

## 評価報告書

皮膚感作性試験代替法 ADRA:アミノ酸誘導体結合性試験

皮膚感作性試験資料編纂委員会

令和5年(2023年)12月12日

皮膚感作性試験資料編纂委員会

福山朋季（委員長：麻布大学）

安達玲子（国立医薬品食品衛生研究所）

大竹利幸（株式会社資生堂）

小島幸一（一般財団法人 食品薬品安全センター）

小島 肇（国立医薬品食品衛生研究所）

瀬崎拓人（三井化学株式会社）

武吉正博（一般財団法人 化学物質評価研究機構）

## 要旨

皮膚感作性初期段階の反応であるタンパク質と化学物質の結合反応を対象とした代替法であるペプチド結合性試験(Direct Peptide Reactivity Assay : DPRA)は、システインあるいはリジンを含むペプチドと化学物質の結合反応を機器分析によって評価する簡単な手法であり、2015年にOECD 試験法ガイドライン(Test Guidelien : TG)に収載された。しかし、DPRAは、反応液中での被験物質の析出や共溶出が起りやすく、且つ混合物の感作性評価ができない等の課題があった。日本で開発されたアミノ酸誘導体結合性試験(Amino acid Derivative Reactivity Assay : ADRA)は、DPRAと同じ原理であるが、求核試薬としてナフタレン環を導入したシステインあるいはリジンをを用い、被験物質と混合・反応させた後、紫外線(Ultra Violet : UV)検出器および蛍光(Fluorescence : FL)検出器を搭載した高速液体クロマトグラフィー(High Performance Liquid Chromatography : HPLC)で分析することで、これらの課題を克服することができる。ADRAの使用法は、被験物質の情報や状態によって異なる。分子量が既知の被験物質については、4 mMに調製した被験物質溶液を用いたADRA(4 mM)、混合物のような分子量が未知の被験物質については、0.5 mg/mLに調製した被験物質溶液を用いたADRA(0.5 mg/mL)を使用する。共溶出が認められる場合は、FL検出器を用いたADRA-FL法が使用できる。

ADRAは、最初、1 mMに調製した被験物質溶液を用いたADRA(1 mM)が、2019年にOECDのTGに収載された。その後、混合物の感作性評価を可能にするためのADRA(0.5 mg/mL)、求核試薬を蛍光検出するADRA-FL法および偽陰性物質の数を減らすために開発されたADRA(4 mM)が盛り込まれたOECD TG改定版が2022年に発出された。

ADRA(0.5 mg/mL)およびADRA(4 mM)のバリデーション研究は、5施設において、10化合物および8化合物の習熟度確認物質を対象に、施設内および施設間再現性試験が実施された。なお、HPLCによる求核試薬の測定は、UV検出器とFL検出器の両方で実施し、ADRA-UV法とADRA-FL法の同一性についても検証が行われた。ADRA(0.5 mg/mL)およびADRA(4 mM)の施設内再現性は、ADRA-UV法あるいはADRA-FL法のどちらで測定しても100%であり、施設間再現性も、ADRA-UV法あるいはADRA-FL法のどちらで測定しても100%であり、達成基準(85%)を満たした。また、接触皮膚炎のリスクを動物で予測する試験法として知られているマウスを用いる局所リンパ節試験(Local Lymph Node Assay: LLNA)の試験結果を参照し、ADRA(0.5 mg/mL)およびADRA(4 mM)における正確度(Accuracy)、感度(Sensitivity)および特異度(Specificity)はいずれも100%と報告されている。

ADRAは感作性発現機序における初期の重要な事象であるタンパク質と化学物質の結合反応を検出しており、化学物質の感作性を判断する上で重要な情報を与えてくれる。また、ADRAは、LLNAの1/20程度、DPRAの1/2の経費で実施可能であり、動物を用いない*in chemico*試験法であることから、有用性は高い。しかしながら、本法は代謝系を欠く化学的試験法であり、活性化に代謝系や非生物的活性化を必要とする感作性物質、弱い感作性物質や金属塩などは正しくその感作性が検出されない可能性がある。以上の事実を踏まえ、本資料編纂委員会は、他のKey Event(KE)を対象とした代替法やコンピューターを用いた定量的構造活性相関(Quantitative Structure-Activity Relationship: QSAR)等の*in silico*手法と組み合わせた評価を推奨する。

## 1. 緒言

皮膚感作性を評価することは化学物質の安全性評価において重要である。化学物質の皮膚での接触皮膚炎のリスクを動物で予測する経済協力開発機構(Organisation for Economic Co-operation and Development: OECD) TG としてモルモットを用いる皮膚感作性試験(OECD TG 406)やマウスを用いる局所リンパ節試験(Local Lymph Node Assay: LLNA)がある。LLNAには放射性化合物(Radioisotope: RI)の取込量を測定する LLNA-RI 法(OECD TG 429<sup>1)</sup>)のほか、RI を用いず Adenosine triphosphate(ATP)量を測定する LLNA: DA 法(OECD TG 442A<sup>2)</sup>)や Bromodeoxyuridine(BrdU)量を測定する LLNA: BrdU-ELISA 法および LLNA: BrdU-FCM 法(OECD TG 442B<sup>3)</sup>)がある。

EU における欧州化学品規則(Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals: REACH)では、安全性評価はコンピューターを用いた QSAR モデルや *in vitro* 試験等による代替法が推奨されており、動物実験により安全性が評価された成分を含んだ化粧品の輸入および販売が禁止された(2013年3月全面施行)。そのため、化学物質の皮膚感作性を評価する代替法の開発が進み、動物を用いない多くの代替法が OECD TG として承認されてきている。

皮膚感作性に伴う化学的および生物学的機序に関する最新の知見は、有害性発現経路(Adverse Outcome Pathway: AOP)として提示されている。皮膚感作性は、その AOP に基づく 4 つの Key Event(KE)を経て成立し、下記のように、KE1~KE3 には動物を使わない代替法が開発され、OECD TG 化されている。

KE1: 化学物質とタンパク質の共有結合、DPRA、ADRA および kDPRA(OECD TG 442C)<sup>4)</sup>

KE2: 角化細胞活性化に関連する ARE Nrf2 依存性ルシフェラーゼの発現、KeratinoSens<sup>TM</sup> および LuSens(OECD TG 442D)<sup>5)</sup>

KE3: 特異的細胞表面マーカーの発現およびケモカインやサイトカインの産生、皮膚感作性関連遺伝子群の発現プロファイルを指標とした樹状細胞の活性化、h-CLAT、U-SENS<sup>TM</sup>、IL-8 Luc assay および GARD<sup>TM</sup> skin(OECD TG 442E)<sup>6)</sup>

KE4: リンパ節における T 細胞の増殖、LLNA(OECD TG 429<sup>1)</sup>、TG 442A<sup>2)</sup>および TG 442B<sup>3)</sup>)

DPRA は、求核試薬としてシステイン含有ペプチド(Ac-RFAACAA-COOH)とリジン含有ペプチド(Ac-RFAAKAA-COOH)を用い、それぞれを被験物質と混合・反応させ、24 時間後における未反応のペプチド量を基に被験物質の反応性を分類する手法であり、HPLC 分析が可能な施設であれば容易に実施することができる<sup>4,7,8)</sup>。しかし、DPRA で用いる求核試薬のペプチドは、特異的な UV 吸収や FL がなく、ペプチドの検出波長として 220 nm を用いるため、DPRA の被験物質の調製濃度は、100 mM と高濃度となる。DPRA は反応液中での被験物質の析出<sup>9)</sup>、HPLC の検出時における被験物質と求核試薬の共溶出<sup>10)</sup>、システイン含有ペプチド二量体の多発など試験精度に影響を及ぼす事例<sup>11)</sup>や重量濃度で調製された被験物質溶液や混合物の感作性評価ができないなどの限界があった。

そこで、求核試薬の測定における検出感度を上げるために、求核試薬として、システインおよびリジンに検出部位として高い UV 吸収率を持ち、かつ特定波長の光照射によって強い FL を発するナフタレン環を導入した N-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-cysteine (NAC) および  $\alpha$ -N-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-lysine (NAL) を用いた ADRA が開発された(図 1)<sup>12,13)</sup>。NAC(N-

Acetyl Cystein)およびNALの検出部位であるナフタレン環は281 nmと比較的長波長側に極大吸収波長をもつため、220 nmで検出しているDPRAと比較して検出特異性が高く、被験物質由来の夾雑ピーク(吸収)の影響を受けにくいだけでなく、FL検出器による特異的な検出・定量が可能である<sup>14,15)</sup>。

ADRAは、最初、1 mMに調製した被験物質溶液を用いたADRA(1 mM)のバリデーション研究が始まり、Japanese Center for the Validation of Alternative Methods(JaCVAM)による第三者評価(ピアレビュー)を経て<sup>16-18)</sup>、OECD 専門家会議で議論された後、2019年にOECDのTGに収載された。その後、混合物の感作性評価を可能にするために、0.5 mg/mLの被験物質溶液を用いたADRA(0.5 mg/mL)<sup>19)</sup>、求核試薬をFL検出するADRA-FL法<sup>14,15)</sup>、偽陰性物質の数を減らすために開発されたADRA(4 mM)<sup>20)</sup>が、2022年にOECD TGに盛り込まれ、改定された(Annex 1 参照)。

JaCVAM 皮膚感作性試験資料編纂委員会(以下、委員会)がADRAの皮膚感作性試験代替法としての科学的妥当性について、現在までに公開されている情報をもとに評価したので、その結果を報告する。

## 2. 試験法の原理と方法

OECD TG 442Cに収載されているADRAとDPRAは、KE1の『化学物質とタンパク質の共有結合』に対応した動物および細胞を用いない*in chemico*試験である。

多くの感作性物質は、タンパク質のシステインまたはリジンに結合することから、ADRAは、図1に示すように、システインおよびリジンの検出部位として高いUV吸収やFLを持つナフタレン環を導入したNACおよびNALの2種類を使用する。被験物質とそれぞれの求核試薬を混合し、反応させ、24時間後における未反応の求核試薬量をHPLCで分離定量する(詳細はAnnex 2 参照)。ADRAではNAC二量体をHPLCで定量することができるため、NACのクオリティチェックに利用できるだけでなく、酸化促進作用のある被験物質によるNAC二量体の生成についても予測することができる。求核試薬を検出するHPLCシステムには、UV検出器とFL検出器を直列につなぐことにより、同時検出することができる。これにより、もしUV検出器で共溶出が認められた場合でも、FL検出器で測定した値を採用することができる。ただし、NAC二量体は、UV吸収を持つが、FLは消失するため、原則的にUV検出器で得られた値を採用する。

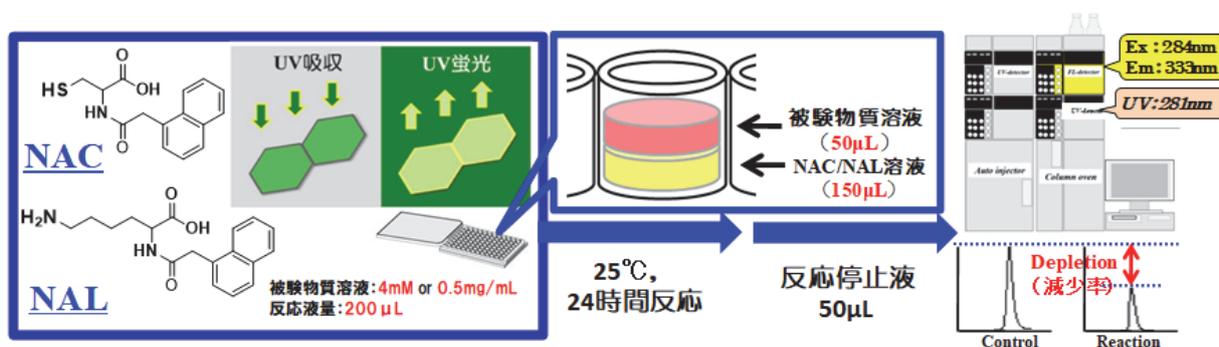


図1 ADRAの概要

### 3. 精度

ADRA (1 mM) は、4 施設に技術移転を実施し、その後に施設内再現性 (Phase I) および施設間再現性 (Phase II) の試験が実施されている。詳細な結果は Annex 3 (表 S3-1~S3-5) に示す。

#### 3-1. ADRA (1 mM) の技術移転性

基本的な実験設備と HPLC 技術を持つ参加施設に、リード施設 (富士フィルム) から 1 日のトレーニングで技術移転は可能であった。プレトレーニング試験として、代表的な感作性物質 4 化合物および非感作性物質 1 化合物、計 5 化合物の評価が行われ (表 S3-1)、4 施設とも 5 化合物の評価はすべて、リード施設の結果と一致した (表 S3-2)。

プレトレーニング試験を終了した参加施設には、トレーニング試験が実施された。トレーニング試験の化合物は、NAC および NAL (以下、NAC/NAL) の減少率の平均値が、閾値に近い化合物を含む 6 化合物の感作性物質と 4 化合物の非感作性物質から成る 10 化合物のデータセットが選択され (表 S3-3)、4 施設の施設内再現性は、それぞれ 100%、90%、100% および 100%、施設間再現性は、80% となり、それぞれ達成基準 (70%) を満たした (表 S3-4)。なお、プレトレーニング試験およびトレーニング試験では、減少率の閾値は、5.05 が使われた。これらの試験の後、NAC の二量体の増加を防ぐため、反応液に EDTA を添加することが決まったため、この条件で 82 化合物の ADRA を再実施し、得られた減少値から閾値を計算したところ、閾値が 4.9 に変更になった。従って、バリデーション研究以降の減少率の閾値は、4.9 が使用された。

#### 3-2. ADRA (1 mM) の施設内再現性および施設間再現性試験<sup>16-18)</sup>

ADRA (1 mM) のバリデーション研究は、4 施設において、10 化合物を対象に施設内再現性試験が実施され、これらの 10 化合物のデータを含む 40 化合物を対象に施設間再現性試験が実施された。4 施設の施設間再現性の結果は、100% (10/10)、100% (10/10)、100% (7/7)、90% (9/10) であった。40 化合物の施設間再現性 (3 施設換算) は 91.9% であり、達成基準 (80%) を満たした (表 1 および表 S3-5)。なお、ADRA の 4 施設におけるバリデーション研究で検証された 40 種類の化合物の LLNA の結果に対する本試験法の正確度は 86.9% (139/160)、感度は 81.5% (88/108)、特異度は 98.1% (51/52) であった。

