(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5627462号
(P5627462)

(45)発行日　平成26年11月19日(2014.11.19)　(24)登録日　平成26年10月10日(2014.10.10)

(51)Int.Cl.			F I		
A23K	1/18	(2006.01)	A23K	1/18	A
A23K	1/175	(2006.01)	A23K	1/175	
A61P	1/16	(2006.01)	A61P	1/16	
C12Q	1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	ZNAA
C12N	15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A

請求項の数 5　(全 54 頁)

(21)出願番号　特願2010-527528 (P2010-527528)
(86)(22)出願日　平成20年10月3日 (2008.10.3)
(65)公表番号　特表2011-501658 (P2011-501658A)
(43)公表日　平成23年1月13日 (2011.1.13)
(86)国際出願番号　PCT/GB2008/003351
(87)国際公開番号　WO2009/044152
(87)国際公開日　平成21年4月9日 (2009.4.9)
審査請求日　平成23年9月16日 (2011.9.16)
(31)優先権主張番号　0719358.4
(32)優先日　平成19年10月3日 (2007.10.3)
(33)優先権主張国　英国 (GB)

(73)特許権者　390037914
マース　インコーポレーテッド
ＭＡＲＳ　ＩＮＣＯＲＰＯＲＡＴＥＤ
アメリカ合衆国　ヴァージニア州　２２１０１－３８８３　マックリーン　エルム　ストリート　６８８５
(74)代理人　100092783
弁理士　小林　浩
(74)代理人　100095360
弁理士　片山　英二
(74)代理人　100120134
弁理士　大森　規雄
(74)代理人　100104282
弁理士　鈴木　康仁

最終頁に続く

(54)【発明の名称】遺伝子検査およびペット食

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

ラブラドールレトリバー品種の遺伝的形質を有するイヌにおける肝臓中銅蓄積に起因する疾患の予防剤であって、少なくとも４．５ｍｇ／ｋｇ～１０ｍｇ／ｋｇ乾物未満の濃度で銅を含む食品を含み、イヌの寿命を通じて該イヌに該予防剤を供給することによって疾患を予防する、前記予防剤。

【請求項２】

少なくとも１２０ｍｇ／ｋｇ乾物の濃度で亜鉛をさらに含む、請求項１に記載の予防剤。

【請求項３】

イヌにおいて肝臓中銅蓄積に起因する疾患を予防する際に使用するための、請求項１または２に記載の予防剤であって、前記イヌは、

（ｉ）純血種のラブラドールレトリバーである少なくとも一方の親を有する；および／または

（ｉｉ）肝臓中銅蓄積と関連する臨床症状がない；および／または

（ｉｉｉ）肝臓乾燥重量４００ｍｇ／ｋｇ未満の肝臓中銅濃度を有する；および／または

（ｉｖ）検出可能な肝疾患を有していない、

前記予防剤。

【請求項４】

銅関連慢性肝炎を予防する際に使用するための、請求項１から３のいずれか一項に記載の予防剤。
【請求項５】
食品がラベルされている、請求項１から４のいずれか一項に記載の予防剤。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、肝臓中銅蓄積（liver copper accumulation）および銅関連肝疾患（copper-associated liver disease）に対するイヌの感受性を決定する方法に関する。本発明は、肝臓中銅蓄積および銅関連肝疾患を予防する際に使用するためのイヌ用の食品（foodstuff）、およびその食品の作製法にも関する。
【背景技術】
【０００２】
肝疾患はイヌにおいては稀であるが、その最も一般的な形の１つは慢性肝炎（ＣＨ）である。ＣＨは、線維症、炎症、および肝細胞のアポトーシスおよび壊死の存在によって特徴付けられる組織学的診断名である。疾患の最終段階で肝硬変が生じる可能性がある。ＣＨの原因の１つは肝臓中銅蓄積である。肝臓中銅蓄積は、銅の取り込みの増大、肝臓中銅代謝における一次性代謝障害、または銅の胆汁中排泄の変化が原因である可能性がある。過剰な肝臓中銅蓄積があるイヌは、典型的にはＤ－ペニシラミンという強力な銅キレート剤で治療する。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００３】
本発明者らは、イヌＧＯＬＧＡ５、ＡＴＰ７ａおよびＵＢＬ５遺伝子中またはそれらの領域中の多型（polymorphisms）が、イヌにおいて肝臓中銅蓄積に対する感受性を示すことを発見した。この３つのゲノム領域中の多型が肝臓中銅蓄積のリスクと関連するという発見は、多型のスクリーニングによって肝臓中銅蓄積に対するイヌの感受性を予測するための試験の基盤をもたらす。検出する（detecting）１つまたは複数の確定された（defined）多型の結果を組み合わせることを含むモデルを使用して、試験の予測力を拡大することができる。
【０００４】
イヌの肝臓中の銅の蓄積から、多量の肝臓中の銅に起因する１つまたは複数の肝臓の疾患または状態が生じる可能性がある。例えば、多量の肝臓中の銅から、慢性肝炎、肝硬変および最終的には肝不全が生じる可能性がある。したがって本発明は、多量の銅と関連するこのような肝疾患または状態に感受性であるイヌを同定するのを可能にする。肝臓中銅蓄積に対するイヌの感受性を確認した後、本発明の食品の投与などにより、肝臓中の銅レベルを低レベルまたは正常レベルに維持する目的で、そのイヌに適した予防措置を特定（identify）することができる。
【課題を解決するための手段】
【０００５】
本発明は、肝臓中銅蓄積に対するイヌの感受性を決定する方法であって、（ａ）銅蓄積に対する感受性を表す（indicative）イヌのＧＯＬＧＡ５、ＡＴＰ７ａもしくはＵＢＬ５遺伝子中の多型および／または（ｂ）前記多型（ａ）との連鎖不均衡（linkage disequilibrium）における多型の有無を検出することと、それによって肝臓中銅蓄積に対するイヌの感受性を決定することとを含む方法を提供する。
【０００６】
本発明は、
－　ＧＯＬＧＡ５、ＡＴＰ７ａもしくはＵＢＬ５遺伝子中の１つもしくは複数の多型および／またはその連鎖不均衡における１つもしくは複数の多型、ならびに肝臓中銅蓄積に対

するイヌの感受性とこれらの多型との関係に関する情報を含むデータベース、
－　肝臓中銅蓄積に対するイヌの感受性を決定する方法であって、
（ａ）イヌのゲノムにおける本明細書で定義する多型の有無に関するデータをコンピュータシステムに入力すること、
（ｂ）データを、ＧＯＬＧＡ５、ＡＴＰ７ａもしくはＵＢＬ５遺伝子中の１つもしくは複数の多型および／またはその連鎖不均衡における１つもしくは複数の多型、ならびに肝臓中銅蓄積に対するイヌの感受性とこれらの多型との関係に関する情報を含むコンピュータデータベースと比較すること、および
（ｃ）比較に基づいて肝臓中銅蓄積に対するイヌの感受性を決定すること
を含む方法、
－　コンピュータシステムで実行されると、本発明の方法を実施するようコンピュータシステムに指令するプログラムコード手段を含むコンピュータプログラム、
－　本発明のコンピュータプログラムおよび本発明のデータベースを含むコンピュータ記憶媒体、
－　本発明の方法を実施するように構成されたコンピュータシステムであって、
（ａ）イヌのゲノムにおける本明細書で定義する多型の有無に関するデータを受信するための手段、
（ｂ）データを、ＧＯＬＧＡ５、ＡＴＰ７ａもしくはＵＢＬ５遺伝子中の１つもしくは複数の多型および／またはその連鎖不均衡における１つもしくは複数の多型、ならびに肝臓中銅蓄積に対するイヌの感受性とこれらの多型との関係に関する情報を含むデータベースと比較するためのモジュール、および
（ｃ）前記比較に基づいて肝臓中銅蓄積に対するイヌの感受性を決定するための手段
を含むコンピュータシステム、
－　イヌのゲノムが肝臓中銅蓄積に対するイヌの感受性を示す多型を含有するかどうか決定する方法であって、（ａ）銅蓄積に対する感受性を示すイヌのＧＯＬＧＡ５、ＡＴＰ７ａもしくはＵＢＬ５遺伝子中の多型および／または（ｂ）前記多型（ａ）との連鎖不均衡における多型の有無を検出することを含む方法、並びに
－　肝臓中銅蓄積に対するイヌの感受性を決定するための、（ａ）肝臓中銅蓄積に対する感受性を示すイヌのＧＯＬＧＡ５、ＡＴＰ７ａもしくはＵＢＬ５遺伝子中の多型および／または（ｂ）前記多型（ａ）との連鎖不均衡における多型の使用も提供する。

【０００７】
さらに、また驚くことに、本発明者らは、ラブラドールレトリバーにおいて肝臓中銅濃度を低下させる際に、薬剤ペニシラミンの使用より有効である食品を、今、発見した。したがってこの食品は、ラブラドールレトリバー品種のイヌにおいて肝臓中銅蓄積を予防する際に有用であり、慢性肝炎、肝硬変および肝不全などの、多量の肝臓中の銅と関連する疾患または状態を予防するために使用することができる。

【０００８】
したがって本発明は、ラブラドールレトリバー品種の遺伝的形質を有するイヌにおいて肝臓中銅蓄積に起因する疾患を予防する際に使用するための、２１ｍｇ／ｋｇ乾物（dry matter）未満の濃度で銅を含む食品も提供する。

【０００９】
本発明は、
－　ラブラドールレトリバー品種の遺伝的形質を有するイヌにおいて肝臓中銅蓄積に起因する疾患を予防する方法であって、本発明の食品をイヌに供給することを含む方法、
－　本発明の食品を作製する方法であって、食品が２１ｍｇ／ｋｇ乾物未満の銅濃度を有するように食品の成分を一緒に混合することを含む方法、
－　ラブラドールレトリバー品種の遺伝的形質を有するイヌ用の食品の製造における銅の使用であって、食品が、２１ｍｇ／ｋｇ乾物未満の濃度で銅を含み、前記イヌにおける肝臓中銅蓄積に起因する疾患を予防する際に使用するための食品である使用、
－　ラブラドールレトリバー品種の遺伝的形質を有するイヌにおける肝臓中銅蓄積に起因

する疾患を予防する際に、同時、個別または逐次使用するための、２１ｍｇ／ｋｇ乾物未満の濃度の銅を有する食品および少なくとも１２０ｍｇ／ｋｇ乾物の濃度をもたらす亜鉛サプリメントを含むパック、および

－　本発明によるラベル付き食品または本発明によるラベル付きパックをさらに提供する。

【図面の簡単な説明】

【００１０】

【図１】図１は、治療なしでの肝臓中銅蓄積の進行を示す図である。この図は、任意の治療前の８．７カ月（６～１５カ月の範囲）隔てた２回の実験での、１１匹のラブラドールレトリバーの肝臓中銅濃度（ｍｇ／ｋｇ乾燥重量）を示す。この時間中、全ての動物にそれらの通常のメンテナンス食を与え、それは製造者に従い、乾物ベースで１２～２５ｍｇ／ｋｇの食用銅濃度および乾物ベースで８０～２７０ｍｇ／ｋｇの亜鉛濃度を含有していた。菱形の記号は異常値を表す。

【図２】図２は、食事管理期間中の、試験の開始時および２つの対照実験における２４匹のラブラドールレトリバーの肝臓中銅濃度（ｍｇ／ｋｇ乾燥重量）を示す図である。イヌは以下のように２群に分けた：群１＝食事＋グルコン酸亜鉛含有錠剤、群２＝食事＋プラシーボ。ｘ軸の数字の符号は以下の通りである：１＋２＝治療前、３＋４＝再検査１（８カ月後の第一の対照実験（５～１３カ月の範囲））、５＋６＝再検査２（１６カ月後の第二の対照実験（１２～２５カ月の範囲））。試験したイヌの数は以下の通りである：１：Ｎ＝群１中１２匹のイヌ、２：Ｎ＝群２中１２匹のイヌ、３：Ｎ＝群１中９匹のイヌ、４：Ｎ＝群２中１２匹のイヌ、５：Ｎ＝群１中６匹のイヌ、６：Ｎ＝群２中１０匹のイヌ。菱形の記号は異常値を表す。点線は成長したイヌに関する肝臓中の銅の正常レベルを表す。

【図３】図３は、ペニシラミン単独の影響と比較した、１８匹のラブラドールレトリバーにおける肝臓中銅濃度（ｍｇ／ｋｇ乾燥重量）に対する本発明の食事の有効性を示す図である。ｘ軸の符号は以下の通りである：１＝ペニシラミン前、２＝ペニシラミン後／食前、３＝食後。１から２へのｘ軸に沿った進行はペニシラミン効果を示し、一方２から３への進行は食事の効果を示す。点線は成長したイヌに関する肝臓中の銅の正常レベルを表す。

【図４】図４は、本発明を実施するように構成された機能要素の実施形態を概略的に示す図である。

【発明を実施するための形態】

【００１１】

配列の簡単な説明

配列番号：１～１２９は、本発明のＳＮＰを含むポリヌクレオチド配列を示す。

【００１２】

肝臓中銅蓄積に対する感受性の確認

肝臓中の銅の蓄積から、ラブラドールレトリバー、ドーベルマンピンシェル、ジャーマンシェパード、キースホンド、コッカースパニエル、ウエストハイランドホワイトテリア、ベドリントンテリア、およびスカイテリアを含めた、幾つかのイヌ品種において肝疾患が生じる。任意の品種の正常なイヌの肝臓中の銅濃度の平均値は乾燥重量ベースで２００～４００ｍｇ／ｋｇであるが、新生児は一般により高い肝臓中銅濃度を有する。

【００１３】

銅蓄積に感受性であるイヌは、その肝臓中銅濃度が４００ｍｇ／ｋｇを超える、例えば５００ｍｇ／ｋｇ、６００ｍｇ／ｋｇ、８００ｍｇ／ｋｇ、１０００ｍｇ／ｋｇ、１５００ｍｇ／ｋｇ、２０００ｍｇ／ｋｇ、５０００ｍｇ／ｋｇを超える、または１００００ｍｇ／ｋｇを超えるレベルに達するように銅を蓄積する傾向を有する。本発明による肝臓中銅蓄積に対するイヌの感受性の決定は、イヌが４００ｍｇ／ｋｇを超えるレベルまで肝臓中の銅を蓄積し得る危険または可能性の決定を含む。これは、例えば危険因子、割合または確率として表すことができる。イヌが前に記載したレベルまで銅を蓄積し得るかどうか

決定することは可能である。

【００１４】

４００ｍｇ／ｋｇを超えるレベルへの肝臓中の銅の蓄積は肝疾患と関連し、最終的には肝不全をもたらす可能性がある。したがって、肝臓中銅蓄積に対するイヌの感受性の決定は、慢性肝炎、肝硬変および肝不全などの肝臓中銅蓄積に起因する疾患または状態に対するイヌの感受性を決定する方法も与える。

【００１５】

遺伝形質と関連する多型を解明する方法

本発明者らは、個体群中の遺伝形質と関連する多型を決定する方法、すなわち（「２Ｄマッピング」としても知られる）「パーティションマッピング」を開発した。この方法は現在二元条件（症例／対照研究）に限られている。

【００１６】

遺伝的関連がある複合疾患は一般に２つ以上の遺伝子によって誘導される。これらの遺伝子は非線形的に相互作用して、従来の方法を使用してそれらをマッピングするのが困難となる可能性がある。一対の個体のレベルで検討する（working on）ことによって、多数の遺伝子の影響を取り除くことができる。遺伝子座はその個体対における表現型に貢献するかまたは貢献しないかであるからである。この方法の完全な作業は以下に記載する。この分析の実施後、それぞれの領域中のリスクがある対立遺伝子を抽出し、他の方法を使用して表現型を予想するためのモデルを構築することができる。

【００１７】

「パーティションマッピング」アルゴリズムは、５０キロベース毎に中断しながら（stopping every 50 kilobases）ゲノムをスキャンする。これらの地点のそれぞれにおいて、それぞれの個体対を分析する。それぞれの対に関して、全染色体の遺伝子型を分析し、３つの考えられるシナリオの下での遺伝子型の可能性を比較する。第一のシナリオは、この個体対において表現型を誘導する劣性突然変異が存在することである。第二のシナリオは、この個体対において表現型を誘導する優性突然変異が存在することである。第三のシナリオは、このイヌの対においてこの位置での表現型の重要な突然変異が存在しないことである。以下に記載するように、隠れマルコフモデル（hidden markov model）を使用して可能性を計算する。これらの可能性を比較することによって、その地点における劣性または優性表現型誘導突然変異の存在に肯定的または否定的なこの個体対に関するベイズ因子を導く（derive）ことが可能である。これらの値の対数をとり、したがって正の値は、劣性または優性突然変異のシナリオに対する重みを表し、負の値は、ここに重要な突然変異が存在しないことに対するさらなる証拠を表す。

【００１８】

個体対はその遺伝子座における対数－ベイズ因子の順に分類する。個体対の対数－ベイズ因子を次いで降順に合計し、それぞれの百分率のデータで累積的な証拠の重みの記録をとる。大抵の場合、幾つかの対数－ベイズ因子は正であり、幾つかは負であり得る。これは記録値の影響を与え、百分率のデータは上昇し次いで低下する。この値の最大値は、劣性または優性モデルのいずれかに対する証拠の重みの指標を与える。これは「ピーク値」と呼ばれる。

【００１９】

幾つかの場合、アルゴリズムは、特にゲノムの同型領域、または高密度の多型を有する領域に対する偏向を有する。この影響は４つの考えられる症例／対照状態（症例－症例、症例－対照、対照－症例、対照－対照）中で順序を変えたそれぞれの対で方法を実施することによって定量化する。任意の遺伝子座に関して、順序を変えたモデル下でのピーク値を正常ピーク値から差し引き、これは補正ピーク値を与える。対象とするゲノムの所与の領域中の補正ピーク値を比較することができる。

【００２０】

隠れマルコフモデル（Hidden Markov Model）

パーティションマッピングの重要な要素は、それが遺伝子型データに直接作用しないこ

とである。イヌのペア間の類似度をモデル化する一層の分析を使用し、この分析は、何時２つの個体がそれらのゲノム中の遺伝子座に同じ先祖の対立遺伝子を有するかに関する情報を与える。

【００２１】

イヌのペア中の染色体間には９つの考えられる関係が存在し、最も関連があるのは全４本の染色体の同じハプロタイプであり、最も関連がないのはこの位置における４つの異なるハプロタイプである。これら９つの状態の可能性は隠れマルコフモデルを使用して計算する。

【００２２】

遺伝子座が問題の個体対に作用している場合、これらの状態の幾つかは症例－対照表現型の幾つかの置換の下では考えられない。このため、相対的可能性から劣性または優性対立遺伝子の存在に関するベイズ因子を計算することができる。

【００２３】

多型および銅蓄積に対する感受性

上記した方法を使用して、本発明者らは、イヌＧＯＬＧＡ５、ＡＴＰ７ａおよびＵＢＬ５遺伝子中またはそれらの領域中の多型は、肝臓中銅蓄積に対する感受性を示すことを発見した。したがって本発明は、これらのゲノム位置で１つまたは複数の多型マーカーを使用して、肝臓中銅蓄積に対するイヌの感受性を決定する方法に関する。

【００２４】

本発明は、肝臓中銅蓄積に対するイヌの感受性を決定する方法であって、（ａ）銅蓄積に対する感受性を示すイヌのＧＯＬＧＡ５、ＡＴＰ７ａもしくはＵＢＬ５遺伝子中の多型および／または（ｂ）前記多型（ａ）との連鎖不均衡における多型の有無を検出することと、それによって肝臓中銅蓄積に対するイヌの感受性を決定することとを含む方法を提供する。

【００２５】

フレーズ「多型の有無を検出すること」は、多型がイヌのゲノム中に存在するかどうか決定することを典型的には意味する。多型には一塩基多型（ＳＮＰ）、マイクロサテライト多型、挿入多型および欠失多型がある。多型はＳＮＰであることが好ましい。ＳＮＰの有無を検出することは、ＳＮＰを遺伝子型決定することまたはイヌのゲノム中に存在するＳＮＰの（１つまたは複数の）ヌクレオチドを型決定することを意味する。典型的には、両方の相同染色体上の同じ位置に存在するヌクレオチドが決定される。したがってイヌは、ＳＮＰの第一の対立遺伝子に関して同型、ＳＮＰの第二の対立遺伝子に関して異型または同型であると決定することができる。

【００２６】

本明細書で定義する多型位置のいずれか１つを、直接、言い換えるとその位置に存在するヌクレオチドを決定することによって、または間接的、例えば前記多型位置と連鎖不均衡である別の多型位置に存在するヌクレオチドを決定することによって、型決定することができる。本明細書で定義する多型位置のいずれか１つと連鎖不均衡である多型を同定するために通常の技法を使用することは、当業者の能力の範囲内であり得る。

【００２７】

集団中で互いに連鎖不均衡である幾つかの多型は、典型的には同じ染色体上で１箇所に見られる。典型的には１つは少なくとも３０％の場合（times）、例えば少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも７０％または少なくとも９０％の場合で見られ、もう１つは集団内の個体中の特定の染色体上で見られる。したがって、機能的感受性多型ではなく、ただし機能的多型と連鎖不均衡である多型は、機能的多型の存在を示すマーカーとして働くことができる。本発明の多型と連鎖不均衡である多型は、肝臓中銅蓄積に対する感受性を示す。

【００２８】

本明細書で言及する多型と連鎖不均衡である多型は、その多型の９ｍｂ以内、好ましくは５ｍｂ以内、２ｍｂ以内、１ｍｂ以内、５００ｋｂ以内、４００ｋｂ以内、２００ｋｂ

以内、１００ｋｂ以内、５０ｋｂ以内、１０ｋｂ以内、５ｋｂ以内、１ｋｂ以内、５００ｂｐ以内、１００ｂｐ以内、５０ｂｐ以内または１０ｂｐ以内に典型的には位置する。

【００２９】

したがって本発明は、（ａ）銅蓄積に対する感受性を示すイヌのＧＯＬＧＡ５、ＡＴＰ７ａもしくはＵＢＬ５遺伝子中の多型および／または（ｂ）前記多型（ａ）との連鎖不均衡における多型の有無を検出することを含む。任意の数および任意の組合せの多型を検出して本発明を実施することができる。少なくとも２つの多型を検出することが好ましい。２～５、３～８または５～１０の多型を検出することが好ましい。

