

光線過敏症リスク予測方法の確立と国際協調活動の戦略的推進

静岡県立大学薬学部薬物動態学分野

尾上 誠良

Photoreactivity and dermal/ocular deposition of compounds have been recognized as key considerations for evaluating the phototoxic risk of compounds. Because some drugs are known to cause phototoxic reactions via generation of potent phototoxic metabolites, photosafety assessments on parent drugs alone may lead to false predictions about their photosafety. This study aimed to establish a new photosafety assessment strategy for evaluating the *in vivo* phototoxic potential of both a parent substance and its metabolites. The *in vivo* phototoxic risk of fenofibrate (FF) and its metabolites, fenofibric acid (FA) and reduced fenofibric acid, were evaluated based on photochemical and pharmacokinetic analyses. FF and FA exhibited intensive UV absorption, with molar extinction coefficient values of 17,000 (290 nm) and 14,000 M⁻¹cm⁻¹ (295 nm), respectively. Superoxide generation from FA was significantly higher than from FF, and a marked increase in superoxide generation from FF was observed after incubation with rat hepatic S9 fractions, suggesting enhanced photoreactivity of FF after metabolism. FA showed high dermal/ocular deposition after oral administration (5 mg/kg, p.o.) although the concentration of FF was negligible, suggesting high exposure risk from FA. On the basis of these findings, FA was deduced to be a major contributor to phototoxicity induced by FF taken orally, and this prediction was in accordance with the results from *in vitro/in vivo* phototoxicity tests. Results from this study suggest that this new screening strategy for parent substances and their metabolites provides reliable photosafety information on drug candidates and would be useful for drug development with wide safety margins.

1. 緒言

薬剤性光線過敏症は特定の薬剤投与後の露光により引き起こされる皮膚および眼の異常反応であるが、近年、オゾン層の破壊によって太陽から地表に到達する紫外線 (UV) 量が増加していることから、本症の懸念が増大している¹⁾。体内に取り込まれた光毒性物質はまず皮膚組織に到達し、薬剤の分子内 chromophore、あるいは代謝によって獲得された chromophore が皮膚深部まで到達した光によって照射されると、基底状態の S₀ から励起一重項状態 S₁ に励起される (Fig. 1A)。励起一重項状態の寿命は極めて短く、すなわち蛍光を発して直ちに基底状態 S₀ に戻るか、項間交差により励起三重項状態 T₁ に遷移する。励起三重項状態にある化合物はりん光を発して基底状態 S₀ に戻る²⁾。基底状態ではまったく化学反応をしない条件でも、高い光エネルギーを獲得した励起分子は、そのエネルギーを駆動力として結合の解裂や生成または組み換えなどの化学反応を起こすことができる^{1,3)}。そのような過程を光化学過程といい、ラジカル反応である Type I 反応と、一重項酸素反応である Type II 反応とに分けられる。酸素分子は励起エネルギーのアクセプターとして機能し、それに伴い

産生された singlet oxygen や superoxide 等の活性酸素種 (Reactive oxygen species ; ROS) による生体内物質の酸化反応が薬剤性光線過敏症の発症原因の一つとして考えられている。これらの光化学反応の標的が細胞膜上の各種生体成分である場合には光刺激性を誘発し、また DNA の酸化あるいは塩基修飾によって光遺伝毒性や光がん原性が発現する (Fig. 1B)。励起された薬物がハプテンとなりタンパク質と光付加物を形成した際には、免疫原性を示すことになり、最終的に光アレルギー反応を惹起するものと考えられる。いずれにせよ、薬剤性光線過敏症の機序を考えると、最も重要なトリガーとなるのは太陽光の吸収、そしてそれに伴う化合物の励起であろう⁴⁾。

多くの場合、薬剤性光線過敏症は薬物本体によって引き起こされるが、一部の薬剤においては代謝物の関与が報告されている。これらのケースにおいては、親薬物も光反応性を有しているため、代謝によって薬物の光感受性が増強されたこと、あるいは生体内、特に露光組織において代謝物の存在比率が高いことに起因するものである。また、現在までのところ 5-aminolevulinic acid を除き、代謝によって新たに chromophore が形成される薬物は報告されておらず、親薬物が光反応性を有していなければ、その代謝物も光反応性を有していないと考える⁵⁾。一方で、親薬物が光反応性を有している場合には、代謝による光化学的反応性の増強が生じる可能性を否定できず、親薬物だけに着目していると *in vivo* における光毒性リスクを見誤る可能性があると考えられる。実際に我々は、薬物本体のみの光化学的および薬物動態学的特性に着目して光安全性評価を行った結果、代謝物が光毒性に寄与することが知られているクロル