Dihydroeugenol は、参加施設間で結果がバラついたが、これは、Dihydroeugenol がプレハプテンであり、一部の施設で試験中に酸化して反応性が増加したためと考えられた。Citral および Hydroxycitronellal も参加施設間で結果がバラついたが、これは NAC/NAL の減少率の平均値が閾値付近であったためと考えられた。Dextran も 1 施設のみが陽性の判定であったが、化学構造上は、NAC や NAL と反応する部位がなく、基本的に非反応性であると考えられる。しかしながら、グルコースなどの還元糖の 1 位のアルデヒド基は、それらの 5 位の水酸基と反応して環状構造を形成し、水溶液中では一部が開環し、部分的にアルデヒド基を生成することが知られており<sup>21)</sup>、このアルデヒド基と求核試薬の NAC が反応し、Sciff-base を形成する可能性がある。同様に、Dextran も水溶液中で末端に存在する環状構造の一部が開環して生じたアルデヒド基と NAC が結合し、減少率がわずかに上昇したことが一部の施設で偽陽性が生じた原因と推察される。しかし、改定された TG では、ポリマーは 0.5 mg/mL

に調製した被験物質溶液を用いることとなり、Dextran の場合、本実験条件の 1/8000 程度の濃度となるため、偽陽性になることはないと思われる。

なお、DPRA のバリデーション研究は、ADRA と試験デザインや化合物の種類が異なるため直接の比較はできないが、3 施設の施設内再現性試験の正確度は、66.7%、3 施設の施設間再現性の正確度は 82%と報告されている<sup>22)</sup>。従って、ADRA の施設内および施設間再現性はそれらを上回ることが示されている。

表 1 ADRA の施設内および施設間再現性値

<b>施設内再現性 (Phase I 10物質)</b>			
Lab.A : 100% [=10/10]	Lab.B : 100% [=10/10]	Lab.C : 100% [=7/7]	Lab.D : 90% [=9/10]
<b>施設間再現性 (Phase I 10物質<sup>*1</sup> + Phase II 30物質)</b>			
<b>91.9% (3施設換算値<sup>*2</sup>)</b>			
*1 Phase Iの10物質については3回 (Lab. Cの3物質においては2回) の試験結果におけるAve. scoreの平均値から最終的な判定を行った。			
*2 施設間再現性は通常3施設の結果から計算するため以下の計算方法を用いて4施設の結果から3施設に換算した。			
(1) 4施設のうち1施設を除いた3施設の結果から施設間再現性を計算する ( a) Lab.A除外、 b) Lab.B除外、 c) Lab.C除外、 d) Lab.D除外の4パターン)。			
(2) (1)の4つのパターンの施設間再現性をそれぞれ計算し、4つの施設間再現性の平均値を施設間再現性 (3施設換算値) とする。			

### 3-3. ADRA (0.5 mg/mL) の施設内再現性および施設間再現性試験<sup>23)</sup>

ADRA (0.5 mg/mL) のバリデーション研究は、ADRA (1 mM) のバリデーション研究に参加した 4 施設にリード施設を加えた 5 施設で実施された。また、通常の UV 検出器を用いた測定他に、同じサンプルで FL 検出器を用いた測定も実施し、ADRA-UV 法と ADRA-FL 法の同一性についても相関解析による検証が行われた。ADRA (0.5 mg/mL) の技術移転試験は、被験物質溶液の濃度を 1 mM から 0.5 mg/mL に変更しただけなので、実施されなかった。また、FL 検出器による検出法の技術移転は、UV 検出器の代わりに FL 検出器を使用しただけなので、各施設で NAC および NAL の検量線の測定が正常にできるかどうかの確認のみが実施された。5 施設のうち、1 施設は、2 種類の HPLC システムを用意できなかったために、この施設については、FL 検出器のみ使用された。0.5 mg/mL の被験物質溶液を用いた ADRA-FL 法は、5 施設により 10 種類の習熟度確認物質について施設内および施設間再現性試験が実施され、施設内再現性は 5 施設すべてで 100%、施設間再現性もすべてで 100%であった (表 S3-6-1、S3-6-2 および S3-6-3)。また、0.5 mg/mL の被験物質溶液を用いた ADRA-UV 法は、4 施設により 10 種類の習熟度確認物質について施設内および施設間再現性試験が実施され、施設内再現性は 4 施設すべてで 100%、施設間再現性もすべてで 100%であった。0.5 mg/mL 溶液を用いた ADRA-UV 法と ADRA-FL 法における NAC/NAL の減少率の平均値の相関係数は  $r = 0.99$  ( $p < 0.001$ ) であり極めて強い相関が確認されたことから、両試験法の結果が同等であることが示された。

### 3-4. ADRA (4 mM) の施設内再現性および施設間再現性試験<sup>24)</sup>

ADRA (4 mM) のバリデーション研究も、ADRA (0.5 mg/mL) のバリデーション研究と同様に ADRA (1 mM) に参加した 4 施設にリード施設を加えた 5 施設で実施された。試験デザイ

ン等は、ADRA (0.5 mg/mL) のバリデーション研究と同じであるが、このバリデーション研究との違いは、FL 検出器と UV 検出器を HPLC システムに直列につないで同時検出している点であった。4 mM の被験物質溶液を用いた ADRA-FL 法および ADRA-UV 法は、5 施設により 8 種類の習熟度確認物質について施設内および施設間再現性試験が実施され、施設内再現性試験は両測定法とも 5 施設すべてで 100%、5 施設による施設間再現性もすべてで 100%であった(表 S3-7-1 および S3-7-2)。図 2 は、Farnesal を除く 8 種類の習熟度確認物質と、ADRA (4 mM) および ADRA (1 mM) で結果の違う 4 種類の化合物と 2 種類の陽性対照に対して、ADRA (4 mM) を実施したときの ADRA-UV 法と ADRA-FL 法の相関図である。NAC/NAL の減少率の相関係数は、いずれも  $r=1.00$  ( $p<0.001$ ) であり極めて強い相関が確認されたことから、両試験法の結果が同等であることが示された。

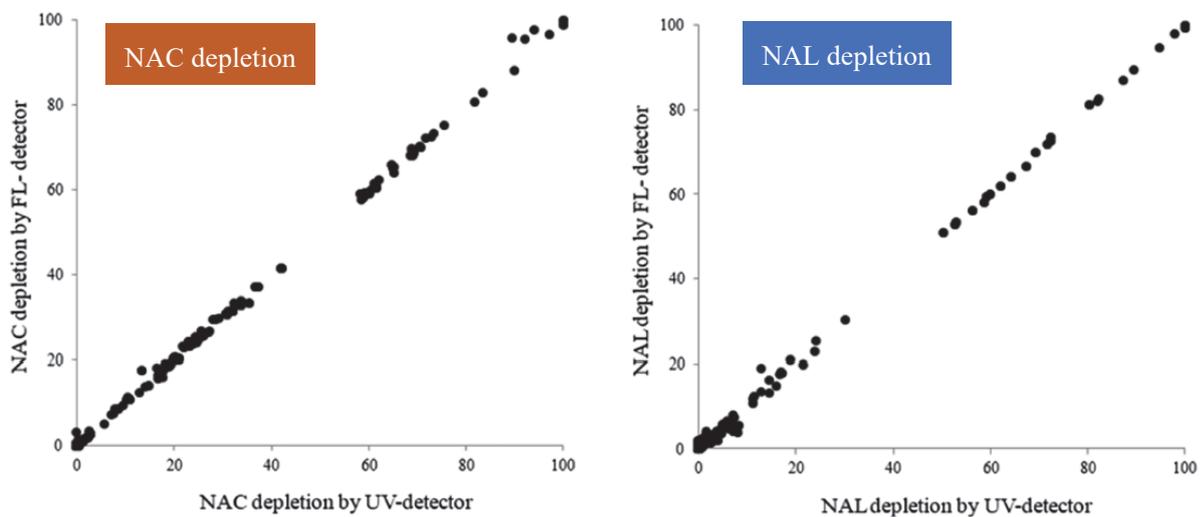


図 2 ADRA (4 mM) バリデーション研究における FL 検出と UV 検出の NAC/NAL 減少率の同等性の検証<sup>24)</sup>

#### 4. 正確度、感度および特異度

ADRA (1 mM)、ADRA (0.5 mg/mL) および ADRA (4 mM) のバリデーション研究の結果は、表 2 に示した。

ADRA (1 mM) の 4 施設におけるバリデーション研究で検証されたコード化された 40 種類の化合物の LLNA の結果に対する本試験法の正確度は 86.9% (139/160)、感度は 81.5% (88/108)、特異度は 98.1% (51/52) であった<sup>18)</sup>。なお、DPRA のバリデーション研究は ADRA と試験デザインや化合物の種類が異なるので直接の比較はできないが、3 施設の LLNA の結果に対する本試験法の正確度は 77.8%、感度は 70.8%、特異度は 91.7% であったことから<sup>22)</sup>、ADRA の正確度、感度および特異度は、感作性を予測する上で十分であることが示された。

ADRA (0.5 mg/mL) の 5 施設における 10 種類の習熟度確認物質のバリデーション研究では、UV 検出の正確度は 100% (40/40)、感度は 100% (24/24)、特異度は 100% (16/16)、また、FL 検出の正確度は 100% (50/50)、感度は 100% (30/30)、特異度は 100% (20/20) であった<sup>23)</sup>。なお、この試験の化合物のコード化は実施されていなかった。

ADRA (4 mM) の 5 施設におけるコード化された 8 種類の習熟度確認物質のバリデーション研究では、正確度、感度、特異度はいずれも 100% (40/40) であった<sup>24)</sup>。

なお、ADRA (4 mM) は、被験物質を従来の 1 mM から 4 mM に濃度を高くすることで、ADRA (1 mM) で偽陰性と判定される化合物の数を減らす効果があることが報告されている<sup>20)</sup>。リード施設だけでなく、他施設でもこの効果が再現するかを確認するために、ADRA (1 mM) において偽陰性化合物と判定される 4 化合物について、ADRA (4 mM) のバリデーション研究の中で検証された<sup>24)</sup>。ADRA (1 mM) で偽陰性、ADRA (4 mM) で LLNA の結果と一致して陽性と判定される 4 化合物 (*m*-Aminophenol、3-Propylidene phthalide、Ethylene glycol dimethacrylate および *n*-Butyl glycidyl ether) について、5 施設において、3 回の試験が実施され、1 施設において、*m*-Aminophenol が 1 回の試験だけ陰性判定になった。そのため、正確度は、98.3% (59/60) であったが、その効果が複数の施設でも確認された (表 S3-8-1 および表 S3-8-2)。

これらのバリデーション以外にも、リード施設で 136 化合物のデータセット (バリデーション化合物を含む) についても、ADRA (1 mM)、ADRA (0.5 mg/mL) および ADRA (4 mM) が実施され、それぞれの予測結果についてまとめられた (Annex 5、表 S5-1 および S5-2)。

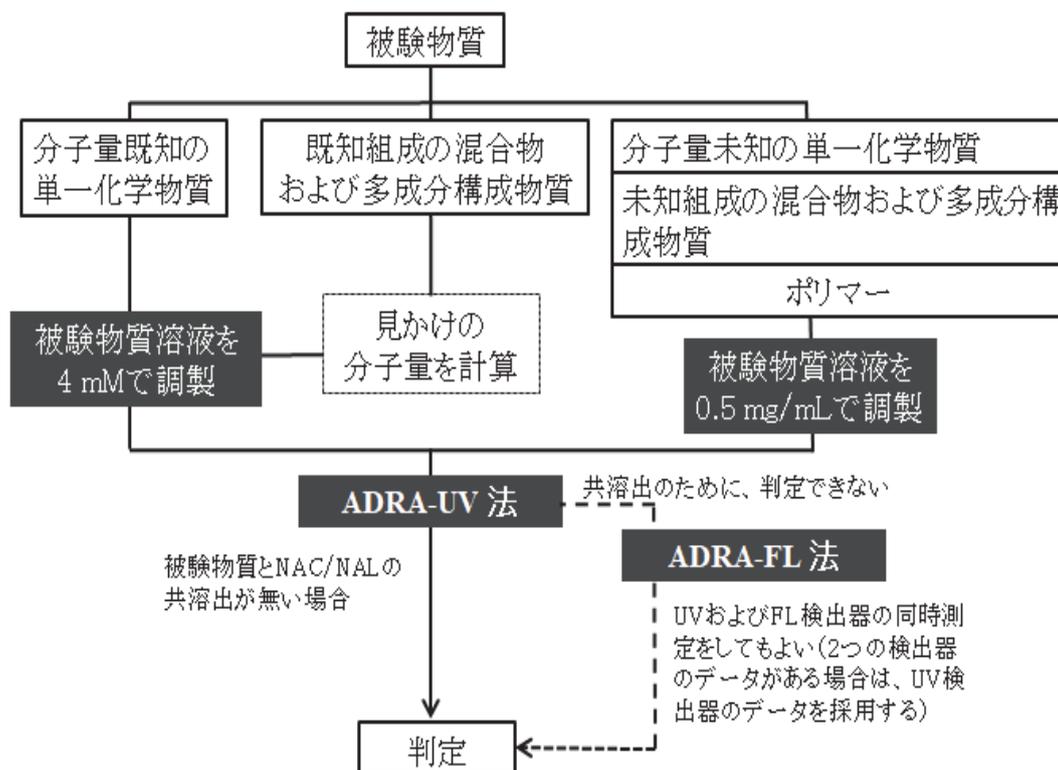
表 2 ADRA (1 mM)、ADRA (0.5 mg/mL) および ADRA (4 mM) のバリデーション研究のまとめ

