

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5419680号
(P5419680)

(45) 発行日 平成26年2月19日(2014.2.19)

(24) 登録日 平成25年11月29日(2013.11.29)

(51) Int.Cl.

F I

| | | | |
|---------------------|------------------|--------------|-------|
| GO 1 N 33/68 | (2006.01) | GO 1 N 33/68 | Z N A |
| GO 1 N 33/53 | (2006.01) | GO 1 N 33/53 | D |
| GO 1 N 27/62 | (2006.01) | GO 1 N 27/62 | V |
| GO 1 N 27/64 | (2006.01) | GO 1 N 27/64 | B |
| CO 7 K 7/08 | (2006.01) | GO 1 N 27/62 | K |

請求項の数 6 (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-501157 (P2009-501157)
 (86) (22) 出願日 平成20年1月31日(2008.1.31)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2008/051519
 (87) 国際公開番号 W02008/105215
 (87) 国際公開日 平成20年9月4日(2008.9.4)
 審査請求日 平成22年9月17日(2010.9.17)
 (31) 優先権主張番号 特願2007-48523 (P2007-48523)
 (32) 優先日 平成19年2月28日(2007.2.28)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 000003975
 日東紡績株式会社
 福島県福島市郷野目字東1番地
 (73) 特許権者 304021831
 国立大学法人 千葉大学
 千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号
 (74) 代理人 110000855
 特許業務法人浅村特許事務所
 (74) 代理人 100066692
 弁理士 浅村 皓
 (74) 代理人 100072040
 弁理士 浅村 肇
 (74) 代理人 100088926
 弁理士 長沼 暉夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルコール性肝障害診断用マーカーペプチドおよびそれを利用したアルコール性肝障害診断方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列表の配列番号1または3のアミノ酸配列を有するヒトフィブリノーゲン由来分解産物であるペプチドから選ばれるアルコール性肝障害診断用マーカーペプチド。

【請求項2】

アルコール性肝障害が疑われる患者から得た検体中の、請求項1記載の1種またはそれ以上のアルコール性肝障害マーカーペプチドの存否を検出しあるいはその量を測定して、アルコール性肝障害発症可能性、アルコール性肝障害あるいはアルコール性肝障害の予後の診断に用いるためのデータを得る方法。

【請求項3】

検体中のアルコール性肝障害診断用マーカーペプチドの存否の検出あるいはその量の測定を質量分析法により行なう請求項2の方法。

【請求項4】

質量分析計で得られるスペクトルのパターン分析により、診断に用いるためのデータを得る請求項3の方法。

【請求項5】

質量分析をレーザーイオン化飛行時間型質量分析計(LDI-TOF MS)により行う請求項4の方法。

【請求項6】

検体中のアルコール性肝障害診断用マーカーペプチドの存否の検出あるいはその量の測

10

20

定を、該ペプチドに対する抗体を用いた免疫測定法により行う請求項2の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アルコール性肝障害診断用マーカーペプチドおよびそれを利用したアルコール性肝障害診断方法に関する。更に詳細には、本発明は、質量分析を利用した血清試料のプロテオーム解析の結果、習慣飲酒に伴って増減し従ってアルコール性肝障害診断用マーカーペプチドとして利用できることが見出された複数の血清ペプチドおよびそれらのペプチドの存否の検出あるいは定量により問題飲酒者等のアルコール性肝障害発症可能性、アルコール性肝障害、アルコール性肝障害の予後等を診断する方法に関するものである。

10

【背景技術】

【0002】

アルコールによる臓器障害の診断の第一歩は正確な飲酒歴の把握であるが、アルコール依存は否認の病気といわれ、常習飲酒家が、その飲酒量を正確に申告しないのは古今東西変わりが無い。従って、その裏づけとなる客観的なマーカーが必要である。習慣飲酒のマーカーとして最も広く測定されているのは G T P (G G T) であるが、飲酒家が G G T 高値を示す場合でも、その値は肝障害の重症度や積算飲酒量とは必ずしも相関せず、またアルコール飲用後の G G T の変化には個体差があり、大量飲酒後にも増加しないいわゆるノンレスポonderが相当数存在する。

【0003】

20

一方、飲酒習慣がない場合でも肥満に伴う脂肪肝、ある種の薬剤の常用者など飲酒以外の要因で G G T が上昇する場合も多く、人間ドック等において G G T 高値、即ち飲酒家といった短絡的指導が行われる場合も少なくない。従って、G G T に相補的な検査として糖鎖欠損トランスフェリン (C D T) が北欧の研究者達により開発され、欧米の文献 (非特許文献 1) ではその有用性が強調されているが、日本人を対象とした成績では飲酒マーカーとしての C D T は G G T のノンレスポonderの 10 % 程度を拾いあげるにとどまっている。

