

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  
研究協力者 伊佐間和郎 帝京平成大学薬学部 教授

本研究では、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、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 82 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、81 化合物で感作性評価が可能であり、25 化合物が陽性と分類された。室内空気汚染実態全国調査で高頻度、高濃度で検出が報告されているグリコール類や可塑剤類については全て陰性であったが、香料や建材等に由来すると考えられる hexanal 及び nonanal が陽性と分類された。また、臨床において接触皮膚炎が報告されている化合物や、動物試験で弱い感作性が報告されているいくつかの化合物が陰性に分類された。これは、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ためと考えられた。Lys/Cys は気道感作性を評価する上で指標の一つとして考えられているが、本研究で陽性と分類された化合物間で Lys-peptide への結合性には違いが認められた。今後、本研究で陽性と分類された化合物について、複数の毒性試験や疫学調査等により総合的な評価を行う必要がある。その過程において、本研究で得られた Lys/Cys 値は、気道感作性評価を実施していく化合物の優先順位付けに利用できるものと思われる。

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<sup>1)</sup>され、建築基準法では 2 種類の化学物質が規制対象<sup>2)</sup>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<sup>3)</sup>。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气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<sup>4)</sup>。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<sup>5)</sup>。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<sup>4,6)</sup>。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非常に少ないのが現状である<sup>5)</sup>。

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おり、その際には **adverse outcome pass way (AOP)** を考慮した試験法が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<sup>7)</sup>。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<sup>8)</sup>によって開発され、現在はOECDのテストガイドライン<sup>9)</sup>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))。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、気道感作性を評価できる可能性が報告されている<sup>6,10)</sup>。

そこで本研究では、室内空気汚染実態全国調査等にて高頻度・高濃度で検出されている化学物質を中心に、DPRA による皮膚感作性及び気道感作性評価を実施した。具体的には、グリコール類、ポリ環状シロキサン類、香料類及び防腐剤類など計 82 化合物について試験を実施した。

## 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、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<sup>11)</sup>。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 (v/v) の割合で混合し、pH を  $7.5 \pm 0.05$  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  $\mu$ L に 200  $\mu$ L のアセトニトリル及び被験対象物質溶液 50  $\mu$ 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  $24 \pm 2$  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  $\mu$ L に 250  $\mu$ 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り

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 時間以内で終了した。

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 では被験物質とペプチドとの反応性評価は、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<sup>9)</sup>。この際、各ペプチドと被験物質との溶出時間の重なりを、Co-elution control にて確認する。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が出来る。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た。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<sup>9)</sup>。本研究では、試験に先立ち、この技能試験を実施した。

### 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. Proficiency test

OECD TG 442C では proficiency test として、Cys-peptide 及び Lys-peptide のそれぞれについて、指定された被験物質 10 物質中 8 物質以上で、Table 3 に示した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。本研究で実施した proficiency test の結果を Table 3 に示した。Cys-peptide では、Farnesal で減少率が 10% と OECD TG 442C で要求している減少率（15~55%）を下回った。また、Lys-peptide では、benzylideneacetone で減少率が 63%

と OECD TG 442C で要求している減少率 (0~7%) から外れていた。一方、その他の被験物質は、Cys-peptide 及び Lys-peptide のどちらについても、そのペプチド減少率は全て OECD TG 442C の要求範囲に収まっていた。そのため、本研究では DPRA 法の実施にあたり、技能レベルが規定水準以上であることが確認できた。

### C2. 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。本研究で試験した 82 化合物のうち、Cys-peptide では 2-phenylethyl alcohol で、Lys-peptide では diethylene glycol monoethyl ether acetate、isoeugenol 及び methyl dibromoglutaronitrile で共溶出が確認された。共溶出例として、2-phenylethyl alcohol 及び diethylene glycol monoethyl ether acetate の Co-elution control の HPLC クロマトグラムを Fig. 4 に示した。共溶出が確認された被験物質のうち、diethylene glycol monoethyl ether acetate、isoeugenol 及び methyl bromoglutaronitrile は Cys-peptide 1:10 prediction model で評価した。一方、2-phenylethyl alcohol は評価を実施しなかった。

### C3. 各被験物質の評価結果

試験した 82 化合物の結果を Table 4 に示した。Cys-peptide との共溶出が認められた 2-phenylethyl alcohol を除く 81 化合物のうち、25 化合物が陽性に、その他の化合物は陰性に分類された。DPRA は感作性試験として広く実施されてきたマウス

局所リンパ節試験 (Local Lymph Node Assay : LLNA) と 80%以上の一致を示すとされているが、感作力の弱い化合物では偽陰性を示すことが多く、さらに代謝活性化が必要な化合物は評価できない<sup>7)</sup>。また、ペプチドと被験物質との反応を水系で行うため、疎水性化合物についても正確に評価することが難しいことが指摘されている<sup>7)</sup>。そのため、評価結果についてはこれらの点に留意する必要がある。

室内空気汚染全国実態調査<sup>3)</sup>で高頻度、高濃度で検出されている、グリコール類、グリコールエーテル類、可塑剤、ポリ環状シロキサン類及びその類縁化合物については、いずれも陰性と分類された。

本研究で対象とした香料化合物のうち、23 化合物は EU の化粧品指令においてアレルギー性物質としての表示が義務付けられている<sup>12)</sup>。この 23 種類の香料のうち、Table 1 の  $\alpha$ -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、そのうち 7 種類が陽性と分類された。一方、残りの 11 種類は "List B: Fragrance chemicals, which are less frequently reported and thus less documented as consumer allergens" とされ、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<sup>13)</sup>では陰性に分類されている。 $\alpha$ -Amylcinnamaldehyde 及び  $\alpha$ -hexylcinnamaldehyde は、DPRa 開発時の報告<sup>13)</sup>で weak sensitizer に分類されていたが、本研究では陰性に分類された。Benzyl benzoate 及び 3-(4-tert-butylphenyl) isobutyraldehyde は、LLNA で weak sensitizer と分類されているが、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おり<sup>13)</sup>、本研究ではいずれも陰性に分類された。

一方、EU の化粧品指令で表示義務の無い香料のうち、室内空気汚染全国実態調査<sup>3)</sup>で検出されている、hexanal 及び nonanal 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<sup>14,15)</sup>であるが、針葉樹建材から放散し室内空气中で検出されている<sup>16)</sup>。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 では LLNA で陽性と報告されている<sup>17)</sup>。また、methyl jasmonate が弱い陽性物質と分類されたが、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 の感作性は認められていない<sup>18)</sup>。DPRa 開発時に 82 化合物が試験され、LLNA で非感作性物質 (Non sensitizer) とされているいくつかの化合物が、弱い陽性と分類されたことが報告されている<sup>13)</sup>。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。

