(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
2023年11月30日(30.11.2023)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2023/228497 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 33/68 (2006.01) *G01N 27/62* (2021.01)
C07K 1/14 (2006.01) *G01N 30/88* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2023/006501

(22) 国際出願日： 2023年2月22日(22.02.2023)

(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 2022-084497 2022年5月24日(24.05.2022) JP

(71) 出願人: 株式会社島津製作所 (**SHIMADZU CORPORATION**) [JP/JP]; 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町１番地 Kyoto (JP).

(72) 発明者: 金子 直樹 (**KANEKO, Naoki**); 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町１番地 株式会社島津製作所内 Kyoto (JP).

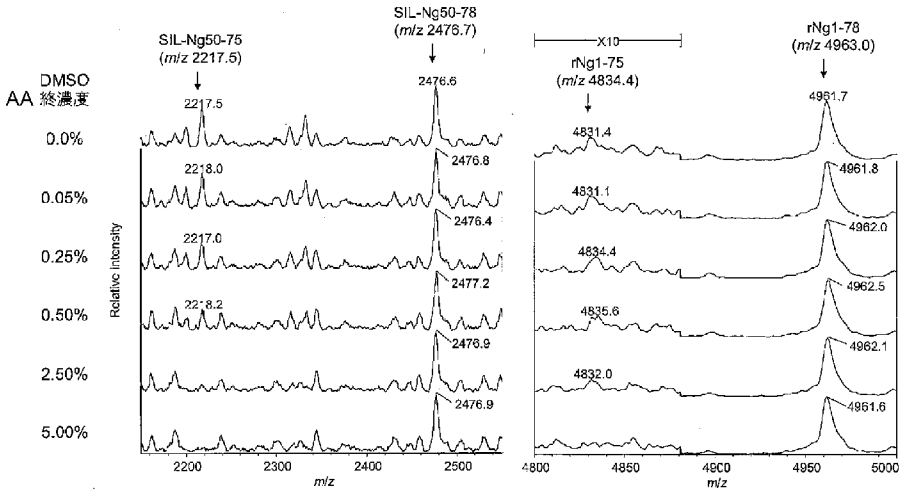
(74) 代理人: 吉 本 力 (**YOSHIMOTO, Tsutomu**); 〒5410059 大阪府大阪市中央区博労町３丁目４－１５ＭＥＬＯＮ国際特許事務所 Osaka (JP).

(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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,

(54) **Title:** METHOD FOR PREPARING SAMPLE SOLUTION CONTAINING NEUROGRANIN-RELATED PEPTIDE, AND METHOD FOR ANALYZING NEUROGRANIN-RELATED PEPTIDE

(54) 発明の名称： ニューログラニン関連ペプチド含有試料溶液の調製方法およびニューログラニン関連ペプチドの分析方法

[図1]



AA... FINAL CONCENTRATION

(57) **Abstract:** Provided are: a method which is for analyzing a neurogranin-related peptide and can suppress deviations in analysis results; and a method for preparing a biological sample containing the neurogranin-related peptide used for same. A method for preparing a sample solution containing a neurogranin-related peptide involves mixing a biological sample containing the neurogranin-related peptide with an organic solvent having a relative polarity of 0.200 to 0.700 to prepare a sample solution containing the organic solvent having a final concentration of at least 5.0 (v/v)%.

WO 2023/228497 A1

［続葉有］

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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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))

一 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))

(57) 要約:分析結果のばらつきを抑制することができるニューログラニン関連ペプチドの分析方法、および、それに用いるニューログラニン関連ペプチド含有生体試料の調製方法を提供する。ニューログラニン関連ペプチド含有試料溶液の調製方法は、ニューログラニン関連ペプチドを含有する生体試料と、相対極性が０．２００以上、０．７００以下である有機溶媒とを混合して、前記有機溶媒の終濃度が５．０(ｖ／ｖ)％以上である試料溶液を調製する。

明　細　書

発明の名称 ：

ニューログラニン関連ペプチド含有試料溶液の調製方法およびニューログラニン関連ペプチドの分析方法

技術分野

[0001] 本発明は、ニューログラニン関連ペプチド含有試料溶液の調製方法およびニューログラニン関連ペプチドの分析方法に関する。

背景技術

[0002] アルツハイマー病は、認知症の主な病型であり、その罹患者は、近年ますます増加しており、その研究はより一層重要となってきている。アルツハイマー病の発症には、アミロイド前駆タンパク質（ＡＰＰ；Amyloid precursor protein）の切断によって生じるアミドロイドβ（Ａβ）などのＡβ関連ペプチドが深く関わっている。そして、免疫沈降法および質量分析法を組み合わせて血液内の複数のＡβ関連ペプチドを検出し、その検出した特定のＡβ関連ペプチド比が、脳内アミロイド蓄積の血液バイオマーカーとして有効に利用できることが報告されている（非特許文献１～２、特許文献１～３）。

[0003] 一方、アルツハイマー病の病態進行をモニターするためには、種々のバイオマーカーが必要であり、アルミロイド蓄積以外に、タウ蓄積、神経変性などの各プロセスを反映するためのバイオマーカーが要求されている。その中で、ニューログラニン(Neurogranin)は、神経変性のバイオマーカーの１つであり、アルツハイマー病患者の脳脊髄液（ＣＳＦ）中で増加することが報告されている（非特許文献３、非特許文献４）。また、アルツハイマー病患者の脳内ではニューログラニンの断片化が促進され、その断片ペプチドが血液中に存在していること、さらには、アセチル化またはグルタチオン化などの翻訳および修飾されたニューログラニンも存在していることも報告されている（非特許文献５）。したがって、血液やＣＳＦなどの生体試料から、ニューログラニンまたはその断片ペプチドなどのニューログラニン関連ペプチド

を検出することによって、神経変性を確認する手段が期待されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：WO２０１５／１７８３９８

特許文献2：WO２０１７／４７５２９

特許文献3：特開２０１７－２０９８０号公報

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Kaneko N, Nakamura A, Washimi Y, Kato T, Sakurai T, Arahata Y, Bundo M, Takeda A, Niida S, Ito K, Toba K, Tanaka K, Yanagisawa K. : Novel plasma biomarker surrogating cerebral amyloid deposition. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 2014;90(9):353-364.

非特許文献2：Nakamura A, Kaneko N, Villemagne VL, Kato T, Doecke J, Dore V, Fowler C, Li QX, Martins R, Rowe C, Tomita T, Matsuzaki K, Ishii K, Ishii K, Arahata Y, Iwamoto S, Ito K, Tanaka K, Masters CL, Yanagisawa K. : High performance plasma amyloid-β biomarkers for Alzheimer's disease. Nature. 2018;554(7691):249-254.

非特許文献3：Portelius E, Olsson B, Hoglund K, Cullen NC, Kvartsberg H, Andreasson U, Zetterberg H, Sandelius A, Shaw LM, Lee VMY, Irwin DJ, Grossman M, Weintraub D, Chen-Plotkin A, Wolk DA, McCluskey L, Elman L, McBride J, Toledo JB, Trojanowski JQ, Blennow K. : Cerebrospinal fluid neurogranin concentration in neurodegeneration: relation to clinical phenotypes and neuropathology. Acta Neuropathol. 2018 ;136(3):363-376.

非特許文献4：Thorsell A, Bjerke M, Gobom J, Brunhage E, Vanmechelen E, Andreasen N, Hansson O, Minthon L, Zetterberg H, Blennow K. : Neurogranin in cerebrospinal fluid as a marker of synaptic degeneration in Alzheimer's disease. Brain Res. 2010;1362:13-22.

非特許文献5：Kvartsberg H, Lashley T, Murray CE, Brinkmalm G, Cullen

NC, Hoglund K, Zetterberg H, Blennow K, Portelius E. : The intact postsynaptic protein neurogranin is reduced in brain tissue from patients with familial and sporadic Alzheimer’s disease. Acta Neuropathol. 2019;137(1):89-102.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] ところで、ニューログラニン関連ペプチドを分析する生体試料としては、一般的な検査で採取が可能であり、低侵襲性である観点から、血液試料が好ましいとされている。しかしながら、血液などに存在するニューログラニン関連ペプチドは、微量であるため、分析方法によっては、同一の血液サンプルであっても、その分析結果の値にばらつきが大きく発生する不具合が生じる。

[0007] 本発明は、分析結果のばらつきを抑制することができるニューログラニン関連ペプチドの分析方法、および、それに用いるニューログラニン関連ペプチド含有生体試料の調製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

[0008] 本発明の第１の態様の調製方法は、ニューログラニン関連ペプチドを含有する生体試料と、相対極性が０．２００以上０．７００以下である有機溶媒とを混合して、前記有機溶媒の終濃度が５．０（ｖ／ｖ）％以上である試料溶液を調製するニューログラニン関連ペプチド含有生体試料の調製方法に関する。

[0009] 本発明の第１の態様の調製方法を用いた第１の態様の分析方法は、第１の態様の調製方法を実施する調製工程と、前記試料溶液を用いて、質量分析法、液体クロマトグラフィー法、免疫測定法、または、表面プラズモン共鳴法を実施する測定工程とを備えるニューログラニン関連ペプチドの分析方法に関する。

発明の効果

[0010] 本発明の第１の態様の調製方法によれば、生体試料に含まれるニューログラニン関連ペプチドの分解を抑制することができる。また、本発明の第１の態様の分析方法によれば、ニューログラニン関連ペプチドの分析結果のばらつきを抑制することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図１は、Ｎｇ関連ペプチド含有試料溶液におけるＤＭＳＯ濃度ごとのマススペクトル（終濃度０～５％）である。縦軸は、相対強度、横軸は、ｍ／ｚを示す。

[図2]図２は、Ｎｇ関連ペプチド含有試料溶液におけるＤＭＳＯ濃度ごとのマススペクトル（濃度０～３０％）である。

[図3]図３は、ＳＩＬ－Ｎｇ５０－７８に対するＳＩＬ－Ｎｇ５０－７５の比と、ＤＭＳＯ濃度との関係を示すグラフ（終濃度０～５％）である。縦軸は、ＳＩＬ－Ｎｇ５０－７８に対するＳＩＬ－Ｎｇ５０－７５の比、横軸は、ＤＭＳＯの終濃度を示す。

[図4]図４は、ＳＩＬ－Ｎｇ５０－７８に対するＳＩＬ－Ｎｇ５０－７５の比と、ＤＭＳＯ濃度との関係を示すグラフ（終濃度０～３０％）である。

[図5]図５は、ｒＮｇ１－７８に対するｒＮｇ１－７５の比と、ＤＭＳＯ濃度との関係を示すグラフ（終濃度０～５％）である。縦軸は、ｒＮｇ１－７８に対するｒＮｇ１－７５の比、横軸は、ＤＭＳＯの終濃度を示す。

[図6]図６は、ｒＮｇ１－７８に対するｒＮｇ１－７５の比と、ＤＭＳＯ濃度との関係を示すグラフ（終濃度０～３０％）である。

[図7]図７は、比較例のＮｇ関連ペプチド含有試料溶液におけるインキュベーション時間ごとのマススペクトルである。縦軸は、相対強度、横軸は、ｍ／ｚを示す。

[図8]図８は、比較例における、ＳＩＬ－Ｎｇ５０－７８に対するＳＩＬ－Ｎｇ５０－７５の比と、インキュベーション時間との関係を示すグラフである。縦軸は、ＳＩＬ－Ｎｇ５０－７８に対するＳＩＬ－Ｎｇ５０－７５の比、横軸は、室温インキュベーション時間を示す。

[図9]図９は、比較例における、ｒＮｇ１－７８に対するｒＮｇ１－７５の比と、インキュベーション時間との関係を示すグラフである。縦軸は、ｒＮｇ１－７８に対するｒＮｇ１－７５の比、横軸は、室温でのインキュベーション時間を示す。

[図10]図１０は、ＳＩＬ－Ｎｇ５０－７８に対するＳＩＬ－Ｎｇ５０－７５の比と、各種溶媒との関係を示すグラフである。縦軸は、ＳＩＬ－Ｎｇ５０－７８に対するＳＩＬ－Ｎｇ５０－７５の比、横軸は、各種溶媒（終濃度１０％）を示す。