	期間	施設数	化合物数		再現性		備考
			施設内	施設間	施設内	施設間	
ADRA (1 mM) UV検出器のみ	'16 10月～ '17 3月	4	10 (3回実施)	40 (1回実施)	90.0～100.0 (平均 97.3%)	91.3	施設内のLab Cは、2回目の3化合物が欠測。施設間再現性103化合物は、施設内の結果を利用 (多数決判定)
ADRA (0.5mg/mL) uvおよびFL検出器のみ	'19 10月～ '20 2月	5	10 (3回実施)	10 (3回実施)	100.0 (UV) 100.0 (FL)	100.0 (UV) 100.0 (FL)	化合物は、10個の習熟化合物を使用。反応したサンプルをUV検出器で、10倍希釈したサンプルをFL検出器で測定
ADRA (4 mM) uvおよびFL検出器のみ	'20 12月～ '21 3月	5	10 (3回実施)	10 (3回実施)	100.0 (UV) 100.0 (FL)	100.0 (UV) 100.0 (FL)	化合物は、10個の習熟化合物を使用。反応したサンプルをUV検出器およびFL検出器で同時測定

## 5. ADRA を用いた皮膚感作性評価手順

ADRA を用いた感作性評価フローを、図 3 に示した。被験物質が、分子量既知の単一化学物質の場合は、4 mM 被験物質溶液を調製し、ADRA (4 mM) を実施する。また、組成が既知の混合物および多成分構成物質は、それぞれの構成成分の分子量および濃度から見かけの分子量を算出し、その分子量を用いて 4 mM の被験物質溶液を調製し、ADRA (4 mM) を実施する。見かけの分子量の算出方法の例は Annex 4 に示した。分子量不明の単一化合物、組成が不明の混合物および多成分構成物質、ポリマーは、0.5 mg/mL の被験物質溶液を調製し、ADRA (0.5 mg/mL) を実施する。固体の混合物の場合は、適切な溶媒を選択し、0.5 mg/mL 被験物質溶液を調製する。液体の混合物の場合は、溶媒に溶解している混合物の重量濃度を基にして、TG に規定されている溶媒で 0.5 mg/mL に調製する。なお、液体混合物において、混合物の成分が溶解している溶媒が ADRA の TG に記載されていない場合は、その溶媒が、ADRA 試験系に影響がないことを示す必要がある。被験物質溶液と求核試薬を反応させ、反応停止液を添加したサンプルは、UV 検出器を用いた ADRA-UV 法で測定し、その値を ADRA の測定値とする。もし、ADRA-UV 法で共溶出が生じた場合は、ADRA-FL 法で測定

した値を採用してもよい。また、あらかじめ UV および FL 検出器を装備した HPLC システムで UV 値と FL 値を同時測定することも可能である。ただし、その場合には、上記のような理由がない限り、ADRA-UV 法で測定した値を採用する。混合物の感作性評価について、OECD は、KE1 の代替法については、なるべくモル濃度で被験物質を調製することを推奨している<sup>4)</sup>。分子量が分からない混合物についても、大部分を占める成分の分子量が分かれば、その分子量を使用して被験物質溶液の調製が可能であることが記載されている (OECD TG442C Appendix II、ADRA、段落 16)。



ADRA, amino acid derivative reactivity assay; UV, ultraviolet; FL, fluorescence;

図3 ADRA を用いた皮膚感作性評価フロー

## 6. 評価可能な物質の範囲

136 物質を対象に ADRA を実施した評価では、Annex 5、表 S5-1 および S5-2 に示す通り、様々な化学物質の皮膚感作性の予測が可能であることが示されている<sup>20)</sup>。

LLNA で陽性と判定される 98 物質は、4 mM に調製した被験物質溶液を用いた ADRA (4 mM) では 23 物質、ADRA (1 mM) では 34 物質、および ADRA (0.5 mg/mL) では 24 物質が偽陰性と判定された。偽陰性と判定された物質のうち、Strong sensitizer に分類されるのは Hexyl salicylate のみであり、多くは LLNA で moderate あるいは weak に分類される化合物であることから、DPRA と同様に感作性ポテンシャルの弱い物質の一部に偽陰性判定が生じる可能性があることに留意する必要がある。

一部のプレハプテンは正しく判定されるが、プロハプテンおよびプレハプテンは、DPRA と同様に原理的に適用範囲外と考えられる。また、本法は主にシステイン基やリジン基と反

応する化学物質を対象としており、非共有結合により複合体を形成する Nickel(II) sulfate などの化合物は、DPRA と同様に評価可能な物質の範囲から外れる。

## 7. 有用性と限界

本法は汎用 HPLC およびその技術を保有する施設で容易に実施可能である。また、本法は動物を用いない *in chemico* の手法であり、「動物の愛護および管理に関する法律」および 3Rs の精神と合致している。さらに 1 化合物あたりの試験消耗品費用を試算したところ、DPRA では約 1 万円であるのに対し、ADRA では約 5 千円と半分の経費であった。一方、LLNA は 1 化合物あたりの消耗品費は約 10 万円である。被験物質の必要量が DPRA に比して少量(1/25)で済み、その秤量から反応開始までの時間(DPRA の約半分)や、用いる反応容器が DPRA ではガラス製オートサンプラー用バイアルであるのに対して ADRA では 96 穴マイクロタイタープレートであることなど、操作性にも勝り簡便である。また、TG 442D および 442E に記載されている *in vitro* の試験法は、細胞の前培養なども含めると複数週の時間が必要である。これに対して、ADRA の試験期間は 2 日から 3 日で実施可能であり、試験法として簡便性、経済性や迅速性などの面から有用と考えられる。

本法は水系での反応を必要とするため、被験物質は少なくとも適切な溶媒 (Water、Acetonitrile、Acetone および 5% DMSO 含有 Acetonitrile) に 4 mM あるいは 0.5 mg/mL の濃度で溶解する必要がある。また、本法の正確度は、約 75% であり、1/4 の化合物の判定が誤って評価される可能性があるため、この試験法単独で皮膚感作性の代替法として考えるのは難しい。特に下記の化合物の類似化合物が陰性判定となった場合、偽陰性の可能性があるため、試験結果の解釈には注意が必要と考えられる。

### 1) LLNA で moderate または weak にあたる弱い感作性物質<sup>19)</sup>

LLNA で weak sensitizer に分類される 12 物質 ( $\alpha$ -Hexylcinnamaldehyde、 $\alpha$ -Amylcinnamaldehyde、Oxalic acid、Benzyl benzoate、Benzyl cinnamate、N,N-Dibutylaniline、Phenyl benzoate、Cinnamyl alcohol、Benzocaine、Linalool、d,l-Citronellol および Aniline) と Moderate sensitizer に分類される 10 物質 (Ethylenediamine、Methyl pyruvate、Benzyl salicylate、Diethyl sulfate、Tropolone、4-Chloroaniline、10-Undecenal、12-Bromo-1-dodecanol、dl- $\alpha$ -Tocopherol および 5-Methyl-2-phenyl-4H-pyrazol-3-one) は、ADRA では陰性となるため、これらの化合物の類似物が陰性判定の場合、注意が必要である。

### 2) プロハプテン、プレハプテン

本試験系は代謝系を有さない化学反応を検出する試験系であることから、感作性の獲得に代謝的あるいは非代謝的活性化を必要とするプロハプテンあるいはプレハプテン(例: Ethylenediamine、Cinnamyl alcohol、Benzocaine など)は偽陰性と評価される可能性がある。

### 3) 金属塩

本試験系は、KE1 すなわちタンパク質と共有結合する可能性のある化合物を検出する試験系であり、金属塩は、共有結合以外の機序によりタンパク質と反応することが知られているため、本試験法は適用外となる。ただし、一部の金属塩(塩化コバルトなど)は本試験系において陽性になることが確認されている。

### 4) 疎水性の高い物質等

水系での反応を必要とする本法では、被験物質が反応液中で析出した場合、陽性の結果であれば、その判定を受け入れることは可能であるが、陰性の結果の場合、被験物質が十分に反応していない可能性があるため、陰性結果をそのまま受け入れることはできず、十分な考察が必要である。ADRA は、反応に必要な被験物質溶液の濃度が 4 mM(または 0.5 mg/mL)であり、DPRA の 100 mM と比較すると 1/10 以下と低い濃度のため、反応液中で被験物質が析出することは稀である。白濁した場合も析出した場合と同様に、陽性結果であれば、その判定を受け入れることは可能であるが、陰性結果はそのまま受け入れることはできず、十分な考察が必要である<sup>9)</sup>。

以上のことから、DPRA を含む他の代替法と同様に、ADRA により感作性陰性と判断された場合は、その物性等により偽陰性となる可能性を考慮し、必要に応じて補完し得る他の KE を対象にした代替法等により確認する必要がある。ADRA により陽性と判断された場合は、感作性陽性と判断することは可能と考えるが、希に偽陽性の結果が生じる可能性があることにも留意する必要がある。ADRA は感作性発現機序における初期の重要な事象であるタンパク質と化学物質の結合反応を検出しており、化学物質の感作性を判断する上で重要な情報を与えることから、証拠の重み付けや他の代替法と組み合わせでの評価を推奨する<sup>25-27)</sup>。

## 8. 結論

ADRA は、簡便性・経済性の面から有用な動物実験代替法である。ADRA は、当初、1 mM に調製した被験物質を用いた試験法のバリデーション研究が、40 化合物を対象にして実施された。DPRA のバリデーション研究と ADRA のバリデーション研究は、施設数、化合物の種類および化合物数が異なるため、直接比較することはできないが、ADRA の施設内および施設間再現性は、90~100%および 91.9%であり、DPRA(施設内：87~100%、施設間：75%)よりも高い。実際に、本試験に使用する濃度である 4 mM あるいは 0.5 mg/mL に調製した被験物質溶液を用いた ADRA のバリデーション研究は、1 mM の ADRA で施設内および施設間の再現性が十分に検証された後に、10 化合物あるいは 8 化合物の習熟度確認物質を対象に実施されており、両濃度とも施設内および施設間再現性は 100%であった。

本試験法(被験物質溶液濃度：4 mM および 0.5 mg/mL)のバリデーション研究における感度、特異度および正確度はすべて 100%であるが、化合物数が少ないので、リード施設が実施した 136 化合物の試験データに注目すると、LLNA の結果に対する ADRA (4 mM) の感度、特異度および正確度は、76%、79%および 76%であり、ADRA (0.5 mg/mL) の感度、特異度および正確度は、74%、79%および 76%であった。また、ヒトの結果に対する ADRA (4 mM) の感度、特異度および正確度は、83%、86%および 84%であり、ADRA (0.5 mg/mL) の感度、特異度および正確度は、81%、86%および 83%であった(Annex 5、表 S5-1)。このように、LLNA の結果に対する ADRA (4 mM) および ADRA (0.5 mg/mL) の正確度、感度および特異度は約 75%、ヒトの結果に対する ADRA (4 mM) および ADRA (0.5 mg/mL) の正確度、感度および特異度は、約 85%である。

ADRA は感作性発現機序における初期の重要な KE であるタンパク質と化学物質の結合反応を検出しており、化学物質の感作性を判断する上で重要な情報を与えてくれる。ADRA の 1 化合物あたりの消耗品の費用は、LLNA の 1/20 程度、DPRA の 1/2 の経費で、短期間で

実施可能であり、動物を用いない *in chemico* 試験法であることから、有用性は高い。しかしながら、本法は代謝系を欠く化学的試験法であり、活性化に代謝系や非生物的活性化を必要とする感作性物質、弱い感作性物質や金属塩、疎水性の高い物質などは正しくその感作性が検出されない可能性がある。以上の事実を踏まえ、委員会は、必要に応じて、細胞を用いる他の KE を対象にした代替法や QSAR 等の *in silico* 手法と組み合わせでの評価を推奨する。

## 謝辞

JaCVAM 皮膚感作性試験資料編纂委員会において、この ADRA の皮膚感作性試験評価報告書を作成するにあたって、ADRA の開発、評価等を主導した富士フイルム株式会社の笠原利彦氏には、具体的かつ詳細な情報の提供に多大なるご協力をいただいた。ここに深く感謝申し上げます。

## 9. 参考文献

- 1) OECD (2010). OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 429. The Local Lymph Node Assay (LLNA), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-429-skin-sensitisation\\_9789264071100-en](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-429-skin-sensitisation_9789264071100-en)
- 2) OECD (2010). OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442A. The Local Lymph Node Assay: DA, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442a-skin-sensitization\\_9789264090972-en](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442a-skin-sensitization_9789264090972-en)
- 3) OECD (2018). OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442B. The Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA or -FCM, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. [https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442b-skin-sensitization\\_9789264090996-en](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442b-skin-sensitization_9789264090996-en)
- 4) OECD (2023) OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442C. *In chemico* skin sensitisation assays addressing the Adverse Outcome Pathway Key Event on Covalent Binding to Proteins. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442c-in-chemico-skin-sensitisation\\_9789264229709-en](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442c-in-chemico-skin-sensitisation_9789264229709-en)
- 5) OECD (2022). OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442D. *In Vitro* skin sensitisation assays addressing the Adverse Outcome Pathway Key Event on Keratinocyte activation. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442d-in-vitro-skin-sensitisation\\_9789264229822-en](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442d-in-vitro-skin-sensitisation_9789264229822-en)
- 6) OECD (2022). OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442E. *In Vitro* Skin Sensitisation Assays Addressing the Adverse Outcome Pathway Key Event on Activation of Dendritic Cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442e-in-vitro-skin-sensitisation\\_9789264264359-en](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442e-in-vitro-skin-sensitisation_9789264264359-en)
- 7) Gerberick GF et al. (2004), Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicological Sciences* 81:332-343.

