



第4項
健康への影響

試験ガイドライン No.442C *In Chemico* 皮膚感作性

AOP を対象とした試験：タンパク質と
の共有結合に基づくキーイベント

2024年6月25日

経済協力開発機構（OECD）の化学
物質の試験に関するガイドライン



OECD の化学物質の試験に関するガイドライン

AOP のキーイベント(タンパク質との共有結合)に基づいた *in chemico* 皮膚感作性試験

はじめに

キーイベント (タンパク質への共有結合) に基づいた試験ガイドライン

1. 皮膚感作性物質とは、国際連合「化学品の分類および表示に関する世界調和システム」(UN GHS) (1) により定義されている通り、皮膚との反復接触後にアレルギー反応を引き起こす物質のことをいう。皮膚感作性の原因となる主要な生物学的イベントに関しては、広く意見が一致している。皮膚感作性に伴う化学的および生物学的機序に関する最新の知識は、有害転帰経路 (AOP) (2) として要約されており、分子レベルのイニシャルイベントからその中間イベントを通じて有害作用、すなわち、アレルギー性接触皮膚炎に至るまでが含まれている。この AOP では、有機化学物質など、アミノ酸残基 (すなわち、システインまたはリジン) と反応する化学物質に焦点が絞られている。この場合、分子レベルのイニシャルイベント (すなわち、最初の主要なイベント) とは、皮膚内に存在するタンパク質の求核中心と求電子物質との共有結合のことである。この AOP における 2 つ目のキーイベントは角化細胞に起こり、炎症性反応や特異的細胞シグナル伝達経路による遺伝子発現の変化からなる。このようなものに、抗酸化剤／求電子物質応答配列 (antioxidant/electrophile response element: ARE) 依存性経路がある。3 つ目のキーイベントは樹状細胞の活性化であり、通常は特異的な細胞表面マーカー、ケモカイン、サイトカインの発現により評価される。4 つ目のキーイベントは T 細胞の増殖である。
2. 皮膚感作性の評価には、通常、実験動物が使用してきた。広く知られている Magnusson と Kligman のモルモットを用いるマキシマイゼーション法 (Guinea Pig Maximisation Test: GPMT) およびビューラー法 (Buehler Test: OECD TG 406) (11) は、皮膚感作性の誘導相と惹起相の双方を評価する。LLNA (OECD TG 429) (12)、ならびにその改変法で放射性同位元素を用いない LLNA: DA (OECD TG 442A) (13)、LLNA: BrdU-ELISA および BrdU-FCM (OECD TG 442B) (14) の 3 法などのマウス試験は、すべて誘導相のみを評価するものであり、動物福祉および皮膚感作性の誘導相を客観的に測定するという点でモルモット試験より優れていることから、これらの試験も受け入れられている。

© OECD, (2024)

本資料は、<http://www.oecd.org/termsandconditions/>で入手可能な条項および条件に従って自由に使用できる。

3. 化学物質に関する皮膚感作性の有害性を評価するため、皮膚感作性の AOP の最初の 3 つのキーイベントを対象とした発症機序に基づく *in chemico* および *in vitro* 試験法が採択された。今回の試験ガイドラインでは、タンパク質との共有結合の評価が行われ、最初のキーイベントが対象である。また、OECD TG 442D では、2 つ目のキーイベントである角化細胞の活性化の評価が行われ (15)、OECD TG 442E では、皮膚感作性の AOP の 3 つ目のキーイベントである樹状細胞の活性化 (16) が対象となっている。最後に、4 つ目のキーイベントは T 細胞の増殖であり、これは、マウス局所リンパ節試験 (Local Lymph Node Assay : LLNA) (12) において間接的に評価される。

キーイベントに基づく試験のガイドラインの試験方法の背景と概要

4. 本試験ガイドライン (Test Guideline : TG) では、皮膚感作性の AOP の最初のキーイベント、すなわち、タンパク質との共有結合について記載された機序を対象とした *in chemico* 試験(2)について記載する。現在、本試験ガイドラインに記載されている試験法は、以下の通りである：
- ペプチド結合性試験 (Direct Peptide Reactivity Assay : DPRA) (付録 I)
 - アミノ酸誘導体結合性試験 (Amino acid Derivative Reactivity Assay : ADRA) (付録 II)
 - 反応速度論的ペプチド結合性試験 (kinetic Direct Peptide Reactivity Assay : kDPRA) (付録 III)
5. 上記試験法は、*in chemico* でのタンパク質との共有結合に基づく試験法であり、科学的に妥当であると考えられる。DPRA については、欧州動物実験代替法評価センター (European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing : EURL ECVAM) 主導のバリデーション試験、およびそれに続く EURL ECVAM の科学諮問委員会 (Scientific Advisory Committee : ESAC) による独立したピアレビュー (第三者評価) による評価を受けている (3) (4) (5)。ADRA については、日本動物実験代替法評価センター (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods : JaCVAM) 主導のバリデーション試験 (6) (7) (8) (9) とその後の独立したピアレビューを受けている (10)。kDPRA については、企業主導のバリデーション試験とその後の独立したピアレビューを受けている (17)。
6. タンパク質の反応性と潜在的な皮膚感作性との相関は、十分に確立されている (18) (19) (20)。それでも、タンパク質の反応性は皮膚感作性の AOP のキーイベントの 1 つを表すにすぎないことから (2) (21)、この特異的なキーイベントに対して開発された試験法により得られた情報は、化学物質の皮膚感作性の有無について結論を出すための単独の試験法としては十分とはいえない。したがって、本試験ガイドラインに記載された試験法により得られたデータは、試験および評価に関する統合的アプローチ (Integrated Approaches to Testing and Assessment : IATA) の範囲内で用いた場合、皮膚感作性の AOP である別のキーイベントを対象とした *in vitro* 試験、ならびに *in silico* モデル化および類似化学物質からの類推などの非実験的手法によって得られた他の関連補足情報とともに提示されるものである(21)。確定方式 (Defined Approaches : DAs)、すなわち、利用する情報源一式と予測に用いる手順の両方に関して標準化された手法において、これらの方法を用いて得られたデータの使用例が公表されており(21)、皮膚感作性試験のための確定方式に関する OECD TG (497) において実施されている(22)。皮膚感作性試験の確定方式において、これらの方法から得られたデータを使用することを意図している場合、ボーダーラ

イン基準の適用やその他のデータ解釈手順については、試験ガイドライン 497 を参照すること (22)。ボーダーライン基準の適用に関する詳細は、付録 1 図 1 を参照のこと。

7. 本試験ガイドライン中の試験法は、手順、適用領域や限界に関して異なる可能性があるものの、いずれの試験法も、「データ相互受け入れ」の恩恵を受けつつ、タンパク質の反応性に関する各国の試験結果の要件に応じて用いることができる。確定方式(DAs)において、方法は自動的に互換性があるわけではない。OECD TG497 では、どの方法/方法の組み合わせを用いるべきかが規定されている。
8. 本試験ガイドラインの付録 I に記載した DPRA および付録 II に記載した ADRA は、皮膚感作性物質（区分 1）と非感作性物質とを識別するものである。規制の枠組みによっては、上記方法で得た陽性結果は、それだけで化学物質を UN GHS におけるカテゴリー 1 に分類できる場合がある。ただし、これらの試験法では、2 つのサブカテゴリーを導入した当局のため UN GHS (1) で定義されているように皮膚感作性物質をサブカテゴリー 1A および 1B (23) に、サブカテゴリー化することや、安全性評価判定のために皮膚感作性の強度を予測することはできない。
9. 対照的に、本試験ガイドラインの付録 III に記載した kDPRA は、UN GHS サブカテゴリー 1A の皮膚感作性物質を、サブカテゴリー 1A に分類されないもの（非サブカテゴリー 1A）、すなわちサブカテゴリー 1B または区分なし (1) と区別することが可能であるが、感作性物質（区分 1）と非感作性物質とを区別することはできない。特定の規制の枠組みによっては、kDPRA で得た陽性結果を単独で用いて、化学物質を UN GHS におけるサブカテゴリー 1A に分類できる場合がある。
10. 定義を補遺に示す。皮膚感作性について、DPRA および ADRA と同等または改良された *in vitro* 試験案の評価に関する「性能基準」が策定されている (24)。

参考文献

- (1) United Nations (UN) (2021), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2021. Available at: [\[https://unece.org/sites/default/files/2021-09/GHS_Rev9E_0.pdf\]](https://unece.org/sites/default/files/2021-09/GHS_Rev9E_0.pdf)
- (2) OECD (2012), The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence, Series on Testing and Assessment No. 168, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
- (3) GF Gerberick, Vassallo JD, Bailey RE, Chaney JG, Morrall SW, Lepoittevin JP (2004), Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicol Sci.* 81, 332-343.

- (4) GF Gerberick, Vassallo JD, Foertsch LM, Price BB, Chaney JG, Lepoittevin JP (2007), Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: a classification tree model approach. *Toxicol Sci.* 97, 417-427.
- (5) EC EURL-ECVAM (2013), Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for the skin sensitisation testing Available at: https://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra.
- (6) M Fujita, Yamamoto Y, Tahara H, Kasahara T, Jimbo Y, Hioki T (2014), Development of a prediction method for skin sensitisation using novel cysteine and lysine derivatives. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 70, 94-105.
- (7) Y Yamamoto, Tahara H, Usami R, Kasahara T, Jimbo Y, Hioki T, Fujita M. (2015) A novel *in chemico* method to detect skin sensitizers in highly diluted reaction conditions. *J Appl Toxicol.* 35, 1348-1360.
- (8) M Fujita, Yamamoto Y, Watanabe S, Sugawara T, Wakabayashi K, Tahara K, Horie N, Fujimoto K, Kusakari K, Kurokawa Y, Kawakami T, Kojima K, Kojima H, Ono A, Katsuoka Y, Tanabe H, Yokoyama H and Kasahara T (2019), Cause of and Countermeasures for Oxidation of the Cysteine-Derived Reagent Used in the Amino acid Derivative Reactivity Assay, *J. Appl. Toxicology*, Feb;39(2):191-208 (doi: 10.1002/jat.3707).
- (9) OECD (2019), Validation study report: Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA), Series on testing and Assessment n° 304. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (10) OECD (2019), Report of the Peer Review Panel on the Validation of the Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA), Series on testing and Assessment n° 305. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (11) OECD (2021), Test No. 406: Skin Sensitisation, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264070660-en>.
- (12) OECD (2010), Test No. 429: Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264071100-en>.
- (13) OECD (2010), Test No. 442A: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: DA, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264090972-en>.
- (14) OECD (2018), Test No. 442B: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA or -FCM, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264090996-en>.
- (15) OECD (2018), Test No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264229822-en>.
- (16) OECD (2018), Test No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation: In Vitro Skin Sensitisation assays addressing

the Key Event on activation of dendritic cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264264359-en>.

- (17) Wareing, B., Kolle, S.N., Birk, B., Alépée, N., Haupt, T., Kathawala, R., Kern, P., Nardelli, L., Raabe, H., Rucki, M., Ryan, C., Verkaart, S., Westerink, W., Landsiedel, R., Natsch, A. (2020), 'The kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (kDPRA): Intra- and inter-laboratory reproducibility in a seven-laboratory ring trial', ALTEX, preprint, DOI: 10.14573/altex.2004291.
- (18) Landsteiner and Jacobs (1936), Studies on the sensitisation of animals with simple chemical compounds. *Journal of Experimental Medicine* 64:625-639.
- (19) Dupuis and Benezra (1982), Allergic contact dermatitis to simple chemicals: a molecular approach. New York & Basel: Marcel Dekker Inc.
- (20) JP Lepoittevin, Basketter DA, Goossens A, Karlberg AT (1998), Allergic contact dermatitis: the molecular basis, Springer, Berlin (doi: 10.1007/978-3-642-80331-4).
- (21) OECD (2016), Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. [ENV/JM/MONO\(2016\)29](#), Series on Testing & Assessment No. 256, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [\[Series on Testing and Assessment: publications by number - OECD\]](#).
- (22) OECD (2021), Guideline No. 497: Defined Approaches on Skin Sensitisation, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/b92879a4-en>.
- (23) B Wareing, Urbisch D, Kolle SN, Honarvar N, Sauer UG, Mehling A, Landsiedel R(2017) Prediction of skin sensitization potency sub-categories using peptide reactivity data, *Toxicol In Vitro* Dec;45(Pt 1):134-145 (doi: 10.1016/j.tiv.2017.08.015).
- (24) OECD (2022), Updated Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified in vitro skin sensitisation DPRA and ADRA test methods, Series on Testing & Assessment No. 303, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

補遺:用語の定義

精確さ：試験法による結果と、一般的に認められた参照値との一致の程度。試験法の性能の尺度であり、妥当性の一側面である。この用語は、多くの場合、試験法の精確な結果の割合を意味する一致率と同義的に用いられる(1)。精確さの算出に用いる式を、予測能の「計算」に示す。

ADRA：アミノ酸誘導体結合性試験 (Amino acid Derivative Reactivity Assay) の略。

AOP (有害転帰経路)：分子レベルのイニシャルイベントから検討対象の *in vivo* 転帰まで、標的化学物質または一群の類似化学物質の化学構造から生じる一連の事象(2)。

バランス精確さ：感度と特異度の平均。この指標は、*in vivo* 陽性化学物質と *in vivo* 陰性化学物質の数が異なる場合に特に有用である。試験法の妥当性を評価する上でこれを考慮することが重要である。バランス精確さの算出に用いる式を、予測能の「計算」に示す。

計算

予測能の計算

真陽性 (TP)、真陰性 (TN)、偽陰性 (FN)、および偽陽性 (FP) に基づき、以下のように感度、特異度、精確さおよびバランス精確さを算出する：

$$\text{感度} = \frac{\text{真陽性数 (TP)}}{\text{陽性物質の総数 (TP + FN)}} \times 100$$

$$\text{特異度} = \frac{\text{真陰性数 (TN)}}{\text{陰性物質の総数 (TN + FP)}} \times 100$$

$$\text{精確さ} = \frac{\text{正確な予測数 (TP + TN)}}{\text{全化学物質数 (TP + FN + TN + FP)}} \times 100$$

$$\text{バランス精確さ} = \frac{\text{感度} + \text{特異度}}{2}$$

検量線：既知物質の実験における反応値と解析濃度（標準曲線とも呼ばれる）との関係を表したもの。

変動係数：一群の反復データについて、その標準偏差を平均値で割ることにより算出されるばらつきの尺度。100 を乗じて百分率として表すことができる。

確定方式 (Defined Approach : DA)：予測するための規定の情報源一式から得られたデータ (*in silico* 予測、*in chemico*、*in vitro* データなど) に用いる、確立されたデータ解釈手順（統計モデル、数学的モデルなど）で構成される。

DPRA：ペプチド結合性試験 (Direct Peptide Reactivity Assay) の略。

EDTA：エチレンジアミン四酢酸 (Ethylenediaminetetraacetic acid) の略。

EURL ECVAM：歐州動物実験代替法評価センター（European Union Laboratory for Alternatives to Animal Testing）の略。

有害性：生物、系統、または（亜）集団がある物質に曝露された場合、悪影響を引き起こす可能性がある物質固有の性質または状態のこと。

IATA（試験および評価に関する統合的アプローチ）：ある化学物質または一群の化学物質の有害性の特定（可能性）、有害性の特徴付け（効力）、および／または安全性評価（可能性／効力および曝露）に用いられる体系的アプローチ。本アプローチでは、関連性があるデータをすべて戦略的に統合し重み付けを行うことにより、有害性の可能性、リスクや、さらに目的を絞った最小限の試験の必要性について、規制上の意思決定情報を与える。

JaCVAM：日本動物実験代替法評価センター（Japanese Center for the Validation of Alternative Methods）の略。

kDPRA：反応速度論的ペプチド結合性試験（kinetic Direct Peptide Reactivity Assay）の略。

k_{max} ：kDPRAで検討物質の反応速度から求められる最大速度定数（ $s^{-1}M^{-1}$ ）（付録IIIの段落24を参照）。

LLNA：2010年にOECD TG 429として公布されたマウス局所リンパ節試験。

分子レベルのイニシャルイベント：化学物質により誘導される生物系の混乱のことであり、分子レベルでの有害転帰経路における開始イベントと同定されるもの。

混合物：化学反応を生じない2つ以上の物質からなる固体または液体(3)。

単一成分物質：定量的組成に、1つの主要成分が全体の80%（w/w）以上存在することにより定義される物質。

多成分物質：定量的組成に、2つ以上の主要成分が濃度10%（w/w）以上および80%（w/w）未満で存在することにより定義される物質。多成分物質は、製造工程に起因して生じる。混合物と多成分物質との違いは、混合物が、化学反応を生じない2つ以上の物質からなるのに対し、多成分物質は、実際に化学反応を生じる2つ以上の物質からなることである。

NAC：N-(2-(1-ナフチル)アセチル)-L-システイン（N-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-cysteine）の略(4)(5)(6)。

NAL：α-N-(2-(1-ナフチル)アセチル)-L-リジン（α-N-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-lysine）の略(4)(5)(6)。

陽性対照：試験系のすべての構成成分を含み、陽性反応を誘導することが知られている物質を用いて実施する試験部分。陽性対照反応の経時的変化を評価できるよう、陽性反応の大きさが過剰であってはならない。

プレハプテン：非生物変換を通じて皮膚感作性物質となる化学物質。

プロハプテン：皮膚感作性を生じるために、酵素による活性化を要する化学物質。

基準対照：処理対象の被験物質およびその他の対照試料と処理される溶媒または媒体など、試験系のすべての構成成分を含む未処理試料のことで、同じ溶媒または媒体に溶解する被験物質と処理される試料について、ベースラインの反応を確立するために用いられる。同時陰性対照を用いた試験の場合、本試料は、溶媒または媒体と試験系との相互作用の有無も示す。

妥当性：試験と検討対象の影響との関係と、試験が特定の目的にとって意義や有用性があるかを示す用語。試験が試験対象となる生物学的影響を正確に測定または予測できる程度を示す。妥当性は、試験法の精確さ（一致度）も考慮する(1)。

信頼性：同じプロトコルを用いて試験法を実施したときに得られる経時的な施設内および施設間再現性的程度を表す尺度。施設内再現性および施設間再現性ならびに施設内反復性の算出により評価される(1)。

再現性：同じ試験手順を用いて同じ物質について試験を実施した場合に得られた結果が一致していること（「信頼度」参照）。(1)

感度：試験方法によって正確に分類されるすべての陽性の化学物質または活性のある化学物質の割合。分類的な結果をもたらす試験法の精確さを示す尺度であり、試験法の妥当性を評価する上で考慮すべき重要事項である(1)。感度の算出に用いる式を、予測能の「計算」に示す。

特異度：試験方法によって正確に分類されるすべての陰性の化学物質または不活性な化学物質の割合。分類的な結果をもたらす試験法の精確さを示す尺度であり、試験法の妥当性を評価する上で考慮すべき重要事項である(1)。特異度の算出に用いる式を、予測能の「計算」に示す。

物質：自然の状態または製造工程で得られる化学元素とその化合物。その製品の安定性を保つために必要な添加物や、製造過程由来の不純物はすべて含まれるが、その物質の安定性に影響を及ぼすことも、その組成を変化させることもなく分離される可能性のある溶媒は除く(3)。

システムの適合性：解析用の処理を実行する前に、標準試料の解析により機器の性能（感度など）を判定すること(7)。

被験物質：被験物質という用語は、試験の対象となる物質を指す場合に用いられる。

TFA：トリフルオロ酢酸 (trifluoroacetic acid) の略。

国際連合の化学品の分類および表示に関する世界調和システム (UN GHS)：人々（雇用主、労働者、輸送担当者、消費者、緊急時対応者など）および環境を守るために、有害作用に関する情報を伝達することを目的として、物理学上、健康上および環境上の有害性の種類およびレベルの基準に従って化学品（物質および混合物）の分類法を提案するとともに、ピクトグラム・注意喚起語・有害性情報・注意書き・化学物質安全性データシートなどの対応する伝達要素を取り扱うシステムである(3)。

