

(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 9 月 22 日(22.09.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/115212 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 27/62 (2006.01) G01N 1/28 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/056405
- (22) 国際出願日: 2011 年 3 月 17 日(17.03.2011)
- (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 2010-062174 2010 年 3 月 18 日(18.03.2010) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 住友ベークライト株式会社(SUMITOMO BAKE-LITE CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1400002 東京都品川区東品川二丁目 5 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): 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). 五十嵐 幸太 (IGARASHI Kohita) [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 丁目 8 番 2 1 号 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, 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, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

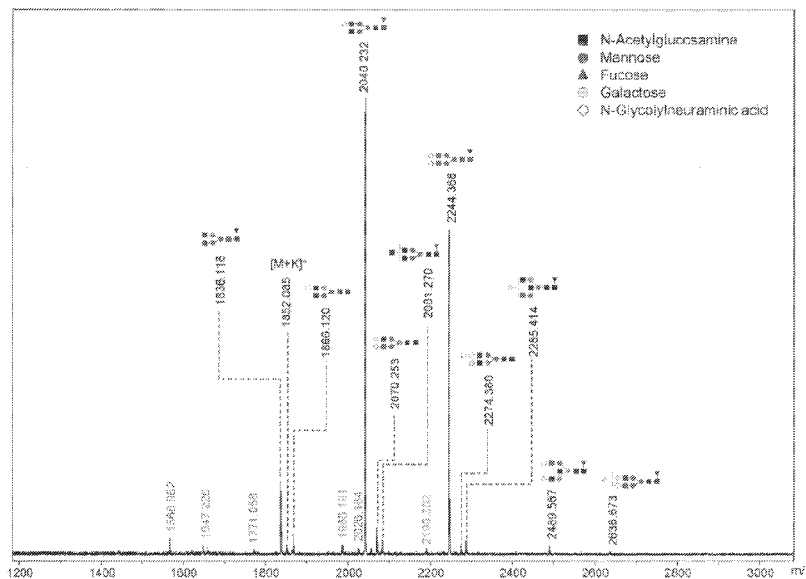
(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT,

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR ANALYSIS OF SUGAR CHAIN BY MASS SPECTROMETRY

(54) 発明の名称: 質量分析による糖鎖の分析方法

[図1]



(57) Abstract: It is found that the ionization efficiency of a sample sugar chain can be increased by carrying out a MALDI-TOF MS measurement after methylating a hydroxy group in the sugar chain, and therefore the quantitative analysis or structural analysis of the sample sugar chain can be achieved with high accuracy.

(57) 要約: 試料糖鎖の水酸基をメチル化した上で、MALDI-TOF MS測定を行うことにより、糖鎖のイオン化効率を高めることが可能であり、これにより、高い精度で試料糖鎖の定量的分析や構造解析が可能であることを見出した。

WO 2011/115212 A1

WO 2011/115212 A1



NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI 添付公開書類:

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, — 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
NE, SN, TD, TG).

明 細 書

発明の名称：質量分析による糖鎖の分析方法

技術分野

[0001] 本発明は、生体試料中に含まれる糖鎖を質量分析により分析する方法に関する。

背景技術

[0002] 糖鎖とは、グルコース、ガラクトース、マンノース、フコース、キシロース、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、シアル酸などの単糖およびこれらの誘導体がグリコシド結合によって鎖状に結合した分子の総称である。

[0003] 糖鎖は非常に多様性に富んでおり、天然に存在する生物が有する様々な機能に関与する物質である。糖鎖は生体内でタンパク質や脂質などに結合した複合糖質として存在することが多く、生体内の重要な構成成分の一つである。生体内の糖鎖は細胞間情報伝達、タンパク質の機能や相互作用の調整などに深く関わっていることが明らかになりつつある。

[0004] 例えば、糖鎖を有する生体高分子としては、細胞の安定化に寄与する植物細胞の細胞壁のプロテオグリカン、細胞の分化、増殖、接着、移動等に影響を与える糖脂質、および細胞間相互作用や細胞認識に関与している糖タンパク質等が挙げられるが、これらの高分子の糖鎖が、互いに機能を代行、補助、増幅、調節、あるいは阻害しあいながら高度で精密な生体反応を制御する機構が次第に明らかにされつつある。さらに、このような糖鎖と細胞の分化増殖、細胞接着、免疫、および細胞の癌化との関係が明確にされれば、この糖鎖工学と、医学、細胞工学、あるいは臓器工学とを密接に関連させて新たな展開を図ることが期待できる（非特許文献1）。

[0005] 病気を早期発見して生活の質（QOL）を高く保つためには、病気の発症の予防や推移を診断できるバイオマーカーが必要である。糖鎖生合成にかかわる糖転移酵素の遺伝子破壊マウスの解析から、糖鎖はさまざまな組織・器

官の機能維持に必須であることが明らかにされている（非特許文献2、3）。また、糖鎖修飾に異常がみられるとさまざまな疾病が引き起こされることも知られている（非特許文献4）。糖鎖の構造は細胞の癌化やさまざまな疾病によって著しく変化するので、疾病の推移を調べるためのバイオマーカーとしての利用が期待されている。

[0006] MALDI-TOF MSは、複雑なサンプル調製が不要で、簡便迅速に測定が行えることから、近年、バイオマーカー探索の強力なツールの一つと考えられている（特許文献1～3）。しかしながら、MALDI-TOF MSにより糖鎖の分析を行う場合、分析の感度の向上を図ることが一つの課題となっている。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特開2009-142238号公報

特許文献2：特開2009-216609号公報

特許文献3：特開2009-229426号公報

非特許文献

[0008] 非特許文献1：糖鎖生物学入門 化学同人 2005年11月1日発行 第1版

非特許文献2：Ioffe E., Stanley P., Proc. Natl. Acad. Sci., 91, pp. 728-732 (1994)

非特許文献3：Metzler M., Gertz A., Sarker M., Schachter H., Schrader J.W., Marth J.D., EMBO J., 13, pp. 2056-2065 (1994)

非特許文献4：Powell L.D., Paneerselvam K., Vij R., Diaz S., Manzi A., Buist N., Freeze H., Varki A., J. Clin. Invest., 94, pp. 1901-1909 (1994)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 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、生

体試料中に含まれる糖鎖を、MALDI-TOF MSに代表される質量分析法を用いて高い感度で分析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

[0010] 本発明者らは、糖鎖が多くの水酸基を含み、極性の高い中性物質であることから質量分析を行う際のイオン化効率が低く、それゆえに、質量分析を実施した場合の精度が低くなることに鑑み、この問題を解決すべく鋭意研究を重ねた。その結果、試料糖鎖の水酸基をメチル化した上で、MALDI-TOF MS測定を行うことにより、糖鎖のイオン化効率を高めることが可能であり、これにより、高い感度で試料糖鎖の定量的分析や構造解析が可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0011] すなわち、本発明は、生体試料に含まれる糖鎖の水酸基をメチル化した上で質量分析法により糖鎖を分析する方法に関し、より詳しくは、以下の発明を提供するものである。

[0012] [1] 生体試料に含まれる糖鎖を質量分析法により分析する方法であって、

- (a) 生体試料から糖鎖を遊離する工程、
- (b) 遊離させた糖鎖を固相担体に捕捉する工程、
- (c) 捕捉した糖鎖を再遊離する工程、
- (d) 再遊離した糖鎖の水酸基をメチル化する工程、および
- (e) メチル化した糖鎖を質量分析法により分析する工程、を含む方法。

[0013] [2] [1]に記載の方法を実施するための、糖鎖の水酸基をメチル化するための試薬を含むキット。

発明の効果

[0014] 本発明によれば、MALDI-TOF MSを用いて、生体試料中に含まれる糖鎖を高い感度で分析することが可能となる。また、水酸基をメチル化した糖鎖を酸加水分解などにより切断した場合、切断部位のみ水酸基が生じるため、本発明によれば、糖鎖の切断部位や結合様式をも解析することが可能

となる。

図面の簡単な説明

[0015] [図1] 図1は、ウシ血清 IgG の N 型結合糖鎖を MALDI-TOF MS により分析した結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0016] (生体試料から糖鎖を遊離する工程)

本発明において使用する糖鎖を含む試料としては、例えば全血、血清、血漿、尿、唾液、細胞、組織、ウイルス、植物組織などの生体試料を用いることができる。また、精製された、あるいは未精製の糖タンパク質を用いることができる。試料は脱脂、脱塩、タンパク質分画、熱変性などの方法により前処理されていてもよい。

[0017] 糖鎖遊離手段を用いて上記生体試料に含まれる糖タンパク質から糖鎖を遊離させる。糖鎖を遊離させる手段としては、N-グリコシダーゼあるいはO-グリコシダーゼを用いたグリコシダーゼ処理、ヒドラジン分解、アルカリ処理によるβ脱離などの方法を用いることができる。N型糖鎖の分析を行う場合は、N-グリコシダーゼを用いる方法が好ましい。グリコシダーゼ処理に先立って、トリプシンやキモトリプシンなどを用いてプロテアーゼ処理を行ってもよい。

(遊離した糖鎖を固相担体に捕捉する工程)

糖鎖を含む溶液を糖鎖と特異的に結合する捕捉担体に接触させて捕捉担体上に糖鎖を捕捉する。

[0018] 糖鎖は生体内物質のなかで唯一、アルデヒド基をもつ物質である。すなわち、糖鎖は水溶液などの状態で環状のヘミアセタール型と、非環状型のアルデヒド型とが平衡で存在する。タンパク質や核酸、脂質など糖鎖以外の生体内物質にはアルデヒド基が含まれていない。このことから、アルデヒド基と特異的に反応して安定な結合を形成する官能基を有する捕捉担体を利用すれば、糖鎖のみを選択的に捕捉することが可能である。アルデヒド基と特異的に反応する官能基としては、例えば、オキシルアミノ基、ヒドラジド基、ア

ミノ基、セミチオカルバジド基ならびにそれらの誘導体を好ましく、ヒドラジド基あるいはオキシルアミノ基がより好ましい。オキシルアミノ基とアルデヒド基との反応によって生じるオキシム結合およびヒドラジド基とアルデヒド基との反応によって生じるヒドラゾン結合は、酸処理などによって容易に切断されるため、糖鎖を捕捉したのち、糖鎖を担体から簡単に切り離すことができる。一般的に、生理活性物質の捕捉・担持にはアミノ基が多用されているが、アミノ基とアルデヒド基の反応によって生じる結合（シッフ塩基）は結合力が弱いため、還元剤などを用いた二次処理が必要であることから、アミノ基は糖鎖の捕捉には好ましくない。

[0019] 糖鎖を捕捉するための担体としては、ポリマー粒子を用いることが好ましい。ポリマー粒子は、少なくとも表面の一部に糖鎖のアルデヒド基と特異的に反応する官能基を有した固体あるいはゲル粒子であることが好ましい。ポリマー粒子が固体粒子あるいはゲル粒子であれば、ポリマー粒子に糖鎖を捕捉させたのち、遠心分離やろ過などの手段によって容易に回収することができる。また、ポリマー粒子をカラムに充填して用いることも可能である。カラムに充填して用いる方法は、特に連続操作化の観点から重要となる。反応容器としてフィルタープレート（例えば、Millipore社製のMultiScreen Solvinert Filter Plate）を用いることにより、複数のサンプルを同時に処理することが可能となり、例えば、ゲルろ過に代表されるカラム操作による従来の精製手段と比較して、糖鎖精製のスループットが大幅に向上される。

[0020] ポリマー粒子の形状は特に限定しないが、球状またはそれに類する形状が好ましい。ポリマー粒子が球状の場合、平均粒径は好ましくは0.05～1000 μm であり、より好ましくは0.05～200 μm であり、さらに好ましくは0.1～200 μm であり、最も好ましくは0.1～100 μm である。平均粒径が下限値未満では、ポリマー粒子をカラムに充填して用いる際、通液性が悪くなるために大きな圧力を加える必要がある。また、ポリマー粒子を遠心分離やろ過で回収することも困難となる。平均粒径が上限値を超えると、ポリマー粒子と試料溶液の接触面積が少なくなり、糖鎖捕捉の効

率が低下する。本発明においては、ヒドラジド基含有ポリマー粒子である「BiotGlyco^(R)」（住友ベークライト株式会社製、#BS-45603）を好適に用いることができる。

[0021] 糖鎖を特異的に捕捉するポリマー粒子によって糖鎖を捕捉する際の反応系のpHは、好ましくは2～9、より好ましくは2～7であり、さらに好ましくは2～6である。pH調整のためには、各種緩衝液を用いることができる。糖鎖捕捉時の温度は、好ましくは4～90℃、より好ましくは4～70℃、さらに好ましくは30～80℃であり、最も好ましくは40～80℃である。反応時間は適宜設定することができる。ポリマー粒子をカラムに充填して試料溶液を通過させてもよい。

[0022] ポリマー粒子を用いた場合、担体表面には糖鎖以外の英雑物が非特異的に吸着しているため、これらを洗浄除去する必要がある。洗浄液としては、水、緩衝液、界面活性剤を含む水または緩衝液、有機溶剤などを適宜組み合わせ用いることが好ましい。特に好ましい形態は、界面活性剤を含む水または緩衝液で十分に洗浄したのち、有機溶剤で洗浄し、最後に水で洗浄する方法である。これらの洗浄により、非特異的吸着物がポリマー粒子表面から除去される。

[0023] 担体上の余剰官能基は、例えば、無水酢酸などを利用して、キャッピングすることができる。

（捕捉した糖鎖を再遊離する工程）

次いで、捕捉担体であるポリマー粒子に結合した糖鎖を再遊離し、精製された糖鎖試料を得る。

[0024] ポリマー粒子に結合した糖鎖を別の化合物（以下、「化合物A」と称す）に置換する工程に関して説明する。化合物Aはラベル化試薬であることが好ましい。糖鎖が結合しているポリマー粒子に対して化合物Aを過剰量加えることで置換が成される。すなわち、糖鎖はポリマー粒子から切り離され、それと同時に糖鎖に化合物Aが付加する（糖鎖は化合物Aで「ラベル化」される）。過剰に加える化合物Aの量は、好ましくはポリマー粒子が有する糖鎖

と特異的に反応する官能基量の1.5倍量以上、より好ましくは3倍量以上、さらに好ましくは5倍量以上であり、最も好ましくは10倍量以上である。反応系のpHは、好ましくは2~9、より好ましくは2~7であり、さらに好ましくは2~6である。pH調整のためには、各種緩衝液を用いることができる。反応系の温度は、好ましくは40~90℃、より好ましくは40~80℃である。本工程後、溶媒は蒸発していることが好ましい。

[0025] 化合物Aとしては、アミノオキシ基またはヒドラジド基を有する化合物が好ましく、最も好ましい化合物は、N-アミノオキシアセチルトリプトファンil(アルギニン メチル エステル)である。この化合物は、上記の「BlotGlyco^(R) for MALDI」(住友ベークライト株式会社製、#BS-45603)に付属の再遊離試薬として、市販されている。

