

200938011A

厚生労働科学研究費補助金
労働安全衛生総合研究事業

化学物質の国際調和分類基準（GHS）に対応した感作性化学物質のリスト作りとその応用による化学物質の安全使用

平成21年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 日下幸則

平成22（2010）年3月

目次

I. 総括研究報告書

- 化学物質の国際調和分類基準(GHS)に対応した感作性化学物質
のリスト作りとその応用による化学物質の安全使用 1

II. 分担研究報告書

1. 新感作性物質分類の提案 5
佐藤一博他
2. 構造相関活性 (QSAR) ソフトによる皮膚感作性物質の予知
予測検討 12
佐藤一博他
3. ミョウガのアレルギー性接触皮膚炎の原因物質の検討 18
皆本景子他
4. 構造相関活性 (QSAR) ソフトによる気道感作性物質の予知予測
の検討 20
佐藤一博他

III. 研究成果資料 28

1. 宮川宗之. 化学物質の危険有害性に関する分類・表示の世界調和システム(GHS)とわが国における実施について. 日衛誌 65(1): 5-13, 2010.
2. 青山公治. 動物による皮膚および呼吸器感作性試験の最近の動向
日衛誌 65(1): 14-19, 2010.
3. 皆本景子. 化粧品、医薬部外品性文中の皮膚感作性物質と接触皮膚炎.
日衛誌 65(1): 20-29, 2010.
4. 家庭用品に使用される化学物質による健康被害と安全対策. 日衛誌
65(1): 30-36, 2010.
5. Sato K, Umemura T, Tamura T, Kusaka Y, Aoyama K, Ueda A, Harada K,
Minamoto K, Otsuki T, Yamashita K, Takeshita T, Shibata E, Dobashi K,
Kame S, Miyagawa M, Kaniwa M, Endo Y, Yuta K. Skin sensitization study
by Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR). AATEX 14:
940-946, 2009.

平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金（労働安全衛生総合研究事業）

総括研究報告

化学物質の国際調和分類基準(GHS)に対応した感作性化学物質のリスト作りとその応用による化学物質の安全使用

主任研究者：日下幸則（福井大学医学部環境保健学）

研究要旨：

化学物質の危険・有害性の絵表示や化学物質安全性データシート(MSDS)の交付が、2008 年度から Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS、国際調和分類基準)により世界的に統一された。(独)製品評価技術基盤機構(NITE)が行なった絵表示や MSDS を交付すべき 1500 の化学物質の分類作業の期間、気道感作性物質については我々の作成した感作性物質リスト（職業・環境アレルギー誌：12(1):95-97,2004）が和文英文とも判定基準に採用されていた。

我国の日本産業衛生学会による感作性物質の分類基準では、その根拠としてヒトの報告（症例、疫学、検査）のみを採用しており、動物実験の結果を根拠として採用していない。ヨーロッパ共同体(EU)や GHS の基準は動物実験の結果も採用している。そこで、調査検討を重ね、動物実験結果を根拠として取り入れた皮膚・気道感作性分類基準を新たに独自に作成し、既存の感作性物質リストを再分類した。

環境意識の高まりにより有害物質そのものを作らないという「生産前対策」を究極の目標とする「グリーンケミストリー」なる分野が注目を集めている。これは、コンピューターソフト（QSAR（Quantitative Structure-Activity Relationship：定量的構造活性相関）ソフトを用いて、化合物生産前に対象化合物の種々毒性を立体構造式より知る（予測）必要がある。QSAR ソフトに関しては、富士通（株）から情報を得て、我国初の皮膚感作性 QSAR モデル及び世界的にも稀有な気道感作性 QSAR モデルを作成した。

<分担研究者>

青山公治 鹿児島大学医学部衛生学

上田 厚 熊本大学医学部衛生学

原田幸一 熊本大学医学部保健学科

大槻剛己 川崎医科大学医学部衛生学

柴田英治 愛知医科大学医学部衛生学

竹下達也 和歌山県立大学医学部衛生学

山下邦彦 ダイセル化学工業(株)評価解析
センター

土橋邦生 群馬大学医学部保健学科

佐藤一博 福井大学医学部環境保健学

皆本景子 熊本大学医学部衛生学

梅村朋弘 福井大学医学部環境保健学

田村太朗 福井大学医学部環境保健学

<研究協力者>

宮川宗之 労働安全衛生総合研究所

鹿庭正昭 国立医薬品食品衛生研究所

亀尾聡美 群馬大学医学部公衆衛生学

井戸敏子 福井大学医学部皮膚科

A. 研究目的

化学物質の危険・有害性の絵表示やMSDSの交付が、2008年度からGHS（国際調和分類基準）により世界的に統一された。GHS省庁連絡会議が行い（独）製品評価技術基盤機構(NITE)のホームページにある絵表示やMSDSを交付すべき1500の化学物質の分類作業のうち、感作性物質については我々の作成した感作性物質リスト（職業・環境アレルギー誌：12(1):95-97,2004）が和文英文とも判定基準に採用されていた。

我国の感作性物質の分類基準では、その根拠としてヒトの報告（症例、疫学、検査）のみを採用しており、動物実験の結果を根拠として採用しておらず検討が必要である。ヨーロッパの基準は動物実験の結果も採用しており、調査が必要である。

従来分類では、ヒトにおける疫学研究および症例報告の情報を基に化学物質を二群に分類してきた。これは、ヒトへの感作性を問題にした場合に極めて直接的な分類根拠であり、動物実験の結果の取り扱いにおいて常に問題となる、ヒトへの外挿の不確実性を考慮する必要がなく、簡便で合理的な分類基準である。しかしながら、一方で近年の動物を用いる試験手法は大きな進歩をとげた。たとえば皮膚感作性に関しては、Local Lymph Node Assay(LLNA)法が独立した皮膚感作性試験手法としてOECD(OECD No.429)に採択された。また、それにより明らかになってきたヒトでの試験結果との相関に関する報告をみた場合、限られた物質のデータではある定性的相関に加え、定量的相関もあることが示