- 8) Gerberick GF et al. (2007), Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. *Toxicological Sciences* 97:417-427.
- 9) Yamamoto Y et al. (2019) Precipitation of test chemicals in reaction solutions used in the amino acid derivative reactivity assay and the direct peptide reactivity assay. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 100: 106624.
- 10) Fujita M et al.(2019) The underlying factors that explain why nucleophilic reagents rarely co-elute with test chemicals in the ADRA. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 96: 95-105.
- 11) Fujita M et al. (2019) Cause of and countermeasures for oxidation of the cysteine-derived reagent used in the amino acid derivative reactivity assay. *Journal of Applied Toxicology*. 39:191-208.
- 12) Fujita M et al. (2014), Development of a prediction method for skin sensitisation using novel cysteine and lysine derivatives, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 70: 94-105.
- 13) Yamamoto Y et al. (2015), A novel *in chemico* method to detect skin sensitizers in highly diluted reaction conditions, *Journal of Applied Toxicology*, 35: 1348-1360.
- 14) Fujita M et al. (2019), Newly Developed Means of HPLC-Fluorescence Analysis for Predicting the Skin Sensitization Potential of Multi-Constituent Substances Using ADRA. *Toxicology In Vitro*, 59: 161-178.
- 15) Wanibuchi S et al. (2019) The amino acid derivative reactivity assay with fluorescence detection and its application to multi-constituent substances. *Journal of Toxicological Sciences*, 44: 821-832.
- 16) OECD (2019), Validation report: Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA) – JaCVAM Validation Study Report. Series on testing and Assessment No. 304. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 17) OECD (2019), Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA) – Report of the Peer Review Panel. Series on testing and Assessment No.305. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 18) Fujita M et al. (2019) The within- and between-laboratory reproducibility and predictive capacity of the *in chemico* Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA): Results of validation study implemented in four participating laboratories, *Journal of Applied Toxicology*, 39: 1492-1505.
- 19) Yamamoto Y et al. (2019), Expanding the applicability of the Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA): Determining a weight concentration for preparation of test chemical solutions that yields a predictive capacity identical to the conventional method using molar concentration and demonstrating the capacity to detect sensitizers in liquid mixtures. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 97: 67-79.
- 20) Imamura M et al. (2021) Improving predictive capacity of the Amino acid Derivative Reactivity Assay test method for skin sensitization potential with an optimal molar concentration of test chemical solution. *Journal of Applied Toxicology*, 41: 303-329.
- 21) Satyanarayana U and Chakrapani U (2014) *Biochemistry* 4th edition, Elsevier Health Sciences.
- 22) OECD (2012) Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) ECVAM Validation Study Report

- <https://tsar.jrc.ec.europa.eu/system/files/Published/DPRA%20Validation%20Study%20Report.pdf>
- 23) Yamamoto Y et al. (2022) Within- and between-laboratory reproducibility and predictive capacity of amino acid derivative reactivity assay (ADRA) using a 0.5 mg/mL test chemical solution: Results of the study for reproducibility confirmation implemented in five participating laboratories. *Journal of Applied Toxicology*, 42: 1078-1090.
  - 24) Fujita M et al. (2022) The within- and between-laboratories reproducibility and predictive capacity of Amino acid Derivative Reactivity Assay using 4 mM test chemical solution: Results of ring study implemented at five participating laboratories. *Journal of Applied Toxicology*, 42: 318-333.
  - 25) Yamamoto Y et al. (2019) Applicability of amino acid derivative reactivity assay for prediction of skin sensitization by combining multiple alternative methods to evaluate key events. *Journal of Applied Toxicology*, 44: 585-600.
  - 26) Imamura M et al. (2022) Applicability of ADRA (4 mM) for the prediction of skin sensitization by combining multiple alternative methods to evaluate key events *Journal of Applied Toxicology*, 42: 1159-1167.
  - 27) OECD (2021) OECD Guideline No. 497. Defined Approaches on Skin Sensitisation. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [https://www.oecd-ilibrary.org/environment/guideline-no-497-defined-approaches-on-skin-sensitisation\\_b92879a4-en](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/guideline-no-497-defined-approaches-on-skin-sensitisation_b92879a4-en)
  - 28) ADRA protocol: JaCVAM Statements. Available at: [http://www.jacvam.jp/en\\_effort/effort02.html](http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html)
  - 29) Akimoto M et al. (2020) Oxidation of a cysteine-derived nucleophilic reagent by dimethyl sulfoxide in the amino acid derivative reactivity assay. *Journal of Applied Toxicology*, 40: 843-854.

## Annex 1. ADRA を用いた皮膚感作性評価における試験法の変遷

ADRA では、さまざまな濃度の被験物質溶液を使用して、その感作性について評価されてきた。ADRA は、DPRA と同じ原理に基づく試験方法として開発されたため、当初、感作性評価は、DPRA と同じ 100 mM の被験物質溶液を使って評価された<sup>12)</sup>。しかしながら、求核試薬の検出感度が高いため、100 mM の被験物質溶液を用いる ADRA では、反応後のサンプルを希釈してから HPLC にかける必要があった。100 mM の被験物質溶液の濃度では、難溶解性被験物質を評価する際に、反応液中で被験物質析出が危惧されるだけでなく、HPLC 測定毎に希釈作業を要する。そのため、適切な被験物質の濃度を定めるために、DPRA 法を確立するために使用された 82 化合物のデータセット<sup>7)</sup>を用いて検討したところ、1 mM の被験物質溶液を用いる ADRA (1 mM) 法が DPRA と同等の予測精度を示したため、ADRA (1 mM) を標準法とした<sup>13)</sup>。これにより、被験物質溶液および求核試薬の濃度は、当初の 1/100 に減少し、反応溶液中の被験物質の析出頻度<sup>9)</sup>や HPLC 分析における共溶出<sup>10)</sup>の頻度を著しく低減することができた。2016 年に、この ADRA (1 mM) を OECD TG に収載するためのバリデーション研究を始めるために、バリデーション参加施設に技術移転試験を実施したところ、ほとんどの参加施設で求核試薬 NAC の二量体の増加が認められた。その原因を探索したところ、洗浄したガラス器具に残留した成分が NAC の二量体化を促進したことが疑われたため、実験に使用するすべての器具をディスポーザブルの製品(ポリプロピレン製)に変えた。その後も、一部の施設で NAC の二量体の増加が発生し、検討の結果、精製水中の銅イオンの増加が関わっていることが明らかになった。それゆえ、金属キレートであるエチレンジアミン四酢酸(EthyleneDiamineteTraacetic Acid: EDTA)が 0.25 μM 含まれる条件は、0.01 ppm 銅イオンによる NAC の二量体化を抑制し、EDTA 自体が ADRA の反応に影響を与えないことが確認された<sup>11)</sup>。この条件(被験物質濃度; 1 mM、0.25 μMEDTA)がバリデーション研究に採用され、2019 年に OECD TG に収載された。

2019 年に発行された TG 442C(段落 3、Appendix 1(DPRA))には、DPRA で混合物の感作性評価を可能にするためには、重量濃度で調製した被験物質溶液による試験法の開発が必要であると記載されていた。そのため、ADRA において、重量濃度で調製した被験物質溶液を用いた重量濃度法を確立するために、0.05、0.1、0.2、0.5 mg/mL の濃度で被験物質溶液を調製し、上記 82 化合物を用いて ADRA を実施し、DPRA と ADRA (1 mM) の結果を比較した<sup>19)</sup>、被験物質の濃度を 0.05 mg/mL から 0.5 mg/mL に上げるにしたがって、偽陰性の頻度が減少し(偽陽性の頻度は若干増加)、感作性予測精度は、被験物質溶液の濃度が 0.5 mg/mL の時に ADRA (1 mM) よりも数%高く、DPRA と同程度であった<sup>19)</sup>。これにより、ADRA を重量濃度で実施する場合の被験物質溶液の最適濃度は、0.5 mg/mL であることが示された。しかし、この検討結果は、すでに TG 化された ADRA (1 mM) の被験物質濃度が最適ではないという疑念を生じさせた。その後実施した、プレ/プロハプテンを含む 136 種類の化学物質を含むデータセットでは、ADRA (1 mM) の予測精度は DPRA よりも低く<sup>19)</sup>、その原因を解析したところ、NAC/NAL の減少率が、閾値よりわずかに低く、偽陰性と判定される化学物質が多いことが、原因であることが判明した。ADRA (0.5 mg/mL) の結果からも分かるように、ADRA を実施する被験物質溶液の濃度は、1 mM より高い方が、偽陰性化合物の数が減少し、予測精度も高くなると予想された。したがって、ADRA の被験物質溶液の最適モル

濃度を決定するために、ADRA (1 mM) で偽陰性と誤って判定された 8 化合物について、2、3、4 および 5 mM の被験物質溶液を用いて、ADRA を実施したところ、4 mM 以上ですべての化合物が正しく陽性と判定された。そこで、4 mM に調製した被験物質溶液を用いて、136 化合物について感作性評価を実施したところ、予測精度が向上することが確認された<sup>20)</sup>。また、ADRA は従来の UV 検出の他に FL 検出が可能であり、NAC/NAL を特異的に検出することができることから、被験物質由来の成分と共溶出することがほとんどない<sup>14,15)</sup>。これらの結果から、分子量既知の単一化合物については 4 mM の被験物質溶液を用い、分子量不明の単一物質および混合物については、0.5 mg/mL に調製した被験物質溶液および ADRA-FL 法を用いることが提案され、2019 年から 10 種類の習熟度確認物質について、リード施設を含む 5 施設で、施設内・施設間の再現性を評価するバリデーション研究が実施された。このバリデーション結果については、OECD の感作性専門家会議で審査され、コメンティンググラウンドを経て、2022 年 4 月に、2 つの濃度の被験物質溶液 (4 mM および 0.5 mg/mL) および FL 検出器を用いた ADRA-FL 法を含む改定案が、OECD 会議において議論され、6 月に承認・公表された。

## Annex 2. 試験手順／判定<sup>28)</sup>

### 2-1. 使用する求核試薬および陽性対照の調製

- ・ NAC 含有リン酸緩衝溶液 (pH 8.0)  
NAC (純度：98%以上) は、リン酸緩衝液 (pH 8.0) に 6.667 μM の濃度になるように溶解させる。
- ・ NAL 含有リン酸緩衝溶液 (pH 10.2)  
NAL (純度：98%以上) は、リン酸緩衝液 (pH 10.2) に 6.667 μM の濃度になるように溶解させる。
- ・ 陽性対照：  
Phenylacetaldehyde (PADH、CAS No:122-78-1、純度 ≥ 90%)  
PADH を、アセトニトリルに 4 mM の濃度で溶解させる。  
Scuaric acid diethyl ester (SADE、CAS No:5231-87-8、純度 ≥ 95%)  
SADE を、アセトニトリルに 4 mM の濃度で溶解させる。  
※陽性対照物質は、PADH と SADE のどちらかを実施すればよい。ただし、PADH はアルデヒドのため化合物の安定性が良くない。そのため、NAC/NAL の減少率の値が管理幅に入らなくなることがあるので、注意が必要である。被験物質を重量濃度で調製する場合も、陽性対照物質は 4 mM に調製して使用する。

### 2-2. 各反応液の調製および反応手順

各被験物質、陽性対照物質、および各種クオリティチェック用コントロールは、下記のように調製する。

NAC：被験物質 or 陽性対照物質=1:200 5 μM NAC, 4 mM 被験物質 (or 0.5 mg/mL) *or 4 mM 陽性対照物質	NAL：被験物質 or 陽性対照物質=1:200 5 μM NAL, 4 mM 被験物質 (or 0.5 mg/mL) *or 4 mM 陽性対照物質
■ 150 μL NAC 溶液 ■ 50 μL 被験物質溶液 or 陽性対照物質溶液	■ 150 μL NAL 溶液 ■ 50 μL 被験物質溶液 or 陽性対照物質溶液

\*反応液中の被験物質の濃度； ADRA (4 mM) : 1 mM、ADRA (0.5 mg/mL) : 0.125 mg/mL

#### クオリティチェック用コントロール

##### 【共溶出コントロール】

NAC 用	NAL 用
■ 150 μL リン酸緩衝液 (pH 8.0) ■ 50 μL 被験物質溶液	■ 150 μL リン酸緩衝液 (pH 10.2) ■ 50 μL 被験物質溶液

##### 【参照コントロール A および B】

NAC 用	NAL 用
■ 150 μL NAC 溶液 ■ 50 μL アセトニトリル	■ 150 μL NAL 溶液 ■ 50 μL アセトニトリル

【参照コントロール C】

NAC 用	NAL 用
<p>■ 150 μL NAC 溶液</p> <p>■ 50 μL アセトニトリルおよび被験物質の溶解に用いた溶媒*</p>	<p>■ 150 μL NAL 溶液</p> <p>■ 50 μL アセトニトリルおよび被験物質の溶解に用いた溶媒*</p>

\*：被験物質の溶解に用いた溶媒がアセトニトリルの場合は、アセトニトリルのみで良い。

以下のフローチャートに従い、実施する。

**1. 被験物質溶液の調製**

【分子量が既知の被験物質】  
以下のいずれかの溶媒を使用して、80 mMの濃度に溶解させる<sup>a)</sup>

【混合物、ポリマー、分子量不明の被験物質】  
以下のいずれかの溶媒を使用して、10 mg/mLの濃度に溶解させる<sup>a)</sup>  
液体の混合液およびポリマーは、混合物とそれ以外の溶媒量から混合物の重量濃度を算出する。  
溶媒: Water, Acetonitrile, Acetone, 5% DMSO/Acetonitrile<sup>b)</sup> (これら以外の溶媒を使用する場合は、溶媒が反応に影響を及ぼさないことを確認しておくこと)

2. 80 mMあるいは10 mg/mLの被験物質溶液を溶媒で20倍希釈する(4 mM or 0.5mg/mL)。液体の混合液は、総混合物とそれ以外の溶媒成分から混合物の重量濃度を算出し、適切な溶媒で、0.5 mg/mLに調製する。

3. 被験物質溶液とNAC or NAL含有リン酸バッファーを1:3の割合で混合(n=3)  
 ・Sample: 被験物質溶液(4 mM or 0.5mg/mL) + 6.67 μM NAC or NAL含有リン酸バッファー<sup>c)</sup>  
 ・Co-elution Control: 被験物質溶液 + リン酸バッファー<sup>c)</sup>  
 ・Reference Control: 溶媒 + 6.67 μM NAC or NAL含有リン酸バッファー<sup>c)</sup>

4. 各混合液を24 ± 1時間インキュベートする(暗所、25 ± 1°C)

