

評価報告書

眼刺激性試験代替法 Vitrigel[®]-EIT 法

眼刺激性試験資料編纂委員会

令和 4 年(2022 年)4 月 8 日

眼刺激性試験資料編纂委員会

山本 直樹 (委員長：藤田医科大学/金沢医科大学)
佐々木 正治 (アレクシオンファーマ合同会社)
竹内 小苗 (P&G イノベーション合同会社)
波多野 浩太 (ホーユー株式会社)
原 範子 (藤田医科大学)
山下 晴洋 (大正製薬株式会社)

略語

CAS :	Chemical Abstracts Services
EIT :	Eye Irritancy Test
IATA :	Integrated Approaches to Testing and Assessment
GHS :	Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals
JaCVAM :	Japanese Center for the Validation of Alternative Methods
OECD :	Organization for Economic Co-operation and Development
RhCE :	Reconstructed human Cornea-like Epithelium
TEER :	Trans Epithelial Electrical Resistance
TG :	Test Guideline
UN :	United Nations

要旨

Vitrigel®-EIT (Eye Irritancy Test) 法は、コラーゲン Vitrigel® 膜上で培養したヒト角膜上皮組織シート型培養モデルの経上皮バリア機能を指標として、TEER (Trans Epithelial Electrical Resistance) を測定し、その物質の眼刺激性を評価する試験法である。経済協力開発機構 (OECD: Organization for Economic Co-operation and Development) の試験法ガイドライン (TG: Test Guideline) 494 としてボトムアップ方式で国際連合化学品の分類および表示に関する世界調和システム (UN GHS: United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) 区分に該当しない物質を検出する方法として採択されている。本報告書では、Vitrigel®-EIT 法のバリデーション研究報告書、第三者評価報告書、関連論文などをもとに試験法の概要を説明し、JaCVAM 眼刺激性試験資料編纂委員会の意見をまとめた。

Vitrigel®-EIT 法の信頼性・正確性を確認するため、36 物質を用いて 3 施設でバリデーション研究が行われた。この研究において Vitrigel®-EIT 法の施設内再現性はそれぞれの施設で 80%、90%、100%、また、施設間再現性は 92% であり、再現性はバリデーション実行委員会の定めた基準を満たした。一方、正確性は、感度 75~83%、特異度 42%、正確度 64~69% であった。この値は行政的利用を目指す試験法にとって十分なものではなく、開発者は予測性を改良するため、適用除外を「培養液に 2.5% になるよう混合した調製物において、pH が 5 以下となる酸性の物質および調製後 3 分以内の短時間に相分離を示す物質」と定めた。これにより、開発者が改良プロトコルを用いて実施した 158 物質のデータ (バリデーション結果を含む) から、適用除外を考慮した 107 物質のボトムアップ方式による感度は 96%、特異度は 67%、正確度は 81% となった。

以上より、本委員会は、Vitrigel®-EIT 法は適用除外を理解した上で使用すれば、ボトムアップ方式で UN GHS 区分に該当しない物質を検出する方法として用いることができると結論した。

1. まえおき

Vitrigel®-EIT 法は、竹澤らにより開発されたコラーゲン Vitrigel®膜¹⁾上で培養したヒト角膜上皮組織シート型培養モデルの経上皮バリア機能の経時変化を指標に用い、眼刺激性を評価する試験法である。本試験法は、ボトムアップ方式により UN GHS 区分に該当しない物質を検出することができる²⁻⁵⁾。

3次元角膜様モデルを用いた眼刺激性試験として、EpiOcular™ 眼刺激性試験、SkinEthic™ ヒト角膜上皮モデル眼刺激性試験および LabCyte CORNEA-MODEL24 眼刺激性試験が TG492 に収載されているが⁶⁾、いずれも細胞毒性を指標としている。本試験法は、これらと異なり経上皮バリア機能を反映する TEER 値の経時変化を指標として、簡便に短時間で眼刺激性を評価できる方法として国立研究開発法人農業生物資源研究所（現 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構）および関東化学株式会社の共同研究において開発され^{2,4,5)}、JaCVAM によるバリデーション研究³⁾ および第三者評価⁷⁾を経て2019年にTG494に収載された⁸⁾。その後、開発者よりTG494の適応範囲に関する改定の提案があり（Appendix 1）、JaCVAM および OECD における検討を経て、2021年にOECD TG494改定案が作成された⁹⁾。本試験法は、作用機構に基づいたものであり、OECD ガイダンス文書 263 に示す IATA (Integrated Approaches to Testing and Assessment) の構成要件として¹⁰⁾、有用であると考えられる。

本報告書では、Vitrigel®-EIT 法のバリデーション研究報告書、第三者評価報告書、関連論文などをもとに試験法の概要を説明し、JaCVAM 眼刺激性試験資料編纂委員会の意見をまとめたものである。

2. 試験法の位置づけ

Vitrigel®-EIT 法は、UN GHS 区分に該当しない物質（単一物質および混合物）を検出するために用いる試験法である。

3. 試験法の原理

Vitrigel®-EIT法 は、ヒト角膜上皮組織シート型培養モデルに被験物質を曝露した際の経上皮バリア機能の経時変化を指標として、被験物質の眼刺激性の有無を判定する試験法である。

経上皮バリア機能を反映する TEER 値の経時変化から、被験物質の UN GHS 区分における区分に該当しないと判定する。

4. 試験手順

Vitrigel®-EIT 法の手順を以下に示す。詳細は、TG 494⁹⁾ およびプロトコル¹¹⁾を参照する。使用する細胞は HCE-T 細胞（理研バイオリソース研究センター RCB2280）を購入して用いる。コラーゲン Vitirigel® 膜チャンバーおよび TEER 測定装置は関東化学株式会社より購入できる。

4-1. モデルの構築

コラーゲンVitrigel® 膜チャンバーを 12wellプレートにセットし、ウェル内に培養液を 1.5mL を加え、チャンバー内に 1.2×10^5 cells/mLに調製した細胞懸濁液を 0.5mLずつ分注しCO₂インキュベーター (37°C, 5%CO₂-Air)内に静置する。播種後 2日目に、チャンバー内の培養液を除き気相 - 液相界面培養を開始する。播種後 6日目のモデルのチャンバー内に培養液を 0.5mL入れ、温度を 28°C±2°Cに調節する。TEER 測定用電極をチャンバーにセットし TEER 値を測定する。TEER値がモデルの成立基準を満たしているかを確認する。

4-2. 被験物質の調製

培養液で 2.5%(w/v) になるように被験物質を溶解または懸濁し、調製物を作製する。

調製物を pH 試験紙(測定範囲に pH 1~11 が含まれるもの)または pH メーターにて測定し、pH が 5 以下となる酸性の物質は試験に適応できない。また、調製物の作製後 0 および 3 分に UV/VIS 分光光度計にて 660 nm の吸光度を測定し、絶対値で 0.1 を超える差がみられた物質は短時間に相分離を示す物質として試験に適応できない。被験物質が吸光度の測定を阻害する場合には、異なった波長を用いることもできる。

4-3. 被験物質の適用および測定

成立基準を満たすモデルに TEER 測定用電極を設置した後、被験物質 2.5%(w/v)水溶液または懸濁液をモデルに曝露する。被験物質の適用時のモデル温度は、28°C±2°Cとする。

1 種類の被験物質について 3 個のモデルを用いて試験を行い、TEER値を 10 秒毎に 3 分間記録し、それぞれのTEERの初期値に対する変化率の平均値から、3 つの指標 (Time lag、Intensity、Plateau level) を求める。これら指標の経時変化を自動解析し、眼刺激性の有無を判定する。

4-4. 判定

計算手順

3 つの指標は以下の式から算出される (図 1 参照)