[0026] ここでは、糖鎖捕捉物質に捕捉された糖鎖を遊離して標識化サンプルを得る方法を説明したが、下記の方法によれば、非標識サンプルを得ることができ、本発明はこのような試料調製方法をも提供する。この試料調製方法は、糖鎖が結合しているポリマー粒子を酸性条件で処理することにより、ヒドラゾン結合を解離させ、糖鎖を遊離させることを特徴としている。このときの酸性条件での処理は、0.01~20体積パーセントの酢酸溶液、好ましくは0.1~5体積パーセントの酢酸溶液、による処理であり、40~80℃で5~60分間行われる。本工程後、溶媒が蒸発していることが好ましい。
(再遊離した糖鎖の水酸基をメチル化する工程)

次いで、再遊離した糖鎖の水酸基をメチル化する。メチル化試薬としては、例えば、ヨードメタンが挙げられる。メチル化試薬の量は、好ましくは10~200μL、より好ましくは10~100μLである。メチル化試薬は、ジメチルスルホキシド(DMSO)との混合液であることが好ましく、NaOH/DMSOスラリーであることがより好ましい。ここでNaOH/DMSOスラリーとは、微粉化した固体のNaOHを、DMSOに分散させたものである。

[0027] メチル化試薬溶液を上記糖鎖再遊離工程を経たポリマー粒子に添加し、所

定の温度、時間静置することにより、糖鎖のメチル化が行われる。メチル化工程は、通常、10～60℃、好ましくは10～40℃で、10分間行われる。

[0028] メチル化反応は、純水を添加することにより、停止することができる。反応液からのメチル化糖鎖の回収は、例えば、クロロホルム抽出により行うことができる。例えば、メチル化反応の反応液をクロロホルムに添加し、その後、クロロホルム層を回収し、これを純粋で洗浄後、クロロホルム溶液を蒸発させたものを、後述の質量分析に用いることができる。

[0029] 上記のように、本発明の方法によれば、再遊離した糖鎖をポリマー粒子と分離する必要がなく、糖鎖とポリマー粒子が混在したままでメチル化が可能である。また、メチル化反応は禁水反応であるため、通常、糖鎖溶液を凍結乾燥などの方法で乾燥させたものを、この反応に使用するが、本発明の方法では、糖鎖再遊離工程後には溶媒が蒸発しているため、乾燥工程は必要ない。このように、本発明は、簡便な操作で糖鎖の精製とメチル化を行う方法を提供するものである。

（メチル化した糖鎖を質量分析法により分析する工程）

得られた糖鎖は、MALDI-TOF MSに代表される質量分析法で分析することができる。MALDI-TOF MS測定により得られたマススペクトルは、解析ソフト等を用いて解析することができる。質量電荷比（ m/z 値）を読み取ることにより、試料糖鎖のピークが検出される。質量電荷比やピーク強度（ピーク高さ、ピーク面積など任意の指標）から、糖鎖の定量や糖鎖の構造を分析することができる。糖鎖の分析においては、各種データベース（例えば、GlycoMod、Glycosuiteなど）を利用することができる。

（キット）

本発明は、上記本発明の方法を実施するための、糖鎖の水酸基をメチル化するための試薬を含むキットを提供する。本発明のキットには、メチル化試薬以外に、例えば、（１）糖鎖を捕捉（精製）するための担体（ビーズなど）、（２）担体に捕捉された糖鎖を標識化および／または再遊離するための

試薬、(3) 反応液中に過剰に存在する(2)の試薬を除去するための担体(カラムなど)、(4) 反応用チューブ、(5) 使用説明書、を含むことができる。

実施例

[0030] 以下、実施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。

[0031] [実施例 1] 糖タンパク質からの糖鎖遊離

ウシ血清イムノグロブリン G (IgG, シグマアルドリッチ製, #I5506) 1 mg をチューブに取り、1 M の重炭酸アンモニウム水溶液 (5 μ L)、純水 (50 μ L)、120 mM のジチオスレイトール水溶液 (5 μ L) を加え、完全に溶解させた後、60°C で 30 分間インキュベートした。次に、123 mM のヨードアセトアミド水溶液 (10 μ L) を加え、遮光して室温で 1 時間静置したのち、トリプシン 400 ユニットを加え、37°C で 1 時間静置した。95°C で 5 分間加熱することでトリプシンを失活させた後、N-グリコシダーゼ F (ロシュ・ダイアグノスティックス製, #11365193001) 5 ユニットを加え、37°C で 16 時間静置することで糖鎖を遊離させた。

[0032] [実施例 2] ポリマー粒子への糖鎖担持

得られた遊離糖鎖溶液 20 μ L (IgG 100 μ g 相当) を、ポリマー粒子 (住友ベークライト株式会社製、BS-45603) 5 mg に添加し、2% 酢酸を含むアセトニトリル 180 μ L を加えたのち、80°C で 1 時間反応させ、乾固させた。2 M グアニジン塩酸塩溶液、水、メタノール、1% トリエチルアミン溶液にてポリマー粒子を洗浄後、10% 無水酢酸/メタノール溶液を添加し、室温で 30 分間反応させヒドラジド基をキャッピングした。キャッピング後、メタノールおよび水でポリマー粒子を洗浄した。

[0033] [実施例 3] 糖鎖再遊離

上記で調製した糖鎖担持ポリマー粒子に、純水 20 μ L、2% 酢酸を含むアセトニトリル 180 μ L を加えたのち、80°C で 1 時間反応させ、乾固させることにより、糖鎖をポリマー粒子から遊離させた。

[0034] [実施例4] メチル化試薬溶液の調製

粒状の水酸化ナトリウム約1 gを乳鉢にとり、乳棒ですみやかに粉碎した。これにDMSO 1 mLを加えて混合し、スラリー状の溶液を調製した。この溶液100 μ Lとヨードメタン（和光純薬工業製、#131-02661）100 μ Lを混合し、メチル化試薬溶液を調製した。

[0035] [実施例5] 糖鎖のメチル化

上記、糖鎖再遊離後のポリマー粒子に、メチル化試薬溶液100 μ Lを添加した。25℃で10分間静置し反応させた後、純水200 μ Lを加えて反応を停止した。フィルトレーションにより溶液とポリマー粒子を分離し、溶液を回収した。溶液をサンプルチューブに移し、400 μ Lのクロロホルムを加え、1分間攪拌することにより、メチル化された糖鎖をクロロホルム層に回収した。サンプルチューブを静置してクロロホルム層と水層を分離させたのち、クロロホルム層を別のサンプルチューブに回収した。これに純水800 μ Lを加え、1分間攪拌することにより、クロロホルム層に含まれる水溶性不純物を除去した。サンプルチューブを静置してクロロホルム層と水層を分離させたのち、クロロホルム層を別のサンプルチューブに回収し、遠心乾燥機で乾燥させ、メチル化糖鎖を得た。

[0036] [実施例6] MALDI-TOF MS測定

得られたメチル化糖鎖を100 μ Lのメタノールに溶解させた。この溶液をマトリックス溶液（2, 5-ジヒドロキシ安息香酸の10 mg/mL水溶液）で10倍希釈し、うち1 μ Lを試料台にスポット、乾燥・結晶化させた。これをマトリックス支援レーザーイオン化-飛行時間型質量分析器（MALDI-TOF MS）（ブルカー・ダルトニクス社製' autoflex III'）により分析した。測定はポジティブイオン検出モード、リフレクトロンモードにて行った。

[0037] 得られたマススペクトルを（図1）に示す。スペクトルから得られた質量数対電荷比（m/z値）から糖鎖組成を推定した。糖鎖組成の推定は、GlycoMod tool（<http://www.expasy.org/tools/glycomod/>）およびGly

y c o S u i t e データベース (<http://glycosuitedb.expasy.org/glycosuite/glycodb>) を使用して行った。推定した糖鎖の模式図を図 1 のマスペクトル中に示す。

- [0038] 以上のように、試料糖鎖の水酸基をメチル化した上で、MALDI-TOF MS 測定を行うことにより、高い感度で試料糖鎖の定量的分析や構造解析が可能であることが示された。

