

- 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](http://www.safe.nite.go.jp/english/ghs_index.html#results) accessed on Feb 21<sup>st</sup>, 2011
- 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). 3<sup>rd</sup> rev., New York and Geneva.

分担研究報告3

ドイツにおける職業性接触皮膚炎の保障システムとその予防対策

分担研究者 皆本景子（熊本大学大学院生命科学研究部・環境保健医学分野）

分担研究者 亀尾聡美（群馬大学大学院医学系研究科・公衆衛生学）

分担研究者 佐藤一博（福井大学医学部環境保健学）

研究要旨

ドイツの職業性接触皮膚炎（Occupational Contact Dermatitis: OCD）の保障システムと予防対策は包括的で充実している。その一次予防としての感作性物質リスト（MAK and BAT Values 2009）は実践的で、本邦の新しい感作性物質リストの向上にあたって、参考とするものであるが、その背景となるドイツ独自の保障システムとその予防プログラムを学ぶことで、さらに理解を深めることができた。

A. 研究目的

本邦における感作性物質リストの今後の向上のため、ドイツに4ヶ所あるOCDの3次予防プログラム拠点のひとつを訪れ、ドイツの保障システムと予防対策について調査し、交流することを目的とした。

B. 研究方法

平成22年8月21日～29日のドイツ・オランダ訪問の期間中、22、23日にProf. Dr. T.L. Diepgen University Heidelberg, Dept. of Social Medicine, Occupational and Environmental Dermatologyを訪問し、ドイツの保障システムとくに予防対策について説明を受け、ドイツと日本の感作性物質クライテリアなどについて討論を行った。

C. 研究結果

ドイツの職業病分類を表1に示す。Skin diseasesは、1930年代に確立され、その後改変された。皮膚科医もしくは産業医が、OCDとして疑った時点でnotified caseとして、保健組合に報告され、その保障システムのなかで、従来の医療保険より高い質の加療と休業補償を受ける（図1）。また、

一部の業種の組合で行われている2次予防セミナーに参加できる。さらに、難治のものが、3週間のセンターでの集中的な加療と教育、その後の3週間の患者の居住する地域での継続加療の計6週間からなる3次予防プログラムに移行する。当センターでは、年間約150名の患者を受け入れており、心理学、教育学など多分野の専門家も関わるEU諸国においても先駆的で、ユニークなものである（表2）。3次予防プログラム終了後、やはり快適就業が不可能であった患者は、registered caseとして、(1)配置転換(2)再教育(3)感作性物質と症状の重篤さに基づいて算出されるMdE (diminution of working ability)による年金のいずれかの保障を受けることになる。配置転換で生じた収入の不足分も保証される。

Prof. Diepgenは、感作性物質のMAK sub committee memberであるとともに、東西ドイツ統一の頃、ドイツ労働省が設立した委員会〔the task force for "Sensitizing and irritant working substances" : a

subcommittee of the Ausschuß für Gefahrstoffe (committee for hazardous substances)] の議長で、その委員会で種々の感作性物質の規制がなされた。たとえば、パウダーつきラテックス手袋は禁止され、ラテックス手袋の溶出可能な蛋白の含有量は、 $30 \mu\text{g/g}$  以下とされている。また、wet work を OCD のリスクのひとつとして規制が行われている。

その他、教室で現在行われている手湿疹の疫学調査、ヨーロッパにおける香料の感作率の疫学調査などの概要の説明を受けた。

#### D. 考察

本邦でも、OCD が職業性皮膚障害のかなりの多くの部分を占めていることは、周知の事実であるが、労災保険の適応をほとんど受けていず、業務上疾病として保障される例はきわめて稀である。ドイツの保障と予防システムは OCD の特性を医学的根拠に基づいて理解し構築されている優れたシステムであると考えられる。感作性物質リストとともに、今後も継続して理解を深めていくことは、本邦の OCD 対策にたいへん有意義

である。

#### E. 謝辞

私たちの訪問を快く受け入れていただいた Prof. Diepgen に深謝いたします。

#### F. 参考文献

- 1 List of MAK and BAT Values 2009 (Maximum Concentrations and Biological Tolerance Values at the Workplace) Report No.45. DFG (Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area)
- 2 Contact Dermatitis 4<sup>th</sup>. Edition, Frosh PJ, Menné T, Lepottevin J-P (Eds): Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, 2006
- 3 Mattered U, Diepgen TL, Weisshaar E. Effects of a health-educational and psychological intervention on socio-cognitive determinants of skin protection behaviour in individuals with occupational dermatoses. International Archives of Occupational & Environmental Health. 83(2):183-9, 2011

表 1 Occupational diseases in Germany (last up-date June 2009)

No.	Diseases
1	Diseases caused by chemical agents
2	Diseases caused by physical impact
3	Diseases caused by infectious agents or parasites including tropical diseases
4	Diseases of the respiratory tract, lungs, pleura and peritoneum
5	Skin diseases
	5101 Severe or recurrent skin diseases which have forced the person to discontinue all activities that caused or could cause the development, worsening or recurrence of the disease
	5102 Skin cancer or skin alterations showing a cancerous tendency caused by soot, raw paraffin, tar, anthracene, pitch or similar substances
6	Diseases caused by other factors