5. 吸光検出器および蛍光検出器を装備したHPLCで、NAC or NALを分析する(反応後、72時間以内に測定)  
吸光度と蛍光強度を同時測定することが推奨される(吸光度値を優先的に採用)

6. 未反応のNACあるいはNALのピーク面積から、NACあるいはNALの減少率(depletion)を算出する。

$$\text{NACあるいはNALの減少率} = \left[ 1 - \frac{\text{反復注入におけるNACあるいはNALのピーク面積}}{\text{基準対照CにおけるNACあるいはNALのピーク面積}} \right] \times 100$$

a) 正確に、被験物質を秤量できる場合は、直接、4mM(分子量既知化合物)あるいは0.5 mg/mL(混合物、ポリマー)を調製しても良い。  
 b) DMSOを用い80 mMを調製し、アセトニトリルで20倍希釈して、4 mMを調製する(DMSOの含有濃度は、5%)  
 c) NACのリン酸バッファーは、pH 8.0、NALのリン酸バッファーは、pH 10.2

\*分析条件(推奨)

推奨カラム：コアシェルタイプシリカゲル(2.5 - 2.7 μm、3.0 mm×150 mm)等

例) Wakopak Core C18 ADRA(φ3.0 × 150 mm、富士フイルム和光純薬)

カラム温度：40°C

サンプル温度：25°C(冷却機能がある場合、4°Cにすることを推奨)

検出波長：吸光度：281 nm、蛍光(Excitation / Emission)：284/333 nm

流速：0.3 mL/min

注入量：10~20 μL(装置によって変更可能、ピーク形に応じて変更可能)

移動相：A液：0.1% (v/v) TFA(トリフルオロ酢酸)水溶液

B液：0.1% (v/v) TFA含有アセトニトリル溶液

### HPLC 条件

時間 (分)	NAC 溶出条件		NAL 溶出条件	
	A 液(%)	B 液(%)	A 液(%)	B 液(%)
0	70	30	80	20
9.5	45	55	55	45
10	0	100	0	100
13	0	100	0	100
13.5	70	30	80	20
20	終了		終了	

#### 2-3. 試験成立の条件<sup>4)</sup>

試験成立には、以下の条件を満たさなければならない。

- 1) NAC/NAL のそれぞれを用いて、0.156 ~ 5.0  $\mu\text{M}$  の範囲の 6 濃度にて標準曲線の作成を行い、その寄与率が 0.990 より大きい。
- 2) 被験物質の NAC/NAL (n=3) の減少率の標準偏差が、10%未満である。
- 3) 陽性対照である PADH または SADE の NAC/NAL の n=3 の減少率の平均値および標準偏差は下記の条件を満たす必要がある。

- NAC 減少率 (n=3 の平均値)  
PADH : 30 - 80%、SADE: 30 - 80%
- NAL 減少率 (n=3 の平均値)  
PADH : 70 - 100%、SADE: 70 - 100%
- 減少率の標準偏差 (SD)  
PADH の NAC/NAL とともに、10%未満  
SADE の NAC/NAL とともに、10%未満

- 4) NAC/NAL のそれぞれに 3 種類の参照コントロール (A、B、C) を設け、以下を確認する。

参照コントロール A (n=3) : 分析前の HPLC システム適合性

参照コントロール B (n=6) : 分析時間中の参照コントロールの安定性

参照コントロール C (n=3) : 使用された溶媒が NAC/NAL の減少に影響しないこと

- 参照コントロール A および C の NAC/NAL の平均濃度が、3.2~4.4  $\mu\text{M}$ <sup>\*</sup>の範囲に入っていること。

<sup>\*</sup>溶媒に 5% DMSO/アセトニトリルを使用した場合は、DMSO による NAC の SH 基の酸化により、NAC 二量体が産生され、NAC 濃度が減少することが知られているので、参照コントロール C の NAC の濃度の平均値は、2.8 ~ 4.0  $\mu\text{M}$  であること<sup>29)</sup>。

- 参照コントロール B (n=6) とアセトニトリルで調製した参照コントロール C (n=3) を合わせた 9 回について、NAC/NAL の平均ピーク面積、SD および CV (変動係数) を計算し、CV は、10%未満であること。

- ・各溶媒における参照コントロール C(n=3)の NAC/NAL ピーク面積の CV は、10%未満であること。

#### 2-4. 評価

被験物質の反応性は、測定ごとの NAC/NAL の減少率を算出し、NAC/NAL の減少率の平均値が、閾値である 4.9%を基準に感作性および非感作性を判定する(表 S2-1)。基本的には、試験成立基準を満たしており、信頼性に影響を与える事象がなければ、1回の測定で最終判定をすることができる。ただし、NAC/NAL の減少率の平均値が、閾値に近い場合は、判定結果が正しくない可能性があることから、確認試験を実施して判定結果の是非を確認する。つまり、NAC/NAL の減少率の平均値が、「3% ≤NAC/NAL の減少率の平均値 ≤10%」となった場合は、2回目の試験を実施する。1回目と2回目の判定結果が同じ場合は、その判定が最終判定となる。しかし、1回目と2回目の判定結果が異なった場合は、さらに3回目の試験を実施し、3回の判定結果の多数決により判定する。

ADRA は、検出波長が 281 nm のため、DPRA と比較して NAC あるいは NAL と被験物質の溶出時間が重なる共溶出が起こりにくい。また、FL 検出器により、NAC および NAL の特異的な検出ができることから、共溶出が起こることは極めて稀である。しかし、NAC の共溶出が、UV 検出器および FL 検出器の両方で認められた場合は感作性を評価できないが、NAL のみで共溶出が認められた場合は、NAC 単独モデルで評価が可能である。NAC 単独モデルは、NAC の減少率が、NAC 単独モデルの閾値である 5.6 を基準に感作性および非感作性を判定する(表 S2-2)。ただし、NAC の減少率の平均値が、閾値に近い場合は、判定結果が正しくない可能性があることから、確認試験を実施して判定結果の是非を確認する。つまり、NAC の減少率の平均値が、「4% ≤NAC の減少値 ≤11%」に適合する場合は、2回目の試験を実施する。1回目と2回目の判定結果が同じ場合は、その判定が最終判定となる。しかし、1回目と2回目の判定結果が異なった場合は、3回目の試験を実施し、3回の判定結果の多数決により判定する。

表 S2-1 ADRA 感作性予測モデル

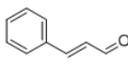
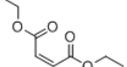
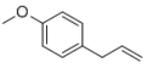
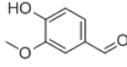
NAC/NAL の減少率の平均	判定
< 4.9%	非感作性物質
4.9% ≤	感作性物質

表 S2-2 ADRA NAC 感作性単独予測モデル

NAC の 減少率	判定
< 5.6%	非感作性物質
5.6% ≤	感作性物質

### Annex 3. バリデーション結果

表 S3-1 ADRA (1 mM) のプレトレーニング試験の試験計画の概要

試験期間	2016年6月				
化合物	PT-001 ( <i>p</i> -Benzoquinone) 	PT-002 (Cinnamaldehyde) 	PT-003 (Diethyl maleate) 	PT-004 (4-Allylanisole) 	PT-005 (Vanilline) 
LLNA potency	Strong	Moderate	Moderate	Weak	Non-sensitizer
試験数	2回 (各試験 N=3)				
目標	富士フィルムの予測結果と一致すること (施設内再現性: 100%, 施設間再現性: 100%)				

: Sensitizer     : Non-sensitizer

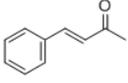
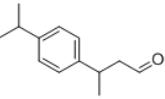
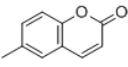
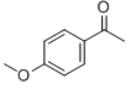
表 S3-2 ADRA (1 mM) のプレトレーニング試験の試験結果

コード	化合物	LLNA potency	予測結果 (カッコ内は減少率のAverage scoreを示す)														
			A			B			C			D			富士フィルム		
			1回目	2回目	平均値	1回目	2回目	平均値	1回目	2回目	平均値	1回目	2回目	平均値	1回目	2回目	平均値
PT-001	<i>p</i> -Benzoquinone	Strong	S (89.2)	S (89.0)	<b>S</b> ( <b>89.1</b> )	S (84.3)	S (84.2)	<b>S</b> ( <b>84.3</b> )	S (85.9)	S (86.3)	<b>S</b> ( <b>86.1</b> )	S (86.5)	S (89.7)	<b>S</b> ( <b>88.1</b> )	S (86.7)	S (88.0)	<b>S</b> ( <b>87.3</b> )
PT-002	Cinnamaldehyde	Moderate	S (27.3)	S (49.2)	<b>S</b> ( <b>38.2</b> )	S (26.6)	S (21.5)	<b>S</b> ( <b>24.0</b> )	S (49.5)	S (49.2)	<b>S</b> ( <b>49.4</b> )	S (28.4)	S (52.5)	<b>S</b> ( <b>40.4</b> )	S (13.9)	S (15.6)	<b>S</b> ( <b>14.7</b> )
PT-003	Diethyl maleate	Moderate	S (16.9)	S (17.9)	<b>S</b> ( <b>17.4</b> )	S (11.7)	S (12.8)	<b>S</b> ( <b>12.2</b> )	S (18.5)	S (14.4)	<b>S</b> ( <b>16.4</b> )	S (16.7)	S (15.7)	<b>S</b> ( <b>16.2</b> )	S (10.5)	S (11.4)	<b>S</b> ( <b>10.9</b> )
PT-004	4-Allylanisole	Weak	S (12.8)	S (17.0)	<b>S</b> ( <b>14.9</b> )	S (6.6)	S (8.1)	<b>S</b> ( <b>7.3</b> )	S (10.0)	S (9.3)	<b>S</b> ( <b>9.6</b> )	S (7.3)	S (7.0)	<b>S</b> ( <b>7.2</b> )	S (7.0)	S (8.5)	<b>S</b> ( <b>7.8</b> )
PT-005	Vanilline	Non-sensitizer	NS (1.4)	NS (3.5)	<b>NS</b> ( <b>2.4</b> )	NS (0.0)	NS (0.0)	<b>NS</b> ( <b>0.0</b> )	NS (4.8)	NS (4.0)	<b>NS</b> ( <b>4.4</b> )	NS (4.4)	NS (2.5)	<b>NS</b> ( <b>3.4</b> )	NS (0.6)	NS (0.3)	<b>NS</b> ( <b>0.4</b> )
施設内再現性 (%)			100			100			100			100			100		
施設間再現性 (%)			100														

減少率: 感作性物質  $\geq 5.05$     非感作性物質  $< 5.05$  (プレトレーニング試験およびトレーニング試験では閾値として 5.05 が用いられた。表 S3-5 以降のバリデーション試験では閾値が 4.9 に変更された。)

: Sensitizer     : Non-sensitizer

表 S3-3 ADRA (1 mM) のトレーニング試験の試験計画の概要

試験期間	2016年7月～8月				
評価困難ポイント	1. 陰性/陽性の閾値に極めて近い化合物を2種類 (T-004, T-006) 含む。 2. 陰性/陽性の閾値に比較的近い化合物を2種類 (T-003, T-005) 含む。 3. わずかにNACと共溶出する化合物を1種類 (T-010) 含む。				
化合物	T-001 (Oxazolone) 	T-002 (Phthalic anhydride) 	T-003 (Formaldehyde) =O	T-004 (Glyoxal) 	T-005 (Benzylideneacetone) 
LLNA potency	Strong	Strong	Strong	Moderate	Moderate
化合物	T-006 (Cyclamen aldehyde) 	T-007 (1-Butanol) HO-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	T-008 (6-Methylcoumarin) 	T-009 (Lactic acid) 	T-010 (4'-Methoxyacetophenone) 
LLNA potency	Weak	Non-sensitizer	Non-sensitizer	Non-sensitizer	Non-sensitizer
試験数	2回 (各試験 N=3)				
目標	施設内再現性：70%以上, 施設間再現性70%以上				

■ : Sensitizer    □ : Non-sensitizer

表 S3-4 ADRA (1 mM) トレーニング試験の施設内および施設間再現性試験の結果

コード	化合物	LLNA potency	予測結果 (カッコ内は減少率のAverage scoreを示す)														
			A			B			C			D			富士フィルム		
			1回目	2回目	平均値*	1回目	2回目	平均値*	1回目	2回目	平均値*	1回目	2回目	平均値*	1回目	2回目	平均値*
T-001	Oxazolone	Strong	S (74.3)	S (73.2)	S (73.7)	S (75.4)	S (75.3)	S (75.4)	S (80.1)	S (77.0)	S (78.6)	S (77.1)	S (74.9)	S (76.0)	S (77.2)	S (77.7)	S (77.5)
T-002	Phthalic anhydride	Strong	S (44.2)	S (40.8)	S (42.5)	S (25.7)	S (29.2)	S (27.5)	S (43.5)	S (40.4)	S (41.9)	S (45.2)	S (45.9)	S (45.4)	S (47.4)	S (47.3)	S (47.3)
T-003	Formaldehyde	Strong	S (11.7)	S (9.3)	S (10.5)	S (15.5)	S (8.0)	S (11.8)	S (20.1)	S (8.4)	S (14.2)	S (10.0)	S (9.3)	S (9.7)	S (9.6)	S (9.6)	S (9.6)
T-004	Glyoxal	Moderate	S (6.8)	S (10.3)	S (8.5)	S (6.6)	S (7.9)	S (7.2)	S (6.7)	S (5.4)	S (6.0)	S (9.4)	S (15.2)	S (12.3)	S (5.4)	S (6.0)	S (5.7)
T-005	Benzylideneacetone	Moderate	S (7.7)	S (8.3)	S (8.0)	S (8.0)	S (7.6)	S (7.8)	S (9.0)	S (10.3)	S (9.7)	S (11.6)	S (7.4)	S (9.5)	S (9.3)	S (14.1)	S (11.7)
T-006	Cyclamen aldehyde	Weak	NS (3.5)	NS (2.5)	NS (3.0)	S (12.3)	S (9.4)	S (10.9)	S (5.7)	S (10.7)	S (8.2)	S (6.5)	S (6.6)	S (6.5)	NS (1.9)	NS (2.0)	NS (1.9)
T-007	1-Butanol	Non-sensitizer	NS (3.2)	NS (1.9)	NS (2.6)	NS (0.3)	NS (1.2)	NS (0.7)	NS (0.1)	NS (1.6)	NS (0.8)	NS (0.0)	NS (0.7)	NS (0.3)	NS (0.0)	NS (0.0)	NS (0.0)
T-008	6-Methylcoumarin	Non-sensitizer	NS (0.3)	NS (0.2)	NS (0.2)	NS (2.4)	NS (1.6)	NS (2.0)	NS (2.4)	NS (4.9)	NS (3.7)	NS (1.1)	NS (2.8)	NS (1.9)	NS (0.1)	NS (0.4)	NS (0.2)
T-009	Lactic acid	Non-sensitizer	NS (2.6)	NS (1.1)	NS (1.8)	NS (0.6)	NS (1.9)	NS (1.3)	NS (2.8)	NS (2.0)	NS (2.4)	NS (0.1)	NS (0.1)	NS (0.1)	NS (0.0)	NS (0.0)	NS (0.0)
T-010	4'-Methoxyacetophenone	Non-sensitizer	NS (3.6)	NS (2.3)	NS (3.0)	S (6.0)	NS (3.8)	NS (4.9)	S (9.7)	S (12.2)	S (10.9)	NS (1.2)	NS (1.9)	NS (1.6)	NS (0.8)	NS (0.9)	NS (0.8)
施設内再現性 (%)			100			90.0			100			100			100		
施設間再現性(全化合物) (%)			80.0														
施設間再現性(T-010以外) (%)			88.9														

