

# 報告書

Reactive Oxygen Species (ROS) アッセイを用いた

イオンブースター

の光毒性試験

[OECDテストガイドライン495準拠]

試験施設

株式会社きれいテストラボ

〒135-0047 東京都江東区富岡二丁目11番6号 長谷萬ビル3F

TEL 03-6695-0144

【無断転載禁止】



試験委託	株式会社アトラスプランニング
	〒160-0022 東京都新宿区新宿1-2-5第2飯塚ビル5F
	大竹 恵理子
試験番号	RA21070601
被検試料	イオンブースター pH12.5 (純水99.83%, 水酸化カリウム0.17%)
試験項目	Reactive Oxygen Species (ROS) アッセイを用いた光毒性試験
資料保存場所	株式会社きれいテストラボ
試験実施日	2021年7月8日
保存期間	試験終了後5年間

本試験は化学物質GLPに準拠して実施された。  
本報告書は日本薬局方原案作成要領に従い記載した。

本報告書をwebなどへ転載を希望する場合、必ず事前にきれいテストラボにご相談ください。

## 目次

略語 .....	4
要約 .....	5
試験目的 .....	5
試験概要 .....	5
参照試験方法 .....	5
材料と試験方法 .....	6
1. 被検試料の調製 .....	6
2. 陰性対照物質の調製 .....	6
3. 陽性対照物質の調製 .....	6
4. 試薬の調製 .....	6
5. 試験構成 .....	7
6. 試験操作 .....	7
7. ROS生成の計算 .....	8
8. 数値の取り扱い .....	9
9. 試験成立の条件 .....	9
10. 判定 .....	9
試験結果 .....	10
1. 試験成立 .....	10
2. 結果 .....	10
参考文献 .....	10
表 .....	11

(最終ページ:12ページ)

## 略語

a.u.: arbitrary unit

CAS: Chemical Abstracts Services

JaCVAM: Japanese Center for the Validation of Alternative Methods

A: Absorbance

OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development

ROS: Reactive Oxygen Species

SD: Standard Deviation

## 要約

Reactive Oxygen Species (ROS)アッセイを用いて、

被検試料「イオンブースター」(pH12.5)

の光毒性を評価した。一重項酸素(Singlet oxygen,  $^1\text{O}_2$ )およびスーパーオキシドアニオン(Superoxide anion,  $\cdot\text{O}_2^-$ )の各反応液に、紫外線を含む光を被検試料共存下で60分間照射し、照射後の $^1\text{O}_2$ および $\cdot\text{O}_2^-$ の生成量を算出した。

被検試料共存下での $^1\text{O}_2$ 生成量平均値  $\pm$  標準偏差は $1 \pm 3$ 、 $\cdot\text{O}_2^-$ 生成量平均値  $\pm$  標準偏差は $-3 \pm 1$ を示し、 $^1\text{O}_2$ 生成量が25未満、 $\cdot\text{O}_2^-$ 生成量が20未満であった。したがって、OECDテストガイドライン495等に沿った判定基準により、被検試料の光毒性は「陰性」と判定された。

## 試験目的

被検試料の光毒性作用を評価するため、ROSアッセイ試験を実施した。

## 試験概要

光毒性とは、日光を介して発症する化学物質誘発性の毒性反応である。光毒性を示す物質は、光刺激性・光アレルギー性・光遺伝毒性・光がん原性などを誘導する可能性がある。そのため日光にさらされる可能性のある化粧品などの製品には、光毒性を示す物質が配合されていない事が重要である。

化学物質の太陽光の吸収に伴う物質の励起によって生成される $^1\text{O}_2$ や $\cdot\text{O}_2^-$ などの活性酸素種(ROS)が、光毒性の主因である事が知られている<sup>1)</sup>。そこで本試験では、ソーラーシミュレーター照射下において発生する $^1\text{O}_2$ 、および $\cdot\text{O}_2^-$ の量を測定するROSアッセイ<sup>1-3)</sup>を用いて、被検試料の光毒性を評価した。

## 参照試験方法

ROSアッセイはJaCVAMのバリデーション<sup>1)</sup>を経て、in vivoにおける直接的な光毒性物質を予見する上で感度の高い方法として、2014年に薬食審査発0521第1号「医薬品の光安全性評価ガイドラインについて」<sup>4)</sup>で紹介された。さらにOECDテストガイドライン495<sup>3)</sup>として2019年に採択された。

