

博士論文

経皮適用化合物の光反応性ならびに皮膚滞留性に基づく
統合的光安全性評価

Integrated approach to photosafety assessment based on the photoreactivity
and skin deposition on dermally-applied chemicals

2020 年 3 月
(March, 2020)

静岡県立大学大学院 薬食生命科学総合学府
博士課程薬学専攻 薬剤学講座

猪山 陽輔
Yosuke Iyama

博士論文

経皮適用化合物の光反応性ならびに皮膚滞留性に基づく
統合的光安全性評価

Integrated approach to photosafety assessment based on the photoreactivity
and skin deposition on dermally-applied chemicals

本論文は静岡県立大学大学院 薬食生命科学総合学府
博士論文である。

2020 年 3 月
(March, 2020)

静岡県立大学大学院 薬食生命科学総合学府
博士課程薬学専攻 薬剤学講座

猪山 陽輔
Yosuke Iyama

略語

本論文中に用いた略語は以下の通りである。

ACD	Acridine
CIE	Commission Internationale de l'Eclairage
Clog P	Calculated log P
C_{\max}	Maximum concentration
C_{ss}	Steady-state concentration
C_v	Chemical concentration in applied solution
D	Diffusion coefficient
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ENX	Enoxacin
EU	European Union
FLM	Flumequine
FSM	Furosemide
HCP	Hexachlorophene
ICH	International Council on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
K	Partition coefficient
K_{OLM}	Partition coefficient to one-layered membrane model

K_{sc}	Partition coefficient to stratum corneum
L_{OLM}	Mean thickness of one-layered membrane model
L_{sc}	Mean thickness of stratum corneum
L_{TLM}	Mean thickness of two-layered membrane model
MEC	Molar extinction coefficient
MFX	Moxifloxacin
MOP	8-Methoxypsoralen
MRT	Mean residence time
NaPB	Sodium phosphate buffer
NBT	Nitroblue tetrazolium
NFX	Norfloxacin
NLA	Nalidixic acid
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
OFX	Orbifloxacin
OXA	Oxolinic acid
P	Permeability coefficient
PBS	Phosphate-buffered saline
PEG	Polyethylene glycol
PMZ	Promethazine
P_{OLM}	Permeability coefficient through one-layered membrane model

P_{sc}	Permeability coefficient through stratum corneum
P_{TLM}	Permeability coefficient through two-layered membrane model
Q	Accumulated amount of test compounds
QN	Quinine hydrochloride
QNLs	Quinolone derivatives
RNO	<i>p</i> -Nitrosodimethylaniline
ROS	Reactive oxygen species
SB	Sulisobenzone
SIR	Selected ion recording
SP	Solubility parameter
T_{max}	Time to maximum skin concentration
tPSA	Topological polar surface area
UPLC/ESI-MS	Ultra-performance liquid chromatography equipped with electrospray ionization mass spectrometry
UV	Ultraviolet light
VIS	Visible light

目次

緒言	1
第 1 章 抽出皮膚を用いた統合的光安全性評価	
1-1. 序論	6
1-2. 実験材料および試験方法	7
1-2-1. 実験材料	7
1-2-2. 実験動物	8
1-2-3. <i>In vitro</i> 皮膚透過性評価	8
1-2-4. UPLC/ESI-MS 分析	9
1-2-5. 皮膚滞留性予測	11
1-2-6. UV-VIS 吸収スペクトル測定	12
1-2-7. ROS assay	12
1-2-7-1. 擬似太陽光照射	12
1-2-7-2. 評価方法	13
1-2-8. <i>In vivo</i> 光毒性試験	13
1-2-8-1. 色差測定	13
1-2-8-2. 評価方法	14
1-2-9. データ解析	14

1-3. 結果	15
1-3-1. 皮膚滞留性予測	15
1-3-1-1. 皮膚透過性評価	15
1-3-1-2. 皮膚中濃度予測	17
1-3-2. 光化学的特性評価	18
1-3-3. <i>In vivo</i> 光毒性評価	20
1-4. 考察	22
第 2 章 人工膜を用いた統合的光安全性評価	
2-1. 序論	27
2-2. 実験材料および試験方法	28
2-2-1. 実験材料	28
2-2-2. 実験動物	28
2-2-3. <i>In vitro</i> 膜透過性評価	29
2-2-3-1. 単層膜モデル作製法	29
2-2-3-2. <i>In vitro</i> 膜透過性試験	29
2-2-4. UPLC/ESI-MS 分析	30
2-2-5. 膜滞留性予測	32
2-2-6. <i>In vivo</i> 薬物動態試験	32
2-2-7. UV-VIS 吸収スペクトル測定	32

2-2-8. ROS assay	32
2-2-9. <i>In vivo</i> 光毒性試験	32
2-2-10. データ解析	33
2-3. 結果	34
2-3-1. 人工膜に対する被験物質の透過性評価	34
2-3-1-1. 単層膜モデル作製法の最適化	34
2-3-1-2. 膜透過性試験	39
2-3-1-3. 膜滞留性予測	41
2-3-2. ラット摘出皮膚に対する被験物質の透過性評価	42
2-3-2-1. 皮膚透過性試験	42
2-3-2-2. 皮膚滞留性予測	44
2-3-3. <i>In vivo</i> 皮膚内動態評価	45
2-3-4. 光化学的特性評価	46
2-3-5. <i>In vivo</i> 光毒性評価	48
2-4. 考察	50
総括	53
謝辞	55

参考文献56

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、太陽光中に含まれる紫外線 (ultraviolet light; UV) および可視光 (visible light; VIS) の曝露によって惹起される皮膚および眼における異常反応である [1]. 紅斑, 発疹, 水疱, 落屑および色素沈着など外見変化をともなう場合が多い. 本症を発症した患者は原因物質の摂取中止, 追加治療, さらに太陽光曝露を回避する行動が必要となり, quality of life (QOL) の低下が避けられない. 光毒性反応は医薬品のみならず, 化粧品やサプリメントなどが原因となる場合も数多く報告されており, 新規物質の創製をする際に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.

光毒性反応は光刺激反応, 光遺伝毒性反応および光アレルギー反応の 3 種類に大別されており, 光毒性陽性化合物が UVA/B および VIS 領域 (UVB, 290–320 nm; UVA, 320–400 nm; VIS, 400–700 nm) の光を吸収することが引き金となる (Fig. 1). 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, 蛍光, 燐光, 熱および光化学的反応を介してエネルギーの放出を行う [2]. 皮膚もしくは眼に存在する化合物が日光曝露により光励起されたとき, 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 2 種類に分類され, エネルギー転移およびフリーラジカル産生を介した反応をそれぞれ type I および type II と呼ぶ [3]. 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 と光化学的反応を介して反応し, 細胞・組織障害を引き起こす. 生体内には O_2 も豊富に存在しており, O_2 自身が acceptor として光化学的反応を引き起こすこともある. 光励起化合物と O_2 が反応することにより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寄与すると考えられている.

化合物の光安全性評価法としてこれまで数多くの方法が開発されており, 光刺激性に限らず光遺伝毒性や光アレルギー性反応の発現機序に基づく評価系がある (Table 1). 光毒性反応カスケードのうち, 最上流とされている光励起性が評価可能な化合物の UV/VIS 吸収特性に着目した評価系がある [4]. 400–700 nm の波長領域における化合物のモル吸光係数 (molar extinction coefficient; MEC) に基づく光毒性リスク予測を試み, MEC が $1,000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ 以下の化合物は光毒性発現リスクが低いことを経験則的に示している. *In vitro* 3T3 neutral red uptake phototoxicity test (3T3 NRU PT)

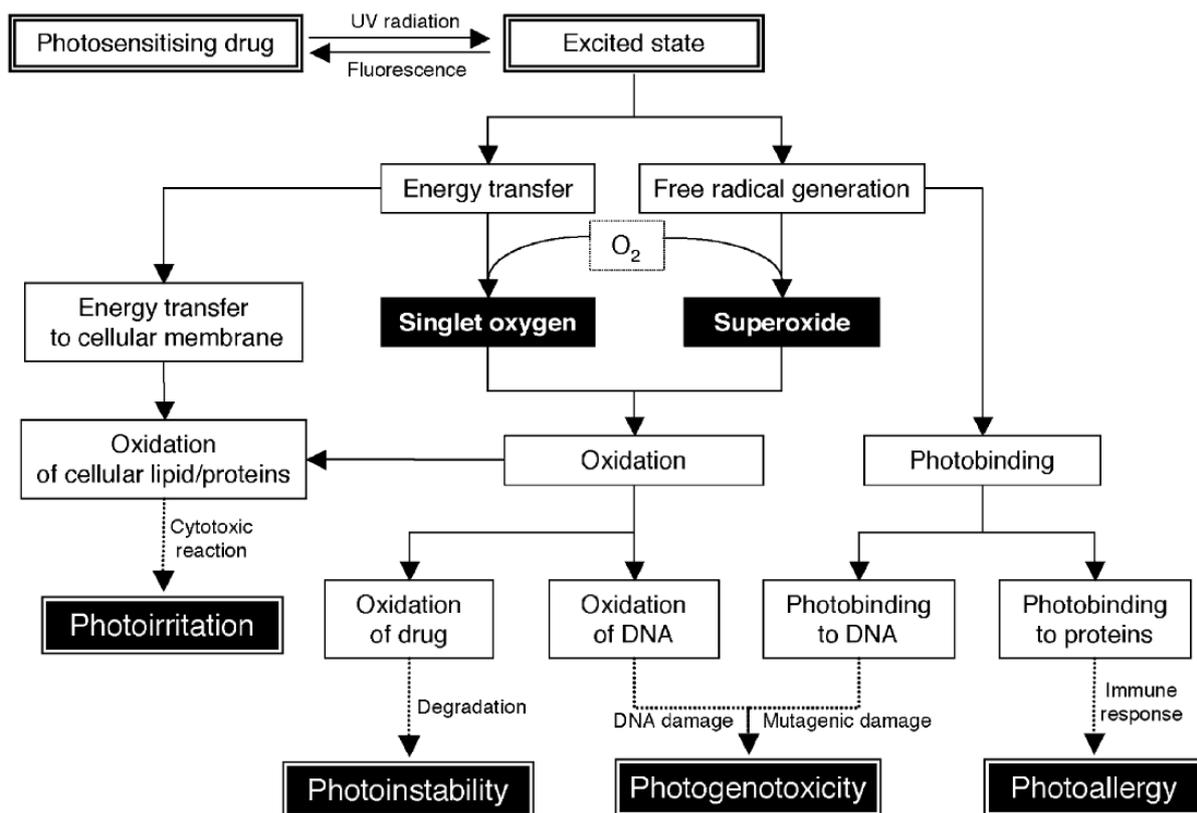


Fig. 1 Schematic representation of possible pathways for phototoxic reactions elicited by photoreactive drugs. Reproduced, with kind permission of Springer Science and Business Media, from *Pharm. Res.*, **23** (1), 2006, 156-164, S. Onoue *et al.*, Figure 5, Copy-right (2006) by springer

は光照射された化合物の Balb/c 3T3 細胞株に対する細胞毒性，つまり光毒性を評価可能である [5]。高い感度を有する 3T3 NRUPT は最も広く用いられている光毒性試験法のひとつであるものの，偽陰性判定をもたらすことが報告されており，開発初期段階のスクリーニング法としての信頼性には懸念がある [6]。ROS assay は擬似太陽光照射下で化合物から産生される singlet oxygen および superoxide anion を測定することで，光化学的特性評価が可能な試験法である。生体内では直接的または間接的な光化学的反応を介して光毒性反応カスケードが進んでいくことが知られており，溶存酸素存在下における化合物の ROS 産生能を評価することで，生体内での包括的な光反応性を評価することができる。ROS assay は静岡県立大学薬学部薬剤学分野 (旧・薬物動態学分野)，日本製薬工業会および日本動物実験代替法評価センターによってバリデートされ，被験物質の溶解性に懸念がない限り偽陰性判定のない光毒性評価が

Table 1 Developed tools for phototoxic risk evaluation

<i>In silico</i> predictions		
DEREK		Barratt <i>et al.</i> [13,14]
HOMO-LUMO gap		Lampi <i>et al.</i> [15]
Photochemical evaluations		
UV spectral analysis		Henry <i>et al.</i> [16]
ROS assay		Onoue <i>et al.</i> [17]
D-ROM assay		Onoue <i>et al.</i> [18]
aROS assay		Onoue <i>et al.</i> [19]
fROS assay		Seto <i>et al.</i> [20]
mROS assay		Seto <i>et al.</i> [21]
eROS assay		Kato <i>et al.</i> [22]
Phototoxicity/photoirritancy		
Photo-patch test		Epistein [23]
Photo-basophil-histamine-release test		Przybilla <i>et al.</i> [24]
Photohemolysis model		Selvaag <i>et al.</i> [25]
Photo hen's egg test		Freeman <i>et al.</i> [26]
Human reconstituted model		Portes <i>et al.</i> [27]
3T3 NRU PT		Spielmann <i>et al.</i> [5]
Oxygen consumption in <i>Bacillus subtilis</i>		Beani <i>et al.</i> [28]
Photogenotoxicity		
Photo Ames test		Brendler-Schwaab <i>et al.</i> [29]
Photo Comet test		Brendler-Schwaab <i>et al.</i> [29]
CGE-based DNA-photocleaving assay		Onoue <i>et al.</i> [30]
DNA-binding assay		Onoue <i>et al.</i> [31]
Photoallergy		
Pig skin model		Sarabia <i>et al.</i> [32]
NCTC2544 IL-18 assay		Galbiati <i>et al.</i> [33]
Photo-LLNA		Ulrich <i>et al.</i> [34]
Photo h-CLAT		Toyoda <i>et al.</i> [35]
Photo KeratinoSens		Inoue <i>et al.</i> [36]
Photo ADRA		Patel <i>et al.</i> [37]
Photo DPRA		Patel <i>et al.</i> [37]

可能な ROS assay は創薬初期段階における光反応性評価法として有用である [7]. 2014 年, 医薬品規制調和国際会議 (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) が施行された. ICH S10 ガイドラインは医薬品候補化合物の光安全性評価の方法やスキームが記載されており, ROS assay をはじめとしていくつかの評価系が推奨されている. 2019 年, ROS assay は光反応性評価法として経済協力開発機構 (Organisation for Economic Co-operation and Development; OECD) ガイドライン化 (TG 495) に成功している.

高い光反応性を有している化合物でも太陽光に曝されなければ光毒性反応を引き起こす可能性は低いことが知られている [8]. つまり, 光毒性発現にかかわる因子は化合物の光反応性だけでなく, 皮膚や眼など露光部への蓄積性も毒性発現に大きくかかわる. Seto らは化合物の光化学的および *in vivo* 薬物動態学的な両特性に着目し, 両データの統合的解析により化合物の光毒性, 中でも光刺激性にかかわるリスクを効果的に予測できることを報告した [9]. しかしながら, 医薬品開発の初期段階では多くの候補化合物があり, 全化合物に対して同様の光安全性評価を実施すると大量の実験動物が必要であるが, コスト, 3Rs の原理 (reduction, replacement, refinement) および評価スループットの観点から改善が望まれる. そこで, 従来の *in vivo* 薬物動態試験から 1 匹の実験動物に対して複数化合物を同時に投与し得られたサンプル中の複数化合物濃度を測定可能な cassette-dosing 法を適用した *in vivo* 薬物動態試験に変更した光安全性評価法を新たに提案し, 複数化合物の光毒性リスクを高効率かつ高精度で予測できた [10-12]. このことから, 光反応性および皮膚蓄積性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非常に高い有用性を示した. 一方で, cassette-dosing 法を適用した *in vivo* 薬物動態試験を用いた場合でも一定数の実験動物を使用することは避けられず, スループットの観点から更なる改良が望まれる. 光毒性反応は化粧品でも誘発されることが知られており, 化粧品開発にも適用可能な評価系, つまり動物実験代替法を用いた経皮適用化合物に対する光安全性評価法の開発が必須である.

経皮適用を指向した医薬品を開発するにあたり全身および局所作用にかかわらず候補化合物の皮膚透過性評価が広く実施されており, Franz 型 (縦型) 拡散セル,

水平型 (横型) 拡散セルおよびインライン型拡散セルなど様々な装置が開発されている。特に Franz 型拡散セルを用いた *in vitro* 皮膚透過性試験は OECD テストガイドライン化 (TG428) もされている [38]。使用する膜は多岐にわたり、ヒト、ブタおよびラットなど生体皮膚を用いる場合だけでなく、シリコン膜やポリマーで構成された膜など人工膜を用いることもできる [39,40]。一般的に皮膚に塗布した化合物は Fick の拡散則に従い皮膚中を拡散・透過した後に真皮に存在する毛細血管などから全身循環へ移行する [41]。受動拡散による皮膚内移動のため、拡散した距離に反比例して濃度勾配が生じる。経皮適用した化合物の皮膚透過速度は投与から一定時間経過後に定常状態となることが知られており、定常状態を保っている間は皮膚内に存在する化合物の濃度は一定であると仮定できる [42]。この間の濃度は種々の皮膚透過性パラメーターを基に算出が可能である。つまり、皮膚透過性試験として汎用されている Franz 型拡散セルを用いた *in vitro* 皮膚透過性試験により化合物の皮膚透過に関するデータを得ることで、透過性試験で用いた膜に対する透過速度が定常時における膜中濃度 (steady-state concentration; C_{ss}) を算出することができる。しかしながら、経皮適用化合物の光毒性リスク予測に C_{ss} を皮膚滞留性の指標として用いる検討はなされておらず、その適用可能性は不明である。そこで、本研究では *in vivo* 薬物動態試験を *in vitro* 皮膚透過性試験に代替し、ROS assay と組み合わせることで動物実験代替法としての統合的光安全性評価法を新規に提案し、医薬品開発に対しては評価スループットの向上、化粧品開発に対しては新たに適用可能な評価系の開発を試みた。第 1 章ではラット摘出皮膚を用いた *in vitro* 皮膚透過性試験および ROS assay による光毒性リスク評価を同一母骨格を有する化合物群に対して適用し、光毒性リスク予測を試みた。第 2 章ではさらなる動物福祉の実現が可能な光安全性評価系を開発すべく、人工膜を用いた統合的光安全性評価系を提案し、構造・物性的に多様な化合物群の光毒性リスクに対する本評価系の予測性を検証した。

第 1 章 摘出皮膚を用いた統合的光安全性評価

1-1. 序論

化合物の光反応性および露光部への蓄積性が光毒性反応を誘発するリスクファクターとして光安全性評価に重要な情報であることが知られている [9]. したがって、化合物の光化学的および薬物動態学的特性を評価することは光安全性評価を実施する上で非常に重要である. 以前の検討では、薬物動態評価に複数化合物を 1 匹の実験動物に対して同時投与し、得られたサンプルから同時分析が可能な *cassette-dosing* 法を適用することで、化合物の光毒性リスクを高効率的に予測する光安全性評価系を開発したものの [10], 動物実験における 3Rs の原理のうち “reduction” は達成できたものの、依然として *in vivo* 試験の回避には結実していない.

現在、経皮適用した化合物の皮膚滞留性評価には *in vivo* 試験に依存することが多い. 一方、経皮適用化合物の皮膚透過性評価は Franz 型拡散セルを用いた *in vitro* 皮膚透過性試験が広く用いられている [43]. *In vitro* 試験より得られた皮膚中濃度を用いた光安全性評価系の構築は動物福祉の推進に寄与するであろうが、*in vitro* 皮膚透過性にかかわるデータの光安全性評価に対する適用可能性は未だ不明である.

