

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6749685号
(P6749685)

(45) 発行日 令和2年9月2日(2020.9.2)

(24) 登録日 令和2年8月14日(2020.8.14)

(51) Int.Cl.		F I		
GO 1 N 30/88	(2006.01)	GO 1 N 30/88		J
GO 1 N 33/50	(2006.01)	GO 1 N 33/50		Q

請求項の数 4 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2016-92093 (P2016-92093)	(73) 特許権者	390011442 株式会社マンドム 大阪府大阪市中央区十二軒町5番12号
(22) 出願日	平成28年4月28日(2016.4.28)	(73) 特許権者	000002901 株式会社ダイセル 大阪府大阪市北区大深町3番1号
(65) 公開番号	特開2017-198637 (P2017-198637A)	(74) 代理人	110002239 特許業務法人後藤特許事務所
(43) 公開日	平成29年11月2日(2017.11.2)	(72) 発明者	白井 健二 兵庫県神戸市東灘区岡本八丁目9番1号 学校法人甲南学園内
審査請求日	平成31年2月15日(2019.2.15)	(72) 発明者	目片 秀明 大阪市中央区十二軒町5番12号 株式会社マンドム内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 被験物質の皮膚感作性の検定方法

(57) 【特許請求の範囲】

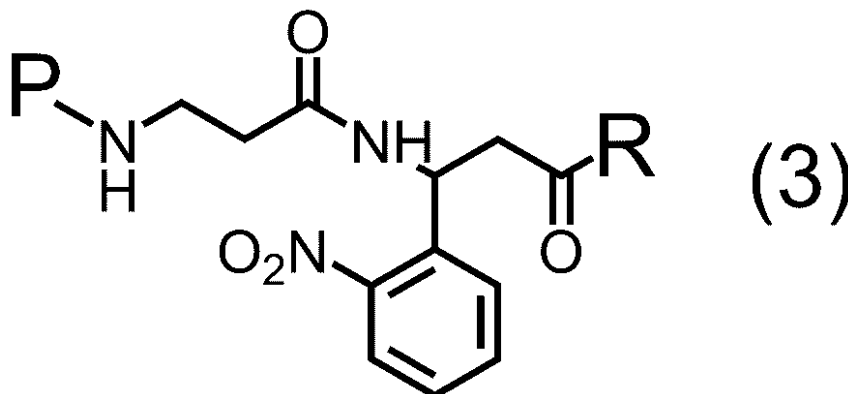
【請求項1】

皮膚感作性物質との結合能を有するペプチドと樹脂とが切断リンカーを介して結合した樹脂固定ペプチドに被験物質を接触させた後、

ペプチドと被験物質との結合の有無を測定する被験物質の皮膚感作性の検定方法であって、

前記の樹脂固定ペプチドが、下記式(3)で表されることを特徴とする被験物質の皮膚感作性の検定方法。

【化1】



10

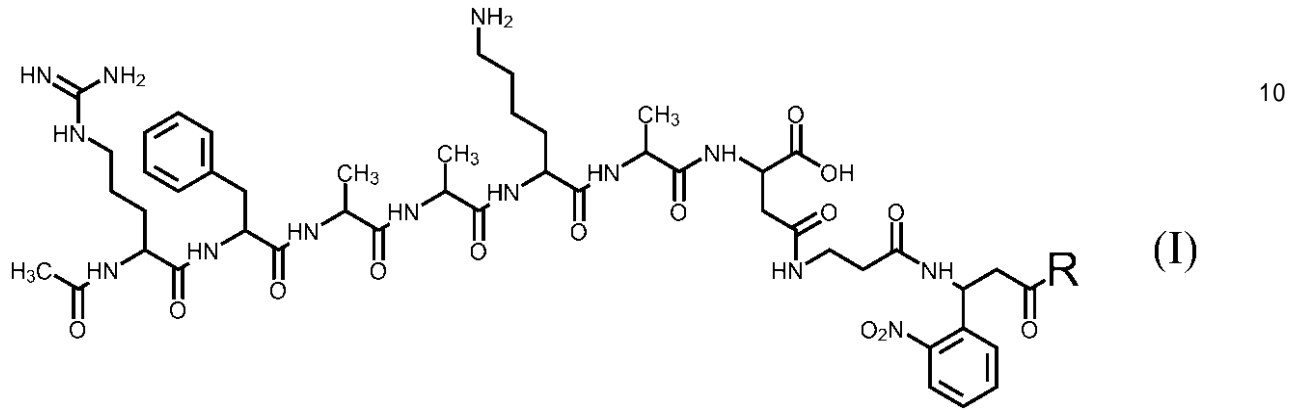
20

(式中、Pはリジン残基を1個以上含むペプチド又はシステイン残基を1個以上含むペプチドであって、アミノ酸の重合度が1～10であるペプチドを示す。Rはポリオキシアルキレンポリオールを含む樹脂を示す。)

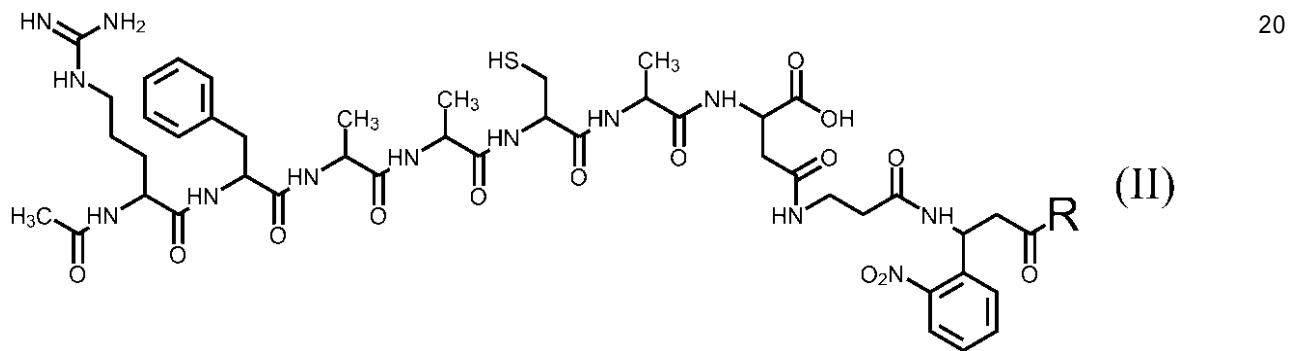
【請求項2】

前記の樹脂固定ペプチドが、下記式(I)又は(II)で表されることを特徴とする請求項1に記載の被験物質の皮膚感作性の検定方法。

【化2】



【化3】



(式中、Rはポリオキシアルキレンポリオールを含む樹脂を示す。)

