

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

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

平成 25 年度～26 年度 総合研究報告書

研究代表者 尾上 誠良

平成 26 (2 0 1 4) 年 5 月

目 次

I．総合研究報告

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

----- 1

尾上 誠良

II．研究成果の刊行に関する一覧表

----- 28

III．研究成果の刊行物・別刷

----- 29

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等技術イノベーション総合研究事業）

平成 25-26 年度 総合研究報告書

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
(H25-医薬-若手-024)

研究代表者 尾上 誠良
静岡県立大学 薬学部 教授

研究要旨

薬剤性光線過敏症とは、医薬品が体内で太陽光によって光化学的に活性化され、皮膚において誘発される有害反応である。創薬や安全性評価の従事者にとっては、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、医薬品開発においても動物実験代替法を用いた安全性評価に関する国際協調を急がねばならない。本研究では、精度と生産性が高い *in vitro* 光毒性試験法開発を進め、本試験法を信頼性の高い安全性試験へ展開させるために動物実験の 3Rs (Reduction, Refinement, Replacement) の促進を前提とした *in vitro/in vivo* 融合評価系の開発を併せて行った。応募者が開発し International Conference on Harmonization (ICH) Topic S10 guideline で採用が検討されている ROS (reactive oxygen species) assay を基盤により多くの化合物に適用できるよう改良し、さらに ROS assay データと薬物動態情報を融合することで効率良く光毒性リスクを予測できるものと考えた。その検証として、ROS assay を改良し、多くの化合物に適用して毒性予測性や変動を網羅的に調査した。また、*in vitro* 試験法の施設間再現性や予測性の検証実験として JPMA (日本製薬工業協会) と協力し、他施設 validation study を実施した。さらに、ROS assay とカセットドージング薬物動態学的データと組み合わせ得た毒性予測と実際の臨床報告を比較して臨床予測性について検証した。また、ROS assay の国際ガイドラインへの採用を目指して国際協調活動を推進し、ICH Topic S10 と Personal Care Products Council guidance “Evaluation of Photoirritation and Photoallergy Potential” に採用された。

A. 研究目的

薬剤性光線過敏症はその投与方法にかかわらず薬剤摂取後、露光により引き起こさ

れる副作用である。創薬段階における本副作用リスクの回避が強く望まれており、これまでにも多くの *in vitro* ならびに *in vivo*

評価方法が開発されている。本研究の目的は薬剤性光線過敏症リスク評価のため簡便かつ信頼性の高い評価系を提示することであり、国際協調を最終的に達成することで国際的なニーズに答えようとするものである。In vitro 評価法として UV 吸収測定が広く実施されているが、より実質的な光化学的反応性を評価するために我々は reactive oxygen species (ROS) assay を開発した。本試験法は被験物質を照射する際に発生する ROS 量をモニタリングすることを特徴とする光化学反応性評価法であり、種々のモデル化合物を用いた検討において薬剤性光線過敏症リスクを予測出来る可能性を示唆した。過去に ROS assay の有用性を検証するための多施設バリデーションスタディを行い、その transferability ならびに信頼性を精査することが出来た。今回、バリデーションスタディレポートを作成し、第三者評価を受けた。また、被験物質の体内動態情報と ROS アッセイデータを効率よく組み合わせることで光毒性リスクを予測する新しい試みを検討することとした。光安全性評価方法について国際協調活動を推進し、ICH ならびに Personal Care Products Council (PCPC) guidance に採用された。

B. 研究方法

B-1) ROS assay

日本動物実験代替法検証センター (JaCVAM) 主催のバリデーション運営委員会 (VMT) の下、ROS assay プロトコルを確立した。VMT 主導で化合物選択を実施し、最終的に 2 種の標準物質 (quinine, sulisobenzon), 23 種の光毒性陽性化合物

(acridine, acridine HCl, amiodarone HCl, chlorpromazine HCl, doxycycline HCl, fenofibrate, furosemide, ketoprofen, 6-methylcoumarine, 8-methoxy psoralen, nalidixic acid, nalidixic acid Na, norfloxacin, ofloxacin, piroxicam, promethazine HCl, rosiglitazone, tetracycline, anthracene, avobenzon, bithionol, hexachlorophene, rose bengal) ならびに 19 種の光毒性陰性化合物 (aspirin, benzocaine, erythromycin, phenytoin, penicillin G, bumetizole, camphor sulfonic acid, chlorhexidine, cinnamic acid, drometizole, histidine, methylbenzylidene camphor, octrizole, octyl methacrylate, octyl methoxycinnamate, octyl salicylate, PABA, SDS, UV-571) を選定した。バリデーションスタディには Atlas 社の Suntest CPS あるいは Seric 社の SXL-2500 を有する製薬協加盟企業が参加し (Fig. 1), GLP の精神にのっとり各種検討を実施した。ROS assay プロトコルに従い、コード化された 42 種類の被験物質 (200 μ M) を含む反応液を 96 ウェルプレートに分注して Atlas Suntest CPS series による 1 時間の擬似太陽光照射後 (ca. 2.0 mW/cm²), ROS (Singlet oxygen と Superoxide) の産生量をそれぞれ測定した。実験は 3 回繰り返す、各化合物の光毒性リスクを評価した。また、ICH topic S10 に継続して情報を発信し、ICH S10 guideline に ROS アッセイを提案した、B-2) ROS assay と薬物動態情報との統合

ROS アッセイデータと薬物動態情報を組み合わせることで創薬初期段階において有用な高効率光安全性評価系の構築を試みた。モデル薬物である 8 種の phenothiazines (PTZs; Mequitazine (MQ),

promethazine HCl (PM), chlorpromazine HCl (CP), Perphenazine (PP), fluphenazine 2HCl (FP), and thiolidazine HCl (TD), Trifluoperazine 2HCl (TF), prochlorperazine dimaleate (PC)) に対し、UV や ROS アッセイ等の光化学的特性評価と cassette-dosing 法を用いた薬物動態試験を実施し、得られた結果を組み合わせ考察し各 PTZs の光毒性リスクについて順位づけした。予測した光毒性リスクと、ラットを用いた *in vivo* 光毒性試験の結果と比較検証した。

B-3) ROS assay と薬物代謝情報との統合
FF とその主要代謝物である fenofibric acid (FA) および reduced fenofibric acid (RFA) に対し光化学的特性評価を行った。ラットに FF (5 mg/kg) を経口投与後、経時的に採取した血漿、眼および皮膚中の薬物濃度および代謝物濃度を測定した。両者の結果からその光毒性リスクが特に高いと考えられる代謝物について、*in vitro* および *in vivo* の両面から詳細な光毒性試験を行った。

