounds exhibited strong absorption in UVA/B regions, and generation of significant ROS from all tested chemicals were observed under simulated sunlight exposure. The steady-state concentration (C_{ss}) values of tested compounds in removed rat skin were estimated on the basis of the skin permeability. The C_{ss} values of ACD, FSM, HCP, MOP, NFX, and PMZ were calculated to be 69, 2.8, 57, 50, 3.2, and 59, respectively. On the basis of the ROS data and C_{ss} values of tested compounds, the phototoxic risk of tested compounds was predicted. The predicted phototoxic risk by proposed screening system (ACD > HCP > MOP > PMZ > FSM \approx NFX) was mostly in agreement with the observed *in vivo* phototoxicity (ACD > HCP > MOP > FSM \approx PMZ > NFX). From these findings, the phototoxic risk of tested compounds could be predicted by combined use of ROS assay and *in vitro* skin permeation test, and the new photosafety screening system would contribute to product development and animal welfare.

1. 緒言

薬剤性光線過敏症は特定の化合物を全身または局所投与後、太陽光曝露により惹起される皮膚および眼における異常反応である¹⁾。本症は患者が視覚的に認知でき、本症に対する様々な処置が必要となるため、患者のquality of lifeの低下を招きうる。光毒性は医薬品のみならず、様々な化学物質が原因となることが報告されており²⁾、創製・開発される製品について適切な光毒性リスク予測およびその回避が求められている。光毒性反応はUVA/B (UVB, 290-320nm; UVA, 320-400nm) および可視光 (visible light: VIS, 400-700nm) 領域の光エネルギーを化合物が吸収することが引き金となる。光励起された化合物はエネルギー的に不安定な状態であり、吸収した光エネルギーの放出を蛍光、燐光、熱および光化学的反応を介して行う³⁾。皮膚もしくは眼に存在する化合物が太陽光曝露にて励起することで生体内分子と光化学的反応を引き起こす可能性がある。この光化学的反応は反応様式によりエネルギー転移を介するtype I光化学反応およびフリーラジカル産生を介するtype II光化学反応がある⁴⁾。光励起化合物は生体

内に存在するタンパク、脂質およびDNAと反応し、細胞・組織障害を引き起こす。反応する生体内分子に基づき光毒性は光刺激性、光遺伝毒性および光アレルギーに大別される。生体内には O_2 も豊富に存在しており、 O_2 自身が光エネルギーのacceptorとして光化学的反応に関与することもある。光励起化合物と O_2 が反応することで産生する活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) は反応性が非常に高く、化合物の光毒性反応に関与すると考えられている。

化合物の光安全性評価法はこれまで数多く開発されており、光毒性の発現機序に基づく評価系が存在する⁵⁾。特に、UV/VIS吸収特性評価⁶⁾、*in vitro* 3T3 neutral red uptake phototoxicity test (3T3 NRU PT)⁷⁾、ROS assay⁸⁾は化学物質の光安全性評価にて広く用いられる評価系である。2014年にはInternational Council for Harmonisation of Technical Requirement for Pharmaceutical Human Use (ICH) より医薬品の光安全性評価に関するガイドライン (ICH S10) が施行され、医薬品候補化合物の光安全性評価の流れを示し、上記の評価方法などが推奨されている。また、当研究室で開発したROS assayは、2019年に*in chemico*光反応性評価法としてOrganisation for Economic Co-operation and Development (OECD) におけるテストガイドライン化(TG 495)に成功した。

光毒性化合物は生体内にて太陽光へ曝露されなければ光毒性反応を引き起こす可能性は低く⁹⁾、露光部位である皮膚や眼などへの曝露も光毒性発現に強く関わる。以前の研究にて、化合物の光化学的および薬物動態学的特性の統合的解析により化合物の光毒性リスクを効果的に予測できる



Strategic development of a photosafety evaluation system for chemicals contributing to 3Rs principle in animal experiments

Yoshiki Seto

Laboratory of biopharmacy, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka

ことを報告した¹⁰⁾。さらに、薬物動態試験におけるコスト、動物実験の3Rs (reduction, replacement, refinement) および評価スループットの観点からの改善を指向し、1匹の実験動物に複数化合物を同時に投与することで生体サンプル中の複数化合物濃度の測定を可能にする *in vivo* cassette-dosing 薬物動態試験を導入することで新たな統合的光安全性評価法を提案し、複数化合物の光毒性リスクを高効率かつ高精度に予測できることを報告し、光反応性および皮膚曝露の両特性に着目した光安全性評価は医薬品候補化合物の光毒性リスク予測ツールとして高い有用性を示した¹¹⁻¹⁴⁾。一方で、cassette-dosing法においても皮膚内濃度推移を得るには一定数の実験動物の使用は必要であり、動物福祉とスループットの観点から更なる改良が必要であった。経皮適用化合物の開発では候補化合物の皮膚透過性評価としてFranz型拡散セルを用いた *in vitro* 皮膚透過性試験 (OECD TG 428)¹⁵⁾ などが用いられる。さらに皮膚透過性評価を応用し、化合物の皮膚透過速度が定常状態に達した際の皮膚中濃度 (steady-state concentration; C_{ss}) を算出する方法が報告されている¹⁶⁾。しかしながら、経皮適用化合物の光毒性リスク予測にて皮膚曝露の指標としての C_{ss} の適用可能性は不明である。

そこで本研究ではROS assayと *in vitro* 皮膚透過性試験を組み合わせた統合的光安全性評価法を新規に提案し、本評価法の経皮適用化合物の光安全性評価への適用性について精査した。被験物質としてacridine (ACD), furosemide (FSM), hexachlorophene (HCP),

8-methoxypsoralen (MOP), norfloxacin (NFX) および promethazine (PMZ) を用いた (Fig. 1)。6種の被験物質はそれぞれ異なる母骨格を持ち、分子量およびClog P値は幅広い物性値を示す。被験物質の光化学的特性はUV-VIS吸収測定およびROS assayにより評価した。ラット摘出皮膚を用いた *in vitro* 皮膚透過性試験を実施し、各被験物質の C_{ss} を算出した。各被験物質のROS dataならびに C_{ss} を用いた統合的解析により被験物質の光毒性リスクを予測し、*in vivo* 光毒性試験の結果と比較し、本評価系の予測能を検証した。

2. 方法

2.1. 実験材料

ACDはAlfa Aesar (Haverhill, MA, USA)より購入した。FSM, NFXおよびPMZは富士フィルム和光純薬より購入した。HCPおよびMOPは東京化成工業より購入した。その他の試薬は市販品を購入して用いた。

2.2. 実験動物

Sprague-Dawley系雄性ラット (9-14週齢, 体重約300-450g)は日本SLCより購入した。ラットは室温 24 ± 1 °C, 湿度 $55 \pm 5\%$ ならびに明暗サイクル12hで維持された動物飼育施設にて自由摂餌と飲水が可能な環境で飼育された。全ての動物実験は静岡県立大学実験動物倫理委員会のガイドラインに準じて実施した。

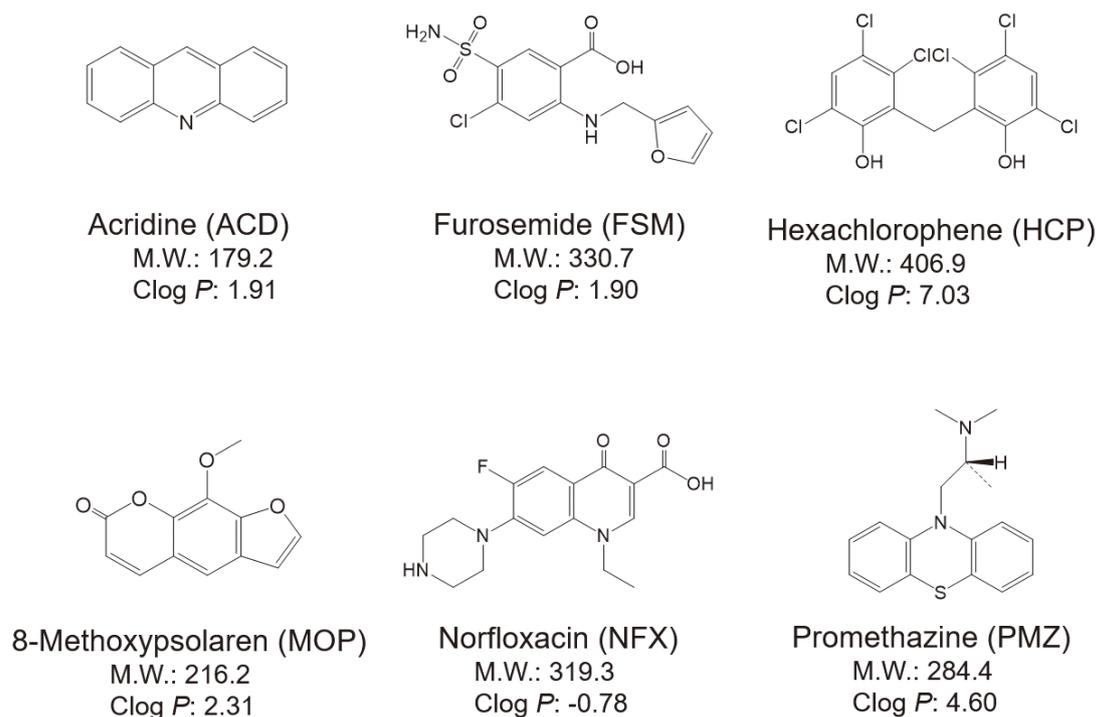


Fig. 1 Chemical structures and physicochemical properties of test compounds.