Time lag (sec) : t_1

Intensity (%/sec) : $-(P_2 - P_1)/(t_2 - t_1)$

Plateau level (%) : $100 - P_2$

t_1 (sec) : TEER 値の変化速度が $0 \geq dP/dT > -0.03\%/sec$ の範囲内にある最大の曝露時間。

t_2 (sec) : t_1 後、TEER 値の変化速度が $dP/dT \leq -0.03\%/sec$ の条件を満たした後、 $0 \geq dP(P_3 - P_2)/dT(t_3 - t_2) > -0.03\%/sec$ の条件を満たした最初の曝露時間。

t_3 (sec) : $t_2 + 30$ sec

P_1, P_2, P_3 (%) : 曝露時間 t_1, t_2, t_3 の時 TEER 値の t_0 時の TEER 値に対する百分率。

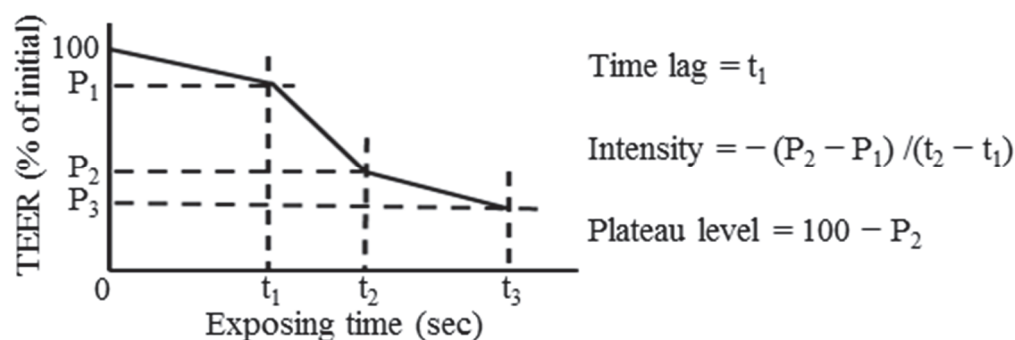


図 1. TEER 測定値の推移

上記の指標をもとにした予測モデルを表 1 に示す。

表 1. 予測モデル

基準	予測
Time lag ≤ 180 (sec) or Intensity ≥ 0.05 (%/sec) or Plateau level > 5.0 (%)	不可 (I) ⁽¹⁾
Time lag > 180 (sec) and Intensity < 0.05 (%/sec) and Plateau level ≤ 5.0 (%)	区分外 (NI) ⁽²⁾

注釈：

- (1) 不可の場合には、IATA⁹⁾ の既存データや情報をもとに、被験物質におけるすべの眼刺激性作用機構の妥当性を考慮する必要がある。
- (2) 区分外とは、UN GHS 区分に該当しない化学物質を指す。

4.5. 試験成立の承認基準

以下の条件をすべて満たした場合、試験の成立を承認する。

- 1) 初期の TEER 値が $140 \sim 220 \Omega \cdot \text{cm}^2$ の範囲にあるモデルである。
- 2) 陰性対照(生理食塩水：Saline)のPlateau level (PL) が 5 %以下である。
- 3) 陽性対照(塩化ベンザルコニウム：BAC)のPL が40%以上である。
- 4) 参照試料(エタノール：EtOH)のPL が10%以上である。
- 5) 被験物質の 3 つの指標の平均標準偏差が 15%以下である。

5. バリデーション研究

開発者とは異なる 3 施設(株式会社ダイセル:Daicel、株式会社ボゾリサーチセンター:BRC、一般財団法人食品薬品安全センター：FDSC) の協力を得て、Vitrigel®- EIT 法のバリデーション研究が行われた³⁾。これら 3 施設はバリデーション研究の前に開発者から技術実習を受けた後、技術移転性を確認した。試験はすべての被験物質について 3 施設でそれぞれ 3 回実施された。バリデーション結果は Appendix2 に示した。

5-1. 試験法の信頼性

5-1-1. 技術移転性

技術移転性については、プレバリデーション研究(phase 0)にて、3施設による5物質(BAC、2-Propanol、Glycerol、n-Hexanol、Silicon dioxide n-hydrate)および陽性対照物質(EtOH)を用いた試験が行われ、プロトコルの確認がなされた³⁾。その結果、EtOHの受け入れPL基準(20~30%)が厳しく、1施設で基準を満たせなかった。バリデーション実行委員会で議論した結果、この基準値を10~30%に広げ、この物質を自家製モデルの適正を評価する参照試料とし、陽性対照をBACとすることになった。

5-1-2. 施設内再現性

Phase I バリデーション研究において、10物質を用いて施設内再現性が評価され、UN GHS 区分判定の施設内再現性は80%、90%、100%とバリデーション実行委員会の基準(80%以上)を満たした。バリデーション実行委員会で議論した結果、EtOHの受け入れPL基準値を10~40%に広げ、適用温度を18℃~30℃から22℃~30℃に上げることが合意された。

5-1-3. 施設間再現性

Phase II バリデーション研究において、10物質を用いて施設間再現性が評価された。その結果、施設間再現性は80%以上であるバリデーション実行委員会の基準を満たした。ただし、UN GHS 区分1にあたるイミダゾール(No.2-1)を2施設が陰性と判断した。バリデーション実行委員会はこの結果を重く受け止め、Phase II の結果を不採用とし、プロトコルの改善を開発者に依頼した。その結果、開発者より、被験物質適用温度を28℃±2℃とする改訂が提案された。このプロトコルを用いて、3施設がイミダゾールで陽性結果を得たことを確認した上で36物質を用いてPhase III バリデーション研究を実施した。その結果、施設間再現性は92%であり、バリデーション実行委員会の定めた基準(80%以上)を満たした。施設内・施設間再現性を高めるためのプロトコルの変遷をAppendix 2の図1に示す。Phase II 終了後、バリデーション実行委員会で議論した結果、EtOHの受け入れPL基準値は≥10%となった。

5-2. 試験法の正確性

Phase III バリデーション研究の結果をもとに、3施設で行われたデータを用いて正確性が検証された。その結果、感度75~83%、特異度42%、正確度64~69%となった。この値は行政的利用を目指す試験法にとって十分なものではないとバリデーション実行委員会は考えた。

6. 追加検証

開発者は、Appendix 1に示した経緯を経て、OECD 専門家の意見をもとに158物質まで追加検討を行い(Appendix 3)、表2に示すように、感度88%(61/69物質)、特異度63%(56/89物質)および正確度74%(117/158物質)を得ている。なお、特異度は、phase III 結果と大きく異なるが、バリデーション研究で選択された適用物質は感度の検出を優先していることから、選ばれた陰性物質数の偏りにより、結果として特異度が低くなったと考える。

本追加検討において偽陰性を示した10物質のうち5物質が酸性であり、調製物のpHは5よりも低い値であった。また、調製液に不溶で短時間に相分離する物質も偽陰性となる可能性が示唆された。これらの点を考慮し、pHが5以下となる12物質および調製後3分以内の短

時間に相分離を示す 39 物質を適用除外とした結果、107 物質においてボトムアップ方式での正確性は感度 96% (51/53 物質)、特異度 67% (36/54 物質)、正確度 81% (87/107 物質)へと改善した(表 3)。液体の物質は、感度 100% (34/34 物質)、特異度 71% (22/31 物質)、正確度 86% (56/65 物質)、固体の物質は、感度 89% (17/19 物質)、特異度 61% (14/23 物質)、正確度 74% (31/42 物質)であった。

なお、2 つの偽陰性物質は Camphene と 1,4-Dibutoxybenzene である。いずれも US GHS 区分 2B に分類される。Drivers of classification¹²⁾ によると角膜に対する障害は認められず、結膜に対する障害のみ認められていることから、弱い刺激性であるため偽陰性になったものと開発者は考えた。

この適用除外は、バリデーション研究報告書および第三者評価報告書とは異なるが、改定 TG 検討の際に OECD にて合意されたものである。

表 2. 158 物質を用いた開発者によるボトムアップ方式での解析結果

		Vitrigel®-EIT 法		Total
		I	NI	
UN GHS	Cat.1, 2A, 2B	61	8	69
	No Category	33	56	89
Total		94	64	158

感度: 88% (61/69)

特異度: 63% (56/89)

正確度: 74% (117/158)

表 3. 適用除外 39 物質を除く 107 物質を用いた開発者によるボトムアップ方式での解析結果

		Vitrigel®-EIT 法		Total
		I	NI	
UN GHS	Cat.1, 2A, 2B	51	2	53
	No Category	18	36	54
Total		69	38	107

感度: 96% (51/53)

特異度: 67% (36/54)

正確度: 81% (87/107)

7. 試験法の適用範囲および留意点

TG 494 は、試験法の適正と正確性の確保を考慮して Vitrigel®-EIT 法の適用に以下の制限を設けている。

- 1) バリデーション研究および追加検証において混合物（単一物質の水溶液を除く）、気体（ガス）およびエアゾール様物質は被験物質として用いられていない。したがって、本試験法でこれら物質を評価する場合には、物性や規格要件を把握し、科学的に妥当な結果が得られるかどうかを前もって検討する必要がある。
- 2) UN GHS 区分 1、区分 2（2A・2B）物質の検出には用いることはできない。
- 3) 培養液で 2.5%(w/v)になるように溶解または懸濁した調製物において、pHが 5 以下となる物質および調製後 3 分以内に相分離を示す物質は適用できない。

還元作用や着色のある被験物質ではMTT (3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 等を用いた細胞毒性評価に支障をきたすが、本試験法の指標であるTEERではそのような被験物質でも評価できる特徴をもつ。

