

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5688829号
(P5688829)

(45) 発行日 平成27年3月25日(2015.3.25)

(24) 登録日 平成27年2月6日(2015.2.6)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Z N A D
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z
GO 1 N 27/62 (2006.01)	GO 1 N 27/62 V

請求項の数 53 (全 108 頁)

(21) 出願番号 特願2007-544210 (P2007-544210)	(73) 特許権者 596156174 吉川 敏一 京都府宇治市菟道荒槇1-5-1
(86) (22) 出願日 平成18年11月10日(2006.11.10)	
(86) 国際出願番号 PCT/JP2006/322506	(73) 特許権者 303058708 株式会社バイオマーカーサイエンス 京都府京都市左京区田中門前町103番地の5
(87) 国際公開番号 W02007/055341	
(87) 国際公開日 平成19年5月18日(2007.5.18)	(74) 代理人 100078282 弁理士 山本 秀策
審査請求日 平成21年10月21日(2009.10.21)	
(31) 優先権主張番号 特願2005-327243 (P2005-327243)	(74) 代理人 100062409 弁理士 安村 高明
(32) 優先日 平成17年11月11日(2005.11.11)	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	(74) 代理人 100113413 弁理士 森下 夏樹
(31) 優先権主張番号 特願2006-187238 (P2006-187238)	(72) 発明者 吉川 敏一 京都府宇治市菟道荒槇1-5-1
(32) 優先日 平成18年7月6日(2006.7.6)	最終頁に続く
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	

(54) 【発明の名称】 示差的な糖尿病の予知・診断方法および糖尿病予知・診断用キット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

被験体由来のサンプル中のマーカー物質を選択的に認識する手段を含む、被験体が糖尿病であるかどうか事前診断または診断するためのシステムであって、該マーカー物質は、トランスサイレチンおよびトランスサイレチン誘導体のうち少なくとも1種を含み、該認識する手段は、トランスサイレチンとトランスサイレチン誘導体とを識別する能力を有する、システム。

【請求項2】

前記システムは、前記マーカー物質に特異的に相互作用する因子をさらに備え、該因子は、核酸分子、タンパク質、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される、請求項1に記載のシステム。

【請求項3】

前記因子は、抗体である、請求項2に記載のシステム。

【請求項4】

前記因子は、標識されるか、または標識可能である、請求項2に記載のシステム。

【請求項5】

前記手段は、質量分析装置、核磁気共鳴測定装置、X線解析装置、SPR、クロマトグラフィ、免疫学的手段、生化学的手段、電気泳動機器、化学的分析機器、蛍光二次元ディファレンシャル電気泳動法、同位体標識法、タンデムアフィニティ精製法、物理学的手段、レーザーマイクロダイセクションおよびこれらの組み合わせからなる群より選択される

、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 6】

さらに、前記マーカ物質の標準を含む、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 7】

さらに、前記サンプルを精製する手段を備える、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 8】

前記被験体は、哺乳動物を含む、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 9】

前記被験体は、齧歯類を含む、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 10】

前記被験体は、ヒトを含む、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 11】

前記手段は、前記マーカ物質の定量をする能力を有する、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 12】

前記マーカ物質の定量を行うための定量手段をさらに備える、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 13】

前記定量手段は、標準曲線と測定結果とを比較して前記マーカ物質が正常値の範囲内かどうかを判定する判定手段を含む、請求項 12 に記載のシステム。

【請求項 14】

前記判定手段は、コンピュータである、請求項 13 に記載のシステム。

【請求項 15】

マーカ物質に特異的に相互作用する因子を含む被験体が糖尿病であるかどうか事前診断または診断するための組成物であって、該マーカ物質は、トランスサイレチンおよびトランスサイレチン誘導体のうち少なくとも 1 種を含み、該因子は、トランスサイレチンとトランスサイレチン誘導体とを識別する能力を有する抗体である、組成物。

【請求項 16】

前記トランスサイレチン誘導体は、S - システニルトランスサイレチン、グルタチオン化トランスサイレチン、S - S 結合形成トランスサイレチン、酸化トランスサイレチン、ホルミル化トランスサイレチン、アセチル化トランスサイレチン、リン酸化トランスサイレチン、糖鎖付加トランスサイレチン、ミリスチル化トランスサイレチンおよびこれらの複合誘導体からなる群より選択される、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 17】

前記トランスサイレチン誘導体は、S - システニルトランスサイレチンである、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 18】

前記トランスサイレチン誘導体は、S - システニルトランスサイレチンであり、前記認識する手段は抗体である、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 19】

前記手段は、トランスサイレチンとトランスサイレチン誘導体とに対して示差的に反応する、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 20】

前記手段は、トランスサイレチンまたはトランスサイレチン誘導体のいずれか一方としか実質的に反応しない、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 21】

前記トランスサイレチンの減少および前記トランスサイレチン誘導体の増加からなる群より選択される少なくとも 1 つの現象が、糖尿病を発症しているか、または将来の発症リスクが高いことの指標である、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 22】

前記トランスサイレチンの減少および前記トランスサイレチン誘導体の増加からなる群

10

20

30

40

50

より選択される少なくとも1つの現象が、糖尿病の進展の程度、または将来の発症リスクの高さの指標となる、請求項1に記載のシステム。

【請求項23】

前記トランスサイレチンは、配列番号1もしくは配列番号3に示される核酸配列によってコードされるか、または配列番号2もしくは配列番号4に示されるアミノ酸配列を有するか、配列番号2もしくは配列番号4に示されるアミノ酸配列の先頭の20アミノ酸が切除されたアミノ酸配列を有するか、あるいは、これらの改変配列を有する、請求項1に記載のシステム。

【請求項24】

前記トランスサイレチン誘導体は、配列番号1もしくは配列番号3に示される核酸配列によってコードされるアミノ酸配列、または配列番号2もしくは配列番号4に示されるアミノ酸配列における、それぞれ、30位のシステインまたはそれに対応するシステインのシステインがシステイニル化されている誘導体であるか、または、配列番号2もしくは配列番号4に示されるアミノ酸配列における、それぞれ、30位のシステインまたはそれに対応するシステインのシステインがシステイニル化されている誘導体の先頭の20アミノ酸が切除されたものである、請求項1に記載のシステム。

10

【請求項25】

前記手段は、トランスサイレチンの単量体と四量体との区別をする能力を有する、請求項1に記載のシステム。

【請求項26】

前記手段は、トランスサイレチンとS-システイニルトランスサイレチンとの区別をする能力を有する、請求項1に記載のシステム。

20

【請求項27】

前記手段は、トランスサイレチンとS-システイニルトランスサイレチンとの区別をする能力を有する抗体を含む、請求項1に記載のシステム。

【請求項28】

前記手段は、トランスサイレチンとS-システイニルトランスサイレチンとを認識し、かつ、前記システムはトランスサイレチンとS-システイニルトランスサイレチンとを識別する手段をさらに備える、請求項1に記載のシステム。

【請求項29】

前記手段は、トランスサイレチンとS-システイニルトランスサイレチンとを認識し、前記システムはトランスサイレチンの分子量とS-システイニルトランスサイレチンの分子量とを識別する手段、およびトランスサイレチンとS-システイニルトランスサイレチンとの相対比を測定する手段をさらに備える、請求項1に記載のシステム。

30

【請求項30】

マーカー物質に特異的に相互作用する因子を含む被験体が糖尿病であるかどうか事前診断または診断するための診断薬であって、該マーカー物質は、トランスサイレチンおよびトランスサイレチン誘導体のうち少なくとも1種を含み、該因子は、トランスサイレチンとトランスサイレチン誘導体とを識別する能力を有する抗体である、診断薬。

【請求項31】

被験体が糖尿病であるかどうか事前に検出もしくは検出するため、または該事前診断もしくは診断を支援するために、該被験体由来のサンプル中のマーカー物質を測定する方法であって、

40

該方法は、

A) 該被験体由来のサンプル中のマーカー物質を測定し、トランスサイレチンとトランスサイレチン誘導体とを識別する工程；および

B) 該測定結果から、該被験体が糖尿病またはその可能性があるかどうかを決定する工程、

を包含し、

該マーカー物質は、トランスサイレチンおよびトランスサイレチン誘導体のうち少なく

50

とも1種を含む、
方法。

【請求項32】

前記トランスサイレチンの減少および前記トランスサイレチン誘導体の増加からなる群より選択される少なくとも1つの現象が、糖尿病を発症しているか、または将来の発症リスクが高いことの指標である、請求項31に記載の方法。

【請求項33】

前記トランスサイレチンの減少および前記トランスサイレチン誘導体の増加からなる群より選択される少なくとも1つの現象が、糖尿病の進展の程度、または将来の発症リスクの高さの指標となる、請求項31に記載の方法。

10

【請求項34】

被験体由来のサンプル中のマーカー物質を選択的に認識する手段の、被験体が糖尿病であるかどうか事前診断または診断するための医薬の製造における、使用であって、該マーカー物質は、トランスサイレチンおよびトランスサイレチン誘導体のうち少なくとも1種を含み、該認識する手段は、トランスサイレチンとトランスサイレチン誘導体とを識別する能力を有する、使用。

【請求項35】

前記トランスサイレチンの減少および前記トランスサイレチン誘導体の増加からなる群より選択される少なくとも1つの現象が、糖尿病を発症しているか、または将来の発症リスクが高いことの指標である、請求項34に記載の使用。

20

【請求項36】

前記トランスサイレチンの減少および前記トランスサイレチン誘導体の増加からなる群より選択される少なくとも1つの現象が、糖尿病の進展の程度、または将来の発症リスクの高さの指標となる、請求項34に記載の方法。

【請求項37】

被験体由来のサンプル中のマーカー物質を選択的に認識する手段の、被験体が糖尿病であるかどうか事前診断または診断するための使用であって、該マーカー物質は、トランスサイレチンおよびトランスサイレチン誘導体のうち少なくとも1種を含み、該認識する手段は、トランスサイレチンとトランスサイレチン誘導体とを識別する能力を有する、使用。

30

【請求項38】

前記トランスサイレチンの減少および前記トランスサイレチン誘導体の増加からなる群より選択される少なくとも1つの現象が、糖尿病を発症しているか、または将来の発症リスクが高いことの指標である、請求項37に記載の使用。

【請求項39】

前記トランスサイレチンの減少および前記トランスサイレチン誘導体の増加からなる群より選択される少なくとも1つの現象が、糖尿病の進展の程度、または将来の発症リスクの高さの指標となる、請求項37に記載の使用。

【請求項40】

前記サンプルは、血液であることを特徴とする請求項31に記載の方法。

40

【請求項41】

前記サンプルを、前記マーカー物質に対する親和性を有する物質を固定化した担体に接触させて、体液中の前記マーカー物質を担体上に捕捉し、捕捉された前記マーカー物質の量に基づいて体液中の前記マーカー物質の濃度を算出することを特徴とする請求項31に記載の方法。

【請求項42】

前記担体は平面部分を有し、前記マーカー物質に対する親和性を有する物質は、該平面部分の一部に固定化されていることを特徴とする請求項41に記載の方法。

【請求項43】

前記マーカー物質に対する親和性を有する物質は、イオン交換体、金属キレート体また

50

は抗体であることを特徴とする請求項 4 1 または 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

被検物質が有する糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を評価することを特徴とする物質の評価方法であって、

a) 糖尿病を発症している非ヒト動物または将来の発症リスクが高い非ヒト動物に被験物質を摂取させる工程；および

b) 該非ヒト動物の体液中におけるマーカー物質の少なくとも 1 つの濃度を基準値と比較し、被検物質が有する糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を評価する工程であって、該マーカー物質は、トランスサイレチンおよびトランスサイレチン誘導体のうち少なくとも 1 種を含む、工程、
を包含する、方法。

10

【請求項 4 5】

前記トランスサイレチンの減少および前記トランスサイレチン誘導体の増加からなる群より選択される少なくとも 1 つの現象が、糖尿病を発症しているか、または将来の発症リスクが高いことの指標である、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記トランスサイレチンの減少および前記トランスサイレチン誘導体の増加からなる群より選択される少なくとも 1 つの現象が、糖尿病の進展の程度、または将来の発症リスクの高さの指標となる、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記基準値は、糖尿病を発症している非ヒト動物または将来の発症リスクが高い非ヒト動物に、糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を有さない既知物質を摂取させた際の、該非ヒト動物の体液中における前記マーカー物質の濃度であることを特徴とする請求項 4 4 に記載の方法。

20

【請求項 4 8】

前記体液は、血液であることを特徴とする請求項 4 4 ~ 4 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記被検物質は、食品素材であることを特徴とする請求項 4 4 ~ 4 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 5 0】

前記体液または体液成分を、前記マーカー物質に対する親和性を有する物質を固定化した担体に接触させて、体液中の前記マーカー物質を担体上に捕捉し、捕捉された前記マーカー物質の量に基づいて体液中の前記マーカー物質の濃度を算出することを特徴とする請求項 4 4 ~ 4 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 1】

前記担体は平面部分を有し、前記マーカー物質に対する親和性を有する物質は、該平面部分の一部に固定化されていることを特徴とする請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記マーカー物質に対する親和性を有する物質は、イオン交換体、金属キレート体または抗体であることを特徴とする請求項 5 0 または 5 1 に記載の方法。

40

【請求項 5 3】

請求項 4 4 ~ 5 2 のいずれかに記載の物質の評価方法によって被検物質を評価し、糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を有する物質をスクリーニングすることを特徴とする物質のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、疾病の事前診断および診断のための方法、物質の評価方法、および物質のスクリーニング方法に関し、さらに詳細には、被検者の体液中におけるマーカー物質の濃度

50

を指標として、糖尿病の有無または将来の発症リスクを判定（事前診断）する疾病の診断方法、糖尿病を発症している動物または将来の発症リスクが高い動物に被験物質を摂取させ、該動物の体液中におけるマーカー物質の濃度を指標として、被験物質が有する糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を評価する物質の評価方法、および、該評価方法を用いて糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を有する物質をスクリーニングする物質のスクリーニング方法、に関する。

【0002】

本発明は、血液中のマーカー物質の濃度を測定し、その値を健常値と比較する糖尿病の診断方法、および糖尿病の診断に用いるためのキットに関する。

【0003】

本発明は、特に、健常者に見出されるマーカー物質と罹患者に見出されるマーカー物質とを示差的に識別することができる手段に関する。

【背景技術】

【0004】

近年、食生活の欧米化が進み、それに起因すると考えられる肥満，糖尿病，動脈硬化等の生活習慣病が増加している。これらの発症増加は遺伝的なものではなく、主に環境因子によるものである。例えば、高脂肪食や高カロリー食の摂取による脂質代謝異常が、血中脂質上昇、インスリン抵抗性の発症、脂肪細胞肥大化、インスリン分泌不全等の原因となっている。その結果、糖尿病、肥満、動脈硬化等が高確率で発症し、病態の進展へとつながっている。これらの生活習慣病の中でも糖尿病は、知覚麻痺、失明、動脈硬化等との合併症を引き起こすことも多く、日常生活に多大な障害をもたらす病気として特に問題視されている。

【0005】

糖尿病はインスリンの作用不足による高血糖が引き起こす複合疾患である。糖尿病は1型と2型に分類される。1型糖尿病は、膵臓のランゲルハンス島が炎症を起こした結果、インスリン分泌能が低下または枯渇してしまい、高血糖に至るものである。一方、2型糖尿病はそれ以外の原因によってインスリンの作用不足が起こり、高血糖に至るものである。この2型糖尿病は日本人の糖尿病の大部分を占めるものであり、特に問題視されている。2型糖尿病の発病メカニズムはまだ不明の点があるが、主に環境因子が引き金になって発病するとされ、過食や肥満が大きな原因の一つである。例えば、肥満のために膵臓のインスリン分泌量が激増した結果、膵臓が疲労して逆にインスリン分泌量が減少し、結局インスリンの作用不足となり高血糖となる。あるいは、脂肪の増加によってインスリン受容体が減少し、その結果、インスリンの作用不足となり高血糖となる。一方、逆に、インスリンの作用不足から生まれる余剰のグルコースが脂肪となって蓄えられて肥満が進むこともあり、糖尿病はその発症メカニズムにおいて肥満と密接に関係している。また、2型糖尿病は発症初期に自覚症状がないことが多く、発見時にはかなり進行していて治療が困難となることもある。すなわち、2型糖尿病の予備軍は相当に多いと予想される。

【0006】

現在、糖尿病の診断に用いられている臨床検査項目としては、尿糖、空腹時血糖、ヘモグロビンA1c（HbA1c）、血中インスリン値、血中・尿中C-ペプチド値（CPR）などがある。その他、グルコースを経口摂取した後の血中グルコース濃度をモニターし、そのクリアランス能力をみる経口グルコース負荷試験（OGTT）も行われている。また、新たな臨床マーカーの例としては、血中レチノイン酸が提案されている（特許文献1）。

【0007】

しかし、インスリンの増減は、必ずしも糖尿病の明確な指標にならない。そこで、このほかに、遺伝子産物として有用な糖尿病のマーカー、特に、事前診断が可能なマーカーの報告はこれまでになされていない。

【0008】

また、ヒトは他因子の病態が絡み合っているが、因子が純粋なモデル動物で同様の診断

10

20

30

40

50

指標となるかどうかは不明である。

【0009】

また、健常者に見出されるマーカー物質と罹患者に見出されるマーカー物質とを示差的に識別することができる手段はいまだに提供されていない。

【特許文献1】特開2004-163379号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

2型糖尿病のように発症初期に自覚症状が少ない疾患の場合は、予防をすることが特に大事である。そのためには、糖尿病の発症前の段階を検出する、いわゆる事前診断の技術が必要である。そうすれば、糖尿病が発症する前に食事制限や運動等の処置を行うことができ、糖尿病を予防することが可能になる。しかしながら、従来の臨床検査では糖尿病を発症前の段階で検出することは難しく、予防という観点ではほとんど無力であるのが現状である。一方、マルチマーカーシステムと称し、複数のマーカー物質を指標にして臨床検査の診断精度を上げる方法がすでに提案されている。したがって、糖尿病の診断にもマルチマーカーシステムを適用して診断精度を上げることが考えられる。しかし、マルチマーカーシステムによって糖尿病の診断を行うには、複数の有用なマーカー物質が必要となるが、現在のところそのような複数のマーカー物質は存在せず、マルチマーカーシステムによって糖尿病を検出した例は報告されていない。このように、糖尿病の予防や早期発見に有用で、マルチマーカーシステムにも適用可能な糖尿病の診断方法が求められている。

10

20

【0011】

2型糖尿病のように発症初期に自覚症状が少ない疾患の場合は、予防をすることが特に大事である。そのためには、糖尿病の発症の有無に加えて、糖尿病の将来の発症リスクを判定する診断技術が求められる。そうすれば、糖尿病が発症する前に、生活習慣の是正、食事制限、運動等の処置を行うことができ、当該疾病の発症を予防することが可能になる。さらに、当該疾病の発症リスクを低減させるような効果を有する食品素材等があれば、そのような食品素材を含む食品を日常的に摂取することで、糖尿病を容易に予防することができる。

【0012】

しかし、糖尿病の将来の発症リスクを判定する診断技術は確立しておらず、物質が有する当該疾病の改善効果や発症リスクを低減させる効果を評価する方法、および、当該疾患の改善効果や発症リスクを低減させる効果を有する物質をスクリーニングする方法も開発されていない。

30

【0013】

本発明の目的は、糖尿病の有無または将来の発症リスクを判定する診断方法を提供し、さらに、被検物質が有する糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を評価する方法、および、該評価方法を用いて糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を有する物質をスクリーニングする方法を提供することにある。

【0014】

本発明はまた、特に、健常者に見出されるマーカー物質と罹患者に見出されるマーカー物質とを示差的に識別することができる手段を提供することを目的とする。

40

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明者らは、糖尿病の予防のための事前診断や早期発見に有用な糖尿病の新たなマーカー物質を検索すべく、糖尿病患者と健常者の血液中のタンパク質を質量分析計スペクトルにより網羅的に比較し、糖尿病患者に特異的な、遺伝子産物であるタンパク質を検索した。その結果、糖尿病患者と健常者の間で統計的に有意差のある複数のタンパク質を見出した。さらに、それらのタンパク質を同定したところ、トランスサイレチン(trans-thyretin)、アポリポタンパク質CII、アポリポタンパク質CIII、および血清アルブミンならびにそれらの誘導体(たとえば、酸化物、システイニル化物、グリコ

50

シル化物等)と同定された。すなわち、本発明者らは、糖尿病の被験体および糖尿病予備群においては血液中のトランスサイレチンおよびアポリポタンパク質C I I Iは健常者より高く、アポリポタンパク質C I Iおよび血清アルブミンについては健常者より低い値を示すことを見出し、本発明を完成した。すなわち、本発明の要旨は以下の通りである。

【0016】

本発明者らはまた、上記課題を解決すべく、糖尿病を発症する前の段階から、発症と未発症の境界、そして発症している段階、に至る種々の動物の体液サンプルを調製した。そして、当該体液サンプルを質量分析計によるプロテオーム解析により網羅的に解析した。その結果、糖尿病の有無に加え、将来の発症リスクと関連する(すなわち、事前診断を可能にする)タンパク質を複数見出した。そして、被検者の体液中における当該タンパク質の濃度を指標として、糖尿病の有無または将来の発症リスクの判定(すなわち、事前診断)する系を構築した。さらに、動物の体液中における当該タンパク質の濃度を指標として、被検物質が有する糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を評価する系を構築した。さらに、当該評価方法を用いて、糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を有する物質のスクリーニングする系を構築した。本発明を完成した。すなわち、本発明の要旨は以下の通りである。

(1) 被験体由来のサンプル中のマーカー物質、上記マーカー物質に特異的に相互作用する因子、または上記マーカー物質を選択的に認識する手段を含む、被験体が糖尿病であるかどうか事前診断または診断するためのシステム。

(2) 上記マーカー物質が、上記被験体の体液中に存在する、項目1に記載のシステム。

(3) 上記マーカー物質が、上記被験体の血液中に存在する、項目1に記載のシステム。

(4) 上記マーカー物質が、遺伝子産物である、項目1に記載のシステム。

(5) 上記マーカー物質が、トランスサイレチン、トランスサイレチン誘導体、アポリポタンパク質C I I、アポリポタンパク質C I I誘導体、アポリポタンパク質C I I I、アポリポタンパク質C I I I誘導体および血清アルブミンならびにこれらに対応するタンパク質からなる群より選択される、1またはそれより多い物質を含む、項目1に記載のシステム。

(6) 上記因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される、項目1に記載のシステム。

(7) 上記因子は、タンパク質または上記複合分子である、項目1に記載のシステム。

(8) 上記因子は、抗体である、項目1に記載のシステム。

(9) 上記因子は、標識されるか、または標識可能である、項目1に記載のシステム。

(10) 上記手段は、質量分析装置、核磁気共鳴測定装置、X線解析装置、SPR、クロマトグラフィー、免疫学的手段、生化学的手段、電気泳動機器、化学的分析機器、蛍光二次元ディフュージョン電気泳動法、同位体標識法、タンデムアフィニティ精製法、物理学的手段、レーザーマイクロダイセクションおよびこれらの組み合わせからなる群より選択される、項目1に記載のシステム。

(11) さらに、上記マーカー物質の標準を含む、項目1に記載のシステム。

(12) さらに、上記サンプルを精製する手段を備える、項目1に記載のシステム。

(13) 上記被験体は、哺乳動物を含む、項目1に記載のシステム。

(14) 上記被験体は、齧歯類を含む、項目1に記載のシステム。

(15) 上記被験体は、ヒトを含む、項目1に記載のシステム。

(16) 上記因子または上記手段は、上記マーカー物質の定量をする能力を有する、項目1に記載のシステム。

(17) 上記マーカー物質の定量を行うための定量手段をさらに備える、項目1に記載のシステム。

(18) 上記定量手段は、標準曲線と測定結果とを比較して上記マーカー物質が正常値の範囲内かどうかを判定する判定手段を含む、項目17に記載のシステム。

10

20

30

40

50

(19) 上記判定手段は、コンピュータである、項目18に記載のシステム。

(20) 上記システムは、上記マーカ物質または上記マーカ物質に特異的に相互作用する上記因子を含む組成物である、項目1に記載のシステム。

(21) 上記マーカ物質が、トランスサイレチンおよびトランスサイレチン誘導体からなる群より選択される少なくとも1つの物質を含み、上記トランスサイレチン誘導体は、S-システニルトランスサイレチン、S-システニルトランスサイレチン、グルタチオン化トランスサイレチン、S-S結合形成トランスサイレチン、酸化トランスサイレチン、ホルミル化トランスサイレチン、アセチル化トランスサイレチン、リン酸化トランスサイレチン、糖鎖付加トランスサイレチン、ミリスチル化トランスサイレチンおよびこれらの複合誘導体からなる群より選択される、項目1に記載のシステム。

10

(22) 上記トランスサイレチンの減少および上記トランスサイレチン誘導体の増加からなる群より選択される少なくとも1つの現象が、糖尿病を発症しているか、または将来の発症リスクが高いことの指標である、項目21に記載のシステム。

(23) 上記トランスサイレチンの減少および上記トランスサイレチン誘導体の増加からなる群より選択される少なくとも1つの現象が、糖尿病を発症の程度、または将来の発症リスクが高さの指標である、項目21に記載のシステム。

(24) 上記トランスサイレチンは、配列番号1もしくは配列番号3に示される核酸配列によってコードされるか、または配列番号2もしくは配列番号4に示されるアミノ酸配列を有するか、先頭の20アミノ酸が切除されているか、あるいは、これらの改変配列を有する、項目21に記載のシステム。

20

(25) 上記トランスサイレチン誘導体は、配列番号1もしくは配列番号3に示される核酸配列によってコードされるアミノ酸配列、または配列番号2もしくは配列番号4に示されるアミノ酸配列における、それぞれ、30位のシステインまたはそれに対応するシステインのシステインがシステニル化されている誘導体であるか、または、先頭の20アミノ酸が切除されている、項目21に記載のシステム。

(26) 上記因子または上記手段は、トランスサイレチンの単量体と四量体との区別をする能力を有する、項目1に記載のシステム。

(27) 上記因子または上記手段は、トランスサイレチンとS-システニルトランスサイレチンとの区別をする能力を有する、項目1に記載のシステム。

(28) 上記因子または上記手段は、トランスサイレチンとS-システニルトランスサイレチンとの区別をする能力を有する抗体を含む、項目1に記載のシステム。

30

(29) 上記因子または上記手段は、トランスサイレチンとS-システニルトランスサイレチンとを認識し、かつ、上記システムはトランスサイレチンとS-システニルトランスサイレチンとを識別する手段をさらに備える、項目1に記載のシステム。

(30) 上記因子または上記手段は、トランスサイレチンとS-システニルトランスサイレチンとを認識し、上記システムはトランスサイレチンの分子量とS-システニルトランスサイレチンの分子量とを識別する手段、およびトランスサイレチンとS-システニルトランスサイレチンとの相対比を測定する手段をさらに備える、項目1に記載のシステム。

(31) 上記マーカ物質が、アポリポタンパク質CIIまたはアポリポタンパク質CII誘導体を含み、上記アポリポタンパク質CII誘導体は、プロ体である、項目1に記載のシステム。

40

(32) 上記アポリポタンパク質CIIの減少および上記アポリポタンパク質CII誘導体の変動からなる群より選択される少なくとも1つの現象が、糖尿病を発症しているか、または将来の発症リスクが高いことの指標である、項目31に記載のシステム。

(33) 上記アポリポタンパク質CIIの減少および上記アポリポタンパク質CII誘導体の変動からなる群より選択される少なくとも1つの現象が、糖尿病を発症の程度、または将来の発症リスクが高さの指標である、項目31に記載のシステム。

(34) 上記アポリポタンパク質CIIは、配列番号5もしくは配列番号7に示される核酸配列によってコードされるか、または配列番号6もしくは配列番号8に示されるアミ

50

ノ酸配列、あるいは、これらの改変配列を有する、項目 3 1 に記載のシステム。

(3 5) 上記因子または上記手段は、アポリポタンパク質 C I I を選択的に識別する能力を有する、項目 3 1 に記載のシステム。

(3 6) 上記因子または上記手段は、アポリポタンパク質 C I I を選択的に識別する能力を有する抗体を含む、項目 3 1 に記載のシステム。

(3 7) 上記因子または上記手段は、アポリポタンパク質 C I I を選択的に識別する能力を有し、かつ、上記システムは上記アポリポタンパク質 C I I を定量する手段を備える、項目 3 1 に記載のシステム。

(3 8) 上記マーカー物質が、アポリポタンパク質 C I I I またはアポリポタンパク質 C I I I 誘導体を含み、上記アポリポタンパク質 C I I I はアポリポタンパク質 C I I I 0 であり、上記アポリポタンパク質 C I I I 誘導体は、アポリポタンパク質 C I I I 1 およびアポリポタンパク質 C I I I 2 からなる群より選択される、項目 1 に記載のシステム。

10

(3 9) 上記アポリポタンパク質 C I I I の増加、アポリポタンパク質 C I I I 1 の増加およびアポリポタンパク質 C I I I 2 の増加からなる群より選択される少なくとも 1 つの現象が、糖尿病を発症しているか、または将来の発症リスクが高いことの指標である、項目 3 8 に記載のシステム。

(4 0) 上記アポリポタンパク質 C I I I の増加、アポリポタンパク質 C I I I 1 の増加およびアポリポタンパク質 C I I I 2 の増加からなる群より選択される少なくとも 1 つの現象が、糖尿病を発症の程度、または将来の発症リスクが高さの指標である、項目 3 8

20

(4 1) 上記アポリポタンパク質 C I I I は、配列番号 9 もしくは配列番号 1 1 に示される核酸配列によってコードされるか、または配列番号 1 0 もしくは配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列を有する、あるいは、これらの改変配列を有する、項目 3 8 に記載のシステム。

(4 2) 上記アポリポタンパク質 C I I I 誘導体は、配列番号 9 もしくは配列番号 1 1 に示される核酸配列によってコードされるか、または配列番号 1 0 もしくは配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列において、それぞれ、7 4 位スレオニンに糖鎖を有する誘導体である、項目 3 8 に記載のシステム。

(4 3) 上記因子または上記手段は、アポリポタンパク質 C I I I とアポリポタンパク質 C I I I 誘導体とを区別する能力を有する、項目 3 8 に記載のシステム。

30

(4 4) 上記因子または上記手段は、アポリポタンパク質 C I I I 0、アポリポタンパク質 C I I I 1 およびアポリポタンパク質 C I I I 2 のうち少なくとも 2 つを区別する能力を有する、項目 3 8 に記載のシステム。

(4 5) 上記因子または上記手段は、アポリポタンパク質 C I I I 0 とアポリポタンパク質 C I I I 1 とアポリポタンパク質 C I I I 2 とをすべて区別する能力を有する、項目 3 8 に記載のシステム。

(4 6) 上記因子または上記手段は、アポリポタンパク質 C I I I とアポリポタンパク質 C I I I 誘導体とを区別する能力を有する抗体を含む、項目 3 8 に記載のシステム。

(4 7) 上記因子または上記手段は、アポリポタンパク質 C I I I 0、アポリポタンパク質 C I I I 1 およびアポリポタンパク質 C I I I 2 のうち少なくとも 2 つを区別する能力を有する抗体を含む、項目 3 8 に記載のシステム。

40

(4 8) 上記因子または上記手段は、アポリポタンパク質 C I I I 0 とアポリポタンパク質 C I I I 1 とアポリポタンパク質 C I I I 2 とをすべて区別する能力を有する抗体の組み合わせを含む、項目 3 8 に記載のシステム。

(4 9) 上記因子または上記手段は、アポリポタンパク質 C I I I とアポリポタンパク質 C I I I 誘導体とを認識し、上記システムは、アポリポタンパク質 C I I I とアポリポタンパク質 C I I I 誘導体とを識別する手段をさらに備える、項目 3 8 に記載のシステム。

(5 0) 上記因子または上記手段は、アポリポタンパク質 C I I I とアポリポタンパク

50

質 C I I I 誘導体とを認識し、上記システムは、アポリポタンパク質 C I I I 0、アポリポタンパク質 C I I I 1 およびアポリポタンパク質 C I I I 2 のうち少なくとも 2 つを識別する手段をさらに備える、項目 3 8 に記載のシステム。

(5 1) 上記因子または上記手段は、アポリポタンパク質 C I I I とアポリポタンパク質 C I I I 誘導体とを認識し、上記システムは、アポリポタンパク質 C I I I 0 とアポリポタンパク質 C I I I 1 とアポリポタンパク質 C I I I 2 とをすべて識別する手段をさらに備える、項目 3 8 に記載のシステム。

(5 2) 上記マーカー物質が、血清アルブミンまたは血清アルブミン誘導体を含む、項目 1 に記載のシステム。

(5 3) 上記血清アルブミンの減少および上記血清アルブミン誘導体の変動からなる群より選択される少なくとも 1 つの現象が、糖尿病を発症しているか、または将来の発症リスクが高いことの指標である、項目 5 2 に記載のシステム。

(5 4) 上記血清アルブミンの減少および上記血清アルブミン誘導体の変動からなる群より選択される少なくとも 1 つの現象が、糖尿病を発症の程度、または将来の発症リスクが高さの指標である、項目 5 2 に記載のシステム。

(5 5) 上記血清アルブミンは、配列番号 1 3 もしくは配列番号 1 5 に示される核酸配列によってコードされるか、または配列番号 1 4 もしくは配列番号 1 6 に示されるアミノ酸配列、あるいは、これらの改変配列を有する、項目 5 2 に記載のシステム。

(5 6) 上記因子または上記手段は、血清アルブミンを選択的に識別する能力を有する、項目 5 2 に記載のシステム。

(5 7) 上記因子または上記手段は、血清アルブミンを選択的に識別する能力を有する抗体を含む、項目 5 2 に記載のシステム。

(5 8) 上記因子または上記手段は、血清アルブミンを選択的に識別する能力を有し、かつ、上記システムは上記血清アルブミンを定量する手段を備える、項目 3 1 に記載のシステム。

(5 9) 診断薬である、項目 1 に記載のシステム。

(6 0) 被験体が糖尿病であるかどうか事前診断もしくは診断するため、または上記事前診断もしくは診断を支援するための方法であって、

A) 上記被験体由来のサンプル中のマーカー物質を測定する工程 ; および

B) 上記測定結果から、上記被験体が糖尿病またはその可能性があるかどうかを決定する工程、
を包含する、方法。

(6 1) 項目 2 ~ 5 9 のいずれか 1 項に記載の特徴を有する、項目 6 0 に記載の方法。

(6 2) 被験体由来のサンプル中のマーカー物質、上記マーカー物質に特異的に相互作用する因子、または上記マーカー物質を選択的に認識する手段の、被験体が糖尿病であるかどうか事前診断または診断するための医薬の製造における、使用。

(6 3) 項目 2 ~ 5 9 のいずれか 1 項に記載の特徴を有する、項目 6 2 に記載の使用。

(6 4) 被験体由来のサンプル中のマーカー物質、上記マーカー物質に特異的に相互作用する因子、または上記マーカー物質を選択的に認識する手段の、被験体が糖尿病であるかどうか事前診断または診断するための使用。

(6 5) 項目 2 ~ 5 9 のいずれか 1 項に記載の特徴を有する、項目 6 4 に記載の使用。

(6 6)

項目 6 0 に記載の方法であって、血液中のマーカー物質の濃度を測定し、その値を健常値と比較し、上記マーカー物質がトランスサイレチン、アポリポタンパク質 C I I I、血清アルブミンの群から選択される 1 または 2 以上のタンパク質であることを特徴とする、方法。

(6 7)

上記アポリポタンパク質 C I I I は、アポリポタンパク質 C I I I 0、アポリポタンパク質 C I I I 1、アポリポタンパク質 C I I I 2 の群から選択される 1 または 2 以上のタンパク質であることを特徴とする項目 6 6 に記載の糖尿病の診断方法。

10

20

30

40

50

(6 8)

下記工程 (1) ~ (4) :

(1) 被検者の血液から血清または血漿を調製する工程 ;

(2) 工程 (1) で得られた血清または血漿中のトランスサイレチンの濃度値を健常値と比較して、糖尿病を検出する工程 ;

(3) 工程 (2) で糖尿病が検出されなかった場合は、さらに、血清または血漿中のアポリタンパク質 C I I I 2 の濃度値を健常値と比較して、糖尿病を検出する工程 ; および

(4) 工程 (3) で糖尿病が検出されなかった場合は、さらに、血清または血漿中のアポリタンパク質 C I I I 1 の濃度値を健常値と比較して、糖尿病を検出する工程、

を含む、項目 6 7 に記載の方法。

10

(6 9)

下記工程 (5) ~ (8) :

(5) 被検者の血液から血清または血漿を調製する工程、

(6) 工程 (5) で得られた血清または血漿中の血清アルブミンの濃度値を健常値と比較して、糖尿病を検出する工程、

(7) 工程 (6) で糖尿病が検出された場合は、さらに、血清または血漿中のアポリタンパク質 C I I I 2 の濃度値を健常値と比較して、糖尿病を検出する工程、

(8) 工程 (7) で糖尿病が検出されなかった場合は、さらに、血清または血漿中のアポリタンパク質 C I I I 1 の濃度値を健常値と比較して、糖尿病を検出する工程 ;

を含む、項目 6 7 に記載の診断方法。

20

(7 0)

上記工程 (4) で糖尿病が検出された場合は、さらに、血清または血漿中のアポリタンパク質 C I I I 0 の濃度値を健常値と比較して、糖尿病を検出することを特徴とする項目 6 8 に記載の方法。

(7 1)

上記工程 (8) で糖尿病が検出された場合は、さらに、血清または血漿中のアポリタンパク質 C I I I 0 の濃度値を健常値と比較して、糖尿病を検出することを特徴とする項目 6 9 に記載の方法。

(7 2)

項目 6 0 に記載の方法であって、血液中のマーカー物質の濃度を測定し、その値を健常値と比較し、上記マーカー物質が下記 (a) ~ (e) :

30

(a) 7 . 0 以下の pH で陽イオン交換体に補足される、分子量が約 1 3 8 0 0 であるタンパク質 ;

(b) 7 . 0 以下の pH で金属イオン固定化担体に補足される、分子量が約 8 7 0 0 であるタンパク質 ;

(c) 7 . 0 以下の pH で陽イオン交換体に捕捉される、分子量が約 9 4 0 0 であるタンパク質または、pH 7 . 0 で金属イオン固定化担体に補足される、分子量が約 9 4 0 0 であるタンパク質 ;

(d) 7 . 0 以下の pH で陽イオン交換体に補足される、分子量が約 9 7 0 0 であるタンパク質、または、pH 7 . 0 で金属イオン固定化担体に補足される、分子量が約 9 7 0 0 であるタンパク質 ; および

40

(e) 7 . 0 以下の pH で陽イオン交換体に補足される、分子量が約 6 6 0 0 0 であるタンパク質、または、pH 7 . 0 で金属イオン固定化担体に補足される、分子量が約 6 6 0 0 0 であるタンパク質、

の群から選択される 1 または 2 以上のタンパク質であることを特徴とする、方法。

(7 3)

項目 6 0 に記載の方法であって、血液中のマーカー物質の濃度を測定し、その値を健常値と比較し、上記マーカー物質が下記 :

(a) トリプシンで消化すると、分子量が約 1 2 7 0、約 1 3 7 0、約 1 3 9 0、約 1 5 2 0、約 2 4 5 0、約 2 6 4 0、および約 3 1 4 0 のポリペプチドを生じる、分子量約 1

50

3800のタンパク質；および/または

(b) トリプシンで消化すると、分子量が約900、約1200、約1390、約1710、約1940、および約2080のポリペプチドを生じる、分子量約8700~9700のタンパク質、

のタンパク質であることを特徴とする、方法。

(74)

上記マーカー物質に対する親和性を有する物質を固定化した担体に血清または血漿を接触させて、マーカー物質を捕捉し、上記マーカー物質の濃度を測定することを特徴とする項目66乃至73のいずれかに記載の方法。

(75)

上記マーカー物質に対する親和性を有する物質は、上記マーカー物質に特異的な抗体であることを特徴とする項目74に記載の方法。

(76)

上記マーカー物質に対する親和性を有する物質は、イオン交換基を有するものであることを特徴とする項目74に記載の糖尿病の診断方法。

(77)

上記担体は平面部分を有し、上記マーカー物質に対する親和性を有する物質は上記平面部分の一部に固定化されていることを特徴とする項目74~76のいずれかに記載の方法。

(78)

上記抗体は、担体に固定化されていることを特徴とする項目1に記載のシステム。

(79)

項目60に記載の方法であって、上記被験体の体液中における下記マーカー物質(a)~(n)：

(a) pH4.0で弱陽イオン交換体に結合し、かつ質量分析に供すると質量/電荷比が約7040のイオンピークを生じるタンパク質、

(b) pH4.0で弱陽イオン交換体に結合し、かつ質量分析に供すると質量/電荷比が約8330のイオンピークを生じるタンパク質、

(c) pH4.0で弱陽イオン交換体に結合し、かつ質量分析に供すると質量/電荷比が約8530のイオンピークを生じるタンパク質。

(d) pH7.0かつ0.5MのNaCl濃度で銅イオン結合金属キレート体に結合し、かつ質量分析に供すると質量/電荷比が約9060のイオンピークを生じるタンパク質、

(e) pH4.0で弱陽イオン交換体に結合し、かつ質量分析に供すると質量/電荷比が約9260のイオンピークを生じるタンパク質、

(f) pH4.0で弱陽イオン交換体に結合し、かつ質量分析に供すると質量/電荷比が約9450のイオンピークを生じるタンパク質、

(g) pH7.0かつ0.5MのNaCl濃度で銅イオン結合金属キレート体に結合し、かつ質量分析に供すると質量/電荷比が約13700のイオンピークを生じるタンパク質、

(h) pH4.0で弱陽イオン交換体に結合し、かつ質量分析に供すると質量/電荷比が約76400のイオンピークを生じるタンパク質、

(i) pH4.0で弱陽イオン交換体に結合し、かつ質量分析に供すると質量/電荷比が約79100のイオンピークを生じるタンパク質、

(j) pH4.0で弱陽イオン交換体に結合し、かつ質量分析に供すると質量/電荷比が約3500のイオンピークを生じるタンパク質、

(k) pH7.0かつ0.5MのNaCl濃度で銅イオン結合金属キレート体に結合し、かつ質量分析に供すると質量/電荷比が約3560のイオンピークを生じるタンパク質、

(l) pH7.0かつ0.5MのNaCl濃度で銅イオン結合金属キレート体に結合し、かつ質量分析に供すると質量/電荷比が約4180のイオンピークを生じるタンパク質、

(m) pH4.0で弱陽イオン交換体に結合し、かつ質量分析に供すると質量/電荷比が

10

20

30

40

50

約 1 2 8 0 0 のイオンピークを生じるタンパク質；

(n) p H 4 . 0 で弱陽イオン交換体に結合し、かつ質量分析に供すると質量 / 電荷比が約 6 5 7 0 0 のイオンピークを生じるタンパク質；および

(a) ~ (n) のタンパク質に対応するタンパク質または改変体からなる群より選択される少なくとも 1 つタンパク質の濃度を健常値と比較し、糖尿病の発症の有無または将来の糖尿病の発症リスクを判定することを特徴とする、方法。