2.3. UV-VIS吸収スペクトル測定

各被験物質濃度(20 μ M)を20mM sodium phosphate buffer (NaPB, pH7.4)に溶解し、石英セル(光路長:10mm)に移した。各被験物質のUV-VIS吸収スペクトルをHITACHI U-2010 spectrophotometer (株式会社日立ハイテクノロジーズ)により記録した。

2.4. ROS assay

2.4.1. 擬似太陽光照射装置

擬似太陽光照射装置としてAtlas Suntest CPS+ (Atlas Material Technology LCC)を用いた。装置は1,500WのXenon arc lampおよび短波長のUVをカットするフィルターを備えたものを使用した。照射強度はUVA detectorであるDr. Hönle #0037 (Dr. Hönle)を用い、UVA強度として約2.0mW/cm²であることを確認し、Atlas Suntest CPS+内の温度は28 $^{\circ}$ Cに保った。

2.4.2. 評価方法

光照射によって被験物質からsinglet oxygenおよびsuperoxid産生を測定した¹⁷⁾。Singlet oxygenについて、被験物質(200 μ M)、p-nitrosodimethylaniline (50 μ M)およびimidazole (50 μ M)を含む20mM NaPB (pH7.4) 200 μ Lを96-well microplateに分注し、440nmの吸光値をSAFIRE microplate spectrophotometer (TECAN)を用いて測定した。その後、プレートをreaction containerにセットし、擬似太陽光を1h照射した。照射後、440nmの吸光値を測定し、440nmの吸光値の減少をsinglet oxygen産生の指標とした。Superoxideについて、被験物質(200 μ M)およびnitroblue tetrazolium(50 μ M)を含む20mM NaPB(pH7.4) 200 μ Lを96-well microplateに分注し、560nmの吸光値をSAFIREを用いて測定した。その後、プレートをreaction containerにセットし、擬似太陽光を1h照射した。照射後、560nmの吸光値を測定し、560nmの吸光値の増加をsuperoxide産生の指標とした。

2.5. *In vitro*皮膚透過性評価

Isoflurane麻酔下でラット腹部皮膚を採取し、未処置の摘出皮膚ならびにテープストリッピングを20回行うことで角質を除去した皮膚を実験に用いた。レセプター液としてpolyethylene glycol 400 (PEG 400)を40%含むリン酸緩衝液(phosphate-buffered saline: PBS, pH7.4)を用い、試験中は32 $^{\circ}$ Cに保った。全被験物質(各1mg/mL)を含むpropylene glycol溶液を摘出皮膚の上部に添加し、透過性試験を開始した。試験開始から0, 0.5, 8, 10, 12, 18および24h後にレセプター溶液100 μ Lを採取した。得られたサンプル中の各被験物質濃度をultra-performance liquid chromatography equipped with electrospray ionization mass spectrometry (UPLC/ESI-MS)を用いて測定した。

2.6. 皮膚滞留性予測

皮膚透過パラメーターを用いて化合物の皮膚透過速度が定常状態の際の皮膚中濃度を算出できる^{16, 18)}。まず、被験物質のレセプター溶液中蓄積量(accumulated amount; Q)は以下のように示すことができる。

$$Q = KLC_v \left(\frac{D}{L^2} t - \frac{1}{6} \right)$$

K , L , C_v および D はそれぞれpartition coefficient, thickness, chemical concentration in applied solutionおよびdiffusion coefficientを示す。分配($K \cdot L$)および拡散(D/L^2)は最小二乗法を用いて算出した。

透過係数(permeation coefficient; P)は以下の式にしたがって算出した。

$$P = \frac{KD}{L}$$

各摘出皮膚に対する P の関係を以下に示す。 P_{tot} , P_{sc} および P_{ved} はそれぞれpermeability coefficient through whole skin, permeability coefficient through stratum corneumおよびpermeability coefficient through viable epidermisを意味する。

$$\frac{1}{P_{tot}} = \frac{1}{P_{sc}} + \frac{1}{P_{ved}}$$

上記式を用いて算出した被験物質の皮膚透過性のパラメーターを用いて、透過速度が定常状態となった際の皮膚中濃度 C_{ss} を以下の式を用いて算出した。

$$C_{ss} = \frac{C_v}{2L_{tot}} \left\{ K_{sc} L_{sc} \left(1 + \frac{P_{tot}}{P_{ved}} \right) + K_{ved} L_{ved} \frac{P_{tot}}{P_{ved}} \right\}$$

