

総括研究報告書

国際協調を指向した薬剤性光線過敏症リスク評価方法開発の新展開

研究代表者 尾上 誠良 静岡県立大学 薬学部 教授

研究要旨

薬剤投与後に露光によって惹起される薬剤性光線過敏症は近年注目を集める副作用の一つであり、本副作用リスク回避のために効果的な予測方法の開発が国内外で急務の課題となっている。本研究では新規に開発した *in vitro* 光化学的試験方法である ROS アッセイのデータに薬物動態学的特性を考慮することでより高精度な光安全性予測が可能であるか検証した。

研究代表者

尾上 誠良（静岡県立大学 薬学部 教授）

A. 研究目的

多くの場合、薬剤性光線過敏症は薬物本体によって引き起こされるが、一部の薬剤においては代謝物の関与が報告されている。これらのケースにおいては、親薬物も光反応性を有しているため、代謝によって薬物の光感受性が増強されたこと、あるいは生体内、特に露光組織において代謝物の存在比率が高いことに起因するものである。また、現在までのところ 5-aminolevulinic acid を除き、代謝によって新たに chromophore が形成される薬物は報告されておらず、親薬物が光反応性を有していなければ、その代謝物も光反応性を有していないと考える。一方で、親薬物が光反応性を有している場合には、代謝による光化学的反応性の増強が生じる可能性を否定できず、親薬物のみに着目していると *in vivo* における光毒性

リスクを見誤る可能性があると考えられる。実際に我々は、薬物本体のみの光化学的および薬物動態学的特性に着目して光安全性評価を行った結果、代謝物が光毒性に寄与することが知られているクロルプロマジンにおいて予測の過誤を生じた。従って、親薬物が光反応性を有している限り、創薬において代謝物の光安全性評価も実施すべきであると考えられるが、一方で ICH S10 では代謝物に関する評価の必要性について述べられていない。さて、Fenofibrate (FF) は経口高脂血症治療薬として汎用されている薬物であり、その副作用として光線過敏症が報告されている。FF の光毒性においてはその代謝物や光分解物が関与する可能性が報告されているが、*in vivo* におけるそれらの寄与は明らかとなっていない。また FF は、経口投与後速やかに carboxylesterase (CES) 1A1 によって活性代謝物である fenofibric acid (FA) に代謝され、FA はさらに CYP 3A4 により reduced fenofibric acid (RFA) へと代謝されることが知られており (Fig.

1), これらが FF の主要代謝物であることが知られている。従って, FF の光線過敏症に対する主要代謝物の寄与を明らかにすることが, 代謝物の光毒性リスク評価系の構築につながると考える。そこで, 本研究では代謝物を含めた包括的光安全性評価系の構築を目的とし, FF とその主要代謝物である FA および RFA に対して, 光化学的/光生物学的特性および体内動態の面から, 光安全性評価を実施した。

B . 研究方法

B-1) 試薬類

Acetic acid, DMSO, ethanol (EtOH), formic acid, FF, imidazole, ketoprofen, NBT, p-nitrosodimethylaniline, quinine HCl 2H₂O, NaH₂PO₄ 2H₂O, Na₂HPO₄ 12H₂O は和光純薬工業 (大阪, 日本) より購入した。ACN

(HPLC grade) は Honeywell Japan (東京, 日本) より購入した。FA は AK Scientific Inc. (Union City, CA, USA) より購入した。RFA は Toronto Research Chemicals Inc. (Toronto, Ontario, Canada) より購入した。10% fetal bovine serum (FBS), dulbecco's modified eagle medium (DMEM), earle's balanced salt solution (EBSS), neutral red (NR), sulisobenzone は Sigma-Aldrich Japan (東京, 日本) より購入した。Pooled IGS Sprague-Dawley rat liver S9 fraction, pooled IGS Sprague-Dawley rat intestinal S9 fraction, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-regenerating system は 積水メディカル (東京, 日本) より購入した。その他のすべての試薬は市販品を用いた。ROS assay 用 reaction container は Ozawa Science (愛知, 日本) より提供された。

B-2) ROS アッセイ

擬似太陽光の照射には Xe arc lamp を備えた Atlas Suntest CPS+ (Atlas Material Technologies LCC, Chicago, IL, USA) を用いた。Atlas Suntest CPS+ では短波長の UV をカットし実際の太陽光を模するためのフィルターを用いて CIE85/1989 daylight simulation requirement に良好に対応した擬似太陽光を照射している。照射は 28 , 250 W/cm², で 1 h 行った。被検物質は DMSO に溶解し (10 mM), stock solution として用いた。Singlet oxygen は imidazole を singlet oxygen の acceptor に用いて, p-nitrosodimethylaniline 水溶液の 440 nm における吸光値をモニタリングすることで測定した。測定原理を以下に示した。