\* 平均値は、2回の結果の平均をもとに判定

減少率：感作用物質 ≥5.05    非感作用物質 <5.05 (プレトレーニング試験およびトレーニング試験では閾値として5.05が用いられた。表 S3-5以降のバリデーション試験では閾値が4.9に変更された。)

■ : Sensitizer    □ : Non-sensitizer

表 S3-5 ADRA (1 mM) の施設内および施設間再現性試験の結果

No.	Chemicals	LLNA Category	DPRA result	Lab. A			Lab. B			Lab. C			Lab. D		
				Exp.1	Exp.2	Exp.3	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Exp.1	Exp.2	Exp.3
<b>Phase I</b>															
1	Lauryl gallate	Strong	S	97.8	96.3	96.3	59.3	58.5	96.8	83.0	60.3	71.6	96.3	96.4	96.8
2	4-(Methylamino) phenol hemisulfate salt	Strong	S	56.6	55.9	56.5	58.0	58.1	56.0	57.9	57.7	56.2	56.2	56.5	56.6
3	Chloramine T	Strong	S	94.1	95.0	96.3	99.0	99.3	99.5	97.7	97.5	96.5	50.0	54.1	55.6
4	Cinnamaldehyde	Moderate	S	30.8	28.2	15.1	21.0	22.5	22.7	54.0	—	36.2	24.7	16.1	26.6
5	2-Mercaptobenzothiazole	Moderate	S	25.0	22.1	21.7	27.0	27.7	27.5	24.5	—	40.6	50.0	44.2	50.0
6	Ethyl acrylate	Weak	S	45.7	45.7	46.1	46.7	48.1	47.0	48.8	25.1	48.9	51.2	50.3	53.1
7	Imidazolidinylurea	Weak	S	14.9	10.1	11.5	10.2	11.5	10.2	12.3	15.1	15.1	13.0	14.7	19.8
8	Glycerol	NC	NS	0.3	0.1	0.6	0.1	0.0	0.1	0.2	2.8	2.9	0.6	1.1	4.8
9	Salicylic acid	NC	NS	1.5	1.4	1.8	2.8	2.0	4.9	0.6	—	6.1	2.8	1.3	9.0
10	Isopropanol	NC	NS	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.1	0.3	2.5	3.0	0.4	1.9	4.8
<b>Phase II</b>															
11	Diphenylcyclopropenone	Extreme	S	18.2			14.2			17.9			13.5		
12	p-Benzoquinone	Extreme	S	81.1			84.2			79.3			72.2		
13	Hydroquinone	Strong	S	62.7			62.9			70.6			64.4		
14	2-Methyl-2H-isothiazol-3-one	Strong	S	50.2			50.0			50.2			48.4		
15	2-Aminophenol	Strong	S	68.2			66.0			66.5			63.3		
16	Iodopropynyl butylcarbamate	Strong	S	50.3			47.2			50.2			50.0		
17	Propyl gallate	Strong	S	86.5			82.0			84.3			84.2		
18	Dihydroeugenol	Moderate	NS	4.5 / 6.5 / 5.6			2.9			5.1 / 5.2			2.2		
19	Benzylsalicylate	Moderate	NS	0.8			0.4			1.9			0.0		
20	Squaric acid diethylester	Moderate	NS	47.7			48.4			46.0			34.5		
21	citral	Moderate	S	4.6 / 6.9 / 6.5			5.1 / 2.4 / 6.3			6.1 / 0.0 / 2.8			3.4 / 8.3 / 11.9		
22	Palmitoyl Chloride	Moderate	S	46.5			27.5			29.9			47.8		
23	Resorcinol	Moderate	NS	2.8			0.6			6.9 / 3.8 / 4.6			3.0 / 4.4		
24	Benzylcinnamate	Weak	NS	0.8			0.0			0.5			0.1		
25	2,3-Butanedione	Weak	S	15.2			17.8			19.5			34.5		
26	Famesol	Weak	NS	20.2			18.6			18.9			18.9		
27	Eugenol	Weak	S	12.2			16.1			19.1			10.8		
28	Penicillin G	Weak	S	1.2			0.0			3.0 / 1.4			0.2		
29	Lilial	Weak	S	7.1 / 7.0			13.8			4.9 / 6.2			6.6 / 15.0		
30	Hydroxycitronellal	Weak	S	3.9 / 10.5 / 6.4			11.3			6.4 / 5.4			3.7 / 7.0 / 4.6		
31	Benzyl alcohol	NC	NS	0.2			2.5			2.2			0.2		
32	Dimethylisophthalate	NC	NS	0.9			0.5			0.0			0.6		
33	4-Aminobenzoic acid	NC	NS	1.1			0.0			2.3			1.3		
34	Diethyl phthalate	NC	NS	0.8			0.0			0.0			0.1		
35	Methylsalicylate	NC	NS	0.6			0.0			0.5			0.0		
36	Dextran	NC	- <sup>a)</sup>	5.0 / 1.4 / 4.7			1.1			7.2 / 7.5			2.9		
37	Coumarin	NC	NS	4.6 / 2.7			0.8			1.8			0.1		
38	Propyl paraben	NC	NS	1.0			0.1			0.2			0.0		
39	Sulfanilamide	NC	NS	0.9			1.7			1.6			7.4 / 2.9 / 2.3		
40	Funaric acid	NC	S	5.3 / 3.5 / 3.1			2.4			2.4			0.6		

■ : Sensitizer    □ : Non-sensitizer

減少率：感作性物質 ≥ 4.9    非感作性物質 < 4.9

Phase IIにおいて、NAC/NALの減少率の平均値が閾値付近(3.0-10.0)となった化合物について、追加試験を実施したため、複数の値が記載されている。

Lab.Cで「-」の表記は、欠測データ(陽性対照物質の減少率が試験成立条件を満たしていなかったにも関わらず、再試験を実施しなかったため)。

a) Dextranは高分子であり、100 mMの被験物質溶液が調製できないため、DPRAでは評価不能

表 S3-6-1 UV 検出およびFL 検出による ADRA (0.5 mg/mL) バリデーション研究 (NAC 減少率)

Test chemical	Depletion of NAC (%)														
	Lab.A			Lab.B			Lab.C			Lab.D			Lab.E		
	1st set	2nd set	3rd set	1st set	2nd set	3rd set	1st set	2nd set	3rd set	1st set	2nd set	3rd set	1st set	2nd set	3rd set
<b>Result of UV detection</b>															
p-Benzoquinone	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0				97.5	100.0	100.0
Diphenylcyclopropanone	50.1	49.9	55.3	47.2	49.6	48.2	62.2	56.0	60.1				53.2	51.6	52.2
2-Methyl-2H-isothiazol-3-one	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	94.1	93.3	91.8				93.0	92.6	92.8
Palmitoyl Chloride	9.7	14.4	20.8	0.0	5.8	6.0	12.2	11.8	19.8				14.5	12.5	13.5
Imidazolidinyl urea	31.1	38.5	46.0	23.8	25.2	22.6	36.6	39.4	33.7				37.1	33.8	35.3
Farnesal	34.2	36.8	45.6	54.0	53.5	54.6	77.5	88.8	66.2				25.1	46.8	45.7
Glycerol	1.0	2.9	0.0	0.0	0.5	1.3	2.5	0.4	0.1				1.5	0.1	0.1
Isopropanol	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	1.6	2.0	0.0				0.3	0.0	0.3
Dimethyl isophthalate	0.0	3.6	1.2	1.6	0.4	0.2	3.5	4.2	3.3				1.8	0.9	0.0
Propyl paraben	0.0	3.7	0.7	2.8	0.0	1.2	7.5	3.9	3.2				1.2	0.2	0.0
<b>Result of FL detection</b>															
p-Benzoquinone	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.5	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Diphenylcyclopropanone	50.0	51.8	56.6	50.1	49.2	47.2	61.2	54.3	58.0	99.8	99.7	50.0	52.5	51.4	52.5
2-Methyl-2H-isothiazol-3-one	98.9	98.9	100.0	98.0	97.9	97.7	100.0	100.0	100.0	98.4	98.1	98.7	99.1	99.2	99.1
Palmitoyl Chloride	25.5	19.4	24.0	4.7	4.4	4.9	10.2	10.9	28.5	3.9	15.8	16.9	16.7	13.3	14.9
Imidazolidinyl urea	31.3	31.3	44.7	18.2	27.2	39.0	25.7	27.5	28.7	19.9	31.2	24.2	29.6	27.0	26.5
Farnesal	47.3	45.8	60.1	51.7	49.4	55.5	75.6	85.7	75.5	48.5	56.9	72.9	29.1	46.0	46.4
Glycerol	0.7	0.6	2.3	0.1	1.6	4.0	1.0	0.9	1.3	0.0	2.4	0.4	6.3	0.5	0.1
Isopropanol	1.3	3.1	2.4	2.5	0.7	0.3	0.4	4.7	0.6	0.0	3.3	0.7	0.6	0.3	0.1
Dimethyl isophthalate	5.5	0.0	1.7	1.5	0.1	1.8	3.1	2.3	0.0	0.0	3.1	0.0	3.2	0.7	1.0
Propyl paraben	3.4	3.2	0.7	1.4	0.4	3.2	7.3	2.6	0.0	0.0	5.2	0.0	3.0	0.3	1.3

表 S3-6-2 UV 検出およびFL 検出による ADRA (0.5 mg/mL) バリデーション研究 (NAL 減少率)

Test chemical	Depletion of NAL (%)														
	Lab.A			Lab.B			Lab.C			Lab.D			Lab.E		
	1st set	2nd set	3rd set	1st set	2nd set	3rd set	1st set	2nd set	3rd set	1st set	2nd set	3rd set	1st set	2nd set	3rd set
<b>Result of UV detection</b>															
p-Benzoquinone	100.0	91.4	89.6	100.0	100.0	89.6	93.1	94.2	89.9				90.8	91.3	89.7
Diphenylcyclopropanone	1.9	9.1	7.0	2.4	2.6	1.4	2.0	8.2	6.8				4.3	3.2	3.2
2-Methyl-2H-isothiazol-3-one	0.2	0.0	1.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	1.5				0.0	0.0	0.0
Palmitoyl Chloride	98.2	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0				100.0	100.0	100.0
Imidazolidinyl urea	2.0	1.8	2.1	2.5	0.0	0.0	0.8	0.7	2.4				6.3	1.2	1.1
Farnesal	4.4	9.8	16.0	6.8	8.5	14.9	7.3	14.6	16.1				20.6	4.9	1.9
Glycerol	0.0	0.3	0.0	0.0	2.3	0.0	0.0	0.0	1.3				0.0	0.6	0.3
Isopropanol	0.2	0.8	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.1	0.5				0.0	0.6	0.0
Dimethyl isophthalate	0.0	0.2	4.1	0.0	0.0	0.0	0.0	5.1	4.6				0.0	0.3	0.0
Propyl paraben	0.0	4.9	4.5	0.0	0.0	0.0	0.0	4.5	4.8				0.0	0.5	0.0
<b>Result of FL detection</b>															
p-Benzoquinone	89.1	90.5	90.3	89.8	90.0	90.6	93.1	92.9	91.6	91.5	88.7	86.3	92.4	90.4	92.1
Diphenylcyclopropanone	0.0	6.7	6.8	3.6	2.3	2.6	2.9	8.0	4.1	0.0	7.6	0.8	4.4	3.8	6.6
2-Methyl-2H-isothiazol-3-one	0.0	0.8	5.2	1.6	0.2	0.1	0.3	0.2	3.3	0.0	11.0	0.0	0.2	0.6	1.8
Palmitoyl Chloride	98.2	99.9	99.9	97.6	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	98.8	92.9	99.9	100.0	100.0	100.0
Imidazolidinyl urea	2.0	0.0	5.4	0.0	0.0	0.0	2.6	1.3	7.7	0.0	9.2	0.0	4.1	0.7	1.9
Farnesal	5.9	5.2	17.7	9.3	9.1	17.0	10.3	20.5	22.5	11.1	20.3	19.3	24.4	8.9	10.7
Glycerol	1.4	0.0	4.0	0.0	4.8	0.0	1.0	0.1	7.5	0.0	0.3	0.0	1.7	0.7	1.4
Isopropanol	0.0	0.6	4.0	1.6	1.0	1.3	1.7	2.0	0.8	0.0	0.3	0.0	0.4	1.0	1.3
Dimethyl isophthalate	0.0	0.0	6.5	0.0	0.0	0.0	1.7	3.2	5.2	0.1	3.5	0.0	0.0	1.2	3.1
Propyl paraben	0.5	4.4	5.7	0.0	0.0	0.0	1.3	3.1	1.7	0.0	2.3	0.0	0.0	0.9	3.2