C . 研究結果

C-1) ROS assay

JaCVAM多施設バリデーション研究は、AtlasまたはSeric社製の擬似太陽光照射装置を用いて7施設により実施された。最初に、陰性及び陽性対照物質を用いて各施設における照射条件を決定した後、全42種類のコード化された被験物質について評価した。その結果、ROSアッセイは、施設内の日内差/日間差及び施設間差が小さく、汎用性に優れている試験法であることが示された (Fig. 2)。また、ROSアッセイによる光毒性物質の陽性検出率は、難溶性のため評価で

きなかった被験物質を除くと100%であった (Fig. 3)。すなわち偽陰性結果がないことから、ROSアッセイは、光毒性ポテンシャルの評価に有用であると結論された。JaCVAMの支援によってバリデーションレポートのpeer reviewをグローバルエキスパートから受けた。Review panelから一部判断基準に関する改訂提案を受けたものの、ROSアッセイの陰性予測精度と頑健性については好意的に受け止められた。本バリデーション結果に基づき、ICH(日米EU医薬品規制調和国際会議)の光安全性評価ガイドラインにおいて、ROSアッセイは、全身及び皮膚適用薬における光毒性評価の要否判断に利用可能な試験法の一つとして採択された。さらにPersonal Care Products Council guidance “Evaluation of Photoirritation and Photoallergy Potential”にも同様にROSアッセイが採用された。

C-2) ROS assay と薬物動態情報との統合
光吸収によって励起状態となった光毒性化合物は、光化学反応を起こすことで、光毒性を惹起すると考えられており、すなわち、光反応性は光毒性リスクの直接的な指標となる。PTZs (Fig. 4) の光化学的反応性について精査すべく、ROS assay を実施した (Fig. 5)。光毒性陽性化合物であるquinineを陽性対照とし、光毒性陰性化合物であるerythromycinを陰性対照に用いた。以前の報告と同様に、擬似太陽光照射下においてquinineからの高いsinglet oxygenおよびsuperoxide anionの産生を認めたが、一方でerythromycinからは両者の産生を認めなかった。すべてのPTZsにおいてtype II光化学反応を介した強いsinglet oxygenの産生を認めた。Superoxide anionの産

生は TD, FP, および PP においてわずかに認められた。特に, fluorinated PTZs において強力な ROS 産生を認め, ROS 産生能を順位づけると以下ようになった: FP TF TD > MQ PM CP PC > PP。また, すべての PTZs における ROS データは, 以前の研究において定義された ROS assay の criteria [singlet oxygen ($\Delta A_{440\text{ nm}} \times 10^3$): 25; superoxide anion ($\Delta A_{560\text{ nm}} \times 10^3$): 20] を上回り, PTZs は高い光化学的反応性を有することが明らかとなった。従って, ROS data および MEC 値に基づき, PTZs は光化学的反応性が高く, 露光部位に分布した場合には光毒性が懸念されるであろう。

光毒性反応は露光組織である皮膚および眼に現れることから, PTZs の露光組織への分布は光安全性評価を行う上で考慮すべき重要な点である。本研究では創薬初期スクリーニング系に適用することを考慮し, スループット向上と動物資源の削減を可能とする cassette-dosing PK analyses を用いた。まず, 8 種の PTZs をラットに経口投与 (5 mg/kg each, p.o.) し, 血中薬物濃度推移をモニタリングし (Fig. 6), 各種 PK パラメーターを算出した (Table 1)。共投与されたほとんどの PTZs の血漿中濃度はゆるやかに上昇し, T_{max} は 3–4.5 h であった。一方で, MQ の見かけの吸収は極めて遅く, T_{max} は 17 h であった。PTZs の全身曝露は薬物によって大きく異なり, C_{max} は約 10–120 ng/mL であり, C_{max} によって各 PTZs の全身曝露を以下のように順位付けした: FP > TF > TD > MQ PP PC > PM CP。また, PTZs は血漿中から緩やかに消失し, 消失速度定数は約 0.03–0.39 h⁻¹ で

あった。それゆえに, PTZs は長期投与によって露光組織に蓄積する可能性があり, 光毒性リスクの増大につながると考える。多くの PTZs が投与後約 4.5 h において C_{max} に達したため, 4.5 h における露光組織 (皮膚及び目) への PTZs の分布を調べた。ほとんどの PTZs は露光組織, 特に主要な光毒性発現部位である皮膚, に分布した。FP は皮膚 (637 ng/g tissue) および眼 (548 ng/g tissue) に多く移行しており, それぞれの K_p 値は 5.6 mL/g tissue, 4.8 mL/g tissue であった。この結果は FP の高い全身曝露量 (C_{max} : 120 ng/mL) と良好に対応している。興味深いことに, PP の皮膚中濃度は FP の皮膚中濃度を上回り, PP の K_p 値は FP よりも約 4 倍高値であった。全ての PTZs が高い全身曝露を示したにもかかわらず, TD の皮膚内濃度および眼内濃度はそれぞれ 72 ng/g tissue, 40 ng/g tissue と全 PTZs 中で最も低値を示した。対照的に, PM は全身曝露が低いにもかかわらず, PM の皮膚内および眼内濃度はそれぞれ 336 ng/g tissue, 162 ng/g tissue と比較的高値を示した。この結果は恐らく塩基性薬物の皮膚移行が脂溶性の高さに支配されていることに起因し, PM の高い log P によって説明できると考える。よって, 皮膚および眼内薬物濃度の高さは以下のような順序となった: PP FP > PM > MQ PC TF > CP TD。露光部位への移行量に基づいて考えると, PP と FP は露光部位に分布し, 光吸収により反応すれば他の PTZs よりもより強く光毒性を惹起する可能性があると考えられる。一方で, TD および CP は皮膚および眼への移行量が比較的少なく, 他の PTZs よりも光毒性リスク

は低いであろう。

In vivo における PTZs の光安全性について精査すべく、ラットに各 PTZs と positive/negative controls (100 mg/kg) を経口投与後、UV を照射し、UV 照射前後の皮膚色調変化を指標として、皮膚光毒性反応を評価した (Fig. 7)。マウスに 80 mg/kg の CP を投与し、UVA を照射すると顕著な光毒性反応を示したという過去の報告に基づき、PTZs における光毒性試験を計画・実行した。陽性対照である quinine を投与し、UV を照射しなかったラットにおける皮膚表面の色調は vehicle 投与、非照射群と比較し、有意な差は認めなかった (data not shown)。一方で、UV 照射、quinine 投与群では主に b^* の値が上昇したことにより erythromycin 投与、UV 照射群と比較し ΔE 値が 3.7 ± 2.1 上昇した。Quinine と同様に全 PTZs において UV 照射群では非照射群と比較し顕著に高い ΔE 値を認めた (data not shown)。特に、FP 投与後の UV 照射により L^* (ΔL^* : 11.4 ± 0.7) 値および b^* (Δb^* : 3.4 ± 0.7) 値の上昇と a^* (Δa^* : -8.2 ± 0.9) 値の減少による皮膚表面の色調の顕著な変化が惹起され、FP による著しく強い光毒性反応を示唆した。TF および PC においても ΔE 値の顕著な変化を認め、quinine と比較して有意に強い皮膚光毒性反応が明らかとなった ($P < 0.05$)。対照的に non-halogenated PTZs を投与し、UV を照射したラットにおける ΔE 値は他の PTZs を投与して UV を照射した場合と比較して低い値となり、すなわち non-halogenated PTZs は PTZs の中でも比較的毒性が弱いことを示唆した (Table 2)。

