

新規試験法提案書

光安全性評価法ROSアッセイ

平成28年1月

国立医薬品食品衛生研究所

# 新規試験法提案書

平成 28 年 1 月 20 日

No. 2015-02

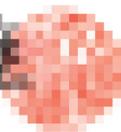
## 光安全性評価法 ROS アッセイ に関する提案

平成 27 年 12 月 17 日に東京、国立医薬品食品衛生研究所にて開催された新規試験法評価会議（通称：JaCVAM 評価会議）において以下の提案がなされた。

**提案内容：** ROS (Reactive Oxygen Species) アッセイは、適用限界に留意すれば、光化学反応性に関して偽陰性の評価をすることがないことから、さらなる光安全性評価の要否の判断に利用できる。2014 年に本試験法は医薬品の光安全性評価ガイドラインとして採択され、既に行政的な受け入れが始まっている。本試験法を光安全性の評価戦略に組み入れることは、3T3 NRU PT やそれに続く動物試験の実施数を削減することにつながる。化粧品・医薬部外品原料、農薬、その他一般化学物質についての光安全性評価法として、行政上の利用が期待できる。

この提案書は、医薬品の光安全性評価ガイドライン、ROSアッセイバリデーション報告書および関連論文をもとに、光毒性試験資料編纂委員会によりまとめられた文書を用いて、JaCVAM評価会議が評価および検討した結果、その有用性が確認されたことから作成された。

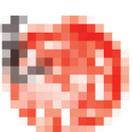
以上の理由により、行政当局の安全性評価方法として光安全性評価法 ROS アッセイの使用を提案するものである。



大野泰雄

大野泰雄

JaCVAM 評価会議 議長



西川秋佳

西川秋佳

JaCVAM 運営委員会 委員長

## JaCVAM 評価会議

大野泰雄	(運営委員会推薦) : 座長
飯塚尚文	(独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
五十嵐良明	(国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部)
石井雄二	(国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 病理部)
岩瀬裕美子	(日本製薬工業協会)
金子和弘	(日本化学工業協会)
篠田和俊	(独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
杉山真理子	(日本化粧品工業連合会)
谷川浩子	(日本動物実験代替法学会)
西川秋佳	(国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター)
牧 栄二	(日本免疫毒性学会)
森田 健	(日本環境変異原学会)
山田隆志	(独立行政法人 製品評価技術基盤機構)
横関博雄	(日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会)
吉田武美	(日本毒性学会)
吉村 功	(座長推薦)

任期：平成 26 年 4 月 1 日～平成 28 年 3 月 31 日

## JaCVAM 運営委員会

- 西川秋佳 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター) : 委員長  
川西 徹 (国立医薬品食品衛生研究所)  
小川久美子 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 病理部)  
加藤 篤 (国立感染症研究所)  
菅野 純 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部)  
篠田和俊 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)  
関野祐子 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 薬理部)  
高木篤也 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部  
動物管理室)  
束野正明 (厚生労働省 医薬・生活衛生局化学物質安全対策室)  
中村高敏 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)  
日田 充 (厚生労働省 医薬・生活衛生局化学物質安全対策室)  
広瀬明彦 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 安全性予測  
評価部)  
本間正充 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 変異遺伝部)  
美上憲一 (厚生労働省 医薬・生活衛生局化学物質安全対策室)  
三澤 馨 (厚生労働省 医薬・生活衛生局審査管理課)  
小島 肇 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 安全性予測  
評価部 第二室) : 事務局



## **JaCVAM statement on the Reactive Oxygen Species (ROS) assay for photosafety assessment**

At a meeting held on 17 December 2015 at the National Institute of Health Sciences (NIHS) in Tokyo, Japan, the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) Regulatory Acceptance Board unanimously endorsed the following statement:

**Proposal:** Provided that proper consideration is given to the limits of applicability, the Reactive Oxygen Species (ROS) assay is a useful means of determining the need for additional photosafety assessment, because it does not produce false negatives regarding photochemical reactivity. Guidelines for the photosafety assessment of drugs using the ROS assay were approved in 2014 and are increasingly accepted for regulatory use.

The incorporation of the ROS assay into photosafety assessment strategies can be expected to help reduce the need for 3T3 NRU PT as well as follow-up testing using animals. We look forward its use in a regulatory context for the photosafety assessment of ingredients used in cosmetics and quasi-drugs, agricultural chemicals, and other chemical substances.

This statement was prepared following a review of guidelines for the photosafety assessment of drugs, the ROS Assay Validation Report, and related documentation and using materials prepared by the Phototoxicity Testing JaCVAM Editorial Committee to acknowledge that the results of a review and study by the JaCVAM Regulatory Acceptance Board have acknowledged the usefulness of this assay.

Based on the above, we propose the ROS assay as a means for photosafety assessment in safety assessments by regulatory agencies.



Yasuo Ohno  
Chairperson  
JaCVAM Regulatory Acceptance Board



Akiyoshi Nishikawa  
Chairperson  
JaCVAM Steering Committee

20 January 2016

The JaCVAM Regulatory Acceptance Board was established by the JaCVAM Steering Committee, and is composed of nominees from the industry and academia.

This statement was endorsed by the following members of the JaCVAM Regulatory Acceptance Board:

Mr. Yasuo Ohno (nominee by JaCVAM Steering Committee) : Chairperson  
Mr. Naofumi Iizuka (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency)  
Mr. Yoshiaki Ikarashi (National Institute of Health Sciences: NIHS)  
Mr. Yuji Ishii (NIHS)  
Ms. Yumiko Iwase (Japan Pharmaceutical Manufacturers Association)  
Mr. Kazuhiro Kaneko (Japan Chemical Industry Association)  
Mr. Eiji Maki (Japanese Society of Immunotoxicology)  
Mr. Takeshi Morita (Japanese Environmental Mutagen Society)  
Mr. Akiyoshi Nishikawa (NIHS)  
Mr. Kazutoshi Shinoda (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency)  
Ms. Mariko Sugiyama (Japan Cosmetic Industry Association)  
Ms. Koko Tanigawa (Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments)  
Mr. Takashi Yamada (National Institute of Technology and Evaluation)  
Mr. Hiroo Yokozeki (Japanese Society for Dermatoallergology and Contact Dermatitis)  
Mr. Takemi Yoshida (Japanese Society of Toxicology)  
Mr. Isao Yoshimura (nominee by Chairperson)

Term: From 1st April 2014 to 31st March 2016

This statement was endorsed by the following members of the JaCVAM steering Committee after receiving the report from JaCVAM Regulatory Acceptance Board:

Mr. Akiyoshi Nishikawa (BSRC, NIHS): Chairperson  
Mr. Toru Kawanishi (NIHS)  
Mr. Mitsuru Hida (Ministry of Health, Labour and Welfare)  
Mr. Akihiko Hirose (Division of Risk Assessment, BSRC, NIHS)  
Mr. Masamitsu Honma (Division of Genetics and Mutagenesis, BSRC, NIHS)  
Mr. Jun Kanno (Division of Cellular and Molecular Toxicology, BSRC, NIHS)  
Mr. Atsushi Kato (National Institute of Infectious Diseases)  
Mr. Kenichi Mikami (Ministry of Health, Labour and Welfare)  
Mr. Kaoru Misawa (Ministry of Health, Labour and Welfare)  
Mr. Takatoshi Nakamura (Pharmaceutical & Medical Devices Agency)  
Ms. Kumiko Ogawa (Division of Pathology, BSRC, NIHS)  
Ms. Yuko Sekino (Division of Pharmacology, BSRC, NIHS)  
Mr. Kazutoshi Shinoda (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency)  
Mr. Atsuya Takagi (Animal Management Section of the Division of Cellular and Molecular Toxicology, BSRC, NIHS)  
Mr. Masaaki Tsukano (Ministry of Health, Labour and Welfare)  
Mr. Hajime Kojima (Section for the Evaluation of Novel Methods, Division of Risk Assessment, BSRC, NIHS): Secretary



# 光安全性評価法：ROS アッセイ

## 目 次

評価会議報告書 .....	1
評価報告書 .....	7
医薬品の光安全性評価ガイドラインについて.....	53
Peer Review Panel Evaluation of the Reactive Oxygen Species (ROS) Photosafety Assay .....	71
REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS) ASSAY TO EXAMINE PHOTOREACTIVITY OF CHEMICALS.....	87



評価会議報告書

Reactive oxygen species (ROS)アッセイ

平成 27 年（2015 年）11 月 30 日

JaCVAM 評価会議

## JaCVAM 評価会議

- 大野泰雄 (運営委員会推薦)：座長
- 飯塚尚文 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
- 五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所)
- 石井雄二 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター)
- 岩瀬裕美子 (日本製薬工業協会)
- 金子和弘 (日本化学工業協会)
- 篠田和俊 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
- 杉山真理子 (日本化粧品工業連合会)
- 谷川浩子 (日本動物実験代替法学会)
- 西川秋佳 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター)
- 牧 栄二 (日本免疫毒性学会)
- 森田 健 (日本環境変異原学会)
- 山田隆志 (独立行政法人 製品評価技術基盤機構)
- 横関博雄 (日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会)
- 吉田武美 (日本毒性学会)
- 吉村 功 (座長推薦)

任期：平成 26 年 4 月 1 日～平成 28 年 3 月 31 日

Reactive oxygen species (ROS)アッセイは、化学物質の光反応性を検出する試験法である。光曝露により生じる化学物質の毒性の多くは、化学物質の光化学反応に伴う細胞や組織の酸化的傷害が発現機序とされ、光励起された化学物質は一重項酸素やスーパーオキシドアニオン等の ROS を産生する。ROS アッセイは、化学物質に擬似太陽光を照射したときの ROS の産生の有無を調べることにより、光反応性を予測する。

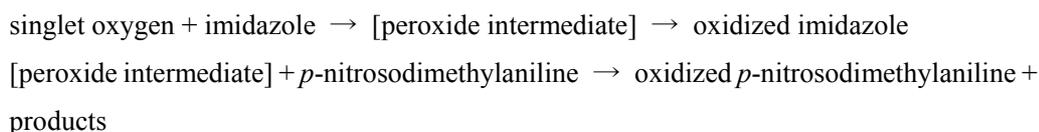
ROS アッセイは、JaCVAM 協力の下で多施設バリデーションが実施され<sup>1)</sup>、OECD が定める国際的基準(2005年)<sup>2)</sup>に従って、専門家からなる独立した第三者評価委員会により、科学的な評価が行われた<sup>3)</sup>。JaCVAM 評価会議は、これをもとにして JaCVAM 光毒性資料編纂委員会により作成された ROS アッセイ評価報告書(2015年7月8日)<sup>4)</sup>を用いて、本試験法の妥当性について検討した。

## 1. 試験法の定義

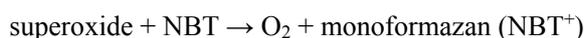
名称： Reactive oxygen species (ROS)アッセイ

代替する対象毒性試験： *In vivo* の光毒性試験<sup>5)</sup>および Neutral Red Uptake Phototoxicity Test (以下、3T3 NRU PT と略す)<sup>6)</sup>試験

試験法の概略： 本試験法は、化学物質に擬似太陽光を照射し、ROS 中の一重項酸素とスーパーオキシドアニオンの 2 種の産生の有無を調べる試験である。一重項酸素は *p*-nitrosodimethylaniline の変色を指標としてその産生を評価する。すなわち、被験物質が光照射を受けて励起化合物となり、これから産生された一重項酸素が反応液中の imidazole と反応して反応中間体を形成する。これが *p*-nitrosodimethylaniline を酸化することで変色をもたらし、440 nm の吸光値が減少する。この吸光値の減少を一重項酸素の生成として測定する。



スーパーオキシドアニオンの産生は、nitroblue tetrazolium (NBT) の還元を指標とする。励起化合物から産生されるスーパーオキシドアニオンは一電子転移反応により NBT を還元し、生成される monoformazan は 560 nm に UV 吸収を有する。この吸光値の増加をスーパーオキシドアニオンの生成の指標として測定する。



## 2. 評価に用いた資料および評価内容の科学的妥当性

JaCVAM 協力の下で実施された多施設バリデーション試験の結果が、OECD が定めた国際的基準(2005年)<sup>2)</sup>に従って、バリデーション実施機関とは独立した専門家からなる第

三者評価委員会にて科学的な評価や検証が行われ、その結果をもとに JaCVAM 光毒性資料編纂委員会が報告書としてまとめたものを評価資料とした。

化学物質に太陽光を照射した場合、得られた励起エネルギーは生体内物質や酸素分子に転移したり、あるいは化合物そのものが生体内物質と結合して光付加物を形成する。また、酸素分子は励起エネルギーのアクセプターとなり、それに伴い産生された一重項酸素やスーパーオキシドアニオン等の 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として考えられている<sup>7)</sup>。ROS は、光毒性物質のみでなく光アレルギーを示す物質でも発生し、光タンパク結合または光分解につながると考えられている<sup>8)</sup>。以上のように、本試験法は、化学物質に擬似太陽光を照射し、産生する一重項酸素とスーパーオキシドアニオンの有無を調べる光化学的反応性試験であることから、光安全性の評価法として原理的に妥当性があると考えられる。

### 3. 本試験法の有用性と適用限界

本試験法は、動物あるいは動物由来の生体試料を使用しないことから、3Rs の精神に合致している。また化学物質の光化学的反応を迅速かつ簡便に測定でき、多検体処理が可能である。さらにコスト面においても優れている。

多施設バリデーション試験において、難溶性のため評価できなかった被験物質を除くと、本試験法による光毒性陽性物質の検出率は 100%であり、偽陰性結果がないことから、光毒性のハザード評価に有用であると考えられる。さらに、医薬品の光安全性評価ガイドライン<sup>9)</sup>において、本試験法は初期評価項目のひとつとして記載され、本試験法で陰性と判定された開発中の医薬品に、さらなる光毒性試験を行う必要はないとされている。そのため、本試験法を光安全性評価に導入することにより、代替する光毒性試験数の削減につながることが期待できる。

次に、細胞や動物を利用する光安全性評価系では、それ自身の毒性が強い UVB を光源として使用することが難しく、UVB 領域にしか吸収を有さない化合物に対して適用が困難な場合があるが、本試験法は被験物質自体の物性の評価系であるために UVB の照射も可能である。また、生体試料を必要としないシステムであるため、その再現性も高い。一方、適用限界として、反応液中で析出する溶解性の低い物質や溶解時に着色が認められる化学物質は評価できない。また被験物質はモル濃度単位で試験するようプロトコルが設定されているため、抽出物や混合物のように分子量が不明でモル濃度を算出できない被験物質は評価できない。このような試験方法の課題に対し、各々、界面活性剤やアルブミンを加えた方法<sup>10-12)</sup>、指示薬を添加しない試験コントロール溶液の設定<sup>13)</sup>、 $\mu\text{g/mL}$  単位で試験する方法<sup>14)</sup>等の対応法が検討されており、抽出物や混合物等の多い化粧品原料をはじめ、一般化学物質ならびに農薬についての光安全性評価法として有用性が期待できるが、まだ評価方法として確立はされていない。

また、光安全性の適用範囲として光毒性および光アレルギーはともに発現機序の上流に

光化学反応が存在すること、さらに、光アレルギー物質も本試験法で検出できるとの知見が得られてきたことから<sup>3)</sup>、適切に実施された ROS アッセイで陰性であれば光毒性、光アレルギーを示さないと判断されるが、陽性の場合、別途評価されるべきである。

#### 4. 目的とする物質又は製品の毒性を評価する試験法としての、社会的受け入れおよび行政上の利用の可能性

##### 社会的受け入れ性：

本試験法は、化学物質の光化学的特性を指標とした簡便かつ動物および動物由来試料を用いない試験法であり、擬似太陽光照射装置(solar simulator)、UVA 測定装置、マイクロプレートリーダーが利用できる施設であれば容易に実施できる試験である。本試験法は、化学物質の光化学的特性を指標とした光毒性および光アレルギーの発現機序における上流の重要なイベントを検出しており、化学物質の光安全性を考える上で重要な情報を与えることから、本試験法の社会的受け入れ性は高い。なお、本試験法の実施に当たっては、被験物質の特性と試験法の適用限界を見極め、得られた結果の解釈に注意を払う必要がある。

##### 行政上の利用性：

本試験法は、適用限界に留意すれば、光化学反応性に関して偽陰性の評価をすることがないことから、さらなる光安全性評価の要否の判断に利用できる。2014年に本試験法は医薬品の光安全性評価ガイドラインとして採択され、既に行政的な受け入れが始まっている。本試験法を光安全性の評価戦略に組み入れることは、3T3 NRU PT やそれに続く動物試験の実施数を削減することにつながる。化粧品・医薬部外品原料、農薬、その他一般化学物質についての光安全性評価法として、行政上の利用が期待できる。

#### 引用文献

- 1) 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. (2014) 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.
- 2) OECD GUIDANCE DOCUMENT ON THE VALIDATION AND INTERNATIONAL ACCEPTANCE OF NEW OR UPDATED TEST METHODS FOR HAZARD ASSESSMENT No.34 (2005), OECD Series on Testing and Assessment: Testing for Human Health JaCVAM Executive Summary of “Peer Review Panel Evaluation of the Reactive Oxygen Species (ROS) Photosafety Assay” (16 October 2013)
- 3) JaCVAM 光毒性資料編纂委員会：ROS アッセイ評価報告書(2015年7月8日)
- 4) Morikawa F., Nakayama Y., Fukuda M., Yokoyama Y., Nagura T., Ishihara M., Toda K. (1974) Techniques for evaluation of phototoxicity and photoallergy in laboratory

- animals and man. in “Sunlight and Man” Ed. by Fitzpatrick, T.B. University of Tokyo Press, Tokyo, pp.529-557.
- 5) OECD (2004) Test Guideline 432. *In Vitro* 3T3 NRU phototoxicity test.
  - 6) Onoue S., Seto Y., Gandy G., Yamada, S. (2009) Drug-induced phototoxicity; An early *in vitro* identification of phototoxic potential of new drug entities in drug discovery and development. *Current Drug Safety*, 4(2), 123-136.
  - 7) Tokura Y. (2009) Photoallergy. *Expert Rev. Dermatol.*, 4(3), 263-270.
  - 8) 厚生労働省 (2014) 医薬品の光安全性評価ガイドラインについて (薬食審査発 0521 第 1 号, 平成 26 年 5 月 21 日)
  - 9) Onoue S., Yamauchi Y., Kojima T., Igarashi N., Tsuda Y. (2008) Analytical studies on photochemical behavior of phototoxic substances; Effect of detergent additives on singlet oxygen generation. *Pharm. Res.*, 25, 861–868.
  - 10) Onoue S, Kato M, Yamada S (2014) Development of an albuminous reactive oxygen species assay for photosafety evaluation under experimental biomimetic conditions, *J. Appl. Toxicol.*, 34: 158–65.
  - 11) Seto Y, Kato M, Yamada S, Onoue S. (2013) Development of micellar reactive oxygen species assay for photosafety evaluation of poorly water-soluble chemicals. *Toxicol. in Vitro*, 27: 1838–46.
  - 12) Onoue S, Suzuki G, Kato M, Hirota M, Nishida H, Kitagaki M, Kouzuki H, Shizuo Yamada S. (2013) Non-animal photosafety assessment approaches for cosmetics based on the photochemical and photobiochemical properties, *Toxicol. in Vitro*, 27: 2316–24
  - 13) Nishida H, Hirota M, Seto Y, Suzuki G, Kato M, Kitagaki M, Sugiyama M, Kouzuki H, Onoue S.(2015) Non-animal photosafety screening for complex cosmetic ingredients with photochemical and photobiochemical assessment tools., *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 72(3) 578-585.

## ROS アッセイ評価報告書

2015年7月8日

JaCVAM 光毒性資料編纂委員会

委員長	堀井 郁夫	(ファイザー株式会社)
委員	尾上 誠良	(静岡県立大学)
	金子 和弘	(日本化学工業協会)
	上月 裕一	(株式会社 資生堂)
	田中 憲穂	(食品薬品安全センター)
	笛木 修	(医薬品医療機器総合機構)
	細井 一弘	(参天製薬株式会社)

## 目次

i.	略語 .....	4
ii.	要旨 .....	5
1.	試験方法の科学的背景・根拠および規制上の位置づけ .....	6
1.1	科学的背景 .....	6
1.2	科学的根拠 .....	7
1.3	規制上の位置づけ .....	9
2	試験のプロトコルおよび判定基準 .....	11
2.1	測定原理 .....	11
2.2	材料および試薬 .....	11
2.3	被験物質 .....	12
2.4	陽性ならびに陰性対照物質 .....	13
2.5	器具・機器 .....	13
2.6	試験方法ならびにデータ解析 .....	14
2.7	データ採用条件 .....	17
2.8	陽性基準 .....	18
3	試験法のバリデーション .....	18
3.1	用いられた物質とその妥当性 .....	18
3.2	バリデーション結果の評価 .....	21
4	試験方法に関する他の科学的考察 .....	25
4.1	光に不安定な物質への適用 .....	25
4.2	難溶性物質への対応 .....	25
4.3	混合物および分子量不明試料への対応 .....	26
4.4	光アレルギー性予測への利用 .....	28
5	3Rs への関与（動物福祉面からの妥当性） .....	29
6	試験方法の有用性と問題点 .....	29
7	結論 .....	30
8	用語の解説 .....	31
9	参考文献 .....	31
10	Appendix .....	34
Appendix 1	Executive Summary of “Peer Review Panel Evaluation of the Reactive Oxygen Species (ROS) Photosafety Assay” (16 October 2013) .....	34
Appendix 2	List of reasons for chemical selection .....	36
Appendix 3	Test chemicals for the Phase 1 study .....	38
Appendix 4	List of reasons for chemical selection .....	39
Appendix 5	Test chemicals for Phase 2 study and code list .....	45

## i. 略語

3T3 NRU-PT:	3T3 neutral red uptake phototoxicity test
CDER:	Center for Drug Evaluation and Research (医薬品評価研究センター)
CPMP:	Committee for Proprietary Medicinal Products (欧州医薬品委員会)
DMSO:	Dimethyl sulfoxide
EMA:	European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (欧州医薬品審査庁, 2004年まで使われていた呼称)
EMA:	European Medicines Agency (欧州医薬品庁)
EWG:	Expert Working Group (専門家作業部会)
FDA:	Food and Drug Administration (米国食品医薬品局)
IC:	Internal conversion (内部転移)
ICH:	International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (日米 EU 医薬品規制調和国際会議)
ISC:	Intersystem crossing (項間交差)
NaPB:	Sodium Phosphate Buffer
NBT:	Nitroblue tetrazolium
NBT <sup>+</sup> :	Monoformazan
OECD:	Organisation for Economic Co-operation and Development (経済協力開発機構)
RNO:	<i>p</i> -nitrosodimethyl aniline
ROS:	Reactive Oxygen Species, including superoxide anion (SA) and singlet oxygen (SO).
UVA:	Ultraviolet light A (wavelengths between 320 and 400 nm).
UVB:	Ultraviolet light B (wavelengths between 290 and 320 nm).
UVC:	Ultraviolet light C (wavelengths between 190 and 290 nm).
UV/VIS:	Ultraviolet and visible light

## ii. 要旨

Reactive oxygen species (ROS) アッセイは、化学物質の光化学的特性を指標とした簡便で多検体処理可能な光安全性評価法として提案され、化学物質に擬似太陽光を照射し、singlet oxygen と super oxide anion の産生の有無を調べる光反応性試験の一つとして、光線過敏症誘発の可能性を予測し得ることが明らかにされている。この ROS アッセイは 2014 年に step 5 に到達した ICH S10 ガイドラインにおいてもとり上げられており「データからは、この試験法は *in vivo* における直接的な光毒性物質を予見する上での感度が高いことが示されている」と記述されている。

ROS アッセイの有用性評価として、JaCVAM 指導下での多施設バリデーション試験が実施された結果、施設内および施設間差が少なく、汎用性に優れている試験法であることが示された。また、難溶性のため評価できなかった被験物質を除くと、ROS アッセイによる光毒性物質の陽性検出率は 100%であり、偽陰性結果がないことから、ROS アッセイは光毒性ポテンシャルの評価に有用であると考えられた。これらのバリデーション報告書に対する第三者評価においても同様の評価がなされた。

このような背景のもと、JaCVAM は OECD が定めた国際的な基準（2005 年）に従って、ROS アッセイのバリデーション状況に関して科学的な評価や検証を行うための専門家による独立した委員会を設けた。委員会は 2013 年 2 月に第 1 回の会合を持ち、その後 5 次に亘って評価報告書の見直しを重ねてきた。本評価報告書は委員会による評価と結論を要約したものである。

当委員会は結論として、ROS アッセイの再現性と予測性は化学物質の総合的な光毒性評価上、十分に適応できるアッセイ方法であると結論した。今後、ROS アッセイにおいて陽性の結果が得られた場合、次の段階として 3T3 光毒性試験（OECD 試験ガイドライン#432）等の *in vitro* 試験の適用が推奨されるが、陰性の結果が得られた場合は更なる動物試験やその他の試験は不要であると帰結できることにより、光毒性評価に必要な時間や費用を軽減し、実験動物の使用を削減することができると思われる。

また、本アッセイの予測性・再現性は、医薬品の光毒性試験法の一環として、その創薬初期段階および開発の意思決定に用いる事を支持できるものである。さらに、最近の検討において、ROS アッセイにおける混合物および分子量不明試料への適用可能性が示され、化粧品原料、一般化学物質ならびに農薬の光安全性に関するハザード検出法として ROS アッセイへの期待が高まっている。

# 1. 試験方法の科学的背景・根拠および規制上の位置づけ

## 1.1 科学的背景

光安全性とは、光を介して発症する化学物質誘発性の毒性反応であり、図 1(A)に示したように光によって化学物質が励起することがトリガーとなっている。このような毒性を示す化合物を図 1(B)では励起光毒性化合物と定義しているが、このような物質は、光刺激性、光アレルギー性、光遺伝毒性、光がん原性を誘導する可能性がある。化学物質の光安全性を評価するために様々なアッセイ法 (*in vitro* および *in vivo*) が開発されており、これらには、(i) *in silico* スクリーニングツール、(ii) 光化学的特性を中心とした分子物性評価、(iii) 各種毒性反応に特異的な光生物化学的アッセイ方法などが含まれている (Onoue *et al.*, 2009). *in silico* 評価システムとしては、例えば DEREK や HOMO-LUMO Gap 等が知られている。光化学的特性評価ツールは実際に合成された医薬品候補化合物の分子物性を指標とした光感受性分析を主体とし、薬剤性光線過敏症の誘発に寄与し得る光化学的反応の有無について高いスループットで示唆することが出来る。光毒性の機序を考えると、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。この観点から、「太陽光の吸収しやすさ」の指標である UV/VIS 吸収特性が医薬品開発における光安全性評価において有用であることが Henry らによって提案された。Henry らの報告によれば、モル吸光係数  $1,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  以下の化合物は光毒性リスクが低い (Henry *et al.*, 2009). さらに、Bauer らはこの閾値についてより多くの化学物質を対象に精査し、その妥当性について検証している (Bauer *et al.*, 2014). 一方、UV/VIS 吸収特性だけでなく、励起エネルギーによる光化学的反応性を直接評価することが可能となれば、より実質的な光毒性予測に寄与できる可能性がある。そこで、Onoue らはこの観点から光照射下における薬物からの ROS 産生を指標とした新たな光毒性予測ツールである ROS アッセイを 2006 年に考案した (Onoue and Tsuda, 2006). すでに上市されている複数の医薬品をそれぞれ ROS アッセイで評価したところ、副作用報告として光線過敏症が報告されている化合物群は ROS を産生する傾向にあり、一方、様々なスクリーニングで光安全性の高いと考えられる化合物群からの ROS 産生は極めて限定されたものであった。すなわち、ROS アッセイは光毒性リスクを予測するうえで有用なツールとなる可能性が示唆され、本アッセイのハイスループットスクリーニング系への応用検討の結果、スループットの改善とアッセイの小スケール化に成功している (Onoue *et al.*, 2008a). ROS アッセイの利点としては、化学物質の光化学的反応性を迅速かつ簡便に測定できることが挙げられるが、その反面、本アッセイデータは光安全性だけではなく、光安定性などに問題がある化合物も含めて陽性と判別してしまうことが課題の一つであり、これは光化学的反応性評価法であるが故の課題である。

本文書において、光安全性とは化学物質に接触あるいは摂取した後で、光への曝露に関連して発症する有害作用全般を対象とし、従来より、光毒性、光アレルギー性、光遺伝毒性、光がん原性の 4 種の異なる作用が含まれる。光安全性は、対象となる化学物質の光化学的特性、非臨床試験のデータおよび臨床安全性情報をふまえて統合的に評価される。光毒性は光刺激性と同義で、光照射によって産生される光反応性物質に対する急性の組織反応である。光線過敏症とは、光照射により惹起される組織反応に対し、時折使用される一般用語であり、広義の光毒性と同じ意味で用いられることもあるが、光毒性と光アレルギー性を明確に区別する必要がある場合に使用することは適切ではない。

ROS アッセイバリデーションマネジメントチームは JaCVAM 指導下で複数の参加施設で 2 種類の擬似太陽光照射装置を用いたバリデーション試験 2 試験を実施し、ROS アッセイの技術移転性 (transferability)、堅牢性 (robustness) ならびに予測性 (prediction capacity) を検証した。バリデーション試験結果を論文として投稿し(Onoue et al., 2013a; Onoue et al., 2014a)、詳細なデータを含むバリデーション報告書ならびに試験法プロトコルを JaCVAM ホームページ上に公開した (ROS assay validation management team, 2013a, 2013b, 2013c)。ROS アッセイバリデーション報告書を評価した第三者評価委員会の報告書も JaCVAM ホームページ上に公開され(Spielmann et al., 2013)、その要約を Appendix 1 に示した(Appendix 1: Executive Summary of “Peer Review Panel Evaluation of the Reactive Oxygen Species (ROS) Photosafety Assay”)

