

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-505254

(P2014-505254A)

(43) 公表日 平成26年2月27日(2014.2.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574	Z
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	S
	GO 1 N 33/53	H
	GO 1 N 33/53	J

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 26 頁)

(21) 出願番号	特願2013-550945 (P2013-550945)	(71) 出願人	507181383
(86) (22) 出願日	平成24年1月31日 (2012.1.31)		インペリアル イノベーションズ リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成25年9月4日 (2013.9.4)		イギリス国 エスタブリッシュ 2 ピージー
(86) 国際出願番号	PCT/GB2012/000100		ロンドン、サウス ケンジントン、プリ
(87) 国際公開番号	W02012/104585		ンセス ゲート 5 2
(87) 国際公開日	平成24年8月9日 (2012.8.9)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	1101667.2		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成23年1月31日 (2011.1.31)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 森下 夏樹
		(74) 代理人	100181674
			弁理士 飯田 貴敏
		(74) 代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔

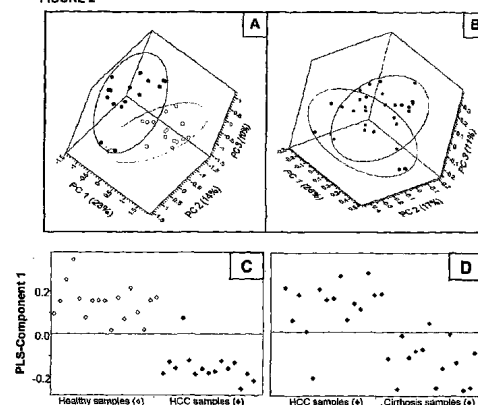
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 診断方法

(57) 【要約】

サンプルを分析し、グリシン、トリメチルアミン - N - オキシド、ヒップレート、およびシトレートからなる群から選択される少なくとも1つの化合物のレベルを決定し、サンプル中のレベルを対照レベルと比較することによって肝がんを診断するための方法が、本明細書中に開示される。サンプルの分析は、サンプルについてのプロフィールの決定を含み得る。開示される方法は、肝がんを有する患者と肝硬変を有する患者とを区別することにおいて有用である。

FIGURE 2



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

試験被験体からのサンプルを分析するための方法であって、該方法は、

i) 該試験被験体からの該サンプル中のグリシン、トリメチルアミン - N - オキシド、ヒップレート、およびシトレートからなる群から選択される少なくとも 1 つの化合物のレベルを決定するステップ、ならびに

ii) ステップ i) において決定された該少なくとも 1 つの化合物のレベルを少なくとも 1 つの対照レベルと比較するステップであって、該少なくとも 1 つの化合物のレベルは、該被験体が肝がんを有するかどうかの指標となるステップ

を含む、方法。

10

【請求項 2】

前記対照レベルは、健康な被験体からのサンプルから決定され、該対照レベルと比較して低減したレベルは、肝がんの指標となる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記対照レベルは、肝がん患者からのサンプルから決定され、該対照レベルと比較して同様であるレベルは、肝がんの指標となる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

サンプル中のグリシン、トリメチルアミン - N - オキシド、ヒップレート、およびシトレートからなる群から選択される少なくとも 2 つの化合物のレベルを決定するステップを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 5】

サンプル中のグリシン、トリメチルアミン - N - オキシド、ヒップレート、およびシトレートからなる群から選択される少なくとも 3 つの化合物のレベルを決定するステップを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

サンプル中のグリシン、トリメチルアミン - N - オキシド、ヒップレート、およびシトレートのレベルを決定するステップを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

前記少なくとも 1 つの化合物のレベルを用いて、前記試験被験体からの前記サンプルについてのプロフィールを決定するステップ；および該試験被験体からの該サンプルの該プロフィールを、健康な被験体からのサンプルから決定された少なくとも 1 つの対照レベルを用いて決定された対照プロフィールと比較するステップを含む、前述の請求項のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 8】

a) クレアチニン、クレアチン、カルニチン、およびアセトンからなる群から選択される少なくとも 1 つのさらなる化合物のレベルを決定するステップ；ならびに

b) ステップ a) において決定された該少なくとも 1 つの化合物のレベルを健康な被験体からのサンプルから決定された対照レベルと比較するステップであって、

i) クレアチニンおよび / もしくはアセトンのレベルの低減；および / または

ii) クレアチンおよび / もしくはカルニチンのレベルの増大

40

は、肝がんの指標となる、ステップ

をさらに含む、前述の請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

前記サンプルは哺乳動物から得られる、前述の請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

前記哺乳動物はヒトである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記サンプルは、選択された、血液、血漿、血清、脳脊髄液、胆汁酸、唾液、滑液、胸膜液、囲心腔液、腹膜液、排泄物、鼻液 (nasal fluid)、眼液 (ocular fluid)、細胞内液、細胞間液、リンパ液、および尿である、前述の請求項のい

50

ずれかに記載の方法。

【請求項 1 2】

前記サンプルは尿である、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記肝がんは肝細胞癌である、前述の請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 4】

化合物のレベルを決定するステップは、前記サンプルを、該化合物に特異的に結合する抗体と接触させるステップを含む、前述の請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 5】

化合物のレベルを決定するステップは、前記サンプルにおいて比色アッセイまたは分光光度アッセイを実施するステップを含む、請求項 1 ~ 1 3 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 1 6】

前記方法は、肝がんを有する患者と肝硬変を有する患者とを区別することができる、前述の請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 7】

肝がんを診断することにおいて使用するためのキットであって、該キットは、グリシン、トリメチルアミン - N - オキシド、ヒップレート、およびシトレートからなる群から選択される化合物のレベルを決定するための、少なくとも 1 つの試薬を含む、キット。

【請求項 1 8】

グリシン、トリメチルアミン - N - オキシド、ヒップレート、およびシトレートからなる群から選択される化合物のレベルを決定するための、少なくとも 2 つの試薬を含む、請求項 1 7 に記載のキット。

20

【請求項 1 9】

グリシン、トリメチルアミン - N - オキシド、ヒップレート、およびシトレートからなる群から選択される化合物のレベルを決定するための、少なくとも 3 つの試薬を含む、請求項 1 7 に記載のキット。

【請求項 2 0】

グリシン、トリメチルアミン - N - オキシド、ヒップレート、およびシトレートのレベルを決定するための試薬を含む、請求項 1 7 に記載のキット。

【請求項 2 1】

前記少なくとも 1 つの化合物のレベルを決定するための前記試薬は、前記アッセイにおいて、該少なくとも 1 つの化合物のレベルに依存して色の変化をもたらす、請求項 1 7 ~ 2 0 のいずれかに記載のキット。

30

【請求項 2 2】

前記少なくとも 1 つの化合物のレベルを決定するための前記試薬は、該少なくとも 1 つの化合物に特異的に結合する少なくとも 1 つの抗体を含む、請求項 1 7 ~ 2 0 のいずれかに記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

40

技術分野

本発明は、肝がん罹患した被験体を同定するための診断方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

発明の背景

肝がんは、肝臓に由来するがんであると考えられる原発性肝がんの形態、またはがんが、肝臓において生じ、別の器官に移動する続発性肝がんの形態を取り得る。肝細胞癌 (HCC) は、原発性肝がんの最も一般的な形態であり、世界中で 3 番目に一般的ながんの死因である^{1, 2, 3}。上記疾患は、開発途上世界、および特にサハラ砂漠以南のアフリカ諸国およびアジアにおいて特に流行しており⁴、そこでは、数カ国が、1 0 0 , 0 0 0 人

50

につき 20 症例を越える高い発生率を示す。がんが完全に除去されることができない場合、上記疾患は、通常、3 ヶ月～6 ヶ月以内に致死的である⁵。HCC の症状は、非常に重症であり得、黄疸、腹水による膨満 (b l o a t i n g)、血餅異常による容易な挫傷、食欲不振、故意でない体重損失、特に右上部における腹部の疼痛、吐き気、嘔吐、および疲労を含み得る⁶。

【0003】

現在の診断の方法としては、通常、生まれてすぐには検出不可能である血清 α - フェトプロテイン (AFP) (胎児の糖タンパク質) を用いて HCC についてスクリーニングすることが挙げられる。ほとんどの HCC は、AFP を分泌するが、AFP は、70% 未満の乏しい感度および特異度を有する^{7, 8, 9, 10}。さらに、血清の AFP 試験はひどく高価であるので、アフリカおよびアジアの地域において利用不可能であり得る。多くの他の血清マーカー (デス - γ - カルボキシプロトロンビン、抗 - p53、 γ - グルタミル - トランスペプチダーゼ、およびイソフェリチンが挙げられる) も、HCC についてスクリーニングすることにおいて使用されるが、AFP のように、低い度合いの感度および特異度を示す^{11, 12}。

10

【0004】

HCC についての血清マーカーの感度および特異度の問題は、現在の方法を用いて、肝硬変に罹患した患者を HCC に罹患した患者から区別することが難しい場合があるという事実によってさらに強調される。HCC の早期診断は、2 cm 以下の病変が切除または移植により治療できるので非常に重要である。従って、当該分野において、疾患の早期ステージにおいてでさえ、HCC を有する患者と、肝硬変を有する患者と、健康な対照とを区別するために十分に高い感度および特異度のレベルを有する試験の開発の真の必要性が存在する。