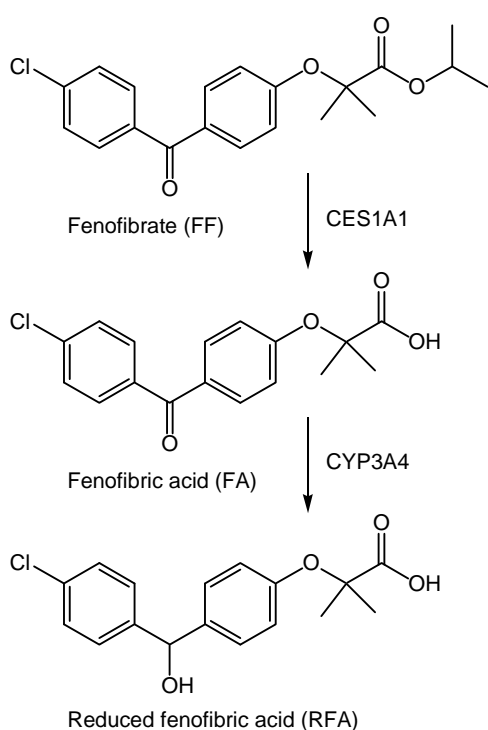
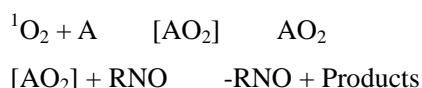


Fig. 1 FF の代謝過程 .

A: $^1\text{O}_2$ acceptor, imidazole

RNO: nitroso compounds

mROS assay においては被検物質の最終濃度が 200 μM となるように被検物質の stock solution を, *p*-nitrosodimethylaniline (50 μM) および imidazole (50 μM) を含む 20 mM NaPB (pH7.4) with 0.5% Tween 20 と混合した。酵素処理後の ROS assay においては rat S9 fractions で処理した FF が 30 μM となるよう *p*-nitrosodimethylaniline (50 μM) および imidazole (50 μM) を含む 20 mM NaPB (pH7.4) と混合した。その混合液 200 μL を 96-well microplate (旭硝子, 東京, 日本; code number: 3881-096; clear, untreated, flat-bottom) に分注し, 析出物の有無を確認後, 440 nm の吸光値を SAFIRE microplate spectrophotometer (TECAN, Mannedorf, Switzerland) を用いて測定した。その後, プレートを reaction container に入れ石英の蓋を装着し, 擬似太陽光を 1 h 照射した。照射後のプレートは, 振盪後, 再び 440 nm の吸光値を測定した。Superoxide anion は NBT の還元によって生成する nitroblue diformazan の 560 nm における吸光値をモニタリングすることで測定した。測定原理を以下に示した。



mROS assay においては被検物質の最終濃度が 200 μM となるように被検物質の stock solution を, NBT (50 μM) を含む 20 mM NaPB (pH7.4) with 0.5% Tween 20 と混合した。酵素処理後の ROS assay においては rat S9 fractions で処理した FF が 30 μM となるよう NBT (50 μM) を含む 20 mM NaPB (pH7.4) と混合した。その混合液 200 μL を 96-well microplate (旭硝子, 東京,

日本; code number: 3881-096; clear, untreated, flat-bottom) に分注し, 析出物の有無を確認後, 560 nm の吸光値を SAFIRE microplate spectrophotometer (TECAN, Mannedorf, Switzerland) を用いて測定した。その後, プレートを reaction container に入れ石英の蓋を装着し, 擬似太陽光を 1 h 照射した。照射後のプレートは, 振盪後, 再び 560 nm の吸光値を測定した。

B-3) 動物実験

雄性 Sprague-Dawley ラット (11-12 週齢, 体重約 300-350 g) は日本 SLC (浜松, 日本) より購入した。実験までの間, ラットは動物飼育施設において自由に摂餌, 飲水が可能な環境で適切な気温 ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) および湿度 ($55 \pm 5\%$) 管理の下, 飼育した。薬物動態学的評価に用いるラットは薬物経口投与前 18 h から絶食した。In vivo 光毒性試験に用いるラットは, 試験開始 18 h 前に pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) 麻酔下のラット腹部を剃毛した。全ての動物実験は静岡県立大学内の動物愛護倫理委員会の承認を得たガイドラインに準じて実施した。

絶食したラットに FF (5 mg/kg) を投与後, 血液サンプル (約 300 μL) を 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 48 h において尾静脈より採取した。血液サンプルを遠心分離 (10,000 $\times g$, 10 min, 4°C) して得られた血漿サンプルは, 2.5 倍量 (v/v) の ACN を加え, 振盪後, 遠心分離 (10,000 $\times g$, 5 min, 4°C) し, 上清を 0.20 μm membrane filter (Millex®-LG, Millipore Co., Ltd., Billerica, MA, USA) を通すことでろ過した。得られたろ液に internal standard である ketoprofen (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含む 50% ACN と 1:1 で混合し, UPLC/ESI-MS 分析による定量を行った。皮

