

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02010/024091

発行日 平成24年1月26日 (2012. 1. 26)

(43) 国際公開日 平成22年3月4日 (2010. 3. 4)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 B O 2 4
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 S	4 B O 6 3
G O 1 N 33/577 (2006.01)	G O 1 N 33/577 B	
G O 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/50 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 22 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2010-526634 (P2010-526634)	(71) 出願人 504145342 国立大学法人九州大学 福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2009/063696	
(22) 国際出願日 平成21年7月31日 (2009. 7. 31)	
(31) 優先権主張番号 特願2008-217239 (P2008-217239)	(71) 出願人 000001959 株式会社 資生堂 東京都中央区銀座7丁目5番5号
(32) 優先日 平成20年8月26日 (2008. 8. 26)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	
	(74) 代理人 100080089 弁理士 牛木 護
	(74) 代理人 100137800 弁理士 吉田 正義
	(74) 代理人 100148253 弁理士 今枝 弘充
	(74) 代理人 100148079 弁理士 梅村 裕明

最終頁に続く

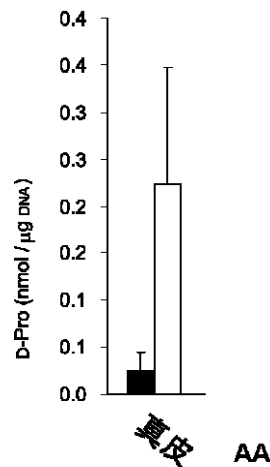
(54) 【発明の名称】 D a o 1 - / - マウスを活用したD-アミノ酸関連疾患の評価・スクリーニング方法

(57) 【要約】

D A O 酵素欠損マウスと他の疾患モデルマウスとの交配実験で生産される多数の動物から D a o 1 - / - のホモ接合体を迅速に選別し、多数のサンプルに含まれる D - アミノ酸を迅速に定量測定することができる評価方法を開発する。

本発明は、マウスの生体組織又は該生体組織由来の培養組織細胞に対する試験条件による影響の評価方法であって、D a o 1 - / - マウス等を用意するステップと、前記 D a o 1 - / - マウス等の生体組織等を前記試験条件に曝露するステップと、前記 D a o 1 - / - マウス等の生体組織等を前記試験条件に曝露したことによる影響を分析するステップとを含む、評価方法を提供する。

【図7-2】



AA DERMIS

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(1) $Da o 1^{+ / +}$ の遺伝子型を有するマウスと、 $Da o 1^{- / -}$ の遺伝子型を有するマウスとを用意するステップと、

(2) 前記 $Da o 1^{+ / +}$ の遺伝子型を有するマウスと、前記 $Da o 1^{- / -}$ の遺伝子型を有するマウスとの生体組織又は該生体組織由来の培養組織細胞を試験条件に曝露するステップと、

(3) 前記 $Da o 1^{+ / +}$ の遺伝子型を有するマウスと、前記 $Da o 1^{- / -}$ の遺伝子型を有するマウスとの生体組織又は該生体組織由来の培養組織細胞を前記試験条件に曝露したことによる影響を分析するステップとを含むことを特徴とする、マウスの生体組織又は該生体組織由来の培養組織細胞に対する試験条件による影響の評価方法。

10

【請求項 2】

前記ステップ(1)は、 $Da o 1^{+ / +}$ 、 $+ / -$ 及び $- / -$ の遺伝子型のマウスを個体識別するステップと、前記個体識別されたマウス個体のそれぞれから染色体 DNA を抽出するステップと、前記抽出された染色体 DNA のうち第 7 エクソンを含む領域を増幅して増幅 DNA 断片を得るステップと、前記増幅 DNA 断片を Hpa I I 制限酵素で消化するステップと、前記増幅 DNA 断片の制限酵素消化産物を分析するステップとを含む、 $Da o 1^{+ / +}$ 、 $+ / -$ 及び $- / -$ 遺伝子型の判定方法によって、前記 $Da o 1^{+ / +}$ の遺伝子型を有するマウスと、前記 $Da o 1^{- / -}$ の遺伝子型を有するマウスとを選別することを含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の評価方法。

20

【請求項 3】

前記増幅 DNA 断片を得るステップは、配列番号 1 及び 2 に列挙されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドプライマーを用いて増幅することを含むことを特徴とする、請求項 2 に記載の評価方法。

【請求項 4】

前記 $Da o 1^{+ / +}$ の遺伝子型を有するマウスと、 $Da o 1^{- / -}$ の遺伝子型を有するマウスとは、他の遺伝子のうち少なくとも 1 個について対立遺伝子の組合せが同一であることを特徴とする、請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 つに記載の評価方法。

【請求項 5】

前記他の遺伝子の対立遺伝子の組合せは $H r^{- / -}$ を含むことを特徴とする、請求項 4 に記載の評価方法。

30

【請求項 6】

前記ステップ(3)は、前記ステップ(2)の前に、前記 $Da o 1^{+ / +}$ の遺伝子型を有するマウスと、前記 $Da o 1^{- / -}$ の遺伝子型を有するマウスとの生体組織又は該生体組織由来の培養組織細胞中の D - アミノ酸含有量を測定すること、前記ステップ(2)の後に、前記試験条件に曝露した後で、前記 $Da o 1^{+ / +}$ の遺伝子型を有するマウスと、前記 $Da o 1^{- / -}$ の遺伝子型を有するマウスとの生体組織又は該生体組織由来の培養組織細胞中の D - アミノ酸含有量を測定すること、及び、前記ステップ(2)の前に測定された D - アミノ酸含有量と、前記ステップ(2)の後に測定された D - アミノ酸含有量とを比較することを含む、請求項 1 ないし 5 のいずれかに記載の評価方法。

40

【請求項 7】

前記 D - アミノ酸含有量は、光学分割カラム系を用いるカラムクロマトグラフィーによって測定されることを特徴とする、請求項 6 に記載の評価方法。

【請求項 8】

前記 D - アミノ酸含有量は、光学異性体を識別するモノクローナル抗体を用いる免疫学的手法によって測定されることを特徴とする、請求項 6 に記載の評価方法。

【請求項 9】

前記 D - アミノ酸は D - プロリンであることを特徴とする、請求項 6 ないし 8 のいずれか 1 つに記載の評価方法。

【請求項 10】

50

前記 D - アミノ酸含有量を測定する生体組織又は該生体組織由来の培養組織細胞は、真皮、表皮、腎臓、膵臓、精巣、副腎、小脳、下垂体及び血清からなるグループから選択される 1 種または 2 種以上の生体組織又は該生体組織由来の培養組織細胞であることを特徴とする、請求項 6 ないし 9 のいずれか 1 つに記載の評価方法。

【請求項 11】

前記 D - アミノ酸は D - プロリンであり、該 D - プロリンは光学分割カラムを用いるカラムクロマトグラフィーによって測定され、前記生体組織は真皮又は表皮であることを特徴とする、請求項 10 に記載の評価方法。

【請求項 12】

D a o 1 + / + 及び H r - / - の遺伝子型を有するマウスと、D a o 1 - / - 及び H r - / - の遺伝子型を有するマウスと、配列番号 1 及び 2 に列挙するヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドプライマーと、プロリンの光学異性体を識別する光学分割カラム系とを含むことを特徴とする、請求項 11 に記載の評価方法を実施するための評価システム。

10

【請求項 13】

医薬品及び / 又は化粧料の候補物質を請求項 12 に記載の評価システムによって評価することを特徴とする、医薬品及び / 又は化粧料の候補物質のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、マウスの生体組織又は該生体組織由来の培養組織細胞に対する試験条件による影響の評価方法と、該評価スクリーニング方法を実施するための評価システムと、該評価システムを用いる医薬品及び / 又は化粧料候補物質に関する。

20

【背景技術】

【0002】

グリシン以外の全てのアミノ酸には D 型と L 型という 2 種類の光学異性体が存在する。L - アミノ酸は生物のタンパク質合成に用いられており、タンパク質に含まれるアミノ酸はほとんど L - アミノ酸である。これに対して D - アミノ酸は下等生物の一部の生理活性ペプチドに含まれるが、その多くは翻訳後修飾のプロセスを経て生合成される。そこで、タンパク質又はペプチドを構成するアミノ酸は主に L - アミノ酸であり、D - アミノ酸は例外的な存在である。

30

【0003】

D - アミノ酸は細菌の細胞壁のペプチドグリカンの構成成分である。また、ペプチドを構成しない遊離の D - アミノ酸については、水棲動物や昆虫などの下等動物において存在することは以前から報告されていた。しかし、高等動物に存在するアミノ酸は L 型であって、D 型は微量しか存在しないと信じられていた時代があった（非特許文献 1）。