本研究では、*in vivo* 薬物動態評価からラット摘出皮膚を用いた *in vitro* 皮膚透過性試験へ代替し、ROS assay および *in vitro* 皮膚透過性試験により構成された光安全性評価系を新たに提案し、経皮適用化合物に対する適用可能性を精査した. 被験物質として光毒性陽性化合物が多いキノロン系抗菌薬 (quinolone derivatives; QNLs) のうち enoxacin (ENX), flumequine (FLM), moxifloxacin (MFX), nalidixic acid (NLA), orbifloxacin (OFX) および oxolinic acid (OXA) の 6 種を選択した. 選択した 6 種 QNLs は母骨格が同一であるものの、分子量ならびに脂溶性の観点から比較的広い物性値の広がりをもつ. QNLs に対して ROS assay を実施することで光反応性を評価し、*in vitro* 皮膚透過性試験より得られた透過性データを基に定常状態における皮膚中濃度である C_{ss} を算出することで *in vitro* 皮膚滞留性を評価した. QNLs の光反応性および *in vitro* 皮膚滞留性にに基づき、光毒性リスクを予測した. 提案した光安全性評価法の予測性を検証すべくラットを用いた *in vivo* 光毒性試験を実施した.

1-2. 実験材料および試験方法

1-2-1. 実験材料

ENX および NLA はシグマアルドリッチ ジャパン合同会社 (東京) より購入した. FLM, MFX および sulisobenzone (SB) は東京化成工業株式会社 (東京) より購入した. OFX はフナコシ株式会社 (東京) より購入した. OXA, quinine hydrochloride (QN), imidazole, nitroblue tetrazolium (NBT), dimethyl sulfoxide (DMSO), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ および formic acid は富士フィルム和光純薬株式会社 (大阪) より購入した. Acetonitrile, trifluoperazine dihydrochloride, butorphanol tartrate, medetomidine, midazolam と isoflurane は Honeywell International (Morristown, NJ, USA), MP Biomedicals LLC (Santa Ana, CA, USA), Meiji Seika ファルマ株式会社 (東京), 日本全薬工業株式会社 (福岡), 武田テバ薬品株式会社 (愛知) と Pfizer (New York, NY, USA) より購入した.

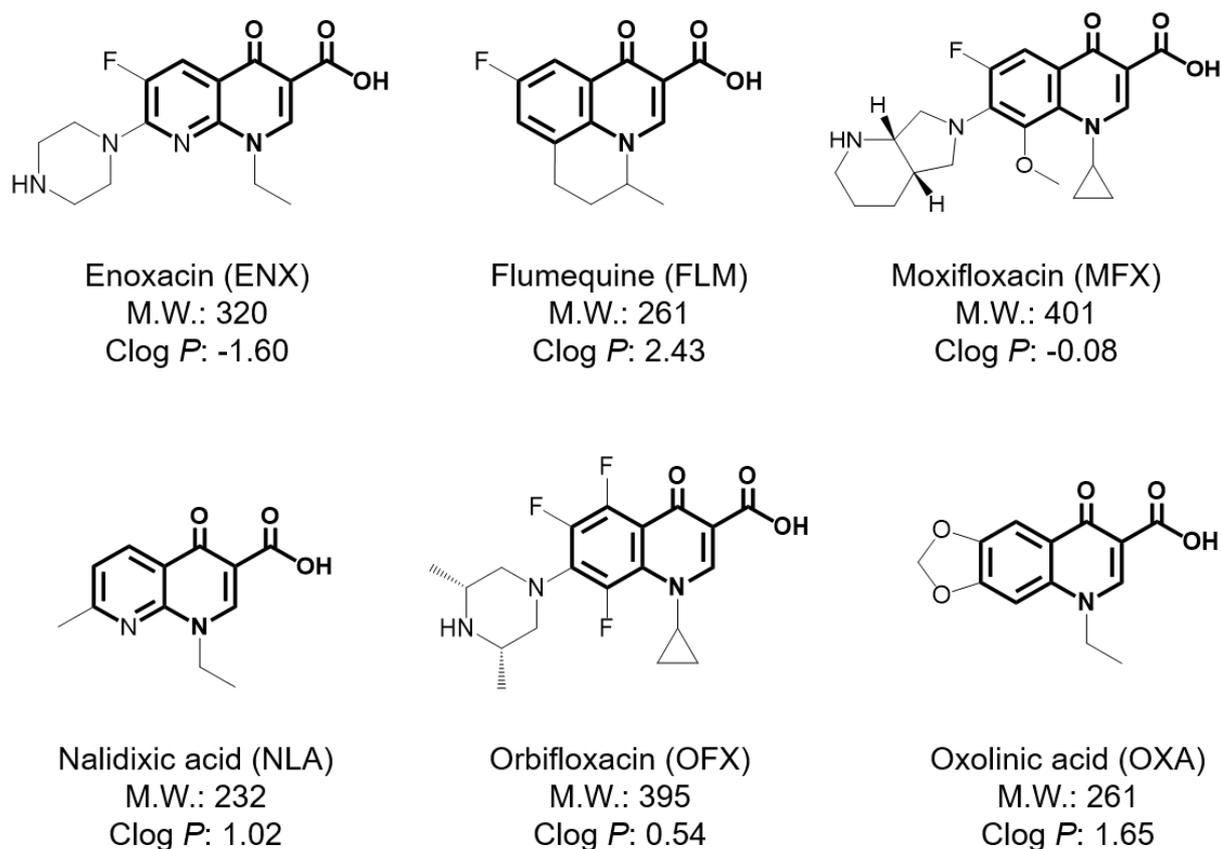


Fig. 2 Chemical structures and physicochemical properties of QNLs. Thick line represents common part of QNLs.

1-2-2. 実験動物

Sprague-Dawley 系雄性ラット (10–15 週令, 体重約 300–420 g) は日本 SLC (静岡) より購入した. ラットは室温 $24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, 湿度 $55\pm 5\%$ ならびに明暗サイクル 12 h 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.

1-2-3. *In vitro* 皮膚透過性評価

In vitro 皮膚透過性試験より得られた化合物の皮膚透過性データより, C_{ss} を求めることができる. したがって, QNLs のラット摘出皮膚における C_{ss} を算出すべく Franz 型拡散セル (Fig. 3, レシーバー液量: 12 mL, 有効表面積: 1.77 cm^2 ; 株式会社コスモスビード, 福岡) を用いた *in vitro* 皮膚透過性試験を実施した. Isoflurane 吸入麻酔下でラット腹部を剃毛, 大動脈からの脱血および氷冷生理食塩水 60 mL による還流後, 剃毛部の皮膚を採取した. 二層膜モデルとして新鮮な摘出皮膚を用い, 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単層膜モデルとした.

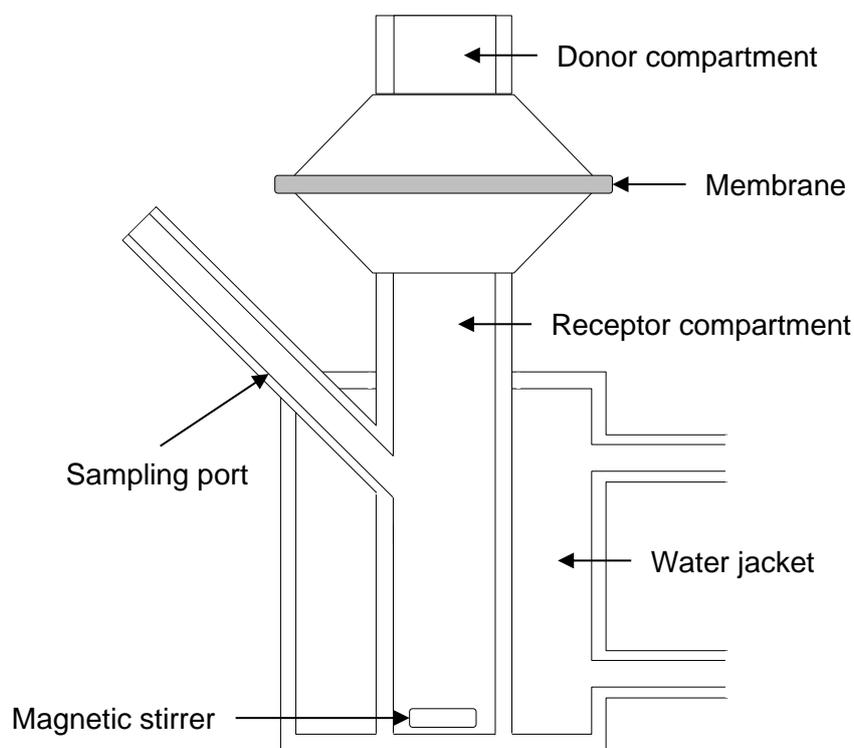


Fig. 3 Schematic illustration of Franz type diffusion cell.

pH7.4 に調整したリン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline; PBS) をレセプター液として、試験中は 32°C に保った。全 QNLs 濃度がそれぞれ 1 mg/mL となるよう propylene glycol に溶解した混合溶液を調製後、Franz 型拡散セルに装着した単層および二層膜モデルに全 QNLs を含む混合溶液を適用して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 24 h 経過後、レセプター溶液 100 μ L を採取した。その際、等量の PBS をレシーバー側に加えることで体積を一定に維持した。得られたサンプルに内標準物質 (internal standard; IS) として使用した enrofloxacin (500 ng/mL) を含む acetonitrile 溶液を等量加え、その溶液中の各 QNL 濃度を ultra-performance liquid chromatography equipped with electrospray ionization mass spectrometry (UPLC/ESI-MS) を用いて測定した。

1-2-4. UPLC/ESI-MS 分析

UPLC/ESI-MS を用いてサンプル中 QNLs の濃度測定を行った。本研究で使
用した 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 Acquity UPLC™
system (Waters, Milford, MA, USA) から構成されており、カラムには Acquity UPLC™
BEH C18 (particle size: 1.7 μ m, column size: ϕ 2.1 \times 50 mm; Waters) を用いた。カラム温度
は 40°C に保った。IS および各 QNL は 0.1% formic acid 含有 Milli-Q 水 (A) と
acetonitrile (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
1.30 min (ENX), 3.30 min (FLM), 2.19 min (MFX), 3.09 min (NLA), 2.02 min (OFX),
2.35 min (OXA) および 1.91 min (enrofloxacin) であった。グラジエントコンディショ
ンは、0–1.0 min, 15–30% (B); 1.0–4.0 min, 30–35% (B) とし、流速は 0.25 mL/min とし
た。MS による検出においては化合物の $[M+H]^+$ 特異的 m/z (320.1, ENX; 261.3, FLM;
402.1, MFX; 232.2, NLA; 396.0, OFX; 262.1, OXA および 360.2, enrofloxacin) を用いた。

Table 2 Conditions of UPLC/ESI-MS analysis

Column	Acquity UPLC™ BEH C18 (Waters) (particle size: 1.7 μm, column size: φ2.1×50 mm)												
Column temperature	40°C												
Mobile phase	Solution A: Milli-Q containing 0.1% formic acid Solution B: Acetonitrile Construct a gradient program as follow: <table border="1" data-bbox="619 504 1315 698"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>% Solution A</th> <th>% Solution B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Initial</td> <td>85</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>1.0</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>4.0</td> <td>65</td> <td>35</td> </tr> </tbody> </table>	Time (min)	% Solution A	% Solution B	Initial	85	15	1.0	70	30	4.0	65	35
Time (min)	% Solution A	% Solution B											
Initial	85	15											
1.0	70	30											
4.0	65	35											
Flow rate	0.25 mL/min												
Cone voltage	15 V												
Detection	Selected ion recording (SIR) for specific <i>m/z</i> ENX: 320.1 [M+H] ⁺ FLM: 261.3 [M+H] ⁺ MFX: 402.1 [M+H] ⁺ NLA: 232.2 [M+H] ⁺ OFX: 396.0 [M+H] ⁺ OXA: 262.1 [M+H] ⁺ Enrofloxacin: 360.2 [M+H] ⁺												
Injection volume	5 μL												
Sample temperature	15°C												
Retention time	ENX: 1.30 min FLM: 3.30 min MFX: 2.19 min NLA: 3.09 min OFX: 2.02 min OXA: 2.35 min Enrofloxacin: 1.91 min												

1-2-5. 皮膚滞留性予測

膜透過パラメーターを用いて化合物の膜透過速度一定時における膜中濃度を算出できる [43]. まず, QNLs 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.

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

この時, 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) にかかわる各パラメーターは上に示す式に最小二乗法を用いてカーブフィッティングすることで算出した.

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

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

ここで, 各膜モデルに対する P の関係を以下に示す. P_{TLM} , P_{sc} および P_{OLM} はそれぞれ permeability coefficient through two-layered membrane model, permeability coefficient through stratum corneum および permeability coefficient through one-layered membrane model を意味する.

$$\frac{1}{P_{TLM}} = \frac{1}{P_{sc}} + \frac{1}{P_{OLM}}$$

この関係より, 角質層に対する透過性を示す P_{sc} を算出することができる.

以上に示す式を用いて算出した QNLs の膜透過性に関するパラメーターを用いて, 透過速度が一定時における皮膚中濃度である C_{ss} を以下の式を用いて算出した. また, その時に起こり得る化合物の推移を Fig. 4 に示した.

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

この時, L_{TLM} , L_{sc} と L_{OLM} はそれぞれ mean thickness of one-layered membrane model, mean thickness of stratum corneum と mean thickness of one-layered membrane model を表す. K_{sc} および K_{OLM} はそれぞれ partition coefficients to stratum corneum および partition coefficients to one-layered membrane model を示す.

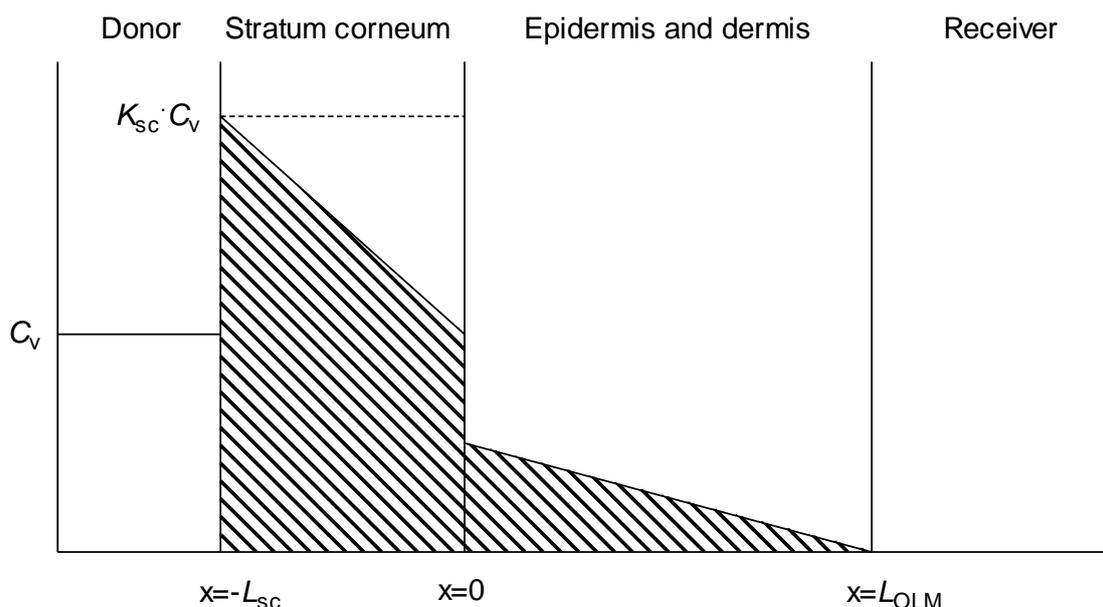


Fig. 4 Schematic diagram of skin concentration-distance profile in the *in vitro* skin permeation test. C_v , applied concentration; K_{sc} , diffusion coefficient to stratum corneum; L_{sc} , mean thickness of stratum corneum; and L_{OLM} , mean thickness of one-layered membrane model.

1-2-6. UV-VIS 吸収スペクトル測定

各被験物質濃度が $20 \mu\text{M}$ となるよう 20 mM sodium phosphate buffer (NaPB, pH7.4) に溶解し、その溶液を光路長が 10 mm の石英セルに移した。各被験物質の UV-VIS 吸収スペクトルは HITACHI U-2010 spectrophotometer (株式会社日立ハイテクノロジーズ, 東京) により記録した。光源切替波長を 350 nm とし、 $290\text{--}350 \text{ nm}$ の領域は D_2 ランプ、 $351\text{--}700 \text{ nm}$ の領域は W1 ランプを用いてサンプルに光を照射した。

1-2-7. ROS assay

1-2-7-1. 擬似太陽光照射

ROS assay における擬似太陽光照射には $1,500 \text{ W}$ の Xenon arc lamp および短波長の UV をカットし実際の太陽光を模倣するためのフィルターを備えた Atlas Suntest CPS+ (Atlas Material Technology LCC, Chicago, IL, USA) を用いた。Atlas Suntest CPS+ の擬似太陽光は CIE85/1989 daylight simulation requirements に良好に対応していることが明らかとなっている [7]。照射強度は UVA detector である Dr. Hönle #0037 (Dr. Hönle, Munich, Germany) を用いることで UVA 強度として約 2.0 mW/cm^2 である

ことを確認し, Atlas Suntest CPS+ 内の温度は 28°C に保った.

1-2-7-2. 評価方法

ROS assay は光照射によって被験物質から産生された singlet oxygen および superoxide anion を測定する試験法であり, 被験物質の光反応性を評価することができる [44]. Singlet oxygen に関して, imidazole を singlet oxygen の acceptor に用いた. Singlet oxygen と反応した imidazole が *p*-nitrosodimethylaniline (RNO) を酸化する. RNO は本来 440 nm に吸収を示すが, 酸化によりその吸収が失われる. したがって, 擬似太陽光照射により減少した 440 nm における吸光値を被験物質からの singlet oxygen 産生の指標とした. まず, 被験物質 (200 μM), RNO (50 μM) および imidazole (50 μM) を含む 20 mM NaPB (pH7.4) 200 μL を 96-well microplate (旭硝子, 東京; code number: 3881-096; clear, untreated, flat-bottom) に分注し, 析出物の有無を目視で確認後, 440 nm の吸光値を SAFIRE microplate spectrophotometer (TECAN, Mannedorf, Switzerland) を用いて測定した. その後, プレーートを reaction container に入れ石英の蓋を装着し, 1-2-7-1 に従い擬似太陽光を 1 h 照射した. 照射後のプレートを振盪し, 440 nm の吸光値を測定した. Superoxide anion について, NBT は superoxide anion との一電子移動反応により nitroblue diformazan へ還元される. Nitroblue diformazan は 560 nm に光吸収を示すため, 露光により起きる 560 nm での吸光値上昇をモニタリングすることで被験物質の superoxide anion 産生能を評価した. 被験物質 (200 μM) および NBT (50 μM) を含む 20 mM NaPB (pH 7.4) 200 μL を 96-well microplate に分注し, 析出物の有無を目視で確認後, 560 nm の吸光値を SAFIRE を用いて測定した. その後, プレーートを 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に 560 nm の吸光値を測定した.

