

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012年5月24日(24.05.2012)



(10) 国際公開番号
WO 2012/067165 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/076450
- (22) 国際出願日: 2011年11月16日(16.11.2011)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2010-256418 2010年11月17日(17.11.2010) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人愛媛大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION EHIME UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7908577 愛媛県松山市道後樋又10番13号 Ehime (JP). 公立大学法人横浜市立大学(PUBLIC UNIVERSITY CORPORATION YOKOHAMA CITY UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒2360027 神奈川県横浜市金沢区瀬戸22番2号 Kanagawa (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 澤崎 達也(SAWASAKI, Tatsuya) [JP/JP]; 〒7908577 愛媛県松山市文京町3番 国立大学法人愛媛大学 無細胞生命科学工学研究センター内 Ehime (JP). 遠藤 弥重太(ENDO, Yaeta) [JP/JP]; 〒7908577 愛媛県松山市文京町3番 国立大学法人愛媛大学 無細胞生命科学工学研究センター内 Ehime (JP). 石上 友章(ISHIGAMI, Tomoaki) [JP/JP]; 〒2360004 神奈川県横浜市金沢区福浦三丁目9番の1 公立大学法人横浜市立大学内 Kanagawa (JP). 青木 一郎
- (AOKI, Ichiro) [JP/JP]; 〒2360004 神奈川県横浜市金沢区福浦三丁目9番の1 公立大学法人横浜市立大学内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 庄司 隆, 外(SHOJI, Takashi et al.); 〒5320011 大阪府大阪市淀川区西中島五丁目6番13号 御幸ビル307号 Osaka (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告(条約第21条(3))

(54) Title: METHOD FOR ANALYZING PROTEINS CONTRIBUTING TO AUTOIMMUNE DISEASES, AND METHOD FOR TESTING FOR SAID DISEASES

(54) 発明の名称: 自己免疫疾患に関与するタンパク質の解析方法及び該疾患の検査方法

(57) Abstract: [Problem] To provide a method for detecting a myriad of proteins that contribute to autoimmune diseases with high sensitivity and high efficiency, and a method for analyzing the data obtained as a result of the detection method. [Solution] In order to construct the abovementioned detection method and analysis method, a means is provided for detecting autoantibody production by bringing mammal-derived proteins derived, which are expressed by a cell-free protein synthesis system, into contact with samples derived from patients with autoimmune diseases, and for comprehensively analyzing the proteins that contribute to autoimmune diseases by statistically analyzing the detected data, and performing gene ontology analysis and/or pathway analysis.

(57) 要約: 【課題】自己免疫疾患に関与する無数のタンパク質を高感度かつ高効率に検出する方法及び該検出方法から得られたデータの解析方法を提供する。【解決手段】上記検出方法及び解析方法を構築するために、無細胞タンパク質合成系により発現させた哺乳動物由来のタンパク質を自己免疫疾患患者由来の試料と接触させることにより自己抗体産出を検出し、そして該検出したデータを統計的分析処理、さらに遺伝子オントロジー解析及び/又はパスウェイ解析を行うことにより、自己免疫疾患に関与するタンパク質を網羅的に解析する手段を提供した。

WO 2012/067165 A1

明 細 書

発明の名称：

自己免疫疾患に関与するタンパク質の解析方法及び該疾患の検査方法

技術分野

[0001] 本発明は、自己免疫疾患に関与するタンパク質の解析方法及び該疾患の検査方法に関する。

なお、本出願は、参照によりここに援用されるところの、日本国特許出願の特願2010-256418からの優先権を請求する。

背景技術

[0002] ヒトのゲノムシーケンスが終了し、遺伝子について、バイオインフォマティクス (bioinformatics) の発展を促しながら、種を超えて保存されているアミノ酸配列 (ドメイン) の探索、それを基にしたオーソログ遺伝子の分類など、核酸やアミノ酸配列を中心とした解析がなされている。しかし、未だにゲノム上の遺伝子の半数近くは、機能未知のままである。

ゲノム上に見出された、機能がまったく未知の遺伝子はもちろんのこと、実は、アノテーション (注釈付け) された遺伝子でさえ、生化学的な機能はまだわかっていない遺伝子が大半を占める。

そのため、ゲノムシーケンス後のポストゲノム時代において、膨大な予算を投入して見つかった2万5千種を超える遺伝子に関して、より有効な情報を得るためには、タンパク質の生化学的な機能を網羅的に解析する技術の発展が必須である (参照：非特許文献1)。

[0003] 上記のような網羅的に解析する技術の一つとして遺伝子発現プロファイルを使用する方法が知られている。遺伝子発現プロファイルを解析することで遺伝子機能を明らかにし、創薬、薬理学、毒性学、診断に供する知見を得るための研究がなされている。例えば、相関分析、主因子分析、分散分析などの統計解析、k平均クラスタリング、階層クラスタリング、最短近傍法、判別分析、ニューラルネットワーク、遺伝的アルゴリズムをDNAチップデー

タの解析に適用している（参照：特許文献1、5～7）。

[0004] 一方、自己免疫疾患は、自分自身の構成成分である抗原（自己抗原）に対する免疫応答すなわち自己免疫によって発生する疾患を言う。

自己抗原が特定の臓器あるいは組織・細胞に限局して存在するような場合には、その臓器のみが障害されることとなり臓器特異的自己免疫疾患となる。代表的な例として、重症筋無力症、多発硬化症等が知られている。

一方、核物質など全身に普遍的な自己抗原に対する自己抗体の存在が知られており、血管炎など全身性の病変が生じているものは全身性自己免疫疾患となる。代表的な例として、全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチ、多発動脈炎症等が知られている。

[0005] アテローム性動脈硬化症は、高血圧、糖尿病、脂質異常症といった生活習慣病の終末像であり、心筋梗塞、脳梗塞、末梢動脈疾患等を発症し、致命的又はADL (Activity of Daily Living) を大きく損なうことがある。

そのため、アテローム性動脈硬化症は、早期発見、発病予測が重要であるが、従来の画像診断では、初期段階のアテローム性動脈硬化を診断することができず、血清マーカー等も有用なものが存在しない状況である。

また、近年の研究成果から、アテローム性動脈硬化における炎症の一部に、自己免疫性機序が関わる可能性が示唆されていたが、実体は不明のままである。

[0006] 近年、上記述べた症状が、少なくとも部分的には自己免疫が関与していると考えられるようになってきたが、なお不明な点も多い。一方、臓器特異的自己免疫疾患では、自己抗体の病因的役割がはっきりしている場合が多い。これまでの研究から、臓器特異的自己免疫疾患は、抗原刺激を受けた Tリンパ球によって引き起こされるものと推定されるに至っている。自己抗体の産生機序については、さまざまな考えが出されている。第1は特定の自己抗体の産生に関わる遺伝子の関与説である。第2は、通常血中に微量にしか存在しない抗原がなんらかの原因で多量に放出されること、又は抗原がなんらかの原因で修飾されることによるとするものである。第3は、抗体産生に関与

するリンパ球側に異常があり、寛容状態から逸脱してしまうことによるものである。

おそらく、これらが重複して自己抗体が産生されてくると考えられている（参照：特許文献2）。また、全身性自己免疫疾患における自己抗体の役割についてはいくつか報告されている。

[0007] 特表2009-503529号公報（特許文献3）は、「IL-1 α 自己抗体の検出を含む、アテローム性動脈硬化症および関連血管疾患の危険度を有する個体を検出する方法」を開示している。

しかし、自己免疫疾患に関与する因子がIL-1 α 自己抗体のみであると考えすることはできない。さらに、本発明で特定した自己免疫疾患に関与する因子には、IL-1 α が含まれていない。

[0008] 特表2008-501636号公報（特許文献4）は、「ホスホリルコリンに対する自己抗体、特にIgM自己抗体の有無は、アテローム性動脈硬化症を発症する危険の増減と関連していること」を開示している。

しかし、自己免疫疾患に関与する因子がホスホリルコリン自己抗体のみであると考えすることはできない。さらに、本発明で特定した自己免疫疾患に関与する因子には、ホスホリルコリンが含まれていない。

先行技術文献

特許文献

- [0009] 特許文献1：特開2008-152405号公報
- 特許文献2：特開2008-118870号公報
- 特許文献3：特表2009-503529号公報
- 特許文献4：特表2008-501636号公報
- 特許文献5：特開2008-59024号公報
- 特許文献6：特開2004-30093号公報
- 特許文献7：特開2005-323573号公報

非特許文献

- [0010] 非特許文献1：生化学 第79巻 第3号、pp.278-286, 2007

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 上記述べた現状により、現段階においては、自己免疫疾患に関与する因子は、単独ではなく複数の因子、特に複数のタンパク質に対する自己抗体が発現していると考えられている。

従来の遺伝子発現プロファイル（参照：特許文献1、5～7）では、自己免疫疾患患者由来の試料中の遺伝子発現量を、健常者由来の試料中の遺伝子発現量と比較することにより、原因タンパク質を特定していた。

しかし、各種の疾患患者の試料中の遺伝子発現量（転写産物）が、該遺伝子をコードするタンパク質の実際の発現量とは必ずしも一致しないことが多々報告されている。さらには、該プロファイルでは、自己抗体が発現しているかどうかを十分に特定することができない。

以上により、自己免疫疾患に関与する無数のタンパク質を高感度かつ高効率に検出する方法及び該検出方法から得られたデータの解析方法の構築が必要である。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは、上記検出方法及び解析方法を構築するために、無細胞タンパク質合成系により発現させた哺乳動物由来のタンパク質を自己免疫疾患患者由来の試料と接触させることにより自己抗体産出を検出し、そして該検出したデータを統計的分析処理、さらに遺伝子オントロジー解析及び／又はパスウェイ解析を行うことにより、自己免疫疾患に関与するタンパク質を網羅的に解析する手段を提供した。

発明の効果

[0013] 本発明では、高感度かつ高効率で自己免疫疾患、特に動脈硬化に関与するタンパク質を解析する手段を提供した。さらに、該手段から得られた動脈硬化に関与するタンパク質に対する自己抗体の抗体価を検出することによる動脈硬化、特にアテローム性動脈硬化の検査方法を提供した。

[0014] すなわち、本発明は以下の通りである。

「1. 以下のいずれか1のタンパク質群に対する自己抗体の抗体価を患者由来の試料から検出することを特徴とする動脈硬化の検査方法。

(1) サイトカインに関与するタンパク質群、ここで、サイトカインに関与するタンパク質群は、以下のいずれか1以上である：

IL-5；STX1A；CSNK2A1；VAMP2；GSK3B；PRKCZ；PCNA；PIN1；STX4；HRB；HMGN1；HIST1H1C；TUBB；NPM1；VAMP8；VAPA；STX3；RABAC1、CCND2。

(2) アミノ酸輸送体に関与するタンパク質群、ここで、アミノ酸輸送体に関与するタンパク質群は、以下のいずれか1以上である：

SLC7A11；SLC36A4；SLC7A9、SLC1A3。

2. 前記サイトカインに関与するタンパク質群は、以下のいずれか1以上である前項1の検査方法。

- (1) IL-5
- (2) STX1A
- (3) CSNK2A1
- (4) VAMP2
- (5) GSK3B
- (6) PRKCZ
- (7) PCNA
- (8) PIN1
- (9) STX4

3. 前記サイトカインに関与するタンパク質群は、以下のいずれか1以上である前項1の検査方法。

- (1) HRB
- (2) HMGN1
- (3) HIST1H1C
- (4) TUBB
- (5) NPM1

- (6) VAMP8
- (7) VAPA
- (8) STX3
- (9) RABAC1
- (10) CCND2

4. 前記アミノ酸輸送体に関するタンパク質群は、以下のいずれか1以上である前項1の検査方法。

- (1) SLC7A11
- (2) SLC36A4
- (3) SLC7A9
- (4) SLC1A3

5. 前記動脈硬化が、アテローム性動脈硬化症である前項1～4のいずれか1の検査方法。

6. 前記検査方法は、発病リスクの検査、重症度の判定検査、又は治療効果の判定検査である前項5の検査方法。

7. 動脈硬化検査を実施するための、少なくとも以下を含む検査キット：
IL-5；STX1A；CSNK2A1；VAMP2；GSK3B；PRKCZ；PCNA；PIN1；STX4；HRB；H
MGN1；HIST1H1C；TUBB；NPM1；VAMP8；VAPA；STX3；RABAC1；CCND2；SLC7A11
；SLC36A4；SLC7A9、及び／又はSLC1A3。

8. 動脈硬化検査を実施するための、IL-5を含み、さらに少なくとも以下のいずれか1を含む検査キット。

- (1) マイクロプレート
- (2) 標準液
- (3) 陽陰性コントロール
- (4) 反应用緩衝液
- (5) 酵素標識抗体
- (6) 洗浄用緩衝液
- (7) 酵素基質液

