

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
EMEA:	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 ⁺ :	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考えられる。

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エネルギー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、それに伴い産生された 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。

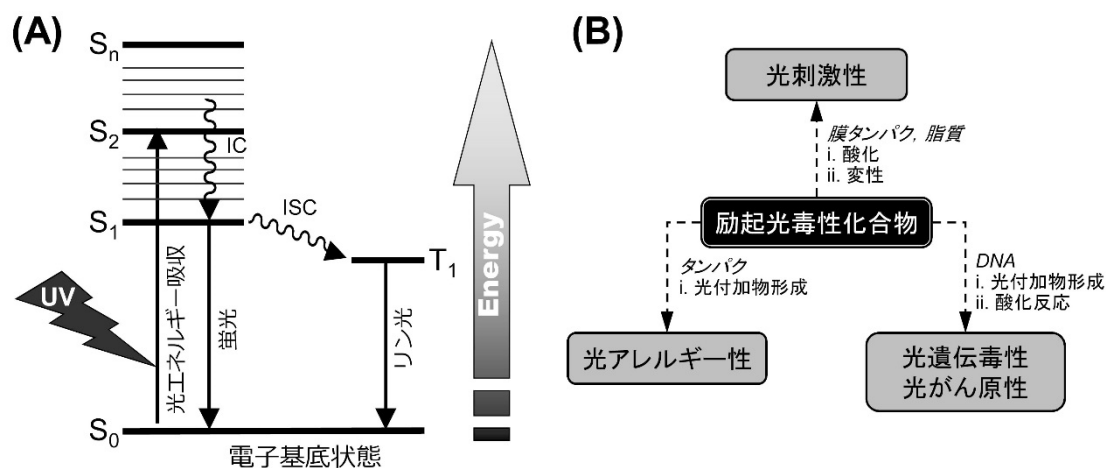


図 1 光毒性機序（仮説）。(A) 光による化学物質の励起と基底状態への遷移。(B) 励起化合物の標的となる生体内分子と光毒性反応。（尾上, 2011）

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。

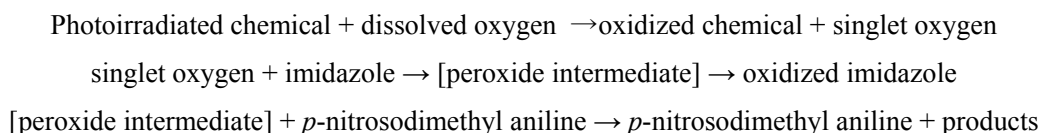
表 1 欧米の光安全性評価ガイドライン

	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	Photosafety 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"> 化学物質全般 バイオテクノロジー医薬品 	<ul style="list-style-type: none"> 全ての原薬および製剤成分 外用剤は製剤での実施を推奨 	<ul style="list-style-type: none"> UV/VIS 吸収を示す化学物質全般 	<ul style="list-style-type: none"> 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) 光線力学療法用製剤
UV/VIS 吸収特性	<ul style="list-style-type: none"> 290–700 nm モル吸光係数に関する記載なし 	<ul style="list-style-type: none"> 290–700 nm モル吸光係数に関する記載なし 	<ul style="list-style-type: none"> 290–700 nm モル吸光係数: 10 M⁻¹・cm⁻¹ 以上 	<ul style="list-style-type: none"> 290–700 nm モル吸光係数: 1000 M⁻¹・cm⁻¹ 以上 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)
投与経路と体内分布	<ul style="list-style-type: none"> 局所適用 皮膚・眼に到達 	<ul style="list-style-type: none"> 皮膚・眼に適用もしくは分布 皮膚・眼に影響を与えるもの 	適用外	<ul style="list-style-type: none"> 皮膚・眼に十分量分布
評価方法				
Photoirritation	<ul style="list-style-type: none"> 3T3 NRU phototoxicity test 	<ul style="list-style-type: none"> 3T3 NRU phototoxicity test マウス, モルモット, ブタ, ウサギを用いた <i>in vivo</i> 試験 	<ul style="list-style-type: none"> 3T3 NRU phototoxicity test 	<ul style="list-style-type: none"> 3T3 NRU phototoxicity test
Photoallergy	<ul style="list-style-type: none"> 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 	適用外	適用外	<ul style="list-style-type: none"> 経皮投与医薬品においても、非臨床光アレルギー性試験の結果のヒトへの予測性は不明としている
Photogenotoxicity	<ul style="list-style-type: none"> 光化学的染色体異常誘発性試験 <i>in vivo</i> コメット試験 トランスジェニック変異原性モデル 	<ul style="list-style-type: none"> 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 	適用外	適用外