【非特許文献 1】Corrigan J.J., Science 164:142-149 (1969)

【0004】

しかし、ヒトを含む哺乳類における D - アミノ酸の存在とその役割については、近年の光学分割法をはじめとする分析法の進歩によってようやく明らかになってきた（非特許文献 2）。D - アスパラギン酸は抗 D - アスパラギン酸抗体を用いた二重染色法などにより、ラット下垂体においてプロラクチン産生細胞に局在することが明らかになった。また、ラット下垂体由来の細胞株でプロラクチンを合成、分泌する細胞に D - アスパラギン酸を与えることによりプロラクチン分泌が用量依存的に増加した。以上のことからプロラクチン産生細胞において D - アスパラギン酸がプロラクチンの分泌を制御していると考えられている（非特許文献 3）。

40

【非特許文献 2】Hamase K, Morikawa A, and Zaitzu K., J Chromatogr B 781: 73-91 (2002)

【非特許文献 3】D'Aniello Aら、FASEB J 14: 699-714 (2000)

【0005】

50

一方、ラット精巢の静脈では他の静脈血よりも常に高濃度の D - アスパラギン酸が検出されていることに加え、ラット精巢から単離、精製した L e y d i g 細胞に D - アスパラギン酸を加えることによりテストステロンの合成及び分泌が用量依存的に促進されることが報告されている（非特許文献 4）。

【非特許文献 4】Nagata Yら、FEBS Lett. 444:160-164 (1999)

【0006】

D - セリンは統合失調症に関連すると推察されている N M D A 受容体のグリシン結合部位を選択的に刺激し、グルタミン酸の本受容体を介する作用を増強することで神経伝達を促進することが報告されている（非特許文献 5）。実際に D - セリンの投与により統合失調症が改善することや、統合失調症患者では血清中の D - セリン濃度が健常者よりも低いことが報告されている。

10

【非特許文献 5】Nishikawa T、Biol. Pharm. Bull. 28: 1561-1565 (2005)

【0007】

皮膚科学との関連のある知見として、D - アスパラギン酸が水晶体のようなタンパク質のターンオーバーが起こりにくい組織に存在するとの報告がある（非特許文献 6）。また、D - アスパラギン酸は皮膚では老齢の被検者の日焼けした皮膚の弾性繊維には含まれるが、日焼けしていない皮膚の弾性繊維には含まれないことから、皮膚の弾性繊維における D - アスパラギン酸形成に UV 曝露が強い関連があることを示唆する報告がある（非特許文献 7）。

【非特許文献 6】Fujii N、Biol. Pharm. Bull. 28: 1585-1589 (2005)

20

【非特許文献 7】Fujii N.ら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 294, 1047-1051 (2002)

【0008】

しかしながらヒトを含む哺乳類における D - アミノ酸の存在及び役割を探るうえで大きい障害は、D - アミノ酸が速やかに分解されてしまうことである。D - アミノ酸の分解では、まず、D - アミノ酸が D - アミノ酸オキシダーゼ（EC 1.4.3.3、以下では「D A O 酵素」という。）によって酸化的脱アミノ化されて、対応する α -ケト酸に変換される。その後 α -ケト酸はトランスアミナーゼによって対応する L - アミノ酸に変換される。D A O 酵素は D - アミノ酸だけを特異的に酸化する酵素で、腎臓その他の臓器で発現する（非特許文献 8）。

【非特許文献 8】Hamase K., Konno R., Morikawa A. and Zaitso K., Biol. Pharm. Bull. 28: 1578-1584 (2005)

30

【0009】

D A O 酵素はマウスでは第 5 染色体上の D a o 1 遺伝子にコード化されるが、この遺伝子のミスセンス突然変異体は d d Y マウスで報告された（非特許文献 9）。この突然変異遺伝子（D a o^c 又は D a o^{G181R}）では、第 181 番目の G l y 残基が A r g 残基に置換されており、酵素活性を失ったタンパク質が産生される。したがって D A O 酵素活性を失活した表現型は劣性遺伝する。劣性ホモ接合体の個体（以下、「D A O 酵素欠損マウス」という。）では D - アラニン及び D - セリンの血中濃度が 5 ないし 8 倍に上昇し、運動失調（a t a x i a）及び常套行動（s t e r e o t y p i c b e h a v i o r）を示す（非特許文献 10）。D A O 酵素欠損マウスと他の疾患モデルマウスとの交配実験については報告がない。

40

【非特許文献 9】Konno R. and Yasumura Y., Genetics 103: 277-285 (1983)

【非特許文献 10】Hashimoto A., Yoshikawa M., Niwa A. and Konno R., Brain Res. 1033:210-215 (2005)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

D A O 酵素欠損マウスと他の疾患モデルマウスとの交配実験で生産される多数の動物から D a o^{G181R} / D a o^{G181R} のホモ接合体を迅速に選別する必要がある。また D - アミノ酸の存在量は L - アミノ酸の存在量の約 1 % 以下しかない場合があるため、微

50

量の D - アミノ酸を大量の L - アミノ酸から分離して検出する必要がある。さらに、多数のマウス個体由来のサンプルや、多数の異なる組織由来のサンプルや、多数の試験条件に曝露されたサンプルに含まれる D - アミノ酸を迅速に定量測定する必要がある。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明はマウスの生体組織又は該生体組織由来の培養組織細胞に対する試験条件による影響の評価方法を提供する。前記評価スクリーニング方法は、(1) $Da o 1^{+ / +}$ の遺伝子型を有するマウスと、 $Da o 1^{- / -}$ の遺伝子型を有するマウスとを用意するステップと、(2) 前記 $Da o 1^{+ / +}$ の遺伝子型を有するマウスと、前記 $Da o 1^{- / -}$ の遺伝子型を有するマウスとの生体組織又は該生体組織由来の培養組織細胞を前記試験条件に曝露するステップと、(3) 前記 $Da o 1^{+ / +}$ の遺伝子型を有するマウスと、前記 $Da o 1^{- / -}$ の遺伝子型を有するマウスとの生体組織又は該生体組織由来の培養組織細胞を前記試験条件に曝露したことによる影響を分析するステップとを含む。

10

【0012】

本発明の評価方法において前記ステップ(1)は、 $Da o 1^{+ / +}$ 、 $+ / -$ 及び $- / -$ 又は $- / -$ の遺伝子型の判定方法によって、前記 $Da o 1^{+ / +}$ の遺伝子型を有するマウスと、前記 $Da o 1^{- / -}$ の遺伝子型を有するマウスとを選別する場合がある。前記判定方法は、 $Da o 1^{+ / +}$ 、 $+ / -$ 及び $- / -$ の遺伝子型のマウスを個体識別するステップと、前記個体識別されたマウス個体のそれぞれから染色体 DNA を抽出するステップと、前記抽出された染色体 DNA のうち第 7 エクソンを含む領域を増幅して増幅 DNA 断片を得るステップと、前記増幅 DNA 断片を Hpa I I 制限酵素で消化するステップと、前記増幅 DNA 断片の制限酵素消化産物を分析するステップとを含む場合がある。

20

【0013】

本発明の評価方法において前記増幅 DNA 断片を得るステップは、配列番号 1 及び 2 に列挙されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドプライマーを用いて増幅することを含む場合がある。

【0014】

本発明の評価方法において、前記 $Da o 1^{+ / +}$ の遺伝子型を有するマウスと、 $Da o 1^{- / -}$ の遺伝子型を有するマウスとは、他の遺伝子のうち少なくとも 1 個について対立遺伝子の組合せが同一である場合がある。

30

【0015】

本発明の評価方法において、前記他の遺伝子の対立遺伝子の組合せは $H r^{- / -}$ を含む場合がある。

【0016】

前記ステップ(3)は、前記ステップ(2)の前に、前記 $Da o 1^{+ / +}$ の遺伝子型を有するマウスと、前記 $Da o 1^{- / -}$ の遺伝子型を有するマウスとの生体組織又は該生体組織由来の培養組織細胞中の D - アミノ酸含有量を測定すること、前記ステップ(2)の後に、前記試験条件に曝露した後で、前記 $Da o 1^{+ / +}$ の遺伝子型を有するマウスと、前記 $Da o 1^{- / -}$ の遺伝子型を有するマウスとの生体組織又は該生体組織由来の培養組織細胞中の D - アミノ酸含有量を測定すること、及び、前記ステップ(2)の前に測定された D - アミノ酸含有量と、前記ステップ(2)の後に測定された D - アミノ酸含有量とを比較することを含む場合がある。