(8) 反応停止液

9. 以下の工程を有する自己免疫疾患に關与するタンパク質の解析方法：

(1) 哺乳動物由来のタンパク質を、自己免疫疾患患者由来の試料と接触させて自己抗体の検出データ（データ1）を取得する工程；

(2) 哺乳動物由来のタンパク質を、健常者由来の試料と接触させて自己抗体の検出データ（データ2）を取得する工程、及び／又は、哺乳動物由来のタンパク質を、自己免疫疾患の治療薬を投与されている自己免疫疾患患者由来の試料と接触させて自己抗体の検出データ（データ3）を取得する工程；

(3) 上記データ1～3のいずれか2以上を用いて統計学的分析を行い、示差的に発現している1以上の自己抗体の自己抗原タンパク質（哺乳動物由来のタンパク質）群のデータ（データ4）を取得する工程；

(4) 上記データ4のタンパク質群に注釈付け（アノテーション）を行う工程、

(5) 上記アノテーションに基づき上記タンパク質群の共通規則を抽出する工程。

10. さらに、前記共通規則に基づく拘束条件を用いてデータマイニングを行う工程を有することを特徴とする前項9の解析方法。

11. 前記(5)の工程で抽出された共通規則を有するタンパク質を用いて上記(1)～(5)の工程を複数回繰り返す工程を特徴とする前項9又は10の解析方法。

12. さらに、前記データ1～3に含まれておらず、かつ前記共通規則を有する哺乳動物由来のタンパク質を使用して、上記(1)～(3)の工程を行うことによりデータ5を取得する工程を有することを特徴とする前項9～11のいずれか1の解析方法。

13. 前記データ5を上記4データに組み合わせる工程を有することを特徴とする前項9～12のいずれか1の解析方法。

14. 前記哺乳動物由来のタンパク質を無細胞タンパク質合成系で発現させることを特徴とする前項9～13のいずれか1の解析方法。

15. 前記(1)及び/又は(2)の工程で、ALPHA(増幅発光近接ホモジニアスアッセイ)を使用してIgGと反応する哺乳動物由来のタンパク質を検出することを特徴とする前項9~14のいずれか1の解析方法。

16. 前記自己免疫疾患が、以下のいずれか1から選ばれる前項9~15のいずれか1の解析方法、

全身性エリテマトーデス、円板状エリテマトーデス、多発性筋炎、強皮症、混合結合組織病、橋本甲状腺炎、原発性粘液水腫、甲状腺中毒症、悪性貧血、Good-pasture症候群、急性進行性糸球体腎炎、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、水疱性類天疱瘡、インスリン抵抗性糖尿病、若年性糖尿病、アジソン病、萎縮性胃炎、男性不妊症、早発性更年期、水晶体原性ぶどう膜炎、交換性脈炎、多発性硬化症、動脈硬化症、アテローム性動脈硬化症、潰瘍性大腸炎、原発性胆汁性肝硬変、慢性活動性肝炎、自己免疫性溶血性貧血、発作性血色素尿症、突発性血小板減少性紫斑病、及びシェーグレン症候群。

17. 前記自己免疫疾患が、動脈硬化症である前項9~16のいずれか1の解析方法。

18. 前記(4)の工程は、遺伝子オントロジー解析であることを特徴とする前項9~17のいずれか1の解析方法。

19. 前記遺伝子オントロジー解析の1つ以上が、分子機能、細胞内局在及び生物学的過程から選択される前項18の解析方法。

20. 前記遺伝子オントロジー解析の共通規則が、分子機能の分類であることを特徴とする前項19の解析方法。

21. 前記(1)~(5)の工程を繰り返すことにより、前記分子機能の分類を下階層に絞りこむことを特徴とする前項20の解析方法。

22. 前記自己免疫疾患が動脈硬化症であり、前記共通規則がアミノ酸輸送体であることを特徴とする前項18~21のいずれか1の解析方法。

23. 前記(4)の工程は、パスウェイ解析であることを特徴とする前項9~17のいずれか1の解析方法。

24. 前記自己免疫疾患が動脈硬化症であり、前記共通規則がサイトカイ

ンであることを特徴とする前項23の解析方法。」

図面の簡単な説明

- [0015] [図1]遺伝子オントロジー解析結果の階層構造の一例
[図2]遺伝子オントロジー解析結果の階層構造の一例
[図3]実施例6の遺伝子オントロジー解析結果
[図4]パスウェイ解析による自己免疫疾患に関与するタンパク質の解析結果
[図5]実施例4の自己抗体の抗体価の測定結果（図中の「AS」は動脈硬化患者由来の血清、「C」は健常者由来の血清を意味する）
[図6]クラスター分析の結果
[図7]クラスター分析の結果
[図8]統計学的処理済みの各患者での自己抗体の抗体価の測定結果
[図9]各患者におけるそれぞれのクラスターでのAverage profile
[図10]各クラスター別の遺伝子オントロジー解析結果
[図11]各IL-5添加による冠状動脈硬化症患者血清中の抗IL-5抗体の抗体価の測定結果
[図12]分泌型IL-5(20-135)の添加による、閉塞性動脈硬化症患者及び冠状動脈硬化症患者血清中の抗IL-5抗体の抗体価の測定結果（図中の「C」は、分泌型IL-5(20-135)の無添加を示す）
[図13]冠状動脈硬化症患者血清中のIL-5濃度の測定結果（図中の「C」は、IL-5の無添加を示す）
[図14]抗IL-5抗体の抗体価の受信者動作特性曲線

発明を実施するための形態

- [0016]（自己免疫疾患に関与するタンパク質の解析方法）

本発明の自己免疫疾患に関与するタンパク質の解析方法は、主に以下の特徴を有する。

（1）哺乳動物由来のタンパク質を、自己免疫疾患患者由来の試料と接触させて自己抗体の検出データ（データ1）を取得する。

これにより、自己免疫疾患患者由来の試料中の自己抗体と反応した哺乳動

物由来のタンパク質（自己抗原タンパク質）を特定することができる。

なお、「自己抗体」とは、一般的にはIgG分子であり、特に、IgG4分子であるが、IgM、IgE、IgA、またはIgD分子でもよい。

(2) 哺乳動物由来のタンパク質を、健常者由来の試料と接触させて自己抗体の検出データ（データ2）を取得する、及び／又は、哺乳動物由来のタンパク質を、自己免疫疾患治療薬を投与されている自己免疫疾患患者由来の試料と接触させて自己抗体の検出データ（データ3）を取得する。

これにより、健常者由来の試料中及び／又は自己免疫疾患治療薬を投与されている自己免疫疾患患者由来の試料中の自己抗体と反応した哺乳動物由来のタンパク質（自己抗原タンパク質）を特定することができる。

(3) 上記データ1～3のいずれか2以上を用いて統計学的分析を行い、示差的に発現している1以上の自己抗体に対する自己抗原タンパク質（哺乳動物由来のタンパク質）群のデータ（データ4）を取得する。

これにより、健常者、自己免疫疾患患者、自己免疫疾患治療薬を投与されている自己免疫疾患患者によって、どのような自己抗体が特異的に産出、増加、減少又は消失されているかを特定することができる。

(4) 上記データ4のタンパク質群に注釈付け（アノテーション）を行う。

これにより、自己抗原タンパク質（哺乳動物由来のタンパク質）の遺伝子機能情報、疾患関連情報、塩基配列情報、公共データベース情報、他種遺伝子間のホモログ情報、遺伝子ネットワーク情報、パスウェイ情報等が付与される。

(5) 前記アノテーションに基づき前記タンパク質群の共通規則を抽出する。

これにより、各種の自己抗原タンパク質の共通規則が特定される。

なお、「共通規則」とは、各タンパク質が、発病時期、分子機能、細胞内構成、生物学的プロセス等の共通の性質を共有することを意味する。

[0017] (自己免疫疾患)

本発明の自己免疫疾患は、以下のいずれか1から選択される。特に、好ま

しい自己免疫疾患は、動脈硬化であり、より好ましくはアテローム性動脈硬化である。

全身性エリテマトーデス、円板状エリテマトーデス、多発性筋炎、強皮症、混合結合組織病、橋本甲状腺炎、原発性粘液水腫、甲状腺中毒症、悪性貧血、Good-pasture症候群、急性進行性糸球体腎炎、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、水疱性類天疱瘡、インスリン抵抗性糖尿病、若年性糖尿病、アジソン病、萎縮性胃炎、男性不妊症、早発性更年期、水晶体原性ぶどう膜炎、交換性脈炎、多発性硬化症、動脈硬化、アテローム性動脈硬化、潰瘍性大腸炎、原発性胆汁性肝硬変、慢性活動性肝炎、自己免疫性溶血性貧血、発作性血色素尿症、突発性血小板減少性紫斑病、およびシェーグレン症候群。

[0018] (試料)

本発明の試料は、各状態（重篤、軽症、自己免疫疾患治療薬を投与されている状態）の自己免疫疾患患者及び健常者由来の生物学的材料を意味する。例えば、採取した血液、血液由来成分（血清、血漿）、尿、糞便、唾液、汗に含まれる産物を対象とする。特に、好ましい試料は、血清である。

[0019] (哺乳動物由来のタンパク質)

本発明の哺乳動物由来のタンパク質は、哺乳動物の体内、特に血液で発現しているタンパク質を意味する。

さらに、本発明の哺乳動物は、ヒトを含む霊長類（例えば、ゴリラ、チンパンジー、ヒヒ、リスザル）、コンパニオンアニマル（例えば、ネコ、ウサギ、イヌ、ウマ）、家畜（例えば、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウマ）、および実験動物（例えば、ネコ、イヌ、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、チンパンジー、およびヒヒ）を含む。

[0020] (接触)

本発明の各工程における「接触」とは、A溶液をB溶液に添加する、又はB溶液をA溶液に添加する、の両方を意味する。

例えば、哺乳動物由来のタンパク質を自己免疫疾患患者由来の試料と接触させる場合には、哺乳動物由来のタンパク質を含む溶液を試料に添加しても

、又は、試料を哺乳動物由来のタンパク質を含む溶液に添加してもよい。

[0021] (データマイニング)

本発明のデータマイニングとは、データから、興味ある規則性や因果関係をプログラム等を使用して自動的に抽出する技術のことである。なお、本発明で使用するデータマイニングは、統計的手法又は非統計的手法の両方を含む。

統計的手法の例として、主成分分析、重回帰分析、因子分析、判別分析、X二乗検定、Fisherの正確検定、Wilcoxonの検定、F-検定、多重検定、Welchのt-検定等が挙げられる。

非統計的手法の例として、クラスター解析、ニューラルネットワーク、自己組織化マップ、遺伝的アルゴリズム、決定木、k-最近傍法、パターン認識等が挙げられる。

加えて、以上述べた手法を併用することもできる。

[0022] (正規化及びフィルタリング)

本発明の工程では、好ましくは、正規化及び／又はフィルタリングを導入する。

実験を行った時間、場所、作業者が異なることから実験のバックグラウンドや、ノイズの程度が異なるので、その実験ごとのバックグラウンドやノイズの程度を揃えるために正規化を行う。本発明の工程で、プロテインチップを使用した場合には、チップごとに画像輝度（蛍光強度）が異なることがある。よって、バックグラウンド輝度を考慮する必要がある。

また、フィルタリングでは、適切なデータを選択し、解析に悪影響を与える誤り値を除く操作のことである。例えば、しきい値を定める方法がある。具体的には、信号強度（蛍光強度）が低い場合、しきい値をXとし、X以下の信号強度をXにするかもしくはゼロにする。

また、クロスバリデーションも導入してもよい。

[0023] (遺伝子オントロジー解析)

遺伝子の機能を調べるには、解析対象の遺伝子群を、遺伝子の機能に基づ

いて、分類し、視覚化する必要がある。遺伝子の機能を表示する方式として、よく使われているものに、遺伝子オントロジー解析がある。遺伝子オントロジーは、遺伝子の機能に関する統一的な枠組みを制定する必要性から立ち上げられたGene Ontologyコンソーシアム (<http://www.geneontology.org/>) と呼ばれるプロジェクトによって、提案されたものである。Gene Ontologyによると、遺伝子の機能を3つの情報として体系化している。即ち、分子機能 (Molecular Function)、細胞内局在 (Cellular component)、生物学的過程 (Biological process) である。

[0024] 遺伝子オントロジー解析から得られた結果の例を図1及び図2で説明する。

GOIDは、生物学的過程、細胞内局在、及び分子機能の3つの情報に関するデータベースの識別符号である。

図1のオントロジー右端括弧中の数字は登録遺伝子数を示す。32056個の遺伝子が輸送体機能 (transport) を有する遺伝子として現在登録されており、アミノ酸輸送体 (amino acid transport) には1272個の遺伝子が登録されている。

