(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2021年9月30日(30.09.2021)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2021/193700 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 33/483 (2006.01) *G01N 21/64* (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01) *G01N 21/78* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2021/012167

(22) 国際出願日： 2021年3月24日(24.03.2021)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2020-054061 2020年3月25日(25.03.2020) JP

(71) 出願人: 富士フイルム株式会社(**FUJIFILM CORPORATION**) [JP/JP]; 〒1068620 東京都港区西麻布２丁目２６番３０号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 藤田 正晴 (**FUJITA Masaharu**); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島５７７番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 山本 裕介(**YAMAMOTO Yusuke**); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島５７７番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 笠原 利彦(**KASAHARA Toshihiko**); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島５７７番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス(**SIKS & CO.**); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目８番７号 京橋日殖ビル８階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) **Title:** METHOD FOR MEASURING RESPIRATORY SENSITIZATION AND RESPIRATORY SENSITIZATION MEASURING REAGENT

(54) 発明の名称： 呼吸器感作性の測定方法および呼吸器感作性測定試薬

(57) **Abstract:** The present invention addresses the problem of providing a method for measuring respiratory sensitization and a respiratory sensitization measuring reagent, the method and reagent making it possible to evaluate respiratory sensitization with a test substance without using any animals. The present invention provides a method for measuring respiratory sensitization, the method comprising: reacting N-(arylalkylcarbonyl)cysteine with a test substance; reacting α-N-(arylalkylcarbonyl)lysine with the test substance; detecting the amounts of the compounds after the reactions or the amounts of the products after the reactions by optical measurement; and determining respiratory sensitization from the ratio of the reactivity between α-N-(arylalkylcarbonyl)lysine and the test substance to the reactivity between N-(arylalkylcarbonyl)cysteine and the test substance or from the reactivity between α-N-(arylalkylcarbonyl)lysine and the test substance.

(57) 要約：本発明の課題は、動物を使用することなく被験物質の呼吸器感作性を評価することができる、呼吸器感作性の測定方法および呼吸器感作性測定試薬を提供することである。本発明によれば、Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインと被験物質とを反応させること；αーＮ－（アリールアルキルカルボニル）リジンと被験物質とを反応させること；反応後の上記化合物のそれぞれの量、または反応後のそれぞれの生成物の量を光学的測定により検出すること；およびＮ－（アリールアルキルカルボニル）システインと被験物質との反応性に対するαーＮ－（アリールアルキルカルボニル）リジンと被験物質との反応性の比率、またはαーＮ－（アリールアルキルカルボニル）リジンと被験物質との反応性から呼吸器感作性を判定することを含む、呼吸器感作性の測定方法が提供される。

WO 2021/193700 A1

［続葉有］

添付公開書類：

一　国際調査報告（条約第21条(3)）

明　細　書

発明の名称 ：

呼吸器感作性の測定方法および呼吸器感作性測定試薬

技術分野

[0001] 本発明は、呼吸器感作性の測定方法および呼吸器感作性測定試薬に関する。

背景技術

[0002] 感作性（アレルギー）とは、特定の抗原に対して免疫反応が過剰に起こることをいう。免疫反応は、外来の異物（抗原）を排除するために働く、生体にとって不可欠な生理機能であるが、一旦発症すると長期にわたって、抗原への暴露を回避する管理も必要となることなどから、重要な毒性の一つと考えられている。

[0003] アレルギー反応は、Ｉ型～ＩＶ型の４つの型に分類される。この内、遅延型アレルギーである皮膚感作性は、ＩＶ型アレルギーに分類される。一方、多くのアレルギー疾患として知られているのは、即時型アレルギーとして分類されるＩ型アレルギーであり、気管支喘息等の呼吸器感作性やアレルギー性鼻炎などを含む。

[0004] 呼吸器感作物質は、３００以上の物質が職業性喘息を引き起こし、世界保健調査（ＷＨＳ）は、３億人以上が喘息に罹患していると推定している。呼吸器感作を示す化学物質としては、樹脂、塗料、発泡体および多様な産業で使用されている酸無水物、イソシアネート、反応性染料および塩化白金酸塩などが知られている。

[0005] 呼吸器感作性試験法として、十分に確立され広く認められているｉｎ　ｖｉｖｏ試験法はない。一方で、呼吸器感作性物質を簡便な試験法で検出する試みとして、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ試験法とｉｎ　ｃｈｅｍｉｃｏ試験法が知られている。ｉｎ　ｖｉｔｒｏ試験法として、培養した樹状細胞の特定の遺伝子発現量を解析することで、呼吸器感作性物質を評価する試験法（非特許文

献１）が提案されているが、評価された呼吸器感作性物質が３種と極めて限定的であり、広範囲にわたる呼吸器感作性物質が評価可能かについては、今後の課題と考えられる。さらに、皮膚感作性代替試験法として開発された数多くのｉｎ　ｖｉｔｒｏ試験法においても、皮膚感作性物質と呼吸器感作性物質を区別して予測できる方法は、知られていない。

[0006] Ｉｎ　ｃｈｅｍｉｃｏ試験法として、Ｄｉｒｅｃｔ　Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｒｅａｃｔｉｖｉｔｙ　Ａｓｓａｙ（ＤＰＲＡ）による呼吸器感作性物質評価を行った報告（非特許文献２）がある。この方法では、１７種類の呼吸器感作性物質に対するシステインペプチドとリジンペプチドの反応性（ｄｅｐｌｅｔｉｏｎ）を高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）測定から算出し、システインペプチドのｄｅｐｌｅｔｉｏｎに対するリジンペプチドのｄｅｐｌｅｔｉｏｎの比率の平均値は、４．６であったと報告されている。しかし、呼吸器感作性物質を判定するためのクライテリアは設定されておらず、呼吸器感作性物質の予測法としては利用できない。

[0007] また、特許文献１には、Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインを用いた皮膚感作性測定試薬が記載され、特許文献２にはα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンを用いた皮膚感作性測定試薬が記載されている。特許文献１及び２に記載された皮膚感作性測定試薬を用いたアッセイは、Ａｍｉｎｏ　ａｃｉｄ　Ｄｅｒｉｖａｔｉｖｅ　Ｒｅａｃｔｉｖｉｔｙ　Ａｓｓａｙ（ＡＤＲＡ）とも言う。

先行技術文献

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Mizoguchi I, Ohashi M, Chiba Y, Hasegawa H, Xu M, Owaki T, and Yoshimoto T. 2017. Prediction of chemical respiratory and contact sensitizers by OX40L expression in dendric cells using a novel 3D coculture system. Frontiers in Immunology, 8,929.

非特許文献2：Lalko JF, Kimber I, Gerberick GF, Foertsch LM, Api AM, Dearman RJ. (2012). The direct peptide reactivity assay: selectivity o

f chemical respiratory allergens. Toxicological Sciences, 129(2), 421-431.

特許文献

[0009] 特許文献1：特開２００１－５９１０２号公報

特許文献2：特開２０１４－３７９９５号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 煩雑な操作、長期間におよぶ試験および高額な試験費用など多くの問題を抱えた動物実験に対して、動物愛護の観点からの社会的要請もあり、動物を用いない動物実験代替法の開発が進んでいる。特に、重篤な症状を示す呼吸器感作性試験の代替法開発は急務であり、培養細胞を用いたｉｎ　ｖｉｔｒｏ試験および化学的な反応によるｉｎ　ｃｈｅｍｉｃｏ試験が検討されているが、いずれも研究初期段階であり、十分な予測結果は得られていない。

[0011] 呼吸器感作性物質は、人間の健康へのリスクがあるにもかかわらず、呼吸器感作物質を特定することができる試験方法は、現在まで確立されていない。今までのところ、呼吸器感作性を研究するためのｉｎ　ｖｉｔｒｏ　ｍｏｄｅｌはわずかしか開発されていないが、これらのモデルはまだ検証されておらず、さらなる研究が必要とされている。

[0012] 非特許文献２に記載のＤＰＲＡでは、システインペプチドとリジンペプチドの２種類の試薬を使用して、別々に被験物質と反応させる。この反応液を高速液体クラマトグラフィー（ＨＰＬＣ）で別々に測定して、それぞれの未反応のペプチド量から減少率（ｄｅｐｌｅｔｉｏｎ）を算出し、これらの平均値（平均減少率）を算出する。呼吸器感作性物質の多くは、リジンとの反応性が高いことが知られているため、ＤＰＲＡでの予測可能性が検討されたが、リジンペプチドの反応性を評価しても呼吸器感作性物質を正しく評価できない場合がある。また、非特許文献２においては、呼吸器感作性物質を判定できる明確な基準については明記されていない。

[0013] 本発明の課題は、動物を使用することなく被験物質の呼吸器感作性を評価

することができる、呼吸器感作性の測定方法および呼吸器感作性測定試薬を提供することである。

課題を解決するための手段

[0014] 本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインおよびα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンを用いることによって呼吸器感作性を測定できることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

[0015] 即ち、本発明によれば、以下の発明が提供される。

＜１＞ Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインと、１種又は２種以上の被験物質とを反応させること；

α－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンと、１種又は２種以上の被験物質とを反応させること；

反応後のＮ－（アリールアルキルカルボニル）システインおよびα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンのそれぞれの量、または反応後のそれぞれの生成物の量を、紫外線検出器または蛍光検出器を用いた光学的測定により検出すること；および

Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインと被験物質との反応性に対するα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンと被験物質との反応性の比率、またはα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンと被験物質との反応性から呼吸器感作性を判定すること；

を含む、呼吸器感作性の測定方法。

＜２＞ 上記Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインおよび上記α－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンが、波長２００～７００ｎｍの領域に吸収を示し、吸収極大波長におけるモル吸光係数が１０Ｌ／ｍｏｌ・ｃｍ以上５０００００Ｌ／ｍｏｌ・ｃｍ以下である化合物であるか、または励起波長が２００～３５０ｎｍであって、２００～４００ｎｍに蛍光を発する化合物である、＜１＞に記載の呼吸器感作性の測定方法。

＜３＞ 上記Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインが、Ｎ－（２

－フェニルアセチル）システインまたはＮ－［２－（ナフタレン－１－イル）アセチル］システインである、＜１＞または＜２＞に記載の呼吸器感作性の測定方法。

＜４＞　上記α－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンが、α－Ｎ－（２－フェニルアセチル）リジンまたはα－Ｎ－［２－（ナフタレン－１－イル）アセチル］リジンである、＜１＞から＜３＞の何れか一に記載の呼吸器感作性の測定方法。

＜５＞　上記Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインおよび上記α－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンが、各々０．１μｍｏｌ／Ｌ～１００μｍｏｌ／Ｌの濃度で調製されたものである、＜１＞から＜４＞のいずれか一に記載の呼吸器感作性の測定方法。

