

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5857312号
(P5857312)

(45) 発行日 平成28年2月10日 (2016. 2. 10)

(24) 登録日 平成27年12月25日 (2015. 12. 25)

(51) Int. Cl.

F 1

GO 1 N 27/62 (2006. 01)

GO 1 N 27/62 V

GO 1 N 33/53 (2006. 01)

GO 1 N 33/53 W

GO 1 N 33/68 (2006. 01)

GO 1 N 33/68 Z N A

GO 1 N 27/447 (2006. 01)

GO 1 N 27/26 3 O 1 A

C 1 2 Q 1/37 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/37

請求項の数 13 (全 98 頁)

(21) 出願番号 特願2011-175982 (P2011-175982)
 (22) 出願日 平成23年8月11日 (2011. 8. 11)
 (65) 公開番号 特開2013-40781 (P2013-40781A)
 (43) 公開日 平成25年2月28日 (2013. 2. 28)
 審査請求日 平成26年8月6日 (2014. 8. 6)

(73) 特許権者 390037327
 積水メディカル株式会社
 東京都中央区日本橋3丁目13番5号
 (73) 特許権者 504137912
 国立大学法人 東京大学
 東京都文京区本郷七丁目3番1号
 (74) 代理人 100123788
 弁理士 宮崎 昭夫
 (74) 代理人 100127454
 弁理士 緒方 雅昭
 (72) 発明者 田伏 洋
 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株
 式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 心疾患診断マーカー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験者から採取される血液サンプル中から、分取されるMDA - LDL中に含まれる、
 ApoB100タンパク質における、酸化の進行度を評価する方法であって、

下記(工程1)～(工程6)の工程を有しており、

(工程1)

抗MDA - LDLモノクローナル抗体を利用する免疫沈降法を適用して、被験者から採
 取される血液サンプル中から、MDA - LDLを分取する工程；

(工程2)

分取されるMDA - LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質に、トリプシンを
 作用させ、トリプシン酵素消化された、該ApoB100タンパク質由来のペプチド断片
 の群を調製する工程；

(工程3)

等電点電気泳動法を適用し、トリプシン酵素消化された、該ApoB100タンパク質
 由来のペプチド断片の群を、各ペプチド断片の等電点に従って、所定の等電点の区分に分
 画し、等電点に基づき分画された、複数のペプチド断片の部分群に分離する工程；

(工程4)

等電点に基づき分画された、複数のペプチド断片の部分群について、各ペプチド断片の
 部分群中に含有されている、ペプチド断片の質量(M_{peptide})を、質量分析手段として
 、MALDI - TOF - MS法を採用して測定し、各ペプチド断片の部分群中に含有され

10

20

ている、ペプチド断片を、その等電点 (pI) と質量 (M_{peptide}) に基づき、それぞれ、ペプチド断片 (pI, M_{peptide}) と特定し、各ペプチド断片 (pI, M_{peptide}) に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ を測定する工程；

(工程 5)

特定されたペプチド断片 (pI, M_{peptide}) の一群中から、下記の表 1 - 1 に示すアミノ酸残基位置の $Ly s$ 残基、ならびに、表 1 - 2 に示すアミノ酸残基位置の $Me t$ 残基からなる群より選択される、少なくとも一つの $Ly s$ 残基または $Me t$ 残基を含み、該 $Ly s$ 残基または $Me t$ 残基が酸化を受けている、 $Apo B 100$ タンパク質由来のペプチド断片に相当する酸化ペプチド断片を少なくとも一つ選択する工程；

10

【表 1 - 1】

表 1-1

リジン 残基番号

114	117	157
293	539	557 612 613
616	620	732 745 1034
1291	1295	1311 1344
1724	1852	2002 2004 2139
2208	2369	2371
2402	2403	2410 2418 2425
2426	2428	2575 2825 2829
3221	3227	3229 3404 3531
3537	3547	3673 3682
3944	3946	3973 3995 4021
4034	4145	4187 4261 4274
4278	4461	4478 4485

20

【表 1 - 2】

表 1-2

メチオニン

残基番号

750
755
4011
4013
4382

30

(工程 6)

選択された酸化ペプチド断片に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ の測定値、 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{measured}}$ に基づき、分取される $MDA - LDL$ 中に含まれる、 $Apo B 100$ タンパク質における、酸化の進行度を評価する工程；

40

前記工程 6 において、酸化の進行度の評価は、

(サブ・ステップ 6 - 1)

特定されたペプチド断片 (pI, M_{peptide}) の一群に含まれるペプチド断片の種類の総数を $N_{\text{total-peptide}}$ とし、特定されたペプチド断片 (pI, M_{peptide}) の一群に含まれる、総数 $N_{\text{total-peptide}}$ 種類のペプチド断片に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ の測定値に基づき、平均化を行って、ピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ の平均値、 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{av}}$ を算出する工程；

(サブ・ステップ 6 - 2)

選択された酸化ペプチド断片に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ の測定値、 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{measured}}$ に基づき、酸化の進行度を評価する工程；

50

$pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+$ の測定値、 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{measured}}$ と、算出されたピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{av}}$ の平均値、 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{av}}$ とを対比し、分取される MDA - LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質中において、選択された酸化ペプチド断片を内在する酸化 ApoB100 タンパク質の含有比率を推定する工程；

(サブ・ステップ 6 - 3)

分取される MDA - LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質中における、選択された酸化ペプチド断片を内在する酸化 ApoB100 タンパク質の含有比率が高いほど、分取される MDA - LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質における、酸化の進行度は高いと評価する工程；

10

上記、(サブ・ステップ 6 - 1) ~ (サブ・ステップ 6 - 3) の工程に基づき、酸化の進行度の評価を行う

ことを特徴とする、評価方法。

【請求項 2】

被験者から採取される血液サンプル中から、分取される MDA - LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質における、酸化の進行度を評価する方法であって、

下記(工程 1) ~ (工程 6) の工程を有しており、

(工程 1)

抗 MDA - LDL モノクローナル抗体を利用する免疫沈降法を適用して、被験者から採取される血液サンプル中から、MDA - LDL を分取する工程；

20

(工程 2)

分取される MDA - LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質に、トリプシンを作用させ、トリプシン酵素消化された、該 ApoB100 タンパク質由来のペプチド断片の群を調製する工程；

(工程 3)

等電点電気泳動法を適用し、トリプシン酵素消化された、該 ApoB100 タンパク質由来のペプチド断片の群を、各ペプチド断片の等電点に従って、所定の等電点の区分に分画し、等電点に基づき分画された、複数のペプチド断片の部分群に分離する工程；

(工程 4)

等電点に基づき分画された、複数のペプチド断片の部分群について、各ペプチド断片の部分群中に含有されている、ペプチド断片の質量 (M_{peptide}) を、質量分析手段として、MALDI - TOF - MS 法を採用して測定し、各ペプチド断片の部分群中に含有されている、ペプチド断片を、その等電点 (pI) と質量 (M_{peptide}) に基づき、それぞれ、ペプチド断片 (pI, M_{peptide}) と特定し、各ペプチド断片 (pI, M_{peptide}) に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ を測定する工程；

30

(工程 5)

特定されたペプチド断片 (pI, M_{peptide}) の一群中から、下記の表 2 に示すアミノ酸残基を含むペプチド断片からなる群より選択される、ペプチド断片を少なくとも一つ選択する工程；

40

【表 2】

表 2 番号	配列	残基番号	
		N-term.	C-term.
201	FDHTNSLNIAGLSLDFSSK (配列番号 1)	1751	1769
202	VPQDMTFR (配列番号 2)	1216	1224
203	DFSAEYEEDGK (配列番号 3)	3953	3963
204	ANLFNK (配列番号 4)	345	350
205	EFNLQNMGLPDFHIPENLFLK (配列番号 5)	1260	1280
206	IISDYHQQFR (配列番号 6)	4487	4496
207	LYSILK (配列番号 7)	2758	2763
208	IVSLIK (配列番号 8)	4407	4412
209	INNQLTLDSTNK (配列番号 9)	2877	2888
210	IHSGSFQSQVELSNDQEK (配列番号 10)	3639	3656
211	QTVNLQLQPYSLVTTLSNDLK (配列番号 11)	1782	1802
212	AQNLYQELLTQEGQASFGGLK (配列番号 12)	4148	4168
213	TQFNNNEYSQDLDAYNTK (配列番号 13)	1985	2002

10

(工程 6)

選択されたペプチド断片に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ の測定値、 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{measured}}$ に基づき、分取される MDA - LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質における、酸化の進行度を評価する工程；

前記工程 6 において、酸化の進行度の評価は、

20

(サブ・ステップ 6 - 1)

特定されたペプチド断片 (pI, M_{peptide}) の一群に含まれるペプチド断片の種類の総数を $N_{\text{total-peptide}}$ とし、特定されたペプチド断片 (pI, M_{peptide}) の一群に含まれる、総数 $N_{\text{total-peptide}}$ 種類のペプチド断片に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ の測定値に基づき、平均化を行って、ピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ の平均値、 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{av}}$ を算出する工程；

(サブ・ステップ 6 - 2)

選択されたペプチド断片に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ の測定値、 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{measured}}$ と、算出されたピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ の平均値、 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{av}}$ とを対比し、分取される MDA - LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質中において、選択されたペプチド断片をトリプシン消化により生成する酸化 ApoB100 タンパク質の含有比率を推定する工程；

30

(サブ・ステップ 6 - 3)

分取される MDA - LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質中における、選択されたペプチド断片をトリプシン消化により生成する酸化 ApoB100 タンパク質の含有比率が高いほど、分取される MDA - LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質における、酸化の進行度は高いと評価する工程；

上記、(サブ・ステップ 6 - 1) ~ (サブ・ステップ 6 - 3) の工程に基づき、酸化の進行度の評価を行う

40

ことを特徴とする、評価方法。

【請求項 3】

被験者から採取される血液サンプル中から、分取される MDA - LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質における、酸化の進行度を評価する方法であって、

下記 (工程 1) ~ (工程 6) の工程を有しており、

(工程 1)

抗 MDA - LDL モノクローナル抗体を利用する免疫沈降法を適用して、被験者から採取される血液サンプル中から、MDA - LDL を分取する工程；

(工程 2)

50

分取されるMDA - LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質に、トリプシンを作用させ、トリプシン酵素消化された、該ApoB100タンパク質由来のペプチド断片の群を調製する工程；

(工程3)

等電点電気泳動法を適用し、トリプシン酵素消化された、該ApoB100タンパク質由来のペプチド断片の群を、各ペプチド断片の等電点に従って、所定の等電点の区分に分画し、等電点に基づき分画された、複数のペプチド断片の部分群に分離する工程；

(工程4)

等電点に基づき分画された、複数のペプチド断片の部分群について、各ペプチド断片の部分群中に含有されている、ペプチド断片の質量(M_{peptide})を、質量分析手段として、MALDI - TOF - MS法を採用して測定し、各ペプチド断片の部分群中に含有されている、ペプチド断片を、その等電点(pI)と質量(M_{peptide})に基づき、それぞれ、ペプチド断片(pI, M_{peptide})と特定し、各ペプチド断片(pI, M_{peptide})に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ を測定する工程；

(工程5)

特定されたペプチド断片(pI, M_{peptide})の一群中から、下記の表3に示すMDA化Lys残基をその内部に含むペプチド断片、表4に示すDHP化Lys残基をその内部に含むペプチド断片、表5に示すMDA化Lys残基をそのC末端に含むペプチド断片、ならびに、表6に示す酸化されたMet残基を含むペプチド断片からなる群より選択される、少なくともLys残基またはMet残基が酸化を受けているペプチド断片に相当する酸化ペプチド断片を少なくとも一つ選択する工程；

【表3】

表3		残基番号	
番号	配列(リジンひとつがMDA化)	N-term	C-term
301	GASGTTGTQEMKDK (配列番号14)	4133	4147
302	LVGFIDDAVK (配列番号15)	2393	2403
303	NIQEYLSILTPDGK (配列番号16)	4447	4463
304	DLKMLETVR (配列番号17)	1309	1317
305	IKFDK (配列番号18)	3228	3232
306	HIYAISAAALSASYKADTVAK (配列番号19)	1838	1858
308	TKNSEEFAAAMSR (配列番号20)	116	128
309	LATALSLSNKFVEGSHNSTVSLTK (配列番号21)	3395	3419
配列(リジンふたつがMDA化)			
350	YTLNKNLKIETPLPFGGK (配列番号22)	1287	1305
351	INPLALKESVKFSSK (配列番号23)	2819	2833
352	SSVKLQGTSKIDDINLEVK (配列番号24)	3528	3547
353	LVKEVLKESQLPTVMDFR (配列番号25)	614	631
354	NNALDFVTKSYNETKIK (配列番号26)	3213	3229
355	KLKSFYHQFVDETNDK (配列番号27)	2426	2442
356	TQFNNNEYSQDLDAYNTKDKIGVELTGR (配列番号28)	1985	2012
357	KLNELSFKTFIEDVVK (配列番号29)	2403	2418
358	TFIEDVVKFLMLIKK (配列番号30)	2411	2426
359	KGISTSAASPAVGTVGMDMDEDDFSKWNFYSPQSSPDK (配列番号31)	3995	4034
360	GISTSAASPAVGTVGMDMDEDDFSKWNFYSPQSSPDKK (配列番号32)	3996	4035

【表 4】

表 4 番号	配列 (リジンひとつが DHP 化)	残基番号	
		N-term.	C-term.
401	DKDQEVLLQTFLDDASPGDK (配列番号 33)	538	557
402	ALVDTLKFTVQAEGAK (配列番号 34)	1028	1043
403	DDKHEQDMVNGIMLSVEK (配列番号 35)	743	760
404	LVKEVLK (配列番号 36)	614	620
405	ALLKK (配列番号 37)	111	115
406	DEPTYILNIKR (配列番号 38)	148	158
407	HKLIDVISMYR (配列番号 39)	4260	4270
408	LEDTPKINSR (配列番号 40)	288	297
409	YEGLEWEGKAHLNIK (配列番号 41)	3964	3979
410	QVSHAKEK (配列番号 42)	2134	2141
411	VKHLIDSLIDFLNFPR (配列番号 43)	4186	4201
412	NLTDFAEQYSIQDWAKR (配列番号 44)	2560	2576
413	ALYVWNGQVPDGVSKVLVDHFGYTK (配列番号 45)	718	742
配列 (リジンふたつが DHP 化)			
450	LVELAHQYKLKETIQK (配列番号 46)	2361	2376
451	ELLKDLSEAGEVEFK (配列番号 47)	4271	4285
452	IEDGTLASKTKGTFA HR (配列番号 48)	3936	3952
453	FLKNIIILPVYDKSLWDFLK (配列番号 49)	3671	3689
454	TFIEDVNFKFLMLIKK (配列番号 50)	2411	2426
455	NFVASHIANILNSEELDIQDLKLVK (配列番号 51)	591	616
457	LQGTSKIDDIWNLEVKENFAGEATLQR (配列番号 52)	3532	3558
458	IAELSATAQEIIKSQAIATKK (配列番号 53)	4466	4486

【表 5】

表 5 番号	配列 (MDA 化リジンがトリブシン作用を受ける場合)	残基番号	
		N-term.	C-term.
501	DQEVLLQTFLDDASPGDK (配列番号 54)	540	557
502	AALTELSLGSAYQAMILGVDSK (配列番号 55)	1703	1724
503	TQFNNNEYSQDLDAYNTK (配列番号 56)	1985	2002
504	IAIANIIDEIIEK (配列番号 57)	2196	2208
505	NNALDFVTK (配列番号 58)	3213	3221
506	EFQVPTFTIPK (配列番号 59)	1334	1344

【表 6】

表 6 番号	配列 (メチオニンが酸化)	残基番号	
		N-term.	C-term.
601	G1STSAASPAVGTVGMDMDDEDDFSK (配列番号 60)	3996	4021
602	FNEFIQNELQEASQELQIHQYIMLR (配列番号 61)	4359	4385
603	HEQDMVNGIMLSVEK (配列番号 62)	746	760

(工程 6)

選択された酸化ペプチド断片に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ の測定値、 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{measured}}$ に基づき、分取される MDA-LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質における、酸化の進行度を評価する工程；

前記工程 6 において、酸化の進行度の評価は、

(サブ・ステップ 6 - 1)

特定されたペプチド断片 (pI, M_{peptide}) の一群に含まれるペプチド断片の種類の総数を $N_{\text{total-peptide}}$ とし、特定されたペプチド断片 (pI, M_{peptide}) の一群に含まれる、総数 $N_{\text{total-peptide}}$ 種類のペプチド断片に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ の測定値に基づき、平均化を行って、ピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ の平均値、 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{av}}$ を算出する工程；

(サブ・ステップ 6 - 2)

10

20

30

40

50

選択された酸化ペプチド断片に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ の測定値、 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{measured}}$ と、算出されたピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ の平均値、 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{av}}$ とを対比し、分取される MDA - LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質中において、選択された酸化ペプチド断片を内在する酸化 ApoB100 タンパク質の含有比率を推定する工程；

(サブ・ステップ 6 - 3)

分取される MDA - LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質中における、選択された酸化ペプチド断片を内在する酸化 ApoB100 タンパク質の含有比率が高いほど、分取される MDA - LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質における、酸化の進行度は高いと評価する工程；

10

上記、(サブ・ステップ 6 - 1) ~ (サブ・ステップ 6 - 3) の工程に基づき、酸化の進行度の評価を行う

ことを特徴とする、評価方法。

【請求項 4】

工程 5 において、選択される酸化ペプチド断片の少なくとも一つは、

前記表 3 に示す MDA 化 Lys 残基をその内部に含むペプチド断片の一群から選択することを特徴とする、請求項 3 に記載の評価方法。

【請求項 5】

工程 1 における、免疫沈降法による MDA - LDL の分取に利用される、抗 MDA - LDL モノクローナル抗体は、MDA - LDL 中に含まれる、MDA 化を受けた ApoB100 タンパク質に特異的なモノクローナル抗体である

20

ことを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の評価方法。

【請求項 6】

また、工程 3 における、等電点電気泳動法を適用するペプチド断片の分画は、等電点タンパク質分離チップを利用して実施する

ことを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の評価方法。

【請求項 7】

被験者から採取される血液サンプル中から、分取される MDA - LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質における、酸化の進行度の評価結果に基づき、該 MDA - LDL が LDL から生成される過程の酸化ストレスの水準の高低を推定する方法であって、

30

下記の工程 A と工程 B を含み

(工程 A)

被験者から採取される血液サンプル中から、分取される MDA - LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質における、酸化の進行度の評価を、請求項 1 に記載の MDA - LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質における、酸化の進行度を評価する方法を利用して行う工程；

(工程 B)

被験者から採取される血液サンプル中から、分取される MDA - LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質における、酸化の進行度の評価結果に基づき、該 MDA - LDL が LDL から生成される過程において、該 MDA - LDL の生成が進行した環境の酸化ストレスの水準の高低を推定する工程；

40

前記工程 B において、酸化ストレスの水準の推定は、

分取される MDA - LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質中における、酸化の進行度が高いほど、該 MDA - LDL が LDL から生成される過程において、該 MDA - LDL の生成が進行した環境の酸化ストレスの水準は高いと推定する

ことを特徴とする、推定方法。

【請求項 8】

被験者から採取される血液サンプル中から、分取される MDA - LDL 中に含まれる、

50

A p o B 1 0 0 タンパク質における、酸化の進行度の評価結果に基づき、該 M D A - L D L が L D L から生成される過程の酸化ストレスの水準の高低を推定する方法であって、

下記の工程 A と工程 B を含み

(工程 A)

被験者から採取される血液サンプル中から、分取される M D A - L D L 中に含まれる、A p o B 1 0 0 タンパク質における、酸化の進行度の評価を、請求項 2 に記載の上記本発明の M D A - L D L 中に含まれる、A p o B 1 0 0 タンパク質における、酸化の進行度を評価する方法を利用して行う工程；

(工程 B)

被験者から採取される血液サンプル中から、分取される M D A - L D L 中に含まれる、A p o B 1 0 0 タンパク質における、酸化の進行度の評価結果に基づき、該 M D A - L D L が L D L から生成される過程において、該 M D A - L D L の生成が進行した環境の酸化ストレスの水準の高低を推定する工程；

前記工程 B において、酸化ストレスの水準の推定は、

分取される M D A - L D L 中に含まれる、A p o B 1 0 0 タンパク質中における、酸化の進行度が高いほど、該 M D A - L D L が L D L から生成される過程において、該 M D A - L D L の生成が進行した環境の酸化ストレスの水準は高いと推定する

ことを特徴とする、推定方法。

【請求項 9】

被験者から採取される血液サンプル中から、分取される M D A - L D L 中に含まれる、A p o B 1 0 0 タンパク質における、酸化の進行度の評価結果に基づき、該 M D A - L D L が L D L から生成される過程の酸化ストレスの水準の高低を推定する方法であって、

下記の工程 A と工程 B を含み

(工程 A)

被験者から採取される血液サンプル中から、分取される M D A - L D L 中に含まれる、A p o B 1 0 0 タンパク質における、酸化の進行度の評価を、請求項 3 に記載の M D A - L D L 中に含まれる、A p o B 1 0 0 タンパク質における、酸化の進行度を評価する方法を利用して行う工程；

(工程 B)

被験者から採取される血液サンプル中から、分取される M D A - L D L 中に含まれる、A p o B 1 0 0 タンパク質における、酸化の進行度の評価結果に基づき、該 M D A - L D L が L D L から生成される過程において、該 M D A - L D L の生成が進行した環境の酸化ストレスの水準の高低を推定する工程；

前記工程 B において、酸化ストレスの水準の推定は、

分取される M D A - L D L 中に含まれる、A p o B 1 0 0 タンパク質中における、酸化の進行度が高いほど、該 M D A - L D L が L D L から生成される過程において、該 M D A - L D L の生成が進行した環境の酸化ストレスの水準は高いと推定する

ことを特徴とする、推定方法。

【請求項 10】

心疾患の診断に先立ち、被験者の病態を把握する目的で実施する、被験者から採取される血液サンプル中から、分取される M D A - L D L 中に含まれる、A p o B 1 0 0 タンパク質における、酸化の進行度を評価する際、該評価に利用するマーカーとして、該酸化の進行度の評価に適する、A p o B 1 0 0 タンパク質由来の酸化ペプチド断片を選択する方法であって、

前記評価に利用するマーカーとして、

下記の表 7 - 1 に示すアミノ酸残基位置の L y s 残基、ならびに、表 7 - 2 に示すアミノ酸残基位置の M e t 残基からなる群より選択される、少なくとも一つの L y s 残基または M e t 残基を含み、該 L y s 残基または M e t 残基が酸化を受けている、A p o B 1 0 0 タンパク質由来のペプチド断片に相当する酸化ペプチド断片を少なくとも一つ選択する

10

20

30

40

50

【表 7 - 1】

表 7-1		
リジン	残基番号	
114	117	157
293	539	557 612 613
616	620	732 745 1034
1291	1295	1311 1344
1724	1852	2002 2004 2139
2208	2369	2371
2402	2403	2410 2418 2425
2426	2428	2575 2825 2829
3221	3227	3229 3404 3531
3537	3547	3673 3682
3944	3946	3973 3995 4021
4034	4145	4187 4261 4274
4278	4461	4478 4485

10

【表 7 - 2】

表 7-2	
メチオニン	残基番号
750	
755	
4011	
4013	
4382	

20

ことを特徴とする、マーカーの選択方法。

【請求項 11】

心疾患の診断に先立ち、被験者の病態を把握する目的で実施する、被験者から採取される血液サンプル中から、分取されるMDA-LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質における、酸化の進行度を評価する際、該評価に利用するマーカーとして、該酸化の進行度の評価に適する、ApoB100タンパク質由来のペプチド断片を選択する方法であって、

30

前記評価に利用するマーカーとして、

下記の表8に示すアミノ酸残基を含むペプチド断片からなる群より選択される、ペプチド断片を少なくとも一つ選択する

【表 8】

表 8 番号	配列	残基番号	
		N-term.	C-term.
201	FDHTNSLNIAGLSLDFSSK (配列番号1)	1751	1769
202	VPQDTMTFR (配列番号2)	1216	1224
203	DFSAEYEEDGK (配列番号3)	3953	3963
204	ANLFNK (配列番号4)	345	350
205	EFNLQNMGLPDFHIPENLFLK (配列番号5)	1260	1280
206	IISDYHQQFR (配列番号6)	4487	4496
207	LYSILK (配列番号7)	2758	2763
208	IVSLIK (配列番号8)	4407	4412
209	INNQLTLDSTNK (配列番号9)	2877	2888
210	IHSGSFQSQVELSNDQEK (配列番号10)	3639	3656
211	QTVNLQLQPYSLVTTLSNDLK (配列番号11)	1782	1802
212	AQNLQYELLTQEGQASFQGLK (配列番号12)	4148	4168
213	TQFNNNEYSQDLDAYNTK (配列番号13)	1985	2002

40

ことを特徴とする、マーカーの選択方法。

【請求項 12】

心疾患の診断に先立ち、被験者の病態を把握する目的で実施する、被験者から採取され

50

る血液サンプル中から、分取されるMDA - LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質における、酸化の進行度を評価する際、該評価に利用するマーカーとして、該酸化の進行度の評価に適する、ApoB100タンパク質由来の酸化ペプチド断片を選択する方法であって、

前記評価に利用するマーカーとして、

下記の表9に示すMDA化Lys残基をその内部に含むペプチド断片、表10に示すDHP化Lys残基をその内部に含むペプチド断片、表11に示すMDA化Lys残基をそのC末端に含むペプチド断片、ならびに、表12に示す酸化されたMet残基を含むペプチド断片からなる群より選択される、少なくともLys残基またはMet残基が酸化を受けているペプチド断片に相当する酸化ペプチド断片を少なくとも一つ選択する

10

【表9】

表9 番号	配列(リジンひとつがMDA化)	残基番号	
		N-term.	C-term.
301	GASGTTGTQEWKDK (配列番号14)	4133	4147
302	LVGFIDDAVKK (配列番号15)	2393	2403
303	NIQEYLSILTPDGK GK (配列番号16)	4447	4463
304	DLKMLETVR (配列番号17)	1309	1317
305	IKFDK (配列番号18)	3228	3232
306	HIYAISAAALSASYKADTVAK (配列番号19)	1838	1858
308	TKNSEEFAAAMSR (配列番号20)	116	128
309	LATALSLSNKFVEGSHNSTVSLTTK (配列番号21)	3395	3419
配列(リジンふたつがMDA化)			
350	YTLNKNLSKIEIPLPFGGK (配列番号22)	1287	1305
351	INPLALKESVKFSSK (配列番号23)	2819	2833
352	SSVKLQGTSKIDDIWNLEVK (配列番号24)	3528	3547
353	LVKEVLKESQLPTVMDFR (配列番号25)	614	631
354	NNALDFVTKSYNETKIK (配列番号26)	3213	3229
355	KLKSFQYHQFVDETNDK (配列番号27)	2426	2442
356	TQFNNNEYSQDLDAYNTKDKIGVELTGR (配列番号28)	1985	2012
357	KLNELSFKTFIEDVVK (配列番号29)	2403	2418
358	TFIEDVVKFLDMLIKK (配列番号30)	2411	2426
359	KGISTSAASPAVGTVGMDMDEDDFSKWNFYSPQSSPDK (配列番号31)	3995	4034
360	GISTSAASPAVGTVGMDMDEDDFSKWNFYSPQSSPDKK (配列番号32)	3996	4035

20

30

【表 10】

表 10 番号	配列 (リジンひとつが DHP 化)	残基番号	
		N-term.	C-term.
401	DKDQEVLLQTFLDDASPGDK (配列番号 33)	538	557
402	ALVDTLKVFVTAEGAK (配列番号 34)	1028	1043
403	DDKHEDMVGIMLSVEK (配列番号 35)	743	760
404	LVKEVLK (配列番号 36)	614	620
405	ALLKK (配列番号 37)	111	115
406	DEPTYILNIKR (配列番号 38)	148	158
407	HKLIDVISMYR (配列番号 39)	4260	4270
408	LEDTPKINSR (配列番号 40)	288	297
409	YEGLEWEGKAHLNIK (配列番号 41)	3964	3979
410	QVSHAKEK (配列番号 42)	2134	2141
411	VKHLIDSLIDFLNFPR (配列番号 43)	4186	4201
412	NLTDFAEQYSIQDWAKR (配列番号 44)	2560	2576
413	ALYWVNGQVPDGVSKVLVDHFGYTK (配列番号 45)	718	742
表 10 番号	配列 (リジンふたつが DHP 化)	残基番号	
		N-term.	C-term.
450	LVELAHQYKLKETIQK (配列番号 46)	2361	2376
451	ELLKDLKSEAQEVFK (配列番号 47)	4271	4285
452	IEDGTLASKTKGTFA HR (配列番号 48)	3936	3952
453	FLKNIIIPVYDKSLWDFLK (配列番号 49)	3671	3689
454	TFIEDVNFKLDMLIKK (配列番号 50)	2411	2426
455	NFVASHIANILNSEELDIQDLKKLVK (配列番号 51)	591	616
457	LQGTSKIDDIWNLEVKENFAGEATLQR (配列番号 52)	3532	3558
458	IAELSATAQEIIKSQAIAITKK (配列番号 53)	4466	4486

【表 11】

表 11 番号	配列 (MDA 化リジンがトリプシン作用を受ける場合)	残基番号	
		N-term.	C-term.
501	DQEVLLQTFLDDASPGDK (配列番号 54)	540	557
502	AALTELSLGSAYQAMILGVDSK (配列番号 55)	1703	1724
503	TQFNNNEYSQDLDAYNTK (配列番号 56)	1985	2002
504	IAIANIIDEIIEK (配列番号 57)	2196	2208
505	NNALDFVTK (配列番号 58)	3213	3221
506	EFQVPTFTIPK (配列番号 59)	1334	1344

【表 12】

表 12 番号	配列 (メチオニンが酸化)	残基番号	
		N-term.	C-term.
601	GISTSAAAPAVGTVGMDMDEDDFSK (配列番号 60)	3996	4021
602	FNEFIQNELQEASQELQQIHQYIMALR (配列番号 61)	4359	4385
603	HEQDMVNGIMLSVEK (配列番号 62)	746	760

ことを特徴とする、マーカーの選択方法。

【請求項 13】

選択される酸化ペプチド断片の少なくとも一つは、

前記表 9 に示す MDA 化 Lys 残基をその内部に含むペプチド断片の一群から選択することを特徴とする、請求項 12 に記載のマーカーの選択方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、心疾患、特に、虚血性心疾患の疾患進行度を反映する、血液中に可溶性成分として含有される、マーカー・タンパク質の酸化の進行度の評価方法と、該マーカー・タンパク質の酸化の進行度の評価に利用される、該マーカー・タンパク質由来の酵素消化ペプチド断片に関する。より具体的には、本発明は、虚血性心疾患の疾患進行度を反映する、血液中に可溶性成分として含有される、マーカー・タンパク質である、酸化を受けた低

10

20

30

40

50

比重リポタンパク質 (LDL; low-density lipoprotein) 中、特に、マロンジアルデヒド化 LDL (MDA-LDL) 中に含まれる Apolipoprotein B100 (ApoB100 タンパク質) の酸化の進行度の評価方法と、該 MDA-LDL 中に含まれる ApoB100 タンパク質の酸化の進行度の評価に利用される、酸化変性を受けた ApoB100 タンパク質由来の酵素消化ペプチド断片に関する。

【背景技術】

【0002】

分子生物学的技術の近年の急激な進展により、従来では得られなかった、疾患に関する生体分子の情報が急速に蓄積しつつある。なかでも、疾患に罹患した患者から採取される臨床サンプル中に含まれる生体分子の詳細な情報は、個別の疾患の病理的側面を反映している。従って、個別の疾患の病理的側面を反映する、生体分子の詳細な情報は、対象疾患の予防、診断、治療方法の開発、および治療に対する感受性の予測などに応用できることが期待されている。具体的には、対象疾患に関する生体分子の情報を応用した、個別化医療に向けた研究が活発に行われるようになっている。近年、生活習慣病がクローズアップされており、生活習慣病に関する生体分子の特定と、特定された生体分子の情報に基づく、分子レベルでの病態把握の重要性が認識されている。

10

【0003】

動脈硬化性疾患は、生活習慣病の一つである。実際、動脈硬化性疾患は、現在先進国での死因の高位を占めており (日本では第2位、心疾患15.9%、脳血管疾患11.8%、米国では第1位)、その予防対策は医学的・社会的に重要な課題となっている。動脈硬化、特に、アテローム性動脈硬化 (Atherosclerosis) の病態の進展、悪化の過程では、LDLが酸化・変性・糖化することに伴い、LDL受容体への親和性を失い、一方、マクロファージは、そのスカベンジャー受容体を介して酸化・変性・糖化を受けたLDLを結合し、細胞内に取り込み、泡沫細胞 (foam cell) を形成する過程が、中心的な役割を果たしている。従って、血液中に可溶性成分として含有されるLDL中、酸化・変性・糖化を受けたLDLの含有濃度、特に、酸化LDLの含有濃度、ならびに、その酸化部位を検出する手法の開発は、アテローム性動脈硬化における、分子レベルでの病態把握を可能とすると考えられる。

20

【0004】

実際、動脈硬化と酸化LDLの関連性の研究から、血漿中の酸化LDL濃度を上昇させる酸化ストレスが、アテローム性動脈硬化、ならびに、動脈硬化が起因となる心血管疾患の病態において、中心的な役割を果たすことが示唆されている (非特許文献1、非特許文献2参照)。よって、動脈硬化症、ならびに、動脈硬化が起因となる心血管疾患の病態を把握する目的から、臨床サンプル中の酸化LDL濃度の高精度測定の意義は大きい。

30

【0005】

LDLと共存している、酸化LDL、変性LDLの含有量を選択的に測定する方法として、酸化LDL、変性LDLに特異的な抗体を利用するELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 法が報告されている (非特許文献1、特許文献1参照)。

【0006】

ELISA法は、試料中に含まれる抗体あるいは抗原の濃度を検出・定量する際に広く用いられる手法である。特に、対象となる抗原に対して、特異的な抗体を利用することで、夾雑物が多数含まれる試料中に含有される、抗原を選択的に検出、定量する目的に適している。そのため、臨床サンプル中に含まれる、対象疾患に関連するタンパク質の有無、その定量を目的とする、スクリーニング検査に広く用いられている。例えば、sandwich-ELISA法では、対象となる抗原 (目的タンパク質) に特異的な二種の抗体を利用して、下記の手順 (1) ~ (6) により、対象となる抗原 (目的タンパク質) の検出が行われている。

40

(1) 目的タンパク質 (抗原) に対する抗体 (捕獲抗体) を固相に吸着させる。

(2) スキムミルクなどで固相のブロッキングを行う。

(3) 固相に試料溶液および捕獲抗体とは別のエピトープを認識する一次抗体を加える。

この時点で、固相 - 捕獲抗体 - 抗原 - 一次抗体という複合体が固相表面に形成される

50

。

(4) 反応しなかった抗原および一次抗体を洗い流す。

(5) 一次抗体に酵素が標識されていない場合は、酵素標識済みの二次抗体を作用させる。その後、余分な二次抗体を洗い流す。

(6) 標識酵素の基質（通常、発色あるいは発光試薬）を加え、酵素反応の生成物を検出する。

【0007】

sandwich-ELISA法は、標識酵素を利用して、該標識酵素の酵素反応の生成物を検出するため、高感度の検出が可能であるため、試料中に微量含有される抗原（目的タンパク質）を定量的に検出する際、広く採用されている。しかしながら、抗体が認識する部位（エピトープ）は、抗原（目的タンパク質）の特定の部分である。そのため、抗原（目的タンパク質）のエピトープ領域以外の部位に、酸化や変性が生じ、抗原（目的タンパク質）の様子が経時的に変化する場合、その経時的に変化をトレースすることは困難であることが多い。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】特許第3115587号公報

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】ITABE Hiroyuki, (2002), YAKIGAKU ZASSHI, Vol.122, No.10, p.745-753

【非特許文献2】Fogelman, A.M., Shechter, I., Seager, J., Hokom, M., Childe, J.S., Edward, P.A., (1980 April) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.77, No.4, p.2214-2218

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

上記のsandwich-ELISA法を利用する、対象抗原（目的タンパク質）の検出、定量方法は、捕獲抗体の認識部位（第一のエピトープ）、一次抗体認識部位（第二のエピトープ）がそれぞれ特異的であるため、この二つの認識部位以外の領域に、酸化や変性が生じているか、否かの判定はできない。

【0011】

従って、酸化LDL、変性LDLのうち、捕獲抗体の認識部位（第一のエピトープ）ならびに一次抗体認識部位（第二のエピトープ）を共に保持する酸化LDL、変性LDLの総量を定量する目的に利用されている。具体的には、捕獲抗体として、酸化LDL、変性LDLを認識するが、LDLは認識しない特異的な抗体を採用し、一方、一次抗体として、酸化LDL、変性LDL、LDLのいずれも認識する抗体を採用する検出系が報告されている（非特許文献1、特許文献1参照）。

【0012】

前記酸化LDL、変性LDLを認識するが、LDLは認識しない特異的な抗体として、例えば、抗酸化LDLモノクローナル抗体「DLH3」が報告されている（非特許文献1参照）。該「DLH3」抗体は、未処理のLDL、アセチル化LDL、MDA-LDL、糖化LDLとは結合せず、また、LDLに含まれるリン脂質のホスファチジルコリン（PC）、あるいは、その他の脂質（コレステロールエステルなど）とも結合せず、PCの酸化で生じる、アルデヒド型酸化PCと結合する。さらに、前記酸化LDL、変性LDLを認識するが、LDLは認識しない特異的な抗体として、例えば、ヒト・MDA-LDLに対するモノクローナル抗体も報告されている（特許文献1参照）。ヒト・MDA-LDLは、LDLの核となるタンパク質であるApoB100タンパク質に対して、マロンジアルデヒド（malondialdehyde, MDA）が結合したものである。LDLの酸化過程では、例え

ば、PCの過酸化過程に伴い、その高度不飽和脂肪酸の炭素鎖の酸化産物として、MDAを含む各種のアルデヒド分子が生成される。生成するMDAは、 $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$ $\text{HO}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CHO}$ のケト-エノール互変異性が可能であり、タンパク質に含まれるLys残基の側鎖上にあるアミノ基($-\text{NH}_2$)との反応により、例えば、 $-\text{NH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CHO}$ の形状の修飾を行う。

【0013】

従って、酸化LDLでは、少なくとも、含まれるリン脂質、例えば、PCの酸化と、ApoB100タンパク質に対するMDA化とが進行している。LDLと、LDL受容体との結合は、LDL受容体に対するApoB100タンパク質の結合に因っている。ApoB100タンパク質に対するMDA化が進行すると、LDL受容体に対するApoB100タンパク質の結合能が損なわれる。一方、マクロファージは、そのスカベンジャー受容体を介して、酸化LDLを結合し、細胞内に取り込み、泡沫細胞を形成する。

10

【0014】

生活習慣病の予防対策が政策の一つに挙げられるように、その対策の効果は、社会的・経済的に大きく波及する。なかでも、動脈硬化症は、虚血性心疾患、脳梗塞などの主因となる。従って、動脈硬化症の予防的対策は、医学的、社会的に重要な課題である。

【0015】

動脈硬化は、次のような機序で進行すると考えられている。血管内皮下層にコレステロールエステルが蓄積する。コレステロールエステルの蓄積が生じた部位には、平滑筋細胞、結合組織なども集まってくる。次いで、粥腫(アテローム)と呼ばれる状態を形成し、粥腫の形成に伴い、さらに肥厚する。最終的に、粥腫の形成部位では、血管は硬化し、動脈の機能が低下する。

20

【0016】

前述の動脈硬化の進行過程中、粥腫の形成段階は、泡沫細胞が主に関与している。粥腫の形成に関与する泡沫細胞は、マクロファージが、酸化LDLを取り込むことにより生じると報告されている。マクロファージによる酸化LDLの取り込みは、LDL受容体に対する親和性を失った酸化LDLを、スカベンジャー受容体を介して、該酸化LDLを結合し、その細胞内に取り込む機構に因っている。すなわち、該酸化LDLは、MDAがLDLの主成分タンパク質であるApoB100に結合して形成されるMDA-LDLの形状となっている。従って、酸化LDL、特に、MDA-LDLが、動脈硬化の初期病変に関与していることを査証する結果が報告されている(非特許文献2参照)。

30

【0017】

以上の動脈硬化症の進行の機序を考慮し、血液中の酸化LDL、特に、MDA-LDLの検出、定量を目的として、抗MDA-LDL抗体を利用するELISA法による検査が実用化されている(特許文献1参照)。しかしながら、抗MDA-LDL抗体を利用するELISA法による酸化LDLの検出は、酸化LDLの血中濃度の把握が主な目的であり、酸化LDL、特に、MDA-LDL中、ApoB100タンパク質中の酸化部位(MDA化部位)の特定には、利用できない。従って、酸化LDL、特に、MDA-LDL中、ApoB100タンパク質中の酸化部位(MDA化部位)と、動脈硬化症、さらには、虚血性心疾患を含め、アテローム性動脈硬化に起因する心疾患の病態との関連付けなどには、利用できない。その理由は、ELISA法による検査で利用する捕獲抗体は、抗原(目的タンパク質)の特定の部位(エピトープ)を高い選択性で認識するものであり、該特定の部位(エピトープ)以外の部分を俯瞰するには、本来、不向きであるためである。

40

【0018】

以上の状況から、現時点では、酸化LDL中のApoB100タンパク質に対する修飾状態と、動脈硬化の進行度や動脈硬化発症機序の詳細など、所謂、臨床情報との関連について、明確な報告は少ない。

【0019】

この現状を考慮した結果、本発明者らは、下記の課題が存在することを見出した。

【0020】

50

動脈硬化の進行、特に、アテローム性動脈硬化の進行は、酸化ストレスによるLDLの酸化の結果、酸化LDLの血中濃度の上昇と、酸化LDL中のApoB100タンパク質に対する修飾(MDA化)の結果、LDL受容体に対する親和性を失うことに起因している。従って、酸化LDLの血中濃度の測定に加えて、酸化LDL中のApoB100タンパク質における修飾(MDA化)状態を測定することは、酸化ストレスの水準を推定することを可能とする。加えて、酸化LDLの血中濃度の測定、酸化LDL中のApoB100タンパク質における修飾(MDA化)状態の測定を同時に行い、動脈硬化の進行度や動脈硬化発症機序の詳細など、所謂、臨床情報との関連を見出すと、動脈硬化の進行度を合理的に推定する際に有効な、臨床的検査手段の開発に役立つ。

【0021】

10

本発明は、前記の課題を解決するものである。すなわち、本発明の目的は、まず、酸化LDL中のApoB100タンパク質における酸化部位、修飾部位(MDA化部位)のうち、動脈硬化の進行度を反映して、酸化、修飾を受ける確率が明確に変化する、特異的な「酸化部位、修飾部位(MDA化部位)」の一群を特定することにある。同時に、本発明の目的は、特定される特異的な「酸化部位、修飾部位(MDA化部位)」の一群について、各「酸化部位、修飾部位(MDA化部位)」が酸化、修飾を受けているか、否かを、簡便に、高い確度で定量的に検出することが可能な、該特異的な「酸化部位、修飾部位(MDA化部位)」の酸化、修飾状態の検出方法を提供することにある。

【0022】

加えて、本発明の目的は、酸化LDL中のApoB100タンパク質における、該特異的な「酸化部位、修飾部位(MDA化部位)」の酸化、修飾状態の検出方法を利用し、該特異的な「酸化部位、修飾部位(MDA化部位)」が酸化、修飾を受けている比率を測定し、測定された比率に基づき、動脈硬化の進行度を統計的に推定する方法を提供することにある。

20

【0023】

従来、アテローム性動脈硬化を示す動脈硬化症、さらには、アテローム性動脈硬化に起因する心疾患、特に、虚血性心疾患の病態の進行度、すなわち、冠動脈病変枝数(ACI-TIPI score)の評価を行う際、しばしば、カテーテル検査が、冠動脈におけるアテローム性動脈硬化の進行の程度の評価に利用されていた。

【0024】

30

従って、本発明の目的は、前記冠動脈におけるアテローム性動脈硬化の進行の程度の評価に利用されているカテーテル検査に代えて、患者から採取した血液サンプルを用いて、該血液サンプル中に含まれる、酸化LDL中のApoB100タンパク質における、該特異的な「酸化部位、修飾部位(MDA化部位)」が酸化、修飾を受けている比率を測定し、測定された比率に基づき、冠動脈病変枝数の評価に利用可能な、動脈硬化の進行度を統計的に推定する方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0025】

本発明者らは、前記課題を解決すべく、酸化LDL中のApoB100タンパク質における酸化部位、修飾部位(MDA化部位)のうち、動脈硬化の進行度を反映して、酸化、修飾を受ける確率が明確に変化する、特異的な「酸化部位、修飾部位(MDA化部位)」の一群の特定を進めた。

40

【0026】

先ず、本発明者らは、以下の予想を行った。

【0027】

酸化LDLの血中濃度の上昇は、酸化ストレスに起因するLDLの酸化により引き起こされる。その過程では、LDLに含有される脂質を構成する、脂肪酸の炭素鎖、特に、高度不飽和脂肪酸の炭素鎖の酸化に伴い、酸化産物として、MDAを含む各種のアルデヒド分子が生成される。酸化ストレスの水準の高低に依存して、生成されるアルデヒド分子の量、例えば、MDAの量が異なる。MDAは、ApoB100タンパク質中のLys残

50

基側鎖のアミノ基と反応し、MDA化を行うが、生成されるMDAの量が増すと、MDA化されるLys残基数が増す。すなわち、酸化ストレスの水準の高低に依存して、酸化LDLの血中濃度が変動するのみでなく、生成する酸化LDL中のApoB100タンパク質中のMDA化Lys残基(MDA化部位)の総数も変動することが予想される。

【0028】

加えて、生成する酸化LDL中のApoB100タンパク質において、Met残基の側鎖-CH₂-S-CH₃のイオウ原子の酸化も進行する。酸化ストレスの水準が高くなるとともに、酸化を受けるMet残基数が増す。すなわち、酸化ストレスの水準の高低に依存して、酸化LDLの血中濃度が変動するのみでなく、生成する酸化LDL中のApoB100タンパク質中の酸化されたMet残基(酸化部位)の総数も変動することも予想される。

10

【0029】

その際、酸化ストレスの水準が低い状況下で生成される酸化LDL中のApoB100タンパク質中に見出されるMDA化Lys残基は、酸化ストレスの水準が高い状況下で生成される酸化LDL中のApoB100タンパク質中においても、同様にMDA化Lys残基となっている。一方、酸化ストレスの水準が低い状況下で生成される酸化LDL中のApoB100タンパク質中では見出されない、複数個のMDA化Lys残基が、酸化ストレスの水準が高い状況下で生成される酸化LDL中のApoB100タンパク質中には存在すると予想される。

