

(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  
2011年9月9日(09.09.2011)



(10) 国際公開番号  
WO 2011/108544 A1

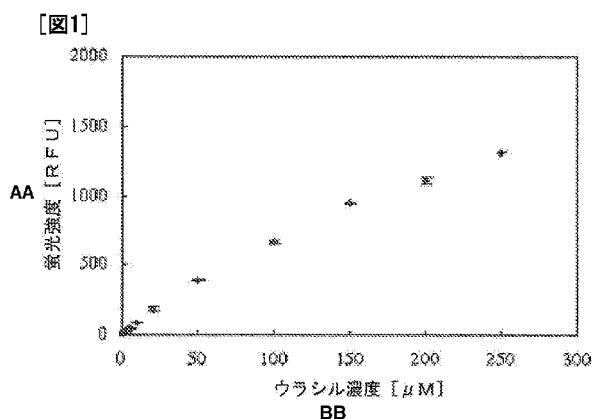
- (51) 国際特許分類:  
G01N 21/78 (2006.01) G01N 33/58 (2006.01)  
C09K 11/06 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/054636
- (22) 国際出願日: 2011年3月1日(01.03.2011)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2010-044610 2010年3月1日(01.03.2010) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人 長崎大学 (NAGASAKI UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒8528521 長崎県長崎市文教町1-14 Nagasaki (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 甲斐 雅亮 (KAI, Masaaki) [JP/JP]; 〒8528521 長崎県長崎市文教町1-14 国立大学法人長崎大学内 Nagasaki (JP). 柴田 孝之 (SHIBATA, Takayuki)

- [JP/JP]; 〒8528521 長崎県長崎市文教町1-14 国立大学法人長崎大学内 Nagasaki (JP).
- (74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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,

[続葉有]

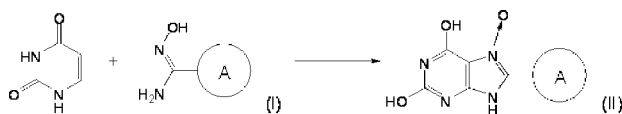
(54) Title: URACIL-SPECIFIC FLUORESCENCE DETECTION REACTION AND METHOD FOR EXAMINING DIHYDROPYRIMIDINE DEHYDROGENASE DEFICIENCY

(54) 発明の名称: ウラシル特異的な蛍光検出反応及びジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ欠損症の検査法



(57) Abstract: Provided is a method for detecting uracil whereby uracil can be detected by a simple procedure within a short period of time and at a high accuracy and low cost. The method for detecting uracil is characterized by comprising reacting uracil with a compound represented by formula (I) to give a fluorescent compound represented by formula (II).

(57) 要約: 本発明は、簡便な方法で短時間に高精度かつ経済的にウラシルを検出することが可能となる、ウラシルの検出方法を提供する。本発明は、ウラシルと、式(I)で表される化合物とを反応させて、式(II)で表される蛍光性化合物を得ることを特徴とする、ウラシルの検出方法に関する。



AA FLUORESCENCE INTENSITY [RFU]  
BB URACIL CONCENTRATION [μM]

WO 2011/108544 A1

NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI 添付公開書類:  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, — 國際調查報告 (條約第 21 條(3))  
NE, SN, TD, TG).

## 明 細 書

発明の名称：

ウラシル特異的な蛍光検出反応及びジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ欠損症の検査法

### 技術分野

[0001] 本発明は、ウラシル特異的な蛍光検出方法、ウラシル検出用試薬、及び該反応を用いたジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ欠損症の検査方法に関する。

### 背景技術

[0002] 5-フルオロウラシル（5-FU）をはじめとするフッ化ピリミジン系抗癌剤は、乳癌や消化器癌などの悪性腫瘍に対して頻用されている代表的な抗癌剤である。しかし、フッ化ピリミジン分解の律速酵素であるジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ（DPD）を遺伝的に欠損している患者に、フッ化ピリミジン系抗癌剤を投与した場合、フッ化ピリミジンの血中濃度の上昇に伴い血液障害や骨髄抑制などの重篤な副作用を引き起こし、最悪の場合死に至ることが知られている。DPDは、通常、ウラシル及びチミンを分解する酵素であるため、DPD欠損患者では、尿中あるいは血中のウラシルとチミンの濃度、特にウラシル濃度が高くなることが知られている。従って、フッ化ピリミジン系抗癌剤を投与する患者に対して、投与前に尿中あるいは血中のウラシル濃度を定量できれば、DPD欠損の診断が可能であるので、DPD欠損患者へのフッ化ピリミジン系抗癌剤の投与による事故を未然に防ぐことができる。

[0003] これまでに、尿中あるいは血中のウラシル定量法として、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いる方法（S. Sumi, K. Kidouchi, S. Ohba and Y. Wada, J. Chromatogr. B 1995, 672, 233-239）や、抗ウラシルモノクローナル抗体を用いる免疫学的測定法（特開2008-120824号及び特開2001-112472号）が開発されてきた。しかし、HPLC法に

は、1検体の測定に時間がかかり多検体を同時に解析できないこと、高額な装置が必要であること等の欠点があった。また、免疫学的測定法にも、基質特異性が低くDPD欠損の判定が困難であること、高額であること等の欠点があった。

[0004] ウラシルの定量以外のDPD活性測定法として、末梢血単核球のDPD活性を直接測定する方法 (B. E. Harris, R. Song, S. Soong and R. B. Diasio, Cancer Res. 1990, 50, 197-201) や、放射性同位体で標識されたウラシルを投与した後代謝された呼気中の標識CO<sub>2</sub>量を測定する方法 (L. K. Mattison, H. Ezzeldin, M. Carpenter, A. Modak, M. R. Johnson and R. B. Diasio, Clin. Cancer Res., 2004, 10, 2652-2658) が報告されている。しかし、前者には、HPLC分離を必要とするため多検体を同時に分析ができないこと、後者には、放射性物質を使用すること、他の酵素の影響によりDPD欠損と誤診断する可能性があること等の諸問題があった。

[0005] このような背景から、これまでに開発されたDPD活性測定法は、病院での日常的な検査に利用されておらず、現在では、フッ化ピリミジン系抗癌剤の投与後に嘔気などの副作用や血液検査での異常が認められた場合に限り、その患者のDPD活性が測定されている。そのため、DPD欠損が判明してフッ化ピリミジンの投与を中断したにも関わらず、副作用が重篤化して死に至った例が、世界中で多数報告されている (鷹羽智之、森山仁、横山剛、的場周一郎、澤田壽仁、日本消化器外科学会雑誌、2008年、41巻、2075~2080頁)。

[0006] 従って、簡便な方法で短時間に高精度かつ経済的にウラシルを検出することが可能なウラシル定量法及びDPD欠損症の検査法の開発が望まれていた。

## 先行技術文献

## 特許文献

[0007] 特許文献1：特開2008-120824号

特許文献2：特開2001-112472号

## 非特許文献

[0008] 非特許文献1 : S. Sumi, K. Kidouchi, S. Ohba and Y. Wada, J. Chromatogr . B 1995, 672, 233-239

非特許文献2 : B. E. Harris, R. Song, S. Soong and R. B. Diasio, Cancer Res. 1990, 50, 197-201

非特許文献3 : L. K. Mattison, H. Ezzeldin, M. Carpenter, A. Modak, M. R. Johnson and R. B. Diasio, Clin. Cancer Res., 2004, 10, 2652-2658