C-3) ROS assay と薬物代謝情報との統合

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 (Fig. 8)。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 ($M^{-1}cm^{-1}$) と高い値であった (Fig. 9A)。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 ($M^{-1}cm^{-1}$) 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 ($M^{-1}cm^{-1}$) 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. 9B)。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. 9C) . 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 . 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 (Fig. 10) . 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 (Table 3) . 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 . 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. 11A) . 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. 11B) . 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) を指標として評価した (Fig. 11C) . 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). FA 塗布群では UV 照射によって Δa^* は 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 assay

Atlas Suntest series ならびに Seric SXL-2500V2 を用いた ROS assay の多施設バリデーションスタディの結果、ROS assay の高い transferability と predictive capacity を確認できた。同評価系を広く運用していくためには、推奨プロトコルの積極的な公表と講習会による継続的な訓練などが必要になるものと考えられる。

D-2) 新規評価系構築

光化学的反応性および皮膚、眼への移行量を合わせて decision matrix を構築し、PTZs の光毒性リスクを推測した。decision matrix は多数の実験結果から系統的に分析し、判断するために用いられる定性的指標および定量的数値のデータを集約した模式的なデータ表である。Matrix decision による PTZs の光毒性リスク判定においては、光化学的反応性および PK の両データにおいて

高いスコアとなった化合物は、その光毒性リスクが高いことを表し、どちらか一方、あるいは両方のスコアが低い値となった化合物は中程度または低い光毒性リスクを有することを表す。光化学的特性評価に基づくスコアリングにおいては、UV 吸収スペクトルおよび ROS データを用いた UV 吸収スペクトルからは、化合物の光励起性についての情報が得られ、ROS データからは化合物の光化学的反応性がわかる。化合物の光励起およびそれに続く光化学反応は、光毒性メカニズム初期において起こりうる現象であり、光励起性および光反応性はそれぞれ、光毒性リスクの指標となる。従って UV 吸収スペクトルと ROS データの両者を光化学的特性評価における指標として用いた。UV 吸収スペクトルにおいては極大吸収波長における MEC 値 $1,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 以上の化合物は光毒性を有する可能性が高いことが報告されており、本研究においても MEC 値に基づきスコアリングを行った。PK データにおいては皮膚および眼への移行量を decision matrix におけるスコアリングに用いた。ICH S10 guideline にも記載されているように、光反応性を有する薬物で、なおかつ露光部位である皮膚や眼に多く曝露される、または皮膚などに滞留しやすく長時間に渡って曝露される薬物は、曝露量が少なく、曝露時間も短いものと比較し、光毒性を引き起こしやすい。一方で、薬物に光反応性がなければ、たとえそれが露光部位に長時間、多量に曝露されたとしても光毒性を起こす可能性は低くなる。従って、光励起性/光反応性と同様に皮膚/眼移行性は、光毒性の発現を左右する重要な要因であり、両者のデータを組み合わせて光

安全性評価に用いることで、信頼性のある光安全性評価を実施できる。そこで MEC 値、ROS データ、および皮膚/眼移行量のそれぞれにおいて、光毒性リスクを 5 段階でスコアリングし、そのトータルスコアを算出して光毒性リスク評価に用いた。UV/ROS データおよび皮膚/眼組織濃度の全てにおいてリスクスコアが 4 と高い値を示した FP は最も高い光毒性リスクを有すると推測できる。また、高い光反応性を示した TF (total score: 10) および皮膚/眼への極めて高い曝露を示した PP (total score: 11) もまた、高い光毒性リスクを有すると推察できる。Total score が 8-9 となった PC, MQ, PM, および TD は光反応性および皮膚/眼への曝露量が中程度から低いレベルとなり、光毒性リスクがそれほど高くないと推察できる。CP は光反応性が高いものの (リスクスコア: 6) 極めて皮膚/眼への曝露量が低く (リスクスコア: 1)、その光毒性リスクは比較的低いと推測できる (total score: 7)。これらのスコアリングに基づき PTZs の光毒性リスクの高さを順位づけした: FP > PP > TF > PC > MQ > PM > TD > CP。ラット *in vivo* 光毒性試験の結果から、PTZs のラットに対する光毒性の強さにはその化学構造と関連性があることが明らかとなった: fluorinated PTZs > chlorinated PTZs > non-halogenated PTZs。本知見は、decision matrix から推測した光毒性リスクと比較的良好に対応し、本研究における光安全性評価系の良好な予測能力を示唆した。一方で、CP において、予測した光毒性リスクと光毒性試験の結果との大きな乖離を認め、すなわち、本評価系では CP の光毒性リスク予測できないことを示

唆した。CP の強力な光毒性については実験的および臨床的に明らかにされており、実際に本研究における *in vivo* 光毒性試験においても強力に光毒性を惹起している。経口的に摂取された CP は比較的速やかに、cytochrome P450 (CYP) 1A2 および CYP 3A4 による *N*-demethylation や CYP 2D6 による 7-hydroxylation を受け、desmethylchlorpromazine などに代謝されることが明らかとなっている。Desmethylchlorpromazine および didesmethylchlorpromazine は CP よりも光毒性が強いことが分かっている。従って、これらの報告から、生体内における光毒性代謝物の産生が CP の光毒性リスク予測において過誤を生じた一因であると推察する。しかしながら、皮膚における CP とこれら代謝物の比率は明らかではなく、さらなる精査を必要とする点であるだろう。また、他の可能性として、CP の臨床における投与量が他の薬物と比較して多いことから、高用量の CP においてのみ光毒性が発現する可能性や、生体内における CP の光化学反応によって、強い光毒性を有する生成物が生じた可能性もあるだろう。本評価系が親薬物のみに着目した評価系であるが故に、予測精度の低下を招いたものと考え、信頼性の高い光安全性評価を実施するために主要代謝物の光化学的および薬物動態学的特性を考慮した評価系を構築していく必要があると考える。

D-3) ROS assay と薬物代謝情報との統合

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ストラテジーを用いることで、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。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低く、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低いものであるが、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。Decision matrix (Table 4) 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。

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今後も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 cassette-dosing 法を用いた皮膚、眼への移行性評価の組み合わせにより PTZs の *in vivo* 光安全性を、一部の例外はあるものの、効率的かつ良好に予測できた。さらに、代謝特性を組み込むことで FF の光毒性リス