20

【0005】

血清マーカーの低い感度および特異度に関連する問題の他に、上記疾患が最も流行している地域は、倫理的考慮を生じる。多くのアフリカおよびアジアの国々において、宗教信仰は、疾患についてスクリーニングすることにおける侵襲性技術の使用を禁止する。開発途上世界における患者は、健康診断所から何日もの行程に住んでいる場合があるので、試験からの情報が、試験が行われた後すぐに利用可能であることも重要である。

30

【0006】

HCC は、CT スキャン、MRI スキャン、および生検を用いて、より正確に診断され得る¹³。しかし、これらの技術に関連する費用および時間、ならびに生検の侵襲性性質は、これらの試験が、上記疾患が最も高い流行を示している開発途上の地域に適していないことを意味する。

【0007】

従って、特異度および感度が高く、ならびに先進国および開発途上世界の両方において使用するために実用的であり、利用可能である HCC を診断する方法の開発の必要性が存在する。感度および特異度が高い試験は、早期ステージにおける上記疾患の検出を可能にし、HCC 患者についての予後において重要な改善をもたらす。

40

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

発明の開示

従って、本発明は、試験被験体からのサンプルを分析するための方法を提供し、上記方法は、

- i) 試験被験体からのサンプル中のグリシン、トリメチルアミン - N - オキシド、ヒップレート (hippurate)、およびシトレートからなる群から選択される少なくとも 1 つの化合物のレベルを決定するステップ、ならびに
- ii) ステップ i) において決定された少なくとも 1 つの化合物のレベルを少なくとも 1 つの対照レベルと比較するステップであって、少なくとも 1 つの化合物のレベルは、被験

50

体が肝がんを有するかどうかの指標となるステップを含む。

【0009】

驚くことに、本発明者らは、健康な被験体から取得されたサンプルと比較して、肝がんを有する被験体から取得されたサンプルにおいて、グリシン、トリメチルアミン - N - オキシド、ヒップレート、およびシトレートのレベルが有意により低いことを見出した。そのような化合物のレベルが、肝がんを診断するための方法の一部として測定されたことは以前に全くない。これらの特定の化合物のレベルの測定は、肝がんについての、感度および特異度が高いスクリーニングを可能にし、そして上記化合物が、広範囲の単純なアクセスを用いて測定され得るという事実は、上記疾患が最も流行している開発途上世界において、肝がんについての診断を助ける。

10

【0010】

本発明の方法は、i) 試験被験体からのサンプル中のグリシンのレベルを決定するステップ；およびステップ i) において決定されたグリシンのレベルを対照レベルと比較するステップを含み得る。

【0011】

本発明の方法は、i) 試験被験体からのサンプル中のトリメチルアミン - N - オキシドのレベルを決定するステップ；およびステップ i) において決定されたトリメチルアミン - N - オキシドのレベルを対照レベルと比較するステップを含み得る。

20

【0012】

本発明の方法は、i) 試験被験体からのサンプル中のヒップレートのレベルを決定するステップ；およびステップ i) において決定されたヒップレートのレベルを対照レベルと比較するステップを含み得る。

【0013】

本発明の方法は、i) 試験被験体からのサンプル中のシトレートのレベルを決定するステップ；およびステップ i) において決定されたシトレートのレベルを対照レベルと比較するステップを含み得る。

【0014】

本発明の方法は、グリシン、トリメチルアミン - N - オキシド、ヒップレート、およびシトレートからなる群から選択される少なくとも2つの化合物のレベルを決定するステップ；ならびに少なくとも2つの化合物のレベルを対照レベルと比較するステップを含み得る。1つの実施形態において、上記方法は、グリシンおよびトリメチルアミン - N - オキシドのレベルを決定するステップ、ならびにそのレベルを対照レベルと比較するステップを含み得る。別の実施形態において、上記方法は、グリシンおよびヒップレートのレベルを決定するステップ、ならびにそのレベルを対照レベルと比較するステップを含み得る。別の実施形態において、上記方法は、グリシンおよびシトレートのレベルを決定するステップ、ならびにそのレベルを対照レベルと比較するステップを含み得る。別の実施形態において、上記方法は、トリメチルアミン - N - オキシドおよびヒップレートのレベルを決定するステップ、ならびにそのレベルを対照レベルと比較するステップを含み得る。別の実施形態において、上記方法は、トリメチルアミン - N - オキシドおよびシトレートのレベルを決定するステップ、ならびにそのレベルを対照レベルと比較するステップを含み得る。別の実施形態において、上記方法は、ヒップレートおよびシトレートのレベルを決定するステップを含み得る。

30

40

【0015】

本発明の方法は、グリシン、トリメチルアミン - N - オキシド、ヒップレート、およびシトレートからなる群から選択される少なくとも3つの化合物のレベルを決定するステップ、ならびにそのレベルを対照レベルと比較するステップを含み得る。1つの実施形態において、上記方法は、グリシン、トリメチルアミン - N - オキシド、およびヒップレートのレベルを決定するステップ、ならびにそのレベルを対照レベルと比較するステップを含み得る。1つの実施形態において、上記方法は、グリシン、トリメチルアミン - N - オキ

50

シド、およびシトレートのレベルを決定するステップ、ならびにそのレベルを対照レベルと比較するステップを含み得る。1つの実施形態において、上記方法は、トリメチルアミン - N - オキシド、ヒップレート、およびシトレートのレベルを決定するステップ、ならびにそのレベルを対照レベルと比較するステップを含み得る。1つの実施形態において、上記方法は、グリシン、ヒップレート、およびシトレートのレベルを決定するステップ、ならびにそのレベルを対照レベルと比較するステップを含み得る。

【0016】

本発明の方法は、グリシン、トリメチルアミン - N - オキシド、ヒップレート、およびシトレートのレベルを決定するステップ、ならびにそのレベルを対照レベルと比較するステップを含み得る。

10

【0017】

必要に応じて、本発明の方法は、1つ以上のさらなるマーカーのレベルを決定するステップ、およびそのレベルを対照レベルと比較するステップを含み得る。

【0018】

上で議論された方法のうちの任意のものにおける対照レベルは、健康な被験体からのサンプルから決定され得る。この実施形態に従って、上記対照レベルと比較して低減している少なくとも1つの化合物のレベルは、肝がんの指標となる。

【0019】

あるいは、対照レベルは、肝がんを有する被験体からのサンプルから決定され得る。この実施形態に従って、上記対照レベルと比較して同様である少なくとも1つの化合物のレベルは、肝がんの指標となる。

20

【0020】

対照被験体からのサンプルは、試験被験体からのサンプルと並行してアッセイされ得るが、経験的データに基づいて絶対対照レベルを使用することが、より便利であり得る。絶対対照レベルは、閾値（例えば、少なくとも1つの化合物の閾値レベルまたは閾値プロフィールレベル）を提供する。少なくとも1つの化合物のレベル、または試験被験体からのサンプルのプロフィールレベルは、閾値絶対対照レベルと比較され得、ここで絶対対照値よりも高いか、またはより低いいずれかのレベルは、肝がんの指標となる。

【0021】

本発明の方法は、2つ以上の異なる時点において、同じ被験体からのサンプルを試験するために使用され得る。同じ被験体において、時間の経過とともに複数の試験を実施することは、疾患の重症度が測定されることを可能にし、例えば、疾患が悪化しているかどうかを観測する。あるいは、複数の試験を行うことは、薬物の効力が時間の経過とともにモニタリングされることを可能にし得る。

30

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】図1は、A. HCCを有する患者；B. 肝硬変を有する患者；およびC. 健康な対照からのメジアン¹H NMRスペクトルである。

【図2】図2Aは、HCC被験体 対 健康な対照の主成分分析（PCA）スコアのプロット（scores plots）である。図2Bは、HCC被験体 対 肝硬変の被験体の主成分分析（PCA）スコアのプロットである。図2Cは、健康な被験体 対 HCC被験体の直交シグナル補正（orthogonal signal correction）- 部分最小二乗法判別分析（OSC - PLS - DA）である。図2Dは、HCC被験体 対 肝硬変の被験体の直交シグナル補正 - 部分最小二乗法判別分析（OSC - PLS - DA）である。

40

【図3 - 1】図3は、健康な被験体、肝硬変の被験体、およびHCC被験体からのサンプル中の、A. クレアチニン；B. シトレート；C. カルニチン；D. クレアチン；E. ヒップレート；F. グリシン；G. トリメチルアミン - N - オキシドのメジアン積分値である。

【図3 - 2】図3は、健康な被験体、肝硬変の被験体、およびHCC被験体からのサン

50

ル中の、A . クレアチニン；B . シトレート；C . カルニチン；D . クレアチン；E . ヒップレート；F . グリシン；G . トリメチルアミン - N - オキシドのメジアン積分値である。

【図 3 - 3】図 3 は、健康な被験体、肝硬変の被験体、および H C C 被験体からのサンプル中の、A . クレアチニン；B . シトレート；C . カルニチン；D . クレアチン；E . ヒップレート；F . グリシン；G . トリメチルアミン - N - オキシドのメジアン積分値である。

【図 3 - 4】図 3 は、健康な被験体、肝硬変の被験体、および H C C 被験体からのサンプル中の、A . クレアチニン；B . シトレート；C . カルニチン；D . クレアチン；E . ヒップレート；F . グリシン；G . トリメチルアミン - N - オキシドのメジアン積分値である。

