

皮膚感作性試験ADRAの習熟度試験とその高速化

林田 桃香、野村 文子

ユーザーベネフィット

- ◆ ADRA試験において、高い再現性、良好な検量線直線性が得られます。
- ◆ 高速条件を用いることで10種の被験物質の試験で約50時間かかったHPLC分析が18時間で完了します。
- ◆ 高速条件においても定量精度を損なうことなく溶媒の節約、工数の削減ができます。

■はじめに

化学物質の皮膚へのアレルギー性を評価する皮膚感作性試験は、動物保護の観点から動物実験以外の代替法の整備が進められています。化学物質は、表皮タンパク質中のシステイン、またはリジンと結合すると炎症反応を誘導します。それらの性質を利用し、*in chemico*の代替法として、皮膚感作性試験Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) および Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA) が、化学物質の評価法に関する国際的な指針であるOECD（経済協力開発機構）テストガイドラインに記載されています。

ADRAはシステイン、リジンにナフタレン環を誘導した、それぞれ*N*-(2-(1-naphthyl)acetyl)-*L*-cysteine（以降NAC）、 α -*N*-(2-(1-naphthyl)acetyl)-*L*-lysine（以降NAL）を用いて被験物質の結合性を評価します。ADRAはDPRAと比較して、試料溶液もDPRAの1/100の濃度で分析します。また、ナフタレン環があることで、夾雑成分による検出への影響の少ないUV 281 nmで検出することができます。

ADRA試験法は、OECD TG442C APPENDIX II, ANNEX IIIに記載されています。そこにはシステム適合性試験や習熟度評価試験も記載されています。習熟度評価には、試験環境や試験者の技術的習熟度を評価する目的で、試験物質10種類についてNAC、NALの結合性（NAC、NAL減少率）が規定されています。今回、記載のシステム適合性試験および習熟度試験をNexera XRを用いて行いました。記載された全ての物質について規定範囲内の結果が得られました。

さらに高速条件も検討しました。OECD記載条件と変わらない結果が得られました。

■ADRA

ADRAでタンパク質反応性の評価として用いるNACとNALの構造式を図1に示します。被験物質溶液とNAC溶液、またはNAL溶液を反応させた後、NAC、NALの減少率をHPLCで測定することで、被験物質のシステイン、リジンに対する結合能を評価します。

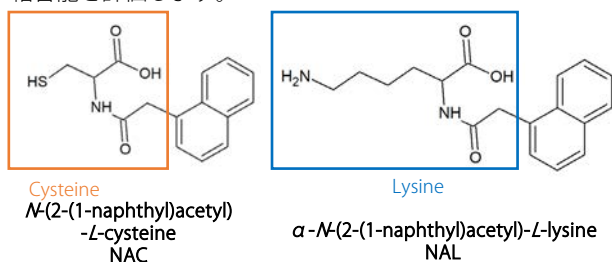


図1 NAC、NALの構造式

■分析条件

表1に分析条件を、図2に前処理手順を示します。試薬類はADRAキット（富士フイルム和光純薬製）を用いて調製しました。

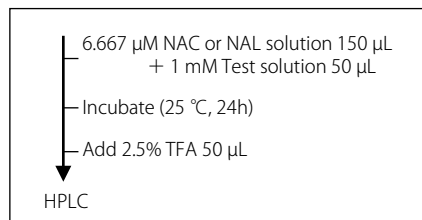


図2 前処理手順

表1 分析条件

System	: Nexera XR
Column	: Shim-pack™ Velox C18 *1 (150 mm × 3.0 mm I.D., 2.7 μm)
Mobile Phase	: A) 0.1%TFA in Water B) 0.1%TFA in Acetonitrile
Time Program for NAC	: B conc. 30% (0 min)→55% (9.5 min)→100% (10-13 min)→30% (13.5-20 min)
Time Program for NAL	: B conc. 20% (0 min)→45% (9.5 min)→100% (10-13 min)→20% (13.5-20 min)
Flow Rate	: 0.3 mL/min
Column Temp.	: 40 °C
Injection Vol.	: 10 μL
96-well Plate	: TORAST 96well 500 RU*2 NAL-96 sealing film (USA Scientific) *3
Detection	: SPD-M40 at 281 nm (UHPLC cell)

