

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02020/066162

発行日 令和3年8月30日(2021.8.30)

(43) 国際公開日 令和2年4月2日(2020.4.2)

(51) Int.Cl.
G01N 33/53 (2006.01)F I
G O I N 33/53

テーマコード (参考)

S

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 26 頁)

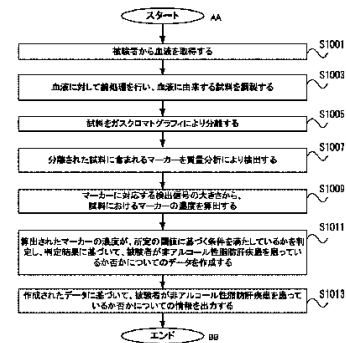
出願番号	特願2020-547977 (P2020-547977)	(71) 出願人	000001993
(21) 国際出願番号	PCT/JP2019/024293		株式会社島津製作所
(22) 国際出願日	令和1年6月19日(2019.6.19)		京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地
(31) 優先権主張番号	特願2018-180886 (P2018-180886)	(71) 出願人	507236258
(32) 優先日	平成30年9月26日(2018.9.26)		学校法人聖路加国際大学
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		東京都中央区明石町10番1号
		(74) 代理人	110001069
			特許業務法人京都国際特許事務所
		(74) 代理人	100084412
			弁理士 永井 冬紀
		(74) 代理人	100202854
			弁理士 森本 卓行
		(72) 発明者	藤本 宏隆
			日本国京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法、非アルコール性脂肪肝疾患検出用キットおよび非アルコール性脂肪肝疾患検出用バイオマーカー

(57) 【要約】

非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法は、哺乳動物の体液に由来する試料を取得することと、試料における2 - アミノアジピン酸、2 - オキシカプロン酸、2 - オキシグルタル酸、アラニン、グルタミン酸、チロシン、乳酸、尿酸、バリン、ピルビン酸、フェニルアラニン、およびプロリンからなる群から選択される少なくとも一つの分子の検出を行うことと、を備える。



AA Start
BB End
S1001 Collect blood from subject
S1002 Perform pretreatment of the blood to prepare sample derived from the blood
S1003 Separate the sample by gas chromatography
S1005 Detect marker contained in the separated sample by mass spectrometry
S1007 Calculate the concentration of the marker in the sample from the intensity of detection signal corresponding to the marker
S1009 Determine whether or not the calculated concentration of the marker satisfies a predetermined threshold value, and produce data on whether or not the subject is suffering from non-alcoholic fatty liver disease on the basis of the result of the determination
S1013 Output information on whether or not the subject is suffering from non-alcoholic fatty liver disease on the basis of the produced data

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

哺乳動物の体液に由来する試料を取得することと、

前記試料における 2 - アミノアジピン酸、2 - オキシカプロン酸、2 - オキシグルタル酸、アラニン、グルタミン酸、チロシン、乳酸、尿酸、バリン、ビルビン酸、フェニルアラニン、およびプロリンからなる群から選択される少なくとも一つの分子の検出を行うことと、を備える非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法において、

前記検出における、前記分子に対応する検出信号の大きさに基づいて得られた、前記哺乳動物が、非アルコール性脂肪肝疾患を患っているか否かについての情報を出力する、非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法。

10

【請求項 3】

請求項 2 に記載の非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法において、

前記検出信号の大きさに基づいて、前記試料における前記分子の濃度を算出し、算出された前記濃度が所定の閾値に基づく条件を満たしているか否かに基づいて得られた、前記哺乳動物が非アルコール性脂肪肝疾患を患っているか否かについての情報を出力する、非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法。

【請求項 4】

請求項 1 から 3 までのいずれか一項に記載の非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法において、

20

前記検出は、ガスクロマトグラフィ、液体クロマトグラフィ、質量分析、ガスクロマトグラフィ / 質量分析、液体クロマトグラフィ / 質量分析、核磁気共鳴分光法、および免疫学的検出法の少なくとも一つにより行われる、非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法。

【請求項 5】

請求項 1 から 3 までのいずれか一項に記載の非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法において、

前記哺乳動物は、人間である、非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法。

【請求項 6】

請求項 1 から 3 までのいずれか一項に記載の非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法において、

30

前記体液は、血液である、非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法。

【請求項 7】

2 - アミノアジピン酸、2 - オキシカプロン酸、2 - オキシグルタル酸、アラニン、グルタミン酸、チロシン、乳酸、尿酸、バリン、ビルビン酸、フェニルアラニン、およびプロリンからなる群から選択される少なくとも一つの分子の測定試薬を含む、非アルコール性脂肪肝疾患検出用キット。

【請求項 8】

2 - アミノアジピン酸、2 - オキシカプロン酸、2 - オキシグルタル酸、アラニン、グルタミン酸、チロシン、乳酸、尿酸、バリン、ビルビン酸、フェニルアラニン、およびプロリンからなる群から選択される少なくとも一つの分子を含む、非アルコール性脂肪肝疾患検出用バイオマーカー。

40

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法、非アルコール性脂肪肝疾患検出用キットおよび非アルコール性脂肪肝疾患検出用バイオマーカーに関する。