＜６＞　Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインと、１種又は２種以上の被験物質とを反応させる際において、被験物質を、被験物質の分子量が既知の場合は０．１ｍｍｏｌ／Ｌ～１０ｍｍｏｌ／Ｌ、被験物質の分子量が不明の場合は０．０５ｍｇ／ｍＬ～１０ｍｇ／ｍＬの濃度において、水、有機溶媒またはそれらの混合溶媒に溶解した溶液と、Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインの溶液とを反応させ、

α－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンと、１種又は２種以上の被験物質とを反応させる際において、被験物質を、被験物質の分子量が既知の場合は０．１ｍｍｏｌ／Ｌ～１０ｍｍｏｌ／Ｌ、被験物質の分子量が不明の場合は０．０５ｍｇ／ｍＬ～１０ｍｇ／ｍＬの濃度において、水、有機溶媒またはそれらの混合溶媒に溶解した溶液と、α－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンの溶液とを反応させる、＜１＞から＜５＞のいずれか一に記載の呼吸器感作性の測定方法。

＜７＞　Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインと、１種又は２種以上の被験物質とを反応させることにより得られた生成物、およびα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンと、１種又は２種以上の被験物質とを反応させることにより得られた生成物を、クロマトグラフィー処理するこ

とを含む、＜１＞から＜６＞のいずれか一に記載の呼吸器感作性の測定方法。

＜８＞　上記の紫外線検出器を用いた光学的測定において検出波長が２００～７００ｎｍである、＜１＞から＜７＞のいずれか一に記載の呼吸器感作性の測定方法。

＜９＞　上記の蛍光検出器を用いた光学的測定において、励起波長が２００～３５０ｎｍであって、蛍光波長が２００～４００ｎｍである、＜１＞から＜８＞のいずれか一に記載の呼吸器感作性の測定方法。

＜１０＞　上記の１種又は２種以上の被験物質が、香料、精油、高分子化合物、医薬品、農薬、食品、化学製品、および天然物由来成分からなる植物抽出液のうちの少なくとも１種である、＜１＞から＜９＞のいずれか一に記載の呼吸器感作性の測定方法。

＜１１＞　紫外線検出器または蛍光検出器を用いた光学的測定におけるＮ－（アリールアルキルカルボニル）システインおよびα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンのピーク面積の平均値から、次式に従ってＮ－（アリールアルキルカルボニル）システインおよびα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンの減少率を計算する、＜１＞から＜１０＞のいずれか一に記載の呼吸器感作性の測定方法。

Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインの減少率（％　ｄｅｐｌｅｔｉｏｎ）＝［１－（反応後の未反応のＮ－（アリールアルキルカルボニル）システインのピーク面積の平均値／標準のＮ－（アリールアルキルカルボニル）システインのピーク面積の平均値）］×１００；

α－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンの減少率（％　ｄｅｐｌｅｔｉｏｎ）＝［１－（反応後の未反応のα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンのピーク面積の平均値／標準のα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンのピーク面積の平均値）］×１００

＜１２＞　Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインと、１種又は２種以上の被験物質との反応、およびα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル

）リジンと、１種又は２種以上の被験物質との反応を別々に行い、

［Ｃ］≧４．９％　かつ　［Ｂ］／［Ａ］≧０．９を満たす場合、または

［Ｂ］≧２０％を満たす場合

には、上記被験物質は呼吸器感作性物質であると判定する、＜１１＞に記載の呼吸器感作性の測定方法：

上記の式中、［Ａ］は、Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインの減少率を示し、［Ｂ］は、α－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンの減少率を示し、［Ｃ］は、［Ａ］と［Ｂ］の平均値を示す。

＜１３＞　Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインと、１種又は２種以上の被験物質との反応、およびα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンと、１種又は２種以上の被験物質との反応を、Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインおよびα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンを含むｐＨ８．０の混合液を用いて行い、

［Ｃ］≧４．９％　かつ　［Ｂ］／［Ａ］≧０．９を満たす場合、または

［Ｂ］≧１０％を満たす場合

には、被験物質は呼吸器感作性物質であると判定する、＜１１＞に記載の呼吸器感作性の測定方法：

上記の式中、［Ａ］は、Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインの減少率を示し、［Ｂ］は、α－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンの減少率を示し、［Ｃ］は、［Ａ］と［Ｂ］の平均値を示す。

＜１４＞　＜１３＞に記載の判定により被験物質が呼吸器感作性ではないと判定された後にさらに、

Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインと、１種又は２種以上の被験物質との反応、およびα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンと、１種又は２種以上の被験物質との反応を、Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインおよびα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンを含むｐＨ１０．２の混合液を用いて行い、

［Ｂ］≧２０％を満たす場合には、被験物質は呼吸器感作性物質であると判

定する、

＜１３＞記載の呼吸器感作性の測定方法。

＜１５＞　上記判定により、ジイソシアネート類を呼吸器感作性物質と判定する、＜１＞から＜１４＞の何れか一に記載の呼吸器感作性の測定方法。

＜１６＞　Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインまたはα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンを測定主薬として含む呼吸器感作性測定試薬であって、１種又は２種以上の被験物質の呼吸器感作性を、紫外線検出器を用いた光学的測定により測定するための、呼吸器感作性測定試薬。

発明の効果

[0016]　本発明によれば、動物を使用することなく被験物質の呼吸器感作性を評価することができる。

発明を実施するための形態

[0017]　本明細書において、「～」とはその前後に記載される数値を下限値および上限値として含む意味で使用される。

[0018]　本発明は、

Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインと、１種又は２種以上の被験物質とを反応させること；

α－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンと、１種又は２種以上の被験物質とを反応させること；

反応後のＮ－（アリールアルキルカルボニル）システインおよびα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンのそれぞれの量、または反応後のそれぞれの生成物の量を、紫外線検出器または蛍光検出器を用いた光学的測定により検出すること；および

Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインと被験物質との反応性に対するα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンと被験物質との反応性の比率、またはα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンと被験物質との反応性から呼吸器感作性を判定すること；

を含む、呼吸器感作性の測定方法に関する。

[0019] 本発明はさらに、Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインまたはα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンを測定主薬として含む呼吸器感作性測定試薬であって、１種又は２種以上の被験物質の呼吸器感作性を、紫外線検出器を用いた光学的測定により測定するための、呼吸器感作性測定試薬に関する。

[0020] 呼吸器感作性は、皮膚感作性と同様に、被験物質が生体内に浸透した後、生体内タンパクと共有結合することが、発症機序の初期段階である。ここで、この共有結合に関わる生体内タンパク中のアミノ酸は、システインのＳＨ基とリジンのＮＨ２基の２種類と考えられるが、主にリジンのＮＨ２基が大きく関与することが知られている。このため、ＡＤＲＡでは、システインとリジンのＮ末端にＵＶ領域に高いモル吸光係数および蛍光を有するアリール基環を導入したＮ－（アリールアルキルカルボニル）システインおよびα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンを化学合成し、この２つの求核試薬と被験物質とを反応させて、未反応の求核試薬を定量することで、被験物質との反応性を算出する試験法とした。本発明においては、Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインと被験物質との反応性に対するα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンと被験物質との反応性の比率、またはα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンと被験物質との反応性を指標にして、呼吸器感作性物質を評価することができる。

[0021] 本発明においては、Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインまたはα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンを試薬として使用することにより、動物を使用することなく呼吸器感作性を測定できるという利点がある。また、本発明においてＮ－（アリールアルキルカルボニル）システインおよびα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンは、蛍光検出が可能であり、これを利用することにより、被験物質と完全に区別して定量することもできる。

[0022] 本発明において、呼吸器感作性の測定とは、呼吸器感作性の測定の検定を含む意味であり、また、一定の基準の呼吸器感作性の有無の判断、および呼

吸器感作性の定量的測定を含む意味である。

[0023] 本発明においては、Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインまたはα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンを使用し、この２種類の試薬と被験物質とを反応させ、反応後のＮ－（アリールアルキルカルボニル）システインおよびα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンのそれぞれの量、または反応後のそれぞれの生成物の量を、紫外線検出器または蛍光検出器を用いた光学的測定により検出する。その後、Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインと被験物質との反応性に対するα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンと被験物質との反応性の比率、またはα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンと被験物質との反応性から呼吸器感作性を判定する。

[0024] 本発明においては、Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインまたはα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンを使用する。

[0025] Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインは、そのままの状態、または溶液状態で、好ましくは、波長１９０～２５００ｎｍの領域で吸収を示す化合物であり、さらに好ましくは、波長２００～７００ｎｍの領域に吸収を示す化合物である。さらに、上記波長領域に吸収極大を有する化合物が好ましい。また、Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインは、好ましくは、吸収極大波長におけるモル吸光係数が１０Ｌ／ｍｏｌ・ｃｍ以上５００００Ｌ／ｍｏｌ・ｃｍ以下である化合物であり、より好ましくは、吸収極大波長におけるモル吸光係数が１０Ｌ／ｍｏｌ・ｃｍ以上２０００Ｌ／ｍｏｌ・ｃｍ以下である化合物であり、さらに好ましくは、吸収極大波長におけるモル吸光係数が１００Ｌ／ｍｏｌ・ｃｍ以上２０００Ｌ／ｍｏｌ・ｃｍ以下である化合物である。

また、Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインは、好ましくは、励起波長が２００～３５０ｎｍであって、２００～４００ｎｍに蛍光を発する化合物である。

[0026] Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインにおいて、アリール基は

炭素数６～１６程度であればよい。またアルキルカルボニル基における炭素数は２～１１程度であればよい。カルボニル基に結合するアルキル基は直鎖状、分岐鎖状、環状のいずれでもよく、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基、ｓｅｃ－ブチル基、ｔｅｒｔ－ブチル基、ペンチル基、イソペンチル基、ネオペンチル基、ｔｅｒｔ－ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、２－エチルヘキシル基、シクロプロピル基などを挙げることができる。上記の化合物としての具体例としては、Ｎ－（２－フェニルアセチル）システイン（以下、ＰＡＣとも言う）、およびＮ－[２－(ナフタレン－１－イル)アセチル]システイン（以下、ＮＡＣとも言う）が挙げられる。

[0027] Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインは公知の方法により製造することが可能であり、例えば、Ｎ－（２－フェニルアセチル）システインは、特開２０１１－５９１０２号公報の段落００１５～００１７に記載の方法により合成することができる。

[0028] Ｎ－[２－(ナフタレン－１－イル)アセチル]システインは、以下の方法により合成できる。

１－ナフチル酢酸５０ｇをトルエン２７０ｍＬに溶解し、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）を滴下しながら、２０℃で塩化チオニル９５．８ｇを滴下する。６０℃で２時間反応後冷却し、トルエン２００ｍＬを添加した後、減圧乾燥して１－ナフチルアセチルクロリドを得る（５６ｇ）。