*1 P/N: 227-32010-04

*2 P/N: 370-04010-01

*3 P/N: 2923-5000

■標準溶液と参照コントロールの分析

ADRAでは、標準溶液による検量線直線性や参照コントロールによるシステム安定性確認などの試験成立条件が設定されています。図3にNAC、NALの検量線を示します。0（ブランク）-5 μMの7点検量線を作成しました。寄与率 $r^2 > 0.990$ が条件として指定されていますが、いずれも良好な直線性が得られました。

表2に参照コントロール（以降RC）の試験結果を示しました。RC-A、Bは被験物質の代わりにアセトニトリルを、RC-Cは被験物質の溶解に用いた溶媒を加えました。RC-AでNAC、NAL濃度が規定値であることを確認し、RC-Bは分析バッチの序盤と終盤で各3回繰り返し測定し、NAC、NALの濃度の結果および面積の再現性をもって分析時間内のシステムの安定性を確認します。RC-CはNAC、NALと各被験物質の溶解に用いた溶媒との反応性を確認するとともに、減少率を算出する際のリファレンスとして用います。

表2 参照コントロール(RC)の結果

		Acceptance Criteria	NAC	NAL
RC-A	Conc.	3.2-4.4 μM	3.7	4.0
RC-B、RC-C (Acetonitrile)	CV (%) (n=9)	<10	0.0	0.0
RC-C (Water)	Conc.	3.2-4.4 μM	3.6	3.7
	CV (%) (n=3)	<10	0.1	0.1
RC-C (Acetonitrile)	Conc.	3.2-4.4 μM	3.8	4.0
	CV (%) (n=3)	<10	0.0	0.0
RC-C (Acetone)	Conc.	3.2-4.4 μM	3.9	3.9
	CV (%) (n=3)	<10	0.0	0.0

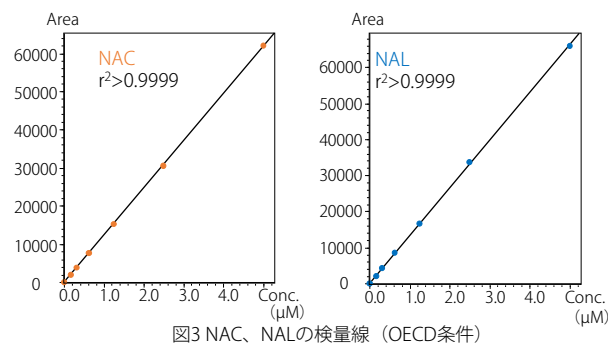


図3 NAC、NALの検量線 (OECD条件)

$$\text{NAC or NAL depletion (\%)} = \left(1 - \frac{\text{NAC or NAL peak area in replicate injection}}{\text{Mean NAC or NAL peak area in RC-C}} \right) \times 100$$

