

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02007/139224

発行日 平成21年10月15日(2009.10.15)

(43) 国際公開日 平成19年12月6日(2007.12.6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/92 (2006.01)	GO 1 N 33/92	Z
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48	H
GO 1 N 30/88 (2006.01)	GO 1 N 30/88	N

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 20 頁)

出願番号 特願2008-517998 (P2008-517998)	(71) 出願人 503360115 独立行政法人科学技術振興機構 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2007/061246	
(22) 国際出願日 平成19年5月26日(2007.5.26)	
(31) 優先権主張番号 特願2006-149328 (P2006-149328)	(74) 代理人 100092783 弁理士 小林 浩
(32) 優先日 平成18年5月30日(2006.5.30)	(74) 代理人 100095360 弁理士 片山 英二
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	(74) 代理人 100104282 弁理士 鈴木 康仁
	(72) 発明者 井ノ口 仁一 宮城県仙台市泉区高森5丁目9-7
	Fターム(参考) 2G045 AA25 BB03 CA25 CA26 DA60 DA77 FA36 FB03 FB06

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インスリン抵抗性病態を示す疾患の検出方法

(57) 【要約】

本発明は、簡便なインスリン抵抗性疾患、特に2型糖尿病の病態検出法を提供する。

本発明は生体から分離した血液試料中のガングリオシドGM3を定量することを含む、インスリン抵抗性疾患、特に2型糖尿病の検出方法を提供する。より詳しくは、(a)採取したヒト血液から血漿又は血清を分離する工程、(b)分離した血漿又は血清中のガングリオシドGM3を定量する工程、及び(c)定量したGM3量を健常人由来の血液試料における平均的ガングリオシドGM3量と比較する工程を含むインスリン抵抗性疾患、特に2型糖尿病の検出方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生体から分離した血液試料中のガングリオシド GM 3 を定量することを含む、インスリン抵抗性病態を示す疾患の検出方法。

【請求項 2】

生体から分離した血液試料がヒトから分離したものである、請求項 1 記載の検出方法。

【請求項 3】

ヒトから分離した血液試料がヒト血漿又は血清である、請求項 2 記載の検出方法。

【請求項 4】

(a) 採取したヒト血液から血漿又は血清を分離する工程、
 (b) 分離した血漿又は血清中のガングリオシド GM 3 を定量する工程、及び
 (c) 定量した GM 3 量を健常人由来の血液試料における平均的ガングリオシド GM 3 量と比較する工程、
 を含む、請求項 1 記載の検出方法。

10

【請求項 5】

前記ガングリオシド GM 3 の定量を、高速液体クロマトグラフィー (H P L C)、高性能薄層クロマトグラフィー (H P T L C)、高速液体クロマトグラフィー - 質量分析 (L C - M S)、ガスクロマトグラフィー - マススペクトロメトリー (G C - M S) または抗 GM 3 抗体を用いた酵素免疫複合体測定法 (E L I S A) によって行う、請求項 4 記載の検出方法。

20

【請求項 6】

インスリン抵抗性病態を示す疾患が 2 型糖尿病、高脂血症、高血圧または肥満である、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の検出方法。

【請求項 7】

インスリン抵抗性病態を示す疾患が 2 型糖尿病である、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の検出方法。

【請求項 8】

被験者から採取した血液試料中のガングリオシド GM 3 量の変動を調べることによってインスリン抵抗性病態を示す疾患の発症リスクを予測する方法。

【請求項 9】

被験者から分離した血液試料がヒト血漿又は血清である、請求項 8 記載の方法。

30

【請求項 10】

(a) 採取したヒト血液から血漿又は血清を分離する工程、
 (b) 分離した血漿又は血清中のガングリオシド GM 3 を定量する工程、及び
 (c) 工程 (b) で測定したガングリオシド GM 3 量と、被験者の正常時の血中ガングリオシド GM 3 量とを比較する工程、
 を含む、請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

前記ガングリオシド GM 3 の定量を、高速液体クロマトグラフィー (H P L C)、高性能薄層クロマトグラフィー (H P T L C)、高速液体クロマトグラフィー - 質量分析 (L C - M S) ガスクロマトグラフィー - マススペクトロメトリー (G C - M S) または抗 GM 3 抗体を用いた酵素免疫複合体測定法 (E L I S A) によって行う、請求項 10 記載の方法。

40

【請求項 12】

被験者から定期的に血液試料を採取し、採取した血液試料中のガングリオシド GM 3 量の変動をモニターする、請求項 8 記載の方法。

【請求項 13】

インスリン抵抗性病態を示す疾患が 2 型糖尿病、高脂血症、高血圧または肥満である、請求項 8 ~ 12 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

50

インスリン抵抗性病態を示す疾患が2型糖尿病である、請求項8～12のいずれかに記載の方法。

【請求項15】

標準物質としてのガングリオシドを含有する、インスリン抵抗性病態を示す疾患の検出キット

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、インスリン抵抗性病態を示す疾患、特に2型糖尿病の検出方法に関し、より詳しくは血中ガングリオシドGM3量を測定することによる2型糖尿病の検出方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

糖尿病は現在生活習慣病の中核として現代の国民病と呼ばれ、その予防・治療方法の開発は急務である。糖尿病の発症機構は解明されていないが、血糖を低下させるホルモンであるインスリンの不足(インスリン分泌不全)とインスリン作用障害(インスリン抵抗性)という2つの病態が混在していると言われている。また、通常、糖尿病は、(1)インスリンをつくる膵臓の細胞まで破壊され、インスリンを補充し続けなければならない1型；(2)インスリンの分泌不足やインスリンの働きが悪くなっている2型；(3)特定の原因によるその他の糖尿病；(4)妊娠糖尿病等に分類されている。