水酸化ナトリウム１４ｇ、水３５０ｍＬの水溶液にＬ－シスチン２０ｇを添加し、溶解する。溶液を氷水浴にて冷却し、１－ナフチルアセチルクロリド８．７６ｇを滴下する。反応混合物を２０℃で２時間撹拌し、冷却後濃塩酸１６．７ｍＬを添加する。酢酸エチルを約７００ｍＬ添加して結晶を濾取し、減圧乾燥して、Ｎ，Ｎ’－ビス（１－ナフチルアセチル）シスチンを得る（３９．２ｇ）。

Ｎ，Ｎ’－ビス（１－ナフチルアセチル）シスチン２０ｇ、亜鉛粉末２０ｇ、メタノール５００ｍＬの混合物に窒素置換下、トリフリオロ酢酸１２０

ｍＬを２時間かけて滴下する。反応混合物を２時間撹拌した後、酢酸エチル５００ｍＬで抽出し、有機相を硫酸マグネシウムで乾燥後、濾過、濃縮する。得られた残渣を酢酸エチルから再結晶し、乾燥してＮ－[２－(ナフタレン－１－イル)アセチル]システインを得る（５．２ｇ）。

[0029] Ｎ－[２－(ナフタレン－１－イル)アセチル]システインは、２００～４００ｎｍに蛍光を発し、２８１ｎｍに吸収極大を示し、モル吸光係数は、約７０００（Ｌ／ｍｏｌ・ｃｍ）であり、最大蛍光波長は、３３５ｎｍである。

[0030] α－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンは、アミノ基を有するため、Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインとの反応性が低い物質とも反応性を有し、汎用の簡易な分析装置を用いて測定することが可能であり、疎水性の化学物質を溶解させるために用いられる有機溶媒比率の高い反応液においても十分な溶解度および安定性を有する。

[0031] α－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンはそのままの状態、または溶液状態で、好ましくは、波長１９０～２５００ｎｍの領域で吸収を示す化合物であり、さらに好ましくは、波長２００～７００ｎｍの領域に吸収を示す化合物である。さらに、上記波長領域に吸収極大を有する化合物が好ましい。α－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンは、好ましくは、吸収極大波長におけるモル吸光係数が１０Ｌ／ｍｏｌ・ｃｍ以上５００００Ｌ／ｍｏｌ・ｃｍ以下である化合物であり、より好ましくは、吸収極大波長におけるモル吸光係数が１０Ｌ／ｍｏｌ・ｃｍ以上２０００Ｌ／ｍｏｌ・ｃｍ以下である化合物であり、さらに好ましくは、吸収極大波長におけるモル吸光係数が１００Ｌ／ｍｏｌ・ｃｍ以上２０００Ｌ／ｍｏｌ・ｃｍ以下である化合物である。

また、α－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンは、好ましくは、励起波長が２００～３５０ｎｍであって、２００～４００ｎｍに蛍光を発する化合物である。

[0032] なおモル吸光係数（ε）は下記式で与えられる。

ε＝Ｄ／（ｃ・ｄ）

ここで、Ｄは溶液の吸光度を表し、ｃは溶質のモル濃度（ｍｏｌ／Ｌ）、ｄは溶液層の厚さ（光路長）（ｃｍ）を表す。モル吸光係数は、市販の分光光度計を用いて吸収スペクトルまたは吸光度を測定することにより求めることができる。

[0033] α－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンにおいて、アリール基は炭素数６～１６程度であればよい。アリール基として、ベンゼン環、ナフタレン環などが挙げられる。またアルキルカルボニル基における炭素数は２～１１程度であればよい。カルボニル基に結合するアルキル基は直鎖状、分岐鎖状、環状のいずれでもよく、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基、ｓｅｃ－ブチル基、ｔｅｒｔ－ブチル基、ペンチル基、イソペンチル基、ネオペンチル基、ｔｅｒｔ－ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、２－エチルヘキシル基、シクロプロピル基などを挙げることができる。α－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンの具体例としては、α－Ｎ－（２－フェニルアセチル）リジン（以下、ＰＡＬとも言う）、およびα－Ｎ－［２－（ナフタレン－１－イル）アセチル］リジン（以下、ＮＡＬとも言う）が挙げられる。

[0034] α－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンは公知の方法に準じて製造することが可能であり、例えば、ＰＡＬおよびＮＡＬは、特開２０１４－３７９９５号公報の段落００２５～００３１に記載の方法により合成することができる。

α－Ｎ－（２－フェニルアセチル）リジンは、２００～４００ｎｍに蛍光を発し、吸収極大波長（２５５ｎｍ付近）におけるモル吸光係数は約２００Ｌ／ｍｏｌ・ｃｍである。

α－Ｎ－［２－（ナフタレン－１－イル）アセチル］リジンは、２００～４００ｎｍに蛍光を発し、吸収極大波長（２８０ｎｍ付近）におけるモル吸光係数は約４００Ｌ／ｍｏｌ・ｃｍであり、最大蛍光波長は、３３２ｎｍである。

[0035] 本発明の呼吸器感作性測定試薬は、上記のＮ－（アリールアルキルカルボニル）システインまたはα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンのみからなるものであってもよく、測定主薬である上記の化合物のほかに１または２以上の添加剤を含んでいるものであってもよい。添加剤の例としては、ｐＨ調整剤、安定化剤、キレート剤、還元剤等が挙げられる。また、本発明の呼吸器感作性測定試薬は、上記の測定主薬および必要に応じて上記の添加剤を、水、水性緩衝液、有機溶媒、またはこれらいずれかの混合溶媒等に溶解させたものであってもよい。本発明の呼吸器感作性測定試薬は、溶液、液体状、固体状（粉末、顆粒、凍結乾燥物、錠剤等）のいずれの形態で提供されてもよい。

[0036] 本発明の呼吸器感作性測定試薬は、例えば、酢酸アンモニウムなどの有機酸塩類またはリン酸塩などの無機塩類を含む水性緩衝液もしくは水またはこれらと有機溶媒との混合溶媒に溶解した形態で、例えば０．０１μｍｏｌ／Ｌ～１ｍｏｌ／Ｌ程度、通常約０．１μｍｏｌ／Ｌ～５００ｍｍｏｌ／Ｌ程度、好ましくは０．１μｍｏｌ／Ｌ～１００μｍｏｌ／Ｌの濃度として使用すればよい。

[0037] 本発明においては、Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインと被験物質とを反応させる際に、並びにα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンと被験物質とを反応させる際に、単一の被験物質を反応させてもよいし、２種以上の被験物質を含有する混合物を反応させてもよい。２種以上の被験物質を含有する混合物とは、主成分に相当する成分として２種以上の被験物質を含む混合物を意味し、１種類の被験物質に対して多種類の不純物が含まれている混合物を意味するものではない。

[0038] 単一の被験物質または２種以上の被験物質を含む混合物の具体例としては、例えば、香料、精油、高分子化合物、医薬品、農薬、食品、化学製品、および天然物由来成分からなる植物抽出液のうちの少なくとも１種を挙げることができるが、特にこれらに限定されるものではない。

[0039] 被験物質は、モル濃度を調節できる場合には、例えば、水、水と相溶性の

ある有機溶媒（例えば、メタノール、エタノール、アセトニトリル、アセトン、Ｎ,Ｎ－ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ））、またはこれらの混合溶媒（水と有機溶媒との混合溶媒、または２種以上の有機溶媒の混合溶媒）に溶解すればよい。

被験物質は、被験物質の分子量が既知の場合は０．１ｍｍｏｌ／Ｌ～１００ｍｍｏｌ／Ｌの濃度になるように溶解することが好ましく、０．５ｍｍｏｌ／Ｌ～５０ｍｍｏｌ／Ｌの濃度になるように溶解することがより好ましく、１ｍｍｏｌ／Ｌ～１０ｍｍｏｌ／Ｌの濃度になるように溶解することがさらに好ましい。

[0040] 次いで、本発明の呼吸器感作性測定試薬の測定主薬であるＮ－（アリールアルキルカルボニル）システインおよびα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンのそれぞれと被験物質溶液とを、上記化合物のそれぞれと被験物質のモル濃度比が例えば１：１００～２０：１、または１：１００～１０：１となるように混合し反応させればよい。

[0041] 被験物質は、モル濃度を調節できない場合にも、例えば、水、水と相溶性のある有機溶媒（例えば、メタノール、エタノール、アセトニトリル、アセトン、Ｎ,Ｎジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ））、またはこれらの混合溶媒（水と有機溶媒との混合溶媒、または２種以上の有機溶媒の混合溶媒）に溶解すればよい。

被験物質は、被験物質の分子量が不明の場合は０．０１ｍｇ／ｍＬ～１０ｍｇ／ｍＬの濃度になるように溶解することが好ましく、０．５ｍｇ／ｍＬ～５ｍｇ／ｍＬの濃度になるように溶解することがより好ましく、０．１ｍｇ／ｍＬ～１ｍｇ／ｍＬの濃度になるように溶解することがさらに好ましい。

[0042] 次いで、本発明の呼吸器感作性測定試薬の測定主薬であるＮ－（アリールアルキルカルボニル）システインおよびα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンの約０．１～約１００μｇ／ｍＬ、通常１～１０μｇ／ｍＬの溶液を上記被験物質溶液に等量加えれば良い。ただし、濃度と添加量を上記

のようにすれば良く、例えば、測定試薬の濃度を２倍にして、添加量を１／２にするなど適切に調整してもよい。

[0043] Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインおよびα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンと被験物質との反応における反応液中のＮ－（アリールアルキルカルボニル）システインおよびα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンのそれぞれの濃度は、好ましくは０．０５μｍｏｌ／Ｌ以上４００μｍｏｌ／Ｌ以下であり、より好ましくは０．１μｍｏｌ／Ｌ以上１００μｍｏｌ／Ｌ以下であり、さらに好ましくは１．０μｍｏｌ／Ｌ以上１０μｍｏｌ／Ｌ以下である。

[0044] 反応は、Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインおよび／またはα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンと被験物質とを含む溶液を、例えば約４℃～約６０℃、好ましくは約１０℃～約５０℃、より好ましくは約１５℃～約４０℃の温度範囲にて、必要により保温しながら、通常は約１分～約２日間、好ましくは１時間～２日間、より好ましくは８時間～３６時間攪拌または静置することによって行うことができる。なお、Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインと、１種又は２種以上の被験物質との反応、およびα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンと、１種又は２種以上の被験物質との反応は、それぞれ別の反応液において行ってもよいし、同一の反応液において行ってもよい。

[0045] 被験物質と求核試薬（即ち、Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインおよびα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジン）との反応性（共有結合能）は、未反応の求核試薬を定量することにより推定することが可能であるが、被験物質と求核試薬との反応の生成物（反応生成物）を検出して定量することが、最も直接的で正しい評価である。混合物の場合、その構成成分が明らかであって、成分と求核試薬との反応生成物が入手可能である場合には、これを用いて、例えば、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）－蛍光法により定量することが可能である。