【背景技術】**【0002】**

50

非アルコール性脂肪肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD) は、脂肪沈着のみが認められ、予後が良好な肝疾患である単純性脂肪肝 (simple steatosis; SS) と、高度の線維化や肝発癌をきたす進行性の非アルコール性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis; NASH) を包括する疾患概念である (非特許文献 1 参照)。SS は NASH を引き起こす場合がある等、進行すると重篤な疾患を引き起こすため、SS を含めた NAFLD をより早い段階、または可能であるなら疾患を発症する前にその発症の予測を行うことは重要である。

【0003】

しかし、現在、NAFLD の発症を予測する診断手法は確立していない。SS のスクリーニングや程度を把握する方法として、腹部超音波検査や CT、MRI 等の画像検査が利用される。NASH の診断は生検が標準的な方法である。この肝生検は侵襲的であり、安全性と経済性の面でスクリーニングには適していない。

【0004】

簡便かつ非侵襲的な方法で NAFLD および NASH を診断できるバイオマーカーの開発は現在最も注目されている領域の一つであるが、臨床の現場で有効に活用できるバイオマーカーは確立されていない。近年、多数のタンパク質を網羅的に解析することができるプロテオミクスやメタボロミクスの技術の進歩により、これらの技術を用いた NAFLD 患者の血清等におけるバイオマーカーの探索が行われるようになってきている (非特許文献 2 参照)。

【0005】

非特許文献 3 および特許文献 1 には、NASH 等の患者と、健常者とを対象に、血漿中の脂質代謝物を定量した結果が報告されている。非特許文献 4 には、各種肝臓疾患の患者と、健常者等を対象に、ジペプチド等を定量した結果が報告されている。特許文献 2 には、アセトアミノフェンが投与された、NASH 等の患者および健常者を対象に、血漿中のアセトアミノフェン - グルクロニドを定量した結果が報告されている。特許文献 3 には、NAFLD 患者と、健常者とを対象に、血清中のキニノーゲン由来のペプチドを定量した結果が報告されている。特許文献 4 には、各種肝臓疾患の患者と、健常者とを対象に、血清中の可溶性 LR11 を定量した結果が報告されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献 1】日本国特表 2010 - 500566 号公報

【特許文献 2】日本国特表 2012 - 504629 号公報

【特許文献 3】国際公開第 2009 / 051259 号

【特許文献 4】日本国特開 2014 - 167446 号公報

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献 1】Naga Chalasani, Zobair Younossi, Joel E. Lavine, Anna Mae Diehl, Elizabeth M. Brunt, Kenneth Cusi, Michael Charlton, Arun J. Sanyal. "The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology" Gastroenterology, (米国), American Gastroenterological Association, 2012年6月、Volume 142, Issue 7, p.1592-1609

【非特許文献 2】Marc-Emmanuel Dumas, James Kinross, Jeremy K. Nicholson. "Metabolic Phenotyping and Systems Biology Approaches to Understanding Metabolic Syndrome and Fatty Liver Disease." Gastroenterology, (米国), American Gastroenterological Association, 2014年1月、Volume 146, Issue 1, p.46-62

【非特許文献 3】Puneet Puri, Michelle M. Wiest, Onpan Cheung, Faridoddin Mirshah

10

20

30

40

50

i, Carol Sargeant, Hae-Ki Min, Melissa J. Contos, Richard K. Sterling, Michael Fuchs, Huiping Zhou, Steven M. Watkins, and Arun J. Sanyal¹. "The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis." *Hepatology*, (米国), American Association for the Study of Liver Diseases, 2009年12月、Volume 50, Issue 6, p.1827-1838

【非特許文献4】Tomoyoshi Soga, Masahiro Sugimoto, Masashi Honma, Masayo Mori, Kaori Igarashi, Kasumi Kashikura, Satsuki Ikeda, Akiyoshi Hirayama, Takehito Yamamoto, Haruhiko Yoshida, Motoyuki Otsuka, Shoji Tsuji, Yutaka Yatomi, Tadayuki Sakuragawa, Hisayoshi Watanabe, Kouei Nihei, Takafumi Saito, Sumio Kawata, Hiroshi Suzuki, Masaru Tomita, Makoto Suematsu. "Serum metabolomics reveals γ -glutamyl dipeptides as biomarkers for discrimination among different forms of liver disease." *Journal of Hepatology*, (オランダ[°] 王国), European Association of Study of the Liver, 2011年10月、Volume 55, Issue 4, p.896-905

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

これらの報告では、NAFLDについての被験者の数が数十人以下と多くなかった。より多くの症例を対象とした各種分子の定量に基づいて得られた、より信頼性の高いバイオマーカーを用いて、被験者由来の試料からNAFLDに関する情報を得ることが望ましい。

20

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明の第1の態様によると、非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法は、哺乳動物の体液に由来する試料を取得することと、前記試料における2 - アミノアジピン酸、2 - オキシカプロン酸、2 - オキシグルタル酸、アラニン、グルタミン酸、チロシン、乳酸、尿酸、バリン、ピルビン酸、フェニルアラニン、およびプロリンからなる群から選択される少なくとも一つの分子の検出を行うことと、を備える。

本発明の第2の態様によると、第1の態様の非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法において、前記検出における、前記分子に対応する検出信号の大きさに基づいて得られた、前記哺乳動物が、非アルコール性脂肪肝疾患を患っているか否かについての情報を出力することが好ましい。