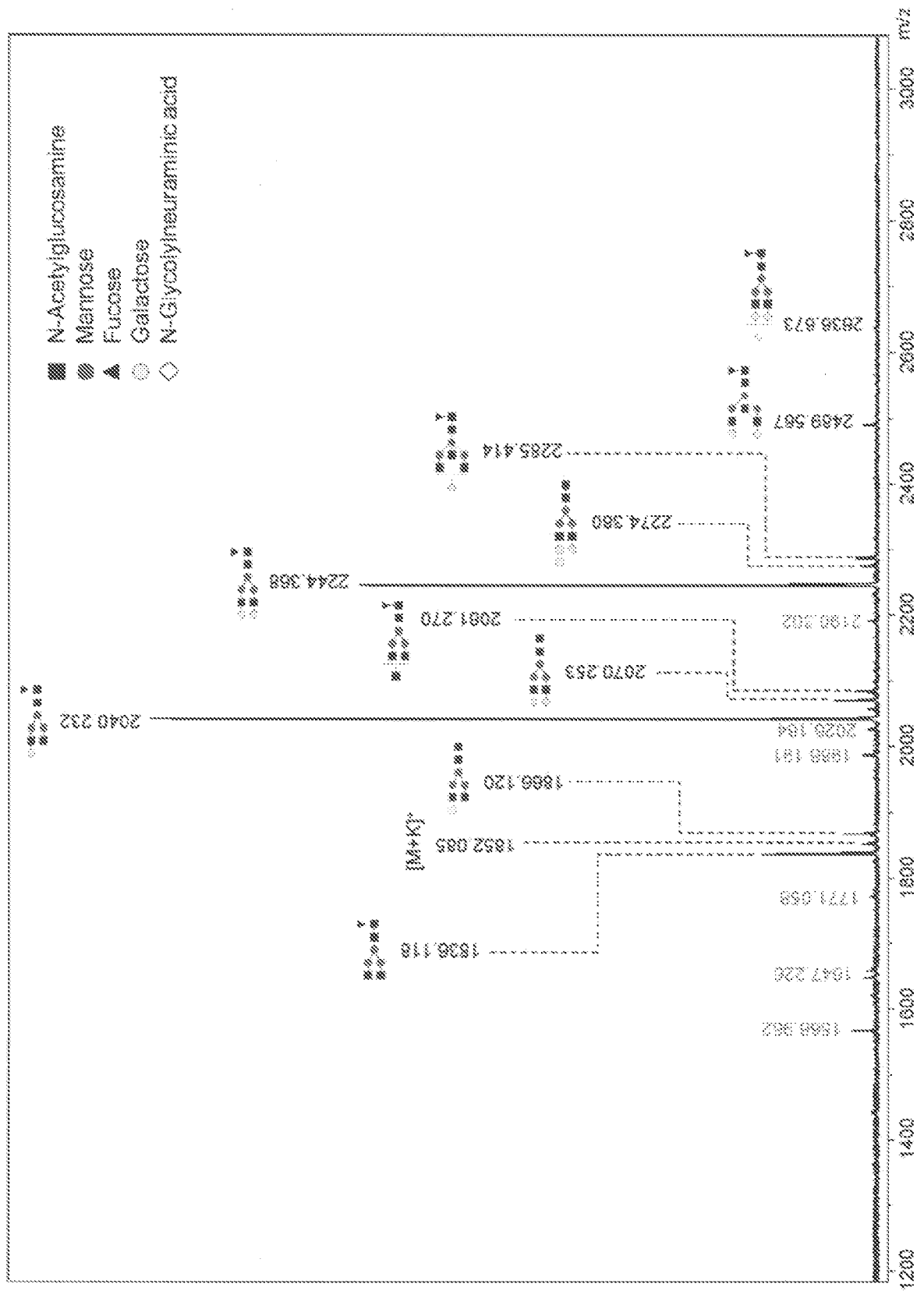
産業上の利用可能性

- [0039] 本発明の糖鎖分析法を用いると、生体試料、たとえば疾患患者の血清、組織などに含まれる糖タンパク質糖鎖の定量的分析（定量的プロファイリング）や構造解析を高い感度で行うことが可能となり、疾患マーカー糖鎖の探索や、薬剤投与時の糖鎖動態研究など、医療の分野での利用可能性がある。