【0030】

20

同様に、酸化ストレスの水準が低い状況下で生成される酸化LDL中のApoB100タンパク質中に見出される酸化化Met残基(酸化部位)は、酸化ストレスの水準が高い状況下で生成される酸化LDL中のApoB100タンパク質中においても、同様に酸化Met残基となっている。一方、酸化ストレスの水準が低い状況下で生成される酸化LDL中のApoB100タンパク質中では見出されない、複数個の酸化Met残基が、酸化ストレスの水準が高い状況下で生成される酸化LDL中のApoB100タンパク質中には存在すると予想される。

【0031】

次に、報告されている、ヒト・MDA-LDLに対するモノクローナル抗体(抗MDA-LDLモノクローナル抗体)は、酸化LDL中のMDA化ApoB100タンパク質に選択的に結合することに着目した。具体的には、酸化LDL中のMDA化ApoB100タンパク質中に存在する、複数個のMDA化Lys残基のうち、特定のMDA化Lys残基が、該抗MDA-LDLモノクローナル抗体のエピトープ中に含まれることに着目した。その際、該抗MDA-LDLモノクローナル抗体が、酸化ストレスの水準が低い状況下で生成される酸化LDL中のMDA化ApoB100タンパク質と、酸化ストレスの水準が高い状況下で生成される酸化LDL中のApoB100タンパク質の双方に結合する場合、エピトープ中に含まれる、特定のMDA化Lys残基は、酸化ストレスの水準の高低に依存せず、共通にMDA化を受けるLys残基(共通MDA化部位)の一つであると判断される。

30

【0032】

40

従って、血液に含まれる酸化LDLの定量に利用される、上記抗MDA-LDLモノクローナル抗体は、酸化ストレスの水準の高低に依存せず、共通にMDA化を受けるLys残基(共通MDA化部位)の一つを、そのエピトープ中に含んでいると判断される。換言すると、上記抗MDA-LDLモノクローナル抗体を捕獲抗体として使用する、免疫沈降法を適用すると、酸化ストレスの水準の高低に依存せず、共通にMDA化を受けるLys残基(共通MDA化部位)の一つを有するMDA化ApoB100タンパク質を含んでいる酸化LDL(MDA-LDL)を選択的に分離できると判断される。

【0033】

一方、従来から、酸化LDLの血中濃度を測定する際には、採取された血液サンプルから、細胞成分を除去した、血漿(blood plasma)、あるいは、細胞成分、繊維素原、凝固

50

因子を除去した、血清 (blood serum) を調製する。次いで、該血漿サンプル、または、血清サンプル中に含まれる酸化 LDL の濃度を、E L I S A 法により測定している。該血漿サンプル、または、血清サンプル中には、酸化されていない LDL と、酸化 LDL が含まれている。酸化ストレスの水準が高い状況下においても、酸化されていない LDL の含有濃度 C_{LDL} と、酸化 LDL の含有濃度 C_{OxLDL} の比率は、 $(C_{OxLDL} / C_{LDL}) < 1 \text{ ng} / \mu \text{g LDL}$ の範囲に留まる。実際、冠動脈病変枝数が高い、急性心筋梗塞 (AMI) 患者において測定される $(C_{OxLDL} / C_{LDL})_{AMI}$ と、冠動脈病変枝数が低い、健常者において測定される $(C_{OxLDL} / C_{LDL})_{normal}$ を比較すると、その平均値は、 $(C_{OxLDL} / C_{LDL})_{AMI} / (C_{OxLDL} / C_{LDL})_{normal}$ は 3 . 5 程度であると報告されている (非特許文献 1 参照)。

10

【0034】

免疫沈降法を適用することで分離される、酸化 LDL は、実際は、その酸化の程度にある範囲の分布を有する、酸化 LDL の混合物となっている。酸化ストレスの水準の高低に依存して、生成される酸化 LDL の混合物中における、酸化の程度の分布が相違している。その酸化の程度の分布の相違に起因して、生成する酸化 LDL 中の Apo B 100 タンパク質中の MDA 化 Lys 残基の総数の分布、ならびに、酸化 Met 残基の総数の分布に相違が生じていると予想される。

【0035】

ビーズ担体、例えば、磁気ビーズの表面に、抗 MDA - LDL モノクローナル抗体を固定化した、抗体固定ビーズを用いる免疫沈降法を適用して、酸化 LDL 中、MDA - LDL を選択的に抗体に結合した後、固液分離によりビーズを回収し、洗浄すると、酸化 LDL のうち、MDA - LDL のみを分離することができる。

20

【0036】

抗 MDA - LDL モノクローナル抗体に選択的に結合されている、酸化 LDL (MDA - LDL) は、MDA 化 Apo B 100 タンパク質と、酸化を受けた脂質とで構成されている。その際、結合されている酸化 LDL (MDA - LDL) に、切断部位特異性を有するプロテアーゼを用いた消化処理、例えば、トリプシン消化処理を施すと、MDA 化 Apo B 100 タンパク質はペプチド断片化される。生成される一群のペプチド断片は、液相中に溶出される。MDA 化 Apo B 100 タンパク質の断片化に伴い、液相に溶出する、一群のペプチド断片は、脂質成分とも分離される。固液分離により、液相とビーズを分離し、液相を回収すると、回収された液相中に、MDA 化 Apo B 100 タンパク質の酵素消化で生成する、一群のペプチド断片が回収される。Apo B 100 タンパク質自体は、4563 アミノ酸残基からなる巨大タンパク質であるため、Apo B 100 タンパク質のトリプシン消化処理で生成する、一群のペプチド断片の総数は、400 種類を超える。

30

【0037】

従って、一群のペプチド断片を全て分離した上で、個々のペプチド断片中に、MDA 化 Lys 残基 (MDA 化部位) あるいは、酸化された Met 残基 (酸化部位) が存在するか、否かを判定することは、原理的には不可能ではないが、技術的には困難である。その点を考慮し、400 種類を超える一群のペプチド断片を、その等電点 (pI) に基づき、複数のグループに分画すると、分画された個々のグループは、20 種類程度のペプチド断片からなる群とできることを見出した。また、各グループを構成する、20 種類程度のペプチド断片は、その等電点 (pI) は類似しているが、偶々、分子量 ($M_{peptide}$) が一致している二種のペプチド断片が、同じグループに含まれる確率は、殆ど皆無であることに想到した。

40

【0038】

従って、その等電点 (pI) が類似している、各グループを構成する、20 種類程度のペプチド断片について、質量分析法を利用して、ペプチド断片の分子量 ($M_{peptide}$) を測定すると、各ペプチド断片は、(pI, $M_{peptide}$) のペプチド断片として、検出できることを見出した。

【0039】

50

その際、各ペプチド断片のアミノ酸配列は、A p o B 1 0 0 タンパク質のアミノ酸配列中の部分アミノ酸配列である。例えば、トリプシン消化処理では、A r g 残基またはL y s 残基のC末端側でペプチド鎖の切断がなされるので、各ペプチド断片のC末端のアミノ酸残基は、A r g 残基またはL y s 残基であり、各ペプチド断片のN末端のアミノ酸残基は、A p o B 1 0 0 タンパク質のアミノ酸配列中、A r g 残基またはL y s 残基のC末側に位置するアミノ酸残基となっている。

【 0 0 4 0 】

A p o B 1 0 0 タンパク質のアミノ酸配列中、前記の条件を満足する部分アミノ酸配列を選別して、該部分アミノ酸配列からなる「推定ペプチド断片」の一群を作製し、各「推定ペプチド断片」について、「部分アミノ酸配列」から推定される分子量 ($M_{\text{predicted-peptide}}$) を算出する。測定された (pI, M_{peptide}) のペプチド断片の分子量 (M_{peptide}) と、測定誤差範囲内で一致する、「部分アミノ酸配列」から推定される分子量 ($M_{\text{predicted-peptide}}$) が見出されると、測定された (pI, M_{peptide}) のペプチド断片のアミノ酸配列は、その「部分アミノ酸配列」であると、高い確度で推定できることを見出した。

10

【 0 0 4 1 】

一方、測定された (pI, M_{peptide}) のペプチド断片が、MDA化L y s 残基 (MDA化部位) または酸化M e t 残基 (酸化部位) を含む場合、測定された分子量 (M_{peptide}) と、測定誤差範囲内で一致する、「部分アミノ酸配列」から推定される分子量 ($M_{\text{predicted-peptide}}$) が見出される確率は、殆ど皆無であることに想到した。換言すると、測定された (pI, M_{peptide}) のペプチド断片のうち、測定された分子量 (M_{peptide}) と、測定誤差範囲内で一致する、「部分アミノ酸配列」から推定される分子量 ($M_{\text{predicted-peptide}}$) が見出されないものは、そのアミノ酸配列中に、MDA化L y s 残基 (MDA化部位) または酸化M e t 残基 (酸化部位) を含む可能性があることに想到した。測定された (pI, M_{peptide}) のペプチド断片のうち、測定された分子量 (M_{peptide}) と、測定誤差範囲内で一致する、「部分アミノ酸配列」から推定される分子量 ($M_{\text{predicted-peptide}}$) が見出されないものは、そのアミノ酸配列中に、少なくとも、何らかの修飾を受けたアミノ酸残基を含む可能性が高いことに想到した。

20

【 0 0 4 2 】

酸化ストレスの水準の高低に依存して、生成される酸化L D L の混合物中における、酸化の程度の分布が相違している。その酸化の程度の分布の相違に起因して、生成する酸化L D L 中のA p o B 1 0 0 タンパク質中のMDA化L y s 残基の総数の分布、ならびに、酸化M e t 残基の総数の分布に相違が生じていると予想される。

30

【 0 0 4 3 】

従って、酸化ストレスの水準の高低に依存して、酸化L D L 中、特に、MDA - L D L 中のA p o B 1 0 0 タンパク質に由来する、一群のペプチド断片中、そのアミノ酸配列中にMDA化L y s 残基または酸化M e t 残基を含んでいるペプチド断片 (pI, M_{peptide}) の含有濃度 $C(pI, M_{\text{peptide}})$ も、変動すると予測される。例えば、MDA - L D L の含有濃度 $C_{\text{MDA-LDL}}$ と、MDA化L y s 残基または酸化M e t 残基を含んでいるペプチド断片 (pI, M_{peptide}) の含有濃度 $C(pI, M_{\text{peptide}})$ との比、 $(C(pI, M_{\text{peptide}}) / C_{\text{MDA-LDL}})$ は、酸化ストレスの水準の高低に依存して、変動すると予測される。その際、酸化ストレスの水準の高低に依存せず、MDA - L D L 中のA p o B 1 0 0 タンパク質中に共通して見出される、MDA化L y s 残基または酸化M e t 残基を含んでいるペプチド断片 (pI, M_{peptide}) では、 $(C(pI, M_{\text{peptide}}) / C_{\text{MDA-LDL}})$ は、酸化ストレスの水準の高低に起因する変動は小さいと予想される。一方、酸化ストレスの水準の高低に依存して、MDA - L D L 中のA p o B 1 0 0 タンパク質中に見出される確率が大きく変動する、MDA化L y s 残基または酸化M e t 残基を含んでいるペプチド断片 (pI, M_{peptide}) では、 $(C(pI, M_{\text{peptide}}) / C_{\text{MDA-LDL}})$ は、酸化ストレスの水準の高低に起因する変動は大きいと予想される。

40

【 0 0 4 4 】

50

前記の予想を考慮して、本発明者らは、MDA-LDL中のApoB100タンパク質のアミノ酸配列中に、MDA化Lys残基または酸化Met残基を含む可能性があると推定されるペプチド断片($pI, M_{peptide}$)の群を選別し、さらに、MDA化Lys残基または酸化Met残基を含む可能性があると推定されるペプチド断片($pI, M_{peptide}$)の群のうち、 $(C(pI, M_{peptide}) / C_{MDA-LDL})$ における、酸化ストレスの水準の高低に起因する変動が一定水準を超えている、部分群の選別を進めた。

【0045】

その際、酸化LDLである、MDA-LDLの1粒子には、ApoB100タンパク質が1分子のみ含まれている点に着目して、MDA-LDLの含有濃度 $C_{MDA-LDL}$ の測定に代えて、MDA-LDL中のApoB100タンパク質分子の含有濃度 $C_{MDA-LDL-ApoB100}$ と、ペプチド断片($pI, M_{peptide}$)の含有濃度 $C(pI, M_{peptide})$ との比、 $(C(pI, M_{peptide}) / C_{MDA-LDL-ApoB100})$ を採ると、 $(C(pI, M_{peptide}) / C_{MDA-LDL-ApoB100}) = (C(pI, M_{peptide}) / C_{MDA-LDL})$ と見做すことが可能であることを見出した。

【0046】

酸化LDLである、MDA-LDL中のApoB100タンパク質の酵素消化で生成する、総種類数 $N_{peptide}$ の一群のペプチド断片($pI, M_{peptide}$)の含有濃度 $C(pI, M_{peptide})$ の平均値、 $C(pI, M_{peptide})_{av.} = (\sum C(pI, M_{peptide})) / N_{peptide}$ は、MDA-LDL中のApoB100タンパク質分子の含有濃度 $C_{MDA-LDL-ApoB100}$ とほぼ等しくなる、すなわち、 $C(pI, M_{peptide})_{av.} = C_{MDA-LDL-ApoB100}$ となる。

【0047】

また、等電点電気泳動により、その等電点(pI)に基づき、グループ化した後、各グループを構成するペプチド断片の群から、質量分析によって、($pI, M_{peptide}$)のペプチド断片として分別された、($pI, M_{peptide}$)のペプチド断片由来のイオン種 $[M_{peptide} + H]^+$ のピーク強度 $I(pI, [M_{peptide} + H]^+)$ は、該($pI, M_{peptide}$)のペプチド断片の含有濃度 $C(pI, M_{peptide})$ に比例している。($pI, M_{peptide}$)のペプチド断片から、該ペプチド断片由来のイオン種 $[M_{peptide} + H]^+$ の生成効率(イオン化効率) $p(pI, M_{peptide})$ を考慮すると、 $I(pI, [M_{peptide} + H]^+) = p(pI, M_{peptide}) \cdot C(pI, M_{peptide})$ と近似的に表記できる。

【0048】

総種類数 $N_{peptide}$ の一群のペプチド断片($pI, M_{peptide}$)について、測定された該($pI, M_{peptide}$)のペプチド断片由来のイオン種 $[M_{peptide} + H]^+$ について、 $I(pI, [M_{peptide} + H]^+) / p(pI, M_{peptide}) = C(pI, M_{peptide})$ の平均値、 $\{I(pI, [M_{peptide} + H]^+) / p(pI, M_{peptide})\}_{av.} = (\sum \{I(pI, [M_{peptide} + H]^+) / p(pI, M_{peptide})\}) / N_{peptide} = (\sum C(pI, M_{peptide})) / N_{peptide}$ は、MDA-LDL中のApoB100タンパク質分子の含有濃度 $C_{MDA-LDL-ApoB100}$ に比例する。すなわち、 $\{I(pI, [M_{peptide} + H]^+) / p(pI, M_{peptide})\}_{av.} = C_{MDA-LDL-ApoB100}$ の比例関係が成り立つ。

【0049】

さらには、測定された該($pI, M_{peptide}$)のペプチド断片由来のイオン種 $[M_{peptide} + H]^+$ のピーク強度 $I(pI, [M_{peptide} + H]^+)$ と、 $\{I(pI, [M_{peptide} + H]^+) / p(pI, M_{peptide})\}_{av.}$ の比、 $I(pI, [M_{peptide} + H]^+) / \{I(pI, [M_{peptide} + H]^+) / p(pI, M_{peptide})\}_{av.}$ は、 $(C(pI, M_{peptide}) / C_{MDA-LDL-ApoB100})$ に比例する。すなわち、 $I(pI, [M_{peptide} + H]^+) / \{I(pI, [M_{peptide} + H]^+) / p(pI, M_{peptide})\}_{av.} = (C(pI, M_{peptide}) / C_{MDA-LDL-ApoB100})$ の比例関係が成り立つ。

【0050】

上記の比例関係を利用して、本発明者らは、($pI, M_{peptide}$)のペプチド断片由来のイオン種 $[M_{peptide} + H]^+$ のピーク位置 $m/z = (M_{peptide} + 1) / 1$ から特定される分子量($M_{peptide}$)に基づき、そのアミノ酸配列中に、MDA化Lys残基または酸化M

e t 残基を含む可能性がある」と推定されるペプチド断片 (pI, M_{peptide}) の群を選別し、さらに、MDA 化 L y s 残基または酸化 M e t 残基を含む可能性がある」と推定されるペプチド断片 (pI, M_{peptide}) の群のうち、 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+) / I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{av.}}$ における、酸化ストレスの水準の高低に起因する変動が一定水準を超えている、部分群の選別を行った。 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+) / I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{av.}}$ ($C(pI, M_{\text{peptide}}) / C_{\text{MDA-LDL-ApoB100}}$) の比例関係を考慮すると、選別される部分群は、($C(pI, M_{\text{peptide}}) / C_{\text{MDA-LDL}}$) における、酸化ストレスの水準の高低に起因する変動が一定水準を超えている、部分群と実質的に等価となる。

【0051】

10

特に、質量分析法として、Matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS)法を採用すると、トリプシン消化処理により得られる、そのC末端のアミノ酸残基は、A r g 残基またはL y s 残基であるペプチド断片に由来する、イオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ の生成効率 (イオン化効率) $p(pI, M_{\text{peptide}})$ は相対的に高い。そのため、測定された該 (pI, M_{peptide}) のペプチド断片由来のイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ の測定確度も高くなることを確認した。

【0052】

加えて、トリプシン消化処理により得られる、ペプチド断片は、A r g 残基またはL y s 残基のC末端側で酵素消化されているため、原則的に、そのC末端のA r g 残基またはL y s 残基以外に塩基性アミノ酸残基を有していない。従って、トリプシン消化処理により得られる、ペプチド断片の等電点 pI は、概ね、塩基性アミノ酸のA r g またはL y s のいずれか一つと、含まれている酸性アミノ酸のA s p とG l u の総数に依存する。その特徴を利用すると、含有される酸性アミノ酸の総数が0である部分群、含有される酸性アミノ酸の総数が1である部分群、含有される酸性アミノ酸の総数が2以上である部分群に区分でき、それぞれの部分群は、 pI に基づき、分離可能であることを確認した。すなわち、偶々、ペプチド断片の分子量 (M_{peptide}) が一致している場合、該ペプチド断片中に含有される酸性アミノ酸の総数が相違すると、その pI は有意な差異を示すので、それぞれのペプチド断片 (pI, M_{peptide}) は、等電点電気泳動により、予め分離することが可能であることを確認した。

20

30

【0053】

さらに、そのアミノ酸配列中に、MDA 化 L y s 残基を含む場合、トリプシン消化処理を施した際、MDA 化 L y s 残基のC末端側で酵素消化される確率は、MDA 化を受けていないL y s 残基のC末端側で酵素消化される確率と比較して、有意に低くなることも確認した。従って、MDA 化 L y s 残基のC末端側で酵素消化を受けず、連続する二つのペプチド断片が連結された形状の、MDA 化 L y s 残基を内部に含有する特異なペプチド断片が得られることも確認した。すなわち、MDA 化の進行とともに、連続する二つのペプチド断片が連結された形状の、MDA 化 L y s 残基を内部に含有する特異なペプチド断片の濃度が相対的に上昇することも確認した。

【0054】

40

一方、L y s 残基がMDA 化を受けていない場合、そのL y s 残基のC末端側で酵素消化されない確率は、一般に低いため、連続する二つのペプチド断片が連結された形状のペプチド断片の濃度は、通常、低い水準に留まる。また、連続する二つのペプチド断片が連結された形状のペプチド断片と、連続する二つのペプチド断片が連結された形状の、MDA 化 L y s 残基を内部に含有する特異なペプチド断片とは、含まれる酸性アミノ酸の総数は等しいは、塩基性アミノ酸の数に相違があるため、その等電点 (pI) は明確に相違している。従って、この二つのペプチド断片は、等電点電気泳動により、予め分離することが可能である。

【0055】

同時に、MDA 化の進行とともに、MDA 化 L y s 残基のC末端側で酵素消化を受ける

50

ことで生成するペプチド断片の濃度も、相対的に上昇することも確認した。但し、トリプシン消化処理を施した際、MDA化Lys残基のC末端側で酵素消化される確率は、一般に低いため、MDA化Lys残基のC末端側で酵素消化を受けることで生成するペプチド断片の濃度は、通常、低い水準に留まる。しかし、MDA化の進行が顕著となると、MDA化Lys残基のC末端側で酵素消化を受けることで生成するペプチド断片の濃度は、相当の水準に達する。MDA化Lys残基のC末端側で酵素消化を受けることで生成するペプチド断片は、MDA化Lys残基を有していない、同じアミノ酸配列を有するペプチド断片と、含有する酸性アミノ酸の総数は同じであるが、Lys残基に代えて、MDA化Lys残基を有しており、その等電点(pI)は酸性側に有意に偏移している。従って、この二つのペプチド断片は、等電点電気泳動により、予め分離することが可能である。

10

【0056】

酸化Met残基を含むペプチド断片と、酸化Met残基を含まず、同じアミノ酸配列を有するペプチド断片は、含有する酸性アミノ酸の総数は等しいため、類似する等電点(pI)を示す。勿論、酸化Met残基と酸化を受けていないMet残基の質量は相違しているため、質量分析により、この二つのペプチド断片を区別することが可能である。Met残基の酸化の進行とともに、酸化Met残基を含むペプチド断片の濃度が上昇し、一方、酸化Met残基を含まず、同じアミノ酸配列を有するペプチド断片の濃度は減少する。酸化Met残基を含むペプチド断片の濃度上昇は、Met残基の酸化の進行を反映する指標となる。

【0057】

20

以上の点を考慮すると、そのアミノ酸配列中に、MDA化Lys残基または酸化Met残基を含むペプチド断片(pI, $M_{peptide}$)のうち、特に、酸化Met残基を含むペプチド断片、連続する二つのペプチド断片が連結された形状の、MDA化Lys残基を内部に含有する特異なペプチド断片、MDA化Lys残基のC末端側で酵素消化を受けることで生成するペプチド断片の濃度変化に基づき、酸化ストレスの水準の推定を行うことが可能であると判断した。

【0058】

以上の検討の後、ヒトの血液中に含有される、LDL中に含まれるApoB100タンパク質のうち、酸化LDL、特に、MDA-LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質中に存在するMDA化Lys残基、ならびに酸化Met残基のうち、酸化ストレスの水準の差異に起因して、MDA化を受ける確率が明確に変化するMDA化Lys残基、ならびに、酸化を受ける確率が明確に変化する酸化Met残基の選別を行った。

30

【0059】

「酸化ストレスの水準」に代えて、虚血性心疾患の病態の進行度、すなわち、冠動脈病変枝数(ACI-TIPI score)の評価結果が、冠動脈病変枝数3と判定された患者群から採血した血液サンプル、冠動脈病変枝数0と判定された健常者群から採血した血液サンプルを、それぞれ、「酸化ストレスが高水準」の血液サンプル、「酸化ストレスが低水準」の血液サンプルと見做す。「酸化ストレスが高水準」の血液サンプル中に含有される、MDA-LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質と、「酸化ストレスが低水準」の血液サンプル中に含有される、MDA-LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質を比較した際、MDA化を受ける確率が明確に相違しているMDA化Lys残基(MDA化部位)、ならびに、酸化を受ける確率が明確に相違している酸化Met残基の選別を行った。

40

【0060】

その際、MDAによる、Lys残基側鎖のアミノ基($-NH_2$)に対する修飾には、MDA一分子が関与する修飾である、Lys残基のMDA化($-NH-CH=CH-CHO$)に加えて、MDA複数分子が関与する修飾に相当する、Lys残基のDHP(dihydroxypyridine)化も存在することが確認された。Lys残基のDHP化は、MDA複数分子が関与する修飾に相当しており、「酸化ストレスの水準」が高い場合に、起こると推断さ

50

れる。従って、「酸化ストレスが高水準」の血液サンプル中に含有される、MDA-LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質と、「酸化ストレスが低水準」の血液サンプル中に含有される、MDA-LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質を比較した際、DHP化を受ける確率が明確に相違しているDHP化Lys残基(DHP化部位)の選別も行った。

【0061】

本発明者らは、上記の選別の結果、「酸化ストレスが高水準」の血液サンプル中に含有される、MDA-LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質と、「酸化ストレスが低水準」の血液サンプル中に含有される、MDA-LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質を比較した際、MDA化を受ける確率が明確に相違しているMDA化Lys残基(MDA化部位)、DHP化を受ける確率が明確に相違しているDHP化Lys残基(DHP化部位)、ならびに、酸化を受ける確率が明確に相違している酸化Met残基(酸化部位)として、ApoB100タンパク質のアミノ酸配列中、後述の表1-1、表1-2に示す、アミノ酸残基位置のLys残基、ならびに、Met残基を選別した。

【0062】

すなわち、MDA-LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質における、アミノ酸残基の酸化、ならびにMDAによる修飾の進行の程度(酸化の進行度)を評価する際、採取されたMDA-LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質の中、表1-1、表1-2に示す、アミノ酸残基位置のLys残基、ならびに、Met残基において、MDA化Lys残基、DHP化Lys残基へと修飾、あるいは、酸化Met残基へと酸化が生じている比率に基づき、「酸化の進行度」を高い確度で評価可能であることを見出した。

【0063】

MDA-LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質における、アミノ酸残基の酸化、ならびにMDAによる修飾の進行の程度(酸化の進行度)は、「酸化ストレスの水準」に依存しているので、MDA-LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質における、「酸化の進行度」の評価結果に基づき、「酸化ストレスの水準」の高低を高い信頼性で推定することが可能であることを見出した。

【0064】

さらに、「酸化ストレスの水準」は、冠動脈におけるアテローム性動脈硬化の進行に関連しており、「酸化ストレスの水準」の高低を高い信頼性で推定した結果は、冠動脈におけるアテローム性動脈硬化の進行の程度を評価する際、病態を反映する指標の一つとして利用可能である。すなわち、MDA-LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質における、「酸化の進行度」の評価結果を、冠動脈におけるアテローム性動脈硬化の進行の程度を評価する際、「酸化ストレス」に由来する病態を反映する指標の一つとして利用可能であることを見出した。換言するならば、MDA-LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質における、「酸化の進行度」の評価に利用可能な「MDA-LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質に由来するペプチド断片」は、心疾患の病態を反映するバイオマーカー、具体的には、冠動脈におけるアテローム性動脈硬化の進行の程度を反映するバイオマーカーとして利用可能であることを見出した。

【0065】

本発明者らは、以上の述べた一連の知見に基づき、本発明を完成するに至った。

【0066】

まず、本発明の第一の形態は、被験者から採取される血液サンプル中から、分取されるMDA-LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質における、アミノ酸残基の酸化、ならびにMDAによる修飾の進行の程度(酸化の進行度)を評価する方法の発明である。

【0067】

本発明の第一の形態の第一の態様にかかるMDA-LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質における、酸化の進行度を評価する方法は、

被験者から採取される血液サンプル中から、分取されるMDA-LDL中に含まれる、

A p o B 1 0 0 タンパク質における、酸化の進行度を評価する方法であって、
下記（工程 1）～（工程 6）の工程を有しており、

（工程 1）

抗 M D A - L D L モノクローナル抗体を利用する免疫沈降法を適用して、被験者から採取される血液サンプル中から、M D A - L D L を分取する工程；

（工程 2）

分取される M D A - L D L 中に含まれる、A p o B 1 0 0 タンパク質に、トリプシンを作用させ、トリプシン酵素消化された、該 A p o B 1 0 0 タンパク質由来のペプチド断片の群を調製する工程；

（工程 3）

等電点電気泳動法を適用し、トリプシン酵素消化された、該 A p o B 1 0 0 タンパク質由来のペプチド断片の群を、各ペプチド断片の等電点に従って、所定の等電点の区分に分画し、等電点に基づき分画された、複数のペプチド断片の部分群に分離する工程；

（工程 4）

等電点に基づき分画された、複数のペプチド断片の部分群について、各ペプチド断片の部分群中に含有されている、ペプチド断片の質量 (M_{peptide}) を、質量分析手段として、M A L D I - T O F - M S 法を採用して測定し、各ペプチド断片の部分群中に含有されている、ペプチド断片を、その等電点 (pI) と質量 (M_{peptide}) に基づき、それぞれ、ペプチド断片 (pI, M_{peptide}) と特定し、各ペプチド断片 (pI, M_{peptide}) に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ を測定する工程；

（工程 5）

特定されたペプチド断片 (pI, M_{peptide}) の一群中から、下記の表 1 - 1 に示すアミノ酸残基位置の L y s 残基、ならびに、表 1 - 2 に示すアミノ酸残基位置の M e t 残基からなる群より選択される、少なくとも一つの L y s 残基または M e t 残基を含み、該 L y s 残基または M e t 残基が酸化を受けている、A p o B 1 0 0 タンパク質由来のペプチド断片に相当する酸化ペプチド断片を少なくとも一つ選択する工程；

【 0 0 6 8 】

【表 1 - 1】

表 1-1

リジン 残基番号

114	117	157
293	539	557 612 613
616	620	732 745 1034
1291	1295	1311 1344
1724	1852	2002 2004 2139
2208	2369	2371
2402	2403	2410 2418 2425
2426	2428	2575 2825 2829
3221	3227	3229 3404 3531
3537	3547	3673 3682
3944	3946	3973 3995 4021
4034	4145	4187 4261 4274
4278	4461	4478 4485

【 0 0 6 9 】

【表 1 - 2】

表 1-2
メチオニン
残基番号
750
755
4011
4013
4382

【 0 0 7 0 】

10

(工程 6)

選択された酸化ペプチド断片に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ の測定値、 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{measured}}$ に基づき、分取される MDA - LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質における、酸化の進行度を評価する工程；

前記工程 6 において、酸化の進行度の評価は、

(サブ・ステップ 6 - 1)

特定されたペプチド断片 (pI, M_{peptide}) の一群に含まれるペプチド断片の種類の総数を $N_{\text{total-peptide}}$ とし、特定されたペプチド断片 (pI, M_{peptide}) の一群に含まれる、総数 $N_{\text{total-peptide}}$ 種類のペプチド断片に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ の測定値に基づき、平均化を行って、ピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ の平均値、 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{av}}$ を算出する工程；

20

(サブ・ステップ 6 - 2)

選択された酸化ペプチド断片に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ の測定値、 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{measured}}$ と、算出されたピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ の平均値、 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{av}}$ とを対比し、分取される MDA - LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質中において、選択された酸化ペプチド断片を内在する酸化 ApoB100 タンパク質の含有比率を推定する工程；

30

(サブ・ステップ 6 - 3)

分取される MDA - LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質中における、選択された酸化ペプチド断片を内在する酸化 ApoB100 タンパク質の含有比率が高いほど、分取される MDA - LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質における、酸化の進行度は高いと評価する工程；

上記、(サブ・ステップ 6 - 1) ~ (サブ・ステップ 6 - 3) の工程に基づき、酸化の進行度の評価を行う

ことを特徴とする、評価方法である。

【 0 0 7 1 】

本発明の第一の形態の第二の態様にかかる MDA - LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質における、酸化の進行度を評価する方法は、

40

被験者から採取される血液サンプル中から、分取される MDA - LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質における、酸化の進行度を評価する方法であって、

下記 (工程 1) ~ (工程 6) の工程を有しており、

(工程 1)

抗 MDA - LDL モノクローナル抗体を利用する免疫沈降法を適用して、被験者から採取される血液サンプル中から、MDA - LDL を分取する工程；

(工程 2)

分取される MDA - LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質に、トリプシンを作用させ、トリプシン酵素消化された、該 ApoB100 タンパク質由来のペプチド断片

50

の群を調製する工程；

(工程3)

等電点電気泳動法を適用し、トリプシン酵素消化された、該ApoB100タンパク質由来のペプチド断片の群を、各ペプチド断片の等電点に従って、所定の等電点の区分に分画し、等電点に基づき分画された、複数のペプチド断片の部分群に分離する工程；

(工程4)

等電点に基づき分画された、複数のペプチド断片の部分群について、各ペプチド断片の部分群中に含有されている、ペプチド断片の質量(M_{peptide})を、質量分析手段として、MALDI-TOF-MS法を採用して測定し、各ペプチド断片の部分群中に含有されている、ペプチド断片を、その等電点(pI)と質量(M_{peptide})に基づき、それぞれ、ペプチド断片(pI, M_{peptide})と特定し、各ペプチド断片(pI, M_{peptide})に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ を測定する工程；

(工程5)

特定されたペプチド断片(pI, M_{peptide})の一群中から、下記の表2に示すアミノ酸残基を含むペプチド断片からなる群より選択される、ペプチド断片を少なくとも一つ選択する工程；

【0072】

【表2】

表2 番号	配列	残基番号	
		N-term.	C-term.
201	FDHTNSLNIAGLSLDFSSK (配列番号1)	1751	1769
202	VPQTDNTR (配列番号2)	1216	1224
203	DFSAEYEDGK (配列番号3)	3953	3963
204	ANLFNK (配列番号4)	345	350
205	EFNLQNMGLPDFHIPENLFLK (配列番号5)	1260	1280
206	IISDYHQFR (配列番号6)	4487	4496
207	LYSILK (配列番号7)	2758	2763
208	IVSLIK (配列番号8)	4407	4412
209	INNQLTLDSTK (配列番号9)	2877	2888
210	IHSGSFQSQVELSNDQEK (配列番号10)	3639	3656
211	QTVNLQLQPYSLVTTLNSDLK (配列番号11)	1782	1802
212	AQNLQYELLTQEGQASFGK (配列番号12)	4148	4168
213	TQFNNEYSQDLDAYNTK (配列番号13)	1985	2002

【0073】

(工程6)

選択されたペプチド断片に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ の測定値、 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{measured}}$ に基づき、分取されるMDA-LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質における、酸化の進行度を評価する工程；

前記工程6において、酸化の進行度の評価は、

(サブ・ステップ6-1)

特定されたペプチド断片(pI, M_{peptide})の一群に含まれるペプチド断片の種類の総数を $N_{\text{total-peptide}}$ とし、特定されたペプチド断片(pI, M_{peptide})の一群に含まれる、総数 $N_{\text{total-peptide}}$ 種類のペプチド断片に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ の測定値に基づき、平均化を行って、ピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ の平均値、 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{av}}$ を算出する工程；

(サブ・ステップ6-2)

選択されたペプチド断片に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ の測定値、 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{measured}}$ と、算出されたピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ の平均値、 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$

a_v とを対比し、分取されるMDA - LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質中において、選択されたペプチド断片をトリプシン消化により生成する酸化ApoB100タンパク質の含有比率を推定する工程；

(サブ・ステップ6 - 3)

分取されるMDA - LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質中における、選択されたペプチド断片をトリプシン消化により生成する酸化ApoB100タンパク質の含有比率が高いほど、分取されるMDA - LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質における、酸化の進行度は高いと評価する工程；

上記、(サブ・ステップ6 - 1) ~ (サブ・ステップ6 - 3)の工程に基づき、酸化の進行度の評価を行う

10

ことを特徴とする、評価方法である。

【0074】

本発明の第一の形態の第三の態様にかかるMDA - LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質における、酸化の進行度を評価する方法は、

被験者から採取される血液サンプル中から、分取されるMDA - LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質における、酸化の進行度を評価する方法であって、

下記(工程1) ~ (工程6)の工程を有しており、

(工程1)

抗MDA - LDLモノクローナル抗体を利用する免疫沈降法を適用して、被験者から採取される血液サンプル中から、MDA - LDLを分取する工程；

20

(工程2)

分取されるMDA - LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質に、トリプシンを作用させ、トリプシン酵素消化された、該ApoB100タンパク質由来のペプチド断片の群を調製する工程；

(工程3)

等電点電気泳動法を適用し、トリプシン酵素消化された、該ApoB100タンパク質由来のペプチド断片の群を、各ペプチド断片の等電点に従って、所定の等電点の区分に分画し、等電点に基づき分画された、複数のペプチド断片の部分群に分離する工程；

(工程4)

等電点に基づき分画された、複数のペプチド断片の部分群について、各ペプチド断片の部分群中に含有されている、ペプチド断片の質量($M_{peptide}$)を、質量分析手段として、MALDI - TOF - MS法を採用して測定し、各ペプチド断片の部分群中に含有されている、ペプチド断片を、その等電点(pI)と質量($M_{peptide}$)に基づき、それぞれ、ペプチド断片($pI, M_{peptide}$)と特定し、各ペプチド断片($pI, M_{peptide}$)に由来するイオン種 $[M_{peptide} + H]^+$ のピーク強度 $I(pI, [M_{peptide} + H]^+)$ を測定する工程；

30

(工程5)

特定されたペプチド断片($pI, M_{peptide}$)の一群中から、下記の表3に示すMDA化Lys残基をその内部に含むペプチド断片、表4に示すDHP化Lys残基をその内部に含むペプチド断片、表5に示すMDA化Lys残基をそのC末端に含むペプチド断片、ならびに、表6に示す酸化されたMet残基を含むペプチド断片からなる群より選択される、少なくともLys残基またはMet残基が酸化を受けているペプチド断片に相当する酸化ペプチド断片を少なくとも一つ選択する工程；

40

【0075】

【表 3】

表 3 番号	配列(リジンひとつがMDA化)	残基番号	
		N-term.	C-term.
301	GASGTTGTQEWKDK (配列番号 1 4)	4133	4147
302	LVGFIDDAVKK (配列番号 1 5)	2393	2403
303	NIQEYLSILTPDGKGG (配列番号 1 6)	4447	4463
304	DLKMLETVR (配列番号 1 7)	1309	1317
305	IKFDK (配列番号 1 8)	3228	3232
306	HIYAISSAALSASYKADTVAK (配列番号 1 9)	1838	1858
308	TKNSEEFAAAMSR (配列番号 2 0)	116	128
309	LATALSLSNKFVEGSHNSTVSLTTK (配列番号 2 1)	3395	3419
配列(リジンふたつがMDA化)			
350	YTLNKNLSLKIEIPLPFGGK (配列番号 2 2)	1287	1305
351	INPLALKESVKFSSK (配列番号 2 3)	2819	2833
352	SSVKLQGTSKIDDIWNLEVK (配列番号 2 4)	3528	3547
353	LVKEVLKESQLPTVMDFR (配列番号 2 5)	614	631
354	NNALDFVTKSYNETKIK (配列番号 2 6)	3213	3229
355	KLKSFYHQFVDETNDK (配列番号 2 7)	2426	2442
356	TQFNNEYSQDLDAYNTKDKIGVELTGR (配列番号 2 8)	1985	2012
357	KLNELSFKTFIEDVVK (配列番号 2 9)	2403	2418
358	TFIEDVVKFLDMLIKK (配列番号 3 0)	2411	2426
359	KGISTSAASPAVGTVGMDMDEDDFSKWNFYSPQSSPDK (配列番号 3 1)	3995	4034
360	GISTSAASPAVGTVGMDMDEDDFSKWNFYSPQSSPDKK (配列番号 3 2)	3996	4035

10

20

【 0 0 7 6 】

【表 4】

表 4 番号	配列(リジンひとつがDHP化)	残基番号	
		N-term.	C-term.
401	DKDQEVLLQTFLDDASPGDK (配列番号 3 3)	538	557
402	ALVDTLKFVTAEGAK (配列番号 3 4)	1028	1043
403	DDKHEQDMVNGIMLSVEK (配列番号 3 5)	743	760
404	LVKEVLK (配列番号 3 6)	614	620
405	ALLKK (配列番号 3 7)	111	115
406	DEPTYILNIKR (配列番号 3 8)	148	158
407	HKLIDVISMYR (配列番号 3 9)	4260	4270
408	LEDTPKINSR (配列番号 4 0)	288	297
409	YEGLEWEGKAHLNIK (配列番号 4 1)	3964	3979
410	QVSHAKEK (配列番号 4 2)	2134	2141
411	VKHLIDSLIDFLNFR (配列番号 4 3)	4186	4201
412	NLTDFAEQYSIQDWAKR (配列番号 4 4)	2560	2576
413	ALYVWVGQVPDGVSKVLVDHFGYTK (配列番号 4 5)	718	742
配列(リジンふたつがDHP化)			
450	LVELAHQYKLKETIQK (配列番号 4 6)	2361	2376
451	ELLKDLKSAEQEVFK (配列番号 4 7)	4271	4285
452	IEDGTLASKTKGTFA HR (配列番号 4 8)	3936	3952
453	FLKNIIIPVYDKSLWDFLK (配列番号 4 9)	3671	3689
454	TFIEDVVKFLDMLIKK (配列番号 5 0)	2411	2426
455	NFVASHIANILNSEELDIQDLKKLVK (配列番号 5 1)	591	616
457	LQGTSKIDDIWNLEVKENFAGEATLQR (配列番号 5 2)	3532	3558
458	IAELSATAQEIIKSQAIAATKK (配列番号 5 3)	4466	4486

30

40

【 0 0 7 7 】

【表 5】

表 5 番号	配列 (MDA 化リジンがトリプシン作用を受ける場合)	残基番号	
		N-term.	C-term.
501	DQEVLLQTFLDDASPGDK (配列番号 54)	540	557
502	AALTELSLGSAYQAMILGVDSK (配列番号 55)	1703	1724
503	TQFNNNEYSQDLDAYNTK (配列番号 56)	1985	2002
504	IAIANIIDEIIEK (配列番号 57)	2196	2208
505	NNALDFVTK (配列番号 58)	3213	3221
506	EFQVPTFTIPK (配列番号 59)	1334	1344

【 0 0 7 8 】

【表 6】

表 6 番号	配列 (メチオニンが酸化)	残基番号	
		N-term.	C-term.
601	GISTSAASPAVGTVGMDMDEDDDFSK (配列番号 60)	3996	4021
602	FNEFIQNELQEASQELQQIHQYIMALR (配列番号 61)	4359	4385
603	HEQDMVNGIMLSVEK (配列番号 62)	746	760

【 0 0 7 9 】

(工程 6)

選択された酸化ペプチド断片に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ の測定値、 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{measured}}$ に基づき、分取される MDA - LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質における、酸化の進行度を評価する工程；

前記工程 6 において、酸化の進行度の評価は、

(サブ・ステップ 6 - 1)

特定されたペプチド断片 (pI, M_{peptide}) の一群に含まれるペプチド断片の種類の総数を $N_{\text{total-peptide}}$ とし、特定されたペプチド断片 (pI, M_{peptide}) の一群に含まれる、総数 $N_{\text{total-peptide}}$ 種類のペプチド断片に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ の測定値に基づき、平均化を行って、ピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ の平均値、 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{av}}$ を算出する工程；

(サブ・ステップ 6 - 2)

選択された酸化ペプチド断片に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ の測定値、 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{measured}}$ と、算出されたピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ の平均値、 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{av}}$ とを対比し、分取される MDA - LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質中において、選択された酸化ペプチド断片を内在する酸化 ApoB100 タンパク質の含有比率を推定する工程；

(サブ・ステップ 6 - 3)

分取される MDA - LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質中における、選択された酸化ペプチド断片を内在する酸化 ApoB100 タンパク質の含有比率が高いほど、分取される MDA - LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質における、酸化の進行度は高いと評価する工程；

上記、(サブ・ステップ 6 - 1) ~ (サブ・ステップ 6 - 3) の工程に基づき、酸化の進行度の評価を行う

ことを特徴とする、評価方法である。

【 0 0 8 0 】

本発明の第一の形態の第三の態様にかかる MDA - LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質における、酸化の進行度を評価する方法において、

工程 5 において、選択される酸化ペプチド断片の少なくとも一つは、

前記表 3 に示す MDA 化 Lys 残基をその内部に含むペプチド断片の一群から選択することが好ましい。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 1 】

本発明の第一の形態の評価方法において、

工程 1 における、免疫沈降法による M D A - L D L の分取に利用される、抗 M D A - L D L モノクローナル抗体は、M D A - L D L 中に含まれる、M D A 化を受けた A p o B 1 0 0 タンパク質に特異的なモノクローナル抗体であることが好ましい。

【 0 0 8 2 】

また、工程 3 における、等電点電気泳動法を適用するペプチド断片の分画は、等電点タンパク質分離チップを利用して実施することができる。

【 0 0 8 3 】

次に、本発明の第二の形態は、上記の本発明の第一の形態にかかる「M D A - L D L 中に含まれる、A p o B 1 0 0 タンパク質における、アミノ酸残基の酸化、ならびに M D A による修飾の進行の程度（酸化の進行度）を評価する方法」を利用して、「M D A - L D L 中に含まれる、A p o B 1 0 0 タンパク質における、酸化の進行度」を評価し、その「酸化の進行度」の評価結果に基づき、分取される M D A - L D L が L D L から生成される過程の「酸化ストレスの水準」の高低を推定する方法の発明である。

10

【 0 0 8 4 】

本発明の第二の形態の第一の態様にかかる M D A - L D L が L D L から生成される過程の「酸化ストレスの水準」の高低を推定する方法は、

被験者から採取される血液サンプル中から、分取される M D A - L D L 中に含まれる、A p o B 1 0 0 タンパク質における、酸化の進行度の評価結果に基づき、該 M D A - L D L が L D L から生成される過程の酸化ストレスの水準の高低を推定する方法であって、

20

下記の工程 A と工程 B を含み

（工程 A）

被験者から採取される血液サンプル中から、分取される M D A - L D L 中に含まれる、A p o B 1 0 0 タンパク質における、酸化の進行度の評価を、上記本発明の第一の形態の第一の態様にかかる M D A - L D L 中に含まれる、A p o B 1 0 0 タンパク質における、酸化の進行度を評価する方法を利用して行う工程；

（工程 B）

被験者から採取される血液サンプル中から、分取される M D A - L D L 中に含まれる、A p o B 1 0 0 タンパク質における、酸化の進行度の評価結果に基づき、該 M D A - L D L が L D L から生成される過程において、該 M D A - L D L の生成が進行した環境の酸化ストレスの水準の高低を推定する工程；

30

前記工程 B において、酸化ストレスの水準の推定は、

分取される M D A - L D L 中に含まれる、A p o B 1 0 0 タンパク質中における、酸化の進行度が高いほど、該 M D A - L D L が L D L から生成される過程において、該 M D A - L D L の生成が進行した環境の酸化ストレスの水準は高いと推定する

ことを特徴とする、推定方法である。

【 0 0 8 5 】

本発明の第二の形態の第二の態様にかかる M D A - L D L が L D L から生成される過程の「酸化ストレスの水準」の高低を推定する方法は、

40

被験者から採取される血液サンプル中から、分取される M D A - L D L 中に含まれる、A p o B 1 0 0 タンパク質における、酸化の進行度の評価結果に基づき、該 M D A - L D L が L D L から生成される過程の酸化ストレスの水準の高低を推定する方法であって、

下記の工程 A と工程 B を含み

（工程 A）

被験者から採取される血液サンプル中から、分取される M D A - L D L 中に含まれる、A p o B 1 0 0 タンパク質における、酸化の進行度の評価を、上記本発明の第一の形態の第二の態様にかかる M D A - L D L 中に含まれる、A p o B 1 0 0 タンパク質における、酸化の進行度を評価する方法を利用して行う工程；