30

本発明の第3の態様によると、第2の態様の非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法において、前記検出信号の大きさに基づいて、前記試料における前記分子の濃度を算出し、算出された前記濃度が所定の閾値に基づく条件を満たしているか否かに基づいて得られた、前記哺乳動物が非アルコール性脂肪肝疾患を患っているか否かについての情報を出力することが好ましい。

本発明の第4の態様によると、第1から第3までのいずれかの態様の非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法において、前記検出は、ガスクロマトグラフィ、液体クロマトグラフィ、質量分析、ガスクロマトグラフィ/質量分析、液体クロマトグラフィ/質量分析、核磁気共鳴分光法、および免疫学的検出法の少なくとも一つにより行われることが好ましい。

40

本発明の第5の態様によると、第1から第4までのいずれかの態様の非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法において、前記哺乳動物は、人間であることが好ましい。

本発明の第6の態様によると、第1から第5までのいずれかの態様の非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法において、前記体液は、血液であることが好ましい。

本発明の第7の態様によると、非アルコール性脂肪肝疾患検出用キットは、2 - アミノアジピン酸、2 - オキシカプロン酸、2 - オキシグルタル酸、アラニン、グルタミン酸、チロシン、乳酸、尿酸、バリン、ピルビン酸、フェニルアラニン、およびプロリンからなる群から選択される少なくとも一つの分子の測定試薬を含む。

本発明の第8の態様によると、非アルコール性脂肪肝疾患検出用バイオマーカーは、2

50

- アミノアジピン酸、2 - オキシカプロン酸、2 - オキシグルタル酸、アラニン、グルタミン酸、チロシン、乳酸、尿酸、バリン、ピルビン酸、フェニルアラニン、およびプロリンからなる群から選択される少なくとも一つの分子を含む。

【発明の効果】

【0010】

本発明によれば、数千人を対象とした大規模な分析に基づいて得られたより信頼性の高いバイオマーカーに基づいて、より正確に被験者由来の試料からN A F L Dに関する情報を得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

10

【図1】図1は、一実施形態の検出方法の流れを示すフローチャートである。

【発明を実施するための形態】

【0012】

以下、図を参照して本発明を実施するための形態について説明する。以下の実施形態の非アルコール性脂肪肝疾患(N A F L D)の検出方法は、対象の個体に由来する試料における所定の分子の検出を行い、当該検出に基づいてこの個体がN A F L Dを患っているか否かについての情報を取得するものである。

【0013】

上記所定の分子は、N A F L Dを患っている個体由来の試料と、健常な個体由来の試料とにおいて濃度が異なる分子である。試料中の当該分子を検出することで、個体がN A F L Dを患っているか否かについての情報を得られるため、上記所定の分子は、N A F L Dのバイオマーカーであり、以下、マーカーと呼ぶ。

20

【0014】

本実施形態におけるN A F L Dのマーカーは、2 - アミノアジピン酸、2 - オキシカプロン酸、2 - オキシグルタル酸、アラニン、グルタミン酸、チロシン、乳酸、尿酸、バリン、ピルビン酸、フェニルアラニン、およびプロリンからなる群から選択される。本実施形態の非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法では、この群から選択される少なくとも一つのマーカーの検出を行い、検出されたマーカーに対応する検出信号の大きさに基づいて、上記個体がN A F L Dを患っているか否かの情報を取得することができる。

なお、以下の実施形態において、「マーカーを検出する」とは、試料に含まれているマーカーを定量するための検出を行うことを指し、イオン化されたマーカー、解離されたマーカー、またはマーカーの誘導体等の、マーカー由来の物質を直接検出するがマーカー自体を直接検出しない場合も含む。

30

【0015】

(試料について)

N A F L Dを患っている個体由来の試料と、健常な個体由来の試料とにおいてマーカーの濃度が異なれば、対象となる個体の生物種は特に限定されないが、哺乳動物が好ましく、人間がより好ましい。

【0016】

N A F L Dを患っている個体由来の試料と、健常な個体由来の試料とにおいてマーカーの濃度が異なれば、対象となる個体の任意の体液を用いて試料を調製することができるが、当該体液は、血液が好ましい。以下では、人間の血液に由来する試料におけるマーカーを検出する例を用いて説明する。本実施形態のN A F L Dの検出方法の対象となる人間を被験者とよぶ。

40

【0017】

被験者となる対象は、特に限定されないが、例えばN A F L Dと診断されていない人間である。人間ドック等、定期的な健康診断を受ける人間を対象とすることが好ましいが、健康診断を受ける生命保険の加入予定者等でもよい。アルコールを所定の量以上摂取している人間や、所定の疾患を現在または過去に患っている者は、適宜対象から除外してもよい。上記所定の量は、例えばエタノール換算で男性30g/日以上、女性20g/日以上

50

である。上記所定の疾患は、例えば、肝疾患、糖尿病、脂質異常症、高尿酸血症または悪性疾患である。

【0018】

(マーカーの検出について)

