

(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10月13日(13.10.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/126053 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 27/62 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/058727
- (22) 国際出願日: 2011年4月6日(06.04.2011)
- (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 2010-088089 2010年4月6日(06.04.2010) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人鹿児島大学(Kagoshima University) [JP/JP]; 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目2番24号 Kagoshima (JP). 住友ベークライト株式会社 (SUMITOMO BAKELITE CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1400002 東京都品川区東品川二丁目5番8号 Tokyo (JP). 三菱化学メディエンス株式会社(Mitsubishi Chemical Medience Corporation) [JP/JP]; 〒1088559 東京都港区芝浦四丁目2番8号 Tokyo (JP).

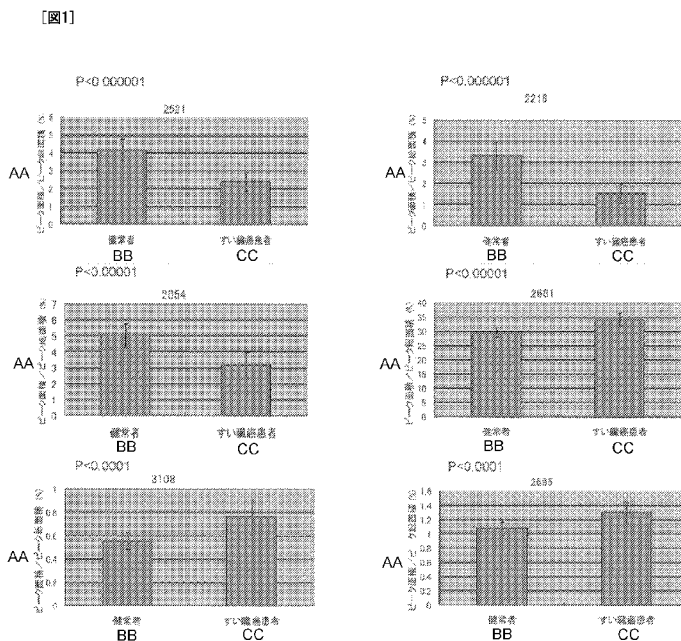
JP]; 〒1088559 東京都港区芝浦四丁目2番8号 Tokyo (JP).

- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 夏越 祥次 (NATSUGOE Shoji) [JP/JP]; 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目2番24号 国立大学法人鹿児島大学内 Kagoshima (JP). 内門 泰斗 (UCHIKADO Yasuto) [JP/JP]; 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目2番24号 国立大学法人鹿児島大学内 Kagoshima (JP). 橋口 照人 (HASHIGUCHI Teruto) [JP/JP]; 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目2番24号 国立大学法人鹿児島大学内 Kagoshima (JP). 新地 洋之 (SHINCHI Hiroyuki) [JP/JP]; 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目2番24号 国立大学法人鹿児島大学内 Kagoshima (JP). 前村 公成 (MAEMURA Kosei) [JP/JP]; 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目2番24号 国立大学法人鹿児島大学内 Kagoshima (JP). 又木 雄弘

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR EXAMINING DIGESTIVE CANCER USING N-BINDING SUGAR CHAINS

(54) 発明の名称: N結合型糖鎖を利用した消化器癌の検査方法



AA... PEAK AREA/TOTAL PEAK AREA (%)
BB... NORMAL SUBJECTS
CC... PATIENTS WITH PANCREATIC CANCER

(57) Abstract: By collecting blood samples from patients with pancreatic cancer, patients with esophageal cancer and patients with gastric cancer and analyzing N-binding sugar chains in plasma of these blood samples by mass spectrography, sugar chains, each showing a significant change in the content in the blood samples of the cancer patients compared with normal subjects, were successfully identified.

(57) 要約: 膵臓癌患者、食道癌患者、胃癌患者より血液を採取し、血漿中のN結合型糖鎖に関して質量分析を行った結果、癌患者の血液サンプルにおいて、健常者と比較して、有意に存在量に変化している糖鎖を同定することに成功した。

WO 2011/126053 A1



(MATAKI Yuko) [JP/JP]; 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目2番24号 国立大学法人鹿児島大学内 Kagoshima (JP). 森脇 紀親(MORI-WAKI Norichika) [JP/JP]; 〒1088559 東京都港区芝浦四丁目2番8号 三菱化学メディエンス株式会社内 Tokyo (JP). 関島 勝(SEKIJIMA Masaru) [JP/JP]; 〒1088559 東京都港区芝浦四丁目2番8号 三菱化学メディエンス株式会社内 Tokyo (JP). 島岡 秀行(SHIMAOKA Hideyuki) [JP/JP]; 〒1400002 東京都品川区東品川二丁目5番8号 住友ベークライト株式会社内 Tokyo (JP). 阿部 碧(ABE Midori) [JP/JP]; 〒1400002 東京都品川区東品川二丁目5番8号 住友ベークライト株式会社内 Tokyo (JP). 福島 雅夫(FUKUSHIMA Masao) [JP/JP]; 〒1400002 東京都品川区東品川二丁目5番8号 住友ベークライト株式会社内 Tokyo (JP). 五十嵐 幸太(IGARASHI Kota) [JP/JP]; 〒1400002 東京都品川区東品川二丁目5番8号 住友ベークライト株式会社内 Tokyo (JP). 阿部 皓基(ABE Hiroki) [JP/JP]; 〒1400002 東京都品川区東品川二丁目5番8号 住友ベークライト株式会社内 Tokyo (JP). 相原 大知(AIHARA Taichi) [JP/JP]; 〒1400002 東京都品川区東品川二丁目5番8号 住友ベークライト株式会社内 Tokyo (JP).

- (74) 代理人: 特許業務法人セントクレスト国際特許事務所(CENTCREST IP ATTORNEYS); 〒1040031

東京都中央区京橋2 - 8 - 21 金鳳堂ビル
9階 Tokyo (JP).

- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))

明 細 書

発明の名称： N結合型糖鎖を利用した消化器癌の検査方法

技術分野

[0001] 本発明は、N結合型糖鎖を消化器癌診断用マーカーとして利用した消化器癌の検査方法に関する。

背景技術

[0002] 消化器は、食物の摂取、運搬、消化および栄養素の吸収、排泄の働きを担う器官である。消化器のうち膵臓は、胃の背側にある長さが約15cmの臓器であり、主な疾患としては膵臓癌と膵炎があり、特に膵臓癌は、近年日本人の死亡率が上昇してきている癌の一つとして知られている。膵臓癌の原因は完全には解明されていないが、食生活の欧米化による動物性脂肪やタンパク質、アルコールなどの過剰摂取、或いは喫煙などがリスクファクターであると考えられている。さらに、慢性膵炎、膵石症、糖尿病、急性膵炎の既往のある人も膵臓癌の高危険群であると考えられている。膵臓癌は、外分泌の働きを持つ細胞、特に膵液が流れる膵管の細胞から発生する癌であり、膵臓癌の90%以上がこのタイプである。膵臓癌は非常に悪性度が高く、早期の段階で他臓器への転移をきたすことから、早期発見が一つの課題である。しかし、膵臓は、胃や十二指腸、脾臓、小腸、大腸、肝臓、胆嚢など多くの臓器に囲まれ、後腹膜に存在するため、各種の画像診断を用いても初期段階の癌を発見することがきわめて困難であり、進行癌で発見される場合が多いのが現状である。

[0003] 胃癌は、日本と東南アジアが高発生地域であり、癌死亡率では世界第2位を占めている。胃癌の予後は、診断技術や治療法の発達により改善しているが、進行胃癌の予後は未だ良好とはいえず、胃漿膜にまで浸潤した胃癌の予後の5年生存率は35%と低い。進行癌の治癒的切除の後に起こる再発の主原因の一つは腹膜播種である。化学療法の進歩により腹膜播種再発に対する治療効果もみられてきているが、未だに5年生存率は低い。胃癌の腹膜播種

の機序には、多くのステップと多くの遺伝子が関与していることが知られている。胃癌の腹膜播種には、接着分子関連遺伝子、アポトーシス関連遺伝子や他の遺伝子が深く関与しているという報告がある。胃癌の腹膜播種を始めとする胃癌の転移のメカニズム解明に関してもさらなる研究が必要である。

[0004] 食道癌は、約半数が胸部中部食道に発生する。本邦の食道癌は90%以上が扁平上皮癌である。罹患率、死亡率ともに男性のほうが高く、女性の5倍以上である。食道癌の発癌に関しては、飲酒や喫煙の関与は以前より報告されており、近年、ALDH2の関与が報告されている。食道癌の手術は高度侵襲を伴い、予後不良な疾患である。近年、早期癌の増加に伴い内視鏡的治療で根治できる症例も増加してきている。さらに化学放射線療法の効果もみられてきており、治療成績の向上がみられている。しかし、切除不能な進行癌の予後は依然不良である。今後も早期癌発見の新しいスクリーニング体系の確立と化学療法の進歩が望まれるところである。

[0005] これまでに開発された癌の検出・診断方法として、腫瘍マーカーの測定が挙げられる。膵臓癌診断のための血中腫瘍マーカーとしては、例えば、CA19-9（非特許文献1）、Dupan-2（非特許文献2）、CA-50（非特許文献3）、Span-1（非特許文献4）等が既に関発されている。また、腫瘍細胞に特異的に発現している遺伝子をマーカーとして用いることにより、膵臓癌の検出や診断を行う方法がいくつかの特許公報で開示されている。現在までに、PANCIA及びPANCIB（特許文献1）や、KCCR13L（特許文献2）が膵臓癌マーカー遺伝子として開示されている。また、膵臓癌の細胞の染色体の特異的な部位にDNAの増幅や欠失があることから、該膵癌に特異的な染色体部位の増幅や欠失を検出することによって、膵癌を診断する方法も提案されている。