クについても臨床情報を反映する興味深い知見を得ることが出来た。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) Masashi Kato, Gen Suzuki, Hiroto Ohtake, Satomi Onoue, and Shizuo Yamada: Development of the comprehensive photosafety assessment strategy for a drug candidate and its major metabolites. 28th JSSX Annual Meeting (Tokyo), Oct 9-11, 2013
- 2) Gen Suzuki, Yoshiki Seto, Yosuke Aoki, Ryo Inoue, Yoshiki Kojo, Masashi Kato, Satomi Onoue and Shizuo Yamada: Novel respirable powder formulation of pirfenidone reduces phototoxic risk. 28th JSSX Annual Meeting (Tokyo), Oct 9-11, 2013
- 3) 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, 山田静雄: ROS assay を中心とした香粧品原料の *in vitro* 光安全性評価. 日本動物実験代替法学会 第 26 回大会 (京都) 要旨集, p. 132, 2013年12月19-21 日
- 4) 大竹啓斗, 加藤尚視, 尾上誠良, 山田静雄: 光毒性リスク評価のための fluorescent reactive oxygen species assay (fROS assay) 開発. 日本動物実験代替法学会 第 26 回大会 (京都) 要旨集, p. 134, 2013年12月19-21日
- 5) 加藤尚視, 大竹啓斗, 尾上 誠良, 山田静雄: Enzymatic reactive oxygen species assay (eROS assay) の開発: 代謝物の光毒性予測を目指して. 日本動物実験代替法学会 第 26 回大会 (京都) 要旨集, p. 135, 2013年12月19-21日
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 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ミ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
- 17) 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
- 18) 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

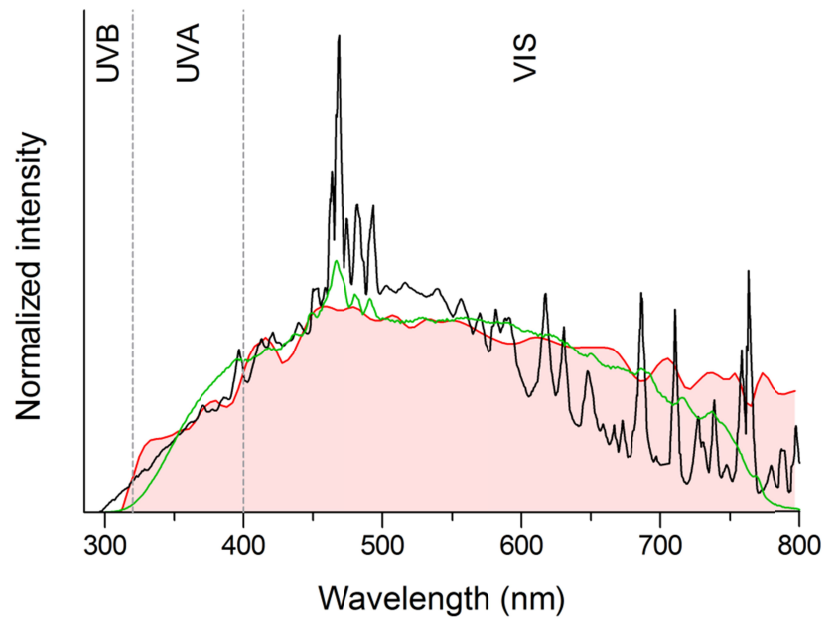


Fig. 1 Spectral patterns of simulated sunlight in Atlas Suntest CPS series, Seric SXL-2500V2, and standard daylight (CIE85/1989). Black line, simulated sunlight emitted from Atlas Suntest CPS series; green line, from Seric SXL-2500V2; and red line, standard daylight (CIE85/1989).

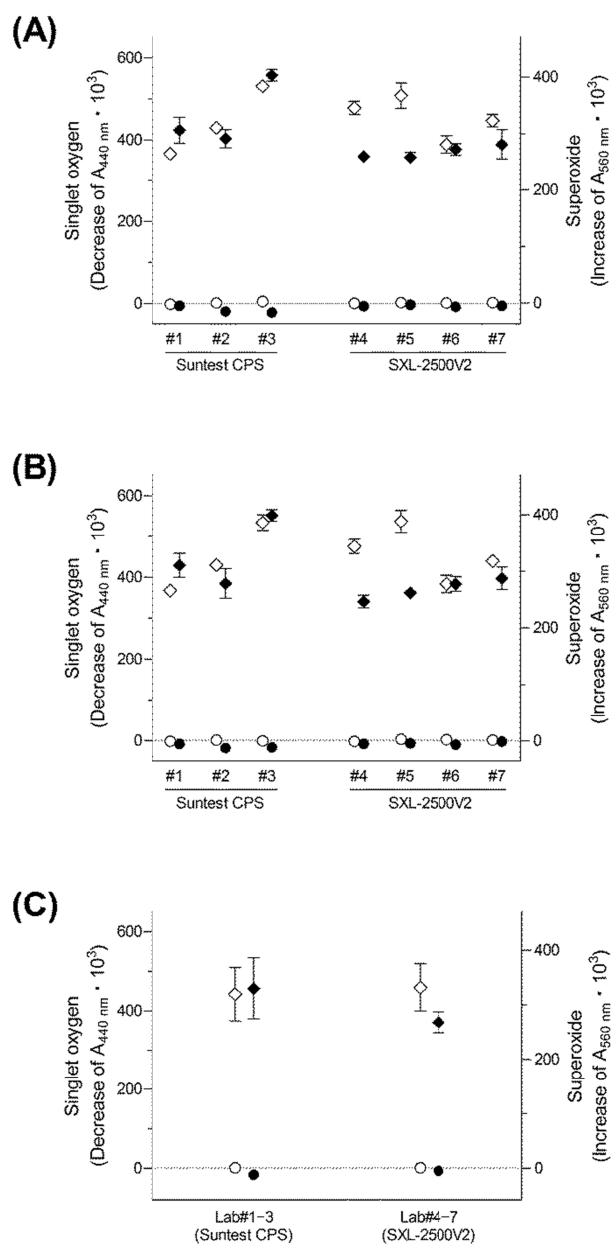


Fig. 2 Intra- and inter-laboratory reproducibility on ROS measurement in 2 different solar simulators. (A) Intra-laboratory reproducibility (intra-day), (B) intra-laboratory reproducibility (inter-day), and (C) inter-laboratory reproducibility. The ROS assay on quinine (1) and sulisobenzone (2) at a concentration of 200 μM was conducted in 7 laboratories employing the Atlas Suntest CPS series (ca. 2.0 mW/cm^2 , Lab#1-3) or Seric SXL-2500V2 (ca. 3.0-5.0 mW/cm^2 , Lab#4-7). \blacklozenge , singlet oxygen for quinine (1); \blacklozenge , superoxide; \circ , singlet oxygen for sulisobenzone (2); and \bullet , superoxide. Data represent mean \pm SD of three repeated experiments for intra-day (n=9) precision and three repeated experiments for inter-day precision (days 1, 2, and 3; n=9).

