

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3974130号

(P3974130)

(45) 発行日 平成19年9月12日(2007.9.12)

(24) 登録日 平成19年6月22日(2007.6.22)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48 A
GO 1 N 27/447 (2006.01)	GO 1 N 27/26 3 1 5 H
GO 1 N 27/62 (2006.01)	GO 1 N 27/62 C
GO 1 N 30/72 (2006.01)	GO 1 N 27/62 V
GO 1 N 33/483 (2006.01)	GO 1 N 30/72 A
請求項の数 23 外国語出願 (全 16 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2004-367043 (P2004-367043)	(73) 特許権者	591003013
(22) 出願日	平成16年12月20日(2004.12.20)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(65) 公開番号	特開2005-189241 (P2005-189241A)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(43) 公開日	平成17年7月14日(2005.7.14)		E AKTIENGESSELLSCHAF
審査請求日	平成17年2月8日(2005.2.8)		T
(31) 優先権主張番号	03104775.6		スイス・シーエイチー4070バーゼル・
(32) 優先日	平成15年12月18日(2003.12.18)		グレンツアーヘルストラツセ124
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100078662
			弁理士 津国 肇
		(74) 代理人	100075225
			弁理士 篠田 文雄
		(72) 発明者	ペーター・ベルント
			スイス国、ツェーハー-4056 バーゼ
			ル、ミットレール・シュトラーセ 138
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 連続組合せ希釈による定量法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

生体分子の複合混合物中のある生体分子の定量方法であって、

a. それぞれ少なくとも1つの識別できる成分を含む、生体分子の混合物の分画の少なくとも2つの画分を用意すること、

b. 画分を組合せ連続希釈に付すこと、

c. 各原画分及び各希釈画分中の生体分子を、感度閾値及び同一性情報を提供する方法により、検出及び同定すること、並びに

d. それぞれの希釈係数を考慮して各希釈レベルで各画分中の生体分子の同定の数を集約することにより、複合混合物中の生体分子を定量すること

を含む方法。

【請求項2】

d) の合計を、全ての希釈レベルでの全ての画分中の全ての生体分子の同定の総数で割る、請求項1記載の方法。

【請求項3】

a) の画分の数、生体分子の混合物の複雑さに依存する、請求項1又は2記載の方法。

【請求項4】

a) の画分の数、生体分子の複合混合物中の異なる生体分子の濃度に依存する、請求項1～2のいずれか1項記載の方法。

【請求項 5】

a) の画分の数、c) の検出及び同定方法に依存する、請求項 1～2 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 6】

b) の希釈レベルの数が、画分中の生体分子の出発濃度に依存する、請求項 1～5 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 7】

b) の希釈レベルの数が、分画後の画分の数に依存する、請求項 1～5 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 8】

10

b) の希釈レベルの数が、検出及び同定方法の検出限界に依存する、請求項 1～5 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 9】

生体分子が、 $(n-1)$ 個以下の画分に存在する（ここで、 n は、画分の総数であり、かつ n は、2 以上である）、請求項 1～8 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 10】

生体分子が、2 つの画分に存在する、請求項 1～8 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 11】

生体分子が、1 つの画分に存在する、請求項 1～8 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 12】

20

c) の検出及び同定方法が、二次元ゲル電気泳動を含む、請求項 1～11 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 13】

c) の検出及び同定方法が、更に質量分析を含む、請求項 12 記載の方法。

【請求項 14】

c) の検出及び同定方法が、免疫検定法を含む、請求項 1～11 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 15】

c) の検出及び同定方法が、質量分析と組合せたガスクロマトグラフィーを含む、請求項 1～11 のいずれか 1 項記載の方法。

30

【請求項 16】

c) の検出及び同定方法が、特異的に標識した分子の実体による電気泳動を含む、請求項 1～11 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 17】

a) の画分が、クロマトグラフィー分画法、超遠心分離法、タンパク質沈降法、又は免疫沈降法により分離される、請求項 1～16 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 18】

生体分子が、ポリペプチドである、請求項 1～17 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 19】

生体分子が、ポリヌクレオチドである、請求項 1～17 のいずれか 1 項記載の方法。

40

【請求項 20】

生体分子が、炭水化物である、請求項 1～17 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 21】

生体分子が、脂質である、請求項 1～17 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 22】

生体分子が、糖タンパク質である、請求項 1～17 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 23】

生体分子が、リポタンパク質である、請求項 1～17 のいずれか 1 項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【0001】

本発明は、生体分子の複合混合物中のある生体分子の定量方法であって、画分への複合混合物の分画と、これに続く画分の組合せ連続希釈、並びに明確な感度閾値及び同定能力を持つ方法による各原画分及び各希釈画分中の生体分子の検出を含む方法に関する。

【0002】

生体分子（例えば、タンパク質）の現行の検出方法は、二次元ゲル電気泳動と、これに続く染色ゲルの容量分析である。しかし、分析される生体分子の量を測定することは、特に異なる試料中のその量を比較しようとするると困難である。生体分子濃度における試料間変動を明らかにするには、ゲルを並行して処理し、かつゲル間のマッチングを行わなければならない。

10

【0003】

生体分子の複合混合物中の生体分子の定量のための簡易な方法が求められている。

【0004】

本発明は、生体分子の複合混合物中のある生体分子の定量方法であって、

a. それぞれ少なくとも1つの識別できる生体分子成分を含む、生体分子の複合混合物の分画から生じる少なくとも2つの画分を用意すること、

b. 画分を組合せ連続希釈工程に付すこと、

c. 各原画分及び各希釈画分中の生体分子を、安定かつ十分に明確な感度閾値及び同一性情報を持つ方法により、検出及び同定すること、並びに

d. それぞれの希釈係数を考慮して各希釈レベルで各画分中の生体分子の同定の数を集約することにより、生体分子の複合混合物中の生体分子を定量することを含む方法を提供する。

20

【0005】

正規化を目的として、d)の合計は、全ての希釈レベル（原画分及び希釈画分の希釈レベル）での全ての画分中の全ての生体分子の同定の総数で割ることができる。

【0006】

生体分子の定量のための本発明の方法は、1つのソースからの生体分子の複合混合物中の1つ以上の生体分子の、他のソースからの複合混合物中のそれぞれの生体分子に比較した相対的定量法を提供する。