Development of photosafety testing strategy and its strategic harmonization
Satomi Onoue

Department of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka

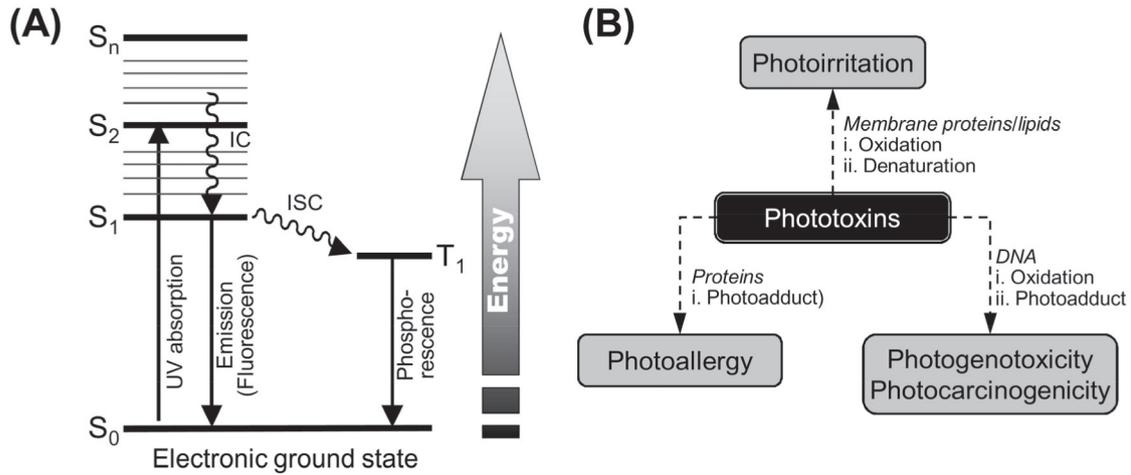


Fig. 1 Possible mechanisms for drug-induced phototoxicity.

(A) Jablonski diagram. S: singlet state; T: triplet state; IC: internal conversion; and ISC: intersystem crossing. Each line among singlet states indicates the excited vibrational states, and excited rotational states were not shown. (B) Several phototoxic responses caused by photo-activated drugs.

プロマジンにおいて予測の過誤を生じた。従って、親薬物が光反応性を有している限り、創薬において代謝物の光安全性評価も実施するべきであると考え、一方で ICH S10 では代謝物に関する評価の必要性について述べられていない。さて、Fenofibrate (FF) は経口高脂血症治療薬として汎用されている薬物であり、その副作用として光線過敏症が報告されている。FF の光毒性においてはその代謝物や光分解物が関与する可能性が報告されているが、*in vivo* におけるそれらの寄与は明らかとなっていない。また FF は、経口投与後速やかに carboxylesterase (CES) 1A1 によって活性代謝物である fenofibric acid (FA) に代謝され、FA はさらに CYP3A4 により reduced fenofibric acid (RFA) へと代謝されることが知られており (Fig. 2), これらが FF の主要代謝物であることが知られている^{6, 7)}。従って、FF の光線過敏症に対する主要代謝物の寄与を明らかにすることが、代謝物の光毒性リスク評価系の構築につながると考える。そこで、本研究では代謝物を含めた包括的光安全性評価系の構築を目的とし、FF とその主要代謝物である FA および RFA に対して、光化学的/光生物学的特性および体内動態の面から光安全性評価を実施した。

2. 実験

2. 1. 試薬類

Acetic acid, DMSO, ethanol (EtOH), formic acid, FF, imidazole, ketoprofen, NBT, p-nitosodimethylaniline, quinine HCl 2H₂O, NaH₂PO₄ 2H₂O, Na₂HPO₄ 12H₂O は和光純薬工業 (大阪, 日本) より購入した。ACN (HPLC grade) は Honeywell Japan (東京, 日本) より購入した。FA は AK Scientific Inc. (Union City, CA, USA) より購入した。RFA は Toronto Research Chemicals Inc. (Toronto,