[0006] また、胃癌に関しては、既知のI型コラーゲンのC端非3重鎖テロペプチド（ICTP）の発現量の変動をマーカーにすることが特徴である。進行胃癌、特にスキルス胃癌の適切な診断マーカー（特許文献3参照）や、癌部または非癌部組織検体より得られたDNA繰り返し配列中に存在する脱メチル

化DNA数を測定し、その割合に基づいて胃癌をはじめ、種々の癌疾患の予後が良好か否かを判断する方法が提案されている（例えば、特許文献4参照。）。）。。

[0007] さらに、転移性結腸直腸癌あるいは原発性あるいは転移性の胃癌または食道癌に関しては、S I、CDX 1、またはCDX 2の発現を指標として、スクリーニングする方法が提案されている（特許文献5参照。）。

しかしながら、腫瘍マーカーは、進行した悪性腫瘍の動態を把握するために使用されているのが現状であり、腫瘍マーカーを利用した癌の検出・診断方法として、早期診断に使用できるものは確立されていない。特に膵臓癌は、早期診断が困難であり、治療成績も不良なため、スクリーニングに応用できる方法の開発が急務である。

先行技術文献

特許文献

- [0008] 特許文献1：特表2000-502902号公報
特許文献2：特願2003-041843号公報
特許文献3：特開2001-33460号公報
特許文献4：特開2002-112799号公報
特許文献5：特表2003-532389号公報

非特許文献

- [0009] 非特許文献1：Somatic Cell Genet., 5, 957-972, 1979
非特許文献2：Cancer Res., 42, 601, 1982
非特許文献3：Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 71, 178-181, 1983
非特許文献4：日外誌, 87, 236, 1986

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0010] 本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は早期

に、簡便に、消化器癌を検査する方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、上記課題を解決するために、消化器癌患者の血液サンプルに含まれる糖タンパク質の糖鎖に着目し、消化器癌の新たな検査方法の開発を試みた。具体的には、膵臓癌患者 17 例、食道癌患者 34 例、胃癌患者 22 例より血液を採取し、血漿中の N 結合型糖鎖に関して質量分析を行った。その結果、癌患者の血液サンプルにおいて、健常者と比較して、有意に存在量が増加している糖鎖を同定することに成功し、本発明を完成するに至った。

[0012] すなわち、本発明は、被検者より採取された血液中の特定の N 結合型糖鎖を検出することによる、消化器癌の検査方法に関し、より詳しくは、以下の発明を提供するものである。

[1] 消化器癌の検査方法であって、

- (a) 被検者より採取された血液中の糖タンパクから糖鎖を遊離させる工程、
- (b) 遊離させた糖鎖を精製する工程、および
- (c) 精製した糖鎖において、下記 (i) および (ii) の特性を示す糖鎖を検出する工程、を含む方法。

[0013] (i) N 結合型糖鎖である

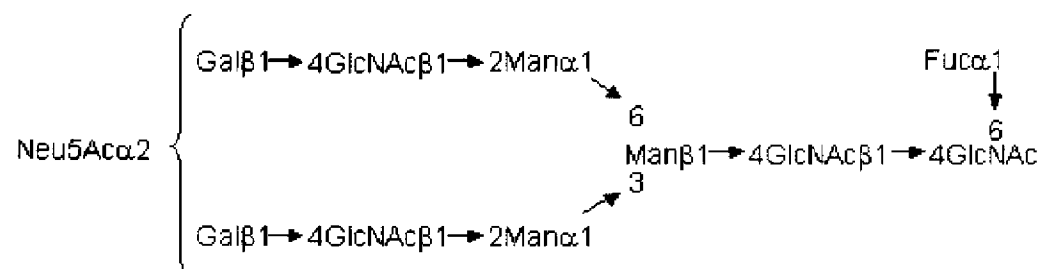
(ii) MALDI-TOF-MS 型分析機による質量分析を行った場合、ピークの質量電荷比 (m/z) が、2521、2216、2054、2681、3108、2695、1326、1892、2172、2257、2334、2375、2639、2703、2725、2827、および 3030 のいずれかを示す

[2] 消化器癌の検査方法であって、

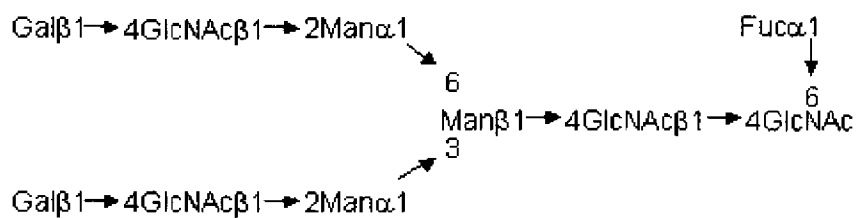
- (a) 被検者より採取された血液中の糖タンパクから糖鎖を遊離させる工程、
- (b) 遊離させた糖鎖を精製する工程、および

(c) 精製した糖鎖において、下記の少なくともいずれか 1 つの糖鎖を検出する工程、を含む方法。

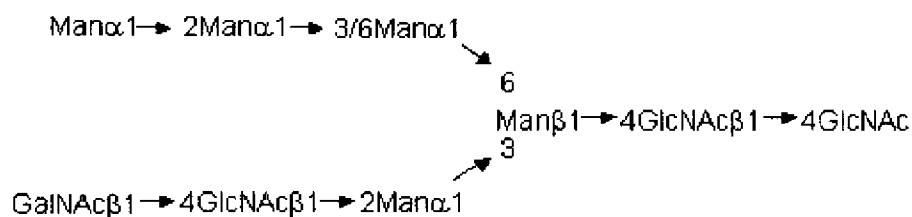
[0014] [化1]



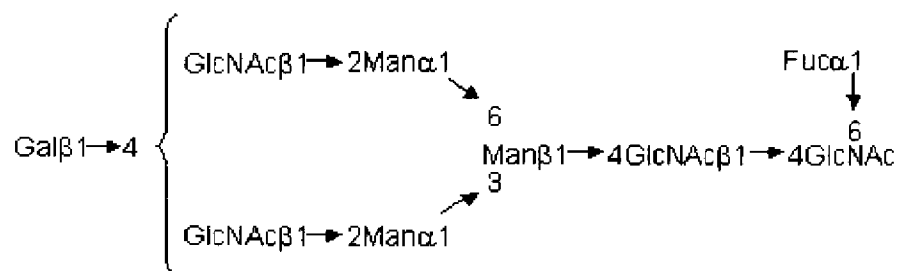
[0015] [化2]



[0016] [化3]

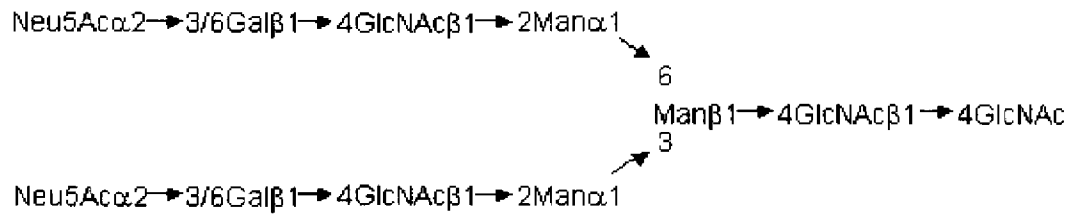


[0017] [化4]

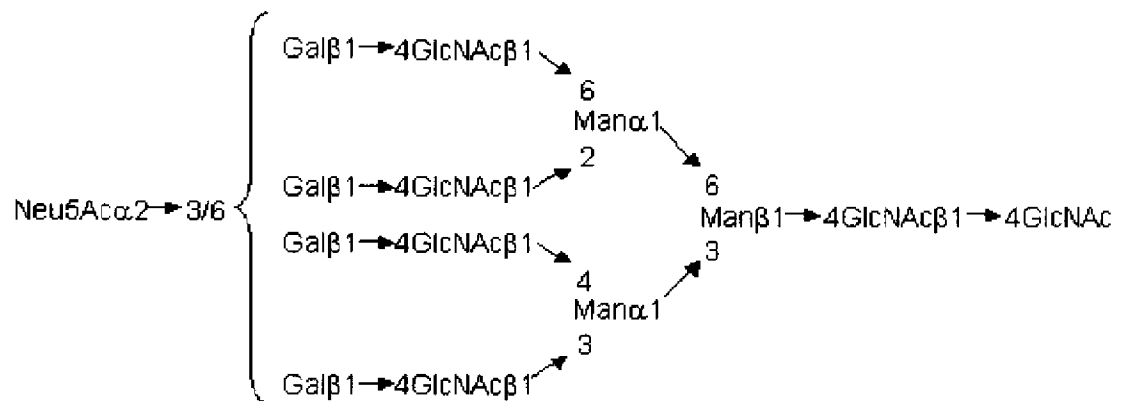


[0018]

[化5]



[0019] [化6]



[0020] [3] 消化器癌が、膵臓癌、食道癌、または胃癌である、[1]または[2]に記載の方法。

発明の効果

[0021] 本発明によれば、被検者より採取された血液において、特定のN結合型糖鎖を検出することにより、癌の早期の段階で簡便に消化器癌の検査を行うことが可能となる。

図面の簡単な説明

[0022] [図1] 健常者と膵臓癌の2群間に対して行ったT-testにより、有意差があると判定された糖鎖について、各検体中での存在量を定量した結果を示すグラフである。糖鎖の存在量の総シグナル量を計算して、各検体における糖鎖の比率で補正をした。

[図2] 健常者と食道癌の2群間に対して行ったT-testにより、有意差があると判定された糖鎖について、各検体中での存在量を定量した結果を示す

グラフである。糖鎖の存在量の総シグナル量を計算して、各検体における糖鎖の比率で補正をした。

[図3] 健常者と胃癌の群間に対して行った *T - t e s t* により、有意差があると判定された糖鎖について、各検体中での存在量を定量した結果を示すグラフである。糖鎖の存在量の総シグナル量を計算して、各検体における糖鎖の比率で補正をした。