L_{tot} , L_{sc} と L_{ved} はそれぞれmean thickness of whole skin, mean thickness of stratum corneumとmean thickness of viable epidermisを表す。 K_{sc} および K_{ved} はそれぞれpartition coefficients to stratum corneumおよびpartition coefficients to viable epidermisを示す。

2.7. *In vivo*光毒性評価

試験開始24h前にラット腹部を剃毛し、被験物質(100mg/mL)を含むdimethyl sulfoxide (DMSO)溶液を調製し、各被験物質のDMSO溶液100 μ Lを塗布した。DMSO溶液塗布3h後に除去し、麻酔下でラット腹部にブラックライトを用いてUVを照射した。UV照射強度の測定はUVA detectorであるDr. Hönle #0037 (Dr. Hönle)を用いて行い、約2.7mW/cm²の照射強度で照射量が30J/cm²となるまでUV照射した。照射前および照射終了24h後の皮膚表面の色調を測定し、UV照射前後の ΔE 値を光毒性評価の指標とした。色差はCommission International del's Eclairage (CIE)により推奨されている $L^*a^*b^*$ systemにより記録する色差計(NF333, 日本電色工業)を用いて測定した。色差計は白色およびゼロ補正

をした後にラット腹部皮膚表面の色差を測定した。測定した輝度 (L^*)、色相 (a^*) および彩度 (b^*) の値を基に色差 (ΔE) を以下のように算出した。

$$\Delta E = \sqrt{[(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]}$$

2. 8. データ解析

In vivo 光毒性試験において、各被験物質のUV照射および非照射群間の統計処理は student's *t* 検定を実施し、危険率5%以下 ($P < 0.05$) を持つて有意とした。脂溶性の指標である $Clog P$ は ChemBioDraw 16.0 software (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) に各被験物質の構造式を入力することで算出した。

3. 結果

3. 1. 光化学的特性評価

全被験物質はUV領域に強い吸収を持ち (Fig. 2A)、極大吸収波長でのMEC値は19,500 (ACD)、14,900 (FSM)、

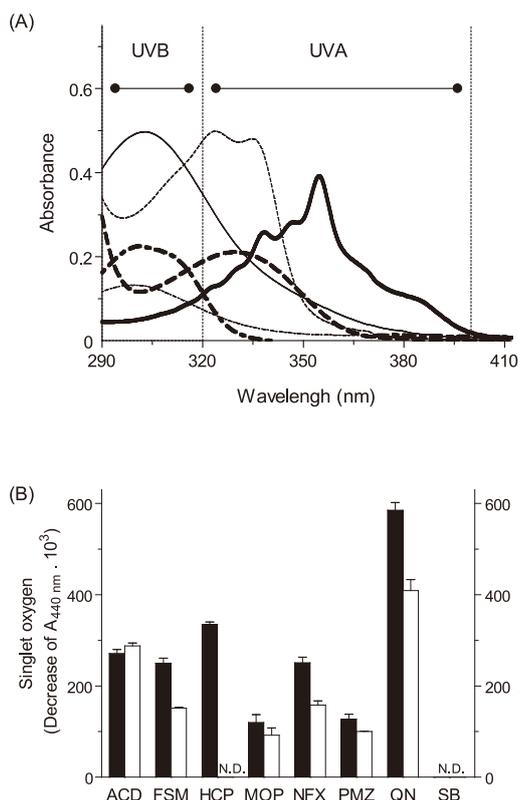


Fig. 2 Photochemical properties of test compounds. (A) UV absorption spectra of test compounds ($20\mu\text{M}$) in 20 mM sodium phosphate buffer ($\text{pH}7.4$). Thick solid line, ACD; thick dashed line, FSM; thick dotted line, HCP; thin solid line, MOP; thin dashed line, NFX; and thick dotted line, PMZ. (B) Generation of ROS including singlet oxygen (filled bars) and superoxide (open bars) from test compounds ($200\mu\text{M}$) exposed to simulated sunlight (250 W/m^2) for 1 h . QN, quinine (positive control); and SB, sulisobenzone (negative control). Data represent the mean \pm S.D. of 3 experiments. N.D., not detected.