20

1型糖尿病は、自己免疫疾患の一つであり、臨床的にインスリン依存型糖尿病と呼ばれることもある。1型糖尿病では、インスリンを分泌する膵臓の細胞が自己の免疫系から攻撃を受け破壊される。インスリンは、血液中の糖を細胞に吸収させ、血糖値を下げる働きをもっているホルモンで、その分泌が減ると、血液中の糖は増え、細胞中の糖は不足する。この状態が続くと、細胞は生命活動を維持できなくなるので、さまざまな臓器障害、失明や足の壊死がもたらされることになる。1型糖尿病のモデルマウスは公知であり、そのモデルマウスを用いて1型糖尿病の治療に関する研究も進んでいる(例えば、Science、2003 Nov 14；302(5648)：1223-7参照)。

2型糖尿病は、臨床的視点からインスリン非依存型糖尿病と呼ばれることもあり、膵臓の細胞におけるインスリン分泌不全と、インスリン抵抗性とによって発症する。インスリン分泌不全とインスリン抵抗性のどちらが強く関わっているかは個々の症例あるいは各症例の経過によって異なるが、混在していることも多い。インスリン分泌不全は、正常な場合は、食事をとりブドウ糖が吸収され血糖値が上がり始めると、それに対応して瞬時にインスリンが分泌されるが、インスリン分泌不全の状態では、この反応が欠如し、血糖の上昇に遅れてインスリンが分泌される。

30

2型糖尿病は、インスリン作用の相対的な不足が原因で発症する。多くの場合、全身のインスリン抵抗性が認められるが、以前は経験的にしか理解されていなかった肥満、過食あるいは運動不足と全身のインスリン抵抗性発症の関連性が、最近になって、分子レベルで解明されてきた。インスリン抵抗性は、「インスリン感受性の細胞または臓器が生理的レベルのインスリンに対する反応性が低下している状態」と定義され、2型糖尿病の病態生理の最も上流に位置する。

40

これまで、単なるエネルギー貯蔵臓器としてしか捉えられてこなかった脂肪組織は、実はアディポサイトカインと総称される多彩な生理活性物質を産生する生体最大の内分泌臓器であることが知られるようになってきた。特に、肥満における内蔵脂肪の過剰蓄積に伴う脂肪細胞の機能異常、すなわちアディポサイトカインの分泌異常(例えば、炎症性サイトカインTNFの過剰分泌やアディポネクチンの分泌低下など)が、インスリン抵抗性を惹起し2型糖尿病や動脈硬化性疾患の多彩な病態の成因として重要な役割を果たしていることが明らかにされている。最近、白色脂肪組織においてマクロファージが浸潤され脂肪組織中に侵入し炎症性サイトカインを分泌し、その結果インスリン抵抗性を惹起することが見いだされ、脂肪組織に潜在する骨髓系細胞の病態生理が注目されている。

50

インスリン受容体はガングリオシド(スフィンゴ糖脂質)、スフィンゴミエリン、コレステロールなどの相転移温度が高い脂質群が集積して形成される細胞膜カベオラマイクロドメインに存在している。脂肪組織の主要なガングリオシドはGM3と呼ばれるものである。TNFで刺激した脂肪細胞や典型的な肥満糖尿病モデル動物の脂肪組織では、ガングリオシドGM3およびその合成酵素遺伝子の発現が著しく増加している事が報告されている(Tagami et al. J. Biol. Chem. Vol. 277, 3085-3092, 2002)。また、インスリン代謝性シグナルの欠損とGM3の過剰蓄積によるインスリン受容体のマイクロドメインからの解離との関係についても報告されている(Kabayama et al. Glycobiology Vol. 15, 21-29, 2005)。

10

一方、現在2型糖尿病の血液診断は、一般的に血糖値、HbA1c値、グリコアルブミン値などを指標に診断されている。血糖値は、血液中のブドウ糖濃度を測定した値である。HbA1cは、赤血球のヘモグロビンにブドウ糖が結合した糖化タンパク質を意味し、これが全ヘモグロビンに対してどのような割合で存在するかを測定する。赤血球寿命(120日)から、過去1乃至2ヶ月の血糖コントロール状態を反映するものと考えられる。

また、グリコアルブミン(GA)は、アルブミンの半減期が17日であるため、過去2週間から1ヶ月の血糖コントロール状態を反映すると考えられる。HbA1cと比較すると、早く大きな変動を観察できるので、治療効果の把握、薬剤投与量の指標として有用である。

しかし、2型糖尿病の病状を正確に把握するためには、これらの測定方法を組み合わせる必要がある。

20

また、原島らは、特開2005-253434号公報において、各種遺伝子の発現解析による診断方法を開示している。しかし、この方法の場合、各種遺伝子の発現解析を要するもので簡便な操作で診断をすることはできない。

【発明の開示】

【0003】

上記のような状況において、より簡便かつ正確な2型糖尿病の検出方法の開発が望まれている。

本発明者は、2型糖尿病の検出方法について鋭意研究した結果、血中ガングリオシドGM3の定量によって、簡便にインスリン抵抗性病態を示す疾患、特に2型糖尿病を検出することができることを見出し、本発明を完成させた。すなわち、本発明は以下に示す、インスリン抵抗性病態を示す疾患の検出方法、インスリン抵抗性病態を示す疾患発症リスクの予測方法などを提供する。

30

(1) 生体から分離した血液試料中のガングリオシドGM3を定量することを含む、インスリン抵抗性病態を示す疾患の検出方法。ここで、「インスリン抵抗性病態を示す疾患」とは、インスリンの代謝性シグナルが抑制され、インスリン非依存性となった病態を示す疾患をいい、例えば2型糖尿病、高脂血症、高血圧、肥満等を含む。以下、「インスリン抵抗性病態を示す疾患」を「インスリン抵抗性疾患」と略記することもある。