さらに、図2では、アミノ酸輸送体の下階層 {酸性アミノ酸輸送体 (95個)、アミノ酸膜貫通輸送体 (8個) 等} が登録されている。

遺伝子オントロジーでは汎用的な大分類から詳細な小分類へと階層構造を形成している。

[0025] (遺伝子オントロジー解析を用いて共通規則を抽出する工程)

下記実施例6の遺伝子オントロジー解析結果の図3を使用して説明する。

図3に記載の4つのタンパク質は、遺伝子オントロジー解析によって得られた結果である。

図3の遺伝子群は、あるクラス分類において重要であることが、上記(3)の工程の統計学的分析(データマイニング)により分かったタンパク質群であるとする。この図3の遺伝子群から共通した性質や特徴を抽出することが、遺伝子アノテーションから共通規則を抽出する工程の目的である。例え

ば、図3の遺伝子オントロジーに対して、複数の遺伝子において共通に見られるオントロジーがないかを検索する。

図3では、「amino acid transporter (アミノ酸輸送体)」又はその下階層が共通して見られる。これにより、一回目の上記(1)～(5)の工程により、自己免疫疾患に関与するタンパク質群はアミノ酸輸送体のクラス分類に関わっているという規則が潜んでいる可能性を見出すことができる。

なお、実験者の主観を排除するために、クラス分類されたタンパク質群のTermの中で一番頻出頻度が高いものを共通規則として抽出してもよい。

[0026] 上記工程(1)～(5)の工程の終了後において、抽出した共通規則の基づく拘束条件を用いてデータマイニングを行う工程を追加してもよい。

データマイニングでは、例えば、得られたデータ1～3に対し、amino acid transporter (GO:0006865)に対応するデータ(タンパク質)という拘束条件を設けて、それに該当するタンパク質群のみでデータマイニング、さらにはクロスバリデーションすることで、amino acid transporterがどの程度、クラス分類に寄与するかを定量的に把握することができる。

また、amino acid transporter (GO:0006865)の上階層は、amino transport (GO:0015837)である。そこで別のデータマイニングでは、得られたデータ1～3に対し、amino transport (GO:0015837)に対応するデータ(タンパク質)という拘束条件を設けて、それに該当するタンパク質群のみでデータマイニング、さらにはクロスバリデーションすることで、amino transporterがどの程度、クラス分類に寄与するかを定量的に把握することができる。

加えて、amino acid transporter (GO:0006865)の下階層は、acidic amino acid transport (GO:0015800)である。そこで別のデータマイニングでは、得られたデータ1～3に対し、acidic amino acid transport (GO:0015800)に対応するデータ(タンパク質)という拘束条件を設けて、それに該当するタンパク質群のみでデータマイニング、さらにはクロスバリデーションすることで、acid amino acid transporterが

どの程度、クラス分類に寄与するかを定量的に把握することができる。

仮に、“acidic amino acid transportを含む”を拘束条件としてデータマイニングを行った結果（正解率もしくはエラー率）を、“amino transport”を含む拘束条件としデータマイニングを行った結果及び”amino acid transport”を含む拘束条件としデータマイニングを行った結果と比較した場合に、“acidic amino acid transportを含む”を拘束条件としてデータマイニングを行った結果が他2者より良ければクラス分類には、“amino acid transporter”及び”amino transporter”ではなく、“acidic amino acid transport”が重要であることが分かる。これにより、自己免疫疾患に関与するタンパク質の分子機能を上階層から下階層に絞りこむことができる。

[0027] すなわち、上記のような工程を複数繰り返すことにより、より一般性の高い共通規則を抽出することができる。

加えて、データ1～3には含まれておらず、かつ共通規則の特性を有するタンパク質を、上記(1)～(3)の工程を実施することにより、追加のデータであるデータ5を取得することができる。さらに、データ5をデータ4に組み合わせることにより、精度が高く、より一般性の高い共通規則を抽出することができる。

[0028] パスウェイ解析を本実施例から得られた図4で説明する。図4では、各丸印は遺伝子を、丸印同士をつなぐ線は、相互関係があることを示している。なお、図4では、相互関係スコアを省略している。相互関係スコアとは、一般に、線でつながれた二つの遺伝子が医学文献データベースMEDLINEの同一アブストラクト文中に存在した件数を示している。

また、1つのハブタンパク質として、9種類のタンパク質(IL-5、STX1A、C SNK2A1、VAMP2、GSK3B、PRKCZ、PCNA、PIN1、STX4)を特定できる。さらに、別のハブタンパク質として、10種類のタンパク質(HRB、HMG1、HIST1H1C、TUBB、NPM1、VAMP8、VAPA、STX3、RABAC1、CCND2)を特定することができる。

文献データベースとしては、一般に、米国NCBIのMEDLINEやOMIMを用いているが、その他の文献データベースでもかまわない。

[0029] (パスウェイ解析を用いて共通規則を抽出する工程)

パスウェイ解析により、自己免疫疾患に関与するタンパク質の共通規則を抽出する工程を説明する。また、パスウェイ解析ソフトウェアとしては、公知のソフトウェア {例: Pathway Assist ver 3.0 (Arriadne Genomics)} を用いることができる。

上記説明したように示差的に発現している1以上のタンパク質(自己抗原タンパク質)群のデータ4を含む発現タンパク質リストを作成する。

そして、作成した発現タンパク質リストをパスウェイ解析ソフトウェアにインポートする。なお、下記実施例においては、公知のパスウェイ解析ソフトウェアを用いてパスウェイ解析を行なっているため、添付されている説明書のプロトコールに従った。

次に、発現タンパク質リスト内でのパスウェイを計算する。即ち、生物医学文献情報を記憶している公共のデータベースであるMEDLINEデータベースにおいて検索可能な論文の要約中から、パスウェイ解析ソフトウェアの処理アルゴリズム(Natural Language Processing Engine)で関連付けられている分子間のつながりが検索される。

そして、分子間のつながりが抽出された場合には、分子間のつながりを示すパスウェイが計算される。

[0030] MEDLINEデータベースにおいて検索可能な論文の要約中から、パスウェイ解析ソフトウェアのアルゴリズムで関連づけられている分子間のつながりが抽出されると、パスウェイ描画画面でノードが表示される。

[0031] 次に、ハブタンパク質群(図4中: IL-5、STX1A、CSNK2A1、VAMP2、GSK3B、PRKCZ、PCNA、PIN1、STX4)の共通規則を抽出する。例えば、本実施例では、各タンパク質群の一部が統計的に有意にサイトカイン(ヒトサイトカイン)に関連するタンパク質(共通規則)であることが抽出することができる。なお、共通規則を抽出するために、前記説明した遺伝子オントロジー解析を利用することができる。

[0032] また、パスウェイ解析により特定されたタンパク質群と自己免疫疾患との

相関について、上記データ1～3のデータでの該タンパク質群の発現レベルとの相関を確認することにより、パスウェイ解析により特定されたタンパク質群と自己免疫疾患の相関を検証できる。

従って、複数の検証を行うことにより、特定されたタンパク質群と自己免疫疾患の相関を有する可能性が高いものであるとの予測をより確実なものとすることができる。

加えて、段落「0026」及び「0027」に記載のように、データマイニング等の工程を追加してもよい。

[0033] (無細胞タンパク質合成系)

本発明で使用する哺乳動物由来のタンパク質は、好ましくは、無細胞タンパク質合成系、より好ましくは真核生物由来のコムギ胚芽等を用いた無細胞タンパク質合成用抽出液を使用して発現させる。

市販のタンパク質合成用抽出液としては、ウサギ網状赤血球由来のRabbit Reticulocyte Lysate System (Promega社) やコムギ胚芽由来のWheat Germ Expression Premium Kit (WEPRO^{登録商標}、株式会社セルフリースサイエンス) 等が挙げられる。

本発明に適用される最良の抽出液は、コムギ胚芽由来の抽出液であり、さらに混入する胚乳成分や胚芽組織細胞中のタンパク質合成阻害をもたらすグルコースなどの代謝物質が実質的に除去された抽出液である。なお、胚乳成分が実質的に除去された抽出液とは、リボソームの脱アデニン化率が7%以下、好ましくは1%以下になっていること意味する。さらに、好適には、細胞抽出液は、糖、リン酸化糖が10mM以下、好ましくは6mM以下まで低減されている(260nmにおける吸光度2000D/mlの抽出液中のグルコース濃度として)。このような抽出液の調製方法は、W02005/063979 A1号公報に例示される。

[0034] なお、本発明の特徴の一つとして、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系で哺乳動物由来のタンパク質を発現させることにより、下記実施例3に示すように、合成後のビオチン化哺乳動物由来のタンパク質を洗浄する必要がないことが挙げられる。すなわち、ビオチン化配列と結合しなかったビオチンを

除去する必要がない。

これにより、本発明の解析方法では、多量の哺乳動物由来のタンパク質に対する自己抗体の抗体価を効率的に測定することができる。

[0035] (自己抗体の検出データの取得)

本発明の「自己抗体の検出データの取得」とは、自己免疫疾患患者に特異的に発現している自己抗体を検出することを意味し、より詳しくは該自己抗体の抗体価を測定することである。なお、抗体価を検出する方法は自体公知の方法を利用することができる。

本発明では検出した1以上の自己抗体の抗体価の数値をエクセルファイル (Microsoft社製) 等へ書き込むことにより、データとして取得することができる。

[0036] (自己抗体の抗体価の検出系)

本発明では、自己抗体の抗体価の検出方法は特に限定されない。しかし、洗浄工程を省略できるホモジニアスアッセイ、特にALPHAを検出系として使用することが好ましい。

本発明では、好ましくはALPHAを使用することで、大量に発現したタンパク質を効率的かつ高精度に検出することができる。

[0037] {ALPHA (増幅発光近接ホモジニアスアッセイ)}

ALPHA は、PerkinElmer社のAlphaScreen™が代表的なアッセイ法である。

その方法は、近接させられたドナービーズとアクセプタービーズとの間に一重項酸素の移動に基づく分析方法である。これは、680nmでの励起において、ドナービーズ中の光増感剤は、周囲の酸素を一重項状態の酸素に変換し、その酸素が200nmの距離まで拡散する。アクセプタービーズ中の化学発光基は、エネルギーをビーズ内の蛍光アクセプターに移動させ、続いて約600nmで光を放出する。なお、アクセプタービーズは、ガラス、シリカゲル、樹脂のような不活性担体であって、上記生体分子を固定化しておくための担体である。ドナービーズは、ガラス、シリカゲル、樹脂のような不活性担体であって、ストレプトアビジンを固定化しておくための担体である。

[0038] (ALPHAを使用したin vitroでの自己抗体価の検出)

ビオチン化した哺乳動物由来のタンパク質（ビオチン化哺乳動物由来タンパク質と称する場合がある）、該ビオチン化基質を直接的又は間接的に認識可能なアクセプタービーズ{Anti-IgG(protein G) Acceptor Beads}、ストレプトアビジンが結合したドナービーズ、自己免疫疾患患者由来の試料（血清）及び／又は健常者由来の試料をマイクロプレートに添加する。

ここで、ビオチン化哺乳動物由来タンパク質に対する自己抗体が発現していれば、該自己抗体が該ビオチン化哺乳動物由来タンパク質を抗原として認識（結合）することにより、ドナービーズとアクセプタービーズが近接してシグナルの上昇が起こる。

一方、ビオチン化哺乳動物由来タンパク質に対する自己抗体が発現していなければ、該自己抗体が該ビオチン化哺乳動物由来タンパク質を抗原として認識（結合）しないので、ドナービーズとアクセプタービーズが近接できずシグナルの上昇が起こらない。

なお、シグナルの検出方法は、例えばアクセプタービーズが発する蛍光強度を使って測定する。

[0039] (イムノアッセイを使用した自己抗体価の検出)

本発明では、自己抗体の抗体価の検出は、哺乳動物由来タンパク質又はその断片を、自己免疫疾患、特に動脈硬化症由来の試料（特に血清）に接触させることによって行うことができる。哺乳動物由来タンパク質又はその断片に結合する自己抗体は、自体公知のイムノアッセイにより検出することができる。具体的な方法は、以下の通りであるが、特に限定されない。

[0040] (非競合的イムノアッセイ)

哺乳動物由来タンパク質又はその断片に結合する自己抗体を、抗ヒト・イムノグロブリン抗体によって検出する。このとき、哺乳動物由来タンパク質若しくはその断片、又は、抗ヒト・イムノグロブリン抗体を予め固相化しておくこと、未反応成分の除去（一般にB/F分離と呼ばれる）を洗浄によって容易に行うことができる。