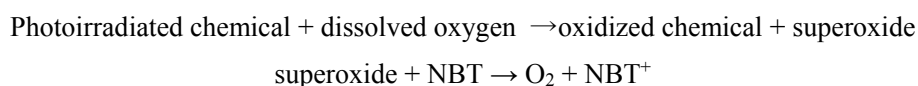
2 試験のプロトコルおよび判定基準

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⁺) 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

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (CAS#13472-35-0), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (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 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ と, 16.2 mmol (5.8 g) の $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 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^2 の照射強度であり, solar simulator のチャンバー内の温度は $20\text{--}29^\circ\text{C}$ 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.

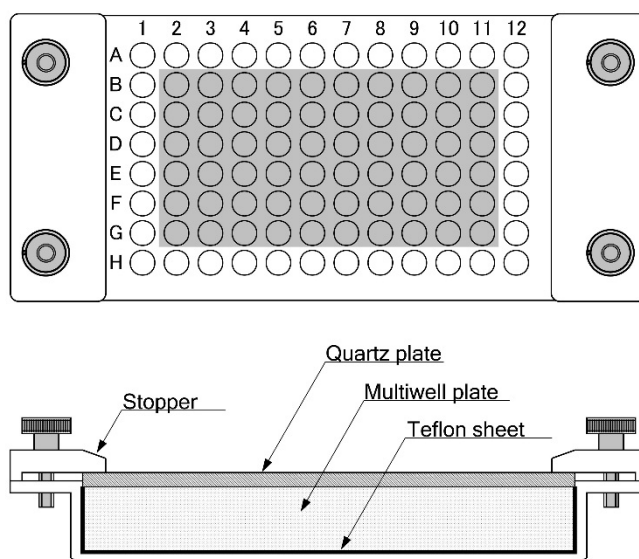


図 2 reaction container の構成

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 μ 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 μ 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 μM) と sulisobenzone (200 μM) 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 mW/cm^2 , SXL-2500V2 は 3.0-5.0 mW/cm^2). 露光後には被験物質や 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.

