

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

今年度は室内空気汚染実態全国調査で検出が報告されている化合物や、欧州連合 (European Union: EU) でアレルギー性が指摘されている香料化合物など、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、計 33 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、14 化合物が陽性と分類された。EU でアレルギー性が指摘されている 21 種類の香料化合物のうち、本研究で陽性に分類されたのは 9 化合物であった。また、職業性の接触皮膚炎が報告されている monoethanolamine 等は陰性に分類された。DPRA では感作性の弱い化合物で、偽陰性と判定される可能性があることが指摘されている。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。本年度の試験では、複数の化合物が陽性と分類されたが、Lys-peptide への結合性には違いが認められた。これらのうち、Lys/Cys が大きかった化合物については、気道感作性の可能性を考慮して、今後、様々な毒性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き初期リスク評価、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^{6,10)}。

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。これまでに、グリコール類、プロピレングリコールエステル類、ポリ環状シロキサン類及び香料類など 49 化合物について評価を実施した。今年度は、全国調査で室内空気から検出が報告されている化合物や、欧州連合 (European Union: EU) でアレルギー性が指摘されている香料化合物など、計 33 化合物について評価を実施した。

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ア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 (v/v) 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 μ L に 200 μ L のアセトニトリル及び被験対象物質溶液 50 μ l 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 μ L に 250 μ L 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との保持時間の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。また、Cysteine 1:10/Lysine 1:50 prediction model でペプチド減少率が

陽性判定のクライテリア付近（3~10%）の場合に再試験を実施した。

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、一昨年度に、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プラーラック温度は 30℃及び 25℃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

各被験物質について、各ペプチドとの

共溶出を確認した。その結果、Cys-peptide に対して共溶出する被験物質は認められず、Lys-peptide に対して isoeugenol 及び methyl dibromoglutaronitrile の 2 種類で共溶出が認められた。そのため、これら 2 つの化合物については Cys-peptide 1:10 prediction model で評価を行った。

C2. 各被験物質の評価結果

本年度試験した 33 化合物の評価結果を Table 3 に示した。今年度試験した化合物では、33 化合物のうち、14 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⁾で検出が報告されている、methylcyclohexane、hexanal 及び nonanal のうち、後者の 2 化合物が陽性と分類された。Hexanal 及び nonanal の工業的な主用途は香料及び香料原料^{13,14)}であるが、針葉樹建材から放散し室内空気中から検出されることも報告されている¹⁵⁾。これらの化合物について、感作性に関する臨床報告は調べた限りでは認められないが、hexanal についてはマウスを用いた局所リンパ節アッセイ (Local Lymph Node Assay: LLNA) において陽性と報告されている¹⁶⁾。

対象とした 23 種類の香料化合物のうち、(1R)-(+)- α -pinene 及び(-)- β -pinene を除く 21 種類は、EU の化粧品指令においてアレルギー性物質として表示が義務付けられている香料に該当する¹⁷⁾。この 21 種類の香料のうち、Table 1 の上から順に α -amylcinnamaldehyde から isoeugenol までの 12 種類は”List A: Fragrance chemicals, which according to existing knowledge, are

most frequently reported and well-recognized consumer allergens”とされているが、そのうち 7 種類が陽性と分類された。一方、残りの 9 種類は”List B: Fragrance chemicals, which are less frequently reported and thus less documented as consumer allergens”とされているが、そのうち 2 種類が陽性と分類された。このように、List A に掲載されているアレルギー性が広く認められている香料の方が、List B に掲載されている香料よりも多く陽性と分類されたが、陰性と分類された化合物も多かった。Coumarin は EU では List A に掲載されているが、本研究や DPRA 開発時の報告¹⁸⁾では陰性に分類されている。また、 α -amylcinnamaldehyde 及び α -hexylcinnamaldehyde については、DPRA 開発時の報告¹⁸⁾では week sensitizer に分類されていたが、本研究では陰性に分類された。DPRA では感作性の弱い化合物で、偽陰性と判定される可能性があることが指摘されている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、(1R)-(+)- α -pinene 及び(-)- β -pinene は陰性と分類された。

