OECD/OCDE

2015/02/04

試験ガイドライン No.442C

In Chemico 皮膚感作性: ペプチド結合性試験 (DPRA)

ご利用に関する注意事項

本文書および本文書に掲載している翻訳は OECD による公式文書**ではありません。**本文書における翻訳と原文の間に用語ないし表現等の齟齬がある場合、**原文のみが有効とみなされます**。内容について疑義が生じた場合、もしくは研究に公的な認証を必要とする場合は、原文に準拠してください。

本翻訳を使用したことに起因する如何なる損害について、当所は一切責任を負いません。

This document and translation are NOT official work by OECD. In the event of any discrepancy between the original work and the translation, **only the text of the original work should be considered valid**. Refer to the original document when there is any doubt about the translation, or legal or official verification is needed for your study. NIHS takes no responsibility even if you get any damage by using this translation.

Original work:

OECD (2015), Test No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA), OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/topics/policy-sub-issues/testing-of-chemicals/previous-test-guidelines/section-4/replaced-test-guidelines/replaced-test-guideline-442C-2015.pdf.

©OECD(2015)

You are free to use this material subject to the terms and conditions available at http://www.oecd.org/termsandconditions/

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 Section 4 Health effects
邦訳: 国立医薬品食品衛生研究所(NIHS) 安全性予測評価部

2015 年 2 月 4 日採択

OECD の化学物質の試験に関するガイドライン

In Chemico 皮膚感作性：ペプチド結合性試験（DPRA）

はじめに

1. 皮膚感作性物質とは、国連勧告「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とおり、皮膚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。本試験ガイドライン（TG）は、UN GHS (1)に従い皮膚感作性物質と非感作性物質を識別するために用いられる *in chemico* 試験（ペプチド結合性試験：DPRA）について記したものである。

2. 皮膚感作性の原因となる主要な生物学的事象に関しては、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これまでの知識は、有害転帰経路（AOP）(2)の形式で要約され、分子レベルの初期事象（molecular initiating event）からその中間事象を通じ有害作用（すなわち、ヒトにおけるアレルギー性接触皮膚炎、またはげっ歯類における接触過敏症）に至るまでを含んでいる。皮膚感作性の AOP の中で、分子レベルの初期事象とは、皮膚内に存在する蛋白質の求核中心と求電子物質との共有結合のことである。

3. 皮膚感作性の評価には、通常、実験動物が使用されてきた。広く知られている Magnusson/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：TG 406 (3)）は、皮膚感作性の誘導相と惹起相の双方を評価する。マウスを用いる局所リンパ節試験（LLNA：TG 429 (4)）、ならびにその改変法で放射性同位元素を用いない LLNA：DA（TG 442A (5)）および LLNA：BrdU-ELISA（TG 442B (6)）は、すべて誘導相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定量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。

4. 最近では、化学物質に関する皮膚感作性の有害性を評価する場合、発症機序に基づく *in chemico* および *in vitro* 試験法が科学的に妥当であると考えらている。ただし、現時点で評価に使用できる動物を用いない各試験法は、AOP の一部しか確認できていないことから、現在用いられている動物試験の完全な置換には、試験および評価に関する統合的アプローチ

© OECD, (2015)

本資料は、個人的な非営利目的であれば、出典を適切に明記するという条件で、経済協力開発機構（OECD）に事前の承諾を得ることなく自由に使用してよい。本資料を商業的に利用する場合は、必ず OECD の書面による承諾を得なければならない。

（IATA）の中で、動物を用いない試験法（*in silico*、*in chemico*、*in vitro*）を組み合わせる必要があると考えられる(2) (7)。

5. DPRA は、リジンかシステインのいずれかを含有する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初期事象（すなわち、蛋白質の反応性）を評価する (8)。システインおよびリジン含有ペプチドの減少率が、皮膚感作性物質と非感作性物質の識別のために用いられ、被験物質を 4 段階に分けられた反応性の 1 つに分類する(9)。

6. DPRA 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）がなされ、有害性の分類および表示を目的に皮膚感作性物質と非感作性物質と識別のために IATA の一部として用いられることが科学的に妥当であると判断された(10)。DPRA データと他の情報との併用例は、文献(11) (12) (13) (14)に報告されている。

