

博士論文

ナフタレン環含有アミノ酸誘導体を用いた皮膚感作性試験
代替法の低濃度および重量濃度測定法の開発と
その有用性の検証

令和2年3月

山本 裕介

岡山大学大学院
医歯薬学総合研究科

目次

略語	1
要約	2
序論	4
第 1 章 Amino acid derivative reactivity assay における試験条件の低濃度化	11
1-1. 材料および方法	12
1-2. 結果	19
1-3. 考察	33
1-4. 小括	41
第 2 章 分子量不明成分の評価法開発	42
2-1. 材料および方法	43
2-2. 結果	44
2-3. 考察	56
2-4. 小括	61
第 3 章 複数試験の組合せアプローチへの適用	62
3-1. 材料および方法	63
3-2. 結果	67
3-3. 考察	72
3-4. 小括	76
総括	77
謝辞	79
引用文献	80
Supplemental data	86

略語

ADRA	Amino acid derivative reactivity assay
ADRA-DM	Amino acid derivative reactivity assay-dilutional method
ADRA-WM	Amino acid derivative reactivity assay-weight concentration method
AOP	Adverse outcome pathway
ATP	Adenosine triphosphate
BrdU	Bromodeoxyuridine
DMSO	Dimethylsulfoxide
DPRA	Direct peptide reactivity assay
EDTA	Ethylenediamine- <i>N,N,N,N</i> -tetraacetic aciddisodium salt dehydrate
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
GHS	The globally harmonized system of classification and labelling of chemical
GPMT	Guinea pig maximisation test
h-CLAT	Human cell line activation test
HPLC	High performance liquid chromatography
LC/MS	Liquid chromatography-mass spectrometry
NMR	Nuclear magnetic resonance
IATA	Integrated approaches to testing and assessment
ITS-SA	Integrated testing strategy scoring approach
ITS-2MA	Integrated testing strategy two methods approach
LLNA	Local lymph node assay
LogKow	Log octanol-water partitioning coefficient
NAC	<i>N</i> -(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-cysteine
NAL	α - <i>N</i> -(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-lysine
OECD	Organisation for economic co-operation and development
QSAR	Quantitative structure–activity relationship
SDS	Safety data sheet
STS	Sequential testing strategy
TFA	Trifluoroacetic acid
U-SENS	U937 skin sensitization test

要約

近年、化学製品における安全性試験において、動物愛護の観点から従来の動物実験に対する規制が厳しくなっている。そのため、動物を使用しない試験法の開発が必要となっており、さまざまな動物実験代替法が開発されている。

皮膚感作性試験においてもいくつかの動物実験代替法が開発されており、皮膚感作の初期段階で起こる感作性物質とタンパク質との反応を評価する試験法として **Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)** がある。この試験法はタンパク質の代わりにペプチドと化合物の反応性を簡便で汎用性の高い方法である。しかしながらこの試験法は、試験に用いる被験物質濃度が高いために被験物質が反応液中で析出する、ペプチドに特異的な UV 吸収波長がないために、HPLC でペプチドを定量する際に被験物質の夾雑ピークがペプチドのピークと共溶出することにより評価できない化合物がある、ペプチドの品質により試験結果が変わることがあり、再現性がよくないといったいくつかの課題があった。これに対し我々の研究施設では、タンパク質の代わりに高い UV 吸収を有するナフタレン環をアミノ酸のシステインおよびリジンに導入した *N*-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-cysteine (NAC) および α -*N*-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-lysine (NAL) を用いた、高感度な皮膚感作性試験代替法 (Fujita 法) を開発した。この試験法では、共溶出やペプチド品質による影響を解決したが、被験物質濃度は DPRA と同じであるため、溶解度の低い物質の測定が出来ないことについては DPRA と同様であった。

本研究ではまず初めに Fujita 法の特徴を活かし、試験濃度を低濃度化することで溶解度の低い物質の測定が可能な試験法「Amino acid Derivative Reactivity Assay-dilutional method (ADRA-DM)」の開発を試みた。

その結果、DPRA の試験法開発に使用された 82 化合物における *in vivo* 試験である Local Lymph Node Assay (LLNA) に対する予測精度が 90.2%と、DPRA と同等以上の予測精度であることが示された。さらに、同じ 82 化合物について ADRA-DM と DPRA の反応液中における析出の有無を比較したところ、DPRA では 30 物質が析出したが、ADRA-DM では 3 物質がわずかに白濁しただけであった。また、DPRA では LogKow が 2 以上の化合物においてほとんどが析出したのに対し、ADRA-DM では LogKow が 6 以上の化合物においてしか析出は見られなかった。

次に、分子量が不明な化合物や混合物の評価ができないという ADRA-DM と DPRA 共通の課題を解決するために、重量濃度で調製した被験物質溶液を用いた試験法の開発も行った。その結果、0.5 mg/mL の被験物質溶液を用いた場合において、上記で開発した ADRA-DM および DPRA と比較して、LLNA に対する予測精度が同程度であった。さらに、非感作性物質の混合液に感作性物質を添加した疑似混合液を用いた評価を行ったところ、感作性物質が 0.5 mg/mL 含まれている場合において、試験に用いた感作性物質すべてを検出することができた。

また、上記で確立した低濃度の試験法と重量濃度で調製した被験物質溶液を用いた試験

法における有用性を確認するために、複数の試験を組み合わせたアプローチ (Integrated Approaches to Testing and Assessment [IATA]) における評価能力の検証を行った。その結果、既存の4種のIATA (2 out of 3 approach, ボトムアップ 3 out of 3 アプローチ, STS, ITS-SA) において、DPRA を用いた場合と同程度の予測精度となり、DPRA と同様に IATA においても使用可能であることが示された。

以上より、本研究で開発した試験法は疎水性物質や混合物を含む広範囲な化合物への適用が可能な、非常に有用な試験法であることが示されると共に、他の皮膚感作性代替法との組み合わせである IATA による皮膚感作性評価における有用性が示された。

序論

安全性評価と動物実験

化学製品の安全性を評価する試験は従来、動物を用いた試験法が行われてきた。しかしながら近年では、動物福祉の観点から世界的に動物実験に対する規制が進んでおり、EU では 2013 年以降、EU 加盟国における動物実験を使用した原料を含む化粧品類の販売が全面的に禁止となっている (European Commission. 2003)。こういった規制は「Replacement : 動物を使用しない方法への置換え」、「Reduction : 使用動物数の削減」、「Refinement : 実験に伴う動物に対する苦痛の削減」の 3 つから成る 3Rs の原則 (Russel and Burch. 1954, Smyth. 1978) に基づいており、特に Replacement に属する動物を使用しない試験法 (動物実験代替法) の開発が喫緊の課題となっている。

経済協力開発機構 (OECD) のテストガイドライン (TG) には国際的に合意された安全性評価試験法が記載されており、動物実験代替法では皮膚刺激性 (OECD TG439. 2019a)、眼刺激性 (OECD TG491. 2018a, TG492. 2019b)、皮膚腐食性 (OECD TG431. 2019c, TG435. 2015)、皮膚感作性 (OECD TG442C. 2019d, e, TG442D. 2018b, c, TG442E. 2018d, e, f)、光毒性 (OECD TG432. 2019f, TG495. 2019g) などにおける試験法が収載されている。

皮膚感作性試験における動物実験

皮膚感作性試験については、従来はモルモットを用いた Buehler Test および Guinea Pig Maximisation Test (GPMT) (OECD TG406, 1992) が行われてきた。GPMT は現在も実施されている試験法であり、被験物質を暴露した後のモルモットにおける皮膚の状態を観察し、炎症の度合いから感作性を評価する。具体的には、被験物質をモルモットの肩に皮下注射し、その 6 日後に被験物質を浸透したフィルターを 48 時間暴露したのち、その約 2 週間後にモルモットの脇腹に被験物質をさらに 24 時間暴露する。その後、暴露後 24 時間および 72 時間の皮膚の状態を観察し、炎症の状態から 4 段階に分類する。この試験法では 1 化合物を評価するのに最低 15 匹のモルモットを必要とする。これに対し、動物の苦痛を軽減した試験法としてマウスを用いた Local Lymph Node Assay (LLNA) (OECD TG429. 2010a, TG442A. 2010b, OECD TG442B. 2018g) が開発されており、近年最も多く利用されている。LLNA は、皮膚感作が属する IV 型アレルギーにおける、抗原特異的な T 細胞の増殖を評価する試験法であり、感作性物質が暴露された部位に近いリンパ節において T 細胞の増殖を誘導するという原理に基づいている。具体的な方法として、マウスの耳介に被験物質を一日おきに計 3 回反復投与し、その後マウスの耳介リンパにおける T 細胞を定量する。定量方法は放射性試薬の ^3H -メチルチミジンまたは ^{125}I -ヨードデオキシウリジンを取り込ませることで DNA 量を定量する方法 (OECD TG429. 2010a) や、アデノシン三リン酸 (ATP) の量を化学発光によって測定する方法 (OECD TG442A. 2010b)、bromodeoxyuridine (BrdU) を取り込ませて ELISA またはフローサイトメトリーにより DNA 量を測定する方法 (OECD TG442B. 2018g)

など、さまざまな方法が提案され、ガイドラインに収載されている。LLNA では 1 化合物を評価するのに最低 20 匹のマウスが必要であり、動物を使用した試験法という点においては Buehler Test や GPMT と同じである。

皮膚感作性のメカニズムと動物実験代替法

皮膚感作は、皮膚が化学物質に暴露されることで引き起こされる接触皮膚炎を臨床症状とするアレルギー反応のことである。皮膚に触れる可能性のあるものは皮膚感作を起こすリスクがあるため、化粧品、日常生活品、農薬、染料など様々な化学製品において皮膚感作性試験が実施されている。これらの皮膚感作性試験の結果は、主に世界共通のハザード分類である GHS 区分に変換され、製品のラベルや安全性データシート (SDS) に記載される。

皮膚感作では、皮膚が感作性物質に暴露されてから症状が現れるまで複雑な過程を経ている。OECD では、安全性評価試験は化学物質の暴露から症状が現れるまでの発生経路 (Adverse Outcome Pathway [AOP]) に基づいた試験法であることを必要としており、皮膚感作においては図 1 に示すように、1. タンパク質と感作性物質の結合 (ハプテン化)、2. 表皮角化細胞の活性化、3. 樹状細胞の活性化、4. 抗原特異的 T 細胞の活性化と増殖、からなる 4 つの Key event を AOP として定義している (OECD. 2014)。このうち Key event 4 を除く 3 つの Key event に基づいた動物実験代替法が TG に収載されており、Key event 1 では本研究で開発した Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA) (OECD TG442C. 2019d) および Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) (OECD TG442C. 2019e)、Key event 2 では ARE-Nrf2 luciferase test method (KeratinoSensTM) および ARE-Nrf2 Luciferase LuSens (OECD TG442D. 2018b, c)、Key event 3 では h-CLAT, U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) および IL-8 Luc assay (OECD TG442E. 2018d, e, f) の計 7 試験が収載されている。

Key event 1 である感作性物質とタンパク質との結合では、主に感作性物質はタンパク質中のシステインおよびリジンと結合することが知られている。そのため、ADRA および DPRA では、システインおよびリジンを含む検出試薬の化合物に対する反応性を評価することで皮膚感作性を予測する (Gerberick *et al.* 2004, 2007, Fujita *et al.* 2014)。

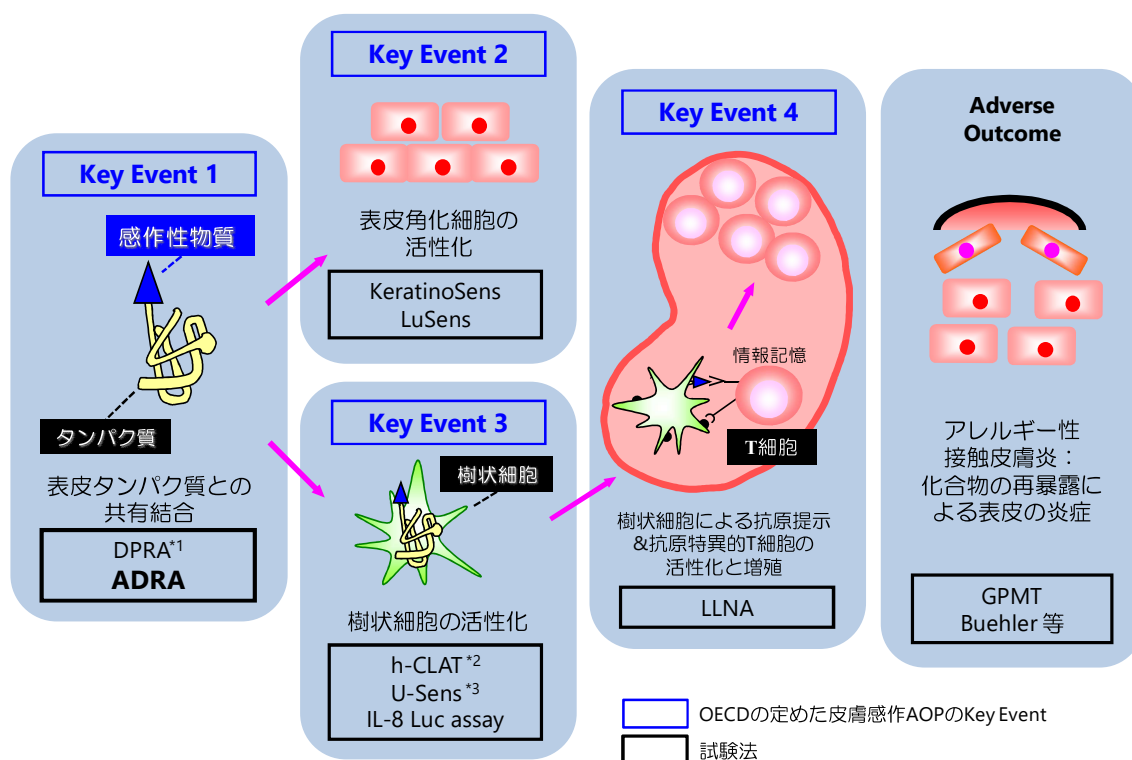
Key event 2 において、多くの感作性物質によって起こる表皮角化細胞の活性化は、転写因子 Nrf2 とその抑制タンパク質 Keap1 および抗酸化剤応答配列 ARE が関係する遺伝子発現経路 (Nrf2-Keap1-ARE pathway) によって起こることが報告されている (Natsch *et al.* 2010)。具体的には感作性物質が Keap1 に結合することにより Nrf2 から Keap1 が乖離することで Nrf2 が ARE を活性化する。そのため、KeratinoSens および LuSens では ARE にルシフェラーゼ遺伝子を導入した細胞を用いて、Nrf2-Keap1-ARE pathway の活性化をルミノメーターで測定することで表皮角化細胞の活性化を評価する。

Key event 3 における樹状細胞の活性化は、Key event 1 で形成したタンパク質と感作性物質の複合体を樹状細胞が認識することで惹起される。タンパク質と感作性物質の複合体を

取り込むことで樹状細胞は成熟し、その後皮膚の表皮から真皮に移動（遊走）して T 細胞に抗原を提示する。h-CLAT および U-SENS はこのメカニズムにおいて、樹状細胞が成熟する際に発現する細胞表面マーカーの発現量をフローサイトメトリーで測定することで、樹状細胞の活性化を評価している。h-CLAT では T 細胞の活性化に必要な副刺激分子である CD86 および樹状細胞への T 細胞の接着を媒介する CD54 の 2 遺伝子の発現を、U-SENS では CD86 の発現を測定している (Ashikaga *et al.* 2003, Piroird *et al.* 2015)。一方、IL-8 Luc assay では樹状細胞の遊走に関わる表皮サイトカインであるインターロイキン-8 (IL-8) の発現量を IL-8 プロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を導入した細胞 (THP-G8) を用いて、ルミノメーターで測定することで樹状細胞の活性化を評価している (Aiba *et al.* 1997, 2003, Takahashi *et al.* 2011)。

上記の試験法のうち、Key event 2 および 3 を評価する試験法は細胞を用いる *in vitro* 試験であり、培地に動物由来の血清を用いるため、完全な動物実験代替法ではないという指摘もある。そのため、KeratinoSens における血清を含まない培地を用いた試験系や h-CLAT におけるヒト血清を用いた試験系が提案されている (Belot *et al.* 2017, Edwards *et al.* 2018)。これに対し、Key event 1 の試験法は化学反応を評価する *in chemico* 試験であるため、動物由来の成分を一切使用しない真の動物実験代替法であるといえる。

また、これらの AOP に基づく皮膚感作性試験代替法は、複雑なメカニズムからなる皮膚感作性における 1 つの Key event のみを評価する手法であるため、1 つの試験法だけでは全ての化合物の皮膚感作性を評価するのは困難であるとされている。そのため、最終的な評価のためには異なる Key event を評価する複数の試験法を組み合わせることで、総合的に皮膚感作性を予測するアプローチ (Integrated Approaches to Testing and Assessment [IATA]) が必要とされている (OECD. 2016)。この IATA では、これまでに皮膚感作性試験として TG に収載されている試験法だけでなく、コンピューターを用いた予測 (*in silico*) を組み合わせた方法など、様々なアプローチが提案されている (ANNEX 1 in OECD. 2016)。



*1 Direct Peptide Reactivity Assay *2 human Cell Line Activation Test *3 U937 Skin Sensitization Test

図 1. 皮膚感作における Adverse Outcome Pathway と評価試験法

皮膚感作において、感作性物質に暴露されてから接触皮膚炎を起こすまでのメカニズム (AOP) における、OECD が定めた主要なイベント (Key event) を示した。動物試験では AOP において後半となる Key event 4 および表皮の炎症を評価するのに対し、代替法では前半の Key event 1～3 を評価する試験法が開発されている。

従来の Key event 1 評価試験

皮膚感作性 AOP の、Key event 1 におけるタンパク質と感作性物質との結合は皮膚感作における重要な最初のステップであり、この結合は主に求電子剤と求核剤間の共有結合であると報告されている (Smith *et al.* 2001, Aleksic *et al.* 2008)。そのため、化合物のタンパク質に対する反応性を評価することで、動物を用いず簡便に皮膚感作性を評価することができる可能性があることから、これまでに上記の ADRA および DPRA を含むいくつかの試験法が開発されてきた (Gerberick *et al.* 2004, 2007, 2008, Divkovic *et al.* 2005, Fujita *et al.* 2014)。また、タンパク質と感作性物質の反応生成物を NMR や LC-MS を用いて解析した報告もされている (Ahlfors *et al.* 2003, Alvarez-Sanchez *et al.* 2004, Nilsson *et al.* 2005)。

DPRA はタンパク質の代わりに図 2 に示すシステインまたはリジンを含むヘプタペプチド (Cys-peptide, Lys-peptide) を検出試薬として用い、このペプチドと被験物質との反応性を測定することで皮膚感作性を予測する (Gerberick *et al.* 2004, 2007)。この試験法は操作が簡

便で汎用性が高いため、Key event 1 の試験法として初めて OECD のテストガイドラインに収載された。DPRA ではペプチドと被験物質との反応性を、反応後における未反応のペプチドを HPLC で定量することで評価するが、ペプチドに特異的な UV 吸収や蛍光がない。そのため、試験系の濃度が比較的高く、反応液中で被験物質が析出したり、HPLC において被験物質由来の夾雑ピークがペプチドのピークと共溶出したりすることで、正確に定量できないことがある。これらの問題を解決するために LC/MS や stopped-flow を用いた低濃度の反応液による試験系 (Natsch *et al.* 2008, Chinpinda *et al.* 2010) も報告されているが、いずれの試験法も汎用的ではなく、stopped-flow については DPRA と同様に被験物質由来の夾雑の影響を受ける可能性が高い。

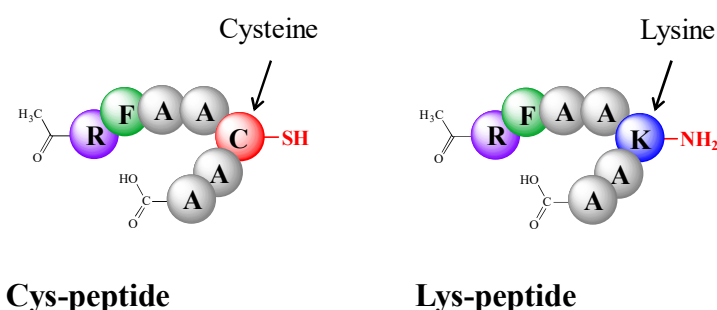


図 2. DPRA の検出試薬として使用する 2 種のペプチド

感作性物質は主にタンパク質中のシステインおよびリジンと結合することから、DPRA ではシステインおよびリジンを含むヘプタペプチドを検出試薬として使用している。システイン含有ペプチド (Cys-peptide) およびリジン含有ペプチド (Lys-peptide) のどちらも、システインおよびリジン以外は同じアミノ酸配列となっている。

ナフタレン環含有アミノ酸誘導体を用いた従来の研究概要

上記の DPRA に対し、Fujita *et al.* (2014) で報告された試験法 (以後 Fujita 法) では、検出試薬の測定における特異性を上げるために、システインおよびリジンに検出部位として高い UV 吸収を持つナフタレン環を導入した *N*-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-cysteine (NAC) および α -*N*-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-lysine (NAL) を開発した (図 3)。これらの試薬における検出部位のナフタレン環は 281 nm と比較的長波長に最大吸収波長をもつため、220 nm で検出している DPRA と比較して検出における特異性が高く、被験物質由来の夾雑の影響を受けにくい。また、ナフタレン環以外にも特異性の高い構造を使用することも可能であるが、反応液の溶媒である水 (緩衝液) および有機溶媒のどちらにもある程度の溶解性があり、システインおよびリジンと感作性物質の反応において立体障害などの影響がない、シンプルで安定性の高い構造であるという点においてナフタレン環が最適であるとしている。

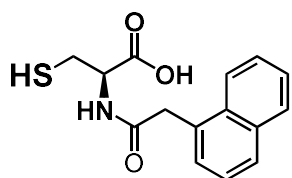
Fujita 法ではこれらの検出試薬と感作性物質の反応性を測定することで化合物の感作性を予測する。具体的には、NAC においては pH 9.5 の条件下で NAC が 0.5 mM、被験物質が 5 mM

(NAL：被験物質 = 1：10) となるように、NAL においては pH 12.0 の条件下で NAL が 0.5 mM、被験物質が 25 mM (NAL：被験物質 = 1：50) となるように反応液をそれぞれ調製し、25℃で 24 時間反応する。その後、未反応の NAC および NAL を HPLC により 281 nm で検出し、定量する。

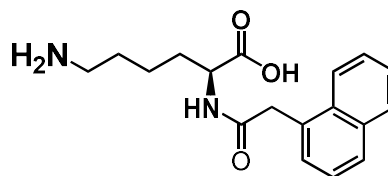
Fujita 法は検出試薬の特異性以外にも DPRA に対する優位点がいくつかある。まず、DPRA では Lys-peptide の反応液に酢酸アンモニウム緩衝液を使用するため、リジンのアミノ基と反応性を持つ感作性物質が緩衝液中のアンモニウムと反応してしまう可能性が考えられるが、Fujita 法ではリン酸緩衝液を反応液に使用しており、反応における pH も DPRA の 10.2 よりも高い 12 としている。そのため、リジン含有検出試薬における反応性が向上している。また、Fujita 法は 24 時間の反応後に 0.5%トリフルオロ酢酸水溶液で反応液を 10 倍希釈して酸性条件にすることで、HPLC における測定中における反応の進行を止め、試験結果の再現性を高くしている。これらの改良により、82 化合物を用いた評価において、DPRA よりも高い感作性物質の検出感度を達成している。また、DPRA において HPLC における被験物質と Lys-peptide の共溶出により測定できなかった化合物について、Fujita 法では被験物質の夾雑の影響を受けることなく評価できることが確認されている。

以上のように、Fujita 法は特異的な UV 吸収を持つ検出試薬を使用し、試験条件も改良することで、DPRA よりも選択的・高感度で再現性の高い検出試薬の定量が可能となっている。

しかしながら、上記で示した反応条件における各試薬の濃度は DPRA と同じであるため、疎水性の化合物については反応液中で被験物質が析出することにより、正しく評価できない可能性がある。また、DPRA と同様に被験物質をモル濃度で調製する必要があるため、複数の成分からなる混合物などの分子量が不明な物質を評価することができない。このように、Fujita 法は DPRA における課題をいくつか改善したが、評価できる化合物に制限があるという試験法の実用性における課題がある。皮膚感作性試験は前述のとおり医薬品、化粧品、日常生活品、農薬、染料など肌に触れる可能性のある様々なものについて必要とされる試験であるため、上記の課題を解決する試験法の開発が求められる。



N-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-cysteine
(NAC)



α-N-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-lysine
(NAL)

図 3. ADRA で使用する 2 種の検出試薬

タンパク質の主要な感作性物質結合部位であるシステインおよびリジンに、281 nm を最大吸収波長とする高い UV 吸収を持つナフタレン環を導入することで、DPRA に対して検出感度を上げている。

本研究の目的

本研究では上記 Fujita 法における検出試薬 NAC、NAL の特性を活かし、前述の DPRA や Fujita 法よりも混合物を含む幅広い化合物に適用可能な試験法を開発することを目的とした。

まず、反応液中における被験物質の析出を回避するために、約 2 桁濃度低い試験濃度における試験条件の確立を試みた。また、低濃度化した試験条件における反応液中の被験物質の析出について、DPRA における反応条件と比較を行った。

上記の DPRA における課題以外に、DPRA および Fujita 法では被験物質溶液をモル濃度で調製する必要があるため、分子量が不明な物質は評価できないという課題がある。しかしながら、動物実験代替法が最も必要とされる化粧品原料においては自然由来の抽出液など、成分が不明な物質や混合物も多く取り扱われる。そのため、この課題を解決するために、上記の低濃度化した試験法の開発に加え、重量濃度で調製した被験物質溶液を用いた試験条件の確立も行った。加えて、非感作性物質を混合した混合液に感作性物質を添加した疑似混合液を調製し、確立した試験条件により混合液中に含まれる感作性物質を検出可能か検証した。

さらに、確立した試験法の有用性を確認するために、他の試験法と組み合わせたアプローチである IATA における皮膚感作性予測能力の検証を行った。なお、検証では既存の組合せアプローチにおける皮膚感作性予測能力の比較に加え、新たに考案した 1 種のアプローチを用いた評価も行った。

第 1 章 Amino acid derivative reactivity assay における 試験条件の低濃度化

感作性物質とタンパク質との結合性を評価する皮膚感作性試験代替法である DPRA では、緩衝液系の反応液に比較的高濃度の被験物質を添加するため、主に疎水性の化合物において析出しやすいという課題があった。また、検出試薬として用いる 2 種のペプチドは特異的な UV 吸収部位がないため、HPLC 分析において 220 nm と短波長で検出する必要があり、被験物質の夾雑ピークとペプチドのピークが共溶出することも少なくない。

これに対し、Fujita *et al.* (2014) によって報告された Fujita 法では、281 nm に最大吸収波長をもつナフタレン環をアミノ酸のシステインおよびリジンに導入した新規化合物 NAC および NAL を検出試薬に用いることで、HPLC 分析における被験物質の夾雑ピークの影響を低減している。しかしながら、反応における被験物質濃度は DPRA と同じであるため、DPRA と同様に疎水性化合物において反応液中で析出が起こるという課題があった。

そこで本章では、Fujita 法で使用している NAC および NAL が比較的長波長に UV 吸収を持つだけでなく、DPRA のペプチドと比較して検出感度も高いという特徴を活かし、試験条件を従来よりも低濃度化することで、反応液中で被験物質が析出するという課題を解決し、疎水性化合物の評価にも適した試験法を開発することを目指した。なお、NAC および NAL の HPLC における定量限界が Fujita 法の約 1/100 程度であること、これ以下の試験濃度だと検出試薬と被験物質の衝突回数が減少することにより、反応性が著しく低下することが予想されたため、検出試薬の濃度を Fujita 法の 1/100 にした場合における試験条件の確立を行った。

1-1. 材料および方法

1-1-1. 試験化合物

第 1 章、第 2 章、第 3 章の全ての研究における試験法の確立や有用性検証に使用した、感作性情報が既知の計 163 化合物を表 1 に示した。このうち、本章で行った試験条件の低濃度化における検討では、DPRA の試験条件確立に使用された 82 化合物を使用した。

表 1. 本研究で使用した試験化合物

№	Test substance	CAS No.	Source ^a	82 chemical data set ^b	data set for IATA study		
					2 out of 3	3 out of 3	STS, ITS-SA, ITS-2MA
1	Oxazolone	15646-46-5	Wako	○ ^c	○	○	○
2	Diphenylcyclopropanone	886-38-4	Wako	○	○	○	○
3	Benzoyl peroxide	94-36-0	TCI	○	○	○	○
4	Chlorothalonil	1897-45-6	TCI				○
5	Kathon CG	26172-55-4 / 2682-20-4	Sigma-Aldrich	○	○	○	○
6	5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one	26172-55-4	Santa Cruz	○			
7	p-Benzoquinone	106-51-4	Wako	○	○	○	○
8	Tetrachloro-salicylanilide	1154-59-2	AccuStandard	○	○	○	○
9	1-Chloro-2,4-dinitrobenzene	97-00-7	Wako	○	○	○	○
10	Bandrowski's base	20048-27-5	Alfa Aesar	○			○
11	4-Nitrobenzyl bromide	100-11-8	Sigma-Aldrich				○
12	Potassium dichromate	7778-50-9	Wako		○	○	○
13	Hydroquinone	123-31-9	Wako		○	○	○
14	Glutaraldehyde	111-30-8	Wako	○	○	○	○
15	Fluorescein isothiocyanate	3326-32-7	Dojindo	○			
16	1,4-Phenylenediamine	106-50-3	TCI		○	○	○
17	Phthalic anhydride	85-44-9	Wako	○	○	○	○
18	Maleic anhydride	108-31-6	TCI				○
19	Hexyl salicylate	6259-76-3	Sigma-Aldrich		○	○	○
20	Benzyl bromide	100-39-0	Wako				○
21	Lauryl gallate	1166-52-5	Wako	○	○	○	○
22	Propyl gallate	121-79-9	Wako	○	○	○	○
23	2-Aminophenol	95-55-6	TCI		○	○	○
24	2-Nitro-1,4-phenylenediamine	5307-14-2	Wako		○	○	○
25	2,5-Diaminotoluene sulfate (PTD)	615-50-9	TCI		○	○	○
26	2-Methyl-2 <i>H</i> -Isothiazol-3-one	2682-20-4	Sigma-Aldrich	○	○	○	○
27	Methyl-2-octynoate	111-12-6	TCI		○	○	
28	Cobalt chloride	7646-79-9	Wako		○	○	○
29	Chloramine T	149358-73-6	TCI				○
30	CD-3	25646-71-3	FF	○			○
31	Formaldehyde	50-00-0	Wako	○	○	○	○
32	Metol	55-55-0	Wako	○	○	○	
33	Iodopropynyl butylcarbamate	55406-53-6	TCI		○	○	○
34	1,2-Dibromo-2,4-dicyanobutane	35691-65-7	Sigma-Aldrich		○	○	○
35	1-Naphthol	90-15-3	Wako				○
36	1-Phenyl-1,2-propanedione	579-07-7	Sigma-Aldrich				○
37	2-Hydroxyethyl acrylate	818-61-1	Wako	○	○	○	○
38	Glyoxal	107-22-2	Wako	○	○	○	○
39	Bisphenol A-diglycidyl ether	1675-54-3	Sigma-Aldrich		○	○	○
40	Vinyl pyridine	1337-81-1	Wako	○			○

表 1 のつづき (1)

No.	Test substance	CAS No.	Source	82 chemical data set	data set for IATA study		
					2 out of 3	3 out of 3	STS, ITS-SA, ITS-2MA
41	2-Mercaptobenzothiazole	149-30-4	Wako	○	○	○	○
42	Isoeugenol	97-54-1	TCI		○	○	○
43	Nonanoyl chloride	764-85-2	TCI	○			
44	Diethyl maleate	141-05-9	Wako	○	○	○	○
45	3-Dimethylamino propylamine	109-55-7	TCI		○	○	○
46	Ethylenediamine free base	107-15-3	Wako		○	○	○
47	1,2-Benzisothiazolin-3-one (Proxel active)	2634-33-5	TCI	○	○	○	○
48	Methyl pyruvate	600-22-6	Wako				○
49	Methyl 2-nonynoate	111-80-8	TCI	○	○	○	○
50	Benzyl salicylate	118-58-1	TCI		○	○	
51	Cinnamaldehyde	14371-10-9	Wako	○			
52	Phenylacetaldehyde	122-78-1	Sigma-Aldrich	○	○	○	○
53	Cinnamic aldehyde	104-55-2	Wako		○	○	○
54	m-Aminophenol	591-27-5	TCI				○
55	Diethyl sulfate	64-67-5	TCI				○
56	Benzylidene acetone	122-57-6	Wako	○	○	○	○
57	3-Propylidenephthalide	17369-59-4	TCI			○	○
58	2,4-Heptadienal	5910-85-0	Wako	○			○
59	Farnesol	4602-84-0	TCI		○	○	
60	Squaric acid	2892-51-5	Wako	○			
61	Tropolone	533-75-5	Wako				○
62	α-Methylcinnamaldehyde	101-39-3	TCI				○
63	Citral	5392-40-5	TCI		○	○	○
64	Nickel sulfate	10101-97-0 /	Wako		○	○	○
65	Tetramethylthiuram disulfide	137-26-8	TCI		○	○	○
66	trans-2-Hexenal	6728-26-3	Wako	○	○	○	○
67	3,4-Dihydrocoumarin	119-84-6	Wako		○	○	
68	2-Methoxy-4-methyl-phenol	93-51-6	Wako				○
69	Resorcinol	108-46-3	Wako	○		○	○
70	2-Phenylpropionaldehyde	93-53-8	Sigma-Aldrich	○	○	○	○
71	4-Chloroaniline	106-47-8	TCI				○
72	Safranal	116-26-7	Santa cruz		○	○	
73	Perillaldehyde	2111-75-3	Wako	○	○	○	○
74	Methyl methanesulfonate	66-27-3	Sigma-Aldrich				○
75	5-Methyl-2-phenyl-4H-pyrazol-3-one	89-25-8	Sigma-Aldrich				○
76	Palmitoyl Chloride	112-67-4	Wako	○			
77	Trimellitic anhydride	552-30-7	Wako	○			○
78	1-(4-Methoxyphenyl)-1-penten-3-one	104-27-8	AccuStandard	○			
79	Ethyl acrylate	140-88-5	Wako	○	○	○	
80	2-Ethylhexyl acrylate	103-11-7	Wako				○
81	1-Bromohexane	111-25-1	TCI				
82	α-Amylcinnamaldehyde	122-40-7	Wako	○			○
83	α-Hexylcinnamaldehyde	101-86-0	Wako	○			
84	2,3-butanedione	431-03-8	Wako	○			○
85	N-Butyl acrylate	141-32-2	Sigma-Aldrich				○
86	Geraniol	106-24-1	Wako		○	○	○
87	Farnesal	19317-11-4	Frinton	○			
88	R-Carvone	6485-40-1	TCI		○	○	○
89	Eugenol	97-53-0	Wako		○	○	○
90	Sodium lauryl sulfate	151-21-3	Sigma-Aldrich		○		○

表 1 のつづき (2)

No	Test substance	CAS No.	Source	82 chemical data set	data set for IATA study		
					2 out of 3	3 out of 3	STS, ITS-SA, ITS-2MA
91	Abietic acid	514-10-3	TCI		○	○	○
92	Oxalic acid	144-62-7	Wako	○			○
93	Benzyl benzoate	120-51-4	Wako	○		○	
94	Lylal	31906-04-4	Sigma-Aldrich		○	○	○
95	Phenyl benzoate	93-99-2	TCI		○	○	○
96	4-Allylanisole	140-67-0	TCI	○			○
97	Benzyl Cinnamate	103-41-3	Wako				
98	Lilial	80-54-6	Wako	○	○	○	○
99	Pentachlorophenol	87-86-5	Wako			○	
100	Cinnamyl Alcohol	104-54-1	Wako		○	○	○
101	α -iso-Methylionone	127-51-5	Sigma-Aldrich		○	○	
102	Cyclamen aldehyde	103-95-7	Sigma-Aldrich	○			
103	Hydroxycitronellal	107-75-5	Wako	○	○	○	○
104	Imidazolidinyl urea	39236-46-9	Sigma-Aldrich	○	○	○	○
105	Undecylenic acid	112-38-9	Sigma-Aldrich			○	
106	5-Methyl-2,3-hexanedione	13706-86-0	TCI	○	○	○	○
107	2,2,6,6-Tetramethyl-3,5-heptanedione	1118-71-4	TCI	○			
108	Ethylene glycol dimethacrylate	97-90-5	Wako	○	○	○	○
109	Butyl glycidyl ether	2426-08-6	TCI		○	○	○
110	Penicillin G	61-33-6	TCI			○	
111	d,l-Citronellol	106-22-9	TCI		○	○	○
112	Bisphenol A Glycidyl Methacrylate	1565-94-2	Polysciences				○
113	Pyridine	110-86-1	Wako		○	○	
114	2-Ethylbutyraldehyde	97-96-1	TCI				○
115	Aniline	62-53-3	Wako			○	○
116	Methylmethacrylate	80-62-6	TCI			○	
117	Xylene	1330-20-7	Wako		○		
118	Nonanoic acid	112-05-0	TCI	○			○
119	Benzocaine	94-09-7	TCI		○	○	○
120	Isopropyl myristate	110-27-0	Wako	○	○		
121	p-Aminobenzoic acid	150-13-0	Wako		○		
122	Methyl salicylate	119-36-8	Wako	○	○	○	○
123	1-Butanol	71-36-3	Wako	○	○	○	○
124	Benzaldehyde	100-52-7	Sigma-Aldrich	○	○	○	○
125	Salicylic acid	69-72-7	Wako	○		○	
126	4-Hydroxybenzoic acid	99-96-7	Wako	○	○	○	○
127	Lactic acid	50-21-5	Sigma-Aldrich	○	○	○	○
128	Coumarin	91-64-5	Wako	○	○	○	○
129	Octanoic acid (Caprylic acid)	124-07-2	Wako	○	○	○	○
130	Propyl paraben	94-13-3	Wako	○	○	○	○
131	4-Methoxyacetophenone (Acetanisole)	100-06-1	Wako	○	○	○	○
132	2-Propanol	67-63-0	Wako	○	○	○	○
133	Diethyl phthalate	84-66-2	Wako	○	○	○	○
134	Propylene glycol (1,2-Propanediol)	57-55-6	Wako	○	○	○	○
135	Glycerol	56-81-5	Wako	○	○	○	○
136	Hexane	110-54-3	Wako	○			
137	Benzyl alcohol	100-51-6	Sigma-Aldrich		○	○	
138	Nickel chloride	7718-54-9	TCI			○	
139	Streptomycin sulfate	3810-74-0	TCI		○	○	○
140	Kanamycin	8063-07-8	No tested by ADRA		○		

表 1 のつづき (3)

№	Test substance	CAS No.	Source	82 chemical data set	data set for IATA study		
					2 out of 3	3 out of 3	STS, ITS-SA, ITS-2MA
141	Sulfanilamide	63-74-1	Wako	○	○	○	○
142	Tween 80	9005-65-6	NOF		○	○	
143	Dextran	9004-54-0	TCI		○		
144	Vanillin	121-33-5	Wako	○			○
145	6-Methylcoumarin	92-48-8	Sigma-Aldrich	○			○
146	Vinylidene dichloride	75-35-4	AccuStandard	○			
147	Methylparaben	99-76-3	Wako	○			
148	1-Bromobutane	109-65-9	Wako	○			○
149	1-Iodohexane	638-45-9	Sigma-Aldrich				○
150	2-Acetylcyclohexanone	874-23-7	Wako	○			○
151	2-Fluoro-5-nitroaniline	369-36-8	TCI				○
152	2-Hydroxypropyl methacrylate	923-26-2	Wako	○			○
153	3-Phenoxypropionitrile	3055-86-5	TCI				○
154	1-Methoxy-4-methyl-2-nitrobenzene	119-10-8	TCI				○
155	Chlorobenzene	108-90-7	Wako	○			○
156	Clofibrate	637-07-0	Wako				○
157	N,N-Diethyl-m-toluamide	134-62-3	TCI				○
158	N,N-Dimethylformamide	68-12-2	Wako				○
159	Ethyl benzoyl acetate	94-02-0	Wako	○			○
160	Ethyl vanillin	121-32-4	TCI	○			○
161	Methyl 3-bromopropanoate	3395-91-3	TCI				○
162	Saccharin	81-07-2	Sigma-Aldrich				○
163	Sulfanilic acid	121-57-3	Wako	○			○

^a AccuStandard, AccuStandard, Inc., New Haven, CT, USA; Alfa Aesar, Alfa Aesar, Ward Hill, MA, USA; Dojindo, Dojindo Molecular Technologies, Inc., Kumamoto, Japan; FF, Synthetic Organic Chemistry Laboratories of FUJIFILM Cororation; Frinton, Frinton Laboratories, Inc., Hainesport, NJ, USA; NOF, NOF CORPORATION, Tokyo, Japan; Polysciences, Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA; Santa Cruz, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA; Sigma-Aldrich, Sigma-Aldrich Corporation, St Louis, MO, USA; TCI, Tokyo Chemical Industry Co Ltd., Tokyo, Japan; Wako, Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan

^b 試験濃度の低濃度化、反応液における析出の確認および重量濃度の被験物質を用いた評価法の開発において評価を行った化合物データセット

^c 各検討で使用した化合物を○で示した。

1-1-2. NAC および NAL と被験物質との反応条件の検討

NAC および NAL は富士フイルムの有機合成研究所にて合成されたものを使用した。NAC および NAL と被験物質との反応は 96 well plate 上で行い、反応液はすべて $n = 3$ で調製した。被験物質は水、アセトニトリル、2-プロパノール、アセトン、5% DMSO/アセトニトリルのいずれかに 1 mM となるよう溶解したものをを用いた。なお、各検討に用いた化合物は、表 1 に記載の化合物のうち、非感作性物質を含めた感作強度が異なる 19 化合物を選択した。

反応における pH の検討では、NAC においては pH 7.5 または pH 8.0、NAL においては pH 10.2 または pH 12.0 の 100 mM リン酸緩衝液に溶解させたものをを用いた。1 well あたりの反応液量は 200 μL とし、NAC の反応では NAC および被験物質の終濃度が 5 μM および 50 μM となるように、NAL の反応では NAL および被験物質の終濃度が 5 μM および 250 μM となるようにそれぞれ混合した。また、コントロール (溶媒対照) として被験物質の代わりに被験物質溶媒を添加したのも $n = 3$ で調製した。その後、96 well plate をプレートシールで密閉したのちに 25°C で 24 時間反応させた。24 時間の反応後、50 μL の 2.5% トリフルオロ酢酸 (TFA) 水溶液を添加したのちに、HPLC で未反応の NAC および NAL の残存量を測定した。HPLC の測定条件は次項に記載した。

NAC における被験物質濃度の検討では、NAC は pH 8.0 の 100 mM リン酸緩衝液に溶解させたものをを用いた。NAC と被験物質との反応では、上記 pH の検討における被験物質の終濃度を 50 μM と 250 μM の 2 濃度となるように反応液を調製した。それ以外の反応および HPLC の測定条件は pH の検討と同じとなるようにした。

1-1-3. HPLC による NAC および NAL の定量と減少率 (Depletion) の算出

各反応液中の NAC および NAL の定量は Prominence LC-20A HPLC system (島津製作所) を使用し、カラムには CAPCELL CORE C18 column (2.7 μm , 3.0 $\times$ 150 mm, 大阪ソーダ) を使用した。NAC および NAL の検出はフォトダイオードアレイによる吸光度検出で行い、281 nm で定量した。流速は 0.3 mL/min、カラムオーブンは 40°C に設定し、次頁表 2 に記載のグラジエント条件で NAC および NAL を定量した。なお、各サンプルの注入量は 10 μL とした。

被験物質に対する NAC および NAL の反応性は、HPLC によって得られた被験物質との反応液における NAC および NAL のピーク面積と溶媒対照のピーク面積から Depletion (%) として以下の式に従って算出した。

$$\text{Depletion (\%)} = [1 - (\text{Peak area of NAC or NAL reacted with test chemical} / \text{Peak area of NAC or NAL in control})] \times 100$$

表 2. HPLC における NAC および NAL の測定条件

Mobile phase	Condition 1 A: 98/2 water/acetonitrilewith 0.1% TFA B: 90/10 acetonitrile/water with 0.1% TFA																						
	Condition 2 A: 0.1% TFA aqueous solution B: 0.1% (v/v) TFA acetonitrile solution																						
	Condition 1 (For NAC and NAL)																						
	<table><tr><td>Time</td><td>%A</td><td>%B</td></tr><tr><td>0 min</td><td>80</td><td>20</td></tr><tr><td>7 min</td><td>0</td><td>100</td></tr><tr><td>10.5 min</td><td>0</td><td>100</td></tr><tr><td>10.51 min</td><td>80</td><td>20</td></tr><tr><td>15 min</td><td colspan="2">End run</td></tr></table>						Time	%A	%B	0 min	80	20	7 min	0	100	10.5 min	0	100	10.51 min	80	20	15 min	End run
Time	%A	%B																					
0 min	80	20																					
7 min	0	100																					
10.5 min	0	100																					
10.51 min	80	20																					
15 min	End run																						
Flow conditions	Condition 2																						
	For NAC			For NAL																			
	Time	%A	%B	Time	%A	%B																	
	0 min	70	30	0 min	80	20																	
	9.5 min	45	55	9.5 min	55	45																	
	10 min	0	100	10 min	0	100																	
	13 min	0	100	13 min	0	100																	
	13.5 min	70	30	13.5 min	80	20																	
	20 min	End run		20 min	End run																		

1-1-4. 82 化合物における LLNA に対する予測精度の算出

1-1-2 で確立した試験条件を用い、表 1 に記載の 82 化合物を評価した結果から感作性/非感作性の判定基準 (クライテリア) を算出した。なお、確立した新たな試験条件による評価法を以後 ADRA-dilutional method (ADRA-DM) と表記する。算出には ADMEWORKS/ModelBuilder V4.5 (富士通九州システムズ) を用い、NAC および NAL の Depletion の平均値を単一パラメータとした線型方程式を使用して感作性/非感作性の 2 クラスに分類した。その後、Statistics Gradient Perceptron Model Settings calculation によって得られた平均値、標準偏差、ウェイト、定数から以下の式に従って 2 クラス分類に最適な Depletion の平均値 (クライテリア) を算出した。

$$\text{Criterion} = \text{Average} - (\text{standard deviation} / \text{weight}) \times \text{constant}$$

算出したクライテリアを用い、82 化合物を感作性/非感作性に分類し、*in vivo* 皮膚感作性試験として最も利用されている LLNA に対する予測精度を Cooper statistics によって算出した。

1-1-5. DPRA の反応条件における被験物質の析出確認

通常の DPRA ではペプチド溶液と被験物質溶液を混合して反応させるが、本研究では被験物質とペプチドとの反応による析出を避けるために、ペプチド溶液の代わりにペプチドを溶解している緩衝液を用いた。

表 1 に記載の 82 化合物について水、アセトニトリル、2-プロパノール、アセトン、10% DMSO/アセトニトリルのいずれかを用いて 100 mM 被験物質溶液を調製した。Cys-peptide の反応条件における析出の観察では、HPLC 用ガラスバイアルに 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) 750 μ L、アセトニトリル 200 μ L、100 mM 被験物質溶液 50 μ L を混合し、溶液中での析出の有無を目視にて観察した。Lys-peptide の反応条件における析出の観察では、HPLC 用ガラスバイアル中で 100 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 10.2) 750 μ L と 100 mM 被験物質溶液 250 μ L を混合し、Cys-peptide の反応条件と同様に溶液中での析出の有無を目視にて観察した。

1-1-6. ADRA-DM の反応条件における被験物質の析出確認

ADRA-DM では通常 96 well plate 上で 200 μ L の反応液を調製するが、本研究では析出を観察しやすくするために HPLC 用ガラスバイアル内に 1000 μ L の反応液を調製した。なお、上記 1-1-5 の検討と同様に、NAC および NAL と被験物質との反応による析出を避けるために、NAC 溶液および NAL 溶液の代わりにこれらの調製に使用する緩衝液を用いた。

まず、1-1-5 と同じ 82 化合物について水、アセトニトリル、アセトン、5% DMSO/アセトニトリルのいずれかを用いて 1 mM 被験物質溶液を調製した。NAC 反応液の場合は pH 8.0、NAL 反応液の場合は pH 10.2 の 100 mM リン酸緩衝液を 750 μ L バイアル瓶に分注し、そこに 1 mM 被験物質溶液をそれぞれ 250 μ L ずつ添加した。溶液を混合した後に溶液中での析出の有無を目視にて観察した。

1-2. 結果

1-2-1. 最適な反応条件の検討

検出試薬濃度を従来法 (Fujita 法) の 1/100 にした場合における、NAC および NAL との最適な反応条件を検討するために、各反応条件における最適 pH の検討と、NAC の反応条件における被験物質濃度の検討を実施した。

NAC の反応条件における最適 pH の検討では、Fujita 法と同じ NAC : 被験物質の濃度比が 1:10 の条件下で反応条件の最適化を検討した。Fujita 法では NAC の反応条件における pH は 9.5 であるが、低濃度化することで pH 8.5 以上では NAC の酸化による二量体化が促進されたため (data not shown)、pH 7.5 および pH 8.0 における反応性を比較した。その結果、2,4-dinitrochlorobenzene、phenylacetaldehyde、diethylmaleate および farnesal は pH 7.5 に比べ、pH 8.0 の Depletion が 5%以上大きかった。一方、cinnamaldehyde に限っては pH 7.5 に比べ、pH 8.0 で Depletion が 5%以上小さかった。全体としては、cinnamaldehyde を除いて、pH 8.0 の Depletion は pH 7.5 の Depletion に比べて同程度か高い値を示した (表 3)。

NAC の反応条件における最適 pH の検討と同様に、NAL の反応条件においても Fujita 法と同じ NAL : 被験物質の濃度比が 1:50 の条件下で反応条件の最適化を検討した。NAL においては pH が高くても安定であるため、リジンにおけるアミノ基の pKa 付近である pH 10.2 と Fujita 法における pH である 12.0 における反応性を比較した。その結果、benzoyl peroxide、fluorescein isothiocyanate および ethyl benzoylacetate では pH 12.0 における HPLC 分析において、被験物質の分解生成物と思われるピークが NAL のピークと共溶出したため、正確な定量ができなかった。また、2,4-dinitrochlorobenzene および farnesal を除き、pH 12.0 に比べ pH 10.2 の Depletion の方が高かった (表 4)。

NAC の反応条件における被験物質濃度の検討では pH 8.0 の反応条件において、NAC と被験物質との比率を Fujita 法と同じ 1:10 と、Fujita 法における NAL と被験物質との比率と同じ 1:50 の 2 種類について検討を行った。その結果、1:10 の場合の Depletion がすでに約 100% と反応性が高い 5 化合物および Depletion が 10%未満で元々反応性の低い 5 化合物を除いて、1:10 の場合に比べて 1:50 の場合の Depletion の方が高かった (表 5)。

表 3. pH 7.5 および pH 8.0 の反応条件における NAC の被験物質に対する反応性

Test substance	pH of NAC reaction solution			
	pH 7.5		pH 8.0	
	Depletion (%)	SD	Depletion (%)	SD
Extreme/strong¹				
Benzoyl peroxide	100.0	0.4	100.0	0.0
5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one	100.0	1.1	100.0	0.0
Tetrachlorosalicylanilide	5.4	0.9	10.1	0.3
2,4-Dinitrochlorobenzene	17.1	0.4	44.5	0.6
Fluorescein isothiocyanate	45.3	0.6	48.8	0.9
Lauryl gallate	100.0	2.5	100.0	0.0
Metol	100.0	1.1	100.0	0.0
Moderate				
2-Methyl-2 <i>H</i> -isothiazol-3-one	100.0	0.4	100.0	0.0
Cinnamaldehyde	45.6	0.3	15.0	1.0
Phenylacetaldehyde	3.2	0.8	11.6	1.8
Diethyl maleate	2.6	0.6	10.9	0.9
Palmitoyl Chloride	0.1	-0.9	-0.2	2.5
Weak				
α -Hexylcinnamaldehyde	0.9	1.0	4.3	1.5
Farnesal	3.0	0.4	11.2	1.3
4-Allylanisole	3.4	0.4	7.6	2.2
Non-sensitizer				
1-Bromobutane	-0.4	0.5	3.6	1.6
Ethyl benzoylacetate	3.3	0.5	7.4	1.4
Isopropyl myristate	0.5	0.4	-1.0	1.4
Propyl paraben	0.0	-0.8	0.9	1.5

¹ LLNA における感作強度のカテゴリー

表 4. pH 10.2 および pH 12.0 の反応条件における NAL の被験物質に対する反応性

Test substance	pH of NAL reaction solution			
	pH 10.2		pH 12.0	
	Depletion (%)	SD	Depletion (%)	SD
Extreme/strong¹				
Benzoyl peroxide	64.0	1.3	unavailable ²	
5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one	17.7	1.1	2.1	0.8
Tetrachlorosalicylanilide	3.7	1.3	2.4	0.9
2,4-Dinitrochlorobenzene	6.1	1.3	8.1	1.4
Fluorescein isothiocyanate	100.0	0.0	unavailable	
Lauryl gallate	12.1	1.1	11.2	0.7
Metol	22.8	1.1	11.8	0.4
Moderate				
2-Methyl-2 <i>H</i> -isothiazol-3-one	7.0	2.2	1.5	1.6
Cinnamaldehyde	13.1	1.3	4.2	1.7
Phenylacetaldehyde	98.3	1.5	95.4	1.6
Diethyl maleate	7.7	1.9	3.4	1.2
Palmitoyl Chloride	95.9	2.5	87.3	1.3
Weak				
α -Hexylcinnamaldehyde	4.6	2.9	2.4	1.7
Farnesal	8.8	1.4	13.4	1.5
4-Allylanisole	3.9	2.6	1.4	1.5
Non-sensitizer				
1-Bromobutane	2.4	1.6	-0.5	1.5
Ethyl benzoylacetate	5.3	1.3	unavailable	
Isopropyl myristate	1.8	1.4	0.5	1.7
Propyl paraben	1.9	3.1	-0.4	1.5

¹ LLNA における感作強度のカテゴリ

² HPLC 分析において被験物質の分解物と思われるピークと NAL のピークが共溶出したため、Depletion を算出できなかった。

表 5. 異なる NAC と被験物質のモル比における NAC の被験物質に対する反応性

Test substance	Ratio of NAC : Test substance			
	1:10		1:50	
	Depletion (%)	SD	Depletion (%)	SD
Extreme/strong¹				
Benzoyl peroxide	100.0	0.0	100.0	0.0
5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one	100.0	0.0	100.0	0.0
Tetrachlorosalicylanilide	10.1	0.3	22.9	1.0
2,4-Dinitrochlorobenzene	44.5	0.6	87.6	2.9
Fluorescein isothiocyanate	48.8	0.9	94.1	3.9
Lauryl gallate	100.0	0.0	100.0	0.0
Metol	100.0	0.0	100.0	0.0
Moderate				
2-Methyl-2 <i>H</i> -isothiazol-3-one	100.0	0.0	100.0	0.0
Cinnamaldehyde	15.0	1.0	100.0	0.0
Phenylacetaldehyde	11.6	1.8	21.2	2.4
Diethyl maleate	10.9	0.9	22.6	3.3
Palmitoyl Chloride	-0.2	2.5	6.9	1.4
Weak				
α -Hexylcinnamaldehyde	4.3	1.5	-1.9	2.3
Farnesal	11.2	1.3	17.1	2.3
4-Allylanisole	7.6	2.2	23.9	2.3
Non-sensitizer				
1-Bromobutane	3.6	1.6	-4.2	2.2
Ethyl benzoylacetate	7.4	1.4	-6.6	2.7
Isopropyl myristate	-1.0	1.4	-1.6	2.4
Propyl paraben	0.9	1.5	1.6	2.2

¹ LLNA における感作強度のカテゴリー

1-2-2. 82 化合物を用いた評価

DPRA および Fujita 法における試験法の確立に使用された 82 化合物のデータセットを用いて、低濃度化した試験条件で評価を行った。なお、上記検討の結果から、NAC および NAL の pH はそれぞれ 8.0 および 10.2、NAC および NAL と被験物質とのモル比はいずれも 1:50 とした。その結果を表 6 に示す。また、NAC および NAL の陰性対照および代表的な陽性

物質における HPLC のクロマトグラムを図 4 に示した。NAC および NAL とともに、Fujita 法と比較すると、いずれの Depletion も同等または低下する傾向にあった。ただし、感作性物質のうち、NAC における nonanoyl chloride、 α -amylcinnamaldehyde、lilial、cyclamen aldehyde および NAL における oxazolone、phthalic anhydride、2-methyl-2*H*-isothiazol-3-one では、本研究における Depletion の方が 5%以上高かった。また、Fujita 法における NAC および NAL の SD はそれぞれ 0～7.8%、0～9.5%であったが、本研究における SD はそれぞれ 0～7.1%、0～4.7%となり、Fujita 法と同程度またはそれ以下のバラツキであった (表 6)。

表 6. 確立した試験条件における 82 化合物に対する NAC および NAL の Depletion

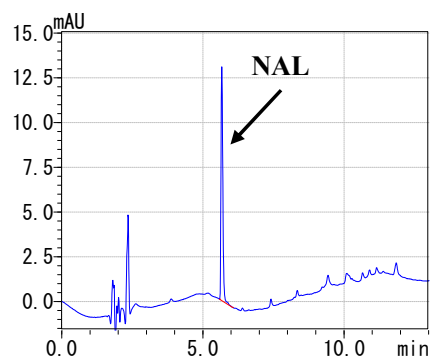
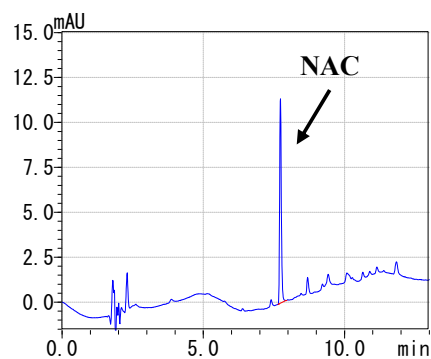
Test substance	ADRA-DM					Fujita method ²				
	NAC		NAL		Mean Depletion (%)	NAC		NAL		Mean Depletion (%)
	Depletion (%)	SD	Depletion (%)	SD		Depletion (%)	SD	Depletion (%)	SD	
Extreme/strong ¹										
Diphenylcyclopropenone	23.9	1.5	6.3	1.2	15.1	99.8	2.1	99.6	1.4	99.7
Oxazolone	80.2	1.6	80.1	0.8	80.1	76.5	0.4	30.1	1.8	53.3
Benzoyl peroxide	100.0	0.0	50.6	2.7	75.3	100.0	0.0	100.0	1.4	100.0
Kathon CG	100.0	0.0	-0.4	0.5	49.8	98.9	0.5	3.6	0.5	51.3
Bandrowski's base	100.0	0.0	5.7	0.4	52.9	100.0	0.0	38.8	1.1	69.4
5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one	100.0	0.0	17.7	1.1	58.8	99.3	0.6	63.3	9.2	81.3
<i>p</i> -Benzoquinone	97.2	2.0	83.5	1.1	90.3	98.9	2.1	97.5	1.4	98.2
Tetrachlorosalicylanilide	22.9	4.2	2.1	0.3	12.5	23.3	0.4	14.9	0.7	19.1
2,4-Dinitrochlorobenzene	87.6	2.9	6.1	1.3	46.9	100.0	0.0	83.2	0.9	91.6
Glutaraldehyde	4.6	1.7	53.1	2.9	28.8	49.2	0.6	96.2	1.4	72.7
Fluorescein isothiocyanate	94.1	0.9	98.1	0.6	96.1	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0
Phthalic anhydride	-1.8	1.5	96.9	1.1	47.5	1.0	1.7	84.4	1.3	42.7
Lauryl gallate	100.0	0.0	19.0	0.4	59.5	99.6	0.3	33.8	0.8	66.7
Propyl gallate	100.0	0.0	56.4	1.4	78.2	93.7	2.0	75.2	1.4	84.5
CD3	100.0	0.0	16.5	0.5	58.3	100.0	0.0	40.8	1.1	70.4
Trimellitic anhydride	1.8	1.6	97.0	1.2	49.4	1.0	1.6	99.4	1.4	50.2
Formaldehyde	24.4	2.7	1.6	1.9	13.0	81.7	1.9	65.6	2.4	73.7
Metol	100.0	0.0	22.8	1.1	61.4	97.5	0.6	60.8	0.4	79.2
Moderate										
2-Hydroxyethyl acrylate	100.0	0.0	16.3	4.7	58.1	100.0	0.0	81.5	1.1	90.7
Glyoxal	12.5	0.9	0.8	0.5	6.7	33.3	2.5	21.3	0.8	27.3
Vinyl pyridine	27.8	2.1	7.7	1.8	17.8	74.8	2.0	6.4	2.1	40.6
2-Mercaptobenzothiazole	100.0	0.0	0.3	0.8	50.2	40.0	1.9	-0.9	0.8	19.5
Nonanoyl chloride	7.5	2.1	39.4	1.8	28.2	8.1	1.6	100.0	0.0	54.1
2-Methyl-2 <i>H</i> -isothiazol-3-one	100.0	0.0	7.0	2.2	53.5	100.0	0.0	-0.2	8.2	49.9
1,2-Benzisothiazoline-3-one	100.0	0.0	0.4	0.7	50.2	100.0	0.0	0.1	1.5	50.1
Methyl-2-nonynoate	11.1	0.8	1.4	0.2	6.2	99.6	2.1	10.2	1.6	54.9
Cinnamaldehyde	100.0	0.0	13.1	1.3	56.5	95.5	1.6	81.3	1.8	88.4
Phenylacetaldehyde	21.2	2.4	98.3	1.5	59.8	99.8	0.4	99.2	1.0	99.5
Benzylideneacetone	19.4	1.3	7.2	1.0	13.3	95.3	2.1	15.0	1.1	55.1
2,4-Heptadienal	35.3	2.6	50.1	1.3	42.7	100.0	0.0	98.4	1.4	99.2
Squaric acid	-2.9	1.8	0.5	0.2	-1.2	-2.0	0.4	1.5	0.6	-0.3
Trans-2-hexenal	83.5	2.4	12.3	1.1	47.9	96.7	2.1	97.6	1.4	97.1
Resorcinol	9.8	3.5	2.2	0.7	6.0	10.0	1.4	64.1	0.6	37.1
Diethyl maleate	22.6	3.3	7.7	1.9	15.1	98.9	0.4	18.7	0.8	58.8
2-phenylpropionaldehyde	8.1	0.8	4.6	1.3	6.3	70.6	7.8	8.5	9.5	39.6
Perillaldehyde	36.9	2.5	18.5	1.0	27.7	94.0	2.1	66.0	1.2	80.0
Palmitoyl Chloride	6.9	1.4	95.9	2.5	51.4	17.1	1.0	100.0	0.0	58.5
1-(4-Methoxyphenyl)-1-penten-3-one	2.9	2.4	4.2	1.6	3.5	88.7	2.1	6.4	1.7	47.6

表 6 のつづき

Test substance	ADRA-DM					Fujita method				
	NAC		NAL		Mean Depletion (%)	NAC		NAL		Mean Depletion (%)
	Depletion (%)	SD	Depletion (%)	SD		Depletion (%)	SD	Depletion (%)	SD	
Weak										
α -Hexylcinnamaldehyde	2.5	2.2	1.1	0.9	1.8	0.1	1.9	1.8	1.5	1.0
α -Amylcinnamaldehyde	1.3	1.5	1.6	0.4	1.4	2.2	1.6	6.0	2.0	4.1
2,3-Butanedione	71.3	1.4	25.5	1.2	48.4	100.0	0.0	73.1	2.8	86.5
Farnesal	17.1	2.3	8.8	1.4	12.9	41.3	0.8	38.6	1.9	39.9
Oxalic acid	0.4	2.9	3.6	1.0	2.0	-4.3	1.6	4.5	1.0	0.1
Benzyl benzoate	1.5	3.4	2.8	1.1	2.2	3.3	2.0	3.0	1.2	3.1
4-Allylanisole	23.9	2.3	3.9	2.6	13.9	66.0	0.8	10.9	1.0	38.4
Lilial	20.7	1.3	3.9	0.9	12.3	4.5	2.7	54.7	1.8	29.6
Cyclamen aldehyde	14.5	2.6	1.7	0.6	8.1	10.5	2.3	11.1	1.0	10.8
Imidazolidinyl urea	35.4	2.2	2.0	0.2	18.7	80.0	0.5	83.7	0.5	81.8
5-Methyl-2,3-hexanedione	15.9	1.1	34.8	2.8	25.3	23.2	1.9	98.9	1.3	61.0
2,2,6,6-Tetramethyl-3,5-heptanedione	0.9	2.4	1.6	0.8	1.2	8.1	1.8	7.6	1.4	7.8
Ethyleneglycol dimethacrylate	8.9	1.1	2.6	1.6	5.8	100.0	0.0	24.3	1.3	62.1
Ethyl acrylate	89.8	1.9	13.7	0.4	51.7	100.0	0.0	96.7	1.2	98.4
Hydroxycitronellal	11.2	2.2	1.5	0.7	6.3	14.8	4.6	21.9	1.2	18.3
Non-sensitizer										
Glycerol	1.8	2.4	0.7	1.2	1.2	4.3	2.3	4.3	1.9	4.3
Hexane	0.4	1.8	0.9	0.9	0.7	3.0	2.0	5.8	1.5	4.4
Diethyl phthalate	0.1	2.0	1.7	1.4	0.9	4.8	1.8	6.8	1.8	5.8
Octanoic acid	-2.1	1.1	1.2	0.5	-0.4	1.8	1.9	5.0	1.0	3.4
2-Hydroxypropyl methacrylate	1.3	1.0	2.2	0.6	1.8	98.1	1.7	10.9	1.3	54.5
1-Butanol	-1.7	1.5	0.8	0.5	-0.4	3.9	2.4	2.5	1.6	3.2
4-Hydroxybenzoic acid	0.6	2.3	-1.4	1.0	-0.4	0.5	1.8	2.2	3.4	1.3
6-Methyl coumatrin	2.2	2.2	1.0	0.7	1.6	6.1	1.8	4.5	1.0	5.3
Methyl salicylate	-2.9	0.9	0.4	0.6	-1.3	-0.7	2.0	9.1	1.1	4.2
Chlorobenzene	1.6	2.1	0.7	0.7	1.2	2.1	2.4	4.6	1.0	3.3
Lactic acid	3.8	3.1	2.8	0.6	3.3	-2.4	1.8	2.8	1.9	0.2
1-Bromobutane	6.7	3.5	2.4	1.6	4.6	6.0	3.6	2.9	0.8	4.4
2-Acethylcyclohexanone	0.3	3.1	0.3	0.6	0.3	7.2	1.9	14.6	2.6	10.9
4'-Methoxyacetophenone	3.9	7.1	3.3	0.6	3.6	4.1	1.3	-1.4	2.3	1.3
Ethyl benzoylacetate	-6.6	2.7	5.3	1.3	-0.6	3.6	2.9	5.4	1.6	4.5
Ethyl vanillin	7.3	1.5	2.1	0.8	4.7	-3.2	2.1	63.9	1.2	30.4
2-Propanol	3.6	1.4	2.8	0.6	3.2	-0.2	1.8	-5.2	6.7	-2.7
Propylene glycol	3.5	1.3	2.2	0.7	2.9	-5.0	2.1	-1.2	1.0	-3.1
Sulfanilamide	-2.7	2.5	1.4	0.7	-0.7	-4.4	2.3	-2.3	1.0	-3.3
Isopropyl myristate	-1.6	2.4	1.8	1.4	0.1	-0.9	1.7	-0.9	0.8	-0.9
Benzaldehyde	24.4	0.8	2.9	1.0	13.7	12.5	1.5	5.3	0.5	8.9
Methylparaben	2.8	1.1	1.3	0.5	2.0	2.6	1.4	3.7	0.6	3.2
Nonanoic acid	-5.3	2.2	1.3	0.7	-2.0	0.9	1.5	3.8	0.6	2.4
Propyl paraben	2.7	2.7	1.9	3.1	2.3	-3.3	1.2	1.0	0.9	-1.2
Salicylic acid	-5.0	2.2	0.4	0.6	-2.3	-2.3	1.4	1.5	0.7	-0.4
Sulphanilic acid	-0.2	0.6	0.4	0.2	0.1	-1.5	0.6	0.9	0.4	-0.3
Vanillin	0.5	2.7	1.9	1.5	1.2	-0.2	2.3	62.7	0.6	31.3
Coumarin	-3.1	2.7	3.9	2.4	0.4	2.5	1.7	1.5	1.5	2.0
Vinylidene dichloride	1.4	2.4	-0.3	0.7	0.5	4.9	1.6	0.7	0.9	2.8

¹ LLNA における感作強度のカテゴリー² Fujita *et al.* (2014) において報告された値を引用

Control



Reacted with phenylacetaldehyde

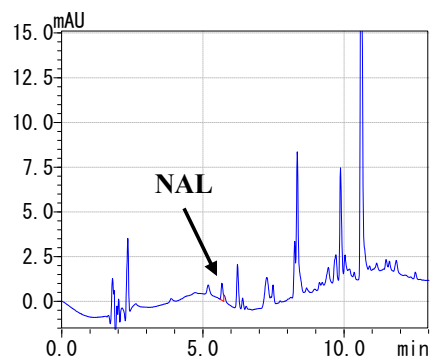
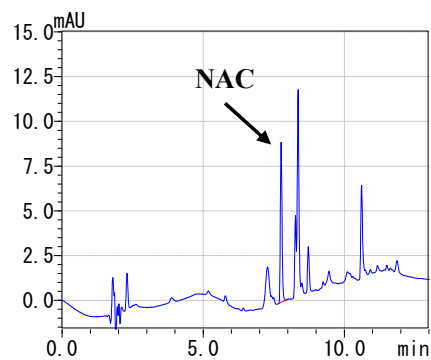


図 4. NAC および NAL のクロマトグラム

上段が NAC および NAL の陰性対照 (溶媒としてアセトニトリルを添加)、下段が感作性物質の phenylacetaldehyde と反応させた後の NAC および NAL のクロマトグラムを示す。NAC は約 8 分、NAL は約 6 分に検出されており、陰性対照と比較して phenylacetaldehyde と反応させた方ではピークサイズが減少している。

1-2-3. 判定クライテリアの算出と LLNA に対する予測精度

ModelBuilder in ADMEWORKS によって、前述の 1-2-2 における 82 化合物の結果から感作性/非感作性の 2 クラス分類に最適なクライテリアを算出したところ、5.050%となった。これより、NAC および NAL の Depletion の平均値が 5.050%以上を感作性、5.050%未満を非感作性と判定し、82 化合物における判定結果を Fujita 法および DPRA と比較した (表 7)。さらに Cooper statistics によって LLNA の結果に対する感作性物質の一致率 (Sensitivity)、非感作性物質の一致率 (Specificity) および全体の一致率 (Accuracy) を算出した (表 8)。その結果 Accuracy は 90.2%となり、わずかに Fujita 法および DPRA の Accuracy より高い値となった。同様に、Sensitivity および Specificity は、DPRA の Sensitivity および Specificity と同等以上であった。

LLNA における感作性物質において、Fujita 法では 5 化合物が偽陰性となったが、本研究では 7 化合物が偽陰性となった。これに対し、LLNA における非感作性物質においては、Fujita 法では 5 化合物が偽陽性となったが、本研究では 1 化合物だけであった (表 7)。具体的には、感作性物質である 1-(4-methoxyphenyl)-1-penten-3-one および 2,2,6,6-tetramethyl-3,5-heptanedione は、Fujita 法では感作性物質と正確に判定されたが、本研究で確立した条件では非感作性物質と誤って分類された。一方、非感作性物質である 2-hydroxypropyl methacrylate、2-acetylcyclohexanone、ethyl vanillin および vanillin は、いずれも Fujita 法では誤って感作性物質と判定されたが、本研究では非感作性物質と正しく分類できた。(表 7)。

表 7. 確立した試験条件の 82 化合物における予測結果と既存の試験法における予測結果との比較

Test substance	EC3 value	LLNA category	ADRA-DM Prediction	Fujita method ¹ Prediction	DPRA ² Prediction
Diphenylcyclo propenone	0.003	Extreme	S	S	S
Oxazolone	0.003	Extreme	S	S	S
Benzoyl peroxide	0.004	Extreme	S	S	S
Kathon CG	0.008	Extreme	S	S	S
Bandrowski's base	0.008	Extreme	S	S	S
5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one	0.009	Extreme	S	S	S
p-Benzoquinone	0.0099	Extreme	S	S	S
Tetrachlorosalicylanilide	0.04	Extreme	S	S	S
2,4-Dinitrochlorobenzene	0.05	Extreme	S	S	S
Glutaraldehyde	0.1	Strong	S	S	S
Fluorescein isothiocyanate	0.14	Strong	S	S	S
Phthalic anhydride	0.16	Strong	S	S	S
Lauryl gallate	0.3	Strong	S	S	S
Propyl gallate	0.32	Strong	S	S	S
CD3	0.6	Strong	S	S	S
Trimellitic anhydride	0.6	Strong	S	S	S
Formaldehyde	0.61	Strong	S	S	S
Metol	0.8	Strong	S	S	S

表 7 のつづき(1)

Test substance	EC3 value	LLNA category	ADRA-DM Prediction	Fujita method Prediction	DPRA Prediction
2-Hydroxyethyl acrylate	1.4	Moderate	S	S	S
Glyoxal	1.4	Moderate	S	S	S
Vinyl pyridine	1.6	Moderate	S	S	S
2-Mercaptobenzothiazole	1.7	Moderate	S	S	S
Nonanoyl chloride	1.8	Moderate	S	S	NS
2-Methyl-2 <i>H</i> -isothiazol-3-one	1.9	Moderate	S	S	S
1,2-Benzisothiazoline-3-one	2.3	Moderate	S	S	S
Methyl-2-nonynoate	2.5	Moderate	S	S	S
Cinnamaldehyde	3	Moderate	S	S	S
Phenylacetaldehyde	3	Moderate	S	S	S
Benzylideneacetone	3.7	Moderate	S	S	S
2,4-Heptadienal	4	Moderate	S	S	S
Squaric acid	4.3	Moderate	NS	NS	S
Trans-2-hexenal	5.5	Moderate	S	S	S
Resorcinol	5.5	Moderate	S	S	NS
Diethyl maleate	5.8	Moderate	S	S	S
2-phenylpropionaldehyde	6.3	Moderate	S	S	S
Perillaldehyde	8.1	Moderate	S	S	S
Palmitoyl Chloride	8.8	Moderate	S	S	S
1-(4-Methoxyphenyl)-1-penten-3-one	9.3	Moderate	NS	S	S
α -Hexylcinnamaldehyde	11	Weak	NS	NS	NS
α -Amylcinnamaldehyde	11	Weak	NS	NS	NS
2,3-Butanedione	11	Weak	S	S	S
Farnesal	12	Weak	S	S	S
Oxalic acid	15	Weak	NS	NS	NS
Benzyl benzoate	17	Weak	NS	NS	NS
4-Allylanisole	18	Weak	S	S	S
Lilial	19	Weak	S	S	S
Cyclamen aldehyde	22	Weak	S	S	S
Imidazolidinyl urea	24	Weak	S	S	S
5-Methyl-2,3-hexanedione	26	Weak	S	S	S
2,2,6,6-Tetramethyl-3,5-heptanedione	27	Weak	NS	S	NS
Ethyleneglycol dimethacrylate	28	Weak	S	S	S
Ethyl acrylate	28	Weak	S	S	S
Hydroxycitronellal	33	Weak	S	S	S
Glycerol	NC	NS	NS	NS	NS
Hexane	NC	NS	NS	NS	NS
Diethyl phthalate	NC	NS	NS	NS	NS
Octanoic acid	NC	NS	NS	NS	NS
2-Hydroxypropyl methacrylate	NC	NS	NS	S	S
1-Butanol	NC	NS	NS	NS	NS
4-Hydroxybenzoic acid	NC	NS	NS	NS	NS
6-Methyl coumatrin	NC	NS	NS	NS	NS
Methyl salicylate	NC	NS	NS	NS	NS
Chlorobenzene	NC	NS	NS	NS	NS
Lactic acid	NC	NS	NS	NS	NS
1-Bromobutane	NC	NS	NS	NS	S
2-Acethylcyclohexanone	NC	NS	NS	S	S
4'-Methoxyacetophenone	NC	NS	NS	NS	NS
Ethyl benzoylacetate	NC	NS	NS	NS	NS

表 7 のつづき(2)

Test substance	EC3 value	LLNA category	ADRA-DM Prediction	Fujita method Prediction	DPRA Prediction
Ethyl vanillin	NC	NS	NS	S	NS
2-Propanol	NC	NS	NS	NS	NS
Propylene glycol	NC	NS	NS	NS	NS
Sulfanilamide	NC	NS	NS	NS	NS
Isopropyl myristate	NC	NS	NS	NS	NS
Benzaldehyde	NC	NS	S	S	NS
Methylparaben	NC	NS	NS	NS	NS
Nonanoic acid	21 (False pos.)	NS	NS	NS	NS
Propyl paraben	NC	NS	NS	NS	NS
Salicylic acid	NC	NS	NS	NS	-
Sulphanilic acid	NC	NS	NS	NS	NS
Vanillin	NC	NS	NS	S	NS
Coumarin	NC	NS	NS	NS	NS
Vinylidene dichloride	NC	NS	NS	NS	NS

NC: Not calculated, NS: Non-sensitizer, S: Sensitizer

¹ Fujita *et al.* (2014) における判定結果を引用

² Gerberick *et al.* (2007) における判定結果を引用

表 8. 確立した試験条件の 82 化合物における LLNA に対する予測精度と既存の試験法における予測精度との比較

		Predicted classification of ADRA-DM			Predicted classification of Fujita method ¹			Predicted classification of DPRA ²		
		S	NS	total	S	NS	total	S	NS	total
Chemical Classification ^a	S	46	7	53	48	5	53	46	7	53
	NS	1	28	29	5	24	29	3	25	28
	total	57	35	82	53	29	82	49	32	81
sensitivity:		86.8%			90.6%			86.8%		
specificity:		96.6%			82.8%			89.3%		
accuracy:		90.2%			87.8%			87.7%		

S: Sensitizer, NS: Non-sensitizer

^a LLNA の判定結果に基づいた感作性、非感作性の分類

¹ Fujita *et al.* (2014) における予測結果を引用

² Gerberick *et al.* (2007) における予測結果を引用

1-2-4. 反応液中における被験物質の析出確認

試験条件を低濃度化することにより、既存の試験法である DPRA と比較して反応液中における被験物質の析出がどれほど減少するか確認するために、82 化合物のデータセットについて ADRA-DM および DPRA の反応条件における被験物質の析出を観察した。

その結果、82 化合物のうち DPRA の反応条件下 (被験物質 5 mM または 25 mM) では反応液中で 30 化合物が析出した。これに対し、新たに確立した ADRA-DM における反応条件下 (被験物質 0.25 mM) では、lauryl gallate, palmitoyl chloride および isopropyl myristate の 3 化合物のみが析出した (表 9 および図 5)。ADRA-DM で析出が見られた 3 化合物において、lauryl gallate は、DPRA では Lys-peptide の反応条件で、明確な白濁が観察されたのに対し、ADRA-DM では NAC および NAL の反応条件とも、わずかに白濁しただけであった。Palmitoyl chloride は、DPRA では白濁に加え固体の析出物 (suspended solid) が観察されたのに対し、ADRA-DM ではわずかに白濁しただけであった。Isopropyl myristate は、DPRA および ADRA-DM のどちらもわずかな白濁が観察されただけであった。表 9 は反応液中の被験物質の析出の一例を示しており、析出には白濁、固形物の浮遊または沈殿、油状の浮遊または沈殿の 5 種類があった。

DPRA において析出した 30 物質に関して、ADRA-DM および DPRA の試験結果を表 10 に示した。DPRA または ADRA-DM において、析出した物質の感作性予測結果に着目すると、nonanoyl chrolide および 1-(4-methoxyphenyl)-1-penten-3-one の 2 物質は、ADRA-DM と DPRA とで予測結果が異なった。

表 9. ADRA-DM および DPRA の反応液中における被験物質の析出の様子

Sample name	DPRA (5 mM of sample for pH 7.5 25 mM of sample for pH 10.2)				ADRA-DM (0.25 mM of sample)			
	Solvent	100mM NaPB pH 7.5	100mM AAcB pH 10.2	State of precipitation	Solvent	100mM NaPB pH 8.0	100mM NaPB pH 10.2	State of precipitation
Diphenylcyclopropanone	AN			solid precipitation	AN			-
Benzoyl peroxide	AN			solid precipitation	AN			-
Tetrachlorosalicylanilide	IPA			turbidity	5% D/A			-
2,4-Dinitrochlorobenzene	AN			oily precipitation	AN			-
Lauryl gallate	IPA			turbidity	5% D/A			turbidity
Nonanoyl chloride	AN			suspended solid	AN			-
Palmitoyl chloride	AT			turbidity + suspended solid	AT			turbidity
α -Hexylcinnamaldehyde	AN			turbidity	AN			-
Benzyl benzoate	AN			turbidity + oily precipitation	AN			-
Isopropyl myristate	AN			turbidity	AN			turbidity