表 S3-6-3 UV 検出およびFL 検出による ADRA (0.5 mg/mL) バリデーション研究 (NAC/NAL 平均値)

Test chemical	Mean depletion (%)														
	Lab.A			Lab.B			Lab.C			Lab.D			Lab.E		
	1st set	2nd set	3rd set	1st set	2nd set	3rd set	1st set	2nd set	3rd set	1st set	2nd set	3rd set	1st set	2nd set	3rd set
<b>Result of UV detection</b>															
p-Benzoquinone	100.0	95.7	94.8	100.0	100.0	94.8	96.6	97.1	94.9				94.1	95.7	94.9
Diphenylcyclopropanone	26.0	29.5	31.2	24.8	26.1	24.8	32.1	32.1	33.5				28.7	27.4	27.7
2-Methyl-2H-isothiazol-3-one	50.1	50.0	50.7	50.0	50.0	50.0	47.0	46.9	46.7				46.5	46.3	46.4
Palmitoyl Chloride	54.0	57.2	60.4	50.0	52.9	53.0	56.1	55.9	59.9				57.3	56.3	56.8
Imidazolidinyl urea	16.6	20.2	24.1	13.2	12.6	11.3	18.7	20.0	18.1				21.7	17.5	18.2
Farnesal	19.3	23.3	30.8	30.4	31.0	34.8	42.4	51.7	41.2				22.9	25.9	23.8
Glycerol	0.5	1.6	0.0	0.0	1.4	0.6	1.3	0.2	0.7				0.7	0.4	0.2
Isopropanol	0.7	0.4	0.0	0.0	0.1	0.1	0.8	1.0	0.2				0.2	0.3	0.2
Dimethyl isophthalate	0.0	1.9	2.7	0.8	0.2	0.1	1.7	4.6	3.9				0.9	0.6	0.0
Propyl paraben	0.0	4.3	2.6	1.4	0.0	0.6	3.8	4.2	4.0				0.6	0.3	0.0
<b>Result of FL detection</b>															
p-Benzoquinone	94.6	95.3	95.2	94.9	95.0	95.0	96.6	96.5	95.8	95.8	94.4	93.1	96.2	95.2	96.0
Diphenylcyclopropanone	25.0	29.3	31.7	26.9	25.7	24.9	32.1	31.2	31.1	49.9	53.7	25.4	28.4	27.6	29.6
2-Methyl-2H-isothiazol-3-one	49.5	49.9	52.6	49.8	49.1	48.9	50.1	50.1	51.6	49.2	54.5	49.4	49.7	49.9	50.5
Palmitoyl Chloride	61.9	59.7	62.0	51.1	52.2	52.4	55.1	55.4	64.3	51.3	54.3	58.4	58.3	56.7	57.5
Imidazolidinyl urea	16.7	15.7	25.1	9.1	13.6	19.5	14.2	14.4	18.2	10.0	20.2	12.1	16.9	13.9	14.2
Farnesal	26.6	25.5	38.9	30.5	29.2	36.2	43.0	53.1	49.0	29.8	38.6	46.1	26.8	27.5	28.6
Glycerol	1.1	0.3	3.2	0.0	3.2	2.0	1.0	0.5	4.4	0.0	1.4	0.2	4.0	0.6	0.8
Isopropanol	0.7	1.9	3.2	2.0	0.8	0.8	1.0	3.4	0.7	0.0	1.8	0.3	0.5	0.6	0.7
Dimethyl isophthalate	2.8	0.0	4.1	0.8	0.0	0.9	2.4	2.7	2.6	0.0	3.3	0.0	1.6	1.0	2.1
Propyl paraben	2.0	3.8	3.2	0.7	0.2	1.6	4.3	2.8	0.8	0.0	3.8	0.0	1.5	0.6	2.2

■ : Sensitizer 減少率  $\geq 4.9$

□ : Non-sensitizer 減少率  $< 4.9$

表 S3-7-1 UV 検出による ADRA (4 mM) バリデーション研究

No.	Test chemicals	LLNA potency	depletion	Lab.A						Lab.B						Lab.C						Lab.D						Lab.E					
				Set1		Set2		Set3		Set1		Set2		Set3		Set1		Set2		Set3		Set1		Set2		Set3		Set1		Set2		Set3	
				NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL										
1	Diphenylcyclopropane	Extreme	depletion (%) mean % depletion	65.2	2.1	70.7	4.0	68.6	5.4	68.8	3.7	69.3	2.7	64.7	6.0	70.6	4.2	75.5	5.7	73.5	7.0	68.7	5.8	71.7	5.4	72.9	6.3	69.0	7.3	69.3	5.5	68.8	6.5
2	2-Methyl-2H-isothiazol-3-one	Moderate	depletion (%) mean % depletion	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.6	100.0	0.0	100.0	0.1	100.0	0.0	100.0	4.8	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0	0.2
3	Palmitoyl Chloride	Moderate	depletion (%) mean % depletion	8.4	82.1	7.1	87.3	8.6	82.3	7.9	89.4	10.2	94.8	9.4	100.0	11.0	100.0	20.0	100.0	36.6	100.0	10.6	100.0	17.7	100.0	19.1	100.0	2.7	100.0	7.5	100.0	5.6	97.9
4	Imidazolidinyl urea	Weak	depletion (%) mean % depletion	58.6	3.6	58.9	3.6	60.2	6.8	64.7	4.0	65.0	7.0	58.4	8.0	61.2	4.7	65.3	11.2	61.2	6.8	59.2	2.4	61.6	3.2	60.3	3.6	61.6	6.3	62.2	7.3	61.3	8.4
5	Farnesal	Weak	depletion (%) mean % depletion	86.0	16.7	85.1	21.6	81.6	23.8	89.6	11.3	94.2	11.4	92.2	18.8	97.1	14.6	100.0	24.2	100.0	30.2	33.7	18.9	64.4	16.9	30.0	17.2	81.8	12.9	83.6	14.5	89.9	15.9
10	Isopropanol	Non-sensitizer	depletion (%) mean % depletion	0.0	0.0	0.4	1.2	0.2	0.2	0.4	0.5	2.5	0.1	0.0	1.1	0.7	0.0	2.9	3.5	0.0	0.3	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.7	0.0	0.0	0.4	0.0	0.4
11	Dimethyl isophthalate	Non-sensitizer	depletion (%) mean % depletion	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.2	0.0	1.6	0.0	0.0	1.4	0.4	2.2	1.5	0.7	0.5	1.2	0.0	0.0	0.0	0.4	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	
12	Propyl paraben	Non-sensitizer	depletion (%) mean % depletion	0.0	0.1	0.2	0.4	0.0	0.7	0.0	0.3	0.0	1.5	0.0	0.0	1.5	0.3	2.1	1.7	1.3	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.3	0.0	0.3	0.0	0.0	0.2	

■ : Sensitizer : 減少率 ≥ 4.9    □ : Non-sensitizer : 減少率 < 4.9    □ : co-elution

表 S3-7-2 FL 検出による ADRA (4 mM) バリデーション研究

No.	Test chemicals	LLNA potency	depletion	Lab.A						Lab.B						Lab.C						Lab.D						Lab.E					
				Set1		Set2		Set3		Set1		Set2		Set3		Set1		Set2		Set3		Set1		Set2		Set3		Set1		Set2		Set3	
				NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL
1	Diphenylcyclopropane	Extreme	depletion (%) mean % depletion	64.1	2.6	70.0	3.5	68.1	5.2	69.9	4.1	69.6	3.3	65.9	6.5	70.5	4.2	75.2	5.1	73.5	8.0	69.5	5.5	72.1	6.1	72.5	6.4	68.2	7.4	68.8	5.2	68.4	6.3
2	2-Methyl-2H-isothiazol-3-one	Moderate	depletion (%) mean % depletion	99.2	0.1	99.2	0.1	99.3	0.3	100.0	1.2	100.0	0.3	100.0	1.4	99.2	0.1	99.2	4.5	99.1	0.9	99.3	0.0	99.2	0.0	99.2	0.0	100.0	0.0	99.5	0.6	99.6	0.9
3	Palmitoyl Chloride	Moderate	depletion (%) mean % depletion	8.7	81.9	7.5	86.9	8.7	82.5	8.7	89.5	10.9	94.6	9.6	99.3	11.0	100.0	20.6	100.0	37.1	100.0	11.4	100.0	16.1	99.9	19.1	100.0	2.8	100.0	7.6	99.3	5.3	97.9
4	Imidazolidinyl urea	Weak	depletion (%) mean % depletion	45.9	2.8	58.3	1.8	59.1	5.6	66.1	2.0	65.3	4.0	59.1	3.9	61.4	3.7	65.4	10.7	61.5	6.2	59.3	1.4	60.6	2.6	60.0	2.4	60.9	4.6	62.4	5.4	60.8	5.5
5	Farnesal	Weak	depletion (%) mean % depletion	97.9	17.7	91.9	19.9	94.8	22.9	95.7	11.8	97.9	12.4	95.5	21.0	96.6	16.3	98.9	25.3	100.0	30.3	83.5	19.1	83.7	18.0	81.1	17.9	80.7	13.5	82.9	13.3	88.1	14.9
10	Isopropanol	Non-sensitizer	depletion (%) mean % depletion	0.0	0.1	0.6	1.4	0.0	0.3	1.5	1.0	3.6	0.0	0.8	2.3	0.7	0.0	2.8	3.3	0.1	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.1	0.0	0.3	0.0	0.4
11	Dimethyl isophthalate	Non-sensitizer	depletion (%) mean % depletion	0.0	0.3	0.1	0.0	0.0	0.3	0.0	0.1	0.1	1.3	0.3	1.3	1.5	0.3	1.8	1.3	0.7	0.5	1.1	0.0	3.2	0.0	0.0	0.7	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
12	Propyl paraben	Non-sensitizer	depletion (%) mean % depletion	0.0	0.4	0.5	0.2	0.0	0.7	0.5	0.1	0.0	1.3	0.6	0.7	1.7	0.2	2.3	1.2	1.4	0.7	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.4	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.2

■ : Sensitizer : 減少率 ≥ 4.9    □ : Non-sensitizer : 減少率 < 4.9

表 S3-8-1 ADRA (1 mM) と ADRA (4 mM) で判定結果が異なる化合物の ADRA (4 mM) による評価 (UV 検出器)

No.	Test chemicals	LLNA potency	depletion	Lab.A						Lab.B						Lab.C						Lab.D						Lab.E					
				Set1		Set2		Set3		Set1		Set2		Set3		Set1		Set2		Set3		Set1		Set2		Set3		Set1		Set2		Set3	
				NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL
6	m-Aminophenol	Moderate	depletion (%) mean % depletion	32.1	0.0	33.8	0.0	30.8	0.0	24.3	0.1	27.1	0.0	22.3	0.0	14.8	0.8	2.9	2.1	10.8	0.1	24.9	0.0	28.6	0.0	32.5	0.0	12.8	0.0	18.9	0.5	23.9	0.5
7	3-Propylenephthalide	Moderate	depletion (%) mean % depletion	34.1	50.4	42.0	59.2	42.1	52.9	35.5	64.2	24.5	72.5	23.0	72.4	31.2	69.2	20.4	80.5	26.1	71.8	13.2	53.3	21.9	56.4	25.5	62.0	16.8	59.9	23.3	67.5	18.1	58.8
8	Ethylene glycol dimethacrylate	Weak	depletion (%) mean % depletion	16.6	1.0	21.0	0.3	17.6	2.4	21.6	1.0	18.2	1.5	16.5	0.3	20.3	1.5	18.7	3.8	29.1	3.0	14.0	0.2	20.1	1.3	19.9	1.5	19.0	1.6	19.3	1.2	19.4	0.7
9	n-Butyl glycidyl ether	Weak	depletion (%) mean % depletion	24.6	1.2	23.2	0.0	25.7	2.1	32.3	3.2	30.7	1.6	28.0	4.8	23.6	1.0	27.2	4.8	37.3	3.8	26.2	0.1	31.9	0.7	33.7	0.0	21.0	2.5	26.0	2.9	25.7	3.1

■ : Sensitizer : 減少率 ≥ 4.9    □ : Non-sensitizer : 減少率 < 4.9

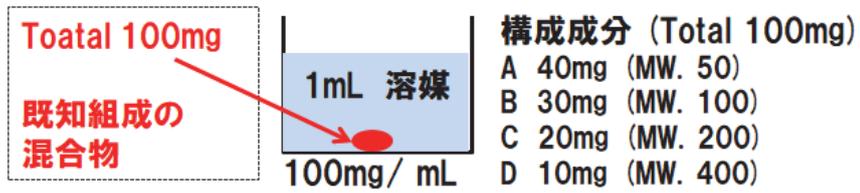
表 S3-8-2 ADRA (1 mM) と ADRA (4 mM) で判定結果が異なる化合物の ADRA (4 mM) による評価 (FL 検出器)

No.	Test chemicals	LLNA potency	depletion	Lab.A						Lab.B						Lab.C						Lab.D						Lab.E					
				Set1		Set2		Set3		Set1		Set2		Set3		Set1		Set2		Set3		Set1		Set2		Set3		Set1		Set2		Set3	
				NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL	NAC	NAL
6	m-Aminophenol	Moderate	depletion (%) mean % depletion	31.5	0.4	32.9	0.0	30.7	0.3	24.0	1.8	26.4	0.3	23.2	1.8	14.1	0.6	2.9	1.6	11.2	0.2	24.6	0.0	29.5	0.0	32.8	0.0	12.6	0.1	18.6	0.6	23.8	1.0
7	3-Propylenephthalide	Moderate	depletion (%) mean % depletion	33.6	50.8	41.5	59.4	41.7	53.3	33.2	64.1	25.3	72.6	24.4	73.4	31.4	70.0	20.2	81.2	25.9	71.7	17.7	52.9	22.9	56.2	26.9	61.8	16.6	60.1	23.9	66.7	18.4	58.0
8	Ethylene glycol dimethacrylate	Weak	depletion (%) mean % depletion	15.7	1.6	20.5	0.3	17.6	2.5	23.2	1.4	19.1	2.1	18.3	2.1	20.7	1.5	18.8	3.5	29.7	2.7	13.9	0.6	20.8	2.9	20.4	3.2	18.9	4.2	19.5	1.3	19.0	0.8
9	n-Butyl glycidyl ether	Weak	depletion (%) mean % depletion	24.0	1.3	23.2	0.3	25.7	2.5	33.3	3.0	31.0	2.8	29.5	4.5	23.7	1.3	26.9	5.6	37.2	4.0	26.4	0.0	31.6	1.1	34.0	0.0	20.3	2.4	25.7	3.0	25.4	3.2