10

【発明を実施するための形態】

【0023】

グリシンとは、式 $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ を有する化合物またはその任意の天然に存在するバリエーションを意味する。

【0024】

トリメチルアミン - N - オキシドとは、式 $(\text{CH}_3)_3\text{NO}$ を有する化合物またはその任意の天然に存在するバリエーションを意味する。

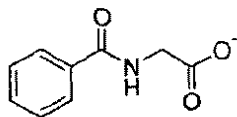
【0025】

本明細書中で、ヒップレートとは、式

20

【0026】

【化 1】



を有する化合物またはその任意の天然に存在するバリエーションを意味する。

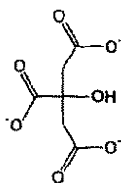
【0027】

本明細書中で、シトレートとは、式

【0028】

30

【化 2】



を有する化合物またはその任意の天然に存在するバリエーションを意味する。

【0029】

上の化合物のうちの任意の 1 つがイオン性である場合、対イオンは、任意のイオンであり得る。好ましくは、上の化合物は、中性形態である。

40

【0030】

肝がん

本発明の方法によって検出され得る肝がんは、任意の肝臓がんを含み得る。肝がんは、原発性肝がん（肝細胞癌（HCC）、線維層板肝細胞癌（fibrolamellar hepatocellular carcinoma）、胆管癌、血管肉腫（angiosarcoma）（または血管肉腫（haemangiosarcoma））、および胚芽細胞腫が挙げられるが、これらに限定されない）を含み得る。あるいは、肝がんは、肝臓から他の器官（肺、腎臓、乳房、胃および結腸、皮膚（例えば、黒色腫）、前立腺、膵臓、ならびに頸部が挙げられるが、これらに限定されない）に転移したがんを含む続発性

50

肝がんを含み得る。

【0031】

被験体

被験体は、任意の動物（例えば、脊椎動物または非脊椎動物）であり得る。脊椎動物は、哺乳動物であり得る。脊椎動物の哺乳動物は、ヒトであり得る。哺乳動物の例としては、マウス、ラット、ブタ、イヌ、ネコ、ウサギ、霊長目などが挙げられるが、これらに限定されない。被験体は、霊長目であり得る。好ましくは、被験体はヒトである。

【0032】

試験被験体は、診断が実施される被験体である。試験被験体は、肝がんのリスクがあると考えられる被験体であり得る。例えば、試験被験体は、肝がんの症状（例えば、黄疸、腹水による膨満、血餅異常による容易な挫傷、食欲不振、故意でない体重損失、特に右上部における腹部の疼痛、吐き気、嘔吐、および疲労）を示し得る。あるいは、試験被験体は、肝がんに対して公知の繋がりを持つ遺伝マーカーを示すので、肝がんのリスクがあると考えられ得る。あるいは、試験被験体は、試験で血清α-フェトプロテインに対して陽性となることから、肝がんのリスクがあると考えられ得る。

10

【0033】

本発明の方法は、非ヒト動物である被験体からのサンプルを分析するために使用され得、その動物は、肝がんのための薬物のスクリーニングのために使用される。少なくとも1つの化合物のレベルに及ぼされる潜在的な薬物の作用は、潜在的な薬物が有効であるかどうかの指標となり得る。

20

【0034】

対照被験体は、それに対して試験被験体が比較される被験体である。対照被験体は、肝がんを有する被験体であり得、その場合、対照プロフィールのプロフィールと同様のプロフィールを示す試験被験体は、肝がんを有すると診断される。あるいは、対照被験体は、健康な被験体であり得、その場合、対照被験体のプロフィールと異なるプロフィールを示す試験被験体は、肝がんを有すると診断される。好ましくは、対照被験体は、健康な被験体である。

【0035】

健康な被験体は、肝がんを有さない任意の被験体であり得る。好ましい実施形態において、本発明の方法は、肝がんを有する患者と肝硬変を有する患者とを区別することができる。少なくとも1つの化合物のレベルを考慮することにより被験体のプロフィールを決定することによって、本発明の方法は、非常に感度および特異度が高い試験を可能にし、上記試験は、肝がん罹患した患者と肝硬変に罹患した患者とを差異化することができる。

30

【0036】

サンプル

本発明の方法において試験されたサンプルは、被験体から得られた任意の生物学的標本であり得る。サンプルは、組織サンプルであり得る。サンプルは、最小限に侵襲性または非侵襲性に得られ得、例えば、サンプルは、血液、血漿、血清、唾液、尿、大便、涙、任意の他の体液、組織サンプル（例えば、生検）、およびその細胞抽出物（例えば、赤血球細胞抽出物）であり得るか、またはそれらから得られ得る。当業者は、サンプル（例えば、血清サンプル）が化合物のレベルの分析前に希釈され得ることを認識する。

40

【0037】

好ましくは、サンプルは、尿サンプルである。本発明の方法における尿サンプルの使用は、被験体からサンプルを得ることが完全に非侵襲性であるので、特に有益である。これは、被験体が、肝がんについて試験されるために侵襲性手順を受けることを、例えば、倫理的な理由または宗教的理由のために望まない場合がある場合に有用である。さらに、尿サンプルの使用は、簡単な手法でサンプルが得られることを意味し、いくつかの実施形態において、上に記載された本発明の方法または下に記載されるキットは、自己診断（self testing）を実施するために使用され得る。

【0038】

50

さらなる化合物

本発明の方法は、サンプル中の、血清 α - フェトプロテイン、クレアチニン、クレアチン、カルニチン、アセトン、ラクテート、グルタメート、ロイシン、アラニン、コリン、ホスホリルエタノールアミン、トリグリセリド、グルコース、グリコーゲン、アセテート、N - アセチル糖タンパク質、ビルベート、グルタミン、 α - ケトグルタレート、グリセロール、チロシン、1 - メチルヒスチジン、フェニルアラニン、低密度リポタンパク質、イソロイシン、バリン、およびアセトアセテート、またはそれらの任意の天然に存在するバリエーションからなる群から選択される少なくとも1つの化合物のレベルを決定するステップ、ならびに少なくとも1つの化合物のレベルを少なくとも1つの対照レベルと比較するステップをさらに含み得る。

10

【0039】

本発明の方法の一部としてさらなる化合物を測定することは、生成され得るサンプルのプロフィールがより正確となることを可能にし、従って、本発明の感度および特異度を増大させる。試験される化合物のレベルが上げれば上がるほど、肝がんを有する被験体のプロフィールに似たプロフィールを示すけれども肝がんには罹患していない被験体（例えば、肝硬変患者）を区別するための上記方法の能力が、より高くなる。

【0040】

1つの実施形態において、本発明の方法は、クレアチニンのレベルを決定するステップ、およびクレアチニンのレベルを対照レベルと比較するステップを含み、上記対照レベルは、a) 健康な被験体からのサンプルから決定され、上記対照レベルと比較して低減したレベルは、肝がんの指標となり、および/または上記対照レベルは、b) 肝がんを有する被験体からのサンプルから決定され、上記対照レベルと比較して同様であるレベルは、肝がんの指標となる。

20

【0041】

1つの実施形態において、本発明の方法は、クレアチンのレベルを決定するステップ、およびクレアチンのレベルを対照レベルと比較するステップを含み、上記対照レベルは、a) 健康な被験体からのサンプルから決定され、上記対照レベルと比較して増大したレベルは、肝がんの指標となり、および/または上記対照レベルは、b) 肝がんを有する被験体からのサンプルから決定され、上記対照レベルと比較して同様であるレベルは、肝がんの指標となる。

30

【0042】

1つの実施形態において、本発明の方法は、カルニチンのレベルを決定するステップ、およびカルニチンのレベルを対照レベルと比較するステップを含み、上記対照レベルは、a) 健康な被験体からのサンプルから決定され、上記対照レベルと比較して増大したレベルは、肝がんの指標となり、および/または上記対照レベルは、b) 肝がんを有する被験体からのサンプルから決定され、上記対照レベルと比較して同様であるレベルは、肝がんの指標となる。

【0043】

好ましい実施形態において、本発明の方法は、試験被験体からのサンプル中のグリシン、トリメチルアミン - N - オキシド、ヒップレート、シトレート、クレアチニン、クレアチン、およびカルニチンのレベルを決定するステップ、ならびにそれらの化合物のレベルを対照レベルと比較するステップを含み、上記対照レベルは、健康な被験体からのサンプルから決定され、上記対照レベルと比較して低減したレベルは、肝がんの指標となる。

40

【0044】

別の好ましい実施形態において、本発明の方法は、試験被験体からのサンプル中のグリシン、トリメチルアミン - N - オキシド、ヒップレート、シトレート、クレアチニン、クレアチン、およびカルニチンのレベルを決定するステップ、ならびにそれらの化合物のレベルを対照レベルと比較するステップを含み、上記対照レベルは、肝がん患者からのサンプルから決定され、上記対照レベルと比較して同様であるレベルは、肝がんの指標となる。

