

(19) 日本国特許庁(JP)

**再公表特許(A1)**

(11) 国際公開番号

**W02008/001840**

発行日 平成21年11月26日 (2009.11.26)

(43) 国際公開日 **平成20年1月3日(2008.1.3)**

(51) Int.Cl.

**C12Q 1/37 (2006.01)**

F1

C12Q 1/37

テーマコード (参考)

4B063

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 19 頁)

出願番号 特願2008-522619 (P2008-522619)  
 (21) 国際出願番号 PCT/JP2007/062982  
 (22) 国際出願日 平成19年6月28日 (2007.6.28)  
 (31) 優先権主張番号 特願2006-177730 (P2006-177730)  
 (32) 優先日 平成18年6月28日 (2006.6.28)  
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(71) 出願人 504159235  
 国立大学法人 熊本大学  
 熊本県熊本市黒髪二丁目39番1号  
 (74) 代理人 110000109  
 特許業務法人特許事務所サイクス  
 (72) 発明者 今村 隆寿  
 熊本県熊本市本荘1丁目1番1号 国立大  
 学法人熊本大学内  
 Fターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ36 QR16  
 QR48 QR58 QS12 QS36 QX02

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腎臓・泌尿器疾患の診断方法

## (57) 【要約】

本発明の目的は、腎臓・泌尿器疾患との特異性が高く、かつ患者に与える侵襲が少ないことを特徴とする腎臓・泌尿器疾患の診断方法及び診断キットを提供することである。本発明によれば、尿中のプロテアーゼ活性を複数の基質を用いて測定し、当該基質に対するプロテアーゼ活性のパターンを分析することを含む、腎臓・泌尿器疾患の診断方法が提供される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

尿中のプロテアーゼ活性を複数の基質を用いて測定し、当該基質に対するプロテアーゼ活性のパターンを分析することを含む、腎臓・泌尿器疾患の診断方法。

## 【請求項 2】

アセチル -  $X^1$  -  $X^2$  - Y (式中、 $X^1$  及び  $X^2$  は、各々独立にアミノ酸残基を示し、Y は、 $X^2$  との結合が切断されると蛍光を発する化合物になる官能基を示す) で示される基質に対するプロテアーゼ活性を測定することにより、尿中のプロテアーゼ活性を測定する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

アセチル-Asn-Phe-MCA、アセチル-Phe-Arg-MCA、アセチル-Tyr-Arg-MCA、アセチル-Phe-Lys-MCA、又はアセチル-His-Ala-MCA (式中、MCA は、4-メチルクマリル-7-アミド基を示す) に対するプロテアーゼ活性を測定することにより、尿中のプロテアーゼ活性を測定する、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

アセチル-Asn-Phe-MCA、アセチル-Phe-Arg-MCA、アセチル-Tyr-Arg-MCA、アセチル-Phe-Lys-MCA、及びアセチル-His-Ala-MCA (式中、MCA は、4-メチルクマリル-7-アミド基を示す) に対する尿プロテアーゼ活性の測定において、Asn-Pheでは86以下、Phe-Argでは103以下、Phe-Lysでは12以上、Tyr-Argでは8.6以上、His-Alaでは7.4以上の場合 (単位はcpu/mg creatinine) は異常値であると判断する、請求項 1 から 3 の何れかに記載の方法。

## 【請求項 5】

腎臓・泌尿器疾患が、急速進行性糸球体腎炎、ネフローゼ症候群、IgA腎症、慢性糸球体腎炎、慢性腎不全、前立腺癌、又は膀胱癌である、請求項 1 から 4 の何れかに記載の方法。

## 【請求項 6】

アセチル-Phe-Arg-MCAに対する尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合よりも低下しており、アセチル-Phe-Lys-MCAに対する尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合よりも上昇しており、かつアセチル-Asn-Phe-MCA、アセチル-Tyr-Arg-MCA及びアセチル-His-Ala-MCAに対する尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合と同等であることを指標として急速進行性糸球体腎炎であると判定する (式中、MCA は、4-メチルクマリル-7-アミド基を示す)、急速進行性糸球体腎炎の診断方法。

## 【請求項 7】

アセチル-Phe-Arg-MCAに対する尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合よりも低下しており、アセチル-Tyr-Arg-MCA及びアセチル-Phe-Lys-MCAに対する尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合よりも上昇しており、かつアセチル-Asn-Phe-MCA及びアセチル-His-Ala-MCAに対する尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合と同等であることを指標としてネフローゼ症候群であると判定する (式中、MCA は、4-メチルクマリル-7-アミド基を示す)、ネフローゼ症候群の診断方法。

## 【請求項 8】

アセチル-Asn-Phe-MCA及びアセチル-Phe-Arg-MCAに対する尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合よりも低下しており、アセチル-Tyr-Arg-MCA及びアセチル-Phe-Lys-MCAに対する尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合よりも上昇しており、かつアセチル-His-Ala-MCAに対する尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合と同等であることを指標としてIgA腎症であると判定する (式中、MCA は、4-メチルクマリル-7-アミド基を示す)、IgA腎症の診断方法。

## 【請求項 9】

アセチル-Asn-Phe-MCAに対する尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合よりも低下しており、アセチル-Tyr-Arg-MCA及びアセチル-Phe-Lys-MCAに対する尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合よりも上昇しており、かつアセチル-Phe-Arg-MCA及びアセチル-His-Ala-MCAに対する尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合と同等であることを指標として慢性糸球