☒ 1 Notification of Occupation Skin Diseases (OSD) in Germany

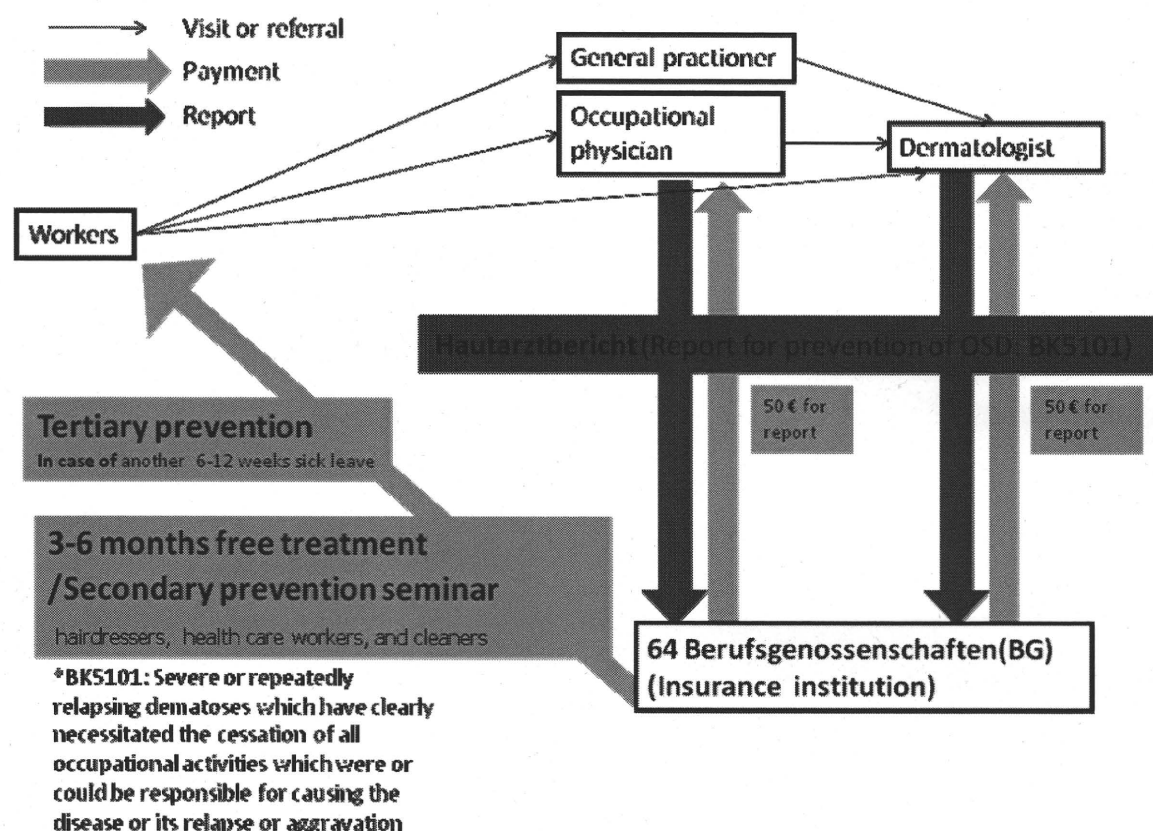


表 2 Weekly plan for tertiary prevention of occupational contact dermatitis in Heidelberg University Hospital

Tuesday	Wednesday	Thursday	Monday	Friday	Saturday
8:15 Rounds and treatment	8:15 Rounds and treatment	8:15 Rounds and treatment	8:15 Rounds and treatment	8:15 Rounds and treatment	8:15 Rounds and treatment
10:45-12:15 General gloves counseling Ergonomic practice	11:00-12:00 Individual gloves counseling	11:00-12:00 Skin and eating behavior : basic nutrients and food allergy	11:00-12:00 Doctor's lecture	10:30-12:00 Insurance organization counseling (compensation, help and service)	
13:45-15:15 Skin protection seminar	14:00-15:30 Skin and psychological aspect	14:00-15:30 Health Psychology	14:00-15:30 Health Psychology	14:00-16:00 City information (guide)	
19:00 Treatment through patients themselves	19:00 Treatment through patients themselves	19:00 Treatment through patients themselves	19:00 Treatment through patients themselves	19:00 Treatment through patients themselves	19:00 Treatment through patients themselves

平成22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4

ヨーロッパにおける消費者製品の感作性物質の規制、動物実験代替法の  
in vitro 試験、及び、QSAR ソフトの EU 最新情報

分担研究者 亀尾聡美（群馬大学大学院医学系研究科・公衆衛生学）  
分担研究者 皆本景子（熊本大学大学院生命科学研究部・環境保健医学）  
分担研究者 佐藤一博（福井大学医学部環境保健学）

研究要旨

オランダ・国立公衆衛生環境研究所（RIVM）の Henk van Loveren 教授および RIVM 研究員を訪問し、消費者製品における感作性物質の規制、感作性物質の動物実験代替法の in vitro 試験、及び、QSAR ソフトの EU 最新情報などについて調査し討論を行った。EU において消費者製品中の物質の法的規制により感作性物質由来の接触皮膚炎の減少など顕著な効果が得られていた。今後、EU での RREACH 規制等により動物実験が困難となっていくなか、皮膚感作性試験について、QSAR などの動物実験代替法の開発が重要となると考えられた。今回の訪問を通じて、日本における感作性物質リスト作成を今後進める上での有益な議論・交流を行うことができた。

**A. 研究目的**

日本における感作性物質リスト作成を今後進める上での参考とするために、オランダ・国立公衆衛生環境研究所（RIVM）を訪問し、ヨーロッパ共同体（EU）における消費者製品中の感作性物質の規制、動物実験代替法の in vitro 試験および QSAR ソフトの最新情報などについて調査し、議論・交流を深めることを目的とした。

**B. 研究方法**

平成22年8月21日～29日のドイツ・オランダ訪問の期間中、25日～27日にかけてオランダ・ビルトーベンのオランダ・国立公衆衛生環境研究所（RIVM）を訪問し、Henk van Loveren 教授および、研究所の研究員の講演に出席し、ヨーロッパにおける感作性物質を初めとする化学物質

の規制、消費者製品中の感作性物質の規制、動物実験代替法の最新情報についての調査・討論を行った。

**C. 研究結果**

**1. 消費者製品における感作性物質**

オランダ RIVM では、EU における消費者製品の感作性物質に関して様々な調査・研究を行っている<sup>1)</sup>。その内容の一部について紹介する。消費者製品としてジュエリー、化粧品、衣服、革製品などが挙げられる。一般消費生活のみではなく職業曝露の可能性もある。EU の欧州化学品庁（ECB）における法的規制としては、R42：気道感作性では、主にヒトに対しての研究結果を基にしており職業性喘息も含まれている（26物質）。R43：皮膚感作性では、ヒトに対しての研究結果と適切な動物試験の結果を基にしてい

る (643 物質)。R42 と R43 の両方に該当するのは 51 物質である。ジュエリーにおけるニッケルなどの金属、衣服や洗剤その他の消費者製品に含まれるクロム、重クロム酸カリウム、コバルトなどが皮膚感作性について重要である。様々な消費者製品の中に防腐剤として含有されることのある isothiazolinones, Methyl dibromoglutaronitrile (MDBGN), Formaldehyde, Thiurames, Di-isocyanates, Parabens などが注目されている。また香水・エアフレッシュャーなどに使われる D-limonene, Tree moss, Oak moss, Peru balsam などが、皮膚感作性があるとされている。P-Phenylenediamine (PPD) に代表される Hair dyes (毛染め剤) の皮膚感作性も問題となっている。ヨーロッパの一般の人々約 26,000 人の疫学調査から得られた消費者製品中のアレルゲンの皮膚感作性の陽性率は、ニッケル (17.9%)、フレグランスミックス (9.7%)、Peru balsam (6.0%)、コバルト (5.9%)、重クロム酸カリウム (4.6%)、thiurams (3.2%)、及び PPD (3.9%) である<sup>1)</sup>。

## 2. 消費者製品中の感作性物質規制の効果

デンマークにおける法的規制による効果の例について紹介する。1990 年に消費者製品からのニッケル溶出を法的規制により  $0.5 \mu\text{gNi}/\text{cm}^2/\text{week}$  以下に減少させた。デンマークの皮膚疾患を持つ若い女性患者 (5-30 歳) におけるニッケルアレルギーの陽性率は、27.6% (1985 年) から 16.8% (2007 年) へ減少した<sup>2-3)</sup>。ヨーロッパ全体においては 1994 年にニッケルの規制が行われ、その後ニッケル由来の接触皮膚炎は減少した。これは、ニッケル規制の効果によるものと考えられた。しかしながら、