[図4] 質量分析の結果得られた膵臓癌患者および健常者の各ピークについて、その面積を多変量解析し、2群（患者群、健常者群）に分離できるピーク組み合わせを同定した結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0023] 本発明は、消化器癌の検査方法であって、被検者より採取された血液中の糖タンパクから糖鎖を遊離させる工程（工程（a））、遊離させた糖鎖を精製する工程（工程（b））、および、精製した糖鎖において、下記（i）および（i i）の特性を示す糖鎖を検出する工程（工程（c））、を含む方法を提供する。

[0024] （i） N結合型糖鎖である

（i i） MALDI-TOF-MS型分析機による質量分析を行った場合におけるピークの質量電荷比（ m/z ）が、2521、2216、2054、2681、3108、2695、1326、1892、2172、2257、2334、2375、2639、2703、2725、2827、および3030のいずれかを示す。

[0025] 本発明の検査方法を適用する「消化器癌」としては、特に制限されるものではないが、本発明は、難治性の癌である膵臓癌や食道癌、および発生頻度の高い癌である胃癌において特に有用である。

[0026] 本発明の消化器癌の検査方法のサンプルである「被検者より採取された血液」としては、血液成分を全て含む全血であっても、血液から分離された血清や血漿等であってもよいが、血清や血漿が良く、とくに血漿が特に好ましい。

[0027] 本発明において、血液中の糖タンパクから糖鎖を遊離させる方法としては、特に制限されるものではないが、例えば、N-グリコシダーゼF（グリコペプチダーゼ、PN G a s e、グリカナーゼ、グリコアミダーゼなどとも称される）やグリコペプチダーゼA等を用いた酵素法や、ヒドラジン分解法を挙げることができる。なかでも、N-グリコシダーゼFによる酵素法を好適に用いることができる。その際、トリプシン等のプロテアーゼを併用することもできる。

[0028] 本発明において、遊離させた糖鎖を精製する方法としては、試料中の混合物から糖鎖を選択的に捕捉し精製する方法であれば特に制限されないが、MALDI-TOF-MSや高速液体クロマトグラフィー（HPLC）での高感度測定用に最適化された糖鎖補足ビーズであるBiot Glyco（登録商標）（住友ベークライト株式会社製）を用いた方法が特に好適である。

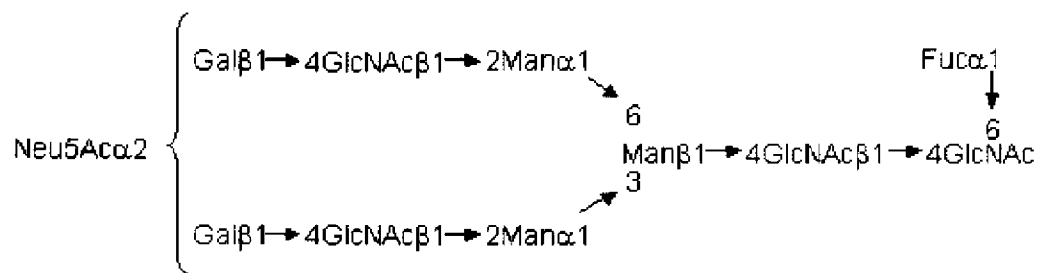
[0029] 本発明においては、精製した糖鎖において、N結合型糖鎖であって、MALDI-TOF-MS型分析機による質量分析を行った場合におけるピークの質量電荷比（ m/z ）が、2521、2216、2054、2681、3108、2695、1326、1892、2172、2257、2334、2375、2639、2703、2725、2827、および3030のいずれかを示す糖鎖を検出する。本発明においては、ピークの質量電荷比（ m/z ）が、2521または2216を示す糖鎖を検出することが、特に好ましい。なお、質量電荷比（ m/z ）の上記値には、 ± 1 以内の測定誤差が生じうることを理解されたい。

[0030] ここで「N結合型糖鎖」とは、糖タンパク質の糖鎖のうち、タンパク質のアスパラギン残基が持つ側鎖のアミド基の窒素原子に結合している糖鎖であり、N型糖鎖やアスパラギン結合型糖鎖とも称される。また、「MALDI-TOF-MS」とは、MALDI法を利用して飛行時間を基に質量を測定する方法である。MALDI法は、試料をプレート上にスポットした後、マトリクス溶液（2,5-Dihydroxybenzoic acid）を添加、乾固し、結晶状態にし、パルスレーザー照射により大きなエネルギーをマトリクス上に与え、（

$M+H)^+$ 、 $(M+Na)^+$ などの試料由来イオンとマトリクス由来イオンとを脱離させる方法である。イオンが一定の加速電圧 V で加速される場合、イオンの質量を m 、イオンの速度を v 、イオンの電荷数を z 、電気素量を e 、イオンの飛行時間を t としたとき、イオンの質量電荷比(m/z)は、『 $m/z = 2 e V t^2 / L^2$ 』で表すことができる。

[0031] 本発明において、MALDI-TOF-MS型分析機を用いた質量分析によるピークの質量電荷比(m/z)が2521である糖鎖とは、MALDI-TOF-MS型分析機による質量分析の結果、2521 m/z マススペクトルピークを呈する糖鎖であり、その構造式は、

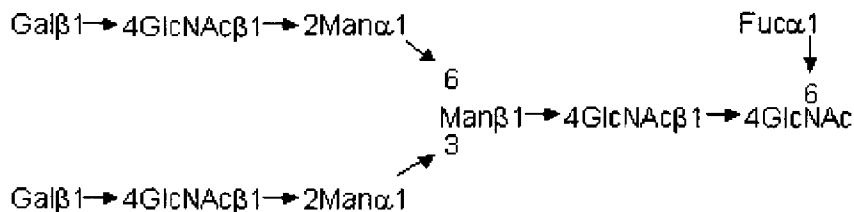
[0032] [化7]



[0033] と推定される。

[0034] また、本発明において、MALDI-TOF-MS型分析機を用いた質量分析によるピークの質量電荷比(m/z)が2216である糖鎖とは、MALDI-TOF-MS型分析機による質量分析の結果、2216 m/z マススペクトルピークを呈する糖鎖であり、その構造式は、

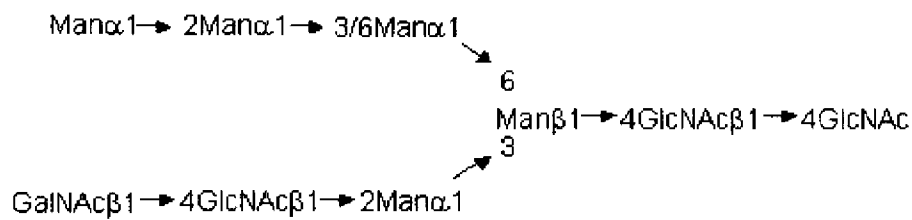
[0035] [化8]



[0036] または

[0037]

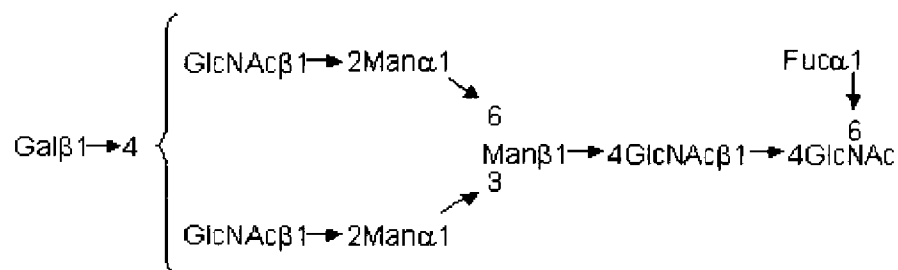
[化9]



[0038] と推定される。

[0039] また、本発明において、MALDI-TOF-MS型分析機を用いた質量分析によるピークの質量電荷比 (m/z) が 2054 である糖鎖とは、MALDI-TOF-MS型分析機による質量分析の結果、2054 m/z マスペクトルピークを呈する糖鎖であり、その構造式は、

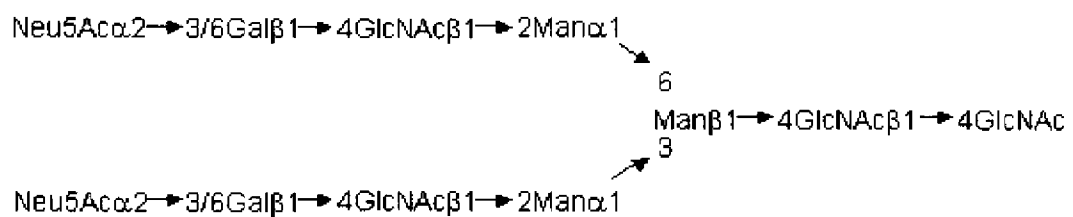
[0040] [化10]



[0041] と推定される。

[0042] また、本発明において、MALDI-TOF-MS型分析機を用いた質量分析によるピークの質量電荷比 (m/z) が 2681 である糖鎖とは、MALDI-TOF-MS型分析機による質量分析の結果、2681 m/z マスペクトルピークを呈する糖鎖であり、その構造式は、