防腐剤 3 種類のうち、bronidox 及び DMDM hydantoin は、昨年度報告した bronopol と同様にホルムアルデヒドドナー型防腐剤である^{19,20)}。DMDM hydantoin については、臨床において複数例のアレルギー性接触皮膚炎が報告されている^{19,20)}。一方、bronidox については、臨床における感作例はほとんど報告されていない^{19,20)}。Methyl dibromoglutaronitrile については、これまでに臨床での感作例が報告されており、感作物質として認識されて

いる²¹⁾。本研究では、これら3種類の防腐剤はいずれも陽性に分類された。

本研究では4種類のアミン類について評価を実施したが、いずれも陰性と分類された。そのうち、エタノールアミン類（モノ、ジ、トリ）3種類については、動物試験では感作性が認められないが、ヒトでは感作が報告されている²²⁾。具体的には、感作が多く報告されているのは金属加工（切削）に従事している労働者における職業性接触皮膚炎であり、機械の潤滑油（切削液）に monoethanolamine が含まれており、手の皮膚バリアが破壊された状態で頻繁に暴露されることが原因と考えられている。そのため、これらの化合物は感作性が弱い可能性が考えられ、結果として DPRA では陰性に分類されたものと考えられた。

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。このように、DPRA で得られる被験物質の Cys-peptide 及び Lys-peptide への結合性の違いが、一定の呼吸器感作性の指標になり得る可能性が指摘されている⁶⁾。一方で、DPRA のみでは皮膚感作性と呼吸器感作性を区別することは難しく、被験物質の

呼吸器感作性については AOP を考慮し、複数の試験法を組み合わせる必要があることも指摘されている²³⁾。

本年度の試験で陽性と分類された14化合物について Lys/Cys を見ると、hexanal、citral 及び hydroxycitronellal で 1.3、1.05 及び 0.96 と 0.2 を超えていた。また、ペプチド減少率がクライテリア付近のため追加試験を実施した cinnamyl alcohol について、2回目の試験では Lys/Cys が 0.59 となった。これは、Lys-peptide の減少率が1回目（1.74%）と2回目（14.5%）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。

本年度の試験では、複数の香料化合物が陽性と分類されたが、Lys-peptide への結合性には違いが認められた。これらのうち、Lys/Cys が大きかった化合物については、気道感作性の可能性を考慮して、今後、様々な毒性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

室内空気汚染実態全国調査で検出が報告されている化合物や、EU でアレルギー性が指摘されている香料化合物など、計33化合物について DPRA による感作性評価を実施し、14化合物が陽性と分類された。EU でアレルギーが指摘されている21種類の香料化合物については、陽性に分類されたのは9化合物であった。また、職業性の接触皮膚炎が報告されている monoethanolamine 等は陰性に分類された。

DPra では感作性の弱い化合物で、偽陰性と判定される可能性があることが指摘されている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。本年度の試験では、複数の化合物が陽性と分類されたが、その Lys-peptide への結合性には違いが認められた。これらのうち、Lys/Cys が大きかった化合物については、気道感作性の可能性を考慮して、今後、様々な毒性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) Kawakami T., Isama K., Kagawa-Tanaka T., Jinno H. Analysis of glycols, glycol ethers, and other volatile organic compounds present in household water-based hand pump sprays, *J. Environ. Sci. Health Part A*, 52, 1204-1210, 2017.