[0046] 求核試薬または反応生成物の分析方法としては、特に限定されないが、求

核試薬と被験物質とを反応させる工程で得られる生成物を、クロマトグラフィー処理することを含むことが好ましい。例えば、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）、ガスクロマトグラフィー（ＧＣ）、薄層クロマトグラフィー（ＴＬＣ）などにより、上記反応により生成した化合物、上記求核試薬および被験物質を分離して分析する方法が挙げられる。上記ＨＰＬＣ、ＧＣまたはＴＬＣに用いることのできるクロマトグラフ手法としては、逆相、順相、イオン交換などを挙げることができる。このようなクロマトグラフ手法に使用可能な市販のカラムやＴＬＣとしては、例えば、ＬＣカラムとしてはＣＡＰＣＥＬＬ　ＣＯＲＥ　Ｃ１８（大阪ソーダ社製）、ＣＡＰＣＥＬＬ－ＰＡＫ（大阪ソーダ社製）、Ｌ－ｃｏｌｕｍｎ　ＯＤＳ（化学品評価研究機構製）、Ｓｈｏｄｅｘ　Ａｓａｈｉｐａｋ（昭和電工社製）、ＣＯＲＴＥＣＳ（ウォーターズ社製）、Ｐｏｒｏｓｈｅｌｌ（アジレント・テクノロジー社製）などを挙げることができ、ＴＬＣプレートではシリカゲル６０Ｆ２５４（メルク社製）、Ｓｉｌｉｃａ　Ｇｅｌ　Ｐｌａｔｅ（ナカライテスク社製）などを挙げることができる。

[0047] 本発明の一例においては、被験物質と呼吸器感作性測定試薬との反応後の求核試薬の減少率を、紫外線検出器を用いた光学的測定により検出してもよい。

紫外線検出器としては、市販の検出器を使用することができ、島津製作所社製、ウォーターズ社製、日立製作所社製、アジレント・テクノロジー社製などが挙げられる。

[0048] 紫外線検出器を用いた光学的測定においては、検出波長は、好ましくは２００～７００ｎｍであり、より好ましくは２００～４００ｎｍであり、より好ましくは２２０～３５０ｎｍであり、さらに好ましくは２５０～３００ｎｍである。

[0049] 本発明の別の例においては、被験物質と呼吸器感作性測定試薬との反応後の求核試薬の減少率を、蛍光検出器を用いた光学的測定により検出してもよい。

基底状態の分子は、励起光を吸収して励起状態へ遷移する。吸収した励起エネルギーの一部は、振動エネルギーなどにより失活し、振動準位の低い位置に無輻射遷移した後、基底状態に戻る際に発する光が蛍光である。蛍光検出器を用いた光学的測定は、吸光光度法に比べて一般に10^3倍以上高感度な分析手法と言われる。さらに蛍光物質を測定対象とするため、選択性に優れ、かつ極微量の分析手段として用いられる。蛍光強度は蛍光物質の濃度に比例するため、検量線を作成することで定量分析が可能である。蛍光検出器としては、市販の検出器を使用することができ、島津製作所社製、ウォーターズ社製、日立製作所社製、アジレント・テクノロジー社製、大阪ソーダ社製などが挙げられる。

[0050] 蛍光検出器を用いた光学的測定においては、励起波長が好ましくは２００～３５０ｎｍであり、より好ましくは２３０～３２０ｎｍであり、さらに好ましくは２５０～３００ｎｍであり、さらに一層好ましくは２７０～３００ｎｍであり、特に好ましくは２８０～２９０ｎｍである。蛍光波長は、好ましくは２００～４００ｎｍであり、より好ましくは３００～３７０ｎｍであり、さらに好ましくは３００～３６０ｎｍであり、特に好ましくは３２０～３５０ｎｍである。

[0051] Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインの減少率およびα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンの減少率は、紫外線検出器または蛍光検出器を用いた光学的測定におけるＮ－（アリールアルキルカルボニル）システインおよびα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンのピーク面積の平均値から、次式に従って計算することができる。

[0052] Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインの減少率（％　ｄｅｐｌｅｔｉｏｎ）＝［１－（反応後の未反応のＮ－（アリールアルキルカルボニル）システインのピーク面積の平均値／標準のＮ－（アリールアルキルカルボニル）システインのピーク面積の平均値）］×１００

[0053] α－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンの減少率（％　ｄｅｐｌｅｔｉｏｎ）＝［１－（反応後の未反応のα－Ｎ－（アリールアルキルカル

ボニル）リジンのピーク面積の平均値／標準のα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンのピーク面積の平均値）］×１００

[0054] 本発明においては、被験物質が呼吸器感作性物質であるかどうかの判定は、以下の基準で行うことが好ましい。

下記において、［Ａ］は、Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインの減少率を示し、［Ｂ］は、α－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンの減少率を示し、［Ｃ］は、［Ａ］と［Ｂ］の平均値を示す。

[0055]（判定基準１）

Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインと、１種又は２種以上の被験物質との反応、およびα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンと、１種又は２種以上の被験物質との反応を別々に行う場合については、

［Ｃ］≧４．９％　かつ　［Ｂ］／［Ａ］≧０．９を満たす場合、または

［Ｂ］≧２０％を満たす場合

には、上記被験物質は呼吸器感作性物質であると判定する。

[0056]（判定基準２）

Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインと、１種又は２種以上の被験物質との反応、およびα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンと、１種又は２種以上の被験物質との反応を、Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインおよびα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンを含むｐＨ８．０の混合液を用いて行う場合については、

［Ｃ］≧４．９％　かつ　［Ｂ］／［Ａ］≧０．９を満たす場合、または

［Ｂ］≧１０％を満たす場合

には、被験物質は呼吸器感作性物質であると判定する。

[0057]（判定基準３）

上記した判定基準２における判定により被験物質が呼吸器感作性ではないと判定された後にさらに、

Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインと、１種又は２種以上の被験物質との反応、およびα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンと

、１種又は２種以上の被験物質との反応を、Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインおよびα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンを含むｐＨ１０．２の混合液を用いて行い、

［Ｂ］≧２０％を満たす場合

には、被験物質は呼吸器感作性物質であると判定する。

[0058] 本発明の一例においては、上記した判定により、ジイソシアネート類を呼吸器感作性物質と判定することができる。ジイソシアネート類としては、1,5-ナフタレンジイソシアネート、イソホロンジイソシアネート、メチレンビスフェニルジイソシアネート、ヘキサメチレンジイソシアネート、2,4-トルエンジイソシアネート、2,6-トルエンジイソシアネートなどが挙げられるが、特に限定されない。

[0059] 以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

実施例

[0060] 実施例における略号は以下の意味を有する。

ＥＤＴＡ：エチレンジアミン四酢酸

ＮＡＣ：Ｎ－[２－(ナフタレン－１－イル)アセチル]システイン

ＮＡＬ：α－Ｎ－［２－（ナフタレン－１－イル）アセチル］リジン

ＴＦＡ：トリフルオロ酢酸

ＳＤ：標準偏差

[0061] ［試験方法］

（１）各種溶液調製

（１－１）０．１ｍｍｏｌ／Ｌ　ＥＤＴＡ水溶液

１）　１５ｍＬ容量のコニカルチューブにＥＤＴＡ・２Ｎａ・２H_2O（同仁化学製）を３７．２ｍｇ秤量し、２５ｍＬメスピペットを使って１０ｍＬの蒸留水（光製薬製、日本薬局方注射用水）を加え、溶解させる（１０ｍｍｏｌ／Ｌ　ＥＤＴＡ水溶液）。

２）　１００ｍＬ容量の容器に蒸留水（光製薬製、日本薬局方注射用水）を

５０ｍＬメスピペットを使って４９．５ｍＬ加え、そこに上記１）の１０ｍｍｏｌ／Ｌ　ＥＤＴＡ水溶液を０．５ｍＬ添加して混合し１００倍希釈する（０．１ｍｍｏｌ／Ｌ　ＥＤＴＡ水溶液）。

[0062] （１－２）１００ｍｍｏｌ／Ｌリン酸緩衝液（ｐＨ８．０）

１）　１００ｍＬ容量の容器に無水リン酸二水素ナトリウム（富士フイルム和光純薬社製、特級）を０．６ｇ秤量し、５０ｍＬメスピペットを使って５０ｍＬの蒸留水（（光製薬製、日本薬局方注射用水））を加え、溶解させる。

２）　５００ｍＬ容量の容器に５０ｍＬ（または１００ｍＬ）メスピペットを使って３００ｍＬの蒸留水（光製薬製、日本薬局方注射用水）を加える。

３）　無水リン酸水素二ナトリウム（富士フイルム和光純薬社製、特級）を４．２６ｇ秤量し、２）の蒸留水（光製薬製、日本薬局方注射用水）に添加して溶解させる。

４）　３）の無水リン酸水素二ナトリウム溶液に１）の無水リン酸二水素ナトリウム溶液を２５ｍＬメスピペットを使って１６ｍＬ加える。

５）　２５ｍＬメスピペットを使って４）の溶液から１７ｍＬを除き、残りの４）に０．１ｍｍｏｌ／Ｌ　ＥＤＴＡ水溶液を１ｍＬ添加して３００ｍＬにする。この溶液中のＥＤＴＡの濃度は０．３３μｍｏｌ／Ｌであり、反応液中での濃度は０．２５μｍｏｌ／Ｌとなる。

６）　上記溶液の一部を別の容器に分取し、ｐＨメーターでｐＨを測定して、ｐＨ７．９～８．１の範囲内であることを確認する。

[0063] （１－３）１００ｍｍｏｌ／Ｌリン酸緩衝液（ｐＨ１０．２）

１）　５０ｍＬメスピペットを使って５００ｍＬ容量の容器に２８６ｍＬの蒸留水（光製薬製、日本薬局方注射用水）を加える。

２）　無水リン酸水素二ナトリウムを４．２６ｇ秤量し、１）の蒸留水（光製薬製、日本薬局方注射用水）に添加して溶解させる。

３）　０．１ｍｏｌ／ＬのＮａＯＨ水溶液（富士フイルム和光純薬製、特級）を２５ｍＬメスピペットを使って１４ｍＬ加える。

４）　上記溶液の一部を別の容器に分取し、ｐＨメーター（ポータブルｐＨ計（ＨＭ－２０Ｐ）、東亜電波工業）でｐＨを測定して、ｐＨ１０．１～１０．３の範囲内であることを確認する。