10

20

30

40

50

体腎炎であると判定する（式中、MCA は、4-メチルクマリル-7-アミド基を示す）、慢性系球体腎炎の診断方法。

【請求項 10】

アセチル-Phe-Arg-MCAに対する尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合よりも低下しており、アセチル-His-Ala-MCAに対する尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合よりも上昇しており、かつアセチル-Asn-Phe-MCA、アセチル-Tyr-Arg-MCA及びアセチル-Phe-Lys-MCAに対する尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合と同等であることを指標として慢性腎不全であると判定する（式中、MCA は、4-メチルクマリル-7-アミド基を示す）、慢性腎不全の診断方法。

【請求項 11】

アセチル-Tyr-Arg-MCA及びアセチル-His-Ala-MCAに対する尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合よりも上昇しており、かつアセチル-Asn-Phe-MCA、アセチル-Phe-Arg-MCA及びアセチル-Phe-Lys-MCAに対する尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合と同等であることを指標として前立腺癌であると判定する（式中、MCA は、4-メチルクマリル-7-アミド基を示す）、前立腺癌の診断方法。

【請求項 12】

アセチル-Tyr-Arg-MCAに対する尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合よりも上昇しており、かつアセチル-Asn-Phe-MCA、アセチル-Phe-Arg-MCA、アセチル-Phe-Lys-MCA及びアセチル-His-Ala-MCAに対する尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合と同等であることを指標として膀胱癌であると判定する（式中、MCA は、4-メチルクマリル-7-アミド基を示す）、膀胱癌の診断方法。

【請求項 13】

アセチル-Asn-Phe-MCA、アセチル-Phe-Arg-MCA、アセチル-Tyr-Arg-MCA、アセチル-Phe-Lys-MCA、及びアセチル-His-Ala-MCA（式中、MCA は、4-メチルクマリル-7-アミド基を示す）を含む、腎臓・泌尿器疾患の診断キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、腎臓・泌尿器疾患の診断方法及び診断キットに関する。より詳細には、本発明は、尿中のプロテアーゼ活性を測定することによって腎臓・泌尿器疾患を診断する方法、及び上記方法を行うための診断キットに関する。

【背景技術】

【0002】

腎臓は一日に約1700リットルの血液を濾過し尿1リットルを産生する。これにより老廃物排泄、水と塩分濃度調節、血漿の適切なpHの維持を行い、さらにエリスロポエチンなどの生理的に必要な物質を産生して生体維持のために供給している。腎臓は沈黙の臓器といわれ、肝臓と同様に病気がかなり進行し予備能力を越えて機能低下が起こって初めて症状が出現するので、症状が出現した時点では腎臓の状態は相当重篤化している。腎臓の状態は尿成分にかなり反映されるので、腎疾患のスクリーニングとして尿蛋白質量、尿クレアチニン濃度、血尿などの検査が施行されているが、いずれも疾患との特異性は低く病気の初期段階を検出するには充分ではない。系球体腎炎の最終診断は腎生検による腎臓組織の形態変化によって行われるが、これによる診断は原因と必ずしも一致したのではなく初期では確定診断が困難であり、しかも患者に与える侵襲が大きい。また、尿路系癌（特に膀胱癌）は尿路に露出している場合が多く、尿にはこれらの癌情報も含んでいることが充分期待されるが、尿によるこれらの癌診断の試みは未だなされていない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

本発明は、腎臓・泌尿器疾患との特異性が高く、かつ患者に与える侵襲が少ないことを特徴とする腎臓・泌尿器疾患の診断方法及び診断キットを提供することを解決すべき課題

10

20

30

40

50

とした。

【課題を解決するための手段】

【0004】

腎臓・泌尿器疾患の病因に直結し、かつ病気の初期でも検出されるリアルタイムマーカーを発見することができれば、腎臓・泌尿器疾患との特異性が高く、かつ患者に与える侵襲が少ないことを特徴とする腎臓・泌尿器疾患の診断方法及び診断キットを提供することが可能になる。蛋白質分解酵素であるプロテアーゼは、細胞内で蛋白質代謝等に関わるとともに分泌されて細胞外で様々な機能を果たしている。本発明者らは、腎臓や尿路に炎症や腫瘍が発生すると、刺激を受けた臓器細胞からのプロテアーゼ分泌変化や白血球、さらには腫瘍細胞から分泌、また自壊あるいは傷害された細胞から漏出するプロテアーゼによって、尿中のプロテアーゼ活性は変化する可能性があることを推定した。プロテアーゼは基質となるアミノ酸配列を変えることにより種々の活性が測定でき、さらに基質に蛍光物質を組み入れることにより高感度検出が可能である。そこで、本発明者らは、検体採取において患者への侵襲が全くない尿に出現する種々の蛋白質分解酵素(プロテアーゼ)活性に注目し、多種の基質を使って網羅的に検出し、これらの活性と、各種の腎臓・泌尿器疾患との関係を調べた。その結果、本発明者らは、尿中のプロテアーゼ活性を測定することによって腎臓・泌尿器疾患を診断できることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

10

【0005】

即ち、本発明によれば、以下の発明が提供される。

20

(1) 尿中のプロテアーゼ活性を複数の基質を用いて測定し、当該基質に対するプロテアーゼ活性のパターンを分析することを含む、腎臓・泌尿器疾患の診断方法。

【0006】

(2) アセチル -  $X^1$  -  $X^2$  - Y (式中、 $X^1$ 及び $X^2$ は、各々独立にアミノ酸残基を示し、Yは、 $X^2$ との結合が切断されると蛍光を発する化合物になる官能基を示す)で示される基質に対するプロテアーゼ活性を測定することにより、尿中のプロテアーゼ活性を測定する、(1)に記載の方法。

