

ペプチド結合性試験（Direct Peptide Reactivity Assay : DPR）の評価会議報告書

JaCVAM 評価会議

平成 27 年（2015 年）2 月 6 日

JaCVAM 評価会議

- 大野泰雄 (運営委員会推薦) : 座長
- 五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部)
- 一鬼 勉 (日本化学工業協会)
- 篠田和俊 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
- 杉山真理子 (日本化粧品工業連合会)
- 谷川浩子 (日本動物実験代替法学会)
- 西川秋佳 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター)
- 平賀秀明 (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
- 牧 栄二 (日本免疫毒性学会)
- 増田光輝 (座長推薦)
- 森田 健 (日本環境変異原学会)
- 山田隆志 (独立行政法人 製品評価技術基盤機構)
- 横関博雄 (日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会)
- 吉田武美 (日本毒性学会)
- 吉田 緑 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 病理部)
- 吉村 功 (座長推薦)
- 渡部一人 (日本製薬工業協会)

任期：平成 26 年 4 月 1 日～平成 28 年 3 月 31 日

ペプチド結合性試験 (Direct Peptide Reactivity Assay : DPRA) は、化学物質の皮膚感作性を予測する試験法であり、従来のモルモットの皮膚感作性試験 (OECD TG406)、マウスの局所リンパ節試験 (Local Lymph Node Assay: LLNA、OECD TG429) および LLNA の変法である LLNA:DA (OECD TG442A)ならびに LLNA:BrdU-ELISA (OECD TG442B)と比べ、動物を用いないという特徴を有する。DPRA は、皮膚感作性成立の初期段階の反応であるハプテンとタンパク質の結合性を調べることに より、皮膚感作性の有無を予測する試験法である。European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL ECVAM)によるバリデーション研究を基にした ESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee) による第三者評価が終了し OECD による専門家会議を経て、OECD TG442C として 2015 年 2 月 5 日に採択された¹⁾。JaCVAM 評価会議は、皮膚感作性試験資料編纂委員会は、上記資料をもとに作成した皮膚感作性試験評価報告書を用いて、DPRA の妥当性について検討した。

1. 試験法の定義

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

代替する対象毒性試験： モルモットの皮膚感作性試験 (OECD TG406) およびマウスの局所リンパ節試験 [Local Lymph Node Assay: LLNA (OECD TG429)、LLNA:DA (OECD TG442A)、LLNA:BrdU-ELISA (OECD TG442B)]

試験法の概略： DPRA は、生体における皮膚感作性発現までの過程の化学物質とタンパク質との安定な結合物の形成性を評価する“動物を用いない *in chemico* 試験”である。DPRA では、皮膚内のタンパク質の代わりに 7 個のアミノ酸から成る合成ペプチドのシステイン含有ペプチドとリジン含有ペプチドの 2 種類 (いずれも市販品) を使用する。化学物質とそれぞれのペプチドを混合することにより反応させ、混合 24 時間後における未反応のペプチド量を HPLC で分離定量する。試験成立条件を満たした化学物質の反応性は、測定ごとのペプチド減少率から平均値を算出し、予測モデルに従って High、Moderate、Low および Minimal の 4 段階に分類される。その結果、反応性が Low、Moderate および High に分類される化学物質は皮膚感作性あり、Minimal に分類される化学物質は皮膚感作性なしと予測される。

2. 評価に用いた資料および評価内容の科学的妥当性

DPRA は、EURL ECVAM 主導のバリデーション試験とそれに続く ESAC による独立した第三者評価において評価され、代替試験法として科学的に妥当であると報告されている²⁾。本邦においては、JaCVAM 皮膚感作性試験資料編纂委員会が、DPRA の皮膚感作性試験代替法としての科学的妥当性について、OECD TG442C¹⁾、EURL ECVAM のバリデーション報告書³⁾のみならず現在まで

公開されている情報⁴⁾を基に検証した。検証の結果⁵⁾、DPRAには感作性発現機序における初期の重要なイベントであるタンパク質と化学物質の結合反応を検出するという科学性があり、*in chemico*の皮膚感作性試験代替法として妥当であると考えられた。

3. 本試験法の有用性と適用限界

DPRAは、動物を用いない*in chemico*の試験法で、3Rsの精神に合致している。また、1アッセイ当たりの経費も、LLNAと比較して1/10程度で実施可能であり、試験期間もLLNAより短期間であることから、本試験法は簡便性および経済性の面から有用といえる。更に、DPRAは、感作性発現機序における初期の重要なイベントであるタンパク質と化学物質の結合反応を検出するものであり、化学物質の感作性を判断する上で重要な情報を与える。

しかしながら、DPRAの施設内再現性において、United Nations (UN) Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) 区分1Bの物質（弱い感作性物質）では再現性が得られなかったため達成基準（85%）を満たせず、DPRAでは弱い感作性物質に対しては判定を誤る懸念がある。また、施設間再現性においては、ペプチドと共有結合を生じうる官能基を持たない金属塩を除くことにより再現性は82%となり、達成基準（80%）を上回る。従って、DPRAにおいて金属塩は適用範囲外とすべきである。DPRAは液相中で反応を行うため、化学物質は指定された数種類の溶媒に溶解する必要がある。疎水性の高い化学物質は正しく判定されない可能性がある。また、DPRAの検証試験における感度は、試験適用外と考えられる金属塩を除いた場合でも75%であり、DPRAで陰性の結果が得られた場合は、偽陰性の可能性を考慮し、補完し得る他の試験法との組み合わせで確認する必要がある。これまでの結果から、皮膚感作性がModerateまたはWeakの化学物質、感作性の獲得に代謝的あるいは非代謝的活性化を必要とするプロハプテンあるいはプレハプテン、および疎水性の高い化学物質は偽陰性を示す可能性が高いため、試験結果の解釈には注意が必要である

4. 目的とする物質又は製品の毒性を評価する試験法としての、行政上の利用および社会的受け入れの可能性

社会的受け入れ性：

DPRAは、HPLC分析が可能な施設であれば容易に実施できる試験法であり、また化学物質との反応に用いる2種類の合成ペプチドも市販されており、入手に制限はない。DPRAの実施に当たっては、化学物質の性質を見極め、得られた結果の解釈に注意を払う必要がある。しかし、DPRAは皮膚感作性成立の初期段階の化学物質とタンパク質の結合反応を検出しており、化学物質の感作性を考える上で重要な情報を与えていること、また、簡便かつ安価な試験法であることから、DPRAの社会的受け入れ性は高いものとする。

行政上の利用性：

DPRA で陽性の結果が得られた場合、その化学物質を UN GHS 区分 1 に分類（強い感作性物質）することは行政上可能である。しかしながら、まれに偽陽性の結果が生じることに留意しなければならない。一方、DPRA の陰性結果が得られた場合、その化学物質の皮膚感作性は偽陰性の可能性があり、DPRA 単独でその皮膚感作性を判定することは難しい。Integrated Approaches to Testing and Assessment: IATA)* を構成するその他の情報源と組み合わせて評価することにより、DPRA は行政的に利用可能であると考えられる。

*:OECD にてガイダンス案が検討中

参考文献

- 1) OECD Test Guideline 442C, *In Chemico* Skin Sensitisation, Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) (2015)
http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442c-in-chemico-skin-sensitisation_9789264229709-en;jsessionid=2d30155etbl8v.x-oecd-live-02
- 2) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for skin sensitization testing.
- 3) EUROPEAN COMMISSION (2012) Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) , ECVAM Validation Study Report
http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/files-dpra/DPRA%20Validation%20Study%20Report.pdf
- 4) Gerberick GF, 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(2), 417-427
- 5) JaCVAM 皮膚感作性試験資料編纂委員会：皮膚感作性試験評価報告書 Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)（平成 27 年 2 月 6 日）