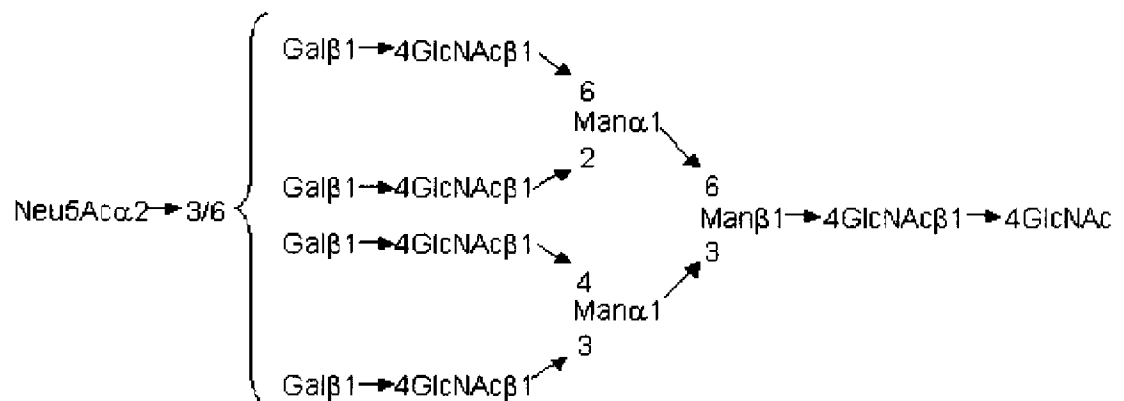
[0043] [化11]



[0044] と推定される。

[0045] また、本発明において、MALDI-TOF-MS型分析機を用いた質量分析によるピークの質量電荷比 (m/z) が 3108 である糖鎖とは、MALDI-TOF-MS型分析機による質量分析の結果、3108 m/z マスペクトルピークを呈する糖鎖であり、その構造式は、

[0046] [化12]



[0047] と推定される。

[0048] また、本発明において、MALDI-TOF-MS型分析機を用いた質量分析によるピークの質量電荷比 (m/z) が 1326 である糖鎖とは、MALDI-TOF-MS型分析機による質量分析の結果、1326 m/z マスペクトルピークを呈する糖鎖であり、その構造式は、 $(\text{Hex})_2(\text{HexNAc})_2(\text{Deoxyhexose})_1$ と推定される (表 1)。

[0049] また、本発明において、MALDI-TOF-MS型分析機を用いた質量分析によるピークの質量電荷比 (m/z) が 1892 である糖鎖とは、MALDI-TOF-MS型分析機による質量分析の結果、1892 m/z マスペクトルピークを呈する糖鎖であり、その構造式は、 $(\text{HexNAc})_2(\text{Deoxyhexose})_1 + (\text{Man})_3(\text{GlcNAc})_2$ と推定される (表 1)。

[0050] また、本発明において、MALDI-TOF-MS型分析機を用いた質量分析によるピークの質量電荷比 (m/z) が 2172 である糖鎖とは、MALDI-TOF-MS型分析機による質量分析の結果、2172 m/z マス

ペクトルピークを呈する糖鎖であり、その構造式は、 $(\text{Hex})_2(\text{HexNAc})_1(\text{NeuAc})_1 + (\text{Man})_3(\text{GlcNAc})_2$ と推定される（表1）。

[0051] また、本発明において、MALDI-TOF-MS型分析機を用いた質量分析によるピークの質量電荷比（ m/z ）が2257である糖鎖とは、MALDI-TOF-MS型分析機による質量分析の結果、2257 m/z マススペクトルピークを呈する糖鎖であり、その構造式は、 $(\text{Hex})_1(\text{HexNAc})_3(\text{Deoxyhexose})_1 + (\text{Man})_3(\text{GlcNAc})_2$ と推定される（表1）。

[0052] また、本発明において、MALDI-TOF-MS型分析機を用いた質量分析によるピークの質量電荷比（ m/z ）が2334である糖鎖とは、MALDI-TOF-MS型分析機による質量分析の結果、2334 m/z マススペクトルピークを呈する糖鎖であり、その構造式は、 $(\text{Hex})_3(\text{HexNAc})_1(\text{NeuAc})_1 + (\text{Man})_3(\text{GlcNAc})_2$ と推定される（表1）。

[0053] また、本発明において、MALDI-TOF-MS型分析機を用いた質量分析によるピークの質量電荷比（ m/z ）が2375である糖鎖とは、MALDI-TOF-MS型分析機による質量分析の結果、2375 m/z マススペクトルピークを呈する糖鎖であり、その構造式は、 $(\text{Hex})_2(\text{HexNAc})_2(\text{NeuAc})_1 + (\text{Man})_3(\text{GlcNAc})_2$ と推定される（表1）。

[0054] また、本発明において、MALDI-TOF-MS型分析機を用いた質量分析によるピークの質量電荷比（ m/z ）が2639である糖鎖とは、MALDI-TOF-MS型分析機による質量分析の結果、2639 m/z マススペクトルピークを呈する糖鎖であり、その構造式は、 $(\text{Hex})_3(\text{HexNAc})_4 + (\text{Man})_3(\text{GlcNAc})_2$ と推定される（表1）。

[0055] また、本発明において、MALDI-TOF-MS型分析機を用いた質量分析によるピークの質量電荷比（ m/z ）が2703である糖鎖とは、MALDI-TOF-MS型分析機による質量分析の結果、2703 m/z マススペクトルピークを呈する糖鎖であり、その構造は、上記2681 m/z マススペクトルピークを呈する糖鎖のNa付加体と推定される（表1）。

[0056] また、本発明において、MALDI-TOF-MS型分析機を用いた質量

分析によるピークの質量電荷比 (m/z) が 2725 である糖鎖とは、MALDI-TOF-MS 型分析機による質量分析の結果、2725 m/z マスペクトルピークを呈する糖鎖であり、その構造式は、 $(\text{Hex})_2(\text{HexNAc})_3(\text{Deoxyhexose})_1(\text{NeuAc})_1+(\text{Man})_3(\text{GlcNAc})_2$ と推定される (表 1)。

[0057] また、本発明において、MALDI-TOF-MS 型分析機を用いた質量分析によるピークの質量電荷比 (m/z) が 2827 である糖鎖とは、MALDI-TOF-MS 型分析機による質量分析の結果、2827 m/z マスペクトルピークを呈する糖鎖であり、その構造式は、 $(\text{Hex})_2(\text{HexNAc})_2(\text{Deoxyhexose})_1(\text{NeuAc})_2+(\text{Man})_3(\text{GlcNAc})_2$ と推定される (表 1)。

[0058] また、本発明において、MALDI-TOF-MS 型分析機を用いた質量分析によるピークの質量電荷比 (m/z) が 3030 である糖鎖とは、MALDI-TOF-MS 型分析機による質量分析の結果、3030 m/z マスペクトルピークを呈する糖鎖であり、その構造式は、 $(\text{Hex})_2(\text{HexNAc})_3(\text{Deoxyhexose})_1(\text{NeuAc})_2+(\text{Man})_3(\text{GlcNAc})_2$ と推定される (表 1)。

[0059] 従って、本発明は、消化器癌の検査方法であって、被検者より採取された血液中の糖タンパクから糖鎖を遊離させる工程 (工程 (a))、遊離させた糖鎖を精製する工程 (工程 (b))、および、精製した糖鎖において、上記構造式からなる少なくともいずれか 1 つの糖鎖を検出する工程 (工程 (c)) を含む方法をも提供するものである。

[0060] 本発明においては、上記糖鎖を検出する限り、MALDI-TOF-MS 型分析機以外の分析機を使用することもできる。イオン源として、例えば、電子イオン化法、化学イオン化法、電界離脱法、高速原子衝突法、エレクトロスプレーイオン化法、大気圧化学イオン化法等を用いることができ、また、分析法としては、例えば、磁場偏向型、四重極型、イオントラップ型、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型などの方法を用いることができる。また、本発明においては、上記糖鎖を検出する限り、高速液体クロマトグラフィーを用いることもでき、上記質量分析と高速液体クロマトグラフィーとを組み合わせることもできる。

[0061] 工程（c）における糖鎖の検出の結果は、必要に応じて、対照値（例えば、健常者における検出値、癌患者における検出値）と比較される。本実施例において、膵臓癌患者、食道癌患者、および胃癌患者において、MALDI-TOF-MS型分析機による質量分析を行った場合におけるピークの質量電荷比（ m/z ）が、2521、2216、および2054のいずれかを示す糖鎖の検出値は、健常者の検出値よりも、有意に低いことが明らかとなった。従って、被検者において、これらの糖鎖の検出値が、健常者の検出値よりも有意に低い場合、あるいはこれら癌患者の検出値と近似している場合、被検者は、これら癌の疑いがあると判定される。一方、本実施例において、膵臓癌患者および食道癌患者において、MALDI-TOF-MS型分析機による質量分析を行った場合におけるピークの質量電荷比（ m/z ）が、2681、3108、および2695のいずれかを示す糖鎖の検出値は、健常者の検出値よりも、有意に高いことが明らかとなった。従って、被検者において、これらの糖鎖の検出値が、健常者の検出値よりも有意に高い場合、あるいはこれら癌患者の検出値と近似している場合、被検者は、これら癌の疑いがあると判定される。本発明における癌の検査においては、上記糖鎖のうち、複数の糖鎖の検出結果を組み合わせ、癌の検査を行うことにより、その精度を高めることも可能である。さらに、本発明における癌の検査方法を、既に公知の他の癌の検査方法と組み合わせることにより、癌の検査の精度を高めることも可能である。

実施例

[0062] 以下、実施例及び比較例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0063] [実施例1]

（1）血液の採取

インフォームド・コンセントの得られた、膵臓癌患者17例、食道癌患者34例、胃癌患者22例の患者、および対照として健常者11例より血液を採取し、血漿を遠心分離した。得られた検体（血漿）は連結可能匿名化を行