膚および眼組織は経口投与後 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48 h 後において, ジエチルエーテル麻酔下, 下降大動脈より脱血, および氷冷生理食塩水によって還流したラットから採取した。採取した組織サンプルは重量測定後, ハサミでミンスし, 4 mL の ACN を加え Physcotron (Microtech Co. Ltd., 千葉, 日本) によりホモジナイズした。得られたサンプルに, 振盪および超音波処理を 10 分間行い, 遠心分離 (1,300 × g, 10 min) した。この抽出操作を 2 回行い, 上清はガラスチューブに分取したのち, 40 °C で窒素乾固した。残渣を ketoprofen 500 ng/mL を含む 50% ACN で溶解し, 0.20 μm membrane filter (Millex®-LG, Millipore Co., Ltd., Billerica, MA, USA) を用いてろ過したのち, UPLC/ESI-MS 分析による定量を行った。UPLC/ESI-MS システムは binary solvent manager, column compartment, および Micromass SQ detector connected with Waters Masslynx v 4.1. を含む Waters Acquity UPLC™ system (Waters, Milford, MA, USA) から構成されており, カラムには Waters Acquity UPLC™ BEH C18 (particle size: 1.7 μm, column size: φ2.1 × 50 mm; Waters) を用いた。カラム温度は 40 °C に保った。スタンダードおよびサンプルは Mili-Q water containing 0.1% formic acid (A) と ACN (B) から成るグラジエント移動相によって分離し, 各化合物の保持時間は 1.1 min (IS); 1.2 min (RFA); 2.0 min (FA); 4.2 min (FF) であった。グラジエントコンディションは, 0-1.0 min, 50% B; 1.0-5.0 min, 50-95% B (linear gradient curve); 5-5.5 min, 95% B; and 5.5-6 min, 50% B とし, 流速は 0.25 mL/min とした。MS による検出では化合物に特異的な

イオンの m/z (361.2 [M+H]⁺ for FF; 319.2 [M+H]⁺ for FA; 303.0 [M-OH]⁺ for RFA; and 255.5 [M+H]⁺ for ketoprofen) を用いた。

B-4) 3T3 NRU PT

マウス由来不死化線維芽細胞である Balb/c 3T3 cells (CloneA-31) を DMEM に 10% FBS を添加した培地を用いて継代し, 20 継代未満のものを試験に用いた。培養は 37 °C, 5% CO₂ に保った CO₂ incubator を用い, 2-3 日おきに継代した。試験は OECD Test Guideline 432 に準じて行った。2 枚の 96 well マイクロプレートに 2.0 × 10⁴ cells/well となるよう細胞を播種し, CO₂ インキュベーターにて 24 h 培養した。培養液をデカントにより除去し, EBSS を用いて希釈, 調整した被検物質 (FF, FA, quinine: positive control, sulisobenzone: negative control) を 100 μL 添加後, CO₂ インキュベーター内で 1 h 曝露させた。曝露後, metal halide lamp および UVB を減弱させるための H1 フィルターを搭載した SOL 500 Sun Simulator (Dr Hönle, Munich, Germany) にて UVA 照射量が 5 J/cm² となるよう照射した。非照射群はアルミホイルで遮光し, 静置した。照射後, 試験液を除去し, EBSS で洗浄した後, 培養液を添加して 24 h 培養した。培養液を除去し, NR 液 (50 μg/mL in DMEM) を添加後 3 h 静置し, NR 液を除去, 洗浄 (PBS, 150 μL) した。NR 抽出液 (Acetic acid: EtOH: water=1: 50: 49) を添加し, 10 分後に攪拌したのち 540 nm における吸光度を Benchmark Plus microplate spectrophotometer (BioRad, Hercules, CA, USA) を用いて測定した。UV 照射群および非照射群における concentration-response curve に基づいて

mean photo effect (MEC) values を算出し、光毒性判定に用いた。

B-5) ラット in vivo 光毒性試験

皮膚へ塗布する被検物質 (FF, FA, quinine: positive control, sulisobenzone: negative control) は 100 mg/mL となるよう DMSO に溶解した。あらかじめ腹部を剃毛したラットに pentobarbital にて麻酔し (50 mg/kg, i.p.), 1.5 cm × 1.5 cm サイズ中を切り取ったビニルテープを貼り付け、そこへ被検物質の DMSO 溶液 100 μL を塗布した。塗付後 4 h において薬液を除去し、水で湿らせたコットンで洗浄した。ラットは black light (FL15BL-B, National, 東京, 日本) を用いて UVA 照射量が 30 J/cm² となるまで照射した。照射強度は UV-Meter (Dr. Hönle AG, UV-Technology, Munich, Germany) を用いた。UV 非照射部位はアルミホイルで遮光した。照射終了後 24 h において色差計 (NF333, 日本電色工業, 東京, 日本) を用いて皮膚表面の色調を計測した。色差計は皮膚表面 3 次元色反射率を L*a*b* system (CIE 推奨) により記録する。輝度 (L*) は黒 (L*=0) から白 (L*=100) までの間で明るさを表し、色相 (a*) は赤 (a*=100) および緑 (a*=-100) 間のバランスを表し、彩度 (b*) は黄色 (b*=100) および青 (b*=-100) 間のバランスを表す。UV 照射前後の皮膚表面の色差 (ΔE) を以下のように算出し、光毒性の指標とした。