1-2-8. *In vivo* 光毒性評価

1-2-8-1. 色差測定

色差は Commission International del's Eclariage (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, 東京) 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.

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^*) は赤および緑 ($-100 \leq a^* \leq 100$) 間のバランスを表し、彩度 (b^*) は黄色および青 ($-100 \leq b^* \leq 100$) 間のバランスを表す。測定した L^* , a^* および b^* の値を基に色差 (ΔE) を以下のように算出した。

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

1-2-8-2. 評価方法

提案した光安全性評価系の予測性を検証すべくラットを用いた *in vivo* 光毒性試験を実施した。試験開始 24 h 前に isoflurane による吸入麻酔下でラット腹部を剃毛した。各 QNL を 100 mg/mL となるよう dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解した。ラットに isoflurane 吸入麻酔し、剃毛した腹部へ被験物質の DMSO 溶液 100 μ L を染み込ませた濾紙 (2.0 cm \times 2.0 cm) にて塗布した。DMSO 溶液塗布から 3 h 後に塗布液を除去し、水で湿らせたコットンで塗布部位を洗浄した。Midazolam (200 μ g/mL), butorphanol tartrate (250 μ g/mL) と medetomidine (15 μ g/mL) から成る三種混合麻酔 (10 mL/kg) を腹腔内投与後、ラット腹部にブラックライト (FL15BL-B, National, 東京) 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, Munich, Germany) を用いて行い、約 2.7 mW/cm² の照射強度で照射量が 30 J/cm² となるよう UV 照射した。照射前と照射終了から 24 h 後の皮膚表面の色調を 1-2-8-1 に従い測定し、UV 照射前後の ΔE 値を光毒性評価の指標とした。

1-2-9. データ解析

In vivo 光毒性試験において、各 QNLs 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 ($P < 0.05$) を持って有意とした。脂溶性の指標である Clog *P* は ChemBioDraw 16.0 software (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) に各 QNL の構造式を入力することで算出した。

1-3. 結果

1-3-1. ラット摘出皮膚における被験物質の滞留性評価

1-3-1-1. 皮膚透過性評価

フランチ型拡散セルを用いた *in vitro* 皮膚透過性試験は、経皮適用化合物の皮膚透過性を評価する試験法として OECD テストガイドライン化されている [39]. さらに、*in vitro* 皮膚透過性試験から得られる膜透過データの汎用性は高く、血漿中濃度推移および皮膚中濃度の予測にも適用が可能である [45,46]. 本光安全性評価法では、フランチ型拡散セルを用いた *in vitro* 皮膚透過性試験から得られた QNLs の膜透過性を基に透過速度が一定時における膜中濃度を算出し、*in vitro* 皮膚滞留性の指標として光毒性リスク予測に用いた. レセプター溶液中の QNLs 累積量を経時的にモニタリングしたところ、試験開始から 24 h 経過後の全 QNLs の蓄積量は二層膜モデルと比較して単層膜モデルが多かった (Fig. 5). 二層膜モデルでは NLA および FLM の透過量が他の QNLs より高く、単層膜モデルでは MFX が最も高い透過量を示した. QNLs の累積量プロファイルに基づき、種々の膜透過パラメーターを算出した (Table 3). 二層膜モデルおよび単層膜モデルに対する透過性の指標としてそれぞれ P_{TLM} および P_{OLM} を算出した. P_{TLM} は NLA が最も高く 1.1×10^{-5} cm/s であった. 他の 5 種被験物質の P_{TLM} は 9.8×10^{-6} (ENX), 7.6×10^{-6} (FLM), 4.4×10^{-6} (MFX), 2.9×10^{-6} (OFX) および 3.3×10^{-6} (OXA) cm/s と算出した. P_{OLM} は 3.4×10^{-5} (ENX), 8.7×10^{-5} (FLM), 1.9×10^{-4} (MFX), 1.2×10^{-4} (NLA), 1.2×10^{-4} (OFX) と 7.1×10^{-5} (OXA) cm/s であった. 膜透過係数もレセプター溶液中への累積量と同様に、全 QNLs の P_{OLM} は P_{TLM} と比し高値を示した. 一般的に分子量が 500 を下回る化合物は皮膚透

Table 3 Parameters for skin permeation of QNLs

	ENX	FLM	MFX	NLA	OFX	OXA
$P_{TLM} (\times 10^{-5} \text{ cm/s})$	0.98	0.76	0.44	1.1	0.29	0.33
$P_{OLM} (\times 10^{-5} \text{ cm/s})$	3.4	8.7	19	12	12	7.1

P_{TLM} , permeability coefficient through two-layered membrane model and P_{OLM} , permeability coefficient through one-layered membrane model

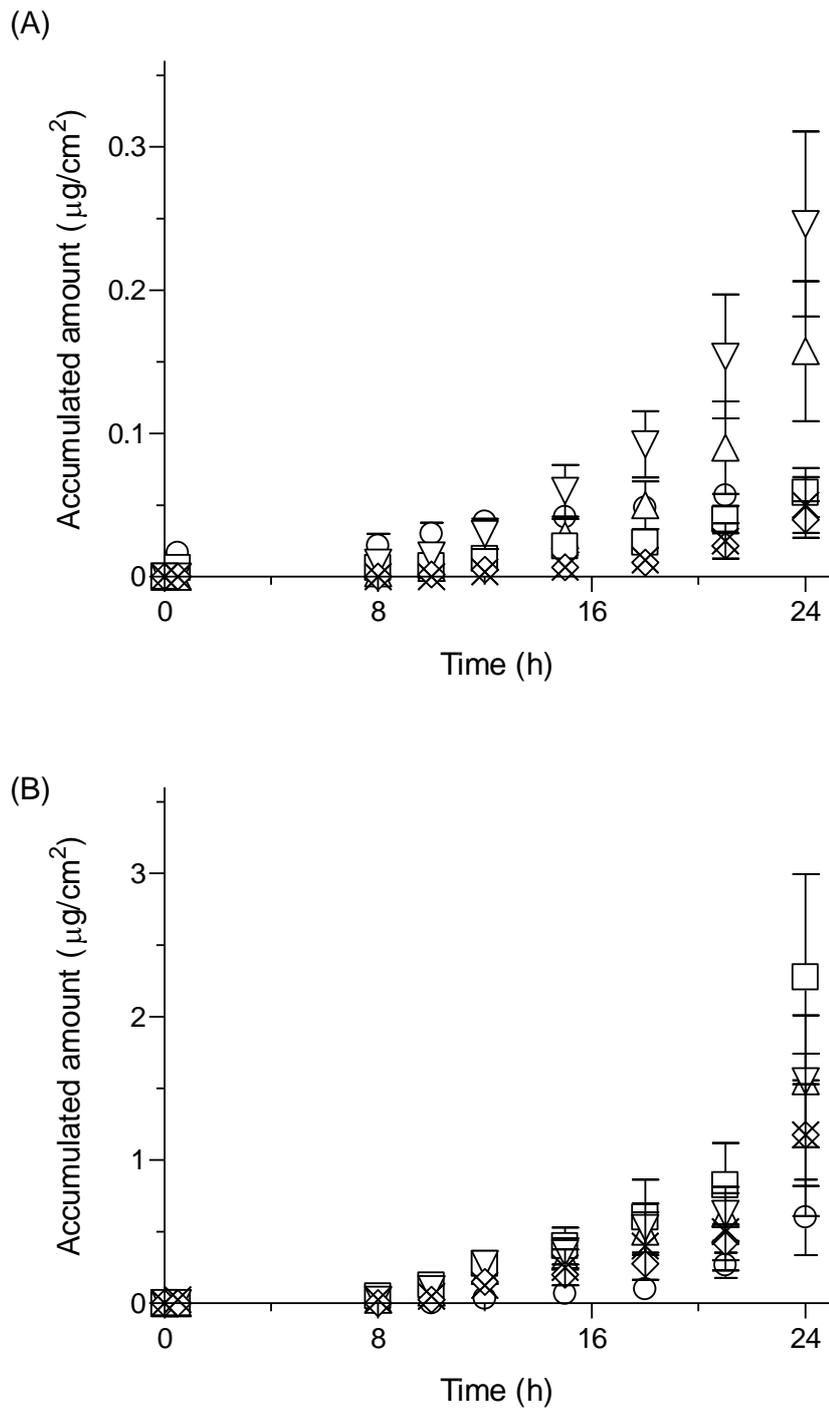


Fig. 5 Accumulated amount of QNLs permeating (A) intact skin and (B) stripped skin in the receptor compartments. ○, ENX; △, FLM; □, MFX; ▽, NLA; ◇, OFX; and ×, OXA. Data represent mean for 4 experiments.

、分子量と皮膚透過性には負の相関がある [47]. 二層膜モデルに対する透過性は分子量が QNLs 中最も小さい NLA が最も高く、400 g/mol 程度と比較的分子量が大きい MFX および OFX の透過性は低かった. しかしながら、最も低い皮膚透過性を示した OXA は分子量が 261 g/mol と比較的小さいため、分子量および皮膚透過性間で比較的良い対応をしたものの完全ではなかった. 適切な脂溶性を持つ化合物も皮膚透過性が高いことは既に知られている [48]. 脂溶性が非常に低い場合は角質層を透過することが困難であり、脂溶性が著しく高いと皮膚中から血液中へ移行する割合が低くなる. 6 種 QNLs の脂溶性の指標として用いた $Clog P$ 値は -0.08–2.43 であった. MFX および OFX の $Clog P$ 値はそれぞれ -0.08 および 0.54 と他の QNLs より低く、 P_{TLM} は QNLs 中で比較的 low 値であった. つまり、本検討で用いた QNLs の場合、脂溶性の低い QNLs は皮膚透過性も低かった.

1-3-1-2. 皮膚滞留性予測

皮膚への蓄積性は化合物の光毒性発現にかかわる性質である. 一方で、皮膚蓄積性評価には実験動物を用いた *in vivo* 薬物動態評価が必要とされ、3Rs の観点から動物実験代替法の開発が求められている. 経皮適用製剤開発において、分子量、 $\log P$ 、位相幾何学的表面電荷 (topological polar surface area; tPSA)、溶解度パラメーター (solubility parameter; SP) および融点など数多くの記述子を用いて皮膚透過性予測が行われている [49]. しかしながら、化合物の「皮膚滞留性」が光毒性発現にかかわる因子であり、「皮膚透過性」から光毒性リスクを予測することは困難である. そこで、*In vitro* 皮膚透過性試験の結果より得られた化合物の皮膚透過パラメーターを用いることで算出できる皮膚中濃度、つまり C_{ss} を皮膚滞留性の指標として用いた. 本研究では、QNLs の C_{ss} を算出し光毒性予測に用いた. 皮膚透過性パラメーターを基に QNLs のラット摘出皮膚における C_{ss} を算出したところ、ENX, FLM, MFX, NLA, OFX および OXA の C_{ss} はそれぞれ 1.2, 5.0, 3.4, 8.2, 2.0 および 2.2 $\mu\text{g/mL}$ であり (Fig. 6), *in vitro* 皮膚滞留性は以下の順であった.

In vitro skin deposition: NLA > FLM > MFX > OFX \approx OXA > ENX

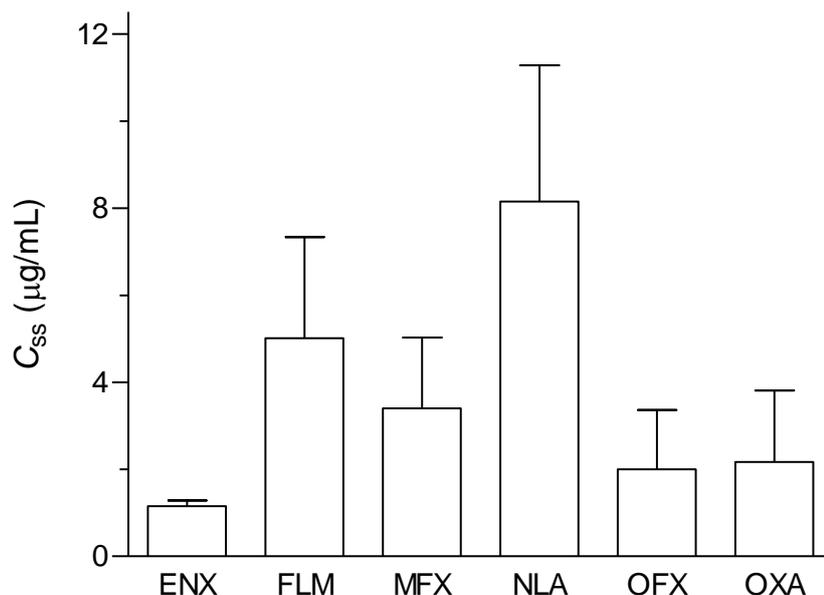


Fig. 6 Calculated C_{ss} values of QNLs in the rat skin. Data represent mean \pm S.E. for 4 experiments.

1-3-2. 光化学的特性評価

化合物が持つ光化学的特性は光毒性リスクを予測する上で欠かせない情報であり、UVA/B および VIS の一部をエネルギーとして吸収する過程が光毒性反応の引き金となる。したがって、QNLs に対して UV-VIS スペクトル解析を実施し (Fig. 7A), 得られたスペクトルデータからモル吸光係数 (molar extinction coefficient; MEC) を算出することで QNLs の光励起性を評価した。全 QNLs は VIS 領域において光の吸収は観察されなかったものの、UVA/B 領域では高い光吸収を示した。本試験で測定した波長領域 (290–700 nm) のうち、極大波長での各 QNL の MEC は 17,600 (ENX), 12,500 (FLM), 39,900 (MFX), 13,200 (NLA), 24,100 (OFX) と 12,500 (OXA) $M^{-1}\cdot cm^{-1}$ であった。290 から 700 nm の波長において MEC が $1,000 M^{-1}\cdot cm^{-1}$ 上回らない化合物については、直接的な光毒性を引き起こすほどの光反応性がないと定義されており [6], MEC が $1,000 M^{-1}\cdot cm^{-1}$ 以下ではない全 QNLs の光反応性は光毒性発現リスクの可能性を否定できるほど低くなかった。

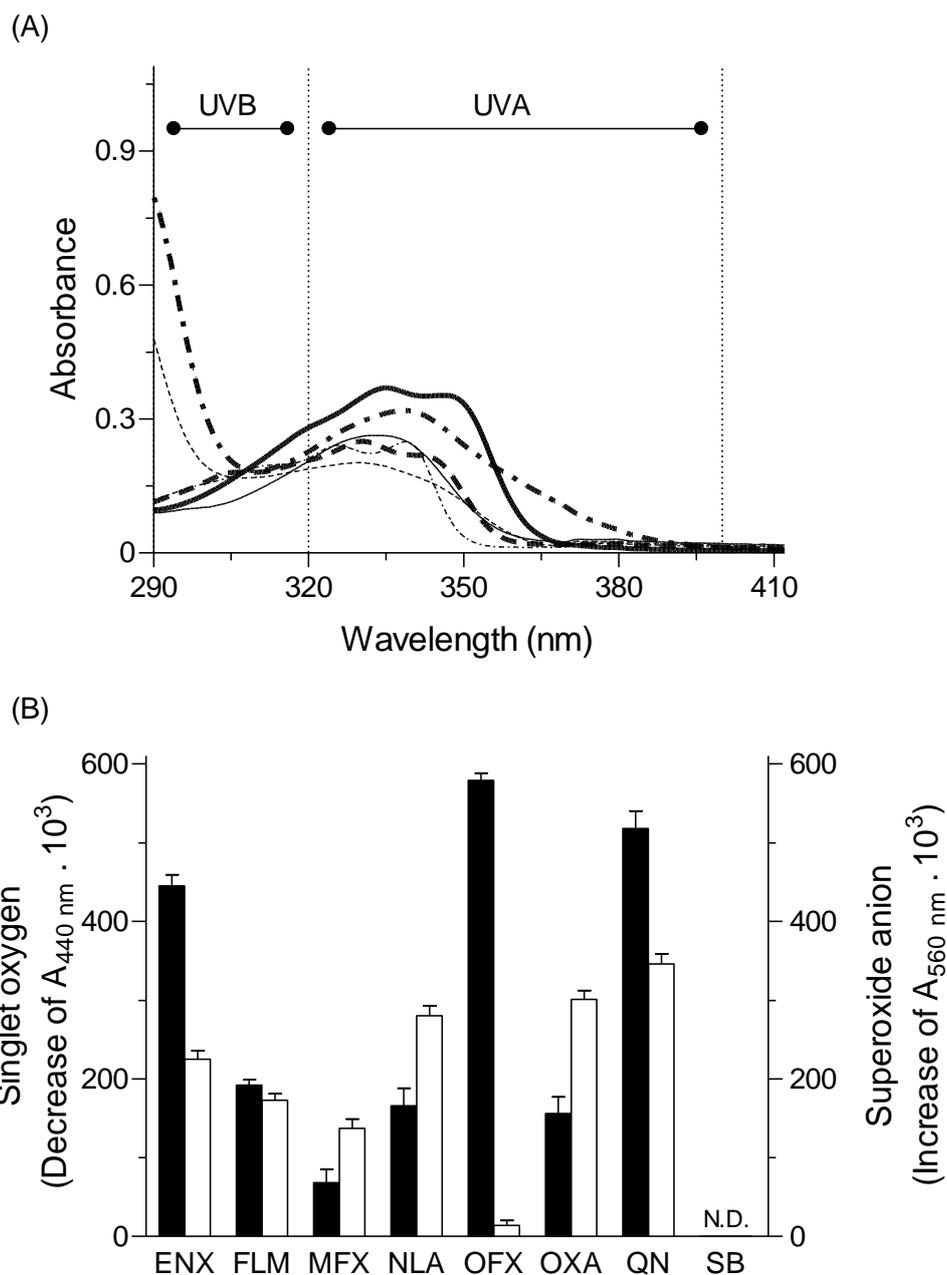


Fig. 7 Photochemical properties of QNLs. (A) UV absorption spectra of QNLs (20 μM) in 20 mM NaPB (pH7.4). Thick solid line, ENX; thick dashed line, FLM; thick dotted line, MFX; thin solid line, NLA; thin dashed line, OFX; and thick dotted line, OXA. (B) Generation of ROS including singlet oxygen (filled bars) and superoxide anion (open bars) from QNLs (200 μM) exposed to simulated sunlight (250 W/m^2). N.D.; not detected. Data represent mean \pm S.D. for 3 experiments.