[0064] （１－４）反応停止液（２．５％（ｖ／ｖ）ＴＦＡ水溶液または０．５％（ｖ／ｖ）ＴＦＡ水溶液）

蒸留水（富士フイルム和光純薬社製）１００ｍＬにＴＦＡ（富士フイルム和光純薬製、特級）を２．５ｍＬ添加する（２．５％（ｖ／ｖ））。

蒸留水（富士フイルム和光純薬社製）１００ｍＬにＴＦＡ（富士フイルム和光純薬製、特級）を０．５ｍＬ添加する（０．５％（ｖ／ｖ））。

[0065] （１－５）ＨＰＬＣ移動相Ａ：０．１％（ｖ／ｖ）ＴＦＡ水溶液

蒸留水（富士フイルム和光純薬社製）１ＬにＴＦＡを１．０ｍＬ添加する。

[0066] （１－６）ＨＰＬＣ移動相Ｂ：０．１％（ｖ／ｖ）ＴＦＡアセトニトリル溶液

ＨＰＬＣグレードのアセトニトリル（富士フイルム和光純薬社製、ＨＰＬＣ用）１ＬにＴＦＡ１．０ｍＬを添加する。

[0067] （２）求核試薬ストック液調製

（２－１）ＮＡＣストック溶液調製

１試験では同一のストック溶液を使用し、１試験毎に使い切れる量に小分けして保存する。具体的な調製例を以下に示す。

１）　５０ｍＬ容量の容器に１１．６ｍｇ（±０．１ｍｇ）のＮＡＣを秤量し、これに２５ｍＬメスピペットを使って２０ｍＬの１００ｍｍｏｌ／Ｌリン酸緩衝液（ｐＨ８．０）　を添加し、試験管ミキサーで軽く攪拌して溶解させる（２ｍｍｏｌ／Ｌ）。

２）　５００ｍＬ容量の容器に同緩衝液を５０ｍＬメスピペットを使って１４９．５ｍＬ加え、そこに上記の２ｍｍｏｌ／Ｌ　ＮＡＣ溶液を０．５ｍＬ添加し、転倒混和をして３００倍希釈する（６．６６７μｍｏｌ／Ｌ）。

[0068] （２－２）ＮＡＬストック溶液調製（分子量＝３１４．３８）

１試験では同一のストック溶液を使用し、１試験毎に使い切れる量に小分けして保存する。具体的な調製例を以下に示す。

１）　５０ｍＬ容量の容器に１２．６ｍｇ（±０．１　ｍｇ）のＮＡＬを秤量し、そこに２５ｍＬメスピペットを使って２０ｍＬの１００ｍｍｏｌ／Ｌリン酸緩衝液（ｐＨ１０．２）を添加し、試験管ミキサーで軽く攪拌して溶解させる（２ｍｍｏｌ／Ｌ　ＮＡＬ溶液）。

２）　５００ｍＬ容量の容器に同緩衝液を５０ｍＬメスピペットを使って１４９．５ｍＬ加え、そこに上記の２ｍｍｏｌ／Ｌ　ＮＡＬ溶液を０．５ｍＬ添加し、転倒混和をして３００倍希釈する（６．６６７μｍｏｌ／Ｌ）。

[0069] （２－３）ＮＡＣ／ＮＡＬ混合ストック液（ｐＨ８．０）調製

１）　５０ｍＬ容量の容器にＮＡＣ標品１１．６ｍｇ（±０．１ｍｇ）およびＮＡＬ標品１２．６ｍｇ（±０．１ｍｇ）を秤量し、これに２５ｍＬメスピペットを使って２０ｍＬの１００ｍｍｏｌ／Ｌリン酸緩衝液（ｐＨ８．０）を添加し、試験管ミキサーで軽く攪拌して溶解させる（２ｍｍｏｌ／Ｌ）。

２）　５００ｍＬ容量の容器に同緩衝液を５０ｍＬメスピペットを使って１４９．５ｍＬ加え、そこに上記の２ｍｍｏｌ／Ｌ　ＮＡＣ溶液および２ｍｍｏｌ／Ｌ　ＮＡＬ溶液を０．５ｍＬずつ添加し、転倒混和をして３００倍希釈する（６．６６７　μｍｏｌ／Ｌ）。

[0070] （２－４）ＮＡＣ／ＮＡＬ混合ストック液（ｐＨ１０．２）調製

１）　５０ｍＬ容量の容器にＮＡＣ標品１１．６ｍｇ（±０．１ｍｇ）およびＮＡＬ標品１２．６ｍｇ（±０．１ｍｇ）を秤量し、これに２５ｍＬメスピペットを使って２０ｍＬの１００ｍｍｏｌ／Ｌリン酸緩衝液（ｐＨ１０．２）を添加し、試験管ミキサーで軽く攪拌して溶解させる（２ｍｍｏｌ／Ｌ）。

２）　５００ｍＬ容量の容器に同緩衝液を５０ｍＬメスピペットを使って１４９．５ｍＬ加え、そこに上記の２ｍｍｏｌ／Ｌ　ＮＡＣ溶液および２ｍｍｏｌ／Ｌ　ＮＡＬ溶液を０．５ｍＬずつ添加し、転倒混和をして３００倍希

釈する（６．６６７　μｍｏｌ／Ｌ）。

[0071]（３）被験物質溶液の調製

１ｍｍｏｌ／Ｌの被験物質溶液が調製できる溶媒を水、アセトニトリル、アセトンおよび５％ＤＭＳＯのアセトニトリル溶液の優先順位に従って１種類選定する。水、アセトニトリル、アセトンを選定した場合には、まず２０ｍｍｏｌ／Ｌの被験物質溶液を調製する。適当量秤量した被験物質に対して、２０ｍｍｏｌ／Ｌ溶液になるように溶媒を加えて、完全に溶解する。その後、２０ｍｍｏｌ／Ｌ溶液の一部を分取し、同じ溶媒で２０倍希釈して、１ｍｍｏｌ／Ｌの被験物質溶液を調製する。５％ＤＭＳＯのアセトニトリル溶液を選定した場合には、上記同様、２０ｍｍｏｌ／ＬのＤＭＳＯ溶液を調製する。その後、この一部を分取し、アセトニトリルで２０倍希釈して、１ｍｍｏｌ／Ｌの被験物質溶液を調製する。

[0072]（４）反応

（４－１）添加

被験物質溶液は９６ウェルプレート（Ｕ９６　ＰＰ－０．５　ＭＬ　ＮＡＴＵＲＡＬ、Ｔｈｅｒｍｏ　（ＮＵＮＣ）社）上で主に１２連ピペットを用いて調製し、以下の用量に従って試薬を添加する。

求核試薬（ＮＡＣおよびＮＡＬ）：１５０μＬ

ＮＡＣ／ＮＡＬ混合ストック液（ｐＨ８．０）の場合は、上記（２－３）の溶液を１５０μＬ添加し、ＮＡＬ／ＮＡＬ混合ストック液（ｐＨ１０．２）の場合は、上記（２－４）の溶液を１５０μＬ添加する。

被験物質溶液：５０μＬ

[0073]（４－２）反応

プレートシール（レジスタントエンボスシール、島津ジーエルシー社）でしっかり密封し、プレートシェーカー（Ｔｉｔｒａｍａｘ　１００、Ｈｅｉｄｏｌｐｈ社）で攪拌する。遠心機でスピンダウンしたのち、２５℃、２４時間、遮光状態でインキュベートしたものも用意する。

[0074]（４－３）反応停止

２４時間インキュベートした後、プレートシールを剥がし、各サンプルに反応停止液（２．５％（ｖ／ｖ）ＴＦＡ）を５０μＬずつ添加して反応を停止させる。

[0075] （５）ＨＰＬＣ測定

求核試薬のＨＰＬＣ測定条件を以下に示す。

[0076] [表1]

表１：ＨＰＬＣ測定条件

HPLC 装置	LC-20A(Prominence)シリーズ （島津製作所）			
カラム	CAPCELL CORE C18 カラム(3.0×150mm, 2.7μm)(大阪ソーダ)			
検出器	UV 検出:SPD-M20A （島津製作所）			
検出波長	UV 検出:281nm			
カラム温度	40℃			
サンプル温度	25℃			
注入量	10-20μl			
溶離液	A:水(0.1%トリフルオロ酢酸)			
	B:アセトニトリル(0.1%トリフルオロ酢酸)			
測定時間	20 分間			
溶出条件	【NAC】			
	時間(min.)	流速(ml/min.)	%A	%B
	0.0	0.3	70	30
	9.5	0.3	45	55
	10.0	0.3	0	100
	13.0	0.3	0	100
	13.5	0.3	70	30
	20.0	終了		
	【NAL】			
	時間(min.)	流速(ml/min.)	%A	%B
	0.0	0.3	80	20
	9.5	0.3	55	45
	10.0	0.3	0	100
	13.0	0.3	0	100
	13.5	0.3	80	20
	20.0	終了		

[0077]（ＵＶ検出）

ＵＶ検出は、２８１ｎｍで検出されるピーク面積を求める。

[0078]（６）データ解析

（６－１）減少率の算出

反応後の未反応のＮＡＣ又はＮＡＬ及び標準（反応前）のＮＡＣ又はＮＡＬのピーク面積の平均値（各々、ｎ＝３）から、次式に従ってＮＡＣ又はＮＡＬの減少率を計算する。

ＮＡＣ減少率（％　ｄｅｐｌｅｔｉｏｎ）＝［１－（反応後の未反応のＮＡＣのピーク面積の平均値／標準（反応前）のＮＡＣピーク面積の平均値）］×１００

ＮＡＬ減少率（％　ｄｅｐｌｅｔｉｏｎ）＝［１－（反応後の未反応のＮＡＬのピーク面積の平均値／標準（反応前）のＮＡＬピーク面積の平均値）］×１００

[0079] 反応後の未反応のＮＡＣのピーク面積の平均値とは、被験物質と求核試薬（ＮＡＣ）とを反応させた後の未反応のＮＡＣを３回測定した際の面積平均値であり、標準（反応前）のＮＡＣピーク面積の平均値とは、標準（反応前）のＮＡＣを３回測定した際の面積平均値である。

反応後の未反応のＮＡＬのピーク面積の平均値とは、被験物質と求核試薬（ＮＡＬ）とを反応させた後の未反応のＮＡＬを３回測定した際の面積平均値であり、標準（反応前）のＮＡＬピーク面積の平均値とは、標準（反応前）のＮＡＣを３回測定した際の面積平均値である。