試料におけるマーカーの検出方法は、検出されたマーカーの濃度が、N A F L Dに対応する濃度か否かを所望の精度で判別することができれば特に限定されない。

【0019】

定量性等の観点から、試料に含まれるマーカーは、ガスクロマトグラフィ、液体クロマトグラフィ、質量分析、核磁気共鳴分光法、若しくは、これらの組合せ、またはE L I S Aに代表される免疫学的検出法により検出されることが好ましい。様々な種類の物質を含む試料から、目的のマーカーを好適に分離して検出する観点から、試料に含まれるマーカーは、ガスクロマトグラフィ/質量分析(以下、G C / M Sと呼ぶ)または液体クロマトグラフィ/質量分析(L C / M Sと呼ぶ)により検出されることがより好ましい。ここで、G C / M SおよびL C / M Sは、タンデム質量分析やM Sⁿ等の複数回の質量分離を行う場合も含むものとする。

10

【0020】

従って、試料に含まれるマーカーを検出する検出装置または検査装置としては、ガスクロマトグラフ、液体クロマトグラフ、質量分析計、N M R分光計、またはこれらを組み合わせた装置が用いられる。上述の通り、ガスクロマトグラフ-質量分析計(以下、G C - M Sと呼ぶ)によりG C / M Sを行ったり、液体クロマトグラフ-質量分析計(以下、L C - M Sと呼ぶ)によりL C / M Sを行うことが好ましい。質量分析計はシングル質量分析計でも2段階以上の質量分離が可能な質量分析計でもよい。質量分析計の内部でこれらの質量分離を行う質量分析器についてもその種類は特に限定されず、四重極マスフィルタ、イオントラップおよび飛行時間型質量分析器等を適宜含むものとすることができる。

20

【0021】

一方、検出の容易さや迅速さ等の観点から、試料に検出試薬を加え、当該検出試薬とマーカーとの化学反応を利用してマーカーの濃度を検出することが好ましい。例えば、検出試薬は、マーカーとの化学反応により発色する指示薬を含むことができ、当該指示薬を加えた試料溶液の色調からマーカーの濃度を検出することができる。

【0022】

上述のガスクロマトグラフィ、液体クロマトグラフィ、質量分析若しくは核磁気共鳴分光法に用いる消耗品、または上記検出試薬を備える非アルコール性脂肪肝疾患検出用キットが提供される。このようなキットを用いて本実施形態の非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法を行うことで、より迅速に、かつ/またはより簡便に、被験者がN A F L Dを患っているか否かについての情報を取得することができる。

30

【0023】

(試料の前処理について)

被験者から採血等により得られた試料は、適宜保管された後、前処理に供される。試料は、血液のまま保管されてもよいし、血液を遠心分離して得られた血漿または血清の状態で保管されてもよい。試料の保管方法は特に限定されず、冷凍保存、冷蔵保存または常温での保存を行うことができる。

40

【0024】

マーカーを検出するために試料を検出装置に供する前の前処理の方法は特に限定されない。G C / M Sを行う場合、試料に内部標準を加え、溶媒抽出した後に遠心濃縮、凍結乾燥および誘導体化を適宜行うことができる。内部標準は、検出するマーカーのm / zや試料の種類(血清、血漿等)等に合わせて適宜選択することができる。例えば血清試料においてm / z 500以下の領域を測定する場合、血清に含まれない合成化合物である2-イソプロピルリンゴ酸等を適宜用いることができる。誘導化の方法は特に限定されず、例えば凍結乾燥後の試料にメトキシアミン溶液を加えオキシム化した後、N-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド(M S T F A)を加えてシリル化することが

50

できる。前処理が行われた試料は、検出装置に導入される。

【0025】

(検出により得られたデータの解析について)

検出により得られたデータを解析する方法は特に限定されず、試料におけるマーカーの濃度(以下、マーカー濃度と呼ぶ)が算出できれば良い。当該データの解析は、パーソナルコンピュータ等の情報処理装置や、検出装置に含まれる処理装置等の解析装置により行われることが好ましいが、人間が行ってもよい。質量分析によりマーカーの検出を行った場合には、マススペクトルやマスクロマトグラムに対応するデータが作成される。その後、これらにおけるピークの強度や面積に基づいてマーカーの検出量が算出され、マーカーの検出量を内部標準の検出量で割った値と、内部標準の既知の濃度との積等によりマーカー濃度が算出される。

10

【0026】

マーカー濃度が算出されたら、マーカー濃度が所定の閾値(以下、マーカー閾値と呼ぶ)に基づく条件を満たすか否かにより、被験者がN A F L Dを患っているか否か、またはN A F L Dを患っているリスクが高いか否かが判定(以下、罹患判定と呼ぶ)される。マーカー閾値は、過去に測定された、N A F L Dの患者および健常者におけるマーカーの濃度に基づき、例えば感度または特異度が所望の値になるように予め設定されたものを用いる。例えば、N A F L Dの患者におけるマーカーの濃度が健常者におけるマーカーの濃度よりも統計的に高いとすると、被験者におけるマーカー濃度がマーカー閾値よりも高い場合に、被験者がN A F L Dの患者として判定されるようにマーカー閾値に基づく条件が設定されている。

20

【0027】

罹患判定は1つのマーカーについてのマーカー濃度により行うことができる。複数のマーカーについてのマーカー濃度を用いて罹患判定を行う場合は、複数のマーカー濃度の値と、対応する複数のマーカー閾値とに基づいて多変量解析等により行うことができる。あるいは、複数のマーカーのうち、マーカー濃度がマーカー閾値に基づく条件を満たすものの個数により、罹患判定を行ってもよい。この場合、当該個数によりリスクを「高」「中」「低」の3段階等に分類してもよい。