試験した防腐剤のうち、2-bromo-2-nitro-

1,3-propanediol (bronopol) は、化粧品や様々な衛生製品の防腐剤として使用されている<sup>19)</sup>。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<sup>20)</sup>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<sup>21,22)</sup>。Bronopol はホルムアルデヒドドナー型防腐剤であり、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)<sup>23)</sup>。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<sup>24)</sup>。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<sup>23)</sup>。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、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<sup>25)</sup>、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。また、bronidox 及び DMDM hydantoin についてもホルムアルデヒドドナー型防腐剤である<sup>24,26)</sup>。DMDM hydantoin 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。

一方、bronidox は、臨床での感作例はほとんど報告されていない。この 2 種類の防腐剤についても、本研究では陽性と分類された。Methyldibromoglutaronitrile は、臨床での感作例が報告されており<sup>27)</sup>、本研究でも陽性に分類された。

フマル酸ジエステル類及びマレイン酸ジエステル類は防腐剤や樹脂添加剤等として使用されている。このうち、dimethyl fumarate は強い感作性を示すことが知られており、その類縁化合物であるフマル酸ジエステル類及びマレイン酸ジエステル類も dimethyl fumarate に交叉反応性を示すとともに、それら自体も感作性を有することが知られている<sup>28)</sup>。本研究でも、これらのジメチル、ジエチル及びジブチルエステル類は陽性と分類された。一方、皮膚感作性が報告<sup>29)</sup>されている diethylhexyl maleate 及びその異性体である diethylhexyl fumarate は陰性と分類された。これは、これらの化合物のオクタノール・水分配係数が他の化合物に比べて大きいいため水溶解性が低く、DPRA による正しい評価が難しいと考えられた。

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 は、GPMT の結果の解釈の違いから感作性の評価が分かっているが<sup>30,31)</sup>、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 では陽性とされているが<sup>32)</sup>、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。

本研究で評価を実施したエタノールア

ミン類 3 種類は、動物試験では感作性が認められておらず、本研究でも陰性に分類された。一方で、monoethanolamine について、ヒトでは金属加工（切削）労働者における職業性接触皮膚炎が報告されている<sup>33)</sup>。これは、monoethanolamine を含有する機械の潤滑油（切削液）に、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。同様に、本研究で陰性と分類された 1,3-butandiol は、化粧品類で接触皮膚炎が多数報告されている<sup>34,35)</sup>。そのため、これらの化合物は感作性については弱いですが、使用形態から高頻度に曝露されるために、臨床での感作例が多数報告されていると思われる。このような化合物については曝露も想定しつつ、そのほかの試験法も合わせた複合的な評価が必要であると考えられた。

#### C4. 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<sup>10)</sup>。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<sup>6)</sup>。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<sup>36)</sup>。

本研究で陽性と分類された化合物の半数程度で、Lys/Cys が 0.2 を越えていたが、cinnamyl alcohol や 2-bromoethanol については、ペプチド減少率が陽性クライテリア付近であり、Lys-peptide の減少率が 1 回目と 2 回目で大きく異なっていた。そのため、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。一方、欧州で接触皮膚炎が多数報告されている dimethyl fumarate は皮膚症状のみならずシックハウス症状も報告<sup>28)</sup>されており、Lys/Cys は 0.46 と 0.2 以上を示していた。そのため、今後より多くの化合物について評価し、そのデータの蓄積が必要と考えられるが、Lys/Cys による気道感作性評価はある程度有効ではないかと思われる。

気道感作性については、*in vivo* 及び *in vitro* どちらにおいても確立された試験方法は報告されていない<sup>4,6)</sup>。そのため、気道感作性の評価は AOP を考慮して複数の毒性試験や疫学調査等により総合的な評価を行う必要がある。その過程において、本研究で得られた Lys/Cys 値は、評価を実施していく化合物の優先順位付けに利用できるものと思われる。

#### D. まとめ

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、82 化合物について DPRA を用いた皮膚感作性及び気道感作性評価を実施した。その結果、共溶出した 1 化

合物を除く 81 化合物で感作性評価が可能であり、25 化合物が陽性と分類された。全国調査で高頻度、高濃度で検出されているグリコール類や可塑剤類は全て陰性であったが、香料や建材等に由来すると考えられる hexanal 及び nonanal が陽性と分類された。臨床において接触皮膚炎が報告されている化合物や、動物試験で弱い感作性が報告されているいくつかの化合物が陰性に分類された。これは、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ためと考えられた。Lys/Cys は気道感作性の指標の一つとして考えられているが、本研究で陽性と分類された化合物の Lys-peptide への結合性には違いが認められた。今後、本研究で陽性と分類された化合物について、複数の毒性試験や疫学調査等により総合的な評価を行う必要がある。その過程において、本研究で得られた Lys/Cys 値は、気道感作性評価を実施していく化合物の優先順位付けに利用できるものと思われる。

#### E. 研究発表

##### E1. 論文発表

- 1) Kawakami 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.
- 2) 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.
- 3) 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) 河上強志, 伊佐間和郎, 五十嵐良明: ウェットティッシュ製品に含まれる防腐剤調査, 第 45 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会・学術大会 (2015.11)
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 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, 日本薬学会第 137 年会 (2017.3)
- 10) 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
- 11) 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)

- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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), 日本薬学会第 138 年会, 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) 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](http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_073.pdf)
- 13) 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.
- 14) 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>
- 15) 職場の安全サイト: ノナナール, <http://anzeninfo.mhlw.go.jp/anzen/gmsds/124-19-6.html>
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) Scognamiglio J., Jones L., Letizia C.S., Api A.M.: Fragrance material review on methyl jasmonate, *Food Chem. Toxicol.*, 50, S572-S576, 2012.
- 19) Kawakamai 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.
- 20) 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.
- 21) Peters M.S., Connolly S.M., Schroeter A.L.: Bronopol allergic contact dermatitis, *Contact Dermatitis*, 9, 397-401, 1983.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) 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.
- 25) 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.
- 26) 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.
- 27) Erdmann S.M., Sachs B., Merk H.F.: Allergic contact dermatitis due to methyl dibromo glutaronitrile in Euxyl K 400 in an ultrasonic gel, *Contact Dermatitis*, 44, 39-40, 2001.
- 28) 河上強志・伊佐間和郎・松岡厚子・西村哲治: 防カビ剤として用いられたフマル酸ジメチルによる接触皮膚炎, *J. Environ. Dermatol. Cutan. Allergol.*, 6, 339-350, 2012.
- 29) 今村真也・足立厚子・白井成鎬・井上友介・前山泰彦・島田恭子・森あゆみ・佐々木和実: 購入 3 日目天日干し後に着用したブラジャー紐に一致して出現した, di (2-ethylhexyl) maleate による接触皮膚炎, *J. Environ. Dermatol. Cutan. Allergol.*, 9, 436, 2015.
- 30) 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](http://www.cerij.or.jp/evaluation_document/yugai/95_80_7.pdf)
- 31) 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>
- 32) 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](http://www.cerij.or.jp/evaluation_document/yugai/101_77_9.pdf)
- 33) Lessmann H., Uter W., Schnuch A., Geier J.: Skin sensitizing properties of the ethanalamines mono-, di-, and triethanolamine. Data analysis of a multicentre surveillance network (IVDK) and review of the literature, *Contact Dermatitis*, 60, 243-255, 2009.
- 34) Aizawa A., Ito A., Masui Y., Ito M.: Case of allergic contact dermatitis due to 1,3-butylene glycol, *J. Dermatol.*, 41, 815-816, 2014.
- 35) Sugiura M., Hayakawa R., Kato Y., Sugiura K., Hashimoto R., Shamoto M.: Results of patch testing with 1, 3-butylene glycol from 1994 to 1999, *Environ. Dermatol.*, 8, 1-5, 2001.
- 36) 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, molecular weight, logKow, boiling point, classification, and supplier of chemicals studied.