8. 本委員会の結論

Vitrigel®-EIT 法のバリデーション研究の結果、本試験法はバリデーション実行委員会の定めた再現性の基準を満たしていた。また、追加検証の結果、適用除外を理解した上で使用すれば、正確性も十分であると確認された。よって、Vitrigel®-EIT 法はボトムアップ方式で UN GHS 区分に該当しない物質を検出する方法として用いることができると本委員会は考える。

謝辞

当該試験法の眼刺激性試験評価報告書を作成するにあたり、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構（農研機構）の竹澤俊明氏、関東化学株式会社の山口宏之氏、国立医薬品食品衛生研究所の小島肇氏による情報提供等のご協力に深く感謝申し上げます。

9. 参考文献

- 1) Takezawa, T., Ozaki, K., Nitani, A., Takabayashi, C., Shimo-Oka, T., Collagen vitrigel: A novel scaffold that can facilitate a three-dimensional culture for reconstructing organoids. *Cell Transplant*, 13 (2004):463–473.
- 2) Takezawa, T., Nishikawa, K., and Wang, P. C., Development of a human corneal epithelium model utilizing a collagen vitrigel membrane and the changes of its barrier function induced by exposing eye irritant chemicals, *Toxicology In Vitro* 25 (2011): 1237–1241.
- 3) VITRIGEL-EIT Validation Management Team (2017) Validation Study of the Vitrigel-EIT method as an alternative to in vivo eye irritation testing Study Report, Version 2.0
- 4) Yamaguchi, H., Kojima, H., and Takezawa, T., Vitrigel-eye irritancy test method using HCE-T cells, *Toxicological Sciences* 135 (2013): 347–355.
- 5) Yamaguchi, H., Kojima, H., and Takezawa, T., Predictive performance of the Vitrigel-eye irritancy test method using 118 chemicals, *Journal of Applied Toxicology* 36 (2016): 1025–1037.
- 6) OECD (2018) Test Guideline 492. Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage.
- 7) Vitrigel-Eye Irritation Test (EIT) method Report of the Peer Review Panel (2017)
- 8) OECD (2019) Test Guideline 494, Vitrigel-Eye Irritancy Test Method for Identifying Chemicals not requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage
- 9) OECD (2021) Test Guideline 494, Vitrigel-Eye Irritancy Test Method for Identifying Chemicals not requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage
- 10) OECD (2019) Guidance Document on an Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA) for Serious Eye Damage and Eye Irritation Series on Testing & Assessment No. 263 (Second Edition)
- 11) Standard Protocol for the Vitrigel-EIT method, Version 1.80e. (2015)
- 12) Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., and McNamee, P., Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD), *Archives of toxicology* 91 (2017): 521–547.

Appendix 1 Vitrigel®-EIT 法 TG494 の改定にいたる経緯

Vitrigel®-EIT 法は、ボトムアップ方式にて UN GHS 区分に該当しない物質の検出をする眼刺激性試験代替法としてバリデーション研究が行われた。3 施設で行われた 36 物質を用いたバリデーション研究の結果、予測性は、感度 75～83%、特異度 42%、正確度 64～69%となった。さらに、開発者のデータを追加した計 93 物質の結果では、感度 83%、特異度 70%、正確度 78%となった。この結果をもとに、以下に示す適用除外条件が提案され、この適用除外条件に当てはまる 17 物質を除いた 76 物質を評価したところ、感度 93%、特異度 69%、正確度 83%となった。

<適用除外条件>

1. 培養液で 2.5%(w/v)になるように溶解または懸濁した調製物において、pH が 5 以下となる物質
2. logP 値 2.5 以上、および、密度 0.95 g/cm³ 以下または 1.10 g/cm³ 以上の固体

上述の適用除外条件を取り入れた Vitrigel®-EIT 法は、第三者評価を経て OECD の TG として提案された。しかしながら、条件 2 については、当てはまる固体が少なく評価できないという判断で OECD 専門家会議により却下された。結果として、固体物質がすべて適用除外になった。その場合の予測性は、この適用除外条件に当てはまる 42 物質を除いた 51 物質を評価したところ、感度 96%、特異度 74%、正確度 84%となった。以下に示す適用除外条件下で、2019 年 6 月 18 日に Vitrigel®-EIT 法は TG494 として OECD で採択された。

<適用除外条件>

1. 培養液で 2.5%(w/v)になるように溶解または懸濁した調製物において、pH が 5 以下となる物質
2. 固体物質

TG は採択されたものの、適用可能物質が約 55%(51/93)という少ない状態を改善するため、開発者らは直ちに追加実験の立案に入った。解決すべき問題点は、固体物質を適用するための条件設定であった。

固体物質を適用するための条件設定に関しては、JaCVAM 眼刺激性試験資料編纂委員会の意見も参考に日本薬局方の濁度測定法を用い、被験物質の濃度が 20%変化する指標として、調製直後と 3 分後の吸光度の差が 0.1 を超える場合に培養液中での相分離が起きている、すなわち懸濁液の分散安定性が低いと判断した。

<適用除外条件>

1. 培養液で 2.5% (w/v)になるように溶解または懸濁した調製物において、pH が 5 以下となる物質
2. 調製後 3 分以内に相分離を示す物質

あらたな適用除外条件を用いて、158 物質(液体 94、固体 64)の追加検討を行った、そのうち、51 物質(22 の固体のうち、pH5 以下 7 物質、相分離 15 物質 ; 29 の液体のうち、pH5 以下 5 物質、相分離 24 物質)が適用除外となった。残りの 107 物質の適用除外を含む 158 物質の結果と比較すると、感度が 88%から 96%、特異度は 63%から 67%、正確度が 74%から 81%と改善さ

れた。予測性値は以前の TG と大きな変化はないが、適用可能物質が拡大し、適用範囲が科学的に適正となった、この改定案に国際的な合意が得られ、2021 年 6 月 14 日の改定版に反映された(報告書の表 2 および表 3 参照)、107 物質における固体・液体毎の予測性は、TG494 の Table 1 に記載されている。表 3 および Table 1 に示す偽陰性物質はいずれも固体の UN GHS 区分で 2B であった。

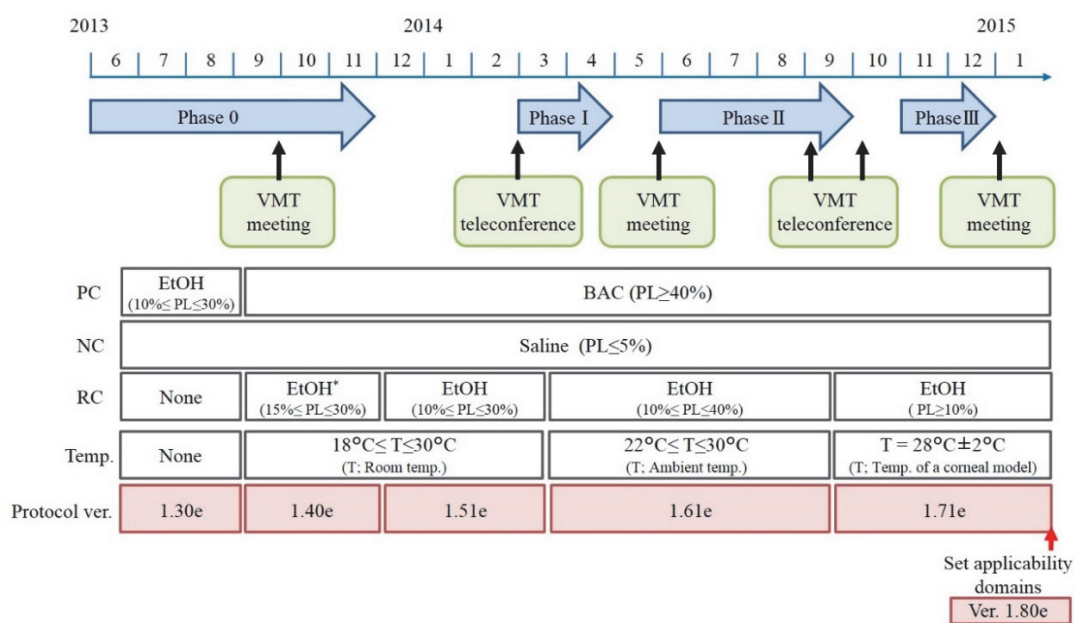
なお、以前の TG では許容されていた液体で相分離を示す 24 物質に関しては、偽陰性が 2 物質(UN GHS 区分 1、区分 2B)含まれており、改定により改善が認められた、ちなみに、固体において相分離を示した 15 物質に関しては、偽陰性が 2 物質(いずれも UN GHS 区分 1)認められた。