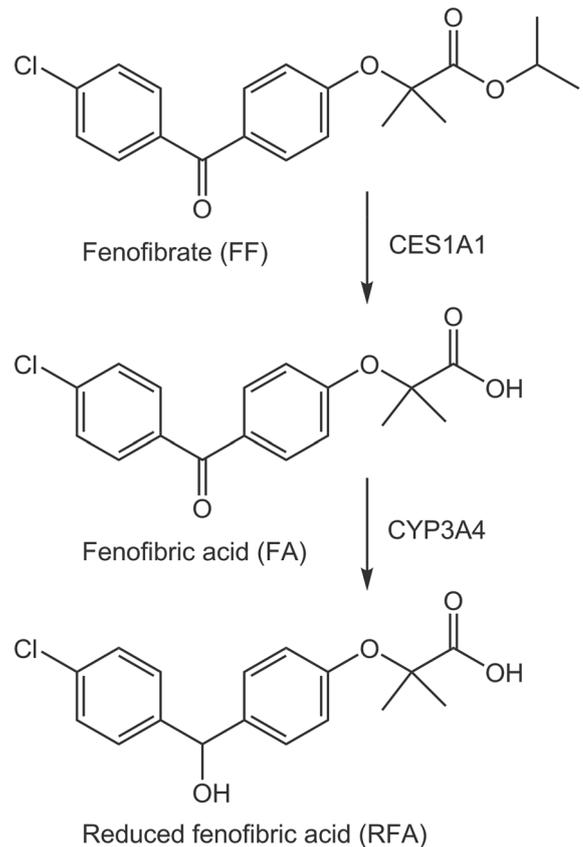


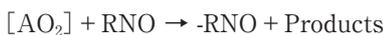
Fig. 2 Chemical structures of each test compound and metabolic pathways.

Ontario, Canada) より購入した。10% fetal bovine serum (FBS), dulbecco's modified eagle medium (DMEM), earle's balanced salt solution (EBSS), neutral red (NR), sulisobenzone は Sigma-Aldrich Japan (東京, 日本) より購入した。Pooled IGS Sprague-Dawley rat liver S9 fraction, pooled IGS Sprague-Dawley rat intestinal S9 fraction,

nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-regenerating systemは積水メディカル(東京, 日本)より購入した. その他のすべての試薬は市販品を用いた. ROS assay用 reaction containerはOzawa Science (愛知, 日本)より提供された.

2. 2. ROS アッセイ

擬似太陽光の照射にはXe arc lampを備えたAtlas Suntest CPS+ (Atlas Material Technologies LCC, Chicago, IL, USA)を用いた. Atlas Suntest CPS+では短波長のUVをカットし実際の太陽光を模するためのフィルターを用いてCIE85/1989 daylight simulation requirementに良好に対応した擬似太陽光を照射している. 照射は28℃, 250 W/cm², で1h行った. 被検物質はDMSOに溶解し(10 mM), stock solutionとして用いた. Singlet oxygenはimidazoleをsinglet oxygenのacceptorに用いて, *p*-nitrosodimethylaniline水溶液の440 nmにおける吸光値をモニタリングすることで測定した^{3, 8, 9}. 測定原理を以下に示した.



A : ¹O₂ acceptor, imidazole

RNO : nitroso compounds

mROS assayにおいては被検物質の最終濃度が200 μMとなるように被検物質のstock solutionを, *p*-nitrosodimethylaniline (50 μM) およびimidazole (50 μM) を含む20 mM NaPB (pH7.4) with 0.5% Tween 20と混合した¹⁰. 酵素処理後のROS assayにおいてはrat S9 fractionsで処理したFFが30 μMとなるよう*p*-nitrosodimethylaniline (50 μM)およびimidazole (50 μM)を含む20 mM NaPB (pH7.4)と混合した. その混合液200 μLを96-well microplate (旭硝子, 東京, 日本; code number:3881-096:clear, untreated, flat-bottom)に分注し, 析出物の有無を確認後, 440 nmの吸光値をSAFIRE microplate spectrophotometer (TECAN, Mannedorf, Switzerland)を用いて測定した. その後, プレートをreaction containerに入れ石英の蓋を装着し, 擬似太陽光を1h照射した. 照射後のプレートは, 振盪後, 再び440 nmの吸光値を測定した. Superoxide anionはNBTの還元によって生成するnitroblue diformazanの560 nmにおける吸光値をモニタリングすることで測定した. 測定原理を以下に示した.