NaPB: Sodium phosphate buffer, AAcB: Ammonium acetate buffer

AN: Acetonitrile, IPA: Isopropanol, AT: Acetone, 5% D/A: 5% DMSO/Acetonitrile

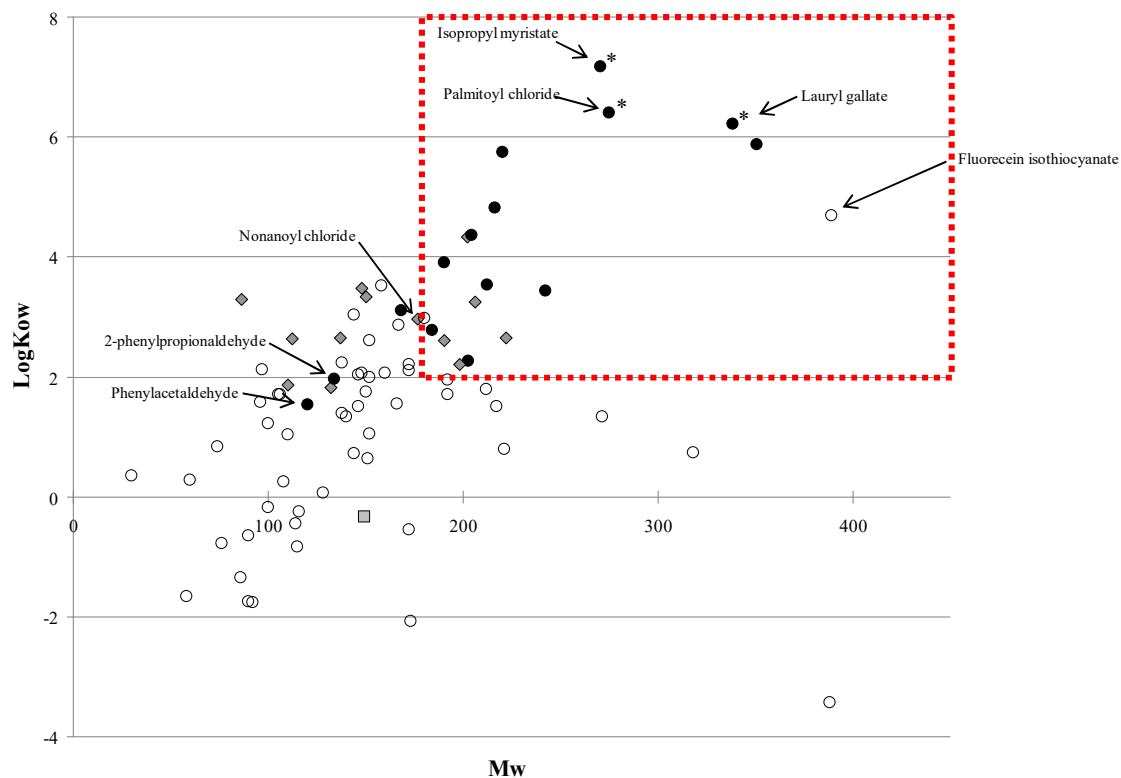


図 5.82 化合物における分子量および LogKow と反応液中での析出の関係

■: DPRA における Cys-peptide の反応条件で析出, ◆: DPRA における Lys-peptide の反応条件で析出,
 ●: DPRA における Cys-peptide および Lys-peptide の反応条件で析出, ○: 析出なし をそれぞれ表す。
 また、* は ADRA-DM の反応条件において析出が見られた化合物を表す。赤枠は Mw > 180 かつ
 LogKow > 2.0 の領域を示す。

表 10. DPRA または ADRA-DM で析出の見られた化合物と試験結果

Test chemicals	CAS No.	LLNA		Mw	LogKow	ADRA-DM						DPRA ¹					
		EC3 (%)	category			Solvent	Depletion (%)		Mean depletion (%)	Prediction	P/T	Solvent	Depletion (%)		Mean depletion (%)	Prediction	P/T
							NAC	NAL					Cys-peptide	Lys-peptide			
Diphenylcyclopropanone	886-38-4	0.003	Extreme	206.24	3.25	AN	23.9	6.3	15.1	S	-	AN	98.8	-0.7	49.1	S	L
Benzoyl peroxide	94-36-0	0.004	Extreme	242.23	3.43	AN	100.0	50.6	75.3	S	-	AN	100	81.3	90.7	S	C/L
Kathon CG	56965-84-9	0.008	Extreme	mixture	mixture	W	100.0	-0.4	49.8	S	-	W	99.1	3.9	51.5	S	C
5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one	26172-55-4	0.009	Extreme	149.6	-0.34	W	100.0	17.7	58.8	S	-	W	96.3	35.1	65.7	S	C
Tetrachlorosalicylanilide	1154-59-2	0.04	Extreme	351.01	5.87	5% D/A	22.9	2.1	12.5	S	-	IP	36.8	9	22.9	S	C/L
2,4-Dinitrochlorobenzene	97-00-7	0.05	Extreme	202.55	2.27	AN	87.6	6.1	46.9	S	-	AN	100	14.7	57.4	S	C/L
Lauryl gallate	1166-52-5	0.3	Strong	338.44	6.21	5% D/A	100.0	19.0	59.5	S	L	IP	90.9	8.7	49.8	S	C/L
Nonanoyl Chloride	764-85-2	1.8	Moderate	176.68	2.97	AN	7.5	39.4	28.2	S	-	AN	18.2	-6.3	6.0	NS	L
Methyl-2-nonyanoate	111-80-8	2.5	Moderate	168.23	3.1	AN	11.1	1.4	6.2	S	-	AN	100	3.2	51.6	S	C/L
Cinnamaldehyde	14371-10-9	3	Moderate	132.16	1.82	AN	100.0	13.1	56.5	S	-	AN	70.6	43.2	56.9	S	L
Phenylacetaldehyde	122-78-1	3	Moderate	120.15	1.54	AN	21.2	98.3	59.8	S	-	AN	60.7	22.6	41.7	S	C/L
2,4-Heptadienal	122-57-6	4	Moderate	110.15	1.86	AN	35.3	50.1	42.7	S	-	AN	97.3	23.9	60.6	S	L
2-phenylpropionaldehyde	93-53-8	6.3	Moderate	134.18	1.96	AN	8.1	4.6	6.3	S	-	AN	48.2	21.2	34.7	S	C/L
Perillaldehyde	2111-75-3	8.1	Moderate	150.22	3.34	AN	36.9	18.5	27.7	S	-	AN	31.9	13.8	22.9	S	L
Palmitoyl Chloride	112-67-4	8.8	Moderate	274.87	6.4	AT	6.9	95.9	51.4	S	C/L	AT	25.5	26.6	26.1	S	C/L
1-(4-Methoxyphenyl)-1-penten-3-one	104-27-8	9.3	Moderate	190.24	2.61	AN	2.9	4.2	3.5	NS	-	AN	29.9	14.3	22.1	S	L
α-Hexylcinnamaldehyde	101-86-0	11	Weak	216.32	4.82	AN	2.5	1.1	1.8	NS	-	AN	-0.3	-1.6	-1.0	NS	L
α-Amylcinnamaldehyde	122-40-7	11	Weak	202.29	4.33	AN	1.3	1.6	1.4	NS	-	AN	0.6	3.9	2.3	NS	L
Farnesal	19317-11-4	12	Weak	220.35	5.74	AN	17.1	8.8	12.9	S	-	AN	16.4	8.5	12.5	S	C/L
Benzyl benzoate	120-51-4	17	Weak	212.24	3.54	AN	1.5	2.8	2.2	NS	-	AN	0.2	3	1.6	NS	C/L
4-Allylanisole	140-67-0	18	Weak	148.2	3.47	AN	23.9	3.9	13.9	S	-	AN	20.6	-0.8	9.9	S	L
Lilial	80-54-6	19	Weak	204.31	4.36	AN	20.7	3.9	12.3	S	-	AN	14	0.7	7.4	S	C/L
Cyclamen aldehyde	103-95-7	22	Weak	190.28	3.91	AN	14.5	1.7	8.1	S	-	AN	18.9	1	10.0	S	C/L
2,2,6,6-Tetramethyl-3,5-heptanedione	1118-71-4	27	Weak	184.28	2.78	AN	0.9	1.6	1.2	NS	-	AN	1.4	0	0.7	NS	C/L
Ethyleneglycol dimethacrylate	97-90-5	28	Weak	198.22	2.21	AN	8.9	2.6	5.8	S	-	AN	87.3	12.4	49.9	S	L
Hexane	110-54-3	NC	NS	86.18	3.29	AN	0.4	0.9	0.7	NS	-	AN	-0.4	-5.1	-2.8	NS	L
Diethyl phthalate	84-66-2	NC	NS	222.24	2.65	AN	0.1	1.7	0.9	NS	-	AN	0.8	-0.7	0.1	NS	L
Chlorobenzene	108-90-7	NC	NS	112.56	2.64	AN	1.6	0.7	1.2	NS	-	AN	0.4	1.3	0.9	NS	L
1-Bromobutane	109-65-9	NC	NS	137.02	2.65	AN	6.7	2.4	4.6	NS	-	AN	13.8	1.2	7.5	NS	L
Isopropyl myristate	110-27-0	NC	NS	270.45	7.17	AN	-1.6	1.8	0.1	NS	C/L	AN	0.8	-4	-1.6	NS	C/L

AN: Acetonitrile, W: Water, IPA: Isopropanol, AT: Acetone, 5% D/A: 5% DMSO/Acetonitrile, P: Positive, N: Negative

C: システイン含有検出試薬の反応条件で析出, L: リジン含有検出試薬の反応条件で析出

1-3. 考察

1-3-1. 試験条件の低濃度化

従来法の Fujita 法は、281 nm に吸収極大を有するナフタレン環をシステインとリジンの N 末端に結合させたアミノ酸誘導体 (NAC および NAL) を用いて、未反応の誘導体を HPLC で定量する方法である。Fujita 法は DPRA の反応条件に基づいて設定されており、反応液における NAC および NAL の濃度は 0.5 mM であった。しかし、DPRA は、ほとんどの化学物質が吸収を有する 220 nm での HPLC 分析であるため、夾雑物等の影響により定量が困難な場合が多いのに対して、Fujita 法は HPLC 分析において安定なベースラインが得られる 281 nm で測定するため、夾雑物の影響が少なく、かつ高い精度で定量できるという特徴を有している。このように、NAC および NAL は 281 nm での検出感度が高いため、これらの濃度を 1/100 まで下げても定量が可能であると予想された。したがって、反応液中の NAC や NAL の濃度を 1/100 に下げることが可能であるとすれば、被験物質溶液の調製濃度も低下させることが可能となり、水や有機溶媒に難溶性である被験物質でも容易に被験物質溶液の調製が可能となると考えられる。また、反応液中の被験物質濃度が低いため、反応液中における被験物質の析出がなく、正確な評価ができるものと期待された。

低濃度の反応溶液で評価する前に、まず反応条件の最適化を行った。本法では反応液中のすべての化合物の濃度を Fujita 法の濃度に対して 1/100 に希釈するため、被験物質と NAC および被験物質と NAL との衝突確率が減少し、反応性が低下することが予想された。この反応性低下を抑える手段として、反応液の pH を高くすることや NAC と被験物質との濃度比を 1:10 から 1:50 まで高くすることの 2 点が考えられたため、これらの条件検討を行った。なお、NAL は Fujita 法においても被験物質との比率は 1:50 であり、この反応条件下では添加量が限界であると判断し、検討しなかった。

Fujita 法における pH は NAC の酸化が認められない限界値である 9.5 としたが、本法では NAC の濃度が低いため、反応液中の溶存酸素の影響を受けやすくなり、そのため Fujita 法と比較して低い pH にする必要があると考えた。実際、pH 9.0 および pH 8.5 では NAC の酸化による二量体の生成が認められたため (data not shown)、pH 7.5 と pH 8.0 について 82 化合物から皮膚感作性の強度が異なる 19 化合物の評価を行った。その結果、Fujita 法における NAC の Depletion と比べると、全体的に低下する傾向が見られ、また、その傾向は pH が低いほど大きいことがわかった (表 3)。また、pH 8.0 においては NAC の酸化は認められなかったため (data not shown)、NAC の反応液における最適 pH を 8.0 とした。

NAL における最適 pH の検討において、生体内における pH は中性付近であるが、中性付近の pH ではリジンのアミノ基はほとんどがプロトン化しており、求核性が低下するため感作性物質と反応しない可能性が予想された。そのため、リジンにおけるアミノ基の pKa 付近である pH 10.2 と Fujita 法の NAL における反応液条件である pH 12.0 について、19 化合物の評価を行った。その結果、pH 12.0 では HPLC の分析において、benzoyl peroxide、fluorescein isothiocyanate および ethyl benzoylacetate の分解生成物と思われるピークが NAL

のピークと共溶出して定量できなかった。これは、被験物質濃度が 1 mM と従来の Fujita 法に比べて非常に低いため、被験物質が OH⁻ の影響を受けやすく、分解生成物が生じやすくなったことに起因すると考えられる。さらに、tetrachlorosalicylanilide、2,4-dinitrochlorobenzene、 α -hexylcinnamaldehyde および farnesal を除き、pH 12.0 に比べ pH 10.2 の Depletion の方が同程度以上であったことから、NAL における反応液の最適 pH は 10.2 とした (表 4)。

NAC の反応条件における被験物質濃度の検討では、予想通り NAC と被験物質の比率が 1:10 に比べて 1:50 における Depletion の方が全般的に高いことがわかった (表 5)。したがって、NAC と被験物質との最適比率は 1:50 とした。

上記試験条件下における、82 化合物に対する NAC および NAL の Depletion は、Fujita 法と比較すると全体的に低下する傾向にあることがわかった。これは、前述したように希釈による衝突確率の低下によるものと考えられる。しかし、次の 2 つの観点からは、反応性は低下したものの、感作性予測にはあまり影響しないと考えられた。

まず、反応性が比較的高い化合物について考察する。Fujita 法において Extreme/Strong の被験物質で反応性が極めて高く、Depletion が 90%以上の化合物は NAC では 12 化合物あったが、本試験条件では 10 化合物とほぼ同程度であった。一方、NAL では Fujita 法において 6 化合物あったが、本試験条件では 3 化合物と少なかった。しかし、残りの 3 化合物のうち diphenylcyclopropanone 以外の 3 化合物の Depletion はすべて 50%以上であり、ある程度の反応性は保持されていた。

次に、反応性が極めて低い化合物について考察する。Fujita 法においては、NAC および NAL の Depletion が 5%以下の化合物は、いずれも 8 化合物であった。一方、本試験条件の NAC では非感作性物質を除くと 10 化合物あったが、NAL では 20 化合物あり、NAL における Depletion の低下が目立った。しかし、Mean depletion に着目すると、5%以下を示した化合物は 7 化合物であったのに対して、Fujita 法では 5 化合物と大きな違いはなかった。このことから、本試験法において NAL の反応性は低下する傾向にはあるものの、NAC および NAL の平均値では 5%以下となる化合物は Fujita 法と同程度であり、この事実は NAL のアミノ基による反応性が低下しても、NAC の SH 基の反応性がある程度補うことができるものと考えられる。また、この 5%程度を感作性物質と非感作性物質とを区別するクライテリアとすれば、本試験法は Fujita 法と同程度の皮膚感作性の予測精度を提供できる可能性があるものと推測された。

統計解析から求めた感作性物質と非感作性物質を区別するクライテリアは 5.050%となり、前述の NAC および NAL の Depletion から 5%程度と推定したクライテリアとほぼ一致した。また、この値に基づいて算出した Accuracy は 90.2%となり、Fujita 法および DPRA の 87.8% および 87.7%に比べ同等以上の予測精度を示した。また、表 7 から本試験法では、感作性物質を非感作性物質と誤って分類した偽陰性は 7 化合物と、Fujita 法の 5 化合物よりも多かった。しかし、非感作性物質を感作性物質と分類した偽陽性は、Fujita 法では 5 化合物であったのに対して、本試験法では 2 化合物と少なく、偽陽性が極めて少ない試験法であるこ

とがわかった。これは、本試験法では本質的に被験物質と反応する化合物以外は反応性が極めて低くなり、誤検出が少なくなったことによると考えられる。

Depletion のバラツキに着目すると、NAC および NAL の SD はそれぞれ 0~7.1% および 0~4.7% であり、Fujita 法の 0~7.8% および 0~9.5% と同程度であった。このことから、反応液中の化合物の濃度を 1/100 にしても、値のバラツキにはあまり影響がないことがわかった。また、非感作性物質 29 化合物における NAC および NAL の SD の最大値は 7.1% および 3.1% であり、感作性判定のクライテリアである 5.050% より NAC においてはわずかに高くなっている。これに対し、DPRA における上記 29 化合物における Cys-peptide および Lys-peptide の SD の最大値は 17.5% および 22.0% と、感作性判定のクライテリアである 6.38% をはるかに上回る値となっている (Gerberick *et al.* 2007)。また、ADRA-DM では 24 時間の反応後に TFA を反応液に添加し、反応液の pH を酸性条件にすることにより、NAC のチオール基および NAL のアミノ基の乖離を抑えるため、HPLC の測定中における反応の進行を抑制している。これにより DPRA よりも試験結果のばらつきが小さいと考えられる。以上のことから、本試験法におけるクライテリアである 5.050% は妥当な値であることが示唆される。しかしながら、クライテリア付近の結果については、試験時のばらつきによって判定が変わる可能性があるため、試験結果の再現性を確認する必要があると考えられる。

感作性物質について、本試験法と DPRA および Fujita 法の評価結果が異なる例について考察した (表 6, 7)。まず、nonanoyl chloride および resorcinol は、DPRA では非感作性物質と誤って分類されたが、本試験法および Fujita 法ではいずれも感作性物質と正確に分類できた。前者は、本試験法および Fujita 法のどちらも NAL の Depletion は約 40% 以上であった。一般に nonanoyl chloride のような酸クロリドは、アミノ基と速やかに反応すると考えられる。実際、同じ酸クロリドである palmitoyl chloride でも同様に、95% 以上と高い Depletion であった。しかし、DPRA における酸クロリドと Lys ペプチドとの Depletion は低く、nonanoyl chloride では 0% 未満、palmitoyl chloride では 20% を少し超えた程度であった。したがって、酸クロリドに関しては、DPRA に比べ ADRA-DM の方が、正確に評価できる可能性があると考えられる。一方、resorcinol においては、酸化によってベンゾキノンに変化することで感作性を示す pre-hapten であり、Depletion がクライテリア付近であることから、本試験法および Fujita 法では NAL の反応液における緩衝液の違い等により、resorcinol の一部が酸化されて反応した可能性がある。

一方 squaric acid は、DPRA では感作性物質と正確に分類されたが、本試験法および Fujita 法のどちらも非感作性物質と誤って分類された。この化合物に関しては、DPRA と本試験法および Fujita 法で Depletion が大きく異なっていた。Fujita *et al.* (2014) でも考察されている通り、被験物質の溶解が充分でなかった可能性が考えられる。

また、1-(4-methoxyphenyl)-1-penten-3-one のみ DPRA および Fujita 法では感作性物質と正確に分類されたが、本試験法では非感作性物質と誤って判定された。この化合物では NAC の反応性が Fujita 法に比べて著しく低下しており、そのため非感作性物質に誤って分類され

たと考えられる。したがって、この被験物質は低濃度にしたことおよび反応液の pH が低くなったことによる反応性低下の影響を受けやすい化合物である可能性が考えられる。

α -Hexylcinnamaldehyde、 α -amylcinnamaldehyde、oxalic acid および benzyl benzoate はいずれの試験法でも非感作性物質と誤って分類された。このことから、これらはタンパク結合試験では正しく評価できない化合物であると考えられる。

次に、非感作性物質に関して本試験法と DPRA および Fujita 法の評価結果が異なる例について考察した(表 6, 7)。まず、1-bromobutane は DPRA で感作性物質と誤って分類されたが、本試験法および Fujita 法では非感作性物質と正確に分類された。この化合物はハロゲン化アルキルの一種であり、前述の酸クロリドと同様にアミノ基と反応性を示すことが知られていることから、DPRA において誤って感作性物質と判定されたと考えられる。

2-Hydroxypropyl methacrylate は、DPRA および Fujita 法では感作性物質と誤って分類されたが、本試験法では非感作性物質と正確に分類された。一般に、メタクリル酸エステルはアクリル酸エステルに比べて反応性が低いことが知られている。本試験法はメタクリル酸エステルの内、感作性物質である ethyleneglycol dimethacrylate および非感作性物質である 2-hydroxypropyl methacrylate をそれぞれ LLNA 試験結果と一致する分類ができたことから、本試験法はメタクリル酸エステルにおける微妙な感作性の差を検出できる可能性があることが示唆された。

一方 benzaldehyde は、DPRA では非感作性物質と正確に分類されたが、本試験法および Fujita 法では感作性物質と誤って判定された。この化合物はアルデヒド基を有しており、構造上リジンと反応する感作性懸念構造として知られている。実際、LLNA では非感作性だが、ヒトで感作性を示すという報告がされている (Natsch *et al.* 2012)。しかしながら、本試験法の結果ではリジンを有する NAL とは反応しておらず、NAC における Depletion が増加している (表 6)。また、HPLC のクロマトグラムから NAC の二量体のピークが増加していることが確認されている (data not shown)。これらのことから、アルデヒドが酸化剤として働くことで NAC のチオール基を酸化させ、二量体が生成することで NAC が減少した可能性が考えられる。本試験法で偽陽性となった化合物はこの benzaldehyde のみであり、偽陽性がほとんどない試験法であることを示唆している。

本試験法の LLNA に対する Accuracy は 90.2%であり、Fujita 法 および DPRA の 87.8%および 87.7%に比べてわずかではあるが高かった (表 8)。これは Fujita 法および DPRA に比べて検出試薬および被験物質を低濃度で反応性させる評価法であるため、NAC や NAL と本質的に反応する被験物質以外は、ほとんど反応性を示さないためと考えられる。したがって、感作性と非感作性のクライテリアを適切に選べば、感作性物質と非感作性物質をより正確に判定できる評価法である可能性がある。

本研究の関連研究で、溶媒等に微量に含まれる金属による NAC の酸化を防ぐために、リン酸緩衝液に EDTA を 0.33 μ M 添加した試験系が報告されている (Fujita *et al.* 2019a)。この報告において、本研究で使用した 82 化合物を用いた評価を行っており、LLNA に対する予

測精度 (Accuracy) が約 87%と、本研究の 90.2%と同程度であることが示されている。また、判定が異なった化合物はいずれも Depletion 平均値がクライテリア付近の感作性物質であり、EDTA の添加は試験結果に影響がないことが示されている。以上より、EDTA を添加することで金属イオンの影響が抑制されることにより NAC の安定性が向上し、それにより試験の再現性等の精度が高くなる利点はあるが、陰性/陽性の判定結果は基本的に本研究と同じになると考えられる。

また、同じく本研究の関連研究で、NAC および NAL に含まれるナフタレン環が蛍光を持つという特徴を活かし、HPLC において NAC および NAL を蛍光検出により定量する方法が報告されている (Fujita *et al.* 2019b, Wanibuchi *et al.* 2019)。この方法では、反応条件は本研究と同じであり、NAC および NAL の検出を蛍光によって行っているという点が異なるだけであるため、82 化合物における LLNA に対する予測精度は 87.8%と、本研究の 90.2%とほぼ同じ結果となっている。蛍光検出にすることにより、吸光度による検出よりも感度および選択性が高くなるため、混合物などの化合物由来の夾雑ピークが多く得られる化合物の評価に向いているが、反応条件は本研究と同じであるため、陰性/陽性の判定結果は変わらないと考えられる。

DPRA や Fujita 法以外の Key event 1 を評価する試験法でタンパク質の代わりに 4-nitrobenzenethiol (NBT) と化合物の反応性を stopped-flow で検出する方法 (Chinpinda *et al.* 2010) や、DPRA の Cys-peptide とは異なる配列のシステインを含むヘプタペプチド (配列: Ac-NKKCDLF) との反応性を LC/MS で測定する方法 (Natsch *et al.* 2008) が報告されている。

前者の報告では stopped-flow の結果から算出された NBT と化合物の反応速度が、LLNA の感作強度と相関性があることが示されているが、評価を行った化合物数が 23 化合物と少ない。また、この報告では SH 基との反応しか検出していないため、リジンに代表されるアミノ基と反応する感作性物質を検出できない可能性がある。加えて、stopped-flow では反応液全体の吸光度から NBT の残存量を測定するため、NBT と同じ波長帯に吸収を持つ化合物の評価はできないと考えられる。これに対し、本研究で開発した方法では、SH 基とアミノ基の両方の反応性を評価することができる点や、測定に HPLC を用い、281 nm と比較的長波長で検出することで化合物の夾雑の影響をほとんど受けないと考えられる点において、上記の試験法より汎用性が高いといえる。

後者の報告では LC/MS で測定することにより、反応性だけでなく反応生成物も定量できることができ、80 化合物における LLNA に対する予測精度 (Accuracy) は 88.8%と、本研究の予測精度である 90.2%と同程度となっている。しかしながら、前者の Chinpinda *et al.* の方法と同様に SH 基との反応性しか検出していないため、アミノ基と反応する感作性物質を検出できない可能性がある。また、LC/MS は HPLC と比較すると一般的ではないため、汎用性の高さという点やアミノ基との反応性も検出できるという点において本研究の試験法の方が有用であると考えられる。

1-3-2. 反応液中における被験物質の析出

in vitro 試験および *in chemico* 試験では、培地中または反応液中で被験物質が析出した場合、溶解している被験物質の濃度が添加量よりも少なくなるため、正しく評価できないことがある。実際、OECD のテストガイドラインに登録されている皮膚感作性試験代替法は、いずれも *in vitro* 試験および *in chemico* 試験であるため、反応液中で析出するような疎水性の高い物質は正しく評価できない可能性が考えられる。そのため、いずれの試験法においても、ガイドラインには難水溶性物質の試験結果の解釈について注意が必要である旨が記載されている(OECD, 2018a, b, 2019a, b, c, d, e)。今回新たに確立した ADRA-DM も *in chemico* 試験であるが、他の代替法と比較して試験濃度が低濃度であるため、疎水性の高い物質においても析出することなく評価ができる可能性があると考えた。そこで本研究では、反応液中で被験物質自体が析出するか否かを確認した。なお、ここでは検出試薬を含まない反応液の調製直後における被験物質の析出の有無を観察した。

使用した 82 物質の内、混合物のため LogKow が計算できない Kathon CG を除く 81 物質について、LogKow と分子量 (Mw) の関係と、DPRA の反応液中での被験物質の析出や白濁の有無を図 5 に示した。この図からわかるように、LogKow が 4 以上で Mw が 180 以上の物質は、fluorecein isothiocyanate を除いてすべて析出した。また、Lys-peptide および Cys-peptide 両方の反応液で析出した物質は、ほとんど LogKow が 2 以上で Mw が 180 以上であったことから、析出は親水性/疎水性 (LogKow) のみならず分子量 (Mw) にも依存することが示唆された。これは、被験物質のモル濃度が一定であるため、分子量が大きいと被験物質の添加量 (体積) が増えるためであろうと考えられる。これに対し、この後の第 2 章で報告する重量濃度の被験物質溶液を用いる方法であれば、被験物質溶液を上記のようなモル濃度ではなく重量濃度で調製するため、分子量に依存せず被験物質の添加量は同じである。そのため、LogKow だけで析出を予測できる可能性がある。

上記の 2 つの条件 (LogKow が 4 以上かつ Mw が 180 以上) に当てはまるにもかかわらず、析出しなかった fluorecein isothiocyanate は、同じ 2 つの条件に当てはまる化合物のうち、唯一被験物質溶媒に 10% DMSO/アセトニトリルを用いている。DMSO は一般に被験物質を溶解する能力が高い溶媒であるため、緩衝液と混合しても被験物質が析出しなかった可能性が高い。同じく被験物質の溶媒が 10% DMSO/アセトニトリルである 2-mercaptobenzothiazole も、LogKow が 2.86 であるにもかかわらず析出しなかったため、この可能性を支持する結果であると考えられる。

一方、LogKow が 0 未満である親水性の高い物質の内、唯一 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one は Cys-peptide の反応液で析出した。この理由として、Cys-peptide の反応液には本被験物質が溶解しない溶媒であるアセトニトリルが 20%存在するため、被験物質が析出したと考えられる。実際、20% 存在するアセトニトリルを水に置き換えると、析出は観察されなかった (data not shown)。同様に、分子量や LogKow が計算できない Kathon CG も、5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one を約 75%含むため、この理由により析出したと考えら

れる (not shown in 図. 5)。

Phenylacetaldehyde および 2-phenylpropionaldehyde は分子量が小さいが、Lys-peptide および Cys-peptide 両方の反応液中で析出した。この 2 物質は構造が極めて類似しているため、分子量や LogKow 以外の化学的特性によって析出したのかもしれない。

反応液中で被験物質が析出し、かつ DPRA と ADRA-DM で結果が異なった 2 物質は、どちらも DPRA の反応液のみ析出がみられた。このうち 1-(4-methoxyphenyl)-1-penten-3-one は ADRA-DM において誤って非感作性物質と分類された。この化合物については 1-3-1 で述べた通り、低濃度にしたことおよび反応液の pH が低くなったことによる反応性低下の影響を受けやすい化合物である可能性が考えられる。一方、DPRA では被験物質の濃度が高いため、ADRA-DM に比べて反応性が高く、正しく感作性物質と分類したと考えられる。なお、この化合物は ADRA-DM の反応液中では被験物質が析出しなかったことから、析出によって予測結果を誤った訳ではない。

一方、nonanoyl chloride は、ADRA-DM では正しく感作性物質と予測できたが、DPRA では間違って非感作性物質と分類された。Hard and Soft Acids and Bases (HSAB) 則によると、nonanoyl chloride のようなハロゲン化アシルはハード求電子剤であり、アルコールおよびアミンと強く反応することが予想される (Tse-Lok. 1975)。実際、いくつかの報告でハロゲン化アシルとアミンとの反応性が示されている (Christian *et al.* 2005, McMurry. 2015)。表 10 を見ると、ADRA-DM における nonanoyl chloride の各 Depletion は、NAL では 7.4%であるのに対し、NAL では 39.4%と高い値を示しており、上記の理論を支持する結果となっている。これに対し、DPRA における Lys-peptide の Depletion は 0 未満であり、Lys-peptide の反応液でのみ被験物質が析出している。このことから、DPRA で非感作性物質と分類されたのは、被験物質が析出したことが主要因であると考えられる。Nonanoyl chloride と同様に疎水性の高いハロゲン化アシルである palmitoyl chloride についても、ADRA-DM では NAL の Depletion が 95.9%とほとんど反応しているのに対し、DPRA における Lys-peptide の Depletion は 26.1%と反応はしているが ADRA-DM と比較して低い。この結果は、反応液中で被験物質が析出し、かつ非感作性物質と予測された場合は偽陰性の可能性があるため、結果の解釈に十分な注意が必要であることを示唆している。

今回の検討では検出試薬は添加せず、被験物質のみの反応液中における析出を観察したが、実際の試験では検出試薬との反応生成物が析出する場合や被験物質が析出するときに検出試薬と共沈することもあると考えられる。前者の場合は検出試薬と被験物質が反応して生じる析出の為、析出の影響を受けることなく試験結果は陽性となると考えられる。しかしながら、後者の場合は実際に検出試薬と被験物質は反応していないにもかかわらず、試験結果が陽性となると可能性がある。表 10 を確認すると、DPRA では 30 化合物で反応液中における析出が観察されたが、nonanoyl chloride 以外の 29 物質においては正しく感作性を予測できており、共沈と考えられるような析出のあった非感作性物質における偽陽性の結果はなかった。このことより、反応溶液中の試験化学物質の沈殿は必ずしも誤った予測をも

たらずとは限らないことが分かる。安全性評価という観点では感作性ポテンシャルをもつ化合物を誤って非感作性と評価してしまうことは避けなければならないため、nonanoyl chloride のような析出がみられ、かつ判定が陰性となった結果については最大限の注意を払う必要があると考えられる。

82 物質の中で、DPRA の反応液中では 30 物質が析出したが、ADRA-DM の反応液中では 3 物質がわずかに白濁したに過ぎなかった。また、これらの 3 物質はいずれも LogKow が 6 を超えることから、ADRA-DM の反応液で析出するのは極めて疎水性が高い物質のみに限定されると言える。加えて、ADRA-DM ではこのわずかに白濁した 3 物質も、*in vivo* 結果を正しく予測することができたことから、析出が判定結果に影響を与える可能性は極めて低いと考えられる。

DPRA では使用する検出試薬であるペプチドに特異的な UV 吸収がなく、HPLC における検出感度が低いため、反応液を高濃度に調製する必要がある。そのため、被験物質の析出が多くなり、正しく評価できない化合物や HPLC で分析することができない化合物など、適用可能な化合物に制限がかかる。これに対し、ADRA-DM は析出に関する問題はほとんど生じないため、より多くの化合物を評価することが可能であると考えられる。

1-4. 小括

Fujita 法をもとに、検出試薬と被験物質との反応における反応液の pH および被験物質濃度を検討することにより、既存の試験法である DPRA および Fujita 法に対して検出試薬濃度が 1/100、被験物質濃度が NAC 反応系において 1/20、NAL 反応系において 1/100 となる試験法 (ADRA-DM) を確立した。新たに確立した試験条件により、*in vivo* 試験である LLNA に対する予測精度は 90.2%を達成し、DPRA の 87.7%および Fujita 法の 87.8%と比較して同等以上であることが確認された。

また、被験物質の低濃度化に成功したことにより、DPRA では 82 化合物中 30 化合物において反応液中における析出がみられたのに対し、ADRA-DM では LogKow が 6 を超える疎水性の高い 3 化合物においてわずかに白濁する程度であることが確認された。また、nonanoyl chloride においては DPRA では析出がみられ、かつ偽陰性となったが、ADRA-DM では析出はなく、結果も陽性となったことから、析出により DPRA では正しく評価できない化合物も ADRA-DM では評価できることが示された。

以上より、本研究で確立した試験法を用いることで、既存法と同等以上の *in vivo* 試験に対する予測能力を持ちながら、被験物質の使用量を大幅に削減できると共に、従来法では評価が困難であった難水溶性物質を含む、より広範囲な化合物への適用が可能となった。

第2章 分子量不明成分の評価法の開発

DPRA、Fujita 法および第1章で開発した ADRA-DM は被験物質と検出試薬の化学反応を測定する試験法であるため、被験物質と検出試薬のモル比を一定にし、検出試薬に対して被験物質が過剰にある反応条件にすることで、さまざま分子量の化合物の反応性を検出している。しかしながら、この条件では被験物質溶液をモル濃度で調製する必要があり、分子量が不明な物質を評価することができない。分子量不明の物質について同様に評価するためには、重量濃度などの分子量を必要としない調製法で、ある程度の分子量の範囲をカバーできるような被験物質濃度を設定すれば評価できる可能性がある。DPRA の試験条件においては第1章において示されたように、現在のモル濃度での試験条件において既に多く化合物で反応液中における析出が確認されており、重量濃度で多くの化合物の分子量をカバーするような濃度設定をした場合、更に多くの化合物が析出してしまう可能性がある。これに対し、ADRA-DM では多くの化合物の分子量をカバーするような濃度でも析出しない可能性が高い。そのため、第2章では分子量情報を必要としない試験法として、重量濃度で調製した被験物質溶液を使用した試験条件の確立を試みた。また、EU 等における動物実験の禁止により、動物実験代替法による安全性評価が喫緊で必要とされている化粧品においては、原料として自然由来の抽出液などの混合物が多く取り扱われるため、重量濃度で調製した被験物質溶液を用いた試験条件の混合物の評価への適用の可能性について、既知の化合物を混合した疑似混合液を用いて検証を行った。

よって本章では、第1章で確立した ADRA-DM を応用して、分子量が不明な成分も評価可能となる重量濃度での試験法を確立することで、さらなる適用範囲の拡大を目指すことを研究の目的とした。

2-1. 材料および方法

2-1-1. 試験化合物

重量濃度で調製した被験物質溶液を用いた試験条件の確立には、第 1 章の試験濃度の低濃度化における検討で使用した 82 化合物を被験物質として用いた。また、後述の疑似混合液を用いた評価検討では、82 化合物のデータセットから 10 化合物の非感作性物質を疑似混合液に用いた。

2-1-2. 被験物質溶液濃度の比較

0.05 mg/mL、0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.5 mg/mL の 4 濃度の被験物質溶液を表 1 に記載の 82 化合物について調製した。これらの被験物質溶液を用いて、第 1 章 1-1-2 に記載の方法と同様の反応条件で NAC および NAL と反応させた (反応液中における被験物質の終濃度：12.5 µg/mL、25 µg/mL、50 µg/mL、125 µg/mL)。なお、NAC 溶液においては関連研究 (Fujita *et al.* 2019a) の報告に基づき、溶媒等に微量に含まれる金属による NAC の酸化を防ぐために、リン酸緩衝液に EDTA を 0.33 µM 添加したものを用いた。反応後の HPLC による測定は第 1 章 1-1-3 に記載の条件と同様の条件で行い、それぞれの被験物質濃度における NAC および NAL の Depletion を算出した。

上記で算出した Depletion から 82 化合物を感作性/非感作性に分類し、Cooper statistics を用いて LLNA に対する予測精度を算出した。また、ヒトに対する予測精度も 82 化合物のうち、ヒトに対する感作性データのある 51 化合物の結果をもとに算出した。なお、感作性/非感作性の判定クライテリアは関連研究 (Fujita *et al.* 2019a) の報告に基づき、NAC および NAL の Depletion 平均値が 4.9%以上を感作性、4.9%未満を非感作性とした。

2-1-3. 疑似混合液を用いた評価

試験法確立に使用した 82 化合物のうち、diethyl phthalate、4-hydroxybenzoic acid、methyl salicylate、chlorobenzene、sulfanilamide、isopropyl myristate、methylparaben、propyl paraben、salicylic acid、coumarin の 10 種の非感作性物質をそれぞれアセトニトリルで 1 mg/mL ずつ混合したものを疑似混合液とした。この疑似混合液に上記 82 化合物のうち、感作強度のことなる 10 種の感作性物質をそれぞれ 0.05 mg/mL、0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.5 mg/mL の 4 濃度となるように添加した。この混合液を被験物質溶液として第 1 章 1-1-2 および 1-1-3 と同様の手順にて評価を行った。

2-2. 結果

2-2-1. 被験物質溶液濃度の比較

分子量が不明な化合物も評価できる試験条件を確立するために、まず 0.05 mg/mL、0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.5 mg/mL の 4 濃度の重量濃度で調製した被験物質溶液を用いた場合における NAC および NAL の Depletion を比較した。表 11 に 4 濃度の被験物質溶液を用いた場合の 82 化合物における NAC および NAL の Depletion を示した。また、比較対象として第 1 章で確立した ADRA-DM (被験物質溶液濃度: 1 mM) における NAC および NAL の Depletion も記載した (表 11 の 1 mM)。表中の濃い桃色は 1 mM における Depletion に対して 20%以上増加したことを示し、薄い桃色は 10%以上増加したことを示している。一方、薄い青色は 10%以上減少したことを示し、濃い青色は 20%以上減少したことを示す。NAC の Depletion は被験物質濃度に依存しており、濃度が高いほど 1 mM よりも Depletion が高い結果が多く、濃度が低いほど 1 mM 溶液よりも Depletion が低い結果が多かった。

NAL の Depletion は NAC の場合と似ていたが、濃度依存的な変化が見られた化合物は NAC と比較して少なかった。1 mM よりも高い Depletion を示した化合物数は NAC よりも少なかったが、1 mM より Depletion が低くなった化合物数は NAC と同程度であった。

2-2-2. 被験物質溶液濃度の違いにおける感作性判定結果の比較

82 化合物について、0.05 mg/mL、0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.5 mg/mL の 4 濃度の被験物質溶液を用いた場合における、感作性/非感作性の 2 クラス分類を実施した結果を表 12 に示した。12 化合物の感作性物質 (methyl-2-nonynoate, cinnamaldehyde, resorcinol, 2-phenylpropionaldehyde, farnesal, 4-allylanisol, lilial, cyclamen aldehyde, imidazolidinylurea, 5-methyl-2,3-hexanedione, ethyleneglycol dimethacrylate, hydroxycitronellal) は、1 mM における結果と異なり、0.05 mg/mL、0.1 mg/mL、または 0.2 mg/mL で非感作性となった。また、3 化合物の非感作性物質 (2-hydroxypropyl methacrylate, 2-acetylcyclohexanone, ethyl benzoylacetate) が 0.2 mg/mL または 0.5 mg/mL において誤って感作性と判定された。一方、1-(4-methoxyphenyl)-1-penten-3-one は、1 mM で非感作性と誤って判定されたが、0.5 mg/mL では正しく感作性と判定された。

表 11. 0.05 mg/mL、0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.5 mg/mL の被験物質溶液濃度における 82 化合物に対する NAC および NAL の反応性と 1 mM の被験物質溶液濃度における NAC および NAL の反応性との比較