請求の範囲

- [請求項1] 生体試料に含まれる糖鎖を質量分析法により分析する方法であって、
- (a) 生体試料から糖鎖を遊離する工程、
 - (b) 遊離させた糖鎖を固相担体に捕捉する工程、
 - (c) 捕捉した糖鎖を再遊離する工程、
 - (d) 再遊離した糖鎖の水酸基をメチル化する工程、および
 - (e) メチル化した糖鎖を質量分析法により分析する工程、
- を含む方法。
- [請求項2] 請求項1に記載の方法を実施するための、糖鎖の水酸基をメチル化するための試薬を含むキット。

[1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/056405

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N27/62(2006.01) i, G01N1/28(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, G01N1/28

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)

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.
Y	JP 2009-229426 A (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.), 08 October 2009 (08.10.2009), claims; paragraphs [0008] to [0019]	1, 2
Y	JP 2009-236600 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 15 October 2009 (15.10.2009), paragraph [0003]	1, 2
A	Pilsoo Kang et al., Solid-phase permethylation of glycans for mass spectrometric analysis, Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2005, Volume 19, Issue 23, 3421-3428	1, 2



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

05 April, 2011 (05.04.11)

Date of mailing of the international search report

19 April, 2011 (19.04.11)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/056405

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 2009-270996 A (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.), 19 November 2009 (19.11.2009), entire text; all drawings	1, 2
A	JP 2009-216609 A (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.), 24 September 2009 (24.09.2009), entire text; all drawings	1, 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2011/056405

JP 2009-229426 A	2009.10.08	(Family: none)	
JP 2009-236600 A	2009.10.15	(Family: none)	
JP 2009270996 A	2009.11.19	EP 2275809 A1	2011.01.19
		US 2011/065141 A1	2011.03.17
		WO 2009/136506 A1	2009.11.12
JP 2009-216609	2009.09.24	(Family: none)	

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, G01N1/28(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, G01N1/28			
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 1971-2011年 日本国実用新案登録公報 1996-2011年 日本国登録実用新案公報 1994-2011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） 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	
Y	JP 2009-229426 A（住友ベークライト株式会社）2009.10.08、特許 請求の範囲、【0008】 - 【0019】	1, 2	
Y	JP 2009-236600 A（独立行政法人産業技術総合研究所）2009.10.15 【0003】	1, 2	
A	Pilsoo Kang et al., Solid-phase permethylation of glycans for mass spectrometric analysis, Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2005, Volume 19, Issue 23, 3421-3428	1, 2	
☒ 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 05.04.2011		国際調査報告の発送日 19.04.2011	
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100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官（権限のある職員） 廣田 健介 電話番号 03-3581-1101 内線 3292	2W 3807

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 2009-270996 A (住友ベークライト株式会社) 2009.11.19、全文、 全図	1, 2
A	JP 2009-216609 A (住友ベークライト株式会社) 2009.09.24、全文、 全図	1, 2

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/J P 2 0 1 1 / 0 5 6 4 0 5

JP 2009-229426 A	2009. 10. 08	(ファミリーなし)	
-----	-----	-----	-----
JP 2009-236600 A	2009. 10. 15	(ファミリーなし)	
-----	-----	-----	-----
JP 2009-270996 A	2009. 11. 19	EP 2275809 A1	2011. 01. 19
		US 2011/065141 A1	2011. 03. 17
		WO 2009/136506 A1	2009. 11. 12
-----	-----	-----	-----
JP 2009-216609 A	2009. 09. 24	(ファミリーなし)	
-----	-----	-----	-----