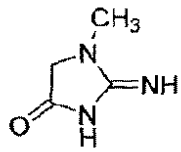
50

【 0 0 4 5 】

本明細書中で、クレアチニンとは、式

【 0 0 4 6 】

【 化 3 】



を有する化合物またはその任意の天然に存在するバリエーションを意味する。

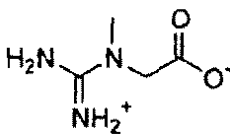
10

【 0 0 4 7 】

本明細書中で、クレアチンとは、式

【 0 0 4 8 】

【 化 4 】



を有する化合物またはその任意の天然に存在するバリエーションを意味する。

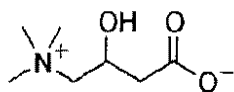
20

【 0 0 4 9 】

本明細書中で、カルニチンとは、式

【 0 0 5 0 】

【 化 5 】



を有する化合物またはその任意の天然に存在するバリエーションを意味する。1つの実施形態において、カルニチンは、L - カルニチンエナンチオマーである。

30

【 0 0 5 1 】

上の化合物のうちの任意の1つがイオン性である場合、対イオンは、任意のイオンであり得る。好ましくは、上の化合物は、中性形態である。

【 0 0 5 2 】

化合物のレベルを決定するステップ

本明細書中で、化合物のレベルを決定するステップは、当該分野において公知である任意の定量方法または定性方法を用いて達成され得、それにより、試験サンプルからの少なくとも1つの化合物のレベルは、対照サンプルからの少なくとも1つの化合物のレベルと比較され得る。

【 0 0 5 3 】

少なくとも1つのレベルの決定は、単一の方法、または方法の組み合わせを用いて達成され得る。

40

【 0 0 5 4 】

化合物のレベルの決定は、その化合物の濃度を決定するステップを含み得るか、または代替的に、相対尺度において、その化合物のレベルを決定するステップを含み得る。

【 0 0 5 5 】

少なくとも1つの化合物のレベルを決定するために使用され得る方法としては、液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) ^{1 4}、キャピラリー電気泳動、ならびに質量分析法と組み合わせたこれらの技術の各々、すなわち、液体クロマトグラフィー - 質量分析法 ^{1 5}、ガスクロマトグラフィー - 質量分析法 ^{1 6}、高速液体クロマトグラフィー - 質量分析法、キャピラリー電気泳動 - 質量分析

50

法¹⁷が挙げられ得るが、これらに限定されない。

【0056】

少なくとも1つの化合物のレベルを決定するために使用され得る他の方法としては、熱分解質量分析法、屈折率分光法(RI)、紫外分光法(UV)、近赤外分光法(Near-IR)、マイクロ波分光法、核磁気共鳴分光法(NMR)¹⁸、ラマン分光法、光散乱分析(LS)、薄層クロマトグラフィー(TLC)、電気化学分析、蛍光分析、放射化学分析、ネフェロメトリー、タービジメトリー(turbidometry)、電気抵抗分析、流体-固体相互作用ベースの検出(fluid-solid interaction-based detection)、分光光度法、比色定量、光反射、燃焼熱分析、免疫アッセイ、免疫組織化学アッセイ、および当該分野において公知である他の方法が挙げられ得る。

10

【0057】

1つの実施形態において、少なくとも1つの化合物のレベルの決定は、分光光度アッセイを用いて達成される。分光光度アッセイは、物質を含む溶液の、特定の波長の光を吸収する能力を測定することによって、特定の化合物の量が決定され得る任意のアッセイであり得る。分光光度アッセイは、サンプル中に存在する化合物の直接検出を含み得、ここで上記化合物は、存在する化合物のレベルに依存して、公知の波長において異なる吸光度を提供する。あるいは、上記アッセイは、特定の化合物の存在下での吸光度の変化を受ける試薬の添加を含み得る。吸光度のこの変化は、目的の特定の化合物のレベルを決定するために測定され得る。

20

【0058】

比色アッセイ

1つの実施形態において、少なくとも1つの化合物のレベルの決定は、比色アッセイを用いて達成され得る。比色アッセイは、色の変化を測定すること、または色の変化を観測することによって化合物のレベルが決定され得る任意のアッセイであり得る。比色アッセイは、物質の吸光度が測定される波長が電磁スペクトルの可視領域内である分光光度アッセイであり得る。比色アッセイは、色チャートとサンプルとの色の比較を含み得る。比色アッセイは、特定の化合物の存在下での測定可能な色の変化を受ける試薬の添加を含み得る。

【0059】

少なくとも1つの化合物の各々のレベルの決定は、別個の比色アッセイを用いて決定され得る。任意の比色アッセイは、化合物のレベルの決定のために使用され得、上記アッセイは、サンプル中の化合物のレベルのみに依存し、かつ任意の他の変数には重要な程度まで依存しない色の変化をもたらす。

30

【0060】

当該分野において公知である任意のアッセイは、サンプル中の少なくとも1つの化合物のレベルを検出するために使用され得る。使用され得るアッセイの例は、

シトレートアッセイ(例えば、AbCam(製品コード-ab83396)から入手可能なもの)(それは、オキサロアセテートを介してシトレートをピルベートに変換することを含む。ピルベートは、その後、無色のプローブを、容易に検出可能な強く着色した(ラムダマックス(Lambda max)=570nm)蛍光の(Ex/Em, 535/587nm)生成物に変換する。)

40

グリシンアッセイ(それは、クロラミンTによるグリシンのホルムアルデヒドへの分解を含む。ホルムアルデヒドは次に、アセチルアセトンおよびアンモニアが反応物であるハンチ反応によって、3,5-ジアセチル-1,4-ジヒドロルチジンに変換され得る。低い範囲(0.1μg~3μgのグリシンのレベル)におけるこの反応生成物は、蛍光光度法により測定され得るのに対して、より高い範囲においては、比色分析が使用され得る¹⁹。)

TMAOアッセイ(アセテートバッファー(0.8M、pH4.5)中の硫酸鉄(FeSO₄)とエチレンジアミン四酢酸(EDTA)二ナトリウム(0.1M)との等モルの

50

混合物による T M A への還元後、クロマゲン (c h r o m a g e n) としてピクレートの使用を含む^{20, 21}。)

である。

【0061】

ヒトまたは機械が読み取り可能な細片 (s t r i p)

少なくとも1つの化合物のレベルは、ヒトまたは機械が読み取り可能な細片の使用を通して決定され得、上記少なくとも1つの化合物のレベルは、上記ヒトまたは機械が読み取り可能な細片における変化を測定することによって決定され得る。ヒトまたは機械が読み取り可能な細片における変化は、上記ヒトまたは機械が読み取り可能な細片の、中または上に存在する試薬と上記少なくとも1つの化合物との間の化学反応を介して起こるヒトまたは機械が読み取り可能な細片における変化であり得る。例えば、ヒトまたは機械が読み取り可能な細片は、少なくとも1つの化合物のレベルを決定するために、少なくとも1つの比色アッセイを実施するための試薬を含み得る。

10

【0062】

ヒトまたは機械が読み取り可能な細片は、複数の領域を含み得、別個の化学反応が各領域において行われる。各領域における化学反応は、少なくとも1つの化合物のうちの1つを検出するために使用され得る。各領域に存在する試薬は、サンプルと接触すると、サンプル中に存在する化合物との化学反応を受けることができる。少なくとも1つの化合物の各々のレベルは次に、ヒトまたは機械が読み取り可能な細片の各領域において起こった変化 (例えば、色の変化) の度合いに従って決定され得る。

20

【0063】

1つの実施形態において、ヒトまたは機械が読み取り可能な細片における変化が色の変化である場合、ヒトまたは機械が読み取り可能な細片は、ヒトによって読み取られ得、ヒトまたは機械が読み取り可能な細片を、様々な度合いの色を示し、かつ様々な度合いの色が特定のレベルの化合物に帰するチャートと比較する。

【0064】

別の実施形態において、ヒトまたは機械が読み取り可能な細片は、特定の波長において溶液の吸光度を測定することによって、または任意の他の手段によって、各領域中のヒトまたは機械が読み取り可能な細片において起こった変化 (例えば、色の変化) の度合いを計算する機械によって読み取られ得る。

30

【0065】

ヒトまたは機械が読み取り可能な細片の各領域に提供されるアッセイは、ヒトまたは機械が読み取り可能な細片の領域に起こる変化に関する任意のアッセイであり得、その変化は、少なくとも1つの化合物のレベルのみに依存する。

【0066】

結合アッセイ

少なくとも1つの化合物のレベルは、結合アッセイを含む方法によって決定され得る。結合アッセイは、少なくとも1つの化合物のうちの1つが、1つ以上の他の分子によって特異的に結合される任意のアッセイであり得、1つ以上の他の分子は、その後検出され得る。1つの実施形態において、1つ以上の他の分子は、1つ以上のタンパク質であり得る。少なくとも1つの化合物のうちの1つに特異的に結合するタンパク質は、1つ以上のタンパク質に特異的な抗体を用いて、その後検出され得る。

40

【0067】

1つの実施形態において、1つ以上の他の分子は、少なくとも1つの化合物のうちの1つに特異的に結合する抗体であり得る。

【0068】

抗体は、モノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体、またはそれらのフラグメントであり得る。

【0069】

少なくとも1つの化合物のレベルは、免疫アッセイまたは免疫組織化学アッセイを用い

50

て決定され得る。本発明の方法において使用することに適した免疫組織化学アッセイの例としては、免疫蛍光アッセイ、例えば、直接蛍光抗体アッセイ、間接蛍光抗体（IFA）アッセイ、抗補体免疫蛍光アッセイ、およびアビジン - ビオチン免疫蛍光アッセイが挙げられるが、これらに限定されない。他のタイプの免疫組織化学アッセイとしては、免疫ペルオキシダーゼアッセイが挙げられる。