## 1.2 科学的根拠

どのような発症機序の光毒性反応でも、その発症機序の上流には光化学反応が存在する。1817 年に提唱された光化学第一法則 (または Grotthuss-Draper law) では “入射した光のうち、吸収されたものだけが反応に関わる” とあり、すなわち光吸収する化合物のみが光毒性反応を示し得ることが述べられている。オゾン層を通過して地表に到達できる太陽光の波長は主に 290-700 nm 程度であるが、300 nm よりも短波長で比較的能量の高い光の真皮到達率はわずか 10% 程度である。一方、長波長側になるにつれてエネルギーは小さくなるものの、皮膚透過性は高くなり、これらが薬剤性光線過敏症のトリガーとなることも多い。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  $S_0$  から励起一重項状態  $S_1$  に励起される (図 1(A))。励起一重項状態の寿命は短く、すなわち蛍光を発生して直ちに基底状態  $S_0$  に戻るか、項間交差により励起三重項状態  $T_1$  に遷移する。励起三重項状態にある化合物はりん光を発生して基底状態  $S_0$  に戻る。このように光を吸収して励起された分子は速やかにもとの基底状態に戻る特性があるが、この過程が極めてスムーズに起これば吸収された光エネルギーによる光毒性反応への寄与は限定されたものとなる。しかし、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。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、singlet oxygen 反応である Type II 反応とに分けられる。これらは薬剤性光線過敏症の発症において初期に認められ、すなわち UV/VIS の曝露によって励起され、その際に得られた励起エネルギーは生体内物質や酸素分子に転移したり、あるいは化合物そのものが生体内物質と結合して光付加物を形成する。また、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、それに伴い発生された singlet oxygen や superoxide 等の活性酸素種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 (図 1(B))。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。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性反応を惹起するものと考えられる。このように、薬物が励起された後に反応する分子種によって発現する毒性反応がそれぞれ異なる。これらの機序に加えて、励起エネルギーや活性酸素種によって薬物そのものが分解され、毒性物質を生成するケースも想定され、毒性機序は多様かつ複雑である。このような光化学的反応が光毒性反応のトリガーになっていることを考慮すれば、ROS アッセイを光毒性評価ツールの一つとして利用することは妥当と考えられる。

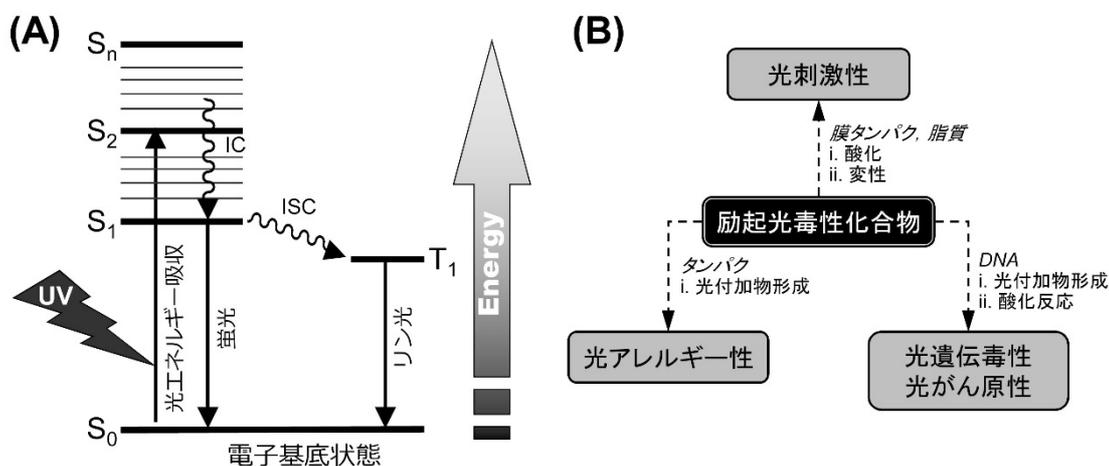


図 1 光毒性機序 (仮説)。(A) 光による化学物質の励起と基底状態への遷移。(B) 励起化合物の標的となる生体内分子と光毒性反応。(尾上, 2011)

### 1.3 規制上の位置づけ

前述のように、光照射によって励起光毒性物質を発生する化合物は、光刺激性、光アレルギー性、光遺伝毒性または光がん原性を誘導する可能性があるものの、ICHにおいて作成された医薬品の光安全性評価に関するガイドラインの適用範囲は、光刺激性と光アレルギー性に限定している。光安全性評価に関してはこれまで 2002 年に欧州医薬品審査庁 (EMA; 現 EMA)/欧州医薬品委員会 (CPMP)、翌年の 2003 年には米国食品医薬品局 (FDA)/医薬品評価研究センター(CDER)、さらに 2004 年には経済協力開発機構 (OECD)から評価方法が提示されているが、これら 3 つのガイドライン/ガイダンスの共通点として、化合物の光化学的特性を評価する必要性が記述されていることが挙げられる。これらのガイドライン/ガイダンスでは初期スクリーニングとして UV/VIS 吸収特性が提案されている。OECD ガイドラインでは評価系におけるモル吸光係数に関する閾値を  $10 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  と設定しており、実質的には全ての化合物がこの閾値を超える。それ故、より現実的な閾値の設定を目的とした研究が行われ、Henry らは既知光毒性医薬品を対象として光吸収特性を精査した結果、経験則的にモル吸光係数  $1,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  がより適切な閾値であり、これを超えない医薬品については光安全性評価を実施する必要性は低いことを示している (Henry *et al.*, 2009)。EMA は 2010 年に自らのガイダンスに関する Question and Answers を公表し、この考えを追随している。ICHにおいて医薬品の光安全性評価が安全性に関するトピックとして 2010 年に採択され、EWG が発足し、3 年間の検討期間を経て、2013 年 11 月に光安全性評価に関するガイドラインの Step 4 文書が合意された。ICH ガイドラインにおいて光毒性評価の要否を判断する初期評価において、モル吸光係数が  $1000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  を超える物質であっても化学的光反応性評価系において陰性であれば、さらなる光毒性評価や臨床試験における光防御措置は不要とされている。ROS アッセイは化学的光反応性から被験物質の光毒性が陰性であることを確認できる方法として、医薬品の光安全性評価に利用されている。

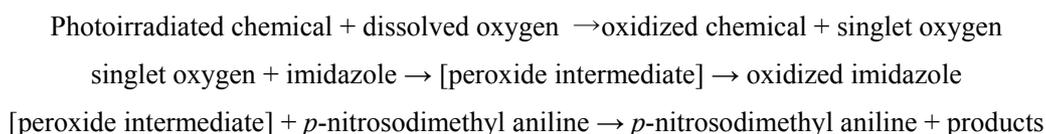
表 1 欧米の光安全性評価ガイドライン

	EMA/CPMP	FDA/CDER	OECD	ICH
ガイドライン	Guidance on photosafety testing	Guidance for industry photosafety testing	<i>In vitro</i> 3T3 NRU phototoxicity test	Phototoxicity evaluation of pharmaceuticals (S10)
光毒性評価が必要となる条件				
対象化合物の範囲	<ul style="list-style-type: none"> <li>化学物質全般</li> <li>バイオテクノロジー医薬品</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>全ての原薬および製剤成分</li> <li>外用剤は製剤での実施を推奨</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>UV/VIS 吸収を示す化学物質全般</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>新規医薬品有効成分(API)</li> <li>新規添加剤</li> <li>経皮投与用臨床製剤(皮膚貼付剤など)</li> <li>光線力学療法用製剤</li> </ul>
UV/VIS 吸収特性	<ul style="list-style-type: none"> <li>290–700 nm モル吸光係数に関する記載なし</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>290–700 nm モル吸光係数に関する記載なし</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>290–700 nm モル吸光係数: 10 M<sup>-1</sup>・cm<sup>-1</sup> 以上</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>290–700 nm モル吸光係数: 1000 M<sup>-1</sup>・cm<sup>-1</sup> 以上</li> <li>UV/VIS の吸収により、反応性に富んだ分子種を形成する (ROS アッセイ)</li> </ul>
投与経路と体内分布	<ul style="list-style-type: none"> <li>局所適用</li> <li>皮膚・眼に到達</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>皮膚・眼に適用もしくは分布</li> <li>皮膚・眼に影響を与えるもの</li> </ul>	適用外	<ul style="list-style-type: none"> <li>皮膚・眼に十分量分布</li> </ul>
評価方法				
Photoirritation	<ul style="list-style-type: none"> <li>3T3 NRU phototoxicity test</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>3T3 NRU phototoxicity test</li> <li>マウス, モルモット, ブタ, ウサギを用いた <i>in vivo</i> 試験</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>3T3 NRU phototoxicity test</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>3T3 NRU phototoxicity test</li> </ul>
Photoallergy	<ul style="list-style-type: none"> <li>改良された LLNA アッセイや MEST アッセイが将来的に有用になる可能性を示唆するのみ</li> </ul>	適用外	適用外	<ul style="list-style-type: none"> <li>経皮投与医薬品においても、非臨床光アレルギー試験の結果のヒトへの予測性は不明としている</li> </ul>
Photogenotoxicity	<ul style="list-style-type: none"> <li>光化学的染色体異常誘発性試験</li> <li><i>in vivo</i> コメット試験</li> <li>トランスジェニック変異原性モデル</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>サルモネラ菌, 酵母, V79 細胞を用いた <i>in vitro</i> 光遺伝毒性試験</li> </ul>	適用外	適用外

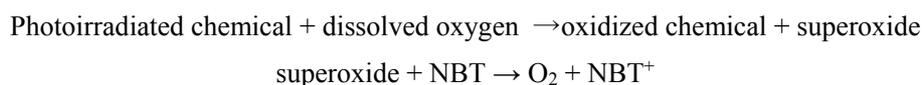
## 2 試験のプロトコルおよび判定基準

### 2.1 測定原理

事前の検討において、光照射した薬物から産生される singlet oxygen と superoxide の 2 種の ROS 測定が精度の高い光安全性評価に寄与することが示唆された (Onoue *et al.*, 2006&2008). そこで、この 2 種の ROS 産生を評価することを目的として ROS アッセイが構築された. Singlet oxygen は *p*-nitrosodimethyl aniline の変色を指標としてその産生を評価できる. すなわち、励起化合物から産生された singlet oxygen は反応液中の imidazole 環と反応して trans-annular peroxide intermediate を形成するが、これが *p*-nitrosodimethyl aniline を酸化することで変色をもたらし、440 nm の吸光値が減少する. この吸光値の減少が singlet oxygen の生成を示唆するものである.



Superoxide も同じく分光学的手法によって測定が可能であり、基質として nitroblue tetrazolium (NBT) を使用する. 励起化合物から産生される superoxide は one-electron transfer reaction により NBT を還元し、生成される monoformazan (NBT<sup>+</sup>) は 560 nm に UV 吸収を有する. この吸光値の上昇が superoxide の生成を示唆する.



これらの反応は photodynamic に促進されるが、光照射強度、光照射時間、サンプル温度、共存する有機溶媒をはじめとする種々のアッセイ条件によっても大きく変動が誘発されるため、細心の注意が必要である.

### 2.2 材料および試薬

#### 2.2.1 ROS アッセイ用試薬類ならびにその調製

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O (CAS#13472-35-0), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O (CAS#10039-32-4), dimethyl sulfoxide (DMSO, CAS#67-68-5), *p*-nitrosodimethyl aniline (RNO, CAS#138-89-6), imidazole (CAS#288-32-4), and nitroblue tetrazolium (NBT, CAS#298-83-9) は市販の試薬を使用する。

### 2.2.2 20 mM sodium phosphate buffer (NaPB, pH7.4)

3.8 mmol (593 mg) の NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O と, 16.2 mmol (5.8 g) の Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O を量り取り, 900 mL の精製水に溶解した。HCl によって pH7.4 に調整し, 精製水で 1 L にメスアップしてよく混和する。

### 2.2.3 200 μM *p*-nitrosodimethyl aniline 水溶液

20 μmol (3 mg) の *p*-nitrosodimethyl aniline を 100 mL の NaPB に溶解する。調製後は遮光バイアルに入れ, 冷蔵庫にて保管する。

### 2.2.4 200 μM imidazole 水溶液

200 μmol (13.6 mg) の imidazole を 10 mL の NaPB に溶解し, さらに NaPB で 100 倍希釈する。調製後は遮光バイアルに入れ, 冷蔵庫にて保管する。

### 2.2.5 400 μM NBT 水溶液

40 μmol (32.7 mg) の NBT を 100 mL の NaPB で溶解した。NBT は溶解度が低いため, 超音波処理やボルテックス等の溶解補助操作が必要となることがある。調製後は遮光バイアルに入れ, 冷蔵庫にて保管する。

## 2.3 被験物質

ROS アッセイを実施する際には, DMSO で 10 mM の stock solution をアッセイ直前に調製し, ROS アッセイにおける終濃度は 200 μM とする。光安定性に注意をしつつ, ボルテックスミキサーにて 5–10 分程度混和し溶解性を確認することを推奨するが, 被験物質の溶解度が低い場合には NaPB で溶解してもよい。それでもなお溶解しない場合には, DMSO stock solution を DMSO で希釈し溶解性を確認して ROS アッセイを実施することとする。希釈する場合には ROS アッセイにおける終濃度が, 20, 50, あるいは 100 μM となることが望ましいがこの限りではない。希釈した場合には判定基準が非希釈時と変わるので注意が必要である。なお, 200 μM の結果の判定を用いることが推奨され, 溶けない場合には低濃度を使用するが, 結果の判断には注意が必要である。

## 2.4 陽性ならびに陰性対照物質

ROS アッセイにおいては陽性対照物質として quinine HCl (CAS#6119-47-7), そして陰性対照物質として sulisobenzone (CAS#4065-45-6) を用いることが望ましい. いずれも DMSO stock solution をアッセイ直前に調製することとする.

## 2.5 器具・機器

### 2.5.1 Solar simulator

光線過敏症のほとんどが太陽光への曝露によって惹起されることを考慮すれば, ROS アッセイに使用する solar simulator は可能な限り CIE85/1989 標準昼光に近いことが望ましい. 例えば, 光源として Xe ランプ (1,500 W) を装備した Atlas Suntest CPS/CPS plus (Atlas Material Technology LLC, Chicago, USA) あるいは Seric SXL-2500V2 (SERIC., Ltd., Tokyo, Japan) を使用し, 標準昼光により近くするべく 290 nm 以下の照射光をカットするために UV フィルターを装着して用いる. UVA detector Dr. Hönle #0037 (Dr. Hönle, München, Germany) で照射光を測定したとき, 約 2 mW/cm<sup>2</sup> の照射強度であり, solar simulator のチャンバー内の温度は 20–29°C の範囲に制御されていることが望ましい. また, solar simulator によっては照射ムラが発生することがあるので, アッセイの前に検証し, 照射ムラがない領域を明確にしておく必要がある. 本稿で提示するデータはすべてこれらの照射装置を用いて ROS アッセイを実施したものである. 他の solar simulator を用いて使用することも可能であるが, その場合には陽性対照 (quinine), 陰性対照 (sulisobenzone) ならびに推奨化合物セット (recommended chemical set) を用いて推奨プロトコールに記載されている条件最適化を必要とする.

### 2.5.2 ROS アッセイ用 reaction container

擬似太陽光を照射する際にはサンプルを 96 well microplate (平底, コーティングなし) に入れて行うが, その際には水分揮発によるサンプル濃度変動を回避するためにフタをすることが必要である. 通常の microplate のフタでは照射光のスペクトルパターンが変化する可能性が高く, それ故 solar simulator からの照射光に影響が出ないよう留意すべきである. 望ましくは図 2 (次頁) に示す quartz reaction container (オザワ科学, 愛知) を用いることが推奨されるが, これに限定されるものではなく同等品を用いてもよい. 推奨される quartz reaction container はスチール製の固定具, 白色テフロンシート, そしてフタの役目を果たす quartz plate から構成される. また, Onoue らは先に, 96 well のうち図 2 に示す領域 (B2–G11) にはほぼ同等の照射量の擬似太陽光が注がれることを明らかにしており (Onoue *et al.*,

2008), それ故, 信頼あるデータを得るためにはこの領域を用いて ROS アッセイを行うことが推奨される.

### 2.5.3 その他に必要とされる器具・装置

ROS アッセイを実施する際には先述の装置・器具のほか, 校正された UVA detector, 温度計, マイクロプレートリーダー, 光学顕微鏡, ボルテックスミキサー, プレートシェーカー, 超音波洗浄機, マイクロピペットなどが必要である.

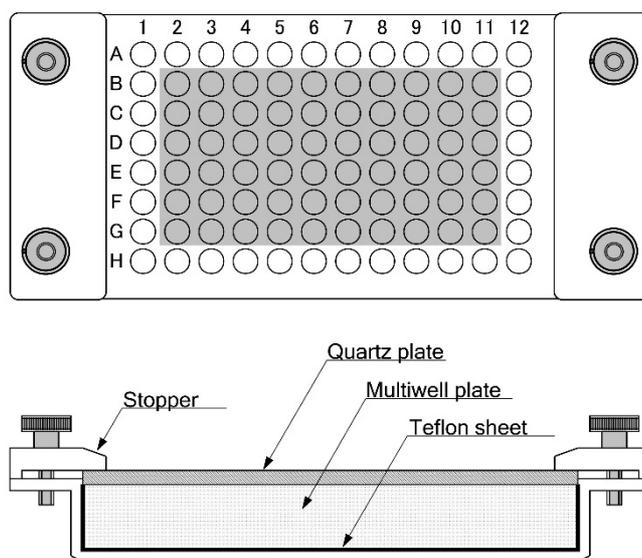


図 2 reaction container の構成

## 2.6 試験方法ならびにデータ解析

ROS アッセイでは singlet oxygen と superoxide の双方を分析するため, まずそれぞれの測定に必要な assay mixture を図 3 に従い作成する. singlet oxygen 測定用の assay mixture (1 mL) には任意の濃度の被験物質, 50 n mol の *p*-nitrosodimethyl aniline, 50 n mol の imidazole がそれぞれ含まれ, superoxide 測定用の assay mixture (1 mL) は任意の濃度の被験物質と 50 n mol の NBT を含有する. 調製後, 200  $\mu$ L の assay mixture を 96 well microplate に  $n=3$  になるよう図 4 に従って移し, その後に光学顕微鏡観察 ( $\times 100$ ) によって不溶性粒子あるいは析出物の有無を確認する. もし, 被験物質の溶解度の問題で完全に溶解していなかった場合には DMSO stock solution を希釈して 200 $\mu$ M より低い濃度での ROS アッセイを実施することで対応する. 陽性ならびに陰性コントロールとして quinine

(200  $\mu\text{M}$ ) と sulisobenzone (200  $\mu\text{M}$ ) の assay mixture を調製するとともに, blank として被験物質の stock solution の代わりに NaPB を加えたものも併せて用意する. Plate shaker によって 5 秒程度攪拌した後, 擬似太陽光照射前の各 assay mixture の吸光値 (singlet oxygen は 440 nm, superoxide は 560 nm) をプレートリーダーで測定する. 96 well microplate を quartz reaction container にセットし, 気密性を高めるために quartz plate をしっかりと固定する. Solar simulator のチャンバー内に assay mixture を入れるか, 照射エリアに assay mixture を配置し, 1 時間擬似太陽光を照射する (照射量: Suntest CPS/CPS+ は約 2.0  $\text{mW}/\text{cm}^2$ , SXL-2500V2 は 3.0-5.0  $\text{mW}/\text{cm}^2$ ). 露光後には被験物質や  $\text{NBT}^+$  が析出していることがあるため, 1 分程度 plate shaker で混和し, その後にプレートリーダーにて各 assay mixture の吸光値を同様に測定する.

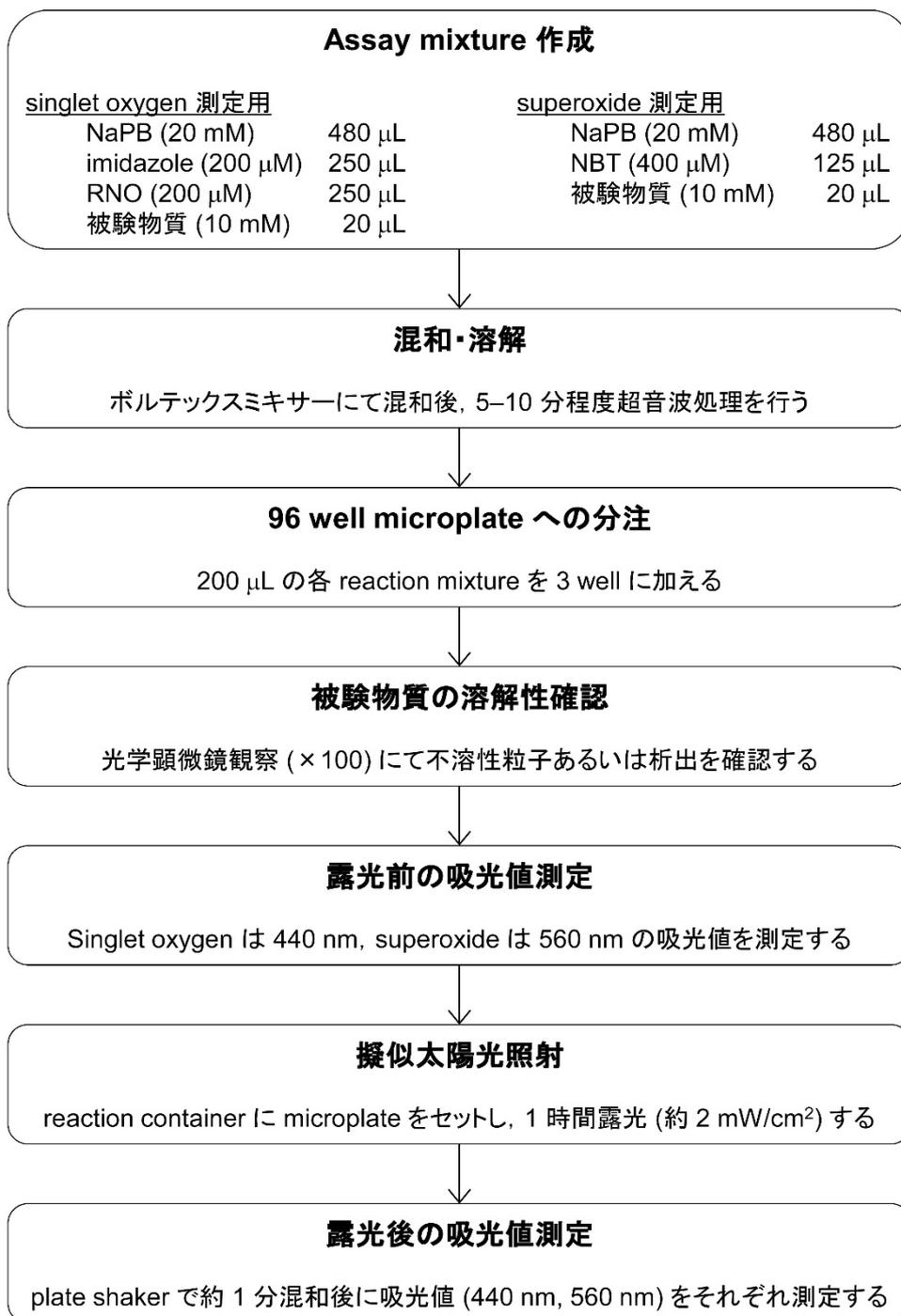


図 3 ROS アッセイのワークフロー

Blank ならびに被験物質の露光前後の吸光値から singlet oxygen ならびに superoxide の産生を以下の通りそれぞれ計算する。被験物質に着色が認められ、なおかつ光照射によって変色が認められる場合には、ROS 反応基質を含まない Assay mixture を用意して ROS

assay と同様の操作を行い、440 nm あるいは 560 nm における吸光値変化を ROS assay データから差し引くことで対応が可能である。

Singlet oxygen の産生 :  $\Delta A_{440} \times 10^3 = \{A_{440(-)} - A_{440(+)} - (A - B)\} \times 10^3$

A<sub>440(-)</sub>: 露光前の assay mixture の 440 nm における吸光値

A<sub>440(+)</sub>: 露光後の assay mixture の 440 nm における吸光値

A: 露光前の blank の 440 nm における吸光値

B: 露光後の blank の 440 nm における吸光値

Superoxide の産生 :  $\Delta A_{560} \times 10^3 = \{A_{560(+)} - A_{560(-)} - (B - A)\} \times 10^3$

A<sub>560(-)</sub>: 露光前の assay mixture の 560 nm における吸光値

A<sub>560(+)</sub>: 露光後の assay mixture の 560 nm における吸光値

A: 露光前の blank の 560 nm における吸光値

B: 露光後の blank の 560 nm における吸光値

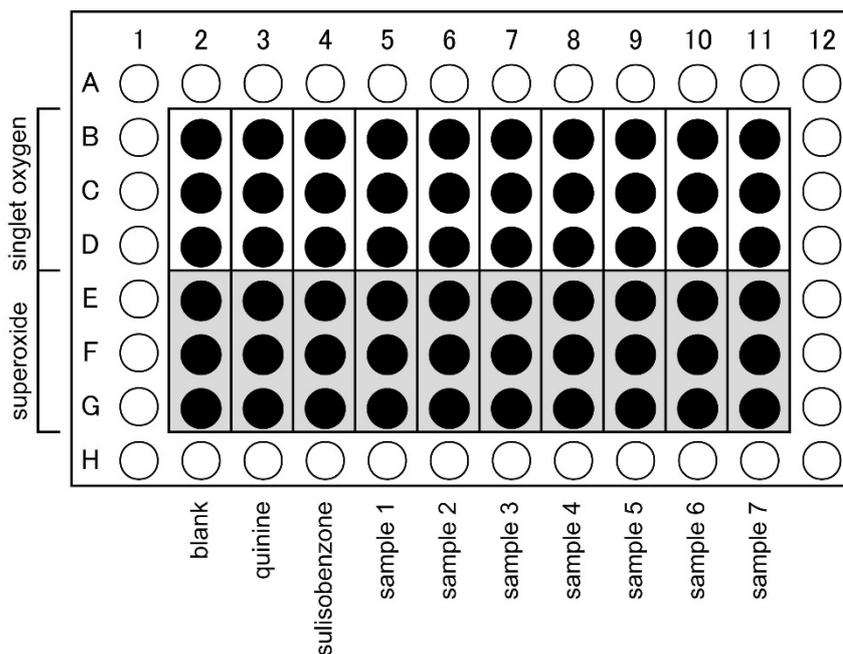


図 4 ROS アッセイにおけるサンプルレイアウト

## 2.7 データ採用条件

ROS アッセイを行う際には以下の条件を満たした場合にのみデータを採用するものとする。

- (i) 露光前の assay mixture 中において被験物質が溶解していること
- (ii) blank, 陽性ならびに陰性標準物質についても同時に ROS アッセイで評価していること. その際には陽性標準物質 quinine (200  $\mu$ M) の singlet oxygen データが 300 以上, superoxide が 200 以上であり, 陰性標準物質 sulisobenzone (200  $\mu$ M) の singlet oxygen データが 25 以下, superoxide が 20 以下であること.
- (iii) 標準物質ならびに被験物質の assay mixture の 440 nm あるいは 560 nm における吸光値が 0.02 から 1.5 の範囲に入っていること.

## 2.8 陽性基準

約 40 種の市販医薬品化合物における ROS アッセイデータとそれらの光安全性に関する臨床情報から, ROS アッセイにおける経験則的な閾値を設定した (Onoue *et al.*, 2008). 被験物質 (200  $\mu$ M) の ROS data について, singlet oxygen ( $\Delta A_{440\text{ nm}} \cdot 10^3$ ): 25 以上, そして superoxide ( $\Delta A_{560\text{ nm}} \cdot 10^3$ ): 20 以上のいずれかの条件を満たしたとき, 被験物質は光感受性が高くならんかの光毒性反応を惹起する可能性があるものと判断できる. ただし, 溶解度の問題で希釈下での ROS アッセイを余儀なくされた際にはこの限りではない. すなわち, assay mixture 中の被験物質濃度が 200  $\mu$ M よりも低い場合, ROS data が上記閾値を超えていた場合には陽性判定を行うことができるが, 閾値よりも低い場合には陰性判定はできない.

## 3 試験法のバリデーション

### 3.1 用いられた物質とその妥当性

ROS アッセイの多施設バリデーションでは 2 種類のソーラーシミュレータが使用され, それぞれ 1 試験ずつ計 2 試験が実施された. 各試験は技術移転性の評価を目的としてプレバリデーション (Phase I) 試験と試験法の評価を目的とするバリデーション (Phase II) より構成された. プレバリデーション, バリデーションに共通して, 陽性対照物質として quinine HCl を, 陰性対照物質として sulisobenzone が使用された. Quinine HCl はヒトの光毒性物質として報告されている (Ljunggren *et al.*, 1986). Sulisobenzone は 3T3 NRU-PT のバリデーション試験でヒトデータをもとに非光毒性物質に分類されている (Spielmann *et al.*, 1998).

なお, プレバリデーションに用いた 5-fluorouracil (5-FU) はヒトで光毒性物質として報告されている (Dillaha *et al.*, 1983) が, 3T3 NRU-PT では光毒性を示さないと報告されている

(Kleinman et al, 2010 and Onoue et al, 2010) . 5-FU による光毒性の原因として、UV-B のみに反応しているとの報告 (Kirkup M.E. et al, 2003 and Andersen K.E. et al, 1984) や UV-B で光分解する際の ROS 生成によるとの報告 (Miolo G. et al, 2011) がある. 5-FU は自然の太陽光の波長範囲では主に UV-B (290-320 nm) を吸収する (バリデーション報告書, Appendix 7) ことから、5-FU の光化学的な活性化には UV-B の照射が必須と考えられる. 5-FU の光毒性に関して、高品質なヒトでのデータはなく、5-FU が光毒性物質であるかどうかは判断できなかった. 5-FU は、3T3 NRU-PT だけでなく、ROS アッセイでも陽性結果を示さないとの情報があったことから、ROS アッセイの限界に関する情報を確認するためにプレバリデーション用の化合物として選択された. 一方、5-FU を含むフッ化ピリミジン系薬剤の副作用として手足症候群 (重篤副作用疾患別対応マニュアル, 手足症候群, 厚生労働省, 2010) が知られており、5-FU の光毒性として疑われている. しかし、いわゆる化学物質による直接的な光毒性によるものではなく、手足症候群の症状が太陽光線への曝露によって悪化した症例が含まれている可能性も考慮すべきかもしれない.