【請求項3】

前記の樹脂固定ペプチドに被験物質を接触させた後、前記の樹脂固定ペプチドのリンカ一部を切断し、生成したペプチド部位を含む化合物について、ペプチドと被験物質との結合の有無を測定することを特徴とする請求項1又は2に記載の被験物質の皮膚感作性の検定方法。

【請求項4】

ペプチドと被験物質との結合の有無を、クロマトグラフィー法を用いて測定する請求項1～3の何れか1項に記載の被験物質の皮膚感作性の検定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、被験物質の皮膚感作性の検定方法に関する。

【背景技術】

【0002】

皮膚感作性物質は生体の感受性によっては重篤なアレルギー反応を誘発する。したがって、医薬品、農薬、食料品、化粧品、及び洗剤等の開発において、その原料や添加剤、最終製品等には皮膚感作性物質が含まれていないことが要求されており、これを確認する方法として種々の皮膚感作性試験が報告されている。

【0003】

これらの皮膚感作性試験としては、被験物質を実験動物に適用する試験である、Maximization試験、Buehler試験、Local Lymph Node Assay等が挙げられる。しかし、この様な

10

20

30

40

50

試験においては、実験動物の飼育及び管理等の必要があるだけでなく、皮膚観察等の作業が煩雑である等の問題があった。また、動物愛護の観点からも代替し得る方法を見出すことが求められていた。

【0004】

このような問題を解決する方法として、DPRA (Direct Peptide Reactivity Assay) 等のペプチド結合性を指標にする *in vitro* の試験系が開発されている (非特許文献 1 ~ 3)。この試験法は、皮膚感作性物質との結合性を有するペプチドを試薬として用い、被験物質と混合した後、HPLCクロマトグラフィーを用いて混合前後のペプチド減少率を算出することで、被験物質に含まれる皮膚感作性物質の有無を評価するものである。

【先行技術文献】

10

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献 1】G.F.Gerberick et al., Development of a Peptide Reactivity Assay for Screening. *Toxicol. Sci.*, 81, 332-343:2004.

【非特許文献 2】G.F.Gerberick et al., Quantification of Chemical Peptide Reaction for Screening Contact Allergens: A Classification Tree Model Approach. *Toxicol. Sci.*, 97(2), 417-427:2007.

【非特許文献 3】EURL ECVAM Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for Skin Sensitisation Testing. European Commission, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection (IHCP), EU Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL ECVAM), November 2013.

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかしながら、これらの試験系では、水に対する溶解性が低い被験物質は試験そのものが実施できないといった問題があった。また、検定試薬 (ペプチド) にはシステイン残基を含むものがあり、ペプチド間でジスルフィド結合を形成することにより皮膚感作性物質との結合性が消失するため、皮膚感作性試験の精度が低下するといった問題があった。さらに、HPLCクロマトグラフィーを用いて混合前後のペプチド減少率を算出する際、被験物質 (の一部) がペプチドと溶出時間が重なることがあり、正確なペプチド減少率を算出する事ができないといった問題があった。

30

【0007】

従って、本発明の目的は、種々の被験物質に対して適応可能であり、簡便かつ迅速に、さらに高い精度で被験物質の皮膚感作性を検定する方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意検討した結果、特定の樹脂固定ペプチドを用いて被験物質の皮膚感作性の検定を行った場合、簡便かつ迅速に、さらに高い精度で被験物質の皮膚感作性を検定できることを見出し、本発明を完成させた。

【0009】

40

すなわち、本発明は、皮膚感作性物質との結合能を有するペプチドと樹脂とが切断リンカーを介して結合した樹脂固定ペプチドに被験物質を接触させた後、ペプチドと被験物質との結合の有無を測定することを特徴とする被験物質の皮膚感作性の検定方法を提供する。

【0010】

また、前記の樹脂固定ペプチドに被験物質を接触させた後、前記の樹脂固定ペプチドのリンカー部を切断し、生成したペプチド部位を含む化合物について、ペプチドと被験物質との結合の有無を測定することを特徴とする前記の検定方法を提供する。

【0011】

また、前記のペプチドは、リジン残基を 1 個以上含むペプチドであるか、又はシステイ

50

ン残基を1個以上含むペプチドであることが好ましい。

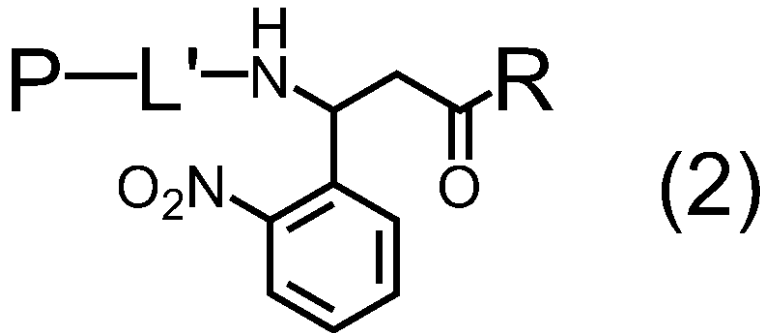
【0012】

また、ペプチドと被験物質との結合の有無を、クロマトグラフィー法を用いて測定する前記の検定方法についても提供する。

【0013】

また、本発明では皮膚感作性物質との結合能を有するペプチドと樹脂とが切断リンカーを介して結合した樹脂固定ペプチドに被験物質を接触させた後、ペプチドと被験物質との結合の有無を測定する被験物質の皮膚感作性の検定方法であって、前記の樹脂固定ペプチドが、下記式(2)で表されることを特徴とする被験物質の皮膚感作性の検定方法についても提供する。