った後、 -80°C で凍結保存した。

(2) 血液サンプルの作製

タンパク質と修飾糖鎖を遊離させる目的で、血漿をN-グリコシダーゼF及びトリプシンにより処理した。具体的には、 $100\mu\text{L}$ の血漿に、純水($165\mu\text{L}$)、 1M 重炭酸アンモニウム($25\mu\text{L}$)、及び 120mM ジチオスレイトール($25\mu\text{L}$)を加え、 60°C で30分間静置した後、 123mM ヨードアセトアミド($50\mu\text{L}$)を加え、室温、遮光下で1時間静置した。続いて、トリプシン(2000unit 、 $25\mu\text{L}$)を加え、 37°C で1時間静置した後、 80°C で15分間加熱することによりトリプシンを変性させた。室温まで冷却させた後に、N-グリコシダーゼF(10unit 、 $10\mu\text{L}$)を加え、 37°C でオーバーナイト静置した。 80°C で15分間加熱することにより、酵素を変性させ、最終量 $400\mu\text{L}$ の酵素処理血漿サンプルを得た。また、内部標準グルコースオリゴマー(1-20)(生化学工業 #800111)を 10mg/mL となるように純水に溶解し、内部標準糖鎖溶液を作製した。上記酵素処理血漿サンプル $95\mu\text{L}$ に対し、内部標準糖鎖溶液 $5\mu\text{L}$ (= $50\mu\text{g}$ 相当)を添加し、全量 $100\mu\text{L}$ の溶液を調製した。このうち、 $20\mu\text{L}$ を糖鎖補足ビーズ(BlotGlyco(登録商標) for MALDI(住友ベークライト株式会社製))により処理し、遊離した糖鎖の捕捉、及びラベル化を行った。

(3) 糖鎖分析の結果解析

ビーズに捕捉された糖鎖を精製・分離し、マトリックス(2,5-dihydroxybenzoic acid)溶液と混合して、MALDI-TOF-MS測定に供した。質量分析器としては、Autoflex III smartbeam TOF/TOF(Bruker Daltonics社製)を用いた。また、データの収集・解析には該機器附属のソフトウェア(例えば、flexControl, flexAnalysis)を用いた。また、レーザーイオン化は、通常ポジティブイオンモードで行い、リフレクターモードで検出した。

[0064] 得られたマススペクトルから20~100のピークを同定した。このうち

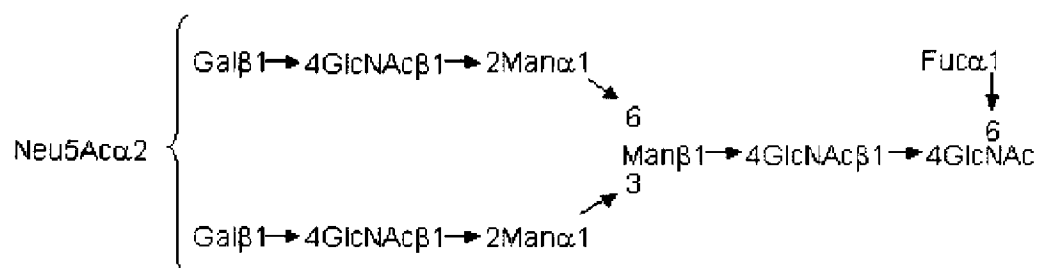
、膵臓癌、胃癌、膵臓癌について、それぞれ、内部標準糖鎖などを除外した6種類の糖鎖を解析対象とし、内部標準と比較することにより各糖鎖の定量化を行った。糖鎖の存在量の総シグナル量を計算して、それぞれの糖鎖の比率で補正をした。

[0065] さらに、健常者と膵臓癌、健常者と食道癌、健常者と胃癌のそれぞれ2群間に対してT-*t e s t*を行い、有意差を示す糖鎖の特定を試みた。その結果、膵臓癌および食道癌については、質量電荷比 (m/z) が、2521、2216、2054、2681、3108、および2695を示す糖鎖が、胃癌については、質量電荷比 (m/z) が、2521、2216、および2054を示す糖鎖が特定された(図1~3)。なお、ピーク面積/ピーク総面積(%)は、質量電荷比 (m/z) が、2521、2216、または2054を示す糖鎖では、癌患者において有意に低く、2681、3108、または2695を示す糖鎖では、癌患者において有意に高かった。

[0066] また、2521 m/z 糖鎖、及び2216 m/z 糖鎖を用いた場合の正答率を、6つの分類器(Compound Covariate Predictor、Diagonal Linear Discriminant Analysis、1-Nearest Neighbor Predictor、3-Nearest Neighbor Predictor、Nearest Centroid Predictor、Support Vector Machine Predictor)により算出した。その結果、膵臓癌については、平均88%程度の正答率が得られた。

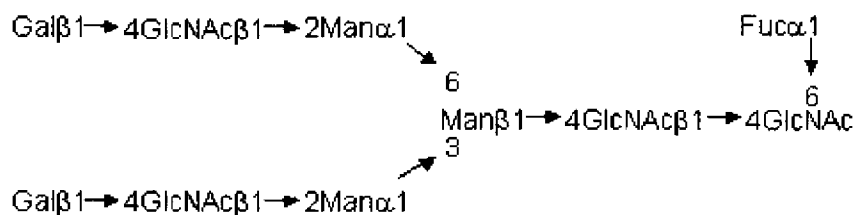
[0067] また、質量分析の結果得られたシグナルから糖鎖の構造式を予測した。その結果、質量電荷比 (m/z) が2521を示す糖鎖は、構造が、

[0068] [化13]



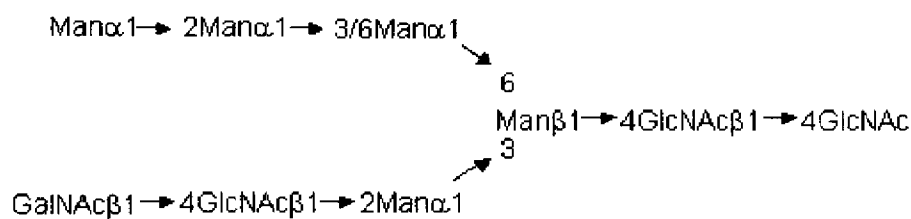
[0069] と予想され、質量電荷比 (m/z) が2216を示す糖鎖は、構造が、

[0070] [化14]

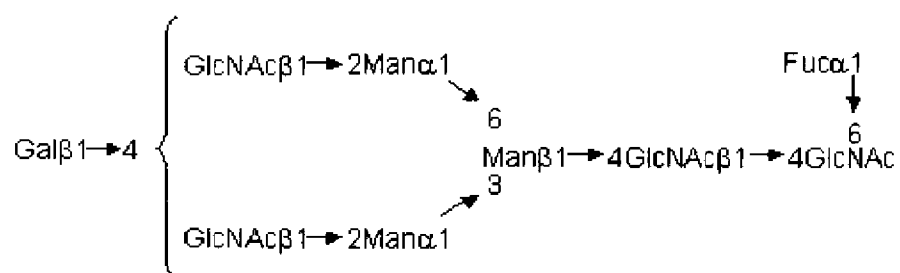


[0071] または

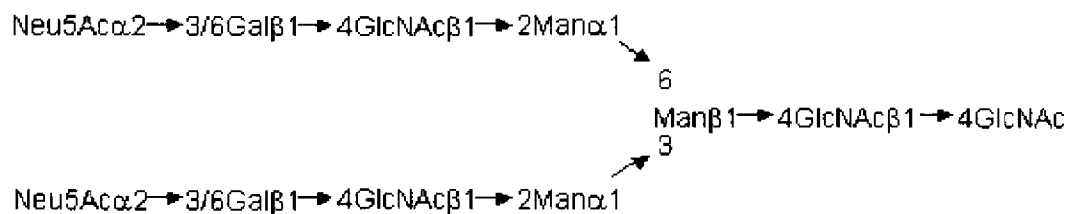
[0072] [化15]

[0073] と予想され、質量電荷比 (m/z) が 2054 を示す糖鎖は、構造が、

[0074] [化16]

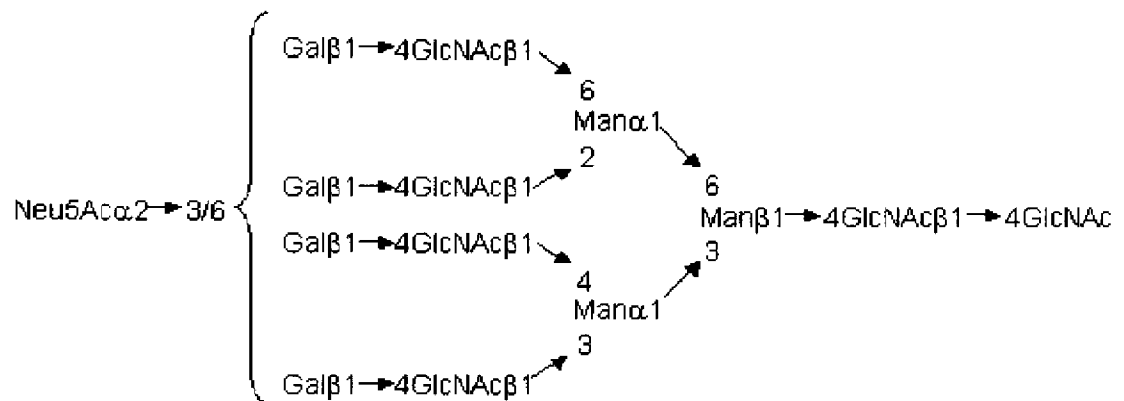
[0075] と予想され、質量電荷比 (m/z) が 2680 を示す糖鎖は、構造が、

[0076] [化17]

[0077] と予想され、質量電荷比 (m/z) が 3108 を示す糖鎖は、構造が、

[0078]

[化18]



[0079] と予想された。

[0080] [実施例 2]

(1) 血液の採取

インフォームド・コンセントの得られた、膵臓癌患者 17 例、および対照として健常者 11 例より血液を採取し、血漿を遠心分離した。得られた検体（血漿）は連結可能匿名化を行った後、 -80°C で凍結保存した。