【0004】

エタノールの第一代謝産物であるアセトアルデヒドは反応性に富み、種々の蛋白との間で各種のアセトアルデヒド付加体を形成する。例えばアセトアルデヒド - ヘモグロビン付加体を E L I S A 法などにより検出する試みがなされている (非特許文献 2) 。糖尿病における H b A 1 c のように飲酒量を過去にさかのぼって推測しうる興味深いマーカーと期待されるものもあるが、感度に難があり実用化していない。

30

【0005】

習慣飲酒は慢性肝障害の 2 大要因のひとつである。わが国の肝硬変症例において、純粹にアルコールのみに起因する症例の割合は 10 ~ 15 % に過ぎないとされている。しかし、これは主として大学病院などを対象にして得られたデータであり、200 万人を超えると予想されるアルコール依存症の存在を考えると、医療機関を受診する機会がないアルコール性肝障害患者が多数潜在していると予想される。また、習慣飲酒は脳出血、高血圧、痛風などの増悪因子でもあり、問題飲酒者を早期にかつ的確にスクリーニングすることは極めて重要である。しかし、上記のように、現在存在するいわゆる飲酒マーカーにおいて感度・特異度において決定的なものはなく、新たなマーカーを検索することが求められている。

40

網羅的発現タンパク解析の手法として一般的なのは二次元タンパク電気泳動であるが、低分子量蛋白またはペプチドの検出に難がある。近年、matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) や surface enhanced laser desorption ionization (SELDI) と飛行型質量分析計を組み合わせたプロテインチップテクノロジーが開発され、新規腫瘍マーカーの検出など臨床応用が始まっている (非特許文献 3) 。従ってこれらのプロテオミクス技術などを活用して網羅的に新たなマーカーを検索することが求

50

められている。

【非特許文献1】Anton RF et al., *Alcoholism Clin. Exp. Res.*, 2002; 26: 1215 - 1222

【非特許文献2】Niomola O et al., *J. Clin. Invest.*, 1991; 87: 1367 - 1374

【非特許文献3】Petricoin EF et al., *Lancet*, 2002; 359: 572 - 577

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、問題飲酒者などのアルコール性肝障害を早期にしかも的確にスクリーニングしうる新規マーカーを見出し、その測定系を確立し、医療に役立てることを課題としている。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは上記の課題に関して鋭意検討した結果、本発明を完成した。即ち、本発明者らはSELDI-TOF MS、MALDI-TOF MSを応用し、アルコール性肝障害で入院した患者において経時的に採取された血清検体を用い、習慣飲酒に伴って増減する新規の血清蛋白を同定することに成功した。そしてこれらの血清蛋白はアルコール性肝障害診断マーカーペプチドとして利用できることを見出し本発明を完成させた。

【0008】

従って、本発明は、配列表の配列番号1から4のアミノ酸配列を有するヒトフィブリノーゲン由来分解産物であるペプチドから選ばれるアルコール性肝障害診断用マーカーペプチドに関する。

更に、本発明は、アルコール性肝障害が疑われる患者から得た検体中の、上記の1種またはそれ以上のアルコール性肝障害マーカーペプチドの存否を検出しあるいはその量を測定して、アルコール性肝障害発症可能性、アルコール性肝障害あるいはアルコール性肝障害の予後を診断する方法に関する。

【発明の効果】

【0009】

本発明のマーカーペプチドの存否を検出しあるいはその量を測定することにより、例えば、習慣飲酒者や問題飲酒者がアルコール性肝障害を発症する可能性を診断することもでき、飲酒が要因のアルコール性肝障害、例えば、肝炎、肝硬変などを診断することもでき、また通常アルコール性肝障害を診断することもできる。更には、アルコール性肝障害の治療経過などを診断することもできる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

以下に本発明を更に詳細に説明する。

本発明によりアルコール性肝障害診断用マーカーペプチドとして利用できることを見出されたペプチドは、配列表の配列番号1から4のアミノ酸配列を有するヒトフィブリノーゲン由来分解産物であるペプチドから選ばれる。

【0011】

次にそれぞれのペプチドを説明する。

配列表の配列番号1のアミノ酸配列を有するペプチド(以下1.4kDaペプチドと記載することもある)は、理論分子量が1465.4である。1.4kDaペプチドは、15個のアミノ酸が結合したポリペプチドであり、ヒトフィブリノーゲンペプチドA分解産物である。サンプル中の1.4kDaペプチドの濃度は、アルコール性肝障害があるときは高くなり、そうでないときは、その濃度が低くなるかほとんど検出できない。