【化1】

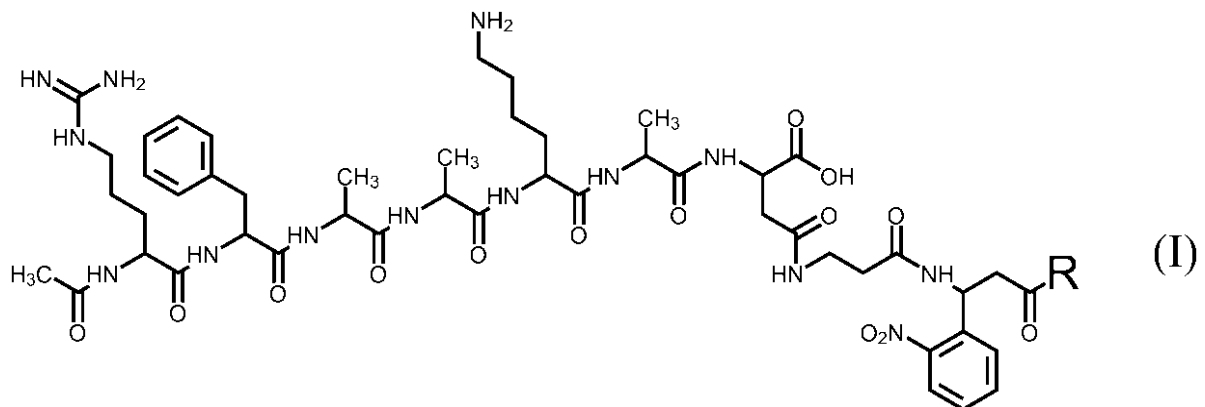


(式中、Pはリジン残基を1個以上含むペプチド又はシステイン残基を1個以上含むペプチドを示す。L'は2価の炭化水素基、エーテル結合、チオエーテル結合、エステル結合、アミド結合、カルボニル基、又はこれらの2以上が結合した2価の基を示す。Rは樹脂を示す。)

【0014】

また、本発明では皮膚感作性物質との結合能を有するペプチドと樹脂とが切断リンカーを介して結合した樹脂固定ペプチドに被験物質を接触させた後、ペプチドと被験物質との結合の有無を測定する被験物質の皮膚感作性の検定方法であって、前記の樹脂固定ペプチドが、下記式(I)又は(II)で表されることを特徴とする被験物質の皮膚感作性の検定方法についても提供する。

【化2】

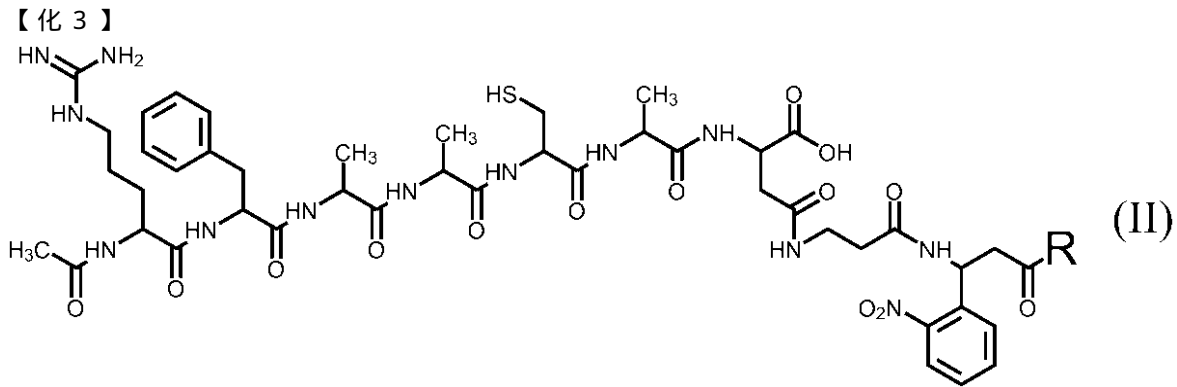


10

20

30

40



10

(式中、Rは樹脂を示す。)

【発明の効果】

【0015】

本発明により、種々の被験物質に対して適応可能であり、簡便かつ迅速に、さらに高い精度で被験物質の皮膚感作性を検定する方法を提供することができる。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明の被験物質の皮膚感作性の検定方法（以下、「本発明の検定方法」と称する場合がある）は、皮膚感作性物質との結合能を有するペプチドと樹脂とが切断リンカーを介して結合した樹脂固定ペプチド（以下、「樹脂固定ペプチド」と称する場合がある）に被験物質を接触させた後、ペプチドと被験物質との結合の有無を測定することを特徴とする。なお、樹脂固定ペプチドは本発明の検定方法における試薬（以下、「本発明の検定試薬」と称する場合がある）として用いることができる。

20

【0017】

<被験物質の皮膚感作性の検定方法>

本発明の検定方法は、特定の樹脂固定ペプチドに被験物質を接触させた後、ペプチドと被験物質との結合の有無を測定することを特徴とする。被験物質に皮膚感作性物質が含まれる場合は、樹脂固定ペプチドと被験物質とを接触させることで、被験物質に含まれる皮膚感作性物質が樹脂固定ペプチドのペプチド部位と反応・結合し、結合物が生じる。一方、被験物質に皮膚感作性物質が含まれない場合は、前記の結合物は生じない。本発明は、この様な結合の有無（結合物の有無）を測定することで、被験物質に皮膚感作性物質が含まれるか否かを判断するものである。

30

【0018】

なお、前記の樹脂固定ペプチドに被験物質を接触させた後、前記の樹脂固定ペプチドのリンカー部を切断し、生成したペプチド部位を含む化合物について、ペプチドと被験物質との結合の有無を測定してもよい。また、ペプチドと被験物質との結合の有無を、クロマトグラフィー法を用いて測定してもよい。

【0019】

本発明の検定方法は、例えば、樹脂固定ペプチドと被験物質とを接触させた後、その混合物から、樹脂固定ペプチド及び/又は樹脂固定ペプチドと被験物質（皮膚感作性物質）との結合物を分離し、得られた樹脂固定ペプチド（被験物質と結合したものを含む）のリンカー部を切断し、切断により生じたペプチド部位を含む化合物（被験物質と結合したものを含む）を分離した後、ペプチドと被験物質との結合の有無を測定することを特徴としてもよい。

40

【0020】

つまり、本発明の検定方法では、下記の工程A～工程Eを含んでもよい。

工程A：樹脂固定ペプチドと被験物質とを接触させる工程

工程B：工程Aにより得られた混合物から、樹脂固定ペプチド（被験物質と結合したものを含む）を分離する工程

50

工程 C : 工程 B で分離した樹脂固定ペプチド (被験物質と結合したものを含む) のリンカー部を切断する工程

工程 D : 工程 C にて生じたペプチド部位を含む化合物 (被験物質と結合したものを含む) を分離する工程

工程 E : 工程 D にて分離されたペプチド部位を含む化合物 (被験物質と結合したものを含む) について、ペプチドと被験物質との結合の有無を測定する工程

【 0 0 2 1 】

[工程 A]