### 3.1.1 プレバリデーション

プレバリデーションでは陰性対照物質、陽性対照物質を含む 13 物質が使用された. プレバリデーションに使用した物質に関する情報をバリデーション報告書より抜粋し、Appendix 2 および Appendix 3 に示す.

他の 10 物質のうち、8-MOP, amiodarone HCl, chlorpromazine, doxycycline HCl, furosemide, ketoprofen および norfloxacin は 3T3NRU-PT バリデーション試験の光毒性物質のリストから選択された. ヒトのデータは 3T3NRU-PT バリデーション試験に記載されている (Spielmann et al, 1994a and 1998a) . Diclofenac, levofloxacin, omeprazole のヒト光毒性物質との報告を根拠に選択された (Przybilla et al, 1987, Boccumini et al, 2000, Dam et al, 2008) .

### 3.1.2 バリデーション

バリデーションに用いた化学物質の構成を表 2 に示す. 光毒性物質 23 物質、非光毒性物質 19 物質の計 42 物質をコード化した状態で、試験施設 7 施設に分配した. 42 物質の構成は医薬品 23 物質、化学物質 9 物質、紫外線吸収剤 10 物質であった. バリデーションに使用した物質の選択根拠を Appendix 4 に示した.

表 2 バリデーションに用いられた物質

分類	光毒性物質 (23 物質)	非光毒性物質 (19 物質)
医薬品 (23 物質)	(18 物質) Acridine Acridine HCl Amiodarone HCl Chlorpromazine HCl Doxycycline HCl Fenofibrate Furosemide Ketoprofen 6-Methylcoumarine	(5 物質) Aspirin Benzocaine Erythromycin Phenytoin Penicilin G
化学物質 (9 物質)	(4 物質) Anthracene Bithionol Hexachlorophene Rose Bengal	(5 物質) Sodium dodecyl sulphate Cinnamic acid Chlorhexidine L-histidine p-Aminobenzoic acid
紫外線吸収剤 (10 物質)	(1 物質) Butyl methoxydibenzoylmethane (Avobenzone)	(9 物質) Benzy lindene camphor sulphonic acid 4-Methyl benzy lidene camphor Octyl salicylate Octyl methoxycinnamate 2-Ethylhexyl 4-methoxycinnamate 2-(2-Hydroxy-5-methylphenyl)benzotriazole 2-tert-Butyl-6-(5-chloro-2H-benzotriazol-2-yl)-4-methylphenol 2-(2H-Benzotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenol 2-(2H-Benzotriazol-2-yl)-6-dodecyl-4-methylphenol

### 3.1.3 試験法の正確性を評価するために用いられた化学物質の in

#### vivo 参照データ

ROS アッセイの多施設バリデーション試験では、コード化した化合物を用いて実施したプレバリデーション試験の結果を用いて試験法の正確性を評価した。バリデーションに用いた 42 物質の光化学的特性およびヒト、動物、*in vitro* 評価系での光毒性に関する情報をバリデーション報告書より抜粋し、Appendix 5 に示した。使用した物質のうち、光毒性物質と非光毒性物質がほぼ半々であることは感度や特異度等、試験法の正確性を評価するために実施するバリデーション試験に適していたと思われる。しかしながら、医薬品では光毒性物質の割合が多く、紫外線吸収剤では非光毒性物質の割合が多く、物質の種類によって、選定された陽性物質と陰性物質に偏りがあった。

なお、第三者評価委員会はその報告書において、使用した化学物質に関し「第三者評価委員会はバリデーション試験で選択された化学物質はアッセイを評価する化学物質の代表として適切かつ十分なであることに同意した。ヒト光毒性物質を含む 42 物質は陽性として知られる 23 物質，陰性 19 物質より構成された。それらの物質はヒトパッチテストと 3T3 NRU-PT のデータに裏付けられていた。バリデーション試験で得られたすべてのデータはバリデーション試験報告書に記載されている。」と記載している。

## 3.2 バリデーション結果の評価

### 3.2.1 試験法のデータと結果の利用性

ROS アッセイ多施設バリデーションでは 2 種類のソーラーシミュレータが使用され、2 試験実施された。1 試験目はアトラス社の Suntest CPS/CPS+を用い、2011 年 3 月～10 月にかけて、3 施設で実施され、もう 1 試験はセリック社の SXL-2500V2 を用い、2011 年 5 月～2012 年 6 月にかけて 4 施設で実施された。

これらのバリデーション試験のデータと結果はバリデーション報告書中に記載され、利用可能である。

### 3.2.2 試験方法の正確性

バリデーション試験結果から算出した試験施設の感度，特異度，陽性予測率，陰性予測率および正確性を表 3 に示した。難溶性のため評価不可能であった物質を除くと，光毒性物質に対する感度は全施設ともに 100%であり，陰性予測率も各施設とも 100%であり，偽陰性はなかった。

表 3 ROS アッセイバリデーション試験結果

試験施設	人工太陽灯光源	感度	特異度	陽性予測率	陰性予測率	正確性
1	アトラス社 Suntest CPS/CPS+	100% (21/21)	75.0% (12/16)	84.0% (21/25)	100% (12/12)	89.2% (33/37)
2		100% (18/18)	71.4% (10/14)	81.8% (18/22)	100% (10/10)	87.5% (28/32)
3		100% (20/20)	88.2% (15/17)	90.9% (20/22)	100% (15/15)	94.6% (35/37)
4	セリック社 SXL-2500V2	100% (19/19)	71.4% (10/14)	82.6% (19/23)	100% (10/10)	87.9% (29/33)
5		100% (19/19)	50.0% (6/12)	76.0% (19/25)	100% (6/6)	80.6% (25/31)
6		100% (19/19)	73.3% (11/15)	82.6% (19/23)	100% (11/11)	88.2% (30/34)
7		100% (18/18)	69.2% (9/13)	81.8% (18/22)	100% (9/9)	87.1% (27/31)

Weakly photoreactive と判定された物質を光毒性物質と判定した場合の判定結果を示す。

感度：光毒性物質が ROS アッセイで陽性を示す割合（％）

特異度：非光毒性物質が ROS アッセイで陰性を示す割合（％）

陽性予測率：ROS アッセイで陽性だった物質のうち、光毒性物質の割合（％）

陰性予測率：ROS アッセイで陰性だった物質のうち、非光毒性物質の割合（％）

正確性：ROS アッセイの判定結果が光毒性物質、非光毒性物質を正しく判定した割合（％）

### 3.2.3 試験データの再現性

各施設における陽性対照物質、陰性対照物質の日内変動を図 5 に、日間変動を図 6 に示し、また、光源装置間の再現性を図 7 に示した。日内変動、日間変動ともに小さく、施設間、異なる光源装置間の変動も小さかった。試験系の施設内、施設間の再現性は高く、光源装置間の汎用性に問題なかった。また、各施設における試験結果の再現性について、表 4 に示した。

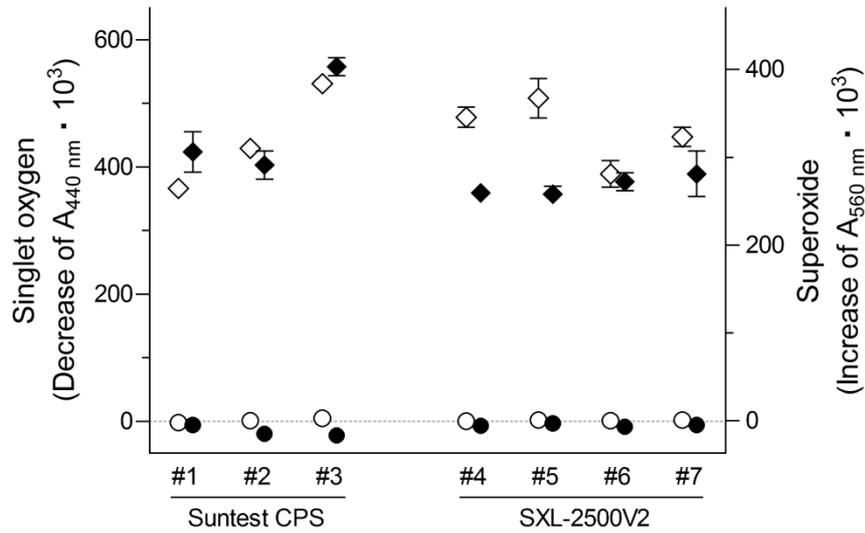


図5 各試験施設における陽性対照物質，陰性対照物質の日内変動  
 日内変動は各施設で最も多くの測定を実施した日の陽性および陰性対照物質の結果から算出した。Lab#1-3: Atlas Suntest CPS(約 2.0 mW/cm<sup>2</sup>), Lab#4-7: Seric SXL-2500V2 (3.0-5.0 mW/cm<sup>2</sup>)., ◇: quinine の singlet oxygen, ◆: quinine の superoxide; ○: sulisobenzone の singlet oxygen, ●: sulisobenzone の superoxide, データは mean ± SD を示す(n=9).

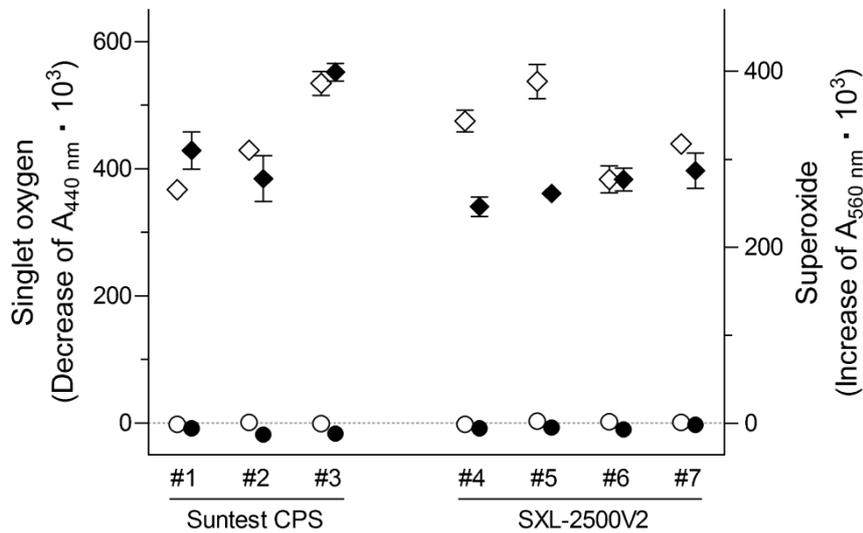


図6 各試験施設における陽性対照物質，陰性対照物質の日間変動  
 日間変動は各施設の測定日における最初の測定における陽性および陰性対照物質の結果から算出した。Lab#1-3: Atlas Suntest CPS(約 2.0 mW/cm<sup>2</sup>), Lab#4-7: Seric SXL-2500V2 (3.0-5.0 mW/cm<sup>2</sup>)., ◇: quinine の singlet oxygen, ◆: quinine の superoxide; ○: sulisobenzone の singlet oxygen, ●: sulisobenzone の superoxide, データは mean ± SD を示す(days 1, 2, and 3; n=9).

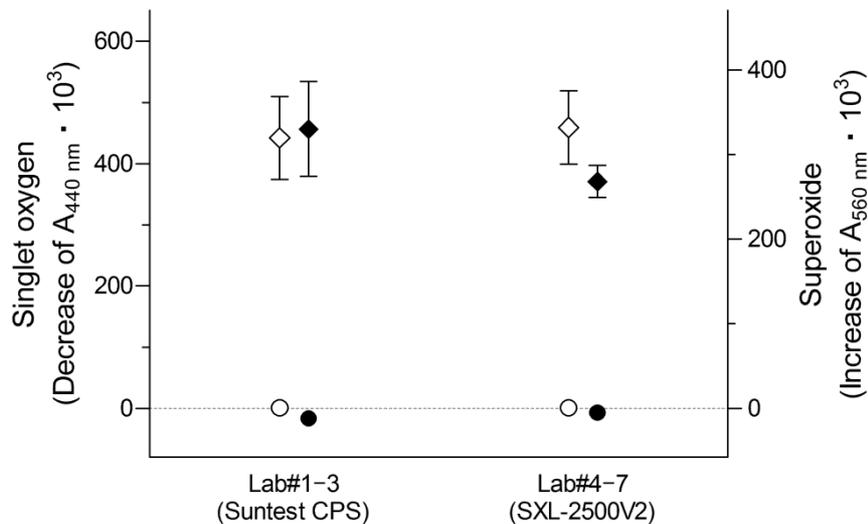


図7 陽性対照物質，陰性対照物質の光源装置間の再現性  
 日間変動は各施設の測定日における最初の測定における陽性および陰性対照物質の結果から算出した。Lab#1-3: Atlas Suntest CPS(約 2.0 mW/cm<sup>2</sup>), Lab#4-7: Seric SXL-2500V2 (3.0-5.0 mW/cm<sup>2</sup>)., ◇: quinine の singlet oxygen, ◆: quinine の superoxide; ○: sulisobenzone の singlet oxygen, ●: sulisobenzone の superoxide, データは mean±SD を示す(days 1, 2, and 3; n=9).

表 4 バリデーション結果の光源装置間，施設間の再現性

		バリデーションに用いた化学物質				
		光毒性物質		非光毒性物質		
ROS アッセイ バリデーション結果	陽性	Suntest CPS	SXL-2500V2	Suntest CPS	SXL-2500V2	
		[#1] 21	[#4] 19	[#1] 4	[#4] 4	
		[#2] 18	[#5] 19	[#2] 4	[#5] 6	
		[#3] 20	[#6] 19	[#3] 2	[#6] 4	
			[#7] 18		[#7] 4	
		陰性	Suntest CPS	SXL-2500V2	Suntest CPS	SXL-2500V2
			[#1] 0	[#4] 0	[#1] 12	[#4] 10
	[#2] 0		[#5] 0	[#2] 10	[#5] 6	
	[#3] 0		[#6] 0	[#3] 15	[#6] 11	
			[#7] 0		[#7] 9	

Lab#1-3: Atlas Suntest CPS(約 2.0 mW/cm<sup>2</sup>), Lab#4-7: Seric SXL-2500V2 (3.0-5.0 mW/cm<sup>2</sup>)  
 数値は ROS アッセイで陽性あるいは陰性を示した物質のうち，光毒性物質あるいは非光毒性物質の個数を示す。

### 3.2.4 試験方法のデータの信頼性

バリデーションに参加したすべての試験施設が日常的に GLP 適合試験を実施している施設ではないが、データの信頼性保証はなされた。すなわち、すべての生データおよび解析結果は各施設において確認され、その後、バリデーション運営員会の信頼性保証グループで確認されていた。これらの操作を通じ、信頼性保証の観点で、生データが正確に試験結果に反映されていることが確認されていた。

## 4 試験方法に関する他の科学的考察

### 4.1 光に不安定な物質への適用

ROS アッセイは医薬品の光化学的反応性を迅速かつ簡便に測定できるが、その反面、得られるデータからは光安全性だけではなく、光安定性などに問題がある化合物も含めて陽性と判別することがある。これは ROS アッセイが光毒性反応のきわめて初期に起こる光化学的反応性を評価するツールであるが故の課題であり、光安全性評価における一次スクリーニングとして本法を利用する際にはこの点を熟考の上データの解釈を行う必要がある。Onoue らはこの課題を解決すべく、試験溶液と共に指示薬を添加しない試験コントロール溶液を調製し、反応後に反応溶液から試験コントロール溶液で得られた値を差し引く手法を提案しており、光安定性に問題のある化合物に対する予測精度の改善が認められている (Onoue et al., 2013)。

### 4.2 難溶性物質への対応

近年の創薬活動においては水に難溶性の化合物が医薬品候補物質として創出されることが非常に多いが、ROS アッセイにおいては基本的に 200  $\mu\text{M}$  の濃度でスクリーニングを行うために assay mixture 中での析出を認めることがある。その場合にはより低濃度になるよう希釈を行って ROS アッセイを実施することが可能ではあるが、その際には得られたデータによって陽性判定を出すことはできても陰性判定を出すことがきわめて難しい。Onoue らはこの課題を解決すべく、界面活性剤を利用した ROS アッセイやアルブミンを assay mixture に加えた改良型 ROS アッセイを提案しており、本手法では難溶性医薬品への適用率が顕著に改善される (Onoue et al., 2008; Onoue et al., 2014; Seto et al., 2013)。界面活性剤を利用した改良型 ROS アッセイについては、難水溶性の化粧品素材においてもその有用性が確認されており、ROS アッセイの適用性拡大に大きく寄与するものと期待される (Onoue et al., 2013)。ただし、assay mixture の組成を変えた場合には ROS アッセイにおける判定基

準が変わる可能性があり，誤った光安全性情報を得ることがないよう細心の注意が必要である。

### 4.3 混合物および分子量不明試料への対応

化粧品素材においては定まった分子量を有していない植物抽出物等の混合物が数多く存在するが，ROS アッセイにおいては，前述の通り 200  $\mu\text{M}$  の濃度でスクリーニングを行うために，モル濃度の算出できない混合物の試験実施が不可能である．Nishida らはこの課題を解決すべく，試験濃度を分子量が明確でないと設定できないモル濃度ではなく， $\mu\text{g}/\text{mL}$  単位での ROS アッセイを報告している (Nishida et al., 2015)．本報告に使用された物質を表 5 に示し，また，得られた結果を表 6 に示した．報告では，これまでに光安全性上の懸念が存在すると報告されている化学物質のほとんどが分子量 500 以下の低分子化合物であり，その平均分子量は 250 と仮定できること，分子量 250 の化合物が 200  $\mu\text{M}$  となる 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  での試験で，定法の ROS アッセイと同等の感度が認められることが確認されている．混合物を用いた検証においても，適用濃度 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  での試験は陽性検出率 100%である有用なスクリーニングツールであることが確認されたことから，モル濃度の設定できない素材への ROS アッセイ展開の可能性が示された．ただし混合物によって，植物抽出物のように，その内容物が不明瞭である場合が考えられ，同じ名前の素材においてもその構成成分や組成が大きく異なる可能性がある．このような場合においては，ROS アッセイで得られる結果にも大きな影響を及ぼすことが考えられるため，誤った光安全性情報を得ることが無いように細心の注意が必要である．

表 5 試験に用いられた物質

分類	光毒性物質 (40 物質)		非光毒性物質 (26 物質)
化粧品 (30 物質)	(17 物質) 4-Methyl-7-ethoxycoumarin 5-Methoxypsoralen 6-Methylcoumarin 7-Methoxycoumarin 8-Methoxypsoralen Benzophenone Bithionol Dichlorophene Fenticlor	Hexachlorophene Methyl $\beta$ -naphthyl ketone Methyl <i>N</i> -methyl anthranilate Musk ambrette Musk ketone Musk xylene <i>p</i> -Phenylenediamine Triclocarban	(13 物質) 1,3-Butylene glycol 2-Propanol 3-(4-Methylbenzylidene) camphor Ascorbic acid Cetyl alcohol Ethanol Glycerine Isopropyl myristate Lauric acid Propylene glycol Sodium laurate Sodium lauryl sulfate Sulisobenzene
その他物質 (16 物質)	(12 物質) Acridine Amiodarone HCl Chlorpromazine HCl Diclofenac Na Enoxacin Fenofibrate	Indomethacin Ketoprofen Piroxicam Promethazine HCl Sulfanilamide Tetracycline HCl	(4 物質) DMSO Lactic acid Methyl salicylate Penicillin G
混合物 (20 物質)	(11 物質) Angelica root oil Bergamot oil Celery seed oil Cumin seed oil Grapefruit oil Lemon oil Lime oil Oil parsley St. John's wort powder Tagetes oil Verbena oil		(9 物質) Carrot oil Corn oil Ginger oil Lemongrass oil Olive oil Orange oil Rape seed oil Safflower oil Soybean oil

表 6 ROS アッセイ試験結果 (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

分類	感度	特異度	陽性予測率	陰性予測率	正確性
化粧品	100% (17/17)	76.9% (10/13)	85.0% (17/20)	100% (10/10)	90.0% (27/30)
その他物質	100% (12/12)	50.0% (2/4)	85.7% (12/14)	100% (2/2)	87.5% (14/16)
混合物	100% (11/11)	55.6% (5/9)	73.3% (11/15)	100% (5/5)	80.0% (16/20)

50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で試験を実施し、判定基準は従来法に従った場合の結果を示す。

感度：光毒性物質が ROS アッセイで陽性を示す割合 (%)

特異度：非光毒性物質が ROS アッセイで陰性を示す割合 (%)

陽性予測率：ROS アッセイで陽性だった物質のうち、光毒性物質の割合 (%)

陰性予測率：ROS アッセイで陰性だった物質のうち、非光毒性物質の割合 (%)

正確性：ROS アッセイの判定結果が光毒性物質、非光毒性物質を正しく判定した割合 (%)

## 4.4 光アレルギー性予測への利用

化粧品素材において、光安全性は光毒性と光アレルギー性に分けられるが、そのうち、光アレルギー性は、光を介した物質とタンパク質の直接結合または、光による分解物とタンパク質の結合による抗原形成が重要である。光照射による励起光毒性物質産生時に発生する singlet oxygen と superoxide は、光刺激性を惹起する毒性励起物質だけではなく、光アレルギー性を示す物質でも同様に発生し、光アレルギー性では、光タンパク結合または光分解のエネルギーにつながると考えられている (Tokura, 2009)。一般に、光アレルギー性の定義が定まっておらず、臨床の現場においても光毒性と光アレルギー性が明確に分けられていない場合が多いと考えられる。このような現状においては、光毒性を示さない光アレルギー性物質の選定が難しいため、ROS アッセイが作用機序の観点から光アレルギー性物質の検出が可能か否かを検証することは容易ではない。そこで Onoue らは、光アレルギー性物質として報告されている物質の中で、*In vivo* 光毒性試験において陰性結果が報告されている物質、もしくは 3T3 NRU-PT を実施し、陰性もしくは疑陽性を示した物質を光アレルギー性の寄与が高い物質として分類した。光アレルギー性物質として分類された 18 物質を表 7 に示した。それら全ての ROS アッセイの結果は陽性であった。従って、光毒性に光アレルギー性を含めた光安全性の評価ツールとして ROS アッセイを利用することは妥当と考えられる(Onoue et al., perspnal communication)。

表 7 光毒性陰性が報告されている光アレルギー性物質

光毒性陰性報告	<i>In vivo</i> assay (Guinea pigs)	<i>In vitro</i> assay (3T3 NRU-PT)	
光アレルギー性物質として報告されており、 <i>In vivo</i> and/or <i>In vitro</i> 光毒性試験で陰性を示す化合物 (18 物質)	陰性 (10 物質) 6-Methylcoumarin Bithionol Indomethacin Ketprofen Musk ambrette Musk xylene Piroxicam Sulfanilamide Tribromosalicylanilide Trichlorocarbanilide	陰性 PIF < 2 (5 物質) Dichlorophene Fenticlor Hexachlorophene Hydrochlorothiazide Isoniazid	疑陽性 PIF > 2 and < 5 (3 物質) Octyl dimethyl PABA Omadine (Na salt) Pyridoxine HCl

PIF: Photo irritation factor

## 5 3Rs への関与（動物福祉面からの妥当性）

ROS アッセイでは化合物を反応液に溶解して光を照射した際に產生される ROS を測定する試験系であり、動物あるいは動物由来の生体材料を使用しないことから、ROS アッセイの実施に際して動物福祉面の問題は存在しない。

ROS アッセイは、2014 年 5 月に公開された医薬品の光安全性ガイドラインにおいて、初期評価の評価項目のひとつの化学的光反応性評価系として記載され、ROS アッセイで陰性と判定された開発中の医薬品に、さらなる光毒性試験を行う必要ないとされている。そのため、ROS アッセイを光安全性評価に導入することにより、*in vitro* 光毒性試験である 3T3 NRU-PT の試験数を削減することができ、さらに *in vivo* 光毒性試験の試験数削減につながる。

## 6 試験方法の有用性と問題点

細胞や動物を利用する光安全性評価系ではエネルギーの高い UVB を光源として使用することが難しく、多くの場合は UVA のみの照射を余儀なくされる。このため、UVB 領域にしか吸収を有さない化合物に対しては偽陰性評価を与えることがあるが、ROS アッセイはシンプルな物性評価系であるために UVB の照射も可能となる。また、生体試料を必要としないシステムのため、その再現性も高い。一方、方法論的な限界としては ROS アッセイは化合物を反応液に溶解して光を照射した際に產生される ROS 量を吸光度の変化から測定する試験系であるため、反応液中で析出する溶解性の低い物質や溶解時に着色が認められる化学物質は評価できない。これら課題についての解決策として改良型 ROS アッセイや試験コントロール溶液の設置などが提案されており、それらで得られた知見については ROS アッセイの結果判断の更なる助けになるであろう。また、ROS アッセイは代謝過程を含まないことから被験物質の生体内代謝に依存する光安全性リスクを予測することが難しい。

試験に用いた濃度と陽性/陰性判定について、陽性結果の判定ならびに 200  $\mu\text{M}$  濃度での陰性判定には問題ないが、20  $\mu\text{M}$  濃度での陰性判定には注意する必要がある。バリデーショナルマネジメントチームが第三者評価委員会の勧告を受けて作成した推奨プロトコールでは析出、着色により 200 $\mu\text{M}$  で判定できない場合に 20  $\mu\text{M}$  の試験結果を採用できるとしている。しかしながら、行政への申請時にさらなる光毒性評価は不要と判断する根拠として 20  $\mu\text{M}$  の陰性結果を利用する場合には、被験物質の光照射条件下での安定性を確認するものと規定している。一方、医薬品の光安全性評価ガイドライン（厚生労働省、2014）では ROS アッセイに関して、「200 $\mu\text{M}$  の試験濃度で適切な条件下で実施された場合、この試験法での陰性結果は光毒性の懸念が非常に低いことを示す…」と記載され、20  $\mu\text{M}$  での陰性判定結果はさらなる光安全性試験を不要とする根拠として採用しないことを示している。バリデー

ション報告書によると、プレバリデーションでの陽性化学物質 11 物質は、200  $\mu\text{M}$  で全物質が陽性を示し、20  $\mu\text{M}$  では 10 物質が陽性結果を示し、1 物質 (8-MOP) が陰性を示した。また、ICH の S10 E W G の指摘を受けて、バリデーション参加施設 1 施設にて実施したバリデーションに用いた 42 物質について、20  $\mu\text{M}$  濃度での ROS アッセイを実施した結果は 200  $\mu\text{M}$  濃度測定時に比べると反応は小さかったが、すべての陽性物質で陽性を示し、8-MOP も含め、偽陰性結果を呈した物質はなかった。200  $\mu\text{M}$  に比べ、20  $\mu\text{M}$  で反応が小さくなる濃度に関連した要因として、化合物の光安定性が考えられたこと、ならびに、20  $\mu\text{M}$  での偽陰性結果を示した 8-MOP は 200  $\mu\text{M}$  濃度で評価可能で陽性結果を示したこと、推奨プロトコールでは 20 $\mu\text{M}$  濃度の結果は 200  $\mu\text{M}$  で評価できない場合、かつ、測定条件下で被験物質に光による分解が認められない場合に限定することにより、バリデーションの結果が正確に反映されている。一方、ICH S10 EWG では 20  $\mu\text{M}$  での陰性結果を医薬品開発品の光安全性評価を不要とする判断の根拠として採用することに慎重であり、陰性結果は 200  $\mu\text{M}$  での試験結果のみを採用することとなった。今後、20  $\mu\text{M}$  濃度での試験結果の集積あるいは 200  $\mu\text{M}$  濃度での可溶化等の析出防止技術の応用により、試験結果の利用方法が複数あることによる混乱が解消されることが望まれる。

混合物および分子量不明試料については、 $\mu\text{g/mL}$  単位での ROS アッセイに関する報告がなされている。

医薬品では ROS アッセイは光安全性の初期評価として、光安全性評価の要否判断に利用可能であり、ICH 加盟国の規制当局により受け入れられる。

化学物質および農薬では、ROS アッセイは光反応性を評価することで、潜在的な光毒性のハザード検出手法として有用であろう。

化粧品では、ROS アッセイおよび改良型 ROS アッセイを適用することで、光毒性、光アレルギー性物質の検出が可能であることが示されている (Onoue et al., 2013)。しかしながら、光化学的反応性試験である ROS アッセイの特性から、適切に実施された ROS アッセイで陰性であれば光毒性、光アレルギー性を示さないと判断して差支えないが、ROS アッセイにおける陽性は光反応性を有することを示すものであって、光毒性、光アレルギー性の有無の評価は別途評価されるべきである。

## 7 結論

ROS アッセイは化学物質に擬似太陽光を照射し、singlet oxygen と super oxide anion の産生の有無を調べる光反応性試験の一つである。7 施設により実施された多施設バリデーション試験において、ROS アッセイは、施設内の日内差/日間差および施設間差が小さく、汎用性に優れている試験法であることが示された。また、難溶性のため評価できなかった被験物質を除くと、ROS アッセイによる光毒性物質の陽性検出率は 100%であり、偽陰性結果がないことから、ROS アッセイは光毒性ポテンシャルの評価に有用であると考えられた。

さらに ROS アッセイ多施設バリデーションの第三者評価委員会はその報告書(Spielmann et al., 2013) において、「委員会は、ROS アッセイの再現性および予測性が一連の光安全性試験実施ならびに医薬品の研究開発における意思決定戦略で ROS アッセイが利用されることを支持することに十分であると結論する。この戦略において、ROS アッセイで陽性、弱い陽性を示すか、判定不能の場合には、3T3 NRU-PT (OECD Test Guideline 432)などの次のレベルの *in vitro* 試験系に進め、陰性の場合には動物での試験や他の試験は要求されない。委員会はまた、ROS アッセイは光安全性評価に要する期間、費用および使用動物数の削減につながると結論した。さらに ROS アッセイを光安全性評価戦略に組み入れることは 3T3 NRU-PT やそれに続く動物での試験が必要となる化合物数を有意に減少させることにつながる。」と結論した。

本バリデーション結果に基づき、ICH の光安全性評価ガイドラインにおいて、ROS アッセイは全身および皮膚適用薬における光毒性評価の要否判断に利用可能な試験法の一つとして採択された (Step 4, 2013 年 11 月)。今後、ROS アッセイで陰性の場合には、さらなる光毒性評価が不要となり、光毒性試験数とその費用の削減効果が期待される。

さらに最近の検討において、光アレルギー性物質も ROS アッセイで検出することができるとの知見が得られ、ROS アッセイは光毒性だけでなく、光アレルギー性も含んだ光安全性の評価ツールとして利用されることが期待される。化粧品原料について混合物および分子量不明試料への適用可能性が示され、化粧品原料、一般化学物質ならびに農薬について ROS アッセイが潜在的な光安全性に関するハザード検出の手法として有用であることが期待される。

## 8 用語の解説

Chromophore (クロモフォア) : 可視光あるいは UV を吸収する分子の部分構造。

Internal conversion (内部転移) : ある分子がよりエネルギーの高い、もしくは低い振動励起状態に遷移すること。

Intersystem crossing (項間交差) : 高い振動励起状態の分子からのスピン変換に伴って近くに存在する分子が異なる振動励起状態に遷移すること。

## 9 参考文献

Andersen KE, Lindskov R (1984) Recall of UVB-induced erythema in breast cancerpatient receiving multiple drug chemotherapy. *Photodermatol*, 1, 129-132.