ニッケルは、EU 諸国において高頻度でパッチテスト陽性となるアレルゲンであり、コバルトなどの他の金属とともに今後も調査研究の継続が必要であると考えられる。また、セメント中のクロム含有量を 1983 年に 2ppm 以下とした結果、陽性率は、8.9% から 1.3% に減少した。このように EU において法的規制の顕著な効果が得られている。

## 3. 動物実験代替法(1): in vitro 試験

近年、EU では、化学物質の登録・評価・認可・及び制限 (REACH) による規制に伴い、健康と環境の保護のための化学物質の規制が厳しくなっている。また、REACH では、動物実験に代わる評価を推奨しており、感作性物質の試験について動物実験代替法の開発が望まれている<sup>4-7)</sup>。近く、化粧品の試験では、動物実験を使うことが禁止される動向である。研究開発中の In vitro 試験、QSAR ソフト、感作性を評価するための 바이오インフォマティクス的手法などを紹介する。これらは、非動物試験の開発とともに費用を抑え時間短縮を行うことも目的としている。In vitro 試験としては、Keratinocyte response, Dendritic cell, T-cell induction, あるいは、Peptide reactivity を利用した感作性物質試験への応用化を目指した研究が行われている<sup>8-10)</sup>。Keratinocyte response の利用として、3D reconstructed human epidermal models が開発されており、今後の皮膚感作性物質試験への応用が期待される<sup>11)</sup>。

## 4. 動物実験代替法(2): QSAR

EU における QSAR (QSARs: quantitative structure-activity relationships) ソフトの最新情報について紹介する<sup>12-13)</sup>。

表.1 QSAR ソフトによる結果とLLNA結果の比較

QSAR Software	Chemicals					
	hydroxycitronellal CAS No.:107-75-5		dimethyl carbonate CAS No.:616-38-6		pentachlorophenol CAS No.:616-38-6	
DEREK	alert found	positive	no alert found	negative	no alert found	negative
SMARTs	alert found	positive	no alert found	negative	alert found	positive
TopKAT	probability<0.7	negative	probability<0.7	negative	probability<0.7	negative
TIME-SS	alert found	positive	no alert found	negative	no alert found	negative
MultiCASE	alert found	positive	no alert found	negative	alert found	positive
LLNA test	positive		negative		?	

QSAR は、global モデルと local モデルの 2 つに大別できるが、local モデルは、特定の化学物質類への適用のみであるが、global モデルは、全ての化学物質への適用を目的とする。Global な QSAR モデルとして以下のソフト (DEREKFW, SMARTs, OASIS/TIMESS, TopKAT MultiCASE) を用いて数種の化学物質のそれぞれの感作性試験の結果、及び LLNA の結果との比較を表 1 に示した。

Hydroxycitronellal の alert の出た QSAR ソフトの結果及び、dimethyl carbonate の各 QSAR ソフトの結果は、LLNA の結果と良く一致している。一方、pentachlorophenol については、QSAR ソフト毎に positive と negative に結果が分かれた。LLNA の結果は出ていないため、どちらがより信頼性があるか判断は困難であるが、alert found を有意とみなすと positive と評価できそうである。今後、QSAR は、第一段階のスクリーニングの手段として使い、その後、その他の試験方法と併せて行うなど、動物実験代替法としての有効な利用が進められていくと考えられる。

### 5. 動物実験代替法(3): バイオインフォマティクス

感作性物質を評価するために、ある物質

に曝露された際に、どのような遺伝子が発現するのかを予め、in vitro にて調べておくことも有用である。RIVM では、近年、毒性学分野でも使われている DNA マイクロアレイ及び、バイオインフォマティクスの手法を用いて、感作性物質曝露による遺伝子発現プロファイルを明らかにする研究を行っている<sup>14)</sup>。

### D. 考察

EU での RREACH 規制等により動物実験が厳しくなっていくなか、QSAR は、感作性物質の第一段階の試験手段として、動物実験代替法としての有効な利用が進められていくと考えられる。EU の動物実験に関する規制は、今後、世界標準になることも考えられるため、日本においても動物実験代替法の開発と応用を進めていく必要があるものと考えられた。

### E. 結論

EU において消費者製品中の物質の法的規制により感作性物質由来の接触皮膚炎の減少など顕著な効果が得られていた。皮膚感作性試験について、今後、更なる動物実験代替法の開発が重要となると考えられた。

また、今回の訪問を通じて、日本における感作性物質リスト作成を今後進める上で有益な議論・交流を行うことができた。

## F. 謝辞

オランダ・国立公衆衛生環境研究所 (RIVM)、Henk van Loveren 教授および、研究員の皆様に深く感謝致します。

## G. 引用文献

1). Wijnhoven SWP, Ezendam J, Schuur AG, van Loveren H, van Engelen JGM. (2008) Allergen in consumer products. RIVM Report 320025001/2008.

2). Thyssen JP, Johansen JD, Carlsen BC, Menne T. (2009) Prevalence of nickel and cobalt allergy among female patients with dermatitis before and after Danish government regulation: a 23-year retrospective study. *J Am Acad Dermatol* 61(5): 799-805.

3). Caroe C, Andersen KE, Mortz CG. (2011) Fluctuations in the prevalence of nickel and cobalt allergy in eczema patients patch tested after implementation of the nickel regulation in Denmark. *Contact Dermatitis* 64(3): 126-131.

4). Vandebriel RJ, van Loveren H. (2010) Non-animal sensitization testing: state-of-the-art. *Crit Rev Toxicol* 40(5): 389-404.

5). Lankveld DP, Van Loveren H, Baken KA, Vandebriel RJ. (2010) In vitro testing for direct immunotoxicity: state of the art. *Methods Mol Biol* 598: 401-423.

6). Vandebriel RJ, Pennings JL, Baken KA, Pronk TE, Boorsma A, Gottschalk R, et al. (2010) Keratinocyte gene expression profiles discriminate sensitizing and irritating compounds. *Toxicol Sci* 117(1): 81-89.

7). Vandebriel RJ, Van Och FM, van Loveren H. (2005) In vitro assessment of sensitizing activity of low molecular weight compounds. *Toxicol Appl Pharmacol* 207(2 Suppl): 142-148.

8). Jowsey IR, Basketter DA, Westmoreland C, Kimber I. (2006) A future approach to measuring relative skin sensitising potency: a proposal. *J Appl Toxicol* 26(4): 341-350.

9). Basketter D, Maxwell G. (2007) In vitro approaches to the identification and characterization of skin sensitizers. *Cutan Ocul Toxicol* 26(4): 359-373.

*Toxicol* 26(4): 359-373.9).

10). Grindon C, Combes R, Cronin MT, Roberts DW, Garrod JF. (2008) An integrated decision-tree testing strategy for skin sensitisation with respect to the requirements of the EU REACH legislation. *Altern Lab Anim* 36 Suppl 1: 75-89.

11). Uchino T, Takezawa T, Ikarashi Y. (2009) Reconstruction of three-dimensional human skin model composed of dendritic cells, keratinocytes and fibroblasts utilizing a handy scaffold of collagen vitrigel membrane. *Toxicol In Vitro* 23(2): 333-337.