（工程 B）

50

被験者から採取される血液サンプル中から、分取されるMDA-LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質における、酸化の進行度の評価結果に基づき、該MDA-LDLがLDLから生成される過程において、該MDA-LDLの生成が進行した環境の酸化ストレスの水準の高低を推定する工程；

前記工程Bにおいて、酸化ストレスの水準の推定は、

分取されるMDA-LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質中における、酸化の進行度が高いほど、該MDA-LDLがLDLから生成される過程において、該MDA-LDLの生成が進行した環境の酸化ストレスの水準は高いと推定することを特徴とする、推定方法である。

【0086】

10

本発明の第二の形態の第三の態様にかかるMDA-LDLがLDLから生成される過程の「酸化ストレスの水準」の高低を推定する方法は、

被験者から採取される血液サンプル中から、分取されるMDA-LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質における、酸化の進行度の評価結果に基づき、該MDA-LDLがLDLから生成される過程の酸化ストレスの水準の高低を推定する方法であって、

下記の工程Aと工程Bを含み

(工程A)

被験者から採取される血液サンプル中から、分取されるMDA-LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質における、酸化の進行度の評価を、上記本発明の第一の形態の第三の態様にかかるMDA-LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質における、酸化の進行度を評価する方法を利用して行う工程；

20

(工程B)

被験者から採取される血液サンプル中から、分取されるMDA-LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質における、酸化の進行度の評価結果に基づき、該MDA-LDLがLDLから生成される過程において、該MDA-LDLの生成が進行した環境の酸化ストレスの水準の高低を推定する工程；

前記工程Bにおいて、酸化ストレスの水準の推定は、

分取されるMDA-LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質中における、酸化の進行度が高いほど、該MDA-LDLがLDLから生成される過程において、該MDA-LDLの生成が進行した環境の酸化ストレスの水準は高いと推定することを特徴とする、推定方法である。

30

【0087】

本発明の第三の形態は、心疾患、特に、虚血性心疾患の主要因である、冠動脈におけるアテローム性動脈硬化の進行の程度を評価する際、病態を反映する指標の一つとして、被験者から採取される血液サンプル中から、分取されるMDA-LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質における、酸化の進行度を使用する方法である。具体的には、冠動脈におけるアテローム性動脈硬化の進行の程度の評価に先立ち、被験者の病態を把握する目的で実施する、被験者から採取される血液サンプル中から、分取されるMDA-LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質における、酸化の進行度を評価する際、該酸化の進行度の評価に適する、ApoB100タンパク質由来の酸化ペプチド断片を、その評価に利用するマーカーとして選択する方法の発明である。

40

【0088】

従って、本発明の第三の形態は、「心疾患診断に利用可能な診断マーカーの選択方法」に相当する発明であり、より具体的には、心疾患の診断に先立ち、被験者の病態を把握する目的で実施する、被験者から採取される血液サンプル中から、分取されるMDA-LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質における、酸化の進行度を評価する際、該評価に利用するマーカーとして、該酸化の進行度の評価に適する、ApoB100タンパク質由来の酸化ペプチド断片を選択する方法の発明である。

【0089】

本発明の第三の形態の第一の態様にかかる「心疾患診断に利用可能な診断マーカーの選

50

択方法」は、

心疾患の診断に先立ち、被験者の病態を把握する目的で実施する、被験者から採取される血液サンプル中から、分取されるMDA-LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質における、酸化の進行度を評価する際、該評価に利用するマーカーとして、該酸化の進行度の評価に適する、ApoB100タンパク質由来の酸化ペプチド断片を選択する方法であって、

前記評価に利用するマーカーとして、

下記の表7-1に示すアミノ酸残基位置のLys残基、ならびに、表7-2に示すアミノ酸残基位置のMet残基からなる群より選択される、少なくとも一つのLys残基またはMet残基を含み、該Lys残基またはMet残基が酸化を受けている、ApoB100タンパク質由来のペプチド断片に相当する酸化ペプチド断片を少なくとも一つ選択する【0090】

【表7-1】

表 7-1

リジン 残基番号

114 117 157
293 539 557 612 613
616 620 732 745 1034
1291 1295 1311 1344
1724 1852 2002 2004 2139
2208 2369 2371
2402 2403 2410 2418 2425
2426 2428 2575 2825 2829
3221 3227 3229 3404 3531
3537 3547 3673 3682
3944 3946 3973 3995 4021
4034 4145 4187 4261 4274
4278 4461 4478 4485

【0091】

【表7-2】

表 7-2

メチオニン

残基番号

750
755
4011
4013
4382

【0092】

ことを特徴とする、マーカーの選択方法である。

【0093】

本発明の第三の形態の第二の態様にかかる「心疾患診断に利用可能な診断マーカーの選択方法」は、

心疾患の診断に先立ち、被験者の病態を把握する目的で実施する、被験者から採取される血液サンプル中から、分取されるMDA-LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質における、酸化の進行度を評価する際、該評価に利用するマーカーとして、該酸化の進行度の評価に適する、ApoB100タンパク質由来のペプチド断片を選択する方法であって、

前記評価に利用するマーカーとして、

下記の表8に示すアミノ酸残基を含むペプチド断片からなる群より選択される、ペプチド断片を少なくとも一つ選択する

【 0 0 9 4 】

【 表 8 】

表 8 番号	配列	残基番号	
		N-term.	C-term.
201	FDHTNSLNIAGLSLDFSSK (配列番号 1)	1751	1769
202	VPQTDMTFR (配列番号 2)	1216	1224
203	DFSAEYEEDGK (配列番号 3)	3953	3963
204	ANLFNK (配列番号 4)	345	350
205	EFNLQNMGLPDFHIPENLFLK (配列番号 5)	1260	1280
206	IISDYHQQFR (配列番号 6)	4487	4496
207	LYSILK (配列番号 7)	2758	2763
208	IVSLIK (配列番号 8)	4407	4412
209	INNQLTLDSTNK (配列番号 9)	2877	2888
210	IHSGSFQSQVELSNDQEK (配列番号 10)	3639	3656
211	QTVNLQLQPYSLVTTLSNDLK (配列番号 11)	1782	1802
212	AQNLQELLTQEGQASFGGLK (配列番号 12)	4148	4168
213	TQFNNNEYSQDLDAYNTK (配列番号 13)	1985	2002

10

【 0 0 9 5 】

ことを特徴とする、マーカーの選択方法である。

【 0 0 9 6 】

本発明の第三の形態の第三の態様にかかる「心疾患診断に利用可能な診断マーカーの選択方法」は、

20

心疾患の診断に先立ち、被験者の病態を把握する目的で実施する、被験者から採取される血液サンプル中から、分取されるMDA-LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質における、酸化の進行度を評価する際、該評価に利用するマーカーとして、該酸化の進行度の評価に適する、ApoB100タンパク質由来の酸化ペプチド断片を選択する方法であって、

前記評価に利用するマーカーとして、

下記の表 9 に示すMDA化Lys残基をその内部に含むペプチド断片、表 10 に示すDHP化Lys残基をその内部に含むペプチド断片、表 11 に示すMDA化Lys残基をそのC末端に含むペプチド断片、ならびに、表 12 に示す酸化されたMet残基を含むペプチド断片からなる群より選択される、少なくともLys残基またはMet残基が酸化を受けているペプチド断片に相当する酸化ペプチド断片を少なくとも一つ選択する

30

【 0 0 9 7 】

【表 9】

表 9 番号	配列(リジンひとつがMDA化)	残基番号	
		N-term.	C-term.
301	GASGTTGTYQEWKDK (配列番号 14)	4133	4147
302	LVGFIDDAVKK (配列番号 15)	2393	2403
303	NIQEYLSILTPDGK GK (配列番号 16)	4447	4463
304	DLKMLETVR (配列番号 17)	1309	1317
305	IKFDK (配列番号 18)	3228	3232
306	HIYAISSAALSASYKADTVAK (配列番号 19)	1838	1858
308	TKNSEEFAAAMSR (配列番号 20)	116	128
309	LATALSLSNKFVEGSHNSTVSLTTK (配列番号 21)	3395	3419
配列(リジンふたつがMDA化)			
350	YTLNKNLSLKIEIPLPFGGK (配列番号 22)	1287	1305
351	INPLALKESVKFSSK (配列番号 23)	2819	2833
352	SSVKLGTSKIDDIWNLEVK (配列番号 24)	3528	3547
353	LVKEVLKESQLPTVMDFR (配列番号 25)	614	631
354	NNALDFVTKSYNETKIK (配列番号 26)	3213	3229
355	KLKSFYHQFVDETNDK (配列番号 27)	2426	2442
356	TQFNNEYSQDLDAYNTKDKIGVELTGR (配列番号 28)	1985	2012
357	KLNELSFKTFIEDVVK (配列番号 29)	2403	2418
358	TFIEDVVKFLDMLIKK (配列番号 30)	2411	2426
359	KGISTAASPAVGTVGMDMDEDDFSKWNFYSPQSSPDK (配列番号 31)	3995	4034
360	GISTAASPAVGTVGMDMDEDDFSKWNFYSPQSSPDKK (配列番号 32)	3996	4035

10

20

【0098】

【表 10】

表 10 番号	配列(リジンひとつがDHP化)	残基番号	
		N-term.	C-term.
401	DKDQEVLLQTFLLDDASPGDK (配列番号 33)	538	557
402	ALVDTLKFVTQAEQAK (配列番号 34)	1028	1043
403	DDKHEQDMVNGIMLSVEK (配列番号 35)	743	760
404	LVKEVLK (配列番号 36)	614	620
405	ALLKK (配列番号 37)	111	115
406	DEPTYILNIKR (配列番号 38)	148	158
407	HKLIDVISMYR (配列番号 39)	4260	4270
408	LEDTPKINSR (配列番号 40)	288	297
409	YEGLEWEGKAHLNIK (配列番号 41)	3964	3979
410	QVSHAKEK (配列番号 42)	2134	2141
411	VKHLIDSLIDFLNFPR (配列番号 43)	4186	4201
412	NLTDFAEQYSIQWAKR (配列番号 44)	2560	2576
413	ALYWVNGQVPDGVSKVLVDHFGYTK (配列番号 457)	718	742
配列(リジンふたつがDHP化)			
450	LVELAHQYKLKETIQK (配列番号 46)	2361	2376
451	ELLKDLKAEQEVFK (配列番号 47)	4271	4285
452	IEDGTLASKTKGTFA HR (配列番号 48)	3936	3952
453	FLKNIIIPVYDKSLWDFLK (配列番号 49)	3671	3689
454	TFIEDVVKFLDMLIKK (配列番号 50)	2411	2426
455	NFVASHIANILNSEELDIQDLKLVK (配列番号 51)	591	616
457	LQGTSKIDDIWNLEVKENFAGEATLQR (配列番号 52)	3532	3558
458	IAELSAQAQEI IKSQA IATKK (配列番号 53)	4466	4486

30

40

【0099】

【表 1 1】

表 11 番号	配列 (MDA 化リジンがトリプシン作用を受ける場合)	残基番号	
		N-term.	C-term.
501	DQEVLLQTFLDDASPGDK (配列番号 5 4)	540	557
502	AALTELSLGSAYQAMILGVDSK (配列番号 5 5)	1703	1724
503	TQFNNNEYSQDLDAYNTK (配列番号 5 6)	1985	2002
504	IAIANIIDELIEK (配列番号 5 7)	2196	2208
505	NNALDFVTK (配列番号 5 8)	3213	3221
506	EFQVPTFTIPK (配列番号 5 9)	1334	1344

【 0 1 0 0】

【表 1 2】

表 12 番号	配列 (メチオニンが酸化)	残基番号	
		N-term.	C-term.
601	GISTSAASPAVGTVGMDMDEDDFSK (配列番号 6 0)	3996	4021
602	FNEFIQNELQEASQELQQIHQYIMALR (配列番号 6 1)	4359	4385
603	HEQDMVNGIMLSVEK (配列番号 6 2)	746	760

【 0 1 0 1】

ことを特徴とする、マーカーの選択方法である。

【 0 1 0 2】

本発明の第一の形態の第三の態様にかかる「心疾患診断に利用可能な診断マーカーの選択方法」において、

選択される酸化ペプチド断片の少なくとも一つは、

前記表 9 に示す MDA 化 L y s 残基をその内部に含むペプチド断片の一群から選択することが好ましい。

【発明の効果】

【 0 1 0 3】

本発明の方法によれば、血清・血漿などの比較的患者の精神的・肉体的負担のかからないサンプルから心疾患の病態にかかわるバイオマーカーを迅速かつ容易に検出することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【 0 1 0 4】

【図 1】本発明の第三の形態にかかる「心疾患診断に利用可能な診断マーカーの選択方法」における「診断マーカー」として利用可能な酸化ペプチド断片の一群、すなわち、被験者から採取される血液サンプル中から、分取される MDA - LDL 中に含まれる、ApoB 100 タンパク質における、酸化の進行度を評価する際、該酸化の進行度の評価に適する、ApoB 100 タンパク質由来の酸化ペプチド断片の一群を探索する過程に採用した、探索プロセスのステップ構成を模式的に示す図である。

【図 2】図 1 に示す「診断マーカー」として利用可能な酸化ペプチド断片の一群の探索プロセスのステップ構成中、「サンプル前処理」101 のステップを実施する際に採用した一連のサブ・ステップの構成を模式的に示す図である。

【図 3】図 1 に示す「診断マーカー」として利用可能な酸化ペプチド断片の一群の探索プロセスのステップ構成中、「等電点電気泳動」102 のステップを実施する際に採用した、「等電点タンパク質分離チップ」の構成を模式的に示す図である。

【図 4】図 1 に示す「診断マーカー」として利用可能な酸化ペプチド断片の一群の探索プロセスのステップ構成中、「等電点電気泳動」102 のステップを実施する際、「等電点タンパク質分離チップ」を用いる等電点電気泳動に適合する電気泳動装置、ならびに、「等電点タンパク質分離チップ」中に保持した状態での凍結乾燥処理に適合する乾燥装置とで構成される、「等電点タンパク質分離チップ」に適合する電気泳動装置・乾燥装置の全体構成を模式的に示す図である。

【図 5】図 3 にその構成を模式的に示した「等電点タンパク質分離チップ」の具体例を例示する図であり、複数の流路を具える「等電点タンパク質分離チップ」の構成の一例を示

10

20

30

40

50

す図である。

【図6】図4にその全体構成を模式的に示した、「等電点タンパク質分離チップ」に適合する電気泳動装置・乾燥装置の具体例を例示する図であり、該装置の外観を示す画像である。

【図7】図1に示す「診断マーカー」として利用可能な酸化ペプチド断片の一群の探索プロセスのステップ構成中、「MALDI-TOF MS質量分析」103のステップにおいて、「等電点電気泳動」により分画された「単一の区画(pI)」に含まれる、複数種のペプチド断片(pI, M_{peptide})に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のピーク位置(m/z)_{peak}を、測定される「MALDI-TOF MS質量分析」スペクトルに基づき、特定する操作、ならびに、そのピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ を求める操作を模式的に示す図である。

10

【図8】図1に示す「診断マーカー」として利用可能な酸化ペプチド断片の一群の探索プロセスのステップ構成中、「サンプルプロファイニング」104のステップにおいて、「等電点電気泳動」102のステップにおける、各ペプチド断片(pI, M_{peptide})のスポットの「流路方向の拡がり」の状況を、連続した「単一の区画(pI)」複数において、測定された「MALDI-TOF MS質量分析」スペクトルの信号強度 $I(pI, m/z)$ を、(pI, m/z)面上にプロットし、各ペプチド断片(pI, M_{peptide})のスポット中心の pI_{mean} を決定し、各ペプチド断片(pI, M_{peptide})に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ を特定する($pI_{\text{mean}}, (m/z)_{\text{peak}}$)と、該イオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のトータル・ピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{total}}$ を求める操作を模式的に示す図である。

20

【図9】表2中に、「心疾患診断に利用可能な診断マーカー」として利用可能なペプチド断片として記載する、 $m/z = 1306$ のイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ を与える、ApoB100タンパク質のトリプシン酵素消化により生成する、Lys残基とMet残基を含まないアミノ酸配列IISDYHQQFRのペプチド断片(アミノ酸番号4487-4496の断片)について、虚血性心疾患と診断された患者群(冠動脈病変枝数3)10名、非患者群(冠動脈病変枝数0)23名、合計33名に由来するサンプルにおける、該 $m/z = 1306$ のイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ の正規化ピーク強度に付いて、合計33名に由来するサンプル群中において、Zスコア化した値(Zスコア)を、患者群(冠動脈病変枝数3)10名に由来するサンプル、非患者群(冠動脈病変枝数0)23名に由来するサンプルの二つの部分群に区分して、プロットしたグラフであり、前記二つの部分群間において、Zスコア化した値(Zスコア)の分布に統計的に有意な差異があることを示す図である。

30

【図10】マロンジアルデヒドによる、Lys側鎖のアミノ基($-NH_2$)に対する修飾、具体的には、MDA一分子が関与する修飾である、アミノ基($-NH_2$)のMDA化により生成するMDA化Lys、ならびに、MDA二分子が関与する修飾に相当する、アミノ基($-NH_2$)のDHP(dihydroxypyridine)化により生成するDHP化Lysの分子構造を示す図である。

【図11-1】ApoB100タンパク質のアミノ酸配列中、1~1000番目の範囲を示す図である。

【図11-2】ApoB100タンパク質のアミノ酸配列中、1001~2000番目の範囲を示す図である。

40

【図11-3】ApoB100タンパク質のアミノ酸配列中、2001~3000番目の範囲を示す図である。

【図11-4】ApoB100タンパク質のアミノ酸配列中、3001~4000番目の範囲を示す図である。

【図11-5】ApoB100タンパク質のアミノ酸配列中、4001~4563番目の範囲を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0105】

以下に、本発明の第一の形態~第三の形態に関して、より詳しく説明する。

50

【0106】

まず、本発明の第一の形態～第三の形態は、いずれも、本発明者らが、心疾患、特に、虚血性心疾患の主要因である、冠動脈におけるアテローム性動脈硬化の進行の程度を評価する際、病態を反映する指標の一つとして、新たに見出した「心疾患診断マーカー」を利用する発明に相当している。

【0107】

本発明において利用されている「心疾患診断マーカー」は、下記の探索手順により、患者（被験者）における、虚血性心疾患の病態の進行度を反映して、明確な「量的変化」を示す「マーカー」として特定されたものである。具体的には、虚血性心疾患の病態の進行度の高い患者（被験者）群、具体的には、冠動脈病変枝数3と判定された患者群と、冠動脈病変枝数0と判定された健常者（非患者）群を比較した際、健常者（非患者）群において検出される量を基準として、患者群において検出される量は、「有意に高い」、または、「有意に低い」という、統計学的検定結果を示す「マーカー」として特定されたものである。

10

【0108】

本発明において利用されている「心疾患診断マーカー」と、その探索手順、ならびに、特定された「心疾患診断マーカー」が、実際に、健常者（非患者）群において検出される量を基準として、患者群において検出される量は、「有意に高い」、または、「有意に低い」という、統計学的検定の結果について、より詳しく説明する。

【0109】

20

本発明者らは、虚血性心疾患の病態の進行度を反映する指標として、被験者から採血した血液中における、酸化されていないLDLの含有濃度 C_{LDL} と、酸化LDLの含有濃度 C_{oxLDL} の比率、 (C_{oxLDL}/C_{LDL}) が、実際に利用可能であると、既に検証がなされている点に着目した（非特許文献1参照）。加えて、酸化LDL、特に、MDA-LDLが、動脈硬化の初期病変に関与していることを査証する結果が報告されている点にも着目した（非特許文献2参照）。従って、虚血性心疾患の病態の進行度、具体的には、冠動脈におけるアテローム性動脈硬化の進行の程度を反映する指標として、被験者から採血した血液中における、MDA-LDLの含有濃度 $C_{MDA-LDL}$ と、酸化されていないLDLの含有濃度 C_{LDL} の比率も、利用可能であると判断した。

【0110】

30

その際、体内において、LDLから、MDA-LDLが生成される過程では、LDLの酸化に伴って生成される、MDAがLDL中に含有されるApoB100タンパク質、特に、該ApoB100タンパク質中のLys残基に作用し、Lys残基側鎖のアミノ基（ $-NH_2$ ）に対する修飾が起こる。具体的には、Lys残基は、図10に示すように、MDA一分子が関与する修飾である、アミノ基（ $-NH_2$ ）のMDA化により生成するMDA化Lys残基、あるいは、MDA複数分子が関与する修飾に相当する、アミノ基（ $-NH_2$ ）のDHP（dihydropyridine）化により生成するDHP化Lys残基に変換される。

【0111】

「酸化ストレス」によって、LDLの酸化が進行するため、LDL中に含有されるApoB100タンパク質中のアミノ酸残基、例えば、Met残基側鎖の $-CH_2-S-CH_3$ の酸化も進行し、 $-CH_2-SO-CH_3$ （一酸化体：Met(O)）、ならびに、 $-CH_2-SO_2-CH_3$ （二酸化体：Met(O₂))に変換される。

40

【0112】

「酸化ストレス」の水準が高いほど、LDLの酸化が進行するため、MDA-LDLの生成量は増加し、同時に、生成したMDA-LDL中に含まれるApoB100タンパク質における、MDAによる修飾量、具体的には、MDA化Lys残基、DHP化Lys残基の含有比率も増加する。勿論、「酸化ストレス」の水準が高いほど、生成したMDA-LDL中に含まれるApoB100タンパク質における、酸化修飾を受けたMet残基の含有比率も増加する。

50

【0113】

本発明者らは、被験者から採血した血液中に含有される、MDA-LDLを分取し、分取されたMDA-LDL中に含まれるApoB100タンパク質における、MDAによる修飾量、具体的には、MDA化Lys残基、DHP化Lys残基の含有比率の測定結果に基づき、LDLからMDA-LDLが生成する過程において、「酸化ストレス」の水準が高い環境であったか、「酸化ストレス」の水準が低い環境であったかを、判定することが可能であることに想到した。この手法では、被験者から採血した血液中に含有される、MDA-LDLを全量回収する必要はなく、MDA-LDLの一部をサンプリングし、このサンプル中に含まれるMDA-LDLについて、MDA化Lys残基、DHP化Lys残基の含有比率、あるいは、酸化修飾を受けたMet残基の含有比率を測定する形態を利用

10

【0114】

LDL中に含まれるApoB100タンパク質は、三次構造を形成しており、ApoB100タンパク質中に含まれる、複数のLys残基のうち、三次構造の内部に位置するものは、MDAによる修飾を受けず、三次構造の表面に露呈しているLys残基が、MDAによる修飾を受ける。また、ApoB100タンパク質中に含まれる、複数のMet残基のうち、三次構造の内部に位置するものは、酸化修飾を受けず、三次構造の表面に露呈しているMet残基が、酸化修飾を受ける。

【0115】

さらには、ApoB100タンパク質の三次構造表面に露呈している、複数のLys残基のうちでも、MDAによる修飾を受ける確率に差異が存在するため、「酸化ストレス」の水準の高低に依存して、ApoB100タンパク質全体において、MDA化Lys残基、DHP化Lys残基の含有比率が変化する。また、ApoB100タンパク質の三次構造表面に露呈している、複数のMet残基のうちでも、酸化修飾を受ける確率に差異が存在するため、「酸化ストレス」の水準の高低に依存して、ApoB100タンパク質全体において、酸化修飾を受けたMet残基の含有比率が変化する。

20

【0116】

換言すると、MDA-LDL中に含まれるApoB100タンパク質全体における、MDA化Lys残基、DHP化Lys残基の含有比率の測定結果に代えて、ApoB100タンパク質の三次構造表面に露呈している、複数のLys残基のうち、「酸化ストレス」の水準の高低に依存して、MDAによる修飾を受ける確率が明確に変動する、特定のLys残基部位を選別し、その選別されたLys残基部位における、MDA化Lys残基、あるいは、DHP化Lys残基へ変換される比率の測定結果に基づき、LDLからMDA-LDLが生成する過程におえる「酸化ストレス」の水準の高低を、判定することが可能であることに想到した。また、MDA-LDL中に含まれるApoB100タンパク質全体における、酸化修飾を受けたMet残基の含有比率の測定結果に代えて、ApoB100タンパク質の三次構造表面に露呈している、複数のMet残基のうち、「酸化ストレス」の水準の高低に依存して、酸化修飾を受ける確率が明確に変動する、特定のMet残基部位を選別し、その選別されたMet残基部位における、酸化修飾を受けたMet残基へ変換される比率の測定結果に基づき、LDLからMDA-LDLが生成する過程におえる「酸化ストレス」の水準の高低を、判定することが可能であることに想到した。

30

40

【0117】

加えて、ApoB100タンパク質全体において、MDA化Lys残基、DHP化Lys残基の含有比率が増加すると、本来トリプシン消化を受け易い切断部位のLys残基が、MDA化Lys残基、DHP化Lys残基に変換される確率が上昇する。その際、MDA化Lys残基、DHP化Lys残基への変換に起因して、かかる本来トリプシン消化を受け易い部位におけるトリプシン消化の確率は減少する。一方、かかる部位の周囲に存在する、Lys残基、Arg残基におけるトリプシン消化の確率は、相対的に上昇する場合があることに想到した。換言すると、「酸化ストレス」の水準の高低に依存して、本来トリプシン消化を受け易い切断部位のLys残基が酸化修飾を受ける確率が明確に変動する

50

結果、該部位の周囲に存在する、L y s 残基、A r g 残基におけるトリプシン消化効率の変動が誘起される場合がある。従って、「酸化ストレス」の水準の上昇により誘起される、前記トリプシン消化効率の相対的上昇に伴って、生成効率が上昇するペプチド断片の量の相対的变化の測定結果に基づき、L D L から M D A - L D L が生成する過程におえる「酸化ストレス」の水準の高低を、判定することが可能であることに想到した。なお、前記トリプシン消化効率の相対的上昇に伴って、生成効率が上昇するペプチド断片自体は、そのC末端は、修飾を受けていないL y s 残基、A r g 残基であり、さらに、該ペプチド断片中にM D A 化L y s 残基、D H P 化L y s 残基、あるいは、酸化修飾を受けたM e t 残基を内在している必要は無いことにも想到した。

【0118】

10

例えば、後述する表13に記載する「M D A 化L y s 残基、D H P 化L y s 残基、ならびに、酸化修飾を受けたM e t 残基を含んでいない」ペプチド断片であっても、「酸化ストレス」の水準の上昇に伴って、該ペプチド断片の周囲に存在する、L y s 残基、A r g 残基におけるトリプシン消化効率の変動が誘起されると、かかるペプチド断片の生成効率が相対的に上昇することがあることにも想到した。

【0119】

本発明において利用されている「心疾患診断マーカー」は、前記の選別基準に基づき、「酸化ストレス」の水準の高低に依存して、当該アミノ酸残基部位における、M D A による修飾を受ける確率、あるいは、酸化修飾を受ける確率が明確に変動する部位として選別された、特定のアミノ酸残基部位を含む、M D A - L D L 中に含まれるA p o B 1 0 0 タンパク質由来のペプチド断片の一群に相当している。

20

【0120】

本発明において利用されている「心疾患診断マーカー」である、前述の特定のアミノ酸残基部位を含む、M D A - L D L 中に含まれるA p o B 1 0 0 タンパク質由来のペプチド断片における、当該アミノ酸残基部位における、M D A による修飾を受けている確率、あるいは、酸化修飾を受けている確率の測定結果は、勿論、分取されるM D A - L D L 中に含まれる、A p o B 1 0 0 タンパク質における、酸化の進行度を反映している。

【0121】

従って、本発明の第一の形態は、「心疾患診断マーカー」として選別された、特定のアミノ酸残基部位を含むペプチド断片における、当該アミノ酸残基部位における、M D A による修飾を受けている確率、あるいは、酸化修飾を受けている確率の測定結果に基づき、被験者から採取される血液サンプル中から、分取されるM D A - L D L 中に含まれる、A p o B 1 0 0 タンパク質における、アミノ酸残基の酸化、ならびにM D A による修飾の進行の程度（酸化の進行度）を評価する方法の発明である。

30

【0122】

本発明の第二の形態は、「心疾患診断マーカー」として選別された、特定のアミノ酸残基部位を含むペプチド断片における、当該アミノ酸残基部位における、M D A による修飾を受けている確率、あるいは、酸化修飾を受けている確率の測定結果に基づき、「酸化の進行度」を評価し、その「酸化の進行度」の評価結果を利用して、分取されるM D A - L D L がL D L から生成される過程の「酸化ストレスの水準」の高低を推定する方法の発明である。すなわち、本発明の第二の形態にかかる「酸化ストレスの水準」の高低を推定する方法は、評価対象の血液サンプルを採取した被験者の体内の「酸化ストレスの水準」の高低を推定する方法に相当している。

40

【0123】

本発明の第三の形態は、心疾患、特に、虚血性心疾患の主要因である、冠動脈におけるアテローム性動脈硬化の進行の程度を評価する際、病態を反映する指標の一つとして、被験者の体内の「酸化ストレスの水準」の高低の推定結果を利用することを意図した発明である。その際、本発明の第三の形態では、前記本発明の第二の形態にかかる「酸化ストレスの水準」の高低を推定する方法、すなわち、評価対象の血液サンプルを採取した被験者の体内の「酸化ストレスの水準」の高低を推定する方法を適用して、被験者の体内の「

50

酸化ストレスの水準」の高低の推定を行う。本発明の第二の形態では、被験者から採取される血液サンプル中から、分取されるMDA-LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質における、酸化の進行度を評価し、その「酸化の進行度」の評価結果に基づき、「酸化ストレスの水準」の高低の推定を行う。本発明の第二の形態にかかる「酸化の進行度」の評価方法では、上記の選別基準に基づき、選別された、特定のアミノ酸残基部位を含むペプチド断片を、「酸化の進行度」の評価に適合する「マーカー」として利用している。

【0124】

本発明の第三の形態は、冠動脈におけるアテローム性動脈硬化の進行の程度の評価に先立ち、被験者の病態を把握する目的で実施する、被験者から採取される血液サンプル中から、分取されるMDA-LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質における、酸化の進行度を評価する際、その評価に利用する「マーカー」を、上記の選別基準に基づき、選別された、特定のアミノ酸残基部位を含むペプチド断片の一群から、選択する方法の発明である。従って、本発明の第三の形態は、上記の選別基準に基づき、選別された「心疾患診断マーカー」の一群から、「心疾患診断に利用可能な診断マーカーを選択する方法」に相当している。

【0125】

冠動脈におけるアテローム性動脈硬化の進行の程度の評価に先立ち、被験者の病態を把握する目的で実施する、被験者から採取される血液サンプル中から、分取されるMDA-LDL中に含まれる、ApoB100タンパク質における、酸化の進行度を評価する。その際、その評価に利用する「マーカー」として、先に説明したように、MDA-LDL中に含まれるApoB100タンパク質全体における、MDA化Lys残基、DHP化Lys残基の含有比率、酸化修飾を受けたMet残基の含有比率、あるいは、酸化修飾を受けたその他のアミノ酸残基（例えば、Tyr残基）の含有比率を高い確度で推定することが可能な「マーカー」のいずれも利用可能である。その多様な「マーカー」の群のうち、本発明の第三の形態では、上記の選別基準に基づき、選別された「心疾患診断マーカー」の一群から、評価に利用する「マーカー」を選択する点に、技術的な特徴がある。

【0126】

上記の選別基準に基づき、本発明において利用されている「心疾患診断マーカー」の選別の手順を以下に説明する。

【0127】

「心疾患診断マーカー」の選別の手順、すなわち、「マーカー探索」プロセスの全体構成を、図1に示す。該プロセスは、「サンプル前処理」工程101、「等電点電気泳動」工程102、「MALDI-TOF MS 質量分析」工程103、「サンプルプロファイリング」工程104、「データ解析・マーカー特定」工程105の五つの工程で構成されている。

【0128】

本発明では、選別された「心疾患診断マーカー」について、「心疾患診断」に先立ち、被験者から採取される血液サンプルを用いて、その量を測定することを最終目的とする。従って、被験者から採取される血液サンプルの量を考慮し、少量の血液サンプルを利用する測定に適する、「サンプル前処理」、「等電点電気泳動」、「MALDI-TOF MS 質量分析」の条件を選択し、その条件において、「心疾患診断マーカー」の選別を行っている。従って、「心疾患診断マーカー」の選別の際に採用する、「サンプル前処理」、「等電点電気泳動」、「MALDI-TOF MS 質量分析」の条件と同じ条件を用いて、「心疾患診断」に先立ち、被験者から採取される血液サンプルを用いて、その量を測定することが可能となる。

【0129】

具体的には、「等電点電気泳動」工程では、後述する「等電点タンパク質分離チップ」を利用する「等電点電気泳動」を行い、その後、該「等電点タンパク質分離チップ」内に保持した状態で乾燥処理を施し、さらに、乾燥処理を施した「等電点タンパク質分離チッ

10

20

30

40

50

ブ」内に保持した状態で、「MALDI-TOF MS 質量分析」を実施する形態を採用している。

【0130】

(1)「サンプル前処理」工程

「サンプル前処理」工程101は、図2に示す、4つのステップ：血液サンプルから「血清」を調製する「血清調製」ステップ201；抗MDA-LDL抗体を用いる「免疫沈降」法を利用して、血清中から、MDA-LDLを分取する「免疫沈降処理」ステップ202；トリプシン消化処理を利用して、分取されたMDA-LDL中に含まれるApoB100タンパク質由来のペプチド断片群を調製する「断片化」処理ステップ203；調製されたペプチド断片群を含む、トリプシン消化処理反応液中の溶媒を除去し、調製されたペプチド断片群全量を含む乾燥物として回収する「断片化ペプチド回収」ステップ204で構成されている。

10

【0131】

(1-1)「血清調製」ステップ201

まず、「心疾患診断マーカー」の選別を行う対象は、被験者から採血した血液中に含まれる、MDA-LDL中に含まれるApoB100タンパク質である。血液中、MDA-LDLは、血清中に溶存しているので、定法に従って、被験者から採血した血液サンプルから、血清を調製する。血液の凝固処理後、遠心分離により、血餅（沈澱物）を分離し、血清を回収する。

【0132】

20

回収された血清を保存する際には、-80以下の温度で冷凍保存する。すなわち、前記冷凍保存を行うことで、保存する間に、血清中に含まれるMDA-LDLに対して、さらに、MDA化、酸化が進行することを防止する。

【0133】

(1-2)「免疫沈降処理」ステップ202

回収された血清中に、種々の可溶性タンパク質、脂質が溶解している。特に、MDA-LDL以外に、MDA化されていない酸化LDL、酸化を受けていないLDLも、該血清中に共存している。血清中から、MDA-LDLのみを選択的に分取するため、抗MDA-LDL抗体を用いる「免疫沈降」法を利用する。

【0134】

30

抗MDA-LDL抗体を担体上に固定化した、アフィニティー担体を、血清中に加え、抗原抗体反応により、MDA-LDLのみを選択的に抗MDA-LDL抗体と反応させ、捕獲する。その後、固液分離により、アフィニティー担体を回収することで、血清中に含まれている、MDA-LDLのみを分取する。

【0135】

なお、血清中に含まれている、MDA-LDLの濃度は不明であるが、血清中に含まれている、MDA-LDLの全量を回収する必要は無いので、通常、使用するアフィニティー担体の量は、血清100μL当たり、抗MDA-LDL抗体の添加量が、2μg～4μgの範囲となるように選択することができる。抗MDA-LDL抗体を固定化する担体として、例えば、IgG抗体の固定化に適する磁気ビーズを利用すると、抗原抗体反応後、固液分離により、アフィニティー担体を回収する際、該磁気ビーズを、磁力を利用して、選択的に回収できるので好ましい。

40

【0136】

血清中には、MDA-LDL以外に、MDA化を受けていないLDL、例えば、酸化に起因する修飾を全くを受けていないLDLが大量に共存している。一般に、血清中に含まれる酸化LDLの含有濃度は、10μg/dL以上、100μg/dL未満であるが、全LDLの含有濃度は、50～100mg/dL程度であると報告されている。従って、血清中における、MDA-LDLの含有濃度 $C[MDA-LDL]$ と、全LDLの含有濃度 $C[total LDL]$ の比率； $C[MDA-LDL]/C[total LDL]$ は、通常、 $C[MDA-LDL]/C[total LDL]<0.2\%$ の範囲と推定される。アフィニティー担体を

50

回収する際、非選択的に担体の表面に吸着した、MDA化受けていないLDL、例えば、酸化に起因する修飾を全く受けていないLDLが混入することを防止するため、固液分離後、アフィニティー担体を十分に洗浄する。十分な洗浄を終えた時点では、回収されたアフィニティー担体の表面には、未反応の抗MDA-LDL抗体と、MDA-LDLと複合体を形成している抗MDA-LDL抗体のみが固定化されている。

【0137】

該「免疫沈降処理」ステップ202で利用する抗MDA-LDL抗体として、例えば、抗体No.29225（積水メディカル社）などの抗MDA-LDLモノクローナル抗体が好適である。

【0138】

ヒト・MDA-LDLを免疫原として、マウスを免疫することにより、抗ヒト・MDA-LDLモノクローナル抗体を創製する手法は、既に報告されている（特許第3115587号公報参照）。該手法で創製される抗ヒト・MDA-LDLモノクローナル抗体のうち、ヒト・MDA-LDL中に含まれる、ヒト・ApoB100タンパク質と特異的な反応性を示すものを選別し、該「免疫沈降処理」ステップ202で利用する抗MDA-LDL抗体として利用することができる。

【0139】

(1-3) 「断片化」処理ステップ203

洗浄後、回収されたアフィニティー担体の表面に固定化された、抗MDA-LDL抗体と複合体を形成している、MDA-LDLを、トリプシンを用いて酵素消化し、分取されたMDA-LDL中に含まれるApoB100タンパク質由来のペプチド断片群を調製する。

【0140】

酵素消化に先立ち、アフィニティー担体の表面に固定化された、抗MDA-LDL抗体と複合体を形成している、MDA-LDLを、該抗体から分離し、アフィニティー担体の表面に固定化された、抗MDA-LDL抗体を固液分離して、液相にMDA-LDLを回収する操作を施すことが、一般に望ましい。

【0141】

抗体から、その抗原を遊離する手段としては、抗体の抗原に対する反応性を低下する処理が利用される。通常、抗原中に存在するエピトープ（抗原性決定基）と、抗体中のCDR（相補性決定領域）の結合は、疎水的相互作用に因っている。例えば、抗原中に存在するエピトープ（抗原性決定基）と、抗体中のCDR（相補性決定領域）の相互作用を低下させるため、アセトニトリルなどの極性有機溶媒を添加して、抗体中のCDR（相補性決定領域）を該極性有機溶媒によって、溶媒和（被覆）する手段が利用可能である。また、SDSなどの界面活性剤型のタンパク質変性剤を添加することで、抗体の可変領域を変性させ、抗原中に存在するエピトープ（抗原性決定基）に対する親和性を消失させる手法も利用可能である。

【0142】

一方、MDA-LDLを抗体から分離することなく、抗MDA-LDL抗体と複合体を形成している、MDA-LDLに、トリプシンを作用させ、酵素消化し、MDA-LDL中に含まれるApoB100タンパク質由来のペプチド断片群を調製する形態を採用することも可能である。その場合には、MDA-LDL中に含まれるApoB100タンパク質由来のペプチド断片群に加えて、抗MDA-LDL抗体由来のペプチド断片群も生成される。抗MDA-LDL抗体由来のペプチド断片群は、別途特定できるため、MDA-LDL中に含まれるApoB100タンパク質由来のペプチド断片群と、抗MDA-LDL抗体由来のペプチド断片群の混合物から、MDA-LDL中に含まれるApoB100タンパク質由来のペプチド断片群を特定することが可能である。

【0143】

その他、トリプシンを用いる酵素消化を行う際には、トリプシンの自己消化に起因して、トリプシン由来のペプチド断片群も生成される。このトリプシンの自己消化に起因する

10

20

30

40

50

、トリプシン由来のペプチド断片群も、別途特定できるため、MDA-LDL中に含まれるApoB100タンパク質由来のペプチド断片群、抗MDA-LDL抗体由来のペプチド断片群、トリプシン由来のペプチド断片群の混合物から、MDA-LDL中に含まれるApoB100タンパク質由来のペプチド断片群を特定することが可能である。

【0144】

「断片化」処理ステップ203においては、分取されたMDA-LDL中に含まれるApoB100タンパク質の全量を、トリプシンを用いる酵素消化により断片化する。その際、トリプシンは、Arg残基のC末側のペプチド結合、Lys残基のC末側のペプチド結合を切断するが、一般に、MDA化Lys残基、DHP化Lys残基のC末側のペプチド結合が切断される効率は、修飾を受けていないLys残基のC末側のペプチド結合が切断される効率より低い。特定の部位のLys残基が、MDA化Lys残基、DHP化Lys残基に変換されている比率を調べる際には、前記の切断効率の差異が明確になる反応条件を選択することが望ましい。すなわち、Arg残基のC末側のペプチド結合、修飾を受けていないLys残基のC末側のペプチド結合の切断は完了するが、MDA化Lys残基、DHP化Lys残基のC末側のペプチド結合の切断の進行比率は、明確に劣っている反応条件を選択することが望ましい。

10

【0145】

従って、トリプシンを用いる酵素消化の反応条件を、例えば、反応液中のトリプシン濃度を50ng/μL~100ng/μLの範囲に選択し、反応液の攪拌を行いつつ、液温を35~38の範囲に、反応時間を12時間~24時間の範囲に選択することが望ましい。また、例えば、血清300μL中から分取されたMDA-LDL中に含まれるApoB100タンパク質に対するトリプシンを用いる酵素消化を行う際、反応液全体の液量は、15μL~40μLの範囲に選択することが望ましい。

20

【0146】

MDA-LDLを抗体から分離する処理を施した場合、トリプシンを用いた酵素消化反応液は、MDA-LDL中に含まれるApoB100タンパク質由来のペプチド断片群、トリプシン由来のペプチド断片群と、トリプシンを含んでいる。

【0147】

MDA-LDLを抗体から分離することなく、抗MDA-LDL抗体と複合体を形成している、MDA-LDLを使用する場合、トリプシンを用いた酵素消化反応液は、MDA-LDL中に含まれるApoB100タンパク質由来のペプチド断片群、抗MDA-LDL抗体由来のペプチド断片群、トリプシン由来のペプチド断片群と、トリプシン、抗MDA-LDL抗体を担持しているアフィニティー担体を含んでいる。抗MDA-LDL抗体を担持しているアフィニティー担体を、固液分離により除去すると、残る液相中には、MDA-LDL中に含まれるApoB100タンパク質由来のペプチド断片群、抗MDA-LDL抗体由来のペプチド断片群、トリプシン由来のペプチド断片群と、トリプシンが含まれている。

30

【0148】

いずれの場合も、抗MDA-LDL抗体由来のペプチド断片群の全量を含む液相部分を、「断片化」処理済みの試料液として回収する。回収される「断片化」処理済みの試料液の液量は、実質的に前記酵素消化反応液全体の液量と等しい。

40

【0149】

(1-4) 「断片化ペプチド回収」ステップ204

回収された「断片化」処理済みの試料液中に含まれる溶媒除去し、調製されたペプチド断片群全量を含む乾燥物として回収する。

【0150】

回収される「断片化」処理済みの試料液の液量が、15μL~40μLの範囲である場合、溶媒除去による乾燥に、例えば、遠心エバポレーターを利用することができる。乾燥処理を行った後、調製されたペプチド断片群全量を含む乾燥物を保存する場合、例えば、-30以下の温度で冷蔵保存する。

50

【0151】

(2) 「等電点電気泳動」工程

一般に、血清中に含まれる酸化LDLの含有濃度は、 $10\mu\text{g}/\text{dL}$ 以上、 $100\mu\text{g}/\text{dL}$ 未満であるので、血清 $300\mu\text{L}$ 中に含有されている酸化LDLは、 30ng 以上、 300ng 未満である。酸化LDL1粒子中に含まれるApoB100タンパク質の重量比率は、25質量%程度であり、含有されている酸化LDLが、 30ng 以上、 300ng 未満であると、含まれるApoB100タンパク質は、 8ng 以上、 80ng 未満と見積もられる。

【0152】

回収される「調製されたペプチド断片群全量を含む乾燥物」サンプル中には、一サンプル当たり（血清 $300\mu\text{L}$ 当たり）、合計で、 8ng 以上、 80ng 未満の範囲のMDA-LDL中に含まれるApoB100タンパク質に由来するペプチド断片群が含有されている。換言すると、一サンプル当たり（血清 $300\mu\text{L}$ 当たり）、 0.015pmol 以上、 0.15pmol 未満の範囲のMDA-LDL中に含まれるApoB100タンパク質をトリプシン消化することで得られるペプチド断片の一群が含有されている。一サンプル中に含まれる、MDA-LDL中に含まれるApoB100タンパク質に由来する、各ペプチド断片は、ApoB100タンパク質一分子から、それぞれ断片が切り出されるので、各ペプチド断片の分子数は、ApoB100タンパク質の分子数または、それ以下である。従って、血清 $300\mu\text{L}$ から調製される、一サンプル中に含まれる、各ペプチド断片（ pI, M_{peptide} ）の含有量 $M(pI, M_{\text{peptide}})$ は、 0.015pmol 以上、 0.15pmol 未満の範囲になっていると推定される。

【0153】

一方、「等電点電気泳動」で分離される、各ペプチド断片（ pI, M_{peptide} ）のスポットについて、各ペプチド断片（ pI, M_{peptide} ）に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ の「 m/z 」値と、各スポットにおける「流路方向の拡がり」の状況を示す、該イオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ の分布を、「MALDI-MS 質量分析」を利用して、十分な精度と確度で測定する必要がある。その際、一サンプル中に含まれる、各ペプチド断片（ pI, M_{peptide} ）の総量 $M(pI, M_{\text{peptide}})$ は、各ペプチド断片（ pI, M_{peptide} ）のスポットの「流路方向の拡がり σ_{pI} 」と、流路の幅 W の積、 $(W \times \sigma_{pI})$ で示されるスポットの面積 $S(pI, M_{\text{peptide}})$ 内に存在すると見做せる。 $M(pI, M_{\text{peptide}}) / S(pI, M_{\text{peptide}})$ は、該スポットにおける、ペプチド断片（ pI, M_{peptide} ）の平均的な面密度に相当する。各スポットにおける「流路方向の拡がり」の状況を示す、該イオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ の分布を、「MALDI-MS 質量分析」を利用して、十分な精度と確度で測定するためには、該スポットにおける、ペプチド断片（ pI, M_{peptide} ）の平均的な面密度、 $M(pI, M_{\text{peptide}}) / S(pI, M_{\text{peptide}})$ を十分に水準にすることが必要である。