本発明の検定方法における工程 A は、樹脂固定ペプチドと被験物質とを接触させる工程である。本工程において、被験物質に皮膚感作性物質が含まれる場合は、樹脂固定ペプチドと被験物質とを接触させることにより、樹脂固定ペプチドのペプチド部位と皮膚感作性物質とが結合することとなる。接触させる方法としては、例えば、樹脂固定ペプチドと被験物質とを溶媒中で混合させる方法が挙げられる。また、混合した後に静置する工程を有していても良い。

10

【 0 0 2 2 】

工程 A における接触時間は特に限定されないが、1分～120時間程度が好ましく、より好ましくは5分～48時間程度、さらに好ましくは10分～36時間程度である。工程 A における温度 (反応温度) は 0 ～ 100 程度が好ましく、より好ましくは 10 ～ 60 程度、さらに好ましくは 20 ～ 40 程度である。

【 0 0 2 3 】

工程 A において使用される溶媒としては、被験物質を溶解することが可能なものであれば特に限定されず、例えば、水、リン酸ナトリウム、酢酸アンモニウム等の水性緩衝液、有機溶媒、又はこれらの混合溶媒を用いることができる。有機溶媒としては、ジメチルスルホキシド (DMSO)、N, N - ジメチルホルムアミド (DMF)、N, N - ジメチルアセトアミド (DMAc)、N - メチル - 2 - ピロリドン (NMP)、2 - ピロリドン、アセトニトリル、アセトン、クロロホルム、ヘキサン、シクロヘキサン、オリーブ油等植物油、炭素数 1 ～ 4 の一価のアルコール等が挙げられる。炭素数 1 ～ 4 の一価のアルコールとしては、メタノール、エタノール、n - プロパノール、イソプロパノール、n - ブタノール、イソブタノール等が挙げられる。これらの溶媒は 1 種又は 2 種以上を選択して使用することもできる。

20

【 0 0 2 4 】

[工程 B]

本発明の検定方法における工程 B は、工程 A にて得られた混合物から、樹脂固定ペプチド (被験物質と結合したものを含む) を分離する工程である。工程 B における分離方法としては、例えば、遠心分離、フィルターろ過による分離、磁性ビーズを利用した分離等が挙げられる。なお、工程 B にて用いられる溶媒は特に限定されず、例えば、工程 A にて例示したものをを用いることができる。

30

【 0 0 2 5 】

遠心分離は、工程 A を経て得られた混合物を遠心分離に付すことで、混合物中の樹脂固定ペプチド (被験物質と結合したものを含む) と、樹脂固定ペプチドとは結合していない被験物質とを分離する方法である。例えば、前記の混合物を遠心分離に付した後に上清を取り除くことで、前記の樹脂固定ペプチドを高い純度で得ることができる。

40

【 0 0 2 6 】

フィルターろ過による分離は、工程 A を経て得られた混合物をフィルターろ過に付すことで、樹脂固定ペプチド (被験物質と結合したものを含む) と、樹脂固定ペプチドとは結合していない被験物質とをサイズの大小によって分離する方法であり、これらのサイズの差が大きい場合に特に有効である。例えば、前記の混合物をフィルターろ過に付すことにより、前記の樹脂固定ペプチドを高い純度で得ることができる。

【 0 0 2 7 】

磁性ビーズを利用した分離は、樹脂固定ペプチド (被験物質と結合したものを含む) の

50

樹脂部分に磁性ビーズを使用した場合に有効な分離方法であり、磁性ビーズと磁石の磁力を利用した分離方法である。具体的には、工程 A を経て得られた混合物に磁石を接触させることで、磁石に樹脂固定ペプチド（被験物質と結合したものを含む）を付着させ、樹脂固定ペプチドとは結合していない被験物質と分離する方法である。なお、磁石から樹脂固定ペプチドを解離させる方法としては、例えば、磁石の磁力を失わせる方法（例えば、磁石として電磁石を用いる方法）が挙げられる。また、磁石に樹脂固定ペプチドが付着した状態において、後述の工程 C 及び D を行うことにより、切断リンカーの一部を含むペプチド（被験物質と結合したものを含む）を得る方法も挙げられる。これにより、樹脂固定ペプチド（被験物質と結合したものを含む）や、切断リンカーの一部を含むペプチド（被験物質と結合したものを含む）を高い純度で得ることができる。

10

【 0 0 2 8 】

本発明の検定方法が工程 B を含む場合、工程 A を経て得られた混合物から樹脂固定ペプチドとは結合能の無い被験物質を除去できるため、樹脂固定ペプチドと被験物質（皮膚感作性物質）とが結合した樹脂固定ペプチドのみが得られることとなり、その結果、皮膚感作性の検定精度が向上する。

【 0 0 2 9 】

[工程 C]

本発明の検定方法における工程 C は、工程 B で分離した樹脂固定ペプチド（被験物質と結合したものを含む）のリンカー部を切断する工程である。これにより、切断リンカーの一部を含むペプチド（被験物質と結合したものを含む）と、切断リンカーの一部を含む樹脂が得られる。なお、切断リンカーの一部を含むペプチドを、「ペプチド部位を含む化合物」と称する場合がある。なお、工程 C にて用いられる溶媒は特に限定されず、例えば、工程 A にて例示したものをを用いることができる。

20

【 0 0 3 0 】

工程 C において、光により切断する場合、その切断方法は特に限定されないが、例えば、樹脂固定ペプチド（被験物質と結合したものを含む）に対して光を照射する方法が挙げられる。照射する光の種類は特に限定されないが、例えば、紫外線（波長 315 nm ~ 380 nm）が挙げられる。また、光源としては特に限定されないが、低圧水銀灯、中圧水銀灯、高圧水銀灯、超高圧水銀灯、ケミカルランプ、ブラックライトランプ、マイクロウェーブ励起水銀灯、メタルハライドランプ等が好ましく用いられる。

30

【 0 0 3 1 】

工程 C において、アルカリにより切断する場合、その切断方法は特に限定されないが、例えば、樹脂固定ペプチド（被験物質と結合したものを含む）を含む溶液に、アルカリ溶液を混合すること等が挙げられる。使用されるアルカリとしては特に限定されないが、例えば、アンモニア、ヒドラジン、トリエチルアミン、水素化ホウ素ナトリウム、水酸化ナトリウムを用いることができる。アルカリ溶液は、これらのアルカリを溶媒（例えば、水、有機溶媒、又はこれらの混合溶媒等）に溶解させることで調製することができる。