【００３０】

多型はＧＯＬＧＡ５、ＡＴＰ７ａまたはＵＢＬ５遺伝子のいずれか１つに存在する可能性があり、あるいはこれらの遺伝子のいずれの１つにも存在しないが、これらの遺伝子のいずれか１つにおける多型と連鎖不均衡である可能性がある。これらの遺伝子のいずれか１つにおいて存在する、またはそれと連鎖不均衡である２つ以上の多型を検出することができる。多型は任意の組合せであってよい。

【００３１】

イヌのＤＮＡは、

（ｉ）２つ以上の多型（ａ）、

（ｉｉ）２つ以上の多型（ｂ）、または

（ｉｉｉ）１つまたは複数の多型（ａ）および１つまたは複数の多型（ｂ）のそれぞれの位置で型決定することができる。

【００３２】

２つの多型（ａ）が存在するとき、それぞれの多型はＧＯＬＧＡ５、ＡＴＰ７ａまたはＵＢＬ５遺伝子の別個の１つに存在し、またはこれらの遺伝子の１つのみに存在する可能性がある。３つ以上の多型（ａ）、例えば３～１０のこのような多型が存在するとき、多型は同じ遺伝子中、これらの遺伝子の２つまたは全３個の遺伝子に存在する可能性がある。

【００３３】

同様に、２つの多型（ｂ）が存在するとき、それぞれの多型はＧＯＬＧＡ５、ＡＴＰ７ａまたはＵＢＬ５遺伝子の別個の１つ、またはこれらの遺伝子の１つのみにおける多型と連鎖不均衡である可能性がある。３つ以上の多型（ｂ）、例えば３～１０のこのような多型が存在するとき、多型は同じ遺伝子中、これらの遺伝子の２つまたは全３個の遺伝子における多型と連鎖不均衡である可能性がある。

【００３４】

好ましい方法は、肝臓中銅蓄積に対する感受性を示すイヌのＧＯＬＧＡ５、ＡＴＰ７ａまたはＵＢＬ５遺伝子中の少なくとも１つの多型（ａ）および前記多型（ａ）との連鎖不均衡における少なくとも１つの多型（ｂ）の有無を検出することを含む。

【００３５】

本発明の好ましい方法では、多型はＳＮＰである。ＳＮＰは、銅蓄積に対する感受性を示すイヌのＧＯＬＧＡ５、ＡＴＰ７ａまたはＵＢＬ５遺伝子中の任意のＳＮＰ、および／またはそれとの連鎖不均衡におけるＳＮＰであってよい。ＳＮＰは、表ＩＩＩおよび表ＩＶ中で同定したＳＮＰから選択されることが好ましい。表ＩＩＩおよび表ＩＶ中では、それぞれのＳＮＰは配列中の位置６１に位置する。その位置でのそれぞれのＳＮＰに関する野生型および他の対立遺伝子が与えられる。任意の数のＳＮＰを、表ＩＩＩおよびＩＶから任意の組合せで使用することができる。ＳＮＰは異なる型の多型と組み合わせることができる。

【００３６】

この方法は、表ＩＩＩ中のＳＮＰから選択される１つもしくは複数のＳＮＰおよび／またはそれとの連鎖不均衡における１つもしくは複数のＳＮＰの有無を検出することを含むことが好ましい。したがって、これら５個のＳＮＰのいずれかまたはこれら５個のＳＮＰのいずれかと連鎖不均衡である任意のＳＮＰを型決定することができる。これら５個のＳ

ＮＰまたは連鎖不均衡におけるＳＮＰの少なくとも２つを、型決定することが好ましい。全ての５個の位置を型決定することがより好ましい。したがって、型決定する（１つまたは複数の）ヌクレオチドは、
配列番号：１の位置６１（ＢＩＣＦ２Ｐ５０６５９５、ＳＮＰ１）；
配列番号：２の位置６１（ＢＩＣＦ２Ｐ７７２７６５、ＳＮＰ２）；
配列番号：３の位置６１（ＢＩＣＦ２Ｓ２３３３１８７、ＳＮＰ３）；
配列番号：４の位置６１（ＢＩＣＦ２Ｐ１３２４００８、ＳＮＰ４）；
配列番号：５の位置６１（ＢＩＣＦ２Ｐ５９１８７２、ＳＮＰ５）；またはこれらの位置のいずれか１つと連鎖不均衡である任意の位置に相当する位置から選択されることが好ましい。好ましくは、この方法は、ＳＮＰＢＩＣＦ２Ｐ５０６５９５（配列番号：１）、ＢＩＣＦ２Ｐ７７２７６５（配列番号：２）、ＢＩＣＦ２Ｓ２３３３１８７（配列番号：３）、ＢＩＣＦ２Ｐ１３２４００８（配列番号：４）、およびＢＩＣＦ２Ｐ５９１８７２（配列番号：５）の有無を検出することを含む。

【００３７】

ＳＮＰ１はＧＯＬＧＡ５遺伝子のイントロン内に存在する。ＳＮＰ２、３および４はＵＢＬ５遺伝子の領域内に位置する。ＳＮＰ５はＡＴＰ７ａ遺伝子の領域内に位置する。したがって本発明の検出法は、１つまたは複数のこれらの遺伝子内またはそれらの領域中（コード領域中または他の領域中）に存在する任意のＳＮＰ、または連鎖不均衡である任意の他のＳＮＰに関する。

【００３８】

イヌのゲノム中、表ＩＩＩまたはＩＶ中で確認した位置に存在する（１つまたは複数の）ヌクレオチドの型決定は、表ＩＩＩまたはＩＶ中で確認した配列に正確に対応する配列中のこの位置に存在する、ヌクレオチドが型決定されることを意味することができる。しかしながら、表ＩＩＩ中で確認した配列番号：１～５または表ＩＶ中の配列番号：６～１２９中に存在する正確な配列は、試験するイヌにおいて必ずしも存在しないことは理解されよう。したがって、存在するヌクレオチドの型決定は、表ＩＩＩもしくはＩＶ中で確認した位置、または配列中の相当もしくは対応する位置であってよい。したがって、本明細書で使用する用語相当は、表ＩＩＩもしくはＩＶ中で確認した位置、またはそれに対応する位置を意味する。配列、したがってＳＮＰの位置は、例えばイヌのゲノム中のヌクレオチドの欠失または付加のために変わる可能性がある。当業者は、例えばＧＡＰ、ＢＥＳＴＦＩＴ、ＣＯＭＰＡＲＥ、ＡＬＩＧＮ、ＰＩＬＥＵＰまたはＢＬＡＳＴなどのコンピュータプログラムを使用して、配列番号：１～１２９のそれぞれにおける関連位置に対応またはそれに相当する位置を決定することができるはずである。ＵＷＧＣＧパッケージはＧＡＰ、ＢＥＳＴＦＩＴ、ＣＯＭＰＡＲＥ、ＡＬＩＧＮおよびＰＩＬＥＵＰを含めたプログラムを提供し、これらを使用して相同性またはラインアップ配列を計算することができる（例えばそれらのデフォルト設定で使用して）。典型的にはそのデフォルト設定で、ＢＬＡＳＴアルゴリズムを使用して２つの配列を比較またはラインアップすることもできる。２つの配列のＢＬＡＳＴ比較を実施するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Information(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)によって公表されている。このアルゴリズムは以下でさらに記載する。配列のアラインメントおよび比較用の類似の公表されているツールは、European Bioinformatics Instituteウエブサイト(http://www.ebi.ac.uk)、例えばＡＬＩＧＮおよびＣＬＵＳＴＡＬＷプログラムで見ることができる。

【００３９】

イヌのゲノム中の１つまたは複数の本発明の多型の有無を検出した後、それによって肝臓中銅蓄積に対するイヌの感受性を決定する。それぞれの多型単独または他の多型と組み合わせた遺伝子型は、肝臓中銅蓄積に対するイヌの感受性を示す。一例として、表ＩはＧＯＬＧＡ５、ＵＢＬ５およびＡＴＰ７ａ遺伝子の領域中の５つのＳＮＰの組合せの異なる考えられる遺伝子型、および多量の銅（６００ｍｇ／ｋｇを超える肝臓中レベル）を有するこれらの遺伝子型を有するイヌの割合を述べる。この例では、肝臓中銅蓄積に対するイヌの感受性を決定するために、イヌ由来のＤＮＡサンプルを使用して、イヌのゲノム中の

５つのＳＮＰを遺伝子型決定することができる。ＳＮＰの遺伝子型を決定した後、これらは実施例１中に与えるキーに基づいて、すなわち遺伝子型と多量の銅の関連度に基づいて、２進値に変換することができる。したがって表Ｉを使用して、その遺伝子型パターンおよび多量の銅を有するイヌの割合に基づいて２進値を危険因子に変換する。

【００４０】

任意の年齢、例えば０～１２、０～６、０～５、０～４、０～３、０～２または０～１年齢で、本発明の方法によってイヌを試験することができる。イヌは、可能な限り若い年齢、例えばその寿命の最初の１年、最初の６カ月または最初の３カ月以内で試験することが好ましい。イヌは銅蓄積が起こる前に試験することが好ましい。イヌの病歴は知られているかまたは知られていなくてよい。例えば、イヌは両親が知られている子犬であってよく、かつ銅蓄積に関する両親の病歴が知られていてよい。あるいはイヌは、血統および病歴が知られていない野良犬または救出された犬であってよい。

【００４１】

本発明の方法によって試験するイヌは任意の品種であってよい。典型的にはイヌは、ラブラドールレトリバー、ドーベルマンピンシェル、ジャーマンシェパード、キースホンド、コッカースパニエル、ウエストハイランドホワイトテリア、ベドリントンテリア、およびスカイテリアから選択される品種の遺伝的形質を有し得る。イヌは混血もしくは交配種犬、または雑種もしくは非近交系犬であってよい。イヌは、任意の純血種のまたはより好ましくは本明細書で記載する品種のいずれかから遺伝した、少なくとも２５％、少なくとも５０％、または少なくとも１００％のそのゲノムを有する可能性がある。イヌは純血種であってよい。本発明の一実施形態では、試験するイヌの一方または両方の親は純血種のイヌであるか、またはそうであった。別の実施形態では、１匹または複数匹の祖父母が純血種のイヌであるか、またはそうであった。試験するイヌの祖父母の１、２、３または全４匹が純血種のイヌであり得るか、またはそうであった可能性がある。

【００４２】

イヌはラブラドールレトリバー品種の遺伝的形質を有することが好ましい。イヌは純血種のラブラドールレトリバーであってよい。あるいはイヌは、混血もしくは交配種犬、または非近交系犬（雑種）であってよい。イヌの一方または両方の親は純血種のラブラドールレトリバー犬であってよい。イヌの祖父母の１、２、３または全４匹が純血種のラブラドールレトリバー犬であってよい。イヌはその遺伝的背景で少なくとも５０％または少なくとも７５％のラブラドールレトリバー品種を有する可能性がある。したがって、少なくとも５０％または少なくとも７５％のイヌのゲノムが、ラブラドールレトリバー品種に由来する可能性がある。

【００４３】

イヌの品種の遺伝的背景は、遺伝子マーカー、例えばＳＮＰまたはマイクロサテライトの対立遺伝子頻度を評価することによって決定することができる。イヌにおける異なるＳＮＰまたはマイクロサテライトの対立遺伝子頻度の組合せは、イヌの品種または混血品種のイヌを構成する品種の決定を可能にする痕跡を与える。このような遺伝子検査は市販の検査であってよい。あるいは、イヌはラブラドールレトリバー品種の遺伝的形質に関して試験する必要がない可能性がある。例えばイヌの飼い主または獣医がラブラドールレトリバー品種の遺伝的形質に関する知識を有する可能性があるからである。これは例えばイヌの血統の知識のため、またはその外見のためである可能性がある。

【００４４】

本発明の予測試験は、イヌの品種の遺伝的背景または１つまたは複数の他の疾患に対する感受性の決定などの、１つまたは複数の他の予測または診断試験と共に実施することができる。

【００４５】

多型の検出（Detection of polymorphisms）

本発明による多型の検出は、イヌのポリヌクレオチドまたはタンパク質と多型の特異的結合因子（specific binding agent）を接触させることと、当該因子がポリヌクレオチド

またはタンパク質と結合するかどうか決定することとを含むことができ、因子の結合が多型の存在を示し、かつ因子の結合の欠如は多型の不在を示す。

【００４６】

この方法は一般に、イヌ由来のＤＮＡを含有するイヌ由来のサンプルにｉｎ　ｖｉｔｒｏで実施する。サンプルは典型的にはイヌの体液および／または細胞を含み、例えば口腔スワブなどのスワブを使用して得ることができる。サンプルは血液、尿、唾液、皮膚、頬細胞または毛根サンプルであってよい。典型的には、この方法を実施する前にサンプルを処理し、例えばＤＮＡ抽出を実施することができる。サンプル中のポリヌクレオチドまたはタンパク質は、例えば適切な酵素を使用して、物理的または化学的のいずれかで切断することができる。一実施形態では、サンプル中のポリヌクレオチドの一部分を、多型の検出前に、例えばクローニングまたはＰＣＲベースの方法を使用することによってコピーまたは増幅する。

【００４７】

本発明中では、任意の１つまたは複数の方法は、イヌにおける１つまたは複数の多型の有無を検出することを含むことができる。典型的には、多型はイヌのポリヌクレオチドまたはタンパク質中の多型配列の存在を直接決定することによって検出する。このようなポリヌクレオチドは、典型的にはゲノムＤＮＡ、ｍＲＮＡまたはｃＤＮＡである。以下に言及する方法などの任意の適切な方法によって、多型を検出することができる。

【００４８】

特異的結合因子は、多型を有するタンパク質またはポリペプチドと優先的または高親和性で結合するが、他のポリペプチドまたはタンパク質とは結合しないまたは低い親和性でのみ結合する因子である。特異的結合因子は、プローブまたはプライマーであってよい。プローブはタンパク質（抗体など）またはオリゴヌクレオチドであってよい。プローブは標識可能であり、または間接的に標識することができる。ポリヌクレオチドまたはタンパク質とプローブの結合を使用して、プローブまたはポリヌクレオチドまたはタンパク質のいずれかを固定することができる。

【００４９】

一般にこの方法では、イヌの多型ポリヌクレオチドまたはタンパク質と因子の結合を決定することによって、多型を検出することができる。しかしながら一実施形態では、因子は、例えば変異体の位置と隣接するヌクレオチドまたはアミノ酸との結合によって、対応する野生型配列と結合することもできるが、野生型配列との結合形式は、多型を含有するポリヌクレオチドまたはタンパク質の結合と検出上異なる可能性がある。

【００５０】

この方法は２つのオリゴヌクレオチドプローブを使用するオリゴヌクレオチド連結反応アッセイに基づくものであってよい。これらのプローブは多型を含有するポリヌクレオチド上の隣接領域と結合し、結合後２つのプローブが適切なリガーゼ酵素によって１つに連結するのが可能となる。しかしながら、プローブの１つ中の１つのミスマッチの存在は、結合および連結を妨害する可能性がある。したがって、連結プローブは多型を含有するポリヌクレオチドとのみ存在する可能性があり、したがって、連結産物の検出を使用して多型の存在を検出することができる。

【００５１】

一実施形態では、ヘテロ二重鎖分析系システムにおいてプローブを使用する。このようなシステムにおいて、プローブが多型を含有するポリヌクレオチド配列と結合するとき、それは多型が存在する部位でヘテロ二重鎖を形成し、したがって二本鎖構造は形成しない。このようなヘテロ二重鎖構造は、一本鎖または二本鎖特異的酵素の使用によって検出することができる。典型的にはプローブはＲＮＡプローブであり、ヘテロ二重鎖領域はＲＮＡａｓｅＨを使用して切断し、切断産物を検出することによって多型を検出する。

【００５２】

この方法は例えばPCR Methods and Applications3、268～71(1994)およびProc.Natl.Acad.Sci.85、4397～4401(1998)中に記載される蛍光化学切断ミスマッチ分析に基づくもの

であってよい。

【００５３】

一実施形態では、それが多型を含有するポリヌクレオチドと結合する場合のみ、ＰＣＲ反応を促進するＰＣＲプライマー、例えば配列特異的ＰＣＲシステムを使用し、多型の存在はＰＣＲ産物を検出することによって決定することができる。多型と相補的であるプライマーの領域は、プライマーの３’末端またはその付近であることが好ましい。多型の存在は、蛍光色素を使用すること、およびＴａｇｍａｎ　ＰＣＲ検出システムなどの因子系ＰＣＲアッセイを停止させることによって決定することができる。

【００５４】

特異的結合因子は、多型配列によってコードされるアミノ酸配列と特異的に結合することができる。例えば、因子は抗体または抗体断片であってよい。検出法はＥＬＩＳＡシステムに基づくものであってよい。この方法はＲＦＬＰ系システムであってよい。ポリヌクレオチド中の多型の存在が、制限酵素によって認識される制限部位を生成または破壊する場合、この方法を使用することができる。

【００５５】

多型の存在は、多型の存在がゲル電気泳動中のポリヌクレオチドまたはタンパク質の移動度を生み出す変化に基づいて決定することができる。ポリヌクレオチドの場合、一本鎖高次構造多型（ＳＳＣＰ）または変性剤濃度勾配ゲル電気泳動（ＤＤＧＥ）分析を使用することができる。多型を検出する別の方法では、多型領域を含むポリヌクレオチドは多型を含有する領域中で塩基配列決定して、多型の存在を決定する。

【００５６】

多型の存在は蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）によって検出することができる。特に、二重ハイブリダイゼーションプローブシステムによって多型を検出することができる。この方法は、互いに近くに位置し対象とする標的ポリヌクレオチドの内部セグメントと相補的である、２つのオリゴヌクレオチドプローブの使用を含み、この場合２つのプローブのそれぞれをフルオロフォアで標識する。任意の適切な蛍光標識または色素を、１つのプローブ（ドナー）上のフルオロフォアの発光波長が第二のプローブ（アクセプター）上のフルオロフォアの励起波長と重複するように、フルオロフォアとして使用することができる。典型的なドナーフルオロフォアはフルオレセイン（ＦＡＭ）であり、かつ典型的なアクセプターフルオロフォアには、テキサスレッド、ローダミン、ＬＣ－６４０、ＬＣ－７０５およびシアニン（Ｃｙ５）がある。

【００５７】

蛍光共鳴エネルギー移動を起こすために、２つのフルオロフォアは、標的の両方のプローブのハイブリダイゼーション時に極めて接近している必要がある。ドナーフルオロフォアが適切な波長の光で励起するとき、発光スペクトルエネルギーがアクセプタープローブ上のフルオロフォアに移動し、その蛍光が生じる。したがって、ドナーフルオロフォアに適した波長での励起中のこの波長の光の検出は、２つのプローブにおけるフルオロフォアのハイブリダイゼーションおよび密接な結合を示す。それぞれのプローブは、上流（５’）に位置するプローブがその３’末端で標識され、かつ下流（３’）に位置するプローブがその５’末端で標識されるように、片方の末端においてフルオロフォアで標識することができる。

【００５８】

標的配列との結合時の２プローブ間のギャップは、１、２、４、６、８または１０ヌクレオチドのギャップなどの、１～２０ヌクレオチド、好ましくは１～１７ヌクレオチド、より好ましくは１～１０ヌクレオチドである可能性がある。

【００５９】

２つのプローブの第一のプローブは多型と隣接する遺伝子の保存配列と結合するように設計することができ、第二のプローブは１つまたは複数の多型を含む領域と結合するように設計することができる。第二のプローブによって標的化される遺伝子の配列内の多型は、生成する塩基のミスマッチによって引き起こされる溶融温度の変化を測定することによ

って検出することができる。溶融温度の変化の程度は、ヌクレオチド多型に関与する数および塩基型に依存し得る。

【００６０】

プライマー伸長技法を使用して多型の型決定を実施することもできる。この技法中、多型部位周囲の標的領域を、例えばＰＣＲを使用してコピーまたは増幅する。次いで一塩基の配列決定反応を、多型部位から一塩基離れてアニーリングするプライマーを使用して実施する（対立遺伝子特異的ヌクレオチドの取り込み）。次いでプライマー伸長産物を検出して、多型部位に存在するヌクレオチドを決定する。伸長産物を検出することができる幾つかの方法が存在する。例えば１つの検出法では、蛍光標識したジデオキシヌクレオチドターミネーターを使用して、多型部位での伸長反応を停止させる。あるいは、質量改変したジデオキシヌクレオチドターミネーターを使用し、質量分析法を使用してプライマー伸長産物を検出する。１つまたは複数のターミネーターを特異的に標識することによって、伸長したプライマーの配列、したがって多型部位に存在するヌクレオチドを推定することができる。反応当たり２つ以上の反応産物を分析することができ、したがって、２つ以上のターミネーターを特異的に標識する場合、両方の相同染色体に存在するヌクレオチドを決定することができる。

【００６１】

本発明は、銅蓄積に対する感受性の予測において使用するための、本明細書で定義するＳＮＰのいずれかの検出において使用することができるプライマーまたはプローブをさらに提供する。本発明のポリヌクレオチドは、本明細書で定義するＳＮＰを検出するためのプライマー伸長反応用のプライマーとして使用することもできる。

【００６２】

このようなプライマー、プローブおよび他のポリヌクレオチド断片は、少なくとも１０、好ましくは少なくとも１５または少なくとも２０、例えば少なくとも２５、少なくとも３０または少なくとも４０ヌクレオチド長であることが好ましい。それらは典型的には最大４０、５０、６０、７０、１００または１５０ヌクレオチド長である。プローブおよび断片は、１５０ヌクレオチド長より長くて、例えば最大２００、３００、４００、５００、６００、７００ヌクレオチド長、またはさらに本発明の完全長ポリヌクレオチド配列より最大５または１０ヌクレオチドなど数ヌクレオチド短くてよい。

【００６３】

本発明のＳＮＰを遺伝子型決定するためのプライマーおよびプローブは、表ＩＩＩおよびＩＶ中のＳＮＰ配列を使用して、当技術分野で知られている任意の適切な設計ソフトウェアを使用して設計することができる。これらのポリヌクレオチド配列のホモログも、プライマーおよびプローブを設計するのに適している可能性がある。このようなホモログは、例えば少なくとも１５、２０、３０、１００を超える隣接ヌクレオチドの領域で、少なくとも７０％の相同性、好ましくは少なくとも８０、９０％、９５％、９７％または９９％の相同性を典型的には有する。相同性はヌクレオチドの同一性に基づいて計算することができる（時折「確固たる相同性（hard homology）」と呼ぶ）。