40

【0017】

本発明の評価方法において、前記 D - アミノ酸含有量は、光学分割カラムを用いるカラムクロマトグラフィーによって測定される場合がある。

【0018】

本発明の評価方法において、前記 D - アミノ酸含有量は、光学異性体を識別するモノクローナル抗体を用いる免疫学的手法によって測定される場合がある。

【0019】

本発明の評価方法によってマウスの生体組織又は該生体組織由来の培養組織細胞に対す

50

る試験条件による影響が評価されるD - アミノ酸はD - プロリンの場合がある。

【0020】

前記D - アミノ酸含有量を測定する生体組織又は該生体組織由来の培養組織細胞は、真皮、表皮、腎臓、膵臓、精巣、副腎、小脳、下垂体及び血清からなるグループから選択される1種または2種以上の生体組織又は該生体組織由来の培養組織細胞の場合がある。

【0021】

本発明の評価方法によってマウスの生体組織又は該生体組織に対する試験条件による影響が評価されるD - アミノ酸はD - プロリンであり、該D - プロリンは光学分割カラムを用いるカラムクロマトグラフィーによって測定され、前記生体組織は真皮又は表皮である場合がある。

10

【0022】

本発明は、本発明の評価方法を実施するための評価システムを提供する。前記評価システムは、 $Da o 1^{+ / +}$ 及び $H r^{- / -}$ の遺伝子型を有するマウスと、 $Da o 1^{- / -}$ 及び $H r^{- / -}$ の遺伝子型を有するマウスと、配列番号1及び2に列挙するヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドプライマーと、プロリンの光学異性体を識別する光学分割カラムとを含む。

【0023】

本発明は、医薬品及び/又は化粧料の候補物質を本発明の評価システムによって評価することを特徴とする、医薬品及び/又は化粧料の候補物質のスクリーニング方法を提供する。

20

【0024】

本明細書において $Da o 1$ と表記される遺伝子は、D - アミノ酸オキシダーゼ1というマウスの遺伝子であって、米国ジャクソン研究所のMouse Genome Informaticsプロジェクトのホームページ (<http://www.informatics.jax.org/javawi2/servlet/WIFetch?page=markerDetail&key=7803>) に詳細な説明が公開されている。 $Da o 1$ 遺伝子の突然変異としては $Da o 1^{G 1 8 1 R}$ が知られている (http://www.informatics.jax.org/searches/allele_report.cgi?_Marker_key=7803&int:_Set_key=847160)。本発明における $Da o 1^{-}$ の遺伝子型は、 $Da o 1^{G 1 8 1 R}$ を含むが、これに限定されない、いずれかのD - アミノ酸オキシダーゼ1の酵素活性欠失突然変異アレルの遺伝子型を意味する。本発明における $Da o 1^{+}$ の遺伝子型は、D - アミノ酸オキシダーゼ1酵素について野生型、すなわち、 $Da o 1$ 遺伝子がコード化するタンパク質の第181番目のアミノ酸残基がグリシンである酵素と同じか、あるいは、実質的に同じであって、D - アミノ酸の分解が野生型と同じか、あるいは、実質的に同じ程度に進行するアレルの遺伝子型を意味する。

30

【0025】

本発明における $Da o 1^{+}$ 及び $^{-}$ の遺伝子型を有するマウスは、他のいずれかの遺伝子のアレルを有する場合がある。前記他の遺伝子は、ホモ接合体が特異的な表現型を有する場合もあれば、ヘテロ接合体が特異的な表現型を有する場合もある。したがって、本発明において、前記他の遺伝子のうち少なくとも1個について対立遺伝子の組合せが同一であるような条件下で、 $Da o 1^{+ / +}$ の遺伝子型を有するマウスと、 $Da o 1^{- / -}$ の遺伝子型を有するマウスとでマウスの生体組織又は該生体組織由来の培養組織細胞中のD - アミノ酸含有量に対する試験条件による影響の評価を行う場合がある。前記試験条件による影響は、前記他の遺伝子のうち少なくとも1個についての対立遺伝子の第1の組合せの表現形質と、該対立遺伝子の第2の組合せの表現形質とに対する $Da o 1$ 遺伝子型の作用の相違に対する前記試験条件による影響の場合がある。

40

【0026】

前記他の遺伝子は、疾患モデルの表現型を示す場合の他、D - アミノ酸の合成又は分解の代謝経路に關与する遺伝子や、老化、免疫、ストレス反応、栄養、運動、感覚、記憶、行動、血液循環、消化、排泄、生殖その他のマウスの各臓器又は全身の健康に關係するいかなる遺伝子でも構わない。前記他の遺伝子は、例えば、肥満マウス ($Le p^{ob} / Le$

50

p^{o b})、胸腺依存性免疫不全マウス (Foxn1^{n u} / Foxn1^{n u})、老化促進マウス (Senescence Accelerated Mouse、SAMP1 / Tas1c、SAMP6 / Tas1c、SAMP8 / Tas1c 及び / 又は SAMP10 / Tas1c) 関節炎自然発症マウス (Laq1^{M R L} / Laq1^{M R L}) 及びヘアレスマウス (Hr^{h r} / Hr^{h r}) を含むがこれらに限定されない疾患モデルマウスの原因遺伝子の場合がある。Hr 遺伝子の産物は、ジョンズ・ホプキンス大学の Online Inheritance of Man というホームページによれば、体毛形成に關与する転写因子であると考えられている (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=602302>)。前記 Mouse Genome Informatics プロジェクトのホームページによれば、マウスでは、Hr^{h r} のような MLV プロウイルスの挿入による自然発生突然変異体の他、トランスジーンの挿入その他による偶発的に作成された突然変異体やノックアウトマウスなど、いくつかのアレルが報告されている (<http://www.informatics.jax.org/imsr/fetch?page=imsrSummary&op:gsymname=%3D&gsymname=Hr&gsymnameBreadth=C>)。本発明における Hr^{h r} の遺伝子型は、Hr^{h r} を含むが、これに限定されない、いずれかの Hr 遺伝子産物の機能欠損により、Hr^{h r} のホモ接合体の成体には体毛がない遺伝子型を意味する。

10

【0027】

本発明において、前記他の遺伝子のうち少なくとも1個について対立遺伝子の組合せが同一であるような条件下で D - アミノ酸含有量に対する試験条件による影響の評価を行う場合には、本発明の評価方法におけるステップ(1)では、Da o 1⁺ / ⁺、⁺ / ⁻ 及び / 又は ⁻ / ⁻ 遺伝子型の判定方法に加えて、前記他の遺伝子のうち少なくとも1個について遺伝子型を判定することを含む場合がある。

20

【0028】

本発明の評価方法におけるステップ(1)が Da o 1⁺ / ⁺、⁺ / ⁻ 及び / 又は ⁻ / ⁻ 遺伝子型の判定方法によって選別される場合において、マウスの個体識別は、マウスの飼育ケージ及び / 又はマウスの身体を標識することによって行われる。マウスの身体の標識は、耳のパンチング、高周波その他の標識用チップの体内への埋め込みその他当業者に周知のいかなる方法を用いても構わない。

【0029】

本発明の評価方法のステップ(1)における Da o 1⁺ / ⁺、⁺ / ⁻ 及び / 又は ⁻ / ⁻ 遺伝子型の判定は、いかなる手順で行っても構わない。Da o 1 遺伝子型の判定は、少量の生体組織その他の生物学的材料を各マウス個体から回収して、これに含まれる Da o 1 遺伝子又はその遺伝子産物を解析することによって行われる。好ましい Da o 1 遺伝子型の判定方法は、Da o 1 遺伝子産物の第181番目のアミノ酸残基をコード化する Da o 1 遺伝子配列を弁別することができる方法である。マウス個体からの染色体 DNA 回収と、Da o 1 遺伝子型の解析とは当業者に周知ないかなる方法を用いても構わない。Da o 1 遺伝子型の解析には、PCR法、SMA P法、LAMP法等の遺伝子増幅法を用いる場合がある。Da o 1 遺伝子の異なる遺伝子型の弁別は、染色体 DNA 又は増幅された DNA に対する特定の制限酵素の切断の有無の他、オリゴヌクレオチドプライマーの違いによる増幅の有無によって行われる場合がある。前記特定の制限酵素の切断の有無及び / 又は増幅の有無は、増幅された DNA を分離したり、制限酵素消化後の染色体 DNA を分離した後、前記特定の制限酵素の切断部位の切断の有無を検出可能なプローブを用いたサザンプロット法により該プローブと反応する電気泳動バンドパターンを得ることによっておこなっても構わない。好ましい Da o 1 遺伝子の異なる遺伝子型の弁別は、以下に説明する遺伝子増幅法である。