Test substance	Mw	Depletion of NAC										Depletion of NAL									
		0.05 mg/mL		0.1 mg/mL		0.2 mg/mL		0.5 mg/mL		1 mM		0.05 mg/mL		0.1 mg/mL		0.2 mg/mL		0.5 mg/mL		1 mM	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Extreme/strong ¹																					
Diphenylcyclopropenone	206.24	7.2	0.8	17.1	0.3	29.1	0.5	54.4	0.4	23.9	1.5	0.0	0.1	2.5	0.2	2.9	0.7	3.5	0.4	6.3	1.2
Oxazolone	217.22	35.5	0.9	59.9	1.1	83.5	0.5	89.6	0.2	80.2	1.6	59.7	0.4	69.7	0.1	67.8	0.5	74.3	0.4	80.1	0.8
Benzoyl peroxide	242.23	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	50.4	0.2	54.9	0.3	60.0	0.2	76.2	0.2	50.6	2.7
Kathon CG	115.15	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	99.6	0.7	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.4	0.5
Bandrowski's base	318.38	84.0	2.1	97.3	0.7	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	2.2	0.1	3.4	0.5	14.7	0.8	5.7	0.4
5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one	149.6	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	1.9	0.9	13.7 ^{Co}	0.8	0.0 ^{Co}		17.7	1.1
p-Benzoquinone	108.09	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	97.2	2.0	60.5	0.2	73.2	0.3	82.3	0.1	88.1	0.6	83.5	1.1
Tetrachlorosalicylanilide	351.01	29.6	0.9	34.0	1.0	36.5	1.6	68.3	1.3	22.9	4.2	2.0	0.2	1.9	0.1	1.0	0.2	9.6	0.3	2.1	0.3
2,4-Dinitrochlorobenzene	202.55	41.4	0.1	66.8	0.2	90.3	0.3	100.0	0.0	87.6	2.9	0.0	0.0	1.5	0.4	4.6	0.7	6.3	0.5	6.1	1.3
Glutaraldehyde	100.12	2.9	0.9	0.1	0.1	1.6	0.9	25.1	1.3	4.6	1.7	39.5	0.2	35.6	0.6	58.4	0.2	85.2	0.2	53.1	2.9
Fluorescein isothiocyanate	389.38	45.0	0.3	61.0	0.3	79.3 ^{Co}	0.4	84.5 ^{Co}	1.2	94.1	0.9	49.4	1.2	71.2	0.4	88.2	0.3	97.9	0.1	98.1	0.6
Phthalic anhydride	148.12	0.0	0.0	0.5	0.6	0.6	1.0	9.6	6.2	-1.8	1.5	80.3	1.8	85.8	2.1	89.1	3.2	95.6	0.1	96.9	1.1
Lauryl gallate	338.44	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	40.3	3.1	67.3	0.1	85.8	0.3	95.0	0.0	19.0	0.4
Propyl gallate	212.2	97.6	0.2	98.5	0.2	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	25.7	0.4	44.6	0.3	64.6	0.9	62.3	0.8	56.4	1.4
CD3	271.38	92.1	0.7	93.9	0.2	94.7	1.7	97.8	0.1	100.0	0.0	4.7	0.2	7.7	0.4	13.2	6.7	12.9	0.2	16.5	0.5
Trimellitic anhydride	192.13	0.1	0.2	0.0	0.0	2.5	0.0	4.5	0.8	1.8	1.6	70.0	0.5	87.2	4.3	95.8	0.3	97.5	0.3	97.0	1.2
Formaldehyde	30.03	25.8	0.9	51.6	2.2	67.3	2.2	85.8	0.6	24.4	2.7	0.1	0.1	0.7	0.6	0.6	0.2	0.0	0.0	1.6	1.9
Metol	221.23	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	8.5	0.2	12.2	0.2	17.4	0.4	22.2	0.3	22.8	1.1
Moderate																					
2-Hydroxyethyl acrylate	116.12	96.7	0.3	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	3.0	0.3	7.2	0.3	12.6	0.5	23.4	0.5	16.3	4.7
Glyoxal	58.04	11.6	0.5	17.6	1.0	18.7	1.4	33.9	0.5	12.5	0.9	0.1	0.1	1.4	0.9	2.2	0.1	1.9	0.2	0.8	0.5
Vinyl pyridine	105.14	13.2	0.3	25.5	3.8	43.7	1.2	81.5	0.3	27.8	2.1	0.7	0.3	2.4	0.7	7.7	5.8	0.0	0.0	7.7	1.8
2-Mercaptobenzothiazole	167.25	32.7	0.7	51.2	0.2	84.2	2.0	100.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.2	6.9	0.8	0.3	0.8
Nonanoyl chloride	176.68	0.0	0.0	1.6	0.6	11.1	2.1	11.3	1.6	7.5	2.1	12.6	1.6	28.0	3.0	45.4	1.6	64.1	1.2	39.4	1.8
2-Methyl-2 <i>H</i> -isothiazol-3-one	115.15	97.8	0.1	90.2	0.0	90.0	0.1	81.8	0.1	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.6	4.6	0.0 ^{Co}		7.0	2.2
1,2-Benzisothiazoline-3-one	151.19	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	0.7	0.2	0.6	0.1	2.4	0.8	7.9	0.8	0.4	0.7
Methyl-2-nonynoate	168.23	2.8	0.4	6.2	0.3	18.2	1.9	35.7	1.1	11.1	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.3	7.3	0.5	1.4	0.2
Cinnamaldehyde	132.16	6.9	0.4	28.3	0.2	43.0	1.6	74.8	0.4	100.0	0.0	0.0	0.0	1.5	0.7	2.6	0.5	12.3	0.2	13.1	1.3
Phenylacetaldehyde	120.15	9.3	0.7	13.4	0.1	20.6	0.5	44.8	0.5	21.2	2.4	28.7	0.6	77.0	0.8	94.5 ^{Co}	0.4	83.2 ^{Co}	0.3	98.3	1.5
Benzylideneacetone	146.19	7.9	0.7	12.7	0.5	19.8	0.4	39.1	0.7	19.4	1.3	2.9	1.0	2.0	0.3	1.7	0.2	2.0	0.0	7.2	1.0
2,4-Heptadienal	110.15	20.0	0.3	44.5	0.5	45.7 ^{Co}	0.6	53.5 ^{Co}	0.0	35.3	2.6	3.6	1.0	13.3	0.1	17.1	0.4	37.9	0.4	50.1	1.3

表 11 のつづき(1)

Test substance	Mw	Depletion of NAC										Depletion of NAL									
		0.05 mg/mL		0.1 mg/mL		0.2 mg/mL		0.5 mg/mL		1 mM		0.05 mg/mL		0.1 mg/mL		0.2 mg/mL		0.5 mg/mL		1 mM	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Squaric acid	114.06	2.3	0.9	4.8	0.7	4.3	0.7	2.9	0.8	-2.9	1.8	0.6	0.6	0.8	0.0	0.0	0.0	0.3	0.3	0.5	0.2
Trans-2-hexenal	96.14	52.0	0.2	72.3	0.2	86.7	0.1	97.1	0.0	83.5	2.4	2.0	0.3	4.1	0.6	8.5	0.1	21.6	0.1	12.3	1.1
Resorcinol	110.11	2.3	0.4	6.2	1.0	11.1	0.9	13.4	0.3	9.8	3.5	3.1	5.0	0.1	0.1	0.8	0.2	0.3	0.3	2.2	0.7
Diethyl maleate	172.18	33.1	0.3	25.4	1.4	77.8	0.3	96.3	0.1	22.6	3.3	1.0	0.7	0.6	1.0	1.2	0.4	3.0	0.4	7.7	1.9
2-phenylpropionaldehyde	134.18	3.9	0.9	12.4	1.2	16.6	0.9	29.1	0.3	8.1	0.8	4.2	0.4	6.2	0.3	7.3	0.3	17.1	0.3	4.6	1.3
Perillaldehyde	150.22	11.7	0.6	29.0	0.5	51.2	0.6	85.7	0.0	36.9	2.5	0.7	0.1	4.6	0.3	7.1	0.3	13.5	0.4	18.5	1.0
Palmitoyl Chloride	274.87	6.9	0.6	8.6	0.7	7.7	0.3	19.7	0.9	6.9	1.4	78.1	2.0	98.0	0.3	93.9	3.5	100.0	0.0	95.9	2.5
1-(4-Methoxyphenyl)-1-penten-3-one	190.24	0.9	0.4	2.6	0.6	3.0	1.1	11.3	0.3	2.9	2.4	1.4	0.2	0.8	0.2	0.0	0.0	6.8	0.5	4.2	1.6
Weak																					
α -Hexylcinnamaldehyde	216.32	0.0	0.0	2.7	0.4	2.9	0.5	4.1	0.4	2.5	2.2	0.4	0.6	2.2	0.3	1.9	0.8	4.4	1.0	1.1	0.9
α -Amylcinnamaldehyde	202.29	0.0	0.0	2.2	0.8	2.1	0.4	3.1	0.7	1.3	1.5	0.0	0.0	2.3	0.2	1.3	0.1	3.8	0.6	1.6	0.4
2,3-Butanedione	86.09	12.1	0.8	33.5	0.6	87.3	1.4	100.0	0.0	71.3	1.4	7.9	0.1	8.5	0.2	13.3	2.4	29.5	0.3	25.5	1.2
Farnesal	220.35	6.1	0.2	18.8	0.8	25.6	0.9	21.3	0.2	17.1	2.3	0.8	0.2	6.8	7.7	6.6	0.9	8.1	0.5	8.8	1.4
Oxalic acid	90.03	0.6	1.0	0.3	0.4	0.0	0.0	0.6	0.2	0.4	2.9	0.5	0.2	0.2	0.2	1.4	0.4	1.0	0.1	3.6	1.0
Benzyl benzoate	212.24	0.6	0.5	0.5	0.8	0.1	0.2	3.5	0.0	1.5	3.4	0.1	0.2	0.4	0.1	1.0	0.5	3.9	0.2	2.8	1.1
4-Allylanisole	148.2	8.3	1.5	19.5	0.9	35.5	0.2	61.2	0.4	23.9	2.3	0.1	0.2	2.8	0.1	7.2	0.4	2.9	0.3	3.9	2.6
Lilial	204.31	5.1	1.1	7.4	0.8	9.4	0.2	17.1	0.2	20.7	1.3	0.7	0.7	1.1	0.2	1.6	0.6	4.5	0.1	3.9	0.9
Cyclamen aldehyde	190.28	1.7	0.6	1.1	0.5	2.8	0.5	13.7	0.2	14.5	2.6	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	3.5	0.1	1.7	0.6
Imidazolidinyl urea	388.29	4.6	0.2	11.4	1.1	19.4	0.7	36.7	1.8	35.4	2.2	0.3	0.3	0.1	0.2	1.1	0.7	2.8	0.2	2.0	0.2
5-Methyl-2,3-hexanedione	128.17	3.4	0.5	3.0	1.0	4.1	0.3	11.8	1.1	15.9	1.1	4.4	0.3	14.8	0.2	33.5	0.4	73.7	0.8	34.8	2.8
2,2,6,6-Tetramethyl-3,5-heptanedione	184.28	0.8	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	4.6	0.7	0.9	2.4	0.1	0.2	0.0	0.1	0.2	0.2	3.2	0.2	1.6	0.8
Ethyleneglycol dimethacrylate	198.22	1.6	0.2	2.8	1.4	7.5	0.2	19.5	0.2	8.9	1.1	0.2	0.2	0.5	0.4	0.8	0.5	5.4	0.2	2.6	1.6
Ethyl acrylate	100.12	71.8	0.2	96.5	0.2	100.0	0.0	100.0	0.0	89.8	1.9	3.7	0.4	5.9	0.3	12.1	0.6	30.1	0.5	13.7	0.4
Hydroxycitronellal	172.26	1.9	0.7	9.1	0.6	16.4	0.3	29.5	0.7	11.2	2.2	0.0	0.0	0.4	0.3	1.0	0.7	5.2	0.1	1.5	0.7
Non-sensitizer																					
Glycerol	92.09	0.4	0.7	0.2	0.3	0.3	0.4	0.7	0.2	1.8	2.4	0.7	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.1	0.7	1.2
Hexane	86.18	1.6	0.4	2.7	0.6	0.2	0.3	3.6	0.3	0.4	1.8	2.3	0.3	0.3	0.2	0.1	0.0	3.8	0.1	0.9	0.9
Diethyl phthalate	222.24	2.0	0.2	1.8	1.1	0.6	0.4	4.0	0.7	0.1	2.0	2.6	0.3	0.4	0.2	0.6	0.3	4.2	0.4	1.7	1.4
Octanoic acid	144.21	1.9	0.6	1.4	0.3	0.9	0.8	3.6	0.9	-2.1	1.1	2.2	0.5	0.0	0.0	0.4	0.3	3.7	0.3	1.2	0.5
2-Hydroxypropyl methacrylate	144.17	4.0	0.6	5.9	0.6	9.5	1.0	22.0	0.8	1.3	1.0	0.4	0.3	0.6	0.3	1.2	0.1	3.1	0.2	2.2	0.6
1-Butanol	74.12	1.0	0.9	0.7	0.4	0.6	0.6	1.2	0.7	-1.7	1.5	0.5	0.3	0.4	0.4	1.2	0.4	0.3	0.5	0.8	0.5
4-Hydroxybenzoic acid	138.12	2.0	0.4	4.0	0.6	1.7	0.3	3.6	0.6	0.6	2.3	2.0	0.3	0.0	0.0	0.2	0.3	2.9	0.1	-1.4	1.0

表 11 のつづき(2)

Test substance	Mw	Depletion of NAC										Depletion of NAL									
		0.05 mg/mL		0.1 mg/mL		0.2 mg/mL		0.5 mg/mL		1 mM		0.05 mg/mL		0.1 mg/mL		0.2 mg/mL		0.5 mg/mL		1 mM	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
6-Methyl coumatrin	160.17	2.0	0.6	1.5	0.9	1.1	0.6	3.1	0.5	2.2	2.2	2.2	0.1	0.0	0.0	0.1	0.2	2.9	0.1	1.0	0.7
Methyl salicylate	152.15	1.6	0.5	1.8	0.2	0.2	0.2	3.1	0.6	-2.9	0.9	1.9	0.1	0.1	0.1	0.4	0.3	3.0	0.1	0.4	0.6
Chlorobenzene	112.56	1.5	0.4	0.7	0.2	0.6	0.6	2.2	0.4	1.6	2.1	2.2	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0	3.0	0.1	0.7	0.7
Lactic acid	90.08	0.2	0.2	0.2	0.4	3.4	4.9	0.3	0.6	3.8	3.1	0.0	0.0	0.8	0.3	0.5	0.2	0.0	0.1	2.8	0.6
1-Bromobutane	137.02	1.5	0.1	1.6	0.4	0.3	0.5	2.6	0.3	6.7	3.5	2.2	0.3	0.2	0.2	0.1	0.1	1.9	1.7	2.4	1.6
2-Acethylcyclohexanone	140.18	1.7	0.3	0.9	0.1	5.3	0.3	11.9	0.4	0.3	3.1	3.1	0.0	1.2	0.8	0.1	0.1	2.8	1.5	0.3	0.6
4'-Methoxyacetophenone	150.17	0.1	0.1	2.2	0.3	2.8	0.2	5.7 ^{Co}	0.6	3.9	7.1	0.0	0.1	2.8	1.3	1.4	0.3	3.1	0.0	3.3	0.6
Ethyl benzoylacetate	192.21	2.9	0.4	4.7	0.5	5.4	0.5	10.2	0.3	-6.6	2.7	0.4	0.3	1.0	0.3	1.6	0.1	4.5	0.2	5.3	1.3
Ethyl vanillin	166.17	0.9	0.2	2.5	1.2	3.2	1.0	5.4	0.4	7.3	1.5	0.0	0.0	3.1	0.6	0.8	0.1	2.6	0.1	2.1	0.8
2-Propanol	60.1	0.0	0.0	0.5	0.9	0.6	1.0	0.7	0.7	3.6	1.4	0.1	0.1	0.0	0.0	1.5	0.4	1.1	0.2	2.8	0.6
Propylene glycol	76.09	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.4	0.0	0.1	3.5	1.3	0.2	0.4	0.0	0.0	0.7	0.3	1.0	0.2	2.2	0.7
Sulfanilamide	172.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	0.5	2.7	0.4	-2.7	2.5	0.0	0.0	2.9	0.4	0.9	0.1	3.2	0.4	1.4	0.7
Isopropyl myristate	270.45	0.0	0.0	0.1	0.2	0.6	0.6	2.4	0.3	-1.6	2.4	0.6	0.3	2.6	0.5	0.7	0.3	2.8	0.2	1.8	1.4
Benzaldehyde	106.12	9.9	0.9	20.1	0.2	51.5	2.7	100.0	0.0	24.4	0.8	2.2	0.0	4.1	0.2	10.6	0.5	13.7	0.1	2.9	1.0
Methylparaben	152.15	0.1	0.1	0.4	0.7	0.3	0.5	2.5	0.1	2.8	1.1	0.1	0.2	2.5	0.8	0.2	0.1	2.1	0.1	1.3	0.5
Nonanoic acid	158.24	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.2	1.7	0.0	-5.3	2.2	0.1	0.2	3.4	0.5	0.3	0.2	2.3	0.1	1.3	0.7
Propyl paraben	180.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.8	0.1	2.7	2.7	0.2	0.4	2.0	0.3	0.0	0.0	2.0	0.1	1.9	3.1
Salicylic acid	138.12	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.9	0.5	-5.0	2.2	0.1	0.1	2.3	0.3	0.2	0.2	3.1	0.3	0.4	0.6
Sulphanilic acid	173.19	0.4	0.6	0.2	0.2	0.2	0.3	0.8	0.8	-0.2	0.6	0.5	0.1	0.4	0.3	1.3	0.3	0.0	0.0	0.4	0.2
Vanillin	152.15	0.9	0.7	3.1	0.3	5.5	1.0	4.6	0.5	0.5	2.7	0.5	0.0	0.1	0.1	0.0	0.0	3.0	0.3	1.9	1.5
Coumarin	146.14	0.2	0.3	0.5	0.3	0.0	0.0	1.2	0.5	-3.1	2.7	1.3	0.7	0.2	0.3	0.0	0.0	1.5	0.1	3.9	2.4
Vinylidene dichloride	96.94	0.2	0.4	0.2	0.1	0.0	0.0	0.9	0.4	1.4	2.4	0.7	0.1	0.4	0.3	0.0	0.0	2.4	0.2	-0.3	0.7

Co : HPLC 分析における被験物質と NAC または NAL との共溶出を表す

¹ LLNA における感作強度のカテゴリー

1 mM における Depletion と比較して、 は 10～19%、 は 20%以上高いことを示し、 は 10～19%、 は 20%以上低いことを示す。

表 12. 重量濃度で調製した各被験物質溶液濃度における 82 化合物に対する予測結果と既存の試験法における予測結果との比較

Test substance	EC3 value	LLNA category	human data	Concentration of test substance solution					DPRA ¹
				0.05 mg/mL	0.1 mg/mL	0.2 mg/mL	0.5 mg/mL	1mM	
Diphenylcyclo propenone	0.003	Extreme	S	NS (3.6) ^a	S (9.8)	S (16)	S (28.9)	S (15.1)	S
Oxazolone	0.003	Extreme	S	S (47.6)	S (64.8)	S (75.6)	S (82)	S (80.1)	S
Benzoyl peroxide	0.004	Extreme	S	S (75.2)	S (77.4)	S (80)	S (88.1)	S (75.3)	S
Kathon CG	0.008	Extreme	S	S (50.0)	S (50.0)	S (50)	S (49.8)	S (49.8)	S
Bandrowski's base	0.008	Extreme	-	S (42.0)	S (49.7)	S (51.7)	S (57.3)	S (52.9)	S
5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one	0.009	Extreme	-	S (50.0)	S (50.9)	S (56.9)	S (50)	S (58.8)	S
p-Benzoquinone	0.0099	Extreme	S	S (80.2)	S (86.6)	S (91.2)	S (94.1)	S (90.3)	S
Tetrachlorosalicylanilide	0.04	Extreme	S	S (15.8)	S (17.9)	S (18.7)	S (38.9)	S (12.5)	S
2,4-Dinitrochlorobenzene	0.05	Extreme	S	S (20.7)	S (34.2)	S (47.5)	S (53.2)	S (46.9)	S
Glutaraldehyde	0.1	Strong	S	S (21.2)	S (17.8)	S (30)	S (55.2)	S (28.8)	S
Fluorescein isothiocyanate	0.14	Strong	-	S (47.2)	S (66.1)	S (83.7)	S (91.2)	S (96.1)	S
Phthalic anhydride	0.16	Strong	NS	S (40.2)	S (43.1)	S (44.9)	S (52.6)	S (47.5)	S
Lauryl gallate	0.3	Strong	S	S (70.1)	S (83.7)	S (92.9)	S (97.5)	S (59.5)	S
Propyl gallate	0.32	Strong	S	S (61.7)	S (71.6)	S (82.3)	S (81.1)	S (78.2)	S
CD3	0.6	Strong	-	S (48.4)	S (50.8)	S (53.9)	S (55.4)	S (58.3)	S
Trimellitic anhydride	0.6	Strong	-	S (35.1)	S (43.6)	S (49.1)	S (51)	S (49.4)	S
Formaldehyde	0.61	Strong	S	S (12.9)	S (26.1)	S (33.9)	S (42.9)	S (13.0)	S
Metol	0.8	Strong	S	S (54.3)	S (56.1)	S (58.7)	S (61.1)	S (61.4)	S
2-Hydroxyethyl acrylate	1.4	Moderate	S	S (49.8)	S (53.6)	S (56.3)	S (61.7)	S (58.1)	S
Glyoxal	1.4	Moderate	S	S (5.9)	S (9.5)	S (10.4)	S (17.9)	S (6.7)	S
Vinyl pyridine	1.6	Moderate	-	S (7.0)	S (13.9)	S (25.7)	S (40.8)	S (17.8)	S
2-Mercaptobenzothiazole	1.7	Moderate	S	S (16.3)	S (25.6)	S (42.2)	S (53.4)	S (50.2)	S
Nonanoyl chloride	1.8	Moderate	-	S (6.3)	S (14.8)	S (28.3)	S (37.7)	S (28.2)	NS
2-Methyl-2H-isothiazol-3-one	1.9	Moderate	S	S (48.9)	S (45.1)	S (46.3)	S (40.9)	S (53.5)	S
1,2-Benzisothiazoline-3-one	2.3	Moderate	S	S (50.3)	S (50.3)	S (51.2)	S (53.9)	S (50.2)	S
Methyl-2-nonynoate	2.5	Moderate	S	NS (1.4)	NS (3.1)	S (9.6)	S (21.5)	S (6.2)	S
Cinnamaldehyde	3	Moderate	-	NS (3.5)	S (14.9)	S (22.8)	S (43.6)	S (56.5)	S
Phenylacetaldehyde	3	Moderate	S	S (19.0)	S (45.2)	S (57.5)	S (64.0)	S (59.8)	S
Benzylidenacetone	3.7	Moderate	S	S (5.4)	S (7.3)	S (10.8)	S (20.5)	S (13.3)	S
2,4-Heptadienal	4	Moderate	-	S (11.8)	S (28.9)	S (31.4)	S (45.7)	S (42.7)	S
Squaric acid	4.3	Moderate	S	NS (1.5)	NS (2.8)	NS (2.1)	NS (1.6)	NS (-1.2)	S
Trans-2-hexenal	5.5	Moderate	S	S (27.0)	S (38.2)	S (47.6)	S (59.3)	S (47.9)	S
Resorcinol	5.5	Moderate	S	NS (2.7)	NS (3.2)	S (5.9)	S (6.9)	S (6.0)	NS
Diethyl maleate	5.8	Moderate	S	S (17.1)	S (13.0)	S (39.5)	S (49.7)	S (15.1)	S
2-phenylpropionaldehyde	6.3	Moderate	S	NS (4.1)	S (9.3)	S (11.9)	S (23.1)	S (6.3)	S
Perillaldehyde	8.1	Moderate	S	S (6.2)	S (16.8)	S (29.1)	S (49.6)	S (27.7)	S
Palmitoyl Chloride	8.8	Moderate	-	S (42.5)	S (53.3)	S (50.8)	S (59.8)	S (51.4)	S
1-(4-Methoxyphenyl)-1-penten-3-one	9.3	Moderate	-	NS (1.2)	NS (1.7)	NS (1.5)	S (9.0)	NS (3.5)	S
α-Hexylcinnamaldehyde	11	Weak	S/NS	NS (0.2)	NS (2.5)	NS (2.4)	NS (4.3)	NS (1.8)	NS
α-Amylcinnamaldehyde	11	Weak	S/NS	NS (0.0)	NS (2.3)	NS (1.7)	NS (3.4)	NS (1.4)	NS
2,3-Butanedione	11	Weak	-	S (10.0)	S (21.0)	S (50.3)	S (64.8)	S (48.4)	S
Farnesal	12	Weak	-	NS (3.5)	S (12.8)	S (16.1)	S (14.7)	S (12.9)	S
Oxalic acid	15	Weak	-	NS (0.5)	NS (0.3)	NS (0.7)	NS (0.8)	NS (2.0)	NS
Benzyl benzoate	17	Weak	NS	NS (0.3)	NS (0.5)	NS (0.6)	NS (3.7)	NS (2.2)	NS
4-Allylanisole	18	Weak	-	NS (4.2)	S (11.1)	S (21.3)	S (32.0)	S (13.9)	S
Lilial	19	Weak	S	NS (2.9)	NS (4.2)	S (5.5)	S (10.8)	S (12.3)	S
Cyclamen aldehyde	22	Weak	-	NS (0.9)	NS (0.6)	NS (1.4)	S (8.6)	S (8.1)	S
Imidazolidinyl urea	24	Weak	S	NS (2.4)	S (5.7)	S (10.2)	S (19.7)	S (18.7)	S
5-Methyl-2,3-hexanedione	26	Weak	S	NS (3.9)	S (8.9)	S (18.8)	S (42.7)	S (25.3)	S
2,2,6,6-Tetramethyl-3,5-heptanedione	27	Weak	-	NS (0.4)	NS (0.0)	NS (0.1)	NS (3.9)	NS (1.2)	NS
Ethyleneglycol dimethacrylate	28	Weak	S	NS (0.9)	NS (1.6)	NS (4.1)	S (12.5)	S (5.8)	S
Ethyl acrylate	28	Weak	S	S (37.8)	S (51.2)	S (56.0)	S (65.1)	S (51.7)	S
Hydroxycitronellal	33	Weak	S	NS (1.0)	NS (4.7)	S (8.7)	S (17.4)	S (6.3)	S

表 12 のつづき

Test substance	EC3 value	LLNA category	human data	Concentration of test substance solution					DPRA ¹
				0.05 mg/mL	0.1 mg/mL	0.2 mg/mL	0.5 mg/mL	1mM	
Glycerol	NC	NS	NS	NS (0.5)	NS (0.1)	NS (0.2)	NS (0.6)	NS (1.2)	NS
Hexane	NC	NS	NS	NS (2.0)	NS (1.5)	NS (0.2)	NS (3.7)	NS (0.7)	NS
Diethyl phthalate	NC	NS	NS	NS (2.3)	NS (1.1)	NS (0.6)	NS (4.1)	NS (0.9)	NS
Octanoic acid	NC	NS	NS	NS (2.1)	NS (0.7)	NS (0.7)	NS (3.6)	NS (-0.4)	NS
2-Hydroxypropyl methacrylate	NC	NS	-	NS (2.2)	NS (3.2)	S (5.36)	S (12.6)	NS (1.8)	S
1-Butanol	NC	NS	NS	NS (0.8)	NS (0.5)	NS (0.9)	NS (0.8)	NS (-0.4)	NS
4-Hydroxybenzoic acid	NC	NS	NS	NS (2.0)	NS (2.0)	NS (0.97)	NS (3.27)	NS (-0.4)	NS
6-Methyl coumatrin	NC	NS	-	NS (2.1)	NS (0.7)	NS (0.63)	NS (3.03)	NS (1.6)	NS
Methyl salicylate	NC	NS	NS	NS (1.8)	NS (0.9)	NS (0.26)	NS (3.06)	NS (-1.3)	NS
Chlorobenzene	NC	NS	-	NS (1.9)	NS (0.4)	NS (0.3)	NS (2.57)	NS (1.2)	NS
Lactic acid	NC	NS	NS	NS (0.1)	NS (0.5)	NS (1.98)	NS (0.18)	NS (3.3)	NS
1-Bromobutane	NC	NS	-	NS (1.8)	NS (0.9)	NS (0.2)	NS (2.26)	NS (4.6)	S
2-Acethylcyclohexanone	NC	NS	-	NS (2.4)	NS (1.0)	NS (2.66)	S (7.36)	NS (0.3)	S
4'-Methoxyacetophenone	NC	NS	NS	NS (0.1)	NS (2.5)	NS (2.08)	NS (4.37)	NS (3.6)	NS
Ethyl benzoylacetate	NC	NS	-	NS (1.6)	NS (2.8)	NS (3.47)	S (7.39)	NS (-0.6)	NS
Ethyl vanillin	NC	NS	-	NS (0.4)	NS (2.8)	NS (1.99)	NS (4.01)	NS (4.7)	NS
2-Propanol	NC	NS	NS	NS (0.0)	NS (0.3)	NS (1.04)	NS (0.89)	NS (3.2)	NS
Propylene glycol	NC	NS	NS	NS (0.1)	NS (0.0)	NS (0.63)	NS (0.53)	NS (2.9)	NS
Sulfanilamide	NC	NS	NS	NS (0.0)	NS (1.4)	NS (0.81)	NS (2.96)	NS (-0.7)	NS
Isopropyl myristate	NC	NS	NS	NS (0.3)	NS (1.4)	NS (0.64)	NS (2.58)	NS (0.1)	NS
Benzaldehyde	NC	NS	S	S (6.0)	S (12.1)	S (31.0)	S (56.8)	S (13.7)	NS
Methylparaben	NC	NS	-	NS (0.1)	NS (1.5)	NS (0.3)	NS (2.3)	NS (2.0)	NS
Nonanoic acid	21 (False +)	NS	-	NS (0.1)	NS (1.7)	NS (0.2)	NS (2.0)	NS (-2.0)	NS
Propyl paraben	NC	NS	NS	NS (0.1)	NS (1.0)	NS (0.0)	NS (1.9)	NS (2.3)	NS
Salicylic acid	NC	NS	NS	NS (0.1)	NS (1.2)	NS (0.1)	NS (2.5)	NS (-2.3)	-
Sulphanilic acid	NC	NS	-	NS (0.4)	NS (0.3)	NS (0.75)	NS (0.39)	NS (0.1)	NS
Vanillin	NC	NS	-	NS (0.7)	NS (1.6)	NS (2.73)	NS (3.78)	NS (1.2)	NS
Coumarin	NC	NS	S	NS (0.8)	NS (0.3)	NS (0)	NS (1.31)	NS (0.4)	NS
Vinylidene dichloride	NC	NS	-	NS (0.5)	NS (0.3)	NS (0.01)	NS (1.64)	NS (0.5)	NS

NC: Not calculated, NS: Non-sensitizer, S: Sensitizer "-" No data

^a NAC および NAL の Depletion の平均値を () 内に記載した。

¹ Gerberick *et al.* (2007) における結果を引用

2-2-3. 被験物質溶液濃度の違いにおけるヒトおよび LLNA に対する予測精度の比較

上記 4 種の被験物質濃度における 2 クラス分類の結果について、第 1 章と同様に Cooper statistics によってヒトおよび LLNA に対する予測精度を算出した (表 13-1 および 13-2)。

LLNA に対する予測精度については、いずれの重量濃度においても 1 mM と比較して Accuracy は低かったが、0.5 mg/mL においては 1 mM および DPRA と同程度の値であった。また、0.5 mg/mL における Sensitivity は 1 mM と比較して高かった。Specificity は 0.2 mg/mL および 0.5 mg/mL において 1 mM よりも低い結果となったが、0.05 mg/mL および 0.1 mg/mL においては 1 mM と同じであった (表 13-1)。

ヒトに対する予測精度については、0.5 mg/mL において Accuracy、Sensitivity、Specificity のいずれにおいても 1 mM と同じであった。0.05 mg/mL、0.1 mg/mL および 0.2 mg/mL においては 1 mM と比較して Accuracy および Sensitivity は低く、Specificity は 1 mM と同じであった (表 13-2)。

表 13-1. 重量濃度で調製した被験物質濃度の 82 化合物における LLNA に対する予測精度と既存の試験法における予測精度との比較

		Concentration of test substance solution															DPRA ¹		
		0.05 mg/mL			0.1 mg/mL			0.2 mg/mL			0.5 mg/mL			1 mM					
		S	NS	total	S	NS	total	S	NS	total	S	NS	total	S	NS	total	S	NS	total
Chemical Classification ^a	S	33	20	53	40	13	53	44	9	53	47	6	53	46	7	53	46	7	53
	NS	1	28	29	1	28	29	2	27	29	4	25	29	1	28	29	3	25	28
	total	34	48	82	41	41	82	46	36	82	51	31	82	57	35	82	49	32	81
		sensitivity:		62.3%	sensitivity:		75.5%	sensitivity:		83.0%	sensitivity:		88.7%	sensitivity:		86.8%	sensitivity:		86.8%
		specificity:		96.6%	specificity:		96.6%	specificity:		93.1%	specificity:		86.2%	specificity:		96.6%	specificity:		89.3%
		accuracy:		74.4%	accuracy:		82.9%	accuracy:		86.6%	accuracy:		87.8%	accuracy:		90.2%	accuracy:		87.7%

S: Sensitizer, NS: Non-sensitizer,

^a LLNA の判定結果に基づいた感作性、非感作性の分類¹ Gerberick *et al.* (2007) における結果を引用

表 13-2. 重量濃度で調製した被験物質濃度の 82 化合物におけるヒトに対する予測精度と既存の試験法における予測精度との比較

		Concentration of test substance solution															DPRA ¹		
		0.05 mg/mL			0.1 mg/mL			0.2 mg/mL			0.5 mg/mL			1 mM					
		S	NS	total	S	NS	total	S	NS	total	S	NS	total	S	NS	total	S	NS	total
Chemical Classification ^a	S	23	11	34	27	7	34	31	3	34	32	2	34	32	2	34	31	3	34
	NS	1	16	17	1	16	17	1	16	17	1	16	17	1	16	17	1	16	17
	total	24	27	51	28	23	51	32	19	51	33	18	51	33	18	51	32	19	51
		sensitivity:		67.6%	sensitivity:		79.4%	sensitivity:		91.2%	sensitivity:		94.1%	sensitivity:		94.1%	sensitivity:		91.2%
		specificity:		94.1%	specificity:		94.1%	specificity:		94.1%	specificity:		94.1%	specificity:		94.1%	specificity:		94.1%
		accuracy:		76.5%	accuracy:		84.3%	accuracy:		92.2%	accuracy:		94.1%	accuracy:		94.1%	accuracy:		92.2%

S: Sensitizer, NS: Non-sensitizer,

^a ヒトの結果に基づいた感作性、非感作性の分類¹ Gerberick *et al.* (2007) における結果を引用

2-2-4 非感作性混合溶液中に含まれる感作性物質の検出

2-1-3 に記載の 10 種の非感作性物質を用いた混合液を被験物質として用いて評価を行ったところ、NAC および NAL との反応性は示さなかった (data not shown)。また、HPLC の測定において、混合液由来のピークが NAC および NAL のピークと共溶出することはなかった (図 6)。次に、この混合液に感作強度の異なる 10 種類の感作性物質をそれぞれ 1 種類ずつ添加した疑似混合液を調製した。この疑似混合液を被験物質として用いて評価を実施し、感作性単体のみで実施した試験結果と比較した (図 7)。なお、10 種類の感作性物質は 82 化合物のデータセットのうち、感作性物質 53 化合物の中から LLNA の感作強度が 3 段階になるような 10 化合物を選択し (Extream/strong : 3 化合物, Moderate : 4 化合物, Weak : 3 化合物)、それぞれの感作性物質が 4 濃度になるように添加した (添加濃度:0.05 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.5 mg/mL)。

その結果、感作性物質単体の Depletion に対して 15%以上 Depletion が低下したのは、NAC では perillaldehyde (0.5 mg/mL, 0.2 mg/mL) の 1 化合物、NAL では nonanoyl chloride (0.1 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.5 mg/mL)、phenylacetaldehyde (0.05 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.5 mg/mL)、glutaraldehyde (0.1 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.5 mg/mL)、2,3-butanedione (0.2 mg/mL, 0.5 mg/mL) および 5-methyl-2,3-hexanedione (0.1 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.5 mg/mL) の 5 化合物であった。

疑似混合液中の各感作性物質に対する予測結果を表 14 に示した。感作性物質単体の時と比較すると、感作性物質が混合液に 0.5 mg/mL 含まれている場合は、感作性物質単体と同様に 10 化合物すべてについて感作性と検出することができた。しかしながら、0.2 mg/mL および 0.1 mg/mL の感作性物質が含まれている場合では、単体では感作性物質と判定できていた nonanoyl chloride および 5-methyl-2,3-hexanedione を非感作性と誤って判定した。0.05 mg/mL の感作性物質が含まれている場合では、単体では感作性物質と判定できていた nonanoyl chloride を誤って非感作性と判定した。

今回の疑似混合液に使用した非感作性物質 10 化合物および感作性物質 10 化合物を単体で試験を実施した場合は、HPLC の検出時に共溶出は認められなかったが、glutaraldehyde は NAL の反応において 0.05 mg/mL、0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.5 mg/mL の全用量で共溶出が認められた。また、0.5 mg/mL の *p*-benzoquinone では、HPLC のチャート全体に被験物質由来と考えられるベースラインの乱れが認められたため、表 14 に示す NAC および NAL の Depletion は参考値とした。

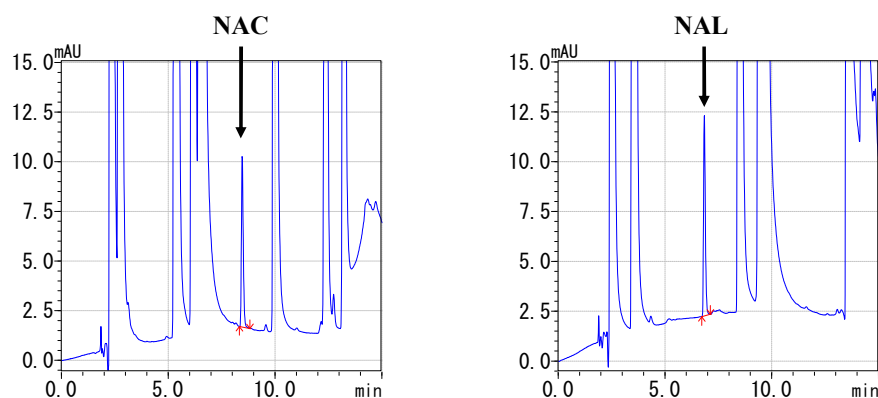
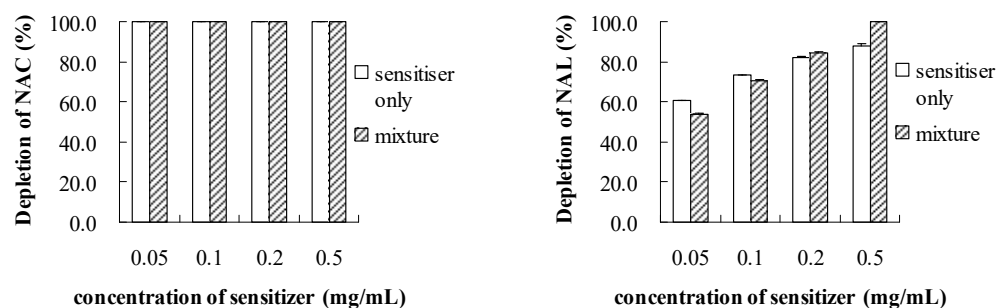


図 6. 10 化合物の非感受性物質混合液と NAC および NAL との反応液の HPLC クロマトグラム

5 μ M の NAC または NAL と 0.25 mg/mL ずつ混合した 10 化合物の非感受性物質を、25°C で 24 時間反応させた後に HPLC で測定を行った。NAC は約 8.5 分、NAL は約 7 分に検出された。

p-Benzoquinone



Glutaraldehyde

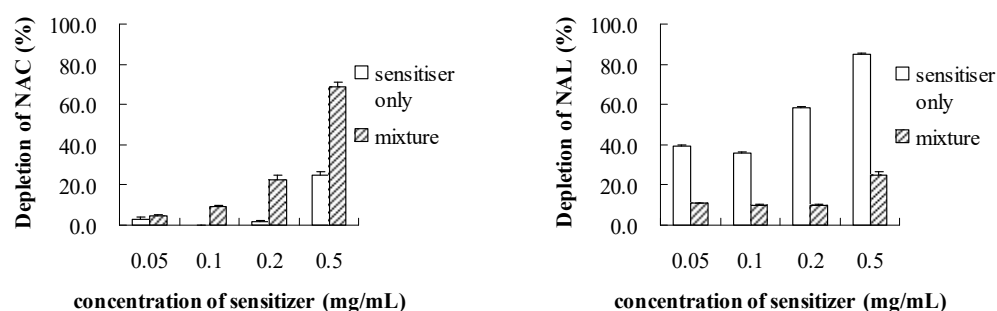
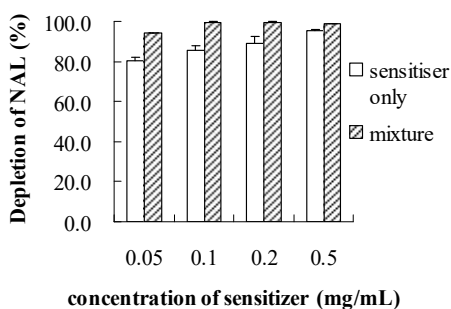
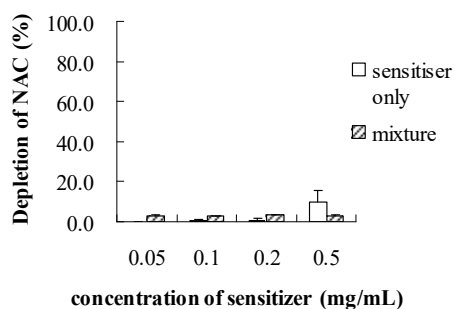


