

Application News

No. L531

高速液体クロマトグラフィー

Prominence™-i を用いた皮膚感作性試験 DPRA (ペプチド結合性試験) の分析

皮膚感作性試験は、モルモットやマウスを使った動物試験法が主流でした。しかし 2013 年に欧州における化粧品の動物実験が完全禁止となり、動物を用いない代替試験法が求められています。DPRA (Direct Peptide Reactivity Assay: ペプチド結合性試験) はその代替法の 1 つであり、被験物質とペプチドの結合性を調べることで、皮膚感作性の有無を評価する方法です。ペプチドにはシステインを含むものとリジンを含むもの 2 種を使用し、これらと被験物質を混合・24 時間反応させた後 HPLC にてペプチドの減少率を求めます。得られた各ペプチドの減少率から被験物質の皮膚感作性を評価します。

本アプリケーションニュースでは、「TG442C 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)」を参考に分析を行いました¹⁾。分析装置には、一体型高速液体クロマトグラフ Prominence-i (PDA モデル) を用いました。なお、被験物質とペプチドの 24 時間インキュベーションは、本装置のオートサンプラーのラックにて行いました。カラムには、Shim-pack™ HR-ODS (100 mm L×2.1 mm i.d., 3 μm) を用いました。

A.Nomura

■ 被験物質について

今回は、被験物質として上記ガイドラインの「補遺 2」に記載されている習熟度評価²⁾ 用物質から、3 物質を用いました。感作物質のホルムアルデヒド (strong)、ベンジリデンアセトン (moderate)、非感作物質の乳酸で試験を行い、システイン含有ペプチドとリジン含有ペプチドの減少率を求めました。

■ サンプル溶液の調製

各被験物質はアセトニトリルを用いて 100 mmol/L に調製しました。システイン含有ペプチド³⁾ 溶液およびリジン含有ペプチド³⁾ 溶液も分析直前にそれぞれ緩衝液を用いて 0.667 mmol/L に調製しました。各溶液を表 1 および 2 のとおり混合しました。これらの溶液の各濃度は、システイン含有ペプチド溶液の場合、ペプチド濃度 0.5 mmol/L に対し被験物質濃度が 5 mmol/L (濃度比は 1 対 10)、リジン含有ペプチド溶液の場合には、ペプチド濃度 0.5 mmol/L に対し被験物質濃度 25 mmol/L (濃度比は 1 対 50) となります。これら溶液をガラスバイアルにいれ、オートサンプラーのラックを 25 °C に設定し 24 時間インキュベートしました。

なお、基準対照とは、インキュベート等の操作や分析中にペプチドの増減がないことを確認する目的で、基準対照 A~C を調製します。基準対照 A を連続分析の最初に測定し、HPLC システムの適合性を検証します。基準対照 B を試験溶液測定前と後に測定し経時的な安定性を、また基準対照 C を試験溶液とセットで測定し試料溶媒がペプチド減少率に影響しないことを検証します。共溶出対照とは、ペプチド溶出位置に夾雑成分の溶出がないかを確認するための試料です。また、陽性対照としてシンナムアルデヒドを用いました。ペプチドの減少率が既知の成分で、一連の操作や分析が上手く行っているか検証します。

■ 分析

インキュベート後、各溶液を表 3 の条件で分析しました。ペプチド標準溶液から検量線を作成した後、「基準対照 A」から順に分析します。各溶液は 3 回分析し、ばらつきなく測定できているかを確認します。図 1 と 2 に、システイン含有ペプチド、リジン含有ペプチド、それぞれの基準対照 A のクロマトグラムを示します。

表 1 システイン含有ペプチドにおける各サンプル溶液の調製

	ペプチド溶液	pH7.5 リン酸緩衝液	アセトニトリル	被験物質溶液
基準対照	750 μL	-	250 μL	-
試験溶液	750 μL	-	200 μL	50 μL
共溶出対照	-	750 μL	200 μL	50 μL