E.2 学会発表

1) 小野敦・渡辺真一・菅原経継・若林晃次・田原宥・堀江宣行・藤本恵一・草苺啓・黒川嘉彦・寒水孝司・中山拓人・草生武・河上強志・小島幸一・小島肇・Jon Richmond・Nicole Kleinstreuer・Bae-Hwa Kim・山本裕介・藤田正晴・笠原利彦: 新規 in chemico 皮膚感作性試験 ADRA 法の多施設バリデーション試験: 第1報, 第44回日本毒性学会学術年会, 横浜, 2017年7月

2) Ono A., Watanabe S., Sugawara T., Wakabayashi K., Tahara T., Horie N., Fujimoto K., Kusakari K., Kurokawa Y.,

Sozu T., Nakayama T., Kusao T., Kawakami T., Kojima K., Kojima H., Richmond J., Kleinstreuer N., Kim B.H., Yamamoto Y., Fujita M., Kasahara T. Phase-1 of the validation study of Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA): a novel in chemico alternative test method of skin sensitization. (The 10th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Seattle, Aug., 2017)

- 3) 藤田正晴・山本裕介・渡辺真一・菅原経継・若林晃次・田原宥・堀江宣行・藤本恵一・草苺啓・黒川嘉彦・河上強志・小島幸一・小島肇・小野敦・笠原利彦: 新規 in chemico 皮膚感作性試験 ADRA 法に使用する Cys 誘導体試薬 (NAC) の酸化原因および防止策の検討, 日本動物実験代替法学会第30回大会, 大田区, 2017年11月
- 4) 河上強志・秋山卓美・伊佐間和郎・小濱とも子・五十嵐良明: 亜リン酸エステル系酸化防止剤の刺激性及び感作性と家庭用 PVC 製手袋中の実態, 第47回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会・第41回皮膚脈管・膠原病研究会, 鹿児島, 2017年12月
- 5) 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 (第二報), 金沢, 2018年3月

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) 職場の安全サイト: ヘキサナール, <http://anzeninfo.mhlw.go.jp/anzen/gmsds/6-25-1.html>
- 14) 職場の安全サイト: ノナナール, <http://anzeninfo.mhlw.go.jp/anzen/gmsds/124-19-6.html>
- 15) 斉藤育江・大貫文・上原眞一・瀬戸博・栗田雅行・小縣昭夫: 木造新築住宅における揮発性有機化合物及びアルデヒド類の発生源調査, *室内環境*, 13, 55-64, 2010.
- 16) Patlewicz G.Y., Basketter D.A., Pease C.K., Wilson K., Wright Z.M., Roberts D.W., Bernard G., Arnau E.G., Lepoittevin J.P.: Further evaluation of quantitative structure-activity relationship models for

- the prediction of the skin sensitization potency of selected fragrance allergens, *Contact Dermatitis*, 50, 91-97, 2004.
- 17) 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
- 18) 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.
- 19) de Groot A.C., White I.R., Flyvholm M.A., Lensen G., Coenraads P.J.: Formaldehyde-releasers in cosmetics: relationship to formaldehyde contact allergy. Part 1. Characterization, frequency and relevance of sensitization, and frequency of use in cosmetics, *Contact Dermatitis*, 62, 2-17, 2010.
- 20) de Groot A.C., 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.
- 21) Erdmann S.M., Sachs B., Merk H.F.: Allergic contact dermatitis due to methylidibromo glutaronitrile in Euxyl K 400 in an ultrasonic gel, *Contact Dermatitis*, 44, 39-40, 2001.
- 22) Lessmann H., Uter W., Schnuch A., Geier J.: Skin sensitizing properties of the ethanolamines mono-, di-, and triethanolamine. Data analysis of a multicentre surveillance network (IVDK) and review of the literature, *Contact Dermatitis*, 60, 243-255, 2009.
- 23) Dik S., Rorije E., Schwillens P., van Loveren H., Ezendam J.: Can the Direct Peptide Reactivity Assay Be Used for the Identification of Respiratory Sensitization Potential of Chemicals?, *Toxicol. Sci.*, 153, 361-371, 2016.