唆されている。更に、原理の異なる複数の試験手法が確立されたことにより、ひとつの化学物質に対して、多面的な考察を行うことも可能となった。一方、呼吸器感作性に関しては、皮膚感作性試験と比較して、評価された物質の種類が少なく、比較しうるヒトでの情報も少ないことから、現時点で評価に値する試験手法を限定することはできないが、逆にすべてを棄却することも適当ではないと判断した。即ち、皮膚感作性および呼吸器感作性のいずれにおいても、化学物質のヒトに対する感作性を、動物実験の結果をもとに予測することは、科学的にみて十分根拠があり労働災害の予防の立場からも望ましいと思われ、動物試験を取り入れた呼吸器及び皮膚感作性分類基準を作成した。既感作性物質を再分類した。ヨーロッパ共同体(EU)では、2007年より化学物質の登録、評価、認可及び制限(REACH)が導入され、EUで年間1トン以上生産または持ち込まれる化学物質はヒトに対する健康影響と環境影響を調べなければならなくなった。REACHは、*in vitro*やコンピューターを用いた代替法を推奨している。しかし現在感作性に関しては、確立した*in vitro*検査はなくコンピューターを持ちいた定量的構造活性相関(QSAR)ソフトしかない。更に、EUでは動物実験により安全性（主に皮膚感作性試験）が確認された化粧品の販売が禁止された（EU化粧品指令第7次改正）。皮膚感作性に関しては、QSARソフトの開発が急務である。また、環境意識の高まりにより有害物質そのものを作らないという「生産前対策」を究極の目標とする「グリーンケミストリー」が注目を集めている。

以上の事からコンピューターを用いた化学物質の2次3次構造から定量的構造活性相関 QSAR(quantitative structure-activityrelationships)により毒性を立体構造式より知る(予測)分野が急速に注目を集めている。今回、皮膚感作性及び呼吸器感作性物質の QSAR ソフトを作成した。

B. 研究方法

1. 新感作性分類基準の提案

現在我国の感作性分類基準は根拠として、動物実験の結果を取り入れていない。そこで化学物質管理の専門家による班会議を重ね、気道皮膚感作とも動物実験の結果を取り入れた分類基準を作成し、現在ある感作性分類リストを再分類した。

2. 皮膚感作性物質の定量的構造活性相関(QSAR) ソフトの開発

これは世界で最も進んでいるドイツ学術振興協会(DFG)の MAK(許容濃度)委員会の感作性物質リストから皮膚感作性物質を GHS 省庁連絡会議が分類し製品評価技術基盤機構(NITE)のホームページにある非皮膚感作性物質をコントロールとして ADMEWORKS/ModelBuilder(富士通九州システムズ)を用いて我国は初の皮膚感作性 QSAR モデルを作成した。

3. 呼吸器感作性物質の定量的構造活性相関(QSAR)の開発

呼吸器感作性物質に関しては公表されている数が最も多いと思われるEUの欧州化学品庁(ECB)のR42とR42/43を呼吸器感作性物質に GHS 省庁連絡会議が分類し製品評価技術基盤機構(NITE)のホームペー

ジにある非皮膚感作性物質(かつ呼吸器感作性物質とは分類不能)をコントロールとして ADMEWORKS/ModelBuilder(富士通九州システムズ)を用いて世界的にも稀有な呼吸器感作性 QSAR モデルを作成した。

C. 研究結果

1. 新感作性分類基準の提案

ヒトにおける皮膚感作性及び呼吸器感作性の予測における動物実験の情報の利用について、以下に案を示す。今回は、あくまでヒトに対する感作性の分類という観点から、呼吸器感作性に関しては従来の第一群の判定基準は変更しないが、皮膚感作性に関しては確立した動物実験手法があるため第三群の判定基準にも動物実験を取り入れた。呼吸器感作性に関しては、評価に値する結果を得るための、動物実験の試験手法の一定の基準を示す形で、第三群の判断基準に取り入れた。

我国の感作性物質リストを上記の新しい感作性分類基準で再分類した。

2. 皮膚感作性物質の定量的構造活性相関(QSAR) ソフトの開発

皮膚感作性 122 物質及びコントロール 169 物質の計 291 物質の二次元三次元構造から ADMEWORKS により約 800 のパラメーターを創出し、特徴抽出により 47 パラメーターセット 32 パラメーターセットを作った。2 つのパラメーターセットを用いて種々の判別分析を行い、分類率・予測率を計算した。100%の完全分類が 32 パラメーターセットの Support Vector Machine(SVM)と AdaBoost で得られ、leave-ten-out による交差検定で 47 パラメーターセット

を用いた Neural Network (NN)で 81.44%の予測率が得られた。

3. 呼吸器感作性物質の定量的構造活性相関 (QSAR) の開発

61の呼吸器感作性物質と153のコントロール物質の計214物質の二次元三次元構造からADMEWORKSにより約800のパラメーターを創出し特徴抽出により12のパラメーターセットとした。この12のパラメーターセットを用いて種々の判別分析を行い、分類率・予測率を計算した。100%の完全分類が線形最小二乗アルゴリズム(TILSQ)、線形学習機械法(LLM)とAdaBoostで得られた(分類率99.53%~100%)。予測率はSVMで97.2%であった(予測率95.33%~97.2%)。

D. 考察

1. 新感作性分類基準の提案

我国の感作性分類も動物実験の結果を取り入れた基準ができた。新しい分類基準で再分類した感作性物質リストとともに、来年度公表する(産衛誌52(5), 2010 予定)。また感作性物質リストはドイツ MAK や EUの ECBのようにリストの拡大も必要と思われる。

2. 皮膚感作性物質の定量的構造活性相関 (QSAR) の開発

我国初の皮膚感作性が出来た。今後、新たな皮膚感作性物質とコントロール物質を用い OECD ガイドラインに沿った外的妥当性の検証を行なう予定である。また化粧品や色素に限った皮膚 QASR ソフトも開発も行なう予定である。今回の結果は、論文

として公表した。

3. 呼吸器感作性物質の定量的構造活性相関 (QSAR) の開発

呼吸器感作は皮膚感作に比べて重篤となることがあるが、頻度は皮膚感作に比べて少ない。呼吸器感作性物質の数も少なく、特にコントロールとしての非呼吸器感作性物質は皆無に等しい。今回特徴抽出がうまくいき、分類率・予測率も非常に高い QSAR モデルができた。現在論文投稿準備中である。