【0070】

少なくとも1つの化合物のレベルは、上記化合物に特異的に結合する抗体を用いて決定され得、別様に当該分野において公知である比色分析手段または放射分析手段を通して上記抗体は検出され得る。1つの実施形態において、少なくとも1つの化合物のレベルは、サンドイッチアッセイを用いて決定され得、それにより少なくとも1つの化合物のうちの1つは、1つのタンパク質によって特異的に結合され、第2のタンパク質によって特異的に検出される。

10

【0071】

化合物のレベルは、上記化合物に特異的に結合することが知られる結合タンパク質を提供することによって決定され得る。上記結合タンパク質は、その後、上記結合タンパク質に特異的な抗体によって検出され得る。

【0072】

サンプルのプロフィールを作製すること（profiling）

サンプルのプロフィールは、少なくとも1つの化合物のレベルを分析することによって決定され得る。サンプルのプロフィールを作製することにより、単一の代謝産物ではなく、代謝産物比の組み合わせ（「代謝プロフィール」）によって特徴付けられるべき被験体の群間に違いを与える。

20

【0073】

サンプルのプロフィールは、少なくとも1つの化合物のレベルを基準として、被験体が肝がんを有するかどうかを決定するために使用され得る。サンプルのプロフィールは、試験被験体からのサンプル中の化合物のレベルおよび対照被験体からのサンプル中の化合物のレベルの全体比較を可能にする。

【0074】

プロフィールを作製することは、外的化合物（例えば、尿のクレアチニン）に対する少なくとも1つの化合物のレベルの考慮を含み得る正規化を含み得る。これは、例えば、健康な被験体と比較して肝がんを有する被験体において変わらない他の化合物のレベルを比較することによって、サンプルの希釈に依存してレベルを正規化し得る。あるいは、プロフィールを作製することは、少なくとも1つの化合物の比を計算することを含み得る。プロフィールを作製することは、他のものと比較して、少なくとも1つの化合物のうちの特定の化合物により重点を置き得る。

30

【0075】

キット

本発明は、肝がんを診断することにおいて使用するためのキットを提供し、上記キットは、グリシン、トリメチルアミン - N - オキシド、ヒップレート、およびシトレートからなる群から選択される化合物のレベルを決定するための、少なくとも1つの試薬を含む。

40

【0076】

本発明のキットは、グリシン、トリメチルアミン - N - オキシド、ヒップレート、およびシトレートからなる群から選択される化合物のレベルを決定するための、少なくとも2つの試薬を含み得る。

【0077】

本発明のキットは、グリシン、トリメチルアミン - N - オキシド、ヒップレート、およびシトレートからなる群から選択される化合物のレベルを決定するための、少なくとも3つの試薬を含み得る。

【0078】

本発明のキットは、グリシン、トリメチルアミン - N - オキシド、ヒップレート、およ

50

びシトレートのレベルを決定するための試薬を含み得る。

【0079】

少なくとも1つの化合物のレベルを決定するための、本発明のキットにおいて使用される試薬は、アッセイにおいて、少なくとも1つの化合物のレベルに依存して、色の変化をもたらし得る。

【0080】

少なくとも1つの化合物のレベルを決定するための、本発明のキットにおいて使用される試薬は、少なくとも1つの化合物に特異的に結合する少なくとも1つの抗体を含み得る。

【0081】

10

本発明のキットは、使用のための指示をさらに含み得る。

【0082】

本発明のキットは、試験細片の上に置かれた少なくとも1つの化合物のレベルを決定するための試薬を含み得る。試験細片の異なる領域は、複数の化合物のレベルを決定するための試薬を含み得、従って、異なるアッセイは、試験細片の異なる領域において実施され得る。

【0083】

1つの実施形態において、本発明のキットは、少なくとも1つの化合物のレベルを決定するための試薬を含む試験細片、および比較チャートを含み得る。比較チャートは、様々な度合いの色を示し得、その色に対して試験細片に存在する色が測定され得る。比較チャートは、試験細片に存在し得る様々な度合いの色が特定のレベルの化合物に帰するとされ得る。

20

【実施例】

【0084】

実施例1：患者の選択

エジプト人の尿および血清のサンプルをNational liver Institute, Menoufiya University, Shbeen El Kom, Egyptに通う患者から収集した。倫理的承認は、National Liver Institute, Menoufiya UniversityおよびHammersmith Hospital Campus, Imperial College Londonにおける研究倫理委員会によって与えられた。

30

【0085】

合計58人の患者を研究のために起用した：（早期の動脈の増強、および門脈相における迅速なウォッシュアウトを示す2つの撮像技術によって、または血清AFP > 400 ng mL⁻¹とともに1つの撮像によって診断された）HCCを有する18人の患者；臨床的または組織学的に認められた肝硬変疾患を有する20人の患者；および20人の健康なエジプト人の対照被験体。3つ全てのコホートからの11サンプルを、主成分分析（PCA）、多変量解析技術に従って、「アウトライアー」と同定した。これは、多変量データに不正に影響を与える異常なスペクトルの発見の指標となり、これらのサンプルをさらなる分析から除外した。これによりHCC群において16サンプル、肝硬変群において14、および健康な対照群において17が残った。HCC群のメジアン年齢は、肝硬変群よりも有意に高くなかった（ $p = 0.37$ ）が、健康な対照よりも有意に高かった（ $p = 0.01$ ）。健康な対照群（9/17）よりもHCC群（15/16）において有意に男性が多かった（ $p = 0.02$ ）が、肝硬変群（11/14）は、それには匹敵しなかった（ $p = 0.32$ ）。HCCステージの病期分類は、Okuda病期分類システム（staging system）に従ったものであり、腫瘍の体積および肝代償不全に基づいて、ステージIは、早期の疾患を表し、ステージIIIは、進行した疾患を表す（28）。HCC被験体の1人は、ステージIの疾患を有し、10人はステージII、および5人はステージIIIを有した。HCCを有する患者の大部分および肝硬変を有する患者の50%は、HCV抗体陽性であった：それぞれ、11/16（69%）、および7/14（50%）

40

50

）。HCCまたは肝硬変を有する残りの患者は、多様な病因を有した。全ての健康な対照は、エジプトの生まれであり、肝臓疾患の病歴を有さなかった。

【0086】

実施例2：尿サンプルの収集

無作為の5 mLの尿サンプルを、エジプトにおいて、透明のガラスチューブの中に収集し、収集後、A . I . G , M . M . E . C、およびS . D . T - RによるImperialへのドライアイス上での航空輸送まで - 80 °Cにて2時間～4時間保存した。サンプルをロンドンにおいて解凍させ、標準的な方法に従って調製した²²：400 μLの尿を200 μLのバッファー溶液（0.2 M Na₂HPO₄ / 0.2 M NaH₂PO₄、pH 7.4）と混合し、60 μLの3 - トリメチルシリル - （2, 2, 3, 3 - ²H₄） - 1 - プロピオネート（TSP）/ D₂O溶液（TSPの最終濃度 = 1 mM）を加えた。TSPは、内部化学シフトの参照として役立ち（δ 0.00 ppm）、D₂Oは、磁場ロックを提供した。緩衝化尿サンプルを10分間静置させ、次に13,000 gで10分間、遠心分離した。プロトン核磁気共鳴（¹H NMR）分光法のために、550 μLの上清を5 mmの直径のガラスNMRチューブ（Wilma Lab GlassTM, New Jersey, USA）の中に移した。サンプルは、データ獲得まで最高4時間までNMR自動分析器におけるサンプル列（queue）の中に残った。

10

【0087】

実施例3：血清の実験室試験

方法

血清AFP、クレアチニン、アラントランスアミナーゼ（ALT）、アスパルテートトランスアミナーゼ（AST）、ビリルビン、およびアルブミンを、エジプトにおいて、尿サンプルの収集時にCobas Integra 400 - Autoanalyzer（Roche, Rotkreuz, Switzerland）を用いて測定した。

20

【0088】

結果

研究被験体の血清AFP、クレアチニン、ALT、AST、ビリルビン、およびアルブミンについてのメジアン（範囲）値の概要を表1に示す。血清AFPレベルを肝硬変群およびHCC群においてのみ測定した。メジアン血清AFPは、HCC患者において有意により高かった（745 IU mL⁻¹対77 IU mL⁻¹、p < 0.001）が、肝硬変群における最も低い血清AFPは、20 IU mL⁻¹であり、20 IU mL⁻¹のカットオフを用いると、全ての肝硬変患者は、血清AFPレベルに基づいて誤ってHCCと分類されてしまう。メジアン血清クレアチニンは、対照と比較して、HCC群において有意により高かった（106 mmol L⁻¹対62 mmol L⁻¹、p < 0.001）が、これは、肝硬変の被験体に対して、有意に異ならなかった（106 mmol L⁻¹対150 mmol L⁻¹、p = 0.16）。血清ALT、AST、およびビリルビンのレベルは、健康な対照と比較して、HCC群において全てが有意により高かったが、肝硬変の被験体は、それには匹敵しなかった。血清アルブミンは、健康な対照と比較して、HCC群において有意により低かったが、肝硬変の被験体は、それには匹敵しなかった。