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

Type	Chemicals	CAS No.	Molecular weight	logKow ^a	Boiling point (°C) ^a	VOC/SVOC/POM ^b	Supplier ^c
Positive Control	Cynnamic aldehyde	14371-10-9	132.2	1.9	252	VOC/SVOC	T
全国調査	Methylcyclohexane	108-87-2	98	3.70±0.17	100	VOC	W
	Hexanal	66-25-1	100	1.93±0.22	131	VOC	T
	Nonanal	124-19-6	142	3.27	192	VOC	T
	α-Amylcinnamaldehyde	122-40-7	202	4.7	288.5	SVOC	T
	α-Amylcinnamyl alcohol	101-85-9	204	4.032±0.245	331.3±11.0	SVOC	SA
	Benzylalcohol	100-51-6	108	1.1	200	VOC	T
	Benzyl salicylate	118-58-1	228.25	4.209±0.254	320	SVOC	T
	Cinnamyl alcohol	104-54-1	134.18	1.95	250	VOC/SVOC	T
	Citral (cis/trans mixtures)	5392-40-5	152	3.127±0.359	229	VOC	W
	Coumarin	91-64-5	146	1.39	298	SVOC	T
	Eugenol	97-53-0	164	2.49	254	VOC/SVOC	T
	Geraniol	106-24-1	154	3.56	230	VOC	T
	Hydroxycitronellal	107-75-5	173	1.654±0.244	241	VOC/SVOC	W
	Lylal	31906-04-4	210	2.424±0.256	318.7±42.0	SVOC	Ar
	Isoeugenol (cis/trans mixtures)	97-54-1	164	3.08±0.25	266	SVOC	T
	Anisyl alcohol	105-13-5	138	0.944±0.229	259	VOC/SVOC	T
	Benzyl cinnamate	103-41-3	238	3.778±0.229	230	VOC	T
	β-citronellol	106-22-9	156	3.239±0.235	220	VOC	T
	Famesol (isomers)	4602-84-0	222.37	4.83±0.31	110~113	VOC	T
	α-hexylcinnamaldehyde	101-86-0	216	4.866±0.318	305	SVOC	T
(+)-Limonene	5989-27-5	136	4.2	176	VOC	T	
Linalool	78-70-6	154	2.97	200	VOC	T	
Methyl-2-octynoate	111-12-6	154	3.220±0.378	220	VOC	T	
α-iso-Methylionone	127-51-5	206	4.079±0.321	285.3±29.0	SVOC	T	
(1R)-(+)-α-Pinene	7785-70-8	136.24	4.83	156	VOC	T	
(-)-β-Pinene	18172-67-3	136	4.35	165	VOC	T	
Bronidox	30007-47-7	212	0.749±0.430	280.8±40.0	SVOC	T	
Preservatives	DMDM hydantoin	6440-58-0	188	-1.078±0.654	303.7±52.0	SVOC	JK
	Methyl dibromoglutaronitrile	35691-65-7	266	1.515±0.408	338.6±42.0	SVOC	SA
Amines	Monoethanolamine	141-43-5	61	-1.31	171	VOC	W
	Diethanolamine	111-42-2	105	-1.43	269	SVOC	W
	Triethanolamine	102-71-6	149	-1.59	335	SVOC	SA
	Diethylamine	109-89-7	73	0.58	55	VOC	W

^a These values are cited from manufacturer's safety data sheet or from Scifinder. (logKow: octanol-water partition coefficient)

^b Type of VOC/SVOC/POM is classified based on WHO definition: VOC 50-100°C~240-260°C, SVOC 240-260°C~380-400°C, POM ≥380°C)

^c T: Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.; K: Kanto Chemical Co., Inc.; J: Junsei Chemical Co., Ltd.; A: Alfa Aesar; W: Wako Pure Chemical Industries, Ltd.; Ar: Ark Pharm, Inc.; SA: Sigma-Aldrich; JK: J&K Scientific.