UVCB：組成が不明または変化する物質、複雑な反応生成物または生体物質。

妥当な試験法：特定の目的に対し十分な妥当性および信頼性があるとみなされ、科学的に有効な原則に基づいている試験法。ある試験法が絶対的な意味で妥当というのではなく、規定した目的に関して妥当であるにとどまる(1)。

定義の参考文献

- (1) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment, No. 34. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- (2) OECD (2012), The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168, OECD, Paris.
- (3) United Nations (UN) (2021), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2021. Available at: https://unece.org/sites/default/files/2021-09/GHS_Rev9E_0.pdf
- (4) M Fujita, Yamamoto Y, Tahara H, Kasahara T, Jimbo Y and Hioki T (2014), Development of a prediction method for skin sensitisation using novel cysteine and lysine derivatives, Journal of pharmacological and toxicological methods, 70:94-105.
- (5) Y Yamamoto, Tahara H, Usami R, Kasahara T, Jimbo Y, Hioki T and Fujita M (2015), A novel *in chemico* method to detect skin sensitizers in highly diluted reaction conditions, Journal of Applied Toxicology, 35(11):1348-60, (doi: 10.1002/jat.3139).
- (6) M Fujita, Yamamoto Y, Watanabe S, Sugawara T, Wakabayashi K, Tahara K, Horie N, Fujimoto K, Kusakari K, Kurokawa Y, Kawakami T, Kojima K, Kojima H, Ono A, Katsuoka Y, Tanabe H, Yokoyama H and Kasahara T (2019), Cause of and Countermeasures for Oxidation of the Cysteine-Derived Reagent Used in the Amino acid Derivative Reactivity Assay, J. Appl. Toxicology, Feb;39(2):191-208 (doi: 10.1002/jat.3707).
- (7) FDA (Food and Drug Administration) (2018), Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation 41 pp. Accessible at: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>

付録 I: *In Chemico* 皮膚感作性：ペプチド結合性試験 (DPRA)

最初に考慮すべき事項、適用および限界

1. DPRA では、リジンかシステインのいずれかを含有するモデル合成ペプチドに対する被験物質の反応性を定量することにより、皮膚感作性の AOP である分子レベルのイニシャルイベント、すなわち、タンパク質の反応性を評価する (1)。次に、システインおよびリジン含有ペプチドの減少率を用いて、4 つの反応性クラスの 1 つに物質を分類し、皮膚感作性物質と非感作性物質とを識別する (2)。
2. DPRA 試験法は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析の経験がある施設であれば技術移管が可能であることが立証されている。本試験法の予測の再現性は、同一施設内で約 85%、複数施設間で約 80% である (3)。バリデーション試験 (4) および既報の試験 (5) から得られた結果を総合すると、皮膚感作性物質 (すなわち、UN GHS カテゴリー1) と非感作性物質との識別について LLNA の結果と比較した場合、DPRA の精確さは 80% (N = 157)、感度は 80% (88/109)、特異度は 77% (37/48) であった。DPRA では、皮膚感作性の強度が低い (low) ~中程度 (moderate) の化学物質 (すなわち、UN GHS サブカテゴリー1B) は、皮膚感作性の強度が高い (high) 化学物質 (すなわち、UN GHS サブカテゴリー1A) に比べて予測能が低い (4) (5)。しかし、本試験法は、IATA または DA に照らし、「概要」の段落 6 および段落 8 の条項に従って、他の情報と組み合わせて検討されるべきであることから、DPRA 単独の試験法としてここに示された精確さの値は指標にすぎない。さらに、動物を用いない皮膚感作性試験法を評価する場合、LLNA を始めとする動物試験結果が、検討対象の種 (すなわち、ヒト) における皮膚感作性を完全に反映しているとはいえないことに留意すべきである。入手可能な全データにより、DPRA は各種有機官能基を含む被験物質の評価および反応メカニズム、(in vivo 試験により判定される) 皮膚感作性の強度、物理化学的性質の検討に適用できることが示されている (1) (2) (3) (5)。総合すると、これらの情報は、皮膚感作性の有害性の同定に、DPRA が有用であることを示している。

3. 本試験ガイドラインにおける「被験物質」という用語は、試験の対象となる物質のことであり¹、物質および／または混合物の試験に対する DPRA の適用可能性とは無関係である（この付録の補遺 1 における DPRA の既知の限界の要約を参照）。金属化合物の場合、共有結合以外の機序によりタンパク質と反応することが知られているため、本試験法は適用外となる。被験物質は、最終濃度 100 mM において適切な溶媒に可溶であること（段落 10 および段落 11 参照）。ただし、本濃度において不溶の被験物質は、可溶化できる低濃度において試験が可能である。このような場合、陽性結果を用いて被験物質が皮膚感作性物質であると判断することができるが、陰性結果からは、反応性を欠くとの確定判断をすべきではない。既知組成の混合物に対する DPRA の適用可能性について、現在入手可能な情報は限られている（4）（5）。それでも、DPRA は、既知組成の多成分物質および混合物の試験には技術的に適用可能であると考えられる（段落 4 および段落 11 参照）。混合物、試験の実施が困難である化学物質（不安定な物質など）、またはこの試験ガイドラインの付録に記載されている適用領域の範囲内にあることが明確ではない化学物質の試験にあたっては、実施する試験から科学的に意義のある結果が得られるか否かを前もって検討すること。特定の区分に属す化学物質に本試験法が適用できない証拠が示され得る場合、本試験法は、そのような区分に属す化学物質に用いるべきではない。

4. この試験ガイドラインの付録に記載されている試験法は、代謝系を包含しない *in chemico* 試験法である。皮膚感作性を生じるのに酵素による生体内活性化を要する化学物質（すなわち、プロハプテン）は、本試験法では検出できない。非生物変換によって感作性物質となる化学物質（すなわち、プレハプテン）の報告例については、そのほとんどが本試験法により正しく検出されている（4）（9）（10）。上記を踏まえ、本試験法により得られた陰性結果は、IATA または DA の枠組みの範囲内で、規定された限界に照らし、また他の情報源との関連において解釈すべきである。試験用ペプチドと共有結合せず、その酸化（すなわち、システインの二量体化）を促進する被験物質の場合、ペプチドの減少を過大評価する可能性があり、偽陽性の判定や、より高い反応性の分類に割り当てる可能性があると考えられる（段落 23 および段落 24 参照）。

5. 上記の通り、DPRA は皮膚感作性物質と非感作性物質を識別できる。一方、DPRA は、IATA または DA などの統合的アプローチの中で用いられる場合（12）、感作性の強度の評価に役立つ場合がある（6）（11）。ただし、DPRA の結果が感作性の強度評価にどれほどの情報を与えるかを判断するには、望ましくはヒトデータに基づいた検討がさらに必要である。

試験の概要

¹ 2013 年 6 月の合同会議において、可能な場合、新規および改訂版の試験ガイドラインでは、試験の対象となる物質を表現する「被験物質」という用語について、より一貫した使用を行うべきであることが合意された。

6. DPRA は、システインまたはリジン含有ペプチドを用い、被験物質と 22.5~30°C で 24 時間インキュベーション後、残存ペプチド濃度を定量する *in chemico* 試験法である。これらの合成ペプチドは、検出に役立つフェニルアラニンを含有する。ペプチドの相対濃度は、勾配溶出法を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と 220 nm での UV 検出によって測定する。次に、システインおよびリジン含有ペプチドの減少率の値を算出し、予測モデル（段落 23 参照）にあてはめて、皮膚感作性物質と非感作性物質とを識別するのに用いる 4 段階の反応性の 1 つに被験物質を割り当てる。

7. この付録に記載された試験法を日常的に用いるのに先立ち、実施施設は、補遺 2 収載の習熟度評価用の 10 物質を用いて技術的習熟度を立証する。

手順

8. 本試験法は、EURL ECVAM 主導で行われたバリデーション試験に用いたプロトコルである DPRA に関する EURL ECVAM 動物実験代替法データベースサービス (DB-ALM) プロトコル No.154 (7) に基づいている。実施施設において本試験法を導入し使用する場合、本プロトコルを用いることが推奨される。DPRA の主要な構成要素および手順について以下に記す。異なる HPLC 設定を用いる場合、その設定が DB-ALM プロトコル記載の検証済みの設定と同等であることを（例えば、補遺 2 の習熟度評価用の物質の試験により）示すこと。

システインまたはリジン含有ペプチドの調製

9. システイン (Ac-RFAACAA-COOH) およびリジン (Ac-RFAAKAA-COOH) 含有合成ペプチドの原液（純度 85%超、望ましくは 90%超）を、被験物質とのインキュベーションの直前に新たに調製する。システイン含有ペプチドの最終濃度は、pH 7.5 のリン酸緩衝液を用いて 0.667 mM とし、一方、リジン含有ペプチドの最終濃度は、pH 10.2 の酢酸アンモニウム緩衝液を用いて 0.667 mM とする。HPLC の分析シーケンスは、HPLC 解析時間が 30 時間未満となるよう設定する。バリデーション試験に用いられ、本試験法に記載されている HPLC の設定の場合、最大で 26 試料（被験物質、陽性対照、試験に用いるそれぞれの溶媒数に基づいた適切な数の溶媒対照を対象とし、それぞれ 3 回反復測定）の解析が 1 回の HPLC の試験で可能になる。1 回の試験時の反復測定にはいずれも、システインおよびリジン含有ペプチドの同じ原液を用いる。使用に先立ち、それぞれのペプチド溶液が適切に溶解していることを確認する。

被験物質の調製

10. DPRA DB-ALM プロトコル記載の可溶化手順に従い、DPRA の実施前に、適切な溶媒に

おける被験物質の溶解性を評価する (7)。適切な溶媒で、被験物質を完全に溶解させる。DPRA では、過剰量の被験物質を、システインあるいはリジン含有ペプチドのいずれかとインキュベートすることから、清澄な溶液であることが目視で確認されれば、被験物質（および多成分物質または混合物の試験の場合、その構成成分のすべて）が溶解しているとみなされる。適切な溶媒には、アセトニトリル、水、水とアセトニトリルの 1:1 混合液、イソプロパノール、アセトン、またはアセトンとアセトニトリルの 1:1 混合液がある。それ以外の溶媒については、基準対照 C（すなわち、適切な溶媒にペプチドのみを溶解した試料、補遺 3 参照）をモニターした場合と同様に、ペプチドの安定性に影響を与えない限り用いることができる。このような溶媒のいずれにも被験物質が不溶である場合、最後の選択肢として最小限の DMSO を用いてもよい。DMSO によってペプチドの二量体化が生じ、その結果、許容基準を満たすことが一層難しくなる可能性があることに注意しなければならない。DMSO を用いる場合、被験物質をまず 300 μ L の DMSO に可溶化させ、得られた溶液をアセトニトリル 2700 μ L により希釈してみるとこと。また、この混合液中で被験物質が不溶である場合、同量の被験物質を DMSO 1500 μ L に可溶化させ、得られた溶液をアセトニトリル 1500 μ L により希釈してみるとこと。被験物質はガラスバイアル中で予め重量を測定し、試験の直前に適切な溶媒に溶解し、100 mM 溶液を調製する。

11. 被験物質が既知の分子量を有する単一成分物質である場合、または既知の組成の混合物もしくは多成分物質である場合、この分子量法を適用すべきである。既知の組成の混合物および多成分物質の場合、単一の集成純度値は、その成分（水を除く）の割合を合計することにより求め、単一の集分子量は、混合物の各構成成分（水を除く）の個々の分子量およびその個々の割合を考慮して求める。次に、得られた純度および集分子量を用いて、100 mM 溶液の調製に必要な被験物質の重量を算出する。主要な分子量を測定できないポリマーの場合、モノマーの分子量（または、ポリマーを構成する複数のモノマーの見かけ上の分子量）を考慮して、100 mM 溶液を調製する。

12. 組成が不明な混合物および多成分物質（すなわち、組成が不明または不定の UVCB 物質、複雑な反応生成物または生体物質）については、適切な溶媒中の全成分（溶媒を除く）の重量に基づき、重量法を用いて濃度 20 mg/mL の被験溶液を調製してもよい。この値は、デフォルトの分子量 200 g/mol に基づく。調査対象の混合物に、典型的な高い分子量の化学物質クラスを含むことが知られている場合、このデフォルトの分子量と被験溶液濃度を適宜調整する必要がある（例：農薬製剤のアプローチ(13)を参照）。また、この重量法は、分子量が得られず、集分子量を決定できない場合にのみ、最終手段として適用すべきである。

陽性対照、基準対照、共溶出対照の調製

13. 陽性対照（positive control : PC）として、シンナムアルデヒド（CAS 番号： 104-55-2、食品グレード純度 95% 以上）を用い、アセトニトリルを用いて濃度 100 mM にする。これ以外

に、既存データが入手可能で同程度の実行許容基準が得られれば、中程度の減少率の値を示す適切な陽性対照を用いることができる。さらに、基準対照（すなわち、適切な溶媒に溶解した試験用ペプチドのみを含有するサンプル）も HPLC の分析シーケンスに含め、これらの基準対照を用いて、解析前の HPLC システムの適合性（基準対照 A）、経時的な基準対照の安定性（基準対照 B）、被験物質の溶解に用いる溶媒がペプチド減少率に影響を及ぼさないこと（基準対照 C）を検証する（補遺 3 参照）。物質ごとに適切な基準対照を用いて、当該物質のペプチド減少率を算出する（段落 20 参照）。さらに、解析する被験物質ごとに被験物質のみにより構成される共溶出対照を HPLC の分析シーケンスに含め、被験物質とリジンかシステインいずれかの含有ペプチドとの共溶出の可能性について検討する。

被験物質とシステインおよびリジン含有ペプチド溶液のインキュベーション

14. システインおよびリジン含有ペプチド溶液は、それぞれ被験物質と 1:10 および 1:50 の比率で混合し、ガラス製オートサンプラーバイアル中でインキュベートする。被験物質の水溶性が低く、被験物質溶液を試験用ペプチド溶液に添加した直後に沈殿物が認められた場合、どの程度の量の被験物質が試験用ペプチドとの反応のため溶液中に残されているのか明確でない。したがって、このような場合、陽性結果は受け入れられるが、陰性結果は確からしさが不明であり相当の注意を払って解釈すべきである（濃度 100 mM でも不溶の被験物質については段落 10 の条項も参照）。反応溶液を 22.5~30°C で 24 ± 2 時間暗所に静置してから、HPLC 分析を行う。被験物質ごとに双方のペプチドについて 3 回反復分析する。HPLC 分析の前に試料の目視確認を行わなければならない。沈殿物または相分離を認める場合、多量の沈殿物により HPLC のラインまたはカラムが詰まるおそれがあるため、予防措置として、試料を低速で遠心分離（100~400 × g）し、沈殿物をバイアルの底に沈殿させるとよい。インキュベーション時間の経過後に沈殿物または相分離を認める場合、ペプチドの減少が過小評価される可能性があり、陰性結果の場合、十分な信頼性を持って反応性を欠くと結論付けることはできない。

HPLC 標準検量線の作成

15. システインおよびリジン含有ペプチドの双方について、標準検量線を作成する。ペプチドの標準物質は、20%または 25%のアセトニトリル：緩衝液を用いて調整し、システイン含有ペプチドにはリン酸緩衝液（pH 7.5）、リジン含有ペプチドには酢酸アンモニウム緩衝液（pH 10.2）を用いる。試験用ペプチドの原液（0.667 mM）を連続希釈した標準液を用いて、0.534~0.0167 mM の範囲を対象とする 6 濃度の検量線用溶液を調製する。標準検量線には、無処置の希釈緩衝液も含める。適切な検量線とは、決定係数 (r^2) が 0.99 超の場合とする。

HPLC の準備および分析

16. HPLC システムの適合性を、分析の実施前に検証する。ペプチドの減少を、UV 検出器 (220 nm の測定波長を有するフォトダイオードアレイ検出器または固定波長吸収検出器) と接続した HPLC によりモニターする。適切なカラムを HPLC システムに設置する。バリデーション済みのプロトコルには、好ましいカラムとして Zorbax SB-C-18 (2.1 mm × 100 mm × 3.5 ミクロン) が記載されている。この逆相 HPLC カラムを使い、分析を開始する前に 2 時間以上、システム全体を 30°C において A 相 50% (0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸-水)、B 相 50% (0.085% (v/v) トリフルオロ酢酸-アセトニトリル) で平衡化する。HPLC 分析は、流速 0.35 mL/分で実施し、線形勾配で 10 分間にアセトニトリル 10%から 25%に、続いて他の物質を除去するため 90%アセトニトリルに急速に上昇させる。同量の標準物質、試料、対照をそれぞれ注入する。注入と注入の間、初期条件下にて 7 分間、カラムの平衡化を再度行うこと。異なる逆相 HPLC カラムを用いる場合、システインおよびリジン含有ペプチドの適切な溶出およびピーク面積を保証するため、使用システムにより変わることがある注入量（通常、3~10 μL の範囲）など設定パラメータを調整する必要がある。重要事項として、別の HPLC 設定を用いる場合、その設定が上記の検証済みの設定と同等であることを（例えば、補遺 2 の習熟度評価用の物質の試験により）示すこと。吸光度を 220 nm でモニターする。フォトダイオードアレイ検出器を用いる場合、258 nm における吸光度も記録する。アセトニトリルの中には、ペプチドの安定性に悪影響を及ぼすものもあるため、新たなバッチのアセトニトリルを用いる場合、その影響を評価しなければならないことに留意する。220 nm のピーク面積と 258 nm のピーク面積の比を、共溶出の指標として用いることができる。各試料について、対照試料に対する面積比の平均値²が 90%超かつ 100%未満の範囲である場合、共溶出が生じなかったことを示す良い指標になると考えられる。
17. システイン含有ペプチドの酸化を促進する被験物質が存在する可能性がある。二量体化したシステイン含有ペプチドのピークを、目視によりモニターできる場合がある。二量体化が生じたと考えられる場合、これによりペプチド減少率が過大評価され、偽陽性の判定や、より高い反応性クラスに割り当てられる可能性があることに留意する（段落 23 および段落 24 参照）。
18. HPLC の分析時間は、被験物質を試験用ペプチド溶液と混合後、22~26 時間経過してから最初のサンプルの注入開始ができるよう設定する。HPLC の分析シーケンスは、HPLC 解析時間が 30 時間未満となるよう設定する。バリデーション試験に用いられ、本試験法に記載されている HPLC の設定では、1 回の HPLC 測定で最大 26 試料の分析が可能である（段落 9 も参照）。HPLC による分析シーケンスの一例を補遺 3 に示す。

² 平均値とは、本文書全体を通じ算術平均値を意味する。

データおよび報告

データの評価

19. システインまたはリジン含有ペプチドの濃度については、各試料を 220 nm で測光し、適切なピークのピーク面積（曲線下面積 [area under the curve : AUC]）の測定、および標準物質から得られる線形検量線を用いたペプチドの濃度より算出する。

20. ペプチド減少率は、下記の式に従って、各試料のピーク面積を測定し、そのピーク面積を関連する基準対照 C（補遺 3 参照）のピーク面積の平均値で割ることにより求める。

$$\text{ペプチド減少率} = \left[1 - \left(\frac{\text{反復注入におけるペプチドのピーク面積}}{\text{基準対照 C におけるペプチドのピーク面積の平均値}} \right) \right] \times 100$$

許容基準

21. 1回の測定は、次の基準を満たすことにより、妥当であるとみなされる：

- a) 標準検量線の決定係数 (r^2) が 0.99 超。
- b) 陽性対照であるシンナムアルデヒドの 3 回反復測定によるペプチド減少率の平均値が、システイン含有ペプチドの場合 60.8~100%、リジン含有ペプチドの場合 40.2~69.0% であり（その他の陽性対照については参考範囲を確定する必要がある）、最大標準偏差（standard deviation : SD）が、システインの減少率では 14.9%未満、リジンの減少率では 11.6%未満。
- c) 基準対照 A のペプチド濃度の平均値が 0.50 ± 0.05 mM であり、アセトニトリル中における 9 例の基準対照 B および C については、ペプチドのピーク面積の変動係数（coefficient of variation : CV）が 15.0%未満。