30

【0089】

表1

40

【0090】

【表 1】

	HCC (範囲)	肝硬変 (範囲)	健康な対照 (範囲)	p-値 (マン-ホイットニー)
血清サンプル (n)	16	14	17	-
AFP (IU mL ⁻¹)	745 (174-5000)	77 (20-174)	-	^b <0.001
クレアチニン (mmol L ⁻¹)	106 (44-318)	150* (97-229)	62 (44-80)	^a <0.001および ^b 0.16
ALT (IU L ⁻¹)	56 (11-164)	30 (16-119)	12 (9-18)	^a <0.001および ^b 0.36
AST (IU L ⁻¹)	79 (22-224)	51 (31-190)	15 (11-20)	^a <0.001および ^b 0.44
ビリルビン (μmol L ⁻¹)	63 (17-547)	48 (14-156)	12 (0.7-19)	^a <0.001および ^b 0.19
アルブミン (g L ⁻¹)	30 (19-34)	29 (23-35)	40 (38-44)	^a <0.001および ^b 0.79

* 2つのサンプルは、血清クレアチニンレベル測定をされなかった。

10

記号説明: ^a HCC 対 健康な対照; ^b HCC 対 肝硬変。

【0091】

実施例 4: ¹H NMR 分光法のスペクトル獲得および加工

サンプルを、無作為の、群に分けられていない順序で行った。¹H MR スペクトルを、水ブリサチュレーションした状態でパルス収集順序 (JEOL 500 MHz Eclipse + NMR 分光計) を用いて得た。16 のデータ収集物を合計 (summate) した。18.7 s の合計繰返し時間を用いて 90° のパルス角度を使用し、その結果、完全に解きほぐした (fully-relaxed) データを得た。獲得時間は、8.7 s であった。データを 64 K ポイントに収集した。MR スペクトルを、KnowItAllTM Informatics System v7.8 (Bio-Rad, Philadelphia, USA) を用いて加工した。自由誘導減衰を 2 の倍数でゼロフィリング (zero-filled) し、0.3 Hz のラインブロードニングファクター (line-broadening factor) を有する指数窓関数を掛け、その後フーリエ変換を行った。全ての MR スペクトルの位相を等しくし (phased)、ベースライン補正を適用した。全てのスペクトルは、TSP を基準とし (δ 0.00 ppm)、メチル-クレアチニンのピークを δ 3.05 ppm に合わせた。MR スペクトル共鳴を、文献に従って割り当てた^{23, 24, 25}。MR スペクトルの分析は、溶媒内のプロトンの交換に起因する、残留の水のシグナル、および尿素のシグナルの変動を除くために、δ 4.50 ppm ~ δ 6.40 ppm の領域を除いて、δ 0.20 ppm ~ δ 10.00 ppm の範囲を含んだ。

20

30

【0092】

実施例 5: 多変量統計的解析

方法

患者群間の違いを、単一の代謝産物ではなく、代謝産物比の組み合わせ (「代謝プロフィール」) を用いて特徴付けた。主成分分析 (PCA)、および部分最小二乗法判別分析 (PLS-DA) の形態での多変量統計的解析を、最初の分析のために使用した²⁶。PCA は、共分散構造の調査を通して複雑なデータの概観を提供する目的変数なし (unsupervised) の分析ツールであり、サンプルのアウトライアーおよびクラスター化を強調する。PLS-DA は、代謝産物データをクラスメンバーシップ (class membership) に関連付ける目的変数あり (supervised) の分析方法であり、群間の分離をはっきりさせる。複雑なスペクトルを、0.02 + / - 0.01 ppm のより小さい領域または「バケット」に分け、ソフトウェアアプリケーション KnowItAll Informatics System v7.8 (Bio-Rad, Philadelphia, USA) における「インテリジェントバケットティング (intelligent bucketting)」アルゴリズムを用いて、特定の代謝産物のピークを表した。これらの領域を次に積分し、総スペクトル積分の和に対して正規化し、そのデータを、多変量解析の前に平均化した (mean-centred)。パレート測定した (Pareto-scaled) データも使用したが、結果は、平均化したデータと同様であり、モデルスペクトルノイズの傾向があったので、平均化したデータのみを全ての分析のために使用した。クラスター化およびアウトライアーを強調するために、同じソ

40

50

ソフトウェアを用いてPCAを実施した。データを次に、Pirouette v4.0 (Infometrix, Washington, USA)を用いて、PLS-DAによって分析した。研究されている生理学的状態と直接関係しないスペクトルにおける変動を除くため、および個体間の変動の、可能性のある影響を最小限にするために、直交シグナル補正 (OSC) のデータフィルタリング技術を使用した^{27, 28}。各分析について、モデルを生み出すために、1つのOSC構成要素を除いた。各モデルの区別力 (discriminatory power) を2つの技術を用いて確認した。1つ目は、リーブワンアウト (leave-one-out) 交差検定であり、それにより、各サンプルを順番に分析から排除し、残りのサンプルおよび排除されたサンプルのクラスメンバーシップから作り出されるモデルを予測した²⁹。2つ目は、完全な外的確認法 (full external validation) であり、訓練事例 (training set) (無作為に選択された、サンプルの70%) からモデルを作り出し、それらの予測力を、独立した「試験」事例 (サンプルのうちの残しておいた30%) を用いて試験した。完全な外的確認法を、サンプルの30%の異なる事例を除いて3回繰り返し、平均をとった。両方の技術について、モデルの誤分類マトリックスは、正しく予測されたサンプルの数を記載し、このことからモデルの感度および特異度が計算され得た。

【0093】

結果

3つの被験体コホートからの代表的な尿のスペクトルを図1に示す。11サンプルをPCAによって「アウト라이어」と同定し、さらなる分析から除外した。これらは、HCC群からの2つのサンプルスペクトル (そのうちの1つは、優位を占めるグルコース代謝産物を示し、それは、未診断の糖尿病からもたらされたかもしれない糖尿を示しており、もう1つのサンプルは、適切に位相を等しくすることができなかった) ; 肝硬変群からの6つのスペクトル (そのうちの3つは、著しい (marked) グルコース代謝産物を示した (適切に位相を等しくされることができなかった1つのサンプル、優位を占めるラクテートのピークを有する1つのサンプル、ならびに多変量解析に強く影響する δ 1.45 ppmおよび δ 1.60 ppmにおいて顕著な未同定ピークを示した1つのサンプル)) ; ならびに健康な対照群からの3つのスペクトル (それらの全ては、優位を占めるグルコース代謝産物を示し、それは糖尿を示す) を含んだ。得られた群のPCAスコアのプロットは、HCCサンプル 対 健康な対照のサンプルのはっきりとしたクラスター化を示した (図2A)。OSC-PLS-DAは、リーブワンアウトアルゴリズムを用いて、100%の感度および94%の特異度でHCCコホートおよび健康な対照コホートを区別した ($R^2 = 0.8$ 、 $Q^2 = 0.74$) (図2C)。完全な外的確認法パラダイムを用いて、区別的な感度は100%、および特異度は93%であった。PLS-DAモデルに最も寄与する共鳴は、グリシン (δ 3.57 ppm)、トリメチルアミン-N-オキシド (TMAO) (δ 3.27 ppm)、ヒップレート (δ 3.96 ppm)、シトレート (δ 2.66 ppm)、クレアチニン (δ 3.05 ppm)、クレアチン (δ 3.93 ppm)、およびカルニチン (δ 3.23 ppm) であった。

【0094】

HCCサンプル 対 肝硬変サンプルのPCAスコアのプロットは、より悪い群クラスター化を示した (図2B)。OSC-PLS-DAは、リーブワンアウトアルゴリズムを用いて、81%の感度および71%の特異度でHCCコホートおよび肝硬変コホートを区別した ($R^2 = 0.54$ 、 $Q^2 = 0.25$) (図2D)。完全な外的確認法パラダイムを用いて、区別的な感度は75%、および特異度は67%であった。PLS-DAの区別化に最も強く寄与する共鳴は、TMAO (δ 3.27 ppm)、クレアチン (δ 3.93 ppm)、およびカルニチン (δ 3.23 ppm) であった。

【0095】

肝臓疾患群におけるサンプルの男性優勢に起因して、発見が、性ではなくHCCの作用によるものであることを確認するために、男性のみの分析を始めた。男性HCCの尿は、100%の感度および93%の特異度で健康な対照の尿から区別化され得、80%の感度

10

20

30

40

50

および 55% の特異度で肝硬変を有する患者の尿から区別化され得た。区別的な代謝産物（グリシン、TMAO、ヒップレート、シトレート、クレアチニン、クレアチン、およびカルニチン）は、合わせた性の比較と同様であった。

【0096】

実施例 6：単変量統計的解析

方法

PLS-DA 負荷プロット (loadings plots) によって決定される最も重要な区別的な代謝産物の共鳴を積分し、総スペクトル積分の和に対して正規化した。値を、総スペクトル積分に対して、パーセント指標として表した。GraphPad Prism v5.01 (California, USA) を用いて、HCC 群、肝硬変群、および健康な対照群の間の違いをマン-ホイットニー検定法を用いて分析し、正常ではないデータの分布を仮定し、 p -値 < 0.05 を有意であると考えた。

10

【0097】

結果

HCC 被験体の尿において低減した代謝産物

尿のグリシンレベル（総スペクトル積分に対して正規化された % として表される）は、健康な対照と比較して、HCC 被験体の尿において有意に低減した（メジアン [四分位数間範囲] $0.46 [0.24 \sim 0.71]$ および $2.41 [1.30 \sim 2.95]$ ($p < 0.001$)) が、肝硬変の被験体と比較して、有意に低減しなかった ($0.53 [0.13 \sim 1.27]$ ($p = 0.88$)) (図 3F)。尿の TMAO レベルは、健康な対照と比較して、HCC 被験体の尿において有意に低減した ($1.17 [0.47 \sim 1.56]$ 、および $3.98 [2.69 \sim 4.67]$ ($p < 0.001$)) が、肝硬変の被験体と比較して、有意に低減しなかった ($2.03 [0.47 \sim 3.07]$ ($p = 0.18$)) (図 3G)。尿のヒップレートレベルは、健康な対照と比較して、HCC 被験体において有意に低減した ($0.53 [0.23 \sim 0.98]$ 、および $1.62 [1.08 \sim 1.88]$ ($p < 0.001$)) が、肝硬変の被験体と比較して、有意に異ならなかった ($0.66 [0.0 \sim 0.89]$ ($p = 0.65$)) (図 3E)。尿のシトレートは、健康な被験体と比較して有意に低減し ($0.04 [0.0 \sim 0.84]$ 、および $1.68 [1.06 \sim 2.74]$ ($p < 0.001$))、肝硬変の被験体と比較して、有意性に対して低減した傾向を有した ($0.91 [0.09 \sim 1.36]$ ($p = 0.12$)) (図 3B)。尿のクレアチニンレベルは、健康な対照および肝硬変の被験体と比較して、HCC の尿において低減したが、有意なレベルまでではなかった ($13.7 [11.59 \sim 18.69]$ 、 $17.49 [13.82 \sim 24.11]$ 、および $17.71 [11.78 \sim 22.28]$ (それぞれ、 $p = 0.12$ および 0.33)) (図 3A)。

20

30

【0098】

HCC 被験体の尿において上昇した代謝産物

尿のクレアチンレベルは、健康な対照および肝硬変の被験体と比較して、HCC 被験体の尿において有意に上昇した： $1.5 [0.92 \sim 3.32]$ ； $0.54 [0.04 \sim 1.28]$ 、および $0.26 [0.12 \sim 0.39]$ (それぞれ、 $p = 0.003$ および $p < 0.001$) (図 3D)。尿のカルニチンレベルは、健康な対照および肝硬変の被験体と比較して、HCC 被験体の尿において有意に上昇しなかった： $1.16 [0.25 \sim 2.59]$ ； $0.58 [0.36 \sim 0.86]$ 、および $0.39 [0.29 \sim 0.97]$ ($p = 0.29$ および $p = 0.30$) (図 3C)。

40

【0099】

【化 6】

参考文献

- ¹ El-Serag, H.B. *Hepatol. Res. (Suppl. 2)* S88-S94
- ² Taylor-Robinson, S.D. et al., *Lancet* 1997, 350 (9085), 1142-1143
- ³ Khan, S.A, et al., *J. Hepatol.* 2002, 37 (6), 806-813
- ⁴ Shariff MI et al., *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2009, 3 (4), 353-367
- ⁵ www.hepatocellular.org
- ⁶ Chien-Jen Chen et al., *JAMA* 2006, 295 (1): pp. 65-73.
- ⁷ Furui J, Furukawa M, Kanematsu T. The low positive rate of serum alpha-fetoprotein levels in hepatitis C virus antibody-positive patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 1995 Sep;42(5):445-449. 10
- ⁸ Nguyen MH, Keffe EB. Screening for hepatocellular carcinoma. *J Clin Gastroenterol* 2002 Nov;35(5 Suppl 2):S86-S91.
- ⁹ Peng YC, Chan CS, Chen GH. The effectiveness of serum alpha-fetoprotein level in anti-HCV positive patients for screening hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 1999 Nov;46(30):3208-3211.
- ¹⁰ Stefaniuk P, Cianciara J, Wiercinska-Drapalo A. Present and future possibilities for early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2010 Jan 28;16(4):418-424.
- ¹¹ Raedle, J. et al., *C. Dig. Dis. Sci* 1995, 40 (12), 2587-2594.
- ¹² Gomaa et al., *World J. Gastroenterol.*, in press.
- ¹³ El-Serag HB, Marrero JA, Rudolph L, Reddy KR (May 2008). "Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma". *Gastroenterology* 134 (6): 1752-63. 20
- ¹⁴ Yang J., et al. *J. Chromatogra B*, 2004, 813, 1-2, 59-65
- ¹⁵ Lu, X. et al., *J. Chromatogra. B*, 2008, 866, 64
- ¹⁶ Pasikanti, K.K. et al., *J. Chromatagr. B*, 2008, 871, 202
- ¹⁷ Benavente F. et al., *Electrophoresis*, 2006, 27, 4570
- ¹⁸ Hollywood, K. et al., *Proteomics* 6, 2006, 4716
- ¹⁹ Sardesai M., et al., *Clinica Chimica Acta*, 1970, 29, 1, 67-71
- ²⁰ Barnes and Blackstock, 1974
- ²¹ Wekell J.C. et al., *Journal of food science*, 1991, 56(1), 132-135
- ²² Beckonert O, Keun HC, Ebbeis TM, Bundy J, Holmes E, Lindon JC, et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat Protoc* 2007;2(11):2692-2703. 30
- ²³ Holmes E, Foxall PJ, Spraul M, Farrant RD, Nicholson JK, Lindon JC. 750 MHz 1H NMR spectroscopy characterisation of the complex metabolic pattern of urine from patients with inborn errors of metabolism: 2-hydroxyglutaric aciduria and maple syrup urine disease. *J Pharm Biomed Anal* 1997 Jul;15(11):1647-1659.
- ²⁴ Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. NMR spectroscopy of biofluids. *Annu Rep NMR Spectrosc* 1999;6(2):1-88.
- ²⁵ Wishart DS, Tzur D, Knox C, Eisner R, Guo AC, Young N, et al. HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Res* 2007 Jan;35(Database issue):D521-D526
- ²⁶ Trygg J, Holmes E, Lundstedt T. Chemometrics in metabonomics. *J Proteome Res* 2007 Feb;6(2):469-479. 40
- ²⁷ Psihogios NG, Gazi IF, Elisaf MS, Seferiadis KI, Bairaktari ET. Gender-related and age-related urinalysis of healthy subjects by NMR-based metabonomics. *NMR Biomed* 2008 Mar;21(3):195-207.

【 0 1 0 0 】

【化 7】

²⁸ Westerhuis J, Hoefsloot H, Smit S, Vis D, Smilde A, van Velzen J, et al. Assessment of PLSDA cross validation [Abstract]. Metabolomics 2008 Mar 24;4(1):81-89.

²⁹ Mahadevan S, Shah SL, Marrie TJ, Slupsky CM. Analysis of metabolomic data using support vector machines. Anal Chem 2008 Oct 1;80(19):7562-7570

【図 1】

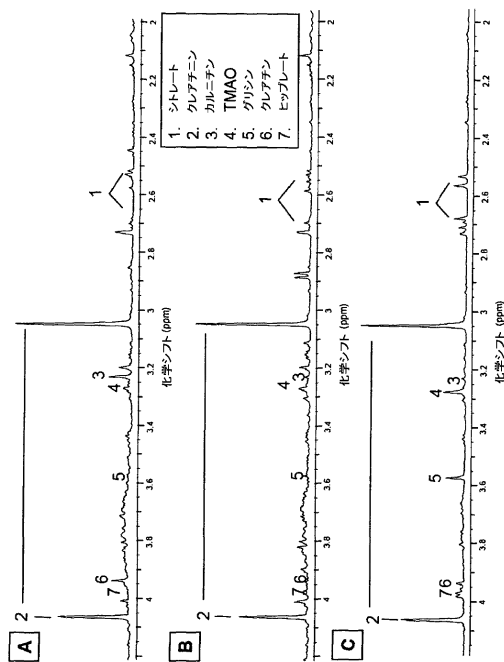
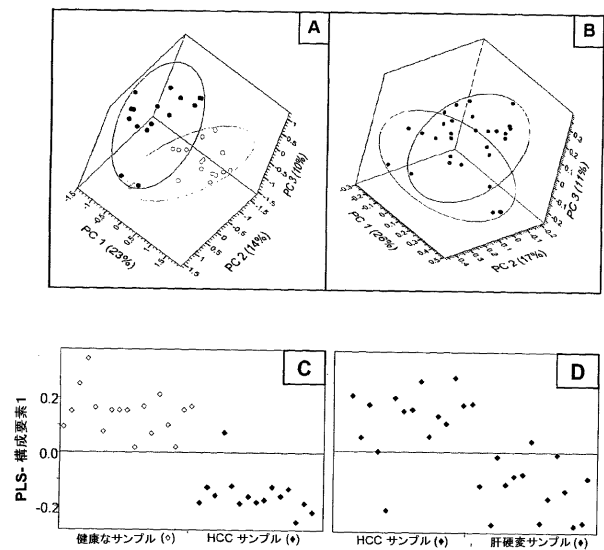


