

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 2 月 17 日 (17.02.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/015200 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 30/88, 33/66 (74) 代理人: 山本 秀策, 外(YAMAMOTO, Shusaku et al.);
〒5406015 大阪府大阪市中央区城見一丁目 2 番 2 7 号
クリスタルタワー 1 5 階 Osaka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/001087
- (22) 国際出願日: 2004 年 2 月 3 日 (03.02.2004)
- (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2003-291880 2003 年 8 月 11 日 (11.08.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 塩野
義製薬株式会社 (SHIONOGI CO., LTD.) [JP/JP]; 〒
5410045 大阪府大阪市中央区道修町三丁目 1 番 8 号
Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中川 裕章 (NAK-
AGAWA, Hiroaki) [JP/JP]; 〒0600005 北海道札幌市
中央区北 5 条西 9 丁目 1 2 - 6 0 1 Hokkaido (JP).
羽藤 愛美 (HATOU, Megumi) [JP/JP]; 〒0040812 北
海道札幌市清田区美しが丘 2 条 4 丁目 1 5 - 2 1
Hokkaido (JP). 新倉 謙一 (NIKURA, Kenichi) [JP/JP];
〒0640806 北海道札幌市中央区南 6 条西 2 0 丁目 2 -
1 - 5 0 1 Hokkaido (JP). 出口 喜三郎 (DEGUCHI,
Kisaburo) [JP/JP]; 〒0010023 北海道札幌市北区北
2 3 条西 5 丁目 1 - 3 7 - 9 0 5 Hokkaido (JP). 西村
紳一郎 (NISHIMURA, Shinichiro) [JP/JP]; 〒0600009
北海道札幌市中央区北 9 条西 1 6 丁目 1 - 1 -
3 0 2 Hokkaido (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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, 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, LS, MW, MZ, 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 (AT, BE, BG, CH,
CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 規則 4.17 に規定する申立て:
— すべての指定国のための不利にならない開示又は新
規性喪失の例外に関する申立て (規則 4.17(v))
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する
申立て
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: SIMPLE DIAGNOSIS OF DISORDER WITH SERA AND TAILOR MADE TREATMENT

(54) 発明の名称: 血清を用いた簡易疾患診断およびテーラーメイド治療

(57) Abstract: A simple diagnosis of disorder with the use of whole sera; and tailor made treatment according to the same. In particular, a method of diagnosing disorder with the use of sera, comprising the step of analyzing sugar chains contained in the whole sera from a test body (a) and the step of correlating the analyzed sugar chains with information on disorders (b). Although conventionally, accurate analysis has been infeasible unless purification to IgG level is conducted, sugar chains changing on serum level have now been identified to thereby enable conducting accurate diagnosis without effecting purification.

(57) 要約: 本発明は、血清全体を用いて疾患を簡便に診断し、それに応じたテーラーメイド治療を提供する。本発明は、血清を用いて疾患を診断する方法であって、(a) 被検体からの血清全体に含まれる糖鎖を分析する工程; および (b) 分析された該糖鎖と、疾患に関する情報とを相関付ける工程、を包含する、方法を提供する。従来は IgG レベルまで精製しなければ精確な分析ができなかったが、血清レベルで変化する糖鎖を同定することができたことから、精製することなく、精確に診断を行うことができるようになった。

WO 2005/015200 A1

明 細 書

血清を用いた簡易疾患診断およびテーラーメイド治療

5

技術分野

本発明は、糖鎖分析を用いたテーラーメイド治療に関する。より詳細には、血清全体の糖鎖分析に基づくテーラーメイド治療に関する。

背景技術

10

テーラーメイド治療（またはオーダーメイド治療）という言葉が近年よく聞かれるようになった。テーラーメイド治療とは、患者（または病因）の特性に合わせて治療法を選択する方法をいう。

15

ゲノム解析が完了した現在、このゲノム解析に基づいて個人ごとの配列の多様性が分析されている。そのような中、SNP s と呼ばれる個人ごとに異なる配列の相違が注目されている。SNP s は、少なくとも1塩基異なる塩基配列のことをいう。

20

SNP s を用いた診断およびテーラーメイド治療は、有用であるとの報告がある反面、必ずしもすべての症例に有効ではないということも報告されている。従って、SNP s を利用したテーラーメイド治療にはおのずから限界があることが指摘されており、この限界を克服するための解決手段が待ち望まれている。

血清を用いた分析は比較的簡易であり、多用されているが、それを糖鎖分析を行うことによって疾患の診断に用いられた例はほとんど存在していない。また、血清全体の糖鎖を分析することによって診断を試みた例は皆無である。

25

発明の開示

上記状況にかんがみ、本発明は、血清を用いて被検体を簡便に診断し、それに

応じたテーラーメイド治療を提供することを課題とする。

上記課題は、被検体に由来する血清全体を用いて糖鎖を分析した結果、その糖鎖の情報と疾患の情報とが本発明者らによって予想外に相関付けられたことによって解決された。従来は血液サンプルなどから疾患マーカーとなり得る糖タンパク質を精製しなければ精確な糖鎖分析ができなかったが、精製を行っていない血清を用いることで疾患により変化する糖鎖を同定することができたことから、疾患マーカーとなり得る糖タンパク質を精製することなく、精確に診断を行うことができるようになった。また、精製後の疾患マーカー糖タンパク質（例えば、IgG）と血清レベルとで解析されるべき糖鎖が異なることから、この診断方法は、従来になかった効果をもたらす。すなわち、多くの種類のタンパク質の糖鎖変化を解析するため、より多くの種類の診断の対象となる疾患に対応づけられた糖鎖変化を同時に解析することになり、精確かつ簡便な診断方法が開発されたことになる。

従って、本発明は、以下を提供する。

(1) 以下の工程：

(a) 被検体からの血清に含まれる疾患マーカーを分析する工程；および

(b) 分析された上記疾患マーカーと、疾患に関する情報とを相関付ける工程、を包含する、被検体からの血清を用いて疾患を診断する方法。

(2) 上記疾患マーカーは、上記疾患と相関関係がある、項目1に記載の方法。

(3) 上記疾患マーカーは、IgGである、項目1に記載の方法。

(4) 上記疾患マーカーは、複数の糖鎖のセットを含む、項目1に記載の方法。

(5) 上記疾患は、慢性関節リウマチを含む、項目1に記載の方法。

(6) 上記疾患マーカーは、N結合型糖鎖を含む、項目1に記載の方法。

(7) 上記疾患マーカーは、末端Gal欠損糖鎖を含む、項目1に記載の方法。

(8) 上記疾患マーカーは、コード番号210.1、コード番号210.2およびコード番号210.3からなる群より選択される糖鎖を少なくとも含む、項

目 1 に記載の方法。

(9) 上記被検体は、ヒトである、項目 1 に記載の方法。

(10) 血清レベルの糖鎖分析と疾患マーカーレベルの糖鎖分析を行う工程をさらに包含する、項目 1 に記載の方法。

5 (11) 疾患マーカーレベルの糖鎖分析結果と、血清レベルの糖鎖分析結果とを相関づける工程をさらに包含する、項目 10 に記載の方法。

(12) 上記糖鎖の分析は、クロマトグラフィーによる分析を含む、項目 1 に記載の方法。

10 (13) 上記糖鎖の分析は、少なくとも 2 種類のクロマトグラフィー分析を含む、項目 1 に記載の方法。

(14) 上記糖鎖の分析は、ODS カラムおよびアミドカラムからなる群より選択される少なくとも 1 つのカラムによる分析を含む、項目 1 に記載の方法。

(15) 少なくとも 1 つの糖鎖消化酵素による消化工程をさらに包含する、項目 1 に記載の方法。

15 (16) 上記血清は前処理なしに分析される、項目 1 に記載の方法。

(17) 上記血清は精製工程なしに分析される、項目 1 に記載の方法。

(18) 以下の工程：

(a) 被検体からの血清に含まれる疾患マーカーを分析する工程；

20 (b) 分析された上記疾患マーカーと、疾患に関する情報とを相関付ける工程；および

(c) 上記疾患に関する情報に応じて適切な処置または予防のための手段を上記被検体に提供する工程、

を包含する、被検体からの血清を用いて診断することによって上記被検体を処置または予防する方法。

25 (19) 上記疾患マーカーは、上記疾患と相関関係がある、項目 18 に記載の方法。

- (20) 上記疾患マーカーは、I g Gに結合する糖鎖である、項目18に記載の方法。
- (21) 上記疾患マーカーは、複数の糖鎖のセットを含む、項目18に記載の方法。
- 5 (22) 上記疾患は、慢性関節リウマチを含む、項目18に記載の方法。
- (23) 上記疾患マーカーは、N結合型糖鎖を含む、項目18に記載の方法。
- (24) 上記疾患マーカーは、末端G a 1欠損糖鎖を含む、項目18に記載の方法。
- (25) 上記疾患マーカーは、コード番号210. 1、コード番号210. 2
10 およびコード番号210. 3からなる群より選択される糖鎖を少なくとも含む、項目18に記載の方法。
- (26) 上記被検体は、ヒトである、項目18に記載の方法。
- (27) 血清レベルの糖鎖分析と疾患マーカーレベルの糖鎖分析を行う工程をさらに包含する、項目18に記載の方法。
- 15 (28) 疾患マーカーレベルの糖鎖分析結果と、血清レベルの糖鎖分析結果とを相関づける工程をさらに包含する、項目27に記載の方法。
- (29) 上記糖鎖の分析は、クロマトグラフィーによる分析を含む、項目18に記載の方法。
- (30) 上記糖鎖の分析は、少なくとも2種類のクロマトグラフィー分析を含む、項目18に記載の方法。
20
- (31) 上記糖鎖の分析は、ODSカラムおよびアミドカラムからなる群より選択される少なくとも1つのカラムによる分析を含む、項目18に記載の方法。
- (32) 少なくとも1つの糖鎖消化酵素による消化工程をさらに包含する、項目18に記載の方法。
- 25 (33) 上記血清は前処理なしに分析される、項目18に記載の方法。
- (34) 上記血清は精製工程なしに分析される、項目18に記載の方法。

(35) 以下の工程：

(a) 被検体からの血清に含まれる疾患マーカーを分析する工程；

(b) 分析された上記疾患マーカーと、疾患に関する情報とを相関付ける工程；および

5 (c) 上記疾患に関する情報に応じて適切な処置または予防のための手段を提示する工程、

を包含する、被検体からの血清を用いて診断することによって上記被検体の状態に応じた処置または予防を提示する方法。

(36) 以下：

10 (a) 被検体からの血清に含まれる疾患マーカーを分析する手段；および

(b) 分析された上記疾患マーカーと、疾患に関する情報とを相関付ける手段、を包含する、被検体からの血清を用いて疾患を診断するシステム。

(37) 上記疾患マーカーは、上記疾患と相関関係がある、項目36に記載のシステム。

15 (38) 上記疾患マーカーは、IgGに結合する糖鎖である、項目36に記載のシステム。

(39) 上記疾患マーカーは、複数の糖鎖のセットを含む、項目36に記載のシステム。

(40) 上記疾患は、慢性関節リウマチを含む、項目36に記載のシステム。

20 (41) 上記疾患マーカーは、N結合型糖鎖を含む、項目36に記載のシステム。

(42) 上記疾患マーカーは、末端Gal1欠損糖鎖を含む、項目36に記載のシステム。

25 (43) 上記疾患マーカーは、コード番号210.1、コード番号210.2およびコード番号210.3からなる群より選択される糖鎖を少なくとも含む、項目36に記載のシステム。

(44) 上記被検体は、ヒトである、項目36に記載のシステム。

(45) 血清レベルの糖鎖分析と疾患マーカーレベルの糖鎖分析を行う手段をさらに備える、項目36に記載のシステム。

5 (46) 疾患マーカーレベルの糖鎖分析結果と、血清レベルの糖鎖分析結果とを相関づける手段を備える、項目45に記載のシステム。

(47) 上記糖鎖の分析は、クロマトグラフィーによる分析を含む、項目36に記載のシステム。

(48) 上記糖鎖の分析は、少なくとも2種類のクロマトグラフィー分析を含む、項目36に記載のシステム。

10 (49) 上記糖鎖の分析は、ODSカラムおよびアミドカラムからなる群より選択される少なくとも1つのカラムによる分析を含む、項目36に記載のシステム。

(50) 少なくとも1つの糖鎖消化酵素による消化手段をさらに備える、項目36に記載のシステム。

15 (51) 前記糖鎖を分析する手段は、前記血清を前処理なしに分析する能力を有する、項目36に記載のシステム。

(52) 前記糖鎖を分析する手段は、前記血清を精製工程なしに分析する能力を有する、項目36に記載のシステム。

20 (53) 被検体から血清を採取する手段をさらに備える、項目36に記載のシステム。

(54) 以下：

(a) 被検体からの血清に含まれる疾患マーカーを分析する手段；

(b) 分析された上記疾患マーカーと、疾患に関する情報とを相関付ける手段；および

25 (c) 上記疾患に関する情報に応じて適切な処置または予防のための手段を上記被検体に提供する手段、

を包含する、被検体からの血清を用いて診断することによって上記被検体を処置または予防するシステム。

(55) 上記疾患マーカーは、上記疾患と相関関係がある、項目54に記載のシステム。

5 (56) 上記疾患マーカーは、IgGである、項目54に記載のシステム。

(57) 上記疾患マーカーは、複数の糖鎖のセットを含む、項目54に記載のシステム。

(58) 上記疾患は、リウマチを含む、項目54に記載のシステム。

10 (59) 上記疾患マーカーは、N結合型糖鎖を含む、項目54に記載のシステム。

(60) 上記疾患マーカーは、末端Gal欠損糖鎖を含む、項目54に記載のシステム。

15 (61) 上記疾患マーカーは、コード番号210.1、コード番号210.2およびコード番号210.3からなる群より選択される糖鎖を少なくとも含む、項目54に記載のシステム。

(62) 上記被検体は、ヒトである、項目54に記載のシステム。

(63) 血清レベルの糖鎖分析と疾患マーカーレベルの糖鎖分析を行う手段をさらに備える、項目54に記載のシステム。

20 (64) 疾患マーカーレベルの糖鎖分析結果と、血清レベルの糖鎖分析結果とを相関づける手段をさらに備える、項目63に記載のシステム。

(65) 上記糖鎖の分析は、クロマトグラフィーによる分析を含む、項目54に記載のシステム。

(66) 上記糖鎖の分析は、少なくとも2種類のクロマトグラフィー分析を含む、項目54に記載のシステム。

25 (67) 上記糖鎖の分析は、ODSカラムおよびアミドカラムからなる群より選択される少なくとも1つのカラムによる分析を含む、項目54に記載のシステ

ム。

(68) 少なくとも1つの糖鎖消化酵素による消化工程をさらに包含する、項目54に記載のシステム。

5 (69) 前記疾患マーカーを分析する手段は、上記血清を前処理なしに分析する能力を有する、項目54に記載のシステム。

(70) 前記疾患マーカーを分析する手段は、上記血清を精製工程なしに分析する能力を有する、項目54に記載のシステム。

(71) 上記被検体から血清を採取する手段をさらに備える、項目54に記載のシステム。

10 (72) 以下：

(a) 被検体からの血清に含まれる疾患マーカーを分析する手段；

(b) 分析された上記疾患マーカーと、疾患に関する情報とを相関付ける手段；および

15 (c) 上記疾患に関する情報に応じて適切な処置または予防のための手段を提示する手段、

を備える、被検体からの血清を用いて診断することによって上記被検体の状態に応じた処置または予防を提示するシステム。

(73) 上記被検体から血清を採取する手段をさらに備える、項目72に記載のシステム。

20

図面の簡単な説明

図1は、イムノグロブリンの構造を示す。

図2は、慢性関節リウマチにおける糖鎖変化の様子を示す。

図3は、二次元マップ法のスキームを示す。

25 図4は、ODSカラムによるIgGのN結合型糖鎖の分析結果を示す。溶離液A：10mM リン酸ナトリウム（pH3.8）および溶離液B：溶離液A中の

0.5% ブタノールを用いて、流速1.0 ml/分、55℃にて60分間かけて溶離液Bの20%～50% 直線勾配により分析した。励起波長：320 nm、発光波長：400 nmにて検出した。図中の略語は、以下の通りである：Ma
n；マンノース、GlcNAc；N-アセチルグルコサミン、Gal；ガラクト
ース、Fuc；フコース。

図5は、IgGから得られるN結合型糖鎖の分析結果例を示す。図中の略語は、以下の通りである：IgG；ヒトIgG（Sigma）、BB；骨折、OA；変形性関節症、RA；慢性関節リウマチ、Ma n；マンノース、GlcNAc；N-アセチルグルコサミン、Gal；ガラクトース、Fuc；フコース。

図6Aは、ODSカラムによる血清のN結合型糖鎖の分析結果例を示す。溶離液A：10 mM リン酸ナトリウム（pH 3.8）および溶離液B：溶離液A中の0.5% ブタノールを用いて、流速1.0 ml/分、55℃にて60分間かけて溶離液Bの20%～50% 直線勾配により分析した。星印は、副産物を示す。

図6Bは、6Aで得られた慢性関節リウマチの血清において得られた各ピークa～nのアミドカラムによるN結合型糖鎖の分析結果例を示す。溶離液A：3% 酢酸トリエチルアミン（pH 7.3）：アセトニトリル（35：65（v/v））および溶離液B：3% 酢酸トリエチルアミン（pH 7.3）：アセトニトリル（50：50（v/v））を用いて、流速1.0 ml/分、40℃にて30分間かけて溶離液Bの0%～60% 直線勾配により分析した。励起波長：320 nm、発光波長：400 nmにて検出した。星印は、副産物を示す。図中の略語は、以下の通りである：Ma n；マンノース、GlcNAc；N-アセチルグルコサミン、Gal；ガラクトース、Fuc；フコース。

図7は、部分酵素消化による溶出時間の変化例を示す。

図8は、部分酵素消化による血清のN結合型糖鎖のマップ上の変化を示す。GUは、グルコース単位を示し、*は、副産物を示す。

図9A～Bは、血清から得られたN結合型糖鎖の分析結果例を示す。図中の略語は、以下の通りである：I g G；ヒトI g G（S i g m a）、B B；骨折、O A；変形性関節症、R A；慢性関節リウマチ。図中の略語は、以下の通りである：M a n；マンノース、G l c N A c；N－アセチルグルコサミン、G a l；
5 ガラクトース、F u c；フコース。

図10は、血清と、I g Gとの糖鎖パターンの比較を示す。血清比較におけるコントロールは、ヒト血清（S i g m a）である。I g G比較におけるコントロールは、ヒトI g G（S i g m a）である。図中の略語は、以下の通りである：B B；骨折、O A；変形性関節症、R A；慢性関節リウマチ、M a n；マンノース、G l c N A c；N－アセチルグルコサミン、G a l；ガラクトース、F u
10 c；フコース。リウマチ患者において、血清中の210.1、210.2および210.3の相対比を比較した場合、I g Gと同様な結果が得られた。

図11は、本発明のコンピュータによる実施例を示す。

図12は、ヒト血清糖タンパク質のP Aオリゴサッカリドの種々のH P L C上のクロマトグラムを示す。a) は、ヒト血清糖タンパク質のP Aオリゴサッカリド混合物がシアル酸の含量によって、D E A EカラムでH P L Cによる分離されることを示す。b) 中性、モノシアル酸、ジシアル酸、およびトリシアル酸のオリゴサッカリドのそれぞれが、第二のO D Sカラムで分離される様子を示す。
15 c) 分離されたオリゴサッカリドを第三のアミドカラムに適用した結果例を示す。矢印は、標準グルコースオリゴマーの溶出位置を示す。数は、グルコース単位数を示す。

図13は、ヒト血清糖タンパク質の中性オリゴサッカリドおよびシアルオリゴサッカリドの構造の同定を示す。中性オリゴサッカリドE（a）、モノシアリルオリゴサッカリドB（b）、およびモノシアリルオリゴサッカリドC（c）の分析プロセス例を示す。黒丸は中性オリゴサッカリドであり、白丸はモノシアリルオリゴサッカリドである。200.1などはコード番号である。矢印は、酵素消
25

化後のオリゴサッカリドの座標移動を示す。実線矢印は、 β ガラクトシダーゼであり、破線は β -N-アセチルヘキソサミニダーゼであり、点線はシアリダーゼである。

図14は、血清糖タンパク質に由来するオリゴサッカリドMono-B、Di-AおよびTri-Bならびに標準フェチュインオリゴサッカリドの400MHz ^1H NMRを示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。

(用語)

以下に本明細書において特に使用される用語の定義を列举する。

本明細書において「疾患マーカー」とは、特定の疾患の原因またはその疾患の結果のいずれかとして生じる分子をいい、この分子の存在の有無もしくは発現量の増減を調べることによって、個体における疾患の存在もしくは疾患に罹患する危険性が示される。適切な疾患マーカーとしては、糖タンパク質、糖ペプチド、糖脂質、ガングリオシド、糖鎖、およびこれらから部分的に分解または誘導された産物が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい疾患マーカーとしては、IgGおよびそのN結合型糖鎖、 α_1 -酸性糖タンパク質およびそのN結合型糖鎖、 α -フェトプロテインおよびそのN結合型糖鎖、トランスフェリンおよびその糖鎖（N結合型糖鎖を含む）、 γ GTPおよびそのN結合型糖鎖、コリンエステラーゼおよびそのN結合型糖鎖、チログロブリン、骨型アルカリフォスファターゼおよびその糖鎖、血液型物質、ヒト絨毛性ゴナドトロピンおよびそのN結合

型糖鎖、癌胎児抗原およびそのN結合型糖鎖、ラクト系糖鎖抗原、CA19-9、CA125、ならびにこれらから部分的に分解または誘導された産物が挙げられる。

5 本明細書において「精製された」、「精製されている」または「精製」とは、資料中のある物質が、分離前に試料中に存在する状態から実質的に引き離すまたは精製されていることをいう。従って、試料から分離された物質は、分離される前に含んでいたその物質以外の物質の含量が少なくとも低減している。その物質が、この物質の意図された目的を妨げないキャリアまたは希釈剤などとともに存在する場合もまた、実質的に精製されたとみなされる。従って、「精製された疾患マーカー」

10 とは、分析前に資料中に存在していた疾患マーカー以外の物質が実質的に減少していることを意味する。

本明細書において「糖鎖」とは、単位糖（単糖および／またはその誘導体）が1つ以上連なってできた化合物をいう。単位糖が2つ以上連なる場合は、各々の単位糖同士の間は、通常、グリコシド結合による脱水縮合によって結合する。こ

15 のような糖鎖としては、例えば、生体中に含有される単糖類（グルコース（Glc）、ガラクトース（Gal）、マンノース（Man）、フコース（Fuc）、キシロース（Xyl）、N-アセチルグルコサミン（GlcNAc）、N-アセチルガラクトサミン（GalNAc）、シアル酸（SA）ならびにそれらの複合体および誘導体）の他、これらの単糖が複数結合した多糖やオリゴ糖、糖タンパク質、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、糖脂質などの複合生体分子から分解または誘導された糖鎖

20 など広範囲なものが挙げられるがそれらに限定されない。したがって、本明細書では、糖鎖は、「多糖（ポリサッカリド）」、「糖質」、「炭水化物」と互換可能に使用され得る。また、特に言及しない場合、本明細書において「糖鎖」は、糖鎖および糖鎖含有物質の両方を包含することがある。