■ : Sensitizer : 減少率 ≥ 4.9    □ : Non-sensitizer : 減少率 < 4.9

Annex 4. 構成成分情報が既知の混合物溶液の見かけの分子量の計算方法

例)構成成分情報が既知の10% 混合物溶液



見かけの分子量 (A single aggregated molecular weight)

$$= (50 \times 40 / 100) + (100 \times 30 / 100) + (200 \times 20 / 100) + (400 \times 10 / 100)$$

$$= 130$$

## Annex 5. ADRA と DPRA の予測性

ADRA は、136 種類の LLNA のデータセットおよび 81 種類のヒトのデータセットに対して、ADRA (1 mM)、ADRA (4 mM) および ADRA (0.5 mg/mL) が実施され、それぞれの試験法の感度、特異度、正確度および平均正確度 (Balanced accuracy) が計算された。なお、平均正確度は、感度と特異度の平均値であり、この指標は、*in vivo* 陽性と *in vivo* 陰性の化学物質の数が異なる場合に、有効である。また、参考までに DPRA のデータも掲載した。136 種類の LLNA のデータセットに対して ADRA は、被験物質濃度を 1 mM から 4 mM にすることで、11 種類の偽陰性化合物が、感作性物質と判定された一方、4 種類の非感作性物質が偽陽性と判定されたが、総合的に LLNA と結果が一致する化合物が 7 種類増加した。同様に、被験物質濃度を 1 mM から 0.5 mg/mL にすることで、10 種類の偽陰性化合物が、感作性物質と判定される一方、4 種類の非感作性物質が偽陽性と判定されたが、総合的に LLNA の結果と一致する化合物が 6 種類増加した。81 種類のヒトのデータセットに対して、ADRA は、被験物質濃度を 1 mM から 4 mM にすることで、7 種類の偽陰性化合物が、感作性物質と判定される一方、非感作性物質が偽陽性と判定された化合物はなく、総合的にヒトと結果が一致する化合物が 7 種類増加した。同様に、被験物質濃度を 1 mM から 0.5 mg/mL にすることで、6 種類の偽陰性化合物が、感作性物質と判定される一方、非感作性物質が偽陽性と判定された化合物はなく、総合的にヒトの結果と一致する化合物が 6 種類増加した。このように、被験物質濃度を 4 mM や 0.5 mg/mL に上げることで、1 mM の被験物質濃度では、NAC/NAL の減少率が閾値よりわずかに低いため非感作性と判定される moderate や weak に分類される感作性物質の一部を陽性として判定できることから、その効果は明らかである。ADRA (4 mM) と ADRA (0.5 mg/mL) の平均正確度は ADRA (1 mM) と同等以上であると考えられる。

表 S5-1 ADRA および DPRA の感作性予測結果のまとめ<sup>15)</sup>

	感度 (%) (Sensitivity)	特異度 (%) (Specificity)	正確度 (%) (Accuracy)	平均正確度 (%) (Balanced accuracy)
<u>vs LLNA data</u>				
ADRA (4mM)	76 ( 74 / 98 )	79 ( 30 / 38 )	76 ( 104 / 136 )	77
ADRA (1 mM)	65 ( 64 / 98 )	89 ( 34 / 38 )	72 ( 98 / 136 )	77
ADRA (0.5mg/mL)	74 ( 73 / 98 )	79 ( 30 / 38 )	76 ( 103 / 136 )	77
DPRA	72 ( 71 / 98 )	76 ( 29 / 38 )	74 ( 100 / 136 )	74
<u>vs human data</u>				
ADRA (4mM)	83 ( 48 / 58 )	86 ( 19 / 22 )	84 ( 67 / 80 )	85
ADRA (1 mM)	71 ( 41 / 58 )	86 ( 19 / 22 )	75 ( 60 / 80 )	79
ADRA (0.5mg/mL)	81 ( 47 / 58 )	86 ( 19 / 22 )	83 ( 66 / 80 )	84
DPRA	78 ( 45 / 58 )	86 ( 19 / 22 )	80 ( 64 / 80 )	82
LLNA	97 ( 56 / 58 )	73 ( 16 / 22 )	90 ( 72 / 80 )	85

表 S5-2 ADRA の感作性予測結果<sup>17)</sup> (1/3)

No	Test chemicals	LLNA EC3(%)	Human category	ADRA (4mM)	ADRA (1mM)	ADRA (0.5mg/mL)	DPRA
<b><i>Extreme sensitizers</i></b>							
1	Diphenylcyclopropenone	0.00030		Pos	Pos	Pos	Pos
2	Oxazolone	0.0030	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
3	Chlorothalonil	0.0040		Pos	Pos	Pos	Pos
4	MCI/MI	0.0050	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
5	<i>p</i> -Benzoquinone	0.0099	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
6	Tetrachlorosalicylanilide	0.040	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
7	Bandrowski's base	0.040		Pos	Pos	Pos	Pos
8	4-Nitrobenzyl bromide	0.050		Pos	Pos	Pos	Pos
<b><i>Strong sensitizers</i></b>							
9	Glutaraldehyde	0.10	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
10	Hydroquinone	0.11	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
11	Phthalic anhydride	0.16	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos
12	Maleic anhydride	0.16		Pos	Pos	Pos	Pos
13	1,4-Phenylenediamine	0.16	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
14	Hexyl salicylate	0.18	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg
15	Benzyl bromide	0.20		Pos	Pos	Pos	Pos
16	Benzoyl peroxide	0.22	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
17	Lauryl gallate	0.30	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
18	Propyl gallate	0.32	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
19	2,5-Diaminotoluene sulfate	0.40	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
20	2-Aminophenol	0.40	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
21	2-Nitro-1,4-phenylenediamine	0.50	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
22	Chloramine-T dihydrate	0.60		Pos	Pos	Pos	Pos
23	CD-3	0.60		Pos	Pos	Pos	Pos
24	Formaldehyde	0.61	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
25	Iodopropynyl butylcarbamate	0.90	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
26	1,2-Dibromo-2,4-dicyanobutane	0.90	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
<b><i>Moderate sensitizers</i></b>							
27	Isoeugenol	1.2	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
28	1-Naphthol	1.3		Pos	Pos	Pos	Pos
29	1-Phenyl-1,2-propanedione	1.3		Pos	Pos	Pos	Pos
30	2-Hydroxyethyl acrylate	1.4	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
31	Glyoxal	1.4	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
32	Bisphenol A diglycidyl ether	1.5	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
33	Vinyl pyridine	1.6		Pos	Pos	Pos	Pos
34	2-Mercaptobenzothiazole	1.7	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
35	2-Methyl-2H-isothiazol-3-one (MI)	1.9	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
36	3-Dimethylamino propylamine	2.2	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg
37	Ethylenediamine	2.2	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg
38	1,2-Benzisothiazolin-3-one	2.3	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
39	Methyl pyruvate	2.4		Neg	Neg	Neg	Neg
40	Methyl 2-nonynoate	2.5	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
41	Benzyl salicylate	2.9	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
42	Phenylacetaldehyde	3.0	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
43	Cinnamic aldehyde	3.0	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
44	<i>m</i> -Aminophenol	3.2		Pos	Neg	Pos	Neg
45	Diethyl sulfate	3.3		Neg	Neg	Pos	Pos
46	3-Propylideneephthalide	3.7	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg
47	Benzylideneacetone	3.7	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
48	2,4-Heptadienal	4.0		Pos	Pos	Pos	Pos
49	Tropolone	4.3		Neg	Neg	Neg	Neg
50	$\alpha$ -Methylcinnamaldehyde	4.5		Pos	Pos	Pos	Pos

表 S5-2 ADRA の感作性予測結果<sup>17)</sup> (2/3)

No	Test chemicals	LLNA EC3(%)	Human category	ADRA (4mM)	ADRA (1mM)	ADRA (0.5mg/mL)	DPRA
51	Nickel (II) sulfate	4.8	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg
52	Tetramethylthiuram disulfide	5.2	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
53	<i>trans</i> -2-Hexenal	5.5	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
54	Resorcinol	5.5	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos
55	Diethyl maleate	5.8	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
56	2-Methoxy-4-methyl-phenol	5.8		Pos	Neg	Pos	Pos
57	Diethylenetriamine	5.8	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos
58	2-Phenylpropionaldehyde	6.3	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
59	4-Chloroaniline	6.5		Neg	Neg	Neg	Neg
60	10-Undecenal	6.8		Neg	Neg	Neg	Neg
61	12-Bromo-1-dodecanol	6.9		Neg	Neg	Neg	Pos
62	<i>dl</i> - $\alpha$ -Tocopherol	7.4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
63	Methyl methanesulfonate	8.1		Pos	Pos	Pos	Pos
64	Perillaldehyde	8.1		Pos	Pos	Pos	Pos
65	5-Methyl-2-phenyl-4H-pyrazol-3-one	8.5		Pos	Neg	Neg	Neg
66	Trimellitic anhydride	9.2		Pos	Pos	Pos	Neg
<b>Weak sensitizers</b>							
67	2-Ethylhexyl acrylate	10		Pos	Pos	Pos	Pos
68	1-Bromohexane	10		Pos	Neg	Neg	Neg
69	$\alpha$ -Hexylcinnamaldehyde	11	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
70	$\alpha$ -Amylcinnamaldehyde	11	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg
71	2,3-butanedione	11		Pos	Pos	Pos	Pos
72	N-Butyl acrylate	11		Pos	Pos	Pos	Pos
73	R-Carvone	13	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
74	Citral	13	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
75	Eugenol	13	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
76	Abietic acid	15	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
77	Oxalic acid	15		Neg	Neg	Neg	Neg
78	Benzyl benzoate	17	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
79	Lylal	17	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
80	4-Allylanisole	18		Pos	Pos	Pos	Pos
81	Benzyl Cinnamate	18		Neg	Neg	Neg	Neg
82	Lilial	19	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg
83	N,N-Dibutylaniline	20		Neg	Neg	Neg	Neg
84	Phenyl benzoate	20	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos
85	Cinnamyl alcohol	21	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg
86	Cyclamen aldehyde	22		Pos	Neg	Pos	Pos
87	Benzocaine	22	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos
88	Imidazolidinyl urea	24	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
89	Geraniol	26	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg
90	5-Methyl-2,3-hexanedione	26	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
91	Ethyleneglycol dimethacrylate	28	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos
92	Linalool	30	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg
93	N-Butyl glycidyl ether	31	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos
94	Hydroxycitronellal	33	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
95	<i>d,l</i> -Citronellol	44	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
96	Bisphenol A Glycidyl Methacrylate	45		Pos	Pos	Pos	Pos
97	2-Ethylbutyraldehyde	76		Pos	Pos	Pos	Pos
98	Aniline	89	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg

表 S5-2 ADRA の感作性予測結果<sup>17)</sup> (3/3)

No	Test chemicals	LLNA EC3(%)	Human category	ADRA (4mM)	ADRA (1mM)	ADRA (0.5mg/mL)	DPRA
<b><i>Non-sensitizers</i></b>							
99	Dibutyl phthalate	NC		Neg	Neg	Neg	Neg
100	1-Bromobutane	NC		Neg	Neg	Neg	Neg
101	1-Butanol	NC	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
102	1-Iodohexane	NC		Neg	Neg	Neg	Pos
103	2-Acetylcyclohexanone	NC		Pos	Neg	Pos	Pos
104	2-Fluoro-5-nitroaniline	NC		Neg	Neg	Neg	Neg
105	2-Hydroxypropyl methacrylate	NC		Pos	Neg	Pos	Pos
106	3-Phenoxypropionitrile	NC		Neg	Neg	Neg	Pos
107	4-Hydroxybenzoic acid	NC	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
108	4'-Methoxyacetophenone	NC	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
109	6-Methylcoumarin	NC	Pos/Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
110	Benzalkonium chloride	NC	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg
111	Benzaldehyde	NC	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg
112	1-Methoxy-4-methyl-2-nitrobenzene	NC		Neg	Neg	Neg	Neg
113	Benzyl butyl phthalate	NC		Pos	Pos	Pos	Neg
114	Chlorobenzene	NC		Neg	Neg	Neg	Neg
115	Clofibrate	NC		Neg	Neg	Neg	Neg
116	Coumarin	NC	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg
117	Diethyl phthalate	NC	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
118	<i>N,N</i> -Diethyl- <i>m</i> -toluamide	NC		Pos	Neg	Pos	Neg
119	<i>N,N</i> -Dimethylformamide	NC		Neg	Neg	Neg	Neg
120	Ethyl benzoylacetate	NC		Neg	Neg	Pos	Neg
121	Ethyl vanillin	NC		Neg	Neg	Neg	Pos
122	Glycerol	NC	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
123	Isopropanol	NC	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
124	Lactic acid	NC	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
125	Methyl salicylate	NC	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
126	Octanoic acid	NC	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
127	Methyl 3-bromopropanoate	NC		Pos	Pos	Pos	Pos
128	Propylparaben	NC	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
129	Propylene glycol	NC	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
130	Saccharin	NC		Neg	Neg	Neg	Pos
131	Streptomycin sulfate	NC	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg
132	Sulfanilamide	NC	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
133	Sulfanilic acid	NC		Neg	Neg	Neg	Neg
134	Vanillin	NC	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
135	Nonanoic acid	21 (false pos)		Neg	Neg	Neg	Neg
136	Sodium lauryl sulfate	14 (false pos)	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos

NC; No Classification, Pos; Positive, Neg; Negative

 : Sensitizer

 : Non-sensitizer