

博士論文

化粧品原料の皮膚感作性評価をめざした動物実験代替法の構築

Development of non-animal evaluation method of
skin sensitization for cosmetic ingredients

2018 年 9 月

September, 2018

静岡県立大学大学院 薬食生命科学総合学府
博士後期課程薬食生命科学専攻 薬物動態学講座

井上 恭子

Kyoko INOUE

博士論文

化粧品原料の皮膚感作性評価をめざした動物実験代替法の構築

Development of non-animal evaluation method of
skin sensitization for cosmetic ingredients

本論文は静岡県立大学大学院 薬食生命科学総合学府
博士論文である

2018 年 9 月
September, 2018

静岡県立大学大学院 薬食生命科学総合学府
博士後期課程薬食生命科学専攻 薬物動態学講座

井上 恭子
Kyoko INOUE

本論文中に用いた略語一覧

ANN	: artificial neural network
AOP	: adverse outcome pathway
ARE	: antioxidant response element
CAS	: chemical abstract service
CI _{max}	: concentration giving maximal induction
CV75	: concentration providing a cell viability of 75%
EC1.5	: interpolated concentration for a 1.5-fold luciferase induction
EC3	: estimated concentration needed to produce a stimulation index of 3
DMEM	: Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	: dimethyl sulfoxide
DPRA	: direct peptide reactivity assay
FBS	: fetal bovine serum
h-CLAT	: human cell line activation test
hRIPT	: human repeated insult patch test
I _{max}	: average maximal induction of luciferase activity
Keap1	: Kelch-like ECH-associated protein 1
LLNA	: local lymph node assay
MAC	: maximum amount of change of cell-surface thiols
6-MC	: 6-methylcoumarin
MEC	: molar extinction (absorption) coefficient
Nrf2	: NF-E2 related factor 2
NRU	: neutral red uptake
OECD	: organisation for economic co-operation and development
PBS	: phosphate-buffered saline
(Q)SAR	: (quantitative) structure-activity relationship
RMSE	: root mean square error
ROS	: reactive oxygen species
TCSA	: 3,3',4',5-tetrachlorosalicylanilide
UV	: ultraviolet
VIS	: visible light

目次

本論文中に用いた略語一覧.....	i
緒論.....	1
第 1 章 Adverse outcome pathway (AOP) に沿った <i>in vitro</i> 試験結果を用いた感作性予測モデル (<i>in vitro</i> モデル) の開発.....	8
第 1 節 序論.....	8
第 2 節 実験材料および方法.....	9
1.2.1. データベース.....	9
1.2.2. ARE assay.....	9
1.2.2.1. 試薬.....	9
1.2.2.2. 細胞と培養方法.....	9
1.2.2.3. 細胞毒性試験.....	11
1.2.2.4. ARE assay.....	11
1.2.2.5. データ解析.....	12
1.2.3. Log K_{ow} の算出.....	12
1.2.4. ニューラルネットワーク解析.....	12
1.2.5. LLNA 予測カテゴリー.....	13
1.2.6. 統計解析.....	13
第 3 節 実験結果.....	14
1.3.1. LLNA と <i>in vitro</i> 試験 (ARE assay, SH test, h-CLAT) 結果の比較.....	14
1.3.2. モデル構築に使用するパラメーター選定.....	14
1.3.3. ニューラルネットワーク解析を用いた LLNA 閾値予測モデルの構築.....	20
第 4 節 考察.....	24
第 2 章 化学構造からの感作性予測モデル (<i>in silico</i> モデル) の構築.....	26
第 1 節 序論.....	26
第 2 節 実験試料および方法.....	27
2.2.1. データベース.....	27
2.2.2. ニューラルネットワーク解析.....	27
2.2.3. LLNA 予測カテゴリー.....	28
2.2.4. 統計解析.....	28

第 3 節 実験結果	31
2.3.1. ニューラルネットワーク解析に用いる記述子の抽出	31
2.3.2. LLNA 閾値予測ニューラルネットワークモデルの構築	31
2.3.3. <i>In vitro</i> モデル と <i>in silico</i> モデルとの組み合わせ	39
第 4 節 考察	48
第 3 章 <i>In vitro</i> 光感作性試験の開発	51
第 1 節 序論	51
第 2 節 実験材料および方法	52
3.2.1. 試薬	52
3.2.2. UV/VIS 照射	52
3.2.3. Photo-ARE assay の開発	52
3.2.3.1. 細胞培養	52
3.2.3.2. 細胞毒性試験	52
3.2.3.3. Photo-ARE assay	53
3.2.3.4. データ解析	53
3.2.4. 統計解析	54
第 3 節 実験結果	55
3.3.1. Photo-ARE assay の UV/VIS 照射条件の検討	55
3.3.2. Photo-ARE assay における光感作性物質による ARE-Nrf2 ルシフェラーゼ遺伝子の発現誘導	57
3.3.3. Photo-ARE assay と <i>in vivo</i> 結果との比較	58
第 4 節 考察	63
総括	66
謝辞	69
参考文献	70

緒論

皮膚に直接適用する化粧品や医薬品の安全性評価において、化学物質が皮膚に接触した際に生じる遅延性アレルギーや、皮膚に接触した光感受性物質が紫外線 (UV) を吸収して励起された後に生じる遅延性アレルギーは、重要な安全性評価項目の一つである。これらはそれぞれ皮膚感作性、光感作性と呼ばれ、非常に複雑な免疫応答に基づく反応であると考えられている (1, 2)。

感作性を有する低分子量の化学物質 (ハプテン) は経皮吸収され、生体のタンパク質との複合体を形成した後、皮膚中の樹状細胞や表皮細胞を活性化する。活性化した樹状細胞は所属リンパ節に遊走し、T 細胞に抗原提示を行うことで抗原特異的 T 細胞の増殖を誘導し、これらが全身に拡散すると感作が成立する (Fig. 1)。一度感作が成立すると、その後再び同じ化学物質に暴露される度に局所で炎症が惹起される。このような一連の免疫応答のうち、感作成立までの過程を誘導期、感作成立後の炎症過程を誘発期と呼ぶ。

化学物質がヒトにおいて皮膚感作性を引き起こす可能性を持つかどうかの評価は、誘導期における皮膚反応を肉眼的に観察・評価するモルモットを用いた試験 (3, 4) が一般的であった。しかし、動物福祉の観点においてより優れた、マウスを用いた

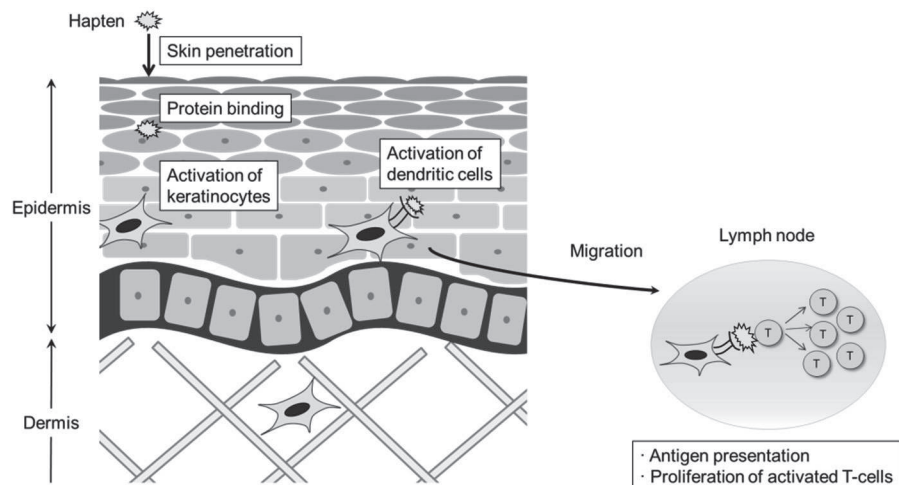


Figure 1. The induction phase of skin sensitization.

local lymph node assay (LLNA) が皮膚感作性の代替法として開発され、経済開発協力機構 (organisation for economic co-operation and development: OECD) ガイドライン法となった (5). LLNA は、マウス耳介に化学物質を塗布した際の、誘導期における局所リンパ節中の細胞増殖反応を指標とした試験である。放射性同位元素の取り込みにより細胞増殖を測定しており、被験物質塗布群のリンパ球増殖が対照群の 3 倍となる濃度は estimated concentration needed to produce a stimulation index of 3 (EC3) とされ、客観的測定値により感作性の有無の判断だけでなく、感作性の強弱を 5 段階でカテゴリー分類 (extreme, strong, moderate, weak and non-sensitizer) することが可能である。さらにヒト感作性試験 human repeated insult patch test (hRIPT) 等から算出されたヒトにおける無作用量と EC3 が相関する事が示されており (6-8)、定量的リスク評価を行うことで EC3 からヒトに適用可能な濃度を算出することが可能と考えられている (9)。このように、LLNA は従来法の主観判定ではなく、客観的測定値により感作性の有無の評価に加え、強度を比較することが可能な試験であり、ヒトとの相関も良好であることから、*in vivo* 試験の gold-standard 法とされている。

一方、動物福祉や法規制の観点から、動物を用いずに *in vitro* 試験や *in silico* 評価を用いて皮膚感作性を予測する手法に関して、LLNA との相関を指標に研究が進められてきた。ハプテンの皮膚への接触から最終的に炎症反応が起きるまでの一連の反応のうち、感作反応の鍵となる反応は adverse outcome pathway (AOP) として OECD 報告書に段階毎に分類されている (Fig. 2)(10)。その中でも感作誘導期におけるタンパク結合、表皮細胞の活性化、樹状細胞の活性化は、感作反応の鍵となる重要な反応とされ、これらに着目した様々な代替法が報告されている (Table 1)(11-22)。

タンパク結合に関しては、金属等の一部の例外を除き、ハプテンは親電子性であり、タンパク質のチオール基やアミノ基と結合することから (23)、化学物質をチオール基またはアミノ基を含むペプチドと混合した時のペプチドとの結合を評価する direct peptide reactivity assay (DPRA) (11) が開発された。DPRA は細胞を用いない *in chemico* 法であるが、細胞を用いる試験法としては、単球系培養細胞である THP-1 細胞に化学物質を適用した際の細胞表面チオール基の変化量を評価する SH test (12) 等が報告されている。

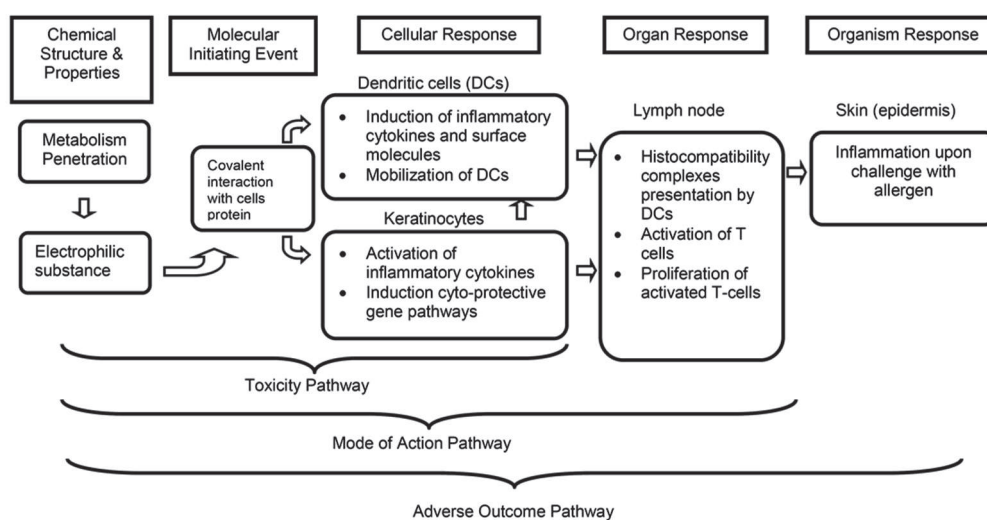


Figure 2. Flow diagram of the pathways associated with skin sensitization. Figure was quoted from OECD report (10).

表皮細胞の活性化に関しては、酸化ストレス応答を制御する機構である Keap1-Nrf2-ARE pathway の関連が注目されている (13). 細胞を感作性物質で処理すると、活性酸素種 (ROS) が産生される (24, 25). 過剰な ROS の蓄積を防御するため、細胞内にはグルタチオン S-トランスフェラーゼ, NAD(P)H キノン還元酵素, ヘムオキシゲナーゼ等の酵素が備わっているが、これらの遺伝子発現を制御しているのが Nrf2 である (26). Nrf2 の活性は、主にセンサータンパク質である Keap1 により調整されている。非酸化ストレス状態下においては、Nrf2 は細胞内においてセンサータンパク質である Keap1 と結合しているが、酸化ストレスまたは感作性物質等の小分子の親電子性物質が Keap1 のチオール基を修飾すると、Nrf2 は Keap1 から解離する。その後、解離した Nrf2 は核へ移行し、抗酸化剤応答配列 ARE を上流に持つ遺伝子の発現が誘導される (27-29). この機構を応用し、ARE 配列の下流にルシフェラーゼ遺伝子配列をつないだレポーター遺伝子を細胞に恒常的に導入し、化学物質処理時のルシフェラーゼによる発光量を測定する ARE assay (13), LuSens (14), KeratinoSens™ (15) が開発された。その他のシグナルに着目した試験として、表皮細胞からの炎症性サイトカインである IL-18 分泌量を測定する epidermal equivalent (EE) potency assay (16) や、三次元皮膚モデルを用いてストレス関連遺伝子の発現量を指標とした epidermal sensitization assay (EpiSensA) (17) 等が報告されている。

樹状細胞の活性化に関しては、ヒト末梢血から調製した樹状細胞を感作性物質で処理すると、CD86, CD54, MHC class II 等の細胞表面抗原の発現量が増加することから (30, 31), THP-1 細胞を化学物質で処理した際の CD86 および CD54 の発現量を測定する human cell line activation test (h-CLAT) が開発された (18, 19). h-CLAT と類似する試験として、U937 細胞を用いて CD86 の発現量を測定する Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) (20), ヒト血液から調製した樹状細胞を用いて CD86 の発現量を測定する human peripheral blood monocyte derived dendritic cells (PBMDs) (21) が報告されている. また、同様に調製した樹状細胞を感作性物質で処理すると、IL-8 の産生量が増加することから (32), IL-8 プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子配列をつないだレポーター遺伝子を THP-1 細胞に恒常的に導入し、化学物質処理時のルシフェラーゼによる発光量を測定する IL-8 Luc assay が開発された (22).

このように、皮膚感作性の免疫反応の一部に焦点をあてた試験法が数多く報告されてきた. しかし、皮膚感作性は複数の反応が組み合わさった多段階の生体反応であるため、一つの試験で感作反応全てを再現可能な代替法は存在しない. また、それぞれの代替法にも適用限界があることから、単独の試験での皮膚感作性の予測は難しく、複数の代替法を組み合わせた評価体系が必要であると考えられている (33).

そこで近年、評価に関する統合的アプローチの中で、皮膚感作性の他の AOP に焦点を当てた *in vitro* 試験の情報や、*in silico* を用いた類似化学物質からの推定情

Table 1. Test methods reported as an *in vitro* skin sensitization test method.

Test method	Assay principle	Toxic event	Reference
DPRAs	Chemical reactivity	Covalent interaction with cell proteins	(11)
SH test	Cell based assay		(12)
ARE assay	Cell based assay	Keratinocytes activation	(13)
LuSens	Cell based assay		(14)
KeratinoSens	Cell based assay		(15)
EE potency assay	Cell based assay		(16)
EpiSensA	Cell based assay		(17)
h-CLAT	Cell based assay	Dendritic cells activation	(18), (19)
U-SENS	Cell based assay		(20)
PBMDs	Cell based assay		(21)
IL-8 Luc	Cell based assay		(22)

報等を組み合わせて判断する取り組みが進められている (14, 34-40). 感作性の有無を判断するハザード評価に関しては, 各 AOP より 1 試験ずつ実施し, その結果を多数決で決定する 2 out of 3 モデル (14, 34) や機械学習モデル (35) 等が報告されている. 感作性強度を予測するリスク評価に関しては, LLNA カテゴリー分類を予測する手法として決定木モデル (36), 各試験結果をスコア化し, スコアの平均点や合計点で評価を行う battery モデル (37), 解析ツールとしてコンピューターを用いるベイジアンネットワークモデル (38, 39) 等が報告されている. しかしながら, これまでに LLNA EC3 を予測するモデルは報告されていなかった. EC3 が予測可能であれば, 個体間変動, 基剤による経皮吸収への影響, 使用方法等を考慮した安全係数を用いた定量的リスク評価を実施することで, ヒトに適用可能な濃度を算出することができる (9). 最終製品の安全性は, hRIPT 等の信頼のおけるヒト試験で最終的に確認することが望まれるため, EC3 は皮膚感作性の評価を行う上で非常に有用な情報である. そこで, 生体反応のような複雑な機構を解明する手法として, 既に経皮吸収性の予測等に応用されているニューラルネットワーク解析に着目し (41-43), *in vitro* 試験結果や *in silico* 情報を用いて化学物質の EC3 の予測を試みた.

ニューラルネットワークとは, 非線形の情報解析ツールであり, ニューロンが相互に結合し巨大なネットワークを築いている脳神経系の回路網を模倣した数理学的モデルである (44). 本研究に用いた階層型ニューラルネットワークは入力層, 中間層, 出力層の 3 層から構成される (Fig. 3). 層と層の間には, ニューロン同士のつながりの強さを示す重みが存在する. 入力層に *in vitro* 試験結果や *in silico* 情報等の予測するための説明変数を, 出力層には予測したい値である EC3 を提示すると, 出力データ (予測 EC3) と教師データ (実測 EC3) との誤差が小さくなるように学習を行いながら重みを調整し, 入力層と出力層の関係を解明する.

本論文では, 感作誘導段階の AOP のうち, 3 つの鍵となる反応を検出する *in vitro* 試験より得られるパラメーターを用いて, EC3 を予測するニューラルネットワークモデルを構築した (第 1 章). また, 化学物質自体がもつ情報である分子軌道より得られる記述子を用いて EC3 を予測するニューラルネットワークモデルを構築した (第 2 章). さらに, 感作性強度を実際よりも弱く見積もる過小評価物質を減らすための試みとして, 両モデルを組み合わせた評価スキームを構築した (第 2 章).

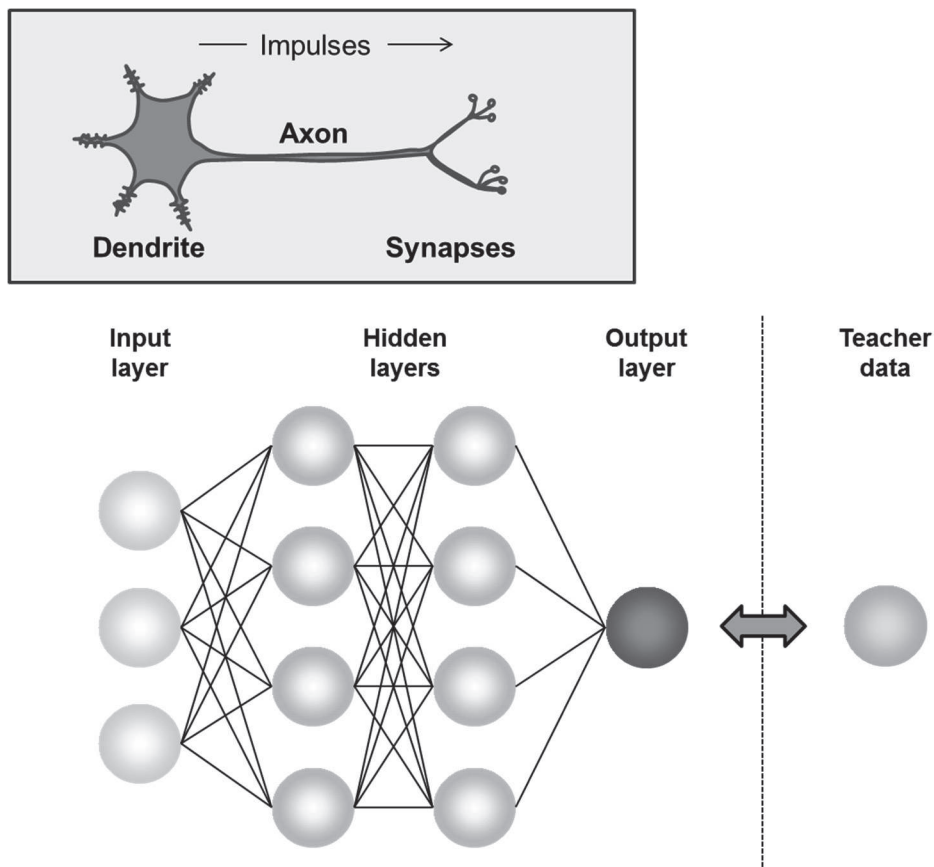


Figure 3. Diagram of neural network.

光感作は、光感受性物質が主に UVA (315~400 nm) の作用によって抗原性を獲得した後に生じる感作反応であると考えられている (2, 45). 光感受性物質に UV が照射された際に起こる反応は、光毒性と光感作に分類される。光毒性とは、光エネルギーを化学物質が吸収し、励起した際に生じる活性酸素により、組織や細胞が障害される反応である (46, 47). 化学物質を皮膚に塗布または全身投与後、光に暴露した際に誘発される毒性反応とされており (48), 化学物質の初回暴露時にも引き起こされる可能性のある急性の毒性反応である (49). 一方、光感作とは、T 細胞の活性化が必要な特異的免疫反応の一種であり、化学物質に最初に暴露された際には起こらない遅延性のアレルギー反応である (2). ただし、光感作性物質が抗原性を獲得するためには、UV 照射による構造変化とタンパク質との結合が必要であり、これらに伴い光

毒性反応が起こるため、光感作性物質は一般に光毒性を有し、光毒性と光感作は排他的に分けることができない (2, 50).

このような光感受性物質が引き起こす生体反応は、モルモット、ウサギ、ラット、マウス等の動物を用いてその毒性が試験されてきたが (45, 51-55), 動物愛護や法規制の観点から、感作と同様に動物を用いない評価法の開発が望まれている. 光毒性試験については, *in vitro* 3T3 neutral red uptake (3T3 NRU) 光毒性試験法が OECD ガイドライン化されている (48). また, 近年 ROS assay (56) が医薬品の光安全性評価ガイドラインとして採択された (57). 一方, 光感作代替法に関しては幾つかの *in vitro* 手法が報告されているが (47, 50, 58-63), ガイドラインとして採択された試験法はない. 従来, 光感受性物質による反応は大半が光毒性反応であり, 光感作性反応は稀であると考えられてきた (2). しかし, 光毒性を *in vitro* で簡便に評価可能となった現在では, 光毒性に起因する臨床症例は減少し, 光感作に起因する症例数の方が上回っているため (2, 59, 64, 65), 光感作を評価可能な系の構築が期待されている.

光感作は, 抗原の形成以降は感作と同様の免疫反応が関与すると考えられている (45). そのため, 光感作においても感作と同様に, 複数の鍵となる反応を検出する *in vitro* 試験法や *in silico* 情報を組み合わせることで, 動物を用いずに評価することが可能であると考えられる. 現在までに, 感作反応の鍵となる反応のうち, タンパク結合や樹状細胞の活性化に焦点をあてた光感作性試験法の報告はあるものの (58, 60, 61, 63), 表皮細胞の活性化に深く関連する Keap1-Nrf2-ARE pathway に焦点をあてた試験法は報告されていない. そこで本論文では, 感作代替評価法で進められてきた検討と同様に, 各反応における評価を組み合わせることで光感作の有無を総合的に判断するハザード評価を行うことを目的とし, Keap1-Nrf2-ARE pathway に着目して表皮細胞の活性化を評価する *in vitro* 光感作性試験法の開発を行った (第 3 章). さらに, 医薬品開発における光安全性評価フローを参照し, 現在までに報告されている他の *in vitro* 光感作性試験法と組み合わせ, 化粧品原料の光感作性評価フローを構築した (第 3 章).

第 1 章 Adverse outcome pathway (AOP) に沿った *in vitro* 試験結果を用いた感作性予測モデル (*in vitro* モデル) の開発

第 1 節 序論

感作誘導期の AOP であるタンパク結合, 表皮細胞の活性化, 樹状細胞の活性化に焦点をあてた *in vitro* 試験法や, 類似化学物質からの推定情報を組み合わせて感作性を予測する *in silico* 手法が多数報告されてきた (14, 34-40). 皮膚感作性の有無を予測するハザード評価や LLNA カテゴリー強度を予測するリスク評価を目的とした報告が多数ある一方で, LLNA EC3 を直接予測する報告はない. 化学物質の皮膚感作性評価において, 最終的にヒト試験で感作性を示さないことを確認する必要があるが, ヒトに適用可能な濃度の算出のためには EC3 は重要な情報となる. そこで本章では, 生体反応のような複雑な機構を解明する手法として, 既に経皮吸収性や抗ウイルス薬耐性の予測等に応用されているニューラルネットワーク解析 (41-43, 66) に着目し, EC3 予測への応用を試みた.

LLNA 陰性物質では, 試験陽性となる閾値濃度である EC3 が算出されないため, これらの物質に関しては LLNA 陰性となった最大試験濃度を, LLNA 陽性物質に関しては EC3 を LLNA 閾値と設定した. 感作性データのない化合物の LLNA 閾値を複数の *in vitro* 感作性試験結果から予測することを目的とし, LLNA の結果が既に報告済みの 62 化学物質を用いて, タンパク結合を SH test, 表皮細胞の活性化を ARE assay, 樹状細胞の活性化を h-CLAT で評価し, 得られた試験パラメーターおよび経皮吸収性の指標として化学物質の疎水性を示す $\log K_{ow}$ と LLNA 閾値との関連をニューラルネットワークで解析し, LLNA 閾値の予測モデル (*in vitro* モデル) 構築を試みた.

第 2 節 実験材料および方法

1.2.1. データベース

In vivo 感作性試験である LLNA と, *in vitro* 感作性試験のうちタンパク結合を評価する SH test および樹状細胞の活性化を評価する h-CLAT の結果が既知の 62 化学物質を用いた (Table 2). 各試験結果は文献値を用いた (67-76). 用いた化学物質の LLNA カテゴリー強度の内訳は, extreme sensitizer が 6 個, strong sensitizer が 12 個, moderate sensitizer が 14 個, weak sensitizer が 16 個, non-sensitizer が 14 個 (LLNA における偽陽性を 1 個含む) であった.

1.2.2. ARE assay

1.2.2.1. 試薬

Propyl gallate, linalool, hydroxycitronellal, pyridine, cobalt chloride, propylene glycol は和光純薬工業 (Osaka, Japan) より購入した. 2-Mercaptobenzothiazole と hexylcinnamic aldehyde は東京化成工業 (Tokyo, Japan) より購入した. Ethylenediamine は純正化学 (Tokyo, Japan) より, isopropanol は同仁化学研究所 (Kumamoto, Japan) より, dimethyl sulfoxide (DMSO) は関東化学 (Tokyo, Japan) より購入した. その他の化学物質は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した. 全ての試薬は特級グレードもしくは同等以上のものを用いた.

1.2.2.2. 細胞と培養方法

62 化学物質の表皮細胞の活性化を ARE assay で評価した. 評価には, ヒト乳癌由来 MCF7 細胞に, ラット GSTA2 遺伝子の ARE 配列 8 リピートと融合させた SV40 プロモーターを有するルシフェラーゼ遺伝子のプラスミドを安定的に導入した AREc32 細胞 (CXR biosciences, Dundee, UK) を用いた.

細胞培養液は 10% (v/v) ウシ胎仔血清 (FBS) (Gibco, Grand Island, NY, USA), 100 units/mL ペニシリン (Gibco), 100 µg/mL ストレプトマイシン (Gibco) および 500 µg/mL G418 (Calbiochem, San Diego, CA, USA) を添加した Glutamax 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium, low glucose (DMEM, Gibco) を用い, 細胞は 5% CO₂ 下 37°C で培養した.

Table 2. List of 62 tested chemicals.

Sample name	CAS	Sample name	CAS
Abietic acid	514-10-3	2-Hydroxypropyl methacrylate	923-26-2
2-Aminophenol	95-55-6	Isoeugenol	97-54-1
3-Aminophenol	591-27-5	Isopropanol	67-63-0
Benzocaine	94-09-7	Lactic acid	50-21-5
<i>p</i> -Benzoquinone	106-51-4	Linalool	78-70-6
Benzoyl peroxide	94-36-0	Maleic anhydride	108-31-6
1-Bromohexane	111-25-1	2-Mercaptobenzothiazole	149-30-4
1-Butanol	71-36-3	2-Methoxy-4-methylphenol	93-51-6
Butyl glycidyl ether	2426-08-6	Methyldibromo glutaronitrile	35691-65-7
4-Chloroaniline	106-47-8	Methyl salicylate	119-36-8
Chlorobenzene	108-90-7	1-Naphthol	90-15-3
Cinnamic alcohol	104-54-1	Nickel sulfate	10101-97-0
Cinnamic aldehyde	104-55-2	2-Nitro-1,4-phenylenediamine	5307-14-2
Citral	5392-40-5	Octanoic acid	124-07-2
Cobalt chloride	1332-82-7	Oxalic acid	144-62-7
3,4-Dihydrocoumarin	119-84-6	Oxazolone	15646-46-5
1,4-Dihydroquinone	123-31-9	Penicillin G	61-33-6
Dimethylsulfoxide	67-68-5	Phenylacetaldehyde	122-78-1
2,4-Dinitrochlorobenzene	97-00-7	1,4-Phenylenediamine	106-50-3
Diethylphthalate	84-66-2	Phthalic anhydride	85-44-9
Diphenylcyclopropenone	886-38-4	Potassium dichromate	7778-50-9
Ethylene diamine	107-15-3	Propyleneglycol	57-55-6
Ethyleneglycol dimethacrylate	97-90-5	Propyl gallate	121-79-9
Eugenol	97-53-0	Pyridine	110-86-1
Formaldehyde (act. 37%)	50-00-0	Resorcinol	108-46-3
Geraniol	106-24-1	Saccharin	81-07-2
Glutaraldehyde (act. 50%)	111-30-8	Sodium dodecyl sulfate	151-21-3
Glycerol	56-81-5	Tetrachlorosalicylanilide	1154-59-2
Hexyl cinnamic aldehyde	101-86-0	Tetramethylthiuram disulphide	137-26-8
4-Hydroxybenzoic acid	99-96-7	Trimellitic anhydride	552-30-7
Hydroxycitronellal	107-75-5	Vanillin	121-33-5

CAS, Chemical abstract service number.

1.2.2.3. 細胞毒性試験

AREc32 細胞を 1 ウェル当たりの細胞数が 50,000 個となるように 96 ウェルプレート (Falcon, Corning, NY, USA) に播種し (180 μ L/well), 48 時間の前培養の後, 化学物質の適用を行った. 適用する物質が水溶性の場合は, 細胞培養液を用いて最大 100 mg/mL または溶解・懸濁限界濃度より, 油溶性の場合は DMSO を用いて 500 mg/mL または溶解・懸濁限界濃度より, 2 倍希釈系列で 6 濃度水準を調製した. 媒体に DMSO を用いた場合は, 細胞培養液でさらに 10 倍に希釈し, DMSO の終濃度が 1% 以下となるようにした. 20 μ l の調製溶液を 180 μ l の細胞に添加し, CO₂ インキュベーター内で 24 時間反応後, PBS (-) で 2 回洗浄した. 洗浄後, 細胞に 100 μ L の PBS (-) および 100 μ L の CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay Reagent (CellTiter-Glo[®], Promega, Fitchburg, MI, USA) を添加し混和後, 溶液を白色 96 ウェルプレート (Greiner bio-one, Kremsmünster, Austria) に移し, ルシフェラーゼ活性を指標に生細胞数を GloMax Luminometer (Promega) で測定した. 対数線形の用量反応曲線より, 細胞生存率が 75% となる濃度 CV75 を算出した.