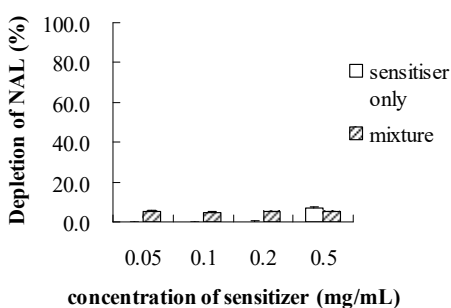
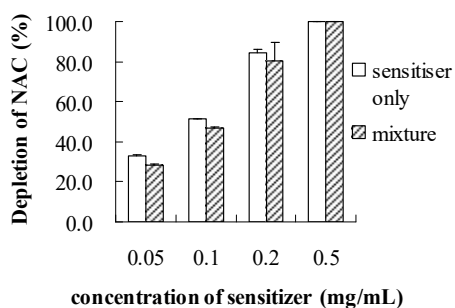
図 7. 感受性物質を添加した混合液を評価した場合と感受性物質単体を評価した場合における NAC および NAL の Depletion の比較

10 化合物の非感受性物質混合液に 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 mg/mL の濃度で感受性物質を添加した場合と、感受性物質単体における場合それぞれにおける NAC および NAL の Depletion をグラフにまとめた。斜線のバーは混合液における Depletion、無地のバーは感受性物質単体における Depletion を表す。

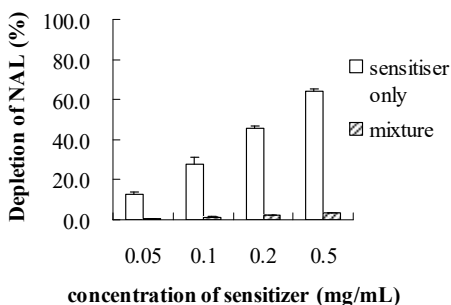
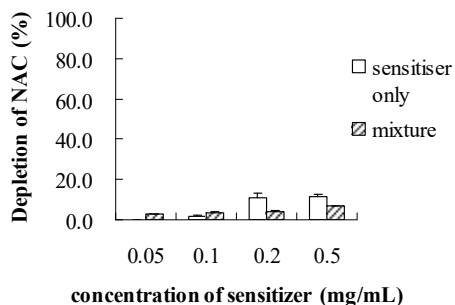
Phthalic anhydride



2-Mercaptobenzothiazole



Nonanoyl chloride



Phenylacetaldehyde

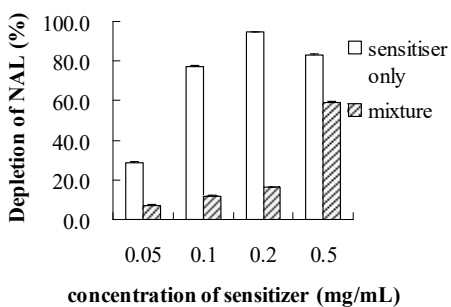
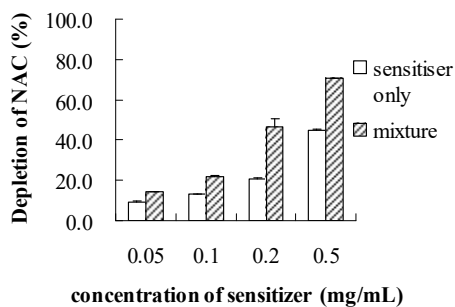
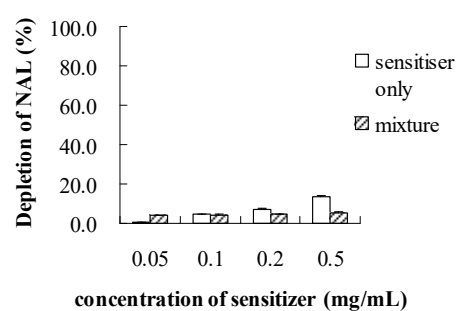
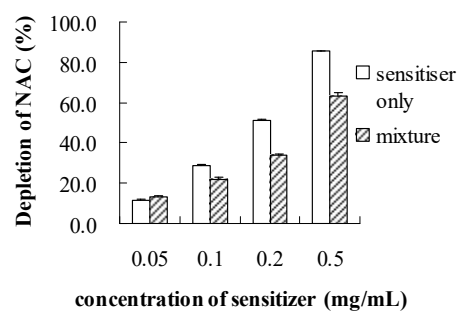
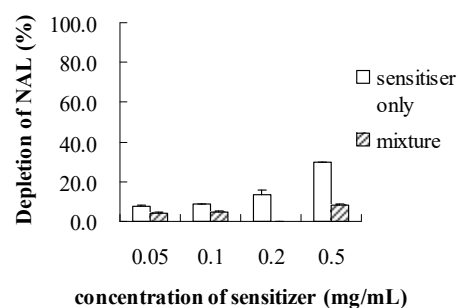
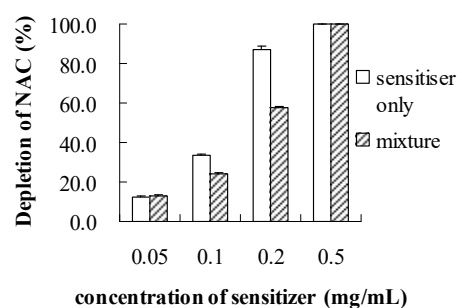


図 7 のつづき(1)

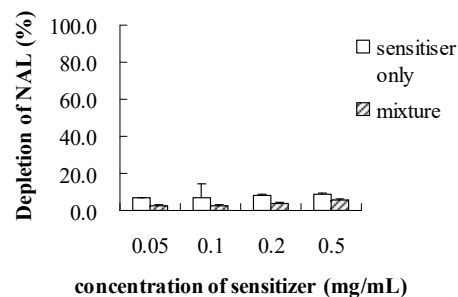
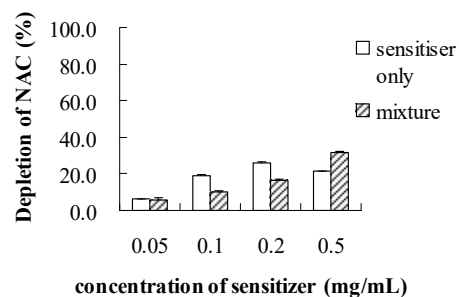
Perillaldehyde



2,3-Butanedione



Farnesal



5-Methyl-2,3-hexanedione

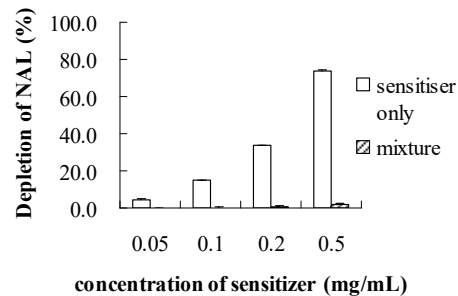
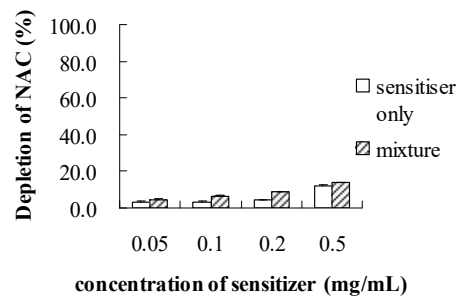


図 7 のつづき(2)

表 14. 感作性物質を添加した疑似混合液を用いた評価における予測結果

Test substance	EC3 value	LLNA category	Concentration of each sensitizer							
			0.05 mg/mL		0.1 mg/mL		0.2 mg/mL		0.5 mg/mL	
			Sensitizer + Mixture ^a	Sensitizer only	Sensitizer + Mixture	Sensitizer only	Sensitizer + Mixture	Sensitizer only	Sensitizer + Mixture	Sensitizer only
<i>p</i> -Benzoquinone	0.0099	Extreme	S (76.7) ^b	S (80.2)	S (85.3)	S (86.6)	S (92.2)	S (91.2)	S (100 ^c)	S (94.1)
Glutaraldehyde	0.1	Strong	S (7.9 ^{Co})	S (21.2)	S (9.7 ^{Co})	S (17.8)	S (16.2 ^{Co})	S (30.0)	S (46.7 ^{Co})	S (55.2)
Phthalic anhydride	0.16	Strong	S (48.4)	S (40.2)	S (51.0)	S (43.1)	S (51.5)	S (44.9)	S (50.9)	S (52.6)
2-Mercaptobenzothiazole	1.7	Moderate	S (16.7)	S (16.3)	S (26.0)	S (25.6)	S (42.8)	S (42.2)	S (52.6)	S (53.4)
Nonanoyl chloride	1.8	Moderate	NS (1.5)	S (6.3)	NS (2.4)	S (14.8)	NS (3.2)	S (28.3)	S (5.0)	S (37.7)
Phenylacetaldehyde	3	Moderate	S (10.6)	S (26.7)	S (16.6)	S (62.9)	S (31.4)	S (72.7)	S (65.0)	S (59.1)
Perillaldehyde	8.1	Moderate	S (8.6)	S (6.2)	S (13.2)	S (16.8)	S (19.2)	S (29.1)	S (34.4)	S (49.6)
2,3-Butanedione	11	Weak	S (8.7)	S (10.0)	S (14.6)	S (21.0)	S (28.7)	S (50.3)	S (54.2)	S (64.8)
Farnesal	12	Weak	NS (4.1)	NS (3.5)	S (6.3)	S (12.8)	S (10.0)	S (16.1)	S (18.3)	S (14.7)
5-Methyl-2,3-hexanedione	26	Weak	NS (2.3)	NS (3.9)	NS (3.4)	S (8.9)	NS (4.7)	S (18.8)	S (7.8)	S (42.7)

NS: Non-sensitizer, S: Sensitizer, Co: HPLC 測定における被験物質由来の成分のピークと NAC または NAL のピークとの共溶出を表す

^a 2-1-3 の項に記載の 10 化合物の非感作性物質混合液

^b NAC および NAL の Depletion の平均値を () 内に記載した

^c HPLC 分析において被験物質由来と考えられるベースラインの乱れが認められたため、Depletion は参考値とした

2-3. 考察

DPRA や Fujita 法、ADRA-DM は被験物質とペプチドやアミノ酸誘導体といった検出試薬を混合したのちに、未反応の検出試薬を HPLC で定量する方法である。これらの試験において、被験物質と検出試薬の反応液は一定のモル比で調製されるため、被験物質の分子量が分かっている必要がある。

重量濃度で被験物質溶液を調製できれば、分子量が不明な被験物質も感作性評価が可能となり、化粧品原料に多く見られる混合物の評価に適用できる可能性にもつながる。本章では、第1章で確立した ADRA-DM と同等の予測精度を実現する重量濃度測定法を確立し、確立した重量濃度測定法をもとに混合液中における感作性物質を検出可能か検証した。

角質層の物理的バリア機能において、分子量が 500 以下の物質が皮下へ透過しやすいとされている (Jan D. Bos *et al.* 2000)。皮下へ透過する最大分子量である分子量 500 の化合物を ADRA-DM の被験物質濃度である 1 mM に調製した場合、重量濃度に換算すると 0.5 mg/mL となるため、0.5 mg/mL を最高濃度として以下 0.2 mg/mL、0.1 mg/mL、0.05 mg/mL の 4 濃度における 82 化合物に対する NAC、NAL の反応性を比較した。

1 mM の被験物質濃度 (ADRA-DM) において、判定クライテリアよりわずかに Depletion 平均値が低かったために偽陰性となった化合物について、0.5 mg/mL の被験物質濃度では正確に感作性と判定された化合物が見られたが、逆に偽陽性率が 1 mM よりも高かった。この理由は、0.5 mg/mL では多くの化合物で 1 mM よりも被験物質濃度が高くなるため、反応性が上がったことによると考えられる。しかしながら、この傾向にそぐわない化合物がいくつか見られたため、それについて以下に考察する。

NAC において、tetrachlorosalicylanilide (Mw=351.01) の 1 mM (0.35 mg/mL) における Depletion は 22.9%であったが、0.05 mg/mL、0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.5 mg/mL における Depletion はそれぞれ 29.6%、34.0%、36.5%、68.3%であり、1 mM より濃度が低くなる 0.05 mg/mL、0.1 mg/mL、0.2 mg/mL でも Depletion は 1 mM より低くならなかった。Tetrachlorosalicylanilide は光によって活性化し、感作性を示す光アレルギー物質として知られている (Rickwood *et al.* 1984, Onoue *et al.* 2013)。本試験法では 24 時間の反応時は遮光下で行うが、それ以外の操作においては蛍光灯下で操作しているため、蛍光灯下での作業時間の違いにより反応性が変わった可能性が考えられる。実際、1 mM 溶液を用いた方法でも、Fujita *et al.* (2019a) の報告では NAC の Depletion が 43.4%と妥当な値となった結果が得られている。

NAL においては lauryl gallate (Mw=338.44) の 1 mM (0.34 mg/mL) における Depletion が 19%であるのに対し、0.05 mg/mL、0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.5 mg/mL における Depletion はそれぞれ 40.3%、67.3%、85.8%、95.0%であり、すべての重量濃度における Depletion が 1 mM よりも高かった。Lauryl gallate は pre-hapten であり、酸化されることで感作性を示す。また、今回の重量濃度の検討で lauryl gallate の溶解に使用した溶媒はアセトニトリルであったが、1 mM のデータでは 5%DMSO/アセトニトリルを使用していた。加えて、lauryl gallate は疎水

性が高いため (LogKow=6.21)、水を多く含む反応液中ではほとんど酸化されないと考えられる。以上のことから、化合物を溶媒で溶解してから、反応液に添加するまでの間に、5%DMSO/アセトニトリル溶液中よりもアセトニトリル溶液中の方が定量的に酸化を受けた可能性があり、それにより 1 mM よりも重量濃度で調製した 4 濃度における Depletion が高くなったと考えられる。

また、今回検討した 82 化合物における 4 つの重量濃度の評価では、従来の 1 mM 被験物質溶液の評価で認められなかった NAC あるいは NAL の共溶出が 0.5 mg/mL および 0.2 mg/mL で認められた(表 11)。NAC においては fluorescein isothiocyanate および 2,4-heptadienal の 2 化合物、NAL においては 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one、phenylacetaldehyde (0.5 mg/mL, 0.2 mg/mL)、2-methyl-2H-isothiazol-3-one (0.5 mg/mL) の 3 化合物で認められた。2,4-Heptadienal、phenylacetaldehyde および 2-methyl-2H-isothiazol-3-one の 3 化合物は、従来の 1 mM 溶液においても、NAL の溶出時間に非常に小さなピークがみられている (data not shown)。重量濃度では 1 mM よりも濃度が高くなったことによりこのピークが大きくなり、共溶出となったと考えられる。Fluorescein isothiocyanate および 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one においては、被験物質の反応性が高く反応液中で分解してしまうため、夾雑ピークが多く認められ、今回の評価において夾雑ピークの一部が NAC あるいは NAL と共溶出してしまったと考えられる。しかしながら、今回共溶出した化合物はどれも反応性の高い化合物であり、被験物質と NAC または NAL が共溶出していてもコントロールに対してピーク面積は小さく、十分陽性と判定できる結果であった。このように、複数の夾雑ピークがみられる化合物は反応性が高い傾向があることが予想されるため、今回の 5 化合物のように夾雑ピークの一部が NAC および NAL と共溶出しても、陽性と評価できる可能性が高い。

検証に使用した 82 化合物において、化合物ごとに 0.05 mg/mL、0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.5 mg/mL に調製した重量濃度をモル濃度に変換すると、0.5 mg/mL では 82 化合物すべて、0.2 mg/mL では 62 化合物が、1 mM に調製したときよりも濃度が高く、このことが前述の判定クライテリア付近の化合物も含め、これらの濃度において NAC の反応性 (Depletion) が増加した要因であると思われる。反対に 0.1 mg/mL および 0.05 mg/mL に調製したときは、1 mM より実際の濃度が高い化合物は 12 化合物および 1 化合物となり、逆に 1 mM よりも濃度が低い化合物が増加することが、これらの濃度で NAC の反応性が減少した化合物が増加した要因であると思われる。NAL では、被験物質溶液が 0.5 mg/mL および 0.2 mg/mL の時に NAC ほど Depletion が高くなる化合物は多くなかったが、0.1 mg/mL および 0.05 mg/mL では Depletion が減少する化合物数が NAC と同じ程度であった。これはそもそも NAC と比較して NAL と反応する化合物が少なく、NAL と反応する化合物の多くは 1 mM でも高い Depletion であるため、それより濃度が高くなっても Depletion が変化しなかったためであると考えられる。ADRA-DM では、NAC および NAL の分子数に対して大過剰の被験物質 (NAC または NAL : 被験物質 = 1 : 50) を添加しているため、被験物質の濃度が多少増減しても反

応性に変化はないと予想していたが、それに反し、多くの化合物が 4 濃度で Depletion が変化することが分かった。この要因は第 1 章においても述べた通り、反応液中における被験物質濃度が 0.0125~0.125 mg/mL、NAC および NAL の濃度が約 1.5 µg/mL という非常に低濃度のため、分子の衝突回数が少なくなり、被験物質の濃度変化による反応の増減が顕著になったと考えられる。以上のことより、ADRA-DM の被験物質濃度である 1 mM より高い濃度である 0.5 mg/mL に調製した被験物質溶液を使用すると、NAC および NAL と被験物質の反応性が増加する化合物が多くなることが確認された。

表 13-1 の結果から、0.5 mg/mL の被験物質溶液における Sensitivity が 1 mM の被験物質溶液における場合と比較して、わずかに高いことが確認できた。今回の検討で使用した 82 化合物の分子量から平均値を算出すると 164.0 になり、その値を使って 0.5 mg/mL をモル濃度に換算すると 3.0 mM になることから、0.5 mg/mL の被験物質溶液における Sensitivity が 1 mM の被験物質溶液より高くなったのは妥当であると考えられる。したがって、1 mM と比較して多くの化合物において高濃度となる 0.5 mg/mL の被験物質溶液で試験を実施すると、1 mM の被験物質溶液で試験した時よりも偽陰性の数が少なくなることが分かった。その場合偽陽性は増加するが、安全性評価という観点から皮膚感作性の予測をする場合、偽陰性が少なくなる方が望ましい。

また、各被験物質濃度における 82 化合物の試験結果において、LLNA の感作強度 (Extream/strong, Moderate, Weak, Non-sensitizer) ごとに対する 1 mM の被験物質溶液を含めた全 5 濃度における予測精度を表 15 に示した。1 mM を含めた 5 濃度とも LLNA の感作強度が低くなるにつれて予測精度も低くなったが、その中でも 0.5 mg/mL においては、Moderate の感作性物質に対する予測精度が他の 4 濃度よりも高かった。しかし、非感作性物質の予測精度は 86.2%であり、1 番低かった。この結果と表 13-1 および 13-2 の結果から、0.5 mg/mL の被験物質溶液が 4 つの重量濃度の中で Accuracy と Sensitivity が 1 番高いことから、分子量が不明の被験物質溶液の感作性評価を実施する場合は、0.5mg/mL に調製して試験を実施することを推奨する。

次に、10 種類の非感作性物質から構成される混合液中の感作性物質を検出できるかどうか評価したところ、混合液に感作性物質を添加した時の Depletion が感作性物質単体で評価した時より 15%以上低下した化合物は、NAC では perillaldehyde (0.2 mg/mL, 0.5 mg/mL) の 1 化合物のみで、NAL では nonanoyl chloride (0.1 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.5 mg/mL)、phenylacetaldehyde (0.05 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.5 mg/mL)、glutaraldehyde (0.1 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.5 mg/mL)、2,3-butanedione (0.2 mg/mL, 0.5mg/mL) および 5-methyl-2,3-hexanedione (0.1 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.5mg/mL) の 5 化合物が該当した。混合液において、NAC の Depletion が減少した perillaldehyde および NAL の Depletion が大幅に低下した glutaraldehyde, nonanoyl chloride, phenylacetaldehyde および 5-methyl-2,3-hexanedione は、疑似混合液中に含まれる非感作性物質の一部が感作性物質と反応したため、NAC および NAL と反応できる感作性物質が減少した可能性が考えられる。感作性物質と反応した可能性の

ある化合物の一つとして sulfanilamide があり、この化合物のもつアミノ基が感作性物質と一部反応した可能性がある。また、4-hydroxybenzoic acid、methyl salicylate、methylparaben、propylparaben、salicylic acid に含まれるヒドロキシ基も感作性物質と反応した可能性がある。実際に、これらの非感作性物質単体と感作性物質を混合した場合において、NAL の Depletion が低くなる傾向がみられた (data not shown)。また、glutaraldehyde は HPLC 分析において NAL と被験物質のピークが共溶出したため、正確な Depletion を算出できなかったことも原因の一つと考えられる。*p*-Benzoquinone でも 0.5 mg/mL の被験物質濃度における HPLC 分析において、化合物由来と思われる微細なピークによるベースラインの乱れが認められ、正確に定量できなかった。これは、*p*-benzoquinone は非常に反応性の高いキノン構造を有しており、glutaraldehyde と同様に疑似混合液中の非感作性物質とも反応したため、ベースラインが乱れるピークパターンとなったと考えられる。このように、混合物では被験物質由来の夾雑成分が HPLC 測定において NAC および NAL と共溶出する可能性があるため、正確に定量できない可能性がある。しかしながら、NAC および NAL に含まれるナフタレン環は蛍光を有しているため、HPLC における検出方法を蛍光検出にすることでより選択的、高感度に定量することが可能となり、夾雑成分の多い物質も定量できることが報告されている (Fujita *et al.* 2019b, Wanibuchi *et al.* 2019)。

各感作性物質濃度における LLNA に対する予測結果については、0.05 mg/mL、0.1 mg/mL、0.2 mg/mL における nonanoyl chloride と 0.1 mg/mL、0.2 mg/mL における 5-methyl-2,3-hexandione において感作性物質単体の時と異なり、非感作性と判定された。この 2 化合物はもともと NAC とはほとんど反応しないが、NAL と反応するため、単体においては陽性と判定されていた。しかし、疑似混合液では NAL はほとんど反応しておらず、それにより陰性と判定されていた。この原因は前述の通り、混合液に含まれるアミノ基やヒドロキシ基をもつ非感作性物質が被験物質と反応することにより、NAL との反応性が下がったことが考えられる。

以上より、今回調製した混合液中に感作性物質を 0.5 mg/mL を添加した場合において、10 化合物すべてを陽性と検出することができた。さらに、感作強度が Extreme/strong の化合物においては、今回の検討における最低濃度の 0.05 mg/mL でもすべて陽性と検出することができた。

現在、ガイドライン化されている Key event 1 の皮膚感作性試験代替法である DPRA は、モル濃度で調製した被験物質溶液を使用することが推奨されている (OECD TG442C. 2015)。Fujita 法および ADRA-DM についても同様にモル濃度で調製した被験物質溶液で評価することが必要であるが、本研究により分子量が不明な被験物質も、被験物質溶液を重量濃度の 0.5 mg/mL に設定することで、従来法と同等以上の予測精度で感作性を評価できることが示された。さらに、混合液中において 0.5 mg/mL の感作性物質溶液を添加した場合 (final: 0.125 mg/mL)、弱い感作性から強い感作性まで、すべての強さの感作性物質を検出することができ、強い感作性物質にいたっては、0.05 mg/mL (final: 0.0125 mg/mL) の被験物質溶液でも検

出できることが示された。以上から、未知の混合物における感作性評価において、まず本試験法で評価を行い、陽性となった場合は感作性と判定し、陰性となった場合は他の試験結果などの情報をもとに非感作性かどうかを判断するトップダウンアプローチにより、化粧品原料として使用されることが多い複雑な混合物の評価に適用できる可能性があることが示された。

表 15. LLNA の感作強度ごとの化合物に対する各被験物質濃度における予測精度

LLNA category	Number of Chemicals	Predictive capacity (%) (vs LLNA)									
		0.05 mg/mL		0.1 mg/mL		0.2 mg/mL		0.5 mg/mL		1 mM	
Extreme/strong	18	94.4	(17/18)	100.0	(18/18)	100.0	(18/18)	100.0	(18/18)	100.0	(18/18)
Moderate	20	70.0	(14/20)	80.0	(16/20)	90.0	(18/20)	95.0	(19/20)	90.0	(18/20)
Weak	15	13.3	(2/15)	40.0	(6/15)	53.3	(8/15)	66.7	(10/15)	66.7	(10/15)
Non-sensitizer	29	96.6	(28/29)	96.6	(28/29)	93.1	(27/29)	86.2	(25/29)	96.6	(28/29)

2-4. 小括

第1章で確立した ADRA-DM をもとに、重量濃度で 0.05 mg/mL、0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.5 mg/mL の 4 種類に調製した被験物質溶液を用いて 82 化合物を評価したところ、0.5 mg/mL におけるヒトおよび LLNA に対する予測精度が ADRA-DM および DPRA と同程度であることが確認され、重量濃度で調製した被験物質溶液を用いてもモル濃度で調製した場合と同様に評価可能であることが示された。特に LLNA に対する Sensitivity においては、1 mM の被験物質溶液を用いた場合よりもわずかに高く、より多くの感作性物質を検出できることから、0.5 mg/mL を分子量が不明な物質を評価する際における最適な被験物質濃度とした。なお、以後 0.5 mg/mL の被験物質溶液を用いた試験法を ADRA-weight concentration method (ADRA-WM) と表記する。

また、非感作性物質を 10 化合物混合した混合液に感作性物質を添加した疑似混合液を用いた検討では、感作性物質を 0.5 mg/mL 添加した場合において、検討に使用した感作性物質全てを検出することができ、混合物も評価可能である可能性が示唆された。感作性物質単体の結果と比較して NAC および NAL における Depletion が低下した化合物がいくつか見られたが、この原因は混合液に含まれるアミノ基やヒドロキシ基をもつ非感作性物質と添加した感作性物質が反応したためと考えられた。そのため、ADRA-WM では複数の成分からなる混合物に含まれる感作性物質も検出可能であると考えられる。

本研究により ADRA-WM を用いることで分子量が不明な物質の評価が可能であることに加えて混合物の評価にも適用可能であることが示され、第1章の結果に加え、さらに広範囲な化合物への適用可能な手法の確立に成功した。

第3章 複数試験の組合せアプローチへの適用

第1章における試験濃度の低濃度化、第2章における分子量が不明な物質でも評価可能な試験条件の確立により、DPRA や Fujita 法より広範な化合物の皮膚感作性評価に適用可能な手法を確立することが出来た。

序論で述べた通り、皮膚感作性試験代替法はいずれの試験法も皮膚感作 AOP における Key event の1つのみ进行评估しているため、いくつもの Key event からなる皮膚感作すべてを評価することはできない。また、各試験法には試験可能な化合物の適用範囲が定められており、適用範囲外の化合物については正しく評価できないリスクがある。そのため、各試験法において正確に評価できない部分を補完し、より精度の高い感作性評価を行うために、異なる Key event を評価する試験法を複数組み合わせるアプローチである IATA が OECD によって定義されている(OECD, 2016)。この IATA の開発の流れを受けて、国内でも厚生労働省より医薬部外品および化粧品の申請における組合せアプローチ (ボトムアップ 3 out of 3) についてガイダンスが発出されている (厚生労働省, 2018)。

そこで本章では、第1章、第2章で確立した試験法が複数の皮膚感作性試験代替法を組み合わせたアプローチに適用可能か検証することを目的とした。検証には既存のアプローチとして、ADRA-DM および ADRA-WM と同じ Key event 1 を評価する試験法である DPRA が使用されている4種のアプローチと、本研究で新たに考案したアプローチの計5種を用い、DPRA を使用した場合と ADRA-DM および ADRA-WM を使用した場合におけるヒトおよび LLNA に対する予測精度を比較した。

3-1. 材料および方法

3-1-1. 試験化合物

複数の試験法を組み合わせた評価における ADRA-DM および ADRA-WM の有用性検証には既存の組合せアプローチの報告 (Urbisch *et al.* 2015, Takenouchi *et al.* 2015) で使用されている化合物データセットから計 147 化合物を使用した (表 1)。

3-1-2. ADRA による試験データの取得

既知の組み合わせアプローチで使用されている 147 化合物のうち、第 1 章、第 2 章で検討に用いた 82 物質に含まれない 81 化合物については、新たに ADRA-DM および ADRA-WM での評価を実施して解析に用いた。なお、反応に使用した NAC 溶液においては第 2 章と同様に、関連研究 (Fujita *et al.* 2019a) の結果に基づき、リン酸緩衝液に EDTA を 0.33 μ M 添加した条件下で実施した。残りの 66 化合物については、ADRA-WM におけるデータは第 2 章で取得したデータを、ADRA-DM におけるデータについては関連研究 (Fujita *et al.* 2019a) で取得したデータを引用して解析に用いた (Supplemental data 1, 2-1 参照)。

感作性/非感作性の判定クライテリアは第 2 章と同様に、NAC および NAL の Depletion 平均値が 4.9%以上を感作性、4.9%未満を非感作性とし、以降の組合せアプローチによるデータ解析に使用した。

3-1-3. 各組合せアプローチによるデータ解析と予測精度の算出

本研究では、既知のアプローチとして 2 out of 3 approach (2 out of 3) (Urbisch *et al.* 2015)、ボトムアップ 3 out of 3 アプローチ (3 out of 3) (厚生労働省. 2018)、Sequential testing strategy (STS) および Integrated testing strategy scoring approach (ITS-SA) (いずれも Nukada *et al.* 2013, Takenouchi *et al.* 2015) の 4 種のアプローチと、本研究で新たに考案した Integrated testing strategy two method approach (ITS-2MA) の計 5 種のアプローチを用いた。これらのアプローチにおいて感作 Key event 1 の試験法として ADRA-DM または ADRA-WM を用いた場合の予測精度を算出し、DPRA を用いた場合と比較した。なお、ADRA-DM および ADRA-WM 以外の他の試験法 (DPRA, KeratinoSens, h-CLAT, DEREK) の結果については公知の論文データを引用した (Urbisch *et al.* 2015, Takenouchi *et al.* 2015)。

2 out of 3 は DPRA、KeratinoSens、h-CLAT の 3 つの試験法における多数決で皮膚感作性の有無を判定するアプローチである。一方、3 out of 3 は上記と同じ 3 つの試験法において 1 試験でも陽性となった場合は感作性、3 試験すべてで陰性となった場合は非感作性と判定するアプローチである。また、2 out of 3 では 3 つのうち 2 つの試験結果が一致している場合は、3 つ目の試験結果によらず判定が決まるため、3 試験すべてのデータがないものについても、2 試験の結果が一致していれば皮膚感作性を判定することができる。3 out of 3 については 1 試験しかデータがなくてもその結果が陽性であれば感作性と判定できるため、3 試験すべてのデータがない場合においても、少なくとも 1 試験で陽性である場合は皮膚感作性

を判定することができる。本研究では、2 out of 3 については 89 化合物について、3 out of 3 については 93 化合物について、DPRA、ADRA-DM、ADRA-WM のうちの 1 試験と KeratinoSens、h-CLAT の 3 つの試験法を組み合わせた場合の皮膚感作性の有無を判定した。

STS、ITS-SA および ITS-2MA は化合物の感作性の有無に加え、感作強度も評価することができる試験法であり、この内の STS は h-CLAT と DPRA の 2 つの試験法を組み合わせた評価法である。具体的には、まず h-CLAT の結果における Minimum induction threshold (MIT) から Strong, Weak, Negative の 3 段階に分類し、次に Negative となった化合物について DPRA で評価を行い、陽性の場合 Weak、陰性の場合 Not-classified と判定する (図 8)。本研究では 124 化合物について DPRA、ADRA-DM、ADRA-WM のうちの 1 試験と h-CLAT の 2 つの試験法を組み合わせた場合について、皮膚感作性の有無および感作強度を評価した。

ITS-SA は DPRA、h-CLAT および文献等の知識ベースのデータに対する化合物の構造活性相関から毒性を予測するソフトウェアである DEREK (Lhasa) の 3 つの評価法を用いて、それぞれの試験結果にスコアを付け、その合計スコアから感作強度を分類するアプローチである。具体的には、h-CLAT の結果における MIT および DPRA の結果における Depletion からそれぞれ 0~3 のスコアを、DEREK の結果から 0, 1 のスコアをそれぞれつけ、3 つの結果の合計スコアから感作強度を分類する (表 16-1, 16-2)。合計スコアが 0 および 1 の場合を Non-sensitizer、2~6 の場合を Weak、7 の場合を Strong と分類する (Nukada *et al.* 2013, Takenouchi *et al.* 2015)。本研究では STS と同じ 124 化合物について、DPRA、ADRA-DM、ADRA-WM のうちの 1 試験と h-CLAT、DEREK の 3 つの方法を組み合わせた場合について、皮膚感作性の有無および感作強度を評価した。また、合計スコアからの感作強度分類について、上記の Nukada *et al.* (2013) および Takenouchi *et al.* (2015) の報告における分類方法に加え、本研究では合計スコアが 0 および 1 の場合を Non-sensitizer、2~5 の場合を Weak、6 および 7 の場合を Strong と分類した場合についても検証を行った (表 16-2)。

ITS-2MA は、まず h-CLAT の結果における MIT と DPRA、ADRA-DM または ADRA-WM の結果における Depletion からそれぞれ Strong, Weak, Non-sensitizer の 3 段階に分類し (表 17-1)、これらの分類結果から表 17-2 に従って最終的な感作強度 (Strong, Weak, Non-sensitizer) を決定するアプローチである。このアプローチについても STS、ITS-SA と同じ 124 化合物について、皮膚感作性の有無および感作強度を評価した。

上記アプローチの結果について、それぞれヒトおよび LLNA に対する予測精度を Cooper statistics を用いて算出した。なお、ヒトにおける感作強度においては Basketter *et al.* (2014) の報告における 6 段階の分類のうち、カテゴリー 1 と 2 を Strong、カテゴリー 3 と 4 を Weak、カテゴリー 5 と 6 を Non-sensitizer として予測精度の算出に用いた。

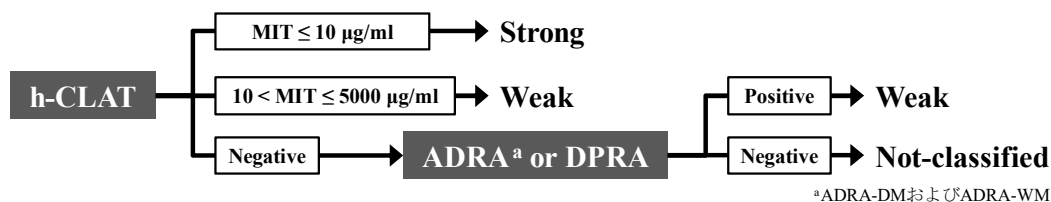


図 8. Sequential testing strategy (STS) における評価のフローチャート

まず、h-CLAT の結果における Minimum induction threshold (MIT) から Strong、Weak、Negative の 3 段階に分類する。次に Negative となった化合物について DPRA、ADRA-DM または ADRA-WM で評価を行い、陽性の場合は Weak、陰性の場合は Not-classified と判定した。

表 16-1. Integrated testing strategy scoring approach (ITS-SA) における各試験法の結果に対するスコア

h-CLAT	ADRA ^a	DPRA	DEREK	ITS score
MIT ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Mean Depletion (%)	Depletion (%) (Cys only) ^b	Alert	
NC	<4.9	<6.376 (<13.89)	No alert	0
>150, ≤5000	≥4.9, <15.5	≥6.376, <22.62 (≥13.89, <23.09)	Alert	1
>10, ≤150	≥15.5, <46.4	≥22.62, <42.47 (≥23.09, <98.24)	-	2
≤10	≥46.4	≥42.47 (≥98.24)	-	3

^a ADRA-DM および ADRA-WM

^b HPLC の分析において被験物質と Lys-peptide のピークが共溶出したことにより、Depletion を正確に算出できなかった化合物については Cys-peptide のみの Depletion から ITS score を算出した。

表 16-2. ITS-SA における各試験の合計スコアに対する感作強度分類

ITS SA (1)		ITS SA (2)	
Total ITS score	Potency Class	Total ITS score	Potency Class
0, 1	NS	0, 1	NS
2~6	Weak	2~5	Weak
7	Strong	6, 7	Strong

表 17-1. Integrated testing strategy two method approach (ITS-2MA) における各試験法の試験結果に対する分類

h-CLAT	ADRA^a	DPRA	Potency Class
MIT ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Mean Depletion (%)	Depletion (%) (Cys only) ^b	
NC	<4.9	<6.376 (<13.89)	NS
>10, ≤ 5000	≥ 4.9 , <46.4	≥ 6.376 , <42.47 (≥ 13.89 , <98.24)	Weak
≤ 10	≥ 46.4	≥ 42.47 (≥ 98.24)	Strong

^a ADRA-DM および ADRA-WM

^b HPLC の分析において被験物質と Lys-peptide のピークが共溶出したことによって、Depletion を正確に算出できなかった化合物については Cys-peptide のみの Depletion から ITS score を算出した。

表 17-2. ITS-2MA における各試験の分類結果に対する感作強度分類

		ADRA ^a or DPRA Potency Class		
		NS	Weak	Strong
h-CLAT Potency Class	NS	NS	Weak	Weak
	Weak	Weak	Weak	Strong
	Strong	Weak	Strong	Strong

^a ADRA-DM および ADRA-WM

3-2. 結果

皮膚感作性試験代替法はいずれの試験法においても、化合物の物性等の特徴により正しく評価することができない場合があるため、それぞれの試験法において適用範囲が定められている。具体的には、ADRA (ADRA-DM、ADRA-WM) および DPRA については金属および生体内で酸化または代謝されることによって感作性を示す化合物 (pre-/pro-hapten)、KeratinoSens については pre-/pro-hapten の化合物、h-CLAT については pre-/pro-hapten および $\text{LogKow} \geq 3.5$ の化合物が適用範囲外となっている (OECD, 2018d, e, 2019b, d)。適用範囲外の化合物でも陽性の結果が得られれば感作性と予測することはできるが、陰性の結果が得られた場合は適用範囲外のために陰性となっている可能性が考えられるため、判定することができない (inconclusive)。本研究では各種組合せアプローチで評価を行う際、各試験の評価能力を正確に比較するために、各試験法の適用範囲を考慮し、適用範囲外かつ陰性の結果となった化合物については除外して比較を行った。上記に加え β -ラクタム構造を有する化合物は、適用範囲外ではないがタンパク質中のセリンの OH 基と反応することが知られており (Ghuysen *et al.* 1991)、システインおよびリジンとの反応性を評価する ADRA-DM、ADRA-WM および DPRA では正しく評価することができない可能性が高いため除外した。また、文献により判定が異なることにより、最終的な判定ができない化合物についても判定不可 (inconclusive) として除外した。

これらの化合物データセットにおける各試験法の結果についてはデータ量が多いため、巻末 86 頁の Supplemental data 1, 2-1, 2-2 に示した。

3-2-1. 2 out of 3 と 3 out of 3 における予測能力

2 out of 3 および 3 out of 3 の報告で使用された化合物データセット (Urbisch *et al.* 2015, 厚生労働省, 2018) から、判定が inconclusive となった化合物を除外した場合の化合物数は、2 out of 3 では 89 化合物、3 out of 3 では 93 化合物であった。

2 out of 3 および 3 out of 3 において、ADRA-DM、ADRA-WM、DPRA のいずれかを KeratinoSens および h-CLAT と組み合わせた場合における、上記化合物セットを用いた場合のヒトおよび LLNA に対する予測精度を表 18 および 19 に示した。

2 out of 3 では、ヒトに対する予測精度は ADRA-WM を用いた場合と DPRA を用いた場合に対して ADRA-DM を用いた場合における一致率 (Accuracy) が 2%ほど低かったが、いずれの試験法を用いた場合もほぼ同程度であった。一方、LLNA に対する予測精度では DPRA を用いた場合における Accuracy が最も高く、これに対し ADRA-DM を用いた場合は 4%ほど、ADRA-WM を用いた場合は 2%ほど低かった。また、LLNA のヒトに対する予測精度と比較して、Accuracy および Specificity において代替法試験を組み合わせた場合の方が高かった。

3 out of 3 では、ヒトおよび LLNA のどちらに対する予測精度も、ADRA-DM、ADRA-WM、DPRA のいずれを用いた場合も同じ値となった。また、LLNA のヒトに対する予測精度と比

較して Accuracy は大きく変わらなかったが、Sensitivity は代替法試験を組み合わせた方が高く、逆に Specificity は LLNA の方が高かった。

表 18. 2 out of 3 approach における予測精度

	vs human data			vs LLNA data		
	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)
ADRA-DM, KratinoSens, h-CLAT	87.7 (57/65)	95.8 (23/24)	89.9 (80/89)	80.9 (55/68)	85.7 (18/21)	82.0 (73/89)
ADRA-WM, KratinoSens, h-CLAT	90.8 (59/65)	95.8 (23/24)	92.1 (82/89)	83.8 (57/68)	85.7 (18/21)	84.3 (75/89)
DPRA, KratinoSens, h-CLAT	92.3 (60/65)	91.7 (22/24)	92.1 (82/89)	86.8 (59/68)	85.7 (18/21)	86.5 (77/89)
LLNA	90.8 (59/65)	62.5 (15/24)	83.1 (74/89)			

表 19. ボトムアップ 3 out of 3 アプローチにおける予測精度

	vs human data			vs LLNA data		
	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)
ADRA-DM, KratinoSens, h-CLAT	98.6 (71/72)	38.1 (8/21)	84.9 (79/93)	100 (73/73)	45.0 (9/20)	88.2 (82/93)
ADRA-WM, KratinoSens, h-CLAT	98.6 (71/72)	38.1 (8/21)	84.9 (79/93)	100 (73/73)	45.0 (9/20)	88.2 (82/93)
DPRA, KratinoSens, h-CLAT	98.6 (71/72)	38.1 (8/21)	84.9 (79/93)	100 (73/73)	45.0 (9/20)	88.2 (82/93)
LLNA	91.7 (66/72)	66.7 (14/21)	86.0 (80/93)			

3-2-2. STS における予測能力

STS の報告で使用された化合物データセット (Takenouchi *et al.* 2015) から、判定が inconclusive となった化合物を除外した場合の化合物数は、ヒトおよび LLNA に対する感作性の有無を判定する 2 ランク分類では 79 化合物および 124 化合物であった。感作強度評価の 3 ランク分類ではヒトに対する予測では 62 化合物、LLNA に対する予測では 121 化合物であった。2 ランク分類では 1 試験で inconclusive となっても、他の試験で陽性となれば感作性と予測することができるが、3 ランク分類では感作強度を弱く見積もってしまう可能性があるため、2 ランク分類より多くの化合物が除外された。また、ヒトのデータでは強度まで報告されているデータが限られるため、2 ランク分類より 3 ランク分類の方が少ない化合物数となった。

STS におけるヒトおよび LLNA に対する予測結果を表 20 に示した。2 ランク分類ではヒトおよび LLNA のどちらに対する予測精度も、ADRA-DM、ADRA-WM、DPRA のいずれを用いた場合もほとんど同じであったが、LLNA に対する予測において、DPRA を用いた場合に対して ADRA-DM および ADRA-WM を用いた場合の方が 2~3%ほど Accuracy が高かった。3 ランク分類においては、ヒトに対する予測では ADRA-WM を用いた場合が ADRA-DM および DPRA を用いた場合に対して 2~3%ほど Accuracy が高く、LLNA に対する予測では

ADRA-DM を用いた場合が ADRA-WM および DPRA を用いた場合に対して 2~3%ほど Accuracy が高かった。

3-2-3. ITS-SA における予測能力

ITS-SA の報告で使用された化合物データセット (Takenouchi *et al.* 2015) から、判定が inconclusive となった化合物を除外した場合の化合物数は、ヒトおよび LLNA に対する感作性の有無を判定する 2 ランク分類では STS と同様の 79 化合物および 124 化合物であった。感作強度評価の 3 ランク分類では STS よりも inconclusive となった化合物が多く、ヒトに対する予測では 54 化合物、LLNA に対する予測では 109 化合物であった。

ヒトおよび LLNA に対する ITS-SA における予測結果を表 21 に示した。2 ランク分類ではヒトおよび LLNA のどちらに対する予測精度も、ADRA-DM、ADRA-WM、DPRA のいずれを用いた場合も大きく変わらなかったが、LLNA に対する予測において、DPRA を用いた場合に対して ADRA-DM および ADRA-WM を用いた場合の方が 3%ほど Accuracy が高かった。3 ランク分類においては、合計スコア 7 のみを Strong とした場合 (表 21 の(1)) よりも、合計スコア 6 および 7 を Strong とした場合 (表 21 の(2)) の方が、LLNA に対する ADRA-WM および DPRA を用いた場合を除き Accuracy が高かった。また、合計スコア 6 および 7 を Strong とした場合において、ヒトに対する予測では ADRA-WM を用いた場合が最も Accuracy が高く、LLNA に対する予測では ADRA-DM を用いた場合が最も Accuracy が高かった。

3-2-4. ITS-2MA における予測能力

本研究で新たに考案した組み合わせアプローチである ITS-2MA の評価では、ITS-SA と同じ化合物データセットを用いた。

ITS-2MA におけるヒトおよび LLNA に対する予測結果を表 22 に示した。2 ランク分類ではヒトおよび LLNA のどちらに対する予測精度も、ADRA-DM、ADRA-WM、DPRA のいずれを用いた場合もほとんど同じであったが、LLNA に対する予測において、DPRA を用いた場合に対して ADRA-DM および ADRA-WM を用いた場合の方が 2~3%ほど Accuracy が高かった。3 ランク分類においては、ヒトに対する予測では ADRA-WM を用いた場合が最も Accuracy が高く、LLNA に対する予測では ADRA-DM を用いた場合が最も Accuracy が高かった。

表 20. Sequential testing strategy における予測精度

	Potency identificaion of 3 class						Hazard identification of 2 class		
	Sensitivity (%)		Specificity (%)	Overprediction rate (%)	Underprediction rate (%)	Accuracy (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)
	for "Strong" chemicals	for "Weak" chemicals							
<u>vs human data</u>									
ADRA-DM, h-CLAT	59.1 (13/22)	76.9 (20/26)	64.3 (9/14)	14.5 (9/62)	17.7 (11/62)	67.7 (42/62)	95.1 (58/61)	66.7 (12/18)	88.6 (70/79)
ADRA-WM, h-CLAT	59.1 (13/22)	80.8 (21/26)	64.3 (9/14)	14.5 (9/62)	16.1 (10/62)	69.4 (43/62)	96.7 (59/61)	66.7 (12/18)	89.9 (71/79)
DPRA, h-CLAT	59.1 (13/22)	80.8 (21/26)	50.0 (7/14)	17.7 (11/62)	16.1 (10/62)	66.1 (41/62)	96.7 (59/61)	55.6 (10/18)	87.3 (69/79)
<u>vs LLNA data</u>									
ADRA-DM, h-CLAT	65.5 (19/29)	84.5 (49/58)	64.7 (22/34)	14.9 (18/121)	10.7 (13/121)	74.4 (90/121)	96.7 (87/90)	64.7 (22/34)	87.9 (109/124)
ADRA-WM, h-CLAT	65.5 (19/29)	86.2 (50/58)	55.9 (19/34)	17.4 (21/121)	9.9 (12/121)	72.7 (88/121)	97.8 (88/90)	55.9 (19/34)	86.3 (107/124)
DPRA, h-CLAT	65.5 (19/29)	86.2 (50/58)	50.0 (17/34)	19.0 (23/121)	9.9 (12/121)	71.1 (86/121)	97.8 (88/90)	50.0 (17/34)	84.7 (105/124)

表 21. Integrated testing strategy scoring approach における予測精度

	ITS-SA (1) or ITS-SA (2)	Potency identificaion of 3 class						Hazard identification of 2 class		
		Sensitivity (%)		Specificity (%)	Overprediction rate (%)	Underprediction rate (%)	Accuracy (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)
		for "Strong" chemicals	for "Weak" chemicals							
vs human data										
ADRA-DM, h-CLAT, DEREK	(1)	40.0 (8/20)	80.0 (16/20)	78.6 (11/14)	9.3 (5/54)	25.9 (14/54)	64.8 (35/54)	95.1 (58/61)	77.8 (14/18)	91.1 (72/79)
	(2)	65.0 (13/20)	75.0 (15/20)	78.6 (11/14)	11.1 (6/54)	16.7 (9/54)	72.2 (39/54)			
ADRA-WM, h-CLAT, DEREK	(1)	40.0 (8/20)	85.0 (17/20)	78.6 (11/14)	9.3 (5/54)	24.1 (13/54)	66.7 (36/54)	96.7 (59/61)	77.8 (14/18)	92.4 (73/79)
	(2)	80.0 (16/20)	75.0 (15/20)	78.6 (11/14)	13.0 (7/54)	9.3 (5/54)	77.8 (42/54)			
DPRA, h-CLAT, DEREK	(1)	50.0 (10/20)	85.0 (17/20)	71.4 (10/14)	11.1 (6/54)	20.4 (11/54)	68.5 (37/54)	96.7 (59/61)	72.2 (13/18)	91.1 (72/79)
	(2)	75.0 (15/20)	75.0 (15/20)	71.4 (10/14)	14.8 (8/54)	11.1 (6/54)	74.1 (40/54)			
vs LLNA data										
ADRA-DM, h-CLAT, DEREK	(1)	42.9 (12/28)	85.1 (40/47)	82.4 (28/34)	8.3 (9/109)	18.3 (20/109)	73.4 (80/109)	95.6 (86/90)	82.4 (28/34)	91.9 (114/124)
	(2)	71.4 (20/28)	74.5 (35/47)	82.4 (28/34)	12.8 (14/109)	11.0 (12/109)	76.1 (83/109)			
ADRA-WM, h-CLAT, DEREK	(1)	50.0 (14/28)	87.2 (41/47)	79.4 (27/34)	9.2 (10/109)	15.6 (17/109)	75.2 (82/109)	96.7 (87/90)	79.4 (27/34)	91.9 (114/124)
	(2)	75.0 (21/28)	66.0 (31/47)	79.4 (27/34)	18.3 (20/109)	9.2 (10/109)	72.5 (79/109)			
DPRA, h-CLAT, DEREK	(1)	53.6 (15/28)	83.0 (39/47)	67.6 (23/34)	14.7 (16/109)	14.7 (16/109)	70.6 (77/109)	96.7 (87/90)	67.6 (23/34)	88.7 (110/124)
	(2)	71.4 (20/28)	63.8 (30/47)	67.6 (23/34)	22.9 (25/109)	10.1 (11/109)	67.0 (73/109)			

表 22. Integrated testing strategy two methods approach における予測精度

	Potency identificaion of 3 class						Hazard identification of 2 class		
	Sensitivity (%)		Specificity (%)	Overprediction rate (%)	Underprediction rate (%)	Accuracy (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)
	for "Strong" chemicals	for "Weak" chemicals							
<u>vs human data</u>									
ADRA-DM, h-CLAT	75.0 (15/20)	70.0 (14/20)	64.3 (9/14)	16.7 (9/54)	13.0 (7/54)	70.4 (38/54)	95.1 (58/61)	66.7 (12/18)	88.6 (70/79)
ADRA-WM, h-CLAT	85.0 (17/20)	70.0 (14/20)	64.3 (9/14)	18.5 (10/54)	7.4 (4/54)	74.1 (40/54)	96.7 (59/61)	66.7 (12/18)	89.9 (71/79)
DPRA, h-CLAT	90.0 (18/20)	65.0 (13/20)	50.0 (7/14)	24.1 (13/54)	5.6 (3/54)	70.4 (38/54)	96.7 (59/61)	55.6 (10/18)	87.3 (69/79)
<u>vs LLNA data</u>									
ADRA-DM, h-CLAT	85.7 (24/28)	72.3 (34/47)	64.7 (22/34)	20.2 (22/109)	6.4 (7/109)	73.4 (80/109)	96.7 (87/90)	64.7 (22/34)	87.9 (109/124)
ADRA-WM, h-CLAT	85.7 (24/28)	61.7 (29/47)	55.9 (19/34)	28.4 (31/109)	5.5 (6/109)	66.1 (72/109)	97.8 (88/90)	55.9 (19/34)	86.3 (107/124)
DPRA, h-CLAT	85.7 (24/28)	53.2 (25/47)	50.0 (17/34)	33.9 (37/109)	5.5 (6/109)	60.6 (66/109)	97.8 (88/90)	50.0 (17/34)	84.7 (105/124)

3-3. 考察

2 out of 3 および 3 out of 3 の化合物データセットにおいて、ADRA-DM、ADRA-WM および DPRA の試験単独における判定結果が異なった化合物は 8 化合物あった。このうちヒトに対して ADRA-WM および DPRA で陽性、ADRA-DM で偽陰性となった化合物が 3,4-dihydrocoumarin、ethyleneglycol dimethacrylate、*N*-butyl glycidyl ether の 3 化合物あった。3 化合物はいずれも LLNA におけるカテゴリーが Weak と弱い感作性物質であり、ADRA (0.5 mg/mL) における Depletion 平均値が 3,4-dihydrocoumarin では 6.3%、ethyleneglycol dimethacrylate では 12.3%、*N*-butyl glycidyl ether では 8.5%と 15%に満たない。ADRA-WM および DPRA よりも濃度の低い ADRA-DM では反応性が下がるため、これらの化合物では偽陰性となった可能性が考えられる。また、ethyleneglycol dimethacrylate については、本章の解析に用いた関連研究 (Fujita *et al.* 2019a) において取得したデータでは陰性であったが、第 1 章の結果では陽性であったことから、ADRA-DM では判定クライテリア付近の化合物であると考えられる。

上記 8 化合物のうち phenyl benzoate、penicillin G、methylmethacrylate においては DPRA で陽性、ADRA-DM および ADRA-WM で偽陰性となった。Penicillin G は β -ラクタム構造を有する化合物であり、前述のとおりタンパク質中のセリンと反応することが報告されているため、システインおよびリジンとの反応性を評価する ADRA-DM、ADRA-WM および DPRA では検出できないと考えられる。実際に、文献における DPRA の結果は陽性となっているが、我々で試験した結果は陰性であった (data not shown)。Phenyl benzoate および methylmethacrylate においては、上記の 3,4-dihydrocoumarin、ethyleneglycol dimethacrylate、*N*-butyl glycidyl ether と同様に弱い感作性物質であり、ADRA-WM における Depletion 平均値が 2.6%および 4.1%と判定クライテリア付近であることから、DPRA より試験濃度の低い ADRA では偽陰性となった可能性が考えられる。

また、benzaldehyde では ADRA-DM および ADRA-WM で陽性であったが、DPRA では偽陰性であった。benzaldehyde は第 1 章 1-4 でも述べた通り、感作性懸念構造であるアルデヒド基を有している。しかしながら、benzaldehyde 自体が酸化または還元される可能性があり、それにより反応性が失われる。そのため、DPRA の反応条件においては化合物自体が酸化還元により反応性を失い、偽陰性となった可能性が考えられる。

最後に、d,l-citronellol では ADRA-DM および ADRA-WM で陰性であったが DPRA では偽陽性であった。この化合物は構造上タンパク質とはほとんど反応しないと考えられるが、ヒドロキシ基がアルデヒド基に酸化されることにより反応性を示す可能性が考えられる。したがって、化合物の保管条件や DPRA における反応条件において、一部が酸化され偽陽性となった可能性が考えられる。

前述のとおり、ADRA-DM、ADRA-WM および DPRA の試験単独における判定結果が異なった化合物は 8 化合物あったが、2 out of 3 において ADRA-DM または ADRA-WM を用いた場合と DPRA を用いた場合における判定結果が異なった化合物は 4 化合物であった

(Supplemental data 1)。同様に 3 out of 3 において、ADRA-DM または ADRA-WM を用いた場合と DPRA を用いた場合における判定結果が異なった化合物はなかった。この結果から、試験法を組み合わせると他の試験法の結果によって情報が補われる分、判定結果が異なる化合物が少なくなることが示された。これは組み合わせ評価における利点の 1 つである。そのため、ヒトに対する予測精度 (Accuracy) は ADRA-DM または ADRA-WM を用いた場合と DPRA を用いた場合とでほとんど同じであった (表 18, 19)。しかし、Sensitivity については ADRA-DM および ADRA-WM を用いた場合の方が DPRA を用いた場合よりも高く、陰性結果に対する信頼性が高いと言える。これは第 1 章の試験開発で評価した 82 化合物における予測精度と同様の傾向であり、ADRA-DM における特徴が組み合わせ評価にも反映していると考えられる。以上より、本検証で得られた結果は 2 out of 3 および 3 out of 3 において、ADRA-DM および ADRA-WM が DPRA と同様に適用可能であることを示している。

2 out of 3 と 3 out of 3 では評価の目的が異なり、2 out of 3 では各試験結果の多数決で評価することで全体の予測精度 (Accuracy) を上げることを目的としており、3 out of 3 では 3 試験のうち 1 試験でも陽性であれば感作性と判定することで、陽性検出率 (Sensitivity) を高くすることを目的としている。実際に、表 18 および 19 の各値に結果に着目すると、2 out of 3 におけるヒトに対する Accuracy はいずれの試験法を用いた場合も約 90% となっており、LLNA のヒトに対する予測精度である 83.1% よりも高かった。同様に、3 out of 3 におけるヒトに対する Sensitivity はいずれの試験法を用いた場合も 98.6% となっており、ほとんどすべての感作性物質を検出することができていた。このように、各組合せアプローチの特徴に照らし合わせた観点においても ADRA-DM および ADRA-WM は DPRA と同様に有用であることが示された。

STS では図 8 に示すように、まず h-CLAT で評価を行い、陰性となった化合物のみ ADRA-DM、ADRA-WM または DPRA で評価を行う。そのため、このアプローチにおける ADRA-DM、ADRA-WM および DPRA のウエイトは h-CLAT よりも低くなる。124 化合物のうち h-CLAT で陰性となった化合物は 32 化合物であり、ADRA-DM、ADRA-WM または DPRA の結果が反映されている化合物は全体の約 26% しかない。加えて、Strong は h-CLAT の結果によってのみ分類されるため、ADRA-DM や ADRA-WM、DPRA の Depletion がどんなに高くても反映されることはない。したがって、ADRA-DM および ADRA-WM を用いた場合と DPRA を用いた場合とで STS における予測精度がほとんど同じであったのは、ADRA-DM、ADRA-WM および DPRA の結果が影響する部分が少ないためであると考えられる。しかしながら、興味深いことに Specificity に着目すると、ADRA-DM および ADRA-WM を用いた場合の方が DPRA を用いた場合よりも高いことが分かった (表 20)。これは 2 out of 3 における結果と同様に、ADRA-DM および ADRA-WM の試験単独における Specificity が高いという特徴が反映された結果であると考えられる。

ITS-SA において Takenouchi *et al.* (2015) の報告では、合計スコア 7 を Strong、2~6 を Weak、0 および 1 を Non-sensitizer とする感作強度分類が示されている (表 16-2 の (1))。これに対

し、本研究で行った合計スコア 6 および 7 を **Storng** とした場合の方が、ADRA-WM および DPRA を用いた場合の LLNA に対する予測を除き、**Accuracy** が高かった (表 21)。これは DPRA では ADRA-DM および ADRA-WM よりも試験濃度が高いために、ADRA-DM および ADRA-WM と比較して全体的に **Depletion** の値が高くなる傾向があり、DPRA を用いた組み合わせで報告している Takenouchi *et al.* (2015) においては、最も合計スコアの高い 7 のみを **Strong** とする分類方法が妥当であるとしていると考えられる。実際に、ADRA-DM、ADRA-WM、DPRA のそれぞれ単独におけるスコア (表 16-1) において、124 化合物中最大値の 3 となった化合物数は、ADRA-DM では 28 化合物、ADRA-WM では 39 化合物、DPRA では 46 化合物となっており、DPRA のスコアが高いことがわかる (Supplemental data 2-1)。このように、DPRA では中程度の感作強度の化合物に対しても強く反応してしまい、結果として過剰評価となってしまう傾向があると考えられる。合計スコア 6 以上を **Strong** とした場合の **Overprediction rate** が DPRA を用いた場合において高いことも、この傾向を支持している (表 21)。以上より、ADRA-DM および ADRA-WM における試験濃度の方が過剰評価となる傾向がないことから、感作強度を分類するという点においては ADRA-DM および ADRA-WM の方が有用である可能性が示唆された。

また、Takenouchi *et al.* (2015) の報告においては LLNA に対する強度予測しか行っていない上に、適用範囲についても h-CLAT における $\text{LogKow} \geq 3.5$ の化合物についてしか考慮されていないのに対し、本研究では h-CLAT における $\text{LogKow} \geq 3.5$ 以外の適用範囲や ADRA-DM、ADRA-WM および DPRA の適用範囲も考慮しており、予測精度の算出も LLNA に加え、ヒトに対する予測も行った。その結果として、合計スコア 6 以上を **Strong** とした方がヒトに対する **Accuracy** が高いことが示されたことから、合計スコア 7 のみを **Storng** とした場合よりも優れた感作強度分類方法であることが示唆された。さらに、より危険である **Strong** の化合物に対する **Sensitivity** についても、合計スコア 6 および 7 を **Storng** とした場合の方が合計スコア 7 のみを **Strong** とした場合と比較して 20%以上高く、強感作性物質を検出するのに優れた評価法であることを示している。

さらに本研究では、STS における ADRA-DM、ADRA-WM および DPRA のウェイトを h-CLAT と同等にした組み合わせ方法にすることで、より正確に感作強度予測ができることを期待し、ITS-2MA を考案した。ITS-2MA による予測結果は、ヒトに対する予測において STS よりも **Accuracy** が 3~5%ほど高く、ITS-2MA が有用なアプローチであることが実証された。さらに、上記で **Strong** の化合物に対する **Sensitivity** が高いと述べた、合計スコア 6 および 7 を **Storng** とした場合の ITS-SA よりも ITS-2MA の方が **Strong** の化合物に対する **Sensitivity** が高く、危険な強感作性物質を検出するのに優れたアプローチであることも示された。ADRA-DM および ADRA-WM を用いた場合と DPRA を用いた場合における予測精度を比較すると、ヒトおよび LLNA のどちらに対する予測精度も ADRA-DM および ADRA-WM を用いた場合の方が同等以上であり、特に LLNA に対する予測精度では ADRA-DM および ADRA-WM を用いた場合の方が DPRA を用いた場合よりも 6~13%ほど

Accuracy が高かった。これより、ITS-2MA における感作強度分類においては、ADRA-DM および ADRA-WM の方が有用である可能性が示唆された。

本研究で検証した組み合わせアプローチ以外にも 2 つの試験法を組み合わせたアプローチとして、DPRA と感作 Key event 3 を評価する IL-8 Luc assay を組み合わせた、感作性の有無を評価する 2 クラス分類のアプローチが報告されている (Kimura *et al.* 2018)。この報告では 143 化合物のデータセットについて LLNA に対する予測精度を算出しており、Accuracy は 87.3%であった。この結果は、化合物のデータセットは異なるが、同様に 2 つの試験法を合わせたアプローチである STS および ITS-2MA の 124 化合物における Accuracy とほぼ同程度であり (表 20, 22)、STS と ITS-2MA が有用なアプローチであることを支持している。

3-5. 小括

既存の組合せアプローチを用いた予測精度の比較では、4 種のアプローチ (2 out of 3, 3 out of 3, STS, ITS-SA) 全てにおいて、ADRA-DM および ADRA-WM を用いた場合における予測精度は DPRA を用いた場合と同程度であることが確認された。特に、感作強度を予測する STS、ITS-SA、ITS-2MA では一部の結果を除き、ADRA-DM および ADRA-WM を用いた場合の方が DPRA を用いた場合よりも予測精度がわずかに高いことが確認された。これは DPRA では試験濃度が ADRA-DM および ADRA-WM よりも高いために全体的に反応性が高く、感作強度の分類において過剰評価してしまうことが多いのに対し、ADRA-DM および ADRA-WM では過剰評価することなく分類できている化合物が多いためであると考えられる。

本研究で新たに考案した組合せアプローチである ITS-2MA における検証では、既存のアプローチと同程度の予測精度であり、その有用性が確認された。さらに、強感作性物質に対する予測能力が STS、ITS-SA と比較して高く、リスクの高い強感作性物質をより多く検出可能な、感度の高い優れたアプローチであることが示された。また、ITS-2MA においても STS、ITS-SA と同様に、ADRA-DM および ADRA-WM を用いた場合の方が DPRA を用いた場合よりも予測精度が高いことが確認された。この理由も上記の通り、ADRA-DM および ADRA-WM では DPRA と比較して過剰評価してしまうことが少ないためと考えられる。

以上より、本研究によって ADRA-DM および ADRA-WM は IATA において DPRA と同様に有用であり、感作強度の分類では DPRA よりも予測能力が優れている可能性が示された。

総括

本研究により Fujita 法における試験系の低濃度化を実現し、既存のタンパク質結合性試験である DPRA と比較して同程度の皮膚感作性予測精度であるにもかかわらず、1/100 の検出試薬濃度で試験可能な方法を確立した。また、試験条件を低濃度化したことにより、DPRA の試験条件では反応液中で析出する化合物も、ほとんどの化合物において析出することなく試験できることを確認し、それにより DPRA では評価不可能な化合物も評価できる可能性を見出した。さらに、Fujita 法および DPRA の課題の 1 つである、分子量不明物質の評価ができないという点も、被験物質溶液を重量濃度で調製する試験系を確立することで解決し、混合物を評価できる可能性も示唆された。これらの新たに確立した試験法 (ADRA-DM, ADRA-WM) は、他の皮膚感作性試験代替法と組み合わせた評価アプローチである IATA においても、既存の試験法である DPRA と同等の予測精度であることを確認した。加えて、新たに考案した組み合わせアプローチである ITS-2MA も、強感作性物質を高感度に検出できる特徴を持った有用な試験法であることを実証した。

以上より、本研究により開発した ADRA-DM および ADRA-WM は、反応液中における被験物質の析出や、分子量が不明な物質を評価できないといった、従来の試験法である DPRA や Fujita 法における課題を解決することで、広範囲な化合物への適用を可能にした非常に有用な試験法であるといえる。しかしながら、ADRA-DM および ADRA-WM にもまだ課題は残されている。

生体内において酸化や酵素による代謝を受けることで感作性を示す pre/pro-hapten は、反応液中で自動酸化されるような一部の化合物については ADRA-DM および ADRA-WM で感作性と検出することができるが、それ以外については正しく評価することができないと考えられる。この課題については、被験物質と検出試薬の反応操作において酸化剤や酵素による処理を組み込んだ試験法の開発や、化合物から予測される酸化体や代謝物を用いた試験による感作性予測などによって解決できる可能性がある。

ADRA-WM の開発により、混合物も評価できる可能性が示唆されたが、実際に組成成分が未知の混合物を評価した際に、微量に含まれる感作性物質を検出できるかどうかは不明である。*in vitro* の皮膚感作性試験である KeratinoSens および h-CLAT は、1 つの化合物を評価する際に複数の用量で評価を行うため、化合物ごとの検出限界濃度を算出することができ、この KeratinoSens および h-CLAT における検出限界濃度から、LLNA よりも微量の感作性物質を検出できる可能性が報告されている (Nishijo *et al.* 2018)。ADRA-WM は DPRA や Fujita 法よりも低濃度の被験物質溶液で試験ができるため、上記の報告のように ADRA-WM においても検出限界濃度を算出可能な方法を開発すれば、組成成分が未知の混合物に対する評価能力を明確にすることが可能であると考えられる。

本研究による IATA の検証により、感作強度もある程度予測可能であることが示されたが、その予測精度は 70%程度であり、感作性の有無だけを評価した場合における予測精度の 80

～90%と比較すると改善の余地がある。感作強度予測能力が高くない要因として、上記の pre/pro-hapten のように生体内で起こる反応を再現できていない部分があると考えられる。そのため、酸化や酵素反応など、生体内（皮下）の環境における特徴を反応条件に応用した試験法に改良することで、より高い精度で感作強度を予測することができるかもしれない。

上記のように ADRA-DM および ADRA-WM に残された課題を解決していくことで、最終的に動物実験で評価している化合物すべてを動物実験代替法で評価可能となることが期待される。

謝辞

本研究の遂行と学位論文の作成にあたり、多くの有益なご指導とご鞭撻を賜りました、指導教官である岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 小野敦 教授に心より感謝を申し上げます。

本学位論文の審査にあたり、主査を務めていただきました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 上田真史 教授、副査を務めていただきました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 竹内靖雄 教授、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 古田和幸 准教授に心より感謝を申し上げます。

本研究の主題である皮膚感作性試験代替法を発案し、ご指導いただいた富士フイルム株式会社 藤田正晴 博士、本研究にご理解とご協力を賜りました上司の富士フイルム株式会社 笠原利彦マネージャーおよび同職場のみなさまに心より感謝を申し上げます。

引用文献

Ahlfors SR, Sterner O, Hansson C. (2003). Reactivity of contact allergenic haptens to amino acid residues in a model carrier peptide, and characterization of formed peptide-hapten adducts. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 16: 59–68.

Aiba S, Terunuma A, Manome H, and Tagami H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur. J. Immunol.* 27:3031-8.

Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y, and Tagami H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl₂ and DNCB. *J. Invest. Dermatol.* 120:390-8.

Aleksic M, Pease CK, Basketter DA, Panico M, Morris HR, Dell A. (2008). Mass spectrometric identification of covalent adducts of the skin allergen 2,4-dinitro-1-chlorobenzene and model skin proteins. *Toxicol. In Vitro.* 22: 1169–1176.

Alvarez-Sánchez R, Divkovic M, Basketter D, Pease C, Panico M, Dell A, Morris H, Lepoittevin JP. (2004). Effect of glutathione on the covalent binding of the ¹³C-labeled skin sensitizer 5-chloro-2-methylisothiazol-3-one to human serum albumin: identification of adducts by nuclear magnetic resonance, matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, and nanoelectrospray tandem mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* 17: 1280–1288.

Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. (2006). Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. In Vitro.* 20, 767–773.

Basketter DA, Alépée N, Ashikaga T, Barroso J, Gilmour N, Goebel C, Hibatallah J, Hoffmann S, Kern P, Martinozzi-Teissier S, Maxwell G, Reisinger K, Sakaguchi H, Schepky A, Tailhardat M, Templier M. (2014). Categorization of chemicals according to their relative human skin sensitizing potency. *Dermatitis.* 25(1):11-21.

Belot N, Sim B, Longmore C, Roscoe L, Treasure C. (2017) Adaptation of the KeratinoSens™ skin sensitization test to animal-product-free cell culture. *ALTEX.* 34(4):560-564.

Bos JD, & Meinardi M. M. (2000). The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp Dermatol.* 9, 165–169.

Casati S, Aschberger K, Asturiol D, Basketter DA, Dimitrov S, Dumont C, Karlberg AT, Lepoittevin J.P, Patlewicz G, Roberts D, Worth A. (2016): Ability of non-animal methods for skin sensitisation to detect pre- and pro-haptens: Report and recommendations of an EURL ECVAM expert meeting. *Publications Office of the European Union*.

Chipinda I, Ajibola RO, Morakinyo MK, Ruwona TB, Simoyi RH, Siegel PD. (2010). Rapid and simple kinetics screening assay for electrophilic dermal sensitizers using nitrobenzenethiol. *Chem. Res. Toxicol.* 23: 918–925.

Christian A. G. N, Montalbetti, Virginie F, (2005), Amide bond formation and peptide coupling, *Tetrahedron.* 61, 10827–10852.

Edwards A, Roscoe L, Longmore C, Bailey F, Sim B, Treasure C. (2018). Adaptation of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) to Animal-Product-Free Conditions. *ALTEX.* 35(4):477-488.

EU化粧品指令 (第7次改正) European Commission (2003) DIRECTIVE 2003/15/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 27 February 2003, amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products, Official J. European Union, L66/26.

Fujita M, Yamamoto Y, Tahara H, Kasahara T, Jimbo Y, Hioki T. (2014). Development of a prediction method for skin sensitization using novel cysteine and lysine derivatives. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 70: 94–105.

Fujita M, Yamamoto Y, Watanabe S, Sugawara T, Wakabayashi K, Tahara Y, Horie N, Fujimoto K, Kusakari K, Kurokawa Y, Kawakami T, Kojima K, Kojima H, Ono A, Katsuoka Y, Tanabe H, Yokoyama H, Kasahara T. (2019a). The cause of and countermeasures for oxidation of the cysteine-derived reagent used in the amino acid derivative reactivity assay. *J. Appl. Toxicol.* 39: 191–208.

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. (2019b). *Toxicol. In Vitro.* 59:161-178.

Gerberick GF, 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.

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: 417–427.

Gerberick GF, Aleksic M, Basketter D, Casati S, Karlberg A-T, Kern P, Kimber I, Lepoittevin JP, Natsch A, Ovigne JM, Costanza R, Sakaguchi H, Schultz T. (2008). Chemical Reactivity Measurement and the Predictive Identification of Skin Sensitisers: The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 64a. *ATLA*. 36: 215–242.

McMurry, JE. (2015). *Organic chemistry “carboxylic acid derivatives nucleophilic acyl substitution reactions”*. Cengage Learning.

Natsch A, 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: 464–478.

Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. *Toxicol. Sci.* 113, 284-292.

Natsch A, Gfeller H., Haupt T, Brunner G. (2012). Chemical reactivity and skin sensitization potential for benzaldehydes: Can Schiff Base formation explain everything? *Chem. Res. Toxicol.* 25: 2203–2215.

Nishijo T, Miyazawa M, Saito K, Otsubo Y, Mizumachi H, Sakaguchi H. (2018). Sensitivity of KeratinoSens™ and h-CLAT for detecting minute amounts of sensitizers to evaluate botanical extract. *J. Toxicol. Sci.* 44(1):13-21.

Nukada Y, Miyazawa M, Kazutoshi S, Sakaguchi H, Nishiyama N. (2013) Data integration of non-animal tests for the development of a test battery to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals. *Toxicol. In Vitro*. 27(2):609-18.

OECD (1992). OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Test No. 406: Skin Sensitization.

OECD (2010a). OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Test No. 429: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay.

OECD (2010b). OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Test No. 442A: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: DA.

OECD (2014). OECD Environment Directorate, Joint meeting of the chemicals committee and the working party on chemicals, pesticides and biotechnology., The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins.

OECD (2015). OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Test No. 435: In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion.

OECD (2016). OECD Environment, Health and Safety Publications 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.

OECD (2018a). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 491: Short Time Exposure In Vitro Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage.

OECD (2018b). OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Test No. 442D, Appendix IA: In Vitro Skin Sensitisation: The ARE-Nrf2 Luciferase KeratinoSens™ Test Method.

OECD (2018c). OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Test No. 442D, Appendix IB: In Vitro Skin Sensitisation: The ARE-Nrf2 Luciferase LuSens Test Method.

OECD (2018d). OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Test No. 442E, ANNEX I: In Vitro Skin Sensitisation: Human Cell Line Activation Test (h-CLAT).

OECD (2018e). OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Test No. 442E, ANNEX II: In Vitro Skin Sensitisation: U937 Cell Line Activation Test (U-SENS™)

OECD (2018f). OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Test No. 442E, ANNEX III: In Vitro Skin Sensitisation: IL-8 Luc assay.

OECD (2018g). OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Test No. 442B: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: BRDU-ELISA or –FCM.

OECD (2019a). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method.

OECD (2019b). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 492: Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage.

OECD (2019c). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 431: In vitro skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method.

OECD (2019d). OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Test No. 442C, Appendix II: In Chemico Skin Sensitisation: Amino acid Derivative Reactivity.

OECD (2019e). OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Test No. 442C, Appendix I: In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA).

OECD (2019f). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test

OECD (2019g). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 495: Ros (Reactive Oxygen Species) Assay for Photoreactivity

Onoue S, Suzuki G, Kato M, Hirota M, Nishida H, Kitagaki M, Kouzuki H, Yamada S. (2013). Non-animal photosafety assessment approaches for cosmetics based on the photochemical and photobiochemical properties. *Toxicol. In Vitro*. 27(8):2316-24.

Piroird C, Ovigne J.M, Rousset F, Martinozzi-Teissier S, Gomes C, Cotovio ., Alépée N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro*. 29, 901-916.

Rickwood DM, Barratt MD. (1984). Photochemical reactions of fentichlor with soluble proteins. *Chem. Biol. Interact*. 52(2):213-22.

Russell WMS, Burch RL. (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique*. London: Methuen.

Smith C, Hotchkiss S. (2001). *Allergic Contact Dermatitis: Chemical and Metabolic Mechanisms*. London: Taylor and Francis.

Smyth D. (1978) *Alternatives to Animal Experiments*. London: Scolar Press.

Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, and Aiba S. (2011). An in vitro test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicol. Sci.* 124:359-69.

Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. *J. Appl. Toxicol.* 35(11):1318-32.

Troutman JA, Foertsch LM, Kern PS, Dai HJ, Quijano M, Dobson RLM, Lalko JF, Lepoittevin JP, Gerberick GF. 2011. The incorporation of lysine into the peroxidase peptide reactivity assay for skin sensitization assessments. *Toxicol. Sci.* 122: 422–436.

Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71(2):337-51.

Wanibuchi S, Yamamoto Y, Sato A, Kasahara T, Fujita M. The amino acid derivative reactivity assay with fluorescence detection and its application to multi-constituent substances. (2019). *J. Toxicol. Sci.* 44(12):821-832.