【0007】

生体分子の複合混合物は、細胞、細胞培養上清、生物学的流体（血清、血漿、尿、気管支洗浄液、喀痰、生検材料（脳脊髄液など））を含む生物学的ソースを含む、任意のソースに由来してよい。生体分子の複合混合物は、少なくとも2つの異なる生体分子を含む。本発明における生体分子は、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、炭水化物、脂質、糖タンパク質、リポタンパク質あるいは他の修飾型又はこれらの代謝物を含む、任意の生体分子であってよい。検出及び同定方法は、単一型の生体分子に限定されていてもよいし、あるいは一度に幾つかの分類の生体分子を検出及び分析することもできる。

30

【0008】

本発明の方法において使用される分画方法は、生体分子の複合混合物を識別できる画分に効率的に分離するものである。好ましくは、生体分子の複合混合物は、各異なる生体分子が $(n-1)$ 個以下だけの画分に存在する（ここで、 n は、画分の総数であり、かつ n は、2以上である）、識別できる画分に分画される。好ましくは、異なる生体分子は、2つの異なる画分に、更に好ましくは1つの画分に存在する。本発明の方法において使用することができる分画方法は、標的とする型の生体分子の複合混合物の分離に適した任意の方法から選択することができる。本発明の方法において使用することができる分画方法は、吸着、重力若しくは沈降速度に基づく分画、電気泳動分画又はこれらの方法論の組合せを含む群から選択することができる。例えば、標的分子としてタンパク質の場合には、この群は、クロマトグラフィー分画法、超遠心分離法、タンパク質沈降法、親和性精製法、又は免疫沈降法を非限定的に含む。標的分子としてペプチド（例えば、タンパク質消化物から得られる）の場合には、この群は、高圧液体クロマトグラフィー（HPLC）を非限

40

50

定的に含む。

【0009】

画分は次に、組合せ連続希釈に付される。組合せ連続希釈には、そこから始めるための少なくとも2つの画分が必要である。好ましくは、生体分子の複合混合物は、続いての検出工程において充分な数の異なる標的分子の検出及び同定が可能となるのに必要な数の画分に分画される。好ましくは、原画分の数には素数ではなく、更に好ましくは、原画分の数には偶数であり、そして好ましくは、各最初の画分は、少なくとも1つの識別できる成分を含む。

【0010】

組合せ連続希釈を始めるための画分の数、生体分子の混合物の複雑さ、生体分子の複合混合物中の個々の生体分子の濃度、分離方法の効率、並びに分画及び組合せ連続希釈後に使用される検出及び同定方法に依存する。

10

【0011】

組合せ連続希釈には、少なくとも1つの異なる生体分子を含む、少なくとも2つの異なる画分が組合せられる。好ましくは、2つの画分が組合せられる。これは、各画分中の生体分子の濃度と各画分の容量とのドット積を全てを組合せた画分の総容量で割った商によって、プールした画分中の生体分子の濃度を変化させる。一般に、これは、希釈画分中のどの生体分子成分でも、原画分中のそれぞれの生体分子の最大濃度に比較して、その濃度を低下させる。以下の希釈工程において、個々のタンパク質の濃度は、次の検出及び同定方法の感度閾値を下まわるまで低下する。

20

【0012】

希釈工程の数は、原画分中の生体分子の出発濃度、分画後の原画分の数、並びに検出及び同定方法の検出限界に依存する。

【0013】

本発明の方法は更に、検出及び同定方法を含む。この検出方法は、明確な感度閾値を特徴とし、また検出生体分子に関する同一性情報を提供する必要がある。それによって、特異的な生体分子の存在又は非存在を、原画分又は希釈画分において決定することができる。本発明の検出及び同定方法は、生体分子の化学組成、構造、又は配列、並びにそれから生じる物理化学的又は酵素的性質に依存することがある。これらは、特異的プローブとのハイブリダイゼーション、特異的抗体又はレクチンとの反応、特異的分子プローブとの酵素又は化学反応、等電点、分子量、生体分子の酵素消化により生じる断片の分子質量、NMRスペクトルあるいはこれらの組合せを含む。タンパク質定量の例では、本発明の検出及び同定方法は、一次元若しくは二次元ゲル電気泳動と質量分析との組合せ、免疫検定法（例えば、ウェスタンブロット）、質量分析と組合せたガスクロマトグラフィー（GS/MS）又は特異標識した分子の実体（例えば、蛍光、化合物（例えば、ビオチン）、又は放射性タグ）による電気泳動よりなる群から選択することができる。

30

【0014】

生体分子の定量法を導くために、各希釈工程のそれぞれの希釈係数が考慮される、各希釈工程の画分の同定又は特定の指紋（ペプチド質量指紋）が計算される。得られる生体分子の同定数は、全ての希釈レベルについて集約される。正規化を目的として、この合計は、全ての画分（原画分及び希釈画分）中の全ての生体分子の同定の総数で割ることができる。

40

【0015】

【数1】

$$\text{相対量 (q)} = \frac{\sum (d_i \times N_i)}{N_{\text{total}}}$$

【0016】

50

[式中、 N_i は、希釈レベル i での個々の生体分子の同定の数 N であり、 d_i は、それぞれの希釈レベル i の希釈係数 d であり、そして N_{total} は、全ての希釈レベルの全ての画分中の全ての生体分子の同定の総数 N である]。

【0017】

本方法は、種々の生体分子の性質とは独立である。ポリヌクレオチドは、ポリペプチド又は炭水化物と同様に処理することができる。本方法の更に別の利点は、生体分子定量を目的とする更なる努力を必要とすることなく、定量法を簡単に生体分子の同定と組合せることである。更に、1つのソース由来の生体分子の量を、別のソースのものと比較しようとするならば、生体分子の混合物を相互に別々に処理することができる。

【0018】

これまで本発明を一般的に記述してきたが、同発明は、以下の図面と一緒に、説明だけを目的として本明細書に含まれるものであり、かつ特に断りない限り限定するという意図のない、特定の実施例を参照することにより更によく理解されよう。

【0019】

図1は、本発明の方法を図解する：第1の工程において、複合混合物を異なる画分に画する。これらの画分は、次に組合せ連続希釈に付す。第2の工程において、生体分子は、例えば、試料プールでの二次元ゲル電気泳動と、これに続く質量分析での同定により検出する。(AU：吸収単位；8～23：画分)

【0020】

図2は、生体分子の相対量の計算を示す。 q ：生体分子の相対量； N_i ：希釈レベル i の個々の生体分子の同定の数 N ； d_i ：それぞれの希釈レベル i の希釈係数 d ； N_{total} ：全ての希釈レベルの全ての画分中の全ての生体分子の同定の総数 N 。(スキーム： $N1$ ：非希釈、 $N2$ ：2倍希釈、 $N3$ ：4倍希釈、 $N4$ ：8倍希釈)