Appendix 2 表 1. Phase I バリ デーション 結果

No.	Test chemical	CASRN	UN GHS	FDSC				BRC				Daicel			
				Time lag	Intensity	Plateau level	Result	Time lag	Intensity	Plateau level	Result	Time lag	Intensity	Plateau level	Result
	Negative control			190 (NI)	0.00 (NI)	0 (NI)	NI	190 (NI)	-0.03 (NI)	0 (NI)	NI	190 (NI)	-0.04 (NI)	0 (NI)	NI
	Positive control			0 (I)	0.33 (I)	59 (I)	I	0 (I)	0.23 (I)	42 (I)	I	0 (I)	0.42 (I)	75 (I)	I
	Reference control			20 (I)	-	3 (NI)	NG	0 (I)	0.12 (I)	21 (I)	I	0 (I)	0.17 (I)	30 (I)	I
1-1	Imidazole	288-32-4	Cat. 1	190 (NI)	-0.03 (NI)	0 (NI)	NI	160 (I)	0.13 (I)	4 (NI)	I	140 (I)	0.11 (I)	7 (I)	I
1-2	Cyclohexanol	108-93-0		30 (I)	0.16 (I)	25 (I)	I	0 (I)	0.40 (I)	48 (I)	I	0 (I)	0.34 (I)	51 (I)	I
1-3	3,3-Dithiodipropionic acid	1119-62-6	Cat.2A or 2B	190 (NI)	-0.06 (NI)	0 (NI)	NI	190 (NI)	-0.07 (NI)	0 (NI)	NI	190 (NI)	-0.05 (NI)	0 (NI)	NI
1-4	Acetone	67-64-1		10 (I)	0.04 (NI)	10 (I)	I	0 (I)	0.12 (I)	21 (I)	I	0 (I)	0.17 (I)	30 (I)	I
1-5	3-Chloropropionitrile	542-76-7		90 (I)	0.19 (I)	20 (I)	I	10 (I)	0.20 (I)	36 (I)	I	10 (I)	0.21 (I)	39 (I)	I
1-6	Ammonium nitrate	6484-52-2	No Cat.	0 (I)	0.69 (I)	21 (I)	I	0 (I)	0.67 (I)	27 (I)	I	0 (I)	1.05 (I)	52 (I)	I
1-7	n,n-Dimethylguanidine sulfate	598-65-2		190 (NI)	-0.05 (NI)	2 (NI)	NI	0 (I)	0.53 (I)	21 (I)	I	0 (I)	0.54 (I)	27 (I)	I
1-8	Toluene	108-88-3		190 (NI)	-0.01 (NI)	0 (NI)	NI	150 (I)	0.02 (NI)	1 (NI)	I	190 (NI)	0.00 (NI)	0 (NI)	NI
1-9	3-Methoxy-1,2-propanediol	623-39-2		190 (NI)	-0.05 (NI)	0 (NI)	NI	190 (NI)	-0.12 (NI)	0 (NI)	NI	190 (NI)	-0.11 (NI)	0 (NI)	NI
1-10	Gluconolactone	90-80-2		190 (NI)	-0.04 (NI)	0 (NI)	NI	0 (I)	0.28 (I)	8 (I)	I	10 (I)	0.18 (I)	10 (I)	I

Appendix 2 表 2. Phase II バリデーション結果

No.	Test chemical	CASRN	UN GHS	FDSC	BRC	Daicel
2-1	Imidazole	288-32-4	Cat. 1	NI	I	NI
2-2	Cyclohexanol	108-93-0		I	I	I
2-3	Sodium dodecyl sulfate	151-21-3		I	I	I
2-4	Sodium salicylate	54-21-7		I	I	I
2-5	Cyclopentanol	96-41-3	Cat. 2A & 2B	I	I	I
2-6	2-Methyl-1-pentanol	105-30-6		I	I	I
2-7	α -Hexylcinnamaldehyde	101-86-0		NI	NI	NI
2-8	n,n-Dimethylguanidine sulfate	598-65-2	No Category	I	I	I
2-9	Toluene	108-88-3		I	NI	NI
2-10	Gluconolactone	90-80-2		I	I	I



Appendix 2 図 1. プロトコルの変遷

Appendix 2 表 3. Phase III バリデーション結果

No.	Test chemical	CASRN	Physical state	UN GHS	FDSC	BRC	Daicel
3-1	2,5-Dimethyl-2,5-hexanediol	110-03-2	Solid	Cat. 1	I	I	I
3-2	2-Benzyl-4-chlorophenol	120-32-1	Solid		I	I	I
3-3	2,2-Dimethyl butanoic acid	595-379	Liquid		I	I	I
3-4	Captan	133-06-2	Solid		NI	NI	NI
3-5	Tetra-n-Octylammonium bromide	14866-33-2	Solid		I	I	NI
3-6	Butanol	71-36-3	Liquid		I	I	I
3-7	3-(2-Aminoethylaminopropyl) trimethoxysilane	1760-24-3	Liquid		I	I	I
3-8	Sodium dodecyl sulfate	151-21-3	Solid		I	I	I
3-9	<i>m</i> -Phenylenediamine	108-45-2	Solid		I	I	I
3-10	Tetraethylene glycol	17831-71-9	Liquid		I	I	I
3-11	Imidazole	288-32-4	Solid		I	I	I
3-12	Sodium salicylate	54-21-7	Solid		I	I	I
3-13	gamma-Butyrolactone	96-48-0	Liquid	Cat. 2A or 2B	I	I	I
3-14	Methyl acetate	79-20-9	Liquid		I	I	I
3-15	Myristyl alcohol	112-72-1	Solid		NI	NI	NI
3-16	2,6-Dichlorobenzoyl chloride	4659-45-4	Liquid*		NI	I	NI
3-17	Dibenzyl phosphate	1623-08-1	Solid		I	I	I
3-18	1-(2-Propoxy-1-methylethoxy)-2-propanol	29911-27-1	Liquid		I	I	I
3-19	Camphene	79-92-5	Solid		I	NI	NI
3-20	Ethyl-2-methylacetoacetate	609-14-3	Liquid		I	I	I
3-21	Propylene glycol propyl ether	1569-01-3	Liquid		I	I	I
3-22	2-Methyl-1-pentanol	105-30-6	Liquid		I	I	I
3-23	α -Hexylcinnamaldehyde	101-86-0	Liquid		NI	NI	NI
3-24	Cyclopentanol	96-41-3	Liquid		I	I	I
3-25	Methyl amyl ketone	110-43-0	Liquid	No Cat.	I	I	I
3-26	2-(n-Dodecylthio)ethanol	1462-55-1	Liquid		NI	NI	NI
3-27	iso-Octylthioglycolate	25103-09-7	Liquid		NI	NI	NI
3-28	2,4-Difluoronitrobenzene	446-35-5	Liquid		I	I	I
3-29	tetra-Aminopyrimidine sulfate	5392-28-9	Solid		NI	NI	NI
3-30	2,4-Pentanediol	625-69-4	Liquid		I	I	I
3-31	iso-Octyl acrylate	29590-42-9	Liquid		NI	NI	NI
3-32	Silicon dioxide n-hydrate	7699-41-4	Solid		NI	NI	NI
3-33	Potassium tetrafluoroborate	14075-53-7	Solid		I	I	I

3-34	<i>n,n</i> -Dimethylguanidine sulfate	598-65-2	Solid		I	I	I
3-35	Toluene	108-88-3	Liquid		I	I	I
3-36	Gluconolactone	90-80-2	Solid		I	I	I

*: pH of 2.5% solution ≤ 5.0

Appendix 2 表 4-1. Phase III FDSC および BRC の正確性

		Vitrigel®-EIT 法		Total
		I	NI	
UN GHS	Cat.1, 2A, 2B	20	4	24
	No Category	7	5	12
Total		27	9	36

感度: 83.3% (20/24)

特異度: 41.7% (5/12)

正確度: 69.4% (25/36)

Appendix 2 表 4-2. Phase III Daicel の正確性

		Vitrigel®-EIT 法		Total
		I	NI	
UN GHS	Cat.1, 2A, 2B	18	6	24
	No Category	7	5	12
Total		25	11	36

感度: 75.0% (18/24)

特異度: 41.7% (5/12)

正確度: 63.9% (23/36)