Type	Chemicals	CAS No.	Molecular weight	logKow <sup>a</sup>	Boiling point (°C) <sup>a</sup>	VOC/SVOC/POM <sup>b</sup>	Supplier <sup>c</sup>
Positive control	Cinnamic aldehyde	14371-10-9					T
Proficiency substances	2,4-Dinitrochlorobenzene	97-00-7					W
	Oxazolone	15646-46-5					T
	Formaldehyde	50-00-0					W
	Benzylideneacetone	122-57-6					T
	Famesal	19317-11-4					W
	2,3-Butanedione	431-03-8					T
	1-Butanol	71-36-3					W
	6-Methylcoumarin	92-48-8					T
	DL-Lactic Acid	50-21-5					T
	4-Methoxyacetophenone	100-06-1					T
Glycol ethers and glycol ether acetates	Ethylene glycol	107-21-1	62	-1.36	196	VOC	T
	Propylene glycol	57-55-6	76	-0.92	188	VOC	K
	1,2-Butanediol	584-03-2	90	-0.34	194	VOC	T
	1,3-Butanediol	107-88-0	90	-0.29	207	VOC	T
	1,4-Butanediol	110-63-4	90	-0.83	228	VOC	T
	2,3-Butanediol	513-85-9	90	-0.92	182	VOC	T
	Hexylene glycol	107-41-5	118	0.58	197	VOC	T
	Diethylene glycol	111-46-6	106	-1.98	245	VOC/SVOC	T
	Dipropylene glycol (mixture of isomers)	110-98-5	134	-0.7~-1.5	232	VOC	T
	Propylene glycol monomethyl ether	107-98-2	90	-0.49	120	VOC	K
	Propylene glycol monoethyl ether	1569-02-4	104	0.3	132	VOC	J
	Propylene glycol monobutyl ether	5131-66-8	132	1.15	170	VOC	T
	Diethylene glycol monoethylether	111-90-0	134	-0.15	196	VOC	T
	Diethylene glycol monobutyl ether	112-34-5	162	0.56	230	VOC	T
	Propylene glycol monomethyl ether acetate	108-65-6	132	0.3	146	VOC	T
	Diethylene glycol monoethyl ether acetate	112-15-2	176	0.32	217	VOC	T
	Diethylene glycol monobutyl ether acetate	124-17-4	204	1.3	245	VOC/SVOC	T
Plasticizers and solvents	3-Methoxy-3-methylbutanol	56539-66-3	118	0.18	174	VOC	T
	2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate	6846-50-0	286	4.91	280	SVOC	T
	2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol monoisobutyrate	25265-77-4	216	3.00	244~247	VOC/SVOC	A
	2-Ethyl-1-hexanol	104-76-7	130	2.28	187	VOC	T
	Methylcyclohexane	108-87-2	98	3.70±0.17	100	VOC	W
Cyclosiloxanes	Octamethylcyclotetrasiloxane	556-67-2	297	5.1	175	VOC	T
	Decamethylcyclopentasiloxane	541-02-6	371	5.2	210	VOC	T
	Dodecamethylcyclohexasiloxane	540-97-6	445	5.86	245	VOC/SVOC	T
Fragrances (EU list)	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	4.209±0.254	320	SVOC	T
	Cinnamyl alcohol	104-54-1	134	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 benzoate	120-51-4	212	3.97	324	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	4.83±0.31	110~113	VOC	T
	α-hexylcinnamaldehyde	101-86-0	216	4.866±0.318	305	SVOC	T
	3-(4-tert-Butylphenyl)isobutyraldehyde (Lilial)	80-54-6	204	3.84±0.25	95-96	VOC	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	

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

<sup>b</sup> 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)

<sup>c</sup> 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 1. CAS No, molecular weight, logKow, boiling point, classification, and supplier of chemicals studied. (Continued)

Type	Chemicals	CAS No.	Molecular weight	logKow <sup>a</sup>	Boiling point (°C) <sup>a</sup>	VOC/SVOC/POM <sup>b</sup>	Supplier <sup>c</sup>
Fragrances (others)	Butyl acetate	123-86-4	116	1.82	126	VOC	T
	Ethyl Salicylate	118-61-6	166	3.03±0.24	231	VOC	T
	Ethylene 1,11-undecanedicarboxylate	105-95-3	270	2.77±0.39	139-142	VOC	W
	Hexanal	66-25-1	100	1.93±0.22	131	VOC	T
	Nonanal	124-19-6	142	3.27	192	VOC	T
	Methyl jasmonate (mixture of isomers)	1101843-02-0	224	2.95±0.35	303±15	SVOC	T
	Methyl dihydrojasmonate (mixture of isomers)	24851-98-7	226	2.65±0.27	308±15	SVOC	T
	2-Phenylethyl alcohol	60-12-8	122	1.4	219	VOC	T
	(1R)-(+)- $\alpha$ -Pinene	7785-70-8	136	4.83	156	VOC	T
(-)- $\beta$ -Pinene	18172-67-3	136	4.35	165	VOC	T	
Preservatives and its decomposition products	2-Bromo-2-nitro-1,3-propanediol (Bronopol)	52-51-7	200	1.15±0.63	358±42	SVOC	T
	Bromonitromethane	563-70-2	140	0.88±0.27	149	VOC	W
	2-Bromoethanol	540-51-2	125	0.26±0.22	150	VOC	T
	Bronidox	30007-47-7	212	0.749±0.430	280.8±40.0	SVOC	T
	DMDM hydantoin	6440-58-0	188	-1.078±0.654	303.7±52.0	SVOC	JK
	Methyldibromoglutaronitrile	35691-65-7	266	1.515±0.408	338.6±42.0	SVOC	SA
Maleic and fumaric acid diesters	Dimethyl maleate	624-48-6	144	0.22	205	VOC	T
	Diethyl maleate	141-05-9	172	1.48	225	VOC	T
	Dibutyl maleate	105-76-0	228	3.38	280	SVOC	T
	Bis(2-ethylhexyl) maleate	142-16-5	341	7.88	410±18	SVOC/POM	T
	Dimethyl fumarate	624-49-7	144	0.74	192-193	VOC	T
	Diethyl fumarate	623-91-6	172	2.20	219	VOC	W
	Dibutyl fumarate	105-75-9	228	3.49	285	SVOC	T
Bis(2-ethylhexyl) fumarate	141-02-6	341	7.25	410±18	SVOC/POM	T	
Aromatic amines	2,4-Diaminotoluene	95-80-7	122	0.14	292	SVOC	W
	2,6-Diaminotoluene	823-40-5	122	-0.24±0.25	282	SVOC	T
	4,4'-Methylenedianiline	101-77-9	198	1.6	398~399	SVOC/POM	W
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
Rubber related compounds	Morpholine	110-91-8	87	-0.86	129	VOC	T
	Cyclohexylamine	108-91-8	99	1.50±0.19	125	VOC	T
	Dicyclohexylamine	101-83-7	181	3.5	256	VOC/SVOC	T