【0021】

図3は、レベル1(希釈なし)、レベル2(2倍希釈)、レベル3(4倍希釈)、及びレベル4(8倍希釈)からの二次元電気泳動ゲルにおけるタンパク質、グリコーゲンホスホリラーゼ(a)、ピメンチン(b)及び熱ショックタンパク105(c)に関する同定の数を示す。値は、三重測定で行われた実験から合計した。(対照：5mMグルコース；高グルコース：10mM)

【0022】

実施例

実施例において参照される市販の試薬は、特に断りない限り製造業者の指示書にしたがい使用した。

【0023】

実施例1：

細胞培養

INS-1細胞(Asfari, Janjicら 1992)は、10% FCS(インビトロジェン(INvitrogen)、熱不活化)、10mMヘペス溶液(インビトロジェン)、1mMピルビン酸Na(シグマ(Sigma))；50μMベーターメルカプトエタノール(シグマ)、1%ペニシリン/ストレプトマイシン溶液(シグマ)、及び低濃度(5mM)又は高濃度(10mM)のグルコース(シグマ)を補足したRPMI 1640培地(インビトロジェン)で培養した。細胞は大体、低グルコース濃度で培養した。予備培養のために、細胞を分割し、次に低グルコース培地で細胞がコンフルエントになるまでインキュベートした。次いで培地を低グルコース又は高グルコース培地に替えて、インキュベーションを4日間続けた。回収のために、細胞を最初にハンクス平衡塩溶液(HBSS、インビトロジェン)で1回洗浄し、次に細胞が丸みを帯び、瓶表面から離れるまでトリプシン/EDTA溶液で1～2分間覆った。トリプシン/EDTA溶液を廃棄して、細胞をトリプシンインヒビター溶液(シグマ)に懸濁し、遠心分離管に移して、1200×gで5分間遠心分離した。この後、再度同じ遠心分離機パラメーターを用いて、細胞をHBSS中で3回洗浄した。上清を吸引して、廃棄し、そしてサイトゾルの調製に使用するまでペレットを-80℃で凍結貯蔵し

10

20

30

40

50

た。

【0024】

サイトゾルの調製

全ての溶液（HBSSを除く）を4℃に冷却し、全ての工程は、冷却環境（氷浴）中で行った。約 10^8 個の細胞を細胞均質化培地（CHM；150mM $MgCl_2$ 、10mM KCl、10mM トリス、0.25M グルコース、1mM EDTA、pH7.4）に再懸濁して、氷上に2分間放置した。この細胞懸濁液をポッター・エルヴェージェム（Potter-Elvehjem）ホモジェナイザーに移した。ポッター・エルヴェージェムホモジェナイザーの冷ペッスルをオーバーヘッド高トルク電動機に取り付け、細胞を1000rpmで10ストロークを用いてホモジェナイズした。均質化の効率（>90%の破壊細胞）は、位相差顕微鏡により確認した。細胞破砕物及び核は、1000×gで5分間遠心分離することにより除去した。ミトコンドリアは、5000×gでの遠心分離により分離した。濃縮サイトゾル画分は、最後に200000×gで遠心分離し、上清を清浄な管に移すことにより回収した。調製物中の最終タンパク質濃度は、2.5～5.0mg/mlであった。

10

【0025】

クロマトグラフィー分画

全ての分画工程は、AKTAエクスプローラー10（AKTAexplorer 10）クロマトグラフィーシステム（アマシャム（Amersham））を用いて室温で行った。サイトゾル調製物（10mgの総タンパク質）を0.45μmミレックス-HV（Milex-HV）シリンジ駆動フィルターユニットに通して、脱塩カラム（直列に連結された3個の5mlハイトラップ（HiTrap）脱塩カラム、アマシャム）に載せた。タンパク質は、緩衝液A（25mM $NaHPO_4$ pH7.5；1mM EDTA；0.5mM ジチオエリトリール；1×コンプリートEDTAフリー（Complete EDTA-free）（ロシュ・ダイアグノスティクス（Roche Diagnostics）製のプロテアーゼインヒビターカクテル錠；pHは7.5に調整）を用いて、1.5ml/分の流量を用いて溶出した。タンパク質は、UV吸収（280nm）の上昇と導電率の最低値をタンパク質画分の境界として利用して、20ml注入ループに回収した。次にタンパク質は、TSK DEAE-5PW 7.5cm×7.5mmカラム（トーソー・バイオセップ（TOSOH BIOSEP））を1ml/分の流量で用いるアニオン交換クロマトグラフィーにより分離した。緩衝液Aは、結合緩衝液として使用し、緩衝液B（25mM $NaHPO_4$ 、pH7.5；1mM EDTA；0.5mM ジチオエリトリール；1×コンプリートEDTAフリー（ロシュ・ダイアグノスティクス製のプロテアーゼインヒビターカクテル錠；1M NaCl、pHは7.5に調整）は、溶離緩衝液として使用した。試料をカラムに載せて、非結合物質を7カラム容量（CV）の緩衝液Aで洗い流した。次に結合タンパク質を3セグメントの勾配（第1セグメント：3CV中に0～11%緩衝液B；第2セグメント：10CV中に11～30%緩衝液B；1.5CV中に30～50%緩衝液B）により溶出した。最後に、カラムを5CVの50%緩衝液Bで洗浄した。1mlの画分を回収し、合わせて8個のプールと流出液を生成した。導電率境界は以下とした：FT：導電率の上昇までのUV280上昇；1（導電率上昇開始～12mS）；2（12～15mS）；3（15～18mS）；4（18～21mS）；5（21～24mS）；6（24～27mS）；7（27～30mS）；8（30～40mS）。

20

30

40

【0026】

二次元電気泳動

画分を濃縮して、POROS20 R1材料（パーセプティブ・バイオシステムズ（PerSeptive Biosystems））100mgで充填した自動充填シリンジ駆動ミニカラム（MoBio Tec M1002）を用いる逆相クロマトグラフィーにより脱塩した。カラムを0.1%トリフルオロ酢酸（TFA）10ml及び70%アセトニトリル／0.1%TFAで洗浄した。試料を装填後、カラムを0.1%TFA 10mlで洗浄して、70%アセトニトリル／0.1%TFA 2mlで溶出した。次に溶出液をスピードヴァク（SpeedVac）エバポレーター中で乾燥して、IEF試料緩衝液（7M尿素、2Mチオ尿素、50mM トリス、pH7.5、2%（w/v）CHAPS、0.4%（w/v）ジチオエリトリール、0.5%