11,200 (HCP), 24,900 (MOP), 24,900 (NFX) と 6,600 (PMZ) $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ であった。290-700nmの波長においてMECが $1,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ 上回らない化合物は直接的な光毒性を引き起こす懸念はないと定義されており¹⁹⁾、6種の被験物質は高い光励起性を持つと判断した。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強い singlet oxygen および superoxide の産生を認め、HCPは singlet oxygen のみ産生する結果を得、その程度は全被験物質中最も高い値を示した (Fig. 2B)。いずれの被験物質も以前の検討にて設定した criteria ($\Delta A_{440\text{nm}} \times 10^3$: 25 for singlet oxygen and/or $\Delta A_{560\text{nm}} \times 10^3$: 20 for superoxide)^{20, 21)} を超えており、強い光反応性を有していた。特に、ACDは singlet oxygen および superoxide のどちらの産生も非常に高く、被験物質中で最も高い光反応性を有していた。

3. 2. *In vitro* 皮膚透過性評価および C_{SS} の算出

経時的にレセプター溶液中の各被験物質濃度を測定した結果、MOPは両方の摘出皮膚で最も高い累積量を示した (Fig. 3)。一方で、NFXの透過量は両摘出皮膚において全

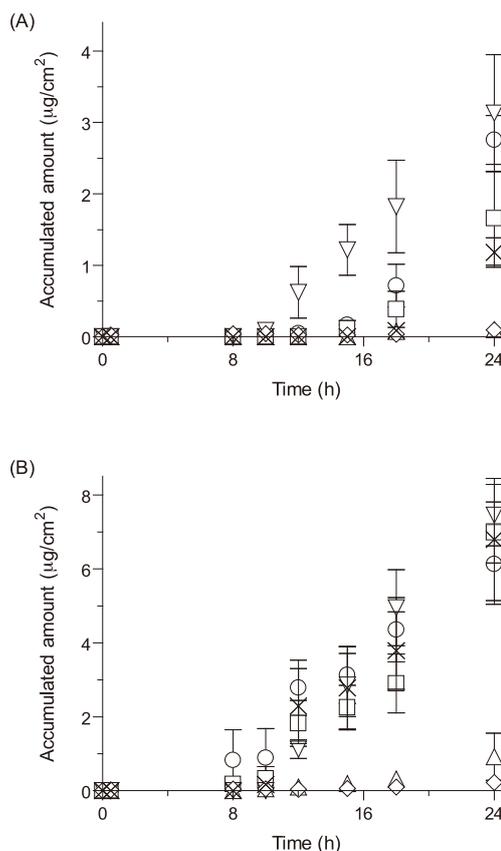


Fig. 3 *In vitro* skin permeability of test compounds. Accumulated amount of test compounds that permeated through (A) whole skin and (B) stripped skin. ○, ACD; △, FSM; □, HCP; ▽, MOP; ◇, NFX; and ×, PMZ. Data represent mean \pm S.E. for 4-6 experiments.

被験物質中最も低値であった。被験物質の累積量プロファイルに基づき、 P_{tot} は 1.6×10^{-4} (ACD), 2.3×10^{-5} (FSM), 9.3×10^{-5} (HCP), 1.0×10^{-4} (MOP), 4.6×10^{-6} (NFX) および 1.0×10^{-4} (PMZ) cm/sであり、 P_{ved} は 3.1×10^{-4} (ACD), 7.8×10^{-4} (FSM), 4.3×10^{-4} (HCP), 2.3×10^{-4} (MOP), 1.4×10^{-5} (NFX) および 4.5×10^{-4} (PMZ) cm/sであった (Table 1)。

得られた皮膚透過性パラメーターを基に被験物質のラット摘出皮膚における C_{ss} を算出したところ、ACD, FSM, HCP, MOP, NFX および PMZ の C_{ss} はそれぞれ69.1, 2.8, 57.3, 50.7, 3.2 および 59.1 $\mu\text{g/mL}$ であった (Fig. 4)。したがって、ラット皮膚における*in vitro*皮膚曝露はACD > PMZ > HCP > MOP > NFX > FSMであった。

3.3. *In vivo* 光毒性評価

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。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評価することで*in vivo*光毒性を評価した (Fig. 5)。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。特にUVA照射群では、全ての被験物質で Δa 値が正の変化を示したことから塗布部の赤みが増したことを示しており、単回投与によりUVA照射にて紅斑反応を誘発することを認めた。すなわち、全被験物質は経皮投与により生体内で光毒性を引き起こすことを示唆した。特に、ACDおよび

HCP投与群の色調変化が他の4種の被験物質と比較して大きかった。各被験物質におけるUVA照射時および非照射時の ΔE 値の差を基に、*in vivo*光毒性の強さはACD \approx HCP > PMZ > MOP > FSM > NFXであると判断した。