【0028】

検出により得られたデータの解析により得られた、マススペクトル若しくはマスクロマトグラム、マーカー濃度または罹患判定の結果を示す情報等は医師や医療従事者等に向けて表示される。この情報により、医師は、被験者がN A F L Dを患っているか否かについて診断を行い、被験者がN A F L Dである場合は治療を行うことができる。また、医療従事者等は被験者の状態を把握等することができる。

30

【0029】

図1は、本実施形態の非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法の流れを示すフローチャートである。本実施形態の検出方法は、N A F L Dの診断を行うため、被験者の血液由来の試料からマーカーをイン・ビトロで検出する方法である。図1のフローチャートでは、G C / M Sによりマーカーを検出する例を示すが、本発明はこれに限定されない。

【0030】

N A F L Dの診断ステップS 1 0 0 1において、医療従事者等により採血等が行われ、被験者から血液が取得される。ステップS 1 0 0 1が終了したら、ステップS 1 0 0 3が開始される。ステップS 1 0 0 3において、検査者や、検出装置のユーザー等が血液に対して前処理を行い、血液に由来する試料を調製する。ステップS 1 0 0 3が終了したらステップS 1 0 0 5が開始される。

40

【0031】

ステップS 1 0 0 5において、試料がガスクロマトグラフィにより分離される。ステップS 1 0 0 5が終了したら、ステップS 1 0 0 7が開始される。ステップS 1 0 0 7において、分離された試料に含まれるマーカーが質量分析により検出される。ステップS 1 0 0 7が終了したら、ステップS 1 0 0 9が開始される。

50

【 0 0 3 2 】

ステップ S 1 0 0 9 において、マーカーに対応する検出信号の大きさから、試料におけるマーカーの濃度が算出される。ステップ S 1 0 0 9 が終了したら、ステップ S 1 0 1 1 が開始される。ステップ S 1 0 1 1 において、算出されたマーカーの濃度が、所定の閾値（マーカー閾値）に基づく条件を満たしているかが判定され、判定結果に基づいて、被験者が N A F L D を患っているか否かについてのデータが作成される。ステップ S 1 0 1 1 が終了したら、ステップ S 1 0 1 3 が開始される。

【 0 0 3 3 】

ステップ S 1 0 1 3 において、ステップ S 1 0 1 1 で作成されたデータに基づいて、被験者が N A F L D を患っているか否かについての情報が表示装置等に出力される。ステップ S 1 0 1 3 が終了したら、処理が終了される。

10

【 0 0 3 4 】

上述の実施の形態によれば、次の作用効果が得られる。

(1) 本実施形態の非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法は、人間の血液に由来する試料を取得することと、試料における 2 - アミノアジピン酸、2 - オキシカプロン酸、2 - オキシグルタル酸、アラニン、グルタミン酸、チロシン、乳酸、尿酸、バリン、ピルビン酸、フェニルアラニン、およびプロリンからなる群から選択される少なくとも一つの分子の検出を行うことと、を備える。これにより、迅速に非アルコール性脂肪肝疾患のスクリーニングを行うことができる。また、これらの分子は後述の実施例に記載されたように、大規模な症例に基づいた分析により得られたマーカーであるから、正確なスクリーニングを行うことができる。

20

【 0 0 3 5 】

(2) 本実施形態の非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法において、マーカーの検出における、マーカーに対応する検出信号の大きさに基づいて得られた、被験者が N A F L D を患っているか否かについての情報を出力する。これにより、定量されたマーカーに基づいて、より精密にスクリーニングを行うことができる。

【 0 0 3 6 】

(3) 本実施形態の非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法において、マーカーに対応する検出信号の大きさに基づいて、試料におけるマーカーの濃度を算出し、算出された濃度がマーカー閾値に基づく条件を満たしているか否かに基づいて、被験者が N A F L D を患っているか否かについての情報を出力する。これにより、定量されたマーカーの濃度に基づいて、より精密にスクリーニングを行うことができる。

30

【 0 0 3 7 】

(4) 本実施形態の非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法において、マーカーの検出は、ガスクロマトグラフィ、液体クロマトグラフィ、質量分析、ガスクロマトグラフィ / 質量分析、液体クロマトグラフィ / 質量分析、核磁気共鳴分光法または免疫学的検出法により行うことができる。これにより、試料に含まれる各成分を分離し、より精密にスクリーニングを行うことができる。

【 0 0 3 8 】

(5) 本実施形態に係る非アルコール性脂肪肝疾患検出用バイオマーカーは、試料における 2 - アミノアジピン酸、2 - オキシカプロン酸、2 - オキシグルタル酸、アラニン、グルタミン酸、チロシン、乳酸、尿酸、バリン、ピルビン酸、フェニルアラニン、およびプロリンからなる群から選択される少なくとも一つの分子を含む。これにより、迅速に非アルコール性脂肪肝疾患のスクリーニングを行うことができる。また、これらの分子は後述の実施例に記載されたように、大規模な症例に基づいた分析により得られたマーカーであるから、正確なスクリーニングを行うことができる。

40

【 0 0 3 9 】

本発明は上記実施形態の内容に限定されるものではない。本発明の技術的思想の範囲内で考えられるその他の態様も本発明の範囲内に含まれる。

【 実施例 】

50

【 0 0 4 0 】

以下の実施例では、腹部超音波所見により N A F L D と診断された患者（ N A F L D 群）と、健常者（正常群）とから得られた血清を G C / M S に供し、 N A F L D 群と正常群とで濃度の異なる血清中の成分を探索した分析の結果が説明される。

なお、本発明は、以下の実施例に示された数値、条件に限定されない。

【 0 0 4 1 】

（対象者）

2 0 1 5 年 1 0 月から 2 0 1 6 年 9 月までに病院を訪れた日本人の人間ドック受診者からランダムに抽出した者のうち、採用基準を満たした 3 7 3 3 人の血清の分析を行った。採用基準は以下の（ 1 ）～（ 5 ）のいずれにもあてはまらないこととした。

（ 1 ）研究参加に不同意を表明した者

（ 2 ）アルコール摂取量（男性：エタノール換算 3 0 g / 日以上、女性：エタノール換算 2 0 g / 日以上）であった者

（ 3 ）肝疾患で治療中の現病歴を有する者

（ 4 ）糖尿病、脂質異常症、高尿酸血症の少なくとも一つについて治療中の現病歴を有する者

（ 5 ）悪性疾患について治療中の現病歴を有する者

上記採用基準を満たした者はいずれも人間ドックで腹部超音波所見が得られており、病院内の研究倫理審査委員会の承諾の下に臨床情報と血清を分析した結果とが突き合わされた。

【 0 0 4 2 】

N A F L D 群と正常群とを合わせた 3 7 3 3 名のうち、女性は 2 2 5 2 名（ 6 0 . 3 % ）であり、中央値年齢は 5 1 歳（四分位範囲： 4 3 歳～ 6 1 歳）であった。分析対象となった研究集団のベースライン特性を以下の表 1 に示した。 B M I の平均は、算術平均を用いた。

【 0 0 4 3 】

【表 1】

表 1：研究集団のベースライン特性

	NAFLD群	正常群	P値
対象者数	826	2,907	
性別（女性:％）	37.9	66.7	<.0001
年齢（歳: 中央値）	53	50	<.0001
BMI（平均）	25.5	21.2	<.0001

【 0 0 4 4 】

（前処理）

採血後、遠心分離により血清が抽出され、採血から 5 ～ 8 時間以内に - 8 0 で冷凍保存された。冷凍保存された血清を 2 5 に 5 分間置いて解凍した。解凍された血清を、 1 0 , 0 0 0 × g 、 4 の条件で 1 分間遠心を行い上清をうつしかえ、氷上に静置した。メタノール / 水 / クロロホルムを 2 . 5 : 1 : 1 の割合で混合した混合液 2 5 0 μ L に、内部標準溶液（ 0 . 1 m g / m L 2 - イソプロピルリンゴ酸） 6 μ L を添加し、この混合液をうつしかえた血清試料に加え、ボルテックスミキサーを用いて攪拌した。血清試料を 3 7 、 3 0 分間、 1 , 2 0 0 r p m の条件で振とうした。振とう後の試料を 1 6 , 0 0 0 × g 、 2 5 の条件で 5 分間遠心した。遠心後の上清 1 5 0 μ L を、予め、水 1 4 0 μ L を加えたチューブに添加し、ボルテックスミキサーを用いて攪拌した。攪拌後の溶液を、 1 6 , 0 0 0 × g 、 2 5 の条件で 5 分間遠心した。遠心後の上清 1 8 0 μ L を新しいチューブに回収した。室温で 6 0 分間遠心エバポレーターにより濃縮を行った。濃縮後

の試料を、 -80°C 下に30分放置し凍結させた。凍結した試料をオーバーナイトで乾燥させた。乾燥後の試料は、デシケーターで保存した。乾燥した試料にメトキシアミン溶液 (20 mg/mL 、ピリジンで溶解) $80\text{ }\mu\text{L}$ を添加し、 37°C 、30分間、 200 rpm の条件で振とうした。その後、 N -メチル- N -トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド $40\text{ }\mu\text{L}$ を添加し、 37°C 、30分間、 1200 rpm の条件で振とうした。振とう後の試料を、 $16000\times g$ 、 25°C の条件で5分間遠心した。遠心後の上清 $50\text{ }\mu\text{L}$ をガラスバイアルに移し、このバイアルをGC-MSのオートサンプラーに設置した。

【0045】

(GC/MS)

ガスクロマトグラフィの条件

システム：GCMS-TQ8040 (島津製作所)

カラムオープン温度： 80°C 、インジェクション温度： 280°C 、インジェクションモード：スプリット導入法、キャリアガス：ヘリウム、キャリアガス流量： 39 cm/sec

分離カラム：

DB-5 (アジレントテクノロジー)：固定相；(5%-フェニル)-メチルポリシロキサン (無極性)、長さ； 30.0 m 、内径： 0.25 mm 、膜厚： $1.00\text{ }\mu\text{m}$

カラム温度プログラム：

時間 (分) 温度 ($^{\circ}\text{C}$)

0 80

2.5 80

18.5 280

23.0 280

【0046】

質量分析の条件

システム：GCMS-TQ8040 (島津製作所)

イオン源温度： 200°C 、インターフェイス温度： 250°C 、検出器電圧： 0.2 kV 、測定モード：スキャンモード、走査範囲： m/z $85 - 500$

【0047】

(データ解析)