例えば、固相化哺乳動物由来タンパク質又はその断片を患者血清に接触後、血清を除去してから抗ヒト・イムノグロブリン抗体を加える。抗ヒト・イムノグロブリン抗体を標識しておけば、自己抗体に比例して固相に結合する標識が増加する。この抗ヒト・イムノグロブリン抗体は、第2抗体と呼ばれる抗体に相当する。抗ヒト・イムノグロブリン抗体として、抗体のクラスを識別しうる抗体を利用すれば、自己抗体をクラス別に検出することもできる。哺乳動物由来タンパク質若しくはその断片、試料（例：血清）、および抗ヒト・イムノグロブリン抗体とは、同時に反応させることもできる。

[0041] 非競合的なイムノアッセイとして、粒子凝集反応やイムノクロマトグラフィーを利用することもできる。粒子凝集反応は、哺乳動物由来タンパク質若しくはその断片感作粒子が自己抗体によって凝集する現象に基づく検出方法である。

一方、イムノクロマトグラフィーでは、先に述べた固相化哺乳動物由来タンパク質若しくはその断片がクロマトグラフ媒体中に存在し、これに対して試料中の自己抗体、そして標識した抗ヒト・イムノグロブリン抗体を反応させ、更に未反応成分の分離がクロマトグラフ媒体中で反応と並行して行われるように設計されている。

[0042] (競合的イムノアッセイ)

哺乳動物由来タンパク質若しくはその断片と抗哺乳動物由来タンパク質若しくはその断片抗体との免疫学的な反応を、自己抗体が阻害する現象を利用して、自己抗体の検出が可能である。この場合にも、未反応成分の除去は、固相を利用して簡便に行うことができる。すなわち、抗哺乳動物由来タンパク質若しくはその断片抗体と血液試料の存在下で哺乳動物由来タンパク質若しくはその断片と接触させるとき、抗哺乳動物由来タンパク質若しくはその断片抗体と哺乳動物由来タンパク質若しくはその断片のいずれかを固相化し、他方を標識して用いる。加えて、B/F分離の後に固相に結合した標識量に基づいて自己抗体の検出が可能である。競合的なイムノアッセイを行う場合、反応成分として用いる抗哺乳動物由来タンパク質若しくはその断片抗体は、

自己抗体と競合するものであればポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体であっても良い。

[0043] (抑制的イムノアッセイ)

哺乳動物由来タンパク質若しくはその断片と試料とを接触させた後に、抗哺乳動物由来タンパク質若しくはその断片抗体との反応を行う。哺乳動物由来タンパク質若しくはその断片に対する自己抗体を含まない場合には哺乳動物由来タンパク質若しくはその断片と抗哺乳動物由来タンパク質若しくはその断片抗体との反応が阻害されないが、試料中に哺乳動物由来タンパク質若しくはその断片に対する自己抗体が存在すれば阻害をもたらす。

具体的には、まず固相化哺乳動物由来タンパク質若しくはその断片を試料に加え、十分に反応させた後に、さらに抗哺乳動物由来タンパク質若しくはその断片抗体を加える。抗哺乳動物由来タンパク質若しくはその断片抗体を標識しておけば、固相に結合した（またはしなかった）標識量を測定することによって自己抗体の存在を確認することができる。あるいは、標識した哺乳動物由来タンパク質若しくはその断片と試料を接触させ、これを固相化した抗哺乳動物由来タンパク質若しくはその断片抗体と接触させることも可能である。特にイムノクロマトグラフィーに応用する場合には利点がある方法である。

[0044] イムノアッセイに用いる標識には、蛍光物質、発光物質、色素、酵素、補酵素、又はラジオアイソトープ等が知られている。中でも、アルカリホスファターゼやパーオキシダーゼのような酵素標識は、安全性や経済性に優れ、しかも必要な感度を比較的容易に達成できることから、有利な標識成分である。

抗ヒト・イムノグロブリン抗体や哺乳動物由来タンパク質若しくはその断片のような反応成分は、これらの標識成分によって直接標識することもできるし、あるいは更にこれらの成分を認識する抗体やアビジン-ビオチン系などを利用して間接標識することもできる。各種の抗体を固相に結合させるには、マイクロプレート、プラスチックビーズ、あるいは合成樹脂微粒子のよ

うな固相担体を用い、物理吸着や化学的な結合、あるいはアビジン-ビオチンを用いた間接的な結合方法が一般に利用される。これらの免疫成分を固相化した担体は、ウシ血清アルブミンやスキムミルクなどの不活性タンパク質で処理することによって、非特異的な反応を抑制することができる。なお、固相と酵素標識を組み合わせたとき、このイムノアッセイは特にELISAと呼ばれる。

[0045] 上記以外での自己抗体価の検出の例示として、間接蛍光抗体法、免疫比濁法、免疫比ろう法、二重免疫拡散法(DID法)、ラテックス凝集法、化学発光法(化学発光酵素免疫測定法等)等が挙げられるが特に限定されていない。

[0046] (検査方法)

本発明の自己免疫疾患、特に動脈硬化症の検査において、以下のタンパク質群のいずれか1以上の抗体を患者由来の試料、特に血清から検出する。

なお、本発明の検査とは、発症リスク検査、重症度の判定検査、治療効果の判定検査を含む。

(1) サイトカインに関与するタンパク質群

(2) アミノ酸輸送体に関与するタンパク質群

サイトカインに関与するタンパク質群としては、好ましくは、IL-5 (interleukin-5)、STX1A (syntaxin 1A)、CSNK2A1 (casein kinase 2, alpha 1 polypeptide)、VAMP2 {vesicle-associated membrane protein 2 (synaptobrevin 2)}、GSK3B (glycogen synthase kinase 3 beta)、PRKCZ (protein kinase C, zeta)、PCNA (proliferating cell nuclear antigen)、STX4 (syntaxin 4) 若しくはPIN1 (peptidylprolyl cis/trans isomerase, NIMA-interacting 1)、及び/又はHRB (HIV-1 Rev binding protein)、HMGN1 (high-mobility group nucleosome binding domain 1)、HIST1H1C (histone cluster 1, H1c)、TUBB (tubulin, beta)、NPM1 {nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)}、VAMP8 (vesicle-associated membrane protein 8)、VAPA {VAMP (vesicle-associated membrane protein)-associated protein A}、STX3 (SYNTAXIN 3)、CCND2 (cyclin D2) 若しくはRABAC1 (

Rab acceptor 1)であるが特に限定されない。

アミノ酸輸送体に関するタンパク質群としては、好ましくは、SLC7A11 {solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, y⁺ system) member 11}、SLC36A4 {solute carrier family 36 (proton/amino acid symporter), member 4}、SLC7A9 {solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y⁺ system), member 9} 又はSLC1A3 {solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 3} であるが特に限定されない。

加えて、下記実施例9～11の結果により、上記タンパク質群の中でも、IL-5が好ましい。さらに、IL-5はfull lengthである完全長だけでなく、部分配列 {例、IL-5(20-135) : IL-5の20位から135位を意味する。以下同じ)、IL-5(64-135:IL-5の64位から135位を意味する。以下同じ)}、特に分泌型IL-5 {IL-5(20-135)} も含む。

[0047] (検査キット)

本発明の自己免疫疾患、特に動脈硬化症の検査キットは、上記述べた各ELISA、化学発光法、免疫クロマト法等を実施するためのキットでありうる。

特に、ELISAキットでは、IL-5、STX1A、CSNK2A1、VAMP2、GSK3B、PRKCZ、PCNA、PIN1、STX4、HRB、HMG1、HIST1H1C、TUBB、NPM1、VAMP8、VAPA、STX3、RABAC1、CCND2、RABAC1、SLC7A11、SLC36A4、SLC7A9、及び／又はSLC1A3を含み、さらに以下のいずれか1の構成を含む。

- (1) マイクロプレート
- (2) 標準液
- (3) 陽陰性コントロール
- (4) 反应用緩衝液
- (5) 酵素標識抗体
- (6) 洗浄用緩衝液
- (7) 酵素基質液
- (8) 反応停止液

[0048] 以下、実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例により限定されるものではない。

実施例 1

[0049] (自己免疫疾患患者由来の試料の調製)

本実施例では、アテローム性動脈硬化症の患者(23名)から得た血清を試料とした。さらに、該試料を、軽度の患者(mild)、重症患者(Serious)、軽度かつ陳旧性患者(mild Old)及び重症かつ陳旧性患者(mild Old)に分けて解析した。

なお、健常者由来の血清をコントロールとした。

実施例 2

[0050] (ビオチン化哺乳動物由来タンパク質をコードする翻訳鋳型の作成)

翻訳鋳型となるmRNAは、各種哺乳動物由来タンパク質(約3千種類)をコードする遺伝子にビオチンタグを融合したビオチン化タンパク質転写鋳型であるベクターを作成した(pEU-ビオチン化タグ-各種哺乳動物由来タンパク質)。該ベクターを基に、タバコモザイクウイルス(TMV)の Ω 配列部分を含むPCR産物を鋳型とした。該転写鋳型を、転写反応溶液〔最終濃度、80mM HEPES-KOH pH7.8、16mM 酢酸マグネシウム、10mM ジチオトレイトール、2mM スペルミジン、2.5mM 4NTPs(4種類のヌクレオチド三リン酸)、0.8U/ μ L RNase阻害剤、1.6U/ μ L SP6 RNAポリメラーゼ〕に添加し、37°Cで3時間反応させた。得られたRNAをフェノール/クロロフォルム抽出、エタノール沈殿の後、Nick Column (Amersham Pharmacia Biotech社製)により精製して翻訳鋳型とした。

実施例 3

[0051] (ビオチン化哺乳動物由来タンパク質の翻訳反応工程)

96穴タイタープレートを反応容器として用いた。

まず、125.0 μ Lの供給相(2 \times Substrate Mixture 62.5 μ L、50 μ Mのビオチン1.25 μ L、MilliQ 61.25 μ L)をタイタープレートに添加した。次に、25.0 μ Lの反応相(4 μ g/ μ Lのcreatine kinase 0.25 μ L、無細胞タンパク質合成

用コムギ胚芽Extract (200 O.D.) $6.5\mu\text{l}$ 、ビオチン化酵素 (180 O.D.) $1.0\mu\text{l}$ 、 $2\times$ Substrate Mixture $8.75\mu\text{l}$ 、 $5\mu\text{M}$ のビオチン $2.5\mu\text{l}$ 、MilliQ $3.5\mu\text{l}$ に、上記実施例2の各翻訳鋳型 {ペレット状の翻訳鋳型 (mRNA) を $25\mu\text{l}$ の反応液で溶かした} を添加したものを、注意深く静かにタイタープレートの底に添加した。タンパク質合成反応は、26度、15~20時間の静置で行った。

合成終了のビオチン化タンパク質は精製せずに、以下の実施例に用いた。

実施例 4

[0052] (Alpha Screen™を用いた自己抗体の抗体価の測定)

384穴タイタープレート (Optiplate-384TPP) を反応容器として用いた。

$8.0\mu\text{L}$ のMixture A { $6.0\mu\text{L}$ のMilliQ, $1.0\mu\text{L}$ の $10\times$ AlphaScreen Buffer (1 M Tris-HCl, pH8.0/0.1% Tween20) , $1.0\mu\text{L}$ の10mG/mL BSA}、 $10\mu\text{L}$ の血清 { (+) : 2.5×10^{-3} 希釈} 及び $5.0\mu\text{L}$ の上記実施例3の各種のビオチン化哺乳動物由来タンパク質 (5倍希釈、Biomek FXを使用) を、それぞれの穴に添加して、 26°C 、30分間静置した。

上記静置後、 $10\mu\text{L}$ のMixture B ($7.88\mu\text{L}$ のMilliQ, $1.0\mu\text{L}$ の $10\times$ AlphaScreen Buffer (1M Tris-HCl, pH8.0/0.1% Tween20) , $1.0\mu\text{L}$ の10mG/mL BSA, $0.06\mu\text{L}$ の {5mG/mL StreptAvidin Donor Beads, $0.06\mu\text{L}$ の5mG/mL Anti-IgG (protein G) Acceptor Beads} を、さらにそれぞれの穴に添加して、 26°C 、60分間静置した。

上記静置後、EnVisionを用いて蛍光強度 (自己抗体価) を測定した。

[0053] 上記測定における一部の自己抗体の結果を図5に示す。

上記結果から、哺乳動物由来タンパク質の相違により自己抗体の検出結果が異なることがわかった。

さらに、抗体価の高い自己抗原タンパク質に関するデータを取得した。

実施例 5

[0054] (自己免疫疾患に特異的に発現している自己抗原タンパク質の解析)

上記実施例4から得られた各患者 {軽度の患者 (mild)、重症患者 (Serio

us)、軽度かつ陳旧性患者 (mild Old) 及び重症かつ陳旧性患者 (mild Old) } 由来の試料における蛍光強度 (自己抗体価) のデータを、コントロールである健常者由来の試料における蛍光強度 (自己抗体価) のデータを比較して、示差的に発現している自己抗体 (特に、発現が上昇している自己抗体) の自己抗原タンパク質群のデータを取得した。