厚生労働省. (2018). 医薬部外品・化粧品の安全性評価のための複数の皮膚感作性試験代替法を組合せた評価体系に関するガイダンス

Supplemental data 1. 2 out of 3 approach およびボトムアップ 3 out of 3 アプローチにおけるデータ

86

Name	CAS No.	log Kow	Applicability domain (Pre-/Pro-hapten ^{1,2,3} and metal)	Human final	LLNA		Alternative Methods																		2 out of 3			3 out of 3					
							ADRA-DM ⁴				ADRA-WM				DPRA ^{1,5}				Keratinosens ¹		h-CLAT ¹												
					Category	EC3 [% (w/v)]	Depletion (%)		Mean (%)	Result	Depletion (%)		Mean (%)	Result	Depletion (%) ^a		Mean (%) ^b	Result	EC 1.5	Result	CD86	CD54	CV75 [µg/mL]	EC150 (CD86) [µg/mL]	EC200 (CD54) [µg/mL]	MIT [µg/mL]	Result	using ADRA-DM	using ADRA-WM	using DPRA	using ADRA-DM	using ADRA-WM	using DPRA
							NAC	NAL			NAC	NAL			Cys	Lys																	
Oxazolone	15646-46-5	1.51		P	Extreme	0.0026	85.3	80.1	82.7	P	89.6	74.3	82.0	P	75.5 71.7	49.6 44.6	62.6 58.1	P	175.5 154.6	P	+	-	166.6	2.7		2.7	P	P	P	P	P	P	P
Diphenylcyclopropenone	886-38-4	3.25		P	Extreme	0.003	28.7	6.3	17.5	P	54.4	3.5	28.9	P	98.8	0	49.4	P	0.5	P	-	+	6.3		3.9	3.9	P	P	P	P	P	P	P
Benzoyl peroxide	94-36-0	3.43		P	Extreme	0.004	100	50.6	75.3	P	100	76.2	88.1	P	100.0	81.3	90.7	P	>2000	N	-	-	41.0				N	N	N	N	P	P	P
Kathon CG	26172-55-4 & 2682-20-4	-0.83		P	Extreme	0.005	100	-0.4	49.8	P	99.6	0.0	49.8	P	90.9	4.3	47.6	P	2.0	P	+	-	3.2	2.2		2.2	P	P	P	P	P	P	P
p-Benzoquinone	106-51-4	0.25		P	Extreme	0.01	96.5	83.5	90.0	P	100	88.1	94.1	P	99.0 99.7	91.0 95.9	95.0 97.8	P	6.5 6.1	P	+	+	4.3	2.7	2.2	2.2	P	P	P	P	P	P	P
Tetrachloro-salicylanilide	1154-59-2	5.87		P	Extreme	0.04	43.4	2.1	22.7	P	68.3	9.6	38.9	P	36.8	9.0	22.9	P	1.2	P	-	+	6.3		3.0	3.0	P	P	P	P	P	P	P
1-Chloro-2,4-dinitrobenzene	97-00-7	2.27		P	Extreme	0.04	89.3	6.1	47.7	P	100	6.3	53.2	P	100.0 99.9	14.7 58.3	57.3 79.1	P	2.5 2.5	P	+	+	5.0	1.9	2.2	1.9	P	P	P	P	P	P	P
Potassium dichromate	7778-50-9	-3.59		P	Extreme	0.08	68.9	0.6	34.7	P	83.6	1.0	42.3	P	61.6	-2.2	30.8	P	1.3	P	+	+	3.2	2.1	1.1	1.1	P	P	P	P	P	P	P
Hydroquinone	123-31-9	1.03	pre/pro-MA	P	Strong	0.1	100	25.9	62.9	P	100	67.3	83.7	P	83.3	51.1	67.2	P	9.8	P	+	-	5.0	2.1		2.1	P	P	P	P	P	P	P
Glutaraldehyde	111-30-8	-0.18		P	Strong	0.1	1.6	53.1	27.3	P	25.1	85.2	55.2	P	30.2	85.4	57.8	P	24.3	P	+	+	5.3	2.8	2.7	2.7	P	P	P	P	P	P	P
1,4-Phenylenediamine	106-50-3	-0.39	pre/pro-MA	P	Strong	0.16	100	71.1	85.5	P	100	70.6	85.3	P	93.0 99.8	23.5 42.2	58.3 71.0	P	5.0 4.5	P	+	-	36.7	2.1		2.1	P	P	P	P	P	P	P
Lauryl gallate	1166-52-5	6.21	pre/pro-MA	P	Strong	0.3	100	19.0	59.5	P	100	95.0	97.5	P	90.9	8.7	49.8	P	1.1	P	+	+	8.2	2.0	2.9	2.0	P	P	P	P	P	P	P
Propyl gallate	121-79-9	1.79	pre/pro-MA	P	Strong	0.32	97.1	56.4	76.7	P	100	62.3	81.1	P	59.9 59.2	26.6 63.6	43.3 61.4	P	132.8 191.3	P	-	+	125.0		32.4	32.4	P	P	P	P	P	P	P
2-Aminophenol	95-55-6	0.6	pre/pro-MA	P	Strong	0.4	100	37.3	68.6	P	99.0	63.2	81.1	P	96.2	18.1	57.2	P	1.5	P	+	-	6.0	1.1		1.1	P	P	P	P	P	P	P
2-Nitro-1,4-phenylenediamine	5307-14-2	0.55	pre/pro-MA	P	Strong	0.4	15.4	3.0	9.2	P	24.8	1.5	13.1	P	93.3	0	46.7	P	11.5	P	-	+	490.7		276.7	276.7	P	P	P	P	P	P	P
2,5-Diaminotoluene sulfate	615-50-9	0.16	pre/pro-MA	P	Strong	0.4	100	17.9	59.0	P	100	24.8	62.4	P	78.4	15.0	46.7	P	5.4	P	+	+	116.0	40.0	40.4	40.0	P	P	P	P	P	P	P
2-Methyl-2H-isothiazol-3-one	2682-20-4	-0.83		P	Strong	0.4/1.9	94.0	7.0	50.5	P	81.8	0.0	40.9	P	97.9	0	49.0	P	11.8	P	+	+	24.7	9.2	7.9	7.9	P	P	P	P	P	P	P
Methyl-2-octynoate	111-12-6	2.6		P	Strong	0.45	41.9	4.0	23.0	P	83.6	0.5	42.1	P	97.2	0	48.6	P	2.5	P	+	-	375.8	28.0		28.0	P	P	P	P	P	P	P
Cobalt (II) chloride	7646-79-9	0.85	metal	P	Strong	0.57	7.4	0.0	3.7	IC *	9.7	1.1	5.4	P	30.3	35.0	32.6	P	298.6 105.9	P	-	+	208.3		35.5	35.5	P	P	P	P	P	P	P
Formaldehyde	50-00-0	0.35		P	Strong	0.7	25.7	1.6	13.6	P	85.8	0.0	42.9	P	60.4 54.8	11.2 2.4	35.8 28.6	P	63.2 136.7	P	+	+	5.8	4.3	5.2	4.3	P	P	P	P	P	P	P
Metol	55-55-0	0.79	pre/pro-MA	P	Strong	0.78	100	22.8	61.4	P	100	22.2	61.1	P	100.0	44.7	72.4	P	2.2	P							ND	P	P	P	P	P	P
Iodopropenyl butylcarbamate	55406-53-6	2.45		P	Strong	0.9	98.8	5.8	52.3	P	100	0.3	50.1	P	99.7	0	49.9	P	2.1	P	-	+	12.8		8.2	8.2	P	P	P	P	P	P	P
1,2-Dibromo-2,4-dicyanobutane	35691-65-7	1.63	pre-MA	P	Strong	0.9	90.2	7.4	48.8	P	100	7.1	53.6	P	100.0 75.3	28.6 28.4	64.3 51.9	P	7.8 8.4	P	+	+	9.9	10.8	9.4	9.4	P	P	P	P	P	P	P
2-Hydroxyethyl acrylate	818-61-1	-0.25		P	Moderate	1.4	100	16.3	58.1	P	100	23.4	61.7	P	92.6	88.9	90.8	P	32.3	P	+	+	24.4	10.8	19.5	10.8	P	P	P	P	P	P	P
Glyoxal	107-22-2	-1.66		P	Moderate	1.4	12.8	0.8	6.8	P	33.9	1.9	17.9	P	56.5	67.8	62.2	P	89.1	P	-	+	396.0		286.7	286.7	P	P	P	P	P	P	P
Bisphenol A diglycidyl ether	1675-54-3	3.84		P	Moderate	1.5	11.6	4.7	8.1	P	20.2	7.6	13.9	P	42.5	1.1	21.8	P	5.2	P	+	+	36.0	18.3	22.2	18.3	P	P	P	P	P	P	P
2-Mercaptobenzothiazole	149-30-4	2.86		P	Moderate	1.7	56.6	0.3	28.4	P	100	6.9	53.4	P	97.5 99.9	0 3.2	48.8 51.5	P	48.1 57.4	P	-	+	169.0		57.5	57.5	P	P	P	P	P	P	P
Isoeugenol	97-54-1	2.656	pre/pro-MA	P	Moderate	1.8	28.5	24.8	26.7	P	72.1	66.2	69.1	P	89.3 99.1	10.7 21.8	50.0 60.4	P	16.1 6.2	P	-	-	112.5				IC *	P	P	P	P	P	P
Diethyl maleate	141-05-9	2.2		P	Moderate	2.1	31.8	7.7	19.8	P	96.3	3.0	49.7	P	100.0 99.8	85.5 78.8	92.8 89.3	P	9.4 2.4	P	+	-	120.0	64.0		64.0	P	P	P	P	P	P	P
3-Dimethylamino propylamine	109-55-7	-0.45	pro/pre	P	Moderate	2.2	6.4	0.6	3.5	IC *	35.7	0.5	18.1	P	10.2	0	5.1	P	85.8	P	+	+	276.7	82.1	165.8	82.1	P	P	P	P	P	P	P
Ethylenediamine free base	107-15-3	-1.62	pro/pre	P	Moderate	2.2	2.7	0.6	1.7	IC *	8.8	0.5	4.6	IC *	3.4 18.6	0 0.7	1.7 9.7	N/P	99.9 549.1	P	+	-	271.7	265.7		265.7	P	P	P	P	P	P	P
1,2-Benzisothiazolin-3-one	2634-33-5	64		P	Moderate	2.3	100	0.4	50.2	P	100	7.9	53.9	P	97.7	9.7	53.7	P	3.2	P	-	+	1.8		0.6	0.6	P	P	P	P	P	P	P
Methyl 2-nonynoate	111-80-8	3.1		P	Moderate	2.5	15.0	1.4	8.2	P	35.7	7.3	21.5	P	100.0	3.2	51.6	P	1.8	P	+	-	191.7	91.8		91.8	P	P	P	P	P	P	P
Phenylacetaldehyde	122-78-1	1.54		P	Moderate	3/4.7	22.4	98.3	60.3	P	44.8	83.2	64.0	P	60.7	22.6	41.7	P	28.5	P	+	+	27.0	17.3	13.0	13.0	P	P	P	P	P	P	P

Supplemental data 1 の続き(1)

87

Name	CAS No.	log Kow	Applicability domain (Pre-/Pro-hapten ^{1,2,3} and metal)	Human final	LLNA		Alternative Methods																	2 out of 3			3 out of 3							
							ADRA-DM ⁴				ADRA-WM				DPRA ^{1,5}				Keratinsens ¹		h-CLAT ¹													
							Category	EC3 [% (w/v)]	Depletion (%)		Mean (%)	Result	Depletion (%)		Mean (%)	Result	Depletion (%) ^a		Mean (%) ^b	Result	EC 1.5	Result	CD86	CD54	CV75 [µg/mL]	EC150 (CD86) [µg/mL]	EC200 (CD54) [µg/mL]	MIT [µg/mL]	Result	using ADRA-DM	using ADRA-WM	using DPRA	using ADRA-DM	using ADRA-WM
					NAC	NAL			NAC	NAL			Cys	Lys																				
					Cinnamic aldehyde	104-55-2	1.82		P	Moderate	3.1	41.1	8.5	24.8	P	74.3	32.2	53.2	P	70.6	43.2	56.9	P	16.1	P	+	+	28.0	10.2	12.3	10.2	P	P	P
Benzylideneacetone	122-57-6	2.04		P	Moderate	3.7	44.9	7.2	26.1	P	39.1	2.0	20.5	P	94.7 92.4	1.5 0	48.1 46.2	P	9.7 7.0	P	+	+	35.3	25.8	34.6	25.8	P	P	P	P	P	P	P	
3-Propyrideneephthalide	17369-59-4	2.03	pre	P	Moderate	3.7	4.2	5.3	4.7	IC *	7.2	7.3	7.3	P	14.3	30.6	22.5	P	>2000	IC *	+	+	113.0	31.2	55.6	31.2	P	IC *	P	P	P	P	P	P
Farnesol	4602-84-0	5.77	pro	P	Moderate	4.1	14.7	4.0	9.3	P	11.6	0.0	5.8	P	7.3	0	3.7	IC *	13.0	P	-	+	42.3		21.0	21.0	P	P	P	P	P	P	P	
Citral	5392-40-5	3.45		P	Moderate	13/6.3/ 4.6/5.3	5.2	5.8	5.5	P	5.9	4.1	5.0	P	85.7 78.6	16.9 8.6	51.3 43.6	P	23.2 16.8	P	+	+	24.0	8.4	15.0	8.4	P	P	P	P	P	P	P	
Nickel (II) sulfate	10101-97-0 / 7786-81-4	-0.17	metal	P	Moderate	4.8	3.3	0.0	1.7	IC *	3.5	0.2	1.9	IC *	-12.0	-1.7	0.0	IC *	329.0	P	+	+	150.0	45.4	45.1	45.1	P	P	P	P	P	P	P	
Tetramethylthiuram disulfide	137-26-8	1.7		P	Moderate	5.2	100	4.4	52.2	P	100	2.1	51.0	P	99.5	6.9	53.2	P	0.8	P	+	+	10.0	9.1	2.7	2.7	P	P	P	P	P	P	P	
trans-2-Hexenal	6728-26-3	1.58		P	Moderate	5.5	80.4	12.3	46.3	P	97.1	21.6	59.3	P	97.9	3.6	50.8	P	83.4	P	+	+	18.9	6.0	5.7	5.7	P	P	P	P	P	P	P	
3,4-Dihydrocoumarin	119-84-6	0.97		P	Moderate	5.6	1.1	4.5	2.8	N	1.4	10.9	6.2	P	0	39.7	19.9	P	>2000	N	-	+	810.0		531.7	531.7	P	N	P	P	P	P	P	
Geraniol	106-24-1	3.47	pro/pre	P	Weak	57/25.8/ 20.4/ 11.8/5.6	9.9	4.1	7.0	P	13.4	0.0	6.7	P	0	10.0	5.0	IC *	110.0	P	+	-	139.2	123.0		123.0	P	P	P	P	P	P	P	
Resorcinol	108-46-3	1.03	pre/pro-MA	P	Moderate	5.92	4.0	2.2	3.1	IC *	13.4	0.3	6.9	P	1.6	0	0.8	IC *	>2000	IC *	-	+	613.4		201.5	201.5	P	IC *	P	IC *	P	P	P	
2-Phenylpropionaldehyde	93-53-8	1.96		P	Moderate	6.3	8.0	4.6	6.3	P	29.1	17.1	23.1	P	48.2 26.6	21.2 5.1	34.7 15.8	P	64.8 26.5	P	+	+	37.9	38.2	44.5	38.2	P	P	P	P	P	P	P	
safranal	116-26-7	3.22		P	Moderate	7.5	Co-elution	13.5	6.7	P	Co-elution	11.3	5.6	P	91.8	0	45.9	P	5.4	P						ND	P	P	P	P	P	P		
Perillaldehyde	2111-75-3	3.34		P	Moderate	8.1	29.1	18.5	23.8	P	85.7	13.5	49.6	P	31.9	13.8	22.8	P	16.6	P	+	-	64.3	51.4		51.4	P	P	P	P	P	P	P	
Ethyl acrylate	140-88-5	1.22		P	Weak	28/9.7	87.8	13.7	50.8	P	100	30.1	65.1	P	96.4 100.0	93.7 90.2	95.1 95.1	P	45.5	P							ND	P	P	P	P	P	P	
R-Carvone	6485-40-1	3.07		P	Weak	12.9	6.3	4.8	5.5	P	17.5	1.8	9.6	P	26.3	Co-elution		P	96.6	P	+	+	245.0	95.0	114.0	95.0	P	P	P	P	P	P	P	
Eugenol	97-53-0	2.73	pre/pro-MA	P	Weak	12.9	16.0	8.5	12.3	P	38.4	11.4	24.9	P	9.2 38.3	19.2 4.2	14.2 21.3	P	>2000 63.7	P/N	+	+	143.2	64.4	137.2	64.4	P	P	P	P	P	P	P	
Abietic acid	514-10-3	6.46	pre	P	Weak	14.7	95.5	11.3	53.4	P	87.0	20.1	53.5	P	99.9	16.3	58.1	P	16.6	P	-	-	89.6				IC *	P	P	P	P	P	P	
Lylal	31906-04-4	3.32		P	Weak	17.1	74.2	6.3	40.2	P	86.9	5.8	46.3	P	39.4	3.4	21.4	P	71.8	P	+	+	254.8	76.0	75.2	75.2	P	P	P	P	P	P	P	
Phenyl benzoate	93-99-2	3.04		P	Weak	17.1	1.3	1.8	1.5	N	2.8	2.3	2.6	N	64.9	2.2	33.6	P	>2000 BT	N	+	+	500.0	137.8	236.4	137.8	P	N	N	P	P	P	P	
Lilial	80-54-6	4.36		P	Weak	18.7	7.0	3.9	5.4	P	17.1	4.5	10.8	P	14.0	0.7	7.4	P	>2000	N	-	+	42.2		44.6	44.6	P	P	P	P	P	P	P	
Pentachlorophenol	87-86-5	4.74	pro/pre	P	Weak	20	5.1	3.3	4.2	IC *	1.3	0.1	0.7	IC *	0	14.5	7.3	P	>2000	IC *	-	+	33.4		19.0	19.0	P	IC *	IC *	P	P	P	P	
Cinnamyl Alcohol	104-54-1	1.84	pro/pre	P	Weak	21	1.9	0.6	1.2	IC *	1.0	0.1	0.6	IC *	0 21.3	15.1 2.7	7.6 12.0	P	123.6 23.9	P	+	+	350.0	101.6	196.6	101.6	P	P	P	P	P	P	P	
Hydroxycitronellal	107-75-5	2.11		P	Weak	23	17.5	1.5	9.5	P	29.5	5.2	17.4	P	17.5 61.7	6.5 32.8	12.0 47.2	P	79.4 30.7	P	+	+	700.0	35.4	26.8	26.8	P	P	P	P	P	P	P	
Imidazolidinyl urea	39236-46-9	-8.28		P	Weak	24	35.4	2.0	18.7	P	36.7	2.8	19.7	P	3.8 59.0	0.9 20.6	2.3 39.8	N/P	45.4 41.3	P	+	+	40.1	42.3	39.3	39.3	P	P	P	P	P	P	P	
Undecylenic acid	112-38-9	4.37		P	Weak	25	1.5	0.2	0.9	N	2.4	0.0	1.2	N	11.4	-0.1	5.7	N	56.7	P						ND				P	P	P		
5-Methyl-2,3-hexanedione	13706-86-0	0.06		P	Weak	25.8	6.4	34.8	20.6	P	11.8	73.7	42.7	P	25.8	7.5	16.7	P	49.8	P	+	+	258.1	253.7	211.6	211.6	P	P	P	P	P	P	P	
Ethylene glycol dimethacrylate	97-90-5	2.21		P	Weak	28	5.9	2.6	4.3	N	19.5	5.4	12.5	P	87.3 93.5	12.4 33.9	49.8 63.7	P	57.4 14.1	P	-	+	563.6		535.4	535.4	P	P	P	P	P	P	P	
N-Butyl glycidyl ether	2426-08-6	1.08		P	Weak	28	2.7	0.2	1.4	N	12.9	4.2	8.5	P	67.3	11.5	39.4	P	59.4	P	-	-	185.3				N	N	P	P	P	P	P	
Penicillin G	61-33-6	1.85		P	Weak	30	2.6	1.7	2.2	N	0.8	2.9	1.9	N	14.3	0	7.2	P	1308.6	N	-	+	5000.0		3754.3	3754.3	P	IC	IC	IC	P	P	P	
Aniline	62-53-3	1.08	pre/pro-MA	P	Weak	89	3.7	0.7	2.2	IC *	4.0	0.7	2.4	IC *	0 0	9.7 2.4	4.8 1.2	IC *	>2000 2.1	P/N	+	+	930.0	537.2	550.8	537.2	P	IC *	IC *	IC *	P	P	P	
Methylmethacrylate	80-62-6	1.28		P	Weak	90	0.0	0.0	0.0	N	7.7	0.5	4.1	N	55.3	11.8	33.5	P	424.4 BT	P/N	-	+	1000.0		479.7	479.7	P	IC	IC	P	P	P	P	

Supplemental data 1 の続き(2)

Name	CAS No.	log Kow	Applicability domain (Pre-/Pro-hapten ^{1,2,3} and metal)	Human final	LLNA		Alternative Methods																				2 out of 3			3 out of 3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
							ADRA-DM ⁴				ADRA-WM				DPRA ^{1,5}				Keratinosens ¹		h-CLAT ¹																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
					Category	EC3 [% (w/v)]	Depletion (%)		Mean (%)	Result	Depletion (%)		Mean (%)	Result	Depletion (%) ^a		Mean (%) ^b	Result	EC 1.5	Result	CD86	CD54	CV75 [µg/mL]	EC150 (CD86) [µg/mL]	EC200 (CD54) [µg/mL]	MIT [µg/mL]	Result	using ADRA-DM	using ADRA-WM	using DPRA	using ADRA-DM	using ADRA-WM	using DPRA																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
							NAC	NAL			NAC	NAL			Cys	Lys																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			

Supplemental data 1 の続き(3)

Name	CAS No.	log Kow	Applicability domain (Pre-/Pro-hapten ^{1,2,3} and metal)	Human final	LLNA		Alternative Methods																		2 out of 3			3 out of 3					
							ADRA-DM ⁴				ADRA-WM				DPRA ^{1,5}				Keratinosens ¹		h-CLAT ¹												
							Depletion (%)		Mean (%)	Result	Depletion (%)		Mean (%)	Result	Depletion (%) ^a		Mean (%) ^b	Result	EC 1.5	Result	CD86	CD54	CV75 [µg/mL]	EC150 (CD86) [µg/mL]	EC200 (CD54) [µg/mL]	MIT [µg/mL]	Result						
							NAC	NAL			NAC	NAL			Cys	Lys																	
					Category	EC3 [% (w/v)]																					using ADRA- DM	using ADRA- WM	using DPRA	using ADRA- DM	using ADRA- WM	using DPRA	
Sulfanilamide	63-74-1	-0.55		N	NS	NC	0.0	1.4	0.7	N	2.7	3.2	3.0	N	0 3.8	0.8 0	0.4 1.9	N	>2000 BT	N	-	-	1000.0				N	N	N	N	N	N	
Tween 80	9005-65-6	4.23		N	NS	NC	4.2	0.2	2.2	N	1.9	0.4	1.2	N	10.2	0	5.1	N	115.5	P	-	-	5000.0				N	N	N	N	P	P	P
Dextran	9004-54-0	NC		N	NS	NC	7.3	0.0	3.7	N	0.4	0.4	0.4	N				ND	>2000	N	-	-	5000.0				N	N	N	N	N	N	ND

MA: Michael accepter, SB: Schiff base, NC: Not-calculated, ND: No data, IC: Inconclusive

* 適用範囲外かつ陰性の結果

¹ Urbisch *et al.* (2015) のデータを引用

² Casati S *et al.* (2016) のデータを引用

³ J. A. Troutman *et al.* (2011) のデータを引用

⁴ Fujita M *et al.* (2019a) のデータを引用したものを斜体で表記した

⁵ Takenouchi O *et al.* (2015) のデータを引用

^a Urbisch *et al.* (2015) のデータにおける Cys-pepitde および Lys-peptide の残存率から Depletion を算出した

^b 上記 a の Cys-peptide および Lys-peptide の Depletion から算出した

Supplemental data 2-1.STS, ITA-SA および ITS-2MA で使用した 124 化合物の各試験法のデータ

Chemical	CAS No.	log Kow	Applicability domain (Pre-/Pro-hapten and metal)	ADRA-DM ⁴						ADRA-WM						DPRA ⁵						h-CLAT ⁵								DEREK ⁵		
				Depletion (%)			Result	ITS score	Potency class	Depletion (%)			Result	ITS score	Potency class	Depletion (%)			Result	ITS score	Potency class	CD86	CD54	CV75 [μg/mL]	EC150 (CD86) [μg/mL]	EC200 (CD54) [μg/mL]	MIT [μg/mL]	Result	ITS score	Potency class	Result	ITS score
				NAC	NAL	Mean (%)				NAC	NAL	Mean (%)				Cys	Lys	Mean (%)														
Diphenylcyclopropanone	886-38-4	3.25		28.7	6.3	17.5	P	2	Weak	54.4	3.5	28.9	P	2	Weak	99.5	3.5	51.5	P	3	Strong	-	+	6.3	NC	3.92	3.92	P	3	Strong	P	1
Oxazolone	15646-46-5	1.51		85.3	80.1	82.7	P	3	Strong	89.6	74.3	82.0	P	3	Strong	74.7	12.4	43.6	P	3	Strong	+	-	166.6	2.71	NC	2.71	P	3	Strong	P	1
Chlorothalonil	1897-45-6	3.66		95.2	3.4	49.3	P	3	Strong	100	3.4	51.7	P	3	Strong	100	1.9	51.0	P	3	Strong	+	-	0.72	0.21	NC	0.21	P	3	Strong	P	1
Kathon CG	26172-55-4 & 2682-20-4			100	-0.4	49.8	P	3	Strong	99.6	0.0	49.8	P	3	Strong	94.6	12.6	53.6	P	3	Strong	+	-	3.2	2.21	NC	2.21	P	3	Strong	P/P	1
p -Benzoquinone	106-51-4	0.25		96.5	83.5	90.0	P	3	Strong	100	88.1	94.1	P	3	Strong	95.8	90.0	92.9	P	3	Strong	+	+	4.3	2.67	2.24	2.24	P	3	Strong	P	1
Tetrachloro-salicylanilide	1154-59-2	5.87		43.4	2.1	22.7	P	2	Weak	68.3	9.6	38.9	P	2	Weak	36.8	9.0	22.9	P	2	Weak	-	+	6.3	NC	2.98	2.98	P	3	Strong	N	0
Bandrowski's base	20048-27-5	0.74	pre/pro-MA	100	5.7	52.9	P	3	Strong	100	14.7	57.3	P	3	Strong	87.5	4.2	45.9	P	3	Strong	+	+	4.9	3.85	1.6	1.6	P	3	Strong	P	1
4-Nitrobenzyl bromide	100-11-8	2.7		100	24.1	62.0	P	3	Strong	100	45.9	73.0	P	3	Strong	99.8	21.6	60.7	P	3	Strong	+	+	3.8	0.8	0.91	0.8	P	3	Strong	P	1
1-Chloro-2,4-dinitrobenzene	97-00-7	2.27		89.3	6.1	47.7	P	3	Strong	100	6.3	53.2	P	3	Strong	99.8	19.6	59.7	P	3	Strong	+	+	5	1.92	2.23	1.92	P	3	Strong	P	1
Potassium dichromate	7778-50-9	-3.59		68.9	0.6	34.7	P	2	Weak	83.6	1.0	42.3	P	2	Weak	61.6	-2.2	30.8	P	2	Weak	+	+	3.2	2.09	1.06	1.06	P	3	Strong	P	1
Glutaraldehyde	111-30-8	-0.18		0.8	53.1	26.9	P	2	Weak	25.1	85.2	55.2	P	3	Strong	25.2	84.2	54.7	P	3	Strong	+	+	5.3	2.78	2.7	2.7	P	3	Strong	P	1
Hydroquinone	123-31-9	1.03	pre/pro-MA	100	25.9	62.9	P	3	Strong	100	67.3	83.7	P	3	Strong	99.6	53.7	76.7	P	3	Strong	+	-	5	2.13	NC	2.13	P	3	Strong	P	1
Phthalic anhydride	85-44-9	2.07		0.3	96.9	48.6	P	3	Strong	9.6	95.6	52.6	P	3	Strong	-7.3	37.0	18.5	P	1	Weak	-	-	400	NC	NC	NC	N	0	NS	P	1
Maleic anhydride	108-31-6	1.62		100	89.6	94.8	P	3	Strong	100	96.7	98.4	P	3	Strong	100	45.9	NC	P	3	Strong	-	+	658	NC	298.4	298.4	P	1	Weak	P	1
1,4-Phenylenediamine	106-50-3	-0.39	pre/pro-MA	100	71.1	85.5	P	3	Strong	100	70.6	85.3	P	3	Strong	80.2	11.5	45.9	P	3	Strong	+	-	36.7	2.09	NC	2.09	P	3	Strong	P	1
Hexyl salicylate	6259-76-3	5.06		1.4	3.1	2.3	N	0	NS	1.2	0.0	0.6	N	0	NS	0.0	-0.4	0.0	N	0	NS	-	+	147.7	NC	52.73	52.73	P	2	Weak	N	0
Benzyl bromide	100-39-0	2.88		61.0	10.3	35.7	P	2	Weak	96.3	34.7	65.5	P	3	Strong	99.9	26.5	63.2	P	3	Strong	+	+	7.5	3.2	2.86	2.86	P	3	Strong	P	1
Benzoyl peroxide	94-36-0	3.43		100	50.6	75.3	P	3	Strong	100	76.2	88.1	P	3	Strong	100	5.6	52.8	P	3	Strong	-	-	34.9	NC	NC	NC	N	0	NS	P	1
Lauryl gallate	1166-52-5	6.21	pre/pro-MA	100	19.0	59.5	P	3	Strong	100	95.0	97.5	P	3	Strong	90.9	8.7	49.8	P	3	Strong	+	+	8.2	2.02	2.91	2.02	P	3	Strong	P	1
Propyl gallate	121-79-9	1.79	pre/pro-MA	97.1	56.4	76.7	P	3	Strong	100	62.3	81.1	P	3	Strong	24.8	-303.0	NC	P	1	Weak	-	+	125	NC	32.4	32.4	P	2	Weak	P	1
2,5-Diaminotoluene sulfate	615-50-9	NA	pre/pro-MA	100	17.9	59.0	P	3	Strong	100	24.8	62.4	P	3	Strong	100	6.0	53.0	P	3	Strong	+	+	116	40	40.4	40	P	2	Weak	P	1
2-Aminophenol	95-55-6	0.6	pre/pro-MA	100	37.3	68.6	P	3	Strong	99.0	63.2	81.1	P	3	Strong	86.5	24.5	55.5	P	3	Strong	+	-	6	1.1	NC	1.1	P	3	Strong	P	1
2-Nitro-1,4-phenylenediamine	5307-14-2	0.55	pre/pro-MA	15.4	3.0	9.2	P	1	Weak	24.8	1.5	13.1	P	1	Weak	99.2	5.7	52.5	P	3	Strong	-	+	490.7	NC	276.68	276.68	P	1	Weak	P	1
Chloramine-T dihydrate	149358-73-6	-0.5		100	100	100	P	3	Strong	96.6	97.1	96.9	P	3	Strong	100	35.9	68.0	P	3	Strong	+	+	314.7	259.2	291	259.2	P	1	Weak	P	1
CD-3	25646-71-3	-3.09	pre/pro-MA	76.6	16.5	46.6	P	3	Strong	97.8	12.9	55.4	P	3	Strong	90.1	13.6	51.9	P	3	Strong	+	+	24.5	10.73	16.37	10.73	P	2	Weak	P	1
Cobalt (II) chloride	7646-79-9	0.85	metal	7.4	0.0	3.7	IC *	0	NS	19.3	0.3	9.8	P	1	Weak	30.1	-	NC	P	2	Weak	-	+	208.3	NC	35.5	35.5	P	2	Weak	P	1
Formaldehyde	50-00-0	0.35		25.7	1.6	13.6	P	1	Weak	85.8	0.0	42.9	P	2	Weak	44.2	3.6	23.9	P	2	Weak	+	+	5.8	4.3	5.2	4.3	P	3	Strong	P	1
Iodopropynyl butylcarbamate	55406-53-6	2.45		98.8	5.8	52.3	P	3	Strong	100	0.3	50.1	P	3	Strong	99.8	1.0	50.4	P	3	Strong	-	+	12.8	NC	8.15	8.15	P	3	Strong	N	0
1,2-Dibromo-2,4-dicyanobutane	35691-65-7	1.63	pre-MA	93.2	3.0	48.1	P	3	Strong	100	7.1	53.6	P	3	Strong	99.6	-575.5	NC	P	3	Strong	+	+	9.9	10.8	9.42	9.42	P	3	Strong	P	1
Isoeugenol	97-54-1	2.65	pre/pro-MA	28.5	24.8	26.7	P	2	Weak	72.1	66.2	69.1	P	3	Strong	55.8	12.6	34.2	P	2	Weak	-	-	112.5	NC	NC	NC	IC *	0	NS	P	1
1-Naphthol	90-15-3	2.69	pre-MA	21.5	2.5	12.0	P	1	Weak	57.8	12.5	35.2	P	2	Weak	21.8	17.4	19.6	P	1	Weak	+	+	57.2	18.3	12.7	12.7	P	2	Weak	P	1
1-Phenyl-1,2-propanedione	579-07-7	1.11		13.1	23.8	18.4	P	2	Weak	16.0	26.5	21.3	P	2	Weak	65.5	22.4	44.0	P	3	Strong	+	+	123.1	81.5	56.7	56.7	P	2	Weak	P	1
2-Hydroxyethyl acrylate	818-61-1	-0.25		100	16.3	58.1	P	3	Strong	100	23.4	61.7	P	3	Strong	100	93.5	96.8	P	3	Strong	+	+	24.4	10.8	19.49	10.8	P	2	Weak	P	1
Glyoxal	107-22-2	-1.66		12.8	0.8	6.8	P	1	Weak	33.9	1.9	17.9	P	2	Weak	68.2	26.7	47.5	P	3	Strong	-	+	396	NC	286.7	286.7	P	1	Weak	P	1
Bisphenol A diglycidyl ether	1675-54-3	3.84		11.6	4.7	8.1	P	1	Weak	20.2	7.6	13.9	P	1	Weak	74.8	3.2	39.0	P	2	Weak	+	+	36	18.27	22.2	18.27	P	2	Weak	P	1
Vinyl pyridine	1337-81-1	1.71		18.1	7.7	12.9	P	1	Weak	81.5	0.0	40.8	P	2	Weak	99.5	0.9	50.2	P	3	Strong	+	-	72.4	13.2	NC	13.2	P	2	Weak	P	1
2-Mercaptobenzothiazole	149-30-4	2.86		56.6	0.3	28.4	P	2	Weak	100	6.9	53.4	P	3	Strong	100	-3.6	50.0	P	3	Strong	-	+	169	NC	57.5	57.5	P	2	Weak	P	1
2-Methyl-2H -isothiazol-3-one	2682-20-4	-0.83		94.0	7.0	50.5	P	3	Strong	81.8	0.0	40.9	P	2	Weak	100	1.1	50.6	P	3	Strong	+	+	24.7	9.23	7.89	7.89	P	3	Strong	P	1
3-Dimethylamino propylamine	109-55-7	-0.45	pro/pre	6.4	0.6	3.5	IC *	0	NS	35.7	0.5	18.1	P	2	Weak	8.0	-2.1	4.0	IC *	0	NS	+	+	276.7	82.1	165.8	82.1	P	2	Weak	P	1
Ethylenediamine	107-15-3	-1.62	pro/pre	2.7	0.6	1.7	IC *	0	NS	8.8	0.5	4.6	IC *	0	NS	0.7	-0.3	0.4	IC *	0	NS	+	-	271.7	265.7	NC	265.7	P	1	Weak	P	1
1,2-Benzisothiazolin-3-one	2634-33-5	0.64		100	0.4	50.2	P	3	Strong	100	7.9	53.9	P	3	Strong	97.7	9.7	53.7	P	3	Strong	-	+	1.83	NC	0.55	0.55	P	3	Strong	P	1
Methyl pyruvate	600-22-6	-0.96		0.6	0.3	0.5	N	0	NS	2.1	0.4	1.2	N	0	NS	-0.5	11.8	5.9	N	0	NS	-	-	>5000	NC	NC						

Supplemental data 2-1 の続き(1)

Chemical	CAS No.	log Kow	Applicability domain (Pre-/Pro-hapten and metal)	ADRA-DM ⁴						ADRA-WM						DPRA ⁵						h-CLAT ⁵						DEREK ⁵				
				Depletion (%)			Result	ITS score	Potency class	Depletion (%)			Result	ITS score	Potency class	Depletion (%)			Result	ITS score	Potency class	CD86	CD54	CV75 [μg/mL]	EC150 (CD86) [μg/mL]	EC200 (CD54) [μg/mL]	MIT [μg/mL]	Result	ITS score	Potency class	Result	ITS score
				NAC	NAL	Mean (%)				NAC	NAL	Mean (%)				Cys	Lys	Mean (%)														
m-Aminophenol	591-27-5	0.24	pre/pro-MA	4.2	0.0	2.1	IC *	0	NS	16.7	0.0	8.3	P	1	Weak	2.1	-0.8	1.1	IC *	0	NS	-	+	243.2	NC	117.1	117.1	P	2	Weak	P	1
Diethyl sulfate	64-67-5	1.14		1.4	0.1	0.7	N	0	NS	1.8	0.6	1.2	N	0	NS	26.2	9.6	17.9	P	1	Weak	+	-	373	240.4	NC	240.4	P	1	Weak	P	1
3-Propylenephthalide	17369-59-4	2.03	pre	4.2	5.3	4.7	IC *	0	NS	7.2	7.3	7.3	P	1	Weak	-5.6	12.6	6.3	IC *	0	NS	+	+	113	31.2	55.6	31.2	P	2	Weak	N	0
Benzylidenacetone	122-57-6	2.04		44.9	7.2	26.1	P	2	Weak	39.1	2.0	20.5	P	2	Weak	92.7	-12.2	46.4	P	3	Strong	+	+	35.3	25.8	34.6	25.8	P	2	Weak	N	0
2,4-Heptadienal	5910-85-0	1.86		35.8	50.1	42.9	P	2	Weak	53.5	37.9	45.7	P	2	Weak	97.3	23.9	60.6	P	3	Strong	+	+	6.9	3.51	5.09	3.51	P	3	Strong	P	1
Tropolone	533-75-5	0.38		2.8	0.0	1.4	N	0	NS	4.6	0.1	2.3	N	0	NS	-3.3	1.1	0.6	N	0	NS	+	+	86.7	27.3	30.18	27.3	P	2	Weak	P	1
α-Methylcinnamaldehyde	101-39-3	2.37		28.4	2.6	15.5	P	2	Weak	31.4	1.5	16.4	P	2	Weak	6.7	16.7	11.7	P	1	Weak	+	+	139	40.8	70.16	40.8	P	2	Weak	P	1
Nickel (II) sulfate	10101-97-0 / 7786-81-4	NA	metal	3.3	0.0	1.7	IC *	0	NS	3.5	0.2	1.9	IC *	0	NS	-12.0	-1.7	0.0	IC *	0	NS	+	+	150	45.4	45.1	45.1	P	2	Weak	P	1
Tetramethylthiuram disulfide	137-26-8	1.7		100	4.4	52.2	P	3	Strong	100	2.1	51.0	P	3	Strong	100	1.6	50.8	P	3	Strong	+	+	10	9.11	2.7	2.7	P	3	Strong	P	1
trans-2-Hexenal	6728-26-3	1.58		80.4	12.3	46.3	P	2	Weak	97.1	21.6	59.3	P	3	Strong	97.0	15.6	56.3	P	3	Strong	+	+	18.9	6	5.7	5.7	P	3	Strong	P	1
Resorcinol	108-46-3	1.03	pre/pro-MA	4.0	2.2	3.1	IC *	0	NS	13.4	0.3	6.9	P	1	Weak	-1.0	13.1	6.6	P	1	Weak	-	+	613.4	NC	201.5	201.5	P	1	Weak	P	1
Diethyl maleate	141-05-9	2.2		31.8	7.7	19.8	P	2	Weak	96.3	3.0	49.7	P	3	Strong	99.8	74.4	87.1	P	3	Strong	+	-	120	64	NC	64	P	2	Weak	P	1
2-Methoxy-4-methyl-phenol	93-51-6	1.88	pre/pro-MA	3.2	5.8	4.5	IC *	0	NS	3.4	9.4	6.4	P	1	Weak	13.6	3.9	8.7	P	1	Weak	+	+	280	30.8	207.4	30.8	P	2	Weak	P	1
2-Phenylpropionaldehyde	93-53-8	1.96		8.0	4.6	6.3	P	1	Weak	29.1	17.1	23.1	P	2	Weak	48.2	21.2	34.7	P	2	Weak	+	+	37.9	38.2	44.5	38.2	P	2	Weak	P	1
4-Chloroaniline	106-47-8	1.72		1.0	0.7	0.8	N	0	NS	3.8	0.6	2.2	N	0	NS	0.3	-0.1	0.2	N	0	NS	+	-	200	87.7	NC	87.7	P	2	Weak	P	1
Methyl methanesulfonate	66-27-3	-0.66		8.7	3.7	6.2	P	1	Weak	25.9	9.6	17.8	P	2	Weak	93.0	10.3	51.7	P	3	Strong	-	-	26.7	NC	NC	NC	N	0	NS	P	1
Perillaldehyde	2111-75-3	-0.66		29.1	18.5	23.8	P	2	Weak	85.7	13.5	49.6	P	3	Strong	31.9	13.8	22.9	P	2	Weak	+	-	64.3	51.43	NC	51.43	P	2	Weak	P	1
5-Methyl-2-phenyl-4H-pyrazol-3-one	89-25-8	2.56		0.8	6.6	3.7	N	0	NS	1.1	3.0	2.0	N	0	NS	7.1	-236.2	NC	N	0	NS	-	-	417	NC	NC	NC	N	0	NS	P	1
Trimellitic anhydride	552-30-7	1.95		1.9	97.0	49.4	P	3	Strong	4.5	97.5	51.0	P	3	Strong	3.1	0.9	2.0	N	0	NS	+	-	250	81.2	NC	81.2	P	2	Weak	P	1
2-Ethylhexyl acrylate	103-11-7	4.09		27.4	3.4	15.4	P	1	Weak	1.3	13.5	7.4	P	1	Weak	100	43.6	71.8	P	3	Strong	+	+	280	99.96	103.77	99.96	P	2	Weak	P	1
α-Amylcinnamaldehyde	122-40-7	4.33		0.0	1.6	0.8	N	0	NS	3.1	3.8	3.4	N	0	NS	1.4	1.0	1.2	N	0	NS	-	+	24.2	NC	25.94	25.94	P	2	Weak	P	1
2,3-butanedione	431-03-8	-1.34		41.2	25.5	33.4	P	2	Weak	100	29.5	64.8	P	3	Strong	75.0	26.6	50.8	P	3	Strong	+	+	94	24.7	46.9	24.7	P	2	Weak	P	1
N-Butyl acrylate	141-32-2	2.2		52.3	2.7	27.5	P	2	Weak	100	45.3	72.6	P	3	Strong	100	85.1	92.6	P	3	Strong	+	+	332	184	227	184	P	1	Weak	P	1
R-Carvone	6485-40-1	3.07		5.7	4.8	5.2	P	1	Weak	17.5	1.8	9.6	P	1	Weak	25.1	0.6	12.9	P	1	Weak	+	+	245	95	114	95	P	2	Weak	P	1
Citral	5392-40-5	3.45		5.2	5.8	5.5	P	1	Weak	5.9	4.1	5.0	P	1	Weak	13.9	19.6	16.8	P	1	Weak	+	+	24	8.4	15	8.4	P	3	Strong	P	1
Eugenol	97-53-0	2.73	pre/pro-MA	16.0	8.5	12.3	P	1	Weak	38.4	11.4	24.9	P	2	Weak	32.1	10.2	21.2	P	1	Weak	+	+	143.2	64.4	137.2	64.4	P	2	Weak	P	1
Abietic acid	514-10-3	6.46	pre	95.5	11.3	53.4	P	3	Strong	87.0	20.1	53.5	P	3	Strong	99.9	15.9	57.9	P	3	Strong	-	-	89.6	NC	NC	NC	IC *	0	NS	P	1
Oxalic acid	144-62-7	-1.74		0.0	3.6	1.8	N	0	NS	0.6	1.0	0.8	N	0	NS	0.9	-0.9	0.5	N	0	NS	+	-	>1000	310.33	NC	310.33	P	1	Weak	N	0
Lylal	31906-04-4	3.32		74.2	6.3	40.2	P	2	Weak	86.9	5.8	46.3	P	2	Weak	9.1	6.3	7.7	P	1	Weak	+	+	254.8	76	75.2	75.2	P	2	Weak	P	1
4-Allylanisole	140-67-0	3.47	pro-MA	27.0	3.9	15.4	P	1	Weak	61.2	2.9	32.0	P	2	Weak	54.0	-6.8	27.0	P	2	Weak	-	+	186	NC	207.6	207.6	P	1	Weak	P	1
Lilial	80-54-6	4.36		7.0	3.9	5.4	P	1	Weak	17.1	4.5	10.8	P	1	Weak	-1.3	0.8	0.4	N	0	NS	-	+	42.2	NC	44.6	44.6	P	2	Weak	P	1
Phenyl benzoate	93-99-2	3.04		1.3	1.8	1.5	N	0	NS	2.8	2.3	2.6	N	0	NS	34.2	-	NC	P	2	Weak	+	+	500	137.8	236.4	137.8	P	2	Weak	P	1
Cinnamyl alcohol	104-54-1	1.84	pro/pre	1.9	0.6	1.2	IC *	0	NS	1.0	0.1	0.6	IC *	0	NS	2.1	2.1	2.1	IC *	0	NS	+	+	350	101.6	196.6	101.6	P	2	Weak	N	0
Benzocaine	94-09-7	1.8	pre/pro-SB	2.3	3.1	2.7	IC *	0	NS	0.0	0.0	0.0	IC *	0	NS	100	0.9	50.4	P	3	Strong	+	-	545.5	74.2	NC	74.2	P	2	Weak	P	1
Imidazolidinyl urea	39236-46-9	-8.28		35.4	2.0	18.7	P	2	Weak	11.8	73.7	42.7	P	2	Weak	48.0	17.1	32.6	P	2	Weak	+	+	40.1	42.3	39.3	39.3	P	2	Weak	P	1
Geraniol	106-24-1	3.47	pro/pre	7.9	3.4	5.6	P	1	Weak	13.4	0.0	6.7	P	1	Weak	-3.1	0.6	0.3	IC *	0	NS	+	-	139.2	123.03	NC	123.03	P	2	Weak	P	1
5-Methyl-2,3-hexanedione	13706-86-0	0.06		6.4	34.8	20.6	P	2	Weak	11.8	73.7	42.7	P	2	Weak	25.8	7.5	16.7	P	1	Weak	+	+	258.1	253.7	211.6	211.6	P	1	Weak	P	1
Ethylene glycol dimethacrylate	97-90-5	2.21		5.9	2.6	4.3	N	0	NS	19.5	5.4	12.5	P	1	Weak	82.5	23.7	53.1	P	3	Strong	-	+	563.6	NC	535.43	535.43	P	1	Weak	P	1
N-Butyl glycidyl ether	2426-08-6	1.08		2.7	0.2	1.4	N	0	NS	12.9	4.2	8.5	P	1	Weak	60.3	66.0	NC	P	2	Weak	-	-	185.3	NC	NC	NC	N	0	NS	P	1
Hydroxycitronellal	107-75-5	2.11		17.5	1.5	9.5	P	1	Weak	29.5	5.2	17.4	P	2	Weak	21.4	21.0	21.2	P	1	Weak	+	+	700	35.4	26.8	26.8	P	2	Weak	P	1
d,l-Citronellol	106-22-9	3.56		1.8	0.1	1.0	N	0	NS	3.3	0.1	1.7	N	0	NS	5.7	0.6	3.2	N	0	NS	+	-	92.6	50.31	NC	50.31	P	2	Weak	P	1
Bisphenol A Glycidyl Methacrylate	1																															