非特許文献4 : 鷹羽智之、森山仁、横山剛、的場周一郎、澤田壽仁、日本消化器外科学会雑誌、2008年、41巻、2075~2080頁

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は、簡便な方法で短時間に高精度かつ経済的にウラシルを検出することが可能な、新規なウラシル特異的反応を特徴とする、ウラシルの検出方法を提供することを目的とする。また、該反应用試薬及び該反応を用いたDPD欠損症の検査方法を提供することを目的とする。

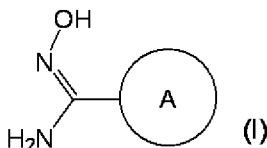
### 課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究した結果、下記の式(I)で表される化合物を用いることにより、ウラシル特異的な反応が起こることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0011] 即ち、本発明は以下に関する。

[1] ウラシルと、式(I) :

[0012] [化1]

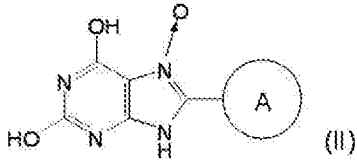


[0013] (式中、Aは、置換されていてもよいアリール基又は置換されていてもよいヘテロアリール基である)

で表される化合物(以下、化合物(I)と略記することもある)とを反応さ

せて、式 ( I I ) :

[0014] [化2]



[0015] (式中、Aは前記と同義である) で表される蛍光性化合物 (以下、化合物 ( I I ) と略記することもある) を得ることを特徴とする、  
ウラシルの検出方法。

[2] Aが、置換されたアリール基である、上記 [1] 記載の方法。

[3] Aが、3-メチルフェニル基である、上記 [1] 記載の方法。

[4] 試料中から、該蛍光性化合物を有機溶媒を用いて抽出する工程を含む、上記 [3] 記載の方法。

[5] ウラシルと式 ( I ) で表される化合物との反応が、酸化剤及び塩基の存在下で行われることを含む、上記 [1] 記載の方法。

[6] 酸化剤が、フェリシアン化カリウムである、上記 [5] 記載の方法。

[7] 酸化剤の使用量が、式 ( I ) で表される化合物に対して 0.001 ~ 3 当量である、上記 [5] 記載の方法。

[8] 塩基が、水酸化カリウムである、上記 [5] 記載の方法。

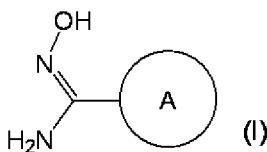
[9] 塩基の使用量が、式 ( I ) で表される化合物に対して 0.1 ~ 200 0 当量である、上記 [5] 記載の方法。

[10] 反応温度が、50 ~ 120 °C である、上記 [1] 記載の方法。

[11] 反応時間が、1 ~ 15 分である、上記 [1] 記載の方法。

[12] 式 ( I ) :

[0016] [化3]



[0017] (式中、Aは上記 [1] と同義である)

で表される化合物を含む、ウラシル検出用試薬。

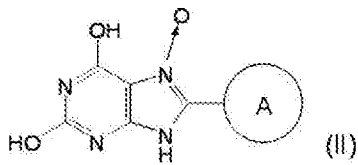
[13] Aが、置換されたアリール基である、上記[12]記載の試薬。

[14] Aが、3-メチルフェニル基である、上記[12]記載の試薬。

[15] 上記[12]記載の試薬を含む、ウラシル検出用キット。

[16] 式(I I) :

[0018] [化4]



[0019] (式中、Aは上記[1]と同義である)

で表される蛍光性化合物。

[17] Aが、置換されたアリール基である、上記[16]記載の化合物。

[18] Aが、3-メチルフェニル基である、上記[16]記載の化合物。

[19] 上記[1]記載の方法を用いて、試料中のウラシルを検出することを含む、ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ欠損症の検査方法。

[20] 試料が、ヒト患者由来の血液試料及び／又は尿試料である、上記[19]記載の検査方法。

## 発明の効果

[0020] 本発明によれば、簡便な方法で短時間に高精度かつ経済的にウラシルを検出することが可能となる。

## 図面の簡単な説明

[0021] [図1]ウラシル(各濃度)と3-メチルベンズオキシムを反応させて、得られた化合物を蛍光光度分析した結果を示す図である。

[図2]ウラシル(各濃度)と3-メチルベンズオキシムを反応させて、得られた化合物を蛍光光度分析した結果を示す図である。

[図3]ウラシルと4-トリフルオロメチルベンズアミドオキシムを反応させて、得られた化合物の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを示す図である。

[図4]ウラシル以外の試料と、3-メチルベンズオキシムを反応させて、得ら

れた化合物を蛍光光度分析した結果を示す図である。

[図5]ウラシルと3-メチルベンズオキシムあるいはウラシルとベンズオキシムを反応させて得られた化合物を各種条件下で処理した後、蛍光光度分析した結果を示す図である。

[図6]尿中のウラシルを3-メチルベンズオキシムを用いて検出した結果を示す図である。

### 発明を実施するための形態

[0022] 本発明において用いられる用語の定義について、以下に詳述する。

[0023] 「ハロゲン原子」とは、フッ素原子、塩素原子、臭素原子及びヨウ素原子を意味する。

[0024] 「アルキル基」とは、直鎖状もしくは分岐鎖状のアルキル基であり、例えば、 $C_{1-4}$ アルキル基が挙げられる。具体的には、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、イソブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル等が挙げられる。

[0025] 「1乃至9個のハロゲン原子で置換されていてもよいアルキル基」とは、そのハロゲン原子が上記定義の「ハロゲン原子」で、そのアルキル部位が上記定義の「アルキル基」である、1乃至9個のハロゲン原子で置換されていてもよいアルキル基をいう。例えば、1乃至9個（例、1乃至3個）のハロゲン原子で置換されていてもよい $C_{1-4}$ アルキル基が挙げられ、具体的には、上記「アルキル基」で列挙したものの他、トリフルオロメチル、2, 2, 2-トリフルオロエチル、ペンタフルオロエチル等が挙げられる。

[0026] 「アルケニル基」とは、直鎖状もしくは分岐鎖状のアルケニル基であり、例えば、 $C_{1-4}$ アルケニル基が挙げられ、具体的には、ビニル、アリル、1-プロペニル、イソプロペニル、1-ブテニル、2-ブテニル、3-ブテニル、1-メチルアリル、2-メチルアリル、1-メチル-1-プロペニル、2-メチル-1-プロペニル、1-エチルビニル等が挙げられる。

[0027] 「アルキニル基」とは、直鎖状もしくは分岐鎖状のアルキニル基であり、例えば、 $C_{1-4}$ アルキニル基が挙げられ、具体的には、エチニル、1-プロピ



ニル、2-プロピニル、1-ブチニル、2-ブチニル、3-ブチニル等が挙げられる。

[0028] 「アルコキシ基」とは、直鎖状もしくは分岐鎖状のアルコキシ基であり、例えば、 $C_{1-4}$ アルコキシ基が挙げられ、メトキシ、エトキシ、 $n$ -プロポキシ、イソプロポキシ、 $n$ -ブトキシ、イソブトキシ、*sec*-ブトキシ、*tert*-ブトキシ等が挙げられる。