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

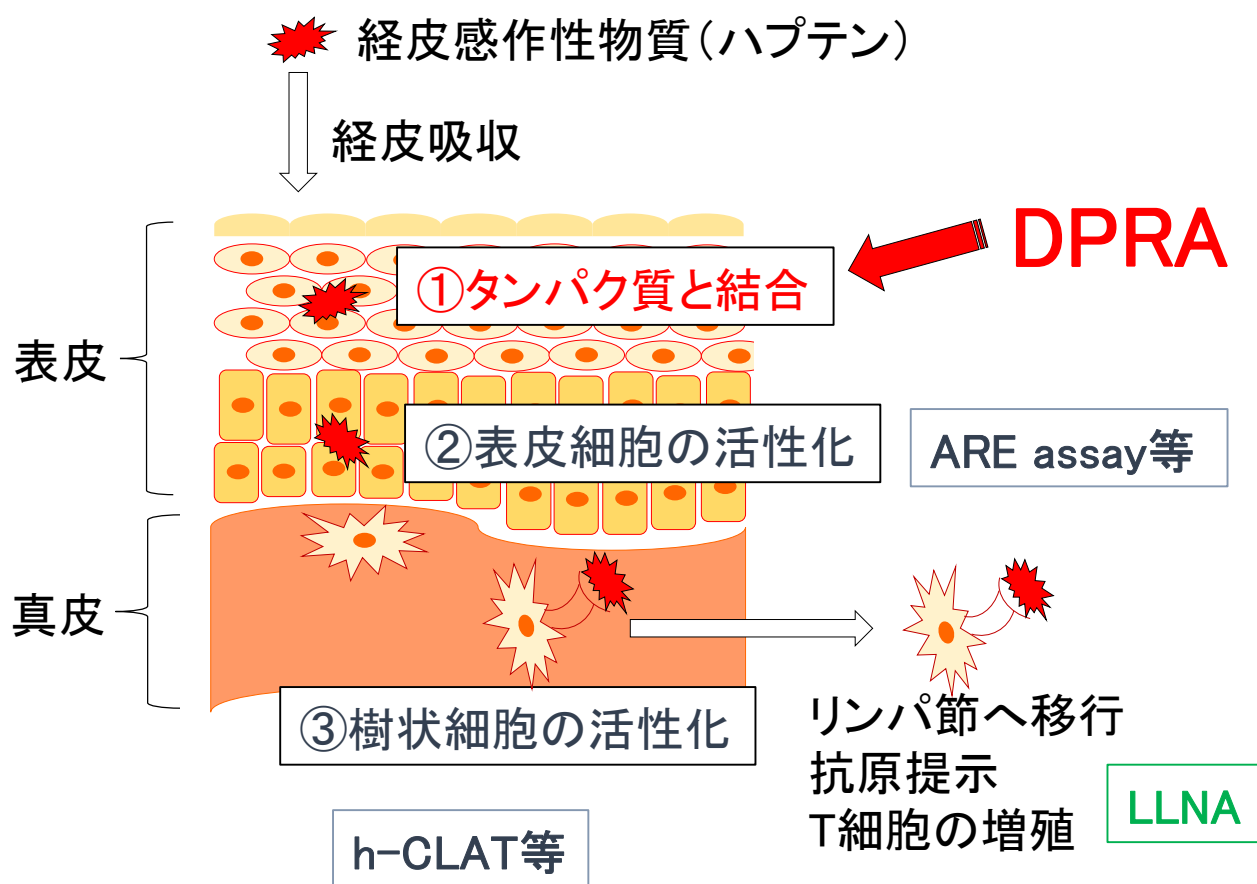
Table 3. Results of DPRA for chemicals studied.