【００６４】

例えばＵＷＧＣＧパッケージはＢＥＳＴＦＩＴプログラムを与え、これを使用して相同性を計算することができる（例えばそれらのデフォルト設定で使用して）(Devereuxら(1984)Nucleic Acids Research12、p387～395)。例えばAltschul S.F.(1993)J Mol Evol36:290～300;Altschul、S、Fら(1990)J Mol Biol215:403～10中に記載されたように、ＰＩＬＥＵＰおよびＢＬＡＳＴアルゴリズムを使用して、相同性を計算するまたは配列をラインアップすることができる（相当または対応する配列の同定など（典型的にはそのデフォルト設定で）。

【００６５】

ＢＬＡＳＴ分析を実施するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Information(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)によって公表されている。このアルゴリズムは、データベース配列中の同じ長さのワードとアラインメントをとるとき、幾つかの

正の値の閾値スコアＴと一致するかまたはそれを満たすクエリ配列中の短いワード長のＷを同定することによって、高スコア配列対（ＨＳＰ）を最初に同定することを含む。Ｔは隣接ワードスコア閾値と呼ばれる（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、上記）。これらの初期隣接ワードヒットは、それらを含有するＨＳＰを発見するための検索を開始するためのシードとして働く。累積アラインメントスコアが増大する可能性がある限り、ワードヒットはそれぞれの配列に沿って両方向で延長する。累積アラインメントスコアがその最大獲得値から量Ｘだけ低下するとき、１つまたは複数の負のスコアの残基アラインメントの蓄積によって累積スコアがゼロ以下になるとき、またはいずれかの配列の末端に達するとき、それぞれの方向におけるワードヒットの延長は止まる。ＢＬＡＳＴアルゴリズムのパラメータＷ、ＴおよびＸは、アラインメントの感度および速度を決定する。ＢＬＡＳＴプログラムはデフォルトとして１１のワード長（Ｗ）、ＢＬＯＳＵＭ６２スコアリングマトリクス(Henikoff and Henikoff(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA89:10915～10919参照）５０のアラインメント（Ｂ）、１０の期待値（Ｅ）、Ｍ＝５、Ｎ＝４、および両方の鎖の比較値を使用する。

【００６６】

ＢＬＡＳＴアルゴリズムは２配列間の類似性の統計分析を実施する、例えばKarlin and Altschul(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA90:5873～5787を参照。ＢＬＡＳＴアルゴリズムによって与えられる類似性の１つの測定値は、２ポリヌクレオチド配列間の一致が偶然に生じ得る確率の指標を与える最小合計確率（Ｐ（Ｎ））である。例えば、第一の配列と第二の配列の比較における最小合計確率が約１未満、好ましくは約０．１未満、より好ましくは約０．０１、および最も好ましくは約０．００１である場合、配列は別の配列と類似していると考えられる。

【００６７】

相同配列は、ヌクレオチドの置換、欠失または挿入であり得る少なくとも１、２、５、１０、２０またはそれより多くの突然変異によって典型的には異なる。

【００６８】

プライマーまたはプローブなどの本発明のポリヌクレオチドは、単離または実質的に精製された形で存在してよい。それらは、それらの目的用途に干渉せずさらに実質的に単離されたとみなされる、担体または希釈剤と混合することができる。これらは実質的に精製された形であってもよく、その場合これらは、調製物のポリヌクレオチドの少なくとも９０％、例えば少なくとも９５％、９８％または９９％を一般に含み得る。

【００６９】

検出抗体（Detector antibodies）

検出抗体は、１つの多型に特異的であるが、本明細書で記載する任意の他の多型とは結合しない抗体である。検出抗体は、例えば免疫沈降技法を含めた精製、単離またはスクリーニング法において有用である。

【００７０】

本発明のポリペプチドの特異的エピトープに対して抗体を産生することができる。抗体、または他の化合物は、それが特異的であるタンパク質と優先的または高親和性で結合するが、他のポリペプチドとは実質的に結合しないまたは低い親和性でのみ結合するとき、ポリペプチドと「特異的に結合する」。抗体の特異的結合能力を決定するための競合結合または免疫放射定量アッセイ用の様々なプロトコルは、当技術分野でよく知られている（例えば、Ｍａｄｄｏｘら、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１５８、１２１１～１２２６、１９９３を参照）。このようなイムノアッセイは、特異的タンパク質とその抗体の間の複合体の形成、および複合体形成の測定を典型的には含む。

【００７１】

本発明の目的で、用語「抗体」は、反対のことを示さない限り、本発明のポリペプチドと結合する断片を含む。このような断片には、Ｆｖ、Ｆ（ａｂ’）およびＦ（ａｂ’）$_2$断片、および単鎖抗体がある。さらに、抗体およびその断片は、キメラ抗体、ＣＤＲ移植抗体またはヒト化抗体であってよい。

【００７２】
（本明細書で言及する任意のこのようなサンプルなどの）生物サンプル中の本発明のポリペプチドを検出するための方法中で抗体を使用することができ、この方法は、
Ｉ　本発明の抗体を提供すること、
ＩＩ　抗体－抗原複合体の形成を可能にする条件下で前記抗体と生物サンプルをインキュベートすること、および
ＩＩＩ　前記抗体を含む抗体－抗原複合体が形成されるかどうか決定すること
を含む。
【００７３】
本発明の抗体は任意の適切な方法によって生成することができる。抗体を調製および特徴付けするための手段は当技術分野でよく知られており、例えば、Harlow and Lane(1988)「Antibodies:A Laboratory Manual」、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NYを参照。例えば抗体は、宿主動物中で完全ポリペプチドまたはその断片、例えば本明細書で以後「免疫原」と呼ぶその抗原エピトープに対する抗体を産生することによって生成することができる。断片は本明細書で言及する任意の断片であってよい（典型的には少なくとも１０または少なくとも１５アミノ酸長）。
【００７４】
ポリクローナル抗体を生成するための方法は、適切な宿主動物、例えば実験動物を免疫原で免疫処置することと、動物の血清から免疫グロブリンを単離することとを含む。したがって動物に免疫原を接種し、血液をその後動物から除去し、ＩｇＧ分画を精製することができる。モノクローナル抗体を生成するための方法は、望ましい抗体を生成する細胞を不死化することを含む。ハイブリドーマ細胞は、接種した実験動物由来の脾細胞と腫瘍細胞を融合することによって生成することができる(Kohler and Milstein(1975)Nature256、495～497)。
【００７５】
望ましい抗体を生成する不死化細胞は従来の手順によって選択することができる。ハイブリドーマは培養中に増殖することが可能であり、腹水形成のため腹膜内に、または同種異系宿主または免疫不全宿主の血流中に注射することが可能である。ヒト抗体は、ヒトリンパ球のｉｎ　ｖｉｔｒｏ免疫処置、次にエプスタインバーウイルスによるリンパ球の形質転換によって調製することができる。
【００７６】
モノクローナル抗体とポリクローナル抗体の両方の生成には、適切には、実験動物はヤギ、ウサギ、ラット、マウス、モルモット、ニワトリ、ヒツジまたはウマである。望む場合、例えば適切な担体とアミノ酸残基の１つの側鎖によって免疫原が結合した結合体として、免疫原を投与することができる。担体分子は典型的には生理的に許容される担体である。得られた抗体は単離、および望む場合は精製することができる。
【００７７】
検出キット
本発明は、本明細書で定義する１つまたは複数の多型を型決定するための手段を含むキットも提供する。特に、このような手段は、本明細書で定義する多型を検出することができるかまたはその検出を容易にすることができる、特異的結合因子、プローブ、プライマー、プライマーの対または組合せ、または本明細書で定義する抗体断片を含めた抗体を含むことができる。プライマーまたはプライマーの対もしくは組合せは、本明細書で論じる検出対象の多型を含むポリヌクレオチド配列のＰＣＲ増幅のみ引き起こす、配列特異的プライマーであってよい。プライマーまたはプライマーの対は、あるいは多型ヌクレオチドに特異的でない可能性はあるが、領域上流（５’）および／または下流（３’）に特異的である可能性がある。これらのプライマーは、多型ヌクレオチドを含む領域のコピーを可能にする。プライマー伸長技法中で使用するのに適したキットは、標識ジデオキシヌクレオチド３リン酸（ｄｄＮＴＰ）を特異的に含み得る。これらは例えば蛍光標識または質量改変して、伸長産物の検出、したがって多型部位に存在するヌクレオチドの決定を可能に

することができる。
【００７８】
キットは、多型の不在を検出することができる、特異的結合因子、プローブ、プライマー、プライマーの対または組合せ、または抗体も含むことができる。キットは、バッファーまたは水溶液をさらに含むことができる。
【００７９】
キットは、前述の方法の実施形態のいずれかの実施を可能にすることができる、１つまたは複数の他の試薬または計器を追加的に含むことができる。このような試薬または計器は、多型と因子の結合を検出するための手段、蛍光標識などの検出可能な標識、ポリヌクレオチドに作用することができる酵素、典型的にはポリメラーゼ、制限酵素、リガーゼ、ＲＮＡｓｅＨ、または標識とポリヌクレオチドを結合させることが可能である酵素、酵素試薬に適した（１つまたは複数の）バッファーまたは水溶液、本明細書で論じる多型と隣接する領域と結合するＰＣＲプライマー、陽性および／または陰性対照、ゲル電気泳動用装置、サンプルからＤＮＡを単離するための手段、スワブまたはニードルを含む計器などの個体からサンプルを得るための手段、またはその上で検出反応を実施することができるウエルを含む支持体の１つまたは複数を含むことができる。キットは、本発明の特異的結合因子、好ましくはプローブを含むポリヌクレオチドアレイなどのアレイであってよく、またはそれを含むことができる。キットは、キットを使用するための一組の説明書を典型的には含む。
【００８０】
バイオインフォマティクス
多型の配列は、電子形式で、例えばコンピュータデータベース中に保存することができる。したがって本発明は、ＧＯＬＧＡ５、ＡＴＰ７ａまたはＵＢＬ５遺伝子中の１つもしくは複数の多型および／またはその連鎖不均衡における１つもしくは複数の多型、ならびに肝臓中銅蓄積に対するイヌの感受性とこれらの多型との関係に関する情報を含むデータベースを提供する。データベースは、多型に関する情報、例えば肝臓中銅蓄積に対する感受性と多型の関連度をさらに含むことができる。
【００８１】
本明細書で記載するデータベースを使用して、肝臓中銅蓄積に対するイヌの感受性を予測することができる。このような決定は電子手段によって、例えばコンピュータシステム（ＰＣなど）を使用することによって実施することができる。典型的には、イヌからの遺伝子データをコンピュータシステムに入力し、遺伝子データを、ＧＯＬＧＡ５、ＡＴＰ７ａもしくはＵＢＬ５遺伝子中の１つもしくは複数の多型および／またはその連鎖不均衡における１つもしくは複数の多型、ならびに肝臓中銅蓄積に対するイヌの感受性とこれらの多型との関係に関する情報を含むデータベースと比較し、この比較に基づいて肝臓中銅蓄積に対するイヌの感受性を予測することによって決定を実施する。したがって、この情報を使用して、イヌの肝臓中銅レベルの管理をガイドすることができる。
【００８２】
本発明は、前記プログラムがコンピュータで実行されるとき、本発明の方法の全ステップを実施するためのプログラムコード手段を含むコンピュータプログラムも提供する。前記プログラムがコンピュータで実行されるとき本発明の方法を実施するための、コンピュータ可読媒体に保存されたプログラムコード手段を含むコンピュータプログラム製品も提供する。コンピュータシステムで実行されると、本発明の方法を実施するようコンピュータシステムに指令するプログラムコード手段を搬送波で含むコンピュータプログラム製品を、追加的に提供する。
【００８３】
図４中に示すように、本発明は、本発明による方法を実施するように構成された装置も提供する。装置はＰＣなどのコンピュータシステムを典型的には含む。一実施形態では、コンピュータシステムは、イヌからの遺伝子データを受信するための手段２０、そのデータと多型に関する情報を含むデータベース１０を比較するためのモジュール３０、および

前記比較に基づいて肝臓中銅蓄積に対するイヌの感受性を予測するための手段４０を含む。

【００８４】

本発明の食品

本発明は、ラブラドールレトリバー品種の遺伝的形質を有するイヌ用の食品に関する。本発明者らは、市販飼料中で見られる銅のレベルはラブラドールレトリバーにおける肝臓中銅蓄積と関連すること、および飼料中の銅のレベルの低下は驚くことに、薬剤ペニシラミンより有効に肝臓中銅レベルを正常レベルにすることを発見した。本発明の食品は低い銅濃度、具体的には２１ｍｇ／ｋｇ乾物未満の銅濃度を有する。この食品を使用してラブラドールレトリバーの肝臓中の銅の蓄積を予防する。したがってそれは、肝臓中銅蓄積に起因する疾患または状態を予防するのに有用である。本明細書で知られている用語「食品」は、食品、飼料、調理済み食品またはサプリメントを含む。任意のこれらの形は固体、半固体または液体であってよい。

【００８５】

より詳細には、本発明の食品は２１ｍｇ／ｋｇ乾物未満の濃度で銅を含む。銅濃度は、乾物１ｋｇ当たり２０ｍｇ未満、１７ｍｇ未満、１５ｍｇ未満、１２ｍｇ未満または１０ｍｇ未満であることが好ましい。銅濃度は、少なくとも４．５、少なくとも４．７５、少なくとも５または少なくとも８ｍｇ／ｋｇ乾物であることが好ましい。典型的には、銅濃度は、４．５～２１ｍｇ／ｋｇ、５～１７ｍｇ／ｋｇまたは１０～１５ｍｇ／ｋｇ乾物の範囲である。銅は任意の生理的に許容される形で、例えば硫酸銅として食品中に存在してよい。

【００８６】

食品は少なくとも１２０ｍｇ／乾燥重量１ｋｇの濃度で亜鉛をさらに含むことができる。亜鉛濃度は少なくとも１５０、少なくとも１８０または少なくとも２００ｍｇ／ｋｇ乾物であることが好ましい。亜鉛濃度は、食品監督機関によって許容された最大値を超えないことが好ましい。典型的には、亜鉛濃度は、乾物１ｋｇ当たり２５０ｍｇ未満、２４０ｍｇ未満、２３０ｍｇ未満または２２０ｍｇ未満である。典型的には、亜鉛濃度は、１２０～２５０、１５０～２５０または２００～２５０ｍｇ／ｋｇ乾物の範囲であり得る。

【００８７】

亜鉛を同じ食品中に与え、本発明の銅のレベルを与えることができる。あるいは、亜鉛はサプリメントの形で与えることができ、これは本発明の食品に加えることができる。サプリメントは錠剤、粉末または液剤の形であってよい。亜鉛は任意の生理的に許容される塩の形で与えることができる。亜鉛源の例には、酢酸亜鉛、硫酸亜鉛、グルコン酸亜鉛、炭酸亜鉛、塩化亜鉛および酸化亜鉛がある。

【００８８】

食品中の銅または亜鉛の濃度は、本明細書では乾物ベースで、すなわち水を含まない食品に基づいて記載して、異なる水分含量を有し得る異なる食品間の直接的な比較を可能にする。ウェットまたはセミウェット食品中の銅または亜鉛の濃度を測定するために、食品のサンプルは、例えばオーブンを使用して最初に乾燥させて、水分を除去する。その後、任意の適切な技法を使用して、乾燥した食品のサンプル中の銅または亜鉛の濃度を測定することができる。当技術分野でよく知られているこのような技法の一例は、フレーム原子吸光分析である。

【００８９】

本発明の食品は、例えばウェットペットフード、セミモイストペットフードまたは乾燥ペットフードの形であってよい。ウェットペットフードは一般に６５重量％を超える水分含量を有する。セミモイストペットフードは２０～６５重量％の水分含量を典型的には有し、保湿剤および微生物の増殖を妨げるための他の成分を含むことができる。キブル（kibble）とも呼ばれる乾燥ペットフードは２０重量％未満の水分含量を一般に有し、その処理は典型的には押出し、乾燥および／または熱中でのベーキングを含む。

【００９０】

食品はウェット食品と乾燥食品の混合物として与えることができる。このような組合せは事前に混合した状態で与えることができ、あるいは別々、同時または連続的にイヌに与えられる２つ以上の別個の食品として与えることができる。

【００９１】

食品はイヌがその食事中に消費する任意の製品を含む。本発明は、標準的な食品およびペットフードスナックを含む。食品は調理済み製品であることが好ましい。それは（例えばウシ、ニワトリ、シチメンチョウ、ラム、魚類などの）肉または動物由来の物質を取り込むことができる。あるいは製品は肉を含まなくてよい（タンパク源を与えるためにダイズ、トウモロコシグルテンまたはダイズ製品などの肉の代用食品を含むことが好ましい）。製品は１つまたは複数の穀類（例えばコーン、コメ、オートムギ、オオムギなど）などのデンプン源を含有することもでき、またはデンプンを含まなくてよい。

【００９２】

乾燥ペットフードの成分は、シリアル、穀類、肉、家禽肉、脂肪、ビタミンおよびミネラルから選択することができる。成分は典型的には混合し、押出機／調理機に通す。次いで製品を典型的には成形し乾燥させ、乾燥後、香料および脂肪を乾燥製品にコーティングまたは噴霧することができる。

【００９３】

全てのペットフードは一定レベルの栄養を与えることを必要とされる。例えば、アメリカ飼料検査官協会（ＡＡＦＣＯ）およびペットフード協会は、一般的に使用される成分に基づいて、ドッグフードに関する栄養素プロファイルを確立している。これらの確立したプロファイルは、「ＡＡＦＣＯドッグフード栄養素プロファイル」と呼ばれる。これらの統制下では、ドッグフードは、ＡＡＦＣＯにより決定された全ての最小レベルに見合い最大レベルを超えない濃度の栄養素を含有するように処方しなければならない。

【００９４】

ドッグフード製品は、イヌのカロリー、タンパク質、脂肪、炭水化物、食物繊維、ビタミンまたはミネラル要件によってカスタマイズすることができる。例えば、ドッグフード製品をカスタマイズして、オメガ－６およびオメガ－３脂肪酸などの必須脂肪酸の正確な量または割合を与えることができる。オメガ－６脂肪酸の主な供給源はヒマワリ、ダイズ油、サフラワーおよびマツヨイグサ油などの植物であり、一方オメガ－３脂肪酸は主にアマニおよび海産源において見られる。銅が多量に存在し食品の生成において避けられる可能性がある食品成分には、甲殻類、肝臓、腎臓、心臓、肉、ナッツ、マッシュルーム、シリアル、ココア、マメ科植物および軟水（銅管）がある。亜鉛が多量に存在し製品中に含めることが可能である食品成分には、乳、ゼラチン、卵黄、コメおよびジャガイモがある。

【００９５】

食品はパッケージすることが好ましい。パッケージは金属（通常スズまたはフレキシホイルの形）、プラスチック（通常ポーチまたはボトルの形）、紙またはカードであってよい。任意の製品中の水分含量は、使用することができるかまたは必要とされるパッケージの型に影響を与える可能性がある。

【００９６】

本発明の食品は亜鉛の供給源と一緒にパッケージすることができる。亜鉛は任意の形で提供することができる。亜鉛は１つまたは複数の食品内、または本発明の最高レベルの銅を含む食品とパッケージされた別個のサプリメントの形で提供することができる。亜鉛が食品中に提供されるとき、それは本発明の特定レベルの銅を含有する同じ食品内に提供することができ、またはそれは１つまたは複数の別個の食品中に、または両方に提供することができる。したがって本発明は、２１ｍｇ／ｋｇ乾物未満の濃度の銅を有する食品および亜鉛サプリメントを含むパックを提供する。食品に加えたとき、亜鉛サプリメントは少なくとも１２０ｍｇ／ｋｇ乾物の濃度をもたらす。食品および亜鉛サプリメントは、ラブラドールレトリバー品種の遺伝的形質を有するイヌにおける肝臓中銅蓄積に起因する疾患を予防する際に、同時、個別または逐次使用するためのものである。

【００９７】
本発明は、本明細書で論じるラベル付き食品も提供する。ラベルは例えば、食品がラブラドールレトリバー品種のイヌに適していることを示すことができる。他の指標または説明書を提供することが可能である。例えば、飼料または食品が他の成分以外に含有する銅および／または亜鉛の量について言及することができる。さらに、給餌説明書を提供することが可能である。
【００９８】
ラブラドールレトリバー
本発明の食品は、ラブラドールレトリバー品種の遺伝的形質を有するイヌにおける肝臓中銅蓄積を予防するのに適している。イヌは典型的にはコンパニオンドッグまたはペットである。イヌは純血種のラブラドールレトリバーであってよい。あるいはイヌは、混血もしくは交配種犬、または非近交系犬（雑種）であってよい。イヌの一方または両方の親は純血種のラブラドールレトリバー犬であってよい。イヌの祖父母の１、２、３または全４匹が純血種のラブラドールレトリバー犬であってよい。イヌはその遺伝的背景で少なくとも５０％または少なくとも７５％のラブラドールレトリバー品種を有し得る。したがって、少なくとも５０％または少なくとも７５％のイヌのゲノムが、ラブラドールレトリバー品種に由来し得る。
【００９９】
イヌの品種の遺伝的背景は、遺伝子マーカー、例えばＳＮＰまたはマイクロサテライトの対立遺伝子頻度を評価することによって決定することができる。イヌにおける異なるＳＮＰまたはマイクロサテライトの対立遺伝子頻度の組合せは、犬の品種または混血品種の犬を構成する品種の決定を可能にする痕跡を与える。このような遺伝子検査は市販の検査であってよい。
【０１００】
あるいは、イヌはラブラドールレトリバー品種の遺伝的形質に関して試験する必要がない可能性がある。例えばイヌの飼い主または獣医がラブラドールレトリバー品種の遺伝的形質に関する知識を有する可能性があるからである。これは例えばイヌの血統の知識のため、またはその外見のためである可能性がある。
【０１０１】
食品は任意の年齢のイヌに適している。食品は０～１２才の年齢、例えば１～５才の年齢、２～７才の年齢または３～９才の年齢を有するイヌに適している可能性がある。
【０１０２】
一般に、食品は健常なイヌに適している。食品は肝臓中の銅の検出可能な蓄積がないイヌに適している。食品は予防的使用、すなわちイヌの肝臓中の銅の蓄積を予防することを意図するものである。食品は、銅蓄積のリスクを最小にすること、およびそれによって慢性肝炎、肝硬変または肝不全などの肝臓中銅蓄積に起因する疾患または状態をイヌが発症する確率を低下させることを意図するものである。典型的には、食品は、異常な肝臓中銅濃度を有さずしたがって銅関連肝炎を罹患するリスクの可能性がないイヌにおける、銅蓄積を予防する際に使用するためのものである。イヌは銅を蓄積する病歴を有さない可能性もある。したがってイヌは、肝臓乾燥重量約４００ｍｇ／ｋｇ未満の範囲の正常レベルの肝臓中の銅を有することが好ましい。しかしながら、イヌの新生児では、肝臓中の銅の正常レベルは肝臓乾燥重量約６００ｍｇ／ｋｇ未満であると考えることができる。イヌにこの食品を与える目的は、肝臓中銅濃度が正常レベルより著しく高いレベルに達するのを予防することである。イヌの肝臓中の銅の濃度を決定するために使用することができる方法は、当技術分野でよく知られている。適切な方法は実施例１中に記載する。
【０１０３】
銅関連慢性肝炎を予防するために食品を使用することができる。食品はこのような肝疾患を予防する目的で、検出可能な肝疾患を有さないイヌにおける銅蓄積を予防する際に使用するためのものであることが好ましい。食品を使用して、慢性肝炎、肝硬変または肝不全などの肝臓中銅蓄積に起因する疾患または状態を治療することも可能である。肝疾患の