[0029] 「1乃至9個のハロゲン原子で置換されていてもよいアルコキシ基」とは、そのハロゲン原子が上記定義の「ハロゲン原子」で、そのアルコキシ部位が上記定義の「アルコキシ基」である、1乃至9個のハロゲン原子で置換されていてもよいアルコキシ基をいう。例えば、1乃至9個（例、1乃至5個）のハロゲン原子で置換されていてもよい $C_{1-4}$ アルコキシ基が挙げられ、具体的には、上記「アルコキシ基」で列挙したものの他、トリフルオロメトキシ、2, 2, 2-トリフルオロエトキシ、ペンタフルオロエトキシ等が挙げられる。

[0030] 「置換されていてもよいアリール基」の「アリール基」としては、例えば $C_{6-10}$ アリール基が挙げられ、具体的には、フェニル、ナフチル等が挙げられ、なかでも好ましくはフェニルである。

[0031] 「置換されていてもよいアリール基」の「置換基」としては、下記置換基群（以下、置換基群Aと略記する）から選択される置換基が挙げられる。該アリール基は、置換可能な位置に1乃至3個の置換基で置換されていてもよく、該置換基が2個以上存在する場合には、各置換基は同一でも異なってもよい。

[0032] 置換基群A：

- (1) 1乃至9個のハロゲン原子で置換されていてもよいアルキル基、
- (2) アルケニル基、
- (3) アルキニル基、及び
- (4) 1乃至9個のハロゲン原子で置換されていてもよいアルコキシ基。

[0033] 「置換されていてもよいヘテロアリール基」の「ヘテロアリール基」とし

ては、

炭素原子以外に、窒素原子、酸素原子及び硫黄原子から選択される 1～4 個のヘテロ原子を有する、単環式  $C_{5-6}$  ヘテロアリール基；

炭素原子以外に、窒素原子、酸素原子及び硫黄原子から選択される 1～4 個のヘテロ原子を有する、単環式  $C_{5-6}$  ヘテロアリール基と、 $C_{6-10}$  アリール基が縮合した、縮合環式  $C_{9-13}$  ヘテロアリール基；及び

炭素原子以外に、窒素原子、酸素原子及び硫黄原子から選択される 1～4 個のヘテロ原子を有する、単環式  $C_{5-6}$  ヘテロアリール基同士が縮合した、縮合環式  $C_{8-10}$  ヘテロアリール基；

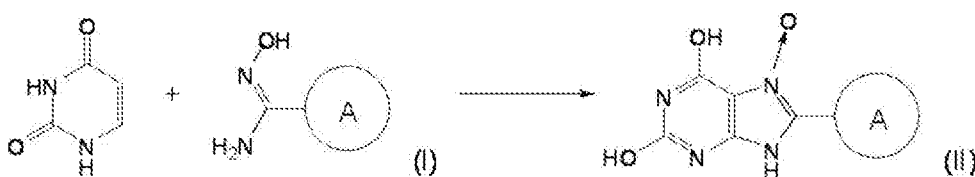
が挙げられる。具体的には、ピリジル、ピラジル、ピリミジル、ピリダジル、トリアジニル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、フリル、オキサゾリル、チエニル、チアゾリル、キノリニル、キノキサリニル、キナゾリニル、シンノリニル、インドリル、ベンゾイミダゾリル、ベンゾトリアゾリル、ベンゾフリル、ベンゾチエニル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾチアゾリル等が挙げられる。

[0034] 「置換されていてもよいヘテロアリール基」の「置換基」としては、上記置換基群 A から選択される置換基が挙げられる。該ヘテロアリール基は、置換可能な位置に 1 乃至 3 個の置換基で置換されていてもよく、該置換基が 2 個以上存在する場合には、各置換基は同一でも異なってもよい。

[0035] 以下、本発明の好適な態様について説明する。

[0036] 本発明は、ウラシルと、式 (I) で表される化合物とを反応させて、式 (II) で表される蛍光性化合物を得ることを特徴とする、ウラシルの検出方法を提供する。

[0037] [化5]



[0038] 上記式 (I)、式 (II) 中、A は、置換されていてもよいアリール基又

は置換されていてもよいヘテロアリール基を示す。

Aとして好ましくは、置換されていてもよいアリール基であり、より好ましくは、上記置換基群Aから選択される1乃至3個の置換基で置換されていてもよい、 $C_{6-10}$ アリール基である。なかでも好ましくは、1乃至9個（例、1乃至3個）のハロゲン原子で置換されていてもよいアルキル（例、 $C_{1-4}$ アルキル）基1乃至3個で置換された、 $C_{6-10}$ アリール基であり、更に好ましくは、3-メチルフェニル、4-トリフルオロメチルフェニルであり、特に好ましくは、3-メチルフェニルである。

ウラシルを高感度に検出できるという点において、Aが無置換のフェニルである場合も、また好ましい。

[0039] 化合物（I）としては、以下の化合物（I-A）～（I-E）が好ましい。

[化合物（I-A）]

Aが、置換されていてもよいアリール基である、化合物（I）。

[化合物（I-B）]

Aが、上記置換基群Aから選択される1乃至3個の置換基で置換されていてもよい、 $C_{6-10}$ アリール基である、化合物（I）。

[化合物（I-C）]

Aが、1乃至9個（例、1乃至3個）のハロゲン原子で置換されていてもよいアルキル（例、 $C_{1-4}$ アルキル）基1乃至3個で置換されていてもよい、 $C_{6-10}$ アリール基である、化合物（I）。

[化合物（I-D）]

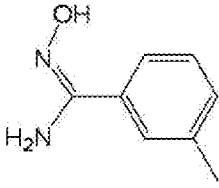
Aが、3-メチルフェニル、フェニル又は4-トリフルオロメチルフェニルである、化合物（I）。

[化合物（I-E）]

式：

[0040]

[化6]



[0041] で表される化合物（即ち、3-メチルベンズアミドオキシム）。

[0042] 化合物（I）は、市販品を入手可能であるか、自体公知の方法により製造することができる。

[0043] 化合物（II）としては、以下の化合物（II-A）～（II-E）が好ましい。

[化合物（II-A）]

Aが、置換されていてもよいアリール基である、化合物（II）。

[化合物（II-B）]

Aが、上記置換基群Aから選択される1乃至3個の置換基で置換されていてもよい、 $C_{6-10}$ アリール基である、化合物（II）。

[化合物（II-C）]

Aが、1乃至9個（例、1乃至3個）のハロゲン原子で置換されていてもよいアルキル（例、 $C_{1-4}$ アルキル）基1乃至3個で置換されていてもよい、 $C_{6-10}$ アリール基である、化合物（II）。

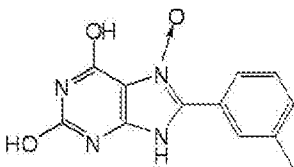
[化合物（II-D）]

Aが、3-メチルフェニル、フェニル又は4-トリフルオロメチルフェニルである、化合物（II）。

[化合物（II-E）]

式：

[0044] [化7]



[0045] で表される蛍光性化合物。

化合物（I I - E）の如くフェニル基にアルキル基（好ましくはメチル基）等の疎水性官能基が導入された蛍光性化合物は、有機溶媒（例、酢酸エチル）で抽出可能であり、特に好ましい。尿中又は血中からの有機溶媒を用いての抽出が可能となることによって、試料（尿・血液）中の蛍光性夾雑物質の影響を受けることなく、多検体を用いた短時間の測定が可能となる。

[0046] 上記のウラシルと化合物（I）との反応（以下、本発明の反応ともいう）は、酸化剤及び塩基（特に、強塩基）の存在下で反応が好適に進行するため、さらに酸化剤及び塩基を加えることが好ましい。

