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

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 (2020), Test No. 442C: In chemico skin sensitisation assays addressing the Adverse Outcome Pathway Key Event on Covalent Binding to Proteins , 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-2020.pdf.

©OECD(2020)

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

OECD/OCDE 442C

採択：2019 年 6 月 18 日
修正：2020 年 6 月 26 日
（補講 I, プロピルパラベン分子量）

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

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 皮膚感作性試験の試験ガイドライン

概要

キーイベント（タンパク質への共有結合）に基いた試験ガイドライン

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）として要約されており（2）、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。本 AOP における 2 つ目のキーイベントは角化細胞に起こり、炎症反応や、抗酸化剤／求電子剤応答配列（antioxidant/electrophile response element：ARE）依存性経路など特定の細胞シグナル伝達経路と関連する遺伝子発現の変化などが含まれる。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、実験動物が使用されてきた。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, (2020)

本資料は、http://www.oecd.org/termsandconditions/に掲載されている諸条件に従って自由に使用することができる。

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く in chemico および in vitro 試験法が採択された。現行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が対象となっている（16）。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）において間接的に評価される（12）。

これらの試験方法の背景および原理は、キーイベントに基いた試験ガイドラインに含まれる。

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 試験について規定する（2）。本試験ガイドラインは、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試験法からなる。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）

5. 上記 2 試験法は、in chemico でのタンパク質との共有結合に基く試験法であり、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）がなされた（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）調整下でバリデーション試験が実施された後（6）（7）（8）（9）、独立したピアレビューがなされた（10）。

6. 本試験ガイドライン中の試験法は、データの生成に用いる手順が異なるものの、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。

7. 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（17）（18）（19）。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）（20）、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、皮膚感作性物質（すなわち、UN

©OECD 2020

GHS 区分 1）と非感作性物質を識別するために提示されるものである（20）。確定方式（Defined Approach：DA）、すなわち、利用する情報源一式に対して、また予測に用いる手順において標準化された手法の範囲内で、これらの試験法を用いて得られたデータの活用例が報告されており（20）、IATA における有効な要素として活用することができる。

8. 本試験ガイドラインに記載されている試験法では、UN GHS が定義した（1）サブカテゴリーである 1A および 1B に（21）、当局が皮膚感作性物質を分類することも、安全性評価に際して皮膚感作性の強さを予測することもできない。しかし、規制の枠組みによっては、これらの試験法から得られた陽性結果を単独で用いて、化学物質を UN GHS の区分 1 に分類できる場合がある。

9. 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」が策定された（22）。

©OECD 2020

参考文献

(1) United Nations (UN) (2017), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Seventh revised edition, New York and Geneva, United Nations Publications. Available at: [https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/07files_e0.html]

(2) OECD (2012), Series on Testing and Assessment No. 168. The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: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-recommendaion-on-the-directpeptide-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 lysinederivatives. J PharmacolToxicol 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 sensitisers in highly diluted reactionconditions. 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), Draft 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.

(10) 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.

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

(12) OECD (2010), OECD Guidelines for Chemical Testing No. 429. Skin sensitisation: Local Lymph Node assay. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

©OECD 2020

(13) OECD (2010), OECD Guidelines for Chemical Testing No. 442A.Skin sensitisation: Local Lymph Node assay: DA. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(14) OECD (2018), OECD Guidelines for Chemical Testing No. 442B. Skin sensitisation: Local Lymph Node assay: BrdU-ELISA or –FCM. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(15) OECD (2018), OECD Key Event based test Guideline 442D: In vitro Skin Sensitisation Assays Addressing AOP Key Event on Keratinocyte Activation. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

(16) OECD (2018), OECD Key event based test Guideline 442E: In Vitro Skin Sensitisation Assays Addressing the Key Event on Activation of Dendritic Cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

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

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

(19) 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).

(20) 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/HA(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [https://community.oecd.org/community/iatass].

(21) 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).

(22) OECD (2019), 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.