【 0 0 3 2 】

工程 C において、光、又はアルカリ以外の切断方法としては、加熱によるもの、酸によるもの、酵素反応によるもの等が挙げられる。

40

【 0 0 3 3 】

本発明の検定方法が工程 C を含む場合、ペプチド部位を含む化合物（被験物質と結合したものを含む）と、切断リンカーの一部を含む樹脂とが得られる。これらは、その物性（例えば分子量や、サイズ等）が異なるため、種々の分離方法（例えば、工程 D における分離方法）により分離することができる。

【 0 0 3 4 】

[工程 D]

本発明の検定方法における工程 D は、工程 C にて生じたペプチド部位を含む化合物（被験物質と結合したものを含む）を分離する工程である。より具体的には、工程 B における分離方法として例示した、遠心分離、フィルターろ過による分離、磁性ビーズを利用した

50

分離等により、工程 C にて生じるペプチド部位を含む化合物（被験物質と結合したものを含む）を分離し、切断リンカーの一部を含む樹脂を除去する工程である。なお、工程 D にて用いられる溶媒は特に限定されず、例えば、工程 A にて例示したものをを用いることができる。

【0035】

本発明の検定方法が工程 D を含む場合、純度の高いペプチド部位を含む化合物（被験物質と結合したものを含む）が得られるため、より皮膚感作性の検定精度が向上する。

【0036】

[工程 E]

本発明の検定方法における工程 E は、工程 D にて分離されたペプチド部位を含む化合物（被験物質と結合したものを含む）について、ペプチドと被験物質との結合の有無を測定する工程である。具体的な測定方法としては特に限定されないが、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、順相クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー法（TLC）等のクロマトグラフィー法を用いた方法が挙げられる。具体的には、例えば、樹脂固定ペプチドと被験物質とを接触させて得られるサンプル（溶液）と、樹脂固定ペプチドのみを含むリファレンス（溶液）とを用意し、必要に応じて上記の工程 B ~ D を行った後にそれぞれをクロマトグラフィー法にて測定し、得られる量比（例えば HPLC にて得られるピークの面積）の差から、ペプチドと被験物質との結合物が生じているか否かを判断する方法が挙げられる。

【0037】

本発明の検定方法におけるクロマトグラフィー法以外の測定方法としては、例えば、核磁気共鳴（NMR）分光法や、マトリクス支援レーザーイオン化（MALDI）法、エレクトロスプレーイオン化（ESI）法、大気圧化学イオン化（APCI）法、電子衝撃イオン化（EI）法、高速原子衝撃イオン化（FAB）法等を用いた質量分析法、赤外分光法（IR法）等の本分野において公知乃至慣用の方法を用いることができる。なお、これらの測定方法は2以上を組み合わせることもできる。

【0038】

<樹脂固定ペプチド>

本発明の樹脂固定ペプチドは、皮膚感作性物質との結合能を有するペプチド（以下、「ペプチド」と称する場合がある）と樹脂とが切断リンカーを介して結合した樹脂固定ペプチドである。なお、本発明の樹脂固定ペプチドは下記式（1）で表すことができ、式中の P は皮膚感作性物質との結合能を有するペプチド（ペプチド部位）、L は切断リンカー（リンカー部位）、R は樹脂（樹脂部位）を示す。



【0039】

前記のペプチドは、皮膚感作性物質との結合能を有するペプチドであれば特に限定されない。また、前記のペプチドは保護基を有していても良い。この様なペプチドとしては、例えば、リジン残基を1個以上含むペプチドや、システイン残基を1個以上含むペプチドが挙げられる。これらのペプチドは、皮膚感作性物質とリジン残基やシステイン残基を介して結合する。皮膚感作性物質との結合能を有するペプチドにおけるアミノ酸の重合度は特に限定されないが、例えば3~20であることが好ましく、より好ましくは4~15、さらに好ましくは5~10である。

【0040】

切断リンカーはペプチドに含まれる何れかのアミノ酸と結合していてもよいが、皮膚感作性物質との結合能の観点からは、ペプチドのC末端又はN末端のアミノ酸と結合していることが好ましい。なお、前記の切断リンカーがペプチドのC末端又はN末端のアミノ酸と結合している場合、ペプチドのC末端又はN末端のアミノ酸の側鎖を介して結合していてもよいし、ペプチドのC末端のカルボキシル基又はN末端のアミノ基を介して結合していてもよい。この中でも、皮膚感作性物質との結合能の観点から、前記の切断リンカーがペプチドのC末端又はN末端のアミノ酸の側鎖を介して結合していることが好ましい。

【0041】

切断リンカーがペプチドのアミノ酸の側鎖を介して結合している場合のアミノ酸としては、リジン（K）、アルギニン（R）、アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）、システイン（C）等の側鎖に反応性官能基を有するアミノ酸であることが好ましい。

【0042】

前記のリジン残基を1個以上含むペプチドは、例えば、ペプチド配列として、RFAAKADやRFAAKAAを含むペプチドであることが好ましく、より好ましくはN末端及び/又はC末端に保護基を有していてもよいH-RFAAKAD-OHやH-RFAAKAA-OHである。また、前記のシステイン残基を1個以上含むペプチドは、例えば、ペプチド配列として、RFAACADやRFAACAAを含むペプチドであることが好ましく、より好ましくはN末端及び/又はC末端に保護基を有していてもよいH-RFAACAD-OHやH-RFAACAA-OHである。なお、これらのペプチドは保護基を有していても良い。保護基としては、ペプチド合成において通常用いられる保護基を用いることができ、例えば、N末端保護基（例えば、Ac（アセチル）基、Boc（t-ブチルオキシカルボニル）基、Z（ベンジルオキシカルボニル）基、Fmoc（9-フルオレニルメチルオキシカルボニル）基、C末端保護基（例えば、OBzl（ベンジルエステル）基、OtBu（t-ブチルエステル）基）、およびアミノ酸側鎖の保護基（Tos（トシル）基、Pbf（4-メトキシトリチル）基、Ochex（シクロヘキシルエステル）基、MeBzl（メチルベンジル）基、Trt（トリチル）基）が挙げられる。なお、前記のリジン残基を1個以上含むペプチドであって保護基を有するものとしては、Ac-RFAAKAD-OH等が例示され、前記のシステイン残基を1個以上含むペプチドであって保護基を有するものとしては、Ac-RFAACAD-OH等が例示される。

10

20

【0043】

前記のペプチドが、ペプチド配列として、RFAAKADを含むペプチドである場合、切断リンカーは、皮膚感作性物質との結合能の観点から、アスパラギン酸（D）の側鎖のカルボキシル基を介して結合することがさらに好ましい。なお、前記のペプチドが、ペプチド配列として、RFAACADを含むペプチドである場合も同様である。