7. 用語の定義を補遺 1 に示す。

最初に考慮すべき事項、適用および限界

8. 蛋白質の反応性と潜在的な皮膚感作性の相関は、十分に確立されている(15) (16) (17)。それでも、皮膚感作性の AOP である分子レベルの初期事象が認められるとはいえ、蛋白結合は主要な事象の 1 つを表すにすぎないことから、試験を伴うか否かを問わず得られた蛋白質の反応性に関する情報は、それ自体で、化学物質の潜在的皮膚感作性を否定するのに十分とはいえない。したがって、本試験ガイドラインにより得られたデータは、他の補足情報（例えば、皮膚感作性の AOP である別の主要な事象を対象とした *in vitro* 試験の情報や、類似化学物質からの推定など試験を伴わない情報）と組み合わせ、IATA などの統合的アプローチに照らして検討すべきである。

9. 本試験ガイドライン記載の試験法を、他の補足情報と組み合わせて用いることにより、IATA に照らし皮膚感作性物質（すなわち、UN GHS におけるカテゴリー1）と非感作物質の識別ができる。本試験ガイドラインを単独で用いて、皮膚感作性物質を当局が UN GHS (1)で定義したサブカテゴリーである 1A および 1B に分類することはできず、安全性評価に際し、皮膚感作性の強さを予測することもできない。しかし、特定の規制の枠組みによっては、DPRA による陽性結果を単独で用いて、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。

10. DPRA 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。本試験法の再現性は、同一施設内では約 85%、複数の施設間では約 80%である(10)。バリデーション試験(18)および公表されている研究(19)において得られた結果を総合すると、LLNA の結果と比較した場合、DPRA による皮膚感作性物質（すなわち、UN GHS におけるカテゴリー1）と非感作性物質とを識別する正確度は 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 におけるサブカテゴリー1B）は、皮膚感作性の強度が高い（high）化学物質（すなわち、UN GHS におけるサブカテゴリー1A）に比べて予測能は低い(18) (19)。しかし、本試験法は、IATA に照らし、上記段落 9 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正確度の値は指標にすぎない。さらに、皮膚感作性の動物を用いない試験法を評価する場合、LLNA およびそれ以外の動物試験結果は、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。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、物理化学的特性の検討に適用できることが示された(8) (9) (10) (19)。総合すると、これら情報は、皮膚感作性の有害性の同定に、DPRA は有用であることを示している。

11. 「被験物質」という用語は、本試験ガイドラインで用いる場合、試験の対象となる物質のことをいい[1]、被験物質が単一の物質か混合物であるかは DPRA への適用を規定するものではない。金属化合物の場合、共有結合以外の機序により蛋白質と反応することが知られているため、本試験ガイドラインは適用外となる。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 18 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。このような例で、陽性結果の場合、その結果を用いて被験物質が皮膚感作性物質であると判定できるが、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は、現在入手可能な情報が限られている(18) (19)。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、技術的に適用可能であるとみなされる（段落 18 参照）。ある混合物について規制当局への提出を意図にデータを取得する場合、本試験ガイドラインを用いる前に、目的に合った適切な結果が示され得るか、また、示される場合その理由について検討する。当該混合物の試験の規制要件がある場合には、こうした検討は不要である。現在の予測モデルでは被験物質とペプチドのモル比を定義することから、組成が不明の複雑な混合物、および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（すなわち UVCB 物質）に本モデルを用いることはできない。そのため、重量測定法に基づく新たな予測モデルの開発が必要であると考えられる。他の特定のカテゴリーに属す

[1] 2013 年 6 月の合同会議において、可能な場合、新規および更新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直ちに行うべきであることが合意された。

化学物質に本試験ガイドラインが適用できない証拠が示され得る場合、本試験法は、そのようなカテゴリーに属す化学物質に用いるべきではない。

12. 本試験ガイドライン記載の試験法は、代謝系を包含しない *in chemico* 試験法である。皮膚感作性能を有するために、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。非生物的な変換後に感作性物質となる化学物質（すなわち、プレハプテン）は、一部の例において、本試験法により正しく検出されることが報告されている(18)。上記を踏まえ、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、定められた限界に照らし、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 29 および 30 参照）。

13. 記載のとおり、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 などの統合的アプローチの中で用いられる場合、感作性の強度の評価が可能な場合がある(11)。また一方、DPRA の結果のみで、感作性の強度の情報になり得るかを判断するには、望ましくはヒトデータに基づいたさらなる検討が求められる。