12). Patlewicz G, Roberts DW, Uriarte E. (2008) A comparison of reactivity schemes for the prediction skin sensitization potential. *Chem Res Toxicol* 21(2): 521-541.

13). Hulzebos E, Gunnarsdottir S, Rila JP, Dang Z, Rorije E. (2010) An Integrated Assessment Scheme for assessing the adequacy of (eco)toxicological data under REACH. *Toxicol Lett* 198(2): 255-262.

14). Vandebriel RJ, Pennings JL, Baken KA, Pronk TE, Boorsma A, Gottschalk R, et al. (2010) Keratinocyte gene expression profiles discriminate sensitizing and irritating compounds. *Toxicol Sci* 117(1): 81-89.



RIVM 研究所の研究室での討論風景。



平成22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5

気道感作性構造相関活性（QSAR）ソフトの改良

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（熊本大学名誉教授）
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）
分担研究者	亀尾聡美（群馬大学医学部公衆衛生学）
分担研究者	井戸敏子（福井大学医学部皮膚科）
分担研究者	吉田貴彦（旭川医科大学医学部健康科学）
分担研究者	福島哲仁（福島県立医科大学医学部衛生学）
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）

研究要旨：

定量的構造活性相関(QSAR)技術を用いて呼吸器感作性陰性・陽性を判別分析により予測するモデルを最新の物にバージョンアップした。呼吸器感作性物質はEuropean Chemical Bureau (ECB) のR42とR42/43で、コントロールは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である。40の呼吸器感作性物質と150のコントロールの計190物質を用いて、そ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17パラメーターセットを作成した。このパラメーターセットを用いて、ADMEWORKS/ModelBuider software（富士通九州システムズ, FJQS） ver.6によりIterative Least Squares linear discriminant（最小二乗アルゴリズム, TILSQ）とAdaBoostの判別分析を行なった。TILSQでは分類率100%で予測率92.6%であった。Adaboostでは分類率100%で予測率94.7%であった。このモデルは将来的にも下位互換性があり、呼吸器感作性の初期予測に充分適応できると考えられた。

## A. 研究目的

職業性疾患の中では皮膚疾患が最も多い非外傷性の疾患である。皮膚疾患には接触皮膚炎、接触蕁麻疹、失神、皮膚がん等があるが最も多いのは接触皮膚炎である (Fedorowicz et al., 2005)。呼吸器感作による症状としては鼻炎、喘息、過敏性肺臓炎、好酸球性肺炎がある (Sato et al., 2007)。呼吸器感作の頻度は接触皮膚炎に比べて低い、時に重篤となる事がある (Fabbri et al., 1988)。

2003年7月に国連より化学物質の分類ラベル表示の国際調和基準 (GHS) が出版され、2008年からは世界中で実施可能となった (United Nations, 2009)。GHSの感作性の分類基準には動物実験の結果が含まれている。ドイツのDFGやEUの欧州化学庁(ECB)の皮膚感作性の分類基準にも承認された動物実験の結果が含まれている。更に、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ー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。幾つかは既に商品化されている。Toxicity Prediction Komputer-Assisted Technology, (Accelys Inc., San Diego,

CA, USA; TOPKAT) や 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、Deductive Estimation of Risk from Existing Knowledge (Derek) for Windowss (DfW, LHASA Ltd., Leeds, UK)は人工知能の QSAR である。Times Metabolism Stimulator for skin Sensitization (LMC, University of Bourgas, Bulgaria; TIMES-SS)はそれらのハイブリッドである (Patlewicz et al., 2007a, Patlewicz et al., 2007b)。我々は ADMEWORKS/ModelBuider (富士通九州システムズ) We also made QSAR model for skin sensitization using ADMEWORKS/ModelBuilder software (Fujitsu Kyusyu Systems Limited, Japan) (Hayashi et al., 2005, Sato et al., 2009)を用いて皮膚感作性の QSAR ソフトを開発したが、これは統計を基本とした QSAR である。

現在、妥当性の検証された呼吸器感作性の動物実験はない (Deutschen Forschungsgemeinschaft, DFG, 2008, United Nations, 2009)。T細胞からのサイトカインのプロフィールにより呼吸器感作性を判断する動物実験は期待が持てる (Dearman et al., 1996)。皮膚感作性の QSAR ソフトに比べて呼吸器感作性の QSAR ソフトの数は少ない (Agius et al. 1991, Karol et al. 1996, Graham et al. 1997, Seed et al. 2008, Warne et al. 2009, Seed et al. 2010)。今回、ADMEWORKS/ModelBuilder ver.6を用いて呼吸器感作性の QSAR ソフトのバージョンアップを行なった。

## B. 研究方法

### 1. 使用した化学物質

呼吸器感作性物質はヨーロッパ共同体(EC)の欧州化学庁(ECB)にある R42 と R42/43 の 116 物質。R42 は吸入によ

り感作を起こさせる物質で、定義は「気道に感作を起こす物質、適切な動物実験で陽性である、またはイソシアネート類であること」である。R42/43は吸入によっても皮膚接触によっても感作を起こす物質である。コンピュータ科学においては、無機物質、有機無機金属化合物は一般の有機化合物と一緒に扱えないので、これらを除いた40の気道感作性物質と150物質のコントロール計190物質を使用した。

## 2. パラメーターと判別分析

40の気道感作性物質と150のコントロール物質の計190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の除去など)により17のパラメーターセットとした。最小二乗アルゴリズム(TILSQ)とAdaboostの判別分析を17パラメーターセットを用い行った。分類率とleave-ten-out交差検定による予測率の計算を行なった。解析は全てADMEWORKS/ModelBuilder(富士通九州システムズ, FJQS)ver.6を用いた。この研究は、福井大学医学部利益相反(COI)委員会の承認を得た。

## C. 研究結果

### 1. 判別分析

17パラメーターセットを用いて呼吸器感作性40物質、コントロール150物質の計190物質の最小二乗アルゴリズム

(TILSQ)とAdaBoostの判別分析とleave-ten-out交差検定(CV)による予測率を計算した。完全分類(100%)をTILSQとAdaBoostとも達成した。Leave-ten-out交差検定(CV)による予測率はTILSQで92.6%でAdaBoostで94.7%であった。

## D. 考察

呼吸器感作性について十分な実験データが無いために、皮膚感作性の定量的構造活性相関(QSAR)ソフトの開発に比べて呼吸器感作性のQSARの開発が余り行なわれてこなかった(Rodford et al., 2003)。特に困難なのは、非呼吸器感作性物質であるコントロールの選定である(Kimber et al., 1996)。呼吸器感作性がないと報告されている非呼吸器感作性物質は4物質しか無かった。そこで我々はGraham等と同様、NITEのホームページにあるGHS省庁連絡会議が行なった分類で、皮膚感作性がないと報告されている非皮膚感作性物質を呼吸器感作性と分類不能と確認の上、非呼吸器感作性物質とみなした(Graham et al., 1997, NITinformation)。