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

<sup>b</sup> 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  $\geq$ 380°C)

<sup>c</sup> 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
		$6.38\% < \text{mean \% depletion} \leq 22.62\%$	Low reactivity
	Positive	$22.62\% < \text{mean \% depletion} \leq 42.47\%$	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
		$11.89\% < \text{mean \% depletion} \leq 23.09\%$	Low reactivity
	Positive	$23.09\% < \text{mean \% depletion} \leq 98.24\%$	Moderate reactivity
		$98.24\% < \text{mean \% depletion} \leq 100\%$	High reactivity

Table 3. Predicted skin sensitisation hazards and peptide depletion (%) of proficiency substances.

Proficiency substances	Predicted skin sensitisation hazards		Peptide depletion (%)			
	LLNA	DPRA	This study		OECD requirement	
			Cysteine	Lysine	Cysteine	Lysine
2,4-Dinitrochlorobenzene	Sensitiser (extreme)	Positive	100	30	90-100	15-45
Oxazolone	Sensitiser (extreme)	Positive	68	53	60-80	10-55
Formaldehyde	Sensitiser (strong)	Positive	54	4.1	30-60	0-24
Benzylideneacetone	Sensitiser (moderate)	Positive	93	63	80-100	0-7
Famesal	Sensitiser (weak)	Positive	10	5.8	15-55	0-25
2,3-Butanedione	Sensitiser (weak)	Positive	78	27	60-100	10-45
1-Butanol	Non-sensitiser	Negative	1.1	0.68	0-7	0-5.5
6-Methylcoumarin	Non-sensitiser	Negative	0.86	0.89	0-7	0-5.5
DL-Lactic Acid	Non-sensitiser	Negative	0.51	0.88	0-7	0-5.5
4-Methoxyacetophenone	Non-sensitiser	Negative	1.6	0.47	0-7	0-5.5

Table 4. Results of DPRA for chemicals studied.

Type	Chemicals	Depletion (%)			Prediction	Lys/Cys	
		Cysteine	Lysine	Mean <sup>a</sup>			
Glycol ethers and glycol ether acetates	Ethylene glycol	0.65	0.82	0.74	Negative		
	Propylene glycol	0.35	0.62	0.48	Negative		
	1,2-Butanediol	0.27	0.94	0.60	Negative		
	1,3-Butanediol	0.16	0.63	0.40	Negative		
	1,4-Butanediol	0.02	0.55	0.28	Negative		
	2,3-Butanediol	0.21	0.81	0.51	Negative		
	Hexylene glycol	0.37	0.75	0.56	Negative		
	Diethylene glycol	0.64	0.99	0.82	Negative		
	Dipropylene glycol (mixture of isomers)	0.63	1.20	0.92	Negative		
	Propylene glycol monomethyl ether	3.21	1.05	2.13	Negative		
	Propylene glycol monoethyl ether	-0.68	0.67	0.34	Negative		
	Propylene glycol monobutyl ether	-0.45	0.58	0.29	Negative		
	Diethylene glycol monoethylether	0.15	1.66	0.90	Negative		
	Diethylene glycol monobutyl ether	5.31	1.30	3.31	Negative		
		2.41	-0.49	1.20			
		Propylene glycol monomethyl ether acetate	-0.04	1.22	0.59	Negative	
		Diethylene glycol monoethyl ether acetate	0.61	n.t. <sup>b</sup>	0.61Cys <sup>c</sup>	Negative	
		Diethylene glycol monobutyl ether acetate	0.49	1.52	1.01	Negative	
Plasticizers and solvents	3-Methoxy-3-methylbutanol	0.45	0.22	0.34	Negative		
	2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate	1.00	0.38	0.69	Negative		
	2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol monoisobutyrate	1.91	0.51	1.21	Negative		
	2-Ethyl-1-hexanol	1.27	0.36	0.82	Negative		
	Methylcyclohexane	0.17	-0.56	0.08	Negative		
Cyclosiloxanes	Octamethylcyclotetrasiloxane	-0.01	0.30	0.15	Negative		
	Decamethylcyclopentasiloxane	0.03	0.75	0.39	Negative		
	Dodecamethylcyclohexasiloxane	-0.03	0.16	0.08	Negative		
Fragrances (EU list)	$\alpha$ -Amylcinnamaldehyde	1.87	0.73	1.30	Negative		
	$\alpha$ -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		0.59
	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.	37.3Cys	Positive(Moderate)		
	Anisyl alcohol	2.02	0.83	1.42	Negative		
	Benzyl benzoate	0.88	0.46	0.67	Negative		
	Benzyl cinnamate	0.63	-0.50	0.32	Negative		
	$\beta$ -citronellol	1.87	0.61	1.24	Negative		
	Farnesol (isomers)		10.1	-0.35	5.07	Positive(Low)	
			13.8	-0.67	6.91		-0.049
			23.0	0.61	11.8		0.027
	$\alpha$ -hexylcinnamaldehyde	2.23	-0.01	1.11	Negative		
	3-(4-tert-Butylphenyl)isobutyraldehyde (Lilial)		11.3	-0.34	5.63	Negative	
			10.8	-0.63	5.42		
	(+)-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	
$\alpha$ -iso-Methylionone		6.26	-0.07	3.13	Negative		
		7.61	0.20	3.81			

<sup>a</sup> Negative depletion is considered as "0" when calculating the mean and underline means positive. <sup>b</sup> n.t.: Co-elution is observed. <sup>c</sup> Using Cys-peptide 1:10 prediction model only.