これらの基準の 1 つまたは複数を満たさない場合、測定を繰り返す。

22. 被験物質の結果については、次の基準を満たすことにより、妥当であるとみなされる：

- a) 被験物質の反復測定における最大標準偏差が、システインの減少率では 14.9%未満、リジンの減少率では 11.6%未満。
- b) 適切な溶媒中における 3 例の基準対照 C のペプチド濃度の平均値が 0.50 ± 0.05 mM。ここに挙げた基準を満たさない場合、データを不採用とし、この被験物質について測定を繰り返す。

予測モデル

23. 被験物質ごとにシステインの減少率およびリジンの減少率の平均値を算出する。平均値を算出して減少率が負であれば「0」とみなす。表1に示したシステイン1:10／リジン1:50の予測モデルにおいて、ペプチド減少率の平均値6.38%を閾値に用いて、IATAまたはDAの枠組み内で皮膚感作性物質と非感作性物質を識別する。本予測モデルを適用して、被験物質を反応性の強度（すなわち、低、中等度および高反応性）のいずれかに割り当てるとき、IATAまたはDAの枠組みの範囲内で、強度の評価に有用な情報が得られることがわかる。

表1：システイン1:10／リジン1:50の予測モデル¹

| システインおよびリジンの減少率の平均値 | 反応性の分類 | DPRAによる予測 ² |
|-----------------------|-------------|------------------------|
| 0%≤減少率の平均値≤6.38% | なし、または極めて低い | 陰性 |
| 6.38%<減少率の平均値≤22.62% | 低い | 陽性 |
| 22.62%<減少率の平均値≤42.47% | 中等度 | |
| 42.47%<減少率の平均値≤100% | 高い | |

¹表の数値は統計的に算出された閾値であり、測定の精度との関連性はない(2)。

²DPRAによる予測は、DAまたはIATAの枠組みの中で、また、段落2および段落4の条項に従って検討すること。

24. 被験物質（当該物質、多成分物質または混合物の1つもしくは複数の構成成分）によっては、220 nmにおいて顕著な吸収を示し、ペプチドと保持時間が同じになる場合（共溶出）が考えられる。被験物質とペプチドの溶出時間が分離されるようにHPLCの設定をわずかに調整することにより、共溶出は解消できる。別のHPLC設定を用いて共溶出の解消に取り組む場合、その設定が検証済みの設定と同等であることを（例えば、補遺2の習熟度評価用の物質の試験により）示す必要がある。共溶出が生じると、ペプチドのピーク面積を正確に求められず、ペプチド減少率の算出が不可能になる。こうした被験物質の共溶出が、システインおよびリジン含有ペプチドの双方またはシステイン含有ペプチドのみに生じた場合、分析結果では「結論が得られない」とする。共溶出がリジン含有ペプチドにのみ生じた場合、表2に報告されたシステイン1:10の予測モデルを用いる。

表2：システイン1:10の予測モデル¹

| システイン (Cys) の減少率 | 反応性の分類 | DPRA による予測 ² |
|------------------------|-------------|-------------------------|
| 0%≤Cys の減少率≤13.89% | なし、または極めて低い | 陰性 |
| 13.89%<Cys の減少率≤23.09% | 低い | 陽性 |
| 23.09%<Cys の減少率≤98.24% | 中等度 | |
| 98.24%<Cys の減少率≤100% | 高い | |

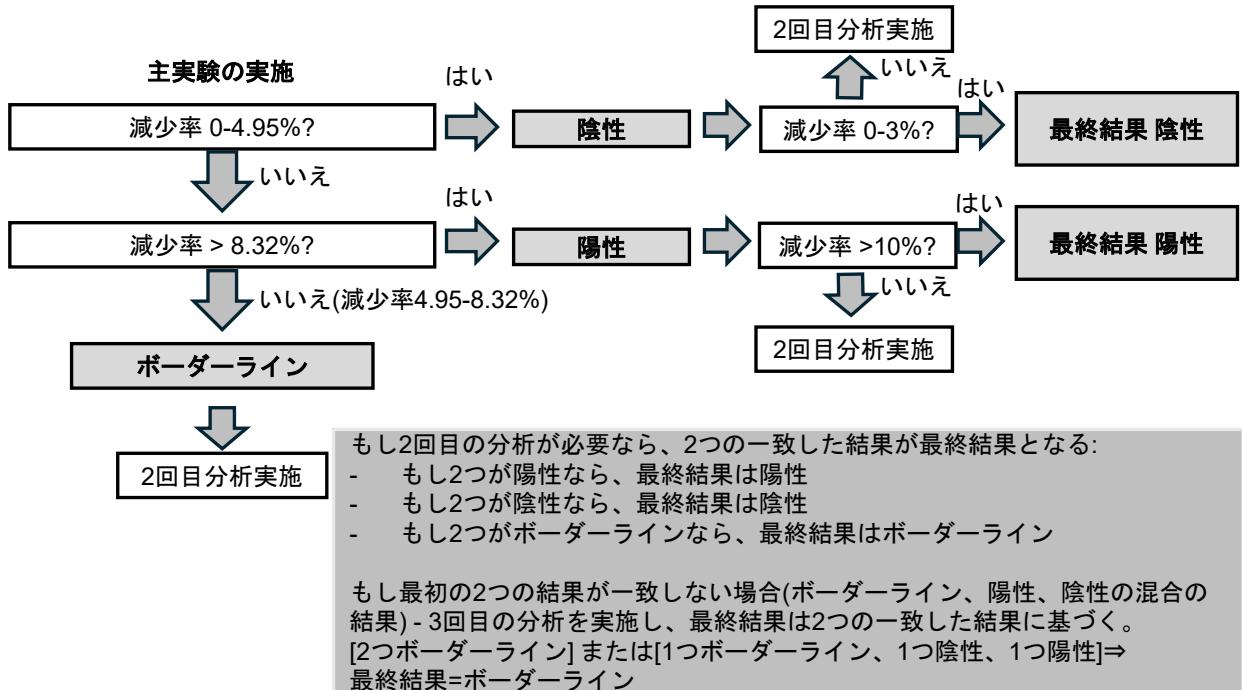
¹ 表の数値は統計的に算出された閾値であり、測定の精度との関連性はない。

² DPRA による予測は、DA または IATA の枠組みの中で、また、段落 2 および段落 4 の条項に従って検討すること。

25. このほか、被験物質と試験用ペプチドの一方との保持時間が、完全ではないが重複している場合がある。このような場合、ペプチド減少率を予測してシステイン 1:10／リジン 1:50 の予測モデルに用いることはできるが、反応性の強度に対する被験物質の分類を正確に行うことはできない。

26. システインおよびリジン含有ペプチドの双方について HPLC 分析を行い、その結果に疑問の余地がない場合、被験物質の分析は 1 回で十分である。ただし、陽性結果と陰性結果との識別に用いられる閾値に近い結果（システイン 1:10／リジン 1:50 の予測モデルにおけるペプチド減少率の平均値が 3~10% の範囲に含まれる場合、または、システイン 1:10 の予測モデルにおけるシステインの減少率が 9~17% の範囲に含まれる場合）である場合、追加の試験が推奨される。ここに挙げる範囲における陰性結果の場合は特に（システイン 1:10／リジン 1:50 の予測モデルにおけるペプチド減少率の平均値が 3~6.38% の範囲に含まれる場合、または、システイン 1:10 の予測モデルにおけるシステインの減少率が 9~13.89% の範囲に含まれる場合）、2 回目の分析を行い、1 回目と 2 回目で結果が一致しない場合には、3 回目の分析を行う。図 1 のフローチャートは分析の繰り返しとボーダーラインの評価を決定するために使用される。

図 1：ボーダーラインの範囲とボーダーラインの結果を結論付けるための複数回実行を考慮した DRPA 予測モデル(平均減少率)のフローチャート



陽性分類本来の閾値は 6.38% であり、この閾値を中心とした統計的に導出されたボーダーライン範囲は 4.95% - 8.32% である。同じフローチャートがシステインのみの予測モデルにも適用され、次の閾値が適用される: 3% ではなく 9%、10% 以上ではなく 17% 以上、4.95% ではなく 10.56%、8.32% 以上ではなく 18.47% 以上。

試験報告書

27. 試験報告書には、以下の情報を含めること。

被験物質および対照 (陽性対照および溶媒／媒体)

- 単一成分物質 (被験物質および対照物質)
 - IUPAC または CAS 名、CAS 番号、SMILES または InChI コード、構造式および／またはその他の識別子などの化学的識別情報
 - 物理的状態、外観、水溶解度、分子量および入手可能な範囲のその他の関連する物理化

学的性質

- 純度、該当する場合で現実的に可能であれば不純物の化学的識別情報など
- 該当する場合、試験の前処理（加温、粉碎など）
- 試験濃度
- 入手可能な範囲の保存条件および安定性
- 多成分物質、UVCB 物質および混合物：
 - 入手可能な範囲の成分の化学的識別情報（上記参照）、純度、定量的組成および関連のある物理化学的性質（上記参照）などによるできる限りの特性
 - 外観、水溶解度、および入手可能な他の関連する物理化学的性質
 - 既知組成の混合物／ポリマーの場合、分子量もしくは見かけの分子量、または試験実施に関連するそれ以外の情報
 - 該当する場合、試験の前処理（加温、粉碎など）
 - 試験濃度
 - 入手可能な範囲の保存条件および安定性
- 陽性対照に対する追加の情報
 - 該当する場合、適切な実施許容基準を示す陽性対照結果の背景データ
- 溶媒／媒体対照に対する追加の情報
 - 該当する場合、使用する溶媒／媒体およびその成分の比率
 - 各被験物質に対する溶媒選択の妥当性
 - アセトニトリルの場合、ペプチドの安定性に及ぼす影響の試験結果
- ペプチド
 - 供給元、ロット、純度

HPLC 機器の設定および分析

- HPLC 機器、HPLC カラムおよびガードカラム、検出器、オートサンプラーの種類
- HPLC 分析に関連するパラメータ：カラム温度、注入量、流速、グラジエントなど

システムの適合性

- 標準物質および基準対照 A の反復測定ごとの 220 nm におけるペプチドのピーク面積
- 線形検量線のグラフおよび決定係数 (r^2)
- 基準対照 A の反復測定ごとのペプチド濃度
- 基準対照 A の 3 例のペプチド濃度 (mM) の平均値、SD、CV
- 基準対照 A および C のペプチド濃度

分析シーケンス

- 基準対照について：
 - B および C の反復測定ごとの 220 nm におけるペプチドのピーク面積
 - アセトニトリル中の基準対照 B および C 9 例について、220 nm におけるペプチドのピーク面積の平均値、SD、CV (基準対照の分析中の経時的安定性の検討のため)
 - 用いた各溶媒について、3 例の適切な基準対照 C の 220 nm におけるペプチドのピーク面積の平均値 (ペプチド減少率算出のため)
 - 用いた各溶媒について、3 例の適切な基準対照 C のペプチド濃度 (mM)
 - 用いた各溶媒について、3 例の適切な基準対照 C のペプチド濃度 (mM) の平均値、SD、CV
- 陽性対照について：
 - 反復測定ごとの 220 nm におけるペプチドのピーク面積

- 反復測定ごとのペプチド減少率
- 3回の反復測定でのペプチド減少率の平均値、SD、CV
- 各被験物質について：
 - 認められる場合、インキュベーション時間終了時における反応混合物の沈殿物の外観沈殿物の再度可溶化や遠心分離の有無
 - 共溶出の存在
 - 該当する場合、それ以外の観察結果の記述
 - 反復測定ごとの 220 nm におけるペプチドのピーク面積
 - 反復測定ごとのペプチド減少率
 - 3回の反復測定でのペプチド減少率の平均値、SD、CV
 - システインの減少率とリジンの減少率の平均値
 - 使用した予測モデルおよび DPRA による予測

習熟度評価の試験

- 試験法の日常的な実施前に、試験施設が試験法に習熟していることを習熟度確認化学物質試験によって実証した旨の記述

結果の考察

- 試験手順の予期しない変更があればその記述
- DPRA により得られた結果の考察と、それが段落 26 に記載された範囲内であるかどうか

結論

付録Iの参考文献

- (1) Gerberick *et al.* (2004), Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicological Sciences* 81:332-343.
- (2) Gerberick *et al.* (2007), Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. *Toxicological Sciences* 97:417-427.
- (3) EC EURL-ECVAM (2013), Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for skin sensitisation testing. Available at: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra.
- (4) EC EURL ECVAM (2012), Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) Validation Study Report 74pp. Accessible at: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra
- (5) Natsch *et al.* (2013), A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology*, published online, 9 April 2013, DOI:10.1002/jat.2868.
- (6) Jaworska *et al.* (2013), Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice *Journal of Applied Toxicology*, published online, 14 May 2013, DOI: 10.1002/jat.2869.
- (7) DB-ALM (INVITTOX), Protocol 154: Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing 17pp. Accessible at: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>
- (8) ECETOC (2003), Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).
- (9) Urbisch *et al.* (2016), Assessment of Pre- and Pro-haptens Using Nonanimal Test Methods for Skin Sensitization, *Chem Res Toxicol.* 29(5):901-13 doi: 10.1021/acs.chemrestox.6b00055
- (10) Pattlewicz *et al.* (2016), Can currently available non-animal methods detect pre and pro-haptens relevant for skin sensitization? *Regul Toxicol Pharmacol.*; 82:147-155. doi: 10.1016/j.yrtph.2016.08.007
- (11) Jaworska *et al.* (2015), *Arch Toxicol.* 2015 Dec;89(12):2355-83. doi: 10.1007/s00204-015-1634-2)
- (12) OECD (2016), Series on Testing & Assessment No. 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. [ENV/JM/MONO\(2016\)29](http://ENV/JM/MONO(2016)29). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<https://community.oecd.org/community/iatass>].
- (13) Strickland J, Truax J, Corvaro M, Settivari R, Henriquez J, McFadden J, Gulleedge T, Johnson V, Gehen S, Germolec D, Allen DG, Kleinstreuer N. Application of Defined Approaches for Skin

Sensitization to Agrochemical Products. *Front Toxicol.* 2022 May 2;4:852856. doi: 10.3389/ftox.2022.852856. PMID: 35586187; PMCID: PMC9108145.

付録 I、補遺 1

ペプチド結合性試験の既知の限界

以下の表に、DPRA の既知の限界の要約を示す。

| 物質クラス／妨害 | 考えられる過小評価または妨害の理由 | データの解釈 | 物質の例 |
|--|--|--|--|
| 金属および無機化合物 | 共有結合以外の機序によりタンパク質と反応することが知られている。 | 試験に用いてはならない。 | 硫酸ニッケル；7786-81-4 |
| プロハプテン | 皮膚感作性を生じるのに酵素による生体内活性化を要する被験物質は、自動酸化により <i>in vivo</i> ／ヒト体内と同程度まで活性化される場合を除いて、本試験法では検出できない。しかし、これにあてはまるかどうかは通常、不明である。 | 偽陰性となる可能性がある。本試験法により得られた陰性結果は、IATA または DA の枠組みの範囲内で、規定された限界に照らし、また他の情報源との関連において解釈すべきである。 | ジエチレントリアミン；111-40-0 (1 A chez l'homme, LLNA n/a) |
| 非生物変換によって感作性物質となる化学物質の報告例については、そのほとんどが本試験法により正しく検出されている。 | | | |
| プレハプテン | | | リナロール : 78-70-6 |
| 220 nm において顕著に吸収を示し、試験用ペプチドと同じ保持時間になる（共溶出）被験物質 | 共溶出が生じると、試験用ペプチドのピーク面積が正確に求められず、ペプチド減少率の算出が不可能になる。 | こうした被験物質の共溶出が、システインおよびリジン含有ペプチドの双方またはシステイン含有ペプチドのみに生じた場合、分析結果では「結論が得られない」とし、別の HPLC 設定を用いることを検討すべきである（段落 22 参照）。共溶出がリジン含有ペプチドにのみ生じた場合、表 2 に報告されたシステイン 1:10 の予測モデルを用いる。 | サリチル酸 : 69-72-7 |
| 組成が不明の複雑な混合物、組成が不明または不定の物質、複雑な反応生成物または生体物質 | 分子量法を適用できない—重量法の適用条件については段落 12 を参照 | 段落 12 を参照 | UVCB、排出化学物質、組成が不定または完全に解明されていない製品または製剤 |
| 最終濃度 100 mM で適切な溶媒に溶解できない被験物質 | 十分な曝露が得られるかどうかわからない。 | 本濃度において不溶の被験物質は、可溶化できる低濃度において試験が可能である。このような場合、陽性結果を用いて被験物質が皮膚感作性物質であるとの特定を支援することができるが、陰性結果からは、反応性を欠くとの確定判断をすべきではない。 | n/a |

| | | | |
|---|--|--|--------------------------------------|
| 反応溶液中に沈殿する化 学物質 | 十分な曝露が得られるかどうかわか らない。 | 陰性結果の場合、十分な信頼性を持って反応性 を欠くと結論付けることはできない。 | ミリスチン酸イソブ ロピル CAS 番号： 110-27-0 |
| システィン含有ペプチド と共有結合しないが、そ の酸化（すなわち、シス ティンの二量体化）を促 進する被験物質 | システィン含有ペプチドの減少を過 大評価する可能性があり、偽陽性の 判定の可能性がある。 | | DMSO 酸化剤 |
| DMSO のみに溶解する被 験物質 | DMSO はシスティンの二量体化によ って過大なペプチド減少を引き起こ し、高いバックグラウンドシスティ ン減少を生じる。 | 偽陰性結果を生じる可能性がある。 | n/a |

付録 I、補遺 2

習熟度評価用の物質

In Chemico 皮膚感作性：ペプチド結合性試験

本試験法に記載された試験法を日常的に用いるのに先立ち、表 1 の習熟度評価用の 10 物質について、DPRA により期待される予測結果を正確に入手し、システインおよびリジン含有ペプチドごとに、習熟度評価用の 10 物質中 8 物質について、それぞれの基準範囲内に収まるペプチド減少率の値を得ることにより実施施設の技術的習熟度を立証すること。習熟度評価用のこれらの物質は、皮膚感作性の有害性について得られる反応の範囲を示すため選択された。それ以外の選択基準は、これらの物質が市販品であること、高品質の *in vivo* 参照データおよび DPRA により生成された高品質の *in vitro* データが入手可能であること、ならびに、EURL ECVAM が主導したバリデーション試験にこれらの物質が用いられて、試験に参加した施設で試験導入成功が立証されていることからなる。

表 1：ペプチド結合性試験の技術的習熟度の立証に推奨される習熟度評価用の物質

| 習熟度評価用の物質 | CAS 番号 | 物理的状態 | <i>In vivo</i> における予測 ¹ | DPRA による予測 ² | システイン含有ペプチド減少率(%) の範囲 ³ | リジン含有ペプチド減少率(%) の範囲 ³ |
|-----------------|------------|-------|------------------------------------|-------------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| 2,4-ジニトロクロロベンゼン | 97-00-7 | 固体 | 感作性物質(非常に強い) | 陽性 | 90-100 | 15-45 |
| オキサゾロン | 15646-46-5 | 固体 | 感作性物質(非常に強い) | 陽性 | 60-80 | 10-55 |
| ホルムアルデヒド | 50-00-0 | 液体 | 感作性物質(強い) | 陽性 | 30-60 | ≤ 24 |
| ベンジリデンアセトン | 122-57-6 | 固体 | 感作性物質(中等度) | 陽性 | 80-100 | ≤ 7 |
| ファルネソール | 19317-11-4 | 液体 | 感作性物質(弱い) | 陽性 | 15-55 | ≤ 25 |
| 2,3-ブタンジオン | 431-03-8 | 液体 | 感作性物質(弱い) | 陽性 | 60-100 | 10-45 |
| 1-ブタノール | 71-36-3 | 液体 | 非感作性物質 | 陰性 | ≤ 7 | ≤ 5.5 |
| 6-メチルクマリン | 92-48-8 | 固体 | 非感作性物質 | 陰性 | ≤ 7 | ≤ 5.5 |
| 乳酸 | 50-21-5 | 液体 | 非感作性物質 | 陰性 | ≤ 7 | ≤ 5.5 |

| | | | | | | |
|-------------------|----------|----|--------|----|-----|-------|
| 4-メトキシアセトフェ ノン | 100-06-1 | 固体 | 非感作性物質 | 陰性 | ≤ 7 | ≤ 5.5 |
|-------------------|----------|----|--------|----|-----|-------|