(8 0)

上記体液は、血液であることを特徴とする項目 7 9 に記載の方法。

(8 1)

上記体液または体液成分を、上記マーカー物質に対する親和性を有する物質を固定化した担体に接触させて、体液中の上記マーカー物質を担体上に捕捉し、捕捉された上記マーカー物質の量に基づいて体液中の上記マーカー物質の濃度を算出することを特徴とする項目 7 9 または 8 0 に記載の疾病の診断方法。

10

(8 2)

上記担体は平面部分を有し、上記マーカー物質に対する親和性を有する物質は、上記平面部分の一部に固定化されていることを特徴とする項目 8 1 に記載の方法。

(8 3)

上記マーカー物質に対する親和性を有する物質は、イオン交換体、金属キレート体または抗体であることを特徴とする項目 8 1 または 8 2 に記載の方法。

(8 4) 被検物質が有する糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を評価することを特徴とする物質の評価方法であって、

20

a) 糖尿病を発症している動物または将来の発症リスクが高い動物に被検物質を摂取させる工程；および

b) 上記動物の体液中における上記マーカー物質の少なくとも 1 つの濃度を基準値と比較し、被検物質が有する糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を評価する工程、を包含する、方法。

(8 5) 項目 2 ~ 5 9 のいずれか 1 項に記載の特徴を有する、項目 8 4 に記載の方法。

(8 6)

項目 8 4 に記載の方法であって、上記マーカー物質が、下記マーカー物質 (a) ~ (n) :

30

(a) p H 4 . 0 で弱陽イオン交換体に結合し、かつ質量分析に供すると質量 / 電荷比が約 7 0 4 0 のイオンピークを生じるタンパク質、

(b) p H 4 . 0 で弱陽イオン交換体に結合し、かつ質量分析に供すると質量 / 電荷比が約 8 3 3 0 のイオンピークを生じるタンパク質、

(c) p H 4 . 0 で弱陽イオン交換体に結合し、かつ質量分析に供すると質量 / 電荷比が約 8 5 3 0 のイオンピークを生じるタンパク質。

(d) p H 7 . 0 かつ 0 . 5 M の N a C l 濃度で銅イオン結合金属キレート体に結合し、かつ質量分析に供すると質量 / 電荷比が約 9 0 6 0 のイオンピークを生じるタンパク質、

(e) p H 4 . 0 で弱陽イオン交換体に結合し、かつ質量分析に供すると質量 / 電荷比が約 9 2 6 0 のイオンピークを生じるタンパク質、

40

(f) p H 4 . 0 で弱陽イオン交換体に結合し、かつ質量分析に供すると質量 / 電荷比が約 9 4 5 0 のイオンピークを生じるタンパク質、

(g) p H 7 . 0 かつ 0 . 5 M の N a C l 濃度で銅イオン結合金属キレート体に結合し、かつ質量分析に供すると質量 / 電荷比が約 1 3 7 0 0 のイオンピークを生じるタンパク質、

(h) p H 4 . 0 で弱陽イオン交換体に結合し、かつ質量分析に供すると質量 / 電荷比が約 7 6 4 0 0 のイオンピークを生じるタンパク質、

(i) p H 4 . 0 で弱陽イオン交換体に結合し、かつ質量分析に供すると質量 / 電荷比が約 7 9 1 0 0 のイオンピークを生じるタンパク質、

50

(j) p H 4 . 0 で弱陽イオン交換体に結合し、かつ質量分析に供すると質量 / 電荷比が約 3 5 0 0 のイオンピークを生じるタンパク質、

(k) p H 7 . 0 かつ 0 . 5 M の N a C l 濃度で銅イオン結合金属キレート体に結合し、かつ質量分析に供すると質量 / 電荷比が約 3 5 6 0 のイオンピークを生じるタンパク質、

(l) p H 7 . 0 かつ 0 . 5 M の N a C l 濃度で銅イオン結合金属キレート体に結合し、かつ質量分析に供すると質量 / 電荷比が約 4 1 8 0 のイオンピークを生じるタンパク質、

(m) p H 4 . 0 で弱陽イオン交換体に結合し、かつ質量分析に供すると質量 / 電荷比が約 1 2 8 0 0 のイオンピークを生じるタンパク質；

(n) p H 4 . 0 で弱陽イオン交換体に結合し、かつ質量分析に供すると質量 / 電荷比が約 6 5 7 0 0 のイオンピークを生じるタンパク質；および

(a) ~ (n) のタンパク質に対応するタンパク質または改変体からなる群より選択される少なくとも 1 つタンパク質である、方法。

(8 7)

上記基準値は、糖尿病を発症している動物または将来の発症リスクが高い動物に、糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を有さない既知物質を摂取させた際の、上記動物の体液中における上記マーカー物質の濃度であることを特徴とする項目 8 6 に記載の方法。

(8 8)

上記体液は、血液であることを特徴とする項目 8 6 または 8 7 に記載の方法。

(8 9)

上記被検物質は、食品素材であることを特徴とする項目 8 6 ~ 8 8 のいずれかに記載の方法。

(9 0)

上記体液または体液成分を、上記マーカー物質に対する親和性を有する物質を固定化した担体に接触させて、体液中の上記マーカー物質を担体上に捕捉し、捕捉された上記マーカー物質の量に基づいて体液中の上記マーカー物質の濃度を算出することを特徴とする項目 8 6 ~ 8 9 のいずれかに記載の方法。

(9 1)

上記担体は平面部分を有し、上記マーカー物質に対する親和性を有する物質は、上記平面部分の一部に固定化されていることを特徴とする項目 9 0 に記載の方法。

(9 2)

上記マーカー物質に対する親和性を有する物質は、イオン交換体、金属キレート体または抗体であることを特徴とする項目 9 0 または 9 1 に記載の方法。

(9 3)

項目 8 4 ~ 9 2 のいずれかに記載の物質の評価方法によって被検物質を評価し、糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を有する物質をスクリーニングすることを特徴とする物質のスクリーニング方法。

(9 4) 項目 9 3 に記載の方法によって得られた物質。

(1 0 1) 被験体由来のサンプル中のマーカー物質、上記マーカー物質に特異的に相互作用する因子、または上記マーカー物質を選択的に認識する手段を含む、被験体が糖尿病であるかどうか事前診断または診断するためのシステムであって、上記認識する手段は、トランスサイレチンとトランスサイレチン誘導体とを識別する能力を有する、システム。

(1 0 2) 上記因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される、項目 1 0 1 に記載のシステム。

(1 0 3) 上記因子は、タンパク質または上記複合分子である、項目 1 0 1 に記載のシステム。

(1 0 4) 上記因子は、抗体である、項目 1 0 1 に記載のシステム。

(1 0 5) 上記因子は、標識されるか、または標識可能である、項目 1 0 1 に記載のシステム。

(1 0 6) 上記手段は、質量分析装置、核磁気共鳴測定装置、X線解析装置、S P R、ク

10

20

30

40

50

ロマトグラフィー、免疫学的手段、生化学的手段、電気泳動機器、化学的分析機器、蛍光二次元ディフュージョン電気泳動法、同位体標識法、タンデムアフィニティ精製法、物理学的手段、レーザーマイクロダイセクションおよびこれらの組み合わせからなる群より選択される、項目101に記載のシステム。

(107) さらに、上記マーカー物質の標準を含む、項目101に記載のシステム。

(108) さらに、上記サンプルを精製する手段を備える、項目101に記載のシステム。

(109) 上記被験体は、哺乳動物を含む、項目101に記載のシステム。

(110) 上記被験体は、齧歯類を含む、項目101に記載のシステム。

(111) 上記被験体は、ヒトを含む、項目101に記載のシステム。

(112) 上記因子または上記手段は、上記マーカー物質の定量をする能力を有する、項目101に記載のシステム。

(113) 上記マーカー物質の定量を行うための定量手段をさらに備える、項目101に記載のシステム。

(114) 上記定量手段は、標準曲線と測定結果とを比較して上記マーカー物質が正常値の範囲内かどうかを判定する判定手段を含む、項目113に記載のシステム。

(115) 上記判定手段は、コンピュータである、項目114に記載のシステム。

(116) 上記システムは、上記マーカー物質または上記マーカー物質に特異的に相互作用する上記因子を含む組成物である、項目101に記載のシステム。

(117) 上記トランスサイレチン誘導体は、S-システイニルトランスサイレチン、グルタチオン化トランスサイレチン、S-S結合形成トランスサイレチン、酸化トランスサイレチン、ホルミル化トランスサイレチン、アセチル化トランスサイレチン、リン酸化トランスサイレチン、糖鎖付加トランスサイレチン、ミリスチル化トランスサイレチンおよびこれらの複合誘導体からなる群より選択される、項目101に記載のシステム。

(118) 上記トランスサイレチン誘導体は、S-システイニルトランスサイレチンである、項目101に記載のシステム。

(119) 上記トランスサイレチン誘導体は、S-システイニルトランスサイレチンであり、上記識別する手段は抗体である、項目101に記載のシステム。

(120) 上記因子または上記手段は、トランスサイレチンとトランスサイレチン誘導体とに対して示差的に反応する、項目101に記載のシステム。

(121) 上記因子または上記手段は、トランスサイレチンまたはトランスサイレチン誘導体のいずれか一方としか実質的に反応しない、項目101に記載のシステム。

(122) 上記トランスサイレチンの減少および上記トランスサイレチン誘導体の増加からなる群より選択される少なくとも1つの現象が、糖尿病を発症しているか、または将来の発症リスクが高いことの指標である、項目101に記載のシステム。

(123) 上記トランスサイレチンの減少および上記トランスサイレチン誘導体の増加からなる群より選択される少なくとも1つの現象が、糖尿病を発症の程度、または将来の発症リスクが高さの指標である、項目101に記載のシステム。

(124) 上記トランスサイレチンは、配列番号1もしくは配列番号3に示される核酸配列によってコードされるか、または配列番号2もしくは配列番号4に示されるアミノ酸配列を有するか、先頭の20アミノ酸が切除されているか、あるいは、これらの改変配列を有する、項目101に記載のシステム。

(125) 上記トランスサイレチン誘導体は、配列番号1もしくは配列番号3に示される核酸配列によってコードされるアミノ酸配列、または配列番号2もしくは配列番号4に示されるアミノ酸配列における、それぞれ、30位のシステインまたはそれに対応するシステインのシステインがシステイニル化されている誘導体であるか、または、先頭の20アミノ酸が切除されている、項目101に記載のシステム。

(126) 上記因子または上記手段は、トランスサイレチンの単量体と四量体との区別をする能力を有する、項目101に記載のシステム。

(127) 上記因子または上記手段は、トランスサイレチンとS-システイニルトラン

10

20

30

40

50

スサイレチンとの区別をする能力を有する、項目101に記載のシステム。

(128) 上記因子または上記手段は、トランスサイレチンとS-システニルトランスサイレチンとの区別をする能力を有する抗体を含む、項目101に記載のシステム。

(129) 上記因子または上記手段は、トランスサイレチンとS-システニルトランスサイレチンとを認識し、かつ、上記システムはトランスサイレチンとS-システニルトランスサイレチンとを識別する手段をさらに備える、項目101に記載のシステム。

(130) 上記因子または上記手段は、トランスサイレチンとS-システニルトランスサイレチンとを認識し、上記システムはトランスサイレチンの分子量とS-システニルトランスサイレチンの分子量とを識別する手段、およびトランスサイレチンとS-システニルトランスサイレチンとの相対比を測定する手段をさらに備える、項目101に記載のシステム。

10

(131) 診断薬である、項目101に記載のシステム。

(132) 被験体が糖尿病であるかどうか事前診断もしくは診断するため、または上記事前診断もしくは診断を支援するための方法であって、

A) 上記被験体由来のサンプル中のマーカー物質を測定する工程；および

B) 上記測定結果から、上記被験体が糖尿病またはその可能性があるかどうかを決定する工程、

を包含する、方法。

(133) 項目102～130のいずれか1項に記載の特徴を有する、項目32に記載の方法。

20

(134) 被験体由来のサンプル中のマーカー物質、上記マーカー物質に特異的に相互作用する因子、または上記マーカー物質を選択的に認識する手段の、被験体が糖尿病であるかどうか事前診断または診断するための医薬の製造における、使用であって、上記認識する手段は、トランスサイレチンとトランスサイレチン誘導体とを識別する能力を有する、使用。

(135) 項目102～130のいずれか1項に記載の特徴を有する、項目134に記載の使用。

(136) 被験体由来のサンプル中のマーカー物質、上記マーカー物質に特異的に相互作用する因子、または上記マーカー物質を選択的に認識する手段の、被験体が糖尿病であるかどうか事前診断または診断するための使用であって、上記認識する手段は、トランスサイレチンとトランスサイレチン誘導体とを識別する能力を有する、使用。

30

(137) 項目102～130のいずれか1項に記載の特徴を有する、項目134に記載の使用。

(138) 上記サンプルは、血液であることを特徴とする項目132に記載の方法。

(139) 上記サンプルを、上記マーカー物質に対する親和性を有する物質を固定化した担体に接触させて、体液中の上記マーカー物質を担体上に捕捉し、捕捉された上記マーカー物質の量に基づいて体液中の上記マーカー物質の濃度を算出することを特徴とする項目132に記載の疾病の診断方法。

(140) 上記担体は平面部分を有し、上記マーカー物質に対する親和性を有する物質は、上記平面部分の一部に固定化されていることを特徴とする項目139に記載の方法。

40

(141) 上記マーカー物質に対する親和性を有する物質は、イオン交換体、金属キレート体または抗体であることを特徴とする項目139または140に記載の方法。

(142) 被検物質が有する糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を評価することを特徴とする物質の評価方法であって、

a) 糖尿病を発症している動物または将来の発症リスクが高い動物に被検物質を摂取させる工程；および

b) 上記動物の体液中における上記マーカー物質の少なくとも1つの濃度を基準値と比較し、被検物質が有する糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を評価する工程、

を包含する、方法。

50

(143) 項目102～130のいずれか1項に記載の特徴を有する、項目84に記載の方法。

(144) 上記基準値は、糖尿病を発症している動物または将来の発症リスクが高い動物に、糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を有さない既知物質を摂取させた際の、上記動物の体液中における上記マーカー物質の濃度であることを特徴とする項目142に記載の方法。

(145) 上記体液は、血液であることを特徴とする項目142～144のいずれか1項に記載の方法。

(146) 上記被検物質は、食品素材であることを特徴とする項目142～145のいずれか1項に記載の方法。

10

(147) 上記体液または体液成分を、上記マーカー物質に対する親和性を有する物質を固定化した担体に接触させて、体液中の上記マーカー物質を担体上に捕捉し、捕捉された上記マーカー物質の量に基づいて体液中の上記マーカー物質の濃度を算出することを特徴とする項目142～146のいずれかに記載の方法。

(148) 上記担体は平面部分を有し、上記マーカー物質に対する親和性を有する物質は、上記平面部分の一部に固定化されていることを特徴とする項目47に記載の方法。

(149) 上記マーカー物質に対する親和性を有する物質は、イオン交換体、金属キレート体または抗体であることを特徴とする項目146または147に記載の方法。

(150) 項目142～149のいずれかに記載の物質の評価方法によって被検物質を評価し、糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を有する物質をスクリーニングすることを特徴とする物質のスクリーニング方法。

20

(151) 項目150に記載の方法によって得られた物質。

【0017】

従って、本発明のこれらおよび他の利点は、添付の図面を参照して、以下の詳細な説明を読みかつ理解すれば、当業者には明白になることが理解される。

【発明の効果】

【0018】

トランスサイレチン、アポリポタンパク質CIII、および血清アルブミンは既知物質でかつある種の臨床的意義は知られているが、糖尿病のマーカー物質となり得ることは本発明により初めて明らかとなった。

30

【0019】

本発明の糖尿病の診断および事前診断のための方法およびそのためのシステムもしくは組成物（診断薬）によれば、糖尿病の診断および事前診断をより確実かつ精度よく行うことができる。また、複数のマーカー物質を組み合わせることによってマルチマーカーシステムによる糖尿病の診断および事前診断を行うことができる。

【0020】

本発明の糖尿病診断用キットによれば、より簡便かつ高精度で糖尿病の診断および事前診断をすることができる。

【0021】

本発明の疾病の診断および事前診断のための方法、組成物（診断薬）およびシステムによれば、糖尿病の有無に加え、糖尿病の将来の発症リスクを判定（すなわち事前診断）することができる。

40

【0022】

本発明の物質の評価方法によれば、被検物質が有する糖尿病の改善効果に加え、糖尿病の将来の発症リスクの低減効果を評価することができる。

【0023】

本発明の物質のスクリーニング方法によれば、糖尿病の改善効果を有する物質に加え、糖尿病の将来の発症リスクの低減効果を有する物質をスクリーニングすることができる。

【0024】

本発明は、特に、健常者に見出されるマーカー物質と罹患者に見出されるマーカー物質

50

とを示差的に識別することができ、効率よい診断を可能とした。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】本発明の糖尿病の診断方法をマルチマーカースystemに応用した例の手順を表すフローチャートである。

【図2】本発明の糖尿病の診断方法をマルチマーカースystemに応用した別の例の手順を表すフローチャートである。

【図3】 m/z が13867のピークについての測定結果を表し、図3(a)は糖尿病患者と健常者に分けてピーク強度をプロットしたグラフであり、図3(b)は図3(a)の結果を、最大値、最小値、中央値、およびカットオフ値で示したグラフであり、図3(c)はROC曲線を示すグラフである。

10

【図4】 m/z が8690のピークについての測定結果を表し、図4(a)は糖尿病患者と健常者に分けてピーク強度をプロットしたグラフであり、図4(b)は図4(a)の結果を、最大値、最小値、中央値、およびカットオフ値で示したグラフであり、図4(c)はROC曲線を示すグラフである。

【図5】糖尿病患者の血清を2次元電気泳動に供した結果を表す写真である。

【図6】 m/z が66216のピークについての測定結果を表し、図6(a)は糖尿病患者と健常者に分けてピーク強度をプロットしたグラフであり、図6(b)は図6(a)の結果を、最大値、最小値、中央値、およびカットオフ値で示したグラフであり、図6(c)はROC曲線を示すグラフである。

20

【図7】質量/電荷比が7043(平均値)のイオンピークについての箱髭図である。

【図8】質量/電荷比が8325(平均値)のイオンピークについての箱髭図である。

【図9】質量/電荷比が8532(平均値)のイオンピークについての箱髭図である。

【図10】質量/電荷比が9062(平均値)のイオンピークについての箱髭図である。

【図11】質量/電荷比が9255(平均値)のイオンピークについての箱髭図である。

【図12】質量/電荷比が9445(平均値)のイオンピークについての箱髭図である。

【図13】質量/電荷比が13720(平均値)のイオンピークについての箱髭図である。

。

【図14】質量/電荷比が76404(平均値)のイオンピークについての箱髭図である。

。

【図15】質量/電荷比が79085(平均値)のイオンピークについての箱髭図である。

。

【図16】質量/電荷比が3497(平均値)のイオンピークについての箱髭図である。

【図17】質量/電荷比が3559(平均値)のイオンピークについての箱髭図である。

【図18】質量/電荷比が4184(平均値)のイオンピークについての箱髭図である。

【図19】質量/電荷比が12786(平均値)のイオンピークについての箱髭図である。

。

【図20】質量/電荷比が65700(平均値)のイオンピークについての箱髭図である。

。

【図21】図21には、健常人由来S-cysteinylated TTRを示す。測定値： $M/Z=13874.7480$ 。

40

【図22】図22には、還元処理後の健常人由来S-cysteinylated TTRを示す。測定値： $M/Z=13759.7393$ 。

【図23】図23には、糖尿病患者由来S-cysteinylated TTRを示す。測定値： $M/Z=13871.3320$ 。

【図24】図24には、還元処理後の糖尿病患者由来S-cysteinylated TTRを示す。測定値： $M/Z=13755.6494$ 。

【図25】図25には、TTRの4量体構造とモノマーのアミノ酸配列を示す。このように、トランスサイレチンは、通常4量体構造をとっており、これが崩れていくと糖尿病になると仮定される。

50

【図26】図26には、ヒトTTR -ドメインの3次元構造(上)と2次構造配列(下)が示される。

【図27】図27は、ラットアポリポタンパク質C I I Iと同定したバンドのゲル写真と、そのバンドのSELDI-TOFによる分析を示す。

【図28】図28は、ラットアポリポタンパク質C I I Iと同定したバンドのゲル写真と、そのバンドのSELDI-TOFによる分析を示す。

【図29】図29には、ヒトアポリポタンパク質C I I I (0~2)のスポットであると考えられる二次元電気泳動上のスポットを示す。

【図30】図30には、図29の各スポットの質量分析の結果を示す。

【図31】図31には、各スポットのSELDI-MSの結果を示す。

【図32】図32には、CM10の検討結果を示す。

【図33】図33には、Q10の検討結果を示す。

【図34】図34は、至適条件検討結果を示す。これらの結果から、得られたスポットが、ヒトアポリポタンパク質C I I I (0~2)のスポットであることが明らかになる。

【図35】図35には、糖尿病患者におけるS-システニル化トランスサイレチン(測定値: M/Z = 13, 863, 理論値: M/Z = 13880.53)のイオン強度とHbA1c値の関係を示す。

【図36】図36には、糖尿病患者におけるS-システニル化トランスサイレチン(測定値: M/Z = 13, 874, 理論値: M/Z = 13880.53)のイオン強度とHbA1c値の関係が示される。

【図37】図37には、糖尿病患者におけるS-システニル化トランスサイレチン(測定値: M/Z = 13, 884, 理論値: M/Z = 13880.53)のイオン強度とHbA1c値の関係が示される。

【図38】図38は、糖尿病患者におけるM/Z: 13, 863の実測データを示す。

【図39】図39には、糖尿病ラット血清 8.3K (Apo CII) 箱髭図を示す。

【図40】図40には、上記の時系列データを示す。

【図41】図41は、ゲル上のバンドのSELDI-MSの結果を示す。

【図42】図42には、得られたバンドのウェスタンブロットによる確認を示す。

【図43】図43には、クロマトグラフィーによる分画において抗ApoC2抗体により増強される様子を示す。

【図44】図44は、ヒトにおけるアポリポタンパク質C I Iもまた事前診断マーカーであることを示す。ここでは、健常人のアポリポタンパク質C I Iの質量分析結果を示す。

【図45】図45は、ヒトにおけるアポリポタンパク質C I Iもまた事前診断マーカーであることを示す。ここでは、糖尿病患者のアポリポタンパク質C I Iの質量分析結果を示す。

【図46】図46は、別の画分を用いた場合でのヒトにおけるアポリポタンパク質C I Iもまた事前診断マーカーであることを示す。ここでは、健常人のアポリポタンパク質C I Iの質量分析結果を示す。

【図47】図47は、別の画分を用いた場合でのヒトにおけるアポリポタンパク質C I Iもまた事前診断マーカーであることを示す。ここでは、糖尿病患者のアポリポタンパク質C I Iの質量分析結果を示す。

【配列表の簡単な説明】

【0026】

配列番号1-2 トランスサイレチン ヒト(それぞれ、核酸配列およびアミノ酸配列)

配列番号3-4 トランスサイレチン ラット(それぞれ、核酸配列およびアミノ酸配列)

配列番号5-6 アポリポタンパク質C I I ヒト(それぞれ、核酸配列およびアミノ酸配列)、

配列番号7-8 アポリポタンパク質C I I ラット(それぞれ、核酸配列およびアミノ酸配列)

10

20

30

40

50

配列番号 9 - 10 アポリポタンパク質 C I I I ヒト (それぞれ、核酸配列およびアミノ酸配列)

配列番号 11 - 12 アポリポタンパク質 C I I I ラット (それぞれ、核酸配列およびアミノ酸配列)

配列番号 13 - 14 血清アルブミン ヒト (それぞれ、核酸配列およびアミノ酸配列)

配列番号 15 - 16 血清アルブミン ラット (それぞれ、核酸配列およびアミノ酸配列)

配列番号 17 - 18 血清アルブミン マウス (それぞれ、核酸配列およびアミノ酸配列)

配列番号 19 - 20 血清アルブミン イヌ (それぞれ、核酸配列およびアミノ酸配列) 10

配列番号 21 - 22 血清アルブミン ウサギ (それぞれ、核酸配列およびアミノ酸配列)

配列番号 23 - 24 血清アルブミン サル (それぞれ、核酸配列およびアミノ酸配列)

配列番号 25 : ヒトのトランスサイレチンのシステイン残基のアミノ酸配列

配列番号 26 : マウスのトランスサイレチンのシステイン残基のアミノ酸配列

配列番号 27 : ラットのトランスサイレチンのシステイン残基のアミノ酸配列

配列番号 28 : Gallus Gallus のトランスサイレチンのシステイン残基のアミノ酸配列

【発明を実施するための最良の形態】

【0027】 20

以下、本発明を説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の冠詞 (例えば、英語の場合は「a」、「an」、「the」など、他の言語における対応する冠詞、形容詞など) 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。

【0028】

(一般技術)

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 Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor およびその 3rd Ed. (2001); Ausubel, F.M. (1987). Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Ausubel, F.M. (1989). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Sambrook, J. et al. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor 30
; Innis, M.A. (1990). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press; Ausubel, F.M. (1992). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates; Ausubel, F.M. (1995). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates; Innis, M.A. et al. (1995) 40
 50

. PCR Strategies, Academic Press; Ausubel, F. M. (1999). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, and annual updates; Sninsky, J. J. et al. (1999). PCR Applications: Protocols for Functional Genomics, Academic Press、別冊実験医学「遺伝子導入&発現解析実験法」羊土社、1997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)が参考として援用される。

【0029】

プロテインチップに関連する技術としては、例えば、サイファージェン社から入手可能な技術などを挙げるができる。

【0030】

(用語の説明)

以下に本明細書において使用される用語を説明する。

【0031】

(マーカー物質として同定された代表的な遺伝子産物)

本明細書において「マーカー物質」とは、ある状態(例えば、糖尿病などの疾患)に罹患しているかまたはその危険性があるかどうかを追跡する示標となる物質をいう。このようなマーカー物質としては、遺伝子、遺伝子産物、代謝物質、酵素などを挙げるができる。

【0032】

本明細書において、「遺伝子産物」とは、遺伝子によってコードされるタンパク質またはmRNAをいう。本明細書では、糖代謝に直接関連しない遺伝子産物(すなわち、インスリンなどの糖代謝に関連しないタンパク質など)が糖尿病の指標として使用可能であることが見出された。

【0033】

本明細書において「トランスサイレチン(TTR)」とは、別名ブリアルブミンともいい、同質のサブユニットからなる四量体を形成するタンパク質として知られており、血中ビタミンA輸送タンパク質であるレチノール結合タンパク質(RBP)とタンパク質複合体を形成し、チロキシン(T4)と結合することが知られている。ラットでは、主なT4輸送タンパク質として知られている。

【0034】

トランスサイレチンは、Raz, A.らにより単離精製され、神田らにより一次構造が同定された(Raz, A. & Goodman D. S., (1969), J. Biol. Chem. 224, 3230-3237; Kanda, Y. et al., (1974), J. Biol. Chem., 247, 6796-6805)。これまで、その異常がアルツハイマー性痴呆および家族性アミロイドーシスポリニューロパチーと関連していることが知られている。

【0035】

トランスサイレチンの代表的なヌクレオチド配列は、

(a) 配列番号1または配列番号3に記載の塩基配列またはそのフラグメント配列を有するポリヌクレオチド;

(b) 配列番号2または配列番号4に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド;

(c) 配列番号2または配列番号4に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される1つの変異を有する改変体ポリペプチドまたはそのフラグメントであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド;

10

20

30

40

50

(d) 配列番号1または配列番号3に記載の塩基配列のスプライス変異体もしくは対立遺伝子変異体またはそのフラグメントである、ポリヌクレオチド；

(e) 配列番号2または配列番号4に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの種相同体またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド；

(f) (a) ~ (e) のいずれか1つのポリヌクレオチドにストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または

(g) (a) ~ (e) のいずれか1つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも70%である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

であり得る。

【0036】

トランスサイレチンのアミノ酸配列としては、

(a) 配列番号2または配列番号4に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントからなる、ポリペプチド；

(b) 配列番号2または配列番号4に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が置換、付加および欠失からなる群より選択される1つの変異を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド；

(c) 配列番号1または配列番号3に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体によってコードされる、ポリペプチド；

(d) 配列番号2または配列番号4に記載のアミノ酸配列の種相同体である、ポリペプチド；または

(e) (a) ~ (d) のいずれか1つのポリペプチドに対する同一性が少なくとも70%であるアミノ酸配列を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、

であり得る。

【0037】

トランスサイレチンの代表的な配列は、配列番号1または配列番号3（核酸配列）および配列番号2または配列番号4（アミノ酸配列）において示される。

【0038】

ここで、トランスサイレチンの生物学的活性としては、例えば、四量体を形成するタンパク質として知られており、血中ビタミンA輸送タンパク質であるレチノール結合タンパク質（RBP）とタンパク質複合体を形成し、チロキシン（T4）と結合する能力を挙げることができる。

【0039】

トランスサイレチンは分子量約14000のサブユニット4個からなる複合タンパク質であり、肝臓で合成される。血液中のトランスサイレチンの臨床的意義としては、栄養状態および肝臓のタンパク質合成能を反映しているとされ、ネフローゼ症候群や急性肝炎の回復期等で高値を示すことが知られている。なお、本明細書では、トランスサイレチンというときは、4量体の複合タンパク質とサブユニット単体とを特に区別せず、両方を指すものとする。

【0040】

トランスサイレチンおよびその誘導体は、ヒト、ラットのほか、他の動物（例えば、哺乳動物）でもそのホモログ（本明細書において、「対応する」遺伝子またはタンパク質などという）が知られている。従って、本明細書においてトランスサイレチンおよびその誘導体は、通常、特に言及しない場合は、ヒト、ラットのほか、生物一般において存在するトランスサイレチンおよびその誘導体を指す。

【0041】

本明細書において「トランスサイレチン誘導体」とは、トランスサイレチンの任意の誘導体を指し、特に、翻訳後修飾などの生体内での代謝産物をいう。代表的なトランスサイレチン誘導体の改変を、以下に質量変動値とともに示す：

10

20

30

40

50

【 0 0 4 2 】

【 表 1 】

タンパク質やペプチドにおける 代表的な翻訳後修飾とその質量変化

修飾基 Modifications	質量変動値 Monoisotopic Mass	修飾基 Modifications	質量変動値 Monoisotopic Mass
メチオニンのホモセリン化	-29.99	ヘキソサミン (GalN, GlcN)	161.06
グルタミンからのヒドログルタミン化	-17.02	ヘキソース (Man, Gal, Glc)	162.05
ジスルフィド (S-S) 結合の形成	-2.01	リボン酸 (リジンとアミド結合)	188.03
Gly の C-末端アミド形成	-0.98	N-アセチルヘキソサミン (GalNAc, GlcNAc)	203.07
Asn や Gln のデアミド化	-0.98	ファルネシル化	204.18
メチル化	14.01	ミリスチル化	210.19
ヒドロキシル化	15.99	ピオチン化 (1級アミンとアミド結合)	226.07
メチオニンの酸化	15.99	ピリドキサルリン酸 (1級アミンとシッフ塩基を形成)	231.02
ペプチド結合1個の解離	18.01	ステアロイル化	266.26
ホルミル化	27.99	ゲラニルゲラニル化	272.25
アセチル化	42.01	シアル酸 (NeuAc, NANA, SA)	291.09
Asp や Glu のカルボキシル化	43.98	グルタチオン化	305.06
リン酸化	79.96	N-グリコシルニューラミン酸 (NeuGc)	307.09
硫酸化	79.95	5'-アデニル化	329.05
システイン化	119.00	4'-フォスフォバントニン	339.07
ペントース (Ara, Rib, Xyl)	132.04	ADP-リボシル化 (from DNA)	541.06
デオキシヘキソース (Fuc, Rha)	146.05		

10

【 0 0 4 3 】

20

【 0 0 4 4 】

本明細書では、代表的な、トランスサイレチン誘導体としては、システイン化（システイニル）、グルタチオン化、S - S 結合形成、酸化（例えば、メチオニン側鎖の酸化）、ホルミル化、アセチル化、リン酸化、糖鎖付加、ミリスチル化などを挙げることができるがそれらに限定されない。

【 0 0 4 5 】

本発明では、糖尿病の患者またはその危険が高い被験体において、トランスサイレチンの量が減少し、代わって、トランスサイレチンの特定の誘導体（例えば、システイニルトランスサイレチン、グルタチオン化トランスサイレチン、S - S 結合形成したトランスサイレチン、酸化トランスサイレチン（例えば、メチオニン側鎖が酸化したトランスサイレチン）、ホルミル化トランスサイレチン、アセチル化トランスサイレチン、リン酸化トランスサイレチン、糖鎖付加トランスサイレチン、ミリスチル化トランスサイレチン）が増加していることが明らかになった。従って、これらのトランスサイレチンの減少またはトランスサイレチン誘導体の増加を指標として、糖尿病またはその危険が高い被験体を診断または事前診断することが可能である。

30

【 0 0 4 6 】

本明細書において「アポリポタンパク質」または「アポ脂質タンパク質」とは、脂質と結合して脂質タンパク質を形成するタンパク質をいい、A、B、C、DおよびEに大別される。ヒトの血漿乳び脂粒（カイロミクロン）、HDL、LDL、およびVLDLなどの典型的な成分であるリポタンパク質複合体のタンパク質成分である。アポリポタンパク質C - II（APOC2と略することがある）は、VLDL、HDLやカイロミクロン中に存在するアポリポタンパク質である。リポタンパク質リパーゼの活性化因子である。このタンパク質の欠損により高カイロミクロン血症や高トリグリセリド血症が生じる。アポリポタンパク質C - III（APOC3と略することがある）は、VLDL、HDLやカイロミクロン中に存在するアポリポタンパク質であり、多数のリパーゼを抑制することが知られている。アポリポタンパク質Cなどについての概説は、Bondarenko, P. V. et al. J. Lipid Res. 1999;40:543-555を参照のこと。

40

【 0 0 4 7 】

50

アポリポタンパク質C I Iの代表的なヌクレオチド配列は、

(a) 配列番号5または配列番号7に記載の塩基配列またはそのフラグメント配列を有するポリヌクレオチド；

(b) 配列番号6または配列番号8に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド；

(c) 配列番号6または配列番号8に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される1つの変異を有する改変体ポリペプチドまたはそのフラグメントであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

(d) 配列番号5または配列番号7に記載の塩基配列のスプライス変異体もしくは対立遺伝子変異体またはそのフラグメントである、ポリヌクレオチド；

(e) 配列番号6または配列番号8に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの種相同体またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド；

(f) (a) ~ (e) のいずれか1つのポリヌクレオチドにストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または

(g) (a) ~ (e) のいずれか1つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも70%である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

【0048】

アポリポタンパク質C I Iのアミノ酸配列としては、

(a) 配列番号6または配列番号8に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントからなる、ポリペプチド；

(b) 配列番号6または配列番号8に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が置換、付加および欠失からなる群より選択される1つの変異を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド；

(c) 配列番号5または配列番号7に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体によってコードされる、ポリペプチド；

(d) 配列番号6または配列番号8に記載のアミノ酸配列の種相同体である、ポリペプチド；または

(e) (a) ~ (d) のいずれか1つのポリペプチドに対する同一性が少なくとも70%であるアミノ酸配列を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、

【0049】

アポリポタンパク質C I Iの代表的な配列は、配列番号5または配列番号7（核酸配列）および配列番号6または配列番号8（アミノ酸配列）において示される。

【0050】

アポリポタンパク質C I Iの生物学的活性としては、例えば、VLDL、HDLやカイロミクロンを構成する能力などを挙げることができる。

【0051】

アポリポタンパク質C I Iは、ヒト、ラットのほか、他の動物（例えば、哺乳動物）でもそのホモログ（本明細書において、「対応する」遺伝子またはタンパク質などという）が知られている。従って、本明細書においてアポリポタンパク質C I Iは、通常、特に言及しない場合は、ヒト、ラットのほか、生物一般において存在するアポリポタンパク質C I Iを指す。

【0052】

アポリポタンパク質は、プロ体として生成される。より詳細な判定をする場合には、プロ体と成熟体とを区別してみることが好ましい。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 3 】

アポリポタンパク質 C I I I の代表的なヌクレオチド配列は、

(a) 配列番号 9 または配列番号 1 1 に記載の塩基配列またはそのフラグメント配列を有するポリヌクレオチド；

(b) 配列番号 1 0 または配列番号 1 2 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド；

(c) 配列番号 1 0 または配列番号 1 2 に記載のアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドまたはそのフラグメントであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

(d) 配列番号 9 または配列番号 1 1 に記載の塩基配列のスプライス変異体もしくは対立遺伝子変異体またはそのフラグメントである、ポリヌクレオチド；

(e) 配列番号 1 0 または配列番号 1 2 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの種相同体またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド；

(f) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドにストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または

(g) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも 7 0 % である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

であり得る。

【 0 0 5 4 】

アポリポタンパク質 C I I I のアミノ酸配列としては、

(a) 配列番号 1 0 または配列番号 1 2 に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントからなる、ポリペプチド；

(b) 配列番号 1 0 または配列番号 1 2 に記載のアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が置換、付加および欠失からなる群より選択される 1 つの変異を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド；

(c) 配列番号 9 または配列番号 1 1 に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体によってコードされる、ポリペプチド；

(d) 配列番号 1 0 または配列番号 1 2 に記載のアミノ酸配列の種相同体である、ポリペプチド；または

(e) (a) ~ (d) のいずれか 1 つのポリペプチドに対する同一性が少なくとも 7 0 % であるアミノ酸配列を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、

であり得る。

【 0 0 5 5 】

アポリポタンパク質 C I I I の代表的な配列は、配列番号 9 または配列番号 1 1 (核酸配列) および配列番号 1 0 または配列番号 1 2 (アミノ酸配列) において示される。

【 0 0 5 6 】

アポリポタンパク質 C I I I の生物学的活性としては、例えば、V L D L , H D L やカイロミクロンを構成する能力などを挙げることができる。

【 0 0 5 7 】

アポリポタンパク質 C I I I は、ヒト、ラットのほか、他の動物 (例えば、哺乳動物) でもそのホモログ (本明細書において、「対応する」遺伝子またはタンパク質などという) が知られている。従って、本明細書においてアポリポタンパク質 C I I I は、通常、特に言及しない場合は、ヒト、ラットのほか、生物一般において存在するアポリポタンパク質 C I I I を指す。

【 0 0 5 8 】

アポリポタンパク質 C I I I は、糖鎖の結合度合いにより、C I I I 0、C I I I 1、C I I I 2 の少なくとも 3 種類が存在することが知られている。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 9 】

このように、アポリポタンパク質C I I Iは3種のタンパク質の総称であり、アポリポタンパク質C I I I 0、アポリポタンパク質C I I I 1、アポリポタンパク質C I I I 2に分類される。そして、本発明の糖尿病の診断方法においては、これら3種のアポリポタンパク質C I I Iの少なくとも1種の濃度を測定する。本発明の糖尿病の診断方法によれば、アポリポタンパク質C I I Iの濃度を細分化して測定するので、精度が高い。

【 0 0 6 0 】

アポリポタンパク質C I I Iは血液中に存在する10種類以上のアポリポタンパク質の1種であり、肝臓で合成される。血液中のアポリポタンパク質C I I Iの臨床的意義としては、閉塞性黄疸や抗脂血症で高値を示すことが知られている。また、アポリポタンパク質C I I Iは糖鎖の有無および構造の違いにより、アポリポタンパク質C I I I 0、アポリポタンパク質C I I I 1、アポリポタンパク質C I I I 2の3種にさらに分類される。アポリポタンパク質C I I I 0は糖鎖を持たないものであり、アポリポタンパク質C I I I 1はアポリポタンパク質C I I I 0に糖鎖が付加されたものであり、アポリポタンパク質C I I I 2はアポリポタンパク質C I I I 1にさらに複合的に糖鎖が付加されたものである。

10

【 0 0 6 1 】

Bondarenko, P. V. et al. J. Lipid Res. 1999;40:543-555によれば、アポリポタンパク質C I I I 0、アポリポタンパク質C I I I 1、アポリポタンパク質C I I I 2は以下のような構造をしている。

【 0 0 6 2 】

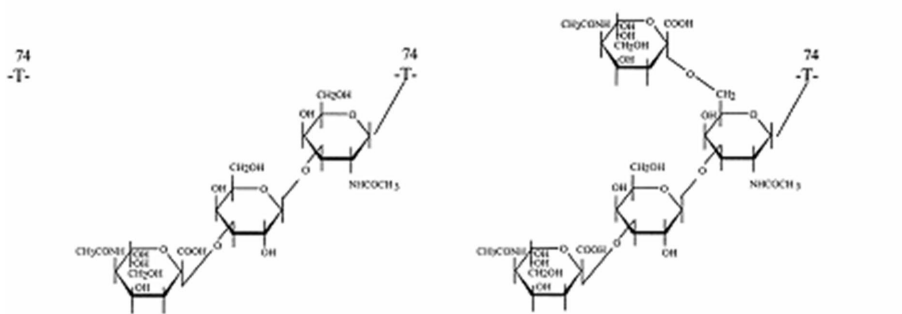
【 化 1 】

20

Proapo C-II, MM = 8914.9
 IQQPQQDEMP SPTFLTQVKÉ SLSSYWESAK TAAQNLYEKT YLPAVDEKLR DLYSKSTAAM STYTGIFTDQ VLSVLKGEÉ

Apo C-III, MM = 8765.7 Da for apo C-III₂
 SEAEDASLLS FMOGYMKHAT KTAKDALSIV QESQVAQQAR GWVTDGFSSL KDYWSTVKDK FSEFWLDLPE VRPTSAVAA
 Sugar chain

Apo C-III₀ Apo C-III₁ Apo C-III₂



30

【 0 0 6 3 】

これらを識別するには、識別可能な抗体などの特異的因子を用いるか、またはこれら特定の糖鎖を選択的に切断する酵素を用いて処理し、分子量が減少するかどうかを判定することなどによって確認することができる。

40

【 0 0 6 4 】

本明細書において「血清アルブミン」とは、血清中に含まれるアルブミンをいい、漿蛋白質中にもっとも多量に含まれ(100mlあたり約4g)で、全蛋白質の60%を占めるである。ヒトでは、分子量64000-68000、等電点pH4.7-4.9である。その役割はいくつかあり、血液の浸透圧の維持、様々な物質(イオン、色素、一部の水溶性ビタミン、薬剤など)を結合し運搬すること、組織へのアミノ酸の供給源となることなどである。血清アルブミンはアルブミンの1種であり、血清中で最も多量に存在するタンパク質である。血清アルブミンは、分子量約69000(アミノ酸1次構造からの計算値は66439)の糖鎖を持たない