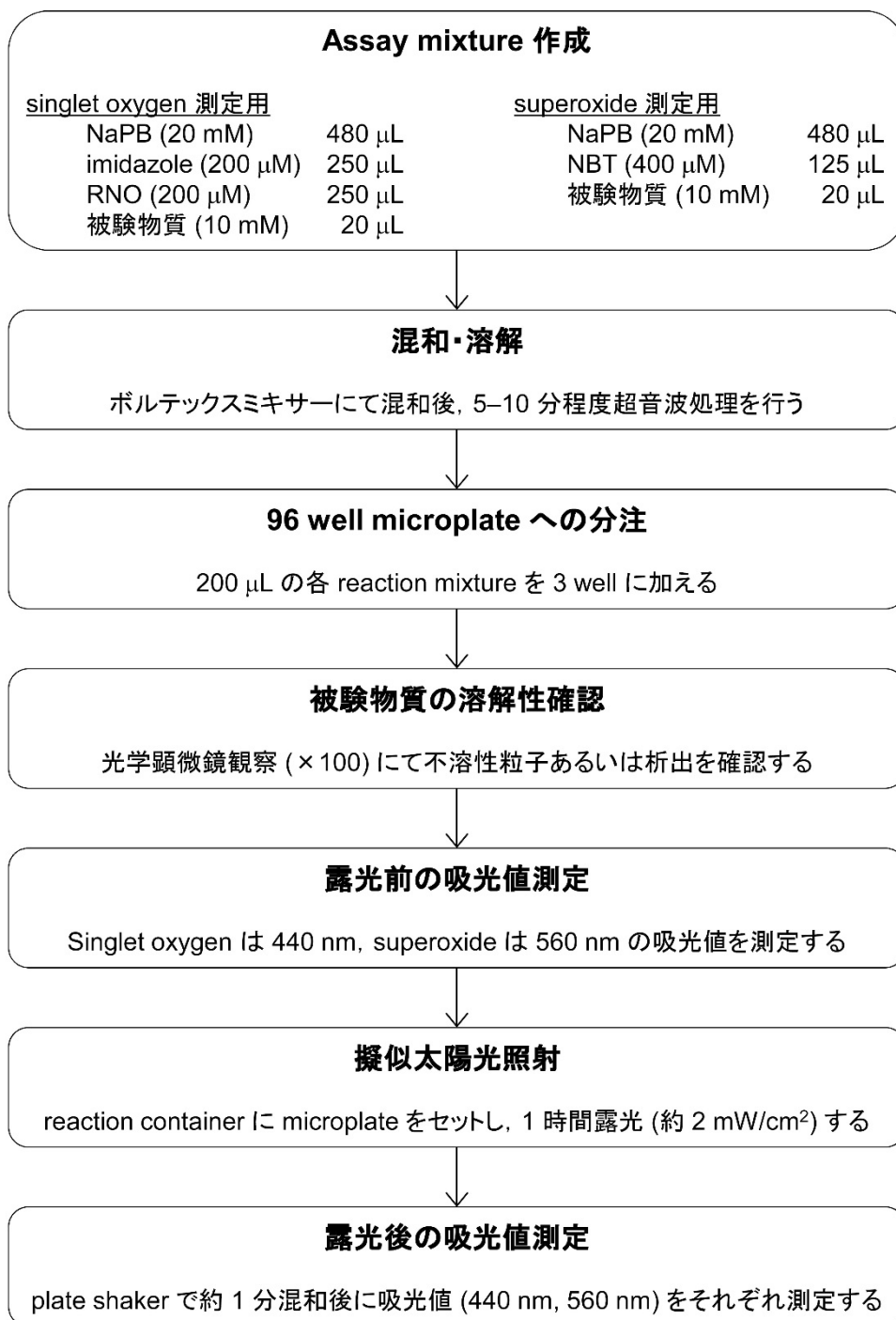


図 3 ROS アッセイのワークフロー

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

A440(-): 露光前の assay mixture の 440 nm における吸光値

A440(+): 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： $\Delta A_{560} \times 10^3 = \{A_{560}(+) - A_{560}(-) - (B - A)\} \times 10^3$

A560(-): 露光前の assay mixture の 560 nm における吸光値

A560(+): 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

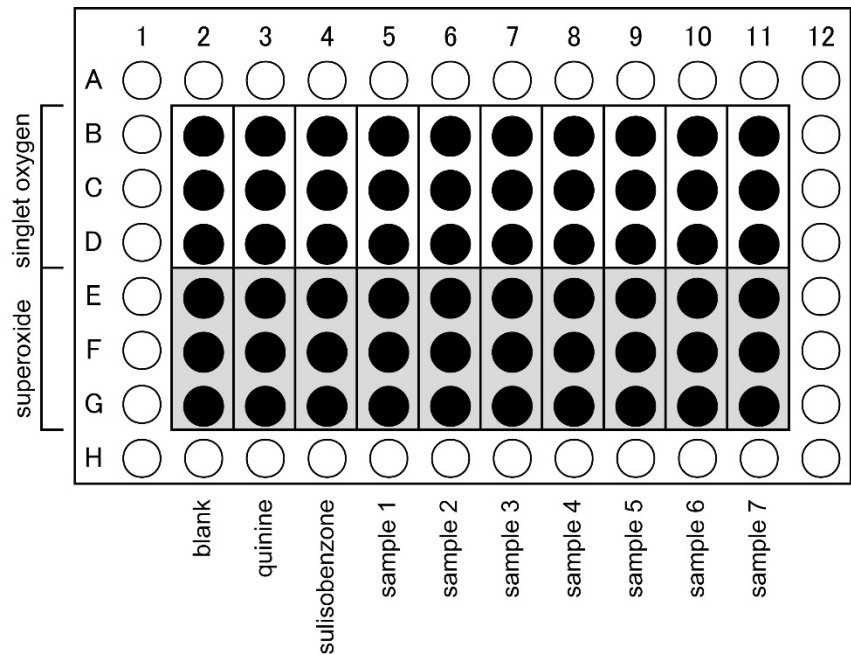


図 4 ROS アッセイにおけるサンプルレイアウト

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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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つたことから、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 物質であつた. 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	8-Methoxy psoralen Nalidixic acid Nalidixic acid (Na salt) Norfloxacin Ofloxacin Piroxicam Promethazine HCl Rosiglitazone Tetracycline	(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。