太陽光によって励起された化合物はしばしばエネルギー転移またはラジカル生成を介した光化学的反応を引き起こす。この時に生体内に存在する酸素分子と反応して産生された ROS が光毒性発現に関与する可能性が示されている [17]。光化学的反応のうち、type I 反応はラジカル反応を、type II 反応はエネルギー転移を介してそれぞれ superoxide anion および singlet oxygen を産生する [3]。したがって、光励起された化合物から産生された singlet oxygen および superoxide anion を測定することで光毒性リスクを予測する ROS assay を QNLs に適用し、光反応性を評価した (Fig. 7B)。ROS assay は光反応性に対する明確な 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) が定められており、基準を下回る ROS の産生を示した化合物は光反応性に関する懸念低いと判断できる [50]。positive control および negative control としてそれぞれ QN および SB を用い、これら 2 種化合物からの ROS 産生量に基づき本試験の妥当性を示した。全 QNLs は露光時に強い ROS の産生を認め、定められた criteria を大きく超えていた。すなわち、全 QNLs は高い光反応性を有していた。特に、ENX および OFX の光反応性が他の QNLs より高かった。

1-3-3. *In vivo* 光毒性評価

本光安全性評価系の予測性を検証すべく、ラットを用いて QNLs の *in vivo* 光毒性試験を実施した。本試験は被験物質を単回投与することにより誘発される光刺激性を評価する手法である。光刺激反応は発赤や紅斑を主徴としており、光刺激反応および皮膚の色調変化は関連性が認められている [51,52]。つまり、各 QNLs を経皮適用し、UVA 照射することでラット皮膚表面に起こる色調変化の度合いを評価することで光毒性の強さの評価が可能と考える。UVA 非照射時に起こる色調変化を観察することで被験物質自身の皮膚刺激性を評価し、UVA 照射の有無による色調変化の差を考慮することで、光毒性反応により誘発された色調変化を直接評価できる。剃毛したラット腹部に各 QNL (10 mg/site) を適用後、UVA 照射前後の皮膚表面の色調変化を *in vivo* 光毒性の指標とした (Fig. 8)。MFX を除く全 QNLs は UVA 照射と非照射群間で ΔE の値に有意な差を認め、その差は FLM が最も大きかった。UVA 照射群/非照射群間における ΔE 値の差に基づく *in vivo* 光毒性は以下の順と判断した。

Observed phototoxicity: FLM > NLA > ENX \approx OFX > OXA > MFX

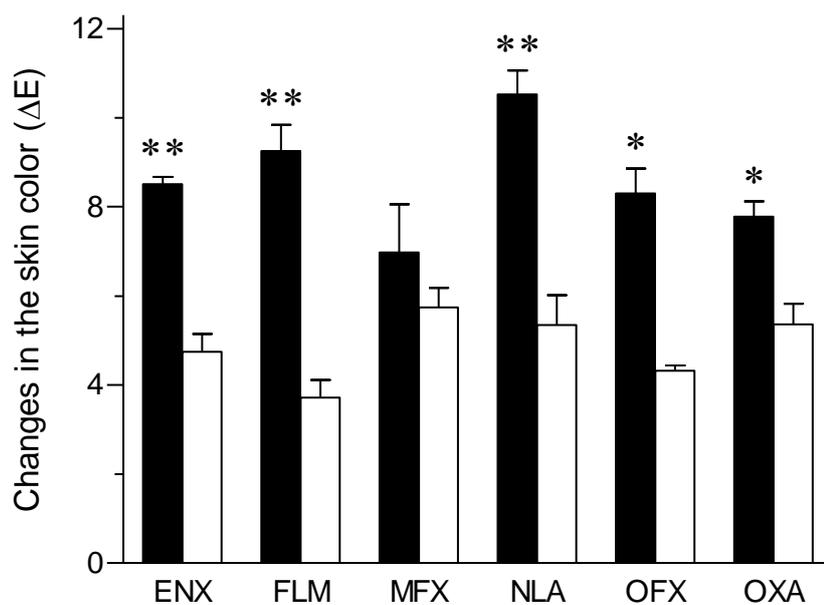


Fig. 8 Colorimetric changes in the rat skin caused by irradiated and non-irradiated QNLs. Differences in skin color (ΔE) between before and after irradiation were estimated on the basis of L^* , a^* , and b^* values. Filled bars, irradiated group; open bars, non-irradiated group. Data represent mean \pm S.E. for 4 experiments. *, $p < 0.01$ and **, $p < 0.001$ vs. corresponding non-irradiated group.

1-4. 考察

ICH S10 ガイドラインでは医薬品候補化合物の光安全性評価の実施にあたり **tier approach** が推奨されている (Fig. 9). **Initial assessment** として UV-VIS 吸収スペクトル測定および ROS assay を実施し, 光毒性に対する懸念がある場合は **experimental evaluation** として 3T3 NRU PT, *in vivo* 皮膚内動態評価, *in vivo* 光毒性試験および臨床試験を補助的に行うことで, 候補化合物の光毒性に対する開発アプローチを決定する. より包括的な光安全性評価法として, ROS assay を用いた光反応性評価ならびに *in vivo* 薬物動態試験による皮膚滞留性評価を実施し, 両試験から得られたデータを統合的に解析することで被験物質の光毒性リスクを精度よく予測できている [10]. しかしながら, 皮膚滞留性評価における *in vivo* 試験の実施は評価系全体のスループットの低下および実験動物の大量消費に対する懸念さがある. そこで, *in vivo* 皮膚内動態

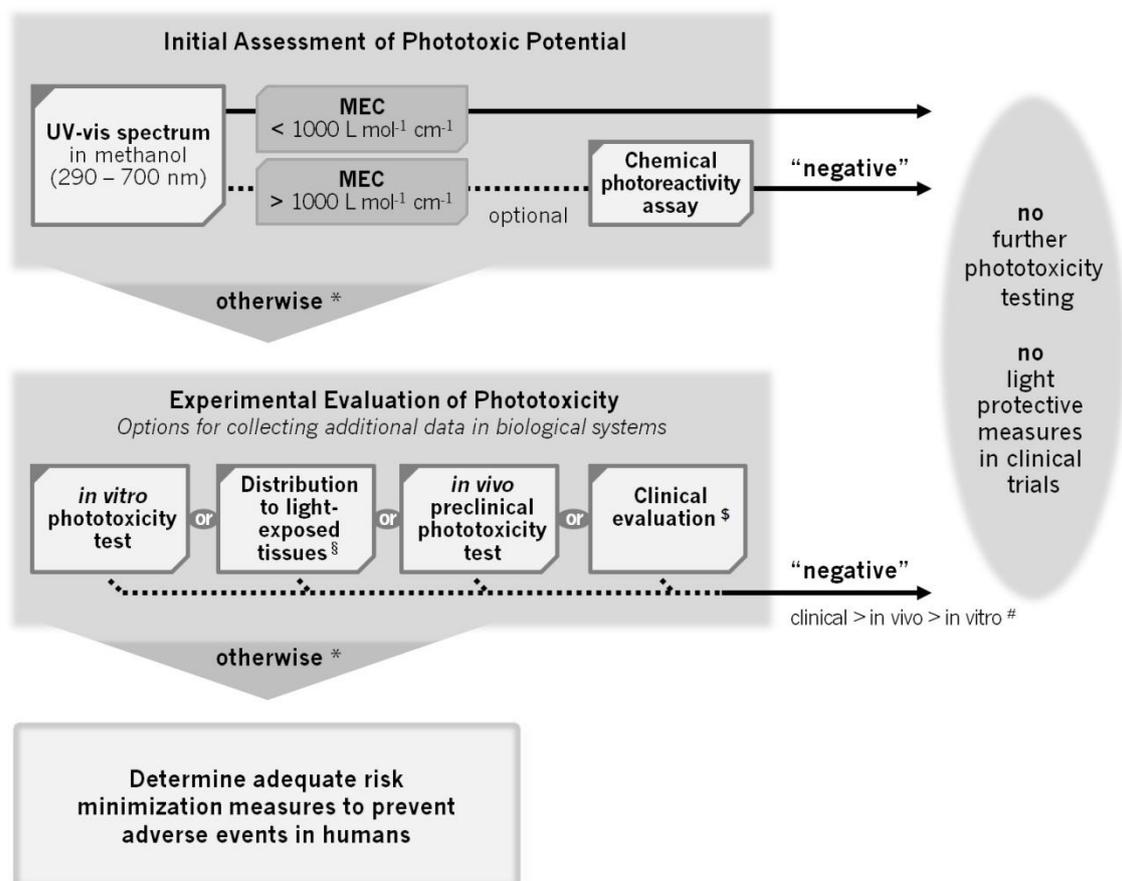


Fig. 9 Outline of possible phototoxicity assessment strategies for pharmaceuticals in ICH S10 guideline.

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、QNLs 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。 *In vitro* 皮膚透過性試験では全 QNLs がラット摘出皮膚を透過することが明らかになった。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 [47]。そのような化合物は経皮適用された後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 [41]。全 QNLs の分子量が 500 以下であり、FLM, NLA, OFX および OXA の $ClogP$ は正の値であるため、これら 4 種 QNLs 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ものと考えられる。一方で、ENX および MFX は $ClogP$ 値がそれぞれ -1.60 および -0.08 であり、脂溶性が低いことから膜透過に細胞間隙や細胞内ルートの寄与は低い可能性がある。水溶性化合物や高分子化合物の皮膚透過には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 [53]、これら付属器官からを介した透過ルートが脂溶性の低い ENX および MFX の皮膚透過に寄与したと考える。

全 QNLs は UV 領域において高い光吸収を示し、その MEC 値は基準値を大きく超えていた。光励起された化合物は蛍光、燐光および光化学的反応などによってエネルギーを放出する。光化学的反応を介して産生された ROS 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 [54]。また、生体内では光励起された化合物分子自身が biradical となり直接生体内分子と反応することで光毒性反応を引き起こす可能性もある。したがって、ROS assay を用いて QNLs の光反応性を評価することにより、type I もしくは type II 光化学的反応を介して産生した ROS および各 QNL 分子自身が biradical となり試験液中の溶存酸素と直接反応することで生じた ROS の両方を考慮することができる。ROS assay の結果から、全 QNLs が高い光反応性を示し、光毒性リスクを有することが明らかになった。6 種の QNLs のうち、ENX および OFX の光反応性が高く、FLM, NLA および OXA の光反応性は中程度であった。MFX は MEC 値が非常に高かったものの、光反応性は全 QNLs 中で最も低かった。キノロン系抗菌薬のうち、キノリン環 6 位にフッ素原子が導入された化合物をフルオロキノロン系抗菌薬と呼ぶ。フルオロキノロン系抗菌薬は 8 位の置換基の違いから free group, halogenated group および methoxylated group の 3 種類に分類されてお

り、それらの構造と光毒性に相関があることが報告されている。臨床試験では、halogenated group > free group > methoxylated group の順で光毒性反応が強いことが報告されている [55,56]。被験物質として用いた QNLs のうち、ENX, MFX と OFX がフルオロキノロン系抗菌薬であり、free group, methoxylated group と halogenated group にそれぞれ分類される。ENX, MFX および OFX の光反応性の強さは構造中 8 位置換基に依存しており、以前の臨床報告を裏付ける結果であった。

化合物が持つ光反応性および皮膚への蓄積性は薬剤性光線過敏症のリスクファクターとして知られている。本光安全性評価では、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 QNLs の光毒性リスクを予測した (Table 4)。*In vitro* 皮膚滞留性の指標として用いた C_{ss} の値に皮膚滞留性の高さに対する明確なクライテリアは定められていない。本評価系では、被験物質内での C_{ss} の大きさを基準として直接比較をした。6 種類の QNLs のうち中程度の光反応性を有する FLM および NLA は高い *in vitro* 皮膚滞留性を示したことから光毒性リスクは高いと判断した。特に、 C_{ss} が最も高値であった NLA の光毒性リスクは最も高いと予測した。ENX および OFX は高い光反応性を示したものの、*in vitro* 皮膚滞留性は低レベルであった。したがって、ENX および OFX の光毒性リスクは QNLs 中で中程度であると判断した。OFX および OXA の *in vitro* 皮膚滞留性は同程度であった一方で、光反応性は OFX と比較し OXA の方が低いため、OXA は OFX に次ぐ光毒性リスクを有すると予測した。MFX は光反応性を有しているものの、ROS 産生量が他の QNLs より低く、*in vitro* 皮膚滞留性も中程度であったことから光毒性

Table 4 Decision matrix

	ENX	FLM	MFX	NLA	OFX	OXA
<i>ROS assay</i> ^{a)}						
$^1\text{O}_2$ ($\Delta A_{440\text{ nm}} \cdot 10^3$)	445	192	68	166	579	156
O_2^- ($\Delta A_{560\text{ nm}} \cdot 10^3$)	225	173	137	280	14	301
<i>In vitro skin permeation test</i>						
C_{ss} ($\mu\text{g/mL}$)	1.2	5.0	3.4	8.2	2.0	2.2

The levels were divided into two grades. Black cells indicated ROS data over the criteria in the ROS assay and higher C_{ss} values in the *in vitro* skin permeation test. ^{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 5 Comparison between predicted phototoxic risk and observed phototoxicity

Predicted phototoxic risk										
NLA	>	FLM	>	OFX	>	ENX	>	OXA	>	MFX
Observed phototoxicity										
FLM	>	NLA	>	ENX	≐	OFX	>	OXA	>	MFX

リスクは最も低いと判断した。以上より，光反応性および皮膚滞留性の統合的解析による 6 種 QNLs の光毒性リスクを予測した (Table 5). 各 QNLs の *in vivo* 光毒性を明らかにするため実施したラットにおける光毒性試験の結果，MFX を除く QNLs は UV 照射前後でラット皮膚表面の色調が有意に変化した。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実際に観察された *in vivo* 光毒性の順を比較したところ，比較的良好に対応した (Table 5). ENX は全 QNLs 中で光反応性が最も高く，光反応性のみに基づく光毒性リスク予測をした場合には最も高いリスクを持つと判断できる。QNLs のうち *in vivo* 光毒性の強さは ENX が中程度であり，光反応性のみを光毒性予測に用いた場合と矛盾が生じる。一方，ROS assay と *in vitro* 皮膚透過性試験により構成される光安全性評価系を用いた場合，ENX の光毒性リスクは中程度であると予測でき，この結果は観察された光毒性反応の強さと良好に相関した。本知見は，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した。皮膚滞留性について，UV 照射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} は化合物のレセプター溶液中への累積速度が一定状態に達した状態での膜中濃度を示しており， C_{ss} を皮膚滞留性の指標として光安全性予測に用いた場合に過小評価を招く懸念がある。NLA および FLM は同程度の光反応性を有していたが， C_{ss} 値の違いにより NLA の光毒性リスクは FLM と比し高いと判断した。一方で，実際に観察された *in vivo* 光毒性は FLM が NLA より強かった。*In vivo* 実験において，経皮投与された化合物の濃度および滞留時間の両方に基づいた皮膚滞留性はその脂溶性に依存することが報告されている [48]。脂溶性の指標として用いた $ClogP$ は FLM が NLA と比較し高値であり，FLM および NLA の予測した光毒性リスクと *in vivo* 光毒性の順における相違は *in vitro* 皮膚滞留性として用いたデータに滞留時間の欠如が起因した可能性がある。したがって，皮膚中の滞留時間に関する評価が可能となれば，より信頼性の高い光安全性予測をもたらすであろう。*In vivo* 体内動態評価および ROS assay を用いた

従来の光安全性評価系と比較し，皮膚滞留性評価においては滞留時間に関する情報が欠如するものの，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．本評価系による光安全性評価は **photo-patch test** を必要とせず，創薬の比較的早い段階で実施が可能である．つまり，光反応性および *in vitro* 皮膚滞留性に基づく光安全性予測法は創薬初期段階における候補化合物の選択に関する初期スクリーニング法として有用であると考えられる．

第 2 章 人工膜を用いた統合的光安全性評価

2-1. 序論

化合物の光化学的特性および皮膚蓄積性が光毒性発現のリスクファクターとなる。第 1 章では、ラット摘出皮膚を用いた *in vitro* 皮膚透過性試験と ROS assay を用いた統合的光安全性評価系を提案し、“reduction” の達成に成功した評価系を用いて予測した QNLs 経皮適用時の光毒性リスクはラット皮膚における光毒性反応の強さの順と良好に対応した。つまり、提案した光安全性評価法を用いることで *in vivo* 試験を実施せずとも精度よく光毒性リスクを評価できる可能性を示した。

2013 年以降はヨーロッパ連合 (European Union; EU) を中心として化粧品開発における実験動物の使用が制限されており [57]、第 1 章で提案した光安全性評価系を化粧品原料に対して適用することは非常に困難である。また、皮膚透過性を実験動物の皮膚を用いて評価した場合、動物の飼育環境や皮膚摘出操作により皮膚へダメージを与える可能性がある。近年、さらなる評価スループットの向上や誤差の低減を指向した皮膚透過性評価を実施すべく実際の皮膚透過性と相関のある膜透過性を得られる人工膜が開発されている [40]。しかしながら、人工膜を用いた透過性試験および ROS assay による光安全性評価は未だなされていない。

本章では、ラット摘出皮膚を人工膜に代替した *in vitro* 膜透過性試験と ROS assay を用いて被験物質の光毒性リスク予測を行い、新たに提案した光安全性評価系の適用可能性を精査した。Acridine (ACD), furosemide (FSM), hexachlorophene (HCP), 8-methoxypsoralen (MOP), norfloxacin (NFX) および promethazine (PMZ) を被験物質として用いた。6 種被験物質はそれぞれ異なる母骨格を持ち、分子量および $\text{Clog } P$ 値から幅広い物性値を有する。ヒト皮膚を模倣した Strat-M[®] を二層膜モデルとして用いた。Strat-M[®] を用いて単層膜モデル作製法の最適化を行い、単層膜および二層膜モデルに対する被験物質の膜透過性に基づき C_{ss} を算出した。人工膜を用いた *in vitro* 皮膚透過性試験により予測した *in vitro* 皮膚滞留性の妥当性を評価すべく、ラット摘出皮膚を用いた *in vitro* 皮膚透過性試験ならびに *in vivo* 薬物動態試験を実施した。UV-VIS 吸収スペクトル測定および ROS assay により被験物質の光化学的特性を評価した。 C_{ss} および ROS 産生量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た。*In vivo* 光毒性試験を実施し、本評価系の予測性を検証した。

2-2. 実験材料および試験方法

2-2-1. 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株式会社 (大阪, 日本) より購入した。HCP および MOP は東京化成工業株式会社 (東京, 日本) より購入した。Strat-M[®] は Merck Millipore (Billerica, MA, USA.) より購入した。

2-2-2. 実験動物

Sprague-Dawley 系雄性ラット (9–14 週令, 体重約 300–450 g) は日本 SLC (静岡, 日本) より購入した。以下は 1-2-2 と同様の方法で実施した。

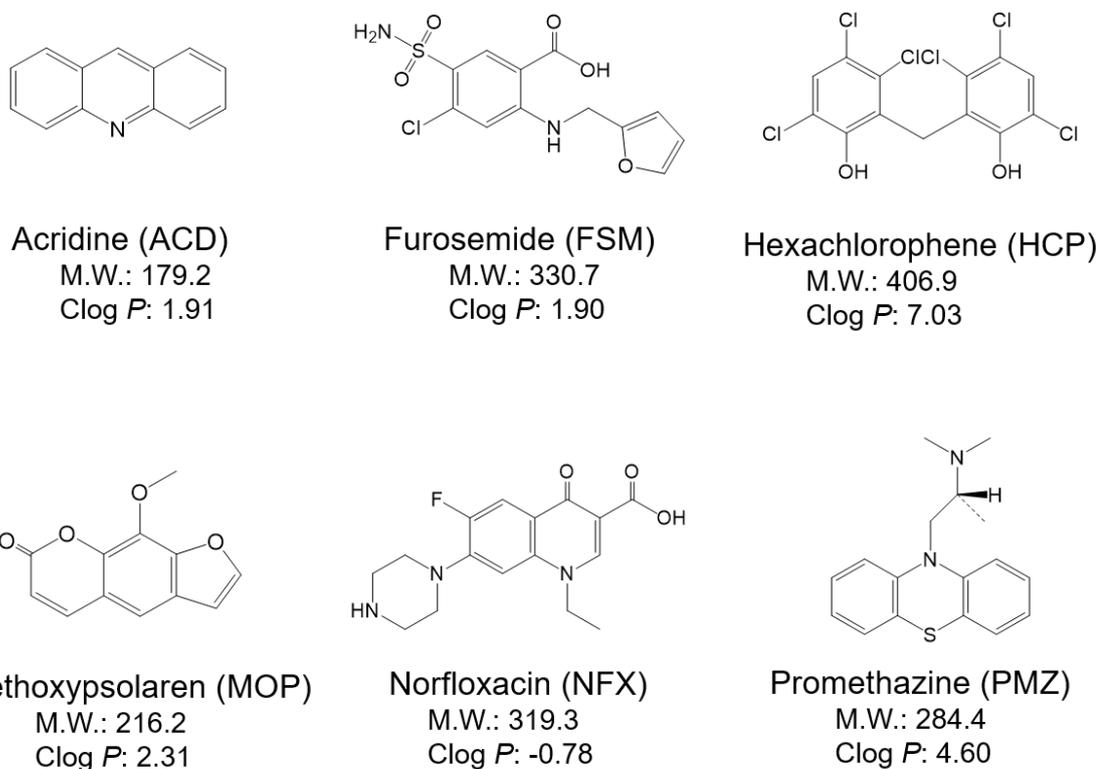


Fig. 10 Chemical structures and physicochemical properties of test compounds.

