

(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3月15日(15.03.2012)

PCT

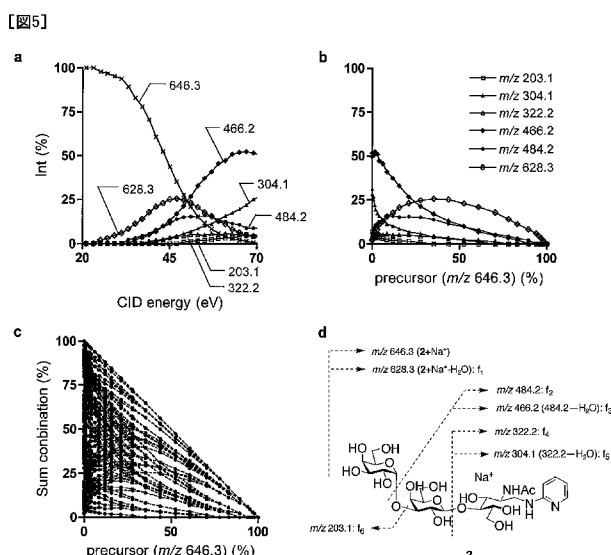
(10) 国際公開番号
WO 2012/033111 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 27/62 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/070322
- (22) 国際出願日: 2011年9月7日(07.09.2011)
- (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 2010-199676 2010年9月7日(07.09.2010) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構(JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒3320012 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 Saitama (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 蟹江 治 (KANIE Osamu) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢2-1 独立行政法人理化学研究所研究本館528号室 独立行政法人科学技術振興機構 ERA T O伊藤グライコトリロジープロジェクト内 Saitama (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス(SIKS & Co.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8階 Tokyo (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, 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, 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).

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR ANALYZING STRUCTURE OF SUBSTANCE

(54) 発明の名称: 物質の構造解析方法



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a method for analyzing the structure of a substance using triple quadrupole mass spectrometry (TQ-MS), the method making it possible to acquire MSⁿ information from data obtained through a TQ-MS examination. This method for analyzing the structure of a substance comprises: (a) subjecting the substance to be analyzed to an examination by TQ-MS while changing the value of CID energy; (b) determining, with respect to each of the values of CID energy, the percentage of the amount of precursor ions to the total ion amount and the percentage of the amount of product ions having a specific m/z value to the total ion amount; (c) extracting the values of the percentage of the amount of product ions having a specific m/z value to the total ion amount which correspond to the values of CID energy that give the values of the percentage of the amount of precursor ions to the total ion amount which were determined in the step (b); (d) determining, with respect to each of all combinations, the sum of the values of the percentage of the amount of product ions having a specific m/z value to the total ion amount which were extracted in the step (c); and (e) selecting the functions that each can be approximated to a straight line from among functions where the value of the percentage of the amount of precursor ions to the total ion amount is expressed by x and the value of the sum determined above with respect to each combination is expressed by y, and analyzing the structure of the substance on the basis of the values of m/z of product ions which give the selected functions.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2012/033111 A1

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

本発明の目的は、三連四重極質量分析法 (TQ-MS) を用いた物質の構造解析方法であって、TQ-MS 測定により得られたデータから MS 情報の取得を可能とする方法を提供することにある。本発明によれば、(a) 目的物質について、CID エネルギーの値を変化させて TQ-MS 測定を行い、(b) 各 CID エネルギーの値において、プレカーサーイオン量の総イオン量に対する百分率と、特定の m/z のプロダクトイオン量の総イオン量に対する百分率とを求め、(c) 工程 (b) において求めたプレカーサーイオン量の総イオン量に対する百分率の各値を与える CID エネルギーの各値における、前記特定の m/z のプロダクトイオン量の総イオン量に対する百分率の各値を抽出し、(d) 工程 (c) において抽出した前記特定の m/z のプロダクトイオン量の総イオン量に対する百分率の各値について、全ての組合せの和を求め、(e) プレカーサーイオン量の総イオン量に対する百分率の値を x とし、かつ前記求めた各組合せの和の値を y とする関数のうち直線近似できるものを選択し、選択した各関数を与えるプロダクトイオンの m/z 値から目的物質の構造を解析することを含む、物質の構造解析方法が提供される。

明 細 書

発明の名称：物質の構造解析方法

技術分野

[0001] 本発明は、目的物質について、三連四重極質量分析法による測定を行い、得られたデータについて所定のデコンボリューション処理を行うことにより目的物質の構造を解析する方法に関する。

背景技術

[0002] 三連四重極質量分析法 (triple-quadrupole mass spectrometry; TQ-MS) は、エレクトロスプレイイオン化 (electrospray ionization; ESI) 法と統合した高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と組合せて、頻繁に使用される (非特許文献 1～5 参照)。このような液体クロマトグラフ質量分析 (LC-MS) システムは、衝突誘起解離 (collision-induced dissociation; CID) 条件下においてイオンの断片化の分析を容易とすることから、構造情報を得るために用いることができる。さらに、クロマトグラフィーカラムにおける所定の種の保持時間から、HPLCにおいて用いられる固定相に対する種の親和性を決定でき、構造情報を得ることができる。しかし、この技術は、MS/MS情報しか提供しないという問題がある。また、四重極イオントラップ型質量分析法 (quadrupole ion trap mass spectrometry; QIT-MS) によれば、綿密な構造情報を提供するマルチステージMS/MS分析が可能となる (非特許文献 3, 4, 6～9を参照)。しかし、HPLC分析における化合物の溶出期間中にマルチステージMS/MS実験を行うことは、実際上は、困難である。したがって、HPLC分析に必要とされる時間内において構造情報について新たな洞察を得るためには、連続の質量スペクトル解析 (MSⁿ) が可能ではないというTQ-MSの欠点を解消することが重要である。

[0003] これまで、複雑なグリカンの構造及びグリコシド結合の形態を解明するための方法を開発するために、QIT-MSを用いたエネルギー分解質量分析

(energy-resolved mass spectrometry; E R M S) が調査されている。ほとんどの場合、様々なオリゴ糖のナトリウム化イオンについて得られた E R M S スペクトルは、プレカーサーイオン及び複数のプロダクトイオンに対応する一連のピークを含むものであり、単純なものである。これらのピークは、ボルツマン・シグモイド方程式 (Boltzmann sigmoidal equations) によって解析され、近似処理される (非特許文献 10~13 参照)。まれに、より複雑な E R M S スペクトルが得られることもある。グリカンの気相反応を解明する過程において、複雑なスペクトルが得られ、MSⁿスペクトルは、Q I T - MS の C I D 工程では通常得られないプロダクトイオンの断片化反応に関する情報 (MSⁿ⁺¹の情報) を含んでいることが明らかにされている。しかし、Q I T - MS 装置は MSⁿ実験を実施するために利用できるもので、このような情報は、Q I T - MS 分析には余り重要ではないと考えられる。その一方、T Q - MS 装置は、MSⁿ実験に用いることができないことから、上述の MSⁿ⁺¹の情報は、T Q - MS 分析にとって極めて重要になる。また、構造の解明のために、T Q - MS 法が H P L C と組合せて用いられる場合、このような MSⁿ⁺¹情報は有用となる。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1: Siuzdak, G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994, 91, 11290-11297.

