

# 皮膚感作性試験評価報告書

## **Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) :**

### ペプチド結合性試験

平成 27 年 2 月 6 日

JaCVAM 皮膚感作性試験資料編纂委員会

## JaCVAM 皮膚感作性試験資料編纂委員会

委員長 筒井尚久（田辺三菱製薬株式会社）

委員 安達玲子（国立医薬品食品衛生研究所）

金澤由基子（一般財団法人 食品薬品安全センター）

小島幸一（一般財団法人 食品薬品安全センター）

佐藤一博（国立大学法人 福井大学）

武吉正博（一般財団法人 化学物質評価研究機構）

森本隆史（住友化学株式会社）

## 要旨

皮膚感作性は化学物質の安全性評価において重要な評価項目であり、従来、モルモットやマウスを用いる動物実験によって評価されてきた。近年 EU における欧州化学品規制では、安全性評価はコンピューターを用いた定量的構造活性相関 (Quantitative Structure-Activity Relationship: QSAR) モデルや *in vitro* 試験の代替法が推奨されており、動物実験により安全性評価された成分を含む化粧品の輸入販売が禁止されたことから (2013 年 3 月全面施行)、動物を用いない *in vitro* 試験法の開発が強く望まれている。Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA : ペプチド結合性試験) は感作性成立初期段階の反応であるタンパク質と化学物質の結合反応を機器分析によって評価する手法である。本報告書は、この DPRA について、その手順や有用性と限界を The European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL ECVAM) により実施されたバリデーション報告書及び EURL ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) 第三者評価 (ピアレビュー) 報告書などを基に作成したものである。

DPRA はシステイン含有ペプチド (Ac-RFAACAA-COOH) と被験物質及びリジン含有ペプチド (Ac-RFAAKAA-COOH) と被験物質をそれぞれ混合・反応させ、24 時間後における未反応のペプチド量を基に被験物質の反応性を分類する手法であり、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析が可能な施設であれば容易に実施することができる。本試験法の先行バリデーション試験における施設内再現性は 73%-100% であり、3 施設中 1 施設において、GHS 区分 1B (弱い感作性物質) の物質で再現性が低かったため、達成基準 (85%) に達しておらず、弱い感作性物質では判定がぶれる懸念があった。一方、施設間再現性は 75% であり、達成基準 (80%) を満たさなかったが、適用範囲外の金属塩を除いた場合に達成基準を上回った。

接触皮膚炎のリスクを動物で予測する試験法として知られているマウスを用いる局所リンパ節試験 (Local Lymph Node Assay: LLNA) の試験結果を参照し、先行バリデーション試験における正確度 (Accuracy) は 78%、感度 (Sensitivity) は 71%、特異度 (Specificity) は 92% と報告されている。本試験適用外の金属塩を除いた場合にでも感度は約 75% であり、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により確認しなければならない。

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しており、化学物質の感作性を判断する上で重要な情報を与えてくれる。LLNA の 1/10 程度の経費で実施可能であり、動物を用いない *in chemico* 試験法であることから、有用性は高い。しかしながら、本法は代謝系を欠く化学的試験法であり、活性化に代謝系や非生物的活性化を必要とする感作性物質、弱い感作性物質や金属塩、疎水性の高い物質などは正しくその感作性が検出されない可能性がある。以上の事実を踏まえ、資料編纂委員会は、証拠の重み付けや他の試験法 (LLNA、モルモットを用いる皮膚感作性試験) と組み合わせでの評価を推奨する。

## 1. 緒言

皮膚感作性を評価することは化学物質の安全性評価において重要である。化学物質の皮膚での接触皮膚炎のリスクを動物で予測する試験法としてモルモットを用いる皮膚感作性試験 (OECD TG406) やマウスを用いる局所リンパ節試験 (Local Lymph Node Assay: LLNA, OECD TG429) がある。この<sup>3</sup>H-Methyl-thymidine 取込量を測定する LLNA 以外に放射性同位元素 (RI) を用いず ATP 量を測定する LLNA:DA (OECD TG442A) や Bromodeoxyuridine 量を測定する LLNA:BrdU-ELISA (OECD TG442B) がある。このように、現在 OECD からガイドラインとして公表されている試験法は、動物を用いた *in vivo* の試験法のみである。

EU における欧州化学品規則 (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals: REACH) では、安全性評価はコンピューターを用いた定量的構造活性相関 (Quantitative Structure-Activity Relationship: QSAR) モデルや *in vitro* 試験等による代替法が推奨されており、動物実験により安全性が評価された成分を含んだ化粧品の輸入及び販売が禁止された (2013 年 3 月全面施行)。そのため、化学物質の皮膚感作性を評価する代替法の開発が強く求められている。

現在、ペプチドとの結合反応を利用した Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA : ペプチド結合性試験)、単球系細胞の活性化を利用した human Cell Line Activation Test (h-CLAT) 及び Myeloid U937 Skin Sensitization Test (MUSST)、ケラチノサイト細胞系の標的遺伝子を用いた ARE-Nrf2 Luciferase Test Method (KeratinoSens<sup>TM</sup>法) などの皮膚感作性試験の動物を用いない動物実験代替法が提案されており、The European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL ECVAM) 等において先行バリデーション研究が行われている。

DPRA は、化学物質がペプチドと共有結合し免疫応答を引き起こす抗原となる性質を利用し、未反応のシステイン或いはリジンを含むペプチドを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で測定する試験法である。本法の先行バリデーション研究の結果については、EURL ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) による第三者評価 (ピアレビュー) が完了している。

JaCVAM 皮膚感作性試験資料編纂委員会 (以下、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、現在までに公開されている情報をもとに評価したので、その結果を報告する。

## 2. 試験法の原理

皮膚感作性は、ヒトでは接触皮膚炎、動物 (齧歯類) では接触過敏症として知られる化学物質の毒性の一つである。OECD がまとめた Adverse Outcome Pathway (AOP) では、化学物質による皮膚感作性は次の 4 つの Key event から成るとされている<sup>1)</sup>。

- 1) 化学物質とタンパク質のシステイン残基あるいはリジン残基との共有結合
- 2) ケラチノサイトにおける炎症性応答及び Antioxidant/electrophile response element (ARE)-dependent pathway による遺伝子発現

- 3) 樹状細胞の活性化（特異的細胞表面マーカーの発現、ケモカインやサイトカインの産生）
- 4) リンパ節における T 細胞の増殖

DPRa は、上述した皮膚感作性の AOP における『化学物質とタンパク質の共有結合』に対応した動物を用いない *in chemico* 試験である。他にも *in chemico* の皮膚感作性試験がいくつか報告されている<sup>2)4)</sup>。

DPRa では、皮膚内のタンパク質の代わりに合成ペプチドであるシステイン含有ペプチド (Ac-RFAACAA-COOH) とリジン含有ペプチド (Ac-RFAAKAA-COOH) の 2 種類を使用する。化学物質とそれぞれのペプチドを混合し、反応させ、混合 24 時間後における未反応のペプチド量を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分離定量する。その結果を基に、化学物質の反応性を 4 段階 (High, Moderate, Low, Minimal) に分類する。

### 3. 試験手順／判定<sup>5)</sup>

#### 3-1. 使用するペプチドおよび陽性対照の調製

- ・システイン含有ペプチド/リン酸緩衝溶液 (システイン含有ペプチド溶液)  
システイン含有ペプチド (Ac-RFAACAA-COOH、純度：90-95%) は、リン酸緩衝液 (pH7.5) に 0.667 mM の濃度になるように溶解させる。
- ・リジン含有ペプチド/酢酸アンモニウム緩衝溶液 (リジン含有ペプチド溶液)  
リジン含有ペプチド (Ac-RFAAKAA-COOH、純度：90-95%) は、酢酸アンモニウム緩衝液 (pH10.2) に 0.667 mM の濃度になるように溶解させる。
- ・陽性対照：Cinnamic Aldehyde (CAS No:104-55-2、純度 $\geq$ 95%)  
Cinnamic Aldehyde を、Acetonitrile に 100 mM の濃度で溶解させ、その後被験物質と同様に両ペプチド溶液と混合する。

#### 3-2. 方法

以下のフローチャートに従い、実施する。

1. 被験物質を100mMの濃度で以下のいずれかの媒体に溶解させる（被験物質溶液）。  
 【媒体】 Acetonitrile、Water、Acetonitrile : Water(1:1)、Isopropanol、Acetone、  
 Acetone : Acetonitrile(1:1)、DMSO: Acetonitrile(1:9)、  
 DMSO: Acetonitrile(1:1)

2. 被験物質溶液とペプチド溶液を混合する

2-A. 被験物質溶液とシステイン含有ペプチド溶液を10:1で混合(n=3)

- Sample: 被験物質溶液+システイン含有ペプチド溶液
- Co-elusion Control: 被験物質溶液+リン酸緩衝液
- Reference Control: 媒体+システイン含有ペプチド溶液

2-B. 被験物質溶液とリジン含有ペプチド溶液を50:1で混合(n=3)

- Sample: 被験物質溶液+リジン含有ペプチド溶液
- Co-elusion Control: 被験物質溶液+酢酸アンモニウム緩衝液
- Reference Control: 媒体+リジン含有ペプチド溶液

3. 各混合液を24±2時間インキュベート（暗室、25±2.5℃）する

4. HPLCで分析する\*

5. 未反応ペプチドのPeak面積から、以下の式により  
 ペプチド減少率（Percent Peptide Depletion）を算出する

$$\text{Percent Peptide Depletion} = \left\{ 1 - \left[ \frac{\text{Peptide Peak Area in Sample}}{\text{Mean Peptide Peak Area in Reference Controls}} \right] \right\} \times 100$$

\*分析条件（推奨）

推奨カラム：Zorbax SB-C18（3.5 μm, 2.1mm×100mm）等

温度：30℃

UV 検出波長：220 nm

流速：0.35 mL/min

移動相：（A）0.1%トリフルオロ酢酸水

（B）0.085%トリフルオロ酢酸アセトニトリル

時間（分）	A%	B%
0	90	10
10	75	25
11	10	90
13	10	90
13.5	90	10

### 3-3. 試験成立の条件

1) 試験成立には、以下の条件を満たさなければならない。

- システイン含有ペプチドおよびリジン含有ペプチドのそれぞれを用いて、0.0167~0.534mM の範囲の 6 濃度にて標準曲線の作成を行い、その相関係数が 0.99 より大きくなければならない。

- 陽性対照である Cinnamic aldehyde の結果は、システイン含有ペプチドでは 3 回の繰り返しによる平均ペプチド減少率は 60.8%~100%で、標準偏差は 14.9%より小さく、リジン含

有ペプチドでは3回繰り返しによる平均ペプチド減少率は40.2%~69.0%で、標準偏差は11.6%より小さくならない。

- それぞれのペプチドごとに3種類のReference Control (A, B, C)を設ける。Reference Control A (n=3)は、分析前のHPLCシステム適合性の確認のためのもの、Reference Control B (n=6)は分析時間中のReference Controlの安定性を確認するためのもの、Reference Control C (n=3)は使用された溶媒がペプチドの減少に影響しないことを確認するためのものである。Reference Control Aの平均ペプチド濃度は $0.50 \pm 0.05 \text{mM}$ となり、9つのReference Control BおよびCではペプチドピーク面積の変動係数が15.0%より小さくなければならない。
- 2) 被験物質を含むSampleの結果では、以下の条件が満たされなければならない
  - 繰り返しで行う分析値の最大標準偏差は、システイン含有ペプチド減少率では14.9%より小さく、リジン含有ペプチド減少率では11.6%より小さくなければならない。
  - 3つのReference Control Cの平均濃度は $0.50 \pm 0.05 \text{mM}$ でなければならない。

#### 3-4. 評価

被験物質の反応性は、測定ごとのペプチド減少率 (Percent Peptide Depletion) から、平均値を算出し、以下のDPRA分類予測モデル (表1) に従って反応性を分類する<sup>5)</sup>。反応性の分類で、Low、Moderate および High に分類される化学物質は陽性、No or Minimal に分類される化学物質は陰性と予測する<sup>6)</sup>。ちなみに、ペプチドと被験物質の溶出時間が重なった場合 (Co-elution)、ペプチド減少率 (Percent Peptide Depletion) の算出が不可能となるが、その溶出時間の重なりが、リジン含有ペプチドでのみ認められた場合には、システイン含有ペプチドの結果から「システイン 1:10 のみの予測モデル」に従い、反応性を分類し、予測する。

表1 分類予測モデル

システイン 1:10 およびリジン 1:50 の予測モデル

システインの減少率とリジンの減少率の平均値	反応性の分類	DPRA 予測
$0\% \leq \text{減少率の平均値} \leq 6.38\%$	No or Minimal	陰性
$6.38\% < \text{減少率の平均値} \leq 22.62\%$	Low	陽性
$22.62\% < \text{減少率の平均値} \leq 42.47\%$	Moderate	
$42.47\% < \text{減少率の平均値} \leq 100\%$	High	

システイン 1:10 のみの予測モデル

システインの減少率	反応性の分類	DPRA 予測
$0\% \leq \text{減少率} \leq 13.89\%$	No or Minimal	陰性
$13.89\% < \text{減少率} \leq 23.09\%$	Low	陽性
$23.09\% < \text{減少率} \leq 98.24\%$	Moderate	
$98.24\% < \text{平均減少率} \leq 100\%$	High	

#### 4. 精度

本法は、EURL ECVAM において、表 2 に示す 24 物質を用いて先行バリデーション試験が実施され、技術移転性、施設内再現性及び施設間再現性が評価されている。

##### 4-1. 技術移転性

16 物質を用いて主導施設の P&G 社から Ricerca 社と IVMU (EURL ECVAM の研究ユニット) への技術移転性について評価が行われている。その結果、設備が整っていて訓練されたスタッフが居れば 3 日間のトレーニングで P&G 社から Ricerca 社と IVMU への DPRA の技術移転が可能であった。また、DPRA は難しい操作手順を必要とせず、装置や試薬は購入可能であり、標準操作手順書 (Standard Operating Procedure: SOP) が詳細に作成されていることから、委員会は、本邦では汎用 HPLC 及びその技術を保有する施設で容易に実施可能と考える。

##### 4-2. 施設内再現性 (表 3-1)

15 物質を用いた 3 施設の施設内での皮膚感作性 (S) と非感作性 (NS) の一致度は、P&G 社 : 73.3%, Ricerca 社 : 100%, IVMU : 86.7% であった。達成基準は 85% に設定されており、P&G 社はこの値を下回った。P&G 社は、GHS 区分 1A の 6 物質はすべて再現性のある結果であったが、1B の 3 物質中 2 物質 (Benzyl Salicylate 及び R(+)-Limonene) で再現性が得られなかったため、達成基準を下回ったと考えられた。また、Minimal, Low, Moderate, High の 4 クラスの一致度は P&G 社 : 66.7%、Ricerca 社 : 100%、IVMU : 73.3% であった。

##### 4-3. 施設間再現性 (表 3-2)

24 物質の 3 施設の施設間再現性は皮膚感作性 (S) と非感作性 (NS) の一致度では 75% となり達成基準の 80% を下回った。24 物質の中には金属塩である Beryllium sulfate 及び Nickel chloride が含まれており、金属塩は対象ペプチドとの共有結合を生じうる官能基を持たないことから、本法の適用範囲外と判断されるため、これら 2 物質を除いた場合の施設間再現性は 82% であった。また、24 物質での Minimal, Low, Moderate, High の 4 クラスでは、施設間再現性は 62.5% であった。

#### 5. 正確度 (感度及び特異度)

精度と同様に、表 2 に示す 24 物質を用いた EURL ECVAM の先行バリデーション試験の成績を基に既知の LLNA の成績との一致度、感度及び特異度が評価されている。

24 物質全ての成績を基に評価を行った場合、実施 3 施設の成績の積算による感度 (Sensitivity) は 70.8%、特異度 (Specificity) は 91.7%、正確度 (Accuracy) は 77.8% であった。試験施設毎の成績は、試験施設 1 (P&G) では感度は 68.8%、特異度は 100%、正確度は 79.2%、試験施設 2 (Ricerca) では感度は 68.8%、特異度は 100%、正確度は 79.2%、試験施設 3 (IVMU) では感度は 75%、特異度は 75%、正確度は 75% であった。また、本法の正確度に関して開発施設である P&G から提出されたヒストリカルデータでは 86%、既報

では 80%~89%と報告されている。

24 物質の試験物質の中には金属塩である Beryllium sulfate 及び Nickel chloride が含まれており、金属塩は対象ペプチドとの共有結合を生じうる官能基を持たないことから、本法の適用範囲外と判断されるため、これらを除く 22 物質による評価を行った場合、実施 3 施設の成績の積算による感度は 76.2%、特異度は 91.7%、正確度は 81.8%となる。

適用範囲外と考えられる金属塩を除外した場合でも、全てあるいは一部の施設で 5 物質 (Dihydroeugenol、Chlorpromazine HCl、Benzylsalicylate、Benzylcinnamate、R (+) -Limonene) が偽陰性と評価されるが、これらの物質の中で Dihydroeugenol 及び Limonene はプロハプテンあるいはプレハプテンとして知られており、本試験系が代謝系を有さない単純な化学反応を検出する試験系であることが偽陰性となる一因と思われる。

なお、全て或いは一部の施設で偽陰性と判定される Chlorpromazine HCl、Benzylsalicylate 及び Benzylcinnamate の 3 物質、一部の施設で偽陽性と判定される Benzyl alcohol 及び Methylsalicylate の 2 物質について、バリデーション報告書では、その理由について明確な説明はなされていない。しかし、これらの中で偽陰性と判定される 3 物質の cLogP の値はいずれも 3.2 以上であり、その疎水性の高さが水系での反応を必要とする本法で偽陰性となる一要因と推察される。一方で 2-Mercaptobenzothiazole (cLogP : 3.42) は高疎水性にもかかわらず正しく陽性と判定されているが、これは本物質の持つ SH 基がリジン残基と高い反応性を有することに起因すると思われる。

表2 供試物質リスト<sup>6)</sup>

No.	Chemical Name	CAS	State	cLogP*	LLNA	LLNA potency category**	GHS potency category
1	Benzoquinone	106-51-4	Solid	0.96	+	extreme	1A
2	4-Phenylenediamine	106-50-3	Solid	0.43	+	strong	1A
3	Kathon CG (1.2% CMI)	26172-55-4	Liquid	-	+	extreme	1A
4	Beryllium sulfate	7787-56-6	Solid	-	+	extreme	1A
5	Formaldehyde	50-00-0	Liquid	-0.69	+	strong	1A
6	Chloramine T	127-65-1	Solid	-	+	strong	1A
7	Chlorpromazine HCl	69-09-0	Solid	4.89	+	strong	1A
8	2-Mercaptobenzothiazole	149-30-4	Solid	3.42	+	moderate	1A
9	Dihydroeugenol	2785-87-7	Liquid	2.84	+	moderate	1B
10	1-Thioglycerol	96-27-5	Liquid	-0.5	+	moderate	1B
11	Imidazolidiny lurea	39236-46-9	Solid	-1.28	+	weak	1B
12	Methylmethacrylate	80-62-6	Liquid	1.14	+	weak	1B
13	Benzylsalicylate	118-58-1	Liquid	3.2	+	moderate	1B
14	Nickel chloride	7718-54-9	Solid	-	-	no category	1B
15	Benzylcinnamate	103-41-3	Solid	3.89	+	weak	1B
16	R(+)-Limonene	5989-27-5	Liquid	3.01	+	weak	1B
17	Glycerol	56-81-5	Liquid	-1.33	-	no category	NC
18	2,4-Dichloronitrobenzene	611-06-3	Solid	3.06	-	no category	NC
19	Benzyl alcohol	100-51-6	Liquid	1.02	-	no category	NC
20	Methylsalicylate	119-36-8	Liquid	1.46	-	no category	NC
21	Isopropanol	67-63-0	Liquid	0.38	-	no category	NC
22	Dimethylisophthalate	1459-93-4	Solid	2.12	-	no category	NC
23	4-Aminobenzoic acid	150-13-0	Solid	0.78	-	no category	NC
24	Xylene	1330-20-7	Liquid	3.01	+	weak	NC

+ : LLNA 陽性、- : LLNA 陰性、NC : GHS 区分外。

\* : ChemBio Draw Ultra 11.0 (Cambridge Soft) を用いて算出。

\*\* : ECETOC Technical Report #87 の分類による。

Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) , ECVAM Validation Study Report (EUROPEAN COMMISSION, 2012) 記載の情報を基に編集。

表 3-1 施設内再現性実験成績<sup>6)</sup>

Chemical	Reference result (GHS category)	P&G			Ricerca			IVMU		
		Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 1	Exp 2	Exp 3
Kathon CG (1.2% CMI)	+(1A)	S <sub>LYS</sub>	S <sub>LYS</sub>	S <sub>LYS</sub>	S	S	S	S	S	S
Beryllium sulfate	+(1A)	S	S	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Formaldehyde	+(1A)	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Chloramine T	+(1A)	S <sub>LYS</sub>	S <sub>LYS</sub>	S <sub>LYS</sub>	S <sub>LYS</sub>	S <sub>LYS</sub>	S <sub>LYS</sub>	S	S	S
Chlorpromazine HCl	+(1A)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
2-Mercaptobenzothiazole	+(1A)	S <sub>LYS</sub>	S <sub>LYS</sub>	S <sub>LYS</sub>	S	S	S	S	S	S
Benzylsalicylate	+(1B)	NS	NS	NS	S	S	S	NS	NS	NS
Nickel chloride	+(1B)	NS	NS	S	NS	NS	NS	S	NS	S
Benzylcinnamate	+(1B)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	S	NS	NS
R(+)-Limonene	+(1B)	S	NS	S	S	S	S	S	S	S
Methylsalicylate	-(NC)	NS	NS	S	NS	NS	NS	S	S	S
Isopropanol	-(NC)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Dimethylisophthalate	-(NC)	NS <sub>LYS</sub>	NS <sub>LYS</sub>	NS <sub>LYS</sub>	NS	NS	NS	NS <sub>LYS</sub>	NS <sub>LYS</sub>	NS <sub>LYS</sub>
4-Aminobenzoic acid	-(NC)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Xylene	-(NC)	NS	NS	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS

+ : LLNA 陽性、- : LLNA 陰性、NC : GHS 区分外。

S<sub>LYS</sub> 或いは NS<sub>LYS</sub> : リジン含有ペプチドにて Co-elution が生じたため、システイン含有ペプチドの結果のみから、判定

S:皮膚感作性ありと判定、NS:皮膚感作性なしと判定

Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) , ECVAM Validation Study Report (EUROPEAN COMMISSION, 2012) 記載の情報を基に編集。

表 3-2 施設間再現性実験成績<sup>6)</sup>

Chemical	Reference result (GHS category)	P&G	Ricerca	IVMU
Benzoquinone	+(1A)	S	S <sub>LYS</sub>	S
4-Phenylenediamine	+(1A)	S	S <sub>CL</sub>	S
Kathon CG (1.2% CMI)	+(1A)	S	S	S
Beryllium sulfate	+(1A)	S	NS	NS
Formaldehyde	+(1A)	S	S	S
Chloramine T	+(1A)	S	S	S
Chlorpromazine HCl	+(1A)	NS*	NS	NS
2-Mercaptobenzothiazole	+(1A)	S	S	S
Dihydroeugenol	+(1B)	NS	NS <sub>LYS</sub>	S
1-Thioglycerol	+(1B)	S <sub>LYS</sub>	S <sub>CL</sub>	S <sub>CL</sub>
Imidazolidinylurea	+(1B)	S	S	S
Methylmethacrylate	+(1B)	S <sub>CL</sub>	S <sub>CL</sub>	S
Benzylsalicylate	+(1B)	NS	NS	S
Nickel chloride	+(1B)	NS	S	NS
Benzylcinnamate	+(1B)	NS	NS	NS
R(+)-Limonene	+(1B)	S	S	S
Glycerol	-(NC)	NS	NS	NS
2,4-Dichloronitrobenzene	-(NC)	NS	NS	NS
Benzyl alcohol	-(NC)	NS <sub>LYS</sub>	NS	S
Methylsalicylate	-(NC)	NS	NS	S
Isopropanol	-(NC)	NS	NS	NS
Dimethylisophthalate	-(NC)	NS	NS	NS
4-Aminobenzoic acid	-(NC)	NS	NS	NS
Xylene	-(NC)	NS	NS	NS

+ : LLNA 陽性、- : LLNA 陰性、NC : GHS 区分外。

LYS 或いは CL : Co-elution が生じたことを示す。

S:皮膚感作性ありと判定、NS:皮膚感作性なしと判定

\*太字の成績は前出の施設内再現性データの多数決判定により決定されたもの。

Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) , ECVAM Validation Study Report (EUROPEAN COMMISSION, 2012) 記載の情報を基に編集。

## 6. 評価可能な物質の範囲

Gerberick らの 82 化学物質を用いた評価では、表 4 に示す通り、様々な化学物質の皮膚感作性の予測が可能であることが示されている。ただし、LLNA で Weak sensitizer に分類される 5 物質 ( $\alpha$ -Hexylcinnamaldehyde,  $\alpha$ -Amylcinnamaldehyde, Oxalic acid, Benzyl benzoate, 2,2,6,6-Tetramethyl-3,5-heptanedione) と Modelate sensitizer に分類される 1 物質 (Nonanoyl chloride) は、DPRa では Minimal となり、陰性に分類されている。したがって、感作性ポテンシャルの弱い物質は、偽陰性と判定される場合があることに留意する必要がある。

一部のプレハプテン (例、4-Phenylenediamine) は正しく判定されるが、プレハプテン及びプロハプテンのすべてを評価可能な物質とする根拠は十分にはない。また、本試験法は、主にシステイン基やリジン基と反応する化学物質を対象とする。一方、タンパク質と配位結合を形成する金属類は、評価可能な物質の範囲から外れる。

表 4 82 化学物質の評価結果<sup>7)</sup>

Chemical Name	EC3 value	LLNA category	Reactivity based on Cys(1:10) and Lys(1:50) data	Chemical Name	EC3 value	LLNA category	Reactivity based on Cys(1:10) and Lys(1:50) data
Diphenylcyclopropanone	0.0003	Extreme	High	Oxalic acid	15	Weak	Minimal
Oxazolone	0.003	Extreme	High	Benzyl benzoate	17	Weak	Minimal
Benzoyl peroxide	0.004	Extreme	High	4-Allylanisole	18	Weak	Low
Kathon CG	0.008	Extreme	High	Lilial	19	Weak	Low
Bandrowski's base	0.008	Extreme	High	Cyclamen aldehyde	22	Weak	Low
5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one	0.009	Extreme	High	Imidazolidinyl urea	24	Weak	Moderate
p-Benzoquinone	0.0099	Extreme	High	5-Methyl-2,3-hexanedione	26	Weak	Low
Tetrachlorosalicylanilide	0.04	Extreme	Moderate	2,2,6,6-Tetramethyl-3,5-heptanedione	27	Weak	Minimal
2,4-Dinitrochlorobenzene	0.05	Extreme	High	Ethylene glycol dimethacrylate	28	Weak	High
Glutaraldehyde	0.1	Strong	High	Ethyl acrylate	28	Weak	High
Fluorescein isothiocyanate	0.14	Strong	High	Hydroxy citronellal	33	Weak	Low
Phthalic anhydride	0.16	Strong	Moderate	Glycerol	Not calculated	Non sensitizer	Minimal
Lauryl gallate	0.3	Strong	High	Hexane	Not calculated	Non sensitizer	Minimal
Propyl gallate	0.32	Strong	High	Diethyl phthalate	Not calculated	Non sensitizer	Minimal
CD3	0.6	Strong	High	Octanoic acid	Not calculated	Non sensitizer	Minimal
Trimellitic anhydride	0.6	Strong	Low	2-Hydroxypropyl methacrylate	Not calculated	Non sensitizer	Low
Formaldehyde	0.61	Strong	Moderate	1-Butanol	Not calculated	Non sensitizer	Minimal
Mentol	0.8	Strong	High	4-Hydroxybenzoic acid	Not calculated	Non sensitizer	Minimal
2-Hydroxyethyl acrylate	1.4	Moderate	High	6-Methyl coumarin	Not calculated	Non sensitizer	Minimal
Glyoxal	1.4	Moderate	High	Methyl salicylate	Not calculated	Non sensitizer	Minimal
Vinyl pyridine	1.6	Moderate	Moderate	Chlorobenzene	Not calculated	Non sensitizer	Minimal
2-Mercaptobenzothiazole	1.7	Moderate	High	Lactic acid	Not calculated	Non sensitizer	Minimal
Nonanoyl chloride	1.8	Moderate	Minimal	1-Bromobutane	Not calculated	Non sensitizer	Low
2-Methyl-2H-isothiazol-3-one	1.9	Moderate	High	2-Acetylcylohexanone	Not calculated	Non sensitizer	Low
1,2-Benzisothiazolin-3-one	2.3	Moderate	High	4-Methoxyacetophenone	Not calculated	Non sensitizer	Minimal
Methyl-2-nonylate	2.5	Moderate	High	Ethylbenzoylacetate	Not calculated	Non sensitizer	Minimal
Cinnamaldehyde	3	Moderate	High	Ethyl vanillin	Not calculated	Non sensitizer	Minimal
Phenylacetaldehyde	3	Moderate	Moderate	Isopropanol	Not calculated	Non sensitizer	Minimal
Benzylideneacetone	3.7	Moderate	High	Propylene glycol	Not calculated	Non sensitizer	Minimal
2,4-Heptadienal	4	Moderate	High	Sulfanilamide	Not calculated	Non sensitizer	Minimal
Squaric acid	4.3	Moderate	Moderate	Isopropyl myristate	Not calculated	Non sensitizer	Minimal
Trans-2-hexenal	5.5	Moderate	High	Benzaldehyde	Not calculated	Non sensitizer	Minimal
Diethyl maleate	5.8	Moderate	High	Methylparaben	Not calculated	Non sensitizer	Minimal
2-Phenylpropionaldehyde	6.3	Moderate	Moderate	Nonanoic acid	21 (False +)	Non sensitizer	Minimal
Perillaldehyde	8.1	Moderate	Moderate	Propylparaben	Not calculated	Non sensitizer	Minimal
Palmitoyl chloride	8.8	Moderate	Moderate	Rsorcicol	Not calculated	Non sensitizer	Minimal
1-(4-Methoxyphenyl)-1-penten-3-one	9.3	Moderate	Low	Salicylic acid	Not calculated	Non sensitizer	-
$\alpha$ -Hexylcinnamaldehyde	11	Weak	Minimal	Sulphanilic acid	Not calculated	Non sensitizer	Minimal
$\alpha$ -Amylcinnamaldehyde	11	Weak	Minimal	Vanillin	Not calculated	Non sensitizer	Minimal
2,3-Butanedione	11	Weak	High	Coumarin	Not calculated	Non sensitizer	Minimal
Farnesal	12	Weak	Low	Vinylidene dichloride	Not calculated	Non sensitizer	Minimal

## 7. 有用性と限界

本法は汎用 HPLC 及びその技術を保有する施設で容易に実施可能である。また、本法は動物を用いない *in chemico* の手法であり、科学的な目的のために実施される動物実験に関し、「動物の愛護及び管理に関する法律」及び 3Rs の精神と合致している。さらに DPRa 及び LLNA について使用する消耗品費を試算したところ、1 アッセイ当たりの消耗品費は LLNA

で約 10 万円であるのに対し、DPRA では約 1 万円と 1/10 程度の経費で実施可能であり、実験期間も LLNA より短期間で実施可能であることから、試験法として簡便性・経済性の面から有用と思われる。

しかしながら、本法は液相中での反応を必要とするため、被験物質は少なくとも適切な溶媒 (Acetonitrile、Water、Acetonitrile:Water (1:1)、Isopropanol、Acetone、Acetone:Acetonitrile (1:1)、DMSO:Acetonitrile (1:9)、DMSO:Acetonitrile (1:1)) に 100mM の濃度で溶解する必要がある。また、本法の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約 75% であり、1/4 の化合物が偽陰性と評価されるため、この試験法単独で皮膚感作性の代替法として考えるのは難しい。特に下記の化合物が偽陰性となる可能性が高いため試験結果の解釈には注意が必要と考えられる。