本試験は、JaCVAMで公表されているROSアッセイ評価報告書(2015年7月8日)<sup>1)</sup>、Nishida (2015)<sup>2)</sup>、の論文およびOECDテストガイドライン495 [Guidelines for the Testing of Chemicals, Reactive Oxygen Species (ROS) Assay for Photoreactivity (Adopted 18 Jun 2019)]<sup>3)</sup>、Onoue (2008)<sup>5)</sup>を参考に実施した。

## 材料と試験方法

試薬および被検試料の秤量は、電子天秤 (GF-4000, A&D) または微量電子天秤 (ML104T/00, Mettler Toledo)を用いた。

試薬および被検試料は下記に従って保管した。

室温： 株式会社きれいテストラボ 試験センター 分析室薬品保管庫

### 1. 被検試料の調製

イオンブースター (液体, 透明) をジメチルスルホキシド (CAS No. 67-68-5, Lot. DLN2070, 室温, 和光純薬工業) によって 2.5 mg/mL (分子量未知の試料<sup>2)</sup>) に用時調製して試験に供した。

### 2. 陰性対照試料の調製

スリソベンゾン (CAS No. 4065-45-6, Lot. 0000008288, 室温, Sigma-Aldrich) をジメチルスルホキシドによって 10 mM に調製し、陰性対照として試験に供した。

### 3. 陽性対照試料の調製

キニーネ塩酸塩二水和物 (CAS No. 6119-47-7, Lot. CAN5766, 室温, 和光純薬工業) をジメチルスルホキシドにより 10 mM に調製し、陽性対照として試験に供した。

### 4. 試薬の調製

#### 1) 20 mM リン酸緩衝液

リン酸二水素ナトリウム二水和物 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , CAS No. 13472-35-0, Lot. WDQ2895, 室温, 和光純薬工業) 0.593 g とリン酸水素二ナトリウム・十二水和物 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , CAS No. 10039-32-4, Lot. CAG5515, 室温, 和光純薬工業) 5.8 g を 900 mL の精製水で溶解し、塩酸 (CAS No. 7647-01-0, Lot. 008H1011, 室温, 和光純薬工業) で pH 7.4 に調整後、精製水を加えて 1000 mL とし、混合した。

#### 2) 0.2 mM p-ニトロソジメチルアニリン

p-ニトロソジメチルアニリン (CAS No. 138-89-6, Lot. D2191501, 室温, Alfa Aesar) 15 mg を 500 mL の 20 mM リン酸緩衝液で溶解し、使用時まで遮光した。

#### 3) 0.2 mM イミダゾール

イミダゾール (CAS No. 288-32-4, Lot. SLBS6105, 室温, Sigma-Aldrich) 27.2 mg を 10 mL の 20 mM リン酸緩衝液で溶解し、20 mM リン酸緩衝液で 100 倍希釈し、使用時まで遮光した。

#### 4) 0.4 mM ニトロブルーテトラゾリウムクロリド

ニトロブルーテトラゾリウムクロリド (CAS No. 298-83-9, Lot. SE146, 室温, 同仁化学研究所) 32.7 mg を 100 mL の 20 mM リン酸緩衝液で溶解し、使用時まで遮光した。

## 5. 試験構成

処理群につき ${}^1\text{O}_2$ および $\cdot\text{O}_2^-$ 反応用にそれぞれ3ウェル使用し、 ${}^1\text{O}_2$ および $\cdot\text{O}_2^-$ の生成量は3ウェルの平均値を用いた。また、1試験につき陰性対照群、陽性対照群および操作対照群をそれぞれ1群設け、試験を実施した。試験に関わる操作は別途記載のない限り室温で行った。試験は2回実施し、判定には2試験の平均値を用いた。

## 6. 試験操作

### 1) 一重項酸素 ${}^1\text{O}_2$ 発生量の検出

表1に従い、20 mM リン酸緩衝液、0.2 mM イミダゾール、0.2 mM p-ニトロソジメチルアニリン、被検試料をジメチルスルホキシドによって2.5 mg/mLに調製した溶液、陰性対照(10 mM スリソベンゼン溶液)および陽性対照(10 mM キニーネ塩酸塩二水和物溶液)を調製し、 ${}^1\text{O}_2$ 測定用の反応液を作成した。操作対照には被検試料および対照物質と同量のジメチルスルホキシドを用いた。調製した ${}^1\text{O}_2$ 反応液を96ウェルプレートに各群200  $\mu\text{L}$ 、3ウェルずつ添加した。