酸化剤としては、自体公知の酸化剤を適宜用いることができるが、このような酸化剤としては、例えば、フェリシアン化カリウム、塩化鉄（I I I）、塩化銅（I I）、ヨウ素酸ナトリウム、過マンガン酸カリウム、硝酸カリウム、硝酸セリウムアンモニウム、ニクロム酸カリウム等が挙げられる。なかでも好ましくは、フェリシアン化カリウムである。酸化剤の使用量は、化合物（I）に対して、例えば0.001～3当量であり、好ましくは0.5～2.5当量である。

塩基としては、自体公知の塩基を適宜用いることができるが、このような塩基としては、例えば、水酸化カリウム、水酸化ナトリウム、水酸化リチウム、水酸化マグネシウム、水酸化カルシウム、炭酸カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸リチウム、炭酸水素カリウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸水素リチウム等が挙げられる。なかでも好ましくは、水酸化カリウムである。塩基の使用量は、化合物（I）に対して、例えば0.1～2000当量であり、好ましくは100～1000当量である。

[0047] 加熱により反応が好適に進行するため、本発明の反応は、50～120℃の反応温度で行うことが好ましく、80～120℃で行うことがより好ましく、90℃で行うことが特に好ましい。

[0048] 極めて短時間の反応及び長時間の反応では得られる化合物（I I）の蛍光強度が減少するため、本発明の反応は、1～15分の反応時間で行うことが好ましく、1～5分で行うことが更に好ましく、2分で行うことが特に好ま

しい。

[0049] 本発明の反応は、溶媒を用いて行うこともできる。該溶媒としては、自体公知の溶媒を用いることができ反応が進行する限り特に限定されないが、例えば、水、N, N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、アルコール類（例えばメタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール、イソブタノール、sec-ブタノール、tert-ブタノール等）等が挙げられる。なかでも好ましくは、水である。また、下記の試料に含まれる水が、溶媒として働いてもよい。

[0050] 本発明の反応により得られる化合物（I I）は蛍光性を有するので、励起波長領域の励起光を化合物（I I）に照射し、蛍光波長領域の蛍光強度を測定することにより、ウラシルを検出することが可能となる。

該励起波長領域は、励起光を照射することにより化合物（I I）が蛍光を呈するものであれば特に限定されず、当業者であれば適宜適切な波長領域を選択して測定することができる。例えば250～400 nmの波長領域の励起光を照射することが好ましく、310～350 nmの波長領域の励起光を照射することがより好ましく、310～330 nmの波長の励起光を照射することが特に好ましい。

該蛍光波長領域は、蛍光波長領域であれば特に限定されず、当業者であれば適宜適切な波長領域を選択して測定することができる。例えば350～500 nmの波長領域における蛍光強度を測定することが好ましく、360～440 nmの波長領域の蛍光強度を測定することがより好ましく、365～410 nmの波長の蛍光強度を測定することが特に好ましい。

該蛍光強度は、自体公知の検出方法により測定することができるが、例えば蛍光分光光度計を用いて測定することができる。

[0051] 本発明の反応により得られる化合物（I I）を含む反応液は、反応直後では強アルカリ性である。蛍光強度の増強を目的として酸（例、酢酸）による中和や、塩（例、塩化ナトリウム）による塩析、あるいは有機溶媒（例、酢酸エチル）による抽出等の処理をさらに行うことが好ましい。

中和（pH 6～7）工程→塩析工程→抽出工程を実施することが特に好ましい。

[0052] 化合物（I）は、そのままあるいは他の添加物とともに、ウラシル検出用試薬とすることができる。該添加物としては、例えば、酸、酸性試薬等が挙げられる。

「酸」としては、無機酸または有機酸が挙げられ、例えば、塩酸、硫酸、硝酸、酢酸、蟻酸等が挙げられる。

「酸性試薬」としては、該酸の水溶液等が挙げられる。

[0053] ウラシル検出用試薬は、そのままあるいは他の物品とともに、ウラシル検出用キットとすることができる。該物品としては、例えば、本発明の反応を有利に進めることができる、酸化剤、塩基及び溶媒、並びに説明書、包装材料、反応容器、体液試料又は老廃物試料の前処理フィルター等が挙げられる。

該酸化剤、塩基及び溶媒としては、上記と同様のものが挙げられる。

該説明書には、検出対象、使用されるべき試料、使用方法及び保管方法（例、冷蔵保存、密閉容器での保存等）等が記載され得る。

包装材料、反応容器及び体液試料又は老廃物試料の前処理フィルターとしては、自体公知のものを用いることができる。

[0054] 本発明の反応はウラシルに特異的な反応である。「ウラシルに特異的」とはウラシルとのみ反応することをいい、例えば、遊離のウラシル以外の核酸塩基、ヌクレオシド、ヌクレオチド及び核酸塩基誘導体（例、プソイドウリジン等の稀少核酸塩基、5-フルオロウラシル等のフッ化ピリミジン系抗癌剤等）等とは反応しないことをいう。

[0055] 本発明の反応は、このようなウラシルに特異的な反応であるので、本発明の反応を用いて試料中のウラシルを検出することにより、ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ欠損症を検査することが可能となる。

該試料としては例えば、哺乳類（例、ヒト（特にヒト患者）等）由来の体液試料（例、血液試料等）及び／又は老廃物試料（例、尿試料等）が挙げら

れる。

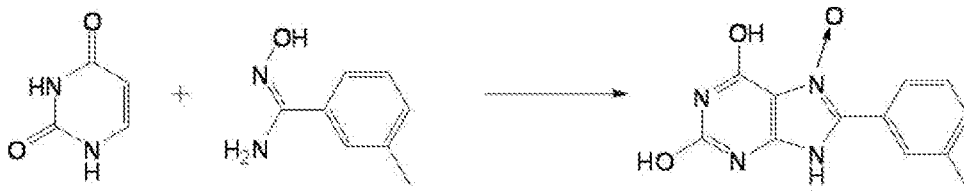
[0056] また、本発明の反応はウラシルに特異的な反応であるので、細胞染色、RNAの塩基配列の読み取り等にも有用である。

### 実施例

[0057] 以下に実施例、参考例及び試験例を挙げて、本発明を更に具体的に説明するが、これによって本発明が限定されるものではない。

[0058] 実施例 1：ウラシルと 3-メチルベンズアミドオキシムとの反応

[0059] [化8]



[0060] ウラシル水溶液（0 μM（参考例）、1 μM、2 μM、5 μM、10 μM、20 μM、50 μM、100 μM、150 μM、200 μM又は250 μM、各々0.25 ml）、3-メチルベンズアミドオキシム水溶液（4 mM、0.25 ml）、フェリシアン化カリウム水溶液（8 mM、0.25 ml）及び水酸化カリウム水溶液（4 M、0.25 ml）を混合し、90℃で2分間加熱した。得られた化合物を、下記の条件で蛍光光度分析に供した。蛍光光度分析の測定結果を、表1、図1、図2に示す。

蛍光光度分析：

機種：日本分光 FP-6300 Spectrofluorometer

Ex/Em=330nm/410nm

スリット幅：5nm、5nm

感度：medium

レスポンス：medium

[0061]