1.2.2.4. ARE assay

細胞の播種から化学物質の適用までは細胞毒性試験と同様の操作を実施した. 細胞適用濃度の設定は, h-CLAT のプロトコルを参照し (18, 19), $1/8 \times CV75$, $1/4 \times CV75$, $1/2 \times CV75$, $CV75$, $2 \times CV75$, $4 \times CV75$ とした. 無毒性のため CV75 が算出できない場合には, 水溶性物質の場合は細胞培養液を用いて最大 10,000 μ g/mL または溶解・懸濁限界濃度より, 油溶性物質の場合は DMSO を用いて 5,000 μ g/mL または溶解・懸濁限界濃度より, 2 倍希釈系列で 6 濃度水準とした. 適用後, CO₂ インキュベーター内で 24 時間反応させ, PBS (-) で 2 回洗浄した. 洗浄後, 細胞に 100 μ L の PBS (-) および 100 μ L の Steady-Glo Luciferase Assay System (Steady-Glo[®], Promega) を添加し混和後, 溶液を白色 96 ウェルプレート (Greiner bio-one) に移し, ARE-Nrf2 ルシフェラーゼレポーター遺伝子の活性を GloMax Luminometer で測定した. 同時に, 同様の処理を行った細胞プレートを別に 1 枚準備し, CellTiter-Glo[®] を用いて細胞生存率を GloMax Luminometer で測定した. 実験は独立して 2 回以上繰り返し, それぞれ 3 回の実験を行った.

1.2.2.5. データ解析

何れかの試験濃度において、媒体対照と比較してルシフェラーゼ活性が 1.5 倍以上増加した場合を陽性と判断し、3 試験中 2 試験以上で陽性となった場合に ARE assay 陽性と判断した (13). 解析は、細胞生存率が 50% 以上の濃度のみ実施した。I_{max} は各試験濃度における平均ルシフェラーゼ誘導倍率の最大値とし、CI_{max}, EC1.5 は対数線形の用量反応曲線より算出した。

I_{max} : 被験物質処理時のルシフェラーゼ活性の最大誘導倍率

CI_{max} : I_{max} を示す濃度

EC1.5 : ルシフェラーゼ活性の誘導が、溶媒対照の 1.5 倍となる濃度

1.2.3. LogK_{ow} の算出

化学物質のオクタノール/水分配係数を示す logK_{ow} は KOWWIN ver. 1.67 (United States Environmental Protection Agency, Washington, D.C., USA) を用いて計算した。立体異性体に関しては、CAS 番号を入力後に計算された logK_{ow} 値を用いた。

1.2.4. ニューラルネットワーク解析

SH test, ARE assay および h-CLAT より得られる様々なパラメーターのうち、LLNA 閾値と相関が認められた記述子を入力層に、LLNA 閾値を出力層に用い、ニューラルネットワークソフトウェア QwikNet Ver. 2.23. (Jensen Software, Sammamish, WA, USA) で解析を行った。本検討においては、入力層、第一中間層、第二中間層、出力層から構成され、それぞれの層の出力は次の層の入力となるように情報は前のみに伝搬される階層型ネットワークモデルを用いた。各層のニューロン数は、4, 5, 2, 1 個とした。学習のアルゴリズムは誤差逆伝播法 (バックプロパゲーション) を用い、学習率は 0.02, モメンタムパラメーターは 0.7 に設定した。それぞれの入力出力に及ぼす影響の大きさを表す重みは -5 から 5 に設定した。

ニューラルネットワークによる学習には、説明変数から目的変数を説明するモデルの学習を過剰に行うと、学習データに対する予測性は向上する一方で、新規データに対する予測性が低下してしまう過学習という現象が知られている (44)。そこで、得られたモデルの予測性は 10-fold cross-validation (66) により評価した。これは、全データ

セットサンプルから複数のサンプルをバリデーション用として分離し、残りのサンプルをトレーニングサンプルとしてモデルを構築した際に、バリデーションサンプルを正確に予測することができるかを検定する手法である。この作業を全てのサンプルがバリデーションサンプルとなるまで繰り返し、モデルの適合性を、以下の式で表される平均二乗誤差 (root mean square error: RMSE) により評価した。

$$\text{RMSE} = \sqrt{\sum ((\text{measured value} - \text{predicted value})^2) / \text{number of data}}$$

1.2.5. LLNA 予測カテゴリー

EC3 または LLNA 予測閾値により、以下の基準でカテゴリー分類を行った。

Extreme sensitizer	: EC3 または LLNA 予測閾値 < 0.1%
Strong sensitizer	: EC3 または LLNA 予測閾値 ≥ 0.1% to < 1%
Moderate sensitizer	: EC3 または LLNA 予測閾値 ≥ 1% to < 10%
Weak sensitizer	: EC3 または LLNA 予測閾値 ≥ 10% to 100%
Non-sensitizer	: LLNA 陰性または <i>in vitro</i> 試験結果が全て陰性

1.2.6. 統計解析

相関係数はピアソンの積率相関係数を用いた。有意差検定は Student's *t*-test を実施し、有意水準は 5% 未満とした。線形重回帰分析は forward selection 法を用い、エクセル統計 2004 ソフトウェア (Social Survey Research Information, Tokyo, Japan) を用いて解析した。

各 *in vitro* 試験法および *in vitro* 予測モデルはクーパー統計により評価した (77)。計算式を以下に示す。ただし、TP: true positive, TN: true negative, FP: false positive, FN: false negative とする。

$$\text{一致率} = (\text{TP} + \text{TN}) / (\text{TP} + \text{FP} + \text{TN} + \text{FN}) \times 100$$

$$\text{感度} = (\text{TP} / (\text{TP} + \text{FN})) \times 100$$

$$\text{特異度} = (\text{TN} / (\text{TN} + \text{FP})) \times 100$$

第 3 節 実験結果

1.3.1. LLNA と *in vitro* 試験 (ARE assay, SH test, h-CLAT) 結果の比較

62 化学物質に関して、表皮細胞の活性化を ARE assay で評価した。表皮細胞の活性化以外の AOP であるタンパク結合と樹状細胞の活性化については、SH test および h-CLAT の文献値を使用した (Table 3)。ARE assay の LLNA との一致率は 80.6%、感度は 77.1%、特異度は 92.9% であった。同一物質について、SH test の LLNA との一致率は 87.1%、感度は 93.8%、特異度は 64.3% であり、h-CLAT の LLNA との一致率は 82.3%、感度は 83.3%、特異度は 78.6% であった。感作性の有無を予測する場合、実際には陽性の化学物質を陰性と予測する偽陰性を減らすことが重要となる。そこで、陽性と判定した試験が 1 試験以上ある場合を感作性陽性とし、複数の試験を組み合わせて評価を行ったところ、偽陰性が減少した結果、特異度が向上した (Table 4)。

1.3.2. モデル構築に使用するパラメーター選定

予測モデルの構築において、一般に、記述子の数が多いほどモデルの予測性は高くなる一方、自由度は低くなり、学習データに含まれていない新規の化学物質の予測性は低くなる。従って、モデルの頑強性を高めるためには予測性を下げてでも記述子の数を絞る必要がある。このような観点から、本研究においては各 *in vitro* 試験から算出される複数のパラメーターの中から、LLNA 閾値との相関性が高いパラメーターを 1 個ずつ解析に用いる記述子として選択した。

Table 3. Chemical information and test results for 62 chemicals.

Sample name	Calculated Log K_{ow}	LLNA			SH test			h-CLAT			ARE assay				
		potency category	EC3 (%)	LLNA threshold (%)	Judge	MAC value (%)	Judge	EC150 ($\mu\text{g/mL}$); (1)	EC200 ($\mu\text{g/mL}$); (2)	CV75 ($\mu\text{g/mL}$); (3)	Minimum value among (1), (2) and (3)	Judge	I_{max}	EC1.5 ($\mu\text{g/mL}$)	CI_{max} ($\mu\text{g/mL}$)
Oxazolone	1.51	Extreme	0.003	0.003	P	58.2	P	2.7	-	166.6	2.7	P	1.62	123.0	175
Diphenylcyclopropanone	3.25	Extreme	0.003	0.003	P	463	P	-	3.9	6	3.9	P	16.91	0.47	2.5
<i>p</i> -Benzoquinone	0.25	Extreme	0.0099	0.0099	P	41.1	P	2.7	2.3	4.3	2.3	P	51.19	2.4	17.5
Tetrachlorosalicylamide	5.87	Extreme	0.04	0.04	P	56.8	P	-	1.2	2.6	1.2	N	1.6	-	6.3
2,4-Dinitrochlorobenzene	2.27	Extreme	0.05	0.05	P	79.9	P	2.3	2.7	5	2.3	P	16.46	0.53	4
Potassium dichromate	-3.59	Extreme	0.08	0.08	P	39	P	2.1	1.1	3.2	1.1	P	4.78	0.22	10
Glutaraldehyde (act. 50%)	-0.18	Strong	0.1	0.1	P	29.6	P	2.8	2.7	5.3	2.7	P	30.02	4.4	42.5
1,4-Dihydroquinone	1.03	Strong	0.11	0.11	P	59.4	P	2.1	-	5	2.1	P	40.53	1.9	25
1,4-Phenylenediamine	-0.39	Strong	0.16	0.16	P	67.7	P	2.1	-	36.7	2.1	P	4.72	<13.4	26.9
Phthalic anhydride	2.07	Strong	0.16	0.16	P	27.9	N	-	-	>400	400	N	1.08	>3200	800
Maleic anhydride	1.62	Strong	0.16	0.16	P	36.6	P	-	298.4	658	298.4	P	5.70	187.9	1050
Benzoyl peroxide	3.43	Strong	0.3	0.3	P	30.5	N	-	-	41	41	P	3.16	11.2	25.00
Propyl gallate	1.79	Strong	0.32	0.32	P	38.8	P	-	32.5	125	32.5	P	5.34	<18.8	150
Cobalt chloride	0.85	Strong	0.38	0.38	P	59.2	P	-	35.5	208.3	35.5	P	7.11	28.5	165
2-Aminophenol	0.60	Strong	0.4	0.4	P	30	P	0.89	-	6	0.89	P	8.88	<31.3	31.3
2-Nitro-1,4-phenylenediamine	0.55	Strong	0.5	0.5	P	48.1	P	-	276.7	490.7	276.7	P	19.84	64.0	787.5
Formaldehyde (act. 37%)	0.35	Strong	0.61	0.61	P	50.1	P	4.3	5.14	5.81	4.3	P	2.59	12.7	25
Methylidibromo glutaronitrile	1.63	Strong	0.9	0.9	P	63.2	P	10.8	9.42	9.91	9.4	P	1.8	2.5	2.5
Isocugenol	2.65	Moderate	1.2	1.2	P	23.7	N	-	-	112.5	112.5	P	4.28	6.5	65
1-Naphthol	2.69	Moderate	1.3	1.3	P	31.7	P	18.3	12.7	57.2	12.7	P	2.2	6.9	13.8
2-Mercaptobenzothiazole	2.86	Moderate	1.7	1.7	P	74.1	P	-	57.5	169	57.5	P	1.66	11.9	31.9
Ethylene diamine	-1.62	Moderate	2.2	2.2	P	19.5	P	265.7	-	271.7	265.7	P	2.03	132.8	330
Cinnamic aldehyde	1.82	Moderate	3	3	P	66.1	P	10.2	12.3	28	10.2	P	12.77	2.0	15.5
Phenylacetaldehyde	1.54	Moderate	3	3	P	54.8	P	11.5	13.4	27	11.5	P	4.27	6.7	20
3-Aminophenol	0.24	Moderate	3.2	3.2	P	24.6	P	-	117.1	243.2	117.1	P	3.89	98.2	1000
Nickel sulfate	-0.17	Moderate	4.8	4.8	P	51.6	P	42.2	45.3	150	42.2	P	3.33	95.3	375
Tetramethylthiuram disulphide	1.70	Moderate	5.2	5.2	P	62.2	P	9.11	2.46	10	2.5	P	5.0	5.8	23.4
Resorcinol	1.03	Moderate	5.5	5.5	P	37.6	P	-	200.9	613.4	200.9	N	1.46	-	375
3,4-Dihydrocoumarin	0.97	Moderate	5.6	5.6	P	44.7	P	-	531.7	810	531.7	N	0.92	-	68.8
2-Methoxy-4-methylphenol	1.88	Moderate	5.8	5.8	P	16.7	P	30.8	207.4	280	30.8	N	1.50	-	131.3
4-Chloroaniline	1.72	Moderate	6.5	6.5	P	48.3	P	87.7	-	200	87.7	N	1.29	-	68.8
Trimeitic anhydride	1.95	Moderate	9.2	9.2	N	13.2	P	81.2	-	250	81.2	N	0.9	-	87.5

Table 3. (Continued).

Sample name	Calculated Log K_{ow}	LLNA			SH test			h-CLAT			ARE assay				
		potency category	EC3 (%)	LLNA threshold (%)	Judge	MAC value (%)	Judge	EC150 ($\mu\text{g/mL}$); (1)	EC200 ($\mu\text{g/mL}$); (2)	CV75 ($\mu\text{g/mL}$); (3)	Minimum value among (1), (2) and (3)	Judge	I_{max}	EC1.5 ($\mu\text{g/mL}$)	CI_{max} ($\mu\text{g/mL}$)
1-Bromohexane	3.63	Weak	10	10	P	20.3	N	-	-	163.3	163.3	P	1.9	21	47.5
Hexyl cinnamic aldehyde	4.82	Weak	11	11	P	29	N	-	-	37	37	P	5.25	7.9	50
Citral	3.45	Weak	13	13	P	40.7	P	8.41	15	24	8.4	P	2.87	4.8	15
Eugenol	2.73	Weak	13	13	P	16.2	P	64.4	137.2	143.2	64.4	P	3.46	3.6	62.5
Abietic acid (act. 70%)	6.46	Weak	15	15	P	15.6	N	-	-	89.6	89.6	P	6.01	22.7	275
Oxalic acid	-1.74	Weak	15	15	P	16.1	P	310.3	-	1000	310.3	N	1.5	-	175
Cinnamic alcohol	1.84	Weak	21	21	P	34	P	147	196.6	350	147	P	13.91	15.1	167.5
Benzocaine	1.80	Weak	22	22	P	30.3	P	74.2	-	545.5	74.2	P	2.62	29.7	262.5
Geraniol	3.47	Weak	26	26	P	25.5	P	123.3	-	140	123.3	P	2.60	25.6	62.5
Ethylene glycol dimethacrylate	2.21	Weak	28	28	P	111	P	-	535.43	563.6	535.4	P	19.80	2.2	115
Linalool	3.38	Weak	30	30	P	25.8	P	-	68.3	290	68.3	P	2.12	76.0	137.5
Penicillin G	1.85	Weak	30	30	N	2	P	-	3754.3	>5000	3754.3	N	1.00	-	625
Butyl glycidyl ether	1.08	Weak	31	31	P	50.1	N	-	-	185.3	185.3	P	8.32	4.2	162.5
Hydroxycitronellal	2.11	Weak	33	33	P	56.2	P	35.4	26.8	700	26.8	P	2.37	63.9	187.5
Dimethylsulfoxide	-1.22	Weak	72	72	N	11.0	N	-	-	5000	5000	N	1.3	-	10000
Pyridine	0.80	Weak	72	72	P	26	P	2370	-	4166.7	2370	N	1.08	-	1250
1-Butanol	0.84	NS	>20	20	N	11.5	N	-	-	1000	1000	N	1.0	-	1250
Chlorobenzene	2.64	NS	>25	25	P	16	P	288.4	-	597.2	288.4	N	0.91	-	29.7
Diethylphthalate	2.65	NS	>100	100	P	23	P	-	296.6	600	296.6	N	1.49	-	125
Glycerol	-1.65	NS	>100	100	N	9	N	-	-	>5000	5000	N	1.38	-	10000
4-Hydroxybenzoic acid	1.39	NS	>25	25	N	3.1	N	-	-	>1000	1000	N	2.58	-	312.5
2-Hydroxypropyl methacrylate	0.72	NS	>50	50	P	22.7	N	-	-	>1000	1000	P	3.80	51.7	437.5
Isopropanol	0.28	NS	>50	50	N	4.3	N	-	-	>5000	5000	N	1.10	-	312.5
Lactic acid	-0.65	NS	>25	25	N	4.4	N	-	-	2800	2800	N	1.46	-	1250
Methyl salicylate	2.60	NS	>20	20	N	15	N	-	-	542.4	542.4	N	1.02	-	75
Octanoic acid	3.03	NS	>50	50	P	46.6	P	-	158.7	359	158.7	N	1.32	-	168.8
Propylene glycol	-0.78	NS	>100	100	N	4.8	N	-	-	>1000	1000	N	1.09	-	1250
Saccharin	0.45	NS	>75	75	N	3.2	N	-	-	>1000	1000	N	0.84	-	156.3
Vanillin	1.06	NS	>50	50	P	27.2	N	-	-	650	650	N	1.30	-	500
Sodium dodecyl sulfate	1.69	F.P.	14	14	N	6.6	N	-	-	60	60	N	0.87	-	50

EC150 and EC200, the effective concentration value for CD86 and CD54; F.P., False positive; MAC value, the maximum amount of change of cell-surface thiols in the SH test; N, Negative; NS, Non-sensitizer; P, Positive.

Table 4. Correlation among LLNA, SH test, h-CLAT, and ARE assay results.

		SH test		h-CLAT		ARE assay		3 tests combination	
		P	N	P	N	P	N	P	N
LLNA	P	45	3	40	8	37	11	47	1
	N	5	9	3	11	1	13	5	9
Accuracy		87.1%		82.3%		80.6%		90.3%	
Sensitivity		93.8%		83.3%		77.1%		97.9%	
Specificity		64.3%		78.6%		92.9%		64.3%	

		SH test & h-CLAT		SH test & ARE assay		h-CLAT & ARE assay	
		P	N	P	N	P	N
LLNA	P	47	1	45	3	46	2
	N	5	9	5	9	4	10
Accuracy		90.3%		87.1%		90.3%	
Sensitivity		97.9%		93.8%		95.8%	
Specificity		64.3%		64.3%		71.4%	

Grey shading indicates that the same results were obtained in LLNA and each *in vitro* assay or combination of these *in vitro* assays ('SH test, h-CLAT & ARE assay (3 tests combination)', 'SH test & h-CLAT', 'SH test & h-CLAT', 'h-CLAT & ARE assay').

SH test からは、EC3 との相関が報告されているチオール基の最大変化量を示す MAC value をニューラルネットワークの入力層に用いた (Fig. 4B)(76). h-CLAT においては、化学物質処理時の 75% 細胞生存率を示す濃度である CV75, CD86 が陽性となる閾値濃度である EC150 および CD54 が陽性となる閾値濃度である EC200 がそれぞれ EC3 と相関することが報告されている (75). また、CV75, EC150, EC200 は互いに良く相関することを報告済みである (76). そこで、試験陰性物質においても算出可能な値である CV75, EC200, EC150 の最小値 (minimum value of (EC150, EC200 and CV75)) と LLNA 閾値との相関を検討したところ、高い相関が認められたため、この値を入力層に用いた (Fig. 4C).

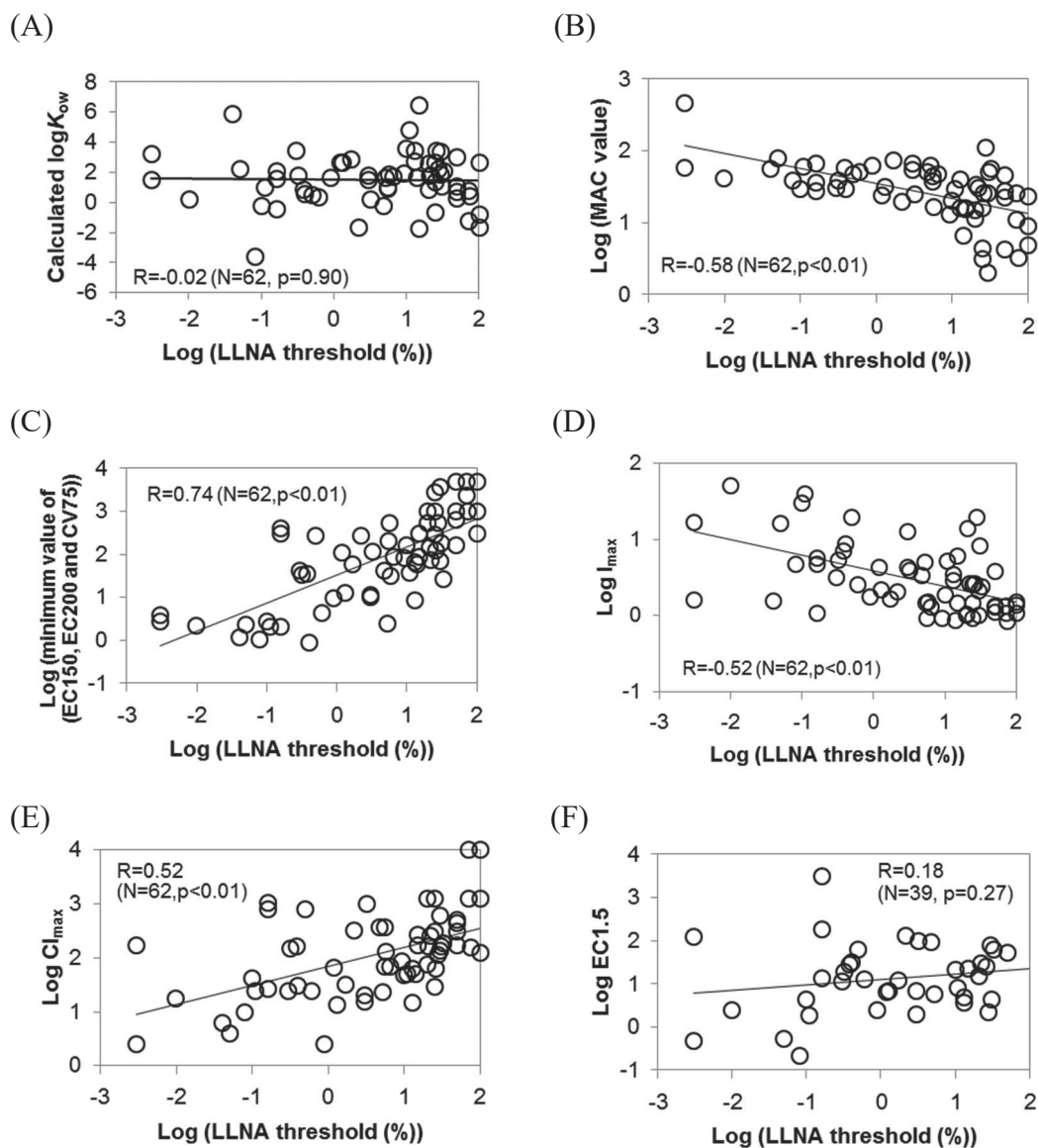


Figure 4. Relationship between $\log K_{ow}$ or parameters of each *in vitro* assay and LLNA threshold. Relationship between LLNA threshold and $\log K_{ow}$ (A), MAC value from SH test (B), minimum value of (EC150, EC200 and CV75) from h-CLAT (C), I_{max} from ARE assay (D), CI_{max} from ARE assay (E) and EC1.5 from ARE assay (F). Data were taken from Table 3.

ARE assay により得られたパラメーターと LLNA 閾値との相関を検討したところ、 I_{max} および CI_{max} が LLNA 閾値と良く相関し、相関係数は同程度であった (Fig. 4 D-F). そこで、ARE assay から用いるパラメーターの選択のため、3 試験の結果を用いて重回帰分析を実施した. 重回帰分析による回帰式を以下に、予測値と実測値の比較を Fig. 5 に示す.

重回帰式分析による回帰式

$$\text{Log (predicted LLNA threshold (\%))} = 0.717698 \times \text{log (minimum value of (EC150, EC200 and CV75))} - 0.463175341 \times \text{log } I_{max} - 0.573137179$$

重回帰分析の結果、回帰式に I_{max} が選択されたことから、ARE assay からニューラルネットワーク解析の入力層に用いる記述子として I_{max} を選択した. さらに、皮膚に適用された化学物質は角層を通過した後に表皮細胞や樹状細胞を活性化するため、皮膚感作性の発現において経皮吸収性は重要な因子と考えられる (78). そこで、*in vitro* 試験結果から得られるパラメーターに加え、化学物質の疎水性を示す $\log K_{ow}$ をニューラルネットワーク解析の入力層に用いる記述子とした.

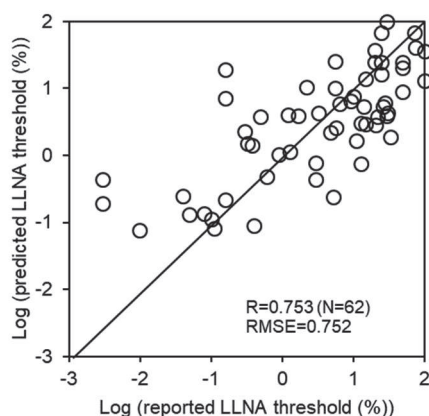


Figure 5. Correlation between reported LLNA and predicted LLNA thresholds by multiple linear regression analysis. The descriptors used in this formula were selected from MAC value in SH test, the minimum of CV75, EC150 (CD86) and EC200 (CD54) in h-CLAT, I_{max} and CI_{max} in ARE assay and $\log K_{ow}$ by multiple linear regression analysis using the forward selection method.

1.3.3. ニューラルネットワーク解析を用いた LLNA 閾値予測モデルの構築

62 化学物質を用いて、上述の 4 記述子 ($\log K_{ow}$, MAC value, I_{max} および minimum values of (EC150, EC200 and CV75)) を入力層に用いた LLNA 閾値予測モデルを Fig. 6A に示す. 未学習の化学物質にも対応可能となるようクロスバリデーションを行った後のモデルが Fig. 6B である. クロスバリデーションは 3 回実施した. 重回帰分析とニューラルネットワーク解析の相関係数はそれぞれ 0.753, 0.812 ± 0.006 , RMSE はそれぞれ 0.752, 0.667 ± 0.009 であり, 両者ともにニューラルネットワークモデルの方が良好な結果であった.

本モデルにおける LLNA 予測閾値および LLNA 予測カテゴリーを Table 5 に示す. 一致率は, 強度を 3 カテゴリー (extreme or strong, moderate or weak and non-sensitizer) に分類した場合が 79.0%, 4 カテゴリー (extreme or strong, moderate, weak, and non-sensitizer) に分類した場合が 61.3%, 5 カテゴリー (extreme, strong, moderate, weak and non-sensitizer) に分類した場合が 56.5% であった (Table 6).

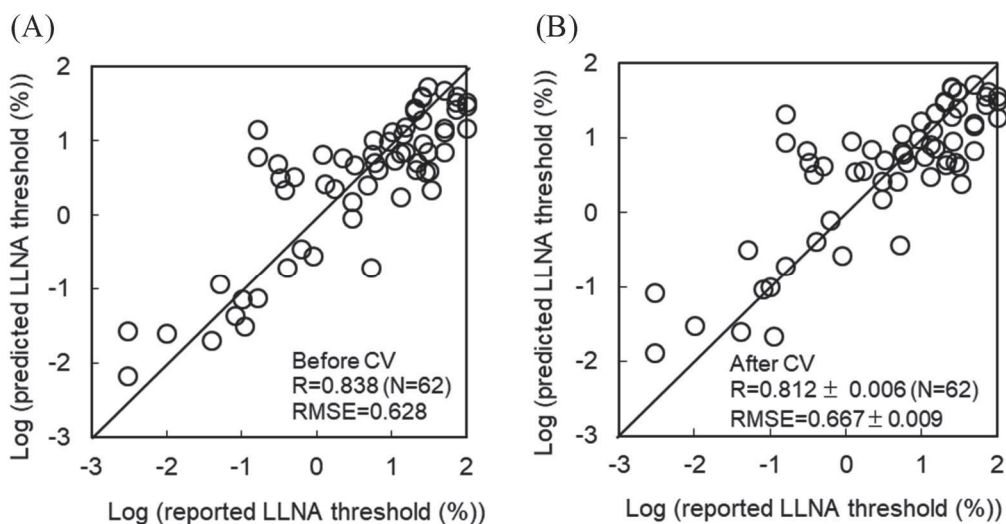


Figure 6. Correlation between LLNA and artificial neural network (ANN) prediction results based on SH test, h-CLAT, cytotoxicity, ARE assay and $\log K_{ow}$ of 62 chemicals. I_{max} (ARE assay), $\log K_{ow}$, MAC value (SH test) and the minimum values of (EC150 (CD86), EC200 (CD54) and CV75) (h-CLAT) of 62 chemicals were used as the input layer and published LLNA thresholds were used as the output layer. Correlation before cross-validation (A) and after cross-validation (B, N=3).

Table 5. Comparison of LLNA thresholds and predicted LLNA thresholds derived from *in vitro* model. Hazard identification indicates the predictive performance for the 62 chemicals from the viewpoint of “positive or negative judgment” in each of the SH test, h-CLAT and ARE assay.