【0007】

(3) アセチル-Asn-Phe-MCA、アセチル-Phe-Arg-MCA、アセチル-Tyr-Arg-MCA、アセチル-Phe-Lys-MCA、又はアセチル-His-Ala-MCA(式中、MCAは、4-メチルクマリル-7-アミド基を示す)に対するプロテアーゼ活性を測定することにより、尿中のプロテアーゼ活性を測定する、(1)又は(2)に記載の方法。

30

(4) アセチル-Asn-Phe-MCA、アセチル-Phe-Arg-MCA、アセチル-Tyr-Arg-MCA、アセチル-Phe-Lys-MCA、及びアセチル-His-Ala-MCA(式中、MCAは、4-メチルクマリル-7-アミド基を示す)に対する尿プロテアーゼ活性の測定において、Asn-Pheでは86以下、Phe-Argでは103以下、Phe-Lysでは12以上、Tyr-Argでは8.6以上、His-Alaでは7.4以上の場合(単位はcpu/mg creatinine)は異常値であると判断する、(1)から(3)の何れかに記載の方法。

【0008】

(5) 腎臓・泌尿器疾患が、急速進行性糸球体腎炎、ネフローゼ症候群、IgA腎症、慢性糸球体腎炎、慢性腎不全、前立腺癌、又は膀胱癌である、(1)から(4)の何れかに記載の方法。

40

【0009】

(6) アセチル-Phe-Arg-MCAに対する尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合よりも低下しており、アセチル-Phe-Lys-MCAに対する尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合よりも上昇しており、かつアセチル-Asn-Phe-MCA、アセチル-Tyr-Arg-MCA及びアセチル-His-Ala-MCAに対する尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合と同等であることを指標として急速進行性糸球体腎炎であると判定する(式中、MCAは、4-メチルクマリル-7-アミド基を示す)、急速進行性糸球体腎炎の診断方法。

【0010】

50

(7) アセチル-Phe-Arg-MCAに対する尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合よりも低下しており、アセチル-Tyr-Arg-MCA及びアセチル-Phe-Lys-MCAに対する尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合よりも上昇しており、かつアセチル-Asn-Phe-MCA及びアセチル-His-Ala-MCAに対する尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合と同等であることを指標としてネフローゼ症候群であると判定する(式中、MCAは、4-メチルクマリル-7-アミド基を示す)、ネフローゼ症候群の診断方法。

【0011】

(8) アセチル-Asn-Phe-MCA及びアセチル-Phe-Arg-MCAに対する尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合よりも低下しており、アセチル-Tyr-Arg-MCA及びアセチル-Phe-Lys-MCAに対する尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合よりも上昇しており、かつアセチル-His-Ala-MCAに対する尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合と同等であることを指標としてIgA腎症であると判定する(式中、MCAは、4-メチルクマリル-7-アミド基を示す)、IgA腎症の診断方法。

10

【0012】

(9) アセチル-Asn-Phe-MCAに対する尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合よりも低下しており、アセチル-Tyr-Arg-MCA及びアセチル-Phe-Lys-MCAに対する尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合よりも上昇しており、かつアセチル-Phe-Arg-MCA及びアセチル-His-Ala-MCAに対する尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合と同等であることを指標として慢性糸球体腎炎であると判定する(式中、MCAは、4-メチルクマリル-7-アミド基を示す)、慢性糸球体腎炎の診断方法。

20

【0013】

(10) アセチル-Phe-Arg-MCAに対する尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合よりも低下しており、アセチル-His-Ala-MCAに対する尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合よりも上昇しており、かつアセチル-Asn-Phe-MCA、アセチル-Tyr-Arg-MCA及びアセチル-Phe-Lys-MCAに対する尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合と同等であることを指標として慢性腎不全であると判定する(式中、MCAは、4-メチルクマリル-7-アミド基を示す)、慢性腎不全の診断方法。

【0014】

(11) アセチル-Tyr-Arg-MCA及びアセチル-His-Ala-MCAに対する尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合よりも上昇しており、かつアセチル-Asn-Phe-MCA、アセチル-Phe-Arg-MCA及びアセチル-Phe-Lys-MCAに対する尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合と同等であることを指標として前立腺癌であると判定する(式中、MCAは、4-メチルクマリル-7-アミド基を示す)、前立腺癌の診断方法。

30

【0015】

(12) アセチル-Tyr-Arg-MCAに対する尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合よりも上昇しており、かつアセチル-Asn-Phe-MCA、アセチル-Phe-Arg-MCA、アセチル-Phe-Lys-MCA及びアセチル-His-Ala-MCAに対する尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合と同等であることを指標として膀胱癌であると判定する(式中、MCAは、4-メチルクマリル-7-アミド基を示す)、膀胱癌の診断方法。

40

【0016】

(13) アセチル-Asn-Phe-MCA、アセチル-Phe-Arg-MCA、アセチル-Tyr-Arg-MCA、アセチル-Phe-Lys-MCA、及びアセチル-His-Ala-MCA(式中、MCAは、4-メチルクマリル-7-アミド基を示す)を含む、腎臓・泌尿器疾患の診断キット。

【発明の効果】

【0017】

本発明によれば、腎臓・泌尿器疾患を高い特異性で診断することが可能である。また、本発明の診断方法は、患者に対する侵襲が全くなき、迅速に腎臓・泌尿器疾患を診断することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