【0044】

前記の切断リンカーとしては、例えば、光切断リンカー（光により切断することが可能なリンカー）、アルカリ切断リンカー（アルカリにより切断することが可能なリンカー）、熱切断リンカー（熱により切断することが可能なリンカー）、酸切断リンカー（酸により切断することが可能なリンカー）、酵素切断リンカー（酵素により切断することが可能なリンカー）が挙げられ、光切断リンカーやアルカリ切断リンカーが好ましく用いられる。これらのリンカーの分子量は特に限定されないが、60～1000程度であることが好ましく、より好ましくは100～400である。

30

【0045】

光切断リンカーとしては、公知の光切断リンカーを適宜選択して使用することができ、特に限定されないが、2-ニトロベンゼン骨格、5-ニトロフェノール骨格、ニトロインドール骨格、又はクマリン骨格を有する光切断リンカー等を挙げることができ、この中でも2-ニトロベンゼン骨格、5-ニトロフェノール骨格を有する光切断リンカーが好ましい。

40

【0046】

光切断リンカーは、例えば光切断リンカー剤により導入することができる。このような光切断リンカー剤としては、例えば、Fmoc-Phg(2-NO₂)-(C#CH₂)OH（渡辺化学工業株式会社製：2-ニトロベンゼン骨格を有する光切断リンカー剤）等を挙げることができる。

【0047】

アルカリ切断リンカーとしては、公知のアルカリ切断リンカーを適宜選択して使用することができ、特に限定されないが、例えば、4-ヒドロキシメチル安息香酸を含むアルカリ切断リンカー等を挙げることができる。なお、アルカリ切断リンカーは、アルカリ切断リンカー剤により導入することができるが、アルカリ切断リンカー剤としては、4-ヒド

50

ロキシメチル安息香酸を含むリンカー剤が挙げられる。

【0048】

樹脂としては、特に限定されないが、例えば、ポリオキシアルキレンポリオール（例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール等）、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸、ポリアクリル酸エステル、ポリエステル（例えば、ポリエチレンテレフタレート、ポリエチレンナフタレート、ポリブチレンテレフタレート、ポリブチレンナフタレート等）、ポリオレフィン（例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、エチレン-プロピレン共重合体等）、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、及びこれらを2種以上組み合わせた樹脂（例えば、これらの共重合体）が挙げられる。また、磁性ビーズとして使用可能な樹脂を用いることができる。なお、本発明の検定方法において、使用する溶媒に対して不溶の樹脂を用いた場合は、樹脂固定ペプチドと被験物質の分離（例えば、遠心分離、フィルターろ過による分離）が容易となる。なお、これらの樹脂は、切断リンカーを導入する観点から、アミノ基、カルボキシル基、水酸基等の官能基を有する樹脂が好ましい。この様な樹脂としては、Fmoc-NH-PEG樹脂（渡辺化学工業株式会社製）、Amino PEGA resin、NovaPEG amino resin、NovaSyn TG amino resin（以上、メルク株式会社製）等が挙げられる。また、樹脂としては、切断リンカー（光、又はアルカリ切断リンカー等）を有する樹脂を用いることもできる。この様な樹脂としては、4-[4-(1-Fmoc-aminoethyl)-2-methoxy-5-nitrophenoxy]butyramidomethyl-polystyrene（シグマアルドリッチジャパン株式会社製）、HMB A - P E G樹脂（渡辺化学工業株式会社製）等が挙げられる。

10

【0049】

本発明の樹脂固定ペプチドは、ペプチド部位がシステイン残基を含むペプチドである場合であっても、ペプチド間でジスルフィド結合を形成することが無く、長期間に渡って安定である。これは、ペプチドを樹脂に固定することにより、ペプチドそのものを検定試薬として用いる場合と比べて、ペプチドが有するシステイン残基が反応する機会が少なくなることが一つの要因であると考えられる。

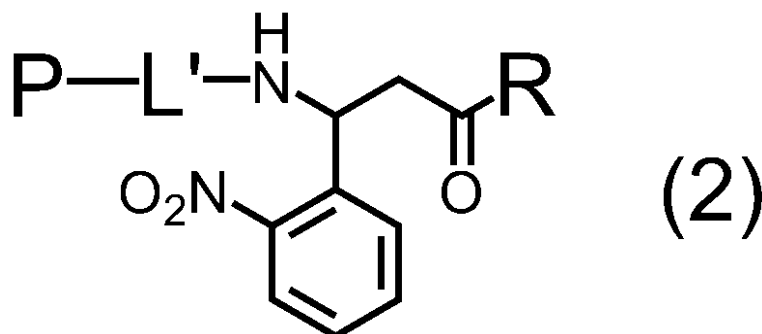
20

【0050】

本発明の樹脂固定ペプチドは、下記式（2）で表される樹脂固定ペプチドであることが好ましい。なお、式（2）中のPは皮膚感作性物質との結合能を有するペプチド部位を示す。なお、Pはリジン残基を1個以上含むペプチド又はシステイン残基を1個以上含むペプチドであることが好ましい。L'はリンカーの一部を示し、例えば、2価の炭化水素基、エーテル結合、チオエーテル結合、エステル結合、アミド結合、カルボニル基、及びこれらの2以上が結合した2価の基が挙げられる。なお、前記の2価の炭化水素基としては、例えば、2価の脂肪族炭化水素基（例えば、2価の直鎖状炭化水素基、又は2価の分岐鎖状炭化水素基）、2価の脂環式炭化水素基、2価の芳香族炭化水素基、及びこれらの2以上が結合した2価の炭化水素基であって、炭素数1~20（好ましくは炭素数2~10）の炭化水素基が挙げられる。Rは樹脂を示す。