(2) 血液サンプルの作製

タンパク質と修飾糖鎖を遊離させる目的で、血漿を N-グリコシダーゼ F 及びトリプシンにより処理した。具体的には、 $100\mu\text{L}$ の血漿に、純水（ $165\mu\text{L}$ ）、 1M 重炭酸アンモニウム（ $25\mu\text{L}$ ）、及び 120mM ジチオスレイトール（ $25\mu\text{L}$ ）を加え、 60°C で 30 分間静置した後、 123mM ヨードアセトアミド（ $50\mu\text{L}$ ）を加え、室温、遮光下で 1 時間静置した。続いて、トリプシン（ 2000unit 、 $25\mu\text{L}$ ）を加え、 37°C で 1 時間静置した後、 80°C で 15 分間加熱することによりトリプシンを変性させた。室温まで冷却させた後に、N-グリコシダーゼ F（ 10unit 、 $10\mu\text{L}$ ）を加え、 37°C でオーバーナイト静置した。 80°C で 15 分間加熱することにより、酵素を変性させ、最終量 $400\mu\text{L}$ の酵素処理血漿サンプルを得た。また、内部標準グルコースオリゴマー（1-20）（生化学工業 #800111）を 10mg/mL となるように純水に溶解し、内

部標準糖鎖溶液を作製した。上記酵素処理血漿サンプル $95\ \mu\text{L}$ に対し、内部標準糖鎖溶液 $5\ \mu\text{L}$ ($=50\ \mu\text{g}$ 相当) を添加し、全量 $100\ \mu\text{L}$ の溶液を調製した。このうち、 $20\ \mu\text{L}$ を糖鎖補足ビーズ (BlotGlyco (登録商標) for MALDI (住友ベークライト株式会社製)) により処理し、遊離した糖鎖の捕捉、及びラベル化を行った。

(3) 糖鎖分析の結果解析

ビーズに捕捉された糖鎖を精製・分離し、マトリックス (2, 5-dihydroxybenzoic acid) 溶液と混合して、MALDI-TOF-MS 測定に供した。質量分析器としては、Autoflex III smartbeam TOF/TOF (Bruker Daltonics 社製) を用いた。また、データの収集・解析には該機器附属のソフトウェア (例えば、flexControl, flexAnalysis) を用いた。また、レーザーイオン化は、通常ポジティブイオンモードで行い、リフレクターモードで検出した。

[0081] 得られたマスペクトルから $20\sim100$ のピークを同定した。膵臓癌患者に共通するピークを集め、膵臓癌患者および健常者の各ピークの面積を、多変量解析ソフト SIMCA-P/P+ (UMETRICS 社製) を用いて解析し、2 群 (患者群、健常者群) に分離できるピーク組み合わせを求めた。

[0082] その結果、上記 2 群分離を与える糖鎖ピークとして、質量電荷比 (m/z) が、 1326 、 1892 、 2054 、 2172 、 2216 、 2257 、 2334 、 2375 、 2521 、 2639 、 2681 、 2703 、 2725 、 2827 、 3030 および 3108 の糖鎖が検出された (図 4、表 1)。

[表1]

m/z	δ mass	推定の糖の構造
1326	1.974	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (Deoxyhexose) ₁
1892	0.013	(HexNAc) ₂ (Deoxyhexose) ₁ + (Man) ₁ (GlcNAc) ₂
2054	0.013	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (Deoxyhexose) ₁ + (Man) ₂ (GlcNAc) ₂
2172	0.009	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (NeuAc) ₁ + (Man) ₂ (GlcNAc) ₂
2216	0.012	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (Deoxyhexose) ₁ + (Man) ₂ (GlcNAc) ₂
2267	0.013	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (Deoxyhexose) ₁ + (Man) ₂ (GlcNAc) ₂
2334	0.009	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (NeuAc) ₁ + (Man) ₂ (GlcNAc) ₂
2375	0.009	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (NeuAc) ₁ + (Man) ₂ (GlcNAc) ₂
2521	0.008	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₁ + (Man) ₂ (GlcNAc) ₂
2639	0.013	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ + (Man) ₂ (GlcNAc) ₂
2681	0.005	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (NeuAc) ₂ + (Man) ₂ (GlcNAc) ₂
2703		2681 の Na 付加体
2725	0.009	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₁ + (Man) ₂ (GlcNAc) ₂
2827	0.004	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₂ + (Man) ₂ (GlcNAc) ₂
3030	0.004	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (Deoxyhexose) ₁ (NeuAc) ₂ + (Man) ₂ (GlcNAc) ₂
3198	2.689	(Hex) ₄ (HexNAc) ₂ (NeuAc) ₁ + (Man) ₂ (GlcNAc) ₂

[0083] なお、表 1 中の記号の意味は、下記の通りである。

δ mass = [測定値 m/z] - [理論値 m/z]

＋：「＋」の右側に示された構造が基本構造であり、左側に示された構造が付加構造である。

Hex: hexose (mannose)

HexNAc: N-acetylhexosamine (N-acetylglucosamine)

Deoxyhexose: fucose

Man: mannose

GlcNAc: N-acetylglucosamine

NeuAc: N-acetylneuraminic acid

産業上の利用可能性

[0084] 本発明によれば、被検者より採取された血液において、特定の N 結合型糖鎖を検出することにより、癌の早期の段階で簡便に消化器癌の検査を行うことが可能となるため、本発明は、特に医療分野において有用である。

請求の範囲

[請求項1]

消化器癌の検査方法であって、

(a) 被検者より採取された血液中の糖タンパクから糖鎖を遊離させる工程、

(b) 遊離させた糖鎖を精製する工程、および

(c) 精製した糖鎖において、下記 (i) および (i i) の特性を示す糖鎖を検出する工程、を含む方法。

(i) N結合型糖鎖である

(i i) MALDI-TOF-MS型分析機による質量分析を行った場合、ピークの質量電荷比 (m/z) が、2521、2216、2054、2681、3108、2695、1326、1892、2172、2257、2334、2375、2639、2703、2725、2827、および3030のいずれかを示す

[請求項2]

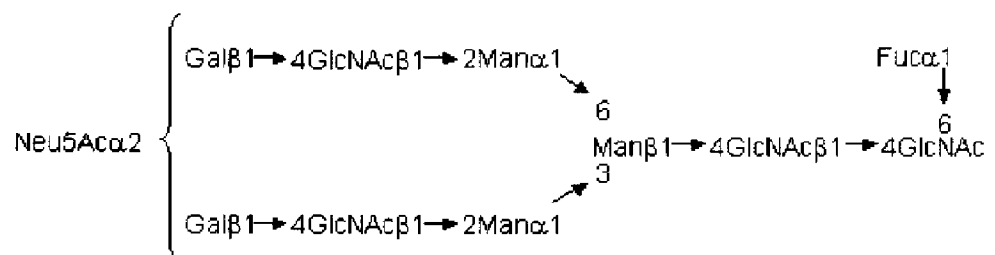
消化器癌の検査方法であって、

(a) 被検者より採取された血液中の糖タンパクから糖鎖を遊離させる工程、

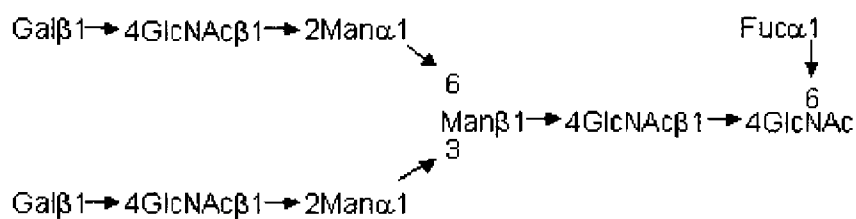
(b) 遊離させた糖鎖を精製する工程、および

(c) 精製した糖鎖において、下記の少なくともいずれか1つの糖鎖を検出する工程、を含む方法。

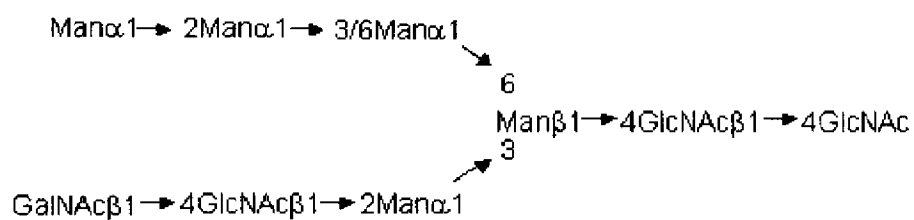
[化1]



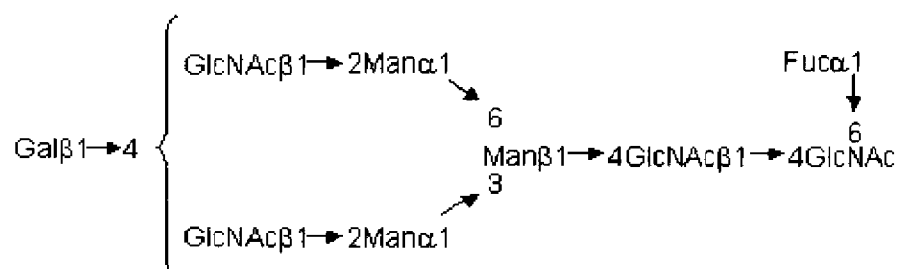
[化2]



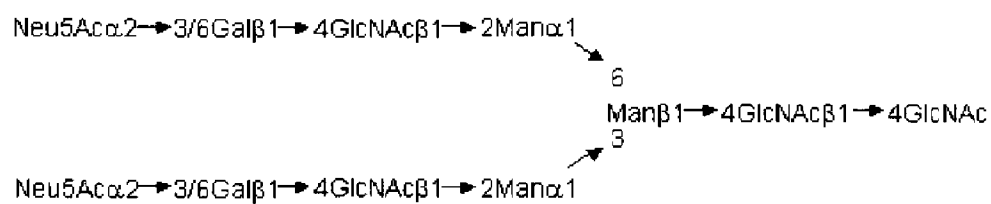
[化3]