非特許文献2: Yu, X.; Cui, D.; Davis, M. R. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1999, 10, 175-183.

非特許文献3: Gygi, S. P.; Aebersold, R. Chem. Biol. 2000, 4, 489-494.

非特許文献4: Villas-Boas, S. G.; Mas, S.; Akesson, M.; Smedsgaard, J.; Nielsen, J. Mass Spectrom. Rev. 2005, 24, 613-646.

非特許文献5: Korfmacher, W. A. Drug Discovery Today 2005, 10, 1357-1367.

非特許文献6: March, R. E. Mass Spectrom. Rev. 2009, 28, 961-989.

非特許文献7 : Jonscher1, K. R.; Yates III, J. R. Anal. Biochem. 1997, 244, 1-15.

非特許文献8 : March R. E. Int. J. Mass Spectrom. 2000, 200, 285-312.

非特許文献9 : March R. E. Rapid Commun. Mass Spectrom. 1998, 12, 1543-1554.

非特許文献10 : Kurimoto, A.; Daikoku, S.; Mutsuga, S.; Kanie, O. Anal. Chem. 2006, 78, 3461-3466.

非特許文献11 : Daikoku, S.; Ako, T.; Kato, R.; Ohtsuka, I.; Kanie, O. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2007, 18, 1873-1879.

非特許文献12 : Shioiri, Y.; Suzuki, K.; Kanie, O. J. Mass Spectrom. 2008, 43, 1132-1139.

非特許文献13 : Shioiri, Y.; Kurimoto, A.; Ako, T.; Daikoku, S.; Ohtake, A.; Ishida, H.; Kiso, M.; Suzuki, K.; Kanie, O. Anal. Chem. 2009, 81, 139-145.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明の目的は、三連四重極質量分析法（TQ-MS）を用いた物質の構造解析方法であって、TQ-MS測定により得られたデータからMSⁿ情報の取得を可能とする方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、上記課題を解決すべく、鋭意検討した結果、TQ-MS測定において取得されたERMSSペクトルに関し、総イオン量に対する各プロダクトイオン量の比率を求め、該プロダクトイオンの比率の任意の組合せの合計について線形回帰分析することによりMSⁿ情報を取得できることを見出した。本発明は、かかる知見に基づいて完成されたものである。

[0007] すなわち、本発明の態様は以下に関する。

[1] (a) 目的物質について、CIDエネルギーの値を変化させて三連四重極質量分析（TQ-MS）測定を行い、

(b) 各CIDエネルギーの値において、プレカーサーイオン量の総イオン量に対する百分率と、特定の m/z のプロダクトイオン量の総イオン量に対する百分率とを求め、

(c) 工程(b)において求めたプレカーサーイオン量の総イオン量に対する百分率の各値を与えるCIDエネルギーの各値における、前記特定の m/z のプロダクトイオン量の総イオン量に対する百分率の各値を抽出し、

(d) 工程(c)において抽出した前記特定の m/z のプロダクトイオン量の総イオン量に対する百分率の各値について、全ての組合せの和を求め、

(e) プレカーサーイオン量の総イオン量に対する百分率の値を x とし、かつ前記求めた各組合せの和の値を y とする関数のうち直線近似できるものを選択し、選択した各関数を与えるプロダクトイオンの m/z 値から目的物質の構造を解析することを含む、

物質の構造解析方法。

[2] 工程(b)において、CIDエネルギーの値をX軸とし、かつ百分率の値をY軸として、プレカーサーイオン量の総イオン量に対する百分率と、特定の m/z のプロダクトイオン量の総イオン量に対する百分率とをプロットしてグラフを作成する、[1]に記載の方法。

[3] 工程(c)において、プレカーサーイオン量の総イオン量に対する百分率をX軸として、前記特定の m/z のプロダクトイオン量の総イオン量に対する各百分率をY軸方向にプロットしてグラフを作成する、[1]又は[2]に記載の方法。

[4] 工程(d)において、プレカーサーイオン量の総イオン量に対する百分率をX軸として、前記求めた各組合せの和の値をY軸方向にプロットしてグラフを作成する、[1]～[3]のいずれかに記載の方法。

[5] 工程(e)における直線近似を以下の式(4)を用いて行う、[1]～[4]のいずれかに記載の方法：

[化1]

$$S_{yx} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (x_j - a_j)(y_j - b_j)}{n-2}} \quad \dots (4)$$

式中、 S_{yx} は、線形回帰曲線の残差を示し、 x_j 及び y_j は、データ j の座標要素を示し、 a_j 及び b_j は、回帰曲線の座標要素を示し、 $n-2$ は、自由度である。

[6] 工程(e)において、MSⁿ情報を取得する、[1]～[5]のいずれかに記載の方法。

[7] 前記目的物質が糖鎖である、[1]～[6]のいずれかに記載の方法。

発明の効果

[0008] 本発明によれば、従来、TQ-MS測定では不可能とされていたMSⁿ情報の取得が可能となり、目的物質についてのより詳細な構造解析が可能となる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]イオンXに関しQIT-MSによって得られた典型的な解離プロファイルを示す。図1のaは、プレカーサーイオンXからフラグメントイオン(f_1 ～ f_4)が生成されることを示すCIDスペクトルを示す。図1のbは、イオンXの解離に関し観測されるERMSスペクトルを示し、データはボルツマン・シグモイド方程式(Boltzmann sigmoidal equations)により、通常、分析することができる。図1のcは、プレカーサーイオンXをx軸とし、個々のプロダクトイオンをy軸として、図1bのERMSを再プロットしたグラフ(比率プロット)を示す。

[図2]図2のaは、ガングリオシドGD1a(1)のメチルエステルのナトリウム化イオンのERMSスペクトルを示す。図2のbは、図1aのERMSの比率プロットを示す。図2のcは、プレカーサーイオン(m/z 1916.1)の断片化を示す。いくつかのグリコシド結合の開裂に対応する解離が観測され、最も豊富なイオンは、N-アセチルガラクトサミニル開裂を伴ったy-イオ

ンであった。

[図3]イオンXの解離のERMSを示し、プロダクトイオンの一つ (f_1) は、さらに、 f_3 及び f_4 に解離する。図3のaは、解離スキムを示す。図3のbは、ERMSスペクトルを示し、いくつかのプロダクトイオンの曲線は、ボルツマン・シグモイド方程式によって近似することができない。図3のcは、ERMSの比率プロットを示し、一連の曲線の合計は直線となる。

[図4]QIT-MSにおいて得られた $[2 + Na]^+$ のERMSスペクトルを示す。図4のaは、ERMSスペクトルを示す。図4のbは、図1aのERMSの比率プロットを示す。黒丸は全てのプロダクトイオンの合計を示し、白い四角の記号は m/z 466.2 及び m/z 628.3 のイオンの合計を示す。図4のcは、プレカーサーイオン (m/z 646.3) の断片化を示す。PA及びN-アセチル基において生じたガラクトシル開裂及び脱水に対応する解離が観測された。