30

【化4】

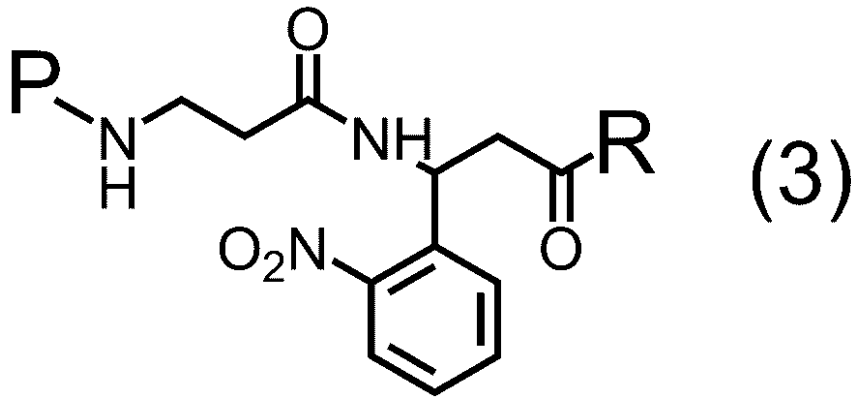


40

【0051】

また、樹脂固定ペプチドは、下記式（3）で表される樹脂固定ペプチドであることが好ましい。なお、式中のP及びRは式（2）におけるものと同様である。

【化5】

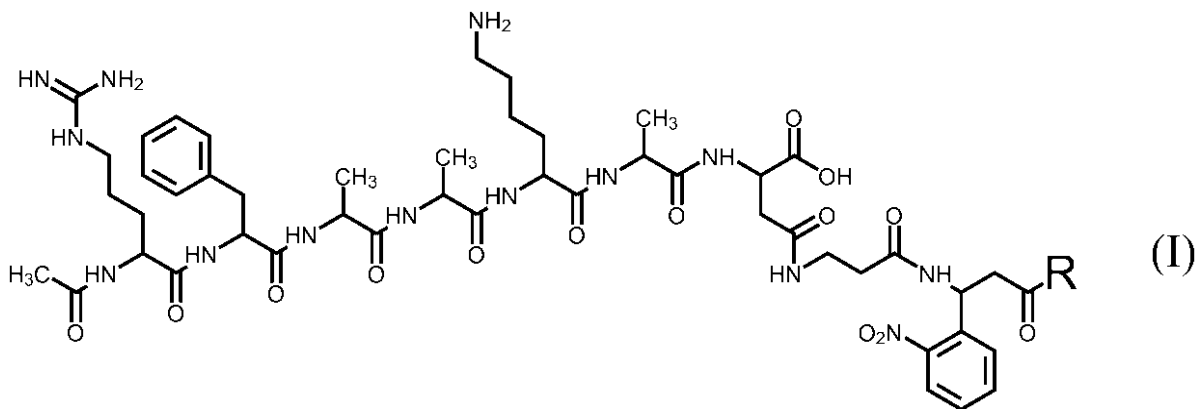


10

【0052】

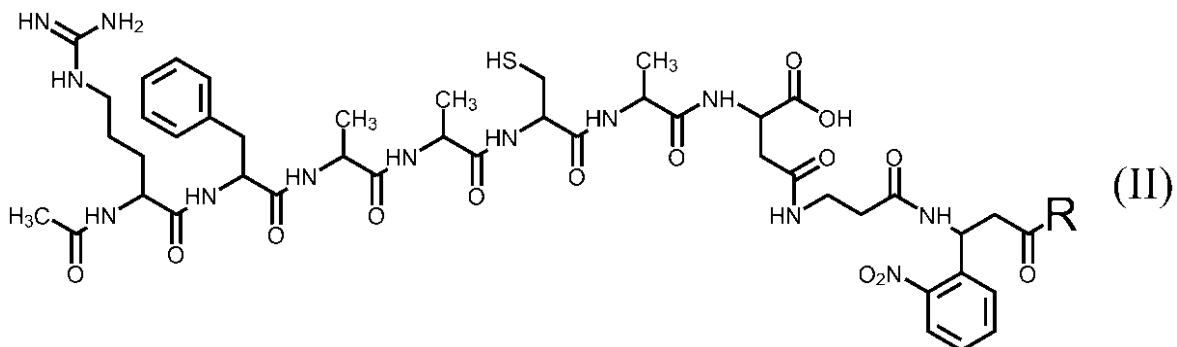
さらにまた、前記の樹脂固定ペプチドは、下記式(I)又は(II)で表される樹脂固定ペプチドであることが好ましい。なお、式中のRは式(2)におけるものと同様である。

【化6】



20

【化7】



30

【0053】

本発明の樹脂固定ペプチドの製造方法は特に限定されないが、例えばペプチド固相合成法等を用いて製造することができる。具体的には、表面をアミノ基等で修飾した樹脂を固相として用い、光、又はアルカリ切断リンカー剤と反応させた後、脱水反応によって1つずつアミノ酸鎖を伸長していくことでペプチド部位を作製する方法が挙げられる。なお、切断リンカーを有する樹脂を用い、脱水反応によって1つずつアミノ酸鎖を伸長していくことでペプチド部位を作製する方法であってもよい。

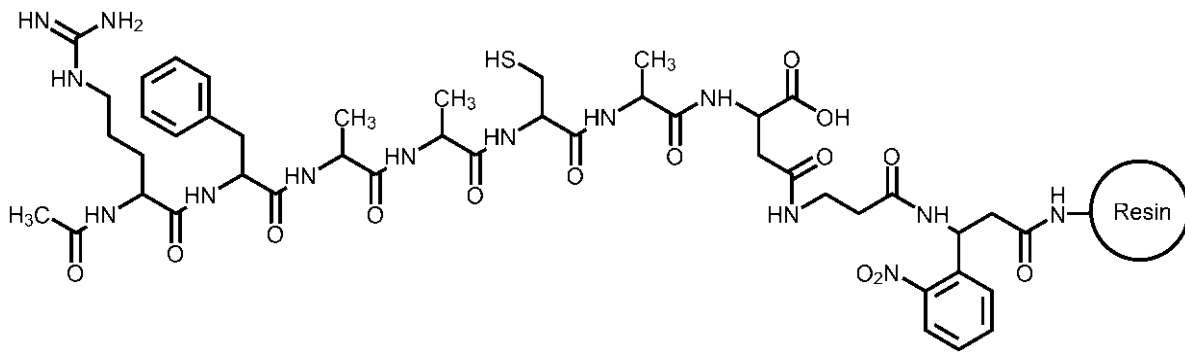
40

【0054】

本発明の検定試薬は前記の樹脂固定ペプチドのみからなるものであってもよく、さらに1種又は2種以上の添加剤を含んでもよい。添加剤としては、例えば、pH調整剤、安定化剤、溶媒等を含んでもよい。なお、本発明の検定試薬は、固体状(粉末状、顆

50

【化9】



10

【0061】

なお、樹脂固定ペプチド(1)及び(2)の作製にて用いた NH_2 -PEG樹脂、Fmoc-Phg(2-NO₂)-(C#CH₂)OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Asp-Otbu、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OHは全て渡辺化学工業株式会社の製品である。

【0062】

[実施例1(エチルアクリレートの皮膚感作性の検定1)]