Bauer D, Averett LA, De Smedt A, Kleinman MH, Muster W, Pettersen BA, Robles C (2014), Standardized UV-vis spectra as the foundation for a threshold-based, integrated photosafety evaluation. *Regul Toxicol Pharmacol*, 68(1), 70-75.

- Boccumini LE, Fowler CL, Campbell TA, Puertolas LF, Kaidbey KH (2000) Photoreaction potential of orally administered levofloxacin in healthy subjects. *Ann Pharmacother*, 34(4), 453-458.
- Dam C, Bygum A (2008) Subacute cutaneous lupus erythematosus induced or exacerbated by proton pump inhibitors. *Acta Derm Venereol*, 88(1), 87-89.
- Dillaha CJ, Jansen GT, Honeycutt WM, Bradford AC (1983) Selective cytotoxic effect of topical 5-fluorouracil. *Arch Dermatol*, 119(9), 774-783.
- Henry B, Fotib C, Alsanteb K (2009) 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.
- Kirkup ME, Narayan S, Kennedy CTC (2003) Cutaneous recall reactions with systemic fluorouracil. *Dermatology*, 206(2), 175-176.
- Kleinman MH, Smith MD, Kurali E, Kleinpeter S, Jiang K, Zhang Y, Kennedy-Gabb SA, Lynch AM, Geddes CD (2010) An evaluation of chemical photoreactivity and the relationship to phototoxicity. *Regul Toxicol Pharmacol*, 58(2), 224-232.
- Ljunggren B, Sjövall P (1986) Systemic quinine photosensitivity. *Arch Dermatol*, 122(8), 909-911.
- Miolo G, Marzano C, Gandin V, Palozzo AC, Dalzoppo D, Salvador A, Caffieri S (2011) Photoreactivity of 5-Fluorouracil under UVB Light. *Chem Res Toxicol*, 24(8), 1319-1326.
- Nishida H, Hirota H, Seto Y, Suzuki G, Kato M, Kitagaki M, Sugiyama M, Kouzuki H, Onoue S (2015) Non-animal photosafety screening for complex cosmetic ingredients with photochemical and photobiochemical assessment tools. *Regul Toxicol Pharmacol*, 72(3):578-585.
- Onoue S, Tsuda Y (2006) Analytical studies on the prediction of photosensitive/phototoxic potential of pharmaceutical substances. *Pharm Res* 23(1), 156-164  
 Onoue S, Igarashi N, Yamada S, Tsuda Y (2008a) High-throughput reactive oxygen species (ROS) assay: an enabling technology for screening the phototoxic potential of pharmaceutical substances. *J Pharm Biomed Anal*, 46(1), 187-193.
- Onoue S, Yamauchi Y, Kojima T, Igarashi N, Tsuda Y (2008b) Analytical studies on photochemical behavior of phototoxic substances; Effect of detergent additives on singlet oxygen generation. *Pharm Res*, 25(4), 861-868.
- Onoue S, Seto Y, Gandy G, Yamada, S (2009) 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.
- Onoue S, Ochi M, Gandy G, Seto Y, Igarashi N, Yamauchi Y, Yamada S (2010) High-throughput screening system for identifying phototoxic potential of drug candidates based on derivatives of reactive oxygen metabolites. *Pharm Res*, 27(8), 1610-1619.
- 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 and Kojima H (2013a) 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.
- Onoue S, Suzuki G, Kato M, Hirota M, Nishida H, Kitagaki M, Kouzuki H, Yamada S (2013b) Non-animal photosafety assessment approaches for cosmetics based on the photochemical and photobiochemical properties. *Toxicol In Vitro*, 27(8), 2316-2324
- 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 (2014a) 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
- Onoue S, Kato M, Yamada S (2014b) Development of an albuminous reactive oxygen species assay for photosafety evaluation under experimental biomimetic conditions. *J Appl Toxicol*, 34(2), 158-165
- Onoue S et al. (manuscript preparation)
- Przybilla B, Ring J, Schwab U, Galosi A, Dorn M, Braun-Falco O (1987) Photosensitizing properties of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the photopatch test. *Hautarzt*, 38(1), 18-25.
- ROS assay validation management team (2013a) Validation report for the international validation study on ROS (Reactive Oxygen Species) assay as a test evaluating phototoxic potential of chemicals (Atlas Suntest version),

[http://www.jacvam.jp/files/news/ROS\\_Assay\\_full%2020130920%20atlas\\_fourth%20data.pdf](http://www.jacvam.jp/files/news/ROS_Assay_full%2020130920%20atlas_fourth%20data.pdf) (accessed May, 2015) ROS assay validation management team (2013b) Validation report for the international validation study on ROS (Reactive Oxygen Species) assay as a test evaluating phototoxic potential of chemicals (Seric version), [http://www.jacvam.jp/files/news/ROS\\_Assay\\_full%2020131009Seric%20fourth.pdf](http://www.jacvam.jp/files/news/ROS_Assay_full%2020131009Seric%20fourth.pdf) (accessed May, 2015)

ROS assay validation management team (2013c) ROS Assay Protocol Version 3.1, [http://www.jacvam.jp/files/news/ROS\\_protocol\\_v3.1\\_130920\\_clean](http://www.jacvam.jp/files/news/ROS_protocol_v3.1_130920_clean) (accessed May, 2015)

Seto Y, Kato M, Yamada S, Onoue S (2013) Development of micellar reactive oxygen species assay for photosafety evaluation of poorly water-soluble chemicals. *Toxicol In Vitro*, 27(6), 1838–1846

Spielmann H, Balls M, Brand M, Döring B, Holzhütter HG, Kalweit S, Klecak G, Eplattenier HL, Liebsch M, Lovell WW, Maurer T, Moldenhauer F, Moore L, Pape WJ, Pfanenbecker U, Potthast J, De Silva O, Steiling W, Willshaw A. (1994) EEC/COLIPA project on in vitro phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. *Toxicol In Vitro.*, 8(4), 793-796.

Spielmann H, Balls M, Dupuis J, Pape WJ, Pechovitch G, de Silva O, Holzhütter HG, Clothier R, Desolle P, Gerberick F, Liebsch M, Lovell WW, Maurer T, Pfanenbecker U, Potthast JM, Csato M, Sladowski D, Steiling W, Brantom P. (1998a) The International EU/COLIPA In Vitro Phototoxicity Validation Study: Results of Phase II (Blind Trial). Part 1: The 3T3 NRU Phototoxicity Test. *Toxicol In Vitro*, 12(3), 305-327.

Spielmann H, Stokes WS, Horii I, Kim BH (2013) Peer Review Panel Evaluation of the Reactive Oxygen Species (ROS) Photosafety Assay, [http://www.jacvam.jp/files/doc/02\\_03/02\\_03\\_C1.pdf](http://www.jacvam.jp/files/doc/02_03/02_03_C1.pdf) (accessed May, 2015)

Tokura Y (2009) Photoallergy. *Expert Rev Dermatol*, 4(3), 263-270.

尾上誠良, 中村和市 (2011) 光毒性, 社団法人日本薬理学会編集「実験薬理学 創薬研究のストラテジー下」(金芳堂)

厚生労働省 (2010) 重篤副作用疾患別対応マニュアル 手足症候群 (<http://www.info.pmda.go.jp/juutoku/file/jfm1003014.pdf>, 2015年2月アクセス確認)

厚生労働省 (2014) 医薬品の光安全性評価ガイドラインについて (薬食審査発 0521 第1号, 平成26年5月21日)

## 10 Appendix

### Appendix 1 Executive Summary of “Peer Review Panel Evaluation of the Reactive Oxygen Species (ROS) Photosafety Assay” (16 October 2013)

#### Executive Summary

The Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) convened an independent scientific peer review panel to evaluate the validation status of the Reactive Oxygen Species (ROS) assay in accordance with established international criteria (OECD, 2005). The ROS assay is a test method proposed as a component of an integrated photosafety testing strategy to evaluate whether test substances such as pharmaceuticals have the potential to cause phototoxicity.

The panel met initially in February and again in August 2013 in Tokyo, Japan. The panel considered the reports of two international validation studies and a proposed ROS assay protocol at their initial meeting. The panel subsequently reviewed updated versions of the ROS Assay protocol and the validation study reports as revised by the Validation Management Team (VMT). This report summarizes the panel's final evaluation and conclusions.

**Overall conclusion:** The panel concluded that the reproducibility and predictivity of the ROS assay is sufficient to support its use in an integrated photosafety testing and decision strategy for drug research and development. In this strategy, negative results in the ROS assay would not require further testing in animals or other tests, while positive, weakly positive, and inconclusive results would proceed to the next level of testing in an *in vitro* test system such as the 3T3 Phototoxicity Assay (OECD Test Guideline 432). The panel also concluded that use of the ROS assay could potentially provide significant savings in time, cost and reduced animal use for photosafety assessments. Furthermore, incorporating the ROS assay into a photosafety testing strategy is expected to significantly reduce the overall number of substances that would require additional testing in the *in vitro* 3T3 Phototoxicity Assay and subsequent testing in animals.

**Regulatory rationale:** The panel concluded that the ROS Assay is applicable for use within the ICH regulatory testing framework for photosafety evaluation of pharmaceutical products. Regulatory authorities (e.g. PMDA/MHLW, U.S. FDA, EMEA) require non-clinical photosafety testing prior to approving First-in-Human Phase I studies so that appropriate precautions and observations can be taken during initial human studies. Such non-clinical photosafety testing typically includes an assessment of the potential for a drug to cause phototoxic reactions, which are characterized clinically by dermal redness, swelling, irritation, and inflammation. The panel also agreed that the ROS assay is applicable to in-house drug research and development.

**Scientific rationale:** The panel recognized that ROS production is the most important mechanism for chemically-induced phototoxicity, and is therefore a critical pathway initiating event leading to phototoxicity. The ROS assay quantitatively measures two common reactive oxygen species generated by photoreactive chemicals after exposure to simulated sunlight. In this validation study, chemicals that did not produce sufficient ROS to meet the photoreactivity threshold classification criteria for the ROS assay are uniformly non-phototoxic, while chemicals that met or exceeded the photoreactivity classification criteria include all known phototoxicants. Therefore if a chemical is not photoreactive in the

ROS assay, it is unlikely that phototoxicity will occur in living systems.

**Limitations:** The panel noted that the ROS assay assesses chemical photoreactivity in a nonbiological system, and therefore may overpredict phototoxicity potential since it does not assess the direct interaction of chemicals with biological tissues. The assay may also overestimate the skin for phototoxic reactions to occur, or photodegradation may occur. Accordingly, positive results in the ROS assay are generally recommended for further evaluation in a photosafety testing strategy.

**Validation study reference chemicals:** The panel agreed that the reference chemicals selected for the validation studies were appropriate and sufficiently representative of the chemicals likely to be evaluated in the assay. The 42 reference chemicals incorporated most known human phototoxicants and included 23 known positives and 19 negatives. The chemicals were backed by data from human patch testing and *in vitro* 3T3 phototoxicity assay results. All data from the validation studies were made available in the validation study reports.

**Assay Reproducibility:** The panel concluded that the assay had excellent reproducibility both within and between laboratories for the 42 reference chemicals evaluated in the validation studies. Additionally, the positive and negative control chemicals had 100% reproducibility within and between laboratories based on classification outcome, which further supports the reproducibility of the ROS assay.

**Test method predictivity:** After reviewing analyses provided in the validation study reports, the panel agreed that conducting a single assay per chemical provided optimal predictivity. The panel concluded that the classification criteria for test outcomes have been appropriately optimized to avoid false negatives while minimizing false positives. The panel also noted that chemicals positive for both reactive oxygen species were uniformly phototoxic.

**Data quality:** The panel agreed that the high level of within and between laboratory reproducibility suggested a consistently high level of quality of the validation studies. While the studies were not conducted in strict accordance with GLPs, most of the labs were GLP certified. The validation management team also confirmed that quality control audits found that validation report data accurately reflected the raw data results.

**Test method protocols:** The panel considered the test method protocols used for the two validation studies and key aspects of a proposed standardized ROS assay protocol. The panel recommended that the solar simulator should be equipped with an appropriate temperature control unit or fan since ROS production can be influenced by temperature. The panel concluded that the list of proficiency chemicals provided in the test method protocol for laboratories to use to demonstrate ability to perform the assay was appropriate. The panel recommended that each lab should develop historical positive and negative control value acceptance ranges that can be used to determine the acceptability of an individual test. The panel also agreed with the appropriateness of the reference chemicals identified for qualification of solar simulators other than the two used in the validation studies.

**Applicability domain:** The applicability domain of the ROS assay is currently restricted to only those chemicals that meet the solubility criteria outlined in the protocol. The panel recommended that as experience is gained from use of the ROS assay, the applicability domain could be more fully described in terms of physicochemical properties and/or chemical classes. This will contribute to increased efficiency by providing criteria that can be used to identify whether a chemical may be satisfactorily tested in the ROS assay, or whether an alternate assay should be used initially.

## Appendix 2 List of reasons for chemical selection

NO.	Compound	Reasons for chemical selection
I-1	5-Fluorouracil (5-FU)	5-FU was reportedly a phototoxic chemical in humans [Dillaha et al., 1983], but it was negative in the 3T3NRU-PT [Kleinman et al., 2010 and Onoue et al., 2010]. Reported causes of human phototoxicity in 5-FU include photocytotoxicity induced by UV-B alone [Kirkup M.E. et al., 2003 and Andersen K.E. et al., 1984] and/or ROS generation derived from UV-B induced photodegradation [Miolo G. et al., 2011]. 5-FU absorbs mainly UV-B (290–320 nm) within the range of natural sunlight (Appendix 7), UV-B irradiation might be essential for photochemical activation of 5-FU. Therefore it was unknown whether 5-FU was a phototoxic chemical, and high quality human data was not available. 5-FU was selected in order to provide information on the limits of the ROS assay. Photosensitivity was mentioned on both the US and the JPN label.
I-2	8-Methoxy psoralen (8-MOP)	8-MOP was selected from the list of phototoxic chemicals used in the 3T3NRU-PT validation study. Human data for this chemical was described as positive in the article on the 3T3 NRU-PT validation study [Spielmann et al, 1994a]. Photosensitivity was mentioned on both the US and the JPN label.
I-3	Amiodarone HCl	Amiodarone HCl was selected from the list of phototoxic chemicals used in the 3T3NRU-PT validation study. Human data for this chemical was described as positive in the article on the 3T3 NRU-PT validation study [Spielmann et al, 1994a]. Photosensitivity was mentioned on both the US and the JPN label.
I-4	Chlorpromazine HCl	Chlorpromazine HCl was selected from the list of phototoxic chemicals used in the 3T3NRU-PT validation study. Human data for this chemical was described as positive in the article on the 3T3 NRU-PT validation study [Spielmann et al, 1994a]. Photosensitivity was mentioned on both the US and the JPN label.
I-5	Diclofenac	Diclofenac was selected as a phototoxic chemical for human per the article by Przybilla et al [1987]. Photosensitivity was mentioned on both the US and the JPN label.
I-6	Doxycycline HCl	Doxycycline HCl was selected from the list of phototoxic chemicals used in the 3T3NRU-PT validation study. Human data for this chemical was described as positive in the article on the 3T3 NRU-PT validation study [Spielmann et al, 1994a]. Photosensitivity was mentioned on both the US and the JPN label.
I-7	Furosemide	Furosemide was selected from the list of phototoxic chemicals used in the 3T3NRU-PT validation study. Human data for this chemical was described as

		positive in the article on the 3T3 NRU-PT validation study [Spielmann et al, 1998a]. Although the 2011 US label did mention photosensitivity, 2012 US label did not. Photosensitivity was mentioned on the JPN label.
I-8	Ketoprofen	Ketoprofen was selected from the list of phototoxic chemicals used in the 3T3NRU-PT validation study. Human data for this chemical was described as positive in the article on the 3T3 NRU-PT validation study [Spielmann et al, 1998a]. Photosensitivity was mentioned on both the US and the JPN label.
I-9	Levofloxacin	Levofloxacin was selected as a phototoxicity positive chemical for human per the article by Boccumini et al [2000]. Photosensitivity was mentioned on both the US and the JPN label.
I-10	Norfloxacin	Norfloxacin was selected from the list of phototoxic chemicals used in the 3T3NRU-PT validation study. Human data for this chemical was described as positive in the article on the 3T3 NRU-PT validation study [Spielmann et al, 1998a]. Photosensitivity was mentioned on both the US and the JPN label.
I-11	Omeprazole	Omeprazole was selected as a phototoxic chemical for human per to the article by Dam et al [2008]. Photosensitivity was mentioned on both the US and the JPN label.
I-12	Quinine HCl	Quinine HCl was used as positive control according to the method of Onoue et al. [2008a]. Quinine HCl was classified as a phototoxic chemical for human per the article by Ljunggren et al [1986]. There was a mention of the photosensitivity in the US label.
I-13	Sulisobenzone	Sulisobenzone was used as negative control according to the method of Onoue et al. [2008a]. Sulisobenzone was classified as a non-phototoxic chemical, because Human data for this chemical was described as negative in the article on the 3T3 NRU-PT validation study [Spielmann et al, 1998b].

### Appendix 3 Test chemicals for the Phase 1 study

No.	Chemical name	CAS No. <sup>a)</sup>	UV/vis absorption <sup>b)</sup>		ROS assay	3T3 NRU	<i>in vivo</i>	
			MEC (L/mol/cm)	$\lambda_{max}$ (nm)			Animal	Human
I-1	5-FU	51-21-8	1800 <sup>c)</sup>	290 <sup>d)</sup>	- <sup>1)</sup>	- <sup>2,3)</sup>	NA	+? <sup>4)</sup>
I-2	8-MOP	298-81-7	3631	300	+ <sup>1)</sup>	+ <sup>5)</sup>	+ <sup>5)</sup>	+ <sup>5)</sup>
I-3	Amiodarone HCl	19774-82-4	5400	290 <sup>d)</sup>	+ <sup>3)</sup>	+ <sup>5)</sup>	+ <sup>5)</sup>	+ <sup>5)</sup>
I-4	Chlorpromazine HCl	69-09-0	1746	304	+ <sup>1)</sup>	+ <sup>5)</sup>	+ <sup>5)</sup>	+ <sup>5)</sup>
I-5	Diclofenac	15307-79-6	7800 <sup>c)</sup>	290 <sup>d)</sup>	+ <sup>1)</sup>	+ <sup>3)</sup>	+ <sup>6)</sup>	+ <sup>7)</sup>
I-6	Doxycycline HCl	10592-13-9	3715	290 <sup>d)</sup>	+ <sup>1)</sup>	+ <sup>5)</sup>	+ <sup>5)</sup>	+ <sup>5)</sup>
I-7	Furosemide	54-31-9	2650	290 <sup>d)</sup>	+ <sup>1)</sup>	+/- <sup>3,8,9)</sup>	NA	+ <sup>8)</sup>
I-8	Ketoprofen	22071-15-4	2092	290 <sup>d)</sup>	+ <sup>1)</sup>	+ <sup>8)</sup>	- <sup>8)</sup>	+ <sup>8)</sup>
I-9	Levofloxacin	100986-85-4	13000 <sup>c)</sup>	333	+ <sup>10)</sup>	+ <sup>10)</sup>	+ <sup>11)</sup>	+ <sup>12)</sup>
I-10	Norfloxacin	70458-96-7	3562	323	+ <sup>1)</sup>	+ <sup>3)</sup>	+ <sup>8)</sup>	+ <sup>8)</sup>
I-11	Omeprazole	73590-58-6	15000 <sup>c)</sup>	301	+ <sup>1)</sup>	+/- <sup>3)</sup>	NA	+ <sup>13)</sup>
I-12	Quinine HCl	6119-47-7	1938	330	+ <sup>1)</sup>	+ <sup>3)</sup>	+ <sup>6)</sup>	+ <sup>14)</sup>
I-13	Sulisobenzone	4065-45-6	3519	290 <sup>d)</sup>	- <sup>1)</sup>	- <sup>3)</sup>	NA	- <sup>15)</sup>

5-FU: 5-fluorouracil, 8-MOP: 8-methoxy psoralen

+ : Positive, - : Negative, +/- : Equivocal, NA : Not available, ? : unclear

a) CAS No.: Chemical abstracts service registry number, b) The UV/vis absorbance (290-700 nm) of chemicals was measured in 20 mM phosphate buffer (pH 7.4). Test chemicals were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) at 10 mM and diluted with 20 mM phosphate buffer (pH 7.4). Final concentration of DMSO was unified to 0.5%. c) Molar extinction coefficient (MEC) of 5-FU, diclofenac, levofloxacin, and omeprazole were extracted from the articles of Onoue et al. (2008a) and Seto et al. (2011).

d)  $\lambda_{max}$  (nm) was a wavelength at which the UV/vis absorbance shows a peak between 290 and 700 nm.  $\lambda_{max}$  (nm) was indicated as 290 nm in the case where the peak absorption is located below 290 nm and the maximum absorption is at 290 nm.

1) Onoue et al., 2008a, 2) Kleinman et al., 2010, 3) Onoue et al., 2010, 4) Dillaha et al., 1983, 5) Spielmann et al., 1994a, 6) Spielmann et al., 1994b, 7) Przybilla et al., 1987, 8) Spielmann et al., 1998a, 9) Peters et al., 2002, 10) Seto et al., 2011, 11) Wagai et al., 1992, 12) Boccumini et al., 2000, 13) Dam et al., 2008, 14) Ljunggren et al., 1986, 15) Spielmann et al., 1998b

#### Appendix 4 List of reasons for chemical selection

NO.	Chemical name	Reasons for chemical selection
<b>Phototoxic drugs</b>		
II-1	Acridine	<p>Acridine was selected from the list of positive chemicals used in the 3T3 NRU-PT validation study. Human data for this chemical was described as positive in the article on the 3T3 NRU-PT validation study [Spielmann et al, 1998a].</p> <p>Acridine (No. II-1) and acridine HCl (No. II-2) were tested both as a free form and a salt in order to test whether the aqueous solubility of chemicals might limit the predictive power of the ROS assay.</p>
II-2	Acridine HCl	<p>Acridine HCl was selected from the list of positive chemicals used in the 3T3 NRU-PT validation study. Human data for this chemical was described as positive in the article on the 3T3 NRU-PT validation study [Spielmann et al, 1998a].</p> <p>Acridine (No. II-1) and acridine HCl (No. II-2) were tested both as a free form and a salt in order to test whether the aqueous solubility of chemicals might limit the predictive power of the ROS assay.</p>
II-3	Amiodarone HCl	<p>Amiodarone HCl was selected from the list of positive chemicals used in the 3T3 NRU-PT validation study. Human data for this chemical was described as positive in the article on the 3T3 NRU-PT validation study [Spielmann et al, 1994a]. Photosensitivity was mentioned on both the US and the JPN label.</p>
II-4	Chlorpromazine HCl	<p>Chlorpromazine HCl was selected from the list of positive chemicals used in the 3T3 NRU-PT validation study. Human data for this chemical was described as positive in the article on the 3T3 NRU-PT validation study [Spielmann et al, 1994a]. Photosensitivity was mentioned on both the US and the JPN label.</p>
II-5	Doxycycline HCl	<p>Doxycycline HCl was selected from the list of positive chemicals used in the 3T3 NRU-PT validation study. Human data for this chemical was described as positive in the article on the 3T3 NRU-PT validation study [Spielmann et al, 1994a]. Photosensitivity was mentioned on both the US and the JPN label.</p>
II-6	Fenofibrate	<p>Fenofibrate was selected from the list of positive chemicals used in the 3T3 NRU-PT validation study. Human data for this chemical was described as positive in the article on the 3T3 NRU-PT validation study [Spielmann et al, 1998a]. Although the 2011 US label did mention photosensitivity, 2012 US label did not. Photosensitivity was mentioned on the JPN label.</p>
II-7	Furosemide	<p>Furosemide was selected from the list of positive chemicals used in the 3T3 NRU-PT</p>

		validation study. Human data for this chemical was described as positive in the article on the 3T3 NRU-PT validation study [Spielmann et al, 1998a]. Although the 2011 US label did mention photosensitivity, 2012 US label did not. Photosensitivity was mentioned on the JPN label.
II-8	Ketoprofen	Ketoprofen was selected from the list of positive chemicals used in the 3T3 NRU-PT validation study. Human data for this chemical was described as positive in the article on the 3T3 NRU-PT validation study [Spielmann et al, 1998a]. Photosensitivity was mentioned on both the US and the JPN label.
II-9	6-Methylcoumarine	6-Methylcoumarine was selected from the list of positive chemicals used in the 3T3 NRU-PT validation study. Human data for this chemical was described as positive in the article on the 3T3 NRU-PT validation study [Spielmann et al, 1998a].
II-10	8-MOP	8-MOP was selected from the list of positive chemicals used in the 3T3 NRU-PT validation study. Human data for this chemical was described as positive in the article on the 3T3 NRU-PT validation study [Spielmann et al, 1994a]. Photosensitivity was mentioned on both the US and the JPN label.
II-11	Nalidixic acid	Nalidixic acid was selected from the list of positive chemicals used in the 3T3 NRU-PT validation study. Human data for this chemical was described as positive in the article on the 3T3 NRU-PT validation study [Spielmann et al, 1998a]. Nalidixic acid (II-11) and nalidixic acid (Na salt) (II-12) were tested both as a free form and a salt in order to test whether the aqueous solubility of chemicals might limit the predictive power of the ROS assay. Photosensitivity was mentioned on both the US and the JPN label.
II-12	Nalidixic acid (Na salt)	Nalidixic acid (Na salt) was selected from the list of positive chemicals used in the 3T3 NRU-PT validation study. Human data for this chemical was described as positive in the article on the 3T3 NRU-PT validation study [Spielmann et al, 1998a]. Nalidixic acid (II-11) and nalidixic acid (Na salt) (II-12) were tested both as a free form and a salt in order to test whether the aqueous solubility of chemicals might limit the predictive power of the ROS assay. Photosensitivity was mentioned on both the US and the JPN label.
II-13	Norfloxacin	Norfloxacin was selected from the list of positive chemicals used in the 3T3 NRU-PT validation study. Human data for this chemical was described as positive in the article on the 3T3 NRU-PT validation study [Spielmann et al, 1998a]. Photosensitivity was mentioned on both the US and the JPN label.
II-14	Ofloxacin	Ofloxacin was selected from the list of positive chemicals used in the 3T3 NRU-PT validation study. Human data for this chemical was described as positive in the article on the 3T3 NRU-PT validation study [Spielmann et al, 1998a]. Photosensitivity was

		mentioned on both the US and the JPN label.
II-15	Piroxicam	Piroxicam was selected from the list of positive chemicals used in the 3T3 NRU-PT validation study. Human data for this chemical was described as positive in the article on the 3T3 NRU-PT validation study [Spielmann et al, 1994a]. Photosensitivity was mentioned on both the US and the JPN label.
II-16	Promethazine HCl	Promethazine HCl was selected from the list of positive chemicals used in the 3T3 NRU-PT validation study. Human data for this chemical was described as positive in the article on the 3T3 NRU-PT validation study [Spielmann et al, 1994a]. Photosensitivity was mentioned on both the US and the JPN label.
II-17	Rosiglitazone	Rosiglitazone was selected because 3T3 NRU-PT was positive, but high quality human data regarding phototoxicity was not available.
II-18	Tetracycline	Tetracycline was selected from the list of positive chemicals used in the 3T3 NRU-PT validation study. Human data for this chemical was described as positive in the article on the 3T3 NRU-PT validation study [Spielmann et al, 1994a]. Photosensitivity was mentioned on both the US and the JPN label.
<b>Phototoxic non-drug chemicals</b>		
II-19	Anthracene	Anthracene was selected from the list of positive chemicals used in the 3T3 NRU-PT validation study. Human data for this chemical was described as positive in the article on the 3T3 NRU-PT validation study [Spielmann et al, 1998a].
II-20	Avobenzone	Avobenzone was reported with photoallergy negative by a photopatch test in the article by Szczurko C et al. [1994] and Trevisi P et al. [1994], but was reported to induce photoallergic reactions in the article by Schauder, S. et al. [1997]. Therefore, avobenzone was classified as a phototoxic chemical because we were not able to completely judge that avobenzone was a non-phototoxic chemical.
II-21	Bithionol	Bithionol was selected from the list of positive chemicals used in the 3T3 NRU-PT validation study. Human data for this chemical was described as positive in the article on the 3T3 NRU-PT validation study [Spielmann et al, 1994a].
II-22	Hexachlorophene	Hexachlorophene was selected from the list of positive chemicals used in the 3T3 NRU-PT validation study. Human data for this chemical was described as positive in the article on the 3T3 NRU-PT validation study [Masuda et al., 1971 and Spielmann et al, 1998a].
II-23	Rose bengal	Rose bengal was selected from the list of positive chemicals used in the 3T3 NRU-PT validation study. Human data for this chemical was described as positive in the article on the 3T3 NRU-PT validation study [Spielmann et al, 1998a].
<b>Non-phototoxic drugs</b>		

