

LLNA: BrdU-ELISA 法を用いた皮膚感作性定量的リスク評価と  
その応用に関する研究

山口大学大学院共同獣医学研究科

福島麻子

2024年3月

## 目次

### 序章 緒言

P-1 皮膚感作性とは

P-2 皮膚感作性試験としての LLNA: BrdU-ELISA 法

P-3 皮膚感作性定量的リスク評価の現状と重要性

P-4 本研究の目的

### 第 1 章 LLNA: BrdU-ELISA 法で得られる EC1.6 値を用いた作業者リスク管理のための皮

#### 膚感作性定量的リスク評価手法の開発

1-1 小序

1-2 LLNA: BrdU-ELISA 法で得られる EC1.6 値の皮膚感作性定量的リスク評価への利  
用可能性の検討

1-3 LLNA: BrdU-ELISA 法で得られる EC1.6 値を用いた作業者の感作性リスク管理の  
ための許容残留限度値算出手法の開発とその検証

1-4 開発した手法に基づく許容残留限度値と全身影響に基づく設備表面残留レベルの比  
較解析

1-5 小括

## 第 2 章 消費者製品に含まれる皮膚感作性物質の定量的リスク評価への応用可能性の検討

### 2-1 小序

### 2-2 デスクマットに添加された抗菌剤によるアレルギー性接触皮膚炎の遡及的解析による皮膚感作性定量的リスク評価手法の適用性の検討

### 2-3 小括

## 終章 総括と結論

## 研究発表実績

## 要約

## 謝辞

## 参考文献

## 序章 緒言

### P-1 皮膚感作性とは

アレルギーとは、特定の免疫反応によって生じる健康への有害影響である。化学物質への曝露で最も一般的に生じるアレルギーとしてアレルギー性接触皮膚炎（allergic contact dermatitis: ACD）が知られており、化学物質の持つ ACD を引き起こす性質を皮膚感作性という。ACD は遅延型アレルギーもしくはIV型アレルギーと呼ばれる、活性化された T リンパ球が主体となる細胞性免疫反応の一つである。ACD に至るまでの過程は、①化学物質との接触、②アレルギー性物質の認識、③アレルギー性物質の再認識、④アレルギー性物質を認識する細胞による曝露局所組織の破壊の 4 段階に分けられる。これらの過程のうち、①及び②を感作相といい、感作のメカニズムを Fig. 1 に示した。接触により化学物質が皮膚中に透過すると、化学物質は表皮タンパク質と結合することで、ケラチノサイトによって産生された炎症性サイトカインやケモカインによって活性化した抗原提示細胞に捕捉・処理される。その後、抗原提示細胞が近傍のリンパ節へ遊走し、リンパ節内でリンパ球に化学物質の情報を伝達する抗原提示が行われ、化学物質を認識したリンパ球（感作リンパ球）が分化・増殖して全身へ分布することで感作が成立し、アレルギー状態となる。③及び④の過程は惹起相と呼ばれ、当該化学物質に再度曝露され、曝露局所の皮膚組織が当該化学物質を認識する感作リンパ球によって攻撃・破壊され、その結果炎症（皮膚炎）が引き起こされる



(武吉, 2005)。

皮膚感作性物質による ACD では刺激性を示さない程度のごく微量の曝露でも皮膚のかぶれ及び炎症を引き起こされ、一度罹患してしまうと完治することは困難で生活の品質を著しく低下させてしまうため、労働安全衛生上の問題となっている (武吉, 2005)。また、化学物質は我々の生活の中で広く普及している製品の原料として使用されており、生産された工業製品の使用による消費者の ACD 発症も報告されている。独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) の消費者製品に関する事故情報データベースでは、衣類に使用される染料や抗菌剤、樹脂製品に含まれる可塑剤などの様々な消費者製品に起因する ACD が報告されている (NITE 事故情報データベース) ことから、これらの消費者製品に使用される化学物質の皮膚感作性を事前に予測すること、あるいは人に接触する可能性のある製品に使用される化学物質について ACD を生じさせないように管理することは公衆衛生上、極めて重要な課題である。

## P-2 皮膚感作性試験としての LLNA: BrdU-ELISA 法

化学物質の皮膚感作性を予測する皮膚感作性試験法としては、従来よりモルモットを用いた Guinea pig maximization test (Magunusson and Kligman, 1969) 及び Buehler test (Buehler, 1965) が用いられ、これまでに多くのデータが取得されてきた。これらの手法は有害事象である皮膚における炎症反応の発現の有無を目視観察して皮膚感作性を評価するため、定性的な結果しか得られず、試験期間が長期間に渡り、動物に苦痛を与えるという問題もあった。これらの問題に対し、Kimber ら (Kimber *et al.*, 1989; Basketter *et al.*, 1996) によって開発されたマウスの耳介に化学物質を適用した後、所属リンパ節内の細胞の増殖反応を放射性同位元素 (RI) で標識された Thymidine (3H-TdR) の取り込みを指標として測定する Local Lymph Node Assay (LLNA) (以下、LLNA-RI 法) を開発した (Fig. 2)。

LLNA-RI 法は、皮膚感作性の発現機序のうち感作相までを評価することで試験期間を短くかつ動物への苦痛を軽減し、TG429 (OECD, 2010) として OECD テストガイドラインに収載され、前述の利点などから動物を用いた皮膚感作性試験法の主流となっている。

これまでの皮膚感作性試験の評価では感作性の有無、即ち定性評価が行われてきた。しかしながら、化学物質が有する感作を誘発する相対的な効力、即ち感作性強度 (potency) は化学物質ごとに異なることは明らかであり、感作性強度の評価が皮膚感作性物質の分類において極めて重要な要素になることが指摘された (Kimber *et al.*, 2003)。

LLNA-RI 法では、陽性と判定される濃度閾値である EC3 値を算出することで、皮膚感作

性強度を定量的に評価する手法が提案されている (Kimber *et al.*, 2003)。このため EC3 値は感작성強度の定量的指標として活用されており、ヒトにおける感작성強度 (Human class 1-6) の推定 (Kimber *et al.*, 2003; Basketter *et al.*, 2014) や、化学品の国際的に調和されたハザード分類・情報伝達システムである国連 Globally Harmonized System (GHS) における皮膚感작성分類の細区分 (1A (強い感작성物質)/1B (その他の感작성物質)) に利用されている (UN, 2023)。また近年は、化粧品分野を中心に EC3 値を利用した皮膚感작성定量的リスク評価も検討されている (Api *et al.*, 2008; Basketter and Safford, 2016; Api *et al.*, 2020)。このように、皮膚感작성評価は定性的評価から定量的評価へシフトしている。

一方、LLNA-RI 法は放射性同位体 (RI) を用いるため、日本国内においては法令に従い専用の放射線施設ならびに国家資格である放射線取扱主任者の選任が必要となり、試験の実施には一定の制約があった。これを克服するため、RI を用いない LLNA: BrdU-ELISA 法が開発された (Fig. 3)(Takeyoshi *et al.*, 2001)。LLNA: BrdU-ELISA 法は、細胞増殖の指標として RI 化合物ではなく 5-Bromo-2-deoxyuridine (BrdU) を使用し、その取り込みを酵素免疫測定法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) によって定量する試験法である。LLNA: BrdU-ELISA 法は、公的なバリデーション研究 (Kojima *et al.*, 2010)、第三者評価 (ICCVAM, 2010) を経て OECD テストガイドライン (TG442B) として収載され (OECD, 2010)、我が国はもとより、世界的な標準的試験法として広く利用されている (Takeyoshi and Nara, 2021)。本法も OECD による第三者評価 (UN, 2022a; UN, 2022b)、

国連 GHS 小委員会の決定により GHS 細区分への適用が承認され、RI 法と同等の定量性が証明されている (UN, 2022c; UN, 2023)。LLNA: BrdU-ELISA 法においても LLNA-RI 法と同様に陽性と判定される濃度閾値 (LLNA: BrdU-ELISA 法では EC1.6 値) を用いて皮膚感作性強度を定量的に評価することが可能であり、LLNA: BrdU-ELISA 法は化学物質の皮膚感作性定量的リスク評価のための極めて有用な手法と考えられる。

### P-3 皮膚感作性定量的リスク評価の現状と重要性

一般に、化学物質の定量的リスク評価は、①ハザードの特定、②ハザードの定量化（または用量反応解析）、③曝露評価、④リスク判定の4つのステップから成る（WHO, 2004）。このうち②ハザードの定量化では、多くの場合、動物試験で得られる無毒性量（no observed adverse effect level: NOAEL）、つまり有害影響を引き起こさない最大用量を起点とし、種間や個体間の差異、用量反応関係などを考慮するための調整係数を適用することによって化学物質の許容曝露量を導出する（Fig. 4）。

従来、皮膚感作性について定量的リスク評価は困難とされてきたが、近年、化粧品分野において、皮膚感作性物質に対する定量的リスク評価手法を確立するための種々の検討が行われている（Api *et al.*, 2008; Basketter and Safford, 2016; Api *et al.*, 2020）。このうち、Api *et al.* (2008) では、消費者製品に含まれる香料成分の皮膚感作性定量的リスク評価について、LLNA-RI法のEC3値とヒトパッチテスト（human repeated insult patch test: HRIPT）データからヒトで感作性を誘発しないと考えられる化学物質量（no expected sensitizing induction level: NESIL）を推定し、感作性アセスメント係数（調整係数）を適用することにより得られた許容曝露量を用いたリスク評価手法が提案されている。

ヒトパッチテスト（HRIPT）は、通常 80～120 人の被験者に対し被験物質（サンプル）を間隔をあけて 24 時間×9 回適用し、14～17 日間の休息期間の後、被験物質を 24 時間適用して皮膚反応を観察する試験である（Kimber and Maurer, 1996）。化粧品分野において

は、マウスやモルモットを用いた皮膚感作性試験データに加えてヒトで皮膚感作性を生じないことを確認するための試験として位置付けられ、LLNA-RI 法等の動物試験データと HRIPT の結果を統合し、ヒトで感作性を誘発しないと考えられる化学物質量 (NESIL) の決定に用いられている (Api *et al.*, 2008; Basketter and Safford, 2016; Api *et al.*, 2020)。

このように、香粧成分については、基本的にヒトパッチテストが実施され、ヒトにおける感作性の情報が豊富である点が特徴であり、このことが皮膚感作性定量的リスク評価の検討が進んでいる背景として考えられる。一方、工業化学品については、ヒトパッチテストなどのヒトにおける情報が得られることは稀であり、動物試験データに基づく皮膚感作性定量的リスク評価手法の開発はほとんど行われていないのが現状である。

工業化学品を使用する作業者の ACD 症例はこれまでに数多く報告されており、ジフェニルメタンジイソシアネート (methylenediphenyl diisocyanate) の原料、エポキシ樹脂の硬化剤、ゴムの添加剤として使用されるジアミノジフェニルメタン (4,4'-diaminodiphenylmethane) では、1960 年代頃から現在まで職業性のアレルゲンとして多数の症例報告がある (Goosens *et al.*, 2002, Jolanki *et al.*, 1994, Emmet 1976)。脱水縮合剤として研究所や工場で使用されるジシクロヘキシルカルボジイミド (dicyclohexylcarbodiimide) についても、主として工場作業者の ACD 発症事例が報告されている (Zshunke and Folesky, 1975)。近年、皮膚感作性物質の職業曝露管理のための基準値として、LLNA EC3 値を利用した設備表面の許容残留限度値の設定が提案された

(Naumann and Arnold, 2019)。しかしながら、許容残留限度値の設定に用いた調整係数等については更なる検討が必要とされている (Naumann and Arnold, 2019)。

また、前述のジアミノジフェニルメタンについては、時計バンドに使われるポリウレタンの接着剤や靴など日用品からの曝露による ACD 症例が複数報告されている (Alomar, 1986; Grimalt *et al.*, 2009) ほか、抗菌剤のクロロタロニル (chlorothalonil) を含有するペンキ中から揮発したクロロタロニルにより顔面の皮膚炎を起こした症例も報告されている (Liden, 1990)。独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) の消費者製品に関する事故情報データベースでは、衣類に使用される染料や抗菌剤、樹脂製品に含まれる可塑剤などの消費者製品に起因する ACD が 1,737 件報告されており、この中で最も報告数が多い事故例は、ピリジン系有機抗菌剤である 2,3,5,6-テトラクロロ 4-(メチルスルホニル)ピリジン (2,3,5,6-tetrachloro-4-(methylsulfonyl)pyridine: TCMSP) を含有するポリ塩化ビニル製デスクマットによる ACD 発症 (1,382 例) であった (NITE 事故情報データベース)。このように、化学物質は我々の生活の中で広く普及している製品の原料として使用されており、日用品の使用による消費者の ACD 発症も報告されていることから、公衆衛生上も重要な問題である。

しかしながら、労働安全衛生、公衆衛生のいずれの分野においても、化粧品などの一部の製品を除く化学物質による皮膚感作性の定量的リスク評価手法は十分に検討されておらず、適切なリスク管理が行われていないのが現状である。職業曝露や消費者の製品中化学物質

への曝露による ACD 発症を未然に防ぐために、皮膚感作性定量的リスク評価手法を開発し、感作性強度に基づくリスク管理を可能にすることが重要であり、化学物質によるリスクを最小化する方法で使用していくための手法開発の社会的意義は大きい。



#### P-4 本研究の目的

化学物質による ACD の回避は労働安全衛生及び公衆衛生上の重要な課題であり、化学物質の皮膚感作性について定量的リスク評価に基づくリスク管理を行うことが極めて重要と考えられるが、現状では、香粧品などの一部の製品を除き、皮膚感作性の定量的リスク評価手法の検討はほとんど行われていない。

労働安全衛生上の観点からは、化学物質を取り扱う作業現場における職業曝露管理のための基準値として、皮膚感作性強度に基づく設備表面の許容残留限度値の設定が望まれる。

皮膚感作性試験のうち、RI を使用せず感作性強度の定量的指標が得られる試験法として利用が広がっている LLNA: BrdU-ELISA 法で得られる EC1.6 値を用いた評価手法の開発が望まれる（課題①）。

また、消費者製品に含まれる化学物質の皮膚感作性の定量的リスク評価については、香粧品以外の日用品を含む種々の消費者製品に含まれる化学物質も対象としたリスク評価手法の開発が望まれる（課題②）。

以上のことから、本研究では、課題①に対しては、LLNA: BrdU-ELISA 法で得られる EC1.6 値の感作性定量的リスク評価への利用可能性の検討と作業リスク管理のための許容残留限度値算出の検討を行った。さらに、既知の感作性物質を例に、開発した手法に基づき算出される許容残留限度値と、全身影響に基づき設定される設備表面残留レベルの比較を実施

し、労働安全衛生の観点から皮膚感作性リスクを考慮した曝露管理の必要性について検証した。

課題②に対しては、消費者製品による ACD 発症事例を例題とした遡及的リスク評価を行い、作業員リスク管理の目的で開発した手法の消費者リスク評価への応用可能性について検討した。

これらの手法開発・検討により、これまで困難とされてきた化学物質による皮膚感作性の定量的リスク評価に関して、皮膚感作性強度に基づく適切なリスク管理の実施を可能とし、化学物質による作業員、消費者の健康影響の防止に貢献することを目的とした。

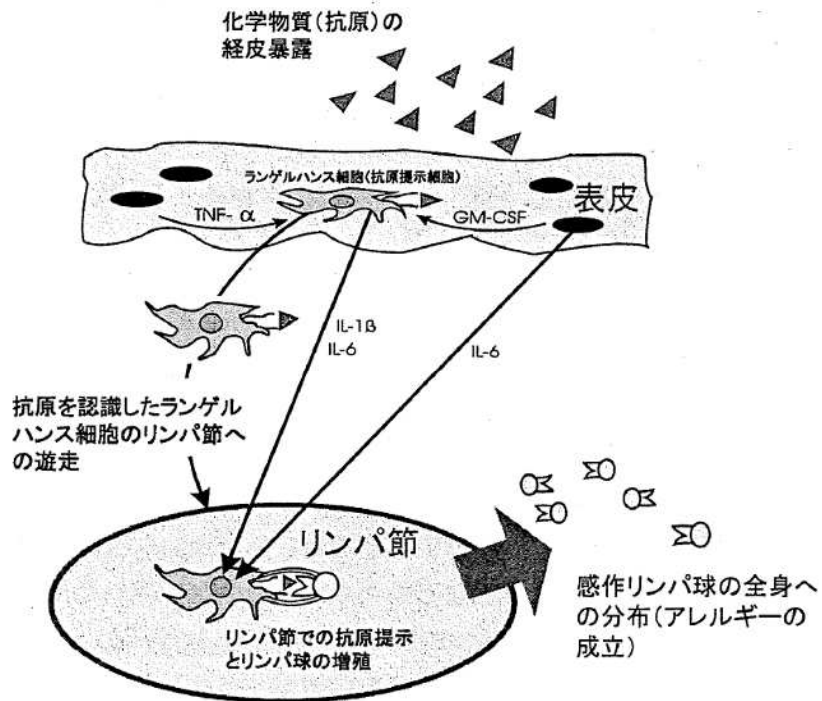


Fig. 1 Mechanism of skin sensitization (武吉, 2005)



$$\text{Stimulation Index (SI)} = \frac{\text{各個体のDPM平均値}}{\text{媒体対照群のDPM平均値}}$$

SI ≥ 3 : 陽性判定基準  
EC3 : SI=3をもたらすのに必要な被験物質濃度 (陽性と判定される濃度閾値)

Fig. 2 Outline of local lymph node assay (LLNA: Kimber *et al.*, 1989; Basketter *et al.*, 1996)



$$\text{Stimulation Index (SI)} = \frac{\text{各個体の平均吸光度}}{\text{媒体対照群の平均吸光度}}$$

SI ≥ 1.6 : 陽性判定基準  
EC1.6 : SI=1.6をもたらすのに必要な被験物質濃度 (陽性と判定される濃度閾値)