各保持時間において m/z を走査して得られた検出強度から、各保持時間におけるマススペクトルを作成した。過去に得られた血清試料におけるマススペクトルのデータに基づいて、作成したマススペクトルにおける各ピークに対応する代謝物 (136種) を同定した。各代謝物に対応する検出強度を、内部標準であるイソプロピルリンゴ酸に対応する検出強度を用いて標準化し、試料における濃度を算出した。NAFLD群と正常群とにおいて各代謝物の濃度を統計解析により比較した。統計解析では、単変量解析として対応の無い t 検定およびマン・ホイットニーの U 検定を用い、複数の代謝物についての多変量解析としてロジスティック回帰分析を用いた。NAFLDの診断能は、各代謝物については、ROC (Receiver Operating Characteristic) 曲線を作成し、ROC曲線より下側の部分の面積 (AUC) を用いて評価した。複数の代謝物での検討はLASSO法を用いた。代謝物および調整因子を投入したモデルでは、 c 統計量を用いて評価した。

【0048】

(結果)

NAFLD群および正常群の2群間で対応のない t 検定を行い、有意な差が認められた代謝物はグルタミン酸、2-オキシグルタル酸、バリン、チロシン、2-アミノアジピン酸、フェニルアラニン、ピルビン酸、尿酸、2-オキシカプロン酸およびアラニン (p 値が最も小さい代謝物を第1位とし、 p 値が小さい順に第10位までの代謝物を列挙) であった。以下の表2に、これらの代謝物の p 値と t 統計量とを示した。 t 統計量はいずれの代謝物においても負の値であったことから、NAFLD群よりも正常群において代謝物の

10

20

30

40

50

量が少なかったことがわかる。表中「 $x E - y$ 」の表記は、 x に10の $-y$ 乗を掛けあわせた値を示し、以下の各表でも同様である。

【0049】

【表2】

表2：二群間の比較で統計学的に有意な差が認められた代謝物

代謝物名	p 値	t 統計量 (正常-疾患あり)
グルタミン酸	6.44E-89	-21.907
2-オキソグルタル酸	3.55E-64	-18.220
バリン	1.63E-57	-16.888
チロシン	4.41E-53	-16.124
2-アミノアジピン酸	3.34E-47	-14.764
フェニルアラニン	2.10E-43	-14.388
ピルビン酸	2.72E-42	-14.225
尿酸	1.64E-39	-13.678
2-オキソカプロン酸	5.81E-38	-13.353
アラニン	2.63E-36	-13.020

10

20

【0050】

30

従属変数としてNAFLD群/正常群、調整因子として年齢、性およびBMIを投入しNAFLD群と各代謝物の関連をロジスティック回帰分析で検討した結果、2-オキソグルタル酸で最も強い関連を認めた(回帰係数 0.5658、標準誤差 0.0547、1SD当たりの変化に対するオッズ比 1.761、95%信頼区間 1.582 - 1.960、 p 値=4.10E-25)。以下の表3に2-オキソグルタル酸を含む5代謝物のロジスティック回帰分析における回帰係数、標準誤差および p 値を示した。なお、調整因子での調整を行わなかった時(すなわち表2における)の順位、および t 統計量と P 値を記載した。

【0051】

【表 3】

表3：ロジスティック回帰分析の結果

代謝物名	回帰係数	標準誤差	p 値	t 検定での p 値	t 検定での t 統計量（正常- 疾患あり）	t 検定 での順位
2-オキシグル タル酸	0.5658	0.0547	4.10E-25	3.55E-64	-18.220	2
グルタミン酸	0.5408	0.0523	5.03E-25	6.44E-89	-21.907	1
ピルビン酸	0.3784	0.0459	1.73E-16	2.72E-42	-14.225	7
チロシン	0.3405	0.0503	1.25E-11	4.41E-53	-16.124	4
アラニン	0.3126	0.0469	2.67E-11	2.63E-36	-13.020	10

10

【0052】

診断能について検討した。従属変数はN A F L D群 / 正常群とし各代謝物についてR O C解析を行い、A U Cを検討した結果、値の大きかった代謝物はグルタミン酸（A U C = 0 . 7 5 9）、2 - オキシグルタル酸（A U C = 0 . 7 2 9）、バリン（A U C = 0 . 6 9 9）であった。以下の表に各代謝物のA U Cを示す。

20

【0053】

【表 4】

表4：ROC解析で得られたAUC値

代謝物名	AUC	順位
グルタミン酸	0.759	1
2-オキシグルタル酸	0.729	2
バリン	0.699	3
チロシン	0.685	4
2-アミノアジピン酸	0.729	5
フェニルアラニン	0.667	6
ピルビン酸	0.671	7
尿酸	0.666	8
2-オキシカプロン酸	0.659	9
アラニン	0.654	10

30

40

【0054】

前記では、単一の代謝物による診断能の検討であったが、複数の代謝物を用いて、同様に検討した。L A S S O法による検討を行った結果、70の代謝物が選択され、その場合