痕跡または症状には、昏睡状態、下痢および黄疸などの臨床的適応がある。肝疾患の生化学的適応には、異常に増大した血清中ビリルビンおよびアルカリホスファターゼ（ＡＬＰ）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ＡＬＴ）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ＡＳＴ）およびγ－グルタミルトランスペプチターゼなどの血清中肝臓酵素の活性がある。このような肝疾患の指標の生化学的測定は、当技術分野でよく知られている。

【０１０４】

食品の対象となるイヌは、如何なる臨床的問題も有さないことが好ましい。

【０１０５】

食品製造

本発明の食品は、適切な成分を一緒に混合することによって作製することができる。食品が必要とされる銅濃度を有するように製造を調節する。銅の濃度は食品の生産工程中にモニタリングすることができる。したがって本発明は、本発明の食品を作製する方法であって、食品が２１ｍｇ／ｋｇ乾物未満の銅濃度を有するように食品の成分を一緒に混合することを含む方法を提供する。食品中に取り込まれる１つまたは複数の要素は、銅の供給源を与えることができる。しかしながら、銅が豊富である可能性がある要素の使用を避けることは重要である。銅が多量に存在し食品の生成において避けられる可能性がある食品成分には、甲殻類、肝臓、腎臓、心臓、肉、ナッツ、マッシュルーム、シリアル、ココア、マメ科植物および軟水（銅管）がある。場合によっては、１つまたは複数の要素は本発明の食品に亜鉛の供給源を与え得る。亜鉛が多量に存在し製品中に含めることが可能である食品成分には、乳、ゼラチン、卵黄、コメおよびジャガイモがある。要素／成分は食品の製造／加工中の任意の時間に加えることができる。

【０１０６】

食品中に存在する銅の濃度を測定して、濃度が本発明による限度未満であることを確認することは重要である。亜鉛の濃度を測定して、それが本発明により好ましい最小レベルを超えることを調べることも可能である。食品の製造方法中のステップの１つは、食品のサンプル中の銅濃度を測定することを含むことができる。銅濃度の少なくとも１回の測定は、食品を調製した後に食品のサンプルから行うことができる。測定を食品の調製中に行って、さらなる成分の添加によって蓄積している銅および／または亜鉛のレベルをモニターすることも可能である。例えば、１つまたは複数の成分の添加後に、サンプルに測定を行うことも可能である。銅、亜鉛および他の元素の測定は、フレーム原子吸光分析などの当技術分野で知られている任意の適切な方法を使用して、サンプルに行うことが可能である。

【０１０７】

典型的には、本発明の食品を作製する方法は、任意の原材料（raw ingredients）を任意選択で調理しつつ成分を一緒に混合するステップと、食品のサンプル中の銅、および場合によっては亜鉛の濃度を測定するステップと、食品をパッケージするステップとを含む。食品を作製する方法は、イヌの飼い主、イヌにエサを与える担当の者もしくは獣医に食品を与えること、および／またはイヌに食品を与えることをさらに含むことができる。

【０１０８】

食品が如何なる銅も含有しないことが稀である可能性がある一方で、本発明により必要とされるレベル未満に銅濃度を依然として維持しながら、銅をサプリメントとして食品に加えて、（例えばアメリカ飼料検査官協会（ＡＡＦＣＯ）によって勧められる）イヌの飼料における銅の最小１日必要量を達成することが可能である。したがって本発明は、ラブラドールレトリバー品種の遺伝的形質を有するイヌ用の食品の製造における銅の使用であって、食品が、２１ｍｇ／ｋｇ乾物未満の濃度で銅を含み、前記イヌにおける銅蓄積に起因を予防する際に使用するための食品である使用も提供する。銅は任意の適切な形で食品に加えることができる。銅サプリメントの例には、塩化第二銅および硫酸銅五水和物がある。

【０１０９】

本発明中で使用する食品製造装置は、以下の要素：乾燥ペットフード成分用容器、液体

用容器、ミキサー、成形機および／または押出機、切断デバイス、調理手段（例えばオーブン）、クーラー、パッケージング手段、およびラベリング手段の１つまたは複数を典型的に含む。乾燥成分用容器は、底部に開口部を典型的に有する。この開口部は、回転式ロックなどの体積制御用エレメントによって覆うことができる。体積制御用エレメントは電子版製造指示書に従い開閉して、ペットフードへの乾燥成分の添加を制御することができる。ペットフードの製造において典型的に使用される乾燥成分には、コーン、コムギ、肉および／または家禽肉がある。ペットフードの製造において典型的に使用される液体成分には、脂肪、獣脂および水がある。液体用容器は、例えば電子版製造指示書により制御して、測定した量の液体をペットフードに加えることができるポンプを含有することができる。

【０１１０】

一実施形態では、（１つまたは複数の）乾燥成分用容器および（１つまたは複数の）液体用容器をミキサーと結合させ、指定量の乾燥成分および液体をミキサーに送達する。ミキサーは電子版製造指示書により制御することができる。例えば、混合の時間または速度を制御することができる。次いで混合した成分を、典型的には成形機または押出機に送達する。成形機／押出機は、混合した成分を必要とされる形状に成形するために使用することができる、当技術分野で知られている任意の成形機または押出機であってよい。典型的には、混合した成分を、限定した開口部に圧力下で押し通して連続ストランドを形成する。ストランドが押出されたとき、それをナイフなどの切断デバイスによって小片（キブル）に切断することができる。キブルは典型的には、例えばオーブン中で調理する。調理時間および温度は、電子版製造指示書により制御することができる。食品に望ましい水分含量が生じるように、調理時間を変化させることができる。次いで調理したキブルを、クーラー、例えば１つまたは複数のファンを含有するチャンバーに移すことができる。

【０１１１】

ペットフード製造装置は、パッケージング装置を含むことができる。パッケージング装置は典型的には、プラスチックまたはペーパーバッグまたはボックスなどの容器にペットフードをパッケージする。装置は、典型的には食品をパッケージした後に、ペットフードをラベルするための手段も含むことができる。ラベルは、その食品が適切であるイヌの型（すなわちラブラドールレトリバー）、および／または食品の成分を示すことができる。

【０１１２】

食品の使用

本発明の食品は、イヌにおける肝臓中銅蓄積を予防するために使用することができる。したがって、本発明の食品は、銅関連慢性肝炎、肝硬変または肝不全などの多量の肝臓中の銅と関連する疾患または状態を予防するために使用することができる。したがって本発明は、ラブラドールレトリバー品種の遺伝的形質を有するイヌにおいて肝臓中銅蓄積および肝臓中銅蓄積に起因する疾患を予防する方法であって、本明細書に記載する食品をイヌに供給することを含む方法を提供する。本発明は、ラブラドールレトリバー品種の遺伝的形質を有するイヌにおいて銅関連慢性肝炎を予防する方法であって、本発明の食品をイヌに与えることを含む方法も提供する。本発明の食品は典型的には、ラブラドールレトリバーにおける銅の蓄積を予防する際の予防的使用のためのものである。本発明の食品は典型的には、ラブラドールレトリバーにおける銅関連慢性肝炎を予防するためのものでもある。

【０１１３】

本発明の食品は、本明細書に記載する遺伝子検査によって、肝臓中銅蓄積に感受性であると決定したイヌにおいて、肝臓中銅の蓄積を予防する際に使用するための食品であることが好ましい。

【０１１４】

本発明の食品の使用は、イヌに亜鉛の供給源を与えることを含むことができる。本明細書に記載するように、亜鉛は任意の適切な形でイヌに与えることができる。低レベルの本発明の銅を含有する食品は、例えば少なくとも１２０ｍｇ／ｋｇ乾物の濃度で亜鉛をさら

に含むことができる。あるいは、１つまたは複数の別個の食品またはサプリメントの形で亜鉛を与えることができる。本発明の食品の使用は、イヌに亜鉛サプリメントを与えることを含むことができる。亜鉛サプリメントは、任意の時間で、すなわち個別、同時または逐次に、本発明の食品に与えることが可能である。亜鉛サプリメントは、それをイヌに与える前に、例えば本発明の食品と混合することが可能であり、またはそれをイヌの飲料水に入れることが可能である。

【０１１５】

本発明の食品は、１日当たり１回または複数回イヌに与えることができる。本発明の食品は、イヌの従来の食品の代わりに与えることが好ましい。銅蓄積を予防する方法または慢性肝炎を予防する方法は、無期限の時間の間、すなわちイヌの寿命を通じて使用することができる。

【０１１６】

本発明を以下の実施例によって例示する。

【実施例１】

【０１１７】

銅蓄積に対する感受性と関連するＳＮＰの解明

１２０匹のラブラドールのＤＮＡサンプルを、２２０００を超えるＳＮＰで遺伝子型決定した。多量の銅を含むイヌ（銅の肝臓中レベルが６００ｍｇ／ｋｇを超える）由来の７２のイヌのサンプルおよび正常な銅の肝臓中レベル（４００ｍｇ／ｋｇ未満）由来の４８のイヌのサンプルが存在した。データはそれぞれの考えられるイヌのペア間で一対比較法を使用して分析した。データは疾患の情報を与える遺伝子座の立証によって整理した。ブール(Boolean)演算子を使用して最適な３箇所のゲノム位置からのデータを使用して、高い銅レベルと関連がある最適化マーカーを見つけた。３箇所の位置を使用した単純化ブールモデルの結果を以下に示す：

【０１１８】

【表１】

表 Ｉ　ゲノム位置CFA8、CFA32およびCFAXを使用した単純化ブール(Boolean)モデルの結果

CFA8 (GOLGA5 遺伝子領域)	CFA32 (UBL5 遺伝子領域)	CFAX (ATP7a 遺伝子領域)	多量の銅を有する対立遺伝子のこのパターンを有するイヌの割合(%)	
1	x	x	69.0%	
1	1	x	72.3%	
1	1	1	81.5%	全3個の対立遺伝子を有する27匹のイヌのうち、22匹(81.5%)が多量の銅を有する
1	1	0	60.0%	
1	0	x	64.9%	
1	0	1	77.8%	
1	0	0	60.7%	
0	x	x	36.1%	
0	1	x	55.6%	
0	1	1	42.9%	
0	1	0	63.6%	
0	0	x	16.7%	
0	0	1	50.0%	
0	0	0	7.1%	3個の対立遺伝子を全く有していない14匹のイヌのうち、1匹が多量の銅を有する

【０１１９】

表Ｉ中の２進値のキーは以下の通りである：

ゲノム位置ＣＦＡ８（ＧＯＬＧＡ５遺伝子）
１＝ＳＮＰ　ＢＩＣＦ２Ｐ５０６５９５にＡＡ遺伝子型が存在する場合
０＝ＳＮＰ　ＢＩＣＦ２Ｐ５０６５９５に任意の他の遺伝子型が存在する場合

ゲノム位置ＣＦＡ３２（ＵＢＬ５遺伝子領域）
１＝ＢＩＣＦ２Ｐ７７２７６５にＧＧ、ＢＩＣＦ２Ｓ２３３３１８７にＣＣ、およびＢＩＣＦ２Ｐ１３２４００８にＧＧが存在する場合
０＝これらのＳＮＰのいずれかが異なる遺伝子型を示す場合

ゲノム位置ＣＦＡＸ（ＡＴＰ７ａ遺伝子領域）
１＝ＢＩＣＦ２Ｐ５９１８７２にＡＡまたはＡＧが存在する場合
０＝ＢＩＣＦ２Ｐ５９１８７２にＧＧが存在する場合

全ての位置において、Ｘ＝未使用対立遺伝子(unused alleles)。

【０１２０】

表Ｉは３箇所のゲノム位置における対立遺伝子の二元条件を表す。ゲノム位置ＣＦＡ８において、１つのＳＮＰを使用した（ＳＮＰ１）。ゲノム位置ＣＦＡ３２において、３つのＳＮＰを使用した（ＳＮＰ２、３および４）。ゲノム位置ＣＦＡＸにおいて、１つのＳ

ＮＰを使用した（ＳＮＰ５）。２進値は、銅蓄積に対する感受性を示す対立遺伝子（「悪(bad)」対立遺伝子）を有するイヌを示す。例えば０００は３つの悪対立遺伝子のいずれも有していないことを表す。１１１は３つの悪対立遺伝子の全てを有することを表す。Ｘはその遺伝子における未使用の対立遺伝子である。ライン１ｘｘおよび０ｘｘは、ＧＯＬＧＡ５遺伝子中のＳＮＰのみを使用する１つの遺伝子検査が有し得る検出力を示す。

【０１２１】

表ＩＩは、示した対立遺伝子うちのより多くを有するイヌは、平均して高い銅濃度を有することを示す。それぞれのパターンを有するイヌの数も見ることができる：

【表２】

表 II

遺伝子の組合せ	Cu_2 の平均量 (mg/kg)	多量の銅を有する対立遺伝子のこのパターンを有するイヌの割合(%)	パターンを有するイヌの数
111	1253.09	81.5%	27
110	733.40	60.0%	20
101	1138.90	77.8%	9
100	737.84	60.7%	28
011	502.27	42.9%	7
010	670.83	63.6%	11
001	450.00	50.0%	4
000	332.47	7.1%	14

【０１２２】

【表３】

表 III　表 I および II 中の結果に関して使用した SNP の位置および配列

SNP	配列番号	canfam2中の染色体	canfam2中の位置	変異を含有する遺伝子または変異付近の遺伝子	SNP 配列 SNP = [野生型塩基／別の塩基]
BICF2P506595 (SNP 1)	1	8	4886813	GOLGA5	CTCAGAACTAGATAGGCTAATAAGTGATAGGCCTTGTGTTTTC CTAGAGTGTGCTTTAAA[A/G]GTTTCTTAAGCTAAAAAATTA CATTCGTGAGAAAATTGAAATAAAAGGAAAACAGTCATG
BICF2P772765 (SNP 2)	2	32	39278300	UBL5	TCTCAGATACTTGATAGCCAGCATTTCCCCCCATTTCTTCCA AGAGCACGAAAGCATAG[A/G]AATGATATTACATCTCGTATG GTGAATGTGACACAGCCGTCAGTTGCGTTAGCTCTGCTT
BICF2S2333187 (SNP 3)	3	32	39390236	UBL5	TATTACCCTGCTCTCCAGCCACTCCTTTACCTTCCATTAGCCC ACACCTGCTCTACACAC[T/C]ATTGCTCATGGAAGCCTTGCC ACGTCCAGTCGCCACTCTGAAATGCCAGCATCCCTCCCA
BICF2P1324008 (SNP 4)	4	32	40043909	UBL5	GACCTGACAGATTATGTAGACTTTGTTTTCAAAGGGAGCACCT GCTGGATATACAACATG[A/G]CACTAAATTGTGCTCCACATC CTTGGCAGAGGTGGGGGGCGGGCACAAAGGAAGAACC
BICF2P591872 (SNP 5)	5	X	62989720	ATP7a	GGGCCCAGCAAGTGGCAGAACTGGGAAGACCCCCTCTTCTTCC GCCTGGAGCAGTGGTGT[A/G]GCAGCACACCACAGGAGTCTG AAAGGGTGGGGAGTCCAAACGGGAACATATACCTGAGAT

【０１２３】

【表４】

表 IV　肝臓中銅蓄積に対する感受性を示すさらなるSNPの位置および配列

SNP	配列番号	canfam2中の染色体	canfam2中の位置	対立遺伝子頻度	微動(minor)対立遺伝子頻度	SNP 配列 SNP = [野生型塩基／別の塩基]
BICF2P1246154	5	X	47335181	0.999507	0.000493	GGCAACAGGGACAGGCTGCTGGGCCACACACTCACCCACACT AGGAGACAAGATCCTCCA[T/C]ATCCTGGGTCTCTATCAGT CAATCACCTAGACCAGTGGGCCAGAGGACAGGGTCCAGCTG
BICF2P463335	6	X	44401786	0.000493	0.000493	GTTGAGAGAGATCATACAGATTCATGTGGCAGGTGCACACTT TTTCTACCTCTTACAACG[T/C]ATTCTCTCTGGCCATTCCT TCTCCTGGGTCCCAAAGTCGGAGAGCTTAGCGGGAGCCTAG
BICF2P1246989	7	8	4149835	0.999506	0.000494	ataagttcacattttgGTGTTTCAAGTGGACATGAATGGAGG GGAGGGCCCTGTTCAATC[T/C]ACTAAAGTGTTTTTTCATC TTGTTTTTTGTGGAAATCAAATCAAGAAGCAGAGTTTTATGT
BICF2P723557	8	8	3406227	0.999014	0.000986	ACTCTCCCGATGTGGGCACCATATGGTGGACCACTTTCTGTG TGAGATGCCTGCTCTTAT[T/C]GCCATGTCCTGTGAAGACA CCATGCTGGTGGAAGCATTTGCCTTTGCCCTGGGTGTTGCC
BICF2S2342729 8	9	8	5393517	0.999014	0.000986	AATCTAAGTAGACTGAGTGGTCACCTTCAGCGCTCAGACCTG AGCATACAAAGCATGGAA[A/G]GTTACTGTGATTCAGCTGA TGTAATGGAATGAAATAAATATAAGAGTTTGGTAACCTAAT
BICF2P312189	10	8	5773958	0.999014	0.000986	TGGAGAGTGCTGGCAGGCAGGGGCAGGCAAACAACACAATAGCA AAGATCTCTTCCACGCTT[T/C]TACTTCCTCAAAAGTCCAA GCCCTCTTAAGATCGCATTTTCTTAGTGACCTTCACTCTAA
BICF2S2432158 3	11	X	56410647	0.999014	0.000986	TTCTTTGCTAGGCCAAGGGCAGAGAATGCATGCCCCCCCTTA CCTCCCAGGGCCCAAGAG[C/G]CATCCTGAGCTGAGTCTAT GGCTCCTGGTGGGGGGCGGCTGTGGGTTGGGGGGGCACAGA
BICF2P1273450	12	8	3160594	0.999013	0.000987	ggtgtcaccaatgccagcgagcaccagctggagggaacagga cacaggtcctccgtcCTG[T/C]GACACTCGGATCTGGGGCT TTGCCTCCAAAACGGAGACCATGCCTGTCCATGGTTCTACG

【表５】

SNP	配列番号	canfam2中の染色体	canfam2中の位置	対立遺伝子頻度	微動(minor)対立遺伝子頻度	SNP 配列 SNP = [野生型塩基／別の塩基]
BICF2P1439540	13	8	3771142	0.998521	0.001479	CTCTAGAACCCTTCAGGTAGACTACATTCACTTTCTACTACA ACTTCATCACCACAACCA[A/T]CTCCCAGTAACCCCCtttt tttcttctccttttttttattttttccttctttttgctcgtc
BICF2P506204	14	8	4191144	0.998521	0.001479	TCCCATGGGTTGAAGGATATCTGGCAGACGGCTCCAACTCCA GTAAAGCCTCAGGCCTCA[A/G]CCAGGAGTTCCCCGGGGCT TCATTCCCATCCCAGACTTTGCCCAGGGCTGATTTGAAAGT
BICF2P380732	15	8	3299879	0.998519	0.001481	TCTTCCTTGCAGATTGGATGGCTGTAGCCTCACCTCACACTG TTGCTGGGATCTGTCCAC[A/G]CTTCTGACCTCCAGCAAGA GCCTCCGGGAGCTAAGCCTGGGCAGCAATGACCTGGGAGAT
BICF2G63016020	16	X	73980557	0.004955	0.004955	TATTGCTAGTAAAGCCAAACTTTCTATTCCACAATTATAAAC TCATGGAGATGGTAATTA[T/C]AGTGCATTATTTGTCAAAT TTTATTATTTTTTCAAATCCCAAAGAAAATGTGATATTCTA
BICF2S23623569	17	32	38362784	0.994576	0.005424	AAGAACAAGGATACAATCTAAGTGATAATCATCCAGCATGTA CTTGTCCTGTTTTCAGAT[T/G]ATCAGCTTAAGTCAAGAGG AATTTTTAGTGCTTACAAATATTTCAAGTGATTTTTCCAGA
BICF2P216837	18	8	7474389	0.012327	0.012327	TGAAGGGGTGCTACTCAGGGCTCTTCATTTAACCTTCCAGGA TGTTTTCCTATGTACTCA[T/C]TCTTCCTTTTGGTTGCTCC TTCTTCTTGCATTTCTTTATCTCTTTACAGAATCATCCAGG
BICF2S22922146	19	X	75388683	0.986193	0.013807	acaaccctaaaatttcagtgattcagtacaacaaaggtttat tATAACCATTCAGGGATC[C/G]AAGTTGGTAGAAACTTCAC TACAATACCTGCTTCCAGTCAACAAGACAGAAAAAGAAAAA
BICF2G63015714	20	X	74415223	0.01382	0.01382	GCAGGGTTGATATATAACTAGTATGCATTAGGTAGACACCTA TTTTGATTACTCACTATT[T/G]TAATATCAGCCTGGTAGTA AGAACCAAATCTATTATGTAAAGTGCATAGAGAATTGaaag
BICF2G63015674	21	X	74439123	0.0143	0.0143	CTAGCTAGCCACCCAACTCCCCACATGCCCAGAGTCATCGTT TATCTTTTCACATCAGCA[T/C]TACATTTTGGCTTGCATTC AAACATTAGCCCATTTTTTTTCCTTTTGTTTTATTTATAGA