Fig. 3 Outline of LLNA:BrdU-ELISA (Takeyoshi *et al.*, 2001)

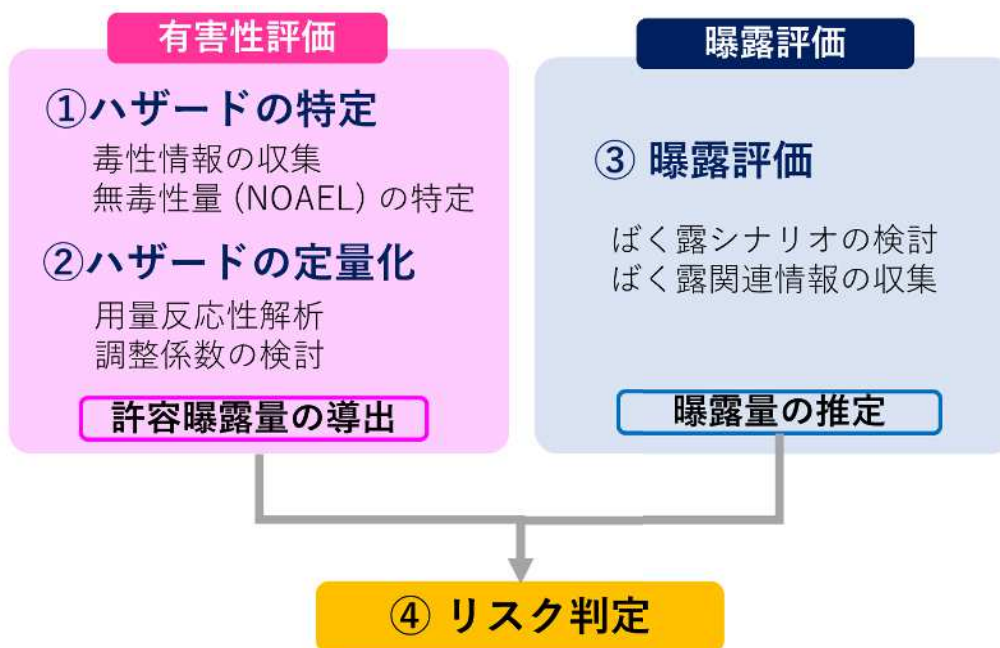


Fig. 4 Framework of quantitative risk assessment

## 第 1 章 LLNA: BrdU-ELISA 法で得られる EC1.6 値を用いた作業者リスク管理のための

### 皮膚感作性定量的リスク評価手法の開発

#### 1-1 小序

労働安全衛生管理の分野では、主に吸入曝露によるリスクを回避する目的で職業曝露限度 (occupational exposure limit: OEL) が設定されている (Deveau *et al.*, 2015) が、皮膚感作性に対する警告は、米国産業衛生専門家会議 (ACGIH) による皮膚感作性の定性的な表記 (DSEN: 化学物質が感作性を有することを示す表記) や GHS 分類による皮膚感作性分類などに限られている。ACD は、職場で感作された労働者が再び皮膚感作性物質に曝露されることで非常に低レベルの曝露によって引き起こされる可能性があり、長期にわたる影響を及ぼすことから、皮膚感作性は労働安全衛生上、非常に重要なリスク因子であり (武吉, 2005)、化学物質の皮膚感作性強度に基づく許容曝露量を用いた定量的リスク評価とリスク管理が強く望まれている。

皮膚感作性については従来、定量的リスク評価が困難とされてきたが、化粧品分野では、皮膚感作性物質に対する定量的リスク評価手法を確立するための検討が進められており、この中では、感作性強度の推定に LLNA-RI 法で得られる EC3 値 (LLNA EC3) の利用が試みられている (Api *et al.*, 2008; Basketter and Safford, 2016; Api *et al.*, 2020)。一方、工業化学品については、これまでに LLNA EC3 を利用した製造設備表面の許容残留限度値の設

定が提案されている (Naumann and Arnold, 2019) が、許容残留限度値の設定に用いた調整係数等については更なる検討が必要とされている (Naumann and Arnold, 2019)。また、RI を使用しない感作性試験法である LLNA: BrdU-ELISA 法のデータを用いた定量的リスク評価についてはこれまでに検討されていない。

そこで本章では LLNA: BrdU-ELISA 法で得られる EC1.6 値 (LLNA EC1.6) を用いた作業リスク管理のための皮膚感作性定量的リスク評価手法の開発を行った。この中で、ヒトで感作性を誘発しないと考えられる化学物質量 (NESIL) を推定するための起点として皮膚感作性定量的リスク評価への利用が試みられている LLNA EC3 と LLNA EC1.6 の同等性を確認することにより、LLNA EC1.6 の皮膚感作性定量的リスク評価への利用可能性を検討した後、LLNA EC1.6 に基づく作業環境における化学物質の許容残留限度値の算出を試みた。さらに、既知の感作性物質を例に、開発した手法に基づき算出される許容残留限度値と、全身影響に基づき設定される設備表面残留レベルの比較を実施し、労働安全衛生の観点から皮膚感作性リスクを考慮した曝露管理の必要性について検証した。

## 1-2 LLNA: BrdU-ELISA 法で得られる EC1.6 値の皮膚感作性定量的リスク評価への利用可能性の検討

### 1-2-1 はじめに

化粧品分野における皮膚感作性定量的リスク評価では、対象化学物質の感作性強度の推定に LLNA-RI 法で得られる EC3 値 (LLNA EC3) が利用されている (Api *et al.*, 2008; Basketter and Safford, 2016; Api *et al.*, 2020)。上記の LLNA EC3 を用いた定量的リスク評価手法開発の過程では、LLNA EC3 とヒトパッチテスト (HRIPT) における無影響量の結果との比較の結果、LLNA EC3 がヒトで感作性を誘発しないと考えられる化学物質量 (NESIL) を推定するための起点として有用であることが検証されている (Api *et al.*, 2015)。本研究では LLNA: BrdU-ELISA 法で得られる EC1.6 値 (LLNA EC1.6) を用いた皮膚感作性定量的リスク評価手法の開発を目的として、まず、LLNA EC1.6 と既に定量的リスク評価手法への応用が試みられている LLNA EC3 との同等性を検討することにより、LLNA EC1.6 の皮膚感作性定量的リスク評価手法への利用可能性を検討した。



## 1-2-2 材料と方法

### LLNA EC1.6、LLNA EC3 及びヒトにおける感作性強度に関する情報の情報源

LLNA EC 1.6 データについて、LLNA: BrdU-ELISA 法の第三者評価報告書 (ICCVAM, 2010) に引用されたデータ及び小林ら (Kobayashi *et al.*, 2020) から収集した。ヒトにおける感作性強度に関する情報として、Basketter らにより報告されたヒトでの感作性の証拠に基づく Human class (Basketter *et al.*, 2014)、及びヒトパッチテスト (HRIPT) の無影響量 (NOEL)(HRIPT NOEL)(Basketter *et al.*, 2005; Basketter *et al.*, 2014) を収集した。

### LLNA EC1.6、LLNA EC3 と HRIPT NOEL との比較解析

LLNA EC1.6、LLNA EC3 と HRIPT NOEL の関係性を解析するため、LLNA EC1.6 または LLNA EC3 と HRIPT NOEL との比 (EC 値/HRIPT NOEL) の分布を解析した。EC 値/HRIPT NOEL 比の解析では、以下の式 1 に従い LLNA EC1.6 (%) の値を皮膚表面単位面積当たりの負荷量 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) に換算した上で LLNA EC1.6/HRIPT NOEL 比を算出し、Naumann and Arnold (2019) によって解析された LLNA EC3 と HRIPT NOEL の比 (LLNA EC3/HRIPT NOEL) と今回得られた LLNA EC1.6/HRIPT NOEL の比について、その同等性を統計的に検討した。

$$\text{EC1.6 } (\mu\text{g}/\text{cm}^2) = \{\text{EC1.6 } (\%) \times 10^4 (\mu\text{g}/\text{mL}) \times 0.025 (\text{mL}/\text{ear})^{*1}\} / 1 (\text{cm}^2/\text{ear})^{*2}$$

(式 1)

\*1 LLNA における適用量、\*2 LLNA における適用面積

### 1-2-3 結果

LLNA: BrdU-ELISA 法に関しては、既報 (ICCVAM, 2010; Kobayashi *et al.*, 2020) より 33 物質の LLNA EC1.6 を収集した (Table 1)。これらのうち、20 物質について LLNA EC1.6 と HRIPT NOEL の両方の情報を得ることができた。Naumann and Arnold (2019) では、10 物質について LLNA-RI 法における LLNA EC 3 と HRIPT NOEL の情報が報告されている (Table 2)。

LLNA EC1.6 (%) を皮膚表面単位面積当たりの負荷量 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) に変換した結果、33 物質の LLNA EC1.6 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) は  $2.38\sim 18,750 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  の範囲であり、HRIPT NOEL 情報が得られた 20 物質の皮膚表面単位面積当たりの負荷量 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) の範囲は  $0.83\sim 23,622 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  であった。これらの 20 物質について算出した LLNA EC1.6/HRIPT NOEL 比を Table 1 に併せて示す。当該比は  $0.07\sim 7.47$  の範囲であり、当該比の平均±標準偏差 (SD) は  $2.13\pm 2.10$  と算出された。一方、Naumann らにより報告された EC3/HRIPT NOEL 比 ( $n=10$ ) は  $0.2\sim 6.5$  の範囲であり、当該比の平均±標準偏差 (SD) は  $2.52\pm 1.95$  と報告されている。両者の EC 値/HRIPT NOEL 比は Fig. 5 に示すようにほぼ同じ範囲に分布しており、両者の平均値の間に有意差は認められなかった (Un-paired *t*-test, 両側)。

#### 1-2-4 まとめ

Naumann and Arnold (2019) が作業環境における皮膚感作性定量的リスク評価手法開発の際にヒトで感作性を誘発しないと考えられる化学物質量 (NESIL) を推定するための起点として採用した LLNA-RI 法により得られる EC 3 (LLNA EC3) と LLNA: BrdU-ELISA 法による EC1.6 (LLNA EC1.6) の同等性を検討するため、Naumann らが解析に使用した 10 物質の LLNA EC3/HRIPT NOEL 比と LLNA: BrdU-ELISA 法で得られる LLNA EC1.6/HRIPT NOEL 比の分布を基にそれらの同等性を検討した。その結果、両者の EC 値/HRIPT NOEL 比はほぼ同じ範囲に分布し、平均値の間に有意差は認められなかったことから、両者は同等の指標と考えられ、LLNA EC1.6 は皮膚感作性定量的リスク評価手法開発の際にヒトで感作性を誘発しないと考えられる化学物質量 (NESIL) を推定するための起点として利用可能であると結論された。

**Table 1. Comparison of the LLNA EC1.6, HRIPT NOEL and Human class (Fukushima *et al.*, 2022)**

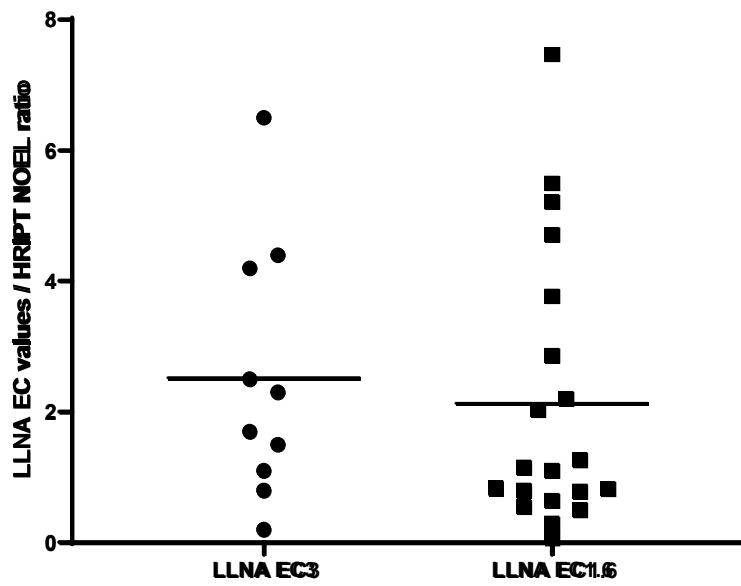
Chemical name	CAS RN	LLNA EC1.6 (%)	LLNA EC1.6 (µg/cm <sup>2</sup> )	HRIPT NOEL (µg/cm <sup>2</sup> )	LLNA EC1.6/HRIPT NOEL ratio	Human class <sup>c</sup>
CMI solution	26172-55-4	0.0095 <sup>b</sup>	2.38	0.83 <sup>c</sup>	2.86	-
2,4-Dinitrochlorobenzene	97-00-7	0.029 <sup>b</sup>	7.25	8.8 <sup>d</sup>	0.82	1
Cobalt(II) chloride	7646-79-9	0.10 <sup>b</sup>	25	-	-	-
Glutaraldehyde	111-30-8	0.115 <sup>a</sup>	28.8	100 <sup>d</sup>	0.29	2
<i>p</i> -Benzoquinone	106-51-4	0.15 <sup>a</sup>	37.5	-	-	-
Formaldehyde	50-00-0	0.163 <sup>a</sup>	40.8	37 <sup>d</sup>	1.10	2
1,4-Phenylenediamine	106-50-3	0.22 <sup>b</sup>	55	10 <sup>d</sup>	5.50	1
Diphenylcyclopropenone	886-38-4	0.45 <sup>a</sup>	113	-	-	1
Trimellitic anhydride	552-30-7	0.862 <sup>a</sup>	216	-	-	-
Nickel sulfate	7786-81-4	1.027 <sup>a</sup>	257	-	-	-
4-Methylaminophenol sulfate	55-55-0	1.081 <sup>a</sup>	270	-	-	3
Isoeugenol	97-54-1	1.3 <sup>b</sup>	325	69 <sup>d</sup>	4.71	2
3-Aminophenol	591-27-5	2.99 <sup>a</sup>	748	-	-	-
Cinnamic aldehyde	104-55-2	4.808 <sup>a</sup>	1202	591 <sup>d</sup>	2.03	2
2-Mercaptobenzothiazole	149-30-4	5.03 <sup>b</sup>	1258	2269 <sup>d</sup>	0.55	3
Eugenol	97-53-0	6.03 <sup>b</sup>	1508	1938 <sup>d</sup>	0.78	3
Imidazolidinyl urea	39236-46-9	6.43 <sup>b</sup>	1608	2000 <sup>d</sup>	0.80	3
$\alpha$ -Hexylcinnamaldehyde	101-86-0	7.07 <sup>b</sup>	1768	23622 <sup>d</sup>	0.07	5
Diethyl Maleate	141-05-9	8.049 <sup>a</sup>	2012	1600 <sup>d</sup>	1.26	2
Isopropyl myristate	110-27-0	9.404 <sup>a</sup>	2351	-	-	5
Cinnamyl alcohol	104-54-1	10 <sup>b</sup>	2500	3000 <sup>d</sup>	0.83	3
4-Chloroaniline	106-47-8	11.029 <sup>a</sup>	2757	-	-	-
Citral	5392-40-5	11.7 <sup>b</sup>	2925	775 <sup>c</sup>	3.77	-
Sodium lauryl sulfate	151-21-3	13.334 <sup>a</sup>	3334	NS <sup>d,*</sup>	-	6
Hydroxycitronellal	107-75-5	13.636 <sup>a</sup>	3409	2953 <sup>d</sup>	1.15	4
Phenyl benzoate	93-99-2	24.3 <sup>b</sup>	6075	9448 <sup>d</sup>	0.64	3
Linalool	78-70-6	27.596 <sup>a</sup>	6899	13793 <sup>d</sup>	0.50	4
Ethylene glycol dimethacrylate	97-90-5	28.18 <sup>b</sup>	7045	-	-	4
Ethyl acrylate	140-88-5	33.333 <sup>a</sup>	8333	1600 <sup>c</sup>	5.21	-
Cyclamen aldehyde	103-95-7	41.496 <sup>a</sup>	10374	4724 <sup>c</sup>	2.20	-
Xylene	1330-20-7	43.3 <sup>b</sup>	10825	NS <sup>d,*</sup>	-	6
Aniline	62-53-3	73.596 <sup>a</sup>	18399	2463 <sup>d</sup>	7.47	4
Methyl methacrylate	80-62-6	75 <sup>b</sup>	18750	-	-	4

<sup>a</sup> ICCVAM, 2010; <sup>b</sup> Kobayashi *et al.*, 2020; <sup>c</sup> Basketter *et al.*, 2005; <sup>d</sup> Basketter *et al.*, 2014

<sup>e</sup> 1: Extensive evidence of contact allergy in relation to degree of exposure and size of exposed population; 2: A frequent cause of contact allergy, but of less significance compared with category 1; 3: A common cause of contact allergy, perhaps requiring higher exposure compared with category 2; 4: Infrequent cause of contact allergy in relation to level of exposure; 5: A rare cause of contact allergy except perhaps in special circumstances, e.g. use in topical medicaments; 6: Essentially absent, with at least no systematic convincing evidence of contact allergy (Basketter *et al.*, 2014)

**Table 2. Comparison of the LLNA EC3 and HRIPT NOEL (Naumann and Arnold, 2019)**

Chemical name	LLNA EC3 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	HRIPT NOEL ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	LLNA EC3/HRIPT NOEL ratio
Methylchloroisothiazolinone/methylisothiazolinone	2.5	1	2.5
2,4-Dinitrochlorobenzene	20	8.5	2.3
1,4-Phenylenediamine	15	10	1.5
Formaldehyde	162	37	4.4
Isoeugenol	450	69	6.5
Glutaraldehyde	23	100	0.2
Cinnamic aldehyde	500	591	0.8
Citral	3250	775	4.2
Eugenol	2225	1938	1.1
Hydroxycitronellal	5000	2953	1.7



**Fig. 5 Distribution of LLNA EC values/HRIPT NOEL ratio**

Horizontal bar shows the mean for the LLNA EC values/HRIPT NOEL ratio.