Table 4. Results of DPRA for chemicals studied. (Continued)

Type	Chemicals	Depletion (%)			Prediction	Lys/Cys	
		Cysteine	Lysine	Mean <sup>a</sup>			
Fragrances (others)	Butyl acetate	0.39	1.46	0.92	Negative		
	Ethyl Salicylate	0.65	1.81	1.23	Negative		
	Ethylene 1,11-undecanedicarboxylate	0.03	-0.56	0.01	Negative		
	Hexanal	31.5	42.3	36.9	Positive(Moderate)	1.34	
	Nonanal	24.6	2.68	13.6	Positive(Low)	0.11	
	Methyl jasmonate (mixture of isomers)	16.6	1.17	8.87	Positive (Low)	0.070	
		20.6	0.02	10.3		0.00092	
		Methyl dihydrojasmonate (mixture of isomers)	2.83	-0.23	1.41	Negative	
		2-Phenylethyl alcohol	n.t. <sup>b</sup>	2.41	n.c. <sup>c</sup>	Not evaluation	
		(1R)-(+)- $\alpha$ -Pinene	8.10	-0.88	3.61	Negative	
		11.6	-0.69	5.80			
	(-)- $\beta$ -Pinene	3.28	-1.08	1.64	Negative		
Preservatives and its decomposition products	2-Bromo-2-nitro-1,3-propanediol (Bronopol)	100	67.6	83.8	Positive (high)	0.68	
	Bromonitromethane	100	9.35	54.7	Positive (high)	0.094	
	2-Bromoethanol	12.8	0.15	6.49	Positive (Low)	0.012	
		13.2	7.58	10.4		0.57	
	Bronidox	99.7	-0.31	49.9	Positive(high)	-0.0031	
	DMDM hydantoin	60.0	2.68	31.34	Positive(Moderate)	0.045	
	Methyldibromoglutaronitrole	100.0	n.t.	100.0Cys <sup>d</sup>	Positive(high)		
Maleic and fumaric acid diesters	Dimethyl maleate	100	83.2	91.6	Positive (high)	0.83	
	Diethyl maleate	100	80.7	90.3	Positive (high)	0.81	
	Dibutyl maleate	100	36.4	68.2	Positive (high)	0.36	
	Bis(2-ethylhexyl) maleate	5.45	-0.32	2.72	Negative		
	Dimethyl fumarate	100	46.1	73.1	Positive (high)	0.46	
	Diethyl fumarate	100	46.2	73.1	Positive (high)	0.46	
	Dibutyl fumarate	100	10.7	55.3	Positive (high)	0.11	
	Bis(2-ethylhexyl) fumarate	8.64	0.50	4.57	Negative		
	6.66	-3.60	3.33				
Aromatic amines	2,4-Diaminotoluene	73.7	0.55	37.1	Positive (Moderate)	0.0075	
		13.2	0.46	6.83			
	2,6-Diaminotoluene	11.34	-1.23	5.67	Negative		
		11.58	-1.37	5.79			
	4,4'-Methylenedianiline	1.38	0.49	0.93	Negative		
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		
Rubber related compounds	Morpholine	3.85	-0.68	1.92	Negative		
	Cyclohexylamine	1.05	0.01	0.53	Negative		
	Dicyclohexylamine	3.81	1.06	2.44	Negative		

<sup>a</sup> Negative depletion is considered as "0" when calculating the mean and underline means positive. <sup>b</sup> n.t.: Co-elution is observed. <sup>c</sup> n.c.: Not calculated. <sup>d</sup> Using Cys-peptide 1:10 prediction model only.

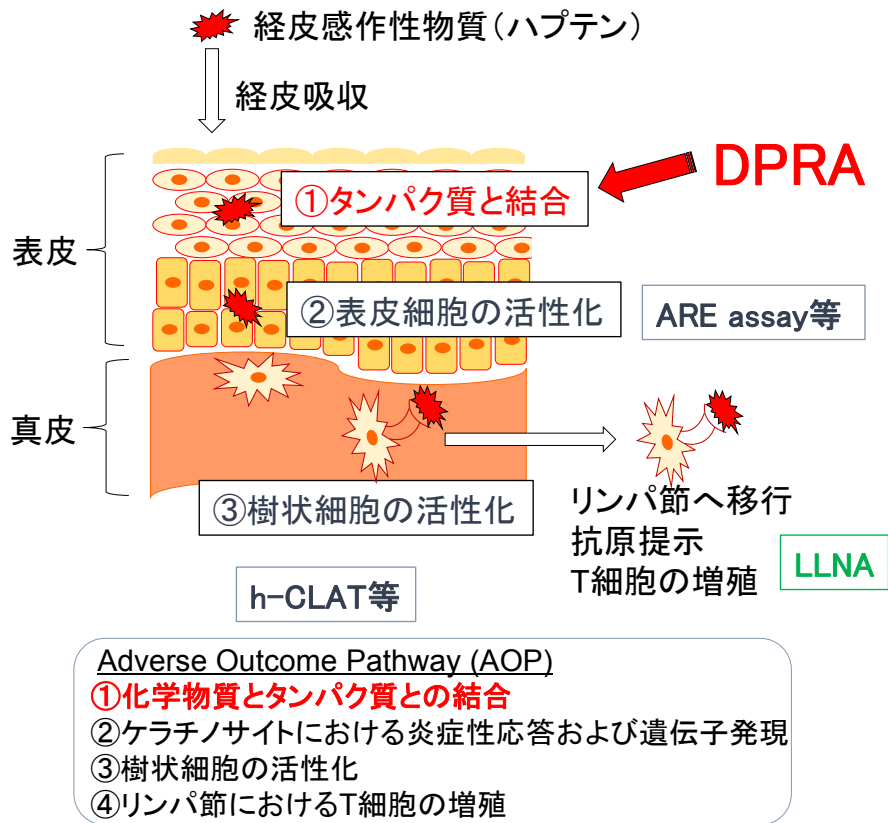


Fig. 1 皮膚感作性のメカニズムとそれに対応した代替試験法  
(引用文献7より改変)

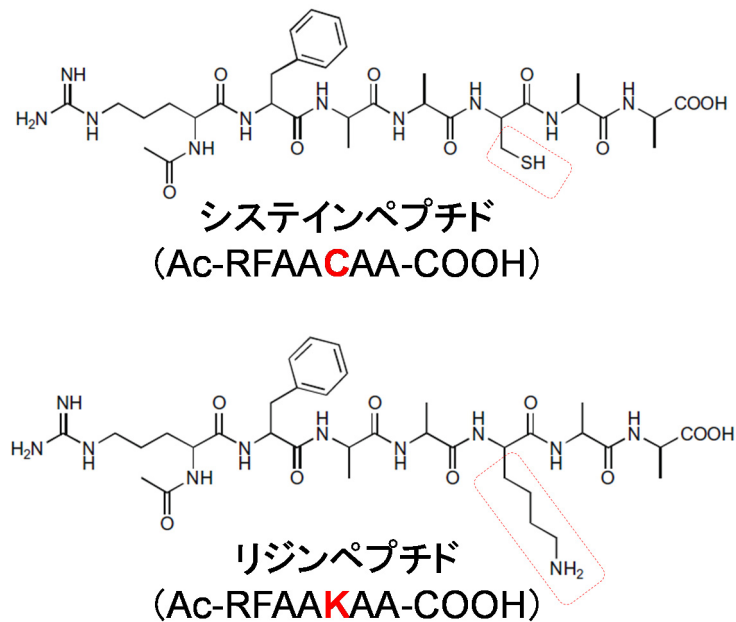


Fig. 2 試験に使用した使用したペプチドの構造  
(上: Cys-peptide、下: Lys-peptide)