©OECD 2020

補遺：定義

精確さ：試験法の結果と、容認されている参照値との間の一致の程度。試験法の性能を判断する尺度であり、妥当性の一側面である。この用語はしばしば、試験法の正しい結果の割合を意味する一致率と同義で用いられることが多い（1）。

（計算式は後述）

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

AOP（Adverse Outcome Pathway［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）。

計算

NAC、NAL いずれかの減少率の計算

減少率の算定方法は以下の通り。

NAC または NAL の減少率 = {1- (反復注入における NAC または NAL のピーク面積 ÷ 基準対照 C における NAC または NAL のピーク面積の平均値)} × 100

予測能の計算

感度、特異度および精確さについて説明される場合に多用される用語がいくつかある。真陽性（true positive：TP）、真陰性（true negative：TN）、偽陰性（false negative：FN）および偽陽性（false positive：FP）である。

感度、特異度および精確さは、TP、TN、FN および FP により規定される。

感度：真陽性数 ÷ 陽性物質の総数、TP ÷ (TP + FN)

特異度：真陰性数 ÷ 陰性物質の総数、TN ÷ (TN + FP)

精確さ：正確な予測数 ÷ 総予測数、(TN + TP) ÷ (TN + TP + FN + FP)

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。

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。

©OECD 2020

EURL ECVAM：欧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：曝露後に生命体、系、または個体群（副次集団）に有害作用を生じる可能性のある作用因子または状況に本来備わっている性質。

IATA（Integrated Approach to Testing and Assessment［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特定（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、危険有害性の可能性、リスク、および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。

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。

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：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：定量的組成によって定義され、1 つの主成分が少なくとも全体の 80%（w/w）を占める物質。

多成分物質：定量的組成によって定義され、2 つ以上の主成分を少なくとも 10%（w/w）以上かつ 80%（w/w）未満の濃度で含有する物質。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：試験系のすべての要素を含み、陽性反応を誘導することが分かっている物質を用いて処理を反復する対照。陽性対照の反応の経時的変動を確実に評価するためには、陽性反応が過度であってはならない。

プレハプテン：非生物変換を介して皮膚感作性物質になる化学物質

プロハプテン：皮膚感作性を生ずるの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。

©OECD 2020

妥当性：試験とその対象となる作用との関連性、およびその試験が特定の目的にとって意義や有用性があることの是非を説明するもの。その試験が試験対象となる生物学的作用を正確に測定または予測する程度を示す。妥当性では、試験法の精確さ（一致率）も考慮される。(1)

信頼度：同じ試験手順を用いて実施した場合に得られる経時的な施設内および施設間再現性の程度を表す尺度。施設内および施設間再現性、ならびに施設内併行精度を算定することで評価する。(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。断定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な事項である。（1）（計算式は後述）。

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。断定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な事項である。（1）（計算式は後述）。

物質：自然の状態の、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（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（United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals：UN GHS）：ヒト（雇用者、労働者、輸送者、消費者および緊急時対応者など）および環境を保護することを目的として有害作用に関する情報を伝達するために、物理的危険性、ならびに健康および環境有害性に基いてその種類および程度を標準化し、ピクトグラム、注意喚起語、危険有害性情報、注意書きおよび安全データシートなど、対応する伝達要素を取り扱うことで化学品（物質および混合物）の分類を提案するシステム（3）。

UVCB：組成が未知または変化する物質、複雑な反応生成物または生物材料。

妥当な試験法：特定の目的に対して妥当性および信頼度が十分であるとみなされる、科学的に有効な原理に基く試験方法。決して、絶対的な意味で試験方法が妥当であるわけではなく、定められた目的に関して妥当であるにすぎない（1）。

©OECD 2020

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) (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

(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 sensitisers 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) (2001), Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation 22pp. Accessible at:www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidance/ucm070 107.pdf - 138 (23)

©OECD 2020

付録 I

In Chemico 皮膚感作性：ペプチド結合性試験（Direct Peptide Reactivity Assay：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）。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（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 区分 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 下位区分 1B）は、皮膚感作性の強度が高い（high）化学物質（すなわち、UN GHS 下位区分 1A）に比べて予測能は低い（4）（5）。しかし、本試験法は、IATA または DA に照らし、「概要」の第 7 段落および第 8 段落の条項に従って、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、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、物理化学的性状の検討に適用できることが示された（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。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（第 10 段落参照）。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（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、技術的に適用可能であるとみなされる（第 4 段落および第 10 段落参照）。

[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。

©OECD 2020

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。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）に本予測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、そのようなカテゴリー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。皮膚感作性を生ず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、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（第 21 段落および第 22 段落参照）。