【0154】

従って、「等電点電気泳動」を行う際、「等電点タンパク質分離チップ」を利用することで、各ペプチド断片（ pI, M_{peptide} ）のスポットの面積 $S(pI, M_{\text{peptide}})$ を狭くし、ペプチド断片（ pI, M_{peptide} ）の平均的な面密度、 $M(pI, M_{\text{peptide}}) / S(pI, M_{\text{peptide}})$ を十分な水準としている。具体的には、「等電点タンパク質分離チップ」の流路の長さ L を 35mm として、その流路に沿って、 pI が $3 \sim 10$ の範囲のペプチド断片をそれぞれのスポットに分離することにより、「流路方向の拡がり σ_{pI} 」が、 $\sigma_{pI} = 0.2$ 程度である際、そのスポットの長さ δL を、 1mm 程度としている。

【0155】

「等電点電気泳動」工程102では、回収される「調製されたペプチド断片群全量を含む乾燥物」サンプル中に含まれる、MDA-LDL中に含まれるApoB100タンパク質由来のペプチド断片群、抗MDA-LDL抗体由来のペプチド断片群、トリプシン由来のペプチド断片群と、トリプシンを、等電点電気泳動により、それぞれのスポットに分離

する。その後、「等電点タンパク質分離チップ」の流路に沿って、分離されているスポットを保持した状態で、「等電点タンパク質分離チップ」全体を、 -30°C に冷却することで、流路内の「泳動後のサンプル溶液」を氷結する。さらに、氷結された「泳動後のサンプル溶液」を流路内に保持した状態で、凍結乾燥処理を施す。該凍結乾燥処理の結果、「等電点タンパク質分離チップ」の流路に沿って、分離されているスポットから、その位置において、凍結乾燥処理済みのペプチド断片のスポットへと変換される。

【0156】

「凍結乾燥処理済みのペプチド断片のスポット」は、該ペプチド断片 (pI, M_{peptide}) の等電点 pI を中心として、「流路方向の拡がり σ_{pI} 」を示す。すなわち、スポットを構成する凍結乾燥処理済みのペプチド断片の面密度は、等電点 pI を中心とする、ガウス分布と近似できる、流路方向の変化を示し、該ガウス分布の標準偏差が、「流路方向の拡がり σ_{pI} 」に相当している。

【0157】

「MALDI-MS 質量分析」を適用して、スポットの形成している、該ペプチド断片 (pI, M_{peptide}) に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のイオン強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ を測定し、流路方向の分布を解析することで、該スポットの中心 pI_{mean} を特定することが可能である。また、該 pI_{mean} を中心とするガウス分布を仮定し、測定されたイオン強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ 分布を良く近似できる標準偏差を算出し、「流路方向の拡がり σ_{pI} 」とすることが可能である。

【0158】

「等電点電気泳動」においては、その流路に沿って、 pI が $3 \sim 10$ の範囲のペプチド断片をそれぞれのスポットに分離する。その間を、 71 の区画に分割して、各区画内に存在しているペプチド断片 (pI, M_{peptide}) に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ の m/z と、そのイオン強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ を測定する。各区画の pI の差分 ΔpI は、 $(10 - 3) / 70 = 0.1$ 程度と見做すことが可能である。実際には、「等電点電気泳動」を行った際、流路に沿って形勢される pH の勾配 (dpH/dL) は、若干のバラツキを示すため、泳動用のサンプル液中に、 pI が既知のペプチド、タンパク質を複数、 pI 標準物質として添加し、該 pI 標準物質複数種のスポット位置を基準として、流路に沿って、各スポット位置の pI を推定する。

【0159】

一方、「MALDI-MS 質量分析」を適用して、各区画に存在しているペプチド断片 (pI, M_{peptide}) に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ の測定を行うため、使用される「MALDI-MS 質量分析装置」が利用するレーザー光の照射スポット径 d_{laser} を基準として、各区画の長さ ΔL を、 $\Delta L = d_{\text{laser}}$ を満たすように設定する。同時に、流路の幅 W も、該レーザー光の照射スポット径 d_{laser} を基準として、 $W = d_{\text{laser}}$ を満たすように設定する。各区画に存在しているペプチド断片 (pI, M_{peptide}) に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ の測定は、各区画の中央に、照射スポット径 d_{laser} のレーザー光を照射して、該照射スポット径 d_{laser} 内に存在するペプチド断片 (pI, M_{peptide}) をイオン化させる。

【0160】

「等電点電気泳動」工程 102 で利用する、「等電点タンパク質分離チップ」と「電気泳動・乾燥装置」の構成と、その使用法の概要を以下に説明する。

【0161】

(2-1) 「等電点タンパク質分離チップ」

図 3 に、「等電点電気泳動」工程 102 で利用する「等電点タンパク質分離チップ」の構成の一例を、模式的に示す。図 3 に模式的に示す構成例では、1本の流路 302 を設ける単一流路構成であるが、同時の複数のサンプルについて、「等電点電気泳動」を実施するため、複数本の流路 302 を並行に配置するマルチ流路構成を採用することもできる。図 3 の (A) は、フタ 304 の上面図を、図 3 の (B) は、基板 303 の上面図を、図 3 の (C) は、組み立てたチップ 300 の A-A' 断面図をそれぞれ示す。図 3 の (D) は、

基板 303 に形成されている、流路 302 の拡大図を示す。流路 302 の底面部には、複数の親水性の柱状体 301 が形成されており、底面部の両側に側壁部が形成され、溝状構造を構成している。流路 302 の両端には、リザーバ 305 a、305 b が設けられる。

【0162】

フタ 304 は、平板状のフタ基材部 306 と、フタ基材部 306 の下面に位置し、基板 303 と接するフタ樹脂部 307 とで構成される。また、フタ 304 には、流路 302 両端のリザーバ 305 a、305 b に対応する位置に、溶液注入用の貫通穴が形成されている。組み立てたチップ 300 では、基板 303 上面にフタ 304 を重ねる際、流路 302 両端のリザーバ 305 a、305 b と、フタ 304 に形成されている溶液注入用の貫通穴が一致する配置とする。その際、流路 302 の上面は、フタ 304 のフタ樹脂部 307 で覆われる。フタ 304 のうち、この流路 302 の上面を覆い、少なくとも流路 302 内に導入されるサンプル溶液と接する表面は、疎水性または撥水性とされている。特に、フタ 304 のフタ樹脂部 307 の下面の表面全体を、疎水性または撥水性とすることが好ましい。

10

【0163】

「等電点電気泳動」を行う際には、流路 302 の両端を利用して、流路 302 内に導入されるサンプル溶液に対して、高電圧を印加する。印加される高電圧によって、流路 302 内に導入されるサンプル溶液中に、流路 302 に沿った電位勾配（電界）を形成する。そのため、流路 302 内に導入されるサンプル溶液から、基板 303 を絶縁しておく必要がある。従って、基板 303 自体を、高絶縁性材料を使用して作製することが望ましい。また、フタ 304 のフタ樹脂部 307 の下面も、流路 302 内に導入されるサンプル溶液と接するため、流路 302 内に導入されるサンプル溶液から、フタ 304 のフタ樹脂部 307 を絶縁しておく必要がある。従って、少なくとも、フタ 304 のフタ樹脂部 307 自体を、高絶縁性材料を使用して作製することが望ましい。また、フタ 304 の基材部 306 自体も、高絶縁性材料を使用して作製することが望ましい。

20

【0164】

基板 303 には、流路 302 を形成するため、その流路構造を加工するにあたって、十分な精度で加工可能な高絶縁性材料を使用して作製することが望ましい。前記の要件を満足する高絶縁性材料の一例として、石英もしくはガラス、更には、PC（ポリカーボネイト）、PMMA（ポリメチルメタクリレート）等の高い絶縁特性を有するプラスチック材料を挙げることができる。

30

【0165】

なお、図 3 に例示する流路 302 は直線状流路であり、流路 302 内に導入されるサンプル溶液中に、流路 302 に沿った電位勾配（電界）を形成する際、適する形状である。が、基板 303 の上面に複数本の流路を併設する、なお、流路 302 内に導入されるサンプル溶液中に、流路 302 に沿った電位勾配（電界）を形成することが可能である限り、直線状流路以外の平面形状を採用することもできる。流路 302 自体の平面形状、流路の配置、流路の長さは、利用されるサンプルや電気泳動の条件に応じて、適宜選択される。具体的には、流路 302 の断面形状は、流路の幅 W、流路の深さ D が $3\mu\text{m} \sim 2000\mu\text{m}$ の範囲に選択されることが望ましい。流路の全長 L、流路の幅 W、ならびに、流路の深さ D は、質量分析を行い際に必要とされる単位底面積あたりのペプチド断片の量の要件を満足できる範囲に選択する。同時に、前記流路のサイズは、「等電点電気泳動」時、流路内で発生するジュール熱の放散に十分な熱効率による温度制御と高効率な流体制御を可能とできる範囲に選択する必要もある。前記二つの要件を満たすとともに、基板 303 の作製に使用する材料の加工精度等を考慮して、前記流路のサイズの選択を行う。

40

【0166】

フタ基材部 306 を作製する材料としては、該フタの機械的強度の保持や、貫通穴作製などの加工が可能で、絶縁特性に優れている材料が好適に利用される。フタ基材部 306 の作製に、例えば、石英もしくはガラス、ポリカーボネイト、PMMA などのアクリル樹脂、PDMS などのシリコン樹脂をはじめとした高分子樹脂材料を利用することができ

50

る。

【0167】

一方、フタ樹脂部307は、流路の上面を覆い、流路の側壁部の上面と、フタ樹脂部307の下面と密着させ、該流路内に充填されるサンプル溶液の漏洩、染み出しを生じさせない構成を採用している。同時に、フタ剥離を行う際、フタ304のうち、少なくともフタ樹脂部307は弾性変形して剥離の境界部に撓み構造を設ける。

【0168】

このため、フタ樹脂部307の作製には、弾性変形性が高い絶縁性材料を用いることが好ましい。例えば、フタ樹脂部307の基材に利用する、弾性変形性が高い絶縁性材料として、PDMSや、PTFE（ポリテトラフルオロエチレン）、PP（ポリプロピレン）、PE（ポリエチレン）、ポリ塩化ビニルなどのポリオレフィン、またはポリエステルなどを挙げることができる。加えて、フタ樹脂部307の下面のうち、少なくとも、流路上面に相当する領域は、疎水性または撥水性を示す表面とすることが好ましい。従って、フタ樹脂部307の下面を疎水性または撥水性を示す表面とするとするため、特に、PDMS等のシリコン樹脂、PTFE等のフッ素系樹脂などの撥水性を有する材料による被覆が好適に利用できる。あるいは、これら撥水性を有し、弾性変形性が高い絶縁性材料を、フタ樹脂部307の基材として利用してもよい。

【0169】

また、少なくとも、フタ304の外形の一端部には、基板303の外形より張り出した部分を設ける。この張り出した一端部は、フタ剥離のための外力の印加に利用される。基板303を固定して押さえつつ、フタ304の一端部に外力を印加すれば、フタ剥離が進行する。例えば、矩形の基板303、フタ304を選択した場合、基板303の長辺方向に該フタの剥離方向を選択する場合、フタ304の外形は、かかる長辺方向の長さを、該基板の長辺よりも長くする。フタ304の長辺方向に張り出した部分に外力を印加すると、その部分に外力の作用点が設定される。さらにはフタ304の剥離を終えた後、該フタを保持し、基板303上面から移動させ、除去する操作を行う際、フタ304の端部を支えるための領域をかかる張り出し部分に設定することが可能となる。また、フタ304を剥離・除去する際、外力を印加する部位として、基板303の長辺と沿って設ける、フタ304の短辺方向の張り出し部分を利用する形態を選択することも可能である。

【0170】

なお、基板303上面とフタ樹脂層307との密着強度は、基板303の上面に形成される流路302から、流路内に充填される溶液の漏洩、染み出しを生じさせない程度の密着状態達成には十分だが、所定の外力を加えることで、この密着面で剥離が進行する。また、基板303上面とフタ樹脂層307との緻密な密着状態の維持においては、フタ樹脂層307自体の密着性は低くし、両者間を密着させる外的な力の負荷に依る形態で補うことも可能である。

【0171】

上記のフタ剥離を行う手法として、例えば、国際公開第2006/085539号パンフレットに開示される方法を採用することもできる。

【0172】

(2-2) 「電気泳動・乾燥装置」

上述の「等電点タンパク質分離チップ」を利用する「等電点電気泳動」と、その後の「凍結乾燥処理」の操作に使用される電気泳動・乾燥装置の構成を以下に説明する。

【0173】

図4は、「等電点タンパク質分離チップ」に適合する電気泳動・乾燥装置400の全体構成を模式的に示す図である。電気泳動・乾燥装置400は、少なくとも、チップを収容する機構401と、「等電点電気泳動」の際、チップ中の流路に電圧を印加するための電源402・電極部403と、チップの温度を制御する機構404とを備えている。また、「等電点電気泳動」後、前記流路上において分離され、各スポットを形成しているペプチド断片、ならびに、タンパク質を、当該スポットを保持した状態で凍結乾燥処理して、「

10

20

30

40

50

凍結乾燥処理済みのペプチド断片のスポット」として固定化する、乾燥機構 405 を備えている。

【0174】

該電気泳動・乾燥装置 400 を用いて、「等電点タンパク質分離チップ」の流路内のサンプル溶液を等電点電気泳動した後、温度制御機構 404 を用いて、流路内のサンプル溶液を急速凍結する。急速凍結することで、流路内のサンプル溶液中において、各スポットを形成しているペプチド断片、ならびに、タンパク質の分離状態を固定する。急速凍結を終えた後、その冷却温度に保持した状態で、フタ 304 を基板 303 から剥離し、除去する。その結果、基板 303 上に形成されている流路内に保持されている、「泳動後のサンプル溶液」の氷結体が露呈される。該氷結体は、凝固した液体成分（水）を含んでおり、流路内で凍結状態に保持したまま、乾燥機構 405 を用いて、凝固した液体成分（水）を除去し、凍結乾燥処理を施す。この凍結乾燥処理の際、温度制御装置 404 を利用して、凍結状態に保持し、凝固した液体成分（水）の除去は、密閉槽や減圧機構等を備えた乾燥機構 405 を用いて実施される。該凍結乾燥処理の結果、「等電点タンパク質分離チップ」の流路に沿って、分離されている各スポットは、その位置を保持したまま、「凍結乾燥処理済みのペプチド断片のスポット」として、乾燥固定される。

10

【0175】

次に、より具体的な例示により、「等電点タンパク質分離チップ」に適合する電気泳動・乾燥装置を構成する各機構とその機能を説明する。なお、「等電点タンパク質分離チップ」に適合する電気泳動・乾燥装置の構成は、下記の具体的な実施態様に示す構成に限定

20

【0176】

「等電点電気泳動」を行う際、「等電点タンパク質分離チップ」の基板 303 上面とフタ樹脂層 307 との緻密な密着状態を維持する。その際、両者間に外力を負荷して、両者の緻密な密着状態を維持する手法を採用することが好ましい。両者間に加える外力の負荷手段として、フタ 304 の上面から荷重を負荷する形態である、負荷荷重印加機構を利用することができる。この負荷荷重印加機構は、基板 303 とフタ樹脂層 307 との密着面全面に実質的に均等な負荷荷重の分散が可能な形態を選択することが望ましい。

【0177】

緻密な密着状態を維持することにより、流路 302 に導入されるサンプル溶液が、基板 303 上面とフタ樹脂層 307 下面の接する部位から流路外に漏れ出す「液漏れ」を防止する。従って、サンプル溶液の流路 302 への導入に先立ち、前記負荷荷重印加機構を動作させて、緻密な密着状態を維持する。「等電点電気泳動」を終了した後、急速凍結により、「泳動後のサンプル溶液」の氷結体を作製すると、「液漏れ」を防止する必要がなくなる。従って、急速凍結を終えた後、前記負荷荷重印加機構を用いた外力負荷を終える。その結果、急速凍結を終えた後、フタ 304 を剥離する操作を実施する際には、フタ 304 の上面は、荷重が負荷されていない状態となる。

30

【0178】

基板 303 を安定的に固定するには、基板 303 の底面、あるいは基板 303 の上面を固定する形式が望ましい。例えば、基板 303 の底面を平坦な平面に加工した上で、真空チャック方式の固定ステージ上の所定位置に基板 303 の底面を固定する形式が好適に利用される。また、基板 303 上面を圧迫固定することも、容易な手法であり、好適である。この場合、基板 303 上面のフタ 304 がない部分を圧迫固定することが望ましい。

40

【0179】

なお、基板 303 を安定的に固定する目的では、基板 303 上面のフタ 304 がある部分を圧迫固定する形態を採用することも可能である。

【0180】

基板 303 を固定した状態で、基板 303 からフタ 304 を剥離・除去する。従って、基板 303 上面のフタ 304 がある部分を圧迫固定し、フタ 304 を剥離する際に、その圧迫固定を解除する形態を採用すると、フタ 304 を剥離する時点で、基板 303 を安定

50

的に固定することが困難となる。基板 303 上面のフタ 304 がある部分を圧迫固定する形式を採用する場合には、フタ 304 を剥離する際、基板 303 の底面を固定する形式、あるいは、基板 303 上面のフタ 304 がない部分を圧迫固定する形式を使用する。

【0181】

基板 303 からフタ 304 を剥離・除去する際には、基板 303 を固定した上で、フタ 304 の一端部に外力を印加し、基板 303 とフタ 304 との密着面に対して実質的に垂直方向に、そのフタ 304 の一端部を強制的に変位させる。この一端部の変位に付随して、フタ 304 は、接着面に対して撓み構造を有するものとなる。その外力を印加した段階において基板 303 の移動を防止するため、上記の通り、基板 303 を固定する。

【0182】

乾燥機構は、流路内で凍結状態に保持したまま、「泳動後のサンプル溶液」の氷結体に対して、凍結乾燥処理を施すことが可能である限り、その構成に特に制限はない。例えば、基板 303 からフタ 304 を剥離・除去した後、露出された「泳動後のサンプル溶液」の氷結体を流路内で、凍結状態に保持するための温度調節機構、ならびに、該「泳動後のサンプル溶液」の氷結体中に含まれる、凝固した液体成分（水）を昇華させる、あるいは、蒸散させるための密閉槽と減圧機構等を備えた凍結乾燥機構が挙げられる。前記凍結乾燥機構を使用して、密閉槽中に基板 303 を配置し、密閉槽内を減圧することにより、「泳動後のサンプル溶液」の氷結体中に含まれる、凝固した液体成分（水）を昇華させ、流路 302 に沿って、分離されている各スポットは、その位置を保持したまま、「凍結乾燥処理済みのペプチド断片のスポット」として、乾燥固定される。

【0183】

「等電点タンパク質分離チップ」に適合する電気泳動・乾燥装置は、操作の容易性の観点から、さらに制御部を備えることが好ましい。制御部は、「等電点電気泳動」を行う際、電流モニター部を用いて、流路 302 内のサンプル溶液中を流れる電流値をモニターし、電源 402 から供給する電圧を制御するために用いることができる。さらに、制御部は、電流値のモニター、電圧の印加時間、使用電力量に基づき、「等電点電気泳動」の終了を判断するために、また、冷却機構の動作を制御するために用いることができる。さらに、制御部は、フタ 304 を吸着する、あるいは、基板 303 の上面にフタ 304 を接触・固定する機と、基板 303 を吸着する、あるいはチップ台上に基板 303 を接触・固定する機構と、固定した基板 303 の上面から、フタ 304 を剥離した後、相対的に遠ざける移動機構の動作を制御し、流路 302 を露出させる一連の操作を実行するために用いることができる。さらに、制御部は、溶液注入機構として、差圧を発生させる減圧・加圧機構を制御するために、また、乾燥機構として、温度調節機構や減圧機構を制御するために、あるいは、信号検出部として、「等電点電気泳動」による、ペプチド断片の分離状態を確認するために用いることができる。

【0184】

上記「等電点タンパク質分離チップ」に適合する「電気泳動・乾燥装置」を使用する際、その使用方法について、以下に簡単に記述する。

【0185】

まず、チップ 300 を、チップ・ガイドに沿ってチップ収容部に設置する。チップ収容部は、チップ台と密閉槽で構成される。チップ 300 は、チップ台上に固定される。固定されているチップ 300 の温度制御は、このチップ台を通して熱の授受を行い、温度制御機構（温度センサー、ペルチェ素子等）を用いて行う。温度制御機構は、「等電点電気泳動」時にチップの温度を一定に保持するため、「急速凍結」時にチップを冷却するため、「凍結乾燥処理」時にチップ温度を加熱する、あるいは「凍結」状態に保持するため、氷点以下の温度に維持するために用いられる。

【0186】

次に、フタ 304 を基板 303 の上面に圧迫させて、フタ 304 を固定し、密着状態を保持する。流路 302 の両端に設けるリザーバ 305 a、305 b の一方に、サンプル溶液を注入する。その後、吸引操作等を行い、流路 302 全体にサンプル溶液を満たす。続

けて、流路302の両端に設けるリザーバ305a、305bに、それぞれ陰極液、陽極液を注入する。以上の操作、フタ304の圧迫固定、サンプル溶液の注入後、吸引操作等の各操作に利用される機構は、全て、制御部で、それらの機構の動作を制御し、実行させることもできる。

【0187】

さらに、フタ304の溶液注入用の貫通穴を介して、電極部の陽極・陰極を、それぞれ、陽極液、陰極液に接するように配設する。電源から配線を通じて電極部に電圧を印加し、電流モニター部を用いて電極部の陽極・陰極間の電流値を測定する。流路302に導入されているサンプル溶液中を流れる電流は、電圧印加時から徐々に減少するため、この電流値あるいは電力値を測定し、その時間的变化をモニターすることにより、等電点電気泳動による分離終了を判断できる。

10

【0188】

「等電点電気泳動」を終了した直後に、温度制御機構を用いて、チップ300を冷却し、流路302内の「泳動後のサンプル溶液」を凍結させる。流路302内の「泳動後のサンプル溶液」中では、流路302に沿って、「等電点電気泳動」によって分離された、ペプチド断片やタンパク質が、それぞれスポットを形成して溶解している状態となっている。その溶媒は水であるが、流路302内にpH勾配を形成するために使用された、酸、塩基、両性担体成分などが溶解しており、凝固点降下のため、氷結が開始する温度は氷点(0)よりも低くなっている。そのため、流路302内の「泳動後のサンプル溶液」全体を、氷結が開始する温度よりも有意に低い温度まで急速に冷却し、一旦過冷却状態とすることで、溝状の流路302内の「泳動後のサンプル溶液」全体を一気に氷結させることが望ましい。すなわち、チップ台に接する、チップ300の基板303の底面から、流路302全体を均一な温度となるように急速に冷却し、氷結が開始する温度よりも有意に低い温度とすることで、一旦過冷却状態とする基板冷却機構、つまり、温度制御機構404を利用することが好ましい。この冷却機構は、基板303の底面全体を均一に冷却するため、基板303の底面全体と均一に熱的接触する配置を採ることが望ましく、チップ台と温度制御機構とを一体化する形態が望ましい。

20

【0189】

次に、基板303の上面からフタ304を剥離する。このとき、チップ収容部にある、チップ300を冷却し続けることで、「泳動後のサンプル溶液」の氷結体を流路302内に保持したまま、基板303上面を露出することができる。

30

【0190】

基板303上面とフタ304下面とを密着させ、所定の配置で接着状態を達成している接着力を開放するため、基板303上面に対して実質的に垂直な方向成分を有する外力を、フタ304の端部に印加して、フタ304を撓ませ、この撓みを所定の曲率に保持しつつ、フタ304の端部を上方に持ち上げる形式で所望の速度で剥離を進める。このフタ304の剥離の過程で、フタ304のフタ樹脂部307の下面と接触している、溝状流路302内の「泳動後のサンプル溶液」の氷結体上面でも、速やかに剥離が進み、「泳動後のサンプル溶液」の氷結体は溝状流路302内に残された状態で、フタ304の剥離を完了させる。その後、分離されたフタ304は、例えば、フタ304の端部をツマミ部でチャックした状態に保持し、ツマミ部を移動させることで、基板303上面から取り除かれる。

40

【0191】

「泳動後のサンプル溶液」の氷結体は流路302内に残され、露呈された状態となっており、そのまま、「凍結乾燥処理」を行うことが可能である。フタ304の剥離後、「泳動後のサンプル溶液」の氷結体を凍結状態に保持しつつ、チップ300を加熱するか、あるいは、チップ300の温度を制御しつつ、密閉槽であるチップ収容部の減圧を行って、「凍結乾燥処理」を実施する。「泳動後のサンプル溶液」の氷結体中に含まれる、凝固した液体成分(水)を除去する「凍結乾燥処理」が完了すると、流路302に沿って、分離されている各スポットは、その位置を保持したまま、「凍結乾燥処理済みのペプチド断片

50

のスポット」として、乾燥固定される。「凍結乾燥処理」の完了後、チップ300の温度を、外気に含まれる水蒸気が結露する温度（露点温度）を超える温度に上昇した後、チップ収容部の内圧を大気圧にまで戻す。

【0192】

「サンプル前処理」工程101において「調製されたペプチド断片群全量を含む乾燥物」サンプルに対して、上述の手順に従って、「等電点タンパク質分離チップ」に適合する「電気泳動・乾燥装置」を使用する「等電点電気泳動」工程102を実施する。その結果、「調製されたペプチド断片群全量を含む乾燥物」サンプル中に含まれる、MDA-LDL中に含まれるApoB100タンパク質をトリプシン消化することで得られるペプチド断片の一群は、流路302に沿って、分離され、そのスポット位置を保持したまま、「凍結乾燥処理済みのペプチド断片のスポット」の一群として、流路302上に乾燥固定される

10

(2-3) 「等電点電気泳動」条件

「等電点電気泳動」の対象となるトリプシン消化による生成される、MDA-LDL中に含まれるApoB100タンパク質由来のペプチド断片群は、下記の6つのタイプに大別される。

(タイプA-0) C末にArg残基又はLys残基を有し、酸性アミノ酸残基を含まないペプチド断片；

(タイプA-1) C末にArg残基又はLys残基を有し、酸性アミノ酸残基一つを含むペプチド断片；

20

(タイプA-2) C末にArg残基又はLys残基を有し、酸性アミノ酸残基二つ以上を含むペプチド断片；

(タイプA'-0) C末にMDA化Lys残基を有し、酸性アミノ酸残基を含まないペプチド断片；

(タイプA'-1) C末にMDA化Lys残基を有し、酸性アミノ酸残基一つを含むペプチド断片；

(タイプA'-2) C末にMDA化Lys残基を有し、酸性アミノ酸残基二つ以上を含むペプチド断片；

これら(タイプA-0)～(タイプA'-2)のペプチド断片のpIは、恐らくは、(タイプA-0) > (タイプA-1) > (タイプA'-0) > (タイプA-2) > (タイプA'-1) > (タイプA'-2)の序例で小さくなり、少なくとも、pI 3～10の範囲に含まれると予測される。

30

【0193】

従って、「等電点電気泳動」においては、pI 3～10の範囲のペプチド断片を分離する条件を採用する。「陽極液」として、アルカリ溶液、例えば、40 mM水酸化ナトリウム水溶液(pH 12)、「陰極液」として、酸溶液、例えば、100 mMリン酸水溶液(約pH 2)を利用し、流路内にpH勾配を形成する。なお、 H_3PO_4 (オルトリン酸)のpKaは、 $pK_{a1}=2.12$, $pK_{a2}=7.21$, $pK_{a3}=12.67$ (25)と報告されている。

【0194】

「等電点電気泳動」のサンプル溶液は、「サンプル前処理」工程101において「調製されたペプチド断片群全量を含む乾燥物」サンプルを、下記の「等電点電気泳動」用サンプル調製溶液中に溶解して調製する。

40

【0195】

「等電点電気泳動」用サンプル調製溶液は、例えば、66%(v/v) cIEF gel、3%(v/v) Carrier ampholyte (pI 3-10)を含む水溶液を利用する。該サンプル調製溶液中には、pIと分子量Mが既知のタンパク質をpIの標準として添加し、「等電点電気泳動」後、流路に沿ってスポットの形成しているペプチド断片のpIを推定する際、その基準に利用する。例えば、該サンプル調製溶液中に、500 fmol/ μ L angiotensin II (pI 6.74)、500 fmol/ μ L fibrinopeptide B (pI 4.0)を添加する。加えて、必要に応じて、2%(v/v) 蛍光マーカー(pI 4, 5.5, 9の3種類)を、該サンプル調製溶液中に

50

添加することもできる。該蛍光マーカー三種は、「等電点電気泳動」後、流路に沿って、酸側からアルカリ側に向かって、 $pI4$ 、 $pI5.5$ 、 $pI9$ に相当する位置にスポットを形成する。従って、流路に沿って、酸側からアルカリ側に向かって、蛍光顕微鏡により、各蛍光マーカーのスポットからの蛍光を観察することで、流路に沿って、酸側からアルカリ側に向かって、 $pI4$ 、 $pI5.5$ 、 $pI9$ に相当する位置を判別する際、利用できる。

【0196】

「サンプル前処理」工程101において、例えば、血清300 μ L中に含まれる、MDA-LDL中に含まれるApoB100タンパク質を分取して「調製されたペプチド断片群全量を含む乾燥物」サンプルを、前記サンプル調製溶液8 μ L中に溶解することができる。

10

【0197】

「等電点タンパク質分離チップ」の流路302の全長Lは、例えば、35mm、また、流路の幅Wは、例えば、2mmに選択する。後述するように、「MALDI-TOF MS 質量分析」工程103では、流路302の全長Lを71の区画に分割して、各区画において、MALDI-TOF MSスペクトルを測定する際、各区画の長さ ΔL は、約0.5mm、各区画の pI の変化量 ΔpI は、0.1程度となる。

【0198】

流路302の底面部に形成される柱状体301の形状、長さ L_{pillar} 、幅 W_{pillar} 、高さ H_{pillar} は、通常、 $L_{pillar} > H_{pillar} > W_{pillar}$ となるように選択する。柱状体の長さ L_{pillar} は、前記各区画の長さ ΔL の1/10以下に選択することが望ましい。また、柱状体の幅 W_{pillar} は、流路の幅Wの1/10以下に選択することが望ましい。

20

【0199】

この柱状体は、流路302を作製する際、同時に作製される。従って、流路302の深さDは、該流路302の底面部に形成される柱状体の形状、長さ L_{pillar} 、幅 W_{pillar} 、高さ H_{pillar} を考慮し、流路302の深さDは、 $2H_{pillar} > D > H_{pillar}$ の範囲に選択することが望ましい。例えば、流路302の深さDを、 $D = H_{pillar}$ となるように選択することがより望ましい。該柱状体の側壁面は、親水性を示すことが望ましく、例えば、柱状体の側壁面上に、親水性コートを施すことが好ましい。また、流路302の底面部に形成される柱状体を規則的に配置し、親水性の側壁面を有する柱状体間に生じる隙間が、サンプル溶液に対して、毛管現象を生起するに十分な狭さを示すものとする。ことが望ましい。

30

【0200】

流路302中にサンプル溶液を導入する際、一方のリザーバに注入したサンプル溶液は、親水性の流路302の底面に濡れ拡がり、さらに、流路302の底面部に形成される柱状体間の狭い隙間を、毛管現象を利用することで進行することで、流路302の底面部全体に濡れ拡がる。最終的に、一方のリザーバに注入したサンプル溶液は、流路302中、底面部に柱状体301が形成されている領域全体に進入するため、流路302全体に均一に導入された状態となる。この毛管現象を利用する、サンプル溶液の導入手段を利用するので、吸引操作を使用することなく、サンプル溶液を流路302全体に均一に導入することができる。

40

【0201】

その後、流路302の両端に設けるリザーバ305a、305bに、それぞれ注入される「陰極液」、「陽極液」は、流路302内に既に充填されている、サンプル溶液と流路302の両端で接する状態となる。

【0202】

リザーバ305a、305bに、それぞれ注入される「陰極液」、「陽極液」の間に電圧を印加すると、流路に沿って、電圧勾配（電界）が形成され、また、 pH の勾配も形成される。流路に沿って形成される、電圧勾配（電界）と pH の勾配を利用して、流路302中に導入されているサンプル溶液中に含有されるペプチド断片、タンパク質、ならびに

50

、蛍光マーカーの「等電点電気泳動」がなされる。

【0203】

「等電点電気泳動」時には、「陰極液」、「陽極液」の間の電圧印加は、例えば、1.5 kV、60 s；0 V、30 s；3.0 kV、720 sとすることで、まず、サンプル溶液中に含有されるペプチド断片、タンパク質、ならびに、蛍光マーカーを電圧勾配（電界）を利用し、流路の中央部に集積した後、形成されるpHの勾配と電圧勾配（電界）を利用して、それぞれのpIに従って、分離し、スポットを形成させる。

【0204】

（3）「MALDI-TOF MS 質量分析」工程

「凍結乾燥処理済みのペプチド断片のスポット」の一群として、流路302上に乾燥固定されている、MDA-LDL中に含まれるApoB100タンパク質をトリプシン消化することで得られるペプチド断片の一群について、「MALDI-TOF MS 質量分析」を利用して、各ペプチド断片（pI, M_{peptide} ）に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ の m/z 、該イオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のイオン強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ の流路方向の分布を測定する。

10

【0205】

具体的には、流路302に沿って、酸側からアルカリ側に向かって、pIが3～10の範囲で、乾燥固定されている各スポットを構成するペプチド断片（pI, M_{peptide} ）のpIは増加している。従って、流路302に沿って、酸側からアルカリ側に向かって、71の区画に分割して、各区画内に存在しているペプチド断片（pI, M_{peptide} ）に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ の m/z と、そのイオン強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ を測定する。

20

【0206】

各スポットを構成しているペプチド断片（pI, M_{peptide} ）は、そのpIに相当する区画において、該ペプチド断片（pI, M_{peptide} ）に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のイオン強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ は極大を示し、そのスポットの流路方向の分布に伴って、その前後の区画で測定されるイオン強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ は減少する。各区画jの中央のpI値を pI_j （ $j = 1 \sim 71$ ）、該区画jにおいて検出される $(m/z) = ((M_k + 1)/1)$ のイオン種 $[M_k + H]^+$ のイオン強度 $I(pI_j, [M_k + H]^+)$ を、 $(pI_j, (m/z))$ 平面上に二次元プロットすると、図8に例示するように、各スポットを構成しているペプチド断片（pI, M_{peptide} ）に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ は、該 $(pI_j, (m/z))$ 平面上において、 $(pI_{\text{mean}}, (M_{\text{peptide}} + 1)/1)$ に極大点を示すイオン強度分布を与えるはずである。

30

【0207】

「MALDI-TOF MS 質量分析」工程103では、流路302に沿って、分離され、そのスポット位置を保持したまま、「凍結乾燥処理済みのペプチド断片のスポット」の一群を特定するため、流路302に沿って、酸側からアルカリ側に向かって、71の区画に分割して、各区画j（ $j = 1 \sim 71$ ）において、MALDI-TOF MSスペクトルを測定する。各区画jにおいて測定されるMALDI-TOF MSスペクトルに基づき、該区画jにおいて検出される、複数のイオン種kの $(m/z) = ((M_k + 1)/1)$ と、そのイオン強度 $I(pI_j, [M_k + H]^+)$ を決定することができる。

40

【0208】

以下に、「MALDI-TOF MS 質量分析」工程103において、流路302に沿って、酸側からアルカリ側に向かって、71の区画に分割して、各区画j（ $j = 1 \sim 71$ ）において、MALDI-TOF MSスペクトルを測定する手順を、説明する。

【0209】

「等電点電気泳動チップ」の流路上には、「等電点電気泳動」工程102において、分離され、そのスポット位置を保持したまま、「凍結乾燥処理済みのペプチド断片のスポット」の一群として、乾燥固定されている。該「等電点電気泳動チップ」の流路に、MALDI-TOF MSの測定で利用されるマトリックス剤溶液を塗布し、乾燥処理して、測

50

定用マトリックスを流路上に形成する。

【0210】

測定用マトリックスを形成した後、流路に沿って、酸側からアルカリ側に向かって、71の区画に分割された、各区画j (j = 1 ~ 71) について、順次、MALDI-TOF MSスペクトルを測定する。

【0211】

以下に、MALDI-TOF MSの測定で利用されるマトリックス剤溶液、マトリックス剤溶液の塗布に利用する「溶液塗布装置」、MALDI-TOF MSスペクトルの測定に利用される「MALDI-TOF MS 質量分析装置」について、説明する。

【0212】

(3-1) 「マトリックス剤溶液」

ApoB100タンパク質自体は、アミノ酸数が4500を超える巨大タンパク質であるが、測定対象は、MDA-LDL中に含まれるApoB100タンパク質をトリプシン消化することで得られるペプチド断片であるため、アミノ酸数は50以下であり、マトリックス剤として、シナピン酸(3,5-ジメトキシ-4-ヒドロキシケイ皮酸)、CHCA(α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸)、DHB(2,5-ジヒドロキシ安息香酸)等が好適に用いられる。

【0213】

一方、測定を行う、各区画j (j = 1 ~ 71) に存在している、ペプチド断片に由来するイオン種 $[M_k + H]^+$ の(m/z) = (($M_k + 1$) / 1)を高い確度で決定する必要がある。従って、各区画j (j = 1 ~ 71) で測定されるMALDI-TOF MSスペクトル中に、そのm/z値の更正に利用される、質量(M)が既知のペプチド、タンパク質に起因するイオン種 $[M + H]^+$ のピークを複数含むことが好ましい。例えば、質量更正用ペプチドとして、900 fmol/ μ L Bradykinin fragment 1-7 (M = 757.3997)、200 fmol/ μ L ACTH fragment18-39 (human) (M = 2465.1986)、200 fmol/ μ L Insulin B chain oxidized (bovine) (M = 3494.6513)を含有させる。

【0214】

「等電点電気泳動」において、スポットを形成しているペプチド断片は、通常、電氣的に中性となっている。また、凍結乾燥処理を行った時点でも、ペプチド断片は、通常、電氣的に中性となっている。凍結乾燥処理後、通常、該ペプチド断片中に存在するカルボキシル基は、-COOHとなっているが、一部、金属塩型の $-COO^-Na^+$ の形態となっているものが混入する場合がある。質量分析に先立ち、金属塩型の $-COO^-Na^+$ を-COOHの形態に変換することが望ましい。その目的で、マトリックス剤溶液中には、プロトン供与体となる、トリフルオロ酢酸を僅かに加える。

【0215】

また、マトリックス剤溶液を塗布した後、含まれる溶媒の蒸散を容易に行うため、水より沸点が有意に低く、水と均一に混合する極性溶媒と、水との混合溶媒を使用する。

【0216】

マトリックス剤溶液として、例えば、20 μ mol/ μ L sinamic acid、0.05% (v/v) TFA、2% (v/v) formamide、70% acetonitrile (沸点82)、900 fmol/ μ L Bradykinin fragment 1-7、200 fmol/ μ L ACTH fragment18-39 (human)、200 fmol/ μ L Insulin B chain oxidized(bovine)を含む水溶液を利用することができる。

【0217】

前記組成のマトリックス剤溶液を使用する際には、深さDの流路302、例えば、深さ10 μ mの流路に対して、マトリックス剤溶液の塗布膜厚は、該流路302の深さDを超えない範囲に選択する。上述する質量更正用ペプチド、マトリックス剤の含有濃度を選択することにより、測定に必要とされる、単位面積当たりのマトリックス剤の量、添加されている質量更正用ペプチドの量を満足することが可能である。

【0218】

「等電点電気泳動チップ」の流路内に、マトリックス剤溶液を均一な塗布膜厚で塗布す

10

20

30

40

50

る。なお、マトリックス剤溶液の塗布膜厚は、流路の深さDを超えない範囲に選択される。従って、流路とその両端に設けるリザーバ部分からなる、窪み領域全体として、塗布されるマトリックス剤溶液の液量の合計は、該窪み領域の全容量を超えない範囲に選択される。

【0219】

(3-2) 「溶液塗布装置」

流路内に、マトリックス剤溶液を均一な塗布膜厚で塗布するため、溶液塗布装置が利用される。通常、溶液塗布装置は、微細な円筒から、シリンジあるいはガスによる圧力でマトリックス剤溶液を適量ずつ押し出す機構と、前記微細な円筒とチップとの相対位置を変える機構とを具えるディスペンサーの構成をとる。

10

【0220】

該溶液塗布装置を利用して、各流路に対して、流路とその両端に設けるリザーバ部分からなる、窪み領域全体に対して、所定のマトリックス剤溶液液量を供給する。流路の底面部は、親水性であるため、供給されるマトリックス剤溶液は、流路の底面部全体を均一に覆うように濡れ拡がる。

【0221】

塗布されたマトリックス剤溶液の乾燥は、マトリックス剤溶液中に含まれる溶媒成分の蒸散を促進するため、加熱して行う。その際、加熱温度 T_{drying} は、マトリックス剤溶液中に含まれる溶媒成分の沸点 T_{bp} に対して、 $T_{\text{drying}} < T_{\text{bp}}$ の範囲に選択される。例えば、上に例示するマトリックス剤溶液の場合、溶媒成分として、ホルムアルデヒド、アセトニトリル、水を含んでおり、そのうち、最も低い沸点を有するアセトニトリルの沸点 82 よりも低い、 80 に加熱温度 T_{drying} を設定することができる。すなわち、溶媒成分の沸点を超えると、気泡が発生し、均一に乾燥処理されたマトリックスの形成が困難とすることを回避する。

20

【0222】

(3-3) 「MALDI-TOF MS 質量分析装置」

流路に沿って、分離され、そのスポット位置を保持したまま、「凍結乾燥処理済みのペプチド断片のスポット」の一群を特定するため、流路に沿って、酸側からアルカリ側に向かって、71の区画に分割して、各区画 j ($j = 1 \sim 71$) において、MALDI-TOF MSスペクトルを測定する。各区画の pI の変化量 ΔpI は 0.1 程度であるため、スポットを構成するペプチド断片 ($pI_{\text{mean}}, M_{\text{peptide}}$) に由来するイオン種は、該スポットの「流路方向の拡がり σ_{pI} 」を考慮すると、 pI_{mean} に相当する区画に加えて、その前後、 $pI_{\text{mean}} \pm \sigma_{pI}$ の範囲に相当する、複数の区画においても、検出される。また、各区画 j の pI の範囲に、 pI_{mean} を示すペプチド断片 ($pI_{\text{mean}}, M_{\text{peptide}}$) も複数種存在する。従って、各区画 j において測定されるMALDI-TOF MSスペクトル中には、相当数のペプチド断片に由来するイオン種 $[M_k + H]^+$ のピークが含まれる。

30

【0223】

これら相当数のペプチド断片に由来するイオン種 $[M_k + H]^+$ のピークについて、その $(m/z) = ((M_k + 1)/1)$ を高い確度で決定するとともに、そのイオン強度 $I(pI_j, [M_k + H]^+)$ を高い精度で測定する必要がある。少なくとも、 $(m/z) = ((M_k + 1)/1)$ については、測定誤差 $\Delta(m/z) = 0.2$ 程度の確度であることが望ましい。

40

【0224】

また、スポットを構成するペプチド断片 ($pI_{\text{mean}}, M_{\text{peptide}}$) について、スポットの「流路方向の拡がり σ_{pI} 」に起因する、イオン強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)$ の分布に基づき、該スポットの中心の pI_{mean} を特定する際、隣接する区画で測定される、イオン強度 $I(pI_j, [M_k + H]^+)$ の比較を行う必要がある。各区画で測定されるスペクトル間でピーク強度の比較を行うため、マトリックス剤溶液中に添加されている内部標準のペプチドに由来するイオン種のイオン強度を基準として、各区画で測定されるスペクトル中のピーク強度の標準化を行う。このピーク強度の標準化に利用する、内部標準のペプチドとして、上述の質量更正用ペプチドの一つを使用することが望ましい。例えば、先

50

に例示したマトリックス剤溶液の場合、質量更正用ペプチドのうち、Bradykinin fragment 1-7の添加量を高く設定し、ピーク強度の標準化に利用する、内部標準のペプチドとしても利用している。

【0225】

測定に使用する「MALDI-TOF MS 質量分析装置」は、チップを質量分析装置内にセットするターゲットホルダーと、レーザ光照射位置に、チップ上の流路に沿って区画している、各区画を移動させ、レーザ光を照射する光照射機構と、各区画に対するレーザ光照射によりイオン化される、ペプチド断片に由来するイオン種 $[M_k + H]^+$ を検出し、質量スペクトルを得る解析機構とを具えている。

【0226】

レーザ光の照射スポット径 d_{laser} は、 $50\mu m \sim 200\mu m$ の範囲に選択する。利用するマトリックス剤の種類に応じて、「MALDI-TOF MS」で利用する、パルス・レーザ光の波長を選択する。パルス・レーザ光照射を繰り返し、検出される、イオン種 $[M_k + H]^+$ のイオン強度を積算することで、各区画の質量スペクトルを測定する。パルス・レーザ光照射の繰り返し回数は、ピーク強度の標準化に利用する、内部標準のペプチドに起因するイオン種のピーク強度が、所定の強度範囲になるように選択される。

【0227】

測定するイオン種 $[M_k + H]^+$ の (m/z) の範囲は、対象のペプチド断片は、アミノ酸数 5 以上のペプチド断片に限定するため、 $400 < (m/z) < 15000$ の範囲に設定する。

【0228】

例えば、測定されるスペクトル上における、上記の三種質量更正用ペプチドに由来するイオン種 $[M_{Mass-standard} + H]^+$ のピーク位置に基づき、 (m/z) の更正を行う。また、各区画 j において測定される、質量更正用ペプチドのうち、Bradykinin fragment 1-7 に由来するイオン種 $[M_{Bradykinin} + H]^+$ のピーク強度 I_j (Bradykinin) を基準として、ペプチド断片に由来するイオン種 $[M_k + H]^+$ のピーク強度 $I(pI_j, [M_k + H]^+)$ を標準化し、相対値 $(I(pI_j, [M_k + H]^+) / I_j(\text{Bradykinin})) \times 100 \equiv I_{rel.}(pI_j, [M_k + H]^+)$ を利用して、異なる区画のスペクトルの比較を行う。

【0229】

(4) 「サンプルプロファイリング」工程 104

「サンプルプロファイリング」工程 104 では、流路に沿って、71 の区画に分割して、各区画 j ($j = 1 \sim 71$) において測定された、MALDI-TOF MS スペクトルに基づき、「等電点電気泳動」工程において、分離されている、各スポットを形成しているペプチド断片 ($pI_{mean}, M_{peptide}$) について、その pI_{mean} と分子量 $M_{peptide}$ を特定する。

【0230】

(4-1) 各区画 j の pI 値 (pI_j) の推定

まず、流路に沿って、71 の区画に分割して、各区画 j ($j = 1 \sim 71$) について、該区画 j 中、MALDI-TOF MS スペクトルの測定の際、レーザ光照射位置、区画 j ($j = 1 \sim 71$) の中央位置、 $L_{mean}(j)$ の pI 値 (pI_j) を推定する。

【0231】

「等電点電気泳動」を行う際、サンプル溶液中に添加した、蛍光マーカー ($pI_{4,5,9}$ の 3 種類) は、「等電点電気泳動」が終了した時点で、流路に沿って、 $pI_{4,5,9}$ に相当する位置にそれぞれスポットを形成している。「凍結乾燥処理」を終えた時点で、蛍光顕微鏡を用いて、これら蛍光マーカーに起因する蛍光を発している位置を特定する。各蛍光マーカーのスポットの中心位置、 $L(pI=4)$ 、 $L(pI=5.5)$ 、 $L(pI=9)$ は、各区画 j ($j = 1 \sim 71$) の中央位置、 $L_{mean}(j)$ のいずれと一致しているかを特定する。前記 $L(pI=4)$ 、 $L(pI=5.5)$ 、 $L(pI=9)$ と、それぞれ一致している、区画 j の中央位置、 $L_{mean}(j)$ の pI 値 (pI_j) は、それぞれ、 $pI_j = 4$ 、 $pI_j = 5.5$ 、 $pI_j = 9$ である。

10

20

30

40

50

【0232】

また、 pI を推定する際、その基準に利用する pI 標準ペプチド、angiotensin II ($pI_{6.74}$ 、 $M_{angiotensin\ II} = 1045.534$)、fibrinopeptide B ($pI_{4.0}$ 、 $M_{fibrinopeptide\ B} = 1569.669$)のスポットを特定する。蛍光マーカーのスポット位置から決定された、 pI_j 4、 pI_j 5.5、 pI_j 9の各区画を基準として、前記二つの pI 標準ペプチドのスポットの中心が位置する区画を推定する。推定された区画を中心として、前後5つの区画で測定されるMALDI-TOF MSスペクトル中、angiotensin IIに由来するイオン種 ($[M_{angiotensin\ II} + H]^+$) のピーク (m/z) = ($M_{angiotensin\ II} + 1$)、ならびに、fibrinopeptide Bに由来するイオン種 ($[M_{fibrinopeptide\ B} + H]^+$) のピーク (m/z) = ($M_{fibrinopeptide\ B} + 1$) を、それぞれ特定する。

10

【0233】

特定されたangiotensin IIに由来するイオン種 ($[M_{angiotensin\ II} + H]^+$) のピーク強度相対値 $I_{rel.}(pI_j, [M_{angiotensin\ II} + H]^+)$ を比較すると、ピーク強度相対値 $I_{rel.}(pI_j, [M_{angiotensin\ II} + H]^+)$ が極大を示す、一つの区画を見出すことができる。angiotensin IIのスポット中心が見出される、区画 j の中央位置、 $L_{mean}(j)$ の pI 値 (pI_j) は、 pI_j 6.74である。特定されたfibrinopeptide Bに由来するイオン種 ($[M_{fibrinopeptide\ B} + H]^+$) のピーク強度相対値 $I_{rel.}(pI_j, [M_{fibrinopeptide\ B} + H]^+)$ を比較すると、ピーク強度相対値 $I_{rel.}(pI_j, [M_{fibrinopeptide\ B} + H]^+)$ が極大を示す、一つの区画を見出すことができる。fibrinopeptide Bのスポット中心が見出される、区画 j の中央位置、 $L_{mean}(j)$ の pI 値 (pI_j) は、 pI_j 4.0である。

20

【0234】

また、流路の両端の区画の中央位置、すなわち、区画1の中央位置 $L_{mean}(1)$ の pI 値 (pI_1)、区画71の中央位置 $L_{mean}(71)$ の pI 値 (pI_{71}) は、それぞれ、「陰極液」、例えば、100mMリン酸水溶液の約pH2、「陽極液」、例えば、40mM水酸化ナトリウム水溶液のpH12から、 pI_1 2、 pI_{71} 12である。

【0235】

以上の操作によって、計7つの区画の中央位置、 $L_{mean}(j)$ の pI 値 (pI_j) が特定される。流路に沿って、区画されている、各区画 j の中央位置、 $L_{mean}(j)$ の pI 値 (pI_j) は、特定された計7つの区画の中央位置、 $L_{mean}(j)$ の pI 値 (pI_j) に基づき、内挿することにより、推定される。推定された各区画 j の中央位置、 $L_{mean}(j)$ の pI 値 (pI_j) の誤差は、 ± 0.1 程度である。

30

【0236】

「等電点電気泳動」を行う、サンプル溶液中には、抗MDA-LDL抗体由来のペプチド断片群、トリプシン由来のペプチド断片群と、トリプシンも含まれている。抗MDA-LDL抗体由来のペプチド断片群、トリプシン由来のペプチド断片群と、トリプシンについて、その pI と分子量 M は予め判明しているので、そのスポット位置と、イオン種のピーク位置 (m/z) も、上記 pI 標準ペプチドに適用した手法を用いて、特定される。

40

【0237】

以上に述べた、 pI と分子量 M が既知である、抗MDA-LDL抗体由来のペプチド断片群、トリプシン由来のペプチド断片群と、トリプシンに由来するイオン種のピーク強度相対値 $I_{rel.}(pI_j, [M_k + H]^+)$ は、いずれのサンプル溶液でも、原則的には同じである。

【0238】

(4-2) MDA-LDL中に含まれるApoB100タンパク質由来のペプチド断片群の (pI_{mean} 、 $M_{peptide}$) の決定

次に、流路に沿って、71の区画に分割して、各区画 j ($j = 1 \sim 71$) において測定された、MALDI-TOF MSスペクトル中から、トリプシン消化による生成される、MDA-LDL中に含まれるApoB100タンパク質由来のペプチド断片群に由来す

50

るイオン種のピークを抽出し、該ペプチド断片が形成するスポットの中心の pI_{mean} を特定する手順について、説明する。すなわち、トリプシン消化による生成される、MDA-LDL中に含まれる ApoB100タンパク質由来のペプチド断片群について、該ペプチド断片を特定する (pI_{mean} 、 $M_{peptide}$) を決定する手順について、説明する。

【0239】

(4-2-1) MALDI-TOF MSスペクトル中のイオン種のピークの抽出

サンプル溶液中に含まれる、トリプシン消化による生成される、MDA-LDL中に含まれる ApoB100タンパク質由来のペプチド断片の濃度が低い場合があり、含有濃度の低いペプチド断片に由来するイオン種のピーク強度は小さくなる。このようにピーク強度が小さなイオン種のピークも、各区画 j ($j = 1 \sim 71$) において測定された、MALDI-TOF MSスペクトル中から抽出するため、測定されたスペクトルのスムージングを行う。

【0240】

MALDI-TOF MSスペクトルは、実際には、飛行時間 t_i と $t_i + \delta t$ の間 (時間窓幅 δt) に検出系に到達したイオン種の個数 $N(t_i)$ をカウントしたものである。従って、実際は、(t_i , $N(t_i)$) の形式の離散的なデータ列となっている。 t_i の増分 Δt_i に対して、 δt を十分に狭く設定している。各レーザ光パルスによりイオン化され、この時間窓幅 δt の間に、検出系に到達するイオン種の個数 $N_m(t_i)$ は、中心値 $N_{mean}(t_i)$ のポワソン分布に従っている。レーザ光パルス多数回 (m) について、各回のカウント数 $N_m(t_i)$ を積算した、 $\sum N_m(t_i) = N(t_i)$ は、ポワソン分布によるバラツキが平均化され、積算回数 m が増すとともに、 $m \cdot N_{mean}(t_i)$ に近くなる。ポワソン分布におけるバラツキの程度は、中心値 $N_{mean}(t_i)$ に対して、($N_{mean}(t_i)$)^{1/2} 程度であり、($N_{mean}(t_i)$)^{1/2} / $N_{mean}(t_i)$ は、中心値 $N_{mean}(t_i)$ が小さくなると、顕著に大きくなる。そのため、ピーク強度が小さなイオン種のピークでは、本来のピーク中心の位置 (t_{i-peak}) において、 $\sum N_m(t_i)$ が極大値を示さず、見かけ上、極大を示す点が若干ずれる場合がある。測定されたスペクトルのスムージングを行うことにより、本来のピーク中心の位置 (t_{i-peak}) を推定することができる。

【0241】

加えて、検出系に到達したイオン種の個数をカウントする際、ノイズ成分が存在しており、ピーク強度が小さなイオン種のピークでは、元来、S/N比が相対的に低く、測定されたスペクトルのスムージングを行うことにより、ノイズの影響を相対的に低減することが可能である。

【0242】

測定されたスペクトルのスムージングは、原理的には、(t_i , $N(t_i)$) の形式の離散的なデータ列に対して、移動平均を取ることに相当している。

【0243】

実際的には、Savitzky-Golay filterを用いて、指定した数ごとにスペクトルの m/z とシグナル値 (t_i , $N(t_i)$) の平均をとることで、質量スペクトルのスムージングを行う。図7に、測定されたスペクトルのスムージングを行った結果の一例を示す。

【0244】

スムージング処理後、極大を示す ($t_{i-peak-obs}$, $N(t_{i-peak-obs})$) を選び、該ピークの (m/z) の測定値とする。スムージング処理に伴い、本来のピーク中心の (t_{i-peak} , $N(t_{i-peak})$) に対して、該ピークの (m/z) の測定値は、 ± 0.2 程度の系統的誤差 $\delta(m/z)$ を示す場合がある。一方、同じスペクトル上に観測されるピーク間の (m/z) の差は、最小でも、 ± 1 であるため、隣接するピークは、十分に分離されている。

【0245】

隣接する区画で測定されるスペクトルを比較する場合には、二つのスペクトル上で観測されている、(m/z) が誤差範囲内で一致するピークが、同じペプチド断片に由来するイオン種であるか、否かの判断を行う必要がある。

【0246】

「等電点電気泳動」により、流路に沿って、分離される、ペプチド断片 (pI , $M_{peptide}$) は、 pI_{mean} を中心とし、「流路方向の拡がり σ_{pI} 」を示すスポットを形成している。該スポットにおける、ペプチド断片 (pI , $M_{peptide}$) の量の分布は、 pI_{mean} を中心とし、「流路方向の拡がり σ_{pI} 」を示すガウス分布と見做せる。従って、ペプチド断片 (pI , $M_{peptide}$) に由来するイオン種 $[M_{peptide} + H]^+$ のイオン強度 $I(pI, [M_{peptide} + H]^+)$ を測定すると、 pI_{mean} を中心とし、「流路方向の拡がり σ_{pI} 」を示すガウス分布様の強度変化を示す。

【0247】

各区画で測定されるスペクトル上に見出される、ピーク ($pI_j, (m/z)_k$) のピーク強度相対値 $I_{rel.}(pI_j, (m/z)_k)$ を、($pI_j, (m/z)_k$) 平面上に二次元プロットすると、スポットを形成しているペプチド断片 ($pI, M_{peptide}$) に由来するイオン種 $[M_{peptide} + H]^+$ のピーク強度相対値 $I_{rel.}(pI, [M_k + H]^+)$ は、ガウス分布様の強度変化を示す。スムージング処理に伴い、ピークの (m/z) の測定値は、 ± 0.2 程度の系統的誤差を示すことを考慮すると、ピークの (m/z)_k の測定値が ± 0.2 以内で一致し、ピーク強度相対値 $I_{rel.}(pI_j, (m/z)_k)$ がガウス分布様の強度変化しているピークは、同じペプチド断片 ($pI, M_{peptide}$) に由来するイオン種 $[M_{peptide} + H]^+$ のピークと判断することができる。

【0248】

図8に、上記の判断基準に従って、($pI_j, (m/z)_k$) 平面上に二次元プロットした、ピーク ($pI_j, (m/z)_k$) のピーク強度相対値 $I_{rel.}(pI_j, (m/z)_k)$ の分布に基づき、同じペプチド断片 ($pI, M_{peptide}$) に由来するイオン種 $[M_{peptide} + H]^+$ のピークを特定した例を示す。

【0249】

その際、各スポットの「流路方向の拡がり σ_{pI} 」は、中心値 pI_{mean} がほぼ同じ場合には、「流路方向の拡がり σ_{pI} 」の程度もほぼ同じになる。標準的な「流路方向の拡がり σ_{pI} 」は、各 pI 領域では、それぞれ、蛍光マーカー、 pI 標準ペプチドのスポットで見出される「流路方向の拡がり σ_{pI} 」とほぼ等しくなる。

【0250】

例えば、分子量 $M_{peptide}$ が等しく、 pI_{mean} の差 ΔpI_{mean} が、「流路方向の拡がり σ_{pI} 」に対して、 $\Delta pI_{mean} < \sigma_{pI}$ である、二つのペプチド断片 ($pI_{mean}, M_{peptide}$)、($pI_{mean} + \Delta pI_{mean}, M_{peptide}$) が分離されている場合、この pI 領域で見出される、(m/z) = ($M_{peptide} + 1$) のピークのピーク強度相対値 $I_{rel.}(pI_j, M_{peptide} + 1)$ の分布は、「流路方向の拡がり σ_{pI} 」が異常に広いスポットを示す。このような場合であっても、この pI 領域における、標準的な「流路方向の拡がり σ_{pI} 」を有する、二つの中心値を有するガウス分布の重なりとして、分離することで、二つのペプチド断片 ($pI_{mean}, M_{peptide}$)、($pI_{mean} + \Delta pI_{mean}, M_{peptide}$) に由来するイオン種のピークを抽出することが可能である。

【0251】

換言するならば、それぞれの pI 領域における、標準的な「流路方向の拡がり σ_{pI} 」を有する、ガウス分布を仮定して、($pI_j, (m/z)_k$) 平面上に二次元プロットした、ピーク ($pI_j, (m/z)_k$) のピーク強度相対値 $I_{rel.}(pI_j, (m/z)_k)$ の分布を解析することにより、単一のペプチド断片 ($pI, M_{peptide}$) がスポットを形成しているか、偶々、分子量が一致しており、僅かに pI_{mean} が異なるペプチド断片のスポットが重なりあっているかの判定を行うことができる。

【0252】

但し、偶々、分子量 $M_{peptide}$ が一致しており、 pI_{mean} の差 ΔpI_{mean} が、 $0.1 \leq \Delta pI_{mean} < \sigma_{pI}$ である場合には、前記の判定手順では、複数のペプチド断片のスポットが重なりあっているか、否かの判定は不能である。

【0253】

10

20

30

40

50

上述の「ピークの抽出」処理を行うと、その流路に沿って、分離されているトリプシン消化による生成される、MDA-LDL中に含まれるApoB100タンパク質由来のペプチド断片($pI, M_{peptide}$)のスポット中心の pI_{mean} と、該ペプチド断片($pI, M_{peptide}$)に由来するイオン種 $[M_{peptide} + H]^+$ のピーク強度相対値 $I_{rel.}(pI, [M_k + H]^+)$ が決定される。

【0254】

その際、ペプチド断片($pI, M_{peptide}$)のスポット中心の pI_{mean} の特定の誤差は、その pI 領域における、標準的な「流路方向の拡がり σ_{pI} 」を超えることは無いが、誤差 δpI_{mean} は、 $\pm 1/2(\sigma_{pI})$ 程度となっている。従って、誤差 δpI_{mean} は、最大、 ± 0.4 となる。

10

【0255】

(4-2-2) 複数の血清サンプル間における、抽出されたピークの対応付け(同定)

複数の血清サンプル間において、トリプシン消化による生成される、MDA-LDL中に含まれるApoB100タンパク質由来のペプチド断片($pI, M_{peptide}$)の量を比較するため、各血清サンプルから調製されるサンプル溶液を同一の条件で、「等電点電気泳動」と「MALDI-TOF MS 質量分析」を行う。各血清サンプルから調製されるサンプル溶液の「等電点電気泳動」を行った、各流路に沿って、「ピークの抽出」がなされた、ペプチド断片(pI_{mean}, M_k)について、同じペプチド断片($pI, M_{peptide}$)であるか、否かの対応付け(同定)を行う。

【0256】

20

上記の手順に従って、それぞれの流路に沿って、「ピークの抽出」がなされた、ペプチド断片(pI_{mean}, M_k)では、各区画 j の pI_j を内挿法で推定しているため、 pI_j の推定値は、 ± 0.1 程度の誤差 δpI_j を有し、また、スポット中心の pI_{mean} の特定時の誤差 δpI_{mean} は、最大、 ± 0.4 となっている。従って、任意の二つの流路間で、「ピークの抽出」がなされた、同じペプチド断片($pI, M_{peptide}$)について、そのスポット中心の pI_{mean} の特定結果を比較すると、両者の pI_{mean} 推定値の「見かけ上の相違」は、最大、 $\delta pI_j + \delta pI_{mean}$ 、 ± 0.5 に達する場合がある。一方、スムージング処理に伴う、系統的誤差 $\delta(m/z)$ は、最大 ± 0.2 であることを考慮すると、両者の分子量 M_k の推定値の「見かけ上の相違」は、最大、 ± 0.3 に達する場合がある。

【0257】

30

従って、任意の二つの流路間で、それぞれ、流路に沿って、分離され、「ピークの抽出」がなされた、ペプチド断片(pI_{mean}, M_k)について、前記の pI_{mean} 推定値の「見かけ上の相違」、分子量 M_k の推定値の「見かけ上の相違」を考慮して、同じペプチド断片($pI, M_{peptide}$)であるか、否かの対応付け(同定)を行う。

【0258】

「等電点電気泳動」により分離される、ペプチド断片($pI, M_{peptide}$)のスポットの流路内での相対順序は、本来の pI の順序に従うため、任意の二つの流路間で、相対順序が逆転することは無い。従って、「ピークの抽出」がなされた、ペプチド断片(pI_{mean}, M_k)について、流路内における(pI_{mean}, M_k)の相対順序に従って、対応関係を決定することが可能である。

40

【0259】

具体的には、流路に沿って、 $pI = 3 \sim pI = 10$ の範囲を、各蛍光マーカーのスポットの中心位置、 $L(pI = 4)$ 、 $L(pI = 5.5)$ 、 $L(pI = 9)$ 、 pI 標準ペプチド、angiotensin II($pI = 6.74$)、fibrinopeptide B($pI = 4.0$)のスポットの中心位置、 $L(pI = 6.74)$ 、 $L(pI = 4.0)$ において、5つの領域(3)に分割する。それぞれの流路について、分割された各領域中において、「ピークの抽出」がなされた、ペプチド断片(pI_{mean}, M_k)の一群に関して、(pI_{mean}, M_k)の相対順序を決定する。

【0260】

同じペプチド断片($pI, M_{peptide}$)である場合、分子量 M_k の推定値の「見かけ上の

50

相違」が ± 0.3 以内であるという条件を考慮しつつ、分割された領域中における (pI_{mean}, M_k) の相対順序が従って、二つの流路間において、「ピークの抽出」がなされた、ペプチド断片 (pI_{mean}, M_k) が同じペプチド断片 ($pI, M_{peptide}$) であるか、否かの対応付け (同定) を進める。

【0261】

同じペプチド断片 ($pI, M_{peptide}$) と対応付け (同定) される際には、二つの流路に沿って、「ピークの抽出」がなされた、ペプチド断片 (pI_{mean}, M_k) の由来するイオン種のピーク強度相対値 $I_{rel.}(pI_j, (m/z)_k)$ の極大点座標 ($pI_{mean}, (m/z)_k$) を、それぞれ、($pI_j, (m/z)_k$) 平面上に二次元プロットすると、二つの二次元プロット上において、 pI_j の推定に伴う、系統誤差 δpI_j と、スムージング処理に伴う、系統的誤差 $\delta(m/z)$ の範囲内で、極大点座標 ($pI_{mean}, (m/z)_k$) は対応している。

10

【0262】

pI_j の推定に伴う、系統誤差 δpI_j と、スムージング処理に伴う、系統的誤差 $\delta(m/z)$ の範囲内で、対応する極大点座標 ($pI_{mean}, (m/z)_k$) が見出されないペプチド断片 (pI_{mean}, M_k) は、一方のサンプル溶液中にしか含まれていないペプチド断片 ($pI, M_{peptide}$) と判断される。

【0263】

被験者から採取される血液サンプル中から、分取される MDA-LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質における、酸化の進行度の差異を反映する、ペプチド断片を選別するため、複数の個人から提供された血液サンプル中から、分取される MDA-LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質の試料について、それぞれ、上記の手順で、複数の血清サンプル間における、抽出されたピークの対応付け (同定) を行う。

20

【0264】

(5) 「データ解析・マーカー特定」工程

各個人から提供された血液サンプル中から、分取される MDA-LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質の試料について、上記の手順で、トリプシン消化による生成される、MDA-LDL 中に含まれる ApoB100 タンパク質由来のペプチド断片 ($pI, M_{peptide}$) に対応すると対応付け (同定) された、ペプチド断片 (pI_{mean}, M_k) の由来するイオン種のピーク強度相対値 $I_{rel.}(pI_j, (m/z)_k)$ は、当該個人において特定された、トリプシン消化による生成される、MDA-LDL 中に含まれる ApoB100 タンパク質由来のペプチド断片 ($pI, M_{peptide}$) に由来するイオン種 $[M_{peptide} + H]^+$ のピーク強度相対値 $I_{rel.}(pI, M_{peptide} + 1)$ である。

30

【0265】

各個人に対して、同定されたペプチド断片 (pI_{mean}, M_k) に由来するイオン種のピーク強度相対値 $I_{rel.}(pI_j, (m/z)_k)$ の極大点座標 ($pI_{mean}, (m/z)_k$) は、上述するように、 pI_j の推定に伴う、系統誤差 δpI_j と、スムージング処理に伴う、系統的誤差 $\delta(m/z)$ を含んでいる。従って、複数の個人、具体的には、虚血性心疾患と診断された患者群 (冠動脈病変枝数 3) 10 名、非患者群 (冠動脈病変枝数 0) 23 名、合計 33 名に対して、同定されたペプチド断片 (pI_{mean}, M_k) の由来するイオン種のピーク強度相対値 $I_{rel.}(pI_j, (m/z)_k)$ の極大点座標 ($pI_{mean}, (m/z)_k$) を平均して、その平均値 ($pI_{mean}, (m/z)_k$)_{Av.} を、対応付け (同定) されたペプチド断片の pI と、該ペプチド断片に由来するイオン種 $[M_{peptide} + H]^+$ の $(m/z) = (M_{peptide} + 1)$ とする。

40

【0266】

前記 33 名の各個人に対して、対応付け (同定) されたペプチド断片 ($pI, M_{peptide}$) に由来するイオン種のピーク強度相対値 $I_{rel.}(pI, M_{peptide} + 1)$ と、極大点座標 ($pI, M_{peptide} + 1$) のリストを作成している。このリストに記載されるペプチド断片 ($pI, M_{peptide}$) は、ピーク強度相対値 $I_{rel.}(pI, M_{peptide} + 1)$ は別として、前記 33 名の各個人のいずれでも、サンプル溶液中に存在することが確認されたものとなっている。勿論、このリストに記載されるペプチド断片 ($pI, M_{peptide}$) は、各個人から提供された血液サンプル中から、分取される MDA-LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質の試料について、上記の手順で、トリプシン消化による生成される、MDA-LDL 中に含まれる ApoB100 タンパク質由来のペプチド断片 ($pI, M_{peptide}$) に対応すると対応付け (同定) された、ペプチド断片 (pI_{mean}, M_k) の由来するイオン種のピーク強度相対値 $I_{rel.}(pI_j, (m/z)_k)$ は、当該個人において特定された、トリプシン消化による生成される、MDA-LDL 中に含まれる ApoB100 タンパク質由来のペプチド断片 ($pI, M_{peptide}$) に由来するイオン種 $[M_{peptide} + H]^+$ のピーク強度相対値 $I_{rel.}(pI, M_{peptide} + 1)$ である。

50

o B 1 0 0 タンパク質をトリプシン消化することで生成されるペプチド断片である。

【 0 2 6 7 】

また、患者群（冠動脈病変枝数 3）10 名、非患者群（冠動脈病変枝数 0）23 名の間では、分取される MDA - LDL 中に含まれる、ApoB 100 タンパク質における、酸化の進行度は明確に相違しており、患者群（冠動脈病変枝数 3）10 名では、「酸化の進行度」は高く、非患者群（冠動脈病変枝数 0）23 名では、「酸化の進行度」は低くなっている。

【 0 2 6 8 】

一方、合計 33 名から提供された血液サンプル中から分取される、MDA - LDL 中に含まれる、ApoB 100 タンパク質の量は、各個人によって、異なっているため、前記リストに記載される、ピーク強度相対値 $I_{rel.}(pI, M_{peptide} + 1)$ は、直接比較することはできない。各個人のリストに記載する、ピーク強度相対値 $I_{rel.}(pI, M_{peptide} + 1)$ を、それぞれ、サンプル溶液の調製に利用した血清サンプルから、分取される MDA - LDL 中に含まれる、ApoB 100 タンパク質の量に対して、正規化が必要がある。

10

【 0 2 6 9 】

サンプル溶液を調製する際、MDA - LDL 中に含まれる、ApoB 100 タンパク質をトリプシン消化することで生成されるペプチド断片の量（モル量）は、用いた MDA - LDL 中に含まれる、ApoB 100 タンパク質の量（モル量）に、比例している。そのため、リストに記載する、ペプチド断片（ $pI, M_{peptide}$ ）の全てについて、そのペプチド断片の量（モル量）を平均すると、その平均値も、用いた MDA - LDL 中に含まれる、ApoB 100 タンパク質の量（モル量）に比例している。勿論、リストに記載する、ピーク強度相対値 $I_{rel.}(pI, M_{peptide} + 1)$ は、そのペプチド断片（ $pI, M_{peptide}$ ）の量（モル量）に、比例している。

20

【 0 2 7 0 】

一方、ペプチド断片（ $pI, M_{peptide}$ ）に由来するイオン種 $[M_{peptide} + H]^+$ のピーク強度 $I(pI, [M_{peptide} + H]^+)$ は、サンプル溶液中のペプチド断片（ $pI, M_{peptide}$ ）の濃度； $C(pI, M_{peptide})$ と、該イオン種 $[M_{peptide} + H]^+$ の生成効率（イオン化効率） $p(pI, M_{peptide})$ を用いて、 $I(pI, [M_{peptide} + H]^+) = p(pI, M_{peptide}) \cdot C(pI, M_{peptide})$ と表記することができる。

30

【 0 2 7 1 】

「データ解析・マーカー特定」工程 105 で、好適に利用可能な解析手順を以下に説明する。

【 0 2 7 2 】

対応付け（同定）がなされたペプチド断片（ $pI, M_{peptide}$ ）の一群について、各ペプチド断片（ $pI, M_{peptide}$ ）に対して、上記平均値 $(pI_{mean}, (m/z)_k)_{Av.}$ を算出し、対応付け（同定）された該ペプチド断片の pI と、該ペプチド断片に由来するイオン種 $[M_{peptide} + H]^+$ の $(m/z) = (M_{peptide} + 1)$ としている。

【 0 2 7 3 】

一方、各個人のリストに記載する、ピーク強度相対値 $I_{rel.}(pI, M_{peptide} + 1)$ は、各区画 j において測定される、質量更正用ペプチドのうち、Bradykinin fragment 1-7 に由来するイオン種 $[M_{Bradykinin} + H]^+$ のピーク強度 $I_j(\text{Bradykinin})$ を基準として、ペプチド断片に由来するイオン種 $[M_k + H]^+$ のピーク強度 $I(pI_j, [M_k + H]^+)$ を標準化し、相対値 $(I(pI_j, [M_k + H]^+) / I_j(\text{Bradykinin})) \times 100 \equiv I_{rel.}(pI_j, [M_k + H]^+)$ とされている。

40

【 0 2 7 4 】

各個人のリストに記載する、ピーク強度相対値 $I_{rel.}(pI, M_{peptide} + 1)$ は、前記標準化処理を施した「標準化済ピーク強度」であるが、合計 33 名から提供された血液サンプル中における定量的な比較を行うため、次の手順(5-1)、(5-2)に従って、各個人 $Sm(Sm = 1 \sim 33)$ のリストに記載する、「標準化済ピーク強度」 $I_{rel.}(pI, M_{peptide} + 1)$

50

) $_{Sm}$ に、「対数変換」処理と、「正規化」処理を施し、「正規化ピーク強度」 $I(pI, M_{peptide+1})_{normal-Sm}$ を算出する。

【0275】

(5-1) 「対数変換」処理

各個人 $Sm(Sm = 1 \sim 33)$ のリストに記載する、「標準化済ピーク強度」 $I_{rel.}(pI, M_{peptide+1})_{Sm}$ の対数変換を行い、「対数標準化済ピーク強度」 $\ln(I_{rel.}(pI, M_{peptide+1})_{Sm})$ に変換する。

【0276】

各流路のサンプル溶液中のペプチド断片($pI, M_{peptide}$)の濃度; $C(pI, M_{peptide})_{Sm}$ と、該イオン種 $[M_{peptide}+H]^+$ の生成効率(イオン化効率) $p(pI, M_{peptide})_{Sm}$ を用いて、 $I(pI, [M_{peptide}+H]^+)_{Sm} = p(pI, M_{peptide})_{Sm} \cdot C(pI, M_{peptide})_{Sm}$ と表記することができる。該イオン種 $[M_{peptide}+H]^+$ の生成効率(イオン化効率) $p(pI, M_{peptide})_{Sm}$ は、本来、同じイオン種に対しては、等しい。また、各流路で測定されるBradykinin fragment 1-7に由来するイオン種 $[M_{Bradykinin}+H]^+$ のピーク強度 $I_j(\text{Bradykinin})$ は、原則的に等しくなっている。

【0277】

従って、「対数標準化済ピーク強度」 $\ln(I_{rel.}(pI, M_{peptide+1})_{Sm}) = \ln(C(pI, M_{peptide})_{Sm}) + \ln(p(pI, M_{peptide})_{Sm}) - \ln(I_j(\text{Bradykinin}))$ のうち、 $\{\ln(p(pI, M_{peptide})_{Sm}) - \ln(I_j(\text{Bradykinin}))\}$ の部分は、本来、何れの流路でも、等しいはずである。

【0278】

(5-2) 「正規化」処理

まず、各個人 $Sm(Sm = 1 \sim 33)$ について、対応付け(同定)がなされたペプチド断片($pI, M_{peptide}$)の一群(N_{peak} 種類)において、「対数標準化済ピーク強度」 $\ln(I_{rel.}(pI, M_{peptide+1})_{Sm})$ の「平均値」、 $\ln(I_{rel.}(pI, M_{peptide+1}))_{av.-Sm} = (1/N_{peak}) \sum \ln(I_{rel.}(pI, M_{peptide+1})_{Sm})$ と、該「平均値」に対する、「標準偏差」: $\sigma(\ln(I_{rel.}(pI, M_{peptide+1}))_{Sm})$ を算出する。

【0279】

該「平均値」は、 $\ln(I_{rel.}(pI, M_{peptide+1}))_{av.-Sm} = (1/N_{peak}) \sum \ln(I_{rel.}(pI, M_{peptide+1})_{Sm}) = \{(1/N_{peak}) \sum \ln(C(pI, M_{peptide})_{Sm})\} + \{(1/N_{peak}) \sum \ln(p(pI, M_{peptide})_{Sm})\} - \ln(I_j(\text{Bradykinin}))$ となる。そのうち、 $\{(1/N_{peak}) \sum \ln(p(pI, M_{peptide})_{Sm})\} - \ln(I_j(\text{Bradykinin}))$ の部分は、本来、何れの流路でも、等しいはずである。

【0280】

各個人 $Sm(Sm = 1 \sim 33)$ について、対応付け(同定)がなされた各ペプチド断片($pI, M_{peptide}$)の「正規化ピーク強度」 $I(pI, M_{peptide+1})_{normal-Sm}$ は、 $I(pI, M_{peptide+1})_{normal-Sm} = [\{\ln(I_{rel.}(pI, M_{peptide+1})_{Sm}) - \ln(I_{rel.}(pI, M_{peptide+1}))_{av.-Sm}\} / \sigma(\ln(I_{rel.}(pI, M_{peptide+1}))_{Sm})]$ と、定義される。

【0281】

(5-3) 「Zスコア化」処理

各個人 $Sm(Sm = 1 \sim 33)$ について、対応付け(同定)がなされたペプチド断片($pI, M_{peptide}$)の一群(N_{peak} 種類)に対して、それぞれ、「正規化ピーク強度」 $I(pI, M_{peptide+1})_{normal-Sm}$ を算出した後、各ペプチド断片($pI, M_{peptide}$)の「正規化ピーク強度」 $I(pI, M_{peptide+1})_{normal-Sm}$ に、下記の手順に従って、「Zスコア化」処理を施す。

【0282】

各個人 $Sm(Sm = 1 \sim 33)$ に対して算出された、各ペプチド断片($pI, M_{peptide}$)の「正規化ピーク強度」 $I(pI, M_{peptide+1})_{normal-Sm}$ に付いて、合計33名の個人 $Sm(Sm = 1 \sim 33)$ のサンプルからなる、全サンプル群中において、その「全サンプル群中

10

20

30

40

50

の平均値」； $I(pI, M_{\text{peptide}+1})_{\text{normal-av.}} = (1/33) \sum I(pI, M_{\text{peptide}+1})_{\text{normal-Sm}}$ と、該「全サンプル群中の平均値」に対する、「全サンプル群中の標準偏差： $\sigma(I(pI, M_{\text{peptide}+1})_{\text{normal}})$ 」を算出する。

【0283】

次いで、算出される「全サンプル群中の平均値」と「全サンプル群中の標準偏差」を用いて、各個人Sm(Sm = 1 ~ 33)に対して算出された、該ペプチド断片(pI, M_{peptide})の「正規化ピーク強度： $I(pI, M_{\text{peptide}+1})_{\text{normal-Sm}}$ 」について、 $[I(pI, M_{\text{peptide}+1})_{\text{normal-Sm}} - I(pI, M_{\text{peptide}+1})_{\text{normal-av.}}] / \sigma(I(pI, M_{\text{peptide}+1})_{\text{normal}})$ を算出し、Z値($I(pI, M_{\text{peptide}+1})_{\text{Z-score-Sm}}$)とする。

【0284】

各個人Sm(Sm = 1 ~ 33)に対して算出された、それぞれのペプチド断片(pI, M_{peptide})のZ値($I(pI, M_{\text{peptide}+1})_{\text{Z-score-Sm}}$)を利用して、疾患群(冠動脈病変枝数3)10サンプルについて、算出された「Z値： $I(pI, M_{\text{peptide}+1})_{\text{Z-score-Sm}}$ 」の平均値を算出し、該疾患群(冠動脈病変枝数3)10サンプルの部分群における、算出された「Z値： $I(pI, M_{\text{peptide}+1})_{\text{Z-score-Sm}}$ 」の平均値が、少なくとも、0.60以上、好ましくは、0.70以上である「ピーク」を選別する。

【0285】

前記の基準に基づき選別される「ピーク」は、コントロール(非患者)群(冠動脈病変枝数0)23サンプルと比較して、疾患群(冠動脈病変枝数3)10サンプルにおいて、「正規化ピーク強度： $I(pI, M_{\text{peptide}+1})_{\text{normal-Sm}}$ 」が統計的に有意に大きい「ピーク」に相当している。実際、合計33サンプルの全てについて、「Z値」を合計すると、0であるので、コントロール(非患者)群(冠動脈病変枝数0)23サンプルの部分群における、算出された「Z値： $I(pI, M_{\text{peptide}+1})_{\text{Z-score-Sm}}$ 」の平均値は、 $-(0.65) \times (10/23) = -0.28$ よりも、さらに負な値となっている。従って、疾患群(冠動脈病変枝数3)10サンプルにおける、算出された「Z値： $I(pI, M_{\text{peptide}+1})_{\text{Z-score-Sm}}$ 」の平均値と、コントロール(非患者)群(冠動脈病変枝数0)23サンプルの部分群における、算出された「Z値： $I(pI, M_{\text{peptide}+1})_{\text{Z-score-Sm}}$ 」の平均値との差は、少なくとも「全サンプル群中の標準偏差： $\sigma(I(pI, M_{\text{peptide}+1})_{\text{normal}})$ 」の0.93以上であり、統計的に有意な差があると見做すことが可能である。

【0286】

各個人Sm(Sm = 1 ~ 33)に対して算出された、それぞれのペプチド断片(pI, M_{peptide})のZ値($I(pI, M_{\text{peptide}+1})_{\text{Z-score-Sm}}$)を利用して、receiver operating characteristic (ROC)解析を行う。各個人Sm(Sm = 1 ~ 33)に由来するサンプルの測定結果から算出した、ペプチド断片(pI, M_{peptide})のZ値($I(pI, M_{\text{peptide}+1})_{\text{Z-score-Sm}}$)を、大きい順に並べると、1位~33位までの「順位付け」がなされる。

【0287】

疾患群(冠動脈病変枝数3)10サンプル中、Z値($I(pI, M_{\text{peptide}+1})_{\text{Z-score-Sm}}$)が上位 N^{th} 位以内であるサンプル数の割合(True positive rateまたはSensitivity)： $\text{TPR}(pI, M_{\text{peptide}+1} : N^{\text{th}})$ ；

コントロール(非患者)群(冠動脈病変枝数0)23サンプル中、Z値($I(pI, M_{\text{peptide}+1})_{\text{Z-score-Sm}}$)が上位 N^{th} 位以内であるサンプル数の割合(False positive rate)： $\text{FPR}(pI, M_{\text{peptide}+1} : N^{\text{th}})$ ；

コントロール(非患者)群(冠動脈病変枝数0)23サンプル中、Z値($I(pI, M_{\text{peptide}+1})_{\text{Z-score-Sm}}$)が上位 N^{th} 位以内に入っていないサンプル数の割合(True negative rateまたはSpecificity)、 $\text{TNR}(pI, M_{\text{peptide}+1} : N^{\text{th}})$ ；

以上の3つの確率を算出する。勿論、 $\text{FPR}(pI, M_{\text{peptide}+1} : N^{\text{th}}) + \text{TNR}(pI, M_{\text{peptide}+1} : N^{\text{th}}) = 1$ となっている。

【0288】

X軸をTNR、Y軸をTPRとする、ROC空間上に、算出される($\text{TNR}(pI, M_{\text{peptide}+1} : N^{\text{th}})$ 、 $\text{TPR}(pI, M_{\text{peptide}+1} : N^{\text{th}})$)が、

10

20

30

40

50

$\text{peptide} + 1 : N^{\text{th}})$ 、 $\text{TPR}(\text{pI}, M_{\text{peptide} + 1} : N^{\text{th}})$ ($N^{\text{th}} = 1 \sim 33$) をプロットする。 (TNR, TPR) で表記される ROC 空間上、 $(0, 1)$ と $(1, 0)$ ならびに、前記 33 個のプロット点を通る ROC 曲線を描く。描かれる ROC 曲線と、X 軸 (Specificity) とで挟まる領域の面積 A_{plot} を数値積分により算出する。算出される面積 A_{plot} は、AUC “area under the ROC curve” に相当している。前記の ROC 解析により算出される「AUC 値」が、少なくとも、0.60 以上、好ましくは、0.70 以上であるという基準に基づき、疾患群 (冠動脈病変枝数 3) とコントロール (非患者) 群 (冠動脈病変枝数 0) の推定に有効なペプチド断片 ($\text{pI}, M_{\text{peptide}}$) を選別することができる。

【0289】

10

なお、総数 33 個のサンプルは、疾患群 (冠動脈病変枝数 3) 10 サンプルとコントロール (非患者) 群 (冠動脈病変枝数 0) 23 サンプルで構成されているので、 $N^{\text{th}} = 10$ の場合のプロット点 ($\text{TNR}(\text{pI}, M_{\text{peptide} + 1} : 10)$ 、 $\text{TPR}(\text{pI}, M_{\text{peptide} + 1} : 10)$) が、ROC 空間上、perfect prediction に相当する $(1, 1)$ に一致すると、「AUC 値」は 1 となる

さらには、疾患群 (冠動脈病変枝数 3) 10 サンプルにおける、算出された「Z 値： $I(\text{pI}, M_{\text{peptide} + 1})_{\text{z-score-sm}}$ 」の平均値が、少なくとも、0.65 以上であるという基準に基づき、選別される「ピーク」も、疾患群 (冠動脈病変枝数 3) とコントロール (非患者) 群 (冠動脈病変枝数 0) の推定に有効なペプチド断片 ($\text{pI}, M_{\text{peptide}}$) に相当している。

20

【0290】

上記の ROC 解析により算出される「AUC 値」に基づく選別基準に基づき、「AUC 値」が、少なくとも、0.60 以上と算出される「ピーク」を選別する。選別される「ピーク」について、該「ピーク」を与える、MDA-LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質からトリプシン消化により生成する、ペプチド断片 ($\text{pI}, M_{\text{peptide}}$) のアミノ酸配列を特定する。

【0291】

(5-4) 選別される「ピーク」を与える、ペプチド断片 ($\text{pI}, M_{\text{peptide}}$) のアミノ酸配列の特定

選別される「ピーク」は、MDA-LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質をトリプシン消化することで生成するペプチド断片に由来している。MDA-LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質は、MDA が関与する化学修飾、あるいは、活性酸素種自体が関与する酸化を受けていることが想定される。

30

【0292】

その際、Lys 残基の側鎖のアミノ基 ($-\text{NH}_2$) は、直接 MDA 化を受け、 $-\text{NH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CHO}$ に変換されていることが想定される。Lys 残基に対する MDA による酸化がさらに進行すると、Lys 残基の側鎖のアミノ基 ($-\text{NH}_2$) は、最終的に、dihydroxypyridine (DHP) となる。これら MDA が関与する化学修飾によるリジンの分子量の変化は、MDA 化 + 54、DHP 化 + 134 である。図 10 に、Lys が MDA 化を受けたときの構造、DHP 化を受けたときの構造をそれぞれ示す。

40

【0293】

また、Met 残基の酸化も想定される。Met 残基が酸化されて化学修飾を受けた場合、その側鎖の $-\text{S}-$ が、 $-\text{SO}-$ 、 $-\text{SO}_2-$ に変換され、+16、+32 の分子量変化が生じる。

【0294】

選別された「ピーク ($\text{pI}_{\text{av}}, (m/z)_{\text{av}}$)」は、全て、電荷数 $z = 1$ のイオン種、すなわち、イオン種 $[M_{\text{peptide} + H}]^+$ 型のピークである。その $(m/z)_{\text{av}}$ は、 $400 < (m/z)_{\text{av}} < 15000$ の範囲であり、すなわち、 $400 < M_{\text{peptide} + 1} < 15000$ の範囲である、ペプチド断片 ($\text{pI}, M_{\text{peptide}}$) に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide} + H}]^+$ のピークであると仮定する。

50

【0295】

少なくとも、 $400 < M_{\text{peptide}} + 1 < 15000$ の範囲である、ペプチド断片 ($pI_{av.}, M_{\text{peptide}}$) のアミノ酸配列は、アミノ酸残基数は、4以上、50以下の範囲である。

【0296】

まず、酸化を受けていないApoB100タンパク質のトリプシン消化に起因して生成する可能性を有する、アミノ酸残基数が50以下のペプチド断片の一群を、ApoB100タンパク質のアミノ酸配列情報に基づき、予測する。具体的には、ApoB100タンパク質のアミノ酸配列中に含まれる、Lys残基ならびにArg残基において、トリプシン消化が起こる結果、生成する可能性がある、アミノ酸残基数が50以下の全てのペプチド断片を予測し、ApoB100タンパク質由来の「理論的予測ペプチド断片」の群とする。ApoB100タンパク質由来の「理論的予測ペプチド断片」の群に含まれる、各ペプチド断片のアミノ酸配列に基づき、その分子量 M_{peptide} を計算する。前記ApoB100タンパク質由来の「理論的予測ペプチド断片」は、ApoB100タンパク質のアミノ酸配列中に含まれる、Lys残基ならびにArg残基の内、任意の二つを選択して、トリプシン消化を行うことで生成され、その間の部分アミノ酸配列のアミノ酸残基数が50以下である、ペプチド断片である。従って、該「理論的予測ペプチド断片」のC末端は、Lys残基またはArg残基であるが、そのアミノ酸残基数が50以下のアミノ酸配列中に、さらに、Lys残基またはArg残基を含むものも含まれている。

【0297】

前記ApoB100タンパク質由来の「理論的予測ペプチド断片」の群に含まれる、Lys残基を含むペプチド断片について、含まれるLys残基の一つが、MDA化修飾を受けた際の分子量 ($M_{\text{peptide}} + 54$) を計算する。さらに、複数のLys残基を含むペプチド断片について、含まれるLys残基の n_1 個が、MDA化修飾を受けた際の分子量 ($M_{\text{peptide}} + 54 \times n_1$) を計算する。

【0298】

同様に、前記ApoB100タンパク質由来の「理論的予測ペプチド断片」の群に含まれる、Lys残基を含むペプチド断片について、含まれるLys残基の一つが、DHP化修飾を受けた際の分子量 ($M_{\text{peptide}} + 134$) を計算する。さらに、複数のLys残基を含むペプチド断片について、含まれるLys残基の n_2 個が、DHP化修飾を受けた際の分子量 ($M_{\text{peptide}} + 134 \times n_2$) を計算する。

【0299】

加えて、前記ApoB100タンパク質由来の「理論的予測ペプチド断片」の群に含まれる、複数のLys残基を含むペプチド断片について、含まれるLys残基の n_2 個が、DHP化修飾を受け、含まれるLys残基の n_1 個が、MDA化修飾を受けた際の分子量 ($M_{\text{peptide}} + 54 \times n_1 + 134 \times n_2$) を計算する。

【0300】

前記ApoB100タンパク質由来の「理論的予測ペプチド断片」の群に含まれる、Met残基を含むペプチド断片について、含まれるMet残基の一つが、酸化を受け、一酸化体 ($Met(O)$) に変換された際の分子量 ($M_{\text{peptide}} + 16$) を計算する。さらに、複数のMet残基を含むペプチド断片について、含まれるMet残基の n_3 個が、酸化を受け、一酸化体 ($Met(O)$) に変換された際の分子量 ($M_{\text{peptide}} + 16 \times n_3$) を計算する。

【0301】

前記ApoB100タンパク質由来の「理論的予測ペプチド断片」の群に含まれる、Met残基を含むペプチド断片について、含まれるMet残基の一つが、酸化を受け、二酸化体 ($Met(O_2)$) に変換された際の分子量 ($M_{\text{peptide}} + 32$) を計算する。さらに、複数のMet残基を含むペプチド断片について、含まれるMet残基の n_4 個が、酸化を受け、二酸化体 ($Met(O_2)$) に変換された際の分子量 ($M_{\text{peptide}} + 32 \times n_4$) を計算する。

【0302】

加えて、前記 A p o B 1 0 0 タンパク質由来の「理論的予測ペプチド断片」の群に含まれる、複数の M e t 残基を含むペプチド断片について、含まれる M e t 残基の n_4 個が、二酸化体 (M e t (O₂)) に変換され、含まれる M e t 残基の n_3 個が、一酸化体 (M e t (O)) に変換された際の分子量 ($M_{\text{peptide}} + 16 \times n_3 + 32 \times n_4$) を計算する。

【0303】

上記 A p o B 1 0 0 タンパク質由来の「理論的予測ペプチド断片」の群に含まれる、酸化修飾が無いペプチド断片の分子量 (M_{peptide}) ;

含まれる L y s 残基に M D A 化修飾または D H P 化修飾が生じているペプチド断片の分子量 ($M_{\text{peptide}} + 54 \times n_1 + 134 \times n_2$) ;

含まれる M e t 残基が、一酸化体 (M e t (O)) または二酸化体 (M e t (O₂)) に変換されているペプチド断片の分子量 ($M_{\text{peptide}} + 16 \times n_3 + 32 \times n_4$) ;

以上の計算された「分子量の予測値 ($M_{\text{cal.}}$)」リスト中から、実際に、「分子量の予測値 ($M_{\text{cal.}}$)」が、 $400 < M_{\text{cal.}} + 1 < 15000$ の範囲内であるものを選別し、候補ペプチド断片の「分子量の予測値 ($M_{\text{cal.}}$)」リストを作成する。

【0304】

かかる候補ペプチド断片の「分子量の予測値 ($M_{\text{cal.}}$)」リスト中から、選別された「ピーク ($pI_{\text{av.}}, (m/z)_{\text{av.}}$)」の $(m/z)_{\text{av.}}$ から推定される、分子量 $M_{\text{obs.}} = (m/z)_{\text{av.}} - 1$ と、測定誤差範囲 (± 0.3) で一致する、「分子量の予測値 ($M_{\text{cal.}}$)」の候補を選別する。

【0305】

すなわち、選別された「ピーク ($pI_{\text{av.}}, (m/z)_{\text{av.}}$)」に対して、分子量の類似性のみに基づき、「分子量の予測値 ($M_{\text{cal.}}$)」の候補の特定と、該候補ペプチド断片のアミノ酸配列の決定 (帰属) を行うことが可能である。

【0306】

後述する「実施態様」中において、より具体的に説明するように、「AUC」値が 0.65 以上の基準を満たす、表 13、表 14 ~ 17 に示すペプチド断片が、本発明にかかる「バイオマーカー」として、選別されている。

【0307】

(実施態様)

本実施態様では、図 1 に示す「診断マーカー」として利用可能な酸化ペプチド断片の一群の探索プロセスに従って、「診断マーカー」として利用可能なペプチド断片の一群を探索した結果と、実際に、その探索に利用した「等電点タンパク質分離チップ」、「電気泳動・乾燥装置」、「溶液塗布装置」、「質量分析計」、「解析プログラム用コンピューター」、ならびに、具体的な解析過程を以下に示す。

【0308】

本実施態様においては、解析対象のペプチド断片は、「トリプシンによる断片化」により採取されるため、探索された「診断マーカー」として利用可能なペプチド断片の一群は、表 13、表 14 ~ 表 17 に記載するように、該ペプチド断片の切断末端は、トリプシン消化に特異的なものとなっている。

【0309】

本実施態様においては、「診断マーカー」として利用可能な酸化ペプチド断片の一群として、表 18 - 1、表 18 - 2 に記載される修飾アミノ酸を含むペプチド断片が利用可能であることを明らかにしている。本実施態様では、解析対象のペプチド断片は、「トリプシンによる断片化」により採取されるため、表 18 - 1、表 18 - 2 に記載される修飾アミノ酸を含むペプチド断片として、該ペプチド断片の切断末端は、トリプシン消化に特異的なもの、例えば、表 14 ~ 表 17 に記載される一群の酸化ペプチド断片が選別されている。

【0310】

表 18 - 1、表 18 - 2 に記載される修飾アミノ酸を含むペプチド断片は、トリプシン

10

20

30

40

50

以外の消化酵素を利用して断片化した際にも、「診断マーカー」として利用可能な酸化ペプチド断片となる。本発明にかかる「心疾患診断マーカー」の技術的範囲は、表 18 - 1、表 18 - 2 に記載される修飾アミノ酸を含むペプチド断片全般を含み、トリプシン以外の消化酵素を利用して断片化された、表 18 - 1、表 18 - 2 に記載される修飾アミノ酸を含むペプチド断片の一群をも包含している。

【0311】

また、図 1 に示す「診断マーカー」として利用可能な酸化ペプチド断片の一群の探索プロセスは、解析対象のペプチド断片は、「トリプシンによる断片化」により採取される形態は勿論のこと、解析対象のペプチド断片が、トリプシン以外の消化酵素を利用して断片化されている形態でも、本発明にかかる「心疾患診断マーカー」を探索する際、同様に有効な手法である。

10

【0312】

以下に、図 1 に示す「診断マーカー」として利用可能な酸化ペプチド断片の一群の探索プロセスに従って、「診断マーカー」として利用可能なペプチド断片の一群を探索した結果と、具体的な解析過程を示す。

【0313】

まず、本実施態様の探索に利用した「等電点タンパク質分離チップ」、「電気泳動・乾燥装置」、「溶液塗布装置」、「質量分析計」、「解析プログラム用コンピューター」を以下に説明する。

【0314】

20

1 等電点タンパク質分離チップ

図 5 は、該実施態様において使用される、等電点タンパク質分離チップの具体的な構成を示す。図 5 の (B) に、等電点タンパク質分離チップの外観を示す。図 5 の (A) に、該チップ基板上に設ける流路の配置と、該流路の幅 W と全長 L を示す。図 5 の (C) に、チップ基板と、チップのフタの断面形状を模式的に示し、フタを装着した時点の流路の深さ D 、ならびに、流路両端のリザーバの位置を示す。図 5 の (D) は、流路の底面に形成されるピラー構造 (柱状体) の周期的な配置の概要とそのサイズを示し、図 5 の (E) は、流路の底面に形成されるピラー構造 (柱状体) の別の一例を示す。該実施態様において使用される、等電点タンパク質分離チップでは、流路のサイズは、幅 W 2 mm、全長 L 35 mm、深さ D 10 μm に選択されている。該流路の底面に形成されているピラー構造 (柱状体) は、個々のピラーのサイズは、幅 W_{pillar} 3.75 μm 、長さ L_{pillar} 12.5 μm 、高さ H_{pillar} 10 μm であり、該ピラーは、その長手方向を、流路の長手方向と一致させて、等間隔で周期的に配置されている。流路内壁面 (側壁と底面)、ならびにピラー構造 (柱状体) の壁面には、線形ポリアクリルアミドがコートされている。線形ポリアクリルアミド・コートにより流路は親水性を保ち、同時に、等電点電気泳動時の電気浸透流も抑えられている。

30

【0315】

なお、該実施態様で使用している、流路と、該流路に設ける柱状構造 (ピラー構造) のサイズについて、具体的な数値を記載しているが、これらの数値は、本発明の実施に利用可能な等電点タンパク質分離チップの流路ならびに、該流路に設ける柱状構造 (ピラー構造) の一例を示すものであり、かかる具体例の構造に限定されるものではない。

40

【0316】

2 電気泳動・乾燥装置

図 6 は、該実施態様において使用される、電気泳動・乾燥装置の具体的な構成を示す。チップ台 (不図示) に等電点タンパク質分離チップが設置されている。温度制御機構 (不図示) にて、チップ台を通して、チップ温度を制御する。図 6 に示す電気泳動・乾燥装置の乾燥機構は、凍結乾燥機構であり、密閉槽構築のための密閉用ガラス蓋と、減圧装置 (不図示) と、真空排気口とで構成されている。電極は、流路両端のリザーバに挿入され、配線 (不図示) によって、電源やコントローラ (不図示) と電氣的に接続される。

【0317】

50

3 溶液塗布装置（不図示）

MUSASHI ENGINEERING製ディスペンサー装置であるSuperSigmaCM-V2を用いている。本実施態様で使用するマトリックス溶液は、20 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ sinamic acid、0.05% (v/v) TFA、2% (v/v) formamide、70% acetonitrile（沸点82）、さらに質量更正用ペプチドとして、900 fmol/ μL Bradykinin fragment1-7 (M = 757.3997)、200 fmol/ μL ACTH fragment18-39 (human) (M = 2465.1989)、200 fmol/ μL Insulin B chain oxidized (bovine) (M = 3494.6513)を含む水溶液である。

【0318】

4 質量分析計（不図示）

Shimadzu社製MALDI-TOF MSであるKratos AXIMA-CFR plusを用いている。タンパク質分離チップを質量分析計に設置する際には、専用のターゲットプレートを利用している。該専用のターゲットプレートは、Shimadzu社より提供される標準ターゲットプレートを参考にして、前述の等電点タンパク質分離チップがセットできるように採寸した窪みを有するターゲットプレートに加工したものである。該専用のターゲットプレートの窪み内に、マトリックス塗布済みの等電点タンパク質分離チップをセットし、質量分析計本体内に設置する。レーザ光走査は、流路の端から端までを71の区画に分け、各区画に、パルス・レーザ光照射を一定回数行い、各パルス・レーザ光照射により得られるスペクトルを積算して、該区画の質量分析スペクトルの測定結果としている。

【0319】

5 解析プログラム用コンピューター（不図示）

解析プログラム用コンピューターを使用して、後述のデータ解析を行った。

【0320】

各区画の質量分析スペクトルの測定結果ごとに、ピーク強度標準化を行っている。ピーク強度の標準化は、質量更正用ペプチドとしてマトリックス中に予め一定濃度で添加しているBradykinin fragment1-7のピーク強度を、内部標準として利用し、各区画で測定されるBradykinin fragment1-7のピーク強度に対する相対値を、標準化済ピーク強度とする。

【0321】

サンプル解析工程

サンプル前処理（捕捉・断片化・回収）

1 - 1 . 抗MDA-LDL抗体を用いた、血清サンプルに対する免疫沈降・消化・回収操作（操作1 - 1 - I）

Invitrogen社の磁気ビーズDynaBeads（マグネットを用いることで、溶液と磁気ビーズを容易に分離可能）を用いている。懸濁液状態の磁気ビーズDynaBeadsを、血清サンプル1検体当たり20 μL 用意する。

【0322】

（操作1 - 1 - II）

抗MDA-LDL抗体（血清サンプル1検体当たり8 μg 、積水メディカル社）を磁気ビーズに吸着させる。

【0323】

抗MDA-LDL抗体を吸着させた後、該磁気ビーズ懸濁液20 μL に、300 μL の血清サンプルと、900 μL のHEPESバッファー（0.1% SDS）を加えて懸濁し、室温で抗原抗体反応を1時間行う。

【0324】

使用する抗MDA-LDL抗体として、特許第3115587号公報に記載する方法に従って、マウスをMDA-LDLで免疫することで創製された抗ヒト・MDA-LDLモノクローナル抗体：抗体No.29225（積水メディカル社）が好適である。

【0325】

（操作1 - 1 - III）

抗原抗体反応後、磁気ビーズをHEPESバッファーで一度洗浄する。次いで、磁気ビーズをPBSバッファーで洗浄する。さらに、磁気ビーズを10倍希釈のPBSバッファーで再洗浄す

10

20

30

40

50

る。

【 0 3 2 6 】

(操作 1 - 1 - IV)

抗原抗体反応・洗浄処理済の磁気ビーズに対して、20 μ L のトリプシン溶液 (72 ng/ μ L, 25mM ammonium bicarbonate) を加えて、37、16時間、1200 rpmの振動を与えながら、消化反応を行う。消化反応後、マグネットを使用して磁気ビーズと消化産物であるペプチド溶液とを分離し、ペプチド溶液を回収する。回収したペプチド溶液を、遠心エバポレーターを使用して乾燥する。乾燥処理済みのペプチド・サンプルは、チップによる等電点電気泳動を行うまでの間、-30 にて保管する。

【 0 3 2 7 】

等電点電気泳動

1 - 2 . 等電点タンパク質分離チップを用いた等電点電気泳動

(操作 1 - 2 - I)

66% (v/v) cIEF gel、3% (v/v) Carrier ampholyte (p I 3-10)、500 fmol/ μ L angiotensin II (p I 6 . 7 4)、500 fmol/ μ L fibrinopeptide B (p I 4 . 0)、必要に応じて、2% (v/v) 蛍光マーカー (p I 4, 5.5, 9 の3種類) を添加してなる水溶液を調合する。この水溶液をチップ用のサンプル調製溶液として使用する。なお、既知の等電点を有する標準ペプチド、angiotensin II (p I 6 , 7 4)、fibrinopeptide B (p I 4 . 0) は、等電点の指標として、利用される。

【 0 3 2 8 】

(操作 1 - 2 - II)

乾燥処理済みのペプチド・サンプル1検体を、サンプル調製溶液8 μ Lに溶解させる (以下、サンプル溶液と称する)。更に、ボルテックスを使用して、該サンプル溶液を3分間攪拌し、氷温に30分間静置する。

【 0 3 2 9 】

(操作 1 - 2 - III)

等電点電気泳動の直前に、ボルテックスを用いて、サンプル溶液を3分間攪拌する。等電点タンパク質分離チップの流路端に位置するリザーバに、サンプル溶液 1 μ Lをアプライする。該リザーバから流路に、サンプル溶液を導入する。

【 0 3 3 0 】

(操作 1 - 2 - IV)

流路の両端に位置する酸側リザーバとアルカリ側リザーバに、電極液である100mMリン酸溶液 (約p H 2) と40mM 水酸化ナトリウム溶液 (p H 1 2) とを、各々7 μ Lアプライする。

【 0 3 3 1 】

(操作 1 - 2 - V)

流路の両端に位置する各リザーバに電極をセットし、電圧1.5kV、0V、3.0kVを、それぞれ60s、30s、720s印加する。

【 0 3 3 2 】

(操作 1 - 2 - VI)

電気泳動終了後、直ちにチップを-30 に冷却する。分離状態を保持しつつ、サンプル溶液を氷結させる。

【 0 3 3 3 】

(操作 1 - 2 - VII)

氷結したサンプル溶液を流路内に保持させたまま、等電点タンパク質分離チップのフタを取り外す。

【 0 3 3 4 】

(操作 1 - 2 - VIII)

フタを取り外すことにより、流路上端が開放されたチップを、冷却した状態で密閉環境下に置き、真空引きする。冷却した状態で、真空引きすることにより、サンプルを凍結乾

10

20

30

40

50

燥する。

【 0 3 3 5 】

(操作 1 - 2 - IX)

凍結乾燥後、蛍光スキャナーあるいは蛍光顕微鏡を用いて、各流路における蛍光マーカの分離状態をモニターする。

【 0 3 3 6 】

MALDI-TOF-MS質量分析

1 - 3 . MALDI-TOF-MSを用いた質量分析

(操作 1 - 3 - I)

マトリックス溶液を調合する。調合するマトリックス溶液は、20 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ sinamic acid、0.05% (v/v) TFA、2% (v/v) formamide、70% acetonitrile の水溶液であり、さらに質量更正用ペプチドとして、900 fmol/ μL Bradykinin fragment 1-7 ($M = 757.3997$)、200 fmol/ μL ACTH fragment18-39 (human) ($M = 2465.1986$)、200 fmol/ μL Insulin B chain oxidized (bovine) ($M = 3494.6513$) を含有する。

【 0 3 3 7 】

(操作 1 - 3 - II)

各流路における蛍光マーカの分離状態のモニターを終えた後、80 に保たれたチップステージに、サンプルの凍結乾燥を行った等電点タンパク質分離チップを載せて固定する。溶液塗布装置を使用して、等電点タンパク質分離チップの流路上にマトリックス溶液を塗布する。溶液塗布装置の圧力設定を調整し、等電点タンパク質分離チップの各流路あたり、約7.5 μL のマトリックス溶液を塗布する。

【 0 3 3 8 】

(操作 1 - 3 - III)

塗布されたマトリックス溶液を乾燥させる。乾燥後、専用のターゲットプレートを利用して、等電点タンパク質分離チップを質量分析計に設置するまでの間、等電点タンパク質分離チップが、-30 にて保管する。

【 0 3 3 9 】

(操作 1 - 3 - IV)

専用のターゲットホルダーの窪み内に等電点タンパク質分離チップを固定し、該専用のターゲットホルダーごと、質量分析計本体内に設置する。

【 0 3 4 0 】

(操作 1 - 3 - V)

全長 L 3 5 mm の流路を、0 . 5 mm 間隔の区画に分割し、酸側の区画からアルカリ側の区画まで計 7 1 の区画に順次、パルス・レーザ光照射をして、区画ごとに質量分析スペクトルを測定する。

【 0 3 4 1 】

解析 1

「解析 1」では、疾患群（冠動脈病変枝数 3）1 0 サンプル、コントロール（非患者）群（冠動脈病変枝数 0）2 3 サンプル、合計 3 3 サンプルについて、各サンプルの流路の区画ごとに測定された質量分析スペクトルの測定結果を用いて、下記の手順に従って、「サンプルプロファイリング」、「データ解析・マーカー特定」を行っている。

【 0 3 4 2 】

「データ解析・マーカー特定」の過程では、各サンプル S_m において測定される、ペプチド断片 (pI , M_{peptide}) に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のピーク強度 $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{S_m}$ を定量的に比較する必要がある。そのため、サンプル毎に、「標準化済ピーク強度： $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{relative-}S_m}$ 」を用いて、「正規化」処理を行い、「正規化ピーク強度： $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{normal-}S_m}$ 」を算出する。

【 0 3 4 3 】

さらに、各サンプル S_m ($S_m = 1 \sim 33$) において測定される、ペプチド断片 (pI , M_p)

peptide) に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ に対する、「正規化ピーク強度: $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{normal-Sm}}$ 」を用いて、合計 33 サンプルからなる、全サンプル群中において、「正規化ピーク強度: $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{normal-Sm}}$ 」に対して、「Zスコア化」処理を行い、各サンプルにおいて測定される、ペプチド断片 (pI, M_{peptide}) に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ の「ピーク強度: $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{Z-score-Sm}}$ 」の Z 値 ($I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{Z-score-Sm}}$) を算出する。

【0344】

「正規化」処理と、「Zスコア化」処理の手順は、次のとおりである。

- (1) 標準化済ピーク強度 ($I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{relative-Sm}}$) の対数変換 ($\ln(I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{relative-Sm}})$) を行う。 10
- (2) 各サンプル Sm ($Sm=1 \sim 33$) の流路内で抽出された、ペプチド断片 (pI, M_{peptide}) に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ の「対数標準化済ピーク強度: $\ln(I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{relative-Sm}})$ 」の平均; $\ln(I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{relative-Sm}})_{\text{av.-Sm}} = (1/N_{\text{peak}}) \sum \ln(I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{relative-Sm}})$ と、該「平均値」に対する、「標準偏差: $\sigma(\ln(I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{relative-Sm}}))_{\text{Sm}}$ 」を算出する。各サンプル Sm ($Sm=1 \sim 33$) で算出される「平均値: $\ln(I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{relative-Sm}})_{\text{av.-Sm}}$ 」と、「標準偏差: $\sigma(\ln(I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{relative-Sm}}))_{\text{Sm}}$ 」を用いて、「対数標準化済ピーク強度: $\ln(I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{relative-Sm}})$ 」について、 $[\ln(I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{relative-Sm}}) - \ln(I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{relative-Sm}})_{\text{av.-Sm}}] / \sigma(\ln(I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{relative-Sm}}))_{\text{Sm}}$ を算出し、「正規化ピーク強度: $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{normal-Sm}}$ 」とする。 20
- (3) 各サンプル Sm ($Sm=1 \sim 33$) に対して算出された、ペプチド断片 (pI, M_{peptide}) に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ の「正規化ピーク強度: $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{normal-Sm}}$ 」に付いて、合計 33 サンプルからなる、全サンプル群中において、その「全サンプル群中の平均値」; $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{normal-av.}} = (1/33) \sum I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{normal-Sm}}$ と、該「全サンプル群中の平均値」に対する、「全サンプル群中の標準偏差: $\sigma(I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{normal}})$ 」を算出する。次いで、算出される「全サンプル群中の平均値」と「全サンプル群中の標準偏差」を用いて、各サンプルに対して算出された「正規化ピーク強度: $I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{normal-Sm}}$ 」について、 $[I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{normal-Sm}} - I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{normal-av.}}] / \sigma(I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{normal}})$ を算出し、Z 値 ($I(pI, [M_{\text{peptide}} + H]^+)_{\text{Z-score-Sm}}$) とする。 30

【0345】

「サンプルプロファイリング」と「データ解析・マーカー特定」

- I. 合計 33 サンプルの全てについて、各サンプル Sm ($Sm=1 \sim 33$) の流路において、各区画で測定される質量分析スペクトルをデータベースに格納する。

【0346】

- II. 各サンプル Sm ($Sm=1 \sim 33$) の流路において、該流路の各区画における pI 値を推定する。サンプル溶液に含まれている、既知の pI を示す蛍光マーカー、ならびに、意図的に加えた等電点指標ペプチド: angiotensin II ($pI 6.74$) と fibrinopeptide B ($pI 4.0$) や、例えば、トリプシンの自己消化に由来する既知のペプチド断片など、全サンプル溶液に共通する、等電点が既知のペプチド群のスポット位置情報 (pI, M) を利用して、各区画における pI 値を算出 (推定) する。 40

【0347】

- III. 各サンプル Sm ($Sm=1 \sim 33$) の流路において、スポットを形成している、MDA-LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質からトリプシン消化により生成する、ペプチド断片 (pI, M_{peptide}) に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のピークを抽出する。該流路の各区画 i ($i=1 \sim 71$) において測定される質量分析スペクトルのイオン強度データ ($I(m/z)_i$) と、該区画における pI 値の推定値 ($pI(i)$) に基づき 50

、下記の手順III-1～III-3に従って、スポットを形成している、ペプチド断片 (pI , M_{peptide}) に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のピークを抽出する。

【0348】

III-1. Savitzky-Golay filterを用いて、各区画で測定される質量分析スペクトルのイオン強度データ ($I(m/z)_i$) について、指定した数毎に、 m/z とイオン強度 ($I(m/z)_i$) の平均 (移動平均) をとることで、各区画で測定される質量分析スペクトルのスムージングを行う。図7に、スムージング処理を施した質量分析スペクトル ($I(m/z)_{i-\text{smoothing}}$) の一例を示す。

【0349】

III-2. 各区画 i について、前記スムージング処理を施した、該区画 i の質量分析スペクトル ($I(m/z)_{i-\text{smoothing}}$) 中、極大値を示す部分を「ピークの候補」として抽出する。

10

【0350】

III-3. 隣接する区画で測定される質量分析スペクトル中で抽出された「ピークの候補」のイオン強度 ($I(m/z)_{i-\text{smoothing}}$) を、 m/z と各区画 i における pI 値の推定値 ($pI(i)$) の二次元座標 (pI , m/z) 上にプロットし、連結した上で、最終的な「ピーク」の抽出を行う。各区画 i で抽出された「ピークの候補」に対して、隣接区画にほぼ同一の m/z の「ピークの候補」がある場合、二次元座標 (pI , m/z) 上において、これらの「ピークの候補」を連結して、質量分析スペクトル中において、共通の1つの「ピーク位置 (m/z)」を示す「ピーク」とする。この「ピーク」抽出操作により、1つの流路において、各区画で測定される質量分析スペクトルのイオン強度データ ($I(m/z)_i$) のセットから、二次元座標 (pI , m/z) 上にプロットした際、「ピーク位置 (m/z)」は共通し、 pI 方向に広がりを出す「スポットを形成している、ペプチド断片 (pI , M_{peptide}) に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のピーク」を抽出することが可能になる。図8に、「ピークの候補」の連結によって、「ピーク」を抽出した一例を示す。抽出した「ピーク」において、 pI 方向において、イオン強度の極大を示す pI を探索し、該「ピーク」のスポット中心の pI 値 ($pI_{\text{mean-Sm}}$) とする。また、該「ピーク」のスポット中心の pI 値 ($pI_{\text{mean-Sm}}$) における、「ピーク位置 (m/z)」を、抽出された「ピーク」の中心位置 (m/z)_{mean-Sm} とする。

20

【0351】

30

IV. 異なる流路間から抽出された「スポットを形成している、ペプチド断片 (pI , M_{peptide}) に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のピーク ($pI_{\text{mean-Sm}}$, (m/z)_{mean-Sm})」の対応付け (シグナルマッチング) を行う。 pI と m/z の許容範囲 (等電点方向 ± 1 、分子量方向 ± 0.3) を設定し、その範囲内に存在する「ピーク」を同一「ピーク」と見做す。許容範囲内に対応する「ピーク」が存在しない流路については、その流路では対応する「ピーク」は存在していないと見做す。

【0352】

V. 合計33サンプルの全てについて、異なる流路間に対応付けされた「ピーク」に対して、その中心 pI 値 ($pI_{\text{mean-Sm}}$) の平均値 ($pI_{\text{av.}}$) と (m/z)_{mean-Sm} の平均値 ($(m/z)_{\text{av.}}$) からなる二次元座標 ($pI_{\text{av.}}$, (m/z)_{av.}) を示す「ピーク」として、その「標準化済ピーク強度: $I(pI_{\text{av.}}, (m/z)_{\text{av.}})_{\text{relative-Sm}}$ 」のリストを作成する。各サンプル Sm ($Sm=1 \sim 33$) の流路間において、対応付けされた「ピーク」のピーク強度の比較を行うため、「標準化済ピーク強度」に対して、上述の「正規化」処理を施し、「正規化ピーク強度: $I(pI_{\text{av.}}, (m/z)_{\text{av.}})_{\text{normal-Sm}}$ 」を算出する。合計33サンプルの全てについて、対応付けされた「ピーク」に対して、二次元座標 ($pI_{\text{av.}}$, (m/z)_{av.}) を示す「ピーク」として、その「正規化ピーク強度: $I(pI_{\text{av.}}, (m/z)_{\text{av.}})_{\text{normal-Sm}}$ 」のリストを作成する。

40

【0353】

VI. 合計33サンプルの全てについて、対応付けされた、二次元座標 ($pI_{\text{av.}}$, (m/z)_{av.}) を示す「ピーク」の一群について、その「正規化ピーク強度: $I(pI_{\text{av.}}, (m/z)_{\text{av.}})_{\text{normal-Sm}}$ 」のリストを作成する。

50

「 Z 」のリストに基づき、疾患群（冠動脈病変枝数 3）10 サンプル、コントロール（非患者）群（冠動脈病変枝数 0）23 サンプルの二つの部分群間において、「正規化ピーク強度： $I(pI_{av.}, (m/z)_{av})_{normal-Sm}$ 」が統計的に有意な差異を有するか、否かを調べる。具体的には、対応付けされた、二次元座標（ $pI_{av.}, (m/z)_{av.}$ ）を示す「ピーク」の一群中から、コントロール（非患者）群（冠動脈病変枝数 0）23 サンプルと比較して、疾患群（冠動脈病変枝数 3）10 サンプルにおいて、「正規化ピーク強度： $I(pI_{av.}, (m/z)_{av})_{normal-Sm}$ 」が統計的に有意に大きい「ピーク」を選別する。あるいは、コントロール（非患者）群（冠動脈病変枝数 0）23 サンプルと比較して、疾患群（冠動脈病変枝数 3）10 サンプルにおいて、「正規化ピーク強度： $I(pI_{av.}, (m/z)_{av})_{normal-Sm}$ 」が統計的に有意に小さい「ピーク」を選別する。

10

【0354】

合計 33 サンプルの全てについて、対応付けされた、二次元座標（ $pI_{av.}, (m/z)_{av.}$ ）を示す「ピーク」の一群について、その「正規化ピーク強度： $I(pI_{av.}, (m/z)_{av})_{normal-Sm}$ 」の比較をより効率的に行うため、「正規化ピーク強度： $I(pI_{av.}, (m/z)_{av})_{normal-Sm}$ 」に対して、上述の「Zスコア化」処理を施し、「Z 値： $I(pI, [M_{peptide} + H]^+)_{Z-score-Sm}$ 」を算出する。

【0355】

「Z 値」が正の値である場合、その「正規化ピーク強度： $I(pI_{av.}, (m/z)_{av})_{normal-Sm}$ 」は、「全サンプル群中の平均値」； $I(pI_{av.}, (m/z)_{av})_{normal-av.} = (1/33) \sum I(pI_{av.}, (m/z)_{av})_{normal-Sm}$ よりも大きいことを意味している。疾患群（冠動脈病変枝数 3）10 サンプルについて、算出された「Z 値： $I(pI_{av.}, (m/z)_{av})_{Z-score-Sm}$ 」の平均値を算出し、該疾患群（冠動脈病変枝数 3）10 サンプルの部分群における、算出された「Z 値： $I(pI_{av.}, (m/z)_{av})_{Z-score-Sm}$ 」の平均値が、少なくとも、0.65 以上である「ピーク」を選別する。

20

【0356】

前記の基準に基づき選別される「ピーク」は、コントロール（非患者）群（冠動脈病変枝数 0）23 サンプルと比較して、疾患群（冠動脈病変枝数 3）10 サンプルにおいて、「正規化ピーク強度： $I(pI_{av.}, (m/z)_{av})_{normal-Sm}$ 」が統計的に有意に大きい「ピーク」に相当している。実際、合計 33 サンプルの全てについて、「Z 値」を合計すると、0 であるので、コントロール（非患者）群（冠動脈病変枝数 0）23 サンプルの部分群における、算出された「Z 値： $I(pI_{av.}, (m/z)_{av})_{Z-score-Sm}$ 」の平均値は、 $-(0.65) \times (10/23) = -0.28$ よりも、さらに負な値となっている。従って、疾患群（冠動脈病変枝数 3）10 サンプルにおける、算出された「Z 値： $I(pI_{av.}, (m/z)_{av})_{Z-score-Sm}$ 」の平均値と、コントロール（非患者）群（冠動脈病変枝数 0）23 サンプルの部分群における、算出された「Z 値： $I(pI_{av.}, (m/z)_{av})_{Z-score-Sm}$ 」の平均値との差は、少なくとも「全サンプル群中の標準偏差： $\sigma(I(pI_{av.}, (m/z)_{av})_{normal})$ 」の 0.93 以上であり、統計的に有意な差があると見做すことが可能である。

30

【0357】

各個人 Sm ($Sm = 1 \sim 33$) に対して算出された、それぞれのペプチド断片（ $pI, M_{peptide}$ ）の Z 値（ $I(pI, M_{peptide} + 1)_{Z-score-Sm}$ ）を利用して、receiver operating characteristic (ROC) 解析を行う。各個人 Sm ($Sm = 1 \sim 33$) に由来するサンプルの測定結果から算出した、ペプチド断片（ $pI, M_{peptide}$ ）の Z 値（ $I(pI, M_{peptide} + 1)_{Z-score-Sm}$ ）を、大きい順に並べると、1 位～33 位までの「順位付け」がなされる。

40

【0358】

疾患群（冠動脈病変枝数 3）10 サンプル中、Z 値（ $I(pI, M_{peptide} + 1)_{Z-score-Sm}$ ）が上位 N^{th} 位以内であるサンプル数の割合（True positive rate または Sensitivity）： $TPR(pI, M_{peptide} + 1; N^{th})$ ；

コントロール（非患者）群（冠動脈病変枝数 0）23 サンプル中、Z 値（ $I(pI, M_{peptide} + 1)_{Z-score-Sm}$ ）が上位 N^{th} 位以内であるサンプル数の割合（False positive r

50

ate) : $FPR(pI, M_{peptide} + 1 : N^{th})$;

コントロール（非患者）群（冠動脈病変枝数 0）23 サンプル中、Z 値（ $I(pI, M_{peptide} + 1)_{Z-score-Sm}$ ）が上位 N^{th} 位以内でないサンプル数の割合（True negative rate または Specificity）、 $TNR(pI, M_{peptide} + 1 : N^{th})$;

以上の 3 つの確率を算出する。勿論、 $FPR(pI, M_{peptide} + 1 : N^{th}) + TNR(pI, M_{peptide} + 1 : N^{th}) = 1$ となっている。

【0359】

X 軸を TNR 、Y 軸を TPR とする、ROC 空間上に、算出される（ $TNR(pI, M_{peptide} + 1 : N^{th})$ 、 $TPR(pI, M_{peptide} + 1 : N^{th})$ ）（ $N^{th} = 1 \sim 33$ ）をプロットする。（ TNR 、 TPR ）で表記される ROC 空間上、（0, 1）と（1, 0）、ならびに、前記 33 個のプロット点を通る ROC 曲線を描く。描かれる ROC 曲線と、X 軸（Specificity）とで挟まる領域の面積 A_{plot} を数値積分により算出する。算出される面積 A_{plot} は、AUC “area under the ROC curve” に相当している。前記の ROC 解析により算出される「AUC 値」が、少なくとも、0.60 以上、好ましくは、0.70 以上であるという基準に基づき、疾患群（冠動脈病変枝数 3）とコントロール（非患者）群（冠動脈病変枝数 0）の推定に有効なペプチド断片（ $pI, M_{peptide}$ ）を選別することができる。

【0360】

なお、総数 33 個のサンプルは、疾患群（冠動脈病変枝数 3）10 サンプルとコントロール（非患者）群（冠動脈病変枝数 0）23 サンプルで構成されているので、 $N^{th} = 10$ の場合のプロット点（ $TNR(pI, M_{peptide} + 1 : 10)$ 、 $TPR(pI, M_{peptide} + 1 : 10)$ ）が、ROC 空間上、perfect prediction に相当する（1, 1）に一致すると、「AUC 値」は 1 となる。

【0361】

更には、前記 33 個のプロット点（ $N^{th} = 1 \sim 33$ ）のうち、ROC 空間上、perfect prediction に相当する（1, 1）に最も近い点で採用される「推定基準」が、「順位付け」を利用する「推定」手法において、最も高い確度の「推定」結果を与える「推定基準」と見做すことができる。

【0362】

上記の「順位付け」を利用する「推定」手法で採用される、「上位 N^{th} 位以内である」という閾値の設定は、そのサンプルの Z 値（ $I(pI, M_{peptide} + 1)_{Z-score-Sm}$ ）が、「 N^{th} 位の Z 値（ $I(pI, M_{peptide} + 1)_{Z-score-Sm}$ ）」と等しいか、より大きいという閾値の設定に相当している。従って、サンプルの Z 値（ $I(pI, M_{peptide} + 1)_{Z-score-Sm}$ ）が、設定される閾値の Z 値： $I(pI, M_{peptide} + 1)_{Z-score-Nth}$ に対して、 $I(pI, M_{peptide} + 1)_{Z-score-Sm} \geq I(pI, M_{peptide} + 1)_{Z-score-Nth}$ であるという「推定基準」を利用する「推定」手法に対して、ROC 解析を行っても、本質的に同じ結果となる。

【0363】

上記の ROC 解析により算出される「AUC 値」に基づく選別基準に基づき、「AUC 値」が、少なくとも、0.60 以上と算出される「ピーク」を選別する。選別される「ピーク」について、後述する「解析 2」において、該「ピーク」を与える、MDA-LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質からトリプシン消化により生成する、ペプチド断片（ $pI, M_{peptide}$ ）のアミノ酸配列を特定した結果を記載する。

【0364】

さらには、疾患群（冠動脈病変枝数 3）10 サンプルにおける、算出された「Z 値： $I(pI, M_{peptide} + 1)_{Z-score-Sm}$ 」の平均値が、少なくとも、0.65 以上であるという基準に基づき、選別される「ピーク」も、疾患群（冠動脈病変枝数 3）とコントロール（非患者）群（冠動脈病変枝数 0）の推定に有効なペプチド断片（ $pI, M_{peptide}$ ）に相当している。

【0365】

10

20

30

40

50

疾患群（冠動脈病変枝数 3）10 サンプルの部分群における、算出された「Z 値：I (p I_{av.}, (m/z)_{av.}) Z-score-Sm」の平均値が、少なくとも、0.65 以上であるという基準に基づき、選別される「ピーク」についても、後述する「解析 2」において、該「ピーク」を与える、MDA-LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質からトリプシン消化により生成する、ペプチド断片 (p I, M_{peptide}) のアミノ酸配列を特定した結果を記載する。

【0366】

実際に、前記「AUC 値」に基づく選別基準に基づき選別される「ピーク」の一つ、その二次元座標 (p I_{av.}, (m/z)_{av.}) が (p I_{av.} = 6.74, (m/z)_{av.} = 1306) のピークについて、コントロール（非患者）群（冠動脈病変枝数 0）23 サンプルと比較して、疾患群（冠動脈病変枝数 3）10 サンプルにおいて、算出された「Z 値：I (p I_{av.}, (m/z)_{av.}) Z-score-Sm」が統計的に有意に大きいことを、t 検定により検証した結果を、図 9 に示す。

10

【0367】

図 9 には、コントロール（非患者）群（冠動脈病変枝数 0）23 サンプルについて、算出された「Z 値：I (p I_{av.}, (m/z)_{av.}) Z-score-Sm」と、疾患群（冠動脈病変枝数 3）10 サンプルにおいて、算出された「Z 値：I (p I_{av.}, (m/z)_{av.}) Z-score-Sm」を区分して、プロットしている。コントロール（非患者）群（冠動脈病変枝数 0）23 サンプルについて、算出された「Z 値：I (p I_{av.}, (m/z)_{av.}) Z-score-Sm」の分布と、疾患群（冠動脈病変枝数 3）10 サンプルにおいて、算出された「Z 値：I (p I_{av.}, (m/z)_{av.}) Z-score-Sm」の分布との間に、統計的に有意な差異があるか、否かを、t 検定により判定すると、p = 0.007 で、有意な差異があると判定された。

20

【0368】

VII. 前記 (m/z)_{av.} = 1306 のイオン種 [M_{peptide} + H]⁺を与える、MDA-LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質からトリプシン消化により生成する、ペプチド断片について、別途、LC-MS/MS 法を適用し、そのアミノ酸配列に関して、内部配列情報を取得した。その結果から、該断片は、MDA-LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質からトリプシン消化により生成する、ペプチド断片の一つである、そのアミノ酸配列は IISDYHQFR (4487-4496, アミノ酸残基番号については、ApoB100 タンパク質のアミノ酸配列を参照) である断片であると同定される。

30

【0369】

「解析 2」

「解析 1」において、前記「AUC 値」に基づく選別基準に基づき選別される「ピーク」は、「MDA-LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質からトリプシン消化により生成する、ペプチド断片」中、コントロール（非患者）群（冠動脈病変枝数 0）23 サンプルと比較して、より酸化を受けていると推断される、疾患群（冠動脈病変枝数 3）10 サンプル中で、その生成比率が有意に高いものと判断される。

【0370】

加えて、「解析 1」において、疾患群（冠動脈病変枝数 3）10 サンプルの部分群における、算出された「Z 値：I (p I_{av.}, (m/z)_{av.}) Z-score-Sm」の平均値が、少なくとも、0.65 以上であるという基準に基づき、選別される「ピーク」も、「MDA-LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質からトリプシン消化により生成する、ペプチド断片」中、コントロール（非患者）群（冠動脈病変枝数 0）23 サンプルと比較して、より酸化を受けていると推断される、疾患群（冠動脈病変枝数 3）10 サンプル中で、その生成比率が有意に高いものと判断される。

40

【0371】

また、抗 MDA-LDL 抗体を使用する免疫沈降では、MDA-LDL が選択的に分取され、回収される MDA-LDL 中に含まれる、ApoB100 タンパク質は、MDA が関与する化学修飾、あるいは、活性酸素種自体が関与する酸化を受けていることが想定される。

50

【0372】

その際、L y s 残基の側鎖のアミノ基 ($-NH_2$) は、直接 M D A 化を受け、 $-NH-CH=CH-CHO$ に変換されていることが想定される。L y s 残基に対する M D A による酸化がさらに進行すると、L y s 残基の側鎖のアミノ基 ($-NH_2$) は、最終的に、dihydroxypyridine (DHP) となる。これら M D A が関与する化学修飾によるリジンの分子量的変化は、M D A 化 + 54、D H P 化 + 134 である。図 10 に、L y s が M D A 化を受けたときの構造、D H P 化を受けたときの構造をそれぞれ示す。

【0373】

また、M e t 残基の酸化も想定される。M e t 残基が酸化されて化学修飾を受けた場合、その側鎖の $-S-$ が、 $-SO-$ 、 $-SO_2-$ に変換され、+16、+32 の分子量変化が生じる。

10

【0374】

「解析 2」では、コントロール（非患者）群（冠動脈病変枝数 0）23 サンプルと比較して、より酸化を受けていると推断される、疾患群（冠動脈病変枝数 3）10 サンプル中で、その生成比率が有意に高い「ピーク」として、「解析 1」で選別された「ピーク ($pI_{av.}, (m/z)_{av.}$)」全てについて、該「ピーク」を与える「M D A - L D L 中に含まれる、A p o B 1 0 0 タンパク質からトリプシン消化により生成する、ペプチド断片」の同定を行っている。

【0375】

「解析 1」で選別された「ピーク ($pI_{av.}, (m/z)_{av.}$)」は、全て、電荷数 $z = 1$ のイオン種、すなわち、イオン種 $[M_{peptide} + H]^+$ 型のピークであると仮定する。その $(m/z)_{av.}$ は、 $400 < (m/z)_{av.} < 15000$ の範囲であり、すなわち、 $400 < M_{peptide} + 1 < 15000$ の範囲である、ペプチド断片 ($pI_{av.}, M_{peptide}$) に由来するイオン種 $[M_{peptide} + H]^+$ のピークであると仮定する。

20

【0376】

少なくとも、 $400 < M_{peptide} + 1 < 15000$ の範囲である、ペプチド断片 ($pI_{av.}, M_{peptide}$) のアミノ酸配列は、アミノ酸残基数は、4 以上、50 以下の範囲である。

【0377】

まず、酸化を受けていない A p o B 1 0 0 タンパク質のトリプシン消化に起因して生成する可能性を有する、アミノ酸残基数が 50 以下のペプチド断片の一群を、A p o B 1 0 0 タンパク質のアミノ酸配列情報に基づき、予測する。具体的には、A p o B 1 0 0 タンパク質のアミノ酸配列中に含まれる、L y s 残基ならびに A r g 残基において、トリプシン消化が起こる結果、生成する可能性がある、アミノ酸残基数が 50 以下の全てのペプチド断片を予測し、A p o B 1 0 0 タンパク質由来の「理論的予測ペプチド断片」の群とする。A p o B 1 0 0 タンパク質由来の「理論的予測ペプチド断片」の群に含まれる、各ペプチド断片のアミノ酸配列に基づき、その分子量 $M_{peptide}$ を計算する。前記 A p o B 1 0 0 タンパク質由来の「理論的予測ペプチド断片」は、A p o B 1 0 0 タンパク質のアミノ酸配列中に含まれる、L y s 残基ならびに A r g 残基の内、任意の二つを選択して、トリプシン消化を行うことで生成され、その間の部分アミノ酸配列のアミノ酸残基数が 50 以下である、ペプチド断片である。従って、該「理論的予測ペプチド断片」の C 末端は、L y s 残基または A r g 残基であるが、そのアミノ酸残基数が 50 以下のアミノ酸配列中に、さらに、L y s 残基または A r g 残基を含むものも含まれている。

30

40

【0378】

前記 A p o B 1 0 0 タンパク質由来の「理論的予測ペプチド断片」の群に含まれる、L y s 残基を含むペプチド断片について、含まれる L y s 残基の一つが、M D A 化修飾を受けた際の分子量 ($M_{peptide} + 54$) を計算する。さらに、複数の L y s 残基を含むペプチド断片について、含まれる L y s 残基の n_1 個が、M D A 化修飾を受けた際の分子量 ($M_{peptide} + 54 \times n_1$) を計算する。

【0379】

50

同様に、前記 A p o B 1 0 0 タンパク質由来の「理論的予測ペプチド断片」の群に含まれる、L y s 残基を含むペプチド断片について、含まれる L y s 残基の一つが、D H P 化修飾を受けた際の分子量 ($M_{\text{peptide}} + 134$) を計算する。さらに、複数の L y s 残基を含むペプチド断片について、含まれる L y s 残基の n_2 個が、D H P 化修飾を受けた際の分子量 ($M_{\text{peptide}} + 134 \times n_2$) を計算する。

【0380】

加えて、前記 A p o B 1 0 0 タンパク質由来の「理論的予測ペプチド断片」の群に含まれる、複数の L y s 残基を含むペプチド断片について、含まれる L y s 残基の n_2 個が、D H P 化修飾を受け、含まれる L y s 残基の n_1 個が、M D A 化修飾を受けた際の分子量 ($M_{\text{peptide}} + 54 \times n_1 + 134 \times n_2$) を計算する。

10

【0381】

前記 A p o B 1 0 0 タンパク質由来の「理論的予測ペプチド断片」の群に含まれる、M e t 残基を含むペプチド断片について、含まれる M e t 残基の一つが、酸化を受け、一酸化体 (M e t (O)) に変換された際の分子量 ($M_{\text{peptide}} + 16$) を計算する。さらに、複数の M e t 残基を含むペプチド断片について、含まれる M e t 残基の n_3 個が、酸化を受け、一酸化体 (M e t (O)) に変換された際の分子量 ($M_{\text{peptide}} + 16 \times n_3$) を計算する。

【0382】

前記 A p o B 1 0 0 タンパク質由来の「理論的予測ペプチド断片」の群に含まれる、M e t 残基を含むペプチド断片について、含まれる M e t 残基の一つが、酸化を受け、二酸化体 (M e t (O₂)) に変換された際の分子量 ($M_{\text{peptide}} + 32$) を計算する。さらに、複数の M e t 残基を含むペプチド断片について、含まれる M e t 残基の n_4 個が、酸化を受け、二酸化体 (M e t (O₂)) に変換された際の分子量 ($M_{\text{peptide}} + 32 \times n_4$) を計算する。

20

【0383】

加えて、前記 A p o B 1 0 0 タンパク質由来の「理論的予測ペプチド断片」の群に含まれる、複数の M e t 残基を含むペプチド断片について、含まれる M e t 残基の n_4 個が、二酸化体 (M e t (O₂)) に変換され、含まれる M e t 残基の n_3 個が、一酸化体 (M e t (O)) に変換された際の分子量 ($M_{\text{peptide}} + 16 \times n_3 + 32 \times n_4$) を計算する。

【0384】

上記 A p o B 1 0 0 タンパク質由来の「理論的予測ペプチド断片」の群に含まれる、酸化修飾が無いペプチド断片の分子量 (M_{peptide}) ;

含まれる L y s 残基に M D A 化修飾または D H P 化修飾が生じているペプチド断片の分子量 ($M_{\text{peptide}} + 54 \times n_1 + 134 \times n_2$) ;

含まれる M e t 残基が、一酸化体 (M e t (O)) または二酸化体 (M e t (O₂)) に変換されているペプチド断片の分子量 ($M_{\text{peptide}} + 16 \times n_3 + 32 \times n_4$) ;

以上の計算された「分子量の予測値 ($M_{\text{cal.}}$)」リスト中から、実際に、「分子量の予測値 ($M_{\text{cal.}}$)」が、 $400 < M_{\text{cal.}} + 1 < 15000$ の範囲内であるものを選別し、候補ペプチド断片の「分子量の予測値 ($M_{\text{cal.}}$)」リストを作成する。

30

【0385】

かかる候補ペプチド断片の「分子量の予測値 ($M_{\text{cal.}}$)」リスト中から、「解析1」で選別された「ピーク ($p I_{\text{av.}}, (m/z)_{\text{av.}}$)」の $(m/z)_{\text{av.}}$ から推定される、分子量 $M_{\text{obs.}} = (m/z)_{\text{av.}} - 1$ と、測定誤差範囲 (± 0.3) で一致する、「分子量の予測値 ($M_{\text{cal.}}$)」の候補を選別する。

40

【0386】

前記の選別操作によって、「解析1」で選別された「ピーク ($p I_{\text{av.}}, (m/z)_{\text{av.}}$)」の $(m/z)_{\text{av.}}$ から推定される、分子量 $M_{\text{obs.}} = (m/z)_{\text{av.}} - 1$ に対して、選別された「分子量の予測値 ($M_{\text{cal.}}$)」の候補を、下記の表13、表14～表17に示す。

【0387】

表13には、「解析1」で選別された「ピーク ($p I_{\text{av.}}, (m/z)_{\text{av.}}$)」中、「酸化修

50

飾が無いペプチド断片」に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のピークと同定されるものが纏められている。

【 0 3 8 8 】

【表 1 3 - 1 】

表 13 番号	配列	残基番号		AUC
		N-term.	C-term.	
201	FDHTNSLNIAGLSLDFSSK	1751	1769	0.71923
202	VPQDTMTFR	1216	1224	0.71154
203	DFSAEYEDGK	3953	3963	0.70385
204	ANLFNK	345	350	0.69231
205	EFNLQNMGLPDFHIPENLFLK	1260	1280	0.69231
206	IISDYHQQFR	4487	4496	0.67692
207	LYSILK	2758	2763	0.67308
208	IVSLIK	4407	4412	0.66923
209	INNQLTLDSENK	2877	2888	0.66538
210	IHSGSFQSQVELSNDQEK	3639	3656	0.66538
211	QTVNLQLQPYSLVTTLSNDLK	1782	1802	0.66154
212	AQNLYQELLTQEGQASFQGLK	4148	4168	0.65385
213	TQFNNNEYSQDLDAYNTK	1985	2002	0.65

10

【 0 3 8 9 】

なお、前記表 1 3 に記載する各ペプチド断片について、その等電点 pI と分子量 Mw を下記の表 1 3 - 2 に示す。

20

【 0 3 9 0 】

【表 1 3 - 2 】

表 13-2		pI	Mw
番号	配列		
201	FDHTNSLNIAGLSLDFSSK	5.21	2066.25
202	VPQDTMTFR	5.81	1094.25
203	DFSAEYEDGK	3.83	1289.27
204	ANLFNK	8.80	705.81
205	EFNLQNMGLPDFHIPENLFLK	4.65	2516.90
206	IISDYHQQFR	6.74	1306.44
207	LYSILK	8.59	735.92
208	IVSLIK	8.75	671.88
209	INNQLTLDSENK	5.84	1360.49
210	IHSGSFQSQVELSNDQEK	4.65	2033.14
211	QTVNLQLQPYSLVTTLSNDLK	5.83	2375.70
212	AQNLYQELLTQEGQASFQGLK	4.53	2366.61
213	TQFNNNEYSQDLDAYNTK	4.03	2165.21

30

【 0 3 9 1 】

表 1 4 には、「解析 1」で選別された「ピーク ($pI_{av.}, (m/z)_{av.}$)」中、「ペプチド鎖中に含まれる LyS 残基に MDA 化修飾が生じているペプチド断片」に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のピークと同定されるものが纏められている。

【 0 3 9 2 】

40

【表 14】

表 14 番号	配列(リジンひとつが MDA 化)	残基番号		AUC
		N-term.	C-term.	
301	GASGTTGT ^Q YQEWK ^D K	4133	4147	0.76923
302	LVGFIDDAV ^K K	2393	2403	0.75769
303	NIQEYLSILTPDG ^K GK	4447	4463	0.75769
304	DL ^K KMLETVR	1309	1317	0.74615
305	IK ^F FDK	3228	3232	0.71923
306	HIYA ^I SSAALSASY ^K ADTVAK	1838	1858	0.70769
308	TKNSEEFAA ^A MSR	116	128	0.67692
309	LATALSLSN ^K KFVEGSHNSTVSLTK	3395	3419	0.67692
配列(リジンふたつが MDA 化)				
350	YTLN ^K KNSL ^K IEIPLPFGGK	1287	1305	0.75385
351	INPLAL ^K ESV ^K KFSSK	2819	2833	0.75
352	SSV ^K LQGT ^S KIDDIWNLEV ^K	3528	3547	0.74231
353	LV ^K EV ^L KE ^S QLPTVMDFR	614	631	0.71154
354	NNALDFVT ^K SYNET ^K IK	3213	3229	0.70385
355	^K L ^K KSFDYHQFVDETNDK	2426	2442	0.7
356	TQFNNEYSQDLDAYNT ^K D ^K IGVELTGR	1985	2012	0.69231
357	^K LNELSF ^K TFIEDVN ^K	2403	2418	0.67692
358	TFIEDVN ^K KFLDML ^I KK	2411	2426	0.65769
359	^K GISTSAASPAVGTVGMDMEDDDFS ^K WNFYSPQSSPDK	3995	4034	0.65385
360	GISTSAASPAVGTVGMDMEDDDFS ^K WNFYSPQSSPDK	3996	4035	0.65385

10

20

【0393】

表 15 には、「ペプチド鎖中に含まれる L y s 残基に D H P 化修飾が生じているペプチド断片」に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のピークと同定されるものが纏められている。

【0394】

【表 15】

表 15 番号	配列(リジンひとつが DHP 化)	残基番号		AUC
		N-term.	C-term.	
401	D ^K QDEVL ^L QTFLDDASP ^G DK	538	557	0.72308
402	ALVD ^T L ^K FVTQAE ^G AK	1028	1043	0.72308
403	DD ^K HEQDMVNGIMLSVE ^K	743	760	0.7
404	LV ^K EV ^L K	614	620	0.69615
405	ALL ^K K	111	115	0.69231
406	DEPTYILNI ^K R	148	158	0.68462
407	HK ^L LIDVISMYR	4260	4270	0.68462
408	LEDTP ^K INSR	288	297	0.67692
409	YEG ^L QEWEG ^K AHLN ^I K	3964	3979	0.67692
410	QVSHAKE ^K	2134	2141	0.65769
411	V ^K HLIDSLIDFLN ^F PR	4186	4201	0.65769
412	NLTDFAEQYSIQDWA ^K R	2560	2576	0.65385
413	ALYWVNGQVPDGV ^S KVLVDHFGYTK	718	742	0.65385
配列(リジンふたつが DHP 化)				
450	LVELAHQY ^K L ^K ETIQ ^K	2361	2376	0.72692
451	ELL ^K DL ^S KEAQEV ^F K	4271	4285	0.72692
452	IEDGT ^L ASK ^T KGTFA HR	3936	3952	0.71923
453	FL ^K NIILPVYD ^K SLWDFL ^K	3671	3689	0.70385
454	TFIEDVN ^K KFLDML ^I KK	2411	2426	0.7
455	NFVASHIANILNSEELDIQDL ^K KL ^V K	591	616	0.68077
457	LQGT ^S KIDDIWNLEV ^K ENFAGEATLQR	3532	3558	0.66154
458	IAELSATAQEII ^K SQAIA ^T KK	4466	4486	0.64231

30

40

【0395】

表 16 には、「解析 1」で選別された「ピーク $(pI_{av.}, (m/z)_{av.})$ 」中、「ペプチド鎖の C 末端の L y s 残基に M D A 化修飾が生じているペプチド断片」に由来するイオン

50

種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のピークと同定されるものが纏められている。

【0396】

【表16】

表 16 番号	配列 (MDA 化リジンがトリプシン作用を受ける場合)	残基番号		AUC
		N-term.	C-term.	
501	DQEVLLQTFLDDASPGDK	540	557	0.75385
502	AALTELSLGSAYQAMILGVDSK	1703	1724	0.74231
503	TQFNNNEYSQDLDAYNTK	1985	2002	0.68077
504	IAIANIIDEIIEK	2196	2208	0.67692
505	NNALDFVTK	3213	3221	0.66923
506	EFQVPTFTIPK	1334	1344	0.66538

10

【0397】

表 17 には、「解析 1」で選別された「ピーク ($pI_{av.}, (m/z)_{av.}$)」中、「ペプチド鎖中に含まれる Met 残基に酸化修飾が生じているペプチド断片」に由来するイオン種 $[M_{\text{peptide}} + H]^+$ のピークと同定されるものが纏められている。

【0398】

【表17】

表 17 番号	配列 (メチオニンが酸化)	残基番号		AUC
		N-term.	C-term.	
601	GISTSAASPAVGTVGMDMDEDDDFSK	3996	4021	0.74615
602	FNEFIQNELQEASQELQQIHQYIMALR	4359	4385	0.66923
603	HEQDMVNGIMLSVEK	746	760	0.65

20

【0399】

なお、表 17 中、番号 601 のペプチド断片「GISTSAASPAVGTVGMDMDEDDDFSK」と、番号 603 のペプチド断片「HEQDMVNGIMLSVEK」中に含まれる Met 残基に酸化修飾は、その分子量の増加から、一酸化体 (Met (O)) と判断される。

【0400】

一方、表 17 中、番号 602 のペプチド断片「FNEFIQNELQEASQELQQIHQYIMALR」中に含まれる Met 残基に酸化修飾は、分子量の増加が、+32 である、二酸化体 (Met (O₂)) であると判断される。

【0401】

30

表 13、表 14 ~ 表 17 中では、各「ピーク」に対して選別された「分子量の予測値 ($M_{cal.}$)」の候補を、その候補ペプチドのアミノ酸配列、ならびに、ApoB100 タンパク質中における存在位置 (アミノ酸残基番号) を用いて、記載している。また、各「ピーク」に対して、上記「解析 1」における選別時に選別基準とした「AUC」の値も併せて記載する。

【0402】

表 14 に示す「候補ペプチドのアミノ酸配列」中では、ApoB100 タンパク質のアミノ酸配列中、

4145 番目、2402 番目、4461 番目、1311 番目、3229 番目、1852 番目、117 番目、3404 番目、

40

1291 番目、1295 番目、2825 番目、2829 番目、3531 番目、3537 番目、616 番目、620 番目、3221 番目、3227 番目、2426 番目、2428 番目、2002 番目、2004 番目、2403 番目、2410 番目、2418 番目、2425 番目、3995 番目、4021 番目、4034 番目、

以上の位置の Lys 残基が、MDA 化修飾を受けていることが判る。

【0403】

表 15 に示す「候補ペプチドのアミノ酸配列」中では、ApoB100 タンパク質のアミノ酸配列中、

539 番目、1034 番目、745 番目、616 番目、114 番目、157 番目、4261 番目、293 番目、3973 番目、2139 番目、4187 番目、2575 番目、73

50

2 番目、

2 3 6 9 番目、2 3 7 1 番目、4 2 7 4 番目、4 2 7 8 番目、3 9 4 4 番目、3 9 4 6 番目、3 6 7 3 番目、3 6 8 2 番目、2 4 1 8 番目、2 4 2 5 番目、6 1 2 番目、6 1 3 番目、3 5 3 7 番目、3 5 4 7 番目、4 4 7 8 番目、4 4 8 5 番目、
以上の位置の L y s 残基が、D H P 化修飾を受けていることが判る。

【0 4 0 4】

表 1 6 に示す「候補ペプチドのアミノ酸配列」中では、A p o B 1 0 0 タンパク質のアミノ酸配列中、

5 5 7 番目、1 7 2 4 番目、2 0 0 2 番目、2 2 0 8 番目、3 2 2 1 番目、1 3 4 4 番目、

以上の位置の L y s 残基が、M D A 化修飾を受けていることが判る。

【0 4 0 5】

表 1 7 に示す「候補ペプチドのアミノ酸配列」中では、A p o B 1 0 0 タンパク質のアミノ酸配列中、

4 0 1 1 番目、4 0 1 3 番目、4 3 8 2 番目、7 5 0 番目、7 5 5 番目、

以上の位置の M e t 残基が、酸化修飾を受けていることが判る。

【0 4 0 6】

従って、表 1 4 ~ 表 1 7 に示す「候補ペプチドのアミノ酸配列」は、下記の表 1 8 - 1 に示すアミノ酸残基位置の L y s 残基に対する、M D A 化修飾あるいは D H P 化修飾の進行度、ならびに、下記の表 1 8 - 2 に示すアミノ酸残基位置の M e t 残基に対する、酸化修飾の進行度を評価する際、「評価マーカー」として適する、酸化ペプチド断片であると判断される。

【0 4 0 7】

【表 1 8 - 1】

表 18-1

リジン 残基番号

114	117	157
293	539	557 612 613
616	620	732 745 1034
1291	1295	1311 1344
1724	1852	2002 2004 2139
2208	2369	2371
2402	2403	2410 2418 2425
2426	2428	2575 2825 2829
3221	3227	3229 3404 3531
3537	3547	3673 3682
3944	3946	3973 3995 4021
4034	4145	4187 4261 4274
4278	4461	4478 4485

【0 4 0 8】

【表 1 8 - 2】

表 18-2

メチオニン

残基番号

750
755
4011
4013
4382

【0 4 0 9】

解析 3

「解析 2」では、「解析 1」で選別された「ピーク ($pI_{av.}, (m/z)_{av.}$)」について、該「ピーク」の $(m/z)_{av.}$ に基づき、推定される分子量 $M_{obs.} = (m/z)_{av.} - 1$ と、測定誤差範囲 (± 0.3) で一致する、「分子量の予測値 ($M_{cal.}$)」の候補、該候補ペプチドのアミノ酸配列の特定を行っている。上記表 13、表 14 ~ 表 17 中に記載する「ピーク ($pI_{av.}, (m/z)_{av.}$)」は、何れも、その「AUC」の値は、少なくとも、0.64 以上の範囲となっている。すなわち、「解析 1」で利用した、合計 33 サンプル中、コントロール (非患者) 群 (冠動脈病変枝数 0) 23 サンプルと比較して、疾患群 (冠動脈病変枝数 3) 10 サンプル中で、その生成比率が有意に高いものと判断される。

【0410】

さらに、「解析 1」で選別された「ピーク ($pI_{av.}, (m/z)_{av.}$)」を複数種組み合わせ、該複数種の「ピーク」の「正規化ピーク強度: $I(pI_{av.}, (m/z)_{av.})_{normal-Sm}$ 」の和 $\{\sum I(pI_{av.}, (m/z)_{av.})_{normal-Sm}\}$ について、上述の「Z スコア化」処理を施し、複数種の「ピーク」の組み合わせに対する、「Z 値: $\{\sum I(pI_{av.}, (m/z)_{av.})_{Z-score-Sm}\}$ 」を算出する。かかる複数種の「ピーク」の組み合わせに対する、「Z 値: $\{\sum I(pI_{av.}, (m/z)_{av.})_{Z-score-Sm}\}$ 」に関して、コントロール (非患者) 群 (冠動脈病変枝数 0) 23 サンプルにおける分布と、疾患群 (冠動脈病変枝数 3) 10 サンプルにおける分布を比較すると、その分布には有意な差異が見出される。

【0411】

例えば、表 13 中に示す、番号 207 のピーク: LYSILK (2758-2763)、表 14 中に示す、番号 301 のピーク: GASGTTGTYQEWKDK (4133-4147)、表 15 中に示す、番号 451 のピーク: ELLKDLSKEAQEVFK (4271-4285) の組み合わせを考慮する。

【0412】

番号 207 のピーク: LYSILK (2758-2763) の「正規化ピーク強度」を、 $I(207)_{normal-Sm}$ と表記し、該 $I(207)_{normal-Sm}$ の「全サンプル群中の平均値」を、 $I(207)_{normal-av.} = (1/33) \sum I(207)_{normal-Sm}$ と、該「全サンプル群中の平均値」に対する、「全サンプル群中の標準偏差」を $\sigma(I(207)_{normal})$ と表記する。また、番号 207 のピークの「正規化ピーク強度」 $I(207)_{normal-Sm}$ について、上述の「Z スコア化」処理を施すことで算出される、「Z 値」を、 $I(207)_{Z-score-Sm}$ と表記する。合計 33 サンプル中、コントロール (非患者) 群 (冠動脈病変枝数 0) 23 サンプルと、疾患群 (冠動脈病変枝数 3) 10 サンプルについて、該 $I(207)_{Z-score-Sm}$ を用いて、ROC 解析を行い算出される、表 13 中に記載する、番号 207 のピークに関する「AUC」値は、0.673 である。

【0413】

番号 301 のピーク: GASGTTGTYQEWKDK (4133-4147) の「正規化ピーク強度」を、 $I(301)_{normal-Sm}$ と表記し、該 $I(301)_{normal-Sm}$ の「全サンプル群中の平均値」を、 $I(301)_{normal-av.} = (1/33) \sum I(301)_{normal-Sm}$ と、該「全サンプル群中の平均値」に対する、「全サンプル群中の標準偏差」を $\sigma(I(301)_{normal})$ と表記する。また、番号 301 のピークの「正規化ピーク強度」 $I(301)_{normal-Sm}$ について、上述の「Z スコア化」処理を施すことで算出される、「Z 値」を、 $I(301)_{Z-score-Sm}$ と表記する。合計 33 サンプル中、コントロール (非患者) 群 (冠動脈病変枝数 0) 23 サンプルと、疾患群 (冠動脈病変枝数 3) 10 サンプルについて、該 $I(301)_{Z-score-Sm}$ を用いて、ROC 解析を行い算出される、表 14 中に記載する、番号 301 のピークに関する「AUC」値は、0.769 である。

【0414】

番号 451 のピーク: ELLKDLSKEAQEVFK (4271-4285) の「正規化ピーク強度」を、 $I(451)_{normal-Sm}$ と表記し、該 $I(451)_{normal-Sm}$ の「全サンプル群中の平均値」を、 $I(451)_{normal-av.} = (1/33) \sum I(451)_{normal-Sm}$ と、該「全サンプル群中の平均値」に対する、「全サンプル群中の標準偏差」を $\sigma(I(451)_{normal})$ と表記する。また、番号 451 のピークの「正規化ピーク強度」 $I(451)_{normal-Sm}$ について、上述の「Z スコア化」処理を施すことで算出される、「Z 値」を、 $I(451)_{Z-score-Sm}$ と表記する。合

10

20

30

40

50

計 33 サンプル中、コントロール（非患者）群（冠動脈病変枝数 0）23 サンプルと、疾患群（冠動脈病変枝数 3）10 サンプルについて、該 $I(451)_{Z\text{-score-Sm}}$ を用いて、ROC 解析を行い算出される、表 15 中に記載する、番号 451 のピークに関する「AUC」値は、0.727 である。

【0415】

各個人 $Sm(Sm = 1 \sim 33)$ に対して算出された、 $I(207)_{Z\text{-score-Sm}}$ 、 $I(301)_{Z\text{-score-Sm}}$ 、 $I(451)_{Z\text{-score-Sm}}$ を利用して、receiver operating characteristic (ROC) 解析を行う。各個人 $Sm(Sm = 1 \sim 33)$ に対して算出された、 $I(207)_{Z\text{-score-Sm}}$ 、 $I(301)_{Z\text{-score-Sm}}$ 、 $I(451)_{Z\text{-score-Sm}}$ を、それぞれ、大きい順に並べると、1 位～33 位までの「順位付け」がなされる。

10

【0416】

疾患群（冠動脈病変枝数 3）10 サンプル中、Z 値 $I(207)_{Z\text{-score-Sm}}$ が上位 N^{th} 位以内である、Z 値 $I(301)_{Z\text{-score-Sm}}$ が上位 N^{th} 位以内である、Z 値 $I(451)_{Z\text{-score-Sm}}$ が上位 N^{th} 位以内である、そのいずれかの条件を満たすサンプル数の割合（True positive rate または Sensitivity）： $TPR(207+301+451 : N^{th})$ ；

コントロール（非患者）群（冠動脈病変枝数 0）23 サンプル中、Z 値 $I(207)_{Z\text{-score-Sm}}$ が上位 N^{th} 位以内である、Z 値 $I(301)_{Z\text{-score-Sm}}$ が上位 N^{th} 位以内である、Z 値 $I(451)_{Z\text{-score-Sm}} > 0$ が上位 N^{th} 位以内である、そのいずれかの条件を満たすサンプル数の割合（False positive rate）： $FPR(207+301+451 : N^{th})$ ；

コントロール（非患者）群（冠動脈病変枝数 0）23 サンプル中、Z 値 $I(207)_{Z\text{-score-Sm}}$ が上位 N^{th} 位以内でない、Z 値 $I(301)_{Z\text{-score-Sm}}$ が上位 N^{th} 位以内でない、Z 値 $I(451)_{Z\text{-score-Sm}}$ が上位 N^{th} 位以内でない、この三条件を満たすサンプル数の割合（True negative rate または Specificity）： $TNR(207+301+451 : N^{th})$ ；

20

以上の 3 つの確率を算出する。勿論、 $FPR(207+301+451 : N^{th}) + TNR(207+301+451 : N^{th}) = 1$ となっている。

【0417】

X 軸を TNR 、Y 軸を TPR とする、ROC 空間上に、算出される（ $TNR(207+301+451 : N^{th})$ 、 $TPR(207+301+451 : N^{th})$ ）（ $N^{th} = 1 \sim 33$ ）をプロットする。ROC 空間上、（0, 1）、（1, 0）と、前記 33 個のプロット点を通る ROC 曲線を描く。描かれる ROC 曲線と、X 軸（Specificity）とで挟まる領域の面積 A_{plot} を数値積分により算出する。算出される面積 A_{plot} は、AUC “area under the ROC curve” に相当している。前記の ROC 解析により算出される「AUC 値」は、「番号 207 のピーク、番号 301 のピーク、番号 451 のピークの組み合わせ」に関する「AUC」値であり、0.858 となることが判った。

30

【0418】

この結果は、上記合計 33 サンプルからなる群においては、「番号 207 のピーク、番号 301 のピーク、番号 451 のピークの組み合わせ」に基づき、例えば、 $N^{th} = 10$ の条件、「Z 値 $I(207)_{Z\text{-score-Sm}}$ が上位 10 位以内である、Z 値 $I(301)_{Z\text{-score-Sm}}$ が上位 10 位以内である、Z 値 $I(451)_{Z\text{-score-Sm}} > 0$ が上位 10 位以内である、そのいずれかの条件を満たす場合、「冠動脈病変枝数 3」の被験者のサンプルと推定する」という推定基準に基づき、各サンプルに関して、「冠動脈病変枝数 3」の被験者のサンプルか、否かの推定を行うと、より高い確度の推定がなされることが判る。

40

【0419】

具体的には、「番号 207 のピーク、番号 301 のピーク、番号 451 のピークの組み合わせ」を採用することで、個々の「ピーク」における「バラツキ」に起因する「誤った推定」を排除でき、「組み合わせ」全体では、疾患群（冠動脈病変枝数 3）10 サンプルであるか、否かの推定が、より高い確度で行えることを査証している。

【0420】

「解析 1」で選別された「ピーク（ $pI_{av.}, (m/z)_{av.}$ ）」は、何れも、コントロール

50

(非患者)群(冠動脈病変枝数0)23サンプルにおける分布と、疾患群(冠動脈病変枝数3)10サンプルにおける分布を比較すると、有意な「分布の差異」が見出される。先に例示したように、「複数種のピークの組み合わせ」を採用すると、個々の「ピーク」における「バラツキ」に起因する「誤った推定」を排除でき、「複数種のピークの組み合わせ」全体では、コントロール(非患者)群(冠動脈病変枝数0)23サンプルにおける分布と、疾患群(冠動脈病変枝数3)10サンプルにおける分布を比較すると、その二つの部分群間に存在する「分布の差異」が、より明確化される。従って、コントロール(非患者)群(冠動脈病変枝数0)と、疾患群(冠動脈病変枝数3)の二つの部分群間における、「病態」の進行度の差異を識別する目的で利用する「診断マーカー」として、先に例示するような「複数種のピークの組み合わせ」の利用はより効果的であることが示される。

10

【0421】

例えば、選別された「診断マーカー」を利用して、被験者Sm-testが、疾患群(冠動脈病変枝数3)に属するか、コントロール(非患者)群(冠動脈病変枝数0)に属するかの推定を行う手順を説明する。

【0422】

まず、上述する手法に準じて、該被験者Sm-testから採取した血液サンプル中から分取される、MDA-LDL中のApoB100タンパク質に由来するペプチド断片の「ピーク($pI_{av.}, (m/z)_{av.}$)」について、「正規化ピーク強度： $I(pI_{av.}, (m/z)_{av.})_{normal-Sm-test}$ 」を算出する。

【0423】

20

「診断マーカー」の「ピーク($pI_{av.}, (m/z)_{av.}$)」に関して、設定される「正規ピーク強度の閾値： $I(pI_{av.}, (m/z)_{av.})_{normal-th}$ 」と、該被験者Sm-testの「正規化ピーク強度： $I(pI_{av.}, (m/z)_{av.})_{normal-Sm-test}$ 」を比較する。

【0424】

その比較の結果、判定条件： $I(pI_{av.}, (m/z)_{av.})_{normal-Sm-test} > I(pI_{av.}, (m/z)_{av.})_{normal-th}$ を満たす場合、該被験者Sm-testは、疾患群(冠動脈病変枝数3)に属する；前記判定条件を満たさない場合、該被験者Sm-testは、コントロール(非患者)群(冠動脈病変枝数0)に属すると、推定を行う。

【0425】

前記推定操作に利用する、「ピーク($pI_{av.}, (m/z)_{av.}$)」に対する「正規ピーク強度の閾値： $I(pI_{av.}, (m/z)_{av.})_{normal-th}$ 」は、例えば、下記の手順に従って設定することが可能である。

30

【0426】

具体的には、「解析1」において、コントロール(非患者)群(冠動脈病変枝数0)23サンプルと疾患群(冠動脈病変枝数3)10サンプルからなる、合計33サンプル中の、各個人Sm($Sm = 1 \sim 33$)に対して、それぞれ、算出される、該「ピーク($pI_{av.}, (m/z)_{av.}$)」の「正規化ピーク強度： $I(pI_{av.}, (m/z)_{av.})_{normal-Sm}$ 」を利用して、「交差検定(Cross-validation)」の手法を応用して、「ピーク($pI_{av.}, (m/z)_{av.}$)」に対する「正規ピーク強度の閾値： $I(pI_{av.}, (m/z)_{av.})_{normal-th}$ 」の最適化を行うことが可能である。

40

【0427】

例えば、“leave-one-out cross-validation”の手法を応用することで、下記の手順により、「ピーク($pI_{av.}, (m/z)_{av.}$)」に対する「正規ピーク強度の閾値： $I(pI_{av.}, (m/z)_{av.})_{normal-th}$ 」の最適化を行うことができる。

【0428】

合計33サンプル中、1個人Sm($Sm = t$; $t = 1 \sim 33$)を取り出し、「テスト事例(testing set)」とし、残る32個人からなる群Sm($Sm \neq t$)を、「訓練事例(training set)」とする。「テスト事例(testing set)」とする、1個人Sm($Sm = t$; $t = 1 \sim 33$)は、33種類あり、それに対応して、「訓練事例(training set)」Sm($Sm \neq t$; $t = 1 \sim 33$)も、33種類作成される。

50

【0429】

「テスト事例 (testing set)」とする、1 個人 $Sm(Sm = t ; t = 1 \sim 33)$ が、疾患群 (冠動脈病変枝数 3) に属する場合、「訓練事例 (training set)」 $Sm(Sm \neq t ; t = 1 \sim 33)$ は、疾患群 (冠動脈病変枝数 3) に属する 9 サンプルと、コントロール (非患者) 群 (冠動脈病変枝数 0) 23 サンプルで構成される。一方、「テスト事例 (testing set)」とする、1 個人 $Sm(Sm = t ; t = 1 \sim 33)$ が、コントロール (非患者) 群 (冠動脈病変枝数 0) に属する場合、「訓練事例 (training set)」 $Sm(Sm \neq t ; t = 1 \sim 33)$ は、疾患群 (冠動脈病変枝数 3) 10 サンプルと、コントロール (非患者) 群 (冠動脈病変枝数 0) に属する 22 サンプルで構成される。

【0430】

作成される「訓練事例 (training set)」 $Sm(Sm \neq t ; t = 1 \sim 33)$ に対して、判定条件: $I(p I_{av.}, (m/z)_{av})_{normal-Sm} \leq I(p I_{av.}, (m/z)_{av})_{normal-th}$ を満たす場合、該被験者 Sm は、疾患群 (冠動脈病変枝数 3) に属する; 前記判定条件を満たさない場合、該被験者 Sm は、コントロール (非患者) 群 (冠動脈病変枝数 0) に属すると、推定を行う。

【0431】

該「訓練事例 (training set)」 $Sm(Sm \neq t ; t = 1 \sim 33)$ が、疾患群 (冠動脈病変枝数 3) に属する 9 サンプルと、コントロール (非患者) 群 (冠動脈病変枝数 0) 23 サンプルで構成されている場合、

疾患群 (冠動脈病変枝数 3) 9 サンプル中、前記判定条件を満たすサンプル数の割合 (True positive rate または Sensitivity): $TPR(Sm \neq t : I(p I_{av.}, (m/z)_{av})_{normal-th})$;

コントロール (非患者) 群 (冠動脈病変枝数 0) 23 サンプル中、前記判定条件を満たすサンプル数の割合 (False positive rate): $FPR(Sm \neq t : I(p I_{av.}, (m/z)_{av})_{normal-th})$;

コントロール (非患者) 群 (冠動脈病変枝数 0) 23 サンプル中、前記判定条件を満たさないサンプル数の割合 (True negative rate または Specificity)、 $TNR(Sm \neq t : I(p I_{av.}, (m/z)_{av})_{normal-th})$;

以上の 3 つの確率を算出する。勿論、 $FPR(Sm \neq t : I(p I_{av.}, (m/z)_{av})_{normal-th}) + TNR(Sm \neq t : I(p I_{av.}, (m/z)_{av})_{normal-th}) = 1$ となっている。

【0432】

該「訓練事例 (training set)」 $Sm(Sm \neq t ; t = 1 \sim 33)$ が、疾患群 (冠動脈病変枝数 3) 10 サンプルと、コントロール (非患者) 群 (冠動脈病変枝数 0) に属する 22 サンプルで構成されている場合、

疾患群 (冠動脈病変枝数 3) 10 サンプル中、前記判定条件を満たすサンプル数の割合 (True positive rate または Sensitivity): $TPR(Sm \neq t : I(p I_{av.}, (m/z)_{av})_{normal-th})$;

コントロール (非患者) 群 (冠動脈病変枝数 0) 22 サンプル中、前記判定条件を満たすサンプル数の割合 (False positive rate): $FPR(Sm \neq t : I(p I_{av.}, (m/z)_{av})_{normal-th})$;

コントロール (非患者) 群 (冠動脈病変枝数 0) 22 サンプル中、前記判定条件を満たさないサンプル数の割合 (True negative rate または Specificity)、 $TNR(Sm \neq t : I(p I_{av.}, (m/z)_{av})_{normal-th})$;

以上の 3 つの確率を算出する。勿論、 $FPR(Sm \neq t : I(p I_{av.}, (m/z)_{av})_{normal-th}) + TNR(Sm \neq t : I(p I_{av.}, (m/z)_{av})_{normal-th}) = 1$ となっている。

【0433】

作成される合計 33 種類の「訓練事例 (training set)」 $Sm(Sm \neq t ; t = 1 \sim 33)$ について、それぞれ、算出される $TPR(Sm \neq t : I(p I_{av.}, (m/z)_{av})_{normal-th})$ と $TNR(Sm \neq t : I(p I_{av.}, (m/z)_{av})_{normal-th})$ の組み合わせ、合計 33 の組み合わせを、X 軸を TNR 、Y 軸を TPR とする、ROC 空間上に、プロットする。ROC 空

10

20

30

40

50

間上、 $(0, 1)$ 、 $(1, 0)$ と、前記 33 個のプロット点 $(TNR(Sm \neq t : I(pI_{av.}, (m/z)_{av})_{normal-th}), TPR(Sm \neq t : I(pI_{av.}, (m/z)_{av})_{normal-th}))$ を通る ROC 曲線を描く。描かれる ROC 曲線と、X 軸 (Specificity) とで挟まる領域の面積 A_{plot} を数値積分により算出する。算出される面積 A_{plot} は、AUC “area under the ROC curve” に相当している。前記の ROC 解析により算出される「AUC 値」は、「ピーク $(pI_{av.}, (m/z)_{av})$ 」に対する「正規ピーク強度の閾値： $I(pI_{av.}, (m/z)_{av})_{normal-th}$ 」に基づく、上記判定条件に対する「AUC 値」、 $AUC(I(pI_{av.}, (m/z)_{av})_{normal-th})$ と見做す。

【0434】

合計 33 サンプル中の、各個人 Sm ($Sm = 1 \sim 33$) に対して、それぞれ、算出される、該「ピーク $(pI_{av.}, (m/z)_{av})$ 」の「正規化ピーク強度： $I(pI_{av.}, (m/z)_{av})_{normal-Sm}$ 」を、大きい順に並べると、1 位 ~ 33 位までの「順位付け」がなされる。「順位付け」された 1 位 ~ 33 位までの「正規化ピーク強度： $I(pI_{av.}, (m/z)_{av})_{normal-Sm}$ 」を、それぞれ、「ピーク $(pI_{av.}, (m/z)_{av})$ 」に対する「正規ピーク強度の閾値： $I(pI_{av.}, (m/z)_{av})_{normal-th}$ 」として、前記の ROC 解析により算出される、上記判定条件に対する「AUC 値」、 $AUC(I(pI_{av.}, (m/z)_{av})_{normal-th} = I(pI_{av.}, (m/z)_{av}))$ を求める。

【0435】

求められる、33 種類の $AUC(I(pI_{av.}, (m/z)_{av})_{normal-th} = I(pI_{av.}, (m/z)_{av}))$ を、「正規ピーク強度の閾値： $I(pI_{av.}, (m/z)_{av})_{normal-th}$ 」として採用した、「正規化ピーク強度： $I(pI_{av.}, (m/z)_{av})_{normal-Sm}$ 」の順位に従って、横軸を「順位」、縦軸を $AUC(I(pI_{av.}, (m/z)_{av})_{normal-th} = I(pI_{av.}, (m/z)_{av}))$ としてプロットする。すると、「順位」が 10 位の近辺で、 $AUC(I(pI_{av.}, (m/z)_{av})_{normal-th} = I(pI_{av.}, (m/z)_{av}))$ が極大となる。この極大を示す、 $AUC(I(pI_{av.}, (m/z)_{av})_{normal-th} = I(pI_{av.}, (m/z)_{av}))$ を与える、「ピーク $(pI_{av.}, (m/z)_{av})$ 」に対する「正規ピーク強度の閾値： $I(pI_{av.}, (m/z)_{av})_{normal-th}$ 」は、最適化された「正規ピーク強度の閾値： $I(pI_{av.}, (m/z)_{av})_{normal-th}$ 」と見做すことが可能である。

【0436】

例えば、「番号 207 のピーク、番号 301 のピーク、番号 451 のピークの組み合わせ」に基づき、被験者 $Sm-test$ が、疾患群 (冠動脈病変枝数 3) に属するか、コントロール (非患者) 群 (冠動脈病変枝数 0) に属するかの推定を行う際には、下記のような判定条件を設定することができる。

【0437】

「番号 207 のピーク」に対する「正規ピーク強度の閾値： $I(207)_{normal-th}$ 」、「番号 301 のピーク」に対する「正規ピーク強度の閾値： $I(301)_{normal-th}$ 」、「番号 451 のピーク」に対する「正規ピーク強度の閾値： $I(451)_{normal-th}$ 」を、それぞれ設定する。設定される「正規ピーク強度の閾値： $I(207)_{normal-th}$ 」、「正規ピーク強度の閾値： $I(301)_{normal-th}$ 」、「正規ピーク強度の閾値： $I(451)_{normal-th}$ 」と、該被験者 $Sm-test$ の「正規化ピーク強度： $I(207)_{normal-Sm-test}$ 」、「正規化ピーク強度： $I(301)_{normal-Sm-test}$ 」、「正規化ピーク強度： $I(451)_{normal-Sm-test}$ 」を、それぞれ比較する。

【0438】

その比較の結果、判定条件「 $I(207)_{normal-Sm-test} \geq I(207)_{normal-th}$ 、 $I(301)_{normal-Sm-test} \geq I(301)_{normal-th}$ 、 $I(451)_{normal-Sm-test} \geq I(451)_{normal-th}$ 」のいずれかを満たす場合、該被験者 $Sm-test$ は、疾患群 (冠動脈病変枝数 3) に属する；前記判定条件を満たさない場合、該被験者 $Sm-test$ は、コントロール (非患者) 群 (冠動脈病変枝数 0) に属すると、推定を行う。

【0439】

前記推定操作に利用する、「正規ピーク強度の閾値： $I(207)_{normal-th}$ 」、「正規ピ

10

20

30

40

50

ーク強度の閾値： $I(301)_{normal-th}$ 」、「正規ピーク強度の閾値： $I(451)_{normal-th}$ 」は、例えば、下記の手順に従って設定することが可能である。

【0440】

具体的には、「解析1」において、コントロール（非患者）群（冠動脈病変枝数0）23サンプルと疾患群（冠動脈病変枝数3）10サンプルからなる、合計33サンプル中の、各個人 $Sm(Sm = 1 \sim 33)$ に対して、それぞれ、算出される、該「ピーク（ $pI_{av.}, (m/z)_{av.}$ ）」の「正規化ピーク強度： $I(pI_{av.}, (m/z)_{av.})_{normal-Sm}$ 」を利用して、「交差検定」の手法を応用して、「正規ピーク強度の閾値： $I(207)_{normal-th}$ 」、「正規ピーク強度の閾値： $I(301)_{normal-th}$ 」、「正規ピーク強度の閾値： $I(451)_{normal-th}$ 」の最適化を行うことが可能である。

10

【0441】

例えば、“leave-one-out cross-validation”の手法を応用することで、下記の手順により、「正規ピーク強度の閾値： $I(207)_{normal-th}$ 」、「正規ピーク強度の閾値： $I(301)_{normal-th}$ 」、「正規ピーク強度の閾値： $I(451)_{normal-th}$ 」の最適化を行うことができる。

【0442】

合計33サンプル中、1個人 $Sm(Sm = t; t = 1 \sim 33)$ を取り出し、「テスト事例（testing set）」とし、残る32個人からなる群 $Sm(Sm \neq t)$ を、「訓練事例（training set）」とする。「テスト事例（testing set）」とする、1個人 $Sm(Sm = t; t = 1 \sim 33)$ は、33種類あり、それに対応して、「訓練事例（training set）」 $Sm(Sm \neq t; t = 1 \sim 33)$ も、33種類作成される。

20

【0443】

「テスト事例（testing set）」とする、1個人 $Sm(Sm = t; t = 1 \sim 33)$ が、疾患群（冠動脈病変枝数3）に属する場合、「訓練事例（training set）」 $Sm(Sm \neq t; t = 1 \sim 33)$ は、疾患群（冠動脈病変枝数3）に属する9サンプルと、コントロール（非患者）群（冠動脈病変枝数0）23サンプルで構成される。一方、「テスト事例（testing set）」とする、1個人 $Sm(Sm = t; t = 1 \sim 33)$ が、コントロール（非患者）群（冠動脈病変枝数0）に属する場合、「訓練事例（training set）」 $Sm(Sm \neq t; t = 1 \sim 33)$ は、疾患群（冠動脈病変枝数3）10サンプルと、コントロール（非患者）群（冠動脈病変枝数0）に属する22サンプルで構成される。

30

【0444】

作成される「訓練事例（training set）」 $Sm(Sm \neq t; t = 1 \sim 33)$ に対して、判定条件「 $I(207)_{normal-Sm} \geq I(207)_{normal-th}$ 、 $I(301)_{normal-Sm} \geq I(301)_{normal-th}$ 、 $I(451)_{normal-Sm} \geq I(451)_{normal-th}$ のいずれかを満たす」場合、該被験者（サンプル） Sm は、疾患群（冠動脈病変枝数3）に属する；前記判定条件を満たさない場合、該被験者 Sm （サンプル）は、コントロール（非患者）群（冠動脈病変枝数0）に属すると、推定を行う。

【0445】

該「訓練事例（training set）」 $Sm(Sm \neq t; t = 1 \sim 33)$ が、疾患群（冠動脈病変枝数3）に属する9サンプルと、コントロール（非患者）群（冠動脈病変枝数0）23サンプルで構成されている場合、

40

疾患群（冠動脈病変枝数3）9サンプル中、前記判定条件を満たすサンプル数の割合（True positive rateまたはSensitivity）： $TPR(Sm \neq t; I(207)_{normal-th}, I(301)_{normal-th}, I(451)_{normal-th})$ ；

コントロール（非患者）群（冠動脈病変枝数0）23サンプル中、前記判定条件を満たすサンプル数の割合（False positive rate）： $FPR(Sm \neq t; I(207)_{normal-th}, I(301)_{normal-th}, I(451)_{normal-th})$ ；

コントロール（非患者）群（冠動脈病変枝数0）23サンプル中、前記判定条件を満たさないサンプル数の割合（True negative rateまたはSpecificity）、 $TNR(Sm \neq t; I(207)_{normal-th}, I(301)_{normal-th}, I(451)_{normal-th})$ ；

50

以上の3つの確率を算出する。勿論、 $FPR(Sm \neq t : I(207)_{normal-th}, I(301)_{normal-th}, I(450)_{normal-th}) + TNR(Sm \neq t : I(207)_{normal-th}, I(301)_{normal-th}, I(450)_{normal-th}) = 1$ となっている。

【0446】

該「訓練事例(training set)」 $Sm(Sm \neq t ; t = 1 \sim 33)$ が、疾患群(冠動脈病変枝数3)10サンプルと、コントロール(非患者)群(冠動脈病変枝数0)に属する22サンプルで構成されている場合、

疾患群(冠動脈病変枝数3)10サンプル中、前記判定条件を満たすサンプル数の割合(True positive rateまたはSensitivity): $TPR(Sm \neq t : I(207)_{normal-th}, I(301)_{normal-th}, I(450)_{normal-th})$;

コントロール(非患者)群(冠動脈病変枝数0)22サンプル中、前記判定条件を満たすサンプル数の割合(False positive rate): $FPR(Sm \neq t : I(207)_{normal-th}, I(301)_{normal-th}, I(450)_{normal-th})$;

コントロール(非患者)群(冠動脈病変枝数0)22サンプル中、前記判定条件を満たさないサンプル数の割合(True negative rateまたはSpecificity)、 $TNR(Sm \neq t : I(207)_{normal-th}, I(301)_{normal-th}, I(450)_{normal-th})$;

以上の3つの確率を算出する。勿論、 $FPR(Sm \neq t : I(207)_{normal-th}, I(301)_{normal-th}, I(450)_{normal-th}) + TNR(Sm \neq t : I(207)_{normal-th}, I(301)_{normal-th}, I(450)_{normal-th}) = 1$ となっている。

【0447】

作成される合計33種類の「訓練事例(training set)」 $Sm(Sm \neq t ; t = 1 \sim 33)$ について、それぞれ、算出される $TPR(Sm \neq t : I(207)_{normal-th}, I(301)_{normal-th}, I(450)_{normal-th})$ と $TNR(Sm \neq t : I(207)_{normal-th}, I(301)_{normal-th}, I(450)_{normal-th})$ の組み合わせ、合計33の組み合わせを、X軸を TNR 、Y軸を TPR とする、ROC空間上に、プロットする。ROC空間上、 $(0, 1)$ 、 $(1, 0)$ と、前記33個のプロット点($TNR(Sm \neq t : I(207)_{normal-th}, I(301)_{normal-th}, I(450)_{normal-th})$, $TPR(Sm \neq t : I(207)_{normal-th}, I(301)_{normal-th}, I(450)_{normal-th})$)を通るROC曲線を描く。描かれるROC曲線と、X軸(Specificity)とで挟まる領域の面積 A_{plot} を数値積分により算出する。算出される面積 A_{plot} は、AUC“area under the ROC curve”に相当している。前記のROC解析により算出される「AUC値」は、 $I(207)_{normal-th}$ 、 $I(301)_{normal-th}$ 、 $I(450)_{normal-th}$ の組み合わせに基づく、上記判定条件に対する「AUC値」、 $AUC(I(207)_{normal-th}, I(301)_{normal-th}, I(450)_{normal-th})$ と見做す。

【0448】

合計33サンプル中の、各個人 $Sm(Sm = 1 \sim 33)$ に対して、それぞれ、算出される「正規化ピーク強度: $I(207)_{normal-Sm}$ 」、「正規化ピーク強度: $I(301)_{normal-Sm}$ 」、「正規化ピーク強度: $I(405)_{normal-Sm}$ 」を、それぞれ、大きい順に並べると、それぞれ、1位~33位までの「順位付け」がなされる。「順位付け」された1位~33位までの「正規化ピーク強度: $I(207)_{normal-Sm}$ 」、「正規化ピーク強度: $I(301)_{normal-Sm}$ 」、「正規化ピーク強度: $I(405)_{normal-Sm}$ 」を、それぞれ、「正規ピーク強度の閾値: $I(207)_{normal-th}$ 」、「正規ピーク強度の閾値: $I(301)_{normal-th}$ 」、「正規ピーク強度の閾値: $I(451)_{normal-th}$ 」とすると、延べ $33 \times 33 \times 33$ 種類の閾値の組み合わせ($I(207)_{normal-th}$ 、 $I(301)_{normal-th}$ 、 $I(450)_{normal-th}$) = ($I(207)_{normal-Sm}$ 、 $I(301)_{normal-Sm}$ 、 $I(450)_{normal-Sm}$)の群が作成される。

【0449】

延べ $33 \times 33 \times 33$ 種類の閾値の組み合わせ($I(207)_{normal-th}$ 、 $I(301)_{normal-th}$ 、 $I(450)_{normal-th}$)に基づく、判定条件について、前記のROC解析により算出される、上記判定条件に対する「AUC値」、 $AUC(I(207)_{normal-th}, I(301)_{normal-th}, I(450)_{normal-th}) = (I(207)_{normal-Sm}, I(301)_{normal-Sm}, I(450)_{normal-Sm})$ を求める。

【 0 4 5 0 】

求められる、延べ $3 \times 3 \times 3 \times 3$ 種類のAUC($(I(207)_{normal-th}, I(301)_{normal-th}, I(450)_{normal-th}) = (I(207)_{normal-Sm}, I(301)_{normal-Sm}, I(450)_{normal-Sm})$)を、大きい値を示す順に並べると、1位～($3 \times 3 \times 3 \times 3$)位までの「順位付け」がなされる。1位のAUC($(I(207)_{normal-th}, I(301)_{normal-th}, I(450)_{normal-th}) = (I(207)_{normal-Sm}, I(301)_{normal-Sm}, I(450)_{normal-Sm})$)を与える、閾値の組み合わせ($(I(207)_{normal-th}, I(301)_{normal-th}, I(450)_{normal-th}) = (I(207)_{normal-Sm}, I(301)_{normal-Sm}, I(450)_{normal-Sm})$)は、最適化された閾値の組み合わせ($(I(207)_{normal-th}, I(301)_{normal-th}, I(450)_{normal-th})$)と見做すことが可能である。

10

【 0 4 5 1 】

実際には、「順位付け」されたAUC($(I(207)_{normal-th}, I(301)_{normal-th}, I(450)_{normal-th}) = (I(207)_{normal-Sm}, I(301)_{normal-Sm}, I(450)_{normal-Sm})$)中、上位1位～27位までは、「然程、値に差がない」と判断できる。

【 0 4 5 2 】

上位1位～27位までAUC値を与える、閾値の組み合わせ($(I(207)_{normal-th}, I(301)_{normal-th}, I(450)_{normal-th}) = (I(207)_{normal-Sm}, I(301)_{normal-Sm}, I(450)_{normal-Sm})$)について、それぞれ、下記の判定条件「 $I(207)_{normal-Sm} \leq I(207)_{normal-th}, I(301)_{normal-Sm} \leq I(301)_{normal-th}, I(450)_{normal-Sm} \leq I(450)_{normal-th}$ のいずれかを満たす」場合、該被験者(サンプル)Smは、疾患群(冠動脈病変枝数3)に属する；前記判定条件を満たさない場合、該被験者Sm(サンプル)は、コントロール(非患者)群(冠動脈病変枝数0)に属すると、合計33サンプル中の各個人Sm($Sm = 1 \sim 33$)に対して、推定を行う。

20

【 0 4 5 3 】

前記上位1位～27位までの「閾値の組み合わせ($(I(207)_{normal-th}, I(301)_{normal-th}, I(450)_{normal-th})$)」に基づく、判定条件による、合計33サンプル中の各個人Sm($Sm = 1 \sim 33$)に対する推定結果を用いて、それぞれ、下記の確率を算出する。

【 0 4 5 4 】

各「閾値の組み合わせ($(I(207)_{normal-th}, I(301)_{normal-th}, I(450)_{normal-th})$)」に基づく、判定条件を用いた推定結果から、

30

疾患群(冠動脈病変枝数3)10サンプル中、前記判定条件を満たすサンプル数の割合(True positive rateまたはSensitivity)： $TPR(I(207)_{normal-th}, I(301)_{normal-th}, I(450)_{normal-th})$ ；

コントロール(非患者)群(冠動脈病変枝数0)23サンプル中、前記判定条件を満たすサンプル数の割合(False positive rate)： $FPR(I(207)_{normal-th}, I(301)_{normal-th}, I(450)_{normal-th})$ ；

コントロール(非患者)群(冠動脈病変枝数0)23サンプル中、前記判定条件を満たさないサンプル数の割合(True negative rateまたはSpecificity)、 $TNR(I(207)_{normal-th}, I(301)_{normal-th}, I(450)_{normal-th})$ ；

以上の3つの確率を算出する。勿論、 $FPR(I(207)_{normal-th}, I(301)_{normal-th}, I(450)_{normal-th}) + TNR(I(207)_{normal-th}, I(301)_{normal-th}, I(450)_{normal-th}) = 1$ となっている。

40

【 0 4 5 5 】

上位1位～27位までの各「閾値の組み合わせ($(I(207)_{normal-th}, I(301)_{normal-th}, I(450)_{normal-th})$)」に対して、算出される $TNR(I(207)_{normal-th}, I(301)_{normal-th}, I(450)_{normal-th})$ と $TPR(I(207)_{normal-th}, I(301)_{normal-th}, I(450)_{normal-th})$ を、X軸を TNR 、Y軸を TPR とする、ROC空間上に、プロットする。ROC空間上にプロットされている、合計27個のプロット点($TNR(I(207)_{normal-th}, I(301)_{normal-th}, I(450)_{normal-th}), TPR(I(207)_{normal-th}, I(301)_{normal-th}, I(450)_{normal-th})$)と、ROC空間上の(1, 1)

50

との距離 $D(I(207)_{\text{normal-th}}, I(301)_{\text{normal-th}}, I(450)_{\text{normal-th}})$ を算出する。算出されるROC空間上の $(1, 1)$ との距離 $D(I(207)_{\text{normal-th}}, I(301)_{\text{normal-th}}, I(450)_{\text{normal-th}})$ を、小さい順に並べると、1位～27位までの「順位付け」がなされる。

【0456】

通常、「順位付け」されたAUC($(I(207)_{\text{normal-th}}, I(301)_{\text{normal-th}}, I(450)_{\text{normal-th}})$) = ($I(207)_{\text{normal-Sm}}, I(301)_{\text{normal-Sm}}, I(450)_{\text{normal-Sm}}$) 中1位の値を与える、「閾値の組み合わせ($I(207)_{\text{normal-th}}, I(301)_{\text{normal-th}}, I(450)_{\text{normal-th}}$)」が、「順位付け」された距離 $D(I(207)_{\text{normal-th}}, I(301)_{\text{normal-th}}, I(450)_{\text{normal-th}})$ 中、1位の距離 $D(I(207)_{\text{normal-th}}, I(301)_{\text{normal-th}}, I(450)_{\text{normal-th}})$ を与えるはずである。

10

【0457】

稀に、「順位付け」された距離 $D(I(207)_{\text{normal-th}}, I(301)_{\text{normal-th}}, I(450)_{\text{normal-th}})$ 中、1位の距離 $D(I(207)_{\text{normal-th}}, I(301)_{\text{normal-th}}, I(450)_{\text{normal-th}})$ を与える、「閾値の組み合わせ($I(207)_{\text{normal-th}}, I(301)_{\text{normal-th}}, I(450)_{\text{normal-th}}$)」は、「順位付け」されたAUC($(I(207)_{\text{normal-th}}, I(301)_{\text{normal-th}}, I(450)_{\text{normal-th}})$) = ($I(207)_{\text{normal-Sm}}, I(301)_{\text{normal-Sm}}, I(450)_{\text{normal-Sm}}$) 中1位の値を与える、「閾値の組み合わせ($I(207)_{\text{normal-th}}, I(301)_{\text{normal-th}}, I(450)_{\text{normal-th}}$)」と相違している場合がある。その際には、「順位付け」された距離 $D(I(207)_{\text{normal-th}}, I(301)_{\text{normal-th}}, I(450)_{\text{normal-th}})$ 中、1位の距離 $D(I(207)_{\text{normal-th}}, I(301)_{\text{normal-th}}, I(450)_{\text{normal-th}})$ を与える、「閾値の組み合わせ($I(207)_{\text{normal-th}}, I(301)_{\text{normal-th}}, I(450)_{\text{normal-th}}$)」を、最適化された閾値の組み合わせ($I(207)_{\text{normal-th}}, I(301)_{\text{normal-th}}, I(450)_{\text{normal-th}}$) と見做すことが可能である。

20

【0458】

すなわち、“leave-one-out cross-validation”の手法を応用することで、選別される、1位の「閾値の組み合わせ($I(207)_{\text{normal-th}}, I(301)_{\text{normal-th}}, I(450)_{\text{normal-th}}$)」が、実際に、「最適な閾値の組み合わせ」に相当するか、否かを、合計33サンプル中の各個人Sm($Sm = 1 \sim 33$)に対する推定結果に基づき、検証することが可能である。

30

【0459】

さらに、“leave-one-out cross-validation”の手法を応用することで、選別される、1位の「閾値の組み合わせ($I(207)_{\text{normal-th}}, I(301)_{\text{normal-th}}, I(450)_{\text{normal-th}}$)」と、2位以下の「閾値の組み合わせ($I(207)_{\text{normal-th}}, I(301)_{\text{normal-th}}, I(450)_{\text{normal-th}}$)」との間の差異が、極僅かである際には、合計33サンプル中の各個人Sm($Sm = 1 \sim 33$)に対する推定結果に基づき、より適正な「閾値の組み合わせ($I(207)_{\text{normal-th}}, I(301)_{\text{normal-th}}, I(450)_{\text{normal-th}}$)」を、選択することが可能である。

【0460】

なお、「番号207のピーク」、「番号301のピーク」、「番号451のピーク」の個々について、それぞれ、最適化を行い、最適化済み「正規ピーク強度の閾値： $I(207)_{\text{normal-th-opt.}}$ 」、最適化済み「正規ピーク強度の閾値： $I(301)_{\text{normal-th-opt.}}$ 」、最適化済み「正規ピーク強度の閾値： $I(451)_{\text{normal-th-opt.}}$ 」を選別し、この最適化済み閾値の組み合わせ($I(207)_{\text{normal-th-opt.}}, I(301)_{\text{normal-th-opt.}}, I(451)_{\text{normal-th-opt.}}$)を使用することもできる。該最適化済み閾値の組み合わせ($I(207)_{\text{normal-th-opt.}}, I(301)_{\text{normal-th-opt.}}, I(451)_{\text{normal-th-opt.}}$)は、少なくとも、上位1位～8位までの「閾値の組み合わせ($I(207)_{\text{normal-th}}, I(301)_{\text{normal-th}}, I(450)_{\text{normal-th}}$)」に含まれている。

40

【0461】

心疾患における「病態の診断」において、本質的に重要なのは、「LDL中に含まれる

50

ApoB100タンパク質」の酸化変化である。従って、本発明によって明らかにされた、「ApoB100タンパク質の酸化程度」の相違を明確に反映する、表18-1、表18-2に示す「酸化部位」を含むペプチド断片であれば、表14～表17に記載されるアミノ酸配列を有するペプチド断片と同様に、心疾患の「診断マーカー」として有効である。すなわち、本発明による「心疾患診断マーカー」は、表14～表17に記載されるアミノ酸配列を有するペプチド断片に限定されるものではない。

【産業上の利用可能性】

【0462】

本発明にかかる「心疾患診断マーカー」は、心疾患における「病態の診断」において、被験者から採取される血液サンプルを利用する「血液検査」の一環して、該血液サンプルから調製される血清サンプル中に含まれる、「MDA化LDL中に含まれるApoB100タンパク質」の酸化変化の評価を進める際、有用なバイオマーカーである。従って、本発明は、被験者から採取される血液サンプルを利用する「血液検査」の一環して、該血液サンプルから調製される血清サンプル中に含まれる、「MDA化LDL中に含まれるApoB100タンパク質」の酸化変化の評価を効率的に進める用途に、好適に利用される。

【0463】

なお、本発明にかかる「心疾患診断マーカー」では、後述する付記1～付記15に記載する発明の形態を採用することも可能である。

【0464】

(付記1)

ApoB100タンパク質における、上記表18-1、表18-2に記載のアミノ酸配列部位に由来するペプチドであって、そのひとつ乃至複数個所のアミノ酸残基が酸化されている

ことを特徴とする、心疾患診断マーカー。

【0465】

(付記2)

上記表13に記載の、ApoB100タンパク質の部分配列を有するペプチドに由来する少なくともひとつのペプチド断片を含む

ことを特徴とする、心疾患診断マーカー群。

【0466】

(付記3)

上記表14～表17に記載の、ApoB100タンパク質の部分配列を有するペプチドに由来する少なくともひとつのペプチド断片を含む

ことを特徴とする、心疾患診断マーカー群。

【0467】

(付記4)

(付記3)に記載のペプチドであって、そのひとつ乃至複数個所のアミノ酸残基が酸化されている

ことを特徴とする、心疾患診断マーカー群。

【0468】

(付記5)

(付記2)および(付記3)に記載の心疾患診断マーカー群の、構成要素の量的変化を、同時に検出する工程を含む

ことを特徴とする、心疾患診断方法。

【0469】

(付記6)

(付記1)～(付記4)に記載の心疾患診断マーカーを検出する方法であり、免疫沈降法の工程を含む

ことを特徴とする、心疾患診断マーカーの検出方法。

【0470】

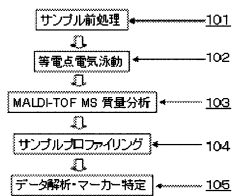
(付記 7)	
プロテアーゼ処理の工程をさらに含む	
ことを特徴とする、(付記 6)に記載の、心疾患診断マーカーの検出方法。	
【0471】	
(付記 8)	
前記プロテアーゼが、トリプシンである	
ことを特徴とする、(付記 7)に記載の、心疾患診断マーカーの検出方法。	
【0472】	
(付記 9)	
前記酸化が、アミノ酸残基のMDA化に起因する化学変化である	10
ことを特徴とする、(付記 1)または(付記 4)に記載の、心疾患診断マーカー。	
【0473】	
(付記 10)	
前記酸化が、アミノ酸残基のMDA化に起因する化学変化である	
ことを特徴とする、(付記 6)～(付記 8)のいずれか一項に記載の、心疾患診断マーカーの検出方法。	
【0474】	
(付記 11)	
前記酸化が、アミノ酸残基に対する酸素付加に起因する化学変化である	
ことを特徴とする、(付記 1)または(付記 4)に記載の、心疾患診断マーカー。	20
【0475】	
(付記 12)	
前記酸化的变化が、アミノ酸残基に対する酸素付加に起因する化学変化である	
ことを特徴とする、(付記 6)～(付記 8)のいずれか一項に記載の、心疾患診断マーカーの検出方法。	
【0476】	
(付記 13)	
少なくとも、等電点タンパク質・ペプチド分離チップと質量分析装置とを含む	
ことを特徴とする、心疾患診断マーカーの検出システム。	
【0477】	30
(付記 14)	
(付記 13)に記載の心疾患診断マーカーの検出システムを含む	
ことを特徴とする、心疾患診断システム。	
【0478】	
(付記 15)	
(付記 14)に記載の、心疾患診断システムを利用する	
ことを特徴とする、心疾患診断方法。	
【符号の説明】	
【0479】	
101 「サンプル前処理」工程	40
102 「等電点電気泳動」工程	
103 「MALDI-TOF MS 質量分析」工程	
104 「サンプルプロファイリング」工程	
105 「データ解析・マーカー特定」工程	
201 「血清調製」ステップ	
202 「免疫沈降処理」ステップ	
203 「断片化」処理ステップ	
204 「断片化ペプチド回収」ステップ	
300 等電点タンパク質分離チップ	
301 柱状体	50

- 3 0 2 流路
- 3 0 3 基板
- 3 0 4 フタ
- 3 0 5 a リザーバ
- 3 0 5 b リザーバ
- 3 0 6 フタ基材部
- 3 0 7 フタ樹脂層
- 4 0 0 電気泳動・乾燥装置
- 4 0 1 チップ収納部
- 4 0 2 電気泳動用電源
- 4 0 4 温度制御機構
- 4 0 5 排気ライン・乾燥機構

10

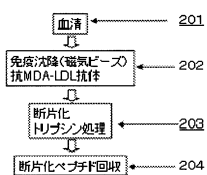
【図 1】

マーカー探索全体構成



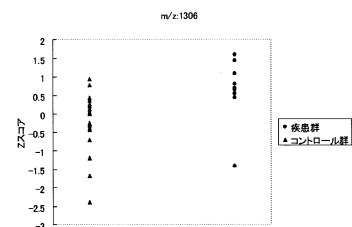
【図 2】

サンプル前処理ステップ



【図 9】

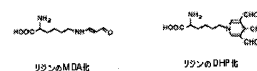
疾患群とコントロール群間で分類に有効なピークの探索



その結果m/z1306のピークのZスコアに有意差があった(検定によるp-value=0.007)

【図 10】

MDAによるリジンの酸化修飾



【図 1 1 - 1】

1 MDP RPALLA LLALPALL LLAGARAE EE MLENVSLVCP KDATRFKHLR KYTYNYEAE SSGVPGTADS RSATIRCKV ELEVPQLCSF ILKTSQICLK
 101 EYVGFNPEGK ALLKKTKNSE EFAAANSRYE LKLAIPGKQ VFLEYEKDEP TYILNIRKGI
 ISALLVPET EEAQVLF LD TYVGNCS THF TVKTRKGNVA
 201 TEISTERDLG QCDRFKPIRT GISPLALIG MTRPLSTLIS SSQSCQYTL DAKRHVAEI
 CKEQHLLFPF SYKNKYGMVA QVTQTLKLED TPKINSRFFG
 301 EGTKKMGLAF ESTKSTSPK QAEAVLKTVO ELKKLITSEQ NIQRANLFNK LVTELRLSD
 EAVTSLLPOL IEVSSPITLQ ALVQCGQPGC STHILQWLKR
 401 VHANPLLDV VTYLVAIPE PSAQLREIF NMARDORSRA TLYALSHAVN NYHKTNPGTG
 QELLDIANYL WEQIQDDGTG DEDYTYILR VIGNMGOTNE
 501 QLTPELKSSI LKCVOSTKPS LMIAKAAIQA LRKMEPKDK QEVLLQTFLD DASPQDKRLA
 AYLMLNRSPS QADINKIVQI LPWEGNEQVK NFVASHIANI
 601 LNSEELDIQD LKLVKEVLK ESQLPVWDF RKFSRNYQLY KSVSIPSLDP ASAKIEGNLI
 FDPNNYLPKE SMLKTTLTAF GFASADLIEI GLEGKGFEPT
 701 LEALFGKQGF FPDVSNKALY WVNGQVDPV SKVLVDHFQY TKDDKHEQDM VNGINLSVEK
 LKDKLSKEV PEARAYLRIL GEELGFASHL DLQLGLKLL
 801 NGARTLQGI QMIGEVIRKG SKNDFFLHYI FMENAFELPT GAGLQLQISS SGVIAPGAKA
 GVKLEVANMO AELYKAPSVS VEFVTNMGII IPDFARSQVQ
 901 MNTNFFHESG LEAHVALKPG KLFKIIPSPK RPKVLLSGGN TLHLVSTTKT EVIPLIENR
 QSWSVCKQVF PGLNYCTSGA YSNASSTOSA SYPLTGDR

【図 1 1 - 2】

1001 LELELRPTGE IEQYSVSATY ELQREDRALV DTLKFVTQAE GAKQTEATMT FKYNRQSMTL
 SSEVQIPDFD VDLGTILRVN DESTGKTSY RLTDIQNKK
 1101 ITEVALMGHL SCDTKEERKI KGVISIPRLQ AEARSEILAH WSPAKLLLOM DSSATAYGST
 VSKRVANHYD EEKIEFEWNT GTNVDTKKMT SNFPVDSLSDY
 1201 PKSLHMYANR LDHVRPQTD MTRFHVGSKL IYANSSWLQK ASGSLPYTQT LODHLNSLKE
 FNLOWNGLPD FHIPENLFLK SDGRVKYTLN KNSLKIEPL
 1301 PFGKSSDRL KMLETVRTPA LHFVSGVHL PSREFQVPTF TIPKYLQGV PLLGLDLST
 NVYSNLYWNS ASYSGONTST DHFSLRARRY MKADSVDLL
 1401 SYNVOGSDET TYDHKNTFTL SCDGSLRHFK LDSHIFKSHV EKLGNVPVSK GLLIFDASS
 WGPQMSASVH LDSKQKHLF VKEVJDDGF RVSSFYAKGT
 1501 YGLSCQDPN TGRNGESNL RFNYSYLOGT NQITGRYEDG TSLTSTSDL QSGIKNTAS
 LKYENYELT KSDINGKYKN FATSNKMDMT FSKQALLRS
 1601 EYQADYESLR FFSLLSGSLN SHGLELNADI LGTDKINSGA HKATLRIGQD GISTATTNL
 KCSLLVLENE LNAELGLSGA SMLKTTNGRF REHNAKFLD
 1701 GKAAITELSL GSAYQAMILG VDSKNIFNFK VSQGLKLSN DMNGSYAEMK FQHTNSNLIA
 GLSLDFSSKL DNIYSKDFY KQTVNLQLOP YSLVTTLNSD
 1801 LKYNALDLTN NGKLRLEPLK LHVAGNLKGA YONNEIKHIY AISSAALSAS YKADTVAKVO
 GVEFSHRLNT DIAGLASADI MNTNYSDSL HFSNVFRSYM
 1901 APTMTIDAH TNGNGKLALN GEHTGOLYSK FLKAEPLAF TFSHDYKGST SHHLVSRKSI
 SAALEHKVSA LITPAEQGTGT WLLKTFQNNN EYSQDLDAYN

【図 1 1 - 5】

4001 AASPAGTVG MNDMEDDFS KWNFYSPQS SPDKKLTFK TELRVRESDE ETQIKVNWEE
 EAASGLLTSL KDNVPKATGV LYDVYNKYHW EHTGLTLREV
 4101 SSKLRRLQD HAENVYOGAI REIDDIDERF QKGASGTTGT YQEWKDKAQN LYQELLTQEG
 QASFGQLKDN VFDGLVRVTO EFHMKVKHLI DSLIDFLNFP
 4201 RFQFPKPGI YTREELCTMF IREVGTVLSQ VYSKVHNGSE ILFSYFQDLV ITPFELRKH
 KLIDVISMYR ELLKLSKEA QEVFKAIQSL KTTVEVLRNLQ
 4301 DLLQIFOLI EDNIKOLKEM KFTYLYNYIQ DEINTIFNDY IPYVFKLLKE NLCLNLHKFN
 EFIONELQEA SOELQIHQY INALREYDF PSIVGWTYKY
 4401 YELEEKIVSL IKNLLVALKD FHSEYIVSAS NFIQSLSQV EQFLHRNIGQ YLSILTDPOG
 KQKEKIAELS ATAGEIKSQ AIATKKIISD YHQGFYKLO
 4501 DFSQDLSQY EKFAESKRL IDLSIQNYHT FLIYITELLK KLQSTTVMNP WMLAPGELT IIL

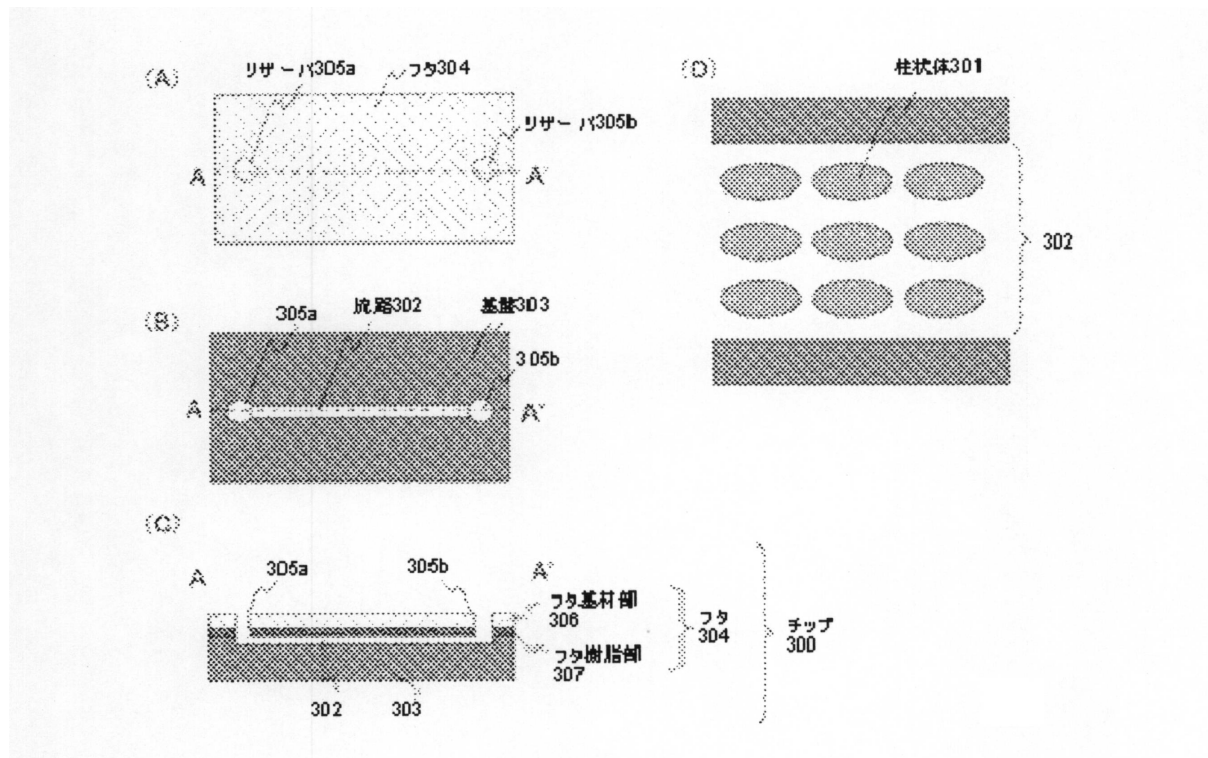
【図 1 1 - 3】

2001 TKDKIQVELT GRTLADTL LLDSPIKVLPL SEPINIIDL ENRDAVEKPO EFTIVAFVKY
 DKNQDVHSIN LPFFETLQEY FERNRQTIIV VLENVQRNLK
 2101 HINIDQFVRK YRAALGKLPO QANDYLNNSFN WERQVSHAKE KLTALTKKYR ITENDIQIAL
 DDAKINFNEK LSQQTVMIO FDQYIKDSYD LHDLKIAIAN
 2201 IIDEIIEKLK SLDEHYHVRV NLVKTIDHLL LFIEINDFNK SSSSTASWIO NVDTKYQIRI
 QIQEKLQQLK RHQINIDQH LAGKLQHIJE AIDVRVLLDQ
 2301 LGTTISFERI NDVLEHVXHF VINLIGDFEV AEKINAFRAK VHELIEREYEV DQGIQVLMOK
 LVELAHQYKL KETIQKLSNV LQGVKIDYF EKLVGFIIDA
 2401 VKKLNELSKF TFIEDWNKFL DMLIKKLSF DYHOFVDET NDKIREVTQRL NGEIQALELP
 QKAELKLFL EETKATVAVY LESLQTKIT LIINWLEAL
 2501 SSASLAHMKK KFRETLEDTR DRWYQNDIQD ELQRYLSLVG QVYSTLVYTI SDWWTLAANK
 LTDFAEQYSI QDWAKRMAL VEGFTVPEI KTLIGTMPAF
 2601 EVSLQALOKA TFQTPDFIVP LTDLRIPSVQ INFKDLKNIK IPSRFSTPEF TILNTFHIPS
 FTIDFVEMKV KIIRTIQML NSELQWVPV DLYRLDKVED
 2701 IPLARITLPO FRLPEIAIPE FIIPITLNLND FQVPLHIPE FQLPHISHTI EVPTFGKLYS
 ILKIQSPFLT LDANADIGNG TTSANEAGIA ASITAKGESK
 2801 LEVLNDFDQA NAQLSNPKIN PLAKESYKF SSKYLRTEHG SEMLFFGNAI EGKSNTVASL
 HTEKNTELS NGVIVKINNO LTLDSNTKYF HKLINPKLDF
 2901 SSQADLRNEI KTLKAGHIA WISSQKGNK WACPRFSDEG THESQISFTI EGPLTSFGLS
 NKINSKHLRV NONLVYESGS LNFSKLEIGS QVDSQHVHGS

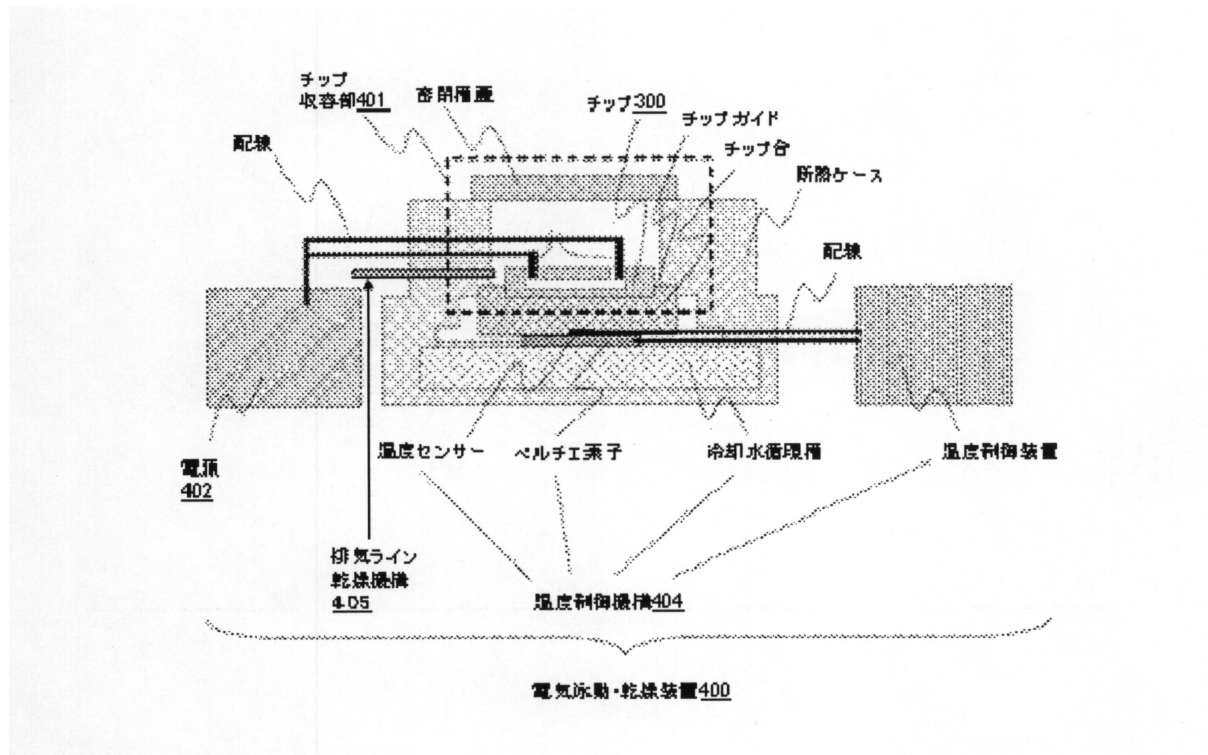
【図 1 1 - 4】

3001 VLTAKGMALF GEGKAEFTGR DHAHLNGKVI GTLKNSLFFS AQPFETAST NNEGMLKVRP
 PLRLTGKIDF LNNYALFLSP SAQQASWQVS ARFNQYKYNQ
 3101 NFSAGNNENI MEAHVINGE ANLDLNIPL TIPEMRLPYT IITIPPLKDF SLWEKTLGKE
 FLKTTKQSF LSVKAQYKKN KHRHSITNPL AVLCEFIQS
 3201 IKSDFRHEK NRNNALDFVT KSYNETKIKF DKYKAEKSHD ELPRTFQIPG YTVPVVNVV
 SPFTIEMSAF GYVFPKAVSM PSFSLGSDV RVPSTYLILP
 3301 SELPELVHP RNLKLSLPDF KELCTISHI IPAMGNITYD FSKSSVITL NTAELFNQS
 DIVAHLSSSS SSVIDALQYK LEGTTLTRK RGLKALALS
 3401 LSNKFVEGSH NSTYSLTKN MEVSATTTK AQIPILRMNF KQELNGNTKS KPTVSSSMF
 KYDFNSSMLY STAKGAVDHK LSLESLSYF SIESSTKGV
 3501 KGSVLSREYS GTIASEANTY LNSKSTRSSV KLGTSKIDD IWNLEVKENF AGEATLORIY
 SLWEHSTKNH LQLEGLFTTN GEHTSKATLE LSPWQMSALV
 3601 QVHASQSSSF HDPDFLQGEV ALNANTKNQ IRWKNVRIH SSSFSQSVEL SNOQEKALD
 IAGSLEGLHR FLKNIILPVY DKSLLWFLKL DVTTISGRQ
 3701 HLRVSTAFVY TKPNNGYSFS IPVKVLADKF IIPGLKLNLD NSVLVMPFTH VPFTDQVPS
 CKLDFEIQI YKLRITSSFA LNLPTLPEVK FPEVDVLTKY
 3801 SQPEDSLIPF FEITVPEQOL TVSOFTLPS VSDGIAALDL NAVANKIADF ELPTIIVPEQ
 TIEIPSIFKS VPAGIAIPSF QALTARFEVD SPYVWATWSA
 3901 SLKNKADYVE TVLDSGSSST VQFLEYELNV LGTHKIEDGT LASKTKGTFA HRDFAEYEE
 DGKYEGLQEW EGKAHLNKS PAFDHLHRY QKDKKGISTS

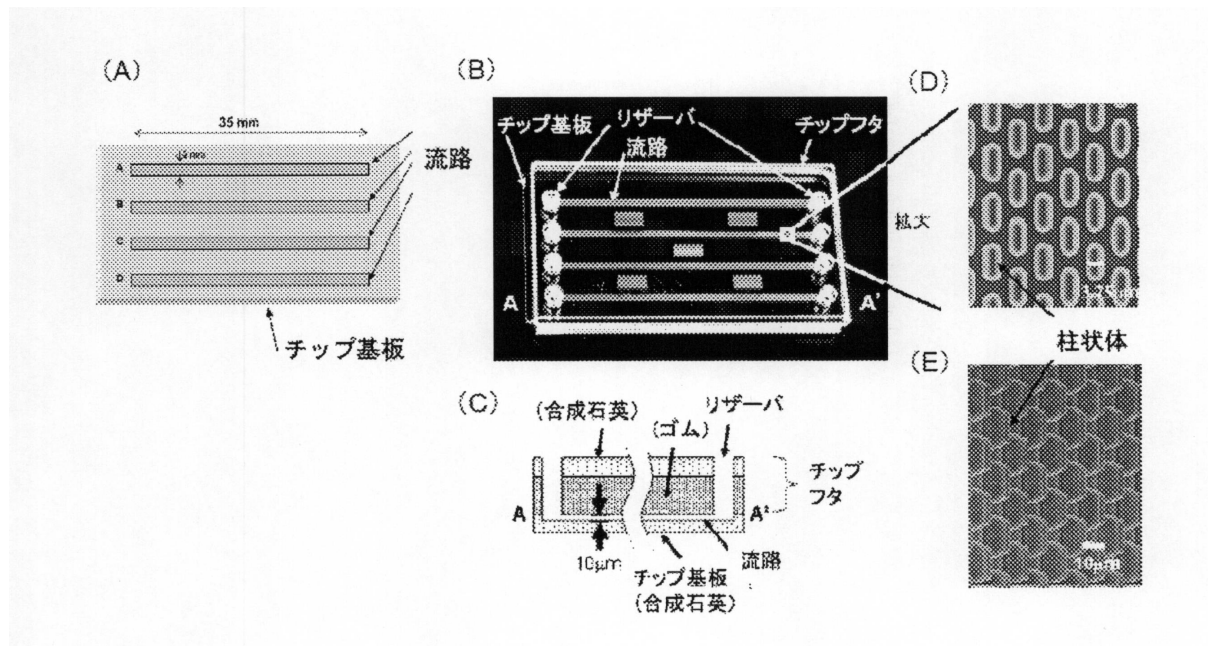
【図 3】



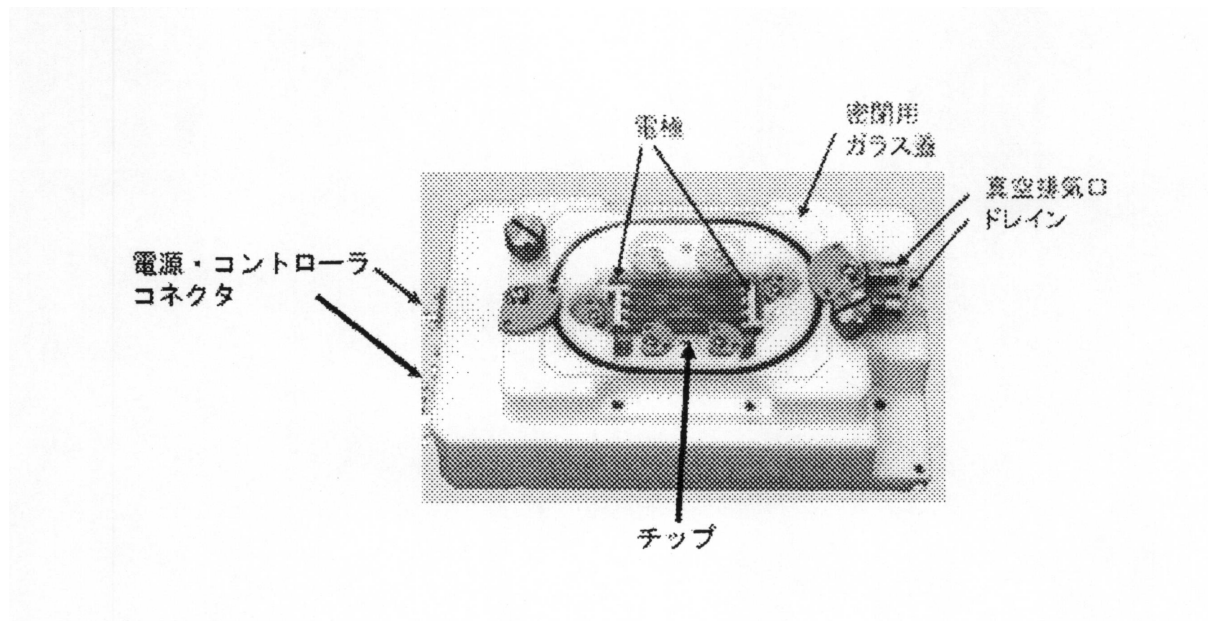
【図 4】



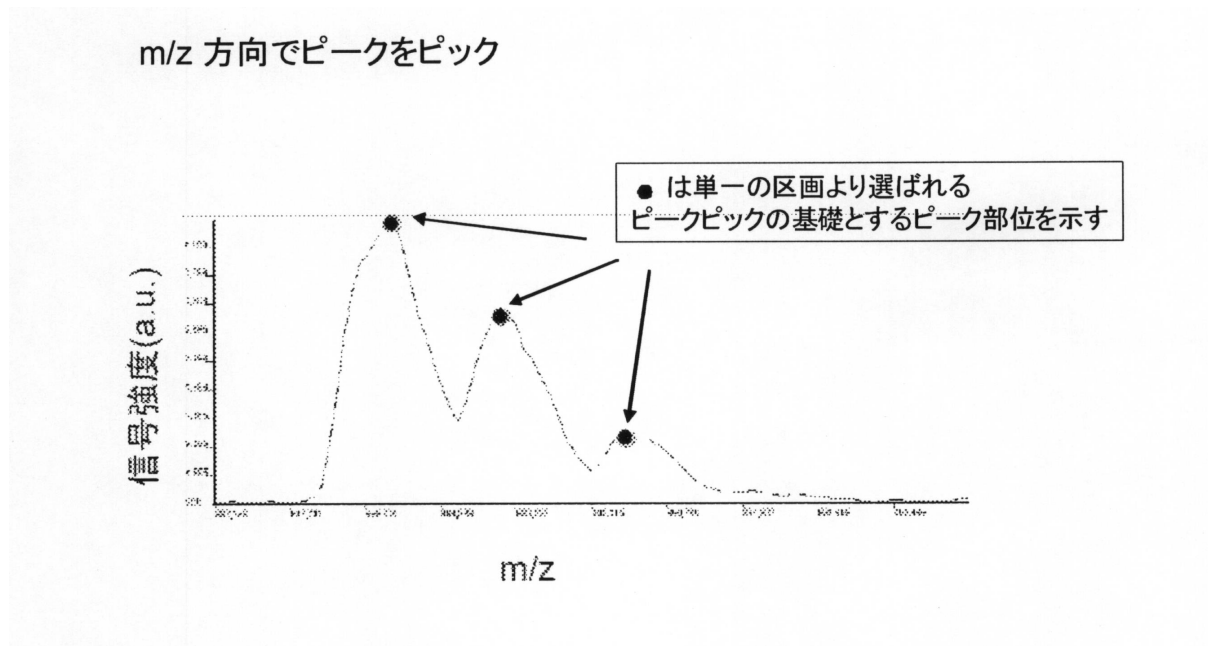
【図5】



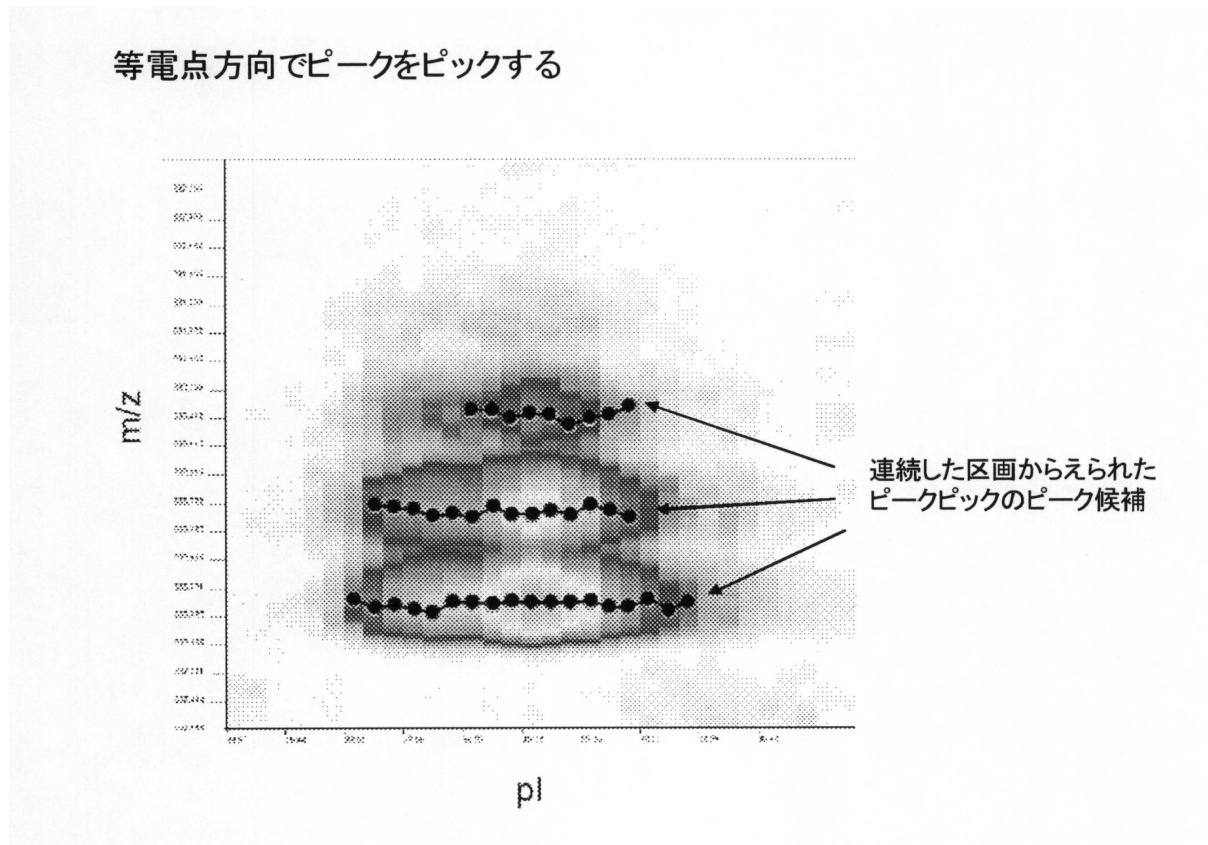
【図6】



【図 7】



【図 8】



【配列表】

0005857312000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 宮崎 賢司
東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内
- (72)発明者 寺本 礼仁
東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内
- (72)発明者 染谷 浩子
東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内
- (72)発明者 上條 憲一
東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内
- (72)発明者 鈴木 亨
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内
- (72)発明者 小谷 一夫
東京都中央区日本橋三丁目13-5 積水メディカル株式会社内

審査官 藤田 都志行

- (56)参考文献 特開2007-278934(JP,A)
特開2010-032219(JP,A)
特表2009-531712(JP,A)
特表2002-501494(JP,A)
特開平09-067255(JP,A)
特表2004-504327(JP,A)
米国特許出願公開第2003/0152566(US,A1)
中嶋 克行, 櫻林 郁之介, 「MDA-LDL」, 日本臨牀, 株式会社日本臨牀社, 2010年 1月28日, Vol. 68, 増刊号1, pp. 25-28

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 27/62
G01N 33/53
G01N 33/68
G01N 27/447
C12Q 1/37
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
Cinii
医中誌WEB

专利名称(译)	心脏病诊断标记		
公开(公告)号	JP5857312B2	公开(公告)日	2016-02-10
申请号	JP2011175982	申请日	2011-08-11
[标]申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社 国立大学法人 东京大学		
申请(专利权)人(译)	NEC公司 积水医疗有限公司 东京大学		
当前申请(专利权)人(译)	积水医疗有限公司 东京大学		
[标]发明人	田伏洋 宫崎賢司 寺本礼仁 染谷浩子 上條憲一 鈴木亨 小谷一夫		
发明人	田伏 洋 宫崎 賢司 寺本 礼仁 染谷 浩子 上條 憲一 鈴木 亨 小谷 一夫		
IPC分类号	G01N27/62 G01N33/53 G01N33/68 G01N27/447 C12Q1/37		
FI分类号	G01N27/62.V G01N33/53.W G01N33/68.ZNA G01N27/26.301.A C12Q1/37 G01N27/447.301.A		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/DA04 2G041/FA12 2G041/GA06 2G045/AA13 2G045/AA25 2G045/BB02 2G045/BB07 2G045/BB51 2G045/CA25 2G045/DA36 2G045/DA64 2G045/DA75 2G045/DA77 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/JA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ36 4B063/QQ79 4B063/QR16 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QS02 4B063/QS39 4B063/QX01 4B063/QX04		
代理人(译)	宫崎昭雄 绪方明		
其他公开文献	JP2013040781A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

甲在心脏疾病诊断的血液测试的一部分，其利用从取自受试者的血液样品制备血清样品被包括在包含在血清样品中的MDA-LDL，在蛋白质的ApoB-100，提供可有效用于评估氧化进展程度的诊断标志物。A含有在MDA-LDL，一组由的ApoB-100蛋白的胰蛋白酶消化产生的肽片段的，一组患者被确定为病变的冠状动脉分支数3名健康受试者中确定的冠状动脉病变分支数0比较（非患者）组中，基于在健康受试者（非患者组）检测到的量的情况下，在患者组检测出的量，称为“显著较高的”或“显著下”，标识为“标记”的显示统计测试结果的那个被用作诊断标记。【选择图】无

(21) 出願番号	特願2011-175982 (P2011-175982)	(73) 特許権者	390037327
(22) 出願日	平成23年8月11日 (2011. 8. 11)		横水メディカル株式会社
(65) 公開番号	特開2013-40781 (P2013-40781A)		東京都中央区日本橋3丁目13番5号
(43) 公開日	平成25年2月28日 (2013. 2. 28)	(73) 特許権者	504137912
審査請求日	平成26年8月6日 (2014. 8. 6)		国立大学法人 東京大学
			東京都文京区本郷七丁目3番1号
		(74) 代理人	100123788
			弁理士 宮崎 昭夫
		(74) 代理人	100127454
			弁理士 緒方 雅昭
		(72) 発明者	田伏 洋
			東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内
最終頁に続く			