### 1-3 LLNA: BrdU-ELISA 法で得られる EC1.6 値を用いた作業者の感作性リスク管理のための 許容残留限度値算出手法の開発とその検証

#### 1-3-1 はじめに

1-2 において LLNA EC1.6 をヒトで感作性を誘発しないと考えられる化学物質量 (NESIL) を推定するための起点として用いることの妥当性が確認されたことを踏まえ、LLNA EC1.6 を用いた作業者リスク管理のための設備表面の許容残留限度値 (acceptable surface limit: ASL) の算出手法について検討を行った。

皮膚感作性の定量的リスク評価手法に関しては、近年、化粧品分野で検討が進められている (Api *et al.*, 2008; Basketter and Safford, 2016; Api *et al.*, 2020)。このうち、Api *et al.* (2008) では、消費者製品に含まれる香料成分の皮膚感作性定量的リスク評価について、次の 4 段階のアプローチが提案されている。

- (1) ハザードの特定: LLNA EC3 を用いた化学物質の皮膚感作強度の推定
- (2) 用量反応性評価またはハザードの定量化: 動物試験結果 (主に LLNA の結果) とヒトパッチテスト (HRIPT) データなどのヒトのデータの比較による、ヒトで感作性を誘発しないと考えられる化学物質量 (NESIL) の推定と感作性アセスメント係数 (調整係数) の決定
- (3) 曝露評価: 種々の消費者製品に含まれる香料成分に対する消費者曝露レベルの推定

(4) リスク判定: ヒトで感作性を誘発しないと考えられる化学物質質量 (NESIL) 及び調製係数に基づく許容曝露レベルの算出、許容曝露レベルと消費者曝露レベルの比較によるリスク判定

本検討では、上記の香粧品分野で開発された定量的リスク評価手法を参考に、LLNA EC1.6 を用いた作業者の感作性リスク管理のための設備表面の許容残留限度値 (ASL) 算出手法の検討を行った。

### 1-3-2 材料と方法

#### 作業者リスク管理のための許容残留限度値 (ASL) 算出式の検討

既報 (Api *et al.*, 2008; Basketter and Safford, 2016; IDEA, 2016; SCCS, 2018) で報告された香粧品の皮膚感作性定量的リスク評価手法及び欧州 REACH 規則のリスク評価ガイドンス (ECHA, 2012) を参考に、LLNA EC1.6 を起点とした作業者リスク管理のための許容残留限度値 (ASL) の算出式に関する検討を行った。

許容残留限度値 (ASL) の算出では、医薬品等の製造施設における曝露管理として、製造設備表面 100 cm<sup>2</sup> の拭き取り検査が実施されていることを踏まえ、設備表面 100 cm<sup>2</sup> 当たりの化学物質質量 ( $\mu\text{g}/100 \text{ cm}^2$ ) を設定することとした (式 2)。ここで、LLNA EC1.6 を起点とした作業者リスク管理のための許容残留限度値 (ASL) の設定を行うための調整係数 (sensitization assessment factor: SAF) の要素として、既報 (Api *et al.*, 2008; Basketter and



Safford, 2016; IDEA, 2016; SCCS, 2018) を参考に、一般的に動物試験結果を基にしたリスク評価に採用される①種間差、②個体差に加え、③曝露条件の3つを採用することとした。

このうち種間差の調整係数 (SAF<sub>種間差</sub>) の値には、1-2 で実施した LLNA EC1.6/HRIPT NOEL 比の解析で得られた当該比の 95 パーセンタイル値を適用することとした。なお、曝露条件に相当する調整係数に関して、既報 (Api *et al.*, 2008; Basketter and Safford, 2016; IDEA, 2016; SCCS, 2018) において香料成分の定量的リスク評価に適用された曝露条件に関する調整係数要素として、製品/マトリックス、頻度/期間、閉塞条件、皮膚の状態/部位が挙げられているが、本検討ではこれらのうち職業曝露シナリオに関連する要素として、頻度/期間に関する調整係数 (SAF<sub>頻度/期間</sub>) を採用することとした。

$$\text{ASL } (\mu\text{g}/100 \text{ cm}^2) = \{\text{EC1.6 } (\mu\text{g}/\text{cm}^2) \times 100\} / \text{調整係数積*} \quad (\text{式 2})$$

$$* \text{SAF}_{\text{種間差}} \times \text{SAF}_{\text{個体差}} \times \text{SAF}_{\text{頻度/期間}}$$

### 許容残留限度値 (ASL) の算出と感作性強度分類との比較

1-2 で収集した LLNA EC1.6 データに前項で検討した調整係数を適用し、許容残留限度値 (ASL) を算出した。算出した許容残留限度値 (ASL) と感作性強度分類との比較として、LLNA EC3 に基づく皮膚感作性の GHS 分類及び Basketter らにより報告されたヒトにおける感作性クラス (Human class) (Basketter *et al.*, 2014) との比較を行った。

### 1-3-3 結果

#### 作業者リスク管理のための許容限度値 (ASL) 算出式

許容残留限度値 (ASL) 算出のための調整係数のうち、種間差の調整係数 ( $\text{SAF}_{\text{種間差}}$ ) として、1-2 の解析から得られた LLNA EC1.6/HRIPT NOEL 比を利用し、正規分布を仮定した場合に 95 パーセンタイル値に相当する平均+2SD (6.33) から導出された 6 を設定した。ここで、調整係数 ( $\text{SAF}_{\text{種間差}}$ ) の設定根拠とした LLNA EC1.6/HRIPT NOEL 比の中には、アニリン (7.47)、1,4-フェニレンジアミン (5.50)、イソオイゲノール (4.71) など平均値を大きく上回る値が含まれる。これらはヒトパッチテスト NOEL データの精度が要因の一つと考えられが、調整係数 ( $\text{SAF}_{\text{種間差}}$ ) として 6 を設定することで、LLNA EC1.6/HRIPT NOEL が大きなものもほぼカバーできると考えられる。個体差の調整係数 ( $\text{SAF}_{\text{個体差}}$ ) については、化学物質による作業者に対する感作誘導の閾値には大きなばらつきがある可能性を考慮し、10 を設定した。曝露条件を考慮した調整係数 ( $\text{SAF}_{\text{頻度/期間}}$ ) については、香料成分の消費者リスク評価では、化粧品等の使用条件に応じた調整係数として 1 または 3 (この場合の 3 は 10 の平方根 (約 3.16 を四捨五入して算出)) が適用されている (Api *et al.*, 2008; Basketter and Safford, 2016; IDEA, 2016)。本検討では、作業者の職業曝露シナリオとして長期の曝露が生じる可能性を考慮し、 $\text{SAF}_{\text{頻度/期間}}$  として 3 を設定した。これらの結果より、調整係数積 ( $\text{SAF}_{\text{種間差}}$  (6) ×  $\text{SAF}_{\text{個体差}}$  (10) ×  $\text{SAF}_{\text{頻度/期間}}$  (3)) を 180 と決定した (Table 3)。

## 皮膚感作性定量的リスク評価のための許容残留限度値 (ASL) の算出

LLNA EC1.6 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) と前項で決定した調整係数積 180 を式 2 に代入し、33 物質の設備表面における許容残留限度値 (ASL) を導出した (Table 4)。算出した許容残留限度値 (ASL) の値の範囲は  $0.001\sim 10.417$  ( $\text{mg}/100\text{ cm}^2$ ) であった。さらに、得られた許容残留限度値 (ASL) ( $\text{mg}/100\text{ cm}^2$ ) を 5 つの範囲 ( $<0.01\text{ mg}/100\text{ cm}^2$ 、 $0.01\sim 0.1\text{ mg}/100\text{ cm}^2$ 、 $0.1\sim 1\text{ mg}/100\text{ cm}^2$ 、 $1\sim 10\text{ mg}/100\text{ cm}^2$ 、 $10\sim 100\text{ mg}/100\text{ cm}^2$ ) に層別化した。その結果、CMI 溶液と 2,4-ジニトロクロロベンゼン (2,4-dinitrochlorobenzene) の許容残留限度値 (ASL) は  $0.01\text{ mg}/100\text{ cm}^2$  未満の範囲、グルタルアルデヒド (glutaraldehyde) を含む 6 物質は  $0.01\sim 0.1\text{ mg}/100\text{ cm}^2$  の範囲、イソオイゲノール (isoeugenol) を含む 10 物質は  $0.1\sim 1\text{ mg}/100\text{ cm}^2$  の範囲、安息香酸フェニル (phenyl benzoate) を含む 13 物質は  $1\sim 10\text{ mg}/100\text{ cm}^2$  の範囲に区分された。残りの 2 物質 (アニリン (aniline)、メタクリル酸メチル (methyl methacrylate)) は  $10\sim 100\text{ mg}/100\text{ cm}^2$  の範囲に区分された。

## 算出した許容限度値 (ASL) と既知の感作性強度情報の比較

算出した許容残留限度値 (ASL) について、Basketter らによって報告された Human class (Basketter *et al.*, 2014) 及び LLNA EC3 に基づく皮膚感作性 GHS 分類の細区分との比較を行った結果を Table 4 に併せて示す。

比較の結果、ASL の範囲として  $<0.01\text{ mg}/100\text{ cm}^2$  及び  $0.01\sim 0.1\text{ mg}/100\text{ cm}^2$  に区分さ

れた物質はいずれも、Human class 1 (ACD の広範な証拠がある物質) または Human class 2 (class 1 より深刻さは低いもののよく知られた ACD の原因物質) に該当することが明らかとなった。ASL の範囲が 1 mg/100 cm<sup>2</sup> を超える物質は、主に Human class 3~6 の物質に相当した (Fig. 6)。

許容残留限度値 (ASL) の範囲と GHS 分類システムに基づく皮膚感作性細区分を比較した結果、ASL の範囲が 1 mg/100 cm<sup>2</sup> 未満に相当する物質は、GHS 区分 1A (強い感作性物質) とほぼ一致することが示された (Fig. 7)。

#### 1-3-4 考察

皮膚感作性定量的リスク評価に関して既報で提案された調整係数 (SAF) を Table 5 に示す。Api *et al.* (2008) は化粧品の定量的リスク評価における調整係数 (SAF) として、個体差について 10、マトリックス/製品について 1~10、使用条件について 1~10 を提案した。その後、Basketter and Safford (2016) は、新たに得られた科学的知見、臨床データ、消費者使用データを用いて、調整係数 (SAF) の包括的なレビューを実施し、その更新を推奨した (Basketter and Safford, 2016)。Basketter and Safford (2016) は総説の中で、フタル酸ジエチル/エタノールやワセリンなどのヒトパッチテスト (HRIPT) で使用される最も一般的な溶媒は、試験条件下での感作誘発に最適であると考えられるとし、マトリックス/製品に関する調整係数 (SAF<sub>マトリックス/製品</sub>) の値を 0.3、1、または 3 (ほとんどの場合は 1) に引き下げることを推奨した。国際香料協会 (IFRA) は、Basketter and Safford (2016) による解析結果に基づき、香料成分の皮膚感作性定量的リスク評価 (QRA2) (IDEA, 2016) を発表した。調整係数 (SAF) の構成要素のうち、種間差に対する調整係数 (SAF<sub>種間差</sub>) に関して、QRA2 は、評価の起点として使用する用量がヒトで感作性を生じないことを確認する目的で実施されたヒトパッチテスト (HRIPT) の結果、または HRIPT の結果によってヒトで感作性を誘発しないと考えられる化学物質質量 (NESIL) を推定するための起点として有用であることが検証されている LLNA-RI 法の EC3 値から推定された“ヒトで感作性を誘発しないと考えられる化学物質質量 (NESIL)”であることから、種間差の調整係数 (SAF<sub>種間差</sub>) は

必要ないと結論した (IDEA, 2016)。これに対し欧州消費者安全科学委員会 (SCCS) は、ヒトのデータが得られていない場合には種間差の調整係数 ( $SAF_{\text{種間差}}$ ) を含める必要があるとし、Basketter らの調査結果 (Basketter *et al.*, 2018) に基づき、種間差の調整係数 ( $SAF_{\text{種間差}}$ ) として 3 を適用することを提案した (SCCS, 2018)。個体差の調整係数 ( $SAF_{\text{個体差}}$ ) については、QRA2 や SCCS などのこれまでの検討で一貫して 10 が適用されてきた。一方、REACH ガイダンス (ECHA, 2012) では異なるアプローチが示されており、個体間のばらつきをカバーするためのデフォルトの調整係数として、作業者については 5、一般消費者については 10 を推奨している (ECHA, 2012)。

以上の各評価機関でのこれまでの検討結果を踏まえ、本検討では、種間差の調整係数 ( $SAF_{\text{種間差}}$ ) については、ヒトのデータが得られないことを前提で動物実験結果による LLNA EC1.6 をヒトにおいて感作を誘導しない許容残留限度値 (ASL) 導出の起点として用いていることを考慮し、調整係数 ( $SAF_{\text{種間差}}$ ) を採用することとした。また、個体差の調整係数 ( $SAF_{\text{個体差}}$ ) については、化学物質による作業者に対する感作誘導の閾値には大きなばらつきがある可能性を考慮し、QRA2 や SCCS など一貫して採用されてきた 10 を採用した。曝露条件に関する調整係数要素のうち、マトリックス/製品に関する調整係数 ( $SAF_{\text{マトリックス/製品}}$ ) に関しては、消費者製品に使用されるような複雑なマトリックスが存在すると感作の成立が増強あるいは減弱される可能性が考えられるものの、職業曝露シナリオでは残留する化学物質自体への直接曝露が想定され、マトリックス/製品の影響はないものと

考えられることから、作業者リスク評価の目的での関連性は低いと判断した。曝露条件の違いを説明するその他の要素（頻度/期間、閉塞、皮膚の状態/部位）のうち、職業曝露シナリオに関連する要素として、作業現場において長期にわたる反復曝露による影響を受ける可能性を考慮し、頻度/期間に関する調整係数（SAF<sub>頻度/期間</sub>）を評価に含めることとした。一方、閉塞、皮膚の状態/部位に関する調整係数は、消費者向け製品の評価に固有の要素であると判断し、本検討の目的（作業者に対する定量的リスク評価）では適用しなかった。

前述の通り、ヒトのデータの代わりにマウスの皮膚感作性試験による LLNA EC 値を許容残留限度値（ASL）導出の起点として用いる場合に種間差に対する調整係数（SAF<sub>種間差</sub>）が必要かどうかについては未だ議論がある。職業曝露管理のための皮膚感作性定量的リスク評価に関して、これまでに LLNA-RI 法で得られる EC3 値（LLNA EC3）を使用して許容残留限度値を算出するアプローチが提案されている（Naumann and Arnold, 2019）。Naumann らの提案では、ヒトにおける NOEL の推定に LLNA EC3 を使用するために、LLNA EC3 と HRIPT NOEL 比の分布を考慮した調整係数が適用されているが、当該係数が種間および個体間の差異の両方をカバーするかどうかについては明確に言及されておらず、この点についてさらなる議論の必要性が示唆されている（Naumann and Arnold, 2019）。

個体差の調整係数（SAF<sub>個体差</sub>）に関して、係数 10 が皮膚感作リスクの個体差を適切にカバーするかどうかについても依然として議論の余地があるが、これまでの事例では係数 10 が一貫して適用されてきた。欧州 REACH ガイダンスでは、労働者の個体間変動が一般集

団の個体間変動よりも小さいことから、個体間の変動をカバーするための基本的な調整係数として、作業者については5、一般集団については10が示されている (ECHA, 2012)。

本検討においては、種間差の調整係数 (SAF<sub>種間差</sub>) を導出するために解析に用いた HRIPT NOEL データは、HRIPT がヒトに影響を与えない用量として安全側に設定された 1 用量で実施されることが多いこと (Basketter and Safford, 2016) も考慮し、調整係数 (SAF<sub>個体差</sub>) は 10 が妥当であると判断した。

このようにして決定した調整係数積 180 (SAF<sub>種間差</sub> 6 × SAF<sub>個体差</sub> 10 × SAF<sub>頻度/期間</sub> 3) を基に算出した許容残留限度値 (ASL) の値の範囲は 0.001~10.417 (mg/100 cm<sup>2</sup>) であった。許容残留限度値 (ASL) を 5 つの範囲に層別化し、その範囲を既知の感作性強度情報であるヒトにおける感作性クラス (Human class) 及び GHS 細区分と比較した。ヒトの感作性クラス (Human class) との比較の結果、許容残留限度値 (ASL) が、<0.01 mg/100 cm<sup>2</sup> 及び 0.01~0.1 mg/100 cm<sup>2</sup> の範囲には Human class 1 及び Human class 2 の物質のみが含まれ、許容残留限度値 (ASL) の範囲が 1 mg/100 cm<sup>2</sup> を超えるものには主に Human class 3~6 の物質が含まれることが明らかとなった。なお、Human class 5 及び 6 の物質は、経皮薬剤への使用などの特殊用途以外ではほぼ皮膚感作性の報告がないあるいは本質的に感作性の報告がない物質群である。これらの物質除いた Human class 1~4 の物質群では設定した許容残留限度値 (ASL) と Human class との間に直線的関係がみられることから、本研究で設定した許容残留限度値 (ASL) は一般的な曝露状況において皮膚感作性の原因となりうる物



質群の有害性の程度（感作性強度）を反映したものと考えられる。GHS 細区分との相関については、ASL 範囲が 1 mg/100 cm<sup>2</sup> 未満の物質は、GHS 区分 1A（強い感作性物質）にほぼ一致した。これらの比較結果から、GHS 区分 1A 物質（強い感作性物質）の使用においては、設備表面の許容残留限度値（ASL）が 1 mg/100 cm<sup>2</sup> 未満になるように管理する必要があり、許容残留限度値（ASL）が <0.01 mg/100 cm<sup>2</sup> または 0.01~0.1 mg/100 cm<sup>2</sup> の強力な皮膚感作性物質の場合は、さらに低い曝露レベルを維持する必要があることが示唆された。