(2) 生体から分離した血液試料がヒトから分離したものである、上記(1)記載のインスリン抵抗性病態を示す疾患の検出方法。

40

(3) ヒトから分離した血液試料がヒト血漿又は血清である、上記(2)記載のインスリン抵抗性病態を示す疾患の検出方法。

(4) (a) 採取したヒト血液から血漿又は血清を分離する工程、

(b) 分離した血漿又は血清中のガングリオシドGM3を定量する工程、及び

(c) 定量したGM3量を健常人由来の血液試料における平均的ガングリオシドGM3量と比較する工程、

を含む、上記(1)記載のインスリン抵抗性病態を示す疾患の検出方法。

(5) 前記ガングリオシドGM3の定量を、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、高性能薄層クロマトグラフィー(HPTLC)、高速液体クロマトグラフィー-質量分析(LC-MS)またはガスクロマトグラフィー-マススペクトロメトリー(GC-MS)

50

によって行う、上記(4)記載のインスリン抵抗性病態を示す疾患の検出方法。

(6)インスリン抵抗性病態を示す疾患が2型糖尿病、高脂血症、高血圧または肥満である、上記(1)~(5)のいずれかに記載のインスリン抵抗性病態を示す疾患の検出方法。

(7)インスリン抵抗性病態を示す疾患が2型糖尿病である、上記(1)~(5)のいずれかに記載のインスリン抵抗性病態を示す疾患の検出方法。

(8)被験者から採取した血液試料中のガングリオシドGM3量の変動を調べることによってインスリン抵抗性病態を示す疾患の発症リスクを予測する方法。

(9)被験者から分離した血液試料がヒト血漿又は血清である、上記(8)記載のインスリン抵抗性病態を示す疾患の発症リスクを予測する方法。

(10)(a)採取したヒト血液から血漿又は血清を分離する工程、

(b)分離した血漿又は血清中のガングリオシドGM3を定量する工程、及び

(c)工程(b)で測定したガングリオシドGM3量と、被験者の正常時の血中ガングリオシドGM3量とを比較する工程、

を含む、上記(9)記載のインスリン抵抗性病態を示す疾患の発症リスクを予測する方法。

(11)前記ガングリオシドGM3の定量を、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、高性能薄層クロマトグラフィー(HPTLC)、高速液体クロマトグラフィー-質量分析(LC-MS)、ガスクロマトグラフィー-マススペクトロメトリー(GC-MS)または抗GM3抗体を用いた酵素免疫複合体測定法(ELISA)によって行う、上記(10)記載のインスリン抵抗性病態を示す疾患の発症リスクを予測する方法。

(12)被験者から定期的に血液試料を採取し、採取した血液試料中のガングリオシドGM3量の変動をモニターする、上記(8)記載のインスリン抵抗性病態を示す疾患の発症リスクを予測する方法。

(13)インスリン抵抗性病態を示す疾患が2型糖尿病、高脂血症、高血圧または肥満である、上記(8)~(12)のいずれかに記載のインスリン抵抗性病態を示す疾患の発症リスクを予測する方法。

(14)インスリン抵抗性病態を示す疾患が2型糖尿病である、上記(8)~(12)のいずれかに記載のインスリン抵抗性病態を示す疾患の発症リスクを予測する方法。

(15)標準物質としてのガングリオシドを含有する、インスリン抵抗性病態を示す疾患の検出キット。

【図面の簡単な説明】

【0004】

図1は、血漿中のGM3量を定量した結果を表す。

図2は、血漿中のGM3値とGA値の相関関係を調べた結果を表す。

図2Aは、健常人の血漿中のGM3値とGA値の相関関係を調べた結果を表す。

図2Bは、2型糖尿病患者の血漿中のGM3値とGA値の相関関係を調べた結果を表す。

図3は、BMI値とGM3値(A)、およびアディポネクチン値(B)の相関関係を示す。GM3値は図1と同様に測定し、血漿アディポネクチンは、アディポネクチン測定キット(大塚製薬株式会社試薬診断薬事業部：<http://www.otsuka.co.jp/shindan/kenkyu/mouse/index.html>)を用いて行った。

【発明を実施するための最良の形態】

【0005】

1.発明の概要

現在、2型糖尿病の血液診断は、血糖値、HbA1c値、グリコアルブミン値などの測定により行われている。本発明者は、2型糖尿病/肥満モデル動物では、正常動物に比較して、ガングリオシドGM3の著しい発現増加が起きており、さらに、このGM3の増加はインスリン抵抗性の原因となっている可能性を見出した。すなわち、インスリン抵抗性

10

20

30

40

50

の病態を示す生活習慣病、例えば2型糖尿病、高脂血症、高血圧、あるいは肥満などへのGM3の関与が示唆された。この知見を基に、ヒトの血漿中のガングリオシドを分析したところ、ガングリオシドGM3が有意に増加していることが明らかとなり、この結果から新規のインスリン抵抗性病態を示す疾患、特に2型糖尿病の診断方法を開発した。

より詳しく述べると、血液中の血球成分を除いた血漿または血清中には、ガングリオシドGM3を主成分として、GD3、GD1a、GM2およびGT1bなどが存在していることが知られている(Arch. Biochem. Biophys. vol. 238, 388-400, 1985, Eur. J. Biochem. 181, 657-662)。また、血漿または血清中のガングリオシド量は、自己免疫疾患(Sera et al., J. Neurological Sciences, vol. 52, 143-148, 1982)や胃がん(J. Clin. Lab. Anal. Vol. 3, 301-306, 1989)で増加傾向が認められることが報告されているが、2型糖尿病患者におけるガングリオシドに関する報告は現在までない。さらに、血漿または血清中のガングリオシドの由来は肝臓やマクロファージなどの血球系細胞が推定(Bergelson, Immunology Today, vol. 16, 483-486, 1995)されているが明確ではなかった。従って、肥満およびインスリン抵抗性状態における脂肪細胞または脂肪組織のガングリオシドGM3発現の増加が血液試料において検知し得るか否かは全く不明であった。このような状況で、本発明者は、インスリン抵抗性病態を示す疾患、特にヒト2型糖尿病の患者の血漿中には、ガングリオシドGM3が高値かつ血液中のガングリオシド分子群の中でも選択的に増加していることを見いだしたものである。さらに、ヒト2型糖尿病の患者の血漿中のガングリオシドGM3量の増加は、高血糖のパラメーターとは相関せず、2型糖尿病をはじめとする複雑なメタボリック症候群の病態を新たな角度から検出することが出来る新規な診断方法として有用であることを見だし、本発明を完成させたものである。以下、2型糖尿病を標的として、詳細に記述する。