4. 考察

本研究では*in vivo*皮膚内動態評価を*in vitro*皮膚透過性試験に代替した光安全性評価系を提案し、光反応性および*in vitro*皮膚曝露データを用いて6種の被験物質の光毒性リスクを予測することで、本光安全性評価系の適用可能性を精査した。

全被験物質はUV領域において強い光吸収を示し、MEC値はICH S10で定める基準値を大きく超えており、光励起により化合物は光化学的反応を引き起こすことを示唆した。光化学的反応によるROS産生は化合物の光毒性発現に関与することが報告されている²⁾。ROS assayより、全被験物質が高い光反応性を示し、光毒性リスクを有することを示唆した。6種の被験物質のうち、ACDおよびHCPの光反応性が高く、FSMおよびNFXの光反応性は中程度であった。MOPおよびPMZは強いROS産生を示したが、他の被験物質と比し低値であった。光安全性評価のためのcriteriaに基づくROS assayの陽性検出率は100%であることが報告されている^{20, 21)}。本検討で用いた被験物質はすべて光毒性を惹起することが報告されており、得られた結果は以前の報告を裏付ける結果であった。

Table 1 Parameters for skin permeation of test compounds

	ACD	FSM	HCP	MOP	NFX	PMZ
P_{tot} ($\times 10^{-5}$ cm/s)	16	2.3	9.3	10	0.46	10
P_{ved} ($\times 10^{-5}$ cm/s)	31	7.8	43	23	1.4	45

P_{tot} , permeability coefficient through whole skin; and P_{ved} , permeability coefficient through viable epidermis

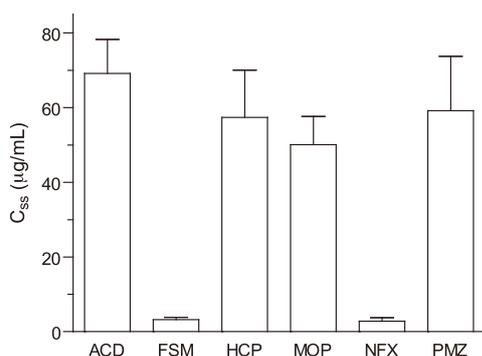


Fig. 4 C_{ss} values of test compounds in the intact rat skin. Data represent the mean \pm S.E. of 4–6 experiments.

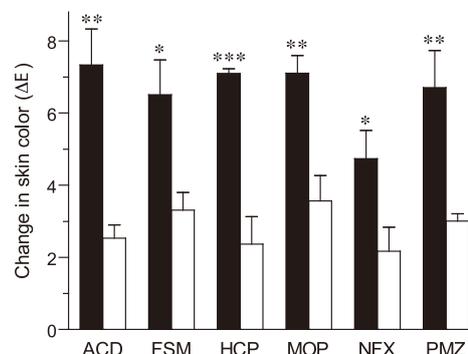


Fig. 5 Colorimetric changes in the rat skin caused by irradiated and non-irradiated test compounds. Filled bars, irradiated group; open bars, non-irradiated group. Data represent the mean \pm S.E. of 4 experiments. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; and ***, $p < 0.001$ vs. corresponding non-irradiated group.

In vitro 皮膚透過性試験では全被験物質が摘出皮膚を透過した。一般的に全身曝露を指向した経皮投与には分子量 500 以下および適度な脂溶性を持つ化合物が適切である²²⁾。経皮投与された化合物は主に角質層および表皮・真皮層の細胞間隙および細胞内ルートを Fick の拡散則に従い透過することで全身循環へ移行する²³⁾。Clog *P* 値が正である 5 種の被験物質は主にラット摘出皮膚の細胞間隙および細胞内ルートを透過しレセプター溶液中へ移行したと考える。一方, NFX の Clog *P* 値は -0.78 であり, 脂溶性が低い。水溶性化合物や高分子化合物の皮膚透過には主に毛嚢および汗腺を介したルートの寄与が報告されており²⁴⁾, 脂溶性の低い NFX はこれら付随器官を介して皮膚を透過したと考える。

化合物が持つ光反応性および皮膚曝露は光毒性のリスクファクターである。したがって, ROS assay および *in vitro* 皮膚透過性試験より得られた結果を統合的に解析することで被験物質の光毒性リスクを予測した (Table 2)。強力な光反応性を有する ACD および HCP は高い *in vitro* 皮膚曝露を示したことから光毒性リスクは高いと判断した。特に ACD の光毒性リスクが最も高いと予測した。MOP および PMZ は比較的低い光反応性を示したが, *in vitro* 皮膚曝露については ACD および HCP と同程度の C_{ss} を示した。したがって, MOP および PMZ の光毒性リスクは今回用いた被験物質中では中程度であると判断した。FSM および NFX の ROS 産生は被験物質中では中程度であったが, 他の 4 種の被験物質と比較し, *in vitro* 皮膚曝露は非常に低い値を示したことから, FSM および NFX の光毒性リスクは今回用いた被験物質中では比較的弱いと考えた。すなわち光毒性予測は Table 3 に示すとおりである。ラットを用いた *in vivo* 光毒性試験にて, すべての被験物質で光毒性