Sample name	LLNA		<i>in vitro</i> tests				<i>in vitro</i> model					previous <i>in vitro</i> model				
	Potency category	EC3 (%)	LLNA thresholds (%)	SH test	h-CLAT	ARE assay	Predicted LLNA thresholds (%)		Predictive potency category			Predicted LLNA thresholds (%)		Predictive potency category		
							0.08	0.05	5	4	3	5	4	3	5	4
Oxazolone	E	0.003	0.003	P	P	P	0.08 ± 0.02	0.13 ± 0.04	E	E or S	E or S	0.13 ± 0.04	S	E or S	E or S	
Diphenylcyclopropanone	E	0.003	0.003	P	P	P	0.013 ± 0.002	0.007 ± 0.003	E	E or S	E or S	0.007 ± 0.003	E	E or S	E or S	
<i>p</i> -Benzoquinone	E	0.0099	0.0099	P	P	P	0.03 ± 0.004	0.18 ± 0.02	E	E or S	E or S	0.18 ± 0.02	S	E or S	E or S	
Tetrachlorosalicylamide	E	0.04	0.04	P	P	N	0.025 ± 0.006	0.03 ± 0.01	E	E or S	E or S	0.03 ± 0.01	E	E or S	E or S	
2,4-Dinitrochlorobenzene	E	0.05	0.05	P	P	P	0.32 ± 0.09	0.04 ± 0.01	S	E or S	E or S	0.04 ± 0.01	E	E or S	E or S	
Potassium dichromate	E	0.08	0.08	P	P	P	0.09 ± 0.05	0.04 ± 0.03	E	E or S	E or S	0.04 ± 0.03	E	E or S	E or S	
Glutaraldehyde (act. 50%)	S	0.1	0.1	P	P	P	0.10 ± 0.02	0.35 ± 0.03	E	E or S	E or S	0.35 ± 0.03	S	E or S	E or S	
1,4-Dihydroquinone	S	0.11	0.11	P	P	P	0.02 ± 0.004	0.07 ± 0.03	E	E or S	E or S	0.07 ± 0.03	E	E or S	E or S	
1,4-Phenylenediamine	S	0.16	0.16	P	P	P	0.19 ± 0.05	0.04 ± 0.01	S	E or S	E or S	0.04 ± 0.01	E	E or S	E or S	
Phthalic anhydride	S	0.16	0.16	P	N	N	21 ± 2.06	12 ± 2.24	W	W	M or W	12 ± 2.24	W	W	M or W	
Maleic anhydride	S	0.16	0.16	P	P	P	8.7 ± 1.65	8.1 ± 1.84	M	M	M or W	8.1 ± 1.84	M	M	M or W	
Benzoyl peroxide	S	0.30	0.3	P	N	P	6.8 ± 1.57	5.6 ± 0.75	M	M	M or W	5.6 ± 0.75	M	M	M or W	
Propyl gallate	S	0.32	0.32	P	P	P	4.8 ± 0.44	4.7 ± 1.03	M	M	M or W	4.7 ± 1.03	M	M	M or W	
Cobalt chloride	S	0.4	0.4	P	P	P	3.2 ± 0.10	4.4 ± 1.10	M	M	M or W	4.4 ± 1.10	M	M	M or W	
2-Aminophenol	S	0.4	0.4	P	P	P	0.42 ± 0.13	0.04 ± 0.01	S	E or S	E or S	0.04 ± 0.01	E	E or S	E or S	
2-Nitro-1,4-phenylenediamine	S	0.5	0.5	P	P	P	4.3 ± 0.83	5.4 ± 0.67	M	M	M or W	5.4 ± 0.67	M	M	M or W	
Formaldehyde	S	0.61	0.61	P	P	P	0.79 ± 0.19	0.27 ± 0.07	S	E or S	E or S	0.27 ± 0.07	S	E or S	E or S	
Methyl dibromo glutaronitrile	S	0.9	0.9	P	P	P	0.27 ± 0.05	1.2 ± 0.14	S	E or S	E or S	1.2 ± 0.14	M	M	M or W	
Isocugenol	M	1.2	1.2	P	N	P	9.0 ± 1.35	6.5 ± 0.10	M	M	M or W	6.5 ± 0.10	M	M	M or W	
1-Naphthol	M	1.3	1.3	P	P	P	3.6 ± 0.54	3.6 ± 0.52	M	M	M or W	3.6 ± 0.52	M	M	M or W	
2-Mercaptobenzothiazole	M	1.7	1.7	P	P	P	3.6 ± 1.00	4.0 ± 0.64	M	M	M or W	4.0 ± 0.64	M	M	M or W	
Ethylene diamine	M	2.2	2.2	P	P	P	7.1 ± 0.72	11 ± 1.61	M	M	M or W	11 ± 1.61	W	W	M or W	
Cinnamic aldehyde	M	3.0	3	P	P	P	1.6 ± 0.29	1.1 ± 0.35	M	M	M or W	1.1 ± 0.35	M	M	M or W	
Phenylacetaldehyde	M	3.0	3	P	P	P	2.7 ± 0.97	1.7 ± 0.61	M	M	M or W	1.7 ± 0.61	M	M	M or W	
3-Aminophenol	M	3.2	3.2	P	P	P	5.2 ± 0.47	6.2 ± 0.96	M	M	M or W	6.2 ± 0.96	M	M	M or W	
Nickel sulfate	M	4.8	4.8	P	P	P	2.6 ± 0.27	3.8 ± 0.84	M	M	M or W	3.8 ± 0.84	M	M	M or W	
Tetramethylthiuram disulphide	M	5.2	5.2	P	P	P	0.38 ± 0.12	0.04 ± 0.01	S	E or S	E or S	0.04 ± 0.01	E	E or S	E or S	
Resorcinol	M	5.5	5.5	P	P	N	6.7 ± 0.66	6.9 ± 0.65	M	M	M or W	6.9 ± 0.65	M	M	M or W	
3,4-Dihydrocoumarin	M	5.6	5.6	P	P	N	11 ± 0.44	7.6 ± 1.36	W	W	M or W	7.6 ± 1.36	M	M	M or W	
2-Methoxy-4-methylphenol	M	5.8	5.8	P	P	N	6.1 ± 0.53	5.9 ± 0.73	M	M	M or W	5.9 ± 0.73	M	M	M or W	
4-Chloroaniline	M	6.5	6.5	P	P	N	4.7 ± 0.54	4.4 ± 0.87	M	M	M or W	4.4 ± 0.87	M	M	M or W	
Trimellitic anhydride	M	9.2	9.2	N	P	N	9.7 ± 1.63	7.6 ± 1.18	M	M	M or W	7.6 ± 1.18	M	M	M or W	

Table 5. (Continued).

Sample name	LLNA		in vitro tests				in vitro model					previous in vitro model				
	Potency category	EC3 (%)	LLNA thresholds (%)	SH test	h-CLAT	ARE assay	Predictive potency category					Predicted LLNA thresholds				
							5	4	3	2	1	5	4	3	2	1
1-Bromohexane	W	10	10	P	N	P	17 ± 0.89	W	W	M or W	7.9 ± 1.12	M	M	M or W		
Hexyl cinnamic aldehyde	W	11	11	P	P	P	5.6 ± 0.75	M	M	M or W	4.7 ± 1.45	M	M	M or W		
Citral	W	13	13	P	P	P	3.0 ± 0.55	M	M	M or W	1.1 ± 0.17	M	M	M or W		
Eugenol	W	13	13	P	P	P	8.2 ± 0.56	M	M	M or W	6.8 ± 0.76	M	M	M or W		
Abietic acid	W	15	15	P	P	P	2.2 ± 3.81	W	W	M or W	6.3 ± 0.56	M	M	M or W		
Oxalic acid	W	15	15	P	P	P	7.2 ± 0.53	M	M	M or W	1.4 ± 0.73	W	W	M or W		
Cinnamic alcohol	W	21	21	P	P	P	4.5 ± 0.45	M	M	M or W	5.3 ± 0.55	M	M	M or W		
Benzocaine	W	22	22	P	P	P	5.0 ± 0.53	M	M	M or W	5.2 ± 0.80	M	M	M or W		
Geraniol	W	26	26	P	P	P	9.0 ± 0.68	M	M	M or W	5.9 ± 0.67	M	M	M or W		
Ethylene glycol dimethacrylate	W	28	28	P	P	P	4.8 ± 1.80	M	M	M or W	4.5 ± 0.78	M	M	M or W		
Linalool	W	30	30	P	P	P	2.5 ± 31.51	W	W	M or W	4.6 ± 0.67	M	M	M or W		
Penicillin G	W	30	30	N	N	N	4.3 ± 31.17	W	W	M or W	5.4 ± 3.84	W	W	M or W		
Butyl glycidyl ether	W	31	31	P	N	P	4.3 ± 0.61	M	M	M or W	5.5 ± 1.09	M	M	M or W		
Hydroxycitronellal	W	33	33	P	P	P	2.5 ± 0.30	M	M	M or W	3.3 ± 0.50	M	M	M or W		
Pyridine	W	72	72	P	P	N	2.9 ± 4.19	W	W	M or W	2.2 ± 2.36	W	W	M or W		
Dimethylsulfoxide	W	72	72	N	N	N	3.6 ± 2.39	N	N	N	4.3 ± 6.95	N	N	N		
1-Butanol	NS	>20	20	N	N	N	31 ± 0.94	N	N	N	37 ± 4.84	N	N	N		
Chlorobenzene	NS	>25	25	P	P	N	19 ± 2.41	W	W	M or W	11 ± 0.75	W	W	M or W		
Diethylphthalate	NS	>100	100	P	P	N	19 ± 3.59	W	W	M or W	9.5 ± 1.24	M	M	M or W		
Glycerol	NS	>100	100	N	N	N	36 ± 2.58	N	N	N	38 ± 2.93	N	N	N		
4-Hydroxybenzoic acid	NS	>25	25	N	N	N	4.7 ± 7.31	N	N	N	50 ± 2.92	N	N	N		
2-Hydroxypropyl methacrylate	NS	>50	50	P	N	P	1.5 ± 1.91	W	W	M or W	2.2 ± 4.64	W	W	M or W		
Isopropanol	NS	>50	50	N	N	N	5.2 ± 4.38	N	N	N	5.2 ± 1.25	N	N	N		
Lactic acid	NS	>25	25	N	N	N	4.9 ± 2.00	N	N	N	4.9 ± 3.67	N	N	N		
Methyl salicylate	NS	>20	20	N	N	N	3.0 ± 3.09	N	N	N	1.9 ± 1.56	N	N	N		
Octanoic acid	NS	>50	50	P	P	N	6.8 ± 0.78	M	M	M or W	4.3 ± 0.26	M	M	M or W		
Propylene glycol	NS	>100	100	N	N	N	3.1 ± 1.17	N	N	N	3.6 ± 2.01	N	N	N		
Saccharin	NS	>75	75	N	N	N	4.2 ± 2.06	N	N	N	4.0 ± 3.54	N	N	N		
Vanillin	NS	>50	50	P	N	N	1.6 ± 0.79	W	W	M or W	1.4 ± 2.09	W	W	M or W		
Sodium dodecyl sulfate	F.P.	14	14	N	N	N	1.3 ± 1.80	N	N	N	1.2 ± 1.60	N	N	N		
Hazard Identification (Positive or Negative)																
Accuracy													87.1%	85.5%	80.6%	
Sensitivity													93.8%	87.5%	77.1%	
Specificity													64.3%	78.6%	92.9%	

E, Extreme; F.P., False positive; M, Moderate; N, negative; NS, Non-sensitizer; P, positive; S, Strong; W, Weak.

Table 6. Correlations among LLNA classification and predicted LLNA classification using *in vitro* prediction model.

(A)		LLNA classification (<i>in vivo</i>)		
		Extreme or Strong	Moderate or Weak	NS
<i>in vitro</i> model classification	Extreme or Strong	12	1	0
	Moderate or Weak	6	28	5
	Negative	0	1	9
Accuracy		79.0%		
Over predicted		9.7%		
Under predicted		11.3%		

(B)		LLNA classification (<i>in vivo</i>)			
		Extreme or Strong	Moderate	Weak	NS
<i>in vitro</i> model classification	Extreme or Strong	12	1	0	0
	Moderate	5	12	10	1
	Weak	1	1	5	4
	Negative	0	0	1	9
Accuracy		61.3%			
Over predicted		25.8%			
Under predicted		12.9%			

(C)		LLNA classification (<i>in vivo</i>)				
		Extreme	Strong	Moderate	Weak	NS
<i>in vitro</i> model classification	Extreme	5	2	0	0	0
	Strong	1	4	1	0	0
	Moderate	0	5	12	10	1
	Weak	0	1	1	5	4
	Negative	0	0	0	1	9
Accuracy		56.5%				
Over predicted		29.0%				
Under predicted		14.5%				

Grey shading indicates that the same results were obtained in LLNA classification and predicted LLNA classification. 3 categories (A), 4 categories (B), 5 categories (C). NS, Non-sensitizer.

第 4 節 考察

本章において、化学物質の疎水性を示す $\log K_{ow}$ 、タンパク結合を評価する SH test から化学物質処理時のチオール基の最大変化量を示す MAC value、表皮細胞の活性化を評価する ARE assay から化学物質処理時の最大ルシフェラーゼ活性誘導量を示す I_{max} 、樹状細胞の活性化を評価する h-CLAT から化学物質処理時の CD86, CD54 が陽性となる閾値濃度および 75% 細胞生存率を示す濃度の最小値 (minimum value of (EC150, EC200 and CV75)) の 4 記述子を入力層に用い、LLNA 閾値を予測するニューラルネットワークモデル (*in vitro* モデル) を構築した。

In vitro モデルにおいて、9 化学物質が実際の感作カテゴリーよりも過小評価された (Table 5)。特に、LLNA カテゴリーが strong である phthalic anhydride は weak と予測され、2 ランク低い予測結果となった。Phthalic anhydride は酸無水物であり、細胞に適用する際に加水分解されることから、h-CLAT において偽陰性となることが報告されているが (79)、ARE assay においても感作性陰性と判定された。また、phthalic anhydride は、タンパク結合を評価する DPRA において、システインを含むペプチドとは反応せず、リジンペプチドとよく反応することが示されている (11)。ARE assay は Keap1 のシステイン残基にハプテンが結合した後、解離した Nrf2 による遺伝子発現誘導を測定する試験であり、リジン残基に結合する化学物質は正しく評価できないことから (13)、DPRA のようなリジンペプチドとの反応性を含む試験結果を追加して同様の解析を実施すれば、より良好な結果が得られる可能性がある。Phthalic anhydride と同様に 3 試験中 1 試験のみが陽性となった化学物質に着目すると、4 化学物質中 3 化学物質で感作性強度は weak と判断されていた (Table 5)。これは、*in vitro* 試験において反応が弱い場合は、LLNA 閾値が高く予測される傾向にあることを示唆する結果である。

一方、本モデルにおいて 18 化学物質が実際の感作カテゴリーよりも過大評価され、実際の感作カテゴリーが weak のものを moderate と予測したものが 10 化学物質あった。そのうち 8 化学物質は *in vitro* 試験全てが陽性と判定されていた。さらに、実際は非感作性物質であるものが、本モデルにおいて weak または moderate と予測された 5 化学物質に関しては、*in vitro* 試験で 1 試験以上が陽性であった。つま

り、過大評価された物質に関しても、*in vitro* 試験の結果を非常によく反映した予測となっていることが考えられる。

本 *in vitro* モデルで入力層に用いた記述子のうち、MAC value と minimum value of (EC150, EC200 and CV75) のみを入力層に用いた LLNA 閾値の予測モデルを以前報告した (76)。モデル構築に用いた化学物質は、前モデルが 64 個、本モデルが 62 個とほぼ同数であるが、相関係数はそれぞれ 0.774 ± 0.007 と 0.812 ± 0.006 、RMSE がそれぞれ 0.751 ± 0.013 、 0.667 ± 0.009 であり、相関係数、RMSE とともに本モデルにおいて向上が認められた。また、感作性の陽性・陰性の判断において LLNA と各モデルの一致率は、前モデルが 50.0% (5 カテゴリー)、57.8% (4 カテゴリー)、78.1% (3 カテゴリー) に対し、本モデルにおいて 56.5% (5 カテゴリー)、61.3% (4 カテゴリー)、79.0% (3 カテゴリー) となり、一致率も本モデルにおいて向上した。これは、経皮吸収性に関与する疎水性を表す $\log K_{ow}$ および表皮細胞の活性化を測定する ARE assay の結果を入力層に追加したことで、感作誘導期における重要な反応がより反映された結果であると考えられる。今回入力層に用いていない感作誘導期の AOP として、化学物質処理時の抗原特異的な T 細胞の増殖がある。化学物質に感作されていないヒトの血液から調製した T 細胞では、抗原特異的なクローンが十分になく、*in vitro* 試験開発が困難であったが、制御性 T 細胞を含む制御サブセットをコントロールすることで試験感度が上がることが近年報告され、感作性物質の評価が可能となってきた (80)。今後、抗原特異的な T 細胞の増殖が評価可能となれば、その結果を入力層に加えることで、更なる予測精度の向上が期待できる。

本研究の後、*in vitro* 感作性試験法である DPRA, KeratinoSensTM, h-CLAT がそれぞれ OECD ガイドライン法として採択された (81-83)。本モデルにおいては SH test, ARE assay, h-CLAT の結果を用いたが、これらのより多くの背景データを有するバリデートされたガイドライン法の結果を用いることで、より信頼性の高いモデルへの向上が期待できる。

第 2 章 化学構造からの感作性予測モデル (*in silico* モデル) の構築

第 1 節 序論

皮膚感作性評価の代替法として, *in vitro* 試験のみならず, *in silico* 手法を用いた予測に関しても多く報告されている (84-88). *In silico* 評価法としては, 化学物質の毒性を化学構造や物性から予測する定量的構造活性相関 (quantitative) structure-activity relationship ((Q)SAR) と, 化学構造や物理学的性質等によって化学物質のカテゴリ化を行い, 属するカテゴリに沿って毒性を評価する read-across がある. (Q)SAR の代表例として, ADMEWORKS (Fujitsu Kyushu Systems Limited, Fukuoka, Japan), TOPKAT (Accelrys, San Diego, CA, USA), TIMES-SS (University of Bourgas, Bulgaria), Case Ultra (MULTICASE, Cleveland, OH, USA), DEREK (LHASA Ltd., Leeds, UK) 等がある. 一方, read-across の代表例としては, OECD QSAR toolbox (89) が知られている.

近年, 共通の 100 化学物質について, 7 個の *in silico* モデルで皮膚感作性を評価した結果が報告された (90). 最も予測性が高いモデルでは信頼領域が狭い一方, 信頼領域が広いモデルでは偽陽性や偽陰性が多いことが示され, 現状の *in silico* モデルは, 幅広いタイプの化学物質の感作性を予測するには単独では不十分であると結論付けられている (90). このように, *in silico* モデル単独での評価には限界があるものの, 複数の評価法の組み合わせの一部に *in silico* モデルを取り入れる有用性がいくつかの研究により示されている (36-38). これらの報告では, 得られた知見の重要性に基づいて専門家が毒性を随時判断する weight-of-evidence に, *in silico* 評価を組み入れることで, 予測性の向上が示されている.

第 1 章において, タンパク結合, 表皮細胞の活性化, 樹状細胞の活性化を評価する *in vitro* 試験結果を組み合わせるニューラルネットワーク解析を行った結果, LLNA 閾値を予測可能であることを見出した. そこで本章においては, (Q)SAR モデルとして, *in silico* で算出した化学物質の分子軌道計算より得られる記述子を用いて第 1 章と同様にニューラルネットワーク解析を行い, LLNA 閾値を予測する検討を行った (*in silico* モデル). さらに, 過小評価された物質数の減少を目的として *in vitro* モデル, *in silico* モデルを組み合わせた感作性評価スキームの構築を試みた.

第 2 節 実験試料および方法

2.2.1. データベース

164 個の感作性物質と 42 個の非感作性物質から成る 206 化学物質を検討に用いた (Table 7). 全ての化学物質の LLNA 結果は, 文献値を引用した (68, 73, 91). 用いた化学物質の LLNA カテゴリー強度の内訳は, extreme sensitizer が 12 個, strong sensitizer が 20 個, moderate sensitizer が 69 個, weak sensitizer が 65 個, non-sensitizer が 40 個 (LLNA における偽陽性を 1 個含む) であった.

2.2.2. ニューラルネットワーク解析

化学物質の構造式ファイル (MOL ファイル) を ChemDraw Pro 10.0 (CambridgeSoft Co., Cambridge, MA, USA) で作成した. 作成したファイルを Chem3D Ultra 10.0 (CambridgeSoft Co.) で開き, Molecular Orbital Program Package (MOPAC) 2002 (Fujitsu, Tokyo, Japan) の Parametric Method 3 (PM3) 法を用いてエネルギーを最小化した後, 分子軌道法から得られる記述子として sum of charges of carbon, hydrogen, oxygen, nitrogen (Sum C, Sum H, Sum O and Sum N), Core-Core repletion, COSMO area, COSMO volume, dipole moment, heat of formation, electronic energy, ionization potential, total energy, polarizability α , β , γ および molecular weight を計算した. 得られた記述子間の線形の相関を検討し, 相関の高い記述子をグループ化した. LLNA 閾値と相関が認められた記述子をそれぞれの独立したグループから抽出し, ニューラルネットワーク解析の入力層に用いた.

Sum (C, H, O and N)	:炭素, 水素, 酸素, 窒素原子の総電荷
Core-Core repletion	:核間反発エネルギー
COSMO area, COSMO volume	:溶媒効果を考慮した時のファンデルワールス半径を利用した 分子面積, 分子体積
Dipole moment (μ)	:分子内で微小な距離だけ離れた, 大きさの等しい 1 対の 正負の電荷の強さを表す量

Electronic energy	: 電子の運動エネルギー, 原子核と電子のクーロン引力ポテンシャル, 電子同士のクーロン反発ポテンシャルの和
Heat of formation	: 化学物質 1 モルが, 成分元素の単体から生成する時の反応熱
Ionization potential	: 原子から電子 1 個を取り去って, 1 価の陽イオンにするために必要なエネルギー
Molecular weight	: 分子中に含まれる原子量の総和
Polarizability α, β, γ	: 電場により生じるベクトル量である dipole moment と電場とを結びつける比例定数
Total energy	: 電子エネルギーと核間反発エネルギーから成る分子固有の全エネルギー

解析は第 1 章と同様の方法で実施した. 入力層, 第一中間層, 第二中間層, 出力層のニューロン数はそれぞれ 6, 4, 2, 1 個とした.

2.2.3. LLNA 予測カテゴリー

EC3 または LLNA 予測閾値により, 以下の基準でカテゴリー分類を行った.

Extreme sensitizer	: EC3 または LLNA 予測閾値 < 0.1%
Strong sensitizer	: EC3 または LLNA 予測閾値 $\geq 0.1\%$ to < 1%
Moderate sensitizer	: EC3 または LLNA 予測閾値 $\geq 1\%$ to < 10%
Weak or non-sensitizer	: EC3 または LLNA 予測閾値 $\geq 10\%$ to 100%

2.2.4. 統計解析

エクセル統計 2004 ソフトウェア (Social Survey Research Information, Tokyo, Japan) を用いて, 相関係数はピアソンの積率相関係数を算出した. 有意差検定は Student's *t*-test を実施し, 有意水準は 5% 未満とした.

Table 7. List of 206 tested chemicals.

Sample name	CAS	Sample name	CAS	Sample name	CAS
Abietic acid	514-10-3	2-Bromotetradecanoic acid	10520-81-7	Diethyl sulfate	64-67-5
2-Acetylcylohexanone	874-23-7	1-Bromotridecane	765-09-3	3,4-Dihydrocumarin	119-84-6
4-Allylanisole	140-67-0	1-Bromoundecane	693-67-4	Dihydroeugenol	2785-87-7
2-Amino-6-chloro-4-nitrophenol	6358-09-4	2,3-Butanedione	431-03-8	1,4-Dihydroquinone	123-31-9
2-(4-Amino-2-nitro-phenylamino)ethanol	2871-01-41	1-Butanol	71-36-3	3-Dimethylaminopropylamine	109-55-7
2-Aminophenol	95-55-6	α -Butyl cinnamic aldehyde	7492-44-6	7,12-Dimethylbenz(a)anthracene	57-97-6
3-Aminophenol	591-27-5	<i>p-tert</i> -Butyl- <i>o</i> -ethylhydrocinnamal (Lilial)	80-54-6	5,5-Dimethyl-3-methylene-dihydro-2(3H)-furanone	29043-97-8
α -Amyl cinnamic aldehyde	122-40-7	Butyl glycidyl ether	2426-08-6	1-(2',5'-Dimethylphenyl)butane-1,3-dione	56290-55-2
2-(4- <i>tert</i> -Amylcyclohexyl)acetaldehyde	620159-84-4	C4 Azlactone	176664-99-6	Dimethyl sulfate	771-78-1
<i>trans</i> -Anethol	104-46-1	C6 Azlactone	176665-02-4	Dimethyl sulfoxide	67-68-5
Aniline	62-53-3	C9 Azlactone	176665-04-6	Dodecyl methane sulfonate	51323-71-8
Benzaldehyde	100-52-7	C11 Azlactone	176665-06-8	4-Ethoxymethylene-2-phenyl-2-oxazolin-5-one (osazolone)	15646-46-5
1,2,4-Benzene-tricarboxylic anhydride (trimellitic anhydride)	552-30-7	C15 Azlactone	176665-09-1	3-Ethoxy-1-(2',3',4',5'-tetramethylphenyl)propane-1,3-dione	170928-69-5
1,2-Benzisothiazolin-3-one	2634-33-5	C17 Azlactone	17665-11-5	Ethyl acrylate	140-8805
Benz(a)pyrene	50-32-8	C19 Azlactone		Ethyl benzoylacetate	94-02-0
Benzocaine	94-09-7	Chlorobenzene	108-90-7	Ethylenediamine free base	107-15-3
<i>p</i> -Benzoquinone	106-51-4	1-Chloro-2,4-dinitrobenzene	97-00-7	Ethylene glycol dimethacrylate	97-90-5
Benzyl benzoate	120-51-4	1-Chlorohexadecane	4860-03-1	<i>N</i> -Ethyl- <i>N</i> -nitrosourea	759-73-9
Benzyl bromide	100-39-0	5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one	26172-55-4	Ethyl vanillin	121-32-4
Benzylidene acetone (4-phenyl-3-buten-2-one)	122-57-6	1-Chloromethylpyrene	1086-00-6	Eugenol	97-53-0
Bis-1,3-(2',5'-dimethylphenyl)propane-1,3-dione		1-Chlorononane	2473-01-1	Famesal	502-67-0
Bisphenol A-diglycidyl ether		1-Chlorooctadecane	3386-33-2	Fluorescein-5-isothiocyanate	3326-32-7
1-Bromobutane	1675-54-3	1-Chlorotetradecane	2425-54-9	Formaldehyde	50-00-0
1-Bromodocosane	109-65-9	Cinnamic alcohol	104-54-1	Furfur	492-94-4
1-Bromododecane	143-15-7	Cinnamic aldehyde	104-55-2	Ceraniol	106-24-1
12-Bromododecanoic acid	73367-80-3	Citral	5392-40-5	Glutaraldehyde	111-30-8
12-Bromo-1-dodecanol	3344-77-2	Clotrimazole	23593-75-1	Glycerol	56-81-5
1-Bromoicosane	4276-49-7	Coumarin	991-64-5	Glyoxal	107-22-2
1-Bromohexadecane	3508-00-7	Cyclamen aldehyde	103-95-7	2,4-Heptadienal	5910-85-0
1-Bromohexane	112-82-3	<i>trans</i> -2,4-Dicenal	3913-71-1	Hexane	110-54-3
1-Bromononane	111-25-1	1,2-Dibromo-2,4-dicyanobutane	35691-65-7	<i>trans</i> -2-Hexanal	6728-26-3
1-Bromooctadecane	693-58-3	Diethyl acetaldehyde	97-96-1	Hexyl cinnamic aldehyde	101-86-0
1-Bromopentadecane	112-89-0	Diethylenetriamine	111-40-0	4-Hydroxybenzoic acid	99-96-7
1-Bromopentadecane	629-72-1	Diethyl malate	141-05-9	Hydroxy citronellal	107-75-5
1-Bromotetradecane	112-71-0	1-(2',5'-Diethylphenyl)butane-1,3-dione	167998-76-7	2-Hydroxyethyl acrylate	818-61-1
7-Bromotetradecane	74036-97-8	Diethylphthalate	84-66-2	3 and 4-(4-Hydroxy-4-methylpentyl)-3-cyclohexene-1-carboxaldehyde	31906-04-4

Table 7. (Continued).

Sample name	CAS	Sample name	CAS	Sample name	CAS
2-Hydroxypropyl methacrylate	923-26-2	Methyl hexadecyl sulfonate	4230-15-3	3-Phenylenediamine	108-45-2
Indazolelidinylurea	39236-46-9	5-Methyl-2,3-hexanedione	13706-86-0	1-Phenyl-2-methylbutane-1,3-dione	6668-24-2
1-Iodododecane	4292-19-7	<i>p</i> -Methylhydrocinamic aldehyde	5406-12-2	1-Phenylbutane-1,3-dione	55846-68-1
1-Iodohexadecane	544-77-4	Methyl 4-hydroxybenzoate (methylparaben)	99-76-3	1-Phenyl-1,2-propanedione	579-07-7
1-Iodohexane	638-45-9	2-Methyl-5-hydroxyethylaminophenol	55302-96-0	3-Phenyl propenal	14371-10-9
1-Iodononane	4282-42-2	3-Methylisoeugenol	186743-29-3	β -Propiolactone	57-57-8
1-Iodoctadecane	629-93-6	6-Methylisoeugenol	13041-12-8	Propylene glycol	57-55-6
1-Iodotetradecane	19218-94-1	2-Methyl-2 <i>H</i> -isothiazol-3-one	2682-20-4	3-Propylenephthalide	17369-59-4
Isoeugenol	97-54-1	Methyl methanesulfonate	66-27-3	Propylparaben	94-13-3
Isomonanoyl chloride	57077-36-8	1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine	70-25-7	Pyridine	110-86-1
Isopropanol	67-63-0	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -nitrosourea	684-93-5	Resorcinol	108-46-3
Isopropyl eugenol	51474-90-9	Methyl 2-oxynonate	111-80-8	Saccharin	81-07-2
Isopropyl isoeugenol	2953-00-7	α -Methylphenylacetaldehyde	93-53-8	Salicylic acid	69-72-7
Isopropyl myristate	110-27-0	3-Methyl-4-phenyl-1,2,5-thiadiazole-1,1-dioxide	3775-21-1	Sodium dodecyl sulfate	151-21-3
Kanamycin	59-01-8	Methyl salicylate	119-36-8	Sodium 3,5,5-trimethylhexanoyloxy benzenesulfonate	94612-91-6
Lactic acid	50-21-5	Methyl 12-sulphophenyl octadecanoate		Sulfanilamide	63-74-1
Lauryl gallate (dodecyl gallate)	1166-52-5	2-Methylundecanal	110-41-8	Sulfamic acid	121-57-3
<i>R</i> (+)-Limonene	5989-27-5	1-Naphthol	90-15-3	Tartaric acid	87-69-4
Linanol	78-70-6	4-Nitrobenzyl bromide	100-11-8	Tetrachlorosalicylamide	1154-59-2
2-Mercaptobenzothiazole	149-30-4	2-Nitro- <i>p</i> -phenylenediamine	5307-14-2	2,2,6,6-Tetramethyl- ϵ -capropane-3,5-dione	1118-71-4
4-methoxyacetophenone	100-06-1	Nonanoyl chloride	764-85-2	1-(2',3',4',5'-Tetramethylphenyl)propane-1,3-dione	55846-68-9
2-Methoxy-4-methyl-phenol	93-51-6	<i>cis</i> -6-Nonenal	2277-19-2	1-(2',3',4',5'-Tetramethylphenyl)butane-1,3-dione	167998-73-4
1-(<i>p</i> -Methoxyphenyl)-1-penten-3-one	104-27-8	Octanoic acid	124-07-2	Tetramethylthiuram disulfide	137-26-8
4-(methylamino)phenol sulfate	55-55-0	Oleoyl methane sulfonate	35709-09-2	2,4,6-Trichloro-1,3,5-triazine (cyanuric chloride)	108-77-0
2-Methyl-4 <i>H</i> ,3,1-benzoxazin-4-one	525-76-8	Oxalic acid	144-62-7	4,4,4-Trifluoro-1-phenylbutane-1,3-dione	326-06-7
α -Methyl cinnamic aldehyde	101-39-3	Palmitoyl chloride	112-67-4	1-(3',4',5'-Trimethoxyphenyl)-4-dimethylpentane-1,3-dione	135099-98-8
6-Methylcoumarin	92-48-8	Pationic 138C (sodium lauryl lactylate)	13557-75-0	1,1,3-Trimethyl-2-formylcyclohexa-2,4-diene (Safranal)	116-26-7
Methyl dodecane sulfonate	2374-65-4	Penicillin G	61-33-6	3,5,5-Trimethylhexanoyl chloride	36727-29-4
2,5-Diamino-toluene	95-70-5	Pentachlorophenol	87-86-5	Undec-10-enal	112-45-8
3-Methyleugenol	186743-26-0	Perillaldehyde	2111-75-3	Vanillin	121-33-5
5-Methyleugenol	186743-25-9	Phenylacetaldehyde	122-78-1	Vinylidene dichloride	75-35-4
6-Methyleugenol	186743-24-8	Phenyl benzoate	93-99-2	Vinylpyridine	1337-81-1
Methyl hexadecene sulfonate	26452-48-2	1,4-Phenylenediamine	106-50-3		

CAS, Chemical abstract service number.

第 3 節 実験結果

2.3.1. ニューラルネットワーク解析に用いる記述子の抽出

206 化学物質の LLNA 閾値および化学構造より計算された各記述子を Table 8 に示す. 第 1 章で記述した通り, モデルの頑強性を高めるためには予測性を下げても記述子の数を絞る必要がある. このため, 分子軌道法より得られた記述子のうち, 相関が高いものをグループ化し, LLNA 閾値と統計学的に有意な相関が認められた記述子を各グループより 1 個ずつ抽出した.

各記述子と LLNA 閾値との相関を検討したところ, Sum H, Sum N, heat of formation, ionization potential, polarizability β および polarizability γ に弱いながらも相関が認められた (Table 9, Fig. 7). 次に, 各記述子間の相関係数を算出したところ, Sum C, Sum H, COSMO area, COSMO volume と COSMO area, COSMO volume, molecular weight, polarizability α , electronic energy, total energy は相関係数が 0.8 以上または -0.8 以下の高い相関を示したため, グループ化を行った (Table 10). 以上の結果から, 最終的に, Sum H, sum N, heat of formation, ionization potential, polarizability β および polarizability γ の 6 個の記述子を LLNA 閾値と相関があり, かつ独立した記述子として選択し, ニューラルネットワーク解析の入力層に用いた.