Type	Chemicals	Depletion (%)			Prediction	Lys/Cys
		Cysteine	Lysine	Mean ^a		
全国調査	Methylcyclohexane	0.17	-0.56	0.08	Negative	
	Hexanal	31.5	42.3	36.9	Positive(Moderate)	1.34
	Nonanal	24.6	2.68	13.6	Positive(Low)	0.11
Fragrances	α -Amylcinnamaldehyde	1.87	0.73	1.30	Negative	
	α -Amylcinnamyl alcohol	23.0	1.17	12.1	Positive(Low)	0.051
	Benzylalcohol	0.45	3.66	2.05	Negative	
	Benzyl salicylate	11.6	-0.075	5.80	Negative	
		1.05	-0.033	0.52		
	Cinnamyl alcohol	15.3	1.74	8.53	Positive(Low)	0.11
		24.5	14.5	19.5		
	Citral (cis/trans mixtures)	18.1	19.0	18.5	Positive(Low)	1.05
	Coumarin	1.34	0.84	1.09	Negative	
	Eugenol	37.5	4.03	20.8	Positive(Low)	0.11
	Geraniol	5.03	0.60	2.81	Negative	
	Hydroxycitronellal	19.1	18.3	18.7	Positive(Low)	0.96
	Lylal	75.3	10.4	42.9	Positive(high)	0.14
	Isoeugenol (cis/trans mixtures)	37.3	n.t. ^b	37.3Cys ^c	Positive(Moderate)	
	Anisyl alcohol	2.02	0.83	1.42	Negative	
	Benzyl cinnamate	0.63	-0.50	0.32	Negative	
	β -citronellol	1.87	0.61	1.24	Negative	
	Farnesol (isomers)	10.1	-0.35	5.07	Positive(Low)	-0.049
		13.8	-0.67	6.91		
		23.0	0.61	11.8		0.027
	α -hexylcinnamaldehyde	2.23	-0.01	1.11	Negative	
	(+)-Limonene	2.62	-0.57	1.31	Negative	
	Linalool	3.41	0.00	1.71	Negative	
	Methyl-2-octynoate	99.2	3.16	51.2	Positive(high)	0.032
	α -iso-Methylionone	6.26	-0.07	3.13	Negative	
		7.61	0.20	3.81		
	(1R)-(+)- α -Pinene	8.10	-0.88	3.61	Negative	
11.6		-0.69	5.80			
(-)- β -Pinene	3.28	-1.08	1.64	Negative		
Preservatives	Bronidox	99.7	-0.31	49.9	Positive(high)	-0.0031
	DMDM hydantoin	60.0	2.68	31.34	Positive(Moderate)	0.045
	Methyldibromoglutaronitrile	100.0	n.t. ^b	100.0Cys ^c	Positive(high)	
Amines	Monoethanolamine	1.34	0.21	0.78	Negative	
	Diethanolamine	2.02	1.48	1.75	Negative	
	Triethanolamine	0.63	-0.31	0.32	Negative	
	Diethylamine	4.10	0.10	2.10	Negative	

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

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

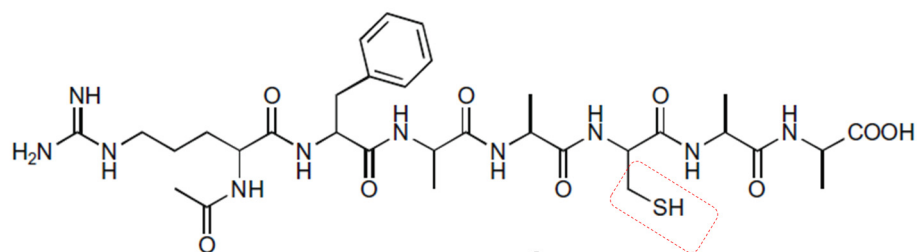
^c Using Cys-peptide 1:10 prediction model only.



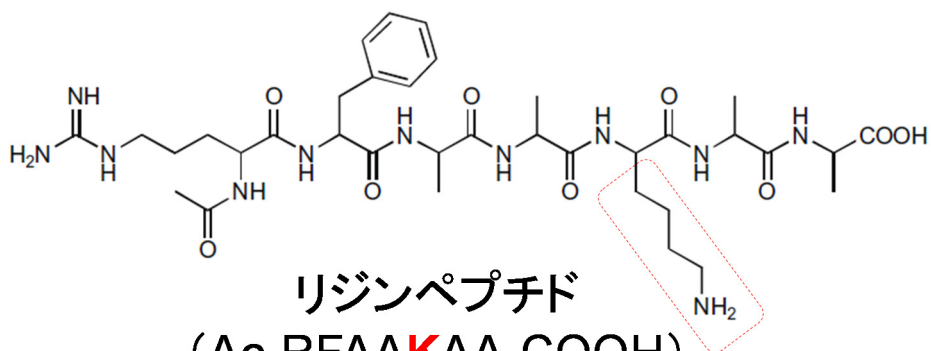
Adverse Outcome Pathway (AOP)