[図5]TQ-MSにおいて得られた $[2 + Na]^+$ のERMSスペクトルを示す。図5のaは、ERMSスペクトルを示す。図5のbは、図5aのERMSの比率プロットを示す。図5のcは、該比率プロットにおける個々のプロダクトイオンの強度の任意の合計を示す。図5のdは、プレカーサーイオン (m/z 646.3) の断片化を示す。PA及びN-アセチル基 (f_1 及び f_3) で生じたガラクトシル開裂 (f_2) 及び脱水に対応する解離が観測された。さらに、QIT-MSでは観測されなかった $f_4 \sim f_6$ 等の他のフラグメントが観測された。

[図6]TQ-MSにおいて得られたナトリウム付加化合物2の解離経路を示す。

発明を実施するための形態

[0010] 本発明の物質の構造解析方法は、(a) 目的物質について、CIDエネルギーの値を変化させてTQ-MS測定を行い、(b) 各CIDエネルギーの値において、プレカーサーイオン量の総イオン量に対する百分率と、特定の m/z のプロダクトイオン量の総イオン量に対する百分率とを求め、(c)

工程 (b) において求めたプレカーサーイオン量の総イオン量に対する百分率の各値を与えるCIDエネルギーの各値における、前記特定の m/z のプロダクトイオン量の総イオン量に対する百分率の各値を抽出し、(d) 工程 (c) において抽出した前記特定の m/z のプロダクトイオン量の総イオン量に対する百分率の各値について、全ての組合せの和を求め、(e) プレカーサーイオン量の総イオン量に対する百分率の値を x とし、かつ前記求めた各組合せの和の値を y とする関数のうち直線近似できるものを選択し、選択した各関数を与えるプロダクトイオンの m/z 値から目的物質の構造を解析することを含むことを特徴とする。

[0011] 本発明において、「CIDエネルギー」とは、CID (collision induced dissociation; 衝突誘起解離) を起こすときに加えるエネルギーを一般的に示し、具体的には、イオンを振動させるためのある周波数の交流電場の電圧を示す。「プレカーサーイオン」とは、前駆体としての目的物質に対応するイオンを意味し、「プロダクトイオン」とは、プレカーサーイオンについてTQ-MS測定を行うことにより得られる各 m/z を有するフラグメントイオンを意味する。また、「 m/z 」とは、質量数 (m) と電荷 (z) との比を示す。また、「MSⁿ情報」とは、プレカーサーイオンが多段階に分解されることによって生成するプロダクトイオンの m/z 値、シグナル強度、CIDエネルギー等から得られるプレカーサーイオンの構造に関する情報を意味する。

[0012] 本発明では、工程 (a) において、目的物質に対応するプレカーサーイオンから特定の m/z を有するプロダクトイオンが生成するまで、CIDエネルギーの値を変化させてTQ-MS測定を行う。好ましくは、プレカーサーイオンの強度がほぼ0となるまで、CIDエネルギーの値を変化させてTQ-MS測定を行う。

[0013] 本発明の構造解析の対象となる目的物質は、TQ-MS測定に供試できるものであれば、特に限定されるものではないが、糖鎖であることが好ましい。糖鎖としては、生体組織又は細胞等から得られたものでもよいし、合成さ

れたタンパク質に結合したのから得られたものでもよく、また、それらを酸加水分解又は酵素分解したり、HPLC等で分離精製したもの等を用いることができる。また、化学合成された糖鎖を用いることもできる。

[0014] 次いで、工程（b）において、変化させたCIDエネルギーの各値において、プレカーサーイオン量の総イオン量に対する百分率と、特定の m/z のプロダクトイオン量の総イオン量に対する百分率とを求める。具体的には、工程（a）において得られたTQ-MS測定データに基づいて、CIDエネルギーの各値におけるプレカーサーイオンの強度の総イオン強度に対する百分率と、特定の m/z のプロダクトイオン強度の総イオン強度に対する百分率とを求める。すなわち、CIDエネルギーを印加してTQ-MS測定を開始する時点では、プレカーサーイオン量は総イオン量に相当し、その百分率の値は100%となる。

[0015] 工程（b）において、CIDエネルギーをX軸とし、かつ百分率をY軸として、上記の通り得られたプレカーサーイオン量の総イオン量に対する百分率と、特定の m/z のプロダクトイオン量の総イオン量に対する百分率とをプロットしてグラフを作成し、各 m/z 値を有するプレカーサーイオン及びプロダクトイオンに関するERMSスペクトルを取得してもよい。本明細書では、このようなERMSスペクトルの一例として、下記実施例に関する図5aのグラフが示されている。ERMSスペクトルは、CIDエネルギー及び上記各イオン量の百分率の二つをパラメータとする複数のデータポイントを含む。

[0016] 続いて、工程（c）では、工程（b）において求めたプレカーサーイオン量の総イオン量に対する百分率の各値を与えるCIDエネルギーの各値における、前記特定の m/z のプロダクトイオン量の総イオン量に対する百分率の各値を抽出する。

[0017] 工程（c）において、プレカーサーイオンの百分率をX軸とし、かつプロダクトイオンの百分率をY軸として、上記抽出した特定の m/z のプロダクトイオン量の総イオン量に対する百分率の各値をプロットすることによりリグ

ラフを作成してもよい。本明細書では、このようなグラフの一例として、下記実施例に関する図5 bのグラフが示されている。

[0018] 続いて、工程（d）において、工程（c）において抽出した前記特定の m/z のプロダクトイオン量の総イオン量に対する百分率の各値について、全ての組合せの和を求める。

[0019] 工程（d）において、プレカーサーイオン量の総イオン量に対する百分率をX軸として、前記求めた各組合せの和の値をY軸方向にプロットしてグラフを作成してもよい。本明細書では、このようなグラフの一例として、下記実施例に関する図5 cのグラフが示されている。このようにして得られるグラフには、特定の m/z 値を有するプロダクトイオンの各組合せに係る百分率の合計を示す複数の曲線が含まれる。

[0020] 続いて、工程（e）において、プレカーサーイオン量の総イオン量に対する百分率の値を x とし、かつ工程（d）において求めた各組合せの和の値を y とする関数のうち直線近似できるものを選択し、選択した各関数を与えるプロダクトイオンの m/z 値から目的物質の構造を解析する。

[0021] 上述の通り、工程（d）においてグラフを作成した場合には、該グラフに含まれる複数の曲線のうち直線近似できるものを選択すれば良い。

[0022] 直線近似の方法としては、当業者に公知の各種手法を用いることができる。例えば、一般に知られる最小二乗法、下記式（4）又は式（5）を用いることにより、工程（d）における直線近似を行うことができる。

[0023] [化2]

$$S_{yx} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (x_j - a_j)(y_j - b_j)}{n-2}} \quad \dots (4)$$