2.3.2. LLNA 閾値予測ニューラルネットワークモデルの構築

206 化学物質について, ニューラルネットワークの入力層に上述の 6 個の記述子を, 出力層に報告済みの LLNA 閾値を用いて, モデルの構築を行った (*in silico* モデル). 相関係数は 0.791, RMSE は 0.571 であった (Fig. 8A). このモデルをクロスバリデーションした後の相関係数は 0.708 ± 0.018 , RMSE は 0.660 ± 0.017 であった (Fig. 8B). 206 化学物質のモデル構築に用いた記述子およびクロスバリデーション後の LLNA 予測閾値を Table 11A に示す. 次に, 予測された LLNA 閾値に基づき, 感作性強度を 4 カテゴリー (extreme, strong, moderate and weak or non-sensitizer) に分類した (Table 11B). 実際の LLNA カテゴリー分類との一致率は 55% であり, 過大評価が 23%, 過小評価が 22% であった.

Table 8. Chemical information including LLNA results and MO-calculated descriptors of 206 chemicals.

Sample name	LLNA			MO-calculated descriptors											Polarizability			Total energy	
	Potency category	EC3 (%)	LLNA threshold (%)	C	H	O	N	Core-repulsion	COSMO area	COSMO volume	Dipole moment	Electronic energy	Heat of formation	Ionization potential	Molecular weight	α	β		γ
Abietic acid	W	15	15	-3.34	4.18	-0.83	0.00	66591	320.85	394.77	2.04	-145494	-114.95	205.77	302.46	151.36	-16.34	26571	-78903
2-Acetylcytobexanone	NS	>40	40	-1.02	1.83	-0.81	0.00	13411	174.34	179.27	5.14	-53110	-104.99	247.71	140.18	61.46	-18.99	5714	-39698
4-Allylanisole	W	18	18	-1.84	2.06	-0.22	0.00	9493	199.59	198.51	1.26	-47832	-5.78	209.95	148.20	86.53	-65.66	13920	-38339
2-Amino-6-chloro-4-nitrophenol	M	2.2	2.2	-0.89	0.99	-1.60	1.41	6207	187.71	187.32	6.32	-59429	-51.16	205.60	188.57	86.53	122.58	38685	-53222
2-(4-Amino-2-nitro-phenylamino)-ethanol	M	2.2	2.2	-1.44	1.84	-1.73	1.34	10828	222.44	223.12	5.11	-68091	-48.56	193.99	197.19	105.52	167.03	36785	-57263
2-Aminophenol	S	0.4	0.4	-1.00	1.32	-0.29	-0.04	4868	142.04	134.06	1.69	-34265	-27.57	198.52	109.13	60.51	-146.51	7071	-29397
3-Aminophenol	M	3.2	3.2	-1.02	1.36	-0.29	-0.05	4484	143.17	134.71	1.68	-33884	-30.25	202.29	109.13	60.90	-95.74	6893	-29400
α -Amyl cinnamic aldehyde	W	11	11	-2.35	2.77	-0.42	0.00	15755	260.72	274.78	3.38	-67181	-28.30	216.50	202.30	119.23	97.21	29627	-51426
<i>trans</i> -Anethol	M	2.3	2.3	-1.77	1.99	-0.22	0.00	9063	200.28	197.84	3.35	-79635	-89.62	249.15	196.33	93.27	-7.44	7105	-50873
Aniline	W	89	89	-1.21	1.26	0.00	-0.05	4084	133.23	123.66	1.50	-26704	17.73	202.38	93.13	55.80	-195.56	10737	-22620
Benzaldehyde	NS	>25	25	-0.81	1.23	-0.42	0.00	3851	142.26	134.69	3.62	-31871	-15.42	230.98	106.12	58.21	77.96	10369	-28020
1,2,4-Benzene-tricarboxylic anhydride (trimellitic anhydride)	M	9.2	9.2	0.82	1.00	-1.82	0.00	8674	194.05	195.19	1.21	-68556	-185.75	246.01	192.13	88.49	54.94	18528	-59882
1,2-Benzisothiazolin-3-one	M	2.3	2.3	-0.66	1.14	-0.46	-0.23	5417	164.92	164.00	3.63	-41125	-12.58	203.15	151.18	80.56	147.23	14187	-35708
Benzo[<i>a</i>]pyrene	E	0.0009	0.0009	-2.61	2.61	0.00	0.00	26553	264.15	294.28	0.11	-85435	77.62	190.18	252.32	198.21	-3.93	97329	-58882
Benzocaine	W	22	22	-0.95	1.73	-0.75	-0.03	10366	202.48	202.12	6.43	-56164	-74.85	205.86	165.19	90.03	321.49	26725	-45798
<i>p</i> -Benzoinone	E	0.0099	0.0099	-1.29	1.44	0.00	0.00	3747	159.59	156.27	2.18	-33508	21.45	225.61	171.04	64.85	-50.53	3142	-29761
Benzyl benzoate	W	17	17	-1.72	2.45	-0.73	0.00	15020	247.68	257.37	5.92	-71060	-31.20	224.03	212.25	120.64	-54.42	18121	-56040
Benzyl bromide	S	0.2	0.2	-1.29	1.44	0.00	0.00	3747	159.59	156.27	2.18	-33508	21.45	225.61	171.04	64.85	-50.53	3142	-29761
Benzylidene acetone (4-phenyl-3-buten-2-one)	M	3.7	3.7	-2.52	1.95	-0.43	0.00	6895	193.00	190.71	4.62	-44531	-9.93	217.85	146.19	90.56	326.40	58997	-37636
Bis-1,3-(2',5'-dimethyl-phenyl)-propane-1,3'-dione	NS	>40	40	-2.81	3.14	-0.34	0.00	33357	324.22	370.01	6.37	-105874	-0.60	215.84	280.37	163.70	-15.23	22683	-72517
Bisphenol A-diglycidyl ether	M	1.5	1.5	-3.10	4.16	-1.06	0.00	35598	380.10	417.48	0.82	-128515	-51.18	212.13	340.42	184.94	45.89	28991	-92917
1-Bromobutane	NS	>25	25	-1.02	1.21	0.00	0.00	636	140.73	130.46	2.42	-22942	-24.14	259.86	137.02	40.08	19.44	2209	-22306
1-Bromododecane	M	8.3	8.3	-5.38	5.56	0.00	0.00	22449	501.31	528.78	2.41	-106827	-122.40	259.79	389.50	167.80	38.56	19217	-84378
1-Bromododecanoic acid	W	18	18	-2.95	3.14	0.00	0.00	10425	300.98	307.44	2.41	-60318	-67.79	259.79	249.23	96.94	36.29	10197	-49894
12-Bromo-1-dodecanol	W	18	18	-2.23	3.27	-0.85	0.00	10940	313.76	323.91	2.43	-73678	-155.86	259.79	279.22	102.01	-35.36	11202	-62738
1-Bromoicosane	M	6.1	6.1	-4.89	5.08	0.00	0.00	20094	461.29	484.56	2.41	-97575	-111.48	259.79	361.45	153.63	38.44	17411	-77481
1-Bromotetradecane	M	4.8	4.8	-4.16	4.35	0.00	0.00	16472	401.16	417.62	2.41	-83608	-95.09	259.76	319.37	132.37	38.14	14686	-67136
1-Bromohexadecane	M	2.3	2.3	-3.92	4.11	0.00	0.00	15184	381.18	395.67	2.41	-78871	-89.63	259.76	305.34	125.29	-13.39	13800	-63687
1-Bromooctadecane	W	10	10	-1.50	1.69	0.00	0.00	3135	180.80	174.55	2.41	-32338	-35.03	259.77	165.07	54.36	28.42	4533	-29203
1-Bromononane	NS	>25	25	-2.23	2.42	0.00	0.00	6776	240.87	240.84	2.41	-46325	-51.41	259.76	207.15	75.67	34.12	7383	-39548
1-Bromotridecane	W	15	15	-4.41	4.59	0.00	0.00	17651	421.22	440.03	2.41	-88236	-100.55	259.76	333.39	139.46	37.98	15608	-70584
1-Bromopentadecane	M	5.1	5.1	-3.68	3.87	0.00	0.00	14003	361.09	373.41	2.41	-74242	-84.17	259.76	291.31	118.20	37.58	12878	-60239
1-Bromotetradecane	M	9.2	9.2	-3.44	3.63	0.00	0.00	12842	341.12	351.54	2.42	-69632	-78.71	259.75	277.29	111.12	36.89	11996	-56790
7-Bromotetradecane	W	2.1	2.1	-3.44	3.65	0.00	0.00	20596	320.66	350.25	2.76	-77389	-81.14	256.18	307.29	112.80	-15.37	8918	-56793
2-Bromotetradecanoic acid	M	3.4	3.4	-2.77	3.63	-0.79	0.00	17122	346.21	365.15	2.49	-86754	-163.64	259.83	277.29	117.88	-44.00	10660	-69632
1-Bromotridecane	W	10	10	-3.20	3.38	0.00	0.00	11607	321.08	329.22	2.41	-64949	-73.25	259.75	263.26	104.03	36.82	11063	-53342
1-Bromoundecane	W	20	20	-2.71	2.90	0.00	0.00	9201	280.99	285.12	2.41	-55647	-62.33	259.76	235.21	89.86	-35.97	9247	-46445
2,3-Butanedione	W	11	11	-0.20	0.94	-0.74	0.00	881	123.43	109.87	0.00	-27496	-85.98	244.50	86.09	34.38	0.04	2213	-26614
1-Butanol	NS	>20	20	-0.88	1.27	-0.38	0.00	1885	126.92	112.22	1.74	-23167	-71.00	252.76	74.12	32.09	4.79	1722	-21282
α -Butyl cinnamic aldehyde	W	11	11	-2.11	2.53	-0.42	0.00	14452	240.77	253.04	3.37	-62430	-22.86	216.49	188.27	111.92	-92.77	31621	-47978

E, Extreme; F.P., False positive; M, Moderate; NS, Non-sensitizer; S, Strong; W, Weak. N*, These were rated as negative when LLNA were performed at 100%.

Table 8. (Continued).

Sample name	LLNA				MO-calculated descriptors											Total energy			
	Potency category	EC3 (%)	LLNA threshold (%)	Sum	C	H	O	N	Core-Core repulsion	COSMO area	COSMO volume	Dipole moment	Electronic energy	Heat of formation	Ionization potential		Molecular weight	Polarizability	α
<i>p</i> -tert-Butyl- α -ethyl hydrocinnamal (Lilial)	W	19	19	-2.44	2.85	-0.42	0.00	22464	259.07	284.13	3.17	-74624	-54.77	218.58	204.31	107.71	-11.87	13424	-52160
Butyl glycidyl ether	W	31	31	-1.23	1.85	-0.62	0.00	6264	191.73	180.83	1.97	-43898	-69.84	248.51	130.19	57.45	1.02	4696	-37634
C4 Azlactone	M	1.8	1.8	-1.08	2.00	-0.63	-0.89	14535	220.37	222.56	2.28	-61773	-100.83	251.99	169.22	77.76	-74.11	7431	-47238
C6 Azlactone	M	1.3	1.3	-1.58	2.49	-0.62	-0.29	17785	260.56	268.04	2.18	-71920	-112.11	254.70	197.28	92.03	70.20	10657	-54135
C9 Azlactone	M	2.8	2.8	-2.29	3.22	-0.61	-0.31	20538	320.54	331.76	2.21	-85018	-127.55	239.36	113.74	76.82	11958	-64480	
C11 Azlactone	W	16	16	-2.79	3.70	-0.62	-0.29	23808	360.72	377.16	2.17	-95185	-139.39	254.77	267.41	127.58	46.71	16003	-71378
C15 Azlactone	W	18	18	-3.74	4.67	-0.61	-0.31	27846	440.73	462.52	2.21	-113016	-160.31	230.32	323.52	156.30	68.45	17143	-85171
C17 Azlactone	W	19	19	-4.24	5.15	-0.62	-0.29	30993	481.03	505.58	2.17	-123062	-172.18	254.77	351.57	170.08	66.53	20516	-92068
C19 Azlactone	W	26	26	-4.73	5.64	-0.62	-0.29	33346	521.09	551.67	2.17	-132311	-183.11	254.75	379.63	184.27	70.52	22207	-98965
Chlorobenzene	NS	>25	25	-1.15	1.10	0.00	0.00	2150	137.65	129.53	1.28	-27615	15.28	219.95	112.56	54.90	-138.73	9480	-25465
1-Chlorohexadecane	E	0.05	0.05	-1.17	0.76	-2.65	2.88	6487	191.75	192.66	6.01	-65697	-14.53	231.97	202.55	85.28	371.36	38492	-59210
1-Chlorooctadecane	M	9.1	9.1	-3.93	4.06	0.00	0.00	15190	376.52	389.13	1.98	-78028	-99.63	247.12	260.89	121.42	9.88	12559	-62838
5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one	E	0.009	0.009	-0.52	0.71	-0.41	-0.20	1079	157.38	153.03	2.90	-35536	-25.66	214.84	149.60	67.03	211.87	25221	-34457
1-Chloromethylpyrene	E	0.005	0.005	-2.19	2.31	0.00	0.00	22062	255.03	283.82	2.15	-79709	48.66	195.26	250.73	169.23	-38.90	63416	-57647
1-Chlorononane	NS	>50	50	-2.23	2.37	0.00	0.00	6716	236.26	234.65	1.97	-45415	-61.41	247.10	162.70	71.83	9.15	6341	-38699
1-Chlorooctadecane	W	16	16	-4.41	4.54	0.00	0.00	17574	416.62	433.23	1.98	-87309	-110.55	247.11	288.94	135.58	10.00	14348	-69735
1-Chlorotetradecane	W	20	20	-3.44	3.58	0.00	0.00	12780	336.37	344.99	1.98	-68722	-88.71	247.11	232.84	107.25	9.70	10778	-55942
Cinnamic alcohol	W	21	21	-1.57	1.95	-0.38	0.00	6065	179.57	173.84	2.05	-40968	-12.98	210.04	134.18	80.88	103.72	36473	-34903
Cinnamic aldehyde	M	3	3	-1.22	1.65	-0.43	0.00	4959	175.84	170.06	4.37	-39144	-2.02	217.64	132.16	83.76	-320.22	55311	-34185
Citral	W	13	13	-1.81	2.25	-0.44	0.00	8480	220.21	220.94	4.54	-48274	-46.52	219.66	152.24	83.37	-94.48	13170	-39794
Clotrimazole	M	4.8	4.8	-3.94	3.90	0.00	-0.03	67009	324.00	402.45	5.47	-147884	116.47	219.85	344.84	195.28	85.98	20213	-80875
Coumarin	NS	>25	25	-0.73	1.38	-0.65	0.00	8941	168.31	165.91	6.23	-49194	-45.17	219.38	146.15	83.34	35.84	14217	-40253
Cyclamen aldehyde	W	22	22	-2.22	2.63	-0.41	0.00	17976	247.99	265.15	3.12	-66689	-50.24	218.94	190.29	100.66	4.12	12614	-48712
<i>trans</i> -2-Decenal	M	2.5	2.5	-1.97	2.41	-0.44	0.00	6908	236.62	232.49	4.36	-47429	-65.89	238.02	154.25	79.81	114.23	13447	-40520
1,2-Dibromo-2,4-dicyanobutane	S	0.9	0.9	-0.72	1.17	0.00	-0.33	5421	191.39	207.20	2.95	-47716	48.91	242.53	265.94	73.95	3.61	3842	-42295
Diethyl acetaldehyde	M	76	76	-1.09	1.51	-0.42	0.00	6562	157.83	147.85	3.24	-34019	-67.94	244.92	100.16	45.42	9.21	2819	-27458
Diethylenetriamine	M	5.8	5.8	-0.96	1.44	0.00	-0.48	3668	163.33	149.41	1.66	-30463	-11.98	219.50	103.17	46.89	-2.49	3601	-26795
Diethyl malate	M	5.8	5.8	-0.30	1.77	-1.47	0.00	9994	218.40	213.33	2.65	-63216	-165.17	262.36	172.18	75.50	-3.97	9680	-53222
1-(2',5'-Dimethylphenyl)butane-1,3-dione	M	9.6	9.6	-1.96	2.75	-0.79	0.00	20559	268.58	289.10	5.18	-78779	-90.19	220.37	218.30	113.05	-24.98	12789	-58220
Diethyl phthalate	NS	N*	100	-0.82	2.21	-1.39	0.00	23590	250.66	269.33	7.62	-88454	-156.63	239.97	222.24	105.43	11.77	8050	-64864
Diethyl sulfate	M	3.3	3.3	-0.68	1.19	-3.12	0.00	4083	181.87	170.12	1.28	-49978	-191.95	263.37	154.18	58.40	-2.87	8398	-45895
3,4-Dihydrocoumarin	M	5.6	5.6	-0.92	1.57	-0.65	0.00	10820	172.32	171.39	5.19	-51804	-80.62	220.33	148.16	77.41	42.39	9948	-40983
Dihydroeugenol	M	6.8	6.8	-1.64	2.13	-0.48	0.00	11741	213.34	215.42	1.97	-57593	-80.38	205.48	166.22	88.48	39.43	9248	-45852
1,4-Dihydroquinone	S	0.11	0.11	-0.86	1.43	-0.58	0.00	3698	139.21	130.32	0.00	-35771	-72.55	204.81	110.11	56.04	0.00	6388	-32073
3-Dimethylaminoethylamine	M	2.2	2.2	-1.31	1.61	0.00	-0.30	7002	162.45	166.52	1.61	-33146	-19.38	215.30	102.18	48.09	-9.40	4070	-26144
7,12-Dimethylbenz[<i>a</i>]anthracene	E	0.006	0.006	-2.95	2.95	0.00	0.00	28708	276.60	309.98	0.23	-89020	62.45	192.31	256.35	191.32	32.64	100936	-60312
5,5-Dimethyl-3-methylene-dihydro-2(3H)-furanone	M	1.8	1.8	-0.77	1.49	-0.72	0.00	11519	165.06	164.89	5.77	-47757	-88.32	244.85	126.16	57.86	-75.34	5292	-36239
1-(2',5'-Dimethylphenyl)butane-1,3-dione	W	13	13	-1.49	2.28	-0.79	0.00	16572	235.08	250.30	4.89	-67898	-81.78	219.88	190.24	98.38	-19.28	12965	-51326
Dimethyl sulfate	S	0.19	0.19	-0.14	0.64	-3.12	0.00	2570	136.51	126.92	4.78	-41574	-186.14	260.04	126.13	41.85	33.83	3253	-39003
Dimethylsulfoxide	W	72	72	-1.24	1.08	-0.84	0.00	1801	110.66	97.54	6.14	-16873	-51.38	221.20	78.13	34.13	30.45	827	-18673
Dodecyl methane sulfonate	M	8.8	8.8	-3.67	3.65	-2.47	0.00	15083	343.39	355.16	5.68	-85241	-199.48	258.57	264.42	117.12	-11.99	13113	-70158
4-Ethoxymethylene-2-phenyl-2-oxazolin-5-one (oxazolone)	E	0.003	0.003	-0.95	1.99	-0.85	-0.18	12195	253.56	250.20	3.64	-72923	-65.61	212.71	171.22	134.99	-23.91	93258	-60728
3-Ethoxy-1-(2',3',4',5'-tetramethylphenyl)propane-1,3-dione	W	33	33	-1.69	2.81	-1.12	0.00	24941	296.55	320.50	5.19	-93389	-143.50	217.76	248.32	128.35	-42.98	21853	-68448
Ethyl acrylate	W	28	28	-0.48	1.24	-0.76	0.00	3794	145.69	133.36	2.72	-33842	-76.87	253.98	100.12	44.64	-30.88	4818	-30048
Ethyl benzoylacetate	NS	>40	40	-0.98	2.13	-1.15	0.00	10875	233.19	233.41	6.04	-65515	-107.48	231.69	192.21	95.53	-100.39	16552	-54640
Ethylenediamine free base	M	2.2	2.2	-0.49	0.82	0.00	-0.33	610	106.23	89.08	0.01	-16415	-8.96	221.75	60.10	26.17	0.01	1282	-15804

Table 8. (Continued).

Sample name	LLNA										MO-calculated descriptors									
	Potency category	EC3 (%)	LLNA threshold (%)	Sum			Core-Core repulsion	COSMO area	COSMO volume	Dipole moment	Electronic energy	Heat of formation	Ionization potential	Molecular weight	Polarizability		Total energy			
				C	H	O									N	α		β	γ	
Ethylene glycol dimethacrylate	W	28	28	-0.57	2.06	-1.49	0.00	12548	251.53	253.32	0.01	-71932	-147.92	242.68	198.22	93.02	0.01	15715	-59384	
N-Ethyl-N-nitrosourea	M	1.1	1.1	-0.22	0.97	-0.88	0.13	4629	146.81	138.87	1.91	-40050	-31.86	231.11	117.11	51.57	-61.14	6743	-35422	
Ethyl vanillin	NS	>50	50	-0.81	1.73	-0.92	0.00	9394	199.31	199.19	4.03	-57849	-101.30	210.18	166.18	87.13	-204.92	15907	-48455	
Eugenol	W	13	13	-1.65	2.13	-0.48	0.00	10461	208.55	209.28	1.66	-55576	-50.68	205.42	164.20	91.41	-101.13	9579	-45116	
Farnesol	W	12	12	-2.86	3.29	-0.43	0.00	23372	367.87	321.80	4.85	-79677	-49.57	215.72	123.09	123.09	-0.51	11333	-56305	
Fluorescein-5-isothiocyanate	S	0.14	0.14	-1.41	2.68	-1.37	0.05	43933	383.84	417.84	4.76	-147059	-81.10	210.24	389.38	242.25	424.04	125435	-103127	
Formaldehyde	S	0.61	0.61	0.23	0.20	-0.43	0.00	-2217	60.78	42.65	2.79	-7996	-38.45	245.11	30.03	9.51	-14.67	61	-10213	
Furil	NS	>25	25	-0.75	1.57	-0.82	0.00	10887	208.47	209.28	0.72	-67362	-67.78	224.77	190.16	97.48	-43.06	54774	-56475	
Geraniol	W	26	26	-2.12	2.48	-0.36	0.00	9997	222.71	223.23	1.23	-50504	-52.75	215.75	154.25	83.24	50.22	11102	-40507	
Glutaraldehyde	S	0.1	0.1	-0.37	1.24	-0.87	0.00	830	146.75	134.53	1.98	-30895	-94.14	247.30	100.12	41.13	21.72	3162	-30066	
Glycerol	NS	N*	100	-0.26	1.38	-1.13	0.00	2859	123.92	112.51	1.76	-34241	-150.37	256.70	92.09	31.08	1.90	1596	-31382	
Glyoxal	M	1.4	1.4	0.38	0.34	-0.73	0.00	-2793	87.47	69.24	0.00	-16920	-70.73	240.66	58.04	19.97	0.00	1243	-19713	
2,4-Heptadienal	M	4	4	-1.16	1.60	-0.44	0.00	1911	171.50	158.71	5.00	-31354	-24.72	217.59	110.16	70.25	-392.55	46285	-29443	
Hexane	NS	N*	100	-1.59	1.59	0.00	0.00	4689	155.67	144.30	0.00	-26094	-40.13	260.76	86.18	42.99	0.04	2640	-21405	
trans-2-Hexenal	M	5.5	5.5	-1.00	1.44	-0.44	0.00	2054	156.44	143.89	4.36	-28780	-44.08	237.91	98.14	51.03	108.87	9730	-26727	
Hexyl cinnamic aldehyde	W	11	11	-2.60	3.01	-0.41	0.00	14791	286.74	296.98	3.40	-69665	-33.21	216.88	216.32	123.09	15.92	28223	-54874	
4-Hydroxybenzoic acid	NS	>25	25	-0.35	1.48	-1.13	0.00	4979	161.17	155.92	2.62	-46567	-120.88	220.48	138.12	67.79	-298.19	21733	-41589	
Hydroxycitronellal	W	33	33	-1.90	2.70	-0.80	0.00	15960	237.05	250.00	3.40	-63989	-135.13	249.23	172.27	76.89	-7.50	6497	-48029	
2-Hydroxyethyl acrylate	M	1.4	1.4	-0.22	1.35	-1.14	0.00	2569	158.50	144.16	3.92	-39390	-117.53	253.46	116.12	48.85	15.86	5721	-36821	
3 and 4-(4-Hydroxy-4-methylphenyl)-3-cyclohexene-1-carboxaldehyde	W	17	17	-2.33	3.12	-0.79	0.00	21114	270.15	289.78	2.74	-78042	-120.13	219.44	210.32	99.37	-26.51	9709	-56928	
2-Hydroxypropyl methacrylate	NS	>50	50	-0.69	1.81	-1.11	0.00	8238	195.15	190.09	3.54	-51960	-132.77	243.54	144.17	62.92	-1.04	7434	-43722	
Indrazolidinylurea	W	24	24	1.44	3.05	-3.45	-1.04	36286	372.41	412.85	3.80	-156214	-340.73	226.43	388.30	173.28	174.10	45778	-119928	
1-Iodododecane	W	13	13	-2.96	3.15	0.00	0.00	10536	307.27	316.18	2.44	-58933	-330.85	227.71	296.23	100.94	43.87	9313	-48397	
1-Iodohexadecane	W	19	19	-3.93	4.12	0.00	0.00	15375	387.36	404.73	2.43	-77567	-75.69	227.71	352.34	129.30	46.03	13038	-62191	
1-Iodohexane	NS	>50	50	-1.51	1.70	0.00	0.00	3271	187.03	183.25	2.44	-30977	-21.10	227.69	212.07	58.28	33.96	3192	-27707	
1-Iodononane	W	24	24	-2.24	2.42	0.00	0.00	6916	247.23	249.78	2.43	-44968	-37.47	227.71	254.15	79.65	41.24	6311	-38052	
1-Iodooctadecane	NS	>25	25	-4.42	4.60	0.00	0.00	17799	427.42	449.00	2.43	-86887	-86.61	227.71	380.40	143.47	46.67	14872	-69088	
1-Iodotetradecane	W	14	14	-3.45	3.63	0.00	0.00	12958	347.25	360.40	2.43	-68253	-64.77	227.71	324.29	115.12	45.10	11184	-55294	
Isoeugenol	M	1.2	1.2	-1.57	2.05	-0.48	0.00	9990	209.05	207.73	2.04	-55113	-57.45	200.34	164.20	98.54	-72.94	44165	-45122	
Isononyl chloride	M	2.7	2.7	-1.70	2.18	-0.34	0.00	9454	230.94	236.80	3.24	-54210	-92.74	257.36	176.69	77.82	8.09	4728	-44755	
Isopropanol	NS	>50	50	-0.69	1.07	-0.38	0.00	1494	105.85	91.03	1.85	-19329	-67.26	257.13	60.10	24.86	-3.26	1129	-17835	
Isopropyl eugenol	NS	>59	59	-2.37	2.82	-0.45	0.00	18168	263.10	276.26	1.38	-73626	-63.38	204.02	206.28	114.23	145.89	13016	-55457	
Isopropyl isoeugenol	S	0.6	0.6	-2.25	2.67	-0.42	0.00	18250	264.00	273.23	1.81	-73704	-59.92	201.08	206.28	123.89	-24.39	66308	-55454	
Isopropyl myristate	W	44	44	-3.50	4.26	-0.76	0.00	25897	380.33	403.92	2.27	-98063	-171.70	253.35	270.45	127.24	-2.42	11837	-72166	
Kanamycin	NS	>25	25	-1.47	5.72	-3.64	-0.62	98100	451.50	553.72	2.29	-249598	-483.63	222.67	484.50	190.68	-27.02	20955	-151497	
Lactic acid	NS	>25	25	0.04	1.14	-1.17	0.00	1862	119.82	107.16	2.68	-32541	-154.41	262.51	90.08	30.64	20.07	2071	-30679	
Lauryl gallate (dodecyl gallate)	S	0.3	0.3	-2.80	4.35	-1.55	0.00	23776	416.76	437.37	7.68	-120283	-260.30	218.14	338.44	163.27	59.16	22030	-96507	
R(+)-Limonene	W	69	69	-2.17	2.17	0.00	0.00	17366	187.22	199.19	0.45	-50384	-2.45	216.58	136.24	74.72	7.78	4454	-33018	
Linalool	W	30	30	-2.26	2.63	-0.37	0.00	13836	221.40	227.90	2.16	-54343	-51.94	218.72	154.25	79.85	10.72	7920	-40506	
2-Mercapto-1,2,4-benzothiazole	M	1.7	1.7	-1.41	1.12	0.00	0.30	4627	180.23	182.17	9.67	-37833	54.13	207.56	167.24	105.68	293.14	17373	-33206	
4-Methoxyacetophenone	NS	>50	50	-1.06	1.71	-0.65	0.00	8840	188.96	188.14	5.32	-50524	-62.56	218.91	150.18	81.27	325.68	29263	-41684	
2-Methoxy-4-methyl-phenol	M	5.8	5.8	-1.16	1.65	-0.49	0.00	8558	176.24	172.74	1.94	-47516	-71.46	205.08	138.17	73.59	-78.85	6195	-38958	
1-(p-Methoxyphenyl)-1-penten-3-one	M	9.3	9.3	-1.70	2.35	-0.65	0.00	11105	242.91	244.45	5.03	-62403	-54.20	208.90	190.24	115.51	667.95	10324	-51298	
4-(methylamino)phenol sulfate	S	0.8	0.8	-1.22	2.51	-2.35	-0.08	11798	242.79	260.87	2.92	-76731	-189.05	210.71	221.23	107.29	323.58	49150	-64933	
2-Methyl-4H-3,1-benzoxazin-4-one	S	0.7	0.7	-0.47	1.37	-0.66	-0.24	10392	183.40	181.66	3.02	-54753	-52.26	221.02	161.16	89.68	-36.47	19294	-44361	
α -Methyl cinnamic aldehyde	M	4.5	4.5	-1.38	1.80	-0.42	0.00	8015	189.48	189.67	3.84	-45649	-7.81	216.91	146.19	89.38	-184.27	43598	-37634	

Table 8. (Continued).