配列表の配列番号2のアミノ酸配列を有するペプチド(以下1.5kDaペプチドと記載することもある)は、その理論分子量は1545.6である。1.5kDaペプチドは

10

20

30

40

50

、セリンがリン酸化されている15個のアミノ酸が結合したポリペプチドであり、ヒトフィブリノペプチドA分解産物である。サンプル中の1.5kDaペプチドの濃度は、アルコール性肝障害があるときは高くなりやすく、そうでないときは、その濃度が低くなるかほとんど検出できない。

配列表の配列番号3のアミノ酸配列を有するペプチド(以下1.6kDaペプチドと記載することもある)は、その理論分子量は1616.6である。1.6kDaペプチドは、セリンがリン酸化されている16個のアミノ酸が結合したポリペプチドであり、ヒトフィブリノペプチドA分解産物である。サンプル中の1.6kDaペプチドの濃度は、アルコール性肝障害があるときは高くなりやすく、そうでないときは、その濃度が低くなるかほとんど検出できない。

10

配列表の配列番号4のアミノ酸配列を有するペプチド(以下2.6kDaペプチドと記載することもある)は、その理論分子量は2659.6である。2.6kDaペプチドは、25個のアミノ酸が結合したポリペプチドであり、フィブリノーゲン-E鎖(Fibrinogen-E chain)分解産物である。サンプル中の2.6kDaペプチドの濃度は、アルコール性肝障害があるときは低くなりやすいか検出しにくく、そうでないときは、濃度が高くなりやすい。

【0012】

以上に説明した本発明により見出されたアルコール性肝障害診断用マーカーペプチドに基づいてアルコール性肝障害の診断が可能になる。即ち、アルコール性肝障害が疑われる患者から得た検体中の、上記アルコール性肝障害診断用マーカーペプチドの存否を検出しあるいはその量を測定して、アルコール性肝障害発症可能性、アルコール性肝障害あるいはアルコール性肝障害の予後を診断することができる。

20

本発明で用いることのできる検体としては、アルコール性肝障害が疑われる患者から採取した血清、血漿、血液、尿などが挙げられる。

本発明のアルコール性肝障害診断用マーカーペプチドの存否の検出あるいはその量の測定は、現在既知のあらゆる方法を採用することができる。例えば、質量分析法、免疫測定法、電気泳動法、液体クロマトグラフィー(LC)法、ガスクロマトグラフィー(GC)法などが挙げられる。

【0013】

質量分析法としては、レーザーイオン化飛行時間型質量分析計(LDI-TOF MS)により行う方法、ESI法(Electrospray Ionization)による質量分析法が挙げられる。レーザーイオン化飛行時間型質量分析計としては、マトリックス支援レーザーイオン化(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)飛行時間型質量分析計(MALDI-TOF MS法)、表面増強レーザー脱離イオン化(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization)飛行時間型質量分析計(SELDI-TOF MS法)などを例示できる。

30

MALDI-TOF MS法は、MALDIと飛行型質量分析計を組み合わせたプロテオーム解析法であり、例えば、Bruker Daltonics社のクリント・プロットシステムTM・マス・スペクトロメーターを使用することができる。この場合、例えば、磁気ビーズ、好ましくは陽イオン磁気ビーズにサンプルを加え、本発明のマーカーを吸着させ、次いで、それを溶出し、溶出液にマトリックス溶液を加えアンカーチップにアプライしてシステムに適用することにより、マーカー濃度の存否、高い低いを読み取ることができる。

40

SELDI-TOF MS法は、SELDIと飛行型質量分析計を組み合わせたプロテインチップテクノロジーであり、例えば、Ciphergen社により開発されたプロテイン・バイオロジー・システムII・マス・スペクトロメーター(Ciphergen Biosystems, Inc)を使用することができる。その詳細はWO 01/25791 A2号公報、特開2001-281222号公報等に詳しい。この場合、通常、検体を、前処理した後、チップに吸着させて、SELDI-TOF MS質量計に付

50

す。検体が血清の場合、アルブミンの吸着剤を用いるか、イオン交換チップでアルブミンが電荷をもたなくなるまでバッファーで洗浄してアルブミンを系から除去することが好ましい。

これらの方法に用いられるプロテインチップとしては、本発明のアルコール性肝障害診断用マーカーペプチドを吸着できるチップであれば特に限定しない。例えば、疎水性やイオン交換などのペプチドに親和性を持つ官能基が修飾されているチップ（ケミカルチップともいう）、目的のペプチドに対する抗体を固定化したチップ（バイオケミカルチップ）等を例示できる。