表1  ${}^1\text{O}_2$ 反応液の組成

組成	添加量( $\mu\text{L}$ )
20 mM リン酸緩衝液	480
0.2 mM イミダゾール	250
0.2 mM p-ニトロソジメチルアニリン	250
2.5 mg/mLの被検試料/ジメチルスルホキシドまたは対照試料	20

### 2) スーパーオキシドアニオン $\cdot\text{O}_2^-$ 発生量の検出

表2に従い、20 mM リン酸緩衝液、0.4 mM ニトロブルーテトラゾリウムクロリド、被検試料をジメチルスルホキシドによって2.5 mg/mLに調製した溶液、陰性対照(10 mM スリソベンゼン溶液)および陽性対照(10 mM キニーネ塩酸塩二水和物溶液)を用いて $\cdot\text{O}_2^-$ 測定用の反応液を調製した。また、操作対照には被検試料および対照物質と同量のジメチルスルホキシドを用いた。調製した $\cdot\text{O}_2^-$ 反応液を96ウェルプレートに各群200  $\mu\text{L}$ 、3ウェルずつ添加した。

表2  $\cdot\text{O}_2^-$ 反応液の組成

組成	添加量( $\mu\text{L}$ )
20 mM リン酸緩衝液	855
0.4 mM ニトロブルーテトラゾリウムクロリド	125
2.5 mg/mLの被検試料/ジメチルスルホキシドまたは対照試料	20

- 3) 被検試料1-1, 操作対照(B), 陽性対照(P)および陰性対照(N)の添加は図1<sup>3)</sup>に従った. 各物質の添加後, 目視によって着色や色調の変化の確認, 顕微鏡によって反応液の溶解性を確認した. また,  $^1\text{O}_2$ と $\cdot\text{O}_2^-$ は同一プレート上で測定した.
- なお, 被検試料「イオンブースター」は図1の試験試料1に相当するウェルに添加した.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A					一重項酸素							
B		B	N	P	1	-	-	-	-	-	-	
C		B	N	P	1	-	-	-	-	-	-	
D		B	N	P	1	-	-	-	-	-	-	
E		B	N	P	1	-	-	-	-	-	-	
F		B	N	P	1	-	-	-	-	-	-	
G		B	N	P	1	-	-	-	-	-	-	
H					スーパーオキシドアニオン							

図1 96ウェルプレートへの添加位置

B: 操作対照, N: 陰性対照, P: 陽性対照, 1-1: 被検試料

- 4) 光照射前にマイクロプレートリーダー(SPARK® 10M, TECAN)を用いて440 nm ( $A_{440}$ )および560 nm ( $A_{560}$ )の吸光度を測定した.
- 5) Quartz reaction container(オザワ科学)に96ウェルマイクロプレートを装着し, ソーラーシミュレーター(Suntest CPS+, Atlas)を用いて60分間照射した. また, 96ウェルプレートへの照射前にあらかじめ15分以上照射し, ソーラーシミュレーターの照射光と温度を安定させた. ソーラーシミュレーターの温度は25℃に設定した.
- 6) 照射後に96ウェルプレートを270 rpmで1分間振り混ぜて, 反応液を十分に攪拌した後, 目視によって着色や色調の変化を確認, 顕微鏡によって反応液の溶解性を確認した.
- 7) マイクロプレートリーダーによって $A_{440}$ および $A_{560}$ を測定し, これらを生データとした.

## 7. ROS生成の計算

### 1) $^1\text{O}_2$ 生成量

被検試料, 陽性対照および陰性対照の $^1\text{O}_2$ 生成量(arbitrary unit; a.u.)を以下の式に従い算出した.

$$^1\text{O}_2\text{の生成量} = [A_{440}(-) - A_{440}(+) - (a - b)] \times 1000$$

$A_{440}(-)$  : 光照射前の440 nmでの吸光度

$A_{440}(+)$  : 光照射後の440 nmでの吸光度

a : 光照射前の440 nmでの操作対照の吸光度(平均)

b : 光照射後の440 nmでの操作対照の吸光度(平均)