30

40

【0030】

本発明の評価方法における遺伝子増幅法による Da o 1 遺伝子の異なる遺伝子型の弁別は、Da o 1 遺伝子の突然変異部位を制限酵素 Hpa I I が認識することを利用する。図1は本発明の Da o 1 遺伝子型の判定方法に関するヌクレオチド配列のアライメント図である。図1は、Da o 1 遺伝子の染色体 DNA 配列 (Dao1_genomic) のうち Da o 1 遺

50

子の転写開始点から15111番目の塩基と15460番目の塩基との間の野生型配列（配列表の配列番号4）と、*Dao1*^{G181R}突然変異体における点突然変異（転写開始点から15223番目のグアニンがアデニンに置換される。）を含む第7エクソン部分のcDNAの野生型配列（配列表の配列番号3の625番目ないし726番目の塩基）と、本発明の実施例で用いる遺伝子増幅用プライマー（Forward primer（配列番号1）及びReverse primer（配列番号2））と、制限酵素HpaIの認識配列とのアライメント結果を示す。なお、リバーシ・プライマー配列の逆相補体配列（Reverse primer*）を配列表に配列番号5として列挙した。図2は本発明の*Dao1*遺伝子型の判定方法に用いるDNA領域のHpaI制限酵素地図である。野生型染色体DNAの第7エクソンには3カ所HpaI切断部位（下向き矢印）が存在する。このうち最も5'末端側のHpaI認識配列（CCGG）は、*Dao1*^{G181R}突然変異型マウス染色体DNAではCCAGとなり、HpaIによって認識されない（*）。第7エクソン領域は、第6イントロンに位置するフォワード・プライマー（Forward）と、第7イントロンに位置するリバーシ・プライマー（Reverse）とによって増幅される。野生型マウスゲノムDNA由来の増幅産物（Wild type）と、前記突然変異型マウスゲノムDNA由来の増幅産物（*Dao1*^{G181R}）とをHpaIで消化すると、それぞれ、3カ所及び2カ所で切断される。

【0031】

本発明の評価方法におけるD-アミノ酸含量の測定は、当業者に周知ないかなる方法を用いて実施しても構わない。例えば、予めo-フタルアルデヒド（OPA）、N-tert-ブチルオキシカルボニル-L-システイン（Boc-L-Cys）その他の修飾試薬で立体異性特異的にD-及びL-アミノ酸を誘導体化し、その後、ODS-80TsQAのような分析カラムを用いて100mMの酢酸塩緩衝液（pH6.0）とアセトニトリルの混液をグラジエント溶離して分離する方法が、アスパラギン酸、セリン及びアラニンのD型及びL型の同時測定に用いることができる。また、予め4-フルオロ-7-ニトロ-2,1,3-ベンゾキサジアゾール（NBD-F）のような蛍光試薬でD-及びL-アミノ酸を誘導体化し、その後、ODS-80TsQA、Mightysil RP-18GP等のような分析カラムを用いて立体異性非特異的に各アミノ酸を分離した後、Pirkle型キラル固定相カラム（例えばSumichiral OA-2500S又はR）を用いて光学分割して立体異性特異的に分離する方法が、プロリン、ロイシンその他のアミノ酸の微量測定に用いることができる（浜瀬健司及び財津潔、分析化学、53巻、677-690（2004））。本明細書における光学分割カラム系とは、少なくとも光学分割カラムを用いる分離分析系をいい、光学分割カラム以外の分析カラムによる分離分析を含む場合がある。代替的には、アミノ酸の光学異性体を識別するモノクローナル抗体、例えばD-ロイシン、D-アスパラギン酸等に特異的に結合するモノクローナル抗体を用いる免疫学的手法によってD-アミノ酸を定量することができる（特願2008-27650明細書）。

【0032】

本発明における試験条件とは、被験動物に全身的又は局部的に物理的、化学的及び/又は生物学的な処理条件をいう。前記物理的な処理には、紫外線及び赤外線を含む光線や電磁波、音響、振動及び無重力を含む加速度、温度、温水又は冷水による水浴、乾燥又は湿潤等を含むがこれらに限定されない。化学的な処理には、水素イオン、無機物質及び/又は有機物質の適用を含むがこれらに限定されない。生物学的な処理には、食餌、水等の摂取、明暗周期、ケージ面積、ケージの種類、同一ケージに飼育する動物個体数その他の飼育環境、薬物の投与等を含むがこれらに限定されない。本発明における試験条件は、前記のいずれかの処理又はその組合せの場合があり、それぞれの処理を連続的及び/又は断続的に施す場合がある。

【0033】

本発明の評価方法におけるD-アミノ酸含量の測定において、「前記ステップ（2）の後に、前記試験条件に曝露した後で、前記*Dao1*^{+/+}の遺伝子型を有するマウスと、前記*Dao1*^{-/-}の遺伝子型を有するマウスとの生体組織又は該生体組織由来の培養組

10

20

30

40

50

織細胞中の D - アミノ酸含有量を測定すること」は、前記試験条件への曝露が終了した後に D - アミノ酸含有量を測定する場合と、前記試験条件への曝露の途中で D - アミノ酸含有量を測定する場合とを含む。

【0034】

本発明の評価方法によると、 $Da o 1^{+ / +}$ の遺伝子型を有するマウスと、 $Da o 1^{- / -}$ の遺伝子型を有するマウスとに由来する生体組織又は該生体組織由来の培養組織細胞のさまざまな特性に対する前記試験条件による影響を評価することができる。かかる特性は、D - アミノ酸含有量の変動と、D - アミノ酸と代謝経路で関連する他の物質、例えば、L - アミノ酸、ケト酸等の含有量の変動と、これらの物質の代謝、消化吸収、分解排泄に係る消化器、肝臓、腎臓、循環器等の生理的及び/又は病理的特性との他、花粉、ハウスダストその他に対するアレルギー、アトピー、皮膚その他の臓器の移植免疫を含むがこれらに限定されない免疫に関連する特性の変動と、微生物の感染又は微生物との共生に関連する特性の変動と、行動、記憶、感覚その他の神経生物学的な特性の変動と、癌及び/又は細胞増殖の亢進及び/又は抑制に関連する特性の変動と、皮膚その他の臓器における加齢に関する特性、例えば、シワ、脱毛等に関する特性と、保湿性、バリア特性、その他の皮膚の健康及び/又は美容に関連する特性とに対する前記試験条件による影響を評価することができる。

10

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1】本発明の $Da o 1$ 遺伝子型の判定方法に関するヌクレオチド配列のアライメント図。

20

【図2】本発明の $Da o 1$ 遺伝子型の判定方法に用いる DNA 領域の Hpa I I 制限酵素地図。

【図3 - 1】 $Da o 1$ 酵素活性から確認済みの $Da o 1^{+ / +}$ ホモ接合体マウス（第1レーン）、 $Da o 1^{G 1 8 1 R / G 1 8 1 R}$ ホモ接合体マウス（第4レーン）及び $Da o 1^{+ / G 1 8 1 R}$ F1 世代ヘテロ接合体マウス（第2及び3レーン）の染色体 DNA 由来の増幅産物の Hpa I I 分解断片の電気泳動パターン。

【図3 - 2】ヘアレスマウス ($H r^{h r} / H r^{h r}$ 、 $Da o 1^{+ / +}$) と、 $Da o 1$ 酵素欠損マウス ($H r^{+ / +}$ 、 $Da o 1^{G 1 8 1 R / G 1 8 1 R}$) の交配の F2 世代でヘアレス表現型を有する F2 世代のマウス個体 12 匹の染色体 DNA 由来の増幅産物の Hpa I I 分解断片の電気泳動パターン。

30

【図4 - 1】プロリン及び 4 - ヒドロキシプロリンの光学異性体。

【図4 - 2】プロリン及び 4 - ヒドロキシプロリンの光学異性体を同時に分析するシステムのカラム流路図。

【図5】プロリン及び 4 - ヒドロキシプロリンの光学異性体を同時に分析するシステムの第1及び第2カラムの溶出パターンの波形図 (D1 及び D2)。

【図6 - 1】 $Da o 1$ 遺伝子の野生型ホモ接合体マウス ($Da o 1^{+ / +}$) 血清中の L - 型及び D - 型プロリンの光学分割カラムの溶出パターン。

【図6 - 2】 $Da o 1$ 酵素活性欠損型ホモ接合体マウス ($Da o 1^{G 1 8 1 R / G 1 8 1 R}$) 血清中の L - 型及び D - 型プロリンの光学分割カラムの溶出パターン。

40

【図7 - 1】遺伝子型が $Da o 1^{+ / +}$ 及び $Da o 1^{G 1 8 1 R / G 1 8 1 R}$ と判定された個体のさまざまな臓器での D - プロリン存在量を示す棒グラフ。