2. インスリン抵抗性疾患の検出・診断方法

まず、本発明は、生体から分離した血液試料中のガングリオシドGM3を定量することを含む、インスリン抵抗性病態を示す疾患、特に2型糖尿病の検出方法を提供する。ガングリオシドとは、シアル酸残基を含むスフィンゴ糖脂質の総称をいい、哺乳動物の細胞壁の成分である。血漿中のガングリオシドとしてはGM3が最も多く存在し、続いてGD3、GD1a、GM2、GT1bなどが存在することが知られているが(Senn et al., Eur. J. Biochem. 181, 657-662, 1989)、本発明は、その内、GM3の血中量を指標としてインスリン抵抗性疾患の検出を行うものである。インスリン抵抗性疾患としては、2型糖尿病、高脂血症、高血圧、肥満等をあげることができる。特に、高脂血症を伴う2型糖尿病の検出には有効である。

本発明の検出方法は、ヒトの診断方法に限定されず、ネコ、ウサギ、ヒツジ、イヌ、サル、ウマ、ウシなどの哺乳動物の診断に適用することができる。しかしながら、インスリン抵抗性疾患の診断方法は生活習慣病であり、本発明の検出方法は特にヒトにおける診断を対象としている。この場合は、ヒトから分離した血液試料を用い、好適にはヒト血漿又はヒト血清を血液試料として診断に用いる。

より具体的には、本発明は、

- (a) 採取したヒト血液から血漿又は血清を分離する工程、
- (b) 分離した血漿又は血清中のガングリオシドGM3を定量する工程、及び
- (c) 定量したGM3量を健常人由来の血液試料における平均的ガングリオシドGM3量と比較する工程、

を含む、インスリン抵抗性病態を示す疾患、特に2型糖尿病の検出方法を提供する。

ここで「ヒト」とは健常者および被験者の両者を指し、両者から得られた結果を比較することにより、インスリン抵抗性病態を示す疾患、特に2型糖尿病の是非を診断することができる。「被験者」とは、本発明の診断を受ける対象者をいい、インスリン抵抗性病態を示す疾患、特に2型糖尿病患者および2型糖尿病の疑いがある患者を含む。

また、「健常人由来の血液試料における平均的ガングリオシドGM3量」は、その地域

、国など特定の領域に在住の健常人をランダムに抽出し、それらの健常人の血中ガングリオシドGM3量を測定することによって求めることができる。一般的に、健常人由来の血液試料における平均的ガングリオシドGM3量は、 $3.0 \sim 6.5 \text{ nmol/ml}$ の範囲に入るので、この数値を指標として、被験者がインスリン抵抗性病態を示す疾患、特に2型糖尿病患者であるか、2型糖尿病の疑いがある患者であるか診断することができる。

まず、上記工程(a)において、採取したヒト血液から血漿又は血清を分離する。血液試料から血漿又は血清を分離する方法は、当業者に既知の方法、例えば、臨床検査技術学第3版(菅野剛史・松田信義著、医学書院)に記載の方法(真空採血またはシリンジ採血)を用いることができる。具体的には、全血をEDTA添加採血管に採取し、転倒混和後、 $1,500 \times g$ 、10分間遠心することによって、全血から血漿を分離することができる。また、全血を血清分離剤の入った採血用試験管に採取し、転倒混和後、室温で20分間放置後、上記と同様に遠心分離後、上清を採取し、血清を得ることが出来る。測定対象となる血液試料は、前処理を行うことによって、より高感度かつ、より高精度な測定が可能となるので、適当な方法によって前処理してから測定を行うことが好ましい。前処理においては、例えば、遠心分離、有機溶剤等による除蛋白、有機溶剤による抽出、酸または塩基による振分け、アミノプロピルカラムの利用等を挙げることができる。

次に、工程(b)において、工程(a)において分離した血漿又は血清中のガングリオシドGM3を定量する。ガングリオシドGM3の定量は、特にこれに限定するわけではないが、例えば、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、高性能薄層クロマトグラフィー(HPTLC)、高速液体クロマトグラフィー-質量分析(LC-MS)、ガスクロマトグラフィー-マススペクトロメトリー(GC-MS)または抗GM3抗体を用いた酵素免疫複合体測定法(ELISA)によって行うことができる。本発明においては、特に、高性能薄層クロマトグラフィー(HPTLC)が好適である。

血漿または血清中のガングリオシドGM3の定量は、例えば、(1)血漿又は血清からガングリオシド画分を精製し、(2)そのガングリオシド画分を、例えば、高性能薄層クロマトグラフィーによって展開し、ガングリオシドGM3量を測定することによって実施することができる。

血漿又は血清からガングリオシド画分を精製する方法としては、公知の方法を用いることができる。そのような公知の方法として、Ladisichらの方法(Anal. Biochem. Vol. 146, 220-231, 1985; Methods in Enzymology vol 138, 300-306, 1987)を用いることができる。より具体的には、後述する実施例に記載の方法によって血漿又は血清からガングリオシド画分を精製することができる。

また、ガングリオシド画分は、高性能薄層クロマトグラフィーにて展開し、それぞれの成分に分離することができる。血漿中には、ガングリオシドGM3を主成分として、GD3、GD1a、GM2およびGT1bなどが存在しており、これらは例えば、メルク社製の高性能薄層シリカゲルクロマトグラフィー用プレートに、スポットし、当業者に既知の展開溶媒、例えば、クロロホルム：メタノール：0.2%塩化カルシウムの比率が55：45：10(v/v)または50：35：8(v/v)を用いて、室温で展開し、分離することができる。展開後に検出された成分のスポットは、例えば、島津製作所製フライングスポットスキャナーのようなデンストメーターを用いて、あるいはイメージアナライザーにより定量することができる。本発明においては、デンストメーターを用いる方法が望ましい。

さらに、工程(c)においては、工程(b)において定量したGM3量を健常人由来の血液試料における平均的ガングリオシドGM3量と比較する。健常人由来の血液試料における平均的ガングリオシドGM3量は、 $3.0 \sim 6.5 \text{ nmol/ml}$ の範囲に入るので、この上限を超えた場合は、インスリン抵抗性疾患、例えば2型糖尿病に罹患している、あるいは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

3. インスリン抵抗性疾患発症リスクを予測する方法

次に、本発明は、被験者から採取した血液試料中のガングリオシドGM3量の変動を調

10

20

30

40

50

べることによってインスリン抵抗性疾患、特に2型糖尿病の発症リスクを予測する方法を提供する。

上述のインスリン抵抗性疾患の検出方法は、健常人の血中ガングリオシドGM3量と比較することによってインスリン抵抗性疾患、特に2型糖尿病を検出する方法に関する。しかしながら、種々の遺伝子、タンパク質などの発現レベルには個人差がある。したがって、そのような個人差を考慮した場合は、健常人の血中ガングリオシドGM3量と比較するよりも、自己の血中ガングリオシドGM3量を定期的に測定し、その血中ガングリオシドGM3量の変動をモニターすることによって、インスリン抵抗性疾患、特に2型糖尿病の発症リスク、あるいはインスリン抵抗性疾患、特に2型糖尿病に罹患しているか否かを判断したほうがよりの確な場合もあり得る。そこで、この実施態様においては、自己の血中ガングリオシドGM3量の変動を調べることによってインスリン抵抗性疾患、特に2型糖尿病の発症リスクを予測する。

10

血中ガングリオシドGM3量の定量は上述した方法によって行うことができる。本発明においては、定期的（例えば、3ヶ月毎、6ヶ月毎、1年毎）に血中ガングリオシドGM3量を測定し、正常時より、例えば、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上または50%以上血中ガングリオシドGM3量が増加した場合に、インスリン抵抗性疾患、特に2型糖尿病の発症リスクがある、あるいはインスリン抵抗性疾患、特に2型糖尿病に罹患していると予測することができる。

ここで、例えば2型糖尿病の発症リスクがある、あるいは2型糖尿病に罹患していると予測された場合は、さらに、その他の2型糖尿病の診断方法によって総合的に診断し、2型糖尿病に罹患しているか否か診断することもできる。

20

このようなインスリン抵抗性疾患発症リスクを予測する方法によって、簡便な方法で早期にインスリン抵抗性疾患、特に2型糖尿病の発症リスクを検知し、2型糖尿病の発症を予防することが可能となる。

4. インスリン抵抗性疾患、特に2型糖尿病検出キット

本発明はさらに、上記の方法を用いることを特徴とする、インスリン抵抗性疾患、特に2型糖尿病の検出キットを提供する。本発明のキットには、使用説明書のほか、標準物質としてGM3、GD3、GD1a、GM2およびGT1bを含有することができる。また、GM1、シアリルパラグロボシド等の他のガングリオシドを含有してもよい。また、高性能薄層シリカゲルクロマトグラフィー用プレート、展開溶媒とするための原液（クロロホルム、メタノール、塩化カルシウム水溶液等）を含有できる。

30

【実施例】

【0006】

以下本発明を実施例に基づいて詳細に説明する。

本研究目的のインフォームドコンセントによって同意を得られた、表1に示した健常人群（n=14）および2型糖尿病群（n=14）の健常人および2型糖尿病患者から血液を採取し、血漿を得、以下のようにガングリオシド分画を精製し、高性能薄層クロマトグラフィー（HPTLC）で展開後、分析した。

【表 1】

表 1 本研究で用いた健常人および2型糖尿病患者血漿中の血糖値、HbA1c値およびGA値

	健常人 (n=14)	糖尿病患者群(n=14)
血糖値(mg/dl)	111±13	211±27
HbA1c (%)	5.0±0.4	9.6±1.9
GA 値 (%)	14.7±2.4	31.5±5.0

(平均値±標準偏差)

表 1 は、図 1 および図 2 で血漿 GM 3 を分析した健常人および 2 型糖尿病患者サンプルの血糖値、HbA1c および GA 値を示す。

まず、採取した血液にエチレンジアミン 4 酢酸塩 (EDTA) を添加し、混和後、1500 x g で遠心し、その上清を採取することによって血漿を得た。

次に、血漿に 100% エタノールを加えて終濃度を 70% とし、1,000 rpm で、5 分間遠心して上清を回収した。その後、再度沈殿に 10 倍量の 70% エタノールを加えて、70 で 10 分間インキュベートした。同様に 1,000 rpm で 5 分間遠心して上清を回収し、初めの抽出液と合わせてロータリーエバポレーターを用いて窒素乾固して総抽出物とした。

ガングリオシドの精製は Ladisch の方法 (Anal. Biochem. Vol. 146, 220-231, 1985; Methods in Enzymology vol. 138, 300-306, 1987) によって行った。