50

タンパク質であり、肝臓で合成される。血液中の血清アルブミンの臨床的意義としては、栄養状態の悪化や肝障害の程度を反映して低値を示すことが知られている。

【 0 0 6 5 】

血清アルブミンの代表的なヌクレオチド配列は、

(a) 配列番号 1 3 または配列番号 1 5 に記載の塩基配列またはそのフラグメント配列を有するポリヌクレオチド；

(b) 配列番号 1 4 または配列番号 1 6 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド；

(c) 配列番号 1 4 または配列番号 1 6 に記載のアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドまたはそのフラグメントであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

(d) 配列番号 1 3 または配列番号 1 5 に記載の塩基配列のスプライス変異体もしくは対立遺伝子変異体またはそのフラグメントである、ポリヌクレオチド；

(e) 配列番号 1 4 または配列番号 1 6 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの種相同体またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド；

(f) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドにストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または

(g) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも 7 0 % である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

であり得る。

【 0 0 6 6 】

血清アルブミンのアミノ酸配列としては、

(a) 配列番号 1 4 または配列番号 1 6 に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントからなる、ポリペプチド；

(b) 配列番号 1 4 または配列番号 1 6 に記載のアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が置換、付加および欠失からなる群より選択される 1 つの変異を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド；

(c) 配列番号 1 3 または配列番号 1 5 に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体によってコードされる、ポリペプチド；

(d) 配列番号 1 4 または配列番号 1 6 に記載のアミノ酸配列の種相同体である、ポリペプチド；または

(e) (a) ~ (d) のいずれか 1 つのポリペプチドに対する同一性が少なくとも 7 0 % であるアミノ酸配列を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、

であり得る。

【 0 0 6 7 】

血清アルブミンの代表的な配列は、配列番号 1 3 または配列番号 1 5 (核酸配列) および配列番号 1 4 または配列番号 1 6 (アミノ酸配列) において示される。

【 0 0 6 8 】

血清アルブミンの生物学的活性としては、例えば、血液の浸透圧の維持、様々な物質(イオン、色素、一部の水溶性ビタミン、薬剤など)を結合し運搬すること、組織へのアミノ酸の供給源となる能力などを挙げることができる。

【 0 0 6 9 】

血清アルブミンは、ヒト、ラットのほか、他の動物(例えば、哺乳動物)でもそのホモログ(本明細書において、「対応する」遺伝子またはタンパク質などという)が知られている。従って、本明細書において血清アルブミンは、通常、特に言及しない場合は、ヒト、ラットのほか、生物一般において存在する血清アルブミンを指す。血清アルブミンの他

10

20

30

40

50

の動物の配列は、マウス（配列番号17 - 18）、イヌ（配列番号19 - 20）、ウサギ（配列番号21 - 22）、サル（配列番号23 - 24）を挙げることができる。

【0070】

（診断・事前診断（予防）因子）

本発明において、診断、または事前診断は、マーカー物質に特異的な因子または手段を用いて実現することができる。

【0071】

本明細書において「因子」（agent）としては、意図する目的を達成することができる限りどのような物質または他の要素（例えば、光、放射能、熱、電気などのエネルギー）でもあってよい。そのような物質としては、例えば、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド、ペプチド、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、脂質、有機低分子（例えば、ホルモン、リガンド、情報伝達物質、有機低分子、コンビナトリアルケミストリで合成された分子、医薬品として利用され得る低分子（例えば、低分子リガンドなど）など）、これらの複合分子が挙げられるがそれらに限定されない。ポリヌクレオチドに対して特異的な因子としては、代表的には、そのポリヌクレオチドの配列に対して一定の配列相同性を（例えば、70%以上の配列同一性）もって相補性を有するポリヌクレオチド、プロモーター領域に結合する転写因子のようなポリペプチドなどが挙げられるがそれらに限定されない。ポリペプチドに対して特異的な因子としては、代表的には、そのポリペプチドに対して特異的に指向された抗体またはその誘導体あるいはその類似物（例えば、単鎖抗体）、そのポリペプチドがレセプターまたはリガンドである場合の特異的なリガンドまたはレセプター、そのポリペプチドが酵素である場合、その基質などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0072】

したがって、本明細書においてポリヌクレオチドまたはポリペプチドなどの生物学的因子に対して「特異的に相互作用する因子」とは、そのポリヌクレオチドまたはそのポリペプチドなどの生物学的因子に対する親和性が、他の無関連の（特に、同一性が30%未満の）ポリヌクレオチドまたはポリペプチドに対する親和性よりも、代表的には同等またはより高いか、好ましくは有意に（例えば、統計学的に有意に）高いものを包含する。そのような親和性は、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、結合アッセイなどによって測定することができる。

【0073】

本明細書において第一の物質または因子が第二の物質または因子に「特異的に相互作用する」とは、第一の物質または因子が、第二の物質または因子に対して、第二の物質または因子以外の物質または因子（特に、第二の物質または因子を含むサンプル中に存在する他の物質または因子）に対するよりも高い親和性で相互作用することをいう。物質または因子について特異的な相互作用としては、例えば、核酸におけるハイブリダイゼーション、タンパク質における抗原抗体反応、リガンド - レセプター反応、酵素 - 基質反応など、核酸およびタンパク質の両方が関係する場合、転写因子とその転写因子の結合部位との反応など、タンパク質 - 脂質相互作用、核酸 - 脂質相互作用などが挙げられるがそれらに限定されない。従って、物質または因子がともに核酸である場合、第一の物質または因子が第二の物質または因子に「特異的に相互作用する」ことには、第一の物質または因子が、第二の物質または因子に対して少なくとも一部に相補性を有することが包含される。また例えば、物質または因子がともにタンパク質である場合、第一の物質または因子が第二の物質または因子に「特異的に相互作用する」こととしては、例えば、抗原抗体反応による相互作用、レセプター - リガンド反応による相互作用、酵素 - 基質相互作用などが挙げられるがそれらに限定されない。2種類の物質または因子がタンパク質および核酸を含む場合、第一の物質または因子が第二の物質または因子に「特異的に相互作用する」ことには、転写因子と、その転写因子が対象とする核酸分子の結合領域との間の相互作用が包含される。

10

20

30

40

50

【0074】

本明細書において「抗体」は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、多重特異性抗体、キメラ抗体、および抗イディオタイプ抗体、ならびにそれらの断片、例えばF(a b')₂およびFab断片、ならびにその他の組換えにより生産された結合体を含む。さらにこのような抗体を、酵素、例えばアルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ガラクトシダーゼなど、に共有結合させまたは組換えにより融合させてよい。

【0075】

本明細書において「手段」とは、ある目的を達成する任意の道具となり得るものをいい、特に、本明細書では、「選択的に認識する手段」とは、ある対象を他のものとは異なって認識することができる手段をいう。このような能力については、ある対象（たとえば、トランスサイレチン）を他のもの（たとえば、システニルトランスサイレチンのようなトランスサイレチン誘導体）から本明細書において「識別する能力」ということもある。本明細書において用いる場合は、選択的に認識する手段としては、両方を認識するが、示差的に認識することができさえすればよく、片方のみを認識しもう片方は認識しないような手段である必要はない。ただし、好ましくは、片方のみを認識しもう片方は認識しないような手段であることが有利である。結果の解釈が効率よく行えるからである。

【0076】

本明細書において「抗原」(antigen)とは、抗体分子によって特異的に結合され得る任意の基質をいう。本明細書において「免疫原」(immunogen)とは、抗原特異的免疫応答を生じるリンパ球活性化を開始し得る抗原をいう。

【0077】

本明細書において使用される抗体は、擬陽性が減じられるかぎり、どのような特異性の抗体を用いても良いことが理解される。従って、本発明において用いられる抗体は、ポリクローナル抗体であってもよく、モノクローナル抗体であってもよい。

【0078】

本明細書中で使用される「化合物」は、任意の識別可能な化学物質または分子を意味し、これらには、低分子、ペプチド、タンパク質、糖、ヌクレオチド、または核酸が挙げられるが、これらに限定されず、そしてこのような化合物は、天然物または合成物であり得る。

【0079】

本明細書において「有機低分子」とは、有機分子であって、比較的分子量が小さなものをいう。通常有機低分子は、分子量が約1000以下のものをいうが、それ以上のものであってもよい。有機低分子は、通常当該分野において公知の方法を用いるかそれらを組み合わせることで合成することができる。そのような有機低分子は、生物に生産させてもよい。有機低分子としては、例えば、ホルモン、リガンド、情報伝達物質、有機低分子、コンビナトリアルケミストリで合成された分子、医薬品として利用され得る低分子（例えば、低分子リガンドなど）などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0080】

本明細書において「リガンド」とは、あるタンパク質に特異的に結合する物質をいう。例えば、細胞膜上に存在する種々のレセプタータンパク質分子と特異的に結合するレクチン、抗原、抗体、ホルモン、神経伝達物質などがリガンドとして挙げられる。

【0081】

本明細書において「タンパク質」、「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのアミノ酸のポリマーをいう。このポリマーは、直鎖であっても分岐していてもよく、環状であってもよい。アミノ酸は、天然のものであっても非天然のものであってもよく、改変されたアミノ酸であってもよい。この用語はまた、複数のポリペプチド鎖の複合体へとアセンブルされた複合体をさし得る。この用語はまた、天然または人工的に改変されたアミノ酸ポリマーも包含する。そのような改変としては、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化または任意の他の操作もしくは改変（例えば、標識成分との結合体

10

20

30

40

50

化)などが挙げられる。この定義にはまた、例えば、アミノ酸の1または2以上のアナログを含むポリペプチド(例えば、非天然のアミノ酸などを含む)、ペプチド様化合物(例えば、ペプチド)および当該分野において公知の他の改変が包含される。特に言及する場合、本発明の「ポリペプチド」は、マーカー物質を指すことがある。

【0082】

本明細書において「アミノ酸」は、天然のものでも非天然のものでもよい。「誘導体アミノ酸」または「アミノ酸アナログ」とは、天然に存在するアミノ酸とは異なるがもとのアミノ酸と同様の機能を有するものをいう。そのような誘導体アミノ酸およびアミノ酸アナログは、当該分野において周知である。

【0083】

本明細書において「天然のアミノ酸」とは、天然のアミノ酸のL-異性体を意味する。天然のアミノ酸は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、メチオニン、トレオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、プロリン、ヒスチジン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、 γ -カルボキシグルタミン酸、アルギニン、オルニチン、およびリジンである。特に示されない限り、本明細書でいう全てのアミノ酸はL体である。

【0084】

本明細書において「非天然アミノ酸」とは、タンパク質中で通常は天然に見出されないアミノ酸を意味する。非天然アミノ酸の例として、上述のD型アミノ酸、ノルロイシン、パラ-ニトロフェニルアラニン、ホモフェニルアラニン、パラ-フルオロフェニルアラニン、3-アミノ-2-ベンジルプロピオン酸、ホモアルギニンのD体またはL体およびD-フェニルアラニンが挙げられる。

【0085】

本明細書において「アミノ酸アナログ」とは、アミノ酸ではないが、アミノ酸の物性および/または機能に類似する分子をいう。アミノ酸アナログとしては、例えば、エチオニン、カナバニン、2-メチルグルタミンなどが挙げられる。アミノ酸模倣物とは、アミノ酸の一般的な化学構造とは異なる構造を有するが、天然に存在するアミノ酸と同様な様式で機能する化合物をいう。

【0086】

アミノ酸は、その一般に公知の3文字記号か、またはIUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionにより推奨される1文字記号のいずれかにより、本明細書中で言及され得る。ヌクレオチドも同様に、一般に受け入れられた1文字コードにより言及され得る。

【0087】

本明細書において「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのヌクレオチドのポリマーをいう。この用語はまた、「オリゴヌクレオチド誘導体」または「ポリヌクレオチド誘導体」を含む。「オリゴヌクレオチド誘導体」または「ポリヌクレオチド誘導体」とは、ヌクレオチドの誘導体を含むか、またはヌクレオチド間の結合が通常とは異なるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドをいい、互換的に使用される。そのようなオリゴヌクレオチドとして具体的には、例えば、2'-O-メチル-リボヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5'ホスホロアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合とがペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン(phenoxazine-modified cytosine)で置換さ

10

20

30

40

50

れたオリゴヌクレオチド誘導体、DNA中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体およびオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体などが例示される。他にそうではないと示されなければ、特定の核酸配列はまた、明示的に示された配列と同様に、その保存的に改変された改変体（例えば、縮重コドン置換体）および相補配列を包含することが企図される。具体的には、縮重コドン置換体は、1またはそれ以上の選択された（または、すべての）コドンの3番目の位置が混合塩基および/またはデオキシノシン残基で置換された配列を作成することにより達成され得る（Batzera, Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka, J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); Rossolini, Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)）。

10

【0088】

本明細書において「ヌクレオチド」は、天然のものでも非天然のものでもよい。「ヌクレオチド誘導体」または「ヌクレオチドアナログ」とは、天然に存在するヌクレオチドとは異なるがもとのヌクレオチドと同様の機能を有するものをいう。そのようなヌクレオチド誘導体およびヌクレオチドアナログは、当該分野において周知である。そのようなヌクレオチド誘導体およびヌクレオチドアナログの例としては、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、メチルホスホネート、キラルメチルホスホネート、2'-O-メチルリボヌクレオチド、ペプチド型核酸（PNA）が含まれるが、これらに限定されない。

【0089】

20

本明細書において「複合分子」とは、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、脂質、糖、低分子などの分子が複数種連結してできた分子をいう。そのような複合分子としては、例えば、糖脂質、糖ペプチドなどが挙げられるがそれらに限定されない。本明細書では、配列番号2のアミノ酸を有するポリペプチドまたはその改変体もしくはフラグメントであって、診断に關与する生物学的な活性性を有する限り、それぞれの改変体もしくはフラグメントなどをコードする核酸分子も使用することができる。また、そのような核酸分子を含む複合分子も使用することができる。

【0090】

本明細書において「核酸」はまた、遺伝子、cDNA、mRNA、オリゴヌクレオチド、およびポリヌクレオチドと互換可能に使用される。特定の核酸配列はまた、「スプライス改変体」を包含する。同様に、核酸によりコードされた特定のタンパク質は、その核酸のスプライス改変体によりコードされる任意のタンパク質を暗黙に包含する。その名が示唆するように「スプライス改変体」は、遺伝子のオルタナティブスプライシングの産物である。転写後、最初の核酸転写物は、異なる（別の）核酸スプライス産物が異なるポリペプチドをコードするようにスプライスされ得る。スプライス改変体の産生機構は変化するが、エキソンのオルタナティブスプライシングを含む。読み越し転写により同じ核酸に由来する別のポリペプチドもまた、この定義に包含される。スプライシング反応の任意の産物（組換え形態のスプライス産物を含む）がこの定義に含まれる。

30

【0091】

本明細書において「遺伝子」とは、遺伝形質を規定する因子をいう。通常染色体上に一定の順序に配列している。タンパク質の一次構造を規定する遺伝子を構造遺伝子といい、その発現を左右する遺伝子を調節遺伝子という。本明細書では、「遺伝子」は、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸」ならびに/あるいは「タンパク質」、「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」をさすことがある。

40

【0092】

本明細書において遺伝子の「相同性」とは、2以上の遺伝子配列の、互いに対する同一性の程度をいう。従って、ある2つの遺伝子の相同性が高いほど、それらの配列の同一性または類似性は高い。2種類の遺伝子が相同性を有するか否かは、配列の直接の比較、または核酸の場合ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーション法によって調べられ得る。2つの遺伝子配列を直接比較する場合、その遺伝子配列間でDNA配列が、代表

50

的には少なくとも50%同一である場合、好ましくは少なくとも70%同一である場合、より好ましくは少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である場合、それらの遺伝子は相同性を有する。

【0093】

本明細書ではアミノ酸および塩基配列の類似性、相同性および同一性の比較は、配列分析用ツールであるBLASTを用いてデフォルトパラメータを用いて算出される。同一性の検索は例えば、NCBIのBLAST 2.2.9 (2004.5.12 発行)を用いて行うことができる。本明細書における同一性の値は通常は上記BLASTを用い、デフォルトの条件でアラインした際の値をいう。ただし、パラメータの変更により、より高い値が出る場合は、最も高い値を同一性の値とする。複数の領域で同一性が評価される場合はそのうちの最も高い値を同一性の値とする。

10

【0094】

本明細書において「対応する」アミノ酸または核酸とは、あるポリペプチド分子またはポリヌクレオチド分子において、比較の基準となるポリペプチドまたはポリヌクレオチドにおける所定のアミノ酸またはヌクレオチドと同様の作用を有するか、または有することが予測されるアミノ酸またはヌクレオチドをいい、特に酵素分子にあっては、活性部位中の同様の位置に存在し触媒活性に同様の寄与をするアミノ酸をいう。例えば、アンチセンス分子であれば、そのアンチセンス分子の特定の部分に対応するオルソログにおける同様の部分であり得る。対応するアミノ酸は、例えば、システイン化、グルタチオン化、S-S結合形成、酸化(例えば、メチオニン側鎖の酸化)、ホルミル化、アセチル化、リン酸化、糖鎖付加、ミリスチル化などがされる特定のアミノ酸であり得る。あるいは、対応するアミノ酸は、二量体化を担うアミノ酸であり得る。このような「対応する」アミノ酸または核酸は、一定範囲にわたる領域またはドメインであってもよい。従って、そのような場合、本明細書において「対応する」領域またはドメインと称される。

20

【0095】

本明細書において「対応する」遺伝子(例えば、ポリペプチド分子またはポリヌクレオチド分子)とは、ある種において、比較の基準となる種における所定の遺伝子と同様の作用を有するか、または有することが予測される遺伝子(例えば、ポリペプチド分子またはポリヌクレオチド分子)をいい、そのような作用を有する遺伝子が複数存在する場合、進化的に同じ起源を有するものをいう。従って、ある遺伝子に対応する遺伝子は、その遺伝子のオルソログであり得る。従って、マウス、ラットのアポリポタンパク質CII, アポリポタンパク質CIII, トランスサイレチン、血清アルブミンは、それぞれ、ヒトにおいて、対応するアポリポタンパク質CII, アポリポタンパク質CIII, トランスサイレチン、血清アルブミンを見出すことができる。そのような対応する遺伝子は、当該分野において周知の技術を用いて同定することができる。したがって、例えば、ある動物(例えば、マウス)における対応する遺伝子は、対応する遺伝子の基準となる遺伝子(例えば、アポリポタンパク質CII, アポリポタンパク質CIII, トランスサイレチン、血清アルブミン)は、の配列をクエリ配列として用いてその動物(例えばヒト、ラット)の配列データベースを検索することによって見出すことができる。

30

【0096】

本明細書において「フラグメント」とは、全長のポリペプチドまたはポリヌクレオチド(長さがn)に対して、1~n-1までの配列長さを有するポリペプチドまたはポリヌクレオチドをいう。フラグメントの長さは、その目的に応じて、適宜変更することができ、例えば、その長さの下限としては、ポリペプチドの場合、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50およびそれ以上のアミノ酸が挙げられ、この具体的に列挙していない整数で表される長さ(例えば、11など)もまた、下限として適切であり得る。また、ポリヌクレオチドの場合、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、75、100およびそれ以上のヌクレオチドが挙げられ、この具体的に列挙していない整数で表される長さ(例えば、11など)もまた、下限として適切であり得る。本明細書において、このようなフラグメントは、例えば、全長のも

40

50

のがマーカーとして機能する場合、そのフラグメント自体もまたマーカーとしての機能を有する限り、本発明の範囲内に入ることが理解される。

【0097】

本明細書中で使用される「接触（させる）」とは、化合物を、直接的または間接的のいずれかで、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対して物理的に近接させることを意味する。ポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、多くの緩衝液、塩、溶液などに存在し得る。接触とは、核酸分子またはそのフラグメントをコードするポリペプチドを含む、例えば、ビーカー、マイクロタイタープレート、細胞培養フラスコまたはマイクロアレイ（例えば、遺伝子チップ）などに化合物を置くことが挙げられる。

【0098】

本明細書において「ストリンジেন্টな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド」とは、当該分野で慣用される周知の条件をいう。本発明のポリヌクレオチド中から選択されたポリヌクレオチドをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法などを用いることにより、そのようなポリヌクレオチドを得ることができる。具体的には、コロニーあるいはプラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0 MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC (saline-sodium citrate) 溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150 mM 塩化ナトリウム、15 mM クエン酸ナトリウムである）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるポリヌクレオチドを意味する。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning 2nd ed., Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995) などの実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。ここで、ストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズする配列からは、好ましくは、A配列のみまたはT配列のみを含む配列が除外される。従って、本発明において使用されるポリペプチド（例えば、トランスサイレチンなど）には、本発明で特に記載されたポリペプチドをコードする核酸分子に対して、ストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズする核酸分子によってコードされるポリペプチドも

【0099】

本明細書において「ハイブリダイズ可能なポリヌクレオチド」とは、上記ハイブリダイズ条件下で別のポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドをいう。ハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドとして具体的には、配列番号2、4、6などで表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAの塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するポリヌクレオチド、好ましくは80%以上の相同性を有するポリヌクレオチド、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するポリヌクレオチドを挙げることができる。

【0100】

DNA二重鎖の安定性に影響を与える因子としては、塩基の組成、長さおよび塩基対不一致の程度が挙げられる。ハイブリダイゼーション条件は、当業者によって調整され得、これらの変数を適用させ、そして異なる配列関連性のDNAがハイブリッドを形成するのを可能にする。完全に一致したDNA二重鎖の融解温度は、以下の式によって概算され得る。

$$T_m () = 81.5 + 16.6 (\log [Na^+]) + 0.41 (\% G + C) - 600 / N - 0.72 (\% \text{ホルムアミド})$$

ここで、Nは、形成される二重鎖の長さであり、[Na⁺]は、ハイブリダイゼーション溶液または洗浄溶液中のナトリウムイオンのモル濃度であり、%G+Cは、ハイブリッド中の（グアニン+シトシン）塩基のパーセンテージである。不完全に一致したハイブリ

10

20

30

40

50

ッドに関して、融解温度は、各 1 % 不一致 (ミスマッチ) に対して約 1 ずつ減少する。

【 0 1 0 1 】

本明細書において「精製された」生物学的因子 (例えば、核酸またはタンパク質など) とは、その生物学的因子に天然に随伴する因子の少なくとも一部が除去されたものをいう。したがって、通常、精製された生物学的因子におけるその生物学的因子の純度は、その生物学的因子が通常存在する状態よりも高い (すなわち濃縮されている)。

【 0 1 0 2 】

本明細書中で使用される用語「精製された」は、好ましくは少なくとも 75 重量%、より好ましくは少なくとも 85 重量%、よりさらに好ましくは少なくとも 95 重量%、そして最も好ましくは少なくとも 98 重量%の、同型の生物学的因子が存在することを意味する。

10

【 0 1 0 3 】

本明細書において遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなどの「発現」とは、その遺伝子などがインピボで一定の作用を受けて、別の形態になることをいう。好ましくは、遺伝子、ポリヌクレオチドなどが、転写および翻訳されて、ポリペプチドの形態になることをいうが、転写されて mRNA が作製されることもまた発現の一態様であり得る。より好ましくは、そのようなポリペプチドの形態は、翻訳後プロセッシングを受けたもの (本明細書にいう誘導体) であり得る。

【 0 1 0 4 】

本明細書においてポリペプチド発現の「検出」または「定量」は、例えば、mRNA の測定および免疫学的測定方法を含む適切な方法を用いて達成され得る。分子生物学的測定方法としては、例えば、ノーザンブロット法、ドットブロット法または PCR 法などが例示される。免疫学的測定方法としては、例えば、方法としては、マイクロタイタープレートを用いる ELISA 法、RIA 法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法などが例示される。また、定量方法としては、ELISA 法または RIA 法などが例示される。

20

【 0 1 0 5 】

本明細書において「発現量」とは、目的の細胞などにおいて、ポリペプチドまたは mRNA が発現される量をいう。そのような発現量としては、本発明の抗体を用いて ELISA 法、RIA 法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法などの免疫学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本発明ポリペプチドのタンパク質レベルでの発現量、またはノーザンブロット法、ドットブロット法、PCR 法などの分子生物学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本発明において使用されるポリペプチドの mRNA レベルでの発現量が挙げられる。「発現量の変化」とは、上記免疫学的測定方法または分子生物学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本発明において使用されるポリペプチドのタンパク質レベルまたは mRNA レベルでの発現量が増加あるいは減少することを意味する。

30

【 0 1 0 6 】

本明細書中で使用される用語「結合」は、2つのタンパク質もしくは化合物または関連するタンパク質もしくは化合物の間、あるいはそれらの組み合わせの間での、物理的相互作用または化学的相互作用を意味する。結合には、イオン結合、非イオン結合、水素結合、ファンデルワールス結合、疎水性相互作用などが含まれる。物理的相互作用 (結合) は、直接的または間接的であり得、間接的なものは、別のタンパク質または化合物の効果を介するかまたは起因する。直接的な結合とは、別のタンパク質または化合物の効果を介してもまたはそれらに起因しても起こらず、他の実質的な化学中間体を伴わない、相互作用をいう。

40

【 0 1 0 7 】

本明細書中で使用される用語「調節する (modulate)」または「改変する (modify)」は、特定の活性、転写物またはタンパク質の量、質または効果における増加または減少あるいは維持を意味する。

50

【0108】

本明細書において、活性、発現産物（例えば、タンパク質、転写物（RNAなど））の「減少」または「抑制」あるいはその類義語は、特定の活性、転写物またはタンパク質の量、質または効果における減少、または減少させる活性をいう。

【0109】

本明細書において、活性、発現産物（例えば、タンパク質、転写物（RNAなど））の「増加」または「活性化」あるいはその類義語は、特定の活性、転写物またはタンパク質の量、質または効果における増加または増加させる活性をいう。

【0110】

本明細書において「プローブ」とは、インビトロおよび/またはインビボなどのスクリーニングなどの生物学的実験において用いられる、検索の手段となる物質をいい、例えば、特定の塩基配列を含む核酸分子または特定のアミノ酸配列を含むペプチドなどが挙げられるがそれに限定されない。本明細書においてプローブは、マーカー検出手段としてもちいられる。

10

【0111】

通常プローブとして用いられる核酸分子としては、目的とする遺伝子の核酸配列と相同なまたは相補的な、少なくとも8の連続するヌクレオチド長の核酸配列を有するものが挙げられる。そのような核酸配列は、好ましくは、少なくとも9の連続するヌクレオチド長の、より好ましくは少なくとも10の連続するヌクレオチド長の、さらに好ましくは少なくとも11の連続するヌクレオチド長の、少なくとも12の連続するヌクレオチド長の、少なくとも13の連続するヌクレオチド長の、少なくとも14の連続するヌクレオチド長の、少なくとも15の連続するヌクレオチド長の、少なくとも20の連続するヌクレオチド長の、少なくとも25の連続するヌクレオチド長の、少なくとも30の連続するヌクレオチド長の、少なくとも40の連続するヌクレオチド長の、少なくとも50の連続するヌクレオチド長の、少なくとも核酸配列であり得る。プローブとして使用される核酸配列には、上述の配列に対して、少なくとも70%相同な、より好ましくは、少なくとも80%相同な、さらに好ましくは、少なくとも90%相同な、少なくとも95%相同な核酸配列が含まれる。

20

【0112】

本明細書において「検索」とは、電子的にまたは生物学的あるいは他の方法により、ある核酸塩基配列を利用して、特定の機能および/または性質を有する他の核酸塩基配列を見出すことをいう。電子的な検索としては、BLAST (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990))、FASTA (Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 85: 2444-2448 (1988))、Smith and Waterman法 (Smith and Waterman, J. Mol. Biol. 147: 195-197 (1981))、およびNeedleman and Wunsch法 (Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443-453 (1970))などが挙げられるがそれらに限定されない。生物学的な検索としては、ストリンジェントハイブリダイゼーション、ゲノムDNAをナイロンメンブレン等に貼り付けたマクロアレイまたはガラス板に貼り付けたマイクロアレイ（マイクロアレイアッセイ）、PCRおよびin situハイブリダイゼーションなど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、本発明において使用される遺伝子には、このような電子的検索、生物学的検索によって同定された対応遺伝子も含まれるべきであることが意図される。

30

40

【0113】

本明細書における「プライマー」とは、高分子合成酵素反応において、合成される高分子化合物の反応の開始に必要な物質をいう。核酸分子の合成反応では、合成されるべき高分子化合物の一部の配列に相補的な核酸分子（例えば、DNAまたはRNAなど）が用いられ得る。本明細書においてプライマーはマーカー検出手段として使用され得る。

【0114】

50

通常プライマーとして用いられる核酸分子としては、目的とする遺伝子の核酸配列と相補的な、少なくとも8の連続するヌクレオチド長の核酸配列を有するものが挙げられる。そのような核酸配列は、好ましくは、少なくとも9の連続するヌクレオチド長の、より好ましくは少なくとも10の連続するヌクレオチド長の、さらに好ましくは少なくとも11の連続するヌクレオチド長の、少なくとも12の連続するヌクレオチド長の、少なくとも13の連続するヌクレオチド長の、少なくとも14の連続するヌクレオチド長の、少なくとも15の連続するヌクレオチド長の、少なくとも16の連続するヌクレオチド長の、少なくとも17の連続するヌクレオチド長の、少なくとも18の連続するヌクレオチド長の、少なくとも19の連続するヌクレオチド長の、少なくとも20の連続するヌクレオチド長の、少なくとも25の連続するヌクレオチド長の、少なくとも30の連続するヌクレオチド長の、少なくとも40の連続するヌクレオチド長の、少なくとも50の連続するヌクレオチド長の、核酸配列であり得る。プローブとして使用される核酸配列には、上述の配列に対して、少なくとも70%相同な、より好ましくは、少なくとも80%相同な、さらに好ましくは、少なくとも90%相同な、少なくとも95%相同な核酸配列が含まれる。プライマーとして適切な配列は、合成(増幅)が意図される配列の性質によって変動し得るが、当業者は、意図される配列に応じて適宜プライマーを設計することができる。そのようなプライマーの設計は当該分野において周知であり、手動でおこなってもよくコンピュータプログラム(例えば、LASERGENE, Primer Select, DNASTAR)を用いて行ってもよい。

【0115】

本明細書において「生物学的活性」とは、ある因子(例えば、ポリペプチドまたはタンパク質)が、生体内において有し得る活性のことをいい、種々の機能を発揮する活性が包含される。例えば、ある因子がリガンドである場合、その生物学的活性は、そのリガンドが対応するレセプターに結合する活性を包含する。

【0116】

(トランスサイレチン、トランスサイレチン誘導体、アポリポタンパク質CII、アポリポタンパク質CII誘導体、アポリポタンパク質CIII、アポリポタンパク質CIII誘導体および血清アルブミンならびにこれらに対応するタンパク質の検出)

体液などに含まれるトランスサイレチン、トランスサイレチン誘導体、アポリポタンパク質CII、アポリポタンパク質CII誘導体、アポリポタンパク質CIII、アポリポタンパク質CIII誘導体および血清アルブミンならびにこれらに対応するタンパク質を検出する際には、これらトランスサイレチン、トランスサイレチン誘導体、アポリポタンパク質CII、アポリポタンパク質CII誘導体、アポリポタンパク質CIII、アポリポタンパク質CIII誘導体および血清アルブミンならびにこれらに対応するタンパク質を特異的に認識する抗体(以下、トランスサイレチン抗体、トランスサイレチン誘導体抗体、アポリポタンパク質CII抗体、アポリポタンパク質CII誘導体抗体、アポリポタンパク質CIII抗体、アポリポタンパク質CIII誘導体抗体および血清アルブミン抗体ならびにこれらに対応するタンパク質の抗体などと呼ぶ)を作製する。このような抗体は、従来公知の手法を用いて作製することができる。なお、抗体は、モノクローナル抗体であっても、ポリクローナル抗体であっても良い。他のマーカー物質(例えば、トランスサイレチン、トランスサイレチン誘導体、アポリポタンパク質CII、アポリポタンパク質CII誘導体、アポリポタンパク質CIII、アポリポタンパク質CIII誘導体および血清アルブミンならびにこれらに対応するタンパク質など)についても、同様に抗体を作製することができる。

【0117】

一例として、トランスサイレチンモノクローナル抗体の調製方法を以下に記載する。トランスサイレチンモノクローナル抗体は、抗原で免疫した動物から得られる抗体産生細胞と、ミエローマ細胞との細胞融合によりハイブリドーマを調製し、得られるハイブリドーマからトランスサイレチンの活性を特異的に阻害する抗体を産生するクローンを選択することにより調製することができる。

10

20

30

40

50

【0118】

動物の免疫に抗原として用いるトランスサイレチンタンパク質としては、組換えDNA法または化学合成により調製したトランスサイレチンタンパク質のアミノ酸配列の全部若しくは一部のペプチドが挙げられる。例えば、配列番号2に示したトランスサイレチンタンパク質のアミノ酸配列における、21～147番目のアミノ酸配列からなるペプチド(すなわち、成熟型)を抗原として使用することができる。また、細胞表面に存在するトランスサイレチンタンパク質を特異的に検出するためのトランスサイレチンモノクローナル抗体としては、配列番号2に示したトランスサイレチンタンパク質のアミノ酸配列における任意の10以上からなるペプチドを抗原として使用することが好ましい。他のトランスサイレチンの分子経路における任意の因子(例えば、トランスサイレチン、トランスサイレチン誘導体、アポリポタンパク質CⅠⅠ、アポリポタンパク質CⅠⅠ誘導体、アポリポタンパク質CⅠⅠⅠ、アポリポタンパク質CⅠⅠⅠ誘導体および血清アルブミンならびにこれらに対応するタンパク質など)についても同様に抗原を設計することができる。

10

【0119】

得られた抗原用トランスサイレチンをキャリアタンパク質(例えばサイログロブリン)に結合させた後、アジュバントを添加する。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント、フロイントの不完全アジュバント等が挙げられ、これらの何れのものも混合してもよい。

【0120】

上記のようにして得られた抗原を哺乳動物、例えばマウス、ラット、ウマ、サル、ウサギ、ヤギ、ヒツジなどの哺乳動物に投与する。免疫は、既存の方法であれば何れの方法をも用いることができるが、主として静脈内注射、皮下注射、腹腔内注射などにより行う。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔で、好ましくは4～21日間隔で免疫する。

20

【0121】

最終の免疫日から2～3日後に抗体産生細胞を採集する。抗体産生細胞としては、脾臓細胞、リンパ節細胞、末梢血細胞が挙げられるが、一般に脾臓細胞が用いられる。抗原の免疫量は1回にマウス1匹当たり、例えば100μg用いられる。

【0122】

免疫した動物の免疫応答レベルを確認し、また、細胞融合処理後の細胞から目的とするハイブリドーマを選択するため、免疫した動物の血中抗体価、または抗体産生細胞の培養上清中の抗体価を測定する。抗体検出の方法としては、公知技術、例えばEⅠA(エンザイムイムノアッセイ)、RⅠA(ラジオイムノアッセイ)、EⅠⅠSⅠA(酵素連結イムノソルベントアッセイ)等が挙げられる。

30

【0123】

抗体産生細胞と融合させるミエローマ(骨髓腫)細胞として、マウス、ラット、ヒトなど種々の動物に由来し、当業者が一般に入手可能な株化細胞を使用する。使用する細胞株としては、薬剤抵抗性を有し、未融合の状態では選択培地(例えばHAT培地)で生存できず、融合した状態でのみ生存できる性質を有するものが用いられる。一般的に8-アザグアニン耐性株が用いられ、この細胞株は、ヒポキサンチン-グアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼを欠損し、ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン(HAT)培地に生育できないものである。

40

【0124】

ミエローマ細胞は、既に公知の種々の細胞株、例えば、P3(P3x63Ag8.653)(*J. Immunol.* (1979) 123: 1548-1550)、P3x63Ag8U.1(*Current Topics in Microbiology and Immunology* (1978) 81: 1-7)、NS-1(Kohler, G. and Milstein, C., *Eur. J. Immunol.* (1976) 6: 511-519)、MPC-11(Margulies, D.H. et al., *Cell* (1976) 8: 405-415)、SP2/0(Shulman, M. et al

50

、Nature (1978) 276: 269-270)、FO(de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35: 1-21)、S194 (Trowbridge, I. S., J. Exp. Med. (1978) 148: 313-323)、R210 (Galfré, G. et al., Nature (1979) 277: 131-133)等が好適に使用される。

【0125】

抗体産生細胞は、脾臓細胞、リンパ節細胞などから得られる。すなわち、前記各種動物から脾臓、リンパ節等を摘出または採取し、これら組織を破砕する。得られる破砕物をPBS、DMEM、RPMI 1640等の培地または緩衝液に懸濁し、ステンレスメッシュ等で濾過後、遠心分離を行うことにより目的とする抗体産生細胞を調製する。

10

【0126】

次に、上記ミエローマ細胞と抗体産生細胞とを細胞融合させる。細胞融合は、MEM、DMEM、RPMI-1640培地などの動物細胞培養用培地中で、ミエローマ細胞と抗体産生細胞とを、混合比1:1~1:10で融合促進剤の存在下、30~37℃で1~15分間接触させることによって行われる。細胞融合を促進させるためには、平均分子量1,000~6,000のポリエチレングリコール、ポリビニルアルコールまたはセンダイウイルスなどの融合促進剤や融合ウイルスを使用することができる。また、電気刺激(例えばエレクトロポレーション)を利用した市販の細胞融合装置を用いて抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることもできる。

【0127】

細胞融合処理後の細胞から目的とするハイブリドーマを選別する。その方法として、選択培地における細胞の選択的増殖を利用する方法等が挙げられる。すなわち、細胞懸濁液を適切な培地で希釈後、マイクロタイプレート上にまき、各ウェルに選択培地(HAT培地など)を加え、以後適当に選択培地を交換して培養を行う。その結果、生育してくる細胞をハイブリドーマとして得ることができる。

20

【0128】

ハイブリドーマのスクリーニングは、限界希釈法、蛍光励起セルソーター法等により行い、最終的にモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを取得する。取得したハイブリドーマからモノクローナル抗体を採取する方法としては、通常の細胞培養法や腹水形成法等が挙げられる。細胞培養法においては、ハイブリドーマを10~20%ウシ胎児血清含有RPMI-1640培地、MEM培地、または無血清培地等の動物細胞培養培地中で、通常の培養条件(例えば37℃, 5%CO₂濃度)で2~14日間培養し、その培養上清から抗体を取得する。腹水形成法においては、ミエローマ細胞由来の哺乳動物と同種の動物の腹腔内にハイブリドーマを投与し、ハイブリドーマを大量に増殖させる。そして、1~4週間後に腹水または血清を採取する。

30

【0129】

上記抗体の採取方法において、抗体の精製が必要とされる場合は、硫酸塩析法、イオン交換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の公知の方法を適宜に選択して、またはこれらを組み合わせることにより精製する。

【0130】

従って、抗原は、抗体と結合し、またはBリンパ球、Tリンパ球などの特異的レセプターに結合して、抗体産生および/または細胞障害などの免疫反応をひきおこす物質(例えば、タンパク質、脂質、糖などが挙げられるがそれらに限定されない)である。ここで、抗体またはリンパ球レセプターとの結合性を、「抗原性」(antigenicity)という。抗体産生などの免疫応答を誘導する特性を「免疫原性」(immunogenicity)という。抗原として使用される物質は、例えば、その目的とする物質(例えば、タンパク質)を少なくとも1つ含む。含まれる物質は、全長が好ましいが、免疫を惹起し得るエピトープを少なくとも一つ含んでいれば、部分配列でもよい。本明細書において「エピトープ」または「抗原決定基」とは、抗体またはリンパ球レセプターが結合する抗原分子中の部位をいう。エピトープを決定する方法は、当該分野において周知であり、そのよ

40

50

うなエピトープは、核酸またはアミノ酸の一次配列が提供されると、当業者はそのような周知慣用技術を用いて決定することができる。

【0131】

エピトープは、必ずしもその正確な位置および構造が判明していなくても使用することができる。従って、エピトープには特定の免疫グロブリンによる認識に關与するアミノ酸残基のセット、または、T細胞の場合は、T細胞レセプタータンパク質および/もしくは主要組織適合性複合体(MHC)レセプターによる認識について必要であるアミノ酸残基のセットが含まれる。この用語はまた、「抗原決定基」または「抗原決定部位」と交換可能に使用される。免疫系分野において、インピボまたはインピトロで、エピトープは、分子の特徴(例えば、一次ペプチド構造、二次ペプチド構造または三次ペプチド構造および電荷)であり、免疫グロブリン、T細胞レセプターまたはHLA分子によって認識される部位を形成する。ペプチドを含むエピトープは、エピトープに独特な空間的コンフォメーション中に3つ以上のアミノ酸を含み得る。一般に、エピトープは、少なくとも5つのこのようなアミノ酸からなり、代表的には少なくとも6つ、7つ、8つ、9つ、または10のこのようなアミノ酸からなる。エピトープの長さは、より長いほど、もとのペプチドの抗原性に類似することから一般的に好ましいが、コンフォメーションを考慮すると、必ずしもそうでないことがある。アミノ酸の空間的コンフォメーションを決定する方法は、当該分野で公知であり、例えば、X線結晶学、および2次元核磁気共鳴分光法を含む。さらに、所定のタンパク質におけるエピトープの同定は、当該分野で周知の技術を使用して容易に達成される。例えば、Geysenら(1984)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998(所定の抗原における免疫原性エピトープの位置を決定するために迅速にペプチドを合成する一般的な方法);米国特許第4,708,871号(抗原のエピトープを同定し、そして化学的に合成するための手順);およびGeysenら(1986)Molecular Immunology 23:709(所定の抗体に対して高い親和性を有するペプチドを同定するための技術)を参照されたい。同じエピトープを認識する抗体は、単純な免疫アッセイにおいて同定され得る。このように、ペプチドを含むエピトープを決定する方法は、当該分野において周知であり、そのようなエピトープは、核酸またはアミノ酸の一次配列が提供されると、当業者はそのような周知慣用技術を用いて決定することができる。

【0132】

従って、ペプチドを含むエピトープとして使用するためには、少なくとも3アミノ酸の長さの配列が必要であり、好ましくは、この配列は、少なくとも4アミノ酸、より好ましくは少なくとも5アミノ酸、少なくとも6アミノ酸、少なくとも7アミノ酸、少なくとも8アミノ酸、少なくとも9アミノ酸、少なくとも10アミノ酸、少なくとも15アミノ酸、少なくとも20アミノ酸、少なくとも25アミノ酸の長さの配列が必要であり得る。エピトープは線状であってもコンフォメーション形態であってもよい。

【0133】

近年より迅速に所望の抗体を獲得するための方法が知られている。例えば、特開2006-149383号に記載される方法を用いることができる。この方法は、免疫グロブリン遺伝子座において体細胞組換えを誘発させ、種々のイムノグロブリン分子を産生しているDT40細胞集団(WO2004/011644を参照)の中から、ストレプトアビジンに特異的に結合する抗体分子を選別することによって行う。

【0134】

その手順は、多様化ライブラリー(例えば、細胞表面上に多様な抗体分子を提示することができるニワトリ由来のDT40細胞によって構成されるライブラリー)から、目的リガンドに特異的に結合する少なくとも一種のタンパク質を選択する方法である。この方法は、以下の工程を含む:(1)該ライブラリー中に存在する種々のタンパク質と目的リガンド(タンパク質と結合するものであれば如何なるものであってもよく、限定はしないが、例えば、タンパク質、核酸、脂質、糖質、低分子化合物など)を接触させ、該タンパク質群と目的リガンドの混合物をインキュベートし、少なくとも一種のタンパク質と目的リ

10

20

30

40

50

ガンドの複合体を回収する工程(2)工程(1)で選別された少なくとも数種のタンパク質と目的リガンドと接触させ、該タンパク質と目的リガンドの混合物をインキュベートし、該タンパク質と目的リガンドの結合性を確認する工程、(3)工程(1)で選別された少なくとも数種のタンパク質を1種類又は2種類の特定の対照リガンドと接触させ、該タンパク質と対照リガンドの混合物をインキュベートし、該タンパク質と対照リガンドが結合したかどうかを判別する工程、および、(4)工程(1)において目的リガンドとの結合性が確認され、かつ、工程(c)において対照リガンドと結合しなかったタンパク質を選択する工程。目的リガンドと結合するタンパク質の選択は当該技術分野における通常の知識に基づいて行なうことができる。例えば、適当な担体に目的リガンドを結合させ、結合した目的リガンドを多様化ライブラリーに存在するタンパク質と接触させ、適切な条件下でインキュベートした後、生じた担体-目的リガンド-タンパク質の複合体を遠心分離などにより回収し、目的リガンドと結合するタンパク質を選択することができる。

10

【0135】

(改変体)

あるアミノ酸は、相互作用結合能力の明らかな低下または消失なしに、例えば、糖鎖結合領域、システニル化領域、カチオン性領域または基質分子の結合部位のようなタンパク質構造において他のアミノ酸に置換され得る。あるタンパク質の生物学的機能を規定するのは、タンパク質の相互作用能力および性質である。従って、特定のアミノ酸の置換がアミノ酸配列において、またはそのDNAコード配列のレベルにおいて行われ得、置換後もなお、もとの性質を維持するタンパク質が生じ得る。従って、生物学的有用性の明らかな損失なしに、種々の改変が、本明細書において開示されたペプチドまたはこのペプチドをコードする対応するDNAにおいて行われ得る。

20

【0136】

上記のような改変を設計する際に、アミノ酸の疎水性指数が考慮され得る。タンパク質における相互作用的な生物学的機能を与える際の疎水性アミノ酸指数の重要性は、一般に当該分野で認められている(Kyte, JおよびDoolittle, R. F. J. Mol. Biol. 157(1):105-132, 1982)。アミノ酸の疎水的性質は、生成したタンパク質の二次構造に寄与し、次いでそのタンパク質と他の分子(例えば、酵素、基質、レセプター、DNA、抗体、抗原など)との相互作用を規定する。各アミノ酸は、それらの疎水性および電荷の性質に基づく疎水性指数を割り当てられる。それらは:

30

【0137】

あるアミノ酸を、同様の疎水性指数を有する他のアミノ酸により置換して、そして依然として同様の生物学的機能を有するタンパク質(例えば、酵素活性において等価なタンパク質)を生じさせ得ることが当該分野で周知である。このようなアミノ酸置換において、疎水性指数が±2以内であることが好ましく、±1以内であることがより好ましく、および±0.5以内であることがさらにより好ましい。疎水性に基づくこのようなアミノ酸の置換は効率的であることが当該分野において理解される。

40

【0138】

親水性指数もまた、本発明のアミノ酸配列を改変するのに有用である。米国特許第4,554,101号に記載されるように、以下の親水性指数がアミノ酸残基に割り当てられている:アルギニン(+3.0);リジン(+3.0);アスパラギン酸(+3.0±1);グルタミン酸(+3.0±1);セリン(+0.3);アスパラギン(+0.2);グルタミン(+0.2);グリシン(0);スレオニン(-0.4);プロリン(-0.