5. 記載の通り、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が可能な場合がある（6）（11）。ただ一方、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いたさらなる検討が求められる。

試験の概要

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（第 21 段落参照）から、被験物質は、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。

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 1 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。

©OECD 2020

試験の手順

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 1 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-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%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 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

10. DPRA DB-ALM プロトコル（7）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試料、補遺 2 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 を用いる場合、 被験物質を 300 µL の DMSO に可溶化させ、得られた溶液をアセトニトリル 2700 µL により希釈してみること。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 により希釈してみること。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。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）の個々の分子量およびその個々の割合を考

©OECD 2020

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

11. 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、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 2 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（第 18 段落参照）。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 の分析シーケンスに含め、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

12. 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第 10 段落の条項も参照）。反応溶液は 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 回ずつ繰り返し分析する。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、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。

©OECD 2020

HPLC 標準検量線の作成

13. 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）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

14. 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、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 1 の習熟度評価用の物質の試験により）示すこと。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。

15. 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（第 21 段落および第 22 段落参照）。

16. 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（第 9 段落も参照）。HPLC による分析シーケンスの一例

[2] 平均値とは、本文書全体を通じ算術平均値を意味する。

©OECD 2020

を補遺 2 に示す。

データおよび報告

データの評価

17. システィ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。

18. 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 2 参照）のピーク面積の平均値で割ることにより決定される。

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

許容基準

19. 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照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（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。

20. 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測定を繰り返す。

予測モデル

21. 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

©OECD 2020

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）について分類すると、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分かるはずである。

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

22. 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 1 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、IATA の枠組みの中で、また、第 2 段落および第 4 段落の条項に従って検討すること。

32. 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、ペプチド減少率の算定であり、システイン 1：10／リジン 1：50 の予測モデルにおいて用いることはできるが、被験物

©OECD 2020

質の反応性の強度について分類を正確に行うことはできない。

24. 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、境界域にある結果）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

25. 試験報告書には、以下の情報を含めること。

被験物質

- 単一成分物質
    - IUPAC または CAS 名、CAS 登録番号、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
    - 外観、水溶解度、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状
    - 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、粉砕など）
    - 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、混合物：
    - 成分の化学的識別情報（上記参照）、純度、定量的組成、ならびに関連のある物理化学的性状（上記参照）などによって可能な限り特徴付けること
    - 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状
    - 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
    - 該当する場合は、試験の前処理（加温、粉砕など）
    - 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
    - IUPAC または CAS 名、CAS 登録番号、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

©OECD 2020

- 外観、水溶解度、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状
- 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、粉砕など）
- 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、試験実施ごとの許容基準が適切であることを立証する陽性対照の背景データの参照先

- 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
  - IUPAC または CAS 名、CAS 登録番号、および／またはその他の識別子などの化学的識別情報
  - 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
  - 本試験法の記載以外の溶媒／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状
  - 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

©OECD 2020

- 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

©OECD 2020

- 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

©OECD 2020

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/HA(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [https://community.oecd.org/community/iatass].

©OECD 2020

付録 I、補遺 1

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（Direct Peptide Reactivity Assay）。

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含まれるペプチド減少率の値を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。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* 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）	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）	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）	陽性	30-60	≤24
ベンジリデンアセトン	122-57-6	固体	感作物質（中等度）	陽性	80-100	≤7
ファルネソール	19317-11-4	液体	感作物質（弱い）	陽性	15-55	≤25
2,3-ブタンジオン	431-03-8	液体	感作物質（弱い）	陽性	60-100	10-45
1-ブタノール	71-36-3	液体	非感作物質	陰性	≤7	≤5.5
6-メチルクマリン	92-48-8	固体	非感作物質	陰性	≤7	≤5.5
乳酸	50-21-5	液体	非感作物質	陰性	≤7	≤5.5
4-メトキシアセトフェノン	100-06-1	固体	非感作物質	陰性	≤7	≤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（5）に基く。*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）（8）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、第 2 段落および第 4 段落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いて決められた。

©OECD 2020

付録 I、補遺 2

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、適切な溶媒に溶解され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。