具体的には、得られた総抽出物にジイソプロエーテル/ブタノール (3:2) を 6 ml 添加し、1 分間超音波処理を施した。50 mM NaCl を 3 ml 添加し、激しく攪拌 (30 秒間 x 2) した。1,200 rpm で 5 分間遠心後、有機溶媒層を除去した。水層に再度ジイソプロエーテル/ブタノール (3:2) を 6 ml 添加し、同様に激しく攪拌後、遠心して有機溶媒層を除去した。残った水層には 50 mM NaCl を 5 ml 添加して注射筒に装着した Sep-Pak (登録商標) C18 (逆相クロマトグラフィー) に全ての溶液を添加し、精製水 40 ml により脱塩操作を行なった。メタノール 10 ml、クロロホルム/メタノール (1:1) 10 ml の順に溶出し、エバポレーターで濃縮し、ガングリオシド画分を調製した。

得られたガングリオシド画分は組織 0.2 g 分全量を HPTLC プレートにスポットし、展開を行なった。展開溶媒はクロロホルム/メタノール/0.5% CaCl₂ (60:40:9) を使い、発色試薬としてオルシノール硫酸試薬 (120、10 分間) を使用した。検出後、デンシトメーターにより定量した。その結果を図 1 に示す。

図 1 に示したように、血漿中の主要なガングリオシドである GM 3 量を定量したところ、糖尿病患者群は健常人群に比較して有意な高値を示した。一方、その他のガングリオシド分子である GD 3、GD 1a、GM 2 および GT 1b などは HPTLC プレート上では有意な変化を認めなかった。従って、2 型糖尿病などの生活習慣病病態では、血漿中の GM 3 レベルが健常人と比較して有意な高値を示すことが明らかになった。したがって、血漿中の GM 3 量は 2 型糖尿病患者で有意に高く 2 型糖尿病の新たなマーカーである。

次に、表 1 に示した健常人群または 2 型糖尿病患者群のそれぞれの群内で個々の GA 値と GM 3 レベルの相関性を検討した。その結果を図 2 に示す。

図 2 に示したように、健常人群および 2 型糖尿病患者群いずれの群においても両者の相関関係は低かった。また、血糖値と GM 3 レベルも健常人群および 2 型糖尿病患者群にお

10

20

30

40

50

いて相関性は認められなかった。これらの結果から、血漿のガングリオシドGM3レベルは2型糖尿病患者で有意な高値を示すが、高血糖のパラメーターであるGA値や血糖値との相関性は無いことが明らかとなった。従って、2型糖尿病患者におけるGM3レベルの測定は、複雑なメタボリック症候群の病態を新たな角度から検出することが出来る新規な検出法として有用であることが明らかとなった。

以上の結果から、表1に示したようなコントロール不良な2型糖尿病患者群(HbA1c: 9.6 ± 1.9 GA値: 31.5 ± 5.0)で有意な血清GM3レベルの上昇が明らかになったことから、比較的軽度の2型糖尿病患者群における検討を行った。この際、表2に示すように「健常人」、「2型糖尿病」、「高脂血症」および「2型糖尿病+高脂血症」の各群を比較した。

【表2】

表2

	健常人	糖尿病	高脂血症	糖尿病+高脂血症
GM3($\mu\text{g/mL}$)	5.7 ± 2.5	7.7 ± 4.1	8.0 ± 2.3	8.9 ± 3.4
血糖値(mg/dL)	99 ± 10	142 ± 33	98 ± 7	151 ± 46
HbA1c(%)	5.3 ± 0.3	7.4 ± 1.6	5.2 ± 0.4	7.3 ± 1.0
HOMA-R値	1.1 ± 0.5	1.3 ± 0.6	1.6 ± 0.9	3.0 ± 2.1

表2中、「健常人」、「2型糖尿病」、「高脂血症」および「2型糖尿病+高脂血症」の血清中のGM3値、血糖値、HbA1c値、ならびにHOMA-R(インスリン抵抗性の指標)値を示した。

その結果、2型糖尿病患者群(HbA1c: 7.4 ± 1.6 , GA値: 21 ± 5)では血清GM3レベルは上昇傾向を認めたが有意ではなく、インスリン抵抗性の指標であるHOMA-Rも有意な上昇ではなかった。2型糖尿病+高脂血症群(HbA1c: 7.3 ± 1.0 , GA値: 18 ± 6)では、HOMA-Rも 3.0 ± 2.1 ($p = 0.03$)とインスリン抵抗性を示し、血清GM3レベルは有意に上昇していた。また、高脂血症群における血清GM3値は2型糖尿病患者群と同様上昇傾向を示したが、健常人群との有意差はなかった。これらの結果から、インスリン抵抗性を示す高脂血症を併発している2型糖尿病患者群で血清GM3レベルの測定は有用であることが証明された。

次に、インスリン抵抗性の発症や病態と密接に関連するBMI(Body Mass Index)と血漿GM3レベルの関連性を検討した。その結果、図3に示すようにBMI値とアディポネクチン値は逆相関を示したが、血漿GM3値はBMI高値(BMI: > 30)の糖尿病患者で明らかな高値を示した。この結果からも、GM3はインスリン抵抗性を発症する肥満を伴うメタボリックシンドロームの検出・診断に有用であることが示唆された。

【産業上の利用可能性】

【0007】

本発明によれば、生体から簡易に採取し得る血液試料を用い、汎用されている測定機器を用いて簡便にインスリン抵抗性疾患、特に2型糖尿病の診断を行うこと

また、本発明によれば、被験者から定期的に血液試料を採取し、血中ガングリオシドGM3量を測定し、血中ガングリオシドGM3量の変動をモニターすることによって、簡便にインスリン抵抗性疾患、特に2型糖尿病発症リスクの予測を行うことができる。