2-2-3. *In vitro* 膜透過性評価

2-2-3-1. 単層膜モデル作製

二層膜モデルとして選択した Strat-M[®] の角質模倣部位を除去する方法の最適化を行った。Franz 型拡散セルに Strat-M[®] を装着し、各種有機溶媒 1 mL を添加後定められた期間静置した。静置時間について、butanol, ethanol, methanol および isopropyl alcohol を用いた有機溶媒最適化に関する検討では 30 min, methanol 処置時間最適化時は 10, 20, 30, 40, 60 および 120 min の間静置をした。その後、取り外した膜表面の有機溶媒をふき取り、大気圧および 25°C 環境下で膜の重量変化がなくなるまで乾燥した。1 mg/mL となるよう ACD を溶解した propylene glycol 溶液を乾燥した膜に 100 μ L 滴下した。その後、経時的にレセプター溶液である propylene glycol 400 を 40% 含む PBS (pH7.4) を 100 μ L 採取し等量のレセプター液をレシーバー側に加えることで体積を一定に維持した。得られたサンプルは Oasis[®] HLB 3 cc Extraction Cartridges (Waters, Milford, MA, USA) を用いて固層抽出を実施した。Milli-Q 2 mL および methanol 2 mL を用いてカートリッジの pre-conditioning を行いサンプル溶液 100 μ L を load した。その後、0.1% formic acid 1mL および methanol 2 mL を用いて目的物質を固定層から溶離した。得られた溶出液を 50°C で窒素乾固した後、残渣を IS である trifluoperazine (500 ng/mL) を含む 50% methanol 溶液で溶解し、UPLC/ESI-MS システムを用いて 2-2-4 に従い分析および定量した。膜表面の形態観察は、サンプルを炭素両面テープを使用してアルミニウムサンプルホルダーに固定し、VE-7800 (株式会社キーエンス, 大阪) により白金コーティングした後に Miniscope[®] TM3030 (株式会社日立ハイテクサイエンス, 東京) を用いて行った。

2-2-3-2. *In vitro* 膜透過性試験

Franz 型拡散セル (レシーバー液量: 12 mL, 有効表面積: 1.77 cm²) を用いた *in vitro* 膜透過性試験を実施した。Propylene glycol 400 を 40% 含む PBS (pH7.4) をレセプター液として用いた。レセプター液は試験中 32°C に保った。被験物質濃度がそれぞれ 1 mg/mL となるよう propylene glycol に溶解した混合溶液を調製後、フランツ型拡散セルに装着した単層および二層膜モデルに全被験物質を含む混合溶液を適用して透過性試験を開始した。試験開始からラット摘出皮膚を用いた場合は 0, 0.5,

8, 12, 18 および 24 h 経過後, 人工膜を用いた場合は 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 および 8 h 経過後にレセプター溶液 100 μ L を採取し等量の 40% propylene glycol を含む PBS をレシーバー側に加えることで体積を一定に維持した. 以下のサンプル処理および定量は 2-3-3-1 と同様の方法で実施した.

2-2-4. UPLC/ESI-MS 分析

UPLC/ESI-MS システムは 1-2-4 と同様の装置を用いた. IS および各被験物質は 0.1% formic acid 含有 Milli-Q 水 (A) と methanol (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 2.59 min (ACD), 3.43 min (FSM), 4.28 min (HCP), 3.55 min (MOP), 2.51 min (NFX), 2.72 min (PMZ) および 4.08 min (trifluoperazine) であった. グラジエントコンディションは, 0–1.0 min, 15% (B); 1.0–4.5 min, 15–95% (B)とし, 流速は 0.25 mL/min とした. MS による検出においては化合物の $[M+H]^+$ 特異的 m/z (180.2, ACD; 353.1, FSM; 408.4, HCP; 217.2, MOP; 320.0, NFX; 285.4, PMZ および 408.3, trifluoperazine) を用いた.

Table 6 Conditions of UPLC/ESI-MS analysis

Column	Acquity UPLC™ BEH C18 (Waters) (particle size: 1.7 μm, column size: φ2.1×50 mm)												
Column temperature	40°C												
Mobile phase	Solution A: Milli-Q containing 0.1% formic acid Solution B: Methanol Construct a gradient program as follow: <table border="1" data-bbox="619 504 1315 698"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>% Solution A</th> <th>% Solution B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Initial</td> <td>85</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>1.0</td> <td>85</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>4.5</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> </tbody> </table>	Time (min)	% Solution A	% Solution B	Initial	85	15	1.0	85	15	4.5	5	95
Time (min)	% Solution A	% Solution B											
Initial	85	15											
1.0	85	15											
4.5	5	95											
Flow rate	0.25 mL/min												
Cone voltage	20 V												
Detection	Selected ion recording (SIR) for specific <i>m/z</i> ACD: 180.2 [M+H] ⁺ FSM: 353.1 [M+H] ⁺ HCP: 408.4 [M+H] ⁺ MOP: 217.2 [M+H] ⁺ NFX: 320.0 [M+H] ⁺ PMZ: 285.4 [M+H] ⁺ Trifluoperazine: 408.3 [M+H] ⁺												
Injection volume	5 μL												
Sample temperature	15°C												
Retention time	ACD: 2.59 min FSM: 3.43min HCP: 4.28 min MOP: 3.55 min NFX: 2.51 min PMZ: 2.72 min Trifluoperazine: 4.08 min												

2-2-5. 膜滞留性予測

1-2-5 と同様の方法で実施した.

2-2-6. *In vivo* 薬物動態試験

全被験物質の濃度がそれぞれ 1 mg/mL となるよう propylene glycol に溶解した混合溶液を調製した. ラットに isoflurane 吸入麻酔し, あらかじめ剃毛した腹部へ混合溶液 100 μ L を染み込ませた濾紙 (2.0 cm \times 2.0 cm) を用いて塗布した. 経皮適用から 2, 4, 6, 8, 12 および 24 h 後, isoflurane 吸入麻酔下で大動脈からの脱血および氷冷生理食塩水 60 mL による還流を行い, 投与部位の皮膚を採取した. 採取した皮膚表面に残存した投与液は精製水を用いてふき取り, 摘出皮膚の皮下組織を取り除くことで角質層, 表皮および真皮を採取した. 採取した皮膚サンプルはハサミによりミンス後, acetonitrile 4 mL 中で Physcotron (Microtech, 千葉, 日本) を用いてホモジナイズした. ホモジナイズしたサンプルは各 10 min 間振盪および超音波処理した後に, 遠心分離 (1,300 g, 10 min) したサンプルの上清をガラスチューブに採取した. 本抽出操作を 2 回行い, 得られた上清を 40°C で窒素乾固し皮膚中濃度測定までの間保存した. 窒素乾固で得た残渣を IS である trifluoperazine (500 ng/mL) を含む 50% methanol 溶液で溶解し, UPLC/ESI-MS システムを用いて 2-2-4 に従い各被験物質の分析および定量を実施した.

2-2-7. UV-VIS 吸収スペクトル測定

1-2-6 と同様の方法で実施した.

2-2-8. ROS assay

1-2-7 と同様の方法で実施した.

2-2-9. *In vivo* 光毒性試験

各被験物質を 100 mg/mL となるよう DMSO に溶解した. ラットに isoflurane 吸入麻酔し, あらかじめ剃毛した腹部へ被験物質の DMSO 溶液 100 μ L を染み込ませた濾紙 (2.0 cm \times 2.0 cm) にて塗布した. 塗布時間は *in vivo* 薬物動態評価の結果に基づき, 経皮適用した各被験物質が最高血中濃度に達する時間までとし, そ

の後塗布した DMSO 溶液を除去した。以下は 1-2-8 と同様の方法で実施した。

2-2-10. データ解析

1-2-9 と同様の方法で実施した。

2-3. 結果

2-3-1. 人工膜に対する被験物質の滞留性評価

2-3-1-1. 単層膜モデル作製法の最適化

In vitro 皮膚透過性試験を用いた皮膚中濃度予測法は、対象となる膜の二層膜および単層膜の両モデルに対する化合物の透過性を評価する必要がある。ヒト皮膚を模倣した Strat-M[®] を二層膜モデルとして選択した。Strat-M[®] を有機溶媒で処理することで角質層模倣部位を除去した膜を単層膜モデルとして用いるため、単層膜モデル作製方法の最適化を行った。Butanol, ethanol, methanol および isopropyl alcohol をそれぞれ適用した Strat-M[®] に対する ACD の膜透過性を評価したところ、全有機溶媒で処置した膜に適用後のレセプター溶液中 ACD 量は無処置の Strat-M[®] を用いた場合と比し高値であった (Fig. 11A)。特に, methanol 処置した膜に対する ACD の透過性が最も高かったため、単層膜モデル作製に用いる有機溶媒は methanol とした。Strat-M[®] を 10, 20, 30, 40, 60 および 120 min の間 methanol で処置した膜に対して ACD を適用後のレセプター溶液中濃度を経時的にモニタリングしたところ、30 min 処置した膜に対する透過性が最も高かった (Fig. 11B)。無処置および methanol を 30 min 処置した Strat-M[®] を電子顕微鏡にて観察したところ、角質模倣部位が除去できた可能性を示した (Fig. 12)。

Strat-M[®] は主に polyether sulfone および polyolefin から構成されており、有機溶媒で処置することで構成成分が溶解することが知られている [61]。2 種のポリマーのうち、角質層模倣部位は polyether sulfone が豊富に存在しており、polyether sulfone はプロトン性有機溶媒に易溶である。したがって、プロトン性有機溶媒処置により Strat-M[®] 表面の polyether sulfone の除去を試みた。その結果、methanol 処置膜に対する ACD の透過性が高かった。物質間の相溶性を示す値として SP があり、この値が類似すると相溶性が高いと判断できる。本検討で用いた有機溶媒の SP 値は 14.5 (methanol), 12.7 (ethanol), 11.4 (butanol) および 8.8 MPa^{1/2} (isopropyl alcohol) であり、polyether sulfone の SP 値は 17.4 MPa^{1/2} であった。つまり、polyether sulfone と最も SP 値が類似した methanol で処置した際に最も Strat-M[®] 表面が溶解し、ACD の膜透過量が最も高値となった可能性を示唆した。Methanol の適用時間について、30

min 適用した際に最も ACD の透過量が高かった。つまり、30 min より短時間では polyether sulfone の溶解が不十分であり、一方で 30 min 以上に適用時間を設定した際には methanol が静置中に気化し、液量の減少が polyether sulfone の析出が起こり 30 min 間静置時と比較し ACD の透過性が低値を示したと考える。以上より、methanol を 30 min 間処置した Strat-M[®] を単層膜モデルとして用いた。

今回作製した単層膜モデルの膜透過性評価に対する妥当性を精査すべく、6 種被験物質の透過性における再現性を評価した。全被験物質の P_{OLM} は P_{TLM} と比較し高値を示した (Fig. 13)。その時の変動係数 (coefficient of variation; CV) は P_{TLM} が 18.6%–43.1% であり、 P_{OLM} が 23.5%–38.1% であった。つまり、今回作製した単層膜モデルを *in vitro* 皮膚透過性試験を用いて化合物の膜透過性を評価した場合、二層膜モデルとして用いた Strat-M[®] と同程度の変動が起きる可能性を示した。

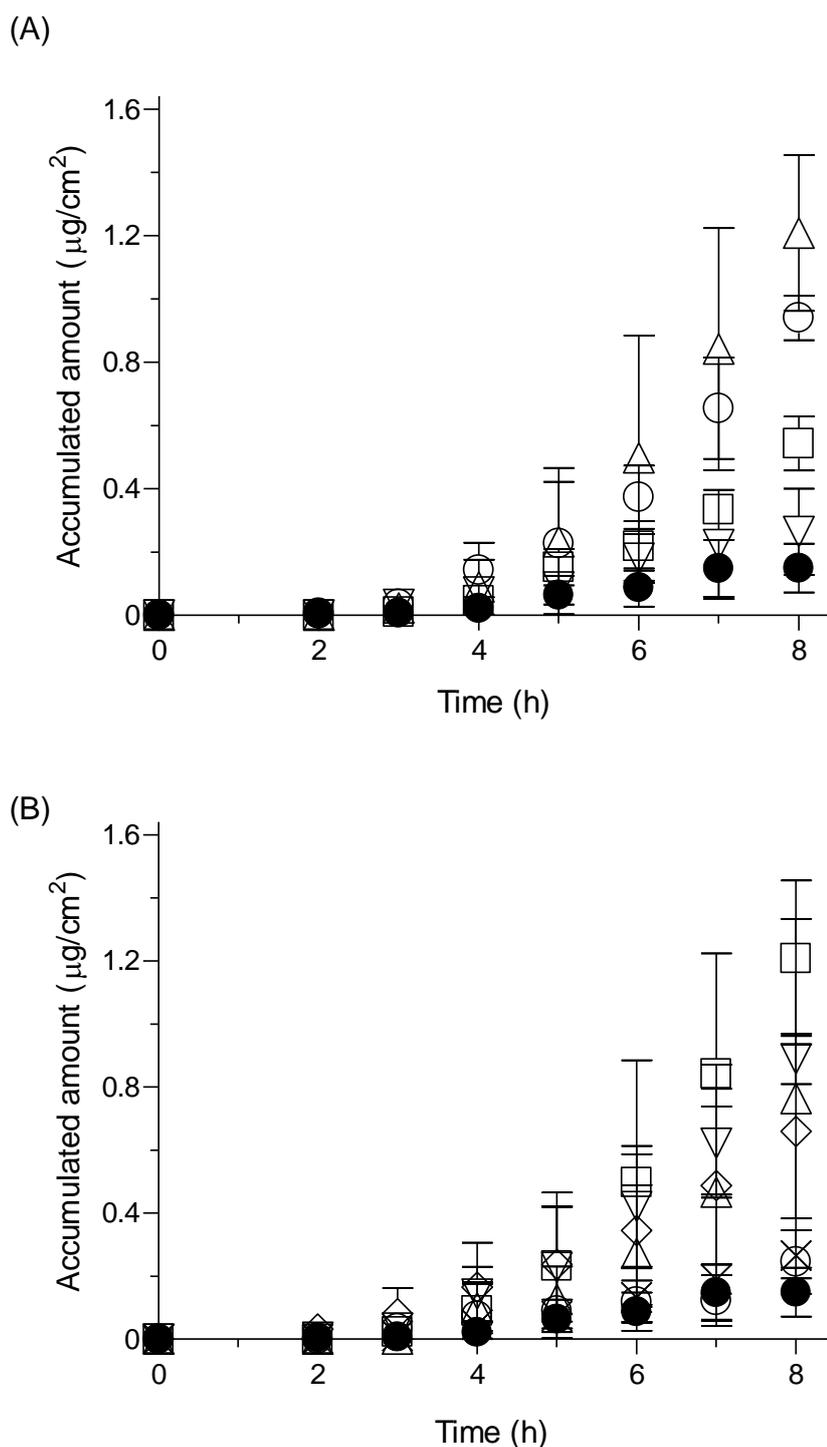
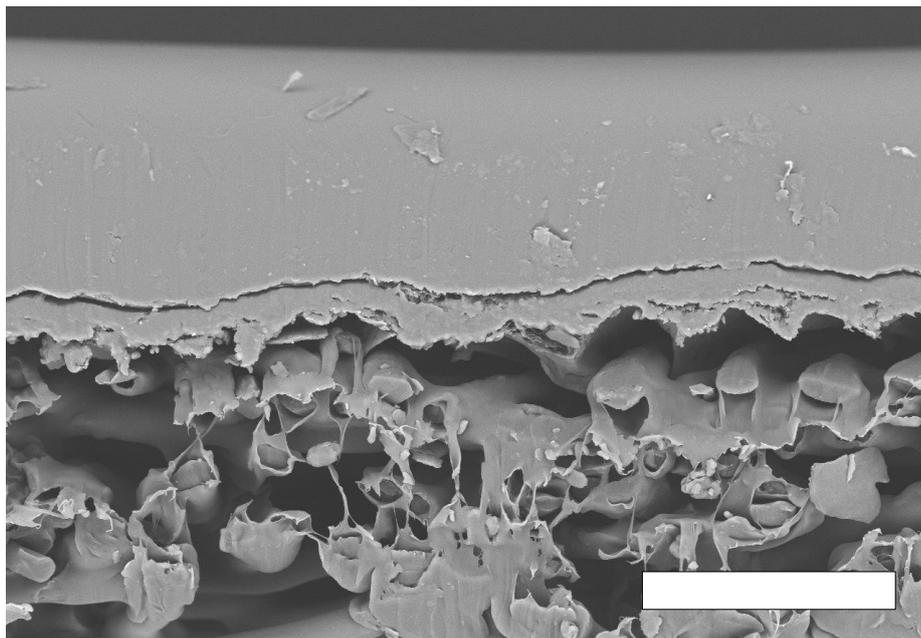


Fig. 11 Optimization of preparation method for one-layered membrane model. (A) Accumulated amount of ACD permeating through ●, Strat-M®; ○, ethanol-treated Strat-M®; △, methanol-treated Strat-M®; □, butanol-treated Strat-M®; and ▽, isopropyl alcohol-treated Strat-M®. (B) Accumulated amount of ACD permeating through methanol-treated Strat-M®. Incubation time was set for ●, 0 min; ○, 10 min; △, 20 min; □, 30 min; and ▽, 40 min; ◇, 60 min; and ×, 120 min. Data represent mean±S.E. for 4–6 experiments.