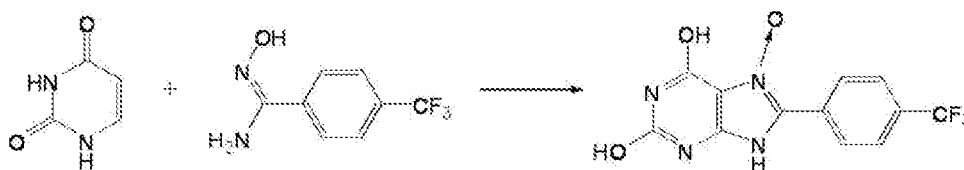
[表1]

表1. ウラシル濃度と得られた化合物の蛍光強度

ウラシル濃度 ( $\mu$ M)	蛍光強度 (RFU)
0 (参考例)	0.2
1	9.8
2	17.5
5	42.0
10	86.0
20	179
50	391
100	668
150	950
200	1113
250	1310

[0062] 実施例2：ウラシルと4-トリフルオロメチルベンズアミドオキシムとの反応

[0063] [化9]



[0064] ウラシル水溶液（1mM、100ml）、4-トリフルオロメチルベンズアミドオキシム（4mM、100ml）、フェリシアン化カリウム水溶液（8.0mM、100ml）及び水酸化カリウム水溶液（2M、100ml）を混合し、100℃で10分間加熱した。反応後、反応液を酢酸エチルで抽出し、得られた有機層を濃縮した。この操作を13回繰り返す、得られた残渣を混合した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶離液：酢酸エチル/メタノール=9/1→8/2→7/3）により精製して、目的化合物（25mg）を白色粉末として得た（収率：6%）。得られた化合物を、<sup>1</sup>H-NMRに供した。結果を図3に示す。

測定機：varian UNITY plus 500 (500MHz)

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400MHz)  $\delta$ =8.89 (broad s, 0.25H), 8.29 (d, J=8.0 Hz, 0.5H), 8.08 (d, J=7.8Hz, 0.5H), 7.72 (d, J=8.0Hz, 0.5H), 7.68 (d, J=7.8Hz, 0.5H), 6.68 (broad s, 0.25H).

[0065] 以上のことから、ウラシルと化合物（I）の反応により、化合物（I I）が得られること（図3）、化合物（I I）が蛍光性化合物であることがわかった（表1、図1）。また、ウラシル濃度と蛍光強度には相関があることがわかった（表1、図1）。さらに、蛍光強度は410nmの蛍光波長で最も高くなることがわかった（図2）。

[0066] 参考例1：ウラシル以外の試料と3-メチルベンズアミドオキシムとの反応  
ウラシルを、以下の表2に示す測定試料に変更した以外は、実施例1と同様にして、蛍光光度分析に供した。結果を図4に示す。

[0067] [表2]

表2. 測定試料

試料番号	測定試料	
1	核酸塩基	シトシン
2		チミン
3		アデニン
4		グアニン
5	ヌクレオシド	ウリジン
6		シチジン
7		チミジン
8		アデノシン
9		グアノシン
10	ヌクレオチド	5' --UMP
11		5' --CMP
12		5' --dTMP
13		5' --AMP
14		5' --GMP
15	核酸塩基誘導体	プソイドウリジン
16		5-フルオロウラシル
17		1-メチルウラシル
18		6-メチルウラシル
19		5, 6-ジヒドロウラシル
20	糖類	グルコース
21		フルクトース
22		ラクトース
23		リボース
24		スクロース
25	アミノ酸	生体を構成するアミノ酸（20種類）の混合物

[0068] 以上のことから、本発明の反応は、基質特異性が非常に高く、遊離のウラシル以外の核酸塩基、ヌクレオシド、ヌクレオチド、核酸塩基誘導体（例、プソイドウリジン等の稀少核酸塩基、5-フルオロウラシル等のフッ化ピリミジン系抗癌剤、ジヒドロウラシル等のウラシル代謝産物、メチルウラシル

等)等に対して蛍光性を与えないことがわかった(図4)。

[0069] 実施例3：尿中ウラシル濃度の定量(尿中ウラシルの直接定量)

(試薬：計1 mL)

試薬組成A(テスト試薬)

- (1) 8%希釈尿(尿試料：健常人ボランティア(37歳・男性))：125  $\mu$ L
- (2) 水またはウラシル標準液：125  $\mu$ L
- (3) 4 mM 3-メチルベンズアミドオキシム水溶液：250  $\mu$ L
- (4) 8 mM フェリシアン化カリウム水溶液：250  $\mu$ L
- (5) 2 M 水酸化カリウム水溶液：250  $\mu$ L

試薬組成B(尿由来の蛍光ブランク)

- (1) 8%希釈尿(尿試料：健常人ボランティア(37歳・男性))：125  $\mu$ L
- (2) 水：125  $\mu$ L
- (3) 水：250  $\mu$ L
- (4) 8 mM フェリシアン化カリウム水溶液：250  $\mu$ L
- (5) 2 M 水酸化カリウム水溶液：250  $\mu$ L

試薬組成C(試薬由来の蛍光ブランク)

- (1) 水：125  $\mu$ L
- (2) 水：125  $\mu$ L
- (3) 4 mM 3-メチルベンズアミドオキシム水溶液：250  $\mu$ L
- (4) 8 mM フェリシアン化カリウム水溶液：250  $\mu$ L
- (5) 2 M 水酸化カリウム水溶液：250  $\mu$ L

(操作)

- (1) 上記組成の試薬を順に反応容器に添加した
- (2) 90°Cで2分加熱した
- (3) 氷浴で2分冷却した
- (4) 反応液の蛍光強度を測定した(測定条件は実施例1に準じた)

(5) 同じ尿のクレアチニン濃度を測定した

クレアチニン濃度は以下の2種類の方法のいずれかにより測定した。尚いづれの方法も詳細な手順は、付属の説明書に従って行った。

#### 方法1

本方法は、尿試験紙であるオーシヨンスティックス10PA（アークレイファクトリー, Shiga, Japan）を用いた方法である。

(操作)

(1) 試験紙を尿に2秒間浸漬した

(2) 試験紙に付いた余剰尿を軽く拭き取り、試験紙を水平に保持して60秒間静置した

(3) 試験紙の色調変化によりクレアチニン濃度を判定した

#### 方法2

本方法は、Creatinine Assay Kit (Cayman, MI, USA) を用いた方法である。

(操作)

(1) 15  $\mu$ L の10倍希釈尿に、キット付属のAlkaline Picrate Solution を150  $\mu$ L 加え、室温で10分間インキュベーションした

(2) 490–500 nmの吸光度を測定した (Initial absorbance:  $I_{abs}$ )

(3) この溶液にキット付属のAcid Solutionを5  $\mu$ L 加え、室温で20分間インキュベーションした

(4) 490–500 nmの吸光度を測定 (Final absorbance:  $F_{abs}$ )

(5) クレアチニン標準液を用いて作成した検量線を用いて、 $F_{abs} - I_{abs}$  の値よりクレアチニン濃度を算出した

(結果)

蛍光誘導体化反応によって生じる尿中ウラシル由来の蛍光強度は、試薬組成Aの反応で得られる強度から、試薬組成Bおよび試薬組成Cで得られる各蛍光強度の値を差し引き、添加検量線を作成することで、尿中ウラシル濃度

を定量することができる。検量線から得られた値をさらにクレアチニン補正することで、 $14.1 \mu\text{mol} / \text{g} \cdot \text{Cre}$ の値を得た。この値は、日本人の尿中ウラシル濃度の平均値の範囲内にある。クレアチン補正は、尿中ウラシルの尿量誤差を回避するために行なった。以上の結果より、本発明の方法が、尿中のウラシルを定量できることが明らかとなった。