(-) ROS assay (+)	Suntest CPS	SXL-2500V2	Suntest CPS	SXL-2500V2
	[#1] 22	[#4] 22	[#1] 2	[#4] 2
	[#2] 21	[#5] 22	[#2] 4	[#5] 4
	[#3] 22	[#6] 22	[#3] 7	[#6] 7
		[#7] 22		[#7] 2
	Suntest CPS	SXL-2500V2	Suntest CPS	SXL-2500V2
	[#1] 0	[#4] 0	[#1] 9	[#4] 9
[#2] 0	[#5] 0	[#2] 6	[#5] 6	
[#3] 0	[#6] 0	[#3] 5	[#6] 5	
	[#7] 0		[#7] 9	
		(+) Phototoxicity (-)		

Fig. 3 Positive and negative predictivity of the ROS assay in Lab#1–7.

PTZs	CAS No.	Clog P^a	R ¹	R ²
<i>Non-halogenated group</i>				
Mequitazine (MQ)	88598-74-7	4.91	-H	
Promethazine HCl (PM)	58-33-3	4.60	-H	
Thioridazine HCl (TD)	130-61-0	6.20	-SCH ₃	
<i>Fluorinated group</i>				
Fluphenazine 2HCl (FP)	146-56-5	4.32	-CF ₃	
Trifluoperazine 2HCl (TF)	440-17-5	4.89	-CF ₃	
<i>Chlorinated group</i>				
Chlorpromazine HCl (CP)	69-09-0	5.50	-Cl	
Perphenazine (PP)	58-39-9	4.01	-Cl	
Prochlorperazine dimaleate (PC)	84-02-6	4.58	-Cl	

Fig. 4 Chemical structures of PTZs. ^a, Calculated on ChemBioDraw Ultra 13.0 software.

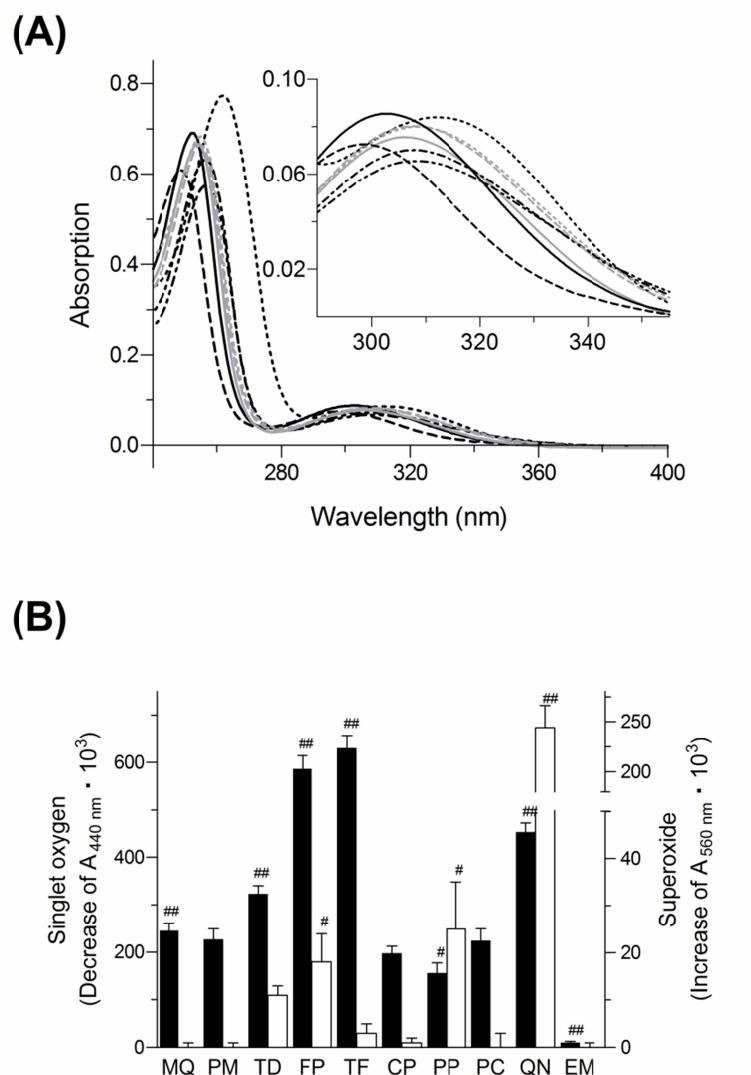


Fig. 5 Photochemical properties of PTZs. (A) UV spectral patterns of PTZs (20 μM) in 20 mM NaPB (pH7.4). Solid line, MQ; broken line, PM; dotted line, TD; dashed-dotted line, FP; dashed-two dotted line, TF; gray solid line, CP; gray broken line, PP; and gray dotted line, PC. (B) Generation of singlet oxygen (filled bars) and superoxide (open bars) from PTZs (200 μM) exposed to simulated sunlight (2.0 mW/cm²). QN, quinine as positive control; and EM, erythromycin as negative control. Data represent mean±SD of 3 experiments. #, *P* < 0.05 and ##, *P* < 0.01 with respect to CP in each ROS determination.