Appendix 3 開発者による追加検討（158 物質）

Drivers of classification ^{2,3}																			
No.	Chemical	Organic functional groups ¹⁾	CAS No.	Form	GHS	Judgment by VigiEIT	Severity				Persistence		Specific Observations		Excluded by pre-test 2(Briefly phase-separating chemicals)				
							Cut-off values		CO mean	Conj mean	IR mean	Number of animals	Cut-off time	Number of animals		CO=4 of animals			
																Absolute differences between the absorbance values of test chemical preparation at 0 and 3 minutes. ΔA _{abs} 0-			
1	n-Octylamine	Aliphatic amine, primary;Amine, primary	111-86-4	Liquid	1	I	I	n/a		Unknown		= 4	4/4	2.55	0.36	2.19	12	✓	
2	Basasol Orange 52L	(n/a)	n/a	Liquid	1	I	I							3.03	2.63	0.40	4	✓	
3	Cyclohexyl isocyanate	Cycloalkane;Isocyanate	3173-53-3	Liquid	1	NI	≥ 3		2/2	21		2/2	2/2	2.16	1.97	0.19	7	✓	
4	Domiphen bromide (10%)	Aryl;Ether moiety;Quaternary ammonium salts;Surfactants - Cationic	538-71-6	Liquid	1	I	≥ 3		2/3	21		at least 2/3	= 4	3/3	0.57	0.54	0.03	7	
5	Tetraethylene glycol	Acrylate;Alkene moiety ;Carboxylic acid ester;Ether moiety	17831-71-9	Liquid	1	I		> 1.5	6/6	21		at least 5/6	= 4	5/6	0.05	0.04	0.01	7	
6	8-Chloro-1-octanol	Alcohol;Alkyl halide	23144-52-7	Liquid	1	I	≥ 1	≥ 2	3/3; 3/3	21		3/3	3.07	3.06	0.01	7			
7	Benzethonium chloride (10%)	Alkane, branched with quaternary carbon;Alkyl (heteroarenes;Alkyl-, alkenyl- and alkynyl (heteroarenes;Aryl;Benzyl;Ether moiety;Quaternary ammonium salts;Surfactants - Cationic;tert-Butyl	121-54-0	Liquid	1	I	≥ 3		2/3	21		at least 2/3	= 4	2/3	0.32	0.32	0.00	9	
8	Cyclohexanol	Alcohol;Cycloalkane	108-93-0	Liquid	1	I	≥ 3		3/4	21		1/4	0.08	0.08	0.00	7			
9	Cetylpyridinium bromide (10%)	Aryl;Pyridine;Pyridinium ion;Surfactants - Cationic	140-72-7	Liquid	1	I	≥ 3	> 1.5	6/6; 4/6	21	21	at least 4/6 (max 5); at least 3/6 (max 4); 3/6	0.16	0.15	0.00	7			
10	Pyridine	Aryl;Pyridine;Pyridinium ion	110-86-1	Liquid	1	I	≥ 3		2/3	21		at least 1/3	= 4	1/3	0.00	0.00	0.00	7	
11	Lactic acid	Alcohol;Carboxylic acid	50-21-5	Liquid	1	I	≥ 3		3/3	21		2/3	= 4	3/3	-0.01	-0.01	0.00	3	✓
12	Diethylethanamine	Alcohol;Aliphatic amine, tertiary;Amine, tertiary	100-37-8	Liquid	1	I	≥ 3		4/6	21	21	5/6; 5/6	= 4	5/6	-0.01	-0.01	0.00	10	
13	Butyl cellosolve	Alcohol;Ether moiety	111-76-2	Liquid	1	I	≥ 1	≥ 2	6/6; 6/6; 5/6	21		1/6	0.01	0.01	0.00	8			
14	Trilon X-100	Alcohol;Alkane, branched with quaternary carbon;Alkyl (heteroarenes;Alkyl-, alkenyl- and alkynyl (heteroarenes;Aryl;Ether moiety;tert-Butyl	9002-93-1	Liquid	1	I		> 1.5	5/6	Unknown			-0.03	-0.03	0.00	7			
15	Triethanolamine polyoxyethylene (3) lauryl ether sulfate, 40%	Alcohol;Aliphatic amine, tertiary;Amine, tertiary;Ether moiety	27028-82-6	Liquid	1	I							-0.06	-0.06	0.00	7			
16	Sodium polyethylene (3) lauryl ether sulfate, 25.5%	Alkene moiety ;Sulfate	9004-82-4	Liquid	1	I	> 0		3/3; 2/3	21	21	3/3; 3/3	-0.06	-0.06	0.00	7			
17	Polyoxyethylene (10) polyoxypropylene (1.5) lauryl—mystyl ether	Alcohol;Ether moiety	68439-51-0	Liquid	1	I							-0.06	-0.06	0.00	6			
18	3-(2-Aminoethylamino)propyltrimethoxysilane	Aliphatic amine, primary;Aliphatic amine, secondary;Alkoxysilane;Amine, primary;Amine, secondary;Silane	1760-24-3	Liquid	1	I	≥ 1	≥ 2	≥ 1	3/3; 3/3; 2/3	21	3/3; 2/3	0.01	0.01	0.00	10			
19	Cetylpyridinium chloride (10%)	Aryl;Pyridine;Pyridinium ion;Surfactants - Cationic	6004-24-6	Liquid	1	I	≥ 1	≥ 2	≥ 1	3/3; 3/3	21	at least 2/3	= 4	3/3	0.06	0.06	0.00	7	
20	Stearyltrimethylammonium chloride (10%)	Quaternary ammonium salts;Surfactants - Cationic	112-03-8	Liquid	1	I	≥ 1	≥ 2	≥ 1	3/3; 3/3; 2/3	21	3/3	= 4	3/3	0.30	0.32	0.02	7	
21	Benzyl alcohol	Alcohol;Aryl;Benzyl	100-51-6	Liquid	2	I	≥ 1		2/3	21		at least 1/3	= 4	2/3	-0.02	-0.03	0.01	7	
22	2-Ethoxyethyl acetate	Acetoxy;Carboxylic acid ester;Ether moiety	111-15-9	Liquid	2	I	> 0		1/4				-0.03	-0.03	0.00	7			
23	2,6-Dichlorobenzoyl chloride	Acyl halide;Aryl;Aryl halide	4659-45-4	Liquid	2A	I	≥ 1	≥ 2	6/6; 6/6	7	7	6/6; 2/6	0.86	0.14	0.73	3	✓		
24	n-Hexanol	Alcohol	111-27-3	Liquid	2A	I	≥ 1	≥ 2	4/4; 4/4	7	7	4/4	1.93	1.63	0.30	7	✓		
25	1-Octanol	Alcohol	111-87-5	Liquid	2A	I	≥ 1	≥ 2	≥ 1	2/3; 2/3; 2/3			2.32	2.20	0.12	7	✓		
26	2-Ethyl-1-hexanol	Alcohol;Alkane, branched with tertiary carbon	104-76-7	Liquid	2A	I	≥ 1	≥ 2	4/4; 3/4	7	7	3/4; 1/4	2.24	2.17	0.07	7			
27	Methyl ethyl ketone	Ketone	78-93-3	Liquid	2A	I	≥ 1	≥ 2	3/4; 3/4	7	7	3/4	-0.03	-0.04	0.00	7			
28	Ethanol	Alcohol	64-17-5	Liquid	2A	I	≥ 2	≥ 1	6/6; 5/6; 5/6	21		1/6	-0.03	-0.03	0.00	7			
29	Acetone	Ketone	67-64-1	Liquid	2A	I	≥ 1	≥ 2	4/4; 4/4; 4/4	7	7	4/4; 1/4; 1/4	-0.04	-0.04	0.00	7			