[図11]図１１は、ｒＮｇ１－７８に対するｒＮｇ１－７５の比と、各種溶媒との関係を示すグラフである。縦軸は、ｒＮｇ１－７８に対するｒＮｇ１－７５の比、横軸は、各種溶媒（終濃度１０％）を示す。

[図12]図１２は、Ｎｇ関連ペプチド含有試料溶液におけるＡＣＮ濃度ごとのマススペクトル（終濃度０～２０％）である。縦軸は、相対強度、横軸は、ｍ／ｚを示す。

[図13]図１３は、図１２のｍ／ｚ２１５０～２５４０付近における拡大図を示す。

[図14]図１４は、図１２のｍ／ｚ４８００～５０００付近における拡大図を示す。

発明を実施するための形態

[0012] １．第１の実施形態

１－１．調製方法

第１の実施形態にかかるニューログラニン関連ペプチド含有試料溶液の調製方法は、生体試料と、相対極性が０．２００以上、０．７００以下である有機溶媒とを混合する。

[0013] なお、「ニューログラニン関連ペプチド」（以下、「Ｎｇ関連ペプチド」と略する。）には、ニューログラニン、翻訳および／または修飾されたニューログラニン、ならびに、これらの断片ペプチドが含まれる。

[0014] 生体試料は、Ｎｇ関連ペプチドを含有する試料であって、例えば、血液、

脳脊髄液、尿、体分泌液、唾液、痰、糞便などの体液が挙げられる。血液には、全血、血漿、血清などが含まれる。血液は、個体から採取された全血に、遠心分離、冷凍保存などの処理がなされたものであってよい。好ましくは、血液が挙げられる。血液は、脳骨髄液と比較して低侵襲性であり、また、健康診断等におけるスクリーニングの対象試料であって入手が容易である。

[0015] 有機溶媒の相対極性(relative polarity)は、０．２００以上、０．７００以下である。相対極性の下限については、好ましくは、０．３００以上、より好ましくは、０．３７０以上、最も好ましくは、０．４００以上であり、また、上限については、好ましくは、０．６００以下、より好ましくは、０．５００以下、最も好ましくは、０．４５０以下である。相対極性は、例えば、Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry", Christian Reichards, Wiley-VCH Publishers, 3rd ed., 2003に詳細に開示されている。

[0016] このような有機溶媒としては、例えば、アセトン（０．３５５）、ジメチルホルムアミド（０．３８６）、ジメチルスルホキシド（０．４４４）、アセトニトリル（０．４６０）、２－プロパノール（０．５４６）、エタノール（０．６５４）、１－ブタノール（０．５８６）、２－ブタノール（０．５０６）などが挙げられる。括弧内の数字は、相対極性の値を示す。これらは、１種単独で使用してもよく、２種以上併用してもよい。Ｎｇ関連ペプチドの分解をより一層確実に抑制できる観点から、好ましくは、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ；Dimethyl sulfoxide）が挙げられる。一方、Ｎｇ関連ペプチドの分解抑制に加えて、より一層の高感度でＮｇ関連ペプチドを検出できる観点から、好ましくは、アセトニトリル（ＡＣＮ；Acetonitrile）が挙げられる。

[0017] 調製工程では、有機溶媒の終濃度が、調製後のＮｇ関連ペプチド含有試料溶液に対して、５．０（ｖ／ｖ）％以上となるように、生体試料と有機溶媒とを混合する。終濃度の下限については、好ましくは、１０．０（ｖ／ｖ）％以上であり、また、上限については、例えば、３０．０（ｖ／ｖ）％以下、好ましくは、２０．０（ｖ／ｖ）％以下である。濃度を上記下限以上とす

ることにより、有機溶媒混合によるＮｇ関連ペプチドの分解抑制が効果的に発揮される。また、濃度を上記上限以下とすることにより、有機溶媒の過剰添加によるＮｇ関連ペプチドの検出感度の低下を抑制することができる。さらに、アセトニトリルを使用した際には、好ましくは、上記範囲に加え、さらに好ましくは、１５．０（ｖ／ｖ）％以上、２０．０（ｖ／ｖ）％以下である。これらの濃度範囲とすることにより、より高い感度でＮｇ関連ペプチドを検出することができるため、例えば、後述する質量分析法により得られるマススペクトルにおいて、より多くの種類のＮｇ関連ペプチドのピークを検知することができる。また、生体試料１００体積部に対して、有機溶媒の添加量は、例えば、５．０体積部以上、好ましくは、１０．０体積部以上であり、また、例えば、２００体積部以下、好ましくは、５０．０体積部以下である。

[0018] 調製工程では、上記終濃度とするために、必要に応じて、緩衝液を添加することが好ましい。緩衝液としては、例えば、Ｔｒｉｓ緩衝液、リン酸緩衝液、ＨＥＰＥＳ緩衝液、酢酸アンモニウム緩衝液などが挙げられる。これにより、試料溶液のpHを中性にして上記終濃度に達成できるとともに、後述する精製工程で精製しやすくすることができる。緩衝液のｐＨは、中性であることが好ましく、例えば、ｐＨ６．０以上、好ましくは、６．５以上であり、また、例えば、８．５以下、好ましくは、８．０以下である。緩衝液の混合割合は、調製後のＮｇ関連ペプチド含有試料溶液に対して、例えば、５．０（ｖ／ｖ）％以上、好ましくは、１０．０（ｖ／ｖ）％以上であり、また、例えば、８０．０（ｖ／ｖ）％以下、好ましくは、４０．０（ｖ／ｖ）％以下である。また、有機溶媒１００体積部に対して、５０．０体積部以上、好ましくは、１００体積部以上であり、また、例えば、１０００体積部以下、好ましくは、５００体積部以下である。

[0019] なお、後述する精製工程を連続して実施する際には、第１結合工程にて後述する結合溶液のように、界面活性剤を上記緩衝液とともに生体試料に混合してもよい。

[0020] これにより、Ｎｇ関連ペプチド含有試料溶液が調製（製造）される。この試料溶液では、特定の有機溶媒が特定量、含有されているため、試料溶液中においてＮｇ関連ペプチドの分解を抑制することができる。すなわち、所定時間保存していても、Ｎｇ関連ペプチド含有量の経時的な減少が抑制されて、生体試料採取後からのＮｇ関連ペプチド量が変化しにくく、ほぼ一定である。そのため、所定時間保存後に測定（後述）を実施したとしても、保存時間による検出濃度の変化が抑制され、検出濃度のばらつきを抑制することができる。また、測定工程中で生じる分解も抑制することができる。そのため、測定工程の時間による検出濃度の変化が抑制され、検出濃度のばらつきを抑制することができる。

[0021] 本発明者は、生体から採取した血液などの生体試料の中に含有されるＮｇ関連ペプチドに注目し、Ｎｇ関連ペプチドは、生体試料中において経時的に分解（消化）されること、具体的には、Ng関連ペプチドは、ニューログラニンの７５番目のアミノ酸のＣ末端が、生体試料中のプロテアーゼによって経時的に切断されることを発見した。すなわち、分析対象としてＮｇ１－７８を例に挙げると、血液試料を生体から採取（分離）して分析する際に、採取から分析に至るまでの保存時間または分析準備時間中に、Ｎｇ１－７８が、Ｎｇ１－７５とＮｇ７６－７８とに徐々に分解されてしまい、Ｎｇ１－７８が当該時間に応じて変化（減少）していくことを見出した。そこで、さらに鋭意検討した結果、生体試料中に特定の有機溶媒を特定量存在させることにより、当該アミノ酸の分解が抑制されることを知見し、本発明の調製方法を完成するに至った。なお、生体中においても、Ｎｇ１－７８は常に分解されているが、その分Ｎｇ１－７８が生体から産出されるため、生体中では、Ｎｇ１－７８は一定に保たれており、上記減少が生じるのは、生体から切り離して、分析用の生体試料とした時点からである。

[0022] １－２．分析工程

第１の実施形態にかかる分析方法は、生体試料中のＮｇ関連ペプチドの分析方法であって、調製工程および測定工程を順に備える。調製工程は、上記

した調製方法であり、測定工程は、質量分析法を実施する。好ましい形態としては、測定工程の中で、精製工程を実施する。すなわち、測定工程が、Ｎｇ関連ペプチド含有試料溶液中のＮｇ関連ペプチドを精製する精製工程と、質量分析法を実施する検出工程とを順に備える。以下、この形態を詳述する。

[0023] ［精製工程］

精製工程は、好ましくは、アフィニティ精製である。アフィニティ精製としては、１回精製でも２回精製でも良いが、より高感度でＮｇ関連ペプチドを検出できる観点から、好ましくは、２回精製を実施する。この場合、精製工程は、第１結合工程（結合工程の一例）と、第１洗浄工程（洗浄工程の一例）と、第１溶出工程と、中性化工程と、第２結合工程と、第２洗浄工程と、第２溶出工程（溶出工程の一例）とをこの順に備える。以下、各工程を詳述する。

[0024] （第１結合工程）

第１結合工程では、調製工程で得られたＮｇ関連ペプチド含有試料溶液を第１担体に接触させる。これにより、試料溶液中のＮｇ関連ペプチドが第１担体に結合して、第１結合体が得られる。

[0025] 第１担体は、Ｎｇ関連ペプチドが結合可能なものであればよく、例えば、抗体固定化担体が挙げられる。

[0026] 第１担体に固定化されている抗体は、Ｎｇ関連ペプチドを認識可能な抗原結合部位を有する抗体（抗Ｎｇ関連ペプチド抗体）であり、例えば、Ｎｇ関連ペプチドを認識可能な抗原結合部位を有する免疫グロブリンまたはその断片が挙げられる。

[0027] 免疫グロブリンとしては、例えば、ＩｇＧ（ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４）、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＹ、ＩｇＤ、ＩｇＥなどが挙げられる。免疫グロブリン断片としては、例えば、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆ（ａｂ’）、Ｆ（ａｂ）、Ｆｄ、Ｆｖ、Ｌ鎖、Ｈ鎖などが挙げられる。より具体的には、クローンＮＧ２、ＮＧ７、ＥＰＲ２１１５２およびこれらの断片などであ

る。抗体は、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体のいずれでもよい。

[0028] 第１担体の材質としては、例えば、アガロース、セファロース、デキストラン、シリカゲル、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリアクリロニトリル、（メタ）アクリル酸系ポリマー、フッ素樹脂、金属錯体樹脂、ガラス、金属、磁性体などが挙げられる。

[0029] 第１担体の形状としては、球状（ビーズ形状を含む）、板状、針状、不定形などのいずれの形状であってもよく、また、マイクロデバイス内の流路壁などであってもよい。

[0030] この際、第１担体に加えて、必要に応じて、結合溶液をさらに添加してもよい。結合溶液は、好ましくは、界面活性剤を含有する中性緩衝液である。緩衝液としては、例えば、調製工程で上記した緩衝液と同様のものが挙げられる。結合溶液のｐＨは、例えば、ｐＨ６．０以上、好ましくは、６．５以上であり、また、例えば、８．５以下、好ましくは、８．０以下である。

[0031] 結合溶液に含有される界面活性剤としては、例えば、疎水基の炭素数が７以上１５以下（好ましくは、９以上１１以下）である中性界面活性剤が挙げられる。これにより、第１結合体への非特異的吸着を抑制したり、質量分析において、イオン化干渉を低減することができる。このような界面活性剤としては、例えば、ｎ－ノニル－β－Ｄ－マルトシド、ｎ－ノニル－β－Ｄ－チオマルトシド、ｎ－デシル－β－Ｄ－マルトシド、ｎ－ウンデシル－β－Ｄ－マルトシド（ＵＤＭ：n-Undecyl-β-D-maltoside）などのマルトースを親水性部分に有する界面活性剤；例えば、α－Ｄ－グルコピラノシルα－Ｄ－グルコピラノシド　モノデカノエート（トレハロースＣ１０）などのトレハロースを親水性部分に有する界面活性剤；例えば、ｎ－デシル－β－Ｄ－グルコシドなどのグルコースを親水性部分に有する界面活性剤などが挙げられる。これら界面活性剤は、１種単独で用いることができ、また、２種以上を併用することができる。