¹ *In vivo* における有害性（および強度）の予測結果は、LLNA データに基づく (5)。*In vivo* における強度は、ECETOC (8) により提唱された基準を用いている。

² DPRA による予測は、DA または IATA の枠組みの中で、また、段落 2 および段落 4 の条項に従って検討すること。

³ 範囲は、独立した 6 つの施設により実施された 10 例以上の減少率の値に基づいて決められた。

付録 I、補遺 3

分析シーケンスの例

| | |
|-------------|--|
| 校正標準および基準対照 | 標準物質 1 標準物質 2 標準物質 3 標準物質 4 標準物質 5 標準物質 6 希釈緩衝液 基準対照 A、反復 1 基準対照 A、反復 2 基準対照 A、反復 3 |
| 共溶出対照 | 被験物質 1 に対する共溶出対照 1 被験物質 2 に対する共溶出対照 2 |
| 基準対照 | 基準対照 B、反復 1 基準対照 B、反復 2 基準対照 B、反復 3 |
| 1 セット目の反復 | 基準対照 C、反復 1 シンナムアルデヒド、反復 1 試料 1、反復 1 試料 2、反復 1 |
| 2 セット目の反復 | 基準対照 C、反復 2 シンナムアルデヒド、反復 2 試料 1、反復 2 試料 2、反復 2 |
| 3 セット目の反復 | 基準対照 C、反復 3 シンナムアルデヒド、反復 3 試料 1、反復 3 試料 2、反復 3 |
| 基準対照 | 基準対照 B、反復 4 基準対照 B、反復 5 基準対照 B、反復 6 |

3 セットの基準対照（すなわち、適切な溶媒に溶解した試験用ペプチドのみからなる試料）を分析シーケンスに含めること：

基準対照 A : HPLC システムの適合性の検証に用いる。

基準対照 B : 基準対照の分析の経時的な安定性を検証するため、分析シーケンスの最初と最後に含める。

基準対照 C : 被験物質の溶解に用いる溶媒がペプチド減少率に影響を及ぼさないことを検証するため、分析シーケンスに含める。

付録 II: *In Chemico* 皮膚感作性：アミノ酸誘導体結合性試験 (ADRA)

最初に考慮すべき事項、適用および限界

1. ADRA では、リジンかシステインのいずれかを含有するモデル合成アミノ酸誘導体に対する被験物質の反応性を定量することにより、皮膚感作性の AOP である分子レベルのイニシャルイベント、すなわち、タンパク質の反応性を評価する (1) (2) (3)。NAC として知られるシステイン誘導体 N-(2-(1-ナフチル)アセチル)-L-システイン (CAS 番号 : 32668-00-1) および NAL として知られるリジン誘導体 α -N-(2-(1-ナフチル)アセチル)-L-リジン (CAS 番号 : 397841-92-8) の減少率を用いて、皮膚感作性物質と非感作性物質と識別する (1) (2) (3)。
2. ADRA プロトコルの再現性および移行性については、日本動物実験代替法評価センター (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods : JaCVAM) が主導したバリデーション試験を用いて確認されている (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10)。ADRA には紫外線 (UV) 検出と蛍光 (FL) 検出の 2 種類がある (11) (12)。UV 検出と蛍光検出の両方を用いて ADRA の施設内再現性 (WLR) および施設間再現性 (BLR) を求めたところ、いずれも 100% であった (9) (10)。局所リンパ節アッセイ (LLNA) データに基づく皮膚感作性の予測によれば、UV 検出による ADRA は感作性物質および非感作性物質を、精確さ 76% (104/136)、感度 76% (74/98)、特異度 79% (30/38)、バランス精確さ 77% で特定した (8)。さらに、ヒトデータに基づく皮膚感作性の予測によれば、UV 検出による ADRA は、精確さ 84% (67/80)、感度 83% (48/58)、特異度 86% (19/22)、バランス精確さ 84% であった (8)。しかし、本試験法は、IATA に照らし、「概要」の段落 6 および段落 8 の条項に従って、他の情報と組み合わせて用いることが推奨されることから、ADRA 単独の試験法としてここに示された精確さの値は参考にすぎない。さらに、動物を用いない皮膚感作性試験法を評価する場合、LLNA を始めとする動物試験が、ヒトにおける皮膚感作性を完全に反映しているとはいえないことに留意すべきである。入手可能な全データにより、ADRA の適用領域には様々な有機官能基、反応メカニズム、(in vivo 試験により判定される) 皮膚感作性の強度および物理化学的性質が含まれることが示されている (1) (2) (3) (4)。独立したピアレビューにより、ADRA のバリデーション試験は、本試験法が皮膚感作性の有害性を予測により特定するための統合試験戦略の一部として許容可能であることを示していると考えられた (6) (13) (14)。
3. 共溶出は、被験物質 (当該物質、多成分物質または混合物の 1 つもしくは複数の構成成

分) が、OD 281 nm (UV 検出器) または Ex/Em 284/333 nm (FL 検出器) で顕著に検出され、NAC または NAL と同じ保持時間有する場合に生じる (15)。求核試薬 NAC および NAL を用いて、UV 吸収化合物が共溶出すると、従来の紫外線 (UV) 検出器を使用した場合には、不確定な結果となることがある (11) (12)。この問題は、蛍光 (FL) 検出器を用いた代替測定または並列測定によって防止することができる。したがって、バリデーション試験 (9) (10) においても、両検出器を用いた同時測定により得られた減少率を収集し、UV 検出法と同等の結果が得られたことから、両検出法は妥当であることが示された。ただし、FL 検出法では不確定な結果となることは少ない。ADRA の既知の限界を付録 II、補遺 1 に表で示す。

4. 本試験ガイドラインでは、「被験物質」という用語は、試験対象であることをいう場合に用いる³。金属化合物の場合、共有結合以外の機序によりタンパク質と反応することが知られているため、本試験法は適用外となる。この試験ガイドラインの付録に記載されている試験法は、代謝系を包含しない *in chemico* 試験法である。皮膚感作性を生じるのに酵素による生体内活性化を要する化学物質（すなわち、プロハプテン）は、本試験法では検出できない。非生物変換によって感作性物質となる化学物質（すなわち、プレハプテン）の報告例には、本試験法により正しく検出されているものもある (1) (2) (3) (4) (7) (8)。上記をふまえ、本試験法により得られた陰性結果は、IATA の枠組みの範囲内で、規定された限界に照らし、また他の情報源との関連において解釈すべきである。N-(2-(1-ナフチル)アセチル)-L-システイン (NAC) 試薬の酸化（すなわち、システインの二量体化）を促進する被験物質の場合、NAC の減少を過大評価する可能性があり、判定が偽陽性となる可能性があると考えられる（段落 22 および付録 II、補遺 1 参照）。UV 検出器を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で NAC 二量体の検出および定量が可能であると考えられることから、被験物質との反応および共有結合ではなく、酸化的二量体化によって NAC 試薬が減少したことを確認したり除外したりできると考えられる。

5. ADRA の試験方法により、難溶性物質の試験が可能となる (16)。試験を実施するためには、被験物質は、最終濃度 4 mM において適切な溶媒に可溶でなければならない（段落 14 参照）。本濃度において不溶の被験物質は、さらに低濃度で試験が可能である。このような場合、陽性結果を用いて被験物質が皮膚感作性物質であると判断することができるが、陰性結果からは、反応性を欠くとの確定判断をすべきではない。

6. ADRA で用いる求核試薬の定量は 281 nm にて実施される (1) (2)。求核試薬と UV 吸収性被験物質が共溶出する場合、不確定な予測となる可能性がある。しかし、このスペクトル領域の紫外線を吸収する物質は、概ね共役二重結合を有する物質に限られ、UV 吸収成分の共溶出によって不確定な結果となる可能性は大幅に低い (15)。さらに、NAC および NAL は蛍光性である

³ 2013 年 6 月の合同会議において、可能な場合、新規および改訂版の試験ガイドラインでは、試験の対象となる物質を表現する「被験物質」という用語について、より一貫した使用を行うべきであることが合意された。

ため、FL 検出器を用いて検出することができる (11) (12)。被験物質が当該励起／発光波長で蛍光を示すことはまれであるため、FL 検出器を使用することで、不確定な結果をさらに減らすことができる。UV 吸収のある多成分物質の場合は特に、これが有用である。

7. ADRA を用いて被験物質の感作性を評価する場合、原液の調製には 2 つの選択肢がある (図 1 および段落 15~16 参照) : a) 被験物質が、分子量が既知である単一成分物質であるか、既知組成の混合物または多成分物質の被験物質では、濃度 4 mM に調製した原液を用いて ADRA を実施する (8)。b) 被験物質が、分子量不明の単一成分物質であるか、混合物で分子量が不明である場合 (組成が不明または不定の混合物、複雑な反応生成物または生体物質 [UVCB]) 、0.5 mg/mL に調製した原液に基づく重量法を用いて ADRA を実施する。また、ポリマーにも ADRA の重量法 (0.5 mg/mL) を使用することができる。この重量法を用いて ADRA の予測能を評価したところ、ADRA (0.5 mg/mL) は LLNA データと比較して、精確さ 76% (103/136) 、感度 74% (73/98) 、特異度 79% (30/38) 、バランス精確さ 77% で、感作性物質および非感作性物質を特定することができる (8)。また、ヒトデータの予測能は、重量法による ADRA (0.5 mg/mL) が、精確さ 83% (66/80) 、感度 81% (47/58) 、特異度 86% (19/22) であることを示している (8)。ADRA (0.5 mg/mL) のバリデーション試験に使用した被験物質の分子量範囲は 60.10~388.29 であり、その際の反応液中の被験物質に対する求核試薬の比は 1:416~1:64 であった (9)。

8. ADRA は皮膚感作性物質と非感作性物質とを識別することができる。ADRA の結果を他の情報源と組み合わせて検討する場合に感作性の強度の評価に寄与できるか否かを判断するには、望ましくはヒトのデータを基にさらに検討する必要がある (13) (14)。

試験の概要

9. ADRA は、被験物質の存在下で $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、24 ± 1 時間インキュベーションしたあと、NAC および NAL の残存濃度を定量する *in chemico* 試験法である。いずれの誘導体にも、UV 検出および FL 検出を高めるために N 末端にナフタレン環を導入している。NAC および NAL の相対濃度は、UV 検出 (光学密度、281 nm) と、任意で FL 検出 (励起／発光 [Ex/Em] 、284/333 nm) を併用し、勾配溶出法 (段落 19 参照) を用いた HPLC により測定する。最終的に皮膚感作性物質と非感作性物質を識別するため、NAC および NAL 双方について減少率を算出し、予測モデルとの比較を行う (段落 27 参照) 。

10. 本試験法に記載された試験法を日常的に用いるのに先立ち、実施施設は、付録 II、補遺 2 に収載された習熟度評価用の 10 物質を用いて技術的習熟度を立証する。

手順

11. 本試験法は、JaCVAM が主導した ADRA のバリデーション試験に用いられたプロトコル

(17) を基にしており、試験施設に ADRA を導入する際に本試験法を使用することが推奨される。ADRA の主要な構成要素および手順について以下に記す。異なる HPLC 設定を用いる前に、その設定がプロトコル記載の検証済みの設定と同等であることを、望ましくは、付録 II、補遺 2 の習熟度評価用の物質の試験により示すこと。

NAC および NAL の品質

12. 求核試薬は、富士フィルム和光純薬株式会社のカタログ番号 296-80901 で、皮膚感作性試験用の「ADRA キット」として入手可能である。富士フィルム株式会社による皮膚感作性検出用試薬としての NAC/NAL の使用の特許は、日本国内にとどまる。このため、他国では、許可を得ることなく NAC/NAL を使用することができる。他の製造業者の NAC/NAL を用いる場合は、以下に記す 3 つの品質基準を満たさなければならない。これらの品質基準を満たすよう製造されたことが明らかである NAC および NAL を購入することで、品質を確認する必要もなく、遅滞なく ADRA を実施することができる。

NAC および NAL に必要な品質：

- 1) 純度：NAC、NAL ともに純度が 98% 以上であること。
- 2) 安定性：NAC および NAL の原液を用いて、被験物質を含まない基準対照を調製し、調製直後（0 時間）および 24 時間のインキュベーション後に NAC と NAL の残存濃度を定量する。NAC と NAL の残存濃度を次式の通りに算出する：

$$\text{NAC 残存濃度} = \frac{\text{NAC のピーク面積}}{\text{NAC および NAC 二量体のピーク面積の合計}} \times 100$$

$$\text{NAL 残存濃度} = \frac{\text{24 時間後の NAL のピーク面積}}{\text{0 時間時点の NAL のピーク面積}} \times 100$$

NAC 安定性低下の主な原因是二量体化であり、被験物質との反応性および試験の再現性に悪影響を及ぼす可能性がある (3)。そのため、NAC の残存濃度を NAC と二量体の総量に基づいて算出する。二量体は経時的に生成する場合と原液調製時に既に生成している場合があるため、原液調製時および 24 時間後の NAC の残存濃度を算出する。NAC (0 時間および 24 時間の両方) および NAL (24 時間) の残存濃度がいずれも 90% 以上であること (17)。

- 3) 反応性：付録 II、補遺 2 に示した習熟度評価用の 10 物質を用いて NAC および NAL の反応性の評価を行い、所定の要件を満たすこと。

NAC および NAL の原液の調製

13. 使用に先立ち、NAC および NAL の溶解性をバッチごとに検証すること。0.333 μ M EDTA を含有し、pH 8.0 の 100 mM リン酸緩衝液を溶媒とする濃度 2 mM の NAC 原液、および pH 10.2 の 100 mM リン酸緩衝液を溶媒とする濃度 2 mM の NAL 原液を調製する。次に、この 2 つの原液を緩衝液で希釈して、6.667 μ M 原液を調製する。NAC 原液、NAL 原液はいずれも調製後できるだけ速やかに使用すること (3)。これらの原液を保存する場合は、-75°C 以下にて使用前の最大 12 カ月間凍結保存することができる。インキュベーション混合液の NAC の最終濃度は pH 8.0 のリン酸緩衝液中に 5 μ M、インキュベーション混合液の NAL の最終濃度は pH 10.2 のリン酸緩衝液中に 5 μ M とする。

被験物質溶液の調製

14. JaCVAM による ADRA のプロトコルに記載されている可溶化手順に従い、DPRA の実施前に、適切な溶媒における被験物質の溶解性を評価する (17)。適切な溶媒では、被験物質は完全に溶解するはずである。ADRA のプロトコルでは、過剰量の被験物質存在下に NAC や NAL をインキュベートするよう規定されていることから、被験物質（および試験対象が多成分物質または混合物である場合は、その全成分）が溶解していることは、目視により被験物質溶液が透明であることを確認すれば十分である (17)。溶媒には、蒸留水、アセトニトリルおよびアセトンが適している。これらの溶媒のいずれにも被験物質が不溶である場合、最後の選択肢として最小限の DMSO を用いてもよい (19)。DMSO によって求核試薬 NAC の二量体化が生じ (18) (19)、その結果、許容基準を満たすことがより難しくなる可能性があることに注意しなければならない。DMSO-アセトニトリル溶媒（アセトニトリル中に 5% DMSO）を選択する場合は、被験物質を DMSO に 80 mM で溶解させ、この溶液をアセトニトリルを用いて 20 倍希釈して 4 mM 被験物質溶液を調製する。DMSO を用いたことで NAC 試薬の二量体化の増加が認められる場合、NAC 二量体の検出は HPLC で可能であることから、分析により確認することができる。ADRA に適していると既に考えられている溶媒以外の溶媒を被験物質に使用する場合、溶媒自体が NAC や NAL の減少（二量体化、酸化など）をもたらさず、被験物質や混合成分の完全性を低下させたり阻害したりしないことを確認する必要がある。被験物質は使い捨てのポリプロピレン製試験管中で予め重量を測定し、試験の直前に適切な溶媒に溶解し、4 mM 原液を調製する（段落 5 参照）。

15. 被験物質が既知の分子量を有する単一成分物質であるか、あるいは既知の組成の混合物または多成分物質である場合には、この分子量法を適用すべきである（図 1 を参照）。既知の組成の混合物および多成分物質の場合、単一の集成純度値は、その成分（水を除く）の割合を合計することにより求め、単一の集成分子量は、混合物の各構成成分（水を除く）の個々の分子量およびその個々の割合を考慮して求める。次に、得られた純度および集成分子量を用いて、4 mM 溶液の調製に必要な被験物質の重量を算出する。

16. 分子量が不明の単一成分物質の試験では、被験物質原液の濃度は 4 mM ではなく、0.5

mg/mL にて行うこと (7) (図 1 および段落 7 参照)。ポリマーも、濃度 0.5 mg/mL で試験してよい。組成が不明な混合物および多成分物質 (すなわち、組成が不明または不定の UVCB 物質、複雑な反応生成物または生体物質) の場合、重量分析法を用いて被験溶液を調製してよい。次に、適切な溶媒中の全成分 (溶媒を除く) の重量に基づき、被験物質を 0.5 mg/mL で原液に溶解する (段落 14 および図 1 参照)。この被験物質濃度 0.5 mg/mL は、ADRA (4 mM) を実施する場合は分子量 125 g/mol に相当する。ADRA (0.5 mg/mL) による ADRA 重量法が、広い分子量範囲 (30.03~512.60) にある 136 の化学物質を ADRA (4 mM) と同程度の精確さで予測することが示された (8) (段落 7 を参照)。重量法の予測能に関するこの評価は、分子量がわかっている被験物質に基づいており、混合物の参考データがないことから混合物を試験に用いていない。したがって、調査対象の混合物に、典型的な高い分子量の化学物質クラスを含むことが知られている場合、このデフォルトの分子量と試験溶液濃度を適宜調整する必要がある (例: 農薬製剤のアプローチ (24) を参照)。重量法は、集分子量を決定できない場合にのみ、最終手段として適用すべきである。混合物を用いた試験については、可能な限り、個々の成分の感作性および反応性に関する情報を収集すべきである。

陽性対照、基準対照、共溶出対照の調製

17. 陽性対照 (positive control : PC) として、フェニルアセトアルデヒド (AS 番号 : 122-78-1、純度 90% 以上) またはスクアリン酸ジエチルエステル (CAS 番号 : 5231-87-8、純度 95% 超) を、アセトニトリル中で濃度 4 mM で使用する (10)。フェニルアセトアルデヒドは酸化および重合を起こしやすいことから、適切な保存または新鮮な試料を用いることにより、試料の完全性を保証する必要がある。スクアリン酸ジエチルエステルは加水分解されやすいため、高温や多湿を避けて保管すること。これ以外に、中程度の減少率の値を示す適切な陽性対照は、既存データが入手可能で同程度の実行許容基準が得られれば、用いることができる。さらに、適切な溶媒に溶解した NAC または NAL のみを含有する基準対照も HPLC の分析シーケンスに含め、これらの基準対照を用いて、解析前の HPLC システムの適合性 (基準対照 A)、経時的な基準対照の安定性 (基準対照 B)、用いる溶媒が NAC または NAL の減少率に及ぼすあらゆる影響 (基準対照 C) について検証する (付録 II、補遺 3 参照)。被験物質の NAC および NAL の減少率を計算する際には、その被験物質に適した基準対照を用いる (段落 23 参照)。また、被験物質のみにより構成される共溶出対照を HPLC の分析シーケンスに含め、被験物質と NAC、NAL のいずれかとの共溶出の可能性について検討する。