試験の概要

14. 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 25±2.5ºC 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、勾配溶出法による高速液体クロマトグラフィー（HPLC）と 220 nm における UV 検出により測定する。次に、システインおよびリジン含有ペプチド減少率の値を算出し、予測モデル（段落 29 参照）から、被験物質を、皮膚感作性物質と非感作性物質を識別するために用いられ、被験物質を 4 段階に分けられた反応性の 1 つに分類することができる。

15. 本試験ガイドライン記載の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。

試験手順

16. 本試験ガイドラインは、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 (20)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）立証できる。

システインまたはリジン含有ペプチドの調製

17. システイン（Ac-RFAA**C**AA-COOH）およびリジン（Ac-RFAA**K**AA-COOH）含有合成ペプチドの原液（純度 85%超、望ましくは 90～95%の範囲）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 0.667 mM とする。HPLC 解析時間を 30 時間未満にするため、HPLC の試験の順序を設定する。バリデーション試験に用いられ、本試験ガイドラインに記載されている HPLC の設定の場合、最大で 26 サンプル（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 回繰り返し測定）の解析が 1 回の HPLC の試験で可能になる。同一の試験時の反復測定では、同一のシステインおよびリジン含有ペプチドの原液を用いる。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

18. DPRA DB-ALM プロトコル(20)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。適切な溶媒では、被験物質が完全に溶解するはずである。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 混合液である。それ以外の溶媒については、基準対照 C（すなわち、適切な溶媒に溶解されたペプチドのみからなるサンプル、補遺 3 参照）によりモニターされる場合と同様に、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。これらの溶媒のいずれを試みても被験物質が不溶である場合、最後の選択肢として被験物質をジメチルスルホキシド（DMSO）300 µL に可溶化させ、得られた溶液をアセトニトリル 2700 µL により希釈し、また、この混合を試みても被験物質が不溶である場合、同一量の被験物質を DMSO 1500 µL に可溶化させ、得られた溶液をアセトニトリル 1500 µL により希釈する。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。既知組成の混合物および多成分物質の場合、単一の純度は、その成分（水を除く）の割合を合計することにより測定し、単一の見かけ上の分子量は、混合物の各構成成分（水を除く）個々の分子量およびその個々の割合を考慮の上測定する。次に、得られた純度および見かけ上の分子量を用いて、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。ただし、既知組成の混合物、多成分物質、またはポリマーの試験の場合、無希釈の被験物質で試験することも検討する。液体の場合、無希釈の被験物質は、システインおよびリジン含有ペプチドとそれぞれ 1：10 および 1：50 の比率でインキュベートすることにより、事前に希釈しない処置として試験する。固体の場合、被験物質は、使用される同一溶媒にその最大可溶濃度まで溶解させ、見かけ上の 100 mM 溶液を調製する。その後は、システインおよびリジン含有ペプチドとそれぞれ 1：10 および 1：50 の比率でインキュベートすることにより、さらなる希釈をしない処置として試験する。見かけ上の 100 mM 溶液と無希釈の被験物質との間で結果（反応の有無）が一致する場合、その結果については確定判断して良い。

陽性対照、基準対照、共溶出対照の調製

19. 陽性対照（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、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を得られれば、用いることができる。さらに、基準対照（すなわち、適切な溶媒に溶解された試験用ペプチドのみ含有するサンプル）も HPLC の実行試験に含め、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 26 参照）。加えて、解析される被験物質ごとに当該被験物質のみにより構成される共溶出対照を HPLC の実行試験に含め、当該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

20. 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においてインキュベートする。被験物質の水溶性が低いため、被験物質溶液を試験用ペプチド溶液に添加直後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にならない。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（最大で濃度 100 mM に不溶の被験物質については段落 11 の条項も参照）。反応溶液は 25±2.5ºC で 24±2 時間暗所に静置してから、HPLC 分析を行う。各被験物質は、双方のペプチドについて 3 回繰り返し検査する。サンプルは、HPLC 分析の前に目視確認しなければならない。沈殿物または相分離が認められる場合、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、サンプルを低速で遠心分離（100～400×*g*）し、沈殿物を

バイアルの底に沈殿させることを考慮する。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が認められれば、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