(A)



(B)

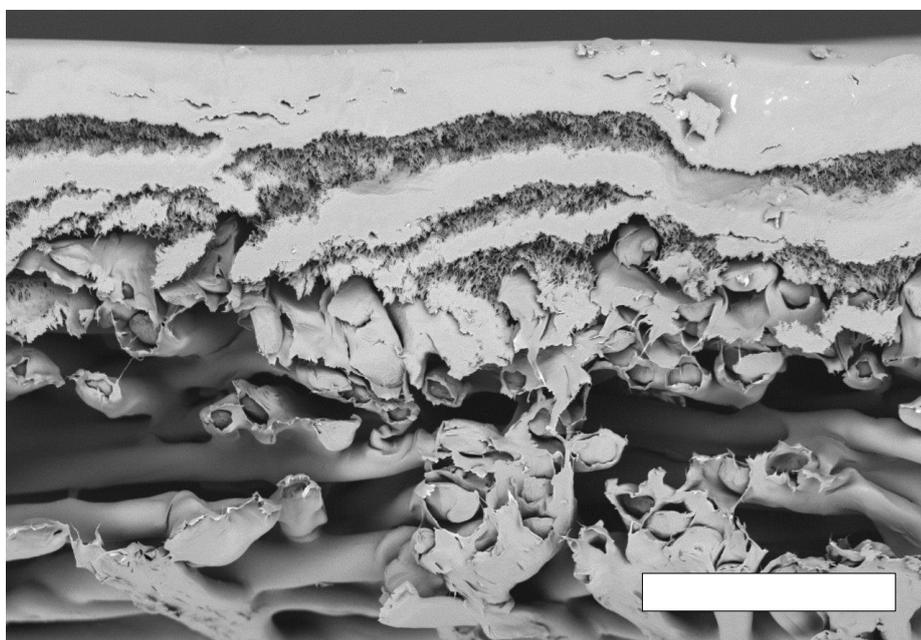


Fig. 12 SEM images of (A) Strat-M[®] and (B) methanol-treated Strat-M[®]. White bars represent 100 μm .

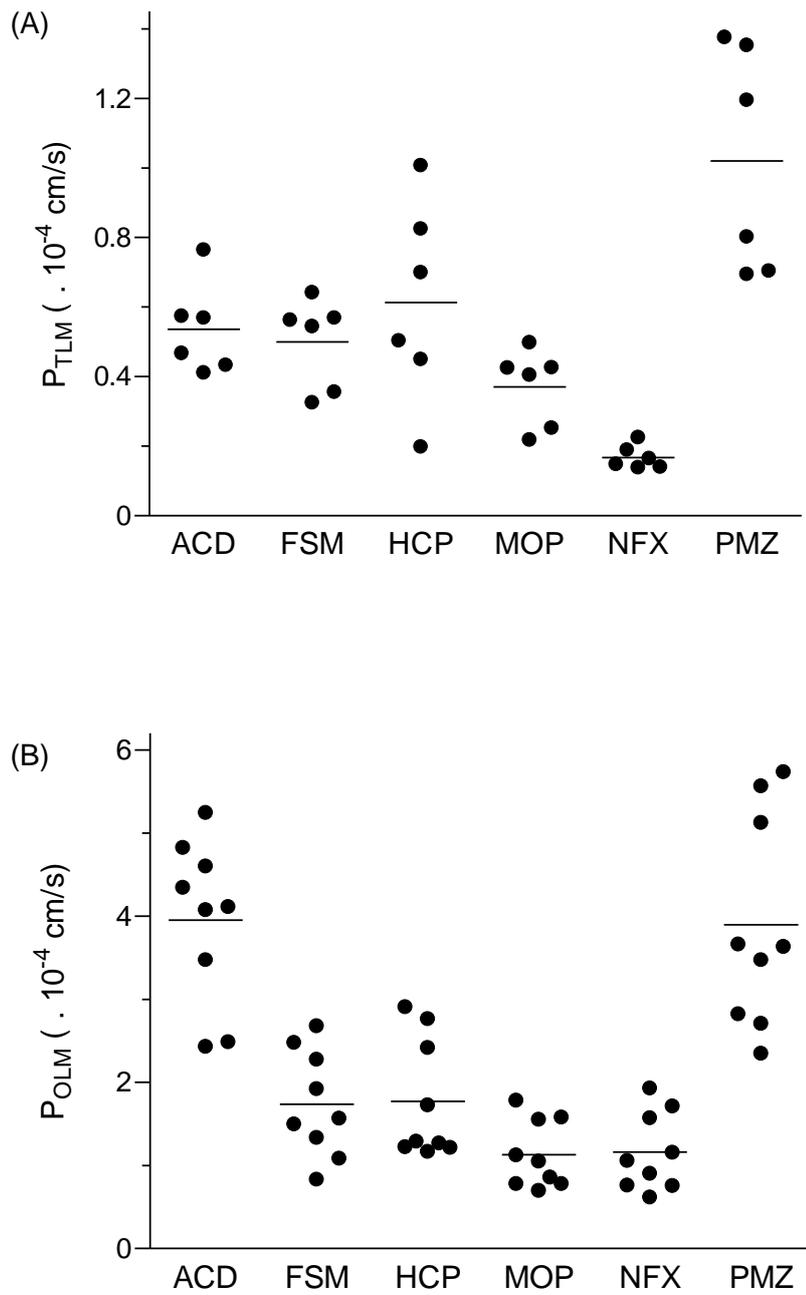


Fig. 13 Reproducibility of membrane permeability of test compounds permeating (A) Strat-M[®] and (B) methanol-treated Strat-M[®] for 30 min. Data represent mean value for 6-9 experiments.

2-3-1-1. 膜透過性評価

Strat-M[®] を二層膜モデル, 30 min の間 methanol 処置した Strat-M[®] を単層膜モデルとして用い, レセプター液中に到達した被験物質量を経時的に測定することにより各被験物質のそれぞれの膜に対する透過性を評価した (Fig. 14). 本試験では, Strat-M[®] の薄さを鑑みて試験開始から 8 h で膜透過速度定常状態に達すると考えた. 全被験物質の透過量について, 単層膜モデルの方が二層膜モデルと比較して高かった. 二層膜および単層膜モデルのどちらにおいてもレセプター液中 PMZ 量は全被験物質中最も高く, 試験開始 8 h 後における値はそれぞれ 0.4 および 1.3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった. 被験物質の累積量プロファイルに基づき, P_{TLM} は 5.0×10^{-5} (ACD), 5.0×10^{-5} (FSM), 6.0×10^{-5} (HCP), 4.0×10^{-5} (MOP), 2.0×10^{-5} (NFX) および 1.0×10^{-4} (PMZ) cm/s であり, P_{OLM} は 4.0×10^{-4} (ACD), 1.7×10^{-4} (FSM), 1.8×10^{-4} (HCP), 1.1×10^{-4} (MOP), 1.2×10^{-4} (NFX) および 3.9×10^{-4} (PMZ) cm/s であった (Table 7). 全被験物質の P_{OLM} は P_{TLM} と比較して高く, その差は 2.9 から 7.4 倍であった. 二層膜モデルに対する透過性は $\text{Clog } P$ 値が -0.78 と被験物質中で唯一負の値を持つ NFX が最も低かった. HCP および PMZ の $\text{Clog } P$ 値はそれぞれ 7.0 および 4.6 であり, $\text{Clog } P$ を基準とした脂溶性は HCP が最も高い一方で, PMZ の P_{TLM} は HCP より高く全被験物質中最も高値であった. この結果は, 至適な脂溶性を持つ化合物が良好な膜透過性を有する可能性を示した.

Table 7 Parameters for membrane permeation of test compounds

	ACD	FSM	HCP	MOP	NFX	PMZ
$P_{\text{TLM}} (\times 10^{-5} \text{ cm/s})$	5.4	5.0	6.1	3.7	1.7	10
$P_{\text{OLM}} (\times 10^{-5} \text{ cm/s})$	40	17	18	11	12	39

P_{TLM} , permeability coefficient through two-layered membrane model and P_{OLM} , permeability coefficient through one-layered membrane model

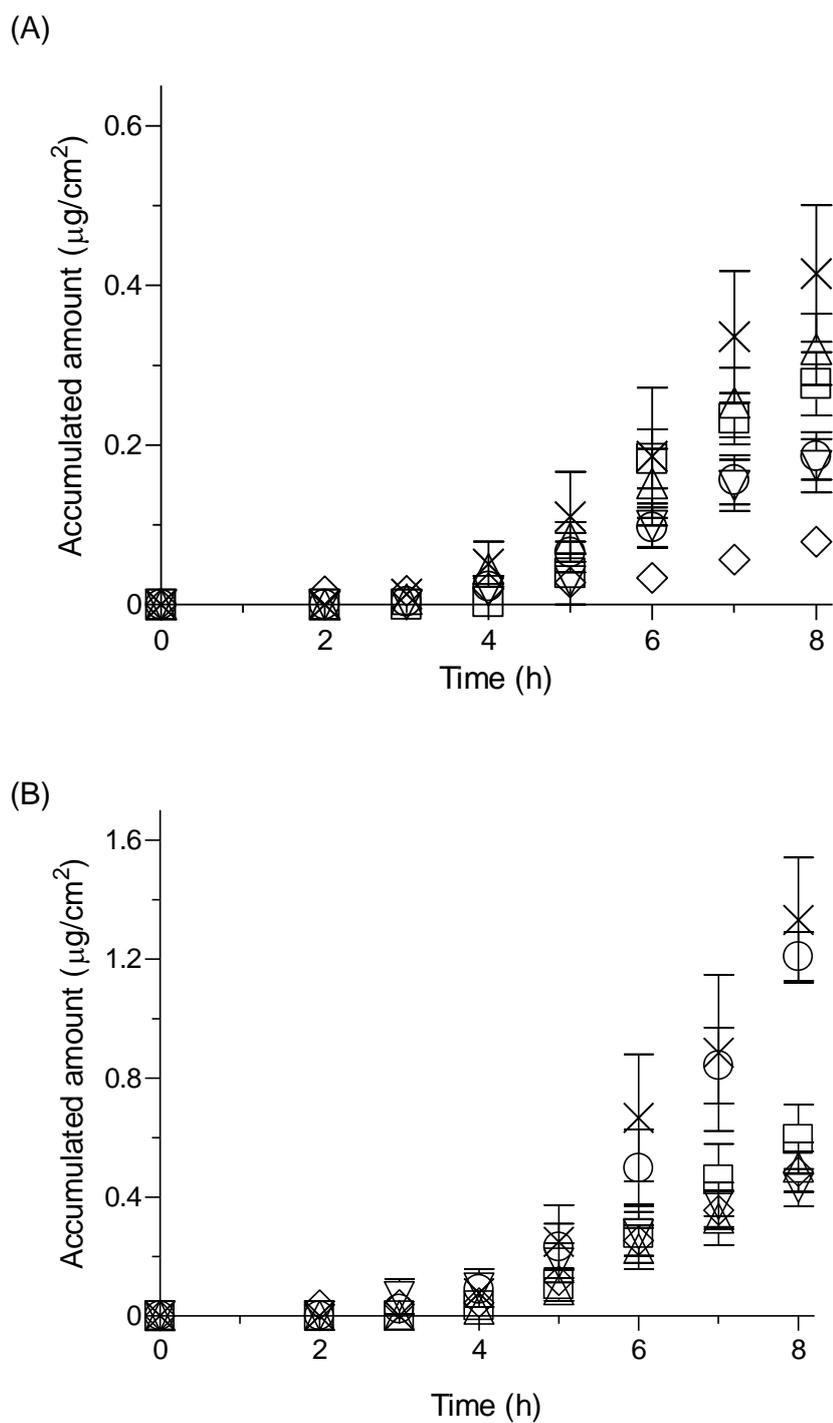


Fig. 14 *In vitro* membrane permeability of test compounds. Accumulated amount of test compounds that permeated through (A) two-layered membrane model and (B) one-layered membrane model. ○, ACD; △, FSM; □, HCP; ▽, MOP; ◇, NFX; and ×, PMZ. Data represent mean±S.E. for 6–9 experiments.

2-3-1-2. 膜滞留性予測

第 1 章では, QNLs のラット摘出皮膚中の C_{ss} を基準とした *in vitro* 皮膚蓄積性を光安全性評価に取り入れることで, より精度の高い光毒性リスク予測が可能であることを示した. 本章では, 動物実験代替法による統合的光安全性評価を指向し, ラット摘出皮膚ではなく人工膜中 C_{ss} を算出した. 皮膚透過性パラメーターを基に被験物質の人工膜における 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 23.4, 19.6, 20.5, 9.4, 5.9 および 38.1 $\mu\text{g/mL}$ であり (Fig. 15), 人工膜を用いた場合の *in vitro* 皮膚滞留性は以下の順であった.

In vitro skin deposition: PMZ > ACD > HCP > FSM > MOP > NFX

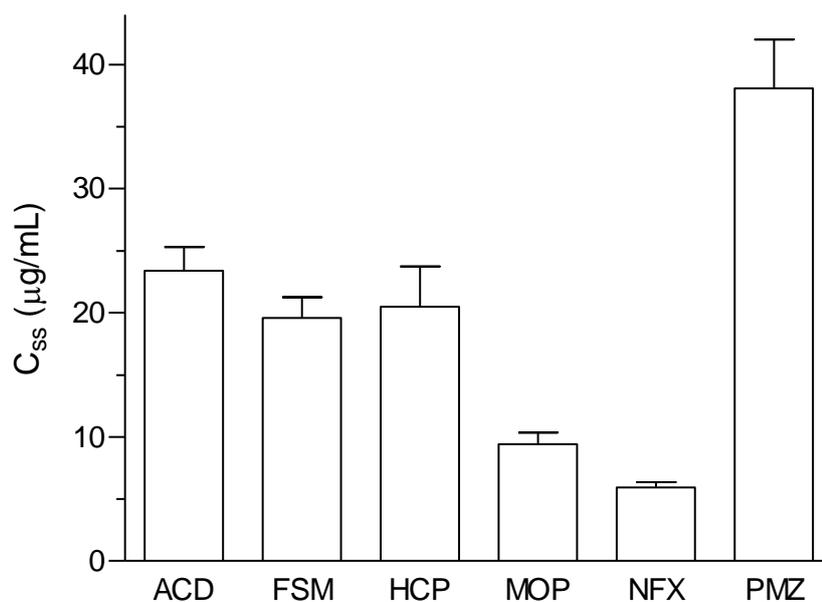


Fig. 15 C_{ss} values of test compounds in the Strat-M[®]. Data represent the mean \pm S.E. of 6–9 experiments.

2-3-2. ラット摘出皮膚に対する被験物質の滞留性評価

2-3-2-1. 皮膚透過性評価

被験物質の皮膚透過速度が一定時における皮膚中濃度を算出すべく、単層および二層膜モデルに対する各被験物質の皮膚透過性を評価した。二層膜モデルとして無処置のラット摘出皮膚を用い、テープストリッピングを 20 回実施したラット摘出皮膚を単層膜モデルとして使用した。全被験物質を含む投与液を各膜に適用後、経時的にレセプター溶液中の各被験物質濃度をモニタリングした結果、MOP は二層および単層膜モデルの両方で最も高い累積量を示した (Fig. 16)。一方で、NFX の透過量は両膜モデル群で全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_{TLM} 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_{OLM} 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 8)。 P_{TLM} は、分子量が最も小さい ACD が全被験物質中最も高く、分子サイズの大きさが皮膚透過性に影響を与える可能性を示したものの、分子量と皮膚透過性は完全に対応したものではなかった。 $Clog P$ が最も低値である NFX の P_{TLM} は 6 種被験物質中で最も低いことから、脂溶性の低さと皮膚透過性の低さは比較的対応した傾向を認めた。一方で、 $Clog P$ 値が 7.0 および 4.6 である HCP と PMZ の P_{TLM} はそれぞれ 9.3×10^{-5} および 1.0×10^{-4} cm/s と同等であり、脂溶性と皮膚透過性の間に正の相関は認めなかった。

Table 8 Parameters for skin permeation of test compounds

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

P_{TLM} , permeability coefficient through two-layered membrane model and P_{OLM} , permeability coefficient through one-layered membrane model

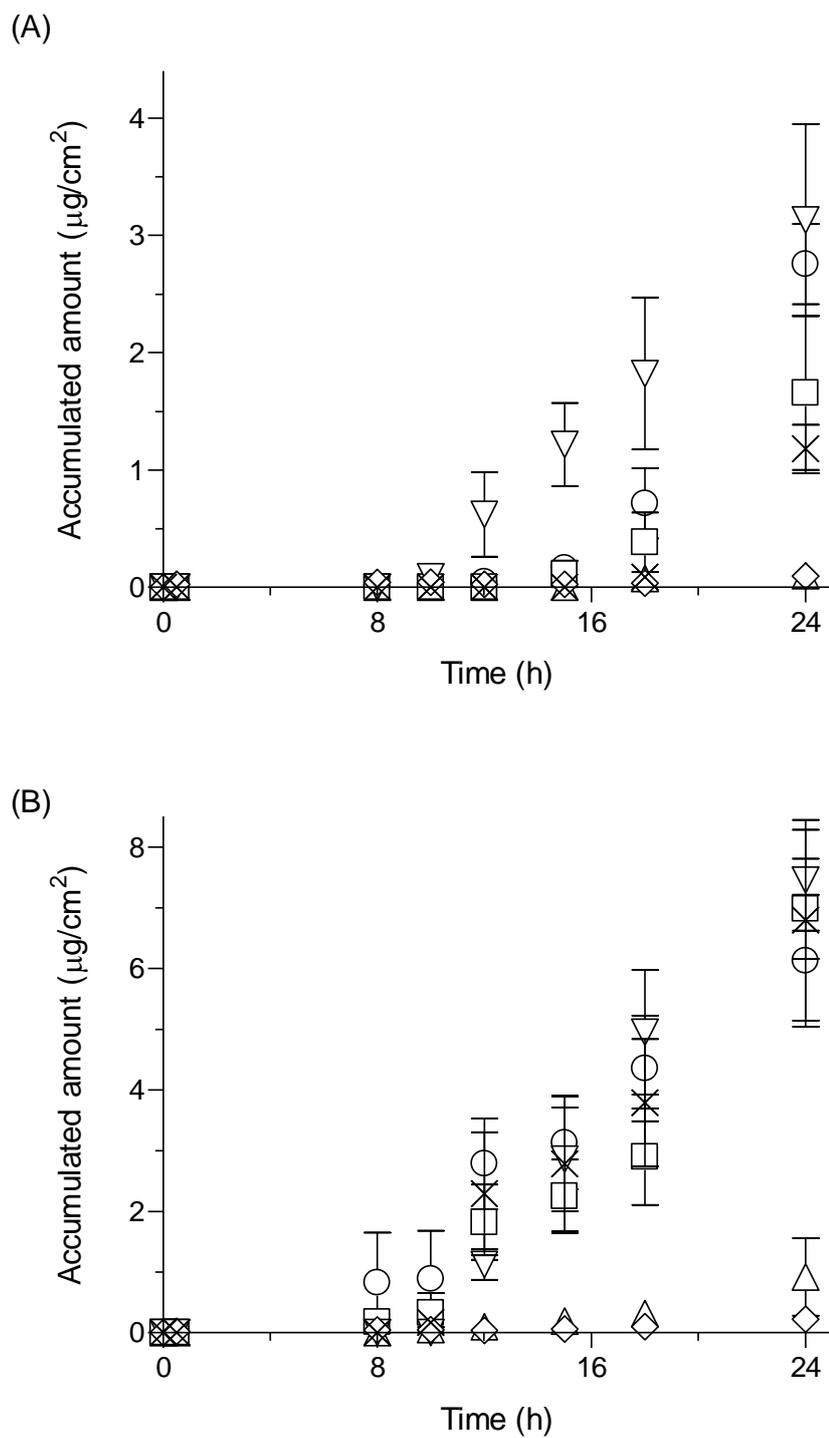


Fig. 16 *In vitro* skin permeability of test compounds. Accumulated amount of test compounds that permeated through (A) TLM and (B) OLM. ○, ACD; △, FSM; □, HCP; ▽, MOP; ◇, NFX; and ×, PMZ. Data represent mean±S.E. for 4–6 experiments.

