

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2008/105215

発行日 平成22年6月3日 (2010.6.3)

(43) 国際公開日 平成20年9月4日 (2008.9.4)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
CO7K 7/08 (2006.01)	CO7K 7/08	2GO41
GO1N 33/68 (2006.01)	GO1N 33/68 ZNA	2GO45
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 D	4HO45
GO1N 27/62 (2006.01)	GO1N 27/62 V	
GO1N 27/64 (2006.01)	GO1N 27/64 B	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 17 頁) 最終頁に続く

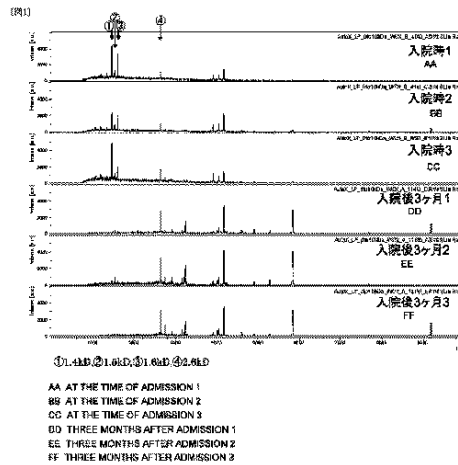
出願番号 特願2009-501157 (P2009-501157)	(71) 出願人 000003975 日東紡績株式会社 福島県福島市郷野日字東1番地
(21) 国際出願番号 PCT/JP2008/051519	
(22) 国際出願日 平成20年1月31日 (2008.1.31)	
(31) 優先権主張番号 特願2007-48523 (P2007-48523)	(71) 出願人 304021831 国立大学法人 千葉大学 千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号
(32) 優先日 平成19年2月28日 (2007.2.28)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	
	(74) 代理人 110000855 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) 【要約】

ヒトフィブリノペプチドAの分解産物あるいはヒトフィブリノーゲン α -E鎖の分解産物をマーカーペプチドとして利用することによりアルコール性肝障害を的確にかつ迅速に診断することができる。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

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。

【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を診断する方法。

【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 の診断方法。

【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する請求項 3 の診断方法。

【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 の診断方法。

【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 の診断方法。

【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。

【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ない。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 γ -GTP (GGT) であるが、飲酒家がGGT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GGT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ンドナーが相当数存在する。

【0003】

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GGTが上昇する場合も多く、人間ドック等などにおいてGGT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、GGTに相補的な検査として糖鎖欠損トランスフェリン (CDT) 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CDTはGGTのノンレスポンドナーの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ELISA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

10

20

30

40

50

おけるHbA1c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。

【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、純粋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ではなく、新たなマーカーを検索することが求められている。

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、また通常の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が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。

10

【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、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、ヒトフィブリノーゲンペプチド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。

20

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、ヒトフィブリノーゲンペプチド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。

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 α -E鎖（Fibrinogen α -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。

30

【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。

40

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

50

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。

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^{T M}・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、マーカ濃度の存否、高い低いを読み取ることができる。

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、そ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、本発明のマーカを組み合わせて診断してもよい。また、本発明のマーカに加えて、従来知られている γ -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。

10

【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入院直後及び禁酒3ヶ月後の血清を用いた。

20

【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 α -シアノー4-ヒドロキシシナミノ酸 (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。

30

40

【0019】

(2) 結果

図1に代表的なアルコール性肝障害患者血清の入院直後及び禁酒3ヶ月後のデータを示す。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から明らかなように、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

50

後のデータでは、分子量2.6 kDa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1.4 kDaペプチド、1.5 kDaペプチド、1.6 kDaペプチド及び2.6 kDa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) 1.4 kDaペプチドの同定

WCX ClinProt Magnetic Beads実験によって見出された1.4 kDa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0.3 g/L α -シアノー-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。1.4 kDa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、1.4 kDa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。

【0022】

(2) 1.5 kDaペプチドの同定

WCX ClinProt Magnetic Beads実験によって見出された1.5 kDa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 α -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 10
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。

【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、1 20
00 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 α -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 30
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。

【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、1 40
00 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 50

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 0.3 g/L α -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 α -E 鎖の分解産物であることがわかった。2.6 kDa 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、2.6 kDa 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。

【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血清の測定結果である。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上昇しており、一方、(4) 2.6 kDa ペプチドの血中濃度が減少している様子が見られる。

