(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2020年9月17日(17.09.2020)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2020/184676 A1

(51) 国際特許分類:
C12Q 1/02 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2020/010909

(22) 国際出願日： 2020年3月12日(12.03.2020)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

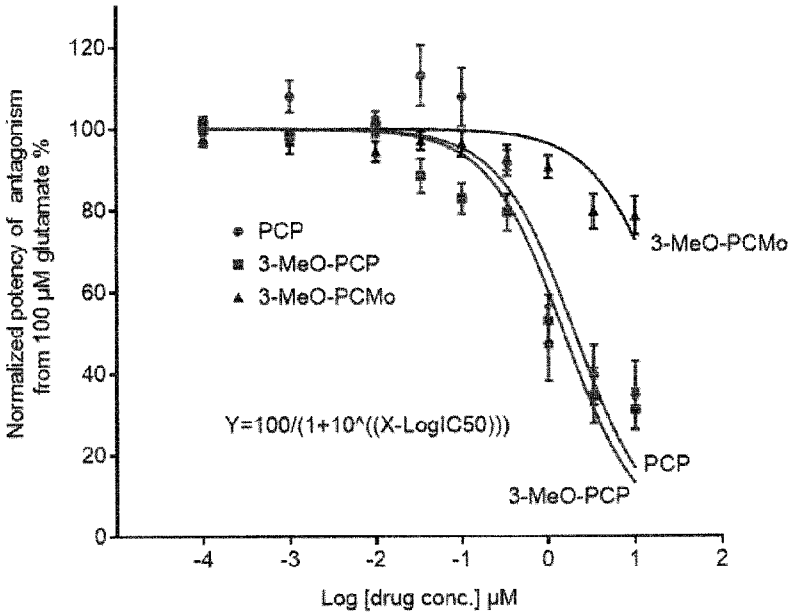
(30) 優先権データ：
特願 2019-046531 2019年3月13日(13.03.2019) JP

(71) 出願人: 国立大学法人群馬大学(**NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION GUNMA UNIVERSITY**) [JP/JP]; 〒3718510 群馬県前橋市荒牧町四丁目２番地 Gunma (JP). 国立大学法人 東京大学(**THE UNIVERSITY OF TOKYO**) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 白尾 智明 (**SHIRAO, Tomoaki**); 〒3718510 群馬県前橋市荒牧町四丁目２番地 国立大学法人群馬大学内 Gunma (JP). 光岡 俊成 (**MITSUOKA, Toshinari**); 〒3718510 群馬県前橋市荒牧町四丁目２番地 国立大学法人群馬大学内 Gunma (JP). 花村 健次(**HANAMURA, Kenji**); 〒3718510 群馬県前橋市荒牧町四丁目２番地 国立大学法人群馬大学内 Gunma (JP). 小金澤 紀子 (**KOGANEZAWA, Noriko**); 〒3718510 群馬県前橋市荒牧町四丁目２番地 国立大学法人群馬大学内 Gunma (JP). 関野 祐子(**SEKINO,**

(54) **Title:** METHOD FOR HIGH-THROUGHPUT EVALUATION OF NMDA RECEPTOR INHIBITION ACTIVITY

(54) 発明の名称： ＮＭＤＡ受容体阻害活性のハイスループット評価方法



(57) **Abstract:** The present invention addresses the problem of establishing a method for the direct, rapid and simple high-throughput evaluation of an NMDA receptor inhibition activity. An NMDA receptor inhibition activity can be evaluated with high throughput by a method comprising the following steps in this order: (A) bringing a substance of interest into contact with cultured neurons; (B) bringing the cultured neurons into contact with a glutamate solution; (C) immobilizing the cultured neurons; (D) visualizing drebrin clusters of dendritic spines of the cultured neurons; and (E) measuring the line density along the dendrites of the drebrin clusters, and determining that the substance of interest has an NMDA receptor inhibition activity when the line density is higher than the line density of the cultured neurons that are not con-

WO 2020/184676 A1

［続葉有］

Yuko); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP).

(74) 代理人：廣田　雅紀 **(HIROTA, Masanori)**; 〒1070052 東京都港区赤坂二丁目２番１９号アドレスビル６階 Tokyo (JP).

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

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

添付公開書類：

一　国際調査報告（条約第21条(3)）

tacted with the substance of interest.

(57) 要約：本発明は、ＮＭＤＡ受容体阻害活性の直接的且つ迅速、簡便なハイスループット評価方法を確立することを課題とする。（Ａ）培養神経細胞に、被験物質を接触させるステップ；（Ｂ）前記培養神経細胞に、グルタミン酸溶液を接触させるステップ；（Ｃ）前記培養神経細胞を固定するステップ；（Ｄ）前記培養神経細胞の樹状突起スパインのドレブリンクラスターを可視化するステップ；及び（Ｅ）前記ドレブリンクラスターの樹状突起に沿った線密度を測定し、前記線密度が、前記被験物質に接触させていない培養神経細胞の線密度と比較して高い場合に、前記被験物質がＮＭＤＡ受容体阻害作用を有すると判定するステップを順次備えた方法により、ＮＭＤＡ受容体阻害活性をハイスループットで評価することができる。

明　細　書

発明の名称 ：

ＮＭＤＡ受容体阻害活性のハイスループット評価方法

技術分野

[0001] 本発明は、培養神経細胞の樹状突起スパインのドレブリンクラスターの樹状突起に沿った線密度を指標として用いる、ＮＭＤＡ受容体阻害活性のハイスループット評価方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、新精神作用物質（New psychoactive substances；ＮＰＳ、日本では「危険ドラッグ」とも呼ばれる）が、「リーガル・ハイ」、「バスソルト」、「リサーチケミカル」等の用語を使って販売されている。しかしながら、それらは国際的に規制されている薬物と同様の効果を持つ乱用物質である。ＮＰＳの出現は世界中の１００以上の国と地域で報告されており、ＮＰＳの広がりが、多くの国で公衆衛生上の懸念を高めている（非特許文献１）。したがって、リスク評価プロセスを通じてこれらの物質を速やかに規制するために、ＮＰＳに対して利用可能な関連データ及び分析結果を蓄積していくことが極めて重要である。

[0003] メトキセタミンやジフェニジン等の、ＮＭＤＡ受容体阻害活性を有するＮＰＳが報告されている（非特許文献２～５等）。ＮＭＤＡ受容体は、中枢神経系の学習と記憶に主に関与する受容体であり、ＮＭＤＡ受容体の活動が低下すると、健忘症、知覚の変化、幻覚及び妄想が起こることが知られている。このように、ＮＭＤＡ受容体は、知覚的及び精神的現象に大いに関連しているため、ＮＭＤＡ受容体阻害剤が乱用薬物として使用される可能性、及び、ＮＭＤＡ受容体阻害剤が麻薬と同様の危険な効果を持つ可能性が高いことが示唆されている（非特許文献６）。しかしながら、中枢神経系に対して作用する化合物の安全性薬理試験法は、ネズミ個体を用いた行動解析のみであり、コスト、時間がかかるという問題点がある。そのため、規制当局は、新