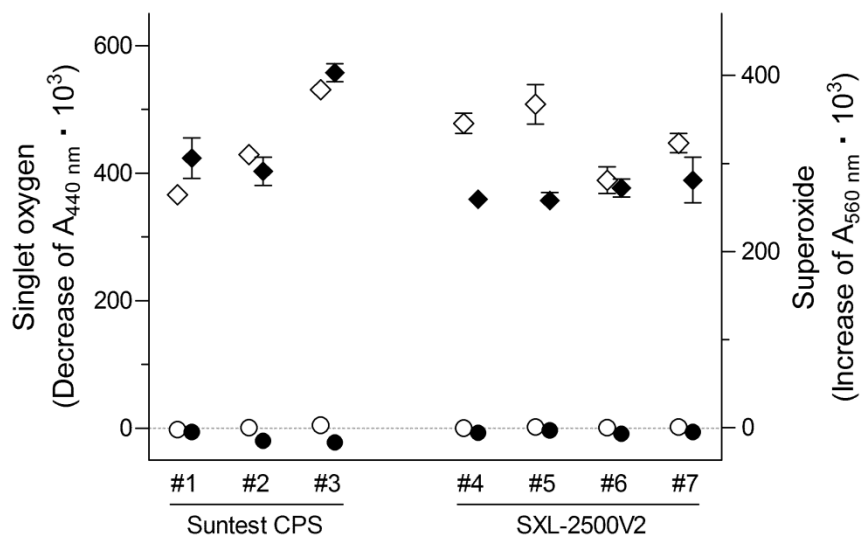


図 5 各試験施設における陽性対照物質、陰性対照物質の日内変動
 日内変動は各施設で最も多くの測定を実施した日の陽性および陰性対照物質の結果から算出した。Lab#1-3: Atlas Suntest CPS(約 2.0 mW/cm²), Lab#4-7: Seric SXL-2500V2 (3.0-5.0 mW/cm²)., ◇: quinine の singlet oxygen, ◆: quinine の superoxide; ○: sulisobenzone の singlet oxygen, ●: sulisobenzone の superoxide, データは mean±SD を示す(n=9).

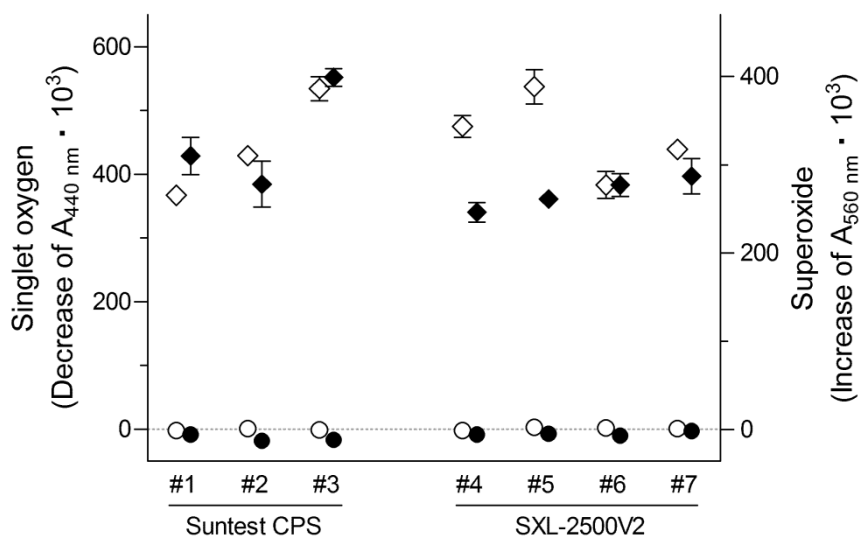


図 6 各試験施設における陽性対照物質、陰性対照物質の日間変動
 日間変動は各施設の測定日における最初の測定における陽性および陰性対照物質の結果から算出した。Lab#1-3: Atlas Suntest CPS(約 2.0 mW/cm²), Lab#4-7: Seric SXL-2500V2 (3.0-5.0 mW/cm²)., ◇: quinine の singlet oxygen, ◆: quinine の superoxide; ○: sulisobenzone の singlet oxygen, ●: sulisobenzone の superoxide, データは mean±SD を示す(days 1, 2, and 3; n=9).