E. 結論

項目1. 2. 3は平成22年度の研究計画を達成できた。

F. 謝辞

本研究を進めるにあたり、東京労災病院産業中毒センター所長圓藤陽子先生に指導助言を頂き深謝致します。

平成21年度厚生労働科学研究費補助金（労働安全衛生総合研究事業）
分担研究報告1

新感作性物質分類の提案

分担研究者	佐藤一博（福井大学医学部環境保健学）
主任研究者	日下幸則（福井大学医学部環境保健学）
分担研究者	青山公治（鹿児島大学医学部衛生学）
分担研究者	上田 厚（熊本大学医学部衛生学）
分担研究者	原田幸一（熊本大学医学部保健学科）
分担研究者	大槻剛己（川崎医科大学医学部衛生学）
分担研究者	柴田英治（愛知医科大学医学部衛生学）
分担研究者	竹下達也（和歌山県立大学医学部公衆衛生学）
分担研究者	山下邦彦（ダイセル化学工業(株)評価解析センター）
分担研究者	土橋邦生（群馬大学医学部保健学科）
分担研究者	皆本景子（熊本大学医学部衛生学）
分担研究者	梅村朋弘（福井大学医学部環境保健学）
分担研究者	田村太朗（福井大学医学部環境保健学）
研究協力者	宮川宗之（労働安全衛生総合研究所）
研究協力者	鹿庭正昭（国立医薬品食品衛生研究所）
研究協力者	亀尾聡美（群馬大学医学部公衆衛生学）
研究協力者	井戸敏子（福井大学医学部皮膚科）

研究要旨：

我国の感作性物質の分類基準は、人間における疫学研究及び症例報告の情報を基に皮膚・気道感作性物質とも分類しており動物実験の結果を考慮していない。しかし、感作性についての動物実験の信頼性は高くなっており、人間の感作性との間に定性的だけでなく定量的にも相関が見られるようになってきた。

そこで、昨年度に続き米国産業衛生専門家会議(ACGIH)・ドイツ学術振興協会(DFG)の許容濃度委員会(MAK)委員会・ヨーロッパ共同体(EU)の欧州化学庁(ECB)・ドイツの皮膚科医等が作成した分類基準等を検討し班会議を重ね、我国に適合した動物実験の結果を考慮した感作性物質分類基準をまとめた。これを用いて既に公表されている感作性物質リストの物質を再分類した。

要約すると、人間に感作を起こす確からしさに基づいて1群（人間に対して明らかに感作性がある物質）、2群（人間に対しておそらく感作性がある物質）、3群（動物試験などにより人間に対して感作性が懸念される物質）に分類される。気道皮膚感作も第3群の根拠にも動物実験法の基準を示す形で取り入れている。

この結果を感作性物質リストとともに来年度公表する予定である。

A. 研究目的

我国の感作性物質の分類基準は、皮膚気道感作性物質とも動物実験の結果を考慮していない。しかし、感作性についての動物実験の精度は高くなっており、世界的にも人間の感作性の分類基準に取り入れられるようになってきた。

従来、人間における疫学研究および症例報告の情報を基に化学物質を二群に分類してきた。これは、人間への感作性を問題にした場合に極めて直接的な分類根拠であり、動物実験の結果の取り扱いにおいて常に問題となる、人間への外挿の不確実性を考慮する必要がなく、簡便で合理的な分類基準である。しかしながら、一方で近年の動物を用いる試験手法は大きな進歩をとげた。たとえば皮膚感作性に関しては、Local Lymph Node Assay(LLNA)法が独立した皮膚感作性試験手法として OECD(OECD No.429)に採択された。また、それにより明らかになってきた人間での試験結果との相関に関する報告をみた場合、限られた物質のデータではあるが、動物実験の結果と人間の結果に、従来の定性的相関に加え、定量的相関もあることが示唆されている。更に、原理の異なる複数の試験手法が確立されたことにより、ひとつの化学物質に対して、多面的な考察を行うことも可能となった。一方、呼吸器感作性に関しては、これまでのところ公的に認められた、確立した試験手法はない。しかしながら、過去に報告された論文を調査した結果、卵白アルブミン(OVA)を用いたモデルが多い中で、人間において呼吸器感作性が報告されている無水トリメリット酸(TMA)やトルエンジイソシアネート(TDI)等を用いた検討も多く

なされており、動物においてもそれらの呼吸器アレルギー反応が検出されている。皮膚感作性試験と比較して、評価された物質の種類が少なく、比較しうる人間での情報も少ないことから、現時点で評価に値する試験手法を限定することはできないが、逆にすべてを棄却することも適当ではないと判断した。即ち、皮膚感作性および呼吸器感作性のいずれにおいても、化学物質の人間に対する感作性を、動物実験の結果をもとに予測することは、科学的にみて十分根拠があり、労働災害の予防の立場からも望ましいと判断した。

感作性物質分類基準及び分類リストを改訂することにした。

B. 研究方法

2009年度版国際調和分類基準(GHS)の感作性の分類基準、ドイツ学術振興協会(DFG)のMAK(許容濃度委員会)の分類基準、ヨーロッパ共同体(EU)のECBの基準、ドイツの皮膚科医等による基準、アメリカACGIH(米国産業衛生専門官会議)によるそれぞれ感作性の分類基準を考察し、班会議により、我国に適応した感作性の分類基準を作成し、感作性物質リストの物質も再分類することにした。

1. 現行の日本産業衛生学会(OEL)の分類基準・リスト

一日本産業衛生学会許容濃度等委員会の感作性分類基準¹⁾

IV. 感作性物質

感作性物質を、反応の場としての気道と皮膚に分けて基準を設け、「人間に対して明らかに感作性がある物質(第1群)」と、「人間に対しておそらく感作性があると考

えられる物質（第2群）」に分類する。第1群及び第2群の分類の基準は、以下のごとくである。

なお、感作性のある物質の許容濃度の勧告にあたっては、労働者の感作の予防、または感作成立後の感作反応の発生予防が、必ずしも考慮されていないことに注意すること。

1. 気道感作性物質

第1群

① 曝露状況、呼吸器症状、特異抗体およびアレルギー素因との関連を明確に示した疫学的研究があるとともに、

② 呼吸器症状の有症者としての下記の条件のいずれかを満たす症例研究が、異なる研究機関から報告されていること。

1. 曝露と呼吸器症状との間に関連性があると同時に、同物質に対する特異抗体が検出されるか、皮内試験が陽性反応を示すこと。
2. 曝露と呼吸器症状との間に関連性があると同時に、特異的吸入誘発試験で陽性反応を呈すること。但し、それが非アレルギー反応でないことを間接的にでも支持する証拠があること。