Sample name	LLNA										MO-calculated descriptors									
	Potency category	EC3 (%)	LLNA threshold (%)	Sum				Core-Core repulsion	COSMO area	COSMO volume	Dipole moment	Electronic energy	Heat of formation	Ionization potential	Molecular weight	Polarizability			Total energy	
				C	H	O	N									α	β	γ		
6-Methylcoumarin	NS	>25	25	-0.88	1.53	-0.65	0.00	10824	187.32	187.73	6.50	-54530	-54.54	215.94	160.17	92.86	-72.03	18877	-43705	
Methyl dodecane sulfonate	S	0.39	0.39	-3.55	3.54	-2.46	0.00	15847	343.22	356.57	5.48	-86001	-195.86	236.07	224.42	117.33	43.52	13768	-70154	
2,5-Diamino-toluene	S	0.2	0.2	-1.29	1.40	0.00	-0.10	7580	164.07	160.57	2.74	-37756	5.62	190.04	122.17	74.91	7.73	21158	-30176	
3-Methylugenol	W	32	32	-1.74	2.24	-0.50	0.00	16743	219.45	232.70	2.50	-63509	-57.76	210.80	178.23	97.26	-34.01	13521	-48566	
5-Methylugenol	W	13	13	-1.76	2.26	-0.50	0.00	13880	223.99	229.59	3.07	-62448	-59.34	209.02	178.23	98.91	-32.77	11147	-48567	
6-Methylugenol	W	17	17	-1.77	2.26	-0.49	0.00	13432	222.83	227.66	2.74	-61996	-56.26	204.76	178.23	100.03	4.94	15172	-48564	
Methyl hexadecane sulfonate	S	0.8	0.8	-4.41	4.32	-2.47	0.00	18475	419.23	435.46	6.84	-101692	-194.25	249.94	318.51	147.89	-26.61	19104	-83217	
Methyl hexadecyl sulfonate	NS	>25	25	-4.51	4.50	-2.46	0.00	20640	423.23	444.36	5.49	-104587	-217.71	256.05	320.53	145.67	40.28	17586	-83948	
5-Methyl-2,3-hexanedione	W	26	26	-0.93	1.66	-0.73	0.00	9833	172.54	176.24	3.54	-46796	-105.38	245.22	128.17	55.83	19.53	4490	-36963	
Methyl hexadecanamide aldehyde	W	14	14	-1.55	1.98	-0.43	0.00	8401	199.16	199.42	3.22	-46770	-35.15	216.09	148.20	80.88	-13.33	12131	-38368	
<i>p</i> -Methylhydrocinnamic aldehyde	NS	>50	50	-0.53	1.56	-1.03	0.00	7937	177.61	176.12	5.17	-52957	-109.85	221.13	152.15	76.54	-244.21	21183	-45021	
Methyl 4-hydroxybenzoate (methylparaben)	S	0.4	0.4	-1.45	2.15	-0.66	-0.04	9599	209.94	208.54	2.51	-56114	-85.09	199.13	167.21	89.85	134.03	24463	-46515	
2-Methyl-5-hydroxyethylaminophenol	M	3.6	3.6	-1.69	2.19	-0.50	0.00	14681	220.34	227.36	2.52	-63254	-64.60	201.90	178.23	105.97	7.01	45294	-48573	
3-Methylisoeugenol	M	1.6	1.6	-1.73	2.20	-0.48	0.00	12621	226.20	229.62	2.01	-61194	-64.93	200.26	178.23	106.29	-66.64	47323	-48573	
6-Methylisoeugenol	M	1.9	1.9	-0.52	0.97	-0.42	-0.21	2201	138.08	130.77	3.20	-29712	-23.63	211.76	115.15	54.58	-80.04	5100	-27511	
2-Methyl-2 <i>H</i> -isothiazol-3-one	M	8.1	8.1	-0.93	0.95	-2.50	0.00	230	129.40	116.51	3.94	-32455	-139.66	265.62	110.13	38.60	47.41	3089	-32225	
Methyl methanesulfonate	M	0.03	0.03	-0.29	0.86	-1.60	1.03	6396	164.45	159.37	2.24	-52527	41.84	239.04	147.09	59.53	-15.94	5504	-46131	
<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -nitrosourea	E	0.05	0.05	0.03	0.71	-0.88	0.14	1647	129.50	116.38	2.35	-33620	-26.51	231.12	103.08	44.50	-65.21	5227	-31973	
1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine	M	2.5	2.5	-1.25	1.99	-0.75	0.00	6329	244.24	233.96	3.25	-52881	-105.75	218.74	152.15	75.60	146.26	10917	-45016	
Methyl 2-nonynoate	M	6.3	6.3	-0.52	1.53	-1.01	0.00	9036	175.40	174.53	6.73	-54052	-105.75	230.83	208.23	110.17	327.10	37289	-52733	
α -Methylphenylacetaldehyde	M	1.4	1.4	-1.01	1.57	-1.75	-0.60	9693	215.80	222.46	9.09	-62425	-25.95	230.83	208.23	110.17	327.10	37289	-52733	
3-Methyl-4-phenyl-1,2,5-thiadiazole-1,1-dioxide	NS	>20	20	-0.52	1.53	-1.01	0.00	8985	175.35	174.38	6.73	-54001	-105.74	218.74	152.15	75.59	-3.71	10907	-45016	
Methyl salicylate	M	2	2	-5.16	5.80	-3.21	0.00	49179	531.68	598.73	5.87	-170661	-280.05	229.79	454.66	214.69	-15.07	24033	-121482	
Methyl 2-sulphophenyl octadecanoate	W	10	10	-2.54	2.96	-0.42	0.00	12569	276.36	279.85	3.21	-60718	-102.08	247.06	184.32	88.02	21.24	9312	-48150	
2-Methylundecanal	W	1.3	1.3	-1.50	1.78	-0.28	0.00	9901	173.49	174.08	1.28	-46827	-7.40	200.91	144.17	89.34	-38.47	15451	-66926	
1-Naphthol	E	0.05	0.05	-1.29	1.34	-1.34	1.43	5165	188.91	189.42	5.70	-51802	3.38	237.43	216.03	80.09	224.19	19268	-46636	
4-Nitrobenzyl bromide	S	0.5	0.5	-1.15	1.16	-1.36	1.34	7735	172.11	168.88	6.47	-51333	-1.72	193.50	153.14	84.28	99.65	16278	-43598	
2-Nitro- <i>p</i> -phenylenediamine	M	1.8	1.8	-1.73	2.19	-0.34	0.00	7885	236.22	238.92	3.12	-52641	-93.51	258.84	176.69	76.17	34.95	4957	-44756	
Nonanoyl chloride	W	23	23	-1.79	2.23	-0.43	0.00	6199	213.79	208.80	3.18	-43270	-59.86	225.00	140.23	69.62	-26.27	4749	-37071	
<i>cis</i> -6-Nonenal	NS	>50	50	-1.34	2.19	-0.85	0.00	6614	210.44	204.61	2.39	-47762	-139.68	261.25	144.21	62.78	15.87	5443	-41147	
Octanoic acid	W	15	15	-0.91	0.60	-1.51	0.00	1818	106.44	89.45	0.00	-31473	-185.50	269.98	90.04	26.52	0.01	1695	-33291	
Oleyl methane sulfonate	W	25	25	-5.08	5.07	-2.47	0.00	21494	456.06	479.61	5.70	-111609	-205.79	225.00	346.57	163.02	16.88	15224	-90115	
Oxalic acid	W	15	15	0.91	0.60	-1.51	0.00	1818	106.44	89.45	0.00	-31473	-185.50	269.98	90.04	26.52	0.01	1695	-33291	
Palmitoyl chloride	M	8.8	8.8	-3.42	3.88	-0.34	0.00	16383	376.30	391.88	3.12	-85278	-131.72	258.86	274.87	125.63	-1.92	12288	-68895	
Patitonic 138C (sodium lauroyl lactylate)	W	15	15	-2.01	4.09	-3.07	0.00	44432	425.25	494.88	11.91	-145553	-498.72	244.13	366.43	147.98	-18.42	15609	-101121	
Pencillin G	W	30	30	-1.52	3.14	-2.34	-0.24	55250	351.80	444.26	6.66	-144077	-297.59	224.49	356.37	154.51	-68.52	18715	-88829	
Pentachlorophenol	W	20	20	-0.69	0.28	-0.25	0.00	3693	208.79	222.54	1.70	-63732	-51.31	212.77	266.34	102.41	44.07	38415	-60039	
Perillaldehyde	M	8.1	8.1	-1.61	2.04	-0.43	0.00	13977	198.79	208.19	4.02	-53049	-31.68	228.94	150.22	78.28	-77.47	13458	-39072	
Phenylacetaldehyde	W	3	3	-1.14	1.57	-0.43	0.00	5136	159.98	154.41	2.96	-36604	-20.66	223.05	120.15	64.55	58.30	5211	-31468	
Phenyl benzoate	W	20	20	-1.57	2.23	-0.66	0.00	13510	230.08	235.48	3.03	-66099	-23.77	220.28	198.22	115.13	196.00	35807	-52589	
1,4-Phenylenediamine	S	0.16	0.16	-1.14	1.25	0.00	-0.11	5147	147.62	139.52	0.00	-31872	13.74	190.61	108.14	66.82	-0.10	24117	-26725	
3-Phenylenediamine	S	0.49	0.49	-1.16	1.27	0.00	-0.10	5186	147.58	139.41	2.75	-31912	13.20	198.31	108.14	65.99	-11.75	10460	-26726	
1-Phenyl-2-methylbutane-1,3-dione	W	29	29	-1.36	2.15	-0.79	0.00	16575	210.60	225.27	5.26	-64443	-66.49	231.31	176.22	87.60	-34.40	7696	-47867	
1-Phenylacene-1,3-dione	M	1.1	1.1	-2.11	2.89	-0.78	0.00	19165	272.54	291.39	2.80	-77378	-82.76	213.92	218.30	109.74	-49.39	13302	-58212	
1-Phenyl-1,2-propanedione	M	1.3	1.3	-0.85	1.57	-0.72	0.00	7938	181.92	181.68	4.49	-48908	-55.67	232.85	148.16	75.94	-50.44	11340	-40970	
3-Phenyl propanol	M	1.4	1.4	-1.22	1.65	-0.43	0.00	4937	175.87	170.51	4.37	-39122	-2.01	217.64	132.16	83.78	297.27	55372	-34185	
β -Propiolactone	S	0.15	0.15	0.04	0.69	-0.73	0.00	181	101.34	84.75	4.77	-23335	-68.91	265.91	72.06	26.84	-15.45	713	-23154	

Table 8. (Continued).

Sample name	LLNA										MO-calculated descriptors									
	Potency category	EC3 (%)	LLNA threshold (%)	Sum			Core-Core repulsion	COSMO area	COSMO volume	Dipole moment	Electronic energy	Heat of formation	Ionization potential	Molecular weight	Polarizability		Total energy			
				C	H	O									N	α		β	γ	
Propylene glycol	NS	N*	100	-0.51	1.25	-0.74	0.00	2536	114.61	102.45	-110.47	252.89	76.10	27.81	15.70	13.12	-24610			
3-Propylenephthalide	M	3.7	3.7	-1.09	1.73	-0.64	0.00	11546	209.03	209.57	-48.16	214.41	174.20	102.64	202.22	341.18	-47142			
Propylparaben	NS	>25	25	-1.02	2.05	-1.03	0.00	10565	217.59	218.64	-62.82	221.32	180.20	92.13	-172.33	14832	-51917			
Pyridine	W	72	72	-0.93	1.12	0.00	-0.19	2719	114.56	102.54	-26.65	234.08	79.10	43.44	1.73	9.12	-19168			
Resorcinol	M	5.5	5.5	-0.87	1.45	-0.57	0.00	3787	139.10	130.27	-73.61	212.40	110.11	55.49	-0.93	3098	-32074			
Saccharin	NS	>75	75	-0.83	1.16	-2.22	-0.61	7548	180.30	182.09	-91.58	236.94	183.18	85.72	23.83	5769	-49250			
Salicylic acid	NS	>25	25	-0.34	1.45	-1.11	0.00	6028	158.49	153.94	-47.613	218.64	138.12	66.82	-64.16	10544	-41585			
Sodium dodecyl sulfate	F.P.	14	14	-2.72	2.94	-3.94	0.00	21757	354.80	383.80	-428.07	257.21	288.38	108.07	-6.20	11752	-73347			
Sodium 3,5,5-trimethylhexanoyloxy benzensulfonate	M	6.4	6.4	-3.01	3.42	-3.77	0.00	65122	319.31	405.72	-347.12	226.76	336.38	146.70	76.73	16089	-86791			
Sulfanilamide	NS	>50	50	-1.43	1.47	-1.82	-0.61	6693	185.26	187.29	-63.33	206.32	172.20	88.10	-376.19	26581	-44563			
Sulfamic acid	M	8.7	8.7	0.76	1.54	-2.30	0.00	8140	157.26	153.94	-282.49	264.77	150.09	47.16	49.12	3373	-47249			
Tartaric acid	M	8.7	8.7	0.76	1.54	-2.30	0.00	8140	157.26	153.94	-282.49	264.77	150.09	47.16	49.12	3373	-47249			
Tetrachlorosalicylamide	E	0.04	0.04	-1.34	1.69	-0.79	0.06	13083	307.72	333.86	-63.26	205.37	351.02	178.00	265.84	189631	-84505			
2,2,6,6-Tetramethyl-heptane-3,5-dione	W	27	27	-1.81	2.59	-0.78	0.00	26621	233.22	262.92	-125.01	247.68	184.28	82.33	-14.80	7935	-50754			
1-(2,3,4,5-Tetramethylphenyl)-3-(4-tert-butylphenyl)propane-1,3-dione	NS	40	40	-3.31	4.09	-0.77	0.00	41445	382.70	442.83	-87.58	217.72	336.47	188.31	-9.71	31156	-86376			
1-(2,3,3',4',5'-Tetramethylphenyl)butane-1,3-dione	M	8.3	8.3	-1.83	2.62	-0.79	0.00	21935	261.89	286.01	-98.67	217.50	218.30	116.10	-66.24	19828	-58228			
Tetramethylthiourea disulfide	M	5.2	5.2	-2.24	2.11	0.00	0.71	5389	240.28	257.06	51.59	198.44	240.41	158.84	2.34	12840	-45289			
2,4,6-Trichloro-1,3,5-triazine (cyanuric chloride)	E	0.09	0.09	0.07	0.00	0.00	-0.69	1433	169.78	162.92	-398.91	18.62	184.41	79.11	-409.49	52174	-41324			
4,4,4-Trifluoro-1-phenylbutane-1,3-dione	W	20	20	-0.46	1.53	-0.66	0.00	6583	222.18	232.19	-208.38	232.32	216.16	82.64	-36.70	8422	-73830			
1-(3',4',5'-Trimethoxyphenyl)-4-dimethylpentane-1,3-dione	NS	>40	40	-1.66	3.04	-1.38	0.00	35245	328.05	369.78	-187.81	218.25	294.35	144.76	-120.70	27958	-85399			
1,1,3,3-Triethyl-2-formylcyclohexa-2,4-diene (Safraanal)	M	7.5	7.5	-1.53	1.94	-0.41	0.00	18034	189.21	203.68	-33.78	212.56	150.22	78.66	-110.94	13846	-39074			
3,5,5-Trimethylhexanoyl chloride	M	2.7	2.7	-3.13	1.63	-0.39	0.00	21585	202.57	224.14	-662.91	43.06	205.98	176.69	82.14	-8.62	8289	-44706		
Undec-10-enal	M	6.8	6.8	-2.21	2.65	-0.44	0.00	8124	256.67	254.62	-71.35	238.03	168.28	86.93	-130.93	14120	-43969			
Vanillin	NS	>50	50	-0.56	1.47	-0.90	0.00	7601	181.09	178.45	-99.95	211.13	152.15	78.83	-194.27	15781	-45011			
Vinylidene dichloride	NS	>50	50	-0.57	0.42	0.00	0.00	-3871	110.72	96.83	2.34	225.97	96.94	31.57	-71.95	4860	-20771			
Vinylpyridine	M	1.6	1.6	-1.29	1.48	0.00	-0.19	5138	146.76	139.27	42.11	224.76	105.14	63.77	-84.82	16829	-25331			

Table 9. Correlation coefficient between LLNA thresholds and MO-calculated descriptors.

Correlation coefficient	Sum C	Sum H	Sum O	Sum N	Core-Core repulsion	COSMO area	COSMO volume	Dipole moment	Electronic energy	Heat of formation	Ionization potential	Molecular weight	Polarizability α	Polarizability β	Polarizability γ	Total energy
log (LLNA thresholds (%))	-0.1204	0.1985	-0.0003	-0.1998	0.0908	0.1049	0.1032	0.0827	-0.0566	-0.2704	0.2187	0.0254	-0.1015	-0.1533	-0.4226	-0.0312
														*	**	**

* , p<0.05; ** , p<0.01.

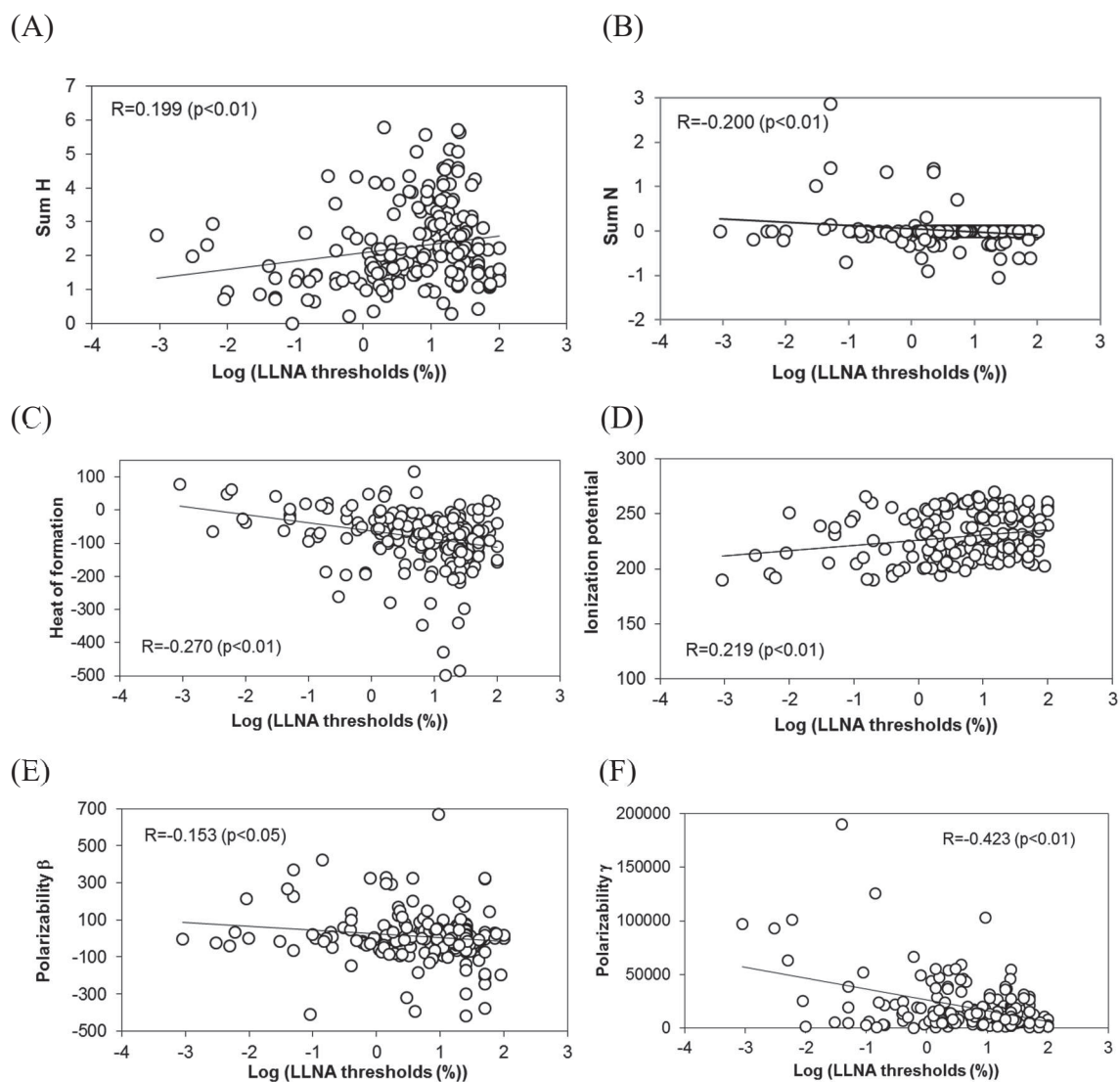


Figure 7. Relationship between LLNA thresholds and MO-calculated descriptors showing a significant correlation in Table 9. Relationship between LLNA thresholds and Sum H (A), Sum N (B), heat of formation (C), ionization potential (D), polarizability β (E) and polarizability γ (F).

Table 10. Correlation coefficient between MO-calculated descriptors.

	Sum C	Sum H	COSMO area	COSMO volume	Molecular weight	Polarizability α	Electronic energy	Total energy	Core-Core repulsion	Sum O	Ionization potential	Heat of formation	Polarizability β	Polarizability γ	Dipole moment	Sum N
Sum C	1.0000	-0.8832	-0.8373	-0.8177	-0.7111	-0.6719	0.5466	0.5463	-0.4861	-0.1262	-0.1262	0.1241	-0.0704	-0.0566	-0.0433	-0.0058
Sum H	-0.8832	1.0000	0.9569	0.9512	0.8532	0.7849	-0.7922	-0.7925	0.7034	-0.0925	0.1956	-0.4402	0.0872	0.0719	0.0781	-0.1447
COSMO area	-0.8373	0.9569	1.0000	0.9923	0.9400	0.8579	-0.8426	-0.8805	0.6882	-0.1793	0.1973	-0.4769	0.1337	0.1918	0.1547	-0.1042
COSMO volume	-0.8177	0.9512	0.9923	1.0000	0.9572	0.8865	-0.8920	-0.9092	0.7653	-0.2123	0.1538	-0.4924	0.1332	0.2096	0.1773	-0.1083
MW	-0.7111	0.8532	0.9400	0.9572	1.0000	0.8990	-0.8972	-0.9264	0.7506	-0.2594	0.0971	-0.4619	0.1740	0.2969	0.1985	-0.0669
Polarizability α	-0.6719	0.7849	0.8579	0.8865	0.8990	1.0000	-0.8760	-0.8804	0.7715	-0.1748	-0.1856	-0.2610	0.1932	0.5197	0.2145	-0.0555
Electronic energy	0.5466	-0.7922	-0.8426	-0.8920	-0.8972	-0.8760	1.0000	0.9735	-0.9309	0.4429	-0.0060	0.5940	-0.1398	-0.2871	-0.2446	0.1073
Total energy	0.5463	-0.7925	-0.8805	-0.9092	-0.9264	-0.8804	0.9735	1.0000	-0.8229	0.4765	-0.0609	0.6268	-0.1636	-0.3196	-0.2659	0.0750
Core-Core repulsion	-0.4861	0.7034	0.6882	0.7653	0.7506	0.7715	-0.9309	-0.8229	1.0000	-0.3398	-0.0824	-0.4754	0.0863	0.2033	0.1833	-0.1469
Sum O	-0.1262	-0.0925	-0.1793	-0.2123	-0.2594	-0.1748	0.4429	0.4765	-0.3398	1.0000	-0.1376	0.7428	-0.0726	-0.0382	-0.4553	-0.0944
Ionization potential	-0.1262	0.1956	0.1973	0.1538	0.0971	-0.1856	-0.0609	-0.0609	-0.0824	-0.1376	1.0000	-0.3922	-0.0017	-0.4196	-0.0866	-0.0991
Heat of formation	0.1241	-0.4402	-0.4769	-0.4924	-0.4619	-0.2610	0.5940	0.6268	-0.4754	0.7428	-0.3922	1.0000	0.0005	0.1230	-0.2607	0.1946
Polarizability β	-0.0704	0.0872	0.1337	0.1332	0.1740	0.1932	-0.1398	-0.1636	0.0863	-0.0726	-0.0017	0.0005	1.0000	0.2832	0.1414	0.2356
Polarizability γ	-0.0566	0.0719	0.1918	0.2096	0.2969	0.5197	-0.2871	-0.3196	0.2033	-0.0382	-0.4196	0.1230	0.2832	1.0000	0.1258	0.0429
Dipole moment	-0.0433	0.0781	0.1547	0.1773	0.1985	0.2145	-0.2446	-0.2659	0.1833	-0.4353	-0.0866	-0.2607	0.1414	0.1258	1.0000	0.1492
Sum N	-0.0058	-0.1447	-0.1042	-0.1083	-0.0669	-0.0555	0.1073	0.0750	-0.1469	-0.0944	-0.0991	0.1946	0.2356	0.0429	0.1492	1.0000

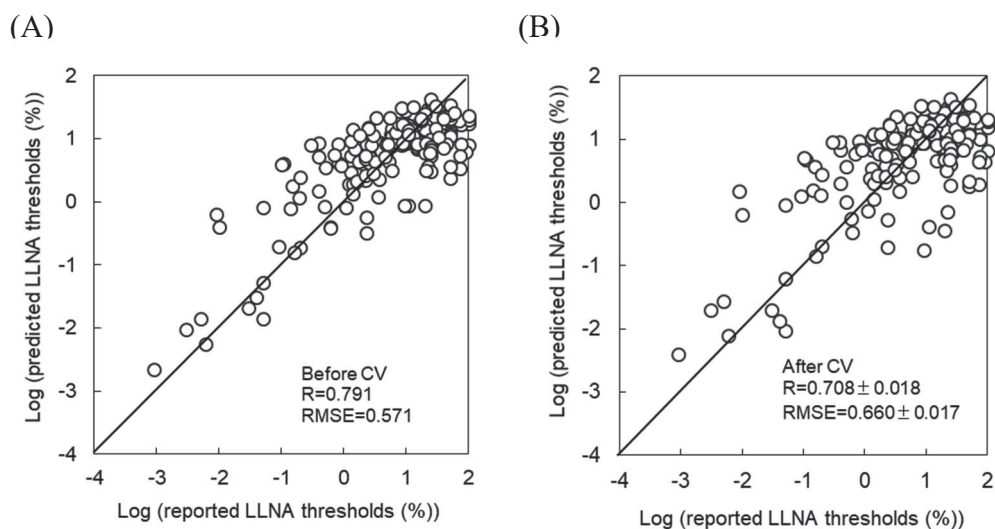


Figure 8. Correlation between LLNA and ANN prediction results based on MO descriptors of the dataset of 206 chemicals. Six descriptors shown in Fig. 7 were used as the input layer and reported LLNA thresholds were used as the output layer. Correlation before cross-validation (A) and after cross-validation (B, N=3).

2.3.3. *In vitro* モデル と *in silico* モデルとの組み合わせ

第 1 章で構築した *in vitro* 感作性試験である SH test, ARE assay および h-CLAT 結果を用いて構築した *in vitro* モデルと、本 *in silico* モデルとを組み合わせた感作性評価の検討を実施した (Fig. 9). *In vitro* モデルを構築する際に用いた 62 化学物質のうち、金属を含む potassium dichromate, cobalt chloride および nickel sulfate は MOPAC2002 で分子軌道法による記述子の計算が不可能であったため、それらを除く 59 化学物質について *in silico* モデルを用いて LLNA 閾値を予測した (Table 12A). このうち、既に本モデルの学習データに含まれていた 53 物質については、クロスバリデーション後の予測値を LLNA 閾値とした. 実測 LLNA 閾値と本モデルより算出した LLNA 予測閾値は良い相関を示した (Fig. 9B). しかしながら、約半数の物質に関して、予測値が実測値を上回っており、これは感作性強度を実際よりも弱く予測していることを意味する. 化学物質の安全性評価の観点で考えると、感作性強度を予測する際に過小評価される物質を極力減らすことが重要である. 従って、過小評価物質を減少させるため、構築した二つの予測モデルのうち、LLNA 予測閾

値が低い方の値を採用する複合モデルを構築し、実測値との比較を行った (Fig. 9C). この複合モデルにおいては、LLNA 予測閾値は必然的に *in vitro* モデルでの予測値以下となる. *In vitro* モデル, *in silico* モデルおよび複合モデルにおけるカテゴリ予測結果を Table 12B に示す. 複合モデルによりカテゴリ分類で過小評価された物質は 8% に減少した.

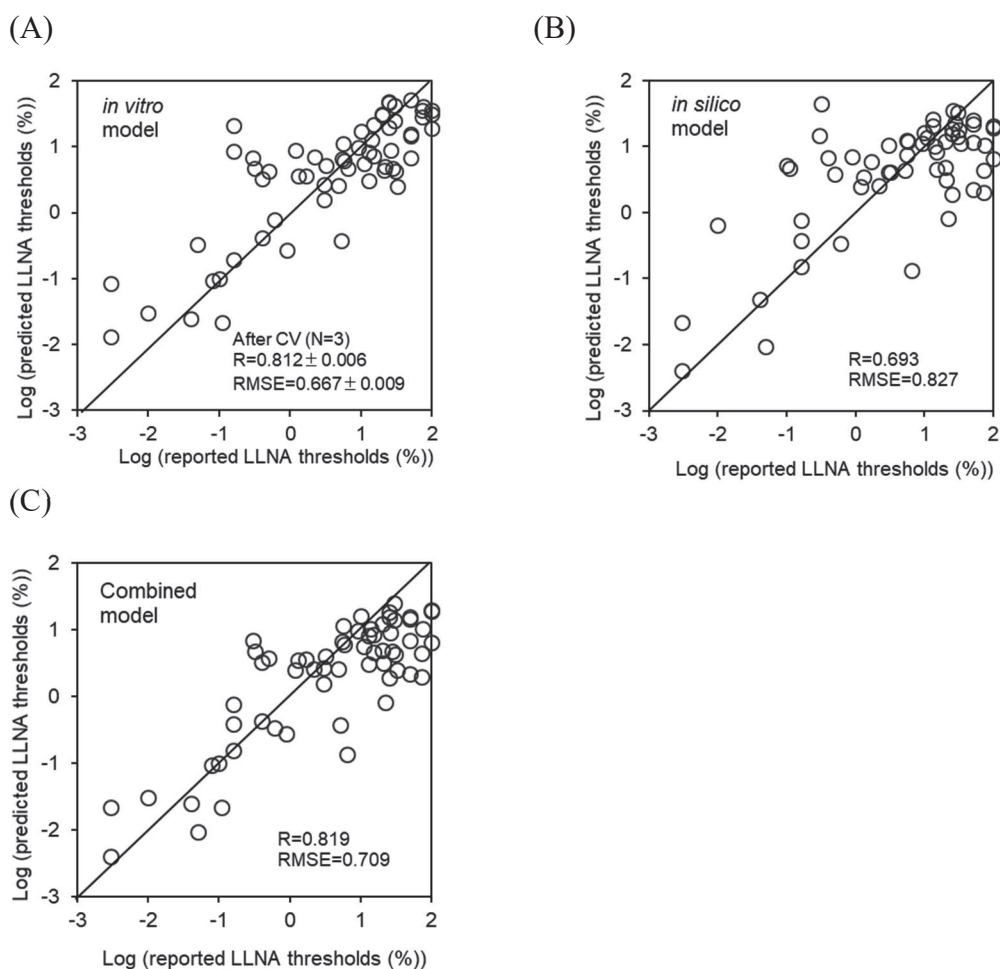


Figure 9. Correlation between LLNA and prediction results of *in vitro* model and *in silico* model. (A) Results of *in vitro* model for 62 chemicals which is the same as Fig. 6B. (B) Results of *in silico* model for 59 chemicals. (C) Correlation between reported LLNA threshold and minimum of (predicted LLNA threshold of *in vitro* and *in silico* model).

Table 11(A). Predicted LLNA thresholds derived from *in silico* model.