mROS assayにおいては被検物質の最終濃度が200 μMとなるように被検物質のstock solutionを, NBT (50 μM) を含む20 mM NaPB (pH7.4) with 0.5% Tween 20と混合した. 酵素処理後のROS assayにおいてはrat

S9 fractions で処理したFFが30 μMとなるようNBT (50 μM) を含む20 mM NaPB (pH7.4) と混合した. その混合液200 μLを96-well microplate (旭硝子, 東京, 日本; code number : 3881-096 ; clear, untreated, flat-bottom)に分注し, 析出物の有無を確認後, 560 nmの吸光値をSAFIRE microplate spectrophotometer (TECAN, Mannedorf, Switzerland)を用いて測定した. その後, プレートをreaction containerに入れ石英の蓋を装着し, 擬似太陽光を1h照射した. 照射後のプレートは, 振盪後, 再び560 nmの吸光値を測定した.

2. 3. 動物実験

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

絶食したラットにFF (5 mg/kg)を投与後, 血液サンプル(約300 μL)を0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 48hにおいて尾静脈より採取した. 血液サンプルを遠心分離(10,000 × *g*, 10 min, 4℃)して得られた血漿サンプルは, 2.5倍量(v/v)のACNを加え, 振盪後, 遠心分離(10,000 × *g*, 5 min, 4℃)し, 上清を0.20 μm membrane filter (Millex[®]-LG, Millipore Co., Ltd., Billerica, MA, USA)を通すことでろ過した. 得られたろ液にinternal standardであるketoprofen (1 μg/mL)を含む50% ACNと1:1で混合し, UPLC/ESI-MS分析による定量を行った. 皮膚および眼組織は経口投与後2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48h後において, ジエチルエーテル麻酔下, 下降大動脈より脱血, および氷冷生理食塩水によって還流したラットから採取した. 採取した組織サンプルは重量測定後, ハサミでミンスし, 4 mLのACNを加えPhycotron (Microtech Co. Ltd., 千葉, 日本)によりホモジナイズした. 得られたサンプルに, 振盪および超音波処理を10分間行い, 遠心分離(1,300 × *g*, 10 min)した. この抽出操作を2回行い, 上清はガラスチューブに分取したのち, 40℃で窒素乾固した. 残渣をketoprofen 500 ng/mLを含む50% ACNで溶解し, 0.20 μm membrane filter (Millex[®]-LG, Millipore Co., Ltd., Billerica, MA, USA)を用いてろ過したのち, UPLC/ESI-MS分析による定量を行った. UPLC/ESI-MSシステムはbinary solvent manager, column compartment, およびMicromass SQ detector connected with Waters Masslynx v 4.1.を含む

Waters Acquity UPLC™ system (Waters, Milford, MA, USA) から構成されており、カラムには Waters Acquity UPLC™ BEH C18 (particle size : 1.7 μm, column size : φ2.1 × 50 mm ; Waters) を用いた。カラム温度は 40 °C に保った。スタンダードおよびサンプルは Mili-Q water containing 0.1% formic acid (A) と ACN (B) から成るグラジエント移動相によって分離し、各化合物の保持時間は 1.1 min (IS); 1.2 min (RFA); 2.0 min (FA); 4.2 min (FF) であった。グラジエントコンディションは、0-1.0 min, 50% B ; 1.0-5.0 min, 50-95% B (linear gradient curve) ; 5-5.5 min, 95% B ; and 5.5-6 min, 50% B とし、流速は 0.25 mL/min とした。MS による検出では化合物に特異的なイオンの m/z (361.2 [M+H]⁺ for FF ; 319.2 [M+H]⁺ for FA ; 303.0 [M-OH]⁺ for RFA ; and 255.5 [M+H]⁺ for ketoprofen) を用いた。

2. 4. 3T3 NRU PT

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

2. 5. ラット *in vivo* 光毒性試験

皮膚へ塗布する被検物質 (FF, FA, quinine : positive control, sulisobenzone : negative control) は 100 mg/mL となるよう DMSO に溶解した。あらかじめ腹部を剃毛し