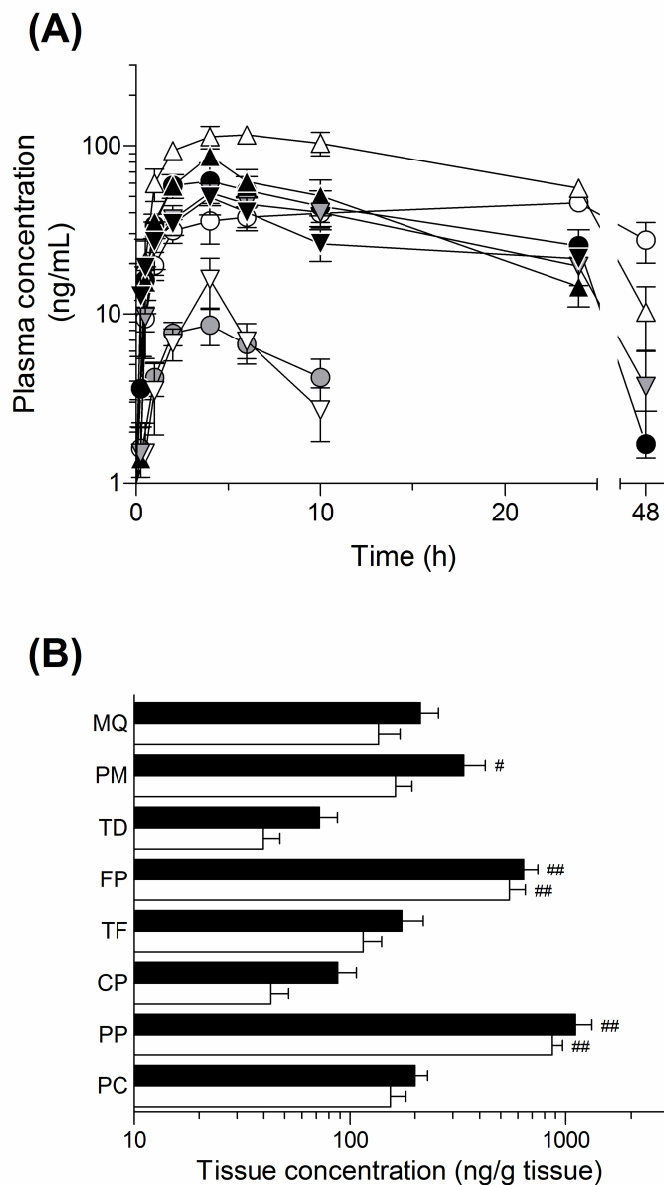


Fig. 6 Pharmacokinetic characteristics of PTZs in rats. (A) Plasma concentrations of PTZs in rats after oral cassette-dosing of 8 PTZs (5 mg/kg, each). □, MQ; ○, PM; ▲, TD; △, FP; ●, TF; ▽, CP; ◊, PP; and ○, PC. Data represent mean±SEM of 4 experiments. (B) Deposition of PTZs in skin (filled bars) and eyes (open bars) at 4.5 h after oral cassette-dosing of 8 PTZs (5 mg/kg each). Data represent mean±SEM of 4 experiments. #, $P < 0.05$ and ##, $P < 0.01$ with respect to TD.

Table 1 Pharmacokinetic parameters of PTZs after oral cassette-dosing

	C_{\max} (ng/mL)	T_{\max} (h)	k_{el} (h^{-1})	$AUC_{0-\infty}$ (ng·h/mL)
MQ	52.3±3.6	17.0±4.0	0.033±0.019	5,395±473
PM	9.8±1.5	3.0±0.6	0.13±0.046	301±36
TD	66.1±14.8	4.0±0.8	0.044±0.026	1,604±308
FP	119.8±12.3	4.0±0.8	0.030±0.013	4,310±304
TF	75.6±13.4	4.0±0.8	0.088±0.026	1,415±191
CP	13.5±4.6	3.3±0.8	0.39±0.13	109±30
PP	53.4±3.2	4.5±0.5	0.045±0.012	1,325±170
PC	52.7±8.5	3.3±0.8	0.054±0.034	985±292

C_{\max} , maximum concentration; T_{\max} , time to maximum concentration; k_{el} , apparent elimination rate constant; and $AUC_{0-\infty}$, area under the curve of blood concentration vs. time from $t=0$ to $t=\infty$ after administration. Values are expressed as mean±SEM of 4 experiments.

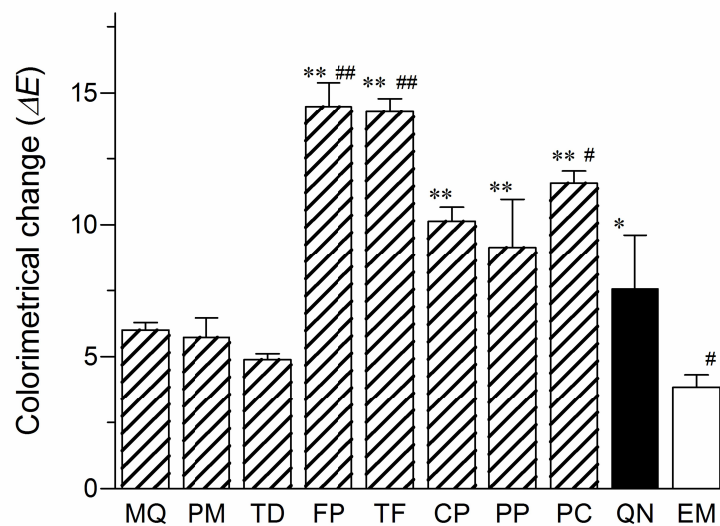


Fig. 7 Colorimetric evaluation of PTZ-induced phototoxic skin response. Differences in skin color (ΔE) between irradiated and non-irradiated rats treated with each drug (100 mg/kg, *p.o.*) were calculated on the basis of L^* , a^* , and b^* values. QN, quinine as positive control; and EM, erythromycin as negative control. Data represent mean \pm SEM of 4 experiments. *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ with respect to EM-treated group; #, $P < 0.05$ and ##, $P < 0.01$ with respect to QN-treated group.

Table 2 Summary of outcomes from photosafety testing on PTZs

	Obtained data/prediction
<i>Experimental data</i>	
Photoreactivity (UV, ROS)	FP ≐ TF > TD > MQ ≐ PM ≐ CP ≐ PC > PP
Skin/ocular distribution	PP > FP > PM > MQ ≐ PC ≐ TF > CP ≐ TD
<i>In vivo</i> phototoxicity	FP ≐ TF > PC > PP ≐ CP > MQ ≐ PM ≐ TD

<i>Matrix-decision</i>	FP > PP > TF > PC > MQ ≐ PM ≐ TD > CP

<i>Conclusion</i>	Fluorinated PTZs > Chlorinated > Non-halogenated

White cells, non-halogenated PTZs; gray cells, chlorinated PTZs; and black cells, fluorinated PTZs.