[0070] 試験例 1 : 蛍光性化合物である化合物 ( I I ) の有機溶媒抽出

( i ) ウラシル水溶液 (  $40 \mu\text{M}$ 、 $0.25 \text{ml}$  )、( i i ) 化合物 ( I ) [ 3-メチルベンズアミドオキシム水溶液又はベンズアミドオキシム水溶液 ] (  $4 \text{mM}$ 、 $0.25 \text{ml}$  )、( i i i ) フェリシアン化カリウム水溶液 (  $8 \text{mM}$ 、 $0.25 \text{ml}$  ) 及び水酸化カリウム水溶液 (  $2 \text{M}$ 、 $0.25 \text{ml}$  ) を混合し、 $90^\circ\text{C}$ で2分間加熱した。反応液を、図5に示す条件で処理し、さらに下記の条件で蛍光光度分析に供した。蛍光光度分析の測定結果を図5に示す。

蛍光光度分析:

機種 : 日本分光 FP-6300 Spectrofluorometer  
Ex / Em =  $315 \text{nm} / 365 \text{nm}$

励起バンド幅 :  $5 \text{nm}$

蛍光バンド幅 :  $5 \text{nm}$

化合物 ( I ) として、3-メチルベンズアミドオキシムを用いた場合、中和後に有機溶媒によって抽出することにより、顕著な蛍光強度の増加が観察された。

[0071] 実施例 4 : 尿中ウラシル濃度の定量 ( 溶媒抽出を介した尿中ウラシルの定量 )

( 試薬 : 計  $1 \text{mL}$  )

( 1 ) 8%希釈尿 ( 尿試料 : 健康人ボランティア ( 23歳・男性 ) ) :  $125 \mu\text{L}$

( 2 ) 水またはウラシル標準液 :  $125 \mu\text{L}$

( 3 )  $4 \text{mM}$  3-メチルベンズアミドオキシム水溶液 :  $250 \mu\text{L}$

(4) 8 mM フェリシアン化カリウム水溶液：250  $\mu$ L

(5) 2 M 水酸化カリウム水溶液：250  $\mu$ L

(操作)

(1) 上記組成の試薬を順に反応容器に添加した

(2) 90°Cで2分加熱した

(3) 氷浴で2分冷却した

(4) 酢酸30  $\mu$ Lを添加して混和した

(5) 塩化ナトリウム400 mgを添加して激しく混和した

(6) 酢酸エチル1 mLを添加して激しく混和した

(7) 上層の蛍光強度を測定した（測定条件は試験例1に準じた）

(8) 同じ尿のクレアチニン濃度を測定した（測定方法は実施例3に準じた）

(結果)

結果を図6に示す。検量線から得られた値をさらにクレアチニン補正することで、40.1  $\mu$ mol/g・Creの値を得た。この値は、日本人の尿中ウラシル濃度の平均値の範囲内にある。クレアチン補正は、尿中ウラシルの尿量誤差を回避するために行なった。

以上の結果より、本発明の方法は、尿中に蛍光性の夾雑物質が多量に含まれる場合、有機溶媒抽出によって、尿中のウラシルを適正に定量できることが明らかとなった。

### 産業上の利用可能性

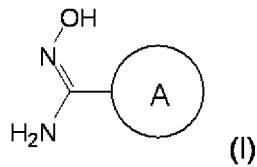
[0072] 本発明の反応はウラシルとの特異的な反応であるので、本発明の反応によれば、簡便な方法で短時間に高精度かつ経済的にウラシルを検出することが可能となる。また、ウラシル濃度と本発明の反応により得られる化合物の蛍光強度には相関があるので、本発明の反応によれば、特殊な技術を必要とせずウラシルを定量することが可能となる。従って、本発明の方法によれば、DPD欠損症を簡便に検査することが可能となり、癌化学療法において有益である。

[0073] 本出願は、日本で出願された特願2010-44610を基礎としており  
それらの内容は本明細書に全て包含されるものである。

## 請求の範囲

[請求項1] ウラシルと、式 (I) :

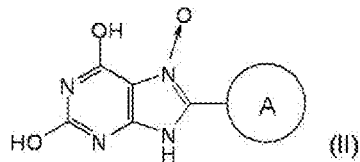
[化1]



(式中、Aは、置換されていてもよいアリール基又は置換されていてもよいヘテロアリール基である)

で表される化合物とを反応させて、式 (II) :

[化2]



(式中、Aは前記と同義である) で表される蛍光性化合物を得ることを特徴とする、

ウラシルの検出方法。

[請求項2] Aが、置換されたアリール基である、請求項1記載の方法。

[請求項3] Aが、3-メチルフェニル基である、請求項1記載の方法。

[請求項4] 試料中から、該蛍光性化合物を有機溶媒を用いて抽出する工程を含む、請求項3記載の方法。

[請求項5] ウラシルと式 (I) で表される化合物との反応が、酸化剤及び塩基の存在下で行われることを含む、請求項1記載の方法。

[請求項6] (i) 酸化剤が、フェリシアン化カリウムである、及び/又は (ii) 塩基が、水酸化カリウムである、請求項5記載の方法。

[請求項7] 酸化剤の使用量が、式 (I) で表される化合物に対して0.001～3当量である、請求項5記載の方法。

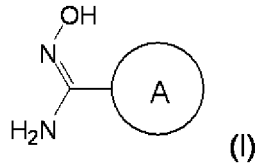
[請求項8] 塩基の使用量が、式 (I) で表される化合物に対して0.1～2000当量である、請求項5記載の方法。



[請求項9] (i) 反応温度が、50～120℃である、及び／又は (ii) 反応時間が、1～15分である、請求項1記載の方法。

[請求項10] 式(I)：

[化3]



(式中、Aは請求項1と同義である)

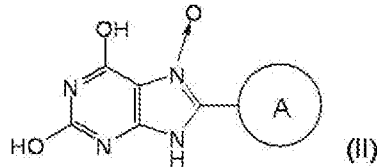
で表される化合物を含む、ウラシル検出用試薬。

[請求項11] Aが、3-メチルフェニル基である、請求項10記載の試薬。

[請求項12] 請求項10記載の試薬を含む、ウラシル検出用キット。

[請求項13] 式(II)：

[化4]



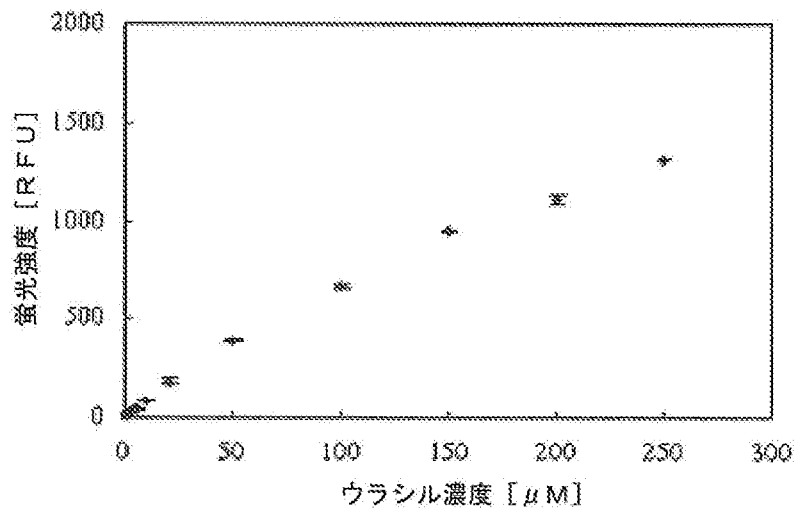
(式中、Aは請求項1と同義である)