[0024] 式（4）中、 S_{yx} は、線形回帰曲線の残差を示し、 x_j 及び y_j は、データ j の座標要素を示し、 a_j 及び b_j は、回帰曲線の座標要素を示す。 $n-2$ は、自由度である。ここで、閾値としての S_{yx} 値は、TQ-MSにおいて得られたデータに応じて適宜決定することができる。好ましくは、 $S_{yx} = 2$ を閾値

として用いることが好ましく、この場合、 S_{yx} の値が2以下となる曲線が直線近似により選択される。

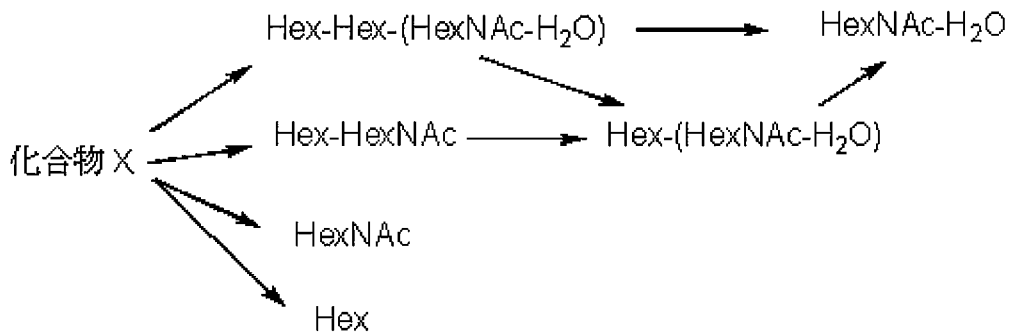
[0025] [化3]

$$R^2 = \frac{\sum_{j=1}^n (x_j - p)(y_j - q)}{\sqrt{\sum_{j=1}^n (x_j - p)^2} \sqrt{\sum_{j=1}^n (y_j - q)^2}} \dots (5)$$

[0026] 式(5)中、 x_j 及び y_j は、データjの座標要素を示し、p及びqはデータ座標のそれぞれの平均を示す。ここで、閾値としての R^2 値は、TQ-MSにおいて得られたデータに応じて適宜決定することができる。好ましくは、 $R^2=0.90$ を閾値として用いることが好ましく、この場合、 R^2 の値が0.90以上となる曲線が直線近似により選択される。

[0027] 本発明では、上記の通り、直線近似を行うことにより選択した各関数(グラフにおける曲線)を与えるプロダクトイオンのm/z値から目的物質の構造を解析する。具体的には、直線近似できた関数を与える組合せに係るプロダクトイオンのm/z値等を比較することにより、プレカーサーイオンからどのような順序で各プロダクトイオンが生成したかを解析することができる。例えば、下記実施例で使用した試料(ガリリ抗原三糖)が構造未知の化合物Xであると仮定した場合、本発明によれば、下記の解離経路及び構造情報を取得することが可能である。

[0028] [化4]



[0029] 上記解離経路において、Hexは、ヘキソース(六炭糖)を示し、Hex

N A c は、N-アセチルヘキソサミンを示す。上記解離経路の情報から、化合物 X の構造は、Hex-Hex-Hex N A c であることが明らかとなる。

[0030] すなわち、本発明の解析によれば、T Q-M S 測定においても、M S 情報を抽出することが可能となる。

[0031] 以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は以下の実施例により特に限定されるものではない。

実施例

[0032] <材料及び方法>

(材料)

ガングリオシド G D 1 a (1) は、生化学工業株式会社 (日本、東京) から購入し、エステル化した。ガリリ抗原三糖 (2) は、Carbohydrate Synthesis Ltd. (オックスフォード、イギリス) から購入し、過去に報告されている手順 (Hase, S.; Ikenaka, T.; Matsushima, Y. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1978, 85, 257-263.) に従い、ピリジルアミノ化した。

[0033] (機器 (M S) 及びデータの収集)

試料は、ポジティブモードで、Pico View ESI (nanospray) source (New Objective, Inc. MA、米国) を装備した、四重極イオントラップ型質量分析装置 Esquire 3000 plus (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany)、及び API Q-Star pulsar i (Applied Biosystems/SCIEX, ON、カナダ) を用いて分析した。

[0034] T Q-M S 測定として、上記 API Q-Star pulsar i Q-TOF MS 装置 (Analyst QS によって制御) を用いて行った実験は、以下の通りである。データ収集は、m/z 100 及び 2000 の間のフルスキャンで、ポジティブモードで行った。試料 (1 pmol/μL) をメタノールに溶解し、150 nL/min の流速で、塗布されたナノスプレーチップ (New Objective, Inc. MA、米国) を用いて、イオン源に導入した。ナノスプレーのための標準的なイオンスプレー電圧は、1600 V とした。窒素ガスを、カーテンガス (15 psi) 及び衝突ガスとして使

用した。衝突ガス圧力 2.8×10^{-3} torrに相応し、かつプレカーサーイオンの荷電状態及び m/z 値にに依じて23~69 eVに渡る衝突エネルギーと一致する機器パラメータCAD=2で、衝突誘起解離(CID)測定を行った。第一及び第二のデクラスタリングポテンシャル(declustering potentials)、すなわち、DP1及びDP2は、それぞれ50V及び15Vであり、フォーカシングポテンシャル(focusing potential)は250Vであった。MS/MSスペクトルは、低解像度モード(単位解像度未満)における四重極によるプレカーサーイオンの選択を用いて取得した。その結果、衝突セルに親の全同位体群を送り、全ての断片の同位体群を得た。ここで報告されている全てのスペクトルは、1.0分間のスキンの平均である。

[0035] 一方、上記四重極イオントラップ型質量分析装置Esquire 3000 plusによる、QIT-MS/MSを用いた質量分析のための詳細な実験条件は、過去に報告されている(Kanie, O.; Kurimoto, A.; Kanie, Y.; Daikoku, S.; Ohtake, A.; Suzuki, K. Proc. Jpn. Acad. Ser. B 2009, 85, 204-215.)。

[0036] (データの処理方法)

ERMSのグラフを得るために、以下の方程式(1)を用いた。イオン“ I_p ”が一連のプロダクトイオン $I_1, I_2, I_3, \dots, I_i$ を生成する場合、個々のイオンについての相対イオン電流を、以下の方程式(1)で定義した。この方程式(1)を用いることにより、本発明のERMSスペクトル(図5a)が得られる。

[0037] [化5]

$${}^{\text{rel}}C = \frac{C_{I_i}}{C_{I_p} + \sum_{j=1}^n C_{I_j}} \times 100 \quad \dots (1)$$

[0038] 式中、 ${}^{\text{rel}}C$ は、観測されたイオンのうちの所定のイオンのイオン電流(%)を示し、総イオン電流のパーセンテージで表される。 C_{I_i} は、焦点において観測されたイオン電流を示し、 C_{I_p} は、プレカーサーイオンのイオン電流を示す。計算は、エクセル(エクセル2000、マイクロソフト社、ワシントン、

米国) を用いて作成したプログラムを用いて行った。該プログラムは、D S U M関数に基づくものであり、考慮に入れる同位体範囲 (w) を選択するようにプログラムしたものである (本実験では w = 2) 。