2-3-2-2. 皮膚滞留性予測

本検討では、人工膜を用いた *in vitro* 皮膚透過性試験のより得られたデータを基に算出した C_{ss} の光安全性評価に対する適用可能性を検証することを目的とした。しかしながら、人工膜のみを用いて C_{ss} を算出した例はなく、得られた C_{ss} の妥当性が不明である。したがって、既に知見のあるラット摘出皮膚中の C_{ss} を比較として算出した。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. 17)。したがって、ラット皮膚を用いた場合の *in vitro* 皮膚滞留性は以下の順であった。

In vitro skin deposition: ACD > PMZ > HCP > MOP > NFX > FSM

FSM を除く全被験物質のラット摘出皮膚中 C_{ss} は人工膜を用いた場合と比較して高値を示したものの、*in vitro* 皮膚滞留性の順は比較的対応した。したがって、Strat-M[®] およびラット摘出皮膚のどちらを用いた場合においても *in vitro* 皮膚滞留性の評価は可能であることを示した。

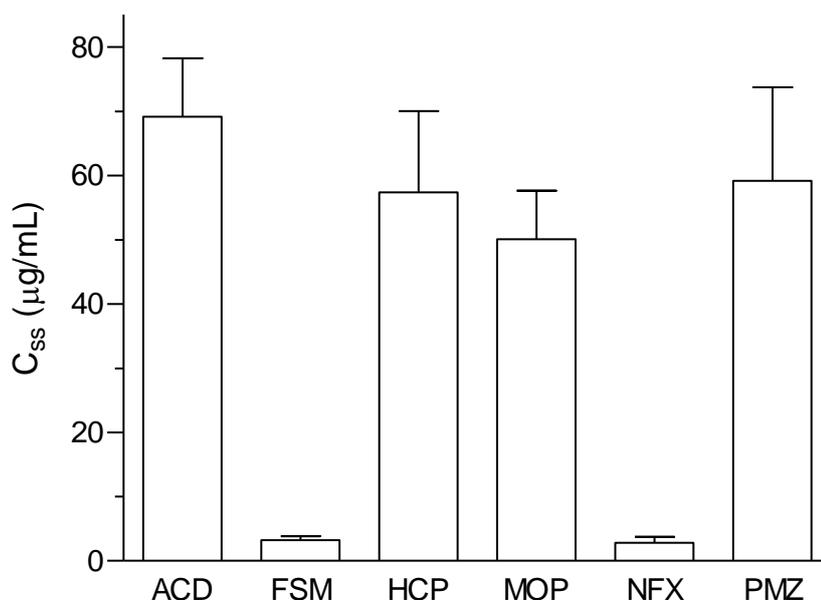


Fig. 17 C_{ss} values of test compounds in the intact rat skin. Data represent the mean \pm S.E. of 4–6 experiments.

2-3-3. *In vivo* 皮膚内動態評価

被験物質の *in vivo* 皮膚滞留性を評価すべく、ラット腹部に全被験物質を含む propylene glycol 溶液を経皮適用後の各被験物質の経時的な皮膚内濃度をモニタリングした (Fig. 18). また、得られた皮膚内濃度-時間曲線から薬物動態学的パラメーターを算出した (Table 9). 6 種の被験物質はラット腹部に共投与から 4 もしくは 6 h 後に最高皮膚中濃度 (maximum concentration in the skin; C_{max}) を示し、特に HCP の C_{max} 値が $23.8 \mu\text{g/g skin}$ と全被験物質中最も高かった. 一方で、FSM および NFX の C_{max} はそれぞれ 4.4 および $5.9 \mu\text{g/g skin}$ と低値であった. 皮膚内での平均滞留時間 (mean residence time; MRT) を算出したところ、FSM が 10.0 h と他の 5 種被験物質と比し高値を示した. 光毒性発現には、経皮適用化合物の一時的な皮膚曝露だけでなく皮膚中に滞留する時間も重要なファクターとなる. つまり、一時的な曝露を示す C_{max} および滞留時間を示す MRT の両パラメーターを考慮した *in vivo* 皮膚滞留性に基づいた *in vivo* 皮膚滞留性は以下の順であった.

In vivo skin deposition: HCP > PMZ > ACD > MOP > FSM > NFX

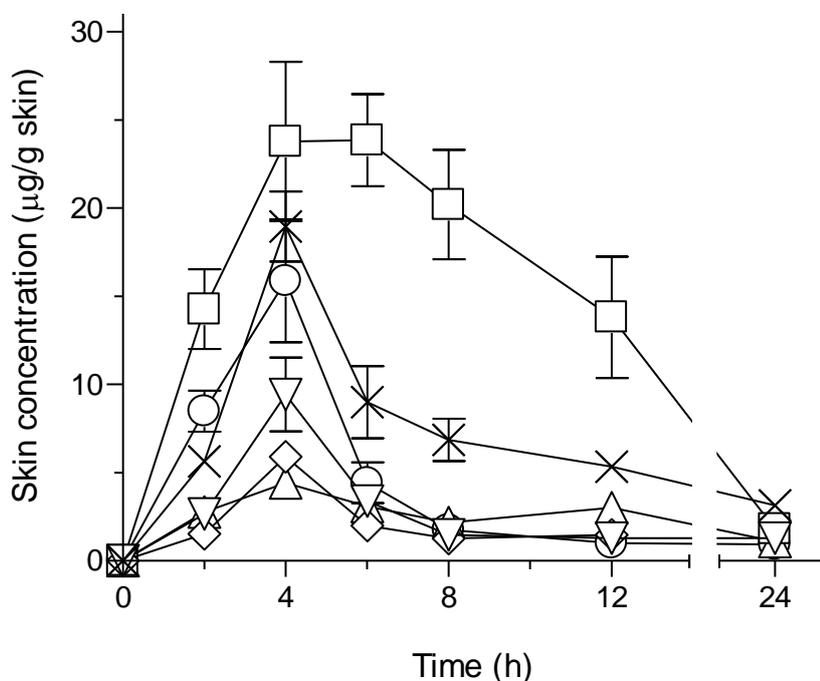


Fig. 18 Skin concentration-time profiles of test compounds after co-application (0.1 mg/site). ○, ACD; △, FSM; □, HCP; ▽, MOP; ◇, NFX; and ×, PMZ. Data represent the mean±S.E. of 4 experiments.

Table 9 Pharmacokinetic parameters after co-application of test compounds in rats

	ACD	FSM	HCP	MOP	NFX	PMZ
T_{\max} (h)	4	4	6	4	4	4
C_{\max} ($\mu\text{g/g skin}$)	15.9 \pm 3.5	4.4 \pm 0.4	23.8 \pm 2.6	10.4 \pm 1.7	5.9 \pm 0.4	19.0 \pm 2.0
MRT (h)	6.4	10.0	8.5	8.8	5.6	9.5

Each value represents the mean \pm S.E. of 4 experiments.

2-3-4. 光化学的特性評価

UV/VIS 吸収スペクトル測定および ROS assay を 6 種被験物質に対して実施することで、それらの光化学的特性を評価した (Fig. 19). 全被験物質は UV 領域に強い吸収を持ち、その範囲で吸収が極大となる波長での MEC 値は 19,500 (ACD), 14,900 (FSM), 11,200 (HCP), 24,900 (MOP), 24,900 (NFX) と 6,600 (PMZ) $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ であった。つまり、6 種類の被験物質は高い光励起性を持つと判断できる。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産生した singlet oxygen および superoxide anion は定められた criteria を超えていた。HCP は singlet oxygen の産生量のみ criteria を超え、その産生量は全被験物質中最も多かった。したがって、6 種の被験物質全てが criteria を超えており、光反応性を持つことが明らかになった。特に、ACD は singlet oxygen および superoxide anion のどちらの産生量も非常に多く、被験物質中で最も高い光反応性を有していた。難水溶性化合物を除き ROS assay は光毒性化合物の陽性検出率が 100% である [58]。本検討で用いた全被験物質は光毒性化合物としての報告があり、以前の報告を裏付ける結果が得られた。

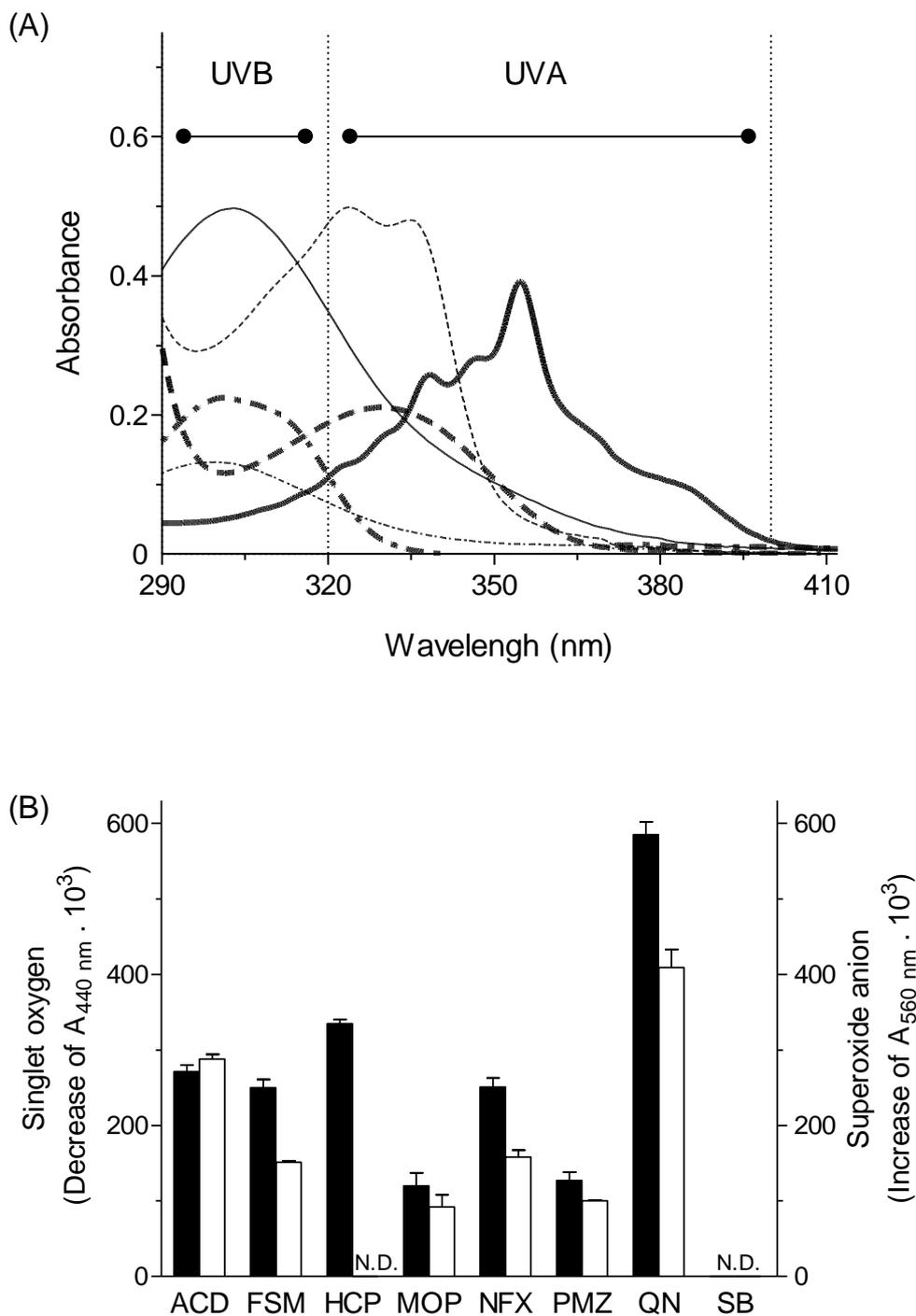


Fig. 19 Photochemical properties of test compounds. (A) UV absorption spectra of test compounds (20 μM) in 20 mM sodium phosphate buffer (pH7.4). Thick solid line, ACD; thick dashed line, FSM; thick dotted line, HCP; thin solid line, MOP; thin dashed line, NFX; and thick dotted line, PMZ. (B) Generation of ROS including singlet oxygen (filled bars) and superoxide (open bars) from test compounds (200 μM) exposed to simulated sunlight (250 W/m^2) for 1 h. Data represent the mean \pm S.D. of 3 experiments. N.D., not detected.

2-3-5. *In vivo* 光毒性評価

提案した光安全性評価系の適用可能性の検証には、本評価系により予測した結果と実際に生体内で起こる光毒性反応との関連性を評価する必要がある。したがって、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。一般に、露光部に分布した光毒性陽性化合物から産生された ROS および光励起された化合物自身的一方もしくは両方が細胞膜障害を引き起こし、発赤や紅斑を主徴とする光刺激反応を呈する [59]。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客観的に評価することで光毒性、特に光刺激性の強さを評価した (Fig. 20)。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。つまり、6 種の被験物質が光毒性反応を誘発した。UVA 照射群では、全 6 種被験物質で色相の変化を示す Δa 値が正の変化を示した。この結果は塗布部の赤みが UVA 照射により増したことを示しており、単回投与により紅斑反応を誘発することを認めた。つまり、全被験物質は光刺激性を有することが明らかとなった。特に、ACD および HCP 投与群の色調変化が他の 4 種被験物質と比較して大きかった。各被験物質における UVA 照射前後の ΔE 値の差を基に、*in vivo* 光毒性の強さは以下の順であった。

Observed phototoxicity: ACD \cong HCP > PMZ > MOP > FSM > NFX

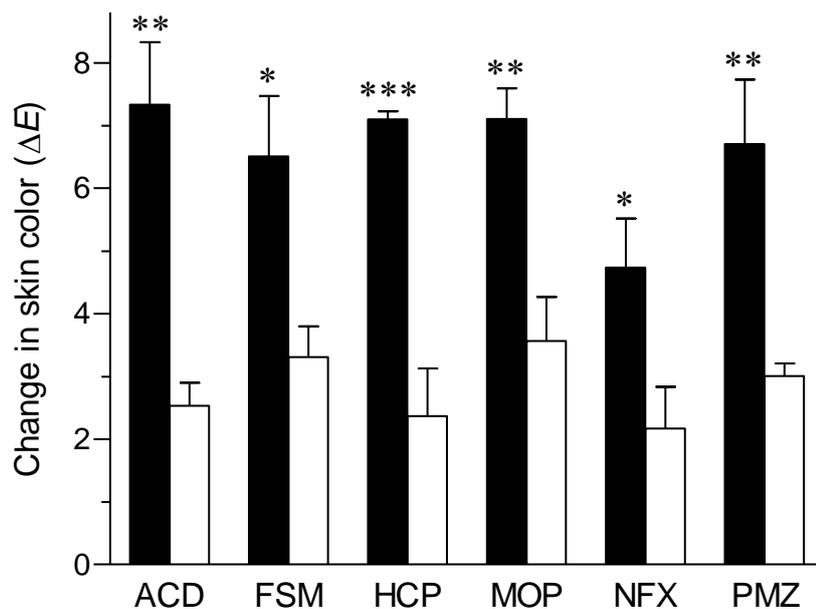


Fig. 20 Colorimetric changes in the rat skin caused by irradiated and non-irradiated test compounds. Filled bars, irradiated group; open bars, non-irradiated group. Data represent the mean±S.E. of 4 experiments. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; and ***, $p < 0.001$ vs. corresponding non-irradiated group.

2-4. 考察

第 1 章では、ROS assay および *in vitro* 皮膚透過性試験により構成された光安全性評価法を提案した。しかしながら、*in vitro* 皮膚透過性試験にラット摘出皮膚を用いており、完全な動物実験代替法には至っていない。本検討では、ラット摘出皮膚を人工膜に代替した光安全性評価系を新たに提案し、その適用可能性を精査した。二層膜モデルとしてヒト皮膚を模倣した Strat-M[®] を選択し、Strat-M[®] の角質層模倣部位を除去した膜を単層膜モデルとした。人工膜を用いて算出した被験物質の C_{ss} はラット摘出皮膚を用いた場合と比較して FSM を除き低値を示した。今回使用した人工膜である Strat-M[®] はヒト皮膚を模倣している [40]。一般的に、皮膚の厚さ、硬さおよび水分量には種差があり、それらを鑑みるとヒト皮膚はラット皮膚と比較して皮膚バリア能が高く、すなわち経皮適用した化合物の皮膚透過性は低値となる [60]。つまり、ヒト皮膚を模倣した Strat-M[®] およびラット皮膚における被験物質の透過性の差が人工膜を用いた場合における C_{ss} の低さに影響を与えた可能性がある。Strat-M[®] における FSM の C_{ss} はラット摘出皮膚の場合と比較して高値を示し、他の被験物質と異なる傾向を示した。水溶性化合物である FSM の皮膚透過は皮膚中の汗腺や毛嚢といった付属器官を介したルートの寄与が大きい [53]。Strat-M[®] はポリマーが密に重なることで膜を形成しているために細孔が存在し、この細孔を介した FSM の透過がラット皮膚の汗腺を介する透過より容易であった可能性がある。分子表面の極性に関する指標である tPSA の値は 26.3 (ACD), 118.7 (FSM), 40.5 (HCP), 44.8 (MOP), 72.9 (NFX) および 6.5 (PMZ) Å² であり、FSM が最も高値であった。したがって、FSM と Strat-M[®] を構成するポリマーが静電相互作用を引き起こし、見かけ上滞留していた可能性がある。*In vitro* 皮膚透過性試験による皮膚滞留性予測は水溶性化合物の C_{ss} を過大評価する傾向にあり、FSM を含む水溶性化合物の C_{ss} 予測は懸念がある。

被験物質の光反応性および皮膚蓄積性を統合的に解析することで光毒性リスクを予測した (Table 10)。本検討では、新たに提案した光安全性評価法として人工膜を用いた *in vitro* 皮膚透過性試験を実施し、統合的光安全性評価に対する適用性が示されているラット摘出皮膚を用いた *in vitro* 皮膚透過性試験と *in vivo* cassette-dosing 薬物動態評価を新規光安全性評価法の適用可能性を検証する目的で行った。したがって、3 種類の皮膚蓄積性に関するデータをそれぞれ光反応性データと統合することで、

Table 10 Integrated data with photoreactivity and skin deposition

	ACD	FSM	HCP	MOP	NFX	PMZ
<i>ROS assay</i> ^{a)}						
$^1\text{O}_2$ ($\Delta A_{440\text{ nm}} \cdot 10^3$)	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: C_{ss} ($\mu\text{g/mL}$)</i>						
Strat-M [®]	23.4	19.6	20.5	9.4	5.9	38.1
Rat skin	69.1	2.8	57.3	50.1	3.2	59.2
<i>In vivo cassette-dosing pharmacokinetic study</i>						
C _{max} ($\mu\text{g/g skin}$)	15.9	4.4	23.8	10.4	5.9	19.0
MRT (h)	6.4	10.0	8.5	8.8	5.6	9.5