たラットに pentobarbital にて麻酔し (50 mg/kg, i.p.), 1.5 cm × 1.5 cm サイズ中を切り取ったビニルテープを貼り付け、そこへ被検物質の DMSO 溶液 100 μL を塗布した。塗付後 4 h において薬液を除去し、水で湿らせたコットンで洗浄した。ラットは black light (FL15BL-B, National, 東京, 日本) を用いて UVA 照射量が 30 J/cm² となるまで照射した。照射強度は UV-Meter (Dr. Hönle AG, UV-Technology, Munich, Germany) を用いた。UV 非照射部位はアルミホイルで遮光した。照射終了後 24 h において色差計 (NF333, 日本電色工業, 東京, 日本) を用いて皮膚表面の色調を計測した。色差計は皮膚表面 3 次元色反射率を L*a*b* system (CIE 推奨) により記録する。輝度 (L*) は黒 (L*=0) から白 (L*=100) までの間で明るさを表し、色相 (a*) は赤 (a*=100) および緑 (a*=-100) 間のバランスを表し、彩度 (b*) は黄色 (b*=100) および青 (b*=-100) 間のバランスを表す。UV 照射前後の皮膚表面の色差 (ΔE) を以下のように算出し、光毒性の指標とした¹¹⁾。

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

3. 結果

3. 1. 光化学的特性評価

一般的に、薬物の光毒性反応においては、薬物分子が UV/VIS (290-700 nm) を吸収し励起状態となることが引き金になり、励起状態となった薬物分子の光化学反応が直接的な原因であると認識されている。そこで FF とその主要代謝物である FA および RFA の光化学的特性について UV 吸収特性と擬似太陽光曝露時の ROS 産生能に着目して評価した。FF および FA は強い UVA/B 吸収を示し、MEC 値はそれぞれ 17,000, 14,000 (M⁻¹cm⁻¹) と高い値であった (Fig. 3A)。従って FF および FA は高い光励起性を有することが明らかとなった。一方で RFA においては弱い UVB 吸収のみを認め、RFA の光励起性は弱いことが明らかとなった。Henry らは過去に、MEC 値が 1,000 (M⁻¹cm⁻¹) を超えない薬物は光毒性を示さない傾向にあることを報告している。従って、RFA の MEC 値が 1,000 (M⁻¹cm⁻¹) を下回っていることから、RFA の光毒性リスクは低いと考える。各化合物の実際の光反応性について精査すべく、擬似太陽光照射下における化合物からの ROS の産生能を評価した (Fig. 3B)。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