【図7 - 2】真皮における D - プロリン存在量を比較した棒グラフ。

【図8】 $Da o 1$ 酵素欠損マウスにおける腫瘍細胞の増殖を検討した棒グラフ。

【発明を実施するための形態】

【0036】

以下、本発明について詳細に説明する。本発明の技術的範囲は請求の範囲の記載によって限定されるものであって、本発明の実施例は例示にすぎない。

【実施例1】

【0037】

50

Dao1^{+/+}、^{+/+}、^{+/+}及び^{+/+}又は^{+/+}遺伝子型の判定方法の開発

Dao1^{G181R}は、配列番号3に列挙するDao1遺伝子のcDNAのヌクレオチド配列のうち第661番目のグアニンがアデニンに置換される突然変異である。そのため、野生型では制限酵素HpaIIの切断配列(CCGG)になるのに対し、Dao1^{G181R}突然変異体ではCCAGとなり切断されない。ここで突然変異部位を含む第625-726番目のヌクレオチドは第7エクソンに含まれるから(GenBankエントリ番号NM_010018.2)、染色体DNAでもHpaII切断部位の有無によって野生型か突然変異型かを識別することができる。

【0038】

離乳後のマウスを個体識別したうえ、各マウス個体の尾から市販の哺乳類ゲノムDNAミニプレップキット(シグマ、G1N70-1KT)を用いて染色体DNAを抽出・精製した。フォワード・プライマーとして第6イントロンに位置する配列番号1のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドを用い、リバーズ・プライマーとして第7イントロンに位置する配列番号2のヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドを用いた。市販の反応混合液(プロメガ、M7122)を用いて、(1)94°C、4分間、1回、(2)94°C、30秒間、55°C、30秒間、72°C30秒間、40回、(3)72°C、10分間、1回(4)4°C、保存という熱サイクル設定でマウス染色体DNAを増幅した。PCR反応産物は、市販のキット(キアゲン、28104)を用いて精製され、HpaII(TOYOBO、HPA201)存在下で37°C、3時間インキュベーションして制限酵素処理された。70°C、5分間の加熱により制限酵素を不活性化させた後、市販の電気泳動マイクロチップ(アジレント、2100バイオアナライザ)によりDNA断片の長さを分析した。

10

20

【0039】

図3-1は、Dao1酵素活性から確認済みのDao1^{+/+}ホモ接合体マウス(第1レーン)、Dao1^{G181R/G181R}ホモ接合体マウス(第4レーン)及びDao1^{+/G181R}F1世代ヘテロ接合体マウス(第2及び3レーン)の染色体DNA由来の増幅産物のHpaII分解断片の電気泳動パターンである。図3-1からわかるとおり、Dao1⁺遺伝子の染色体DNAからは95bpのDNA断片が得られ、Dao1^{G181R}遺伝子の染色体DNAからは107bpのDNA断片が得られるので、野生型ホモ接合体、突然変異型ホモ接合体及びヘテロ接合体は明瞭に判別できた。図3-2は、ヘアレスマウス(Hr^{h/r}/Hr^{h/r}、Dao1^{+/+})と、Dao1酵素欠損マウス(Hr^{+/+}、Dao1^{G181R/G181R})の交配のF2世代でヘアレス表現型を有するF2世代のマウス個体12匹についてDao1遺伝子判定を行った結果である。表1はヘアレス表現型を有するF2世代のマウス個体138匹についてのDao1遺伝子型及び性別を整理した表である。

30

【0040】

【表1】

F2世代ヘアレスマウス(Hr ^{-/-})					
Dao1 ^{+/+}		Dao1 ^{+/-}		Dao1 ^{-/-}	
39		55		44	
F	M	F	M	F	M
18	21	31	24	22	22

40

Fはメス、Mはオスである。

【0041】

50

以上のとおり、本判定方法により、多数のマウス個体の $D a o 1$ 遺伝子型を速やかに判定することが可能になった。

【実施例 2】

【0042】

プロリン及び 4 - ヒドロキシプロリンの光学異性体の定量分析方法の開発

プロリン及び 4 - ヒドロキシプロリンは皮膚コラーゲンに多く含まれる。そこでプロリン及び 4 - ヒドロキシプロリンの両方について同時に全ての光学異性体を分離して定量的に分析することができる方法を開発した。

【0043】

図 4 - 1 は、プロリン及び 4 - ヒドロキシプロリンの光学異性体を示す。プロリンの光学異性体は L - 型か D - 型かの 2 種類だけだが、4 - ヒドロキシプロリンの光学異性体は、L - 型か D - 型かの違いに加えて、トランス型かシス型かの違いにより合計 4 種類ある。まず、蛍光試薬 NBD - F でアミノ酸を誘導体化して蛍光標識した。その後、図 4 - 2 に示すように第 1 カラムで逆相分離クロマトグラフィを行い、トランス - 4 - ヒドロキシプロリン、シス - 4 - ヒドロキシプロリン及びプロリンの各ピークを検出した。そして、前記各ピークの分画をカラムスイッチングバルブを用いて分取して第 2 カラムに導いて光学分割クロマトグラフィを行った。

10

【0044】

図 5 の 1 D の波形図は流速 $40 \mu L / 分$ の溶媒を用いたモノリシック ODS カラムの溶出パターンを $470 nm$ の励起光を照射して $530 nm$ の蛍光発光で検出したものである。2 D の波形図は、1 D の溶出パターンのトランス - 4 - ヒドロキシプロリン、シス - 4 - ヒドロキシプロリン及びプロリンの各ピークを自動的に検出してバルブ切り替えを行って各ピークの分画だけを QN - 2 - AX カラムに導いて光学分割クロマトグラフィを行った結果である。

20

【0045】

図 6 - 1 の波形図は、 $D a o 1$ 遺伝子の野生型ホモ接合体マウス ($D a o 1^{+ / +}$) 血清中の L - 型及び D - 型プロリンの光学分割カラムの溶出パターンであり、図 6 - 2 の波形図は、 $D a o 1$ 酵素活性欠損型ホモ接合体マウス ($D a o 1^{G181R / G181R}$) 血清中の L - 型及び D - 型プロリンの光学分割カラムの溶出パターンである。D - プロリンは $D a o 1$ 野生型ホモ接合体マウスではほとんど検出できなかったが、 $D a o 1$ 酵素活性欠損型ホモ接合体マウスでは明確に検出することができた。

30

【0046】

図 7 - 1 は実施例 1 で判別されたヘアレスマウスと $D a o 1$ 酵素活性欠損マウスの交配の F2 世代のヘアレスマウスのうち、遺伝子型が $D a o 1^{+ / +}$ 及び $D a o 1^{G181R / G181R}$ と判定された個体のさまざまな臓器での D - プロリン存在量を比較した結果であり、図 7 - 2 は真皮における D - プロリン存在量を比較した結果である。図 7 - 1 のグラフの縦軸の単位は、血清については $pmol / \mu L$ 、その他の組織では $pmol / mg$ であった。図 7 - 2 のグラフの縦軸の単位は $nmol / \mu g DNA$ であった。ともに、それぞれ 5 匹のマウスの臓器の測定値の平均と標準誤差 (SE) を表す。血清の他、下垂体、副腎、膵臓及び真皮においても $D a o 1$ 酵素活性欠損マウスでは野生型マウスより数倍以上多くの D - プロリンが存在した。また、 $D a o 1$ 酵素活性野生型マウスの小脳、腎臓及び肝臓では D - プロリンはほぼ検出されなかったが $D a o 1$ 酵素活性欠損マウスでは D - プロリンが明確に検出された。 $D a o 1$ 酵素活性欠損マウスの精巣における D - プロリン量は野生型マウスに比べて少し多いだけで顕著な差がみられなかった。皮膚においても $D a o 1$ 酵素活性欠損マウスでは D - アミノ酸含量が野生型より多いことは今回初めて明らかになった。今後皮膚における D - アミノ酸含量への紫外線照射や加齢による影響が明らかになる。なお、今回の分析では、D - 4 - ヒドロキシプロリンの含有量についてはシス - 異性体及びトランス - 異性体のいずれも全組織において検出限界以下であった。

40

【実施例 3】

【0047】

50

Dao1 酵素欠損マウスにおける腫瘍増殖

Swiss Webster Sarcoma 180株の肉腫細胞は10%ウシ胎児血清(Irvine Scientific、ロット#300A80601)添加DME M(Sigma)培地を用いて5%CO₂、37°Cの加湿条件下で培養した。1x10⁷個/mLの懸濁液を調製し、Dao1 酵素欠損マウス又は野生型マウスの右後肢フットパットの0.05mLずつ皮内注射により移植した。移植後1週間ごとに腫瘍の長径、短径及び厚みをノギスで計測し、以下の式により腫瘍体積を算出した。

腫瘍体積(mm³) = 長径(mm) x 短径(mm) x (厚み(mm) - 3)
ここで厚みはもともとの足の厚みを3mmとしてその差を腫瘍の厚みとした。

【0048】

結果は図8に示す。図8は、Dao1 酵素欠損マウスと対照マウスとについて、移植後1、2及び3週間経過時の腫瘍体積の変化を比較した棒グラフである。対照マウスでは移植後1週間ですでに60mm³の腫瘍体積が3週間で2倍に増加していたのに対し、Dao1 酵素欠損マウスでは、移植後1週間では腫瘍体積が約20mm³しかなく、2週間では5mm³程度まで減少し、3週間では完全に消失した。この結果から、Dao1 酵素欠損マウスでは移植された腫瘍の増殖を抑制し腫瘍を消失させる活性があることが明らかになった。

【0049】

今回確立されたヘアレスマウスとDao1 酵素欠損マウスとの交配実験系は、エリテマトーデス、強皮症、皮膚筋炎、シェーグレン症候群、結節性多発動脈炎、ベーチェット病、関節リウマチ等の膠原病又は膠原病類縁疾患と、糖尿病と、光線皮膚炎と、接触皮膚炎と、じょく瘡と、しみ、くすみ、しわ、たるみ等のその他の皮膚所見とについてD-アミノ酸の果たす役割を解明するために今後大いに利用されることが期待される。

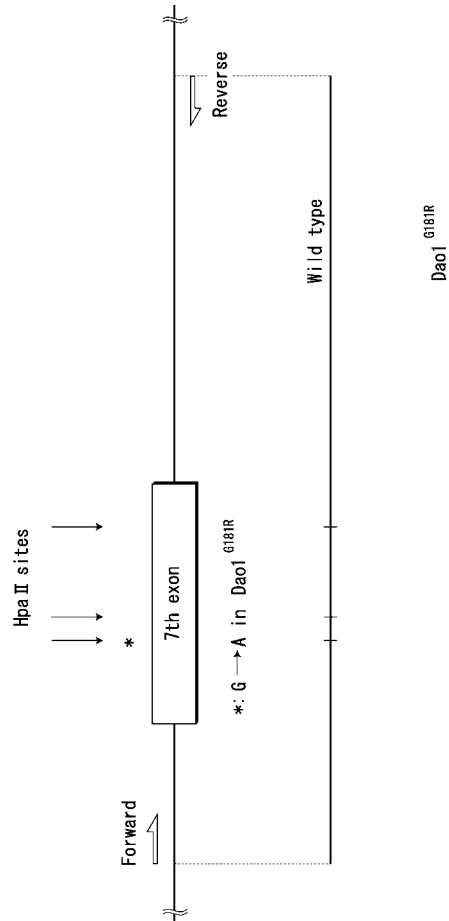
10

20

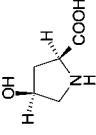
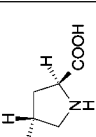
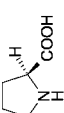
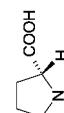
【図1】

Table with 5 columns: HpaII site, Dao1_cDNA, Dao1_genomic, Forward primer, Reverse primer. Rows include sites 15111, 15161, 15211, 15261, 15311, 15361, 15411. Includes legend for Dao1_cDNA, Dao1_genomic, Reverse primer, and symbols for mutant sites.

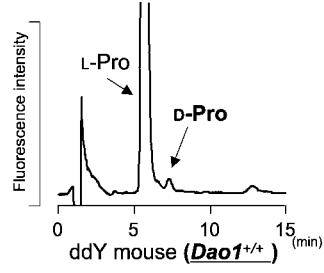
【図2】



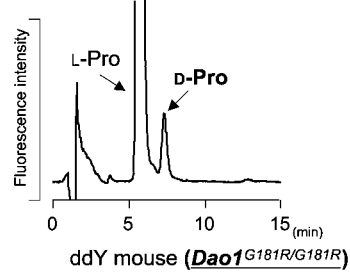
【 図 4 - 1 】

4-hydroxyproline (Hyp)	<i>cis</i> - form		cis-L-Hyp
	<i>trans</i> - form		trans-L-Hyp
proline (Pro)			L-Pro
			D-Pro
		L-enantiomer	D-enantiomer