【0014】

ESI法の場合は、プロテアーゼ処理等の前処理した検体を、高速液体クロマトグラフィー等の分離手段と直結した質量分析計に付するのが好ましいことが多い。

免疫測定法としては、本発明のアルコール性肝障害診断用マーカーペプチドに対するポリクローナル抗体やモノクローナル抗体を作成し、従来知られているペプチドを測定する免疫測定法を挙げることができる。そのような免疫測定法として、酵素免疫測定法（EIA法）、免疫比濁測定法（TIA法）、ラテックス免疫凝集法（LATEx法）、電気化学発光法、蛍光法などを例示することができる。またイムノクロマト法、試験紙を利用した方法も有効である。これらの方法は、いずれも当業者に周知の方法でありこれら周知の方法をそのまま採用することができる。

これらの方法以外にも、電気泳動法、液体クロマトグラフィー（LC）法、ガスクロマトグラフィー（GC）法などが挙げられる。これらの方法も既に当業者に周知であり、これらの周知の方法をそのまま採用することができる。

【0015】

以上に説明した方法により、アルコール性肝障害が疑われる患者から得た検体中のアルコール性肝障害診断用マーカーペプチドの存否を検出しあるいはその量を測定することにより、アルコール性肝障害発症可能性、アルコール性肝障害あるいはアルコール性肝障害の予後等のアルコール性肝障害に関連する状況（以下、アルコール性肝障害等と記載することもある）を診断することができる。本発明のマーカーは、配列表の配列番号1から4のアミノ酸配列を有するペプチドのいずれかの存否を検出しあるいはその量を測定することによりアルコール性肝障害等の診断をすることも有効であるが、さらに、本発明のマーカーを組み合わせて診断してもよい。また、本発明のマーカーに加えて、従来知られているGTP等の他の診断薬と併せて、アルコール性肝障害等を診断してもよい。

本発明の診断方法は、上記した質量分析により行う場合には、質量分析計によって得られるスペクトルのパターン分析によって診断することもできる。本発明の診断方法は、例えば、習慣飲酒者や問題飲酒者がアルコール性肝障害を発症する可能性を診断することもでき、飲酒が要因のアルコール性肝障害、例えば、肝炎、肝硬変などを診断することもでき、また通常アルコール性肝障害を診断することもできる。更には、アルコール性肝障害の治療経過などを診断することもできる。本発明の診断方法は、特にアルコール性肝障害の診断に適している。

【0016】

以下に実施例を挙げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例に何ら限定されるものではない。

【実施例1】

【0017】

WCX ClinProt Magnetic Beads を用いる肝臓疾患診断用マーカー蛋白質の同定

インフォームド・コンセントを行った3名の患者血清を使用して、WCX ClinProt Magnetic Beads (Bruker Daltonics, Inc) を用いて血清中の新規肝障害マーカーを探索した。WCX Magnetic Beads とは Weak Cation Exchange Magnetic Beads のことであり、検体中の正電荷物質を結合させるという特徴を持っている。検体としてアルコール性肝障害患者3名の入院直後及び禁酒3ヶ月後のそれぞれの血清を用いた。

【0018】

(1) 方法

以下にWCX ClinProt Magnetic Beads実験操作法を簡単に述べる。チューブに10 μ lのBinding solution (Bruker Daltonics, Inc)、10 μ lのビーズ溶液 (Bruker Daltonics, Inc)と5 μ lの血清を加え、5分間インキュベーションした。チューブをMagnetic Beads Separator (Bruker Daltonics, Inc)に置き、1分間ビーズを片側に集め、上清をピペットで除去した。続いてMagnetic Beads Separatorからチューブを外し、100 μ lの洗浄液 (Bruker Daltonics, Inc)を加え、Magnetic Beads Separatorにチューブを立て、前後に10回チューブを移動させた。1分間ビーズを片側に集め、上清をピペットで除去した。この操作を3回繰り返した。10 μ lの溶出液 (Bruker Daltonics, Inc)を加え、ビーズを懸濁させた。チューブをMagnetic Beads Separatorに立て、2分間ビーズを片側に集め、その上清を新しいチューブに移した。10 μ lのStabilization Solution (Bruker Daltonics, Inc)を溶出液に加えた。Matrix Solutionは0.3g/L -シアノ-4-ヒドロキシシンナミノ酸 (Bruker Daltonics, Inc)をエタノール (Wako) / アセトン (Wako) (2:1)で溶かした溶液を用いた。10 μ lの溶出液に20 μ lのMatrix Solutionを加え、1 μ lをAnchor chip (Bruker Daltonics, Inc)にアプライした。作製したAnchor chipはAutoFlex II (Bruker Daltonics, Inc)によって読み取った。