Sample name	LLNA			<i>In silico</i> model		
	Potency category	LLNA thresholds (%)	Predicted LLNA thresholds (%)	Predictive potency category	Predicted LLNA thresholds (%)	Predictive potency category
Abietic acid	W	15	8.4 ± 0.30	M	9.8 ± 0.54	M
2-Acetylcyclohexanone	NS	40	21.8 ± 1.90	W or NS	10.1 ± 0.58	W or NS
4-Allylanisole	W	18	14.8 ± 2.20	W or NS	10.2 ± 0.62	W or NS
2-Amino-6-chloro-4-nitrophenol	M	2.2	2.1 ± 0.28	M	0.4 ± 0.14	S
2-(4-Amino-2-nitro-phenylamino)-ethanol	M	2.2	3.9 ± 0.52	M	4.9 ± 1.27	M
2-Aminophenol	S	0.4	6.8 ± 0.20	M	13.7 ± 0.94	W or NS
3-Aminophenol	M	3.2	4.0 ± 0.45	M	25.7 ± 3.47	W or NS
α -Amyl cinnamic aldehyde	W	11	16.3 ± 3.14	W or NS	18.1 ± 2.49	W or NS
2-(4- <i>tert</i> -Amylcyclohexyl)acetaldehyde	W	37	9.5 ± 0.17	M	10.8 ± 1.40	W or NS
<i>trans</i> -A-nethol	M	2.3	0.5 ± 0.11	S	10.5 ± 1.32	W or NS
Aniline	W	89	4.4 ± 0.11	M	8.7 ± 0.83	M
Benzaldehyde	NS	25	9.3 ± 0.33	M	8.6 ± 0.85	M
1,2,4-Benzene tricarboxylic anhydride (trimellitic anhydride)	M	9.2	11.3 ± 3.71	W or NS	7.3 ± 0.24	M
1,2-Benzisothiazolin-3-one	M	2.3	0.21 ± 0.11	S	7.55 ± 0.35	M
Benzo[<i>a</i>]pyrene	E	0.0009	0.005 ± 0.00	E	7.710 ± 1.31	M
Benzoic acid	W	22	0.81 ± 0.41	S	1.90 ± 0.20	M
<i>p</i> -Benzoquinone	E	0.0099	0.64 ± 0.08	S	0.01 ± 0.00	E
Benzyl benzoate	W	17	20 ± 2.57	W or NS	9 ± 0.37	M
Benzyl bromide	S	0.2	2.8 ± 0.70	M	1.5 ± 0.13	M
Benzylidene acetone (4-phenyl-3-buten-2-one)	M	3.7	2.5 ± 0.29	M	0.0 ± 0.01	E
Bis-1,3-(2,5-dimethylphenyl)propane-1,3-dione	NS	40	9.9 ± 0.61	M	12.9 ± 1.86	W or NS
Bisphenol A-diglycidyl ether	M	1.5	7.3 ± 0.54	M	8.2 ± 0.45	M
1-Bromobutane	NS	25	6.9 ± 0.19	M	8.8 ± 0.74	M
1-Bromododecane	M	8.3	8.8 ± 0.77	M	3.2 ± 0.23	M
1-Bromododecanoic acid	W	18	8.7 ± 0.29	M	4.0 ± 3.37	M
12-Bromododecanoic acid	W	18	9.9 ± 0.60	M	20.7 ± 1.98	W or NS
12-Bromo-1-dodecanol	M	6.9	9.0 ± 0.47	M	5.8 ± 0.32	M
1-Bromocyclohexane	M	6.1	8.6 ± 0.26	M	5.8 ± 0.59	M
1-Bromohexadecane	M	4.8	8.4 ± 0.54	M	31.5 ± 2.69	W or NS
1-Bromohexane	M	2.3	9.1 ± 0.71	M	17.2 ± 2.20	W or NS
1-Bromohexane	W	10	16 ± 0.52	W or NS	7 ± 1.91	M
1-Bromononane	NS	25	10 ± 0.94	W or NS	5 ± 1.21	M
1-Bromooctadecane	W	15	8.2 ± 0.07	M	2.7 ± 0.61	M
1-Bromopentadecane	M	5.1	8.9 ± 0.22	M	15.1 ± 0.17	W or NS
1-Bromotetradecane	M	9.2	9.1 ± 0.31	M	30.7 ± 1.99	W or NS
7-Bromotetradecane	W	21	8.8 ± 0.96	M	20.8 ± 1.38	W or NS
2-Bromotetradecanoic acid	M	15	8.4 ± 0.30	M	9.8 ± 0.54	M
1-Bromotridecane	NS	40	21.8 ± 1.90	W or NS	10.1 ± 0.58	W or NS
1-Bromoundecane	W	18	14.8 ± 2.20	W or NS	10.2 ± 0.62	W or NS
2,3-Butanedione	M	2.2	2.1 ± 0.28	M	0.4 ± 0.14	S
1-Butanol	M	2.2	3.9 ± 0.52	M	4.9 ± 1.27	M
α -Butyl cinnamic aldehyde	M	3.2	4.0 ± 0.45	M	25.7 ± 3.47	W or NS
<i>p-tert</i> -Butyl- α -ethyl hydrocinnamal (Lilial)	W	11	16.3 ± 3.14	W or NS	18.1 ± 2.49	W or NS
Butyl glycidyl ether	W	37	9.5 ± 0.17	M	10.8 ± 1.40	W or NS
C4 Azlactone	M	2.3	0.5 ± 0.11	S	10.5 ± 1.32	W or NS
C6 Azlactone	M	89	4.4 ± 0.11	M	8.7 ± 0.83	M
C9 Azlactone	NS	25	9.3 ± 0.33	M	8.6 ± 0.85	M
C11 Azlactone	M	9.2	11.3 ± 3.71	W or NS	7.3 ± 0.24	M
C15 Azlactone	M	2.3	0.21 ± 0.11	S	7.55 ± 0.35	M
C17 Azlactone	E	0.0009	0.005 ± 0.00	E	7.710 ± 1.31	M
C19 Azlactone	W	22	0.81 ± 0.41	S	1.90 ± 0.20	M
Chlorobenzene	E	0.0099	0.64 ± 0.08	S	0.01 ± 0.00	E
1-Chloro-2,4-dinitrobenzene	W	17	20 ± 2.57	W or NS	9 ± 0.37	M
1-Chlorohexadecane	S	0.2	2.8 ± 0.70	M	1.5 ± 0.13	M
5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one	M	3.7	2.5 ± 0.29	M	0.0 ± 0.01	E
1-Chloromethylpyrene	NS	40	9.9 ± 0.61	M	12.9 ± 1.86	W or NS
1-Chlorononane	M	1.5	7.3 ± 0.54	M	8.2 ± 0.45	M
1-Chlorooctadecane	NS	25	6.9 ± 0.19	M	8.8 ± 0.74	M
1-Chlorotetradecane	M	8.3	8.8 ± 0.77	M	3.2 ± 0.23	M
Cinnamic alcohol	W	18	8.7 ± 0.29	M	4.0 ± 3.37	M
Cinnamic aldehyde	W	18	9.9 ± 0.60	M	20.7 ± 1.98	W or NS
Citral	M	6.9	9.0 ± 0.47	M	5.8 ± 0.32	M
Clotrimazole	M	6.1	8.6 ± 0.26	M	5.8 ± 0.59	M
Coumarin	M	4.8	8.4 ± 0.54	M	31.5 ± 2.69	W or NS
Cyclamen aldehyde	M	4.8	8.4 ± 0.54	M	17.2 ± 2.20	W or NS
<i>trans</i> -2-Decenal	M	2.3	9.1 ± 0.71	M	7 ± 1.91	M
1,2-Dibromo-2,4-dicyanobutane	W	10	16 ± 0.52	W or NS	5 ± 1.21	M
Diethyl acetaldehyde	NS	25	10 ± 0.94	W or NS	2.7 ± 0.61	M
Diethylenetriamine	W	15	8.2 ± 0.07	M	15.1 ± 0.17	W or NS
Diethyl maleate	M	5.1	8.9 ± 0.22	M	30.7 ± 1.99	W or NS
1-(2,5-Diethylphenyl)butane-1,3-dione	M	9.2	9.1 ± 0.31	M	20.8 ± 1.38	W or NS
Diethylphthalate	W	21	8.8 ± 0.96	M	20.8 ± 1.38	W or NS

Table 11(A). (Continued).

Sample name	LLNA			<i>In silico</i> model		
	Potency category	LLNA thresholds (%)	Predicted LLNA thresholds (%)	Potency category	Predicted LLNA thresholds (%)	Predictive potency category
Diethyl sulfate	M	3.3	23 ± 1.05	W or NS		W or NS
3,4-Dihydrocinnamin	M	5.6	12 ± 0.97	W or NS		M
Dihydroeugenol	M	6.8	12 ± 1.56	W or NS		W or NS
1,4-Dihydroquinone	S	0.11	4.8 ± 0.28	M		M
3-Dimethylaminopropylamine	M	2.2	5.5 ± 0.69	M		M
7,12-Dimethylbenzofuranone	E	0.006	0.010 ± 0.01	E		E
5,5-Dimethyl-3-methylene-dihydro-2(3H)-furanone	M	1.8	9.0 ± 1.21	M		M
1-(2,5-Dimethylphenyl)butane-1,3-dione	W	1.3	32 ± 1.24	W or NS		W or NS
Dimethyl sulfate	S	0.19	1.3 ± 0.25	M		M
Dimethylsulfoxide	W	72	4.4 ± 0.63	M		M
Dodecyl methane sulfonate	M	8.8	9.1 ± 0.14	M		M
4-Ethoxymethylene-2-phenyl-1,2-oxazolin-5-one (oxazolone)	E	0.003	0.02 ± 0.01	E		E
3-Ethoxy-1-(2,3,4,5-tetramethylphenyl)propane-1,3-dione	W	33	28 ± 5.85	W or NS		W or NS
Ethyl acrylate	W	28	6.4 ± 1.82	M		M
Ethyl benzoylacetate	NS	40	22 ± 1.31	W or NS		W or NS
Ethylenediamine free base	M	2.2	2.6 ± 0.13	M		M
Ethylene glycol dimethacrylate	W	28	22 ± 1.18	W or NS		W or NS
N-Ethyl-N-nitrosourea	M	1.1	0.74 ± 0.13	S		S
Ethyl vanillin	NS	50	35 ± 0.91	W or NS		W or NS
Eugenol	W	13	26 ± 3.07	W or NS		W or NS
Farnesal	W	12	17 ± 1.31	W or NS		W or NS
Fluorescein-5-isothiocyanate	S	0.14	1.6 ± 0.06	M		M
Formaldehyde	S	0.61	0.34 ± 0.05	S		S
Furil	NS	25	4.1 ± 1.41	M		M
Ceraniol	W	26	35 ± 0.24	W or NS		W or NS
Glutaraldehyde	S	0.1	5.2 ± 1.33	M		M
Glycerol	NS	100	19 ± 4.37	W or NS		W or NS
Glyoxal	M	1.4	1.1 ± 0.23	M		M
2,4-Heptadienal	M	4	7.8 ± 0.43	M		M
Hexane	NS	100	16 ± 2.27	W or NS		W or NS
<i>trans</i> -2-Hexenal	M	5.5	21 ± 3.59	W or NS		W or NS
Hexyl cinnamic aldehyde	W	11	14 ± 2.38	W or NS		W or NS
4-Hydroxybenzoic acid	NS	25	19 ± 2.19	W or NS		W or NS
Hydroxycitronellal	W	33	11 ± 0.92	W or NS		W or NS
2-Hydroxyethyl acrylate	M	1.4	12 ± 1.01	W or NS		W or NS
3 and 4-(4-Hydroxy-4-methylphenyl)-3-cyclohexene-1-carboxaldehyde	W	17	20 ± 0.49	W or NS		W or NS
2-Hydroxypropyl methacrylate	NS	50	22 ± 2.06	W or NS		W or NS
Imidazolidinylurea	W	24	4.7 ± 0.88	M		M
1-Iodododecane	W	13	12 ± 0.73	W or NS		W or NS
1-Iodoheptadecane	W	19	7.8 ± 0.12	M		M
1-Iodohexane	NS	50	12 ± 3.10	W or NS		W or NS
1-Iodononane	W	24	27 ± 1.38	W or NS		W or NS
1-Iodooctadecane	NS	25	7.4 ± 1.09	M		M
1-Iodotetradecane	W	14	9.1 ± 0.65	M		M
Isoeugenol	M	1.2	2.5 ± 0.81	M		M
Isononanyl chloride	M	2.7	14 ± 0.97	W or NS		W or NS
Isopropanol	NS	50	2.2 ± 0.43	M		M
Isopropyl eugenol	NS	59	23 ± 4.20	W or NS		W or NS
Isopropyl isoeugenol	S	0.6	0.57 ± 0.24	S		S
Isopropyl myristate	W	44	8.3 ± 0.71	M		M
Kanamycin	NS	25	5.9 ± 0.61	M		M
Lactic acid	NS	25	16 ± 2.32	W or NS		W or NS
Lauryl gallate (dodecyl gallate)	S	0.3	9.0 ± 0.62	M		M
R(+)-Limonene	W	69	18 ± 3.07	W or NS		W or NS
Linalool	W	30	33 ± 1.45	W or NS		W or NS
2-Mercapto benzothiazole	M	1.7	6.0 ± 1.84	M		M
4-methoxyacetophenone	NS	50	18 ± 2.36	W or NS		W or NS
2-Methoxy-4-methylphenol	M	5.8	12 ± 1.67	W or NS		W or NS
1-(<i>p</i> -Methoxyphenyl)-1-penten-3-one	M	9.3	0.18 ± 0.03	S		S
4-(methylamino)phenol sulfate	S	0.8	7.0 ± 2.15	M		M
2-Methyl-4 <i>H</i> ,3,1-benzoxazin-4-one	S	0.7	5.8 ± 0.73	M		M
α -Methyl cinnamic aldehyde	M	4.5	6.9 ± 2.51	M		M
6-Methylcoumarin	NS	25	8.6 ± 1.68	M		M
Methyl dodecane sulfonate	S	0.39	9.1 ± 1.06	M		M
2,5-Diamino-toluene	S	0.2	0.23 ± 0.11	S		S
3-Methyl eugenol	W	32	24 ± 1.24	W or NS		W or NS
5-Methyl eugenol	W	13	27 ± 0.93	W or NS		W or NS
6-Methyl eugenol	W	17	15 ± 2.78	W or NS		W or NS
Methyl hexadecene sulfonate	S	0.8	9.3 ± 0.54	M		M
Methyl hexadecyl sulfonate	NS	25	8.4 ± 0.36	M		M
5-Methyl-2,3-hexanedione	W	26	18 ± 0.64	W or NS		W or NS
<i>p</i> -Methylhydrocinnamic aldehyde	W	14	16 ± 1.13	W or NS		W or NS

Table 11 (B). Comparison between reported *in vivo* LLNA classification and predicted LLNA classification using the *in silico* model.

		<i>in silico</i> model classification			
		Extreme	Strong	Moderate	Weak or NS
LLNA classification (<i>in vivo</i>)	Extreme	8	2	2	0
	Strong	0	4	16	0
	Moderate	0	4	40	25
	Weak or NS	0	3	40	62

Accuracy: 55%

Over-prediction of potency category: 23%

Under-prediction of potency category: 22%

Table 12 (A). Prediction of LLNA thresholds using *in vitro* model, *in silico* model and combined model.

Sample name	LLNA			<i>in vitro</i> model			<i>in silico</i> model			Combined model		
	Potency category	EC3 (%)	LLNA thresholds (%)	Predicted LLNA thresholds (%)	Predictive potency category	Predicted LLNA thresholds (%)	Predictive potency category	Minimum of predicted LLNA thresholds (%)	Predictive potency category	Predictive potency category		
Oxazolone	Extreme	0.003	0.003	0.08 ± 0.02	Extreme	0.02 ± 0.01	Extreme	0.02	Extreme	Extreme		
Diphenylcyclopropenone	Extreme	0.003	0.003	0.013 ± 0.002	Extreme	0.004	Extreme	0.004	Extreme	Extreme		
<i>p</i> -Benzocoumarone	Extreme	0.0099	0.0099	0.03 ± 0.004	Extreme	0.64 ± 0.08	Strong	0.03	Extreme	Extreme		
Tetrachlorosalicylanilide	Extreme	0.04	0.04	0.025 ± 0.006	Extreme	0.05 ± 0.08	Extreme	0.025	Extreme	Extreme		
2,4-Dinitrochlorobenzene	Extreme	0.05	0.05	0.32 ± 0.09	Extreme	0.009 ± 0.002	Extreme	0.009	Extreme	Extreme		
Potassium dichromate	Extreme	0.08	0.08	0.09 ± 0.05	Extreme	N.D.	Extreme	0.09	Extreme	Extreme		
Glutaraldehyde (act. 50%)	Strong	0.1	0.1	0.10 ± 0.02	Extreme	5.2 ± 1.33	Moderate	0.10	Moderate	Extreme		
1,4-Dihydroquinone	Strong	0.11	0.11	0.02 ± 0.00	Extreme	4.8 ± 0.28	Moderate	0.02	Moderate	Extreme		
1,4-Phenylenediamine	Strong	0.16	0.16	0.19 ± 0.05	Strong	0.15 ± 0.06	Strong	0.15	Strong	Strong		
Phthalic anhydride	Strong	0.16	0.16	21 ± 2.06	Weak	0.77	Strong	0.77	Strong	Strong		
Maleic anhydride	Strong	0.16	0.16	8.7 ± 1.65	Moderate	0.38	Strong	0.38	Strong	Strong		
Benzoyl peroxide	Strong	0.30	0.3	6.8 ± 1.57	Moderate	15	Weak or NS	6.8	Moderate	Moderate		
Propyl gallate	Strong	0.32	0.32	4.8 ± 0.44	Moderate	45	Weak or NS	4.8	Moderate	Moderate		
Cobalt chloride	Strong	0.4	0.4	3.2 ± 0.10	Moderate	N.D.	Moderate	3.2	Moderate	Moderate		
2-Aminophenol	Strong	0.4	0.4	0.42 ± 0.13	Strong	6.8 ± 0.20	Moderate	0.42	Strong	Strong		
2-Nitro-1,4-phenylenediamine	Strong	0.5	0.5	4.3 ± 0.83	Moderate	3.8 ± 0.81	Moderate	3.8	Moderate	Moderate		
Formaldehyde (act. 37%)	Strong	0.61	0.61	0.79 ± 0.19	Strong	0.34 ± 0.05	Strong	0.34	Strong	Strong		
Methylchloroglutaronitrile	Strong	0.9	0.9	0.27 ± 0.05	Strong	7.0 ± 1.91	Moderate	0.27	Strong	Strong		
Isoeugenol	Moderate	1.2	1.2	9.0 ± 1.35	Moderate	2.5 ± 0.81	Moderate	2.5	Moderate	Moderate		
1-Naphthol	Moderate	1.3	1.3	3.6 ± 0.5	Moderate	3.5 ± 0.16	Moderate	3.5	Moderate	Moderate		
2-Mercaptobenzothiazole	Moderate	1.7	1.7	3.6 ± 1.00	Moderate	6.0 ± 1.84	Moderate	3.6	Moderate	Moderate		
Ethylene diamine	Moderate	2.2	2.2	7.1 ± 0.72	Moderate	2.6 ± 0.13	Moderate	2.6	Moderate	Moderate		
Cinnamic aldehyde	Moderate	3.0	3	1.6 ± 0.29	Moderate	4.0 ± 3.37	Moderate	1.6	Moderate	Moderate		
Phenylacetaldehyde	Moderate	3.0	3	2.7 ± 0.97	Moderate	11 ± 1.48	Weak or NS	2.7	Moderate	Moderate		
3-Aminophenol	Moderate	3.2	3.2	5.2 ± 0.47	Moderate	4.0 ± 0.45	Moderate	4.0	Moderate	Moderate		
Nickel sulfate	Moderate	4.8	4.8	2.6 ± 0.27	Moderate	N.D.	Moderate	2.6	Moderate	Moderate		
Tetramethylthiuram disulfide	Moderate	5.2	5.2	0.38 ± 0.12	Strong	4.4 ± 0.59	Moderate	0.38	Strong	Strong		
Resorcinol	Moderate	5.5	5.5	6.7 ± 0.66	Moderate	7.5 ± 1.38	Moderate	6.7	Moderate	Moderate		
3,4-Dihydrocoumarin	Moderate	5.6	5.6	11 ± 0.44	Weak	12 ± 0.97	Weak or NS	11	Weak or NS	Weak or NS		
2-Methoxy-4-methylphenol	Moderate	5.8	5.8	6.1 ± 0.53	Moderate	12 ± 1.67	Weak or NS	6.1	Moderate	Moderate		
4-Chloroaniline	Moderate	6.5	6.5	4.7 ± 0.54	Moderate	0.13	Strong	0.13	Strong	Strong		
Trimeletic anhydride	Moderate	9.2	9.2	9.7 ± 1.63	Moderate	11 ± 3.71	Weak or NS	9.7	Moderate	Moderate		
1-Bromohexane	Weak	10	10	17 ± 0.89	Weak	16 ± 0.52	Weak or NS	16	Weak or NS	Weak or NS		
Hexyl cinnamic aldehyde	Weak	11	11	5.6 ± 0.75	Moderate	14 ± 2.38	Weak or NS	5.6	Moderate	Moderate		
Citral	Weak	13	13	3.0 ± 0.55	Moderate	21 ± 1.98	Weak or NS	3.0	Moderate	Moderate		
Eugenol	Weak	13	13	8.2 ± 0.56	Moderate	26 ± 3.07	Weak or NS	8.2	Moderate	Moderate		
Abietic acid	Weak	15	15	22 ± 3.81	Weak	8.4 ± 0.30	Moderate	8.4	Moderate	Moderate		
Oxalic acid	Weak	15	15	7.2 ± 0.53	Moderate	4.5 ± 0.24	Moderate	4.5	Moderate	Moderate		
Cinnamic alcohol	Weak	21	21	4.5 ± 0.45	Moderate	3.2 ± 0.23	Moderate	3.2	Moderate	Moderate		

Table 12 (A). (Continued).

Sample name	LLNA		<i>in vitro</i> model		<i>in silico</i> model		Combined model	
	Potency category	EC3 (%)	LLNA thresholds (%)	Predicted LLNA thresholds (%)	Predictive potency category	Predicted LLNA thresholds (%)	Predictive potency category	Minimum of predicted LLNA thresholds (%)
Benzocaine	Weak	22	22	5.0 ± 0.53	Moderate	0.81 ± 0.41	Strong	0.81
Geraniol	Weak	26	26	9.0 ± 0.68	Moderate	35 ± 0.24	Weak or NS	9.0
Ethylene glycol dimethacrylate	Weak	28	28	4.8 ± 1.80	Moderate	22 ± 1.18	Weak or NS	4.8
Linalool	Weak	30	30	25 ± 31.51	Weak	33 ± 1.45	Weak or NS	25
Penicillin G	Weak	30	30	43 ± 31.17	Weak	14 ± 1.61	Weak or NS	14
Butylglycidyl ether	Weak	31	31	4.3 ± 0.61	Moderate	18 ± 2.49	Weak or NS	4.3
Hydroxycitronellal	Weak	33	33	2.5 ± 0.30	Moderate	11 ± 0.92	Weak or NS	2.5
Pyridine	Weak	72	72	29 ± 4.19	Weak	2.0 ± 0.38	Moderate	2.0
Dimethylsulfoxide	Weak	72	72	36 ± 2.39	Negative	4.4 ± 0.63	Moderate	4.4
1-Butanol	NS	>20	20	31 ± 0.94	Negative	4.9 ± 1.27	Moderate	4.9
Chlorobenzene	NS	>25	25	19 ± 2.41	Weak	1.9 ± 0.20	Moderate	1.9
Diethylphthalate	NS	>100	100	19 ± 3.59	Weak	21 ± 1.38	Weak or NS	19
Glycerol	NS	>100	100	36 ± 2.58	Negative	19 ± 4.37	Weak or NS	19
4-Hydroxybenzoic acid	NS	>25	25	47 ± 7.31	Negative	19 ± 2.19	Weak or NS	19
2-Hydroxypropyl methacrylate	NS	>50	50	15 ± 1.91	Weak	22 ± 2.06	Weak or NS	15
Isopropanol	NS	>50	50	52 ± 4.38	Negative	2.2 ± 0.43	Moderate	2.2
Lactic acid	NS	>25	25	49 ± 2.00	Negative	16 ± 2.32	Weak or NS	16
Methyl salicylate	NS	>20	20	30 ± 3.09	Negative	12 ± 0.82	Weak or NS	12
Octanoic acid	NS	>50	50	6.8 ± 0.78	Moderate	12 ± 0.83	Weak or NS	6.8
Propylene glycol	NS	>100	100	31 ± 1.17	Negative	6.5 ± 0.31	Moderate	6.5
Saccharin	NS	>75	75	42 ± 2.06	Negative	10 ± 2.32	Weak or NS	10
Vanillin	NS	>50	50	16 ± 0.79	Weak	25 ± 2.29	Weak or NS	16
Sodium dodecyl sulfate	F.P.	14	14	13 ± 1.80	Negative	10 ± 0.57	Weak or NS	10

F.P., False positive; NS, Non-sensitizer.

Table 12 (B). Comparison between reported *in vivo* LLNA classification and predicted LLNA classification using *in vitro* model, *in silico* model and combined model.

Reported LLNA classification (<i>in vivo</i>)	<i>In vitro</i> model classification				<i>In silico</i> model classification				Combined model classification			
	Extreme	Strong	Moderate	Weak or NS	Extreme	Strong	Moderate	Weak or NS	Extreme	Strong	Moderate	Weak or NS
Extreme	6	0	0	0	4	1	0	0	6	0	0	0
Strong	2	4	5	1	0	4	5	2	2	6	4	0
Moderate	0	1	12	1	0	1	8	4	0	2	11	1
Weak or NS	0	0	11	19	0	1	9	20	0	1	17	12

Accuracy: 66%

Over-prediction of potency category: 23%

Under-prediction of potency category: 11%

Accuracy: 61%

Over-prediction of potency category: 19%

Under-prediction of potency category: 20%

Accuracy: 56%

Over-prediction of potency category: 35%

Under-prediction of potency category: 8%

第 4 節 考察

ハプテンはタンパク質との結合により免疫応答を活性化することから、化学物質の部分構造が感作性に影響すると考えられており (23), 経験に基づくルールベースシステムを用いて感作性を予測する DEREK (LHASA Ltd., Leeds, UK) 等において, このような部分構造をアラートとして用いている (92). しかしながら, 部分構造のアラートに基づいた予測では, 感作性の有無の予測は可能でも, 感作性の強度予測をすることは困難であった. そこで, 本章では, 化学物質の分子軌道法から得られる記述子を用いて, 第 1 章と同様のニューラルネットワーク解析を実施し, LLNA 閾値予測モデルの構築を行った.

LLNA 閾値と統計的に有意な相関があり, かつ独立した記述子として Sum H, Sum N, heat of formation, ionization potential, polarizability β , polarizability γ が選択され, これらの記述子をニューラルネットワーク解析の入力層に用いることで良好な LLNA 閾値予測モデルが構築できた. その理由として, これらの記述子が感作性の発現に重要な物理化学性状と関連している事が推察される. 例えば, 脂溶性は分極率および水素結合等と関連するため, それらに関係のある Sum H, Sum N, ionization potential, polarizability β , polarizability γ は経皮吸収やタンパク結合に影響すると考えられる. また, Sum H, Sum N, ionization potential は電気陰性度と関連することから, 求核反応や求電子反応に影響すると考えられる. さらに, heat of formation, ionization potential は化学物質の安定性に影響を与えると想定されることから, 生体内での代謝や分解に関連する可能性が考えられる.

皮膚感作性の予測においては, その反応機序の複雑さゆえに, *in vitro* 試験の結果や *in silico* により得られる情報を統合し, 化学物質の生物学的, 生化学的, 化学的な様々な情報を用いて評価することが必須と考えられている (33). そこで, 第 1 章で構築した *in vitro* 結果より LLNA 閾値を予測する *in vitro* モデルおよび本章で構築した化学物質の *in silico* 情報より LLNA 閾値を予測する *in silico* モデルを組み合わせて複合モデルを構築した. 安全性保証の観点では, 過小評価物質の数を減らすことが非常に重要であるため, 複合モデルでは, 各予測モデルで算出された LLNA 閾値の低値を採用した. Table 12B に示すように, *in vitro* モデルのカテゴリ分類においては, 7 化学物質が過小評価された. そのうち, 前述のとおり, 金属を含

む cobalt chloride に関しては分子軌道が計算できず *in silico* モデルでの評価対象外となり, benzoyl peroxide, propyl gallate, 3,4-dihydrocoumarin は *in vitro* モデルよりも *in silico* モデルの LLNA 予測閾値の方が高かったため, 複合モデルにおいても同様に過小評価となった. 一方, phthalic anhydride, maleic anhydride, 2-nitro-1,4-phenylenediamine においては *in silico* モデルの LLNA 予測閾値の方が *in vitro* モデルの予測閾値よりも低く, その結果, phthalic anhydride, maleic anhydride において LLNA 予測カテゴリーは実際の LLNA カテゴリーと一致した. 2-nitro-1,4-phenylenediamine の LLNA 予測閾値は実際の LLNA 閾値に近づいたが, カテゴリー分類においては過小評価のままであった. LLNA カテゴリーが strong である phthalic anhydride は, 第 1 章での考察の通り, リジンペプチドと結合すること, *in vitro* 試験では加水分解の影響が考えられること等から *in vitro* モデルでは実際よりも 2 ランク強度が弱い weak と判定された. しかし, *in silico* モデルと組み合わせた複合モデルでは strong と判定されたことから, いくつかの *in vitro* 試験において偽陰性となる化学物質に関しては, 複合モデルは非常に有用であることが示された. このように, 過小評価物質は複合モデルにおいて減少することが示された (Table 12B).

動物を用いずに化学物質の安全性を評価する際, 特に毒性のある化学物質に関しては, ヒトに適用する前に包括的なリスク評価を行うことが非常に重要である. 従って, 過小評価物質の数を減らすことが可能な複合モデルはリスク評価に有用と考えられる. 本章で示した複合モデルにおいて, 過小評価物質が減るということは, 一方で過大評価物質が増えることを意味するが, ヒトへの適用を前提としたリスク評価においては重大な問題ではないと考えられる.

In vitro モデルにおいて non-sensitizer と予測された 10 化学物質のうち, dimethyl sulfoxide および sodium dodecyl sulfate のみが偽陰性であった. Dimethyl sulfoxide は LLNA において EC3 が 77% と高く, 感作性強度は weak と報告されており, sodium dodecyl sulfate はヒトにおいて感作原ではないことから, LLNA の結果が偽陽性と報告されている. つまり, *in vitro* モデル は偽陰性が非常に少ない予測モデルである. 従って, 現実的な評価スキームとして, 最初に *in vitro* 試験を実施し, 1 試験以上が陽性となった化学物質に関してのみ, 複合モデルでの評価が適していると考えられる (Fig. 10).

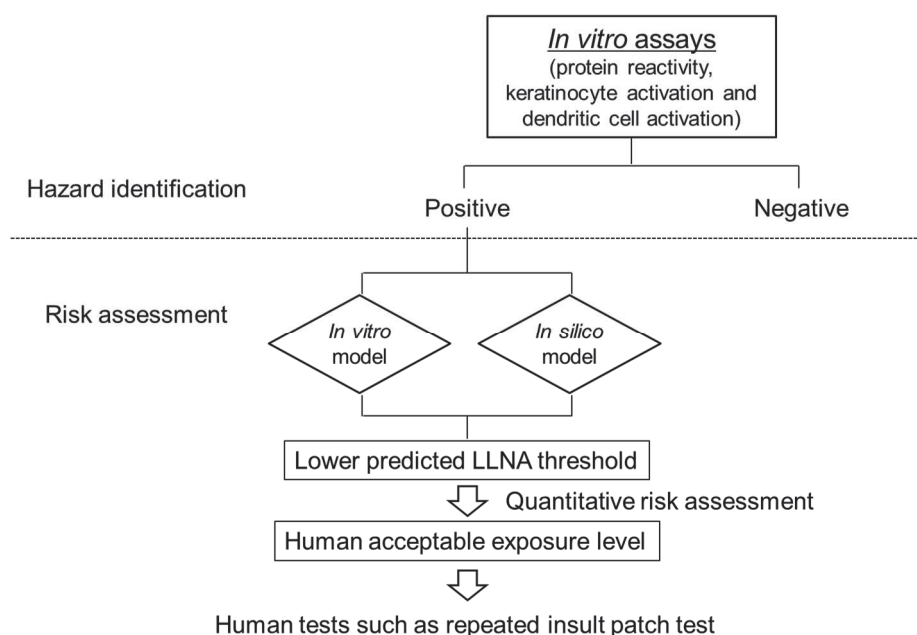


Figure 10. Proposed evaluation scheme for skin sensitization using the *in vitro* model and the *in silico* model.