50

5 ± 1) ; アラニン (- 0 . 5) ; ヒスチジン (- 0 . 5) ; システイン (- 1 . 0) ; メチオニン (- 1 . 3) ; バリン (- 1 . 5) ; ロイシン (- 1 . 8) ; イソロイシン (- 1 . 8) ; チロシン (- 2 . 3) ; フェニルアラニン (- 2 . 5) ; およびトリプトファン (- 3 . 4) 。 アミノ酸が同様の親水性指数を有しかつ依然として生物学的等価体を与え得る別のものに置換され得ることが理解される。このようなアミノ酸置換において、親水性指数が ± 2 以内であることが好ましく、 ± 1 以内であることがより好ましく、および ± 0 . 5 以内であることがさらにより好ましい。

【 0 1 3 9 】

本発明において、「保存的置換」とは、アミノ酸置換において、元のアミノ酸と置換されるアミノ酸との親水性指数または / および疎水性指数が上記のように類似している置換をいう。保存的置換の例は、当業者に周知であり、例えば、次の各グループ内での置換：アルギニンおよびリジン；グルタミン酸およびアスパラギン酸；セリンおよびスレオニン；グルタミンおよびアスパラギン；ならびにバリン、ロイシン、およびイソロイシン、などが挙げられるがこれらに限定されない。

10

【 0 1 4 0 】

本明細書において「改変体」とは、もとのポリペプチドまたはポリヌクレオチドなどの物質に対して、一部が変更されているものをいう。そのような改変体としては、置換改変体、付加改変体、欠失改変体、短縮 (t r u n c a t e d) 改変体、対立遺伝子変異体などが挙げられる。対立遺伝子 (a l l e l e) とは、同一遺伝子座に属し、互いに区別される遺伝的改変体のことをいう。従って、「対立遺伝子変異体」とは、ある遺伝子に対して、対立遺伝子の関係にある改変体をいう。「種相同体またはホモログ (h o m o l o g) 」とは、ある種の中で、ある遺伝子とアミノ酸レベルまたはヌクレオチドレベルで、相同性 (好ましくは、60%以上の相同性、より好ましくは、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の相同性) を有するものをいう。そのような種相同体を取得する方法は、本明細書の記載から明らかである。「オルソログ (o r t h o l o g) 」とは、オルソログス遺伝子 (o r t h o l o g o u s g e n e) ともいい、二つの遺伝子がある共通祖先からの種分化に由来する遺伝子をいう。例えば、多重遺伝子構造をもつヘモグロビン遺伝子ファミリーを例にとると、ヒトとマウスのヘモグロビン遺伝子はオルソログであるが、ヒトのヘモグロビン遺伝子とヘモグロビン遺伝子はパラログ (遺伝子重複で生じた遺伝子) である。

20

30

【 0 1 4 1 】

本明細書において「保存的 (に改変された) 改変体」は、アミノ酸配列および核酸配列の両方に適用される。特定の核酸配列に関して、保存的に改変された改変体とは、同一のまたは本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸をいい、核酸がアミノ酸配列をコードしない場合には、本質的に同一な配列をいう。遺伝コードの縮重のため、多数の機能的に同一な核酸が任意の所定のタンパク質をコードする。例えば、コドン G C A 、 G C C 、 G C G 、 および G C U はすべて、アミノ酸アラニンをコードする。したがって、アラニンがコドンにより特定される全ての位置で、そのコドンは、コードされたポリペプチドを変更することなく、記載された対応するコドンの任意のものに変更され得る。このような核酸の変動は、保存的に改変された変異の1つの種である「サイレント改変 (変異) 」である。

ポリペプチドをコードする本明細書中のすべての核酸配列はまた、その核酸の可能なすべてのサイレント変異を記載する。当該分野において、核酸中の各コドン (通常メチオニンのための唯一のコドンである A U G 、 および通常トリプトファンのための唯一のコドンである T G G を除く) が、機能的に同一な分子を産生するために改変され得ることが理解される。したがって、ポリペプチドをコードする核酸の各サイレント変異は、記載された各配列において暗黙に含まれる。好ましくは、そのような改変は、ポリペプチドの高次構造に多大な影響を与えるアミノ酸であるシステインの置換を回避するようになされ得る。

40

【 0 1 4 2 】

本明細書中において、機能的に等価なポリペプチドを作製するために、アミノ酸の置換

50

のほかに、アミノ酸の付加、欠失、または修飾もまた行うことができる。アミノ酸の置換とは、もとのペプチドを1つ以上、例えば、1～10個、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個のアミノ酸で置換することをいう。アミノ酸の付加とは、もとのペプチド鎖に1つ以上、例えば、1～10個、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個のアミノ酸を付加することをいう。アミノ酸の欠失とは、もとのペプチドから1つ以上、例えば、1～10個、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個のアミノ酸を欠失させることをいう。アミノ酸修飾は、アミド化、カルボキシル化、硫酸化、ハロゲン化、アルキル化、グリコシル化、リン酸化、水酸化、アシル化（例えば、アセチル化）などを含むが、これらに限定されない。置換、または付加されるアミノ酸は、天然のアミノ酸であってもよく、非天然のアミノ酸、またはアミノ酸アナログでもよい。天然のアミノ酸が好ましい。

10

【0143】

本明細書において、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの「置換、付加または欠失」とは、もとのポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対して、それぞれアミノ酸もしくはその代替物、またはヌクレオチドもしくはその代替物が、置き換わること、付け加わることまたは取り除かれることをいう。このような置換、付加または欠失の技術は、当該分野において周知であり、そのような技術の例としては、部位特異的変異誘発技術などが挙げられる。置換、付加または欠失は、1つ以上であれば任意の数でよく、そのような数は、その置換、付加または欠失を有する改変体において目的とする機能（例えば、マーカーなど）が保持される限り、多くすることができる。例えば、そのような数は、1または数個

20

【0144】

本明細書において「誘導體」は、上記のような「改変体」に対しても存在し得る。

【0145】

（診断方法）

本明細書において「診断」とは、被検体における疾患、障害、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、状態の現状または未来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、体内の状態を調べることができ、そのような情報を用いて、被検体における疾患、障害、状態、投与すべき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。本明細書において、狭義には、「診断」は、現状を診断することをいうが、広義には「事前診断

30

を含む。

【0146】

本明細書において特に、「事前診断」とは、糖尿病について言及する場合、糖尿病の発症前の段階を検出することをいい、将来の発症リスクを判定すること、糖尿病の予防を目的として糖尿病に罹患するおそれの有無を判定することを含む。本発明の方法、装置、システムを用いることによって、体内の状態を事前に調べることができ、そのような情報を用いて、被検体における疾患、障害、状態、投与すべき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。

40

【0147】

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。本明細書において、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を明確にするために、特に「事前診断もしくは診断を支援」とすると称することができる。

【0148】

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退させることをいう。

50

【0149】

本発明の糖尿病の診断方法においては、糖尿病のマーカー物質として、血液中のこれら3種のタンパク質のうちの少なくとも1種の濃度を測定する。そして、その測定値を健常値と比較することにより、糖尿病の診断を行う。ここで、「糖尿病の診断」とは、糖尿病に罹患しているか否かを判定することのみではなく、糖尿病の予防を目的として糖尿病に罹患するおそれの有無を判定することや、糖尿病の改善状態や再発のモニタリングを行うことも含む。本発明の糖尿病の診断方法においては、3種のマーカー物質の一部だけの濃度を測定してもよいし、3種全部の濃度を測定してもよい。特に、全部のマーカー物質の濃度を測定する場合は、マルチマーカーシステムを組んで多方面から糖尿病の診断を行うことができ、診断の精度が高い。また、これら3種のタンパク質はいずれも健常者の血液中にも存在しているため、その濃度の変動をモニタリングすることにより、健常者が糖尿病を発病する兆候を検出することもできる。

10

【0150】

本発明の疾病の診断方法は、被検者の体液中における上記マーカー物質（例えば、(a)～(n)）の少なくとも1つの濃度を健常値と比較し、糖尿病の発症の有無または将来の発症リスクを判定するものである。本発明の疾病の診断方法では、血糖を直接指標とするのではなく、別のマーカー物質を指標とするので、血糖値が上昇する前の状態をも捉えることができる。その結果、糖尿病の有無に加え、糖尿病の将来の発症リスクを判定することができる。なお、「糖尿病の事前診断」および「糖尿病の将来の発症リスクを判定する」とは、交換可能に使用され、糖尿病を発症していない時点において、将来、糖尿病に罹患する可能性（危険性）の有無またはその可能性（危険性）の程度を判定することをいう。

20

【0151】

ここで、各マーカー物質における質量/電荷比（以下、「M/Z」と略記することもある。）の「約7040」、「約8330」、「約8530」等の値は、質量分析における測定値の誤差範囲を考慮した値であり、概ね±0.2%の幅を有する。すなわち、約7040は概ね $7040 \pm 0.2\%$ 、約8330は概ね $8330 \pm 0.2\%$ 、約8530は概ね $8530 \pm 0.2\%$ を表す。他の質量/電荷比についても全く同様に、概ね±0.2%の幅を有する。また、これらのマーカー物質はいずれも主に血液中に存在するタンパク質である。なお、被検者が糖尿病を発症している場合または糖尿病の将来の発症リスクが高い場合、体液中のマーカー物質(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)および(i)の濃度はより高値を示し、マーカー物質(j)、(k)、(l)、(m)および(n)の濃度はより低値を示す。

30

【0152】

本発明の疾病の診断方法の好ましい実施形態においては、マーカー物質に対する親和性を有する物質を固定化した担体を使用する。そして、該担体に体液または体液成分を接触させて、体液または体液成分に含まれるマーカー物質を、マーカー物質に対する親和性を有する物質を介して担体上に捕捉し、捕捉されたマーカー物質の量に基づいて体液中のマーカー物質の濃度を算出する。本発明の疾病の診断方法によれば、担体上に捕捉されたマーカー物質を測定対象とするので、測定試料中に含まれる夾雑物質の影響を低減させることができ、より高感度かつ高精度でマーカー物質の濃度を測定することができる。なお、体液成分の例としては、体液が血液である場合の血清または血漿が挙げられる。

40

【0153】

本発明の疾病の診断方法の好ましい実施形態では、平面部分を有する担体を用い、マーカー物質に対する親和性を有する物質は該平面部分の一部に固定化されている。かかる構成により、マーカー物質に対する親和性を有する物質を、担体上の複数箇所にスポット的に固定化することができる。その結果、1個の担体で複数の測定試料を同時処理することや、1個の担体で複数のマーカー物質の濃度を同時測定することが可能となり、作業効率がよい。さらに、各スポットの面積を小さくすることにより、微量の測定試料からでもマーカー物質の濃度を測定することができる。なお、平面部分を有する担体の例としては、

50

チップ等の基板が挙げられる。

【0154】

本発明の疾病の診断方法の好ましい実施形態においては、マーカー物質に対する親和性を有する物質としてイオン交換体、金属キレート体または抗体を用い、イオン交換体、金属キレート体または抗体を介して測定試料中のマーカー物質を担体上に捕捉する。当該物質がイオン交換体または金属キレート体の場合は各種のものが入手容易であり、マーカー物質を捕捉するための担体を容易に調製することができる。また、当該物質が抗体の場合は、より特異的にマーカー物質を捕捉することができる。捕捉されたマーカー物質の量を測定する方法としては、質量分析、イムノアッセイ（抗体の場合）が挙げられる。

【0155】

（システム）

本明細書において、「システム」とは、診断するための任意の系をいい、一般に、1または複数の構成要素からなり、複数の構成要素がある場合それらの要素は互いに作用・関連し合っており、全体として調和のとれた挙動・機能を示すという3条件を満足する系をいう。システムは、装置、組成物、診断薬など任意の形態であり得る。従って、システムは、例えば、測定装置を備える大掛かりなシステムから、クロマトグラフィーを備えるシステム、免疫反応を利用したキット、抗体を含む組成物（すなわち、マーカー物質のモノクロナール抗体を含む、体外医薬品である診断薬）などを包含することが理解される。

【0156】

（スクリーニング）

本発明では、本発明の開示をもとに、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。

【0157】

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生物または物質などの標的を、特定の操作/評価方法で多数を含む集団の中から選抜することをいう。スクリーニングのために、本発明の因子（例えば、抗体）、ポリペプチドまたは核酸分子を使用することができる。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。また本発明では、本発明の開示をもとに、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。

【0158】

1実施形態において、本発明は、本発明のタンパク質または本発明のポリペプチド、あるいはその生物学的に活性な部分に結合するか、またはこれらの活性を調節する、候補化合物もしくは試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。本発明の試験化合物は、当該分野において公知のコンビナトリアルライブラリー法における多数のアプローチの任意のものを使用して得られ得、これには、以下が挙げられる：生物学的ライブラリー；空間的にアクセス可能な平行固相もしくは溶液相ライブラリー；逆重畳を要する合成ライブラリー法；「1ピーズ1化合物」ライブラリー法；およびアフィニティークロマトグラフィー選択を使用する合成ライブラリー法。生物学的ライブラリーアプローチはペプチドライブラリーに限定されるが、他の4つのアプローチは、ペプチド、非ペプチドオリゴマーもしくは化合物の低分子ライブラリーに適用可能である（Lam (1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145）。

【0159】

分子ライブラリーの合成のための方法の例は、当該分野において、例えば以下に見出され得る：DeWittら (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6909；Erbら (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422；Zuckermannら (1994) *J. Med. Chem.* 37:2678；Choら (1993) *Science* 261:1303；Carrell

10

20

30

40

50

ら (1994) *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2059; Carrellら (1994) *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2061; および Gallopら (1994) *J. Med. Chem.* 37: 1233。

【0160】

化合物のライブラリーは、溶液中で (例えば、Houghten (1992) *Bio Techniques* 13: 412~421)、あるいはビーズ上 (Lam (1991) *Nature* 354: 82~84)、チップ上 (Fodor (1993) *Nature* 364: 555~556)、細菌 (Ladner 米国特許第5,223,409号)、胞子 (Ladner、上記)、プラスミド (Cullら (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1865~1869) またはファージ上 (Scott および Smith (1990) *Science* 249: 386~390; Devlin (1990) *Science* 249: 404~406; Cwirllaら (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 6378~6382; Felici (1991) *J. Mol. Biol.* 222: 301~310; Ladner 上記) において示され得る。

10

【0161】

本発明は、他の実施形態において、本発明の活性成分 (例えば、ポリペプチドまたは核酸) と同等に有効な因子をスクリーニングするための道具として、コンピュータによる定量的構造活性相関 (quantitative structure activity relationship = QSAR) モデル化技術を使用して得られる化合物もまた、本発明に包含される。ここで、コンピュータ技術は、いくつかのコンピュータによって作成した基質鑄型、ファーマコフォア、ならびに本発明の活性部位の相同モデルの作製などを包含する。一般に、インピトロで得られたデータから、ある物質に対する相互作用物質の通常の特性をモデル化することに対する方法は、CATALYSTM ファーマコフォア法 (Ekins et al., *Pharmacogenetics*, 9: 477~489, 1999; Ekins et al., *J. Pharmacol. & Exp. Ther.*, 288: 21~29, 1999; Ekins et al., *J. Pharmacol. & Exp. Ther.*, 290: 429~438, 1999; Ekins et al., *J. Pharmacol. & Exp. Ther.*, 291: 424~433, 1999) および比較分子電界分析 (comparative molecular field analysis; CoMFA) (Jones et al., *Drug Metabolism & Disposition*, 24: 1~6, 1996) などを使用して示されている。本発明において、コンピュータモデリングは、分子モデル化ソフトウェア (例えば、CATALYSTM バージョン4 (Molecular Simulations, Inc., San Diego, CA) など) を使用して行われ得る。

20

30

【0162】

活性部位に対する化合物のフィッティングは、当該分野で公知の種々のコンピュータモデリング技術のいずれかを使用して行うことができる。視覚による検査および活性部位に対する化合物のマニュアルによる操作は、QUANTA (Molecular Simulations, Burlington, MA, 1992)、SYBYL (Molecular Modeling Software, Tripos Associates, Inc., St. Louis, MO, 1992)、AMBER (Weiner et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 106: 765-784, 1984)、CHARMM (Brooks et al., *J. Comp. Chem.*, 4: 187~217, 1983) などのようなプログラムを使用して行うことができる。これに加え、CHARMM、AMBER などのような標準的な力の場を使用してエネルギーの最小化を行うこともできる。他のさらに特殊化されたコンピュータモデリングは、GRID (Goodford et al., *J. Med. Chem.*, 28: 849~857, 1985)、MCSS (Miranker and Karplus, *Function and G*

40

50

enetics, 11:29~34, 1991)、AUTODOCK (Goodsell and Olsen, Proteins: Structure, Function and Genetics, 8:195~202, 1990)、DOCK (Kuntz et al., J. Mol. Biol., 161:269~288, (1982))などを含む。さらなる構造の化合物は、空白の活性部位、既知の低分子化合物における活性部位などに、LUDI (Bohm, J. Comp. Aid. Molec. Design, 6:61~78, 1992)、LEGEND (Nishibata and Itai, Tetrahedron, 47:8985, 1991)、LeapFrog (Tripos Associates, St. Louis, MO) などのようなコンピュータプログラムを使用して新規に構築することもできる。このようなモデリングは、当該分野において周知慣用されており、当業者は、本明細書の開示に従って、適宜本発明の範囲に入る化合物を設計することができる。

10

【0163】

(投与・注入・医薬)

本発明のスクリーニング方法によって得られた物質を含む組成物は、生物への移入に適した形態であれば、任意の製剤形態で提供され得る。そのような製剤形態としては、例えば、液剤、注射剤、徐放剤が挙げられる。投与経路としては経口投与、非経口投与、患部への直接投与などが挙げられる。

【0164】

本明細書において「キット」とは、通常2つ以上の区画に分けて、提供されるべき部分(例えば、抗体、標識など)が提供されるユニットをいう。混合されて提供されるべきでなく、使用直前に混合して使用することが好ましいような組成物の提供を目的とするときに、このキットの形態は好ましい。そのようなキットは、好ましくは、提供される部分(例えば、試薬をどのように処理すべきかを記載する指示書または説明書を備えていることが有利である。本明細書においてキットが試薬キットとして使用される場合、キットには、通常、抗体の使い方などを記載した指示書などが含まれる。

20

【0165】

本明細書において「指示書」は、本発明の医薬などを投与する方法を医師、患者など投与を行う人に対する説明を記載したものである。この指示書は、本発明の診断薬の使い方、または医薬などを投与することを指示する文言が記載されている。また、指示書には、投与部位として、骨格筋に投与(例えば、注射などによる)することを指示する文言が記載されていてもよい。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(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。

30

【0166】

本明細書において「被験体」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。患者または被験体は好ましくは、ヒトであり得る。

40

【0167】

本明細書において「生体内」または「インビボ」(in vivo)とは、生体の内部をいう。特定の文脈において、「生体内」は、目的とする物質が配置されるべき位置をいう。

【0168】

本明細書において「インビトロ」とは、種々の研究目的のために生体の一部分が「生体外に」(例えば、試験管内に)摘出または遊離されている状態をいう。インビボと対照をなす用語である。

【0169】

本明細書において「エキソビボ」とは、遺伝子導入を行うための標的細胞を被験体より

50

抽出し、インビトロで治療遺伝子または因子を導入した後に、再び同一被験体に戻す場合、一連の動作をエキソピボという。

【0170】

本発明において使用されるポリペプチド、核酸、医薬ならびにそのようなポリペプチドまたは核酸によって調製された組成物は、生物への移入に適した形態であれば、任意の製剤形態で提供され得る。そのような製剤形態としては、例えば、液剤、注射剤、徐放剤が挙げられる。投与方法は、経口投与、非経口投与（例えば、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、皮内投与、粘膜投与、直腸内投与、腔内投与、患部への局所投与、皮膚投与など）、患部への直接投与などが挙げられる。そのような投与のための処方物は、任意の製剤形態で提供され得る。そのような製剤形態としては、例えば、液剤、注射剤、徐放剤が挙げられる。本発明の組成物および医薬は、全身投与されるとき、発熱物質を含まない、経口的に受容可能な水溶液の形態であり得る。そのような薬学的に受容可能なタンパク質溶液の調製は、pH、等張性、安定性などに相当な注意を払うことを条件として、当業者の技術範囲内である。

10

【0171】

本発明において医薬の処方のために使用される溶媒は、水性または非水性のいずれかの性質を有し得る。さらに、そのビヒクルは、処方物の、pH、容量オスモル濃度、粘性、明澄性、色、滅菌性、安定性、等張性、崩壊速度、または臭いを改変または維持するための他の処方物材料を含み得る。同様に、本発明の組成物は、有効成分の放出速度を改変または維持するため、または有効成分の吸収もしくは透過を促進するための他の処方物材料を含み得る。

20

【0172】

本発明の製剤の処方手順は、当該分野において公知であり、例えば、日本薬局方、米国薬局方、他の国の薬局方などに記載されている。従って、当業者は、本明細書の記載があれば、過度な実験を行うことなく、投与すべき量を決定することができる。

【0173】

（好ましい実施形態）

以下に本発明の好ましい実施形態を説明する。以下に提供される実施形態は、本発明のよりよい理解のために提供されるものであり、本発明の範囲は以下の記載に限定されるべきでないことが理解される。従って、当業者は、本明細書中の記載を参酌して、本発明の範囲内で適宜改変を行うことができることは明らかである。

30

【0174】

（診断システム）

1つの局面において、本発明は、被験体由来のサンプル中のマーカー物質、該マーカー物質に特異的に相互作用する因子、または該マーカー物質を選択的に認識する手段を含む、被験体が糖尿病であるかどうか事前診断または診断するためのシステムを提供する。

【0175】

ある具体的な局面では、本発明は、被験体由来のサンプル中のマーカー物質を含む、被験体が糖尿病であるかどうか事前診断するためのシステムまたは組成物を提供する。

【0176】

ある具体的な局面では、本発明は、被験体由来のサンプル中のマーカー物質に特異的に相互作用する因子を含む、被験体が糖尿病であるかどうか事前診断するためのシステムまたは組成物を提供する。

40

【0177】

ある具体的な局面では、本発明は、被験体由来のサンプル中のマーカー物質を選択的に認識する手段を含む、被験体が糖尿病であるかどうか事前診断するためのシステムを提供する。

【0178】

ある具体的な局面では、本発明は、被験体由来のサンプル中のマーカー物質を含む、被験体が糖尿病であるかどうか診断するためのシステムまたは組成物を提供する。

50

【0179】

ある具体的な局面では、本発明は、被験体由来のサンプル中のマーカー物質に特異的に相互作用する因子を含む、被験体が糖尿病であるかどうか診断するためのシステムまたは組成物を提供する。

【0180】

ある具体的な局面では、本発明は、被験体由来のサンプル中のマーカー物質を選択的に認識する手段を含む、被験体が糖尿病であるかどうか診断するためのシステムを提供する。

【0181】

これらの組成物またはシステムは、上記マーカー物質を同定することができる限り、任意の被験体由来のサンプル中のマーカー物質、該マーカー物質に特異的に相互作用する因子、または該マーカー物質を選択的に認識する手段を用いることができることが理解され得る。従って、本明細書において具体的に記載された因子または手段のみならず、当該分野において公知の任意の等価の因子または手段を用いることができることが理解される。

10

【0182】

1つの実施形態において、使用されるマーカー物質は、前記被験体の体液、好ましくは血液中に存在するものであることが特徴である。理論に束縛されることを望まないが、体液であれば、取り出した後処理が簡便であり、大量の診断または診断支援が可能であるからである。理論に束縛されることを望まないが、血液が好ましいのは、本発明のマーカー物質の挙動が顕著に反映されるからである。

20

【0183】

1つの実施形態では、本発明において使用されるマーカー物質は、遺伝子産物であることが特徴である。特に、この遺伝子産物は、糖代謝に直接関連することがこれまで知られていなかったものであることが好ましい。なぜなら、糖代謝に直接関連することが知られていないマーカーでも、糖尿病のマーカー物質として診断または事前診断が可能になることは、これまで知られておらず、簡便、早期に糖尿病の診断を行うことが可能になるからである。また、本発明において同定されたマーカー物質は、モデル動物においてもマーカーとなることが示されており、ヒトにおいて経験的に見出されてきたマーカーのように、多数の病因によって変動し得、従って、糖尿病であればその疾患のみに起因するかどうか不明であったものが多いところ、本発明のマーカー物質では、そのような不明確性は無い。なぜなら、本発明のマーカー物質は、プロテインチップによる網羅解析の結果見出されたものであり、かつ、モデル動物における確認も行っているからである。

30

【0184】

具体的な実施形態では、本発明において用いられるマーカー物質は、トランスサイレチン、トランスサイレチン誘導体、アポリポタンパク質C I I、アポリポタンパク質C I I誘導体、アポリポタンパク質C I I I、アポリポタンパク質C I I I誘導体および血清アルブミンならびにこれらに対応するタンパク質からなる群より選択される、1またはそれより多い物質を含む。好ましくは、2以上、3以上、あるいはそれより多い数のマーカー物質（特に、各々、誘導体と対を成しているものを1群とみなしたとき、異なる群から選択される複数のマーカー物質）を含むことが有利である。マルチマーカーシステムとして、より精確な診断を行うことが可能であり、確定診断をも可能にするからである。

40

【0185】

1つの実施形態では、本発明において使用される因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択され、好ましくは、因子は、タンパク質または複合分子（例えば、糖タンパク質、脂質タンパク質など）である。好ましくは、因子は、抗体（例えば、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体）である。このような因子は、標識されるか、または標識可能であることが好ましい。なぜなら、診断することが容易となるからである。

【0186】

本明細書において「標識」とは、目的となる分子または物質を他から識別するための存

50

在(たとえば、物質、エネルギー、電磁波など)をいう。そのような標識方法としては、R I (ラジオアイソトープ)法、蛍光法、ピオチン法、化学発光法等を挙げることができる。上記の核酸断片および相補性を示すオリゴヌクレオチドを何れも蛍光法によって標識する場合には、蛍光発光極大波長が互いに異なる蛍光物質によって標識を行う。蛍光発光極大波長の差は、10 nm以上であることが好ましい。蛍光物質としては、核酸の塩基部分と結合できるものであれば何れも用いることができるが、シアニン色素(例えば、Cy DyeTMシリーズのCy 3、Cy 5等)、ローダミン6 G試薬、N - アセトキシ - N2 - アセチルアミノフルオレン(A A F)、A A I F (A A Fのヨウ素誘導體)等を使用することが好ましい。蛍光発光極大波長の差が10 nm以上である蛍光物質としては、例えば、Cy 5とローダミン6 G試薬との組み合わせ、Cy 3とフルオレセインとの組み合わせ、ローダミン6 G試薬とフルオレセインとの組み合わせ等を挙げることができる。本発明では、このような標識を利用して、使用される検出手段に検出され得るように目的とする対象を改変することができる。そのような改変は、当該分野において公知であり、当業者は標識におよび目的とする対象に応じて適宜そのような方法を実施することができる。

10

【0187】

本発明の好ましい実施形態において、使用される手段は、質量分析装置、核磁気共鳴測定装置、X線解析装置、S P R、クロマトグラフィー(例えば、H P L C、薄層クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー)、免疫学的手段(例えば、ウェスタンブロッティング、E L I S A、R I A)、生化学的手段(例えば、p I電気泳動、サザンブロッティング、二次元電気泳動)、電気泳動機器、化学的分析機器、蛍光二次元ディファレンシャル電気泳動法(2 D E - D I G E)、同位体標識法(I C A T)、タンデムアフィニティ精製法(T A P法)、物理学的手段、レーザーマイクロダイセクションおよびこれらの組み合わせからなる群より選択される。

20

【0188】

本発明の好ましい実施形態では、本発明のシステムは、さらに、マーカー物質の標準を含む。このような標準は、マーカー物質の検出手段(該マーカー物質に特異的に相互作用する因子、または該マーカー物質を選択的に認識する手段など)が正常に機能しているかどうかを確認するために用いることが好ましい。

【0189】

好ましい実施形態では、本発明では、対象となるサンプルを精製する手段をさらに備え得る。このような精製手段としては、例えば、クロマトグラフィーなどを挙げることができる。精製することによって、診断の精度を上げることができることから、好ましい実施形態において使用され得るが、これは必須ではない。

30

【0190】

本発明において、被験体は、哺乳動物を含み、1つの実施形態では、被験体は、齧歯類を含む。このような齧歯類(例えば、ラット、マウスなど)は、モデル動物、特に、糖尿病のモデル動物が作製されていることから好ましい。好ましい実施形態では、被験体は、ヒトを含む。

【0191】

1つの実施形態では、本発明において使用される因子または手段は、本発明のマーカー物質の定量をする能力を有する。このような定量は、標準曲線を描いたときに、検量線がきちんと描ける手段または因子であるものがよい。好ましくは、例えば、抗体、質量分析、クロマトグラフィー分析などを挙げることができる。従って、ある実施形態では、本発明のシステムは、マーカー物質の定量を行うための定量手段をさらに備える。

40

【0192】

1つの実施形態では、定量手段は、標準曲線と測定結果とを比較して前記マーカー物質が正常値の範囲内かどうかを判定する判定手段を含む。このような判定手段は、コンピュータを用いて実現することができる。

【0193】

1つの実施形態では、本発明のシステムは、マーカー物質またはマーカー物質に特異的

50

に相互作用する前記因子を含む組成物である。

【0194】

(トランスサイレチン関連)

1つの局面では、本発明のシステムにおいて対象となるマーカー物質は、トランスサイレチンおよびトランスサイレチン誘導体からなる群より選択される少なくとも1つの物質を含み、該トランスサイレチン誘導体は、S-システニルトランスサイレチン、グルタチオン化トランスサイレチン、S-S結合形成トランスサイレチン、酸化(例えば、メチオニン側鎖の酸化)トランスサイレチン、ホルミル化トランスサイレチン、アセチル化トランスサイレチン、リン酸化トランスサイレチン、糖鎖付加トランスサイレチン、ミリスチル化トランスサイレチンなどを挙げることができる。特に、S-システニルトランスサイレチンであることが好ましい。また、本発明は、トランスサイレチンと、トランスサイレチン誘導体(特に、酸化還元経路において登場する代謝産物)との量比を検討することによって、糖尿病の悪化度または危険度を決定することができることを見出した点に顕著性があるというべきである。

10

【0195】

従って、1つの実施形態では、トランスサイレチンの減少およびトランスサイレチン誘導体の増加からなる群より選択される少なくとも1つの現象は、糖尿病を発症しているか、または将来の発症リスクが高いことの指標である。

【0196】

好ましくは、トランスサイレチンの減少およびトランスサイレチン誘導体の増加からなる群より選択される少なくとも1つの現象は、糖尿病を発症の程度、または将来の発症リスクが高さの指標であり得る。このような指標は、本明細書の記載に基づいて当業者が決定することができることが理解される。

20

【0197】

具体的な実施形態では、本発明において対象となるトランスサイレチンは、配列番号1もしくは配列番号3に示される核酸配列によってコードされるか、または配列番号2もしくは配列番号4に示されるアミノ酸配列を有する、あるいは、これらの改変配列を有する。

【0198】

別の実施形態では、本発明において対象となるトランスサイレチン誘導体は、配列番号1もしくは配列番号3に示される核酸配列によってコードされるアミノ酸配列、または配列番号2もしくは配列番号4に示されるアミノ酸配列における、それぞれ、30位(成熟形態では10位)のシステインまたはそれに対応するシステインがシステニル化されている誘導体であるか、あるいは、これらの改変配列を有し得る。

30

【0199】

1つの実施形態では、本発明において使用される因子または手段は、トランスサイレチンの単量体と四量体との区別をする能力を有する。

【0200】

別の実施形態では、本発明において使用される因子または手段は、トランスサイレチンとS-システニルトランスサイレチンとの区別をする能力を有する(例えば、抗体)。このような能力を有する因子または手段は、例えば、抗体であれば、抗体のライブラリーを作製し、さらに、そのライブラリーの中から、トランスサイレチンまたはS-システニルトランスサイレチンのいずれか一方に特異的に(好ましくは、選択的に)反応するものを選択することによって作製することができ、このような技術は、当該分野において周知技術を用いて達成することができる。抗体以外でも同様に、当該分野において周知技術を用いて達成することができる。

40

【0201】

好ましい実施形態では、本発明における因子または手段は、トランスサイレチンとS-システニルトランスサイレチンとを認識し、かつ、本発明のシステムはトランスサイレチンとS-システニルトランスサイレチンとを識別する手段をさらに備える。例えば、

50

抗体 + 電気泳動などの分子量等での識別手段の組み合わせを提供することによって、トランスサイレチン類は同定するが、誘導体とそれ以外とを識別するために電気泳動または質量分析などを利用することで識別を達成することができることが理解される。このような技術は、当該分野において周知技術を用いて達成することができる。

【0202】

好ましい実施形態では、本発明における因子または手段は、トランスサイレチンとS - システニルトランスサイレチンとを認識し、本発明のシステムはトランスサイレチンの分子量とS - システニルトランスサイレチンの分子量とを識別する手段、およびトランスサイレチンとS - システニルトランスサイレチンとの相対比を測定する手段をさらに備える。このようなシステムを提供することによって、本発明は、糖尿病の悪化度、発症確率の判定することができる。

10

【0203】

(アポリポタンパク質C I I)

好ましい局面では、本発明のシステムにおいて用いられるマーカー物質は、アポリポタンパク質C I Iまたはアポリポタンパク質C I I誘導体を含み、該アポリポタンパク質C I I誘導体は、プロアポリポタンパク質C I Iなどを挙げるすることができる。

【0204】

1つの実施形態では、アポリポタンパク質C I Iの減少およびアポリポタンパク質C I I誘導体の変動からなる群より選択される少なくとも1つの現象が、糖尿病を発症しているか、または将来の発症リスクが高いことの指標であり得る。

20

【0205】

1つの実施形態では、アポリポタンパク質C I Iの減少およびアポリポタンパク質C I I誘導体の変動からなる群より選択される少なくとも1つの現象が、糖尿病を発症の程度、または将来の発症リスクが高さの指標であり得る。

【0206】

具体的な実施形態では、本発明において対象となるアポリポタンパク質C I Iは、配列番号5もしくは配列番号7に示される核酸配列によってコードされるか、または配列番号6もしくは配列番号8に示されるアミノ酸配列、あるいは、これらの改変配列を有する。

【0207】

別の実施形態では、本発明において対象となるプロアポリポタンパク質C I Iは、上記配列においてリード配列が結合したものであり得る。

30

【0208】

1つの実施形態では、本発明において使用される因子または手段は、アポリポタンパク質C I Iを選択的に識別する能力を有する(例えば、抗体)。このような能力を有する因子または手段は、例えば、抗体であれば、抗体のライブラリーを作製し、さらに、そのライブラリーの中から、アポリポタンパク質C I Iを特異的に(好ましくは、選択的に)反応するものを選択することによって作製することができ、このような技術は、当該分野において周知技術を用いて達成することができる。抗体以外でも同様に、当該分野において周知技術を用いて達成することができる。

【0209】

好ましい実施形態では、本発明における因子または手段は、アポリポタンパク質C I Iを選択的に識別する能力を有し、かつ、システムは該アポリポタンパク質C I Iを定量する手段を備える。このようなシステムを提供することによって、本発明は、糖尿病の悪化度、発症確率の判定することができる。

40

【0210】

特に好ましい局面では、本発明は被験体由来のサンプル中のマーカー物質、該マーカー物質に特異的に相互作用する因子、または該マーカー物質を選択的に認識する手段を含む、被験体が糖尿病であるかどうか事前診断または診断するためのシステムであって、該認識する手段は、トランスサイレチンとトランスサイレチン誘導体とを識別する能力を有する、システムを提供する。ここで、マーカー物質、相互作用する因子、選択的に認識する

50

手段等の実施形態としては、トランスサイレチンとトランスサイレチン誘導体とを識別する能力を有することが担保される限り、上記（診断システム）において例示されている任意の形態を採り得ることが理解される。

【0211】

好ましい実施形態では、本発明のシステムにおいて使用されるトランスサイレチンは、S - システニルトランスサイレチンである。

【0212】

好ましい実施形態では、本発明のシステムにおいて使用される選択的に認識する手段は、抗体である。この抗体は、トランスサイレチンとS - システニルトランスサイレチンとを示差的に認識することができる限り、どのような性質を有していてもよい。好ましくは、トランスサイレチンまたはS - システニルトランスサイレチンのいずれか一方のみを反応し、他方とは実質的に反応しない抗体であることが有利であり、より好ましくは、前者のみと反応する抗体と後者のみと反応する抗体の両方のセットを備えていてもよい。

【0213】

本明細書において「実質的に反応しない」とは、通常使用するアッセイシステム（例えば、ELISA等）において、検出限界以下であることをいう。したがって、そのような「実質的に反応しない」状態は、使用するアッセイシステムにより異なるが、標準的には、ピオチン - スレプトアビジンを用いたELISAアッセイ系における検出限界を想定する。当業者は、実際のアッセイにおいて、検出を阻止しない濃度・限界値を設定することができ、これらは、実質的に反応しないということができる。

【0214】

（アポリポタンパク質CIII）

好ましい局面では、本発明のシステムにおいて用いられるマーカー物質は、アポリポタンパク質CIIIまたはアポリポタンパク質CIII誘導体を含み、該アポリポタンパク質CIIIはアポリポタンパク質CIII₀であり、該アポリポタンパク質CIII誘導体は、アポリポタンパク質CIII₁およびアポリポタンパク質CIII₂からなる群より選択される。また、本発明は、アポリポタンパク質CIII₀、アポリポタンパク質CIII₁およびアポリポタンパク質CIII₂の量比を検討することによって、糖尿病の悪化度または危険度を精確に決定することができることを見出した点に顕著性があるというべきである。

【0215】

従って、1つの実施形態では、アポリポタンパク質CIIIの増加、アポリポタンパク質CIII₁の増加およびアポリポタンパク質CIII₂の増加からなる群より選択される少なくとも1つの現象が、糖尿病を発症しているか、または将来の発症リスクが高いことの指標である。

【0216】

好ましくは、アポリポタンパク質CIIIの増加、アポリポタンパク質CIII₁の増加およびアポリポタンパク質CIII₂の増加からなる群より選択される少なくとも1つの現象が、糖尿病を発症の程度、または将来の発症リスクが高さの指標であり得る。このような指標は、本明細書の記載に基づいて当業者が決定することができることが理解される。

【0217】

具体的な実施形態では、本発明において対象となるアポリポタンパク質CIIIは、配列番号9もしくは配列番号11に示される核酸配列によってコードされるか、または配列番号10もしくは配列番号12に示されるアミノ酸配列を有する、あるいは、これらの改変配列を有する。

【0218】

別の実施形態では、本発明において対象となるアポリポタンパク質CIII誘導体は、配列番号9もしくは配列番号11に示される核酸配列によってコードされるか、または配列番号10もしくは配列番号12に示されるアミノ酸配列において、それぞれ、配列番号