【0019】

(2) 結果

図1に代表的なアルコール性肝障害患者3名の血清の入院直後及び禁酒3ヶ月後のそれぞれのデータを示す。Anchor chip から脱離したサンプルの蛋白質の分子量を横軸に、その分子量で検出器に到達した分析物の量を反映するピークを縦軸で表すことができる。よって図1から明らかのように、アルコール性肝障害患者の入院時のデータでは、分子量1.4kDa蛋白質、1.5kDa蛋白質及び1.6kDa蛋白質のピークが観察されたが、入院後はほとんど観察されないことが判明した。一方、アルコール性肝障害患者の禁酒3ヶ月後のデータでは、分子量2.6kDa蛋白質のピークが観察されたが、入院直後はほとんど観察されないことが判明した。従って、この1.4kDaペプチド、1.5kDaペプチド、1.6kDaペプチド及び2.6kDaペプチドを指標として、アルコール性肝障害を診断できることが判った。

【実施例2】

【0020】

マーカーペプチドの同定

【0021】

(1) 1.4kDaペプチドの同定

WCX ClinProt Magnetic Beads実験によって見出された1.4kDaペプチドについて、チューブに10 μ lのBinding solution (Bruker Daltonics, Inc)、10 μ lのビーズ溶液 (Bruker Daltonics, Inc)と5 μ lの血清を加え、5分間インキュベーションした。チューブをMagnetic Beads Separator (Bruker Daltonics, Inc)に置き、1分間ビーズを片側に集め、上清をピペットで除去した。続いてMagnetic Beads Separatorからチューブを外し、100 μ lの洗浄液 (Bruker Daltonics, Inc)を加え、Magnetic Beads Separatorにチューブを立て、前後に10回チューブを移動させた。1分間ビーズを片側に集め、上清をピペットで除去した。この操作を3回繰り返した。10 μ lの溶出液 (Bruker Daltonics, Inc)を加え、ビーズを懸濁させた。チューブをMagnetic Beads Separatorに立て、

2分間ビーズを片側に集め、その上清を新しいチューブに移した。10 μ lのStabilization Solution (Bruker Daltonics, Inc)を溶出液に加えた。Matrix Solutionは0.3g/L -シアノ-4-ヒドロキシシンナミノ酸 (Bruker Daltonics, Inc)をethanol (Wako) / acetone (Wako) (2:1)で溶かした溶液を用いた。10 μ lの溶出液に20 μ lのMatrix Solutionを加え、1 μ lをAnchor chip (Bruker Daltonics, Inc)にアプライした。作製したAnchor chipはAutoFlex II (Bruker Daltonics, Inc)によって読み取った。そのデータを取得後、MascotTM (Matrix Science, Inc)検索を行った結果、ヒトフィブリノペプチドAの分解産物であることがわかった。1.4kDaペプチドのAutoFlex II (Bruker Daltonics, Inc)で読み取ったデータ及びアミノ酸配列を図2に示す。また、1.4kDaペプチドのアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示した。

10

【0022】

(2) 1.5kDaペプチドの同定

WCX ClinProt Magnetic Beads 実験によって見出された1.5kDaペプチドについて、チューブに10 μ lのBinding solution (Bruker Daltonics, Inc)、10 μ lのビーズ溶液 (Bruker Daltonics, Inc)と5 μ lの血清を加え、5分間インキュベーションした。チューブをMagnetic Beads Separator (Bruker Daltonics, Inc)に置き、1分間ビーズを片側に集め、上清をピペットで除去した。続いてMagnetic Beads Separatorからチューブを外し、100 μ lの洗浄液 (Bruker Daltonics, Inc)を加え、Magnetic Beads Separatorにチューブを立て、前後に10回チューブを移動させた。1分間ビーズを片側に集め、上清をピペットで除去した。この操作を3回繰り返した。10 μ lの溶出液 (Bruker Daltonics, Inc)を加え、ビーズを懸濁させた。チューブをMagnetic Beads Separatorに立て、2分間ビーズを片側に集め、その上清を新しいチューブに移した。10 μ lのStabilization Solution (Bruker Daltonics, Inc)を溶出液に加えた。Matrix Solutionは0.3g/L -シアノ-4-ヒドロキシシンナミノ酸 (Bruker Daltonics, Inc)をエタノール (Wako) / アセトン (Wako) (2:1)で溶かした溶液を用いた。10 μ lの溶出液に20 μ lのMatrix Solutionを加え、1 μ lをAnchor chip (Bruker Daltonics, Inc)にアプライした。作製したAnchor chipはAutoFlex II (Bruker Daltonics, Inc)によって読み取った。そのデータを取得後、MascotTM (Matrix Science, Inc)検索を行った結果、ヒトフィブリノペプチドAの分解産物であることがわかった。1.5kDaペプチドのAutoFlex II (Bruker Daltonics, Inc)で読み取ったデータ及びアミノ酸配列を図3に示す。また、1.5kDaペプチドのアミノ酸配列を配列表の配列番号2に示した。