25 本明細書において「単糖」とは、少なくとも1つの水酸基および少なくとも1つのアルデヒド基またはケトン基を含む、ポリヒドロキシアルデヒドまたはポリ

ヒドロキシケトンならびにその誘導体をいう。通常単糖は、一般式 $C_nH_{2n}O_n$ で表されるがそれらに限定されず、フコース（デオキシヘキソース）、N-アセチルグルコサミンなども含まれる。ここで、上の式において、 $n=2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$ および 10 であるものを、それぞれジオース、トリオース、テトロース、ペントース、ヘキソース、ヘプトース、オクトース、ノノースおよびデコースという。一般に鎖式多価アルコールのアルデヒドまたはケトンに相当するもので、前者をアルドース、後者をケトースという。本明細書において特に言及するときは、単糖の誘導体は、置換されていない単糖上の一つ以上の水酸基が別の置換基に置換され、結果生じる物質をいう。そのような単糖の誘導体としては、カルボキシル基を有する糖（例えば、C-1位が酸化されてカルボン酸となったアルドン酸（例えば、D-グルコースが酸化されたD-グルコン酸）、末端のC原子がカルボン酸となったウロン酸（D-グルコースが酸化されたD-グルクロン酸）、アミノ基またはアミノ基の誘導体（例えば、アセチル化されたアミノ基）を有する糖（例えば、N-アセチル-D-グルコサミン、N-アセチル-D-ガラクトサミンなど）、アミノ基およびカルボキシル基を両方とも有する糖（例えば、N-アセチルノイラミン酸（NANA、シアル酸の一種）、N-アセチルムラミン酸など）、デオキシ化された糖（例えば、2-デオキシ-D-リボース）、硫酸基を含む硫酸化糖、リン酸基を含むリン酸化糖などがあるがそれらに限定されない。本明細書では、単糖という場合は、上記誘導体も包含する。あるいは、ヘミアセタール構造を形成した糖において、アルコールと反応してアセタール構造のグリコシドもまた、単糖の範囲内にある。これらの単糖が複数個結合したものがオリゴ糖若しくは多糖である。通常グリコシド結合による脱水縮合であるが、非還元末端側の糖の結合の方向性により α と β 、また夫々のどの位置の炭素に結合するかにより物性に大きく影響することが知られている。従って糖鎖構造と言う場合には、 $\beta 1,4$ 結合など結合様式が、単糖の種類（構成糖）と共に重要な情報となる。オリゴ糖と多糖との間の明確な区分は無いが、大体10-50糖

程度が境界となる。本明細書では、特に言及しない限り、オリゴ糖と多糖とは交換可能に使用される。

本明細書において「糖鎖含有物質」とは、糖鎖および糖鎖以外の物質を含む物質をいう。このような糖鎖含有物質は、生体内に多く見出され、例えば、生体中に含有される単糖、オリゴ糖、多糖類の他、糖タンパク質、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、糖脂質などの複合生体分子、およびそれら複合生体分子から分解または誘導された糖鎖など広範囲なものが挙げられるがそれらに限定されない。

本明細書において「糖タンパク質」とは、少なくとも1種の糖鎖を含む、好ましくはそのような糖鎖が結合したタンパク質をいう。従って、特に言及しない場合糖タンパク質は、糖ペプチドを含む。ただし、糖ペプチドと糖タンパク質とを区別する場合は、糖ペプチドは、糖タンパク質よりも小さなポリペプチドをさすことがある。通常、糖タンパク質は、高等生物において機能を発揮するために必要な糖鎖を有している。そのような糖タンパク質としては、例えば、N結合型糖鎖、O結合型糖鎖、C結合型糖鎖を単独で、あるいはそれらの複数種類を有する糖タンパク質が挙げられるがそれらに限定されない。そのような糖タンパク質は、酵素、ホルモン、サイトカイン、増殖因子、結合因子、抗体、ワクチン、レセプター、構造タンパク質、血清タンパク質などを包含するが、それらに限定されない。

本明細書において「糖鎖構造」とは、糖鎖の配列状態およびその情報をいう。特に言及しない限りは、本明細書において糖鎖と糖鎖構造とは、互換可能に用いられ得る。細胞、組織、臓器および生体などに重要な影響を与える糖鎖構造としては、例えば、アスパラギン結合型糖タンパク質糖鎖（N結合型糖鎖）、ムチンおよびムチン結合型糖タンパク質糖鎖（O結合型糖鎖）、糖脂質、糖ヌクレオチド、プロテオグリカン、GPIアンカーなどに含まれる糖鎖ならびに遊離糖鎖、それらの前駆体の構造が挙げられるがそれらに限定されない。本発明では、そのような糖鎖構造の変化を分析することも重要であり得る。

本明細書において「糖鎖構造のセット」または「糖鎖のセット」とは、本明細書において互換可能に利用されて、例えば、複数種の糖鎖を有する物質または組成物における、一組の糖鎖構造または糖鎖をいう。そのような糖鎖構造のセットは、例えば、同一種類の糖タンパク質上の同位置のアミノ酸に結合している糖鎖の多様性であってもよいし、複数の糖タンパク質における別々の糖鎖構造であってもよい。本発明では、そのような糖鎖構造のセットのレベルの変化を分析することも重要であり得る。

本明細書において糖鎖構造の「量的変化の情報」とは、複数の糖鎖（または糖鎖構造のセット）が有する存在量または発現量の変化に関する情報をいう。このような糖鎖構造の量的変化の情報は、その糖鎖自体の存否に関する情報として表示することもできるし、その糖鎖が含まれる分子（例えば、糖タンパク質）全体を情報として表示することもできる。量的変化の情報はまた、注目すべき糖鎖の割合の比として表現することができるがそれに限定されない。そのような量的変化の情報を構成するおのこの糖鎖または糖鎖を含む分子の量（またはレベル）を示す単位としては、例えば、 ng 、 μmol 、質量分析における信号強度、分光分析における信号強度、または $\text{mg}/\text{試料 g}$ 、 $\text{mmol}/\text{試料 g}$ 、あるいは相対蛍光強度、及びそれらを基にした百分率などの相対的数値などが挙げられるがそれらに限定されない。本発明では、そのような糖鎖構造の量的変化量の変化を分析（区間微分などによる）することも重要であり得る。

本明細書において「相互作用」とは、2つの物体について言及するとき、その2つの物体が相互に力を及ぼしあうことをいう。そのような相互作用としては、例えば、共有結合、水素結合、ファンデルワールス力、イオン性相互作用、非イオン性相互作用、疎水性相互作用、静電的相互作用などが挙げられるがそれらに限定されない。ある実施形態では、相互作用は、共有結合であることが好ましいが、その他の相互作用もまた、糖鎖において重要であり得る。

本明細書において相互作用、発現、存在などの「レベル」とは、その相互作用、

5 発現、存在などの強さを示す程度をいい、糖鎖に関する情報を判断するために使用され得る。そのようなレベルは、例えば、物理学的解析（例えば、質量分析、NMR、X線解析など）、分光学的解析（例えば、抗体、レクチンによる凝集反応および発色反応などを分析するなど）、化学的解析（例えば、オキシム結合などの特異的結合を化学的に定量する方法など）、生物学的解析（例えば、ある糖鎖に特異的な細胞の反応性を定量する方法など）が挙げられるがそれらに限定されない。

（試料調製および糖鎖分析）

10 本明細書において「血液」とは、当該分野において通常用いられる意味と同じ意味で用いられ、血管系（循環系）を循環する体液をいう。

本明細書において「血清」とは、血液から血球と血液凝固成分を取り除いた部分をいう。「血清」とは血液を放置若しくは遠心分離操作をして、血球や凝固成分の上清の液体成分を示す。血清は、アルブミン、グロブリンなど血中タンパク質を含む。

15 本明細書において「イムノグロブリン」または「Ig」とは、抗体としての分子構造をもつタンパク質の総称である。イムノグロブリンは、すべての脊椎動物の血清および体液中に含まれる。ヒトの血清中には、1mlあたり16～18mg含まれているといわれている。イムノグロブリンは、糖鎖を有しており、この糖鎖が生物学的活性に重要な働きを果たしているといわれている。

20 本明細書において「イムノグロブリンG」または「IgG」とは、イムノグロブリンの一種であり、両生類以上の高等動物では、主要なイムノグロブリンで、ヒトではイムノグロブリンの約70%を占めるといわれている。魚類では含まれていないといわれている。その生物学的性質は動物の種により、またIgGの中のサブクラスにより異なる。ヒトではIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4の4種類のサブクラスが存在する。

血清の調製方法は、当該分野において周知であり、採血した血液を放置若しくは遠心分離し液体成分を固形成分から分離したものである。臨床検査のための採血は真空採血管で行われることが殆どであり、採血された血液は血球と凝固成分が凝固したゲル状物質と、液体成分(血清)に、放置若しくは遠心分離操作において分離される。

本明細書において使用される糖鎖分析は、当該分野において公知のものを利用することができる。そのような分析方法としては、例えば、物理学的方法（例えば、質量分析、NMRなど）、化学的方法（例えば、糖特異的官能基との化学的特異的反応の解析、糖鎖と特定の物質の相互作用を利用したクロマトグラフィー、それらを組み合わせた2次元マップ法など）、生化学的方法（例えば、レクチン、抗体、酵素の特異性を利用したアッセイなど）、生物学的方法（例えば、微生物のある糖に対する親和性、優先性などを調べるアッセイなど）が挙げられるがそれらに限定されない。

そのような糖鎖分析の一例としては、例えば、糖鎖を含む試料を調製した後、その試料を質量分析する方法が挙げられる。質量分析の方法は、当該分野において周知であり、例えば、MALDI-TOFなどが挙げられるがそれらに限定されない。当業者はそのような方法を適宜改変して本発明に用いることができる。

そのような質量分析を用いると、通常、10 pmolレベルの試料まで、より通常には100 pmolまでの分析可能となっている。以下に例示的な方法を説明する。

質量分析に用いる試料は、クロマトグラフィー、電気泳動技術などの技術によって分析することによって提供され得る。そのようなクロマトグラフィーなどの技術は、当該分野において周知である。

本明細書において「クロマトグラフィー」とは、混合物の試料から、担体（固定相）中の移動度（分配平衡）の差を利用して試料中にある特定の標的物質または標的物質群を別の物質または物質群から分離する方法をいう。従って、試料の

分離が達成される限りどのような技術もクロマトグラフィーの範囲内にある。クロマトグラフィーは、例えば、ある標的物質を混合物から分離する目的で使用され得るし、あるいは、ある標的物質について定性的または定量的な分析をするためにも使用され得る。例えば、通常クロマトグラフィーとは呼ばれない電気泳動技術もまた、通常試料中の少なくとも1つの成分を分離することができることから、本明細書においてクロマトグラフィーの範囲内にある。固定相は通常液体または固体であり得る。移動相は通常液体または気体であり得る。吸着剤などの固定相または移動相の一端に試料を吸着させ、これに適当な溶媒（移動相）を移動させると試料中の成分は固定相（固定相の表面または内部など固定相のある部分）を溶出と吸着を繰り返しながら移動する。その間に吸着されやすいものとされにくいものとの間に移動度の差を生じて、混合物の分離が可能になる。移動相が液体のものは、液体クロマトグラフィーとも呼ばれる。従来、移動相が液体か気体かによって液体クロマトグラフィー（LLC、LSCなど。HPLC、FPLC（登録商標）などもこれに入る）とガスクロマトグラフィー（例えば、GLC、GSCなど）とに分けられ、分離の機構によってキラルクロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、分配クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー（ゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）、ゲル濾過クロマトグラフィー（GFC）などのゲルクロマトグラフィー）、塩析クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、超臨界流体クロマトグラフィー、高速向流分配クロマトグラフィー、パーフュージョンクロマトグラフィーなどの分類で使用されている。また固定相の形状により、カラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、ペーパークロマトグラフィーなどの種類に分類されている。本発明の方法は、どのような形態のクロマトグラフィーにおいても使用され得る。本明細書において固定相および移動相は、そのクロマトグラフィーを使用する目的に応じて当業者が適宜選択することができる。そのような固定相および移動相

の選定は、当該分野において周知であり、例えば、「ライフサイエンスのための高速液体クロマトグラフィー 基礎と実験」中川照真、牧野圭祐編、廣川書店に記載されている。

5 糖鎖を含む試料の調製は、レクチン、抗体などを利用して糖鎖または糖鎖を含む物質を、分離して行ってもよい。目的に応じて所望のストリンジェンシー条件を用いることによって、種々の分離を行うことができる。

10 本明細書において、試料中の糖鎖または糖鎖含有物質を「分離」とは、その糖鎖または糖鎖含有物質が、分離前に試料中に存在する状態から実質的に引き離すまたは精製することをいう。従って、試料から分離された糖鎖または糖鎖含有物質は、分離される前に含んでいた糖鎖または糖鎖含有物質以外の物質の含量が少なくとも低減している。従って、本発明の糖鎖構造の分析には、このような分離された糖鎖または糖鎖含有物質を含む試料を用いることが好ましい。

15 本明細書において「所望のストリンジェンシー（条件）」とは、糖鎖と特異的に相互作用する物質と、糖鎖または糖鎖含有物質との間の相互作用が解離しないような条件をいう。そのような条件は、当該分野において周知の技術を用い、用いる試薬、担体、糖鎖または糖鎖含有物質、糖鎖と特異的に相互作用する物質、形成される相互作用などの種々のパラメータを参酌しながら、当業者が適宜選定することができる。例えば、相互作用が共有結合である場合は、所望のストリンジェンシーは、水（例えば、超純水）または緩衝液（例えば、酢酸緩衝液）でリ
20 ンスすることであってもよい。

（二次元マップ法）

25 本明細書において「二次元マップ法」「二次元マッピング」「3次元マップ法」「2/3次元マップ法」または「多次元マップ法」とは、交換可能に用いられ、2種類以上のクロマトグラフィーを併用して分析を行うことをいう。好ましくは、そのようなクロマトグラフィーは、異なる種類（例えば、疎水性クロマトグラフ

ィー、順相クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなど）を併用することが有利である。これらの技術に加えて、核磁気共鳴（NMR）、質量分析、分光法、メチル化分析、レクチンの親和性分析、およびそれらとエキソグリコシダーゼ消化との組み合わせもまた、二次元マッピングにより分離された各糖鎖を明確に構造解析を行うのにしばしば使用されており、本発明の実施において適宜単独でまたは組み合わせて用いることができる。

二次元マップ法は糖鎖の非常に広範なN-結合型の糖鎖構造を分析することができる。例えば、ヒトIgGは、種々の二アンテナ糖鎖を含有し、昆虫や植物糖タンパク質は、キシロース含有糖鎖を生成し、エリスロポエチン由来の糖鎖は、Gal β 1-4GlcNAc反復単位またはGal β 1-3GlcNAc配列を有し、そしてブタ膵臓カリジノゲナーゼは、ガラクトース残基においてバリエーションを有する三アンテナ糖鎖および四アンテナ糖鎖やガラクトースがN-アセチルガラクトサミンに置換した糖鎖を含む。このような多様な構造を有する糖鎖に二次元マップ法は対応することができる。

15

（糖鎖の遊離）

二次元マップ法で用いるためのN結合型糖鎖の調製は当該分野において周知である。例えば、化学的方法および酵素的方法のいずれによっても、糖タンパク質からN結合型糖鎖を遊離することが可能である。最も信頼できる化学的手法はヒドラジン分解である。ヒドラジン分解は、MatsushimaおよびFujii (Bull. Chem. Soc. Jpn., 30, 48, 1957) によって初めて報告され、Takasakiら (Methods in Enzymology Ginsburg, V., Ed., Academic Press, New York, 1982, 263) によって改良された方法である。ヒドラジン分解を手軽に行える装置及び試薬キットも市販されている。一方酵素的方法は、主にグリコアミダーゼ消化が利用される。酵素によるN-型糖鎖遊離は、Koide及びMuramatsuら (J. Biol. Chem., 249, 4897, 1974) により最初に発見されたエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを用いること

25

もできるが、広範な基質特異性を持ちN-アセチルグルコサミン残基がタンパク質に残らないグリコアミダーゼの利用が一般的である。グリコアミダーゼはTakashi (Biochem. Biophys. Res. Commun., 76, 1194, 1977) により発見され、グリコペプチダーゼ、ペプチド-N-グリコシダーゼ、N-グリコシダーゼ、グリコアミダーゼなどと称されて広く市販、利用されている。市販のグリコアミダーゼはアーモンド由来のグリコアミダーゼAと微生物 (Flavobacterium) 由来のグリコアミダーゼFがある。グリコアミダーゼFは植物や昆虫などに見られる還元末端N-アセチルグルコサミンにフコースが α 1, 3結合した糖鎖構造に作用しにくいことが知られるが、双方とも糖ペプチド基質に対して十分に作用し、そして糖鎖の遊離は、通常、ほぼ定量的である。グリコアミダーゼAによる消化に適した糖ペプチドの調製のに関して、本発明者らは、以下の方法を例示的に説明する。シアル酸含有糖タンパク質について、糖タンパク質 (例えば、約2%) を中性pHにて熱変性させる (例えば、100℃、10分間)。変性糖タンパク質サンプルに、トリプシンおよびキモトリプシン (例えば、各々、基質の1/100重量) ならびに緩衝液 (pH 7~8) を添加し、必要な場合、この混合物を、例えば、37℃で1~2日間インキュベートする (好ましくは、10mM Ca^{2+} の存在下で)。あるいは、例えば、pH 7~8、80℃にて40分間、S-カルボキシアミドメチル化糖タンパク質の2%溶液を、サーモリシン (基質の1/50~1/100重量) により消化してもよい。この糖タンパク質を糖ペプチドの分解する過程は、立体障害を減らし酵素が糖鎖に反応しやすくするが、省略される場合もある。プロテアーゼ消化を、中性pH、100℃にて10分間加熱することにより停止し、そしてグリコアミダーゼ消化に直接使用する。十分なサンプルが得られる場合、プロテアーゼ消化混合物を、例えば、Sephadex (登録商標) G-25カラムを用いてクロマトグラフィーに供して、グリコアミダーゼ消化の前に糖ペプチドを精製することができる。

糖ペプチド試料は、凍結乾燥した後 糖鎖100nmol当たり20 μ lの100m

Mクエン酸ーリン酸緩衝液 (pH 5~6) に溶解させ、グリコアミダーゼA溶液 (0.2 mU/10 μ l 100 mMクエン酸ーリン酸緩衝液 (pH 5~6) (リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、またはTris-HCl緩衝液であってもよい)) を添加する。反応混合物を、37℃で5~16時間インキュベートする。

- 5 グリコアミダーゼFをトリプシンとキモトリプシンで処理をした糖ペプチドに作用させるときは、中性付近のpHで糖鎖100nmol当たりグリコアミダーゼF溶液を0.2U相当加え、37℃で1~24時間インキュベートする。プロテアーゼ消化を行わないときや処理時間を短くするときは酵素使用量を増やして対応することもある。
- 10 遊離した糖鎖は以下の分析手法に応じて精製、脱塩などの処理を行なう。例えば、糖鎖遊離後にプロナーゼなどペプチドをアミノ酸単位まで分解する酵素を用いて処理し、ペプチドの低分子化により、ゲルろ過やイオン交換などで糖鎖が精製しやすくなる。化学的方法と酵素的な方法を比較する場合は一長一短があり当業者は適宜その利点を考慮してこれらの方法を利用することができる。

- 15 O-結合型の糖鎖についても同様にO-グリコシダーゼ (Iwaseら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 151, 422, 1988) など酵素的又は化学的にヒドラジン (Kuraya & Hase, J. Biochem., 112, 122, 1992) などを用いて糖鎖を遊離することができる。糖脂質については糖鎖を遊離しないで分析することも広く行なわれているし、同様にエンドグリコセラミダーゼ (Ito & Yamagata, J. Biol. Chem., 264, 9510, 1989) など酵素的に、又化学的に糖鎖を遊離することもできる。これら糖鎖の遊
- 20 離処理を行なわない場合には遊離糖鎖の解析を行なうことができる。

(糖鎖の分析)

- 25 遊離された糖鎖をクロマトグラフィーで分離して分析するとき、多くの場合検出感度を上げるために標識化される。標識方法としてはトリチウムなど放射性同位元素を用いた手法と、2-アミノピリジンや4-アミノ安息香酸オクチルエステルなど蛍光や紫外吸収を持った化合物を結合させる手法があり、それらに対応

した蛍光検出器、紫外検出器、シンチレーションカウンターなどで高感度に検出される。標識化されない糖鎖の場合でも、示差屈折計、パルスドアンペオメトリー検出器、質量分析装置などにより検出することができる。糖鎖をクロマトグラフィーで分離しない場合や、クロマトグラフィーで分離した糖鎖を非連続的に検出する場合、ペーパークロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、電気泳動などで糖鎖を分離した場合などは前記の検出法他、オルシノール硫酸法などで糖を化学的に発色させる手法、抗体やレクチンなど特定の糖鎖構造を認識する物質を用いて凝集・発色・比色などを計測する手法、発色・比色や放射性同位体元素を用いてフィルムなどにイメージングする手法、質量分析やNMR解析などが用い
5
10
15
20

ることができる。特定の構造を認識するレクチンや抗体を基板上にスポットして、糖鎖のプロファイリングを行う糖鎖チップなどの手法を用いることもできる。多くの糖鎖構造解析法の中で蛍光標識を行なった糖鎖を2種類以上のクロマトグラフィーで分離し、同時にその溶出位置から糖鎖構造を推定する2次元マップ法が広く普及している。本法はN型糖鎖のみならず、O型糖鎖、糖脂質糖鎖、グルカン類においても行なわれる。N型糖鎖のみでも、標識法、利用するクロマトグラフィー、標準試料などの違いにより、幾つかの手法が提唱されているが、高橋のグループにより開発された中性糖鎖を対象とした二次元マッピング (Tomiya N et al, Anal. Biochem., 171, 73, 1988)、シアリル糖鎖まで対象に含めた3次元マッピング (Takahashi N et al, Anal. Biochem., 226, 139, 1995) に準じて本明細書中では説明する。

(N-型糖鎖の命名)

糖脂質糖鎖やO-結合型糖鎖については研究者間で糖鎖命名についてほぼ統一が取れているが、N-型糖鎖に関してはいろいろな表記がなされる。本明細書において糖鎖構造の表示は、高橋らの命名法 (<http://www.gak.co.jp>; 高橋禮子編著、
25
生化学実験法23、糖蛋白質糖鎖研究法、学会出版センター、1989年; Takahash

i N, Tomiya N: Analysis of N-linked oligosaccharides: Application of glycoamidaseA: in Handbook of endoglycosidases and glycoamidases (Takahashi N, Muramatsu Teds.). pp.209-241, CRC Press, BocaRaton, FL, 1992) に準ずる。これは、1)N-アセチルラクトサミン型（コンプレックス型）糖鎖の場合には、

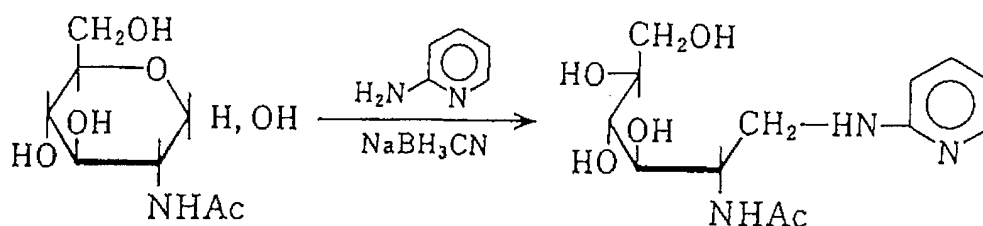
- 5 (1) 分岐の数を3桁の数字の最初の数で示す。(2)還元末端のN-アセチルグルコサミンに α 1,6結合にてフコースが結合しているときは1を、結合していないときには0を3桁の数字の真ん中に入れる。(3)コア構造5糖の β マンノースにN-アセチルグルコサミンが β 1,4で結合しているときは1を、結合していないときには0を3桁の数字の最後に入れる。3桁の数字の後に.を置きその右側には固有番号をつける。2)高マンノース型（ハイマンノース型）糖鎖は最初にMを、次にマンノース残基数を入れる。その後に.を置きその右側には固有記号をつける。還元末端のN-アセチルグルコサミンに α 1,6結合にてフコースが結合しているときはMの後にFを入れる。3)混成型（ハイブリッド型）糖鎖は最初にHを、次にマンノース残基数を入れる。その後に.を置きその右側には固有記号をつける。
- 10 還元末端のN-アセチルグルコサミンに α 1,6結合にてフコースが結合しているときはHの後にFを入れる。4)還元末端のN-アセチルグルコサミンに α 1,3結合にてフコースが結合しているときはFを、コア構造5糖の β マンノースにキシロースが β 1,2で結合しているときはXを全体の後に入れる。その両方を有するときにはFXの順に入れる。5)N-アセチルガラクトサミンをガラクトースの代わりに有する場合は、ガラクトースとして記号をつけた後に、N-アセチルガラクトサミンの数が1ならa、2ならb、3ならc・・・と数に対応した小文字アルファベットを最後に
- 20 つける。6)コア構造5糖のようにN-アセチルラクトサミン型と高マンノース型若しくは混合型の何れにも分類できる場合はN-アセチルラクトサミン型の命名を優先する。7)シアル酸を有する場合には、シアル酸の残基数を書き、次にシアル酸の分子種がN-アセチルノイラミンサンの場合にはAを、さらに固有番号のセットを、上記糖鎖構造の前につけて-で結ぶ。そのような表示方法の例としては、ガ
- 25

ラクトース β 1,4-N-アセチルグルコサミン β 1,2-マンノース α 1,3- (マンノース
 α 1,3- (マンノース α 1,6-) マンノース α 1,6-) マンノース β 1,4-N-アセチルグ
 ルコサミン β 1,4-N-アセチルグルコサミンを H 5. 1 2、ガラクトース β 1,4-N-
 アセチルグルコサミン β 1,2-マンノース α 1,3- (マンノース α 1,6-) マンノース
 5 β 1,4-N-アセチルグルコサミン β 1,4-N-アセチルグルコサミンを 1 0 0. 4、ガ
 ラクトース β 1,4-N-アセチルグルコサミン β 1,2-マンノース α 1,3- (マンノース
 α 1,3- (マンノース α 1,6-) マンノース α 1,6-) マンノース β 1,4-N-アセチルグ
 ルコサミン β 1,4- (フコース α 1,6-) N-アセチルグルコサミンを HF 5. 1 2、
 N-アセチルグルコサミン β 1,2-マンノース α 1,3- (N-アセチルグルコサミン β 1,
 10 2-マンノース α 1,6-) マンノース β 1,4-N-アセチルグルコサミン β 1,4- (フコー
 ス α 1,6-) N-アセチルグルコサミンを 2 1 0. 1 およびガラクトース β 1,4-N-ア
 セチルグルコサミン β 1,2- (ガラクトース β 1,3-N-アセチルグルコサミン β 1,4-
) マンノース α 1,3- (ガラクトース β 1,4-N-アセチルグルコサミン β 1,2-マンノ
 ース α 1,6-) マンノース β 1,4-N-アセチルグルコサミン β 1,4-N-アセチルグルコ
 15 サミンを 3 0 0. 2 2 と呼ぶことが挙げられるがそれに限定されない。

(糖鎖分析例 1)

全血清の N-結合型糖鎖の Nakagawa ら (Anal. Biochem., 226, 130, 1995) の分析
 例を挙げる。健常人の血清 2 0 0 μ L を 1 0 0 °C 1 0 分間加熱変成後、1 4 0 μ
 20 g のトリプシンと 1 4 0 μ g のキモトリプシンを加え、pH 8、3 7 °C で 1 6 時
 間インキュベートしてタンパク質をペプチドに分解した。更に 1 mU の N-グリコ
 アミダーゼ A を加え 0. 5 M クエン酸緩衝液中で 1 6 時間インキュベートし糖鎖を
 遊離した。最終的に 2 0 0 μ g のプロナーゼを加えて反応させ、ペプチドをアミ
 ノ酸に分解した。Bio Gel P-4 (BioRad 社) ゲルろ過で糖鎖を精製し、2-ア
 25 ミノピリジンで蛍光標識した。糖鎖の還元末端へのピリジルアミノ基の導入は、
 放射標識を用いずに、糖鎖のピコモルレベルでの検出を可能にする (Hase S., et

al., J. Biochem. (Tokyo), 85, 217, 1979)。糖鎖と2-アミノピリジンとの間の反応は、



- 5 に示されるように進行する。当初の手法 (Hase S et al, J. Biochem., 95, 197, 1984) は、シアル酸の遊離が問題になり他の蛍光標識法が開発されたが基本的な反応原理は同じ還元アミノ化反応が殆どであり、同じ長谷らのグループによりシアル酸が遊離しないよう改良された (Yamamoto S et al, J. Biochem., 105, 547, 1989)。この技術は、クロマトグラフィー分離および糖鎖の決定のための、
- 10 最も有効かつ有名な手順の1つである。

(糖鎖のピリジルアミノ化の手順)

例示的な中性糖鎖のピリジルアミノ誘導体を調製する手順を以下に説明する。

(試薬)

- 15 1. 2-アミノピリジン塩酸溶液：濃塩酸 (12 N) に再結晶又は蛍光標識用の2-アミノピリジンを溶解し、水で10倍に希釈したときにpH6.8になるように調製する。
2. 還元試薬：ソジウムシアノボロヒドリド (Aldrich Chemical Co.) 20 mg 当たり 12 μ l の水を加えたもの (用時調製)

20 (手順)

1. 十分に乾燥したサンプルに 50 μ l の2-アミノピリジン塩酸溶液を添加し、そして混合する。

2. 密封し、サンプルを 90℃にて10分間加熱する。
3. 5 μ l の上記の還元試薬を添加する。
4. 密封し、サンプルを 90℃にて1時間加熱する。
5. サンプルを 200～300 μ l の水に希釈する。
- 5 6. 10 mM NH_4HCO_3 を溶出液として用いて、Sephadex (登録商標Amersham Biotech社) G-15カラムによるゲル濾過によりピリジルアミノ化糖鎖 (PA糖鎖) を精製する。
7. 糖鎖画分を収集し、構造分析用サンプルとして使用する。

糖鎖の構造決定は、主に高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と部分酵素消化
10 によりなされるが、場合によりいくつかの技術 (メチル化、核磁気共鳴 (NMR)、および質量分析 (MS)) を組み合わせて実施される。

(高性能液体クロマトグラフィー)

PA糖鎖の分離は、以下に示す3種のカラム用いて、HPLCにより実施する
15 ことができる。

第1工程：陰イオン交換樹脂TSKgel DEAE-5PW (7.5x75mm, 東ソー)を用いたHPLC:

溶出を、溶媒A (10% (v/v) アセトニトリル水溶液にトリエチルアミンを加えたもの、pH 9.5) および溶媒B (3% 酢酸-トリエチルアミン緩衝液 pH
20 7.3とアセトニトリル9:1 (v/v)) を用いて、30℃にて流速1.0 ml/分で実施する。カラムを、溶媒Aにより平衡化する。サンプルを注入した後、溶媒Aに対する溶媒Bの比を、40分かけて20%まで直線勾配で増加させる。ピークとして表れた各々の糖鎖画分を回収し、乾固するまで減圧下でエバポレートする。

第2工程：Nakanopack ODSカラム (0.6×15 cm、中埜酢店) を用いた
25 逆相HPLC:

溶出を、溶媒C (10 mM ナーリン酸緩衝液、pH 3.8) および溶媒D

(10 mM Na-リン酸緩衝液、0.5% 1-ブタノール、pH 3.8) を用いて、例えば、55℃にて流速1.0 ml/分で実施する。カラムを、溶媒Cおよび溶媒Dの4:1混合物(容量)により平衡化する。第一工程で分けられた各々の糖鎖画分を注入した後、溶媒Cに対する溶媒Dの比を、60分かけて50:50まで直線勾配で増加させる。ODSカラムにおいてピークとして表れた各々の糖鎖画分を回収し、乾固するまで減圧下でエバポレートする。

5

第3工程: TSK-GEL Amide-80カラム(0.46×25 cm、東ソー)を用いたサイズ分画HPLC:

溶出を、溶媒E(3%酢酸-トリエチルアミン緩衝液、pH 7.3およびアセトニトリルの35:65混合物)および溶媒F(3%酢酸-トリエチルアミン、pH 7.3:アセトニトリルの50:50混合物)を用いて、40℃にて流速1.0 ml/分で実施する。第2工程で分離された糖鎖画分を、溶媒Eに溶解し、アミドカラムに注入する。初めにカラムを溶媒Eで平衡化する。サンプルを注入した後、50分かけて直線勾配を使用し、100%溶媒Fを得る。

10

それぞれのHPLCシステムにおいて、PA糖鎖を、それぞれ、320 nmおよび400 nmの励起波長および発光波長を用いた蛍光により検出する。様々な種類のPA糖鎖の検出は、モルベースではほぼ等価である。従って、各々のPA糖鎖のピーク領域は、糖鎖のモル量を反映する。

15

上記3工程での糖鎖分離のHPLCチャートは図12 (Anal. Biochem. 226, 130- , 1995を参照) の様になる。

20

(2/3次元糖マッピング)

PAグルコースオリゴマーを用いてサンプルPA糖鎖の溶出位置を校正することが重要である。これにより、実験毎のPA糖鎖の溶出時間の変動を最小限に抑えることができる。上記の条件下で、PAグルコースオリゴマーは、逆相カラムおよびアミド吸着カラムにおいて、効果的に分離され得る。次いで、サンプルPA

25

糖鎖の溶出位置を、標準のPAグルコースオリゴマーと溶出時間について比較することにより、規定する。

図12には、中性糖鎖において2つのHPLCカラム（ODS-シリカカラムおよびアミド-シリカカラム）における、150種以上のPA糖鎖の溶出位置が示されている（中性糖鎖の2次元マップ）。この溶出位置は、前記と同じ条件で分析した場合には再現性があり、ODSカラムとアミドカラムの溶出位置により糖鎖構造の推定ができる。メーカー等カラムの種類が異なると溶出位置の誤差が大きくなるが、Nakanopack（中埜酢店）、CLCとHRC（島津製作所）のODSカラム6 x 150 mmでは溶出がほぼ同じで再現性が高い。第一工程でシアル酸の残基数により分離された糖鎖についても、同様にODSカラムとアミドカラムの溶出位置により糖鎖構造の推定ができる。この様にして糖鎖構造は既知の糖鎖の溶出位置と比較してその糖鎖構造が推定される。次にその推定構造が正しいかどうか各種グリコシダーゼで消化して確認する。例えば第1工程で中性糖鎖に分類され、ODSカラムの分析でのピークEはその溶出位置より200.4（Gal β 1,4-GlcNAc β 1,2-Man α 1,3-(Gal β 1,4-GlcNAc β 1,2-Man α 1,6-)) Man β 1,4-GlcNAc β 1,4-GlcNAc) と推定された。 β -ガラクトシダーゼ（タチナタマメ由来、生化学工業）を用いてこの糖鎖を処理すると、200.1（GlcNAc β 1,2-Man α 1,3-(GlcNAc β 1,2-Man α 1,6-)) Man β 1,4-GlcNAc β 1,4-GlcNAc) の溶出位置に移動した。更に β -N-アセチルヘキシサミニダーゼ（タチナタマメ由来、生化学工業）で処理すると、000.1（Man α 1,3-(Man α 1,6-)) Man β 1,4-GlcNAc β 1,4-GlcNAc) の溶出位置に移動した。このことにより、ピークEが当初推定どおり200.4の構造であると決定した。第1工程でモノシアルル糖鎖画分に溶出し、ODSカラムの分析でB及びCに溶出した糖鎖は、この時点では2次元マップに該当する糖鎖は無かった。 α 2,3と α 2,6結合の何れのシアル酸にも同様に作用するArthrobacter ureafaciens由来のシアリダーゼ（ナカライテスク）で中性糖鎖200.4の溶出位置に移動し、 α 2,3シアル酸に特異的なSalmonella typhimurium由来のシアリダーゼ（寶酒造）では移動しな

ったことから中性糖鎖構造200.4にシアル酸が α 2,6結合で1残基結合していると推定された。BとCに β -ガラクトシダーゼを作用させてからArthrobacter由来のシアリダーゼを作用させると、Bは200.3 (Gal β 1,4-GlcNAc β 1,2-Man α 1,3 (GlcNAc β 1,2-Man α 1,6-) Man β 1,4-GlcNAc β 1,4-GlcNAc) を、Cは200.2 (GlcNAc β 1,2-Man α 1,3 (Gal β 1,4-GlcNAc β 1,2-Man α 1,6-) Man β 1,4-GlcNAc β 1,4-GlcNAc) と同様の溶出位置となった。更にB及びCを β -ガラクトシダーゼ、 β -N-アセチルヘキソサミニダーゼ、Arthrobacter由来シアリダーゼで逐次処理を行なうとBは100.4 (Gal β 1,4-GlcNAc β 1,2-Man α 1,3 (Man α 1,6-) Man β 1,4-GlcNAc β 1,4-GlcNAc) を、Cは100.3 (Man α 1,3 (Gal β 1,4-GlcNAc β 1,2-Man α 1,6-) Man β 1,4-GlcNAc β 1,4-GlcNAc) と同様の溶出位置となった (図13、Anal. Biochem. 226, 130- , 1995を参照)。この様にしてBはNANA α 2,6-Gal β 1,4-GlcNAc β 1,2-Man α 1,3 (GlcNAc β 1,2-Man α 1,6-) Man β 1,4-GlcNAc β 1,4-GlcNAc (1A1-200.4) と、CはGlcNAc β 1,2-Man α 1,3 (NANA α 2,6-Gal β 1,4-GlcNAc β 1,2-Man α 1,6-) Man β 1,4-GlcNAc β 1,4-GlcNAc (1A2-200.4) とその構造が決定され、BについてはNMR解析により確認された (図14、Anal. Biochem. 226, 130- , 1995を参照)。この様にして血清中より最終的に中性糖鎖14種類、モノシアリル糖鎖8種類、ジシアリル糖鎖4種類、トリシアリル糖鎖5種類の構造が解析された (表1、Anal. Biochem. 226, 130- , 1995のTable1)。

表1
ODS/アミドシリカにおけるヒト血清から得られたPAオリゴサッカリドの落出位置

ピーク番号/ コード番号	PAオリゴサッカリドの構造	Glc 単位	
		ODS	アミド
中性			
A1 M7.2		5.1	8.1
A2 M8.1		4.9	9.0
B1 M7.1		5.8	8.0
B2 M9.1		5.2	9.7

Label	Chemical structure	6.1	7.1
C M6.1		6.1	7.1
D M5.1		7.2	6.2
E 200.4		10.2	7.0
F 210.1		12.3	5.5
G 210.2		13.1	6.3
H 210.3		13.3	6.4

表1-つづき

ピーク番号/ コード番号	PAオリゴサッカリドの構造	Glc 単位	
		ODS	アミド
I 210.4	Gal β 4GlcNAc β 2Man α 6 Man β 4GlcNAc β 4GlcNAc Fuc α 6	14.1	7.4
J 211.1	Gal β 4GlcNAc β 2Man α 3 GlcNAc β 2Man α 6 GlcNAc β 4-Man β 4GlcNAc β 4GlcNAc Fuc α 6	17.8	5.8
K 211.2	Gal β 4GlcNAc β 2Man α 6 GlcNAc β 2Man α 3 GlcNAc β 4-Man β 4GlcNAc β 4GlcNAc Fuc α 6	18.7	6.6
L 211.4	Gal β 4GlcNAc β 2Man α 6 GlcNAc β 2Man α 3 GlcNAc β 4-Man β 4GlcNAc β 4GlcNAc Fuc α 6	20.2	7.5
モノシアリル A 1A1-200.3	Neu5Ac α 6Gal β 4GlcNAc β 2Man α 3 GlcNAc β 2Man α 6 Man β 4GlcNAc β 4GlcNAc	9.3	6.2

B 1A1-200.4	Gal β 4GlcNAc β 2Man α 6 Man β 4GlcNAc β 4GlcNAc	9.9	7.0
C 1A2-200.4	Neu5Ac α 6Gal β 4GlcNAc β 2Man α 3 Neu5Ac α 6Gal β 4GlcNAc β 2Man α 6 Man β 4GlcNAc β 4GlcNAc	12.0	6.9
D 1A1-210.3	Gal β 4GlcNAc β 2Man α 3 GlcNAc β 2Man α 6 Fuc α 6 Man β 4GlcNAc β 4GlcNAc	12.5	6.6
E 1A1-201.4	Neu5Ac α 6Gal β 4GlcNAc β 2Man α 3 Gal β 4GlcNAc β 2Man α 6 GlcNAc β 4-Man β 4GlcNAc β 4GlcNAc	12.7	7.2
F 1A1-210.4	Neu5Ac α 6Gal β 4GlcNAc β 2Man α 3 Gal β 4GlcNAc β 2Man α 6 Fuc α 6 Man β 4GlcNAc β 4GlcNAc	13.2	7.6
G 1A3-210.4	Neu5Ac α 6Gal β 4GlcNAc β 2Man α 3 Gal β 4GlcNAc β 2Man α 6 Fuc α 6 Man β 4GlcNAc β 4GlcNAc	14.8	6.9
H 1A1-211.4	Neu5Ac α 3Gal β 4GlcNAc β 2Man α 3 Gal β 4GlcNAc β 2Man α 6 GlcNAc β 4-Man β 4GlcNAc β 4GlcNAc Fuc α 6	18.3	7.7
	Neu5Ac α 6Gal β 4GlcNAc β 2Man α 3		

表1ーつづき

ピーク番号/ コード番号	PAオリゴサッカリドの構造	Glc 単位	
		ODS	アミド
ジシアリル			
A 2A1-200.4	Neu5Aα6Galβ4GlcNAcβ2Manα6 		

B 3A2-300.8	Neu5Ac α 6Gal β 4GlcNAc β 2Man α 6	13.1		8.0
	Neu5Ac α 3Gal β 4GlcNAc β 4			
	Neu5Ac α 6Gal β 4GlcNAc β 2			
C 3A1-300.8	Neu5Ac α 6Gal β 4GlcNAc β 2Man α 6	15.3		8.5
	Neu5Ac α 3Gal β 4GlcNAc β 4			
	Neu5Ac α 6Gal β 4GlcNAc β 2			
D 3A2-310.8	Neu5Ac α 6Gal β 4GlcNAc β 2	16.7		8.4
	Neu5Ac α 6Gal β 4GlcNAc β 2Man α 6			
	Neu5Ac α 3Gal β 4GlcNAc β 4			
E 3A1-310.8	Neu5Ac α 6Gal β 4GlcNAc β 2	19.6		8.7
	Neu5Ac α 6Gal β 4GlcNAc β 2Man α 6			
	Neu5Ac α 3Gal β 4GlcNAc β 4			

(試料)

本明細書において「試料」とは、その中の少なくとも1つの成分（好ましくは糖鎖または糖鎖含有物質）の分析を目的とするものであれば、どのような起源のものをも使用することができる。本発明において特に、血清全体を使用することができる。血清全体の糖鎖が診断に応用されることは従来知られておらず、顕著な効果といえる。したがって、試料は、生物の全部または一部から取り出されたものであり得るが、それに限定されない。別の実施形態において、試料は、合成技術によって合成されたものであり得る。そのような合成技術によって合成されたものを試料として用いるのは、例えば、標準データをとる場合や糖鎖の代謝や生体への結合を測定する場合において有用である。

試料としては、例えば、血清の場合、当該分野において周知の調製方法で調製された血清をそのまま用いることができるが、簡単に精製してもよい。従って、試料の調製方法としては、分析される対象としての糖鎖の分析に悪影響がない限り、どのような調製方法を用いてもよい。そのような調製方法としては、例えば、静脈から採血し、その後、遠心分離（例えば、 $2000 \times g$ ）を行って得られた上清を血清試料とすることができる。

本明細書において使用される用語「生体分子」とは、生体に関連する分子をいう。そのような生体分子を含む試料を、本明細書において特に生体試料ということがある。本明細書において「生体」とは、生物学的な有機体をいい、動物、植物、菌類、ウイルスなどを含むがそれらに限定されない。従って、生体分子は、生体から抽出される分子を包含するが、それに限定されず、生体に影響を与え得る分子であれば生体分子の定義に入る。そのような生体分子には、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド、ペプチド、アミノ酸、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、核酸（例えば、cDNA、ゲノムDNAのようなDNA、mRNAのようなRNAを含む）、ポリサッカリド、オリゴサッカリド、単糖、脂質、低分子（例えば、ホルモン、リガンド、情報伝達物質、有機低

分子など）、これらの複合分子などが包含されるがそれらに限定されない。本明細書では、生体分子は、好ましくは、糖鎖または糖鎖を含む複合分子（例えば、糖タンパク質、糖脂質など）であるが、含有される糖鎖構造が反映される生体分子であれば、その生体分子自体が糖鎖を有しなくても本発明において使用することができる。

そのような生体分子の供給源としては、生物由来の糖鎖が結合または付属する材料であれば特にその由来に限定はなく、動物、植物、細菌、ウイルスを問わない。より好ましくは動物由来生体試料が挙げられる。好ましくは、例えば、全血、血漿などの糖タンパク質など糖鎖成分を含む液状試料等が挙げられ、より好ましくは血清がよい。

本明細書において糖鎖構造と疾患に関する情報との「相関付け」とは、ある糖鎖構造（好ましくは糖鎖構造の量的変化の情報など）またはその変化の特定の情報を、疾患レベルに対応付けることをいい、そのような関係を相関関係という。従来、特に血清レベルの糖鎖構造と疾患のレベルとの間の相関関係は知られていなかったことから、本発明においては、そのような相関関係が発見されたことは格別の効果といえる。

本明細書において、相関付けは、少なくとも1つの糖鎖構造の変化（増減）または変化の程度（変化量）と、細胞、組織、臓器、分泌物または生体の変化（例えば、疾患状態）とを関連付けること、例えば、ある糖鎖構造の増減または出現もしくは消長と、疾患状態のレベルまたは出現もしくは消長とを対応付けることによって行うことができる。相関付けに使用される糖鎖構造の数は、相関付けが行うことができる限り少ない数であってよく、通常少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つ、より好ましくは少なくとも3つであり得るがそれらに限定されない。特定の糖鎖、および／または複数の糖鎖構造の増減または出現もしくは消長と、疾患の増減または出現もしくは消長とを対応付ける場合は、行列式を利用して数学的処理を行ってもよい。好ましい実施形態では、本明細書において示さ

れるように、特定の種の糖鎖を少なくとも1種観察し、相関付けに使用することが十分であり得る。従って、特定の糖鎖の血清とにおけるレベルが疾患と対応づけられている場合は、その特定の糖鎖を調べることにより、1種類であっても疾患の診断を行うことができる。

- 5 相関付けの具体的方法としては、例えば、特定の糖鎖と疾患の種類、症状の種類や程度およびその他の診断や治療に有用な情報を統計学的に処理して回帰曲線を描く方法などが挙げられるがそれらに限定されない。

(診断)

- 10 本明細書において「診断」とは、被検体における疾患の種類、障害の種類と程度、身体状態などに関連する種々のパラメータを同定し、そのような疾患、障害、状態の現状、薬物反応性予測、病態変化予測または原因を判定することをいう。本発明の方法、装置、システムを用いることによって、糖鎖構造を分析し、疾患の状態と相関付けることができ、そのような情報を用いて、被検体における疾患、
15 障害、状態、投与すべき薬物の種類や量など処置または予防のための処方物または方法などの種々のパラメータを選定することができる。

本発明の診断方法は、原則として、身体から出たものを利用することができることから、医師などの医療従事者の手を離れて実施することができることから、産業上有用である。

20

(治療)

本明細書において「治療」とは、ある疾患または障害について、そのような状態になった場合に、そのような疾患または障害の悪化を防止、好ましくは、現状維持、より好ましくは、軽減、さらに好ましくは消長させることをいう。

- 25 本明細書において「被検体」とは、本発明の処置が適用される生物をいい、「患者」ともいわれる。患者または被検体は好ましくは、ヒトであり得る。

本明細書において「病因」とは、被検体の疾患、障害または状態（本明細書において、総称して「病変」ともいい、植物では病害ともいう）に関連する因子をいい、例えば、原因となる病原物質（化学物質等を含む病原因子）、病原体、病変細胞、病原ウイルス、病原微生物、物理的な力、精神的に強い影響を与える言葉や状況、睡眠の不足、偏った栄養や生活習慣などが挙げられるがそれらに限定されない。

本発明が対象とする「疾患」は、病因が関連する任意の疾患であり得る。そのような疾患としては、癌、ウイルスまたは細菌による感染症、アレルギー、高血圧、高脂血症、糖尿病、心臓病、脳梗塞、痴呆症、肥満、動脈硬化性疾患、不妊症、精神神経疾患、白内障、早老症、紫外線放射線過敏症などが挙げられるがそれらに限定されない。

本発明が対象とする「障害」は、病因が関連する任意の障害であり得る。

そのような疾患、障害または状態の具体例としては、例えば、循環器系疾患（貧血（例えば、再生不良性貧血（特に重症再生不良性貧血）、腎性貧血、がん性貧血、二次性貧血、不応性貧血など）、がんまたは腫瘍（例えば、白血病、多発性骨髄腫）など）；神経系疾患（痴呆症、アルツハイマー病、脳卒中およびその後遺症、脳腫瘍、脊髄損傷など）；免疫系疾患（T細胞欠損症、白血病など）；運動器・骨格系疾患（骨折、骨粗鬆症、関節の脱臼、亜脱臼、捻挫、靱帯損傷、変形性関節症、骨肉腫、ユーイング肉腫、骨形成不全症、骨軟骨異形成症など）；皮膚系疾患（無毛症、黒色腫、皮膚悪性リンパ腫、血管肉腫、組織球症、水疱症、膿疱症、皮膚炎、湿疹など）；内分泌系疾患（視床下部・下垂体疾患、甲状腺疾患（甲状腺癌など）、副甲状腺（上皮小体）疾患、副腎皮質・髄質疾患、糖代謝異常、脂質代謝異常、タンパク質代謝異常、核酸代謝異常、先天性代謝異常（フェニールケトン尿症、ガラクトース血症、ホモシスチン尿症、メープルシロップ尿症）、無アルブミン血症、アスコルビン酸合成能欠如、高ビリルビン血症、高ビリルビン尿症、カリクレイン欠損、肥満細胞欠損、尿崩症、バソプレッ

- シン分泌異常、侏儒症、ウオルマン病（酸リパーゼ（A c i d l i p a s e）欠損症）、ムコ多糖症V I型など）；呼吸器系疾患（肺疾患（例えば、肺炎、肺がんなど）、気管支疾患、肺がん、気管支がんなど）；消化器系疾患（食道疾患（例えば、食道がん）、胃・十二指腸疾患（例えば、胃炎、腸炎、胃がん、十二指腸がんなど）、小腸疾患・大腸疾患（例えば、大腸ポリープ、結腸がん、直腸がんなど）、胆道疾患、肝臓疾患（例えば、肝硬変、肝炎（A型、B型、C型、D型、E型など）、劇症肝炎、慢性肝炎、原発性肝がん、アルコール性肝障害、薬物性肝障害）、膵臓疾患（急性膵炎、慢性膵炎、膵臓がん、嚢胞性膵疾患）、腹膜・腹壁・横隔膜疾患（ヘルニアなど）、ヒルシュスプラング病など）；泌尿器系疾患（腎疾患（腎不全、原発性糸球体疾患、腎血管障害、尿細管機能異常、間質性腎疾患、全身性疾患による腎障害、腎がんなど）、膀胱疾患（膀胱炎、膀胱がんなど）など）；生殖器系疾患（男性生殖器疾患（男性不妊、前立腺肥大症、前立腺がん、精巣がんなど）、女性生殖器疾患（女性不妊、卵巣機能障害、子宮筋腫、子宮腺筋症、子宮がん、子宮内膜症、卵巣がん、絨毛性疾患など）など）；循環器系疾患（心不全、狭心症、心筋梗塞、不整脈、弁膜症、心筋・心膜疾患、先天性心疾患（例えば、心房中隔欠損、心室中隔欠損、動脈管開存、ファロー四徴）、動脈疾患（例えば、動脈硬化、動脈瘤）、静脈疾患（例えば、静脈瘤）、リンパ管疾患（例えば、リンパ浮腫）など）などが挙げられるがそれらに限定されない。
- 20 本明細書において「I g Gに関連する疾患」とは、I g Gの状態（例えば、糖鎖の状態）がその疾患の症状などに関連するものをいう。そのような疾患としては、慢性関節リウマチ、自己免疫疾患、アレルギー、IgA腎症、アトピー性皮膚炎、糖尿病、肝疾患、筋ジストロフィー、シェーングレイン症候群、ウェゲナー肉芽腫、高血圧などが挙げられるがそれらに限定されない。
- 25 本明細書において「慢性関節リウマチ」とは、単に「リウマチ」ともいい、全身性の疾患であり、結合組織を侵す疾患を言う。臨床症状としては、関節炎が主

に挙げられ、関節炎は、多数の関節（例えば、手足）において関節軟部組織の肥厚を生じる。通常、関節軟骨を滑膜組織がおおい軟骨を侵食するといわれる。関節の変形および廃疾がしばしば起きるといわれる。

5 本明細書において「薬剤」とは、ある状態、障害または疾患（または病害）を処置、予防または予後のために使用するために用いられる物をいう。本明細書では、薬剤は、医薬、農薬などと互換的に使用され得るがそれに限定されない。従って薬剤は、医薬であってもよく、農薬であっても、またそれらの候補物質であってもよいし、冷却、加温、マッサージ、カウンセリングやX線、運動療法、外科的手術など障害に好ましい影響を与えるもの全てを示す。薬剤が標的とする対象として、例えば、被検体自体の細胞、組織または臓器（器官）、あるいは病因（例えば、がん細胞、細菌、真菌、ウイルス、真核生物など）が挙げられるがそれらに限定されない。ここで、がん細胞は被検体自体の細胞の範疇にも入り、病因の範疇にも入るが、本発明の解釈においてはそのような重複は影響を与えないことが当業者に理解されるべきである。そのような薬剤のうち動物（好ましくは、ヒトを含む霊長類のような哺乳動物）としては、例えば、以下のような薬剤
10 15 が挙げられるがそれらに限定されない：

中枢神経系用薬（例えば、全身麻酔剤、催眠鎮静剤、抗不安剤、抗癲癇剤、解熱鎮痛消炎剤、興奮剤、覚醒剤、抗パーキンソン剤、精神神経用剤、総合感冒剤、その他の中枢神経系用薬など）；

20 末梢神経用剤（例えば、局所麻酔剤、骨格筋弛緩剤、自律神経剤、鎮けい剤など）；

感覚器官用薬（例えば、眼科用剤、耳鼻科用剤、鎮暈剤など）；

循環器官用薬（例えば、強心剤、不整脈用剤、利尿剤、血圧降下剤、血管収縮剤、血管拡張剤、高脂血症用剤、その他の循環器官用薬など）；

25 呼吸器官用薬（例えば、呼吸促進剤、鎮咳剤、去痰剤、鎮咳去痰剤、気管支拡張剤、含嗽剤など）；

消化器官用薬（例えば、止瀉剤、整腸剤、消化性潰瘍用剤、健胃消化剤、制酸剤、下剤、浣腸剤、利胆剤、その他の消化器官用薬など）；

5 ホルモン剤（例えば、脳下垂体ホルモン剤、唾液腺ホルモン剤、甲状腺、副甲状腺ホルモン剤、蛋白同化ステロイド剤、副腎ホルモン剤、男性ホルモン剤、卵胞、黄体ホルモン剤、混合ホルモン剤、その他のホルモン剤など）；

泌尿生殖器官および肛門用薬（例えば、泌尿器官用剤、生殖器官用剤、子宮収縮剤、痔疾用剤、他の泌尿生殖器管、肛門用薬など）；

10 外皮用薬（例えば、外皮用殺菌消毒剤、創傷保護剤、化膿性疾患用剤、鎮痛、鎮痒、収斂、消炎剤、寄生性皮膚疾患用剤、皮膚軟化剤、毛髪用剤、その他の外皮用剤など）；

歯科口腔用剤；

その他の個々の器官系用薬；

15 ビタミン剤（例えば、ビタミンA剤、ビタミンD剤、ビタミンB剤、ビタミンC剤、ビタミンE剤、ビタミンK剤、混合ビタミン剤、その他のビタミン剤など）；

滋養強壯薬（例えば、カルシウム剤、無機質製剤、糖類剤、蛋白アミノ酸製剤、臓器製剤、乳幼児用剤、その他の滋養強壯剤など）；

血液および体液用薬（例えば、血液代用剤、止血剤、血液凝固阻止剤、その他の血液、体液用剤など）；

20 人工透析用薬（例えば、人工腎臓透析用剤、腹膜透析用剤など）；

その他の代謝性医薬品（例えば、臓疾患用剤、解毒剤、習慣性中毒用剤、痛風治療剤、酵素製剤、糖尿病用剤、他に分類されない代謝性薬など）；

細胞賦活用剤（例えば、クロロフィル製剤、色素製剤、その他の細胞賦活用剤など）；

25 腫瘍用薬（例えば、アルキル化剤、代謝拮抗剤、抗腫瘍性抗生物質製剤、抗腫瘍性植物成分製剤、その他の腫瘍用剤など）；

放射性医薬品；

アレルギー用薬（例えば、抗ヒスタミン剤、刺激療法剤、非特異性免疫原製剤、その他のアレルギー用薬、生薬および漢方処方に基づく医薬品、生薬、漢方製剤、その他の生薬漢方処方に基づく製剤など）；

- 5 抗生物質製剤（例えば、グラム陽性菌に作用する、グラム陰性菌に作用する、グラム陽、陰性菌に作用、グラム陽性菌マイコプラズマ作用、グラム陽性陰性、リケッチアに作用、抗酸菌に作用するもの、真菌（カビ）に作用するもの、その他の抗生物質製剤など）；

- 10 化学療法剤（例えば、サルファ剤、抗結核剤、合成抗菌剤、抗ウィルス剤、その他の化学療法剤など）；

生物学的製剤（例えば、ワクチン類、毒素、トキシノイド類、抗毒素、抗レプトスピラ血清、血液製剤類、生物学的試験用製剤類、その他の生物学的製剤、抗原虫剤、駆虫剤など）；

- 15 調剤用薬（例えば、賦形剤、軟膏基剤、溶解剤、矯味、矯臭、着色剤、その他の調剤用剤など）；

診断用薬（例えば、X線造影剤、機能検査用試薬、その他の診断用薬）；

公衆衛生用薬（例えば、防腐剤）；

体外診断用医薬品（例えば、細菌学的検査用薬など）；

分類されない治療を主目的としない薬剤；ならびに

- 20 麻薬（例えば、あへんアルカロイド系麻薬、コカアルカロイド系製剤、合成麻薬など）。

温熱、冷却、超音波、X線等放射線、固定、カウンセリング、外科的切除、運動療法などは薬物ではないが疾患に於いて被検体に好ましい影響を与えるものであり、本明細書に言う「薬剤」に含まれる。

- 25 本明細書において薬剤の「有効量」とは、その薬剤が目的とする薬効が発揮することができる量をいう。本明細書において、そのような有効量のうち、最小の

濃度を最小有効量ということがある。そのような最小有効量は、当該分野において周知であり、通常、薬剤の最小有効量は当業者によって決定されているか、または当業者は適宜決定することができる。そのような有効量の決定には、実際の投与のほか、動物モデルなどを用いることも可能である。本発明はまた、このよう

5 　　うな有効量を決定する際に有用である。

　　本明細書において「薬学的に受容可能なキャリア」は、医薬または動物薬のような農薬を製造するときに使用される物質であり、有効成分に有害な影響を与えないものをいう。そのような薬学的に受容可能なキャリアとしては、例えば、以下が挙げられるがそれらに限定されない：抗酸化剤、保存剤、着色料、風味料、

10 　　および希釈剤、乳化剤、懸濁化剤、溶媒、フィラー、増量剤、緩衝剤、送達ビヒクル、賦形剤および／または農学的もしくは薬学的アジュバント。

　　本発明の処置方法において使用される薬剤の種類および量は、本発明の方法によって得られた情報（例えば、疾患に関する情報）を元に、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、投与される被検体の

15 　　部位の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。本発明のモニタリング方法を被検体（または患者）に対して施す頻度もまた、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、および治療経過などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。疾患状態をモニタリングする頻度としては、例えば、毎日－数ヶ月に1回（例えば、1週

20 　　間に1回－1ヶ月に1回）のモニタリングが挙げられる。1週間－1ヶ月に1回のモニタリングを、経過を見ながら施すことが好ましい。

　　本明細書において「指示書」は、本発明のテイラーメイド治療方法などを医師、患者など投与を行う人に対して記載したものである。この指示書は、本発明の医薬などを例えば、放射線治療直後または直前（例えば、24時間以内など）に投与することを指示する文言が記載されている。この指示書は、本発明が実施される国の監督官庁（例えば、日本であれば厚生労働省、米国であれば食品医薬品局

25

(FDA) などが規定した様式に従って作成され、その監督官庁により承認を受けた旨が明記される。指示書は、いわゆる添付文書 (package insert) であり、通常は紙媒体で提供されるが、それに限定されず、例えば、電子媒体 (例えば、インターネットで提供されるホームページ、電子メール) のような形態でも提供され得る。

必要に応じて、本発明の治療では、2種類以上の薬剤が使用され得る。2種類以上の薬剤を使用する場合、類似の性質または由来の物質を使用してもよく、異なる性質または由来の薬剤を使用してもよい。このような2種類以上の薬剤を投与する方法のための疾患レベルに関する情報も、本発明の方法によって入手することができる。

本発明ではまた、得られた疾患に関する情報を元に、遺伝子治療を施すことも可能である。遺伝子治療とは、発現されたか、または発現可能な核酸の、被験体への投与により行われる治療をいう。本発明のこの実施形態において、核酸は、それらのコードされたタンパク質を産生し、そのタンパク質は治療効果を媒介する。

遺伝子治療方法もまた、本発明において併用され得る。例示的な方法は、以下のとおりである。そのような遺伝子治療は、例えば、疾患レベルを改変するために用いることができる。

遺伝子治療の方法の一般的な概説については、Goldspielら, Clinical Pharmacy 12:488-505 (1993); WuおよびWu, Biotherapy 3:87-95 (1991); Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993); Mulligan, Science 260:926-932 (1993); ならびにMorganおよびAnderson, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993); May, TIB TECH 11 (5):155-215 (1993) を参照のこと。遺伝子治療

において使用される一般的に公知の組換えDNA技術は、Ausubelら

(編), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); およ
びKriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press
5 on, NY (1990) に記載される。

本発明では、いったん類似の種類(例えば、ヒトに対するマウスなど)の生物、
培養細胞、組織などに関し、ある特定の糖鎖構造の分析結果と、疾患レベルとが
相関付けられた場合、対応する糖鎖構造の分析結果と、疾患レベルとが相関付け
10 ることができることは、当業者は容易に理解する。そのような事項は、例えば、
動物培養細胞マニュアル、瀬野ら編著、共立出版、1993年などに記載され支
持されており、本明細書においてこのすべての記載を援用する。

(本明細書において用いられる一般的技術)

本明細書において使用される技術は、そうではないと具体的に指示しない限り、
15 当該分野の技術範囲内にある、糖鎖科学、マイクロフルイディクス、微細加工、
有機化学、生化学、遺伝子工学、分子生物学、微生物学、遺伝学および関連する
分野における周知慣用技術を使用する。そのような技術は、例えば、以下に列挙
した文献および本明細書において他の場所において引用した文献においても十分に
説明されている。

20 微細加工については、例えば、Campbell, S. A. (1996). The Science and Engineering of Microe
lectronic Fabrication, Oxford University Press; Zaut, P. V. (1996). Micromicro
array Fabrication: a Practical Guide
25 to Semiconductor Processing, Semiconductor Services; Madou, M. J. (1997). Fund

amentals of Microfabrication, CRC Press; Rai-Choudhury, P. (1997). Handbook of Microlithography, Micromachining, & Microfabrication: Microlithography
5 などに記載されており、これらは本明細書において関連する部分が参考として援用される。

本明細書において用いられる分子生物学的手法、生化学的手法、微生物学的手法、糖鎖科学的手法は、当該分野において周知であり慣用されるものであり、例えば、Maniatis, T. et al. (1989). Molecular
10 Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harborおよびその3rd Ed. (2001); Ausubel, F. M., et al. eds, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc., NY, 10158 (2000); Innis, M. A. (19
15 90). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press; Innis, M. A. et al. (1995). PCR Strategies, Academic Press; Sninsky, J. J. et al. (1999). PCR Applications: Protocols for Functional Genomics, Academic Press; Gait, M. J. (1985). Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Gait, M. J. (1990). Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Eckstein, F. (1991). Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL
20
25

Press; Adams, R. L. et al. (1992). The Biochemistry of the Nucleic Acids, Chapman & Hall; Shabarova, Z. et al. (1994). Advanced Organic Chemistry of Nucleic
5 c Acids, Weinheim; Blackburn, G. M. et al. (1996). Nucleic Acids in Chemistry and Biology, Oxford University Press; Hermanson, G. T. (1996). Bioconjugate Techniques, Academic Press; Method in Enzy
10 mology 230、242、247、Academic Press、1994; 別冊実験医学「遺伝子導入&発現解析実験法」羊土社、1997; 畑中、西村ら、糖質の科学と工学、講談社サイエンティフィック、1997; 糖鎖分子の設計と生理機能 日本化学会編、学会出版センター、2001などに記載されており、これらは本明細書において関連する部分（全部であり得る）が参考として
15 援用される。

(スクリーニング)

本明細書において、「スクリーニング」とは、目的とするある特定の性質をもつ物質または生物などを、特定の操作および／または評価方法で多数の候補から
20 選抜することをいう。本明細書では、本発明によって得られた疾患に関する情報を用いることによって、さらなる薬剤のスクリーニングを行うことができる。スクリーニングは、インビトロ、インビボなど実在物質を用いた系を使用してもよく、インシリコ（コンピュータを用いた系）の系を用いて生成されたライブラリーを用いてもよい。本発明では、所望の活性を有するスクリーニングによって得
25 られた化合物もまた、本発明の範囲内に包含されることが理解される。従って、本発明では、本発明の開示をもとに、疾患を考慮したコンピュータモデリングに

よる薬物が提供されることも企図される。

(好ましい実施形態の説明)

以下に好ましい実施形態の説明を記載するが、この実施形態は本発明の例示で
5 あり、本発明の範囲はそのような好ましい実施形態に限定されないことが理解され
べきである。当業者はまた、以下のような好ましい実施例を参考にして、本
発明の範囲内にある改変、変更などを容易に行うことができることが理解される
べきである。

1つの局面において、本発明は、被検体からの血清を用いて疾患を診断する方
10 法であって、(a) 被検体からの血清に含まれる糖鎖を分析する工程；および
(b) 分析された該糖鎖と、疾患に関する情報とを相関付ける工程、
を包含する、方法を提供する。

あるいは、本発明は、被検体からの血清を用いて疾患を診断するシステムであ
って、(a) 被検体からの血清に含まれる糖鎖を分析する手段；および (b) 分
15 析された該糖鎖と、疾患に関する情報とを相関付ける手段、を包含する、システ
ムを提供する。

ここで、被検体からの血清などの試料を提供する方法または手段は、当該分野
において周知であり、どのような技術を用いて調製または提供してもよい。本発
明では、そのような試料が何らかの形で提供されることで十分であり、その調製
20 方法または手段は問わない。そのような試料調製方法としては、例えば、採血な
どによって、血液を採取し、その後遠心分離によって血清を調製することができ
る。I g Gが必要であるときは、血清よりアフィニティーカラム（例えば、プロ
テインGカラム）などを用いて精製することができる。

好ましい実施形態において、本発明の方法またはシステムが分析対象とする糖
25 鎖は、血清レベルとI g Gレベルとでほぼ同じ挙動をすることが判明している種
であることが有利であるがそれに限らない。血清レベルとI g Gレベルとで糖鎖

の挙動の関連性は知られておらず、本発明によりIgGを精製する必要が無くなり簡易に疾患による糖鎖変化が解析できること、IgG以外の血清中糖タンパク質糖鎖も同時に解析されるためにIgG以外の他の糖タンパク質糖鎖の変化も同時に検出でき汎用性が広がることが期待できる。本発明は、このような対応関係を初め

5 て示したという点で格別の効果を示す。従って、本発明は、そのような予想外の発見に基づいて診断およびテーラーメイド治療を行うことを達成したという効果を奏する。

好ましい実施形態において、本発明が分析対象とする糖鎖構造は、複数の糖鎖構造のセットを含むことが有利であり得る。複数の糖鎖構造のセットを分析する

10 ことによって、疾患状態の情報との相関付けがより詳細に検討することができるからである。血清由来の複数の糖鎖構造のセットの情報と、疾患状態の情報とが、相関付けることができることは従来知られておらず、本発明は、そのような予想外の発見に基づいて診断およびテーラーメイド治療を行うことを達成したという効果を奏する。

好ましい実施形態において、本発明が分析対象とする情報は、慢性関節リウマチに関する情報である。慢性関節リウマチは、対象となる被検体中の免疫関連状態すなわちイムノグロブリンの変化に起因することから、従来は、そのイムノグロブリンに関連する任意の情報に基づいて診断する試みがなされていた。本発明では、慢性関節リウマチの状態が、イムノグロブリンの特定の糖鎖に関連づけられ、かつ、その特定の糖鎖の変化の一部が血清において反映されていることが見

15 出されたことから糖タンパク質を精製する必要が無くなり、診断およびテーラーメイド治療において多大な利点を有する。

20

好ましい実施形態において、本発明の方法およびシステムが分析の対象とする糖鎖構造は、N結合型糖鎖であり、より好ましくは、末端G a 1 欠損糖鎖である。

25 そのような糖鎖としては、例えば、コード番号210. 1、コード番号210. 2およびコード番号210. 3などが挙げられるがそれらに限定されない。

好ましい実施形態において、本発明の方法およびシステムが対象とする被検体は、哺乳動物であり、より好ましくは、モデル動物（例えば、霊長類（サルなど）、げっ歯類（マウス、ラットなど）など）であり得、もっとも好ましくは、ヒトであり得る。モデル動物を被検体とする場合は、他の動物（例えば、ヒト）
5 における疾患の状態の情報の目安を提供することができる。ヒトを被検体とする場合は、より詳細な疾患の状態の情報を提供することができ、またヒトより得た試料（血清）を直接分析するのみではなく他の処理を経て用いることもできる。好ましくは、分析対象となる被検体は、処置または予防などを行うことが意図される被検体である。別の実施形態では、疾患の状態のレベルの情報を一般的に提供するために、処置、予防などを行うことが意図されない被検体もまた、分析対象とすることができる。

別の好ましい実施形態において、本発明の方法またはシステムにおける糖鎖構造の分析は、複数の糖鎖構造の量的変化の情報またはその関連情報の分析を含む。このような複数の糖鎖構造の量的変化の情報またはその関連情報の分析としては、
15 個々の糖鎖構造の絶対量を分析することおよび複数の糖鎖構造の相対量を分析することおよびそれを行う手段が挙げられるがそれらに限定されない。本発明では、そのような量の変化を分析することが一つの特徴であり得る。あるいは、標準となる糖鎖または他の物質に対する相対量を分析してもよい。ここで、相関付けは、疾患の状態と複数の糖鎖構造の量的変化の情報またはその関連情報の分析との相
20 関付けを含むがそれに限定されない。そのような相関付けを行う方法および手段は、当該分野において公知の技術を用いて行うことができる。

分析される糖鎖構造の量的変化の情報またはその関連情報の分析としては、例えば、複数の糖鎖構造の絶対量、相対量（相対比）、ある標準物質（例えば、ガラクトース β 1, 4-N-アセチルグルコサミン β 1, 2-マンノース α 1, 3-（ガラクトース β 1, 4-N-アセチルグルコサミン β 1, 2-マンノース α 1, 6-）マンノース β 1, 4-N-
25 アセチルグルコサミン β 1, 4-N-アセチルグルコサミンなどの糖やIgG、トランス

フェリンなど特定のタンパク質) に対する相対量などが挙げられ、その単位としては、重量、容積、モル、炭素原子量などが挙げられるがそれらに限定されない。

本発明の方法およびシステムにおいて糖鎖分析の対象とされる糖鎖構造は、アスパラギン結合型糖鎖（N結合型糖鎖）を含む。アスパラギン結合型糖鎖とは、
5 アスパラギン残基にN配糖体として結合している糖鎖である。この型の糖鎖は、複雑で精巧な生合成経路により多様な構造に仕上げられることが知られている。各段階の生合成中間体または種々の成熟型の糖鎖は、細胞の機能調節、細胞内輸送などの成熟型タンパク質の形成過程、細胞間認識などのタンパク質が機能する状況、老朽化したタンパク質の肝細胞への取り込みなどの種々の状況で役割を有
10 することが知られている。しかし、アスパラギン結合型糖鎖の構造は、不均一であり、その不均一性の意味するところは充分解明されていなかった。特に、特定の糖鎖がイムノグロブリンにおいて疾患とともに変化することは知られていたが、イムノグロブリンにおいて疾患とともに変化する糖鎖が血清において変化する糖鎖とは完全に一致しないが、増減に相関があることは知られていなかった。また、
15 このような糖鎖を複数のセットとして量的変化の情報またはその関連情報の分析で分析し、その結果を意味づけることは全く従来行われていなかったことであり、そのような相関付けによる検査、診断およびテーラーメイド治療が実現されたことはまさしく本発明が達成した重要な効果であるといえる。

あるいは、本発明が対象とする糖鎖構造は、O結合型糖鎖（Oーグリカンともいう）であり得る。O結合型糖鎖としては、例えば、N-アセチルガラクトサミン、
20 N-アセチルグルコサミン、ガラクトース若しくはそれらを含む糖鎖がセリンまたはスレオニンと結合するムチン型糖鎖、マンノースまたはN-アセチルグルコサミンがセリンまたはスレオニンと結合する糖鎖、ガラクトースがヒドロキシリジンに結合する糖鎖などが挙げられるがそれに限定されない。O結合型糖鎖を有する
25 糖蛋白質もまた情報伝達または細胞間接着を制御する機能が示唆されていることから、これらムチン型糖鎖もまた、本発明が対象とする重要な糖鎖構造であり得

る。

1つの実施形態では、本発明では、I g Gレベルの糖鎖分析の結果と、血清レベルの糖鎖分析の結果とを相関づける方法または手段をさらに含むことが有利であり得るが、必ずしも必要というわけではない。このような相関付けは、相対的
5 または絶対量の比較によって行うことができる。本発明は、I g Gレベルの分析結果は原理的に不要であることが特徴であるが、このようなI g Gレベルの分析結果を含めてもよい。

別の実施形態では、本発明は、I g Gレベルの糖鎖分析とを行う工程または手段をさらに包含するが、必ずしも必要というわけではない。I g Gの糖鎖分析は
10 血清と同様に行うことができる。また、I g Gの調製には、当該分野において周知の方法、例えば、アフィニティーカラムまたはクロマトグラフィーカラムを組み合わせを利用することができる。

好ましい実施形態において、本発明において使用される糖鎖構造の分析は、クロマトグラフィーによる分析を含む。クロマトグラフィーによる分析を用いることが好ましいのは、例えば、糖鎖の分離精製と分析とが同時に行うことができ、
15 定量性がよいからである。しかも、アミノピリジンなどによる還元アミノ化反応による蛍光標識法など高感度分析系が確立しており、クロマトグラフィーの分析装置は取り扱いが比較的容易で広く普及している。二次元マップ法など、パターン分析に用いた試料をそのまま詳細な糖鎖構造解析法に利用することができる。
20 好ましくは、本発明では、少なくとも2種類のクロマトグラフィーカラム（例えば、ODSカラム、アミドカラムなど）を用いることが有利である。2種類のカラムを組み合わせることによって、より詳細な分析を行うことができるからである。本発明では2種類の分析でほぼ完全な同定を行うことができることが判明している。また、このように複数のカラムが使用される場合は、異なる種類（例え
25 ば、疎水性カラムおよびアフィニティーカラムなど）のものを使用することがより好ましい。

好ましい実施形態において、本発明において使用される糖鎖構造の分析は、質量分析を含む。質量分析を用いることが好ましいのは、例えば、分析時間が短く、分解能が高いことから情報量が多いからである。また、得られたデータをデジタル変換しやすく、コンピュータによる処理に適しているからである。

- 5 あるいは、本発明において、糖鎖構造を分析する方法は、例えば、糖鎖アレイ、糖鎖レプリカを利用する方法などが挙げられるがそれらに限定されない。

本発明の診断方法を実行するコンピュータ構成あるいはそれを実現するシステムの例を図11を参照して示す。図11は、本発明の診断方法を実行するコンピュータの500の構成例を示す。

- 10 コンピュータ500は、入力部501と、CPU502と、出力部503と、メモリ504と、バス505とを備える。入力部501と、CPU502と、出力部503と、メモリ504とは、バス505によって相互に接続されている。入力部501と出力部503とは入出力装置506に接続されている。

コンピュータ500によって実行される関連付けの処理の概略を説明する。

- 15 関連付け方法および／または処置もしくは予防の選択を実行させるプログラム（以下、それぞれ関連付けプログラムおよび選択プログラムという）は、例えば、メモリ502に格納されている。あるいは、関連付けプログラムおよび選択プログラムは、それぞれ独立してあるいは一緒に、フロッピー（登録商標）ディスク、MO、CD-ROM、CD-R、DVD-ROMのような任意のタイプの記録媒体に記録され得る。あるいは、アプリケーションサーバに格納されていてもよい。
- 20 そのような記録媒体に記録された関連付けプログラムおよび／または選択プログラムは、入出力装置506（例えば、ディスクドライブ、ネットワーク（例えば、インターネット））を介してコンピュータ500のメモリ504にロードされる。CPU502が関連付けプログラムおよび／または選択プログラムを実行することによって、コンピュータ500は、本発明の関連付け方法および／または選択方法の処理を実行する装置として機能する。
- 25

入力部 5 0 1 を介して、糖鎖構造の分析の結果（例えば、配列情報、レベル、量など）および疾患に関する情報などを入力する。必要に応じて、糖鎖と相関付けられる状態、障害または疾患などの副次的情報、処置および／または予防に関する情報も入力してもよい。

5 CPU 5 0 2 は、入力部 5 0 1 で入力された情報をもとに、糖鎖構造に関する情報と疾患レベルとを相関付け、メモリ 5 0 4 に相関データを格納する。その後、CPU 5 0 2 は、これらの情報をメモリ 5 0 4 に格納し得る。その後、出力部 5 0 3 は、CPU 5 0 2 が選択した疾患のレベルに関する情報などを診断情報として出力する。出力されたデータは、入出力装置 5 0 6 から出力され得る。

10 別の局面において、本発明は、被検体からの血清を用いて診断することによって該被検体を処置、または障害を予防する方法であって、（a）被検体からの血清に含まれる糖鎖を分析する工程；（b）分析された該糖鎖と、疾患に関する情報とを相関付ける工程；および（c）該疾患に関する情報に応じて適切な処置または予防のための手段を該被検体に提供する工程、を包含する、方法を提供する。

15 あるいは、本発明は、被検体の疾患のレベルに応じて被検体を処置または予防する方法を提供する。この方法は、（a）被検体からの試料（例えば、血清）に含まれる糖鎖構造を分析する工程；（b）分析された糖鎖構造と、疾患のレベルとを相関付ける工程；および（c）疾患のレベルに応じた処置または予防を被検体に施す工程を包含する。

20 あるいは、本発明は、被検体からの血清を用いて診断することによって該被検体を処置または予防するシステムであって、（a）被検体からの血清に含まれる糖鎖を分析する手段；（b）分析された該糖鎖と、疾患に関する情報とを相関付ける手段；および（c）該疾患に関する情報に応じて適切な処置または予防のための手段を該被検体に提供する手段、を包含する、システムを提供する。あるいは、本発明は、被検体の疾患のレベルに応じて被検体を処置または予防するシス

25 テムを提供する。このシステムは、（a）被検体からの試料（例えば、血清）に

含まれる糖鎖構造を分析する手段；（b）分析された糖鎖構造と、疾患レベルとを相関付ける手段；および（c）疾患のレベルに応じた処置または予防を被検体に施す手段を備える。

5 本発明の処置または予防のための方法およびシステムにおいて、被検体からの血清、I g Gなどの試料を提供する方法または手段は、当該分野において周知であり、どのような技術を用いて調製または提供してもよい。本発明では、そのような試料が何らかの形で提供されることで十分であり、その調製方法または手段は問わない。そのような試料調製方法としては、例えば、採血などによって、血液を採取し、その後、血清を遠心分離によって調製することができる。I g Gが
10 必要であるときは、アフィニティーカラム（例えば、プロテインGカラム）などを用いて血清から精製することができる。

好ましい実施形態において、本発明の方法またはシステムが分析対象とする糖鎖は、血清レベルとI g Gレベルとでほぼ同じ挙動をすることが判明している種であることが有利であるがそれに限らない。血清レベルとI g Gレベルとの糖鎖
15 の関係は知られておらず、本発明は、このような対応関係を初めて示したという点で格別の効果を示す。従って、本発明は、そのような予想外の発見に基づいて診断およびテーラーメイド治療を行うことを達成したという効果を奏する。

好ましい実施形態において、本発明が対象とする糖鎖構造は、複数の糖鎖構造のセットを含むことが有利であり得る。複数の糖鎖構造のセットを分析すること
20 によって、疾患状態の情報との相関付けがより詳細に検討することができるからである。血清由来の複数の糖鎖構造のセットの情報と、疾患状態の情報とが、相関付けることができることは従来知られておらず、本発明は、そのような予想外の発見に基づいて診断およびテーラーメイド治療を行うことを達成したという効果を奏する。

25 好ましい実施形態において、本発明が対象とする疾患は、慢性関節リウマチである。慢性関節リウマチは、対象となる被検体中の免疫関連状態すなわちイムノ

グロブリンの変化に起因することから、従来は、そのイムノグロブリンに関連する任意の情報に基づいて診断する試みがなされていた。本発明では、慢性関節リウマチの状態が、イムノグロブリンの特定の糖鎖に関連づけられ、かつ、その特定の糖鎖の変化の一部が血清において反映されていることが見出されたことから、

5 診断およびテーラーメイド治療において多大な利点を有する。

好ましい実施形態において、本発明の方法およびシステムが分析の対象とする糖鎖構造は、N結合型糖鎖であり、好ましくは、末端G a 1 欠損糖鎖である。そのような糖鎖としては、例えば、コード番号210. 1、コード番号210. 2およびコード番号210. 3などが挙げられるがそれらに限定されない。

10 好ましい実施形態において、本発明の方法およびシステムが対象とする被検体は、哺乳動物であり、より好ましくは、モデル動物（例えば、霊長類（サルなど）、げっ歯類（マウス、ラットなど）など）であり得、もっとも好ましくは、ヒトであり得る。モデル動物を被検体とする場合は、他の動物（例えば、ヒト）における疾患の状態の情報の目安を提供することができる。好ましくは、分析対象となる被検体は、処置または予防などを行うことが意図される被検体である。

15 別の実施形態では、疾患の状態のレベルの情報を一般的に提供するために、処置、予防などを行うことが意図されない被検体もまた、対象に含めることができる。

本発明の被検体を処置または予防する方法およびシステムにおいて、糖鎖構造の分析は、本明細書において他の場所において詳述されるように、種々の分析方法および手段を用いることができ、当業者は本明細書の開示を参照して実施することができる。分析された糖鎖構造と疾患のレベルとの相関付けおよびそのための手段もまた、本明細書において他の場所において詳述されるように、種々の方法および手段を用いることができ、当業者は本明細書の開示を参照して実施することができる。この場合、相関付けは、未知のデータを相関付けることもできる

20 し、既知のデータと相関付けることも可能である。

疾患のレベルに応じた処置または予防を被検体に施すこととしては、例えば、

その疾患に対応した薬剤を選択し、その被検体に応じて処方することによって薬剤を投与することが挙げられるがそれに限定されない。このような方法は、医師などの人間が行うことができ、あるいは、このような方法は、自動化された機械に行わせることも可能である。そのような機械は、糖鎖構造を分析する手段、糖鎖構造と疾患のレベルとを相関付ける手段、疾患のレベルに応じた処置または予防を選択する手段およびそのような処置または予防に応じて処方された処方物を提供する手段からなる群より選択される少なくとも1つの手段を含み得る。

このような装置において、糖鎖構造を分析する手段は、糖鎖構造を分析するための方法を実現することができる手段であればどのようなものでも使用することができる。そのような手段は、物理学的方法（例えば、質量分析、NMR、X線構造解析、電子顕微鏡分析など）、化学的方法（例えば、糖特異的官能基との化学的特異的反応の解析、糖鎖と特定の物質の相互作用を利用したクロマトグラフィーおよびそれらを組み合わせた二次元マップ法など）、生化学的方法（例えば、酵素の特異性を利用したアッセイなど、糖鎖アレイ、糖鎖レプリカなどを利用する方法）、生物学的方法（例えば、微生物のある糖に対する親和性、優先性などを調べるアッセイなど）、バイオインフォマティクスなどを実現するものであり得る。

糖鎖構造と疾患のレベルとを相関付ける手段としては、例えば、データ処理を行うことができるコンピュータなどが挙げられるがそれらに限定されない。好ましくは、そのような相関付け手段は、疾患に関する情報が格納された記録媒体を備えていることが好ましい。そのような情報を用いることによって、糖鎖構造と疾患のレベルとの相関付けが容易になり得る。

疾患のレベルに応じた処置または予防を選択する手段としてもまた、例えば、データ処理を行うことができるコンピュータなどが挙げられるがそれらに限定されない。好ましくは、そのような相関付け手段は、疾患に関する情報および／または治療もしくは予防法に関する情報が格納された記録媒体を備えていることが

好ましい。そのような情報を用いることによって、処置または予防の選択が容易になり得る。

このような相関付けおよび／または処置もしくは予防の選択を実行するコンピュータ構成の例を図 1 1 を参照して示す。図 1 1 は、本発明の相関付けの処理を
5 実行するコンピュータの 5 0 0 の構成例を示す。

コンピュータ 5 0 0 は、入力部 5 0 1 と、CPU 5 0 2 と、出力部 5 0 3 と、メモリ 5 0 4 と、バス 5 0 5 とを備える。入力部 5 0 1 と、CPU 5 0 2 と、出力部 5 0 3 と、メモリ 5 0 4 とは、バス 5 0 5 によって相互に接続されている。入力部 5 0 1 と出力部 5 0 3 とは入出力装置 5 0 6 に接続されている。

10 コンピュータ 5 0 0 によって実行される相関付けの処理の概略を説明する。

相関付け方法および／または処置もしくは予防の選択を実行させるプログラム（以下、それぞれ相関付けプログラムおよび選択プログラムという）は、例えば、メモリ 5 0 2 に格納されている。あるいは、相関付けプログラムおよび選択プログラムは、それぞれ独立してあるいは一緒に、フロッピー（登録商標）ディスク、
15 MO、CD-ROM、CD-R、DVD-ROMのような任意のタイプの記録媒体に記録され得る。あるいは、アプリケーションサーバに格納されていてもよい。そのような記録媒体に記録された相関付けプログラムおよび／または選択プログラムは、入出力装置 5 0 6（例えば、ディスクドライブ、ネットワーク（例えば、インターネット））を介してコンピュータ 5 0 0 のメモリ 5 0 4 にロードされる。
20 CPU 5 0 2 が相関付けプログラムおよび／または選択プログラムを実行することによって、コンピュータ 5 0 0 は、本発明の相関付け方法および／または選択方法の処理を実行する装置として機能する。

入力部 5 0 1 を介して、糖鎖構造の分析の結果（例えば、配列情報、レベル、量など）および疾患に関する情報などを入力する。必要に応じて、糖鎖と相関付
25 けられる状態、障害または疾患などの副次的情報、処置および／または予防に関する情報も入力してもよい。

CPU 502は、入力部501で入力された情報をもとに、糖鎖構造に関する情報と疾患のレベルとを相関付け、メモリ504に相関データを格納する。その後、CPU 502は、これらの情報をメモリ504に格納し得る。CPU 502は、必要に応じて、これらの情報に基づき、適切な信号強度を選択する。生成された相関付けデータに基づいて、適切な処置または予防方法を選択または作成する。この情報をメモリ504に格納することもできる。

その後、出力部503は、CPU 502が選択した疾患のレベルに関する情報、適切な処置または予防方法に関する情報などを出力する。出力されたデータは、入出力装置506から出力され得る。

本発明の方法およびシステムにおいて実施される処置または予防に応じて処方された処方物を提供する方法および手段は、当該分野において周知の方法または手段を利用して提供することができる。従って、当業者は、そのような方法および手段がいったん選択されるべき処置または予防が選択されたならば、そのような選択された処置または予防を、必要に応じて被検体などのパラメータ（例えば、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、症状、患者の年齢、体重、性別、既往歴、投与される被検体の部位の形態または種類）および投与頻度、ならびに他の種々の臨床検査値を考慮して、処方し、その処方に応じた製剤および処置を行うことができることを理解し、そのような手段を容易に構成および使用することができることも理解する。このような手段は、自動化することもでき、あるいは他の手段と一体化することもできる。したがって、処方物を提供する手段もまた、上記コンピュータの一部として構成することも可能である。

本発明の処置または予防方法およびシステムにおいて分析される糖鎖構造は、複数の糖鎖構造のセットを含むことが好ましい。このような対応づけられた種の糖鎖、または複数の糖鎖構造のセットを分析することによって、疾患の情報との相関付けがより詳細に検討することができ、それにより、より適切な処置または予防方法を選択することができるからである。血清由来の複数の糖鎖構造のセッ

トの情報と、疾患の情報とが、相関付けることができることは従来知られておらず、本発明は、そのような予想外の発見に基づいて診断およびテーラーメイド治療を行うことを達成したという効果を奏する。

5 別の実施形態において、本発明の処置または予防方法およびシステムは、慢性関節リウマチ薬を利用した方法およびシステムであることが好ましいがそれに限定されない。そのような処置または予防において使用され得る薬剤としては、例えばリウマチの場合、非ステロイド性消炎鎮痛剤、ステロイド類、免疫抑制剤、金チオリンゴ酸ナトリウムなどの金製剤、メトトレキサート・アクタリットなどの抗リウマチ薬、温熱療法、関節の可動域体操や筋肉強化訓練などの運動療法、
10 補装具の装着、滑膜除去や人工関節置換などの手術、安静保温を心がけるなどの生活注意などが挙げられるがそれらに限定されない。

好ましくは、分析した糖鎖構造によって疾患状態が診断された場合、本発明において選択されるべき処置または予防は、その疾患に対して（必要に応じて患者の状態を考慮して）適切な薬剤を被検体に投与することが有利である。そのような
15 場合、被検体において選択した薬剤が有効であることが予めわかっていることから、無駄な治療または予防を施すことを回避することができる。被検体に投与する薬剤は、その被検体に対して腎障害やアレルギーなどの別の好ましくない有害反応を惹起しないことが好ましい。そのような有害反応を惹起すると、有効であることが判明した薬剤といえども、生体自身に有効に作用する効果を超える有害作用を生じる可能性があるからである。しかし、そのような有害反応が克服可能である場合、無視し得る場合、有効作用によるメリットが有害作用によるデメリットを上回ると判断された場合そのような有害反応を惹起する可能性のある薬剤でも使用することができる。そのような有害反応を惹起する可能性のある薬剤
20 を投与する場合は、そのような有害反応を回避する処置（例えば、アレルギー回避のための薬剤の投与など）をさらに行うことが好ましくあり得る。そのような有害反応回避処置もまた、当業者は、当該分野において公知の技術を用いて選択

し、行うことができる。

本発明の特定の実施例において、分析される糖鎖構造はコード番号 2 1 0. 1、
コード番号 2 1 0. 2 およびコード番号 2 1 0. 3 からなる群より選択される糖
鎖を少なくとも含み得る。このような場合、処置されるべき疾患としては慢性関
5 節リウマチを含み得る。

好ましい実施形態において、本発明の処置または予防方法およびシステムが対
象とする被検体は、哺乳動物であり、より好ましくは、有益動物（例えば、家畜
（ウシ、ブタ、ウマなど）など）であり得、もっとも好ましくは、ヒトであり得
る。好ましくは、処置または予防の対象となる被検体は、処置または予防などを
10 行うことが意図される被検体である。好ましくは、このような方法およびシステ
ムでは、予め処置または予防の対象となる被検体の薬剤耐性、体質、疾患などに
関する情報を得ていることが好ましい。そのような情報を多く集めるほど、より
適切な個人対応型のテーラーメイド治療を行うことが可能となるからである。

本発明の処置または予防方法およびシステムでは、糖鎖構造の分析は、複数の
15 糖鎖構造の量的変化の情報またはその関連情報の分析を含むことが好ましい。こ
のような複数の糖鎖構造の量的変化の情報またはその関連情報の分析は、絶対量
を分析することおよび複数の糖鎖構造の相対量や特定のタンパク質の量など他の
臨床検査値との相対量を分析することを包含する。また、相関付けは、疾患のレ
ベルと該複数の糖鎖構造の量的変化の情報またはその関連情報との相関付けを含
20 むことが好ましい。

本発明の処置または予防の方法およびシステムにおける糖鎖分析の対象は、ア
スパラギン結合型糖鎖、ムチン型糖鎖、糖脂質糖鎖、プロテオグリカンなどの糖
鎖を含み得る。

好ましい実施形態において、本発明において使用される糖鎖構造の分析は、質
25 量分析、クロマトグラフィー、分光光学分析による分析を用いた分析などが挙げら
れるがそれらに限定されない。

別の局面において、本発明は、被検体からの血清を用いて診断することによって該被検体の状態に応じた処置または予防を提示する方法であって、（a）被検体からの血清に含まれる糖鎖を分析する工程；（b）分析された該糖鎖と、疾患に関する情報とを相関付ける工程；および（c）該疾患に関する情報に応じて適切な処置または予防のための手段を提示する工程、包含する、方法を提供する。

あるいは、本発明は、被検体からの血清を用いて診断することによって該被検体の状態に応じた処置または予防を提示するシステムであって、（a）被検体からの血清に含まれる糖鎖を分析する手段；（b）分析された該糖鎖と、疾患に関する情報とを相関付ける手段；および（c）該疾患に関する情報に応じて適切な処置または予防のための手段を提示する手段、を備える、システムを提供する。

本発明の方法およびシステムにおいて、被検体からの血清、I g Gなどの試料を提供する方法または手段は、当該分野において周知であり、どのような技術を用いて調製または提供してもよい。本発明では、そのような試料が何らかの形で提供されることで十分であり、その調製方法または手段は問わない。そのような試料調製方法としては、例えば、採血などによって、血液を採取し、その後、血清を清置や遠心分離によって調製することができる。I g Gが必要であるときは、アフィニティーカラム（例えば、プロテインGカラム）などを用いて血清より精製することができる。

血清レベルで糖鎖の挙動と疾患との関係は知られておらず、本発明は、このような対応関係を初めて示したという点で格別の効果を示す。従って、本発明は、そのような予想外の発見に基づいて診断およびテーラーメイド治療を行うことを達成したという効果を奏する。

好ましい実施形態において、本発明が対象とする糖鎖構造は、複数の糖鎖構造のセットを含むことが有利であり得る。複数の糖鎖構造のセットを分析することによって、疾患状態の情報との相関付けがより詳細に検討することができるからである。血清由来の複数の糖鎖構造のセットの情報と、疾患状態の情報とが、相

関付けることができることは従来知られておらず、本発明は、そのような予想外の発見に基づいて診断およびテーラーメイド治療を行うことを達成したという効果を奏する。

5 好ましい実施形態において、本発明が対象とする疾患は、慢性関節リウマチである。慢性関節リウマチは、対象となる被検体中の免疫関連状態すなわちイムノグロブリンの変化に起因することから、従来は、そのイムノグロブリンに関連する任意の情報に基づいて診断する試みがなされていた。慢性関節リウマチの状態が、イムノグロブリンの特定の糖鎖と関連づけられていたが、本発明ではかつ、その特定の糖鎖の変化の一部が血清において反映されていることが見出されたこと
10 ことから、診断およびテーラーメイド治療において多大な利点を有する。

好ましい実施形態において、本発明の方法およびシステムが分析の対象とする糖鎖構造は、N結合型糖鎖であり、より好ましくは、末端G a 1 欠損糖鎖である。そのような糖鎖としては、例えば、コード番号210.1、コード番号210.2およびコード番号210.3などが挙げられるがそれらに限定されない。

15 好ましい実施形態において、本発明の方法およびシステムが対象とする被検体は、哺乳動物であり、より好ましくは、モデル動物（例えば、霊長類（サルなど）、げっ歯類（マウス、ラットなど）など）であり得、もっとも好ましくは、ヒトであり得る。モデル動物を被検体とする場合は、他の動物（例えば、ヒト）における疾患の状態の情報の目安を提供することができる。好ましくは、分析対象となる被検体は、処置または予防などを行うことが意図される被検体である。
20 別の実施形態では、疾患の状態のレベルの情報を一般的に提供するために、処置、予防などを行うことが意図されない被検体もまた、対象に含めることができる。

被検体または病因からの試料に含まれる糖鎖構造を分析する方法および手段は、本明細書において他の場所において詳述されるように、種々の分析技術を用いる
25 ことができ、当業者は本明細書の開示を参照して実施することができる。分析された糖鎖構造と疾患のレベルとの相関付けおよびそのための手段もまた、本明細

書において他の場所において詳述されるように、種々の技術を用いることができ、当業者は本明細書の開示を参照して実施することができる。この場合、相関付けは、未知のデータを相関付けることもできるし、既知のデータと相関付けることも可能である。

- 5 疾患のレベルに応じた処置または予防を選択および提示することは、いったんそのような疾患のレベルに関する情報が与えられたならば、当業者は容易に実施することができる。選択および提示は、どのような形式で行ってもよい。好ましくは、選択および提示の方式としては、医師の処方箋の形式が採られ得るが、それに限定されない。提示の方式としては、紙媒体のようなものであってもよく、
- 10 電子媒体（例えば、記録媒体または伝送媒体（例えばインターネット））を利用してよい。

- 疾患のレベルに応じた処置または予防を選択および提示をすることおよびそのための手段もまた、当業者は、いったんそのような疾患レベルに関する情報が与えられたならば、当業者は容易に実施することができる。従って、当業者は、本
- 15 明細書の開示に従って疾患のレベルに関する情報を得ることができ、そのような情報に基づいて、処置または予防の選択および提示をすることができる。そのような処置または予防としては、例えば、その被検体に関して有効である薬剤を選択し、その被検体に応じて処方することが挙げられるがそれに限定されない。このような方法およびシステムは、医師などの人間が実施することができ、あるいは、
- 20 このような方法は、自動化された機械に行わせることも可能である。そのような機械は、糖鎖構造を分析する手段、糖鎖構造と疾患レベルとを相関付ける手段および疾患レベルに応じた処置または予防を選択する手段からなる群より選択される少なくとも1つの手段、および必要に応じてそのように選択された処置または予防を提示する手段を含み得る。

- 25 選択された処置または予防を提示する手段としては、例えば、データ処理を行うことができ、かつ、そのように処理されたデータを提示するモニターが接続さ

れたコンピュータなどが挙げられるがそれらに限定されない。好ましくは、そのような提示手段は、疾患に関する情報が格納された記録媒体を備えていることが好ましい。そのような情報を用いることによって、薬剤に関する情報を提示することが容易になり得る。

- 5 本発明の処置または予防の提示方法において分析される糖鎖構造は、複数の糖鎖構造のセットを含むことが好ましい。血清由来の複数の糖鎖構造のセットを分析することによって、疾患の情報との相関付けがより詳細に検討することができ、それにより、より適切な処置または予防方法を選択することができるからである。複数の糖鎖構造のセットの情報と、疾患の情報とが、相関付けることができることは従来知られておらず、本発明は、そのような予想外の発見に基づいて診断およびテーラーメイド治療を提示する方法およびシステムが提供されるという効果を奏する。
- 10

好ましくは、本発明では、I g Gレベルの糖鎖分析の結果と、血清レベルの糖鎖分析の結果とを相関づける方法または手段をさらに含むことが有利である。このような相関付けは、相対的または絶対量の比較によって行うことができる。

15

従って、好ましい実施形態では、本発明は、I g Gレベルの糖鎖分析を行う工程または手段をさらに包含する。I g Gの糖鎖分析は血清と同様に行うことができる。また、I g Gの調製には、当該分野において周知の方法、例えば、アフィニティーカラムまたはクロマトグラフィーカラムを組み合わせる利用することができる。

20

別の実施形態において、本発明の処置または予防を提示するための方法およびシステムは、慢性関節リウマチに関する方法およびシステムであることが好ましいがそれに限定されない。そのような処置または予防において使用され得る薬剤としては、例えば、非ステロイド性消炎鎮痛剤、ステロイド類、免疫抑制剤、金チオリンゴ酸ナトリウムなどの金製剤、メトトレキサート・アクタリットなどの抗リウマチ薬、温熱療法、関節の可動域体操や筋肉強化訓練などの運動療法、補

25

装具の装着、滑膜除去や人工関節置換などの手術、安静保温を心がけるなどの生活注意などが挙げられるがそれらに限定されない。

好ましくは、分析した糖鎖構造の構造、量、存在形式などに関する情報から、ある処置が有効であることが示される場合、本発明の提示方法において提示される。そのような場合、被検体において選択した薬剤投与を含む処置が有効であることが予めわかっていることから、無駄な治療または予防を施すことを回避することができる。そのような薬剤は、別の実施形態において、複数の薬剤や処置の組み合わせであってもよい。

そのような薬剤は、その被検体に対して腎障害やアレルギーなどの別の好ましくない有害反応を惹起しないことが好ましい。そのような有害反応を惹起すると、有効であることが判明した薬剤といえども、生体自身に有効に作用する効果を超える有害作用を生じる可能性があるからである。しかし、そのような有害反応が克服可能であるか、無視し得る場合、そのような有害反応を惹起する可能性のある薬剤が提示され得る。そのような場合、有害反応を起こし得る可能性を提示することが好ましい。好ましくは、そのような有害反応を惹起する可能性のある薬剤を投与する場合は、そのような有害反応を回避する処置（例えば、アレルギー回避のための薬剤の投与など）を提示することが有利である。そのような有害反応回避処置もまた、当業者は、当該分野において公知の技術を用いて選択し、行うことができる。

本発明の特定の実施例において、分析される糖鎖構造はコード番号 210.1、コード番号 210.2 およびコード番号 210.3 からなる群より選択される糖鎖を少なくとも含み得る。このような場合、処置されるべき疾患としては慢性関節リウマチを含み得る。

好ましい実施形態において、本発明の処置または予防の提示方法が対象とする被検体は、哺乳動物であり、より好ましくは、有益動物（例えば、家畜（ウシ、ブタ、ウマなど）など）であり得、もっとも好ましくは、ヒトであり得る。好ま

しくは、処置または予防の提示方法の対象となる被検体は、処置または予防などを行うことが意図される被検体である。好ましくは、このような方法では、予め処置または予防の対象となる被検体の薬剤耐性、体質、疾患などに関する情報を得ていることが好ましい。あるいは、そのような情報は提示方法が実行されるた
5 びに提供されてもよい。そのような情報の提示は、手動でもよく、あるいは記録媒体などから自動的に入力される形式をとってもよい。提示されるべき被検体に関する生物学的情報が予めわかっている場合は、そのような情報は記録媒体に格納されて提供され得る。このような提示方法によって、より適切な個人対応型のテーラーメイド治療を被検体は知ることができる。

10 本発明の処置または予防の提示方法では、糖鎖構造の分析は、血清レベルの糖鎖と疾患に関し相関がつけられた種の糖鎖を含むこと、および／または複数の糖鎖構造の量的変化の情報またはその関連情報の分析を含むことが好ましい。そのような特定種の糖鎖の分析、および／またはこのような複数の糖鎖構造の量的変化の情報またはその関連情報の分析は、絶対量を分析することおよび複数の糖鎖
15 構造の相対量を分析することを包含する。また、相関付けは、疾患に関する情報と該複数の糖鎖構造の量的変化の情報またはその関連情報との相関付けを含むことが好ましい。

本発明の処置または予防の方法における糖鎖分析の対象は、アスパラギン結合型糖鎖、ムチン型糖鎖、糖脂質糖鎖、プロテオグリカンなどの糖鎖を含み得る。

20 好ましい実施形態において、本発明の提示方法において使用される糖鎖構造の分析は、質量分析、クロマトグラフィー、分光分析による分析を用いた分析などが挙げられるがそれらに限定されない。

本発明の処置または予防方法の提示を実行するコンピュータ構成の例を図11を参照して示す。図11は、本発明の処置または予防方法の提示の処理を実行す
25 るコンピュータの500の構成例を示す。

コンピュータ500は、入力部501と、CPU502と、出力部503と、

メモリ 504 と、バス 505 とを備える。入力部 501 と、CPU 502 と、出力部 503 と、メモリ 504 とは、バス 505 によって相互に接続されている。入力部 501 と出力部 503 とは入出力装置 506 に接続されている。

コンピュータ 500 によって実行される関連付けの処理の概略を説明する。

- 5 関連付け方法および／または処置もしくは予防の選択を実行させるプログラム（以下、それぞれ関連付けプログラムおよび選択プログラムという）は、例えば、メモリ 502 に格納されている。あるいは、関連付けプログラムおよび選択プログラムは、それぞれ独立してあるいは一緒に、フロッピー（登録商標）ディスク、MO、CD-ROM、CD-R、DVD-ROM のような任意のタイプの記録媒体に記録され得る。あるいは、アプリケーションサーバに格納されていてもよい。
- 10 そのような記録媒体に記録された関連付けプログラムおよび／または選択プログラムは、入出力装置 506（例えば、ディスクドライブ、ネットワーク（例えば、インターネット））を介してコンピュータ 500 のメモリ 504 にロードされる。CPU 502 が関連付けプログラムおよび／または選択プログラムを実行することによって、コンピュータ 500 は、本発明の関連付け方法および／または選択方法の処理を実行する装置として機能する。
- 15

- 20 入力部 501 を介して、糖鎖構造の分析の結果（例えば、配列情報、レベル、量など）および疾患に関する情報などを入力する。必要に応じて、糖鎖と関連付けられる状態、障害または疾患などの副次的情報、処置および／または予防に関する情報も入力してもよい。

- 25 CPU 502 は、入力部 501 で入力された情報をもとに、糖鎖構造に関する情報と疾患レベルとを関連付け、メモリ 504 に関連データを格納する。その後、CPU 502 は、これらの情報をメモリ 504 に格納し得る。CPU 502 は、必要に応じて、これらの情報に基づき、適切な信号強度を選択する。生成された関連付けデータに基づいて、適切な処置または予防方法を選択または作成する。この情報をメモリ 504 に格納することもできる。

その後、出力部 503 は、CPU 502 が選択した疾患に関する情報、適切な処置または予防方法に関する情報などを出力する。出力されたデータは、入出力装置 506 から出力され得る。そのような出力されたデータは、紙媒体の形式として被検体またはその被検体を診察する医師などに提示されるか、あるいは、電子媒体（例えば、記録媒体または伝送媒体など）として提示され得る。そのような媒体での提示形式はどのようなものでも可能であるが、当局の基準に従うことが好ましい。したがって、処方箋または医療カルテの形式をとることが好ましくあり得る。

10 本明細書において引用された、科学文献、特許、特許出願などの参考文献は、その全体が、各々具体的に記載されたのと同じ程度に本明細書において参考として援用される。

以上、本発明を、理解の容易のために好ましい実施形態を示して説明してきた。以下に、実施例に基づいて本発明を説明するが、上述の説明および以下の実施例は、例示の目的のみに提供され、本発明を限定する目的で提供したのではない。

15 従って、本発明の範囲は、本明細書に具体的に記載された実施形態にも実施例にも限定されず、特許請求の範囲によってのみ限定されることが理解されるべきである。

実施例

20 以下において記載する実施例では、特に言及しない限り、和光純薬から入手した試薬を用いた。また、実験においては、北海道大学および他の医療処置実施機関において実施時に規定される基準を遵守して行った。

（実施例 1）

25 慢性関節リウマチは、自己免疫グロブリン G（IgG）を認識して結合するリウマトイド因子（RF）を産生する自己免疫疾患である。RF の抗原となる Ig

Gは、H鎖およびL鎖のそれぞれ二量体からなり、Fc部位の2つのCH₂ドメインのAsn297に結合した2本のN結合型糖鎖をもつ糖タンパク質である

(図1)。IgGの糖鎖は図2に示すような二本鎖複合型糖鎖を有し、RA患者のIgG糖鎖は健常人に比べ、非還元末端のGalを欠損した糖鎖の割合が高いことがわかっていました。しかし、リウマチ疾患によって、このような糖鎖の構造変化現象が他の糖タンパク質も含む全血清中のN結合型糖鎖においても観察できるかどうかはわかっていなかった。そこで、血清中の全糖タンパク質から遊離したN結合型糖鎖を分析し、IgGにおける糖鎖パターンと比較した。

(2次元糖鎖マップ法)

10 本実施例で用いた二次元糖鎖マップ法を説明する。

二次元糖鎖マップ法とは、2種類の異なるクロマトグラフィーを組み合わせた分析法であり、本実施例では、ODSカラム（オクタデシルシリカ、島津製作所製）とアミドカラム（東ソー製）とを使用した。これにより、試料から糖鎖を分離し、溶出位置から糖鎖構造を解析することができる。

15 特に、構造が既知である標準糖鎖の、2種類のカラムによる溶出位置の座標の集積を2次元マップという。

試料の調製は以下のように行った。まず、分析対象となる患者（骨折患者、変形関節症患者、慢性関節リウマチ患者）および健常者より真空採血管を用いて採血し、清置により血清を得る。更に血清試料からIgGを、MAb Trap Kit（Amersham Biosciences社製）を使用して分離した。

20 血清および分離したIgGは、トリプシン、キモトリプシン（Sigma社製）を用いてペプチド鎖の部分を短くした。次に、N-グリコシダーゼF（Roche社製）を用いて糖鎖部分をペプチドから遊離した。プロナーゼ（Calbiochem社製）を用いてペプチドをアミノ酸へと分解した。次にゲル濾過で精製を行った後に蛍光標識を行った。蛍光標識としては、2-アミノピリジンとシアノホウ酸ナトリウム（Aldrich社製）を使用した。この試料をゲルろ過で精製後、弱酸分解でシアル

酸を遊離した。この様にして調製した蛍光標識糖鎖を高速液体クロマトグラフィー（日立ハイテクノロジーズ社製）で分離、分析を行った。まず、ODSカラム（HRC-ODS 6 x 150mm、島津製作所社製）で分離した後、分離したピークを夫々アミドカラム（Amide-80 4.6 x 250mm、東ソー社製）にかけて分離分析し、糖鎖を精製すると同時にその溶出位置を計算する。ODS、Amideの溶出位置から2次元マップを用いて糖鎖構造を推定し、推定構造に基づきその構造を確認するために、部分的に糖分解酵素（ β -N-アセチルヘキソサミニダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ（以上、タチナタマメ由来、生化学工業社製）、 α -L-フコシダーゼ（ウシ腎臓由来、Sigma社製））により逐次酵素消化を行い、酵素消化毎にODSカラム、アミドカラムによる分析を行った（図3）。部分酵素消化と再度の分析により、糖鎖の推定構造が正しいことを確認する。

ODSカラムによる分析は、以下のように行った。流速は、1 ml / 分、55℃で行った。溶離液としては、A：10 mM リン酸ナトリウム（pH 3.8）、B：0.5% 1-ブタノール / Aを用いた。この二種類の溶離液を、B 20% ~ 50%（0 ~ 60分）で直線勾配を用いて溶離した。分離の例示を図4に示す。分析は、蛍光分光光度計で励起光320 nm、検出光400 nmを用いて行った。ピリジルアミノ化糖鎖の蛍光強度は糖鎖構造に拠り変化しないことが解っているため、HPLCでのピーク面積をそれぞれの糖鎖構造のモル量比として扱うことが可能である。

アミドカラムによる分析は、以下のように行った。流速は、1 ml / 分、40℃で行った。溶離液としては、A：3% 酢酸トリエチルアミン（pH 7.3）：アセトニトリル（35 : 65（v / v））、B：A：3% 酢酸トリエチルアミン（pH 7.3）：アセトニトリル（50 : 50（v / v））を用いた。この二種類の溶離液を、B 0% ~ 60%（0 ~ 30分）で直線勾配を用いて溶離した。分離は図6のようになる。分析は、蛍光分光光度計で励起光320 nm、検出光400 nmを用いて行った。

(結果および相関付け)

IgG糖鎖のODSカラムでのプロファイル例を図4に、図5には主な糖鎖の構造とその量比(モル比)を示す。血清糖鎖のODSカラムでのプロファイル例を図6Aに、図6BにはODSで分離した各ピークのAmideカラムを用いた分析のクロマトグラムを示す。図7には各ピークの糖鎖構造を部分酵素消化により決める過程の例を、図8には血清由来の糖鎖の部分酵素消化での経緯を2次元マップ上にまとめたものを、図9には血清由来の糖鎖構造とその量比(モル比)を示す。図10には、特定の糖鎖210.1と210.2+210.3に着目し、その割合の変化をみた。リウマチ患者のIgG糖鎖において210.1が増加することは知られていたが、本試験において血清に於いても同様に増加し、血清全体の糖鎖分析が疾患の診断に有用であることが示唆された。また、今まで報告されていないが骨折患者のIgG糖鎖ではピークA(210.1)の増加とピークD(210.4)の減少が、変形関節症患者ではIgG糖鎖においては顕著な変化は認められないが血清糖鎖において210.1の210.2+3との比較での減少が観察された。この上昇下降を指標として用いれば、血清の糖鎖解析によりリウマチと変形関節症の診断に使用できる可能性があることが分かった。従来IgG糖鎖が各種疾患で変化し、疾患の診断や発症機構の解明に有用であることは示唆されていたが、本試験により血清糖鎖の分析においても同様に疾患の診断に有用であることが示唆された。更に血清糖鎖の分析ではIgG糖鎖では変化が認められない疾患でも糖鎖変化が観察されたことより、複数の疾患の診断に有用であることが示唆された。試料の調製は血清の方がIgGよりも簡易であることも併せ、血清糖鎖による診断が産業上有用である。

(実施例2：実際の診断における応用)

次に、ランダムに検体を採取し、上述の糖鎖の分析により、リウマチであるかどうかを示すことができるかを調べた。

上述の実施例に記載されるように慢性関節リウマチ患者と疑われる被検体およ

び正常被検体から血清サンプルを調製し、上述の実施例に記載されるようなプロトコルを用いて糖鎖分析を行った。その結果、上述の 210. 1、コード番号 210. 2 およびコード番号 210. 3 において異常が見られた被検体を慢性関節リウマチであるかどうかを医師が確認したところ、そうであることが明らかになった。他方、210. 1、コード番号 210. 2 およびコード番号 210. 3 において異常が見られなかった被検体は、慢性関節リウマチには罹患していなかった。従って、本発明の手法は、実際の診断に使用可能であることが明らかになった。

（実施例 3：テーラーメイド治療）

実施例 2 に記載した診断の結果に従って、慢性関節リウマチと診断された患者に抗リウマチ剤非ステロイド性消炎鎮痛剤、ステロイド類、免疫抑制剤、金チオリンゴ酸ナトリウムなどの金製剤、メトトレキサート・アクタリットなどの抗リウマチ薬を投与すると、慢性関節リウマチを処置することができる。従って、本発明により、実際にテーラーメイド治療を行うことができることが明らかになる。

以上のように、本発明の好ましい実施形態を用いて本発明を例示してきたが、本発明は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願および文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。

産業上の利用可能性

本発明は、血清全体の糖鎖構造を解析することによって、予想外に詳細に疾患状態を分析することが可能となり、診断およびテーラーメイド治療が可能となった。

請求の範囲

1. 以下の工程：

(a) 被検体からの血清に含まれる疾患マーカーを分析する工程；および

5 (b) 分析された該疾患マーカーと、疾患に関する情報とを相関付ける工程、
を包含する、被検体からの血清を用いて疾患を診断する方法。

2. 実質的に疾患マーカーを精製する工程を含まない、請求項1に記載の方法。

10 3. 前記疾患は、慢性関節リウマチを含む、請求項1に記載の方法。

4. 前記疾患マーカーは、N結合型糖鎖を含む、請求項1に記載の方法。

15 5. 前記疾患マーカーは、末端G a 1 欠損糖鎖を含む、請求項1に記載の方法。

6. 前記疾患マーカーは、コード番号210. 1、コード番号210. 2およびコード番号210. 3からなる群より選択される糖鎖を少なくとも含む、請求項1に記載の方法。

20 7. 前記被検体は、ヒトである、請求項1に記載の方法。

8. 血清レベルの糖鎖分析と精製された疾患マーカーレベルの糖鎖分析を行う工程をさらに包含する、請求項1に記載の方法。

25 9. 精製された疾患マーカーレベルの糖鎖分析結果と、血清レベルの糖鎖分析

10. 前記糖鎖の分析は、クロマトグラフィーによる分析を含む、請求項8に記載の方法。

5 11. 前記糖鎖の分析は、少なくとも2種類のクロマトグラフィー分析を含む、請求項8に記載の方法。

12. 前記糖鎖の分析は、ODSカラムおよびアミドカラムからなる群より選択される少なくとも1つのカラムによる分析を含む、請求項8に記載の方法。

10

13. 少なくとも1つの糖鎖消化酵素による消化工程をさらに包含する、請求項1に記載の方法。

14. 前記血清は前処理なしに分析される、請求項1に記載の方法。

15

15. 以下の工程：

(a) 被検体からの血清に含まれる疾患マーカーを分析する工程；

(b) 分析された該疾患マーカーと、疾患に関する情報とを相関付ける工程；
および

20 (c) 該疾患に関する情報に応じて適切な処置または予防のための手段を該被検体に提供する工程、

を包含する、被検体からの血清を用いて診断することによって該被検体を処置または予防する方法。

25

16. 以下：

16. 以下：

- (a) 被検体からの血清に含まれる疾患マーカーを分析する手段；および
- (b) 分析された該疾患マーカーと、疾患に関する情報とを相関付ける手段、を包含する、被検体からの血清を用いて疾患を診断するシステム。

5

17. 以下の工程：

- (a) 被験体の血清を得る工程；
- (b) 得られた血清をトリプシンまたはキモトリプシンで処理し、トウペプチドを得る工程；
- (c) 得られた糖ペプチドを遊離させる工程；
- (d) 遊離された糖鎖を分析する工程；および
- (e) 分析された糖鎖と、疾患に関する情報とを相関付ける工程、を包含する、血清を用いて被検体の疾患を診断する方法。

10

15

18. 実質的に疾患マーカーを精製する工程を含まない、請求項17に記載の方法。

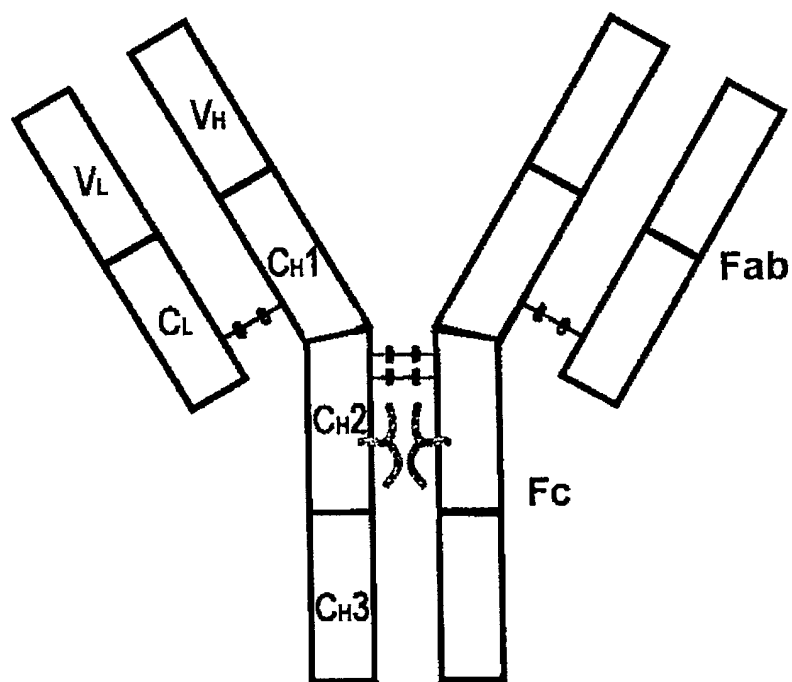


図 1

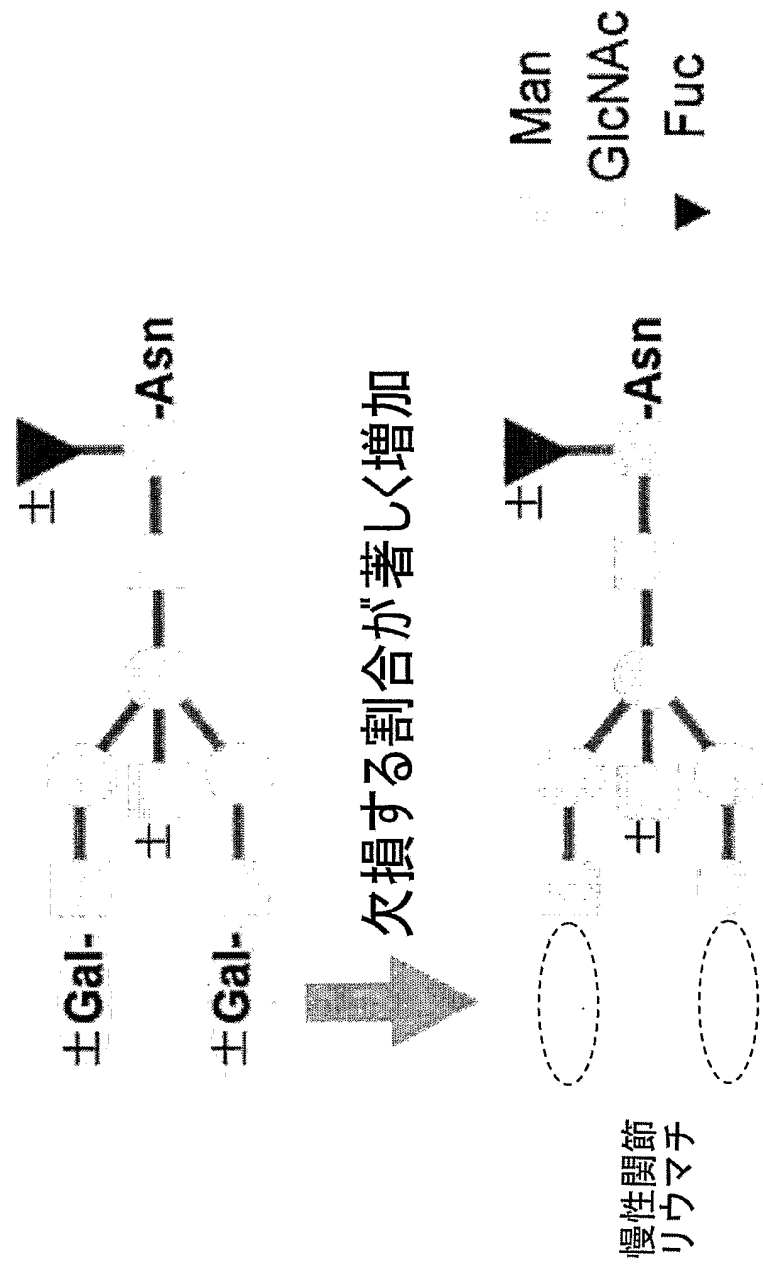


図 2

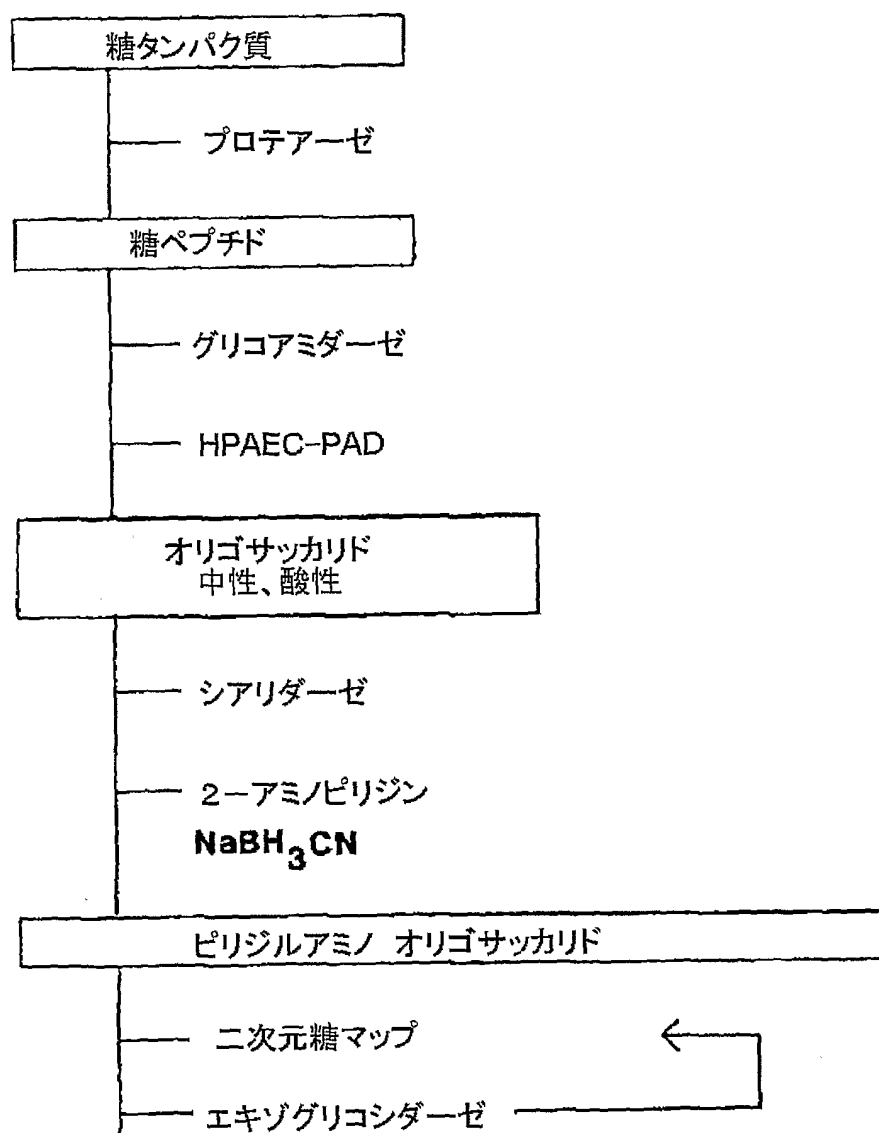


图 3

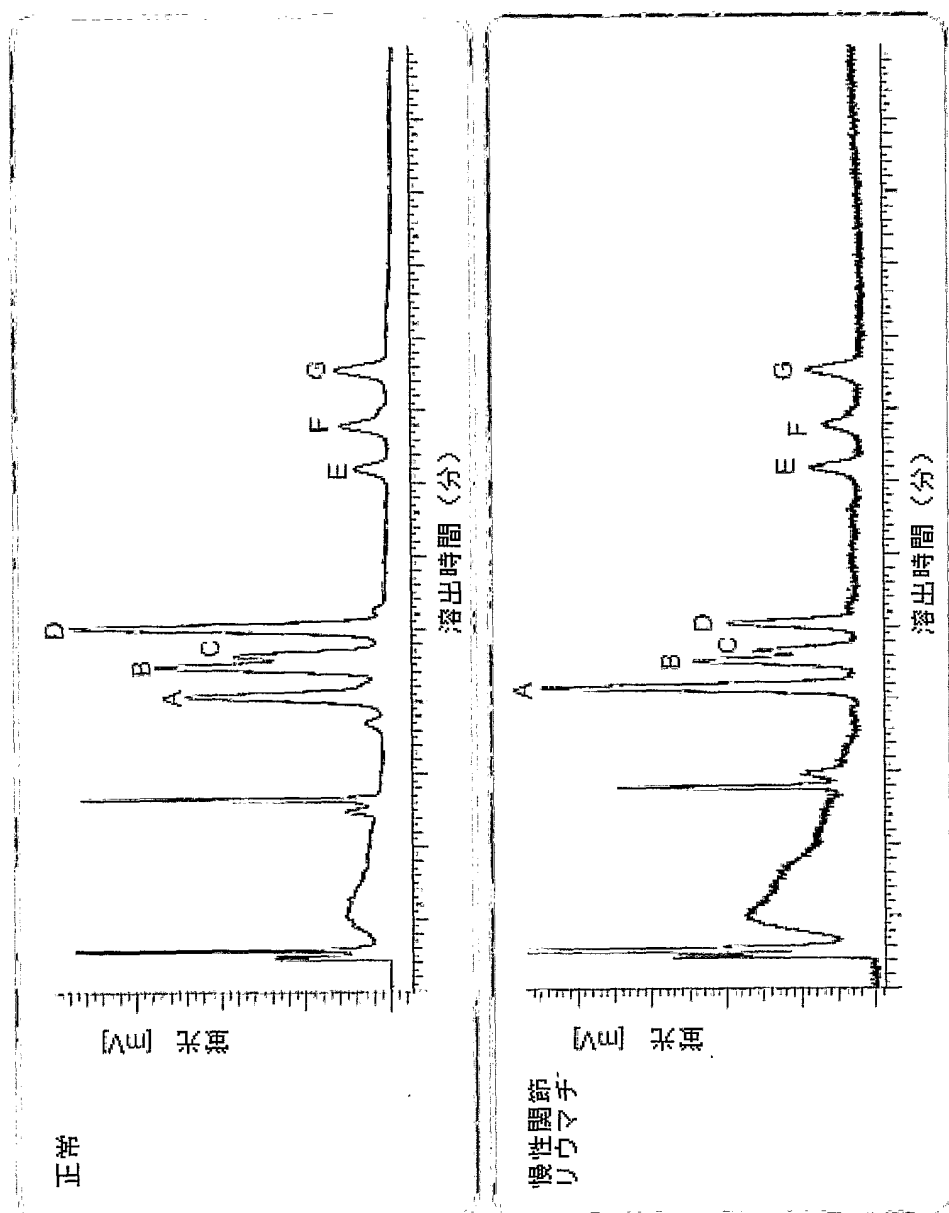


図 4

ピークコード番号	構造	IgG	BB	OA1	OA2	RA1	RA2
A 210.1		18.4	25.7	18.6	21.5	31.9	34.0
B 210.2		20.5	21.1	19.5	23.5	19.6	17.5
C 210.3		12.3	14.4	13.4	11.3	9.3	10.3
D 210.4		28.5	23.6	27.9	24.4	20.8	15.4
E 211.1		4.1	3.9	5.2	4.6	3.3	6.6
F 211.2		7.5	5.2	6.4	6.9	4.3	6.9
G 211.4		8.7	6.2	8.9	7.8	10.8	9.3

图 5

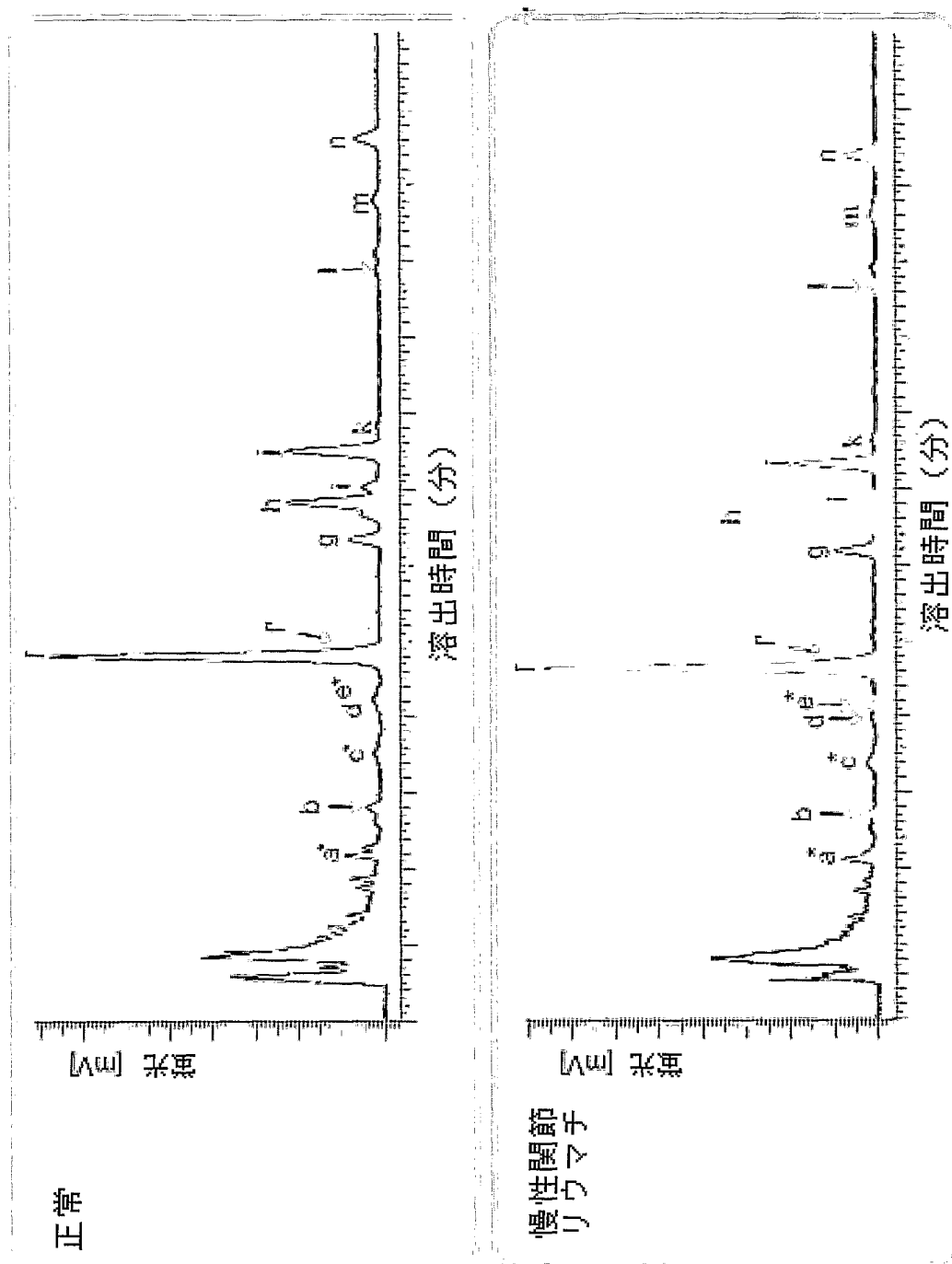


図 6 A

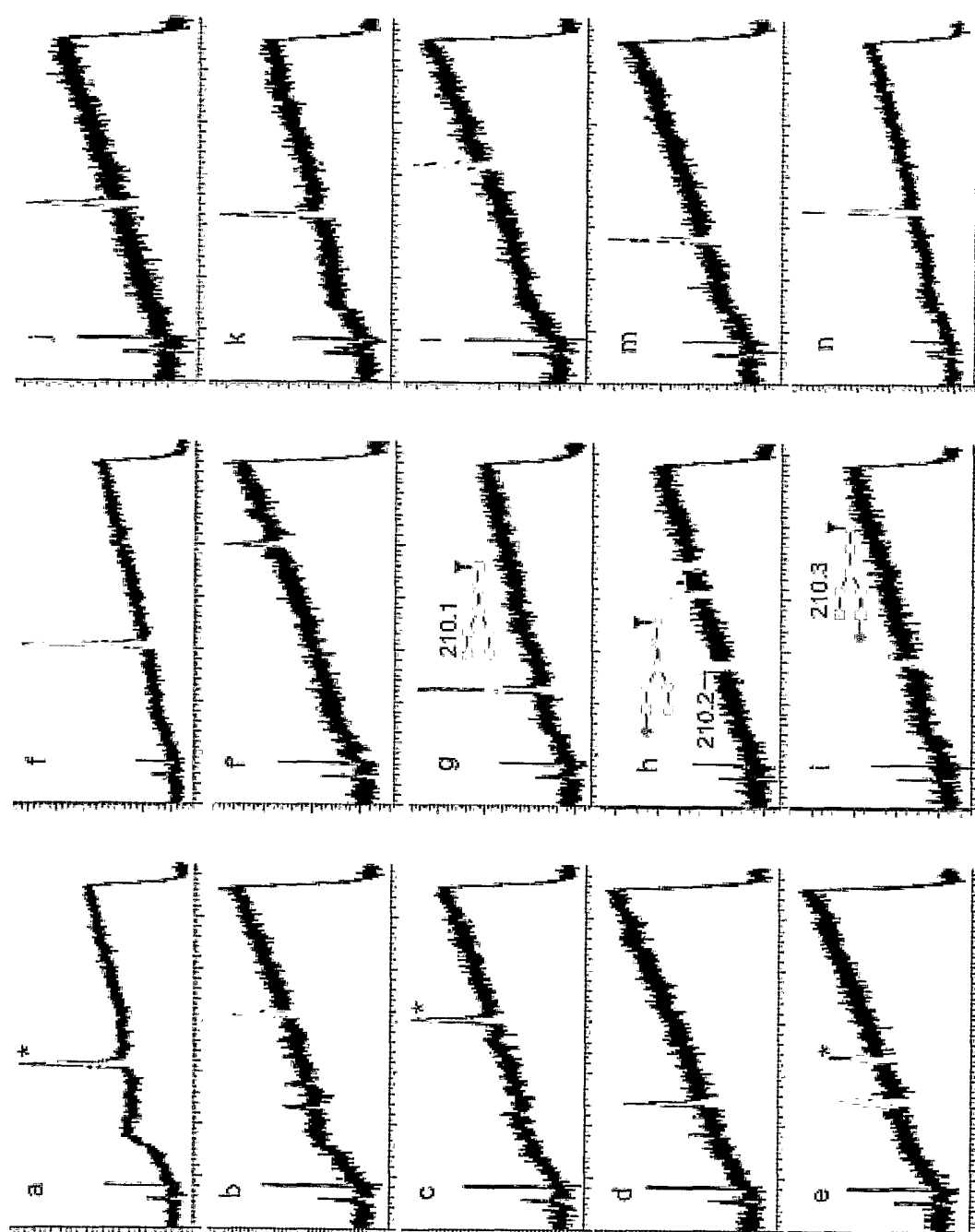


图 6 B

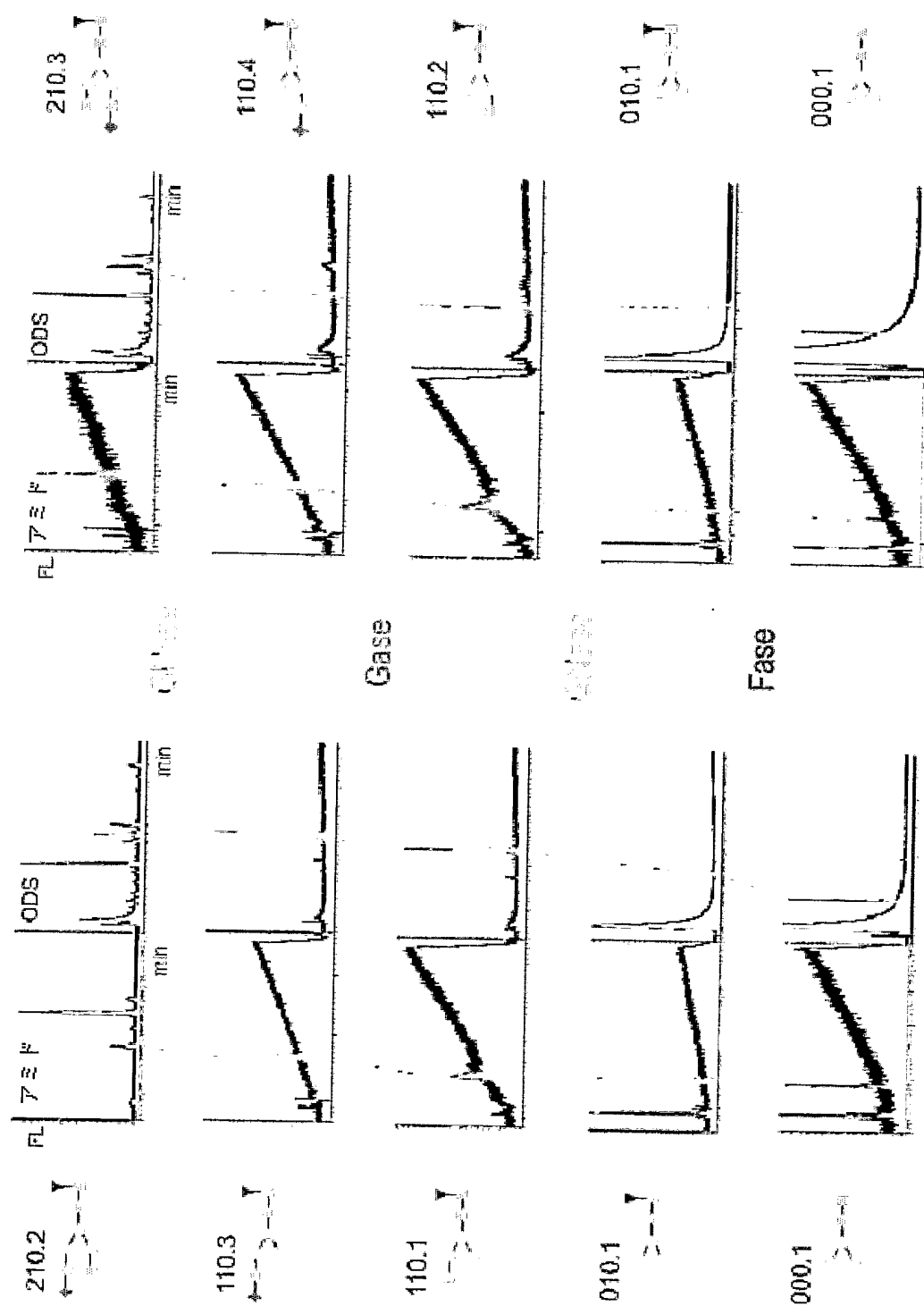


図 7

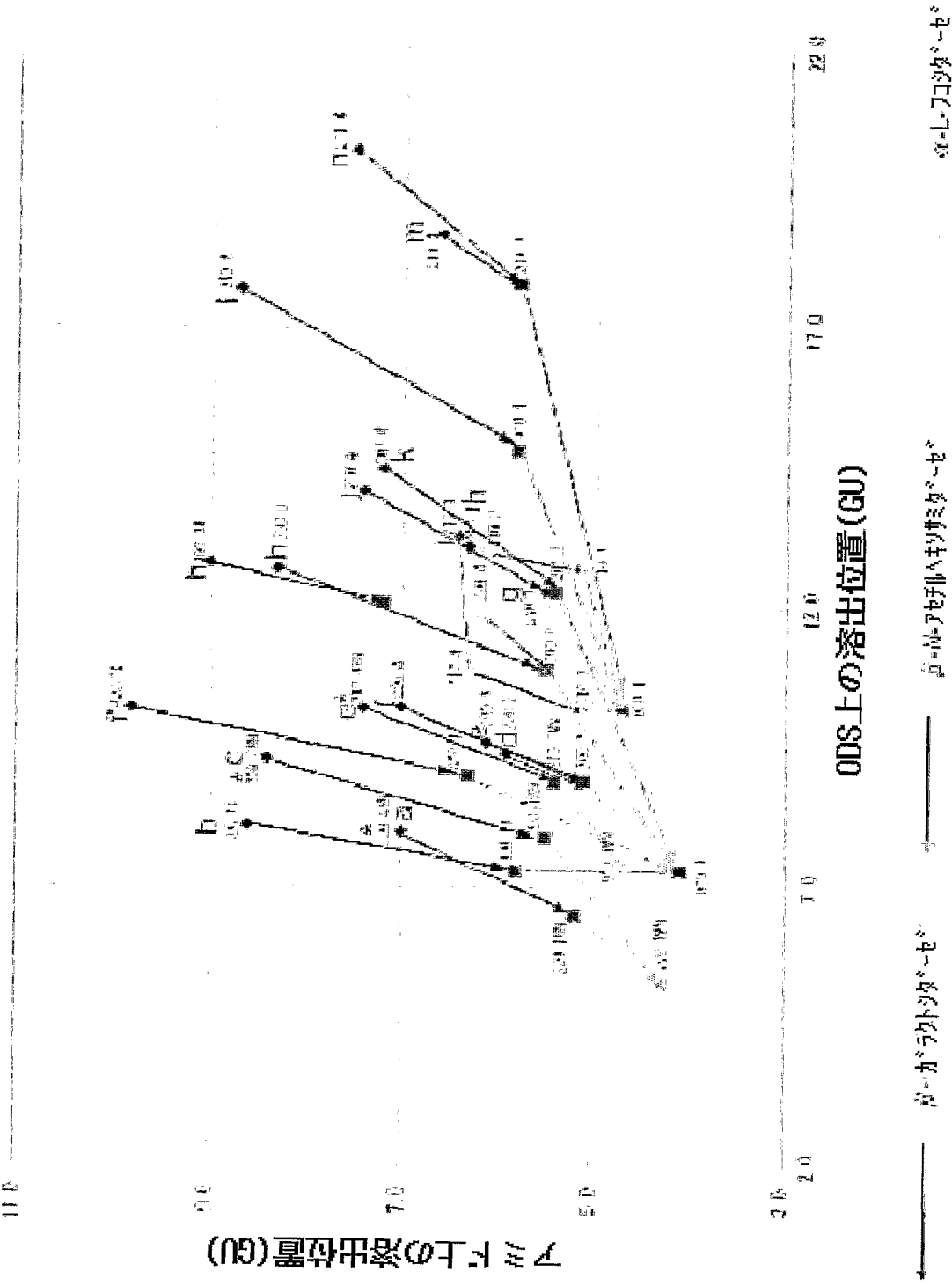
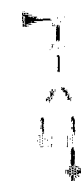
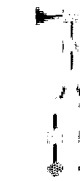