図4 NAC、NALの減少率算出方法

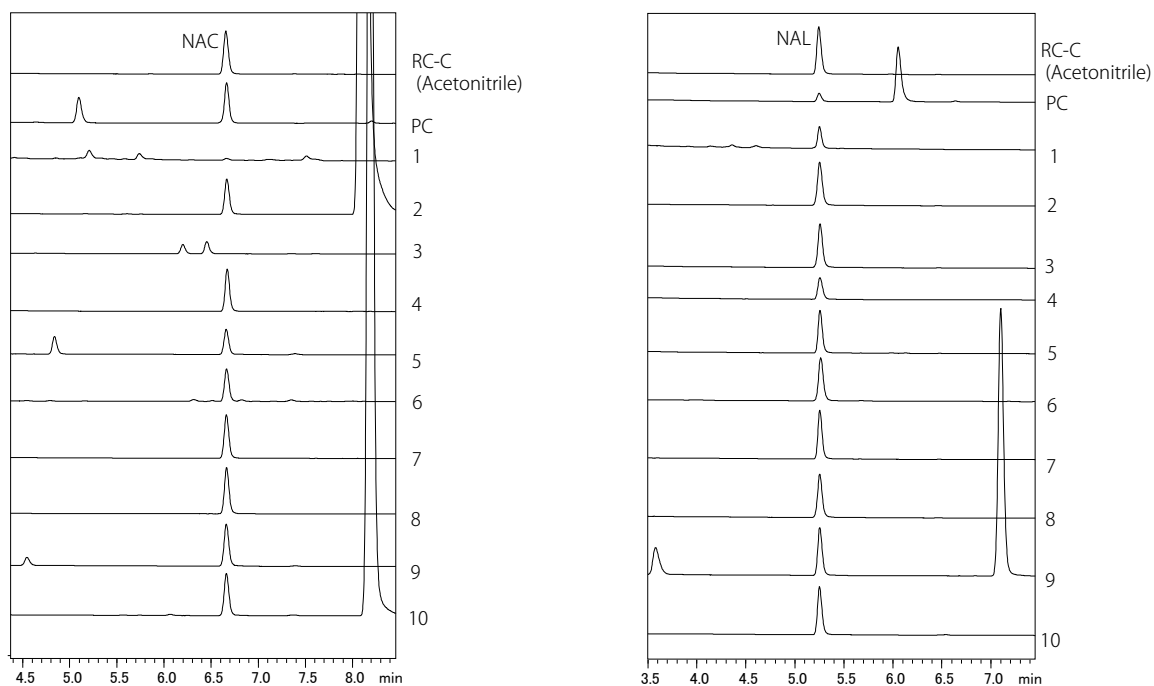


図5 PC、習熟度化合物のクロマトグラム (左: NAC、右: NAL) (各クロマト番号は表3参照)

表3 陽性対象 (PC)、習熟度化合物のNAC、NAL減少率と標準偏差 (n=3)

No.	Substance	Solvent	NAC Depletion (%)			NAL Depletion (%)		
			Criteria	Result	SD	Criteria	Result	SD
PC	Squaric acid diethyl ester	Acetonitrile	15-40	15.0	0.2	40-85	84.9	3.0
1	p-Benzoquinone	Acetonitrile	90-100	96.2	0.4	40-70	55.2	0.1
2	Diphenylcyclopropenone	Acetonitrile	15-45	23.8	1.4	≤10	0.0	0.1
3	2-Methyl-2H-isothiazol-3-one	Water	80-100	100	0.0	≤7	0.5	0.4
4	Palmitoyl Chloride	Acetonitrile	≤10	5.9	0.5	50-100	51.6	0.9
5	Imidazolidinyl urea	Water	10-45	33.5	3.8	≤10	1.0	0.1
6	Farnesal	Acetonitrile	20-40	31.2	1.5	≤15	1.9	0.5
7	Glycerol	Water	≤7	0.0	0.0	≤7	0.0	0.0
8	Isopropanol	Water	≤7	0.4	0.7	≤7	0.7	0.4
9	Dimethyl isophthalate	Acetonitrile	≤7	0.7	1.3	≤7	0.0	0.0
10	Propyl paraben	Acetonitrile	≤7	0.8	1.2	≤7	0.0	0.0

■ 習熟度化合物の分析

OECD記載の評価物質10種類について習熟度評価を行いました。被験物質の皮膚感作性はNAC、NALの減少率を元に判定します。図4に減少率の算出方法を示します。技術的習熟度の評価手順では、NAC減少量、NAL減少量が各成分ごとに定められた減少率の範囲内に入ること、n=3の標準偏差 (SD) が10%以下であると合格になります。またシステム適合性としては、習熟度化合物10種類中8種類で基準値を満たすことが要求されています。図5に陽性対象 (PC)、習熟度化合物のクロマトグラムを、表3に減少率と標準偏差を示します。結果、10種類全ての習熟度化合物で基準値を満たす結果が得られました。