20

30

40

【0023】

(3) 1.6kDaペプチドの同定

WCX ClinProt Magnetic Beads 実験によって見出された1.6kDaペプチドについて、チューブに10 μ lのBinding solution (Bruker Daltonics, Inc)、10 μ lのビーズ溶液 (Bruker Daltonics, Inc)と5 μ lの血清を加え、5分間インキュベーションした。チューブをMagnetic Beads Separator (Bruker Daltonics, Inc)に置き、1分間ビーズを片側に集め、上清をピペットで除去した。続いてMagnetic Beads Separatorからチューブを外し、100 μ lの洗浄液 (Bruker Daltonics, Inc)を加え、Magnet

50

ic Beads Separatorにチューブを立て、前後に10回チューブを移動させた。1分間ビーズを片側に集め、上清をピペットで除去した。この操作を3回繰り返した。10 μ lの溶出液(Bruker Daltonics, Inc)を加え、ビーズを懸濁させた。チューブをMagnetic Beads Separatorに立て、2分間ビーズを片側に集め、その上清を新しいチューブに移した。10 μ lのStabilization Solution(Bruker Daltonics, Inc)を溶出液に加えた。Matrix Solutionは0.3g/L -シアノ-4-ヒドロキシシンナミノ酸(Bruker Daltonics, Inc)をエタノール(Wako)/アセトン(Wako)(2:1)で溶かした溶液を用いた。10 μ lの溶出液に20 μ lのMatrix Solutionを加え、1 μ lをAnchor chip(Bruker Daltonics, Inc)にアプライした。作製したAnchor chipはAutoFlex II(Bruker Daltonics, Inc)によって読み取った。そのデータを取得後、MascotTM(Matrix Science, Inc)検索を行った結果、ヒトフィブリノペプチドAの分解産物であることがわかった。1.6kDaペプチドのAutoFlex II(Bruker Daltonics, Inc)で読み取ったデータ及びアミノ酸配列を図4に示す。また、1.6kDaペプチドのアミノ酸配列を配列表の配列番号3に示した。

10

【0024】

(4) 2.6kDaペプチドの同定

WCX ClinProt Magnetic Beads実験によって見出された2.6kDaペプチドについて、チューブに10 μ lのBinding solution(Bruker Daltonics, Inc)、10 μ lのビーズ溶液(Bruker Daltonics, Inc)と5 μ lの血清を加え、5分間インキュベーションした。チューブをMagnetic Beads Separator(Bruker Daltonics, Inc)に置き、1分間ビーズを片側に集め、上清をピペットで除去した。続いてMagnetic Beads Separatorからチューブを外し、100 μ lの洗浄液(Bruker Daltonics, Inc)を加え、Magnetic Beads Separatorにチューブを立て、前後に10回チューブを移動させた。1分間ビーズを片側に集め、上清をピペットで除去した。この操作を3回繰り返した。10 μ lの溶出液(Bruker Daltonics, Inc)を加え、ビーズを懸濁させた。チューブをMagnetic Beads Separatorに立て、2分間ビーズを片側に集め、その上清を新しいチューブに移した。10 μ lのStabilization Solution(Bruker Daltonics, Inc)を溶出液に加えた。Matrix Solutionは0.3g/L -シアノ-4-ヒドロキシシンナミノ酸(Bruker Daltonics, Inc)をエタノール(Wako)/アセトン(Wako)(2:1)で溶かした溶液を用いた。10 μ lの溶出液に20 μ lのMatrix Solutionを加え、1 μ lをAnchor chip(Bruker Daltonics, Inc)にアプライした。作製したAnchor chipはAutoFlex II(Bruker Daltonics, Inc)によって読み取った。そのデータを取得後、MascotTM(Matrix Science, Inc)検索を行った結果、ヒトフィブリノーゲン-E鎖の分解産物であることがわかった。2.6kDaペプチドのAutoFlex II(Bruker Daltonics, Inc)で読み取ったデータ及びアミノ酸配列を図5に示す。また、2.6kDaペプチドのアミノ酸配列を配列表の配列番号4に示した。