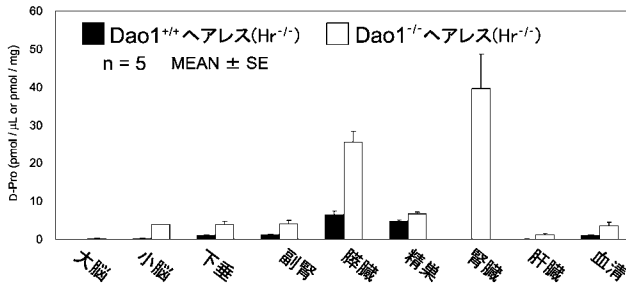
【 図 6 - 1 】



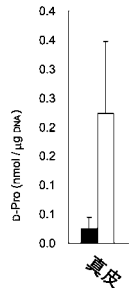
【 図 6 - 2 】



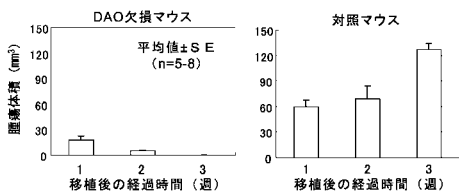
【 図 7 - 1 】



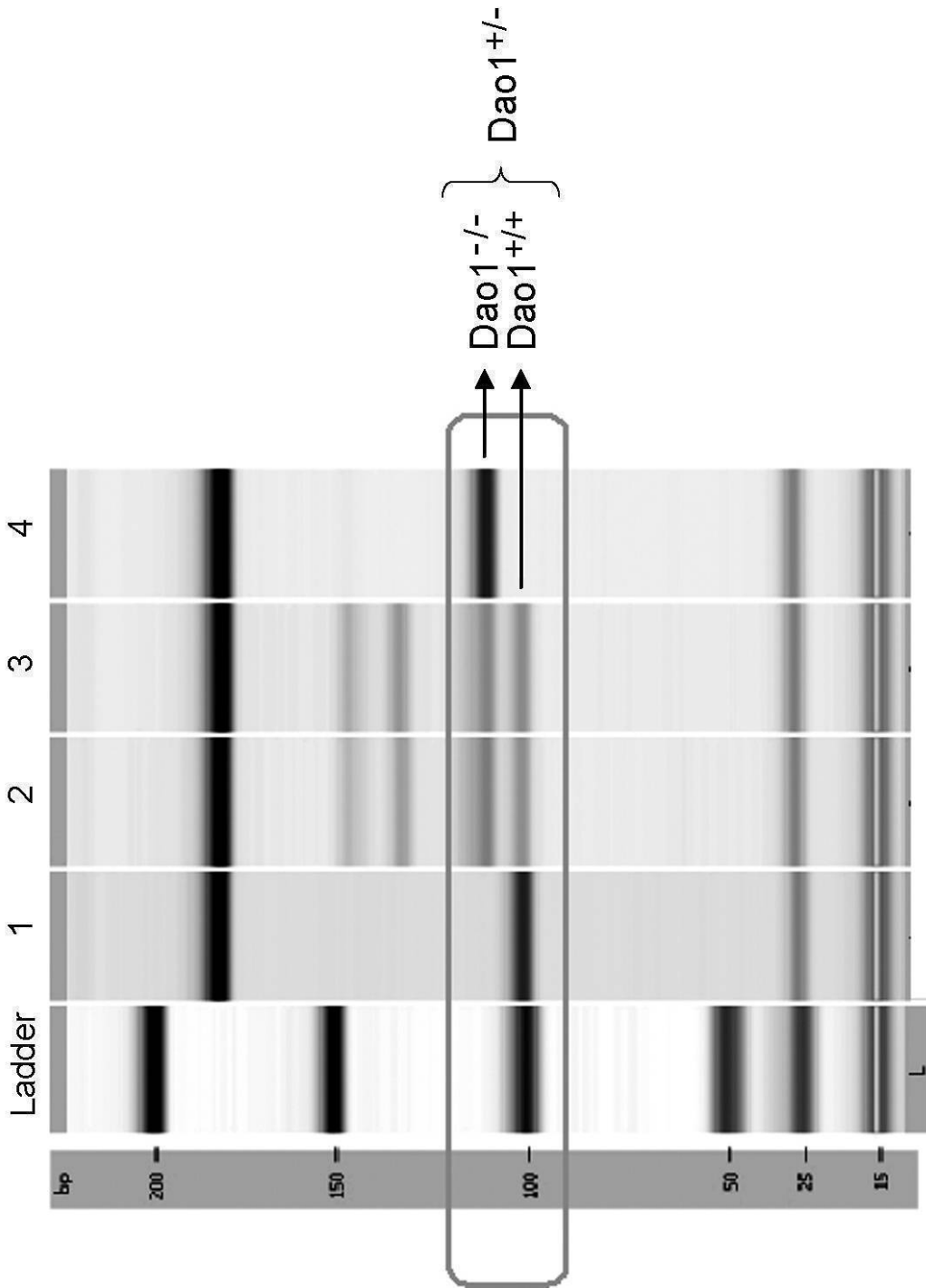
【 図 7 - 2 】



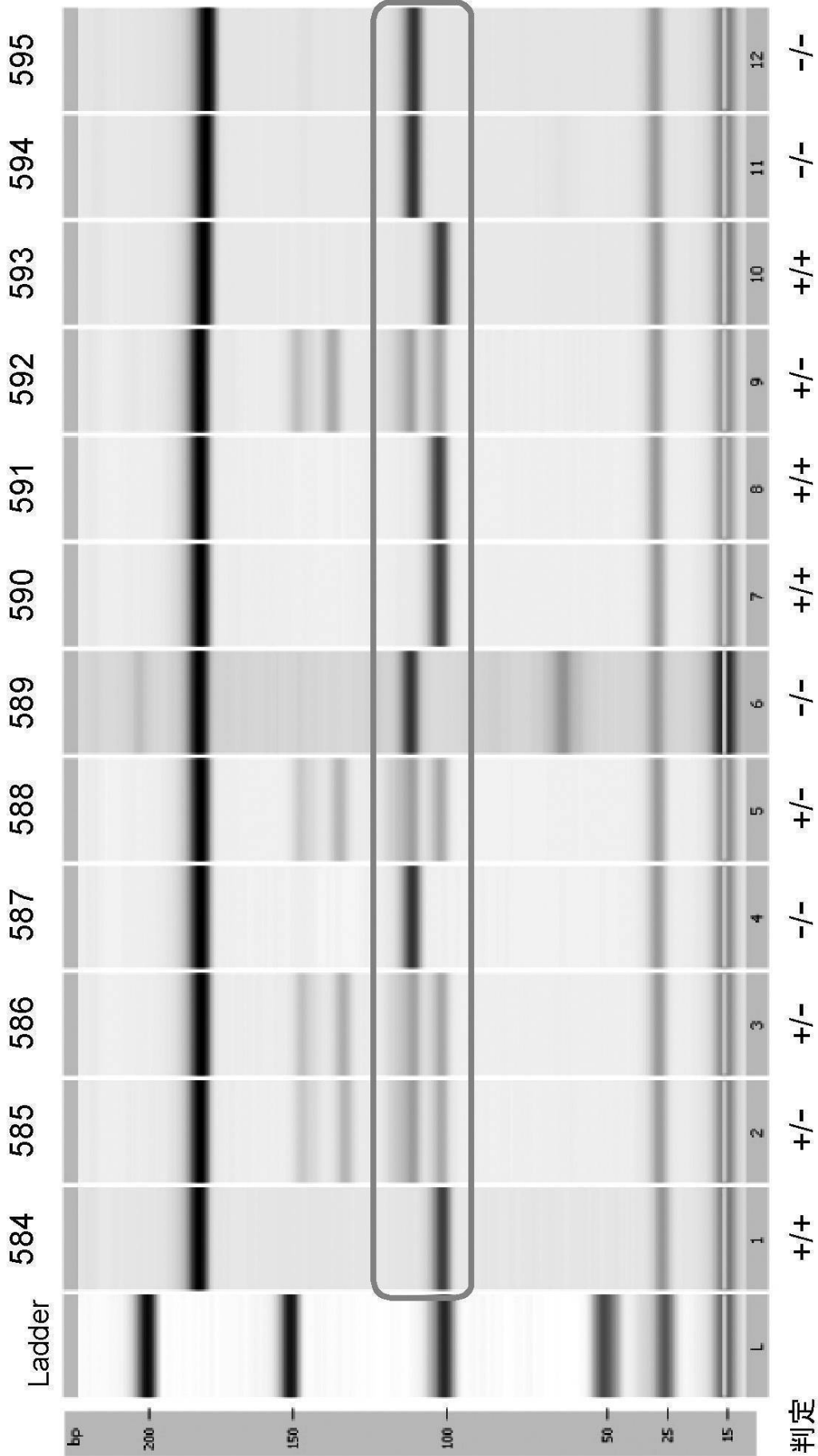
【 図 8 】



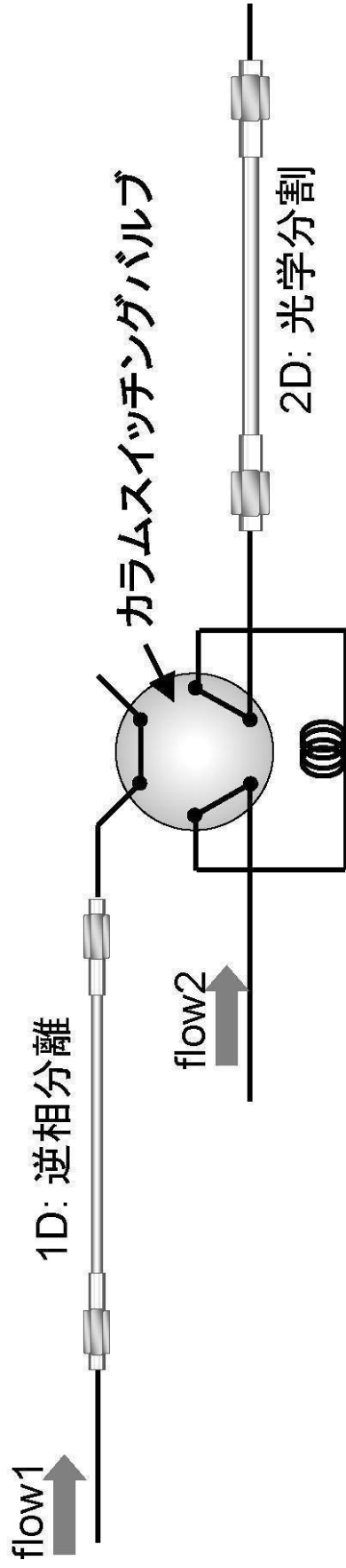
【 図 3 - 1 】



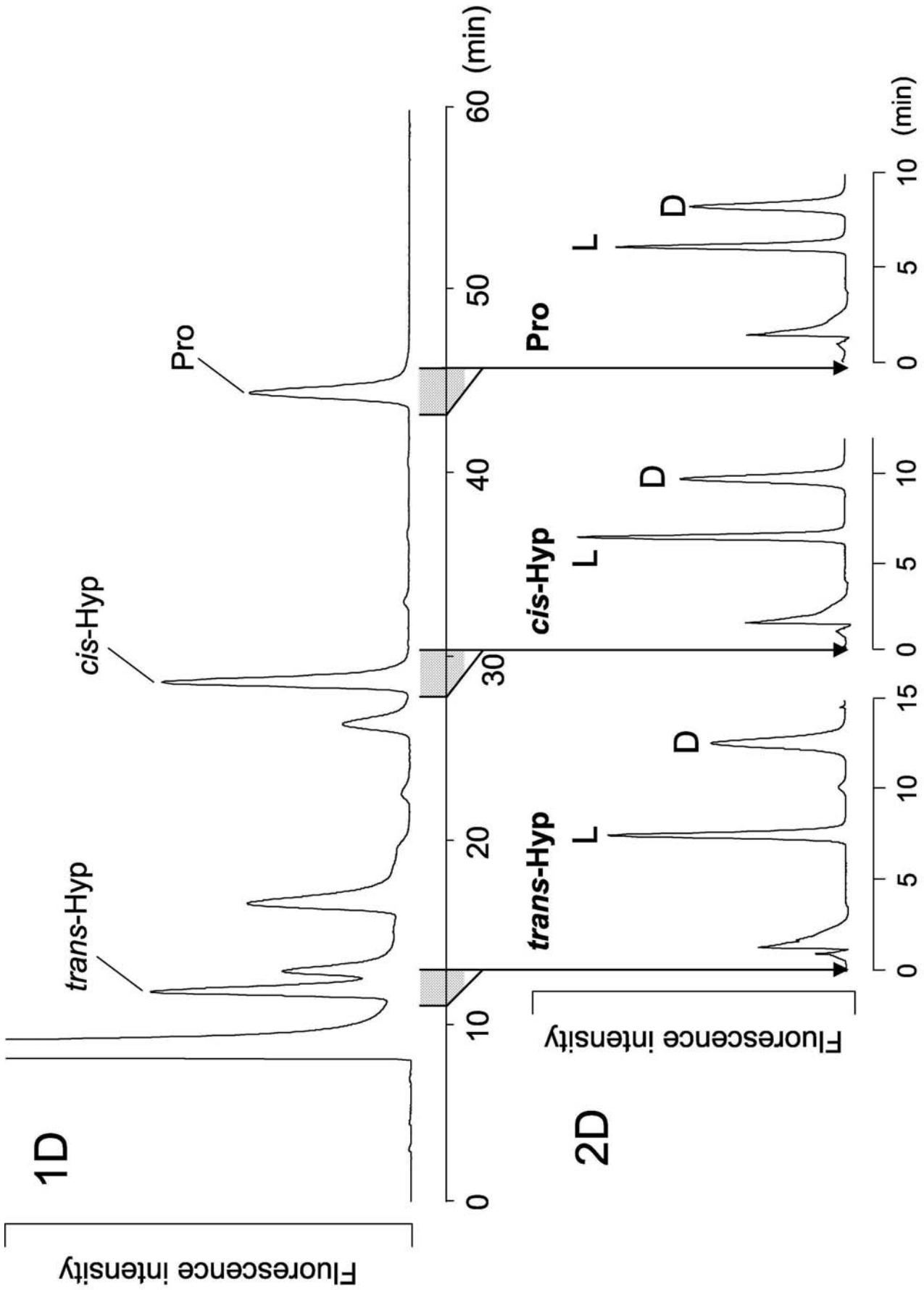
【 3 - 2 】



【 図 4 - 2 】



【 図 5 】



【 配列表 】

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/063696

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12N15/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N30/88(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/577(2006.01)i 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) C12N15/00, C12N15/09, C12Q1/02, C12Q1/68, G01N30/88, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, G01N33/577		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2009 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2009 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2009		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	HASHIMOTO A. et al., Mice lacking D-amino acid oxidase activity exhibit marked reduction of methamphetamine-induced stereotypy, Eur. J. Pharmacol., 2008 May, vol.586, p.221-225	1, 4, 6, 7, 9-11/2, 3, 8/ 5, 12, 13
X/Y/A	HAMASE K., Sensitive two-dimensional determination of small amounts of D-amino acids in mammals and the study on their functions, Chem Pharm Bull (Tokyo). 2007, vol.55, p.503-510	1, 4, 6, 7, 9-11/2, 3, 8/ 5, 12, 13
Y	SASAKI M. et al., A single-base-pair substitution abolishes D-amino-acid oxidase activity in the mouse, Biochim. Biophys. Acta., 1992, vol.1139, p.315-318	2, 3
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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	"T"
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	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
"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)	"X"
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	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
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"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 09 September, 2009 (09.09.09)		Date of mailing of the international search report 29 September, 2009 (29.09.09)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/063696

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	OHGUSU T. et al., High-throughput determination of free D-aspartic acid in mammals by enzyme immunoassay using specific monoclonal antibody, Anal Biochem. 2006, vol.357, p.15-20	8
P,X	TOJO Y. et al., Simple and rapid genotyping of D-amino acid oxidase gene recognizing a crucial variant in the ddY strain using microchip electrophoresis, J. Sep. Sci., 2009 Jan., vol.32, p.430-436	1-4, 6, 7, 9-11

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2009/063696									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))											
Int.Cl. C12N15/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N30/88(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/577(2006.01)i											
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))											
Int.Cl. C12N15/00, C12N15/09, C12Q1/02, C12Q1/68, G01N30/88, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, G01N33/577											
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											
<table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2009年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2009年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2009年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2009年	日本国実用新案登録公報	1996-2009年	日本国登録実用新案公報	1994-2009年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2009年										
日本国実用新案登録公報	1996-2009年										
日本国登録実用新案公報	1994-2009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)											
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)											
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									
X/ Y/ A	HASHIMOTO A. et al., Mice lacking D-amino acid oxidase activity exhibit marked reduction of methamphetamine-induced stereotypy, Eur. J. Pharmacol., 2008 May, vol.586, p.221-225	1, 4, 6, 7, 9-11 /2, 3, 8/ 5, 12, 13									