最初のコンピューターによる呼吸器感作性物質の構造と活性を調べた方法は単に電子親和力(electrophilic potential)を調べたものだった(Agius et al., 1991)。Graham C (1997)はCASE/MultiCaseを用いた呼吸器感作性化学物質の構造活性相関(SAR)モデルを報告している。CASE/MultiCaseで2つのサブグループのモデルの活性の強さとleave-one-out交差検定により予測率を評価している。MultiCaseでは感度80%で特異度98%だった。CASEモデルでは、感度は72%と75%と低かったが特異度は98%と95%だった。外的妥当性の検証では感度0.95・特異度0.95だった(Graham et al., 1997)。

感作性物質は非感作性物質に比べて様々な物理化学的特性が異なる。特にLog P (オクタノール/水分配係数)、分子量、

水溶性、最低空軌道(LUMO)が非感作性物質と異なると報告されている(Graham et al., 1997)。しかし、今回これらのパラメーターは残らなかった。呼吸器感作性物質と皮膚感作性物質の違いもある。抗原形成が気管内の溶液中で起こる呼吸器感作性物質では水溶性が重要と考えられるが、皮膚感作性物質は水溶性が低いすなわち脂溶性が高いことが皮膚透過性に必要と考えられる(Rodford et al., 2003)。我々の皮膚感作の QSAR ソフト(Sato et al., 2009)では、32 パラメーターセットで secondary sp3 carbon count の重みが 0.290789・ environment molecular connectivity of substructure (-O-C)の重みが 0.28867 で、 all-path calc for substructure (-C-) の重みが -0.265617 で count of substructure (DMPATH) (-ester-)の重みが-0.233505 だった。47 パラメーターセットで Log P の重みが -0.05034 だった。Leave-one-out 交差検定による予測率は、73.88%~81.44%で、47 パラメーターセットの NN で 81.44%の予測率が得られた(Sato et al., 2009)。今後、QSAR 検証の OECD 原則に従い 接触皮膚炎の教科書(Coiz et al., 2006)にある皮膚感作性物質を使って外的妥当性の検証を行なう予定である。

今回のモデルでは、secondary sp3 carbon count と environment molecular connectivity of substructure は 17 パラメーターセットに残らなかった。all-path calc for substructure の重みは-0.494088、count of substructure(DMPATH)(-ester-)の重みは-0.257991 だった。前回(Sato K, 2010)最も絶対値が高かったパラメーターは、Average Energy Resulting from All Group Energies だった。Average Energy Resulting from All Group Energies はよく見られる 10 グループの平均の結合エネルギーを見たものである(Andrews binding) (Andrews PR et al., 1984)。Average Energy Resulting from All Group Energies のパラメーターは薬の

レセプターへの結合具合を見るために使われる。今回は、-0.161839 と大きい絶対値ではなかった。

呼吸器感作性 QSAR ソフトの開発には、実験データを増やす、確かな仮説に基づく特徴抽出の改良、新しいパラメーターの追加、呼吸器感作性に適した判別関数の選択など更なる研究が必要である。

QSAR ソフトは発展段階でありまだ充分ではないが、未検査の呼吸器感作性物質の試験においもその第一段階として in silico の方法が提案されている(Seed et al., 2008)。今回の呼吸器 QSAR ソフトの分類率は 100%で、予測率(CV)は 92.6%と 94.7%だった。この QSAR システムは、未検査の化学物質の呼吸器感作性に対する初期段階の予測に応用できると思われる。

## E. 結論

平成 22 年度の研究計画を予定通り実施できた。世界的にも稀有な呼吸器感作性 QSAR ソフトを開発した。計画通り実施できた。以上は、論文としても公表した(刊行物・別刷参照)。

## F. 引用文献

- Agius RM, Nee J, McGovern B, Robertson A. Structure activity hypotheses in occupational asthma caused by low molecular weight substances. *Ann Occup Hyg* 1991; 35: 129-137.
- Andrews PR, Craik DJ, Martin JL. Functional group contributions to drug-receptor interactions. *J Med Chem* 1984; 27: 1648-1657.
- Carrera GV, Gupta S, Aires-de-Sousa J. Machine learning of chemical reactivity from databases of organic reactions. *J Comput Aided Mol Dis* 2009; 23: 419-429.
- Coiz CJL, Lepottevin JP. Dictionary of contact allergens: chemical structures, sources and references. In Frosch PJ, Menne T, Lepottevin

- jp editors. Contact Dermatitis 4<sup>th</sup> ed. Berlin: Springer-Verlag; 2006. p943-1105.
- Dearman RJ, Basketter DA, Kimber I. Characterization of chemical allergens as a function of divergent cytokine secretion profiles induced in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996; 138: 308-316.
- Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG). List of MAK and BAT Values IV Sensitizing substances. Wiley-VCH, Weinheim; 2008: 158-173.
- European Commission. Annex 1 Directive 67/548/EEC on Dangerous Substances.
- <http://ecb.jrc.ec.europa.eu/classification-labelling/search-classlab/>, visited February, 2010.
- Fabbri LM, Danieli D, Crescioli S, Bevilacqua P, Meli S, Saetta M, Mapp CE. Fatal asthma in a subject sensitized to a toluene diisocyanate. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137: 1494-1498.
- Fedrowicz A, Singh H, Soderholm S, Demchuk E. Structure-activity models for contact sensitization. *Chem Res Toxicol* 2005; 18: 954-969.
- Golla S, Madihally S, Robinson RL Jr, Gasen KA. Quantitative structure-property relationship of skin sensitization: a quantitative prediction. *Toxicol in vitro* 2009; 23: 454-465.
- Graham C, Rosenkranz HS, Karol MH. Structure-activity model of chemicals that cause human respiratory sensitization. *Reg Toxicol Pharmacol* 1997; 26: 296-306.
- Hayashi M, Kamata E, Hirose A, Takahashi M, Morita T, Ema M. In silico assessment of chemical mutagenesis in comparison with results of Salmonella microsome assay on 909 chemicals. *Mutat Res* 2005; 588: 129-135.
- Karol MH, Graham C, Gealy R, Macina OT, Sussman N, Rosenkranz HS. Structure-activity relationships and computer-assisted analysis of respiratory sensitization potential. *Toxicol Lett* 1996; 86: 187-191.
- Kimber I, Bernstein IL, Karol MH, Robinson MK, Sarlo K, Selgrade MK. Workshop overview. Identification of respiratory allergens. *Fundam Appl Toxicol* 1996; 33: 1-10.
- Graham C, Rosenkranz HS, Karol MH. Structure-activity model of chemicals that cause human respiratory sensitization. *Regul Toxicol Pharmacol* 1997; 26: 296-306.
- NITE Information about the status of the implementation of GHS in Japan, \_ [http://www.safe.nite.go.jp/english/ghs\\_index.html#results](http://www.safe.nite.go.jp/english/ghs_index.html#results) visited on February 21, 2011.
- Patlewicz G, Aptula AO, Uriarte E, Roberts DW, Kern PS, Gerberick GF, Kimber I, Dearman RJ, Ryan CA, Basketter DA. An evaluation of selected global (Q)SARs/expert systems for the prediction of skin sensitisation potential. *SAR QSAR Environ Res* 2007a; 18: 515-541.