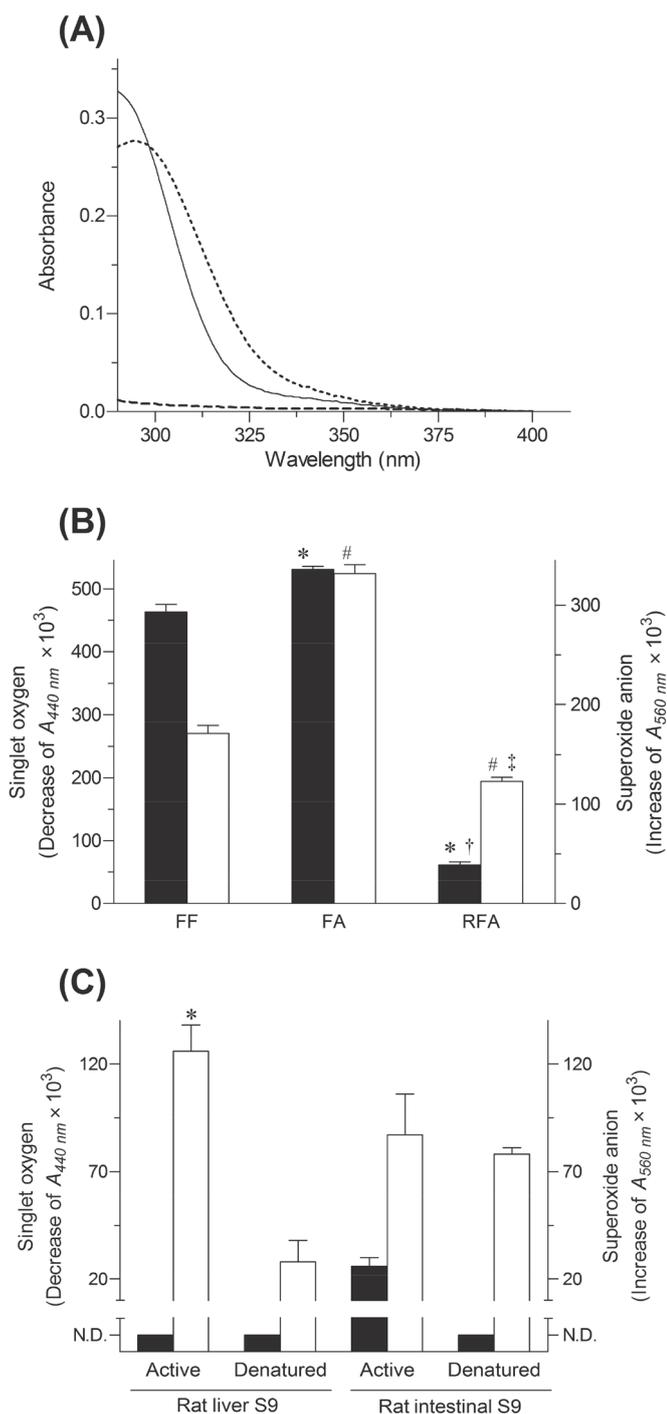


Fig. 3 Photochemical properties of FF, FA and RFA. UV-absorption spectra of test compounds (20 μM) in ethanol (A). Solid line, FF; dashed line, RFA; dotted line, FA. Generation of ROS from FF, FA and RFA (B) and from FF after incubation with active and denatured rat hepatic/intestinal S9 fractions (C).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

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. 3C)。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。

3. 2. 薬物動態学的評価

一般的に光毒性反応は皮膚や眼において生じるものであることから、薬物の全身曝露と同様に皮膚/目への曝露も *in vivo* 光毒性を予測する上で重要な指標となる。そこで各化合物の薬物動態学的特性について、全身および皮膚/眼への曝露に着目して精査した (Table 1)。FF をラットに経口投与後、FF は全ての組織において検出限界 (10 ng/mL, 7.1 ng/g tissue) 以下であり、ラット体内における FF の速やかな消失を示唆した。FA の血漿中および各組織中濃度は速やかかつ持続的に上昇し、 T_{max} は 6.0-13 h であった。FA の血漿および皮膚における C_{max} および $AUC_{0-\infty}$ は RFA と比較し、約 3-4 倍高く、RFA と比較して FA の生成速度は速く、また、全身および皮膚曝露量も高いことを示唆した。一方で、RFA の血漿中および各組織中濃度はゆるやかに上昇し、 T_{max} は 12-16 h となり、FA と比較して RFA の生成は遅いことを示唆した。RFA は血漿中および皮膚中からの消失半減期が FA と比較して約 1.5-2.0 倍長く、RFA は FA と比較して緩やかな消失を示した。よって、RFA は FA と比較して長く皮膚に保持される可能性がある。眼においては FA のみが検出でき、 C_{max} および $AUC_{0-\infty}$ はそれぞれ 100 ng/g tissue, 2.6 h \cdot ng/g tissue であった。得られた結果に基づき、各化合物の皮膚および眼への曝露を次のように順位づけた：FA > RFA > FF。

3. 3. *in vitro/in vivo* 光毒性試験

FA の光安全性について、光安全性試験代替法としてバリデートされ、汎用されている試験法である 3T3 neutral red uptake phototoxicity test (3T3 NRU PT)、およびラット *in vivo* 光毒性試験によって評価した。比較対象として親薬物である FF に対しても同様の光安全性試験を実施した。3T3 NRU PT において、陰性対照である sulisobenzon 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。

Table 1 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)	$AUC_{0-\infty}$ ($\text{h}\cdot\mu\text{g/mL}$) or $AUC_{0-\infty}$ ($\text{h}\cdot\text{ng/g tissue}$)	$MRT_{0-\infty}$ (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 \pm SEM for 4-7 rats. N.A., not available due to concentrations below the limit of detection.

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

ことが明らかとなり、さらに、3T3 NRU PT の結果と一致していた。従って、FA の *in vitro/in vivo* 光毒性は FF よりも強いことが明らかとなった。