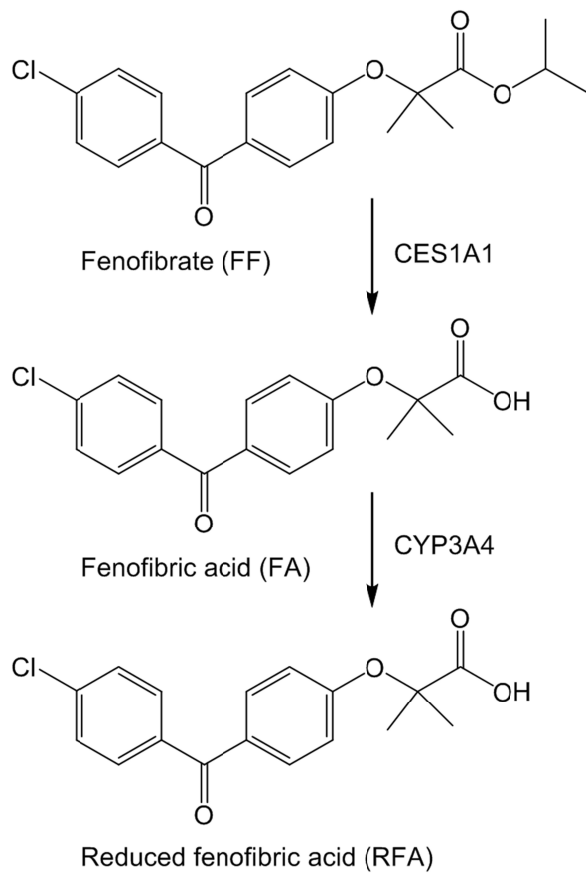


Fig. 8 Chemical structures of each test compound and metabolic pathways

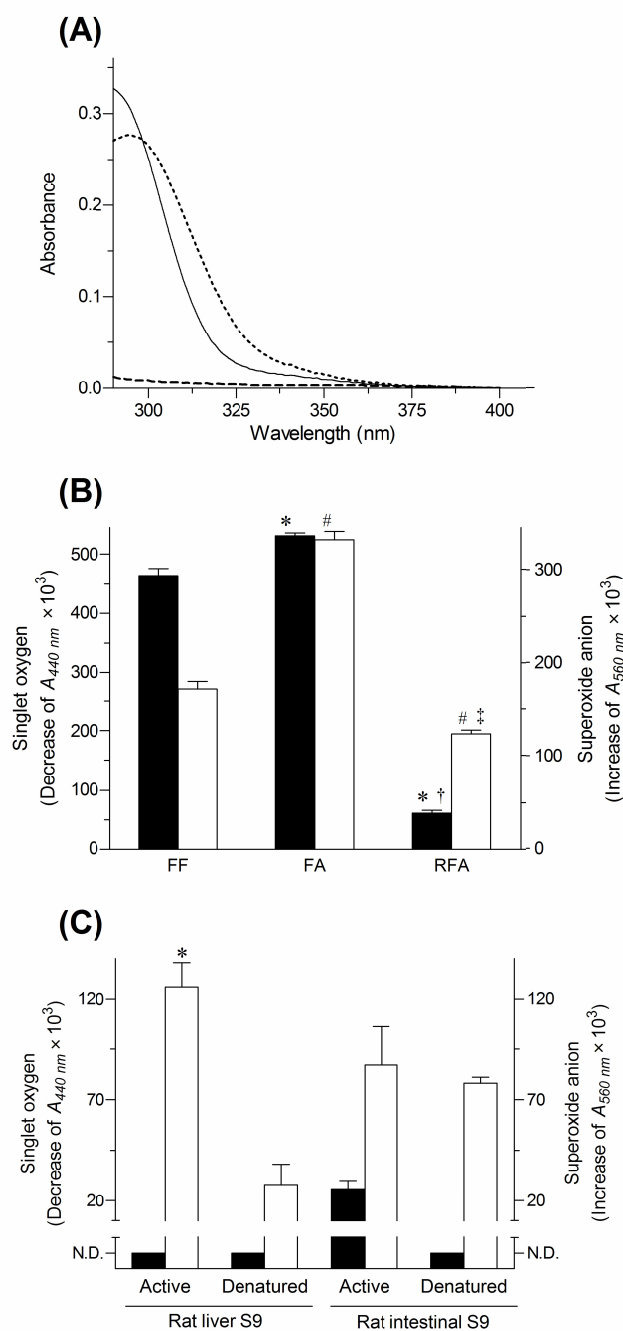


Fig. 9 Photochemical properties of FF, FA and RFA. UV-absorption spectra of test compounds (20 μM) in ethanol (A). *Solid line*, FF; *dashed line*, RFA; *dotted line*, FA. Generation of ROS from FF, FA and RFA (B) and from FF after incubation with active and denatured rat hepatic/intestinal S9 fractions (C). *Filled columns*, generation of singlet oxygen; *Open columns*, generation of superoxide. * $P < 0.05$, vs singlet oxygen of FF; † $P < 0.05$, vs singlet oxygen of FA; # $P < 0.05$, vs superoxide of FF; ‡ $P < 0.05$, vs superoxide of FA (B). * $P < 0.05$, vs superoxide in denatured rat hepatic S9 fractions (C). Data represent the mean \pm SD ($n=3$).

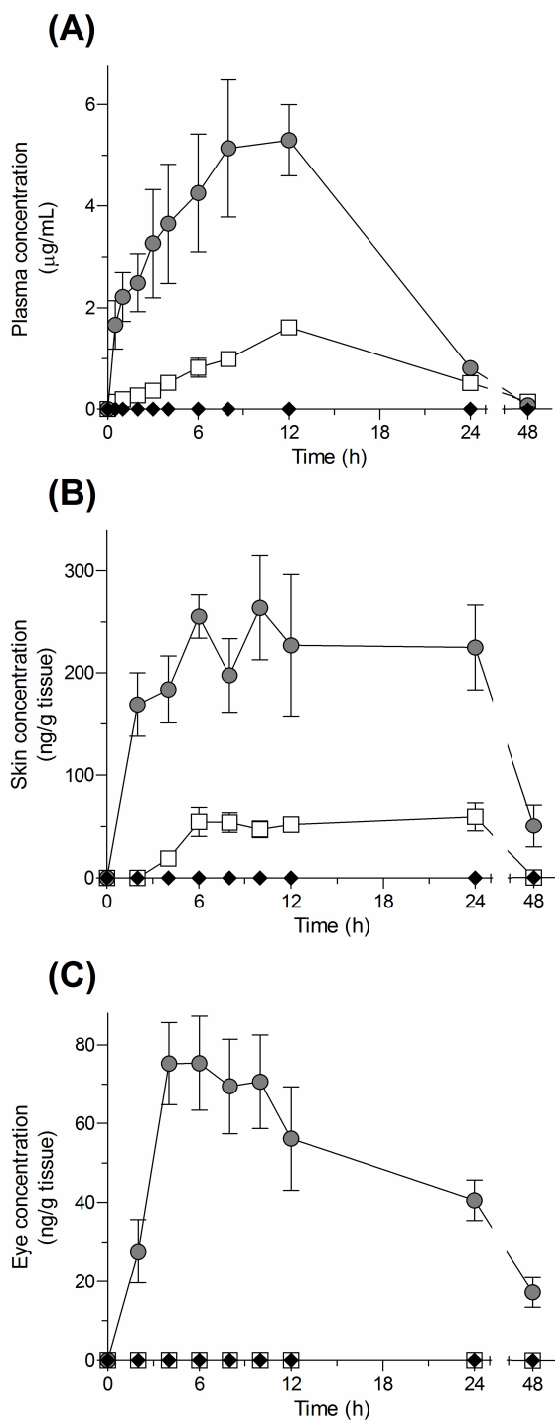


Fig. 10 Concentration-time profiles of FF, FA and RFA in plasma (A), skin (B) and eyes (C) after oral administration of FF (5 mg/kg, *p.o.*) in rats. Filled diamonds, FF; gray circles, FA; open squares, RFA. Each value represent the mean \pm SEM ($n=7-4$).

