

(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  
2014年10月2日(02.10.2014)



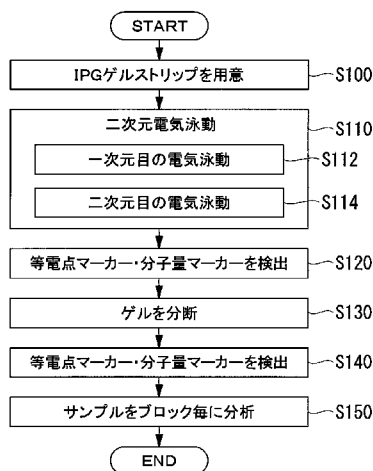
(10) 国際公開番号  
**WO 2014/156293 A1**

- (51) 国際特許分類:  
G01N 27/447 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/052245
- (22) 国際出願日: 2014年1月31日(31.01.2014)
- (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 2013-071753 2013年3月29日(29.03.2013) JP
- (71) 出願人: シャープ株式会社(SHARP KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒5458522 大阪府大阪市阿倍野区長池町2番22号 Osaka (JP). 独立行政法人国立がん研究センター(NATIONAL CANCER CENTER) [JP/JP]; 〒1040045 東京都中央区築地5丁目1番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 木下 英樹(KINOSHITA Hideki). 鵜沼 豊(UNUMA Yutaka). 近藤 格(KONDO Tadashi); 〒1040045 東京都中央区築地5丁目1番1号 独立行政法人国立がん研究センター内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 船山 武, 外(FUNAYAMA Takeshi et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 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, BN, 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, IR, IS, KE, KG, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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, RW, SD, SL, 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, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI

[続葉有]

(54) Title: ANALYSIS METHOD

(54) 発明の名称: 分析方法



- S100 Prepare IPG gel strip  
S110 Two-dimensional electrophoresis  
S112 First-dimension electrophoresis  
S114 Second-dimension electrophoresis  
S120, S140 Detect isoelectric point marker/molecular weight marker  
S130 Divide gel  
S150 Analyze samples by block

(57) Abstract: An analysis method including a step for subjecting a target object to two-dimensional electrophoresis in an isoelectric point direction and a molecular weight direction substantially orthogonal to the isoelectric point direction, a step for dividing a medium including the target object subjected to two-dimensional electrophoresis at a division face along the isoelectric point direction and a division face along the molecular weight direction, and a step for comparing the target object between the divided mediums.

(57) 要約: 対象物体を、等電点方向と、該等電点方向に略直交する分子量方向とに二次元電気泳動させる工程と、前記二次元電気泳動させた対象物体を含む媒体を、前記等電点方向に沿った分断面と、前記分子量方向に沿った分断面とで格子状に分断する工程と、前記分断された媒体間で前記対象物体を比較する工程と、を含む分析方法。

**WO 2014/156293 A1**



(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, 添付公開書類:  
MR, NE, SN, TD, TG).

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

## 明 細 書

発明の名称：分析方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、分析方法に関する。

本願は、2013年3月29日に、日本に出願された特願2013-071753号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

### 背景技術

[0002] 生物活動を直接的に支えているタンパク質を網羅的に解析する手法として近年プロテオーム解析が盛んに行われている。プロテオームとは、特定の細胞、器官、及び臓器の中で生産されているタンパク質全体のことである。そのうちの一つの技術である二次元電気泳動法は、分解能が高く、一度で数千種類のタンパク質を検出できるために、タンパク質等の生体サンプルの分離方法として多用されている。二次元電気泳動では、タンパク質の物理的な性質に基づいて、等電点電気泳動で分離された後、さらにSDS-PAGEにより分子量方向に分離される。等電点電気泳動は、ゲルに電圧を印加し、タンパク質の等電点の違いにより分離をおこなう手法である。また、SDS-PAGEによる分離では、陰イオン系界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム（SDS）とタンパク質が複合体を形成した状態で電気泳動を行うSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）が広く利用されている。

[0003] 二次元電気泳動によってタンパク質は平板上のポリアクリルアミドゲル内にスポットとして検出される。また、各タンパク質スポットのタンパク質を同定する技術として、ペプチドマスフィンガープリント法があり、この方法を用いる事でスポット内の各タンパク質の種類を決定することが可能である。この方法は、分離されたゲル中のスポットを膜に転写して、膜中のスポットでも同様にタンパク質を同定することができる。

[0004] ペプチドマスフィンガープリント法では、各タンパク質のスポットをゲル

の状態で切り出し、そのプラグ状のゲルを液体状のバッファが漏れないチャンバーに移す。次に、トリプシン処理バッファで置換を行った後に、トリプシン等のタンパク質消化酵素でゲル内のタンパク質をペプチドに消化する。そして、ゲルから溶出したペプチドに対して質量分析装置を用いて質量分析を行い、予めデータベース上などで推定されているタンパク質から予想されるペプチド断片の質量スペクトルと、実測された質量スペクトルのパターンを比較照合し、消化前のタンパク質を同定する。

[0005] スポットまたはバンドの切り出し方法としては、剃刀やメス等の刃物やピペットチップ、また筒状の器具により自動でカットする装置等を用いて切り抜く方法が知られている（特許文献1参照）。また、二次元電気泳動で分離されたタンパク質を含むゲルの一ブロックを切り取って、ゲル中のタンパク質をペプチドに消化する方法も知られている（非特許文献1参照）。

[0006] 上記各方法は、分離された生体サンプルの一部を解析する手法であるが、ゲルを複数に分画する方法も知られている。非特許文献2では、溶液中で等電点電気泳動によって分離したタンパク質を分画する方法やSDS-PAGEによって分離したタンパク質を溶液中に溶出させることで分画する方法が開示されている。これらの分画されたタンパク質はタンパク質の一つの物理的性質によってのみ分画されている。そのため、実際の分子量または等電点にのみ基づいて分画される。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0007] 特許文献1：特開2007-209360号公報

### 非特許文献

[0008] 非特許文献1：PNAS vol. 97, NO. 17, 15 Aug. 2000, 9390-9395

非特許文献2：Nature vol. 480, 8 Dec. 2011, p 254

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0009] しかしながら、非特許文献2に記載の方法では、分子量のみに基づく分画、或いは等電点のみに基づく分画が行われるため、タンパク質などの対象物体に関する十分な情報を得ることができない場合がある。すなわち、分子量のみに基づく分画では等電点シフト情報が含まれない為に、タンパク質翻訳後の修飾情報が曖昧となる。また、等電点のみに基づいて分画される場合には、プロセッシングや糖鎖付加等による質量方向の変動が不明となる。非特許文献1に記載の方法においても、1ブロックを切り取っているために、同様のタンパク質のプロセッシングの情報を得ることができない。

[0010] 本発明は、このような事情を考慮してなされたものであり、2次元電気泳動により分離された対象物体を、特定の等電点領域と分子量領域を持ったまま質量分析器を用いて高感度で検出することを目的の1つとする。

### 課題を解決するための手段

[0011] 本発明の一態様は、対象物体を、等電点方向と、該等電点方向に略直交する分子量方向とに二次元電気泳動させる工程と、前記二次元電気泳動させた対象物体を含む媒体を、前記等電点方向に沿った分断面と、前記分子量方向に沿った分断面とで格子状に分断する工程と、前記分断された媒体間で前記対象物体を比較する工程と、を含む分析方法である。

### 発明の効果

[0012] 本発明の一態様によれば、2次元電気泳動により分離された対象物体を、特定の等電点領域と分子量領域を持ったまま質量分析器を用いて高感度で検出することができる。

### 図面の簡単な説明

[0013] [図1]第1実施形態に係る分析方法の流れを示すフローチャートの一例である。

[図2] I P Gゲルストリップ1の外観形状の一例を示す図である。

[図3]等電点電気泳動装置 10 の構成の一例を示す図である。

[図4]二次元目電気泳動装置 30 の一部についての斜視図、およびその A-A 線における断面図である。

[図5]二次元目電気泳動装置 30 に I P G ゲルストリップ 1 が導入された様子を示す図である。

[図6]二次元電気泳動が行われた後のサンプル分離媒体（ゲル） 37 を撮像した撮像画像の一例である。

[図7A]ゲルを切断する切断面を示す図である。

[図7B]切断されたゲルのブロックが除去された後のサンプル分離部 36 を示す図である。

[図8]ブロックにサンプルを分割する方法と M S ベースプロテオミクスを用いたタンパク質発現比較を組み合わせて得られた情報を表示する方法を示す図である。

[図9]翻訳後修飾にある差異をブロック毎に検出する様子を示す図である。

[図10A]切断位置の分子量と等電点を推定できるサンプル分離媒体支持板 70 を示す図である。

[図10B]切断位置の分子量と等電点を推定できるサンプル分離媒体支持板 70 にサンプル分離媒体が設置された様子を示す図である。

[図10C]切断位置の分子量と等電点を推定できるサンプル分離媒体支持板 70 上のサンプル分離媒体からゲルブロックが切り取られた後を示す図である。

[図11]各ブロックの推定分子量と等電点の例を示す図である。

## 発明を実施するための形態

[0014] 以下、図面を参照し、本発明の分析方法の実施形態について説明する。

### <第 1 実施形態>

図 1 は、第 1 実施形態に係る分析方法の流れを示すフローチャートの一例である。まず、分析者は、I P G（固定化 pH 勾配ゲル）ゲルストリップ 1 を用意する（ステップ S 100）。図 2 は、I P G ゲルストリップ 1 の外観形状の一例を示す図である。図 2 に示すように、I P G ゲルストリップ 1 は、