■ 高速分析

OECDで推奨されるカラムは粒子径2.7 μmの高速分析用ですが、OECDの条件は汎用型HPLCの耐圧範囲内で設定されているため、1サンプルあたり20分の分析時間を要します。例えば10種類の試験には、システム適合性試験、検量線作成試験も含めて50時間かかります。ここではNexera XRの耐圧範囲(最大70 MPa)に合わせて、同じカラムを用いて高速分析を検討しました。

表4に分析条件を示します。1分析7分で分析を行いました。図6にNACとNALの標準溶液のクロマトグラムを、図7にNAC、NALの検量線を示します。良好な直線性が得られました。またRC-B、RC-C (アセトニトリル) から得たシステムの適合性はOECD記載条件での結果と同等の結果が得られました。

表4 分析条件

System	: Nexera XR
Column	: Shim-pack Velox C18 (150 mm × 3.0 mm I.D., 2.7 μm)
Mobile Phase	: A) 0.1%TFA in Water B) 0.1%TFA in Acetonitrile
Time Program for NAC	: B conc. 30% (0 min)→55% (3.5 min)→ 100% (3.6-5.0 min)→30% (5.1-7.0 min)
Time Program for NAL	: B conc. 20% (0 min)→45% (3.5 min)→ 100% (3.6-5.0 min)→20% (5.1-7.0 min)
Flow Rate	: 1.0 mL/min
Column Temp.	: 40 °C
Injection Vol.	: 10 μL
96-well Plate	: TORAST 96well 500 RU NAL-96 sealing film
Detection	: SPD-M40 at 281 nm (UHPLC cell)

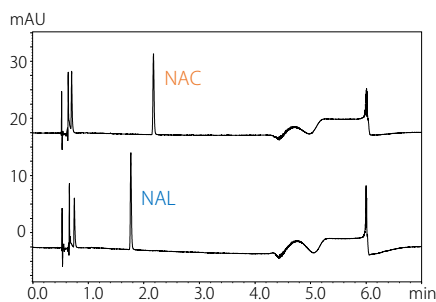


図6 NAC、NAL標準溶液 (5 μM) のクロマトグラム

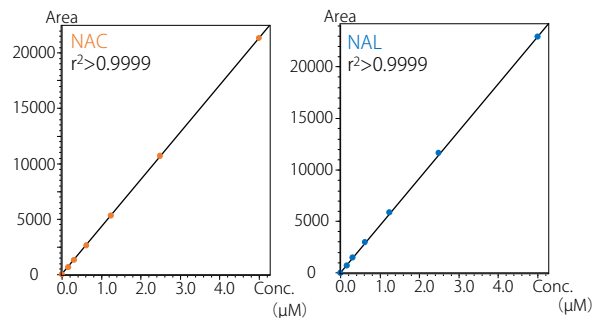


図7 NAC、NALの検量線 (高速条件)

■ まとめ

Nexera XRを用いてOECDテストメソッド準拠のADRAを行いました。良好な再現性、検量線直線性が確認できました。汎用条件では10種類のテストに50時間を要しましたが、高速条件ではこれを18時間に短縮できました。

- 本アプリケーションニュース作成にあたり、富士フイルム株式会社 山本裕介様、藤田正晴様、笠原利彦様に多大なご協力頂きました。
- プロトコル、解析手順はOECD TG442C、富士フイルム ADRA技術セミナー2019-プロトコル・手技説明、ADRAキット取扱説明書を参考にしました。

Nexera、Shim-packは、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

01-00258-JP 初版発行：2021年 9月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

最新版は、島津製作所>分析計測機器の以下のサイトより閲覧できます。
<https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/index.htm>

会員情報サービス Shim-Solutions Club にご登録いただけますと、毎月の最新情報をメールでご案内します。新規登録は、<https://solutions.shimadzu.co.jp/> よりお願いします。

© Shimadzu Corporation, 2021