©OECD 2020

付録 II

In Chemico 皮膚感作性：アミノ酸誘導体結合性試験（Amino acid Derivative Reactivity Assay：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）。次に、システインおよびリジン誘導体の減少率を用いて、皮膚感作性物質と非感作性物質の識別を行う（1）（2）（3）。

2. ADRA 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。ADRA の WLR（施設内再現性）は、参加 4 施設において 100%（10/10）、100%（7/7）、90%（9/10）、100%（10/10）であった。また、参加 3 施設により 40 被験物質について得られた結果から算定した BLR（施設間再現性）は 91.9%（4）であった。4 施設において実施されたバリデーション試験の対象 40 物質について、その累積データにおける精確さは 86.9%（139/160）、感度は 81.5%（88/108）、特異度は 98.1%（51/52）であった（4）（5）。バリデーション試験（4）（5）、その他既報の研究結果から（3）、LLNA の結果と比較して ADRA では、精確さ 79%（98/124）（ADRA の適用領域内にある 124 化合物）、感度 74%（65/88）および特異度 92%（33/36）にて感作性物質と非感作性物質が識別されることが示されている（6）。さらに、ADRA の適用領域内にある 73 化合物におけるヒト皮膚感作性の予測は、精確さ 86%（63/73）、感度 85%（44/52）および特異度 90%（19/21）である（6）。ただし、本試験法は、IATA に照らし、「概要」の第 7 段落および第 8 段落の条項に従って、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、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、ADRA の適用領域にはさまざまな有機官能基、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状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、皮膚感作性の有害性を予測により識別するための統合試験戦略の一部として本試験法が許容可能でなければならないことを実証するものとみなされた（7）。

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 ADRA 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。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。皮膚感作性を生ず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）。上記を踏まえ、本試験法により得られ

©OECD 2020

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。*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（第 27 段落および第 28 段落参照）。HPLC によって形成されたあらゆる 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、酸化的二量化によって NAC 試薬が減少したことは確認または除外できるものと考えられる。

4. ADRA の試験方法により、難溶性物質の試験が可能となる。試験を実施するためには、被験物質は、最終濃度 1 mM において適切な溶媒に可溶でなければならない（第 14 段落参照）。本濃度において不溶の被験物質は、より低濃度での試験も可能である。これらの例において陽性結果の場合、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。

5. 一般的に有機化合物の多くは、220 nm の波長域の紫外線を吸収する。求核試薬と被験物質が共溶出する場合、偽陰性予測となる可能性がある。これは、ペプチドベースの求核試薬の定量を 220 nm にて実施するよう明記されている DPRA で起こり得る。対照的に、ADRA で用いる求核試薬の定量は 281 nm にて実施される。このスペクトル領域の紫外線を吸収する物質は、概して共役二重結合を有する物質に限られることから、共溶出の可能性は有意に低い（8）。

6. 現在の予測モデルでは被験物質と求核試薬のモル比を定義する必要があることから、組成が不明の複雑な混合物、および組成が不明もしくは不定の物質、複雑な反応生成物、または生体物質（UVCB 物質）に本モデルを用いることはできない。混合物に対する ADRA 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（9）（10）。多成分物質および混合物を ADRA などの試験法に用いるためには、プロトコルを新たに開発し、HPLC 分析によって求核試薬の減少率を定量できるようにする必要がある（9）（10）。このため、多成分物質および混合物の評価が可能である本ガイドラインでは特定の方法を決定することはできないが、現時点で既知組成の多成分物質や混合物に適用可能であると考えられる評価方法については、第 15 段落に記載されている（9）。ただし、これらの物質についてはバリデーション試験実施時に試験対象とはなっていなかった。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）、または本ガイドライン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。

7. ADRA では皮膚感作性物質と非感作性物質を識別することが可能である。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。

©OECD 2020

試験の概要

8. ADRA は、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）の残留濃度を定量する *in chemico* 試験法である。定量は、被験物質の存在下にて 25±1ºC、24±1 時間のインキュベーション後に行われる。いずれの誘導体にも、UV 検出を促進するために *N* 末端に導入されるナフタレン環が 1 つ含まれる。NAC および NAL 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 281 nm における UV 検出により測定する。その後、NAC および NAL 双方について減少率の値を算出し、予測モデルとの比較を行う（第 26 段落参照）。

9. 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、この付録の補遺 1 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。

試験の手順

10. 本試験法は、JaCVAM が調整した ADRA のバリデーション試験に用いられたプロトコル（11）を基にしており、試験施設に ADRA を導入する際に使用するよう推奨される。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、この付録の補遺 1 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

11. 求核試薬は、富士フイルム和光（FUJIFILM Wako：FFWK）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。NAC/NAL の製造特許は、富士フイルム株式会社により日本でしか取得されていない。このため、他国の製造者は、許可を得ることなく NAC/NAL を生産することができる。他の 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、被験物質が全く含まれてい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 の残留濃度を定量する。NAC および NAL の残留濃度がいずれも最低 90%であること（11）。NAC の残留濃度は、総 NAC の割合および NAC 二量体の残留濃度として算定する。

3) 反応性：補遺 1 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。

©OECD 2020

NAC およびNAL の原液の調製

12. 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 μM 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 μM 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 未満にて使用前の最大 12 ヵ月間凍結保存することができる。NAC 溶液の最終濃度は pH 8.0 のリン酸緩衝液にて 5 μM、NAL 溶液の最終濃度は pH 10.2 のリン酸緩衝液にて 5 μM とする。

被験物質溶液の調製

13. JaCVAM による ADRA のプロトコル（11）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。適切な溶媒では、被験物質が完全に溶解するはずである。ADRA のプロトコルでは、NAC、NAL いずれも過剰容量中にて被験物質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。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。DMSO によって求核試薬 NAC の二量体化が生じ（12）、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 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－アセトニトリル溶液）に可溶化させてみること。DMSO－アセトニトリル溶媒を用いる際は、被験物質を DMSO に溶解させ、この溶液をアセトニトリルを用いて 20 倍希釈して 1 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には、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。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、1 mM 溶液を調製する。

14. 分子量が既知である単一成分物質の試験では、被験物質溶液の濃度は 1 mM ではなく、0.5 mg/mL にて行ってもよい（9）。また、特徴が明らかであるポリマーの場合も、その数平均分子量に基き、1 mM 濃度にて単一成分物質の試験手順と同様にして試験を行うこと。

15. 組成が既知である混合物および多成分物質の試験については以下の通りである。

1) 液体：通常は希釈せず用いる。被験物質が難溶性であるために反応溶液の作製に支障が出る場合、すなわち、非溶解物、混濁および／または沈殿が認められる場合には、陽性結果については評価に用いることもできるが、陰性結果について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。ただし、結果が偽陽性である可能性がある限り、予測の解釈にも相応の注意を払うこと。

2) 固体：使用する同一溶媒に被験物質を最大可溶濃度まで溶解させ、1 mM 溶液を調製する。その後、希釈せずにできる限り最大濃度の被験物質溶液を試験に用いる。被験物質が難溶性であるために反応溶液の作製に支障が出る

©OECD 2020

場合、すなわち、非溶解物、混濁および／または沈殿が認められる場合には、陽性結果については評価に用いることもできるが、陰性結果について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。ただし、結果が偽陽性である可能性がある限り、予測の解釈にも相応の注意を払うこと。

陽性対照、基準対照、共溶出対照の調製

16. 陽性対照（positive control：PC）として、フェニルアセトアルデヒド（CAS 番号：122-78-1、純度 90%以上）を用い、アセトニトリルを用いて濃度 1 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、適切な溶媒に溶解された NAC または NAL のみ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（補遺 2 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（第 23 段落参照）。また、当該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、当該被験物質と 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

17. 96 穴マイクロプレートを用いて、NAC 溶液、NAL 溶液をいずれも 1：50 の割合で被験物質とインキュベートする。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、当該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相当の注意を払って解釈すべきである（濃度 1 mM では溶解しない化学物質の試験については第 4 段落も参照のこと）。反応溶液は 25±1ºC で 24±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）を加え、反応を止めること（3）。

HPLC の準備および分析

18. NAC、NAL ともに減少率を決定するため、被験物質ごとに 3 回ずつ繰り返し分析する。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 穴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）の分析が可能である。一回の試験時の反復測定では、同一バッチの 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 × g）し、あらゆる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、NAC および NAL の減少率が誤る可能性があることが示唆されることから、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