第2群

上記に準ずるものであるが、疫学的研究では、必ずしも明確にされていない物質。

2. 皮膚感作性物質

第1群

① 曝露状況、接触皮膚炎症状およびパッチテスト（皮膚貼付試験）との関

連性を明確に示した疫学的研究があり、かつ、

② 皮膚炎症状とパッチテストとの関係を検討した症例研究が異なる研究機関から報告されていること。実施されたパッチテストは、対照を設けた適切な方法のものであること。

第2群

上記に準ずるものであるが、疫学的研究は、必ずしも明確にされていない物質。

—現在の我国の感作性物質リスト—

気道

第1群 (11)

グルタルアルデヒド、ヘキサ-1,6-ジイソシアネート、コバルト、ベリリウム、コロホニウム（ロジン）、無水トリメット酸、ジフェニルメタン-4,4'-ジイソシアネート（MDI）、無水フタル酸、トルエンジイソシアネート（TDI）、メチルテトラヒドロ無水フタル酸、白金

第2群(7)

エチレンジアミン、ホルムアルデヒド、クロム、メタクリル酸メチル、ニッケル、無水マレイン酸、ピペラジン

皮膚

第1群(14)

エチレンジアミン、ニッケル、クロム、白金、グルタルアルデヒド、*o*-, *m*-, *p*-フェニレンジアミン、コバルト、ホルムアルデヒド、コロホニウム（ロジン）、水銀、ロジウム、チウラム#

第2群(18)

アクリル酸ブチル、アクリル酸メチル、エ

チレンオキシド、過酸化ジベンゾイル、ジクロロプロパン、テレピン油、トルエンジイソシアネート(TDI)、銅、ヒドラジン、ヒドロキノン、フタル酸ジブチル、ベリリウム、ベンゾフラン、ポリ塩化ビニル、レゾルシノール、メタクリル酸メチル、無水マレイン酸、ヨウ素

2. 国際調和分類基準 (GHS) の感作性分類基準²⁾

2009年第3版の国際調和分類基準の感作性分類は、Category 1をSub-category 1A(strong sensitizer)とSub-category 1B(other sensitizer)に細分類している。感作性物質の分類基準に動物実験の結果を取り入れており、皮膚感作性に関しては、ヒトの報告よりも、扱いやすさと再現性が動物実験の報告の方が優れているとしている。但し、気道感作性に関しては確立した(OECDで承認された)動物実験が無いためそのみでは気道感作性物質には挙げられていない。そのため、Categoryの細分類には動物実験の定量的なデータが必要となるため皮膚感作のみ細分類が適応となる。

2. ドイツ MAK (許容濃度委員会) の分類基準³⁾

感作性物質を Sufficient, 2. Probable, 3. Not sufficient の3つのカテゴリーに分類していて 1,2 を感作性物質に挙げているが、3.も必ずしも除外せず考慮している。

1. Sufficient

①曝露と感作症状の明確な多機関により多数の症例疫学的報告があること。

②皮膚感作の場合、適切なガイドラインに基づく動物実験による場合であること。adjuvant を使用しない複数の適切な動物実験の陽性結果のみで 'Sufficient evidence' としている。皮膚感作の評価は動物実験が優れている、としている。

2. Probable

①曝露と感作症状の明確な複数の症例報告や疫学的報告が、一機関だけによる場合。

②皮膚感作の場合、adjuvant を使用した複数の適切な動物実験の陽性結果のみの場合。

3. Not sufficiently, but also not excluded

一方、気道感作の動物実験のみの報告は、承認されたガイドラインに基づく動物実験がないので、原則感作性物質(1と2)には挙げていない。一例の症例報告も感作性物質に挙げていない。

3. ヨーロッパ共同体(EU)の欧州化学庁(ECB)の基準⁴⁾

ECB (European Chemical Bureau, Ispra, Italy, EU)は、ヒトでの報告・疫学データ以外にも、適切な動物実験陽性結果のみでも、気道感作 R42 や皮膚感作 R43 や気道感作かつ皮膚感作 R42/43 を付けている。適切な気道感作の動物実験として、IgE 測定やモルモットにおける特異的気道反応の動物実験とある。

4. ドイツの皮膚科医等による基準⁵⁾

ドイツの皮膚科医等 34 人の専門家が 16 年間 34 回の委員会を開催し、皮膚感作性の分類基準とともに 244 皮膚感作性物質を報告している(Schlede E et. al,

Toxicology 193, 219-239, 2003)。

Category A: significant contact allergen

しばしばヒトにおいて、陽性報告のある皮膚感作性物質で、集団において1%以上が陽性反応を示す物質。動物実験も考慮する。

Category B: solid-based indications for contact allergen

比較的まれに、ヒトにおいて陽性報告のある皮膚感作性物質で、集団において陽性報告が1%未満の物質。動物実験も考慮する。

Category C: insignificant or questionable contact allergen

ヒトでの報告がほとんどない場合や、単に動物実験の陽性結果のみの場合、**Category C** に分類している。

A, B, C とも感作性物質として挙げている。

5. アメリカの ACGIH の基準⁶⁾

ACGIH (米国産業衛生専門官会議) の感作性物質の符号である 'SEN' は、①皮膚か気道か、あるいはヒトか動物かによる報告の区別を明記していないし、②根拠論文は元の **Documentation** まで辿ればあるが個別に根拠論文は挙げられていない。

以上の世界の分類基準を踏まえ、我国に適合した動物実験の結果を取り入れた感作性物質の分類基準を作成した。

C. 研究結果

新感作性分類基準(案)

[感作性物質の定義]

気道感作性物質とは、その物質により

アレルギー性呼吸器疾患*を誘発する物質とする。

皮膚感作性物質とは、その物質によりアレルギー性皮膚反応を誘発する物質とする。

*鼻炎、喘息、過敏性肺臓炎、好酸球性肺炎等、アレルギーの関与が考えられる疾患

[許容濃度]