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

C . 研究結果

C-1) 光化学的特性評価

一般的に、薬物の光毒性反応においては、

薬物分子が UV/VIS (290–700 nm) を吸収し励起状態となることが引き金になり、励起状態となった薬物分子の光化学反応が直接的な原因であると認識されている。そこで FF とその主要代謝物である FA および RFA の光化学的特性について UV 吸収特性と擬似太陽光曝露時の ROS 産生能に着目して評価した。FF および FA は強い UVA/B 吸収を示し、MEC 値はそれぞれ 17,000, 14,000 (M⁻¹cm⁻¹) と高い値であった (Fig. 2A)。従って FF および FA は高い光励起性を有することが明らかとなった。一方で RFA においては弱い UVB 吸収のみを認め、RFA の光励起性は弱いことが明らかとなった。Henry らは過去に、MEC 値が 1,000 (M⁻¹cm⁻¹) を超えない薬物は光毒性を示さない傾向にあることを報告している。従って、RFA の MEC 値が 1,000 (M⁻¹cm⁻¹) を下回っていることから、RFA の光毒性リスクは低いと考える。各化合物の実際の光反応性について精査すべく、擬似太陽光照射下における化合物からの ROS の産生能を評価した (Fig. 2B)。FF および FA は擬似太陽光照射下において強力な ROS 産生を示し、高い光反応性を示唆した。一方で、RFA からの ROS 産生は FF および FA と比較して有意に低値を示し、RFA の低い光反応性を示唆した。興味深いことに、FA からの ROS 産生能は FF と比較して有意に高く (P < 0.05)、FA の光反応性が FF よりも高いことを示唆した。特に FA からの superoxide anion の産生は FF の約 2 倍高値を示し、FA の顕著に高い superoxide anion 産生能を示唆した。これらの結果から、各化合物の光反応性の高さは以下のような順序となった: FA > FF > RFA。

FA が FF よりも高い ROS 産生を示したため, FF が生体内での代謝を経て光反応性が変わる可能性について精査すべく, ラット肝/小腸 S9 画分で処理した FF からの

ROS 産生を評価した (Fig. 2C). ラット小腸 S9 画分で処理した FF から産生された ROS は熱失活させたもので処理した FF から産生された ROS と比較して有意な差は認めなかった. 一方で, ラット肝 S9 画分で処理した FF から産生された superoxide anion は失活させたもので処理した FF の場合と比較して有意に高い値を示し, すなわち, FF の光反応性は肝代謝を経て増大する可能性を示唆した.

C-2) 薬物動態学的評価

一般的に光毒性反応は皮膚や眼において生じるものであることから, 薬物の全身曝露と同様に皮膚/目への曝露も *in vivo* 光毒性を予測する上で重要な指標となる. そこで各化合物の薬物動態学的特性について, 全身および皮膚/眼への曝露に着目して精査した. FF をラットに経口投与後, FF は全ての組織において検出限界 (10 ng/mL, 7.1 ng/g tissue) 以下であり, ラット体内における FF の速やかな消失を示唆した. FA の血漿中および各組織中濃度は速やかかつ持続的に上昇し, T_{max} は 6.0–13 h であった. FA の血漿および皮膚における C_{max} および $AUC_{0-\infty}$ は RFA と比較し, 約 3–4 倍高く, RFA と比較して FA の生成速度は速く, また, 全身および皮膚曝露量も高いことを示唆した. 一方で, RFA の血漿中および各組織中濃度はゆるやかに上昇し, T_{max} は 12–16 h となり, FA と比較して RFA の生成は遅いことを示唆した. RFA は血漿中および皮膚中からの消失半減期が FA と比較して約 1.5–2.0 倍長く, RFA は FA と比較して緩やかな消失を示した. よって, RFA は FA と比較して長く皮膚に保持される可能性がある. 眼においては FA のみが検出

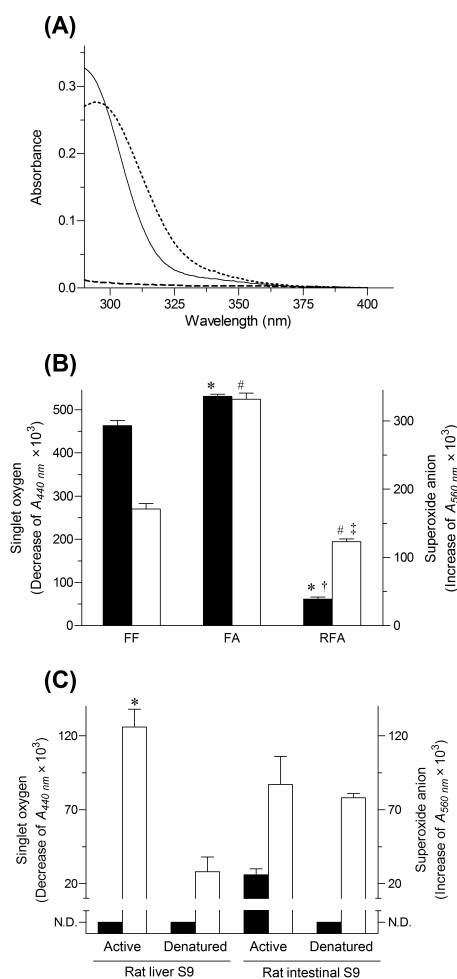


Fig. 2 Photochemical properties of FF, FA and RFA. UV-absorption spectra of test compounds (20 μ M) in ethanol (A). Solid line, FF; dashed line, RFA; dotted line, FA. Generation of ROS from FF, FA and RFA (B) and from FF after incubation with active and denatured rat hepatic/intestinal S9 fractions (C). Filled columns, generation of singlet oxygen; Open columns, generation of superoxide. * $P < 0.05$, with respect to singlet oxygen of FF; † $P < 0.05$, with respect to singlet oxygen of FA; # $P < 0.05$, with respect to superoxide of FF; ‡ $P < 0.05$, with respect to superoxide of FA (B). * $P < 0.05$, with respect to superoxide in denatured rat hepatic S9 fractions (C). Data represent the mean \pm SD ($n=3$).