II-24	Aspirin	Aspirin was selected based on negative results of the 3T3 NRU-PT per the article by Onoue et al. [2010]. Photosensitivity was not mentioned on either the US or the JPN label.
II-25	Benzocaine	Benzocaine was selected based on negative results of the 3T3 NRU-PT per the article by Onoue et al. [2010]. Photosensitivity was not mentioned on either the US or the JPN label.
II-26	Erythromycin	Erythromycin was selected based on negative results of the 3T3 NRU-PT per the article by Onoue et al. [2010]. Photosensitivity was not mentioned on either the US or the JPN label.
II-27	Penicillin G	Penicillin G was selected from the list of negative chemicals used in the 3T3 NRU-PT validation study [Spielmann et al, 1994a]. Photosensitivity was not mentioned on either the US or the JPN label.
II-28	Phenytoin	Phenytoin was selected based on negative results of the 3T3 NRU-PT per the article by Onoue et al. [2010]. Photosensitivity was not mentioned on either the US or the JPN label.
<b>Non-phototoxic non-drug chemicals</b>		
II-29	Bumetrizole	Bumetrizole was selected from UV absorbers. We thought that human data of this UV absorber would be provided. Human data for this chemical, however, was not available. Therefore after confirming negative result in 3T3 NRU-PT, this chemical was classified as a non-phototoxic chemical.
II-30	Camphor sulfonic acid	Chemical No. II-30 was registered at first as benzylindene camphor sulphonic acid. This was a UV absorber used in the 3T3 NRU-PT validation study. However, we carried out the Phase 2 study without noticing a transcription error of the CAS number on the final chemical list. Because we did not notice this mistake until after the Phase 2 study, this chemical was reclassified as a non-phototoxic chemical after confirming negative results in 3T3 NRU-PT and low molar extinction coefficient (MEC).
II-31	Chlorhexidine	Chlorhexidine was selected from the list of negative chemicals used in the 3T3 NRU-PT validation study [Spielmann et al, 1994a and 1998a]. Negative result in human was described in the article on the 3T3 NRU-PT validation study [Spielmann et al, 1998a].
II-32	Cinnamic acid	We originally intended to use cinnamic aldehyde, an aromatic ingredient used in cinnamon, as Chemical No. II-32, because this chemical used in the 3T3 NRU-PT validation study. However, we inadvertently added cinnamic acid instead of cinnamic aldehyde to the list of chemicals. Cinnamic acid is known to form a dimer by light irradiation when in the solid state. The difference between cinnamic aldehyde and cinnamic acid is that the former has a side chain of aldehyde and the later one of carboxyl. In addition, we carried out 3T3NRU-PT for cinnamic acid and the result was

		negative, just like cinnamic aldehyde. Therefore, we concluded that either chemical was suitable for the ROS assay validation study, because cinnamic acid resembles cinnamic aldehyde structurally, and the result of 3T3 NRU-PT testing was the same.
II-33	Drometrizole	Drometrizole was selected from UV absorbers. We thought that human data of this UV absorber would be provided. Human data for this chemical, however, was not available. Therefore after confirming negative result in 3T3 NRU-PT, this chemical was classified as a non-phototoxic chemical.
II-34	L-Histidine	L-Histidine was selected from the list of negative chemicals used in the 3T3 NRU-PT validation study [Spielmann et al, 1994a].
II-35	Methylbenzylidene camphor	Methylbenzylidene camphor was selected from UV absorbers. This was in the list of negative chemicals in the 3T3 NRU-PT validation study and Human data for this chemical was described as negative in the article on the 3T3 NRU-PT validation study [Spielmann et al, 1998b].
II-36	Octrizole	Octrizole was selected from UV absorbers. We thought that human data of this UV absorber would be provided. Human data for this chemical, however, was not available. Therefore after confirming negative result in 3T3 NRU-PT, this chemical was classified as a non-phototoxic chemical.
II-37	Octyl methacrylate	Chemical No. II-37 was registered at first as octyl methoxycinnamate. This was UV absorber used in the 3T3 NRU-PT validation study. However, we have carried out the Phase 2 study without noticing a transcribing error of the CAS number when we made the final chemical list. Because we noticed to take it wrong after the Phase 2 study, this chemical was classified as non-phototoxic chemical again after confirming negative result in 3T3 NRU-PT and low molar extinction coefficient (MEC).
II-38	Octyl methoxycinnamate	Octyl methoxycinnamate was selected from UV absorbers. This was in the list of negative chemicals in the 3T3 NRU-PT validation study and Human data for this chemical was described as negative in the article on the 3T3 NRU-PT validation study [Spielmann et al, 1998b].
II-39	Octyl salicylate	Octyl salicylate was selected from UV absorbers. This was in the list of negative chemicals in the 3T3 NRU-PT validation study and Human data for this chemical was described as negative in the article on the 3T3 NRU-PT validation study [Spielmann et al, 1998b].
II-40	PABA	PABA was selected from the list of negative chemicals used in the 3T3 NRU-PT validation study [Spielmann et al, 1994a and 1998a]. Negative result in animals was described in the article on the 3T3 NRU-PT validation study [Spielmann et al, 1998a].
II-41	SDS	SDS was selected from the list of negative chemicals used in the 3T3 NRU-PT validation study [Spielmann et al, 1994a].

II-42	UV-571	UV-571 was selected from UV absorbers. We thought that human data of this UV absorber would be provided. Human data for this chemical, however, was not available. Therefore after confirming negative result in 3T3 NRU-PT, this chemical was classified as a non-phototoxic chemical.
<b>Positive/Negative controls</b>		
PC	Quinine HCl	Quinine HCl was used as positive control according to the method of Onoue et al. [2008a]. Quinine HCl was classified as a phototoxic chemical for human per the article by Ljunggren et al [1986]. Photosensitivity was mentioned on the US label.
NC	Sulisobenzone	Sulisobenzone was used as negative control according to the method of Onoue et al. [2008a]. Sulisobenzone was classified as a non-phototoxic chemical, because Human data for this chemical was described as negative in the article on the 3T3 NRU-PT validation study [Spielmann et al, 1998b].

## Appendix 5 Test chemicals for Phase 2 study and code list

No.	Chemical name	CAS No. <sup>a)</sup>	UV/vis absorption <sup>b)</sup>		3T3 NRU	<i>in vivo</i>		Laboratory		
			MEC (L/mol/cm)	$\lambda_{max}$ (nm)		Animal	Human	1	2	3
<b>Phototoxic drugs</b>										
II-1	Acridine	260-94-6	2773	354	+ <sup>1)</sup>	+ <sup>1)</sup>	+ <sup>1)</sup>	C-130	B-090	A-005
II-2	Acridine HCl	17784-47-3	2635	354	+ <sup>1)</sup>	+ <sup>1)</sup>	+ <sup>1)</sup>	C-126	B-086	A-001
II-3	Amiodarone HCl	19774-82-4	5400	290 <sup>c)</sup>	+ <sup>2)</sup>	+ <sup>2)</sup>	+ <sup>2)</sup>	C-127	B-087	A-002
II-4	Chlorpromazine HCl	69-09-0	1746	304	+ <sup>2)</sup>	+ <sup>2)</sup>	+ <sup>2)</sup>	C-106	B-066	A-026
II-5	Doxycycline HCl	10592-13-9	3715	290 <sup>c)</sup>	+ <sup>2)</sup>	+ <sup>2)</sup>	+ <sup>2)</sup>	C-116	B-076	A-036
II-6	Fenofibrate	49562-28-9	3514	290 <sup>c)</sup>	+ <sup>1)</sup>	NA	+ <sup>1)</sup>	C-139	B-054	A-014
II-7	Furosemide	54-31-9	2650	290 <sup>c)</sup>	+/- <sup>1,3,4)</sup>	NA	+ <sup>1)</sup>	C-141	B-056	A-016
II-8	Ketoprofen	22071-15-4	2092	290 <sup>c)</sup>	+ <sup>1)</sup>	- <sup>1)</sup>	+ <sup>1)</sup>	C-128	B-088	A-003
II-9	6-Methylcoumarine	92-48-8	3219	290 <sup>c)</sup>	+ <sup>1)</sup>	+ <sup>1)</sup>	+ <sup>1)</sup>	C-113	B-073	A-033
II-10	8-MOP	298-81-7	3631	300	+ <sup>2)</sup>	+ <sup>2)</sup>	+ <sup>2)</sup>	C-131	B-091	A-006
II-11	Nalidixic acid	389-08-2	3192	331	+ <sup>1)</sup>	+ <sup>1)</sup>	+ <sup>1)</sup>	C-137	B-052	A-012
II-12	Nalidixic acid (Na salt)	3374-05-8	3019	333	+ <sup>1)</sup>	+ <sup>1)</sup>	+ <sup>1)</sup>	C-134	B-094	A-009
II-13	Norfloxacin	70458-96-7	3562	323	+ <sup>3)</sup>	+ <sup>1)</sup>	+ <sup>1)</sup>	C-110	B-070	A-030
II-14	Ofloxacin	82419-36-1	8443	290 <sup>c)</sup>	+ <sup>1)</sup>	+ <sup>1)</sup>	+ <sup>1)</sup>	C-112	B-072	A-032
II-15	Piroxicam	36322-90-4	3304	352	- <sup>2)</sup>	- <sup>2)</sup>	+ <sup>2)</sup>	C-135	B-095	A-010
II-16	Promethazine HCl	58-33-3	1558	297	+ <sup>2)</sup>	NA	+ <sup>2)</sup>	C-101	B-061	A-021
II-17	Rosiglitazone	122320-73-4	1765	311	+ <sup>d)</sup>	NA	NA	C-117	B-077	A-037
II-18	Tetracycline	60-54-8	3842	290 <sup>c)</sup>	+ <sup>2)</sup>	+ <sup>2)</sup>	+ <sup>2)</sup>	C-102	B-062	A-022
<b>Phototoxic non-drug chemicals</b>										
II-19	Anthracene	120-12-7	2315	355	+ <sup>1)</sup>	+ <sup>1)</sup>	+ <sup>1)</sup>	C-121	B-081	A-041
II-20	Avobenzone	70356-09-1	7686	354	+ <sup>5)</sup>	- <sup>6)</sup>	+ <sup>7)</sup>	C-109	B-069	A-029
II-21	Bithionol	97-18-7	2462	321	+ <sup>2)</sup>	+ <sup>2)</sup>	+ <sup>2)</sup>	C-115	B-075	A-035
II-22	Hexachlorophene	70-30-4	2431	300	- <sup>1)</sup>	- <sup>1)</sup>	+ <sup>1,8)</sup>	C-107	B-067	A-027
II-23	Rose bengal	632-69-9	19269	549	+ <sup>1)</sup>	- <sup>1)</sup>	+ <sup>1)</sup>	C-104	B-064	A-024
<b>Non-phototoxic drugs</b>										
II-24	Aspirin	50-78-2	80	290 <sup>c)</sup>	- <sup>3)</sup>	NA	NA	C-140	B-055	A-015
II-25	Benzocaine	94-09-7	4273	290 <sup>c)</sup>	- <sup>3)</sup>	NA	NA	C-114	B-074	A-034
II-26	Erythromycin	114-07-8	0	290 <sup>c)</sup>	- <sup>3)</sup>	NA	NA	C-119	B-079	A-039
II-27	Penicillin G	113-98-4	0	290 <sup>c)</sup>	- <sup>2)</sup>	NA	NA	C-118	B-078	A-038
II-28	Phenytoin	57-41-0	0	290 <sup>c)</sup>	- <sup>3)</sup>	NA	NA	C-145	B-060	A-020

## Appendix 5 Test chemicals for Phase 2 study and code list (continued)

No.	Chemical name	CAS No. <sup>a)</sup>	UV/vis absorption <sup>b)</sup>		3T3 NRU	<i>in vivo</i>		Laboratory		
			MEC (L/mol/cm)	$\lambda_{\max}$ (nm)		Animal	Human	1	2	3
<b>Non-phototoxic non-drug chemicals</b>										
II-29	Bumetizole	3896-11-5	3873	306	- <sup>d)</sup>	NA	NA	C-138	B-053	A-013
II-30	Camphor sulfonic acid	3144-16-9	0	290 <sup>c)</sup>	- <sup>d)</sup>	NA	NA	C-132	B-092	A-007
II-31	Chlorhexidine	55-56-1	1338	290 <sup>c)</sup>	- <sup>1)</sup>	NA	- <sup>1)</sup>	C-144	B-059	A-019
II-32	Cinnamic acid	140-10-3	3373	290 <sup>c)</sup>	- <sup>d)</sup>	NA	NA	C-123	B-083	A-043
II-33	Drometizole	2440-22-4	3946	295	- <sup>d)</sup>	NA	NA	C-129	B-089	A-004
II-34	L-Histidine	71-00-1	0	290 <sup>c)</sup>	- <sup>2)</sup>	NA	NA	C-111	B-071	A-031
II-35	Methylbenzylidene camphor	36861-47-9	9200	304	- <sup>9)</sup>	- <sup>9)</sup>	- <sup>9)</sup>	C-136	B-051	A-011
II-36	Octrizole	3147-75-9	3958	296	- <sup>d)</sup>	NA	NA	C-133	B-093	A-008
II-37	Octyl methacrylate	688-84-6	0	290 <sup>c)</sup>	- <sup>d)</sup>	NA	NA	C-105	B-065	A-025
II-38	Octyl methoxycinnamate	5466-77-3	3000	290 <sup>c)</sup>	- <sup>9)</sup>	- <sup>9)</sup>	- <sup>9)</sup>	C-142	B-057	A-017
II-39	Octyl salicylate	118-60-5	1500	290 <sup>c)</sup>	- <sup>9)</sup>	- <sup>9)</sup>	- <sup>9)</sup>	C-120	B-080	A-040
II-40	PABA	150-13-0	2404	290 <sup>c)</sup>	- <sup>2)</sup>	- <sup>1)</sup>	NA	C-124	B-084	A-044
II-41	SDS	151-21-3	0	290 <sup>c)</sup>	- <sup>2)</sup>	NA	NA	C-125	B-085	A-045
II-42	UV-571	125304-04-3	1900	290 <sup>c)</sup>	- <sup>d)</sup>	NA	NA	C-122	B-082	A-042
<b>Positive/Negative controls</b>										
PC	Quinine HCl	6119-47-7	1938	330	+ <sup>3)</sup>	+ <sup>10)</sup>	+ <sup>11)</sup>	PC	PC	PC
NC	Sulisobenzone	4065-45-6	3519	290 <sup>c)</sup>	- <sup>3)</sup>	NA	- <sup>9)</sup>	NC	NC	NC

8-MOP: 8-methoxy psoralen, PABA: *p*-aminobenzoic acid, SDS: sodium dodecyl sulfate

+ : Positive, - : Negative, +/- : Equivocal, NA : Not available, PC : Positive control, NC : Negative control  
a) CAS No.: Chemical abstracts service registry number, b) The UV/vis absorbance (290-700 nm) of most chemicals was measured in 20 mM phosphate buffer (pH 7.4). However, the UV/vis absorbance of chemical Nos. II-19, II-20, II-29, II-33 and II-36 were measured in methanol, because these chemicals were not solved in 20 mM phosphate buffer (pH 7.4). In the each case, test chemicals were dissolved in DMSO at 10 mM and diluted with 20 mM phosphate buffer (pH 7.4) or methanol. Final concentration of DMSO was unified to 0.5%. c)  $\lambda_{\max}$  (nm) was a wavelength at which the UV/vis absorbance shows a peak between 290 and 700 nm.  $\lambda_{\max}$  (nm) was indicated as 290 nm in the case where the peak absorption is located below 290 nm and the maximum absorption is at 290 nm. d) *In vitro* phototoxicity was assessed by the 3T3 NRU PT in the participating laboratories, according to the OECD 432 guideline.

1) Spielmann et al., 1998a, 2) Spielmann et al., 1994a, 3) Onoue et al., 2010, 4) Peters et al., 2002, 5) Gaspar et al., 2012, 6) ZEBET in house data, 7) Schauder et al., 1997, 8) Masuda et al., 1971, 9) Spielmann et al., 1998b, 10) Spielmann et al., 1994b, 11) Ljunggren et al., 1986

各都道府県衛生主管部（局）長 殿

厚生労働省医薬食品局審査管理課長  
（公 印 省 略）

### 医薬品の光安全性評価ガイドラインについて

日米 EU 医薬品規制調和国际会議（以下「ICH」という。）が組織され、品質、安全性及び有効性の各分野で、ハーモナイゼーションの促進を図るための活動が行われているところである。

今般、医薬品の製造販売承認に際して添付すべき非臨床における安全性試験の資料に関し、ICHにおける三極の合意事項として、新たに「医薬品の光安全性評価ガイドライン」を別添のとおり定めましたので、下記事項を御了知の上、貴管内関係業者等に対し周知方御配慮願います。

#### 記

##### 1. 本ガイドラインの要点

- (1) 本ガイドラインは、医薬品の光毒性及び光アレルギー検出のために行われる安全性評価の望ましい実施方法を示すものであり、従来の非臨床試験に係るガイドラインを補完するものである。
- (2) 本ガイドラインは、新規医薬品有効成分、新規添加剤、経皮投与用臨床製剤（皮膚貼付剤等）、及び光線力学療法用製剤に適用される。
- (3) 本ガイドラインで取り扱う内容は、光毒性（光刺激性）及び光アレルギーであり、光遺伝毒性及び光がん原性については取り扱われない。
- (4) 光安全性評価の実施については、薬剤開発者に委ねられているが、外来での臨床試験を行う前に、光毒性の初期評価（UV～可視光領域の吸収スペクトルの評価等）の実施が提案・推奨されるほか、必要に応じ、実験的評価（*in vitro* 又は *in vivo* 試験）を実施すべきとされている。
- (5) 光安全性評価の方法はフレキシブルであり、様々なアプローチが選択し得る。

別添

## 医薬品の光安全性評価ガイドライン

### 目次

1. 緒言.....	1
1.1 ガイドラインの目的.....	1
1.2 背景.....	1
1.3 適用範囲.....	1
1.4 一般原則.....	2
2. 光安全性評価において考慮すべき要因.....	3
2.1 光化学的特性.....	3
2.2 組織分布/ファーマコキネティクス.....	3
2.3 代謝物に関して.....	4
2.4 薬理学的特性.....	4
3. 非臨床光安全性試験.....	4
3.1 一般的概念.....	4
3.2 化学的試験法を用いた光反応性試験.....	5
3.3 <i>In vitro</i> 試験法を用いた光毒性試験.....	5
3.4 全身適用薬の <i>in vivo</i> 光安全性試験.....	6
3.5 経皮適用薬の <i>in vivo</i> 光安全性試験.....	8
4. 臨床における光安全性評価.....	8
5. 評価手法.....	8
5.1 全身適用薬に推奨される評価手法.....	10
5.2 経皮適用薬に推奨される評価手法.....	11
6. 注釈.....	12
7. 用語の解説.....	13
8. 参考文献.....	14

# 1. 緒言

## 1.1 ガイドラインの目的

本ガイドラインの目的は、光安全性評価についての国際的な基準を勧告し、ヒト臨床試験や医薬品の製造販売承認申請に必要とされるこれらの評価の国際的調和をはかることである。本ガイドラインには、光安全性を評価するにあたり考慮すべき要因や追加の評価が必要な場合についても述べており、ICH M3 (R2) ガイドライン第 14 章の「光安全性試験（文献 1）」とあわせて読む必要がある。本ガイドラインにより地域間で勧告される光安全性評価に本質的な相違が生じる可能性は少なくなるであろう。

本ガイドラインはいくつかの章に分かれている。第 2 章では光安全性評価において考慮すべき要因について論じる。第 3 章では既存の非臨床光安全性試験について説明するが、この章では特定の試験方法について説明しない。第 4 章では、臨床での光安全性評価について言及する。第 5 章では、全身曝露を意図して投与する、あるいは経皮投与する医薬品の光安全性を評価する方法を決定するための手法について、第 2 章、第 3 章、および第 4 章で説明した考え方と試験を用いて提示する。

3R（代替法の利用/使用動物数の削減/苦痛の軽減）の原則に従って使用動物数を削減するために、動物を使わない方法あるいは臨床データの活用による光安全性評価を考慮すべきである。

## 1.2 背景

ICH M3(R2) ガイドラインには、臨床開発に係る光安全性評価の実施時期についての情報が記載されている。当該ガイドラインでは、光毒性の可能性に関する初期評価を行い、必要に応じて、多数の被験者への投与（第Ⅲ相試験）が行われる前に、実験的評価を行うことが推奨されている。同様に、ICH S9 ガイドライン（文献2）には、抗悪性腫瘍薬に関する光安全性試験の実施時期に関する記載がある。しかしながら、ICH M3(R2) ガイドラインおよびICH S9 ガイドラインのいずれにも、具体的な評価手法は述べられていない。本ガイドラインでは、光安全性試験が必要とされる場合および可能な評価手法の詳細を概説する。

## 1.3 適用範囲

本ガイドラインは、新規医薬品有効成分（API）、新規添加剤、経皮投与用臨床製剤（皮膚貼付剤など）、および光線力学療法用製剤に適用される。

眼に投与される医薬品については、眼の光毒性を予測する *in vitro* 評価手法の信頼性が不明であり、標準化された *in vivo* 評価手法がないことから、具体的なガイダンスを提供しない（注 1 を参照のこと）。

光線力学療法に用いられる医薬品については、意図する薬理作用に元来付随する光化学的な活性をもって開発されており、通常、これらについて追加的な光毒性の検討を行う必要はない。しかしながら、光線力学療法に用いられる医薬品においても、患者における適切なリスク管理のために、トキシコキネティクスや組織分布の検討を行うべきである。

本ガイドラインは、一般的に、ペプチド、蛋白質、抗体薬物複合体あるいはオリゴヌクレオチドに適用されない。さらに、すでに市販された成分について、APIあるいは添加剤に新たな懸念要因（錠剤から局所用クリームへの剤型変更など）がなければ、本ガイドラインは適用されない。

#### 1.4 一般原則

医薬品の光安全性評価は、光化学的特性、非臨床試験のデータおよび臨床安全性情報をふまえた統合的なプロセスである。光安全性評価は、ヒトでの有害事象の発生を防ぐために、リスクを最小化する方策が必要とされるかどうかを決定することを目的とする。

光安全性試験との関連で、従来から4つの異なる作用（光毒性、光アレルギー、光遺伝毒性、光がん原性）が議論されてきた。光遺伝毒性（注2を参照のこと）および光がん原性（ICH M3(R2)ガイドラインの注6）の試験については、ヒトの医薬品に関して、現状で有用でないと考えられている。本ガイドラインでは、以下に定義する光毒性と光アレルギーの作用のみを扱う。

- ・ 光毒性（光刺激性）：光照射によって産生される光反応性物質に対する急性の組織反応。
- ・ 光アレルギー：光化学反応によって蛋白質付加体などの光反応生成物を形成し、それにより引き起こされる免疫を介した反応。

光感作性とは、光照射により惹起される組織反応に対し、時折使用される一般用語である。しかしながら、本ガイドラインでは、光毒性と光アレルギーを明確に区別するために、光感作性という用語を用いないこととする。

化学物質が光毒性や光アレルギーを示すためには、以下の性質が重要である。

- ・ 太陽光の波長内（290–700 nm）に光の吸収帯が存在する。
- ・ UVあるいは可視光の吸収により、反応性に富んだ分子種を形成する。
- ・ 光に曝露される組織（皮膚や眼）に十分な量が分布する。

これらの条件の一つでも当てはまらない場合には、通常その化合物は光毒性の懸念を直接呈することがないと考えられる。しかし、光に対する皮膚の感受性亢進が間接的メカニズムにより起きることもある。本ガイドラインで概説する試験は、一般的にそのようなメカニズムに対応していない（第2.4項も参照すること）。

## 2. 光安全性評価において考慮すべき要因

### 2.1 光化学的特性

光反応性を評価するためには、まず、化合物が290から700 nmの間の波長で光を吸収するか否かについて考慮する。290から700 nmの波長においてモル吸光係数(MEC)が $1000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を上回らない化合物(文献3)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考えられる(詳細については注3を参照のこと)。

光による分子の励起は、エネルギー転移メカニズムにより、スーパーオキシドアニオンや一重項酸素を含む活性酸素種(ROS)を生成する。光反応性により別の分子(光付加体や細胞毒性を持つ光反応物質の形成など)を生じることがあるが、その場合であっても、通常は、同様にROSが生成されると考えられる。このため光(UV~可視領域)の照射によるROS生成は、光毒性の指標となりうる。

光安定性試験(文献4)も光反応性を示唆しうる。しかしながら、これらの条件下ですべての光反応性物質を検出することはできず、光により分解することがそのままその薬剤の光毒性を示唆するわけではない。このため、光安定性試験だけでは、さらなる光安全性評価を必要とするかどうかを決めるべきでない。

光化学的特性の評価は、データの収集記録を容易に確認できる、科学的に質の高い基準で実施されるか、またはGLP/GMPに準拠して実施されるべきである。

### 2.2 組織分布/ファーマコキネティクス

光照射時に組織に分布する光反応性物質の濃度は、光毒性反応が生じるか否かを決定する非常に重要な薬物動態学的パラメータである。この濃度は、化学物質の血漿中濃度や、組織内の血流、血管から間質および細胞への分配、さらに組織内での結合、貯留および蓄積などの様々な要因に依存している。曝露期間は、血漿や組織内半減期に反映されるクリアランス速度に依存する。全体として、これらのパラメータによって光反応性物質の組織内における平均滞留時間が決まる。

化合物の組織内での結合、貯留あるいは蓄積は、光毒性反応にとって決定的なものではない。光反応性が十分に高い分子であれば、血漿中あるいは細胞間質液中で到達する濃度において光毒性反応を生じる可能性がある。しかしながら、血漿中半減期が長い化合物や日光に曝される組織に長時間滞留する化合物、あるいは組織/血漿濃度比が高い化合物は、半減期や滞留時間が短い、あるいは組織/血漿濃度比が低い化合物よりも光毒性反応を引き起こしやすい。さらに、光化学反応が生じるのに必要な化合物濃度を超えている時間が長ければ長いほど、ヒトは、より長く光毒性のリスクに曝される。

光毒性反応のリスクを無視できるという組織濃度の閾値は、科学的に存在し得るが、現在のところ、すべての化合物に適用できる一般的な閾値を設定し得るだけのデータがない。しかしながら、ヒトにおける実際の、あるいは予想される組織内濃度に基づき、また、上述の要因を考察することによって、さらなる光安全性評価を必要としないと判断することは、ケースバイケースで可能である。その例としては、1) 全身の総曝露量が非常に低い薬剤、あるいは2) 血漿中半減期や組織滞留時間が非常に短い薬剤などが挙げられよう。

化合物の組織構成要素（たとえば、メラニンやケラチン）への結合は、組織での貯留や蓄積が生じるメカニズムの一つである。メラニンとの結合により組織での化合物濃度は増加するが、メラニン結合性のある薬剤に関するこれまでの経験から、メラニン結合性のみでは光安全性に対する懸念にならないことが示唆されている。

単回投与による組織分布試験において、投与後の複数の時点で動物を調べることにより、一般的には、組織/血漿濃度比、組織滞留時間、滞留と蓄積のポテンシャルについて適切な評価が可能になる。そのような試験において血漿中あるいは組織中薬物濃度の消失半減期を明らかにするためには、評価のタイムポイントを適切な間隔で設定すべきである。

可視光により活性化され、内部組織における消失半減期の長い化合物に関しては、医学的処置中に強い光の照射を受けてこれらの組織に損傷を生じる場合があることが知られている。従って、光線力学療法に用いる医薬品のように、可視光で活性化され *in vivo* で強い光毒性を有する化合物や、あるいは作用機序に基づいて光毒性を有することが知られている化合物では、内部組織における分布を測定し、組織特異的半減期を推定すべきである。UV 領域にのみ吸収を有する薬物や組織からの消失半減期が短い薬物については、光反応性を有することが知られていても内部組織におけるリスクを惹起することがないであろう。

### 2.3 代謝物に関して

代謝により親化合物と大幅に異なるクロモフォアが生じることは通常ないことから、一般的に代謝物について別途光安全性評価を行う必要はない。

### 2.4 薬理学的特性

多くの場合、薬物誘発性の光毒性は、化学構造に起因するものであり、薬理作用によるものでない。しかしながら、ある種の薬理学的特性（たとえば、免疫抑制作用、ヘム代謝の攪乱作用）を持つ場合は、皮膚刺激や UV 誘発性皮膚腫瘍形成など、光誘発性作用に対する感受性を増幅する可能性がある。本ガイドラインに概説されている試験手法は、このようなタイプの間接的なメカニズムを検出するものでない。これらの間接的なメカニズムの中には、他の非臨床の薬理/毒性試験により確認され、評価できるものがある。しかしながら、間接的メカニズムに関連した光毒性には、その他に、ヒトでの使用経験の中で初めて明らかになるものもある。

## 3. 非臨床光安全性試験

### 3.1 一般的概念

非臨床光安全性試験に関しては、モデルシステムと適切な照射スペクトルの両方を考慮した試験条件を慎重に選択することが重要である。理想的に、非臨床試験法は、高い感度と特異度の両方（すなわち、低い偽陰性率と偽陽性率）を有していることが望ましい。しかしながら、本ガイドラインに述べられている評価を行うために最も重要なことは、非臨床光安全性試験が、偽陰性の頻度が低くなるような高い感度（すなわち、高い陰性予測率）を有していることである。なぜなら、陰性結果の場合、通常さ

らなる光安全性評価を求められないからである。現在利用可能な非臨床試験法は*in vitro*および*in vivo*共に、主に潜在的な光毒性を検出することに重点を置いているものであり、臨床的な光毒性に、必ずしもそのまま外挿できるとは限らない。

照射条件の選択は、*in vitro*および*in vivo*試験法のいずれにおいても重要である。我々が通常曝露されている太陽光は、非常に幅広いスペクトルを有している。しかしながら、太陽光は、明確に定義されたものでなく、緯度、標高、季節、時刻、天候などの様々な要因によって変化し得る。さらに太陽光に対するヒトの皮膚の感受性も、様々な要因（たとえば、スキンタイプ、解剖学的部位、日焼けの度合い）によって変化し得る。標準的な太陽光の照射条件については、様々な機関において定義されてきた。ソーラーシミュレータの光源の適切性を評価するためには、そのような標準規格（たとえば文献5）を参照すべきであり、照度と照射量を照射スペクトルのUVA領域に基づいて標準化すべきである。現行の*in vitro*および*in vivo*の光毒性試験法では、UVAで5~20 J/cm<sup>2</sup>の範囲の照射量が用いられている。このUVA照射量は、夏の昼間に、温帯地域の海拔ゼロ地点で長時間の屋外活動を行った場合に相当する。通常、ヒトでは、UVBで生じる日焼け反応により全体的な光照射量が制限されている。しかしながら、非臨床光毒性試験法では、UVB照射量によって全体の照射量が制限されるべきでなく、試験法の感度を下げずに十分なUVA照射量での試験を行うために（部分的にフィルターをかけることにより）UVB量を減少させることもある。ヒト皮膚におけるUVBの曝露は表皮に限定されるのに対し、UVAは毛細血管中の血液にまで到達する。それゆえに、全身適用される医薬品においては、UVAに比べUVBによる光化学的な活性化が临床上重要でないと考えられている。しかしながら、光曝露を受ける組織に塗布される局所適用製剤の場合には、UVB照射にも考慮する必要がある。

適切な光源（スペクトル分布、照度、および照射量）の選択とモニタリング、および用いる手順については、試験方法に明確に記載されていなければならない（例、文献6）。

### 3.2 化学的試験法を用いた光反応性試験

医薬品開発者が光反応性評価の実施を選択した場合には、試験法の感度が適切であることを医薬品を用いて検証するべきである。そのような試験法の一つが、たとえば文献7に記載されているROSアッセイである。データからは、この試験法は*in vivo*における直接的な光毒性物質を予見する上での感度が高いことが示されている。しかし、偽陽性結果の割合が高いことから、特異度は低い。200 μMの試験濃度で、適切な条件下で実施された場合、この試験法での陰性結果は光毒性の懸念が非常に低いことを示すが、陽性結果は（どの濃度であっても）追加的評価を考慮すべき指標と考える。

### 3.3 *In vitro* 試験法を用いた光毒性試験

化学物質の光毒性誘発能を評価するために、多くの*in vitro*試験法が開発されてきた。これらの試験法の一部は、医薬品の評価に用いるための検証が行われていない。ある試験法は評価化合物を培養液に溶解して用いる試験法であり、このような方法の適格性は化合物の溶解性に依存するが、薬物中の有効成分や添加物の評価に適することが多い。その他に、組織表面へ直接適用される試験法もあり、これらは、局所投与を意図した製剤全体としての評価に適切であろう。

最も広く用いられている *in vitro* の光毒性試験法は3T3ニュートラルレッド取り込み光毒性試験 (3T3 NRU PT) であり、これに関しては該当するOECDガイドライン (文献6) がある。この手法は、水溶性物質に関して現在もっとも適切な *in vitro* スクリーニング手法であると考えられている。

この試験法に関してECVAMの実施した正式のバリデーションでは高い感度 (93%) と高い特異度 (84%) が示されたが、企業体は経験的に特異度についてより低いものと考えている。OECDガイドラインは、特に医薬品に関して検証されたものでない。医薬品の低い特異度に対処するためには、OECDガイドラインを一部改変することが提唱されている (注4を参照のこと)。提唱されたこれらの改変は、医薬品の試験として適切である。3T3 NRU PTの感度は高く、この試験法で陰性結果が得られた化合物についてはヒトで光毒性を生じる懸念が非常に低いと考えられる。しかしながら、3T3 NRU PTで陽性結果が得られた場合は、臨床的な光毒性を必ずしも示唆するものでないが、追加的評価を考慮すべき指標と考えるべきである。

BALB/c 3T3細胞はUVBによる傷害を受けやすいため、光照射にあたっては320 nm以下の光を減衰するフィルターの使用が当初推奨されていた (文献6)。しかしながら、用いられる光源とフィルターを適切に設定することによって、UVB対UVAの比率を調整し、UVBによる光毒性の評価を可能とすることができる。UVBはほとんど表皮より下に到達しないことから、UVBによる光毒性は全身適用される医薬品においてほとんど問題とならない。しかしながら、UVBによる光毒性は、局所適用される製剤に関係してくる。UVB域の波長を主に吸収する局所製剤で *in vitro* の評価を必要とする場合には、改変した照射条件 (上記参照) で3T3 NRU PTを実施しても良い。あるいは、UVB耐性のより高い *in vitro* の皮膚モデルを用いても良い。

角質層を有するヒト皮膚の再構築モデルを用いれば、原薬から最終的な臨床製剤に至るまでの様々な局所適用物質の試験が可能となる。再構築ヒト皮膚を用いてこれまでに開発された試験法は、照射の有無により細胞の生死を測定するものである。そのような試験法では、ヒト皮膚に対する既知の急性光毒性物質を検出することが可能であると考えられる。しかし、*in vivo* のヒト皮膚よりも感受性が低く、陽性反応を生じる最低用量が高い試験法もある。したがって、使用する試験法の感度を理解し、より高濃度の製剤の使用や照射時間の延長など、妥当かつ可能な試験法の条件を適宜調整することが重要である。

投与経路によらず、眼における光毒性を特異的に評価できる *in vitro* モデルは存在しない。3T3 NRU PTやヒト皮膚再構築試験法で陰性結果が得られれば、リスクが低いことを示唆できるかもしれないが、眼の光毒性に対するこれらの試験法の予測性は不明である。

### 3.4 全身適用薬の *in vivo* 光安全性試験

全身適用薬の光毒性試験は、モルモット、マウス、ラット等の様々な動物種で実施されている。標準的試験デザインは確立されていないため、以下に述べる要素を現時点で最良の方法として使用しても差し支えない。

動物種の選択にあたっては、照射に対する感受性（最小紅斑量）、熱に対する忍容性、対照物質における成績を考慮すべきである。有色およびアルビノのいずれの動物モデルも利用可能である。光毒性の検出のためには、アルビノのほうが有色動物よりも感受性が高い傾向があるが、標的組織に十分な曝露が行えない場合、メラニンに著しく結合するAPI（第2.2項を参照のこと）に対して有色動物の使用を考慮すべきである。

*In vivo*の光毒性試験を実施する場合には、試験をデザインする前に、化合物の薬物動態学的プロファイルに関する情報を得ておくことが望ましい。これは、動物への照射を $T_{max}$ 付近にて確実にを行い、意図する臨床曝露に対応して適切な試験期間を選択できるようにするためである。関連する薬物動態学的データをまだ入手していない場合には、*in vivo*光毒性試験の一環として収集すべきである。

光毒性は、通常、急性反応であるが、*in vivo*の試験法の試験期間について慎重に考えるべきである。光に曝露される組織における反復投与後の化合物の蓄積は、光毒性反応を増大させる可能性がある。同様に、各投与後の反復照射も、損傷の蓄積により光毒性反応を増大させる可能性がある。一般に、可能であれば臨床で用いられる投与経路を使い、試験の投与期間は1日あるいは数日間までとするので十分である。投与後（ $T_{max}$ 付近で）の照射については、単回あるいは連日反復実施のいずれを選択してもよい。

全身適用薬の非臨床 *in vivo* 光毒性試験における投与量を選択する際には、ヒトでのリスクアセスメントに資するものとするべきである。これらの試験における最高投与量は、ICH M3(R2) ガイドライン第 1.5 項に示されている一般毒性試験で推奨される投与量の規定に準じて決定することが適切と考える。最大投与量において陰性結果が得られる場合、通常、低用量での検討は必要でない。しかしながら、陽性結果が予測される場合は、追加的用量群を設定することにより、 $C_{max}$  の比較を考慮しつつ、無毒性量に基づくリスクアセスメントを行うことが可能となる。溶媒対照群および非照射投与群の設定により、化合物に関連した光毒性を特定し、照射によらず誘導される有害事象と照射により誘導される有害事象を識別することができる。動物で設定可能な最大全身曝露量が臨床曝露量を下回る場合は、陰性結果が得られたとしても、ヒトでのリスクを予測する上で信頼性に疑問が残る。

通常、紅斑発現照射量の閾値未満の照射において、化合物により誘導されるもっとも鋭敏な光毒性の初期徴候は、紅斑とその後に発現する浮腫である。反応の種類は、化合物により異なる可能性がある。光毒性反応が確認された場合は、それぞれにつき用量および時間依存性の評価を行い、可能であれば、無毒性量を決定すべきである。追加的エンドポイント（皮膚の初期炎症マーカー、急性の刺激性を示唆するリンパ節の反応など）を設定することにより、ハザードの特定が可能になるかもしれない。

400 nm超の光を吸収する全身適用薬に関して、動物で光毒性試験を行う場合に、網膜の光毒性は、詳細な病理組織学的評価を用いて検討すべきである。400 nm未満の光しか吸収しない化合物に関しては、そのような光の角膜、水晶体および硝子体での透過が限定的であり、成人の網膜に到達しないことから、網膜における評価を通常必要としない。

*In vivo*光毒性試験は、正式に検証されていないため、医薬品を含む適当な陽性対照物質を用いることにより、適切に使用できることを示す必要がある。試験法の適切性を確

立するためには、ヒトにおいて光毒性を示し、複数の化学的分類および光毒性発現機序からなる化合物を含めて検証すべきである。網膜光毒性に関する陽性対照物質としては、可視光領域（400 nm超）に吸収を有するものが推奨される。ある*in vivo*試験法が正式に検証されるか、あるいは一般に受け入れられ、試験実施施設で確立されている場合には、各試験における陽性対照物質の同時使用を必要としない。

全身適用薬についての光アレルギー試験は推奨されない。全身適用後のヒトにおける光アレルギー反応はまれであり、全身適用薬に関する非臨床光アレルギー試験法は確立されていない。

### 3.5 経皮適用薬の*in vivo* 光安全性試験

動物種の選択や、試験期間、照射条件など、全身投与における評価の場合に推奨される内容が、経皮投与の場合においても適用される。経皮適用薬では、一般的に臨床製剤を用いた試験を行うべきである。可能な限り、予定される臨床投与条件を採用する。曝露部位への照射は投与後、特定の時間に行うべきであり、投与から照射までの間隔は製剤の特性に基づいて決定すべきである。光毒性の兆候は、適切なエンドポイントに基づいて評価すべきである（第3.4項を参照のこと）。試験法の感度については、適切な陽性対照物質を用いて示すべきである。経皮適用薬の光毒性試験において、全身的な薬物濃度の評価は一般的に必要ない。

経皮投与の医薬品の場合、接触光アレルギーについては急性光毒性（光刺激性）と共に、非臨床試験で評価されてきた。しかし、このような試験法の正式なバリデーションは行われていない。これらの試験で観察される急性光刺激はヒトにも関係すると考えられるが、ヒトの光アレルギーに対して、これらの試験の予測性は不明である。製造販売承認申請のためには、非臨床光アレルギー試験が一般的に推奨されない。

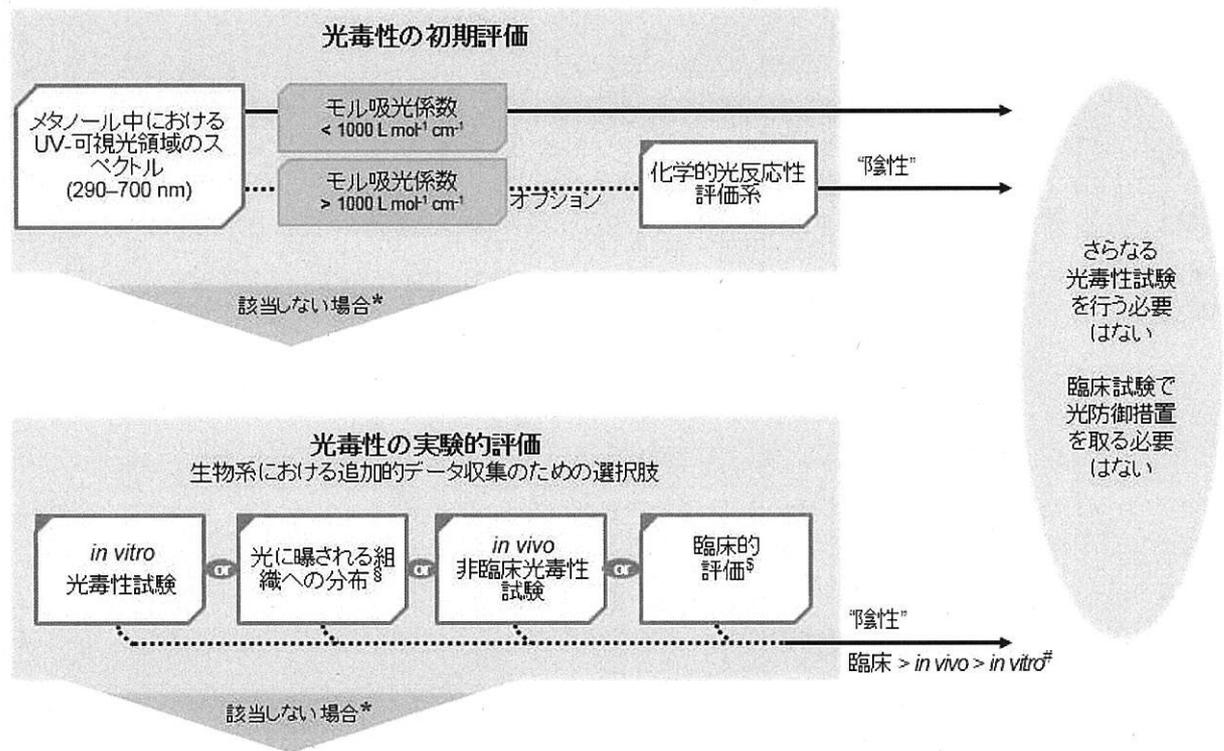
## 4. 臨床における光安全性評価

ヒトでのデータ収集が必要とされる場合には、臨床試験での標準的な有害事象報告から、光安全性に目的を絞った臨床試験にわたる多くのオプションが存在する。詳細な方法についてはケースバイケースで決定される。

## 5. 評価手法

光安全性評価の方法の選択は、薬剤開発者に委ねられている。ICH M3(R2) ガイドラインでは、外来での臨床試験に先立ち、光化学的性質および薬理学的/化学的分類に基づく光毒性の初期評価を行うよう提案している。UV～可視光領域の吸収スペクトルの評価は、これを行えばさらなる光安全性評価を行う必要がなくなる場合もあることから、初期評価の手法として推奨される。さらに、ヒトへのリスクおよび追加的試験の必要性に関してさらに多くの情報を得るためには、皮膚および眼への分布を評価してもよい。その後、必要ならば、光毒性の実験的評価（*in vitro*、*in vivo*試験あるいは臨床的な評価）を多数の被験者への曝露（第Ⅲ相試験）を行う前に行うべきである。

図1に光毒性評価方法の概要を示す。図は、本ガイドラインの本文で概説された評価方法に基づく。評価方法はフレキシブルである。特定の状況において、評価の一部は任意であり、行う必要がない場合もある。



ヒトにおける有害事象防止のための  
適切なりスク最小化措置を決定する

図1 全身および皮膚経路で投与される医薬品に関して考えられる光毒性評価方法の概要

- \* データにより光毒性の懸念が小さいことが立証されない、あるいはデータがない（試験法/試験/評価が行われない）場合を指す。
- # 適切に行われた *in vivo* 光毒性試験における“陰性”の結果は、*in vitro*での陽性結果に優先する。適切に実施された臨床光安全性評価で懸念が示されなかった場合は、非臨床での陽性結果に優先する。*In vitro*光毒性試験における陽性結果は、組織分布データにより、有効性を失う場合がある（本文参照）。米国では、皮膚適用される製品に関しては、市販予定製剤を用いた光安全性の臨床評価が必要になる場合がある。
- § 臨床試験での一般的有害事象報告から、光安全性評価のための臨床試験まで及ぶ。
- § 組織分布は皮膚適用する医薬品の光毒性のための考慮事項でない。

## 5.1 全身適用薬に推奨される評価手法

### 5.1.1 光毒性ポテンシャルの評価

その物質の MEC が  $1000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (290–700 nm) を超えない場合、光安全性試験の実施は推奨されず、ヒトにおいて直接的な光毒性は発現しないものと考えられる。しかしながら、まれではあるが、間接的メカニズムによる光毒性（偽ポルフィリン症やポルフィリン症など）が起きる可能性が排除できないことに注意すべきである。MEC が  $1000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  以上である化合物に関しては、薬剤開発者が光反応性試験の実施を選択する場合、陰性結果によってそれ以上の光安全性評価を不要とする判断を支持することができる（第 3.2 項を参照のこと）。それ以外の場合には、その物質の非臨床/臨床光安全性評価を実施すべきである。化学的分類上関連する化合物の光毒性に関して入手可能なデータについては、取るべきアプローチに関する情報がそこから得られる可能性があるため、評価すべきである。

### 5.1.2 光毒性の実験的評価

3Rの原則に従って動物の使用を減らすために、動物試験を行う前に、一般的には検証された *in vitro* の評価法を考慮すべきである（たとえば Directive 2010/63/EU を参照のこと）。薬剤開発者が *in vitro* のアプローチを選択する場合、現在のところ、3T3 NRU PT が最も広く用いられている試験法であり、多くの場合、最初の光毒性試験として考慮される。感度の高い 3T3 NRU PT は陰性結果の予測性に優れていることから、陰性結果はその化合物に光毒性がないとする十分な証拠として一般に受け入れられている。この場合、さらなる試験の実施は必要なく、ヒトへの直接的な光毒性は発現しないものと考えられる。

いくつかの条件下（たとえば難水溶性化合物）では、光毒性の初期評価として *in vitro* の試験法を用いるのが適切でない場合がある。この場合には、動物またはヒトを用いた評価が考慮される。あるいは、薬剤の分布データが入手できる場合には、ケースバイケースであるものの、それ以上の光安全性評価を不要とする判断を支持することができる（第 2.2 項を参照のこと）。

*In vitro* の光毒性評価法にて陽性結果が得られた場合、*in vitro* で検出された光毒性の *in vivo* における反応との関連性を評価するために、動物を用いた光毒性試験を実施することが可能である。あるいは、薬剤の分布データにより、*in vivo* における光毒性のリスクが非常に低いと判断される場合には、それ以上の光安全性評価を不要とする判断を支持することができる（第 2.2 項を参照のこと）。又は、別の選択肢として、光安全性リスクを臨床において評価したり、光防御手段を利用して管理することも可能である。適切に実施された動物あるいはヒトにおける光毒性試験の陰性結果は、*in vitro* の陽性結果よりも優先される。そのような場合、さらなる試験実施は必要なく、ヒトにおいて直接的な光毒性は発現しないものと考えられる。動物試験において陽性結果が得られた場合でも、 $C_{\max}$  の比較を考慮した無毒性量に基づくリスク評価により、ヒトでの直接的な光毒性が発現する懸念が少ないと判断できることもある。それ以外の場合には、臨床評価が必要とされる。いずれの場合においても、適切に実施された臨床光毒性評価で問題がないことが示された場合は、非臨床での陽性結果よりも優先される。 *In vitro*

の光毒性試験における陽性結果は、その後に化学的光反応性試験（ROSアッセイなど）で陰性結果を得たととしても覆されない。

動物を用いた光毒性試験あるいは臨床光毒性試験がすでに実施されている場合は、その後に化学的光反応性試験あるいは*in vitro*光毒性試験を実施する必要がない。

## 5.2 経皮適用薬に推奨される評価手法

### 5.2.1 光毒性ポテンシャルの評価

有効成分および添加剤のMECが $1000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ （290–700 nm）を超えない場合は、さらなる光安全性試験の実施が推奨されず、ヒトにおいて光毒性が発現しないものと考えられる。MECが $1000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 以上の化合物についても、光反応性試験（ROSアッセイなど）で陰性結果が得られた場合、さらなる光安全性評価を必要としない場合がある（例外については注5を参照のこと）。それ以外の場合には、その物質の非臨床/臨床光安全性評価を実施すべきである。化学的分類上関連する化合物の光毒性に関して入手可能なデータについては、取るべきアプローチに関する情報がそこから得られる可能性があるため、評価すべきである。

経皮投与製剤の光毒性に関して、組織分布は、考慮すべき要因とならない。経皮投与製剤は、皮膚に直接適用されることから、塗布される部位が通常光に曝露されない場合を除き、光に曝露される組織に分布すると見なされる。

### 5.2.2 光毒性および光アレルギーの実験的評価

適切な試験条件（たとえば、溶解性の低さに起因する濃度制限がないこと、適切なUVB照射量が確保できること）が得られるのであれば、3T3 NRU PTをAPIおよび新規添加剤、それぞれの光毒性評価に用いることができる。光毒性のある成分が*in vitro*で特定されなかった場合には、その臨床製剤における光毒性ポテンシャルが全体として低いものと考えて差し支えない。

臨床製剤において光毒性反応に影響を与えるような性質（たとえば皮膚透過性や細胞内への取り込み）の一部は、3T3 NRU PTのみで評価することができない。したがって、臨床製剤を用いた評価や、臨床試験のモニタリング結果により、総合的な陰性結果の確認が必要である。

再構築されたヒト皮膚モデルは、臨床製剤の光毒性の評価に使用可能である。再構築されたヒト皮膚試験法で適切な条件下（第3.3項を参照のこと）において陰性結果が得られた場合には、その製剤の直接的な光毒性ポテンシャルが低いとみなすことができる。この場合、一般にさらなる試験実施は必要ない（例外については注5を参照のこと）。

適切な*in vitro*試験法がない場合には、初期評価から臨床製剤を用いて*in vivo*の光毒性試験を実施してもよい。適切に実施された*in vivo*動物試験で陰性結果が得られた場合には、当該製剤が直接的な光毒性を有しないと判断して差し支えなく、さらなる光毒性試験を実施する必要がない（例外については注5を参照のこと）。あるいは、光毒性ポテンシャルを臨床的に評価しても差し支えない。

290から700 nmの間どの波長でもMECが $1000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を上回るAPIあるいは新規添加剤を含む経皮投与製剤については、光毒性に加え、光アレルギーの評価が一般的

に必要とされる。非臨床光アレルギー試験の予測性は不明であるため、一般的には市販予定製剤を用いた臨床評価として、第Ⅲ相試験の中で実施される。

局所曝露を目的に皮膚貼付剤として適用される臨床製剤の光安全性評価は、上記の経皮投与される臨床製剤に関する原則に従って行う。全身曝露を目的とした皮膚貼付剤に関しては、皮膚適用薬と全身適用薬の両者に関する原則を適用する。さらに、全体的リスク評価においては、意図する臨床における用法（使用時に奨励される皮膚領域、適用期間など）や貼付剤基剤の特性（UVと可視光を通さないなど）を考慮する。

## 6. 注釈

**注1:** 該当する波長を吸収し、MECが  $1000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  を超える眼に投与される化合物（点眼薬、眼内投与される薬剤など）については、光毒性ポテンシャルの評価を、光毒性評価の一般原則に従って行うべきである。眼における薬剤の分布および眼の光学的特性も考慮すべきである。化合物あるいは化学的分類上関連する化合物に関して入手できるすべてのデータは、総合的評価の中で考慮すべきである。

400 nm 未満の波長の光だけを吸収し、水晶体よりも後方（硝子体など）に眼内投与される化合物に関しては、成人の後眼部に到達する光が 400 nm 以上に限られることから、網膜光毒性に関する懸念が少ない。しかしながら、およそ 10 歳未満の小児の水晶体は 400 nm 未満の波長の光を完全には防御しない。

**注2:** 光遺伝毒性試験を標準的な光毒性試験プログラムの一部として実施することは推奨されない。過去にいくつかの地域的なガイドライン（たとえば CPMP/SWP/398/01）では、特に *in vitro* のほ乳類細胞を用いた光染色体異常誘発性試験（染色体異常試験あるいは小核試験）の実施を推奨していた。しかしながら、CPMP/SWP ガイドラインが発行されて以降のこれらのモデルにおける経験より、これらの試験は感度が過剰に高く、光染色体異常の偽陽性結果が生じることが報告されてきた（文献8）。さらに、光遺伝毒性試験データの解釈、すなわち臨床的に関連性のあるUV依存性の皮膚がん増加に対する意義は不明瞭である。

**注3:** MEC測定のための標準化された条件は非常に重要である。適切な溶媒の選択について、分析に必要な条件（たとえば溶解性やUV～可視領域の光の透過性）と生理学的な妥当性（たとえばpH 7.4の緩衝液）の両面から決定すべきである。メタノールは望ましい溶媒として推奨されており、MECの閾値を  $1000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  とする際に用いられた（文献3）。UV～可視領域の光のスペクトルを測定する際には、潜在的な限界（たとえば、高濃度あるいは低溶解性に起因するアーティファクト）について考慮すべきである。もし、分子中のクロモフォアがpH感受性を有すると考えられる場合（たとえば、フェノール構造や芳香族アミン/カルボン酸など）には、水性のpH 7.4の緩衝条件下で追加的スペクトル測定を行うことにより、吸光スペクトルやMECの差異に関する有益な情報が得られる。メタノール中での測定とpH調整条件下での測定の間有意な差が認められた場合には、 $1000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  というMECの閾値を用いることはできない。

**注4:** 製薬企業体を実施した調査では、OECD TG 432に述べられている3T3 NRU PTにおいて高い割合（約50%）で陽性結果が得られ、その大部分が動物やヒトでの反応と関連しないことが示されている（文献9）。医薬品のデータの遡及的調査を受けて、試

験の最高濃度を1000から100  $\mu\text{g/mL}$ に下げることが適切とされた（文献10）。光照射条件下でこの濃度まで細胞毒性を示さない化合物は光毒性を有さないと考えて差し支えない。さらに、全身適用薬では、OECD TG 432で「光毒性の可能性あり」とされるカテゴリー（すなわちphoto irritation factor (PIF)値が2~5の間、あるいはmean photo effect (MPE)値が0.10~0.15の間）の場合、毒性学的関連性が疑わしい。このカテゴリーに含まれる化合物に関しては、一般的に光安全性評価をさらに行う必要がない。PIF値が2~5の化合物で照射なしで $\text{IC}_{50}$ を測定することができない場合には、MPEの計算で陽性に分類されないこと、すなわちMPEが0.15未満であることを確認することが重要である。

光に当たるヒト組織で到達すると考えられる濃度よりもかけ離れて高い*in vitro*濃度のみで3T3 NRU PTが陽性となった全身適用薬に関しては、ケースバイケースで、また規制当局との協議の上、追加の*in vivo*試験を行わずに、ヒトでの光毒性に関して「低リスク」であると考えられる場合もある。

**注5：**米国では皮膚適用される製品に関しては、製品認可に必要な市販予定製剤（APIおよびすべての添加剤）を用いた光毒性（光刺激性）臨床試験が必要となる場合がある。

## 7. 用語の解説

**3T3 NRU PT：***In vitro* 3T3 Neutral Red Uptake Phototoxicity Test（3T3ニュートラルレッド取り込み光毒性試験）。

**評価：**本ガイドライン内の意味としては、入手できるすべての情報を用いて判断を行うことであり、必ずしも追加試験を実施することを意味するわけではない。

**クロモフォア：**可視光あるいはUVを吸収する分子の部分構造。

**経皮適用薬：**皮膚に局所適用される医薬品。

**直接的光毒性：**医薬品あるいは添加剤が光を吸収することにより引き起こされる光毒性。

**間接的光毒性：**医薬品あるいは添加剤により引き起こされる細胞学的、生化学的、生理学的変化による光毒性であるが、医薬品あるいは添加剤の光化学的反応に関連しないもの（ヘム代謝の攪乱など）。

**照度：**照射されるUVあるいは可視光の単位面積当たりの強度であり、 $\text{W/m}^2$ あるいは $\text{mW/cm}^2$ で表される。

**照射：**ある物体がUVあるいは可視光に曝露される過程。

**MEC：**Molar Extinction Coefficient（モル吸光係数）は、ある特定の波長において分子が光子を吸収できる効率を反映し（通常 $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ で表される）、溶媒などいくつかの要素による影響を受ける。

**MPE:** Mean Photo Effectは、3T3 NRU PTの結果から算出される。MPEは完全な濃度反応曲線との比較に基づく（OECD TG 432を参照）。

**NOAEL：**No Observed Adverse Effect Level（無毒性量）。

**OECD TG**：経済協力開発機構試験法ガイドライン。

**外来での臨床試験**：患者が臨床試験実施施設に拘束されない臨床試験。

**光反応生成物**：光化学反応の結果として生じる新規化合物/構造。

**光反応性**：光の吸収の結果として他の分子と反応する化学物質の性質。

**PIF**：Photo Irritation Factorは3T3 NRU PTの結果から算出される照射時および非照射時のIC<sub>50</sub>値の比。

**ROS**：Reactive Oxygen Speciesはスーパーオキシドアニオンや一重項酸素などを含む活性酸素種。

**全身適用薬**：全身曝露を意図して投与される医薬品。

**UVA**：紫外線A（波長320–400 nm）。

**UVB**：紫外線B（波長280–320 nm；地上に到達する太陽光の一部としては波長290–320 nm）。

## 8. 参考文献

1. ICH M3(R2) Guideline: Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals; June 2009.
2. ICH S9 Guideline: Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals; Oct. 2009.
3. Bauer D, Averett LA, De Smedt A, Kleinman MH, Muster W, Pettersen BA, Robles C. Standardized UV-vis spectra as the foundation for a threshold-based, integrated photosafety evaluation. *Regul Toxicol Pharmacol* 2014;68(1):70-5.
4. ICH Q1B Guideline: Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products; Nov. 1996.
5. CIE-85-1989: Solar Spectral Irradiance; Jan. 1989.
6. OECD (2004), *Test No. 432: In vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing.
7. Onoue S, Igarashi N, Yamada S, Tsuda Y. High-throughput reactive oxygen species (ROS) assay: An enabling technology for screening the phototoxic potential of pharmaceutical substances. *J Pharm Biomed Anal* 2008; 46(1): 187–193.
8. Lynch AM, Robinson SA, Wilcox P, Smith MD, Kleinman M, Jiang K, Rees RW. Cycloheximide and disulfoton are positive in the photoclastogenicity assay but do not absorb UV irradiation: another example of pseudophotoclastogenicity? *Mutagenesis* 2008 ; 23(2):111-118.
9. Lynch, AM, Wilcox, P. Review of the performance of the 3T3 NRU *in vitro* phototoxicity assay in the pharmaceutical industry. *Exp Toxicol Pathol* 2011; 63(3): 209-214.

10. Ceridono M, et al. Workshop Report: The 3T3 neutral red uptake phototoxicity test: Practical experience and implications for phototoxicity testing – The report of an ECVAM–EFPIA workshop. *Regul Toxicol Pharmacol* 2012; 63(3): 480–488.



**Peer Review Panel Evaluation of the Reactive Oxygen Species (ROS)  
Photosafety Assay**

**Japanese Center for the Validation of Alternative Methods  
National Institute of Health Sciences  
Tokyo, Japan**

**16 October 2013**

# Table of Contents

## **Executive Summary**

### **Peer Review Panel Evaluation**

1. Introduction
2. Regulatory Rationale
3. Scientific Rationale And Limitations
4. Test Method Protocol
5. Inter- And Intra-Laboratory Reproducibility
6. Validation Reference Chemicals
7. Test Method Predictivity
8. Availability Of Data
9. Data Quality
10. Applicability Domain
11. Proficiency Chemicals
12. Performance Standards
13. Advantages: Cost, Time, And Animal Welfare
14. Conclusions

### **Appendices**

1. Peer Review Panel Members
2. Acknowledgements
3. Glossary
4. References

## Executive Summary

The Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) convened an independent scientific peer review panel to evaluate the validation status of the Reactive Oxygen Species (ROS) assay in accordance with established international criteria (OECD, 2005). The ROS assay is a test method proposed as a component of an integrated photosafety testing strategy to evaluate whether test substances such as pharmaceuticals have the potential to cause phototoxicity.

The panel met initially in February and again in August 2013 in Tokyo, Japan. The panel considered the reports of two international validation studies and a proposed ROS Assay protocol at their initial meeting. The panel subsequently reviewed updated versions of the ROS Assay protocol and the validation study reports as revised by the Validation Management Team (VMT). This report summarizes the panel's final evaluation and conclusions.

**Overall conclusion:** The panel concluded that the reproducibility and predictivity of the ROS assay is sufficient to support its use in an integrated photosafety testing and decision strategy for drug research and development. In this strategy, negative results in the ROS assay would not require further testing in animals or other tests, while positive, weakly positive, and inconclusive results would proceed to the next level of testing in an *in vitro* test system such as the 3T3 Phototoxicity Assay (OECD Test Guideline 432). The panel also concluded that use of the ROS assay could potentially provide significant savings in time, cost and reduced animal use for photosafety assessments. Furthermore, incorporating the ROS assay into a photosafety testing strategy is expected to significantly reduce the overall number of substances that would require additional testing in the *in vitro* 3T3 Phototoxicity Assay and subsequent testing in animals.

**Regulatory rationale:** The panel concluded that the ROS Assay is applicable for use within the ICH regulatory testing framework for photosafety evaluation of pharmaceutical products. Regulatory authorities (e.g. PMDA/MHLW, U.S. FDA, EMEA) require non-clinical photosafety testing prior to approving First-in-Human Phase I studies so that appropriate precautions and observations can be taken during initial human studies. Such non-clinical photosafety testing typically includes an assessment of the potential for a drug to cause phototoxic reactions, which are characterized clinically by dermal redness, swelling, irritation, and inflammation. The panel also agreed that the ROS assay is applicable to in-house drug research and development.

**Scientific rationale:** The panel recognized that ROS production is the most important mechanism for chemically-induced phototoxicity, and is therefore a critical pathway initiating event leading to phototoxicity. The ROS assay quantitatively measures two common reactive oxygen species generated by photoreactive chemicals after exposure to simulated sunlight. In this validation study, chemicals that did not produce sufficient ROS to meet the photoreactivity threshold classification criteria for the ROS assay are uniformly non-phototoxic, while chemicals that met or exceeded the photoreactivity classification criteria include all known phototoxicants. Therefore if a chemical is not photoreactive in the ROS assay, it is unlikely that phototoxicity will occur in living systems.

**Limitations:** The panel noted that the ROS assay assesses chemical photoreactivity in a non-biological system, and therefore may overpredict phototoxicity potential since it does not assess the direct interaction of chemicals with biological tissues. The assay may also overestimate the

potential for phototoxicity because some chemicals may not achieve sufficient concentration in skin for phototoxic reactions to occur, or photodegradation may occur. Accordingly, positive results in the ROS assay are generally recommended for further evaluation in a photosafety testing strategy.

**Validation study reference chemicals:** The panel agreed that the reference chemicals selected for the validation studies were appropriate and sufficiently representative of the chemicals likely to be evaluated in the assay. The 42 reference chemicals incorporated most known human phototoxicants and included 23 known positives and 19 negatives. The chemicals were backed by data from human patch testing and in vitro 3T3 phototoxicity assay results. All data from the validation studies were made available in the validation study reports.

**Assay Reproducibility:** The panel concluded that the assay had excellent reproducibility both within and between laboratories for the 42 reference chemicals evaluated in the validation studies. Additionally, the positive and negative control chemicals had 100% reproducibility within and between laboratories based on classification outcome, which further supports the reproducibility of the ROS assay.

**Test method predictivity:** After reviewing analyses provided in the validation study reports, the panel agreed that conducting a single assay per chemical provided optimal predictivity. The panel concluded that the classification criteria for test outcomes have been appropriately optimized to avoid false negatives while minimizing false positives. The panel also noted that chemicals positive for both reactive oxygen species were uniformly phototoxic.

**Data quality:** The panel agreed that the high level of within and between laboratory reproducibility suggested a consistently high level of quality of the validation studies. While the studies were not conducted in strict accordance with GLPs, most of the labs were GLP certified. The validation management team also confirmed that quality control audits found that validation report data accurately reflected the raw data results.

**Test method protocols:** The panel considered the test method protocols used for the two validation studies and key aspects of a proposed standardized ROS assay protocol. The panel recommended that the solar simulator should be equipped with an appropriate temperature control unit or fan since ROS production can be influenced by temperature. The panel concluded that the list of proficiency chemicals provided in the test method protocol for laboratories to use to demonstrate ability to perform the assay was appropriate. The panel recommended that each lab should develop historical positive and negative control value acceptance ranges that can be used to determine the acceptability of an individual test. The panel also agreed with the appropriateness of the reference chemicals identified for qualification of solar simulators other than the two used in the validation studies.

**Applicability domain:** The applicability domain of the ROS assay is currently restricted to only those chemicals that meet the solubility criteria outlined in the protocol. The panel recommended that as experience is gained from use of the ROS assay, the applicability domain could be more fully described in terms of physicochemical properties and/or chemical classes. This will contribute to increased efficiency by providing criteria that can be used to identify whether a chemical may be satisfactorily tested in the ROS assay, or whether an alternate assay should be used initially.

## Peer Review Panel Evaluation of the ROS Assay

### Introduction

The Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) convened an independent scientific peer review panel to evaluate the validation status of the Reactive Oxygen Species (ROS) Assay in accordance with established international validation and acceptance criteria (OECD, 2005). The ROS Assay is a test method proposed to evaluate whether test substances such as pharmaceuticals may have the potential to cause phototoxicity.

The panel met initially in February and again in August 2013 in Tokyo. The panel considered the reports of two international validation studies and a proposed outline for a ROS assay protocol at their initial meeting. Following provision of a complete ROS assay protocol by the Validation Management Team (VMT) and updating of the validation study reports, the panel met a second time to complete its evaluation. In conducting its evaluation, the panel addressed each of the evaluation criteria that correspond to internationally harmonized validation and acceptance criteria. This report summarizes the panel's final evaluation and conclusions.

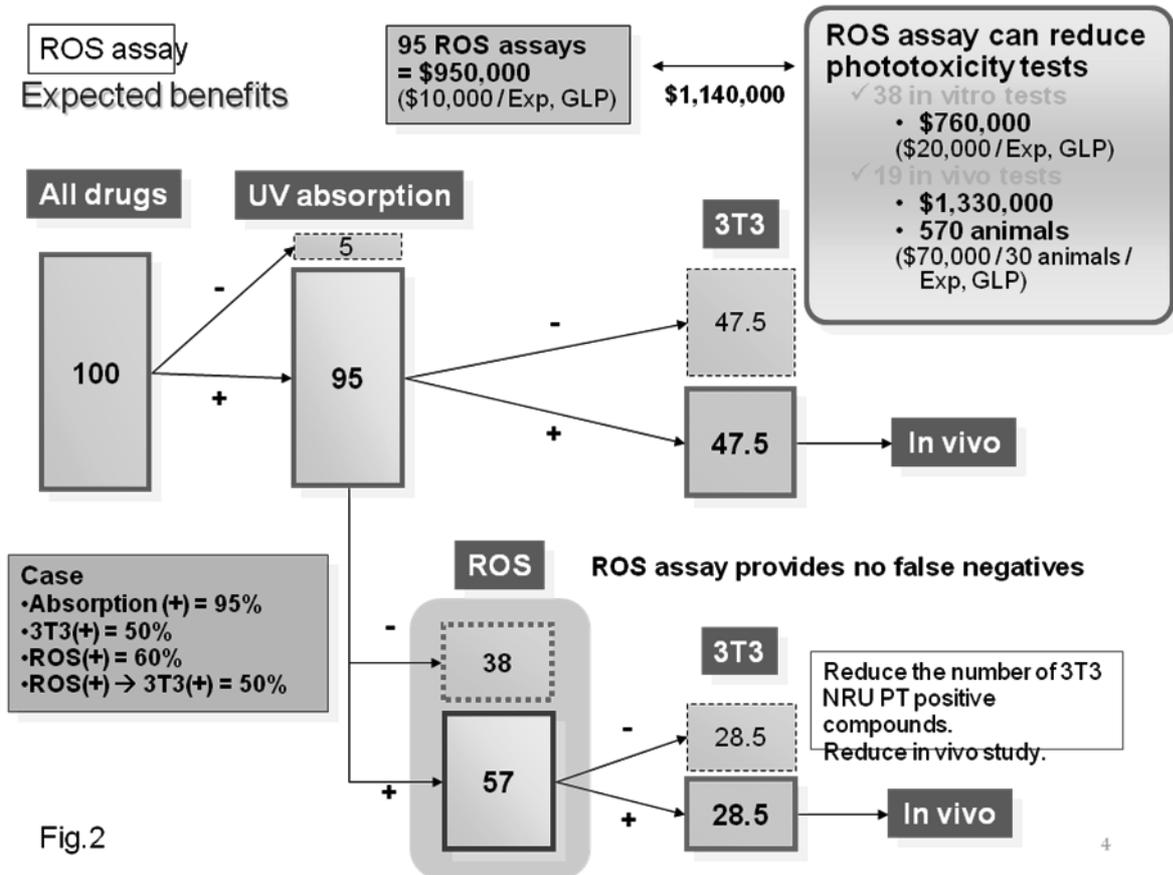
### **Evaluation Criterion 1: A rationale for the test method should be available, including description of toxicological mechanisms, a clear statement of scientific need, and regulatory application.**

The panel concluded that the ROS assay is applicable for use within the ICH regulatory testing framework for photosafety evaluation of pharmaceutical products. Regulatory authorities (e.g. PMDA/MHLW, U.S. FDA, EMEA, KFDA) require non-clinical photosafety testing prior to approving First-in-Human Phase I studies so that appropriate precautions and observations can be taken during initial human studies. Such non-clinical photosafety testing typically includes an assessment of the potential for a drug to cause phototoxic reactions, which are characterized by dermal redness, swelling, irritation, and inflammation. The panel also recognized that the ROS assay is applicable to in-house drug research and development. A proposed integrated photosafety testing strategy incorporating the ROS assay is provided below as Figure 1.

Chemicals that exhibit the potential for phototoxicity should be identified and if appropriate, eliminated in the early stages of drug discovery and development. Ideally, drugs should not be phototoxic. However, some beneficial drugs that have phototoxicity potential may be unavoidable, in which case it is important to ensure that there are appropriate precautions on drug labels so that patients can avoid exposures to sunlight that could lead to adverse reactions.

ROS production is the most important mechanism for inducing chemical phototoxicity. Physicochemical tests such as the ROS Assay enable the identification of ROS production by chemicals after exposure to UV and/or visible light.

**Figure 1**  
**Proposed integrated photosafety testing strategy incorporating the ROS Photosafety Assay (courtesy of Dr. Hosoi)**



**Evaluation Criterion 2: The relationship between the test method endpoint(s) and the biological effect and to the toxicity of interest should be addressed, describing limitations of the test methods.**

**Scientific rationale** The ROS assay is based on identifying reactive oxygen species produced by photoreactive chemicals after exposure to UV and/or visible light. This mechanism is the basis for phototoxic reactions in the skin of humans, e.g., redness, swelling, irritation, and inflammation. The panel recognized that ROS production is the most important mechanism for chemically-induced phototoxicity, and is therefore a critical pathway initiating event leading to phototoxicity. The ROS assay quantitatively measures two common reactive oxygen species generated by photoreactive chemicals after exposure to simulated sunlight. In this validation study, chemicals that did not produce sufficient ROS to meet the positive photoreactivity threshold classification criteria for this assay are uniformly non-phototoxic, while chemicals that met or exceeded the positive classification criteria include all known phototoxicants. Therefore if a chemical is negative in the ROS assay it is unlikely that phototoxicity will occur in living systems.

**Limitations:** The panel noted that the ROS assay assesses chemical photoreactivity in a non-biological system, and therefore may overpredict phototoxicity potential since it does not assess the direct interaction of chemicals with biological tissues. Additionally, the initiation of phototoxic reaction in humans depends on pharmacokinetics and sufficient concentration in the target tissue, which cannot be assessed in this assay. The assay may also overestimate the potential for phototoxicity because some chemicals may not achieve sufficient concentration in skin for phototoxic reactions to occur, or photodegradation may occur. Accordingly, positive results in the ROS assay are generally recommended for further evaluation in a photosafety testing strategy.

**Evaluation Criterion 3: A detailed test method protocol should be available.**

The panel considered the test method protocols used for the two validation studies and key aspects of a proposed standardized ROS assay protocol. The panel concluded that the proposed ROS assay protocol was sufficiently detailed to allow for users to successfully perform the procedure. The panel also concluded that the protocol included adequate and appropriate analysis and classification criteria. The panel recommended that the solar simulator should be equipped with an appropriate temperature control unit or fan since ROS production can be influenced by temperature. The panel concluded that the list of proficiency chemicals provided in the test method protocol for laboratories to use to demonstrate ability to perform the assay was appropriate. The panel recommended that each lab should develop historical positive and negative control value acceptance ranges that can be used to determine the acceptability of an individual test.

**Evaluation Criterion 4: Within- and between-laboratory reproducibility of the test method should be demonstrated.**

The panel concluded that the assay demonstrated excellent reproducibility both within and between laboratories for the 42 reference chemicals evaluated in the validation studies. Additionally, the positive and negative control chemicals had 100% reproducibility within and between laboratories based on classification outcome, which further supports the reproducibility of the ROS assay.

**Evaluation Criterion 5: Demonstration of the test method's performance should be based on testing of representative, preferably coded reference chemicals.**

The panel agreed that the reference chemicals selected for the validation studies were appropriate, and sufficiently representative of the chemicals likely to be evaluated in the assay. The 42 reference chemicals incorporated most known human phototoxicants and included 23 known positives and 19 negatives. The chemicals were backed by data from human patch testing and in vitro 3T3 phototoxicity assay results. The validation reference chemicals were appropriately coded to minimize bias by performing labs. All data from the validation studies were made available in the validation study reports.

The panel noted the potential importance of chemical structure, and acknowledged the VMT for incorporating chemical structures for all chemicals in the validation report. In addition, the panel noted that the VMT also assessed and described whether the current drug label information for Japan and U.S. included precautionary language for phototoxicity.

**Evaluation Criterion 6: Accuracy or predictive capacity should be demonstrated using representative chemicals. The performance of test methods should have been evaluated in relation to existing relevant toxicity data as well as information from the relevant target species.**

After reviewing analyses provided in the study reports, the panel agreed with the VMT that a single assay per chemical provided optimal predictivity. The panel concluded that the classification criteria for test outcomes had been appropriately optimized to avoid false negatives while minimizing false positives (see ROS assay protocol judgment criteria). Appropriate criteria are provided for photoreactive, weakly photoreactive, non-photoreactive, and inconclusive classifications. In the first validation study (Atlas solar simulator), two phototoxic and one non-phototoxic reference chemicals were classified as inconclusive due to solubility issues, and were not included in the integrated accuracy calculations. In the second validation study (Seric solar simulator), three phototoxic and four non-phototoxic reference chemicals were classified as inconclusive due to solubility issues, and were not included in the integrated accuracy calculations.

All of the phototoxic reference chemicals that produced conclusive results were identified as photoreactive in both validation studies, resulting in a sensitivity of 100% and a false negative rate of 0%. In the first validation study, of the 18 non-phototoxic reference chemicals that provided conclusive results, 15 were identified as non-photoreactive and three were classified as weakly photoreactive, resulting in a specificity of 83.3 % (15/18), and a false positive rate of 16.7% (3/18). In the second study, of the 15 non-phototoxic chemicals for which there were conclusive results, 12 were identified as non-phototoxic, two were classified as weakly

photoreactive, and one was classified as phototoxic, resulting in a specificity of 80% (12/15), and a false positive rate of 20% (3/15). However, it is important to note that of the non-phototoxic chemicals producing photoreactive results, all three responses were categorized as weakly photoreactive in the first study, and 2 of the 3 responses were categorized as weakly photoreactive in the second study.

**Evaluation Criterion 7: All data supporting the assessment of the validity of the test method should be available for expert review.**

All raw data for the two validation studies was provided in the validation study reports, which are readily available electronically from the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods at the National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan.

**Evaluation Criterion 8: Ideally, all data supporting the validity of a test method should have been obtained in accordance with the principles of Good Laboratory Practice (GLP).**

The panel concluded that there was a high level of within and between laboratory reproducibility, which suggested a consistently high level of quality of the validation studies. While the studies were not conducted in strict accordance with GLPs, six of the seven laboratories participating in the validation studies were GLP certified. This included two of three of the labs in Study #1 (Atlas), and all four of the labs participating in Study #2 (Seric). There was no significant variability between laboratories, which suggested a consistent level of quality. The validation management team also confirmed that quality control audits found that validation report data accurately reflected the raw data results.

**Evaluation Criterion 9: The applicability domain of the validity of the test method should be defined for expert review.**

The applicability domain of the ROS Assay is currently restricted to only those chemicals that meet the solubility criteria outlined in the protocol. The panel recommended that as experience is gained from use of the ROS assay, the applicability domain could be more fully described in terms of physicochemical properties and/or chemical classes. This would contribute to increased efficiency by providing criteria that can be used to identify whether a chemical may be satisfactorily tested in the ROS assay, or whether an alternate assay should be used initially.

Chemicals that are insoluble in the recommended vehicles and therefore are not suitable for testing with this assay may be able to be tested in other vehicles, such as BSA, alcohol, and acetone. However, further characterization and standardization of procedures using these alternative vehicles should be performed before incorporation into routine use.

**Evaluation Criterion 10: Proficiency chemicals should be provided in the proposed protocol.**

The panel concluded that the list of 9 proficiency chemicals provided in the test method protocol for laboratories to use to demonstrate ability to perform the assay was appropriate. These 9 chemicals were selected from the validation study reference chemicals and represent a wide range of responses in the assay as well as a wide range of solubilities.

**Evaluation Criterion 11: Performance standards should be developed for the proposed protocol.**

The panel agreed with the appropriateness of the 17 reference chemicals identified for qualification of proposed solar simulators other than the two solar simulators used in the validation studies. The reference chemicals were appropriately selected from the reference chemicals used for the validation studies. While performance standards were not specifically proposed, the panel considered that these reference chemicals would be appropriate for incorporation in future performance standards for the ROS assay.

**Evaluation Criterion 12: Are there advantages in terms of time, cost and animal welfare?**

The ROS assay can potentially provide significant savings in time, cost and reduced animal use when used in an integrated photosafety testing strategy by allowing decisions to be made earlier and with fewer overall tests for many chemicals. These advantages are illustrated in Figure 1, which shows that chemicals that are non-photoreactive in the ROS assay need not be tested in animals or other tests. The ROS assay also reduces the number of chemicals which progress to testing in the 3T3 Phototoxicity Assay, with a subsequent reduction in the number of positive results in the 3T3 assay that may progress to *in vivo* tests for confirmation.

**Conclusion**

The panel concluded that the reproducibility and predictivity of the ROS assay is sufficient to support its use in an integrated photosafety testing and decision strategy for drug research and development. In this integrated strategy, negative results in the ROS assay would not require further testing in animals or other tests, while positive, weakly positive, and inconclusive results would proceed to the next level of testing in an *in vitro* test system such as the 3T3 Phototoxicity Assay (OECD Test Guideline 432). The panel also concluded that use of the ROS assay will provide significant potential savings in time, cost and reduced animal use for photosafety assessments. Furthermore, incorporating the ROS assay into a photosafety testing strategy will significantly reduce the overall number of substances that require additional testing in the *in vitro* 3T3 Phototoxicity Assay, and substantially reduce the number of substances that require subsequent testing in animals.

## Appendix 1

### Independent Peer Review Panel Members

#### **Horst Spielmann, M.D., Panel Chairman**

Dr. Spielmann is a Professor for Regulatory Toxicology in the Institute for Pharmacy, Faculty of Biology, Chemistry, and Pharmacy at the Freie Universität Berlin in Berlin, Germany. He is the former and first head of the National German Center for the Validation of Alternative Methods (ZEBET) at the Federal Institute for Risk Assessment (BfR) in Berlin, Germany, where he directed the standardization and international validation of several in vitro methods and also served as the head of the Department of Scientific Services. He served as Germany's first national representative on the Scientific Advisory Committee for the European Centre for the Validation of Alternative Methods at the European Commission's Joint Research Centre in Ispra, Italy, and has served as an expert for many years for the European Commission's Framework Programs on alternatives to animal testing and in vitro toxicology. In December 2012, he was appointed as the Animal Welfare Officer for the State of Berlin.

#### **William S. Stokes, D.V.M., Rapporteur**

Dr. Stokes is an Adjunct Professor in the Department of Molecular Biomedical Sciences, College of Veterinary Medicine, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, U.S.A. He recently retired from the United States Public Health Service where he was an Assistant U.S. Surgeon General. He served as the first Director of the U.S. National Toxicology Program's Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods at the National Institute of Environmental Health Sciences from 1997-2012, where he directed the international validation and scientific peer review of numerous new test methods for regulatory safety assessments. He also served as the first Executive Director of the U.S. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods from 1997-2012. He is a Fellow of the Academy of Toxicological Sciences and a board certified environmental scientist, and is also board certified in laboratory animal medicine and animal welfare.

#### **Ikuo Horii, Ph.D.**

Dr. Horii is a global consultant for Pfizer and former Executive Director of Pfizer Drug Safety Research and Development in Nagoya, Japan. He is a Certified Toxicologist in the Japanese Society of Toxicology with a background in biochemistry, pharmacology, pathology, and molecular toxicology. He is currently a Visiting Professor at several institutions, including the School of Pharmacy at Showa University in Japan, Dalian Medical University in China, and Cambridge University in the United Kingdom. He is a Visiting Research Fellow at the National Institute of Health Sciences in Tokyo, Japan and Lecturer at Kyoto University, Tokyo University, and Chiba Institute of Science. He is President of Horii Science Associates and a board member of the Japanese Society of Toxicology.

#### **Bae-Hwan Kim, D.V.M., Ph.D.**

Dr. Kim is a Professor in the Department of Public Health at Keimyung University in Daegu, Republic of Korea, where he leads a biomedical research program and lectures in the College of Natural Sciences. He previously worked in the pharmaceutical and cosmetic industry for 15 years as a Team Leader in the Preclinical Department. His research includes investigation of the oxidative stress and oxidative photodamage induced by UV radiation and interventional strategies for avoidance of UV irradiation damage. His focus is on the safety evaluation of substances applied to the skin and the development of alternative methods to animal

experiments. Dr. Kim serves on the Editorial Board of the Journal of Biomedical Research and is a Council Member of the Korean Association for Laboratory Animal Science and the Korean Society for Alternatives to Animal Experiments.

## **Appendix 2**

### **Acknowledgements**

The Peer Review Panel members gratefully acknowledge Steven Venti from BHK Limited for his invaluable assistance with translation and editing during the peer review process. The Panel also acknowledges the members of the Validation Management Team for the completeness of the validation study reports, their cooperation and responsiveness to requests for additional information and analyses, and their responsive consideration of suggestions and updating of the validation study reports and test method protocol. Finally, the Panel expresses its appreciation to Dr. Hajime Kojima and his staff at the National Institute of Health Sciences for their excellent support and arrangements for the peer review panel meetings.

## Appendix 3

### Glossary<sup>1</sup>

**3T3 NRU-PT:** In vitro 3T3 neutral red uptake phototoxicity test.

**Dose of light:** The quantity [= intensity  $\times$  time (seconds)] of UV or visible light incident on a surface, expressed in J/m<sup>2</sup> or J/cm<sup>2</sup>.

**Irradiance:** The intensity of UV or visible light incident on a surface, measured in W/m<sup>2</sup> or mW/cm<sup>2</sup>.

**MEC:** Molar Extinction Coefficient (also called molar absorptivity) is a constant for any given molecule under a specific set of conditions (e.g., solvent, temperature, and wavelength) and reflects the efficiency with which a molecule can absorb a photon (typically expressed as L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

**Photoreactivity:** the property of a chemical to react with another molecule as a consequence of photon absorption. Excitation of molecules by light can lead to generation of reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anion (SA) and singlet oxygen (SO) through energy transfer mechanisms.

**Phototoxicity:** acute toxic response that is elicited after the first exposure of skin to certain chemicals and subsequent exposure to light, or that is induced similarly by skin irradiation after systemic administration of a chemical.

**ROS:** Reactive Oxygen Species, including superoxide anion (SA) and singlet oxygen (SO).

**UVA:** Ultraviolet light A (wavelengths between 320 and 400 nm).

**UVB:** Ultraviolet light B (wavelengths between 290 and 320 nm).

**UVC:** Ultraviolet light C (wavelengths between 190 and 290 nm).

---

<sup>1</sup> Note: definitions derived from OECD TG 432 and the ROS assay protocol

## Appendix 4

### References

1. OECD. Guidance Document No. 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France. 2005. Available at:  
[http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?doclanguage=en&cite=env/jm/mono\(2005\)14](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?doclanguage=en&cite=env/jm/mono(2005)14)
2. OECD. Test Guideline 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Assay. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France. 2005. Available at:  
[http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-432-in-vitro-3t3-nru-phototoxicity-test\\_9789264071162-en](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-432-in-vitro-3t3-nru-phototoxicity-test_9789264071162-en)
3. ROS Assay Validation Management Team. Validation report for the international validation study on ROS (Reactive Oxygen Species) assay as a test evaluating phototoxic potential of chemicals (Atlas Suntest version), 20 September 2013.
4. ROS Assay Validation Management Team. Validation report for the international validation study on ROS (Reactive Oxygen Species) assay as a test evaluating phototoxic potential of chemicals (Seric version), 9 October 2013.
5. ROS Assay Validation Management Team. Reactive Oxygen Species (ROS) Assay to Examine Photoreactivity of Chemicals: ROS Assay Protocol, version 3.1, 20 September 2013.



## **REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS) ASSAY TO EXAMINE PHOTOREACTIVITY OF CHEMICALS**

Issued by: ROS assay Validation Management Team

Date: 28 November 2014.

### **1. INTRODUCTION**

The purpose of this document is to recommend a protocol for assaying the photoreactivity of chemicals based on reactive oxygen species (ROS). Photoreactivity is defined as the property of a chemical to react with another molecule as a consequence of photon absorption. Excitation of molecules by light can lead to generation of ROS such as superoxide anion (SA) and singlet oxygen (SO) through energy transfer mechanisms. The ROS assay does not measure phototoxicity directly, but rather is a physicochemical test that can be applied to that purpose, similar to measurement of UV absorbance.