感作性のある物質の許容濃度の数値を勧告するにあたっては、労働者の感作の予防、または感作成立後の感作反応の発生予防が、必ずしも考慮されていないことに注意すること。人間への重篤度は、気道において高い場合がある。

[感作性物質リスト]

本分類で感作性ありと分類されないことは、感作性がないということと同義ではない。

[感作性物質の分類]

感作性物質を、反応の場としての気道と皮膚に分けて基準を設け、「人間に対して明らかに感作性がある物質 (第1群)」、「人間に対しておそらく感作性があると考えられる物質 (第2群)」、「動物試験などにより人間に対して感作性が懸念される物質 (第3群)」

第1群、第2群の分類の基準は、以下のごとくである。

1. 気道感作性物質

第1群 人間に対して明らかに感作性がある物質

(判断基準)

呼吸器症状と曝露歴(職歴)が密接な関連性があると同時に、抗原特異的誘発試験(環境誘発試験)による陽性反応、血清学的陽

性反応、または皮膚試験の陽性反応のうち、いずれかひとつを満たす症例報告が、異なる機関からなされている。かつ、呼吸器症状と曝露歴（職歴）との関連性を明確に示した適切な疫学研究があること。

第2群 人間に対しておそらく感作性があると考えられる物質

（判断基準）

上記に準ずるものであるが、疫学研究では、必ずしも明確にされていない物質。

第3群 動物試験などにより人間に対して感作性が懸念される物質

（1）異なる機関から以下の条件をすべて満たす気道感作性の動物実験において陽性の報告があること。

（i）感作および惹起方法は、吸入、鼻投与、気管投与のうちのいずれかであること。

（ii）惹起反応の検出項目は、気管支肺胞洗浄またはそれに代わる手法による細胞分画および病理組織学的検索を実施しており、さらに呼吸機能、抗体産生あるいはサイトカイン解析のうちのいずれかひとつを実施していること。

（iii）陰性対照として、少なくとも惹起のみ群と感作のみ群の両群を設定していること。

（iv）陽性対照として、トルエンジイソシアネートまたは無水トリメリット酸などを実験に組み入れていること。

<または>

（2）単独の機関による上記試験（（i）～（iv））につき陽性の報告があり、本条件（（i）～（iv））に該当しないが適切な感作性試験法による感作性の陽性の報告があること。

2. 皮膚感作性物質

第1群 人間に対して明らかに感作性がある物質

（判断基準）

皮膚炎症状とパッチテストとの関係を検討した症例報告が異なる機関から2つ以上なされていること。かつ、曝露状況、接触皮膚炎症状およびパッチテスト（皮膚貼付試験）との関連性を明確に示した疫学研究があること。実施されたパッチテストは、対照を設けた適切な方法のものであること。

第2群 人間に対しておそらく感作性があると考えられる物質

（判断基準）

上記に準ずるものであるが、疫学研究では、必ずしも明確にされていない物質。

第3群 動物試験などにより人間に対して感作性が懸念される物質

（判断基準）

適切な皮膚感作性の動物実験による陽性の報告*がある場合。

* OECD Guideline 406: モルモットを用いた Magnuson と Kligman の Guinea-Pig Maximization test (GPMT) で陽性率が30%以上、Buehler test で陽性率が15%以上。もしくは OECD Guideline 429: マウスを用いた Local Lymph Node Assay (LLNA) の試験結果に濃度依存性があり、による陽性の報告があり、Stimulation Index (SI)値が3以上であること

以上の分類基準に基づいて我国の感作性物質リストを再分類した。

感作性物質リストの改訂（案）¹

気道

第1群

グルタルアルデヒド、コバルト*、コロホニ

ウム（ロジン）、ジフェニルメタン-4,4'-ジイソシアネート(MDI)、トルエンジイソシアネート類(TDI)、白金*、ヘキサン-1,6-ジイソシアネート、ベリリウム*、無水トリメット酸、無水フタル酸、メチルテトラヒドロ無水フタル酸

第2群

エチレンジアミン、クロム*、ニッケル*、ピペラジン、ホルムアルデヒド、無水マレイン酸、メタクリル酸メチル皮膚

第1群

過酸化ジベンゾイル、グルタルアルデヒド、クロム*、コバルト*、コロホニウム（ロジン）、水銀*、チウラム、テレピン油、ニッケル*、白金*、ヒドラジン*、*p*-フェニレンジアミン、ホルムアルデヒド、レゾルシノール

第2群

アクリル酸ブチル、アクリル酸メチル、ウスニック酸、エチレンオキシド、エチレンジアミン、ジクロロプロパン、銅*、トルエンジイソシアネート類(TDI)、ヒドロキノン、フタル酸ジブチル、ベリリウム*、ポリ塩化ビニル可塑剤²、無水マレイン酸、メタクリル酸メチル、ヨウ素*、ロジウム*

第3群

o-フェニレンジアミン、*m*-フェニレンジアミン

1 1998年に提案された感作性物質と、それ以降に提案された感作性物質をの上記の分類基準で見直したものであり、全物質を見直したリストではない。

2 全ての可塑剤が同定されているわけではない。

*当該物質自体ないしその化合物を示すが、

感作性に関与するすべての物質が同定されているわけではない。

D. 考察

以上の感作性分類基準は、皮膚感作性物質・呼吸器感作性物質の分類基準とも根拠として動物実験の結果を取り入れており、世界的に見ても進んだ分類基準となっている。

E. 結論

以上の我国の新しい感作性分類基準と分類リストを来年度公表する。

F. 引用文献

- 1) 日本産業衛生学会許容濃度等委員会：許容濃度の勧告(2009)。産衛誌 51(5):98-123, 2009
- 2) Globally harmonized system of classification and labeling of chemicals (GHS). 3rd rev. UN, New York and Geneva, 2009
- 3) List of MAK and BAT Values 2008. Report No.44 Weinheim: Willey-VCH, 2008
- 4) <http://ecb.jrc.it/classification-labelling/>
- 5) Schlede E, Aberer W, Fuchs T, Gerner I et al. Chemical substances and contact allergy-244 substances ranked according to allergenic potency. Toxcology 193: 219-259, 2003
- 6) American Conference of Governmental Industrial Hygienists. 2009 TLV[®] and BEI[®]. Cincinnati, ACGIH, 2009