でき, C_{max} および $AUC_{0-\infty}$ はそれぞれ 100 ng/g tissue, 2.6 h·ng/g tissue であった. 得られた結果に基づき, 各化合物の皮膚及び眼への曝露を以下のように順位づけた: FA > RFA > FF.

C-3) 光毒性試験

FA の光安全性について, 光安全性試験代替法としてバリデートされ, 汎用されている試験法である 3T3 neutral red uptake phototoxicity test (3T3 NRU PT), およびラット *in vivo* 光毒性試験によって評価した. 比較対象として親薬物である FF に対しても同様の光安全性試験を実施した. 3T3 NRU PT において, 陰性対照である sulisobenzone を曝露した群では UV 照射群と非照射群の間で濃度-細胞生存率曲線の有意な変化は認めなかった. 一方で, 陽性対照である quinine を曝露した群では UV 照射により濃度-細胞生存率曲線が低濃度側へ大きくシフトし, すなわち quinine の 3T3 細胞に対する強力な光毒性を示唆した (Fig. 3A). Quinine と同様に FF および FA においても UV 照射による大きな濃度-細胞生存率曲線の低濃度側へのシフトを認め, 両化合物の強い光毒性を示唆した (Fig. 3B). 得られた濃度-細胞生存率曲線をもとに mean photo effect (MPE) 値を算出したところ FF で 0.40, FA で 0.54 となった. MPE 値は光毒性の有無を判定する基準として用いられており, MPE 値が 0.1 以上であれば光毒性陽性, 0.1 を下回れば光毒性陰性となる. この判定基準に準ずると, FF と FA はともに光毒性陽性であると判明した. また, FA の MPE 値が FF の MPE 値を上回ったことから, FA の 3T3 細胞に対する光毒性は

FF よりも強力であることが明らかとなった. *In vivo* における各化合物の光毒性について, ラット皮膚への薬物塗布および UV 照射前後の皮膚色調変化量 (ΔE) を指標と

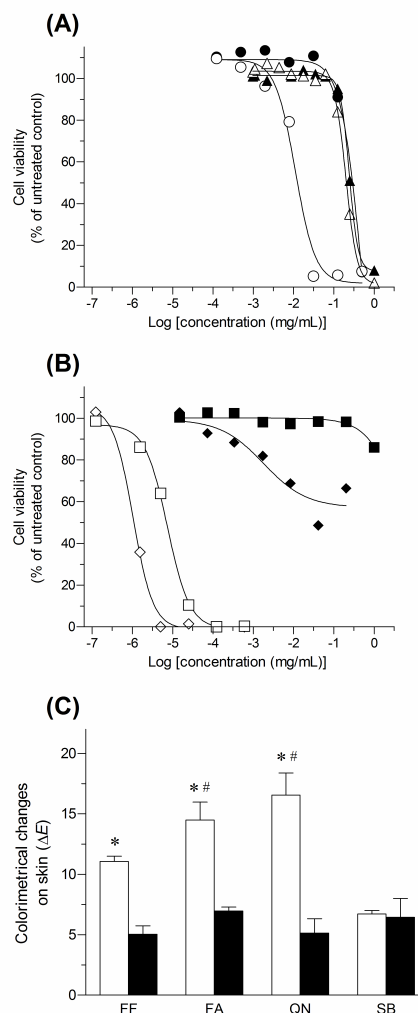


Fig. 3 *In vitro/in vivo* phototoxicity of compounds. Photodynamic cytotoxicity of QN: positive control and SB: negative control (A), FF and FA (B) in 3T3 NRU PT, and colorimetric evaluation of phototoxic skin responses in rats treated with FF, FA, quinine (QN) and sulisobenzone (SB) (C). Open symbols and open columns, UVA-irradiated groups; filled symbols and filled columns, non-irradiated groups. Each value represents the mean of duplicate measurements (A, and B) and the mean \pm SEM of 4 experiments (C). *P < 0.05 with respect to the non-irradiated group of each compound; #P < 0.05 with respect to UV-irradiated groups of SB.

して評価した (Fig. 3C) . 予備検討において FF および FA 塗布後の皮膚内濃度は 2-6 h において増減を認めず , 定常状態となっていると想定できるため , 皮膚への塗布時間を 4 h と定めた (data not shown) . Sulisobenzone 塗布群では , UV 照射/非照射群間において皮膚表面の有意な色調変化は認めなかった . 一方で , quinine は , 以前の報告と同様に UV 照射によって顕著な Δb^* の増大を伴う有意な ΔE^* の増大を示した ($P < 0.05$) . FF および FA 塗布群において , Δb^* が 6.4 (FF) および 5.9 (FA) 増大したことによる非照射群に比した UV 照射群における ΔE の有意な増大を認めた ($P < 0.05$) . さらに , FA 塗布群では UV 照射によって Δa^* も 4.7 増大し , 顕著な炎症反応を示唆した . また , sulisobenzone 塗布 , UV照射群と , FF 塗布 , UV 照射群の ΔE には有意な差を認めなかった一方で , FA 塗布 , UV 照射群の ΔE は sulisobenzone 塗布 , UV照射群と比較し有意に増大していた ($P < 0.05$) . 本知見から , FA はラット皮膚に対し FF よりも強い光毒性反応を惹起することが明らかとなり , さらに , 3T3 NRU PT の結果と一致していた . 従って , FA の *in vitro/in vivo* 光毒性は FF よりも強いことが明らかとなった .