このような本発明の検出方法により、様々な生活習慣病に共通の病態であるインスリン抵抗性を把握できる可能性があり、新たな病態メカニズムの発見に基づく、臨床的に有用

10

20

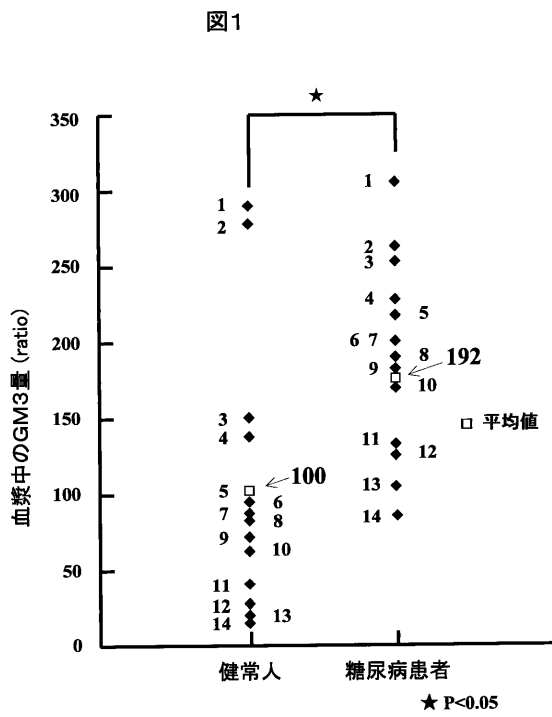
30

40

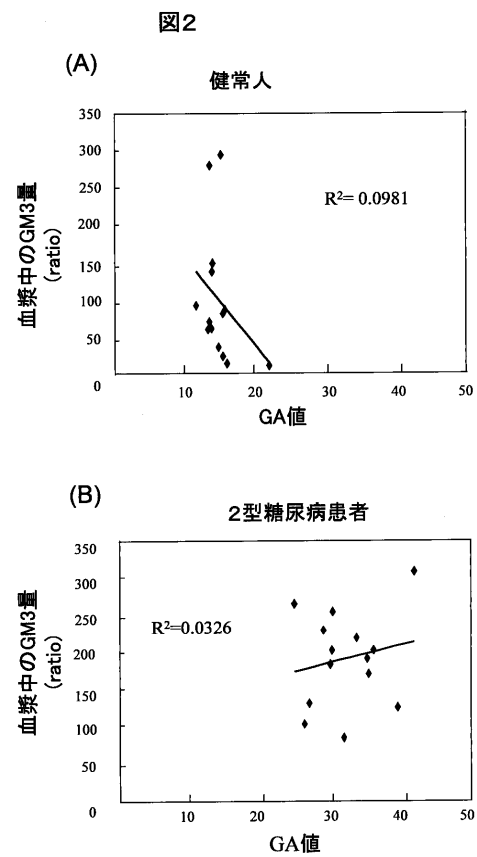
50

性の高い、2型糖尿病をはじめとする生活習慣病の治療戦略に寄与し得る。

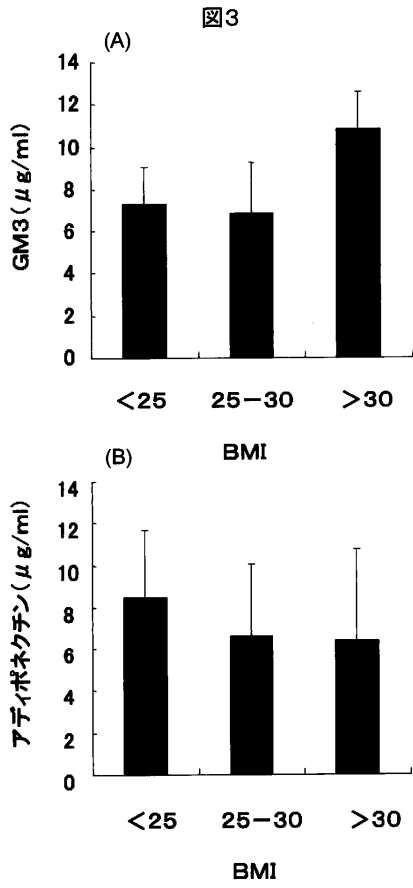
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/061246

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N30/88(2006.01)i, G01N30/72(2006.01)i, G01N30/90(2006.01)i, G01N33/92(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) G01N30/88, G01N30/72, G01N30/90, G01N33/92 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 1996-2007 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2007 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2007 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2005-221293 A (Frontier Science Co., Ltd.), 18 August, 2005 (18.08.05), Claims; Par. Nos. [0017] to [0019], [0023] to [0030], [0039] (Family: none)	15
A	Tadashi Yamashita, Akira Hashiramoto, Martin Haluzik, Hiroki Mizukami, Shoshannah Beck, Aaron Norton, Mari Kono, Shuichi Tsuji, Jose Luis Daniotti, Norbert Werth, Roger Sandhoff, Konrad Sandhoff, and Richard L. Proia, "Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3", Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003.03.18, Vol.100, No.6, P3445-3449	15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 21 June, 2007 (21.06.07)		Date of mailing of the international search report 03 July, 2007 (03.07.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/061246