50

以下、本発明の実施の形態についてさらに詳細に説明する。

本発明による腎臓・泌尿器疾患の診断方法は、尿中のプロテアーゼ活性を測定すること  
を特徴とする方法である。具体的には、尿中のプロテアーゼ活性を複数の基質を用いて測  
定し、当該基質に対するプロテアーゼ活性のパターンを分析することによって、腎臓・泌  
尿器疾患の診断を行う。プロテアーゼ活性は、2アミノ酸から構成されるペプチド基質に  
対するプロテアーゼ活性（加水分解活性）を測定することによって測定することができる  
。本発明では、例えば、アセチル -  $X^1$  -  $X^2$  - Y（式中、 $X^1$ 及び $X^2$ は、各々独立にアミ  
ノ酸残基を示し、Yは、 $X^2$ との結合が切断されると蛍光を発する化合物になる官能基を  
示す）で示される基質に対するプロテアーゼ活性を測定することにより、尿中のプロテア  
ーゼ活性を測定することができる。

10

【0019】

$X^1$ が示すアミノ酸残基としては、GlyからTrpの19種類のアミノ酸残基（Cys以外のアミ  
ノ酸残基）を挙げることができる。また、 $X^2$ が示すアミノ酸残基の具体例としては、Lys  
、Phe、Val、Ala又はArgの5種類のアミノ酸残基を挙げることができる。

【0020】

Yは、 $X^2$ との結合が切断されると蛍光を発する化合物になる官能基を示す。このよう  
な官能基としては、MCA（4-methylcoumaryl-7-amide）基、CMCA（4-chloromethyl  
coumaryl-7-amide）基、FMCA（4-trifluoromethylcoumaryl-7-amide）基、ローダミ  
ン110基、又はFITC基などを挙げることができる。

20

【0021】

本発明において好ましくは、アセチル-Asn-Phe-MCA、アセチル-Phe-Arg-MCA、アセチル  
-Tyr-Arg-MCA、アセチル-Phe-Lys-MCA、又はアセチル-His-Ala-MCA（式中、MCAは、4-メ  
チルクマリル-7-アミド基を示す）に対するプロテアーゼ活性を測定することにより、尿  
中のプロテアーゼ活性を測定する。上記した5種類の基質に対する尿中のプロテアーゼ活  
性を測定することによって、急速進行性糸球体腎炎、ネフローゼ症候群、IgA腎症、慢性  
糸球体腎炎、慢性腎不全、前立腺癌、又は膀胱癌などの腎臓・泌尿器疾患を特異的に診断  
することができる。

【0022】

アセチル-Asn-Phe-MCA、アセチル-Phe-Arg-MCA、アセチル-Tyr-Arg-MCA、アセチル-Phe  
-Lys-MCA、又はアセチル-His-Ala-MCAに対する尿プロテアーゼ活性の測定は、例えば、以  
下の通り行うことができる。上記5種類の基質をジメチルスルホキシドに溶解し、さらに  
0.1M Tris-HCl, pH7.6, 150 mM NaClで希釈した溶液(1 mM)を96穴プレートに入れる。こ  
れに尿を加えて37℃で反応させ、蛍光強度の増加を約1分毎に蛍光測定器で経時的に検  
出する。例えば、10点のうち連続5点の増加率が最も高い値を各基質に対するプロテア  
ーゼ活性とすることができる。プロテアーゼ活性は尿の濃度に影響されるので、クレアチニ  
ン100mg/dlに対する活性として表すことができる。被験者の尿中の各基質に対するプロ  
テアーゼ活性を、コントロール値（即ち、健常者におけるプロテアーゼ活性）と比較する  
ことにより、腎臓・泌尿器疾患が、急速進行性糸球体腎炎、ネフローゼ症候群、IgA腎症  
、慢性糸球体腎炎、慢性腎不全、前立腺癌、又は膀胱癌などの腎臓・泌尿器疾患を診断す  
ることができる。診断の指標は、本明細書中に上記した記載した通りであり、また図7に  
も示す通りである。具体的には、アセチル-Asn-Phe-MCA、アセチル-Phe-Arg-MCA、アセチ  
ル-Tyr-Arg-MCA、アセチル-Phe-Lys-MCA、及びアセチル-His-Ala-MCAに対する尿プロテア  
ーゼ活性の測定において、例えば、Asn-Pheでは86以下、Phe-Argでは103以下、Phe-Lysで  
は12以上、Tyr-Argでは8.6以上、His-Alaでは7.4以上の場合（単位はcpu/mg creatinine  
）は異常値であると判断することができる。

30

40

【0023】

さらに本発明によれば、アセチル-Asn-Phe-MCA、アセチル-Phe-Arg-MCA、アセチル-Tyr  
-Arg-MCA、アセチル-Phe-Lys-MCA、及びアセチル-His-Ala-MCA（式中、MCAは、4-メチ  
ルクマリル-7-アミド基を示す）を含む、腎臓・泌尿器疾患の診断キットが提供される。な  
お、本発明の診断キットには、上記5種類の基質に加えて、さらに溶媒、緩衝液、測定ブ

50

レートなどを適宜含めてもよい。

【0024】

以下の実施例により本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

【実施例】

【0025】

(1) 実験方法

尿は健常者、腎炎患者および泌尿器系癌患者のものを本人の承諾を得て、前回の排尿から約2時間後の尿を用いた。急速進行性糸球体腎炎9名、ネフローゼ症候群10名、IgA腎症26名、慢性糸球体腎炎12名、慢性腎不全22名、前立腺癌21名、膀胱癌8名、健常者10名の尿を測定した。

10

【0026】

Acetyl(あるいはsuccinyl)-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-MCA(4-methylcoumaryl-7-amide)を合成し、X<sub>2</sub>-MCA間をプロテアーゼが加水分解することによってMCAがAMC(7-amino-4-methylcoumarin)になり蛍光を発するので、これを励起波長355nm、検出波長450nmで測定した。X<sub>2</sub>にはLys、Phe、Val、Ala、Argの5種類のアミノ酸を選定し、X<sub>1</sub>にはGlyからTrpの19種類のアミノ酸を配置した計95種類の基質をdimethylsulfoxideに溶解し、さらに0.1M Tris-HCl, pH7.6, 150 mM NaClで希釈した50 μl(1 mM)を96穴プレートに入れた。これに尿50 μlを加えて37 °Cで反応させ、蛍光強度の増加を約1分毎に蛍光測定器Arvoで経時的に検出した。10点のうち連続5点の増加率が最も高い値を各基質に対する活性とした。活性は尿の濃度に影響されるので、クレアチニン100mg/dlに対する活性として表した。検出されたMCA基質加水分解活性の中から、充分かつ高頻度で加水分解がみられる数種の基質を選び、患者と健常者との比較を行った。Unpaired t-testを行い、P < 0.05を有意とした。また、これらの活性をパターン解析し、これによる分類と臨床診断との関連性を検討した。

20

【0027】

(2) 結果

(2-1) 尿中に存在すると推定される代表的なプロテアーゼの活性パターン

ヒトトロンピン(1 IU/ml)はPR > AR > NF = PK = GAの順に活性を示し、従来よりBoc-V-P-R-MCAが特異的な基質として使われている事実によく一致していた。ヒトウロキナーゼ(10 nM)はAR > GK > AR = HR = PR = MR = QRの順に活性があり、ArgやLysを好むその性質に合致していた。ヒトカテプシンB(20 nM)活性はNF > GAが主であった。しかし、NFとGAは3者共に、PK、ARとPRはトロンピンとウロキナーゼとで加水分解されていることから、1つの基質に対する活性は必ずしも1つのプロテアーゼに由来しないものと認められる。

30

【0028】

(2-2) 健常者尿中に検出されるMCA基質加水分解活性の概要

異常を知るためには健常者の活性が標準となるので、健常者10名のプロテアーゼ活性を測定した。-X-Arg-MCA系に最も多種の活性が認められ、AR、LR、MR、HR、FR、YR、WR、PR等への活性が検出された。なかでも、FR活性が高かった。次は、-X-Lys-MCA系でHK、FK、WK、YKへの活性がみられたが、FK活性が最も高かった。あとは-X-Phe-MCA系でLF、NFに活性があり、特にカテプシンBが最も強い活性を示したNFに対しては全基質のなかで最も高い活性があった。残りの-X-Val-MCA、-X-Ala-MCA系の基質に対しては全く活性の検出されないものが多かったものの、VV、IV、GA、HAへの弱い活性が認められた。

40

【0029】

(2-3) 腎臓・泌尿器疾患患者と健常者における尿プロテアーゼ活性の比較

(2-3-1) Acetyl-Asn-Phe-MCA加水分解活性(図2)

Acetyl-Asn-Phe-MCAは、図1で示した様に、カテプシンBが最もよく加水分解した基質であり、健常者尿中の活性で最も高かった。この活性は、IgA腎症(P < 0.034)と慢性糸球体腎炎(P < 0.034)で有意の低下が認められた。これらの疾患では、この活性に関わるプロテアーゼの産生低下あるいは消費・分解が亢進している可能性が考えられる。

50

## 【0030】

(2-3-2) Acetyl-Phe-Arg-MCA加水分解活性(図3)

この活性は、慢性糸球体腎炎( $P < 0.08$ )以外の腎疾患である急速進行性糸球体腎炎( $P < 0.008$ )、ネフローゼ症候群( $P < 0.023$ )、IgA腎症( $P < 0.045$ )、慢性腎不全( $P < 0.005$ )では有意に低かったが、癌では有意な差はみとめられなかった。これらの疾患では、本活性に関わるプロテアーゼの産生低下あるいは消費・分解が亢進している可能性が考えられる。

## 【0031】

(2-3-3) Acetyl-Tyr-Arg-MCA加水分解活性(図4)

急速進行性糸球体腎炎( $P < 0.15$ )と慢性腎不全( $P < 0.18$ )以外である、ネフローゼ症候群( $P < 0.034$ )、IgA腎症( $P < 0.0011$ )、慢性糸球体腎炎( $P < 0.007$ )、前立腺癌( $P < 0.042$ )、膀胱癌( $P < 0.047$ )といった癌を含めたすべての疾患においてこの活性は有意に高かった。これらの疾患では、この活性に関わるプロテアーゼの産生亢進あるいは消費・分解が遅延している可能性が考えられる。Acetyl-Tyr-Arg-MCA活性は、前述のAcetyl-Asn-Phe-MCAやAcetyl-Phe-Arg-MCAの様に健常者に比較して疾患では低下する活性とは対照的に、疾患で増加する活性であり、しかも癌でも増加することから、極めて診断的価値が高い。また、acetyl-Phe-Arg-MCAと構造的に極めて類似しているにもかかわらず、疾患では対照的な変動を示すこともこの活性の特記すべき点である。

## 【0032】

(2-3-4) Acetyl-Phe-Lys-MCA加水分解活性(図5)

慢性腎不全( $P < 0.055$ )以外の腎疾患である急速進行性糸球体腎炎( $P < 0.019$ )、ネフローゼ症候群( $P < 0.013$ )、IgA腎症( $P < 0.044$ )、慢性糸球体腎炎( $P < 0.023$ )において有意に高かったが、癌での有意差は認められなかった。慢性腎不全を除く多種の腎疾患で高値を示し、癌では上昇しない活性であることから、腎疾患に特異的かつ応用も範囲も広く、診断的有用性の高い活性として興味深い。

## 【0033】

(2-3-5) Acetyl-His-Ala-MCA加水分解活性(図6)