10

20

30

40

50

10 および12のそれぞれ73位および74位またはそれに対応するスレオニンに糖鎖を有する誘導体である。

【0219】

1つの実施形態では、本発明において使用される因子または手段は、アポリタンパク質CIIIとアポリタンパク質CIII誘導体とを区別する能力を有する。

【0220】

別の実施形態では、本発明において使用される因子または手段は、アポリタンパク質CIII0、アポリタンパク質CIII1およびアポリタンパク質CIII2のうち少なくとも2つを区別する能力を有する。このような能力を有する因子または手段は、例えば、抗体であれば、抗体のライブラリーを作製し、さらに、そのライブラリーの中から、アポリタンパク質CIII0、アポリタンパク質CIII1およびアポリタンパク質CIII2のうち少なくとも2つを特異的に（好ましくは、選択的に）反応するものを選択することによって作製することができ、このような技術は、当該分野において周知技術を用いて達成することができる。抗体以外でも同様に、当該分野において周知技術を用いて達成することができる。

10

【0221】

好ましい実施形態では、本発明における因子または手段は、アポリタンパク質CIII0とアポリタンパク質CIII1とアポリタンパク質CIII2とをすべて区別する能力を有する（例えば、抗体）。このような能力を有する因子または手段は、例えば、抗体であれば、抗体のライブラリーを作製し、さらに、そのライブラリーの中から、アポリタンパク質CIII0とアポリタンパク質CIII1とアポリタンパク質CIII2とをすべて区別するように特異的に（好ましくは、選択的に）反応するものを選択することによって作製することができ、このような技術は、当該分野において周知技術を用いて達成することができる。抗体以外でも同様に、当該分野において周知技術を用いて達成することができる。

20

【0222】

従って、1つの実施形態では、因子または前記手段は、アポリタンパク質CIIIとアポリタンパク質CIII誘導体とを区別する能力を有する抗体を含み、好ましくは、アポリタンパク質CIII0、アポリタンパク質CIII1およびアポリタンパク質CIII2のうち少なくとも2つを区別する能力を有する抗体を含み、アポリタンパク質CIII0とアポリタンパク質CIII1とアポリタンパク質CIII2とをすべて区別する能力を有する抗体の組み合わせを含む。

30

【0223】

好ましい実施形態では、本発明における因子または手段は、アポリタンパク質CIIIとアポリタンパク質CIII誘導体とを認識し、前記システムは、アポリタンパク質CIIIとアポリタンパク質CIII誘導体とを識別する手段をさらに備える。例えば、抗体+電気泳動などの分子量等での識別手段の組み合わせを提供することによって、アポリタンパク質CIII類は、同定するが、誘導体とそれ以外とを識別するために電気泳動または質量分析などを利用することで識別を達成することができる。このような技術は、当該分野において周知技術を用いて達成することができる。

40

【0224】

好ましい実施形態では、本発明における因子または手段は、アポリタンパク質CIIIとアポリタンパク質CIII誘導体とを認識し、本発明のシステムは、アポリタンパク質CIII0、アポリタンパク質CIII1およびアポリタンパク質CIII2のうち少なくとも2つを識別する手段をさらに備える。例えば、抗体+電気泳動などの分子量等での識別手段の組み合わせを提供することによって、アポリタンパク質CIII類は、同定するが、誘導体とそれ以外とを識別するために電気泳動または質量分析などを利用することで識別を達成することができる。このような技術は、当該分野において周知技術を用いて達成することができる。

【0225】

50

好ましい実施形態では、本発明における因子または手段は、アポリポタンパク質C I I Iとアポリポタンパク質C I I I誘導体とを認識し、前記システムは、アポリポタンパク質C I I I 0とアポリポタンパク質C I I I 1とアポリポタンパク質C I I I 2とをすべて識別する手段をさらに備える。このようなシステムを提供することによって、本発明は、糖尿病の悪化度、発症確率の判定することができる。

【0226】

(血清アルブミン)

別の局面において、本発明のシステムにおいて用いられるマーカー物質は、血清アルブミンまたは血清アルブミン誘導体を含み、該血清アルブミン誘導体は、酸化された血清アルブミン、フラクシオン化された血清アルブミンなどが挙げられる。

10

【0227】

従って、1つの実施形態では、血清アルブミンの減少および血清アルブミン誘導体の変動からなる群より選択される少なくとも1つの現象が、糖尿病を発症しているか、または将来の発症リスクが高いことの指標である。アルブミンは、種々の疾患の指標として測定されているが、糖尿病の指標であることはこれまで知られていなかった。特に、トランスサイレチン、アポリポタンパク質C I I I、アポリポタンパク質I I Iなどと組み合わせたときに、診断の精度を上昇させることは初めて見出されたことは特筆に価する。

【0228】

好ましくは、血清アルブミンの減少および血清アルブミン誘導体の変動からなる群より選択される少なくとも1つの現象が、糖尿病を発症の程度、または将来の発症リスクが高さの指標である。このような指標は、本明細書の記載に基づいて当業者が決定することができることが理解される。

20

【0229】

具体的な実施形態では、本発明において対象となる血清アルブミンは、配列番号13もしくは配列番号15に示される核酸配列によってコードされるか、または配列番号14もしくは配列番号16に示されるアミノ酸配列、あるいは、これらの改変配列を有する。あるいは、本明細書において記載されるか他に公知の血清アルブミン配列を有していても良い。

【0230】

1つの実施形態では、本発明において使用される因子または手段は、血清アルブミンを選択的に識別する能力を有する(例えば、抗体)。このような能力を有する因子または手段は、例えば、抗体であれば、抗体のライブラリーを作製し、さらに、そのライブラリーの中から、血清アルブミンに特異的に(好ましくは、選択的に)反応するものを選択することによって作製することができる。このような技術は、当該分野において周知技術を用いて達成することができる。抗体以外でも同様に、当該分野において周知技術を用いて達成することができる。

30

【0231】

好ましい実施形態では、本発明における因子または手段は、血清アルブミンを選択的に識別する能力を有し、かつ、前記システムは該血清アルブミンを定量する手段を備える。例えば、抗体+電気泳動などの分子量等での識別手段の組み合わせを提供することによって、血清アルブミン類は同定するが、血清アルブミン自体とそれ以外とを識別するために電気泳動または質量分析などを利用することで識別を達成することができることが理解される。このような技術は、当該分野において周知技術を用いて達成することができる。

40

【0232】

1つの局面において、本発明のシステムは、好ましくは、診断薬として使用され得る。

【0233】

(診断方法)

1つの局面において、本発明は、被験体が糖尿病であるかどうか事前診断もしくは診断するため、または該事前診断もしくは診断を支援するための方法であって、A)該被験体由来のサンプル中のマーカー物質を測定する工程;およびB)該測定結果から、該被験体

50

が糖尿病またはその可能性があるかどうかを決定する工程、を包含する、方法を提供する。ここで、サンプルの取得は、どのような手段であっても良い。通常、医師以外の担当者が測定に従事する場合は、何らかの形で医師が取得したものであり得る。測定結果から、糖尿病またはその可能性があるかどうかを決定する工程は、正常値と比べて、各々のマーカー物質に比較して異常であるかどうかを判定することによって実施することができる。

【0234】

本発明の方法において、使用されるマーカー物質などは、上記（システム）、（トランスサイレチン）、（アポリポタンパク質CIII）、（アポリポタンパク質CII）および（血清アルブミン）の項において記載される任意の1または複数の特徴を矛盾することがない限り有していても良いことが理解される。

10

【0235】

（使用）

1つの局面において、本発明は、被験体由来のサンプル中のマーカー物質、該マーカー物質に特異的に相互作用する因子、または該マーカー物質を選択的に認識する手段の、被験体が糖尿病であるかどうか事前診断または診断するための医薬の製造における、使用を提供する。ここで、サンプルの取得は、どのような手段であっても良い。通常、医師以外の担当者が測定に従事する場合は、何らかの形で医師が取得したものであり得る。測定結果から、糖尿病またはその可能性があるかどうかを決定する工程は、正常値と比べて、各々のマーカー物質に比較して異常であるかどうかを判定することによって実施することができる。

20

【0236】

本発明の方法において、使用されるマーカー物質などは、上記（システム）、（トランスサイレチン）、（アポリポタンパク質CIII）、（アポリポタンパク質CII）および（血清アルブミン）の項において記載される任意の1または複数の特徴を矛盾することがない限り有していても良いことが理解される。

【0237】

別の局面では、本発明は、被験体由来のサンプル中のマーカー物質、該マーカー物質に特異的に相互作用する因子、または該マーカー物質を選択的に認識する手段の、被験体が糖尿病であるかどうか事前診断または診断するための使用を提供する。ここで、サンプルの取得は、どのような手段であっても良い。通常、医師以外の担当者が測定に従事する場合は、何らかの形で医師が取得したものであり得る。測定結果から、糖尿病またはその可能性があるかどうかを決定する工程は、正常値と比べて、各々のマーカー物質に比較して異常であるかどうかを判定することによって実施することができる。

30

【0238】

本発明の方法において、使用されるマーカー物質などは、上記（システム）、（トランスサイレチン）、（アポリポタンパク質CIII）、（アポリポタンパク質CII）および（血清アルブミン）の項において記載される任意の1または複数の特徴を矛盾することがない限り有していても良いことが理解される。

【0239】

（さらなる説明）

本発明の糖尿病の診断方法において、マーカー物質の濃度を測定する方法は、そのマーカー物質の濃度を特異的に測定できる方法であれば、タンパク質の定量に一般に用いられている方法をそのまま用いることができる。例えば、各種のイムノアッセイ、質量分析（MS）、クロマトグラフィー、電気泳動等を用いることができる。

40

【0240】

イムノアッセイによれば、夾雑物質の多い試料のままでも正確にマーカー物質の濃度を測定することが出来る。イムノアッセイの例としては、抗原抗体結合物を直接的または間接的に測定する沈降反応、凝集反応、溶血反応などの古典的な方法や、標識法と組み合わせることで検出感度を高めたエンザイムイムノアッセイ（EIA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、蛍光イムノアッセイ（FIA）等の方法が挙げられる。なお、これらのイムノア

50

ッセイに用いるマーカー物質に特異的な抗体は、モノクローナルでもよいし、ポリクローナルでもよい。

【0241】

質量分析によってマーカー物質の濃度を測定する場合のイオン化の方法としては、マトリクス支援レーザーイオン化(matrix-assisted laser desorption/ionization、MALDI)、エレクトロスプレーイオン化(electrospray ionization、ESI)のいずれも適用可能であるが、多価イオンの生成が少ないMALDIが好ましい。特に、飛行時間質量分析計(time-of-flight mass spectrometer、TOF)と組み合わせたMALDI-TOF-MSによれば、より正確にマーカー物質の濃度を測定することができる。さらに、2台の質量分析計を用いたMS/MSによれば、より正確にマーカー物質の濃度を測定することができる。

10

【0242】

電気泳動によりマーカー物質の濃度を測定する場合は、例えば、検査材料をSDS-ポリリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)に供して目的のマーカー物質を分離し、適宜の色素や蛍光物質でゲルを染色し、目的のマーカー物質に相当するバンドの濃さや蛍光強度を測定すればよい。SDS-PAGEだけではマーカー物質の分離が不十分な場合は、等電点電気泳動(IEF)と組み合わせた2次元電気泳動を用いることもできる。さらに、ゲルから直接検出するのではなく、ウエスタンブロッティングを行って膜上のマーカー物質の量を測定することもできる。

20

【0243】

クロマトグラフィーによってマーカー物質の濃度を測定する場合は、例えば、液体高速クロマトグラフィー(HPLC)による方法を用いることができる。すなわち、試料をHPLCに供して目的のマーカー物質を分離し、そのクロマトグラムピーク面積を測定することにより試料中のマーカー物質の濃度を測定することができる。

【0244】

本発明の糖尿病の診断方法は、(a)7.0以下のpHで陽イオン交換体に補足される、分子量が約13800であるタンパク質、(b)7.0以下のpHで金属イオン固定化担体に補足される、分子量が約8700であるタンパク質、(c)7.0以下のpHで陽イオン交換体に捕捉される、分子量が約9400であるタンパク質、または、pH7.0で金属イオン固定化担体に補足される、分子量が約9400であるタンパク質、(d)7.0以下のpHで陽イオン交換体に補足される、分子量が約9700であるタンパク質、または、pH7.0で金属イオン固定化担体に補足される、分子量が約9700であるタンパク質、(e)7.0以下のpHで陽イオン交換体に補足される、分子量が約6600であるタンパク質、または、pH7.0で金属イオン固定化担体に補足される、分子量が約6600であるタンパク質、をマーカー物質とし、その血液中の量を健常値と比較する方法も含む。なお、上記(a)、(b)、(c)、(d)、(e)の物性は、それぞれ、トランスサイレチンサブユニット、アポリポタンパク質CII I0、アポリポタンパク質CII I1、アポリポタンパク質CII I2、血清アルブミンと一致する。

30

【0245】

本発明の糖尿病の診断方法は、(a)トリプシンで消化すると、分子量が約1270、約1370、約1390、約1520、約2450、約2640、および約3140のポリペプチドを生じる、分子量約13800のタンパク質、および/または、(b)トリプシンで消化すると、分子量が約900、約1200、約1390、約1710、約1940、および約2080のポリペプチドを生じる、分子量約8700~9700のタンパク質をマーカー物質とし、その血液中の量を健常値と比較する方法も含む。なお、ProFoundデータベースを用いてペプチドマスフィンガープリンティングを行うと、(a)はトランスサイレチンと同定される。また、MS-Fitデータベースを用いてペプチドマスフィンガープリンティングを行うと、(b)はアポリポタンパク質CII Iと同定される。

40

50

【0246】

本発明の糖尿病の診断方法における好ましい実施形態の一つは、マーカー物質を担体上に捕捉し、その捕捉されたマーカー物質の濃度を測定することである。すなわち、マーカー物質に対する親和性を有する物質を担体に固定化し、その親和性を有する物質を介してマーカー物質を担体上に捕捉する。本実施形態によれば、試料中に含まれる夾雑物質の影響を低減させることができ、より高感度かつ高精度でマーカー物質の濃度を測定することができる。なお「親和性」の例としては、抗原と抗体、酵素と基質、ホルモンとレセプターのようなバイオアフィニティの他、イオン結合、疎水性相互作用等の化学的な作用が挙げられる。

【0247】

本実施形態においてマーカー物質の測定方法にイムノアッセイを用いる場合は、抗体を固定化した担体を用いることが好ましい。このようにすれば、担体に固定化された抗体を1次抗体としたイムノアッセイの系を簡単に構築することができる。例えば、マーカー物質に特異的でエピトープの異なる2種類の抗体を用意し、一方を1次抗体として担体に固定化し、他方を2次抗体として酵素標識し、サンドイッチEIAの系を構築することができる。その他、結合阻止法や競合法によるイムノアッセイの系も構築可能である。さらに、担体として基板を用いる場合は、抗体チップによるイムノアッセイが可能である。抗体チップによれば、複数のマーカー物質の濃度を同時に測定でき、迅速な測定が可能である。

【0248】

一方、本実施形態においてマーカー物質の測定方法に質量分析を用いる場合は、抗体の他、イオン結合や疎水性相互作用によってマーカー物質を担体に捕捉することもできる。イオン結合や疎水性相互作用は抗原と抗体等のバイオアフィニティほどの特異性がなく、マーカー物質以外の物質も捕捉されるが、質量分析によれば分子量を反映した質量分析計スペクトルによって定量するので、問題はない。特に、担体として基板を使用したプロテインチップを用い、表面エンハンス型レーザー脱離イオン化(surface-enhanced laser desorption/ionization) - 飛行時間質量分析(time-of-flight mass spectrometry) (以下、「SELDI-TOF-MS」と称する)を行えば、マーカー物質の濃度をより正確に測定することができる。使用できる基板の種類としては、陽イオン交換基板、陰イオン交換基板、順相基板、逆相基板、金属イオン基板、抗体基板等を用いることができるが、陽イオン交換基板、特に弱陽イオン交換基板と、金属イオン基板が好ましく用いられる。

【0249】

イオン結合によってマーカー物質を担体に捕捉する場合は、イオン交換体を担体に固定化する。この場合、イオン交換体には陰イオン交換体、陽イオン交換体のいずれも用いることができ、さらに、強陰イオン交換体、弱陰イオン交換体、強陽イオン交換体、弱陽イオン交換体のいずれも用いることができる。例えば、弱陰イオン交換体の例としては、ジメチルアミノエチル(DE)、ジエチルアミノエチル(DEAE)等の弱陰イオン交換基を有するものが挙げられる。また、強陰イオン交換体の例としては、4級アンモニウム(トリメチルアミノメチル)(QA)、4級アミノエチル(ジエチル, モノ・2-ヒドロキシブチルアミノエチル)(QAE)、4級アンモニウム(トリメチルアンモニウム)(QMA)等の強陰イオン交換基を有するものが挙げられる。また、弱陽イオン交換体の例としては、カルボキシメチル(CM)等の弱陽イオン交換基を有するものが挙げられる。さらに、強陽イオン交換体の例としては、スルホプロピル(SP)等の強陽イオン交換基を有するものが挙げられる。一方、疎水性相互作用によってマーカー物質を担体に捕捉する場合は、担体に疎水基をもつ物質を固定化する。疎水基の例としては、C4~C20のアルキル基、フェニル基等が挙げられる。さらに、Cu²⁺、Zn²⁺、Ni²⁺、Ca²⁺、Co²⁺、Mg²⁺等の金属イオンを固定化した担体にマーカー物質を捕捉することもできる。

【0250】

本実施形態において用いる担体の例としては、ビーズ、マイクロタイタープレート、樹

10

20

30

40

50

脂等の公知のものを使用することができる。特に、ビーズとマイクロタイタープレートは、免疫アッセイにおいて従来から用いられており、測定系の構築が容易である。一方、基板のような、平面部分を有する担体を用いることもできる。この場合は、平面部分の一部にマーカー物質に対する親和性を有する物質を固定化することが好ましい。例としては、基板としてチップを用い、その表面の複数箇所にスポット的にマーカー物質に特異的な抗体を固定化した担体が挙げられる。

【0251】

本発明の糖尿病の診断方法においては、被験者から採取した血液を検体とし、その血液から調製した血清または血漿を検査材料とすることが好ましい。血清または血漿は遠心分離等の公知の方法で血液から調製することができる。

10

【0252】

本発明の糖尿病の診断方法における好ましい実施形態の一つとして、マルチマーカーシステムによる糖尿病の診断が挙げられる。本発明の糖尿病の診断方法をマルチマーカーシステムに応用する例を、図1および図2を参照しながら説明する。図1は、マルチマーカーシステムによる本発明の糖尿病の診断方法の手順を示すフローチャートである。図1のフローチャートの方法によれば、まず、血液中のトランスサイレチンの濃度を指標として1次判定をする。そして、トランスサイレチンの濃度が健常値よりも高い場合は、糖尿病と判定する。一方、トランスサイレチンの濃度が健常値以下である場合は、血液中のアポリポタンパク質CII I2の濃度を指標として2次判定をする。そして、アポリポタンパク質CII I2の濃度が健常値よりも高い場合は、糖尿病と判定する。一方、アポリポタンパク質CII I2の濃度が健常値以下である場合は、血液中のアポリポタンパク質CII I1の濃度を指標として3次判定をする。そして、アポリポタンパク質CII I1の濃度が健常値以下である場合は、正常(糖尿病ではない)と判定する。一方、アポリポタンパク質CII I1の濃度が健常値よりも高い場合は、血液中のアポリポタンパク質CII I0の濃度を指標として4次判定をする。そして、アポリポタンパク質CII I0の濃度が健常値よりも高い場合は、糖尿病と判定する。一方、アポリポタンパク質CII I0の濃度が健常値以下である場合は、正常(糖尿病ではない)と判定する。

20

【0253】

図2は、別のマルチマーカーシステムによる本発明の糖尿病の診断方法の手順を示すフローチャートである。図2のフローチャートの方法によれば、まず、血液中の血清アルブミンの濃度を指標として1次判定をする。そして、血清アルブミンの濃度が健常値以上である場合は、正常(糖尿病ではない)と判定する。一方、血清アルブミンの濃度が健常値よりも低い場合は、血液中のアポリポタンパク質CII I2の濃度を指標として2次判定をする。そして、アポリポタンパク質CII I2の濃度が健常値よりも高い場合は、糖尿病と判定する。一方、アポリポタンパク質CII I2の濃度が健常値以下である場合は、血液中のアポリポタンパク質CII I1の濃度を指標として3次判定をする。そして、アポリポタンパク質CII I1の濃度が健常値以下である場合は、正常(糖尿病ではない)と判定する。一方、アポリポタンパク質CII I1の濃度が健常値よりも高い場合は、血液中のアポリポタンパク質CII I0の濃度を指標として4次判定をする。そして、アポリポタンパク質CII I0の濃度が健常値よりも高い場合は、糖尿病と判定する。一方、アポリポタンパク質CII I0の濃度が健常値以下である場合は、正常(糖尿病ではない)と判定する。

30

40

【0254】

なお、本発明で糖尿病マーカーとして使用するトランスサイレチン、アポリポタンパク質CII I、および血清アルブミンと、従来から知られているHbA1cやCPR等の臨床マーカーを組み合わせることによってもマルチマーカーシステムを構築することは可能である。

【0255】

上記のようなマルチマーカーシステムによる糖尿病の診断方法によれば、多方面から判定できるので、かなりの高精度で糖尿病の診断をすることができる。さらに、従来の糖尿

50

病の診断方法では困難であった、糖尿病の発病前の段階の検出、すなわち糖尿病予備軍の診断にも好適である。また、マルチマーカーシステムによれば、糖尿病の検出のみでなく、糖尿病予備軍の検出、糖尿病の改善状態のモニターも高精度に行うことができる。

【0256】

本発明の糖尿病診断用キットは、トランスサイレチン等のマーカー物質に特異的な抗体を含むものである。キットに含まれる抗体は単独の試薬としてもよいし、担体にあらかじめ固定化された状態でもよい。単独の試薬の場合は、その形状は溶液でもよいし凍結乾燥物でもよい。また、複数の抗体を含めてもよく、例えば、イムノアッセイで使用する標識抗体を2次抗体として含めてもよい。また、本発明の糖尿病診断用キットには他の試薬類を含めてもよく、例えばEIAを行うためのキットであれば、ビーズ等の担体、ブロッキング液、PBS等の緩衝液、発色基質等を含むものでもよい。

10

【0257】

本発明の疾病の診断方法は、被検者の体液中における下記マーカー物質(a)~(n)の少なくとも1つの濃度を健常値と比較し、糖尿病の有無または将来の発症リスクを判定するものである。

(a) pH4.0で弱陽イオン交換体に結合し、かつ質量分析に供すると質量/電荷比が約7040のイオンピークを生じるタンパク質、

(b) pH4.0で弱陽イオン交換体に結合し、かつ質量分析に供すると質量/電荷比が約8330のイオンピークを生じるタンパク質、

(c) pH4.0で弱陽イオン交換体に結合し、かつ質量分析に供すると質量/電荷比が約8530のイオンピークを生じるタンパク質。

20

(d) pH7.0かつ0.5MのNaCl濃度で銅イオン結合金属キレート体に結合し、かつ質量分析に供すると質量/電荷比が約9060のイオンピークを生じるタンパク質、

(e) pH4.0で弱陽イオン交換体に結合し、かつ質量分析に供すると質量/電荷比が約9260のイオンピークを生じるタンパク質、

(f) pH4.0で弱陽イオン交換体に結合し、かつ質量分析に供すると質量/電荷比が約9450のイオンピークを生じるタンパク質、

(g) pH7.0かつ0.5MのNaCl濃度で銅イオン結合金属キレート体に結合し、かつ質量分析に供すると質量/電荷比が約13700のイオンピークを生じるタンパク質、

30

(h) pH4.0で弱陽イオン交換体に結合し、かつ質量分析に供すると質量/電荷比が約76400のイオンピークを生じるタンパク質、

(i) pH4.0で弱陽イオン交換体に結合し、かつ質量分析に供すると質量/電荷比が約79100のイオンピークを生じるタンパク質、

(j) pH4.0で弱陽イオン交換体に結合し、かつ質量分析に供すると質量/電荷比が約3500のイオンピークを生じるタンパク質、

(k) pH7.0かつ0.5MのNaCl濃度で銅イオン結合金属キレート体に結合し、かつ質量分析に供すると質量/電荷比が約3560のイオンピークを生じるタンパク質、

(l) pH7.0かつ0.5MのNaCl濃度で銅イオン結合金属キレート体に結合し、かつ質量分析に供すると質量/電荷比が約4180のイオンピークを生じるタンパク質、

40

(m) pH4.0で弱陽イオン交換体に結合し、かつ質量分析に供すると質量/電荷比が約12800のイオンピークを生じるタンパク質、

(n) pH4.0で弱陽イオン交換体に結合し、かつ質量分析に供すると質量/電荷比が約65700のイオンピークを生じるタンパク質。

【0258】

これらのマーカー物質はいずれも主に血液中に存在するタンパク質である。なお、被検者が糖尿病を発症している場合または糖尿病の将来の発症リスクが高い場合、体液中のマーカー物質(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)および(i)の濃度はより高値を示し、マーカー物質(j)、(k)、(l)、(m)および(n)の濃度はより低値を示す。以下、マーカー物質(a)、(b)、(c)、(d)、(e)

50

)、(f)、(g)、(h)および(i)からなるグループを「グループ1」、マーカー物質(j)、(k)、(l)、(m)および(n)からなるグループを「グループ2」と称することができる。

【0259】

本発明の疾病の診断方法で使用する健常値は、例えば、糖尿病を発症していないと確定診断された健常人における上記マーカー物質(a)~(n)の体液中の濃度データを収集し、その濃度値を元に設定することができる。糖尿病の将来の発症リスクを判定する場合も、当該健常人における濃度値を元に健常値を設定することができる。なお、健常値を段階的に複数設定し、糖尿病の有無または将来の発症リスクを定量的に判定することもできる。

10

【0260】

本発明の疾病の診断方法において使用する体液としては、血液が好ましく用いられる。特に、被検者から採取した血液から調製した血清または血漿(体液成分)を測定試料とすることが好ましい。血清または血漿は遠心分離等の公知の方法で血液から調製することができる。

【0261】

(評価方法)

1つの局面において、本発明は物質の評価方法を提供し、この方法は、糖尿病を発症している動物または将来の発症リスクが高い動物に被検物質を摂取させ、該動物の体液におけるマーカー物質(例えば、(a)~(n)の14種)の少なくとも1つの濃度を基準値と比較し、被検物質が有する糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を評価するものである。本発明の物質の評価方法では、血糖を直接指標とするのではなく、別のマーカー物質を指標とするので、動物における血糖値が上昇する前の状態をも捉えることができる。その結果、被検物質が有する糖尿病の改善効果に加え、糖尿病の将来の発症リスクの低減効果を評価することができる。なお、「動物」には、ラット等の飼育可能な動物の他、ヒトも含むものとする。

20

【0262】

かかる構成により、より正確に、被検物質が有する糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を評価することができる。

【0263】

かかる構成により、測定試料となる体液を簡単に採取でき、より簡便かつ迅速に、被検物質が有する糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を評価することができる。

30

【0264】

かかる構成により、機能性食品の開発を目的として、糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を評価することができる。

【0265】

上記した本発明の疾病の診断方法と同様に、本発明の物質の評価方法においても、前記体液または体液成分を、前記マーカー物質に対する親和性を有する物質を固定化した担体に接触させて、体液中の前記マーカー物質を担体上に捕捉し、捕捉された前記マーカー物質の量に基づいて体液中の前記マーカー物質の濃度を算出する構成(請求項10)、前記担体は平面部分を有し、前記マーカー物質に対する親和性を有する物質は、該平面部分の一部に固定化されている構成、前記マーカー物質に対する親和性を有する物質は、イオン交換体、金属キレート体または抗体である構成が推奨される。

40

【0266】

本発明の物質の評価方法では、糖尿病を発症している動物または将来の発症リスクが高い動物に被検物質を摂取させ、該動物における上記マーカー物質(a)~(n)の少なくとも1つの濃度を基準値と比較し、被検物質が有する糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を評価するものである。なお、被検物質が糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を有する場合、体液中におけるグループ1に属するマーカー物質

50

の濃度はより低値を示し、グループ2に属するマーカー物質の濃度はより高値を示す。

【0267】

好ましい実施形態では、上記基準値として、糖尿病を発症している動物または将来の発症リスクが高い動物に、糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を有さない既知物質を摂取させた際の、該動物の体液中における前記マーカー物質の濃度を用いる。すなわち、糖尿病を発症している動物または将来の発症リスクが高い動物に、糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を有さない既知物質を摂取させた場合、その体液中の上記マーカー物質の濃度は「異常値」となる。そして、被検物質を摂取させた上記動物における値（測定値）と当該基準値（異常値）とを比較し、測定値が基準値と有意に差がありかつ正常側である場合（正常側に維持された場合）に、当該被検物質が糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を有すると評価することができる。具体的には、グループ1に属するマーカー物質を指標とする場合は、測定値が当該基準値に比べて有意に低いときに、グループ2に属するマーカー物質を指標とする場合は、測定値が基準値に比べて有意に高いときに、当該被検物質が糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を有すると評価することができる。

10

【0268】

さらに、基準値は複数あってもよい。例えば、上記の異常値に加え、糖尿病を発症していない動物または糖尿病の発症リスクが低い動物における値（正常値。陰性対照。）を基準値に加えることができる。具体的には、（1）糖尿病を発症していない動物または糖尿病の発症リスクが低い動物に、普通食または被検物質を摂取させる群（正常値を示す群）、（2）糖尿病を発症している動物または糖尿病の発症リスクが高い動物に、糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を有さない既知物質を摂取させる群（異常値を示す群）、および、（3）糖尿病を発症している動物または糖尿病の発症リスクが高い動物に被検物質を摂取させる群、の3群を設定し、動物を飼育する。そして、各動物の体液中の上記マーカー物質を測定し、各測定値を比較する。このとき、（1）と（2）とで有意差があり、（3）と（2）とで有意差があり、かつ（3）が（2）に比べて正常側（（1）に近い側）である場合（正常側に維持された場合）に、当該被検物質が糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を有すると評価することができる。すなわち、被検物質に糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果があれば、（3）において血糖値が正常値に維持され、マーカー物質の濃度が正常値である（1）に近い値をとる。

20

30

【0269】

さらに、基準値として、（4）糖尿病を発症している動物または将来の発症リスクが高い動物に、糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を有する既知物質を摂取させる群、の動物における値（陽性対照）を加えることもできる。具体的には、上記（1）～（3）に加えて、上記（4）の群を設定し、動物を飼育する。このとき、（1）と（2）とで有意差があり、（3）と（2）とで有意差があり、かつ（3）が（2）に比べて正常側（（1）および（4）に近い側）である場合に、当該被検物質が糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を有すると評価することができる。すなわち、このような被検物質は、（4）で採用した上記既知物質と同様の挙動を示し、同様の作用を有する物質といえる。

40

【0270】

上記した「糖尿病を発症している動物、または糖尿病の発症リスクが高い動物」は、例えば、遺伝的に必ず糖尿病を発症する動物を用いることで、実現できる。より具体的には、例えば、大塚製薬（株）徳島研究所から供給されているOLETF（Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty）ラットを用いることができる。OLETFラットは肥満を伴う2型糖尿病を自然発症するモデルラットであり、雄では25週齢におけるOGTTでほぼ全例が糖尿病と診断される。同様に、「糖尿病を発症していない動物、または糖尿病の発症リスクが低い動物」は、例えば、遺伝的に全く糖尿病を発症しないモデル動物を用いることで、実現できる。より具体的には、例えば、大塚製薬（株）徳島研究所から供給されているLETO（Long-Evans Tokushima Otsuka）ラットを用いることができる。LETOラッ

50

トは、糖尿病を全く発症しないコントロールラットであり、遺伝的にOLETFラットと近縁である。

【0271】

本発明の物質の評価方法に使用する動物としては、特に限定はなく、例えばマウス、ラット、ウサギ、ブタ等を使用することができる。特に、ラットとマウスはその飼育が容易であるので、本発明の評価方法に好ましく用いられる。動物の飼育方法としては特に限定はなく、例えば、飼料を自由摂取させて、3～20日程度飼育すればよい。さらに、動物としてヒトを用いることもできる。ヒトを用いる場合は、臨床試験の結果によって物質を評価することになる。

【0272】

本様相の物質の評価方法において使用する動物の体液としては、血液が好ましく用いられる。特に、血液から調製した血清または血漿（体液成分）を測定試料とすることが好ましい。血清または血漿は遠心分離等の公知の方法で血液から調製することができる。

【0273】

本発明の物質の評価方法における被検物質としては、食品素材、医薬原体などが挙げられる。特に、食品素材を評価対象とする場合は、機能性食品の開発に役立てることができる。

【0274】

本発明の物質の評価方法を簡便に行なうために、必要な試薬類をまとめて評価用キットを構築することができる。当該評価用キットとしては、例えば、マーカー物質に対する親和性を有する物質を固定化した担体を含むものが挙げられる。特に、担体として、CM等の弱陽イオン交換体、銅イオン等の金属キレート体、あるいはマーカー物質に対する抗体を固定化した基板を含めた評価用キットによれば、SELDI-TOF-MSや抗体チップによるイムノアッセイを簡便に行なうことができる。本キット中には他の試薬類、例えば、標準物質、前処理用の各種緩衝液等を含めてもよい。

【0275】

本発明の物質のスクリーニング方法は、本発明の物質の評価方法によって被検物質を評価し、糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を有する物質をスクリーニングするものである。本発明の物質のスクリーニング方法においても、上記した本発明の物質の評価方法の実施形態と全く同様の実施形態をとることができる。さらに、上記した評価用キットと同様の構成からなるスクリーニング用キットを構築することもできる。

【0276】

本発明はまた、本発明に記載の物質の評価方法によって被検物質を評価し、糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を有する物質をスクリーニングすることを特徴とする物質のスクリーニング方法である。

【0277】

本発明は物質のスクリーニング方法にかかり、動物の体液中におけるマーカー物質（例えば、(a)～(n)の14種）の少なくとも1つの濃度を基準値と比較し、糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を有する物質をスクリーニングするものである。本発明の物質のスクリーニング方法では、血糖を直接指標とするのではなく、別のマーカー物質を指標とするので、動物における血糖値が上昇する前の状態をも捉えることができる。その結果、糖尿病の改善効果を有する物質に加え、糖尿病の将来の発症リスクの低減効果を有する物質をスクリーニングすることができる。特に、被検物質が食品素材の場合は、糖尿病の改善効果を有する機能性食品または将来の発症リスクの低減効果を有する機能性食品の開発に有用な食品素材をスクリーニングすることができる。

【0278】

本発明は、このようなスクリーニング方法によって得られた物質も提供する。

【0279】

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。

10

20

30

40

50

【0280】

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。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。

【実施例】

【0281】

以下に、実施例をもって本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

10

【実施例1】

【0282】

1. プロテインチップを用いた糖尿病マーカー候補タンパク質の検索

糖尿病患者10名分、健常者10名分、計20名分の血清サンプルを収集した。各血清サンプルについて、変性緩衝液(9M 尿素、2% CHAPS、50mM Tris-HCl (pH 9.0))を加えて前処理を行い、一部の夾雑タンパク質を除去した。次に、前処理した各血清サンプルを強陰イオン交換樹脂に吸着させた後、pHの異なる溶出液で順に溶出させ、画分1(素通り)、画分2(pH 7.0で溶出)、画分3(pH 5.0で溶出)、画分4(pH 4.0で溶出)、画分5(pH 3.0で溶出)、画分6(有機溶媒で溶出)の6つの画分を得た。それぞれの画分に対して、プロテインチップを用いてS E L D I - T O F - M Sを行い、糖尿病患者の血清に特異的なタンパク質を網羅的に検索した。プロテインチップは、金属イオン(Cu²⁺)、弱陽イオン交換体(CM)、強陰イオン交換体(Q)、逆相(C16アルキル鎖)の4種(いずれもサイファージェン社製)について検討した。エネルギー吸収物質(EAM)は、 α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸(CHCA)とシナピン酸(SPA)の2種を検討した。その結果、プロテインチップの種類、画分の種類、チップの洗浄条件(pH)、EAMの種類等の組み合わせによって多数のピークが検出された。これらのピークから、糖尿病患者と健常者との間で有意に強度が異なるピークを検索した。

20

2. 候補ピークの検索(1)

弱陽イオン交換体を固定化したプロテインチップを用い、画分4について洗浄pHを7.0とした場合に、質量/電荷比(m/z)が13867, 14049, 13885, 14087, および13761の5個のピークが検出された。また、弱陽イオン交換体を固定化したプロテインチップを用い、画分5について洗浄pHを4.0とした場合に、m/zが13885のピークが検出された。これら6個のピークから、分子量13800~14100の範囲付近に候補となるタンパク質(以下、「候補タンパク質(1)」と称する。)が存在することが示唆された。

30

【0283】

各ピークについて、糖尿病患者と健常者に分けてピーク強度をプロットし、ROC曲線を作成し、さらに、カットオフ値を設定した。一例として、図3(a)~(c)にm/zが13867のピークについての例を示す。図3(a)は糖尿病患者と健常者に分けてピーク強度をプロットしたグラフであり、水平線はカットオフ値である。図3(b)は図3(a)の結果を、最大値、最小値、中央値、およびカットオフ値で示したグラフである。図3(c)はROC曲線であり、ROC面積が1に近いほど(曲線が左上に寄るほど)その測定系の精度が高いことを示す。他の5個のピークについても同様のグラフ(図示せず)を作成した。各ピークについて、P値、ROC面積、使用チップ、チップの洗浄条件、画分、および使用EAMをまとめた表を以下の表2に示す。

40

【0284】

【表 2】

m/z	P値	ROC面積	使用チップ	洗浄pH	画分	EAM
13867	0.001	0.88	弱陽イオン交換	7.0	4	SPA
14049	0.002	0.84	弱陽イオン交換	7.0	4	SPA
13885	0.001	0.88	弱陽イオン交換	4.0	5	SPA
13885	0.0005	0.90	弱陽イオン交換	7.0	4	SPA
14087	0.002	0.81	弱陽イオン交換	7.0	4	SPA
13761	0.05	0.67	弱陽イオン交換	7.0	4	SPA

10

【 0 2 8 5 】

3. 候補タンパク質(1)の精製

糖尿病患者の血清から、以下の手順により候補タンパク質(1)を精製した。まず、糖尿病患者の血清50 μ Lに変性緩衝液(9M 尿素、2% CHAPS、50mM Tris-HCl(pH9.0))75 μ Lを加え、4で20分間処理した。さらに、洗浄/結合緩衝液(100mM NaClを含む、50mM リン酸緩衝液(pH7.0))1.5mLを加えて希釈した後、洗浄/結合緩衝液で平衡化したQ Ceramic HyperD Spin Column(バイオセプラ社)にアプライした。そのまま4で30分間攪拌した後、500 μ Lの洗浄/結合緩衝液で2回洗浄した。次に、125mM、150mM、175mM、200mM、または250mMのNaClを含む5種類の50mM リン酸緩衝液(pH7.0)100 μ Lで順に溶出して分画した。各画分についてSELDI-TOF-MSにて分析したところ、175mM、200mM、および250mMのNaClを含む緩衝液で溶出した画分に、候補タンパク質(1)と同様の分子量約13800~14100のピークが検出された。なお、アルブミンは溶出前の洗浄工程で全て溶出されており、この条件で候補タンパク質(1)とアルブミンは完全に分離された。

20

4. 候補タンパク質(1)の同定

NaCl濃度が175mM、200mM、および250mMの画分を混合した(90 μ L \times 3)。混合した画分をVivaSpin 5000 Cut Off(ザルトリウス社)にて遠心濃縮し、さらに10倍量の50mM リン酸緩衝液(pH7.0)を加えて最終液量50 μ Lまで濃縮し、緩衝液交換した。次に、濃縮したサンプルをゲル濃度16%のSDS-PAGEに供し、クマシーブリリアントブルー(CBB)にてゲルを染色した。その結果、分子量約13800の位置に目的のバンドが検出された。次に、目的のバンドに0.02 μ g/ μ Lのトリプシン溶液(25mM 炭酸水素アンモニウム(pH8.0)に溶解)を作用させてゲル内で消化した。消化したサンプルについてMALDI-MS/MS分析をしたところ、少なくとも7個のピークが検出され、それらの分子量は、「1266.960」、「1366.300」、「1394.270」、「1522.140」、「2451.790」、「2646.030」、および「3141.310」と算出された。これらのデータを元にProFoundデータベースによって既知タンパク質を検索し、ペプチドマスフィンガープリンティングを行ったところ、目的のタンパク質は99%以上の確率でトランスサイレチンのサブユニットと同定された。従来知られているトランスサイレチンのサブユニットの分子量は13890、等電点は5.3であるのに対し、今回単離したタンパク質の分子量は約13800、予想される等電点は5.3であり、両者の物理化学的性質はほぼ一致した。

30

40

【 0 2 8 6 】

なお、トランスサイレチンは同一のサブユニット4個からなる4量体であることが知られているが、本実施例の結果によれば、トランスサイレチンは4量体の形ではなくサブユ

50

ニット単体で検出された。

[実施例 2]

【0287】

1. 候補ピークの検索(2)

実施例 1 と同様にして別の候補ピークを検索した。その結果、弱陽イオン交換体を固定化したプロテインチップを用い、画分 6 について洗浄 pH を 4.0 とした場合に、m/z が 9279, 9705 の 2 個のピークが検出された。また、弱陽イオン交換体を固定化したプロテインチップを用い、画分 5 について洗浄 pH を 4.0 とした場合に、m/z が 9285, 9415 の 2 個のピークが検出された。また、弱陽イオン交換体を固定化したプロテインチップを用い、画分 6 について洗浄 pH を 7.0 とした場合に、m/z が 9289, 9638, 9712 の 3 個のピークが検出された。また、金属イオン (Cu²⁺) を固定化したプロテインチップを用い、画分 6 について洗浄 pH を 7.0 とした場合に、m/z が 8690, 9289, 9638, 9712 の 4 個のピークが検出された。これら 11 個のピークから、分子量 8600 ~ 9800 の範囲付近に候補となるタンパク質 (以下、「候補タンパク質 (2)」と称する。) が存在することが示唆された。

10

【0288】

実施例 1 と同様にして、各ピークについて、糖尿病患者と健常者に分けてピーク強度をプロットし、ROC 曲線を作成し、さらに、カットオフ値を設定した。一例として、図 4 (a) ~ (c) に m/z が 8690 のピークについての例を示す。図 4 (a) は糖尿病患者と健常者に分けてピーク強度をプロットしたグラフであり、図 4 (b) は図 4 (a) の結果を、最大値、最小値、中央値、およびカットオフ値で示したグラフであり、図 4 (c) は ROC 曲線である。他の 10 個のピークについても同様のグラフ (図示せず) を作成した。各ピークについて、P 値、ROC 面積、使用チップ、チップの洗浄条件、画分、および使用 EAM をまとめた表を以下の表 3 に示す。

20

【0289】

【表 3】

m/z	P値	ROC面積	使用チップ	洗浄pH	画分	EAM
8690	0.041	0.74	金属イオン	7.0	6	CHCA
9279	0.041	0.72	弱陽イオン交換	4.0	6	SPA
9285	0.016	0.76	弱陽イオン交換	4.0	5	CHCA
	0.041	0.70	弱陽イオン交換	7.0	6	SPA
9289	0.034	0.72	金属イオン	7.0	6	SPA
9415	0.002	0.90	弱陽イオン交換	4.0	5	SPA
9638	0.049	0.76	弱陽イオン交換	7.0	6	SPA
	0.028	0.76	金属イオン	7.0	6	SPA
9705	0.049	0.72	弱陽イオン交換	4.0	6	SPA
9712	0.034	0.78	弱陽イオン交換	7.0	6	SPA
	0.028	0.78	金属イオン	7.0	6	SPA