50

(w/v) 両性電解質) にとった。タンパク質 0.5 mg を含むアリコート を各画分からとっておき、試料 1 ~ 8 として標識した。画分の残りから以下の試料を調製した：試料 9 : 0.25 mg 画分 1 + 0.25 mg 画分 2 ; 試料 10 : 0.25 mg 画分 3 + 0.25 mg 画分 4 ; 試料 11 : 0.25 mg 画分 5 + 0.25 mg 画分 6 ; 試料 12 : 0.25 mg 画分 7 + 0.25 mg 画分 8 ; 試料 13 : 0.125 mg 画分 1 + 0.125 mg 画分 2 + 0.125 mg 画分 3 + 0.125 mg 画分 4 ; 試料 14 : 0.125 mg 画分 5 + 0.125 mg 画分 6 + 0.125 mg 画分 7 + 0.125 mg 画分 8 ; 試料 15 : 0.0625 mg 画分 1 + 0.0625 mg 画分 2 + 0.0625 mg 画分 3 + 0.0625 mg 画分 4 + 0.0625 mg 画分 5 + 0.0625 mg 画分 6 + 0.0625 mg 画分 7 + 0.0625 mg 画分 8。よって試料 1 ~ 8 は、タンパク質画分 0.5 mg を含み、試料 9 ~ 12 は、それぞれこれらの試料の 2 倍希釈に相当し、試料 13 及び 14 は、4 倍希釈に、そして試料 15 は、これら原画分の 8 倍希釈に相当する。等電点電気泳動は、20℃ のプロテアン IEF セル (Protean IEF Cell) (バイオラッド (BioRad)) 中で 3 ~ 10 の pH 範囲の固定化 pH 勾配 (IPG) ストリップ (IPG 3-10 L ; アマシャム) を用いて実行した。乾燥ストリップは、7 M 尿素、2 M チオ尿素、2 % (w/v) CHAPS、0.4 % (w/w) ジチオエリトリール、及び 0.5 % (w/v) 両性電解質を含む溶液に再水和した。このタンパク質画分をストリップの陰極末端にカップ装填した。電圧は、8 時間にわたり 5000 V まで直線的に上昇し、続いて 10 時間 5000 V で安定した。このストリップを、平衡化溶液 I (6 M 尿素、50 mM トリス pH 7.5、30 % グリセロール、2.0 % SDS、30 mM ジチオエリトリール) 及び平衡化溶液 II (6 M 尿素、50 mM トリス pH 8.8、30 % グリセロール、2.0 % SDS、0.23 M ヨードアセトアミド) 中でそれぞれ 10 分間連続洗浄することにより、平衡化及びアルキル化した。このストリップを 11 % アクリルアミド / PDA (37 : 1) 勾配ゲル (240 mm × 200 mm × 1.5 mm) に載せた。タンパク質は、常に冷却 (20℃) しながらの ETTAN Dalt 電気泳動装置 (アマシャム) で 80 V O/N の電気泳動により分離した。

10

20

【0027】

ゲル染色及び加工

ゲルは、50 % メタノール / 10 % 酢酸中で固定して、クーマシーブルー (コロイダル・ブルー (Colloidal Blue)、インビトロジェン、カールズバッド (Carlsbad)、カリフォルニア州) で一晩染色し、続いて超純水で合計 7 時間何回も洗浄した。ゲルを走査して、1.2 mm の直径を持つスポットを自動スポットピッキング装置を用いて切り出した。スポットは、100 mM 炭酸水素アンモニウム及び 30 % アセトニトリルを含む溶液中で脱染色した。乾燥した脱染色ゲル断片を 10 µg/ml トリプシン溶液 (ロシュ・ダイアグノスティクス) 5 µl 中で一晩室温で消化した。超純水 10 µl の添加後、タンパク質は、75 % アセトニトリル及び 0.3 % (v/v) TFA を含む溶液 5 µl で抽出した。このペプチド溶液を、MALDI 標的にマトリックスとしての α-シアノー 4-ヒドロキシケイ皮酸と一緒にスポットした。

30

【0028】

質量分析及びタンパク質同定

ペプチド質量は、ブルーカー・ウルトラフレックス測定器 (Bruker Ultraflex Instrument) (ブルーカー (Bruker)、ブレーメン、ドイツ) で、ACTH 及びブラジキニンを内部質量標準として使用して測定した。以下に説明されるように、モノアイソトピックペプチド質量は、質量スペクトルから自動検出して、タンパク質配列のデータベース (例えば、スイスプロット (SwissProt)、又は NCBI ラットゲノムドラフト) からの全てのタンパク質のコンピュータ内 (in-silico) トリプシン消化から誘導されるペプチドの理論質量と比較した。

40

【0029】

MALDI 質量スペクトルに関するピーク注釈

質量分析データは、測定器のベースラインを決定するために、低域中央パラメトリックスプラインフィルターで 2 回フィルターにかけた。ベースラインからの平滑化残差平均標

50

準偏差を、データにおける測定器ノイズレベルの推定値として使用した。

【0030】

ベースライン補正、及びノイズを超えるレベル座標におけるデータの修正後、ベースラインから最大偏差のデータ点を使用して、予想ペプチドピークを検出するための非線形 (Levenberg-Marquardt) データフィッティング手順の種を蒔いた。具体的には、このフィット手順は、ピーク高、分解能、及びモノアイソトピック質量によりパラメーター化された最良のフィッティングの平均理論ペプチド同位体分布を作り出すことを試みる。有意なフィットへの収斂は、シグマ値を追跡することにより常法で求められる。

【0031】

収斂の成功後、データ点の $1/3$ をランダム交換しての 16 回反復を用いるブートストラップ手順を利用して、求めたパラメーターの誤差を推定する。 10

【0032】

得られるフィットは、データから引き算して、フィット付近のノイズレベルを、外挿ノイズレベル及びピークフィットからの偏差の合計に調整し、そしてノイズのレベルを 5 倍を超えて上まわる候補ピークを見い出すことができるまで、次のピークを見い出すため、このプロセスを繰り返す。このプロセスは、50 を超えるデータピークが見い出されたら終わる。

【0033】

ゼロ次及び一次の質量への飛行時間の変換は、検出内部標準ピークからの直線外挿を用いて補正し、そしてモノアイソトピック質量値の信頼区間は、ピークと標準の質量の正確さから推定する。 20