X/ Y/ A	HAMASE K., Sensitive two-dimensional determination of small amounts of D-amino acids in mammals and the study on their functions, Chem Pharm Bull (Tokyo). 2007, vol.55, p.503-510	1, 4, 6, 7, 9-11 /2, 3, 8/ 5, 12, 13									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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		の日の後に公表された文献									
「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		「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矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの									
「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		「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									
「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)		「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									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 09.09.2009		国際調査報告の発送日 29.09.2009									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 福間 信子	4B 3539								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448									

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 9 / 0 6 3 6 9 6

C (続き) . 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
Y	SASAKI M. et al., A single-base-pair substitution abolishes D-amino-acid oxidase activity in the mouse, Biochim. Biophys. Acta., 1992, vol.1139, p.315-318	2,3
Y	OHGUSU T. et al., High-throughput determination of free D-aspartic acid in mammals by enzyme immunoassay using specific monoclonal antibody, Anal Biochem. 2006, vol.357, p.15-20	8
P,X	TOJO Y. et al., Simple and rapid genotyping of D-amino acid oxidase gene recognizing a crucial variant in the ddY strain using microchip electrophoresis, J. Sep. Sci., 2009 Jan., vol.32, p.430-436	1-4,6,7,9-11

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 30/88 (2006.01)	G 0 1 N 30/88	2 0 1 W
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	G 0 1 N 30/88	F
	C 1 2 N 15/00	A

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(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, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100125081

弁理士 小合 宗一

(74)代理人 100161665

弁理士 高橋 知之

(72)発明者 浜瀬 健司

福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号 国立大学法人 九州大学内

(72)発明者 財津 潔

福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号 国立大学法人 九州大学内

(72)発明者 三田 真史

東京都中央区銀座7丁目5番5号 株式会社資生堂内

(72)発明者 芦田 豊

神奈川県横浜市金沢区福浦2-12-1 株式会社資生堂 リサーチセンター(金沢八景)内

(72)発明者 東條 洋介

神奈川県横浜市都筑区早渕2-2-1 株式会社資生堂 リサーチセンター(新横浜)内

Fターム(参考) 2G045 CA26 CB01 DA35 FB03 FB06

4B024 AA01 AA11 CA01 CA02 DA02 GA11 HA09 HA12

4B063 QA01 QA05 QA18 QQ04 QQ08 QQ26 QQ42 QQ80 QR08 QR32

QR55 QR62 QR72 QR77 QS25 QS28 QS34 QS36 QS39 QX02

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	DAO1-/-小鼠D-氨基酸相关疾病的评估和筛选方法		
公开(公告)号	JPWO2010024091A1	公开(公告)日	2012-01-26
申请号	JP2010526634	申请日	2009-07-31
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人九州大学 株式会社资生堂		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人九州大学 资生堂公司, 有限公司		
[标]发明人	浜瀬健司 財津潔 三田真史 芦田豊 東條洋介		
发明人	浜瀬 健司 財津 潔 三田 真史 芦田 豊 東條 洋介		
IPC分类号	C12Q1/68 C12Q1/02 G01N33/53 G01N33/577 G01N33/50 G01N33/15 G01N30/88 C12N15/09		
CPC分类号	G01N33/5088 A01K67/0276 A01K2217/03 A01K2217/075 A01K2217/15 A01K2227/105 A01K2267/0331 A01K2267/0356 C07K14/4702 C12N9/0024 C12N15/8509 C12Q1/26 G01N2333/90644 G01N2500/10		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12Q1/02 G01N33/53.S G01N33/577.B G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N30/88.201.W G01N30/88.F C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/DA35 2G045/FB03 2G045/FB06 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA02 4B024/DA02 4B024/GA11 4B024/HA09 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ04 4B063/QQ08 4B063/QQ26 4B063/QQ42 4B063/QQ80 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX02		
代理人(译)	吉田 正义 弘光今枝 高桥智之		
优先权	2008217239 2008-08-26 JP		
其他公开文献	JP5639890B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了一种评估方法, 其可以从DAO酶缺陷小鼠和其他疾病模型小鼠之间的交配实验中快速地从大量动物中鉴别出Dao1-/-纯合子, 从而快速进行D-氨基酸的定量测量 包含在大量样本中。 本发明提供了用于评估测试条件对小鼠组织或源自该组织的培养的组织细胞的作用的方法。 该方法包括以下步骤: 提供Dao1-/-鼠标等; 将来自Dao1-/-小鼠等的组织暴露于测试条件; 并且分析将来自Dao1-/-小鼠等的组织暴露于测试条件的效果。