30

40

【0290】

2. 候補タンパク質 (2) の精製

糖尿病患者の血清から、以下の手順により候補タンパク質 (2) を精製した。まず、糖尿病患者の血清 50 μL に変性緩衝液 75 μL を加え、4 で 20 分間処理した。さらに、洗浄 / 結合緩衝液 (50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0)) 1.5 mL を加えて希釈

50

した後、洗浄/結合緩衝液で平衡化したQ Ceramic HyperD F Spin Columnにアプライした。そのまま4 で30分間攪拌した後、500 μ Lの洗浄/結合緩衝液で2回洗浄した。次に、50mM、150mM、または250mMのNaClを含む3種類の50mM リン酸緩衝液(pH6.0)100 μ Lで順に溶出して分画した。各画分についてSELDI-TOF-MSにて分析したところ、候補タンパク質(2)と同様の分子量約8690、9415、9712のピークが検出された。なお、アルブミンは溶出前の洗浄工程で全て溶出されており、この条件で候補タンパク質(2)とアルブミンは完全に分離された。

3. 候補タンパク質(2)の同定

SDS-PAGEにて精製した目的のバンドに0.02 μ g/ μ Lのトリプシン溶液(25mM 炭酸水素アンモニウム(pH8.0)に溶解)を作用させてゲル内で消化した。消化したサンプルについてMALDI-MS/MS分析をしたところ、少なくとも5個のピークが検出され、それらの分子量は、「898」、「1197」、「1717」、「1939」、「2076」と算出された。これらのデータを元にMS-Fitデータベースによって既知タンパク質を検索し、ペプチドマスフィンガープリンティングを行ったところ、目的のタンパク質は3種のアポリポタンパク質CIII、すなわち、アポリポタンパク質CIII0、アポリポタンパク質CIII1、アポリポタンパク質CIII2と同定された。従来知られているアポリポタンパク質CIII0、アポリポタンパク質CIII1、アポリポタンパク質CIII2の分子量はそれぞれ8765、9421、9713、等電点はそれぞれ4.95、4.80、4.65であるのに対し、今回単離した3種のタンパク質の分子量はそれぞれ8690、9415、9712、予想される等電点はいずれも4.5~5.0であり、両者の物理化学的性質はほぼ一致した。

4. 2次元電気泳動による糖尿病患者血清の分析

糖尿病患者の血清を、1次元目(水平方向)がIEF、2次元目(垂直方向)がSDS-PAGEの2次元電気泳動に供したところ、分子量6.5~14.4kDa、等電点(pI)5付近に3個のバンドA、B、Cが検出された(図5)。これらのバンドは健常者の血清からは検出されなかった。これらのバンドA、B、Cについて、SELDI-TOF-MSによって分析したところ、A、B、Cの分子量は、それぞれアポリポタンパク質CIII2、アポリポタンパク質CIII1、アポリポタンパク質CIII0の分子量と一致した。この結果は、上記のプロテインチップを用いた候補タンパク質(2)の検索結果と一致した。

[実施例3]

【0291】

候補ピークの検索(3)

実施例1と同様にしてさらに別の候補ピークを検索した。その結果、弱陽イオン交換体を固定化したプロテインチップを用い、画分3について洗浄pHを7.0とした場合に、m/zが66418、66449の2個のピークが検出された。また、弱陽イオン交換体を固定化したプロテインチップを用い、画分5について洗浄pHを4.0とした場合に、m/zが66449のピークが検出された。また、弱陽イオン交換体を固定化したプロテインチップを用い、画分6について洗浄pHを7.0とした場合に、m/zが66572のピークが検出された。また、金属イオン(Cu²⁺)を固定化したプロテインチップを用い、画分4について洗浄pHを7.0とした場合に、m/zが66216のピークが検出された。また、金属イオン(Cu²⁺)を固定化したプロテインチップを用い、画分6について洗浄pHを7.0とした場合に、m/zが66572、66582の2個のピークが検出された。また、金属イオン(Cu²⁺)を固定化したプロテインチップを用い、画分5について洗浄pHを7.0とした場合に、m/zが66596のピークが検出された。なお、これらのピークは候補タンパク質(1)や候補タンパク質(2)とは異なり、糖尿病患者において低値を示した。これら8個のピークから、分子量66000~67000の範囲付近に候補となるタンパク質(以下、「候補タンパク質(3)」と称する。)が存在することが示唆された。この分子量の値は、公知のヒト血清アルブミンの分子量(664

39) の値に極めて近く、かつ m/z が 66449 というヒト血清アルブミンの分子量とほとんど同じ値のピークも検出されたことから、候補タンパク質(3)は血清アルブミンであると同定した。

【0292】

実施例1および2と同様にして、各ピークについて、糖尿病患者と健常者に分けてピーク強度をプロットし、ROC曲線を作成し、さらに、カットオフ値を設定した。一例として、図6(a)~(c)に m/z が 66216 のピークについての例を示す。図6(a)は糖尿病患者と健常者に分けてピーク強度をプロットしたグラフであり、図6(b)は図6(a)の結果を、最大値、最小値、中央値、およびカットオフ値で示したグラフであり、図6(c)はROC曲線である。なお、本ピークは糖尿病患者の方が低値を示すので、図6(c)のROC曲線は右下に傾き、かつ右下に寄るほど精度が高いことを示す。他の7個のピークについても同様のグラフ(図示せず)を作成した。各ピークについて、P値、ROC面積、使用チップ、チップの洗浄条件、画分、および使用EAMをまとめた表を以下の表4に示す。

10

【0293】

【表4】

m/z	P値	ROC面積	使用チップ	洗浄pH	画分	EAM
66216	0.023	0.76	金属イオン	7.0	4	CHCA
66418	0.005	0.82	弱陽イオン交換	7.0	3	SPA
66449	0.005	0.84	弱陽イオン交換	4.0	5	SPA
	0.010	0.82	弱陽イオン交換	7.0	3	SPA
66572	0.005	0.74	弱陽イオン交換	7.0	6	SPA
	0.005	0.24	金属イオン	7.0	6	SPA
66582	0.034	0.66	金属イオン	7.0	6	SPA
66596	0.028	0.28	金属イオン	7.0	5	SPA

20

30

[実施例4]

【0294】

以下の構成の糖尿病検出用キット(1)を構築した。本キットは抗体を固定化した基板を含むものであり、基板上にマーカ物質を捕捉し、サンドイッチEIAの系でトランスサイレチン、アポリポタンパク質CIII、および血清アルブミンを測定するためのものである。検出は蛍光標識ストレプトアビジンで行う。

【0295】

【表 5】

抗トランスサイレチンモノクローナル抗体固定化ガラス基板	1枚	
ビオチン標識抗トランスサイレチンモノクローナル抗体(溶液)	適量	
トランスサイレチン標準品(凍結乾燥品)	適量	
抗アポリポタンパク質CIIIモノクローナル抗体固定化ガラス基板	1枚	
ビオチン標識抗アポリポタンパク質CIIIモノクローナル抗体(溶液)	適量	
アポリポタンパク質CIII標準品(凍結乾燥品)	適量	10
抗ヒト血清アルブミンモノクローナル抗体固定化ガラス基板	1枚	
ビオチン標識抗ヒト血清アルブミン質CIIIモノクローナル抗体(溶液)	適量	
ヒト血清アルブミン標準品(凍結乾燥品)	適量	
ブロッキング液	適量	
洗浄用緩衝液(×10)	適量	
蛍光標識ストレプトアビジン	適量	
		20

[実施例 5]

【0296】

以下の構成の糖尿病検出用キット(2)を構築した。本キットは、マイクロタイタープレートを用いたサンドイッチEIAによって、トランスサイレチン、アポリポタンパク質CIII、および血清アルブミンを測定するためのものである。

【0297】

【表 6】

抗トランスサイレチンモノクローナル抗体プレート(96穴)	1枚	30
ペルオキシダーゼ標識抗トランスサイレチンモノクローナル抗体(凍結乾燥品)	適量	
トランスサイレチン標準品(凍結乾燥品)	適量	
抗アポリポタンパク質CIIIモノクローナル抗体プレート(96穴)	1枚	
ペルオキシダーゼ標識抗アポリポタンパク質CIIIモノクローナル抗体(凍結乾燥品)	適量	
アポリポタンパク質CIII標準品(凍結乾燥品)	適量	
抗ヒト血清アルブミンモノクローナル抗体プレート(96穴)	1枚	40
ペルオキシダーゼ標識抗ヒト血清アルブミンモノクローナル抗体(凍結乾燥品)	適量	
ヒト血清アルブミン標準品(凍結乾燥品)	適量	
ブロッキング液	適量	
洗浄用緩衝液(×10)	適量	
基質液(3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン、TMBZ)	適量	
反応停止液(1N 硫酸)	適量	
		50

[実施例 6]

【0298】

1. ラットを用いた動物実験

2型糖尿病自然発症モデルラットとしてOLETFラットを、該モデルラットと同じ系統（遺伝的に近縁）の2型糖尿病を発症しないラットとしてLETOラットを準備した。OLETFラットとLETOラットはいずれも大塚製薬（株）徳島研究所より提供された。LETOラットの群（第1群）とOLETFラットの群（第2群）とを設定し、各ラットを飼育した。飼料にはCRF-1（オリエンタルバイオサイエンス社）を用い、各群とも自由摂取とした。各群とも5週齢から試験を開始し、50週または62週まで飼育した。5（飼育開始時）、9、13、17、21、25、29、33、37、41、45、および49の各週齢時にOGTTを行ない、血液をサンプリングした。これらの各血液サンプルから血清を調製した。飼育終了後、特に異常が見られなかったラットから、第1群から4匹、第2群から7匹を選択した。それらのラットにおけるOGTTの評価を、常法に従い、正常（○）、境界（△）、糖尿病（●）の3段階で評価した。OGTTの結果を第1表に示す。表中、1-1から1-4はそれぞれ第1群のラット（計4匹）、2-1から2-7は第2群の各ラット（計7匹）の結果であり、5～49の整数はラットの週齢である。すなわち、第1群のラットでは糖尿病を発病しなかったが、第2群のラットでは、21週齢あたりから徐々に糖尿病を発症していた。次に、第1表で特に示した21サンプルを、以下の解析に供した。

10

【0299】


20

【表7】

第1表

		5	9	13	17	21	25	29	33	37	41	45	49
第1群	1-1	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	1-2	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	1-3	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	1-4	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
第2群	2-1	○	○	○	○	△	○	△	●	●	●	●	●
	2-2	○	○	○	○	△	●	●	●	●	●	●	●
	2-3	○	○	○	△	●	●	●	●	●	●	●	●
	2-4	○	○	○	△	●	△	●	●	●	●	●	●
	2-5	○	○	○	△	△	●	△	●	●	●	●	●
	2-6	○	○	○	○	○	△	△	●	●	●	●	●
	2-7	○	○	○	○	△	△	△	●	●	●	●	●

30

 解析に供したサンプル

40

【0300】

各血清サンプル20μLに、変性緩衝液（9M 尿素、2% CHAPS、50mM Tris-HCl（pH9.0））30μLを加えて前処理を行い、タンパク質を変性させた。次に、前処理した各血清サンプルを強陰イオン交換樹脂カラム（Q Ceramic Hyper D、バイオセブラ社）にアプライした。次に、pH9.0の緩衝液（50mM Tris-HCl（pH9.0）、0.1%（w/v）1-o-N-オクチル-D-グルコピラノシド（以下、「OGP」と称する。））、pH7.0の緩衝液（50mM HEPES-NaOH（pH7.0）、0.1%（w/v）OGP）、pH5.0の緩衝液（100mM 酢酸ナトリウム（pH5.0）、0.1%（w/v）OGP）

50

、pH 4.0の緩衝液(100mM 酢酸ナトリウム(pH 4.0)、0.1%(w/v) OGP)、pH 3.0の緩衝液(50mM クエン酸ナトリウム(pH 3.0)、0.1%(w/v) OGP)、および有機溶媒(33.3% イソプロピルアルコール、16.7% アセトニトリル、0.1% トリフルオロ酢酸からなる混合液)各200 μ Lで順に溶出させ、画分1(pH 9.0で溶出、素通り)、画分2(pH 7.0で溶出)、画分3(pH 5.0で溶出)、画分4(pH 4.0で溶出)、画分5(pH 3.0で溶出)、画分6(有機溶媒)の6つの粗分画画分を得た。

【0301】

得られた各画分10 μ LをpH 4.0のプロテインチップ結合緩衝液(100mM 酢酸ナトリウム)で10倍希釈した後、陽イオン交換チップCM10(サイファージェン社)に添加した。同様に、得られた各画分10 μ LをpH 7.0のプロテインチップ結合緩衝液(100mM リン酸、0.5M NaCl)で10倍希釈した後、銅修飾チップIMAC30(サイファージェン社)に添加した。各プロテインチップを各結合緩衝液で3回洗浄した後に脱イオン水で1回洗浄し、乾燥させた。次に、エネルギー吸収分子であるシナピン酸(SPA)または -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸(CHCA)を添加し、プロテインチップリーダーModel PBS IIC(サイファージェン社)を用いて、SELDI-TOF-MSを行なった。なお、測定分子量範囲(M/Z)は、3000~200000の範囲で行なった。また、測定は2連で行い、M/Zの平均値を算出した。データ解析は、Protein Chip Software、Ciphergen Express Data Magnager、およびBiomarker Patterns Software(いずれもサイファージェン社)を用いて行なった。具体的には、ベースライン補正、分子量校正、スペクトルの正規化処理を行なった後、シングルマーカー解析および数本のマーカーを組み合わせたマルチフロー解析を行なった。その結果、粗分画画分の種類、プロテインチップの種類、チップの洗浄条件等の組み合わせによって多数のピークが検出された。これらのピークの中から、第1群と第2群のサンプル間で有意差があったピークを14個選抜した。

2. マーカー物質(a)の特定

画分5において、陽イオン交換チップCM10を用いた場合に、質量/電荷比が7043(平均値)のイオンピークが検出された。図7に、21週齢時における本ピークのピーク強度を各群に分けてプロットした場合の箱髴図を示す。図中、髴の上端と下端はそれぞれ最大値と最小値、箱の上辺と下辺はそれぞれ第3四分位(75パーセントイル)と第1四分位(25パーセントイル)、箱の中の線は中央値である(以下の図も同じ)。すなわち、本ピークは、第1群で低値を示し、第2群で高値を示した。以上より、SELDI-TOF-MSに供すると質量/電荷比が約7040のピークを生じるタンパク質(マーカー物質(a))が、糖尿病を発症しているラットまたは将来の発症リスクが高いラットに特異的な物質で、当該疾病のマーカーとなり得ることがわかった。これにより、ヒトの血液にもマーカー物質(a)が存在する場合に、血中におけるマーカー物質(a)の濃度を指標として、糖尿病の発症の有無または将来の発症リスクを判定することができることが示された。さらに、被検物質を摂取させた動物の血中におけるマーカー物質(a)の濃度を指標として、被検物質が有する糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果の評価、および、そのような物質のスクリーニングが行なえることが示された。例えば、所望の被検物質を使用して同様の動物実験を行なって血清サンプルを調製し、同様の手順でSELDI-TOF-MSを行なった場合に、質量/電荷比が約7040のピークを生じるタンパク質の濃度が正常値に維持されたとき、該被検物質は、糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を有すると評価することができる。

3. マーカー物質(b)の特定

画分6において、陽イオン交換チップCM10を用いた場合に、質量/電荷比が8325(平均値)のイオンピークが検出された。図8に、21週齢時における本ピークのピーク強度を各群に分けてプロットした場合の箱髴図を示す。すなわち、本ピークは、第1群で低値を示し、第2群で高値を示した。以上より、SELDI-TOF-MSに供すると

10

20

30

40

50

質量/電荷比が約8330のピークを生じるタンパク質(マーカー物質(b))が、糖尿病を発症しているラットまたは将来の発症リスクが高いラットに特異的な物質で、当該疾病のマーカーとなり得ることがわかった。これにより、ヒトの血液中にもマーカー物質(b)が存在する場合に、血中におけるマーカー物質(b)の濃度を指標として、糖尿病の発症の有無または将来の発症リスクを判定することができることが示された。さらに、被検物質を摂取させた動物の血中におけるマーカー物質(b)の濃度を指標として、被検物質が有する糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果の評価、および、そのような物質のスクリーニングが行なえることが示された。例えば、所望の被検物質を使用して同様の動物実験を行なって血清サンプルを調製し、同様の手順でSELDI-TOF-MSを行なった場合に、質量/電荷比が約8330のピークを生じるタンパク質の濃度が正常値に維持されたとき、該被検物質は、糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を有すると評価することができる。

10

4. マーカー物質(c)の特定

画分6において、陽イオン交換チップCM10を用いた場合に、質量/電荷比が8532(平均値)のイオンピークが検出された。図9に、21週齢時における本ピークのピーク強度を各群に分けてプロットした場合の箱髭図を示す。すなわち、本ピークは、第1群で低値を示し、第2群で高値を示した。以上より、SELDI-TOF-MSに供すると質量/電荷比が約8530のピークを生じるタンパク質(マーカー物質(c))が、糖尿病を発症しているラットまたは将来の発症リスクが高いラットに特異的な物質で、当該疾病のマーカーとなり得ることがわかった。これにより、ヒトの血液中にもマーカー物質(c)が存在する場合に、血中におけるマーカー物質(c)の濃度を指標として、糖尿病の発症の有無または将来の発症リスクを判定することができることが示された。さらに、被検物質を摂取させた動物の血中におけるマーカー物質(c)の濃度を指標として、被検物質が有する糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果の評価、および、そのような物質のスクリーニングが行なえることが示された。例えば、所望の被検物質を使用して同様の動物実験を行なって血清サンプルを調製し、同様の手順でSELDI-TOF-MSを行なった場合に、質量/電荷比が約8530のピークを生じるタンパク質の濃度が正常値に維持されたとき、該被検物質は、糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を有すると評価することができる。

20

5. マーカー物質(d)の特定

画分1において、銅修飾チップIMAC30を用いた場合に、質量/電荷比が9062(平均値)のイオンピークが検出された。図10に、21週齢時における本ピークのピーク強度を各群に分けてプロットした場合の箱髭図を示す。すなわち、本ピークは、第1群で低値を示し、第2群で高値を示した。以上より、SELDI-TOF-MSに供すると質量/電荷比が約9060のピークを生じるタンパク質(マーカー物質(d))が、糖尿病を発症しているラットまたは将来の発症リスクが高いラットに特異的な物質で、当該疾病のマーカーとなり得ることがわかった。これにより、ヒトの血液中にもマーカー物質(d)が存在する場合に、血中におけるマーカー物質(d)の濃度を指標として、糖尿病の発症の有無または将来の発症リスクを判定することができることが示された。さらに、被検物質を摂取させた動物の血中におけるマーカー物質(d)の濃度を指標として、被検物質が有する糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果の評価、および、そのような物質のスクリーニングが行なえることが示された。例えば、所望の被検物質を使用して同様の動物実験を行なって血清サンプルを調製し、同様の手順でSELDI-TOF-MSを行なった場合に、質量/電荷比が約9060のピークを生じるタンパク質の濃度が正常値に維持されたとき、該被検物質は、糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を有すると評価することができる。

30

40

6. マーカー物質(e)の特定

画分6において、陽イオン交換チップCM10を用いた場合に、質量/電荷比が9255(平均値)のイオンピークが検出された。図5に、21週齢時における本ピークのピーク強度を各群に分けてプロットした場合の箱髭図を示す。すなわち、本ピークは、第1群

50

で低値を示し、第2群で高値を示した。以上より、SELDI-TOF-MSに供すると質量/電荷比が約9260のピークを生じるタンパク質(マーカー物質(e))が、糖尿病を発症しているラットまたは将来の発症リスクが高いラットに特異的な物質で、当該疾病のマーカーとなり得ることがわかった。これにより、ヒトの血液中にもマーカー物質(e)が存在する場合に、血中におけるマーカー物質(e)の濃度を指標として、糖尿病の発症の有無または将来の発症リスクを判定することができることが示された。さらに、被検物質を摂取させた動物の血中におけるマーカー物質(e)の濃度を指標として、被検物質が有する糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果の評価、および、そのような物質のスクリーニングが行なえることが示された。例えば、所望の被検物質を使用して同様の動物実験を行なって血清サンプルを調製し、同様の手順でSELDI-TOF-MSを行なった場合に、質量/電荷比が約9260のピークを生じるタンパク質の濃度が正常値に維持されたとき、該被検物質は、糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を有すると評価することができる。

10

7. マーカー物質(f)の特定

画分6において、陽イオン交換チップCM10を用いた場合に、質量/電荷比が9445(平均値)のイオンピークが検出された。図12に、21週齢時における本ピークのピーク強度を各群に分けてプロットした場合の箱髭図を示す。すなわち、本ピークは、第1群で低値を示し、第2群で高値を示した。2以上より、SELDI-TOF-MSに供すると質量/電荷比が約9450のピークを生じるタンパク質(マーカー物質(f))が、糖尿病を発症しているラットまたは将来の発症リスクが高いラットに特異的な物質で、当該疾病のマーカーとなり得ることがわかった。これにより、ヒトの血液中にもマーカー物質(f)が存在する場合に、血中におけるマーカー物質(f)の濃度を指標として、糖尿病の発症の有無または将来の発症リスクを判定することができることが示された。さらに、被検物質を摂取させた動物の血中におけるマーカー物質(f)の濃度を指標として、被検物質が有する糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果の評価、および、そのような物質のスクリーニングが行なえることが示された。例えば、所望の被検物質を使用して同様の動物実験を行なって血清サンプルを調製し、同様の手順でSELDI-TOF-MSを行なった場合に、質量/電荷比が約9450のピークを生じるタンパク質の濃度が正常値に維持されたとき、該被検物質は、糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を有すると評価することができる。

20

30

8. マーカー物質(g)の特定

画分4において、銅修飾チップIMAC30を用いた場合に、質量/電荷比が13720(平均値)のイオンピークが検出された。図13に、21週齢時における本ピークのピーク強度を各群に分けてプロットした場合の箱髭図を示す。すなわち、本ピークは、第1群で低値を示し、第2群で高値を示した。2以上より、SELDI-TOF-MSに供すると質量/電荷比が約13700のピークを生じるタンパク質(マーカー物質(g))が、糖尿病を発症しているラットまたは将来の発症リスクが高いラットに特異的な物質で、当該疾病のマーカーとなり得ることがわかった。これにより、ヒトの血液中にもマーカー物質(g)が存在する場合に、血中におけるマーカー物質(g)の濃度を指標として、糖尿病の発症の有無または将来の発症リスクを判定することができることが示された。さらに、被検物質を摂取させた動物の血中におけるマーカー物質(g)の濃度を指標として、被検物質が有する糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果の評価、および、そのような物質のスクリーニングが行なえることが示された。例えば、所望の被検物質を使用して同様の動物実験を行なって血清サンプルを調製し、同様の手順でSELDI-TOF-MSを行なった場合に、質量/電荷比が約13700のピークを生じるタンパク質の濃度が正常値に維持されたとき、該被検物質は、糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を有すると評価することができる。

40

9. マーカー物質(h)の特定

画分3において、陽イオン交換チップCM10を用いた場合に、質量/電荷比が76404(平均値)のイオンピークが検出された。図14に、21週齢時における本ピークの

50

ピーク強度を各群に分けてプロットした場合の箱髴図を示す。すなわち、本ピークは、第1群で低値を示し、第2群で高値を示した。2以上より、SELDI-TOF-MSに供すると質量/電荷比が約76400のピークを生じるタンパク質(マーカー物質(h))が、糖尿病を発症しているラットまたは将来の発症リスクが高いラットに特異的な物質で、当該疾病のマーカーとなり得ることがわかった。これにより、ヒトの血液中でもマーカー物質(h)が存在する場合に、血中におけるマーカー物質(h)の濃度を指標として、糖尿病の発症の有無または将来の発症リスクを判定することができることが示された。さらに、被検物質を摂取させた動物の血中におけるマーカー物質(h)の濃度を指標として、被検物質が有する糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果の評価、および、そのような物質のスクリーニングが行なえることが示された。例えば、所望の被検物質を使用して同様の動物実験を行なって血清サンプルを調製し、同様の手順でSELDI-TOF-MSを行なった場合に、質量/電荷比が約76400のピークを生じるタンパク質の濃度が正常値に維持されたとき、該被検物質は、糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を有すると評価することができる。

10

【0302】

10. マーカー物質(i)の特定

画分4において、陽イオン交換チップCM10を用いた場合に、質量/電荷比が79085(平均値)のイオンピークが検出された。図15に、21週齢時における本ピークのピーク強度を各群に分けてプロットした場合の箱髴図を示す。すなわち、本ピークは、第1群で低値を示し、第2群で高値を示した。以上より、SELDI-TOF-MSに供すると質量/電荷比が約79100のピークを生じるタンパク質(マーカー物質(i))が、糖尿病を発症しているラットまたは将来の発症リスクが高いラットに特異的な物質で、当該疾病のマーカーとなり得ることがわかった。これにより、ヒトの血液中でもマーカー物質(i)が存在する場合に、血中におけるマーカー物質(i)の濃度を指標として、糖尿病の発症の有無または将来の発症リスクを判定することができることが示された。さらに、被検物質を摂取させた動物の血中におけるマーカー物質(i)の濃度を指標として、被検物質が有する糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果の評価、および、そのような物質のスクリーニングが行なえることが示された。例えば、所望の被検物質を使用して同様の動物実験を行なって血清サンプルを調製し、同様の手順でSELDI-TOF-MSを行なった場合に、質量/電荷比が約79100のピークを生じるタンパク質の濃度が正常値に維持されたとき、該被検物質は、糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を有すると評価することができる。

20

30

【0303】

11. マーカー物質(j)の特定

画分6において、陽イオン交換チップCM10を用いた場合に、質量/電荷比が3497(平均値)のイオンピークが検出された。図16に、21週齢時における本ピークのピーク強度を各群に分けてプロットした場合の箱髴図を示す。すなわち、本ピークは、第1群で高値を示し、第2群で低値を示した。2以上より、SELDI-TOF-MSに供すると質量/電荷比が約3500のピークを生じるタンパク質(マーカー物質(j))が、糖尿病を発症しているラットまたは将来の発症リスクが高いラットに特異的な物質で、当該疾病のマーカーとなり得ることがわかった。これにより、ヒトの血液中でもマーカー物質(j)が存在する場合に、血中におけるマーカー物質(j)の濃度を指標として、糖尿病の発症の有無または将来の発症リスクを判定することができることが示された。さらに、被検物質を摂取させた動物の血中におけるマーカー物質(i)の濃度を指標として、被検物質が有する糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果の評価、および、そのような物質のスクリーニングが行なえることが示された。例えば、所望の被検物質を使用して同様の動物実験を行なって血清サンプルを調製し、同様の手順でSELDI-TOF-MSを行なった場合に、質量/電荷比が約3500のピークを生じるタンパク質の濃度が正常値に維持されたとき、該被検物質は、糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を有すると評価することができる。

40

50

【 0 3 0 4 】

1 2 . マーカー物質 (k) の特定

画分 1 において、銅修飾チップ I M A C 3 0 を用いた場合に、質量 / 電荷比が 3 5 5 9 (平均値) のイオンピークが検出された。図 1 7 に、2 1 週齢時における本ピークのピーク強度を各群に分けてプロットした場合の箱髭図を示す。すなわち、本ピークは、第 1 群で高値を示し、第 2 群で低値を示した。以上より、S E L D I - T O F - M S に供すると質量 / 電荷比が約 3 5 6 0 のピークを生じるタンパク質 (マーカー物質 (k)) が、糖尿病を発症しているラットまたは将来の発症リスクが高いラットに特異的な物質で、当該疾病のマーカーとなり得ることがわかった。これにより、ヒトの血液中にもマーカー物質 (k) が存在する場合に、血中におけるマーカー物質 (k) の濃度を指標として、糖尿病の発症の有無または将来の発症リスクを判定することができることが示された。さらに、被検物質を摂取させた動物の血中におけるマーカー物質 (k) の濃度を指標として、被検物質が有する糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果の評価、および、そのような物質のスクリーニングが行なえることが示された。例えば、所望の被検物質を使用して同様の動物実験を行なって血清サンプルを調製し、同様の手順で S E L D I - T O F - M S を行なった場合に、質量 / 電荷比が約 3 5 6 0 のピークを生じるタンパク質の濃度が正常値に維持されたとき、該被検物質は、糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を有すると評価することができる。

10

【 0 3 0 5 】

1 3 . マーカー物質 (l) の特定

画分 4 において、銅修飾チップ I M A C 3 0 を用いた場合に、質量 / 電荷比が 4 1 8 4 (平均値) のイオンピークが検出された。図 1 8 に、2 1 週齢時における本ピークのピーク強度を各群に分けてプロットした場合の箱髭図を示す。すなわち、本ピークは、第 1 群で高値を示し、第 2 群で低値を示した。以上より、S E L D I - T O F - M S に供すると質量 / 電荷比が約 4 1 8 0 のピークを生じるタンパク質 (マーカー物質 (l)) が、糖尿病を発症しているラットまたは将来の発症リスクが高いラットに特異的な物質で、当該疾病のマーカーとなり得ることがわかった。これにより、ヒトの血液中にもマーカー物質 (l) が存在する場合に、血中におけるマーカー物質 (l) の濃度を指標として、糖尿病の発症の有無または将来の発症リスクを判定することができることが示された。さらに、被検物質を摂取させた動物の血中におけるマーカー物質 (l) の濃度を指標として、被検物質が有する糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果の評価、および、そのような物質のスクリーニングが行なえることが示された。例えば、所望の被検物質を使用して同様の動物実験を行なって血清サンプルを調製し、同様の手順で S E L D I - T O F - M S を行なった場合に、質量 / 電荷比が約 4 1 8 0 のピークを生じるタンパク質の濃度が正常値に維持されたとき、該被検物質は、糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を有すると評価することができる。

20

30

【 0 3 0 6 】

1 4 . マーカー物質 (m) の特定

画分 5 において、陽イオン交換チップ C M 1 0 を用いた場合に、質量 / 電荷比が 1 2 7 8 6 (平均値) のイオンピークが検出された。図 1 9 に、2 1 週齢時における本ピークのピーク強度を各群に分けてプロットした場合の箱髭図を示す。すなわち、本ピークは、第 1 群で高値を示し、第 2 群で低値を示した。以上より、S E L D I - T O F - M S に供すると質量 / 電荷比が約 1 2 8 0 0 のピークを生じるタンパク質 (マーカー物質 (m)) が、糖尿病を発症しているラットまたは将来の発症リスクが高いラットに特異的な物質で、当該疾病のマーカーとなり得ることがわかった。これにより、ヒトの血液中にもマーカー物質 (m) が存在する場合に、血中におけるマーカー物質 (m) の濃度を指標として、糖尿病の発症の有無または将来の発症リスクを判定することができることが示された。さらに、被検物質を摂取させた動物の血中におけるマーカー物質 (m) の濃度を指標として、被検物質が有する糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果の評価、および、そのような物質のスクリーニングが行なえることが示された。例えば、所望の被検物質を

40

50

使用して同様の動物実験を行なって血清サンプルを調製し、同様の手順でSELDI-TOF-MSを行なった場合に、質量/電荷比が約12800のピークを生じるタンパク質の濃度が正常値に維持されたとき、該被検物質は、糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を有すると評価することができる。

【0307】

15. マーカー物質(n)の特定

画分4において、陽イオン交換チップCM10を用いた場合に、質量/電荷比が65700(平均値)のイオンピークが検出された。図80に、21週齢時における本ピークのピーク強度を各群に分けてプロットした場合の箱髷図を示す。すなわち、本ピークは、第1群で高値を示し、第2群で低値を示した。以上より、SELDI-TOF-MSに供すると質量/電荷比が約65700のピークを生じるタンパク質(マーカー物質(n))が、糖尿病を発症しているラットまたは将来の発症リスクが高いラットに特異的な物質で、当該疾病のマーカーとなり得ることがわかった。これにより、ヒトの血液中にもマーカー物質(n)が存在する場合に、血中におけるマーカー物質(n)の濃度を指標として、糖尿病の発症の有無または将来の発症リスクを判定することができることが示された。さらに、被検物質を摂取させた動物の血中におけるマーカー物質(n)の濃度を指標として、被検物質が有する糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果の評価、および、そのような物質のスクリーニングが行なえることが示された。例えば、所望の被検物質を使用して同様の動物実験を行なって血清サンプルを調製し、同様の手順でSELDI-TOF-MSを行なった場合に、質量/電荷比が約65700のピークを生じるタンパク質の濃度が正常値に維持されたとき、該被検物質は、糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を有すると評価することができる。

[実施例7]

【0308】

上記実施例において、分子量から、S-システニルトランスサイレチンであると予測されたマーカー物質について以下に同定するスキームを記載する。

【0309】

糖尿病患者および、対照である健常人の血清由来S-cysteinylatedTTRの精製同定スキームを記す。

【0310】

(A. イオン交換による精製法)

糖尿病患者および、健常人の血清500 μ Lを50mM Tris-HCl (pH7.0)にて5倍希釈を行い、20kG, 4, 10min遠心分離処理後、強陰イオン交換カラムであるAmersham HiTrapQ HP 1mLを用いて分画を行った。はじめに50mM Tris-HCl (pH7.0)にて5CV洗浄を行い、次いで、50mM Tris-HCl (pH7.0), 160mM NaClにて5CV洗浄を行った。溶出は50mM Na-Acetate (pH4.0)を用いて2CV行った。溶出サンプルは5倍量のアセトンにてアセトン沈殿を行い、得られた沈殿物を62.5mM Tris-HCl (pH6.8), 1% SDS, 20%グリセロール, 0.005% BPB混合溶液200 μ Lに溶解しSDS-PAGE用のサンプルとした。

【0311】

(B. SDS-PAGEによる精製法)

A. の要領で作成した上記サンプルを20 μ L使用し、DRC Perfect NT Gelポリペプチド分析用を用い、定電圧(100V, 2.5hr)にて分画を行った。泳動緩衝液は100mM Tris, 100mM Tricine, 0.1% SDSを用いた。泳動終了後、10% AcOH in 40% MeOHにて固定化を行い、超純水にて洗浄後、CBBにて染色を行った。

【0312】

(C. ウェスタンブロッティングによる同定法)

B. の要領でSDS-PAGEを行った後、CBBで染色を行わず、下記の要領でPV

10

20

30

40

50

D F 膜にブロッキングを行い、B I O - R A D A m p l i f i e d A l k a l i n e P h o s p h a t a s e G o a t A n t i - R a b b i t I m m u n - B l o t A s s a y K i t により検出を行った。

【 0 3 1 3 】

(1) 試薬の調製

・陽極緩衝液

60mM Tris , 40mM CAPS , 0.1% SDS , pH9.6

・陰極緩衝液

60mM Tris , 40mM CAPS , 15% MeOH , pH9.6

・Tris - buffered saline (TBS)

20mM Tris-HCl , 500mM NaCl , pH7.5

・洗浄溶液(TTBS)

20mM Tris-HCl , 500mM NaCl , 0.05% Tween-20 , pH 7.5

・ブロッキング緩衝液

T B S 中5%脱脂乾燥ミルク

・1次抗体溶液

抗human Transthyretin抗体(rabbit IgG 200 μg/mL)をTTBSで1000倍希釈(終濃度0.2 μg/mL)

・2次抗体溶液

Biotinylated Goat Anti Rabbit IgG(H+L)をTTBSで3000倍希釈

・ストレプトアビジン - ビオチン化アルカリホスファターゼ複合体

Streptavidin 10 μLを30mLのTTBSに溶解し、更にビオチン化アルカリホスファターゼ 10 μLを加え、2時間、室温でインキュベートする。

・AP発色溶液

25xストックを超純水にて25倍希釈し、AP発色緩衝液を作成する。AP発色緩衝液20mLに対し200 μLのAP発色試薬A , 200 μLのAP発色試薬Bを添加しAP発色溶液とする。

【 0 3 1 4 】

(2) 陽極板に陽極緩衝液を湿潤させた紙を重ね、その上にメタノールを5分間湿潤させたP V D F 膜 (7 × 6 c m) を重ね、更にゲルを乗せ、陰極緩衝液を湿潤させた紙を重ね、陰極板を乗せ、定電流 1 0 5 m A で 3 0 分 通 電 し た。

(3) 通電後、P V D F 膜は超純水に浸し、5分振とうした。

(4) P V D F 膜は風乾後、ブロッキング緩衝液にてブロッキングを行った。ブロッキングは室温、にて1時間振とうの条件で行った。

(5) ブロッキング後、T T B S に浸し室温にて5分×3回、振とうを行いブロッキング緩衝液の洗浄を行った。

(6) 1次抗体溶液に浸し、室温で2時間、振とうを行った。

(7) 1次抗体反応後、T T B S に浸し室温にて5分×3回、振とうし洗浄を行った。

(8) 2次抗体溶液に浸し、室温で2時間、振とうを行った。

(9) (8) の作業中、ストレプトアビジン - ビオチン化アルカリホスファターゼ複合体を作製した。

(1 0) 2次抗体反応後、T T B S に浸し室温にて5分×3回、振とうし洗浄を行った。

(1 1) ストレプトアビジン - ビオチン化アルカリホスファターゼ複合体溶液に浸し、室温で2時間、振とうを行った。

(1 2) ストレプトアビジン - ビオチン化アルカリホスファターゼ複合体反応後、T T B S に浸し室温にて5分×3回、振とうし洗浄を行った。

(1 3) A P 発色溶液に浸し、ヒトT T Rであることを確認した。

【 0 3 1 5 】

(D . ゲルからの抽出およびM A L D I - T O F - M S 分析)

ゲルからの抽出は、メタノールと100mM 重炭酸アンモニウムの等量混合溶液を用

10

20

30

40

50

いて脱色を行い、超純水：100 mM 重炭酸アンモニウム：MeCN = 2 : 5 : 3の比で混合した混合溶液（15 μ L）を用いて行った。

【0316】

得られた抽出液2 μ Lを金属プレートに乗せ、マトリックスには飽和CHCA 0.4 μ Lを用いてApplied Biosystems 4700 Proteomics Analyzerにて測定を行った。

【0317】

（結果）

結果を図21～図24に示す。

【0318】

（ウエスタンブロットングによるTTRモノマーの確認）

上記方法にて、13.8 K付近のタンパク質がTTR抗体を用いて、TTRモノマーであることを確認した。各誘導体は、モノマー分画に含まれたことも見出した。

【0319】

上記モノマー分画のMSスペクトルは以下の通りである。

【0320】

理論値：S-cysteinyLATEDTTR M/Z=13880.53

還元後TTR M/Z=13761.41

図21には、健常人由来S-cysteinyLATED TTRを示す。測定値：M/Z= 13874.7480。

【0321】

図22には、還元処理後の健常人由来S-cysteinyLATED TTRを示す。測定値：M/Z= 13759.7393。

【0322】

図23には、糖尿病患者由来S-cysteinyLATED TTRを示す。測定値：M/Z= 13871.3320。

【0323】

図24には、還元処理後の糖尿病患者由来S-cysteinyLATED TTRを示す。測定値：M/Z= 13755.6494。

【0324】

図25には、TTRの4量体構造とモノマーのアミノ酸配列を示す。このように、トランスサイレチンは、通常4量体構造をとっており、これが崩れていくと糖尿病になると仮定される。

【0325】

図26には、ヒトTTR -ドメインの3次元構造と2次構造配列が示される。表1に示されるタンパク質やペプチドにおける代表的な翻訳後修飾とその質量変化を用いて、質量分析により、誘導体を分析することができる。

[実施例8]

【0326】

上記実施例において、分子量から、アポリポタンパク質CIIIであると予測されたマーカー物質について以下に同定するスキームを記載する。

【0327】

以下にRat Apolipoprotein CIIIの精製同定スキームを記載する。

【0328】

（A.イオン交換による精製法）

Rat Serum 750 μ Lを50 mM Tris-HCl（pH6.0）にて5倍希釈を行い、Millipore Millex-HV（0.45 μ m）フィルターユニットを用いてろ過したものをサンプルとした。得られたサンプルを強陰イオン交換カラムであるAmersham HiTrap Q HP 1 mLを用いて分画を行った。はじめに50 mM Tris-HCl（pH6.0）にて5 CV洗浄を行い、次いで50 mM Tris-HCl（pH6.0），200 mM NaClにて12 CV洗浄を行い、その後50 mM Tris-HCl（pH6.0）にて5 CV洗浄を行った。溶出は50

10

20

30

40

50

mM Na - Acetate (pH 3.0) を用いて 2 CV 行った。溶出サンプルは 10 倍量のアセトンにてアセトン沈殿を行い、得られた沈殿物を 62.5 mM Tris - HCl (pH 6.8), 1% SDS, 20% グリセロール, 0.005% BPB 混合溶液 100 μ L に溶解し SDS - PAGE 用のサンプルとした。

【0329】

(B. SDS - PAGE による精製法)

A. の要領で作成した上記サンプルを 20 μ L 使用し、DRC Perfect NT Gel ポリペプチド分析用を用い、定電圧 (100 V, 2.5 hr) にて分画を行った。泳動緩衝液は 100 mM Tris, 100 mM Tricine, 0.1% SDS を用いた。泳動終了後、10% AcOH in 40% MeOH にて固定化を行い、超純水にて洗浄後、CBB にて染色を行った。

10

【0330】

(C. ゲルからの抽出および SELDI - TOF - MS 分析)

ゲルからの抽出は、メタノールと 100 mM 重炭酸アンモニウムの等量混合溶液を用いて脱色を行い、超純水 : 100 mM 重炭酸アンモニウム : MeCN = 2 : 5 : 3 の比で混合した混合溶液 (15 μ L) を用いて行った。

【0331】

得られた抽出液 15 μ L を CIPHERGEN H50 Protein Chip Array に乗せ、0.1% TFA 5 μ L にて 2 回洗浄を行い、マトリックスには 25% SPA 0.5 μ L を 2 回乗せて測定を行った。

20

【0332】

(D. ゲル内消化による同定法)

SELDI - TOF - MS を用いて分子量を測定したサンプルについてゲル内消化を行い、同定を行った。(下記プロトコルを参照)

(1) 反応溶液の調整

還元溶液の調整 < 用事調整 >

・ DTT (1.5 mg) を 100 mM 重炭酸アンモニウム (1 mL) に溶解する。

アルキル化溶液の調整 < 用事調整 >

・ ヨードアセトアミド (10 mg) を 100 mM 重炭酸アンモニウム (1 mL) に溶解する。

30

トリプシン溶液の調整 < 用事調整 >

・ トリプシン (20 μ g) を 50 mM 酢酸 (0.1 mL) に溶解し、トリプシン保存液とする。トリプシン保存液 (25 μ L) に超純水 (200 μ L), 100 mM 重炭酸アンモニウム (500 μ L), MeCN (300 μ L) を加え、トリプシン溶液とする。

(2) バンドを切り出し、500 μ L のチューブに入れる。

(3) メタノールと 100 mM 重炭酸アンモニウムの等量混合溶液を 100 μ L 加え脱色する。

(4) 還元溶液を 100 μ L 加え、30 分インキュベートする。

(5) アルキル化溶液を 100 μ L 加え、30 分インキュベートする。

40

(6) トリプシン溶液を 15 μ L 加え、37 °C で一晩インキュベートする。

(7) 1/10 倍量の 1% TFA を加え、反応を停止する。

【0333】

消化サンプル 1 μ L を金属プレートに乗せ、マトリックスには飽和 CHCA 0.4 μ L を用いて Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer にて測定を行った。

【0334】

(得られたデータについて)

Mascot (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html) のデータベ

50

ースサーチを行い、ラットアポリポタンパク質C I I Iであると同一した。その結果を図27および図28に示す。

【0335】

図27は、同一したバンドのゲル写真と、そのバンドのSELDI-TOFによる分析を示す。

【0336】

図28は、同一したバンドのゲル写真と、そのバンドのSELDI-TOFによる分析を示す。

【0337】

同様のマーカーがヒトにおいて存在することを以下のようにして確認した。

10

【0338】

精製レジンの選択およびレジンへの至適吸着条件の検討を行った。

【0339】

使用ProteinChips Q10 及び CM10

検討pH pH 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 7.0

使用Buffer

pH3.0 : 50mM Na-Citrate Buffer

pH3.5~5.5 : 50mM Na-Acetate Buffer

pH7.0 : 50mM HEPES Buffer

図29には、ヒトアポリポタンパク質C I I I (0~2)のスポットであると考えられる二次元電気泳動上のスポットを示す。

20

【0340】

図30には、各スポットの質量分析の結果を示す。

【0341】

図31には、各スポットのSELDI-MSの結果を示す。

【0342】

図32から図34には、上記至適吸着条件検討の結果を示す。図32には、CM10の検討結果を示し、図33には、Q10の検討結果を示す。図34は、至適条件検討結果を示す。これらの結果から、得られたスポットが、ヒトアポリポタンパク質C I I I (0~2)のスポットであることが明らかになる。

30

[実施例9]

【0343】

(S-システニル化トランスサイレチンは糖化ヘモグロビン(Saccharic Hemoglobin; HbA1c)値による重症度評価においても関連する)

上記のようにして同一したS-システニル化トランスサイレチンが糖化ヘモグロビン(HbA1c)値による重症度評価においても相関性を示すことを本実施例において示した。HbA1cは、現在最も信頼性のある糖尿病マーカーとして用いられている。

【0344】

まず、上記実施例に記載されるプロトコルを用いて、糖尿病患者におけるS-システニル化トランスサイレチン(測定値: M/Z = 13, 863, 理論値: M/Z = 13, 880.53)のイオン強度とHbA1c値の関係を確認した。

40

【0345】

測定条件および統計値

IMAC30: キレート金属(Cu)固定化チップ、

Fr4: 図 血清の発現解析プロトコル参照。

【0346】

CHCA: MS測定マトリックス

測定値 : M/Z : 13, 863,

P-Value : 0.0004, ROC area : 0.86。

【0347】

50

結果を図35に示す。図35には、糖尿病患者におけるS-システニル化トランスサイレチン(測定値: $M/Z = 13, 863$, 理論値: $M/Z = 13880.53$)のイオン強度とHbA1c値の関係を示す。縦軸: SELDI-TOF-MSで測定したS-cysteinylated TTRのイオン強度; 横軸: C:コントロール(健常者)、P:糖尿病患者。

【0348】

次に、糖尿病患者におけるS-システニル化トランスサイレチン(測定値: $M/Z = 13, 874$, 理論値: $M/Z = 13880.53$)のイオン強度とHbA1c値の関係を測定した。

【0349】

測定条件および統計値

IMAC30:キレート金属(Cu)固定化チップ、
Fr4:図 血清の発現解析プロトコール参照。

【0350】

MS測定マトリックス:SPA-H

測定値 : $M/Z : 13, 874$,

P-Value: 0.007 , ROC area: 0.82 。

【0351】

図36に、その結果を示す。図36には、糖尿病患者におけるS-システニル化トランスサイレチン(測定値: $M/Z = 13, 874$, 理論値: $M/Z = 13880.53$)のイオン強度とHbA1c値の関係が示されており、縦軸: SELDI-TOF-MSで測定したS-cysteinylated TTRのイオン強度; 横軸: C:コントロール(健常者)、P:糖尿病患者が記載されている。

【0352】

次に、糖尿病患者におけるS-システニル化トランスサイレチン(測定値: $M/Z = 13, 884$, 理論値: $M/Z = 13880.53$)のイオン強度とHbA1c値の関係を調べた。

【0353】

測定条件および統計値

CM10(pH7):弱陽イオン交換チップ(洗浄条件)

Fr4:図 血清の発現解析プロトコール参照。

【0354】

SPA-H : : MS測定マトリックス

測定値 : $M/Z : 13884$,

P-Value: 0.0005 , ROC area: 0.90

その結果を図37に示す。図37には、糖尿病患者におけるS-システニル化トランスサイレチン(測定値: $M/Z = 13, 884$, 理論値: $M/Z = 13880.53$)のイオン強度とHbA1c値の関係が示される。縦軸: SELDI-TOF-MSで測定したS-cysteinylated TTRのイオン強度; 横軸: C:コントロール(健常者)、P:糖尿病患者。

【0355】

次に、糖尿病患者における $M/Z : 13, 863$ の実測データを示す(図38)。

【0356】

このように、S-システニル化トランスサイレチンの挙動は、糖尿病の指標であることが判明し、しかもその重症度に相関していることも明らかになった。

[実施例10]

【0357】

(アポリポタンパク質は良好な事前診断マーカーである。)

本実施例において、上記実施例において、予防(事前)マーカーと予測した8.3Kは、Apo CIIと同定した。

10

20

30

40

50

【0358】

(ラットアポリタンパク質C2の精製同定スキーム)

(A. イオン交換による精製法)

ラット血清750 μ Lを50mM Tris-HCl (pH6.0)にて5倍希釈を行い、Millipore Millex-HV (0.45 μ m) フィルターユニットを用いてろ過したものをサンプルとした。得られたサンプルを強陰イオン交換カラムであるAmersham HiTrap Q HP 1mLを用いて分画を行った。はじめに50mM Tris-HCl (pH6.0)にて5CV洗浄を行い、次いで50mM Tris-HCl (pH6.0), 200mM NaClにて12CV洗浄を行い、その後50mM Tris-HCl (pH6.0)にて5CV洗浄を行った。溶出は50mM Na-Acetate (pH3.0)を用いて2CV行った。溶出サンプルは10倍量のアセトンにてアセトン沈殿を行い、得られた沈殿物を62.5mM Tris-HCl (pH6.8), 1% SDS, 20%グリセロール, 0.005% BPB混合溶液100 μ Lに溶解しSDS-PAGE用のサンプルとした。

10

【0359】

(B. SDS-PAGEによる精製法)

A.の要領で作成した上記サンプルを20 \cdot L使用し、DRC Perfect NT Gel ポリペプチド分析用を用い、定電圧(100V, 2.5hr)にて分画を行った。泳動緩衝液は100mM Tris, 100mM Tricine, 0.1% SDSを用いた。泳動終了後、10% AcOH in 40% MeOHにて固定化を行い、超純水にて洗浄後、CBBにて染色を行った

20

(C. ゲルからの抽出およびSELDI-TOF-MS分析)

ゲルからの抽出は、メタノールと100mM 重炭酸アンモニウムの等量混合溶液を用いて脱色を行い、超純水:100mM 重炭酸アンモニウム:MeCN=2:5:3の比で混合した混合溶液(15 μ L)を用いて行った。

【0360】

得られた抽出液15 μ LをCIPHERGEN H50 ProteinChip Arrayに乗せ、0.1% TFA 5 μ Lにて2回洗浄を行い、マトリックスは2.5% SPA 0.5 μ Lを2回乗せて測定を行った。

30

【0361】

(D. ゲル内消化による同定法)

SELDI-TOF-MSを用いて分子量を測定したサンプルについてゲル内消化を行い、同定を行った。(下記プロトコールを参照)

(1) 反応溶液の調整

還元溶液の調整<用事調整>

・DTT (1.5mg)を100mM 重炭酸アンモニウム(1mL)に溶解する。

アルキル化溶液の調整<用事調整>

・ヨードアセトアミド(10mg)を100mM 重炭酸アンモニウム(1mL)に溶解する。

トリプシン溶液の調整<用事調整>

・トリプシン(20 μ g)を50mM 酢酸(0.1mL)に溶解し、トリプシン保存液とする。トリプシン保存液(25 μ L)に超純水(200 μ L), 100mM 重炭酸アンモニウム(500 μ L), MeCN(300 μ L)を加え、トリプシン溶液とする。

40

(2) バンドを切り出し、500 μ Lのチューブに入れる。

(3) メタノールと100mM 重炭酸アンモニウムの等量混合溶液を100 μ L加え脱色する。

(4) 還元溶液を100 μ L加え、30分インキュベートする。

(5) アルキル化溶液を100 μ L加え、30分インキュベートする。

(6) トリプシン溶液を15 μ L加え、37 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートする。

50

(7) 1/10倍量の1% TFAを加え、反応を停止する。

【0362】

消化サンプル1 μ Lを金属プレートに乗せ、マトリックスには飽和CHCA 0.4 μ Lを用いてApplied Biosystems 4700 Proteomics Analyzerにて測定を行った。

【0363】

得られたデータについて

Mascot (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html) のデータベースサーチを行い、Rat Similar to Apolipoprotein C2であると同定した。

10

【0364】

(E. ウェスタンブロッティングによる同定法)

B. の要領でSDS-PAGEを行った後、CBBで染色を行わず、下記の要領でPVDF膜にブロッティングを行い、BIO-RAD Amplified Alkaline Phosphatase Goat Anti-Rabbit Immun-Blot Assay Kit, 170-6412, Lot 300002087により検出を行った。

(1) 試薬の調製

・陽極緩衝液

60mM Tris, 40mM CAPS, 0.1% SDS, pH 9.6

20

・陰極緩衝液

60mM Tris, 40mM CAPS, 15% MeOH, pH 9.6

・Tris - buffer saline (TBS)

20mM Tris-HCl, 500mM NaCl, pH 7.5

・洗浄溶液(TTBS)

20mM Tris-HCl, 500mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5

・ブロッキング緩衝液

TBS中5% 脱脂乾燥ミルク

・1次抗体溶液

Santa Cruz Biotechnology, anti Apo C2 (Q-20) Goat polyclonal IgG, sc-19014, Lot C1904をTTBSで1000倍希釈(終濃度0.2 μ g/mL)

30

・2次抗体溶液

Zymed Laboratories, Rabbit Anti-Goat IgG (H+L) Biotin-Conjugate, 81-1640, Lot 50494328をTTBSで3000倍希釈

・ストレプトアビジン - ビオチン化アルカリホスファターゼ複合体

Streptavidin 10 μ Lを30mLのTTBSに溶解し、更にビオチン化アルカリホスファターゼ10 μ Lを加え、2時間、室温でインキュベートする。

40

・AP発色溶液

25 \times ストックを超純水にて25倍希釈し、AP発色緩衝液を作成する。AP発色緩衝液20mLに対し200 μ LのAP発色試薬A, 200 μ LのAP発色試薬Bを添加しAP発色溶液とする。

(2) 陽極板に陽極緩衝液を湿潤させたろ紙を重ね、その上にメタノールを5分間湿潤させたPVDF膜(7 \times 6cm)を重ね、更にゲルに乗せ、陰極緩衝液を湿潤させたろ紙を重ね、陰極板に乗せ、定電流105mAで30分通電した。

(3) 通電後、PVDF膜は超純水に浸し、5分振とうした。

(4) PVDF膜は風乾後、ブロッキング緩衝液にてブロッキングを行った。ブロッキングは室温、にて1時間振とうの条件で行った。

50

(5) ブロッキング後、TTBSに浸し室温にて5分×3回、振とうを行いブロッキング緩衝液の洗浄を行った。

(6) 1次抗体溶液に浸し、室温で2時間、振とうを行った。

(7) 1次抗体反応後、TTBSに浸し室温にて5分×3回、振とうし洗浄を行った。

(8) 2次抗体溶液に浸し、室温で2時間、振とうを行った。

(9) (8)の作業中、ストレプトアビジン - ビオチン化アルカリホスファターゼ complex作成した。

(10) 2次抗体反応後、TTBSに浸し室温にて5分×3回、振とうし洗浄を行った。

(11) ストレプトアビジン - ビオチン化アルカリホスファターゼ complex溶液に浸し、室温で2時間、振とうを行った。

(12) ストレプトアビジン - ビオチン化アルカリホスファターゼ complex反応後、TTBSに浸し室温にて5分×3回、振とうし洗浄を行った。

(13) AP発色溶液に浸し確認した。

【0365】

(F. 抗体チップ (CIPHERGENPS10/PS20 ProteinChipArray) を用いた同定法)

Cの要領により抽出したサンプルについて、抗体チップを用いて同定を行った。(下記プロトコールを参照)

(1) 試薬の調整

ブロッキング緩衝液: 1M Tris-HCl pH 8.0 + 140mM NaCl

洗浄緩衝液1: 0.1% Triton X-100 / PBS

洗浄緩衝液2: 1% Triton X-100 / PBS + 150mM NaCl

(2) 50% MeCN 200μLを各スポットにapplyし、1min, RT, 静置する(PS10のみ)。

(3) MeCNを除去しPBS 200μLを各スポットにapplyし、1min, RT, 静置する(PS10のみ)。

(4) PBSを除去し125μg/mL 100μLのプロテインA溶液を各スポットにapplyし、4に overnight 静置する。

(5) プロテインA溶液 <SIGMA Aldrich, Protein A from Staphylococcus aureus, P7837-5MG, Lot 074K10321>を除去し、ブロッキング緩衝液 200μLをapplyし、30min, RT (室温), 静置する。

(6) ブロッキング緩衝液を除去し洗浄緩衝液1 200μLをapplyし、5min, RT, 静置する(2 times)。

(7) 洗浄緩衝液1を除去し、抗体溶液 <Santa Cruz Biotechnology, anti Apo C2 (Q-20) Goat polyclonal IgG, sc-19014, Lot C1904>をPBSにて終濃度30μg/mLになるように希釈し、抗体溶液 100μLをapplyし2hr, RT, 振とうを行う。

(8) 抗体溶液を除去し、洗浄緩衝液1 200μLをapplyし、5min, RT, 振とうを行う(2 times)。

(9) 洗浄緩衝液1を除去し、PBS 200μLをapplyし、5min, RT, 振とうを行う。

(10) PBSを除去し、10mM HEPES (pH 7.5) 200μLをapplyし、30sec, RT, 振とうを行う。

(11) HEPESを除去し、抗原溶液20μLをapplyし、2hr, RT, 振とうを行う。

(12) 抗原溶液を除去し、洗浄緩衝液2 200μLをapplyし、3min, RT, 振とうを行う(2 times)。

(13) 洗浄緩衝液2を除去し、PBS 200μLをapplyし、3min, RT,

10

20

30

40

50

振とうを行う。

(14) PBSを除去し、10mM HEPES (pH 7.4) 200 μ Lをapply、30sec, RT (室温), 振とうを行う。

(15) HEPESを除去し、風乾後、EAM (50% SPA 0.5 μ L x 2 times)をapplyし、測定を行う。

【0366】

また、その結果を図39および図40に示す。

【0367】

図39には、糖尿病ラット血清 8.3K (Apo CII) 箱髭図を示す。

【0368】

図40には、上記の時系列データを示す。アポCIIが良好な事前診断マーカーであることが明らかになった。

【0369】

図41~43には、得られた血清が、ラットのアポリポタンパク質CIIであることを示す結果が示されている。図41は、ゲル上のバンドのSELDI-MSの結果を示す。図42には、得られたバンドのウェスタンブロットによる確認を示す。図43には、クロマトグラフィーによる分画において抗ApoC2抗体により増強される様子を示す。

【0370】

図44から図47は、ヒトにおけるアポリポタンパク質CIIもまた事前診断マーカーであることを実証する。

[実施例11:スクリーニング]

【0371】

まず、本発明において見出されたマーカー物質に変動(好ましくは、正常化)させる可能性のある物質を、スクリーニングする。

【0372】

本実施例では、糖尿病を発症している動物または将来の発症リスクが高い動物に被験物質を摂取させ、該動物の体液中における該マーカー物質の少なくとも1つの濃度を基準値と比較し、被検物質が有する糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果を評価する。

[実施例12:ヒトでのスクリーニング]

【0373】

実施例11で動物モデルで糖尿病の改善効果または将来の発症リスクの低減効果が見られた物質について、実際にヒト被験体においても効果があるかを評価する。これは、通常の治験と同様の手続に則って行う。

【0374】

このようなスクリーニングにより、動物において実際に糖尿病を診断することができることが理解される。

[実施例13: 健常者に見出されるマーカー物質と罹患者に見出されるマーカー物質とを示差的に識別することができる抗体の作製]

上述の実施例において、糖尿病のマーカー物質であることが明らかになったトランスサイレチンには、非修飾のものと、アミノ酸配列中に唯一存在するシステイン残基において修飾されたものがある。その修飾には、システニル化の他に、スルホニル化やグルタチオン化、ホモシステニル化等が知られているが、上記実施例において糖尿病のマーカーとして、システニル化トランスサイレチンが見出された。

【0375】

本実施例では、このシステニル化トランスサイレチンを特異的に検出し、非修飾のトランスサイレチンは検出しないような系を作ることを目的とした。

【0376】

抗原としているペプチド(特にCys残基近傍)の配列はヒトと代表的な免疫動物との間でよく保存されており、トランスサイレチンは血清に多く含まれることから、普通に免

10

20

30

40

50

役しても抗体はできにくいと考えられることから、Chio me社のADLib（登録商標）の技術を用いることにした。システイン残基付近のアミノ酸配列のアライメントを以下に示す。

[Homo sapiens]	GPTGTGESKCPLMVK	（配列番号25）
[Mus musculus]	GPAGAGESKCPLMVK	（配列番号26）
[Rattus norvegicus]	GPGGAGESKCPLMVK	（配列番号27）
[Gallus Gallus]	APLVSHGSVDSKCPLMVK	（配列番号28）

（材料および方法）

使用した抗原は以下のとおりである。抗体作製は、Chio me社（東京、文京）に依頼して行った。

【0377】

（抗原）

ペプチドの元となるタンパクの名前と由来： トランスサイレチン（transthyretin, human）

長さ： 15残基

ペプチド配列： GPTGTGESKCPLMVK（トランスサイレチンのN末端の最初のアミノ酸残基から15残基；配列番号25）

修飾： ペプチド中のCys残基がジスルフィド結合によりフリーのシステインと結合している（システイニル化修飾されている）。

【0378】

（抗原調製方法）

抗原は、常法に基づいて調製した。

【0379】

以上の手法を行った結果、各ペプチド（Cys化ペプチド、非修飾ペプチド両方とも）が、約20mg生成された。これを、ミリQ（蒸留水）中に溶解し、この溶液を-80で保存し、各4mg程度に分注した。

【0380】

（抗体調製方法）

抗体セレクションプロセスの概略を以下に示す。

【0381】

（磁気ビーズ作製）

まず、磁気ビーズへの抗原固定を行った。磁気ビーズにシステイニル化トランスサイレチン部分ペプチドを固定しセレクションを行った後、1週間後に培養上清を用いてシステイニル化トランスサイレチン部分ペプチドと非システイニル化トランスサイレチン部分ペプチドに対してELISAを行った。

【0382】

（ライブラリーからの抗体セレクション）

（抗体選抜方法）

抗体選抜方法は、原理的には、特開2006-149383号に記載される方法に従った。手短には、免疫グロブリン遺伝子座において体細胞組換えを誘発させ、種々のイムノグロブリン分子を産生しているDT40細胞集団（WO2004/011644を参照）の中から、ストレプトアビジンに特異的に結合する抗体分子を選別することによって行った。以下に詳細に説明する。

【0383】

（ストレプトアビジンに特異的に結合する抗体の選別）

（培養細胞）

DT40細胞は、5%のCO₂恒温槽にて5%のCO₂、39.5で培養した。培地は、IMDM培地（Invitrogen社）を用い、10%FBS、1%ニワトリ血清、ペニシリン100単位/ml、ストレプトマイシン100μg/ml、2-メルカプトエタノール

10

20

30

40

50

55 μM を加えて使用した。また、トリコスタチンA (和光純薬)は、メタノールに5 mg/mlに溶解したものをストックとし、最終濃度が2.5 ng/mlとなるように適宜培地で希釈して用いた。細胞濃度は $10^5 \sim 10^6$ 個/mlに保ちながら培養を続けた。

【0384】

(ストレプトアビジン磁気ビーズの作製)

磁気ビーズはDyna beads M-280 Tosyl activated (Dyna社)を、また磁気スタンドはDyna 1 MPC (Dyna社)を用いた。ビーズ200 μl を500 μl の緩衝液A (0.1 Mリン酸ナトリウム、pH 7.4)で3回洗った後、緩衝液A、400 μl 中で240 μg のストレプトアビジン (ナカライテスク社)と37 で24時間、回転により攪拌しながら反応させた。次にビーズを緩衝液C (10 mMリン酸ナトリウム、pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% BSA) 500 μl で2回洗浄した。その後緩衝液D (0.2 M Tris-HCl, pH 8.5, 0.1% BSA) 500 μl を加え、37 で4時間、回転により攪拌しながら反応させ、ブロッキングを行った。その後500 μl の緩衝液Cで2回洗浄した後、0.02%アジ化ナトリウムを含む緩衝液C、400 μl に懸濁した。

10

【0385】

(ウサギ Ig G 磁気ビーズの作製)

磁気ビーズはDyna beads M-280 Tosyl activated (Dyna社)を、また磁気スタンドはDyna 1 MPC (Dyna社)を用いた。ビーズ200 μl を500 μl の緩衝液A (0.1 Mリン酸ナトリウム、pH 7.4)で3回洗った後、緩衝液A、200 μl 中で120 μg のウサギ Ig G (SIGMA社)と37 で一晩、回転により攪拌しながら反応させた。次にビーズを緩衝液C (10 mMリン酸ナトリウム、pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% BSA) 200 μl で2回洗浄した。その後緩衝液D (0.2 M Tris-HCl, pH 8.5, 0.1% BSA) 200 μl を加え、37 で4時間、回転により攪拌しながら反応させ、ブロッキングを行った。その後500 μl の緩衝液Cで2回洗浄した後、0.02%アジ化ナトリウムを含む緩衝液C、200 μl に懸濁した。

20

【0386】

(ストレプトアビジン磁気ビーズおよびウサギ Ig G 磁気ビーズによるセレクション)

トリコスタチンA、2.5 ng/mlで7週間処理した野生型DT40細胞約 5×10^7 個を洗浄緩衝液 (1% BSAを含むPBS) 10 mlで1回、さらに1 mlで一回洗浄したのち、1 mlの洗浄緩衝液中でストレプトアビジン磁気ビーズ (ウサギ Ig G 磁気ビーズによるセレクションの場合はウサギ Ig G 磁気ビーズ) 5×10^6 個と混合し、4で30分間、穏やかに回転させつつインキュベートした。その後1 mlの洗浄緩衝液で5回洗浄した。最後に、磁気ビーズに結合した細胞を500 μl に懸濁し、これを30 mlの培地に加えたのち、96穴プレートに300 μl ずつ分注し、39.5で培養した。1週間後、培養上清でELISAを行った。

30

【0387】

(2枚のプレートによるELISA)

2枚の96穴イムノプレート・マキシソープ (NalgeNunc社)を用意し、それぞれに5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のストレプトアビジン (ナカライテスク) およびオボアルブミン (Sigma社) (いずれもPBSに溶解)を200 μl 加え、室温で一晩放置してプレートに固定した (ウサギ Ig G 磁気ビーズによるセレクションの場合は、ウサギ Ig G (SIGMA社) および卵白リゾチーム (SIGMA社)を用いた)。その後0.5%スキムルク200 μl により室温で1時間ブロッキングし、ELISA洗浄緩衝液 (0.05% Tween 20を加えたPBS) 200 μl で3回洗浄した。ここに細胞培養上清100 μl を加え、室温で1時間反応させた。なお、ここで培養上清は、同じものをストレプトアビジン固定プレートとオボアルブミン固定プレートの両方に (ウサギ Ig G 磁気ビーズセレクションの場合はウサギ Ig G 固定プレートと卵白リゾチーム固定プレート) 100 μl ずつ分注した。その後ELISA洗浄緩衝液200 μl で5回洗浄し、ホースラディッシュペルオキシダーゼ

40

50

共役ヤギ抗ニワトリIgM抗体(Bethyl社)をPBSにより2000倍に希釈して100μlずつ加えた。室温で45分間反応後、ELISA洗浄緩衝液で5回洗浄し、その後TMB+(Dako社)を100μl加え、室温で4分間反応させた後、1N硫酸100μlにより反応を停止させた。定量は、mQuantBiomolecularSpectrometer(Bio-TekInstruments社)により450nmの吸光を測定して行った。

【0388】

ELISAの結果は、ストレプトアビジンに反応する抗体のO.D.値で示すと共に、同じクローンのオボアルブミンとの反応性に関するELISAの結果を同時に示すことによって評価する。

【0389】

ストレプトアビジンに対し高い親和性を示しているクローンはいずれもオボアルブミンに対しても強く反応しているため、ストレプトアビジンに対する親和性のみを指標に選別を行うと、どのようなリガンドにも非特異的に結合する抗体を選別する確率が極めて高いことが実験的に明らかになった。一方、この方法を用いれば、こうした非特異的な抗体を当初から効率的に除外できることが確認された。実際、ストレプトアビジン単独でアッセイを行うと28クローンが候補として選別されるが、そのほとんどがオボアルブミンに対しても強く結合する。そのようなクローンを除外することにより、即座に1クローンに限定することが可能である。

【0390】

(2. 特異性の確認)

(ストレプトアビジン特異性検証のためのELISA用培養上清の作製)

さらなる特異性をELISAにより解析するのに用いた培養上清は、血清由来のIgM等を除去するため、以下のようにして調製した培地を用いた。ニワトリ血清(Invitrogen社)から50%飽和硫酸によりイムノグロブリンを沈殿として除去し、上清をPBSに透析した。透析により生じた体積増加をCentriPrep(Amicon社)による濃縮で補正し、抗体除去ニワトリ血清とした。これをAIM-V無血清培地(Invitrogen社)に6%の濃度で加えた。ここに約106/mlの濃度で細胞を加え、2日培養し、培養上清をとりELISAを行った。

【0391】

(ストレプトアビジン特異性検証のためのELISA)

96穴イムノプレート・マキシソープに5μg/mlのストレプトアビジン、オボアルブミン、ヒトIgG(Sigma社)、また0.5%スキムミルク(Difco社)(いずれもPBSに溶解)を200μl加え、室温で一晩放置してプレートに固定した。その後0.5%スキムミルク200μlにより室温で1時間ブロックし、ELISA洗浄緩衝液200μlで3回洗浄した。ここに細胞培養上清を1倍から3,125倍まで、6段階に5倍ずつ希釈したものを100μl加え、室温で1時間反応させた。なお、ここで用いたクローンは、さきのSD10を一度限界希釈して得られたクローンSD10-1を用いた。その後ELISA洗浄緩衝液200μlで5回洗浄し、ホースラディッシュペルオキシダーゼ共役ヤギ抗ニワトリIgM抗体をPBSにより2,000倍に希釈して100μlずつ加えた。室温で45分間反応後、ELISA洗浄緩衝液で5回洗浄し、その後TMB+を100μl加え、室温で4分間反応させた後、1N硫酸100μlにより反応を停止させた。定量は、mQuantBiomolecularSpectrometerにより450nmの吸光を測定して行った。

【0392】

(結果)

(ELISAによる特異性検討)

システイニル化トランスサイレチン部分ペプチドと非システイニル化トランスサイレチン部分ペプチドへの反応性比較を行った。

【0393】

その結果、システイニル化トランスサイレチン部分ペプチドに対して反応するクローン

10

20

30

40

50

の殆どは、非システニル化トランスサイレチン部分ペプチドに対しても同様に反応したが、そのうち2クローンに関して、両ペプチドに対する反応性が若干ことなるものが得られた。

【0394】

さらに選抜を進めると、Cys化ペプチド特異的抗体を作製することができる。したがって、システニル化トランスサイレチンを特異的に検出し、非修飾のトランスサイレチンは検出しない抗体を作製することができる。そのためには、本実施例において用いた抗原ペプチド(Cys化ペプチド)に反応し、非修飾の同じ配列のペプチドには反応しないようなものを選抜することによって得ることができることを見出された。

[実施例14：Asp修飾TTRペプチドを用いた抗体製造]

【0395】

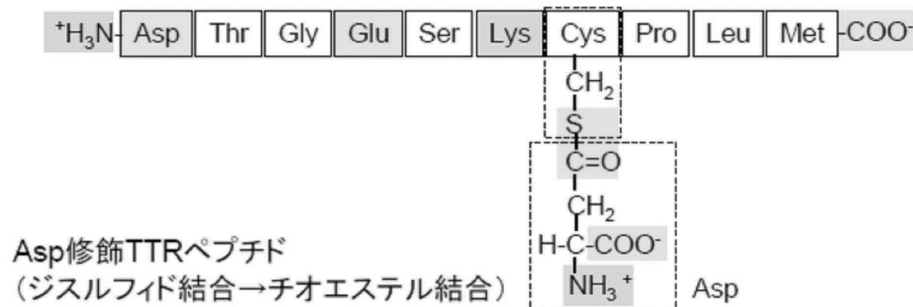
実施例13において、抗原としてAsp修飾TTRペプチドを用いて同様の抗体製造を実施した。

【0396】

使用した、抗原は以下のとおりである。

【0397】

【化1】



【0398】

これを、「ImjectImmunogen EDC Kit with BSA」(PIERCE社)を用いてBSAへコンジュゲーションし、実施例13に記載される手順に従って抗体を製造した。

【0399】

実施例13に記載されるようにその結果を調査することにより、Cys化ペプチド特異的抗体を作製することができる。したがって、システニル化トランスサイレチンを特異的に検出し、非修飾のトランスサイレチンは検出しない抗体を作製することができる。

[実施例15：HuCALを用いた抗体製造]

【0400】

上述の実施例において、糖尿病のマーカー物質であることが明らかになったトランスサイレチンには、非修飾のものと、アミノ酸配列中に唯一存在するシステイン残基において修飾されたものがある。その修飾には、システニル化の他に、スルホニル化やグルタチオン化、ホモシステニル化等が知られているが、上記実施例において糖尿病のマーカーとして、システニル化トランスサイレチンが見出された。

【0401】

本実施例では、このシステニル化トランスサイレチンを特異的に検出し、非修飾のトランスサイレチンは検出しないような別の系を作ることを目的とした。

【0402】

抗原としているペプチド(特にCys残基近傍)の配列はヒトと代表的な免疫動物との間でよく保存されており、トランスサイレチンは血清に多く含まれることから、普通に免疫しても抗体はできにくいと考えられることから、Morphosys社(ドイツ)のMorphoSys(登録商標)、HuCAL(登録商標)、HuCAL GOLD(登録商標)、AutoPan(登録商標)、およびAutoScreen(登録商標)技術を用いることとした。

システイン残基付近のアミノ酸配列のアライメントを以下に示す。

10

20

30

40

50

[Homo sapiens]	GPTGTGESKCPLMVK	(配列番号 25)
[Mus musculus]	GPAGAGESKCPLMVK	(配列番号 26)
[Rattus norvegicus]	GPGGAGESKCPLMVK	(配列番号 27)
[Gallus gallus]	APLVSHGSVDSKCPLMVK	(配列番号 28)

(材料および方法)

使用した抗原は以下のとおりである。抗体作製は、Gene Frontier社(東京、中央)に依頼して行った。

【0403】

(抗原)

ペプチドの元となるタンパクの名前と由来： トランスサイレチン (transthyretin, human)

長さ： 15 残基

ペプチド配列： TGESKCPLMVK (トランスサイレチンのN末端の最初のアミノ酸残基から15残基;配列番号25のうち5位~15位)

修飾：ペプチド中のCys残基がジスルフィド結合によりフリーのシステインと結合している(システイン化修飾されている)かあるいはビオチン化されている。

【0404】

従って、以下の4種類の配列を作製した。

【0405】

- 1) B i o t i n - T G E S K [C (C y s)] P L M V K - C O O H
- 2) N H ₂ - T G E S K [C (C y s)] P L M V K (b i o t i n) - C O O H
- 3) B i o t i n - T G E S K C P L M V K - C O O H
- 4) T G E S K C P L M V K - C O O H

1) および 2) は抗原ペプチドであり、3) および 4) はコントロールペプチドである。1) および 2) は、純度は95%以上とし、各々5mg使用した。コントロールは、純度90%で、1mgを使用した。

【0406】

(抗原調製方法)

抗原は、常法に基づいて調製した。

【0407】

以上の手法を行った結果、各ペプチド(Cys化ペプチド、非修飾ペプチド両方とも)が、約20mg生成された。これを、ミリQ(蒸留水)中に溶解し、この溶液を-80で保存し、各4mg程度に分注した。

【0408】

(抗体調製方法)

(一次スクリーニング)

原理的には、AutoPan(登録商標)を用いて一時スクリーニングを行った。

【0409】

使用したファージライブラリーは、HuCAL GOLD(登録商標)であり、これは、ヒト型Fab抗体を表面に発現させたファージライブラリーである。150億種類を超える多様なFabを持つファージが含まれている。ヒトのコンビナトリアル抗体ライブラリー(HuCAL; WO97/08320; Knappikら、J. Mol. Biol. 296:55、2000)から得られる。この手法は、(ポリ)ペプチドライブラリーの作製に適当な1つまたは複数の(ポリ)ペプチド配列をコードする1つまたは複数の核酸配列を組み立てる方法であって、(ポリ)ペプチド配列がアミノ酸コンセンサス配列を含むものであり、以下の段階を含む方法：(a)少なくとも3つの相同蛋白質のコレクションから、少なくとも1つのアミノ酸コンセンサス配列を含む1つまたは複数の(ポリ)ペプチド配列を導き出す段階；(b)選択的に、該(ポリ)ペプチド配列内、または該(ポ

10

20

30

40

50

り) ペプチドもしくは他の(ポリ)ペプチド配列の間においてアミノ酸の間の好ましくない相互作用を除去するため修飾される、該(ポリ)ペプチド配列内のアミノ酸を同定する段階(c) 各々の該(ポリ)ペプチド配列の中で、少なくとも1つの構造的サブ要素を同定する段階; (d) 各々の該(ポリ)ペプチド配列を、対応する核酸コード配列に逆翻訳する段階; (e) 該サブ要素をコードするサブ配列の末端に隣接する領域または末端の間にある領域に切断部位を組み立てる段階で、該切断部位の各々が、(ea) 各々の該核酸コード配列内では唯一であり; (eb) すべての該核酸コード配列の対応するサブ配列に共通であるという特徴を有する。

【0410】

このように得たライブラリーについて、抗原を固相化し、HuCAL(登録商標)ライブラリーと反応させる。結合したファージの回収(溶出)は、独自のCysDisplayを利用して行う。一次スクリーニングによって候補抗体を発現しているファージを数百~数千種類にまで絞り込む。ここでは、特表2003-505025に記載される手法に基づいた手法であるCycDisplayTMを用いた。この技術では、ファージに発現される抗体(Fab)をジスルフィド結合を解して発現させ、ファージ部分を還元剤により溶出する。そのため、親和性のみに依存した溶出方法に比べて、多くの特異的抗体の選択が可能となる。

【0411】

あるいは、ファージミドのレスキュー、ファージの増幅および精製は以下のようにして行う。HuCAL(登録商標)Fabを、34µg/mlクロラムフェニコールおよび1%グルコースを含む2xTY培地(2xTY-CG)において増幅させた。ヘルパーファージ(VCSM13)を37、OD600約0.5で感染させた後、2xTY/34µg/mlクロラムフェニコール/50µg/mlカナマイシンにおいて遠心および再懸濁した後、細胞を30で一晩増殖させた。ファージを上清からPEG沈殿させた後(Ausubelら、1998)、PBS/20%グリセロールに再浮遊させて、-80で保存した。2回の選別ラウンドのあいだのファージ増殖は以下のように行った: 溶出したファージを対数中期TG1細胞に感染させて、1%グルコースおよび34µg/mlクロラムフェニコールを添加したLB-寒天に播種した。30で一晩インキュベートした後、コロニーを掻き取ってOD6000.5に調節した。ヘルパーファージを上記のように添加した。

【0412】

MaxisorpTMマイクロタイタープレート(Nunc社)のウェルを、PBSに溶解して50µg/mlに希釈した(2µg/ウェル)ラットまたはヒトTIMP蛋白質によってコーティングした。5%脱脂粉乳のPBS溶液によってブロッキングした後、上記のように精製したHuCAL(登録商標)Fabファージ1~5x1012個を20で1時間加えた。数回の洗浄段階の後、結合したファージを100mMトリエチルアミンによるpH溶出によって放出した後、1MTris·HCl、pH7.0によって中和した。Krebsら、J. Immunol. Meth. 254:67、2001を参照のこと。2~3ラウンドの選別を行い、上記のように各ラウンドのあいだにファージの増殖を行った。

【0413】

(二次スクリーニング)

次に、ELISAによる二次スクリーニングを行う。これは、AutoScreen(登録商標)を用いて行う。一次スクリーニングで絞り込まれたファージをクローニングし、各々Fab抗体を発現させ、抗原特異的なELISA陽性クローンを選定する。

【0414】

選択したHuCAL(登録商標)Fab1断片のFabコードインサートを、可溶性Fabの迅速な発現を促進するために、発現ベクターpMORPH(登録商標)x7FS(Knappikら、J. Mol. Biol. 296:55、2000)にサブクローニングした。選択したHuCAL(登録商標)Fab1クローンのDNA調製物を適切な制

10

20

30

40

50

限酵素によって消化した後、F a bコードインサートを切り出した。精製したインサートを、s c F v - インサートを既に有する上記制限酵素切断ベクターp M O R P H (登録商標) × 7 にサブクローニングすると、F a b 発現ベクターが作製される。このベクターにおいて発現されたF a b は、検出および精製のために二つのC - 末端タグ (F L A G (商標) および S t r e p - t a g I I) を有する。

【 0 4 1 5 】

これをE L I S A にて選別する。

【 0 4 1 6 】

(候補抗体の生産および精製)

次に、配列決定によりE L I S A 陽性クローンが単一クローンであることを確認した後、多量の抗体を生産する。えられたF a b 抗体をアフィニティークロマトグラフィーにより精製する。

【 0 4 1 7 】

生産した抗体は、p M O R P H (登録商標) × 9 F S によってコードされるF a b 断片のT G - 1 細胞における発現は、3 4 μ g / m l クロラムフェニコールを添加した2 × T Y 培地1 L と共に振とうフラスコ培養において行った。0 . 5 m M I P T G によって誘導した後、細胞を2 2 で1 6 時間増殖させた。細胞沈降物のペリプラスム抽出物を調製して、F a b 断片をS t r e p - t a c t i n (登録商標) クロマトグラフィー (I B A 社、ゲッティンゲン、ドイツ) によって単離した。見かけの分子量は、較正標準物質を用いたサイズ排除クロマトグラフィー (S E C) によって決定した。濃度は、U V 分光光度法によって決定した。

【 0 4 1 8 】

(2 . 特異性の確認)

(ストレプトアビジン特異性検証のためのE L I S A 用培養上清の作製)

さらなる特異性をE L I S A により解析するのに用いた培養上清は、血清由来のI g M 等を除去するため、以下のようにして調製した培地を用いた。ニワトリ血清 (Invitrogen 社) から5 0 % 飽和硫酸によりイムノグロブリンを沈殿として除去し、上清をP B S に透析した。透析により生じた体積増加をC e n t r i P r e p (Amicon 社) による濃縮で補正し、抗体除去ニワトリ血清とした。これをA I M - V 無血清培地 (Invitrogen 社) に6 % の濃度で加えた。ここに約1 0 6 / m l の濃度で細胞を加え、2 日培養し、培養上清をとりE L I S A を行った。

【 0 4 1 9 】

(ストレプトアビジン特異性検証のためのE L I S A)

9 6 穴イムノプレート・マキシソープに5 μ g / m l のストレプトアビジン、オボアルブミン、ヒトI g G (Sigma 社) 、また0 . 5 % スキムミルク (Difco 社) (いずれもP B S に溶解) を2 0 0 μ l 加え、室温で一晩放置してプレートに固定した。その後0 . 5 % スキムミルク2 0 0 μ l により室温で1 時間ブロッキングし、E L I S A 洗浄緩衝液2 0 0 μ l で3 回洗浄した。ここに細胞培養上清を1 倍から3 , 1 2 5 倍まで、6 段階に5 倍ずつ希釈したものを1 0 0 μ l 加え、室温で1 時間反応させた。なお、ここで用いたクローンは、さきのS D 1 0 を一度限界希釈して得られたクローンS D 1 0 - 1 を用いた。その後E L I S A 洗浄緩衝液2 0 0 μ l で5 回洗浄し、ホースラディッシュペルオキシダーゼ共役ヤギ抗ニワトリI g M 抗体をP B S により2 , 0 0 0 倍に希釈して1 0 0 μ l ずつ加えた。室温で4 5 分間反応後、E L I S A 洗浄緩衝液で5 回洗浄し、その後T M B + を1 0 0 μ l 加え、室温で4 分間反応させた後、1 N 硫酸1 0 0 μ l により反応を停止させた。定量は、m Q u a n t B i o m o l e c u l a r S p e c t r o m e t e r により4 5 0 n m の吸光を測定して行った。

【 0 4 2 0 】

評価基準としては、規定のE L I S A 陽性 (コントロールペプチド) に対して5 倍以上のE L I S A 比活性が得られるものを5 つ選択し (各々2 5 - 5 0 μ g) 、これらから選択された適切な抗体を生産する。F a b 抗体の形式化または二価F a b ミニ抗体 (M y c

10

20

30

40

50

- His タグ付) の形式を選択してもよい。

【0421】

(結果)

(ELISAによる特異性検討)

システイニル化トランスサイレチン部分ペプチドと非システイニル化トランスサイレチン部分ペプチドへの反応性比較を行う。

【0422】

その結果、システイニル化トランスサイレチン部分ペプチドに対して反応するクローンの殆どは、非システイニル化トランスサイレチン部分ペプチドに対しても同様に反応するものと示差的に反応するものが得られる。

10

【0423】

さらに選抜を進めると、Cys化ペプチド特異的抗体を作製することができる。したがって、システイニル化トランスサイレチンを特異的に検出し、非修飾のトランスサイレチンは検出しない抗体を作製することができる。そのためには、本実施例において用いた抗原ペプチド(Cys化ペプチド)に反応し、非修飾の同じ配列のペプチドには反応しないようなものを選抜することによって得ることができる。