21. 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%アセトニトリル溶液中で調製する。緩衝液には、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）の連続的な希釈標準液を用いて、6 濃度の検量線用溶液を調製し、0.534～0.0167 mM の範囲を対象とする。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

22. 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紫外検出器）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。検証済みの DB-ALM プロトコルでは、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/分とし、線形勾配でアセトニトリルについて 10 分間に 10%から 25%、続いて他の物質を除去するためアセトニトリル濃度を 90%に急速に上昇させる。同量の標準物質、サンプル、対照をそれぞれ注入する。注入と注入の間、7 分間で初期条件下に再度平衡化する。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）示す必要がある。吸光度は 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。各サンプルについて、対照サンプルに対する面積比の平均値[2]が 90%超かつ 100%未満の範囲の比である場合、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。

[2] 平均値とは、本文書全体を通じ算術平均値を意味する。

23. 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し得る。二量体化したシステイン含有ペプチドのピークは、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、より高い反応性に分類される可能性があることに留意する（段落 29 および 30 参照）。

24. システインおよびリジン含有ペプチドの HPLC 分析は、同時（HPLC システムが 2 つ使用可能な場合）、またはそれぞれ別の日に実施できる。それぞれ別の日に分析を行う場合、双方の試験について各実施日に、すべての被験物質溶液を新たに調製する。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、分析時間を設定する。HPLC 分析時間を 30 時間未満にするため、HPLC の実行試験を設定する。バリデーション試験に用いられ、本試験ガイドラインに記載されている HPLC の設定の場合、最大で 26 サンプルの分析が 1 回の HPLC 試験で可能になる（段落 17 も参照）。HPLC による分析手順の一例を補遺 3 に示す。

データおよび報告

データの評価

25. 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、各サンプルを 220 nm で測光し、適切なピークのピーク面積（曲線下面積：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。

26. ペプチド減少率は、下記の式に従って、各サンプル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判定される。

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

許容基準

27. 1 回の試験は、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、最大標準偏差（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は 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（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、試験を繰り返す。

28. 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基準対照 C 3 例のペプチド濃度の平均値が 0.50±0.05 mM。これらの基準を満たさない場合、データは不採用とし、この特定の被験物質について試験を繰り返す。

予測モデル

29. システインの減少率およびリジンの減少率の平均値を、各被験物質について算出する。平均値を算出する場合、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が 6.38%を閾値に用い、IATA の枠組みの中で、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を分類（すなわち、低い、中程度、高い反応性）すると、おそらく IATA の枠組みの範囲内で、強度の評価に有用な情報を提供する場合がある。

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%	中程度	
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] DPRA による予測は、IATA の枠組みの中で、また、段落 9 および 12 の条項に従って検討すること。

30. 被験物質（特定の物質、または多成分物質の 1 つもしくは複数の構成成分、または混合物）によっては、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場合（共溶出）が考えられる。被験物質と試験用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、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、または極小	陰性
13.89%＜Cys の減少率≦23.09%	低い	陽性
23.09%＜Cys の減少率≦98.24%	中程度	
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、IATA の枠組みの中で、また、段落 9 および 12 の条項に従って検討すること。

31. それ以外に、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、ペプチド減少率の予測、およびシステイン 1：10／リジン 1：50 の予測モデルの使用は可能であるが、被験物質を反応性の強度の分類を正確に行うことはできない。

32. 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（すなわち、境界線上の結果）である場合、さらなる分析が必要な場合がある。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には 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。

試験報告書

33. 試験報告書には以下の情報を含める。

被験物質

- 単一成分物質
  - 化学的識別情報、例えば IUPAC または CAS 名、CAS 番号、SMILES または InChI コード、構造式やそれ以外の識別に有用な情報
  - 外観、水溶性、分子量、および入手可能なその他の関連する物理化学的性質
  - 純度、適切なデータが入手できるのであれば不純物の化学的同定など
  - 該当する場合、試験前の処理（例えば、加温、粉砕）
  - 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同定（上記参照）、純度、含有量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徴付け
- 外観、水溶性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
- 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上の分子量、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、試験前の処理（例えば、加温、粉砕）
- 試験濃度
- 入手可能な範囲の保存条件および安定性