30 Isopropyl alcohol	Alcohol;Alkane, branched with secondary carbon;Isopropyl	Liquid	2A	I		≥ 2	3/4	7	4/4	-0.03	-0.03	0.00	7		
31 Butyrolactone	Lactone;Oxolane	Liquid	2A	I	≥ 1	≥ 2	3/3; 3/3	7	7	2/3; 1/3	-0.02	-0.03	0.00	7	
32 Cyclopentanol	Alcohol;Cycloalkane	Liquid	2A	I	≥ 1	≥ 2	3/3; 3/3	7	7	1/3; 1/3	0.12	0.12	0.00	7	
33 Butanol	Alcohol	Liquid	2A	I	≥ 1	≥ 2	≥ 1 at least 2/3	3/3; 3/3; 3/3	Unknown	= 4	1/3	-0.02	-0.02	0.00	8
34 Isobutyl alcohol	Alcohol;Alkane, branched with tertiary carbon;Isopropyl	Liquid	2A	I	≥ 1	≥ 2	4/4; 4/4	7	7	4/4; 1/4	-0.05	-0.05	0.00	7	
35 Methyl acetate	Acetoxy;Carboxylic acid ester	Liquid	2A	I	≥ 1	≥ 2	3/4; 3/4	7	7	4/4; 1/4	-0.06	-0.06	0.00	7	
36 2-Methyl-1-pentanol	Alcohol;Alkane, branched with tertiary carbon	Liquid	2B	I	≥ 1	≥ 1	2/3			1.32	0.66	0.66	7	✓	
37 Pseudonone	Alkene moiety ,Allyl;Conjugated system;Ketone;Terpenes	Liquid	2B	NI		≥ 2	2/3			2.90	2.78	0.12	7	✓	
38 Isobutanol	Aldehyde;Alkane, branched with tertiary carbon;Isopropyl	Liquid	2B	I	≥ 1	≥ 2	2/3; 2/3			0.06	0.00	0.06	6		
39 n-Butanol	Aldehyde	Liquid	2B	I	≥ 1	≥ 2	2/3; 2/3			0.02	0.00	0.03	7		
40 Propasol solvent P	Alcohol;Alkane, branched with secondary carbon;Ether moiety	Liquid	2B	I	≥ 1	≥ 1	5/6	7	7	1/6; 1/6	-0.03	-0.03	0.01	8	
41 Di(propylene glycol) propyl ether	Alcohol;Alkane, branched with secondary carbon;Ether moiety	Liquid	2B	I	≥ 1	≥ 2	3/3; 3/3			0.00	0.00	0.00	7		
42 3-Chloropropionitrile	Alkyl halide;Nitrile	Liquid	2B	I	≥ 1	≥ 1	2/3			-0.04	-0.05	0.00	5	✓	
43 Ethyl-2-methylacetate	Carboxylic acid ester;Ketone	Liquid	2B	I	≥ 1	≥ 1	3/3			-0.04	-0.04	0.00	7		
44 Monoethanolamine (10%)	Alcohol;Aliphatic amine, primary;Amine, primary	Liquid	2B	I	≥ 1	≥ 1	2/3			-0.04	-0.04	0.00	9		
45 Glycolic acid (10%)	Alcohol;Carboxylic acid	Liquid	2B	NI		≥ 2	2/3			-0.02	-0.02	0.00	4	✓	
46 1,2,3-Trichloropropane	Alkane, branched with secondary carbon;Alkyl halide	Liquid	NC	I	> 0					1.39	0.11	1.28	7	✓	
47 Xylene	Alkyl (hetero)arenes;Alkyl-, alkenyl- and alkynyl (hetero)arenes;Aryl	Liquid	NC	I	= 0		Conj 1/4			1.69	0.54	1.16	7	✓	
48 Ethyl trimethyl acetate	Carboxylic acid ester;tert-Butyl	Liquid	NC	I	> 0		CO 1/6			1.49	0.85	0.64	7	✓	
49 Styrene	Alkene moiety ,Alkenyl (hetero)arenes;Alkyl-, alkenyl- and alkynyl (hetero)arenes;Aryl	Liquid	NC	NI	> 0					1.97	1.33	0.63	7	✓	
50 2,4-Difluoronitrobenzene	Aryl;Aryl halide;Nitrobenzene	Liquid	NC	I	= 0					1.50	0.89	0.61	7	✓	
51 Diisobutyl ketone	Alkane, branched with tertiary carbon;Isopropyl;Ketone	Liquid	NC	NI	= 0					1.51	1.00	0.51	7	✓	
52 Isopropyl myristate	Alkane, branched with secondary carbon;Carboxylic acid ester;Isopropyl	Liquid	NC	NI	= 0					1.82	1.43	0.39	7	✓	
53 n-Octyl bromide	Alkyl halide	Liquid	NC	NI	= 0					0.40	0.05	0.35	8	✓	
54 3, 3-Dimethylpentane	Alkane, branched with quaternary carbon;Alkanes;Hydrocarbons	Liquid	NC	NI	= 0					0.82	0.49	0.33	7	✓	
55 Methyl amyl ketone	Ketone	Liquid	NC	I	> 0		Conj 1/4			1.82	1.52	0.29	7	✓	
56 2-Methylpentane	Alkane, branched with tertiary carbon;Alkanes;Hydrocarbons;Isopropyl	Liquid	NC	NI	= 0					0.55	0.31	0.24	7	✓	
57 1,5-Hexadiene	Alkene moiety ,Alkenes;Allyl;Hydrocarbons	Liquid	NC	NI	= 0					0.28	0.10	0.18	7	✓	
58 Methyl isobutyl ketone	Alkane, branched with tertiary carbon;Isopropyl;Ketone	Liquid	NC	I	> 0					1.24	1.06	0.18	7	✓	
59 1,2,4-Trimethylbenzene	Alkyl (hetero)arenes;Alkyl-, alkenyl- and alkynyl (hetero)arenes;Aryl	Liquid	NC	NI	= 0					1.88	1.71	0.17	7	✓	
60 Dodecane	Alkanes;Hydrocarbons	Liquid	NC	NI	= 0					0.75	0.59	0.16	7	✓	
61 Isopropyl bromide	Alkane, branched with secondary carbon;Alkyl halide;Isopropyl	Liquid	NC	I	= 0					0.19	0.04	0.15	8	✓	
62 Methyl cyclopentane	Alkanes;Cycloalkane;Hydrocarbons	Liquid	NC	NI	= 0					1.69	1.54	0.14	7	✓	
63 Hexane	Alkanes;Hydrocarbons	Liquid	NC	NI	= 0					0.55	0.45	0.11	7	✓	
64 iso-Propyl myristate	Alkane, branched with secondary carbon;Carboxylic acid ester;Isopropyl	Liquid	NC	NI	= 0					1.07	0.99	0.09	7		
65 Petroleum ether	Alkanes;Hydrocarbons	Liquid	NC	NI	= 0					0.08	0.00	0.08	7		
66 iso-Octylthioglycolate	Alkane, branched with tertiary carbon;Carboxylic acid ester;Isopropyl;Thiol	Liquid	NC	NI	= 0					2.15	2.08	0.07	7		
67 1,4-Dibromobutane	Alkyl halide	Liquid	NC	NI	= 0					3.09	3.02	0.06	7		
68 1,6-Dibromohexane	Alkyl halide	Liquid	NC	NI	= 0					3.03	2.99	0.04	7		
69 2,2-Dimethyl-3-pentanol	Alcohol;Alkane, branched with quaternary carbon;Alkane, branched with secondary carbon;tert-Butyl	Liquid	NC	I	> 0		CO 1/3			2.24	2.20	0.04	7		