D . 考察

D-1) ROS データと薬物動態情報の戦略的統合

本研究では , FF およびその主要代謝物である FA と RFA に対して光化学的特性および薬物動態学的特性の両面から光安全性評価を行うことで , 代謝物を含めた包括的光安全性評価系の構築を試み

た . その結果 , 本研究において実施した光化学的特性および薬物動態学的特性に基づいた評価系が代謝物を含めた光安全性評価に有用であることが明らかとなった . 従って , 本研究において提案した光安全性評価戦略を用いることで , 代謝物の影響を加味した信頼性のある光安全性評価が可能となるだろう . また , 本研究における光安全性評価において明らかとなった , FA が FF による光毒性反応の主たる原因物質であることは , 代謝物の光安全性評価の必要性を強く示唆する重要な知見であり , 代謝物を含めた光安全性評価の実施は医薬品開発において必須であると考えられる . 光毒性において化合物が太陽光を吸収し , 励起される過程は光毒性発症メカニズムの第一段階であり , それゆえ , UV 吸収スペクトルが光毒性リスクの一つの指標となりうる . 一般的に , 化合物の UV 吸収スペクトルは薬物分子内の π 電子共役系の長さに比例することが知られている . FF, FA および RFA の構造に着目すると , カルボニル基を有する FF と FA は強い UV 吸収を示している一方で , カルボニル基を欠いた RFA は極めて低い UV 吸収特性を示している . 従って , カルボニル基は FF および FA の強い UV 吸収特性において重要な役割を担っているといえる . それは , カルボニル基が 2 つのベンゼン環の π 電子共役系の広がりにも寄与しているからであろう . UV/VIS の吸収により励起状態となった化合物は , type I/type II 光化学反応 (e.g. ROS 産生) を起こし , 光毒性反応を誘発する . そのため , 光照射下における化合物の ROS 産生能に基づいた光反応性評価は光安全性評価において信頼性のある指標とし

Table 1 Summary of data

		FF	FA	RFA
<i>Photochemical properties</i>				
UV absorbance				
λ_{max} (nm) [ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)]		290 [17,000]	295 [14,000]	290[850]
ROS assay	1O_2 ($\Delta A_{440\text{ nm}} \times 10^3$)	463	531	61.0
	O_2^- ($\Delta A_{560\text{ nm}} \times 10^3$)	171	332	123
<i>Distribution to UV exposed tissues</i>				
$t_{1/2}$ (h)	Skin	N.A.	11	17
	Eyes	N.A.	22	N.A.
C_{max} (ng/g tissue)	Skin	N.A.	340	80
	Eyes	N.A.	100	N.A.
$AUC_{0-\infty}$ (h \cdot μ g/g tissue)	Skin	N.A.	8.5	2.0
	Eyes	N.A.	2.6	N.A.

Each crucial factor was divided into three levels. Black, gray and white cells represent high, moderate and low levels, respectively.

N.A., not available due to concentrations below the limit of detection.

て用いることができる。以前の報告によれば、光励起されたベンゾフェノン類は、type I 光化学反応 (e.g. superoxide の産生) を介して脂質過酸化を引き起こし、光刺激性反応を惹起する。FA の superoxide anion の産生能は FF よりも高く、FA は FF よりも高い光刺激性リスクを有しているであろう。また、本知見はラット肝 S9 画分処理により FF からの superoxide anion 産生が増大したと良好に対応し、すなわち、FF が肝臓で FA に変換され、より強い光刺激性を惹起する可能性を示唆した。薬物による光毒性反応は、皮膚および眼において生じるものであることから、全身曝露量と同様に皮膚/眼組織への曝露および滞留性は、化合物の光安全性評価における重要な指標である。皮膚および眼への曝露量に着目すると、FA が顕著に高い曝露量を示したことから、FA は極めて高い光毒性リスクを有すると考える。一方で RFA の皮膚曝露は比較的 low、その光毒性リスクは FA よりも低いと考える。これらの

PK 特性は FF の CES 1A1 による速やかな加水分解、さらには FA の CYP 3A4 による比較的緩やかな RFA への代謝によるものであると考える。FA は CYP 3A4 阻害活性を有することが報告されており、FA の代謝による RFA の生成は FA 自身の CYP 3A4 阻害によって緩やかになっているかもしれない。RFA の皮膚曝露は比較的 low のものであるが、RFA も光毒性リスクを有していると考えられる。なぜなら、RFA の長い皮膚滞留性が慢性投与時の皮膚への蓄積につながり、光毒性を誘発しうるからである。薬物の光毒性リスクは、薬物の光化学的反応性の強さとは露光部位である皮膚/眼への到達量の両者を考慮することによって、比較的 low に予測することができる。複数のデータを考慮し、系統的評価を行うことができる手法として matrix decision approach が用いられており、本研究においても、光化学的特性および薬物動態学的特性のデータを統合し、decision matrix を作成し、光毒性リスク評価に用いた (Table