[0032] 結合溶液中の界面活性剤濃度は、例えば、０．０１％（ｗ／ｖ）以上、好ましくは、０．０５％（ｗ／ｖ）以上であり、また、例えば、１０％（ｗ／ｖ）以下、好ましくは、３％（ｗ／ｖ）以下である。界面活性剤濃度が上記範囲であれば、ミセルが充分に形成されるため、界面活性剤の効果を確実に発揮させることができる。

[0033] 第１結合工程の前に、必要に応じて、ＩｇＧ、ＩｇＭなどの抗体を除去する前処理などを実施してもよい。

[0034] （第１洗浄工程）

第１洗浄工程では、第１結合工程の後において、第１洗浄溶液を用いて第１結合体を洗浄する。

[0035] 第１洗浄溶液は、好ましくは、界面活性剤を含有する中性緩衝液である。これにより、疎水性の高い不要成分（血中タンパク質、脂質、糖脂質など）を効果的に除去することができる。第１洗浄溶液における中性緩衝液および界面活性剤としては、結合溶液で例示した中性緩衝液および界面活性剤と同様のものが挙げられる。

[0036] 第１洗浄溶液中の界面活性剤濃度は、例えば、０．０１％（ｗ／ｖ）以上、好ましくは、０．０２％（ｗ／ｖ）以上であり、また、例えば、５％（ｗ／ｖ）以下、好ましくは、２％（ｗ／ｖ）以下である。界面活性剤濃度が上記範囲であれば、ミセルが充分に形成されるため、界面活性剤の効果を確実に発揮させることができる。

[0037] 洗浄方法は、公知の方法を採用すればよく、好ましくは、複数回洗浄を実施する。例えば、界面活性剤を含有する中性緩衝液を用いて洗浄し、続いて、界面活性剤を含有しない中性緩衝液を用いて洗浄する。

[0038] 界面活性剤を含有しない中性緩衝液も、結合溶液で例示した中性緩衝液と同様のものを使用することができる。これにより、界面活性剤が第１結合体に残存することによる泡立ちを抑制することができる。

[0039] 洗浄方法としては、一般的な方法を採用すればよく、例えば、洗浄溶液内で担体を攪拌する方法、洗浄ノズルから洗浄溶液を噴射する方法などが挙げ

られる。これら中性緩衝液による洗浄後に、必要に応じて、水による洗浄をさらに実施してもよい。

[0040] （第１溶出工程）

第１溶出工程では、第１洗浄工程の後において、第１結合体を第１酸性溶液に接触させる。これにより、第１結合体からＮｇ関連ペプチドが解離して、第１酸性溶液にＮｇ関連ペプチドが溶出する。その結果、Ｎｇ関連ペプチドを含有する第１溶出液が得られる。

[0041] 第１酸性溶液としては、例えば、グリシン緩衝液、塩酸などの酸性水溶液が挙げられ、好ましくは、グリシン緩衝液が挙げられる。第１酸性溶液のｐＨは、例えば、３．５以下、好ましくは、３．０以下であり、また、例えば、０．５以上、好ましくは、１．０以上である。

[0042] 第１酸性溶液は、好ましくは、界面活性剤を含有する。これにより、第１結合体からＮｇ関連ペプチドをより確実に解離させることができる。また、溶出されたＮｇ関連ペプチドが、試験管、マイクロプレートなどの容器に付着することを抑制する。したがって、Ｎｇ関連ペプチドの回収率を確実に向上させて、検出感度を向上させることができる。第１酸性溶液に用いる界面活性剤としては、結合溶液で例示した界面活性剤と同様のものが挙げられる。また、第１酸性溶液中の界面活性剤濃度は、第１洗浄溶液中の界面活性剤濃度と同様である。

[0043] （中性化工程）

中性化工程では、第１溶出工程の後において、第１溶出液を中性緩衝液と混合する。これにより、第１溶出液が中性化して、Ｎｇ関連ペプチドを含有する精製溶液が得られる。

[0044] 中性化工程に用いる中性緩衝液は、好ましくは、界面活性剤を含有する。これにより、第２結合工程で第２結合体への非特異的吸着を抑制することができる。中性化工程に用いる中性緩衝液および界面活性剤としては、結合溶液で例示した中性緩衝液および界面活性剤と同様のものが挙げられる。また、中性緩衝液中の界面活性剤濃度は、第１結合溶液中の界面活性剤濃度と同

様である。

[0045] 得られる精製溶液のｐＨは、中性であって、例えば、ｐＨ６．０以上、好ましくは、６．５以上であり、また、例えば、８．５以下、好ましくは、８．０以下である。これにより、第２結合工程において、結合効率を向上させることができる。

[0046] （第２結合工程）

第２結合工程では、中性化工程の後において、精製溶液を第２担体に接触させる。これにより、精製溶液のＮｇ関連ペプチドが第２担体に結合して、第２結合体が得られる。

[0047] 第２担体としては、好ましくは、抗体固定化担体であり、具体的には、第１担体で例示した抗体固定化担体と同様のものが挙げられる。

[0048] （第２洗浄工程）

第２洗浄工程では、第２結合工程の後において、第２洗浄溶液を用いて第２結合体を洗浄する。

[0049] 第２洗浄溶液は、好ましくは、界面活性剤を含有する中性緩衝液である。これにより、例えば、疎水性の高い不要成分（血中タンパク質、脂質、糖脂質など）を効果的に除去することができる。第２洗浄溶液に用いる中性緩衝液および界面活性剤としては、結合溶液で例示した中性緩衝液および界面活性剤と同様のものが挙げられる。また、第２洗浄溶液中の界面活性剤濃度は、第１洗浄溶液中の界面活性剤濃度と同様である。

[0050] 洗浄方法は、公知の方法を採用すればよく、具体的には、第１洗浄工程で例示した洗浄方法と同様の方法を実施すればよい。

[0051] （第２溶出工程）

第２溶出工程では、第２洗浄工程の後において、第２結合体を、第２酸性溶液に接触させる。これにより、第２結合体からＮｇ関連ペプチドが解離して、第２酸性溶液にＮｇ関連ペプチドが溶出する。その結果、Ｎｇ関連ペプチドを含有する第２溶出液が得られる。

[0052] 第２酸性溶液を構成する酸性水溶液としては、第１溶出工程で例示した第

１酸性溶液と同様のものが挙げられ、好ましくは、塩酸が挙げられる。

[0053] 第２酸性溶液は、好ましくは、揮発性有機溶媒を含有する。これにより、第２結合体からＮｇ関連ペプチドを効率よく解離させ、第２酸性溶液に溶出させることができ、Ｎｇ関連ペプチドの回収率を向上させることができる。

[0054] 揮発性有機溶媒としては、水と任意の割合で混和する有機溶媒が挙げられ、例えば、アセトニトリル、メタノール、エタノール、アセトン、トルエン、イソプロパノール、ヘキサン、ブタノール、シクロヘキサン、エチレングリコール、ベンゼン、クロロホルム、アセトアルデヒド、トリエチルアミン、フェノール、ナフタレン、ホルムアルデヒド、テトラヒドロフラン、酢酸エチルなどが挙げられ、好ましくは、アセトニトリル、メタノール、エタノール、アセトン、イソプロパノールなどが挙げられる。これら有機溶剤は、１種単独で用いることができ、また、２種以上を併用することもできる。

[0055] 第２酸性溶液中の揮発性有機溶媒濃度は、例えば、１０％（ｖ／ｖ）以上、好ましくは、２５％（ｖ／ｖ）以上であり、また、例えば、９０％（ｖ／ｖ）以下、好ましくは、８０％（ｖ／ｖ）以下である。濃度が上記範囲内であれば、第２担体からＮｇ関連ペプチドが効率よく解離させることができ、また、質量分析時の感度（Ｓ／Ｎ比）を向上させることができる。

[0056] 第２酸性溶液は、好ましくは、メチオチンなどのアミノ酸をさらに含有する。これにより、質量分析装置に配置し、分析が開始するまでの間において、Ｎｇ関連ペプチドの酸化を低減させることができ、検出感度を向上させることができる。第２酸性溶液中のアミノ酸濃度は、例えば、０．０１ｍＭ以上、好ましくは、０．０５ｍＭ以上であり、また、例えば、５ｍＭ以下、好ましくは、１ｍＭ以下である。

[0057] 第２酸性溶液は、好ましくは、９ｋＤａ以上のタンパク質をさらに含有する。これにより、質量分析試料に上記タンパク質が含まれるため、質量分析時にタンパク質がプロトン受容体として作用し、Ng関連ペプチドを効率よくイオン化することでき、その結果、Ｎｇ関連ペプチドの検出感度を格段に向上させることができる。タンパク質の質量の上限は、例えば、１００ｋＤａ

以下、好ましくは、１５ｋＤａ以下である。このようなタンパク質としては、質量が９ｋＤａ以上であれば限定的でなく、具体的には、ウシ血清アルブミン（Bovine Serum Albumin;BSA）、シトクロム、オボアルブミン、リゾチームなどが挙げられる。第２酸性溶液におけるタンパク質の濃度は、例えば、１０ｎＭ以上、好ましくは、３０ｎＭ以上であり、また、例えば、６００ｎＭ以下、好ましくは、１５０ｎＭ以下である。

[0058] ［検出工程］

検出工程では、精製工程の後において、第２溶出液に対して質量分析法を実施して、Ｎｇ関連ペプチドを検出する。

[0059] 質量分析法におけるイオン化方法としては、例えば、ＭＡＬＤＩ（Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization;マトリックス支援レーザー脱離イオン化法）、ＥＳＩ（Electrospray ionization;エレクトロスプレーイオン化法）、ＡＰＣＩ（Atmospheric Pressure Chemical Ionization;大気圧化学イオン化法）などが挙げられる。試料溶液中の微量なＮｇ関連ペプチドを高感度で検出できる観点から、好ましくは、ＭＡＬＤＩが挙げられる。

[0060] 質量分析法としては、例えば、ＴＯＦ－ＭＳ（飛行時間型質量分析法）、ＩＴ－ＭＳ（イオントラップ型質量分析法）、ＩＴ－ＴＯＦ－ＭＳ（イオントラップ－飛行時間型質量分析法）、ＦＴＩＣＲ－ＭＳ（フーリエ変換イオンサイクロトロン型質量分析法）などが挙げられるが、これらに限定されない。イオン化法としてＭＡＬＤＩを使用した場合を、これらの質量分析法を総称して、ＭＡＬＤＩ－ＭＳとする。

[0061] ＭＡＬＤＩ－ＭＳによる具体的な検出操作としては、例えば、まず、ＭＡＬＤＩプレートにマトリックス含有溶液を滴下し、乾燥（結晶化）させることにより、マトリックスを配置する。続いて、そのマトリックス上に、第２溶出液を滴下および乾燥させて、ＭＡＬＤＩ－ＭＳ試料を得る。続いて、ＭＡＬＤＩ－ＭＳ試料にレーザーを照射させて、Ｎｇ関連ペプチドをイオン化させ、そのイオン化したペプチドを上記装置による検出器によって検知して、マススペクトルとして出力される。そして、そのマススペクトルを解析す

ることにより、生体試料に含まれるＮｇ関連ペプチドの種類および濃度などの分析結果を得ることができる。

[0062] マトリックスとしては、例えば、α－シアノ－４－ヒドロキシ桂皮酸（ＣＨＣＡ；α-cyano-4-hydroxycinnamic acid）、２，５-ジヒドロキシ安息香酸、シナピン酸、３－アミノキノリンなどが挙げられる。これらマトリックスは、１種単独で用いることができ、また、２種以上を併用することができる。

[0063] マトリックスを含有させる溶媒としては、例えば、アセトニトリル、トリフルオロ酢酸、メタノール、エタノール、水などが挙げられる。これら溶媒は、１種単独で用いることができ、また、２種以上を併用することができる。マトリックス含有溶液におけるマトリックス濃度は、例えば、０．１ｍｇ／ｍＬ以上、好ましくは０．５ｍｇ／ｍＬ以上であり、また、例えば、５０ｍｇ／ｍＬ以下、好ましくは、１０ｍｇ／ｍＬ以下である。