4. 考 察

光毒性において化合物が太陽光を吸収し、励起される過程は光毒性発症メカニズムの第一段階であり、それゆえ、UV 吸収スペクトルが光毒性リスクの一つの指標となりうる。一般的に、化合物の UV 吸収スペクトルは薬物分子内の π 電子共役系の長さに比例することが知られている。FF、FA および RFA の構造に着目すると、カルボニル基を有する FF と FA は強い UV 吸収を示している一方で、カルボニル基を欠いた RFA は極めて低い UV 吸収特性を示している。従って、カルボニル基は FF および FA の強い UV 吸収特性において重要な役割を担っているといえる。それは、カルボニル基が 2 つのベンゼン環の π 電子共役系の広がりにより寄与しているからであろう。UV/VIS の吸収により励起状態となった化合物は、type I/type II 光化学反応 (e.g. ROS 産生) を起こし、光毒性反応を誘発する。そのため、光照射下における化合物の ROS 産生能に基づいた光反応性評価は光安全性評価において信頼性のある指標として用いることができる。以前の報告によれば、光励起されたベンゾフェノン類は、type I 光化学反応 (e.g. superoxide の産生) を介して脂質過酸化を引き起こし、光刺激性反応を惹起する。FA の superoxide anion の産生能は FF よりも高く、FA は FF よりも高い光刺激性リスクを有しているであろう。また、本知見はラット肝 S9 画分処理により FF からの superoxide anion 産生が増大したことと良好に対応し、すなわち、FF が肝臓で FA に変換され、より強い光刺激性を惹起する可能性がある。皮膚および眼への曝露量に着目すると、FA が顕著に高い曝露量を示したことから、FA は極めて高い光毒性リスクを有すると考える。一方で RFA の皮膚曝露は比較的 low、その光毒性リスクは FA よりも低いと考える。これらの PK

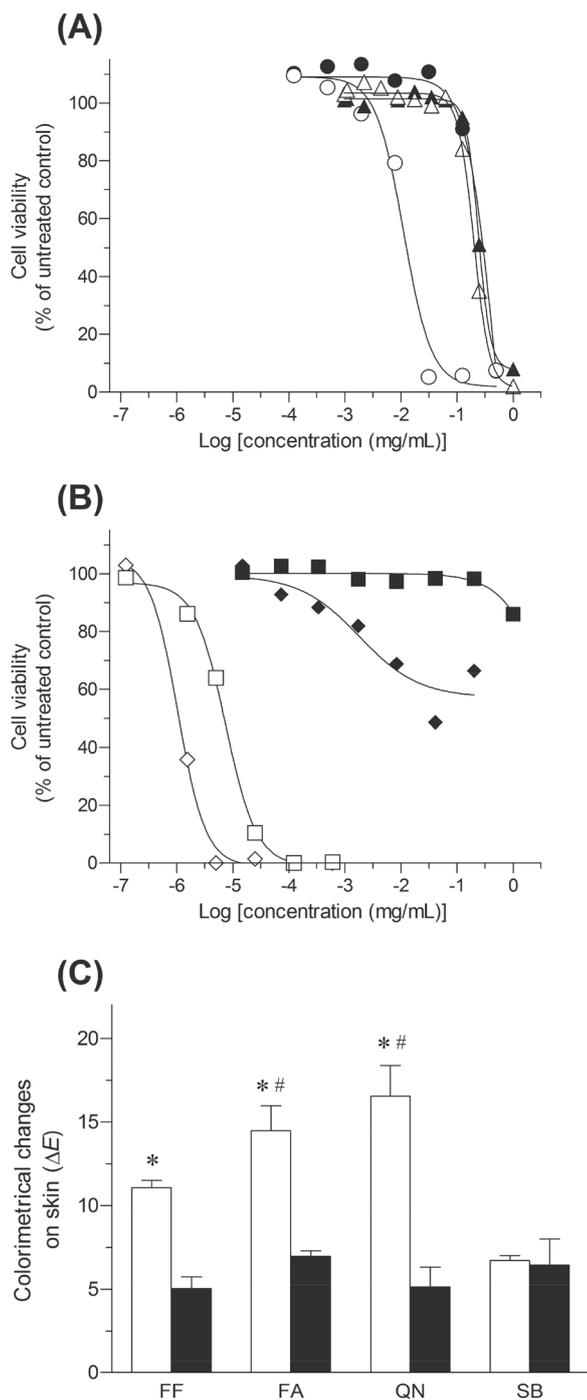


Fig. 4 *In vitro/in vivo* phototoxicity of compounds. Photodynamic cytotoxicity of QN: positive control and SB: negative control (A), FF and FA (B) in 3T3 NRU PT, and colorimetric evaluation of phototoxic skin responses in rats treated with FF, FA, quinine (QN) and sulisobenzone (SB) (C). Open symbols 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.