規化合物についてインシリコで構造の類似性を判定し、規制するか否かを判断しているのが現状である。

[0004] 上述の状況から、ＮＭＤＡ受容体阻害活性を有するＮＰＳを、機能的側面から既存の薬物との類似度を評価して迅速に規制できるようにするため、ＮＭＤＡ受容体阻害活性を検出、測定する方法が求められている。現状では、ＮＭＤＡ受容体阻害活性の検出、測定方法として、２つの方法が提案されている。第一はカルシウムイメージング法であり（非特許文献７、８）、第二はトリチウム標識したＭＫ８０１を用いた置換アッセイである（非特許文献９）。しかしながら、これらの方法は、ＮＭＤＡ受容体に対する作用を直接測定することができないうえ、操作が煩雑であり、放射性同位体を使用しなければならない場合もあり、ＮＭＤＡ受容体阻害作用の直接的且つ簡便、迅速な測定には不向きである。

[0005] 培養神経細胞は、培養を行うと樹状突起を徐々に伸ばし、ニューロン間の成熟シナプスを形成する。その後、培養３週間で、きのこ型の頭部を持つ「樹状突起スパイン」と呼ばれる構造が完成する。樹状突起スパインにおいて、ドレブリンはアクチンフィラメントに高濃度で蓄積され、樹状突起スパインにおける受容体及び足場タンパク質の動態を安定化させる（非特許文献１０、１１）。このように樹状突起スパインに蓄積されたドレブリンは、ドレブリンクラスターと呼ばれる。培養神経細胞に対するグルタミン酸処理は、樹状突起スパインから樹状突起への急速なドレブリン流出を誘導する（非特許文献１２、１３）。投与されたグルタミン酸は、ＡＭＰＡ型グルタミン酸レセプター（ＡＭＰＡＲ）とＮＭＤＡ受容体の両方を活性化するが、ドレブリンクラスターからのドレブリンの流出は、ＮＭＤＡ受容体活性化によって誘導され、定量的である（非特許文献１３～１５）。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1：UNODC. UNODC report-Global Synthetic Drugs Assessment-Amphetamine-type stimulants and new psychoactive substances. (2017). ht

tps://www.unodc.org/unodc/en/scientists/global-synthetic-drugs-assessment-2017.html.

非特許文献2：Kikura-Hanajiri, R., Uchiyama, N., Kawamura, M., & Goda, Y. (2014). Changes in the prevalence of new psychoactive substances before and after the introduction of the generic scheduling of synthetic cannabinoids in Japan.Drug Testing and Analysis, 6, 832-839. https://do.org/10.1002/dta.1584.

非特許文献3：Kikura-Hanajiri, R. (2017). Changes in the prevalence substances and their legal status in Japan. Folia Pharmacol. Jpn., 150, 1-6.

非特許文献4：Hondebrink, L., Kasteel, E., Tukker, A., Wijnolts, F., Verboven, A., & Westerink, R. (2017). Neuropharmacological characterization of the new psychoactive substance methoxetamine. Neuropharmacology, 123, 1, 1-9.

非特許文献5：Roth, B., Gibbons, S., Arunotayanun, W., Huang, X., Setola, V., & Treble, R. (2013). The Ketamine Analogue Methoxetamine and 3- and 4-Methoxy Analogues of Phencyclidine Are High Affinity and Selective Ligands for the Glutamate NMDA. Les Iversen published.

非特許文献6：Morris, H., & Wallach, J. (2014). From PCP to MXE: a comprehensive review of the non‐medical use of dissociative drugs. Drug Testing and Analysis, 6, 614-632.

非特許文献7：Ring, A., & Tanso, R. (2007). Measurements with fluorescent probes in primary neural cultures; improved multiwell techniques. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 56, 300-307.

非特許文献8：Sato, K., Takahashi, K., Shigemoto-Mogami, Y., Chujo, K., & Sekino, Y. (2016). Glypican 6 Enhances N-Methyl-D-Aspartate Receptor Function inHuman-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neurons. Frontiers in Cellular Neuroscience, 10(259).

非特許文献9：Reynolds, I. J. (2001). [3H] (+)MK801 radioligand binding assay at the N-methyl-D-aspartate receptor. Curr. Protoc. Pharmacol. Chap. 1: Unit 1.20.

非特許文献10：Sekino, Y., Kojima, N., & Shirao, T. (2007). Role of actincytoskeleton in dendritic spine morphogenesis. Neurochemistry International, 51, 92-104.

非特許文献11：Shirao, T., Hanamura, K., Koganezawa, N., Ishizuka, Y., Yamazaki, H., & Sekino, Y. (2017). The role of drebrin in neurons. Journal of Neurochemistry, 141(6), 819-834.

非特許文献12：Sekino, Y., Tanaka, S., Hanamura, K., Yamazaki, H., Sasagawa, Y., Xue, Y., Hayashi, K., & Shirao, T. (2006). Activation of N-methyl-d-aspartate receptor induces a shift of drebrin distribution: Disappearance from dendritic spines and appearance in dendritic shafts. Molecular Cellular Neuroscience,31, 493-594.

非特許文献13：Mizui, T., Sekino, Y., Yamazaki, H., Ishizuka, Y., Takahashi, H., Kojima, N., Kojima, M., and Shirao, T. (2014). Myosin II ATPase activitymediates the long-term potentiation-induced exodus of stable F-actin bound by drebrin A from dendritic spines. PLoS One, 9, e85367.

非特許文献14：Sekino, Y., Koganezawa, N., Mizui, T., & Shirao, T. (2017). Role of Drebrin in Synaptic Plasticity, Advances in Experimental Medicine and Biology-Drebrin, 1006 (183-201).

非特許文献15：Koganezawa, N., Hanamura, K., Sekino, Y., & Shirao, T. (2017). The role of drebrin in dendritic spines. Molecular and Cellular Neuroscience, 84, 85-92.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 上述したとおり、ＮＭＤＡ受容体阻害剤の、直接的且つ迅速、簡便な阻害

活性の評価方法は未だ構築されておらず、機能面からの新規ＮＭＤＡ受容体阻害剤の規制は行われていないのが現状である。本発明は、以上の事情に鑑みなされたものであり、ＮＭＤＡ受容体阻害活性の直接的且つ迅速、簡便なハイスループット評価方法を確立することにより、ＮＭＤＡ受容体阻害剤の迅速な規制、及び新規治療薬としてのＮＭＤＡ受容体阻害剤のスクリーニング及び活性評価を可能にすることを目的とするものである。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、鋭意検討を重ねた結果、既知のＮＭＤＡ受容体阻害剤であるフェンシクリジン（ＰＣＰ）と、ＰＣＰアナログ２種（３－ＭｅＯ－ＰＣＭｏ及び３－ＭｅＯ－ＰＣＰ）を用い、これらの化合物を成熟した培養神経細胞に接触させることで、グルタミン酸処理によるドレブリンクラスターの線密度減少が抑制されることを見いだした。さらに、かかるドレブリンクラスターの線密度減少が、化合物濃度と相関すること、並びに該相関に基づいて算出した５０％阻害濃度（IC_{50}）の比が、これらの化合物の阻害定数（K_i）の比と良好な相関関係を示すことを見いだした。本発明は、これらの知見により完成したものである。

[0009] すなわち、本発明は以下の事項により特定されるとおりのものである。

（１）以下のステップ（Ａ）～（Ｅ）を順次備えたことを特徴とするＮＭＤＡ受容体阻害活性のハイスループット評価方法。

（Ａ）培養神経細胞に、被験物質を接触させるステップ；

（Ｂ）前記培養神経細胞に、グルタミン酸溶液を接触させるステップ；

（Ｃ）前記培養神経細胞を固定するステップ；

（Ｄ）前記培養神経細胞の樹状突起スパインのドレブリンクラスターを可視化するステップ；

（Ｅ）前記ドレブリンクラスターの樹状突起に沿った線密度を測定し、前記線密度が、前記被験物質に接触させていない培養神経細胞の線密度と比較して高い場合に、前記被験物質がＮＭＤＡ受容体阻害作用を有すると判定するステップ；

（２）以下のステップ（Ｆ）を、ステップ（Ｅ）の後に備えたことを特徴とする上記（１）に記載の方法。

（Ｆ）ステップ（Ａ）で培養神経細胞に接触させた被験物質の濃度と、ステップ（Ｅ）で測定したドレブリンクラスターの線密度との相関に基づいて、前記被験物質のＩＣ$_{50}$を算出するステップ；

（３）以下のステップ（Ｇ）を、ステップ（Ｆ）の後に備えたことを特徴とする上記（１）又は（２）に記載の方法。

（Ｇ）ステップ（Ｆ）で算出した被験物質のＩＣ$_{50}$を、既知のＮＭＤＡ受容体阻害剤のＩＣ$_{50}$と比較することにより、前記被験物質と、前記既知のＮＭＤＡ受容体阻害剤とのＮＭＤＡ受容体阻害活性比を算出するステップ；

（４）培養神経細胞が、海馬神経細胞由来であることを特徴とする上記（１）～（３）のいずれかに記載の方法。

（５）培養神経細胞が、げっ歯類由来であることを特徴とする上記（１）～（４）のいずれかに記載の方法。

（６）ステップ（Ｄ）の可視化が、抗ドレブリン抗体による免疫染色であることを特徴とする上記（１）～（５）のいずれかに記載の方法。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、簡便且つ短時間で実施することのできる、ＮＭＤＡ受容体阻害活性のハイスループット評価方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]実施例のセクション２－１の結果を示す図である。

[図2]実施例のセクション２－２の結果を示す図である。

[図3]実施例のセクション２－３の結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0012] 本発明におけるＮＭＤＡ受容体阻害活性のハイスループット評価方法とは、（Ａ）培養神経細胞に、被験物質を接触させるステップ；（Ｂ）前記培養神経細胞に、グルタミン酸溶液を接触させるステップ；（Ｃ）前記培養神経細胞を固定するステップ；（Ｄ）前記培養神経細胞の樹状突起スパインのド

レブリンクラスターを可視化するステップ；及び（Ｅ）前記ドレブリンクラスターの樹状突起に沿った線密度を測定し、前記線密度が、前記被験物質に接触させていない培養神経細胞の線密度と比較して高い場合に、前記被験物質がＮＭＤＡ受容体阻害作用を有すると判定するステップ；を順次備えた方法である。

[0013] 本発明の方法は、培養神経細胞の樹状突起に沿って形成されたドレブリンクラスターの線密度変化を指標として、被験物質のＮＭＤＡ受容体阻害活性を評価する方法である。ここで、培養神経細胞としては、ＮＭＤＡ受容体の活性化によりドレブリンクラスターが減少する細胞であればよく、例えば、初代培養神経細胞、神経芽細胞腫と神経膠腫のハイブリドーマ、神経芽細胞腫や、多能性幹細胞（胚性幹細胞、人工多能性幹細胞）に由来する培養神経細胞等を挙げることができ、海馬由来の初代培養神経細胞を好適に使用することができる。また、培養神経細胞の由来は、ヒトのＮＭＤＡ受容体の阻害活性評価に用いることができるものであることが好ましく、例えば哺乳類由来、より好ましくは霊長類由来、さらに好ましくはヒト由来を挙げることができるが、マウスやラット等、げっ歯類由来の培養神経細胞を用いることもできる。また、上記培養神経細胞は、ヒト胎児由来の培養神経細胞であってもよい。

[0014] 本発明において、被験物質とは、ＮＭＤＡ受容体の阻害活性を有し得る化合物であればよく、ＮＰＳの候補化合物や、麻酔等の医薬品候補化合物を例示することができ、フェンシクリジン、メトキセタミン、ジフェニジン等の既知のＮＰＳの類縁化合物や、ケタミン等のＮＭＤＡ受容体拮抗薬の類縁化合物であってもよい。上記ステップ（Ａ）における被験物質の終濃度は、IC_{50}を算出するために適した濃度を常法に基づいて決定することができるが、例えば阻害率５０％を挟む濃度が得られるように、被験物質を段階希釈した希釈系列を用いることが望ましい。また、上記ステップ（Ａ）における接触時間は、被験物質がＮＭＤＡ受容体まで到達するために十分な時間であればよく、例えば２～２０分間、好ましくは５～１５分間、より好ましくは８

～１２分間を例示することができる。

[0015] 上記ステップ（Ｂ）は、ＮＭＤＡ受容体を活性化させ、ドレブリンクラスターの減少を引き起こすために、グルタミン酸溶液を接触させるステップである。ここで、グルタミン酸溶液の終濃度及び接触時間は、被験物質のＩＣ$_{50}$を算出するために適切なＮＭＤＡ受容体活性化を引き起こす濃度及び接触時間であればよい。上記濃度としては例えば１μＭ～５００μＭ、好ましくは１０μＭ～３００μＭ、より好ましくは５０μＭ～２００μＭ、さらに好ましくは８０μＭ～１５０μＭを挙げることができ、上記接触時間としては、例えば２～２０分間、好ましくは５～１５分間、より好ましくは８～１２分間を例示することができる。また、グルタミン酸溶液に代えて、ＮＭＤＡ受容体活性化を引き起こすことのできるいかなる化合物を用いてもよい。

[0016] 上記ステップ（Ｃ）における培養神経細胞の固定は、固定後のドレブリンクラスターの可視化が効率的に行える条件であればいかなる公知の方法を用いてもよく、固定化試薬としては、例えばメタノール、アセトン、ホルムアルデヒド、パラホルムアルデヒド（ＰＦＡ）、エタノール、グルタルアルデヒド、スベルイミノ酸ジメチルを挙げることができ、固定化試薬は、冷凍庫（－２０±２℃）又は冷蔵庫（４±２℃）で冷却したものや、室温のものを使用することができる。

[0017] 上記ステップ（Ｄ）において、培養神経細胞のドレブリンクラスターの可視化は、いかなる公知の方法により可視化してもよく、ドレブリンに対して特異的に結合し得る分子を用いて可視化する方法を例示することができる。上記ドレブリンに対して特異的に結合し得る分子としては、例えば抗ドレブリン抗体を挙げることができ、検出の簡便性や、他の培養神経細胞マーカーを用いて共染色した場合や、４’，６－ジアミジノ－２－フェニルインドール（ＤＡＰＩ）を用いて細胞を染色した場合における識別性の観点から、蛍光標識された抗ドレブリン抗体を用いることが好ましい。ここで、蛍光標識としては、ＦＩＴＣ、Ｃｙ３、Ｃｙ５、Rhodamine、Alexa fluor（登録商標、インビトロジェン社製）等の蛍光物質を挙げることができる。抗ドレブリ

ン抗体は、直接標識してもよく、これらに対する二次抗体を用いて検出してもよい。本発明で用いる抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体のいずれであってもよく、市販のものを使用できる他、常法により作製することもできる。また、抗ＭＡＰ２抗体等の他の培養神経細胞マーカーを用いて、培養神経細胞を共染色してもよい。

[0018] 一態様では、ドレブリンクラスターの可視化は、例えば培養神経細胞において抗ドレブリン抗体（抗ドレブリンラクダＶＨＨ抗体等）を発現させ、該抗ドレブリン抗体の集積を検出することにより行うこともできる。抗ドレブリン抗体は、二次抗体で検出してもよいが、蛍光タンパク質等の標識物質を結合させた抗ドレブリン抗体を培養神経細胞内で発現させ、標識物質を検出することにより、生細胞を用いたリアルタイムイメージングを行うことができる。また、一態様において、あらかじめ蛍光タンパク質等の標識物質を結合させたドレブリン又はドレブリン断片を培養神経細胞内で発現させると、発現した標識ドレブリン又はドレブリン断片がドレブリンクラスターを形成する。この態様においては、該標識ドレブリン又はドレブリン断片を検出することにより、追加の可視化ステップなしにドレブリンクラスターを検出することができる。これらの態様においては、ステップ（Ｃ）における培養神経細胞の固定は行っても行わなくてもよい。

[0019] 上記ステップ（Ｅ）におけるドレブリンクラスターの線密度は、上記ステップ（Ｄ）により可視化されたドレブリン陽性シグナルの個数を手動又は自動で計数し、樹状突起の単位長さ当たりのドレブリン陽性シグナルの個数を算出することにより測定される。かかる線密度の測定は、IN Cell Developer Toolbox（ＧＥヘルスケア社製）等の公知の画像解析ソフトウェアを用いて自動測定することが好ましい。

[0020] 本発明の方法は、上記ステップ（Ｅ）の後に、上記ステップ（Ａ）で培養神経細胞に接触させた被験物質の濃度と、ステップ（Ｅ）で測定したドレブリンクラスターとの線密度の相関に基づいて、前記被験物質のＩＣ$_{50}$を算出するステップ（Ｆ）を備えてもよい。ＩＣ$_{50}$の算出は、常法に基づいて行う

ことができ、例えば、被験物質の濃度に対する阻害活性値をプロットした阻害曲線を作成して算出することができる。また、本発明の方法により得られたＩＣ$_{50}$は、Ｋ$_{i}$値と良好な相関関係にあるため、上記ステップ（Ｆ）で得られた被験物質のＩＣ$_{50}$を、既知のＮＭＤＡ受容体阻害剤のＩＣ$_{50}$と比較して阻害活性比を算出することで、前記被験物質の活性を迅速且つ簡便な方法にて評価することができる。

[0021] 本発明の一態様において、本発明の方法は、ＮＭＤＡ受容体活性化を引き起こす物質のスクリーニング及び活性評価に用いることもできる。かかる態様において、被験物質の濃度とドレブリンクラスターの線密度の減少との相関に基づいて、被験物質のＮＭＤＡ受容体活性化能が評価される。

[0022] 本発明の一態様において、ドレブリンクラスターの線密度に代えて、或いはドレブリンクラスターの線密度と共に、ドレブリンＡ及び／又はドレブリンＥの発現量変化を、被験物質の活性評価に用いてもよい。かかる態様は、被験物質が神経細胞に与える長期的影響を評価するのに有効である可能性がある。

[0023] 本発明は、従来のＮＭＤＡ受容体阻害活性の測定方法と比較して迅速且つ簡便に、定量性、再現性良く、高精度にＮＭＤＡ受容体阻害活性の評価を行うことができる。そのため、従来は機能面からの評価及び規制が困難であったＮＰＳの迅速な規制や、ＮＭＤＡ受容体をターゲットとした治療薬のハイスループットスクリーニングへの応用が期待される。

[0024] 以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

実施例

[0025] １．方法

１－２　動物実験

動物実験は、群馬大学昭和キャンパス（群馬県前橋市）の動物実験委員会によって設定されたガイドラインに従って行い、研究における動物の使用に関するＮＩＨガイドラインに準拠した。動物の苦しみを最小限に抑え、使用

される動物の数を減らすためにあらゆる努力を払った。妊娠ウィスターラットは、日本チャールス・リバー株式会社から入手した。動物は標準的な動物施設条件下で飼料と水を自由に摂取させて飼育した。

[0026] １－２　海馬神経細胞培養

１８日目胚のラットの海馬から調製した凍結ニューロンを、ポリリジンであらかじめコーティングした９６ウェルプレート（Thermo 96 Well Black Poly Bottom Poly-Lysine、Thermo Fisher Scientific社製）に、３．０×１０^{4}細胞／ｃｍ^{2}の密度で播種した。Ｂ２７サプリメント、ペニシリン／ストレプトマイシン、及びＬ－アラニル－Ｌ－グルタミン（Glutamax-I；Thermo Fisher Scientific社製）を含むNeurobasal Medium（Thermo Fisher Scientific社製）を使用して、３７℃、５％CO_2環境下でインキュベートした。４ＤＩＶ（インビトロでの培養日数）に、シトシンβ－Ｄ－アラビノフラノシド（Sigma社製）を最終濃度０．２μＭになるように加えてグリア細胞の増殖を抑制した。ニューロンを２１ＤＩＶ培養した後、それらを薬理学的に処理した。

[0027] １－３　被験物質の投与

ＰＣＰ、３－ＭｅＯ－ＰＣＭｏ、及び３－ＭｅＯ－ＰＣＰ（Cayman Chemical社製）を０．１％ＤＭＳＯ溶液により所定の濃度に希釈し、９６ウェルプレートのうち、培養神経細胞が培養されている所定のウェルに投与した。被験物質の投与から１０分後に、ウェル内の最終濃度が１００μＭとなるようにグルタミン酸溶液（和光純薬株式会社製）を調製し、薬液投与１０分後に投与した。ドレブリンクラスター密度の用量反応曲線を得るための実験のために、最終グルタメート濃度は１、３、１０、３０、５０又は１００μＭであった。いくつかの培養神経細胞は、グルタミン酸塩処理の前に、ＮＭＤＡ受容体に対する競合アンタゴニストであるＤ－２－アミノ－５－ホスホノバレリン酸（ＡＰＶ；５０、１００又は５００μＭ）で１０分間処理した。

[0028] １－４　免疫細胞化学

培養神経細胞を、リン酸緩衝液中４％パラホルムアルデヒドで固定した。

リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）中０．１％トリトンＸ－１００で５分間浸透処理した後、培養神経細胞をＰＢＳ中３％ウシ血清アルブミン（ＰＢＳＡ） で室温（ＲＴ）にて１時間ブロッキングし、次いで一次抗体と共に４℃で一晩インキュベートした。抗ドレブリン抗体（マウスモノクローナル、Ｍ２Ｆ６、１：１）及び抗ＭＡＰ２抗体（ウサギポリクローナル、１：２０００）（Merck Millipore社製）を一次抗体として使用した。ＰＢＳで洗浄した後、細胞を二次抗体及び４’，６－ジアミジノ－２－フェニルインドール二塩酸塩（ＤＡＰＩ、１：１０００、Thermo Fisher Scientific社製）と共に室温で１時間インキュベートした。使用した二次抗体は、Alexa Fluor 488ロバ抗マウスＩｇＧ（１：２５０）及びAlexa Fluor 594ロバ抗ウサギＩｇＧ（１：２５０、Jackson Immuno Research Laboratories社製）であった。

[0029] １－５　画像の自動取得と解析

９６ウェルプレートで培養された海馬神経細胞の三重染色像は、IN Cell Analyzer 2200（GE Healthcare社製）の自動焦点機能を使用することによって自動的に取得された（２０倍レンズ、開口数０．４５）。全てのデータは１６ビット／ピクセルで２０４８×２０４８の解像度で収集された。画像内の単一の画素は、標本面内の３２５ｎｍの正方形に対応していた。Ｚスタック画像は、ハイコンテント画像ソフトウェアであるIN Cell Developer Toolbox v1.9（GE Healthcare社製）を用いて拡張焦点変換プロトコル（extended focus transformation protocol）により処理され、Ｚシリーズスタックからの焦点があった単一の２次元画像を生成した。培養神経細胞の細胞体は、ＭＡＰ２及びＤＡＰＩ染色に基づいて認識された。培養神経細胞の細胞体を特定するために、セグメンテーション機能により、異なるカーネルサイズ及び感度を有するコントラストベースのセグメンテーションアルゴリズムを介して、ＭＡＰ２陽性シグナルの蛍光強度に基づいて蛍光体を局在化させた。Erosion（収縮）、Sieve（ふるい）、Dilation（拡張）のコマンド及びＤＡＰＩ陽性領域を用いて、培養神経細胞の細胞体を同定した。培養神経細胞の樹状突起を識別するために、セグメンテーション機能、並びにDilation及びErosion

コマンドを、ＭＡＰ２陽性シグナルについての別個のパラメーターと共に使用し、その後培養神経細胞の細胞体領域を差し引いた。ドレブリンクラスターを同定するために、セグメンテーション機能により、異なるカーネルサイズ及び感度を有するコントラストベースのセグメンテーションアルゴリズムを介して、ドレブリン陽性シグナルの蛍光強度に基づいて蛍光物体を局在化させた。偽陽性のバックグラウンドシグナルを除去するためにSieveコマンドを使用した。加えて、Dilationコマンドによって決定される、樹状突起までの定義された距離内に位置するドレブリン陽性斑点のみを、樹状突起に沿ったドレブリンクラスターとしてカウントした。神経細胞体、樹状突起及びドレブリンクラスター、視野当たりの細胞数、視野当たりの樹状突起長を同定した後、ドレブリンクラスターの線密度が自動的に算出された。

[0030] １－６　統計

データは、ＡＮＯＶＡ（エクセル統計Statcel4、有限会社オーエムエス出版製）に従ってｔ検定又はターキー－クレイマー検定によって統計的に分析した。全てのデータは平均値±平均値の標準誤差（ＳＥＭ）として示した。市販のソフトウェア（GraphPad Prism 8、GraphPad Software社製）を用いて用量適合曲線を描き、IC_{50}を計算した。

[0031] ２．結果

２－１　グルタミン酸処理は、ＮＭＤＡ受容体活性化を介してドレブリンクラスター密度を減少させた

まず、グルタミン酸がドレブリンクラスター密度に及ぼす影響を、ハイスループットイメージングシステムを用いて調べた。２１インビトロ培養日数（ＤＩＶ）のラット海馬培養神経細胞を、いくつかの濃度のグルタミン酸溶液（１μM、Ｎ＝６１；３μM、Ｎ＝９７；１０μM、Ｎ＝８８；３０μM、Ｎ＝９７；５０μM、Ｎ＝２０；１００μM、Ｎ＝１０６）で処理した。上記１－４の免疫細胞化学の処理を行った後、画像取得及び分析は自動的に行われた。得られたドレブリンクラスター密度のグルタミン酸用量反応曲線を図１Ａに示す。EC_{50}は１０．４μMであり、９５％信頼区間（ＣＩ）は

６．２９μＭ～１７．４μＭの範囲であった。

[0032] また、グルタミン酸刺激によるドレブリンクラスター密度の減少は、ＡＰＶ（５０μＭ、Ｎ＝４；１００μＭ、Ｎ＝７；５００μＭ、Ｎ＝６）によって阻害されることを確認した（図１Ｂ）。ここでの結果により、当該実験系が、グルタミン酸刺激によるドレブリンクラスター密度の減少、及び、ＮＭＤＡ受容体競合的アンタゴニストによるドレブリンクラスター密度減少の阻害を検出することができることが示された。

[0033] ２－２ グルタミン酸誘発ドレブリンクラスター密度の減少に対するＰＣＰ、３－ＭｅＯ－ＰＣＭｏ及び３－ＭｅＯ－ＰＣＰの阻害効果

まず、本発明者らは、１００μＭグルタミン酸溶液を用いてドレブリンクラスターの密度をどの程度減少させるかを決定した（対照、Ｎ＝９５；グルタミン酸１００μＭ、Ｎ＝７７）。図２Ａに示されるように、１００μＭグルタミン酸溶液処理により、対照群と比較してドレブリンクラスター密度が約４０％減少した（対照０．５３８±０．０１４３；１００μＭグルタミン酸０．３１９±０．００３５）。

[0034] 次に、グルタミン酸を用いたＮＭＤＡ受容体刺激によるドレブリンクラスターの密度の低下に対する、ＮＭＤＡ受容体の非競合的拮抗薬であるＰＣＰの抑制効果を調べた（０～１０ μＭ、Ｎ＝１８）。対照群に対する各投与群の平均阻害率を計算することにより、用量依存的効果を分析した。図２Ｂより、ＰＣＰが１００μＭグルタメートのＮＭＤＡＲ刺激によって１μＭ以上の濃度でドレブリンクラスターの減少を有意に抑制し、ＰＣＰが用量依存的にドレブリンクラスターの減少を抑制することが示された。

[0035] 同様の方法により、ＰＣＰアナログである３－ＭｅＯ－ＰＣＭｏ及び３－ＭｅＯ－ＰＣＰの阻害作用を調べた（０～１０μＭ；３－ＭｅＯ－ＰＣＭｏ、Ｎ＝２９；３－ＭｅＯ－ＰＣＭｏ、Ｎ＝３０）。図２Ｃは、３－ＭｅＯ－ＰＣＰが、３３３ｎＭ以上の濃度で１００μＭグルタミン酸によるドレブリンクラスターの減少を有意に阻害したことを示す。図２Ｄは、３ －ＭｅＯ－ＰＣＭｏが、３．３３μＭ以上の濃度で１００μＭグルタミン酸によるドレ

ブリンクラスターの減少を有意に阻害したことを示す。さらに、３－ＭｅＯ－ＰＣＰ及び３－ＭｅＯ－ＰＣＭｏの両方が、用量依存的にドレブリンクラスターの減少を阻害した。

[0036] ２－３　ＰＣＰ、３－ＭｅＯ－ＰＣＭｏ及び３－ＭｅＯ－ＰＣＰのＩＣ$_{50}$値

分析の定量的信頼性を高めるために、測定値に基づいて曲線近似した用量作用曲線を作成した（図３）。図３より、３－ＭｅＯ－ＰＣＰの阻害活性がＰＣＰの阻害活性と同程度であり、３－ＭｅＯ－ＰＣＭｏの阻害活性がＰＣＰのそれよりも低いことが示された。ＩＣ$_{50}$は、ＰＣＰ＝２．０２μＭ（９５％ＣＩ：１．３９～２．９７μＭ）、３－ＭｅＯ－ＰＣＰ＝１．５１μＭ（９５％ＣＩ：１．１６～１．９９μＭ）、３－ＭｅＯ－ＰＣＭｏ＝２６．７μＭ（９５％ＣＩ：２０．０～３７．３μＭ）であった。

[0037] ３．考察

上記２－３で算出したＩＣ$_{50}$に基づく阻害活性の順は、活性が大きい方から３－ＭｅＯ－ＰＣＰ＞ＰＣＰ＞３－ＭｅＯ－ＰＣＭｏであった。最近なされたＮＭＤＡ受容体に対する結合アッセイの報告によれば、ＰＣＰの阻害定数（Ｋ$_i$）値は２２．１ｎＭ (Colestock et al. (2018)、Drug Testing and Analysis, 10, 272-283) 及び５７．９ｎＭ (Wallach, J. (2014). Structure activity relationship (SAR) studies of arylcyclohexylamines as N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. PhD dissertation. University of the Sciences, Philadelphia) であると報告されており、３－ＭｅＯ－ＰＣＰのＫ$_i$値は３８．１ｎＭであると報告されている (Wallach, J. (2014))。これは、３－ＭｅＯ－ＰＣＰが、ＰＣＰの平均よりもＮＭＤＡ受容体に対してわずかに高い親和性を有することを示す。一方で、３－ＭｅＯ－ＰＣＭｏのＫ$_i$値は２５２．９ｎＭであり、ＰＣＰのＫ$_i$値と比べて１／１２であると報告されている (Colestock et al. (2018))。

[0038] 上記のＫ$_i$値からＰＣＰに対する親和性比を計算したところ、ＰＣＰ＝１としたときに、３－ＭｅＯ－ＰＣＰ＝０．７３ (Wallach, J. (2014)のＫ$_i$値からの再計算)、３－ＭｅＯ－ＰＣＭｏ＝１１．４ (Colestock et al. (2018)

のK$_i$値からの再計算）であった。まとめると、親和性の順序は、３－ＭｅＯ－ＰＣＰ＞ＰＣＰ＞３－ＭｅＯ－ＰＣＭｏで、本発明の方法により得られたＩＣ$_{50}$に基づく活性の順序と同じであった。

[0039] 同一の作用機序を有する阻害剤の場合、それらのＩＣ$_{50}$値を比較することにより、相対的な阻害活性を評価するのに有用であるとの報告がある（Cheng &Prusoff (1973) Biochemical Pharmacology, 22(23), 3099-3108；Cer et al. (2009) Nucleic Acids Res. 1(37): W441-W445）。ＰＣＰ及び他の高親和性ＮＭＤＡ受容体アンタゴニストは、ＮＭＤＡＲと同様の阻害メカニズムを有することが示唆されている（Lodge＆Mercier (2015) Br. J. Pharmacol, 172, 4254-4276）。かかる知見に基づいて、本研究で得られたＩＣ$_{50}$値からＰＣＰに対する効力比を計算したところ、ＰＣＰ＝１としたときに、３－ＭｅＯ－ＰＣＰ＝０．７５、３－ＭｅＯ－ＰＣＭｏ＝１３．２であり、上記K$_i$値から計算した効力比と類似していた。この結果より、本発明によって得られるＩＣ$_{50}$値は、ＮＭＤＡ受容体阻害作用を反映しており、ＮＭＤＡ受容体阻害活性を有する化合物（ＮＰＳ候補化合物や、新規治療剤等）の薬理学的評価（毒性評価）に使用することができることが明らかになった。

産業上の利用可能性

[0040] 本発明によれば、簡便且つ短時間で実施することのできる、ＮＭＤＡ受容体阻害活性のハイスループット評価方法を提供することができる。かかる評価方法により、従来は機能面からの評価及び規制が困難であったＮＰＳの迅速な規制や、ＮＭＤＡ受容体をターゲットとした治療薬のハイスループットスクリーニング及び機能評価が可能になるため、産業上の有用性は極めて高い。

請求の範囲

[請求項1] 以下のステップ（Ａ）～（Ｅ）を順次備えたことを特徴とするＮＭＤＡ受容体阻害活性のハイスループット評価方法。

（Ａ）培養神経細胞に、被験物質を接触させるステップ；

（Ｂ）前記培養神経細胞に、グルタミン酸溶液を接触させるステップ；

（Ｃ）前記培養神経細胞を固定するステップ；

（Ｄ）前記培養神経細胞の樹状突起スパインのドレブリンクラスターを可視化するステップ；

（Ｅ）前記ドレブリンクラスターの樹状突起に沿った線密度を測定し、前記線密度が、前記被験物質に接触させていない培養神経細胞の線密度と比較して高い場合に、前記被験物質がＮＭＤＡ受容体阻害作用を有すると判定するステップ；

[請求項2] 以下のステップ（Ｆ）を、ステップ（Ｅ）の後に備えたことを特徴とする請求項１に記載の方法。

（Ｆ）ステップ（Ａ）で培養神経細胞に接触させた被験物質の濃度と、ステップ（Ｅ）で測定したドレブリンクラスターの線密度との相関に基づいて、前記被験物質のＩＣ$_{50}$を算出するステップ；

[請求項3] 以下のステップ（Ｇ）を、ステップ（Ｆ）の後に備えたことを特徴とする請求項１又は２に記載の方法。

（Ｇ）ステップ（Ｆ）で算出した被験物質のＩＣ$_{50}$を、既知のＮＭＤＡ受容体阻害剤のＩＣ$_{50}$と比較することにより、前記被験物質と、前記既知のＮＭＤＡ受容体阻害剤とのＮＭＤＡ受容体阻害活性比を算出するステップ；

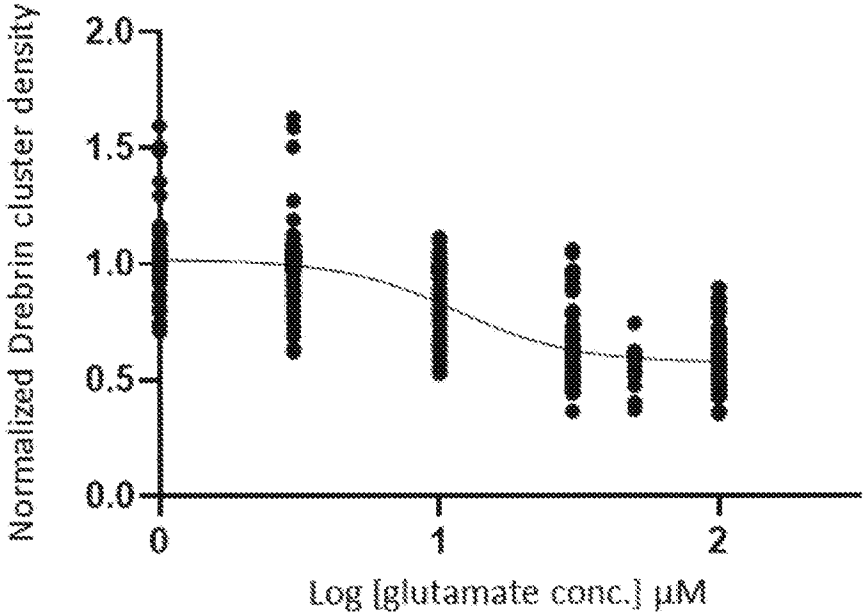
[請求項4] 培養神経細胞が、海馬神経細胞由来であることを特徴とする請求項１～３のいずれかに記載の方法。

[請求項5] 培養神経細胞が、げっ歯類由来であることを特徴とする請求項１～４のいずれかに記載の方法。

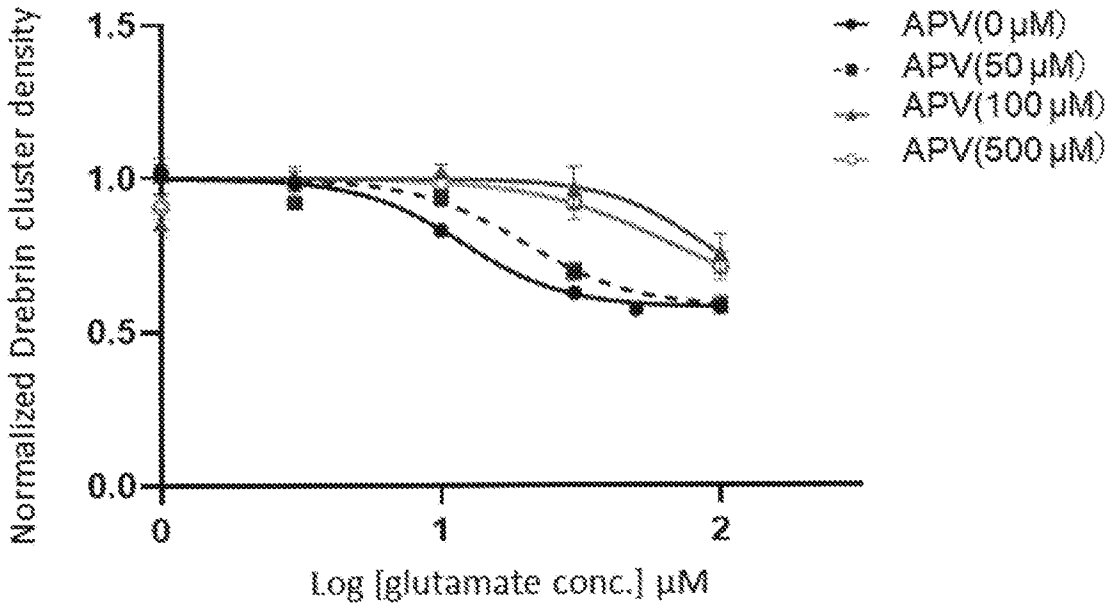
[請求項6] ステップ（Ｄ）の可視化が、抗ドレブリン抗体による免疫染色であることを特徴とする請求項１～５のいずれかに記載の方法。

[図1]

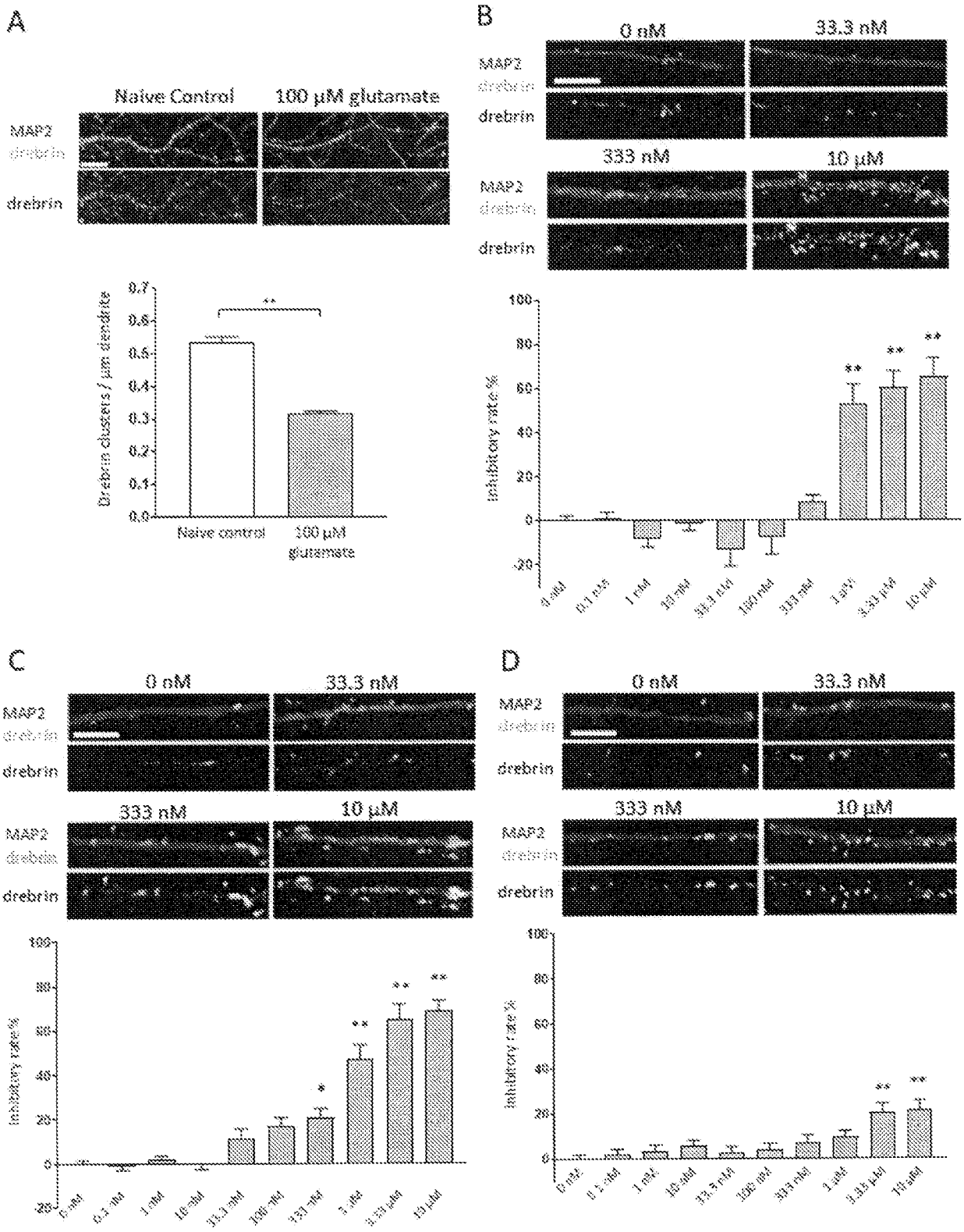
A


Normalized Drebrin cluster density
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
1
2
Log [glutamate conc.] μM

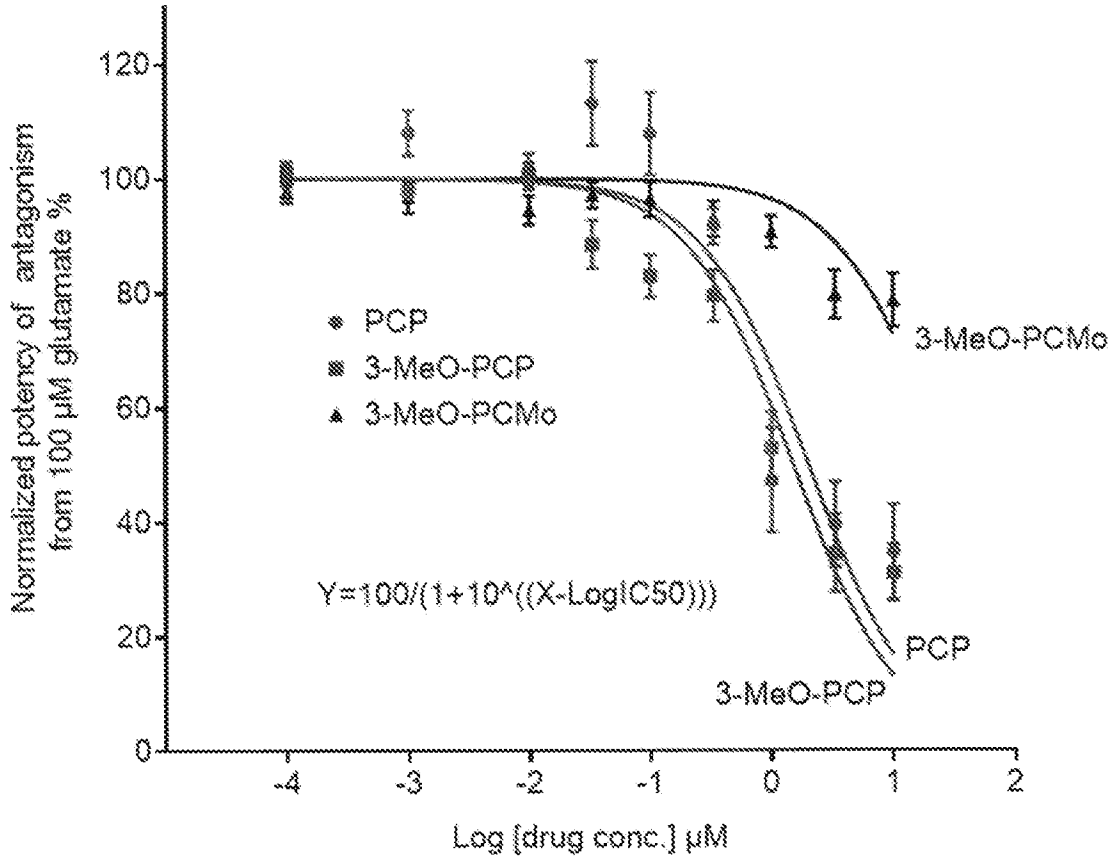
B


Normalized Drebrin cluster density
1.5
1.0
0.5
0.0
0
1
2
Log [glutamate conc.] μM
APV(0 μM)
APV(50 μM)
APV(100 μM)
APV(500 μM)

[図2]


A
Naive Control
100 μM glutamate
MAP2
drebrin
drebrin
Drebrin clusters / μm dendrite
Naive control
100 μM glutamate
B
0 nM
33.3 nM
333 nM
10 μM
MAP2
drebrin
drebrin
inhibitory rate %
C
0 nM
33.3 nM
333 nM
10 μM
MAP2
drebrin
drebrin
inhibitory rate %
D
0 nM
33.3 nM
333 nM
10 μM
MAP2
drebrin
drebrin
inhibitory rate %

[図3]


Normalized potency of antagonism from 100 μM glutamate %
120
100
80
60
40
20
0
-4
-3
-2
-1
0
1
2
Log [drug conc.] μM
PCP
3-MeO-PCP
3-MeO-PCMo
Y=100/(1+10^((X-LogIC50)))
3-MeO-PCMo
PCP
3-MeO-PCP

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2020/010909

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl. C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i
FI: G01N33/50Z, G01N33/15Z, G01N33/48P, G01N33/53D, C12Q1/02
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)
Int.Cl. C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/48, G01N33/50, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2020
Registered utility model specifications of Japan 1996-2020
Published registered utility model applications of Japan 1994-2020

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

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	SEKINO, Yuko et al., Activation of N-methyl-D-aspartate receptor induces a shift of drebrin distribution: Disappearance from dendritic spines and appearance in dendritic shafts, Molecular and Cellular Neuroscience, 2006, vol. 31, pp. 493-504, particularly, fig. 11	1, 5-6 4 2-3
Y	MIAO, S. C. et al., N-methyl-D-aspartate receptor mediates X-irradiation-induced drebrin decrease in hippocampus, The Kitakanto Medical Journal, 2018, vol. 68, pp. 111-115, particularly, abstract	4
A	KOGANEZAWA, Noriko et al., The role of drebrin in dendritic spines, Molecular and Cellular Neuroscience, 2017, vol. 84, pp. 85-92, particularly, fig. 3	1-6
A	JP 2016-040540 A (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION GUNMA UNIVERSITY) 24.03.2016 (2016-03-24), claims	1-6

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19.05.2020	26.05.2020
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2020/010909

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2005/080976 A1 (SUMITOMO DAINIPPON PHARMA CO., LTD.) 01.09.2005 (2005-09-01), claims	1-6
P, X	MITSUOKA, Toshinari et al., Assessment of NMDA receptor inhibition of phencyclidine analogues using a high-throughput drebrin immunocytochemical assay, Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 2019, vol. 99, no. 106583, pp. 1-6, entire text	1-6
P, A	HANAMURA, Kenji et al., High-content imaging analysis for detecting the loss of drebrin clusters along dendrites in cultured hippocampal neurons, Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 2019, vol. 99, no. 106607, pp. 1-8, entire text	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2020/010909

JP 2016-040540 A	24.03.2016	(Family: none)	
WO 2005/080976 A1	01.09.2005	US 2007/0160537 A1 claims EP 1726952 A1	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2020/010909

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12Q 1/02(2006.01)i; G01N 33/15(2006.01)i; G01N 33/48(2006.01)i; G01N 33/50(2006.01)i; G01N 33/53(2006.01)i
FI: G01N33/50 Z; G01N33/15 Z; G01N33/48 P; G01N33/53 D; C12Q1/02

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））

C12Q1/02; G01N33/15; G01N33/48; G01N33/50; G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２０年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２０年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２０年

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/BIOSIS (STN)

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	SEKINO, Yuko et al., Activation of N-methyl-D-aspartate receptor induces a shift of drebrin distribution: Disappearance from dendritic spines and appearance in dendritic shafts, Molecular and Cellular Neuroscience, 2006, vol. 31, pp.493-504 特に、図11	1,5-6
Y		4
A		2-3
Y	MIAO, Shuchuan et al., N-methyl-D-aspartate Receptor Mediates X-irradiation-induced Drebrin Decrease in Hippocampus, THE KITAKANTO MEDICAL JOURNAL, 2018, vol.68, pp.111-115 特に、abstract	4
A	KOGANEZAWA, Noriko et al., The role of drebrin in dendritic spines, Molecular and Cellular Neuroscience, 2017, vol.84, pp.85-92 特に、図3	1-6
A	JP 2016-040540 A (国立大学法人群馬大学) 24.03.2016 (2016-03-24) [特許請求の範囲]	1-6

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

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

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
19.05.2020	26.05.2020

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

権限のある職員（特許庁審査官）
大瀧　真理 2J 9812
電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	WO 2005/080976 A1 (大日本住友製薬株式会社) 01.09.2005 (2005-09-01) [特許請求の範囲]	1-6
P, X	MITSUOKA, Toshinari et al., Assessment of NMDA receptor inhibition of phencyclidine analogues using a high-throughput drebrin immunocytochemical assay, Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 2019, vol.99, no.106583, pp.1-6 全文	1-6
P, A	HANAMURA, Kenji et al., High-content imaging analysis for detecting the loss of drebrin clusters along dendrites in cultured hippocampal neurons, Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 2019, vol.99, no.106607, pp.1-8 全文	1-6

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2020/010909

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2016-040540 A	24.03.2016	（ファミリーなし）	
WO 2005/080976 A1	01.09.2005	US 2007/0160537 A1 claims EP 1726952 A1	