より詳しくは、各々のデータを自然対数変換したのち、平均・標準偏差を使ってスコア化 (平均値を0として、+1SDのものを1, +2SDのものを2とする) した。さらに、スコアの上位のものから382種類のタンパク質を選択した。

[0055] (2) クラスタ分析 (統計ソフトR(<http://www.r-project.org>) のheatmap 2を用いて、Correlation heatmapを作成した) を用いて、上記382種類のタンパク質群を相互に関連性の高いタンパク質群である4つの群に分けた。

なお、cluster 1~4は、それぞれ、126個 (参照: 図6、7)、62個 (参照: 図6、7)、129個 (参照: 図6、7) 及び65個 (参照: 図6、7) を示すグループであった。

[0056] 上記解析結果の一部のデータを図8に示す。なお、Ha1、Ha2、Ha3及びHa4は、それぞれ、軽度の患者 (mild)、重症患者 (Serious)、軽度かつ陳旧性患者 (mild Old) 及び重症かつ陳旧性患者 (mild Old) を示す。

図8の結果から明らかなように、各疾患の状態により、自己抗体の抗体価が異なることがわかった。

[0057] また、各患者におけるそれぞれのクラスターでのAverage profileを図9に示す。

図9の結果から明らかなように、各疾患の状態及び各クラスターにより自己抗体の抗体価が異なることがわかる。

特に、cluster1に属するタンパク質に対する自己抗体の抗体価が非常に高いことがわかった。

[0058] 図8及び図9に記載の解析結果から明らかなように、自己免疫疾患、特に動脈硬化症の患者では、病状の進行、年齢等により、血清中に発現している自己抗体の量及び種類が異なることがわかった。

これにより、血清中の自己抗体に対する自己抗原タンパク質を検出することにより、自己免疫疾患、特に動脈硬化症の発病リスク、重症度、治療効果の判定を行うことができる。

実施例 6

[0059] (遺伝子オントロジー解析による自己免疫疾患に関与するタンパク質の解析)

上記実施例 5 で取得した自己免疫疾患、特にアテローム性動脈硬化で示差的に発現しているタンパク質群の各クラスター別のデータを、公共のデータベース (<http://www.geneontology.org/>) にインポートした。

[0060] 上記インポートした一部の結果を図 10 に示す。

図 10 に示すように、各クラスター別では、Term が異なることがわかる。なお、図 10 の計算値 (Pvalue) は、複数のシグナル値のグループを比較し検定を行った計算結果である。Term は遺伝子の機能を示す。

また、各クラスターで頻出 Term に関し、cluster1 はアミノ酸輸送体 (Amino acid transporter)、cluster2 は炎症反応 (Inflammation)、糖質代謝 (Carbohydrate metabolism) 及びステロイド代謝 (Steroid metabolism)、cluster3 は翻訳 (Translation)、転写 (Transcription) 及び組換え (recombination)、並びに cluster4 は RNA 異化 (RNA catabolism) であった。

[0061] cluster1 に属し、さらに Term アミノ酸輸送体又は該アミノ酸輸送体の下階層概念を有するタンパク質を抽出して、図 3 に示した。

これにより、図 3 に示したタンパク質群である SLC7A11、SLC36A4、SLC7A9 及び SLC1A3 は、自己免疫疾患、特に動脈硬化に関与するタンパク質であると判定することができる。

すなわち、自己免疫疾患、特にアテローム性動脈硬化の患者由来の試料、特に血清中の SLC7A11、SLC36A4、SLC7A9 及び SLC1A3 に対する自己抗体の抗体価を検出、測定することにより、自己免疫疾患、特に動脈硬化症、さらにはアテローム性動脈硬化症の発病リスク、重症度、治療効果の判定を行うことができる。

実施例 7

[0062] (パスウェイ解析による自己免疫疾患に関与するタンパク質の解析)

上記実施例 5 で取得した自己免疫疾患、特にアテローム性動脈硬化で示差的に発現しているタンパク質群のデータを、公知のソフトウェア {GeneSphere, Fujitsu (http://venus.netlaboratory.com/drug_discovery/genesphere/feature/)} で解析し、パスウェイ単位でタンパク質発現を評価した場合に自己免疫疾患において健常者群と比べて有意に発現変動しているパスウェイを抽出した。

[0063] 上記解析結果を図 4 に示す。

図 4 の結果により、14 種類のタンパク質(IL-5、STX1A、CSNK2A1、VAMP2、GSK3B、PRKCZ、PCNA、PIN1、STX4、HRB、HMGN1、HIST1H1C、TUBB、NPM1、VAMP8、VAPA、STX3、RABAC1、CCND2)を特定した。

[0064] これにより、図 4 に示したタンパク質群であるIL-5、STX1A、CSNK2A1、VAMP2、GSK3B、PRKCZ、PCNA、PIN1及びSTX4、さらには、HRB、HMGN1、HIST1H1C、TUBB、NPM1、VAMP8、VAPA、STX3、RABAC1及びCCND2は、自己免疫疾患、特に動脈硬化、さらにはアテローム性動脈硬化に関与するタンパク質であると判定することができる。

すなわち、自己免疫疾患、特に動脈硬化、さらにはアテローム性動脈硬化の患者由来の試料、特に血清中のIL-5、STX1A、CSNK2A1、VAMP2、GSK3B、PRKCZ、PCNA、PIN1及びSTX4、さらには、HRB、HMGN1、HIST1H1C、TUBB、NPM1、VAMP8、VAPA、STX3、RABAC1及びCCND2に対する自己抗体の抗体価を検出、測定することにより、自己免疫疾患、特にアテローム性動脈硬化症の発病リスク、重症度、治療効果の判定を行うことができる。

実施例 8

[0065] (上記実施例で解析して得られた各タンパク質での確認)

上記解析して得られた各タンパク質 (IL-5、STX1A、CSNK2A1、VAMP2、GSK3B、PRKCZ、PCNA、PIN1、STX4、HRB、HMGN1、HIST1H1C、TUBB、NPM1、VAMP8、VAPA、STX3、RABAC1、CCND2、SLC7A11、SLC36A4、SLC7A9及びSLC1A3) を用い

て上記実施例4と同様な方法により、患者由来の血清中の自己抗体の抗体価を測定した。

[0066] 上記タンパク質の大部分は、健常者由来の試料であるコントロールと比較して、有意に高い抗体価を示した。

これにより、上記解析して得られた各タンパク質を用いれば自己免疫疾患、特にアテローム性動脈硬化症の発病リスク、重症度、治療効果の判定を行うことができる。

さらには、本発明の解析方法は、自己免疫疾患に関与するタンパク質の解析方法として優れていることがわかった。

実施例 9

[0067] (抗IL-5抗体の抗体価の測定)

上記実施例1～8により自己免疫疾患、特にアテローム性動脈硬化症の発病リスク、重症度、治療効果の判定の指標となる抗IL-5抗体の抗体価を詳細に測定した。詳細は、以下の通りである。

上記実施例2～4と同様な方法により、Full length IL-5、Full length IL-5より抗体価の高い分泌型IL-5(20-135)及び部分配列IL-5(64-135)をコードする遺伝子を基にして、ビオチン化Full length IL-5、ビオチン化IL-5(20-135)及びビオチン化IL-5(64-135)を無細胞タンパク質合成用コムギ胚芽Extractで発現させた。

さらに、ビオチン化Full length、ビオチン化分泌型IL-5(20-135)及びビオチン化部分配列IL-5(64-135)を、それぞれ、冠状動脈硬化症患者(IHD)及び閉塞性動脈硬化症患者(ASO)由来の血清中に添加して、抗IL-5抗体の抗体価を測定した。

[0068] 冠状動脈硬化症患者血清中のFull length IL-5、分泌型IL-5(20-135)及び部分配列IL-5(64-135)の添加による、冠状動脈硬化症患者血清中の抗IL-5抗体の抗体価の測定結果を図11に示す。

図11に示すように、冠状動脈硬化症患者血清中の抗IL-5抗体は、Full length IL-5よりも、分泌型IL-5(20-135)及び部分配列IL-5(64-135)を強く認識

することを確認した。

[0069] 分泌型IL-5(20-135)の添加による、閉塞性動脈硬化症患者及び冠状動脈硬化症患者血清中の抗IL-5抗体の抗体価の測定結果を図12に示す。

図12に示すように、閉塞性動脈硬化症患者及び冠状動脈硬化症患者血清中の抗IL-5抗体は、分泌型IL-5(20-135)を認識していることを確認した。

以上により、閉塞性動脈硬化症患者及び冠状動脈硬化症患者血清中の抗IL-5抗体は、Full length IL-5だけでなく、分泌型IL-5(20-135)及び部分配列IL-5(64-135)を認識する。これにより、分泌型IL-5(20-135)及び部分配列IL-5(64-135)に対する自己抗体を患者の血清中から検出することにより、自己免疫疾患、特に動脈硬化症の検査を行うことができる。

実施例 10

[0070] (動脈硬化症患者の血清中のIL-5濃度測定)

動脈硬化症患者である冠状動脈硬化症患者血清中 (n=20) 及び健常者由来の血清中(n=10)のIL-5濃度をELISA(IMMUNOTECH, Mareille, France)で測定した。

なお、IL-5は、IL-5 遺伝子配列を基にして、無細胞タンパク質合成用コムギ胚芽Extractで発現させた。

[0071] 上記の測定結果を図13に示す。

図13に示すように、動脈硬化症患者である冠状動脈硬化症患者血清のIL-5濃度が有意に低下していることを確認した。

以上により、患者の血清中のIL-5濃度を検出することにより、自己免疫疾患、特に動脈硬化症の検査を行うことができる。

実施例 11

[0072] (抗IL-5抗体価の受信者動作特性曲線の作成)

上記実施例9～10の結果を基にして、抗IL-5抗体の抗体価の受信者動作特性曲線を作成した。

図14に示すように、抗IL-5抗体の抗体価の感度・特異度は、カットオフ値を1.19-1.21にすると、感度約81.3%，特異度90%となる。

以上により、患者の血清中のIL-5抗体の抗体価の検出による自己免疫疾患、特に動脈硬化症の検査は、感度及び特異度が高いことを確認した。

産業上の利用可能性

[0073] 本発明では、高感度かつ高効率で自己免疫疾患、特に動脈硬化に関与するタンパク質を解析する手段を提供することができる。

請求の範囲

[請求項1] 以下のいずれか1のタンパク質群に対する自己抗体の抗体価を患者由来の試料から検出することを特徴とする動脈硬化の検査方法。

(1) サイトカインに関与するタンパク質群、ここで、サイトカインに関与するタンパク質群は、以下のいずれか1以上である：

IL-5；STX1A；CSNK2A1；VAMP2；GSK3B；PRKCZ；PCNA；PIN1；STX4；HRB；HMGN1；HIST1H1C；TUBB；NPM1；VAMP8；VAPA；STX3；RABAC1、CCND2。

(2) アミノ酸輸送体に関与するタンパク質群、ここで、アミノ酸輸送体に関与するタンパク質群は、以下のいずれか1以上である：

SLC7A11；SLC36A4；SLC7A9、SLC1A3。

[請求項2] 前記サイトカインに関与するタンパク質群は、以下のいずれか1以上である請求項1の検査方法。

- (1) IL-5
- (2) STX1A
- (3) CSNK2A1
- (4) VAMP2
- (5) GSK3B
- (6) PRKCZ
- (7) PCNA
- (8) PIN1
- (9) STX4

[請求項3] 前記サイトカインに関与するタンパク質群は、以下のいずれか1以上である請求項1の検査方法。

- (1) HRB
- (2) HMGN1
- (3) HIST1H1C
- (4) TUBB

- (5) NPM1
- (6) VAMP8
- (7) VAPA
- (8) STX3
- (9) RABAC1
- (10) CCND2

[請求項4] 前記アミノ酸輸送体に関与するタンパク質群は、以下のいずれか1以上である請求項1の検査方法。

- (1) SLC7A11
- (2) SLC36A4
- (3) SLC7A9
- (4) SLC1A3

[請求項5] 前記動脈硬化が、アテローム性動脈硬化症である請求項1～4のいずれか1の検査方法。

[請求項6] 前記検査方法は、発病リスクの検査、重症度の判定検査、又は治療効果の判定検査である請求項5の検査方法。

[請求項7] 動脈硬化検査を実施するための、少なくとも以下を含む検査キット：
IL-5；STX1A；CSNK2A1；VAMP2；GSK3B；PRKCZ；PCNA；PIN1；STX4；H
RB；HMGN1；HIST1H1C；TUBB；NPM1；VAMP8；VAPA；STX3；RABAC1；CC
ND2；SLC7A11；SLC36A4；SLC7A9、及び／又はSLC1A3。

[請求項8] 動脈硬化検査を実施するための、IL-5を含み、さらに少なくとも以下のいずれか1を含む検査キット。

- (1) マイクロプレート
- (2) 標準液
- (3) 陽陰性コントロール
- (4) 反応用緩衝液
- (5) 酵素標識抗体
- (6) 洗浄用緩衝液

(7) 酵素基質液

(8) 反応停止液

[請求項9] 以下の工程を有する自己免疫疾患に関与するタンパク質の解析方法：

(1) 哺乳動物由来のタンパク質を、自己免疫疾患患者由来の試料と接触させて自己抗体の検出データ（データ1）を取得する工程；

(2) 哺乳動物由来のタンパク質を、健常者由来の試料と接触させて自己抗体の検出データ（データ2）を取得する工程、及び／又は、哺乳動物由来のタンパク質を、自己免疫疾患の治療薬を投与されている自己免疫疾患患者由来の試料と接触させて自己抗体の検出データ（データ3）を取得する工程；

(3) 上記データ1～3のいずれか2以上を用いて統計学的分析を行い、示差的に発現している1以上の自己抗体の自己抗原タンパク質（哺乳動物由来のタンパク質）群のデータ（データ4）を取得する工程；

(4) 上記データ4のタンパク質群に注釈付け（アノテーション）を行う工程、

(5) 上記アノテーションに基づき上記タンパク質群の共通規則を抽出する工程。

[請求項10] さらに、前記共通規則に基づく拘束条件を用いてデータマイニングを行う工程を有することを特徴とする請求項9の解析方法。

[請求項11] 前記（5）の工程で抽出された共通規則を有するタンパク質を用いて上記（1）～（5）の工程を複数回繰り返す工程を特徴とする請求項9又は10の解析方法。

[請求項12] さらに、前記データ1～3に含まれておらず、かつ前記共通規則を有する哺乳動物由来のタンパク質を使用して、上記（1）～（3）の工程を行うことによりデータ5を取得する工程を有することを特徴とする請求項9～11のいずれか1の解析方法。

[請求項13] 前記データ5を上記4データに組み合わせる工程を有することを特徴

とする請求項 9～12 のいずれか 1 の解析方法。

[請求項14] 前記哺乳動物由来のタンパク質を無細胞タンパク質合成系で発現させることを特徴とする請求項 9～13 のいずれか 1 の解析方法。

[請求項15] 前記 (1) 及び／又は (2) の工程で、ALPHA (増幅発光近接ホモジニアスアッセイ) を使用してIgGと反応する哺乳動物由来のタンパク質を検出することを特徴とする請求項 9～14 のいずれか 1 の解析方法。

[請求項16] 前記自己免疫疾患が、以下のいずれか 1 から選ばれる請求項 9～15 のいずれか 1 の解析方法、

全身性エリテマトーデス、円板状エリテマトーデス、多発性筋炎、強皮症、混合結合組織病、橋本甲状腺炎、原発性粘液水腫、甲状腺中毒症、悪性貧血、Good-pasture症候群、急性進行性糸球体腎炎、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、水疱性類天疱瘡、インスリン抵抗性糖尿病、若年性糖尿病、アジソン病、萎縮性胃炎、男性不妊症、早発性更年期、水晶体原性ぶどう膜炎、交換性脈炎、多発性硬化症、動脈硬化症、アテローム性動脈硬化症、潰瘍性大腸炎、原発性胆汁性肝硬変、慢性活動性肝炎、自己免疫性溶血性貧血、発作性血色素尿症、突発性血小板減少性紫斑病、及びシェーグレン症候群。

[請求項17] 前記自己免疫疾患が、動脈硬化症である請求項 9～16 のいずれか 1 の解析方法。

[請求項18] 前記 (4) の工程は、遺伝子オンロジー解析であることを特徴とする請求項 9～17 のいずれか 1 の解析方法。

[請求項19] 前記遺伝子オンロジー解析の 1 つ以上が、分子機能、細胞内局在及び生物学的過程から選択される請求項 18 の解析方法。

[請求項20] 前記遺伝子オンロジー解析の共通規則が、分子機能の分類であることを特徴とする請求項 19 の解析方法。

[請求項21] 前記 (1)～(5) の工程を繰り返すことにより、前記分子機能の分類を下階層に絞りこむことを特徴とする請求項 20 の解析方法。

- [請求項22] 前記自己免疫疾患が動脈硬化症であり、前記共通規則がアミノ酸輸送体であることを特徴とする請求項18～21のいずれか1の解析方法。
- [請求項23] 前記(4)の工程は、パスウェイ解析であることを特徴とする請求項9～17のいずれか1の解析方法。
- [請求項24] 前記自己免疫疾患が動脈硬化症であり、前記共通規則がサイトカインであることを特徴とする請求項23の解析方法。

[X1]

- ☐ GO:0008150 : biological_process [270820 gene products]
- ☐ GO:0051234 : establishment of localization [32387 gene products]
- ☐ GO:0006810 : transport [32056 gene products]
 - ☐ GO:0015837 : amine transport [1637 gene products]
 - ☐ **GO:0006865 : amino acid transport [1272 gene products]**
 - ☐ GO:0015849 : organic acid transport [1835 gene products]
 - ☐ GO:0046942 : carboxylic acid transport [1811 gene products]
 - ☐ **GO:0006865 : amino acid transport [1272 gene products]**
- ☐ GO:0051179 : localization [36381 gene products]
- ☐ GO:0051234 : establishment of localization [32387 gene products]
- ☐ GO:0006810 : transport [32056 gene products]
 - ☐ GO:0015837 : amine transport [1637 gene products]
 - ☐ **GO:0006865 : amino acid transport [1272 gene products]**
 - ☐ GO:0015849 : organic acid transport [1835 gene products]
 - ☐ GO:0046942 : carboxylic acid transport [1811 gene products]
 - ☐ **GO:0006865 : amino acid transport [1272 gene products]**

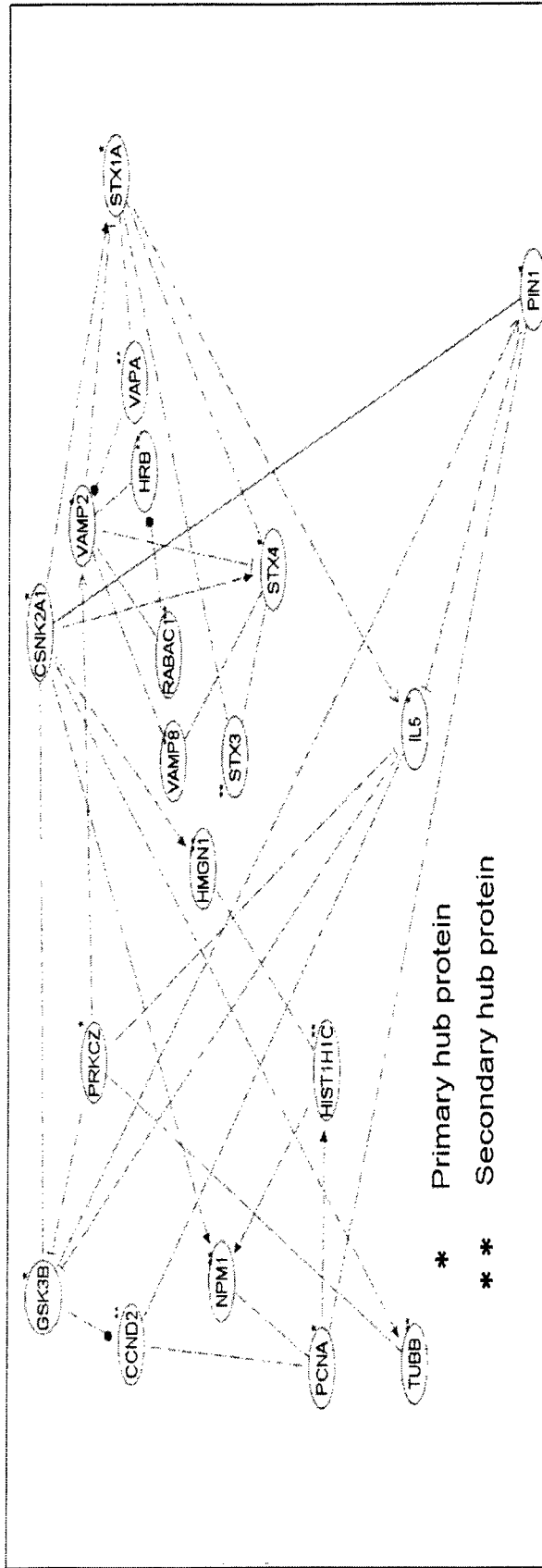
[図2]

- ☐ ■ GO:0015837 : amine transport [1637 gene products]
- ☐ ■ GO:0006865 : amino acid transport [1272 gene products]
- ☐ ■ GO:0015800 : acidic amino acid transport [95 gene products]
- ☐ ■ GO:0032973 : amino acid export [12 gene products]
- ☐ ■ GO:0043090 : amino acid import [44 gene products]
- ☐ ■ GO:0003333 : amino acid transmembrane transport [8 gene products]
- ☐ ■ GO:0015801 : aromatic amino acid transport [16 gene products]
- ☐ ■ GO:0015802 : basic amino acid transport [81 gene products]
- ☐ ■ GO:0015803 : branched-chain aliphatic amino acid transport [133 gene products]
- ☐ ■ GO:0015879 : carnitine transport [27 gene products]
- ☐ ■ GO:0015881 : creatine transport [3 gene products]
- ☐ ■ GO:0042940 : D-amino acid transport [26 gene products]
- ☐ ■ GO:0006860 : extracellular amino acid transport [1 gene product]
- ☐ ■ GO:0015884 : folic acid transport [15 gene products]
- ☐ ■ GO:0031460 : glycine betaine transport [3 gene products]
- ☐ ■ GO:0015807 : L-amino acid transport [150 gene products]
- ☐ ■ GO:0051956 : negative regulation of amino acid transport [7 gene products]
- ☐ ■ GO:0015804 : neutral amino acid transport [169 gene products]
- ☐ ■ GO:0015822 : ornithine transport [21 gene products]
- ☐ ■ GO:0051957 : positive regulation of amino acid transport [9 gene products]
- ☐ ■ GO:0051955 : regulation of amino acid transport [22 gene products]
- ☐ ■ GO:0000101 : sulfur amino acid transport [36 gene products]
- ☐ ■ GO:0034487 : vacuolar amino acid transport [13 gene products]

[図 3]

HsSYMBOL	F u n c t i o n
S L C 3 6 A 4	solute carrier family 36 (proton/amino acid symporter), member 4. mRNA (cDNA clone MGC:48630)
S L C 7 A 9	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 9, mRNA (cDNA clone MGC:24085)
S L C 1 A 3	solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 3, mRNA (cDNA clone MGC:41861)
S L C 7 A 1 1	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 11, mRNA (cDNA clone MGC:20026)

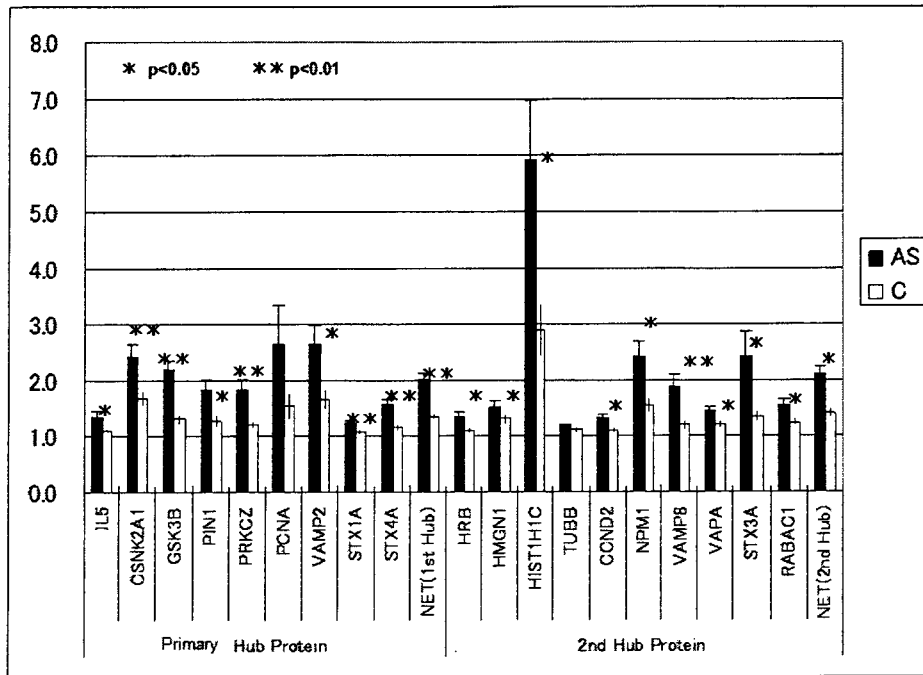
[図4]



* Primary hub protein
** Secondary hub protein

Hub Gene	属性	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
PIN1	重症	GSK3B activation	GSK3B activation	IL5 inhibition	PCNA association							
STX1A	軽症	STX1A association	VAMP2 inhibition	VAPA association	STX4 association	IL5 activation	STX3 association	OSNK2A1 activation	EIF4E activation			
OSNK2A1	陽性上位	STX1A activation	HNRNP2B1 activation	STX4 activation	GSK3B association	NPM1 activation	HMGNI activation	TUBB activation	SRPK1 activation	PIN1 association	KLF1 association	EIF2S2 association
VAMP2	陽性上位	STX1A inhibition	PRKCZ activation	RABAC1 association	HRB association	VAMP8 association	STX4 inhibition	VAPA regulation				
GSK3B	陽性上位	PRKCZ inhibition	PI4F1 association	RPS15 regulation	CCND2 regulation	IL5 inhibition	PIN1 activation	OSNK2A1 association				
CCND2	陽性上位	GSK3B regulation	FKBP4 inhibition	OPRS1 regulation	CDKSR1 regulation	PCNA association	IL5 association					
PCNA	陽性上位	HIST1H1C activation	FLS inhibition	AKTIP inhibition	NPM1 association	CCND2 association	KCTD13 association	TGM2 inhibition	PIN1 association	FZRI regulation		
IL5	陽性中位	STX1A activation	PRKCZ inhibition	GSK3B inhibition	CCND2 association	CYSLTR1 activation	PTAFR association	CRISP2 activation	PIN1 inhibition			

[図5]





	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Cluster1	ZDHHO17	ABDF1	POLH	DTX3L	KOTD18	KIAA0409	RNF38	MAP1LQ3B	SLO1A3	PRPF3	TAF11	QENT42	FAM32A	SRPK2	ZNF625
Cluster2	PINI	MRPL38	ODD088	TUBB	SLO44A5	TMEM66A	KIF13	ZNF9	QAPN9	MLC1	SLO17A3	RPS10	DOX39	OPRS1	ZNF200
Cluster3	ITGB1BP1	RPL27A	SLO04A1	EBI2	SAF2	ZNF668	FZB1	FATE1	HGF2BP	IRIT2	MNS1	CDKRR1	RECDL	GALNT4	SMAD5
Cluster4	CGND2	AYTL1	LGALS8	HTR2B	ABDB9	DNAJB14	TMEM33	RPL37A	RSBN1	PARK2	KIFAP3	STX4A	ZNF193	ZNF215	SRPK1
	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Cluster1	TMEM31	DTNA	RBND4	MSL2L1	VIL1	JSRP1	DADYBP	LYSMD1	SAP30BP	GPM6A	PHF1	UBXD3	O16or03	HIFX	GNL1
Cluster2	H2AF2	TGM2	NARF	NPM3	MGLL	NDST1	ALOX5AP	TMEM16K	WDR69	KLHL3	OLFM3	PMR2	FABP6	DCN	FORL2
Cluster3	KLHL12	HIST2H2AC	ODG10B	O13orf7	KONJ12	TNFAIP8L2	MRPS6	RG8MTD2	NHP2L1	NPY1R	KPNA1	RF26	TWST2	HMGNA4	SNRPD2
Cluster4	SEC61A2	EIF358	STK11IP	PORY14	SPOCK1	GABPA	TRIM45	ADH1B	RBL2	CORT	ODX6B1	LOXHD1	CRISP2	THDP1	O13orf6
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Cluster1	ZMAT2	SLO7A9	OADNB1	RPL36	FKBP4	TRIP10	NOL1	RPL7L1	PRM2	HIST1H1Q	EMG1	RNF10	SRP19	RDX	O1orf63
Cluster2	ATP6V1B2	MAOA	RABAC1	EFTUD2	SHD	REEP2	OPD	TUFT1	TMEM101	OY246A1	SYT4	MFAP3	APH1B	O30orf58	GABRA3
Cluster3	SP110	EIF4E2	RIT2	BAT4	ALS2OR11	HIST1H2BK	ODG1	ENPP5	BAGALT1	MARCP8	EIF352	TMEM103	LGTN	RFP2	MAST2
Cluster4	LRR055	PARN	MANSD1	SETD4	BCAS2	NBPF3	HRB	KONK1	PONA	MDRNI	RABL3	RABL3	RG7	SPSB3	OFLAR
	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Cluster1	O12orf2	NUMB	BTBD10	KCTD14	PLEKHAI1	SLOC36A4	HIST1H2AA	OLDN3	RF22	SV2B	PVRL3	NDX4	O1orf57	CHRM5	HOMER1
Cluster2	PDE8D	LRR039	BGGALT3	KCTD13	GSK3B	PTGDS	STX1A	TPST1	GAD1	SLOC101	AKAP3	PTAFR	P2RY10	PPP1R3C	O1orf65
Cluster3	RNF128	VIL2	ANKRD5	EPS8	JAKMIP1	RPL10A	SMAP1	ZNF24	THEG	SLOC2A1	IGSF6	HNRPR	NARS	ODX2	O19orf4
Cluster4	DOP1B	ACTA1	RAP2A	DZIP1	NDUFS1	ZNF92	MRPS18A	O1orf2	PTRN	GNPTG	LPBGT1	KLHL26	PARVA	SLOC43A3	PRNP
	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
Cluster1	VPS41	PIPK2B	PRKG2	EIF354	GABARAPL2	KLF1	DUSP12	HIST1H4C	SOMM1	ING4	DLID5	FUSIP1	ZFYVE27	NFAP1	RNF182
Cluster2	MT1G	ASNA1													
Cluster3	TNF1	ZNF435	HIST1H4I	ZNF707	OY56R2	LRR049	RPL37A	ZNRF4	VAPA	TMEM74	DDX48	WOR47	VAMP4	PEA15	O1orf102
Cluster4	SUMO2	STGGALNAG1	ODD011	IL5	ZNF678										

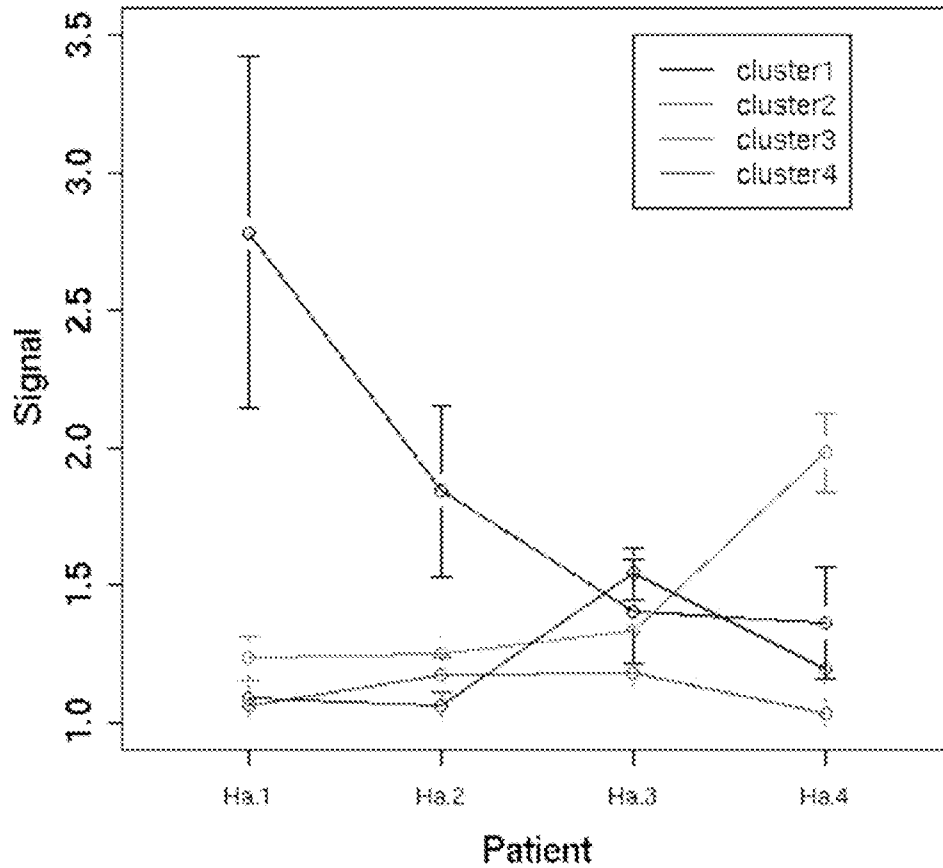
[7]

	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
Cluster1	SYT1	TMEM17	LRR034	S100A16	SYK	ZNF165	D19orf6	STX3A	DDH19	VPS37A	H2AFJ	UCP3	BDAP29	RAGTAP1	CHCHD6
Cluster2															
Cluster3	SPATA5	C2orf25	HMGNI	NUP35	SAMHD1	MSH4	KCNJ8	USP16	RPS13	TEKT4	FTS	EIF3S5	ITM2A	FBXO2	LHFP15
Cluster4															
	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105
Cluster1	TRAK2	RHOG	CHRNA7	DMTM8	RSP03	SLC37A4	ACE	GPSN2	USP10	DDX47	TIGD1	HIGD2A	DDX70	SFRS3	FUT11
Cluster2															
Cluster3	ELOF1	HST1H4E	SLC20A3	O1orf65	S100A13	EIF4E	SLC30A4	O21orf6	PSRD1	ODDD28B	VAMP2	PTPLA	OR6L	HST1H2BJ	ATP6V1G1
Cluster4															
	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
Cluster1	SLC7A11	BIRC5	ENPP2	NEURL	CYBA	GALM2	GPR17	SLC6A13	DGAT2	GDPD1	LUZP1	RTP4	DNAJC16	ODKL3	PLEKHB1
Cluster2															
Cluster3	RAD51AP1	RPS15	HST1H4	LRR05	FUS	DDX05	PPFBP2	ZNF433	HMG20B	DSNK2A1	TOMM34	CYSLTR1	TNFRSF10B	RPL17	NPM1
Cluster4															
	121	122	123	124	125	126	127	128	129						
Cluster1	ADAT2	PRND	POP2	FIS1	ARHGEF7	PHF13									
Cluster2															
Cluster3	STK33	PLEK2	IMPACT	HKR3	METTL1	HNRPA2B1	DATSPER1	DDOATL	VAMP8						
Cluster4															

[図8]

HsSYMBOL	Ha-1	Ha-2	Ha-3	Ha-4
GABARAPL2	18.8	11.2	9.9	11.0
SRP19	20.3	9.8	6.9	7.1
SMAP1	2.5	1.8	1.7	5.2
MAP1LC3B	27.9	13.9	6.2	5.0
ZNF668	4.2	3.3	3.3	4.9
SAFB2	4.1	2.8	2.5	4.7
LGTN	2.3	2.3	2.0	3.3
H1FX	8.5	5.8	2.4	2.9
CACYBP	4.7	3.4	2.4	2.6
PIP5K2B	5.0	2.9	2.0	2.6
PCNA	2.2	2.0	2.9	2.5
RBM34	7.1	3.9	2.0	2.4
C1orf63	6.6	3.3	2.1	2.4
JSRP1	6.1	3.9	1.9	2.4
KLF1	3.8	2.3	2.0	2.3

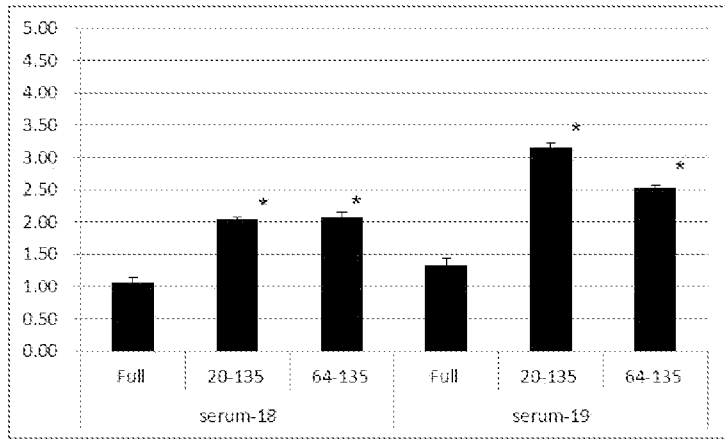
[圖9]



[圖10]

Cluster1	
GCID	Pvalue ExpCount Count Size Term
Amino acid transporter	GC:0006865 0.013 1.373 4 4 amino acid transport
	GC:0015849 0.013 1.373 4 4 organic acid transport
	GC:0051606 0.040 1.030 3 3 detection of stimulus
	GC:0005886 0.011 21.745 30 63 plasma membrane
	GC:0005275 0.013 1.364 4 4 amine transmembrane transporter activity
	GC:0015179 0.013 1.364 4 4 L-amino acid transmembrane transporter
Cluster2	
GCID	Pvalue ExpCount Count Size Term
Inflammation response, Carbohydrate metabolism, Steroid metabolism	GC:0044262 0.004 1.299 5 8 cellular carbohydrate metabolic process
	GC:0006954 0.006 1.948 6 12 inflammatory response
	GC:0006629 0.014 2.273 6 14 lipid metabolic process
	GC:0009605 0.029 2.598 6 16 response to external
	GC:0008202 0.032 0.812 3 5 steroid metabolic process
	GC:0044425 0.019 20.806 28 129 membrane part
GC:0016021 0.023 18.226 25 113 integral to membrane	
Cluster3	
GCID	Pvalue ExpCount Count Size Term
Translation, transcription, recombination	GC:0006310 0.012 1.343 4 4 DNA recombination
	GC:0006413 0.012 1.343 4 4 translational initiation
	GC:0032774 0.031 10.745 16 32 RNA biosynthetic process
	GC:0006350 0.036 11.753 17 35 transcription
	GC:0005840 0.027 4.235 8 13 ribosome
	GC:0003677 0.003 15.258 24 48 DNA binding
GC:0003723 0.006 6.993 13 22 RNA binding	
Cluster4	
GCID	Pvalue ExpCount Count Size Term
RNA catabolism	GC:0000184 0.026 0.325 2 2 mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay
	GC:0006401 0.026 0.325 2 2 RNA catabolic process

[図11]

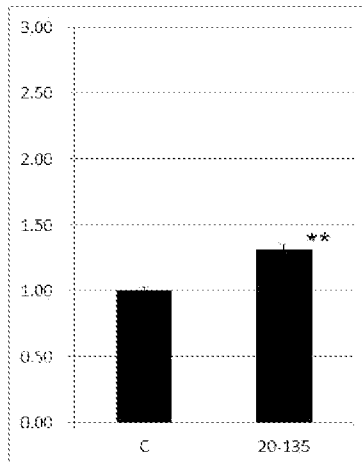
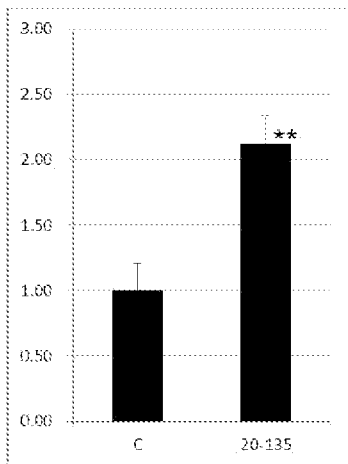


* p<0.01 vs Full constructs of IL5

[図12]

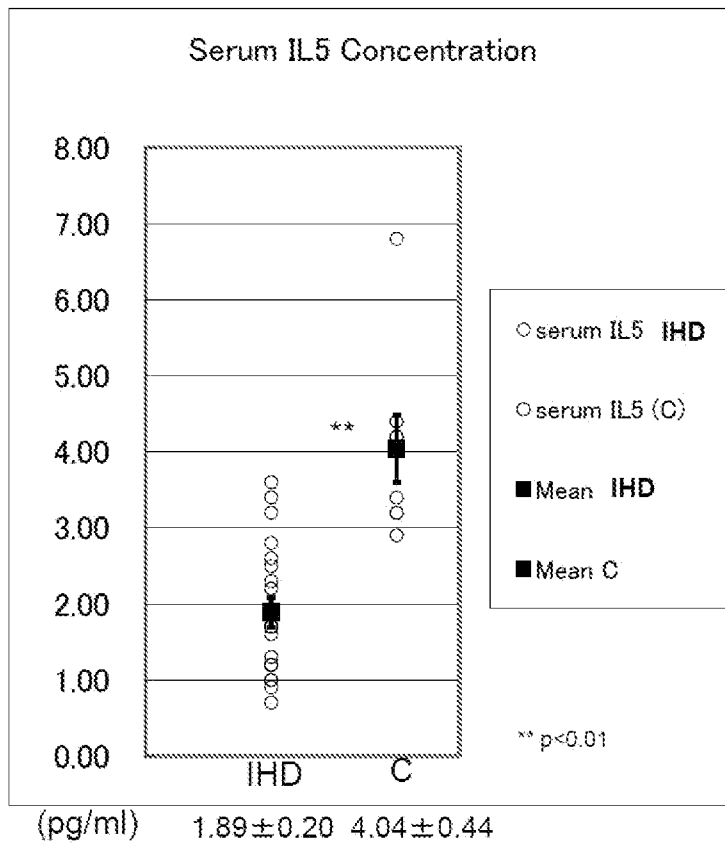
ASO(閉塞性動脈硬化症)
(n=60)

IHD(冠状動脈硬化症)
(n=20)



** p<0.01 vs control

[図13]



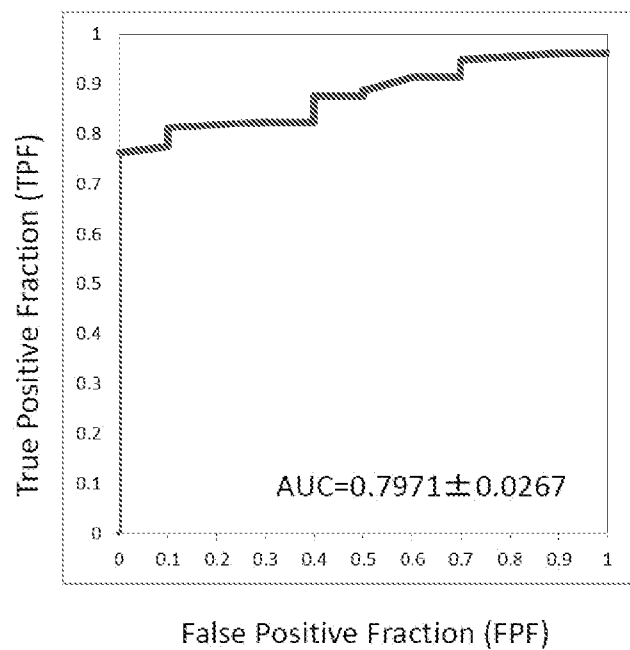
[図14]

抗IL5抗体価の受信者動作特性曲線(ROCカーブ)と感度・特異度

A

cut off v.	FPF	TPF
1.25	0	0.7625
1.24	0	0.7625
1.23	0.1	0.775
1.22	0.1	0.7875
1.21	0.1	0.8125
1.2	0.1	0.8125
1.19	0.1	0.8125
1.18	0.3	0.825
1.17	0.4	0.825
1.16	0.4	0.85
1.15	0.4	0.85
1.14	0.4	0.8625
1.13	0.4	0.875
1.12	0.5	0.875
1.11	0.5	0.8875
1.1	0.5	0.8875
1.09	0.5	0.8875
1.08	0.5	0.8875
1.07	0.6	0.9125
1.06	0.7	0.9125
1.05	0.7	0.9125
1.04	0.7	0.9125
1.03	0.7	0.9375
1.02	0.7	0.95
1.01	0.9	0.9625
1.00	1	0.9625

B



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/076450

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/53(2006.01) i, G01N21/64(2006.01) i, G01N33/543(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N33/53, G01N21/64, G01N33/543

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2009-544971 A (Inova Diagnostics, Inc.), 17 December 2009 (17.12.2009), claims & US 2008/0153115 A1 & US 2010/0311089 A1 & EP 2047263 A & WO 2008/013914 A2	1-8 (partial)
A	JP 2009-503529 A (XBiotech Inc.), 29 January 2009 (29.01.2009), claims & US 2009/0123415 A1 & EP 1915620 A & EP 2216653 A1 & WO 2007/015128 A1	1-8 (partial)
A	JP 2008-501636 A (Athera Biotechnologies AB.), 24 January 2008 (24.01.2008), claims & US 2007/0286868 A1 & EP 1735349 A & WO 2005/100405 A2	1-8 (partial)

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 03 February, 2012 (03.02.12)	Date of mailing of the international search report 21 February, 2012 (21.02.12)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/076450

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BINDER, C.J. et al., The role of natural antibodies in atherogenesis, J.Lipid Res., 2005, Vol.46, No.7, p.1353-1363	1-8 (partial)
A	Masato NOSE et al., "Nanchisei Kekkan'en ni Kansuru Chosa Kenkyu Musaibo Tanpakushitsu Goseikei ni yoru Jiko Kotai no Screening-ho to Kanben na ELISA-ho no Kakuritsu", Nanchisei Kekkan'en ni Kansuru Chosa Kenkyu Heisei 19 Nendo Sokatsu Buntan Kenkyu Hokokusho, 2008, pages 53 to 56	1-8 (partial)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/076450

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

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

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

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

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

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

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

Claims 1-8: The invention of claim 1 relates to a method for examining arteriosclerosis and a kit therefor. As the following documents 1-3 show, however, it has been publicly known to examine arteriosclerosis by detecting an autoantibody. Thus, the aforesaid matter cannot be considered as a special technical feature. In claim 1, 23 different proteins are presented. Although these proteins are classified into two groups, i.e., (1) a group consisting of proteins relating to cytokines, and (2) a group consisting of proteins relating to amino acid transporters, these proteins are a mass of proteins including not only cytokines *per se* but also various proteins. Therefore, it does not appear that these proteins are closely (continued to extra sheet)

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
The international search was made in relation to IL-5 in the inventions of claims 1-8.

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/076450

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

similar to one another, e.g., belonging to the same family. Accordingly, claim 1 has 23 invention groups that have special technical features relating respectively to 23 different proteins. Claims 9-24: The invention of claim 9 relates to a method for analyzing a protein, said protein participating in an autoimmune disease, and, therefore, does not have a technical feature relating to "a method for examining arteriosclerosis" comprising a specific protein.

Thus, it is considered that the present application has 24 invention groups.

Document 1: JP 2009-544971 A

Document 2: JP 2009-503529 A

Document 3: JP 2008-501636 A

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. G01N33/53(2006.01)i, G01N21/64(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. G01N33/53, G01N21/64, G01N33/543

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの
 日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2012年
 日本国実用新案登録公報 1996-2012年
 日本国登録実用新案公報 1994-2012年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2009-544971 A (イノヴァ ダイアグノスティクス インコーポ レイテッド) 2009.12.17, 【特許請求の範囲】 & US 2008/0153115 A1 & US 2010/0311089 A1 & EP 2047263 A & WO 2008/013914 A2	1-8 (部分的)
A	JP 2009-503529 A (エクスパイオテク インコーポレーティッド) 2009.01.29, 【特許請求の範囲】 & US 2009/0123415 A1 & EP 1915620 A & EP 2216653 A1 & WO 2007/015128 A1	1-8 (部分的)

C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 03.02.2012	国際調査報告の発送日 21.02.2012
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 赤坂 祐樹 電話番号 03-3581-1101 内線 3252
	2 J 4636

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2008-501636 A (アテラ バイオテクノロジーズ エービー) 2008.01.24, 【特許請求の範囲】 & US 2007/0286868 A1 & EP 1735349 A & WO 2005/100405 A2	1-8 (部分的)
A	BINDER, C. J. et al., The role of natural antibodies in atherogenesis, J. Lipid Res., 2005, Vol. 46, No. 7, p. 1353-1363	1-8 (部分的)
A	能勢眞人 他, 難治性血管炎に関する調査研究 無細胞タンパク質合 成系による自己抗体のスクリーニング法と簡便なELISA法の確立, 難 治性血管炎に関する調査研究 平成 19 年度 総括・分担研究報告書, 2008, Page. 53-56	1-8 (部分的)

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

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

1. 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

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

請求項1-8について：請求項1に係る発明は、動脈硬化を検査する方法及びキットの発明である。しかしながら、自己抗体を検出することによって、動脈硬化を検査することは下記文献1-3に記載されているように公知の事項であるから、当該事項は特別な技術的特徴ではない。そして、請求項1には、23の異なるタンパク質が記載されている。これらタンパク質は(1) サイトカインに関与するタンパク質群、(2) アミノ酸輸送体に関与するタンパク質群と分類されているもののサイトカイン自体だけではなく、様々なタンパク質が含まれる集合であり、同一のファミリーに属する等、類似するタンパク質であるものとは認められない。したがって、請求項1には、23の異なるタンパク質からなる特別な技術的特徴を有する23の発明(群)が含まれる。請求項9-24について：請求項9に係る発明は、自己免疫疾患に関与するタンパク質の解析方法であって、特定のタンパク質を含む「動脈硬化を検査する方法」を技術的特徴として有するものではない。

したがって、本願発明は、24の発明群を有するものと認められる。

文献1：JP 2009-544971 A 文献2：JP 2009-503529 A 文献3：JP 2008-501636 A

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

国際調査は、請求項1-8に係る発明のIL-5に関して行った。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。