【0034】

コンピュータ内タンパク質消化物へのスペクトルピークの確率的マッチング

質量スペクトルのピーク質量リストは、タンパク質全体の配列データベースについての理論消化物と直接比較する。各理論消化物について、 $[1 - \Pi(1 - NP(p_i))]^{cMatches}$ (ここで、N は、消化物中のペプチドの数であり、 $P(p_i)$ は、配列データベース中の全てのペプチドのカウントにより割ったピークのモノアイソトピック質量に関する信頼区間と一致するペプチドの数であり、そして $cMatches$ は、消化物と質量スペクトルの間の一致の数である) を計算する。この値は、消化物とスペクトルの間の擬陽性一致が得られる確率に比例することを証明することができる。確率値は、スペクトルピークから高い有意性で一致が得られるように更にフィルターにかける。同定の第 1 ラウンド後、同一条件下で獲得される質量スペクトルについての同定の偏差を使用することにより、質量への飛行時間の変換の第 2 及び第 3 次条件を補正する。得られる質量値は、ほぼ 10 ppm 未満の絶対偏差を持つ。次にこれらの質量値は、最終ラウンドのマッチングに使用するが、ここでは、 $0.01/NProteins$ (ボンフェローニ (Bonferroni) 補正による 1% 有意レベル) 未満の $Pmiss$ を持つ全ての一致が許容される。 30

【0035】

データベース分析

データベース中の各タンパク質について、本試験において分析した 2D-PAGE ゲル当たりの同定の数をカウントした。本実施例では、希釈レベル 1 を対照として設定した。次に、以下の値を導いた： 40

- ・ 希釈レベル 1 における同定の数 (非希釈試料、試料 1 ~ 8) = N_1
- ・ 希釈レベル 2 における同定の数 (2 倍希釈、試料 9 ~ 12) = N_2
- ・ 希釈レベル 3 における同定の数 (4 倍希釈、試料 13、14) = N_3
- ・ 希釈レベル 4 における同定の数 (8 倍希釈、試料 15) = N_4

【0036】

予想されるとおり、多くのタンパク質では N 値は、層から層へおおよそ 2 倍低下した。希釈係数を明らかにするために、及び各タンパク質についての大ざっぱな絶対量を導くために、定量値 q を以下のとおり計算した：

$$q = (N_1 + 2 \times N_2 + 4 \times N_3 + 8 \times N_4) / \text{全ての希釈レベルでの同一ソース} \quad 50$$

の全ての試料についての同定タンパク質スポットの総数

【0037】

同一ソースの全ての試料についての同定の総数で割ることは、タンパク質濃度における試料間変動を明らかにするために導入した。

【0038】

各タンパク質について、両方の混合試料（高及び低グルコース）の q 値を計算して比較した。

【0039】

以下の3種のタンパク質を、本定量方法の実行可能性の説明のための実施例として選択した：グリコーゲンホスホリラーゼ（肝臓型）；ビメンチン、及び熱ショックタンパク 105（表1、図3）。

【0040】

【表1】

	q (5mMグルコース) x 10 ⁻⁵	q (10 mMグルコース) x 10 ⁻⁵
グリコーゲンホスホリラーゼ		
実験 1	112	0
実験 2	8	0
実験 3	124	44
ビメンチン		
実験 1	0	2130
実験 2	80	305
実験 3	0	1758
熱ショックタンパク 105		
実験 1	17	13
実験 2	121	39
実験 3	200	89

【0041】

表1：3種の実施例タンパク質の3回の実験で得られたサイトゾル中に存在するタンパク質の相対量（q 値）

【0042】

実施例2：コラーゲンアルファ I（IV）

インスリン抵抗性患者3名とインスリン感受性患者3名（白人、女性）からの血清試料を後述のとおり分画した。肥満度指数（Body Mass Index）（BMI）と、オイグリセミック-高インスリン血症クランプ（Euglycemic-Hyperinsulinemic Clamp）方法（Garvey ら, Diabetes 34 (1985) 222-234）により求めたグルコース廃棄速度（Glucose Disposal Rate）（GDR）を表2に示す。組合せ連続希釈は、本特許出願に記載されるように実施して、生じた試料を後述のとおり二次元 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（2D-PAGE）に付した。検出可能なタンパク質スポット全てを各ゲルから切り出した。タンパク質をトリプシンで消化して、生じたペプチドをマトリックス支援レーザーイオン

10

20

30

40

50

化飛行時間質量分析（Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry）（MALDI-MS）に付した。タンパク質同定は、後述のようにペプチド質量指紋分析により実現し、そしてタンパク質リストを実施例1に記載されたように比較した。

【0043】

【表2】

患者	インスリン感受性 (IS)		患者	インスリン抵抗性 (IR)	
	BMI	GDR		BMI	GDR
IS1	22.4	21.9	IR1	31.3	10.2
IS2	22.4	19.7	IR2	33	11.65
IS3	29.5	20.4	IR3	33.1	8.0

10

【0044】

表2：被験者6名の肥満度指数（BMI）及びオイグリセミック高インスリン血症クランプ方法により求めたグルコース廃棄速度（GDR）。15を超えるGDRが、インスリン抵抗性の決定の区切点と考えられるため、パネルの左側の患者は、インスリン感受性（IS）として、そして右側はインスリン抵抗性（IR）として分類される。これらの個人からの血漿は、組合せ連続希釈と、続く2D-PAGE、スポット切り出し、トリプシン消化、MALDI-MSそして最終的にペプチド質量指紋比較法によるタンパク質同定によって分析した。

20

【0045】

試料調製

プロテオミクス技術を適用することにより、ヒト血漿中のインスリン抵抗性（Insulin Resistance）マーカーを探索するための方法を確立した。血漿は、約10個の高存在量タンパク質を含み、これらが、総タンパク質量の約98%に相当するため、プロテオミクス技術により分析することが困難である。高存在量タンパク質である、アルブミンと抗体鎖は、クロマトグラフィー法を適用することにより除去して、流出画分をイオン交換体で分画した。説明したスキームは、3つのクロマトグラフィー工程のマトリックスブルー、プロテインG及びイオン交換を含み、そして再現性が高い。全てのクロマトグラフィー工程は、FPLCシステム（ファルマシア（Pharmacia））で実行した。

30

【0046】

ミメティックブルー（Mimetic blue）での親和性クロマトグラフィーによるアルブミンの除去及びプロテインGでの親和性クロマトグラフィーによるイムノグロブリンの除去