## 2) $\cdot\text{O}_2^-$ 生成量

被検試料, 陽性対照および陰性対照の $\cdot\text{O}_2^-$ 生成量(a.u.)を以下の式に従い算出した.

$$\cdot\text{O}_2^- \text{の生成量} = [A_{560} (+) - A_{560} (-) - (b - a)] \times 1000$$

$A_{560} (-)$  : 光照射前の560 nmでの吸光度

$A_{560} (+)$  : 光照射後の560 nmでの吸光度

a : 光照射前の560 nmでの操作対照の吸光度(平均)

b : 光照射後の560 nmでの操作対照の吸光度(平均)

## 8. 数値の取り扱い

各数値は次のように取り扱った.

数値の表示桁は以下の通りとし, 表示された数値を用いて計算を行った. また, 数値は必要とされる桁より1桁下の桁で四捨五入した.

被検試料, 対照物質溶解の際の溶媒量 (mL): 小数点2桁

各ウェルから算出される $^1\text{O}_2$ および $\cdot\text{O}_2^-$ の計算値の平均および標準偏差: 整数

## 9. 試験成立の条件

1) 陰性対照が以下の数値であること(3ウェルの平均)

$$-9 < ^1\text{O}_2 < 11 \text{ および } -20 < \cdot\text{O}_2^- < 2$$

2) 陽性対照が以下の数値であること(3ウェルの平均)

$$319 < ^1\text{O}_2 < 583 \text{ および } 193 < \cdot\text{O}_2^- < 385$$

## 10. 判定

被検試料の光毒性はROS assay protocol (Version 3.2, 28 November 2014)<sup>9)</sup>の基準に沿って判定し, 表3に示した. 被検試料の $^1\text{O}_2$ が25未満,  $\cdot\text{O}_2^-$ が20未満の場合を, 陰性とした. また,  $^1\text{O}_2$ が25未満,  $\cdot\text{O}_2^-$ が20以上70未満の場合を, 弱陽性とした. さらに,  $^1\text{O}_2$ が25以上または $\cdot\text{O}_2^-$ が70以上の場合を陽性とした.

表3 判定基準

計算値 (3ウェルの平均)	判定
$< 25 (^1\text{O}_2)$ かつ $< 20 (\cdot\text{O}_2^-)$	陰性(-)
$< 25 (^1\text{O}_2)$ かつ $[\geq 20, < 70] (\cdot\text{O}_2^-)$	弱陽性(±)
$\geq 25 (^1\text{O}_2)$ または $\geq 70 (\cdot\text{O}_2^-)$	陽性(+)

## 試験結果

陰性対照，陽性対照および被検試料の測定値，ROS生成量の平均および標準偏差，被検試料の判定結果を表4～表7に記載した。

### 1. 試験成立

陰性対照，陽性対照および操作対照のROSアッセイの測定結果を表4，表5および表6に示した。

陰性対照の $^1\text{O}_2$ 生成量の平均値  $\pm$  標準偏差は $0 \pm 1$ ， $\cdot\text{O}_2^-$ 生成量の平均値  $\pm$  標準偏差は $-16 \pm 1$ を示し， $^1\text{O}_2$ 生成量が-9を超え、11を下回った。また， $\cdot\text{O}_2^-$ 生成量が-20を超え、2を下回った。

陽性対照の $^1\text{O}_2$ 生成量平均値  $\pm$  標準偏差は $383 \pm 9$ ， $\cdot\text{O}_2^-$ 生成量平均値  $\pm$  標準偏差は $214 \pm 1$ を示し， $^1\text{O}_2$ 生成量が319を超え、583を下回った。また， $\cdot\text{O}_2^-$ 生成量が193を超え、385を下回った。これらより，本試験はOECDテストガイドライン495等<sup>1-3)</sup>が規定する試験成立条件を満たした。

### 2. 結果

被検試料のROSアッセイの測定結果を表4，表5および表6に示した。また，被検試料の判定結果を表7に示した。

被検試料共存下での $^1\text{O}_2$ 生成量平均値  $\pm$  標準偏差は $1 \pm 3$ ， $\cdot\text{O}_2^-$ 生成平均値  $\pm$  標準偏差は $-3 \pm 1$ を示し， $^1\text{O}_2$ 生成量が25未満， $\cdot\text{O}_2^-$ 生成量が20未満であった。

したがって被検試料は，OECDテストガイドライン495等<sup>1-3)</sup>に沿った判定基準により，被検試料の光毒性は「陰性」と判定された。

## 参考文献

- 1) JaCVAM編「ROSアッセイ評価報告書(2015年7月8日)」
- 2) H. Nishida et al., Regul. Toxicol. Pharm., 72, 578-585, 2015.
- 3) OECD Test Guideline 495, 2019.
- 4) 薬食審査発0521第1号「医薬品の光安全性評価ガイドラインについて」平成26年5月21日
- 5) S. Onoue et al., J. Pharm. Biomed. Anal., 46, 1, 187-193, 2008.