[0080]（６－２）平均スコア

ＮＡＣ減少率及びＮＡＬ減少率の平均値（平均スコア：Ａｖｅｒａｇｅ Ｓｃｏｒｅ）を計算する。値は、小数第２位を四捨五入する。

ＮＡＣ及びＮＡＬ減少率の平均値（平均スコア：Ａｖｅｒａｇｅ　Ｓｃｏｒｅ）＝（ＮＡＣ減少率＋ＮＡＬ減少率）／２

[0081] ＮＡＣの減少率［Ａ］、ＮＡＬの減少率［Ｂ］、および［Ａ］と［Ｂ］の平均値［Ｃ］を用いて、以下の（１）および（２）のいずれかの方法で評価

する。

[0082] （１）ＮＡＣとＮＡＬを、別々に調製して評価する場合は、以下の条件を満足すれば、被験物質は、呼吸器感作性物質であると判定する。

平均スコア［Ｃ］≧４．９％　かつ　［Ｂ］／［Ａ］≧０．９の場合、または

［Ｂ］≧２０％の場合

[0083] （２）ＮＡＣとＮＡＬの混合液（ｐＨ８．０）で評価する場合は、以下の判定を満足すれば、被験物質は、呼吸器感作性物質であると判定する。

平均スコア［Ｃ］≧４．９％　かつ　［Ｂ］／［Ａ］≧０．９の場合、または

［Ｂ］≧１０％の場合

[0084] 上記（２）の判定で、被験物質が呼吸器感作性ではないと判定した後に、さらに、

（３）ＮＡＣとＮＡＬの混合液（ｐＨ１０．２）で評価し、以下の判定を満足すれば、被験物質は、呼吸器感作性物質であると判定する。

［Ｂ］≧２０％　の場合

[0085] ＜実施例１＞

下表に示す１３種類の呼吸器感作性物質について、ＡＤＲＡとＤＰＲＡの試験条件で評価した。なお、ＤＰＲＡの結果は、非特許文献２に記載の値を使用した。

[0086] 被験物質および溶液調製：

ＡＤＲＡに関しては、下記１３種類の感作性物質について、１ｍｍｏｌ／Ｌ溶液を調製して試験に使用した。

[0087] 反応条件：

ＡＤＲＡに関しては、上記の「（４）反応」に記載の条件（ＮＡＣとＮＡＬを別々に反応させる条件）で呼吸器感作性物質とＮＡＣおよびＮＡＬとを反応させた。

[0088] 測定条件：

ＡＤＲＡに関しては、上記の「（５）ＨＰＬＣ測定」に記載のＨＰＬＣ測定条件により、求核試薬のｄｅｐｌｅｔｉｏｎ（％）を求めた。

[0089] 結果：

１３種類の被験物質について、上記の試験法に従って実施した結果を以下にまとめる。

ＡＤＲＡでは、１３種類の呼吸器感作性物質を正しく呼吸器感作性物質と判定できた。一方、ＤＰＲＡでは、ジイソシアネート系の４物質を正しく評価できなかった。ＡＤＲＡでは、ＤＰＲＡが評価できないジイソシアネート類も正しく評価できることがわかった。

[0090]

[表2]

呼吸器感作性物質	ADRA						DPRA				
	NAC depletion (%)[A]	NAL depletion (%)[B]	判定基準1 平均% depletion	判定基準2 NAL/NAC [B]/[A]	判定基準3 NAL depletion (%)	予測	システインペプチド depletion (%)[A]	リジンペプチド depletion (%)[B]	判定基準1 平均% depletion	判定基準2 [B]/[A]	予測
1	1.3	57.0	29.2	42.8	57.0	Pos.	8.1	86.3	47.2	10.7	Pos.
2	100.0	89.6	94.8	0.9	89.6	Pos.	54.0	93.0	73.5	1.7	Pos.
3	0.3	96.9	48.6	323.0	96.9	Pos.	10.9	94.0	52.5	8.6	Pos.
4	1.9	97.0	49.4	52.3	97.0	Pos.	8.9	95.3	52.1	10.7	Pos.
5	37.3	98.1	67.7	2.6	98.1	Pos.	83.5	25.1	54.3	0.3	Neg
6	67.5	69.8	68.6	1.0	69.8	Pos.	100.0	35.0	67.5	0.4	Neg
7	25.0	98.3	61.7	3.9	98.3	Pos.	54.5	23.0	38.8	0.4	Neg
8	26.0	98.5	62.3	3.8	98.5	Pos.	87.4	26.3	56.9	0.3	Neg
9	0.8	53.1	26.9	66.4	53.1	Pos.	35.5	79.6	57.6	2.2	Pos.
10	98.4	100.0	99.2	1.0	100.0	Pos.	77.3	99.5	88.4	1.3	Pos.
11	100.0	100.0	100.0	1.0	100.0	Pos.	93.5	97.3	95.4	1.0	Pos.
12	100.0	97.8	98.9	1.0	97.8	Pos.	99.5	98.9	99.2	1.0	Pos.
13	100.0	88.1	94.0	0.9	88.1	Pos.	74.1	99.3	86.7	1.3	Pos.

[0091] 表２における呼吸器感作性物質

１：ヘキサヒドロ無水フタル酸

２：無水マレイン酸

３：無水フタル酸

４：無水トリメリット酸

５：メチレンビスフェニルジイソシアネート

６：ヘキサメチレンジイソシアネート

７：2,4-トルエンジイソシアネート

８：2,6-トルエンジイソシアネート

９：グルタルアルデヒド

１０：ブラックGRリアクティブ

１１：オレンジ-3Rリアクティブ

１２：クロラミン-T

１３：塩化シアヌル

[0092] 備考：呼吸器感作性物質予測欄において、Ｐｏｓは呼吸器感作性物質と予測した物質、Ｎｅｇは非感作性物質と予測した物質を表す。

[0093] ＜実施例２＞

下表に示す５種類の呼吸器感作性物質と２７種類の非呼吸器感作性物質について、通常のＡＤＲＡ（ＮＡＣとＮＡＬを別々に反応させる条件）の試験条件で評価した。

[0094] 被験物質および溶液調製：

下記３２種類の被験物質について、１ｍｍｏｌ／Ｌ溶液を調製して試験に使用した。

[0095] 測定条件：

上記の「（５）ＨＰＬＣ測定」に記載のＨＰＬＣ測定条件により、求核試薬のｄｅｐｌｅｔｉｏｎ（％）を求めた。

[0096] 結果：

３２種類の被験物質（５種類の呼吸器感作性物質と２７種類の非感作性物

質）について、上記の試験法に従って実施した結果を以下にまとめる。

５種類すべての呼吸器感作性物質を正しく呼吸器感作性物質と判定し、２７種類すべての非感作性物質を正しく非感作性物質と判定できた。

[0097]

[表3]

被験物質	呼吸器感作性物質	ADRA							
		NAC		NAL		平均depletion (%)	NAL/NAC	NAL Depletion (%)	呼吸器感作性予測
		Depletion (%)	SD	Depletion (%)	SD				
1	該当	0.8	0.8	43.4	0.7	22.1	51.9	43.4	Pos
2	該当	21.7	0.3	100.0	0.0	60.8	4.6	100.0	Pos
3	該当	70.0	0.1	62.3	0.1	66.2	0.9	62.3	Pos
4	該当	100.0	0.0	21.5	0.4	60.8	0.2	21.5	Pos
5	該当	17.5	0.7	57.7	3.0	37.6	3.3	57.7	Pos
6	非該当	0.3	0.3	0.7	1.2	0.5	2.1	0.7	Neg
7	非該当	0.2	0.3	0.9	0.9	0.5	6.0	0.9	Neg
8	非該当	0.0	0.0	1.7	1.4	0.9	–	1.7	Neg
9	非該当	0.0	0.0	1.2	0.5	0.6	–	1.2	Neg
10	非該当	2.4	0.5	2.2	0.6	2.3	0.9	2.2	Neg
11	非該当	0.1	0.2	0.8	0.5	0.5	6.0	0.8	Neg
12	非該当	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	Neg
13	非該当	0.0	0.0	1.0	0.7	0.5	–	1.0	Neg
14	非該当	0.0	0.0	0.4	0.6	0.2	–	0.4	Neg
15	非該当	0.0	0.0	0.7	0.7	0.4	–	0.7	Neg
16	非該当	0.0	0.0	2.8	0.6	1.4	–	2.8	Neg
17	非該当	0.1	0.1	2.4	1.6	1.2	39.0	2.4	Neg
18	非該当	1.3	0.6	0.3	0.6	0.8	0.2	0.3	Neg
19	非該当	3.3	0.4	3.3	0.6	3.3	1.0	3.3	Neg
20	非該当	1.4	0.3	2.1	0.8	1.7	1.6	2.1	Neg
21	非該当	0.1	0.1	2.8	0.6	1.5	26.0	2.8	Neg
22	非該当	0.1	0.2	2.2	0.7	1.1	19.8	2.2	Neg
23	非該当	0.0	0.0	1.4	0.7	0.7	65.8	1.4	Neg
24	非該当	0.0	0.0	1.8	1.4	0.9	355.3	1.8	Neg
25	非該当	0.1	0.1	1.3	0.5	0.7	15.5	1.3	Neg
26	非該当	0.0	0.0	1.3	0.7	0.6	–	1.3	Neg
27	非該当	0.1	0.2	1.9	3.1	1.0	20.0	1.9	Neg
28	非該当	0.0	0.0	0.4	0.6	0.2	–	0.4	Neg
29	非該当	0.5	0.4	0.4	0.2	0.5	0.9	0.4	Neg
30	非該当	1.5	0.3	1.9	1.5	1.7	1.2	1.9	Neg
31	非該当	0.5	0.5	3.9	2.4	2.2	7.2	3.9	Neg
32	非該当	0.9	0.4	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	Neg

[0098] 表３における被験物質名

１：クロレン酸無水物

２：1,5-ナフタレンジイソシアネート

３：イソホロンジイソシアネート

４：ニンヒドリン

５：イソチオシアン酸フェニル

６：グリセロール

７：ヘキサン

８：フタル酸ジエチル

９：オクタン酸

１０：メタクリル酸2-ヒドロキシプロピル

１１：1-ブタノール

１２：4-ヒドロキシ安息香酸

１３：6-メチルクマトリン

１４：サリチル酸メチル

１５：クロロベンゼン

１６：乳酸

１７：1-ブロモブタン

１８：2-アセチルシクロヘキサノン

１９：4’-メトキシアセトフェノン

２０：エチルバニリン

２１：イソプロパノール

２２：プロピレングリコール

２３：スルファニルアミド

２４：ミリスチン酸イソプロピル

２５：メチルパラベン

２６：ノナン酸

２７：プロピルパラベン

２８：サリチル酸

２９：スルファニル酸

３０バニリン

３１：クマリン

３２：二塩化ビニリデン

[0099] 備考：

表中の呼吸器感作性物質欄の「該当」は呼吸器感作性物質、「非該当」は非感作性物質を示す。

また、呼吸器感作性物質予測欄において、「Ｐｏｓ」は呼吸器感作性物質と予測した物質、「Ｎｅｇ」は非感作性物質と予測した物質を表す。

[0100] ＜実施例３＞

実施例１および２では、従来のＡＤＲＡの試験条件であるように、ＮＡＣとＮＡＬとの反応液を別々に調製して、それぞれについてＨＰＬＣ測定し評価した。しかし、ＮＡＣとＮＡＬを１つの反応液中で混合して反応させれば、１回のＨＰＬＣ測定で評価できることから、大きな効率化につながる。そこで、実施例１および２で使用した１８種類の呼吸器感作性物質について、上記［試験法］の「（２－３）ＮＡＣ／ＮＡＬ混合ストック液（ｐＨ８．０）調製」および「（４－１）」におけるＮＡＣ／ＮＡＬ混合ストック液（ｐＨ８．０）を用いる場合の試験条件で評価した。