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 62-187254 A (Kabushiki Kaisha Shino Tesuto Kenkyusho), 15 August, 1987 (15.08.87), Claims (Family: none)	15
A	Jin'ichi INOBUCHI, Yasuyuki IGARASHI, 'Micro Domain Syndrome to shite no Insulin Teikosei to 2-Gata Tonyobyō', Protein, Nucleic acid and Enzyme, 2003 Nen 6 Gatsu 10 Nichi Hakko, Vol.48, No.8, pages 1179 to 1183	15
A	R.Ziegler, and G.S.Eisenbarth, "Multiple Target Antigens in Pre-Type I Diabetes: Implications for Prediction", Hormone Research, 1990.08, Vol.33, No.2/4, P.144-151	15
A	Jin'ichi INOBUCHI, 'Micro Domain Byo to shite no Insulin Teikosei: Ganglioside GM3 no Kan'yo', Dai 53 Kai The Society of Polymer Science, Japan Toronkai Yokoshu CD-ROM, 2004 Nen 9 Gatsu 1 Nichi Hakko, Vol.53, No.2, pages 5386 to 5387 2W14	15
A	Jin'ichi INOBUCHI, Kazuya KABAYAMA, Futoshi KITAMURA, Satoshi UEMURA, Takashige SATO, Naohiko YOSHIMURA, Seiichi TAUE, Shinji SAKAGAMI, Masaharu NISHIMURA, Masaki SAITO, Yasuyuki IGARASHI, '2-Gata Tonyobyō no Insulin Teikosei ni Kakawaru Ganglioside GM3 no Kino', Dai 23 Kai The Japanese Society of Carbohydrate Research Nenkan Yoshishu, 2002 Nen 7 Gatsu 25 Nichi Hakko, page 70	15
A	M.Gavella, V.Lipovacand, and V.Mrzljak, "Lipid-Bound Sialic Acid in Diabetes", Horm. Metabol.Res., 1989, Vol.21, No.5, P.280-281	15
A	Dong Hoon Kwak, Young Il Rho, Oh Deog Kwon, Seon Ho Ahan, Ju Hung Song, Young Kug Choo, Sung Jo Kim, Bong Kyu Choi, and Kyu Yong Jung, "Decreases of ganglioside GM3 in streptozotocin-induced diabetic glomeruli of rats", Life Sciences, 2003.03.14, Vol.72, No.17, P.1997-2006	15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/061246

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.: 1-14
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 1-14 relate to a method for diagnosis of a disease having an insulin-resistant condition, namely a disease such as type-2 diabetes, and therefore these claims pertain to a method for diagnosis of the human body.
(continued to extra sheet)
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest
the

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, 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/JP2007/061246

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

Thus, the inventions of claims 1-14 relate to a subject matter which this international searching authority is not required, under the provisions of PCT Article 17(2) (a) (i) and PCT Rule 39.1(iv), to search.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 7 / 0 6 1 2 4 6									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N30/88(2006.01)i, G01N30/72(2006.01)i, G01N30/90(2006.01)i, G01N33/92(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. G01N30/88, G01N30/72, G01N30/90, G01N33/92											
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2007年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2007年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2007年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2007年	日本国実用新案登録公報	1996-2007年	日本国登録実用新案公報	1994-2007年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2007年										
日本国実用新案登録公報	1996-2007年										
日本国登録実用新案公報	1994-2007年										
国際調査でを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) JST7580(JDream2), JSTPlus(JDream2)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号									
A	JP 2005-221293 A (株式会社フロンティア・サイエンス) 2005.08.18, 【特許請求の範囲】、段落【0017】 - 【0019】、 【0023】 - 【0030】、【0039】 (ファミリーなし)	15									
☞ C欄の続きにも文献が列挙されている。		☞ パテントファミリーに関する別紙を参照。									
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 21.06.2007		国際調査報告の発送日 03.07.2007									
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) 河野 隆一郎	2 J 3708								
		電話番号 03-3581-1101 内線	3252								

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (2005年4月)

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2007/061246
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Tadashi Yamashita, Akira Hashiramoto, Martin Haluzik, Hiroki Mizukami, Shoshannah Beck, Aaron Norton, Mari Kono, Shuichi Tsuji, Jose Luis Daniotti, Norbert Werth, Roger Sandhoff, Konrad Sandhoff, and Richard L. Proia, "Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3", Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003.03.18, Vol.100, No.6, P3445-3449	15
A	JP 62-187254 A (株式会社シノテスト研究所) 1987.08.15, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	15
A	井ノ口 仁一, 五十嵐 靖之, 「マイクロドメイン・シンドロームとしてのインスリン抵抗性と2型糖尿病」, 蛋白質 核酸 酵素, 2003年6月10日 発行, Vol. 48, No. 8, P. 1179-1183	15
A	R. Ziegler, and G.S.Eisenbarth, "Multiple Target Antigens in Pre-Type I Diabetes: Implications for Prediction", Hormone Research, 1990.08, Vol.33, No.2/4, P.144-151	15
A	井ノ口 仁一, 「マイクロドメイン病としてのインスリン抵抗性: ガングリオシドGM3の関与」, 第53回高分子学会討論会予稿集 CD-ROM, 2004年9月1日 発行, Vol. 53, No. 2, P. 5386-5387 2W14	15
A	井ノ口 仁一, 樺山 一哉, 北村 太, 上村 聡志, 佐藤 貴繁, 吉村 治彦, 田上 清一, 坂上 慎二, 西村 正治, 斉藤 政樹, 五十嵐 靖之, 「2型糖尿病のインシュリン抵抗性に関わるガングリオシドGM3の機能」, 第23回 日本糖質学会年会要旨集, 2002年7月25日 発行, P. 70	15
A	M. Gavella, V. Lipovacand, and V. Mrzljak, "Lipid-Bound Sialic Acid in Diabetes", Horm. Metabol. Res., 1989, Vol.21, No.5, P.280-281	15
A	Dong Hoon Kwak, Young Il Rho, Oh Deog Kwon, Seon Ho Ahan, Ju Hung Song, Young Kug Choo, Sung Jo Kim, Bong Kyu Choi, and Kyu Yong Jung, "Decreases of ganglioside GM3 in streptozotocin-induced diabetic glomeruli of rats", Life Sciences, 2003.03.14, Vol.72, No.17, P.1997-2006	15

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2007/061246

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

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

1. 請求の範囲 1-14 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲 1-14 は、インスリン抵抗性病態を示す疾患、すなわち、2型糖尿病などの疾患であるか否かを診断する方法であることから、人間を診断する方法に該当し、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

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

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

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、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を伴う異議申立てがなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2005年4月)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,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,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。