対照物質

- 陽性対照
  - 化学的識別情報、例えば IUPAC または CAS 名、CAS 番号、SMILES または InChI コード、構造式やそれ以外の識別に有用な情報
  - 外観、水溶性、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、適切なデータが入手できるのであれば不純物の化学的同定など
  - 該当する場合、試験前の処理（例えば、加温、粉砕）
  - 試験濃度
  - 入手可能な範囲の保存条件および安定性
  - 入手可能な場合、適切な実行許容基準であることを示した既存陽性対照結果のヒストリカルデータ

- 溶媒／媒体
  - 該当する場合、使用する溶媒／媒体およびその成分の比率
  - 化学的識別情報、例えば IUPAC または CAS 名、CAS 番号やそれ以外の識別に有用な情報
  - 純度、適切なデータが入手できるのであれば不純物の化学的同定など
  - 本試験ガイドライン記載以外の溶媒／媒体を用いる場合、外観、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
  - 入手可能な範囲の保存条件および安定性
  - 各被験物質についての溶媒選択の妥当性
  - 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、陽性対照、被験物質の調製

- ペプチド溶液の特性（供給元、ロット、ペプチドの正確な重量、原液に添加された量）
- 陽性対照溶液の特性（陽性対照物質の正確な重量、被験溶液に添加された量）
- 被験物質溶液の特性（被験物質の正確な重量、被験溶液に添加された量）

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、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
- グラフにより表された線形検量線および報告された決定係数（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 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

分析データ

- 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。沈殿物が再度可溶化または遠心分離された場合の結果
  - 共溶出の存在
  - 該当する場合、それ以外に関連する観察結果の記述
  - 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

- 該当する場合、本試験法実施の際に（例えば、習熟度評価用の物質の試験により）実施施設の習熟度を立証、または本試験法の経時的な再現性の性能を立証するのに用いた手順

結果の考察

- DPRA により得られた結果の考察
- 他の関連情報が入手可能な場合、IATA に照らした DPRA の結果の考察

結論

参考文献

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Available at: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html

(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) OECD (1992). Skin Sensitisation. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 406, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(4) OECD (2010), The Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 429, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(5) OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay: DA. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442A, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(6) OECD (2010), Skin Sensitisation: BrdU-ELISA: DA. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442B, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(7) Adler *et al.* (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85:367-485.

(8) Gerberick *et al.* (2004). Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. Toxicological Sciences 81:332-343.

(9) Gerberick *et al.* (2007). Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. Toxicological Sciences 97:417-427.

(10) 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.

(11) 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.

(12) Bauch *et al.* (2012). Putting the parts together: combining in vitro methods to test for skin sensitizing potential. Regulatory Toxicology and Pharmacology 63: 489-504.

(13) Nukada *et al.* (2013). Data integration of non-animal tests for the development of a test battery

to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals. Toxicology In Vitro 27:609-618.

(14) Ball *et al* (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and in vitro methods in a weight-of-evidence approach. Regulatory Toxicology and Pharmacology 60:389-400.

(15) Landsteiner and Jacobs (1936). Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. Journal of Experimental Medicine 64:625-639.

(16) Dupuis and Benezra (1982). Allergic contact dermatitis to simple chemicals: a molecular approach. New York & Basel: Marcel Dekker Inc.

(17) Lepoittevin *et al.* (1998). Allergic contact dermatitis: the molecular basis. Springer, Berlin.

(18) 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

(19) 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.

(20) DB-ALM (INVITTOX) Protocol 154: Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing 17pp. Accessible at: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/

(21) 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.

(22) FDA (Food and Drug Administration (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation 22pp. Accessible at:www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidance/ucm070107.pdf - 138

(23) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).

補遺 1

定義

正確度：試験法による結果が、一般的に認められた参照値にどの程度一致するかを示す近似性の指標。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、試験法の正確な結果の割合を意味する「一致性」の代わりに用いられる(21)。

AOP（有害転帰経路）：分子レベルの初期事象から検討対象の *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)。

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

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。

有害性：生物、生物系、または（その下位に属す）生物集団がある物質に暴露された場合、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況のこと。

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危険有害性の同定（可能性）、危険有害性の特徴付け（効力）、および／または安全性評価（可能性／効力および暴露）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、危険有害性の可能性、および／またはリスク、および／またはさらなる標的の必要性について規制上の意思決定情報を与えるため、試験の実施は最小化される。