表 2 リジン含有ペプチドにおける各サンプル溶液の調製

	ペプチド溶液	pH10.5 酢酸アンモニウム緩衝液	アセトニトリル	被験物質溶液
基準対照	750 μL	-	250 μL	-
試験溶液	750 μL	-	-	250 μL
共溶出対照	-	750 μL	-	250 μL

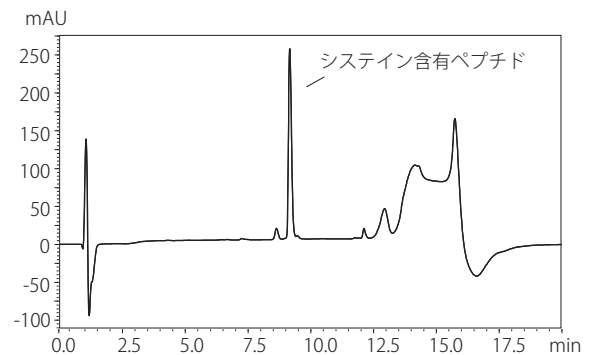


図 1 システイン含有ペプチド (基準対照 A) のクロマトグラム

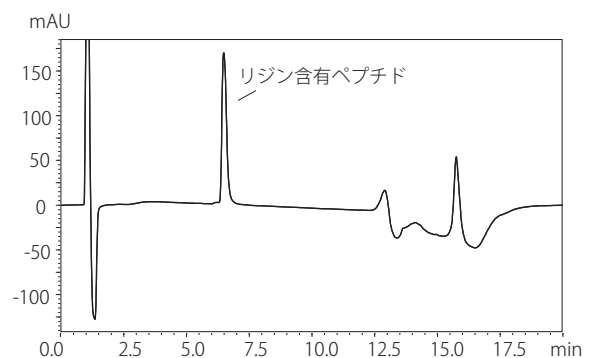


図 2 リジン含有ペプチド (基準対照 A) のクロマトグラム

■ 許容基準の評価および習熟度試験の結果

一連の分析結果から、許容基準の評価 (表 4) を行いました。今回の測定で、全ての項目において基準を満たしていることがわかりました。

図 3 および図 4 には、ペプチド標準溶液となる基準対照 C と陽性対照、各試験溶液の分析結果 (各 1 回目のデータ) のクロマトグラムを示します。各試験溶液の 3 回繰り返し分析結果から各ペプチド減少率の平均を算出しました (表 5)。「補遺 2」の習熟度評価で示されているペプチド減少率の範囲内になりました。

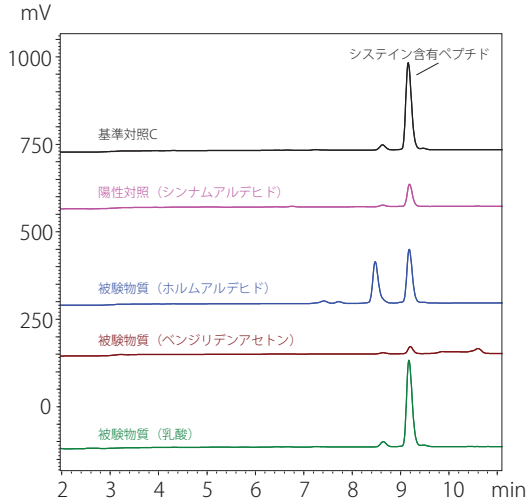


図 3 システイン含有ペプチドにおける各サンプル溶液のクロマトグラム

System	: Prominence-i
Column	: Shim-pack HR-ODS*1 (100 mm L. × 2.1 mm I.D., 3 μm)
Mobile Phase	: A: 0.1 %TFA-Water, B: 0.085 %TFA-Acetonitrile
Time Program	: B Conc. 10 % (0 min) → 25 % (10 min) → 90 % (11 min → 13 min) → 10 % (13.5 min → 20 min)
Flow Rate	: 0.35 mL/min
Column Temp.	: 30 °C
Injection Volume	: 7 μL
Detection	: PDA220 nm