被験物質と NAC 溶液および NAL 溶液のインキュベーション

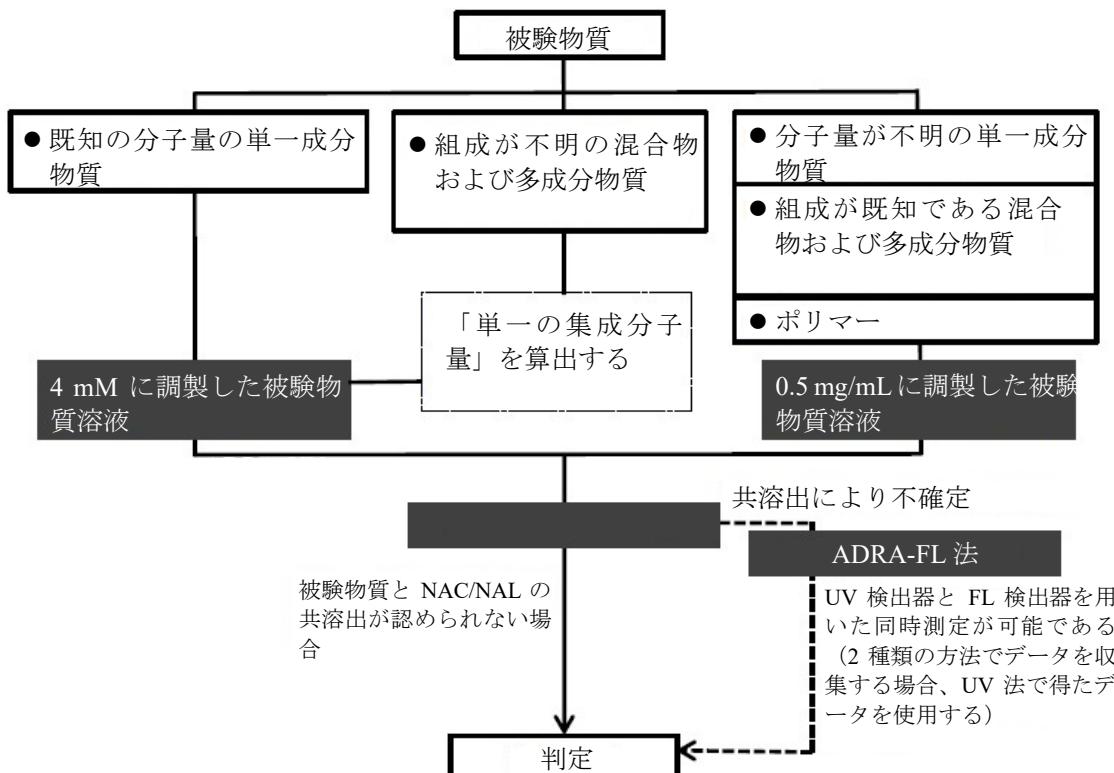
18. 96 ウエルマイクロプレートを用いて、NAC および NAL の原液を被験物質原液といずれも 3 : 1 の割合でインキュベートする。4 mM 被験物質原液の場合、上記により最終濃度が 1 mM 被験物質および 5 μ M NAC/NAL となる (17)。0.5 mg/mL 被験物質原液の場合、被験物質の最終濃

度は 0.125 mg/mL となる。NAC 溶液および NAL 溶液に被験物質を加えた直後に沈殿が認められれば、難溶性であることが示唆され、溶液中に含まれる被験物質の量を正確に知る方法がないことを意味する。このため、陽性結果は信頼性を持って用いることができるが、陰性結果は確からしさが不明であり、反応性を欠くとの確定判断をすべきではない（濃度 4 mM では溶解しない化学物質の試験については段落 5 も参照のこと）。反応溶液は $25 \pm 1^\circ\text{C}$ で 24 \pm 1 時間暗所にてインキュベートしてから、HPLC 分析を行う。インキュベート後、固定液としてトリフルオロ酢酸 (trifluoroacetic acid : TFA) (98%以上) を反応液に加え、反応を止めること (3)。2.5% (v/v) TFA 水溶液を 1:4 の割合で反応溶液に加える。これにより、NAC/NAL および TFA の最終濃度はそれぞれ、4 μM および 0.5% となる。

HPLC の準備および分析

19. NAC/NAL の減少を、UV 検出器と接続した HPLC によりモニターする。被験物質に UV 吸収成分があり、NAC/NAL と共に溶出する場合は、蛍光検出器を使用する (11) (12)。NAC/NAL 検出には 2 つのオプションがある：UV 検出を用いて連続測定を開始し、共溶出により不確定な結果が得られた場合にのみ、蛍光検出を行う。もしくは、並行して HPLC に UV 検出器と FL 検出器を接続し、同時測定を行う。UV 吸収成分の共溶出が認められない場合は、UV データのみを使用する。共溶出のために不確定な結果となる場合に、FL データを用いる (図 1 参照)。万が一、ADRA-FL でも共溶出を認めた場合は、段落 28 に従って操作を行う。NAC、NAL 双方の減少率を決定するのに、被験物質ごとに 3 回反復分析する。固定液を加えれば反応が止まるが、反応溶液の測定は、できるだけ早く、かつどのような場合であっても固定液添加後 3 日以内に実施すること。例えば、96 ウェルマイクロプレートを用いて NAC と NAL の HPLC 分析を分けて実施する場合、1 度に最大で 34 試料（被験物質、陽性対照、試験に用いるそれぞれの溶媒数に基づいた適切な数の溶媒対照を対象とし、それぞれ 3 回反復測定）の分析が可能である。1 回の試験時の反復測定にはいずれも、同じバッチの NAC および NAL 原液を用いる。HPLC 分析の前に被験物質溶液および対照溶液の目視確認を行うこと。多量の沈殿物により HPLC のラインまたはカラムが詰まることへの予防措置として、試料を低速で遠心分離 (100~400 \times g) し、沈殿物をバイアルの底に沈殿させるとよい。インキュベーション時間の経過後に沈殿物または相分離を認める場合、NAC および NAL の減少率を誤る可能性が考えられることから、その場合の陰性結果については、インキュベーション時間の初期になんらかの沈殿物が認められた場合と同様、確からしさが不明であり相当の注意を払って解釈すべきである（上記参照）。

図 1 : ADRA における NAC/NAL 減少を評価する手順（混合物の重量法および UV 吸収成分があり共溶出する場合の代替蛍光検出法を含む）。



MW = 分子量、ADRA = アミノ酸誘導体結合性試験、UV = 紫外線、FL = 蛍光

20. NAC および NAL の双方について、標準検量線を作成する。NAC および NAL の標準液はどちらもトリフルオロ酢酸を 0.5% 含む 20% アセトニトリル緩衝液を用いて調製する。NAC に対しては pH 8.0 のリン酸緩衝液、NAL に対しては pH 10.2 のリン酸緩衝液を用いる。NAC 原液および NAL 原液 (6.667 μ M) を用いて、濃度 5.0~0.156 μ M の 6 種類の検量線用溶液を調製する。標準検量線には、ブランクの希釈緩衝液も含める。適切な検量線とは、決定係数 (R²) が 0.990 超の場合とする。

21. HPLC システムの適合性を、分析の実施前に検証する。NAC および NAL の減少はいずれも、UV 検出器（フォトダイオードアレイ検出器または 281 nm の測定波長を有する固定波長吸収検出器）および FL 検出器（Ex 284 nm、Em 333 nm）と接続した HPLC によりモニターする（段落 19 参照）。適切なカラムを HPLC システムに設置する。バリデーション済みのプロトコルに記載されている推奨 HPLC 設定は、以下の仕様のカラムを用いる。ベース粒子：コアシェル型シリカゲル、粒子径：2.5~2.7 μ m、カラムサイズ：3.0 × 150 mm が望ましい。この逆相

HPLC カラムを使い、分析を開始する前に 30 分以上、システム全体を 40°C において A 相 50% (0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸一水) 、B 相 50% (0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸ーアセトニトリル) で平衡化する。次に、実際に使用する前に 2 回以上グラジエントを実施して、カラムのコンディショニングを行う。HPLC 分析は、流速 0.30 mL/分で実施し、10 分間にアセトニトリルを線形勾配で、NAC では 30% から 55% 、NAL では 25% から 45% に、続いて他の物質を除去するためアセトニトリル濃度を 100% に急速に上昇させる。同量の標準溶液、被験物質溶液、対照溶液を注入する。注入と注入の間、初期条件下にて 6.5 分間、カラムの平衡化を再度行うこと。異なる逆相 HPLC カラムを用いる場合、NAC および NAL の適切な溶出およびピーク面積を保証するため、使用システムにより変わることがある注入量（通常、10~20 μ L の範囲）など設定パラメータを調整する必要がある。重要事項として、異なる HPLC 設定を用いる場合、その設定が上記の検証済みの設定と同等であることを、望ましくは、付録 II、補遺 2 の習熟度評価用の物質の試験により示すこと。UV 検出法を用いて、281 nm で吸光度をモニターする。フォトダイオードアレイ検出器を用いる場合、291 nm における吸光度も記録する。アセトニトリルのバッヂによっては、NAC および NAL の安定性に悪影響を及ぼす場合があるため、新たなバッヂのアセトニトリルを用いる場合、その影響を評価しなければならないことに留意する。281 nm のピーク面積と 291 nm のピーク面積の比を、共溶出の指標として用いることができる。各試料について、対照試料に対する面積比の平均値が 90% 超かつ 100% 未満の範囲である場合、共溶出が生じなかったことを示す良い指標になると考えられる。HPLC による分析シーケンスの一例を付録 II、補遺 3 に示す。

22. NAC の酸化を促進する可能性のある被験物質もある。ADRA-UV の場合、二量体化した NAC のピークを、目視によりモニターできる場合がある。ただし、NAC 二量体は蛍光を発しないため、蛍光検出モードでは検出されない。見かけ上のあらゆる二量体化について、NAC の減少率が過大評価され、偽陽性の判定となる可能性があることから、注意すること（段落 4、14 および付録 II、補遺 1 参照）。

データおよび報告

データの評価

23. NAC および NAL の試料中の濃度を、各試料を 281 nm (UV 検出器) を用いて、蛍光検出を要する場合は Ex/Em 284/333 nm (FL 検出器) を用いて求める（段落 21 参照）。具体的には、適切なピークのピーク面積（曲線下面積 [area under the curve : AUC] ）を求め、標準物質から得られる線形検量線を用いて NAC および NAL の濃度を算出する。

24. 各試料の NAC および NAL の減少率はいずれも、下記の式に従って、ピーク面積を測定し、そのピーク面積をしかるべき基準対照 C (付録 II、補遺 3 参照) のピーク面積の平均値で割ることにより求める。

$$\text{NAC または NAL の減少率} = \left[1 - \left(\frac{\text{反復注入における NAC または NAL のピーク面積}}{\text{基準対照 C における NAC または NAL のピーク面積の平均値}} \right) \right] \times 100$$

許容基準

25. 1回の測定は、次の基準を満たすことにより、妥当であるとみなされる：

a) 標準検量線の決定係数 (r^2) が 0.990 超

b) 陽性対照 (フェニルアセトアルデヒドまたはスクアリン酸ジエチルエステル) の 3 回反復測定による NAC および NAL の減少率の平均値および最大標準偏差 (SD) が、以下の基準を満たす：

• NAC 減少率：

フェニルアセトアルデヒド：30～80%；スクアリン酸ジエチルエステル：30～80%

• NAL 減少率：

フェニルアセトアルデヒド：70～100%；スクアリン酸ジエチルエステル：70～100%

• フェニルアセトアルデヒド、スクアリン酸ジエチルエステルのいずれも、NAC および NAL の減少率の最大標準偏差 (SD) : 10%未満

c) 基準対照 A および C の NAC および NAL の濃度の平均値がいずれも 3.2～4.4 μM であり、アセトニトリル中における 9 例の基準対照 B および C について、NAC および NAL のピーク面積の変動係数 (coefficient of variation : CV) が 10%未満。

ここに挙げた基準をひとつでも満たさない場合、データを不採用とし、被験物質の測定を繰り返す。

26. 被験物質の結果については、次の基準を満たすことにより、妥当であるとみなされる：

a) 被験物質の反復測定における最大標準偏差が、NAC および NAL の減少率とも 10%未満

b) 適切な溶媒中における 3 例の基準対照 C の NAC および NAL の濃度の平均値が 3.2～4.4 μM 。DMSO の 5%アセトニトリル溶液を溶媒としたときの基準対照 C の NAC 平均濃度の許容範囲は 2.8～4.0 μM である (19)。

ここに挙げた基準をひとつでも満たさない場合、データを不採用とし、被験物質の測定を繰り返す。

予測モデル

27. 被験物質ごとに NAC および NAL の減少率の平均値を算出する。平均値を算出して減少率が負であれば「0」とみなす。表 1 に示した NAC/NAL の予測モデルにおいて、減少率の平均値 4.9%を閾値に用いて、IATA または DA の枠組み内で皮膚感作性物質と非感作性物質を識別する。感作性物質および非感作性物質を最も適切に予測できるように、2 クラス分類モデルを用いて NAC および NAL の平均減少率に対するカットオフ値 4.9%を設定した。

表 1 : NAC/NAL の予測モデル¹

| NAC および NAL の減少率の平均値 | ADRA による予測 ² |
|----------------------|-------------------------|
| 4.9%未満 | 陰性 |
| 4.9%以上 | 陽性 |

¹ 表の数値は統計的に算出された閾値であり、測定の精度との関連性はない。

² ADRA による予測は、IATA の枠組みの中で、また、段落 13 および段落 14 の条項に従って検討すること。

28. UV 検出器または FL 検出器のいずれかを用いて共溶出を認めた場合は、共溶出を認めなかつた方の検出器で測定した減少値を用いる（図 1 参照）。両方の検出器で共溶出を認めた場合、被験物質と NAC または NAL の溶出時間が分離するように HPLC の設定をわずかに調整することにより、共溶出を解消できる。別の HPLC 設定を用いて共溶出の解消に取り組む場合、その設定が検証済みの設定と同等であることを、望ましくは、付録 II、補遺 2 の習熟度評価用の物質の試験により示す必要がある。共溶出が生じると、NAC または NAL のピーク面積を正確に求められず、NAC または NAL の減少率の算出が妨げられる。被験物質の共溶出が、NAC および NAL の双方に生じ、溶出時間の分離ができない場合、分析結果では「結論が得られない」とする。共溶出が NAL にのみ生じ、溶出時間の分離ができない場合、NAC のみの予測モデル（表 2 参照）を用いて予測を行う。この場合、ADRA-UV の NAC データを、ADRA-FL の NAC データよりも優先的に採用する。感作性物質および非感作性物質を最も適切に予測できるように、2 クラス分類モデルを用いて NAC の減少率に対するカットオフ値 5.6%を設定した。

表 2 : NAC のみの予測モデル¹

| NAC の減少率の平均値 | ADRA による予測 ² |
|--------------|-------------------------|
| 5.6%未満 | 陰性 |
| 5.6%以上 | 陽性 |

¹ 表の数値は統計的に算出された閾値であり、測定の精度との関連性はない。

² ADRA による予測は、IATA の枠組みの中で検討すること (13) (14)。

29. 結果に疑問の余地がない場合、被験物質に対して NAC および NAL の双方について HPLC 分析を 1 回行えば十分である。ただし、陽性結果と陰性結果との識別に用いられる閾値に近い結果（すなわち、NAC/NAL の予測モデルで 3% から 10% までであるか、または、NAC のみの予測モデルで NAC の減少率が 4% から 11% まで）である場合、追加の分析が推奨される。ここに挙げる範囲における陰性結果の場合は特に（NAC/NAL の予測モデルで 3% から 4.9% であるか、NAC のみの予測モデルで 4% から 5.6%）、2 回目の分析を行い、1 回目と 2 回目で結果が一致しない場合には、3 回目の分析を行う。このような場合、3 回の試験結果の大部分を採用する。

試験報告書

30. 試験報告書には以下の情報を含める：

被験物質および対照（陽性対照および溶媒／媒体）

- 単一成分物質すべて（被験物質および対照物質）
 - IUPAC または CAS 名、CAS 番号、SMILES または InChI コード、構造式および／またはその他の識別子などの化学的識別情報
 - 物理的状態、外観、水溶解度、分子量および入手可能な範囲のその他の関連する物理化学的性質
 - 純度、該当する場合で現実的に可能であれば不純物の化学的識別情報など
 - 該当する場合は、試験の前処理（加温、粉碎）
 - 試験濃度
 - 入手可能な範囲の保存条件および安定性
- 多成分物質、UVCB 物質、混合物
 - 入手可能な範囲の成分の化学的識別情報（上記参照）、純度、定量的組成および関連のある物理化学的性質（上記参照）による特性
 - 外観、水溶解度、および入手可能なその他の関連する物理化学的性質
 - 既知組成の混合物またはポリマーの分子量（または見かけ上の分子量）、または試験に関連するそれ以外の情報

- 該当する場合は、試験の前処理（加温、粉碎）
- 試験濃度
- 入手可能な範囲の保存条件および安定性
- 陽性対照に対する追加の情報
 - 該当する場合、適切な実施許容基準を示す陽性対照結果の背景データ
- 溶媒／媒体対照に対する追加の情報
 - 該当する場合、使用する溶媒およびその成分の比率
 - 各被験物質に対する溶媒選択の妥当性
 - アセトニトリルを用いる場合は、NAC および NAL に対する影響

NAC および NAL、陽性対照、被験物質溶液の調製

- NAC 溶液および NAL 溶液の特性（供給元、ロット、NAC および NAL の正確な重量、原液に添加した量）
- 陽性対照溶液の特性（陽性対照試薬の正確な重量、対照溶液に添加した量）
- 被験物質溶液の特性（被験物質の正確な重量、被験物質溶液に添加した量）

HPLC 機器の設定および分析

- HPLC 機器、HPLC カラムおよびガードカラム、UV または FL 検出器、オートサンプラーの種類
- HPLC 分析に関するパラメータ：カラム温度、注入量、流速、グラジエントなど

システムの適合性

- 標準物質および基準対照 A の反復測定ごとの OD 281 nm (UV 検出器) または Ex/Em 284/333 nm (FL 検出器) における NAC および NAL のピーク面積

- 線形検量線のグラフおよび決定係数 (R²)
- 基準対照 A の反復測定ごとの NAC および NAL の濃度
- 基準対照 A の 3 例の NAC および NAL 濃度 (μM) の平均値、SD、CV
- 基準対照 A および C の NAC および NAL 濃度

分析シーケンス

- 基準対照について
 - 基準対照 B および C の反復測定ごとの OD 281 nm (UV 検出器) または Ex/Em 284/333 nm (FL 検出器) における NAC および NAL のピーク面積
 - アセトニトリル中の基準対照 B および C 9 例について、OD 281 nm (UV 検出器) または Ex/Em 284/333 nm (FL 検出器) における NAC および NAL のピーク面積の平均値、SD、CV (基準対照の分析中の経時的安定性の検討のため)
 - 用いた各溶媒について、3 例の適切な基準対照 C の OD 281 nm (UV 検出器) または Ex/Em 284/333 nm (FL 検出器) における NAC および NAL のピーク面積の平均値 (NAC および NAL 減少率算出のため)
 - 用いた各溶媒について、3 例の適切な基準対照 C の NAC および NAL 濃度 (μM)
 - 用いた各溶媒について、3 例の適切な基準対照 C の NAC および NAL 濃度 (μM) の平均値、SD、CV
- 陽性対照について
 - 反復測定ごとの OD 281 nm (UV 検出器) または Ex/Em 284/333 nm (FL 検出器) における NAC および NAL のピーク面積
 - 反復測定ごとの NAC および NAL の減少率
 - 3 回の反復測定での NAC および NAL の減少率の平均値、SD、CV
- 各被験物質について

- 認められる場合、インキュベーション時間終了時における反応混合物の沈殿物の外観沈殿物の再度可溶化や遠心分離の有無
- 共溶出の存在
- 該当する場合、それ以外の観察結果の記述
- 反復測定ごとの OD 281 nm (UV 検出器) または Ex/Em 284/333 nm (FL 検出器) における NAC および NAL のピーク面積
- 反復測定ごとの NAC および NAL の減少率
- 3 回の反復測定での NAC および NAL の減少率の平均値、SD、CV
- NAC の減少率と NAL の減少率の平均値
- 使用した予測モデルおよび ADRA による予測