慢性腎不全( $P < 0.014$ )と前立腺癌( $P < 0.022$ )で有意に高かった。疾患で高値を示す活性として興味深いだけでなく、Acetyl-Phe-Lys-MCAとは対照的に腎不全のみで上昇し、かつ前立腺癌でのみ有意に上昇することから、この活性はAcetyl-Phe-Lys-MCA活性との組み合わせにより、さらに高い診断的有用性が期待できる。

## 【0034】

(3)まとめ

上記で使用した5種類の基質に対するプロテアーゼ活性は患者と健常者とで比較すると、疾患によって低下する活性と上昇する活性に分けられ、前者はAcetyl-Asn-Phe-MCAとAcetyl-Phe-Arg-MCA加水分解活性であり、後者はAcetyl-Tyr-Arg-MCA、Acetyl-Phe-Lys-MCA、およびAcetyl-His-Ala-MCA加水分解活性である。これらの活性を図7に示す通り、健常者活性に対して低い、差なし、高いに分け各疾患で比較したところ、腎炎と2つの癌を含めた7種疾患において、お互いに異なったパターンをとることが明らかとなった。この結果は、尿中の上記5種類の基質に対する活性を健常者と患者で比較することにより、これらの疾患の鑑別診断が可能となりうることを示している。

## 【0035】

特に、今回注目した5つの腎疾患では、Acetyl-His-Ala-MCAを除く4種の基質に対する活性で鑑別でき、かつ上記の2つの癌も除外できる。また、上記2つの癌に関しては、Acetyl-Phe-Arg-MCA、Acetyl-Phe-Lys-MCA、Acetyl-His-Ala-MCAの3種の基質に対する活性によって鑑別され、かつ腎疾患も除外できる可能性が示された。従って、これらの5種類の基質に対する活性をレポーターとして尿中活性を測定し健常者との比較によるパターン解析を行うことにより、無侵襲性かつ迅速に、腎炎や尿路系癌などの腎臓・泌尿器疾患を診断することが可能になる。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50



【0036】

【図1】図1は、ヒトロンピン、ヒトウロキナーゼ及びヒトカテプシンBの活性パターンを示す。

【図2】図2は、腎臓・泌尿器疾患患者及び健常者の尿におけるアセチル-Asn-Phe-MCAに対するプロテアーゼ活性を示す。

【図3】図3は、腎臓・泌尿器疾患患者及び健常者の尿におけるアセチル-Phe-Arg-MCAに対するプロテアーゼ活性を示す。

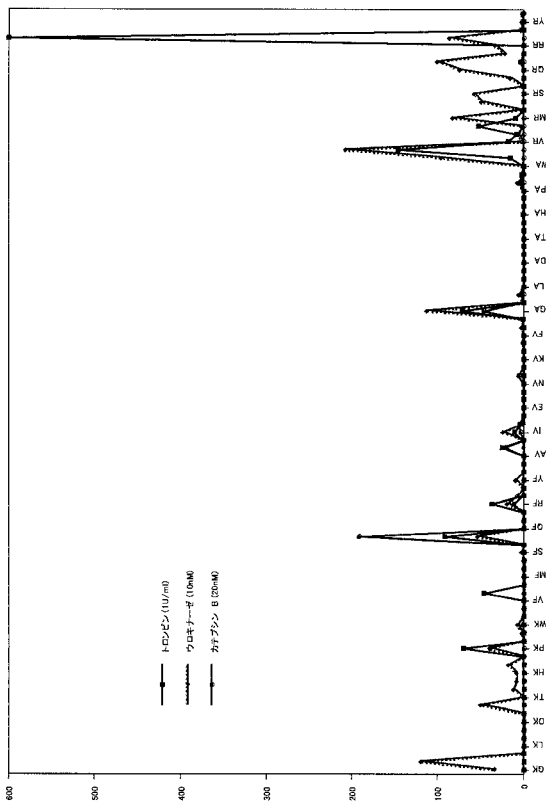
【図4】図4は、腎臓・泌尿器疾患患者及び健常者の尿におけるアセチル-Tyr-Arg-MCAに対するプロテアーゼ活性を示す。

【図5】図5は、腎臓・泌尿器疾患患者及び健常者の尿におけるアセチル-Phe-Lys-MCAに対するプロテアーゼ活性を示す。

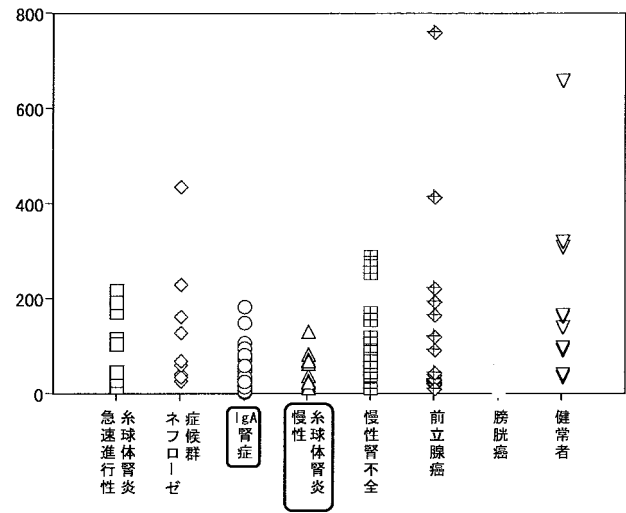
【図6】図6は、腎臓・泌尿器疾患患者及び健常者の尿におけるアセチル-His-Ala-MCAに対するプロテアーゼ活性を示す。

【図7】図7は、5種類の基質に対するプロテアーゼ活性を腎臓・泌尿器疾患患者と健常者とで比較した結果を示す。

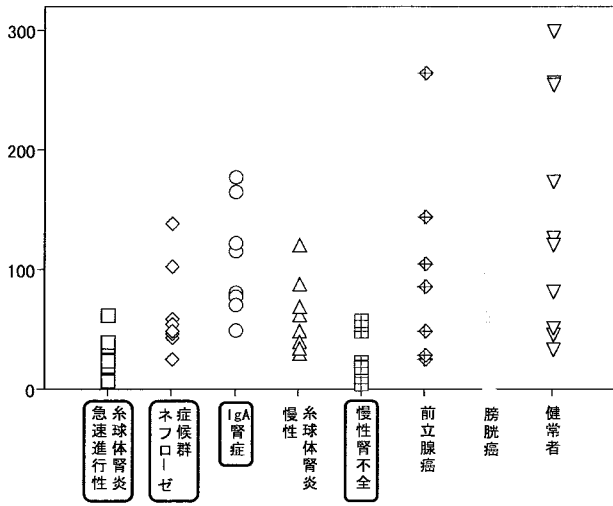
【図1】



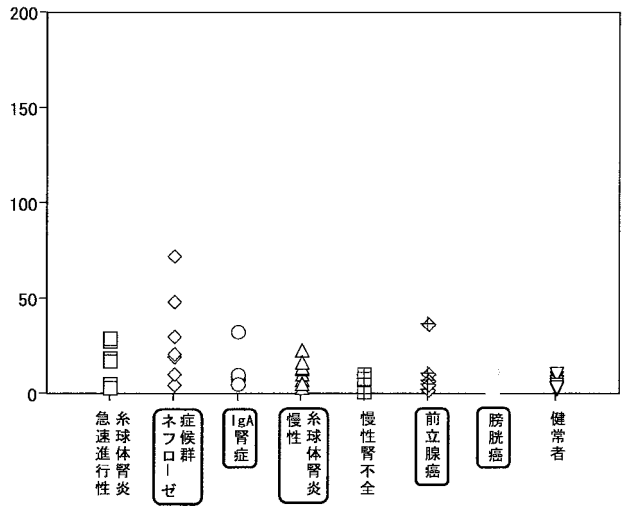
【図2】



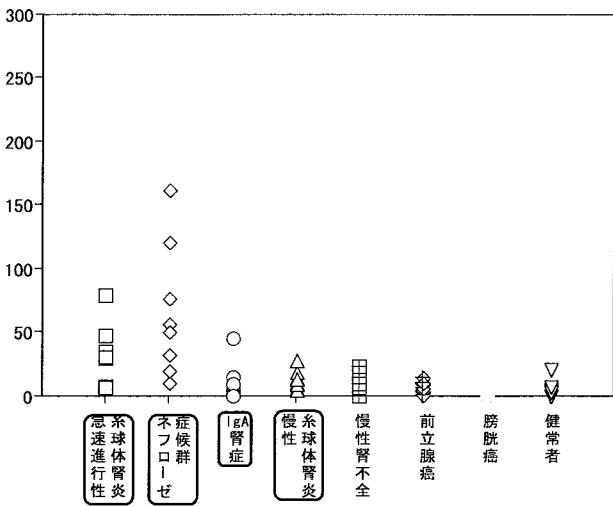
【 図 3 】



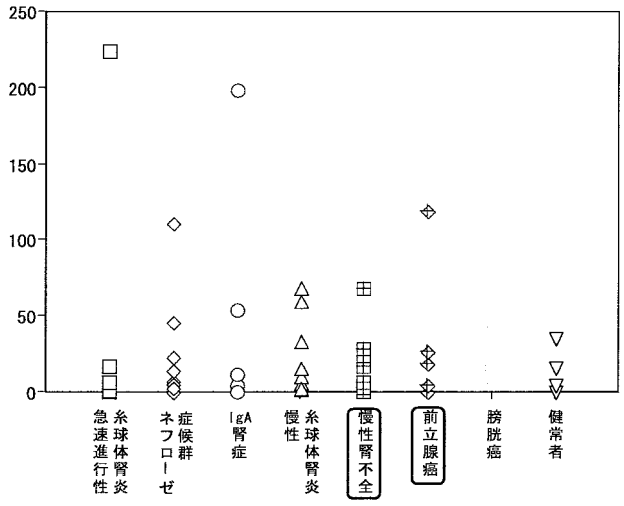
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】

	急速進行性系球体腎炎	ネフロ群候群	Ig A 腎症	慢性系球体腎炎	慢性腎不全	前立腺癌	膀胱癌
Asn-Phe-	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Phe-Arg-	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tyr-Arg-	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Phe-Lys-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
His-Ala-	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

健常者に比較して  低い  差なし  高い

## 【 手続補正書 】

【 提出日 】平成20年2月21日(2008.2.21)

## 【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

( 削除 )

【 請求項 2 】

( 削除 )

【 請求項 3 】

( 削除 )

【 請求項 4 】

( 削除 )

【 請求項 5 】

( 削除 )

【 請求項 6 】

アセチル - P h e - A r g - M C A に対する採取尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合よりも低下しており、アセチル - P h e - L y s - M C A に対する採取尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合よりも上昇しており、かつアセチル - A s n - P h e - M C A 、アセチル - T y r - A r g - M C A 及びアセチル - H i s - A l a - M C A に対する採取尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合と同等であることを指標として急速進行性系球体腎炎であると判定する(式中、M C A は、4 - メチルクマリル - 7 - アミド基を示す)、急

速進行性糸球体腎炎の検出方法。

【請求項 7】

アセチル - P h e - A r g - M C A に対する採取尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合よりも低下しており、アセチル - T y r - A r g - M C A 及びアセチル - P h e - L y s - M C A に対する採取尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合よりも上昇しており、かつアセチル - A s n - P h e - M C A 及びアセチル - H i s - A l a - M C A に対する採取尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合と同等であることを指標としてネフローゼ症候群であると判定する（式中、M C A は、4 - メチルクマリル - 7 - アミド基を示す）、ネフローゼ症候群の検出方法。

【請求項 8】

アセチル - A s n - P h e - M C A 及びアセチル - P h e - A r g - M C A に対する採取尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合よりも低下しており、アセチル - T y r - A r g - M C A 及びアセチル - P h e - L y s - M C A に対する採取尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合よりも上昇しており、かつアセチル - H i s - A l a - M C A に対する採取尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合と同等であることを指標として I g A 腎症であると判定する（式中、M C A は、4 - メチルクマリル - 7 - アミド基を示す）、I g A 腎症の検出方法。

【請求項 9】

アセチル - A s n - P h e - M C A に対する採取尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合よりも低下しており、アセチル - T y r - A r g - M C A 及びアセチル - P h e - L y s - M C A に対する採取尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合よりも上昇しており、かつアセチル - P h e - A r g - M C A 及びアセチル - H i s - A l a - M C A に対する採取尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合と同等であることを指標として慢性糸球体腎炎であると判定する（式中、M C A は、4 - メチルクマリル - 7 - アミド基を示す）、慢性糸球体腎炎の検出方法。

【請求項 10】

アセチル - P h e - A r g - M C A に対する採取尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合よりも低下しており、アセチル - H i s - A l a - M C A に対する採取尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合よりも上昇しており、かつアセチル - A s n - P h e - M C A 、アセチル - T y r - A r g - M C A 及びアセチル - P h e - L y s - M C A に対する採取尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合と同等であることを指標として慢性腎不全であると判定する（式中、M C A は、4 - メチルクマリル - 7 - アミド基を示す）、慢性腎不全の検出方法。

【請求項 11】

アセチル - T y r - A r g - M C A 及びアセチル - H i s - A l a - M C A に対する採取尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合よりも上昇しており、かつアセチル - A s n - P h e - M C A 、アセチル - P h e - A r g - M C A 及びアセチル - P h e - L y s - M C A に対する採取尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合と同等であることを指標として前立腺癌であると判定する（式中、M C A は、4 - メチルクマリル - 7 - アミド基を示す）、前立腺癌の検出方法。

【請求項 12】

アセチル - T y r - A r g - M C A に対する採取尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合よりも上昇しており、かつアセチル - A s n - P h e - M C A 、アセチル - P h e - A r g - M C A 、アセチル - P h e - L y s - M C A 及びアセチル - H i s - A l a - M C A に対する採取尿中のプロテアーゼ活性が健常者の場合と同等であることを指標として膀胱癌であると判定する（式中、M C A は、4 - メチルクマリル - 7 - アミド基を示す）、膀胱癌の検出方法。

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2007/062982
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q1/37(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) C12Q1/37		
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) MEDLINE (STN), BIOSIS/WPI (DIALOG), JSTPlus (JDream2), JMEDPlus (JDream2)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KITAMOTO Y., et al., Role of thrombin in mesangial proliferative glomerulonephritis, Kidney Int., 1998, vol.54, no.5, p.1767-1768	13
Y	JP 2004-528814 A (Childrens' Medical Center Corp.), 24 September, 2004 (24.09.04), & WO 2002/031507 A2 & EP 1334364 A2 & US 2002/0081641 A1	13
Y	JP 5-168497 A (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 02 July, 1993 (02.07.93), (Family: none)	13
<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	"T"
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X"
"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)	"Y"
"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 19 September, 2007 (19.09.07)		Date of mailing of the international search report 02 October, 2007 (02.10.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2007/062982

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 61-17956 A (Nitto Boseki Co., Ltd.), 25 January, 1986 (25.01.86), & EP 167980 A2 & US 4650753 A	13
Y	KAWABATA S., et al., Highly sensitive peptide-4-methylcoumaryl-7-amide substrates for blood clotting proteases and trypsin, Eur. J. Biochem., 1988, vol.172, no.1, p.17-25	13

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2007/062982

**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.: 1-12

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

Claims 1 to 12 pertain to diagnostic methods to be practiced on the human body and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

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.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2007/062982									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12Q1/37 (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. C12Q1/37											
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										
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) MEDLINE (STN)、BIOSIS/WPI (DIALOG)、JSTPlus (JDream2)、JMEDPlus (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									
Y	KITAMOTO Y., et al., Role of thrombin in mesangial proliferative glomerulonephritis, Kidney Int., 1998, vol.54, no.5, p.1767-1768	13									
Y	JP 2004-528814 A (チルドレンズ メディカル センター コーポ レーション) 2004.09.24 & WO 2002/031507 A2 & EP 1334364 A2 & US 2002/0081641 A1	13									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> 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 19.09.2007		国際調査報告の発送日 02.10.2007									
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) 池上 文緒	4B 3765								
		電話番号 03-3581-1101 内線	3448								

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/JP2007/062982

## 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 1-12 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 乃至 12 は、人体の診断方法に関するものであって、PCT 第 17 条(2)(a)(i)及び PCT 規則 39.1(iv)により、この国際調査機関が国際調査を行う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)

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2007/062982
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
Y	JP 5-168497 A (和光純薬工業株式会社) 1993.07.02 (ファミリーなし)	13
Y	JP 61-17956 A (日東紡績株式会社) 1986.01.25 & EP 167980 A2 & US 4650753 A	13
Y	KAWABATA S., et al., Highly sensitive peptide-4-methylcoumaryl-7-amide substrates for blood clotting proteases and trypsin, Eur. J. Biochem., 1988, vol.172, no.1, p.17-25	13

## 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, 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, 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。