- Patlewicz G, Dimitrov SD, Low LK, Kern PS, Dimitrova GD, Comber MIH, Aptua AO, Philips RD, Niemela J, Madsem C, Wedebye EB, Roberts DW, Bailey PT, Mekenyan OG. 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* 2007b; 48:225-239.
- Patlewicz G, Aptula AO, Roberts DW, Uriarte E. A minireview of available skin sensitization (Q)SARs/Experts systems. *QSAR Comb Sci* 2008; 27: 60-76.
- Rodford R, Patlewicz G, Walker JD, Payne MP. Quantitative structure-activity relationships for predicting skin and respiratory sensitization. *Environ Toxicol Chem* 2003; 22: 1855-1861.
- Sato K, Kusaka Y, Spacial committee of Japanese Society of Occupational and Environmental Allergy. A proposal for guideline for prevention of allergic occupational asthma in conformity with the globally harmonized system of classification and labeling of chemicals (GHS). *Int J Immunol Pharmacol* 2007; 20(S2): 51-53
- 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* 2009; 14: 940-946.
- 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. A respiratory sensitization study by a new quantitative structure-activity relationships (QSAR). *AATEX* 2010;15(3):124-130.
- Seed MJ, Cullian P, Agius RM. Methods for the prediction of low-molecular-weight occupational respiratory sensitizers. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008; 8: 103-109.
- Seed M, Agius R. Further validation of computer-based prediction of chemical asthma hazard. *Occup Med* 2010; 60: 115-120.
- United Nations. Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals (GHS). 3<sup>rd</sup> rev., New York and Geneva, 2009.
- Warne MA, Nicholson JK, Lindon JC, Guiney PD, Gartland KPR. A QSAR investigation of dermal and respiratory chemical sensitizers based on computational chemistry properties. *SAR QSAR Environ Res* 2009; 20: 429-451.

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sato K, Umemura T, Tamura T, Ido T, Kusaka Y, Aoyama K, Ueda A, Harada K, Minamoto K, Otsuki T, Yamashita K, Takeshita T, Shibata E, Dobashi K, Kameo S, Miyagawa M, Kaniwa M, Yoshida T, Fukushima T, Yuta K.	A respiratory study by a new Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR).	Skin stimulation and testing (AATEX)	15(3)	124-129	2010
Sato K	Validation study of the new criteria for sensitizers using german sensitizers of deutsche forschungsgemeinschaft (DEG)	Int J Immunopathol Pharmacol	24(S1)	17-21	2011

ORIGINAL ARTICLE

## A Respiratory Sensitization Study by a New Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR)

Kazuhiro Sato<sup>1</sup>, Tomohiro Umemura<sup>1</sup>, Taro Tamura<sup>1</sup>,  
Yukinori Kusaka<sup>1</sup>, Toshiko Ido<sup>2</sup>, Kohji Aoyama<sup>3</sup>,  
Atsushi Ueda<sup>5</sup>, Kohichi Harada<sup>4</sup>, Keiko Minamoto<sup>5</sup>,  
Takemi Otsuki<sup>5</sup>, Kunihiro Yamashita<sup>6</sup>, Tatsuya Takeshita<sup>7</sup>,  
Eiji Shibata<sup>8</sup>, Kunio Dobashi<sup>9</sup>, Satomi Kameo<sup>10</sup>,  
Muneyuki Miyagawa<sup>11</sup>, Masaaki Kaniwa<sup>12</sup>,  
Takahiko Yoshida<sup>13</sup>, Tetsuhito Fukushima<sup>14</sup>  
and Kohtarō Yuta<sup>15\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Environmental Health, School of Medicine, University of Fukui, Fukui, Japan,  
<sup>2</sup>Department of Dermatology, School of Medicine, University of Fukui, Fukui, Japan,  
<sup>3</sup>Department of Environmental Medicine, Kagoshima University Graduate School of Medical and  
Dental Sciences, Kagoshima, Japan, <sup>4</sup>Department of Environmental Health, Faculty of Medical and  
Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, Kumamoto, Japan, <sup>5</sup>Department of Hygiene,  
Kawasaki Medical School, Okayama, Japan, <sup>6</sup>Daicel Chemical Industries, Ltd., Hyogo, Japan,  
<sup>7</sup>Department of Public Health, School of Medicine, Wakayama Medical University, Wakayama,  
Japan, <sup>8</sup>Department of Hygiene, Aichi Medical University, Aichi, Japan,  
<sup>9</sup>School of Health Sciences, Faculty of Medicine, Gunma University, Gunma, Japan,  
<sup>10</sup>Department of Public Health, Gunma University, Gunma, Japan, <sup>11</sup>National Institute of  
Occupational Safety and Health, Kanagawa, Japan, <sup>12</sup>Division of Medical Devices,  
National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan, <sup>13</sup>Department of Health Science, School of  
Medicine, Asahikawa Medical University, Asahikawa, Japan, <sup>14</sup>Department of Hygiene and Preven-  
tive Medicine, School of Medicine, Fukushima Medical University, Fukushima, Japan,  
<sup>15</sup>Fujitsu Limited, Tokyo, Japan (\*present: In Silico Data Ltd., Chiba, Japan)

### Abstract

New respiratory sensitization positive/negative prediction models with discriminant functions were generated and parameter analyses were discussed on the basis of QSAR technology. Samples used in this research were selected from the list of European Chemical Bureau (ECB): R42, R42/43 for positive samples (respiratory sensitizers) and from the classification results of the Japanese Inter-ministerial Committee for negative respiratory sensitizers (controls). A total of 214 compounds (61 positive sensitizers and 153 negative sensitizers) were used in this study. Parameters were generated from 2-D and 3-D structures of compound. All of the approximately 800 parameters generated were reduced to 12 parameter set by feature selection. Various linear and non-linear discriminant analysis methods were applied using the parameter set. All data analyses were performed using ADMEWORKS/ ModelBuilder software. Perfect classification ratios (100%) were achieved using Iterative Least Squares (ILS) and AdaBoost. The highest prediction ratio of 97.2% by leave-one-out cross-validation was achieved with Support Vector Machine (SVM). This model is applicable to initial prediction of respiratory sensitization.

*Key words: respiratory sensitization, quantitative structure-activity relationships (QSAR), animal study*



## Introduction

In occupational health, occupational skin disorders are the most common non-traumatic occupational condition. They include contact dermatitis, contact urticaria, eczema, skin cancer and other conditions. Among them, contact dermatitis is by far the most common form of occupational skin illness (Fedorowicz *et al.*, 2005). Respiratory sensitization is characterized by rhinitis, asthma, hypersensitivity pneumonia and eosinophilic pneumonia (Sato *et al.*, 2007). The prevalence of respiratory sensitization is low compared with that of contact dermatitis. However, severe and occasionally fatal reactions have been reported in respiratory sensitization (Fabbri *et al.*, 1988).