習熟度評価の試験

- 試験法の日常的な実施前に、試験施設が試験法に習熟していることを習熟度確認化学物質試験によって実証した旨の記述

結果の考察

- 試験手順の予期しない変更があればその記述
- ADRA により得られた結果の考察と、それが段落 29 に記載された範囲内であるかどうか。

結論

付録 II の参考文献

- (1) Fujita M, Yamamoto Y, Tahara H, Kasahara T, Jimbo Y and Hioki T (2014), Development of a prediction method for skin sensitisation using novel cysteine and lysine derivatives, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 70:94-105. DOI: 10.1016/j.vascn.2014.06.001.
- (2) Yamamoto Y, Tahara H, Usami R, Kasahara T, Jimbo Y, Hioki T and Fujita M (2015), A novel *in chemico* method to detect skin sensitizers in highly diluted reaction conditions, *Journal of Applied Toxicology*, 35:1348-60. DOI: 10.1002/jat.3139.
- (3) Fujita M, Yamamoto Y, Watanabe S, Sugawara T, Wakabayashi K, Tahara K, Horie N, Fujimoto K, Kusakari K, Kurokawa Y, Kawakami T, Kojima K, Kojima H, Ono A, Katsuoka Y, Tanabe H, Yokoyama H and Kasahara T (2019), Cause of and Countermeasures for Oxidation of the Cysteine-Derived Reagent Used in the Amino acid Derivative Reactivity Assay, *Journal of Applied Toxicology*, 39:191-208. DOI: 10.1002/jat.3707.
- (4) Fujita M, Yamamoto Y, Watanabe S, Sugawara T, Wakabayashi K, Tahara Y, Horie N, Fujimoto K, Kusakari K, Kurokawa Y, Kawakami T, Kojima K, Sozu T, Nakayama T, Kusao T, Richmond J, Kleinstreuer N, Kim BH, Kojima H, Kasahara T and Ono A (2019), The within- and between-laboratory reproducibility and predictive capacity of the *in chemico* Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA): Results of validation study implemented in four participating laboratories, *Journal of Applied Toxicology*, 39: 1492-1505. DOI: 10.1002/jat.3834.
- (5) OECD (2022), Updated Validation report: Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA) – JaCVAM Validation Study Report. Series on testing and Assessment n° 304. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (6) OECD (2019), Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA) – Report of the Peer Review Panel. Series on testing and Assessment n° 305. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (7) Yamamoto Y, Fujita M, Wanibuchi S, Katsuoka Y, Ono A and Kasahara T (2019), Expanding the applicability of the Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA): Determining a weight concentration for preparation of test chemical solutions that yields a predictive capacity identical to the conventional method using molar concentration and demonstrating the capacity to detect sensitizers in liquid mixtures. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 97: 67-79. DOI: 10.1016/j.vascn.2019.01.001
- (8) Imamura M, Wanibuchi S, Yamamoto Y, Kojima H, Ono A, Kasahara T and Fujita M (2021), Improving predictive capacity of the Amino acid Derivative Reactivity Assay test method for skin sensitisation potential with an optimal molar concentration of test chemical solution. *Journal of Applied Toxicology*, 41: 303-329. DOI: 10.1002/jat.4082.
- (9) Yamamoto Y, Watanabe S, Yamaga H, Yoshida K, Wakabayashi K, Tahara Y, Horie N, Fujimoto K, Takeuchi K, Kamiya K, Kojima K, Kawakami T, Sozu T, Wanibuchi S, Fujita M, Kasahara T, Ono, A

- and Kojima H (2022), Within- and between-laboratory reproducibility and predictive capacity of amino acid derivative reactivity assay (ADRA) using a 0.5 mg/ml test chemical solution: Results of the study for reproducibility confirmation implemented in five participating laboratories. *Journal of Applied Toxicology*, DOI: 10.1002/jat.4279. Epub ahead of print.
- (10) Fujita M, Yamamoto Y, Watanabe S, Yamaga H, Yoshida K, Wakabayashi K, Tahara Y, Horie N, Fujimoto K, Takeuchi K, Kamiya K, Kojima K, Kawakami T, Sozu T, Wanibuchi S, Kasahara T, Ono, A and Kojima H (2022), The within- and between-laboratories reproducibility and predictive capacity of Amino acid Derivative Reactivity Assay using 4 mM test chemical solution: Results of ring study implemented at five participating laboratories. *Journal of Applied Toxicology*, 42: 318-333. DOI: 10.1002/jat.4268.
- (11) Fujita M, Yamamoto Y, Wanibuchi S, Katsuoka Y and Kasahara T (2019), A Newly Developed Means of HPLC-Fluorescence Analysis for Predicting the Skin Sensitisation Potential of Multi-Constituent Substances Using ADRA. *Toxicology In Vitro*, 59, 161-178. DOI: 10.1016/j.tiv.2019.04.014.
- (12) Wanibuchi S, Yamamoto Y, Sato A, Kasahara T and Fujita M (2019), The amino acid derivative reactivity assay with fluorescence detection and its application to multi-constituent substances. *Journal of Toxicological Sciences*, 44: 821-832. DOI: 10.2131/jts.44.821.
- (13) Yamamoto Y, Fujita M, Wanibuchi S, Sato A, Akimoto M, Katsuoka Y, Ono A and Kasahara T (2019), Applicability of amino acid derivative reactivity assay for prediction of skin sensitisation by combining multiple alternative methods to evaluate key events. *Journal of Toxicological Sciences*, 44: 585-600. DOI: 10.2131/jts.44.585.
- (14) Imamura M, Yamamoto Y, Fujita M, Wanibuchi S, Nakashima N, Kojima H, Ono A and Kasahara T (2022), Applicability of ADRA (4mM) for prediction of skin sensitisation by combining multiple alternative methods to evaluate Key events. *Journal of Applied Toxicology*, DOI: 10.1002/jat.4283. Epub ahead of print.
- (15) Fujita M, Yamamoto Y, Wanibuchi S, Katsuoka Y and Kasahara T (2019), The underlying factors that explain why nucleophilic reagents rarely co-elute with test chemicals in the ADRA. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 96: 95-105. DOI: 10.1016/j.vascn.2019.02.004.
- (16) Yamamoto Y, Wanibuchi S, Sato A, Kasahara T and Fujita M (2019), Precipitation of test chemicals in reaction solutions used in the amino acid derivative reactivity assay and the direct peptide reactivity assay. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 100: 106624. DOI: 10.1016/j.vascn.2019.106624.
- (17) ADRA protocol: JaCVAM Statements. Available at: http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html
- (18) Tam JP, Wu CR, Liu W and Zhang JW (1991), Disulfide bond formation in peptides by dimethyl sulfoxide. Scope and applications. *Journal of the American Chemical Society*, 113, 6657–6662. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja00017a044>
- (19) Akimoto M, Yamamoto Y, Watanabe S, Yamaga H, Yoshida K, Wakabayashi K, Tahara Y, Horie N, Fujimoto K, Kusakari K, Kamiya K, Kojima K, Kawakami T, Kojima H, Ono A, Kasahara T and Fujita M

- (2020), Oxidation of a cysteine-derived nucleophilic reagent by dimethyl sulfoxide in the amino acid derivative reactivity assay. *J Appl Toxicol.*, 40: 843-854. DOI: 10.1002/jat.3948.
- (20) Natsch A, Ryan CA, Foertsch L, Emter R, Jaworska J, Gerberick F and Kern P (2013), A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitisation undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology*, 33: 1337-52, DOI:10.1002/jat.2868.
- (21) Gerberick GF, Vassalo JD, Foertsch LM, Price BB, Chaney JG and Lepoittevin J-P (2007), Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach, *Toxicological Sciences*, 97: 417-427. DOI: 10.1093/toxsci/kfm064.
- (22) Basketter DA, Scholes EW (1992), Comparison of the local lymph node assay with the guinea-pig maximization test for the detection of a range of contact allergens, *Food and Chemical Toxicology*, 30: 65-69.
- (23) ECETOC (2003), Contact sensitisation: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).
- (24) Strickland J, Truax J, Corvaro M, Settivari R, Henriquez J, McFadden J, Gullede T, Johnson V, Gehen S, Germolec D, Allen DG, Kleinstreuer N. Application of Defined Approaches for Skin Sensitization to Agrochemical Products. *Front Toxicol.* 2022 May 2;4:852856. doi: 10.3389/ftox.2022.852856. PMID: 35586187; PMCID: PMC9108145.

付録 II、補遺 1

アミノ酸誘導体結合性試験（ADRA）の既知の限界

以下の表に、ADRA の既知の限界の要約を示す。

| 物質クラス／妨害 | 考えられる過小評価または妨害の理由 | データの解釈 | 物質の例 |
|---|--|---|--|
| 金属および無機化合物 | 共有結合以外の機序によりタンパク質と反応することが知られている。 | 試験に用いてはならない。 | 硫酸ニッケル；7786-81-4 |
| プロハブテン | 皮膚感作性を生じるのに酵素による体内活性化を要する被験物質は、自動酸化により <i>in vivo</i> ／ヒト体内と同程度まで活性化される場合を除いて、本試験法では検出できない。しかし、これにあてはまるかどうかは通常、不明である。 | 偽陰性となる可能性がある。本試験法により得られた陰性結果は、IATA の枠組みの範囲内で、規定された限界に照らし、また他の情報源との関連において解釈すべきである。 | ジエチレントリアミン；111-40-0 (ヒト 1 A, LLNA n/a) |
| プレハブテン | 非生物変換によって感作性物質となる化学物質の報告例については、本試験法により正しく検出されているものもある。 | | リナロール；78-70-6 |
| UV 吸収 (OD 281 nm) または FL (Ex/Em 284/333 nm) を有し、NAC または NAL と同一の保持時間を有する（共溶出）被験物質 | 共溶出が生じると、NAC または NAL のピーク面積が正確に求められず、NAC または NAL の減少率の算出が不可能になる。 | このスペクトル領域の紫外線を吸収する物質は、概ね共役二重結合を有する物質に限られるから、共溶出の可能性は極めて低い。この範囲に FL を持つ物質は一般に、ナフタレン誘導体を含む多環芳香族化合物または複素多環式化合物に限られる。こうした被験物質の共溶出が、NAC および NAL の両者または NAC のみに生じた場合、分析結果では「結論が得られない」とし、別の HPLC 設定を用いることを検討すべきである（段落 28 参照）。共溶出が NAL にのみ生じる場合、表 2 の NAC のみの予測モデルを用いて予測を行うとよい。 | サフラナール；116-26-7 |
| 組成が不明の複雑な混合物、組成が不明または不定の物質、複雑な反応生成物または生体物質 | 4 mM の被験物質溶液を用いた ADRA は、被験物質と求核試薬のモル比を規定する必要があるが、0.5 mg/mL の被験物質溶液を用いた ADRA は、被験物質のモル比を規定する必要なしに、0.5 mg/mL の重量濃度で調製された被験物質の感作性を予測することができる。混合物が液体であり、溶媒（水、溶液液、抽出溶媒など）に溶解した混合成 | 植物エキスは NAC と反応する様々なポリフェノールを含有するため、植物エキスを高濃度で含有する溶液を ADRA を用いて評価すると、感作性物質と判断される可能性が高い。したがって、このような結果は、他のキーイベントに対する代替法を用いて得た結果や類似物質の <i>in vivo</i> での結果を参照して検討すること。 | n/a |

| | | |
|--|--|--|
| <p>分の総重量が不明な場合は、0.5 mg/mL の被験物質溶液を調製することは不可能であるため、ADRA を用いた感作性の評価を行うことはできない。</p> | | |
| 最終濃度 4 mM で適切な溶媒に溶解できない被験物質 | 十分な曝露が得られるかどうかわからない。 | n/a |
| | 混合物が液体であり、溶媒（水、溶解液、抽出溶媒など）に溶解した混合成分の総重量が不明な場合は、0.5 mg/mL の被験物質溶液を調製することは不可能であるため、ADRA で感作性を評価できない。 | ADRA の試験方法により、難溶性物質の試験が可能となる。本濃度において不溶の被験物質であっても、可溶化できる低濃度において試験が可能である。このような場合、陽性結果を用いて被験物質が皮膚感作性物質であると特定することができるが、陰性結果からは、反応性を欠くとの確定判断をすべきではない。 |
| 反応溶液中に沈殿する化学物質 | 十分な曝露が得られるかどうかわからない。 | ミリスチン酸イソプロピル CAS 番号 : 110-27-0 |
| NAC と共有結合しないが、その酸化（すなわち、NAC 二量体化）を促進する被験物質 | NAC の減少を過大評価する可能性があり、偽陽性の判定の可能性がある。 | HPLC (UV 検出器) で NAC 二量体の検出および定量が可能であると考えられることから、被験物質との反応および共有結合とは対照的に、酸化的二量体化によって NAC 試薬が減少したことを確認または除外できると考えられる。そのため、ADRA は被験物質の酸化作用による誤判定を防止することができる。しかし、NAC 二量体には蛍光がないため、ADRA-UV でしか検出できない。 |
| DMSO のみに溶解する被験物質 | DMSO は NAC の二量体化によって過大な NAC 減少を引き起こし、高いバッケグラウンド NAC 減少を生じる。 | DMSO 酸化剤 n/a |
| | | 被験物質溶液中の DMSO 含有量は 5%までとする。DMSO を用いる場合、被験物質を DMSO とアセトニトリル 1 : 20 の混合液 (5%DMSO-アセトニトリル) に可溶化させてみること。 |

付録 II、補遺 2

習熟度評価用の物質

In Chemico 皮膚感作性：アミノ酸誘導体結合性試験 (ADRA)

本試験法を日常的に用いるのに先立ち、表 1 に推奨されている習熟度評価用の 10 物質について、ADRA により期待される予測結果を正確に入手し、習熟度評価用の 10 物質中 8 物質について、それぞれの基準範囲内に収まる NAC および NAL 減少率の値入手することにより、実施施設の技術的習熟度を立証すること。ADRA の技術的習熟度を示す試験は、基本的に 4 mM による ADRA 試験である (10)。4 mM を用いた ADRA が、習熟度評価用物質によって習得されていることが証明されている場合、0.5 mg/mL を用いた ADRA の技術的習熟度の証明は免除される (9)。習熟度評価用のこれらの物質は、皮膚感作性の有害性について得られる反応の全範囲を示すため選択された。それ以外の選択基準は、これらの物質が市販品であること、高品質の *in vivo* 参照データおよび高品質の ADRA データが入手可能であること、ならびに、JaCVAM 主導によるバリデーション試験にこれらの物質が用いられて、導入成功が立証されていることからなる。

表 1. ADRA_4 mM の技術的習熟度実証用として推奨される化学物質

| 番号 | 被験物質 | CAS 番号 | 物理的状態 | 分子量 | <i>In vivo</i> における予測 ¹ | ADRA 4 mM による予測 ² | 減少率の範囲 | |
|----|-----------------------|------------|-------|--------|------------------------------------|------------------------------|------------------|------------------|
| | | | | | | | NAC ³ | NAL ³ |
| 1 | <i>p</i> -ベンゾキノン | 106-51-4 | 固体 | 108.09 | 感作性物質 (非常に強い) | 陽性 | 90-100 | 70-100 |
| 2 | ジフェニルシクロプロペノン | 886-38-4 | 固体 | 206.24 | 感作性物質 (非常に強い) | 陽性 | 50-90 | ≤ 10 |
| 3 | 2-メチル-2H-イソチアゾール-3-オン | 2682-20-4 | 固体 | 115.15 | 感作性物質 (強い) | 陽性 | 80-100 | ≤ 10 |
| 4 | 塩化パルミトイル | 112-67-4 | 液体 | 274.87 | 感作性物質 (中等度) | 陽性 | ≤ 40 | 70-100 |
| 5 | イミダゾリジニル尿素 | 39236-46-9 | 固体 | 388.29 | 感作性物質 (弱い) | 陽性 | 40-70 | ≤ 20 |
| 6 | ファルネソール | 19317-11-4 | 液体 | 220.35 | 感作性物質 (弱い) | 陽性 | 60-100 | 5-40 |
| 7 | グリセロール | 56-81-5 | 液体 | 92.09 | 非感作性物質 | 陰性 | ≤ 7 | ≤ 7 |
| 8 | イソプロパノール | 67-63-0 | 液体 | 60.10 | 非感作性物質 | 陰性 | ≤ 7 | ≤ 7 |
| 9 | イソフタル酸ジメチル | 1459-93-4 | 固体 | 194.19 | 非感作性物質 | 陰性 | ≤ 7 | ≤ 7 |
| 10 | プロピルパラベン | 94-13-3 | 固体 | 180.20 | 非感作性物質 | 陰性 | ≤ 7 | ≤ 7 |

¹ *In vivo* における有害性 (および強度) の予測結果は、LLNA データに基づく (20) (21) (22)。*In vivo* における強度は、ECETOC により提唱された基準を用いている (23)。

² ADRA による予測は、IATA の枠組みの中で、また、段落 3 および段落 5 の条項に従って検討すること。

³ 範囲は、独立した 5 つの施設により実施された 10 例以上の減少率の値に基づいて決められた。

付録 II、補遺 3

分析シーケンスの例

HPLC 分析の各試料の分析は、下記の順にて行うこと。より実際的な HPLC 分析シーケンスについては「HPLC 試料分析シーケンスの例」に示す表を参照のこと。

1. 校正標準および基準対照 A (N=3) の分析を開始する。
2. 共溶出対照については、標準溶液および基準対照 A の後に分析するのであれば、代わる代わる分析する必要はない。
3. 基準対照 B の分析は、試料、基準対照 C および陽性対照の分析前後に 3 回（計 6 回）行うこと。
4. 基準対照 C、陽性対照および被験物質溶液の分析を行う。（各試料の 1 セット目の反復分析後、2 セット目の反復分析をそれぞれ行う）。

| | |
|-------------|--|
| 校正標準および基準対照 | 標準物質 1 標準物質 2 標準物質 3 標準物質 4 標準物質 5 標準物質 6 希釈緩衝液 基準対照 A、反復 1 基準対照 A、反復 2 基準対照 A、反復 3 |
| 共溶出対照 | 被験物質 1 に対する共溶出対照 1 被験物質 2 に対する共溶出対照 2 |
| 基準対照 | 基準対照 B、反復 1 基準対照 B、反復 2 基準対照 B、反復 3 |
| 1 セット目の反復 | 基準対照 C、反復 1 陽性対照、反復 1 試料 1、反復 1 試料 2、反復 1 |
| 2 セット目の反復 | 基準対照 C、反復 2 陽性対照、反復 2 試料 1、反復 2 試料 2、反復 2 |
| 3 セット目の反復 | 基準対照 C、反復 3 陽性対照、反復 3 試料 1、反復 3 |

| | |
|------|---|
| | 試料 2、反復 3 |
| 基準対照 | 基準対照 B、反復 4 基準対照 B、反復 5 基準対照 B、反復 6 |

3 セットの基準対照（適切な溶媒に溶解した NAC または NAL）を分析シーケンスに含めること。

基準対照 A : HPLC システムの妥当性を検証するための対照。基準対照 A は、被験物質ではなく、アセトニトリル添加後の各検量線による NAC および NAL の濃度を検証するために用いる。

基準対照 B : 分析下での反応溶液の安定性を検証するための対照。基準対照 B は、分析開始時および分析終了時に、被験物質ではなく、アセトニトリル添加後の溶液の NAC/NAL の 3 つのピーク面積のそれぞれについて変動 (CV) を検証するために用いる。

基準対照 C : 各被験物質溶液の NAC/NAL の減少率を算出するための対照。NAC/NAL の減少率を算出するため、被験物質の代わりに溶媒添加後の 3 つの基準対照 C を測定する。基準対照 C は、被験物質の溶解に用いるすべての溶媒について調製する。

付録 III: *In Chemico* 皮膚感作性：反応速度論的ペプチド結合性試験 (kinetic Direct Peptide Reactivity Assay : kDPRA)