ヒト血漿を、対照となる個人3名及びII型糖尿病の患者3名から採取した。プロテアーゼインヒビターカクテル（ロシュ・ダイアグノスティクス、マンハイム、ドイツ）を血漿に加えた（50mlに1錠）。血漿は、25mM MES、pH6.0で3倍希釈することにより塩濃度を低下させ、pHを約6.0に調整した。2つのカラム、ミメティックブルーSAP6XL（50ml、プロメティック・バイオサイエンスーズ社（ProMetic BioSciences Ltd.））及びハイトラップ・プロテインG HP（HiTrap Protein G HP）（5ml、アマシャム・バイオサイエンスーズ（Amersham Biosciences））を連続してつなぎ、25mM MES、pH6.0で平衡化した。血漿タンパク質約1gに対応する容量（15ml、66mg/ml）を0.22μmフィルターにより濾過して、ミメティックブルーカラムに5ml/分で適用した。このカラムの流出液が直接プロテインGカラムに載るため、後のカラムからの流出画分を集めた（約120mg）。2つのカラムを25mM MES、pH6.0 100mlで洗浄し、次にこれらを分離した。ミメティックブルーカラムは、50mM トリス-HCl、pH7.5中の2M NaClの段階的勾配で溶出し、プロテインGは、10

40

50

0 mMグリシン-HCl、pH 2.8で溶出し、そして溶出液は1 Mトリス塩基で中和した。流出画分と2つの溶出液は、二次元ゲルにより分析して、タンパク質はMALDI-MSにより同定した。ミメティックブルーからの溶出液では、主として完全長及び断片化アルブミンを検出した。プロテインGカラムからの溶出液では、主として重鎖及び軽鎖Ig鎖を検出した。他の血漿タンパク質の多くは、流出画分中に回収した。

【0047】

イオン交換クロマトグラフィーによるタンパク質分画

ミメティックブルー及びプロテインGカラムからの流出及び洗浄画分を合わせて、2 Mトリス塩基でpH 8.0に調整し、ハイトラップQ HPカラム (HiTrap Q HP column) (5 ml、アマシャム・バイオサイエンス) に適用して、50 mMトリス-HCl、pH 8.0で5 ml/分で平衡化した。このカラムを、50 mMトリス-HCl、pH 7.5中の0~1 M NaClの上昇塩濃度の直線勾配で溶出した。5 ml画分を回収して、1-Dゲルにより分析した。総タンパク質約50 mgをこのカラムから回収した。ゲル分析に基づいて、画分をプールすることにより、各プールが総タンパク質約5 mgを含むように、8個のプールを形成した。このプールをウルトラフリー-15遠心分離フィルター (Ultrafree-15 Centrifugal Filter) (5 kMWC O、ミリポア (Millipore)) で濃縮して、8個のプールのそれぞれを2-Dゲルにより分析した。各ゲルから約400スポットを切り出して、MALDI-MSにより分析した。

【0048】

2D-PAGE

固定化pH勾配 (IPG) ストリップは、アマシャム・バイオサイエンス (ウプサラ、スウェーデン) から購入した。アクリルアミドは、バイオソルブ (Biosolve) (ファルケンスワード (Valkenswaard)、オランダ) から入手し、そしてポリアクリルアミドゲル調製のための他の試薬は、バイオラッド・ラボラトリーズ (Bio-Rad Laboratories) (ハーキュリーズ (Hercules)、カリフォルニア州、米国) から入手した。CHAPSはロシュ・ダイアグノスティクス (マンハイム、ドイツ) から、尿素はアプリケム (Appliehm) (ダルムシュタット (Darmstadt)、ドイツ) から、チオ尿素はフルカ (Fluka) (ブックス (Buchs)、スイス) から、そしてジチオエリトリールはメルク (Merck) (ダルムシュタット) から入手した。

【0049】

総タンパク質0.5 mgの試料を、試料カップ中その塩基性及び酸性末端で3-10 N L IPGストリップに適用した。等電点電気泳動は200 Vで開始し、電圧は、コンピュータ制御電源を用いて3 V/分で5000 Vまで徐々に上昇させて、更に6時間一定に保持した。第2の次元の分離は、12%一定SDSポリアクリルアミドゲル (180×200×1.5 mm) 上でゲル当たり40 mAで実行した。5%リン酸を含む40%メタノール中で12時間のタンパク質固定後、ゲルはコロイド状クーマシーブルー (ノーベックス (Novex)、サンジエゴ、カリフォルニア州、米国) で24時間染色した。過剰の染料は、H₂Oでゲルから洗浄し、そしてゲルは、アグファ・デュオスキャン (Agfa DUOSCAN) デンシトメータ (分解能400) で走査した。ゲルの電子画像をフォトショップ (Photoshop) (アドビ (Adobe)) ソフトウェアで記録した。画像は、tiff (約5 Mバイト/ファイル) 及びjpeg (約50 Kバイト/ファイル) フォーマットで保存した。ゲルは、MS分析に使用するまで4°Cに保持した。

【0050】

MALDI-MS

選択した1.2 mm直径のスポットを、手製のスポットピッカー (ヨーロッパ特許出願EP 1,384,994に記載) で切り出し、96 ウェルマイクロタイタープレートに入れて、各ゲル片を、サイバイ (登録商標) -ウェル (CyBiTM-Well) 装置 (サイバイオ社 (Cybio AG)、イエーナ (Jena)、ドイツ) 中で50 mM重炭酸アンモニウム中の30%アセトニトリル100 µlにより脱染色した。脱染色後、ゲル片をH₂O 100 µlで5分間洗浄し、スピードヴァク (speedvac) エバポレーター中で加熱することなく45分間乾燥した。各乾燥

10

20

30

40

50

ゲル片は、トリプシン（ロシュ・ダイアグノスティクス、マンハイム、ドイツ）50 ngを含む1 mM重炭酸アンモニウム5 μ lで再水和した。室温で16時間後、0.3%トリフルオロ酢酸を含む50%アセトニトリル20 μ lを各ゲル片に加えた。ゲル片は、絶えず振盪しながら15分間インキュベートした。ペプチド混合物（1.5 μ l）は、0.025% α -シアノー-4-ヒドロキシケイ皮酸（シグマ（Sigma））からなり、かつ標準ペプチドの脱A r g-ブラジキニン（シグマ、20 nM、904.4681 Da）及び副腎皮質刺激ホルモン断片18~39（シグマ、20 nM、2465.1989 Da）を65%エタノール、32%アセトニトリル、及び0.03%トリフルオロ酢酸中に含むマトリックス溶液1 μ lと同時に、アンカーチップ（AnchorChip）（登録商標）に適用した。試料の適用は、サイバイーウェル装置により実行した。試料は、飛行時間質量分析機（ウルトラフレックス（Ultraflex）TOF-TOF、ブルーカー・ダルトニクス（Bruker Daltonics））でリフレクトロンモードで分析した。20 kVの加速電圧を使用した。タンパク質は、ペプチド-質量マッチングに基づいて同定した。