図 8

ピーク コード番号	構造	血清	相対比 [%]			
			BB	OA1	OA2	RA1 RA2
b		1.6	2.2	1.3	1.6	1.8 2.4
d		1.4	1.5	1.2	0.9	1.0 0.8
e		1.9	1.1	0.7	0.9	1.4 0.7
e	副産物		0.8	1.2	0.8	0.9 0.4
f		46.1	48.5	40.0	48.3	44.8 54.0
f			2.8	4.9	2.4	5.7 3.5
g		5.0	3.7	3.8	2.2	2.7 3.5
h		5.8	3.6	5.1	4.2	2.3 2.2

Man Gal
 GlcNAc Fuc

図 9 A

ビーク コード番号	構造	血清	相対比 [%]			
			BB	OA1	OA2	RA1 RA2
h 300.8		10.3	17.5	10.5	12.1	17.4 13.5
h 300.31		1.2	1.5	0.8	1.3	1.0 2.9
i 210.3		3.0	2.6	3.4	2.2	1.4 1.5
j 210.4		15.4	9.8	16.5	13.6	11.4 7.5
k 201.4		-	0.2	0.7	0.8	0.4 0.4
l 310.8		0.6	0.6	0.7	0.6	1.0 0.3
m 211.2		1.3	0.8	2.5	1.3	1.0 1.0
n 211.4		4.2	2.8	6.7	6.8	5.9 5.5

Man

Gal

GlucNAc

Fuc

図 9 B

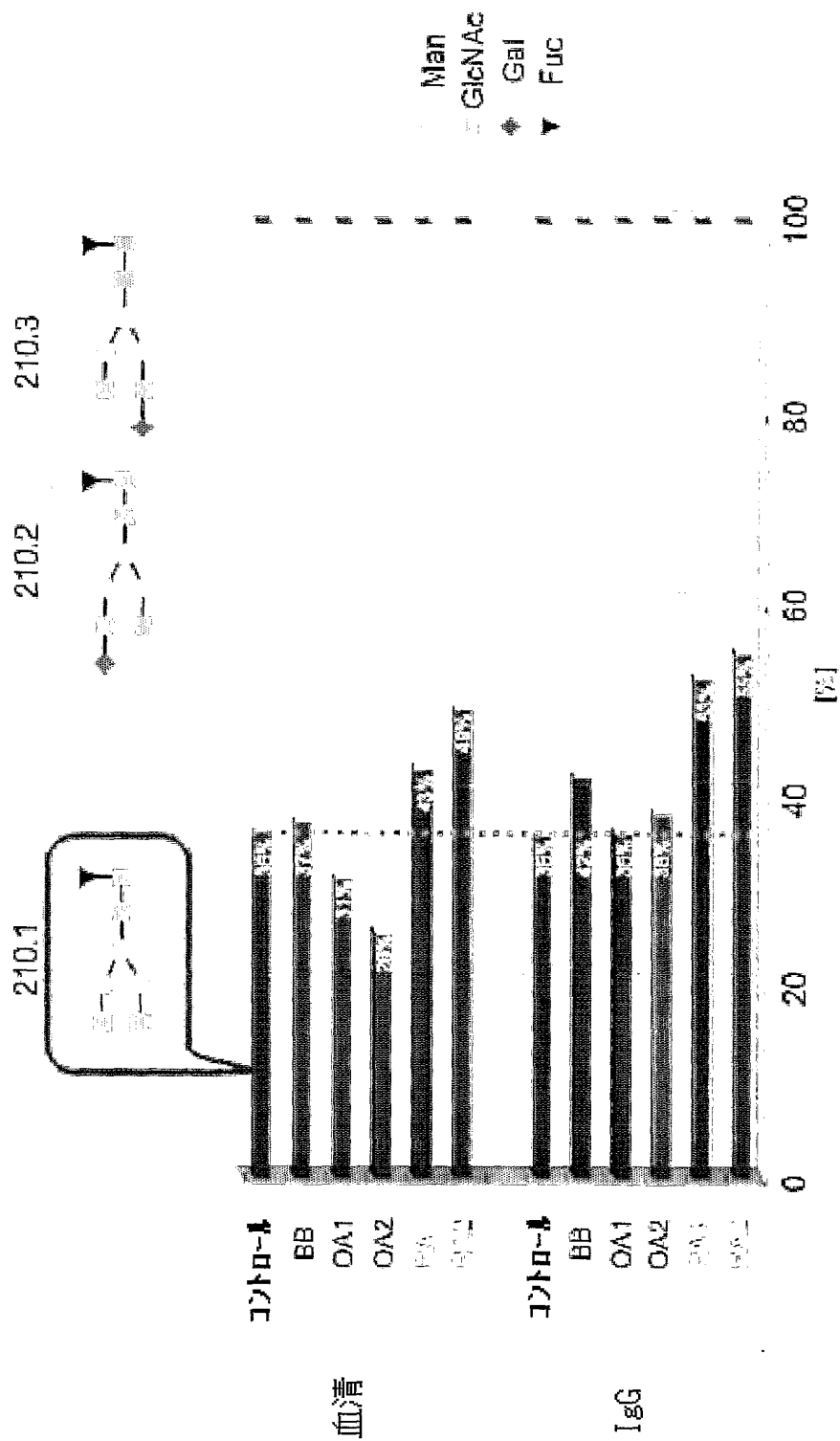


図 10

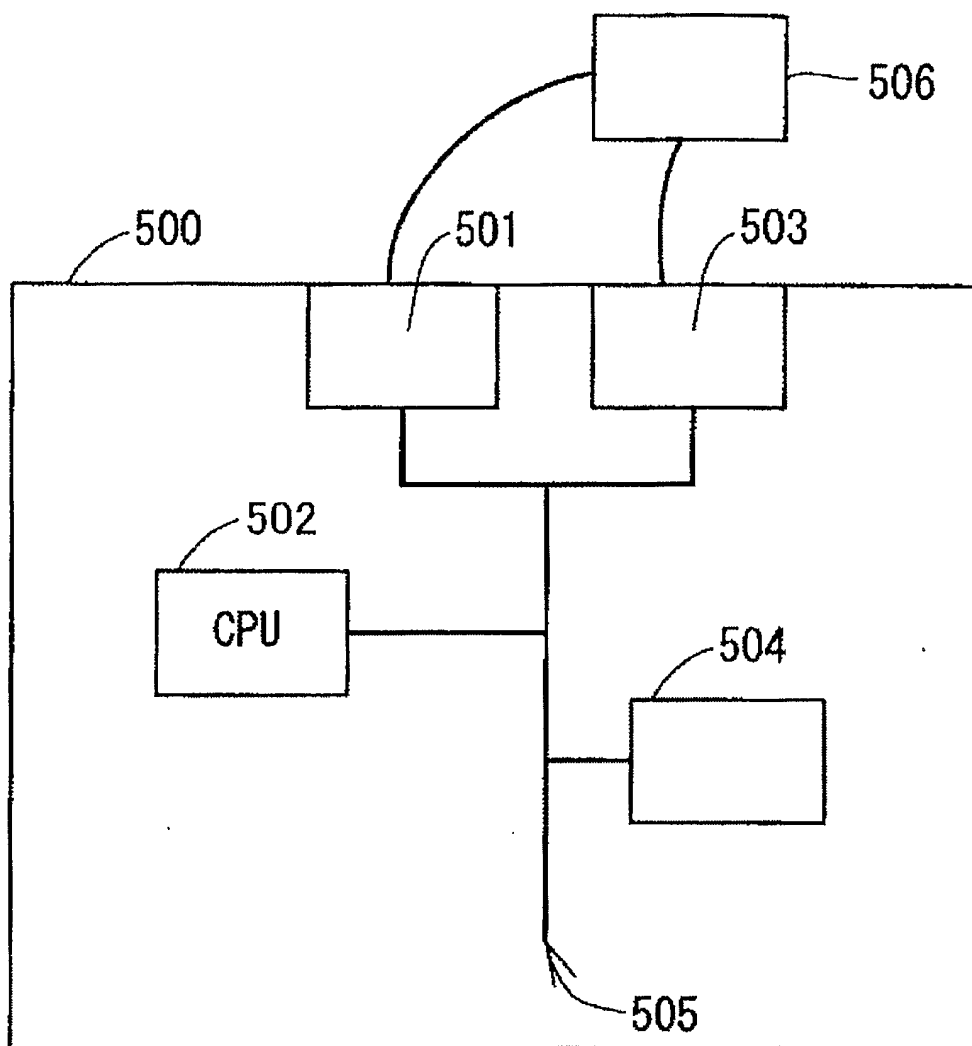


图 1-1

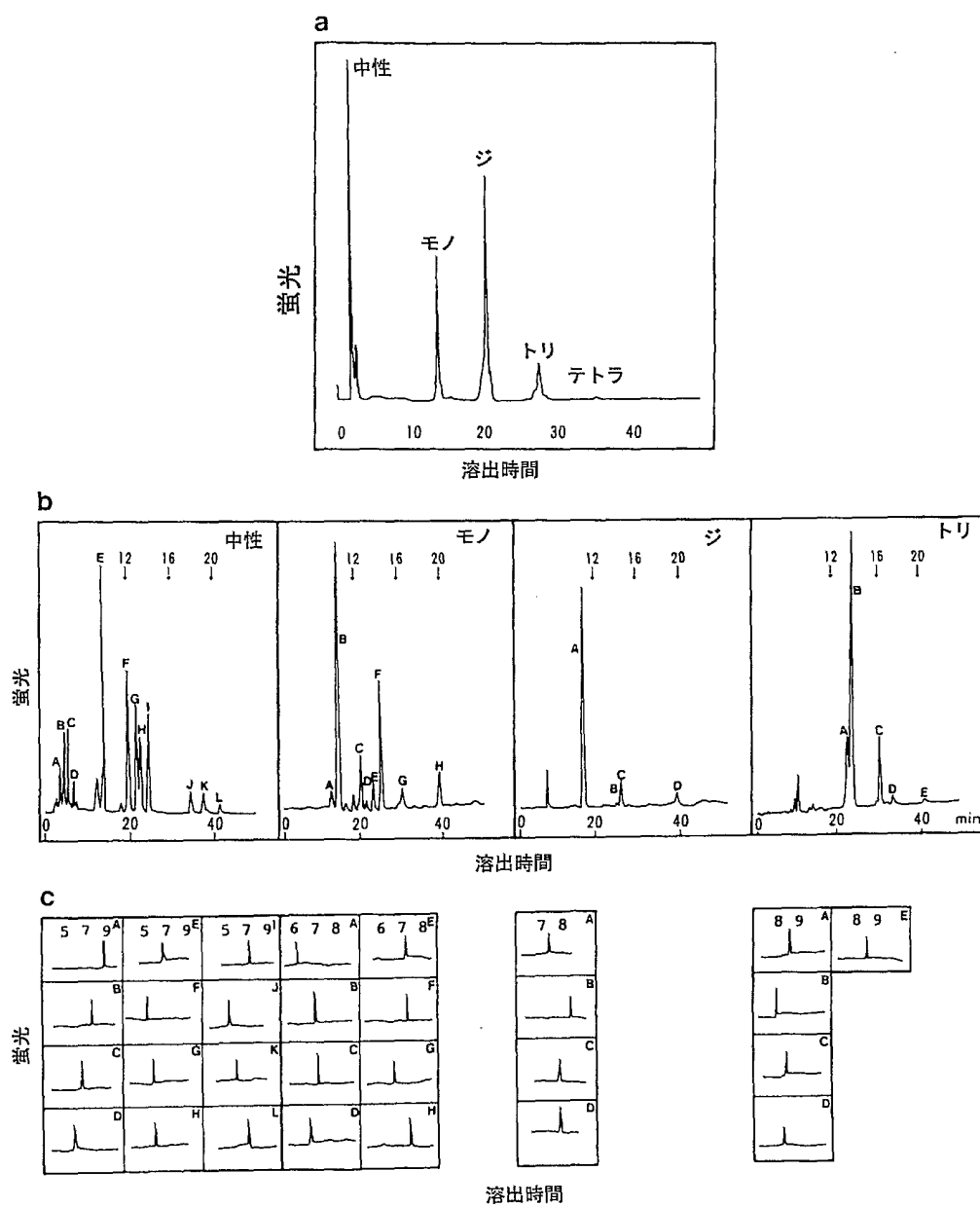


図 1 2

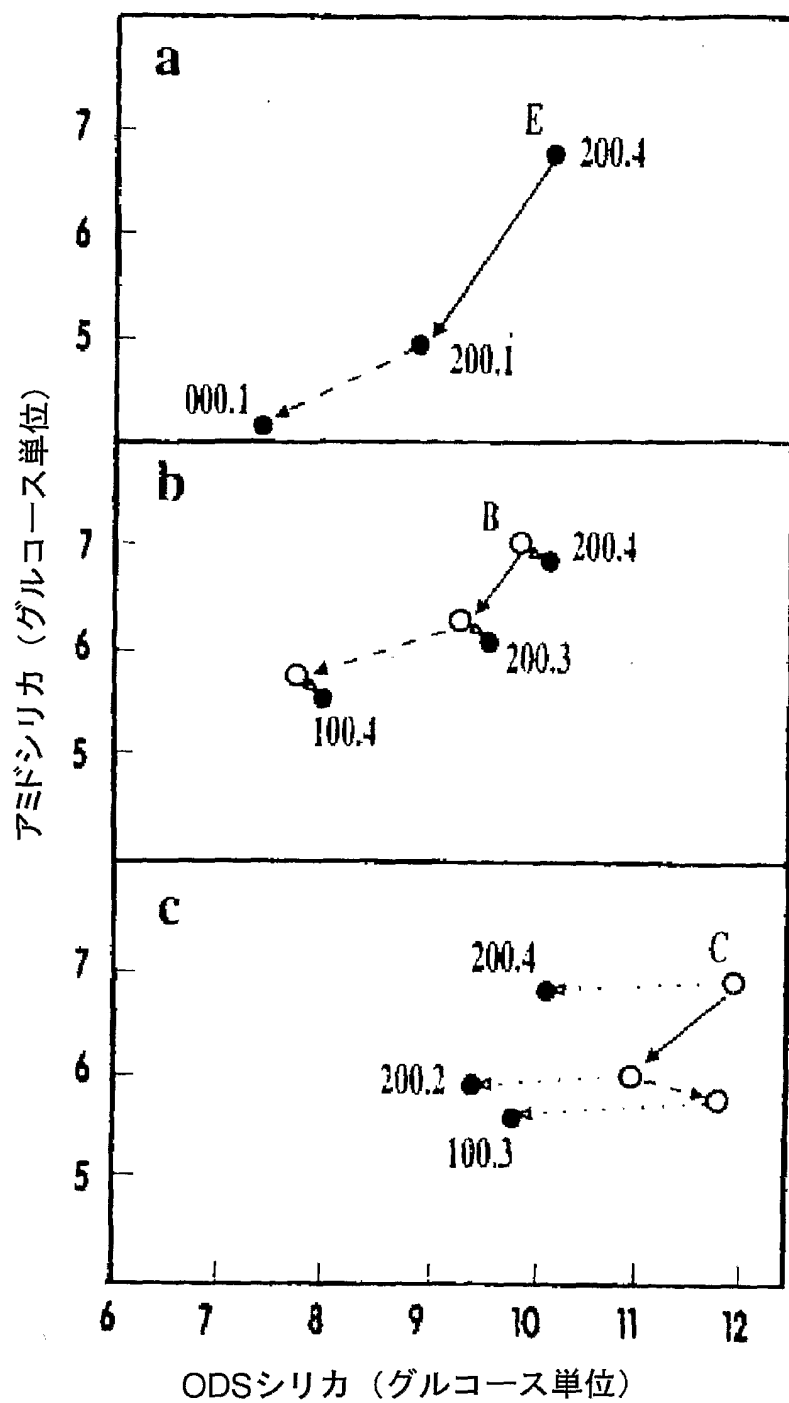


図 1 3

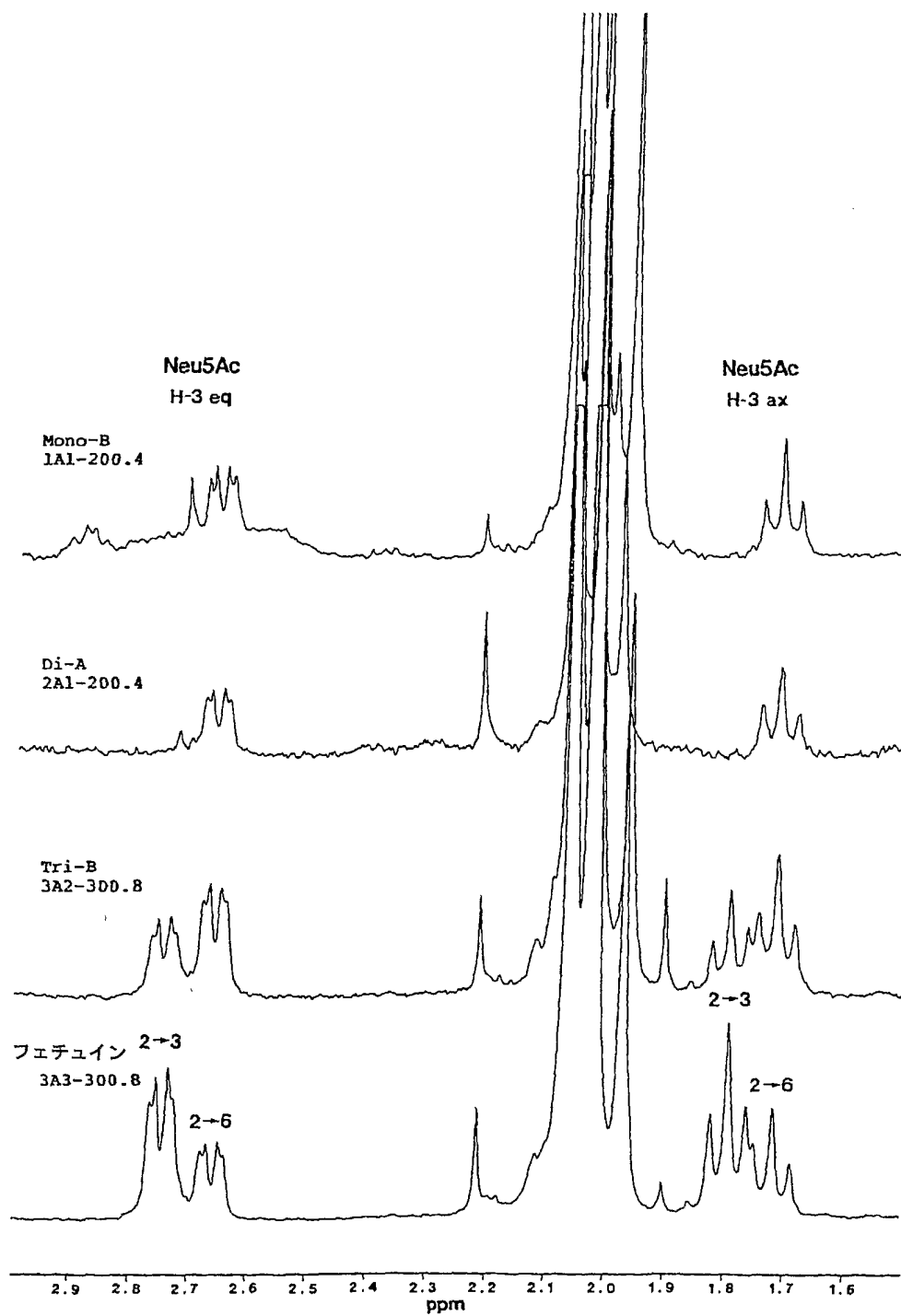


図 1 4

VIII-5-1	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て(規則4.17(v)及び51の2.1(a)(v)) 氏名(姓名)	本国際出願 に関し、 塩野義製薬株式会社 は、本国際出願の請求項に記載された対象が以下のように開示されたことを申し立てる。
VIII-5-1(i)	開示の種類:	その他: 報告会要旨集、発表スライドおよび発表原稿
VIII-5-1(ii)	開示の日付:	2003年 02月 14日 (14. 02. 2003)
VIII-5-1(iii)	開示の名称:	第7回卒業研究経過報告会
VIII-5-1(iv)	開示の場所:	北海道大学理学部生物科学科 (高分子機能学)
VIII-5-1(v)	本申立ては、次の指定国のためになされたものである。:	すべての指定国

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/001087

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ G01N30/88, G01N33/66		
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) Int.Cl ⁷ G01N30/88, G01N33/66		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2004 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2004 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2004		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 9-257790 A (Nakano Vinegar Co., Ltd.), 03 October, 1997 (03.10.97),	1,3-7,10,12, 13,16
Y	(Family: none)	8,9
X	JP 8-228795 A (Nakano Vinegar Co., Ltd.), 10 September, 1996 (10.09.96),	1,3-7,10-13, 16
Y	(Family: none)	8,9
X	JP 3-48700 A (Educational Foundation Fujita Gakuen),	1-3,7,14,16
Y	01 March, 1991 (01.03.91), (Family: none)	8,9
☒ 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 19 April, 2004 (19.04.04)		Date of mailing of the international search report 27 April, 2004 (27.04.04)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/001087

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 8-82623 A (Nakano Vinegar Co., Ltd.), 26 March, 1996 (26.03.96),	1, 4-7, 10, 12, 13, 16
Y	& EP 628793 A & US 5831037 A	8, 9
X	JP 61-170657 A (Monsanto Co.), 01 August, 1986 (01.08.86),	1, 3, 7, 10, 16 8, 9
Y	& EP 198388 A & AU 8652538 A & NO 8600191 A & FI 8600284 A & ZA 8600442 A & DK 8600290 A & US 4659659 A & CA 1272670 A & IL 77666 A	
X	Hokkaido University Rigakubu Seibutsugakka (Kobunshi Kinogaku), Dai 7 Kai Sotsugyo Kenkyu Keika Hokokukai Yoshishu, 14 February, 2003 (14.02.03), page 36	1-14, 16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/001087

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

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

1. ☒ Claims Nos.: 15, 17, 18

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The invention as set forth in claim 15 involve diagnostic methods and methods for treatment of the human body by therapy, and the inventions as set forth in claims 17, 18 pertain to methods involving a diagnosis with the use of serum drawn from subject including human body.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N 30/88 G01N 33/66

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N 30/88 G01N 33/66

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 1971-2004年
 日本国登録実用新案公報 1994-2004年
 日本国実用新案登録公報 1996-2004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)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 9-257790 A(株式会社中埜酢店)1997. 10. 03 (ファミリー無し)	1, 3-7, 10, 12, 13, 16
Y		8, 9
X	JP 8-228795 A(株式会社中埜酢店)1996. 09. 10 (ファミリー無し)	1, 3-7, 10-13, 16
Y		8, 9
X	JP 3- 48700 A(学校法人藤田学園)1991. 03. 01 (ファミリー無し)	1-3, 7, 14, 16
Y		8, 9

☒ 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

19. 04. 2004

国際調査報告の発送日

27. 4. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
 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)

宮澤 浩

2J

9407

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP 8- 82623 A(株式会社中埜酢店)1996. 03. 26 & EP 628793 A & US 5831037 A	1, 4-7, 10, 12, 13, 16 8, 9
X Y	JP 61-170657 A(モンサント コンパニー)1986. 08. 01 & EP 198388 A & AU 8652538 A & NO 8600191 A & FI 8600284 A & ZA 8600442 A & DK 8600290 A & US 4659659 A & CA 1272670 A & IL 77666 A	1, 3, 7, 10, 16 8, 9
X	北海道大学理学部生物学科 (高分子機能学) , 第7回卒業研究経過 報告会要旨集, 平成15年2月14日, 第36頁	1-14, 16

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

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

1. ☒ 請求の範囲 15, 17, 18 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲15に係る発明は、人を含む人体に対して診断及び処置（治療）を行うことを含む方法である。また、請求の範囲17, 18に係る発明は、人を含む被検体から血清を得て診断を行うことを含む方法である。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

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

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

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。