【表６】

SNP	配列番号	canfam2中の染色体	canfam2中の位置	対立遺伝子頻度	微動(minor)対立遺伝子頻度	SNP 配列 SNP = [野生型塩基／別の塩基]
BICF2P426463	22	8	5833993	0.015286	0.015286	TTTTCTCTTTTTCCATAAATGCTCTGGGCTTATTTTCATTTAT CTAGTATTTCTCTTCTGA[A/G]GCTAACTCCCAAAGAGTTT TGTGCATCCTTATTTCCATCACAAGGTCAATGTACGAGTTA
BICF2S22926688	23	8	7502279	0.015779	0.015779	GGGCCCAAGGGCTGAGGATCTCTGTACCTTCTGCTTCTTGGC AGCCCAGGCTGGGTAGCA[T/G]TTCTTGGAAGAGGATTTCC CATGAGTTGTTAACAGAAGGGCGGGCTTCCAGGCGCTGCTT
BICF2P1113947	24	32	38074100	0.981169	0.018831	CATCTTTGCTTGGGGCCTGGGTTTTTATTGAGGATTTGTGAT CTGGTGTATGTGTCTCCT[T/C]AGGCATCCAGAAACCATTC AGAACAAGAACAAGCGTCCAGGTATCCTCTGTAAGTCACTT
BICF2P342874	25	X	44861101	0.020217	0.020217	ACAAACCCTCAGACCCAGATACACAGTATCATGTGGACACAG ACATGTAACACCAAAATG[A/C]CCAACATCATGTGACTACA GGCCCTAAGCAACTAGGTGTAACATCACTTGGGTATGGGCC
BICF2P1171925	26	32	36457625	0.022189	0.022189	AATGCAGTAATACATGTAGCTAAACCTAACCATCAGAGTCTG TTCTATCCTTCTACAAAA[A/G]TAGGGTTGGAGCTGAGCAC ATAGGTAGCATACATCTAGCAAAAGTTTTTGCCTTCAgatt
BICF2G63017200	27	X	71984532	0.025641	0.025641	ttgtgggtcaggtgagttatggacccctccctactcttctg ctatcttgcccCTACAG[T/G]GGTTGCTATTTTGATGTAA TCACAAAACGACCTGGCAATAAAACCTTTTTCTAATTAgggg
BICF2P1286548	28	X	57448138	0.026423	0.026423	GATGCAAGCTGGGACAGAATAAGGTACTGGGCTGTGTCAAGC CCCAGTAAGAGAGGAGCA[T/C]TGTAGGGTAGTTAGGATGG ACTTAATGGAGATGAGTCCTAGGGAGCCACACTCAGAGTTA
BICF2P790089	29	32	38885957	0.0286	0.0286	TAAACACCCCCAATCACTACCATCCTCACACCTAAGGATACA CAATGTGTCTACTTTATG[A/G]TATGTCTTTACTATTCGTT GCTTATGAAATTTTATTCATTAWCTAAAACAGGGAAAAAAG
BICF2G63016713	30	X	72619011	0.9714	0.0286	TATAGYTGGSCAATTAAATCTCCTATTCTTTTGTCTCAAAGG ATATTTGAAATTACATAG[T/C]TCTTTTCTCATATAAAACC TACCATACAATCATTAGATGATCCTTCTTAGTTAATTTTTT

【表７】

SNP	配列番号	canfam2中の染色体	canfam2中の位置	対立遺伝子頻度	微動(minor)対立遺伝子頻度	SNP 配列 SNP＝[野生型塩基／別の塩基]
BICF2P276536	31	8	3149437	0.966436	0.033564	GATGCTGTGGGCCAGTCCAGAACCCACCTGAGAGAAACAAAC AGGCCTCTTTGCCAGCAG[A/G]GCAGCGTCAGTGTCACCCC TGTGACATGTCAGAACCTCCCTGAAAGTTCATCTAACCTCT
BICF2G6301565 8	32	X	74531965	0.963018	0.036982	GGCTCAGAAGAAAAATCAGCCCAGTTCACATCCAATGTTTCC ACACATCTAATCGTCTTG[A/G]GTTCAGAGGTAGATGTGGT ATCACTTAYATGGACACATATAACAGCTGGCCCCCACCTCT
BICF2P308749	33	8	7325380	0.962032	0.037968	gtttcagttaatatagtccttactggatccgattgctgtgg cgctaaaatgaAAGAAGG[T/C]Agggtacctgggtggctca ggggttgagaatctgcttttgactcaggtcatgatcccagg
BICF2P872820	34	8	6388554	0.956114	0.043886	CAGAGTAGCATTATTTTCTGCTGTATGAGGACACTTTGTTA TATCCACAGTGGACAGAA[A/G]ACTGGGTTTTAGAACATGC TCAATTGAAACAAGACTGAGGGCTCACAAATTCCTGCTCCA
BICF2G6301621 0	35	X	73592920	0.955084	0.044916	TTACTTATTCATCTGAGACCAAGGCCACTGTGGTGAACCTAC AAAGCCTTACAAAGCAGG[A/G]CCAGAAGGGCACATAAATC ACTTGACTAACATTTGGTCAAAATAGCTCTTGGGCTCTTTT
BICF2G6301620 9	36	X	73593955	0.049456	0.049456	ATAAAAATAAAAGAGCTATTAATAAGAACTCATAAAATCTAC ATAAATATAGTAACAGGT[T/C]AATATTCCCAGCATATTTT TACAAATCATCTATAAAGAGCATGAGAGCATATAGGGATTA
BICF2P1149405	37	32	41212550	0.941321	0.058679	GCAACAACCTGGTTTGTGTGTGGGAAGCTAATGCCTCCCCAA ATGCAGCAAACTCTCCTC[T/C]TGATTTTAGAAAAGCAGTT TAGTTACAGGCAAATGCATACATGCATGATAAATACTACTC
BICF2G6301617 3	38	X	73672050	0.940828	0.059172	GATTTTATAAAACATGATGACCTTGGCATTTATATAGTAGAT ATTACTACTCTGAAATTC[C/G]AGGAAGTATGATCATAAAC TCACACTTAATCTGGTAGAAGTATGGACAATGTATCAAAGG
BICF2P401962	39	8	4495597	0.935897	0.064103	CTTGGTTGAGTTAAAACATTTGCCCATGCAATTTAATGCATG TCCCTGTGGGGTTGGAAC[T/C]GACGTACACCCGAGCCAAC AGCCTTTCATGGCAGACGCCATCAGGCAGGTGACCCCCACC

【表８】

SNP	配列番号	canfam2中の染色体	canfam2中の位置	対立遺伝子頻度	微動(minor)対立遺伝子頻度	SNP 配列 SNP = [野生型塩基／別の塩基]
BICF2P991264	40	8	3165755	0.071992	0.071992	CCTTCCACACGCTCAGGTTGGCACGGAGGGGGTGTCCTTGCC TGAGGGGTCCTGGCACAG[T/C]CATCAGGGCACACAGCTGA TAACCCAAGGGAGCAGTAGGCAAGACCTCATGGGCGCCGGG
BICF2S23230847	41	X	58531292	0.079389	0.079389	ATTCTCTTTGCTGTCTCCTGTATACAGAGATAAAAGCAAGAG TTTTCCCCTTCAGGTTTC[T/C]GAAACCCAGCTTCCTTTAG ATTTTAAGGGGTATTCTGTGTACCCATTTCCCACCTTCTGC
BICF2P1252842	42	8	4618608	0.919132	0.080868	GCGGGTTGGGACCCCCCCTTCTGCTGCTCCCACTTCAGAGTT GTGGCGTCACTAAGATGA[C/G]ACCTCATGTCGGGAACCTG AGAGTCCCTCGGGAGTTGTGcagggactgtagccgacctat
BICF2G6301719 8	43	X	71984983	0.913947	0.086053	ACATATGCACAGTGAATCGTGGATTGTTGTGTTTGATTTCTT ACATGATACAATAAAAGG[A/G]AAGTAGTTGAAGCAAAACT TTAGTTTAAAGGAAACAATTTCTCTATCATAATGTTCAGTG
BICF2P1364202	44	8	3175135	0.910256	0.089744	CCCACAGACCCCAGGTGCTGACCACAGCAGCCACTTGGCCC CCAATGCAGGAGACACCT[T/C]GGGAATGAAGGGGACAAGG CCAGCTCAGGCACATCGTCAGTGCACCTGATGGGAAGGCCG
BICF2P963708	45	8	5472668	0.095945	0.095945	ATCTGATCCTAGCCAATGGAAAGCAATTTGAGATAGGAATCA TATCTTGTTTTGGTTTAT[A/G]TGCTTTCTTTGGAGTTTTG CACATCATAGATAACTGTAAATTTGTAGAATAAATGTTTGA
BICF2S22939481	46	8	7696228	0.098619	0.098619	GTCAATGCCATTAACCTGGCGAAGCTGCTCGAGCATCCACTG CGATCTCCGCACGAACGA[T/C]GTGGAGCCTTCAAACTGTT TGACCTTCGTGATGGATGCTTGTGTGGGTTTCTTGTTTGTC
BICF2P1028186	47	32	40758922	0.107495	0.107495	ACTGGTTAATAAGACTTCACAGATTTTATCCATCATGTTGAT TATCTGTATATGTATTTT[T/C]TACCACTTAGGATAAAGTT CTGTTATCTGTAATTGATTCCAACCAGCATGTTTGCTCCAA
BICF2P19238	48	32	40849057	0.892012	0.107988	CTTCTTCTTTCCCATTGGATTCTTTCATCAATCGTAGGTAGT TCTTAATGAAGATCTGTG[A/G]TAAAGCCATTCATCTATTC ATTCAACACAAATGGCATCACAGAAAAGAAAAATAACCTTTAT

【表９】

SNP	配列番号	canfam2の染色体	canfam2中の位置	対立遺伝子頻度	微動(minor)対立遺伝子頻度	SNP 配列 SNP = [野生型塩基／別の塩基]
BICF2P247312	49	8	7825200	0.112426	0.112426	GGGACACATTTCTGGACAGACCTCTGATCACACTCACAGGAC AGCAAGAGGAAGCTCTGG[A/G]TACAAGTACAGGGAAAAAA GAAAGAAATGGTCACAGGGAAGCTGCCGCAGGAAAAAGGTA
BICF2S23017118	50	8	7615543	0.881164	0.118836	GGGCAGATCCTCAGTGAGTATTGGCTCATGTTCTCCGAGGGA AGTAGAGTCCCAGAAGAA[A/G]GATGCTAAGGTGCCCAAGAT TCCTGAGCCTGTGTGTGGTACAGTCACAGCAGTACTCCTGA
BICF2P132419	51	32	35699747	0.874506	0.125494	TCATCTCCATTTGTAATAGAAACCACATATATAGAGAGATTG GATTATTAACCACTAAAA[T/C]GTAGCCACTCAAGGGGAGG GGGGGAATGCATTTGGTTTATTTCCCATGTCAAAACAGAAT
BICF2S2311591	52	32	40712955	0.873393	0.126607	AACACTGCTAATAAATATTTATAATGGTTTGAGGAAAATATC AGGTGTGAGATGTCTTCA[T/C]ATCATATAATATATCATAA TATCCTCTAAAAAAGCTCTAAGCATAGGTCTATGGAACTCA
BICF2G630531773	53	X	43502595	0.127219	0.127219	AAGCAATCCAGGAGTCTTTCTCCGGGTAGCAGGCTCGCTTTA CAGGTTAAGGCTGGATGA[A/G]AAGGAAGAACCTGAGCTTC AAATTATCATCTGAGTAGAGCTGATACCCCATGGTTACATTA
BICF2G630587826	54	32	38771348	0.127838	0.127838	GATTTTATTCTTTACTTTGATTTTTTTTTAAGTTTTTACTATGA TATTCAATATGATTGTGG[T/C]TCATGAGATTCCTCTTTTTT AGCTGTATCATTAACTACAGAGCGTTCTCAAATATTTTTCT
BICF2P1007047	55	8	4812890	0.87092	0.12908	GTGGCCGGAGGGGGTGGGCCCTACTGTGGCCCAGCTTCACGT CCCACTGGCCAAACATCA[A/G]GATGCAGACACCCAGGTCC CTTGTGCTGCCTGCTGAGGCTAGGAGCAGCGACTGGAAATG
BICF2G630531804	56	X	43317321	0.869329	0.130671	GATGGGAGACCTCATACACATGCAAAGATCACTATTAAAGAC TCTCGAGCAAAGATCGAA[T/C]GGACTGTGGCAAGCTGCCG CGCATGCCAATCAACAAATGCCTCCGACCATGGATCTAACC
BICF2S23632876	57	8	5656863	0.866371	0.133629	CAACAAGGTTTTTAAGGTTCTTTTCACTACCTTCTTCTTTTT GTACTTGCTTAGGACACC[T/C]GTATGTCTTCACAATATCA CCTGAAAGTCCTTTAGGAGATATACTCAAAAAATAAATAAA

【表１０】

SNP	配列番号	canfam2中の染色体	canfam2中の位置	対立遺伝子頻度	微動(minor)対立遺伝子頻度	SNP 配列 SNP = ［野生型塩基／別の塩基］
BICF2G6301558 7	58	X	75321307	0.865385	0.134615	caacctgagctgaaggcagacactcaactgttgagctaccca ggtgtaccAAACACATCT[A/G]CTCTTAACCAAGCTTATTC TTTGCTATATTTGGCAAATTGTGGCATGTCTACAGTACTCA
BICF2P482693	59	X	43587959	0.864892	0.135108	ATTCCCCATGTTTGAGGAAATCACAGGAGCCACTAGGAAATC AACCATTTCCCAACCAAC[T/C]TGATGATTTCCTGATCCAA AGGTTCTCCCAGGACAAATATGAGGTAGCCTTTCACACTCT
BICF2P940430	60	32	40921126	0.136364	0.136364	CAGTCTTGTAGGAGAGTAGATTGACTCACAGAACTGGCAAGA TTGGGAATCTGAGCATTG[T/C]CACTTGAGTCTTAAAACGT TTACGATTTTATTTCTAGTATTTCAATAAGAAACACATTCT
BICF2P786384	61	32	36389913	0.136723	0.136723	GAATACATTGCCAGAATAATTTCAAGTTCTCAAATCTCAACT AATAAGATTTTCGTTTAAA[T/G]AAGGCATTCAATCATCACT TACTGACAACCCACAAAATTAGGCACTGATGAAAAATTAGC
BICF2P1340243	62	32	41050914	0.150394	0.150394	AAGTTAAGATATTCAAGAAAGAGAAGAGTGACTGAGCTAA AAAGAAAATCAGATCTCT[T/C]CCAGGCTTTAAAATAATCT CCACAATACTGGGCAATCCATGTAGTCTCCCCAGTTCCATT
BICF2S2362644 5	63	32	36617978	0.153846	0.153846	CTCAAAAGGAAAAGCCTGTGGAAAGGCAAAGAGGTATGTGAA AGAGGTAAGTTCAAAATG[C/G]TGACATGACCAGTGTACAT AGATTACAGGGTACTTGGAGGAGCAGTGAGAAAGGAGTCCA
BICF2P161586	64	32	37795702	0.156312	0.156312	TTCTATGAAATAGCTACCATTCTGGTTGGTATCTTCTGTTGA TTTAGATGATGAAGGAAG[T/C]ATAAGAAGTAAGGCTTATG AGTTTATATAAAGCTTTAGTTAAAGCTTTGATTGTGACAAAGC
BICF2P579617	65	32	36631235	0.162389	0.162389	AGAGGAGAAAACACAGCTAAAAACTTTTTTACAGACTGGACA AAGGTGCTTACACTTTTC[A/G]TATTgggcagaatgagggg atgaaaaccaccagtggtctttttgaagccacacaaattcag
BICF2G6301628 0	66	X	73386098	0.835968	0.164032	AGGATGAATATTTATTAACAGTAAATATACATTTTTATTGTT CTATATACTCTAAAGACA[A/G]TTGTAGACAGTAAGATATA TCAATTTTAGAAACAGAAATAATGTTAATTGTATAATATGG

【表１１】

SNP	配列番号	canfam2中の染色体	canfam2中の位置	対立遺伝子頻度	微動(minor)対立遺伝子頻度	SNP 配列 SNP = [野生型塩基／別の塩基]
BICF2P721687	67	32	40771787	0.829389	0.170611	CAGGGATTCCTAAAGGGTGACATGGTATGGTCTAACACTTCC TCACTGTCCTTTTCCCAG[A/C]TGATATAAGAGGAGGACCA GAGAGACACATAAACTGTCTGAGTCTTTAGCATTGTGATAA
BICF2P504739	68	32	37328946	0.827909	0.172091	ACACTAATGGGTAGAGAATACACGTCCATCAGTCATCAATGT AATCTACTAACAGCCTCA[C/G]AGTCTGGCAGTTTTCAGTG AAAAGAGGAGTCATCTCCATTTATTCGAtcaatcagttgac
BICF2S2331874	69	32	39390236	0.825444	0.174556	TATTACCCTGCTCTCCAGCCACTCCTTTACCTTCCATTAGCC CACACCTGCTCTACACAC[T/C]ATTGCTCATGGAAGCCTTG CCACGTCCAGTCGCCACTCTGAAATGCCAGCATCCCTCCCA
BICF2P772765	70	32	39278300	0.816075	0.183925	TCTCAGATACTTGATAGCCAGCATTTCCCCCCATTTTCTTCC AAGAGCACGAAAGCATAG[A/G]AATGATATTACATCTCGTA TGGTGAATGTGACACAGCCGTCAGTTGCGTTAGCTCTGCTT
BICF2S2318354	71	32	35849858	0.18787	0.18787	ACAGGAAGGAGAACTGAGCATCAAGAGAGTTCAGAACATGAT CATTGGGTCAGTTTGTGG[C/G]TGCATTAACTTTTCCCCAA AACAGAAAGCAACAGAGACTTCTGTAGGTCAGTCAACAGTG
BICF2G6305880 54	72	32	38521693	0.810052	0.189948	TTACCATTACTATAACCCAAGTTATAGTATACTATAACCAAG TCCTTAATTGACTTGATG[T/C]TTGTGCAGCTGATTTTTAAA TCTATTTAGAATAATAGTTTACTTGTGACAATTCATATTAA
BICF2S2331344 5	73	8	6343006	0.809665	0.190335	TTGGTCGACTGACTGATTGGTTTTACTGTGGAGGAAAGAAAA GGGAATTTTCCCCAAAGAG[A/G]ACAGAGAGAAAACATGGAA TTGAGCAAAGGGAGAGAATAGAGAGACAGGGCAGCCACTGAAG
BICF2P675334	74	8	4477476	0.19428	0.19428	TGCCTTATCCTCCAGCTCCTCCCCTCACCATCTTGGAAACTAG CTCAAATGTCACTGGTAC[T/G]TGTCTTTCTTTTGATCTTT CTGAAAGACAAACATGATCCCCATCACCTCTGCCTTTAGAAC
BICF2G6301740 9	75	X	71722644	0.804241	0.195759	ACTCCTAAGTAAAAGTTAAATTAACAGATTTGCCATCAAGTA CCTTGCCCATTTTTCCCTA[T/C]AGATCGACTTTTTTACTGGA TGATCCCCCTTGATAATAATCTTGATCTATGTTTTTAATTCCA

【表１２】

SNP	配列番号	canfam2中の染色体	canfam2中の位置	対立遺伝子頻度	微動(minor)対立遺伝子頻度	SNP 配列 SNP = [野生型塩基／別の塩基]
BICF2P798346	76	8	4651519	0.195759	0.195759	ctggtgggcttgtcaggggcaggatgttgtggtgagcaca gaattaaaactaggaGCT[T/C]gaagcgcctgggggggctca gttggttgacggactgccttcatctcaggtcatgatcccctg
BICF2P1150684	77	8	7652070	0.802761	0.197239	CATACAGCGAAGAGATAAAAACACAGGATGCTGGGCTCACGA CCATGACCGGAAAAGGAC[A/G]GCGAGGAAAAGCAAGTATG AGCAGCCCAAAGTCCTTTTTCCAGCACTGGCCATAGGAGGA
BICF2P1348758	78	32	36083895	0.801579	0.198421	CAGAGATGAGGAATCAGACTCCTCGTCCTCTGCTTCTCTACA ATGGCTCATGTTCTCCTT[T/C]CCCCTCAGCTGTTGCATTA ACAGAGGTCAACCCATTCTTCTAAATTTAAATCTCCCAGAA
BICF2G6301759 9	79	X	71555277	0.198617	0.198617	AATCAAACAAGTGCTAGAACATAGAACAAGTGGCTCATCTTT TCCCCAAATGTCTGGATA[A/G]GAAAAAAAAAATCTAAACA AATGCTAGATGTTAAGTATCTGAAATGATCAGCCCATGAAA
BICF2G6301609 0	80	X	73800072	0.200197	0.200197	TCCATACCAGTCCTTGTTGTCTACCCCGAACTTCACCTCTCT AGGCACAGACAGCTCTAA[A/C]TTTCACTCATAGGTATCTT ATGCTGACCTGGCCTGCCTCCCtgttttgttttgttttgttt
BICF2S2352402 7	81	X	64785623	0.79931	0.20069	CAAAAAATTCCCTGAGCCCAGCATCAAGGTACCTGGTTTGGA GTGGGTGGGTCCTCAGAA[A/C]GAATGGGTGTGGTGTACAT TTAGCAAGTTATGTAGCATGTGTCTGTGTAGTCTCACCTCT
BICF2P591872	82	X	62989720	0.795252	0.204748	GGGCCCAGCAAGTGGCAGAACTGGGAAGACCCCCTCTTCTTC CGCCTGGAGCAGTGGTGT[A/G]GCAGCACACCACAGGAGTC TGAAAGGGTGGGGAGTCCCAAACGGGAACATATACCTGAGAT
BICF2G6305877 12	83	32	38968302	0.794379	0.205621	atataatataacttatttaaaatatttGAAGATATTTCTATA GTTATGCTCTACCATTTG[T/C]TATTATAAGATTTCCAACA GCTTACTTCTTGTATGAAATTAATTTACCAGCCCCTCACCT
BICF2G6305877 22	84	32	38964413	0.792899	0.207101	CCCTATTCTATAAACATTCCCTCTTGGCCATCCTGTCAAGT GGGCCCTGACAGTGTGCC[C/G]CAGAAGCTCCCTAGCCTTT GCCCATTCCAGCTATGGCTAGCCTGCCACCAGCCATACACA