[0039] $^{rel}C_{I_p}$ を C_{I_p} に対してプロットすることにより、図5bに示すグラフが得られる。プレカーサーイオン及びプロダクトイオンのピークの個々の強度は、百分率で標準化し、以下の式 (2) により表すことができる。

[0040] [化6]

$$\sum_{i=1}^n {}^{rel}C_{I_i} = 100 - {}^{rel}C_{I_p} \quad \dots (2)$$

[0041] フラグメントイオン (I_i) が独立して生成した場合、すなわち、全てのフラグメントイオンがプレカーサーから直接生成された場合、各イオンの強度は以下の式 (3) により表すことができる。

[0042] [化7]

$${}^{rel}C_{I_i} = n(100 - {}^{rel}C_{I_p}) \quad \dots (3)$$

式中、 $0 < n \leq 1$ である。

[0043] ${}^{rel}C_{I_0} = 0$ ($x = 0$) (プレカーサーイオンはもはや存在しない) の場合、y 切片 (${}^{rel}C_{I_i}$) は、 I_i の最大の応答、又は I_i の「理想的」な強度である。このように、各断片の曲線は一次関数を用いてフィットさせることができる。この事は、E R M S 実験のために収集したデータポイントを最小化できることを意味する。

[0044] I_i が独立していない場合、C I D エネルギーの範囲に渡るプレカーサー (I_p) に対する各プロダクトイオンの比率は直線的な関係ではない。この場合、 I_p の任意の組合せの合計は直線的な関係になる。そこで、全ての m イオンから I_i の l イオンの $C(m, l)$ を考慮し、このような組合せについて各データをプロットしてグラフ (図5c) を作成し、線形回帰曲線の残差 ($S y x$) の標準偏差を調査した。ここで、線形回帰曲線の残差 ($S y x$) は、以下の式 (4) により表される。

[0045] [化8]

$$S_{yx} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (x_j - a_j)(y_j - b_j)}{n-2}} \quad \dots (4)$$

[0046] x_j 及び y_j は、データ j の座標要素を示す。 a_j 及び b_j は、回帰曲線の座標要素を示す。 $n-2$ は、自由度である。さらに、プレカーサーイオンの強度が100%である場合には、プロダクトイオンの強度は0%となる。このように、座標 $(x, y) = (100, 0)$ を通過する回帰曲線を考慮した。 $S_{yx} \approx 0$ の場合、イオンの間には強い関係が存在する。なお、本実験では、閾値として $S_{yx} = 2$ を用いた。

[0047] <結果>

(広範囲のCIDエネルギーに対して得られるプレカーサーに対するフラグメントイオンの比率間の直線的な関係)

まず、CID条件下でのプレカーサーイオンXのMS/MS分析を検討する(図1a)。得られたスペクトル(図1a)は、イオンの個々のシグナルの強度を示す。未同定の化合物の構造を決定することを目的として、比較のためにそれらシグナルの比率を得るかもしれない。一方、CID条件下におけるイオンXのERMS分析(図1b)は、通常のMS/MS分析によって得ることができる情報に加え、プレカーサーイオンの分裂に必要な活性化エネルギーに関する情報を提供する。この事実から、衝突セルで起きている化学反応に関する情報を抽出できるかもしれない。直線関係にある一連の曲線が第二のプロットにおいて見られ、プレカーサーイオンの各百分率に対する個々のイオンの百分率を示している(図1c)。このような場合に、適用されたCIDエネルギーに関わらず、プレカーサーに対するフラグメントイオンの強度の比率が一定であるという重要な情報を得ることができる。この結果から、異なるCIDエネルギーにおいて得られたMS/MSスペクトル同士の比較が可能であることが示され、複雑なグリカンの構造決定における断片ピークの比率の比較のために極めて重要な基準が得られる(Takegawa, Y

.; Deguchi, K.; Ito, S.; Yoshioka, S.; Sano, A.; Yoshinari, K.; Kobayashi, K.; Nakagawa, H.; Monde, K.; Nishimura, S.-I. *Anal. Chem.* 2004, 76, 7294-7303, Kameyama, A.; Kikuchi, N.; Nakaya, S.; Ito, H.; Sato, T.; Shikanai, T.; Takahashi, Y.; Takahashi, K.; Narimatsu, H. *Anal. Chem.* 2005, 77, 4719-4725, Ashline, D.; Singh, S.; Hanneman, A.; Reinhold, V. *Anal. Chem.* 2005, 77, 6250-6262)。過去の報告において検体の大部分について観察されたように、異なるC I Dエネルギーに対するこのような直線性が、この種のE RMSスペクトル(図1 b)において一般に見受けられたことは注目すべきである(非特許文献10~13)。

[0048] ここで、Q I T - M S装置を用いて得られるE RMS分析について説明する。ガングリオシドG D 1 a (化合物1)のメチルエステルの解離反応は、「単純」な断片化過程に続くものの典型例であると考えられる(図2)。C I D条件下で、多数のフラグメントイオン(m/z 1610.9, 1245.8, 940.6, 778.6, 及び693.2)が、ナトリウム化物1 (m/z 1916.1: $[M + Na]^+$)から形成されたことが観測された。個々の一連のデータポイントは、ボルツマン・シグモイド方程式を用いて良好にフィッティングした。プレカーサー(前駆体) - プロダクト(生成物)の関係(比率プロット)は、図2 bに示され通り、広範囲のC I Dエネルギーに渡って、プレカーサーに対するフラグメントイオンの比率が一定であることを示している。

[0049] (フラグメントの断片化に起因する、E RMSにおけるプレカーサーに対するフラグメントイオン間の非直線性)

まれに、図3に示すような複雑なE RMSスペクトルが得られる。このようなデータの取扱いは、近似の困難性ゆえに、E RMSの定量的な分析において問題となっており、これらのスペクトル自身は「構造指紋(structural fingerprints)」と考えることができるものの、それらはそのような定量的な分析に利用されていない(Daikoku, S.; Kurimoto, A.; Mutsuga, S.; Akiyama, T.; Kanemitsu, T.; Shioiri, Y.; Ohtake, A.; Kato, R.; Saotome, C.; Ohtsuka, I.; Koroghi, S.; Sarkar, S. K.; Tobe, A.; Adachi, S.; Suzuki

, K.; Kanie, O. Carbohydr. Res. 2009, 344, 384-394.)。このような場合には、プレカーサーに対するフラグメントイオンの比率のいくつかは直線性を示し、その他は直線性を示さず、シグナル強度のいくつか (f_1 、 f_3 及び f_4) の合計 (f_1') が直線になる (図3 c)。フラグメントイオン f_3 及び f_4 は、 f_1 の曲線が点線 (f_1') から離れた地点において、 f_1 から生成したものと考えられた。この結果から、フラグメントイオンの断片化反応は直線離脱の地点に対応するCIDエネルギーにおいて起こり始めることが示された。