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

3 通りの光毒性リスク予測を実施した。ROS assay および人工膜を用いた *in vitro* 皮膚透過性試験より構成された新規光安全性評価系による被験物質の光毒性リスク予測について、ACD および HCP は他の被験物質と比較し高い光反応性を示していた。さらに ACD は C_{ss} の値も高値であり、PMZ に次いで 2 番目であった。したがって、ACD は最も高い光毒性リスクを有すると判断した。高い光反応性を示した HCP は ACD に次ぐ C_{ss} の高さであったことから、ACD に次ぐ光毒性リスクを持つと判断した。ROS assay の結果より、FSM および NFX は中程度、MOP および PMZ は比較的低い光反応性を示した。つまり、光反応性のみで光毒性リスクを予測した場合は FSM および NFX が MOP および PMZ と比較して光毒性リスクが高くなる。一方で C_{ss} を考慮すると、*in vitro* 皮膚滞留性が最も高かった PMZ は FSM より高い光毒性リスクを持つと予測できる。同様に、MOP の C_{ss} は NFX と比し高値であるため、光毒性リスクは MOP の方が高いと判断した。以上より、ROS assay および人工膜を用いた *in vitro* 皮膚透過性試験を用いた光安全性評価の適用により被験物質の光毒性リスクの順を予測した (Table 11)。以前に提案したラット摘出皮膚を用いた光安全性評価系により被験物質の光毒性リスクを予測した場合に FSM の光毒性リスクは被験物質中最も低いと予測したものの、人工膜を用いた統合的光安全性評価により予測した FSM の光毒性リスクは中程度であった。これは、人工膜を用いた *in vitro*

Table 11 Prediction capacity of the proposed photosafety screening system

Predicted phototoxic risk										
Photoreactivity + <i>in vitro</i> skin deposition using artificial membrane										
ACD	>	HCP	>	PMZ	>	FSM	>	MOP	>	NFX
Photoreactivity + <i>in vitro</i> skin deposition using rat skin										
ACD	>	HCP	>	PMZ	>	MOP	>	NFX	≒	FSM
Photoreactivity + <i>in vivo</i> skin deposition										
ACD	>	HCP	>	PMZ	>	MOP	>	NFX	>	FSM
Observed <i>in vivo</i> phototoxicity										
ACD	≒	HCP	>	PMZ	>	MOP	>	FSM	>	NFX

膜透過性試験により評価した皮膚滞留性が他の評価系を用いた場合と比較して高いことに起因する。人工膜の構成成分および細孔の大きさを最適化して水溶性化合物への適用性を高めることで、より精度の高い皮膚滞留性評価が可能であると考え。3通りの光毒性リスク予測の順は比較的良好に対応しており、*in vivo* 試験から *in vitro* 試験に代替しても予測結果に大きく変化はなかった。本検討で新たに提案した動物実験代替法を用いる光安全性評価により予測した被験物質の光毒性リスクは、*in vivo* 光毒性の順と比較的良好な対応を示した。つまり、実験動物を用いない本評価系は実際に生体内で起こる光毒性反応を反映し得る光毒性リスク予測ができる可能性を示した。人工膜を用いた *in vitro* 膜透過性評価および ROS assay に基づく新規光安全性評価法は水溶性化合物に対する評価に懸念があるものの、動物実験を必要としないことから高いスループット性を有している。すなわち、創薬初期における光安全性スクリーニング法として非常に有用であると考え。3Rs の原理に定められている“replacement”の達成に成功した本評価系は、医薬品と同様に光毒性の適切な評価が必要な化粧品開発においても適用が可能である。

総括

外因性光線過敏症は特定の化合物を全身または局所投与後、露光によって生じる皮膚や眼の異常反応である。光毒性反応は医薬品のみならず、化粧品などにより誘発されることが報告されており、医薬品および化粧品開発段階における候補化合物の適切な光毒性リスク予測が望まれている。光毒性発現には化合物の皮膚滞留性および光反応性の関与が知られており、これらの特性を戦略的に統合することで、精度良く光毒性リスクを予測することが可能であることが報告されている。本研究では、動物愛護の推進および評価スループットの向上を指向し、*in vitro* 皮膚透過性試験および ROS assay により構成した新規光安全性評価法の経皮適用化合物の光毒性リスク予測に対する適用可能性を精査した。

第 1 章では、ラット摘出皮膚を用いた統合的光安全性評価系を提案し、ENX, FLM, MFX, NLA, OFX および OXA の QNLs に対して光毒性リスク予測を行った。ラット摘出皮膚に対する QNLs の透過性を基に算出した C_{ss} は FLM および NLA が高く、MFX は中程度であった。一方で ENX, OFX および OXA の C_{ss} は低値であった。全 QNLs は擬似太陽光照射下で有意に ROS を産生し、高い光反応性を示した。特に、ENX および NLA の光反応性が高く、FLM, NLA および OXA は中程度の光反応性を有していた。MFX の光反応性は全 QNLs 中で最も低かった。各 QNL を適用したラット皮膚表面の UV 照射前後における色調変化に基づいた QNLs の *in vivo* 光毒性の強さを評価することで、本評価系の予測性を検証した。*In vitro* 皮膚滞留性および光反応性の統合的解析により QNLs の光毒性リスクおよび実際に観察された光毒性はそれぞれ以下の順であった。

Predicted phototoxic risk: NLA > FLM > OFX > ENX > OXA > MFX

Observed phototoxicity: FLM > NLA > ENX \approx OFX > OXA > MFX

すなわち、本評価系により予測した QNLs の光毒性リスクは *in vivo* 光毒性の強さと比較的良好に対応した。したがって、ラット摘出皮膚を用いた *in vitro* 皮膚透過性試験および ROS assay を用いることで“reduction”を達成した本光安全性評価系は経皮適用化合物の光毒性リスクを精度よく予測が可能であり、医薬品開発初期における光安全性スクリーニング法として有用であろう。

第 2 章では、完全な動物実験代替法としての光安全性評価系を開発すべく、

ラット摘出皮膚を人工膜に代替した *in vitro* 膜透過性試験および ROS assay による光安全性評価系を構築した。新たに提案した光安全性評価法を用いて被験物質である ACD, FSM, HCP, MOP, NFX および PMZ の光毒性リスクを予測し、本評価系の適用可能性を精査した。Strat-M[®] に対する各被験物質の透過性を基に C_{ss} を算出したところ、PMZ が最も高く、次いで ACD, HCP および FSM の順であった。MOP および NFX の C_{ss} は他の被験物質と比較し低かった。ROS assay の結果より、全被験物質は露光時に有意に ROS を産生し、光反応性を有していた。特に ACD および HCP は他の被験物質と比較して高い光反応性を示した。FSM および NFX の光反応性は中程度であり、MOP および PMZ の光反応性は 6 種の被験物質中で低かった。被験物質の *in vitro* 皮膚滞留性および光反応性の統合的な解析により予測した光毒性リスクおよび *in vivo* 光毒性の強さを以下に示す。

Predicted phototoxic risk: ACD > HCP > PMZ > FSM > MOP > NFX

Observed phototoxicity: ACD \approx HCP > PMZ > MOP > FSM > NFX

すなわち、予測した光毒性リスクと *in vivo* 光毒性の順は良い対応を示した。したがって、人工膜を用いた統合的光安全性評価法は精度良く被験物質の光毒性リスク予測ができ、実験動物を用いずとも光安全性評価が可能であることを示唆した。

本研究により得られた知見より、*in vitro* 皮膚透過性試験および ROS assay により構成された光安全性評価系は、被験物質の光毒性リスクを適切に予測できた。3Rs の原理における“replacement”を達成した人工膜を用いる統合的光安全性評価系は医薬品および化粧品開発の場における光毒性リスク予測法として非常に高い有用性を示すことができた。さらに、*in vivo* 試験を伴わない本評価系は評価スループットの大幅な向上にも寄与すると考える。したがって、*in vitro* 皮膚滞留性および光反応性に基づく本光安全性評価系は医薬品および化粧品開発初期段階における経皮適用を指向した候補化合物の光安全性スクリーニング法として有用であろう。将来的に本光安全性評価法が光安全性の高い新規物質の創製に貢献することを期待する。

謝辞

本研究を遂行するに際し、終始懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました静岡県立大学 薬学部 薬剤学分野 尾上 誠良 教授に謹んで感謝の意を表します。

本論文の作成にあたり、御校閲、御助言を賜りました静岡県立大学 薬学部 臨床薬剤学分野 賀川 義之 教授、静岡県立大学 薬学部 創薬探索センター 浅井 章良 教授ならびに静岡県立大学 薬学部 実践薬学分野 並木 徳之 教授に深謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、終始御指導と御鞭撻を賜りました静岡県立大学 薬学部 薬剤学分野 世戸 孝樹 講師および 佐藤 秀行 講師に感謝申し上げます。

本研究の遂行および論文執筆に際し、公私ともに支えてくださった静岡県立大学 薬学部 薬剤学分野諸氏、友人に深く感謝いたします。

最後に、苦しい時も温かく見守ってくださった家族に深く感謝いたします。

2020 年 3 月

猪山 陽輔

参考文献

1. R.S. Dawe, S.H. Ibbotson. Drug-induced photosensitivity. *Dermatol. Clin.*, **32** (3): 363-368 (2014).
2. A. Jablonski. Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes. *Nature*, **131**: 839-840 (1933).
3. C.S. Foote. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem. Photobiol.*, **54** (5): 659 (1991).
4. D.E. Moore. Mechanisms of photosensitization by phototoxic drugs. *Mutat. Res.*, **422** (1): 165-173 (1998).
5. 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).
6. S. Onoue, H. Ohtake, G. Suzuki, Y. Seto, H. Nishida, M. Hirota, T. Ashikaga, H. Kouzuki. Comparative study on prediction performance of photosafety testing tools on photoallergens. *Toxicol. In Vitro*, **33**: 147-152 (2016).
7. 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).
8. J.H. Epstein. Phototoxicity and photoallergy in man. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **8** (2): 141-147 (1983).
9. 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).
10. 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).
11. 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).
12. 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).

13. M.D. Barratt, J.V. Castell, M.A. Miranda, J.J. Langowski. Development of an expert system rulebase for the prospective identification of photoallergens. *J. Photochem. Photobiol. B*, **58** (1): 54-61 (2000).
14. M.D. Barratt. Structure-activity relationships and prediction of the phototoxicity and phototoxic potential of new drugs. *Altern. Lab. Anim.*, **32** (5): 511-524 (2004).
15. M.A. Lampi, J. Gurska, X.D. Huang, D.G. Dixon, B.M. Greenberg. A predictive quantitative structure-activity relationship model for the photoinduced toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to *Daphnia magna* with the use of factors for photosensitization and photomodification. *Environ. Toxicol. Chem.*, **26** (3): 406-415 (2007).
16. 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).
17. S. Onoue, Y. Tsuda. Analytical studies on the prediction of photosensitive/phototoxic potential of pharmaceutical substances. *Pharm. Res.*, **23** (1): 156-164 (2006).
18. S. Onoue, M. Ochi, G. Gandy, Y. Seto, N. Igarashi, Y. Yamauchi, S. Yamada. High-throughput screening system for identifying phototoxic potential of drug candidates based on derivatives of reactive oxygen metabolites. *Pharm. Res.*, **27** (8): 1610-1619 (2010).
19. S. Onoue, M. Kato, S. Yamada. Development of an albuminous reactive oxygen species assay for photosafety evaluation under experimental biomimetic conditions. *J. Appl. Toxicol.*, **34** (2): 158-165 (2014).
20. Y. Seto, H. Ohtake, M. Kato, S. Onoue. Development of fluorometric reactive oxygen species assay for photosafety evaluation. *Toxicol. In Vitro*, **34**: 113-119 (2016).
21. Y. Seto, M. Kato, S. Yamada, S. Onoue. Development of micellar reactive oxygen species assay for photosafety evaluation of poorly water-soluble chemicals. *Toxicol. In Vitro*, **27** (6): 1838-1846 (2013).
22. M. Kato, H. Ohtake, H. Sato, Y. Seto, S. Onoue. Enzymatic reactive oxygen species assay to evaluate phototoxic risk of metabolites. *Toxicol. Lett.*, **278**: 59-65 (2017).
23. S. Epstein. THE PHOTOPATCH TEST; ITS TECHNIQUE, MANIFESTATIONS, AND SIGNIFICANCE. *Ann. Allergy.*, **22**: 1-11 (1964).
24. B. Przybilla, U. Schwab-Przybilla, T. Ruzicka, J. Ring. Phototoxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs demonstrated in vitro by a photo-basophil-histamine-release test. *Photodermatol.*, **4** (2): 73-78 (1987).

25. E. Selvaag. Evaluation of phototoxic properties of oral antidiabetics and diuretics. Photohemolysis model as a screening method for recognizing potential photosensitizing drugs. *Arzneimittelforschung*, **47** (9): 1031-1034 (1997).
26. R.G. Freeman, W. Murtishaw, J.M. Knox. Tissue culture techniques in the study of cell photobiology and phototoxicity. *J. Invest. Dermatol.*, **54** (2): 164-169 (1970).
27. P. Portes, M.J. Pygmalion, E. Popovic, M. Cottin, M. Mariani. Use of human reconstituted epidermis Episkin for assessment of weak phototoxic potential of chemical compounds. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, **18** (2): 96-102 (2002).
28. J.C. Beani, R. Gautron, P. Amblard, F. Bastrenta, L. Harrouch, P. Jardon, J.L. Reymond. Screening for drug photosensitization activity by measuring the variations in oxygen consumption of *Bacillus subtilis*. *Photodermatol.*, **2** (2): 101-106 (1985).
29. S. Brendler-Schwaab, A. Czich, B. Epe, E. Gocke, B. Kaina, L. Muller, D. Pollet, D. Utesch. Photochemical genotoxicity: principles and test methods. Report of a GUM task force. *Mutat. Res.*, **566** (1): 65-91 (2004).
30. S. Onoue, N. Igarashi, F. Kitagawa, K. Otsuka, Y. Tsuda. Capillary electrophoretic studies on the photogenotoxic potential of pharmaceutical substances. *J. Chromatogr. A*, **1188** (1): 50-56 (2008).
31. S. Onoue, Y. Seto, A. Oishi, S. Yamada. Novel methodology for predicting photogenotoxic risk of pharmaceutical substances based on reactive oxygen species (ROS) and DNA-binding assay. *J. Pharm. Sci.*, **98** (10): 3647-3658 (2009).
32. Z. Sarabia, D. Hernandez, J.V. Castell, G.M. van Henegouwen. Photoreactivity of tiaprofenic acid and suprofen using pig skin as an ex vivo model. *J. Photochem. Photobiol. B*, **58** (1): 32-36 (2000).
33. V. Galbiati, V. Martinez, S. Bianchi, M. Mitjans, E. Corsini. Establishment of an in vitro photoallergy test using NCTC2544 cells and IL-18 production. *Toxicol. In Vitro*, **27** (1): 103-110 (2013).
34. P. Ulrich, B. Homey, H.W. Vohr. A modified murine local lymph node assay for the differentiation of contact photoallergy from phototoxicity by analysis of cytokine expression in skin-draining lymph node cells. *Toxicology*, **125** (2-3): 149-168 (1998).
35. A. Toyoda, H. Itagaki. Development of an in vitro photosafety evaluation method utilizing intracellular ROS production in THP-1 cells. *J. Toxicol. Sci.*, **43** (4): 247-256 (2018).
36. K. Tsujita-Inoue, M. Hirota, T. Atobe, T. Ashikaga, Y. Tokura, H. Kouzuki. Development of novel in vitro photosafety assays focused on the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *J.*

Appl. Toxicol., **36** (7): 956-968 (2016).

37. N.H. Patel, P.K. Mishra, R. Nagane, A. Deshpande, I.Y. Tamboli, R. Date. Comparison of in chemico skin sensitization methods and development of an in chemico skin photosensitization assay. *Altex*, **36** (3): 373-387 (2019).

38. OECD. Test No. 428: Skin Absorption: In Vitro Method. (2004).

39. M. Dias, A. Farinha, E. Faustino, J. Hadgraft, J. Pais, C. Toscano. Topical delivery of caffeine from some commercial formulations. *Int. J. Pharm.*, **182** (1): 41-47 (1999).

40. A. Haq, B. Goodyear, D. Ameen, V. Joshi, B. Michniak-Kohn. Strat-M(R) synthetic membrane: Permeability comparison to human cadaver skin. *Int. J. Pharm.*, **547** (1-2): 432-437 (2018).

41. T. Higuchi. PHYSICAL CHEMICAL ANALYSIS OF PERCUTANEOUS ABSORPTION PROCESS FROM CREAMS AND OINTMENTS. *J. Cosmet. Sci.*, **11** (2): 85-97 (1960).

42. 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).

43. T.J. Franz. Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. *J. Invest. Dermatol.*, **64** (3): 190-195 (1975).

44. ROS assay Validation Management Team. REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS) ASSAY TO EXAMINE PHOTOREACTIVITY OF CHEMICALS. (2013).

45. 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).

46. S. Yamamoto, M. Karashima, Y. Arai, K. Tohyama, N. Amano. Prediction of Human Pharmacokinetic Profile After Transdermal Drug Application Using Excised Human Skin. *J Pharm. Sci.*, **106** (9): 2787-2794 (2017).

47. 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).

48. 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).

49. P.H. Lee, R. Conradi, V. Shanmugasundaram. Development of an in silico model for human skin permeation based on a Franz cell skin permeability assay. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*,

20 (1): 69-73 (2010).

50. S. Onoue, K. Kawamura, N. Igarashi, Y. Zhou, M. Fujikawa, H. Yamada, Y. Tsuda, Y. Seto, S. Yamada. Reactive oxygen species assay-based risk assessment of drug-induced phototoxicity: classification criteria and application to drug candidates. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **47** (4-5): 967-972 (2008).

51. T. Nose, K. Tsurumi. Pharmacological studies on cutaneous inflammation induced by ultraviolet irradiation (1): quantification of erythema by reflectance colorimetry and correlation with cutaneous blood flow. *Jpn. J. Pharmacol.*, **62** (3): 245-256 (1993).

52. S.H. Lim, S.M. Kim, Y.W. Lee, K.J. Ahn, Y.B. Choe. Change of biophysical properties of the skin caused by ultraviolet radiation-induced photodamage in Koreans. *Skin Res. Technol.*, **14** (1): 93-102 (2008).

53. 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): 32 (2016).

54. 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).

55. J.M. Domagala. Structure-activity and structure-side-effect relationships for the quinolone antibacterials. *J. Antimicrob. Chemother.*, **33** (4): 685-706 (1994).

56. N. Hayashi, Y. Nakata, A. Yazaki. New findings on the structure-phototoxicity relationship and photostability of fluoroquinolones with various substituents at position 1. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **48** (3): 799-803 (2004).

57. European Community. Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council of 27 February 2003 amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the member states relating to cosmetic products. (2003).

58. 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).

59. S. Ibbotson. Drug and chemical induced photosensitivity from a clinical perspective. *Photochem Photobiol. Sci.*, **17** (12): 1885-1903 (2018).

60. T. Uchida, W.R. Kadhum, S. Kanai, H. Todo, T. Oshizaka, K. Sugibayashi. Prediction of skin permeation by chemical compounds using the artificial membrane, Strat-M. *Eur. J.*

Pharm. Sci., **67**: 113-118 (2015).

61. H. Todo. Transdermal Permeation of Drugs in Various Animal Species. *Pharmaceutics*, **9** (3): 33 (2017).