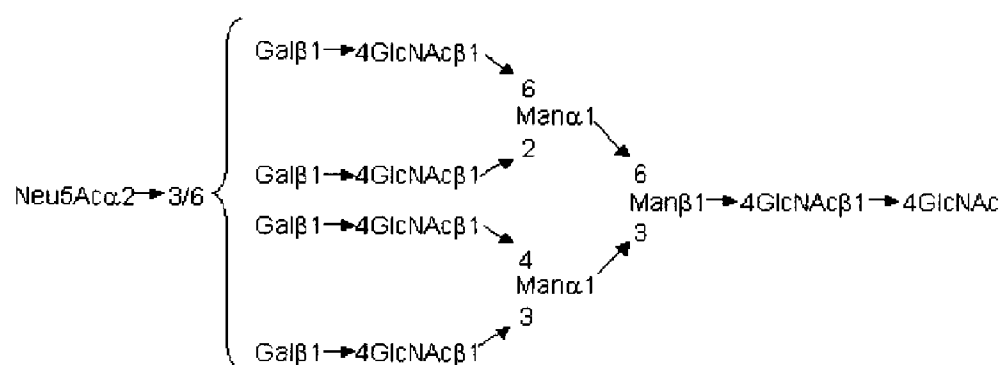
[化4]



[化5]

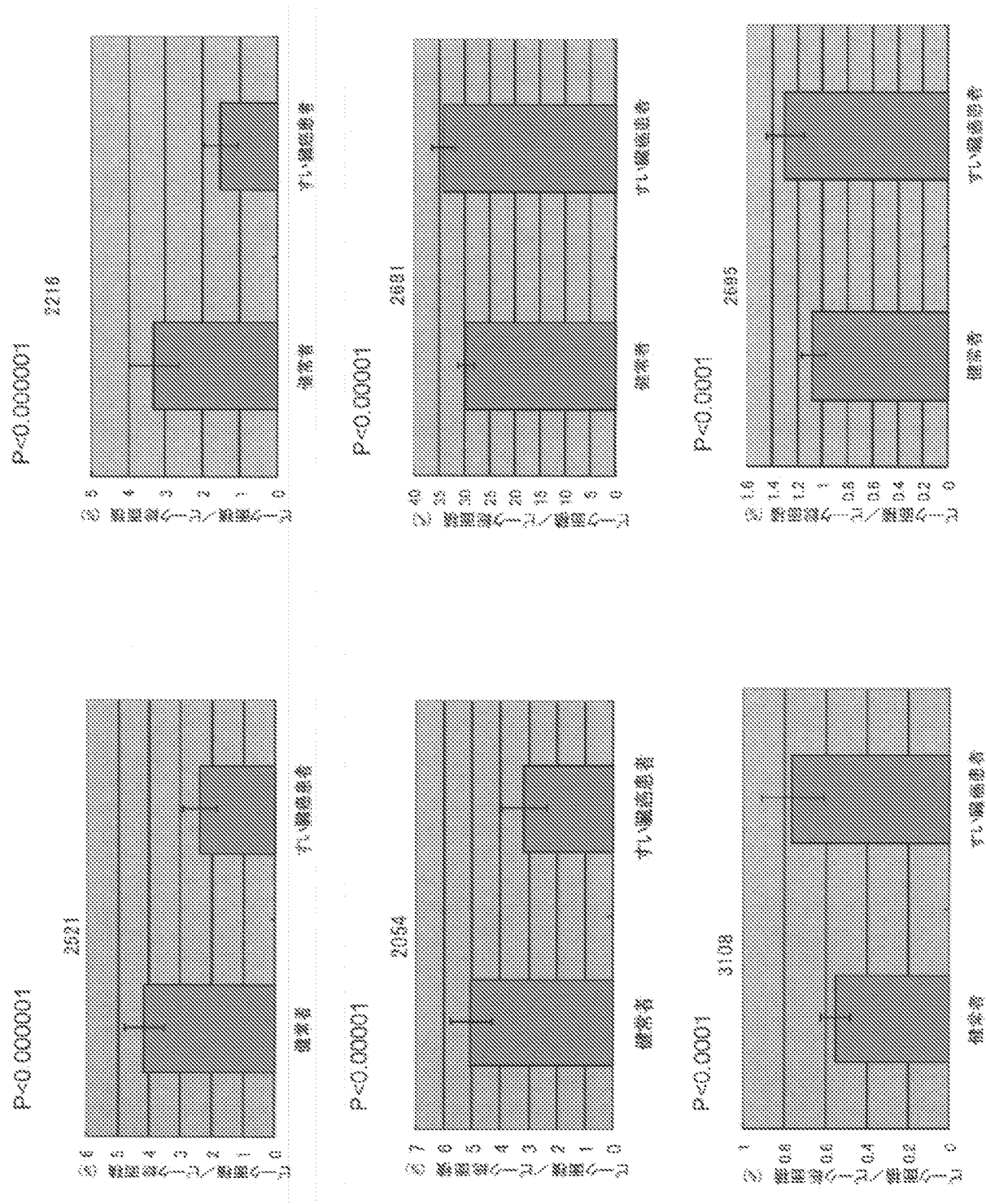


[化6]

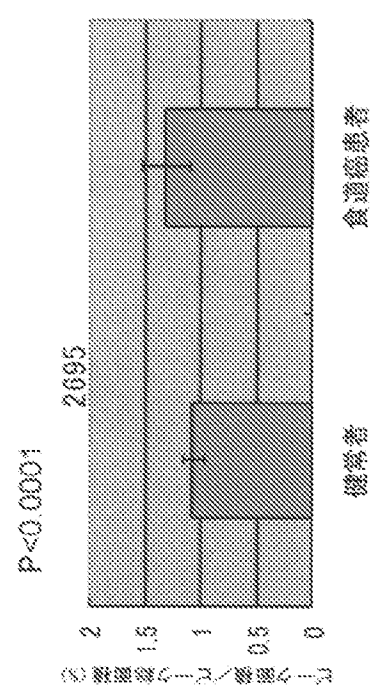
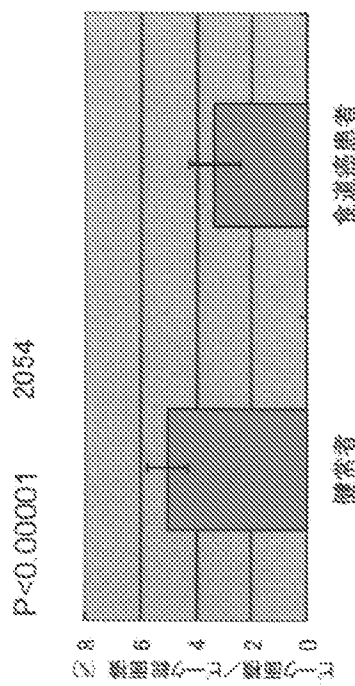
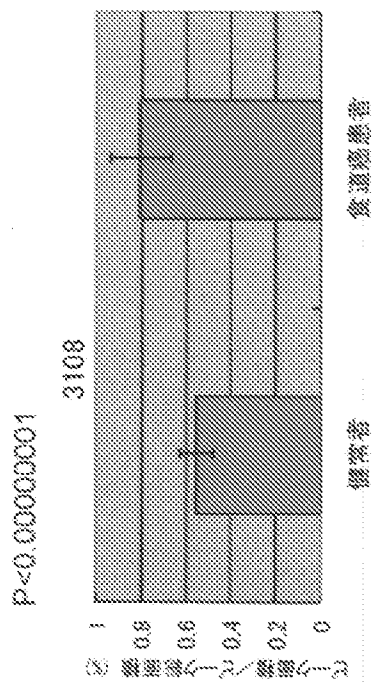
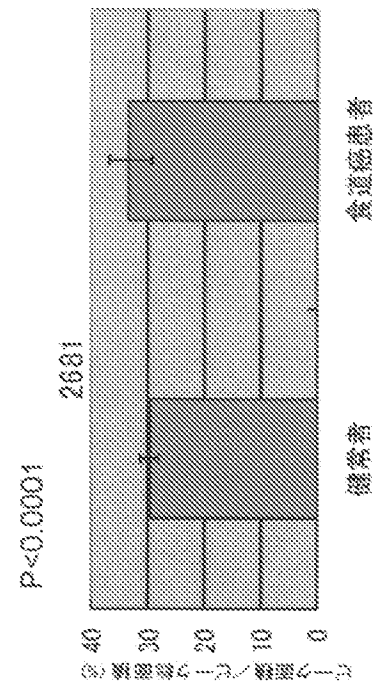
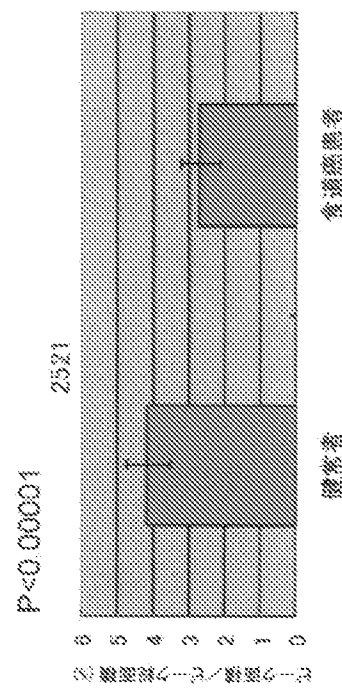
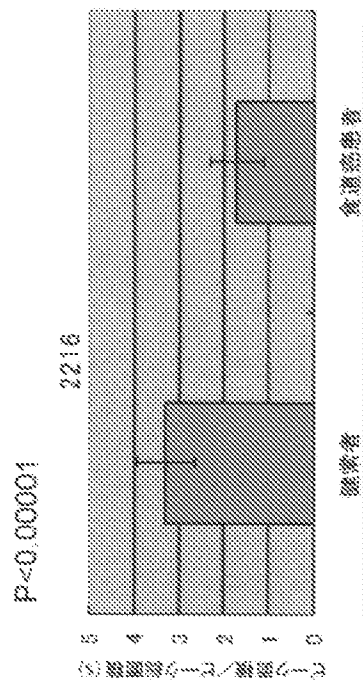