最初に考慮すべき事項、適用および限界

1. kDPRA は、システインを含有する合成モデルペプチドに対する被験物質の反応性を時間依存的および濃度依存的に定量することにより、皮膚感作性の AOP である分子レベルのイニシアルイベント、すなわち、タンパク質の反応性を評価する (1) (2)。反応速度定数を算出し、被験物質の最大反応速度定数の対数 ($\log k_{\max}$ 値、単位 $s^{-1}M^{-1}$) を用いて、UN GHS サブカテゴリー1A の皮膚感作性物質（サブカテゴリー1A）を、サブカテゴリー1A に分類されないもの（非サブカテゴリー1A）、すなわち、UN GHS に基づくサブカテゴリー1B または区分なし（NC）から識別するのを支援する (3)。理論的考察に基づき、被験物質と皮膚タンパク質との反応の速度定数がわかれば、任意量の化学物質から生じるエピトープ量が決まり、逆に、感作誘導に必要なエピトープ量をもたらすのに必要な用量が決まることから、このようなものは律速段階や強度決定段階であるといえる。180 種類の化学物質を評価したときの経験的証拠に基づき、OECD 442C、442D および 442E で測定したすべての評価パラメータの中で、速度定数が最も強力な決定因子であることが示された (3)。
2. kDPRA は、実践的なトレーニングなしに、技術移管が可能であることが立証されている (4)。バリデーション試験で検討した 24 種類の被験物質について、UN GHS サブカテゴリー1A を割り当てる kDPRA の全体的な施設内再現性は 96%、平均施設間再現性は 88% であった (4)。kDPRA 適用可能とされる 180 の被験物質を対象とするバリデーション試験 (4) やその他の既報の研究結果は (3)、kDPRA が、UN GHS サブカテゴリー1A 皮膚感作性物質を、UN GHS に基づいてサブカテゴリー1A でないもの（非サブカテゴリー1A）から識別できることを示している。このとき、LLNA の結果と比較すると、バランス精確さ 85%、感度 84% (38/45)、特

異度 86% (116/135) であった (3)。kDPRA の結果を、皮膚感作性試験のための確定方式に関する試験ガイドライン (15) に沿ってまとめられた OECD LLNA データベースと比較したところ、似た性能が認められた⁴。また、ヒト皮膚感作データ (5) (6) のある 123 の被験物質 (180 のうち) の予測は、バランス精確さ 76%、感度 64% (21/33)、特異度 89% (80/90) (3) であった。ただし、ヒトでの参照データは不確定性が極めて高い⁵。さらに、動物を用いない皮膚感作性試験法を評価する場合、LLNA を始めとする動物試験結果は、検討対象の種、すなわちヒトにおける皮膚感作性を完全に反映しているとはいえないことに留意すべきである。ヒト感作性に対して kDPRA を評価するのに 123 の化学物質のデータセットに基づいて比較したところ、LLNA は、UN GHS サブカテゴリー1A の特定に関して、バランス精確さ 73%、感度 55% (18/33)、特異度 91% (82/90) を示した。入手可能なデータすべてに基づくと、kDPRA の適用領域には様々な有機官能基、反応メカニズム、(in vivo 試験により判定された) 皮膚感作性の強度および物理化学的性質が含まれることが示されている (3)。独立したピアレビュー (16) により、kDPRA は、UN GHS サブカテゴリー1A 皮膚感作性物質を、UN GHS (7) で 1A に区分されない皮膚感作性物質 (非サブカテゴリー1A) と識別することに関して、科学的に妥当であるとされた。したがって、kDPRA は、(i) UN GHS 区分 1 の皮膚感作性物質と同定された化学物質のサブカテゴリー分類に対するフォローアップ試験法として使用することができるほか、(ii) 規制の枠組みに応じて、陽性結果を使用して UN GHS サブカテゴリー1A に化学物質を直接分類するために、単独で使用することができる。

3. 本試験ガイドラインにおける「被験物質」という用語は、試験の対象となる物質のことであり、物質および／または混合物の試験に対する kDPRA の適用可能性とは無関係である。金属化合物の場合、共有結合以外の機序によりタンパク質と反応することが知られているため、本試験法は適用外となる。さらに、kDPRA はシステインペプチドとの反応性のみを測定するため、一部のアシルハロゲン化物、フェノールエステルまたはアルデヒドなど、リジン特異的反応性を有する強い感作性物質は、kDPRA の適用領域外である。しかし、リジン残基とのみ反応することが現在知られている UN GHS サブカテゴリー1A の皮膚感作性物質はごくわずかである。さらに、段階的戦略の中で、DPRA や ADRA で強いリジン特異的反応性を検討することによって、不確実性を減らすことができる。試験用ペプチドと共有結合せず、その酸化 (すなわち、システインの二量体化) を促進する被験物質の場合、ペプチドの減少を過

⁴ 皮膚感作性試験のための確定方式に関する試験ガイドライン (15) に沿ってまとめられた LLNA データセットと比較すると、バランス精確さ 85%、感度 82% (31/38)、特異度 88% (102/116) であった。

⁵ 皮膚感作性試験のための確定方式に関する試験ガイドライン (15) に沿ってまとめられたヒト皮膚感作性データセットと比較すると、バランス精確さ 67%、感度 53% (9/17)、特異度 81% (25/31) であった。

大評価する可能性があり、偽陽性の判定や、より高い反応性の分類に割り当てる可能性があると考えられる。この試験ガイドラインの付録に記載されている試験法は、代謝系を包含しない *in chemico* 試験法である。皮膚感作性を生じるのに酵素による生体内活性化を要する化学物質（すなわち、プロハブテン）の反応性は、本試験法では検出できない。しかし、強い感作性物質を特定する場合のプロハブテンの検出の限界は、弱い感作性物質を特定する場合と比較して、それほど顕著ではないことがわかった（3）。非生物変換によって感作性物質となる化学物質（すなわち、プレハブテン）の大半は、*in chemico* 試験法によって正しく検出されている（8）（9）。しかし、全体での反応速度が低下する酸化の lag-phase のために、自然に急速に酸化するプレハブテンは、kDPRA で（あらゆる *in vitro* 皮膚感作試験と同じく）過小予測される可能性がある。上記を踏まえ、本試験法により得られた、サブカテゴリー1A 分類にならない結果については、以下に記載する現在知られている限界に照らして解釈する必要がある（付録 III、補遺 1 参照）：

- 芳香族アミン、カテコールやヒドロキノンは、酸化条件下でも弱い反応性があることを確認するデータを必要とする場合がある。
 - DPRA や ADRA でリジン残基と特異的に反応するアシルハロゲン化物、フェノールエステルやアルデヒドは、その反応性が弱いことを確認するデータを必要とする場合がある。
4. 試験を実施するためには、被験物質は、最終濃度 20 mM で適切な溶媒に可溶でなければならない（段落 12～13 参照）。この濃度で不溶の被験物質は、 k_{max} 値（kDPRA で被験物質の反応速度から算出する最大速度定数 [単位 $s^{-1}M^{-1}$] [段落 24 参照]）が得られる限り、これより低濃度での試験も可能である。このような場合、陽性結果（すなわち、 $\log k_{max} \geq -2.0$ ）で UN GHS サブカテゴリー1A の皮膚感作性を予測することができるが、陰性の結果（すなわち、反応性なし、または $\log k_{max} < -2.0$ ）から確定判断をすべきではない。
 5. kDPRA は蛍光リードアウトを用いるが、被験物質の自家蛍光、蛍光クエンチングや、試薬（モノブロモビマン）との相互作用の可能性に注意する必要がある。特に、段落 16 に記載されているように、それぞれの被験物質対照を組み入れることと、求めたペプチド減少率のインキュベーション時間依存性を評価することが重要である。さらに、1 級 SH 基を持つ被験物質（チオール）は、チオール基がモノブロモビマンと相互作用し（段落 8 参照）、蛍光を増強する場合があるため、kDPRA によって試験することができない。最後に、本試験条件下（中性、水性条件）で分解する化学物質や、遊離 SH 基を放出する化学物質は、同じ限界を生じやすい。
 6. kDPRA は、既知組成の多成分物質および混合物の試験に、技術的に適用可能であるとみなされる。ただし、バリデーション試験ではこのような物質は検討されていない。このような場合、その成分（水を除く）の割合を合計することにより単一純度を算出し、見かけ上の単一分子量を、混合物の各構成成分（水を除く）の分子量とその割合を考慮して算出する。次に、

得られた純度および見かけ上の分子量を用いて、20 mM 溶液の調製に必要な被験物質の重量を算出する。既知組成の混合物および多成分物質で得た結果が、非線形挙動となる可能性があるため、段落 27 の(ii)に記載した条項を使用する。このモデルはモル比がわかっている必要があることから、組成が不明または不定の混合物や物質、複雑な反応生成物または生体物質（すなわち UVCB 物質）に、このモデルを用いることはできない。混合物、試験困難化合物（不安定など）、本ガイドラインに記載されている適用領域に収まることが明確でない被験物質の試験を検討する場合はいずれも、そのような試験で科学的に意味のある結果が生じるかどうかを事前に考慮する必要がある。最終的に、特定の区分に属す化学物質に本試験法を適用できない証拠が示され得る場合、本試験法は、そのような区分に属す化学物質に用いるべきではない。

7. kDPRA は、UN GHS (3)に基づいて、UN GHS サブカテゴリー1A の皮膚感作性物質とサブカテゴリー1A に分類されない物質（非サブカテゴリー1A）との識別に用いることができる。キーイベントに基づく他の試験法と同じく、DPRA や ADRA などの他の試験法と併用する際には、皮膚感作性の一層包括的な解析に向けた IATA や DA などの統合的アプローチの範囲内で、KDPRA の性能をさらに評価する必要がある (3) (10)。

試験の概要

8. kDPRA は、*in chemico* 試験法 DPRA（本試験ガイドラインの付録IIに記載）の修正法である。kDPRA は、DPRA でも用いるシステインペプチド (Ac-RFAACAA-COOH) を使用するが、リジン含有ペプチドは使用しない。試験ペプチドの最終濃度 (0.5 mM) および反応溶液 (リン酸緩衝液中 25% アセトニトリル) は、kDPRA と DPRA で同じである。DPRA は、被験物質を 1 種類の濃度 (システインペプチドについては 5 mM) で、1 時点 (24 時間以上) に測定するのに対して、kDPRA は、5 種類の濃度 (5、2.5、1.25、0.625 および 0.3125 mM) で並列反応を実施し、25±2.5°C で 6 時点 (10、30、90、150、210 および 1440 分) に測定する。各反応時間後のシステインペプチドの残存濃度を、モノブロモビマン (mBrB ; CAS 番号 74235-78-2) を加えて反応を停止させた後に測定する。反応性が高く非蛍光性の mBrB は、モデルペプチドの結合していないシステイン部分と速やかに反応して蛍光複合体を形成し、これを測定することによって残存ペプチド濃度を定量する。最高濃度の減少率が閾値 13.89% (システインのみの予測モデルにおける DPRA 試験陽性に用いるカットオフ値) を超え、この減少率がペプチドのみを含む対照と比較して統計学的に有意である場合は、さらに計算を行う（そうでない場合、被験物質を、段落 28 に示す予測モデルに従って、反応性なしとみなす）。各時点での残存ペプチド濃度の自然対数と被験物質の濃度とのグラフを描く。直線関係が認められる場合 (相関係数 > 0.90)、この曲線の傾きを求め、インキュベーション時間で割って単位 [$\text{min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$] で表される速度定数を算出する。この値を [$\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$] で表される速度定数に換算し、対数を求める。任意の時点で観察された最大値を $\log k_{\max}$ とし、この最大

速度定数を試験の第一のリードアウトとする。これによって、被験物質と試験ペプチドとの反応の最大反応速度を定量化することができる。次に、システインペプチド減少の反応速度を用いて、UN GHSに基づき、UN GHS サブカテゴリー1A の皮膚感作性物質と 1A に分類されない（非サブカテゴリー1A）皮膚感作性物質とを識別する。 $\log k_{max} \geq -2.0$ の化学物質は、UN GHS サブカテゴリー1A と予測できる。この反応速度定数を、リスク評価時に連続尺度で被験物質の皮膚感作性の強度を評価するために、ATA や DA などの統合的アプローチにさらに利用できると考えられる (3) (10)。

9. 本試験法を日常的に用いるのに先立ち、実施施設は、この付録の補遺 2 に収載された習熟度評価用の 9 物質を用いて技術的習熟度を立証すること。

手順

10. 本試験法は、企業主導で行われたバリデーション試験に用いるプロトコルである、kDPRA DB-ALM プロトコル番号 217 (11) に基づいている。実施施設において本試験法を導入し使用する場合、本プロトコルを用いることが推奨される。kDPRA の主要な構成要素および手順について以下に記す。

システインペプチドの調製

11. 純度 95%以上のシステイン含有合成ペプチド (Ac-RFAACAA-COOH) の原液を、被験物質とのインキュベーションの直前に新たに調製する。システイン含有ペプチドの最終濃度は、アセトニトリルに溶解する被験物質の場合は pH 7.5 のリン酸緩衝液を用いて 0.667 mM とし、pH 7.5 のリン酸緩衝液に溶解する被験物質の場合は 1.0 mM とする。

被験物質の調製

12. 試験実施前に、適切な溶媒に対する被験物質の溶解性を評価する。被験物質を完全に溶解できる、非反応性の水混和性溶媒を用いる。目視により溶解性を確認する。このとき、清澄な溶液であれば、被験物質が溶解していると考えてよい。溶媒はアセトニトリルが望ましい。アセトニトリルに溶解しない場合は、pH 7.5 のリン酸緩衝液での溶解性を評価する。それ以外の溶媒については試験を行っていないが、試験に干渉しないことが示された場合は使用してもよい。具体的には、すべての対照を同じ溶媒を用いて調製し、陽性対照および習熟度確認用化学物質について得られた反応速度がそれぞれ、この付録の段落 26 および補遺 2 に記載された範囲内にある場合である。なお、DMSO はペプチドニ量体化を生じる可能性があるため、溶媒としての使用は避けるべきである。

13. 被験物質はガラスバイアル中で予め重量を測定し、試験の直前に、段落 12 に記載した通りの適切な溶媒に溶解して 20 mM 溶液を調製する。被験物質の希釈液を、20、10、5、2.5 および 1.25 mM の濃度となるよう段階希釈により調製する。

対照の調製

14. 陽性対照 (positive control : PC) として、シンナムアルデヒド (CAS 番号 : 104-55-2、食品グレード純度 95%以上) を用いる。これを、試験直前に、アセトニトリルに 20 mM の濃度で溶解する。次に、PC 濃度 20、10、5、2.5 および 1.25 mM となるように段階希釈液を調製する。この試験では他の陽性対照の使用は推奨されない。その理由は、この試験では正確な反応速度を測定するほか、この陽性対照の一貫した使用によって、施設内既存対照としてのバリデーション試験データを用いて施設間の定量比較が可能になることによる。
15. 陰性対照である溶媒対照 (VC) は、緩衝液や溶媒に溶解したペプチドを含むが、被験物質も PC も含まない。被験物質または PC とインキュベートした試料のペプチド減少率を、それぞれの VC と比較して算出する。
16. この試験には、溶媒および緩衝液中に各種濃度の被験物質を含むがペプチドを含まない被験物質対照も組み込む。この一連の対照を、蛍光測定（自動蛍光およびクエンチング）に関する被験物質の妨害を特定するために使用する。これにより、モノブロモビマンによる影響を評価するほか、バックグラウンド測定とすることができる。
17. ブランク対照 (BC) をバックグラウンド測定値として使用する。これは、溶媒および緩衝液を含むが、被験物質、PC、ペプチドなしで調製する。

被験物質とシステイン含有ペプチド溶液のインキュベーション

18. 被験物質および PC の段階希釈液を、アプリケーションプレートと呼ぶ 96 ウエルマイクロタイプレートで調製する。さらに、kDPRA プロトコルで推奨されているように、事前に定めたプレートレイアウトに従ってしかるべき試薬（ペプチド原液、溶媒、緩衝液）を加えることによって、曝露時間ごとに 96 ウエル黒色アッセイプレート（アッセイプレートと呼ぶ）1 枚を調製する (11)。被験物質濃度あたり 3 回ずつ繰り返し分析する。アプリケーションプレートから被験物質希釈液および PC 希釈液をアッセイプレートに添加して反応を開始する。被験物質の水溶性が低く、被験物質溶液を試験用ペプチド溶液に添加した直後に沈殿物が認められた場合、どの程度の量の被験物質が試験用ペプチドとの反応のため溶液中に残されているのか明確でない。このような場合、陽性結果 ($\log k_{max} \geq -2.0$) は受け入れられるが、陰性結果（反応性なし、または $\log k_{max} < -2.0$ ）は相当の注意を払って解釈すべきである（kDPRA で濃度 20 mM でも不溶の化学物質の試験については、段落 4 の条項も参照）。被験物質および PC を添加した後、プレートを気密粘着ホイルで密封し、200 rpm 以上で 5 分間

振とうする。アッセイプレートの溶液を、暗所、 $25 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ でそれぞれのインキュベート（曝露）時間にわたってインキュベートする。具体的には、mBrB 溶液を添加する前の 10、30、90、150、210、1440 分である。各化学物質に最も適した時点を検討するために、インキュベーション時間を改変してもよい（例えば、反応の速い化学物質では短いインキュベーション時間が適している）。ただし、DPRA のインキュベーション時間に相当する 1440 分は必ず検討する必要がある。インキュベーション（曝露）時間は、被験物質および PC の希釈液をアッセイプレートに添加してから mBrB を添加するまでの時間である。

蛍光測定

- 所望のインキュベーション（曝露）時間に達したら、新たに調製した mBrB 溶液（アセトニトリル中 3 mM）を、遮光下でアッセイプレート（曝露時間あたり 1 枚）のウェルに速やかに添加する。プレートを気密粘着ホイルで密封し、200 rpm 以上で 5 分間振とうする。390 nm の励起フィルターおよび 480 nm の発光フィルターを用いて蛍光強度を測定する。

データおよび報告

データの評価

- DB-ALM プロトコルには Excel の自動評価スプレッドシートが用意されており、データ評価に使用する。詳細な説明が DB-ALM プロトコル番号 217 (11) に記載されている。
- 各インキュベーション（曝露）時間「t」ごとに、以下のパラメータを算出する：
 - 12 のブランク対照（BC）の蛍光強度の算術平均および標準偏差
 - 12 の溶媒対照（VC）の蛍光強度の算術平均および標準偏差
 - BC の平均値を VC から差し引いて、補正 VC 値を求める。
 - それぞれの被験物質および PC の濃度について、得られた値からそれぞれの被験物質対照値を差し引いて、補正被験物質値ないし補正 PC 値を求める。
- 各被験物質濃度ごとに、曝露時間別の相対的ペプチド減少率（%）を求めるために、以下の計算を実施する：

$$\text{相対的ペプチド減少率} [\%] = \left[1 - \left(\frac{\text{補正被験物質値または補正 PC 値}}{\text{補正 VC 平均値}} \right) \right] \times 100\%$$

- 被験物質の各濃度について、3 回反復測定値の算術平均および標準偏差を求める（曝露時間

ごと）。スチューデントのt検定を実施して、この3回反復測定したペプチド濃度が12のVCウェル中の濃度より統計的に有意に低いかどうかを検討する。

24. kDPRAにおいて、(i) 任意の時間における最高被験物質濃度（最終被験物質濃度 5 mM）でペプチド減少率 13.89%以上を認め、(ii) VC との間に統計的有意差を認める場合に、反応速度定数を以下の説明の通りに算出する。この「陽性基準」は、本試験ガイドラインの付録 I に記載されている DPRA のシステインのみの予測モデルにおけるペプチド反応性の「陽性」基準に基づいている。陽性基準を満たさない場合、被験物質は、段落 28 に示す予測モデルに従って反応性なしとされる。

各時点での残存ペプチド濃度（100 - ペプチド減少率 [%]）の自然対数と被験物質の濃度とのグラフを描く。直線関係が認められる場合（相関係数 > 0.90）、この曲線の傾きを求める。この負の傾きの絶対値が、観測した反応速度定数である（擬一次速度定数 k_{observed} [単位 mM⁻¹]）。各曝露時間の k_{observed} 値から、濃度ごとおよびインキュベーション（曝露）時間「t」ごとの反応速度定数（ k_t ）が以下の通りに求まる：

$$k_t [M^{-1}s^{-1}] = k_{\text{observed}} \cdot \frac{1000}{60 \cdot t}$$

ここで、「t」は分で表した曝露時間である。直線関係が認められない場合（すなわち、相関係数が 0.90 未満）は、段落 27.ii の推奨に従う。

25. 相関係数が 0.90 超の場合、各曝露時間「t」について、常用対数値（ $\log k_t$ ）を算出し、最大値を $\log k_{\text{max}}$ として求める。