### 1-3-5 まとめ

本検討において、職場での化学物質に対する感作リスクを最小限に抑えることを目的として、LLNA EC1.6 に基づく設備表面の許容残留限度値 (ASL) の算出手法を検討した。33 物質を対象に導出された許容残留限度値 (ASL) は 0.001~10.417 (mg/100 cm<sup>2</sup>) の範囲であった。許容残留限度値 (ASL) を 5 つの範囲に層別化し、これらの範囲と既存の感作性強度情報と比較した結果、GHS 区分 1A に分類される強い感作性物質を使用する際は、許容残留限度値 (ASL) 1 mg/100 cm<sup>2</sup> 未満で曝露管理する必要があることが示された。本検討で開発した手法により、LLNA EC1.6 に基づく許容残留限度値 (ASL) の設定が可能となり、感作性強度に基づく定量的リスク評価とリスク管理が可能となった。また、許容残留限度値 (ASL) の範囲と既知のヒト感作性強度データとを比較した結果から、GHS 細区分による区分 1A (強い感作性物質) に対する警告は職場での化学物質過敏症のリスクを最小限に抑えるため情報として有益であり、作業環境における化学物質の許容曝露量を示す指標として重要な情報源となり得ることも示された。

**Table 3. SAFs proposed for workers (Fukushima *et al.*, 2022)**

Factor	SAFs	Point of consideration
Interspecies	6	Distribution of LLNA EC1.6/HRIPT NOEL ratio
Interindividuals	10	Interindividual variation for workers
Frequency/duration	3	Exposure may occur for long-period
Composite SAF	180	-

SAF: sensitization assessment factor

**Table 4. Derived ASLs and sensitization potencies for selected chemicals (Fukushima *et al.*, 2022)**

Chemical name	LLNA EC1.6 (µg/cm <sup>2</sup> )	ASL (mg/100cm <sup>2</sup> )	ASL range (mg/100cm <sup>2</sup> )	Human Class <sup>1)</sup>	GHS sub-category <sup>2)</sup>
CMI solution	2.38	0.001		-	1A
2,4-Dinitrochlorobenzene	7.25	0.004	<0.01	1	1A
Cobalt(II) chloride	25	0.014		-	1A
Glutaraldehyde	28.8	0.016		2	1A
<i>p</i> -Benzoquinone	37.5	0.021		-	1A
Formaldehyde	40.8	0.023	0.01-0.1	2	1A
1,4-Phenylenediamine	55	0.031		1	1A
Diphenylcyclopropenone	113	0.063		1	1A
Trimellitic anhydride	216	0.120		-	1B
Nickel sulfate	257	0.143		-	1B
4-Methylaminophenol sulfate	270	0.150		3	1A
Isoeugenol	325	0.181		2	1A
3-Aminophenol	748	0.415		-	1A
Cinnamic aldehyde	1202	0.668	0.1-1	2	1B
2-Mercaptobenzothiazole	1258	0.699		3	1A
Eugenol	1508	0.838		3	1B
Imidazolidinyl urea	1608	0.893		3	1B
α-Hexylcinnamaldehyde	1768	0.982		5	1B
Diethyl Maleate	2012	1.118		2	1B
Isopropyl myristate	2351	1.306		5	1B
Cinnamyl alcohol	2500	1.389		3	1B
4-Chloroaniline	2757	1.532		-	1B
Citral	2925	1.625		-	1B
Sodium lauryl sulfate	3334	1.852		6	1B
Hydroxycitronellal	3409	1.894	1-10	4	1B
Phenyl benzoate	6075	3.375		3	1B
Linalool	6899	3.833		4	1B
Ethylene glycol dimethacrylate	7045	3.914		4	1B
Ethyl acrylate	8333	4.630		-	1B
Cyclamen aldehyde	10374	5.763		-	1B
Xylene	10825	6.014		6	1B
Aniline	18399	10.222		4	1B
Methyl methacrylate	18750	10.417	10-100	4	1B

ASL: acceptable surface limit

1) 1: Extensive evidence of contact allergy in relation to degree of exposure and size of exposed population; 2: A frequent cause of contact allergy, but of less significance compared with category 1; 3: A common cause of contact allergy, perhaps requiring higher exposure compared with category 2; 4: Infrequent cause of contact allergy in relation to level of exposure; 5: A rare cause of contact allergy except perhaps in special circumstances, e.g. use in topical medicaments; 6: Essentially absent, with at least no systematic convincing evidence of contact allergy (Basketter *et al.*, 2014).

2) GHS sub-categories decided by LLNA EC3 (ICCVAM, 2010) and GHS sub-categorization criteria for skin sensitization for LLNA-RI (EC3 ≤2: 1A (strong sensitizers); EC3 >2: 1B (other skin sensitizers))

**Table 5. Comparison of SAFs for skin sensitization quantitative risk assessment (Fukushima *et al.*, 2022)**

Factor	Api <i>et al.</i> (2008)	Basketter and Safford (2016)	QRA2 (IDEA, 2016)	SCCS (2018)	ECHA (2012)	Naumann and Arnold (2019)	<b>Fukushima <i>et al.</i> (2022)</b>
Interspecies	-*	-*	-*	3	10‡	6 (based on LLNA EC3/HRIPT NOEL ratio)	<b>6 (based on LLNA EC1.6/HRIPT NOEL ratio)</b>
Interindividual	10	10	10	10	5 or 10		<b>10</b>
Matrix/Product	1, 3‡, or 10	0.3, 1, or 3‡	0.3, 1, or 3‡	-	1-10	3	-
Frequency/duration	(Use condition)	1 or 3‡	1 or 3‡	3	(Different exposure conditions)	3	<b>3</b>
Occlusion	1, 3‡, or 10§	-	-	-		-	
Skin condition/site		1, 3‡, or 10	1, 3‡§, or 10	3 or 10		1-10	-
Composite SAF	10-300	3-1,000**	30-300	300- 1,000**	50- 10,000**	ca 50	<b>180</b>

SAF: sensitization assessment factor

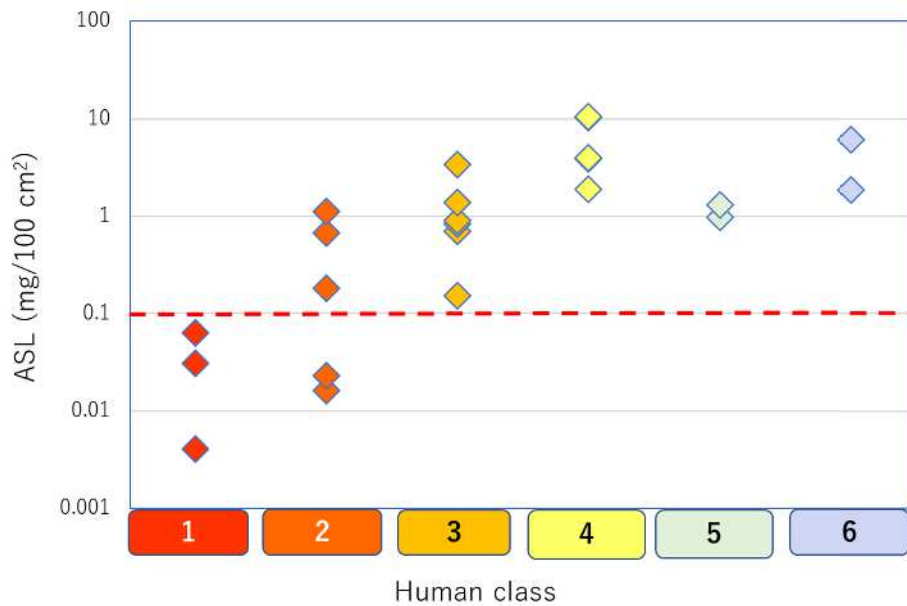
\* No inter-species SAF was applied since the NESIL was predicted on confirmatory studies in humans, or is based on an extrapolated human NESIL from the EC3 values in LLNA (Api *et al.*, 2008; Basketter and Safford, 2016; IDEA, 2016).

† In cases where there is good agreement between the LLNA EC3 value and the NOAEL/LOAEL derived from good quality historical human predictive tests, the lowest threshold value should be used to derive the derived no effect level (DNEL) and in this case there would be no need to apply an interspecies adjustment factor (AF) (ECHA, 2012).

‡ For practical purposes the number 3 is normally the representation of 3.16 (the half log of 10) (Api *et al.*, 2008; Basketter and Safford, 2016; IDEA, 2016).

§ Except for tampons used in vaginal mucous membrane for which factor of 20 applied (Api *et al.*, 2008).

\*\* Composite SAF are not calculated in the original references.



**Fig. 6 Comparison of ASL ranges and Human class\***

ASL: acceptable surface limit

\* Human class (Basketter et al., 2014)

1: Extensive evidence of contact allergy in relation to degree of exposure and size of exposed population

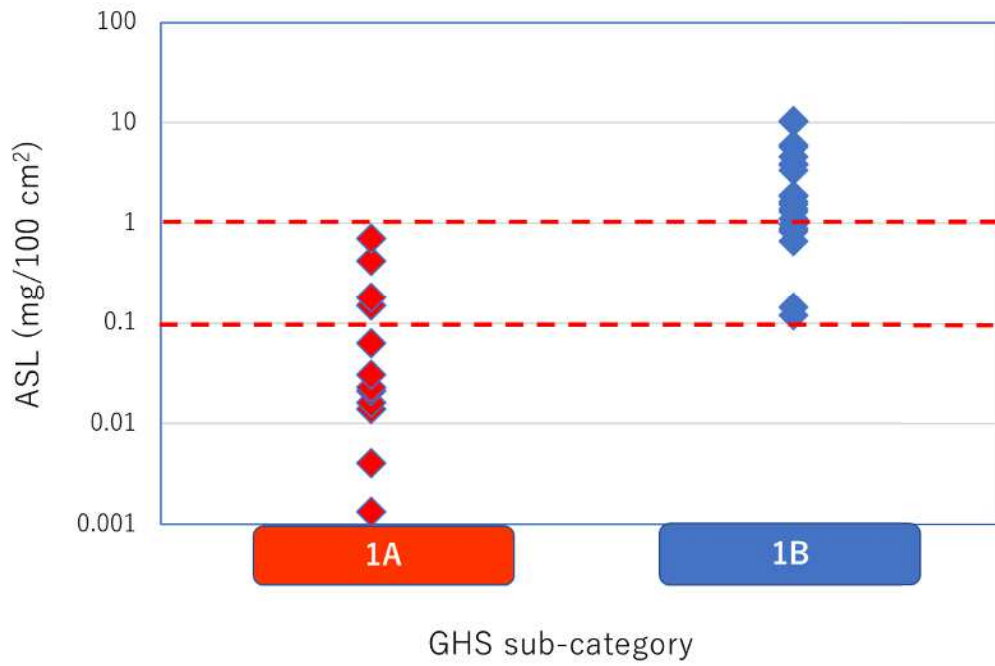
2: A frequent cause of contact allergy, but of less significance compared with category 1

3: A common cause of contact allergy, perhaps requiring higher exposure compared with category 2

4: Infrequent cause of contact allergy in relation to level of exposure

5: A rare cause of contact allergy except perhaps in special circumstances, e.g. use in topical medicaments

6: Essentially absent, with at least no systematic convincing evidence of contact allergy



**Fig. 7 Comparison of ASL ranges and GHS sub-category\***

ASL: acceptable surface limit

\* 1A: strong sensitizers; 1B: other skin sensitizers

## 1-4 開発した手法に基づく許容残留限度値と全身影響に基づく設備表面残留レベルの比較

### 1-4-1 はじめに

感作性物質を取り扱う労働現場においては、感作性強度に基づく設備表面の許容残留限度値（ASL）の設定が望ましいが、このようなリスク管理は行われていないのが現状である。

現時点での設備表面のリスク管理例としては、複数の医薬品を製造する共用設備において、患者保護の観点から交叉汚染防止を目的とした製造設備表面の許容残留レベルの設定が必要とされているが、ここでは通常、評価対象物質の全身影響に基づき設定された許容一日曝露量（permitted daily exposure: PDE）を基にして設備表面残留レベル（surface residue limit: SRL）が設定される（EC, 2015; PIC/S, 2018; WHO, 2021）。全身影響に基づく許容一日曝露量（PDE）を基にした設備表面残留レベル（SRL）は、医薬品を摂取する患者の健康影響を防ぐ目的では十分であると考えられるが、作業者の感作性リスク管理の観点からは、全身影響に基づく許容一日曝露量（PDE）から設定された設備表面残留レベル（SRL）に基づく曝露管理が適切であるかどうかは不明である。

本節では、1-3 で開発した作業者の感作性リスク管理を目的とした許容残留限度値（ASL）の算出手法を用い、感作性強度に基づく許容残留限度値（ASL）と、全身影響から計算された許容一日曝露量（PDE）に基づき設定される設備表面残留レベル（SRL）を比較し、作業者の皮膚感作性リスクを最小限に抑える観点に立った感作性強度に基づく許容残留限度



値（ASL）に基づくリスク管理の必要性を検討した。

## 1-4-2 材料と方法

### 検討対象物質と情報源

本検討の対象物質として、Kobayashi *et al.* (2020) に LLNA: BrdU-ELISA で得られた EC1.6 値 (LLNA EC1.6) が報告された 15 物質のうち、独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) ウェブサイトで公表された政府による GHS 分類 (NITE 統合版 GHS 分類結果一覧) において特定標的臓器毒性 (反復曝露) を有すると分類された物質 (ただし変異原性または発がん性として分類された物質を除く) として、1,4-フェニレンジアミン (1,4-phenylenediamine)、イソオイゲノール (isoeugenol)、メタクリル酸メチル (methyl methacrylate) の 3 物質を選定した (Table 6)。

全身影響に基づく許容一日曝露量 (PDE) を設定するための毒性情報は、政府による GHS 分類 (NITE GHS 分類結果, 2019; NITE GHS 分類結果, 2011; NITE GHS 分類結果, 2017) に使用された評価書を情報源とし、経口経路による全身影響に基づく無影響レベル (NOEL) 等を選定した。

### 皮膚感作性強度に基づく許容残留限度値 (ASL) の算出

1-3 で開発した手法を用いて作業者の感作性リスク管理を目的とした LLNA EC1.6 に基づく許容残留限度値 (ASL) を算出した。

## 全身影響に基づく許容一日曝露量 (PDE) を用いた設備表面残留レベル (SRL) の算出

まず、検討対象物質について、WHO ガイドライン (WHO, 2021) に記載された方法に従い、経口反復投与毒性試験でみられた全身影響に基づく許容一日曝露量 (PDE) を決定した (式 3)。

$$\text{許容一日曝露量 (PDE)(mg/day)} = \text{NOEL (mg/kg/day)} \times \text{体重補正值} / \text{F1} \times \text{F2} \times \text{F3} \times \text{F4} \times \text{F5 (式 3)}$$

ここで、体重補正值: 50 kg

F1: 種間で外挿を行うための係数

F2: 個体間のばらつきを考慮した係数

F3: 毒性試験の期間が短い場合に適用する変数

F4: 重篤な毒性の場合に適用する係数

F5: NOEL が得られていない場合に適用する変数

次に、WHO (2021) に記載された手順に従って、許容一日曝露量 (PDE) に基づく設備表面残留レベル (SRL) を算出した。すなわち、許容一日曝露量 (PDE)、共用設備で製造される製剤のバッチサイズ (BS)、当該製剤の最大一日投与量 (maximum daily dose: MDD) から最大安全キャリーオーバー (maximum safe carryover: MSC) を導出し (式 4)、共用設

備表面積を考慮し、最大安全表面残留量 (maximum safe surface residue: MSSR) を算出した (式 5)。バッチサイズ (BS)、最大一日投与量 (MDD)、共有設備表面積の各値は Walsh *et al.* (2017) に例示された値を用いた。本検討に用いる設備表面残留レベル (SRL) は、ふき取り検査で通常 100 cm<sup>2</sup> 当たりの残留量を測定することを考慮し、100 cm<sup>2</sup> 当たりの残留量として算出した (式 6)。

$$MSC \text{ (g)} = PDE \text{ (}\mu\text{g/day)} \times BS \text{ (kg)} / MDD \text{ (mg/day)} \text{ (式 4)}$$

ここで, バッチサイズ (BS): 100 kg

最大一日投与量 (MDD): 10,000 mg

$$MSSR \text{ (mg/cm}^2\text{)} = MSC \text{ (g)} \times 1,000 / \text{共用設備表面積(cm}^2\text{)} \text{ (式 5)}$$

ここで, 共用設備表面積: 25,000 cm<sup>2</sup>

$$\text{設備表面残留レベル (SRL)(mg/100 cm}^2\text{)} = MSSR \text{ (mg/cm}^2\text{)} \times 100 \text{ (cm}^2\text{)} \text{ (式 6)}$$

## LLNA EC1.6 に基づく許容残留限度値 (ASL) と全身影響に基づく設備表面残留レベル

### (SRL) の比較

検討対象物質について、皮膚感作性強度に基づく許容残留限度値 (ASL) と全身影響に基づく設備表面残留レベル (SRL) の比較を行った。なお、許容残留限度値 (ASL) と設備表面残留レベル (SRL) は共に設備表面 100 cm<sup>2</sup> 当たり存在する化学物質量に相当する値となる。

### 1-4-3 結果

#### LLNA EC1.6 に基づく許容残留限度値 (ASL)

検討対象物質について LLNA EC1.6 から算出した許容残留限度値 (ASL) を Table 7 に示す。

1,4-フェニレンジアミンの許容残留限度値 (ASL) は、EC1.6 値 0.22%に基づき 0.031 mg/100 cm<sup>2</sup>、イソオイゲノールの許容残留限度値 (ASL) は EC1.6 値 1.3%に基づき 0.18 mg/100 cm<sup>2</sup>、メタクリル酸メチルの許容残留限度値 (ASL) は EC1.6 値 75%に基づき 10 mg/100 cm<sup>2</sup>と算出された。