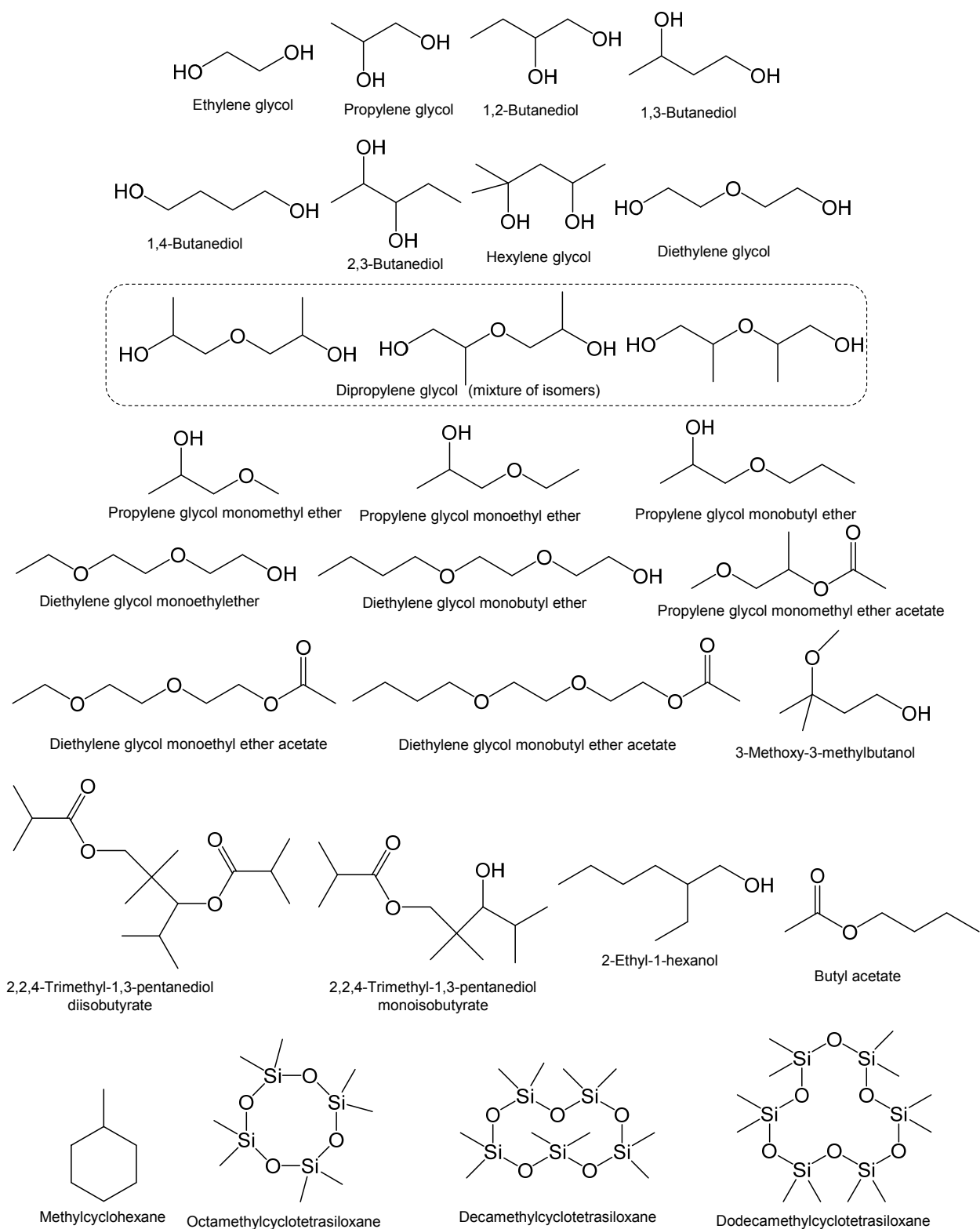


Fig. 3 被験物質の化学構造

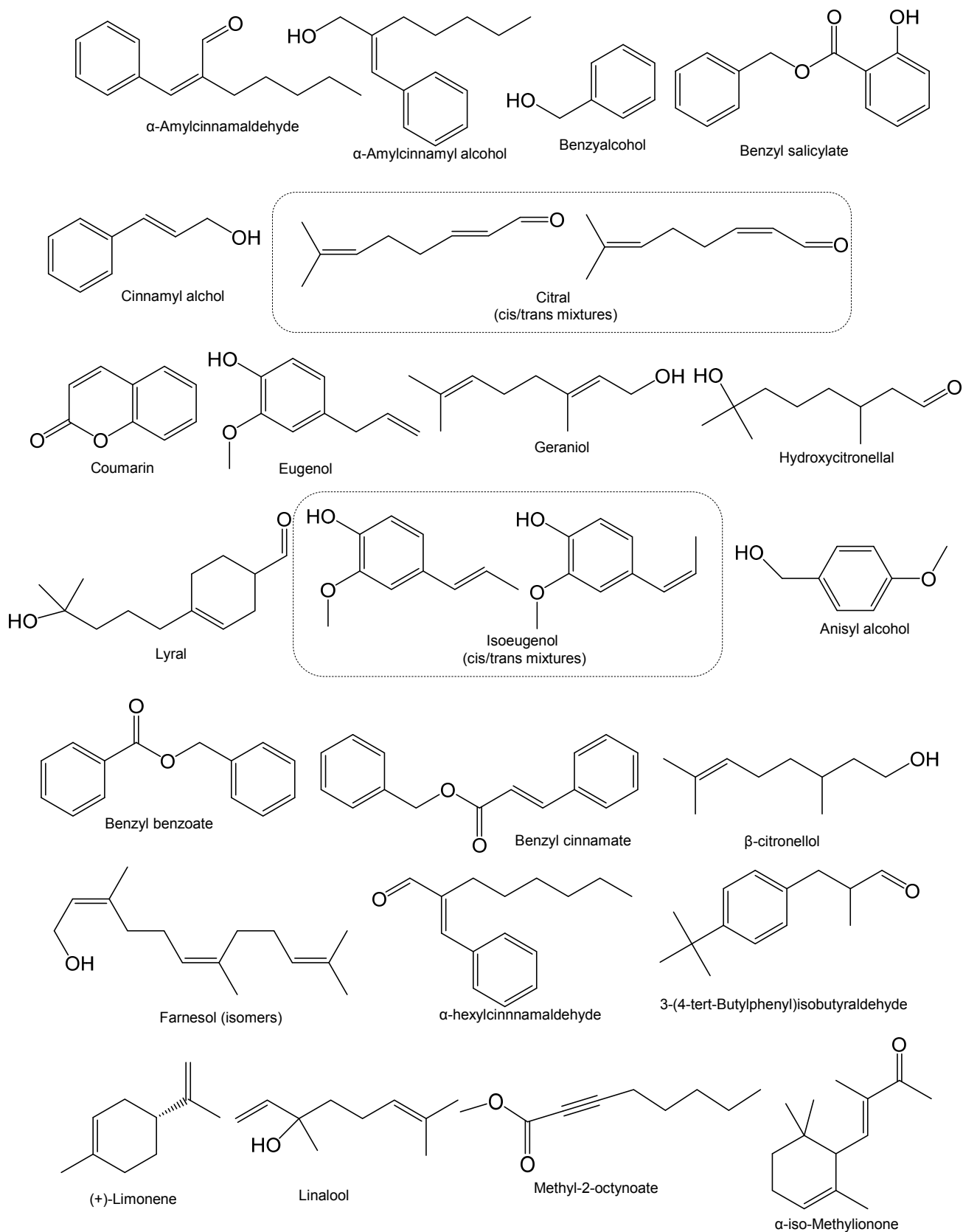


