

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。

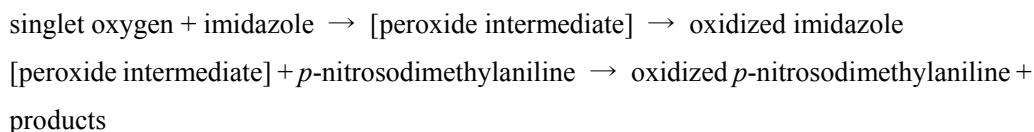
ROS アッセイは、JaCVAM 協力の下で多施設バリデーションが実施され¹⁾、OECD が定める国際的基準(2005年)²⁾に従って、専門家からなる独立した第三者評価委員会により、科学的な評価が行われた³⁾。JaCVAM 評価会議は、これをもとにして JaCVAM 光毒性資料編纂委員会により作成された ROS アッセイ評価報告書 (2015年7月8日)⁴⁾を用いて、本試験法の妥当性について検討した。

1. 試験法の定義

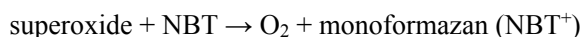
名称： Reactive oxygen species (ROS)アッセイ

代替する対象毒性試験： *In vivo* の光毒性試験⁵⁾および Neutral Red Uptake Phototoxicity Test (以下、3T3 NRU PT と略す)⁶⁾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)²⁾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⁷⁾。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⁸⁾。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⁹⁾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¹⁰⁻¹²⁾、指示薬を添加しない試験コントロール溶液の設定¹³⁾、 $\mu\text{g/mL}$ 単位で試験する方法¹⁴⁾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³⁾、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、陽性の場合には、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.