1) .Decision matrix においては,光反応性および皮膚/眼曝露量の両データとも高い値であればその光毒性リスクは極めて高く,光反応性あるいは皮膚/眼曝露量の一方のみが高いか,どちらも中程度であれば,その光毒性リスクも中程度,光反応性および皮膚/眼曝露量どちらも低ければその光毒性リスクは低いことがわかる.FA は光反応性および皮膚曝露の両データにおいて高い値を示していることから,最も高い光毒性リスクを有しているだろう.FF は強力な光反応性を有する一方で,皮膚曝露が極めて低く,FF の光毒性リスクはそれほど高くないと考える.RFA は光反応性が弱く皮膚曝露も比較的低い,皮膚滞留性が高いことから FF と同程度の光毒性リスクを有するだろう.従って,各化合物の光毒性リスクは以下のような順序となった: FA FF RFA.この光毒性リスクの高さは *in vitro/in vivo* 光毒性試験の結果とも良好に対応し,代謝物の光安全性評価における本評価系の妥当性を示唆した.また,本知見から FF の光毒性に FA が大きく寄与していることが明らかとなった.このことは,photopatch test において FF が negative となり,経口投与後の光曝露においては positive となる理由を一部,説明できるかもしれない.代謝物による毒性リスクを確認するために,一般的な毒性試験法と *in vitro* 代謝実験を組み合わせた代謝物による毒性評価の手法が開発されている.従って,光毒性に関しても,本研究において示したように酵素処理した化合物からの光照射下における ROS 産生能変化に基づいて代謝物による光毒性リスクを予測できる可能性がある.従って,このアッセイ手

法は,予測性や適応可能範囲に関してさらなる精査を必要とするものの,被検物質の代謝物による光毒性リスクを見積もる上で有用であると考え.また,薬物本体のみに着目した簡易的な評価系では正確に光毒性リスクを予測できないことから,将来的に,酵素処理した化合物の ROS data を評価ツールとして組み込むことでその予測精度が向上するかもしれない.さらに,本研究で提示したような,代謝物標品を用いて光安全性評価を行うストラテジーを follow up 評価系として用いることで,正確な光安全性評価が可能になるだろう.しかしながら,誤ったデータの解釈を避けるために,今後も予測能力や適用限界などについて明らかにしていくことが必要であろう.このような不完全性は存在するものの,本研究において提示した包括的光安全性評価は,信頼性のある医薬品候補化合物の光安全性情報を提供してくれるだろう.

D-2) 国際協調活動

ROS assay が ICH S10 guideline に採用されたので,本年度は guideline の日本語訳を支援すると共に(添付資料 ICH S10 guideline : step 5 document, 和訳),講習会の開催を JPMA や JaCVAM と計画した.また,化粧品の安全性評価に関する米国 P CPC guidance “Evaluation of Photoirritation and Photoallergy Potential” への採用に向けて国際協調活動を推進し,目的を達成することが出来た(添付資料 Personal care products council technical guidelines “Safety evaluation guidelines: Evaluation of Photoirritation and Photoallergy Potential”).

E . 結論

光安全性の高い医薬品を生み出すために、医薬品開発における光安全性評価への関心は高まっていくだろう。本研究においては ROS assay を中心とした光化学的特性評価ツールを提示し、さらに本手法と体内動態情報の組み合わせにより FF の in vivo 光安全性を、効率的かつ良好に予測できた。近年では規制当局から基礎研究などに対し、3Rs (refinement, reduction, replacement) への貢献を求める動きが強まっており、本研究において新規に構築した光安全性評価系は、reduction と replacement の面からこの要求に応えることが可能であろう。本評価系の他の化合物群に対する適用可能性の検証など、課題はあるものの、本研究において提案した decision matrix approach は信頼性のある光安全性評価、ならびに新薬の創出における補助となるものと期待する。

F . 健康危険情報

特になし

G . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshiki Seto, Masashi Kato, Shizuo Yamada, Satomi Onoue [Development of micellar reactive oxygen species assay for photosafety evaluation of poorly water-soluble chemicals] *Toxicology in Vitro*, **27(6)**: 1838–46 (2013)
- 2) Satomi Onoue, Gen Suzuki, Masashi Kato, Morihiko Hirota, Hayato Nishida, Masato Kitagaki, Hirokazu Kouzuki, Shizuo Yamada [Non-animal photosafety assessment approaches for cosmetics based on the photochemical and photobiochemical properties] *Toxicology in Vitro*, **27(8)**: 2316–24 (2013)
- 3) Satomi Onoue, Shizuo Yamada [Pirfenidone in respirable powder form for the treatment of pulmonary fibrosis: a safer alternative to the current oral delivery system?] *Therapeutic Delivery*, **4(8)**: 887–9 (2013)
- 4) Satomi Onoue, Masashi Kato, Shizuo Yamada [Development of an albuminous reactive oxygen species assay for photosafety evaluation under experimental biomimetic conditions] *Journal of Applied Toxicology*, **34(2)**: 158–65 (2014)
- 5) Satomi Onoue, Kazuhiro Hosoi, Tsuguto Toda, Hironori Takagi, Naoto Osaki, Yasuhiro Matsumoto, Satoru Kawakami, Shinobu Wakuri, Yumiko Iwase, Toshinobu Yamamoto, Kazuichi Nakamura, Yasuo Ohno, and Hajime Kojima [Intra-/inter-laboratory validation study on reactive oxygen species assay for chemical photosafety evaluation using two different solar simulators] *Toxicology in Vitro*, **28**: 515–23 (2014)
- 6) Satomi Onoue, Masashi Kato, Ryo Inoue, Yoshiki Seto, Shizuo Yamada [Photosafety screening of phenothiazine derivatives with combined use of photochemical and cassette-dosing pharmacokinetic data] *Toxicological Sciences*, **137(2)**: 469-77 (2014)
- 7) Yoshiki Seto, Hiroto Ohtake, Masashi Kato, Satomi Onoue [Phototoxic risk assessments on benzophenone derivatives:

- photobiochemical assessments and dermal cassette-dosing pharmacokinetic study] *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **in press**(DOI: 10.1016/j.yrtph.2015.05.029)
- 8) Hayato Nishida, Morihiko Hirota, Yoshiki Seto, Gen Suzuki, Masashi Kato, Masato Kitagaki, Mariko Sugiyama, Hirokazu Kouzuki, Satomi Onoue [Non-animal photosafety screening for complex cosmetic ingredients with photochemical and photobiochemical assessment tools] *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **in press**(DOI: 10.1016/j.yrtph.2015.05.029)
2. 学会発表
- 1) 大竹啓斗, 加藤尚視, 鈴木源, 尾上誠良, 山田静雄: 薬剤性光線過敏症リスク評価: 代謝物が寄与する光毒性. 日本薬学会 第 134 年会 (熊本), 要旨集 p.197, 2014 年 3 月 28-30 日
- 2) 大竹啓斗, 加藤尚視, 尾上誠良, 山田静雄: 薬剤の物性データ並びに cassette-dosing PK 試験に基づく新規光安全性評価. 日本薬剤学会 第 29 年会 学生主催シンポジウム (大宮), 要旨集 p.77, 2014 年 5 月 20-22 日
- 3) 青木麻子, 鈴木源, 加藤尚視, 世戸孝樹, 山田静雄, 尾上誠良: Pirfenidone 粉末吸入製剤化による消化管障害リスクの回避. 日本薬剤学会 第 29 年会 (大宮), 要旨集 p.68, 2014 年 5 月 20-22 日
- 4) 鈴木源, 加藤尚視, 青木麻子, 世戸孝樹, 尾上誠良: 経気道投与による体内動態制御が pirfenidone の副作用リスクを低減する. 第 41 回 日本毒性学会 学術年会 (神戸), 要旨集 p.S267, 2014 年 7 月 2-4 日
- 5) 大竹啓斗, 加藤尚視, 尾上誠良: *In vitro* 光毒性試験および cassette-dosing pharmacokinetic study による benzophenone 誘導体の光安全性評価. 第 41 回 日本毒性学会 学術年会 (神戸), 要旨集 p.S272, 2014 年 7 月 2-4 日
- 6) 世戸孝樹, 加藤尚視, 山田静雄, 尾上誠良: 難溶性化合物の光安全性評価のための micellar reactive oxygen species (mROS) assay の開発. 第 41 回 日本毒性学会 学術年会 (神戸), 要旨集 p.S274, 2014 年 7 月 2-4 日
- 7) 鈴木源, 加藤尚視, 廣田衛彦, 西田勇人, 北垣雅人, 上月裕一, 尾上誠良: 動物実験代替法の戦略的併用による化粧品原料の光安全性評価. 第 60 回 日本薬学会東海支部大会 2014 (鈴鹿), 要旨集 p.55, 2014 年 7 月 5 日
- 8) 大竹啓斗, 加藤尚視, 尾上誠良: 経皮適用化合物に対する高効率的光毒性リスク評価系の提案-光化学的特性評価および経皮的 cassette-dosing pharmacokinetic 試験. 第 36 回 光医学・光生物学会 (大阪), 要旨集 p.44, 2014 年 7 月 25-26 日
- 9) 尾上誠良: ROS アッセイ 光毒性スクリーニング. 日本動物実験代替法学会ワークショップ「日本発の動物実験代替法の現状」(東京), 2014 年 8 月 1 日
- 10) 世戸孝樹, 加藤尚視, 尾上誠良: 難溶性化合物の光安全性評価のための改良型 reactive oxygen species (ROS) assay の開発. 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 2014 (静岡), 要旨集 p.70, 2014 年 11 月 9 日

- 11) 大竹啓斗, 内田淳, 世戸孝樹, 寺松剛, 寺島朝子, 小口敏夫, 尾上誠良: リボフラビン含有ファモチジン製剤の光安定性改善並びにその動態解析. 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 2014 (静岡), 要旨集 p.81, 2014年11月9日
- 12) 大竹啓斗, 鈴木源, 加藤尚視, 越智幹記, 世戸孝樹, 尾上誠良: 改良型 ROS assay の開発: 広範な化学物質の *in vitro* 光毒性評価を目指して. 日本動物実験代替法学会 第27回大会 (横浜), 要旨集 p.100, 2014年12月5-7日
- 13) 尾上誠良: Reactive oxygen species (ROS) アッセイによる化粧品の光安全性評価. 日本動物実験代替法学会 第27回大会 (横浜), 要旨集 p.68, 2014年12月5-7日

H . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし