

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

気道障害性を指標とする室内環境化学物質のリスク評価手法の開発に関する研究

気道障害性の *in vitro* 評価

研究分担者 河上 強志 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 室長

今年度はプロピレングリコールエステル類、グリコールエステルアセテート類、ポリ環状シロキサン類及び香料類など、揮発性有機化合物（Volatile organic compound: VOC）及び準揮発性有機化合物（Semi volatile organic compound: SVOC）に分類される 27 化合物について Direct peptide reactivity assay（DPRA）による感作性評価を実施した。その結果、香料の methyl jasmonate、防腐剤である 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol（bronopol）とその分解生成物である bromonitromethane 並びに 2-bromoethanol、及び芳香族第一級アミンである 2,4-diaminotoluene の 5 化合物が陽性と分類された。そのうち、methyl jasmonate についてはヒトや動物試験では感作性が認められていないことから、本研究では偽陽性を示している可能性が考えられた。一方で、本研究で陰性と分類された幾つかの化合物は動物試験等では感作性を有していると報告されており、感作性の弱い化合物においては、DPRA による評価のみならず、別の試験法による評価も用いた総合的な判定が必要と考えられた。臨床報告では、これまで bronopol はホルムアルデヒドドナー型防腐剤であることから、ホルムアルデヒドの影響が指摘されていたが、本研究によりその分解物である bromonitromethane 及び 2-bromoethanol が陽性に分類されたことから、これらの分解生成物の影響を検討する必要があると考えられた。また、bronopol については Lys/Cys が 0.2 を超えており気道感作性を有している可能性が考えられたことから、動物試験や疫学調査などにより総合的な評価を行う必要があるものと考えられる。

A. 研究目的

人間は一日の大半を室内環境で過ごすことから、室内空気は人間の健康上、重要な環境媒体である。我が国では室内空気の安全性について、室内濃度指針値が 13 種類の化学物質対して策定¹⁾され、建築基準法では 2 種類の化学物質が規制対

象²⁾とされている。

しかしながら、室内濃度指針値が策定されてから 10 年程度過ぎ、代替溶剤等の使用や準揮発性有機化合物（Semi volatile organic compound: SVOC）による室内環境汚染が懸念されるようになってきている。このような背景から、2012 年からシック

ハウス（室内空気汚染）問題に関する検討会（シックハウス検討会）が開催され、室内濃度指針値の見直しや、対象物質の追加に関する議論が進められている³⁾。この検討会では、現在の室内空気汚染実態の把握のために、全国調査を実施するとともにその結果を公表している。この実態調査結果から室内空気中で注目すべき化合物を選定し、既存のハザード情報に基づく初期リスク評価、さらには優先化合物リスト作成、詳細リスク評価を経て最終的に室内濃度指針値の見直しが行われることになっている。しかし、このような化合物の初期リスク評価に資するハザード情報は比較的限られている。そのため、この段階が室内濃度指針値の改定において律速となることが懸念されている。そこで、本研究ではハザード情報の網羅的な収集、並びに不足情報の補完方法の確立を目的としている。具体的には、気道内挙動の *in vitro/in silico* 予測、気道障害性の *in vitro* 評価及び気道障害性にかかる情報収集及び優先順位判定をサブテーマとして設定して検討を進め、気道障害性が疑われる室内環境化学物質についての優先取組リスト等、室内環境衛生にかかる厚生労働行政を推進する上で必要不可欠な情報の提供を目指している。本分担研究課題は、気道障害性の *in vitro* 評価として、室内環境化学物質の気道感作性評価を目的としている。

化学物質の感作性については、皮膚感作性と気道感作性とがある。前者はIV型アレルギー（遅延型アレルギー）であり、*in vitro* 及び *in vivo* のどちらでも多くの試験法が確立している⁴⁾。そして、これまで

に数多くの化学物質が評価され、その皮膚感作性の有無が報告されている。一方、後者は主にI型アレルギー（瞬時型アレルギー）である。産業衛生学会では、気道感作性物質はアレルギー性呼吸器疾患（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）を誘発する物質と定義付けており、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）と分類し、それぞれに判断基準を示している⁵⁾。ただし、気道感作性については、*in vivo* 及び *in vitro* どちらの試験系においても確立された試験方法はこれまで報告されていない^{4,6)}。そのため、気道感作性物質として確認されている化学物質数は皮膚感作性物質に比べると非常に少ないのが現状である⁵⁾。

化学物質の感作性試験について、近年は動物愛護の観点から代替法が開発されている。そして、その際には *adverse outcome pass way* (AOP) を考慮した試験法の開発が行われている。皮膚感作法試験については、Fig. 1 に示したように、①化学物質とタンパク質との結合、②ケラチノサイトにおける炎症性応答及び遺伝子発現、③樹状細胞の活性化、④リンパ節におけるT細胞の活性化、といった各ステージに対応した試験法が開発されている⁷⁾。このうち、①の化学物質とタンパク質との結合について評価している *Direct peptide reactivity assay* (DPRA) は、Fig. 2 に示したシステイン含有ペプチド (Cys-peptide) またはリジン含有ペプチド

(Lys-peptide) と被験物質とを混合し 24 時間反応させた後、未反応のペプチド量を測定し、そこから被験物質の反応性を分類する方法である。この方法は、Gerberick ら⁸⁾によって開発され、現在は OECD のテストガイドライン⁹⁾に採用されている (OECD Guideline for the Testing of Chemicals TG 442C (In Chemico Skin Sensitization: Direct Peptide Reactivity Assay))。この DPRA について、被験物質に対する Cys-peptide 及び Lys-peptide の結合性の差から、その気道感作性を評価できる可能性が報告されている¹⁰⁾。

そこで本分担研究では、室内空気汚染実態全国調査等にて高頻度・高濃度で検出が報告されている化学物質を中心に、DPRA を用いた皮膚感作性及び気道感作性評価を実施している。昨年度は、グリコール等 23 化合物について評価を実施した。今年度はプロピレングリコールエステル類、グリコールエステルアセテート類、ポリ環状シロキサン類及び香料類など 27 化合物について評価を実施した。また、DPRA ではペプチド減少率が陽性判定のクライテリア付近の場合には、再試験を実施することになっている (Cysteine 1:10/Lysine 1:50 prediction model では 3~10%、Cysteine 1:10 prediction model のみモデルでは 9~17%)⁹⁾。昨年度、試験を実施した diethylhexyl fumarate はこの条件に該当していたことから、diethylhexyl fumarate について再試験を実施した。

B. 研究方法

B1. 試薬類

評価対象とした被験物質の購入先を

Table 1 に示した。また、それらの化学構造を Fig. 3 に示した。対象とした化合物は全て世界保健機関 (World Health Organization: WHO) の定義で、揮発性化合物 (Volatile organic compound: VOC) 及び SVOC に定義された¹¹⁾。リン酸緩衝液の作製に使用した、リン酸二水素ナトリウム及びリン酸水素二ナトリウムは関東化学製の特級試薬を用いた。酢酸アンモニウム緩衝液の作製に用いた酢酸アンモニウム及びアンモニウム水はナカライテスク製及び和光純薬工業製をそれぞれ用いた。アセトニトリル及びトリフルオロ酢酸 (TFA) はシグマアルドリッチ製及び和光純薬工業製の HPLC 用をそれぞれ用いた。Cys-peptide 及び Lys-peptide は株式会社スクラムより購入した。試験に用いた水は全てミリポア製超純水製造装置 Milli-Q AdvantageA10 で製造した水を用いた。

リン酸緩衝液は各 100 mmol/L に調製したリン酸二水素ナトリウム水溶液及びリン酸水素二ナトリウム水溶液を 18/82 の割合で混合し、pH を 7.5±0.05 に調製したものをを用いた。酢酸アンモニウム緩衝液は酢酸アンモニウム 1.542 g を 200 mL の水に溶解した後、アンモニア水を用いて pH を 10.2 に調製したものをを用いた。

ペプチド溶液は Cys-peptide (Cys 溶液) 及び Lys-peptide (Lys 溶液) が 0.667 mmol/L となるように、それぞれリン酸緩衝液及び酢酸アンモニウム緩衝液に溶解させた。

陽性対照に使用した Cinnamic aldehyde 及び各被験物質は 100 mmol/L となるようにアセトニトリルに溶解させた。

B2. 試験方法

OECD TG 442C に従い試験した。Cys-peptide と各被験物質との反応では、Cys 溶液 750 µL に 200 µL のアセトニトリル及び被験対象物質溶液 50 µl を加え、ボルテックスミキサーで攪拌した後、暗所にて 25°C で 24 ± 2 時間静置した。24 時間後に高速液体クロマトグラフ/フォトダイオードアレイ検出器 (HPLC/PDA) にて Cys-peptide を測定した。Lys-peptide では、Lys 溶液 750 µL に 250 µL の被験物質溶液を加え、ボルテックスミキサーで攪拌した後、Cys-peptide と同様に操作後に測定した。また、各ペプチドとの反応において、ペプチド溶液を対応する各緩衝液に置き換えた試料を Co-elution control、被験物質溶液をアセトニトリルに置き換えたものを Reference control としてそれぞれ調製し用いた。ここで、Co-elution control は各ペプチドと被験物質の保持時間が重なるの有無の確認用、Reference control は各ペプチドの安定性評価に用いている。また、試験の成立確認のために、各ペプチドについて検量線を作製し測定した。

これらの試験は、最初に混合された試料から 22~26 時間以内に HPLC による測定を開始し、HPLC 分析は測定開始から 30 時間以内終了した。

各被験物質によるペプチド減少量は次式から算出した。

$$\text{Peptide Depletion (\%)} = \left[1 - \frac{\text{Peptide peak area in replicate injection}}{\text{Mean peptide peak area in reference controls}} \right] \times 100$$

DPRA では被験物質のペプチドとの反応性の評価は、ペプチド減少率の平均値を算出し、Table 2 に示したモデルで分類

することになっている⁹⁾。この際、各ペプチドと被験物質の溶出時間が重なるかどうか、Co-elution control を測定し確認することになっている。もし、ペプチドと被験物質の溶出時間が重なる場合にはペプチド減少率の算出が不可能となる (共溶出 : Co-elution)。ただし、共溶出が Lys-peptide のみの場合には、Cys-peptide 1:10 prediction model に従い分類することになっている。また、共溶出が認められない場合で減少率がマイナスを示した場合には、減少率はゼロとして平均値を算出している。

OECD TG 442C では DPRA 法の実施にあたり試験者の技術レベルを確認するため、感作性強度が extreme から non-sensitizer まで幅広い 10 物質を用いた技能試験 (proficiency test) の実施が求められており、Cys-peptide 及び Lys-peptide のそれぞれについて、10 物質中 8 物質以上で所定のペプチド減少率の範囲に収まることが要求されている⁹⁾。本研究では、昨年度に、proficiency test を実施し OECD TG 442C の要求範囲に収まっていることを確認している¹²⁾。

B3. HPLC/PDA 条件

島津製作所製の NexeraX2 システムを用いた。カラムにはアジレントテクノロジー社製の Zorbax SB-C18 (内径 2.1 mm × 長さ 100 mm × 粒子径 3.5 µm) を用いた。カラムオープン温度及びオートサンPLA ラック温度は 30°C 及び 25°C とした。流速は 0.35 mL/min、注入量は 10 µL とした。移動相は、A 液が 0.1% (w/w) TFA 水、B 液が 0.085% (w/w) TFA アセトニ

トリルとした。グラジエント条件は B 液を初期濃度 10%から 10 分間に 25%とし、その後 1 分間で 90%とした。その後、2 分間 B 液 90%で保持した後、0.5 分で 10%とし、その後 7.5 分間保持した。測定波長は 220 nm 及び 258 nm とし、ペプチド減少率は 220 nm で測定した。

C. 結果及び考察

C1. 各ペプチドとの共溶出について

各ペプチドについて、被験物質無し (Reference control) 及び陽性対照と反応させた (Positive control) 試料の HPLC クロマトグラムを Fig. 4 に示した。本年度試験した 27 化合物のうち、Cys-peptide では 2-phenylethyl alcohol で、Lys-peptide では diethylene glycol monoethyl ether acetate で共溶出が確認された (Fig.4)。そのため、diethylene glycol monoethyl ether acetate は Cys-peptide 1:10 prediction model で評価し、2-phenylethyl alcohol は評価を実施しなかった。

C2. 各被験物質の評価結果

本年度試験した 27 化合物の評価結果を Table 3 に示した。また、前述のように、ペプチド減少率が陽性判定のクライテリア付近の場合には、再試験を実施することになっている。これまでに評価した化合物では、昨年度試験した diethylhexyl fumarate 及び今年度試験した diethylene glycol monobutyl ether、methyl jasmonate、3-(4-tert-butylphenyl)isobutyraldehyde、2-bromoethanol 及び 2,6-diaminotoluene の 6 化合物が該当した (Table 3)。そこで、これらの化合物について再試験を実施し

たところ、2,6-diaminotoluene を除く 5 化合物は最初の試験結果と同じ結果を示した。2,6-Diaminotoluene については、初回が陽性、二回目が陰性であったことから、さらに試験を実施したところ、二回目と同じ結果となり陰性と分類された。

最終的に今年度試験した化合物では、試験が成立した 26 化合物のうち、5 化合物が陽性と分類され、その他の化合物は陰性と分類された。

室内空気汚染全国実態調査³⁾では、グリコールエーテル類やポリ環状シロキサン類が高頻度及び高濃度で検出されることが報告されている。今年度試験した、グリコールエーテル類、グリコールエーテルアセテート類及びポリ環状シロキサン類については、感作性は全て陰性と分類された。ポリ環状シロキサンである、octamethylcyclotetrasiloxane 及び decamethylcyclotetrasiloxane については、昨年度の本研究班の分担研究者による毒性情報収集の結果¹³⁾でも感作性が認められないことが報告されている。

8 種類の香料化合物について評価を実施したところ benzyl benzoate 及び 3-(4-tert-butylphenyl) isobutyraldehyde が陰性に分類された。これらの化合物は、マウスを用いた局所リンパ節アッセイ (Local Lymph Node Assay : LLNA) では弱い陽性物質 (Weak sensitizer) と分類され、DPRA 開発時の報告では benzyl benzoate が陰性、3-(4-tert-butylphenyl) isobutyraldehyde が弱い陽性と分類されている¹⁴⁾。DPRA では感作性の弱い化合物については、偽陰性と判定される可能性があることが指摘されており⁷⁾、そのため

本研究ではこれらの化合物が陰性に分類されたものと考えられた。また、本研究では methyl jasmonate が弱い陽性化合物と分類されたが、モルモットマキシミゼーション試験 (Guinea pig maximization test: GPMT) や、ヒト累積感作性試験 (Human repeated insult patch test: HRIPT) では methyl jasmonate について感作性は認められていない¹⁵⁾。DPRA 開発時に 82 化合物が試験され、LLNA では非感作性物質 (Non sensitizer) と分類されている化合物のいくつかで、弱い陽性と分類されたことが報告されている¹⁴⁾。そのため、本試験では methyl jasmonate は偽陽性を示している可能性が考えられた。また、今回試験に用いた methyl jasmonate は異性体混合物であり、CASRN が異性体を含まないもの (CASRN. 1211-29-6) と異なっていた。そのため、試験結果に異性体の影響も含まれている可能性も考えられた。Ethylene 1,11-undecanedicarboxylate は、欧州連合 (European Union: EU) の消費者科学委員会 (Science Committee of Consumer Safety: SCCS) による化粧品用香料に関する意見書で、構造活性相関に基づき非感作性物質と予測されていたが¹⁶⁾、本研究においても陰性と分類された。

2-Bromo-2-nitro-1,3-propanediol は bronopol と呼ばれる防腐剤であり、化粧品をはじめウェットティッシュ等の衛生製品¹⁷⁾など様々な製品の防腐剤として使用されている。この防腐剤については、GPMT では感作性について判断できないとの報告¹⁸⁾がある一方で、接触皮膚炎の臨床報告では原因物質とされている^{19,20)}。Bronopol はホルムアルデヒドを放出する

ホルムアルデヒドドナー型防腐剤として知られており、ホルムアルデヒドを放出しながら、bromonitromethane や 2-bromoethanol へと分解される (Fig. 5)。そのため、bronopol の感作にはホルムアルデヒドの影響が指摘されていたが、bronopol に陽性を示す患者でホルムアルデヒドにも陽性を示したのは 15%であったことから、bronopol 自体が感作性を有している可能性が指摘されている²¹⁾。さらに、ヒト由来細胞や NMR を用いた試験により、bronopol による感作はホルムアルデヒドとは反応性が異なることや、2-bromoethanol も関与していることなどが報告されている²²⁾。本研究では、bronopol とその分解物である bromonitromethane 及び 2-bromoethanol について、DPRA による評価を実施した。その結果、これら 3 種類の化合物は全て陽性に分類され、bronopol のみならず、その分解物も感作性を有していることが明らかとなった。ただし、bronopol については、温度及び pH が高いほどホルムアルデヒドを放出し分解することが報告されており、リン酸緩衝液中で pH 8.0、25°C の条件のとき、1000 µg/L (5 mmol/L) の bronopol から 24 時間で 30 µg/L (1 mmol/L) のホルムアルデヒドの生成が確認されている²³⁾。DPRA では pH 7.5 及び 10.2 の緩衝液を使用し、各ペプチド溶液を添加後、25°C で 24±2 時間静置しており、bronopol を陽性と分類するには、試験時の分解生成物の影響を検討する必要があると考えられた。

本研究では 3 種類の芳香族第一級アミンについて試験を実施した。そのうち、

2,4-diaminotoluene については、GPMT の結果の解釈の違いから感作性について評価が分かれているが^{24,25)}、本研究では陽性と分類された。また、その構造異性体である 2,6-diaminotoluene については、陰性と分類された。4,4'-Methylenedianiline は GPMT で陽性が認められているが²⁶⁾、本研究では陰性に分類されており、偽陰性を示している可能性が考えられた。

Morpholine、cyclohexylamine 及び dicyclohexylamine は様々な用途に使用されているが、ゴム製品の製造に用いるベンゾチアゾール系の加硫促進剤の分解物として、ゴム製品から放散することが知られている。これらの化合物は本研究では陰性に分類された。

C3. 被験物質の気道感作性

Lalko et al. は既知の気道感作性物質と、皮膚感作性を有するが気道感作性を有さない化合物とを DPRA により評価し、それらの Cys-peptide 及び Lys-peptide におけるペプチド減少率の比 (Lys/Cys) を求め比較した¹⁰⁾。その結果、気道感作性を有する化合物の方が、皮膚感作性のみ有する化合物に比べて Lys/Cys が大きくなることを報告しており、気道感作性物質の Lys/Cys は 0.2 以上を示していた。本研究で陽性と判断された 5 化合物について Lys/Cys を見ると、0.2 以上を示したのは bronopol と 2-bromoethanol の 2 化合物であった。ただし、2-bromoethanol については、2 回試験を実施しており、1 回目は Lys/Cys は 0.012 と 0.2 を大きく下回っている。これは、2-bromoethanol のペプチド減少率が陽性クライテリア付近であり、特に

Lys-peptide の減少率が 1 回目と 2 回目で大きく異なることが影響している。このように、弱い陽性を示す化合物については Lys/Cys を用いた気道感作性評価は適切ではないと考えられた。Bronopol については気道感作性に関するデータがないため、分類できないとされているが²⁷⁾、本研究で気道感作性の可能性が考えられたことから、今後、動物試験や疫学調査などにより総合的な評価を行う必要があるものと考えられる。

D. まとめ

今年度はプロピレングリコールエステル類、グリコールエステルアセテート類、ポリ環状シロキサン類及び香料類など VOC 及び SVOC に分類される 27 化合物について DPRA による感作性評価を実施し、5 化合物が陽性と分類された。そのうち、methyl jasmonate についてはヒトや動物試験では感作性が認められていないことから、本研究の結果は偽陽性を示している可能性が考えられた。一方で、陰性と分類された化合物の幾つかは、動物試験等で感作性有りとしてされており、感作性の弱い化合物においては、DPRA による評価のみならず、別の試験法による評価も用いた総合的な判定が必要と考えられた。Bronopol はそれ自身のみならず、分解生成物である bromonitromethane 及び 2-bromoethanol が陽性に分類されたことから、その影響を検討する必要があると考えられた。また、bronopol は Lys/Cys が 0.2 を超えており気道感作性を有している可能性が考えられたことから、今後、動物試験や疫学調査などにより総合的な

評価を行う必要があるものと考えられる。

E. 研究発表

E1. 論文発表

1) 清水久美子・秋山卓美・伊佐間和郎・河上強志・五十嵐良明: グアニジン系加硫促進剤の感作性評価と家庭用ゴム製品の実態調査, 国立衛研報, 134, 42-49, 2016.

E.2 学会発表

- 1) 河上強志・伊佐間和郎・香川聡子・神野透人: 家庭用水性スプレー製品中のグリコール類等の実態と製品使用時の平均室内空气中濃度の推定, 第25回環境化学討論会 (2016.6)
- 2) 河上強志・伊佐間和郎・五十嵐良明: ポリウレタン製繊維製品に使用されたベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤の簡易分析法の検討と実態調査, 第25回環境化学討論会 (2016.6)
- 3) 河上強志・秋山卓美・五十嵐良明: 酸化染毛剤による皮膚障害の防止方策に関する研究, 第2回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム 2016 (2016.9)
- 4) 河上強志・伊佐間和郎・五十嵐良明: 繊維製品中のアレルギー性金属に関する調査, 第46回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会・学術大会 (2016.11)
- 5) 河上強志・伊佐間和郎・五十嵐良明: ポリウレタン繊維製品におけるベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤の使用傾向, 第53回全国衛生化学技術協議会年会 (2016.11)

6) 河上強志・伊佐間和郎・香川聡子・神野透人: 室内空气中グリコール類濃度に対する家庭用水性スプレー製品の寄与, 第53回全国衛生化学技術協議会年会 (2016.11)

7) 秋山卓美・清水久美子・河上強志・伊佐間和郎・五十嵐良明: グアニジン系加硫促進剤4種の感作性及び家庭用ゴム製品中の含有量, 第53回全国衛生化学技術協議会年会 (2016.11)

8) 河上強志・伊佐間和郎・五十嵐良明・神野透人: DPRAによる揮発性及び準揮発性有機化合物類の感作性評価, 日本薬学会大137年会 (2017.3)

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

G. 引用文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室: 室内濃度指針値一覧, <http://www.nihs.go.jp/mhlw/chemical/situnai/hyou.html>
- 2) 国土交通省: 改正建築基準法に基づくシックハウス対策の概要, <http://www.mlit.go.jp/jutakukentiku/build/sickhouse.files/gaiyou.pdf>
- 3) 厚生労働省: シックハウス(室内空気汚染)問題に関する検討会, <http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/other-iyaku.html?tid=128714>

- 4) 青山公治：動物による皮膚及び呼吸器感作性試験の最近の動向，日衛誌，65，14-19，2010.
- 5) 産業衛生学会：許容濃度等の勧告（2014年度），産衛誌，56，162-188，2014.
- 6) Mekenyan O., Patlewicz G., Kuseva C., Popova I., Mehmed A., Kotov S., Zhechev T., Pavlov T., Temelkov S., Roberts W.D.: A mechanistic approach to modeling respiratory sensitization, *Chem. Res. Toxicol.*, 27, 219-239, 2014.
- 7) 辻田恭子・足利太可雄：皮膚感作試験代替法開発への取り組み，*Fragrance Journal*, 2014-9, 27-31, 2014.
- 8) Gerberick G.F., Vassallo J.D., Bailey R.E., Chaney J.G., Morrall S.W., Lepoittevin J.P.: Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens, *Toxicol. Sci.*, 81, 332-343, 2004.
- 9) OECD Guideline for the Testing of Chemicals TG 442C (In Chemico Skin Sensitization: Direct Peptide Reactivity Assay).
- 10) Lalko J.F., Kimber I., Gerberick G.F., Foertsch L.M., Api A.M., Dearman R.J.: The direct peptide reactivity assay: Selectivity of chemical respiratory allergens, *Toxicol. Sci.*, 129, 421-431, 2012.
- 11) World Health Organization: Indoor air quality investigations, organic pollutants, Euro reports and studies No.111, WHO, Regional office of Europe, Copenhagen (1989).
- 12) 河上強志・伊佐間和郎：気道障害性の in vitro 評価，厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）「気道障害性を指標とする室内環境化学物質のリスク評価手法の開発に関する研究」平成 27 年度報告書
- 13) 東賢一：気道障害性にかかる情報収集及び優先順位判定，厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）「気道障害性を指標とする室内環境化学物質のリスク評価手法の開発に関する研究」平成 27 年度報告書
- 14) Gerberick F., Vassallo J.D., Foertsch L.M., Price B. B., Chaney, J. G., Lepoittevin, J.P.: Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: a classification tree model approach, *Toxicol. Sci.*, 97, 417-427, 2007.
- 15) Scognamiglio J., Jones L., Letizia C.S., Api A.M.: Fragrance material review on methyl jasmonate, *Food Chem. Toxicol.*, 50, S572-S576, 2012.
- 16) Scientific Committee on Consumer Safety: Opinion on fragrance allergens in cosmetic products, http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_073.pdf
- 17) Kawkamai T., Isama K., Ikarashi Y.: Survey of isothiazolinones and other preservatives in household wet tissue products in Japan, *J. Environ. Chem.*, 25, 207-214, 2015.
- 18) 野田勉・山野哲夫・清水充：家庭用品に使用される化学物質の皮膚感作性試験（VI）抗菌剤 2-chloroacetamide、2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol、zinc bis(2-pyridylthio-1-oxide) のモルモット

- における皮膚感作性, 生活衛生, 48, 396-406, 2004.
- 19) Peters M.S., Connolly S.M., Schroeter A.L.: Bronopol allergic contact dermatitis, Contact Dermatitis, 9, 397-401, 1983.
- 20) Frosch P.J., White I.R., Rycroft R.J., Lahti A., Burrows D., Camarasa J.G., Ducombs G., Wilkinson J.D.: Contact allergy to Bronopol, Contact Dermatitis, 22, 24-26, 1990.
- 21) de Groot A., White I.R., Flyvholm M.A., Lensen G., Coenraads P.J.: Formaldehyde-releasers in cosmetics: relationship to formaldehyde contact allergy. Part 2. Patch test relationship to formaldehyde contact allergy, experimental provocation tests, amount of formaldehyde released, and assessment of risk to consumers allergic to formaldehyde, Contact Dermatitis, 62, 18-31, 2010.
- 22) Kireche M. Peiffer J.L., Antonios D., Fabre I., Giménez-Arnau E., Pallardy M., Lepoittevin J.P., Ourlin J.C.: Evidence for chemical and cellular reactivities of the formaldehyde releaser bronopol, independent of formaldehyde release, Chem. Res. Toxicol., 24, 2115-2128, 2011.
- 23) Kajimura K., Tagami T., Yamamoto T., Iwagami S.: The release of formaldehyde upon decomposition of 2-bromo-2-nitropropan-1,3-diol (bronopol), J. Health Sci., 54, 488-492, 2008.
- 24) 財団法人化学物質評価研究機構: CERI 有害性評価書 2,4-diaminotoluene, http://www.cerij.or.jp/evaluation_document/yugai/95_80_7.pdf
- 25) 職場の安全サイト: 2,4-ジアミノトルエン, <http://anzeninfo.mhlw.go.jp/anzen/gmsds/0167.html>
- 26) 財団法人化学物質評価研究機構: CERI 有害性評価書 4,4'-methylenedianiline, http://www.cerij.or.jp/evaluation_document/yugai/101_77_9.pdf
- 27) 職場の安全サイト: 2-ブロモ-2-ニトロプロパン-1,3-ジオール, <http://anzeninfo.mhlw.go.jp/anzen/gmsds/52-51-7.html>

Table 1. CAS No, logKow, boiling point, and supplier of chemicals studied.

Type	Chemicals	CAS No.	Molecular weight	logKow ^a	Boiling point (°C) ^a	VOC/SVOC ^b	Supplier ^c
Positive Control	Cynnamic aldehyde	14371-10-9	132.2	1.9 ^d	252 ^d	VOC/SVOC	T
	Propylene glycol monomethyl ether	107-98-2	90.1	-0.49 ^d	120 ^d	VOC	K
	Propylene glycol monoethyl ether	1569-02-4	104.2	0.3 ^d	132 ^d	VOC	J
	Propylene glycol monobutyl ether	5131-66-8	132.2	1.15 ^d	170 ^d	VOC	T
Glycol ethers and glycol ether acetates	Diethylene glycol monobutyl ether	112-34-5	162.2	0.56 ^d	230 ^d	VOC	T
	Propylene glycol monomethyl ether acetate	108-65-6	132.2	0.3 ^d	146 ^d	VOC	T
	Diethylene glycol monoethyl ether acetate	112-15-2	176.2	0.32 ^d	217 ^d	VOC	T
	Diethylene glycol monobutyl ether acetate	124-17-4	204.3	1.3 ^d	245 ^d	VOC/SVOC	T
	Octamethylcyclotetrasiloxane	556-67-2	296.6	5.1 ^d	175 ^d	VOC	T
Cyclosiloxanes	Decamethylcyclopentasiloxane	541-02-6	370.8	5.2 ^d	210 ^d	VOC	T
	Dodecamethylcyclohexasiloxane	540-97-6	444.9	5.86 ^d	245 ^d	VOC/SVOC	T
	Butyl acetate	123-86-4	116.2	1.82 ^d	126 ^d	VOC	T
	Benzyl benzoate	120-51-4	212.3	3.97 ^d	324 ^d	SVOC	T
	Ethyl Salicylate	118-61-6	166.2	3.032±0.240 ^e	231 ^d	VOC	T
Fragrances	Methyl jasmonate (mixture of isomers)	1101843-02-0	224.3	2.945±0.350 ^e	302.9±15.0 ^e	SVOC	T
	Methyl dihydrojasmonate (mixture of isomers)	24851-98-7	226.3	2.663±0.272 ^e	307.8±15.0 ^e	SVOC	T
	Ethylene 1,11-undecanedicarboxylate	105-95-3	270.4	2.773±0.394 ^e	139-142 ^e	VOC	W
	3-(4-tert-Butylphenyl)isobutyraldehyde (Lilial)	80-54-6	204.3	3.839±0.249 ^e	95-96 ^e	VOC	T
	2-Phenylethyl Alcohol	60-12-8	122.2	1.4 ^d	219 ^d	VOC	T
Bronopol and its decomposition products	2-Bromo-2-nitro-1,3-propanediol (Bronopol)	52-51-7	200.0	1.150±0.631 ^e	358.0±42.0 ^e	SVOC	T
	Bromonitromethane	563-70-2	139.9	0.875±0.267 ^e	149 ^e	VOC	W
	2-Bromoethanol	540-51-2	125.0	0.263±0.221 ^e	150 ^d	VOC	T
Aromatic amines	2,4-Diaminotoluene	95-80-7	122.2	0.14 ^d	292 ^d	SVOC	W
	2,6-Diaminotoluene	823-40-5	122.2	-0.241±0.254 ^e	282 ^d	SVOC	T
	4,4'-Methylenedianiline	101-77-9	198.3	1.6 ^d	398-399 ^e	SVOC	W
Rubber related compounds	Morpholine	110-91-8	87.1	-0.86 ^d	129 ^d	VOC	T
	Cyclohexylamine	108-91-8	99.2	1.500±0.187 ^e	125 ^d	VOC	T
	Dicyclohexylamine	101-83-7	181.3	3.5 ^d	256 ^d	VOC/SVOC	T
Others	Bis(2-ethylhexyl) fumarate	141-02-6	340.5	7.25 ^d	197 ^d	VOC	T

^a logKow: octanol-water partition coefficient.

^b Type of VOC/SVOC is classified based on WHO definition)

^c T: Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., K: Kanto Chemical Co., Inc., J: Junsei Chemical Co., Ltd., W: Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

^d The values are cited from manufacturer's safety data sheet.

^e The values expressed bold face type are cited from Scifinder.

Table 2. Prediction models of DPRA.

Prediction model	Prediction	Mean of cysteine and lysine % depletion	Reactivity Class
Cys-peptide 1:10 Lys-peptide 1:50 Prediction model	Negative	$0\% \leq \text{mean \% depletion} \leq 6.38\%$	No or minimal reactivity
	Positive	$6.38\% < \text{mean \% depletion} \leq 22.62\%$	Low reactivity
		$22.62\% < \text{mean \% depletion} \leq 42.47\%$	Moderate reactivity
		$42.27\% < \text{mean \% depletion} \leq 100\%$	High reactivity
Cys-peptide 1:10 Prediction model	Negative	$0\% \leq \text{mean \% depletion} \leq 11.89\%$	No or minimal reactivity
	Positive	$11.89\% < \text{mean \% depletion} \leq 23.09\%$	Low reactivity
		$23.09\% < \text{mean \% depletion} \leq 98.24\%$	Moderate reactivity
		$98.24\% < \text{mean \% depletion} \leq 100\%$	High reactivity

Table 3. Results of DPRA for chemicals studied.

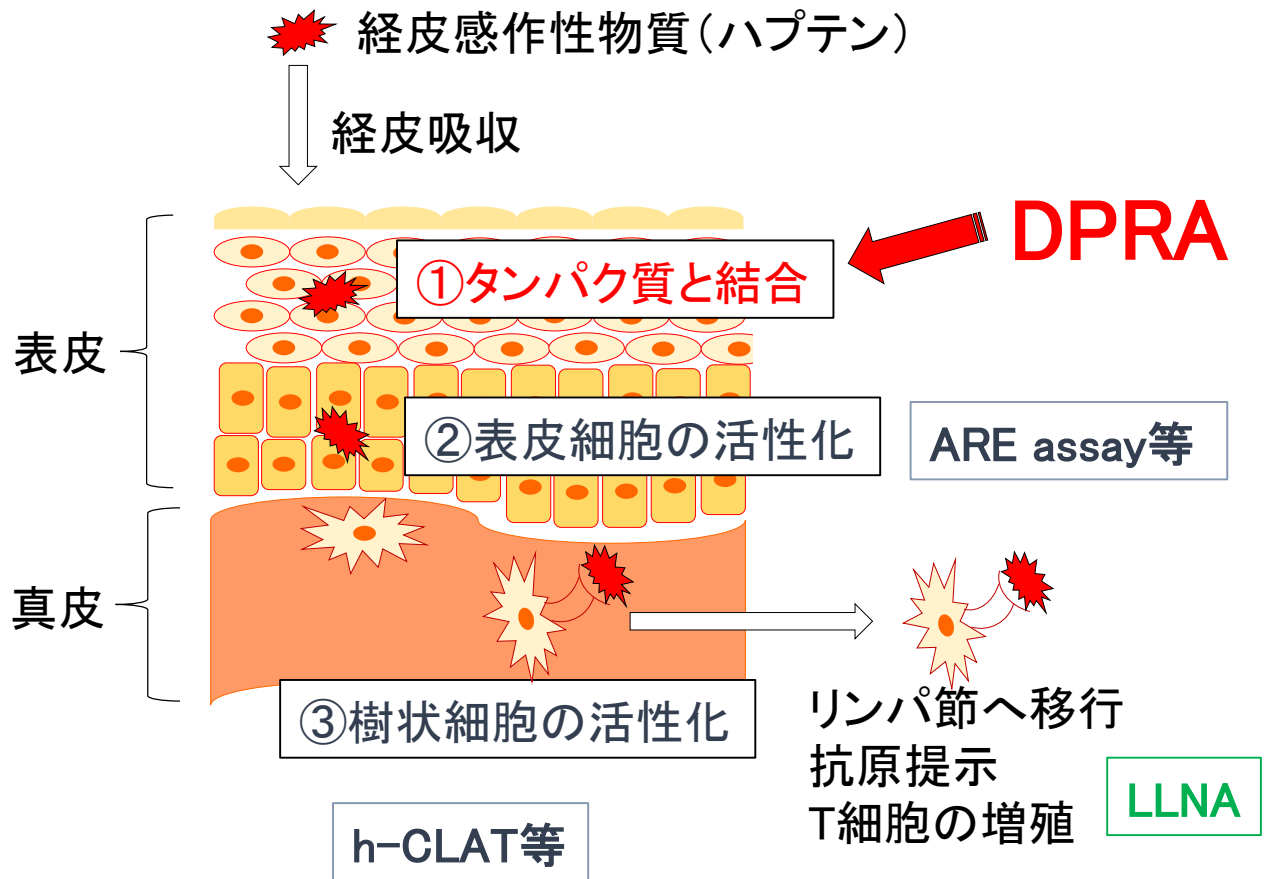
Type	Chemicals	Depletion (%)			Prediction	Lys/Cys	Additional testing
		Cysteine	Lysine	Mean ^a			
Glycol ethers and glycol ether acetates	Propylene glycol monomethyl ether	-0.68	0.67	0.34	Negative		
	Propylene glycol monoethyl ether	-0.45	0.58	0.29	Negative		
	Propylene glycol monobutyl ether	0.15	1.7	0.90	Negative		
	Diethylene glycol monobutyl ether	5.3	1.3	3.3	Negative		○
		2.4	-0.5	1.2			
	Propylene glycol monomethyl ether acetate	-0.035	1.2	0.59	Negative		
	Diethylene glycol monoethyl ether acetate	0.61	n.t. ^b	0.61 _{Cys} ^c	Negative		
	Diethylene glycol monobutyl ether acetate	0.49	1.5	1.0	Negative		
Cyclosiloxanes	Octamethylcyclotetrasiloxane	-0.010	0.30	0.15	Negative		
	Decamethylcyclopentasiloxane	0.029	0.75	0.39	Negative		
	Dodecamethylcyclohexasiloxane	-0.031	0.16	0.08	Negative		
Fragrances	Butyl acetate	0.39	1.5	0.92	Negative		
	Benzyl benzoate	0.88	0.46	0.67	Negative		
	Ethyl Salicylate	0.65	1.81	1.2	Negative		
	Methyl jasmonate	17	1.17	<u>8.9</u>	Positive (Low)	0.070	○
		21	0.02	<u>10</u>		0.00092	
	Methyl dihydrojasmonate	2.8	-0.23	1.4	Negative		
	Ethylene 1,11-Undecanedicarboxylate	0.030	-0.56	0.015	Negative		
	3-(4-tert-Butylphenyl)isobutyraldehyde (Lilial)	11	-0.34	5.6	Negative		○
		11	-0.63	5.4			
	2-Phenylethyl alcohol	n.t. ^b	2.4	n.c. ^d	Not evaluation		
Bronopol and its decomposition products	2-Bromo-2-nitro-1,3-propanediol (Bronopol)	100	67.6	<u>84</u>	Positive (high)	0.68	
	Bromonitromethane	100	9.4	<u>55</u>	Positive (high)	0.094	
	2-Bromoethanol	13	0.15	<u>6.5</u>	Positive (Low)	0.012	○
		13	7.58	<u>10</u>		0.57	
Aromatic amines	2,4-Diaminotoluene	74	0.55	<u>37</u>	Positive (Moderate)	0.0075	
		13	0.46	<u>6.8</u>			
	2,6-Diaminotoluene	11	-1.23	5.7	Negative		○
		12	-1.37	5.8			
	4,4'-Methylenediamine	1.4	0.49	0.93	Negative		
Rubber related compounds	Morpholine	3.8	-0.68	1.9	Negative		
	Cyclohexylamine	1.0	0.01	0.53	Negative		
	Dicyclohexylamine	3.8	1.06	2.4	Negative		
Others	Diethylhexyl fumarate	6.7	-3.6	3.3	Negative		○
		8.6	0.5	4.6			

^a Negative depletion is considered as "0" when calculating the mean and underline means positive.

^b n.t.: Co-elution is observed.

^c Using Cys-peptide 1:10 prediction model only

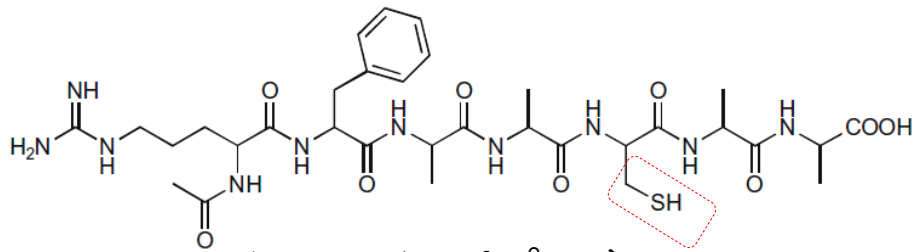
^d n.c.: Not calculated.



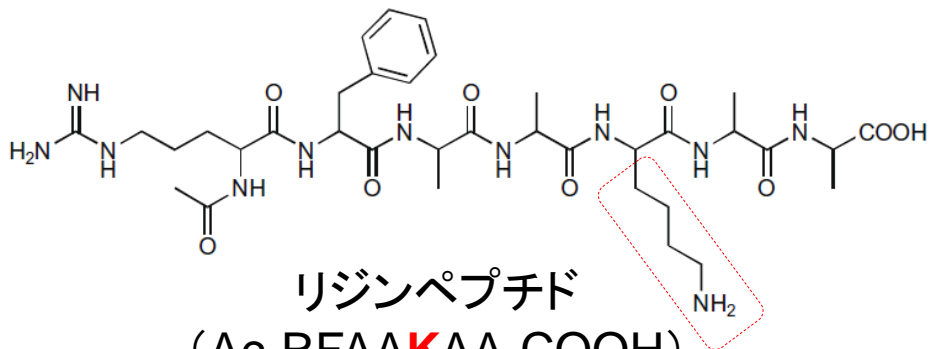
Adverse Outcome Pathway (AOP)

- ①化学物質とタンパク質との結合
- ②ケラチノサイトにおける炎症性応答および遺伝子発現
- ③樹状細胞の活性化
- ④リンパ節におけるT細胞の増殖

Fig. 1 皮膚感作性のメカニズムとそれに対応した代替試験法
(引用文献7より改変)



システインペプチド
(Ac-RFAAC**C**AA-COOH)



リジンペプチド
(Ac-RFAAK**K**AA-COOH)

Fig. 2 試験に使用した使用したペプチドの構造
(上 : Cys-peptide、下: Lys-peptide)

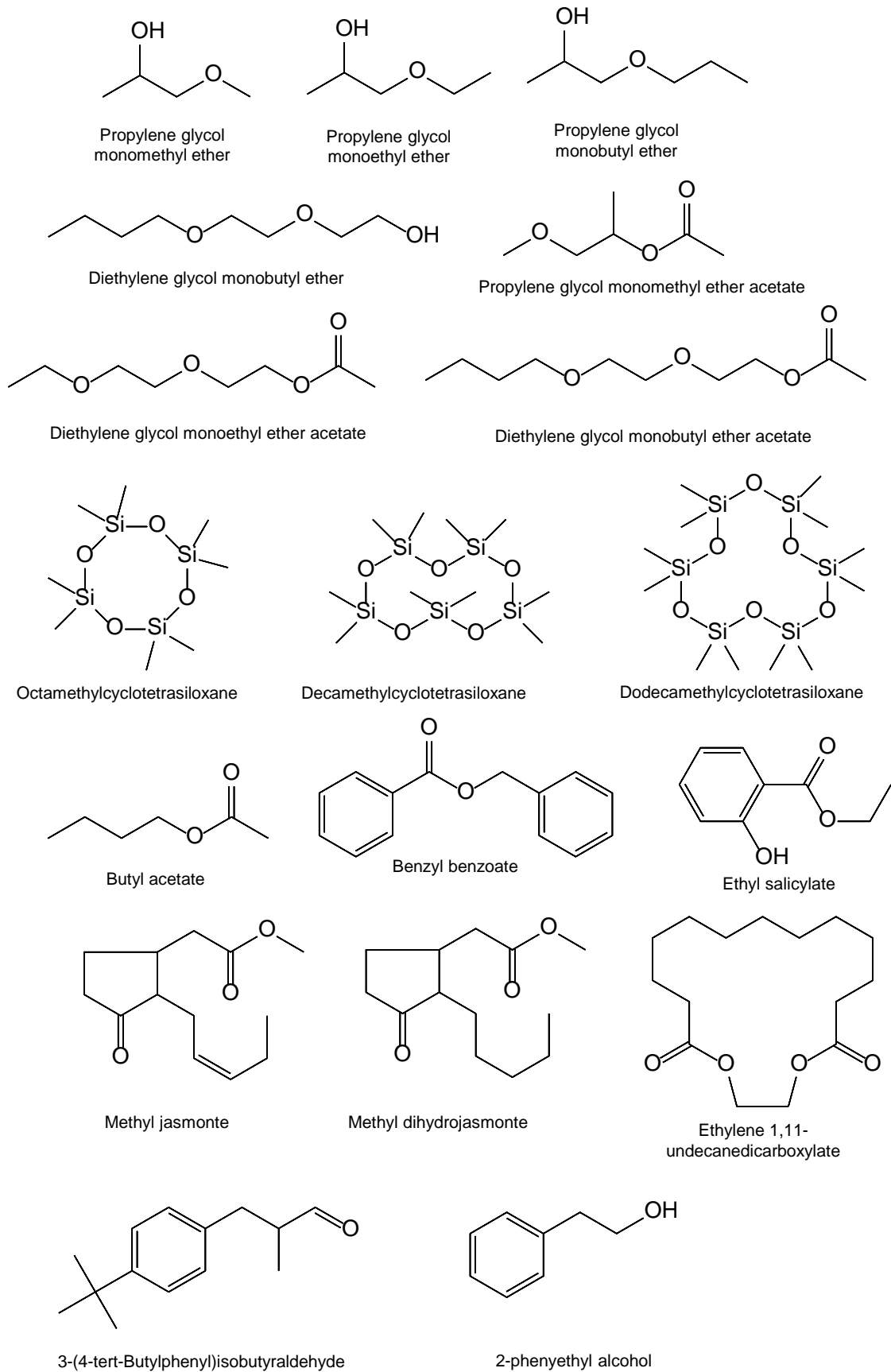


Fig. 3 被験物質の化学構造

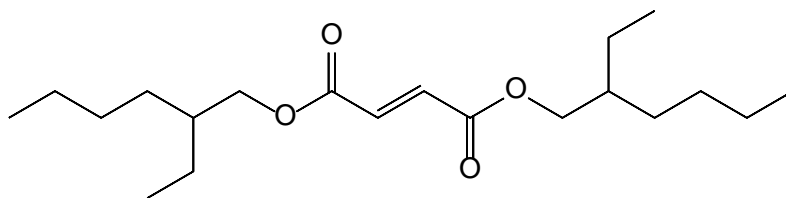
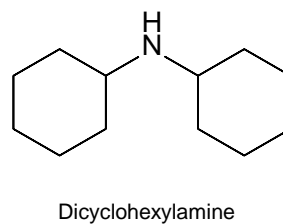
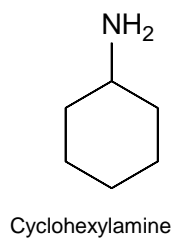
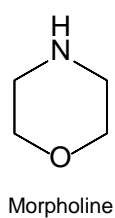
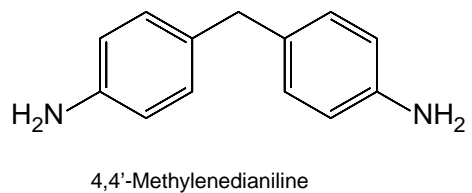
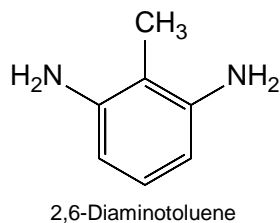
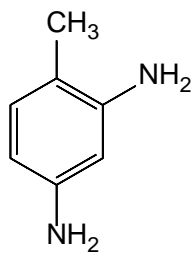
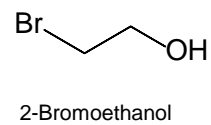
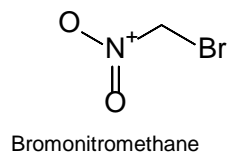
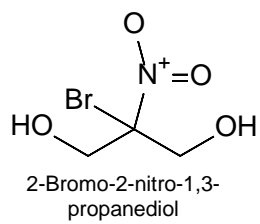


Fig. 3 被験物質の化学構造 (続き)

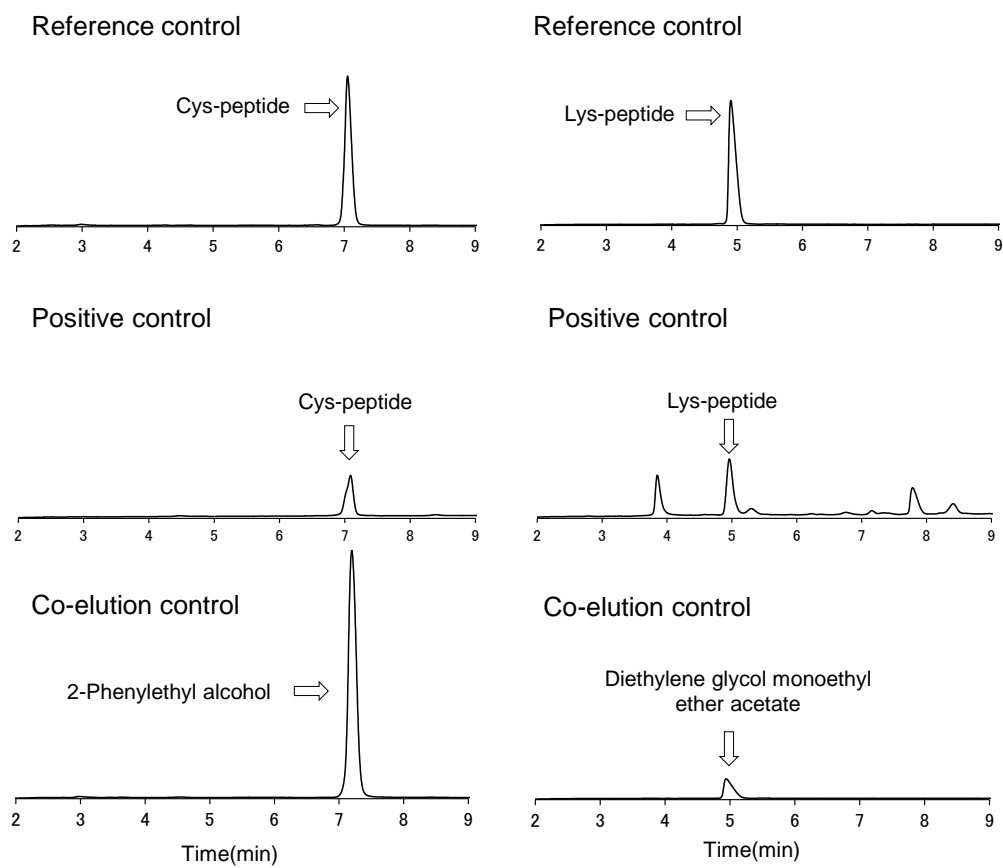


Fig. 4 各ペプチド (Reference control)、陽性対照 (Positive control) 及び被験物質のみ (Co-elution control) の HPLC クロマトグラム ($\lambda=220$ nm)

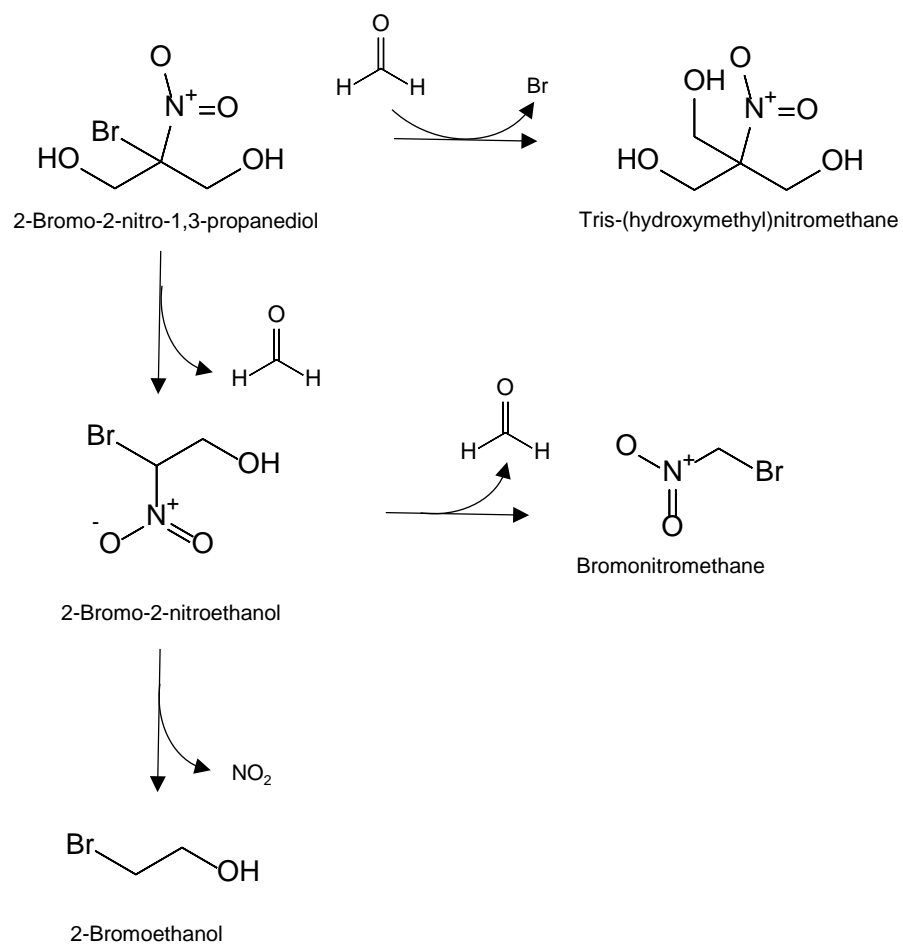


Fig. 5 2-Bromo-2-nitro-1,3-propanediol (Bromopol) の分解過程²²⁾