In July 2003, the United Nations published the Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS). GHS became available in 2008 all over the world (United Nations, 2009). The classification criteria for sensitizers in GHS include evidence from animal studies. According to DFG, 2009, in Germany and the European Chemical Bureau (ECB), European Union (EU), the criteria for skin sensitizers also include evidences from validated animal studies. Moreover, under the new European Union (EU) Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals (REACH) rules, all chemicals in the EU that are produced or imported in quantities of more than 1 ton per annum will need to be assessed as potential human and environmental hazards, for example, in terms of their carcinogenicity and human sensitivity to such chemicals will also need to be determined. REACH calls for increased use of hazard assessment alternatives such as *in vitro* methods and QSARs. Since no *in vitro* replacement is currently available for sensitization, the use of QSAR approaches presents an attractive alternative (Patlewicz *et al.*, 2008). Furthermore, the legislative trend towards the abolition of the animal testing of cosmetic products in the seventh Amending Directive 2003/15/EC to Cosmetics Directive 76/768/EEC includes a demand for alternative evaluation procedures (Carrera *et al.*, 2009). Although animal studies for sensitization exist, their application is limited by time

and cost constraints for the development of new chemicals (Golla *et al.*, 2009). Owing to this legislation and animal welfare concerns, computational techniques, such as QSARs, have recently been advanced for assessing various human toxicities (e.g., carcinogenicity, sensitization). Therefore, QSAR-related systems have been extensively developed for skin sensitization. Some of them are already commercialized. Those are Toxicity Prediction Komputer-Assisted Technology, (Accelrys Inc., San Diego, CA, USA; TOPKAT) and Computer-Automated Structure Evolution (MultiCASE Inc., Cleveland, Ohio, USA; M-CASE), which are both statistically based, Deductive Estimation of Risk from Existing Knowledge (Derek) for Windows (DfW, LHASA Ltd., Leeds, UK), which is knowledge-based, and Times Metabolism Stimulator for skin Sensitization (LMC, University of Bourgas, Bulgaria; TIMES-SS), which is hybrid (Patlewicz *et al.*, 2007a, Patlewicz *et al.*, 2007b). We also made Japanese first QSAR model for skin sensitization using ADMEWORKS/ModelBuilder software (Fujitsu Kyushu Systems Limited, Japan), which is statistically based (Hayashi *et al.*, 2005, Sato *et al.*, 2009).

To date there is no thoroughly validated method to induce and detect respiratory sensitization in animal model (Deutschen Forschungsgemeinschaft, DFG, 2008, United Nations, 2009), although characterization of sensitization potential by cytokines produced by T-cells in *in vivo* tests shows considerable promise (Dearman *et al.*, 1996). Compared with QSAR model for skin sensitization, QSAR models for respiratory sensitization are scarce (Agius *et al.* 1991, Karol *et al.* 1996, Graham *et al.* 1997, Seed *et al.* 2008, Warne *et al.* 2009, Seed *et al.* 2010). We made QSAR model for respiratory sensitization using ADMEWORKS/ModelBuilder (Fujitsu Kyushu Systems Limited, Japan). and the highest prediction rate was 97.2% by leave-one-out cross-validation with Support Vector Machine (SVM). This is the first Japanese QSAR model for respiratory sensitization.

## Materials and Methods

### 1 Data sources for chemicals assessed

Positive data for respiratory sensitizers are from a list of 116 compounds as allergens, that is, R42 and R42/R43 (European Commission). R42 are the substances which may cause sensitization by inhalation. "if there is evidence that the substance or preparation can induce specific respiratory hypersensitivity, where there are positive results from appropriate animal tests, or, if the substance is an isocyanate, unless there is evidence that the specific isocyanate does not cause respiratory hypersensitivity." R42/43 are allergens which may cause sensitization by inhalation and skin contact. On the other hand, negative data are for 222 control compounds (4 substances belonging to the group defined as 'not classified' for respiratory sensitizer, which means that these are reported as non-respiratory sensitizers and 218 substances belonging to the group defined as 'not classified' for skin sensitization, which means that these are reported as non-skin sensitizers and also defined as 'not possible' for respiratory sensitization, which means that these are impossible to classify as respiratory sensitizer) in the results of the classification by the Japanese GHS Inter-ministerial Committee in National Institute of technology and evaluation (NITE) Information concerns the status of the implementation of GHS in Japan (NITE Information). We also regarded dermal non-sensitizers as respiratory non-sensitizers (Graham C *et al.*, 1997). However, inorganic

chemicals, organic metal chemicals and polymers are special compounds, and are not analyzed with general organic compounds in computational chemistry. Therefore, we deleted these compounds (124) and finally assessed 61 positive sensitizing compounds and 153 negative sensitizing compounds (total 214 substances).

### 2.2 Parameters and discriminant function.

A total of 214 compounds (61 positive sensitizing chemicals and 153 negative sensitizing chemicals) were used. Parameters were generated from 2-D and 3-D structures of the compounds. All of the approximately 800 generated parameters were reduced to 12 parameter sets (Table 1) by feature selection (e.g. removing low incidence parameter, multicollinearity or noise parameter). Various linear and non-linear discriminant analyses including Linear Learning Machine (LLM), Neural Network (NN), Support Vector Machine (SVM), AdaBoost and Iterative Least Squares (ILS) linear discriminant methods were applied using 12 parameter set. Negative coefficients in discriminant function indicate negative information of the activity. Positive coefficients indicate positive information. Classification rates and prediction rates (leave-one-out cross-validation, CV) of discriminant function were also calculated. All data analyses were performed using ADMEWORKS/ModelBuilder software (Fujitsu Kyushu Systems Limited, Japan). This study was approved by the Conflict of Interest (COI) Committee of School of Medicine, University of Fukui, Fukui, Japan.

Table 1 12 Parameters for respiratory sensitization

Parameter name	Weight	Average	Std Dev
Count of substructure (DMPATH) (-ester-)	0.38621	0.432558	0.769671
Count of substructure (DMPATH) (-N-)	0.317884	0.274419	0.636907
Fast count the substructure (=S=)	0.182767	0.153488	0.916961
Fast count the substructure (-N-)	0.084473	0.306977	0.70293
Environment molecular connectivity of substructure (-C(O)-)	0.069542	0.816819	0.864617
All-path calc for substructure (-C)	-0.373663	18.116777	22.04109
Molar refractivity environment of the substructure (-C(O)N-)	-0.251503	5.153574	17.063501
Molar refractivity environment of the substructure (-C(O)N=)	-0.197693	4.361633	16.89031
Number of double bonds	0.150684	1.776744	1.636733
Average Energy Resulting from ALL Group Energies	-0.431519	1.365581	10.02545
Bond strain energy of molecule	-0.112731	112.8868	106.937775
Mass weighted Width/Thickness	-0.066721	620.8718	479.725891
CONSTANT	-0.48619		

## Results

### 1 Weight of parameter

The weight of 'Count of substructure (DMPATH)', that is, the number of ester bonds (R-COO-R'), was 0.386210, and that of 'Count of substructure (DMPATH)', that is, the number of nitrogen (-N-) was 0.317884, which were both highly positive values as shown in Table 1. These are considered to induce respiratory sensitization. On the other hand, the weight of 'All-path calc for substructure' (-C-) of -0.373663 and 'Average Energy Resulting from All Group Energies' of -0.431519 were highly negative values (Table 1). 'Average Energy Resulting from All Group Energies' calculates average binding energies as a sum of contributions of 10 common functional groups (Andrews binding) (Andrews PR *et al.*, 1984).