70 1,5-Dibromopentane	Alkyl halide	111-24-0	Liquid	NC	NI	= 0		2.50	2.46	0.04	7
71 1,9-Decadiene	Alkene moiety ;Alkenes;Alkyl;Hydrocarbons	1647-16-1	Liquid	NC	NI	= 0		0.76	0.74	0.03	7
72 Cyclohexanone	Cycloketone;Ketone	108-94-1	Liquid	NC	I	> 0	CO 1/3	0.39	0.37	0.02	7
73 sec-Butylbenzene	Alkane, branched with tertiary carbon;Alkyl (heteroarenes;Alkyl-, alkenyl- and alkynyl (heteroarenes;Aryl	135-98-8	Liquid	NC	NI	= 0		3.52	3.51	0.01	7
74 2-Ethylhexyl <i>p</i> -dimethyl-amino benzoate	Alkane, branched with tertiary carbon;Amine, tertiary;Aromatic amine;Aryl;Carboxylic acid ester	21245-02-3	Liquid	NC	NI	= 0		2.69	2.68	0.01	7
75 Polyoxyethylene hydrogenated castorol (60E.O.)	Acylal; Alcohol; Alkyl; Ether	61788-85-0	Liquid	NC	NI	= 0		2.63	2.62	0.01	7
76 1,3-Di-isopropylbenzene	Alkane, branched with tertiary carbon;Alkyl (heteroarenes;Alkyl-, alkenyl- and alkynyl (heteroarenes;Aryl;Isopropyl	99-62-7	Liquid	NC	NI	= 0		3.06	3.05	0.01	7
77 Polyoxyethylene 23 lauryl ether (10%)	Alcohol;Ether moiety	9002-92-0	Liquid	NC	NI	= 0		-0.04	-0.05	0.01	7
78 Piperonyl butoxide	Alkyl (heteroarenes;Alkyl-, alkenyl- and alkynyl (heteroarenes;Aryl;Benzodioxole;Benzyl;Ether moiety	51-03-6	Liquid	NC	NI	= 0	Conj 2/6	3.24	3.23	0.01	7
79 Polyethylene glycol 400	Alcohol;Dihydroxyl derivatives;Ether moiety	25322-68-3	Liquid	NC	I	= 0		0.03	0.03	0.00	7
80 2,4-Pentanedione	Diketone;Ketone	123-54-6	Liquid	NC	I	> 0		0.04	0.04	0.00	6
81 Ploxyethylene (160) sorbitan trisostearate	Alcohol;Ether moiety	54392-28-8	Liquid	NC	NI			-0.07	-0.07	0.00	7
82 Tween20	Acetal;Alcohol;Alkane, branched with secondary carbon;Alkene moiety ;Allyl;Carboxylic acid ester;Ether moiety;Oxolane;Saturated heterocyclic fragment	9005-64-5	Liquid	NC	NI	= 0		-0.01	-0.01	0.00	7
83 2,4-Pentandiol	Alcohol;Alkane, branched with secondary carbon;Dihydroxyl derivatives	625-69-4	Liquid	NC	I	= 0		-0.05	-0.05	0.00	8
84 Propylene glycol	Alcohol;Alkane, branched with secondary carbon;Dihydroxyl derivatives	57-55-6	Liquid	NC	NI	= 0		-0.02	-0.02	0.00	7
85 4-Bromophenethole	Alkoxy moiety;Aryl;Aryl halide;Ether moiety	588-96-5	Liquid	NC	NI	= 0		3.58	3.58	0.00	7
86 Butyl acetate	Acetoxy;Carboxylic acid ester	123-86-4	Liquid	NC	I	> 0		-0.01	-0.01	0.00	7
87 Glycerol	Alcohol;Alkane, branched with secondary carbon;Glycerol and derivatives	56-81-5	Liquid	NC	I	= 0		-0.04	-0.04	0.00	7
88 3-Methoxy-1,2-propanediol	Alcohol;Alkane, branched with secondary carbon;Dihydroxyl derivatives;Ether moiety;Glycerol and derivatives	623-39-2	Liquid	NC	NI	= 0		-0.03	-0.03	0.00	7
89 Triethanolamine	Alcohol;Aliphatic amine, primary;Aliphatic amine, secondary;Aliphatic amine, tertiary;Amine, primary;Amine, secondary;Amine, tertiary;Dihydroxyl derivatives	102-71-6	Liquid	NC	I	> 0		-0.05	-0.05	0.00	9
90 Tween80	Acetal;Alcohol;Alkane, branched with secondary carbon;Alkene moiety ;Allyl;Carboxylic acid ester;Ether moiety;Oxolane;Saturated heterocyclic fragment	9005-65-6	Liquid	NC	NI	= 0		-0.07	-0.07	0.00	7
91 Polyethylene (14) tribenzylated phenyl ether	Alcohol;Ether moiety	116998-28-8	Liquid	NC	NI			-0.06	-0.06	0.00	7
92 Dimethyl sulfoxide	Sulfoxide	67-68-5	Liquid	NC	NI	> 0		-0.05	-0.05	0.00	7
93 Polyoxyethylene (13) (mono---, di, tri-) styrenated phenyl ether	Alcohol;Ether moiety	104376-75-2	Liquid	NC	NI			-0.06	-0.06	0.00	7
94 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilane	Alkoxysilane;Epoxide;Ether moiety;Saturated heterocyclic fragment;Silane	2530-83-8	Liquid	NC	I	= 0		0.19	0.19	0.00	7
95 3,4-Dichlorophenyl isocyanate	Aryl;Aryl halide;Isocyanate	102-36-3	Solid	1	NI	≥ 2	2/3 21	3.62	3.03	0.59	7 ✓
96 Caplan	Alkene moiety ;Alkyl halide;Allyl;Cycloalkene moiety ;Imide;Pyrrolidone;Pyrrolidinedione;Succinimide;Succinimid e, thio;Sulfenamide;Tetrahydrothialimide;Unsaturated carbocyclic fragment	133-06-2	Solid	1	NI	≥ 1	≥ 1 3/3; 3/3; 3/3	2.89	2.65	0.24	7 ✓
97 (-)-Bibenzoyl-L-tartaric acid	Aryl;Carboxylic acid;Carboxylic acid ester	2743-38-6	Solid	1	I	≥ 3	2/3 Jkknown	3.13	3.11	0.02	7
98 Promethazine hydrochloride	Alkane, branched with secondary carbon;Amine, tertiary;Ammonium salt;Aryl;Phenothiazine	58-33-3	Solid	1	I	≥ 3	3/3 21	2.63	2.60	0.02	6
99 2-Benzyl-4-chlorophenol	Aryl;Aryl halide;Phenol;Precursors quinoid compounds	120-32-1	Solid	1	I	≥ 3	6/6 21	3.07	3.05	0.02	7
100 Distearyl dimethylammonium chloride	Quaternary ammonium salts;Surfactants - Cationic	107-64-2	Solid	1	I	≥ 3	3/3 21	2.90	2.89	0.02	7
101 4-tert-Octylphenol	Alkane, branched with quaternary carbon;Alkyl (heteroarenes;Alkyl-, alkenyl- and alkynyl (heteroarenes;Aryl;Phenol;tert-Butyl	140-66-9	Solid	1	I	≥ 3	> 1.5 6/6; 6/6 Jkknown	3.48	3.47	0.00	7
102 Sodium salicylate	Aryl;Carboxylic acid;Phenol	54-21-7	Solid	1	I	≥ 1	≥ 2 3/3; 3/3 21	0.00	-0.01	0.00	7
103 Imidazole	Amine, secondary;Aryl;imidazole	288-32-4	Solid	1	I	≥ 3	> 1.5 3/3; 2/3 21	-0.03	-0.03	0.00	9
104 Tetrabromophenol blue	Aromatic perhalogenocarbons;Aryl;Aryl halide;Phenol;Sulfonate ester	4430-25-5	Solid	1	I	≥ 3	Jkknown	3.80	3.80	0.00	6
105 <i>m</i> -Phenylenediamine	Amine, primary;Aniline;Aryl;Phenylenediamine, meta-	108-45-2	Solid	1	I	≥ 1	≥ 2	-0.01	-0.01	0.00	8
106 Nonylphenyl-polyethylene glycol	Alcohol;Alkyl (heteroarenes;Alkyl-, alkenyl- and alkynyl (heteroarenes;Aryl;Ether moiety	9016-45-9	Solid	1	I	≥ 1	≥ 2	-0.02	-0.02	0.00	7