[0064] 好ましくは、マトリックスとともに、マトリックス添加剤を併用する。マトリックス添加剤としては、例えば、ホスホン酸基含有化合物、アンモニウム塩などが挙げられ、好ましくは、洗浄溶液の残存によるバックグランドへの悪影響を抑制できる観点から、ホスホン酸基含有化合物が挙げられる。ホスホン酸基含有化合物としては、例えば、ホスホン酸、メチルホスホン酸、フェニルホスホン酸、１－ナフチルメチルホスホン酸、メチレンジホスホン酸（ＭＤＰＮＡ；Methylenediphosphonic acid）、エチレンジホスホン酸、エタン－１－ヒドロキシ－１，１－ジホスホン酸、ニトリロトリホスホン酸、エチレンジアミノテトラホスホン酸などが挙げられる。マトリックス含有溶液におけるマトリックス添加剤濃度は、例えば、０．０１％（ｗ／ｖ）以上、好ましくは、０．１％（ｗ／ｖ）以上であり、また、例えば、１０％（ｗ／ｖ）以下、好ましくは、１％（ｗ／ｖ）以下である。

[0065] この分析方法によれば、Ｎｇ関連ペプチドの分析結果のばらつきを抑制することができる。特に、生体から採取した生体試料を所望時間保存した場合においても、保存時間ごとにおける測定値のばらつき（例えば、マススペク

トルにおける種々のＮｇ関連ペプチドのピーク強度や比率、それらから算出される濃度などのばらつき）を抑制することができる。

[0066] 本発明者は、上記調製方法の知見に基づき、さらに鋭意検討した結果、Ｎｇ関連ペプチドの分析に際し、生体試料に予め特定の有機溶媒を特定量存在させて、Ｎｇ関連ペプチドの分解を抑制した溶液を、分析用の測定試料として用いることにより、保存時間または分析準備時間に起因して生じるＮｇペプチド分析のばらつきを抑制できることを知見し、本発明の分析方法を完成するに至った。

[0067] １－３．変形例

上記実施形態では、検出工程として質量分析法を実施しているが、例えば、検出工程として、液体クロマトグラフィー法、免疫測定法、または、表面プラズモン共鳴法を実施してもよい。これらの測定方法は、測定試料として、上記調製工程で調製したＮｇ含有試料溶液を用いる以外は、公知または常法に従って実施すればよい。血液中の微小量のＮｇ関連ペプチドであっても確実に検出できる観点からは、検出工程として質量分析法を実施することが好ましい。

[0068] ２．態様

上述した複数の例示的な実施形態は、以下の態様の具体例であることが当業者により理解される。

[0069] （第１項）一態様に係るニューログラニン関連ペプチド含有試料溶液の調製方法は、ニューログラニン関連ペプチドを含有する生体試料と、相対極性(relative polarity)が０．２００以上、０．７００以下である有機溶媒とを混合して、前記有機溶媒の終濃度が５．０（ｖ／ｖ）％以上である試料溶液を調製してもよい。

[0070] （第２項）第１項の調製方法において、前記有機溶媒の終濃度が、５．０（ｖ／ｖ）％以上、２０．０（ｖ／ｖ）％以下であってもよい。

[0071] （第３項）第１または第２項に記載の調製方法において、前記生体試料が、血液であってもよい。

[0072] （第４項）第１～第３のいずれか一項に記載の調製方法において、前記生体試料に緩衝液をさらに混合してもよい。

[0073] （第５項）第１～第４のいずれか一項に記載の調製方法において、前記有機溶媒が、ジメチルスルホキシドであってもよい。

[0074] （第６項）第１～第４のいずれか一項に記載の調製方法において、前記有機溶媒が、アセトニトリルであってもよい。

[0075] （第７項）一態様に係るニューログラニン関連ペプチドの分析方法は、第１～第６のいずれか一項に記載の調製方法を実施する調製工程と、前記試料溶液を用いて、質量分析法、液体クロマトグラフィー法、免疫測定法、または、表面プラズモン共鳴法を実施する測定工程とを備えていてもよい。

[0076] （第８項）第７項に記載の分析方法において、前記測定工程は、（ａ）前記試料溶液を担体に接触させて、前記ニューログラニン関連ペプチドが前記担体に結合した結合体を得る結合工程と、（ｂ）前記結合体を、洗浄溶液を用いて、洗浄する洗浄工程と、（ｃ）前記結合体を酸性溶液に接触させて、前記ニューログラニン関連ペプチドが前記酸性溶液に溶出した溶出液を得る溶出工程と、（ｄ）前記溶出液中の前記ニューログラニン関連ペプチドを質量分析法により検出する検出工程とを備えていてもよい。

[0077] （第９項）第８項に記載の分析方法において、前記質量分析法のイオン化法が、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法であってもよい。

実施例

[0078] 次に実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明の範囲はこれらによって限定されない。

[0079] ＜実施例１＞

［調製工程］

界面活性剤を含有する緩衝液（０．１％ｎ－ウンデシル－β－Ｄ－マルトシド（ＵＤＭ）、８００ｍＭ　ＧｌｃＮＡｃ、１００ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、３００ｍＭ　ＮａＣｌ；ｐＨ７．４）２００μＬに、ＤＭＳＯ（ジメチルスルホキシド）５０μＬを混合して、ＤＭＳＯ濃度が２０．０（ｖ／ｖ）

％となるＤＭＳＯ含有緩衝液を調製した。続いて、この緩衝液に、安定同位体標識Ｎｇ５０－７８（ＳＩＬ－Ｎｇ５０－７８；東レリサーチセンター社製）が５０ｐＭ、Ｈｉｓタグ付きのｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔＮｇ（ｒＮｇ；ａｂｃａｍ社製）が６ｎＭとなるように混合して、Ｎｇ・ＤＭＳＯ含有緩衝液を調製した。なお、ＳＩＬ－Ｎｇ５０－７８は、ＰｒｏとＶａｌの炭素原子および窒素原子がそれぞれ^{13}Ｃと^{15}Ｎで置換されている。

[0080] 次いで、Ｎｇ・ＤＭＳＯ含有緩衝液２５０μＬに、市販のヒト血漿試料２５０μＬを混合した。これにより、ＤＭＳＯの終濃度が１０．０（ｖ／ｖ）％となるＮｇ関連ペプチド含有試料溶液を調製した。このＮｇ関連ペプチド含有試料溶液を、室温で３時間インキュベーションした。

[0081] ［精製工程］

（第１結合工程、第１洗浄工程、第１溶出工程）

ヒトNeurogranin（Ｎｇ）の５２－６３残基をエピトープとする抗Ｎｇ抗体（ＩｇＧ１）のクローンＮＧ２（BioLegend社製）を用意した。抗Ｎｇ抗体１００μｇに対して磁性ビーズ（Dynabeads M-270 Epoxy）５．５ｍｇを、固定化緩衝液（１．５Ｍ硫酸アンモニウムを含有する０．１Ｍリン酸緩衝液；ｐＨ７．４）中で、３７℃で１６～２４時間反応させた。これにより、抗体固定化担体である抗体ビーズを作製した。

[0082] インキュベーションしたＮｇ関連ペプチド含有試料溶液を、氷上で５～６０分静置した後、上記抗体ビーズを混合し、氷上または４℃で１時間振盪させた。その後、抗体ビーズを、第１洗浄緩衝液（０．０５％ＵＤＭ、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ；ｐＨ７．４）１００μＬで１または３回洗浄し、５０ｍＭ酢酸アンモニウム緩衝液５０μＬで１または２回洗浄した。その後、抗体ビーズを、第１酸性溶液（０．０５％ＵＤＭ、５０ｍＭグリシン緩衝液；ｐＨ２．８）に接触させて、Ｎｇ関連ペプチドを第１酸性溶液に溶出させた。これにより、Ｎｇ関連ペプチドを含む第１溶出液を得た。

[0083] （中性化工程）

第１溶出液を中性緩衝液（０．１％ＵＤＭ、８００ｍＭ　ＧｌｃＮＡｃ、３００ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、３００ｍＭ　ＮａＣｌ；ｐＨ７．４）と混合して、精製溶液を得た。

[0084]　（第２結合工程、第２洗浄工程、第２溶出工程）

精製溶液を抗体ビーズと混合し、氷上または４℃で１時間振盪させた。その後、抗体ビーズを、第２洗浄緩衝液（０．０５％ＵＤＭ、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ；ｐＨ７．４）５０μＬで２または５回洗浄し、５０ｍＭ酢酸アンモニウム緩衝液５０μＬで１または２回洗浄し、水３０μＬで１回洗浄した。その後、抗体ビーズを、第２酸性溶液（５ｍＭ塩酸と０．１ｍＭメチオニンとを含む７０％（ｖ／ｖ）アセトニトリル水溶液、５０ｎＭ　ＢＳＡ）に接触させて、Ｎｇ関連ペプチドを第２酸性溶液に溶出させた。これにより、Ｎｇ関連ペプチドを含む第２溶出液を得た。

[0085]　［検出工程］

質量分析装置として、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ装置であるAXIMA Performance (Shimadzu/KRATOS,Manchester,UK)を用いた。Ｌｉｎｅａｒ　ＴＯＦ用のマトリックスとしてα－シアノ－４－ヒドロキシ桂皮酸（ＣＨＣＡ）を用い、マトリックス添加剤としてメチレンジホスホン酸（ＭＤＰＮＡ）を用い、溶媒としてアセトニトリルを用いて、２ｍｇ／ｍＬ　ＣＨＣＡ／０．２％（ｗ／ｖ）ＭＤＰＮＡマトリックス溶液を調製した。ＭＡＬＤＩプレート(μFocus MALDI plate 900μm(Hudson Surface Technology,Inc.,Fort Lee,NJ))の４ｗｅｌｌに、マトリックス溶液を０．５μＬずつ滴下し、乾燥させた後、さらに第２溶出液を１μＬずつ滴下し、乾燥させた。

[0086]　次いで、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳを作動させて、Ｎｇ関連ペプチド（ＳＩＬ－Ｎｇ５０－７８、ＳＩＬ－Ｎｇ５０－７５、ｒＮｇ１－７８およびｒＮｇ１－７５）を検出した。設定条件として、マススペクトルデータを、ポジティブイオンモードのＬｉｎｅａｒ　ＴＯＦで取得した。１ｗｅｌｌに対して４００スポット、１６０００ショットずつ積算した。Ｌｉｎｅａｒ　ＴＯＦのｍ／ｚ値はピークのアベレージマスで表示した。ｍ／ｚ値は、外部標

準としてhuman angiotensin IIおよびhuman ACTH fragment 18-39、bovine insulin oxidized beta-chain、bovine insulin、cytochrome cを用いてキャリブレーションした。

[0087] なお、安定同位体標識していないＮｇ５０－７８およびＮｇ５０－７５、recombinantではないＮｇ１－７８およびＮｇ１－７５を対象とすると、もともと血漿中に存在しているＮｇ５０－７８、Ｎｇ５０－７５、Ｎｇ１－７８およびＮｇ１－７５と区別がつかなくなり、分解量が正確に評価できないため、ヒト血漿中には存在しない安定同位体標識したＮｇ５０－７８およびＮｇ５０－７５、Hisタグの付いているｒＮｇ１－７８およびｒＮｇ１－７５を検出対象とした。

[0088] 表１に、マススペクトルで検出したＮｇ関連ペプチドを示す。表中の＊は、ｒＮｇ１－７５とｒＮｇ１－７８は、二価イオンピークのＴｈｅｏｒｅｔｉｃａｌ　ａｖｅｒａｇｅ　ｍ／ｚを示す。

[0089] [表1]

ペプチド名	配列	Theoretical average m/z	配列番号
SIL-Ng50-75	ERGRKGPGPGGPGGAGVARGGAGGGP	2217.5	1
SIL-Ng50-78	ERGRKGPGPGGPGGAGVARGGAGGGPSGD	2476.7	2
rNg1-75	GSSHHHHHHSSGLVPRGSHMGSMDCCTENACSKPDDDILDIPLDDPGAN AAAAKIQASFRGHMARKKIKSGERGRKGPGPGGPGGAGVARGGAGGGP	4834.4 *	3
rNg1-78	GSSHHHHHHSSGLVPRGSHMGSMDCCTENACSKPDDDILDIPLDDPGAN AAAAKIQASFRGHMARKKIKSGERGRKGPGPGGPGGAGVARGGAGGGPSGD	4963.0 *	4