### 2 Discriminant analysis

We performed discriminant analyses and leave-one-out cross-validation (CV) of 214 (61 positive, 153 negative) chemicals assessed by Linear Learning Machine (LLM), Neural Network (NN), Iterative Least Squares (ILS) linear discriminant, Support Vector machine (SVM) and AdaBoost with 12 parameter set (Table 2).

Classification rates were 99.53% to 100%. Complete classification (100%) was achieved in ILS and AdaBoost. The prediction rate was assessed by leave-one-out cross-validation (CV). CV results were 95.33% to 97.2%. The highest CV of 97.2% was achieved in SVM. CV in ILS and AdaBoost were 95.33% and 96.73%, respectively, whose classification rates were 100%.

### Discussion

The paucity of a significant experimental database of respiratory sensitization potential has resulted in fewer attempts to form quantitative structure activity relationships (QSAR) for respiratory sensitization than those for skin sensitization (Rodford *et al.*, 2003). Of particular difficulty is the identification of reliable negative controls (Kimber *et al.*, 1996). We were unable to locate any clinical reports of non-sensitizing respiratory chemicals (control) with the exception of only 4 chemicals defined as 'not classified' for respiratory sensitization, which means

**Table 2** Descriptive analyses, classification rate (%Correct) and prediction rate (Cross-Validation (CV)) with 12 parameters

Linear Learning Machine (LLM)			
Class	Members	Wrong	%Correct
0	153	0	100
1	61	1	98.36
Total	214	0	99.53
CV: 95.79%			
Neural Network (NN)			
Class	Members	Wrong	%Correct
0	153	0	100
1	61	1	98.36
Total	214	1	99.53
CV: 95.33%			
Iterative Least Squares (ILS)			
Class	Members	Wrong	%Correct
0	153	0	100
1	61	0	100
Total	214	0	100
CV: 95.33%			
Support Vector Machine (SVM)			
Class	Members	Wrong	%Correct
0	153	0	100
1	61	1	98.36
Total	214	1	99.53
CV: 97.20%			
AdaBoost			
Class	Members	Wrong	%Correct
0	153	0	100
1	61	0	100
Total	214	0	100
CV: 96.73%			

Class 0: negative control, Class 1: positive respiratory sensitizer

that these are reported as non-respiratory sensitizers (NITE information). We assumed that dermal non-sensitizers are also respiratory non-sensitizers defined as 'not classified' for skin sensitization, which means that these are reported as non-skin sensitizers and also defined as 'not possible' for respiratory sensitization, which means that these are impossible to

classify as respiratory sensitizer in the results of the classification by the Japanese GHS Inter-ministerial Committee in National Institute of technology and evaluation (NITE) Information about the status of the implementation of GHS in Japan (Graham *et al.*, 1997).

First computational methods for the analysis of the relationships between structure and activity of respiratory allergens have focused only upon electrophilic potential (Agius *et al.*, 1991). Graham C (1997) reported a SAR model for chemical respiratory allergens using CASE/MultiCase systems. The CASE/ Multi-Case predicted activity in two sub models each: Units of potency and probability of activity. The sub models were validated using the leave-one-out method. The MultiCase models correctly predicted 80% of the sensitizers (sensitivity) and 98% of the nonsensitizers (specificity). The CASE models had lower sensitivities (72% and 75%) but similar specificities (98% and 95%) to MutiCase. The external data-withholding exercise used to validate the model yielded a sensitivity of 0.95 and a specificity of 0.95 (Graham *et al.*, 1997).

Sensitizers were found to differ from non-sensitizers in certain physical-chemical properties, specifically in molecular weight, water solubility, Log P (octanol/water partition coefficient) or LUMO (lowest unoccupied molecular orbital) (Graham *et al.*, 1997). However, there were not these parameters in Table 1. It must be noted that respiratory sensitization does differ from skin sensitization in number of respects. Antigen formation can occur in the aqueous respiratory tract fluids, and thus water solubility is an important property to be considered. For skin sensitizers, low water solubility is necessary to enable the chemical to penetrate the skin (Rodford *et al.*, 2003). Our previous QSAR model on skin sensitization (Sato *et al.*, 2009) showed that the weight of 'Secondary sp<sup>3</sup> carbon count', that is, the number of methylene groups (-CH<sub>2</sub>-), was 0.290789, that of 'Environment molecular connectivity of substructure' (-C(O)-) was 0.288673. These were high positive values in 32 parameter set. That of the weights of 'All-path calc for substructure' (-C-) was -0.265617 and that of 'Count of substructure (DMPATH)' (-ester-) was -0.233505. These

were high negative values in 32 parameter set. That of Log P was -0.05034 in 47 parameter set. Both 'Environment molecular connectivity of substructure (-C(O)-)' and 'All-path calc for substructure (-C)' are kinds of molecular connectivity (MC) indexes (Todescini *et al.*, 2009, Randic's) which are indexes of branching and measures of the complexity of the assigned substructure ((-C(O)-: carbonyl group, (-C): methyl group). The basic algorithm of these parameters is modified based on Randic's topological parameters (Randic M, 1975). The prediction rate was assessed by leave-ten-out Cross-Validation (CV). CV results were 73.88% to 81.44%. The highest CV of 81.44% was achieved in NN with 47 parameter sets (Sato *et al.*, 2009). We will perform external validation of the QSAR model for skin sensitization using 413 skin sensitizers (Coz *et al.*, 2006) according to Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) principles of QSAR models in the near future (OECD, 2004).

In this study, 'Secondary sp<sup>3</sup> carbon count' and 'Environment molecular connectivity of substructure' were not in Table 1. The weight of 'All-path calc for substructure' was -0.373663. That of 'Count of substructure(DMPATH)' (-ester-) was 0.386210. The absolute value of 'Average Energy Resulting from All Group Energies' was the largest in 12 parameters (-0.431519) (Table 1). 'Average Energy Resulting from All Group Energies' calculates average bond energies as a sum of contributions of 10 common functional groups (Andrews binding) (Andrews PR *et al.*, 1984). The primary use of 'Average Energy Resulting from All Group Energies' is to deduce whether a particular drug represents a good or bad match to its receptor. Negative value indicates binding with its receptor or certain protein. Therefore, binding with its receptor or certain protein might be most important factor in respiratory sensitization (haptentation).

All approaches of these five discriminant methods (Table 2) achieved very high classification and prediction rates. Though there are not major differences in these five approaches, each model is strongly influenced by chance correlation and overfitting. The number of parameters in this study did not meet