表4  $A_{440}$ の生データおよび一重項酸素生成量

実験		$A_{440}$									$^1\text{O}_2$ 生成量 (a.u.)					
		光照射前			光照射後			a	b	a - b	1	2	3	平均	±	SD
		1	2	3	1	2	3									
1	操作対照	1.026	1.024	1.045	1.018	1.017	1.038	1.032	1.024	0.008	0	-1	-1	-1	±	1
	陰性対照	1.035	1.045	1.052	1.029	1.038	1.044	—	—	—	-2	-1	0	-1	±	1
	陽性対照	1.018	1.030	1.026	0.625	0.646	0.650	—	—	—	385	376	368	376	±	9
	被検試料	1.025	1.046	1.040	1.019	1.039	1.031	—	—	—	-2	-1	1	-1	±	2
2	操作対照	1.049	1.057	1.059	1.042	1.051	1.056	1.055	1.050	0.005	2	1	-2	0	±	2
	陰性対照	1.045	1.061	1.059	1.039	1.055	1.053	—	—	—	1	1	1	1	±	0
	陽性対照	1.029	1.051	1.046	0.627	0.654	0.663	—	—	—	397	392	378	389	±	10
	被検試料	1.040	1.055	1.054	1.034	1.046	1.046	—	—	—	1	4	3	3	±	2

a.u.: arbitrary unit, SD: 標準偏差(Standard Deviation), a: 光照射前の560nmでの操作対照の吸光度(平均), b: 光照射後の560nmでの操作対照の吸光度(平均)

表5  $A_{560}$ の生データおよびスーパーオキシドアニオン生成量

実験		$A_{560}$									$\cdot\text{O}_2^-$ 生成量 (a.u.)					
		光照射前			光照射後			a	b	b - a						SD
		1	2	3	1	2	3				1	2	3	平均	±	
1	操作対照	0.043	0.043	0.043	0.059	0.059	0.059	0.043	0.059	0.016	0	0	0	0	±	0
	陰性対照	0.044	0.044	0.044	0.045	0.045	0.045	—	—	—	-15	-15	-15	-15	±	0
	陽性対照	0.043	0.050	0.043	0.292	0.265	0.273	—	—	—	233	199	214	215	±	17
	被検試料	0.043	0.043	0.043	0.057	0.056	0.057	—	—	—	-2	-3	-2	-2	±	1
2	操作対照	0.043	0.043	0.043	0.061	0.061	0.060	0.043	0.061	0.018	0	0	-1	0	±	1
	陰性対照	0.043	0.044	0.044	0.045	0.045	0.046	—	—	—	-16	-17	-16	-16	±	1
	陽性対照	0.042	0.043	0.044	0.280	0.270	0.272	—	—	—	220	209	210	213	±	6
	被検試料	0.042	0.043	0.043	0.056	0.056	0.057	—	—	—	-4	-5	-4	-4	±	1

a.u.: arbitrary unit, SD: 標準偏差(Standard Deviation), a: 光照射前の560nmでの操作対照の吸光度(平均), b: 光照射後の560nmでの操作対照の吸光度(平均)

表6 一重項酸素, スーパーオキシドアニオン生成量の平均値および標準偏差

	$^1\text{O}_2$ 生成量 (a.u.)			$\cdot\text{O}_2^-$ 生成量 (a.u.)		
	平均	±	SD	平均	±	SD
操作対照	-1	±	1	0	±	0
陰性対照	0	±	1	-16	±	1
陽性対照	383	±	9	214	±	1
被検試料	1	±	3	-3	±	1

a.u.: arbitrary unit 、SD: 標準偏差(Standard Deviation)

表7 イオンブースターの光反応性判定

光反応性の判定	
被検試料	陰性