【表１３】

SNP	配列番号	canfam2中の染色体	canfam2中の位置	対立遺伝子頻度	微動(minor)対立遺伝子頻度	SNP 配列 SNP = [野生型塩基／別の塩基]
BICF2G6301855 7	85	X	66396513	0.218164	0.218164	CACTGTGAGGTCTGAATGGAGACATTCATGATAGACTCCAGG ATTTTCCCAGCTATTAAG[T/C]CATGGGCCATAAACTGGAA CACTTGGAAACAGTCCATAGGTTCATATTAAAGAATATGTT
BICF2P652606	86	32	37855796	0.776134	0.223866	GCAAAAGGAACATGAGTTCTGATCTTCTGTAAAGGAGGCTAA TTTACTAATGGTCATAAC[T/C]GTGGcctgagggtcaagtt tctaattaaacgtgcatcttggggYggactagaatacttttc
BICF2S2331279 9	87	32	36791310	0.224852	0.224852	CAAGGSCCAGGTACCCTGAAGGAGTCCGCTTCACCCAGGCAT GATGTGTTTGACAGTCTT[T/C]GTAATTGATACAGCCATTG GCATCCTCTTGCGGCCAAYATCAGCTCCACTTCAACCTCGG
BICF2S2303948	88	8	5896281	0.773669	0.226331	TGCAATGGGTTTTGAAATTAGAGGACATCACAGCAGAGTAGA ATGGTTTGGAACAGGGGA[A/G]TATGATTAGGATTAATGAG ATGAAAGAAAATTCTGGCTAGAGGGCTAGAAGAGCCATGGA
BICF2P506595	89	8	4886813	0.228304	0.228304	CTCAGAACTAGATAGGCTAATAAGTGATAGGCCTTGTGTTTT CCTAGAGTGTGCTTTAAA[A/G]GTTTCTTAAGCTAAAAAAT TACATTCGTGAGAAAATTGAAATAAAAGGAAAACAGTCATG
BICF2S2313060 0	90	8	5180802	0.228304	0.228304	GATACTTTGGGCTCTGGGTGGGAGCCAGCAGTGGTGGGGCAG GGCAGGAGTCCAGCAAGG[T/C]GTCTGGGCATACATGTCTG AGAGTAGGAAAACCACACCATTGCACCTTGCCTTTGACTTC
BICF2P1270451	91	8	5580117	0.229783	0.229783	TCAAGGATCAGAAAAATAAAGCAAAGAAAGAGGCAAAGAAA GAAGAAATGAAATACCTA[A/G]TGGCAGAAGTAGGCAGAGA AATAAAGGCTAAAAGAAAATGGCAGAGGATTGTTTGAAAGG
BICF2G6305882 67	92	32	37876000	0.23001	0.23001	TATGTTATACTATTTTAGTATCTTAATAAATATGATTAGCCA AAATAGTTTTTATCATCCT[C/G]AAAAGTGCAGCATATATTA TTTTCTATTTAAATTCAGAATAGGTATAAACTAGAAAGCATT
BICF2S2312207 4	93	8	4965974	0.76999	0.23001	ACAGCAGTTCTGAGGATGGACTCGCAGAGGCTCCTGACAAGC AGAATGACCAGGCCGAGC[A/G]GAAAGGTCAGTGCTGCCAG TCTAGCCAGAAGTGGGGGAGAGAGGATGTAGGAGCAGTACT

【表１４】

SNP	配列番号	canfam2中の染色体	canfam2中の位置	対立遺伝子頻度	微動(minor)対立遺伝子頻度	SNP 配列 SNP = [野生型塩基／別の塩基]
BICF2P555643	94	32	40258722	0.230769	0.230769	ACTGTACTCAAAAAAGTTCTGTTTGCCTAAATGGGATCAGCC TCTAATGGATGCCAGTGA[T/C]GGGAGGCTGTTCATCATCC CTTCGGGATAATTCAGAGCCTAGGCAGAGGCCCAGCGTTCA
BICF2S23259999	95	8	4990277	0.231732	0.231732	TACAGGCCCCAGGAAGGAGCCACCAGATGCCCAGGACTGGGC CCAGGAATGATGGAGGCT[A/G]TACAGCTGGCTGCCTGCAC TGGCTGCCGCCCCTGTCATCCAGTGTCACAGAGCAGCACCT
BICF2G63016525	96	X	72989415	0.251482	0.251482	AGACATTGCCAAGAAGTATCCACAATGAACAGTTTGAAGGGG ATCCAGAAAAGCACAGGG[T/C]CTACTTCCGCTGGATGAGC AGCAGTGAGAACCACAGTCAGGTAGGTCTTAAAGCAAAGTT
BICF2G63019552	97	X	60108249	0.737179	0.262821	GCTTTGAAAACCAACAGGAAATACATCCAGGAAAGCTATACA ACTGTGGTGAAAGGAAAG[A/G]AAAATCTGCTCTTAAAAGG TTGTGTGCAGACTCACTTGCCCCAGAAACCAGTGCGAAAAC
BICF2G63017884	98	X	70145192	0.271019	0.271019	GAGATGTGTAAAATTTAATAGAAATGAAACTTGCCAAAACAG ACCTCTGTACTCGTCAGC[A/G]TTCTAAGTCCATCTTTCTG TAGCATGTAAGTAGAATAATGTTCTATTAATTTCCTCTCTATG
BICF2G6305875 98	99	32	39023585	0.706931	0.293069	GTTCTTTCTATTCTATCACACATACCACCCCCCTGCCCACAG TACCCCTTTCTGCCATGT[T/C]TCAGACTCCTACACAAGAG GTTCTCTCTCCTGGCTTCCAGTTAGACAGGCAGGTAAAGCT
BICF2P285901	100	8	6743491	0.70069	0.29931	TAAAAAAATACAACAGTAGCATTAGAAGACATGCTAAGCGGC TGTATTAGAGAAGGTTAG[T/C]GCTGGCCTGAAGTTTAGAA ACCTTCCCTTCTCTTTTTTTTTTCCTTCCCTTCTCTTTAA
BICF2P811511	101	32	36167454	0.30583	0.30583	TCAAGAGTACTAGAGCATCTATAATCAATGGTAAATTGGGGA ACTAGTGAAACAAGTTTA[T/C]AGGACAAATAACATAAATA AGGATTTTTTTTTAAATTTGGAAAATTGTGGAATAATGATA
BICF2P1146265	102	X	63433179	0.693725	0.306275	AGAATTCAATTTTGGGAGCCAGGAAACCAGATTAGTTTTCC AAAGGGAAGTGCCATTTG[T/C]ATCTATCCCGGTGGGGCTG CCAAGAATTCCCTGGGGTGGGAGACGGCGCTTCTGTGGATT

【表１５】

SNP	配列番号	canfam2中の染色体	canfam2中の位置	対立遺伝子頻度	微動(minor)対立遺伝子頻度	SNP　配列 SNP＝［野生型塩基／別の塩基］
BICF2P243607	103	X	57821508	0.690523	0.309477	CACCAGAGAGCCCCGCAAGATCATACTGCACAAGGGCTCCAC TGGCCTGGGCTTCAACAT[T/C]GTAGGAGGAGAGGATGGAG AAGGCATTTTTGTTTCCTTCATCCTGGCAGGAGGCCCAGCT
BICF2P382932	104	X	64010327	0.690335	0.309665	TGGTGATGATTTATCCCCCATGTTCAAGATTTATCCTCCCTG TCTCAAGAAATCATGTCA[T/C]TACAGGCATCCTTAAAGTC ACAAGACTGGGAAGTAAATACTGATGAGGTCCAAGACCTGG
BICF2P1061734	105	X	57654632	0.69003	0.30997	AGCATAGTGTACCCACATATAAGGTCACATCTGAGGCCAGGG AGTCGGGGTCTTGAAGAT[T/G]ATGACTGATCATGTGCTTG AGGATGATGATGATCATGTGCTTTCCTGGCTGTGCAGTTG
BICF2S2293723 5	106	X	57492668	0.310158	0.310158	gtgtgtgtgtgtgtgtgtTTAATTCTTTGTGAGAAG CCCCTCATTTTGACCTAA[A/G]TTTGGTAGAGGCCCCAGGG GATCTGAGAGGAGAACACAAAGGATAAACCATTTGCTGTTCA
BICF2S2293748 9	107	X	73723672	0.687068	0.312932	CCAACTTTCACTAGCATCACAGCCCCTATCAATCTCTGTTCT TTTTTCTGTCAGTACCAT[A/G]TTTGCTCCTACTACATCYA ATCTGTGAGCTCACAGGATGAGGACCAACAGCTGCCCTGAG
BICF2P903726	108	32	40883681	0.329389	0.329389	TGTCTTACCTCTCTCTATTCCCTTGTCCATAGTAGTATTAAA TATATCTTCCTGAACACA[A/G]ATCTGATCCAGTCTCTCTTT TGTAATTAAAAGCCTTTGCTAGCTTTGGTGATCACCTCCAG
BICF2P1324008	109	32	40043909	0.664179	0.335821	GACCTGACAGATTATGTAGACTTTGTTTTCAAGGGAGCACC TGCTGGATATACAACATG[A/G]CACTAAATTGTGCTCCACA TCCTTGGCAGAGGTGGGGGGCGGGGCACAAGGAAGAACC
BICF2P320425	110	8	7105593	0.336283	0.336283	CAGAGGAAAAGGAGAAGGTCCCACTTAGGGGACTGGAGAGGA GTGGGGGAACATCACCAG[A/C]GCCTTCCTGAGCCAGGCCC CCTGTGGGGAGAAGCTCTCCCCAGGACTGGGTGCCTTTGAA
BICF2S2321071 3	111	8	6397309	0.634615	0.365385	tcctcccctctccccatccccattctcatgcaagtgtgctctc tctctAAAAACACCCCCCCC[A/C]CACACACACACAGACAC AACCAAAtttgggtctcaatgtcttgaccaaggaaaaggca

【表１６】

SNP	配列番号	canfam2中の染色体	canfam2中の位置	対立遺伝子頻度	微動(minor)対立遺伝子頻度	SNP 配列 SNP = [野生型塩基／別の塩基]
BICF2G6301842 4	112	X	66756995	0.367793	0.367793	gagaaagaaggaggagaaaagaggaaaagTATATTTGATGGAAT GAAAAACAAGAGTTCAAT[T/C]TCACTCTGGTCTGGGGTGA CCACTATTAGTCCTTCAACATCTTCCTTGAAGGAATTTTAA
BICF2G6301589 7	113	X	74179959	0.631164	0.368836	CTGGAATTCTGTCAGATCAACATTCAGAGCTCCATCAAATCT GAGGGAAGCAGTGATAGA[A/G]GATACAATTTGACCTTTCA GTCTATTCAGGTTCATGTAGGTTAGGCATTCAATATCAAAG
BICF2P305287	114	8	3258209	0.371175	0.371175	CCACATGTGGTTACACCACTGTGTTATCCTTCCACCTGTCCC ATCAACCCACCCGCACAT[A/G]TCACAGTGCCTCTGTCCTC AAAGAACACTGTATCCAACACCTCCACATCCTCTCAGCATG
BICF2G6301666 2	115	X	72647220	0.615878	0.384122	ATTCCTATGGTGGGCGCTGCACATTTCCTCCCAGGGGAAGGG CAAGGGTCCTGCATTTCT[A/G]TGCTTTCCAGGGCCTCCGC ACCAAGAGCAATTGCTAGGTCACGCATGCCCCTGCACTTCC
BICF2G6301785 4	116	X	70302610	0.606541	0.393459	CATGTCATCACTAACTAATTTATTAACAAGAGTTTTATTCTT TGAAAAACAAAATCACTC[A/G]CATTACTCAGTTGCTTATT CCTTGATTCATATACAAATGACTGATAACATGAGATAAAAA
BICF2P170917	117	32	38039478	0.600592	0.399408	GATGATTTAGTTGTTTGAATGATCTGGCATATAAATCTTCCA AATCTGTGTCCATTGGAT[T/C]GCTTACAGTTTAATCTTTT TATTTCTTCCCAGAATCACATTTTTTCATTATTTATCTTTG
BICF2G6305882 07	118	32	38333881	0.425201	0.425201	AGTTAAATTCTGTGAATAACTAGAATCCGTTATACTTTTTCT GAAATGAAGTCTGTAGGC[A/T]TTTCAACAGCAAAAGGAAT TCTGWTTTTYAAAACTATACATAATGCTTCTTAAAAGCCCT
BICF2P702899	119	32	39207136	0.428854	0.428854	AATGCCCAACTTTAAAAACGCATTCAAGGTTTTCCTCTGTAAA TGCATTCCTCATTTTGGA[T/C]GTGATGTAAAATCTTATTC AGTGTTTTGTTTTTTTTTCCCCCCACAGGTCTCAACAATTA
BICF2P1388432	120	8	7178740	0.446203	0.446203	GGTGGGACCGGCCATCAGCAGGCGGGCCAGCGCCCCACAGAT GTTGTCACGGACCCGATC[A/G]TGGCGCTCCCGTGCCAGGA GGGGCAACAGAAGCCCCAGCAGCTTGGGGAAGTATCTGGTT

【表１７】

SNP	配列番号	canfam2中の染色体	canfam2中の位置	対立遺伝子頻度	微動(minor)対立遺伝子頻度	SNP 配列 SNP＝[野生型塩基／別の塩基]
BICF2P588571	121	32	37214320	0.454635	0.454635	AGGGGACTTGTGCTAATCACTGGGCAAATTTTATGAACTTCT GAATTTTAAAGCAAAAGA[A/G]AAGGTGAAAGAATGGAAAG AAGGTGTGAGTGTTTGAGGAAAACTTCTTCTTTGGGGTTGA
BICF2S22912518	122	8	6934693	0.544872	0.455128	TACACAAGCAAGGCAGTATGCCCTGTCTCCTTCCCTTGGGCC ACCTGCACTTAGACATGG[T/C]AGGTTCCAGTGATGTGTCT AGTCTCTAGCAAGCAGGGCTTGCTTCTGCTCTATCCATCCA
BICF2P223099	123	8	7427438	0.530602	0.469398	CTGTCCTTGGTCTGGACCTGCTGTGAAGACCAAGTGCTTCCT GAGATCTCTCTGAGTCTA[A/G]TTTCCAGAGCAGTGAGTGA GAAATGAAATGAGCCGAGGATTGCCCTCCCTCCTATGGACT
BICF2P568891	124	8	7938712	0.475321	0.475321	TAAGCCATCAGCATGGGCTCCTAGGGGTCTGTTCAACTCCCT TGTGGTGTCTTACTGCTC[A/G]AGCAAAGGAACAGTCTGGT ACAGTGGGAGCAAGAGCTGAGGTTGGAGAGTGGGGACACAG
BICF2G63019507	125	X	60714796	0.521308	0.478692	GAGGAGGTGGAAGTGATTAAGTTTAAAATTTCTGGGGTGGTT TCTGGCGACATGAAGCTG[A/C]GAGCTAGAATGCCTTTCAA TCTCATAATTTCTTTAATTTGGTGATTATACCAGAGCCACA
BICF2P814468	126	32	37551101	0.517787	0.482213	CCTGACAAACACTACCTCTGCTCTTCAAAAGCAATAAGCATT TATTCTGTGACACATTTA[A/G]ATACAAAGTCAATTACAAT AGAGTATAAGTACACAATACTAGGGAAAGTACAAAGTCATAYG
BICF2P948321	127	32	37526448	0.511834	0.488166	GCATGATGAAATCAGAAAAAGTATGTAAGTTTCTAGAAGAAG CTAGATATATGGTAACTT[A/T]GGTCAAATAGAACCATGTA GTGAAAAGAATATGAGTTTTCAAGTTCAATAAAAAAACAAAA
BICF2P807378	128	32	37648000	0.510848	0.489152	ATGCATAAGTTTCCAAAAGAGTTCAGGATTCCAAAATAAAAG CTTCACTAAAAGATTCAT[A/C]GCAAAAGAGTAATGAACAA TTAAAGTCATAGGATATCTAAAATGAAAAACTGTTAGACTG
BICF2P175415	129	8	6494289	0.489645	0.489645	AGATGGCTTAGTTGTTTCTTTCCTCCTGAAGTCCACAGCT TAGTTACTTGGACTCTCC[A/G]AAATaggatcgttggacat ttgaggaaagctctagcatgaaagccatagactaaaaaaca

【実施例２】

【０１２４】
概要
この試験の目的は、食事の管理がペニシラミンを用いた治療後にラブラドールにおける肝臓中銅濃度に影響を与えるのに有効であるかどうか、および亜鉛を用いた追加的な治療が有用であるかどうか調べることであった。
【０１２５】
この試験は、１２匹のメスおよび１２匹のオスの純血種のラブラドールからなる２４匹のイヌの群に実施した。これらのイヌは銅関連慢性肝炎を有していた元患者(former patient)の家族の一員であった。食事の開始時に、実験用のイヌは臨床上健康であったが、２０匹のイヌの肝臓中銅濃度は４００ｍｇ／ｋｇ乾燥重量（平均値：８９４、範囲：７０～２８１０ｍｇ／ｋｇ乾燥重量）の参照範囲を超えていた。これらの濃度は、ペニシラミンを用いた治療の終了後に測定した。
【０１２６】
全てのイヌに同じ飼料を供給した。追加的な治療はグルコン酸亜鉛（７．５ｍｇ／ｋｇ ＰＯ ＢＩＤ、群１）またはプラシーボ（群２）からなっていた。薬剤師はこの試験の終了までの群の割り当てを理解していた唯一の人間であった。肝臓中銅濃度および組織病理は、平均値で８カ月（５～１３カ月の範囲）、および１６カ月（１２～２５カ月の範囲）の治療前後に臨床検査および血液検査によって評価した。血漿中亜鉛濃度は治療中の別の時点で測定した。
【０１２７】
２１匹のラブラドール犬が試験を終了した。試験の開始時に、群１中のイヌの年齢の平均値は４．１才（２．７～８．３才の範囲）であった。６匹のイヌがメスであり（５匹は卵巣摘出、１匹は非摘出）、かつ６匹のイヌがオス（２匹は去勢、４匹は非去勢）であった。群２中のイヌの年齢の平均値は４．８才（３．６～１１．２才の範囲）であった。６匹のイヌがメスであり（４匹は卵巣摘出、２匹は非摘出）、かつ６匹のイヌがオス（２匹は去勢、４匹は非去勢）であった。嘔吐、食欲不振、および下痢を、グルコン酸亜鉛補充群の３匹のイヌにおいて有害作用として観察した。
【０１２８】
経時的に食事の管理をした両群において肝臓中銅濃度の有意な差が存在した（８カ月：群１ｐ＜０．００１、群２ｐ＝０．００１、および１６カ月：群１ｐ＝０．０３、群２ｐ＝０．０４）。しかしながら、治療前（ｐ＝０．６５）、再検査－１（ｐ＝０．５２）、および再検査－２（ｐ＝０．７９）において群間の肝臓中銅濃度の差は存在せず、肝臓中銅蓄積に対してさらなる亜鉛補充の利点がないことが示唆された。
【０１２９】
この試験の結果は、食事の管理は、ラブラドールにおいて肝臓中銅濃度を低下させるのに有効である可能性があることを示す。亜鉛を用いた補助的治療は脱銅効果(de-coppering effect)を増幅しなかった。
【０１３０】
試験をここでより詳細に記載する。
【０１３１】
材料および方法
ラブラドールレトリバー
試験対象集団は、ＣＡＣＨで前に記載したイヌの家族の一員であった、２４匹の純血種のラブラドールレトリバーからなっていた。全てのイヌはオランダラブラドールレトリバー品種クラブ(the Dutch Labrador Retriever breed club)に登録されていた。
【０１３２】
全てのイヌは、この試験の開始前にペニシラミンを用いたそれらの治療の終了していた。全てのイヌから病歴を得て、身体検査を実施した。クエン酸ナトリウム血液サンプルを、プロトロンビン時間（ＰＴ）、活性化部分トロンボプラスチン時間（ａＰＴＴ）およびフィブリノゲンを含めた凝固プロファイルの分析用に採取した。ヘパリン－およびＥＤＴ

Ａ－血液は肝胆汁性酵素アルカリホスファターゼ（ＡＬＰ）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ＡＬＴ）、胆汁酸（ＢＡ）の分析用、および血小板数、および血漿中亜鉛濃度の測定用にサンプル採取した。Rothuizen(Rothuizen J、I.T.(1998)Tijdschr Diergeneeskd 123:246 - 252)によって与えられたＭｅｎｇｈｉｎｉ技法に従って肝生検を得た。少なくとも３つの肝生検をそれぞれのイヌから得た。２つの生検を１０パーセントの中性緩衝ホルマリン中に固定し、１つの生検は銅の定量的決定用に銅を含まない容器中に保存した。

【０１３３】

全ての生検は組織学的に評価した。以前に記載されたように(Van den Ingh T.S.G.A.M.、R.J.、Cupery R.(1988)Vet Q 10:84～89)、銅分布の評価および半定量化のために肝組織をルベアン酸染色液で染色した。適用評点方式に従い、２を超える銅スコアは異常である（０：銅含まず、１：幾つかの銅染色陽性顆粒を含有する孤立性(solitary)肝細胞および／または細網組織球（ＲＨＳ）細胞、２：少量～適量の銅染色陽性顆粒を含有する少群の肝細胞および／またはＲＨＳ細胞、３：適量の銅染色陽性顆粒を含有する大群もしくは大領域の肝細胞および／またはＲＨＳ細胞、４：多くの銅染色陽性顆粒を有する大領域の肝細胞および／またはＲＨＳ細胞、５：多くの銅染色陽性顆粒を有する肝細胞および／またはＲＨＳ細胞の広範囲にわたる存在）。