平成21年度厚生労働科学研究費補助金（労働安全衛生総合研究事業）
分担研究報告2

構造相関活性（QSAR）ソフトによる皮膚感作性物質の予知予測検討

分担研究者	佐藤一博（福井大学医学部環境保健学）
主任研究者	日下幸則（福井大学医学部環境保健学）
分担研究者	青山公治（鹿児島大学医学部衛生学）
分担研究者	上田 厚（熊本大学医学部衛生学）
分担研究者	原田幸一（熊本大学医学部保健学科）
分担研究者	大槻剛己（川崎医科大学医学部衛生学）
分担研究者	柴田英治（愛知医科大学医学部衛生学）
分担研究者	竹下達也（和歌山県立大学医学部公衆衛生学）
分担研究者	山下邦彦（ダイセル化学工業(株)評価解析センター）
分担研究者	土橋邦生（群馬大学医学部保健学科）
分担研究者	皆本景子（熊本大学医学部衛生学）
分担研究者	梅村朋弘（福井大学医学部環境保健学）
分担研究者	田村太朗（福井大学医学部環境保健学）
研究協力者	宮川宗之（労働安全衛生総合研究所）
研究協力者	鹿庭正昭（国立医薬品食品衛生研究所）
研究協力者	亀尾聡美（群馬大学医学部公衆衛生学）
研究協力者	井戸敏子（福井大学医学部皮膚科）

研究要旨：

我々は、定量的構造活性相関(QSAR)技術を用いて皮膚感作性の陽性・陰性を判別関数により予測するモデルを作成した。皮膚感作性物質は、ドイツ学術振興協会(DFG)の“Maximale Arbeitsplatz-Konzentration” (MAK) and “Biologischer Arbeitsstoff-Toleranz-Wert” (BAT) values 2008から122物質、コントロール物質として製品評価技術基盤機構 (NITE) のサイトにある化学物質の分類及び表示に関する世界調和分類 (GHS) 省庁連絡会議作成の非皮膚感作性物質169物質である (計291物質)。ADMEWORKS/ModelBuider software (富士通) を用いて、この291物質の二次元三次元構造から約800のパラメーターを創出し、特徴抽出により47パラメーターセットと32パラメーターセットを作成した。2つのパラメーターセットを用いて種々の線形及び線形の判別分析を行なった。32パラメーターセットを用いたSupport Vector Machine (SVM)とAdaBoostでは分類

率は100%であった。47パラメーターセットを用いたNeural Networkの交差反応(leave-one-out cross-validation)では、予測率は81.44%だった。これは、我国初の皮膚QSARモデルであり、皮膚感作性物質の初期予測に適応可能と思われるが、皮膚QSARソフトの改訂が必要である。

A. 研究目的

職業性皮膚疾患は接触皮膚炎、湿疹、皮膚がんなどがあり非外傷性の職業性疾患として最も頻度が高い(Fedorowicz et al., 2005)。その中でも接触皮膚炎が頻度が高い。米国では全職業性疾患のうち 22%が皮膚疾患であり内、80%が接触皮膚炎である(Cherry et al., 2000)。接触皮膚炎は日本における医師の職業性アレルギーの中でも最も多く見られた(Sato et al., 2004)。

2003年国連は、化学物質の分類表示の国際調和基準(GHS)を出版し、2008年には世界中で実施が可能となっている(United Nations, 3rd rev. 2009)。GHSの皮膚感作物質の分類基準には動物実験の結果が取り込まれている。例えば、OECDガイドライン 406 であるモルモットによる maximization test や Buhler test や OECDガイドライン 429 であるマウスを使った local lymph node assay (LLNA)である。ドイツの DFG や EU の欧州化学庁(ECB)でも皮膚感作性の分実験の結果を取り入れている。しかし、日本産業衛生学会(JSOH)の皮膚感作性分類基準は動物実験の結果を考慮していない(Japan Society for Occupational Health, 2008)。現在、改訂中である。

EUにおける化学物質の登録、評価、認可及び制限(REACH)下では、年間1トンに以上、EUで生産または持ち込まれる全

ての化学物質は、環境影響や発がん性や感作性などの健康影響を評価しなければならない事になっている。REACHは動物実験に代わる *in vitro* のテストや QSAR による評価を推奨している。現在、感作性に関しては承認された *in vitro* のテストがないため、QSARによる皮膚感作性の評価が注目を集めている(Patlewicz et al., 2008)。更に、EUでは化粧品指令第7次改訂により、動物実験をした原料を用いた化粧品の販売が禁止された(Carrera et al., 2009)。新規化学物質に対する皮膚感作性のテストとして OECD ガイドラインなど妥当性のテストがあるが、時間と経費が掛かることが問題である(Golla et al., 2009)。この規制や動物愛護のため、QSARソフトなどコンピュータを用いて発がん性や感作性を評価する方法が近年開発されてきた。

今回、我々は皮膚感作性物質と非皮膚感作のコントロールの物質を用いて ADMEWORKS/ModelBuilder(富士通九州システムズ)により種々の判別分析を行ない分類率、予測率を計算した(Fujitsu Kyusyu Systems Limited, Japan)(Hayashi, 2005)。この皮膚感作性の QSAR ソフトは我国では初めての報告である。オクタノール/水分配係数で、この値が大きいと疎水性に富み細胞透過性が高く、小さいと親水性が高く細胞透過性が小さい。我々は、皮膚感作性にとって Log P は重要で判

別関数の重みは大きいと予測した。しかし、Log Pの重みは47パラメーターセットで小さく、32パラメーターセットでは残らなかった。今回の結果、皮膚感作性にとってLog Pは重要でない事が示唆された。

B. 研究方法

皮膚感作性物質は、ドイツ MAK の感作性物質リストの Sah と Sh の 190 物質である (Deutschen Forschungsgemeinschaft, DFG, 2008)。分類基準になっているのは、疫学研究、症例報告と妥当性の検証された動物実験 (モルモットの maximization テスト、Buhler テスト やマウスの LLNA) である。一方、コントロールは製品評価技術基盤機構 (NITE) のホームページにある GHS 省庁連絡会議が行なった皮膚感作性物質でないとの報告がある 'not classified' の 218 物質である (The Japanese GHS Inter-ministerial Committee)。しかし、コンピューター化学では、無機物質・有機無機の金属化合物やポリマーは一般の有機化合物と一緒に扱えない。これら 117 物質を除いた皮膚感作性 122 物質とコントロール 169 物質を評価した。