20

30

40

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】独国 Bruker Daltonics 社の磁性ビーズとMALDI-TOF/TOF質量分析計を組み合わせたClinProt systemTM を利用し、陽イオン磁気ビーズ(WCX beads)を使用して測定されたアルコール性肝障害患者3名(入院時1及び入院後3カ月1、入院時2及び入院後3カ月2、入院時3及び入院後3カ月3)のそれぞれの血清の測定結果である

50

。入院時から治療に伴い経時的に、(1) 1.4 kDa ペプチド、(2) 1.5 kDa ペプチド、(3) 1.6 kDa ペプチドの血中濃度が減少しており、一方、(4) 2.6 kDa ペプチドの血中濃度が上昇している様子が見られる。

【図2】独国 Bruker Daltonics 社のMALDI-TOF/TOF質量分析計を利用して、1.4 kDa ペプチドを同定した結果を示す。この結果から、1.4 kDa ペプチドはヒトフィブリノペプチドAの分解産物であることがわかる。

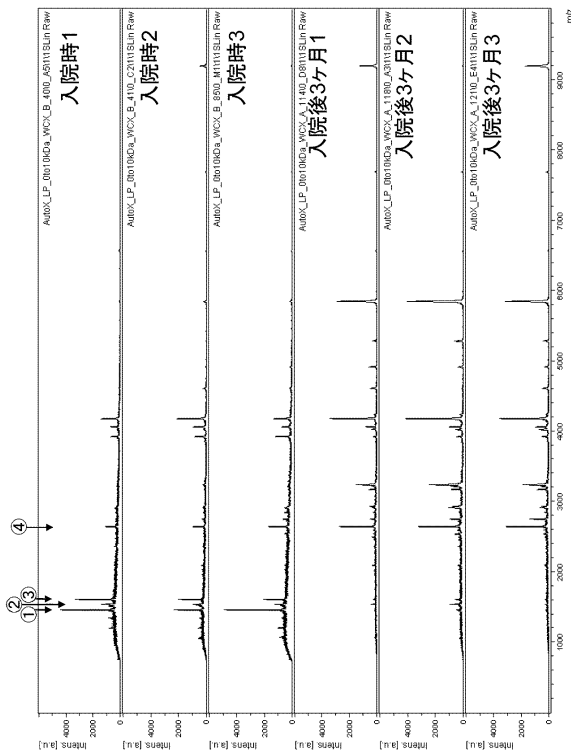
【図3】独国 Bruker Daltonics 社のMALDI-TOF/TOF質量分析計を利用して、1.5 kDa ペプチドを同定した結果を示す。この結果から、1.5 kDa ペプチドはヒトフィブリノペプチドAの分解産物であることがわかる。

【図4】独国 Bruker Daltonics 社のMALDI-TOF/TOF質量分析計を利用して、1.6 kDa ペプチドを同定した結果を示す。この結果から、1.6 kDa ペプチドはヒトフィブリノペプチドAの分解産物であることがわかる。

【図5】独国 Bruker Daltonics 社のMALDI-TOF/TOF質量分析計を利用して、2.6 kDa ペプチドを同定した結果を示す。この結果から、2.6 kDa ペプチドはヒトフィブリノーゲン - E鎖の分解産物であることがわかる。

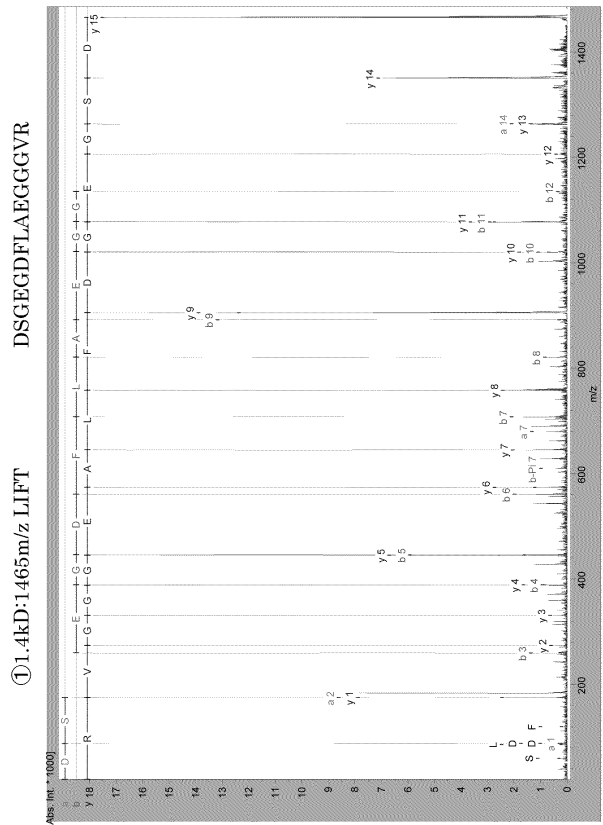
10

【図1】



①1.4kD,②1.5kD,③1.6kD,④2.6kD
①1.4kD:1465m/z LIFT

【図2】



【配列表】

0005419680000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 0 7 K 14/75 (2006.01) C 0 7 K 7/08
 C 0 7 K 14/75