[0090] ［終濃度の変更］

ＤＭＳＯおよび緩衝液の配合量を変更して、調製工程で得られるＮｇ関連ペプチド含有試料溶液のＤＭＳＯ濃度を、それぞれ、０～２５．０（ｖ／ｖ％）（具体的には、０％、０．０５％、０．２５％、０．５％、２．５％、５．０％、１０．０％、１５．０％、２０．０％、２５．０％）となるように変更した。それ以外は、上記と同様にして、上記調製工程～検出工程を実施した。

[0091] これらの結果を図１～図６に示す。具体的には、Ｎｇ関連ペプチド含有試

料溶液におけるＤＭＳＯ濃度ごとのマススペクトルを図１（終濃度０～５％）および図２（終濃度０～３０％）に示し、被分解ペプチドに対する分解ペプチドの強度比とＤＭＳＯ濃度との関係を示すグラフを図３～４（ＳＩＬ－Ｎｇ５０－７５／ＳＩＬ－Ｎｇ５０－７８）および図５～６（ｒＮｇ１－７５／ｒＮｇ１－７８）に示す。

[0092] ＜比較例１＞

調製工程において、ＤＭＳＯを混合せずに（すなわち、ＤＭＳＯ濃度を０％とする）、かつ、インキュベーション時間を０分、１時間、３時間のそれぞれに設定した以外は、上記と同様に、上記調製工程～検出工程を実施した。

[0093] これらの結果を図７～図９に示す。具体的には、生体から採取したＮｇ関連ペプチドが分解されることを立証するために、ＤＭＳＯを含まないＮｇ関連ペプチド含有試料溶液を用いた場合の、インキュベーション時間ごとにおけるマススペクトルを図７に示し、被分解ペプチドに対する分解ペプチドの強度比とインキュベーション時間との関係を示すグラフを図８（ＳＩＬ－Ｎｇ５０－７５／ＳＩＬ－Ｎｇ５０－７８）および図９（ｒＮｇ１－７５／ｒＮｇ１－７８）に示す。

[0094] ＜考察１＞

（１）ＤＭＳＯを添加しない場合における血漿中におけるＮｇの分解

図７から、インキュベーション時間が増加するごとに、ＳＩＬ－Ｎｇ５０－７５のピーク強度およびｒＮｇ１－７５のピーク強度が増加し、図８および図９から、無傷のＳＩＬ－Ｎｇ５０－７８に対するＳＩＬ－Ｎｇ５０－７５の比率、無傷なｒＮｇ１－７８に対するｒＮｇ１－７５の比率が増加している。このことから、血漿中のプロテアーゼの影響により、経時的にＮｇ７５のＣ末端側で切断されていくことが分かる。

[0095] （２）ＤＭＳＯ添加によるＮｇ分解抑制効果

図１～図６は、ＤＭＳＯを添加した試料溶液の状態で３時間インキュベーションした後の分析結果である。図１および図２から、ＳＩＬ－Ｎｇ５０－

７５のピークおよびｒＮｇ１－７５のピークは、ＤＭＳＯ濃度５．０％以上の範囲から、ノイズのピークとほぼ変わらなくなっている。また、図３～図６から、無傷のＳＩＬ－Ｎｇ５０－７８に対するＳＩＬ－Ｎｇ５０－７５の比率、および、無傷なｒＮｇ１－７８に対するｒＮｇ１－７５の比率が、ＤＭＳＯ濃度が向上すればするほど減少しており、特に、ＤＭＳＯ濃度が５．０％以上である範囲では十分に低い値となっている。このことから、ＤＭＳＯ濃度が５．０％以上であれば、Ｎｇ分解抑制効果が十分に発揮されていることが分かる。また、無傷のＳＩＬ－Ｎｇ５０－７８およびｒＮｇ１－７８の量が経時的に安定（一定）になるため、質量分析結果において、同一の生体試料から得られた測定試料に対して、これらの分析結果のばらつきを抑制できることも分かる。

[0096] なお、図６から、ＤＭＳＯ濃度が２５．０％以上である場合、無傷なｒＮｇ１－７８に対するｒＮｇ１－７５の比率が増加傾向となっている。これは、ＤＭＳＯの過剰添加により、ｒＮｇ１－７８の立体構造が変化して、抗原抗体反応性が低下してしまい、その結果、ｒＮｇ１－７８のピーク強度が減少したためと推測される。

[0097] ＜実施例２＞

ＤＭＳＯの代わりに、アセトン、ジメチルホルムアミド、ＡＣＮ（アセトニトリル）、２－プロパノール、または、エタノールを混合し、かつ、終濃度を１０．０％とした以外は、実施例１と同様にして、Ｎｇ関連ペプチド含有試料溶液を調製して、室温で３時間インキュベーションした。次いで、実施例１と同様にして、精製工程および検出工程を実施した。

[0098] ＜比較例２＞

ＤＭＳＯの代わりに、メタノール、または、トルエンを混合し、かつ、終濃度を１０．０％とした以外は、実施例１と同様にして、Ｎｇ関連ペプチド含有試料溶液を調製して、室温で３時間インキュベーションした。次いで、実施例１と同様にして、精製工程および検出工程を実施した。

[0099] このときの被分解ペプチドに対する分解ペプチドの強度比を示すグラフを

、図１０（ＳＩＬ－Ｎｇ５０－７５／ＳＩＬ－Ｎｇ５０－７８）および図１１（ｒＮｇ１－７５／ｒＮｇ１－７８）に示す。また、実施例および比較例で用いた有機溶媒の相対極性を、表２に示す。

[0100] [表2]

有機溶媒	相対極性
水	1
メタノール	0.762
エタノール	0.654
２－プロパノール	0.546
ACN	0.460
DMSO	0.444
ジメチルホルムアミド	0.386
アセトン	0.355
トルエン	0.099

[0101] ＜考察２＞

図１０および図１１から、アセトン、ジメチルホルムアミド、ＡＣＮ、２－プロパノール、および、エタノールが、ＤＭＳＯと同様に、Ｎｇ分解抑制効果を有することが分かった。なお、これは、（１）非極性分子は、血漿中のＮｇ分解酵素と疎水性相互作用して、当該Ｎｇ分解酵素の立体構造を支える疎水性相互作用を遮断して、当該Ｎｇ分解酵素を変性させる、その一方、（２）有機溶媒の極性基が、Ｎｇ分解酵素の極性基と水素結合を形成することにより、Ｎｇ分解酵素を変性させると推測され、これら（１）（２）によ

る極性および非極性のバランスから、ある特定の範囲内の相対極性（０．２００以上、０．７００以下）を有する有機溶媒が、とりわけ効果的にＮｇ分解酵素を変性させて、Ｎｇ分解作用を低減させているものと考えられるが、本発明はこれらの推測メカニズムに限定されない。

[0102] ＜実施例３＞

ＤＭＳＯの代わりにＡＣＮを混合し、終濃度をそれぞれ、０～３０．０（ｖ／ｖ％）（具体的には、０％、０．０５％、０．２５％、０．５％、２．５％、５．０％、１０．０％、１５．０％、２０．０％、２５．０％、３０．０％）とした以外は、実施例１と同様にして、Ｎｇ関連ペプチド含有試料溶液を調製した。その後、これらを室温で３時間インキュベーションした。次いで、実施例１と同様にして、精製工程および検出工程を実施した。

[0103] このときの終濃度０～２０％までのマススペクトル結果を、図１２～図１４に示す。マススペクトルで検出したＮｇ関連ペプチドを、表３に示す。表中の＊は、二価イオンピークのＴｈｅｏｒｅｔｉｃａｌ ａｖｅｒａｇｅ ｍ／ｚを示す。

[0104] [表3]

ペプチド名	配列	Theoretical average m/z	配列番号
Ng48-78	SGERGRKGPGPGG PGGAGVARGGAGGGPSGD	2590.7	5
Ng46-78*	IKSGERGRKGPGPGGPGGAGVARGGAGGGPSGD	1416.5*	6
Ng46-78	IKSGERGRKGPGPGGPGGAGVARGGAGGGPSGD	2832.1	6
Ng45-78	KIKSGERGRKGPGPGGPGGAGVARGGAGGGPSGD	2960.3	7
Ng44-78	KKIKSGERGRKGPGPGGPGGAGVARGGAGGGPSGD	3088.4	8
Ng39-78*	GHMARKKIKSGERGRKGPGPGGPGGAGVARGGAGGGPSGD	1821.0*	9
Ng39-78	GHMARKKIKSGERGRKGPGPGGPGGAGVARGGAGGGPSGD	3641	9
Ng33-78*	IQASFRGH MARKKIKSGERGRKGPGPGGPGGAGVARGGAGGGPSGD	2172.5*	10
Ng33-78	IQASFRGH MARKKIKSGERGRKGPGPGGPGGAGVARGGAGGGPSGD	4343.9	10
Ng45-68	KIKSGERGRKGPGPGGPGGAGVAR	2247.5	11
Ng44-68	KKIKSGERGRKGPGPGGPGGAGVAR	2375.7	12
SIL-Ng50-75	ERGRKGPGPGGPGGAGVARGGAGGGP	2217.5	1
SIL-Ng50-78	ERGRKGPGPGGPGGAGVARGGAGGGPSGD	2476.7	2
rNg1-75*	GSSHHHHHHSSGLVPRGSHMGSMDCCTENACSKPDDDILDIPLDDPGAN AAAAKIQASFRGHMARKKIKSGERGRKGPGPGGPGGAGVARGGAGGGP	4834.4 *	3
rNg1-78*	GSSHHHHHHSSGLVPRGSHMGSMDCCTENACSKPDDDILDIPLDDPGAN AAAAKIQASFRGHMARKKIKSGERGRKGPGPGGPGGAGVARGGAGGGPSGD	4963.0 *	4

[0105] ＜考察３＞

図１２～図１４から、ＡＣＮ濃度が１０．０～２０．０％である場合、特定のＮｇペプチド（Ｎｇ３３－７８、Ｎｇ４５－６８，Ｎｇ４５－６８、Ｎｇ４８－７８、Ｎｇ４６－７８、Ｎｇ４５－７８、Ｎｇ３９－７８，Ｎｇ３３－７８）のピークが明確に観察されているため、シグナル強度が増加しており、感度が向上している。さらに、ＡＣＮ濃度が１５．０～２０．０％である場合、上記に加えて、Ｎｇ４６－７８およびＮｇ３９－７８の２つの二価イオンピークも観察されており、感度がさらに向上している。一方、ＡＣＮ濃度が５．０％以下および２５．０％以上では、上記ピークが明確には観察されなかった。また、ＡＣＮ以外の上記有機溶媒（ＤＭＳＯ、アセトン、ジメチルホルムアミド、ＡＣＮ、２－プロパノール、エタノール、メタノール、トルエン）の分析結果であるマススペクトルにおいても、上記ピークが明確に観察されなかった。

[0106] ＡＣＮ添加によるＮｇ関連ペプチドの感度向上については、ＡＣＮは、タンパク質やペプチド間の疎水性相互作用を弱める働きを有するため、血漿中のタンパク質に吸着していたＮｇ関連ペプチドを遊離させ易くし、抗体がエピトープにアクセスし易くなるためと考えられるが、本発明はこれらの推測メカニズムに限定されない。

請求の範囲

[請求項1] ニューログラニン関連ペプチドを含有する生体試料と、相対極性が０．２００以上０．７００以下である有機溶媒とを混合して、前記有機溶媒の終濃度が５．０（ｖ／ｖ）％以上である試料溶液を調製する、ニューログラニン関連ペプチド含有試料溶液の調製方法。

[請求項2] 前記有機溶媒の終濃度が、５．０（ｖ／ｖ）％以上、２０．０（ｖ／ｖ）％以下である、請求項１に記載の調製方法。

[請求項3] 前記生体試料が、血液である、請求項１に記載の調製方法。

[請求項4] 前記生体試料に緩衝液をさらに混合する、請求項１に記載の調製方法。

[請求項5] 請求項１～４のいずれか一項に記載の調製方法を実施する調製工程と、

前記試料溶液を用いて、質量分析法、液体クロマトグラフィー法、免疫測定法、または、表面プラズモン共鳴法を実施する測定工程とを備える、ニューログラニン関連ペプチドの分析方法。

[請求項6] 前記測定工程は、

（ａ）前記試料溶液を担体に接触させて、前記ニューログラニン関連ペプチドが前記担体に結合した結合体を得る結合工程と、

（ｂ）前記結合体を、洗浄溶液を用いて、洗浄する洗浄工程と、

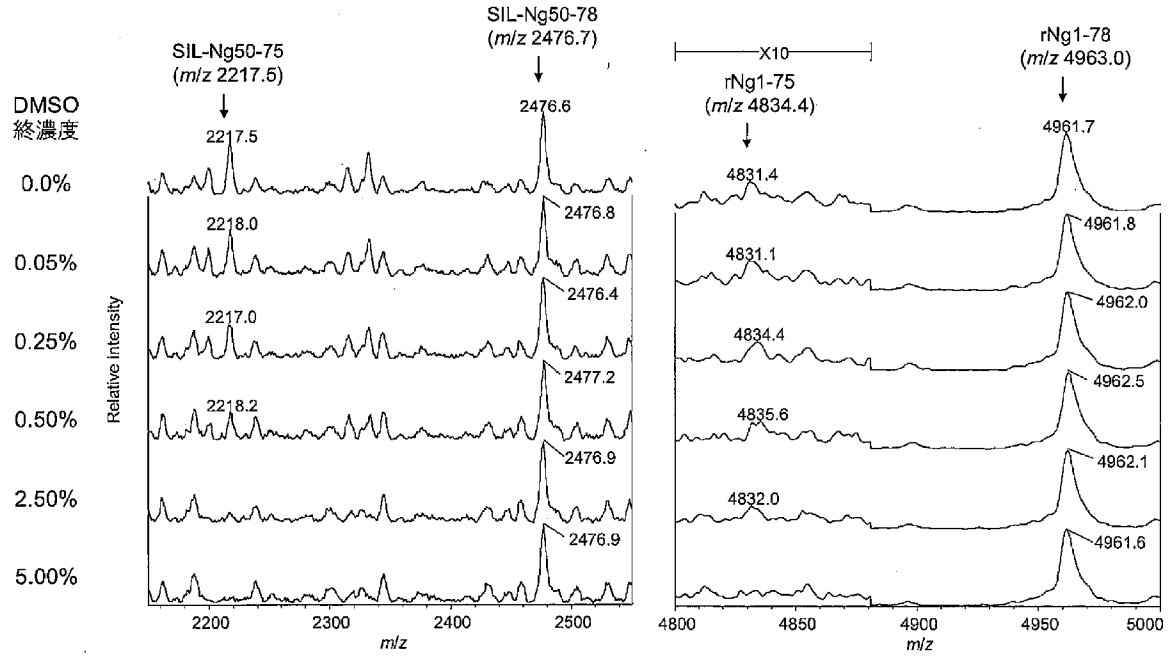
（ｃ）前記結合体を酸性溶液に接触させて、前記ニューログラニン関連ペプチドが前記酸性溶液に溶出した溶出液を得る溶出工程と、

（ｄ）前記溶出液中の前記ニューログラニン関連ペプチドを質量分析法により検出する検出工程と

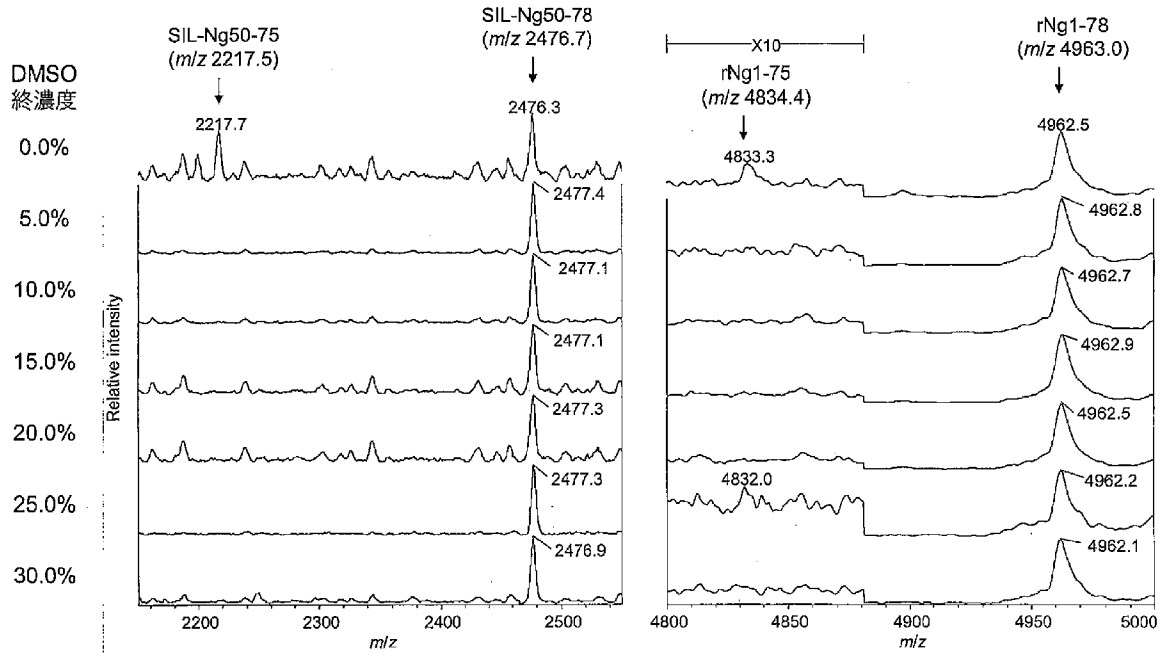
を備える、請求項５に記載の分析方法。

[請求項7] 前記質量分析法のイオン化法が、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法である、請求項６に記載の分析方法。

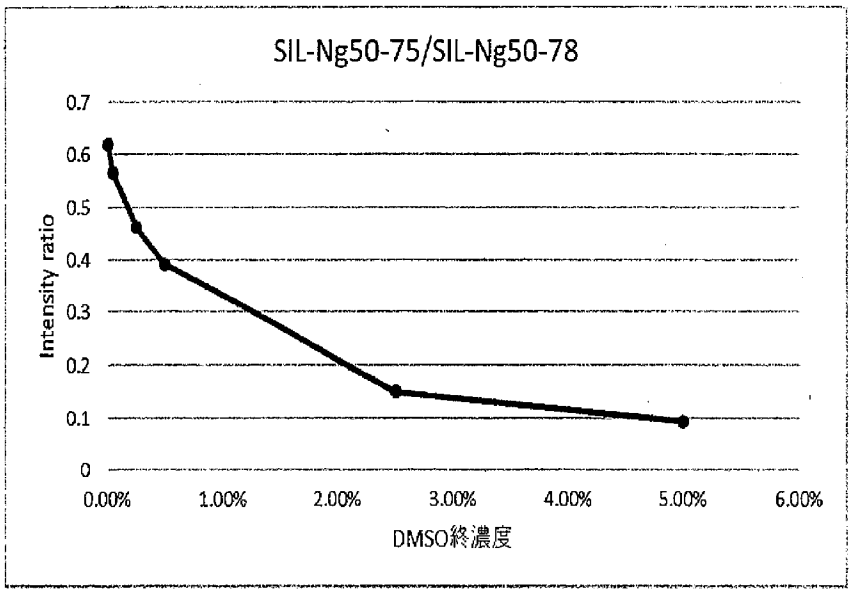
[図1]


SIL-Ng50-75
(m/z 2217.5)
SIL-Ng50-78
(m/z 2476.7)
X10
rNg1-75
(m/z 4834.4)
rNg1-78
(m/z 4963.0)
DMSO
終濃度
0.0%
0.05%
0.25%
0.50%
2.50%
5.00%
2217.5
2476.6
4831.4
4961.7
2218.0
2476.8
4831.1
4961.8
2217.0
2476.4
4834.4
4962.0
2218.2
2477.2
4835.6
4962.5
2476.9
4832.0
4962.1
2476.9
4961.6
Relative intensity
2200
2300
2400
2500
4800
4850
4900
4950
5000
m/z

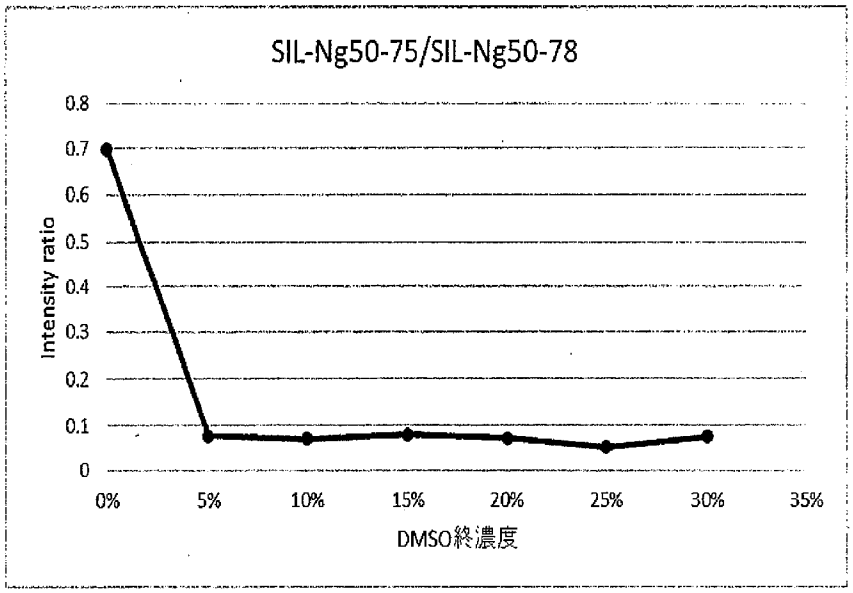
[図2]


SIL-Ng50-75
(m/z 2217.5)
SIL-Ng50-78
(m/z 2476.7)
X10
rNg1-75
(m/z 4834.4)
rNg1-78
(m/z 4963.0)
DMSO
終濃度
0.0%
5.0%
10.0%
15.0%
20.0%
25.0%
30.0%
2217.7
2476.3
4833.3
4962.5
2477.4
4962.8
2477.1
4962.7
2477.1
4962.9
2477.3
4962.5
2477.3
4832.0
4962.2
2476.9
4962.1
Relative intensity
2200
2300
2400
2500
4800
4850
4900
4950
5000
m/z

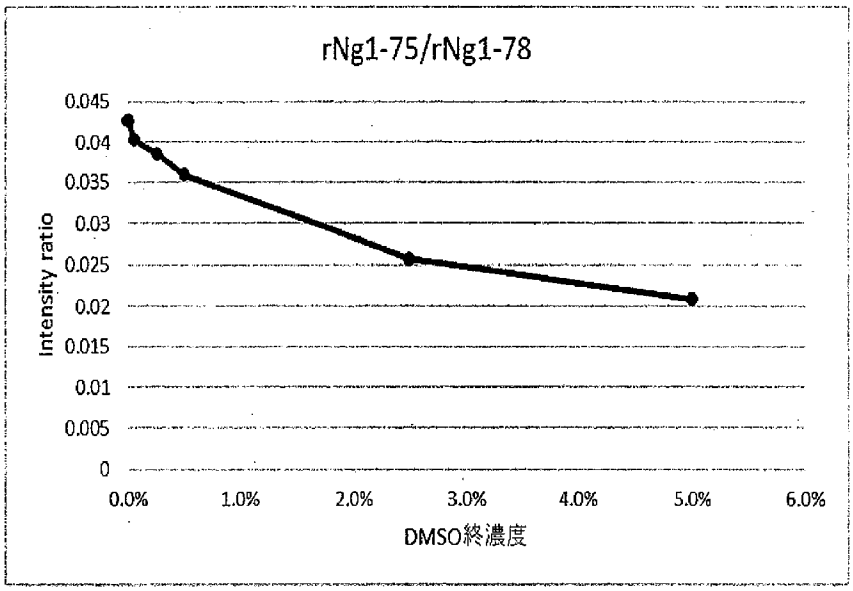
[図3]


SIL-Ng50-75/SIL-Ng50-78
Intensity ratio
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0.00%
1.00%
2.00%
3.00%
4.00%
5.00%
6.00%
DMSO終濃度

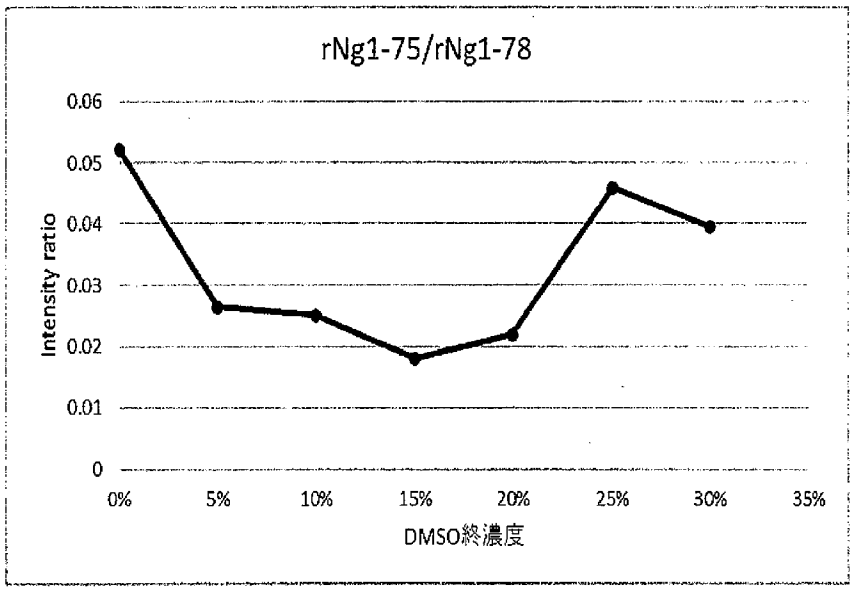
[図4]


SIL-Ng50-75/SIL-Ng50-78
Intensity ratio
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0%
5%
10%
15%
20%
25%
30%
35%
DMSO終濃度

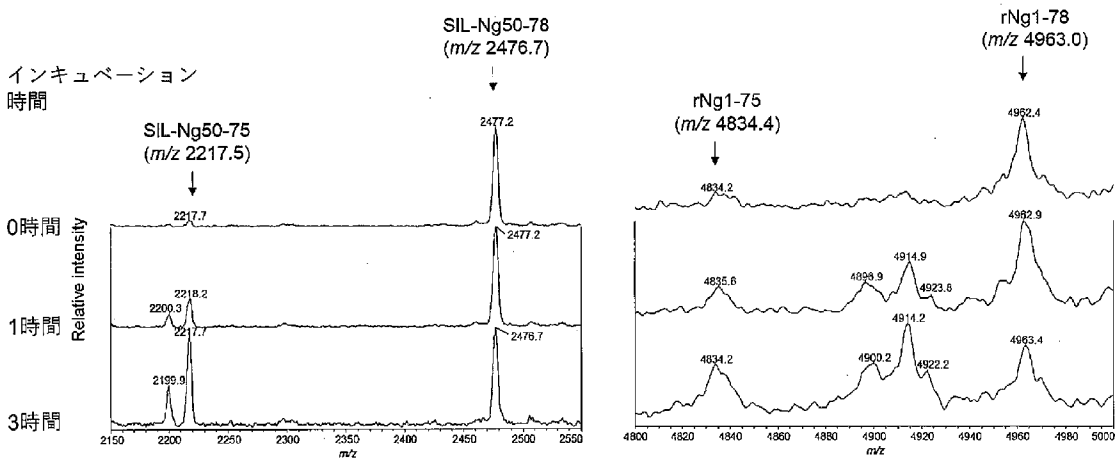
[図5]


rNg1-75/rNg1-78
Intensity ratio
0.045
0.04
0.035
0.03
0.025
0.02
0.015
0.01
0.005
0
0.0%
1.0%
2.0%
3.0%
4.0%
5.0%
6.0%
DMSO終濃度

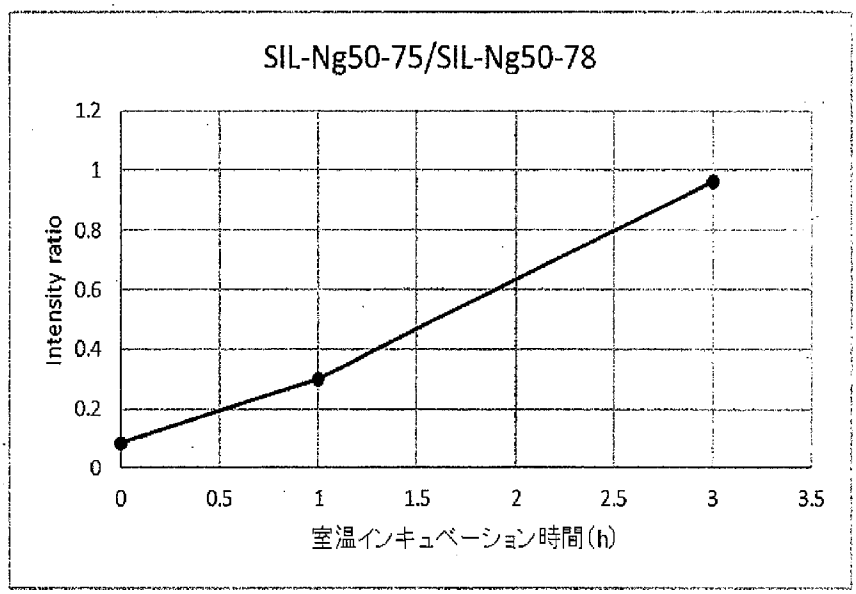
[図6]


rNg1-75/rNg1-78
Intensity ratio
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
0%
5%
10%
15%
20%
25%
30%
35%
DMSO終濃度

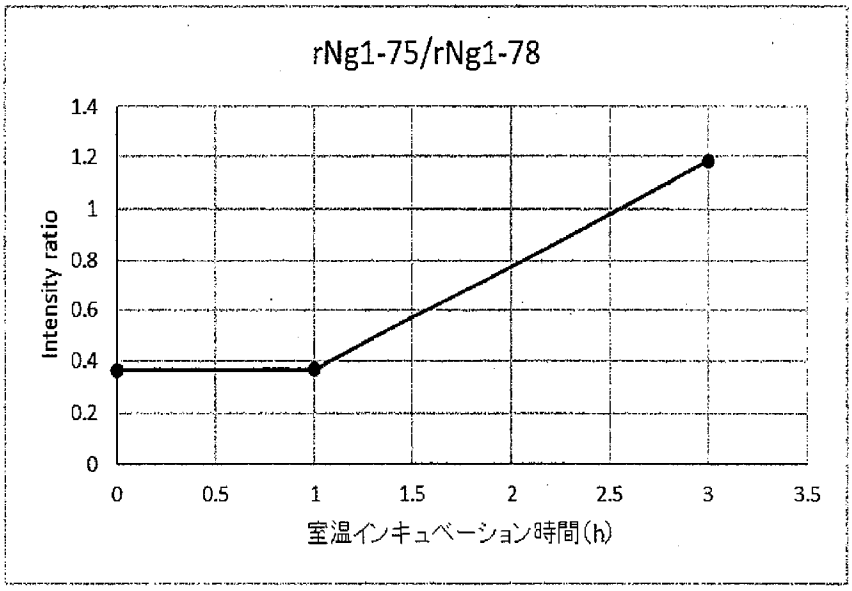
[図7]


インキュベーション
時間
SIL-Ng50-75
(m/z 2217.5)
SIL-Ng50-78
(m/z 2476.7)
rNg1-75
(m/z 4834.4)
rNg1-78
(m/z 4963.0)
0時間
1時間
3時間
Relative intensity
m/z

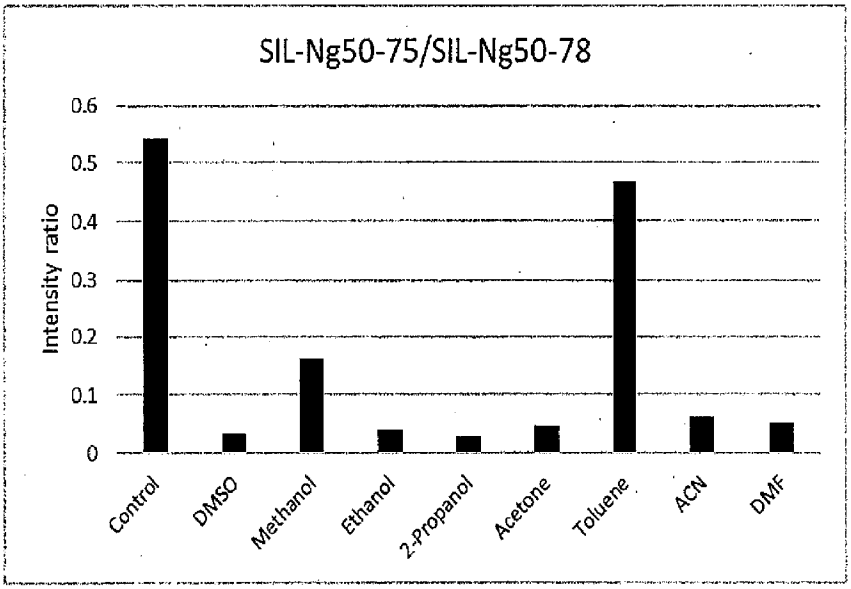
[図8]


SIL-Ng50-75/SIL-Ng50-78
Intensity ratio
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
室温インキュベーション時間(h)

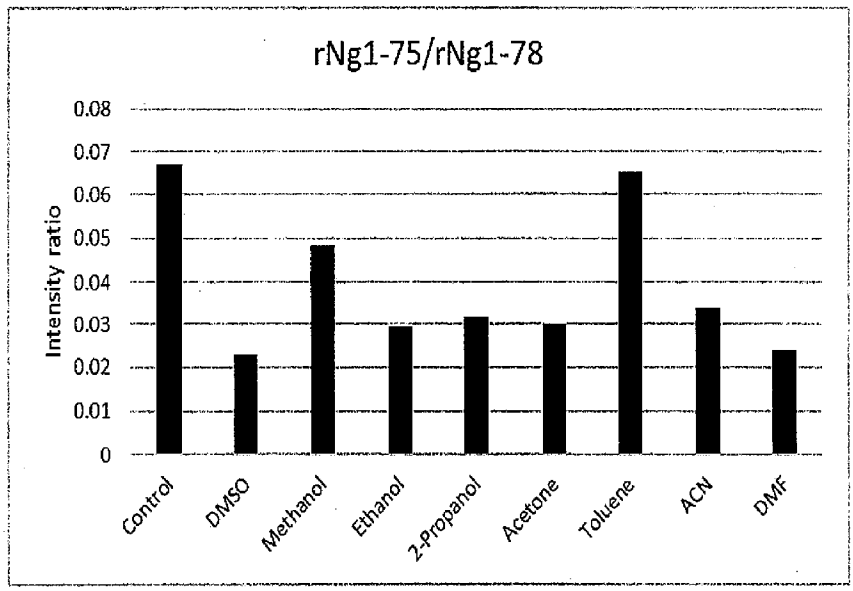
[図9]


rNg1-75/rNg1-78
Intensity ratio
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
室温インキュベーション時間(h)

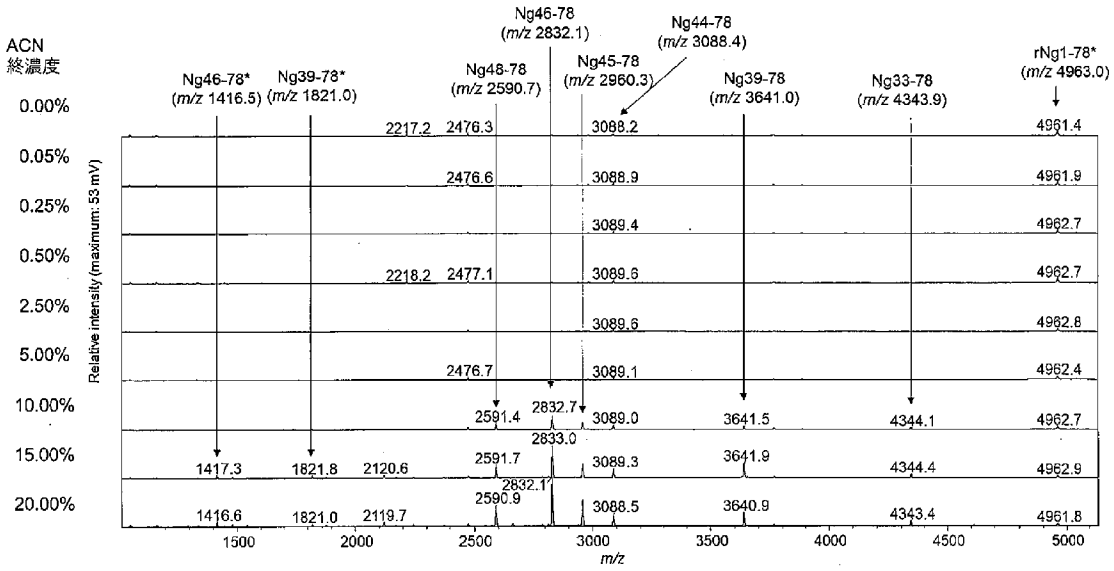
[図10]