許容基準

26. 1回の測定は、次の基準を満たすことにより、妥当であるとみなされる。これらの基準の1つまたは複数を満たさない場合、測定を繰り返す。
- PC : 90 分での PC の $\log k$ ($\log k_{90 \text{ min}}$) が、次の範囲内でなければならない： -1.75 ~ -1.40 M⁻¹s⁻¹。反応性が統計的に有意でない場合などに $\log k_{90 \text{ min}}$ が得られない場合、150 分での値 ($\log k_{150 \text{ min}}$) を考慮に入れるとよく、これが -1.90 ~ -1.45 M⁻¹s⁻¹ の範囲内になければならない。
 - VC: 1 枚のプレートの 12 の VC 値の変動係数が、6 つの曝露時間のうち少なくとも 5 つの曝露時間で 12.5% 未満でなければならない。

27. 被験物質について得たデータをさらに評価し、結果に影響を及ぼす可能性のある条件を確認する：

- (i) 断続的経過：早期に著しいペプチド減少を認めるが、その後の時点には認めない場合、被験物質に固有の非線形反応または実験変動が考えられる。このような場合、測定を繰り返す。同じパターンが再現される場合、非線形の反応速度が証明され、早期に認めた速度定数を採用する。
- (ii) 非線形濃度反応：明らかな減少を認めるのに、濃度一反応関係が線形でないケースはあまりない。このような場合、回帰係数 $R^2 < 0.90$ であるため、速度定数は勾配法で算出されない。代わりに、速度定数を、以下の式に従って個々の減少率に基づいて算出することもできる：

$$k = [\ln(100/(100 - dp))]/(E \times t)$$

ここで、「dp」は%で表される減少率、「E」は被験物質濃度、「t」はインキュベーション（曝露）時間である。この式に基づく速度定数は、閾値 13.89%超の減少率について、それぞれの時点「t」、濃度「E」で算出される。各時点「t」ごとに、各種濃度に対する平均値を求め、ここで再び、任意の時点の最高速度の $\log k_{\max}$ を記録する。

このような場合、試験を再度実施して、この非線形挙動が被験物質に固有のものか、それとも、実験変動によるものかを確認する必要がある。非線形性が再現される場合、個々の減少率に基づく上記の代替速度計算法を最終評価に使用する。

- (iii) 蛍光干渉、すなわち自家蛍光または蛍光クエンチング：試験ペプチドのない被験物質のみが入った対照ウェルに基づいて、被験物質による自家蛍光および蛍光クエンチングの発生を検出することができる。被験物質対照ウェルで記録された自家蛍光で値を補正する際に、自家蛍光が低い場合は問題とならない。しかし、自家蛍光が高い場合、ペプチド付加体の蛍光と自家蛍光とが完全に相加性でない可能性があり、自家蛍光を引き算すると、ペプチドシグナル減少によらない、非相加性を原因とする見かけ上の減少が生じる可能性がある。したがって、観察された減少が時間依存性であるかどうかを確認する必要がある。観察した減少が時間依存性でなく、自家蛍光を認めた場合は、自家蛍光による減少が起きていると考えられる。蛍光クエンチングも「偽の減少（pseudo-depletion）」をもたらす可能性があるものの、即時に起きるため、これによる減少は経時的に増加しないと考えられる。ここに挙げた2つの条件を満たす場合、蛍光クエンチングによる減少が起きていると考えられる。これが起きることはまれである。得られた結果から上記が明確でない場合、測定を繰り返すとよい。ただし、疑いの余地がない場合、繰り返しは不要である。このような場合、自家蛍光もクエンチングも生じない代替蛍光プローブで反応を測定できる場合を除いて、被験物質を kDPRA で評価してはならない（技術的限界）（DB-ALM プロトコル (11) の補遺 1 のセクション II 参照）。

- (iv) 上に挙げたケースはいずれも、DB-ALM プロトコルに詳しく記載されており、DB-ALM プロトコルに付属しているエクセルテンプレートに、データ評価時に自動アラートが表示される。

予測モデル

28. kDPRA は、UN GHS サブカテゴリー1A の皮膚感作性物質を、UN GHS に基づいて、サブカテゴリー1A でないもの（非サブカテゴリー1A）から識別するのに、システィンペプチド減少の反応速度を使用する (3)。この試験法で、サブカテゴリー1A に区分されない結果が得られた場合、この付録の段落 3 および補遺 1 に記載されている限界に照らして解釈する必要がある。

表 1 : kDPRA 予測モデル

| 反応速度 | kDPRA による予測 |
|----------------------------------|--|
| $\log k_{\max} \geq -2.0$ | UN GHS サブカテゴリー1A |
| 反応性なし、または $\log k_{\max} < -2.0$ | UN GHS サブカテゴリー1A に区分されない (非サブカテゴリー1A) |

* UN GHS サブカテゴリー1B を UN GHS 区分なしと識別するためには、さらに情報が必要である。枠組み（例：IATA、DA）によっては、kDPRA 実施に関わらず、この情報を得ることができる。

29. kDPRA の $\log k_{\max}$ の結果が閾値 -2.0 に近く、境界域（すなわち、-1.93～-2.06 (12)）にある場合、決定的な予測はできない。この場合、確定的な予測を行う前に、再試験ないし追加のデータ／情報が必要である。
30. この反応速度定数を、リスク評価時に連続尺度で被験物質の皮膚感作性の強度を評価するために、ATA や DA などの統合的アプローチにさらに利用できると考えられる (3) (10)。

試験報告書

31. 試験報告書には、以下の情報を含めること。

被験物質および対照（陽性対照および溶媒／媒体）

単一成分物質すべて（被験物質および対照物質）

IUPAC または CAS 名、CAS 番号、SMILES または InChI コード、構造式および／またはその他の識別子などの化学的識別情報

物理的状態、外観、水溶解度、分子量および入手可能な範囲のその他の関連する物理化学的性質

純度、該当する場合で現実的に可能であれば不純物の化学的識別情報など

該当する場合、試験の前処理（加温、粉碎など）

試験濃度

入手可能な範囲の保存条件および安定性

陽性対照に対する追加の情報

該当する場合、適切な実施許容基準を示す陽性対照結果の背景データ

溶媒／媒体対照に対する追加の情報

該当する場合、使用する溶媒／媒体およびその成分の比率

アセトニトリル以外の溶媒の選択の妥当性およびその溶媒がペプチド安定性に及ぼす影響の実験的評価の妥当性

ペプチド

供給元、ロット、純度

蛍光分析

使用する蛍光光度計（モデル、タイプなど）、波長設定を含む

習熟度評価の試験

試験法の日常的な実施前に、試験施設が試験法に習熟していることを習熟度確認化学物質試験によって実証した旨の記述

結果の考察

試験手順の予期しない変更があればその記述

KDPRAにより得られた結果の考察と、それが段落 29 に記載された範囲内であるかどうか。

沈殿物が再度可溶化されるか遠心分離した場合、インキュベーション時間終了時における反応混合物の沈殿物の外観など、関連する観察結果の記述。

結論

付録 III の参考文献

- (1) Wareing, B., Urbisch, D., Kolle, S. N., Honarvar, N., Sauer, U. G., Mehling, A. and Landsiedel, R., (2017) Prediction of skin sensitization potency sub-categories using peptide reactivity data. *Toxicol In Vitro* 45, 134-145.
- (2) Roberts, D. W. and Natsch, A., (2009) High throughput kinetic profiling approach for covalent binding to peptides: Application to skin sensitization potency of michael acceptor electrophiles. *Chem. Res. Toxicol.* 22, 592-603.
- (3) Natsch, A., Haupt, T., Wareing, B., Landsiedel, R., and Kolle, S.N., (2020) Predictivity of the kinetic direct peptide reactivity assay (kDPRA) for sensitizer potency as-sessment and subclassification. *ALTEX*, 37(4), 652-664
- (4) Wareing, B., Kolle, S.N., Birk, B., Alépée, N., Haupt, T., Kathawala, R., Kern, P., Nardelli, L., Raabe, H., Rucki, M., Ryan, C., Verkaart, S., Westerink, W., Landsiedel, R., Natsch, A., (2020) The kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (kDPRA): Intra- and inter-laboratory reproducibility in a seven-laboratory ring trial. *ALTEX*, 37(4), 639-651, DOI: 10.14573/altex.2004291.
- (5) Hoffmann S., Kleinstreuer N., Alépée N., Allen D., Api A. M., Ashikaga T., Clouet E., Cluzel M., Desprez B., Gellatly N., Goebel C., Kern P. S., Klaric M., Kühnl J., Lalko J. F., Martinuzzi-Teissier S., Mewes K., Miyazawa M., Parakhia R., van Vliet E., Zang Q., Petersohn D., Non-animal methods to predict skin sensitization (I): the Cosmetics Europe database. *Crit Rev Toxicol*, 2018. 48(5): p. 344-358.
- (6) Basketter, D. A., Alepee, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Gilmour, N., Goebel, C., Hibatallah, J., Hoffmann, S., Kern, P., Martinuzzi-Teissier, S., Maxwell, G., Reisinger, K., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M. and Templier, M., (2014) Categorization of chemicals according to their relative human skin sensitizing potency. *Dermatitis* 25, 11-21.
- (7) International ad hoc Expert Panel, (2020) Independent Peer-Review Panel Report on the scientific validity of the kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (kDPRA) as a modified version of the DPRA assay according to OECD TG 442C, to extend its regulatory applicability to identify UN GHS Subcategory 1A.
- (8) S. Casati, K. A., B.D. Asturiol, D. Basketter, S. Dimitrov, C. Dumont, A.T. Karlberg, J. P. Lepoittevin, G. Patlewicz, D. Roberts, A. Worth, (2016) Ability of non-animal methods for skin sensitisation to detect pre- and pro-haptens: Report and recommendations of an EURL ECVAM expert meeting. Available at: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100479>, last accessed 27.05.206.
- (9) Urbisch, D., Becker, M., Honarvar, N., Kolle, S. N., Mehling, A., Teubner, W., Wareing, B. and Landsiedel, R., (2016) Assessment of Pre- and Pro-haptens Using Nonanimal Test Methods for Skin Sensitization. *Chem. Res. Toxicol.* 29, 901-13.

- (10)Natsch, A., Emter, R., Gfeller, H., Haupt, T. and Ellis, G., (2015) Predicting Skin Sensitizer Potency Based on In Vitro Data from KeratinoSens and Kinetic Peptide Binding: Global Versus Domain-Based Assessment. *Toxicol. Sci.* 143, 319-32.
- (11)DB-ALM Protocol 217: The kinetic Direct Peptide Reactivity assay (kDPRA). Accessible at http://cidportal.jrc.ec.europa.eu/ftp/jrc-opendata/EURL-ECVAM/datasets/DBALM/LATEST/online/DBALM_docs/217_P_kDPRA_final_27Oct20.pdf.
- (12)Kolle, S., Mathea, M., Natsch, A., Landsiedel, R., (2021) Borderline ranges for in chemico and in vitro skin sensitization methods determined from ring trial data - acknowledging experimental uncertainty in defined approaches, *Toxicology Letters*, 350.
- (13)ICCVAM, ICCVAM Test Method Evaluation Report: Usefulness and Limitations of the Murine Local Lymph Node Assay for Potency Categorization of Chemicals Causing Allergic Contact Dermatitis in Humans. 2011. NIH Publication 11-7709.
- (14)ECETOC, ECETOC Document No. 46: Potency Values from the Local Lymph Node Assay: Application to Classification, Labelling and Risk Assessment. 2008.
- (15)OECD (2021), Validation report: Kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (kDPRA). Series on testing and Assessment n° 337 Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (16)OECD (2021), Independent Peer-Review Panel Report on the scientific validity of the kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (kDPRA). Series on testing and Assessment n° 338. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

付録 III、補遺 1

反応速度論的ペプチド結合性試験の既知の限界

以下の表に、kDPRA の既知の限界の要約を示す。

| 物質クラス／妨害 | 考えられる過小評価または妨害の理由 | データの解釈 | 物質の例 |
|--|---|---|---|
| 金属および無機化合物 | 共有結合以外の機序によりタンパク質と反応することが知られている。 | 試験に用いてはならない。 | 硫酸ニッケル；7786-81-4 |
| ヒドロキノン、カテコール、芳香族アミン | 酸化の lag time が見かけの反応速度を下げる可能性がある。 | $\log k_{max} < -2.0$ の結果は、酸化後に反応性が低いことを確認できる場合にのみ受け入れることができる。 | パラフェニレンジアミン；106-50-3；ヒトおよびLLNA 1A |
| チオールまたはチオール放出物質 | 1 級 SH 基を有する被験物質および試験条件下で分解する被験物質は、検出プローブと反応する可能性がある。 | チオール反応性プローブによる誘導体化を用いて、kDPRA で被験物質を試験することはできない。試験ペプチドを用いた他の反応速度論的データ (HPLC など) を生成する必要があると考えられる (本ガイドラインには含まれない)。 | チオグリセロール；96-27-5 試験；LLNA UN GHS 区分 1B；ヒト n/a |
| DPRA や ADRA にみられるような、リジン特異的反応性を有する被験物質 | kDPRA はシスティンペプチドとの反応性のみを測定する。 | DPRA や ADRA の SH 基ではなく NH ₂ 基を特異的に減じる化学物質の $\log k_{max} < -2.0$ の結果は確定的ではない。 | 一部のアシルハロゲン化物、フェノールエステルやアルデヒド、ジヒドロクマリン；119-84-6；LLNA UN GHS 区分 1B；ヒト n/a、グルタルアルデヒド；111-30-8 試験；ヒトおよび LLNA UN GHS 区分 1A |
| プロハプテン | 皮膚感作性を生じるのに酵素による厳密な生体内活性化を要するとの証拠がある被験物質 | 厳密なプロハプテンは過小評価される可能性がある。ただし、i) 厳密なプロハプテン (すなわち、被験物質が直接的なハプテンやブレハプテンとしても作用しない) や、ii) 強力なアレルゲンはまれであることがわかっている。 | ジエチレントリアミン；111-40-0 (ヒト 1A、LLNA UN GHS 区分 1) |
| 蛍光プローブの範囲内で励起される蛍光化学物質 | 被験物質の蛍光と mBrB ペプチド付加体の蛍光が相加的でない場合、偽の減少を認める。 | DB-ALM プロトコル番号 217 の考察に準拠して、試験干渉を評価する。 | テトラクロロサリチルアニリド；1154-59-2；ヒトおよび LLNA UN GHS 区分 1A |
| プローブの発光範囲で吸収 | 被験物質が mBrB-ペプチド付加体 | DB-ALM プロトコル番号 217 の考察に準拠して、試験干渉を評価する。 | バニリン、121-33- |

| | | | |
|---|--|---|--|
| する被験物質 | の蛍光発光をクエンチする場合、偽の減少を認める。 | 渉を評価する。 | 5 ; LLNA NC ; ヒト n/a |
| 組成が不明の混合物、組成が不明または不定の物質、複雑な反応生成物または生体物質 | 公表文献に、kDPRA の適用可能性に関する情報がない。 | n/a | UVCB、排出化学物質、組成が不定または完全に解明されていない製品または製剤 |
| 水、アセトニトリルまたは適合する水混和性溶媒に溶解できない被験物質 | 十分な曝露が得られるかどうかわからない。 | | n/a |
| | | このような場合、 $\log k_{max} > -2.0$ を用いて、被験物質が UN GHS サブカテゴリーアの皮膚感作性物質であるとの特定を支援することができるが、 $\log k_{max} < -2.0$ の場合は、確定判断をすべきではない。段落 12 の規定に基づいて、代わりの溶媒を使用することができる。 | |
| 反応溶液中に沈殿する被験物質 | 十分な曝露が得られるかどうかわからない：被験物質の水溶性が低く、被験物質溶液を試験用ペプチド溶液に添加した直後に沈殿物が認められた場合、どの程度の量の被験物質が試験用ペプチドとの反応のため溶液中に残されているのか明確でない。 | このような場合、陽性結果 ($\log k_{max} \geq -2.0$) は受け入れられるが、陰性結果 (反応性なし、または $\log k_{max} < -2.0$) は相当の注意を払って解釈すべきである (kDPRA で濃度 20 mM でも不溶の化学物質の試験については、段落 4 の条項も参照)。 | メチル-2-ノニノエート ⁶ ; 111-80-8 ; LLNA NC |
| システィンペプチドの酸化を促進する被験物質 | | ペプチド反応性を過大評価する可能性がある。 | DMSO |

⁶ Roberts, D.W. and A. Natsch, *High throughput kinetic profiling approach for covalent binding to peptides: Application to skin sensitization potency of michael acceptor electrophiles*. Chem. Res. Toxicol., 2009. **22**(3): p. 592-603

付録 III、補遺 2

習熟度評価用の物質

In Chemico 皮膚感作性：反応速度論的ペプチド結合性試験 (kinetic Direct Peptide Reactivity Assay : kDPRA)

この付録に記載された試験法を日常的に用いるのに先立ち、表 1 に推奨されている習熟度評価用の 9 物質中 8 物質以上について、kDPRA により期待される予測結果を正確に入手し、習熟度評価用の 9 物質中 7 物質について、それぞれの基準範囲内に収まるシステイン速度定数 $\log k_{max}$ を得ることにより、実施施設の技術的習熟度を立証すること。習熟度評価用のこれらの物質は、皮膚感作性の有害性や強度に関する反応の範囲を示すため選択された。それ以外の選択基準は、これらの物質が市販品であること、高品質の *in vivo* 参照データおよび kDPRA により生成された高品質の *in vitro* データが入手可能であること、ならびに、企業が主導したバリデーション試験にこれらの物質が用いられて、試験に参加した施設で試験導入成功が立証されていることからなる。

表 1：反応速度論的ペプチド結合性試験の技術的習熟度の立証に推奨される習熟度評価用の物質

| 習熟度評価用の物質 | CAS 番号 | 物理的状態 | <i>In vivo</i> における予測 ¹ | UN GHS 区分 LLNA | UN GHS 区分 ヒト | kDPRA による予測 ² | $\log k_{max}$ の範囲 ² |
|---------------------------|------------|-------|------------------------------------|-------------------|-------------------|--------------------------|---------------------------------|
| 2,4-ジニトロクロロベンゼン | 97-00-7 | 固体 | 感作性物質 (非常に強い) | 1A | 1A | 1A | (-0.8) – (-0.4) |
| メチルイソチアゾリノン | 2682-20-4 | 固体 | 感作性物質 (非常に強い) | 1A | 1A | 1A | (-0.5) – (-0.1) |
| オキサゾロン | 15646-46-5 | 固体 | 感作性物質 (非常に強い) | 1A | データなし | 1A | (-0.3) – (0.0) |
| メチル-2-オクチノエート | 111-12-6 | 液体 | 感作性物質 (強い) | 1A | 1A | 1A | (-1.6) – (-1.2) |
| イソオイゲノール | 97-54-1 | 液体 | 感作性物質 (中等度) | 1A | 1A | 1A | (-1.4) – (-1.1) |
| 2,3-ブタンジオン | 431-03-8 | 液体 | 感作性物質 (弱い) | 1B | データなし | 非 1A (1B または NC) | (-3.2) – (-2.1) |
| エチレングリコールジメタクリレート (EGDMA) | 97-90-5 | 液体 | 感作性物質 (弱い) | 1B | 1B | 非 1A (1B または NC) | (-2.8) – (-2.1) |
| 4-メトキシアセトフェノン | 100-06-1 | 固体 | 非感作性物質 | 区分なし ³ | 区分なし ³ | 非 1A (1B または NC) | 反応性なし |

| | | | | | | | |
|---------|----------|----|--------|-------------------|-------------------|------------------|-------|
| クロロベンゼン | 108-90-7 | 液体 | 非感作性物質 | 区分なし ³ | 区分なし ³ | 非 1A (1B または NC) | 反応性なし |
|---------|----------|----|--------|-------------------|-------------------|------------------|-------|

¹ *In vivo* における有害性（および強度）の予測結果は、LLNA データに基づく (13)。*In vivo* における強度は、ECETOC により提唱された基準を用いている (14)。

² 端数を四捨五入した範囲は、独立した 7 つの施設により実施された 14 以上の $\log k_{max}$ 測定値に基づいて決定した。

³ UN GHS では非感作性物質。