で表される蛍光性化合物。

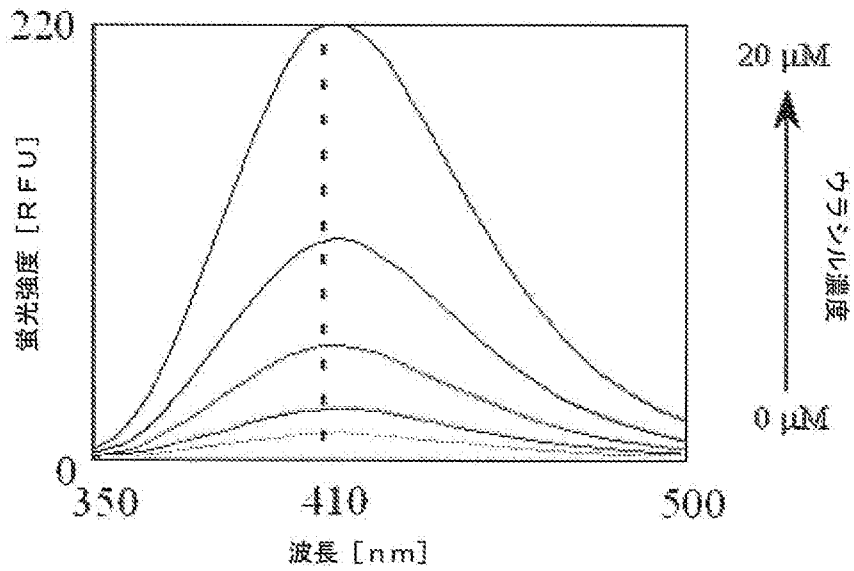
[請求項14] Aが、3-メチルフェニル基である、請求項13記載の化合物。

[請求項15] 請求項1記載の方法を用いて、ヒト患者由来の血液試料及び／又は尿試料中のウラシルを検出することを含む、ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ欠損症の検査方法。

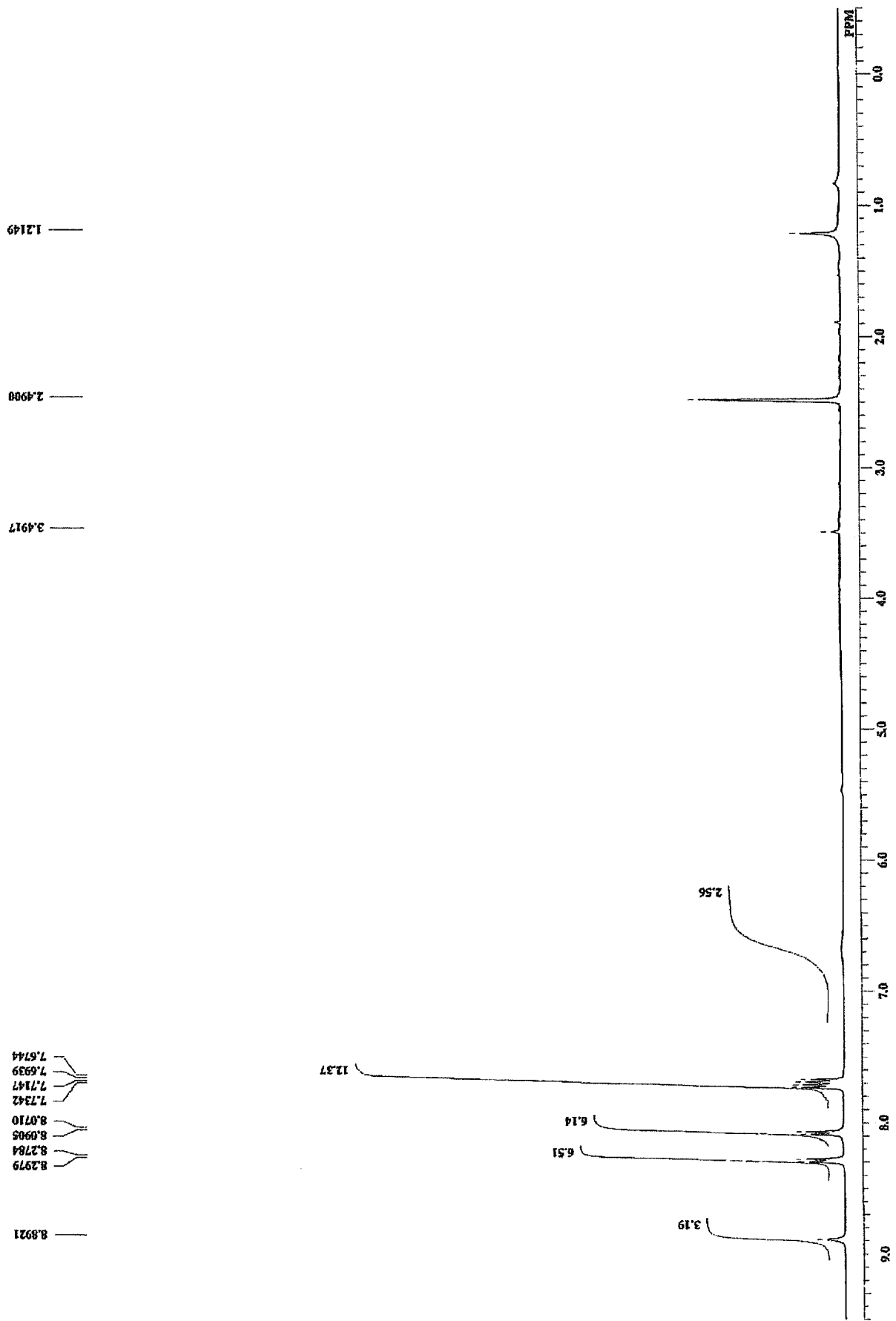
[図1]



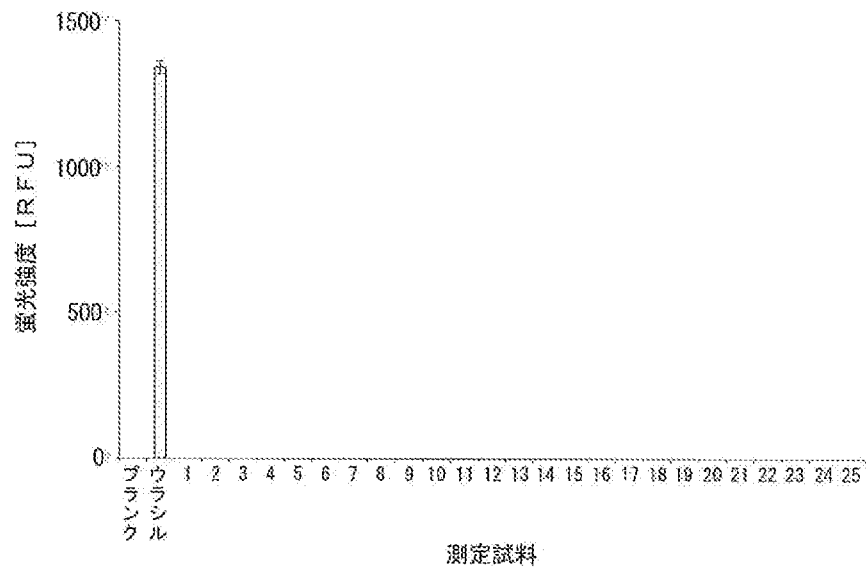
[図2]