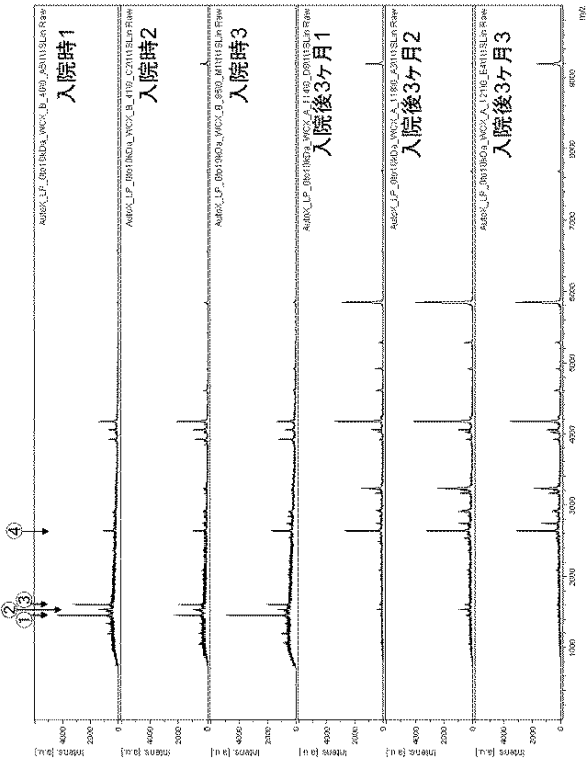
【図 2】 独国 Bruker Daltonics 社の MALDI-TOF/TOF 質量分析計を利用して、1.4 kDa ペプチドを同定した結果を示す。この結果から、1.4 kDa ペプチドはヒトフィブリノーゲンペプチド A の分解産物であることがわかる。

【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ーゲンペプチド 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ーゲンペプチド 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 α -E 鎖の分解産物であることがわかる。