Table 3 PK parameters in plasma, skin and eyes after oral administration of FF in rats

		$t_{1/2}$ (h)	C_{max} ($\mu\text{g/mL}$) or C_{max} (ng/g tissue)	T_{max} (h)	$AUC_{0-\infty}$ (h· $\mu\text{g/mL}$) or $AUC_{0-\infty}$ (h· $\mu\text{g/g}$ tissue)	$MRT_{0-\infty}$ (h)
FF	Plasma	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	Skin	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	Eye	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
FA	Plasma	6.4±0.40	6.3±1.1	9.7±1.1	97±14	13±0.70
	Skin	11±1.5	340±17	13±3.9	8.5±1.3	20±2.1
	Eye	22±6.9	100±5.5	6.0±1.4	2.6±0.33	34±10
RFA	Plasma	12±1.0	1.6±0.10	12±0.0	33±3.2	21±1.5
	Skin	17±3.3	80±6.7	16±4.7	2.0±0.60	30±4.2
	Eye	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.

Each value represents the mean±SEM for 4–7 rats. N.A., not available due to concentrations below the limit of detection.

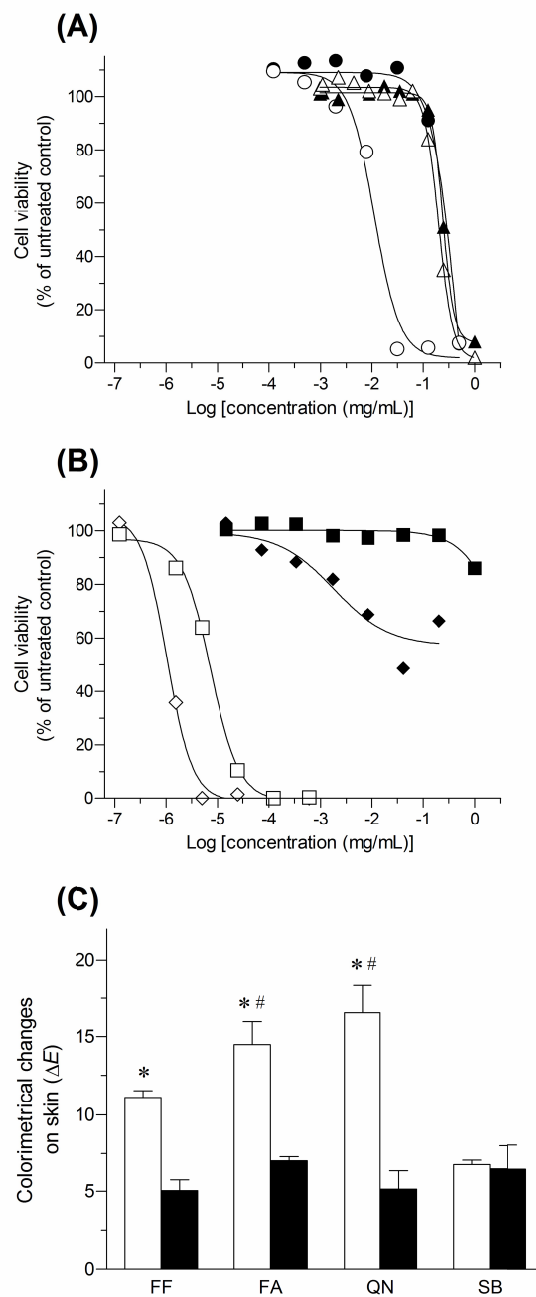


Fig. 11 *In vitro/in vivo* phototoxicity of compounds. Photodynamic cytotoxicity of QN: positive control and SB: negative control (A), FF and FA (B) in 3T3 NRU PT, and colorimetric evaluation of phototoxic skin responses in rats treated with FF, FA, quinine (QN) and sulisobenzone (SB) (C). *Open symbols 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.

Table 4 Decision matrix

		FF	FA	RFA
<i>Photochemical properties</i>				
UV absorbance λ_{max}/ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)		290 nm/17×10³	295 nm/14×10³	290 nm/0.85×10 ³
ROS assay	¹ O ₂ ($\Delta A_{440\text{ nm}}$)	463	531	61
	O ₂ ⁻ ($\Delta A_{560\text{ nm}}$)	171	332	123
<i>Distribution to UV exposing tissues</i>				
$t_{1/2}$ (h)	Skin	N.A.	11	17
	Eyes	N.A.	22	N.A.
C_{max}	Skin	N.A.	340	80
(ng/g tissue)	Eyes	N.A.	100	N.A.
AUC _{0-∞}	Skin	N.A.	8.5	2.0
(h• μg/g tissue)	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.

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yoshiki Seto, Masashi Kato, Shizuo Yamada, <u>Satomi Onoue</u>	Development of micellar reactive oxygen species assay for photosafety evaluation of poorly water-soluble chemicals	<i>Toxicology in Vitro</i>	27(6)	1838-1846	2013
<u>Satomi Onoue</u> , 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	<i>Toxicology in Vitro</i>	27(8)	2316-2324	2013
<u>Satomi Onoue</u> , Shizuo Yamada	Pirfenidone in respirable powder form for the treatment of pulmonary fibrosis: a safer alternative to the current oral delivery system?	<i>Therapeutic Delivery</i>	4(8)	887-889	2013
<u>Satomi Onoue</u> , Masashi Kato, Shizuo Yamada	Development of an albumin reactive oxygen species assay for photosafety evaluation under experimental biomimetic conditions	<i>Journal of Applied Toxicology</i>	34(2)	158-165	2014
<u>Satomi Onoue</u> , Kazuhiro Hosoi, Tetsuhiro Toda, Hiroaki 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	<i>Toxicology in Vitro</i>	28	515-523	2014
<u>Satomi Onoue</u> , Masashi Kato, Ryo Inoue, Yoshiki Seto, Shizuo Yamada	Photosafety screening of phenothiazine derivatives with combined use of photochemical and cassette-dosing pharmacokinetic data	<i>Toxicological Sciences</i>	137(2)	469-477	2014

Yoshiki Seto, Hiroto Ohtake, Masashi Kato, Satomi Onoue	Phototoxic risk assessments on benzophenone derivatives: photobiochemical assessments and dermal cassette-dosing pharmacokinetic study	<i>Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics</i>	DOI: jpet.15.223644	In press	2015
Hayato Nishida, Morihiko Hirota, Yoshiki Seto, Gen Suzuki, Masashi Kato, Masato Kitagaki, Mariko Sugiyama, Hirokazu K	Non-animal photosafety screening for complex cosmetic ingredients with photochemical and photobiochemical assessment tools	<i>Regulatory Toxicology and Pharmacology</i>	DOI: 10.1016/j.yrtph.2015.05.029	In press	2015