[ 3 ]

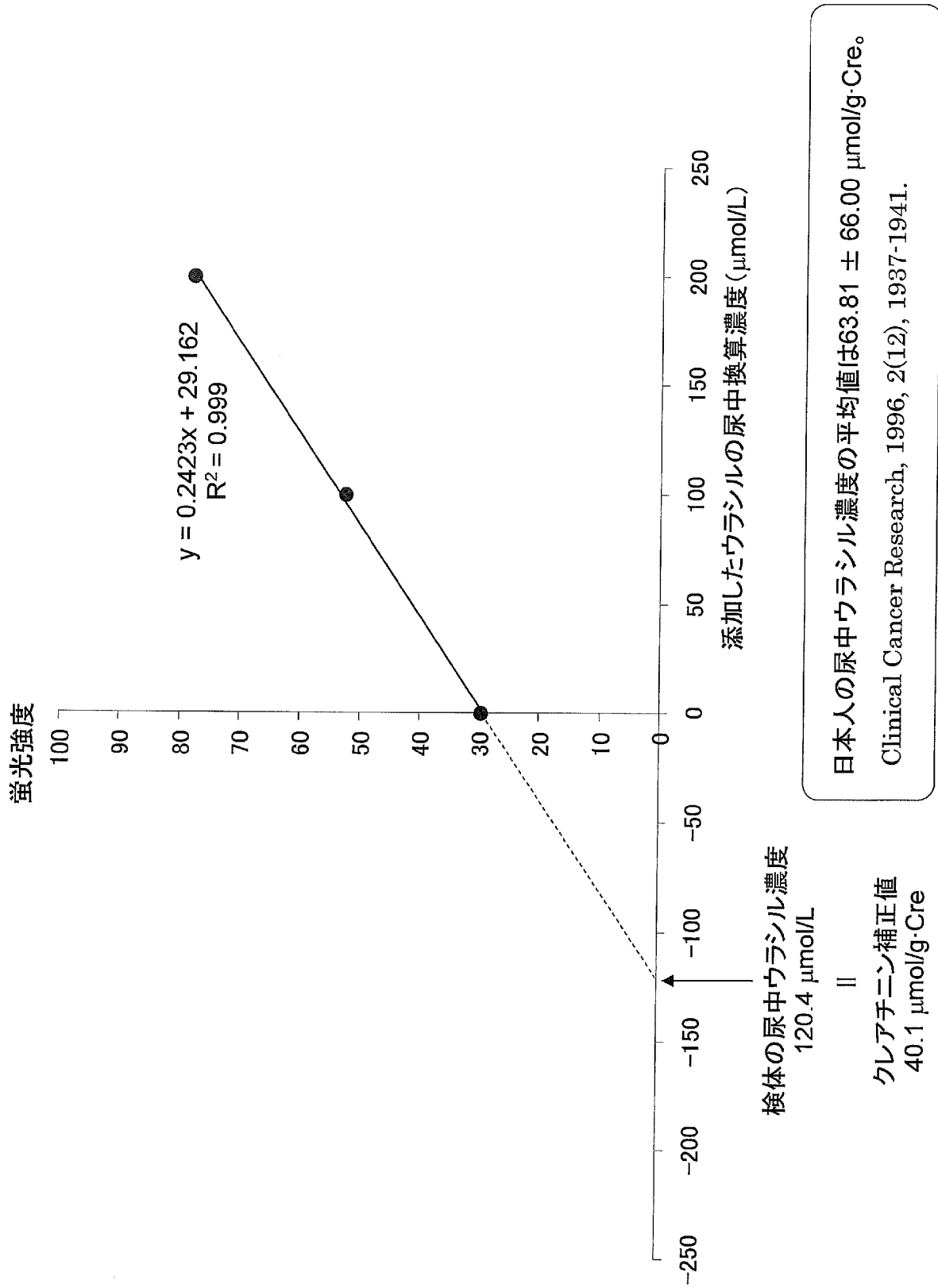


[図4]





[図6]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/054636

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N21/78(2006.01)i, C09K11/06(2006.01)i, G01N33/58(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N21/75-21/83, G01N33/48-33/98, C09K11/06

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN),  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u>	KAWASAKI et al., "Pyrimidine Enki o Shikibetsu Dekiru Shinki Keiko Hanno no Kaihatsu to Hanno Kiko no Kaimei", The Japan Society for Analytical Chemistry Dai 57 Nenkai Koen Yoshishu, 27 August 2008 (27.08.2008), page 370, Y1079	<u>1, 2, 5-10, 12,</u> <u>13</u> <u>15</u> <u>3, 4, 11, 14</u>
Y	JP 2001-112472 A (Taiho Pharmaceutical Co., Ltd.), 24 April 2001 (24.04.2001), entire text; all drawings	15
P, X	Takayuki Shibata et al., A novel and specific fluorescence reaction for uracil, Analytica Chimica Acta, 2010.06.30, Volume 674, Issue 2, 234-238	1-15

 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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
05 April, 2011 (05.04.11)Date of mailing of the international search report  
19 April, 2011 (19.04.11)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2011/054636

JP 2001-112472 A	2001.04.24	AT 373705 T	2007.10.15
		CA 2355893 A1	2001.04.26
		DE 60036452 T2	2008.06.19
		EP 1142995 A1	2001.10.10
		EP 1142995 B1	2007.09.19
		ES 2293924 T3	2008.04.01
		JP 4070372 B2	2008.04.02
		US 6927035 B1	2005.08.09
		WO 01/29207 A1	2001.04.26



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
 Int.Cl. G01N21/78(2006.01)i, C09K11/06(2006.01)i, G01N33/58(2006.01)i

B. 調査を行った分野  
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
 Int.Cl. G01N21/75-21/83, G01N33/48-33/98, C09K11/06

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 1971-2011年  
 日本国実用新案登録公報 1996-2011年  
 日本国登録実用新案公報 1994-2011年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
 CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	川崎 他3名, “ピリミジン塩基を識別できる新規蛍光反応の開発と反応機構の解明”, 日本分析化学会第57年会講演要旨集, 2008.08.27, 第370頁, Y1079	1, 2, 5-10, 12, 13
Y		15
A		3, 4, 11, 14
Y	JP 2001-112472 A (大鵬薬品工業株式会社) 2001.04.24、全文、全図	15

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

国際調査を完了した日 05.04.2011	国際調査報告の発送日 19.04.2011
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 廣田 健介 電話番号 03-3581-1101 内線 3292

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
P, X	Takayuki Shibata et al., A novel and specific fluorescence reaction for uracil, <i>Analytica Chimica Acta</i> , 2010.06.30, Volume 674, Issue 2, 234-238	1-15

JP 2001-112472 A	2001. 04. 24	AT 373705 T	2007. 10. 15
		CA 2355893 A1	2001. 04. 26
		DE 60036452 T2	2008. 06. 19
		EP 1142995 A1	2001. 10. 10
		EP 1142995 B1	2007. 09. 19
		ES 2293924 T3	2008. 04. 01
		JP 4070372 B2	2008. 04. 02
		US 6927035 B1	2005. 08. 09
		WO 01/29207 A1	2001. 04. 26

-----