【０１３４】

肝組織中の銅に関する定量アッセイを、Bode(Bode、P.(1990)Journal of Trace and Microprobe Techniques 8:139;Teskeら(1992)Vet Rec131:30～32)により記載された設備を使用して、Ｔｅｓｋｅらにより記載されたプロトコルに従い中性子放射化分析によって実施した。定量銅濃度は凍結乾燥肝生検において測定し、肝臓乾燥重量ｍｇ／ｋｇで報告した。

【０１３５】

銅含有量以外に、さらなる組織学的変化を０と５の間の段階で格付けして、統計的検定を可能にした（０＝炎症の組織学的所見なし、１＝反応性肝炎、２＝軽度の慢性肝炎、３＝中程度の慢性肝炎、４＝重度の慢性肝炎、５＝肝硬変）。

【０１３６】

この試験はUtrecht University Institutional Animal Care and Use Committeeによって承認された。全てのイヌに関して飼い主のインフォームドコンセントを得た。

【０１３７】

治療なしでの肝臓中銅蓄積の進行

１１匹のイヌにおいて、肝臓中銅濃度の測定を、任意の治療前の平均値(mean)で８．７カ月（６～１５カ月の範囲）後に繰り返した。この時間中、全ての動物にそれらの通常のメンテナンス食を与え、それは製造者に従い、１２～２５ｍｇ／ｋｇ乾物の食用銅濃度および８０～２７０ｍｇ／ｋｇ乾物の亜鉛濃度を含有していた。

【０１３８】

飼料

全てのイヌの飼い主に同一の特別に製造した飼料を提供した。与えた飼料の近似分析：水分５７．９％、粗タンパク質６．１％、粗脂肪５．９％、ミネラル１．７％。代謝エネルギー（アメリカ飼料検査官協会(Association of American Feed Control Officials)のプロトコルに従い測定）：１６５０ｋｃａｌ／供給１ｋｇとして）。飼料は４．７５ｍｇ／ｋｇ乾物の濃度で銅、および１０２ｍｇ／ｋｇ乾物の濃度で亜鉛を含有していた。イヌにはさらなる栄養補助食品および治療剤を含まない飼料を供給した。この試験のラブラドールには１日当たり４２０～８４０ｇの飼料を与えた。

【０１３９】

薬物動態試験

２匹の無関係な９才の、健康なラブラドールレトリバー（１匹のメスと１匹のオス）を薬物動態試験中で使用した。亜鉛の経口投与前の１２時間の間、および最初の６時間の試験期間中食品は控えた。水は自由に与えた。経口用グルコン酸亜鉛は、イヌ１において１

０ｍｇ／ｋｇの用量で、イヌ２において５ｍｇ／ｋｇの用量で投与した。ヘパリン化血液サンプル（４ｍｌ）は、投与前（時間０）および薬剤の施用後１５、３０、４５、６０、９０、１２０分、ならびに４、８、１２および２４時間で頸静脈から回収した。原子吸光分析を使用して亜鉛に関して分析するまで、血漿は－２０℃で保存した。

【０１４０】

薬剤調製、ランダム化、および盲検化

グルコン酸亜鉛の選択は、この薬剤が酢酸塩または硫酸塩のような他の塩より少ない副作用を有するという、本発明者らの臨床的観察に基づいて行った。錠剤はVeterinary Pharmacy of the Faculty of Veterinary Medicine、University of Utrechtによって提供された。亜鉛錠剤はグルコン酸亜鉛の塩として２５ｍｇの成分亜鉛を含有していた(Toppharm Zink 25 gluconaat、Parmalux BV、Uitgeest、NL)。プラシーボ錠剤は１６０ｍｇのラクトースを含有していた(Albochin、Pharmachemie BV、Haarlem、NL)。両群由来の錠剤は同一の外見を有していた。

【０１４１】

薬剤師はコイン投げによって６匹のイヌの組の群の割り当てを予めランダム化した。３匹のイヌにはプラシーボを与え、かつ３匹のイヌは亜鉛で治療した。臨床医の処方において、錠剤（プラシーボまたは亜鉛）は乱数表に従い調合した。

【０１４２】

用量の処方は以下のスキームに従った：

体重：		
＜２８ｋｇ（＜６１．６ポンド）：	８錠剤ＢＩＤ	（２００ｍｇＢＩＤ）
２８～３５ｋｇ（６１．６～７７ポンド）：	９錠剤ＢＩＤ	（２２５ｍｇＢＩＤ）
３５を超える（＞７７ポンド）：	１０錠剤ＢＩＤ	（２５０ｍｇＢＩＤ）

【０１４３】

飼い主には、供給前に３０分間少量のそれらの飼料と混合した錠剤を与えるように指示した。飼い主にも臨床医にも、どの治療をそれぞれのイヌに与えたかについては知らせなかった。乱数表は試験中薬局に所有された状態であり、試験の終了時にのみ明らかにした。

【０１４４】

統計解析

薬物動態パラメータ(WinNonlin4.0.1.(Pharsight Corporation、800West El Camino Real、Mountain View、CA、USA)および統計解析(SPSS11.0 for windows、2001、SPSS Inc.、Chicago、IL、USA)を、市販のソフトウェアパッケージの使用によって計算した。小さな群の大きさのため、ノンパラメトリック統計検定を群間の比較用に使用した。２回の対照実験（再検査－１および再検査－２）での飼料およびグルコン酸亜鉛（群１）を用いた治療前後、および両方の対照実験での飼料およびプラシーボ（群２）を用いた治療後に、マンホイットニー検定を使用して肝臓中銅濃度間の差を検出した。さらに、この試験を使用して、試験前、再検査－１、および再検査－２において群１と群２の間の差を検出した（有意水準ｐ≦０．０５）。

【０１４５】

結果

治療なしでの肝臓中銅蓄積の進行

１１匹のラブラドール犬において、肝臓中銅濃度の測定を任意の治療を与える前に繰り返し、一方これらのイヌにはそれらの通常のメンテナンス食を与えた。全体ではわずか１匹のイヌの肝臓中銅濃度が、両方の測定間の８．７カ月の時間間隔中に、平均値で１００ｍｇ／ｋｇ乾燥重量（範囲２９０～２３７０）から平均値で１６２６ｍｇ／ｋｇ乾燥重量（範囲６３０～３６１０）に増大した。患者の体重に関して（平均値：３３．９ｋｇ、範囲２５～３９．５ｋｇ）、これは８．７カ月の間で体重１ｋｇ当たり１８ｍｇの銅の増大であった。結果は図１中に示す。

【０１４６】

薬物動態試験
１０ｍｇ／ｋｇ（イヌ１）および５ｍｇ／ｋｇ（イヌ２）の元素の亜鉛(elemental zinc)の経口施用後に２匹のイヌにおいて測定した血漿中亜鉛濃度から計算した薬物動態パラメータは以下の通りであった：

イヌ１（１０ｍｇ／ｋｇ）：Ｖ＿Ｆ：分布容積＝２９３７．８７２ｍｌ／体重１ｋｇ、Ｋ０１：吸収速度定数＝０．５６７２１２　ｌ／時間、Ｋ１０：消失速度定数＝０．０５３７２８　ｌ／時間、ＡＵＣ：濃度曲線下面積＝６３．３５２７２時間＊μｇ／ｍｌ、Ｃｌ＿Ｆ：生物学的利用能に関するクリアランス＝１５７．８４６４ｍｌ／時間／ｋｇ、Ｔｍａｘ：最大濃度の時間＝４．５８９８１３時間、Ｃｍａｘ：最大クリアランス＝２．６５９９２４μｇ／ｍｌ）

イヌ２（５ｍｇ／ｋｇ）：Ｖ＿Ｆ：分布容積＝２５３８．６８９ｍｌ／体重１ｋｇ、Ｋ０１：吸収速度定数＝１．１６０６４７　ｌ／時間、Ｋ１０：消失速度定数＝０．０３７８８６　ｌ／時間、ＡＵＣ：濃度曲線下面積＝５１．９８５１３時間＊μｇ／ｍｌ、Ｃｌ＿Ｆ：生物学的利用能に関するクリアランス＝９６．１８１３５ｍｌ／時間／ｋｇ、Ｔｍａｘ：最大濃度の時間＝３．０４７９７４時間、Ｃｍａｘ：最大クリアランス＝１．７５４７２８μｇ／ｍｌ）。

【０１４７】
計算した亜鉛の半減期はｔ$^{1/2}$＝１５．１時間であった。

【０１４８】
Ｒ＝１／（１－ｅｘｐ（－ｋｌ０＊２４）から計算した蓄積率Ｒは１．５２であった。１２時間である投与間隔を選択した。両方のイヌからのＣＬ＿Ｆの平均値から計算した用量推定値は１２７．０１３９ｍｌ／時間／ｋｇであった。

【０１４９】
適切な用量の推定値は目的とする５μｇ／ｍｌの最大血漿中亜鉛濃度に基づいた。用量＝Ｃｌ＿Ｆ×目的とする血液濃度×投与間隔＝７．６２ｍｇ／ｋｇｑ１２時間

【０１５０】
飼料試験およびランダム化、プラシーボ対照亜鉛施用
飼料試験の開始時に、２０匹のイヌの肝臓中銅濃度は４００ｍｇ／ｋｇ乾燥重量（平均値：８９４、範囲：７０～２８１０ｍｇ／ｋｇ乾燥重量）の参照範囲を超えていた。銅の半定量的評価からの結果は０～４．５の範囲であった。１７匹のイヌ由来の肝生検の組織病理学的検査によって、小葉中心性肝細胞に局在した（２を超える）高い肝臓中銅含有量が明らかになった。銅の染色は５匹のイヌにおいて正常であり、多量の正常染色の結果を、定量分析から高い肝臓中銅含有量を有する２匹のイヌの生検から得た。７匹のイヌにおいて慢性肝炎が存在した。ＣＨは様々な程度の肝細胞アポトーシスおよび壊死、単核細胞の炎症、再生および繊維化によって特徴付けた。肝臓炎症の活性は、炎症の量ならびに肝細胞アポトーシスおよび壊死の程度によって決定した。疾患の段階は、繊維化の程度およびパターンおよび肝硬変の存在によって決定した。肝炎は４患者において軽度であり、２匹のイヌにおいて中程度であり、１匹のイヌにおいて肝硬変を診断した。１３匹のイヌでは、肝臓中に存在する炎症の組織学的所見がなく、かつ４匹のイヌの生検において、組織病理学によって反応変化を明らかにした。

【０１５１】
試験の開始時に、群１中のイヌの年齢の平均値は４．１才（２．７～８．３才の範囲）であった。６匹のイヌが卵巣摘出したメスであり、かつ６匹のイヌがオス（２匹は去勢、４匹は非去勢）であった。平均体重は３３ｋｇ（範囲２６．２～３７．５）であった。群１中のイヌの肝臓中銅濃度の平均値は９６１ｍｇ／ｋｇ乾燥重量（範囲３４０～２８１０）であった。組織学的染色からの銅の半定量的評価の平均値は２～３＋（範囲０～４．５）であった。

【０１５２】

群２中のイヌの年齢の平均値は４．８才（３．６～１１．２才の範囲）であった。６匹のイヌがメスであり（４匹は卵巣摘出、２匹は非摘出）、かつ６匹のイヌがオス（２匹は去勢、４匹は非去勢）であった。平均体重は３２．３ｋｇ（範囲２５～４１．９）であった。群２中のイヌの肝臓中銅濃度の平均値は８６１ｍｇ／ｋｇ乾燥重量（範囲７０～１６８０）であった。治療前に両群間の肝臓中銅濃度の差は存在しなかった（ｐ＝０．７３）。組織学的染色からの銅の半定量的評価の平均値は２～３＋（範囲０．５～３）であった。

【０１５３】

群１の３匹のイヌは試験を終了しなかった。中断の理由は全３匹のイヌにおける治療とは無関係であった（１人の飼い主は彼のイヌが年をとりすぎていると感じ、１人の飼い主には個人的な理由があり、かつ１匹のイヌは肥満細胞腫を発症した）。２１匹のイヌは試験、および少なくとも１回の対照実験（再検査－１）を終了した。１６匹のイヌにおいて、さらに後の時点（再検査－２）で肝生検を得た。

【０１５４】

嘔吐、および食欲不振を、群１の３匹のイヌにおいて有害作用として観察した。これらのイヌの１匹は一過性の小腸性の下痢も有していた。有害作用は錠剤の施用直後に生じ、錠剤を飼料と混合すると消散した。

【０１５５】

血液検査

胆汁酸の濃度は、１４μｍｏｌ／ｌ（範囲：３～１０１）の平均値から再検査－１で７．８（範囲：１～３９）および再検査－２で７．１（範囲：０～２１）の平均値に低下した。アルカリホスファターゼ（ＡＬＰ）、およびアラニンアミノトランスフェラーゼ（ＡＬＴ）の濃度の平均値は、全ての実験で正常範囲内に留まった。治療前のＡＬＰ濃度の平均値は、再検査－１で４１Ｕ／ｌ（範囲：８～１１１）、再検査－２で平均値ＡＬＰ＝３７Ｕ／ｌ（範囲１２～１４３）、平均値ＡＬＰ＝３７Ｕ／ｌ（範囲：１９～１５２）であった。治療前の平均値ＡＬＴ濃度は、再検査－１で２８Ｕ／ｌ（範囲：１０～２３４）、再検査－２で平均値ＡＬＴ＝４７Ｕ／ｌ（範囲：１１～７８）、平均値ＡＬＴ＝５１Ｕ／ｌ（２６～６８）であった。

【０１５６】

試験の開始時に、亜鉛の血漿中濃度の平均値は、それぞれ群１および群２中で９５μｇ／ｄｌおよび９６μｇ／ｄｌであった。再検査－１および再検査－２において一方の群の血漿中亜鉛濃度の差は存在しなかった（０．１１と０．７９の間のｐ値）。３回の実験のいずれにおいても群１と群２の間の血漿中亜鉛濃度の差は見られなかった（０．３４と０．５の間のｐ値）。血漿中亜鉛濃度の差を見ることができた唯一の時間ポイントは、群１における亜鉛を用いた治療の最初の一カ月後の血液検査であった。血液のサンプル採取は、亜鉛施用後２～６時間で実施した。この対照実験において、血漿中亜鉛濃度の平均値は１６５μｇ／ｄｌ（範囲１１７～２４９、ｐ＝０．０２）に増大した。

【０１５７】

肝臓中の銅の測定

肝臓中の銅の定量測定は両群において治療中に改善した。再検査－１、および再検査－２において、肝臓中銅濃度は、開始時点と比較して、両群のイヌにおいて有意に低下した。（再検査－１での群１：平均値２８６ｍｇ／ｋｇ、範囲８４～７００、ｐ＜０．００１；再検査－２での群１：平均値４２１ｍｇ／ｋｇ、範囲２２０～７９０、ｐ＝０．０３、再検査－１での群２：平均値２７７ｍｇ／ｋｇ、範囲８０～４５０、ｐ＝０．００１、再検査－２での群２：平均値４０１ｍｇ／ｋｇ、範囲１１８～８５０、ｐ＝０．０４）。再検査－１において両群間の肝臓中銅濃度の差は存在せず（ｐ＝０．５２）、かつ再検査－２において群間の差は存在しなかった（ｐ＝０．７９）。さらに、再検査－１と再検査－２の間の肝臓中銅濃度のさらなる低下はなかった（群１でｐ＝０．４４、群２でｐ＝０．２５）。結果は図２中に示す。

【０１５８】

組織学

銅の組織学的染色は治療で改善した。銅の半定量測定に関する組織学的スコアは、開始時点と比較して、再検査－１および再検査－２において群１および群２中で低下した（再検査－１での群１：ｐ＝０．０３１、再検査－２での群１：ｐ＝０．０１、再検査－１での群２：ｐ＝０．０１、再検査－２での群２：ｐ＝０．００１）。任意の時点において両群間の差は存在しなかった（ｐ＝０．１６～０．７５）。

【０１５９】

肝臓の炎症の重度に関する組織学的スコアは、両群由来のイヌの全ての実験を通して不変状態であった（ｐ＝０．２５～０．４５）。

【０１６０】

結論

肝臓中銅濃度のよりバランスのとれた長期管理でＣＡＣＨを患者に与えるために、この試験の目的は、食事の管理がペニシラミンを用いた治療後にラブラドールにおける肝臓中銅濃度に影響を与えるのに有効であるかどうか、および亜鉛を用いた追加的な治療が有用であるかどうか調べることであった。この試験の結果は、食事の管理は、肝臓中銅濃度を低下させるのに有効である可能性があることを示す。亜鉛を用いた補助的治療は脱銅効果を増幅しなかった。

【実施例３】

【０１６１】

肝臓中銅濃度に対する亜鉛の影響の調査中に、肝臓中銅濃度を１８匹の純血種のラブラドールレトリバーにおいて測定した。半分のイヌに亜鉛のサプリメントを与え、他の半分にはプラシーボを与えた。全てのイヌに実施例２の飼料を供給した。肝臓中銅濃度は、３箇所の時点（１）ペニシラミンを用いた治療前、（２）ペニシラミンを用いた治療後、ただし実施例２の飼料を用いた治療前、および（３）食事療法後で、実施例２の方法を使用して測定した。実施例２中と同様に、亜鉛およびプラシーボで治療したイヌにおいて銅レベルの間に有意な差は存在しなかった（データ示さず）。しかしながら、飼料の使用は銅レベルに対して有意な影響があった。亜鉛で治療したイヌとプラシーボで治療したイヌに関して組み合わせた結果を図３中に示し、これは、少量の銅の飼料は肝臓中の銅のレベルの低下に対してペニシラミン単独より有意な影響を有することを実証する。

【実施例４】

【０１６２】

本発明の食品の一例を以下に述べる：

【表１８】

成分（%）	100
水	47.4
シリアル	28.5
野菜副産物	1.7
卵および卵副産物	1.5
肉および動物副産物	17
油および脂肪	2
ミネラルおよびビタミン	1.9

【０１６３】

この食品中のミネラルおよび微量元素の量の典型的な分析、ならびに使用した方法を、

以下の通り示す：

【表１９】

分析項目	結果 (飼料としての重量% またはmg/kg乾物)	注釈
水分	63 %	5時間105℃での乾燥によって消失
タンパク質	6.5 %	窒素係数6.25を使用したケルダール法によるタンパク質
脂肪	4.2 %	酸加水分解および石油エーテル抽出
灰分	2.2 %	16時間の傾斜温度プログラム、5時間550℃で最終灰分
粗繊維	1.4 %	EC法OJL344 26/11/92 P35、Directive 92/89
銅	5.4 mg/kg	フレーム原子吸光分析による
亜鉛	229 mg/kg	フレーム原子吸光分析による
鉄	62 mg/kg	フレーム原子吸光分析による
カルシウム	9 460 mg/kg	フレーム原子吸光分析による
リン	5 405 mg/kg	比色反応による

【実施例５】

【０１６４】

本発明の食品のさらなる例は以下の通りである：

【表２０】

成分（%）	100
シリアル	39.7
野菜副産物	8.0
野菜タンパク質抽出物	5.0
肉および動物副産物	35.6
油および脂肪	7.5
ミネラルおよびビタミン	4.2

【０１６５】

この食品中のミネラルおよび微量元素の量の典型的な分析、ならびに使用した方法を、以下の通り示す：

【表２１】

分析項目	結果 (飼料としての重量% またはmg/kg乾物)	注釈
水分	8.0 %	5時間105℃での乾燥によって消失
タンパク質	30.0 %	窒素係数6.25を使用したDumas法によるﾀﾝﾊﾟｸ質
脂肪	13.0 %	酸加水分解および石油エーテル抽出
灰分	6.3 %	16時間の傾斜温度プログラム、5時間550℃で最終灰分
粗繊維	4.1 %	EC法OJL344 26/11/92 P35、Directive 92/89
銅	10.9 mg/kg	フレーム原子吸光分析による
亜鉛	245 mg/kg	フレーム原子吸光分析による
鉄	217 mg/kg	フレーム原子吸光分析による
カルシウム	1 087 mg/kg	フレーム原子吸光分析による
リン	760 mg/kg	比色反応による

本発明は、以下の態様を包含する。

［１］

肝臓中銅蓄積に対するイヌの感受性を決定する方法であって、（ａ）銅蓄積に対する感受性を示すイヌのＧＯＬＧＡ５、ＡＴＰ７ａもしくはＵＢＬ５遺伝子中の多型および／または（ｂ）前記多型（ａ）との連鎖不均衡における多型の有無を検出すること、およびそれによって肝臓中銅蓄積に対するイヌの感受性を決定することを含む、前記方法。

［２］

少なくとも１つの多型（ａ）および少なくとも１つの多型（ｂ）の有無を検出することを含む、上記［１］に記載の方法。

［３］

多型が一塩基多型（ＳＮＰ）である、上記［１］または［２］に記載の方法。

［４］

ＢＩＣＦ２Ｐ５０６５９５（配列番号：１）、ＢＩＣＦ２Ｐ７７２７６５（配列番号：２）、ＢＩＣＦ２Ｓ２３３３１８７（配列番号：３）、ＢＩＣＦ２Ｐ１３２４００８（配列番号：４）、ＢＩＣＦ２Ｐ５９１８７２（配列番号：５）およびその連鎖不均衡における１つまたは複数のＳＮＰから選択される１つまたは複数のＳＮＰの有無を検出することを含む、上記［３］に記載の方法。

［５］

ＳＮＰ　ＢＩＣＦ２Ｐ５０６５９５（配列番号：１）、ＢＩＣＦ２Ｐ７７２７６５（配列番号：２）、ＢＩＣＦ２Ｓ２３３３１８７（配列番号：３）、ＢＩＣＦ２Ｐ１３２４００８（配列番号：４）、およびＢＩＣＦ２Ｐ５９１８７２（配列番号：５）の有無を検出することを含む、上記［４］に記載の方法。