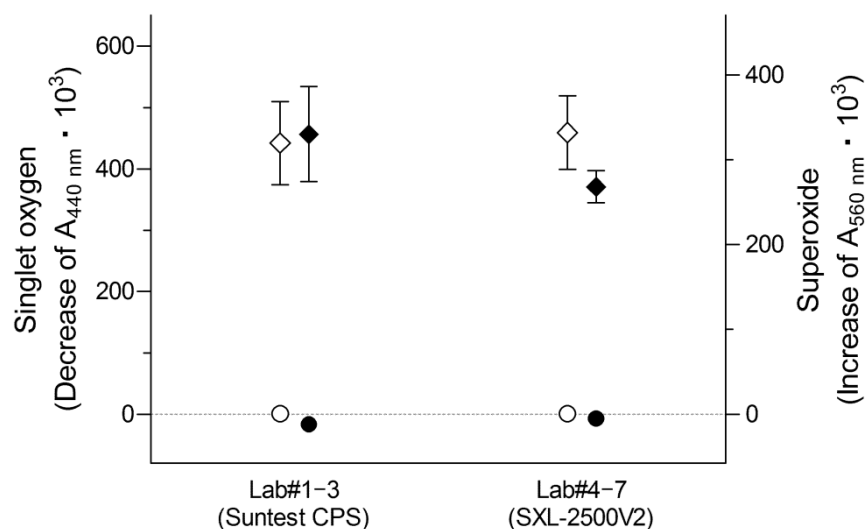


図 7 陽性対照物質，陰性対照物質の光源装置間の再現性
 日間変動は各施設の測定日における最初の測定における陽性および陰性対照物質の結果から算出した。Lab#1-3: Atlas Suntest CPS(約 2.0 mW/cm²), Lab#4-7: Seric SXL-2500V2 (3.0-5.0 mW/cm²)., ◇: quinine の singlet oxygen, ◆: quinine の superoxide; ○: sulisobenzene の singlet oxygen, ●: sulisobenzene の superoxide, データは mean±SD を示す(days 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/cm²), Lab#4-7: Seric SXL-2500V2 (3.0-5.0 mW/cm²)
 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 μ 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に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 μM 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， $\mu\text{g/mL}$ 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 μM となる 50 $\mu\text{g/mL}$ 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 $\mu\text{g/mL}$ 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 β -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 $\mu\text{g/mL}$)

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 $\mu\text{g/mL}$ 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 Trichlorocarbonyl	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 μM 濃度での陰性判定には問題ないが、20 μM 濃度での陰性判定には注意する必要がある。バリデーション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 μM で判定できない場合に 20 μM 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 μM 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 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…」と記載され、20 μM 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 μM で全物質が陽性を示し、20 μM 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 μM 濃度での ROS アッセイを実施した結果は 200 μM 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 μM に比べ、20 μM 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 μM での偽陰性結果を示した 8-MOP は 200 μM 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 μM 濃度の結果は 200 μM 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 μM 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 μM での試験結果のみを採用することとなった。今後、20 μM 濃度での試験結果の集積あるいは 200 μM 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の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, さらに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 antirheumatic 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 (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 (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 (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, Pfannenbecker 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, Pfannenbecker 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 (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	Sulisobenzene	Sulisobenzene was used as negative control according to the method of Onoue et al. [2008a]. Sulisobenzene 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. ^{a)}	UV/vis absorption ^{b)}		ROS assay	3T3 NRU	<i>in vivo</i>	
			MEC (L/mol/cm)	λ_{max} (nm)			Animal	Human
I-1	5-FU	51-21-8	1800 ^{c)}	290 ^{d)}	- ¹⁾	- ^{2,3)}	NA	+? ⁴⁾
I-2	8-MOP	298-81-7	3631	300	+ ¹⁾	+ ⁵⁾	+ ⁵⁾	+ ⁵⁾
I-3	Amiodarone HCl	19774-82-4	5400	290 ^{d)}	+ ³⁾	+ ⁵⁾	+ ⁵⁾	+ ⁵⁾
I-4	Chlorpromazine HCl	69-09-0	1746	304	+ ¹⁾	+ ⁵⁾	+ ⁵⁾	+ ⁵⁾
I-5	Diclofenac	15307-79-6	7800 ^{c)}	290 ^{d)}	+ ¹⁾	+ ³⁾	+ ⁶⁾	+ ⁷⁾
I-6	Doxycycline HCl	10592-13-9	3715	290 ^{d)}	+ ¹⁾	+ ⁵⁾	+ ⁵⁾	+ ⁵⁾
I-7	Furosemide	54-31-9	2650	290 ^{d)}	+ ¹⁾	+/- ^{3,8,9)}	NA	+ ⁸⁾
I-8	Ketoprofen	22071-15-4	2092	290 ^{d)}	+ ¹⁾	+ ⁸⁾	- ⁸⁾	+ ⁸⁾
I-9	Levofloxacin	100986-85-4	13000 ^{c)}	333	+ ¹⁰⁾	+ ¹⁰⁾	+ ¹¹⁾	+ ¹²⁾
I-10	Norfloxacin	70458-96-7	3562	323	+ ¹⁾	+ ³⁾	+ ⁸⁾	+ ⁸⁾
I-11	Omeprazole	73590-58-6	15000 ^{c)}	301	+ ¹⁾	+/- ³⁾	NA	+ ¹³⁾
I-12	Quinine HCl	6119-47-7	1938	330	+ ¹⁾	+ ³⁾	+ ⁶⁾	+ ¹⁴⁾
I-13	Sulisobenzone	4065-45-6	3519	290 ^{d)}	- ¹⁾	- ³⁾	NA	- ¹⁵⁾