SIL-Ng50-75/SIL-Ng50-78
Intensity ratio
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
Control
DMSO
Methanol
Ethanol
2-Propanol
Acetone
Toluene
ACN
DMF

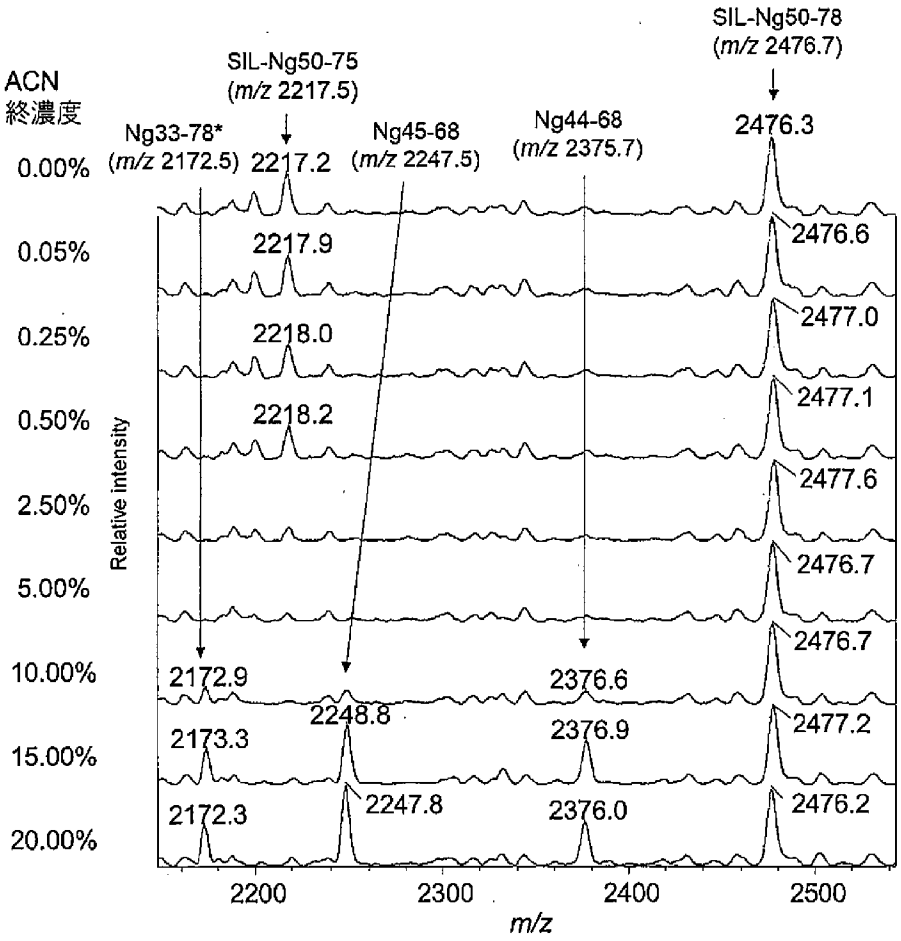
[図11]


rNg1-75/rNg1-78
Intensity ratio
0.08
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
Control
DMSO
Methanol
Ethanol
2-Propanol
Acetone
Toluene
ACN
DMF

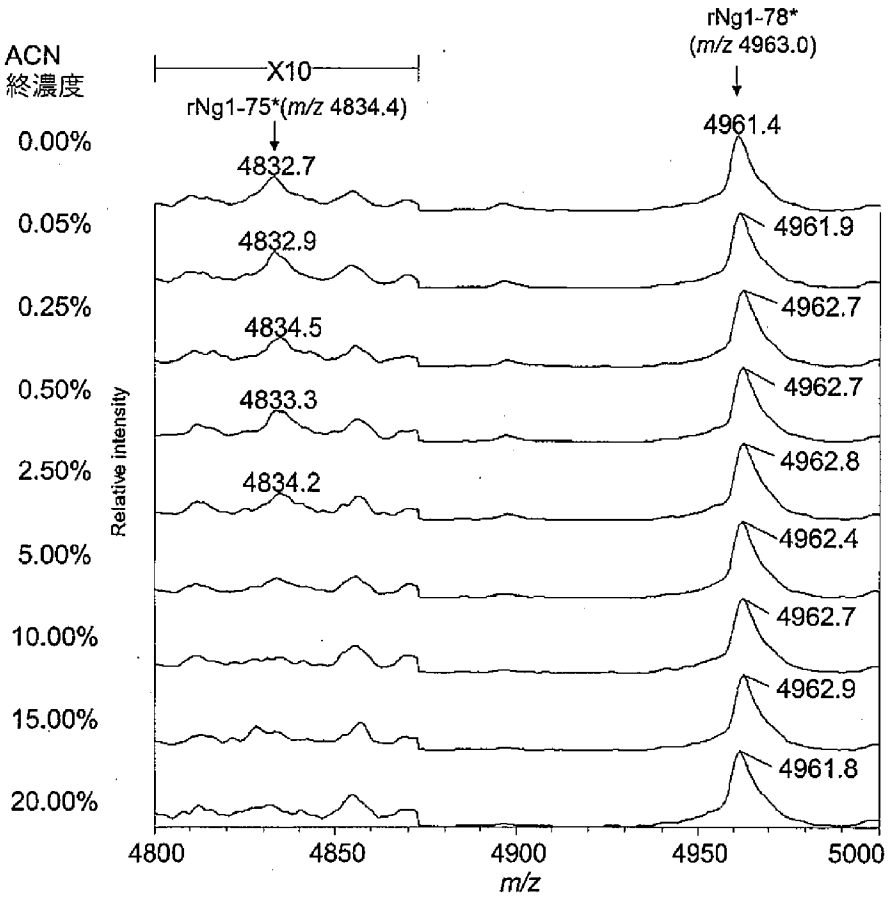
[図12]


ACN
終濃度
0.00%
0.05%
0.25%
0.50%
2.50%
5.00%
10.00%
15.00%
20.00%
Relative intensity (maximum: 53 mV)
Ng46-78* (m/z 1416.5)
Ng39-78* (m/z 1821.0)
Ng46-78 (m/z 2832.1)
Ng48-78 (m/z 2590.7)
Ng45-78 (m/z 2960.3)
Ng44-78 (m/z 3088.4)
Ng39-78 (m/z 3641.0)
Ng33-78 (m/z 4343.9)
rNg1-78* (m/z 4963.0)
1500
2000
2500
3000
3500
4000
4500
5000
m/z

[図13]


ACN
終濃度
0.00%
0.05%
0.25%
0.50%
2.50%
5.00%
10.00%
15.00%
20.00%
Ng33-78*
(m/z 2172.5)
SIL-Ng50-75
(m/z 2217.5)
Ng45-68
(m/z 2247.5)
Ng44-68
(m/z 2375.7)
SIL-Ng50-78
(m/z 2476.7)
2217.2
2476.3
2217.9
2476.6
2218.0
2477.0
2218.2
2477.1
2477.6
2476.7
2476.7
2172.9
2376.6
2248.8
2173.3
2376.9
2477.2
2172.3
2247.8
2376.0
2476.2
Relative intensity
2200
2300
2400
2500
m/z

[図14]


ACN
終濃度
0.00%
0.05%
0.25%
0.50%
2.50%
5.00%
10.00%
15.00%
20.00%
X10
rNg1-75*(m/z 4834.4)
rNg1-78*
(m/z 4963.0)
4832.7
4961.4
4832.9
4961.9
4834.5
4962.7
4833.3
4962.7
4834.2
4962.8
4962.4
4962.7
4962.9
4961.8
Relative intensity
4800
4850
4900
4950
5000
m/z

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2023/006501

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/68(2006.01)i; ***C07K 1/14***(2006.01)i; ***G01N 27/62***(2021.01)i; ***G01N 30/88***(2006.01)i
FI: G01N33/68; G01N27/62 V; C07K1/14 ZNA; G01N30/88 J

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; C07K1/14; G01N27/62; G01N30/88

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 1971-2023
Registered utility model specifications of Japan 1996-2023
Published registered utility model applications of Japan 1994-2023

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

Science Direct

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2015/178398 A1 (SHIMADZU CORPORATION) 26 November 2015 (2015-11-26) paragraph [0060]	1-7
Y	WO 2021/051168 A1 (THE UNIVERSITY OF MELBOURNE) 25 March 2021 (2021-03-25) p. 48, line 32 to p. 49, line 27	1-7
Y	合田 竜弥, 第4回 ペプチド、タンパク質定量のための新技術, 和光純薬時報, 2019, vol. 87, no. 3, pp. 13-14, (GODA, Ryoya.), non-official translation (4th, New technology for peptide and protein quantification. Wako Pure Chemical Times.) p. 14, central column, line 31 to right column, line 1	1-7
Y	JP 2012-530073 A (ORAL HEALTH AUSTRALIA PTY LIMITED) 29 November 2012 (2012-11-29) paragraph [0099]	7

☐ 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
25 April 2023	**16 May 2023**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2023/006501

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

"The form of Annex C/ST.25 text file" above shall read as "the form of ST.26.".

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2023/006501

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2015/178398 A1	26 November 2015	US 2017/0184573 A1 paragraph [0143] EP 3147668 A1	
WO 2021/051168 A1	25 March 2021	US 2022/0363623 A1 paragraphs [0209], [0210] JP 2022-548749 A paragraphs [0143], [0144] EP 4031520 A1	
JP 2012-530073 A	29 November 2012	US 2011/0104179 A1 paragraph [0155] EP 2821414 A1	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2023/006501

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

G01N 33/68(2006.01)i; C07K 1/14(2006.01)i; G01N 27/62(2021.01)i; G01N 30/88(2006.01)i
FI: G01N33/68; G01N27/62 V; C07K1/14 ZNA; G01N30/88 J

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））

G01N33/68; C07K1/14; G01N27/62; G01N30/88

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	１９７１－２０２３年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２３年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２３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）

Science Direct

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
Y	WO 2015/178398 A1 (株式会社　島津製作所) 26.11.2015 (2015-11-26) 段落0060	1-7
Y	WO 2021/051168 A1 (THE UNIVERSITY OF MELBOURNE) 25.03.2021 (2021-03-25) P48L32-P49L27	1-7
Y	合田　竜弥, 第4回　ペプチド、タンパク質定量のための新技術, 和光純薬時報 , 2019, Vol.87, No.3, P13-14 P14中央欄L31-右欄L1	1-7
Y	JP 2012-530073 A (オーラル ヘルス オーストラリア ピーティーワイ リミテッド) 29.11.2012 (2012-11-29) 段落0099	7

☐ 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
25.04.2023	16.05.2023

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）
高田　亜希 2J 5705

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2023/006501

第Ⅰ欄　　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
　☑ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式

b. ☐ 国際出願とともに、ＰＣＴ規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表

c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
　☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(ＰＣＴ規則13の3.1(a))
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式（ＰＣＴ規則13の3.1(b)及びＰＣＴ実施細則第713号）

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

上記「附属書 C/ST.25テキストファイル形式」は「 ST.26形式」と読み替える。

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/JP2023/006501

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2015/178398 A1	26.11.2015	US 2017/0184573 A1 para0143 EP 3147668 A1	
WO 2021/051168 A1	25.03.2021	US 2022/0363623 A1 para0209-0210 JP 2022-548749 A 段落0143-0144 EP 4031520 A1	
JP 2012-530073 A	29.11.2012	US 2011/0104179 A1 para0155 EP 2821414 A1	