#### 全身影響に基づく PDE を用いた設備表面残留レベル (SRL)

検討対象の 3 物質について許容一日曝露量 (PDE) を求め、許容一日曝露量 (PDE) に基づき算出した設備表面残留レベル (SRL) を Table 8 に示す。

1,4-フェニレンジアミンについては、ラットの 90 日間反復投与毒性試験において 8 mg/kg/day で観察された腎臓及び肝臓への影響 (SCCS, 2012) に基づく無影響量 (NOEL) 4 mg/kg/day より許容一日曝露量 (PDE) を算出した。この結果、1,4-フェニレンジアミンの許容一日曝露量 (PDE) は 0.8 mg/day と算出され、設備表面残留レベル (SRL) は 30 mg/100 cm<sup>2</sup>と導出された。

イソオイゲノールについては、マウスの 2 年間反復投与毒性試験で観察された鼻腔の嗅

上皮の病理組織学的所見 (NTP, 2010) に基づく最小毒性量 (LOAEL) 75 mg/kg/day から算出した許容一日曝露量 (PDE) は 3.1 mg/day、設備表面残留レベル (SRL) は 130 mg/100 cm<sup>2</sup>と導出された。

メタクリル酸メチルについては、ラットの2年間経口反復投与毒性試験で 140 mg/kg/day で観察された腎臓重量の増加 (MOE, 2013) に基づく無影響量 (NOEL) 5 mg/kg/day より、許容一日曝露量 (PDE) 及び設備表面残留レベル (SRL) はそれぞれ 5 mg/day、200 mg/100 cm<sup>2</sup>と導出された。

#### LLNA EC1.6 に基づく許容残留限度値 (ASL) と全身影響に基づく設備表面残留レベル (SRL) の比較

検討対象物質について算出した LLNA EC1.6 に基づく許容残留限度値 (ASL) と全身影響に基づく許容一日曝露量 (PDE) ベースの設備表面残留レベル (SRL) の比較結果を Table 9 に示す。

GHS 文書に記載された分類基準 (1A: LLNA EC1.6 ≤6%; 1B: LLNA EC1.6 >6% (UN, 2023)) に従って皮膚感作性 GHS 区分 1A に分類される 1,4-フェニレンジアミン及びイソオイゲノールの全身毒性に基づく設備表面残留レベル (SRL) はいずれも感作性に基づく許容残留限度値 (ASL) をはるかに上回り、1,4-フェニレンジアミンの設備表面残留レベル (SRL) は許容残留限度値 (ASL) の 約 1,000 倍、イソオイゲノールの設備表面残留レベル

(SRL) は許容残留限度値 (ASL) の 700 倍以上高い結果となった。GHS 区分 1B に分類されるメタクリル酸メチルの設備表面残留レベル (SRL) も許容残留限度値 (ASL) を超えたが、設備表面残留レベル (SRL) は許容残留限度値 (ASL) の値の 20 倍以内であった。


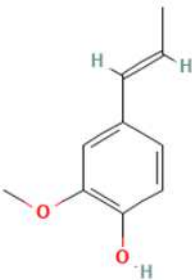
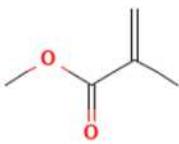
これらの結果は、全身影響を基にした設備表面残留レベル (SRL) を使用した曝露管理は、作業者の皮膚感作性リスク管理の目的では不十分である場合があり、特に GHS 区分 1A に相当する強い感作性物質の場合は感作性リスクを考慮した曝露管理を行う必要があることを示している。



#### 1-4-4 まとめ

本節では、既知の感作性物質を対象に LLNA EC1.6 に基づく許容残留限度値 (ASL) と全身影響に基づく許容一日曝露量 (PDE) ベースの設備表面残留レベル (SRL) とを比較した。この結果、検討対象とした3物質はいずれも、許容一日曝露量 (PDE) に基づく設備表面残留レベル (SRL) が皮膚感作性強度に基づく許容残留限度値 (ASL) を上回り、特に GHS 区分 1A に分類される強い感作性物質では、全身影響に基づく設備表面残留レベル (SRL) での管理は作業者の皮膚感作性リスク管理の目的では不十分であることが示された。リスク管理に用いる許容曝露レベルは関連する曝露経路およびエンドポイントごとに設定する必要があり、作業者の感作性リスク管理の目的では感作性強度に基づく許容残留限度値の設定が必要であることは明らかであるが、現状では、医薬品等の製造施設における曝露管理は、患者の保護を目的とした全身影響に基づく設備表面残留レベルに基づく手法が主流であると想定される。本検討において、医薬品等の製造施設における作業者の化学物質に対するリスク管理に関して、従来の経口摂取を前提とした許容一日曝露量 (PDE) のみならず、強い感作性強度を有する化学物質に関しては感作性リスクの回避を目的とした許容曝露レベルに基づく曝露管理の必要性を具体的に示した意義は大きいと考えられる。

**Table. 6 Selected chemicals**

Chemical name	1,4-Phenylenediamine	Isoeugenol	Methyl methacrylate
CAS RN	106-50-3	97-54-1	80-62-6
Molecular formula <sup>1)</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub>	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>
Structure <sup>1)</sup>			

1) PubChem (National Institutes of Health (NIH)). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

**Table. 7 ASLs for the selected chemicals (Fukushima *et al.*, 2023b)**

	1,4-Phenylenediamine	Isoeugenol	Methyl methacrylate
LLNA EC1.6 * (%)	0.22	1.3	75
LLNA EC1.6 (mg/cm <sup>2</sup> )	0.055	0.33	19
SAF	180	180	180
<b>ASL (mg/100 cm<sup>2</sup>)</b>	<b>0.031</b>	<b>0.18</b>	<b>10</b>

ASL: acceptable surface limit, SAF: sensitization assessment factor

\* Kobayashi *et al.* (2020)

**Table. 8 PDEs and SRLs of the selected chemicals (Fukushima *et al.*, 2023b)**

	1,4-Phenylenediamine	Isoeugenol	Methyl methacrylate
Derivation of PDE	90-day repeated-dose toxicity study in rats	2-year repeated-dose toxicity study in mice	2-year repeated-dose toxicity study in rats
NOEL	NOEL = 4 mg/kg/day (based on the liver and kidney effects at 8 mg/kg/day) (SCCS, 2012)	LOAEL = 75 mg/kg/day (based on the histopathological changes in the olfactory epithelium) (NTP, 2010)	NOEL = 5 mg/kg/day (based on the increased kidney weights at 140 mg/kg/day) (MOE, 2013)
Adjustment factors*	F1: 5 F2: 10 F3: 5 F4: 1 F5: 1	F1: 12 F2: 10 F3: 1 F4: 1 F5: 10	F1: 5 F2: 10 F3: 1 F4: 1 F5: 1
PDE (mg/day)	0.8	3.1	5
MSC (g)	8	31	50
MSSR (mg/cm <sup>2</sup> )	<b>0.3</b>	<b>1.3</b>	<b>2</b>
<b>SRL (mg/100 cm<sup>2</sup>)</b>	<b>30</b>	<b>130</b>	<b>200</b>

PDE: permitted daily exposure, SRL: surface residue limit, MSC: maximum safe carryover, MSSR: maximum safe surface residue

\* F1: a factor to account for extrapolation between species; F2: a factor to account for variability between individuals; F3: A factor to account for repeat-dose toxicity studies of short durations; F4: A factor that may be applied in cases of severe toxicity; F5: A variable factor that may be applied if the no-effect level was not established.

**Table. 9 Comparison of the ASLs and PDE-based SRLs values for the selected chemicals (Fukushima *et al.*, 2023b)**

	1,4-Phenylenediamine	Isoeugenol	Methyl methacrylate
ASL (mg/100 cm <sup>2</sup> )	0.031	0.18	10
SRL (mg/100cm <sup>2</sup> )	30	130	200
<b>SRL/ASL</b>	<b>967</b>	<b>722</b>	<b>20</b>

ASL: acceptable surface limit, PDE: permitted daily exposure, SRL: surface residue limit

## 1-5 小括

ACD は、職場で感作された労働者が再び皮膚感作物質に曝露されることで非常に低レベルの曝露によって引き起こされる可能性があり、また、一度感作されると長期にわたる影響を及ぼすことから、皮膚感作性は労働安全衛生上、非常に重要なリスク因子であり、化学物質の皮膚感作性強度に基づく許容曝露レベルを用いた定量的リスク評価とリスク管理が強く望まれているところである。現状では作業者の皮膚感作性リスク管理のための定量的リスク評価手法は確立されていない。そこで本章では、放射性物質を使用せずに実施可能で世界的に利用が広まっている LLNA: BrdU-ELISA 法により得られる LLNA EC1.6 を用いた作業者に対する感作性リスク管理のための設備表面の許容残留限度値算出手法の開発を行った。この中で、LLNA EC1.6 の皮膚感作性定量的リスク評価への利用可能性の検討を実施するとともに、開発した手法で算出された許容残留限度値と既知の化学物質の感作性強度情報との比較を行うことで、LLNA EC1.6 の皮膚感作性定量的リスク評価への適用可能性を検討した。さらに、既知の感作性物質を例に、開発した手法に基づき算出される許容残留限度値と、全身影響に基づき設定される設備表面残留レベルの比較を実施し、労働安全衛生の観点から皮膚感作性リスクを考慮した曝露管理の必要性について検証した。

LLNA EC1.6 の皮膚感作性定量的リスク評価への利用可能性の検討として、ヒトで感作性を誘発しないと考えられる化学物質量 (NESIL) を推定するための起点として既に

皮膚感作性定量的リスク評価手法への利用が試みられている LLNA-RI 法により得られる LLNA EC3 と LLNA EC1.6 の同等性を検討した結果、両者は同等の指標と考えられ、LLNA EC1.6 は皮膚感作性定量的リスク評価に利用可能であると結論された。

LLNA EC1.6 の皮膚感作性定量的リスク評価への利用可能性を確認できたことから、化粧品分野で開発された定量的リスク評価手法を参考に、LLNA EC1.6 を用いた作業者リスク管理のための許容残留限度値 (ASL) 算出手法の開発を行った。LLNA EC1.6 を許容残留限度値 (ASL) 算出の起点とするために必要な調整係数 (SAF) の検討を行った結果、調整係数 (SAF) の要素として種間差、個体差、曝露条件 (頻度/期間) を設定し、このうち種間差の調整係数 (SAF<sub>種間差</sub>) については LLNA EC1.6/HRIPT NOEL 比の解析結果から導出された係数 6、個体差の調整係数 (SAF<sub>個体差</sub>) については 10、頻度/期間の調整係数 (SAF<sub>頻度/期間</sub>) については 3 を適用し、調整係数積 180 を用いて許容残留限度値 (ASL) を算出した。33 物質を対象に LLNA EC1.6 に基づき導出された許容残留限度値 (ASL) を 5 つの範囲に層別化し、これらの範囲と既存の感作性強度情報と比較した結果、GHS 区分 1A に分類される強い感作性物質を使用する際は、許容残留限度値 (ASL) 1 mg/100 cm<sup>2</sup> 未満で曝露管理する必要があることが示された。

本検討により、LLNA: BrdU-ELISA により得られる LLNA EC1.6 に基づく許容残留限度値 (ASL) の設定が可能となり、感作性強度に基づく定量的リスク評価とリスク管理の可能性が示された。また、許容残留限度値 (ASL) の範囲と既知のヒト感作性強度デ

ータとを比較した結果から、GHS 区分が職場での ACD のリスクを最小限に抑えるための許容曝露レベルの指標として重要な情報源であることも示された。

さらに、開発した許容残留限度値 (ASL) に基づく感作性リスク管理の必要性を検証することを目的として、既知の感作性物質を対象に LLNA EC1.6 に基づく許容残留限度値 (ASL) と全身影響に基づく許容一日曝露量 (PDE) ベースの設備表面残留レベル (SRL) との比較を行った。この結果、検討対象とした 3 物質はいずれも、全身影響に基づく設備表面残留レベル (SRL) が皮膚感作強度に基づく許容残留限度値 (ASL) を上回り、特に GHS 区分 1A に分類される強い感作性物質では、全身影響に基づく設備表面残留レベル (SRL) での管理は作業者の皮膚感作性リスク管理の目的では不十分であることが示された。

以上の検討結果より、LLNA EC1.6 の皮膚感作性定量的リスク評価への適用性が確認され、確立した手法を用いて許容残留限度値 (ASL) と全身影響に基づく設備表面残留レベル (SRL) の比較解析を実施した結果、作業現場において、特に強い感作性を有する化学物質に関しては感作性リスク回避のためのリスク評価が重要であることが示唆された。



## 第 2 章 消費者製品に含まれる皮膚感作性物質の定量的リスク評価への応用可能性の検討

### 2-1 小序

化学物質は我々の生活の中で広く普及している製品の原料として使用されており、日用品の使用による消費者のアレルギー性接触皮膚炎（ACD）発症も報告されている。しかしながら、消費者製品に含まれる化学物質の皮膚感作性定量的リスク評価について、化粧品以外の製品に関してはほとんど検討されていない。この要因として、一般の工業化学品については、ヒトパッチテストなどのヒトにおける情報が得られることは稀であり、ヒトで感作性を誘発しないと考えられる化学物質量（NESIL）の推定が困難である点が挙げられる。

我々は、第 1 章において LLNA: BrdU-ELISA 法で得られる定量的な感作性強度の指標である EC1.6 値（LLNA EC1.6）を用いた作業者の皮膚感作性リスク管理のための許容残留限度値（ASL）の開発に言及した。開発した手法は、評価目的に沿った調整係数を適用することにより、消費者製品に含まれる化学物質の皮膚感作性リスク評価など、他の評価対象及び異なる曝露シナリオの定量的リスク評価にも応用可能と考えられる。

本章では、第 1 章で開発・検証を行った LLNA EC1.6 を用いた作業者リスク管理のための皮膚感作性定量的リスク評価手法を応用し、消費者製品の使用による事故事例として知られるデスクマット中抗菌剤による ACD 発症事例の遡及的解析を試み、LLNA

EC1.6 を用いた皮膚感作性定量的リスク評価手法の消費者製品に含まれる化学物質の皮膚感作性定量的リスク評価への応用可能性の検討を行った。

## 2-2 デスクマットに添加された抗菌剤によるアレルギー性接触皮膚炎発症事例の遡及的解析による皮膚感作性定量的リスク評価手法の適用性の検討

### 2-2-1 はじめに

消費者製品に含まれる化学物質は、日常生活において健康上の問題を引き起こす可能性がある。皮膚はアレルギー性接触皮膚炎（ACD）を引き起こす可能性のある化学物質への主要な曝露部位であり（鹿庭, 2006）、独立行政法人製品評価技術基盤機構（NITE）の消費者製品事故情報データベース（NITE 事故情報データベース）には、1,737 件の ACD 症例が報告されている。この中には、衣類に使用される染料や抗菌剤、樹脂製品の可塑剤などに起因する ACD の報告が含まれるが、このうち多くがポリ塩化ビニル（PVC）デスクマットの使用によるものであり、原因化学物質の調査により、接触アレルゲンとしてピリジン系の有機抗菌剤である 2,3,5,6-テトラクロロ-4-(メチルスルホニル)ピリジン（TCMSP; CAS RN 13108-52-6）(Table 10) が特定されている（Gushi *et al.*, 2003; Inoue *et al.*, 2008; 藤原ら, 2008）。NITE 事故情報データベースに収載された ACD 症例 1,737 件中、当該デスクマットによる ACD 症例は 1,382 件であり、そのうち 51 件は重篤な ACD とされている（NITE 事故情報データベース）。

本検討では、第 1 章で開発した LLNA EC1.6 を用いた作業者リスク管理のための皮膚感作性定量的リスク評価手法について、消費者製品に含まれる化学物質の皮膚感作性定

量的リスク評価への応用可能性を検討することを目的とし、当該手法を応用し、製品事故の原因となりデスクマットの抗菌剤として使用された TCMSP の皮膚感作性リスクについて遡及的に解析した。

## 2-2-2 材料と方法

### TCMSP の皮膚感作性強度の推定

既存情報調査の結果、TCMSP について信頼性のある LLNA EC1.6 データが得られなかったことから、本検討において LLNA: BrdU-ELISA を実施した。

### 被験物質

東京化成工業株式会社より入手した 2,3,5,6-テトラクロロ-4-(メチルスルホニル)ピリジン (TCMSP)(lot No. BGRUJ, 純度: 96.5%) を用いた (Table 10)。

### LLNA: BrdU-ELISA

OECD TG442B (OECD, 2018) に従い LLNA: BrdU-ELISA を実施した。試験は 8 週齢の雌 CBA/J マウス (Jackson Laboratory Japan 株式会社より入手) を用い、(一財) 化学物質評価研究機構日田事業所において同所施設内動物福祉ガイドライン及び国内法令に準拠して実施した。なお、実験に用いた CBA マウスは Th1 レスポンダーであることが知られており (ICCVAM, 1999)、本法において皮膚感作性物質に対する反応性が高いことが報告されている (Takeyoshi *et al.*, 2004)。

TCMSP をアセトン-オリーブ油 (4:1) に溶解し、0.005、0.01、0.025、0.05、0.1、0.25 w/v% 溶液に希釈した後、TCMSP 溶液または媒体を、連続 3 日間 (1 日目～3 日目)、