本章において、化学物質の分子軌道計算より得られる記述子を用いてニューラルネットワーク解析を行うことで、LLNA 閾値が予測可能であることを示した。これまでに報告されている *in silico* 評価はハザード評価を目的としたものであるのに対し、今回構築したモデルは、分子軌道法から得られる情報に着目して毒性の強度を予測するという、他に類を見ない *in silico* のリスク評価への応用例であると考えられる。さらに、複合モデルで予測された LLNA 閾値を用いて、個体間変動、基剤による影響、使用方法等を考慮した安全係数を用いた定量的リスク評価 (9) を実施することで、ヒトに適用可能な濃度の算出が可能となる、初めての皮膚感作性予測モデルである。 *In vitro* や *in silico* 評価のみで感作性を予測する場合、最終的にヒト試験において感作が成立しないことを確認する必要がある。複合モデルで算出した LLNA 閾値を基に、定量的リスク評価によりヒトに適用可能な濃度を決定後、hRIPT 等の臨床試験を実施し、*in vitro* 試験、*in silico* 情報、臨床と包括的に安全性を評価することで、より信頼のある評価法が確立可能と考えられる。

第 3 章 *In vitro* 光感作性試験の開発

第 1 節 序論

光感受性物質に UV が照射されて生じる反応は、光毒性と光感作に分類される。光毒性に関しては *in vitro* 3T3 NRU 光毒性試験 (48) や ROS assay (57) がガイドラインとして採択済みである一方、光感作に関しては複数の *in vitro* 試験が報告されているが (47, 50, 58-63), ガイドライン化された試験法はない。

光感作は光感受性物質が UV によるエネルギーを吸収して抗原となる以外は、感作と同様の免疫反応であると考えられている (45)。感作と大きく異なる点は、*in vivo* 試験法においてもガイドライン化された手法がなく、同一プロトコル下で評価された化学物質が少ないこと、LLNA のような強度を判定する試験法がないこと、さらに光感作性物質は光毒性を持ちあわせることから (2, 50), 評価の際に感作反応、光毒性反応を考慮する必要があること等が挙げられる。しかし、ハザード評価に限定すれば、感作代替法で検討されてきたように、免疫応答の鍵となる反応を検出する *in vitro* 試験や *in silico* 評価を総合的に組み合わせることで、動物を用いずに評価を行うことは可能であると考えられた。

光感作反応のうち、タンパク結合に焦点をあてた *in vitro* 試験法として、ヒト血清アルブミンとの光結合を評価する試験が報告されている (58)。また、樹状細胞の活性化に焦点をあてた試験として、THP-1 細胞やヒト末梢血から調製した樹状細胞を化学物質存在下で UV 照射した際の CD86, CD54, HLA-DR 等を測定する試験が報告されている (60, 61, 63)。しかしながら、表皮細胞の活性化に焦点をあてた *in vitro* 試験法は報告されていない。そこで、感作において表皮細胞の活性化の評価に用いられている Keap1-Nrf2 pathway に着目し、光感作性試験の開発を試みた。

第 2 節 実験材料および方法

3.2.1. 試薬

3,3',4',5-Tetrachlorosalicylanilide (TCSA) は Acros Organics (Morris Plains, NJ, USA) より購入した。6-Methylcoumarin (6-MC), musk ambrette および 3,4',5-tribromosalicylanilide は東京化成工業 (Osaka, Japan) より購入した。Chlorpromazine HCl および sulfanilamide はナカライテスク (Kyoto, Japan) より購入した。Sodium dodecyl sulfate, anthracene, L (+)-ascorbic acid および dextran は和光純薬工業 (Osaka, Japan) より購入した。Isoniazid は LKT Laboratories (St. Paul, MN, USA) より購入した。Acridine は Lancaster Synthesis (Ward Hill, MA, USA), diclofenac sodium salt は Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) より, benzydamine HCl は MP Biomedicals (Santa Ana, CA, USA) より購入した。他の化学物質は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。全ての試薬は特級グレードもしくは同等以上のものを用いた。

3.2.2. UV/VIS 照射

UV/VIS 照射実験には SOL500 Sun Simulator (Dr. Hönle AG, Grägelting, Germany) に 500 W メタルハライドランプおよび UVB 領域の光を減衰させるため H1 フィルターを取り付けたものを用いた。UVA 強度の測定には, UVA-meter (Dr. Hönle AG) を用いた。

3.2.3. Photo-ARE assay の開発

3.2.3.1. 細胞培養

AREc32 細胞は第 1 章に記載の通りに培養した。

3.2.3.2. 細胞毒性試験

1 ウェル当たりの細胞数が 50,000 個となるように AREc32 細胞を 96 ウェルプレート (Falcon, Corning NY, USA) に播種し (180 μ L/well), 48 時間の前培養の後, 化学物質を適用した。水溶性物質は PBS (+) を用いて最大 100 mg/mL または溶解・懸濁限界濃度より, 油溶性物質の場合は DMSO を用いて最大 500 mg/mL または

溶解・懸濁限界濃度より、2 倍希釈系列で 6 濃度水準を作成した。媒体に DMSO を用いた場合は PBS (+) でさらに 10 倍に希釈し、DMSO の終濃度が 1% 以下となるようにした。前培養後、細胞培養液を 180 μ L の PBS (+) に置換し、20 μ L の調製溶液を添加して CO₂ インキュベーター内で 1 時間反応後、UV/VIS 照射を行った。同様の被験物質処理を行ったプレートを別に 1 枚準備し、アルミホイルで遮光した後に UV/VIS 照射を行った細胞を対照として用いた。UV/VIS 照射後、被験物質を除去し、細胞培養液を加えて CO₂ インキュベーター内で 24 時間培養した。培養後、細胞を PBS (-) で 2 回洗浄し、UV/VIS 照射時、非照射時それぞれの細胞生存率を第 1 章に記載の通りに測定し、CV75 を算出した。

3.2.3.3. Photo-ARE assay

細胞毒性試験より算出した UV/VIS 照射時の CV75 をもとに、細胞適用濃度は $1/8 \times CV75$, $1/4 \times CV75$, $1/2 \times CV75$, $CV75$, $2 \times CV75$, $4 \times CV75$ とした。無毒性のため CV75 が算出できない場合には、水溶性物質の場合は PBS (+) を用いて最大 10,000 μ g/mL または溶解・懸濁限界濃度より、油溶性物質の場合は最大 5,000 μ g/mL または溶解・懸濁限界濃度より 2 倍希釈系列で 6 濃度水準を設定した。細胞プレートは ARE-Nrf2 ルシフェラーゼレポーター遺伝子の活性確認用と細胞毒性用に UV/VIS 照射、非照射の各 2 枚ずつ用意した。

UV/VIS 照射と培養液の置換は細胞毒性試験と同様に実施した。UV/VIS 照射 24 時間後に細胞を PBS (-) で 2 回洗浄し、ARE-Nrf2 ルシフェラーゼレポーター遺伝子の活性および細胞生存率を第 1 章に記載の通りに測定した。実験は独立して 2 回以上繰り返し、それぞれ 3 回の測定を行った。

3.2.3.4. データ解析

UV/VIS 照射群の何れかの試験濃度において、媒体対照と比較してルシフェラーゼ活性が 1.5 倍以上増加し、かつ同濃度において非照射時と比較してルシフェラーゼ活性が 1.5 倍以上認められた場合を陽性とした。3 試験中 2 試験以上で陽性となった場合に photo-ARE assay 陽性と判断した。解析は、細胞生存率が 50% 以上の濃度のみ実施した。UV/VIS 照射時および非照射時の CI_{max} は、対数線形の用

量反応曲線より算出した。

I_{\max} : UV/VIS 照射時の被験物質処理によるルシフェラーゼ活性比を非照射時の被験物質処理によるルシフェラーゼ活性比で除した値の最大値

CI_{\max} : I_{\max} を示す濃度

3.2.4. 統計解析

有意差検定は Student's *t*-test を実施し、有意水準は 5% 未満とした。

第 3 節 実験結果

3.3.1. Photo-ARE assay の UV/VIS 照射条件の検討

本検討において、細胞生存率は、生細胞由来の ATP をルシフェラーゼ反応により生じる発光を指標に、また、ARE-Nrf2 ルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現は、ルシフェラーゼレポーターアッセイにて実施している。そこで初めに、細胞培養液中に含まれる pH 指示薬、ビタミン、血清タンパク等の物質が、UV/VIS 照射時のルシフェラーゼの発光に与える影響について検討を行った。UV/VIS 照射量は、3T3 NRU 光毒性試験のプロトコル (48) を参照し、 1.7 mW/cm^2 の強度で 5 J/cm^2 とした。

前培養の後、細胞培養液のまま又は培養液を PBS (+) に置換した細胞に UV/VIS を照射した結果、細胞生存率測定用の CellTiter-Glo[®] 試薬のルシフェラーゼ発光量に有意な差は認められなかった (Fig. 11A)。一方、レポーターアッセイ用の Steady-Glo[®] 試薬のルシフェラーゼ発光量は、細胞培養中で UV/VIS 照射した場合に非照射時と比較して 5 倍以上の亢進が認められ、PBS (+) 中で UV/VIS 照射した場合には統計学的に有意な差は認められなかった (Fig. 11B)。UV/VIS 照射のみ

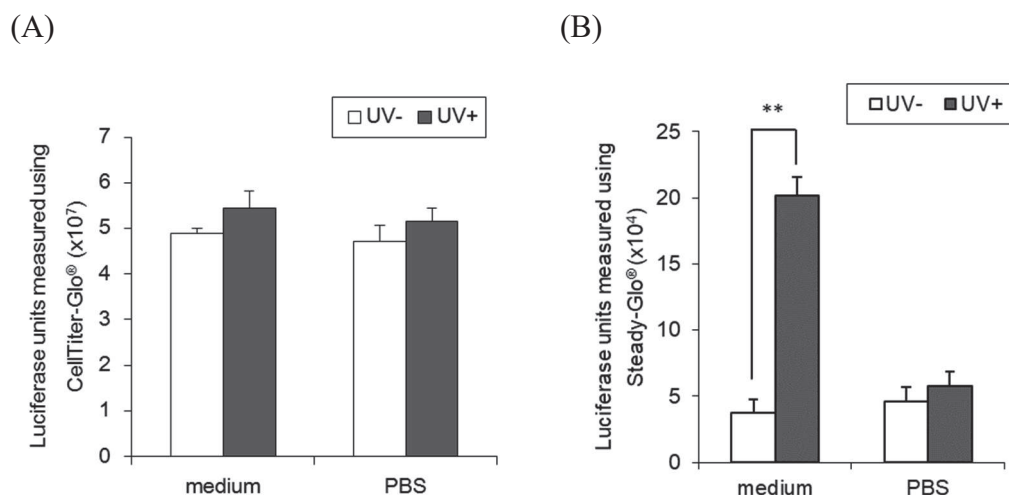


Figure 11. Effects of UV/VIS irradiation on cell viability (A) and ARE-dependent gene expression (B) of AREc32 cells. Luciferase activity was measured with CellTiter-Glo[®] (A) or Steady-Glo[®] (B). Cells were irradiated at the dose of 5 J/cm^2 in cell culture medium or phosphate-buffered saline (PBS). The results are expressed as the mean \pm SD for at least three independent experiments. Statistical analysis was performed with *t*-test. **, $p < 0.01$.

でルシフェラーゼ量が亢進した場合、化学物質処理による ARE-Nrf2 ルシフェラーゼ遺伝子発現の誘導を判断するのが困難となるため、以降の実験では、PBS (+) 中で UV/VIS 照射を実施することにした。

続いて、代表的な光感作性物質である 6-MC を用いて、最適 UV/VIS 照射条件を検討した。6-MC の濃度は、非照射時に細胞毒性が認められない 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ からとした。2.5 J/cm^2 の UV/VIS を 1.7, 2.5, 5 mW/cm^2 の強度で照射した場合の結果を Fig. 12A に示す。いずれの強度においても UV/VIS 照射時の ARE-Nrf ルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現量は非照射時と比較してわずかに亢進が認められた一方、細胞生存率はほとんど影響を受けなかった。5 J/cm^2 の UV/VIS を照射した時は、濃度依存的に ARE-Nrf ルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現は亢進し、高濃度において非照射時と比較して 5 倍程度の誘導が認められた (Fig. 12B)。一方、細胞毒性は高濃度でのみ、わずかに認められた。10 J/cm^2 の UV/VIS を照射した時は、強い細胞毒性が認められ、低毒性濃度領域においても ARE-Nrf ルシフェラーゼレポーター遺伝子はわずかに亢進したのみであった (Fig. 12C)。

以上の結果より、光感作性物質の評価に用いる UV/VIS 照射量は 5 J/cm^2 が最適であると判断した。この照射量は、3T3 NRU PT 試験で用いる照射量と同一である (48)。照射強度の違いは、細胞毒性および ARE-Nrf ルシフェラーゼレポーター遺伝子発現の評価に大きな影響がなかったことから、既に報告済みの他の光感作性試験と同様の 1.7 mW/cm^2 を以降の実験に用いることとした (60)。

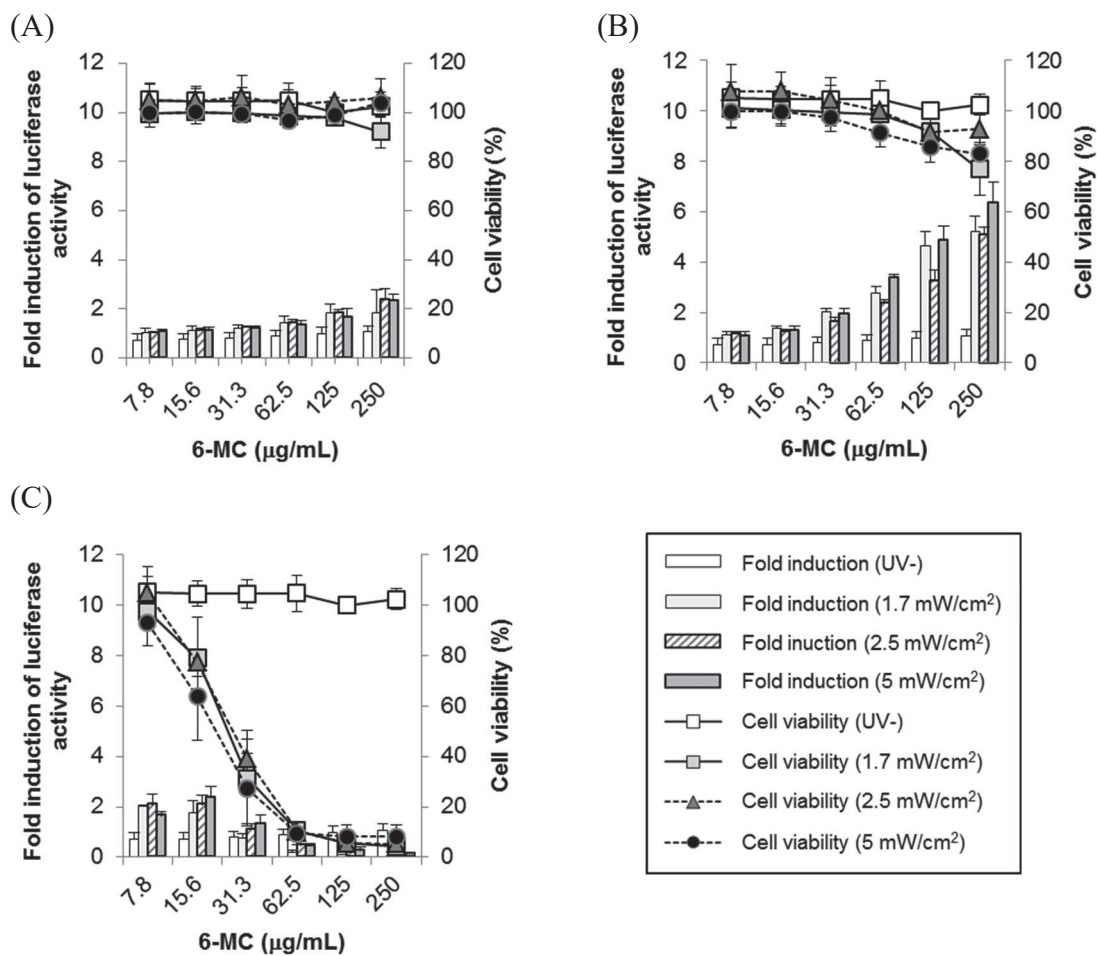


Figure 12. Effects of UV/VIS intensity and the total amount of irradiation on ARE-dependent gene expression and viability of 6-MC treated AREc32 cells. Cells were irradiated at various intensities and dose levels [2.5 J/cm^2 (A), 5 J/cm^2 (B) and 10 J/cm^2 (C)] as shown, after treatment with various concentrations of 6-MC. After irradiation, cells were incubated for 24 h at 37°C . Induction (fold) of luciferase activity and cell viability were calculated. The results are expressed as the mean \pm SD of at least three independent experiments.

3.3.2. Photo-ARE assay における光感作性物質による ARE-Nrf2 ルシフェラーゼ遺伝子の発現誘導

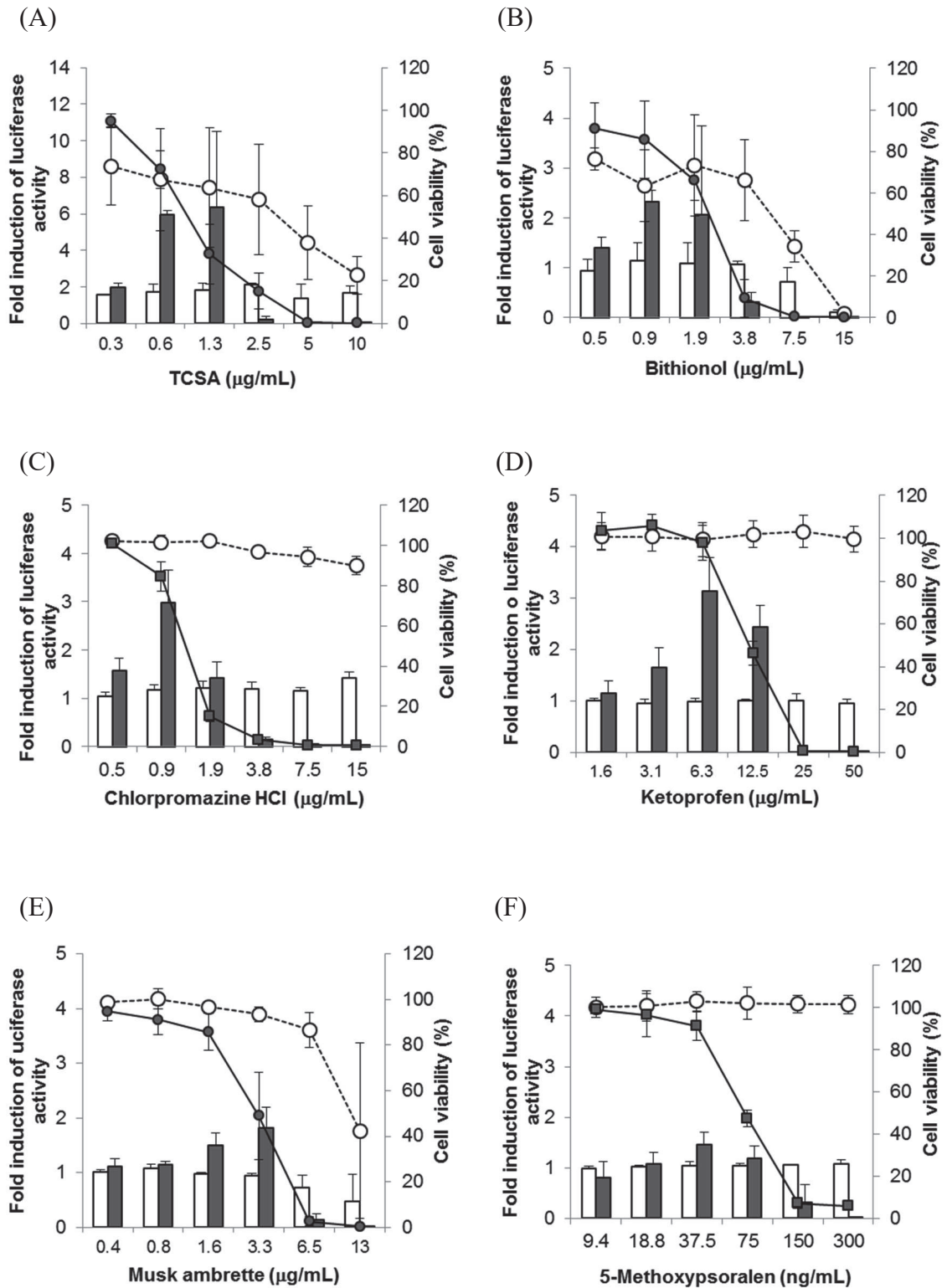
6-MC を用いて設定した実験条件において、他の化学物質の評価を行った。光感作性物質として TCSA, bithionol, chlorpromazine HCl, ketoprofen, musk ambrette を、

光毒性物質として 5-methoxypsoralen を、光毒性や光感作性を示さない物質として sodium dodecyl sulfate および DMSO を評価した。その結果、光感作性物質適用時のみに UV/VIS 照射によって ARE-Nrf ルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現が顕著に亢進した (Fig. 13)。

オリジナルの ARE assay は皮膚感作性試験法であることから (13), 被験物質が皮膚感作性物質の場合には、UV/VIS 非照射時に ARE-Nrf ルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現が亢進すると考えられる。従って、光感作性を評価するためには UV/VIS 照射時と非照射時のルシフェラーゼ誘導量の比が重要であると考えられた。UV/VIS 照射時において媒体対象と比較して 1.5 倍以上のルシフェラーゼの誘導が認められ、かつ、非照射時の同濃度と比較して 1.5 倍以上の誘導が認められた場合を陽性判断基準とすると、検討した 5 個の光感作性物質は全て陽性となることが確認された (Fig. 13A-E)。

3.3.3. Photo-ARE assay と *in vivo* 結果との比較

光感作性物質の評価に最適な判定基準を検討するため、30 化学物質について photo-ARE assay を実施した (Table 13)。先ほどの陽性判断基準を適用した場合、光感作性物質は 17 物質中 12 物質が、光毒性物質は 6 物質のうち 2 物質が陽性となった。光毒性を示さない 7 物質においては全てが陰性と判定された。動物実験または臨床報告結果と photo-ARE assay の判定結果の一致率、感度および特異度を Table 14 に示す。光感作性物質および光毒性物質を対象とした場合、一致率は 70%、感度は 61%、特異度は 100% であった (Table 14A)。一方、光感作性物質のみを対象とした場合、一致率は 77%、感度は 71%、特異度は 85% であった (Table 14B)。



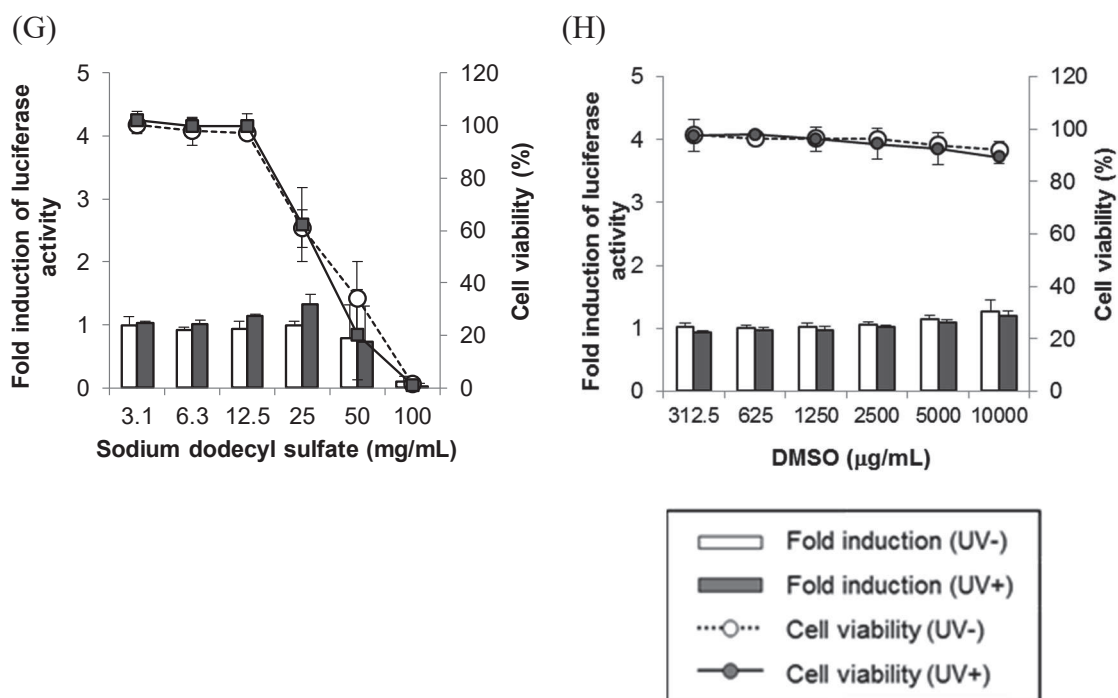


Figure 13. Effects of chemicals, together with 5 J/cm^2 UV/VIS irradiation, on luciferase activity and cell viability. 3, 3', 4', 5-tetrachlorosalicylanilide (TCSA) (A), bithionol (B), chlorpromazine HCl (C), ketoprofen (D), musk ambrette (E), 5-methoxypsoralen (F), sodium dodecyl sulfate (G) and DMSO (H). Cells were irradiated at 5 J/cm^2 UV/VIS at 1.7 mW/cm^2 after treatment with the test chemical. After irradiation, cells were further incubated for 24 h at 37°C . Induction (fold) of luciferase activity and cell viability were calculated. The results are expressed as the mean \pm SD of at least three independent experiments.

Table 13. Chemical information and results of photo-ARE assay of 30 chemicals.

Sample name	CAS	in vivo or clinical data					Results of photo-ARE assay					Solvent	Reference
		photoallergic	phototoxic	Judge	N ^a	I _{max} ^b (UV+/UV-)	C _{max} ^c (µg/ml)	Average of fold induction at C _{max} ^d (UV+)	Average of fold induction at C _{max} ^d (UV-)				
Photoallergenic/phototoxic chemicals													
Acridine	260-94-6	-	+	N	1/3	1.53	0.25	1.79	1.17	DMSO	(58)		
Amiodarone HCl	19774-82-4	-	+	P	3/3	1.78	3.75	1.89	1.06	DMSO	(56)		
Antracene	120-12-7	-	+	P	3/3	1.86	0.0125	1.98	1.08	DMSO	(58)		
Benzophenone	119-61-9	+		P	3/3	3.26	9.25	3.18	0.98	DMSO	(97)		
Benzylamine HCl	132-69-4	+		N	1/3	1.48	157.5	1.65	1.11	PBS	(2)		
Bithionol	97-18-7	+	+	P	2/3	3.19	1.875	2.10	0.93	DMSO	(58)		
Chlorpromazine HCl	69-09-0	+	+	P	3/3	2.55	0.9375	2.98	1.17	DMSO	(58)		
Diclofenac sodium salt	15307-79-6	+	+	P	3/3	2.13	210	2.71	1.25	DMSO	(56)		
Enoxacin	74011-58-8	+		P	3/3	2.42	13.75	2.52	1.04	DMSO	(64)		
Furosemide	54-31-9	-	+	N	1/3	1.51	500	1.78	1.18	DMSO	(96)		
Indomethacin	53-86-1	+	+	N	0/3	1.29	87.5	1.26	0.97	DMSO	(56)		
Ketoprofen	22071-15-4	+	-	P	3/3	3.19	6.25	3.14	0.99	DMSO	(58)		
5-Methoxypsoralen	484-20-8	-	+	N	1/3	1.40	0.0375	1.46	1.04	DMSO	(58)		
6-Methylcoumarin	92-48-8	+	+	P	3/3	4.52	250	4.92	1.11	DMSO	(58)		
Musk ambrette	83-66-9	+	-	P	2/3	1.68	3.25	1.62	0.96	DMSO	(56)		
Piroxicam	36322-90-4	+	+	N	0/3	0.97	500	0.87	0.89	DMSO	(95)		
p-Phenylene diamine	106-50-3	+	+	P	2/3	1.71	156.25	5.48	3.20	DMSO	(94)		
Prometazine HCl	58-33-3	+	+	P	3/3	2.35	3.75	3.49	1.48	DMSO	(58)		
Sulfanilamide	63-74-1	+		N	1/3	1.06	2500	1.12	1.06	DMSO	(56)		
Tenoxicam	59804-37-4	+		N	0/3	1.44	1000	2.11	1.45	DMSO	(95)		
TCSA	1154-59-2	+	+	P	2/3	4.03	0.625	5.99	1.55	DMSO	(93)		
3,4,5-Tribromosalicylanilide	87-10-5	+	+	P	3/3	5.57	1.875	8.25	1.48	DMSO	(56)		
Trilocobarban	101-20-2	+		N	0/3	1.09	0.46875	1.60	1.41	DMSO	(56)		
Non-phototoxic chemicals													
L-(+)-Ascorbic acid	50-81-7	-	-	N	0/3	1.23	337.5	1.36	1.10	PBS	(56)		
Dextran	9004-54-0	-	-	N	0/3	0.94	1250	0.95	1.02	PBS			
DMSO	67-68-5	-	-	N	0/3	0.96	2500	1.02	1.06	PBS	(56)		
Lactic Acid	50-21-5	-	-	N	0/3	0.97	750	1.08	1.11	PBS	(56)		
Methylsalicylate	119-36-8	-	-	N	0/3	1.02	150	1.05	1.03	DMSO	(56)		
Penicillin G sodium salt	69-57-8	-	-	N	0/3	1.20	10000	1.75	1.47	PBS	(56)		
Sodium dodecyl sulfate	151-21-3	-	-	N	0/3	0.94	3.125	1.04	1.00	PBS	(58)		

^aN, Number of repetitions with significant luciferase induction/number of repetitions made; ^bI_{max}, The highest average value of fold induction of luciferase activity at each test concentration among the three repetitions; ^cC_{max}, Concentration for I_{max}; ^dAverage of fold induction at C_{max}, The average value excluding data rejected because of cytotoxicity; N, Negative; P, Positive.

Table 14. Correlation between *in vivo* or clinical data for photoallergenic /phototoxic chemicals (A) and photoallergens (B) and photo-ARE assay results.

(A)

		Photo-ARE assay	
		Positive	Negative
<i>in vivo</i> or clinical data	Photoallergenic/phototoxic chemicals	14	9
	Non-phototoxic chemicals	0	7
Accuracy		70%	
Sensitivity		61%	
Specificity		100%	

(B)

		Photo-ARE assay	
		Positive	Negative
<i>in vivo</i> or clinical data	Photoallergenic chemicals	12	5
	Non-photoallergenic chemicals	2	11
Accuracy		77%	
Sensitivity		71%	
Specificity		85%	

Grey shading indicates that the same results were obtained in *in vivo* or clinical data and in the photo-ARE assay.