Fig. 3 被験物質の化学構造 (続き)

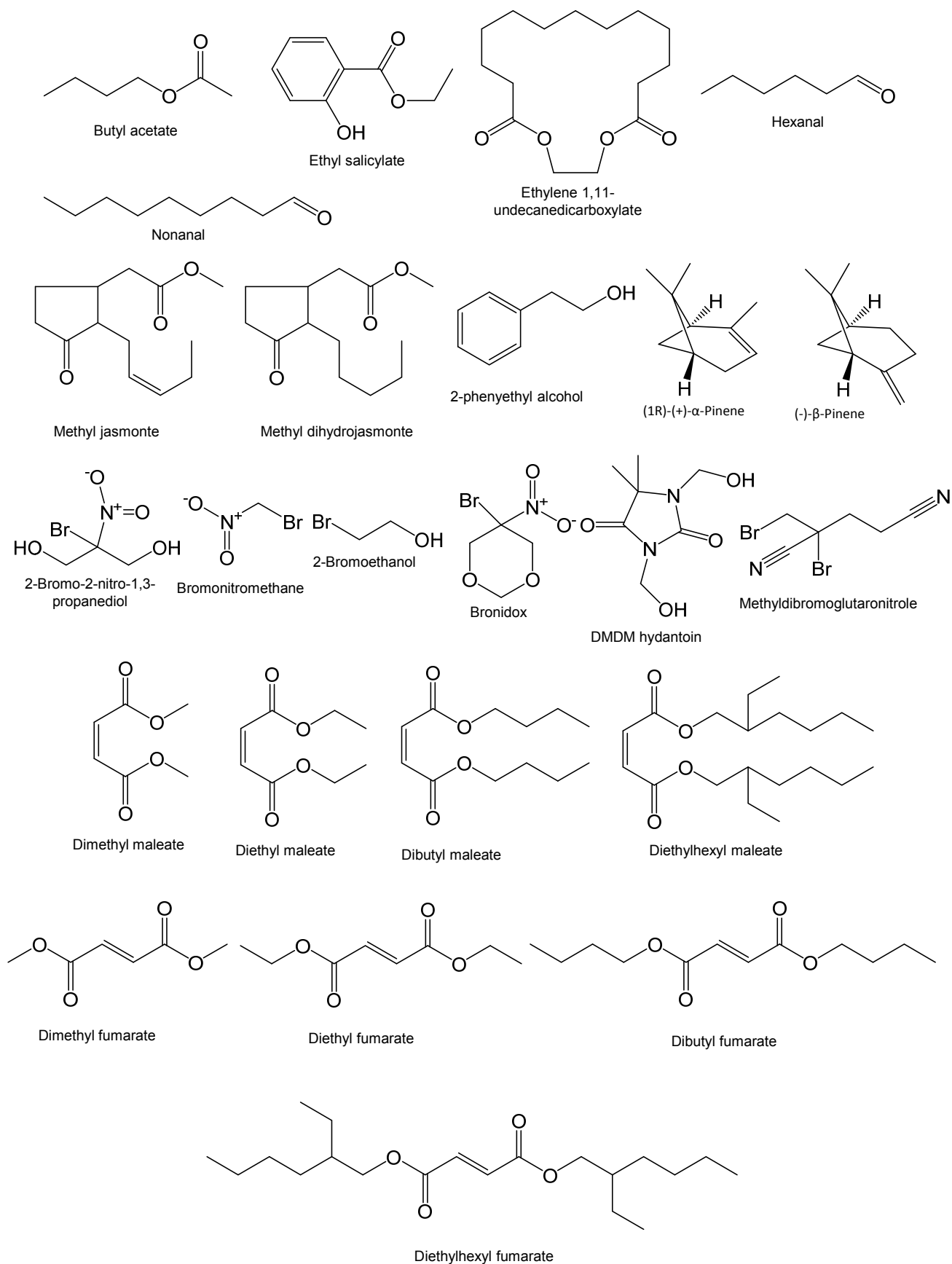


Fig. 3 被験物質の化学構造 (続き)