©OECD 2020

（上記参照）。

19. 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－緩衝液を用いて調整する。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（5.0 μM）の連続希釈を行って 5.0～0.156 μM の 6 濃度の検量線用溶液、およびブランクの希釈緩衝液を調製する。適切な検量線とは、決定係数（R^2）が 0.990 超の場合とする。

20. 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（281 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記載された推奨する HPLC 設定には、好ましいカラムとして、ベース粒子がコアシェル型シリカゲル、粒子径 2.5～2.7 μm、カラムサイズが 3.0 × 150 mm のカラムを用いる。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－水）、B 相 50%（0.1%（v/v）トリフルオロ酢酸－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にて作動させ、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/分とし、線形勾配でアセトニトリルについて 10 分間以内に、NAC では 30%から 55%、NAL では 25%から 45%とし、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 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、望ましくは、補遺 1 の習熟度評価用の物質の試験により示すこと。吸光度は 281 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、291 nm における吸光度も記録する。アセトニトリルのバッチによっては、NAC および NAL の安定性に悪影響を及ぼす場合もあるため、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。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。HPLC による分析シーケンスの一例を補遺 2 に示す。

21. NAC の酸化を促進する可能性のある被験物質もある。二量体化した NAC のピークは、目視によりモニターできる場合がある。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（第 26 段落および第 27 段落参照）。

©OECD 2020

データおよび報告

データの評価

22. NAC、NAL の濃度はいずれも、各試料を 281 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 NAC および NAL の濃度よりそれぞれ算出する。

23. NAC および NAL の減少率はいずれも、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 2 参照）のピーク面積の平均値で割ることにより決定される。

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

許容基準

24. 次の基準を満たすこと。

a) 標準検量線の決定係数（R^2）が 0.990 超。

b) 陽性対照であるフェニルアセトアルデヒドの 3 回反復測定による NAC および NAL の減少率の平均値が、NAC の場合 6～30%、NAL の場合 75～100%であり、最大標準偏差（standard deviation：SD）が、NAC、NAL いずれの減少率についても 10%未満。

c) 基準対照 A および C の NAC および NAL の濃度の平均値はいずれも 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 については、NAC および NAL のピーク面積の変動係数（coefficient of variation：CV）が 10%未満。

これらの基準の 1 つ以上を満たさない場合、データは不採用とし、測定を繰り返す。

25. 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 の減少率ともに 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。

これらの基準の 1 つ以上を満たさない場合、データは不採用とし、測定を繰り返す。

予測モデル

26. 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。

©OECD 2020

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、第 2 段落および第 3 段落の条項に従って検討すること。

27. 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、281 nm において顕著に吸収を示し、NAC または NAL と同じ保持時間になる場合、共溶出が生じる。被験物質と NAC または NAL 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、望ましくは、補遺 1 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、分析結果として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。

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、また、第 2 段落および第 3 段落の条項に従って検討すること。

28. 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（境界域にある結果）である場合、さらなる分析が必要な場合がある。NAC/NAL の予測モデルを用いた場合の減少率の平均値が 3.0%から 10.0%までであるか、または、NAC のみの予測モデルを用いた場合の NAC の減少率が 4.0%から 11.0%までであれば、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。

©OECD 2020

試験報告書

29. 試験報告書には、以下の情報を含めること。

被験物質

- 単一成分物質
  - IUPAC または CAS 名、CAS 登録番号、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
  - 外観、水溶解度、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状
  - 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識別情報（上記参照）、純度、定量的組成、ならびに関連のある物理化学的性状（上記参照）などによって特徴付けること
  - 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状
  - 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
  - IUPAC または CAS 名、CAS 登録番号、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
  - 外観、水溶解度、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状
  - 純度、該当する場合または可能であれば不純物の化学的識別情報
  - 該当する場合は、試験の前処理（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、試験実施ごとの許容基準が適切であることを立証する陽性対照の背景データの参照先

©OECD 2020

- 溶媒
    - 該当する場合、使用する溶媒およびその成分の比率
    - IUPAC または CAS 名、CAS 登録番号、および／またはその他の識別子などの化学的識別情報
    - 純度、該当する場合および可能であれば不純物の化学的識別情報
    - 本試験法の記載以外の溶媒を用いる場合、外観、分子量、その他の関連する物理化学的性状
    - 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、原液に添加された量）
- 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、被験物質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 281 nm における NAC および NAL 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（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 281 nm 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 C9 例について、281 nm 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）