- (74)代理人 100102897
 弁理士 池田 幸弘
- (74)代理人 100097870
 弁理士 梶原 斎子
- (74)代理人 100140556
 弁理士 新村 守男
- (74)代理人 100114719
 弁理士 金森 久司
- (74)代理人 100143258
 弁理士 長瀬 裕子
- (74)代理人 100124969
 弁理士 井上 洋一
- (74)代理人 100132492
 弁理士 弓削 麻理
- (72)発明者 曾川 一幸
 千葉県千葉市中央区亥鼻 1 - 8 - 1 国立大学法人千葉大学大学院医学研究院内
- (72)発明者 野村 文夫
 千葉県千葉市中央区亥鼻 1 - 8 - 1 国立大学法人千葉大学大学院医学研究院内
- (72)発明者 朝長 毅
 千葉県千葉市中央区亥鼻 1 - 8 - 1 国立大学法人千葉大学大学院医学研究院内
- (72)発明者 佐藤 守
 千葉県千葉市中央区亥鼻 1 - 8 - 1 国立大学法人千葉大学大学院医学研究院内
- (72)発明者 大橋 建也
 福島県郡山市富久山町福原字塩島 1 番地 日東紡績株式会社 バイオケミカル研究所内
- (72)発明者 清川 巖
 福島県郡山市富久山町福原字塩島 1 番地 日東紡績株式会社 バイオケミカル研究所内
- (72)発明者 小島 良
 福島県郡山市富久山町福原字塩島 1 番地 日東紡績株式会社 バイオケミカル研究所内
- (72)発明者 片山 勝博
 東京都千代田区九段北 4 - 1 - 2 8 日東紡績株式会社内

審査官 海野 佳子

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 4 / 0 5 8 9 6 6 (W O , A 1)
 特開 2 0 0 6 - 3 0 8 5 3 3 (J P , A)

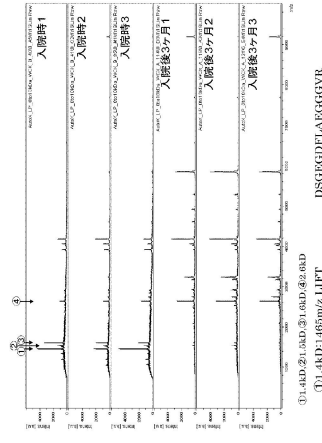
(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)
 G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8
 M E D L I N E (S T N)
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 用于诊断酒精性肝病的标记肽和使用该标记肽诊断酒精性肝病的方法 | | |
| 公开(公告)号 | JP5419680B2 | 公开(公告)日 | 2014-02-19 |
| 申请号 | JP2009501157 | 申请日 | 2008-01-31 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 日东纺绩株式会社 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 日东纺绩株式会社 国立大学法人千叶 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 日东纺绩株式会社 国立大学法人千叶 | | |
| [标]发明人 | 曾川一幸 野村文夫 朝長毅 佐藤守 大橋建也 清川巖 小島良 片山勝博 | | |
| 发明人 | 曾川 一幸 野村 文夫 朝長 毅 佐藤 守 大橋 建也 清川 巖 小島 良 片山 勝博 | | |
| IPC分类号 | G01N33/68 G01N33/53 G01N27/62 G01N27/64 C07K7/08 C07K14/75 | | |
| CPC分类号 | G01N33/6893 | | |
| FI分类号 | G01N33/68.ZNA G01N33/53.D G01N27/62.V G01N27/64.B G01N27/62.K C07K7/08 C07K14/75 | | |
| 代理人(译) | 池田幸 新村守男 井上洋一 | | |
| 优先权 | 2007048523 2007-02-28 JP | | |
| 其他公开文献 | JPWO2008105215A1 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

人纤维蛋白肽A的消化产物或人纤维蛋白原a-E链的消化产物用作标记肽。准确快速地诊断酒精性肝病成为可能。

【 図 1 】



【 図 2 】