計 291 化学物質の二次元三次元構造から約 800 のパラメーターを創出し、特徴抽出 (頻度の低いパラメーター、多重共線性やノイズパラメーターを除去) より 47 パラメーターセット、32 パラメーターセットを作成した。この 2 つのパラメーターセットを用いて、Neural Network (NN)、Support Vector Machine (SVM)、AdaBoost や最小二乗アルゴリズム (TILSQ) などの線形、非線形の判別分析を行なった。

分類率と (leave-ten-out) 交差検定による予測率を計算した。これらの解析は ADMEWORKS/ModelBuilder (富士通九州システムズ) 行なった。(Hayashi, 2005)。

C. 研究結果

1. パラメーターの重み

'secondary sp3 carbon count' (methylene groups (-CH₂-)の数) の重みは 0.290789、'environment molecular connectivity of substructure' (-O-C) の重みは 0.288673 であった。どちらも正の数で皮膚感作性を誘導する。一方、'all-path calc for substructure' (-C-) の重みは -0.265617、'count of substructure (DMPATH)' (-ester-) の重みは -0.233505 で負の数であり皮膚感作は誘導しないと考えられた。

2. 判別分析

291 物質 (122 皮膚感作性物質と 169 コントロール物質) を 47 と 32 のパラメーターセットを使って Neural Network (NN)、the Iterative Least Squares linear discriminant 最小二乗アルゴリズム (TILSQ)、Support Vector machine (SVM) や AdaBoost による判別分析と Leave-Ten-Out による交差検定 (CV) を行なった。

分類率は 90.38% から 100% で、100% の完全分類は 32 パラメーターセットを用いた SVM と AdaBoost で得られた。予測率は、Leave-Ten-Out による交差検定 (LTOCV) によった。予測率は 73.88% から 81.44% であった。47 パラメーターセットを用いた NN で 81.44% の予測率が得られた。分類率が 100% だった 32 パラメ

ーターを用いたSVMとAdaBoostの予測率は76.63%と79.04%であった。

D. 考察

1986年に動物愛護ガイドラインである86/609/ECが実施されて以来、EUでは化学物質のテストにおいて動物実験を置換・精練・削減(3R)する事代替法を支援することが政策となった。(Lillenblum et al., 2008)。しかし、現在皮膚感作性をテストするREACHに適合した*in vitro*の方法は無い(Grindon et al., 2007, Patlewicz et al., 2008)。

そのため幾つもの皮膚感作性のQSARソフトが開発された。例えば Toxicity Prediction Komputer-Assisted Technology, (Accelrys Inc., San Diego, CA, USA; TOPKAT) や Multi Computer-Automated Structure Evolution (MultiCASE Inc., Cleveland, Ohio, USA; M-CASE)これらは統計を基本としたQSARである。Deductive Estimation of Risk from Existing Knowledge (Derek) for Windows (DfW. LHASA Ltd., Leeds, UK)は人工知能によるQSARで Times Metabolism Simulator for Skin Sensitization (LMC, University of Bourgas, Bulgaria; TIMES-SS)は両者のハイブリッドである(Patlewicz et al., 2007a, Patlewicz et al., 2007b)。今回の解析はADMEWORKS/ModelBuilder(富士通九州システムズ)で行なったが、これは統計を基本とするQSARである。これらのQSARソフトの中で皮膚感作性に関して最も良く使用されているのはDerekであ

る(Grindon et al., 2007)。TOPKATとDerekを用いたモルモットのデータとの一致率は73.3%と82.9%で、DerekのLLNAとの一致率は73%だった(Fedrowicz et al., 2005)。我々の予測率は73.88%から81.44%でありほぼ同じである。QSARシステムは発展段階であり十分な信頼性は無いが、新規化学物質の皮膚感作性の初期予測にコンピューターを用いた方法が推奨されている(Grindon et al., 2007)。我々が作成したQSARシステムも実用可能と思われる。

我々は、皮膚透過性が化学物質の皮膚感作に重要でQSARモデルにおいてLog Pが重要な因子となると予測した。Barratt (1994)は分子量とオクタノール/水分配係数(Log P)が皮膚透過性に重要であると報告している。今回の解析では、水溶性はLog Pと相関性が高く(多重共線性)、水溶性のパラメーターを除いて解析した。Log Pの重みは小さく、分子量は32パラメーターセットでは抽出されなかった。実験データが限られていて透過性に関するパラメーターが創出されなかったのかもしれない(Golla et al., 2009)。今回のモデルでは、オクタノール/水分配係数が他の重要なパラメーターと置き換わったか、幾つかのパラメーターが相互に作用した可能性もある。多くの化学物質が溶剤に溶けて人間の皮膚に曝露するが、溶剤の皮膚透過性が化学物質のLogPよりも皮膚感作性に大きな影響を及ぼしているのかも知れない。更なる考察と追加研究が必要である。

我々の分類率と予測率は90.83%~100%と73.88%~81.44%であった。これら

の値を改善するには、実験データの拡大、確かな仮説によるパラメーターの特徴抽出の改良、パラメーターの追加、皮膚感作に適合した判別関数の選択など更なる研究が必要である。

E. 結論

平成 21 年度の研究計画を予定通り実施できた。我国初の皮膚感作性 QSAR ソフトを開発した。更に精度を上げるため、OECD の原則に基づき、外的妥当性の検証を行ない、化粧品、色素に限定した QSAR ソフトを改訂する予定である。

F. 研究成果発表

以上は、第 22 回日本動物実験代替法学会において発表し、日本実験動物代替法学会誌 *Alternatives to Animal Testing and Experimentation (AATEX)* 14(3): 940-946, (2009)に掲載された。

F. 引用文献

Barratt, M.D. (2000) Prediction of toxicity from chemical structure. *Cell Biol Toxicol*, **16**, 1-13.

Carrera G.V.S.M., Gupta S. and Aires-de-Sousa J. (2009) Machine learning of chemical reactivity from databases of organic reactions. *J Comput Aided Mol Des*, **23**, 419-429.