以下の操作手順でエチルアクリレートの皮膚感作性を検定した。

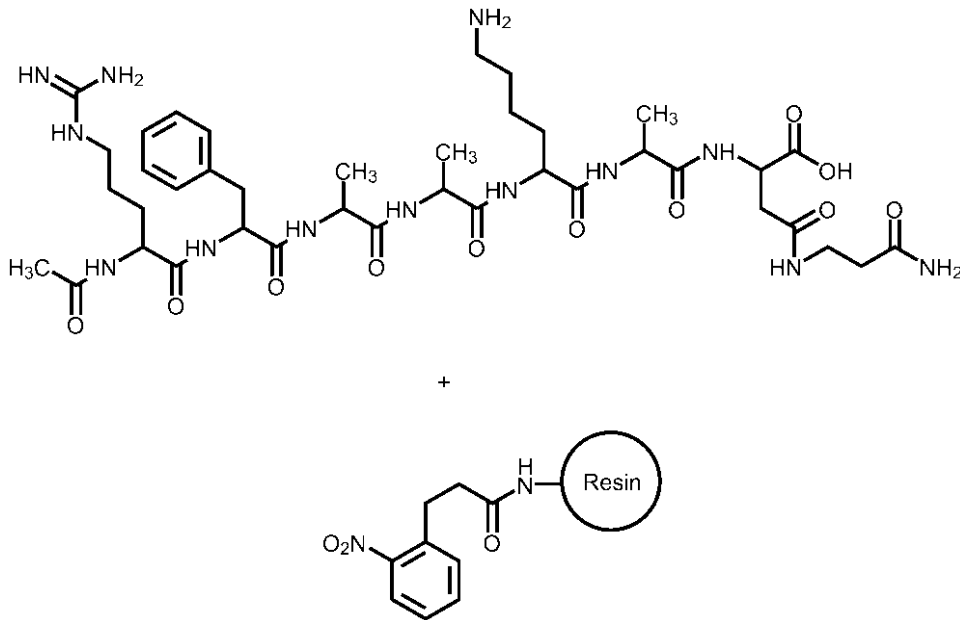
1mgの樹脂固定ペプチド(1)を、5mlのチューブ(株式会社ハイベップ研究所製)に入れ、500 μ lのDMFで5回洗浄した後、500 μ lのA溶媒(水:TFA(体積比)=100:0.1)で5回洗浄した。次に、1mlの0.1重量%トリエチルアミンを含むDMFにエチルアクリレートの濃度が100mMになるように添加して調製したものに樹脂固定ペプチド(1)を添加し、24時間反応させた。次に、500 μ lのDMFで5回洗浄した後、500 μ lのA溶媒で5回洗浄した。次に、A溶媒を500 μ l加えて攪拌した後、ピペットを使用してエッペンドルフチューブに回収した。次に、1500rpm \times 1minの条件で遠心し、上清を廃棄した後、再度A溶媒を500 μ l加えて攪拌する操作を4回繰り返した。次に、400 μ lのA溶媒を投入し、紫外-可視ファイバ光源(浜松ホトニクス、LED光源用コントローラ(C11924))を用い、光量80%、照射距離:5cmの条件で、20分間、光(波長:約365nm)を照射した。次に、光照射後の試料を遠心(15000rpm \times 1min)し、その上清をフィルター(ミリポア0.45 μ m 100/pk:メルク社製)へ移すと共に、遠心(15000rpm \times 1min)し、100 μ lとなった所でHPLC測定(カラム;zorbax社製SB-C18(2.1 \times 100mm)、A溶媒;水:TFA(体積比)=100:0.1、B溶媒;アセトニトリル:TFA=100:0.08、グラジエント;0分/B溶媒10%、11分/B溶媒90%;流速:0.35ml/分)を行った。以下に、樹脂固定ペプチド(1)に光を照射して得られる切断物のモデルを示す。

20

30

【0063】

【化 1 0】



10

【 0 0 6 4 】

[実施例 2 (シクラメンアルデヒドの皮膚感作性の検定 1)]

エチルアクリレートの代わりにシクラメンアルデヒドを用いたこと以外は実施例 1 と同様に、H P L C 測定を行った。

20

【 0 0 6 5 】

(実施例 1 及び 2 のリファレンス)

皮膚感作性物質 (エチルアクリレート) を用いないこと以外は実施例 1 と同様に、H P L C 測定を行った。

【 0 0 6 6 】

[実施例 3 (エチルアクリレートの皮膚感作性の検定 2)]

樹脂固定ペプチド (1) の代わりに樹脂固定ペプチド (2) を用いたこと以外は実施例 1 と同様に、H P L C 測定を行った。

【 0 0 6 7 】

[実施例 4 (シクラメンアルデヒドの皮膚感作性の検定 2)]

樹脂固定ペプチド (1) の代わりに樹脂固定ペプチド (2) を用いたこと以外は実施例 2 と同様に、H P L C 測定を行った。

30

【 0 0 6 8 】

(実施例 3 及び 4 のリファレンス)

皮膚感作性物質を用いないこと以外は実施例 3 と同様に、H P L C 測定を行った。

【 0 0 6 9 】

< 評価 >

実施例 1 にて得られた H P L C のチャートと、そのリファレンスにて得られた H P L C のチャートとを比較することで、樹脂固定ペプチドのペプチド部位に由来する溶出ピーク面積が減少することを確認した。このことから、実施例 1 において、樹脂固定ペプチドのペプチド部位にエチルアクリレートが結合したことが示唆された。さらに、樹脂固定ペプチド (1) から切断されたペプチド部分とエチルアクリレートとの結合物に由来すると考えられる溶出ピークが見られた。また、実施例 2 ~ 4 においても同様の結果が得られた。

40

フロントページの続き

- (72)発明者 宮 崎 洋
兵庫県姫路市網干区新在家1239 株式会社ダイセル内
- (72)発明者 山下 邦彦
兵庫県姫路市網干区新在家1239 株式会社ダイセル内

審査官 高田 亜希

- (56)参考文献 国際公開第2006/011673(WO, A1)
特開平10-259197(JP, A)
特表2012-525131(JP, A)
米国特許第06391980(US, B1)
韓国公開特許第2011-0081462(KR, A)
ペプチド結合性試験, 皮膚感作性試験評価報告書, JaCVAM皮膚感作性試験資料編纂委員会, 2015年 2月 6日, P1-16

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 30/00 - 30/96
B01J 20/281 - 20/292
G01N 33/48 - 33/98
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)