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) λ_{max} (nm) was a wavelength at which the UV/vis absorbance shows a peak between 290 and 700 nm. λ_{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
Phototoxic drugs		
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.
Phototoxic non-drug chemicals		
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].
Non-phototoxic drugs		

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.
Non-phototoxic non-drug chemicals		
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.
Positive/Negative controls		
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	Sulisobenzene	Sulisobenzene was used as negative control according to the method of Onoue et al. [2008a]. Sulisobenzene 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. ^{a)}	UV/vis absorption ^{b)}		3T3 NRU	in vivo		Laboratory		
			MEC (L/mol/cm)	λ _{max} (nm)		Animal	Human	1	2	3
Phototoxic drugs										
II-1	Acridine	260-94-6	2773	354	+ ¹⁾	+ ¹⁾	+ ¹⁾	C-130	B-090	A-005
II-2	Acridine HCl	17784-47-3	2635	354	+ ¹⁾	+ ¹⁾	+ ¹⁾	C-126	B-086	A-001
II-3	Amiodarone HCl	19774-82-4	5400	290 ^{c)}	+ ²⁾	+ ²⁾	+ ²⁾	C-127	B-087	A-002
II-4	Chlorpromazine HCl	69-09-0	1746	304	+ ²⁾	+ ²⁾	+ ²⁾	C-106	B-066	A-026
II-5	Doxycycline HCl	10592-13-9	3715	290 ^{c)}	+ ²⁾	+ ²⁾	+ ²⁾	C-116	B-076	A-036
II-6	Fenofibrate	49562-28-9	3514	290 ^{c)}	+ ¹⁾	NA	+ ¹⁾	C-139	B-054	A-014
II-7	Furosemide	54-31-9	2650	290 ^{c)}	+/- ^{1,3,4)}	NA	+ ¹⁾	C-141	B-056	A-016
II-8	Ketoprofen	22071-15-4	2092	290 ^{c)}	+ ¹⁾	- ¹⁾	+ ¹⁾	C-128	B-088	A-003
II-9	6-Methylcoumarine	92-48-8	3219	290 ^{c)}	+ ¹⁾	+ ¹⁾	+ ¹⁾	C-113	B-073	A-033
II-10	8-MOP	298-81-7	3631	300	+ ²⁾	+ ²⁾	+ ²⁾	C-131	B-091	A-006
II-11	Nalidixic acid	389-08-2	3192	331	+ ¹⁾	+ ¹⁾	+ ¹⁾	C-137	B-052	A-012
II-12	Nalidixic acid (Na salt)	3374-05-8	3019	333	+ ¹⁾	+ ¹⁾	+ ¹⁾	C-134	B-094	A-009
II-13	Norfloxacin	70458-96-7	3562	323	+ ³⁾	+ ¹⁾	+ ¹⁾	C-110	B-070	A-030
II-14	Ofloxacin	82419-36-1	8443	290 ^{c)}	+ ¹⁾	+ ¹⁾	+ ¹⁾	C-112	B-072	A-032
II-15	Piroxicam	36322-90-4	3304	352	- ²⁾	- ²⁾	+ ²⁾	C-135	B-095	A-010
II-16	Promethazine HCl	58-33-3	1558	297	+ ²⁾	NA	+ ²⁾	C-101	B-061	A-021
II-17	Rosiglitazone	122320-73-4	1765	311	+ ^{d)}	NA	NA	C-117	B-077	A-037
II-18	Tetracycline	60-54-8	3842	290 ^{c)}	+ ²⁾	+ ²⁾	+ ²⁾	C-102	B-062	A-022
Phototoxic non-drug chemicals										