各マウスの両耳介に 25  $\mu$ L ずつ塗布した。5 日目に BrdU 液の単回腹腔内注射を行った。

6 日目にマウスを麻酔下での頸椎脱臼により安楽死させた後、左右の耳介リンパ節を採取した。リンパ節中の細胞は一定量の生理食塩液中に分散した後、マイクロプレートに分注し、固定・変性処理を行った後に酵素免疫測定法 (ELISA) により BrdU 取り込み量を測定した。ELISA は市販の細胞増殖アッセイキット (Roche Diagnostics; Cat. no. 11647229001) を使用し、マルチプレートリーダー (FLUOstar Omega, BMG LABTECH) を用い、492 nm を参照波長として 370 nm の吸光度を測定した。吸光度を BrdU 標識指数として定義し、刺激指数 (SI) は各試験群の BrdU 標識指数を媒体対照群の BrdU 標識指数で除して算出した。陽性と判定される濃度閾値である EC1.6 値 (LLNA EC1.6) は次の式 6 を使用して算出した。

$$\text{LLNA EC1.6} = c + \{(1.6-d)/(b-d)\} \times (a-c) \quad (\text{式 6})$$

\* 用量反応曲線上で SI 値 1.6 を挟む上下のデータポイントにおける用量及び SI 値 (それぞれ (a, b) 及び (c, d)) を代入

#### LLNA EC1.6 (%) の皮膚表面単位面積当たりの負荷量 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) への換算

得られた LLNA EC1.6 (%) を皮膚表面単位面積当たりの負荷量 LLNA EC1.6 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) に換算した (式 7)。

$$\text{LLNA EC1.6 } (\mu\text{g}/\text{cm}^2) = \{\text{EC1.6 } (\%) \times 10^4 (\mu\text{g}/\text{mL}) \times 0.025 (\text{mL}/\text{ear})^{*1}\} / 1 (\text{cm}^2/\text{ear})^{*2}$$

(式 7)

\*1 LLNA における適用量、\*2 LLNA における適用面積

### 調整係数 (SAF) の検討と許容曝露レベル (AEL) の算出

第 1 章で開発した LLNA EC1.6 に基づく作業者リスク管理のための皮膚感作性定量的リスク評価手法で設定した調整係数 (SAF) 及び香粧品の皮膚感作性定量的リスク評価においてこれまでに検討された調整係数 (SAF) (Api *et al.*, 2008; Basketter and Safford, 2016; IDEA, 2016; SCCS, 2018; Api *et al.*, 2020) を参考に、デスクマットに添加された抗菌剤の消費者リスク評価のための調整係数 (SAF) を検討した。消費者製品に含まれる化学物質の皮膚感作性定量的リスク評価手法として検討された既報 (Api *et al.*, 2008; Basketter and Safford, 2016; IDEA, 2016; SCCS, 2018; Api *et al.*, 2020) を参考に、調整係数 (SAF) の構成要素は、種間差、個体差、曝露条件とし、このうち種間差の調整係数 (SAF<sub>種間差</sub>) の値には、1-2 で実施した LLNA EC1.6/HRIPT NOEL 比の解析で得られた当該比の 95 パーセンタイル値を適用することとした。曝露条件に関する調整係数 (SAF<sub>曝露条件</sub>) の要素については、Quantitative Risk Assessment for Fragrance Ingredients (QRA2) (Api *et al.*, 2020) で提案された香粧品のリスク評価で考慮されたマトリックス/製品の調整係数 (SAF<sub>マトリックス/製品</sub>)、頻度/期間の調整係数 (SAF<sub>頻度/期間</sub>)、皮膚の状態/

部位の調整係数 (SAF<sub>皮膚の状態/部位</sub>) を基本とし、デスクマットの使用条件を考慮し、必要な要素を検討した。

消費者に対するリスク管理を目的とした皮膚感作性定量的リスク評価に用いる起点とする LLNA EC1.6 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) に検討した調整係数 (SAF) を適用し、許容曝露レベル (acceptable exposure level: AEL) を算出した (式 8)。

$$\text{許容曝露レベル (AEL)}(\mu\text{g}/\text{cm}^2) = \text{LLNA EC1.6}(\mu\text{g}/\text{cm}^2) / \text{調整係数積}^* \quad (\text{式 8})$$

\* SAF<sub>種間差</sub> × SAF<sub>個体差</sub> × SAF<sub>曝露条件</sub>

## 曝露評価

曝露評価として、デスクマット中に含まれる TCMSP のデスクマット使用中の前腕部皮膚表面単位面積当たりの曝露レベル ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) の推定を行った。ここで、TCMSP をデスクマットの抗菌目的で使用する際の規格等の情報は、公開された情報源からは得られなかったことから、本検討では、ポリ塩化ビニル (PVC) 樹脂用の抗菌剤として TCMSP と同じ目的で広く使用されているチアベンダゾール (thiabendazole) の PVC 中推奨濃度 (技術情報協会, 2006; U.S. EPA, 2016) に基づき、PVC 中の TCMSP 添加濃度を 0.1~0.2 wt% と仮定した。デスクマット表面に存在する TCMSP 量の推定については、欧州 REACH 規制のリスク評価ガイダンス (ECHA, 2016) を参考に、製品の厚さ 0.001



cm の接触層に含まれる TCMSP が皮膚に移行する可能性があるとして想定し、保守的な仮定に基づいて、デスクマット表層 0.001 cm の接触層中に含まれる TCMSP 全量が皮膚に移行すると仮定した。これらの仮定に基づき、TCMSP 曝露量は以下の式 9 により算出した。

$$\text{TCMSPの推定曝露レベル } (\mu\text{g}/\text{cm}^2) = V(\mu\text{g}/\text{cm}^2) \times N/100 \quad (\text{式 9})$$

ここで  $N$ : PVC樹脂中のTCMSP含有量 (%)

$V$ : 厚さ 0.001 cmの接触層に相当するPVC樹脂量

### 定量的リスク評価

算出した許容曝露レベル (AEL) と推定曝露レベルの比較を行い、デスクマットの抗菌処理に用いられた TCMSP による感作性リスクの定量的リスク評価を実施した。

### 2-2-3 結果

#### TCMSP の皮膚感作性強度の推定結果

#### LLNA: BrdU-ELISA の結果

LLNA: BrdU-ELISA の結果を Table 11 及び Fig. 5 に示す。SI 値は用量依存的に増加し、0.025%を超える TCMSP 濃度で 1.6 を超えたことから、試験結果は陽性と判定され、LLNA EC1.6 は 0.011%と算出された。

#### LLNA EC1.6 (%) の皮膚表面単位面積当たりの負荷量 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) への換算結果

LLNA EC1.6 = 0.011%を皮膚表面単位面積当たりの用量に換算した結果、LLNA EC1.6 =  $2.75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  が得られた。当該 EC1.6 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) を皮膚感作性のリスク評価に用いる許容曝露レベル (AEL) 算出のための起点とした。

#### 調整係数 (SAF) の検討と許容曝露レベル (AEL) の算出結果

デスクマットの消費者リスク評価のための調整係数 (SAF) を検討した結果を Table 12 に示す。種間差の調整係数 ( $\text{SAF}_{\text{種間差}}$ ) については、第 1 章で LLNA EC1.6 とヒトパッチテスト NOEL (HRIPT NOEL) の比の解析結果に基づき設定した 6 を用いた。個体差の調整係数 ( $\text{SAF}_{\text{個体差}}$ ) については、香粧品の皮膚感作性定量的リスク評価においていずれも 10 が適用されている (Api *et al.*, 2008; Basketter and Safford, 2016; IDEA, 2016;

SCCS, 2018, Api *et al.*, 2020) こと踏まえ、10 を用いた。曝露条件に関する調整係数 (SAF<sub>曝露条件</sub>) の要素については、製品の形状 (接触層中に感作性物質を含むデスクマット)、曝露シナリオ (デスクマット使用中に前腕部皮膚と感作性物質を含有するデスクマット表面が1日最大8時間程度接触) を考慮して検討した。このうち、マトリックス/製品の調整係数 (SAF<sub>マトリックス/製品</sub>) については、本検討の曝露シナリオでは、デスクマット表面の感作性物質の皮膚への浸透は汗を介して生じると考えられ、この仮定では、LLNA: BrdU-ELISA 法で用いられた溶媒 (アセトン-オリーブ油 (4:1)) よりも皮膚への浸透性が高まる懸念はないと考えられる。QRA2 においても、固体マトリックス状の香粧品の調整係数 (SAF<sub>マトリックス/製品</sub>) は、固体から皮膚上の汗や皮脂への移行を介する必要があることを考慮して、大部分の製品に対して調整係数 1 が適用されている。

以上を踏まえ、本シナリオにおける調整係数 (SAF<sub>マトリックス/製品</sub>) は 1 とした。頻度/期間の調整係数 (SAF<sub>頻度/期間</sub>) については、製品が長期間にわたって頻繁に使用され、蓄積影響をもたらす可能性が考えられること及びヒトで感作性を誘発しないと考えられる化学物質量 (NESIL) を推定するための起点として用いられた感作性試験の曝露頻度 (LLNA: BrdU-ELISA 法では 3 回、HRIPT では 9 回) よりも高頻度の曝露が想定されることから、QRA2 を参考に調整係数 (SAF<sub>頻度/期間</sub>) として 3 を適用することとした。また、皮膚の状態/部位の調整係数 (SAF<sub>皮膚の状態/部位</sub>) についても、QRA2 (Api *et al.*, 2020) において前腕部、手首、手の甲、手のひらについて皮膚の状態/部位の調整係数 (SAF<sub>皮</sub>

膚の状態/部位) が設定されていることを参考に、調整係数 (SAF<sub>皮膚の状態/部位</sub>) として 3 を適用することとした。これにより、曝露条件に関する調整係数 (SAF<sub>曝露条件</sub>) は全体で 10 (SAF<sub>マトリックス/製品</sub> (1)、SAF<sub>頻度/期間</sub> (3)、SAF<sub>皮膚の状態/部位</sub> (3)(ここで、3 は 10 の平方根 (約 3.16 を四捨五入して算出) の積) となった。

したがって、最終的な調整係数積 (SAF<sub>種間差</sub> × SAF<sub>個体差</sub> × SAF<sub>曝露条件</sub>) は 600 となった。

LLNA EC1.6 (2.75 µg/cm<sup>2</sup>) に調整係数 (SAF) 積を適用した結果、デスクマットの消費者リスク評価のための許容曝露レベル (AEL) は 0.00458 µg/cm<sup>2</sup> と算出された。

$$\text{許容曝露レベル (AEL) (}\mu\text{g/cm}^2\text{)} = \text{EC1.6 (2.75)}(\mu\text{g/cm}^2\text{)}/\text{調整係数積 (600)} = 0.00458 (\mu\text{g/cm}^2)$$

## 曝露評価結果

Table 13 に示す情報を式 9 に適用し、デスクマット 1 cm<sup>2</sup> 当たりの TCMSP 含有量を推定したところ、デスクマット 1 cm<sup>2</sup> 当たりの推定 TCMSP 含有量は 2.7 µg/cm<sup>2</sup> と導出された。

$$\text{TCMSP の推定曝露レベル (}\mu\text{g/cm}^2\text{)} = 1,350 (\mu\text{g/cm}^2) \times 0.2/100 = 2.7 (\mu\text{g/cm}^2)$$

## 定量的リスク評価結果

TCMSP の許容曝露レベル (AEL) と推定曝露レベルを比較した結果を Table 14 に示す。推定曝露レベル ( $2.7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) は許容曝露レベル (AEL) ( $0.00458 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) よりも明らかに高く、推定曝露レベルは許容曝露レベル (AEL) の 500 倍以上であった。この結果は、本検討で用いた仮定条件下では、デスクマットに使用された TCMSP による深刻な感作性リスクが生じることを示している。

#### 2-2-4 考察

TCMSP は、日本においてデスクマットの抗菌処理剤として使用されたことによって、消費者に多くの ACD を生じたことが報告されている (NITE 事故情報データベース)。ACD が発症した当時、TCMSP が感作性を有することは知られていたものの、その感作性強度に関する情報はなく、TCMSP をデスクマットの抗菌処理剤として使用する際の安全性を事前に検討することは行われていなかった (鹿庭, 2006)。

TCMSP の感作性強度に関する情報について、同じく抗菌剤として使用されるテトラクロロイソフタロニトリル (2,4,5,6-tetrachloroisophthalonitrile) との交差反応性を調べた研究 (野田ら, 2006) において、LLNA: BrdU-ELISA による感作性試験が実施されており、その試験成績から TCMSP の LLNA EC1.6 は 0.086% と算出されているが、当該実験には BALB/c マウスが使用されており、OECD TG442B の推奨マウスである CBA 系統のマウスと異なり、手法も TG442B に規定された方法論とは異なっている。また、LLNA: BrdU-ELISA においてマウス系統による化学物質に対する感受性の差があることが報告されている (Takeyoshi *et al.*, 2004) ことから、本検討においては信頼性のある LLNA EC1.6 を求めるため、新たに OECD TG442B 準拠の LLNA: BrdU-ELISA を実施し、LLNA EC1.6 を算出した。この結果、LLNA EC1.6 は 0.011% と、既報 (野田ら, 2006) よりも低い数値を示し、TCMSP は極めて高い感作性を有することが確認された。皮膚感作性定量的リスク評価においては、評価対象物質の感作性強度を正確に把握して許容

曝露レベル（AEL）を設定することが極めて重要であり、本検討において TCMSP の感作性強度に関する信頼性の高い LLNA EC1.6 が得られたことの意義は大きい。

本検討の曝露評価では、PVC 樹脂中の抗生物質であるチアベンダゾールの推奨濃度を参考とし、デスクマット表面接触層中の TCMSP 含有量を  $2.7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  と推定した。この結果、推定曝露レベルは、許容曝露レベル（AEL）より 500 倍以上高い結果となった。

本検討における曝露評価は、実際の事故製品の技術情報に基づいたものではなく、一定の仮定のもとで TCMSP の曝露量が推定されたものの、定量的リスク評価の結果は、仮定条件下でのデスクマットへの TCMSP の使用では皮膚感作性リスクの懸念が非常に高いことを示した。同様に外装建材の抗菌加工目的で使用される TCMSP のコーティング中の有効抗菌濃度が 0.25～2%と記載されている（日本国特許庁, 1996）ことを考慮すると、本検討において仮定条件下で算出した TCMSP の推定含有量は現実的な範囲内にあると考えられる。

また、PVC 樹脂からの TCMSP の曝露レベルは、厚さ 0.001 cm の接触層に含まれる化学物質が製品の表面に移動すると仮定し（ECHA, 2016）、製品表面に移動した TCMSP の 100%が皮膚に移行する可能性があるという保守的な仮定に基づいて推定した。TCMSP がデスクマットのマトリックス内でどの程度表面に移動するかについては情報がないものの、デスクマット製品が一定期間抗菌効果を期待されるものであることを考慮すると、一定量の TCMSP がマトリックスから製品表面に徐々に移動することが

考えられる。本検討では厚さ 0.001 cm の接触層に含まれる TCMSP が 100%皮膚に移行すると仮定したが、仮に現在のリスク評価結果に 10%の移行率を適用しても、リスクの懸念が非常に高いという評価結果は依然として変わらず、TCMSP をデスクマットの抗菌剤として使用する潜在的なリスクの存在を裏付けている。実際の定量的リスク評価では、製品マトリックスに含まれる化学物質を評価する際に、対象化学物質のマトリックスからの移動や皮膚への移行の程度などの情報を取得し、リスク評価をさらに精緻化することが望ましいと考えられる。

本検討で明らかになった TCMSP の感作性強度と、抗菌剤としての効力が期待できる条件を考慮すると、皮膚との接触頻度の高い製品への使用による感作性リスクを回避することは極めて困難であったことが示唆された。皮膚に直接接触しない塗料や接着剤などの用途に使用された場合、TCMSP による皮膚障害は報告されていない（鹿庭, 2006）ことを考慮すると、消費者製品における皮膚感作性物質のリスクは、曝露シナリオに大きく依存し、各製品の使用条件に応じた曝露シナリオを考慮した上で定量的なリスク評価を実施することが重要となる。消費者製品の感作性リスクを最小限に抑えるためには、製品に使用されている化学物質の感作性強度を定量的に評価し、製品化前に製品の曝露シナリオに応じた定量的リスク評価を実施することが消費者製品による感作性リスクを回避するために重要と考えられる。




#### 2-2-5 まとめ

本検討において、デスクマットの抗菌処理剤として使用された TCMSP による ACD 発症事例を例に、遡及的な定量的リスク評価を実施した。この結果、TCMSP の推定曝露レベルは LLNA EC1.6 に基づき設定した許容曝露レベル（AEL）を大きく上回り、事故を起こしたデスクマットは TCMSP による皮膚感作性リスクが高い状態であったことが確認された。

本検討における曝露評価は、保守的な仮定に基づき曝露レベルを推定した結果であるが、新たに検討した LLNA EC1.6 に基づく消費者製品に対する皮膚感作性定量的リスク評価手法により事故製品に対する遡及的な解析を行った結果、感作性リスクの懸念が極めて高いという結果が得られたことから、本法は消費者製品に含まれる感作性物質の定量的リスク評価にも応用可能であることが示された。

**Table. 10 2,3,5,6-tetrachloro-4-(methylsulfonyl) pyridine (TCMSP)**

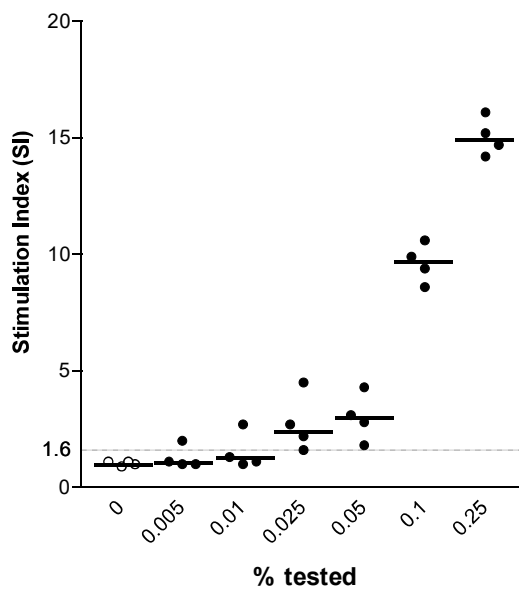
Chemical name	2,3,5,6-tetrachloro-4-(methylsulfonyl) pyridine (TCMSP)
CAS RN	13108-52-6
Molecular formula <sup>1)</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> Cl <sub>4</sub> NO <sub>2</sub> S
Structure <sup>1)</sup>	

1) PubChem (National Institutes of Health (NIH)). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

**Table 11. Results of LLNA: BrdU-ELISA for TCMSP (Fukushima *et al.*, 2023a)**

% tested	N	Mean SI	S.E.
0.000	4	1.03	0.05
0.005	4	1.28	0.24
0.010	4	1.53	0.40
0.025	4	2.75	0.63
0.050	4	3.00	0.51
0.100	4	9.63	0.42
0.250	4	15.05	0.41

N: number of mice, SI: stimulation index, S.E.: standard error



**Fig. 5 Individual SI values and the median in the LLNA: BrdU-ELISA for TCMSP (Fukushima *et al.*, 2023a)**

Open circle shows the individual SI values in the concurrent vehicle control group and closed circle shows those in each test group. Horizontal bar shows the median for the SI values in each group.