【図1】

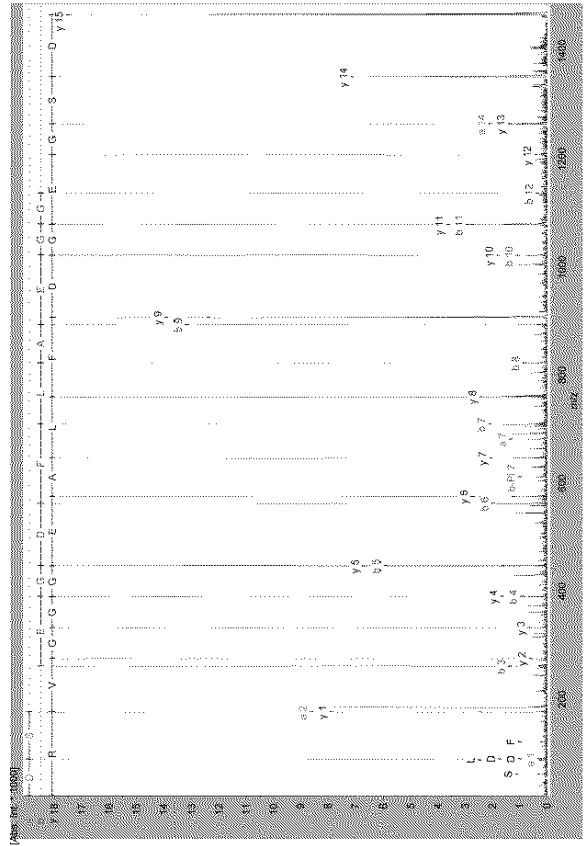


①1.4kD,②1.5kD,③1.6kD,④2.6kD

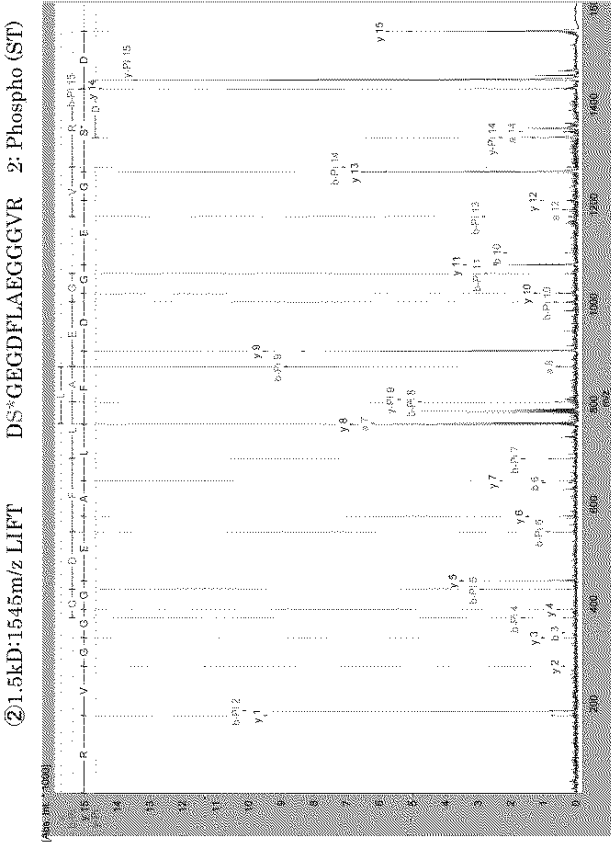
①1.4kD:1465m/z LIFT

DSGEGDFLAEGGGVR

【図2】



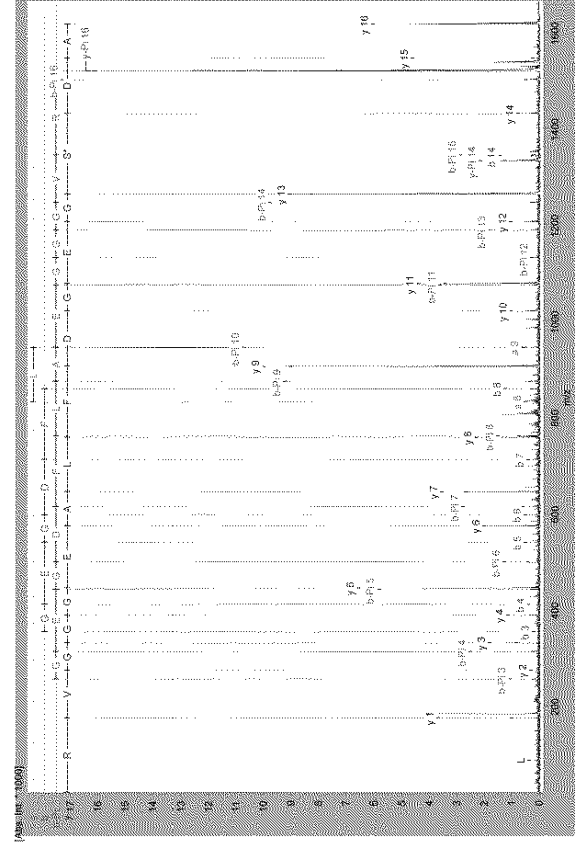
【図3】



②1.5kD:1545m/z LIFT

DS*GEGDFLAEGGGVR 2: Phospho (ST)

【図4】

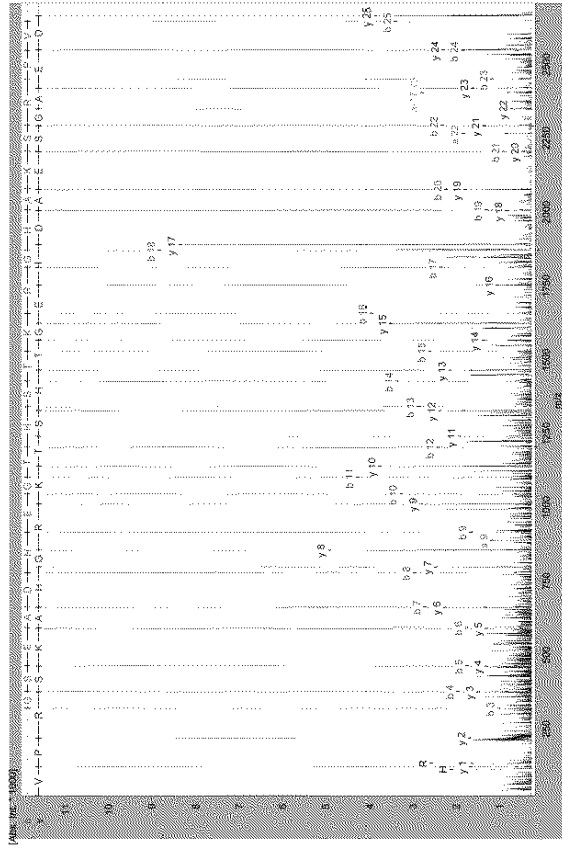


③1.6kD:1616m/z LIFT

ADS*GEGDFLAEGGGVR 3: Phospho (ST)