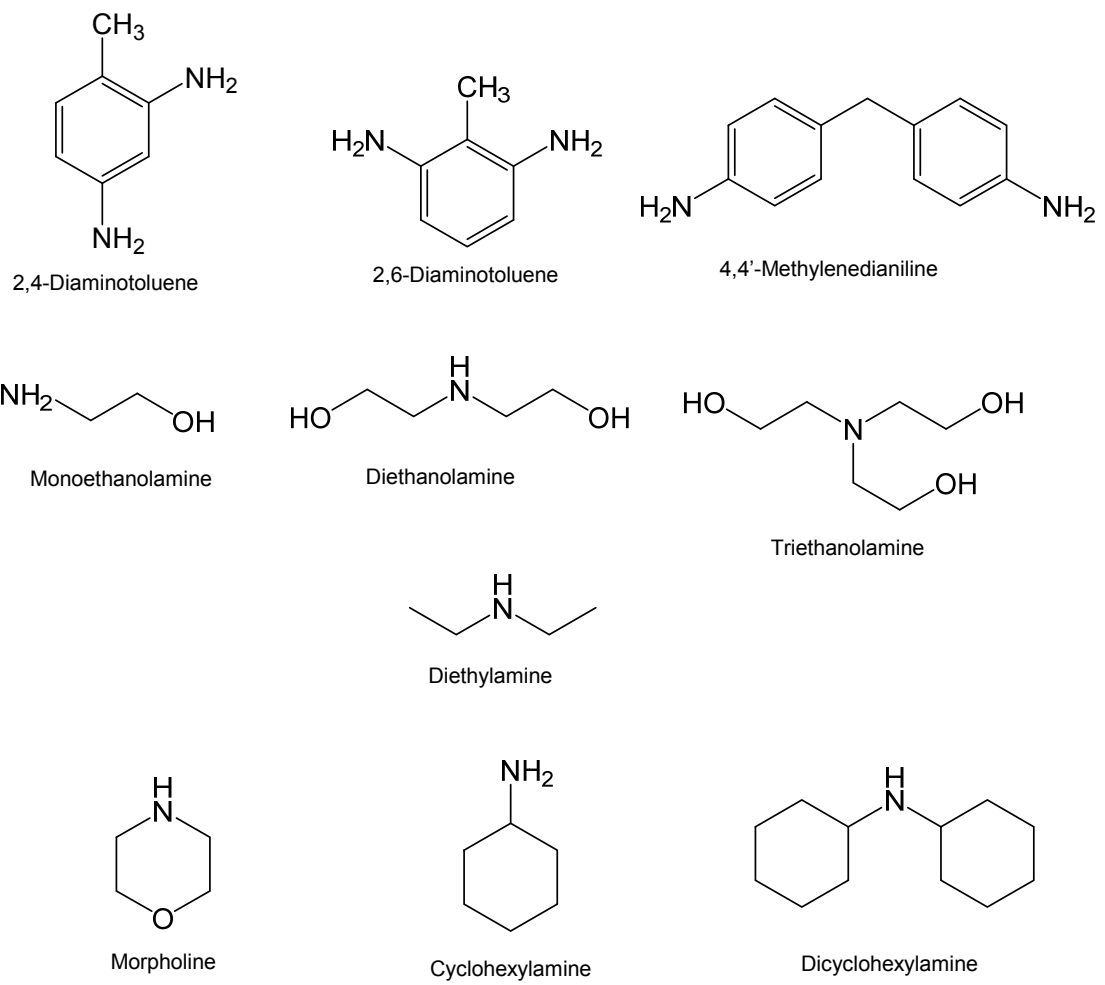


Fig. 3 被験物質の化学構造 (続き)

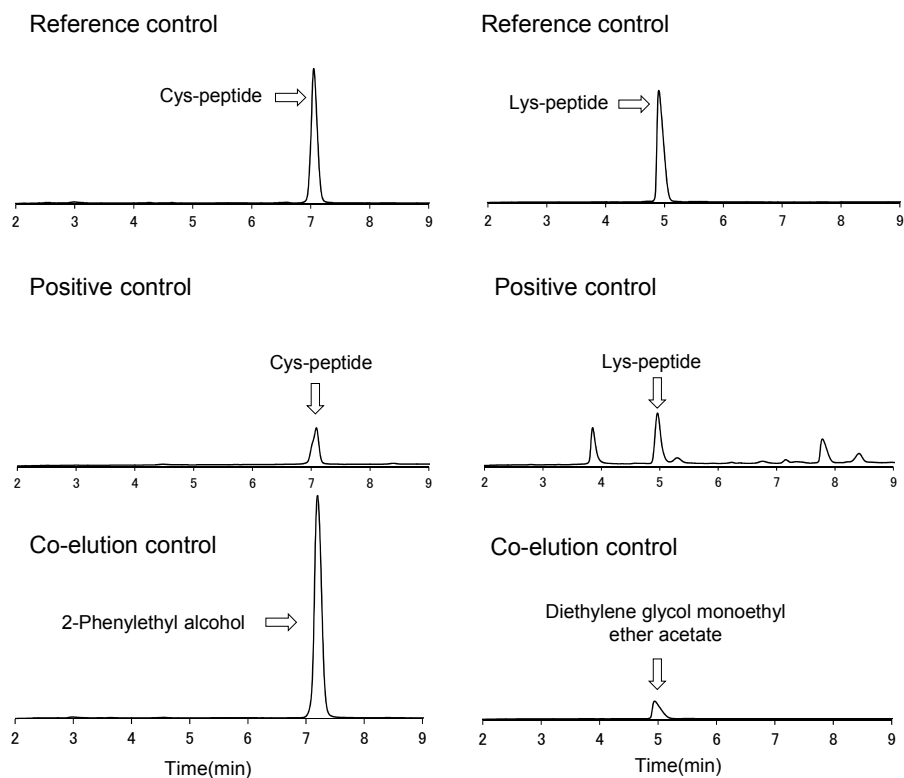


Fig. 4 各ペプチド (Reference control)、陽性対照 (Positive control) 及び被験物質のみ (Co-elution control) の HPLC クロマトグラム ( $\lambda=220$  nm)

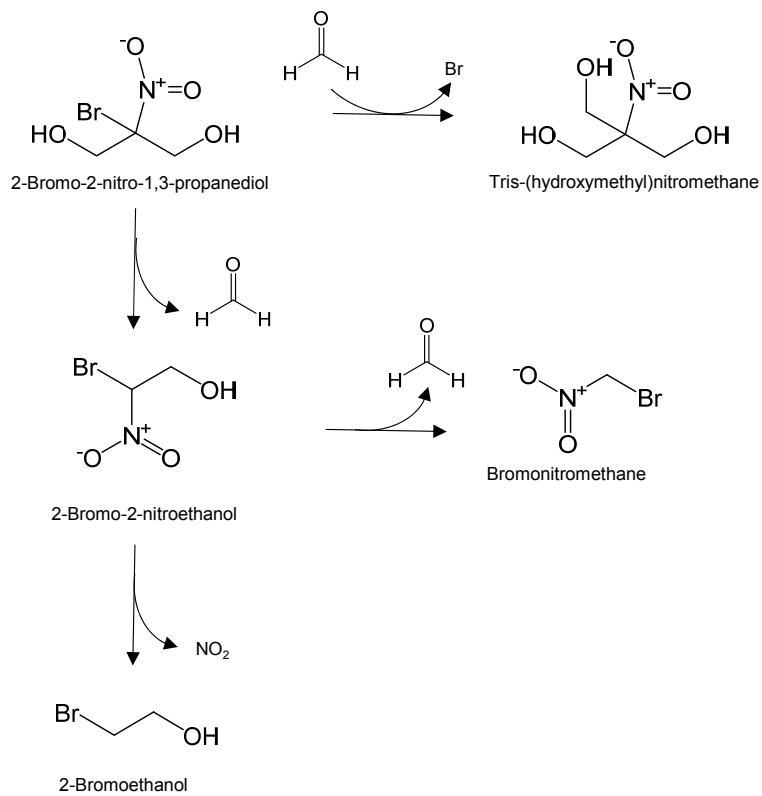


Fig. 5 2-Bromo-2-nitro-1,3-propanediol (Bromopol) の分解過程<sup>24)</sup>