**Table 12. SAFs for consumer risk assessment of skin sensitizers included in desk mats (Fukushima *et al.*, 2023a)**

Factor		Desk mats study	QRA2	Fukushima <i>et al.</i> (2022)
Interspecies		<b>6</b>	-*	6 <sup>†</sup>
Interindividual		<b>10</b>	10	10
Use conditions	Matrix/Product	<b>1</b>	0.3, 1, or 3 <sup>‡</sup>	-
	Frequency/duration	<b>3<sup>‡</sup></b>	1 or 3 <sup>‡</sup>	3
	Skin condition/site	<b>3<sup>‡</sup></b>	1, 3 <sup>‡</sup> , or 10	-
Composite SAF		<b>600</b>	30-300	180

SAF: Sensitization assessment factor

\* No interspecies SAF was applied since the no expected sensitizing induction level (NESIL) was predicted based on confirmatory studies in humans or was based on extrapolated human NESIL from the EC3 values in LLNA (Api *et al.*, 2020).

<sup>†</sup> Based on EC1.6/HRIPT NOEL ratio.

<sup>‡</sup> For practical purposes, the number 3 is normally the representation of 3.16 (the half log of 10) (Api *et al.*, 2006; Basketter and Safford, 2016; SCCS, 2018; Api *et al.*, 2020).

**Table 13. Calculation parameters for estimation of TCMSP exposure level (Fukushima *et al.*, 2023a)**

Parameters	Value
TCMSP content in PVC resin ( <i>N</i> )	0.2%
Amount of PVC <sup>1)</sup> in 0.001 cm thick contact layer ( <i>V</i> ) *	1,350 µg/cm <sup>2</sup>

1) PVC: polyvinyl chloride

\* Assuming specific gravity of soft PVC resin = 1.35 (PVC Industry and Environment Association website “Basic physical properties of PVC resin”. [https://www.vec.gr.jp/enbi/enbi2\\_2.html](https://www.vec.gr.jp/enbi/enbi2_2.html))

**Table 14. Comparison of AEL and estimated exposure levels**

AEL*	Estimated exposure level	Risk characterization
0.00458 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	2.7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	AEL < Estimated exposure level Skin sensitization risk is a concern

AEL: acceptable exposure limit

### 2-3 小括

化学物質は我々の生活の中で広く普及している製品の原料として使用されており、日用品の使用による消費者の ACD 発症も報告されているが、消費者製品に含まれる化学物質の皮膚感作性定量的リスク評価について、香粧品以外の製品に関してはほとんど検討されていないのが現状である。本章では、第 1 章で開発・検証を行った LLNA EC1.6 を用いた作業者リスク管理のための皮膚感作性定量的リスク評価手法について、消費者製品に含まれる化学物質の皮膚感作性定量的リスク評価への応用可能性を検討した。

本検討において、国内で多くの事故情報が報告されているデスクマットの抗菌処理剤として添加された TCMSP による ACD 発症事例を例に、LLNA EC1.6 を用いた作業者リスク管理のための皮膚感作性定量的リスク評価手法を応用した消費者向けリスク評価手法を検討し、検討した手法を用い遡及的な解析を実施した。TCMSP の皮膚感作性強度の推定では、OECD テストガイドラインに準拠した LLNA: BrdU-ELISA の実施により信頼性のある EC1.6 データを取得した上で、LLNA EC1.6 を起点として消費者によるデスクマット使用条件を考慮して設定した調整係数 (SAF) を適用し、許容曝露レベル (AEL) を算出した。曝露評価については、製品タイプから想定される曝露シナリオに基づき、一定の仮定に基づく曝露評価を行った。定量的リスク評価を行った結果、推定曝露レベルは LLNA EC1.6 に基づき設定した許容曝露レベル (AEL) を大きく上回り、仮定した条件では、TCMSP による皮膚感作性リスクが懸念される状況で製品が使用され

ていたことが示された。個々の製品の使用状況に応じた曝露シナリオを考慮した調整係数（SAF）の適用や曝露評価手法の精緻化の課題はあるものの、消費者製品に含まれる感作性物質についても LLNA EC1.6 に基づく定量的リスク評価の適用可能性が示された。

本検討の結果、これまで困難とされてきた化学物質による皮膚感作性の定量的リスク評価に関して、1章において作業リスク管理のために開発した LLNA EC1.6 に基づく皮膚感作性定量的リスク評価手法の消費者製品向け定量的リスク評価への応用可能性が示された。消費者製品に含まれる感作性物質についても、上市に先立ち本検討で開発した手法に沿った定量的リスク評価を実施することにより ACD 発症等の製品事故発生を回避することが可能となり、LLNA EC1.6 に基づく化学物質の感作性定量的リスク評価手法を開発した社会的意義は大きい。



## 終章 総括と結論

化学物質によるアレルギー性接触皮膚炎（allergic contact dermatitis: ACD）は刺激性を示さない微量な濃度においても皮膚のかぶれ及び炎症が引き起こされ、一度罹患してしまうと完治することは困難で生活の品質を著しく低下させてしまうため、労働安全衛生上の問題となっている（武吉, 2005）。また、化学物質は我々の生活の中で広く普及している製品に使用されており、生産された工業製品の使用による消費者の ACD 発症も報告されている（NITE 事故情報データベース）ことから、公衆衛生上も極めて重要な課題である。化学物質の皮膚感作性について定量的リスク評価に基づくリスク管理を行うことが極めて重要と考えられるが、現状では、香粧品などの一部の製品を除き、皮膚感作性の定量的リスク評価手法の検討はほとんど行われていない。

作業員及び消費者に対する化学物質の感作性リスクを回避するためには、化学物質の皮膚感作性について定量的リスク評価に基づくリスク管理を行うことが極めて重要であり、労働安全衛生の観点からは、化学物質を取り扱う作業現場における職業曝露管理のための基準値として、皮膚感作性強度に基づく設備表面の許容残留限度値の設定が望まれる。また、消費者製品に含まれる化学物質の皮膚感作性の定量的リスク評価については、香粧品以外の製品に関しては現時点でほとんど検討されていないが、同様に消費者製品に使用される化学物質について定量的リスク評価に基づくリスク管理を行うことで

消費者の感作性リスクを回避できる可能性がある。

本研究では、課題①として、放射性同位体 (RI) を用いない感作性試験法として開発され我が国はもとより世界的な標準的試験法として広く利用されている LLNA: BrdU-ELISA 法で得られる EC1.6 値 (LLNA EC1.6) の感作性定量的リスク評価への適用性の検討と作業者リスク管理のための許容残留限度値算出への利用可能性の検討を行い、既知の感作性物質を例に、開発した手法に基づき算出される許容残留限度値と全身影響に基づき設定される設備表面残留レベルの比較を実施し、労働安全衛生の観点から皮膚感作性リスクを考慮した曝露管理の必要性について検証した。さらに開発した許容残留限度値 (ASL) に基づく感作性リスク管理の必要性を検証することを目的として、既知の感作性物質を対象に LLNA EC1.6 に基づく許容残留限度値 (ASL) と全身影響に基づく許容一日曝露量 (PDE) ベースの設備表面残留レベル (SRL) との比較を行った。

LLNA: BrdU-ELISA 法で得られる EC1.6 値 (LLNA EC1.6) の感作性定量的リスク評価への適用性の検討に用いた 33 物質について、得られた許容残留限度値 (ASL) を 5 つの範囲に層別化し、これらの範囲と既存の感作性強度情報と比較した結果、GHS 区分 1A に分類される強い感作性物質を使用する際は、許容残留限度値 (ASL) 1 mg/100 cm<sup>2</sup> 未満で曝露管理する必要があることが示された。また、LLNA EC1.6 に基づく許容残留限度値 (ASL) と全身影響に基づく許容一日曝露量 (PDE) ベースの設備表面残留レベル (SRL) との比較に用いた 3 物質はいずれも、全身影響に基づく設備表面残留レベル

(SRL) が皮膚感作強度に基づく許容残留限度値 (ASL) を上回り、特に GHS 区分 1A に分類される強い感作性物質では、全身影響に基づく設備表面残留レベル (SRL) での管理は作業者の皮膚感作性リスク管理の目的では不十分であることが示された。

以上の検討結果より、LLNA EC1.6 の皮膚感作性定量的リスク評価への適用性が確認され、確立した手法を用いて許容残留限度値 (ASL) と全身影響に基づく設備表面残留レベル (SRL) の比較解析を実施した結果、作業現場において、特に強い感作性を有する化学物質に関しては感作性ベースのリスク評価が重要であることが示唆された。

本研究における課題②では、課題①で検討した LLNA EC1.6 を用いた皮膚感作性定量的リスク評価手法の消費者製品に対する応用可能性の検討として、デスクマットの抗菌処理剤として添加された 2,3,5,6-テトラクロロ-4-(メチルスルホニル)ピリジン (TCMSP) による ACD 発症事例を例に遡及的リスク評価を行い、作業リスク管理の目的で開発した手法の消費者リスク評価への応用可能性について検討した。

TCMSP の皮膚感作性強度の推定では、OECD テストガイドラインに準拠した LLNA: BrdU-ELISA の実施により信頼性のある EC1.6 データを取得した上で、LLNA EC1.6 を起点として消費者によるデスクマット使用条件を考慮して設定した調整係数 (SAF) を適用し、許容曝露レベル (AEL) を算出した。曝露評価については、製品タイプから想定される曝露シナリオに基づき、一定の仮定に基づく曝露評価を行った。定量的リスク評価を行った結果、推定曝露レベルは LLNA EC1.6 に基づき設定した許容曝露レベル

(AEL) を大きく上回り、事故を起こしたデスクマットは TCMSP による皮膚感作性リスクが高い状態であったことが確認された。個々の製品の使用状況に応じた曝露シナリオを考慮した調整係数 (SAF) の適用や曝露評価手法の精緻化の課題はあるものの、消費者製品中の感作性物質についても LLNA EC1.6 に基づく定量的リスク評価の適用可能性が示された。

本研究によって、これまで困難とされてきた化学物質による皮膚感作性の定量的リスク評価に関して、放射性物質を使用することなく実施可能な LLNA: BrdU-ELISA 法で得られる EC1.6 値 (LLNA EC1.6) を用いた感作性定量的リスク評価手法の基礎を構築することができた。

作業場リスク管理のために開発した皮膚感作性定量的リスク評価手法では、許容残留限度値 (ASL) と全身影響に基づく設備表面残留レベル (SRL) の比較解析を実施した結果、作業現場において、特に強い感作性を有する化学物質に関しては感作性ベースのリスク評価が重要であることが示唆された。さらに、消費者製品向け定量的リスク評価への応用可能性が示された。消費者製品に含まれる感作性物質についても、上市に先立ち本検討で開発した手法に沿った定量的リスク評価を実施することにより ACD 発症等の製品事故発生を回避することが可能となり、LLNA EC1.6 に基づく化学物質の感作性定量的リスク評価手法を開発した社会的意義は大きい。

本研究により構築された LLNA: BrdU-ELISA 法で得られる EC1.6 値 (LLNA EC1.6)

を用いた皮膚感作性定量的リスク評価手法により化学物質による感作性リスクの最小化に寄与することが可能であり、化学物質によるヒトへの健康影響の低減に貢献できるものと期待される。

## 研究発表実績

### 研究論文

1. **Fukushima A.**, Hayashi T., Takeyoshi M. 2022. Acceptable Surface Limits (ASLs) of skin sensitizers derived from the local lymph node assay (LLNA): BrdU-ELISA EC1.6 values and their relationships to known sensitization potency information. J Appl Toxicol. 42(10): 1723–1730.
2. **Fukushima A.**, Morioka H., Kobayashi T., Katagiri R., Tanabe A., Sakunaga M., Takeyoshi M. 2023. Retrospective quantitative risk assessment of skin sensitization caused by an antimicrobial agent used in a consumer product: 2,3,5,6-Tetrachloro-4-(methylsulfonyl) pyridine. Contact Dermatitis. 88(5): 395–401.
3. **Fukushima A.**, Hayashi T., Takeyoshi M. 2023. Comparison of the acceptable surface limits derived from the skin sensitization potency for workers and swab residue limits determined from the permitted daily exposure derived from the systemic effects. J Toxicol Sci. 48(9): 507–511.

## 学会発表

1. **Fukushima A.**, Hayashi T., Ishii S., Takeyoshi M. 2021. Setting of Acceptable Surface Limits (ASL) and Occupational Exposure Bands (OEB) for Skin Sensitizers using EC1.6 values derived from LLNA: BrdU ELISA based on systemic effects and the acceptable surface limits based on skin sensitizing effects. 第 48 回日本毒性学会学術年会ポスター発表
2. **Fukushima A.**, Hayashi T., Takeyoshi M. 2022. Comparison of the cleaning limits derived from PDE. 第 49 回日本毒性学会学術年会ポスター発表

## 要約

化学物質によるアレルギー性接触皮膚炎 (allergic contact dermatitis: ACD) は労働安全衛生及び公衆衛生上、極めて重要な課題である。化学物質の皮膚感作性について定量的リスク評価に基づくリスク管理を行うことが極めて重要と考えられるが、現状では、化粧品などの一部の製品を除き、皮膚感作性の定量的リスク評価手法の検討はほとんど行われていない。化学物質の皮膚感作性を定量的に予測する皮膚感作性試験法としてマウスを用いる Local Lymph Node Assay (LLNA) が挙げられ、LLNA-RI 法で得られる陽性と判定される濃度閾値である EC3 値 (LLNA EC3) は感作性強度の定量的指標として利用が試みられている。本研究では、放射性同位体 (RI) を用いない皮膚感作性試験として開発され利用が広がっている LLNA: BrdU-ELISA 法で得られる EC1.6 値 (LLNA EC1.6) を用いた定量的リスク評価手法の開発を目指し、検討を行った。労働安全衛生の観点からは、化学物質を取り扱う作業現場における職業曝露管理のための基準値として、皮膚感作性強度に基づく設備表面の許容残留限度値の設定が望まれることから、LLNA: BrdU-ELISA 法で得られる EC1.6 値の感作性定量的リスク評価のための評価の起点としての適用性の検討と、作業リスク管理のための許容残留限度値算出への利用可能性の検討を行った。この結果、LLNA EC1.6 は既に感作性強度の定量的指標としての応用が試みられている LLNA EC3 との同等性が確認されたことから、LLNA EC1.6 を許容残留



限度値 (ASL) 算出の起点とするために必要な調整係数 (SAF) の検討を行い、LLNA EC1.6 に基づく許容残留限度値 (ASL) 設定手法を構築した。調整係数 (SAF) の要素としては種間差、個体差、曝露条件 (頻度/期間) を設定し、LLNA EC1.6 に調整係数 (SAF) を適用することで許容残留限度値 (ASL) を算出した。33 物質を対象に LLNA EC1.6 に基づき導出された許容残留限度値 (ASL) を 5 つの範囲に層別化し、これらの範囲と既存の感作性強度情報と比較した結果、GHS 区分 1A に分類される強い感作性物質を使用する際は、許容残留限度値 (ASL) 1 mg/100 cm<sup>2</sup> 未満で曝露管理する必要があることが示された。さらに、既知の感作性物質を例に、開発した手法に基づき算出される許容残留限度値 (ASL) と、全身影響に基づき設定される設備表面残留レベル (SRL) の比較を実施した結果、作業現場において、特に強い感作性を有する化学物質に関しては感作性ベースのリスク評価が重要であることが示唆された。当該評価手法の消費者リスク評価への応用可能性の検討では、デスクマットの抗菌処理剤として添加された 2,3,5,6-テトラクロロ-4-(メチルスルホニル)ピリジン (TCMSP) による ACD 発症事例について検討した手法を用い遡及的な解析を行い、LLNA EC1.6 を用いた消費者製品に含まれる感作性物質の定量的リスク評価手法への応用可能性を検討した。TCMSP の皮膚感作性強度の推定では、OECD テストガイドラインに準拠した LLNA: BrdU-ELISA の実施により信頼性のある EC1.6 データを取得した上で、LLNA EC1.6 を起点として消費者によるデスクマット使用条件を考慮して設定した調整係数 (SAF) を適用し、許容曝露レベル

(AEL) を算出した。曝露評価については、製品タイプから想定される曝露シナリオに基づき、一定の仮定に基づく評価を行った。定量的リスク評価を行った結果、推定曝露レベルは LLNA EC1.6 に基づき設定した許容曝露レベル (AEL) を大きく上回り、事故を起こしたデスクマットは TCMSP による皮膚感作性リスクが高い状態であったことが確認された。この結果、消費者製品中の感作性物質についても LLNA EC1.6 に基づく定量的リスク評価の応用可能性が示された。本研究の結果、消費者製品に含まれる感作性物質についても、上市に先立ち本検討で開発した手法に沿った定量的リスク評価を実施することにより ACD 発症等の製品事故発生を回避することが可能となり、本法開発の社会的意義は大きい。

以上のことから、本研究成果は作業者の職業曝露や消費者製品中に含まれる感作性物質への消費者の曝露による ACD を未然に防ぐための皮膚感作性定量的リスク評価手法として有用であり、化学物質による感作性リスクを最小化する手法として、ヒトへの健康影響の低減に貢献できるものと期待される。

## 謝辞

本論文を作成するにあたり、細部にわたりご指導、ご鞭撻を賜りました山口大学共同獣医学部教授 岩田 祐之 先生に深く感謝の意を表します。本論文を作成するにあたり、有益なご助言とご指導を賜りました同学部准教授 渋谷 周作 先生に深く感謝の意を表します。本研究を遂行するにあたり、終始ご指導を賜りました一般財団法人化学物質評価研究機構安全性評価技術研究所 技術顧問 武吉 正博 博士に深く感謝の意を表します。本研究の遂行にご協力いただいた一般財団法人化学物質評価研究機構安全性評価技術研究所の諸氏に感謝いたします。

最後に、温かく見守ってくれた家族に深く感謝いたします。

## 参考文献

- Alomar A. 1986. Contact dermatitis from a fashion watch. *Contact Dermatitis*. 15(1): 44–45.
- Api A.M., Basketter D.A., Cadby P.A., Cano M.F., Ellis G., Gerberick G.F., Griem P., McNamee P.M., Ryan C.A., Safford R. 2008. Dermal sensitization quantitative risk assessment (QRA) for fragrance ingredients. *Regul Toxicol and Pharmacol*. 52(1): 3–23.
- Api A.M., Basketter D.A., Bridges J., Cadby P.A., Ellis G., Gilmour N., Griem H., Griem P., Kern P., Khaiat A., O'Brien J., Rustemeyer T., Ryan G., Safford B., Smith B., Vey M. 2020. White IR. Updating exposure assessment for skin sensitization quantitative risk. *Regul Toxicol Pharmacol*. 118: 104805.
- Api A.M., Basketter D.A., Lalko J. 2015. Correlation between experimental human and murine skin sensitization induction thresholds. *Cutan Ocul Toxicol*. 34(4): 298–302.
- Basketter D.A. and Safford B. 2016. Skin sensitization quantitative risk assessment: A review of underlying assumptions. *Regul Toxicol Pharmacol*. 74: 105–116.
- Basketter D.A., Gerberick G.F., Kimber I., Loveless S.E. 1996. The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem Toxicol*.