- 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-RFAACAA-COOH)



リジンペプチド
(Ac-RFAAKAA-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)

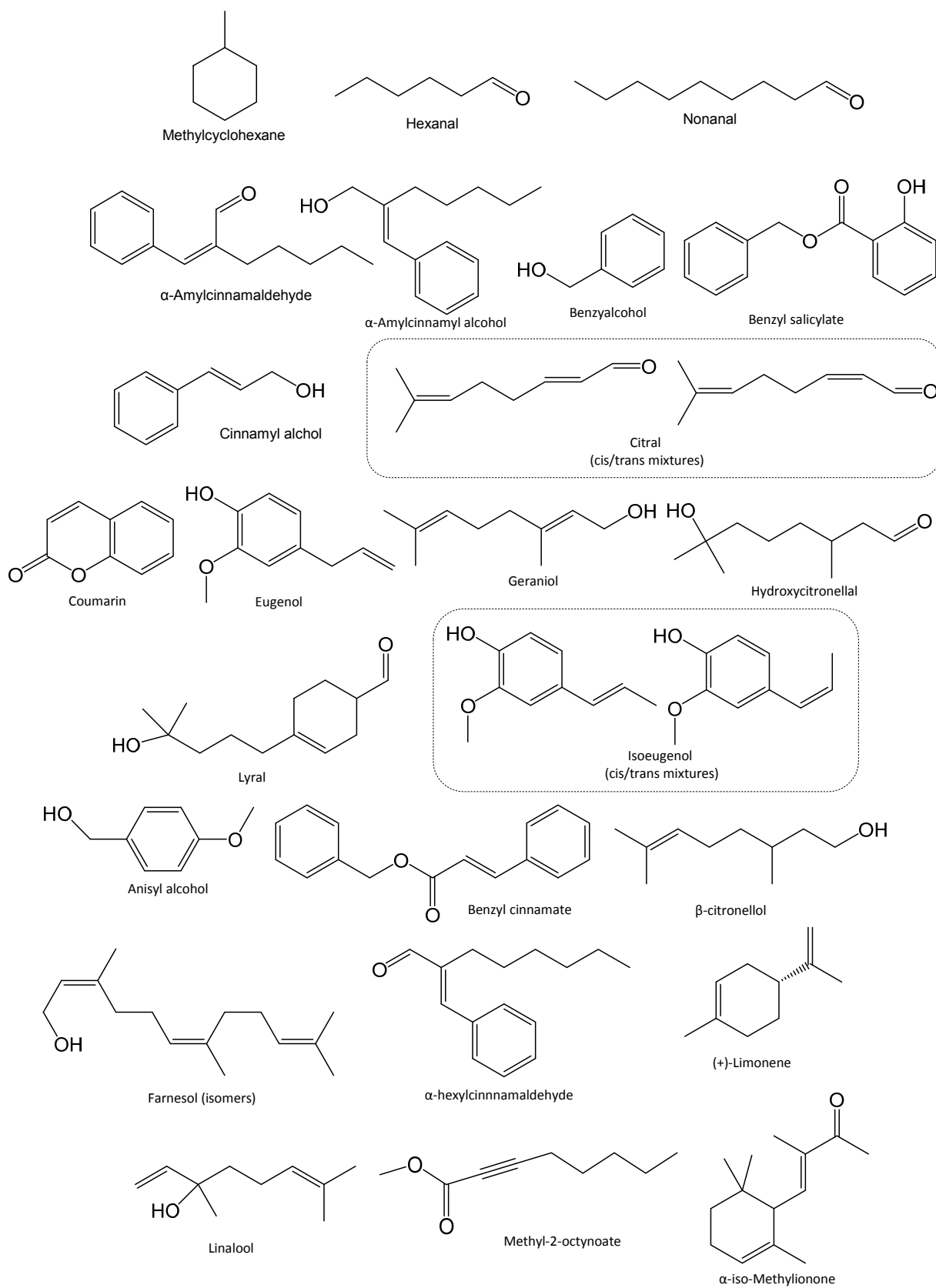


Fig. 3 被験物質の化学構造

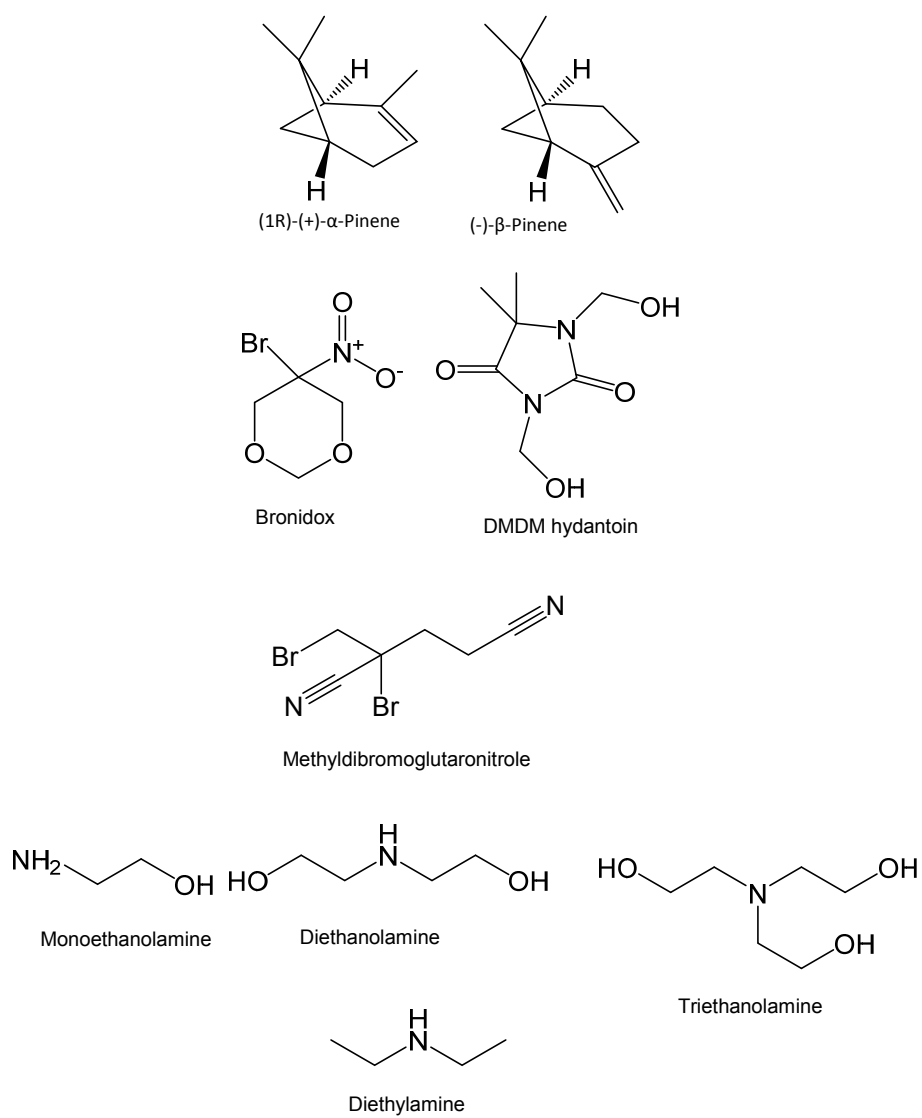


Fig. 3 被験物質の化学構造 (続き)