[0050] ピリジルアミノ化三糖誘導体 (ガリリ抗原 (Galili antigen) ; 2) が、ナトリウム付加種 (m/z 646.3) として観察され、次いで、QIT-MSを用いたERMS実験に供試した (図4 a)。一見して、 m/z 628.3 (f_1) 及び466.2 (f_2) を伴ったフラグメントイオンの生成の間には何らかの相関があるように思われた。これを確かめるため、これらのフラグメントイオンのピーク強度の合計を取得した (図4 b ; 白い四角の記号はこれらの二つのイオンの合計を表し、黒丸は全ての断片の合計である。)。 f_1 及び f_2 の強度の合計が一次関数と一致することは、これらのイオンは緊密な関係を有することを示している。さらに、これらのイオンのERMSプロファイルから、 m/z 466.2のフラグメントイオンは、 m/z 628.3のイオン及び m/z 646.3のイオン (最初のプレカーサー) から生成したことは明らかである。

[0051] (三連四重極MSにより得られたMS/MSスペクトルに含まれるMSⁿ情報)

上述の通り、選択したフラグメントイオンの強度の合計を調査することによって断片化経路を得る分析方法の潜在的有用性が示されたので、次に、TQ-MSを用いて、イオン $[2 + Na]^+$ のERMSスペクトルを調査した。TQ-MSにより得られたERMSスペクトルのプロファイルは、QIT-MSにより得られたものと全く異なっており、また、より複雑であった (図5 a)。個々のフラグメントイオンの「生成曲線」の間の明らかな差異に加えて、QIT-MS実験では観察されなかった m/z 304.1 及び 322.2 のイオンが観測された。また、QIT-MSの実験において観察されたように、 m/z 628.3 (f_1) 及

び 466.2 (f_3)のイオンは強力な関係を有しているものと考えられた。比率プロットは、また、フラグメントイオンの多くがそれらのプレカーサーと非直線関係を有することを示した (図5 b)。一対を超えるフラグメントイオンが互いに関係しているものと考えられたので、個々のフラグメントイオンの組合せの合計を調査した。任意の組合せ、即ち、全体のイオン (m) からのイオン (l) の $C(m, l)$ を考慮し、比率プロットにおいて線形回帰曲線の残差 (S_{yx}) の標準偏差を調査した (図5 c)。 S_{yx} 値が小さいほど、選択される対のイオンの間の関係はより強いと考えられる。図5 cに表される曲線のうち、直線近似により選択された曲線を構成するプロダクトイオン (フラグメントイオン) の組合せを表1に示す。表中、丸印で示されるプロダクトイオンが各曲線を構成する要素であり、各曲線に対応する S_{yx} 値が示されている。例えば、一連のフラグメントイオン $f_1 \sim f_4$ [m/z 304 (f_4), 466 (f_3), 484 (f_2), 628 (f_1)] は、一定の関係を示した。

[0052] [表1]

Syx 値	フラグメントイオン (m/z)					
	f_6 (203.1)	f_4 (304.1)	f_5 (322.2)	f_3 (466.2)	f_2 (484.2)	f_1 (628.3)
0.00	o	o	o	o	o	o
0.49	o	o	-	o	o	o
0.49	-	-	o	-	-	-
1.19	-	o	-	o	o	o
1.19	o	-	o	-	-	-
1.35	-	o	o	o	o	o
1.35	o	-	-	-	-	-

[0053] ERMSプロファイルを全体として見ると、プレカーサー($2+Na^+$)の生成物である f_2 からイオン f_3 が生成されたことが明らかとなり、また、 f_3 が f_4 を生成したことが明らかになった。この結果は、TQ-MSにおいて得られるERMSデータを本発明による方法により分析すれば、 MS^3 及び/又は MS^4 に等しい情報が得られることを示している。すなわち、従来技術では MS^n 情報を取得するために複数回の MS/MS 実験を行わなければならなかったのに対し、本発明によれば、TQ-MSを用いた1回のエネルギー分解質量分析(ERMS)を行えば MS^n 情報の取得が可能である。

[0054] (構造の詳細)

表1の結果から、具体的には、以下の情報が得られる。

- ・ $f_1 = [2 + \text{Na}^+](\text{プレカーサー}:646) - \text{H}_2\text{O}(18)$
- ・ $f_2 = [2 + \text{Na}^+] - \text{Hex}(162)$ $f_3 = f_1 - \text{Hex}$ 、かつ、 $f_3 = f_2 - \text{H}_2\text{O}$
- ・ $f_4 = f_1 - 2\text{Hex}$ 、かつ、 $f_4 = f_3 - \text{Hex}$

なお、「Hex」はヘキソース（六炭糖）を示し、括弧内の数値は m/z 値ないし分子量を示す。上記情報から、図6に示す通り、 $[2 + \text{Na}^+]$ （プレカーサーイオン；試料ガリリ抗原三糖）の解離経路に関する情報を取得することができた。

[0055] プロダクトイオンの構造に関し、イオン f_2 及び f_6 は、PA残基を伴った化合物であり、 f_1 、 f_3 及び f_4 は、PA残基とN-アセチル基との間の脱水イオンであった。ヘキソース由来Cイオン種 (f_5) が、また、小さいシグナルとして観測された。CID条件下におけるイミダゾリン構造の情報について、過去に報告がある (Kurimoto, A.; Kanie, O. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2007, 21, 2770-2778.)。全てのフラグメントイオンが化合物2の構造と相応したが、これらの m/z 値のみからは限られた情報のみ利用可能であった。上記分析から得られた情報は、次の通り、更なる詳細を提供した。すなわち、図6に示す通り、プレカーサーイオン ($2 + \text{Na}^+$) は、二つのグリコシド結合の開裂及び還元末端の脱水を通して、生成イオン f_1 、 f_2 、 f_5 及び f_6 に断片化された。 f_2 は、さらに、脱水及びグリコシル開裂を通して、 f_3 及び f_4 を生成した。イオン f_1 は、二つのグリコシル開裂によって f_4 に変換された。

請求の範囲

- [請求項1] (a) 目的物質について、CIDエネルギーの値を変化させて三連四重極質量分析 (TQ-MS) 測定を行い、
- (b) 各CIDエネルギーの値において、プレカーサーイオン量の総イオン量に対する百分率と、特定の m/z のプロダクトイオン量の総イオン量に対する百分率とを求め、
- (c) 工程 (b) において求めたプレカーサーイオン量の総イオン量に対する百分率の各値を与えるCIDエネルギーの各値における、前記特定の m/z のプロダクトイオン量の総イオン量に対する百分率の各値を抽出し、
- (d) 工程 (c) において抽出した前記特定の m/z のプロダクトイオン量の総イオン量に対する百分率の各値について、全ての組合せの和を求め、
- (e) プレカーサーイオン量の総イオン量に対する百分率の値を x とし、かつ前記求めた各組合せの和の値を y とする関数のうち直線近似できるものを選択し、選択した各関数を与えるプロダクトイオンの m/z 値から目的物質の構造を解析することを含む、
物質の構造解析方法。
- [請求項2] 工程 (b) において、CIDエネルギーの値をX軸とし、かつ百分率の値をY軸として、プレカーサーイオン量の総イオン量に対する百分率と、特定の m/z のプロダクトイオン量の総イオン量に対する百分率とをプロットしてグラフを作成する、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 工程 (c) において、プレカーサーイオン量の総イオン量に対する百分率をX軸として、前記特定の m/z のプロダクトイオン量の総イオン量に対する各百分率をY軸方向にプロットしてグラフを作成する、請求項1又は2に記載の方法。
- [請求項4] 工程 (d) において、プレカーサーイオン量の総イオン量に対する百分率をX軸として、前記求めた各組合せの和の値をY軸方向にプロ