Cherry, N., Meyer, J.D., Adisesh, A., Brooks, R., Owen-Smith, Y. and Beck, M.H. (2000) Surveillance of occupational skin disease: EPIDERM and OPRA. *Br J Dermatol*, **142**, 1128-1134.

Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG). List of MAK and BAT Values 2008. p129-136. Weinheim Wiley-VCH, Weinheim

ECB (European Chemical Beuro) ;<http://ecb.jrc.ec.europa.eu/>
Fedorowicz, A., Singh, H., Soderholm, S. and Demchuk, E. (2005) Structure-activity models for contact sensitization. *Chem Res Toxicol*, **18**, 954-969.

Golla, S., Madihally, S., Robinson R.L., and Gasem K.A.M. (2009) Quantitative structure-property relationship modeling of skin sensitization: a quantitative prediction. *Toxicol in Vitro*, **23**, 454-465.

Grindon C., Combes R., Cronin M., Roberts D.W. and Garrod J.F. (2007) An integrated decision-tree testing strategy for skin sensitization with respect to the requirements of the EU REACH Legistration. *Altern Lab Anim*, **35**, 683-697.

Hayashi M., Kamata E., Hirose A., Takahashi M., Morita T. And Ema M. (2005) In silico assessment of chemical mutagenesis in comparison with results of Salmonella microsome assay on 909 chemicals. *Mutat Res*, **588**, 129-135.

Japan Society for Occupational Health (2008) Recommendation of Occupational Exposure Limits (2008-2009). *J Occup Health*, **50**,

426-443.

Lillenblum W., Dekant W., Foth H., Gebel T., Hengstler J.G., Kahl R., Kramer P.J., Schweinfurth H. and Wellin K.M. Alternative methods to safety studies in experimental animals: role in the risk assessment of chemicals under European Chemical Legislation (REACH). *Arch Toxicol*, **82**, 211-236.

Patlewicz, G., Aptula A.O., Uriarte, E., Roberts, D.W., Kern, P.S., Gerberick, G.F., Kimber, I., Dearman R.J., Ryan, C.A. and Basketter, D.A. (2007a) An evaluation of selected global (Q)SARs/expert systems for the prediction of skin sensitisation potential. *SAR QSAR*, **18**, 515-541.

Patlewicz, G., Dimitrov, S.D., Low, L.K., Kern, P.S., Dimitrova, G.D., Comber M.I.H., Aptua A.O., Philips, R.D., Niemela, J., Madsem, C., Wedebye, E.B., Roberts, D.W., Bailey, P.T. and Mekenyan, O.G. (2007b) TIMES-SS —A promising tool for the assessment of skin sensitization hazard. A characterization with respect to the OECD validation principles for (Q)SARs and an external evaluation for predictivity. *Regul Toxicol Pharmacol*, **48**, 225-239.

Patlewicz, G., Aptula, A.O., Roberts D.W. and Uriarte, E. (2008) A minireview of available skin sensitization (Q)SARs/Expert

systems. *QSAR Comb Sci* **27**, 60-76.

The Japanese GHS Inter-ministerial Committee, Results of the classification, in NITE information about the status of the implementation of GHS in Japan

http://www.safe.nite.go.jp/english/ghs_index.html#results accessed on Nov. 4th, 2009

Sato, K., Kusaka, Y., Suganuma, N., Nagasawa, S. and Deguchi, Y. (2004) Occupational allergy in medical doctors. *J Occup Health*, **46**, 165-170.

United Nations. (2009) Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals (GHS). 3rd rev., New York and Geneva.

分担研究報告3

ミョウガのアレルギー性接触皮膚炎の原因物質の検討

分担研究者 皆本景子（熊本大学医学部衛生学）

分担研究者 原田幸一（熊本大学医学部保健学科）

分担研究者 上田 厚（熊本大学医学部衛生学）

A. 研究目的

ミョウガ (*Zingiber mioga* Roscoe) はショウガ科ショウガ属の多年草で、本邦では幼芽や花芽を食用にする。以前は露地栽培のみであったが、平成4年ごろから、栽培技術が確立され、ハウスで栽培されるようになり、周年供給体制が完成した。ハウス栽培発祥の地、A県は、日本でも有数のミョウガ産地（平成12年全国出荷量の55%を占める）である。今回、栽培従事者に皮膚かぶれを訴える者が少なからずみられ、我々は、これまで、3例のアレルギー性接触皮膚炎 (Allergic Contact Dermatitis:ACD) 症例を把握しており本邦最初の報告例である。ミョウガはショウガ属で、ショウガは刺激性接触皮膚炎とACDどちらも報告があり、gingerolや zingeroneなどが可能性のある感作物質としてあげられているが、これらの物質が抗原であることが確かめられているわけではない。

ACD3症例のうち1例の協力が得られ、ミョウガ成分のアレルゲンの同定を試み、開発されたQSARにて推定された物質の抗原性の有無の検証を行った。

B. 研究方法

ミョウガ5 kgを用い、60℃に加温して、エタノールで3時間かけて抽出し濃縮した。詳細は図1に示す。作製した抽出物をカラムクロマトグラフィーで、分離、精製を行っ

た。さらに、抽出物そのもの、分離された分画と精製された単体と考えられる物質を適当な濃度にプロペトにて希釈し、すでにミョウガのACDの診断のついたハウスミョウガ従事者1名にパッチテストを行った。単体と考えられる物質のうち陽性を呈した物質をGCMS（ガスクロマトグラフ質量分析計）で構造の推定をおこなった。推定された物質をQSARで抗原性の有無の検証を行った。

C. 研究結果

図1に抽出、分離、単離の過程を示す。パッチテストで、抽出物そのものと分画の一部、さらにMG-6に陽性を示した。MG-6はGCMSにて、図2のような脂肪酸 hexadecanoic acidそのものあるいは、2-hydroxyoctanoic acidのhexadecanoic acid esterと推定された。QSARにこれらの物質の抗原性の強さを検証したところ、前者は抗原性なしとされ、後者は弱い抗原性ありとされた。

D. 考察

hexadecanoic acidは palmitic acid のことで、動物、植物に一般的に含まれる飽和脂肪酸で、パームオイルの主成分であることから名づけられたものである。QSAR

では、抗原性は否定された。2-