分子レベルの初期事象：化学物質により誘導される生物系の混乱のことであり、分子レベルで有害転帰経路において始動する事象であると同定されるもの。

混合物：互いに反応しない 2 つ以上の物質からなる混合物または溶液(1)。

単一成分物質：その定量的組成に、1 主要成分が 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：その定量的組成に、2 つ以上の主要成分が濃度 10%（w/w）以上 80%（w/w）未満存在することにより定義される物質。多成分物質は製造過程の結果得られる。混合物と多成分物質

との違いは、混合物の場合、2 つ以上の物質が化学反応を起こさず混合することにより得られるのに対し、多成分物質は化学反応の結果得られることにある。

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で処理を反復する対照。陽性対照反応の経時的変化を評価できるように、陽性反応の大きさが過剰であってはならない。

基準対照：処理対象の被験物質およびその他の対照サンプル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サンプルのことで、同じ溶媒または媒体に溶解する被験物質と処理されるサンプルについて、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、本サンプルは、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。妥当性には、試験法の正確性（一致度）への考慮が盛り込まれる(21)。

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実験室内および実験室間再現性の程度を表す尺度。実験室内および実験室間再現性ならびに実験室内の繰り返し精度の算出により評価される(21)。

再現性：同じ試験プロトコルを用いた、同じ物質の試験から得られる結果間の一致（信頼性の項参照）(21)。

感度：すべての陽性や活性のある化学物質のうち、試験法によって正確に分類されるものの割合。断定的な結果をもたらす試験法の正確性を示す尺度であり、試験法の妥当性を評価する上で考慮することが重要である(21)。

特異度：すべての陰性や不活性な化学物質のうち、試験法によって正確に分類されるものの割合。断定的な結果をもたらす試験法の正確性を示す尺度であり、試験法の妥当性を評価する上で考慮することが重要である(21)。

物質：自然の状態の、または製造過程で得られる化学元素とその化合物のことをいい、その製品の安定性を保つために必要な添加物や、その使用工程から派生する不純物は含まれるが、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する可能性のある溶媒は除く(1)。

システムの適合性：解析用のバッチ処理を実行する前に、標準試料の解析により機器の性能（例えば、感度）を判定すること(22)。

被験物質：「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。

国連勧告「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、危険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危険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、絵表示・注意喚起語・危険有害性情報・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(1)。

UVCB 物質：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。

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、科学的に健全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、定義された目的との関連においてのみ妥当であることをいう(21)。

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

本試験ガイドライン記載の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含まれるペプチド減少率の値を入手することにより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、皮膚感作性の危険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を用い、本試験に参加した施設で試験法を実施した際に成功することが立証されることとした。

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	*In vivo* 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	感作物質（非常に強い［extreme］）	陽性	90-100	15-45
オキサゾロン	15646-46-5	固体	感作物質（非常に強い［extreme］）	陽性	60-80	10-55
ホルムアルデヒド	50-00-0	液体	感作物質（強い［strong］）	陽性	30-60	0-24
ベンジリデンアセトン	122-57-6	固体	感作物質（中程度［moderate］）	陽性	80-100	0-7
ファルネソール	19317-11-4	液体	感作物質（弱い［weak］）	陽性	15-55	0-25
2,3-ブタンジオン	431-03-8	液体	感作物質（弱い［weak］）	陽性	60-100	10-45
1-ブタノール	71-36-3	液体	非感作物質	陰性	0-7	0-5.5
6-メチルクマリン	92-48-8	固体	非感作物質	陰性	0-7	0-5.5
乳酸	50-21-5	液体	非感作物質	陰性	0-7	0-5.5
4-メトキシアセトフェノン	100-06-1	固体	非感作物質	陰性	0-7	0-5.5

[1] *In vivo* における危険有害性（および強度）の予測結果は、LLNA データ(19)に基づく。*In vivo* における強度は、欧州化学物質生態毒性および毒性センター（ECETOC）(23)により提唱された基準を用いて得られている。

[2] DPRA による予測は、IATA の枠組みの中で、また、段落 9 および 11 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。

補遺 3

解析順序の例

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） サンプル 1（反復 1） サンプル 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） サンプル 1（反復 2） サンプル 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） サンプル 1（反復 3） サンプル 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、適切な溶媒に溶解された試験用ペプチドのみからなるサンプル）を分析に含めること。

基準対照 A：HPLC システムの適合性を検証するのに用いる。

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、分析に含める。