34(10): 985–997.

Basketter D.A., Lea L.J., Dickens A., Briggs D., Pate I., Dearman R.J., Kimber I. 1999. A comparison of statistical approaches to the derivation of EC3 values from local lymph node assay dose responses. *J Appl Toxicol.* 19(4): 261–266.

Basketter D.A., Clapp C., Jefferies D., Safford B., Ryan C.A., Gerberick F., Dearman R.J., Kimber I. 2005. Predictive identification of human skin sensitization thresholds. *Contact Dermatitis.* 53(5): 260–267.

Basketter D.A., Alepee N., Ashikaga T., Barroso J., Gilmour N., Goebel C., Hibatallah J., Hoffmann S., Kern P., Martinozzi-Teissier S., Maxwell G., Reisinger K., Sakaguchi H., Schepky A., Taihardat M., Templier M. 2014. Categorization of chemicals according to their relative human skin sensitizing potency. *Dermatitis.* 25(1): 11–21.

Basketter D.A., Natsch A., Ellis G., Api, A.M., Irizar A., Safford B., Ryan C., Kern P. 2018. Interspecies assessment factors and skin sensitization risk assessment. *Regul Toxicol Pharmacol.* 97: 186–188.

Buehler E.V. 1965. Delayed contact hypersensitivity in the guinea pig. *Arch Dermatol.* 91: 171–177.

Deveau M., Chen C-P., Johanson G., Krewski D., Maier A., Niven K. J., Ripple S., Schulte P. A., Silk J., Urbanus J. H., Zalk D. M., Niemeier R. W. 2015. The global landscape of

Occupational Exposure Limits -implementation of harmonization principles to guide limit selection. *J Occup Environ Hyg.* 12(sup1): S127–S144.

European Commission (EC) 2015. EudraLex Volume 4. EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Annex 15: Qualification and Validation.

European Chemicals Agency (ECHA) 2012. Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Chapter R.8: Characterisation of dose [concentration]-response for human health (version: 2.1)

[https://echa.europa.eu/documents/10162/17224/information\\_requirements\\_r8\\_en.pdf/e153243a-03f0-44c5-8808-88af66223258?t=1353935239897](https://echa.europa.eu/documents/10162/17224/information_requirements_r8_en.pdf/e153243a-03f0-44c5-8808-88af66223258?t=1353935239897) (accessed on March 31, 2022).

European Chemical Agency (ECHA). 2016. Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Chapter R.15: Consumer exposure assessment (version 3.0).

[https://echa.europa.eu/documents/10162/17224/information\\_requirements\\_r15\\_en.pdf/35e6f804-c84d-4962-acc5-6546dc5d9a55?t=1468233059314](https://echa.europa.eu/documents/10162/17224/information_requirements_r15_en.pdf/35e6f804-c84d-4962-acc5-6546dc5d9a55?t=1468233059314) (accessed on September 15, 2022).

Emmet E.A. 1976. Allergic contact dermatitis in polyurethane plastic moulders. *J Occup*

*Med.* 18(12): 802–804.

藤原 進, 山田 陽三, 堀川 達弥, 錦織 千佳子, 沼田 剛, 下川 知樹, 佐々木 和実. 2008.

デスクマットとヘルメットベルトに含有された抗菌剤の 2,3,5,6-tetrachloro-4-(methylsulphonyl)pyridine (TCMSP) による接触皮膚炎の 1 例. *日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会雑誌*. 2(1): 25–32.

Fukushima A., Hayashi T., Takeyoshi M. 2022. Acceptable Surface Limits (ASLs) of skin

sensitizers derived from the local lymph node assay (LLNA): BrdU-ELISA EC1.6 values and their relationships to known sensitization potency information. *J Appl Toxicol.* 42(10): 1723–1730.

Fukushima A., Morioka H., Kobayashi T., Katagiri R., Tanabe A., Sakunaga M., Takeyoshi

M. 2023a. Retrospective quantitative risk assessment of skin sensitization caused by an antimicrobial agent used in a consumer product: 2,3,5,6-Tetrachloro-4-(methylsulfonyl) pyridine. *Contact Dermatitis*. 88(5): 395–401.

Fukushima A., Hayashi T., Takeyoshi M. 2023b. Comparison of the acceptable surface

limits derived from the skin sensitization potency for workers and swab residue limits determined from the permitted daily exposure derived from the systemic effects. *J Toxicol Sci.* 48(9): 507–511.

技術情報協会. 2006. 最新添加剤全集～機能性付与のための最適配合・評価～

(ISBN 486104099X).

Goossens A., Detienne T., Bruze M. 2002. Occupational allergic contact dermatitis caused by isocyanates. *Contact Dermatitis*. 47(5): 304–308.

Griem P., Goebel C., Scheffler H. 2003. Proposal for a risk assessment methodology for skin sensitization based on sensitization potency data. *Regul Toxicol Pharmacol*. 38(3): 269–290.

Grimalt R., Vilaplana J., Romaguera C. 2009. Three cases of allergic contact dermatitis to 4,4'-diaminodiphenylmethane. *Contact Dermatitis*. 60(6): 346–347.

Gushi A, Kanekura Y, Katahira Y. Miyoshi T, Kanzaki T. 2003. Contact dermatitis from the antimicrobial coating of a desk mat. *Contact Dermatitis*. 48(6): 347–348.

Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM). 1999. The Murine Local Lymph Node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds. The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No. 99-4494.

[https://ntp.niehs.nih.gov/sites/default/files/iccvam/docs/immunotox\\_docs/llna/llna](https://ntp.niehs.nih.gov/sites/default/files/iccvam/docs/immunotox_docs/llna/llna)



rep.pdf (accessed on February 19, 2024).

Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods

(ICCVAM). 2010. ICCVAM Test method evaluation report on the Murine Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA. A nonradioactive alternative test method to assess the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. NIH Publication Number 10-7552. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. [https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/immunotox\\_docs/llna-elisa/tmer.pdf](https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/immunotox_docs/llna-elisa/tmer.pdf) (accessed on March 31, 2022).

International Dialogue for the Evaluation of Allergens (IDEA). 2016. IDEA project. Final report on the QRA2. Skin sensitisation quantitative risk assessment for fragrance ingredients. <https://cdn2.assets-servd.host/selective-koala/production/documents/QRA2-report.pdf> (accessed on March 31, 2022).

Inoue T, Yagami A, Sano A, Nakagawa M, Abe M, Mori A, Sasaki K, Matsunaga K. 2008. Contact dermatitis because of antimicrobial coating desk mat. *Contact Dermatitis*. 58(2): 123–124.

Jolanki R., Kanereva L., Estlander T., Tarvainen K. 1994. Concomitant sensitization to triglycidyl isocyanurate, diaminodiphenylmethane and 2-hydroxyethyl methacrylate from silk-screen printing coatings in the manufacture of circuit boards. *Contact*

*Dermatitis*. 30(1): 12–15.

鹿庭 正昭. 2006. 家庭用品に使用される化学物質による健康被害と安全対策. 日本衛生学雑誌. 124: 1–20.

Kimber I. and Maurer T. 1996. Toxicology of contact hypersensitivity. Taylor & Francis.

Kimber I., Hilton J., Weisenberger C. 1989. The murine local lymph node assay for identification of contact allergens: a preliminary evaluation of in situ measurement of lymphocyte proliferation. *Contact Dermatitis*. 21(4): 215–220.

Kimber I., Basketter D.A., Butler M., Gamer A., Garrigue J.L., Gerberick G.F., Newsome C., Stelling W., Vohr H.M. 2003. Classification of contact allergens according to potency: proposals. *Food Chem Toxicol*. 41(12): 1799–1809.

Kobayashi T., Maeda Y., Kondo H., Takeyoshi M. 2020. Applicability of the proposed GHS subcategorization criterion for LLNA: BrdU-ELISA (OECD TG442B) to the CBA/J strain. *J Appl Toxicol*. 40(10): 1435–1439.

Kojima H., Takeyoshi M., Sozu T., Awogi T., Arima K., Idehara K., Ikarashi Y., Kanazawa Y., Maki E., Omori T., Yuasa A., Yoshimura I. 2010. Inter-laboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine incorporation. *J Appl Toxicol*. 31(1): 63–74.

Lidén C. 1990. Facial dermatitis caused by chlorothalonil in a paint. *Contact Dermatitis*.

22(4): 206–211.

Magnusson B., Kligman A.M. 1969. The identification of contact allergens by animal assay.

The guinea pig maximization test. *J Invest Dermatol.* 52(3): 268–276.

Ministry of the Environment Government of Japan (MOE) 2013. Profiles of the Initial

Environmental Risk Assessment of Chemicals, vol. 11. Methyl methacrylate.

<https://www.env.go.jp/content/900450228.pdf> (accessed on April 14, 2023)

Naumann B.D. and Arnold S.A. 2019. Setting surface wipe limits for skin sensitizers.

*Toxicol Ind Health.* 35(9): 614–625.

日本国特許庁. 1996. 公開特許公報 (A). 特許出願公開番号: 特開平 08-325485. 抗菌防

カビ性プレコート金属板. [https://www.j-platpat.inpit.go.jp/c1800/PU/JP-H08-](https://www.j-platpat.inpit.go.jp/c1800/PU/JP-H08-325485/7675D3B9D5C4F6D63FC202488DFA579E092341D055C9C2696C19881B)

[325485/7675D3B9D5C4F6D63FC202488DFA579E092341D055C9C2696C19881B](https://www.j-platpat.inpit.go.jp/c1800/PU/JP-H08-325485/7675D3B9D5C4F6D63FC202488DFA579E092341D055C9C2696C19881B)

[11776070/11/ja](https://www.j-platpat.inpit.go.jp/c1800/PU/JP-H08-325485/7675D3B9D5C4F6D63FC202488DFA579E092341D055C9C2696C19881B) (accessed on September 15, 2022)

製品評価技術基盤機構 (NITE) GHS 分類結果. 2011. イソオイゲノール.

<https://www.nite.go.jp/chem/ghs/11-mhlw-0070.html> (accessed on April 14, 2023)

製品評価技術基盤機構 (NITE) GHS 分類結果. 2017. メチルメタクリレート.

<https://www.nite.go.jp/chem/english/ghs/17-mhlw-2034.html> (accessed on April 14,

2023)

製品評価技術基盤機構 (NITE) GHS 分類結果. 2019. p-フェニレンジアミン

<https://www.nite.go.jp/chem/english/ghs/19-mhlw-2006.html> (accessed on April 14, 2023)

製品評価技術基盤機構 (NITE) 統合版 GHS 分類結果一覧

[https://www.nite.go.jp/chem/ghs/ghs\\_nite\\_all\\_fy.html](https://www.nite.go.jp/chem/ghs/ghs_nite_all_fy.html) (accessed on April 14, 2023)

製品評価技術基盤機構 (NITE) 事故情報データベース.

[https://www.nite.go.jp/jiko/jiko-db/accident/search/?m=jiko&a=page\\_search&lang=ja](https://www.nite.go.jp/jiko/jiko-db/accident/search/?m=jiko&a=page_search&lang=ja) (accessed on September 15, 2022)

野田 勉, 山野 哲夫, 大嶋 智子, 清水 充. 2006. 抗菌剤 2,4,5,6-

tetrachloroisophthalonitrile のモルモットおよびマウスにおける皮膚感作性とその交差反応性. 生活衛生. 50(4): 197–205.

National Toxicology Program (NTP). 2010. Toxicology and carcinogenesis studies of isoeugenol (CAS No. 97-54-1) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). Natl Toxicol Program Tech Rep Ser. 551: 1–178.

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 2010. OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS No.429, Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay. OECD, Paris.

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 2018. OECD

GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS No. 442B, Skin Sensitization:

Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA or -FCM (Appendix IA). OECD, Paris.

Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme (PIC/S). 2018. Guideline on setting health based exposure limits for use in risk identification in the manufacture of different products in shared facilities (PIC/S, PI 046-1 Annex).

Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS). 2012. Opinion on p-phenylenediamine, 26-27 June 2012.

Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS). 2018. Opinion on skin sensitisation quantitative risk assessment for fragrance ingredients (QRA2), SCCS/1589/17. <https://data.europa.eu/doi/10.2875/989719> (accessed on September 15, 2022)

武吉 正博. 2005. 化学物質のアレルギー性検査の現状と新しい試験法. 機能材料. 25, 9: 55-64.

Takeyoshi M., Yamasaki K., Yakabe Y., Takatsuki M., Kimber I. 2001. Development of non-radio isotopic endpoint of murine local lymph node assay based on 5-bromo2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation. *Toxicol Lett.* 119(3): 203-208.

Takeyoshi M., Noda S., Yamasaki K. 2004. Differences in responsiveness of mouse strain against p-Benzoquinone as assessed by non-radioisotopic murine local lymph node assay. *Exp Anim.* 53(2): 171-173.

Takeyoshi M. and Nara S. 2021. Registration status of skin sensitisation data derived from the Local Lymph Node Assay (LLNA): BrdU-ELISA in REACH. Arch Toxicol. 95(5): 1857–1858.

U.S. Environmental Protection Agency (U.S.EPA). 2016. Notice of pesticide: Registration (BIOCHEK 8064) Reg. Number:39967-131.  
[https://www3.epa.gov/pesticides/chem\\_search/ppls/039967-00131-20160216.pdf](https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/ppls/039967-00131-20160216.pdf)  
(accessed on January 4, 2023)

United Nations (UN). 2022a. Peer review panel report for GHS sub-categorisation based LLNA BrdU-ELISA. Committee of Experts on the Transport of Dangerous Goods and on the Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals. (UN/SCEGHS/42/INF.4)

United Nations (UN). 2022b. Japanese response to the comments noted in the peer review report for sub-categorisation based LLNA BrdU-ELISA. Committee of Experts on the Transport of Dangerous Goods and on the Globally Harmonized System of classification and Labelling of Chemicals. (UN/SCEGHS/42/INF.5)

United Nations (UN). 2022c. Report of the Sub-Committee of Experts on the Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals on its forty-third session. Committee of Experts on the Transport of Dangerous Goods and on the

Globally Harmonized System of classification and Labelling of Chemicals.  
(ST/SG/AC.10/C.4/86)

United Nations (UN). 2023. Globally Harmonized System of Classification and Labelling  
of Chemicals (GHS), Tenth revised edition.

<https://unece.org/sites/default/files/2023-07/GHS%20Rev10e.pdf>

Walsh A, Altmann T, Canhoto A, Barle EL, Dolan DG et al. 2017. An MSSR-derived scale  
for assessing detectability of visual inspection. Pharmaceutical online.

<https://www.pharmaceuticalonline.com/doc/an-mssr-derived-scale-for-assessing-detectability-of-visual-inspection-0001>

World Health Organization (WHO). 2004. IPCS Risk assessment terminology. Part 1:

IPCS/OECD key generic terms used in chemical hazard/risk assessment. Part 2:

IPCS glossary of key exposure assessment terminology.

<https://inchem.org/documents/harmproj/harmproj/harmproj1.pdf> (accessed on  
March 31, 2022)

World Health Organization (WHO). 2021. 55th report of the WHO Expert Committee on  
Specifications for Pharmaceutical Preparations - Annex 2: Points to consider when  
including Health-Based Exposure Limits (HBELs) in cleaning validation. Annex 2,  
WHO Technical Report Series, No.1033.

Zshunke E. and Folesky H. 1975. Some effects of dicyclohexylcarbodiimide on human skin.

*Contact Dermatitis*. 1(3): 188.