一次元電気泳動用のサンプル含有媒体2と、サンプル含有媒体2を支持する支持体3とを備える。サンプル含有媒体2は、等電点電気泳動によりサンプル（対象物体）が分離される媒体である。サンプルは、例えばタンパク質などの生体サンプルである。サンプル含有媒体2としては、二次元電気泳動の一次元目用ゲルとして用いられるものが利用でき、例えば、ポリアクリルアミド、アガロース、寒天、およびデンプンからなる群より選ばれるゲル化剤によりゲル化された固定化pH勾配（Immobilized pH gradient：IPG）ゲルなどが好適に用いられる。

支持体3としては、例えばプラスチック製の板やフィルムなどを用いることができる。

[0015] サンプル含有媒体2に含まれるサンプルには、第1の色の色素が付与されている。また、サンプル含有媒体2には、例えば、等電点が既知の複数の物質であって、分子量が小さい物質に第2の色の色素が付与された等電点マーカート、等電点が小さく分子量が既知の複数の物質（ペプチド）に第3の色の色素が付与された分子量マーカが混入されている。分析者は、pH3-10のIPGゲルストリップ1に対して、例えば、ペプチドのスポットが略等間隔になるように、 $pI = [4.0], [5.0], [6.2], [7.3], [8.8], [9.6]$ のペプチドを混合してアプライする。これらの意義については、後述する。なお、分析者は、二次元目電気泳動を行う前に、分子量マーカを、サンプルに重ならない部分に添加してもよい。

[0016] 図1に戻り、分析者は、IPGゲルストリップ1に対して二次元電気泳動を行う（ステップS110；S112～S116）。まず、分析者は、IPGゲルストリップ1を等電点電気泳動装置10に導入し、一次元目の電気泳動（等電点電気泳動）を行う（ステップS112）。図3は、等電点電気泳動装置10の構成の一例を示す図である。図3に示すように、等電点電気泳動用装置10は、直方体形状を有し、中央部に細長い矩形状の電気泳動用チャンバー11が形成されている。電気泳動用チャンバー11の長手方向一端側には、サンプル含有媒体2の酸性側の端部が接触する第1電極12が設置

されており、他端側には、サンプル含有媒体 2 の塩基性側の端部が接触する第 2 電極 1 3 が設置されている。第 1 電極 1 2 と第 2 電極 1 3 は、電源 1 4 に接続される。

[0017] 第 1 電極 1 2 と第 2 電極 1 3 の間の電圧は、電圧制御部 1 7 により制御される。電圧制御部 1 7 には、第 1 電極 1 2 および第 2 電極 1 3 に流れる電流を測定する電流計 1 5 と、第 1 電極 1 2 と第 2 電極 1 3 の間の電圧を測定する電圧計 1 6 の検出値が入力される。また、等電点電気泳動用装置 1 0 は、電気泳動中にサンプル含有媒体 2 の乾燥を防ぐ為のカバー 1 8 を備える。

[0018] 等電点電気泳動は、IPGゲルストリップ 1 を搬送用のクリップ 2 0 を用いて電気泳動用チャンバー 1 1 内に載置し、IPGゲルストリップ 1 に当接する第 1 電極 1 2 および第 2 電極 1 3 に電圧を印加することにより行われる。等電点電気泳動は、例えば、タンパク質を含む 8M Urea, 2M Thiourea, 4% CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]propanesulfonate), 20mM dithiothreitol, 0.5% Ampholyte の膨潤液で IPG ストリップ 1 を膨潤させた後で、電圧を印加して行われる。電圧制御部 1 7 は、徐々に電圧を上昇させることにより、タンパク質を等電点に収束させる。

例えば、電圧制御部 1 7 は、例えば、200V で 5 分間維持、200V から 1000V まで 5 分間で上昇、1000V で 5 分間維持、1000V から 6000V まで 10 分間で上昇、6000V で 5 分間維持といった流れで電圧を上昇させる。等電点電気泳動によって、サンプル含有媒体 2 に含まれるタンパク質が、サンプル含有媒体 2 の長手方向にそれぞれの等電点 (pI) に応じた距離、泳動することになる。

[0019] 図 1 に戻り、分析者は、IPGゲルストリップ 1 を二次元目電気泳動装置 3 0 に導入し、二次元目の電気泳動を行う (ステップ S 1 1 4)。図 4 は、二次元目電気泳動装置 3 0 の一部についての斜視図、およびその A-A 線における断面図である。二次元目電気泳動装置 3 0 は、陰極 3 1 A が導入され

る二次元目電気泳動の陰極緩衝液槽 3 1 と、陽極 3 2 A が導入される二次元目電気泳動の陽極緩衝液槽 3 2 と、上部基板 3 3 と、サンプル分離媒体支持板 3 4 と、IPGゲルストリップ 1 が導入されるサンプルローディング部 3 5 と、サンプル分離部 3 6 とを備える。サンプル分離部 3 6 には、一次元目の電気泳動が終了したサンプルを分離するためのサンプル分離媒体（ゲル）3 7 が充填される。

[0020] 図 5 は、二次元目電気泳動装置 3 0 に IPGゲルストリップ 1 が導入された様子を示す図である。図 5 に示すように、IPGゲルストリップ 1 は、サンプルローディング部 3 5 に、サンプル含有媒体 2 を図中下向きにして載置される。この状態で、陰極緩衝液槽 3 1 と二次元目電気泳動の陽極緩衝液槽 3 2 には、泳動バッファ（ゲルと電極を導通させるための液体の試薬）が充填される。また、二次元目電気泳動装置 3 0 は、電源 4 0 と、電圧制御部 4 3 とを備える。陰極 3 1 A と陽極 3 2 A の間の電圧は、電圧制御部 4 3 によって制御される。電圧制御部 4 3 には、陰極 3 1 A および陽極 3 2 A を流れる電流を測定する電流計 4 1 と、陰極 3 1 A と陽極 3 2 A の間の電圧を測定する電圧計 4 2 の検出値が入力される。

[0021] 二次元目電気泳動を行う前に、分析者は、IPGゲルストリップ 1 を、例えば、50 mM DTT、500 mM Tris-HCl (pH 6.6)、4% SDS、12.5% Glycerol、0.005% BPB を含む水溶液に 5 分間沈積させる。その後、サンプルローディング部 3 5 に IPGゲルストリップ 1 を載置し、例えば、陰極 3 1 A と陽極 3 2 A の間に所望の電圧を 20 mA で印加し、30 分間電気泳動を行う。これによって、等電点電気泳動により IPGゲルストリップ 1 の長手方向に泳動したタンパク質を、図 5 における X 方向に泳動させることができる。

[0022] 図 6 は、二次元電気泳動が行われた後のサンプル分離媒体（ゲル）3 7 を撮像した撮像画像の一例である。図示するように、サンプル分離媒体 3 7 上では、左端部において上下方向に並ぶ複数の分子量マーカー 6 2 と、下端部において左右方向に並ぶ複数の等電点マーカー 6 5（図中の矢印が指し示す

スポット)とが、分析者によって視認可能となっている。図中「69」は、サンプルと未反応の色素であって電荷の大きい色素が溜まったものである。また、図6における「kDa」は、分子量を表す単位のキロダルトンである。

[0023] 図1に戻り、分析者は、等電点マーカーと分子量マーカーを検出し(ステップS120)、剃刀等を用いてゲルを分断する(ステップS130)。分析者は、等電点方向(図6における縦方向)に沿った分断面と、分子量方向(図6における横方向)に沿った分断面とで格子状(ブロック状)に分断する。剃刀の刃は、例えば、ゲルよりも硬質な樹脂、セラミック、金属等で出来ていても良く、ゲルを切断したときにゲル片を生じないように出来るだけ薄い刃が良い。

[0024] 図7A及び図7Bは、ゲル60を切断する切断面と、切断されたゲル60のブロックが除去された後のサンプル分離部36を示す図である。図7Aは、ゲル60が切断された直後を示しており、図7Bは、ブロックが除去された後の状態を示している。ゲル60の切断は、分子量マーカー62と等電点マーカー65を切断しないように、縦方向の切断位置63と横方向の切断位置64で行う。また、ゲルの切断の際に、ブロックよりも広い刃長の刃で切断を行うことで、縦方向の切断跡67と横方向の切断跡68が残る。この切断によって生じた切断跡を分子量マーカーと等電点マーカーの位置と比較することにより、切断した位置の分子量位置と等電点位置を算出することができる。

[0025] 図1に戻り、分析者は、等電点マーカーと分子量マーカーを検出し(ステップS140)、サンプルをブロック毎に分析する(ステップS150)。分析者は、例えば、ブロック状に切断したゲルを1mm<sup>3</sup>程度にして、マイクロチューブやマイクロプレート等の容器に移し、ゲル内のタンパク質の消化を行う。次に、分析者は、50μLの100%アセトニトリル(CH<sub>3</sub>CN)、50μLの50mM炭酸水素アンモニウム(NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)を加えて室温で15分間静置して脱染色する。次に、分析者は、100μLの100%C