【0051】

MALDI 質量スペクトルのピーク注釈

質量分析データは、測定器のベースラインを決定するために、低域中央パラメトリックスプラインフィルターで2回フィルターにかける。ベースラインからの平滑化残差平均標準偏差を、データにおける測定器ノイズレベルの推定値として使用する。ベースライン補正、及びノイズを超えるレベル座標におけるデータの修正後、ベースラインから最大偏差のデータ点を使用して、予想ペプチドピークを検出するための非線形（Levenberg-Marquardt）データフィッティング手順の種を蒔いた。具体的には、このフィット手順は、ピーク高、分解能、及びモノアイソトピック質量によりパラメーター化された最良のフィッティングの平均理論ペプチド同位体分布を作り出すことを試みる。有意なフィットへの収斂は、シグマ値を追跡することにより常法で求められる。収斂の成功後、データ点の1/3をランダム交換しての16回反復を用いるブートストラップ手順を利用して、求めたパラメーターの誤差を推定する。得られるフィットは、データから引き算して、フィット付近のノイズレベルを、外挿ノイズレベル及びピークフィットからの偏差の合計に調整し、そしてノイズのレベルを5倍を超えて上まわる候補ピークを見い出すことができるまで、次のピークを見い出すため、このプロセスを繰り返す。このプロセスは、50を超えるデータピークが見い出されたら終える。ゼロ次及び一次の質量への飛行時間の変換は、検出内部標準ピークからの直線外挿を用いて補正し、そしてモノアイソトピック質量値の信頼区間は、ピークと標準の質量の正確さから推定する。

【0052】

コンピュータ内タンパク質消化物へのスペクトルピークの確率的マッチング

質量スペクトルのピーク質量リストは、タンパク質全体の配列データベースについての理論消化物と直接比較する。各理論消化物について、 $[1 - \Pi(1 - NP(p_i))]^{cMatches}$ （ここで、Nは、理論消化物中のペプチドの数であり、 $P(p_i)$ は、配列データベース中の全てのペプチドのカウントにより割ったピークのモノアイソトピック質量に関する信頼区間と一致するペプチドの数であり、そして $cMatches$ は、消化物と質量スペクトルの間の一致の数である）を計算する。この値は、消化物とスペクトルの間の擬陽性一致が得られる確率に比例することを証明することができる。確率値は、スペクトルピークから高い有意性で一致が得られるように更にフィルターにかける。同定の第1ラウンド後、同一条件下で獲得される質量スペクトルについての同定の偏差を使用することにより、質量への飛行時間の変換の第2及び第3次の条件を補正する。得られる質量値は、ほぼ10 ppm未満の絶対偏差を持つ。次にこれらの質量値は、最終ラウンドのマッチングに使用するが、ここでは、 $0.01 / NProteins$ （ボンフェローニ補正による1%有意レベル）未満の P_{miss} を持つ全ての一致が許容される。

【0053】

結果

コラーゲンアルファ I（IV）（コラーゲンIV；スイスプロット（Swissprot）アクセッ

10

20

30

40

50

ション番号 P 1 2 1 0 9 ; O 0 0 1 1 7 ; O 0 0 1 1 8 ; Q 1 4 0 4 0 ; Q 1 4 0 4 1 ; Q 1 6 2 5 8) は、専らインスリン抵抗性患者 2 名 (I R 2 及び I R 3、表 3 を参照のこと) において検出された。1 名の患者 (I R 2) では、スポットは第 2 レベル (2 倍希釈試料) で検出されたが、一方第 2 の患者 (I R 3) では、タンパク質は、第 4 レベル (8 倍組合せ希釈) で 2 回検出された。同定のは、希釈係数と共に増加し (この場合には、それぞれ 1 と 4)、そしてそれぞれ試料で同定されたタンパク質スポットの総数について補正した。

【 0 0 5 4 】

コラーゲン IV レベルはまた、免疫検定法 (バイオトリン (Biotrin) コラーゲン IV E I A ; カタログ番号 B I O 8 2 ; バイオトリン (Biotrin) 、ダブリン、アイルランド) を供給業者のプロトコールにより使用することによって測定した。2 つの検定法からの結果は、表 3 において比較する。

【 0 0 5 5 】

【表 3】

患者	IS1	IS2	IS3	IR1	IR2	IR3
組合せ連続希釈	0	0	0	0	10	1
コラーゲン IV EIA (ng/ml)	108	111	139	86	208	158

【 0 0 5 6 】

表 3 : 組合せ連続希釈からの結果と免疫検定法からの結果との比較。

I S = インスリン感受性患者、I R = インスリン抵抗性患者。

組合せ連続希釈 : 同定のは、希釈係数と総スポットカウントについて調整した。

免疫検定法 (コラーゲン IV E I A) : コラーゲン IV レベルは、バイオトリン・コラーゲン IV E I A により測定した。与えられた結果は、二重反復測定の平均である。

【 0 0 5 7 】

記載されたプロテオミクス方法論の検出の限界は、約 1 5 0 ng/ml の免疫検定法の限界を上まわる。このレベルより上で、タンパク質を検出することができ、記載された同定方法と対にした組合せ連続希釈により粗く定量することができる。絶対定量化は観察されていないが、幾つかの順位相関が存在する、即ち、最高レベルと 2 番目に高いレベルの試料が正しく同定された。

【 0 0 5 8 】

プロテオミクス型大規模タンパク質同定と組合せた、組合せ連続希釈法は、並行して数百のタンパク質を定量するための、及び (例えば、バイオマーカーの同定研究のために) ディファレンシャルタンパク質発現分析において使用することができる、濃度が顕著に異なるタンパク質を同定するための、効率的な手段である。

【 0 0 5 9 】

本発明の実施態様は以下のとおりである。

1. 生体分子の複合混合物中のある生体分子の定量方法であって、
 - a. それぞれ少なくとも 1 つの識別できる成分を含む、生体分子の混合物の分画の少なくとも 2 つの画分を用意すること、
 - b. 画分を組合せ連続希釈に付すこと、
 - c. 各原画分及び各希釈画分中の生体分子を、感度閾値及び同一性情報を提供する方法により、検出及び同定すること、並びに
 - d. それぞれの希釈係数を考慮して各希釈レベルで各画分中の生体分子の同定の数を集約することにより、複合混合物中の生体分子を定量することを含む方法。
2. d) の合計を、全ての希釈レベルでの全ての画分中の全ての生体分子の同定の総数で割る、上記 1 の方法。