［６］
イヌがラブラドールレトリバー品種の遺伝的形質を有する、上記［１］から［５］のいずれか一項に記載の方法。
［７］
イヌ由来のサンプル中のポリヌクレオチドまたはタンパク質と特異的結合因子を接触させ、因子がポリヌクレオチドまたはタンパク質と結合するかどうか決定することによって有無の検出を実施する、上記［１］から［６］のいずれか一項に記載の方法。
［８］
因子がポリヌクレオチドであり、かつ／またはゲル電気泳動中のポリヌクレオチドの移動度を測定することによって有無を検出する、上記［７］に記載の方法。
［９］
少なくとも１つのオリゴヌクレオチドプライマーをハイブリダイズさせ、プライマー伸長産物の生成に適した条件下でサンプルとポリメラーゼを接触させることによって有無を決定し、多型の存在の検出がプライマー伸長産物の存在の検出を含む、上記［７］に記載の方法。
［１０］
ＧＯＬＧＡ５、ＡＴＰ７ａもしくはＵＢＬ５遺伝子中の１つもしくは複数の多型および／またはその連鎖不均衡における１つもしくは複数の多型、ならびに肝臓中銅蓄積に対するイヌの感受性とこれらの多型との関係に関する情報を含むデータベース。
［１１］
肝臓中銅蓄積に対するイヌの感受性を決定する方法であって、
（ａ）イヌのゲノムにおける上記［１］から［５］のいずれか一項に記載の多型の有無に関するデータをコンピュータシステムに入力すること、
（ｂ）データを、ＧＯＬＧＡ５、ＡＴＰ７ａもしくはＵＢＬ５遺伝子中の１つもしくは複数の多型および／またはその連鎖不均衡における１つもしくは複数の多型、ならびに肝臓中銅蓄積に対するイヌの感受性とこれらの多型との関係に関する情報を含むコンピュータデータベースと比較すること、および
（ｃ）前記比較に基づいて肝臓中銅蓄積に対するイヌの感受性を決定することと
を含む、前記方法。
［１２］
コンピュータシステムで実行されると、上記［１１］の全ステップを実施するようコンピュータシステムに指令するプログラムコード手段を含むコンピュータプログラム。
［１３］
上記［１２］に記載のコンピュータプログラムおよび上記［１０］に記載のデータベースを含むコンピュータ記憶媒体。
［１４］
上記［１１］に記載の方法を実施するように構成されたコンピュータシステムであって、
（ａ）イヌのゲノムにおける上記［１］から［５］のいずれか一項に記載の多型の有無に関するデータを受信するための手段、
（ｂ）データを、ＧＯＬＧＡ５、ＡＴＰ７ａもしくはＵＢＬ５遺伝子中の１つもしくは複数の多型および／またはその連鎖不均衡における１つもしくは複数の多型、ならびに肝臓中銅蓄積に対するイヌの感受性とこれらの多型との関係に関する情報を含むデータベースと比較するためのモジュール、および
（ｃ）前記比較に基づいて肝臓中銅蓄積に対するイヌの感受性を決定するための手段と
を含む、前記コンピュータシステム。
［１５］
イヌのゲノムが肝臓中銅蓄積に対するイヌの感受性を示す多型を含有するかどうか決定する方法であって、（ａ）銅蓄積に対する感受性を示すイヌのＧＯＬＧＡ５、ＡＴＰ７ａもしくはＵＢＬ５遺伝子中の多型および／または（ｂ）前記多型（ａ）との連鎖不均衡に

おける多型の有無を検出することを含む、前記方法。
［１６］
肝臓中銅蓄積に対するイヌの感受性を決定するための、（ａ）肝臓中銅蓄積に対する感受性を示すイヌのＧＯＬＧＡ５、ＡＴＰ７ａもしくはＵＢＬ５遺伝子中の多型および／または（ｂ）前記多型（ａ）との連鎖不均衡における多型の使用。
［１７］
ラブラドールレトリバー品種の遺伝的形質を有するイヌにおいて肝臓中銅蓄積に起因する疾患を予防する際に使用するための、２１ｍｇ／ｋｇ乾物未満の濃度で銅を含む食品。
［１８］
上記［1］から［9］、［１１］または［１５］のいずれか一項に記載の方法によって肝臓中銅蓄積に感受性であると決定したイヌにおいて、肝臓中銅蓄積に起因する疾患を予防する際に使用するための、上記［１７］に記載の食品。
［１９］
１７ｍｇ／ｋｇ乾物未満または１２ｍｇ／ｋｇ乾物未満の濃度で銅を含む、上記［１７］または［１８］に記載の食品。
［２０］
少なくとも１２０ｍｇ／ｋｇ乾物の濃度で亜鉛をさらに含む、上記［１７］から［１９］のいずれか一項に記載の食品。
［２１］
純血種のラブラドールレトリバーである少なくとも一方の親を有するイヌにおいて、肝臓中銅蓄積に起因する疾患を予防する際に使用するための、上記［１７］から［２０］のいずれか一項に記載の食品。
［２２］
肝臓中銅蓄積と関連する臨床症状がないイヌにおいて、肝臓中銅蓄積に起因する疾患を予防する際に使用するための、上記［１７］から［２１］のいずれか一項に記載の食品。
［２３］
肝臓乾燥重量４００ｍｇ／ｋｇ未満の肝臓中銅濃度を有するイヌにおいて、肝臓中銅蓄積に起因する疾患を予防する際に使用するための、上記［１７］から［２２］のいずれか一項に記載の食品。
［２４］
検出可能な肝疾患を有していないイヌにおいて使用するための、上記［１７］から［２３］のいずれか一項に記載の食品。
［２５］
銅関連慢性肝炎を予防する際に使用するための、上記［１７］から［２４］のいずれか一項に記載の食品。
［２６］
ラブラドールレトリバー品種の遺伝的形質を有するイヌにおいて肝臓中銅蓄積に起因する疾患を予防する方法であって、上記［１７］から［２５］のいずれか一項に記載の食品をイヌに供給することを含む方法。
［２７］
上記［1］から［9］、［１１］および［１５］のいずれか一項に記載の方法によってイヌが肝臓中銅蓄積に感受性であると決定されている、上記［２６］に記載の方法。
［２８］
少なくとも１２０ｍｇ／ｋｇの濃度で亜鉛を含む食品またはサプリメントをイヌに供給することをさらに含む、上記［２６］または［２７］に記載の方法。
［２９］
肝臓乾燥重量４００ｍｇ／ｋｇ未満の肝臓中銅濃度を有し、かつ／または検出可能な肝疾患を有していないイヌにおいて、肝臓中銅蓄積に起因する疾患を予防するための、上記［２６］から［２８］のいずれか一項に記載の方法。
［３０］

上記［１７］から［２５］のいずれか一項に記載の食品を作製する方法であって、食品が２１ｍｇ／ｋｇ乾物未満の銅濃度を有するように食品の成分を一緒に混合することを含む方法。

［３１］

（ａ）任意の原材料を任意選択で調理しつつ成分を一緒に混合するステップ、

（ｂ）食品のサンプル中の銅、および場合によっては亜鉛の濃度を測定するステップ、および

（ｃ）食品をパッケージするステップ

を含む、上記［３０］に記載の方法。

［３２］

イヌの飼い主、イヌにエサを与える担当の者もしくは獣医に食品を与えること、および／またはイヌに食品を与えることをさらに含む、上記［３０］または［３１］に記載の方法。

［３３］

ラブラドールレトリバー品種の遺伝的形質を有するイヌ用の食品の製造における銅の使用であって、食品が、２１ｍｇ／ｋｇ乾物未満の濃度で銅を含み、前記イヌにおける肝臓中銅蓄積に起因する疾患を予防する際に使用するための食品である使用。

［３４］

ラブラドールレトリバー品種の遺伝的形質を有するイヌにおける肝臓中銅蓄積に起因する疾患を予防する際に、同時、個別または逐次使用するための、２１ｍｇ／ｋｇ乾物未満の濃度の銅を有する食品および少なくとも１２０ｍｇ／ｋｇ乾物の濃度をもたらす亜鉛サプリメントを含むパック。

［３５］

上記［１７］から［２５］のいずれか一項に記載のラベル付き食品または上記［３４］に記載のラベル付きパック。

【符号の説明】

【０１６６】

１０　データベース

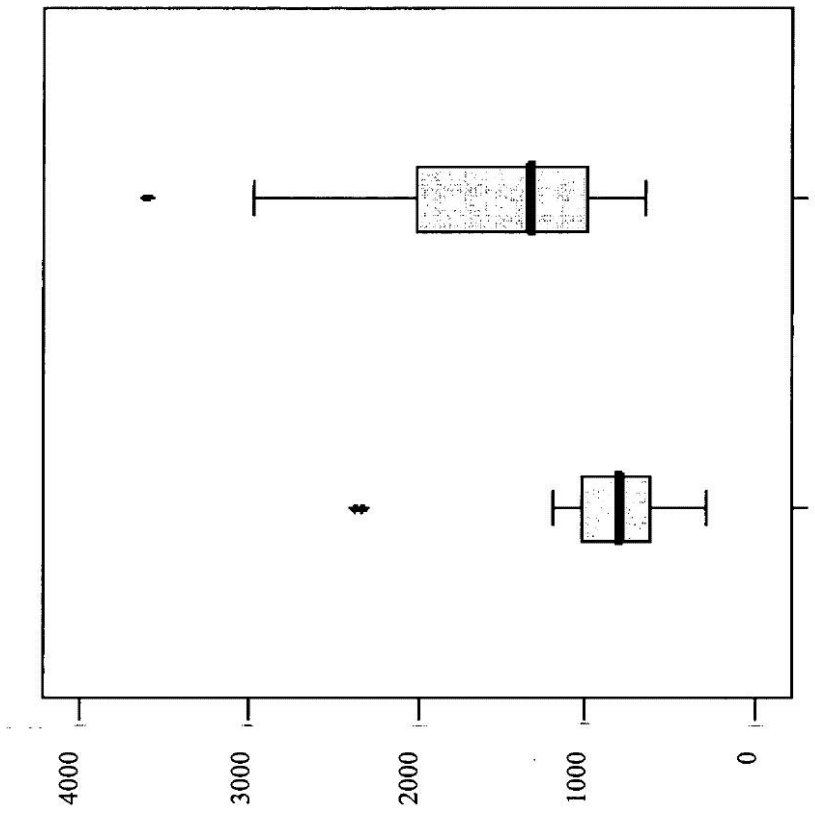
２０　入力

３０　比較モジュール

４０　決定手段

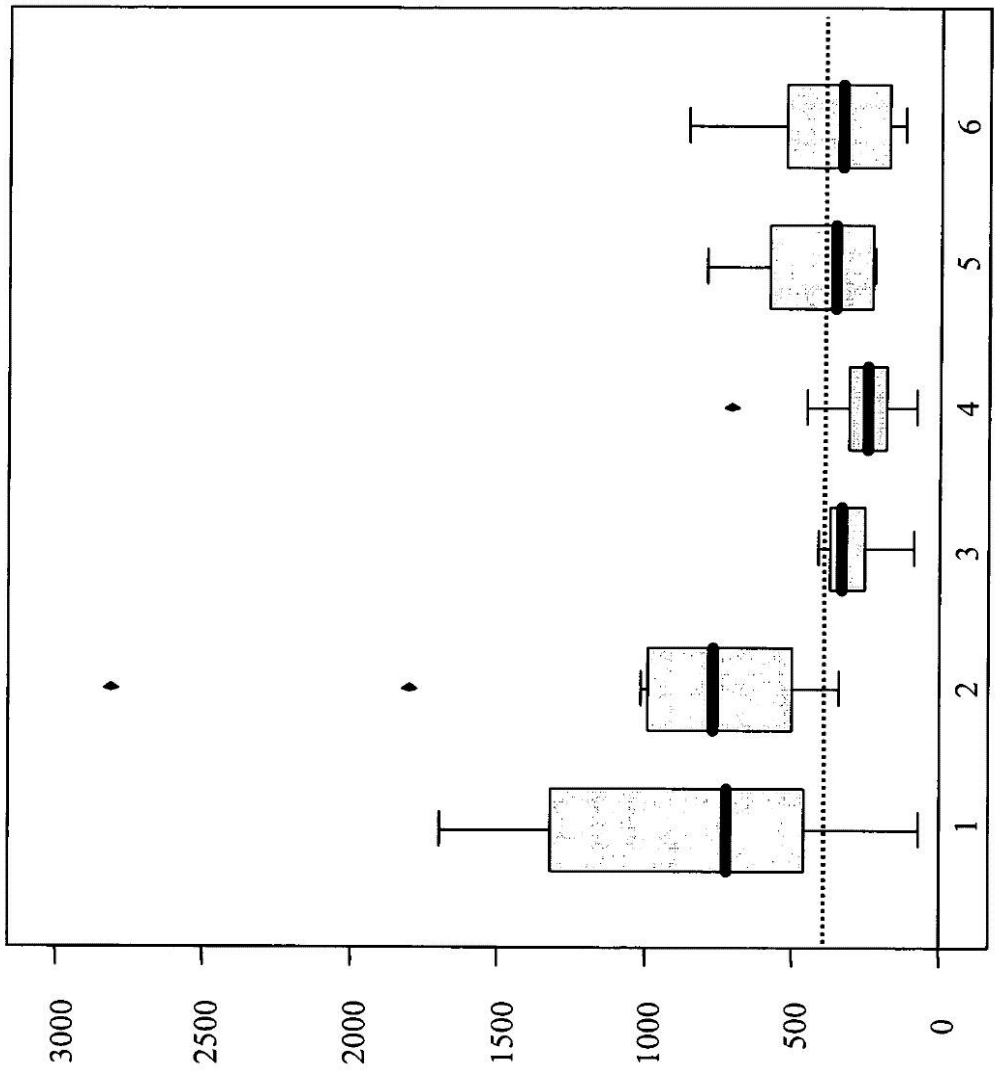
【図１】

Figure 1



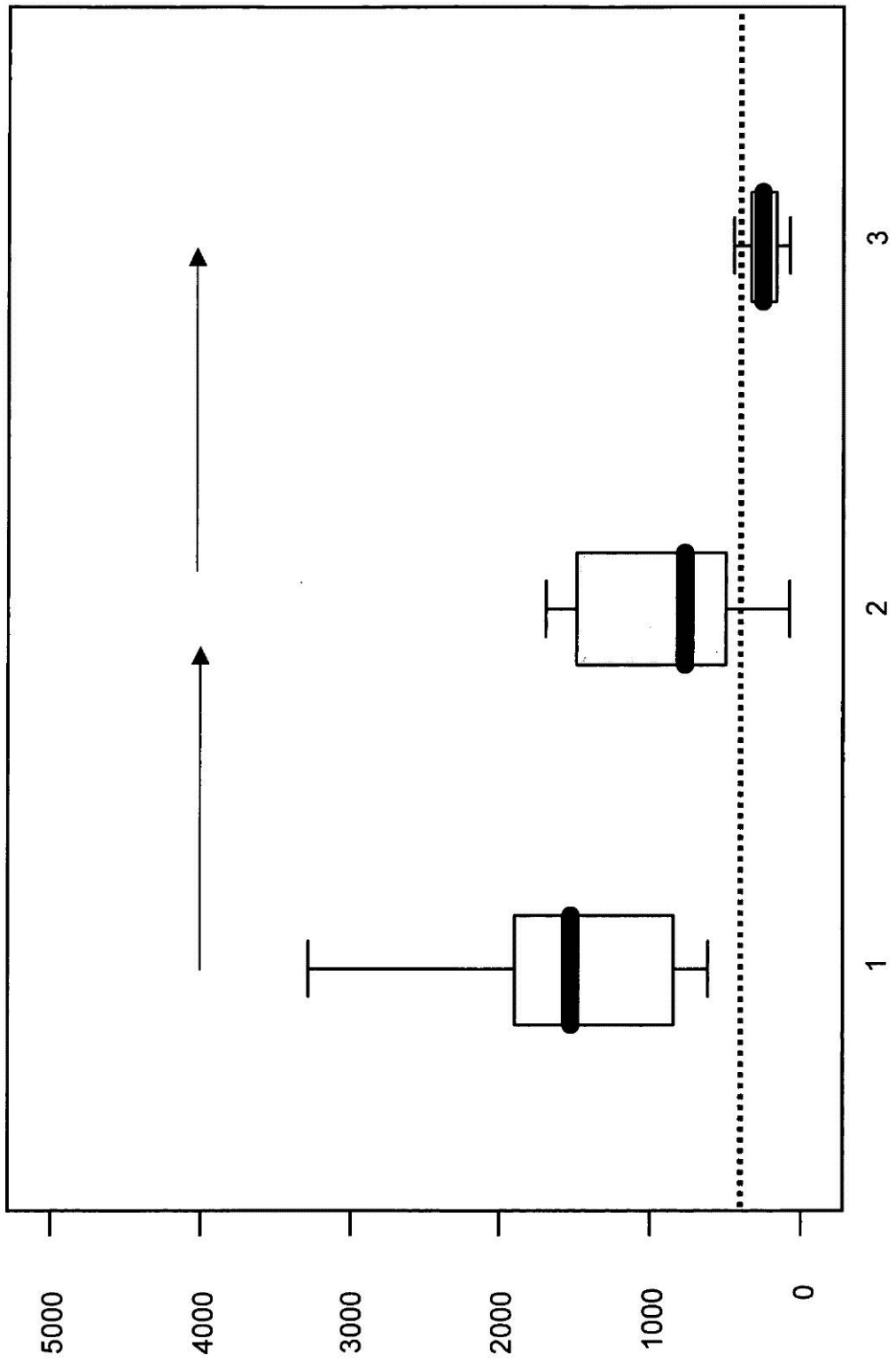
【図２】

Figure 2



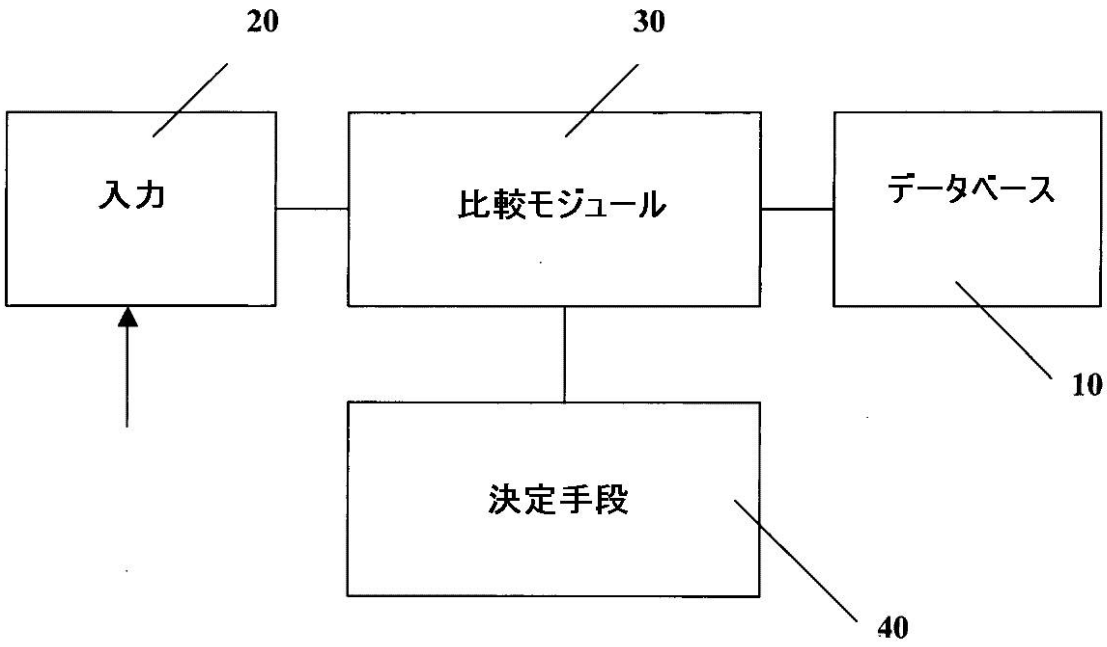
【図３】

Figure 3



【図４】

Figure 4



【配列表】
0005627462000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 ジョーンズ, ポール, グリン
イギリス国 レスターシャー州 エルイ１４ ４アールティ, メルトン モウブレー, ウォルサム オン ザ ウォルド, フリービイ レーン, ウォルサム セントレ フォ ペット ニュートリション
(72)発明者 マーティン, アラン, ジェームズ
イギリス国 レスターシャー州 エルイ１４ ４アールティ, メルトン モウブレー, ウォルサム オン ザ ウォルド, フリービイ レーン, ウォルサム セントレ フォ ペット ニュートリション
(72)発明者 ホフマン, ギャビー
オランダ国 ユトレヒト ティディ ３５０８, ピー. オー. ボックス ８０. １５４, ヤレラーン １０８, ユニバーシティ ユトレヒト, ファクトリー オブ ベテリナリー メディシン, デパートメント オブ クリニカル サイエンシズ オブ コンパニオン アニマルズ
(72)発明者 ロシュイゼン, ジャン
オランダ国 ユトレヒト ティディ ３５０８, ピー. オー. ボックス ８０. １５４, ヤレラーン １０８, ユニバーシティ ユトレヒト, ファクトリー オブ ベテリナリー メディシン, デパートメント オブ クリニカル サイエンシズ オブ コンパニオン アニマルズ

審査官 渡邉 潤也

(56)参考文献 "Whole Dog Journal's Food List", Little Dog & Girl on the Prairie [online]、2007 Jun 27、[2013 Aug 21検索], インターネット<URL:http://blog.livedoor.jp/urea/archives/51627947.html>
"UNIVERSITY STUDY SHOWS DOGS HAVE A LOT TO GAIN WHEN THEY LOSE WEIGHT",GoodNewsforPets.com [online],2007 May 12収録, Internet Archive Wayback Machine,[2013 Aug 21検索],http://www.goodnewsforpets.com/news/archive/Research/041300_weight_study.htmを検索, インターネット<URL:http://web.archive.org/web/20070512095423/http://www.goodnewsforpets.com/news/archive/research/041300_weight_study.htm>
J.Vet.Intern.Med.,2006 Jul-Aug,20(4),p.856-61
Comp.Hepatol.,2003 Apr 3,2(1),5
Pediatrics International,1999,41,p.419-22
"The Best Foods For Dogs With Chronic Active Hepatitis", A Dog's Life Photography & Art [online]、2010 Jun 29、[2013 Aug 21検索], インターネット<URL:http://phoenixdogphotography.com/2010/06/the-best-foods-for-dogs-with-chronic-active-hepatitis/>
"Health and Related Issues" [online]、[2013 Aug 21検索], インターネット<URL:http://homepages.rootsweb.ancestry.com/~oldmill/chelseaBB/HealthPage.htm>

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ａ２３Ｋ １／１８
Ａ２３Ｋ １／１７５
Ａ６１Ｐ １／１６
ＰｕｂＭｅｄ
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
Ｔｈｏｍｓｏｎ Ｉｎｎｏｖａｔｉｏｎ