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える. なぜなら, RFAの長い皮膚滞留性が慢性投与時の皮膚への蓄積につながり, 光毒性を誘発しうるからである. 薬物の光毒性リスクは, 薬物の光化学的反応性の強さとは露光部位である皮膚/眼への到達量の両者を考慮することによって, 比較的良好に予測することができる. 複数のデータを考慮し, 系統的評価を行うことができる手法として matrix decision approach が用いられており, 本研究においても, 光化学的特性および薬物動態学的特性のデータを統合し, decision matrix を作成し, 光毒性リスク評価に用いた (Table 2).

Decision matrix においては, 光反応性および皮膚/眼曝露量の両データとも高い値であればその光毒性リスクは極めて高く, 光反応性あるいは皮膚/眼曝露量の一方のみが高いか, どちらも中程度であれば, その光毒性リスクも中程度, 光反応性および皮膚/眼曝露量どちらも低ければその光毒性リスクは低いことがわかる. FAは光反応性および皮膚曝露の両データにおいて高い値を示していることから, 最も高い光毒性リスクを有しているだろう. FFは強力な光反応性を有する一方で, 皮膚曝露が極めて低く, FFの光毒性リスクはそれほど高くはないと考える. 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: $FA \gg FF \approx RFA$. 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. 本研究において提示した包括的光安全性評価は, 信頼性のある医薬品候補化合物の光安全性情報を提供するものと考えられる.

謝 辞

本研究を遂行するにあたり, 公益財団法人コスメトロジー研究振興財団よりご援助頂きましたことに深く感謝申し上げます.

(引用文献)

- 1) Onoue S, Seto Y, Gandy G, Yamada S: Drug-induced phototoxicity; an early *in vitro* identification of phototoxic potential of new drug entities in drug

Table 2 Decision matrix

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

Each crucial factor was divided into three levels. Black, gray and white cells represent high, moderate and low levels, respectively. N.A., not available due to concentrations below the limit of detection.

discovery and development, *Curr Drug Saf*, 4, 123-136, 2009.

- 2) Jablonski A: Efficiency of anti-Stokes fluorescence in dyes, *Nature*, 131, 839-840, 1933.
- 3) Onoue S, Tsuda Y: Analytical studies on the prediction of photosensitive/phototoxic potential of pharmaceutical substances, *Pharm Res*, 23, 156-164, 2006.
- 4) Henry B, Foti C, Alsante K: 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, 57-62, 2009.
- 5) Moore DE: Drug-induced cutaneous photosensitivity: incidence, mechanism, prevention and management, *Drug Saf*, 25, 345-372, 2002.
- 6) Leenutaphong V, Manuskiatti W: Fenofibrate-induced photosensitivity, *J Am Acad Dermatol*, 35, 775-777, 1996.
- 7) Machet L, Vaillant L, Jan V, Lorette G: Fenofibrate-induced photosensitivity: value of photopatch testing, *J Am Acad Dermatol*, 37, 808-809, 1997.
- 8) Onoue S, Hosoi K, Wakuri S, Iwase Y, Yamamoto T, Matsuoka N, Nakamura K, Toda T, Takagi H, Osaki N, Matsumoto Y, Kawakami S, Seto Y, Kato M, Yamada S, Ohno Y, Kojima H: Establishment and intra-/inter-laboratory validation of a standard protocol of reactive oxygen species assay for chemical photosafety evaluation, *J Appl Toxicol*, 33, 1241-1250, 2013.
- 9) Onoue S, Hosoi K, Toda T, Takagi H, Osaki N, Matsumoto Y, Kawakami S, Wakuri S, Iwase Y, Yamamoto T, Nakamura K, Ohno Y, Kojima H: Intra-/inter-laboratory validation study on reactive oxygen species assay for chemical photosafety evaluation using two different solar simulators, *Toxicol In Vitro*, 28, 515-523, 2014.
- 10) Seto Y, Kato M, Yamada S, Onoue S: Development of micellar reactive oxygen species assay for photosafety evaluation of poorly water-soluble chemicals, *Toxicol In Vitro*, 27, 1838-1846, 2013.
- 11) Seto Y, Inoue R, Ochi M, Gandy G, Yamada S, Onoue S: Combined use of in vitro phototoxic assessments and cassette dosing pharmacokinetic study for phototoxicity characterization of fluoroquinolones, *AAPS J*, 13, 482-492, 2011.