3. a) の画分の数、生体分子の混合物の複雑さに依存する、上記 1 又は 2 の方法。
4. a) の画分の数、生体分子の複合混合物中の異なる生体分子の濃度に依存する、上記 1 ～ 2 のいずれか 1 の方法。
5. a) の画分の数、c) の検出及び同定方法に依存する、上記 1 ～ 2 のいずれか 1 の方法。
6. b) の希釈レベルの数、画分中の生体分子の出発濃度に依存する、上記 1 ～ 5 のいずれか 1 の方法。
7. b) の希釈レベルの数、分画後の画分の数に依存する、上記 1 ～ 5 のいずれか 1 の方法。
8. b) の希釈レベルの数、検出及び同定方法の検出限界に依存する、上記 1 ～ 5 のいずれか 1 の方法。 10
9. 生体分子が、 $(n - 1)$ 個以下の画分に存在する（ここで、 n は、画分の総数であり、かつ n は、2 以上である）、上記 1 ～ 8 のいずれか 1 の方法。
10. 生体分子が、2 つの画分に存在する、上記 1 ～ 8 のいずれか 1 の方法。
11. 生体分子が、1 つの画分に存在する、上記 1 ～ 8 のいずれか 1 の方法。
12. c) の検出及び同定方法が、二次元ゲル電気泳動を含む、上記 1 ～ 11 のいずれか 1 の方法。
13. c) の検出及び同定方法が、更に質量分析を含む、上記 12 の方法。
14. c) の検出及び同定方法が、免疫検定法を含む、上記 1 ～ 11 のいずれか 1 の方法。 20
15. c) の検出及び同定方法が、質量分析と組合せたガスクロマトグラフィーを含む、上記 1 ～ 11 のいずれか 1 の方法。
16. c) の検出及び同定方法が、特異的に標識した分子の実体による電気泳動を含む、上記 1 ～ 11 のいずれか 1 の方法。
17. a) の画分が、クロマトグラフィー分画法、超遠心分離法、タンパク質沈降法、又は免疫沈降法により分離される、上記 1 ～ 16 のいずれか 1 の方法。
18. 生体分子が、ポリペプチドである、上記 1 ～ 17 のいずれか 1 の方法。
19. 生体分子が、ポリヌクレオチドである、上記 1 ～ 17 のいずれか 1 の方法。
20. 生体分子が、炭水化物である、上記 1 ～ 17 のいずれか 1 の方法。
21. 生体分子が、脂質である、上記 1 ～ 17 のいずれか 1 の方法。 30
22. 生体分子が、糖タンパク質である、上記 1 ～ 17 のいずれか 1 の方法。
23. 生体分子が、リポタンパク質である、上記 1 ～ 17 のいずれか 1 の方法。

【図面の簡単な説明】

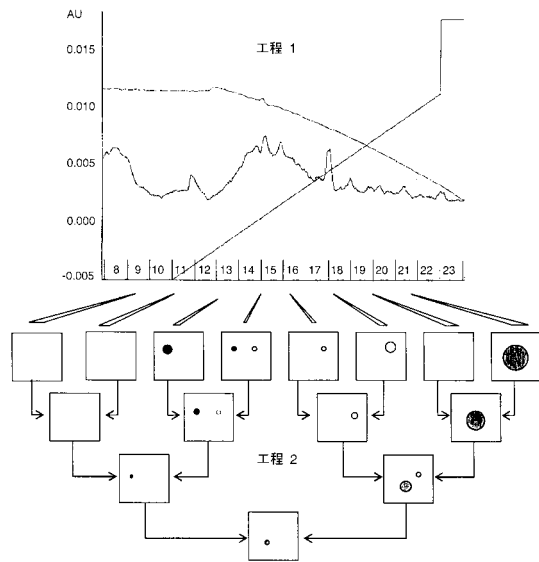
【0060】

【図1】本発明の方法を示す。

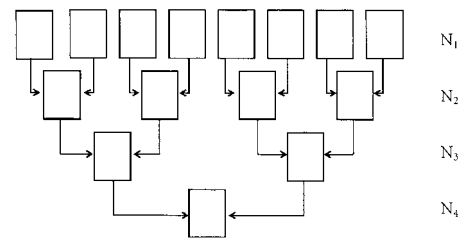
【図2】生体分子の相対量の計算を示す。

【図3】タンパク質、グリコーゲンホスホリラーゼ (a)、ビメンチン (b) 及び熱ショックタンパク 105 (c) に関する同定の数を示す。

【図 1】

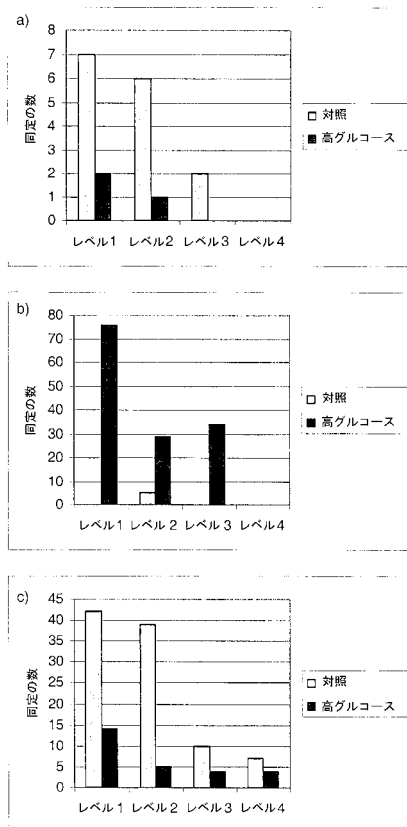


【図 2】



$$q = \frac{\sum (d_i \times N_i)}{N_{\text{total}}}$$

【図 3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

G 0 1 N 33/50 (2006.01)

G 0 1 N 33/483

F

G 0 1 N 33/566 (2006.01)

G 0 1 N 33/483

Z

G 0 1 N 33/68 (2006.01)

G 0 1 N 33/50

P

G 0 1 N 33/566

G 0 1 N 33/68

(72)発明者 シュテファン・エヴァース

ドイツ国、デー-7 9 3 7 9 ミュルハイム、パウラーヘレンヴェッガー-シュトラッセ 2 3

(72)発明者 ハノー・ランゲン

ドイツ国、デー-7 9 5 8 5 シュタイネン、イム・ヴェルフィッッシュビュール 2 7 / 4

審査官 竹中 靖典

(56)参考文献 特開平0 4-2 8 2 3 2 3 (J P, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 33 / 4 8

G 0 1 N 27 / 4 4 7

G 0 1 N 27 / 6 2

G 0 1 N 30 / 7 2

G 0 1 N 33 / 4 8 3

G 0 1 N 33 / 5 0

G 0 1 N 33 / 5 6 6

G 0 1 N 33 / 6 8