©OECD 2020

- 用いた各溶媒について、3 例の適切な基準対照 C の 281 nm 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 281 nm 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 281 nm 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

- 該当する場合、本試験法実施の際に実施施設の習熟度を立証（習熟度評価用の物質の試験など）、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

- ADRA 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 に照らした本試験法の結果の考察

結論

©OECD 2020

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 sensitisers 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, Jon R, Kleinstreuer N, Bae-Hwa K, Kojima H, Kasahara T, Ono A, 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, accepted on May 10, 2019

(5) OECD (2019), Draft 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) Yamamoto Y, Fujita M, Wanibuchi S, Sato A, Katsuoka Y, Ono A, Kasahara T. (2019), Availability of ADRA for prediction of skin sensitization by combining multiple alternative methods. Journal of Toxicological Sciences, accepted on May 9, 2019

(7) 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.

(8) Fujira M, Yamamoto Y, Wanibuchi S, Katsuoka Y, 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

(9) YamamotoY, Fujita M, Manibuchi S, Katsuoka Y, Ono A, 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

(10) Fujita M, Yamamoto Y, Wanibuchi S, Katsuoka Y, Kasahara T A Newly Developed Means of HPLC-Fluorescence Analysis for Predicting the Skin Sensitization Potential of Multi-Constituent Substances Using ADRA. Toxicology In Vitro, 59, 161-178. DOI: 10.1016/j.tiv.2019.04.014.

©OECD 2020

(11) ADRA protocol: JaCVAM Statements. Available at: http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html

(12) James P. Tam JP, Cui Rong Wu CR, Wen Liu W, Jing Wen Zhang JW. (1991), Disulfide bond formation in peptides by dimethyl sulfoxide. Scope and applications. Journal of the American Chemical Society, 113, 6657–6662. DOI: 10.1021/ja00017a044

(13) Natsch A, Ryan CA, Foertsch L, Emter R, Jaworska J, Gerberick F, Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitisation undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology*, **33**(11):1337-52, DOI:10.1002/jat.2868.

(14) Gerberick GF, Vassalo JD, Foertsch LM, Price BB, Chaney JG, 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.

(15) 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.

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

©OECD 2020

付録 II、補遺 1

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 （Amino acid Derivative Reactivity Assay：ADRA）

本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、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含まれる NAC および NAL 減少率の値を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。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 主導による導入が成功することを立証するためのバリデーション試験中にこれらの物質が用いられたこととした。

表 1：ADRA 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	*in vivo* 予測 [1]	ADRA による予測 [2]	減少率の範囲	
							NAC[3]	NAL[3]
1	*p*-ベンゾキノン	106-51-4	固体	108.09	感作物質（非常に強い）	陽性	90-100	40-70
2	クロラミン T 三水和物	7080-50-4	固体	281.69	感作物質（強い）	陽性	90-100	90-100
3	trans-シンナムアルデヒド	14371-10-9	液体	132.16	感作物質（中等度）	陽性	40-100	≤20
4	塩化パルミトイル	112-67-4	液体	274.87	感作物質（中等度）	陽性	≤10	50-100
5	イミダゾリジニル尿素	39236-46-9	固体	388.29	感作物質（弱い）	陽性	10-45	≤10
6	ファルネソール	19317-11-4	液体	220.35	感作物質（弱い）	陽性	20-40	≤15
7	グリセロール	56-81-5	液体	92.09	非感作物質	陰性	≤7	≤7
8	ベンジルアルコール	100-51-6	液体	108.14	非感作物質	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	非感作物質	陰性	≤7	≤7

[1] *in vivo* における危険有害性（および強度）の予測結果は、LLNA データに基く（13）（14）（15）。*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）（16）により提唱された基準を用いて得られている。

[2] ADRA による予測は、IATA の枠組みの中で、また、第 2 段落および第 3 段落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いて決められた。

©OECD 2020

付録 II、補遺 2

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） フェニルアセトアルデヒド（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） フェニルアセトアルデヒド（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） フェニルアセトアルデヒド（反復 3） 試料 1（反復 3） 試料 2（反復 3）

©OECD 2020

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（適切な溶媒に溶解された 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基準対照 C3 例を測定する。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。

©OECD 2020