反応に起因すると考える皮膚の色調変化を観察した。提案した評価系の予測精度を検証すべく, 予測した光毒性リスクおよび *in vivo* 光毒性の結果を比較したところ, 比較的良好に対応することが明らかとなった (Table 3)。本知見より, 提案した評価系の経皮適用化合物の光安全性予測に対する有用性を示唆した。本検討では良好な結果が得られたが, 皮膚曝露評価では UV 曝露部位における化合物の最大濃度および滞留時間の両方が光毒性発現のリスクとなり得る。今回算出した C_{ss} は化合物の皮膚透過速度が定常状態となった際の皮膚中濃度に相当するため過小評価となる懸念がある。経皮投与化合物の皮膚中濃度および滞留時間はその脂溶性に依存することが報告されている²⁵⁾。したがって, 今回構築した評価系についてはさらなる適用可能性の検証が必要であろう。ROS assay および *in vivo* 体内動態評価を用いた光安全性評価系と比較し, 動物実験を用いない本評価系は光安全性評価に必要な実験動物数の削減および評価スループットの向上に寄与すると考える。光反応性および *in vitro* 皮膚曝露に基づく光安全性予測法は候補化合物選択において開発初期のスクリーニング法として有用であろう。

本研究助成により得られた成果

- 1) Y. Iyama, H. Sato, Y. Seto, S. Onoue: A new photosafety screening strategy based on *in chemico* photoreactivity and *in vitro* skin exposure for dermally-applied chemicals, *Toxicology Letters*, **317**: 45–52, 2019
- 2) Y. Iyama, H. Sato, Y. Seto, S. Onoue: Photochemical and pharmacokinetic characterization of orally administered chemicals to evaluate phototoxic risk, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **108** (3): 1303–8, 2019

Table 2 Decision matrix

	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</i>						
C_{ss} (μg/mL)	69.1	2.8	57.3	50.1	3.2	59.2

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 decrease in $A_{440\text{ nm}}$ and increase in $A_{560\text{ nm}}$, respectively.

Table 3 Prediction capacity of the proposed photosafety screening system

Predicted phototoxic risk										
ACD	>	HCP	>	PMZ	>	MOP	>	NFX	≒	FSM
Observed <i>in vivo</i> phototoxicity										
ACD	≒	HCP	>	PMZ	>	MOP	>	FSM	>	NFX

3) Y. Seto, H. Ohtake, H. Sato, S. Onoue: Phototoxic risk assessment of dermally-applied chemicals with structural variety based on photoreactivity and skin deposition, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **113**: 104619, 2020