H<sub>3</sub>CNを添加して室温で10分間静置し、10mM(DTT)、50mM(NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)を添加して60℃で10分間保温した後、20分間静置してタンパク質を還元する。次に、分析者は、30μLの50mMヨードアセトアミド、50mM(NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)を添加して室温で15分間静置してアルキル化を行なう。次に、分析者は、40μLの50mM(NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)を添加して室温で15分放置、さらに、100μLの100%CH<sub>3</sub>CNを添加して室温で30分間静置した後、ウェル内の液を排出して窒素下で10分間置く。次に、分析者は、トリプシン消化液25μlを加え、30℃で一夜インキュベートして、抽出されたペプチドを質量分析器のサンプルとする。上記消化液はエンドペプチダーゼで良くて、トリプシンに限定されない。また、ゲル内タンパク質消化の方法は上記方法に限定されない。質量分析器を用いて検出したペプチドデータによりタンパク質を同定する方法としてはMASCOT、X!Tandem、OMASSA、Andromeda等のようなデータベースと照合するソフトウェアを用いて行う。

[0026] なお、本発明に係る分断処理は、MSベースプロテオミクスを用いてタンパク質の発現量を比較定量する方法と組み合わせる事ができる。先ず、タンパク質を試料間で異なる標識化合物で標識した後に混合し、2次元電気泳動を行う。2次元電気泳動後のゲルを本方法でブロックに切断してペプチドを抽出して質量分析器で分析すると、標識されたタンパク質およびペプチドの物性は変わらないがその質量または標識に用いたタグ分子の質量がわずかにことなるため同時に分析を行ってもその質量の差で各試料に含まれていた各タンパク質を区別できるため、各タンパク質の量の差を比較することができる。

[0027] そのため比較したいタンパク質試料を混合して同時に分析を行うことで2次元電気泳動の差、ゲル内消化・ペプチドの溶出効率、液体クロマトグラフィーの溶出時間の差、および質量分析器の差のずれを最小にできる。標識で用いられる標識化合物には、SILAC、<sup>15</sup>N、<sup>18</sup>O、TNT、iTRAQ等があり、SILAC、<sup>15</sup>Nは代謝標識であり、安定同位体で標識されたア

ミノ酸や硝酸などを細胞に吸収させて細胞内で新規合成されるタンパク質を標識する。一方、 $^{18}\text{O}$ 、TNT、iTRAQ標識は化学標識であり、抽出したタンパク質またはペプチドを試験管内で安定同位体または安定同位体を含むタグ分子と反応させ直接標識できる。上記、代謝標識サンプルおよび直接標識サンプルともに本方法では使用することができる。

[0028] ブロックにサンプルを分割する方法とMSベースプロテオミクスを用いたタンパク質発現比較を組み合わせ得られた情報を表示する方法を図8に示す。翻訳されたタンパク質の多くが翻訳後修飾されているために、各々のタンパク質は翻訳後修飾が行われていると複数のブロックで検出される。SILAC (stable isotope labeling using amino acids in cell culture; 細胞培養液中のアミノ酸を用いた安定同位体ラベル) 法では試料間で異なる安定同位体を用いてラベルを行っているために、それらの等電点と分子量はほぼ同じであり同じブロックに検出され、それらの量はMSピーク量で比較することができる(図8のLC-MSスペクトル)。それら量に応じて図8のように二次元上にヒートマップで表示する事によってその差異を明確に表示できる。図8において、同じタンパク質であれば、検出された全区画でその増減は同じ傾向になると予想される。

[0029] 具体的には、天然型のL-Lysine塩酸塩(Light)を含む培地で培養した細胞と $^{13}\text{C}_6$ -L-Lysine塩酸塩(Heavy)を添加した培地で培養した細胞からタンパク質を調整して、等量でサンプルを混合した後、上記2次元電気泳動を行った後、ゲルをブロックで分割してトリプシンでゲル中のタンパク質をゲル内消化して得られたペプチドの質量を質量分析器により測定して、MASCOTによりタンパク質を同定できる。同じタンパク質であってもタンパク質の翻訳後修飾によって同定されてくるブロック数は複数にまたがる。比較するサンプル間でタンパク質の翻訳量に差があるかどうかの検出と、翻訳後修飾に差異があるとそれらの差もブロック毎で検出することが可能である(図9)。

[0030] 以上説明した第1実施形態の分析方法によれば、二次元電気泳動させたサ

ンプルを含む媒体を、等電点方向に沿った分断面と、分子量方向に沿った分断面とで格子状に分断し、分断された媒体間でサンプルを比較するため、2次元電気泳動により分離された対象物体を、特定の等電点領域と分子量領域を持ったまま質量分析器を用いて高感度で検出することができる。

[0031] また、第1実施形態の分析方法によれば、タンパク質混合液サンプルを細かく分画することで、低濃度タンパク質を検出し、タンパク質のプロセッシングや翻訳後修飾の差を比較でき、詳細に分画する事によってそれらの修飾位置の予測をすることができる。

[0032] <第2実施形態>

以下、第2実施形態に係る分析方法について説明する。第2実施形態に係る分析方法では、等電点マーカーや分子量マーカーを用いるのではなく、サンプル分離媒体支持板に付された基準表示に従って、分断された各ブロックの等電点と分子量を把握する。

[0033] 図10A～図10Cは、切断位置の分子量と等電点を推定できるサンプル分離媒体支持板70が用いられる様子を示す図である。図10Aに示すように、サンプル分離媒体支持板70は予め切断位置をペンやレーザー加工機等の好ましくはタンパク質の検出の差異に同時に検出可能な蛍光等の線（基準表示）73が描かれている。線73は、例えば、前述したマーカーと同じ波長の蛍光色素で印字されている。図10Bは、サンプル分離媒体支持板70にゲルが設置された様子を示す図である。二次元目電気泳動を行った後、線73上でゲルを切断して、ゲルブロックをチャンバー等に移動させる。図10B、図10Cにおいては、本来省略可能な分子量マーカー74と等電点マーカー76を、比較のために表示している。図10Cに示すように、泳動後に検出された分子量マーカーと等電点ペプチドマーカーと線73の位置を比較することによって、切断位置の正確な分子量と等電点を把握することができる。各ブロックの推定分子量と等電点の例を図11に示す。

[0034] 以下、ブロック毎の分析については第1実施形態と同様であるため、説明を省略する。

以上説明した第2実施形態の分析方法によれば、二次元電気泳動させたサンプルを含む媒体を、等電点方向に沿った分断面と、分子量方向に沿った分断面とで格子状に分断し、分断された媒体間でサンプルを比較するため、二次元電気泳動により分離された対象物体を、特定の等電点領域と分子量領域を持ったまま質量分析器を用いて高感度で検出することができる。

[0035] また、第2実施形態の分析方法によれば、タンパク質混合液サンプルを細かく分画することで、低濃度タンパク質を検出し、タンパク質のプロセッシングや翻訳後修飾の差を比較でき、詳細に分画する事によってそれらの修飾位置の予測をすることができる。

[0036] 以上、本発明を実施するための形態について実施形態を用いて説明したが、本発明はこうした実施形態に何等限定されるものではなく、本発明の要旨を逸脱しない範囲内において種々の変形及び置換を加えることができる。

[0037] 本発明は、以下の態様で実施することができる。

(付記1)

対象物体を、等電点方向と、該等電点方向に略直交する分子量方向とに二次元電気泳動させる工程（ステップS110）と、前記二次元電気泳動させた対象物体を含む媒体を、前記等電点方向に沿った分断面と、前記分子量方向に沿った分断面とで格子状に分断する工程（ステップS120）と、前記分断された媒体間で前記対象物体を比較する工程（ステップS130）と、を含む分析方法（図1）。

(付記2)

付記1記載の分析方法であって、前記二次元電気泳動が行われた状態で、基準となる複数の分子量および複数の等電点の位置に分析者によって視認可能なマーカー（62、65）が配置されるように、一次元目の電気泳動前および／または二次元目の電気泳動前に、既知の等電点と既知の分子量を持つマーカーを媒体に混入させる工程を更に含む、分析方法。

(付記3)

付記1記載の分析方法であって、前記二次元電気泳動させた対象物体を含

む媒体を保持する保持部材（70）に、分子量および等電点を示す基準表示（73）がなされており、前記対象物体を比較する工程において、前記基準表示から把握される分子量および等電点を用いる、分析方法。

（付記4）

付記1から3のうちいずれか1記載の分析方法であって、前記対象物体を比較する工程において、同定された前記対象物体の量を比較する、分析方法。

（付記5）

付記1から4のうちいずれか1項記載の分析方法であって、前記対象物体は、タンパク質であり、記対象物体を比較する工程において、同定された前記タンパク質を比較することにより、翻訳後修飾の差を比較する、分析方法。

（付記6）

付記1から5のうちいずれか1項記載の分析方法であって、前記対象物体は、タンパク質であり、前記対象物体を比較する工程において、前記分断された媒体内に含まれるタンパク質を抽出し、質量分析装置を用いて前記抽出したタンパク質を同定する、分析方法。

（付記7）

付記1から6のうちいずれか1項記載の分析方法であって、前記対象物体は、タンパク質であり、前記対象物体を比較する工程において、前記分断された媒体内に含まれるタンパク質をタンパク質分解酵素で消化し、該消化した結果生じたペプチドを抽出し、質量分析装置を用いて前記抽出したタンパク質を同定する、分析方法。

（付記8）

付記1から7のうちいずれか1項記載の分析方法であって、前記対象物体は、異なる安定同位体で標識したタンパク質サンプルを混合したものである、分析方法。

（付記9）

付記 1 から 7 のうちいずれか 1 項記載の分析方法であって、前記対象物体は、タンパク質であり、前記対象物体を比較する工程において、前記分断された媒体内に含まれるタンパク質をエンドペプチダーゼで切断し、質量分析装置を用いてタンパク質の同定と異なる安定同位体タンパク質の量を比較する、分析方法。

### 産業上の利用可能性

[0038] 本発明は、タンパク質などの生体サンプルを電気泳動により分離し、分離した生体サンプルを含むサンプル分離媒体を切り出して分離媒体中のサンプルを質量分析装置によって同定したり解析したりする手段に好適に利用することができる。

### 符号の説明

[0039] 1・・・I P Gゲルストリップ、2・・・サンプル含有媒体、3・・・支持体、10・・・等電点電気泳動装置、11・・・電気泳動用チャンバー、12・・・第1電極、13・・・第2電極、14・・・電源、15・・・電流計、16・・・電圧計、17・・・電圧制御部、18・・・カバー、30・・・二次元目電気泳動装置、31・・・二次元目電気泳動の陰極緩衝液槽、31A・・・陰極、32・・・二次元目電気泳動の陽極緩衝液槽、32A・・・陽極、33・・・上部基板、34・・・サンプル分離媒体支持板、35・・・サンプルローディング部、36・・・サンプル分離部、37・・・サンプル分離媒体、40・・・電源、41・・・電流計、42・・・電圧計、43・・・電圧制御部、60・・・ゲル、62・・・分子量マーカー、63・・・縦方向の切断位置、64・・・横方向の切断位置、65・・・等電点マーカー、67・・・縦方向の切断跡、68・・・横方向の切断跡、70・・・サンプル分離媒体支持板、73・・・線

## 請求の範囲

- [請求項1] 対象物体を、等電点方向と、該等電点方向に略直交する分子量方向とに二次元電気泳動させる工程と、
- 前記二次元電気泳動させた対象物体を含む媒体を、前記等電点方向に沿った分断面と、前記分子量方向に沿った分断面とで格子状に分断する工程と、
- 前記分断された媒体間で前記対象物体を比較する工程と、
- を含む分析方法。
- [請求項2] 請求項1記載の分析方法であって、
- 前記二次元電気泳動が行われた状態で、基準となる複数の分子量および複数の等電点の位置に分析者によって視認可能なマーカーが配置されるように、一次元目の電気泳動前および／または二次元目の電気泳動前に、既知の等電点と既知の分子量を持つマーカーを前記媒体に混入させる工程を更に含む、
- 分析方法。
- [請求項3] 請求項1記載の分析方法であって、
- 前記二次元電気泳動させた対象物体を含む媒体を保持する保持部材に、分子量および等電点を示す基準表示がなされており、前記対象物体を比較する工程において、前記基準表示から把握される分子量および等電点を用いる、
- 分析方法。
- [請求項4] 請求項1から3のうちいずれか1記載の分析方法であって、
- 前記対象物体を比較する工程において、同定された前記対象物体の量を比較する、
- 分析方法。
- [請求項5] 請求項1から4のうちいずれか1項記載の分析方法であって、
- 前記対象物体は、タンパク質であり、
- 記対象物体を比較する工程において、同定された前記タンパク質を

比較することにより、翻訳後修飾の差を比較する、  
分析方法。

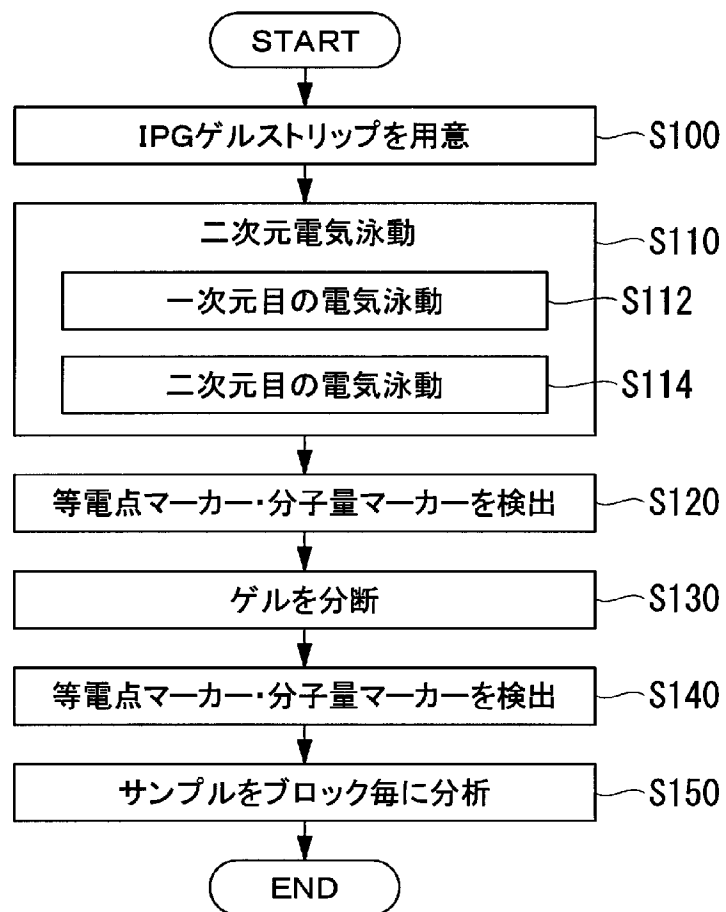
[請求項6] 請求項1から5のうちいずれか1項記載の分析方法であって、  
前記対象物体は、タンパク質であり、  
前記対象物体を比較する工程において、前記分断された媒体内に含まれるタンパク質を抽出し、質量分析装置を用いて前記抽出したタンパク質を同定する、  
分析方法。

[請求項7] 請求項1から6のうちいずれか1項記載の分析方法であって、  
前記対象物体は、タンパク質であり、  
前記対象物体を比較する工程において、前記分断された媒体内に含まれるタンパク質をタンパク質分解酵素で消化し、該消化した結果生じたペプチドを抽出し、質量分析装置を用いて前記抽出したタンパク質を同定する、  
分析方法。

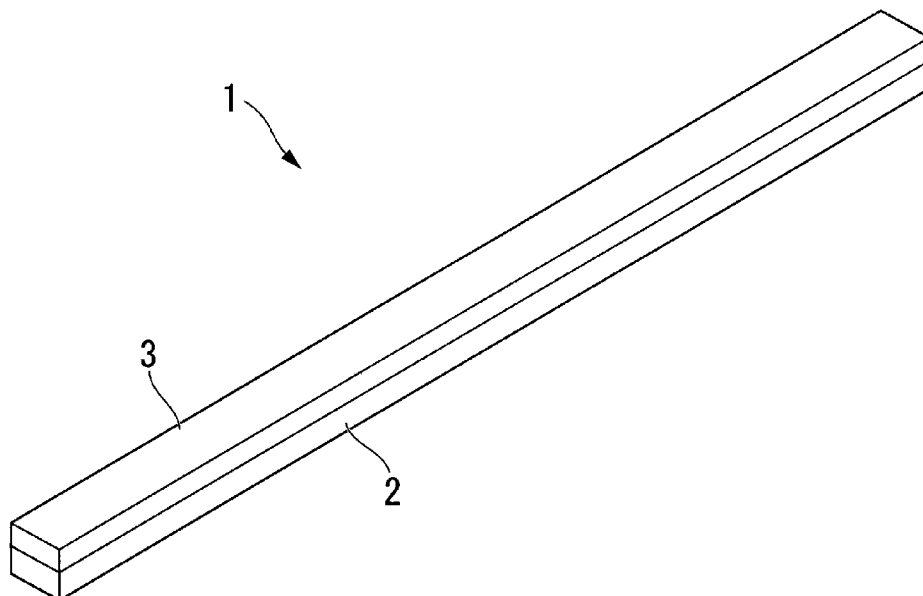
[請求項8] 請求項1から7のうちいずれか1項記載の分析方法であって、  
前記対象物体は、異なる安定同位体で標識したタンパク質サンプルを混合したものである、  
分析方法。

[請求項9] 請求項1から7のうちいずれか1項記載の分析方法であって、  
前記対象物体は、タンパク質であり、  
前記対象物体を比較する工程において、前記分断された媒体内に含まれるタンパク質をエンドペプチダーゼで切断し、質量分析装置を用いてタンパク質の同定と異なる安定同位体タンパク質の量を比較する、  
分析方法。

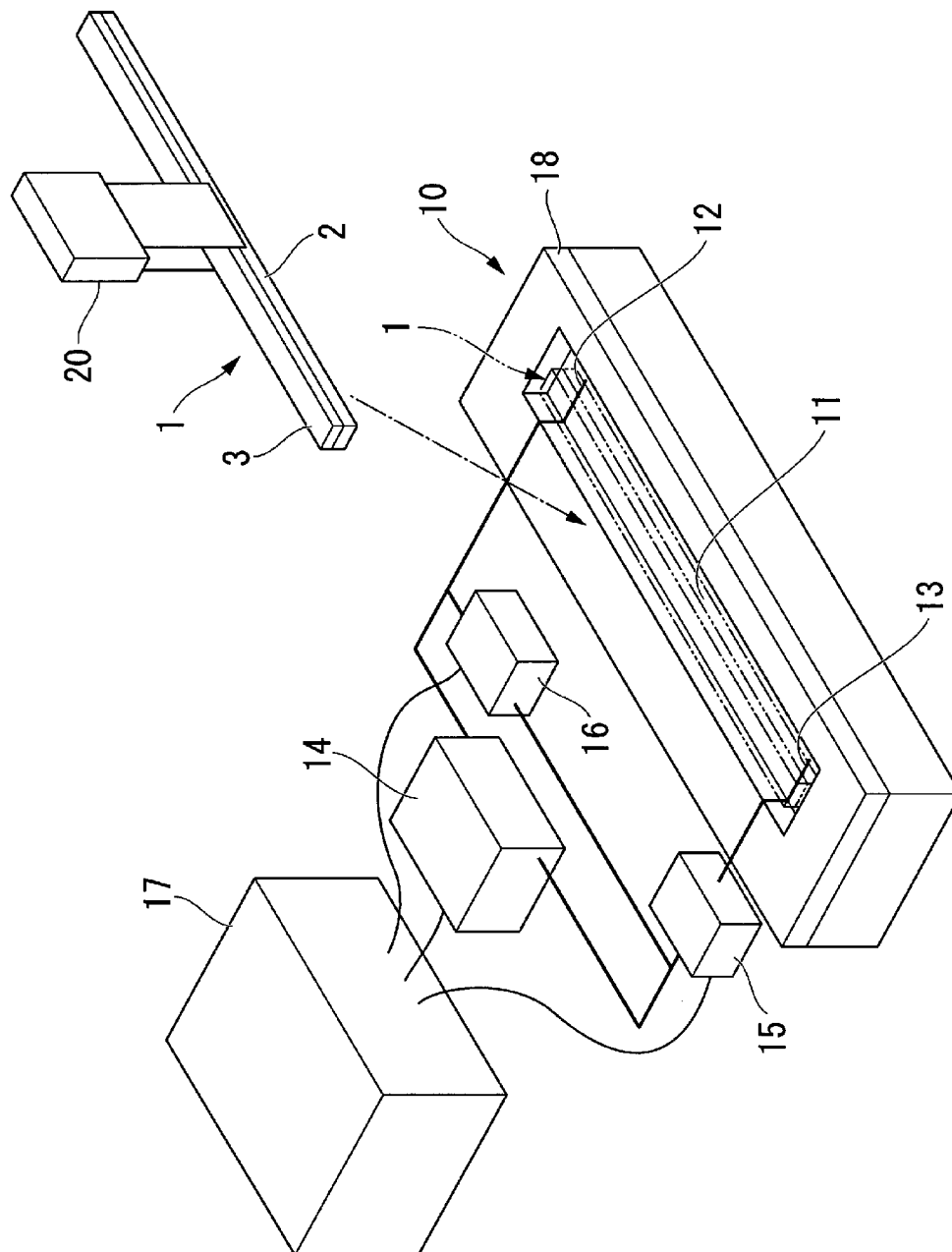
[図1]



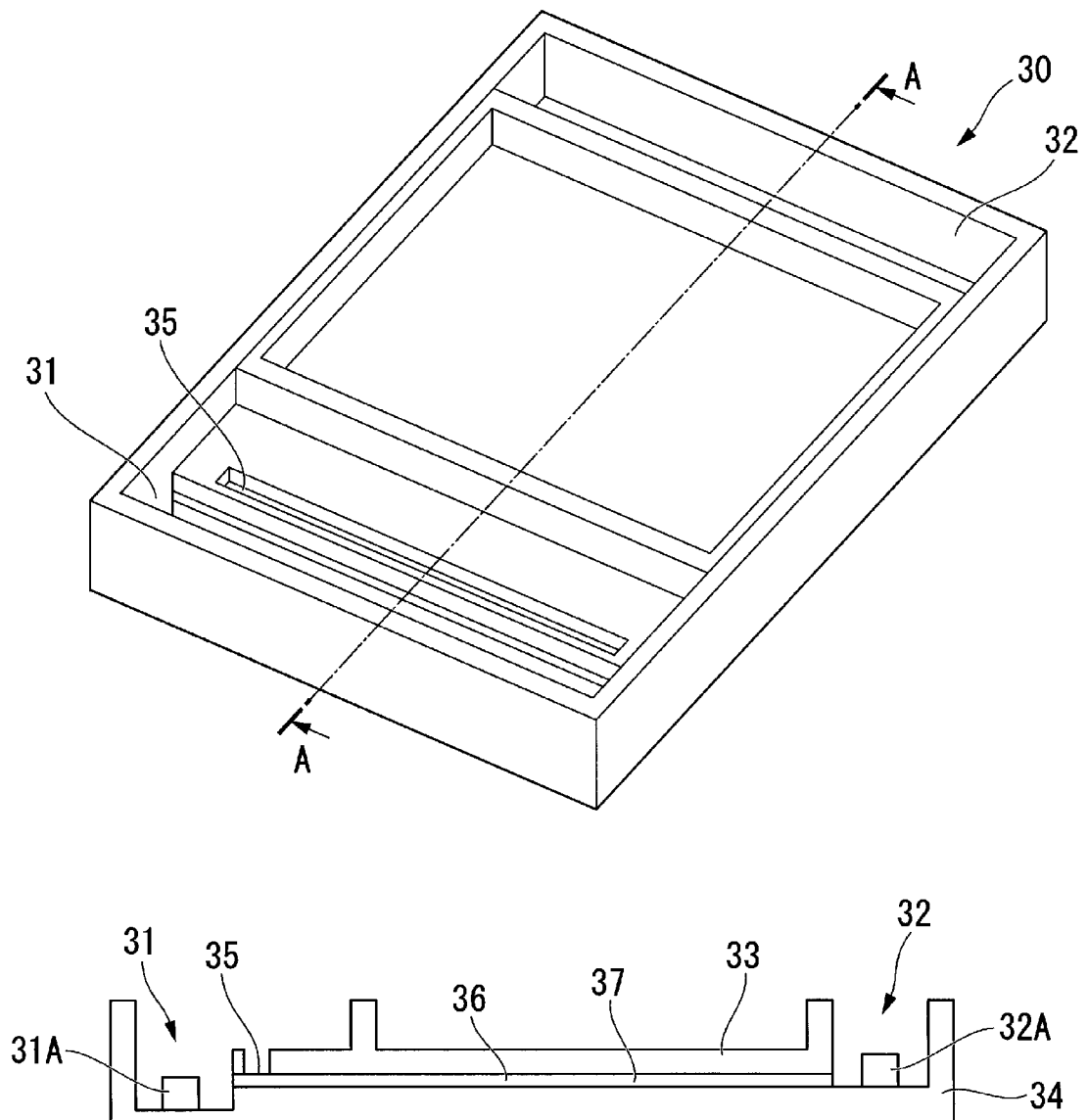
[図2]



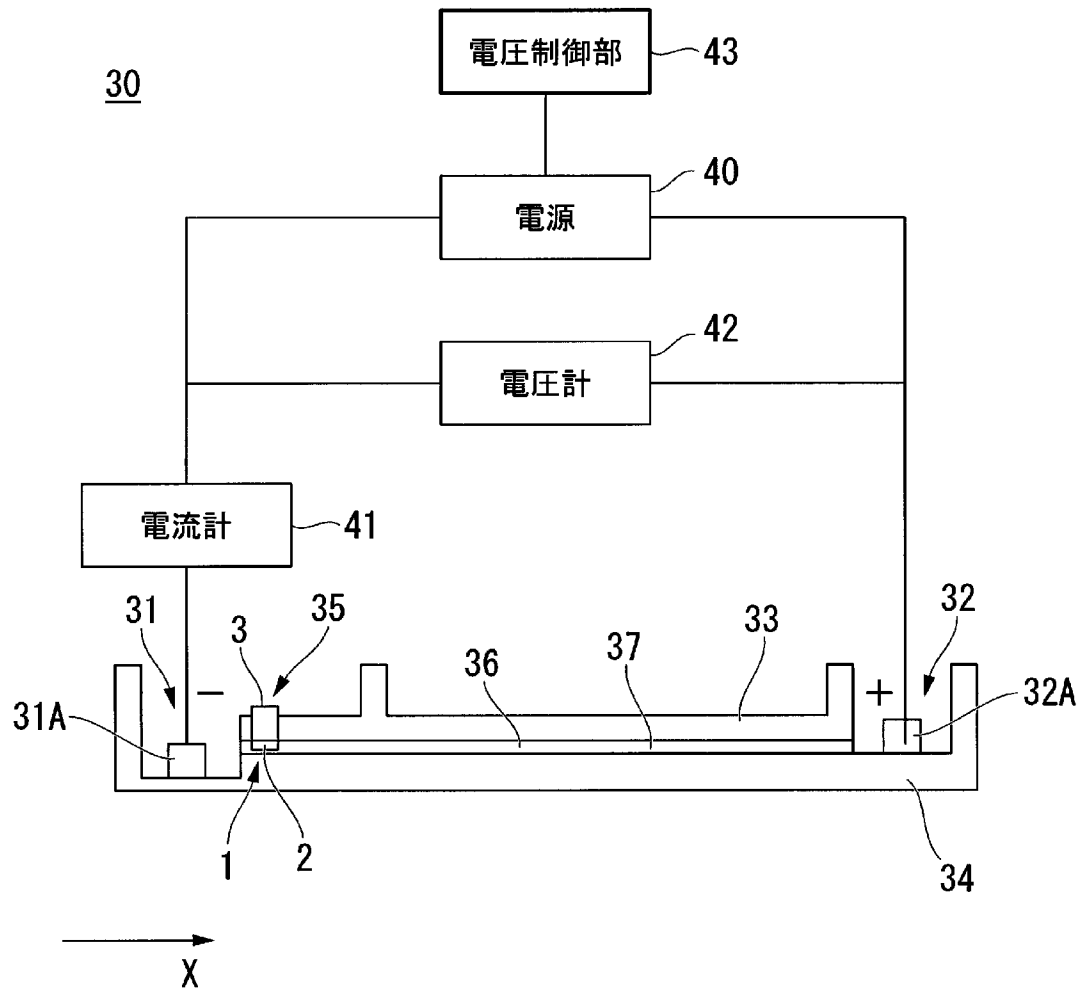
[図3]



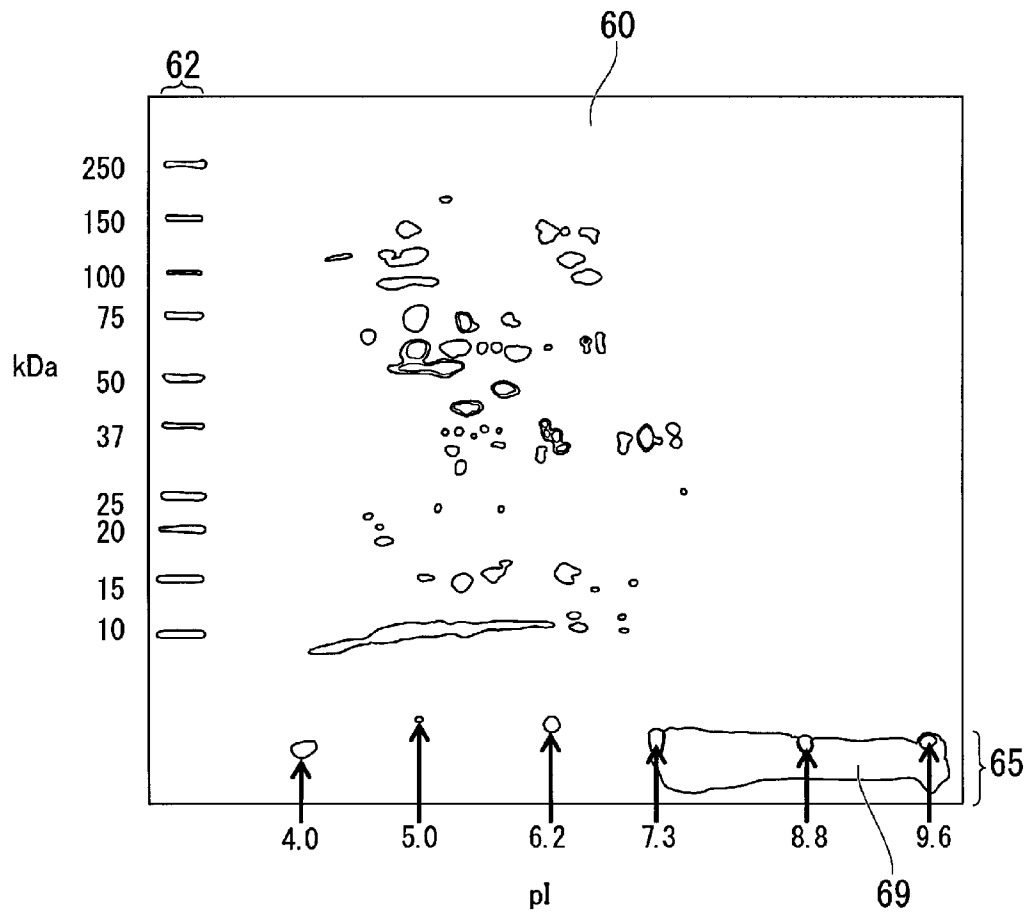
[図4]



[図5]

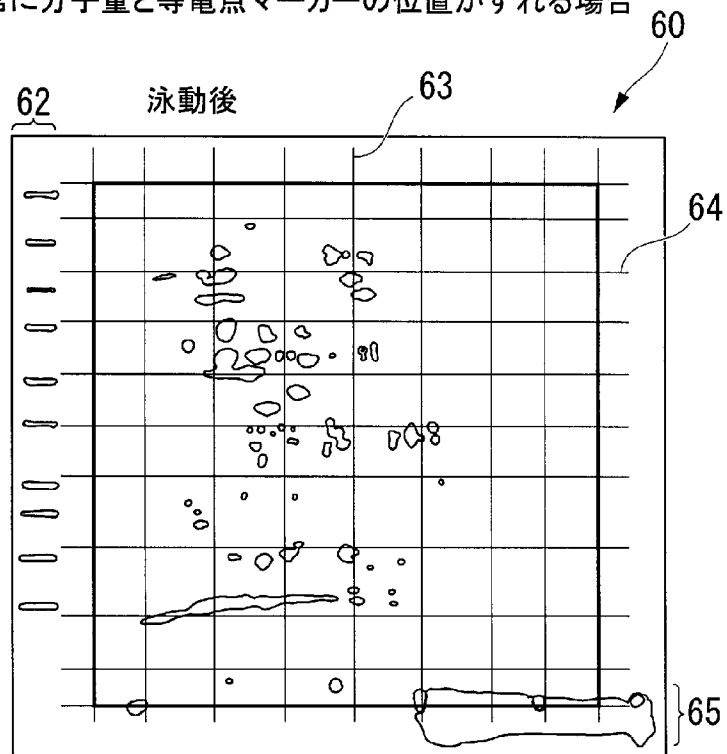


[図6]

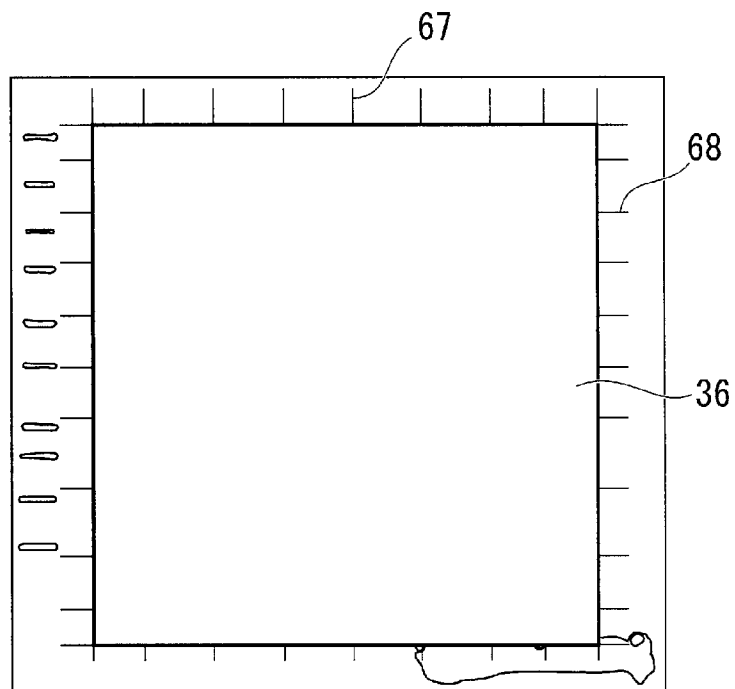


[図7A]

常に分子量と等電点マーカースの位置がずれる場合

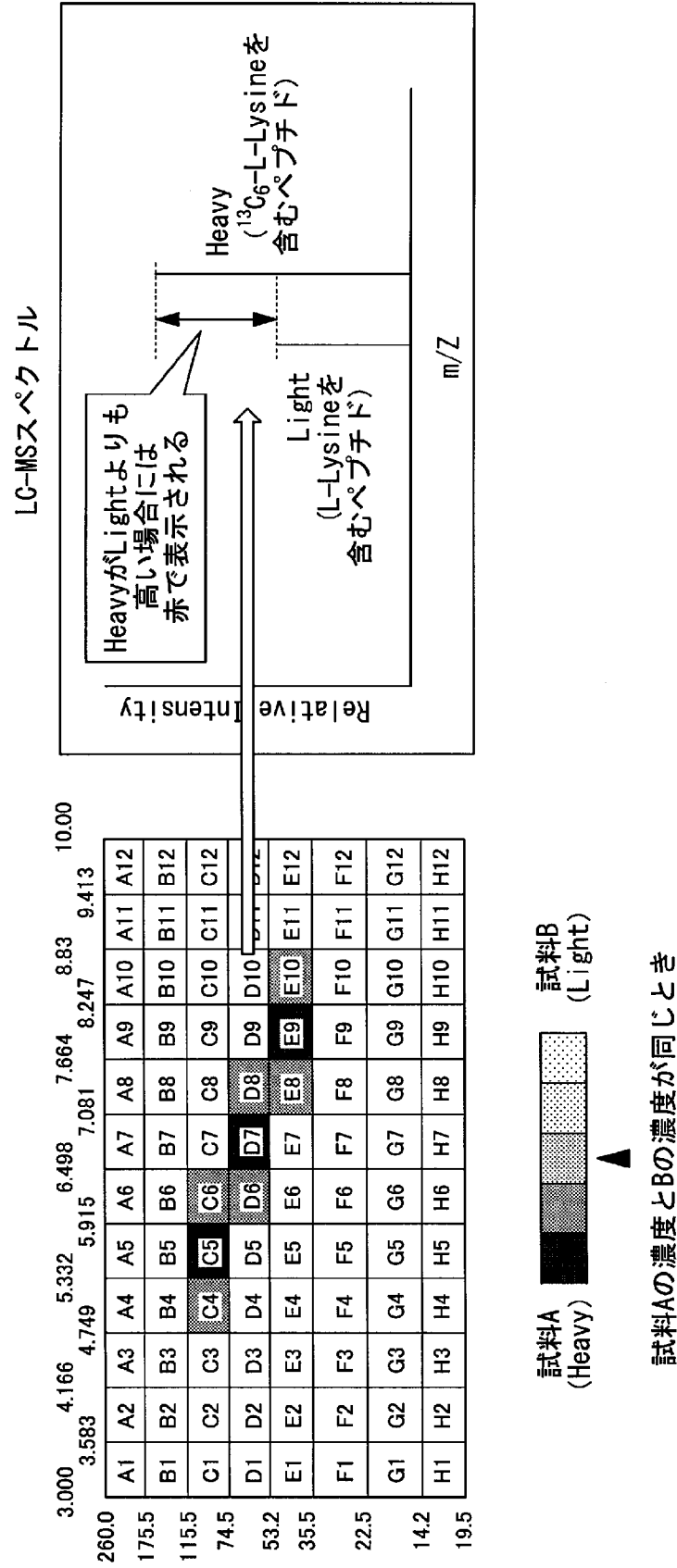


[図7B]

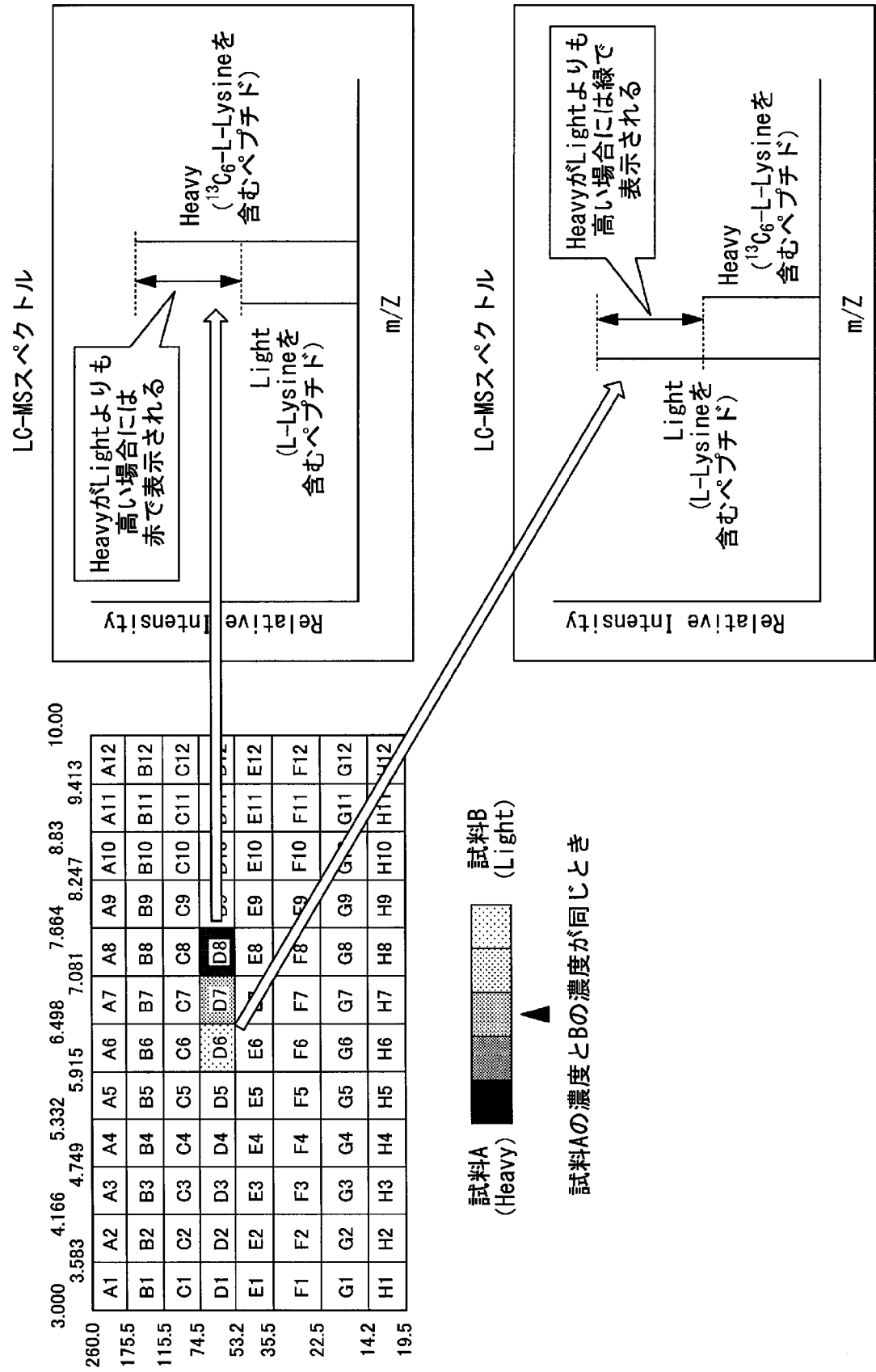


ブロックを回収しないゲルまで切断して  
切断位置をマーカーから推測できる

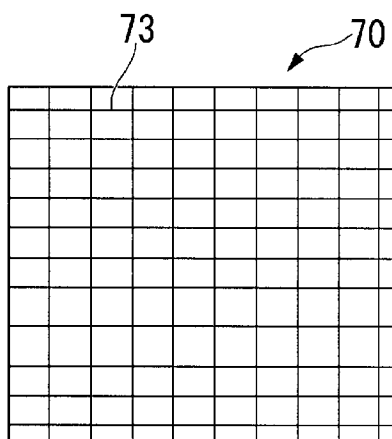
[図8]



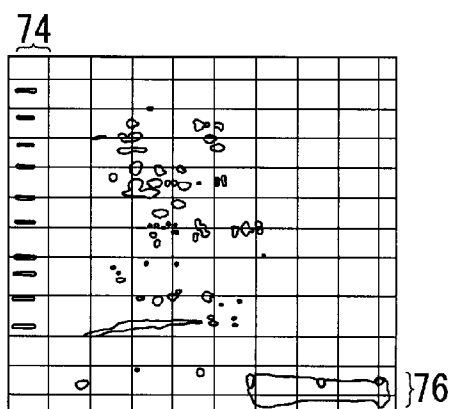
[図9]



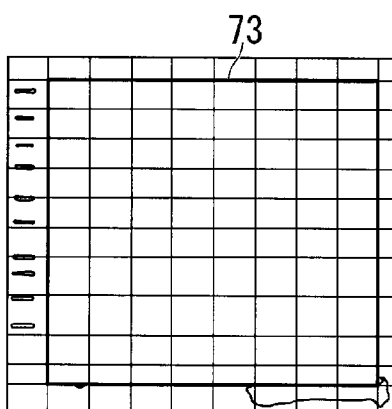
[図10A]



[図10B]

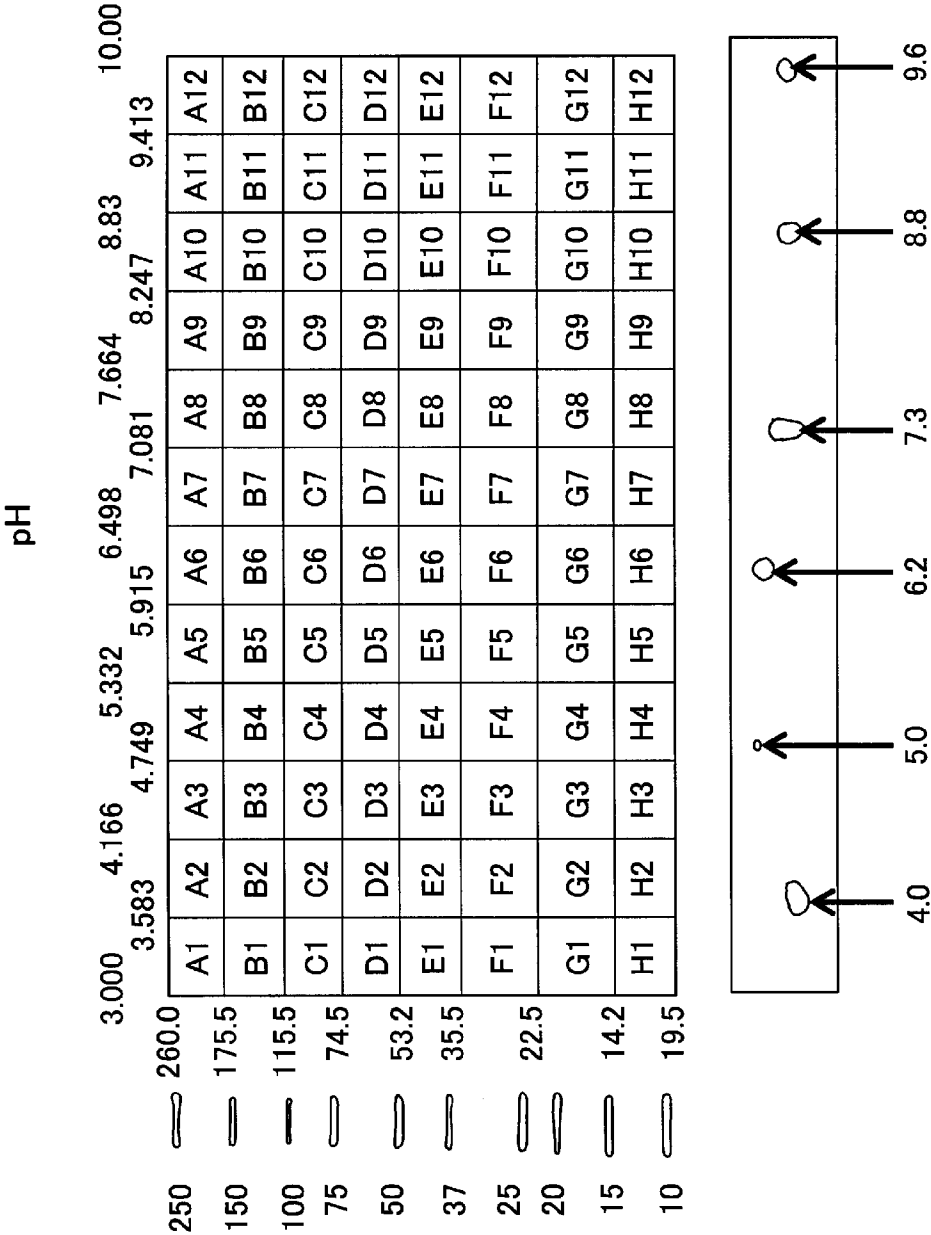


[図10C]



切断、ブロックの回収後  
印刷された印字の位置を  
内部標準を基準としてpI,Mwを算出する

[図11]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/052245

| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>G01N27/447(2006.01) i                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                       |                                                                                 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                       |                                                                                 |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>G01N27/447                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                       |                                                                                 |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2014<br>Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2014 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2014                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                       |                                                                                 |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>WPI                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                       |                                                                                 |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                       |                                                                                 |
| Category*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                    | Relevant to claim No.                                                           |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | WO 2007/073005 A1 (Keio University),<br>28 June 2007 (28.06.2007),<br>page 3, lines 21, 22; page 13, line 23 to page<br>14, line 25; fig. 5, 6<br>(Family: none)                                      | 1-9                                                                             |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | JP 2007-524069 A (Agilent Technologies Inc.),<br>23 August 2007 (23.08.2007),<br>paragraphs [0023], [0026]; fig. 1, 3<br>& US 2006/0160127 A1 & EP 1668351 A<br>& WO 2005/029061 A1 & AU 2003304479 A | 1-9                                                                             |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                       |                                                                                 |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"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)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"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<br>"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<br>"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<br>"&" document member of the same patent family |                                                                                                                                                                                                       |                                                                                 |
| Date of the actual completion of the international search<br>31 March, 2014 (31.03.14)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                       | Date of mailing of the international search report<br>08 April, 2014 (08.04.14) |
| Name and mailing address of the ISA/<br>Japanese Patent Office                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                       | Authorized officer                                                              |
| Facsimile No.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                       | Telephone No.                                                                   |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/052245

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                        | Relevant to claim No. |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | JP 2004-500567 A (The Regents of the University of Michigan),<br>08 January 2004 (08.01.2004),<br>claim 1; paragraphs [0147] to [0150]<br>& US 2002/0039747 A1 & EP 1256001 A<br>& WO 2001/058925 A2 & AU 3488001 A<br>& CA 2400460 A & MX PA02007665 A<br>& CA 2446337 A | 1-9                   |
| A         | JP 2012-007893 A (Toppan Printing Co., Ltd.),<br>12 January 2012 (12.01.2012),<br>entire text; all drawings<br>(Family: none)                                                                                                                                             | 1-9                   |
| A         | JP 2005-069905 A (Hitachi Science Systems Ltd.),<br>17 March 2005 (17.03.2005),<br>paragraphs [0026] to [0029]<br>(Family: none)                                                                                                                                          | 1-9                   |
| A         | US 2007/0119712 A1 (Agilent Technologies, Inc.),<br>31 May 2007 (31.05.2007),<br>fig. 1E<br>& EP 1668350 A & WO 2005/029060 A1<br>& AU 2003278178 A                                                                                                                       | 1-9                   |
| A         | JP 09-210961 A (M&S Instruments Inc.),<br>15 August 1997 (15.08.1997),<br>entire text; all drawings<br>(Family: none)                                                                                                                                                     | 1-9                   |
| A         | JP 2009-509127 A (Jae Gyeong Jeong),<br>05 March 2009 (05.03.2009),<br>entire text; all drawings<br>& US 2008/0185290 A1 & EP 1910511 A<br>& WO 2007/015625 A1 & KR 10-2007-0015895 A<br>& CN 101233224 A                                                                 | 1-9                   |
| A         | US 5968332 A (Jan J.Oppllt),<br>19 October 1999 (19.10.1999),<br>abstract<br>& US 5083315 A & WO 1992/010277 A1<br>& DE 69122593 C & ES 2091886 T<br>& AT 143772 T & CA 2057397 A<br>& MX 9102496 A & BR 9105353 A<br>& AU 9162191 A                                      | 1-9                   |

|                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                            |          |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））<br>Int.Cl. G01N27/447(2006.01)i                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                            |          |
| B. 調査を行った分野<br>調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））<br>Int.Cl. G01N27/447                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                            |          |
| 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<br>日本国実用新案公報 1922-1996年<br>日本国公開実用新案公報 1971-2014年<br>日本国実用新案登録公報 1996-2014年<br>日本国登録実用新案公報 1994-2014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）<br>WPI                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                            |          |
| C. 関連すると認められる文献                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                            |          |
| 引用文献の<br>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<br>請求項の番号                                                                                                                                                                                                             |          |
| A                                                                                                                                                                                                                 | WO 2007/073005 A1（学校法人慶應義塾）2007.06.28, 3頁21, 22行、13頁23行-14頁25行、【図5】、【図6】（ファミリーなし）                                                                | 1-9                                                                                                                                                                                                                        |          |
| A                                                                                                                                                                                                                 | JP 2007-524069 A（アジレント・テクノロジーズ・インク）2007.08.23, 【0023】、【0026】、【図1】、【図3】 & US 2006/0160127 A1 & EP 1668351 A & WO 2005/029061 A1 & AU 2003304479 A | 1-9                                                                                                                                                                                                                        |          |
| <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<br>「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<br>「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<br>「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）<br>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献<br>「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<br>「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<br>「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<br>「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<br>「&」同一パテントファミリー文献 |          |
| 国際調査を完了した日<br>31.03.2014                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                  | 国際調査報告の発送日<br>08.04.2014                                                                                                                                                                                                   |          |
| 国際調査機関の名称及びあて先<br>日本国特許庁（I S A / J P）<br>郵便番号100-8915<br>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）<br>土岐 和雅<br>電話番号 03-3581-1101 内線 3252                                                                                                                                                                      | 2 J 4459 |

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                                                                                                    |                |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 引用文献の<br>カテゴリ*        | 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<br>請求項の番号 |
| A                     | JP 2004-500567 A (ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ<br>オブ ミシガン) 2004.01.08, 【請求項1】、【0147】－【01<br>50】 & US 2002/0039747 A1 & EP 1256001 A & WO 2001/058925 A2<br>& AU 3488001 A & CA 2400460 A & MX PA02007665 A & CA 2446337 A | 1－9            |
| A                     | JP 2012-007893 A (凸版印刷株式会社) 2012.01.12, 【全文】、【全<br>図】 (ファミリーなし)                                                                                                                                                    | 1－9            |
| A                     | JP 2005-069905 A (株式会社日立サイエンスシステムズ)<br>2005.03.17, 【0026】－【0029】 (ファミリーなし)                                                                                                                                         | 1－9            |
| A                     | US 2007/0119712 A1 (Agilent Technologies, Inc.) 2007.05.31,<br>Fig. 1E & EP 1668350 A & WO 2005/029060 A1 & AU 2003278178 A                                                                                        | 1－9            |
| A                     | JP 09-210961 A (エムエス機器株式会社) 1997.08.15, 【全文】、【全<br>図】 (ファミリーなし)                                                                                                                                                    | 1－9            |
| A                     | JP 2009-509127 A (ジョン・ジェギョン) 2009.03.05, 【全文】、【全<br>図】 & US 2008/0185290 A1 & EP 1910511 A & WO 2007/015625 A1 &<br>KR 10-2007-0015895 A & CN 101233224 A                                                          | 1－9            |
| A                     | US 5968332 A (Jan J. Oppllt) 1999.10.19, Abstract & US 5083315 A<br>& WO 1992/010277 A1 & DE 69122593 C & ES 2091886 T & AT 143772<br>T & CA 2057397 A & MX 9102496 A & BR 9105353 A & AU 9162191 A                | 1－9            |