【 5】

④2.6kD:2659m/z LIFT DEAGSEADHEGTHSTKRGHAKSRPV



【配列表】

2008105215000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2008/051519
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/68(2006.01)i, C07K14/75(2006.01)i, G01N27/62(2006.01)i, G01N27/64(2006.01)i, G01N33/53(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) G01N33/68, C07K14/75, G01N27/62, G01N27/64, G01N33/53 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 1996-2008 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2008 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2008 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE (STN), SCHISEARCH (STN), JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/058966 A1 (Nitto Boseki Co., Ltd.), 15 July, 2004 (15.07.04), Full text & US 2006/0116504 A1 & EP 1577385 A1 & NO 20052992 A	1
A	JP 2006-308533 A (Shimadzu Corp.), 09 November, 2006 (09.11.06), Full text (Family: none)	1
A	GRAM J., et al., Increased Levels of Fibrinolysis Reaction Products (D-Dimer) in Patients with Decompensated Alcoholic Liver Cirrhosis., Alcoholic Liver Cirrhosis and Haemostasis, 1991, Vol.26, No.11, P.1173-1178	1
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "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 22 February, 2008 (22.02.08)		Date of mailing of the international search report 04 March, 2008 (04.03.08)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/051519

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 2 - 6
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
It pertains to methods for diagnosis of the human diseases.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
the

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 8 / 0 5 1 5 1 9	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/68 (2006.01)i, C07K14/75 (2006.01)i, G01N27/62 (2006.01)i, G01N27/64 (2006.01)i, G01N33/53 (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. G01N33/68, C07K14/75, G01N27/62, G01N27/64, 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 1971-2008年 日本国実用新案登録公報 1996-2008年 日本国登録実用新案公報 1994-2008年			
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) MEDLINE (STN), SCHISEARCH (STN), JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2)			
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 請求の範囲の番号	
X	WO 2004/058966 A1 (日東紡績株式会社) 2004.07.15, 全文 & US 2006/0116504 A1 & EP 1577385 A1 & NO 20052992 A	1	
A	JP 2006-308533 A (株式会社島津製作所) 2006.11.09, 全文 (ファミリーなし)	1	
A	GRAM J., et al., Increased Levels of Fibrinolysis Reaction Products (D-Dimer) in Patients with Decompensated Alcoholic Liver Cirrhosis., Alcoholic Liver Cirrhosis and Haemostasis,	1	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「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 「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 22.02.2008		国際調査報告の発送日 04.03.2008	
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) 吉田 佳代子	2 J 9 5 1 6
		電話番号 03-3581-1101 内線 3252	

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 8 / 0 5 1 5 1 9

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 請求の範囲の番号
	1991, Vol. 26, No. 11, P. 1173-1178	

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2008/051519

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 2-6 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、ヒトの病気の診断方法である。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2007年4月)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
 C 0 7 K 14/75 (2006.01) G 0 1 N 27/62 K
 C 0 7 K 14/75

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,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,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(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 4-1-28 日東紡績株式会社内

Fターム(参考) 2G041 CA01 DA03 DA04 DA05 FA12 FA13 GA06 MA02

2G045 AA25 CA26 DA36 FB03 FB05

4H045 AA10 AA30 BA10 CA42 EA50

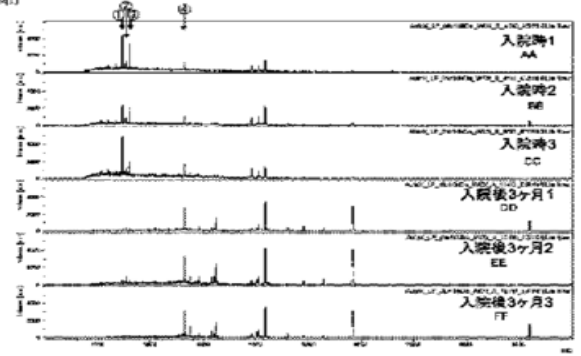
(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	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	JPWO2008105215A1	公开(公告)日	2010-06-03
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		
[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	C07K7/08 G01N33/68 G01N33/53 G01N27/62 G01N27/64 C07K14/75		
CPC分类号	G01N33/6893		
FI分类号	C07K7/08 G01N33/68.ZNA G01N33/53.D G01N27/62.V G01N27/64.B G01N27/62.K C07K14/75		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/DA03 2G041/DA04 2G041/DA05 2G041/FA12 2G041/FA13 2G041/GA06 2G041/MA02 2G045/AA25 2G045/CA26 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB05 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA42 4H045/EA50		
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	JP5419680B2		
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。

(附)



①1.4x10⁶ ②1.6x10⁶ ③1.8x10⁶ ④2.0x10⁶

AA AT THE TIME OF ADMISSION 1
BB AT THE TIME OF ADMISSION 2
CC AT THE TIME OF ADMISSION 3
DD THREE MONTHS AFTER ADMISSION 1
EE THREE MONTHS AFTER ADMISSION 2
FF THREE MONTHS AFTER ADMISSION 3