第 4 節 考察

Keap1-Nrf2-ARE pathway は、皮膚感作性において鍵となる反応とされており、*in vitro* 皮膚感作性試験である ARE assay や KeratinoSens™ に用いられているシグナル経路である。光感作においても、感作と同様に Keap1-Nrf2-ARE pathway が重要な反応の一つと考えられたことから、本章において、本シグナル経路が光感作性物質の検出に応用可能かどうか検討を行った。

最初に実施した UV/VIS 照射条件の検討において、細胞培養液に含まれる物質によって UV/VIS 照射時に Keap1-Nrf2-ARE pathway が活性化されることが示された。細胞培養液中には pH 指示薬として UV 吸収のある phenol red が配合されており、これが活性化を引き起こした原因と考えられたが、phenol red を含まない細胞培養液を用いた実験においても Keap1-Nrf2-ARE pathway は活性化されたことから (data not shown), phenol red 以外の血清タンパク等が影響すると考えられた。培地を PBS (+) に置換後に UV/VIS 照射を行うことで、この活性化は大きく抑えられ、化学物質処理によるシグナルの活性化を検出可能であることが示された。代表的な光感作原である 6-MC を用いた検討より、photo-ARE assay の照射条件は 1.7 mW/cm^2 の強度で 5 J/cm^2 と設定した。この照射条件は 3T3 NRU PT (48) と同一であり、さらに 5 J/cm^2 は、ヒトで光接触皮膚炎を誘発するのに十分な照射量と報告されている (98)。

次に、光感作性物質または光毒性物質として報告されている化学物質を用いて光感作性物質の陽性判断基準の設定を行った。ARE assay は *in vitro* 皮膚感作性試験法として報告された試験であるため、光感作性を判断するためには、UV/VIS 照射時のルシフェラーゼ活性の亢進を非照射時と比較することが必須となる。30 化学物質での検討の結果、UV/VIS 照射時に媒体対照および非照射時と比較してルシフェラーゼ活性がともに 1.5 倍以上になる時を陽性と判断した場合、photo-ARE assay とヒト臨床報告を含む *in vivo* との一致率は 70% と良好な値を示した。偽陰性となった化学物質のうち、sulfanilamide は UVB 領域を吸収することが知られている (99)。Photo-ARE assay においては、強い細胞毒性を有する UVB 領域をカットする H1 フィルターを使用しているため、UVB 領域を吸収する光感作性物質に関しては、本プロトコルで陽性と捉えることは難しいと考えられる。Trichlocarban は UV/VIS 照射

時、非照射時ともに顕著にルシフェラーゼ活性の誘導が認められたが、その比をとると陽性基準である 1.5 倍に満たず、結果として photo-ARE assay は陰性と評価された。Trichlocarban はヒトパッチテストにおいて感作性陽性と報告されている物質であり (100)、感作性物質として非照射時にルシフェラーゼ誘導が起きているため、UV/VIS 照射による影響が検出されづらくなっていることが考えられた。Benzidamine HCl および tenoxicam は UV/VIS 照射によりルシフェラーゼ誘導が認められたが、非照射時との比が 1.5 倍以上とならず、結果として陰性と判断された。Piroxicam は UV/VIS 照射時、非照射時ともにルシフェラーゼの誘導は認められなかった。化学物質が Keap1 のチオール基に結合した際に Keap1-Nrf2-ARE pathway が活性化することから、piroxicam はアミノ基に結合する可能性も考えられる。

Photo-ARE assay と *in vivo* との一致率は、光感作性物質および光毒性物質に関しては 70% であったのに対し、光感作性物質のみを対象とすると 77% にわずかに向上した。一方、特異度は光感作性物質および光毒性物質に関して 100% であったが、光感作性物質のみを対象とすると 85% となった。光感作性物質はある程度の光毒性作用も持ち合わせており (59)、さらに、光毒性と光感作は臨床的にも類似する症状であることが多いことから (49)、両者を明確に区別することは困難と考えられるが、光感作物質を対象とした場合の photo-ARE assay の精度は、感作代替法の ARE assay と同程度であり (Table 5)、光感作反応過程における表皮細胞の活性化を正しく評価していると考えられた。

皮膚感作性の LLNA に該当するような光感作の *in vivo* 試験法が存在しないため、現時点において光感作性の強度予測は困難である。しかし、本試験法の開発により、感作反応において鍵となる反応とされるタンパク結合、表皮細胞の活性化、樹状細胞の活性化を全て *in vitro* 試験で検出可能となったことから、感作で検討されているような複数の試験結果を統合して、動物を用いずに化学物質が光感作性を有するかどうかのハザード評価を実施することは可能と考えられる (36-38)。

光毒性、光感作反応において、最初の反応は化学物質が UV を吸収し、それに伴い励起することであり、医薬品開発においてはモル吸光係数 (molar extinction (absorption) coefficient (MEC)) が $1000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 未満であれば更なる光安全性評価

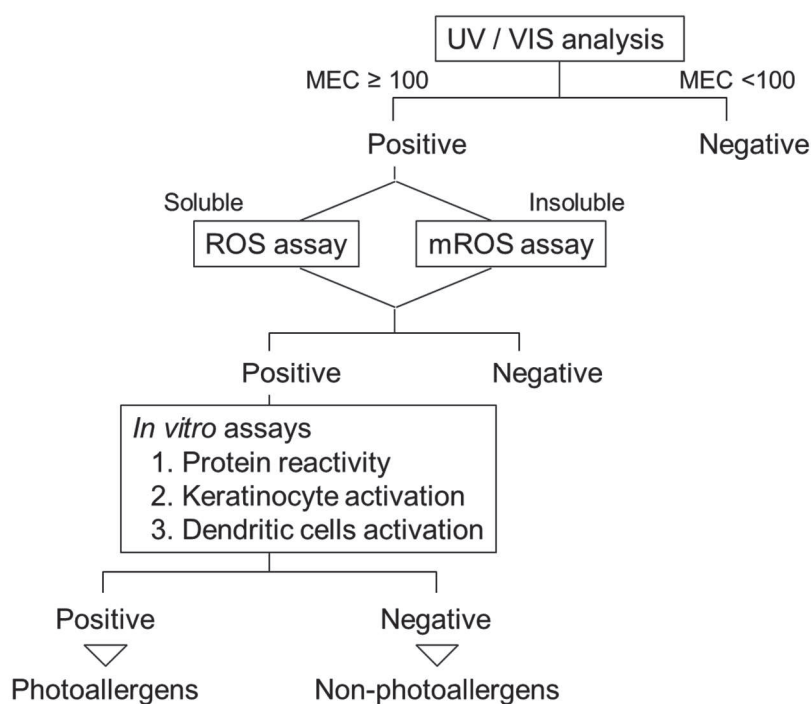


Figure 14. Proposed evaluation scheme for photo-sensitization.

は必要とされず，MEC が $1000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 以上の物質に関しても，ROS assay 等の光反応性試験が陰性の場合には光安全性上の懸念は非常に低いと明記されている (57). 化粧品原料を用いて同一の基準を採用可能であるか検証した結果，光感作性を有する香料成分 musk xylene および光毒性を有する香料成分 musk ketone の MEC が $100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 以上 $1000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 未満であることが示された (99). さらに，MEC が $100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 以上の化粧品原料を ROS assay または難溶性物質を評価可能な mROS assay (101) で評価した際に偽陰性は認められないことから，化粧品原料においては，MEC が $100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 未満の場合には更なる光安全性評価を省略可能， $100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 以上の場合は ROS assay または mROS assay にて陰性が確認されれば，光安全性上の懸念は非常に低いと判断する評価フローが提案されている (99). そこで，このフローを参考に，ROS assay または mROS assay で陽性となった際の光感作性の評価フローを構築した (Fig. 14). 光タンパク結合を評価する試験として，ヒト

血清アルブミンとの光結合性試験 (58) やチオール基またはアミノ基との光結合性試験 (102) が, 樹状細胞の活性化を評価する試験として h-CLAT 光改変法 (60, 61, 63) が報告されている. 本章において, 表皮細胞の活性化を評価する photo-ARE assay を報告した. 感作において重要な反応とされているこれらの反応を *in vitro* 試験で評価し, 3 試験において陰性が確認されれば光感作の懸念は少ないと判断可能であると考えられる.

総括

皮膚感作性は、非常に複雑な免疫応答に基づく反応であり、誘導段階における鍵となる反応に焦点をあてた *in vitro* 試験法や *in silico* 情報を統合し、動物を用いずに毒性の有無や強度を評価する検討が行われてきた (14, 34-40). しかしながら、定量的リスク評価 (9) によりヒトに適用可能な濃度を算出する際に有用な情報となる *in vivo* 感作性試験 LLNA における陽性閾値濃度 EC3 を予測可能な手法に関してはこれまで報告されていなかった. 本研究では、LLNA 陰性物質については陰性となった試験最大濃度を、LLNA 陽性物質については EC3 を LLNA 閾値と定義し、生体反応のような複雑な機構を解明する手法として機械学習の一種であるニューラルネットワーク解析に着目し、LLNA 閾値を予測するモデルの構築を行った.

第 1 章では、感作誘導反応において鍵となる重要な反応とされているタンパク結合を SH test (12), 樹状細胞の活性化を h-CLAT (18, 19) で検討済みの 62 化学物質に関して、表皮細胞の活性化を ARE assay (13) により評価した. 各 *in vitro* 試験結果から得られたパラメーターの中から、LLNA 閾値と有意な相関が認められたパラメーターを抽出した. これらのパラメーターに加え、経皮吸収性の指標として化学物質の疎水性を示す $\log K_{ow}$ をニューラルネットワークの入力層に用いて LLNA 閾値との関連を学習させ、*in vitro* 予測モデルを構築した. 同一データセットを用いた重回帰分析結果と比較すると、実測 LLNA 閾値との相関係数、平均二乗誤差ともにニューラルネットワークを用いた *in vitro* モデルにおいて優れた結果となった.

第 2 章では、206 化学物質について、化学構造の分子軌道法より得られた記述子の中から LLNA 閾値と有意な相関が認められ、かつ互いに高い相関を示さない独立した記述子を抽出した. 抽出した記述子をニューラルネットワークの入力層に用いて、第 1 章と同様に LLNA 閾値との関連を学習させ、*in silico* 予測モデルを構築した. さらに、両モデルともに実際の感作性強度よりも弱く予測する過小評価物質が存在することから、過小評価物質数を減少させることを目的として、両モデルにおける予測 LLNA 閾値の低値を採用する複合モデルを立案した. 複合モデルで評価することで、過小評価物質に関しては LLNA 閾値の予測値と実測値との乖離が小さくな

る。ヒト許容濃度は定量的リスク評価後に製品タイプの使用量を考慮することによって、LLNA 閾値を基に算出されることから、複合モデルはヒトへの適用濃度の決定にあたり、よりリスクを低減させたモデルであると考えられる。

現在、本研究で構築したニューラルネットワークモデルは、OECD ガイダンスの候補の一つとして検討が進められている。本研究の後 *in vitro* 感作性試験法である DPRA, KeratinoSensTM, h-CLAT がそれぞれ OECD ガイドライン法として採択された (81-83)。*In vitro* モデルにおいては SH test, ARE assay, h-CLAT の結果を用いたが、より多くの背景データを有するバリデートされたガイドライン法の結果を用いることにより信頼性の向上が、さらには、評価物質数を増やし、モデルに用いる化学物質を増やすことで、より良好なモデルとなることが期待される。

第 3 章では、表皮細胞の活性化に関連する Keap1-Nrf2-ARE pathway に着目し、photo-ARE assay を開発した。UV/VIS 照射時の溶液や照射条件を最適化することで、光感作性物質を検出可能であることを示した。光感作は、抗原の形成に紫外線のエネルギーを要する以外は、感作と同様の免疫反応であると考えられている (45)。これまで、タンパク結合や樹状細胞の活性化を評価する *in vitro* 光感作試験法は報告されていた一方で、表皮細胞の活性化を検出する試験系は報告されていなかった。本研究によって、感作代替法研究において着目されている Keap1-Nrf2 シグナル経路が光感作性にも関与することが明らかとなり、光感作成立過程において鍵となると考えられる反応が *in vitro* で評価可能となった。現時点において光感作の強度を算出可能な *in vivo* 試験法ガイドラインはないため、光感作の強度を予測する代替評価法の構築は困難である。しかしながら光感作性の有無に関しては感作代替法で検討されてきたような複数の試験を組み合わせた評価が可能であると考えられた。そこで、医薬品開発における光安全性評価フローを参照し、化粧品原料の光感作性評価フローを検討した。化粧品原料に関しては、MEC が $100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 未満の場合に更なる光安全性評価が省略可能であり、MEC が $100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 以上の場合には ROS assay または mROS assay にて陰性が確認されれば光安全性の懸念は低いと考えられた (99)。ROS assay または mROS assay にて陽性となった場合には、光感作反応で重要な反応とされている光タンパク結合、表皮細胞の活性化、樹状細胞の活性化をそれ

ぞれ *in vitro* 試験にて検討し、全ての試験において陰性の場合のみヒトへ適用可能とする評価フローを構築した。

以上、本研究では、皮膚感作性に関してはヒト適用可能濃度算出を目的としたリスク評価、光感作性に関しては毒性の有無を評価するハザード評価について、*in vitro* 試験結果や *in silico* 情報を組み合わせた評価法を構築した。本評価法は、香粧品原料の感作性または光感作性を、動物を用いずに評価する具体的フローであり、今後の香粧品開発の一助になることが期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始懇切なるご指導を賜りました静岡県立大学 薬学部 薬物動態学分野 尾上 誠良 教授に心より感謝申し上げます。

また、本論文の審査過程において、ご助言とご指導を賜りました静岡県立大学 薬学部 生命物理化学講座 橋本 博 教授、衛生分子毒性学講座 吉成 浩一 教授、生体情報分子解析学講座 黒川 洵子 教授に厚く感謝の意を表します。

本研究の機会を与えて下さいました株式会社資生堂 安全性・解析センター 知久 真巳 センター長、佐々 齊 氏、上月 裕一 氏に深く感謝いたします。

共同研究者としてご助言とご指導を賜りました東北大学大学院 医学系研究科 皮膚科 相場 節也 教授および浜松医科大学医学部 皮膚科学講座 戸倉 新樹 教授に深く感謝申し上げます。

研究推進にあたり、多くのご助言を戴きました国立医薬品食品衛生研究所 足利 太可雄氏、株式会社資生堂 廣田 衛彦氏、跡部 朋美氏に御礼申し上げます。また、実験のサポートをして下さいました長内 京子氏、佐藤 まき世氏に感謝いたします。

最後に、いつも温かく見守り、多大な協力のもと本研究を支えてくれた家族に心より感謝いたします。

参考文献

1. I. Kimber, D. A. Basketter, G. F. Gerberick, R. J. Dearman, Allergic contact dermatitis. *Int. Immunopharmacol.* **2**, 201–11 (2002).
2. Y. Tokura, Photoallergy. *Expert Rev. Dermatol.* **4**, 263–70 (2009).
3. B. Magnusson, A. M. Kligman, The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *J. Invest. Dermatol.* **52**, 268–76 (1969).
4. E. V. Buehler, Delayed contact hypersensitivity in the guinea pig. *Arch. Dermatol.* **91**, 171–7 (1965).
5. OECD guideline for the testing of chemicals. TG429. Skin sensitization: Local lymph node assay. (2010).
6. A. M. Api, D. Basketter, J. Lalko, Correlation between experimental human and murine skin sensitization induction thresholds. *Cutan. Ocul. Toxicol.* **34**, 298–302 (2015).
7. D. A. Basketter *et al.*, Predictive identification of human skin sensitization thresholds. *Contact dermatitis* **53**, 260–7 (2005).
8. K. Schneider, Z. Akkan, Quantitative relationship between the local lymph node assay and human skin sensitization assays. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **39**, 245–55 (2004).
9. A. M. Api *et al.*, Dermal sensitization quantitative risk assessment (QRA) for fragrance ingredients. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **52**, 3-23 (2008).
10. The adverse outcome pathway for skin sensitisation initiated by covalent binding to proteins part 1: Scientific evidence. Series on testing and assessment No.168 (2012).
11. G. F. Gerberick *et al.*, Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: a classification tree model approach. *Toxicol. Sci.* **97**, 417–27 (2007).
12. M. Suzuki, M. Hirota, S. Hagino, H. Itagaki, S. Aiba, Evaluation of changes of

- cell-surface thiols as a new biomarker for in vitro sensitization test. *Toxicol. In Vitro* **23**, 687–96 (2009).
13. A. Natsch, R. Emter, Skin sensitizers induce antioxidant response element dependent genes: application to the in vitro testing of the sensitization potential of chemicals. *Toxicol. Sci.* **102**, 110–9 (2008).
 14. C. Bauch *et al.*, Putting the parts together: combining in vitro methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **63**, 489–504 (2012).
 15. R. Emter, G. Ellis, A. Natsch, Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **245**, 281–90 (2010).
 16. V. Galbiati *et al.*, Further development of the NCTC 2544 IL-18 assay to identify in vitro contact allergens. *Toxicol. In Vitro* **25**, 724–32 (2011).
 17. K. Saito *et al.*, Development of a new in vitro skin sensitization assay (Epidermal Sensitization Assay; EpiSensA) using reconstructed human epidermis. *Toxicol. In Vitro* **27**, 2213–24 (2013).
 18. T. Ashikaga *et al.*, Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. In Vitro* **20**, 767–73 (2006).
 19. H. Sakaguchi *et al.*, Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT). II. An inter-laboratory study of the h-CLAT. *Toxicol. In Vitro* **20**, 774–84 (2006).
 20. C. Piroird *et al.*, The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* **29**, 901–16 (2015).
 21. H. Reuter *et al.*, Evaluation of an optimized protocol using human peripheral blood monocyte derived dendritic cells for the in vitro detection of sensitizers: Results of a ring study in five laboratories. *Toxicol. In Vitro* **29**, 976–86 (2015).
 22. T. Takahashi *et al.*, An in vitro test to screen skin sensitizers using a stable THP-

- 1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicol. Sci.* **124**, 359–69 (2011).
23. I. Chipinda, J. M. Hettick, P. D. Siegel, Haptenation: chemical reactivity and protein binding. *J. Allergy* **2011**, 839682 (2011).
 24. D. Byamba, T. G. Kim, D. H. Kim, J. H. Je, M. G. Lee, The roles of reactive oxygen species produced by contact allergens and irritants in monocyte-derived dendritic cells. *Ann. Dermatol.* **22**, 269–78 (2010).
 25. C. Migdal *et al.*, Sensitization effect of thimerosal is mediated in vitro via reactive oxygen species and calcium signaling. *Toxicology* **274**, 1–9 (2010).
 26. Z. El Ali *et al.*, Allergic skin inflammation induced by chemical sensitizers is controlled by the transcription factor Nrf2. *Toxicol. Sci.* **134**, 39–48 (2013).
 27. A. Natsch, The Nrf2-Keap1-ARE toxicity pathway as a cellular sensor for skin sensitizers--functional relevance and a hypothesis on innate reactions to skin sensitizers. *Toxicol. Sci.* **113**, 284–92 (2010).
 28. A. T. Dinkova-Kostova, W. D. Holtzclaw, T. W. Kensler, The role of Keap1 in cellular protective responses. *Chem. Res. Toxicol.* **18**, 1779–91 (2005).
 29. E. Kansanen, S. M. Kuosmanen, H. Leinonen, A. L. Levonen, The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* **1**, 45–9 (2013).
 30. S. Aiba, S. I. Katz, Phenotypic and functional characteristics of in vivo-activated Langerhans cells. *J. Immunol.* **145**, 2791–6 (1990).
 31. H. Ozawa, S. Nakagawa, H. Tagami, S. Aiba, Interleukin-1 beta and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mediate Langerhans cell maturation differently. *J. Invest. Dermatol.* **106**, 441–5 (1996).
 32. M. J. Toebak *et al.*, CXCL8 secretion by dendritic cells predicts contact allergens from irritants. *Toxicol. In Vitro* **20**, 117–24 (2006).
 33. I. R. Jowsey, D. A. Basketter, C. Westmoreland, I. Kimber, A future approach to measuring relative skin sensitising potency: a proposal. *J. Appl. Toxicol.* **26**, 341–50 (2006).

34. D. Urbisch *et al.*, Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **71**, 337–51 (2015).
35. J. Strickland *et al.*, Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. *J. Appl. Toxicol.* **36**, 1150–62 (2016).
36. Y. Nukada, M. Miyazawa, S. Kazutoshi, H. Sakaguchi, N. Nishiyama, Data integration of non-animal tests for the development of a test battery to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals. *Toxicol. In Vitro* **27**, 609–18 (2013).
37. A. Natsch, R. Emter, G. Ellis, Filling the concept with data: integrating data from different in vitro and in silico assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing. *Toxicol. Sci.* **107**, 106–21 (2009).
38. J. Jaworska, A. Harol, P. S. Kern, G. F. Gerberick, Integrating non-animal test information into an adaptive testing strategy - skin sensitization proof of concept case. *ALTEX* **28**, 211–25 (2011).
39. J. Jaworska, Y. Dancik, P. Kern, F. Gerberick, A. Natsch, Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. *J. Appl. Toxicol.* **33**, 1353–64 (2013).
40. J. M. McKim, Jr., D. J. Keller, 3rd, J. R. Gorski, A new in vitro method for identifying chemical sensitizers combining peptide binding with ARE/EpRE-mediated gene expression in human skin cells. *Cutan. Ocul. Toxicol.* **29**, 171–92 (2010).
41. C. W. Lim, S. Fujiwara, F. Yamashita, M. Hashida, Prediction of human skin permeability using a combination of molecular orbital calculations and artificial neural network. *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 361–6 (2002).
42. S. Fujiwara, F. Yamashita, M. Hashida, QSAR analysis of interstudy variable skin permeability based on the "latent membrane permeability" concept. *J. Pharm. Sci.* **92**, 1939–46 (2003).

43. S. Fujiwara, F. Yamashita, M. Hashida, Prediction of Caco-2 cell permeability using a combination of MO-calculation and neural network. *Int. J. Pharm.* **237**, 95–105 (2002).
44. J. E. Dayhoff, J. M. DeLeo, Artificial neural networks: opening the black box. *Cancer* **91**, 1615–35 (2001).
45. M. Takigawa, Y. Miyachi, Mechanisms of contact photosensitivity in mice: I. T cell regulation of contact photosensitivity to tetrachlorosalicylanilide under the genetic restrictions of the major histocompatibility complex. *J. Invest. Dermatol.* **79**, 108–15 (1982).
46. J. J. Inbaraj, B. M. Kukielczak, C. F. Chignell, Phloxine B phototoxicity: a mechanistic study using HaCaT keratinocytes. *Photochem. Photobiol.* **81**, 81–8 (2005).
47. S. Onoue, Y. Tsuda, Analytical studies on the prediction of photosensitive/phototoxic potential of pharmaceutical substances. *Pharm. Res.* **23**, 156–64 (2006).
48. OECD guideline for testing of chemicals. TG432. In vitro 3T3 NRU phototoxicity test. (2004).
49. J. W. Gould, M. G. Mercurio, C. A. Elmetts, Cutaneous photosensitivity diseases induced by exogenous agents. *J. Am. Acad. Dermatol.* **33**, 551–73 (1995).
50. Y. Tokura, Immune responses to photohaptens: implications for the mechanisms of photosensitivity to exogenous agents. *J. Dermatol. Sci.* **23 Suppl 1**, S6–9 (2000).
51. T. Maurer, E. G. Weirich, R. Hess, Predictive animal testing for photocontact allergenicity. *Br. J. Dermatol.* **103**, 593–605 (1980).
52. H. Ichikawa, R. B. Armstrong, L. C. Harber, Photoallergic contact dermatitis in guinea pigs: improved induction technique using Freund's complete adjuvant. *J. Invest. Dermatol.* **76**, 498–501 (1981).
53. W. P. Jordan, Jr., The guinea pig as a model for predicting photoallergic contact

- dermatitis. *Contact dermatitis* **8**, 109–16 (1982).
54. G. F. Gerberick, C. A. Ryan, A predictive mouse ear-swelling model for investigating topical photoallergy. *Food Chem. Toxicol.* **28**, 361–8 (1990).
 55. P. Ulrich, B. Homey, H. W. Vohr, A modified murine local lymph node assay for the differentiation of contact photoallergy from phototoxicity by analysis of cytokine expression in skin-draining lymph node cells. *Toxicology* **125**, 149–68 (1998).
 56. S. Onoue *et al.*, Establishment and intra-/inter-laboratory validation of a standard protocol of reactive oxygen species assay for chemical photosafety evaluation. *J. Appl. Toxicol.* **33**, 1241–50 (2013).
 57. ICH harmonized tripartite guideline. Photosafety evaluation of pharmaceuticals S10. (2014).
 58. W. W. Lovell, P. A. Jones, Evaluation of mechanistic in vitro tests for the discrimination of photoallergic and photoirritant potential. *Altern. Lab. Anim.* **28**, 707–24 (2000).
 59. M. Kurita *et al.*, Induction of keratinocyte apoptosis by photosensitizing chemicals plus UVA. *J. Dermatol. Sci.* **45**, 105–12 (2007).
 60. M. Hoya *et al.*, Development of an in vitro photosensitization assay using human monocyte-derived cells. *Toxicol. In Vitro* **23**, 911–8 (2009).
 61. N. Karschuk *et al.*, A novel in vitro method for the detection and characterization of photosensitizers. *PLoS. One* **5**, e15221 (2010).
 62. V. Galbiati, V. Martinez, S. Bianchi, M. Mitjans, E. Corsini, Establishment of an in vitro photoallergy test using NCTC2544 cells and IL-18 production. *Toxicol. In Vitro* **27**, 103–10 (2013).
 63. R. Hino *et al.*, Evaluation of photoallergic potential of chemicals using THP-1 cells. *J. Dermatol. Sci.* **52**, 140–3 (2008).
 64. Y. Tokura, Quinolone photoallergy: photosensitivity dermatitis induced by systemic administration of photohaptenic drugs. *J. Dermatol. Sci.* **18**, 1–10 (1998).

65. Y. Tokura, M. Ogai, H. Yagi, M. Takigawa, Afloqualone photosensitivity: immunogenicity of afloqualone-photomodified epidermal cells. *Photochem. Photobiol.* **60**, 262–7 (1994).
66. E. Pasomsub, C. Sukasem, S. Sungkanuparph, B. Kijirikul, W. Chantratita, The application of artificial neural networks for phenotypic drug resistance prediction: evaluation and comparison with other interpretation systems. *Jpn. J. Infect. Dis.* **63**, 87–94 (2010).
67. D. A. Basketter, Methylidibromoglutaronitrile: skin sensitization and quantitative risk assessment. *Cutan. Ocul. Toxicol.* **29**, 4–9 (2010).
68. D. Basketter, I. Kimber, in *Textbook of Contact Dermatitis, 5th ed.*, R. J. G. Rycroft, Menne, T., Frosch, P.J., Lepoittevin, J.P., Ed. (Springer, Berlin, 2011), chap. 13, pp. 229–40.
69. D. A. Basketter, E. W. Scholes, Comparison of the local lymph node assay with the guinea-pig maximization test for the detection of a range of contact allergens. *Food Chem. Toxicol.* **30**, 65–9 (1992).
70. C. A. Ryan *et al.*, Examination of a vehicle for use with water soluble materials in the murine local lymph node assay. *Food Chem. Toxicol.* **40**, 1719–25 (2002).
71. G. F. Gerberick *et al.*, A chemical dataset for evaluation of alternative approaches to skin-sensitization testing. *Contact dermatitis* **50**, 274–88 (2004).
72. G. F. Gerberick *et al.*, Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicol. Sci.* **81**, 332–43 (2004).
73. G. F. Gerberick *et al.*, Compilation of historical local lymph node data for evaluation of skin sensitization alternative methods. *Dermatitis* **16**, 157–202 (2005).
74. I. Kimber *et al.*, Classification of contact allergens according to potency: proposals. *Food Chem. Toxicol.* **41**, 1799–809 (2003).
75. Y. Nukada *et al.*, Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin

- sensitization potency. *Toxicol. In Vitro* **26**, 1150–60 (2012).
76. M. Hirota *et al.*, Artificial neural network analysis of data from multiple in vitro assays for prediction of skin sensitization potency of chemicals. *Toxicol. In Vitro* **27**, 1233–46 (2013).
 77. J. A. Cooper, 2nd, R. Saracci, P. Cole, Describing the validity of carcinogen screening tests. *Br. J. Cancer* **39**, 87–9 (1979).
 78. R. H. Guy, R. O. Potts, Penetration of industrial chemicals across the skin: a predictive model. *Am. J. Ind. Med.* **23**, 711–9 (1993).
 79. K. Narita *et al.*, Improvement of human cell line activation test (h-CLAT) using short-time exposure methods for prevention of false-negative results. *Toxicol. Sci.* **43**, 229–40 (2018).
 80. M. Vocanson *et al.*, Human T cell priming assay: depletion of peripheral blood lymphocytes in CD25(+) cells improves the in vitro detection of weak allergen-specific T cells. *EXS* **104**, 89–100 (2014).
 81. OECD guideline for the testing of chemicals. TG 442C. In chemico skin sensitisation: Direct peptide reactivity assay (DPRA). (2015).
 82. OECD guideline for the testing of chemicals. TG 442D. In vitro skin sensitisation: ARE-Nrf2 luciferase test method. (2015).
 83. OECD guideline for the testing of chemicals. TG 442E. In vitro skin sensitisation assays addressing the key event on activation of dendritic cells on the adverse outcome pathway for skin sensitization. (2017).
 84. A. Fedorowicz, L. Zheng, H. Singh, E. Demchuk, QSAR study of skin sensitization using local lymph node assay data. *Int. J. Mol. Sci.* **5**, 56–66 (2004).
 85. A. Fedorowicz, H. Singh, S. Soderholm, E. Demchuk, Structure-activity models for contact sensitization. *Chem. Res. Toxicol.* **18**, 954–69 (2005).
 86. G. Patlewicz, D. W. Roberts, E. Uriarte, A comparison of reactivity schemes for the prediction skin sensitization potential. *Chem. Res. Toxicol.* **21**, 521–41 (2008).
 87. D. W. Roberts, A. O. Aptula, M. T. Cronin, E. Hulzebos, G. Patlewicz, Global

- (Q)SARs for skin sensitisation: assessment against OECD principles. *SAR QSAR Environ. Res.* **18**, 343–65 (2007).
88. Review of data sources, QSARs and integrated testing strategies for skin sensitization. JRC Scientific and technical reports. EUR 23225 EN. (2008).
89. The QSAR Toolbox for grouping chemicals into categories. <https://www.qsartoolbox.org>, (accessed 2018-5-28).
90. W. Teubner *et al.*, Computer models versus reality: how well do in silico models currently predict the sensitization potential of a substance. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **67**, 468–85 (2013).
91. D. A. Basketter, D. Sanders, I. R. Jowsey, The skin sensitization potential of resorcinol: experience with the local lymph node assay. *Contact dermatitis* **56**, 196–200 (2007).
92. M. D. Barratt *et al.*, Development of an expert system rulebase for identifying contact allergens. *Toxicol. In Vitro* **8**, 837–9 (1994).
93. T. Nishijima, Y. Tokura, G. Imokawa, M. Takigawa, Photohaptens TCSA painting plus UVA irradiation of murine skin augments the expression of MHC class II molecules and CD86 on Langerhans cells. *J. Dermatol. Sci.* **19**, 202–7 (1999).
94. M. J. LeVine, Idiopathic photodermatitis with a positive paraphenylenediamine photopatch test. *Arch. Dermatol.* **120**, 1488–90 (1984).
95. T. Hariya, J. Osawa, K. Kitamura, Z. Ikezawa, Piroxicam has at least two epitopes for contact photoallergy. *J. Dermatol. Sci.* 219–24 (1993).
96. F. Vargas *et al.*, Photodegradation and phototoxicity studies of furosemide. Involvement of singlet oxygen in the photoinduced hemolysis and lipid peroxidation. *J. Photochem. Photobiol. B.* **42**, 219–25 (1998).
97. M. Landers, S. Law, F. J. Storrs, Contact urticaria, allergic contact dermatitis, and photoallergic contact dermatitis from oxybenzone. *Am. J. Contact Dermat.* **14**, 33–4 (2003).
98. T. Hasan, C. T. Jansen, Photopatch test reactivity: effect of photoallergen

- concentration and UVA dosaging. *Contact dermatitis* **34**, 383–6 (1996).
99. S. Onoue *et al.*, Non-animal photosafety assessment approaches for cosmetics based on the photochemical and photobiochemical properties. *Toxicol. In Vitro* **27**, 2316–24 (2013).
 100. S. Agren-Jonsson, B. Magnusson, Sensitization to propantheline bromide, trichlorocarbanilide and propylene glycol in an antiperspirant. *Contact dermatitis* **2**, 79–80 (1976).
 101. Y. Seto, M. Kato, S. Yamada, S. Onoue, Development of micellar reactive oxygen species assay for photosafety evaluation of poorly water-soluble chemicals. *Toxicol. In Vitro* **27**, 1838–46 (2013).
 102. S. Oeda *et al.*, Development of an in vitro photosensitization test based on changes of cell-surface thiols and amines as biomarkers: the photo-SH/NH₂ test. *Toxicol. Sci.* **41**, 129–42 (2016).