*1 ガードカラムの使用を推奨いたします。

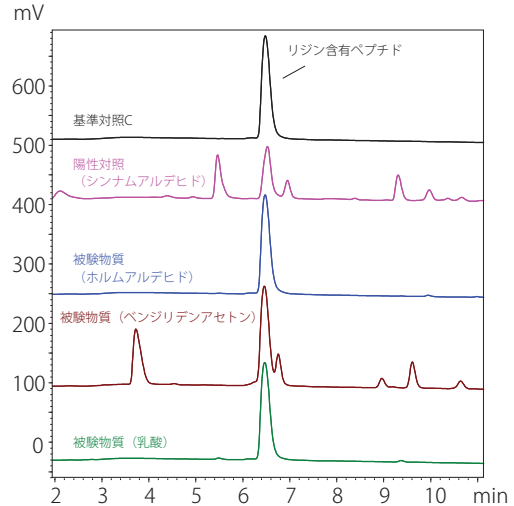


図 4 リジン含有ペプチドにおける各サンプル溶液のクロマトグラム

表 4 許容基準の結果

	システイン含有ペプチド	リジン含有ペプチド	基準	判定
検量線 R ²	0.999	0.999	>0.990	OK
陽性対照シナムアルデヒド 3 回反復測定におけるペプチド減少率*2の平均	77.1 %	51.2 %	システイン含有ペプチド: 60.8~100 % リジン含有ペプチド: 40.2~69.0 %	OK
陽性対照シナムアルデヒド 3 回反復測定に おけるペプチド減少率の標準偏差	0.8 %	1.2 %	システイン含有ペプチド: 14.9 %未満 リジン含有ペプチド: 11.6 %未満	OK
基準対照 A 3 回繰り返し分析濃度平均	0.49 mmol/L	0.50 mmol/L	0.50 ± 0.05 mmol/L	OK
基準対照 B および C 9 回分析のピーク面積の変動係数	3.7 %	0.3 %	15.0 %未満	OK
被験物質「ホルムアルデヒド」 減少率の標準偏差	0.6 %	0.1 %	システイン含有ペプチド: 14.9 %未満 リジン含有ペプチド: 11.6 %未満	OK
被験物質「ベンジリデンアセトン」 減少率の標準偏差	0.3 %	0.3 %	システイン含有ペプチド: 14.9 %未満 リジン含有ペプチド: 11.6 %未満	OK
被験物質「乳酸」 減少率の標準偏差	1.8 %	0.1 %	システイン含有ペプチド: 14.9 %未満 リジン含有ペプチド: 11.6 %未満	OK
基準対照 C 3 回反復測定におけるペプチド濃度の平均	0.50 mmol/L	0.51 mmol/L	0.50 ± 0.05 mmol/L	OK

*2 ペプチド減少率: $[1 - (\text{反復分析におけるペプチドのピーク面積}) / (\text{基準対照 C におけるペプチドピーク面積の平均})] \times 100$

表 5 習熟度評価

	システイン含有ペプチド 減少率の平均 (%)	OECD/OCDE TG442C 補遺 2 記載 システイン含有ペプチド 減少率の範囲 (%)	リジン含有ペプチド 減少率の平均 (%)	OECD/OCDE TG442C 補遺 2 記載 リジン含有ペプチド 減少率の範囲 (%)	判定
ホルムアルデヒド (感作物質 strong)	41.7	30~60	1.7	0~24	OK
ベンジリデンアセトン (感作物質 moderate)	92.7	80~100	3.8	0~7	OK
乳酸 (非感作物質)	5.5	0~7	1.2	0~5.5	OK

- 1) 本アプリケーションニュースでは、TG442C OECD のガイドラインで推奨しているプロトコル (下記) を参考にして分析を行いました。
EURL ECVAM 動物実験代替法データベースサービス (DB-ALM) Protocol no 154: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for Skin Sensitisation Testing
- 2) DPRA に期待する結果を正確に得る技術的習熟度を立証する目的で、指定した物質のペプチド減少率について範囲内の結果が得られるかを見るもの。
- 3) 株式会社スクラム製

Prominence および Shim-pack は、株式会社 島津製作所の商標です。
本文中には TM マークを明記していない場合があります。

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

初版発行: 2019 年 1 月

島津コールセンター ☎ 0120-131691
(075) 813-1691

※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。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。