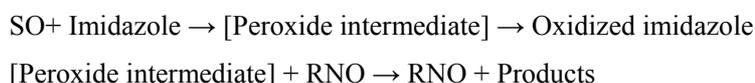
### **2. INITIAL CONSIDERATION**

Validation studies conducted by JaCVAM showed that the ROS assay has 100% sensitivity for predicting phototoxicants but can result in some false positives [1-3]. Based on the results of the validation studies, conducting this assay would classify a test chemical into one of the following: photoreactive, weakly photoreactive, non-photoreactive, or inconclusive. Photoreactive, weakly photoreactive, or inconclusive results would be a flag for follow-up phototoxicity assessment. Non-photoreactive results indicate a very low probability of phototoxicity, and no further phototoxicity testing would be suggested. In the ROS assay, measurement is first made at a concentration of 200  $\mu\text{M}$  (final concentration). If interference such as precipitation or coloration (exhibiting peak absorbance at 440 or 560 nm) is observed at 200  $\mu\text{M}$ , measurements are made at 20  $\mu\text{M}$ . When precipitation or coloration is found at 20  $\mu\text{M}$ , the substance is considered incompatible with the ROS assay. Since the ROS assay is designed to evaluate directly the photoreactivity of chemicals, it is not suitable for detecting chemicals that induce *in vivo* phototoxicity by indirect mechanisms such as porphyria and pseudoporphyria.

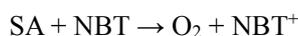
### 3. PRINCIPLE OF THE TEST METHOD

Drug-induced photoirritation can be defined as an inflammatory reaction of the skin after topical or systemic administration of pharmaceutical substances. There are several classes of drugs (including antibacterials, thiazide diuretics, non-steroidal anti-inflammatory drugs, quinolones, and tricyclic antidepressants) which are nontoxic by themselves but could become reactive when exposed to environmental light and thereby result in undesired side effects. The primary event in any photosensitization process is the absorption of photons of a wavelength that induces excitation of the chromophore. The excitation energy is often transferred to oxygen molecules, followed by generation of ROS, including SA through type I reaction and SO through type II reaction by photo-excited drug molecules. These appear to be the principal intermediate species in the phototoxic response. From the standpoint of risk assessment, previous research has demonstrated that determination of ROS from pharmaceutical substances irradiated with UVA/B and visible light would be of help in recognizing their phototoxic potential.

In the ROS assay, SO generation was detected by spectrophotometric measurement of *p*-nitrosodimethyl aniline (RNO) bleaching, followed by decreased absorbance of RNO at 440 nm [4]. Although SO does not react chemically with RNO, the RNO bleaching is a consequence of SO capture by the imidazole ring, which results in the formation of a trans-annular peroxide intermediate capable of inducing the bleaching of RNO, as follows:



SA generation was detected by the observing the reduction of nitroblue tetrazolium (NBT) as indicated below; NBT can be reduced by SA via a one-electron transfer reaction, yielding partially reduced ( $2 e^-$ ) monoformazan ( $\text{NBT}^+$ ) as a stable intermediate [5]. Thus, SA can reduce NBT to  $\text{NBT}^+$ , the formation of which can be monitored spectrophotometrically at 560 nm.



### 4. DESCRIPTION OF THE TEST METHOD

#### Technical equipment

Solar simulators:

Suntest CP series (Atlas Material Technology, Chicago, IL, USA) or SXL-2500V2 (Seric, Tokyo, Japan) with a fan and UVC cut filter (Spectrum shown in Appendix 1)

UVA detector: e.g. #0037 (Dr. Hönle, München, German) or UD series (Topcon, Tokyo, Japan)

Quartz reaction container (Ozawa Science, Aichi, Japan, Appendix 2) or equivalent

Microplate spectrophotometer, equipped with 440 and 560 nm filters

Microscope

Thermometer

Vortex mixer

Plate shaker

Sonicator

Pipettes

Polypropylene tubes

Plastic 96-well plates (clear, non-treated, flat-bottom)

Plastic and glass laboratory ware

### Solar simulator

An appropriate solar simulator is to be used for irradiation of UV and visible light. The irradiation power distribution is to be kept as close to that of outdoor daylight as possible by using an appropriate UVC cut filter. Recommended solar simulators and UVA intensity on the plate position measured by UVA detector #0037 (Dr. Hönle) are as follows:

Suntest CPS+ or CPS (Atlas) with UV cut filter (<290 nm),

1.8 to 2.2 mW/cm<sup>2</sup> (e.g. the indicator setting value of 250 W/m<sup>2</sup> for CPS+) for 1 hour,

6.5 to 7.9 J/cm<sup>2</sup> of UVA intensity (Appendix 1)

SXL-2500V2 (Seric) with UV cut filter (<300 nm),

3.0 to 5.0 mW/cm<sup>2</sup> for 1 hour,

11 to 18 J/cm<sup>2</sup> of UVA intensity (Appendix 1)

The solar simulator is to be equipped with an appropriate temperature control or fan to stabilize the temperature during irradiation, because ROS production is affected by temperature. Standard temperature for a solar simulator with temperature control is 25°C. The acceptable temperature range during irradiation is 20° to 29°C. If a solar simulator other than the two recommended models is used, the reference chemical set listed in section 6 is to be tested prior to performing the ROS assay to ensure that measured values of SO and SA are close to those mentioned in section 6.

### Quartz reaction container

A quartz reaction container is used to avoid loss of UV due to passing through a plastic lid and vaporization of the reaction mixture [6]. A made-to-order container (See Appendix 2.) or its equivalent is recommended. If a different container is used, a lid or seal with high UV transmittance must be used. In this case, a feasibility study using the reference chemicals is to be conducted to determine an appropriate level of exposure to UV and visible light.

## Reagents

The following reagents are to be used and stored according to the instructions of manufacturers.

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O (CAS No. 13472-35-0)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O (CAS No. 10039-32-4)

p-Nitrosodimethylaniline (RNO, CAS No. 138-89-6)

Imidazole (CAS No. 288-32-4)

Nitroblue tetrazolium chloride (NBT, CAS No. 298-83-9)

Purified water

## Preparation of reagents

All reagents are to be sonicated and used within 1 month after preparation. Representative preparation methods are shown as follows.

20 mM sodium phosphate buffer (NaPB), pH 7.4

Weigh 593 mg of NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O and 5.8 g of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O, add 900 mL of purified water, adjust with HCl to a pH of 7.4, dilute with purified water up to 1 L, and mix.

Store in a refrigerator or at room temperature.

0.2 mM p-Nitrosodimethylaniline (RNO)

Dissolve 3 mg of RNO in 100 mL of 20 mM NaPB.

Store in a refrigerator and protect from light.

20 mM imidazole

Dissolve 13.6 mg of imidazole in 10 mL of 20 mM NaPB.

Dilute the 2 × 10<sup>-2</sup> M imidazole solution 100 times with 20 mM NaPB.

Store in a refrigerator and protect from light.

0.4 mM nitroblue tetrazolium chloride (NBT)

Dissolve 32.7 mg of NBT in 100 mL of 20 mM NaPB.

Store in a refrigerator and protect from light.

## Test chemicals

Test chemicals are to be stored appropriately until termination of the study and their stability during the test period is to be confirmed. One concentration level, 200 μM (final concentration), is to be used. A 20-μM concentration can be used if precipitation before light exposure, coloration, or other interference is observed in the reaction mixture at 200 μM.

## Preparation of test chemical solutions

The test chemical solutions are to be prepared using a solvent just before use. Each test chemical is to be weighed in a tube, and solvent added to a concentration 10 mM. The tube is to be mixed with

a vortex mixer and sonicated for 5 to 10 minutes under UV-cut illumination or shade. All preparations are to be protected from light. The final concentration in a reaction mixture is to be 200  $\mu\text{M}$ . When precipitation before light exposure, coloration, or other interference is observed in the reaction mixture at 200  $\mu\text{M}$ , a 1-mM solution (20  $\mu\text{M}$  as the final concentration) is to be prepared using the solvent. For chemicals that are not soluble in DMSO, 20  $\mu\text{L}$  of DMSO is to be contained in the reaction mixture.

#### Positive and negative control chemicals

Quinine hydrochloride (CAS No. 6119-47-7) is to be used at 200  $\mu\text{M}$  (final concentration) as a positive control. Sulisobenzone (CAS No. 4065-45-6) is to be used at 200  $\mu\text{M}$  (final concentration) as a negative control.

#### Preparation of positive and negative control chemical solutions

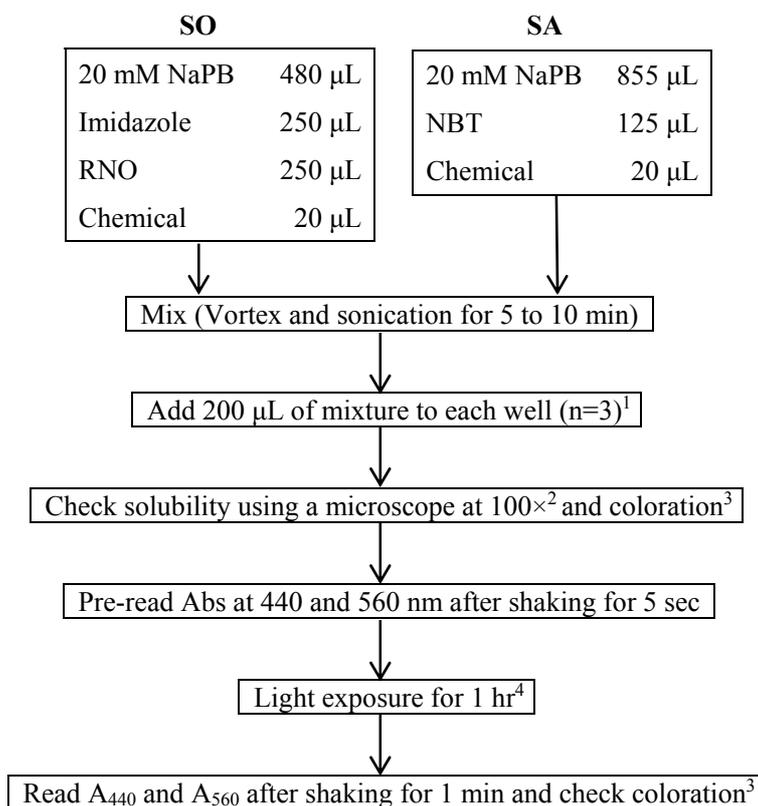
Stock solutions of quinine and sulisobenzone are to be prepared at 10 mM each in DMSO (final concentration of 200  $\mu\text{M}$ ) according to the above procedure, divided into tubes, and stored in a freezer (generally below  $-20^{\circ}\text{C}$ ) for up to 1 month. The stock solution is to be thawed just before the experiment and used within the day.

#### Solvent

Use analytical grade DMSO at first. For chemicals that are not soluble in DMSO, 20 mM of NaPB is to be used. When a test chemical is insoluble in either DMSO or 20 mM NaPB, try bovine serum albumin (BSA) or other solvent [7-8]. Prior to use of BSA or other solvent, however, perform a feasibility study (see Section 6) using the reference chemicals to determine appropriate test conditions. The results of ROS assays using BSA or other solvents, however, are not suitable for regulatory purposes until these solvents have been properly evaluated.

### Test procedure

A tube (e.g. 1.5 mL micro tube) and a plastic clear flat bottomed 96-well microplate are to be used. The reaction mixture is to be prepared by vortex mixing and/or sonication under UV-cut illumination or shade. The same volume of DMSO, 20  $\mu$ L, is to be added in a blank instead of test chemical solution.



### Notes

- 1) Avoid using peripheral wells. More than one test chemical can be tested on a plate. A typical 96-well plate configuration is as follows:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A				Singlet oxygen									
B		B	P	N	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7		
C		B	P	N	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7		
D		B	P	N	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7		
E		B	P	N	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7		
F		B	P	N	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7		
G		B	P	N	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7		
H				Superoxide anion									

B: Blank  
P: Positive control (Quinine)  
N: Negative control (Sulisobenzone)  
T1-T7: Test chemical No. 1-7

- 2) Some chemicals might precipitate in the reaction mixture. It is therefore important to check solubility prior to irradiation. Solubility of each reaction mixture in its well is to be observed with a microscope prior to irradiation. Test chemical concentrations are to be selected so as to avoid precipitation or cloudy solutions.
- 3) The reaction mixture is to be checked for coloration with the naked eye.
- 4) The 96-well plate is to be placed in the quartz reaction container. A quartz cover is to be set on the plate and fastened with bolts. Ensure that temperature and other ambient conditions are stable when using the solar simulator. Measure UVA intensity and temperature at the plate position using a UVA detector and thermometer both before and after irradiation.

## 5. DATA AND REPORTING

### Data analysis

Data from three wells for each chemical concentration is used to calculate mean and standard deviation.

#### SO

$$\text{Decrease of } A_{440} \times 1000 = [A_{440}(-) - A_{440}(+) - (a - b)] \times 1000$$

$A_{440}(-)$ : Absorbance before light exposure at 440 nm

$A_{440}(+)$ : Absorbance after light exposure at 440 nm

a: Blank before light exposure (mean)

b: Blank after exposure (mean)

#### SA

$$\text{Increase of } A_{560} \times 1000 = [A_{560}(+) - A_{560}(-) - (b - a)] \times 1000$$

$A_{560}(-)$ : Absorbance before light exposure at 560 nm

$A_{560}(+)$ : Absorbance after light exposure at 560 nm

a: Blank before light exposure (mean)

b: Blank after exposure (mean)

### Criteria for data acceptance

The following criteria are to be satisfied in each experiment.

No precipitation of test chemical in the reaction mixture before light exposure.

No coloration of test chemical in the reaction mixture before or after light exposure.

No technical problems, including prescribed temperature range, when collecting data set.

Raw OD value: 0.02 to 1.5

Historical positive and negative control values are to be developed by each laboratory based on a

mean  $\pm$  2 SD. The following range was defined based on the 95% confidence interval (mean  $\pm$  1.96SD) obtained from the validation data. When a solar simulator other than a recommended model is used, establish modified criteria based on 95% confidence interval.

Positive control value at 200  $\mu$ M (mean of 3 wells)

SO: 319 to 583

SA: 193 to 385

Negative control value at 200  $\mu$ M (mean of 3 wells)

SO: -9 to 11

SA: -20 to 2

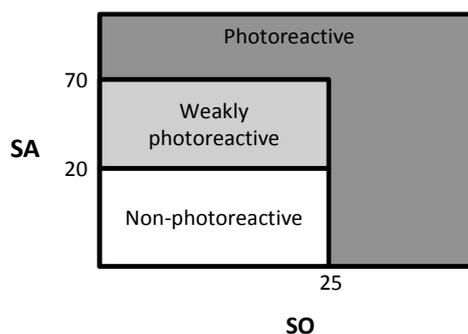
### Criteria for judgment

Each test chemical is to be judged as follows:

Judgment <sup>1,2</sup>	Concentration <sup>3</sup>	SO (mean of 3 wells)	SA (mean of 3 wells)
Photoreactive	200 $\mu$ M	$\geq 25$	and $\geq 70$
		$< 25$ and/or $I^4$	and $\geq 70$
		$\geq 25$	and $< 70$ and/or $I^4$
Weakly photoreactive	200 $\mu$ M	$< 25$	and $\geq 20, < 70$
Non-photoreactive	200 $\mu$ M	$< 25$	and $< 20$
Inconclusive	The results do not meet the above-mentioned criterion.		

### Notes

1. A single experiment is sufficient for judging results, because the ROS assay shows good intra- and inter-laboratory reproducibility in the validation studies.
2. If precipitation, coloration, or other interference is observed at both 20 and 200  $\mu$ M, the chemical is considered incompatible with the ROS assay and judged as inconclusive.
3. Twenty  $\mu$ M can be used for judgment when precipitation or coloration is observed at 200  $\mu$ M. For regulatory purposes, the stability of the test chemical in the reaction mixture both before and after light exposure is to be confirmed when results at 20  $\mu$ M are used for judgment as a non-photoreactive chemical for which no further phototoxicity testing is necessary.
4. Interference such as precipitation or coloration.



### Data quality

Studies for regulatory purposes are to be conducted to the highest of quality standards, with data collection records readily available, in compliance with GLP/GMP regulations whenever possible, and all documents checked by the Quality Assurance Unit of the laboratory.

### Test report

The test report must include the following information:

#### Test chemical

Name and lot No.

Physical nature and purity

Storage condition

Stability during the test period

UV/vis absorption spectrum, maximum molar extinction coefficient at 290 to 700 nm, and/or photostability, if known

Preparation of test chemical solution

Final concentrations tested

#### Control chemicals

Name, manufacturer, and lot No.

Physical nature and purity

Storage condition

Preparation of control chemical solutions

Final concentrations tested

#### Solvent

Name, manufacturer, and lot No.

Justification for choice of solvent

#### Irradiation condition

Manufacturer and type of the solar simulator used

Rationale for selection of the solar simulator used

UVA detector used

UVA irradiance, expressed in  $\text{mW}/\text{cm}^2$

UVA dose, expressed in  $\text{J}/\text{cm}^2$

Temperature before and after irradiation

#### ROS assay procedure

Acceptance and decision criteria

Results

Discussion

Conclusions

## Archives

The study report and all raw data is to be retained according to the SOP in the testing facility.

## 6. REFERENCE CHEMICALS FOR THE FEASIBILITY STUDY

To perform a ROS assay, it is necessary first to ensure irradiation conditions that satisfy the recommended criteria using the positive and negative controls, after which reference chemicals are to be tested in a feasibility study. The reference chemical set, as selected from the validation studies, and acceptable value ranges are shown in Table 1 and Table 2. It is important that the values for SO and SA obtained in the feasibility study be similar to the following values.

Table 1 Standard chemical set for laboratories to demonstrate proficiency using solar simulators of Suntest CPS/CPS+ (Atlas) or SXL-2500V2 (Seric) and the acceptable range

No.	Chemical	CAS No.	SO	SA	Solvent	Concentration
11	Doxycycline hydrochloride	10592-13-9	115 to 429	230 to 468	DMSO	200 $\mu$ M
12	Norfloxacin	70458-96-7	131 to 271	57 to 161	DMSO	200 $\mu$ M
13	8-Methoxy psoralen	298-81-7	31 to 137	0 to 126	DMSO	200 $\mu$ M
14	Fenofibrate	49562-28-9	77 to 203	-31 to 11	DMSO	20 $\mu$ M
15	p-Aminobenzoic acid	150-13-0	-8 to 12	-11 to 7	DMSO	200 $\mu$ M
16	Benzocaine	94-09-7	-7 to 9	<u>-7</u> to 17	DMSO	200 $\mu$ M
17	Erythromycin	114-07-8	-15 to 11	<u>-9</u> to 21	DMSO	200 $\mu$ M
18	Octyl salicylate	118-60-5	-5 to 11	-8 to 20	DMSO	20 $\mu$ M
19	L-Histidine	71-00-1	-8 to 12	8 to 120	NaPB	200 $\mu$ M

The values were calculated as mean +/- 1.96 SD from the validation data.

Note: Underline parts were corrected because of errors in writing.

Table 2 Recommended chemical set for the other solar simulators and the acceptable range

No.	Chemical	CAS No.	SO	SA	Solvent	Concentration
21	Acridine	260-94-6	182 to 328	121 to 243	DMSO	200 $\mu$ M
22	Chlorpromazine hydrochloride	69-09-0	-56 to 70	66 to 106	DMSO	200 $\mu$ M
23	Diclofenac	15307-79-6	34 to 416	47 to 437	DMSO	200 $\mu$ M
24	Doxycycline hydrochloride	10592-13-9	115 to 429	230 to 468	DMSO	200 $\mu$ M
25	Furosemide	54-31-9	31 to 225	-7 to 109	DMSO	200 $\mu$ M
26	Ketoprofen	22071-15-4	120 to 346	77 to 151	DMSO	200 $\mu$ M
27	8-Methoxy psoralen	298-81-7	31 to 137	0 to 126	DMSO	200 $\mu$ M
28	Nalidixic acid	389-08-2	54 to 246	88 to 470	DMSO	200 $\mu$ M
29	Norfloxacin	70458-96-7	131 to 271	57 to 161	DMSO	200 $\mu$ M
30	Omeprazole	73590-58-6	-221 to 103	30 to 216	DMSO	200 $\mu$ M
31	Promethazine hydrochloride	58-33-3	20 to 168	-3 to 77	DMSO	200 $\mu$ M
32	Fenofibrate	49562-28-9	77 to 203	-31 to 11	DMSO	20 $\mu$ M
33	p-Aminobenzoic acid	150-13-0	-8 to 12	-11 to 7	DMSO	200 $\mu$ M
34	Benzocaine	94-09-7	-7 to 9	-7 to 17	DMSO	200 $\mu$ M
35	Erythromycin	114-07-8	-15 to 11	-9 to 21	DMSO	200 $\mu$ M
36	Octyl salicylate	118-60-5	-5 to 11	-8 to 20	DMSO	20 $\mu$ M
37	L-Histidine	71-00-1	-8 to 12	8 to 120	NaPB	200 $\mu$ M

The values were calculated as mean  $\pm$  1.96 SD from the validation data.

## 7. GLOSSARY

**ROS:** Reactive Oxygen Species, including superoxide anion (SA) and singlet oxygen (SO).

**3T3 NRU-PT:** *In vitro* 3T3 neutral red uptake phototoxicity test.

**Irradiance:** The intensity of UV or visible light incident on a surface, measured in W/m<sup>2</sup> or mW/cm<sup>2</sup>.

**Dose of light:** The quantity [= intensity × time (seconds)] of UV or visible light incident on a surface, expressed in J/m<sup>2</sup> or J/cm<sup>2</sup>.

**MEC:** Molar Extinction Coefficient (also called molar absorptivity) is a constant for any given molecule under a specific set of conditions (e.g., solvent, temperature, and wavelength) and reflects the efficiency with which a molecule can absorb a photon (typically expressed as L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

**Photoreactivity:** The property of chemicals that react with another molecule as a consequence of absorption of photons.

**Phototoxicity:** An acute light-induced tissue response to a photoreactive chemical.

**UVA:** Ultraviolet light A (wavelengths between 320 and 400 nm).

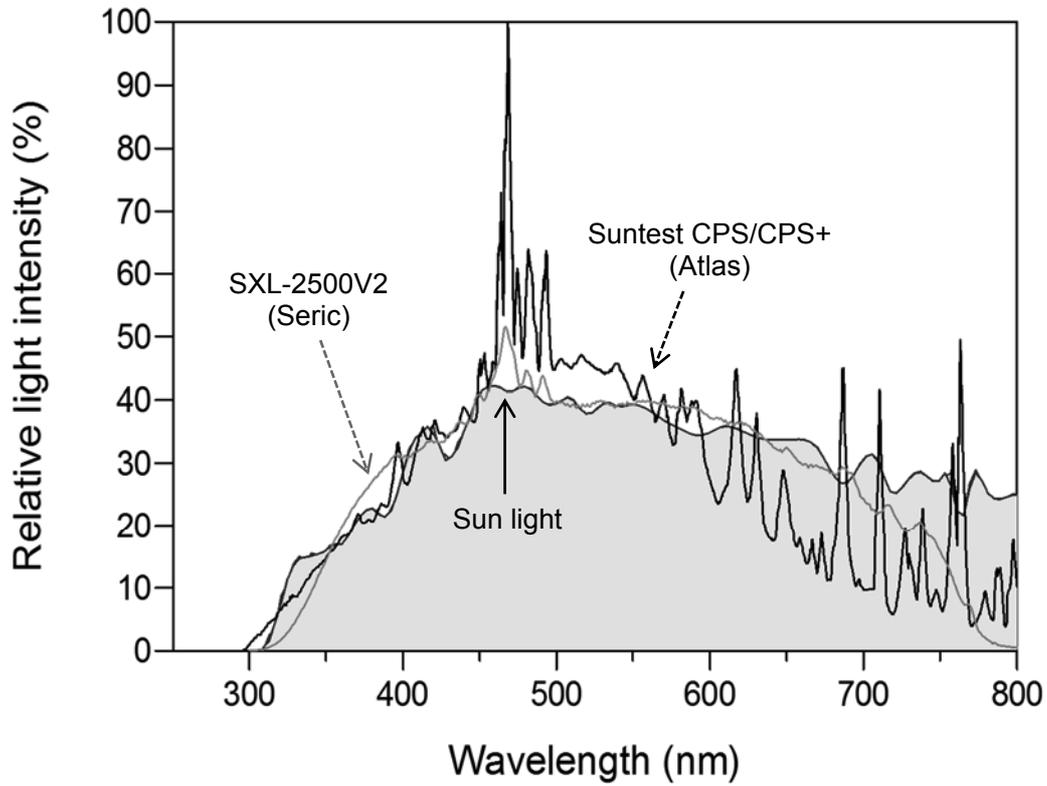
**UVB:** Ultraviolet light B (wavelengths between 290 and 320 nm).

**UVC:** Ultraviolet light C (wavelengths between 190 and 290 nm).

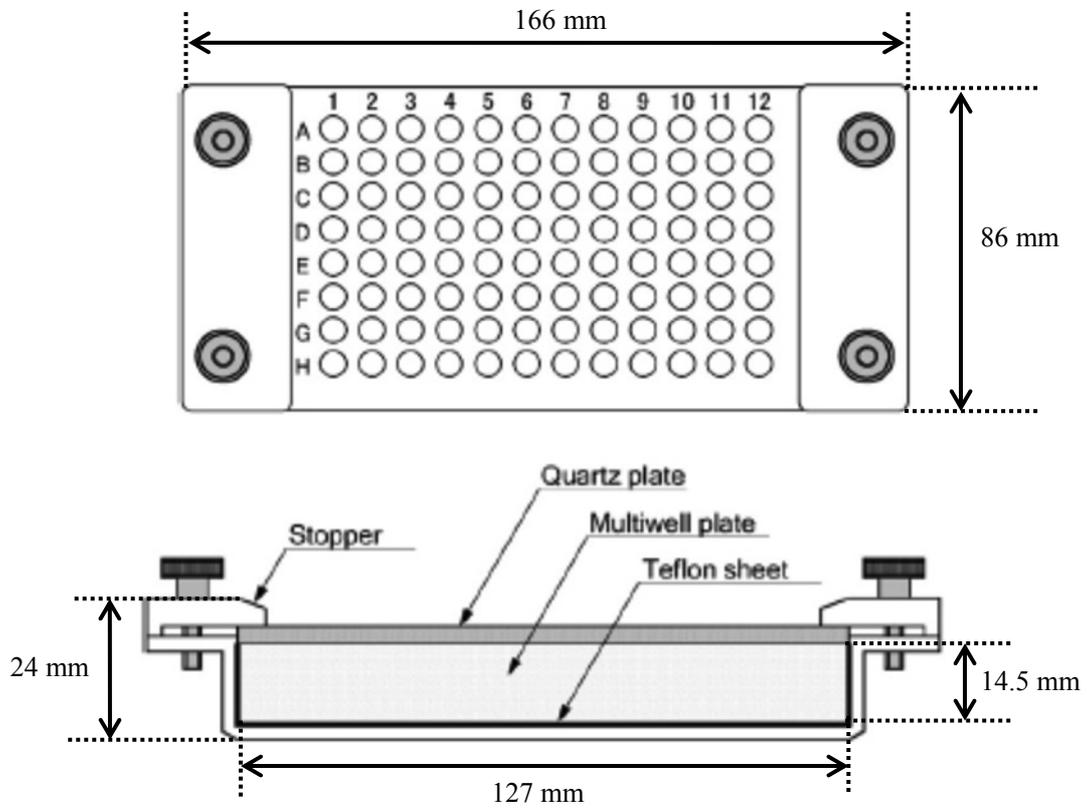
## **8. REFERENCES**

- [1] ROS assay validation management team. Validation report for the international validation study on ROS (Reactive Oxygen Species) assay as a test evaluating phototoxic potential of chemicals (Atlas Suntest version), 2013.
- [2] ROS assay validation management team. Validation report for the international validation study on ROS (Reactive Oxygen Species) assay as a test evaluating phototoxic potential of chemicals (Seric version), 2013.
- [3] 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*, Article first published online, 13 June, 2012 (DOI: 10.1002/jat.2776).
- [4] I. Kraljić, S. El Mohsni. A new method for the detection of singlet oxygen in aqueous solutions. *Photochem Photobiol*, 28, 577-81, 1978.
- [5] Pathak MA, Joshi PC. Production of active oxygen species ( $^1\text{O}_2$  and  $\text{O}_2^-$ ) by psoralens and ultraviolet radiation (320-400 nm). *Biochim Biophys Acta*, 798, 115-26, 1984.
- [6] Onoue S, Igarashi N, Yamada S, Tsuda Y. High-throughput reactive oxygen species (ROS) assay: an enabling technology for screening the phototoxic potential of pharmaceutical substances. *J Pharm Biomed Anal*, 46, 187-93, 2008.
- [7] Onoue S, Yamauchi Y, Kojima T, Igarashi N, Tsuda Y. Analytical studies on photochemical behavior of phototoxic substances; effect of detergent additives on singlet oxygen generation. *Pharm Res*, 25, 861-868, 2008.
- [8] Onoue S, Kato M, Yamada S. Development of an albuminous reactive oxygen species assay for photosafety evaluation under experimental biomimetic conditions. *J Appl Toxicol*, Article first published online, 28 Jan, 2013 (DOI: 10.1002/jat.2846).

Appendix 1 Spectrum of solar simulators used in the validation studies



Appendix 2 Quartz reaction container used in the validation studies



### Appendix 3 Amendment

Version 3.2

Page 10: The SA values of benzocaine and erythromycin were corrected in Table 1 because of errors in writing.

	Incorrect	Correct
Benzocaine	<u>7</u> to 17	<u>-7</u> to 17
Erythromycin	<u>9</u> to 21	<u>-9</u> to 21