107	Acid red 92	Aromatic perhalogenocarbons;Aryl;Aryl halide;Ether moiety;Heterocyclic spiro rings;Lactons;Phenol;Xanthene; Xanthone	Solid	18472-87-2	2	I	≥ 1	3/3	21	at least 2/3 = 4	3/3	2.65	2.65	0.01	8
108	Dodecanoic acid	Carboxylic acid;Surfactants - Anionic	Solid	143-07-7	2	I	≥ 1	≥ 2				3.19	3.19	0.00	6
109	Calcium thioglycolate	Carboxylic acid;Thiol	Solid	814-71-1	2A	I	≥ 3	3/3	21	3/3 = 4	3/3	2.11	2.07	0.04	10
110	Dibenzyl phosphate	Aryl;Benzyl;Phosphate ester	Solid	1623-08-1	2A	I	≥ 1	≥ 2	3/3; 3/3	7	3/3; 1/3	2.75	2.73	0.02	3 ✓
111	Methyl cyanacetate	Carboxylic acid ester;Nitrile	Solid	105-34-0	2A	I	≥ 2	≥ 1	3/3; 3/3	7	2/3	0.00	0.00	0.00	7
112	Potassium oleate	Alkene moiety ;Allyl;Carboxylic acid;Surfactants - Anionic	Solid	143-18-0	2A	I						0.51	0.51	0.01	9
113	3,3'-Dithiodipropionic acid	Carboxylic acid;Disulfide	Solid	1119-62-6	2B	NI	≥ 1	3/3	7	1/3		2.58	1.60	0.97	4 ✓
114	Ethyl 2,6-dichloro-5-fluoro-beta-oxo-3-pyridinepropanoate	Aryl;Aryl halide;Carboxylic acid ester;Ketone;Pyridine;Pyridinium ion	Solid	96588-04-6	2B	I	≥ 1	2/3				1.89	1.49	0.41	5 ✓
115	Camphene	Alkene moiety ;Alkenes;Bicycloheptane; Bridged-ring carbocycles;Cycloalkane;Hydrocarbons;Terpenes	Solid	79-92-5	2B	NI	≥ 2	3/3				2.40	2.39	0.01	7
116	1,4-Dibutylbenzene	Alkoxy moiety;Aryl;Ether moiety	Solid	104-36-9	2B	NI	≥ 2	3/3				3.17	3.16	0.00	7
117	Sodium monochloroacetate	Alkyl halide;Carboxylic acid	Solid	3926-62-3	2B	I	≥ 2	3/3				0.02	0.01	0.00	7
118	Ammonium nitrate	Organic salts	Solid	6484-52-2	2B	I	≥ 2	3/3	7	1/3		-0.05	-0.05	0.00	8
119	Methyl <i>p</i> -hydroxybenzoate	Aryl;Carboxylic acid ester;Phenol	Solid	99-76-3	NC	I	= 0					2.13	0.92	1.21	7 ✓
120	2-Mercaptopyrimidine	Aldimine;Alkene moiety ;Cycloalkene moiety	Solid	1450-85-7	NC	NI	= 0					2.72	1.89	0.83	7 ✓
121	Aluminium hydroxide	Inorganic salt	Solid	21645-51-2	NC	NI	= 0					2.19	1.74	0.45	7 ✓
122	Theobronine	Amine, tertiary;Aryl;Dihydropurinedione;Fused heterocyclic aromatic;Imidazole;Imide;Urea derivatives	Solid	83-67-0	NC	NI	= 0					3.51	3.28	0.23	7 ✓
123	Hydroxyethylcellulose ethoxylate, quaternized	Alcohol; Ammonium salt; Ether	Solid	68610-92-4	NC	NI	= 0					0.27	0.09	0.18	7 ✓
124	3,4-Dimethoxybenzaldehyde	Aldehyde;Alkoxy moiety;Aryl;Ether moiety	Solid	120-14-9	NC	I	= 0					2.73	2.59	0.14	7 ✓
125	Propylparaben	Aryl;Carboxylic acid ester;Phenol	Solid	94-13-3	NC	NI	> 0					3.43	3.35	0.08	7
126	Iminodibenzyl	Amine, secondary;Aryl	Solid	494-19-9	NC	NI	> 0					3.69	3.62	0.07	7
127	Phenothiazine	Amine, secondary;Aryl;Phenothiazine	Solid	92-84-2	NC	NI	= 0					2.74	2.68	0.05	7
128	Anthracene	Anthracene ;Aryl;Fused carbocyclic aromatic;Naphthalene	Solid	120-12-7	NC	NI	= 0					2.84	2.79	0.05	7
129	2,3-Indolinedione	Amine, primary;Aniline;Aryl;Phenol;Precursors quinoid compounds	Solid	91-65-5	NC	I	= 0					2.95	2.92	0.03	7
130	2-Aminophenol	Amine, primary;Aniline;Aryl;Dianilines;Sulfone	Solid	95-55-6	NC	I	= 0					2.95	2.92	0.03	7
131	4'-Sulfonylbisbenzanide	Amine, primary;Aniline;Aryl;Phenol;Sulfone	Solid	80-08-0	NC	NI	= 0					2.73	2.70	0.02	7
132	Potassium tetrafluoroborate	Inorganic salt	Solid	14075-53-7	NC	I	= 0					0.04	0.03	0.01	7
133	Betaine monohydrate	Carboxylic acid;Quaternary ammonium salts	Solid	590-47-6	NC	I	> 0					0.02	0.01	0.00	7
134	Hexamethylenetetramine	Aliphatic amine, tertiary;Amine, tertiary;Bridged-ring heterocycles;Saturated heterocyclic fragment	Solid	100-97-0	NC	I	= 0					-0.02	-0.02	0.00	7
135	EDTA, di-potassium	Aliphatic Amine, tertiary; Carboxylic acid	Solid	25102-12-9	NC	I	> 0					-0.01	-0.01	0.00	5 ✓
136	<i>N,N</i> -Dimethylguanidine sulfate	Amidine;Ammonium salt	Solid	598-65-2	NC	I	= 0	Conf 1/3				-0.01	-0.01	0.00	7
137	Gluconolactone	Alcohol;Lactons	Solid	90-80-2	NC	NI	= 0					-0.01	-0.01	0.00	6
138	1,3,5-Trioxane	Ether moiety;Saturated heterocyclic fragment;T rioxane	Solid	110-88-3	NC	I	> 0					0.00	0.00	0.00	7
139	Sodium hydrogen sulfite	Inorganic salt	Solid	7631-90-5	NC	I	> 0	CO 1/3; Conf 1/3				0.00	0.00	0.00	5 ✓
140	1-Phenyl-3-pyrazolidinone	Aryl;Hydrazine derivatives;Pyrazolidine;Pyrazolidinedione;Pyrazolidone	Solid	92-43-3	NC	I	> 0					2.69	2.66	0.03	5 ✓
141	Piperazine	Aliphatic amine, secondary;Amine, secondary;Piperazine;Saturated heterocyclic fragment	Solid	110-85-0	NC	I	= 0					0.03	0.03	0.00	14
142	Famoxadone	Aryl;Carbamate Ether moiety;Hydrazine derivatives;Imide;Oxazolidine derivatives	Solid	131807-57-3	NC	NI	= 0					2.79	2.76	0.02	7
143	Thiamethoxam	Aryl;Aryl halide;Ether moiety;Guanidine;N-Nitro;Thiazole/Isothiazole	Solid	153719-23-4	NC	NI	= 0					1.23	0.98	0.24	7 ✓
144	Fenamidone	Amidine;Aryl;Hydrazine derivatives;Sulfide	Solid	161326-34-7	NC	NI	= 0					2.71	2.66	0.05	7
145	Amiftraz	Alkyl (hetero)arenes;Alkyl-, alkenyl- and alkynyl (hetero)arenes;Amidine;Aryl	Solid	33089-61-1	NC	NI	= 0					3.16	3.08	0.08	7
146	Pyrimethanil	Alkyl (hetero)arenes;Alkyl-, alkenyl- and alkynyl (hetero)arenes;Amine, secondary;Aromatic amine;Aryl;Pyrimidine	Solid	53112-28-0	NC	NI	= 0					2.95	2.95	0.01	7
147	Fluoxastrobin	Aryl;Aryl halide;Ether moiety;Ketoxime derivatives;Pyrimidine	Solid	361377-29-9	NC	NI	> 0	CO 1/3				2.61	2.54	0.07	7

148	Tetrabromobisphenol A	Aryl; Aryl halide; Phenol	79-94-7	Solid	NC	NI	= 0		2.96	2.94	0.02	7
149	4-[3-Chloro-4-(3-fluorobenzoyloxy)phenylamino]-6-iodoquinazoline	Amine, secondary; Aromatic amine; Aryl; Aryl halide; Benzyl Ether moiety; Fused heterocyclic, aromatic; Pyrimidine; Quinazoline	23178-20-9	Solid	NC	NI	= 0		2.66	2.64	0.02	7
150	2,4-Dichloro-5-sulfamoylbenzoic Acid	Aryl; Aryl halide; Carboxylic acid; Sulfonamide	2736-23-4	Solid	NC	NI	> 0		2.73	2.64	0.09	3 ✓
151	1,2-Epoxybicyclopentane	Cycloalkane; Epoxide; Fused saturated heterocycles; Saturated heterocyclic fragment	286-62-4	Solid	NC	I	> 0	CO 1/3	3.03	2.83	0.20	7
152	L-Phenylephrine	Alcohol; Aliphatic amine, secondary; Amine, secondary; Aryl; Phenol	59-42-7	Solid	NC	I	> 0		2.65	2.56	0.09	14
153	1-Phenyl-3-pyrazolidone	Aryl; Hydrazine derivatives; Pyrazolidine; Pyrazolidinedione; Pyrazolidone	92-43-3	Solid	NC	I	> 0		2.55	2.26	0.29	7 ✓
154	3,4,4'-Trichlorocarbamide	Aryl; Aryl halide; Urea derivatives	101-20-2	Solid	NC	NI	= 0		3.26	3.19	0.07	7
155	N-Phenylthiourea	Aryl; Thiourea derivatives	103-85-5	Solid	NC	NI	= 0		2.58	1.76	0.82	7 ✓
156	4,4'-Methylenbis(2,6-di-tert-butylphenol)	Alkyl (hetero)arenes; Alkyl-, alkenyl- and alkynyl (hetero)arenes; Aryl; Phenol; tert-Butyl	118-82-1	Solid	NC	NI	= 0		2.45	1.38	1.06	7 ✓
157	2,3-Dimethyl-2,3-dinitrobutane	Alkane, branched with tertiary carbon; Nitroaliphatic compounds	3964-18-9	Solid	NC	NI	= 0		2.34	2.03	0.31	7 ✓
158	3',5'-Dihydroxyacetophenone	Aryl; Ketone; Phenol	51863-60-6	Solid	NC	I	= 0		2.13	0.89	1.23	7 ✓

¹⁾ Analyzed by OECD QSAR Toolbox 4.4.1, ²⁾ Barroso et al., *Arch Toxicol.* 9, 521-547 (2017).