【0424】

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。

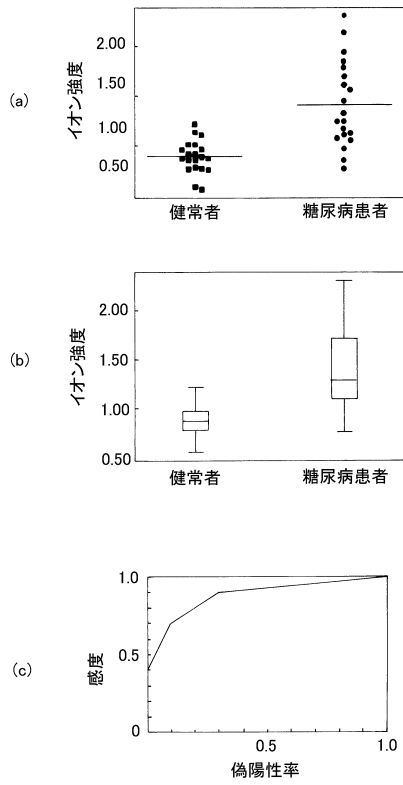
20

【産業上の利用可能性】

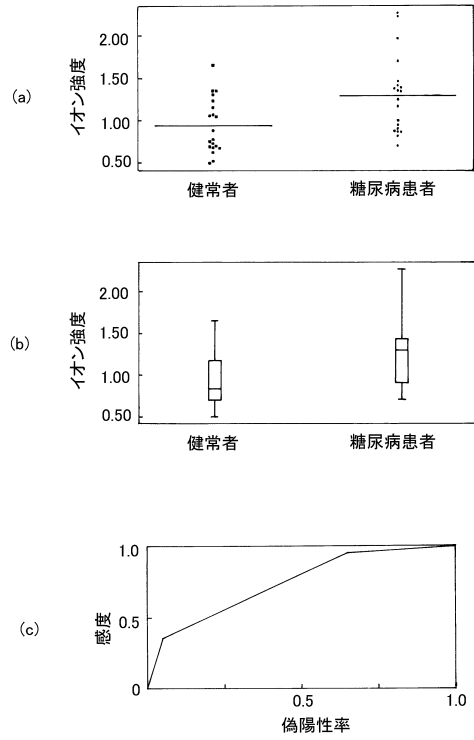
【0425】

本発明は、医薬品産業等において利用性を有する。特に、診断薬の製造において産業上の利用可能性を有する。

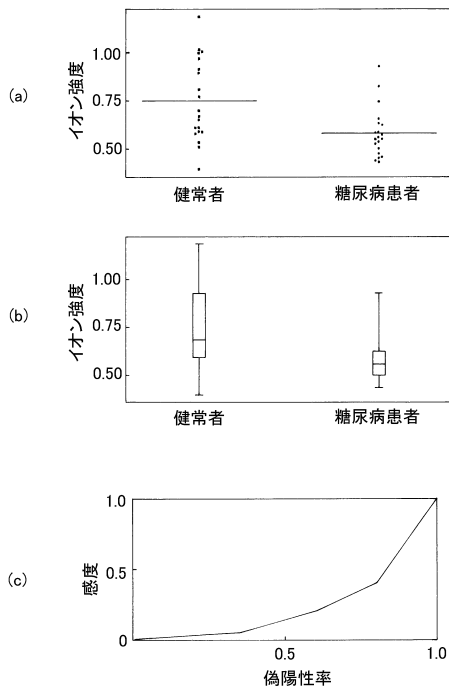
【 図 3 】



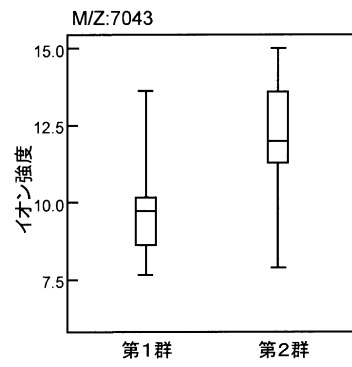
【 図 4 】



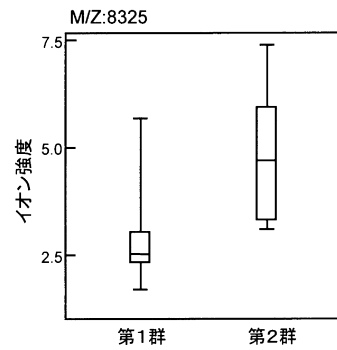
【 図 6 】



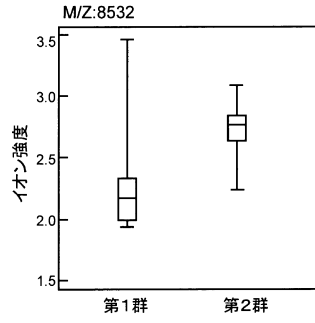
【 図 7 】



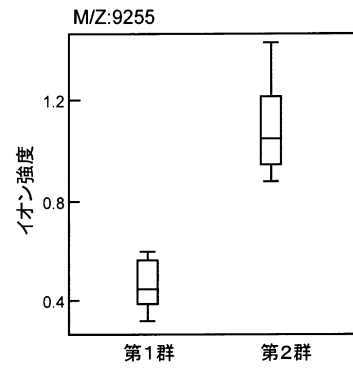
【 図 8 】



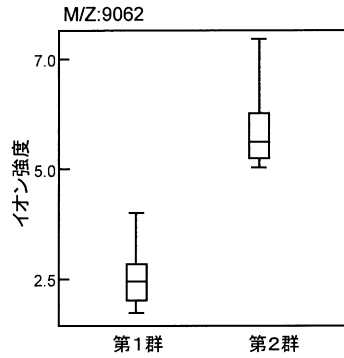
【 図 9 】



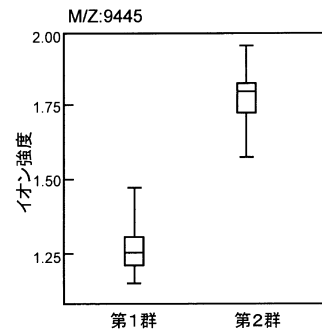
【 図 1 1 】



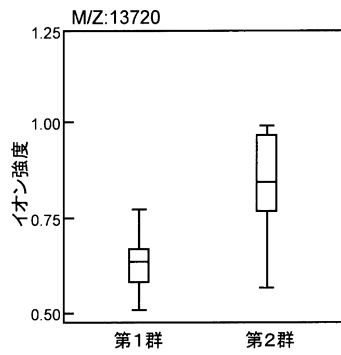
【 図 1 0 】



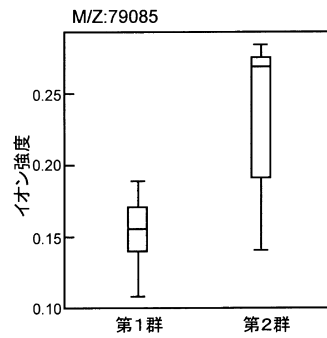
【 図 1 2 】



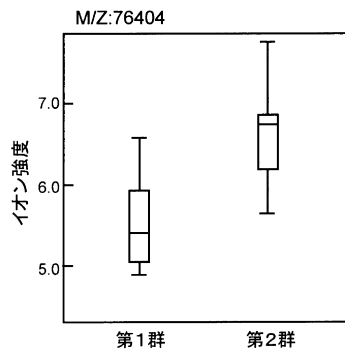
【 図 1 3 】



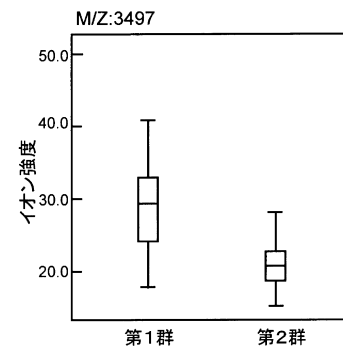
【 図 1 5 】



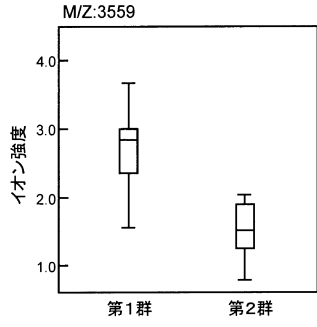
【 図 1 4 】



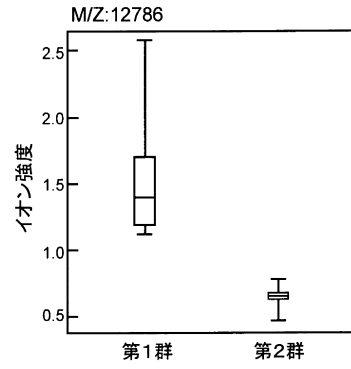
【 図 1 6 】



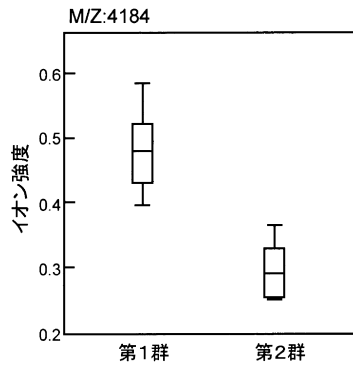
【 図 17 】



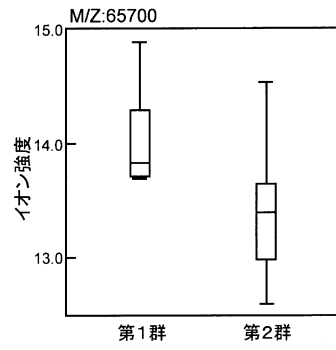
【 図 19 】



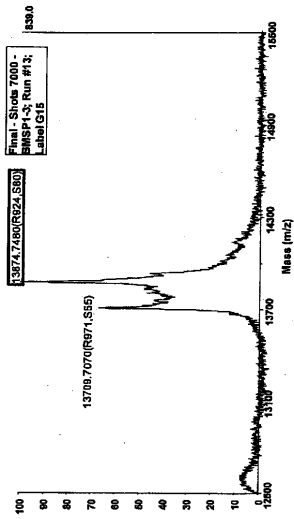
【 図 18 】



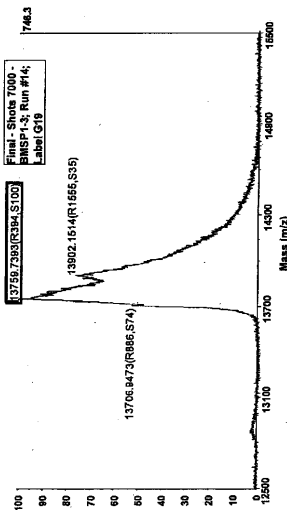
【 図 20 】



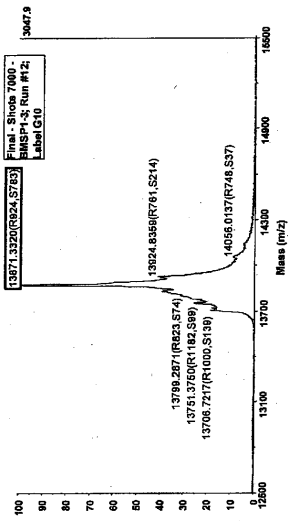
【 図 21 】



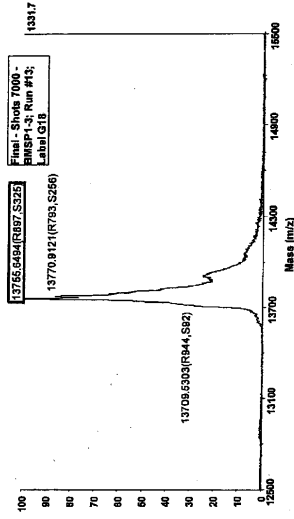
【 図 22 】



【 2 3 】



【 2 4 】

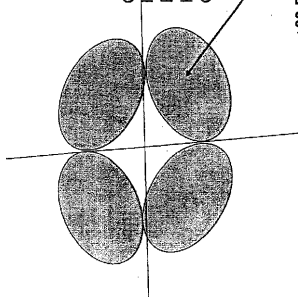


【 2 5 】

トランスサイレチン : 4量体
(55 kDa) : 127残基 x 4)

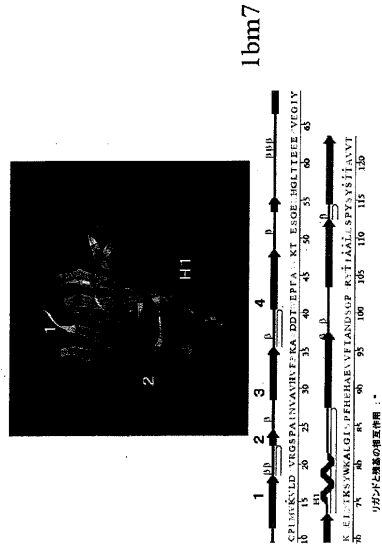
GPTGTGESKC PLMKVLDVAV RGSPA
INVAVHVRK AADTWEPFA SGKTS
ESGELHGLTT EEEFVEGIYK VEIDT
KSNWKALGIS PFHEAEWVF TANDS
GPRRYTAAAL LSPYSYSTTA VTNPKK

127残基

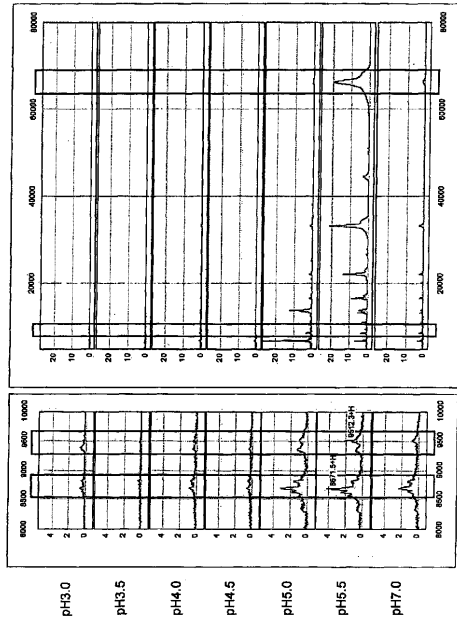


- +30 Da ジヒドロキシル化
- +80 Da リン酸化
- +306Da グルタチオン化

【 2 6 】



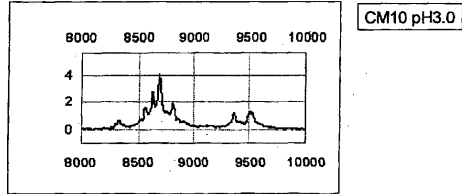
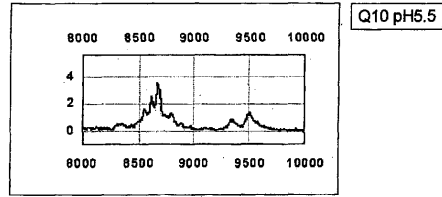
【 図 3 3 】



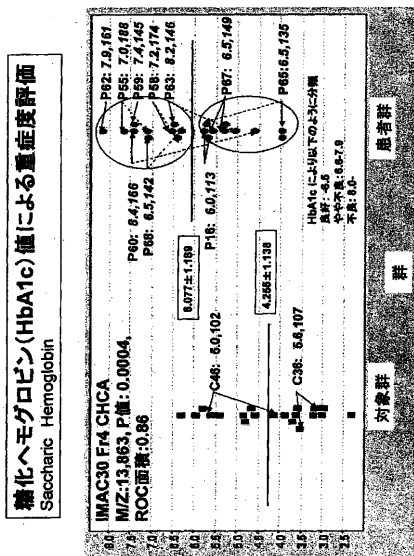
【 図 3 4 】

精製レジン及び至適吸着pH

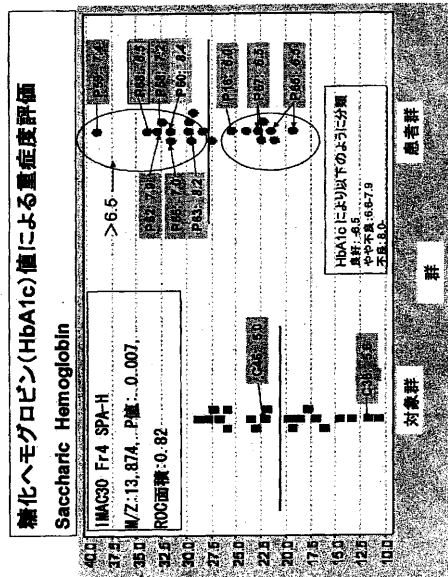
<推奨pH値> pH4.5付近
 <精製レジン> 強陰イオン交換レジンを使用
 <至適吸着pH> >pH5.5



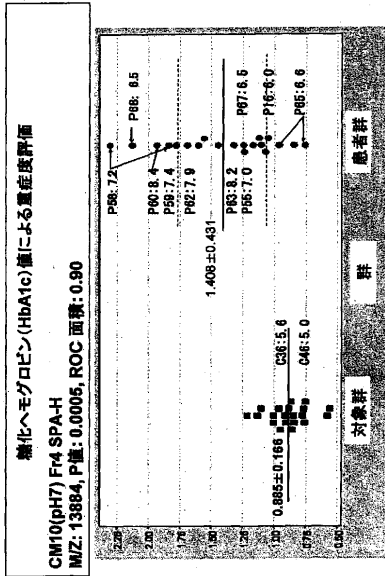
【 図 3 5 】



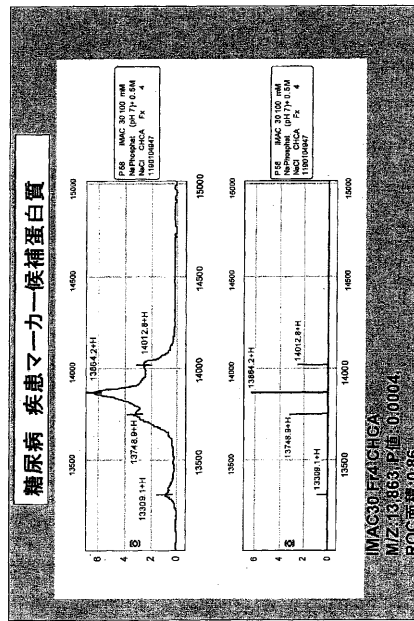
【 図 3 6 】



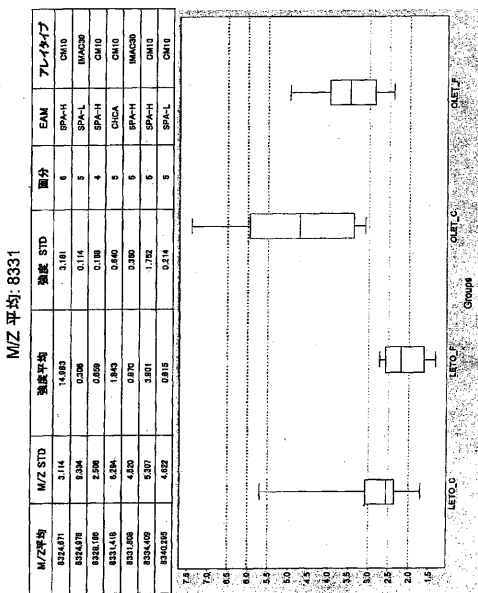
【 図 3 7 】



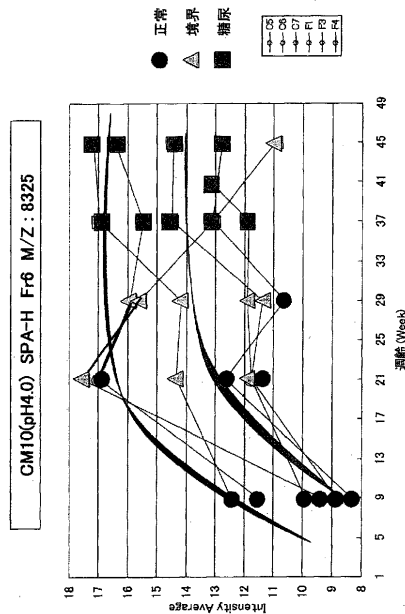
【 図 3 8 】



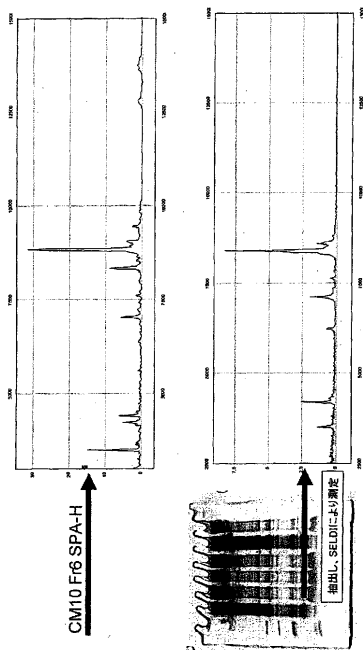
【 図 3 9 】



【 図 4 0 】

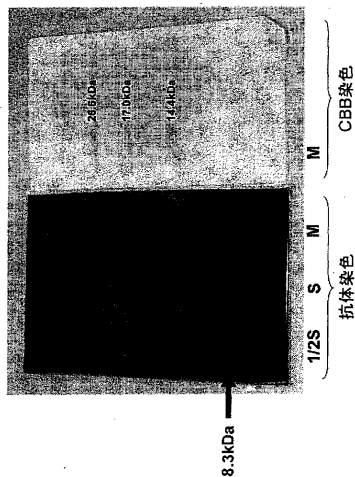


【 図 4 1 】

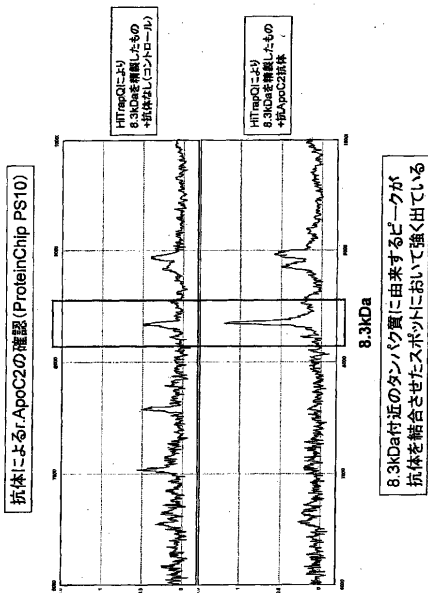


【 図 4 2 】

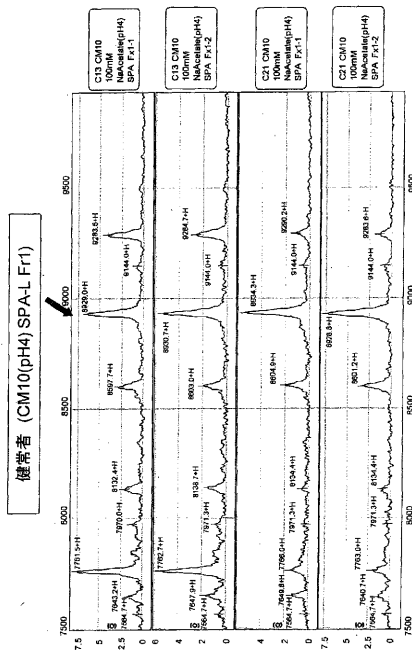
抗体によるr.ApoC2の確認(ウェスタンブローディング法)



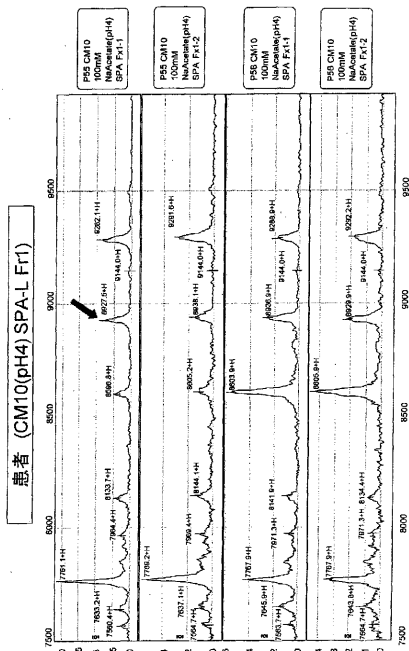
【 図 4 3 】



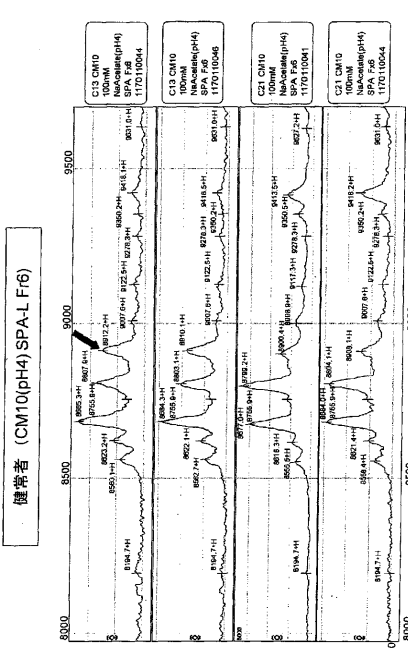
【 図 4 4 】



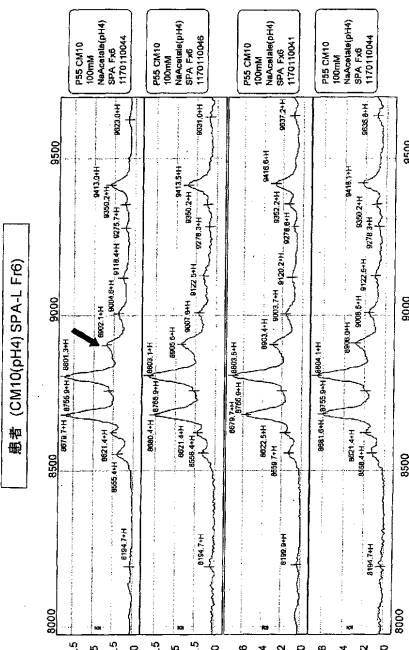
【 図 4 5 】



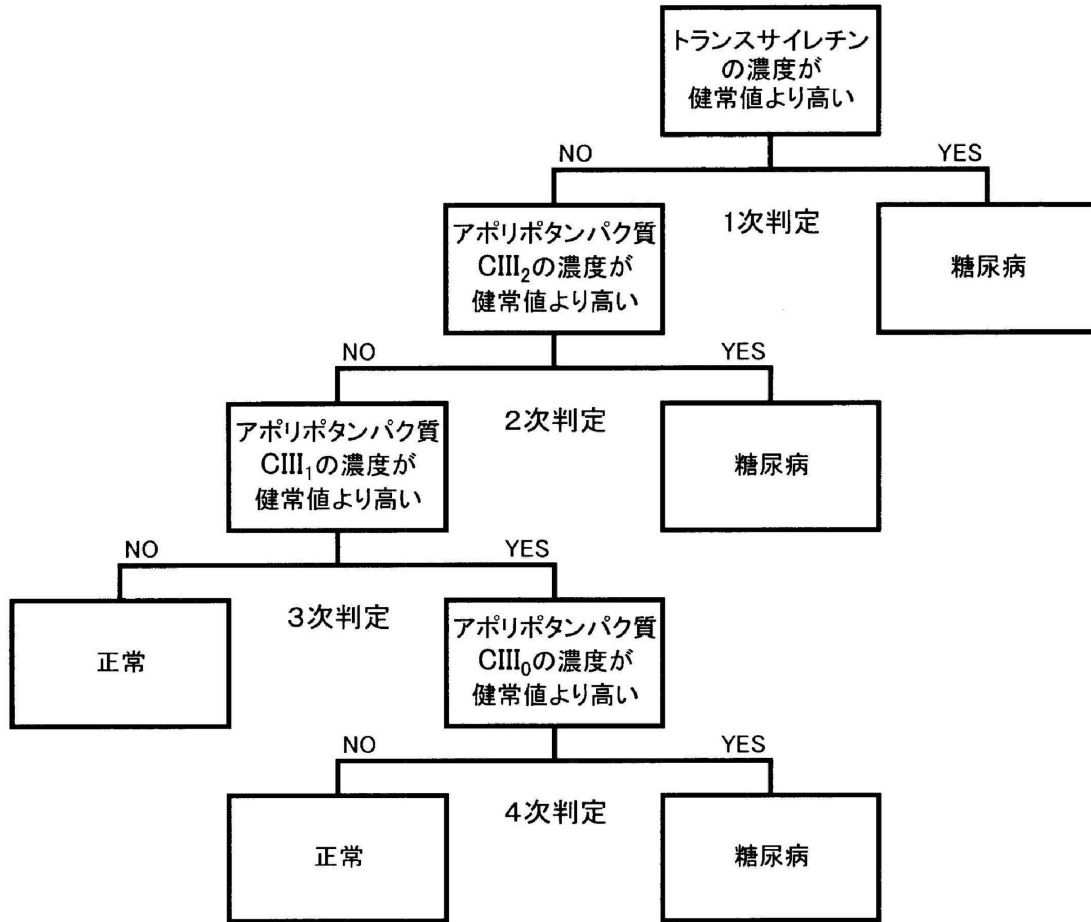
【 図 4 6 】



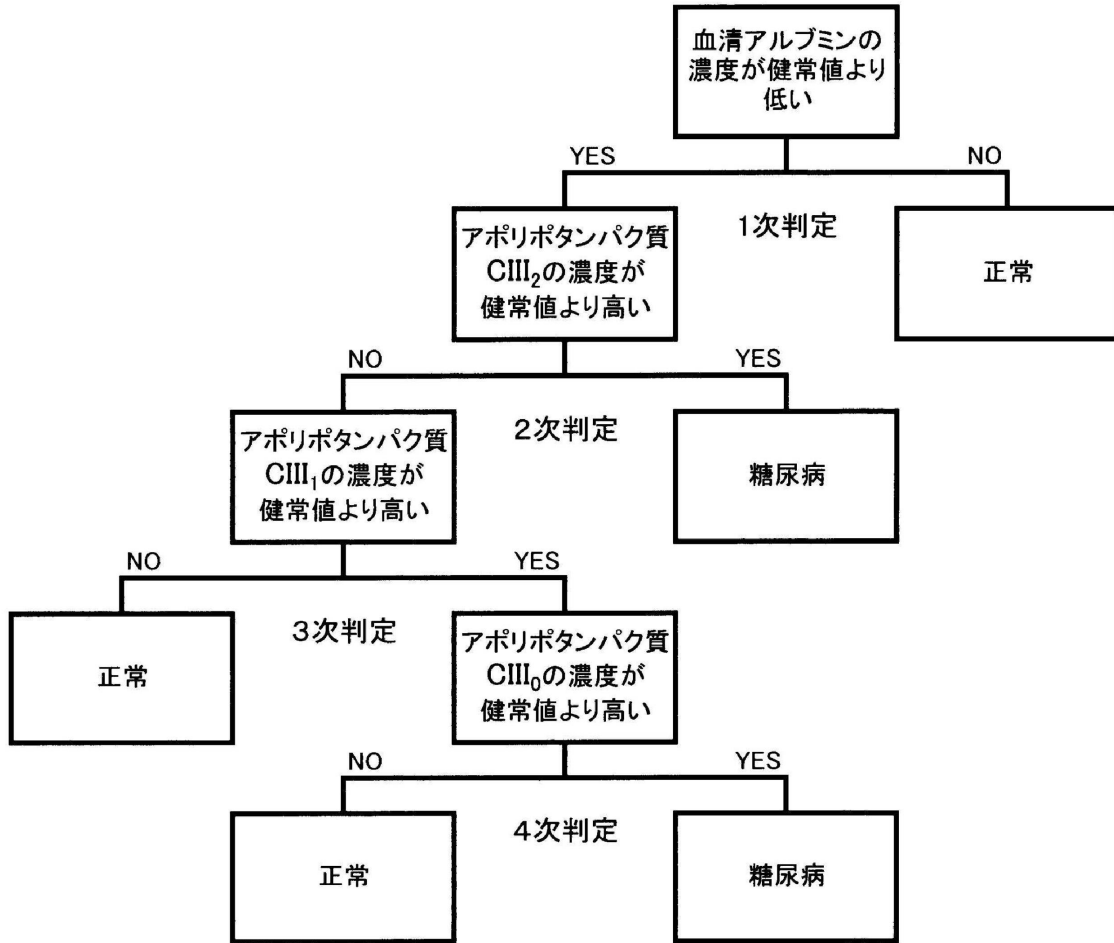
【 図 4 7 】



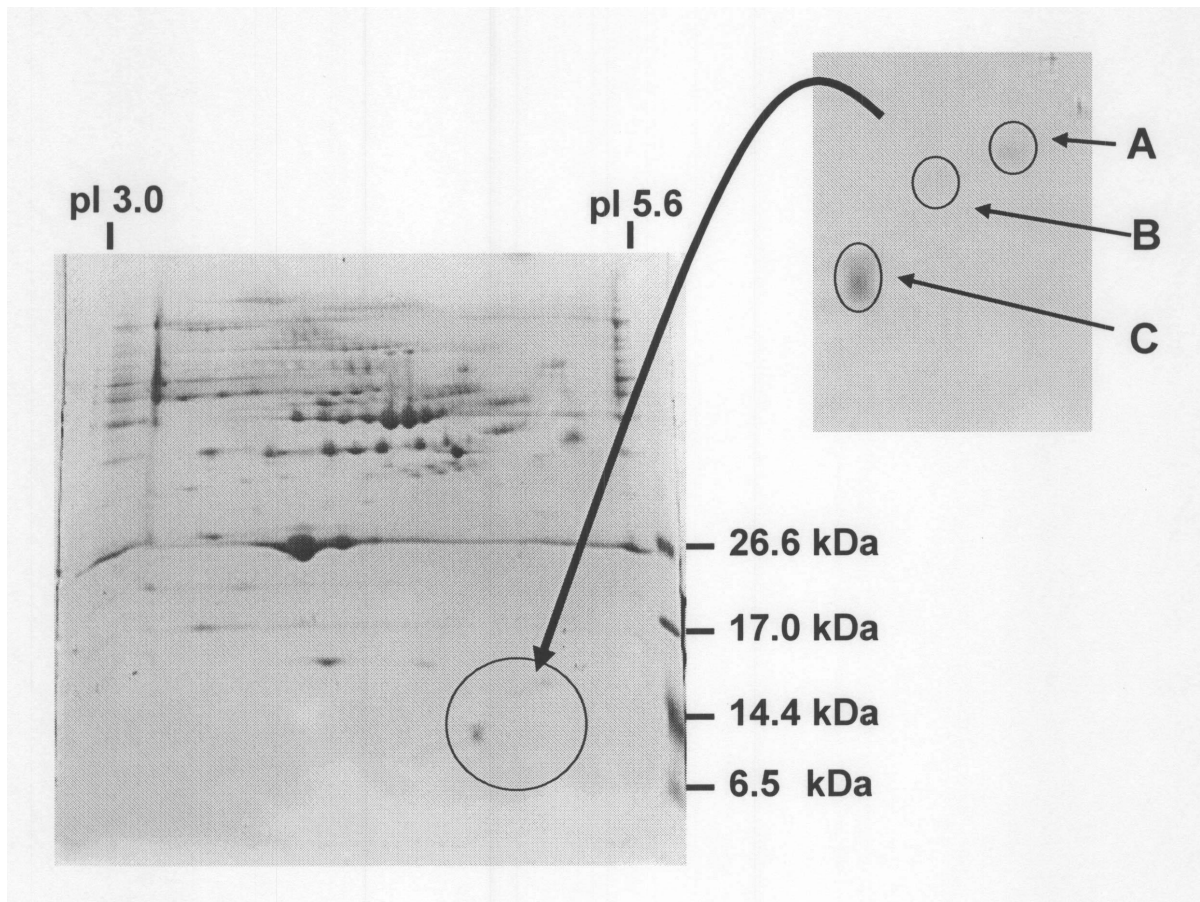
【図1】



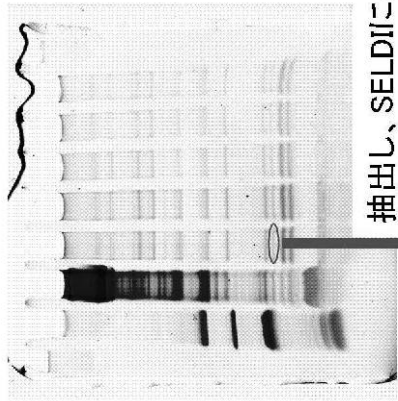
【 図 2 】



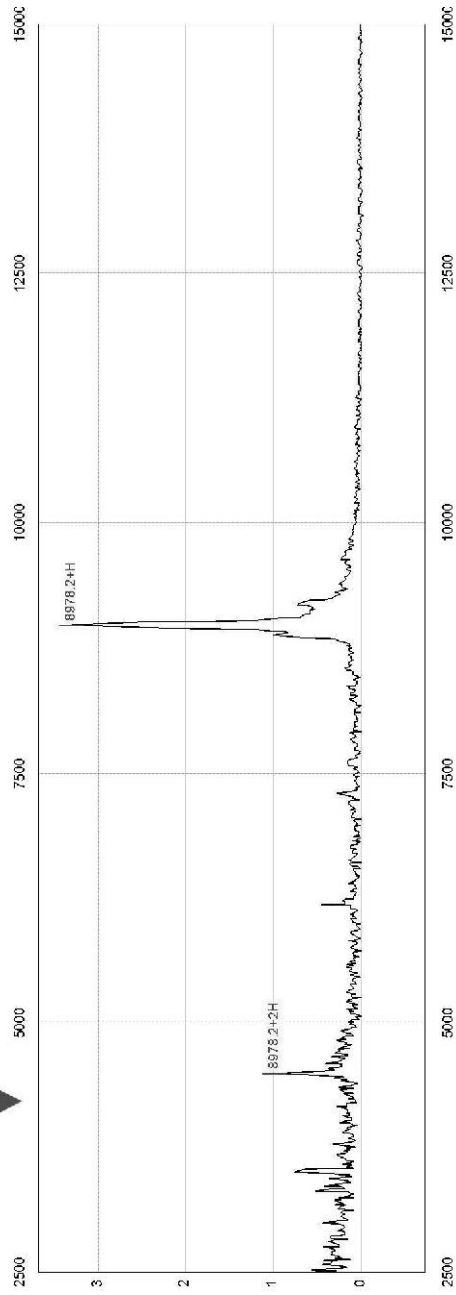
【 5 】



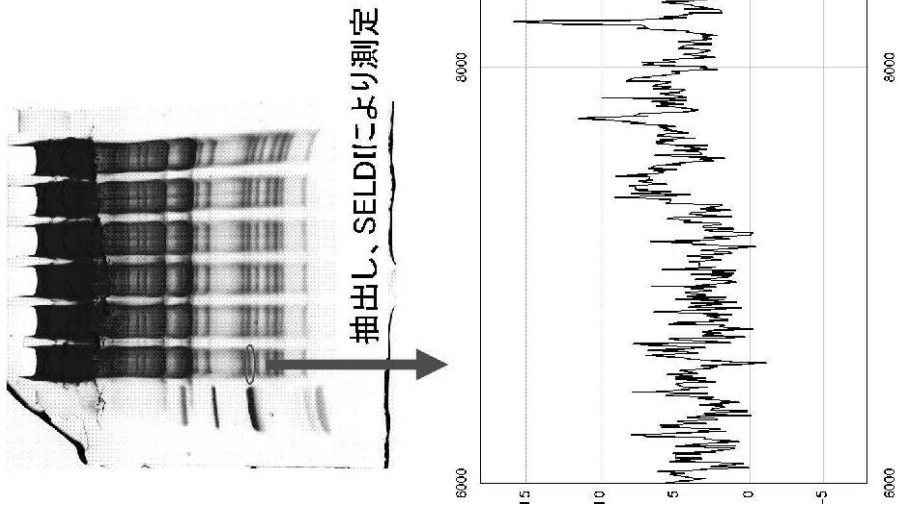
【 図 27 】



抽出し、SELDIにより測定



【 図 2 8 】



【 配列表 】

0005688829000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 内藤 裕二
京都府京都市上京区河原町広小路上る梶井町4 6 5番地 京都府立医科大学内
- (72)発明者 有國 尚
京都府京都市上京区河原町広小路上る梶井町4 6 5番地 京都府立医科大学内
- (72)発明者 赤桐 里美
京都府京都市上京区河原町広小路上る梶井町4 6 5番地 京都府立医科大学内
- (72)発明者 三原 憲一
京都府京都市西京区御陵大原1 - 3 6 株式会社バイオマーカーサイエンス京都桂研究所内
- (72)発明者 大木 利哉
京都府京都市西京区御陵大原1 - 3 6 株式会社バイオマーカーサイエンス京都桂研究所内
- (72)発明者 山口 亜尚
京都府京都市西京区御陵大原1 - 3 6 株式会社バイオマーカーサイエンス京都桂研究所内
- (72)発明者 真船 祥一
京都府京都市西京区御陵大原1 - 3 6 株式会社バイオマーカーサイエンス京都桂研究所内
- (72)発明者 高橋 豊
京都府京都市西京区御陵大原1 - 3 6 株式会社バイオマーカーサイエンス京都桂研究所内
- (72)発明者 中島 由美子
京都府京都市西京区御陵大原1 - 3 6 株式会社バイオマーカーサイエンス京都桂研究所内

審査官 赤坂 祐樹

- (56)参考文献 国際公開第03 / 102163 (WO, A1)
特開2002 - 340890 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33 / 48 - 98

G01N 27 / 62

G01N 33 / 15

MEDLINE (STN)

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)

专利名称(译)	差别糖尿病预测/诊断方法和糖尿病预测/诊断试剂盒		
公开(公告)号	JP5688829B2	公开(公告)日	2015-03-25
申请号	JP2007544210	申请日	2006-11-10
[标]申请(专利权)人(译)	吉川俊 バイオマーカーサイエンス		
申请(专利权)人(译)	吉川俊 株式会社バイオマーカーサイエンス		
当前申请(专利权)人(译)	吉川俊 株式会社バイオマーカーサイエンス		
[标]发明人	吉川敏一 内藤裕二 有國尚 赤桐里美 三原憲一 大木利哉 山口亜尚 真船祥一 高橋豊 中島由美子		
发明人	吉川 敏一 内藤 裕二 有國 尚 赤桐 里美 三原 憲一 大木 利哉 山口 亜尚 真船 祥一 ▲高▼橋 豊 中島 由美子		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/15 G01N33/50 G01N27/62		
CPC分类号	G01N33/66 G01N33/6893 G01N2800/042		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N27/62.V		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	2005327243 2005-11-11 JP 2006187238 2006-07-06 JP		
其他公开文献	JPWO2007055341A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明是在检测和预防糖尿病是有用的，提供了一种诊断或预诊断方法和诊断糖尿病或可以应用于多标记系统糖尿病的预诊断试剂盒。作为标记物质对糖尿病，转甲状腺素蛋白在血液中，载脂蛋白CII，CIII的载脂蛋白，选择选自它们的相关物质，这些浓度的健

康值选择的血清白蛋白和一种或多种蛋白质与糖相比事先诊断或诊断尿液疾病。作为测量标记物质浓度的方法，优选使用对标记物质特异的抗体。还可以捕获和测量载体上的标记物质。根据特定于标记物质可以诊断或预诊断更容易糖尿病诊断糖尿病或前诊断，包括抗体的试剂盒。