[請求項3] 消化器癌が、膵臓癌、食道癌、または胃癌である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

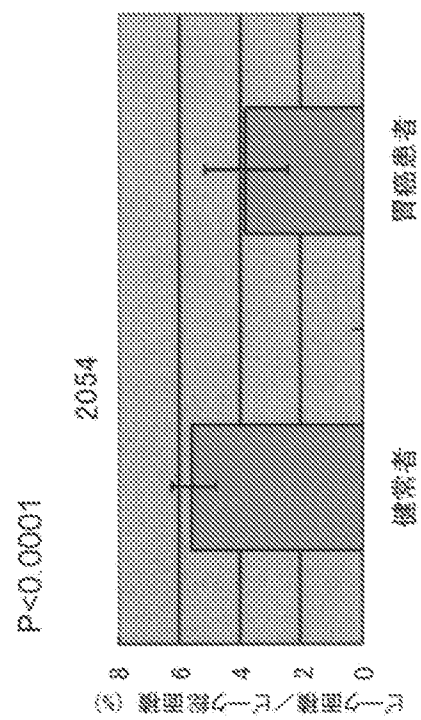
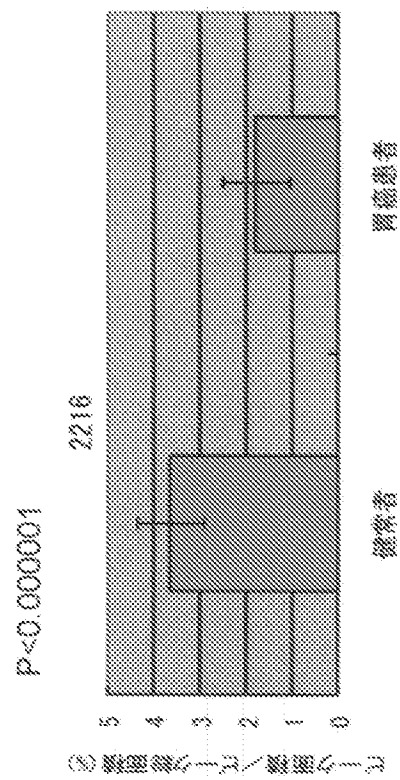
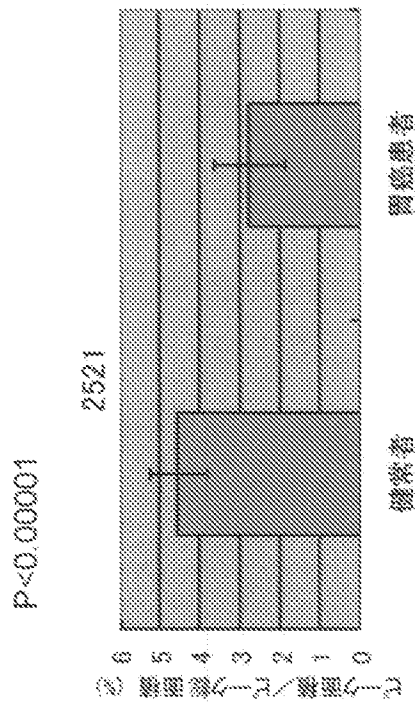
図1



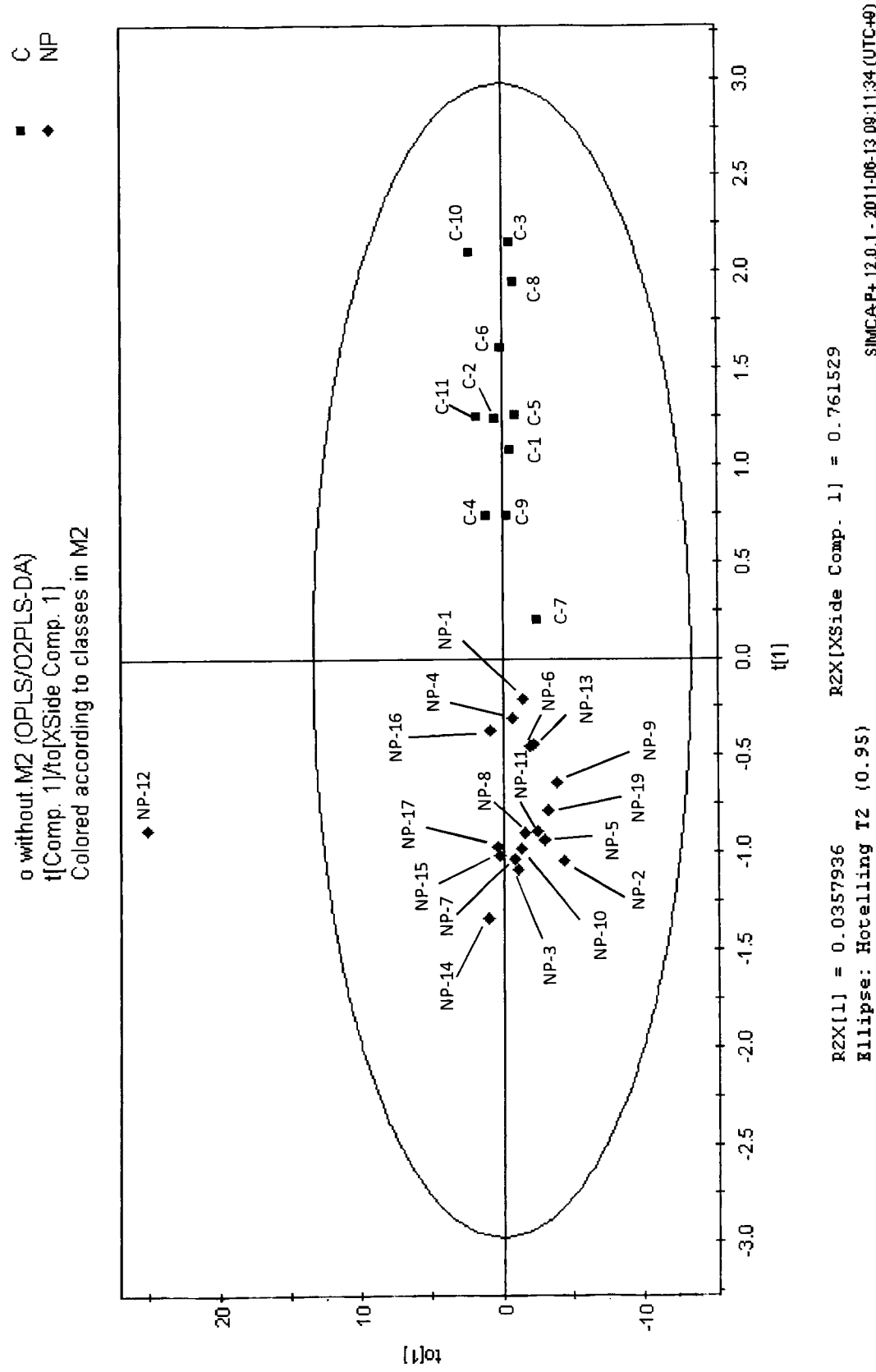
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/058727

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N27/62(2006.01) i, G01N33/574(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)

G01N27/62, G01N33/574

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/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.
X	Jia Zhao et al., "N-linked Glycosylation Profiling of Pancreatic Cancer Serum Using Capillary Liquid Phase Separation Coupled with Mass Spectrometric Analysis", Journal of Proteome Research, 2007, 6, pp. 1126-1138	1-3
A	Miyako Nakano et al., "Site-specific analysis of N-glycans on haptoglobin in sera of patients with pancreatic cancer: A novel approach for the development of tumor markers", International Journal of Cancer, 2008, 122, pp. 2301-2309	1-3
A	JP 2009-168470 A (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 30 July 2009 (30.07.2009), entire text; all drawings	1-3

☒ 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
10 May, 2011 (10.05.11)

Date of mailing of the international search report
24 May, 2011 (24.05.11)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/058727

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Jia Zhao et al., "Glycoprotein Microarrays with Multi-Lectin Detection: Unique Lectin Binding Patterns as a Tool for Classifying Normal, Chronic Pancreatitis and Pancreatic Cancer Sera", Journal of Proteome Research, 2007, 6, pp. 1864-1874	1-3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2011/058727

JP 2009-168470 A 2009.07.30 US 2009/181461 A1 2009.07.16

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. G01N27/62(2006.01)i, G01N33/574(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 (I P C))

Int.Cl. G01N27/62, G01N33/574

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 1 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 1 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 1 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/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	Jia Zhao et al., "N-linked Glycosylation Profiling of Pancreatic Cancer Serum Using Capillary Liquid Phase Separation Coupled with Mass Spectrometric Analysis", Journal of Proteome Research, 2007, 6, pp. 1126-1138	1 - 3
A	Miyako Nakano et al., "Site-specific analysis of N-glycans on haptoglobin in sera of patients with pancreatic cancer: A novel approach for the development of tumor markers", International Journal of Cancer, 2008, 122, pp. 2301-2309	1 - 3

☒ 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

1 0 . 0 5 . 2 0 1 1

国際調査報告の発送日

2 4 . 0 5 . 2 0 1 1

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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

2W

3 8 0 7

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 9 2

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
A	JP 2009-168470 A (和光純薬工業株式会社) 2009.07.30、全文、全 図	1 - 3
A	Jia Zhao et al., "Glycoprotein Microarrays with Multi-Lectin Detection: Unique Lectin Binding Patterns as a Tool for Classifying Normal, Chronic Pancreatitis and Pancreatic Cancer Sera", Journal of Proteome Research, 2007, 6, pp. 1864-1874	1 - 3

JP 2009-168470 A

2009. 07. 30

US 2009/181461 A1

2009. 07. 16