FIGURE 1

【図 2】

FIGURE 2



【図 3 - 1】

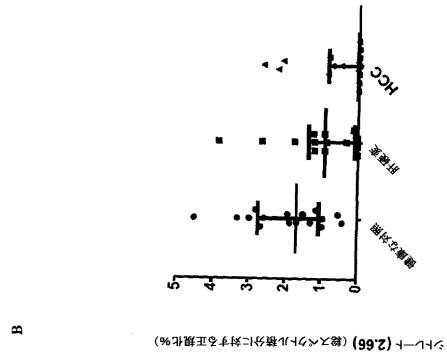
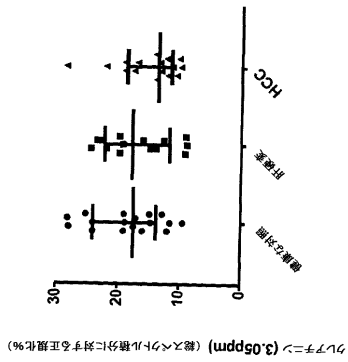


FIGURE 3

A



【図 3 - 3】

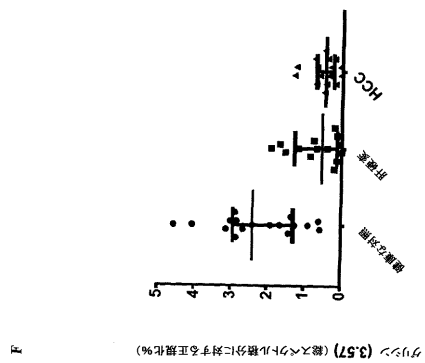
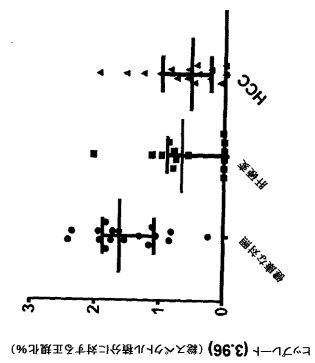


FIGURE 3 (続き)

E



【図 3 - 2】

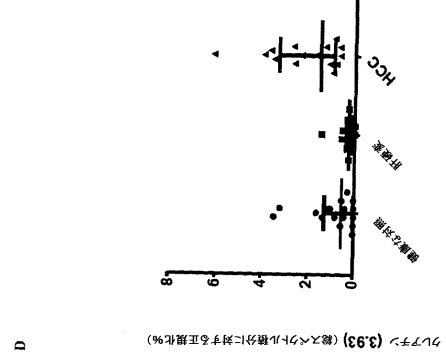
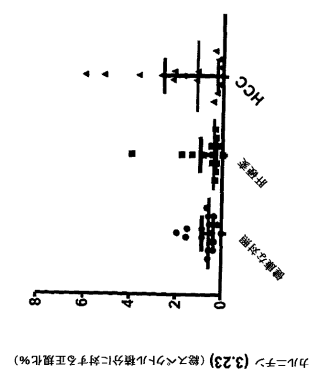


FIGURE 3 (続き)

C



【図 3 - 4】

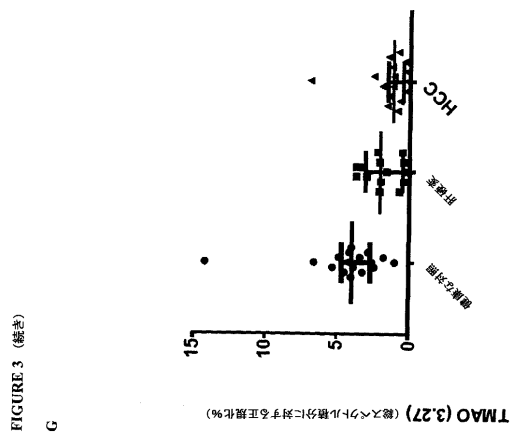


FIGURE 3 (続き)

G

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2012/000100

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/50 G01N33/574 G01N33/68 ADD.		
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) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WANG JUAN ET AL: "(1)H-NMR-based metabolomics of tumor tissue for the metabolic characterization of rat hepatocellular carcinoma formation and metastasis.", TUMOUR BIOLOGY : THE JOURNAL OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR ONCODEVELOPMENTAL BIOLOGY AND MEDICINE FEB 2011 LNKD- PUBMED:20890798, vol. 32, no. 1, 4 October 2010 (2010-10-04), pages 223-231, XP002643118, ISSN: 1423-0380 the whole document ----- -/--	1-3,7,9,13,17
☒ 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		Date of mailing of the international search report
12 October 2012		23/10/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hoff, Céline

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2012/000100

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:

see additional 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 an 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.:

1-3, 6-17, 20-22

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 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/GB2012/000100

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LI ZONG-FANG ET AL: "Gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry-based metabonomics of hepatocarcinoma in rats with lung metastasis: elucidation of the metabolic characteristics of hepatocarcinoma at formation and metastasis.", RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY : RCM SEP 2010 LNKD- PUBMED:20814984, vol. 24, no. 18, September 2010 (2010-09), pages 2765-2775, XP002675273, ISSN: 1097-0231 the whole document	1-3,7,9, 11-13, 15,17
A	SHARIFF MOHAMED I F ET AL: "Characterization of Urinary Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma Using Magnetic Resonance Spectroscopy in a Nigerian Population", JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH, vol. 9, no. 2, February 2010 (2010-02), pages 1096-1103, XP002675274, ISSN: 1535-3893 the whole document	1-3, 7-17,21, 22
T	SHARIFF MOHAMED I F ET AL: "Urinary Metabolic Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma in an Egyptian Population: A Validation Study", JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH, vol. 10, no. 4, April 2011 (2011-04), pages 1828-1836, XP002675275, ISSN: 1535-3893 the whole document	1-3, 7-17,21, 22
A	PSIHOGIOS NIKOLAOS G ET AL: "Evaluation of tubulointerstitial lesions' severity in patients with glomerulonephritides: An NMR-Based metabonomic study", JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH, vol. 6, no. 9, September 2007 (2007-09), pages 3760-3770, XP002684820, ISSN: 1535-3893 the whole document	2,3, 6-16, 20-22
A	BAIN MARCUS A ET AL: "Accumulation of trimethylamine and trimethylamine-N-oxide in end-stage renal disease patients undergoing haemodialysis", NEPHROLOGY DIALYSIS TRANSPLANTATION, vol. 21, no. 5, May 2006 (2006-05), pages 1300-1304, XP002684821, ISSN: 0931-0509 the whole document	2,3, 6-16, 20-22

International Application No. PCT/ GB2012/ 000100

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-5, 7-19, 21, 22(all partially)

A method for analysing a sample from a test subject comprising determining the level of glycine and comparing the level of glycine to at least one control level, wherein the control level of glycine is indicative of whether the subject has hepatic cancer.

2. claims: 1-5, 7-19, 21, 22(all partially)

A method for analysing a sample from a test subject comprising determining the level of trimethylamine-N-oxide and comparing the level of trimethylamine-N-oxide to at least one control level, wherein the control level of trimethylamine-N-oxide is indicative of whether the subject has hepatic cancer.

3. claims: 1-5, 7-19, 21, 22(all partially)

A method for analysing a sample from a test subject comprising determining the level of hippurate and comparing the level of hippurate to at least one control level, wherein the control level of hippurate is indicative of whether the subject has hepatic cancer.

4. claims: 1-5, 7-19, 21, 22(all partially)

A method for analysing a sample from a test subject comprising determining the level of citrate and comparing the level of the compound to at least one control level, wherein the control level of citrate is indicative of whether the subject has hepatic cancer.

5. claims: 6, 20(completely); 2-5, 7-16, 18, 19, 21, 22(partially)

A method for analysing a sample from a test subject comprising determining the level of glycine, trimethylamine-N-oxide, hippurate and citrate and comparing the level of glycine, trimethylamine-N-oxide, hippurate and citrate to at least one control level, wherein the control levels of the compounds are indicative of whether the subject has hepatic cancer.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 テイラー - ロビンソン , サイモン ディー .

イギリス国 エスタブリュー 7 2 エーゼット ロンドン , エクシピション ロード , インペリアル カレッジ ロンドン

专利名称(译)	诊断方法		
公开(公告)号	JP2014505254A	公开(公告)日	2014-02-27
申请号	JP2013550945	申请日	2012-01-31
[标]申请(专利权)人(译)	帝国改革有限公司		
申请(专利权)人(译)	帝国创新有限公司		
[标]发明人	テイラーロビンソンサイモンディー		
发明人	テイラー-ロビンソン, サイモン ディー.		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5308 G01N33/50 G01N33/57438 G01N33/6812 G01N2800/085 Y10T436/17 Y10T436/174614 Y10T436/201666		
FI分类号	G01N33/574.Z G01N33/53.S G01N33/53.H G01N33/53.J		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	2011001667 2011-01-31 GB		
其他公开文献	JP2014505254A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

分析样品以确定至少一种选自甘氨酸，三甲胺-N-氧化物，脲率和柠檬酸盐的化合物的水平，并将样品中的水平与对照水平进行比较以确定肝癌
本文公开了此处公开的内容。样品的分析可包括确定样品的分布。所公开的方法可用于区分患有肝癌的患者和患有肝硬化的患者。

FIGURE 2