[0101] なお、２７種類の非呼吸器感作性物質は、上記の結果では、いずれもＮＡＣおよびＮＡＬは、いずれもほとんど反応しなかったことから、ＮＡＣとＮＡＬ混合液で評価しても、同様にＮＡＣとＮＡＬは、上記の結果を再現する可能性が高いと判断して評価しなかった。

[0102] 被験物質および溶液調製：

下記１８種類の被験物質について、１ｍｍｏｌ／Ｌ溶液を調製して試験に使用した。

[0103] 測定条件：

上記の「（５）ＨＰＬＣ測定」に記載のＨＰＬＣ測定条件により、求核試薬のｄｅｐｌｅｔｉｏｎ（％）を求めた。

[0104] 結果：

上記と同様、１８種類の被験物質について、上記の試験法に従って実施した結果を以下にまとめる。

[0105] [表4]

被験物質	呼吸器感作性物質	ADRA (NAC/NAL 混合：pH=8.0)							
		NAC		NAL		平均 depletion (%)	NAL/NAC	NAL Depletion (%)	呼吸器感作性予測
		Depletion (%)	SD	Depletion (%)	SD				
1	該当	1.1	0.4	96.6	0.6	48.8	88.5	96.6	Pos
2	該当	1.3	1.1	100.0	0.0	50.6	79.2	100.0	Pos
3	該当	100.0	0.0	96.9	0.5	98.5	1.0	96.9	Pos
4	該当	8.6	0.2	70.0	1.0	39.3	8.1	70.0	Pos
5	該当	0.0	0.0	50.1	0.8	25.1	-	50.1	Pos
6	該当	24.1	1.3	92.0	0.7	58.1	3.8	92.0	Pos
7	該当	27.9	1.0	81.1	1.4	54.5	2.9	81.1	Pos
8	該当	23.9	0.8	61.8	4.7	42.8	2.6	61.8	Pos
9	該当	40.0	1.5	70.4	0.5	55.2	1.8	70.4	Pos
10	該当	68.7	0.4	15.9	0.3	42.3	0.2	15.9	Pos
11	該当	67.2	0.7	24.0	1.4	45.6	0.4	24.0	Pos
12	該当	6.2	0.5	0.0	0.0	3.1	0.0	0.0	Neg
13	該当	100.0	0.0	96.2	0.1	98.1	1.0	96.2	Pos
14	該当	100.0	0.0	43.6	1.8	71.8	0.4	43.6	Pos
15	該当	98.3	0.3	2.0	0.6	50.1	0.0	2.0	Neg
16	該当	100.0	0.0	47.0	0.3	73.5	0.5	47.0	Pos
17	該当	96.3	0.4	9.6	0.4	53.0	0.1	9.6	Neg
18	該当	16.8	1.4	0.2	0.4	8.5	0.0	0.2	Neg

[0106] 表４における被験物質名

１：無水フタル酸

２：無水トリメリット酸

３：無水マレイン酸

４：ヘキサヒドロ無水フタル酸

５：クロレン酸無水物

６：1,5-ナフタレンジイソシアネート

７：2,6-トルエンジイソシアネート

８：2,4-トルエンジイソシアネート

９：メチレンビスフェニルジイソシアネート

１０：イソホロンジイソシアネート

１１：ヘキサメチレンジイソシアネート

１２：グルタルアルデヒド

１３：クロラミン-T

１４：塩化シアヌル

１５：ニンヒドリン

１６：ブラックGRリアクティブ

１７：オレンジ-3Rリアクティブ

１８：イソチオシアン酸フェニル

[0107] 備考：

表中の呼吸器感作性物質欄の「該当」は呼吸器感作性物質を示す。また、呼吸器感作性物質予測欄において、「Ｐｏｓ」は呼吸器感作性物質と予測した物質、「Ｎｅｇ」は非感作性物質と予測した物質を表す。

[0108] １８種類の呼吸器感作性物質の内、４物質（No.１２、１５、１７および１８）は、正しく判定できなかったが、１４種類の呼吸器感作性物質を正しく呼吸器感作性物質と判定できることがわかった。２７種類の非感作性物質も含めれば、予測精度は９１．１％で評価できることがわかった。以上の結果から、ＮＡＣとＮＡＬを１つの反応液中で混合して反応させる試験法でも、十分に呼吸器感作性物質を判定できる試験法であると言える。

[0109] ＜実施例４＞

実施例３で使用した１８種類の呼吸器感作性物質の内、正しく呼吸器感作性と予測できなかった４物質およびＮＡＬ　ｄｅｐｌｅｔｉｏｎが１５．９％と低めであったイソホロンジイソシアネートの５種類について、通常のＮＡＬの反応条件であるｐＨ　１０．２の緩衝液下で評価した。

[0110] 被験物質および溶液調製：

下記５種類の被験物質について、１ｍｍｏｌ／Ｌ溶液を調製して試験に使用した。

[0111] 測定条件：

上記の「（５）ＨＰＬＣ測定」に記載のＨＰＬＣ測定条件により、求核試薬のｄｅｐｌｅｔｉｏｎ（％）を求めた。

[0112] 結果：

５種類の被験物質について、上記の試験法に従って実施した結果を以下にまとめる。

[0113] [表5]

被験物質	呼吸器感作性物質	ADRA (NAC/NAL 混合;pH=10.2)					
		NAC		NAL		平均	呼吸器感作性予測
		Depletion (%)	SD	Depletion (%)	SD	Depletion (%)	
1	該当	-	-	63.2	1.7	>31.6	Pos
2	該当	-	-	21.9	0.4	>10.9	Pos
3	該当	-	-	25.2	0.4	>12.6	Pos
4	該当	-	-	100.0	0.0	>50.0	Pos
5	該当	-	-	58.6	0.5	>29.3	Pos

[0114] 表５における被験物質名

１：イソホロンジイソシアネート

２：グルタルアルデヒド

３：ニンヒドリン

４：オレンジ-3Rリアクティブ

５：イソチオシアン酸フェニル

[0115] 備考：

表中の呼吸器感作性物質欄の「該当」は呼吸器感作性物質、呼吸器感作性物質予測欄において、「Ｐｏｓ」は呼吸器感作性物質と予測した物質を表す。また、ＮＡＣのｄｅｐｌｅｔｉｏｎ欄において「－」は、ｐＨ１０．２で

は、ＮＡＣがほぼ完全に酸化されるため、評価できなかったことを示す。

[0116] ＮＡＣとＮＡＬを混合したｐＨ１０．２での緩衝液を用いた試験系では、実施例３で呼吸器感作性物質を間違って非感作性物質と予測した５種類に関しても、正しく呼吸器感作性物質と予測できた。以上の結果から、ＮＡＣとＮＡＬを１つの反応液中で混合して反応させる試験法でも、適切に使用する緩衝液を選択すれば、呼吸器感作性物質を判定できる試験法であると言える。

[0117] なお、グルタルアルデヒドのＮＡＬのｄｅｐｌｅｔｉｏｎが、実施例１では５３．１％であったのに対して、実施例４では２１．９％と低下した。この理由として、実施例４は、実施例１と同じｐＨではあるがＮＡＣが存在する混合液で評価したため、ＮＡＣによる反応抑制効果があった可能性が考えられる。

請求の範囲

[請求項1] Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインと、１種又は２種以上の被験物質とを反応させること；

α－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンと、１種又は２種以上の被験物質とを反応させること；

反応後のＮ－（アリールアルキルカルボニル）システインおよびα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンのそれぞれの量、または反応後のそれぞれの生成物の量を、紫外線検出器または蛍光検出器を用いた光学的測定により検出すること；および

Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインと被験物質との反応性に対するα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンと被験物質との反応性の比率、またはα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンと被験物質との反応性から呼吸器感作性を判定すること；を含む、呼吸器感作性の測定方法。

[請求項2] 前記Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインおよび前記α－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンが、波長２００～７００ｎｍの領域に吸収を示し、吸収極大波長におけるモル吸光係数が１０Ｌ／ｍｏｌ・ｃｍ以上５０００００Ｌ／ｍｏｌ・ｃｍ以下である化合物であるか、または励起波長が２００～３５０ｎｍであって、２００～４００ｎｍに蛍光を発する化合物である、請求項１に記載の呼吸器感作性の測定方法。

[請求項3] 前記Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインが、Ｎ－（２－フェニルアセチル）システインまたはＮ－［２－（ナフタレン－１－イル）アセチル］システインである、請求項１または２に記載の呼吸器感作性の測定方法。

[請求項4] 前記α－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンが、α－Ｎ－（２－フェニルアセチル）リジンまたはα－Ｎ－［２－（ナフタレン－１－イル）アセチル］リジンである、請求項１から３の何れか一項

に記載の呼吸器感作性の測定方法。

[請求項5] 前記Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインおよび前記α－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンが、各々０．１μｍｏｌ／Ｌ～１００μｍｏｌ／Ｌの濃度で調製されたものである、請求項１から４のいずれか一項に記載の呼吸器感作性の測定方法。

[請求項6] Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインと、１種又は２種以上の被験物質とを反応させる際において、被験物質を、被験物質の分子量が既知の場合は０．１ｍｍｏｌ／Ｌ～１０ｍｍｏｌ／Ｌ、被験物質の分子量が不明の場合は０．０５ｍｇ／ｍＬ～１０ｍｇ／ｍＬの濃度において、水、有機溶媒またはそれらの混合溶媒に溶解した溶液と、Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインの溶液とを反応させ、

α－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンと、１種又は２種以上の被験物質とを反応させる際において、被験物質を、被験物質の分子量が既知の場合は０．１ｍｍｏｌ／Ｌ～１０ｍｍｏｌ／Ｌ、被験物質の分子量が不明の場合は０．０５ｍｇ／ｍＬ～１０ｍｇ／ｍＬの濃度において、水、有機溶媒またはそれらの混合溶媒に溶解した溶液と、α－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンの溶液とを反応させる、請求項１から５のいずれか一項に記載の呼吸器感作性の測定方法。

[請求項7] Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインと、１種又は２種以上の被験物質とを反応させることにより得られた生成物、およびα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンと、１種又は２種以上の被験物質とを反応させることにより得られた生成物を、クロマトグラフィー処理することを含む、請求項１から６のいずれか一項に記載の呼吸器感作性の測定方法。