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団(旧 公益財団法人コスメトロジー研究振興財団)よりご援助いただきましたことに深く感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) R.S. Dawe, S.H. Ibbotson. Drug-induced photosensitivity, *Dermatol. Clin.*, **32** (3) : 363-368 (2014)
- 2) S. Onoue, Y. Seto, G. Gandy, S. Yamada. Drug-induced phototoxicity; an early *in vitro* identification of phototoxic potential of new drug entities in drug discovery and development, *Curr. Drug Saf.*, **4** (2) :123-136 (2009)
- 3) A. Jablonski. Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes, *Nature*, **131**: 839-840 (1933)
- 4) C.S. Foote. Definition of type I and type II photosensitized oxidation, *Photochem. Photobiol.*, **54**(5) : 659 (1991)
- 5) Y. Seto, K. Hosoi, H. Takagi, K. Nakamura, H. Kojima, S. Yamada, S. Onoue. Exploratory and Regulatory Assessments on Photosafety of New Drug Entities, *Curr. Drug Saf.*, **7** (2) : 140-148 (2012)
- 6) D.E. Moore. Mechanisms of photosensitization by phototoxic drugs, *Mutat. Res.*, **422** (1) : 165-173 (1998)
- 7) H. Spielmann, M. Liebsch, B. Doring, F. Moldenhauer. First results of an EC/COLIPA validation project of *in vitro* phototoxicity testing methods, *ALTEX*, **11** (1) : 22-31 (1994)
- 8) S. Onoue, Y. Tsuda. Analytical studies on the prediction of photosensitive/phototoxic potential of pharmaceutical substances, *Pharm. Res.*, **23** (1): 156-164 (2006)
- 9) J.H. Epstein. Phototoxicity and photoallergy in man, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **8** (2) : 141-147 (1983)
- 10) Y. Seto, S. Onoue, S. Yamada. *In vitro/in vivo* phototoxic risk assessments of griseofulvin based on photobiochemical and pharmacokinetic behaviors, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **38** (2) : 104-111 (2009)
- 11) Y. Seto, R. Inoue, M. Ochi, G. Gandy, S. Yamada, S. Onoue. Combined use of *in vitro* phototoxic assessments and cassette dosing pharmacokinetic study for phototoxicity characterization of fluoroquinolones, *AAPS J.*, **13** (3) : 482-492 (2011)
- 12) S. Onoue, M. Kato, R. Inoue, Y. Seto, S. Yamada. Photosafety screening of phenothiazine derivatives with combined use of photochemical and cassette-dosing pharmacokinetic data, *Toxicol. Sci.*, **137** (2): 469-477 (2014)
- 13) Y. Seto, H. Ohtake, M. Kato, S. Onoue. Phototoxic Risk Assessments on Benzophenone Derivatives: Photobiochemical Assessments and Dermal Cassette-Dosing Pharmacokinetic Study, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **354** (2) : 195-202 (2015)
- 14) Y. Iyama, H. Sato, Y. Seto, S. Onoue. Photochemical and Pharmacokinetic Characterization of Orally Administered Chemicals to Evaluate Phototoxic Risk, *J. Pharm. Sci.*, **108** (3) : 1303-1308 (2019)
- 15) OECD. Test No. 428: Skin Absorption: *In Vitro* Method. (2004)
- 16) T. Hatanaka, S. Yoshida, W.R. Kadhum, H. Todo, K. Sugibayashi. *In Silico* Estimation of Skin Concentration Following the Dermal Exposure to Chemicals, *Pharm. Res.*, **32** (12) : 3965-3974 (2015)
- 17) ROS assay Validation Management Team. REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS) ASSAY TO EXAMINE PHOTOREACTIVITY OF CHEMICALS. (2013)
- 18) K. Sugibayashi, H. Todo, T. Oshizaka, Y. Owada. Mathematical model to predict skin concentration of drugs: toward utilization of silicone membrane to predict skin concentration of drugs as an animal testing alternative, *Pharm. Res.*, **27**(1): 134-142(2010)
- 19) B. Henry, C. Foti, K. Alsante. Can light absorption and photostability data be used to assess the photosafety risks in patients for a new drug molecule? *J. Photochem. Photobiol. B*, **96** (1) : 57-62 (2009)
- 20) S. Onoue, K. Hosoi, S. Wakuri, Y. Iwase, T. Yamamoto, N. Matsuoka, K. Nakamura, T. Toda, H. Takagi, N. Osaki, Y. Matsumoto, S. Kawakami, Y. Seto, M. Kato, S. Yamada, Y. Ohno, H. Kojima. Establishment and intra-/inter-laboratory validation of a standard protocol of reactive oxygen species assay for chemical photosafety evaluation. *J. Appl. Toxicol.*, **33** (11) : 1241-1250 (2013)
- 21) S. Onoue, K. Hosoi, T. Toda, H. Takagi, N. Osaki, Y. Matsumoto, S. Kawakami, S. Wakuri, Y. Iwase, T. Yamamoto, K. Nakamura, Y. Ohno, H. Kojima. Intra-/inter-laboratory validation study on reactive oxygen species assay for chemical photosafety evaluation using two different solar simulators, *Toxicol. In Vitro*, **28** (4)

- : 515-523 (2014)
- 22) J.D. Bos, M.M. Meinardi. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs, *Exp. Dermatol.*, **9** (3): 165-169 (2000)
- 23) T. Higuchi. PHYSICAL CHEMICAL ANALYSIS OF PERCUTANEOUS ABSORPTION PROCESS FROM CREAMS AND OINTMENTS. *J. Cosmet. Sci.*, **11** (2): 85-97 (1960)
- 24) F. Mohd, H. Todo, M. Yoshimoto, E. Yusuf, K. Sugibayashi. Contribution of the Hair Follicular Pathway to Total Skin Permeation of Topically Applied and Exposed Chemicals, *Pharmaceutics*, **8** (4) (2016)
- 25) A. Yamamoto, K. Setoh, M. Murakami, M. Shironoshita, T. Kobayashi, K. Fujimoto, N. Okada, T. Fujita, S. Muranishi. Enhanced transdermal delivery of phenylalanyl-glycine by chemical modification with various fatty acids, *Int. J. Pharm.*, **250** (1): 119-128(2003)