ットしてグラフを作成する、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

[請求項5] 工程(e)における直線近似を以下の式(4)を用いて行う、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法：

[化1]

$$S_{yx} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (x_j - a_j)(y_j - b_j)}{n-2}} \quad \dots (4)$$

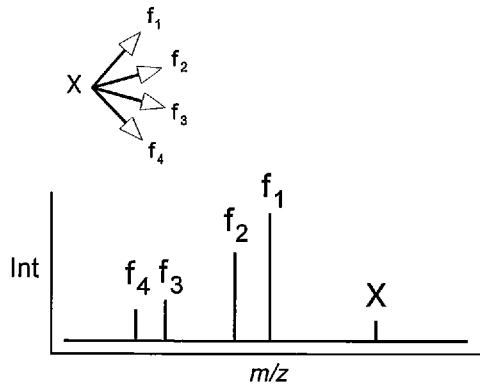
式中、 S_{yx} は、線形回帰曲線の残差を示し、 x_j 及び y_j は、データjの座標要素を示し、 a_j 及び b_j は、回帰曲線の座標要素を示し、 $n-2$ は、自由度である。

[請求項6] 工程(e)において、 MS^n 情報を取得する、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

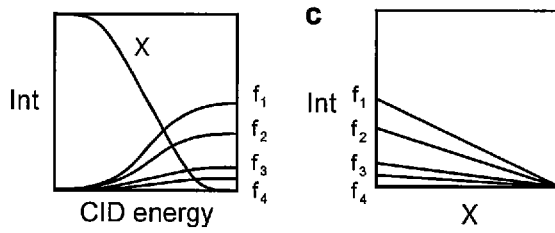
[請求項7] 前記目的物質が糖鎖である、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

[圖1]

a

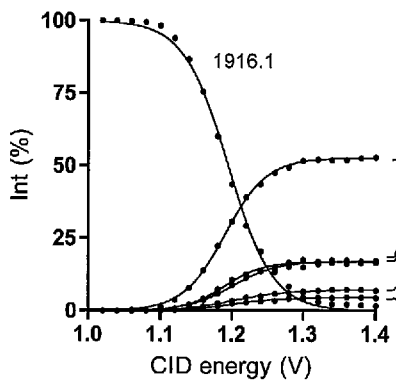


b

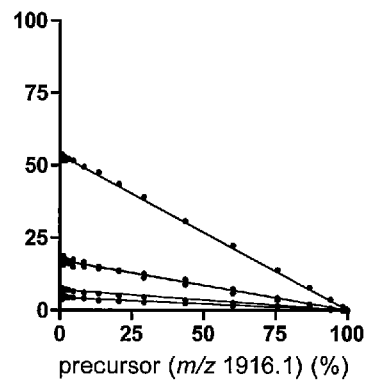


[圖2]

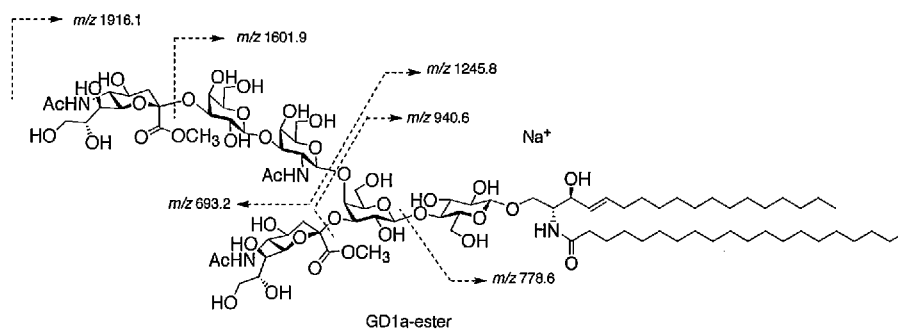
a



b

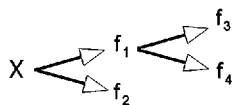


c

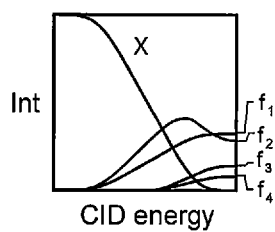


[圖3]

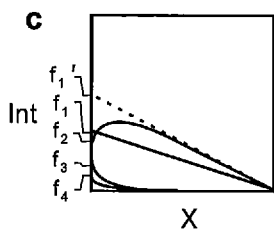
a



b

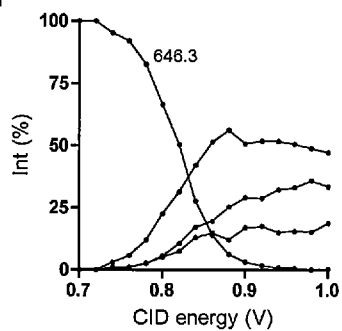


c

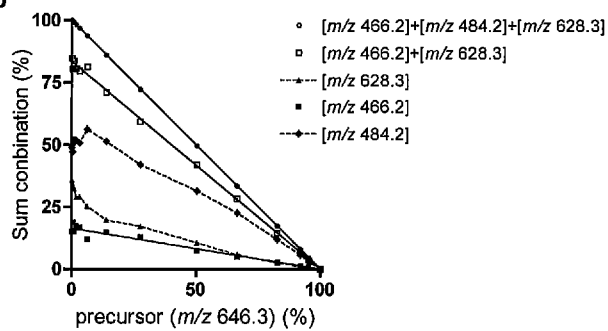


[圖4]