[請求項8] 前記の紫外線検出器を用いた光学的測定において検出波長が２００～７００ｎｍである、請求項１から７のいずれか一項に記載の呼吸器

感作性の測定方法。

[請求項9] 前記の蛍光検出器を用いた光学的測定において、励起波長が２００～３５０ｎｍであって、蛍光波長が２００～４００ｎｍである、請求項１から８のいずれか一項に記載の呼吸器感作性の測定方法。

[請求項10] 前記の１種又は２種以上の被験物質が、香料、精油、高分子化合物、医薬品、農薬、食品、化学製品、および天然物由来成分からなる植物抽出液のうちの少なくとも１種である、請求項１から９のいずれか一項に記載の呼吸器感作性の測定方法。

[請求項11] 紫外線検出器または蛍光検出器を用いた光学的測定におけるＮ－（アリールアルキルカルボニル）システインおよびα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンのピーク面積の平均値から、次式に従ってＮ－（アリールアルキルカルボニル）システインおよびα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンの減少率を計算する、請求項１から１０のいずれか一項に記載の呼吸器感作性の測定方法。

Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインの減少率（％ ｄｅｐｌｅｔｉｏｎ）＝［１－（反応後の未反応のＮ－（アリールアルキルカルボニル）システインのピーク面積の平均値／標準のＮ－（アリールアルキルカルボニル）システインのピーク面積の平均値）］×１００；

α－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンの減少率（％ ｄｅｐｌｅｔｉｏｎ）＝［１－（反応後の未反応のα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンのピーク面積の平均値／標準のα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンのピーク面積の平均値）］×１００

[請求項12] Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインと、１種又は２種以上の被験物質との反応、およびα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンと、１種又は２種以上の被験物質との反応を別々に行い、

［Ｃ］≧４．９％　かつ　［Ｂ］／［Ａ］≧０．９を満たす場合、または

［Ｂ］≧２０％を満たす場合

には、前記被験物質は呼吸器感作性物質であると判定する、請求項１１に記載の呼吸器感作性の測定方法：

上記の式中、［Ａ］は、Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインの減少率を示し、［Ｂ］は、α－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンの減少率を示し、［Ｃ］は、［Ａ］と［Ｂ］の平均値を示す。

[請求項13] Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインと、１種又は２種以上の被験物質との反応、およびα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンと、１種又は２種以上の被験物質との反応を、Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインおよびα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンを含むｐＨ８．０の混合液を用いて行い、

［Ｃ］≧４．９％　かつ　［Ｂ］／［Ａ］≧０．９を満たす場合、または

［Ｂ］≧１０％を満たす場合

には、被験物質は呼吸器感作性物質であると判定する、請求項１１に記載の呼吸器感作性の測定方法：

上記の式中、［Ａ］は、Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインの減少率を示し、［Ｂ］は、α－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンの減少率を示し、［Ｃ］は、［Ａ］と［Ｂ］の平均値を示す。

[請求項14] 請求項１３に記載の判定により被験物質が呼吸器感作性ではないと判定された後にさらに、

Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインと、１種又は２種以上の被験物質との反応、およびα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンと、１種又は２種以上の被験物質との反応を、Ｎ－（アリ

ールアルキルカルボニル）システインおよびα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンを含むｐＨ１０．２の混合液を用いて行い、［Ｂ］≧２０％を満たす場合には、被験物質は呼吸器感作性物質であると判定する、

請求項１３に記載の呼吸器感作性の測定方法。

[請求項15] 前記判定により、ジイソシアネート類を呼吸器感作性物質と判定する、請求項１から１４の何れか一項に記載の呼吸器感作性の測定方法。

[請求項16] Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）システインまたはα－Ｎ－（アリールアルキルカルボニル）リジンを測定主薬として含む呼吸器感作性測定試薬であって、１種又は２種以上の被験物質の呼吸器感作性を、紫外線検出器を用いた光学的測定により測定するための、呼吸器感作性測定試薬。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/012167

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G01N 33/483(2006.01)i; G01N 33/52(2006.01)i; G01N 21/64(2006.01)i; G01N 21/78(2006.01)i
FI: G01N21/78 C; G01N33/483 C; G01N33/52 C; G01N21/64 Z
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N33/483; G01N33/52; G01N21/64; G01N21/78; C12Q1/00-3/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2021
Registered utility model specifications of Japan	1996-2021
Published registered utility model applications of Japan	1994-2021

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LALKO, J. F. et al, "The Direct Peptide Reactivity Assay: Selectivity of Chemical Respiratory Allergens", Toxicological Sciences, 19 June 2012, vol. 129, pp. 421-431, doi:10.1093/toxsci/kfs205 whole document	1-16
A	ARTS, J., "How to assess respiratory sensitization of low molecular weight chemicals?", International Journal of Hygiene and Environmental Health, 12 February 2020, vol. 225, Article No. 113469, pp. 1-8, doi:10.1016/j.ijheh.2020.113469 pp. 5-6, "4.2.2. In chemico/in vitro sensitization testing"	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
01 June 2021 (01.06.2021)	08 June 2021 (08.06.2021)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/012167

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DIK, S. et al., "Can the Direct Peptide Reactivity Assay Be Used for the Identification of Respiratory Sensitization Potential of Chemicals?", Toxicological Sciences, 29 July 2016, vol. 153, no. 2, pp. 361-371, doi:10.1093/toxsci/kfw130 whole document	1-16
A	NORTH, C. M. et al., "Developing a framework for assessing chemical respiratory sensitization: A workshop report", Regulatory Toxicology and Pharmacology, 07 July 2016, vol. 80, pp. 295-309, doi:10.1016/j_yrtph.2016.06.006 Whole document	1-16
A	HEMMING, J. D. C. et al., "Application of the direct peptide reactivity assay (DPRA) to inorganic compounds: a case study of platinum species", Toxicology Research, 20 November 2019, vol. 8, pp. 802-814, doi:10.1039/c9tx00242a whole document	1-16
A	MIZOGUCHI, I. et al., "Prediction of Chemical Respiratory and Contact Sensitizers by OX40L Expression in Dendritic Cells Using a Novel 3D Coculture System", Frontiers in Immunology, 04 August 2017, vol. 8, Article No. 929, pp. 1-12, doi: 10.3389/fimmu.2017.00929 whole document	1-16
A	JP 2018-505655 A (SENZAGEN AB) 01 March 2018 (2018-03-01)	1-16
A	US 2015/0111771 A1 (SENZAGEN AB) 23 April 2015 (2015-04-23)	1-16
A	JP 2011-059102 A (FUJIFILM CORPORATION) 24 March 2011 (2011-03-24)	1-16
A	JP 2014-037995 A (FUJIFILM CORPORATION) 27 February 2014 (2014-02-27)	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2021/012167

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 2018-505655 A	01 Mar. 2018	US 2017/0285010 A1 WO 2016/083604 A1 EP 3224618 A1 CA 2964294 A1 KR 10-2017-0102874 A CN 107250793 A	
US 2015/0111771 A1	23 Apr. 2015	US 2017/0283874 A1 WO 2013/160882 A1 EP 2841599 A1 CA 2871350 A1 CN 104685067 A	
JP 2011-059102 A	24 Mar. 2011	(Family: none)	
JP 2014-037995 A	27 Feb. 2014	(Family: none)	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2021/012167

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

G01N 33/483(2006.01)i; G01N 33/52(2006.01)i; G01N 21/64(2006.01)i; G01N 21/78(2006.01)i
FI: G01N21/78 C; G01N33/483 C; G01N33/52 C; G01N21/64 Z

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

G01N33/483; G01N33/52; G01N21/64; G01N21/78; C12Q1/00-3/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２１年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２１年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２１年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	LALKO, J. F. et al, The Direct Peptide Reactivity Assay: Selectivity of Chemical Respiratory Allergens, Toxicological Sciences, 2012.06.19, Vol. 129, pp. 421-431, doi: 10.1093/toxsci/kfs205 Whole document	1-16
A	ARTS, J., How to assess respiratory sensitization of low molecular weight chemicals?, International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2020.02.12, Vol. 225, Article No. 113469, pp. 1-8, doi: 10.1016/j.ijheh.2020.113469 第5-6ページ「4.2.2. In chemico/in vitro sensitization testing」	1-16
A	DIK, S. et al., Can the Direct Peptide Reactivity Assay Be Used for the Identification of Respiratory Sensitization Potential of Chemicals?, Toxicological Sciences, 2016.07.29, Vol. 153, No. 2, pp. 361-371, doi: 10.1093/toxsci/kfw130 Whole document	1-16

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
"E" 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
"L" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
"P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
"T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
"X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
"Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
"&" 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
01.06.2021	08.06.2021

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
赤木　貴則 2W 1763
電話番号 03-3581-1101 内線 3258

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	North, C. M. et al., Developing a framework for assessing chemical respiratory sensitization: A workshop report, Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2016.07.07, Vol. 80, pp. 295-309, doi: 10.1016/j.yrtph.2016.06.006 Whole document	1-16
A	HEMMING, J. D.C. et al., Application of the direct peptide reactivity assay (DPRA) to inorganic compounds: a case study of platinum species, Toxicology Research, 2019.11.20, Vol. 8, pp. 802-814, doi: 10.1039/c9tx00242a Whole document	1-16
A	MIZOGUCHI, I. et al., Prediction of Chemical Respiratory and Contact Sensitizers by OX40L Expression in Dendritic Cells Using a Novel 3D Coculture System, Frontiers in Immunology, 2017.08.04, Vol. 8, Article No. 929, pp. 1-12, doi: 10.3389/fimmu.2017.00929 Whole document	1-16
A	JP 2018-505655 A (センソシェン アクティエ ボラーグ) 01.03.2018 (2018-03-01)	1-16
A	US 2015/0111771 A1 (SENZAGEN AB) 23.04.2015 (2015-04-23)	1-16
A	JP 2011-059102 A (富士フイルム株式会社) 24.03.2011 (2011-03-24)	1-16
A	JP 2014-037995 A (富士フイルム株式会社) 27.02.2014 (2014-02-27)	1-16

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2021/012167

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2018-505655 A	01.03.2018	US 2017/0285010 A1	
		WO 2016/083604 A1	
		EP 3224618 A1	
		CA 2964294 A1	
		KR 10-2017-0102874 A	
		CN 107250793 A	
US 2015/0111771 A1	23.04.2015	US 2017/0283874 A1	
		WO 2013/160882 A1	
		EP 2841599 A1	
		CA 2871350 A1	
		CN 104685067 A	
JP 2011-059102 A	24.03.2011	（ファミリーなし）	
JP 2014-037995 A	27.02.2014	（ファミリーなし）	