Supplemental data 2-1 の続き(2)

Chemical	CAS No.	log Kow	Applicability domain (Pre-/Pro-hapten and metal)	ADRA-DM ⁴						ADRA-WM						DPRA ⁵						h-CLAT ⁵						DEREK ⁵				
				Depletion (%)		Mean (%)	Result	ITS score	Potency class	Depletion (%)		Mean (%)	Result	ITS score	Potency class	Depletion (%)		Mean (%)	Result	ITS score	Potency class	CD86	CD54	CV75 [μg/mL]	EC150 (CD86) [μg/mL]	EC200 (CD54) [μg/mL]	MIT	Result	ITS score	Potency class	Result	ITS score
				NAC	NAL					NAC	NAL					Cys	Lys															
1-Butanol	71-36-3	0.84		0.1	0.8	0.5	N	0	NS	1.2	0.3	0.8	N	0	NS	0.9	0.1	0.5	N	0	NS	-	-	>1000	NC	NC	NC	N	0	NS	N	0
1-Iodohexane	638-45-9	4.05		0.8	1.3	1.1	N	0	NS	1.7	0.0	0.9	N	0	NS	48.7	-0.1	24.4	P	2	Weak	+	-	80	91.01	NC	91.01	P	2	Weak	N	0
2-Acetylcylohexanone	874-23-7	1.34		1.3	0.3	0.8	N	0	NS	11.9	2.8	7.4	P	1	Weak	6.3	21.5	13.9	P	1	Weak	-	+	423	NC	109.7	109.7	P	2	Weak	P	1
2-Fluoro-5-nitroaniline	369-36-8	1.67		2.6	0.0	1.3	N	0	NS	7.5	0.0	3.7	N	0	NS	7.8	0.7	4.3	N	0	NS	-	-	>1000	NC	NC	NC	N	0	NS	P	1
2-Hydroxypropyl methacrylate	923-26-2	0.72		2.4	2.2	2.3	N	0	NS	22.0	3.1	12.6	P	1	Weak	44.6	-1356	NC	P	2	Weak	-	-	>1000	NC	NC	NC	N	0	NS	P	1
3-Phenoxypropiononitrile	3055-86-5	1.59		0.7	4.7	2.7	N	0	NS	0.4	7.6	4.0	N	0	NS	0.0	29.7	14.9	P	1	Weak	-	+	557.1	NC	451.9	451.9	P	1	Weak	N	0
4-Hydroxybenzoic acid	99-96-7	1.39		0.0	-1.4	-0.7	N	0	NS	3.6	2.9	3.3	N	0	NS	1.7	-0.1	0.9	N	0	NS	-	-	600	NC	NC	NC	N	0	NS	N	0
4-Methoxyacetophenone	100-06-1	1.75		3.3	3.3	3.3	N	0	NS	5.7	3.1	4.4	N	0	NS	1.9	0.2	1.1	N	0	NS	-	-	426	NC	NC	NC	N	0	NS	P	1
6-Methylcoumarin	92-48-8	2.06		0.0	1.0	0.5	N	0	NS	3.1	2.9	3.0	N	0	NS	2.3	-0.2	1.2	N	0	NS	-	-	276.9	NC	NC	NC	N	0	NS	N	0
Benzaldehyde	100-52-7	1.71		25.3	2.9	14.1	P	1	Weak	100	13.7	56.8	P	3	Strong	7.2	-1.7	3.6	N	0	NS	+	+	488.4	300.3	259.9	259.9	P	1	Weak	N	0
1-Methoxy-4-methyl-2-nitrobenzene	119-10-8	2.44		0.4	0.8	0.6	N	0	NS	2.0	0.0	1.0	N	0	NS	0.0	0.3	0.2	N	0	NS	+	-	424	86.7	NC	86.7	P	2	Weak	P	1
Chlorobenzene	108-90-7	2.64		0.0	0.7	0.4	N	0	NS	2.2	3.0	2.6	N	0	NS	-1.2	-0.1	0.0	N	0	NS	+	-	498.3	288	NC	288	P	1	Weak	N	0
Clofibrate	637-07-0	3.62		0.3	1.1	0.7	N	0	NS	0.1	0.0	0.1	N	0	NS	0.3	-0.4	0.2	N	0	NS	+	+	>1000	537.2	883.7	537.2	P	1	Weak	N	0
Coumarin	91-64-5	1.51		0.5	3.9	2.2	N	0	NS	1.2	1.5	1.3	N	0	NS	1.0	-14.9	0.5	N	0	NS	-	-	537.4	NC	NC	NC	N	0	NS	N	0
Diethyl phthalate	84-66-2	2.65		0.0	1.7	0.9	N	0	NS	4.0	4.2	4.1	N	0	NS	0.2	2.5	1.4	N	0	NS	-	+	600	NC	296.6	296.6	P	1	Weak	N	0
N,N-Diethyl-m-toluanide	134-62-3	2.26		6.8	0.9	3.9	N	0	NS	13.2	2.8	8.0	P	1	Weak	-0.2	-0.3	0.0	N	0	NS	-	-	504.2	NC	NC	NC	N	0	NS	N	0
N,N-Dimethylformamide	68-12-2	-0.93		0.2	0.1	0.1	N	0	NS	1.0	0.1	0.5	N	0	NS	0.5	-1.7	0.3	N	0	NS	-	-	2500	NC	NC	NC	N	0	NS	N	0
Ethyl benzoyl acetate	94-02-0	1.71		4.4	5.3	4.9	N	0	NS	10.2	4.5	7.4	P	1	Weak	-2.3	1.0	0.5	N	0	NS	-	-	571.1	NC	NC	NC	N	0	NS	N	0
Ethyl vanillin	121-32-4	1.55		1.4	2.1	1.7	N	0	NS	5.4	2.6	4.0	N	0	NS	1.1	45.1	23.1	P	2	Weak	-	-	596.5	NC	NC	NC	N	0	NS	P	1
Glycerol	56-81-5	-1.65		0.3	0.7	0.5	N	0	NS	0.7	0.5	0.6	N	0	NS	-1.1	-4.8	0.0	N	0	NS	-	-	>5000	NC	NC	NC	N	0	NS	N	0
2-Propanol	67-63-0	0.28		0.1	2.8	1.5	N	0	NS	0.7	1.1	0.9	N	0	NS	0.0	2.8	1.4	N	0	NS	-	-	>5000	NC	NC	NC	N	0	NS	N	0
Lactic acid	50-21-5	-0.65		0.0	2.8	1.4	N	0	NS	0.3	0.0	0.2	N	0	NS	1.8	0.1	1.0	N	0	NS	-	-	2800	NC	NC	NC	N	0	NS	N	0
Methyl salicylate	119-36-8	2.6		0.0	0.4	0.2	N	0	NS	3.1	3.0	3.1	N	0	NS	0.9	-16.2	NC	N	0	NS	-	-	542.4	NC	NC	NC	N	0	NS	N	0
Octanoic acid	124-07-2	3.03		0.0	1.2	0.6	N	0	NS	3.6	3.7	3.6	N	0	NS	1.9	1.8	1.9	N	0	NS	-	+	359	NC	158.7	158.7	P	1	Weak	N	0
Methyl 3-bromopropanoate	3395-91-3	1.21		81.3	5.0	43.2	P	2	Weak	98.8	14.3	56.6	P	3	Strong	99.8	84.4	92.1	P	3	Strong	-	-	78	NC	NC	NC	N	0	NS	P	1
Propylparaben	94-13-3	2.98		0.1	1.9	1.0	N	0	NS	1.8	2.0	1.9	N	0	NS	0.0	0.3	0.2	N	0	NS	+	+	106.7	61.4	70.8	61.4	P	2	Weak	N	0
Propylene glycol	57-55-6	-0.78		0.1	2.2	1.1	N	0	NS	0.0	1.0	0.5	N	0	NS	0.0	-9.7	0.0	N	0	NS	-	-	>5000	NC	NC	NC	N	0	NS	N	0
Saccharin	81-07-2	0.45		0.6	0.0	0.3	N	0	NS	0.7	0.0	0.3	N	0	NS	48.7	-2.4	24.4	P	2	Weak	-	-	>1000	NC	NC	NC	N	0	NS	N	0
Streptomycin sulfate	3810-74-0	-11.8		4.9	0.7	2.8	N	0	NS	4.5	0.3	2.4	N	0	NS	-14.4	-1.1	0.0	N	0	NS	-	-	>1000	NC	NC	NC	N	0	NS	P	1
Sulfanilamide	63-74-1	-0.55		0.0	1.4	0.7	N	0	NS	2.7	3.2	3.0	N	0	NS	1.4	-3.3	0.7	N	0	NS	-	-	>1000	NC	NC	NC	N	0	NS	P	1
Sulfanilic acid	121-57-3	-2.08		0.5	0.4	0.5	N	0	NS	0.8	0.0	0.4	N	0	NS	5.3	0.5	2.9	N	0	NS	-	-	>5000	NC	NC	NC	N	0	NS	P	1
Vanillin	121-33-5	1.05		1.5	1.9	1.7	N	0	NS	4.6	3.0	3.8	N	0	NS	-1.0	64.7	32.4	P	2	Weak	-	-	650	NC	NC	NC	N	0	NS	P	1
Sodium lauryl sulfate	151-21-3	1.69		0.2	0.2	0.2	N	0	NS	0.1	0.4	0.3	N	0	NS	35.8	100	67.9	P	3	Strong	-	-	60	NC	NC	NC	N	0	NS	N	0

MA: Michael accepter, SB: Schiff base

¹ Urbisch *et al.* (2015) のデータを引用² Casati S *et al.* (2016) のデータを引用³ J. A. Troutman *et al.* (2011) のデータを引用⁴ Fujita M *et al.* (2019a) のデータを引用したものを斜体で表記した⁵ Takenouchi O *et al.* (2015) のデータを引用

Supplemental data 2-2. 124 化合物における化合物ごとの STS, ITA-SA および ITS-2MA の判定結果

93

Chemical	CAS No.	log Kow	Applicability domain (Pre-/Pro-hapten ^{1,2,3} and metal)	human		LLNA		STS			ITS SA									ITS 2MA		
				Potency category	2 class	Potency category	EC3	using ADRA-DM	using ADRA-DM	using DPRA	using ADRA-DM			using ADRA-WM			using DPRA			using ADRA-DM	using ADRA-DM	using DPRA
											Total score	Potency class (1)	Potency class (2)	Total score	Potency class (1)	Potency class (2)	Total score	Potency class (1)	Potency class (2)			
Diphenylcyclopropenone	886-38-4	3.25		1	P	Extreme	0.003	Strong	Strong	Strong	6	Weak	Strong	6	Weak	Strong	7	Strong	Strong	Strong	Strong	Strong
Oxazolone	15646-46-5	1.51			P	Extreme	0.003	Strong	Strong	Strong	7	Strong	Strong	7	Strong	Strong	7	Strong	Strong	Strong	Strong	Strong
Chlorothalonil	1897-45-6	3.66				Extreme	0.004	Strong	Strong	Strong	7	Strong	Strong	7	Strong	Strong	7	Strong	Strong	Strong	Strong	Strong
Kathon CG	26172-55-4 & 2682-20-4			1	P	Extreme	0.005	Strong	Strong	Strong	7	Strong	Strong	7	Strong	Strong	7	Strong	Strong	Strong	Strong	Strong
<i>p</i> -Benzoquinone	106-51-4	0.25			P	Extreme	0.01	Strong	Strong	Strong	7	Strong	Strong	7	Strong	Strong	7	Strong	Strong	Strong	Strong	Strong
Tetrachloro-salicylanilide	1154-59-2	5.87		1	P	Extreme	0.04	Strong	Strong	Strong	5	Weak	Weak	5	Weak	Weak	5	Weak	Weak	Strong	Strong	Strong
Bandrowski's base	20048-27-5	0.74	pre/pro-MA			Extreme	0.04	Strong	Strong	Strong	7	Strong	Strong	7	Strong	Strong	7	Strong	Strong	Strong	Strong	Strong
4-Nitrobenzyl bromide	100-11-8	2.7				Extreme	0.05	Strong	Strong	Strong	7	Strong	Strong	7	Strong	Strong	7	Strong	Strong	Strong	Strong	Strong
1-Chloro-2,4-dinitrobenzene	97-00-7	2.27		1	P	Extreme	0.05	Strong	Strong	Strong	7	Strong	Strong	7	Strong	Strong	7	Strong	Strong	Strong	Strong	Strong
Potassium dichromate	7778-50-9	-3.59		1	P	Extreme	0.08	Strong	Strong	Strong	6	Weak	Strong	6	Weak	Strong	6	Weak	Strong	Strong	Strong	Strong
Glutaraldehyde	111-30-8	-0.18		2	P	Strong	0.1	Strong	Strong	Strong	6	Weak	Strong	7	Strong	Strong	7	Strong	Strong	Strong	Strong	Strong
Hydroquinone	123-31-9	1.03	pre/pro-MA	3	P	Strong	0.11	Strong	Strong	Strong	7	Strong	Strong	7	Strong	Strong	7	Strong	Strong	Strong	Strong	Strong
Phthalic anhydride	85-44-9	2.07			N	Strong	0.16	Weak	Weak	Weak	4	Weak	Weak	4	Weak	Weak	2	Weak	Weak	Weak	Weak	Weak
Maleic anhydride	108-31-6	1.62				Strong	0.16	Weak	Weak	Weak	5	Weak	Weak	5	Weak	Weak	5	Weak	Weak	Strong	Strong	Strong
1,4-Phenylenediamine	106-50-3	-0.39	pre/pro-MA	1	P	Strong	0.16	Strong	Strong	Strong	7	Strong	Strong	7	Strong	Strong	7	Strong	Strong	Strong	Strong	Strong
Hexyl salicylate	6259-76-3	5.06		4	P	Strong	0.18	Weak	Weak	Weak	2	Weak	Weak	2	Weak	Weak	2	Weak	Weak	Weak	Weak	Weak
Benzyl bromide	100-39-0	2.88				Strong	0.2	Strong	Strong	Strong	6	Weak	Strong	7	Weak	Strong	7	Strong	Strong	Strong	Strong	Strong
Benzoyl peroxide	94-36-0	3.43		3	P	Strong	0.22	Weak	Weak	Weak	4	Weak	Weak	4	Weak	Weak	4	Weak	Weak	Weak	Weak	Weak
Lauryl gallate	1166-52-5	6.21	pre/pro-MA	2	P	Strong	0.3	Strong	Strong	Strong	7	Strong	Strong	7	Strong	Strong	7	Strong	Strong	Strong	Strong	Strong
Propyl gallate	121-79-9	1.79	pre/pro-MA	2	P	Strong	0.32	Weak	Weak	Weak	6	Weak	Strong	6	Weak	Strong	4	Weak	Weak	Strong	Strong	Weak
2,5-Diaminotoluene sulfate	615-50-9	NA	pre/pro-MA	2	P	Strong	0.4	Weak	Weak	Weak	6	Weak	Strong	6	Weak	Strong	6	Weak	Strong	Strong	Strong	Strong
2-Aminophenol	95-55-6	0.6	pre/pro-MA	2	P	Strong	0.4	Strong	Strong	Strong	7	Strong	Strong	7	Strong	Strong	7	Strong	Strong	Strong	Strong	Strong
2-Nitro-1,4-phenylenediamine	5307-14-2	0.55	pre/pro-MA	2	P	Strong	0.5	Weak	Weak	Weak	3	Weak	Weak	3	Weak	Weak	5	Weak	Weak	Weak	Weak	Strong
Chloramine-T dihydrate	149358-73-6	-0.5				Strong	0.6	Weak	Weak	Weak	5	Weak	Weak	5	Weak	Weak	5	Weak	Weak	Strong	Strong	Strong
CD-3	25646-71-3	-3.09	pre/pro-MA			Strong	0.6	Weak	Weak	Weak	6	Weak	Strong	6	Weak	Strong	6	Weak	Strong	Strong	Strong	Strong
Cobalt (II) chloride	7646-79-9	0.85	metal		P	Strong	0.6	Weak	Weak	Weak	3	Weak ^b	Weak ^b	4	Weak	Weak	5	Weak	Weak	Weak ^b	Weak	Weak
Formaldehyde	50-00-0	0.35		2	P	Strong	0.61	Strong	Strong	Strong	5	Weak	Weak	6	Weak	Strong	6	Weak	Strong	Strong	Strong	Strong
Iodopropynyl butylcarbamate	55406-53-6	2.45		4	P	Strong	0.9	Strong	Strong	Strong	6	Weak	Strong	6	Weak	Strong	6	Weak	Strong	Strong	Strong	Strong
1,2-Dibromo-2,4-dicyanobutane	35691-65-7	1.63	pre-MA	2	P	Strong	0.9	Strong	Strong	Strong	7	Strong	Strong	7	Strong	Strong	7	Strong	Strong	Strong	Strong	Strong
Isoeugenol	97-54-1	2.65	pre/pro-MA	2	P	Moderate	1.2	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	3	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	4	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	3	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}
1-Naphthol	90-15-3	2.69	pre-MA			Moderate	1.3	Weak	Weak	Weak	4	Weak	Weak	5	Weak	Weak	4	Weak	Weak	Weak	Weak	Weak
1-Phenyl-1,2-propanedione	579-07-7	1.11				Moderate	1.3	Weak	Weak	Weak	5	Weak	Weak	5	Weak	Weak	6	Weak	Strong	Weak	Weak	Strong
2-Hydroxyethyl acrylate	818-61-1	-0.25		3	P	Moderate	1.4	Weak	Weak	Weak	6	Weak	Strong	6	Weak	Strong	6	Weak	Strong	Strong	Strong	Strong
Glyoxal	107-22-2	-1.66		2	P	Moderate	1.4	Weak	Weak	Weak	3	Weak	Weak	4	Weak	Weak	5	Weak	Weak	Weak	Weak	Strong
Bisphenol A diglycidyl ether	1675-54-3	3.84		3	P	Moderate	1.5	Weak	Weak	Weak	4	Weak	Weak	4	Weak	Weak	5	Weak	Weak	Weak	Weak	Weak
Vinyl pyridine	1337-81-1	1.71				Moderate	1.6	Weak	Weak	Weak	4	Weak	Weak	5	Weak	Weak	6	Weak	Strong	Weak	Weak	Strong
2-Mercaptobenzothiazole	149-30-4	2.86		3	P	Moderate	1.7	Weak	Weak	Weak	5	Weak	Weak	6	Weak	Strong	6	Weak	Strong	Weak	Strong	Strong

Supplemental data 2-2 の続き(1)

Chemical	CAS No.	log Kow	Applicability domain (Pre-/Pro-hapten and metal) ^{1,2,3}	human		LLNA		STS			ITS SA									ITS 2MA		
				Potency category	2 class	Potency category	EC3	using ADRA-DM	using ADRA-DM	using DPRA	using ADRA-DM			using ADRA-WM			using DPRA			using ADRA-DM	using ADRA-DM	using DPRA
											Total score	Potency class (1)	Potency class (2)	Total score	Potency class (1)	Potency class (2)	Total score	Potency class (1)	Potency class (2)			
2-Methyl-2H-isothiazol-3-one	2682-20-4	-0.83		1	P	Moderate	1.9	Strong	Strong	Strong	7	Strong	Strong	6	Weak	Strong	7	Strong	Strong	Strong	Strong	Strong
3-Dimethylamino propylamine	109-55-7	-0.45	pro/pre	2	P	Moderate	2.2	Weak	Weak	Weak	3	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	5	Weak	Weak	3	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	Weak	Weak ^{a,b}
Ethylenediamine	107-15-3	-1.62	pro/pre	3	P	Moderate	2.2	Weak	Weak	Weak	2	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	2	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	2	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}
1,2-Benzisothiazolin-3-one	2634-33-5	0.64		2	P	Moderate	2.3	Strong	Strong	Strong	7	Strong	Strong	7	Strong	Strong	7	Strong	Strong	Strong	Strong	Strong
Methyl pyruvate	600-22-6	-0.96				Moderate	2.4	NS	NS	NS	0	NS	NS	0	NS	NS	0	NS	NS	NS	NS	NS
Methyl 2-nonyanoate	111-80-8	3.1			P	Moderate	2.5	Weak	Weak	Weak	4	Weak	Weak	5	Weak	Weak	6	Weak	Strong	Weak	Weak	Strong
Phenylacetaldehyde	122-78-1	1.54			P	Moderate	3	Weak	Weak	Weak	6	Weak	Strong	6	Weak	Strong	5	Weak	Weak	Strong	Strong	Weak
Cinnamic aldehyde	104-55-2	1.82		2	P	Moderate	3	Weak	Weak	Weak	5	Weak	Weak	6	Weak	Strong	6	Weak	Strong	Weak	Strong	Strong
m-Aminophenol	591-27-5	0.24	pre/pro-MA			Moderate	3.2	Weak	Weak	Weak	3	Weak ^b	Weak ^b	4	Weak	Weak	3	Weak ^b	Weak ^b	Weak ^b	Weak	Weak ^b
Diethyl sulfate	64-67-5	1.14				Moderate	3.3	Weak	Weak	Weak	2	Weak	Weak	2	Weak	Weak	3	Weak	Weak	Weak	Weak	Weak
3-Propylidenephthalide	17369-59-4	2.03	pre		P	Moderate	3.7	Weak	Weak	Weak	2	Weak ^b	Weak ^b	2	Weak	Weak	2	Weak ^b	Weak ^b	Weak ^b	Weak ^b	Weak ^b
Benzylideneacetone	122-57-6	2.04			P	Moderate	3.7	Weak	Weak	Weak	4	Weak	Weak	4	Weak	Weak	5	Weak	Weak	Weak	Weak	Strong
2,4-Heptadienal	5910-85-0	1.86				Moderate	4	Strong	Strong	Strong	6	Weak	Strong	6	Weak	Strong	7	Strong	Strong	Strong	Strong	Strong
Tropolone	533-75-5	0.38				Moderate	4.3	Weak	Weak	Weak	3	Weak	Weak	3	Weak	Weak	3	Weak	Weak	Weak	Weak	Weak
α-Methylcinnamaldehyde	101-39-3	2.37				Moderate	4.5	Weak	Weak	Weak	5	Weak	Weak	3	Weak	Weak	4	Weak	Weak	Weak	Weak	Weak
Nickel (II) sulfate	10101-97-0 / 7786-81-4	NA	metal	2	P	Moderate	4.8	Weak	Weak	Weak	3	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	3	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	3	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}
Tetramethylthiuram disulfide	137-26-8	1.7		3	P	Moderate	5.2	Strong	Strong	Strong	7	Strong	Strong	7	Strong	Strong	7	Strong	Strong	Strong	Strong	Strong
trans-2-Hexenal	6728-26-3	1.58			P	Moderate	5.5	Strong	Strong	Strong	6	Weak	Strong	7	Strong	Strong	7	Strong	Strong	Strong	Strong	Strong
Resorcinol	108-46-3	1.03	pre/pro-MA	4	P	Moderate	5.5	Weak	Weak	Weak	2	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	3	Weak	Weak	3	Weak	Weak	Weak ^{a,b}	Weak	Weak
Diethyl maleate	141-05-9	2.2		2	P	Moderate	5.8	Weak	Weak	Weak	5	Weak	Weak	6	Weak	Strong	6	Weak	Strong	Weak	Strong	Strong
2-Methoxy-4-methyl-phenol	93-51-6	1.88	pre/pro-MA			Moderate	5.8	Weak	Weak	Weak	3	Weak ^b	Weak ^b	4	Weak	Weak	4	Weak	Weak	Weak ^b	Weak	Weak
2-Phenylpropionaldehyde	93-53-8	1.96			P	Moderate	6.3	Weak	Weak	Weak	4	Weak	Weak	5	Weak	Weak	5	Weak	Weak	Weak	Weak	Weak
4-Chloroaniline	106-47-8	1.72				Moderate	6.5	Weak	Weak	Weak	3	Weak	Weak	3	Weak	Weak	3	Weak	Weak	Weak	Weak	Weak
Methyl methanesulfonate	66-27-3	-0.66				Moderate	8.1	Weak	Weak	Weak	2	Weak	Weak	3	Weak	Weak	4	Weak	Weak	Weak	Weak	Weak
Perillaldehyde	2111-75-3	-0.66				Moderate	8.1	Weak	Weak	Weak	5	Weak	Weak	6	Weak	Strong	5	Weak	Weak	Weak	Strong	Weak
5-Methyl-2-phenyl-4H-pyrazol-3-one	89-25-8	2.56				Moderate	8.5	NS	NS	NS	1	NS	NS	1	NS	NS	1	NS	NS	NS	NS	NS
Trimellitic anhydride	552-30-7	1.95				Moderate	9.2	Weak	Weak	Weak	6	Weak	Strong	6	Weak	Strong	3	Weak	Weak	Strong	Strong	Weak
2-Ethylhexyl acrylate	103-11-7	4.09				Weak	10	Weak	Weak	Weak	4	Weak	Weak	4	Weak	Weak	6	Weak	Strong	Weak	Weak	Strong
α-Amylcinnamaldehyde	122-40-7	4.33		4	P	Weak	11	Weak	Weak	Weak	3	Weak	Weak	3	Weak	Weak	3	Weak	Weak	Weak	Weak	Weak
2,3-butanedione	431-03-8	-1.34				Weak	11	Weak	Weak	Weak	5	Weak	Weak	6	Weak	Strong	6	Weak	Strong	Weak	Strong	Strong
N-Butyl acrylate	141-32-2	2.2				Weak	11	Weak	Weak	Weak	4	Weak	Weak	5	Weak	Weak	5	Weak	Weak	Weak	Strong	Strong
R-Carvone	6485-40-1	3.07		4	P	Weak	13	Weak	Weak	Weak	4	Weak	Weak	4	Weak	Weak	4	Weak	Weak	Weak	Weak	Weak
Citral	5392-40-5	3.45		3	P	Weak	13	Strong	Strong	Strong	5	Weak	Weak	5	Weak	Weak	5	Weak	Weak	Strong	Strong	Strong
Eugenol	97-53-0	2.73	pre/pro-MA	3	P	Weak	13	Weak	Weak	Weak	4	Weak	Weak	5	Weak	Weak	4	Weak	Weak	Weak	Weak	Weak
Abietic acid	514-10-3	6.46	pre	3	P	Weak	15	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	4	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	4	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	4	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}
Oxalic acid	144-62-7	-1.74				Weak	15	Weak	Weak	Weak	1	NS	NS	1	NS	NS	1	NS	NS	Weak	Weak	Weak
Lylal	31906-04-4	3.32		2	P	Weak	17	Weak	Weak	Weak	5	Weak	Weak	5	Weak	Weak	4	Weak	Weak	Weak	Weak	Weak

Supplemental data 2-2 の続き(2)

Chemical	CAS No.	log Kow	Applicability domain (Pre-/Pro-hapten ^{1,2,3} and metal)	human		LLNA		STS			ITS SA									ITS 2MA		
				Potency category	2 class	Potency category	EC3	using ADRA-DM	using ADRA-DM	using DPRA	using ADRA-DM			using ADRA-WM			using DPRA			using ADRA-DM	using ADRA-DM	using DPRA
											Total score	Potency class (1)	Potency class (2)	Total score	Potency class (1)	Potency class (2)	Total score	Potency class (1)	Potency class (2)			
4-Allylanisole	140-67-0	3.47	pro-MA			Weak	18	Weak	Weak	Weak	3	Weak	Weak	4	Weak	Weak	4	Weak	Weak	Weak	Weak	Weak
Lilial	80-54-6	4.36		4	P	Weak	19	Weak	Weak	Weak	4	Weak	Weak	4	Weak	Weak	3	Weak	Weak	Weak	Weak	Weak
Phenyl benzoate	93-99-2	3.04		3	P	Weak	20	Weak	Weak	Weak	3	Weak	Weak	3	Weak	Weak	5	Weak	Weak	Weak	Weak	Weak
Cinnamyl alcohol	104-54-1	1.84	pro/pre	3	P	Weak	21	Weak	Weak	Weak	2	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	2	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	2	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}
Benzocaine	94-09-7	1.8	pre/pro-SB	4	P	Weak	22	Weak	Weak	Weak	3	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	3	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	6	Weak	Strong	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	Strong
Imidazolidinyl urea	39236-46-9	-8.28		3	P	Weak	24	Weak	Weak	Weak	5	Weak	Weak	5	Weak	Weak	5	Weak	Weak	Weak	Weak	Weak
Geraniol	106-24-1	3.47	pro/pre	4	P	Weak	26	Weak	Weak	Weak	4	Weak	Weak	4	Weak	Weak	3	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	Weak	Weak	Weak ^{a,b}
5-Methyl-2,3-hexanedione	13706-86-0	0.06		3	P	Weak	26	Weak	Weak	Weak	4	Weak	Weak	4	Weak	Weak	3	Weak	Weak	Weak	Weak	Weak
Ethylene glycol dimethacrylate	97-90-5	2.21		4	P	Weak	28	Weak	Weak	Weak	2	Weak	Weak	3	Weak	Weak	5	Weak	Weak	Weak	Weak	Strong
N-Butyl glycidyl ether	2426-08-6	1.08		3	P	Weak	31	NS	Weak	Weak	1	NS	NS	2	Weak	Weak	3	Weak	Weak	NS	Weak	Weak
Hydroxycitronellal	107-75-5	2.11		4	P	Weak	33	Weak	Weak	Weak	4	Weak	Weak	5	Weak	Weak	4	Weak	Weak	Weak	Weak	Weak
d,l-Citronellol	106-22-9	3.56		5	N	Weak	44	Weak	Weak	Weak	3	Weak	Weak	3	Weak	Weak	3	Weak	Weak	Weak	Weak	Weak
Bisphenol A Glycidyl Methacrylate	1565-94-2	4.94				Weak	45	Weak ^b	Weak ^b	Weak ^b	2	Weak ^b	Weak ^b	2	Weak ^b	Weak ^b	2	Weak ^b	Weak ^b	Weak ^b	Weak ^b	Weak ^b
2-Ethylbutyraldehyde	97-96-1	1.73				Weak	76	Weak	Weak	Weak	5	Weak	Weak	5	Weak	Weak	5	Weak	Weak	Strong	Strong	Strong
Aniline	62-53-3	1.08	pre/pro-MA	4	P	Weak	89	Weak	Weak	Weak	2	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	2	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	2	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}	Weak ^{a,b}
Nonanoic acid	112-05-0	3.52				Weak	21	Weak	Weak	Weak	2	Weak	Weak	2	Weak	Weak	2	Weak	Weak	Weak	Weak	Weak
1-Bromobutane	109-65-9	2.56				NS	NC	Weak	Weak	Weak	1	NS	NS	1	NS	NS	1	NS	NS	Weak	Weak	Weak
1-Butanol	71-36-3	0.84		6	N	NS	NC	NS	NS	NS	0	NS	NS	0	NS	NS	0	NS	NS	NS	NS	NS
1-Iodohexane	638-45-9	4.05				NS	NC	Weak	Weak	Weak	2	Weak	Weak	2	Weak	Weak	4	Weak	Weak	Weak	Weak	Weak
2-Acetylcyclohexanone	874-23-7	1.34				NS	NC	Weak	Weak	Weak	3	Weak	Weak	4	Weak	Weak	4	Weak	Weak	Weak	Weak	Weak
2-Fluoro-5-nitroaniline	369-36-8	1.67				NS	NC	NS	NS	NS	1	NS	NS	1	NS	NS	1	NS	NS	NS	NS	NS
2-Hydroxypropyl methacrylate	923-26-2	0.72				NS	NC	NS	Weak	Weak	1	NS	NS	2	Weak	Weak	3	Weak	Weak	NS	Weak	Weak
3-Phenoxypropiononitrile	3055-86-5	1.59				NS	NC	Weak	Weak	Weak	1	NS	NS	1	NS	NS	2	Weak	Weak	Weak	Weak	Weak
4-Hydroxybenzoic acid	99-96-7	1.39			N	NS	NC	NS	NS	NS	0	NS	NS	0	NS	NS	0	NS	NS	NS	NS	NS
4-Methoxyacetophenone	100-06-1	1.75			N	NS	NC	NS	NS	NS	1	NS	NS	1	NS	NS	1	NS	NS	NS	NS	NS
6-Methylcoumarin	92-48-8	2.06			N/S	NS	NC	NS	NS	NS	0	NS	NS	0	NS	NS	0	NS	NS	NS	NS	NS
Benzaldehyde	100-52-7	1.71		5	N	NS	NC	Weak	Weak	Weak	2	Weak	Weak	4	Weak	Weak	1	NS	NS	Weak	Strong	Weak
1-Methoxy-4-methyl-2-nitrobenzene	119-10-8	2.44				NS	NC	Weak	Weak	Weak	3	Weak	Weak	3	Weak	Weak	3	Weak	Weak	Weak	Weak	Weak
Chlorobenzene	108-90-7	2.64				NS	NC	Weak	Weak	Weak	1	NS	NS	1	NS	NS	1	NS	NS	Weak	Weak	Weak
Clofibrate	637-07-0	3.62				NS	NC	Weak	Weak	Weak	1	NS	NS	1	NS	NS	1	NS	NS	Weak	Weak	Weak
Coumarin	91-64-5	1.51		3	P	NS	NC	NS	NS	NS	0	NS	NS	0	NS	NS	0	NS	NS	NS	NS	NS
Diethyl phthalate	84-66-2	2.65		6	N	NS	NC	Weak	Weak	Weak	1	NS	NS	1	NS	NS	1	NS	NS	Weak	Weak	Weak
N,N-Diethyl-m-toluidide	134-62-3	2.26				NS	NC	NS	Weak	NS	0	NS	NS	1	NS	NS	0	NS	NS	NS	Weak	NS
N,N-Dimethylformamide	68-12-2	-0.93				NS	NC	NS	NS	NS	0	NS	NS	0	NS	NS	0	NS	NS	NS	NS	NS
Ethyl benzoyl acetate	94-02-0	1.71				NS	NC	NS	Weak	NS	0	NS	NS	1	NS	NS	0	NS	NS	NS	Weak	NS
Ethyl vanillin	121-32-4	1.55				NS	NC	NS	NS	Weak	1	NS	NS	1	NS	NS	3	Weak	Weak	NS	NS	Weak
Glycerol	56-81-5	-1.65		6	N	NS	NC	NS	NS	NS	0	NS	NS	0	NS	NS	0	NS	NS	NS	NS	NS

Supplemental data 2-2 の続き(3)

Chemical	CAS No.	log Kow	Applicability domain (Pre-/Pro-hapten ^{1,2,3} and metal)	human		LLNA		STS			ITS SA									ITS 2MA		
				Potency category	2 class	Potency category	EC3	using ADRA-DM	using ADRA-DM	using DPRA	using ADRA-DM			using ADRA-WM			using DPRA			using ADRA-DM	using ADRA-DM	using DPRA
											Total score	Potency class (1)	Potency class (2)	Total score	Potency class (1)	Potency class (2)	Total score	Potency class (1)	Potency class (2)			
2-Propanol	67-63-0	0.28		5	N	NS	NC	NS	NS	NS	0	NS	NS	0	NS	NS	0	NS	NS	NS	NS	NS
Lactic acid	50-21-5	-0.65		6	N	NS	NC	NS	NS	NS	0	NS	NS	0	NS	NS	0	NS	NS	NS	NS	NS
Methyl salicylate	119-36-8	2.6		5	N	NS	NC	NS	NS	NS	0	NS	NS	0	NS	NS	0	NS	NS	NS	NS	NS
Octanoic acid	124-07-2	3.03		6	N	NS	NC	Weak	Weak	Weak	1	NS	NS	1	NS	NS	1	NS	NS	Weak	Weak	Weak
Methyl 3-bromopropanoate	3395-91-3	1.21				NS	NC	Weak	Weak	Weak	3	Weak	Weak	4	Weak	Weak	4	Weak	Weak	Weak	Weak	Weak
Propylparaben	94-13-3	2.98		5	N	NS	NC	Weak	Weak	Weak	2	Weak	Weak	2	Weak	Weak	2	Weak	Weak	Weak	Weak	Weak
Propylene glycol	57-55-6	-0.78		5	N	NS	NC	NS	NS	NS	0	NS	NS	0	NS	NS	0	NS	NS	NS	NS	NS
Saccharin	81-07-2	0.45				NS	NC	NS	NS	Weak	0	NS	NS	0	NS	NS	2	Weak	Weak	NS	NS	Weak
Streptomycin sulfate	3810-74-0	-11.8			P	NS	NC	NS	NS	NS	1	NS	NS	1	NS	NS	1	NS	NS	NS	NS	NS
Sulfanilamide	63-74-1	-0.55			N	NS	NC	NS	NS	NS	1	NS	NS	1	NS	NS	1	NS	NS	NS	NS	NS
Sulfanilic acid	121-57-3	-2.08				NS	NC	NS	NS	NS	1	NS	NS	1	NS	NS	1	NS	NS	NS	NS	NS
Vanillin	121-33-5	1.05		5	N	NS	NC	NS	NS	Weak	1	NS	NS	1	NS	NS	3	Weak	Weak	NS	NS	Weak
Sodium lauryl sulfate	151-21-3	1.69		6	N	False Pos.	14	NS	NS	Weak	0	NS	NS	0	NS	NS	3	Weak	Weak	NS	NS	Weak

MA: Michael accepter, SB: Schiff base

¹ Urbisch *et al.* (2015) のデータを引用

² Casati S *et al.* (2016) のデータを引用

³ J. A. Troutman *et al.* (2011) のデータを引用

^a 適用範囲外かつ陰性の結果を考慮し、ヒトに対する 3 クラスの感作強度予測においては除外した。

^b 適用範囲外かつ陰性の結果を考慮し、LLNA に対する 3 クラスの感作強度予測においては除外した。