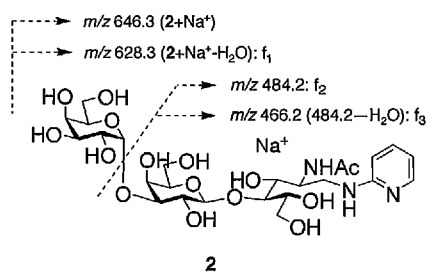
a



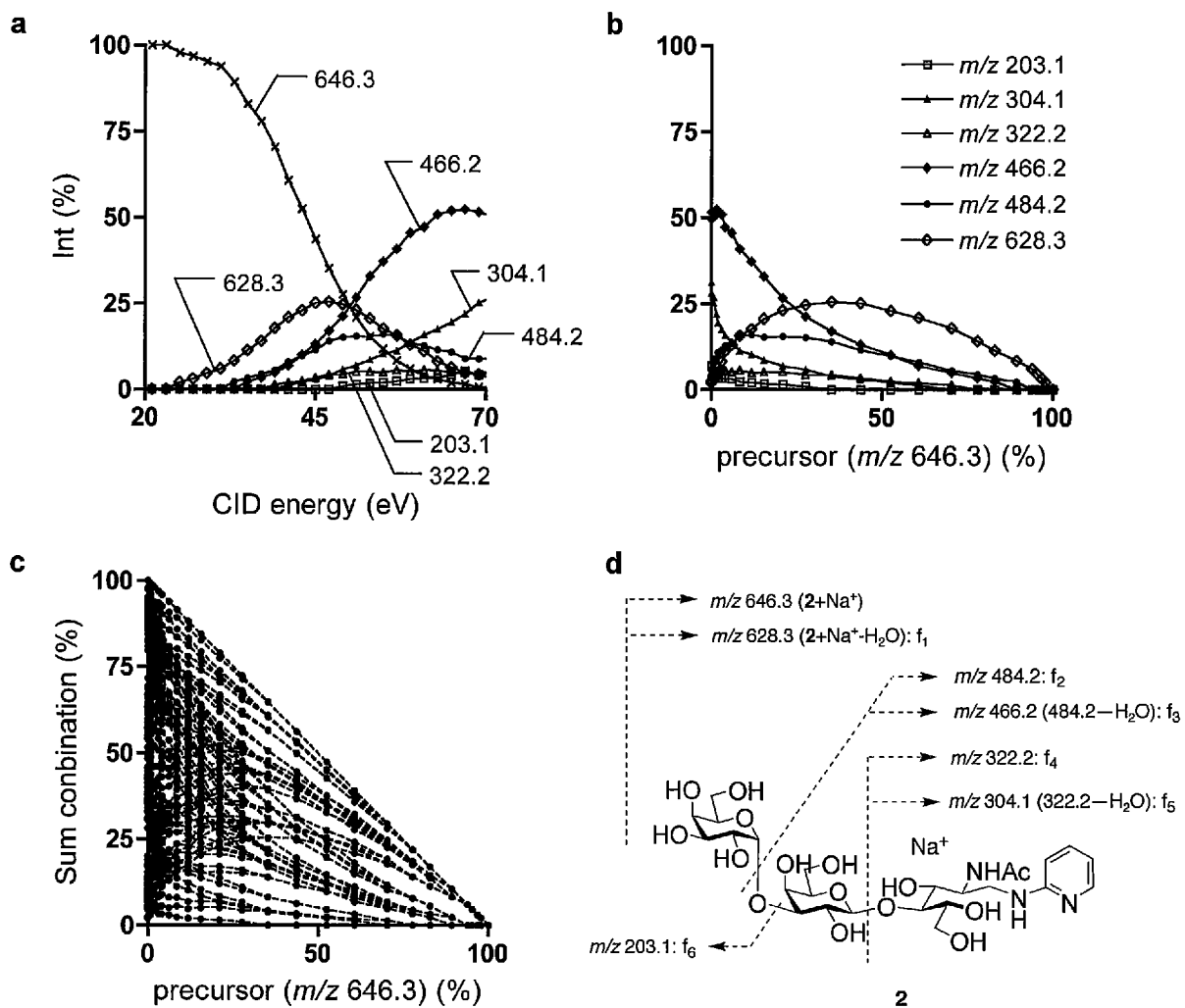
b



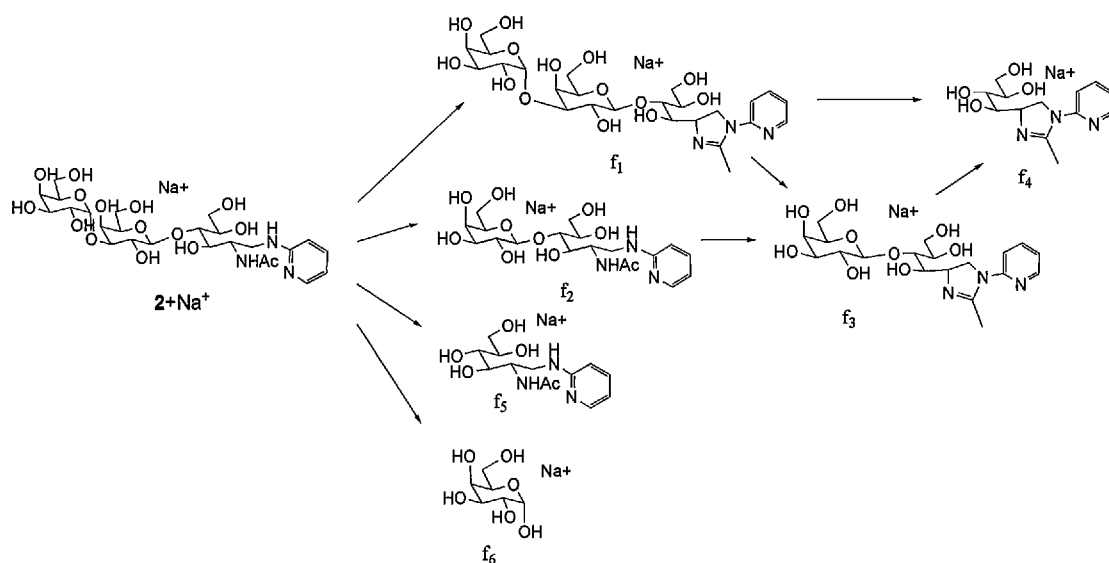
c



[圖5]



[圖6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/070322

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N27/62 (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)

G01N27/62-27/70, H01J49/00-49/48

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 1996-2011

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2011 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2011

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

JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2010-133707 A (Mitsubishi Chemical Corp.), 17 June 2010 (17.06.2010), paragraphs [0030] to [0047], [0074]; fig. 1 (Family: none)	1-7
P, X	Osamu Kanie et al., Multi-stage mass spectrometric information obtained by deconvolution of energy-resolved spectra acquired by triple-quadrupole mass spectrometry, Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2011.06.15, Volume 25, Issue 11, pp.1617-1624, Article first published online: 3 MAY 2011	1-7

 Further documents are listed in the continuation of Box C. 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
22 September, 2011 (22.09.11)Date of mailing of the international search report
04 October, 2011 (04.10.11)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N27/62(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. G01N27/62-27/70, H01J49/00-49/48

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	1971-2011年
日本国実用新案登録公報	1996-2011年
日本国登録実用新案公報	1994-2011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)

JSTPlus(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII)

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 2010-133707 A (三菱化学株式会社) 2010.06.17, 【0030】-【0047】、【0074】、図1、(ファミリーなし)	1-7
P, X	Osamu Kanie et al., Multi-stage mass spectrometric information obtained by deconvolution of energy-resolved spectra acquired by triple-quadrupole mass spectrometry, Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2011.06.15, Volume 25, Issue 11, pp.1617-1624, Article first published online: 3 MAY 2011	1-7

☐ 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

22.09.2011

国際調査報告の発送日

04.10.2011

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
 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)

波多江 進

2W

9508

電話番号 03-3581-1101 内線 3292