II-19	Anthracene	120-12-7	2315	355	+ ¹⁾	+ ¹⁾	+ ¹⁾	C-121	B-081	A-041
II-20	Avobenzone	70356-09-1	7686	354	+ ⁵⁾	- ⁶⁾	+ ⁷⁾	C-109	B-069	A-029
II-21	Bithionol	97-18-7	2462	321	+ ²⁾	+ ²⁾	+ ²⁾	C-115	B-075	A-035
II-22	Hexachlorophene	70-30-4	2431	300	- ¹⁾	- ¹⁾	+ ^{1,8)}	C-107	B-067	A-027
II-23	Rose bengal	632-69-9	19269	549	+ ¹⁾	- ¹⁾	+ ¹⁾	C-104	B-064	A-024
Non-phototoxic drugs										
II-24	Aspirin	50-78-2	80	290 ^{c)}	- ³⁾	NA	NA	C-140	B-055	A-015
II-25	Benzocaine	94-09-7	4273	290 ^{c)}	- ³⁾	NA	NA	C-114	B-074	A-034
II-26	Erythromycin	114-07-8	0	290 ^{c)}	- ³⁾	NA	NA	C-119	B-079	A-039
II-27	Penicillin G	113-98-4	0	290 ^{c)}	- ²⁾	NA	NA	C-118	B-078	A-038
II-28	Phenytoin	57-41-0	0	290 ^{c)}	- ³⁾	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. ^{a)}	UV/vis absorption ^{b)}		3T3 NRU	in vivo		Laboratory		
			MEC (L/mol/cm)	λ _{max} (nm)		Animal	Human	1	2	3
Non-phototoxic non-drug chemicals										
II-29	Bumetrizole	3896-11-5	3873	306	- ^{d)}	NA	NA	C-138	B-053	A-013
II-30	Camphor sulfonic acid	3144-16-9	0	290 ^{c)}	- ^{d)}	NA	NA	C-132	B-092	A-007
II-31	Chlorhexidine	55-56-1	1338	290 ^{c)}	- ¹⁾	NA	- ¹⁾	C-144	B-059	A-019
II-32	Cinnamic acid	140-10-3	3373	290 ^{c)}	- ^{d)}	NA	NA	C-123	B-083	A-043
II-33	Drometrizole	2440-22-4	3946	295	- ^{d)}	NA	NA	C-129	B-089	A-004
II-34	L-Histidine	71-00-1	0	290 ^{c)}	- ²⁾	NA	NA	C-111	B-071	A-031
II-35	Methylbenzylidene camphor	36861-47-9	9200	304	- ⁹⁾	- ⁹⁾	- ⁹⁾	C-136	B-051	A-011
II-36	Octrizole	3147-75-9	3958	296	- ^{d)}	NA	NA	C-133	B-093	A-008
II-37	Octyl methacrylate	688-84-6	0	290 ^{c)}	- ^{d)}	NA	NA	C-105	B-065	A-025
II-38	Octyl methoxycinnamate	5466-77-3	3000	290 ^{c)}	- ⁹⁾	- ⁹⁾	- ⁹⁾	C-142	B-057	A-017
II-39	Octyl salicylate	118-60-5	1500	290 ^{c)}	- ⁹⁾	- ⁹⁾	- ⁹⁾	C-120	B-080	A-040
II-40	PABA	150-13-0	2404	290 ^{c)}	- ²⁾	- ¹⁾	NA	C-124	B-084	A-044
II-41	SDS	151-21-3	0	290 ^{c)}	- ²⁾	NA	NA	C-125	B-085	A-045
II-42	UV-571	125304-04-3	1900	290 ^{c)}	- ^{d)}	NA	NA	C-122	B-082	A-042
Positive/Negative controls										
PC	Quinine HCl	6119-47-7	1938	330	+ ³⁾	+ ¹⁰⁾	+ ¹¹⁾	PC	PC	PC
NC	Sulisobenzone	4065-45-6	3519	290 ^{c)}	- ³⁾	NA	- ⁹⁾	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) λ_{\max} (nm) was a wavelength at which the UV/vis absorbance shows a peak between 290 and 700 nm. λ_{\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