#### 1) LLNA で moderate または weak の化合物

LLNA で weak sensitizer に分類される 5 物質 ( $\alpha$ -Hexylcinnamaldehyde,  $\alpha$ -Amylcinnamaldehyde, Oxalic acid, Benzyl benzoate, 2,2,6,6-Tetramethyl-3,5-heptanedione) と Modelate sensitizer に分類される 1 物質 (Nonanoyl chloride) は、DPRA では Minimal となり、陰性に分類される。

#### 2) プロハプテン、プレハプテン

本試験系は代謝系を有さない単純な化学反応を検出する試験系であることから、感作性の獲得に代謝的或いは非代謝的活性化を必要とするプロハプテン或いはプレハプテン (例: Dihydroeugenol 及び Limonene) は偽陰性と評価される可能性がある。

#### 3) 疎水性の高い物質等

正確度 (感度及び特異度) で述べたとおり、水系での反応を必要とする本法では疎水性の高い物質 (例: Chlorpromazine HCl) は偽陰性と判定される場合がある。さらにシステインやリジン以外のアミノ酸と優先的に反応するような求電子残基を有する物質についても正しく判定されない可能性がある。

以上のことから、DPRA により感作性陰性と判断された場合は、その物性等により偽陰性となる可能性を考慮し、補完し得る他の試験法により確認する必要がある。

先行バリデーション試験の成績から DPRA により陽性と判断された場合は、感作性陽性と判断することは可能と考えるが、本法の特異度は約 90% であり、希に偽陽性の結果が生じる可能性があることにも留意する必要がある。なお、本法は結合強度を Minimal, Low, Moderate, High の 4 クラスの分類する方法も提案されているが、施設間再現性は 62.5% と低く、結合強度の分類には適さないと考える。

一方、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しており、化学物質の感作性を判断する上で重要な情報を与えることから、証拠の重み付けや他の試験法と組み合わせでの評価を推奨する。

## 8. 結論

DPRA は、簡便性・経済性の面から有用な動物実験代替法である。

本試験法の先行バリデーション試験における施設内再現性は、3 施設中 1 施設において、GHS 区分 1B（弱い感作性物質）の物質で再現性が得られなかったため達成基準に達しておらず、弱い感作性物質では判定がぶれる懸念がある。一方、施設間再現性は、適用範囲外の金属塩を除いた場合に達成基準を上回った。

本試験法適用外の金属塩を除いた場合の先行バリデーション試験における感度は約 75% であるため、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により確認しなければならない、DPRA のみで皮膚感作性を陰性と判定することはできない。

先行バリデーション試験における本法の特異度は約 90% であり、陽性の結果が得られた場合は、感作性陽性と判断することは可能だが、希に偽陽性の結果が生じる可能性があることに留意しなければならない。

なお、本法は結合強度を Minimal, Low, Moderate, High の 4 クラスに分類する方法も提案されているが、施設間再現性は 62.5% と低く、結合強度の分類には適さない。

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しており、化学物質の感作性を判断する上で重要な情報を与えてくれる。LLNA の 1/10 程度の経費で実施可能であり、動物を用いない *in chemico* 試験法であることから、有用性は高い。しかしながら、本法は代謝系を欠く化学的試験法であり、活性化に代謝系や非生物的活性化を必要とする感作性物質、弱い感作性物質や金属塩、疎水性の高い物質などは正しくその感作性が検出されない可能性がある。以上の事実を踏まえ、委員会は、証拠の重み付けや他の試験法（LLNA、モルモットを用いる皮膚感作性試験）と組み合わせでの評価を推奨する。

## 引用文献

- 1) OECD ENV/JM/MONO (2012) /Part1, The adverse outcome pathway for skin sensitization Initiated by covalent binding to proteins : Scientific evidence.
- 2) Kato H., Okamoto M., Yamashita K., Nakamura Y., Fukumori Y., Nakai K. and Kaneko H. (2003) Peptide binding assessment using mass spectrometry as a new screening method for skin sensitization. *J. Toxicol. Sci.* 28(1), 19-24.
- 3) Natsch, A. and Gfeller H. (2008) LC-MS-based characterization of the peptide reactivity of chemicals to improve the in vitro prediction of the skin sensitization potential. *Toxicol. Sci.* 106(2), 464-478
- 4) Chipinda I., Ajibola R. O., Marakinyo M. K., Ruwona T. B. Simoyi R. H. and Siegel P. D. (2010) Rapid and simple kinetics screening assay for electrophilic dermal sensitizers using nitrobenzenethiol. *Chem. Res. Toxicol.* 23(5) 918-925.
- 5) OECD (2015) *In Chemico* Skin Sensitization: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442C.
- 6) 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](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/files-dpra/DPRA%20Validation%20Study%20Report.pdf)
- 7) Gerberick F., Vassallo J.D., Foertsch L.M., Price B. B., Chaney, J. G., Lepoittevin, J-P. (2007) Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: a classification tree model approach. *Toxicol. Sci.* 97(2), 417-427