50

のAUCは0.870であった。70の代謝物は以下の通りである。ホウ酸、フェノール、2-ヒドロキシイソ酪酸、グリコール酸、アラニン、グリシン、2-ヒドロキシ酪酸、p-クレゾール、3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシイソ酪酸、2-ヒドロキシイソ吉草酸、2-アミノ酪酸、3-ヒドロキシイソ吉草酸、バリン、尿素、カプリル酸、グリセロール、アセツル酸、リン酸、イソロイシン、プロリン、コハク酸、フマル酸、セリン、グルタル酸、2-デオキシテトロン酸、デカン酸、アスパラギン酸、メチオニン、ピログルタミン酸、ヒドロキシプロリン、グルタミン酸、フェニルアラニン、ラウリン酸、アスパラギン、2-アミノアジピン酸、アコニット酸、グルタミン、ヒスチジン、チロシン、パルミトレイン酸、尿酸、ステアリン酸、トリプトファン、2-ピリドン、ピルビン酸、3-アミノプロパン酸、エリトリトール、トレオン酸、2-オキソグルタル酸、クレアチニン、キシリトール、アラビトール、フコース、エタノールアミンリン酸、イソクエン酸、ヒポキサンチン、馬尿酸、1,5-アンヒドロ-D-グルシトール、3-メチルヒスチジン、マンノース、リシン、パラキサンチン、シロイノシトール、3-インドールプロピオン酸、キヌレニン、シスチン、アセト酢酸、グルコン酸、リボース。

【0055】

同じ従属変数に対して調整因子として年齢、性およびBMIを投入したモデルでのc統計量はグルタミン酸が0.873と最も大きくなった。以下の表5に各代謝物のc統計量を示した。なお、調整因子での調整を行わなかった時(すなわち表4における)の順位、およびAUCを記載した。

【0056】

【表5】

表5：代謝物とc統計量

代謝物名	c統計量	AUC	順位
グルタミン酸	0.8730	0.759	1
2-オキソグルタル酸	0.8726	0.729	2
ピルビン酸	0.8679	0.671	7
乳酸	0.8653	0.651	11
2-アミノアジピン酸	0.8653	0.729	5
バリン	0.8652	0.699	3
アラニン	0.8651	0.654	10
チロシン	0.8645	0.685	4
2-オキソカプロン酸	0.8641	0.659	9
プロリン	0.8631	0.643	14

【0057】

近年、BMIが高くない、つまり肥満とはされない群におけるNAFLDが臨床的に問題視されている。そこで、上記解析をBMIが25未満の肥満ではない群において行ったところ、同様の結果となった。

【0058】

さらに、BMIが23未満の標準体重未満ではない群において、上述の解析を行ったところ、同様の結果となった。

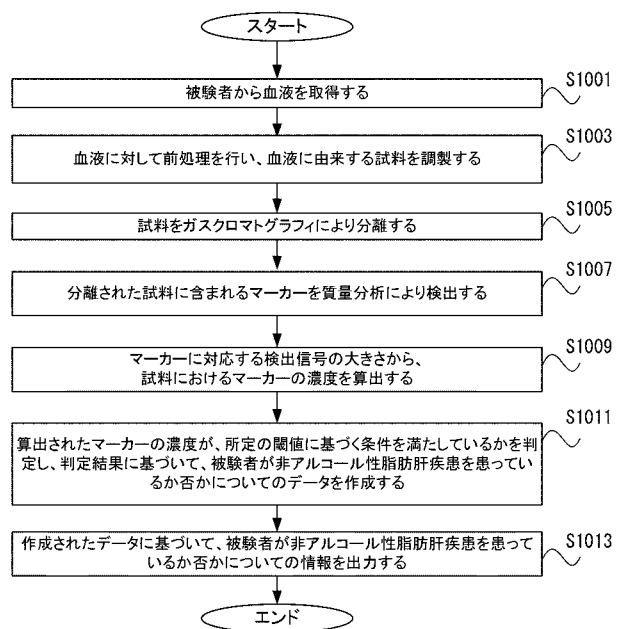
【0059】

次の優先権基礎出願の開示内容は引用文としてここに組み込まれる。

日本国特許出願2018年第180886号(2018年9月26日出願)

【 図 1 】

【図1】



【手続補正書】

【提出日】令和3年3月22日(2021.3.22)

【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】

哺乳動物の体液に由来する試料を取得することと、

前記試料における 2 - アミノアジピン酸の検出を行うことと、を備える非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法において、

前記検出における、2 - アミノアジピン酸に対応する検出信号の大きさに基づいて得られた、前記哺乳動物が、非アルコール性脂肪肝疾患を患っているか否かについての情報を出力する、非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法。

【請求項 3】

請求項 2 に記載の非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法において、

前記検出信号の大きさに基づいて、前記試料における 2 - アミノアジピン酸の濃度を算出し、算出された前記濃度が所定の閾値に基づく条件を満たしているか否かに基づいて得られた、前記哺乳動物が非アルコール性脂肪肝疾患を患っているか否かについての情報を出力する、非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法。

【請求項 4】

請求項 1 から 3 までのいずれか一項に記載の非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法において、

前記検出は、ガスクロマトグラフィ、液体クロマトグラフィ、質量分析、ガスクロマトグラフィ / 質量分析、液体クロマトグラフィ / 質量分析、核磁気共鳴分光法、および免疫学的検出法の少なくとも一つにより行われる、非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法。

【請求項 5】

請求項 1 から 3 までのいずれか一項に記載の非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法において、

前記哺乳動物は、人間である、非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法。

【請求項 6】

請求項 1 から 3 までのいずれか一項に記載の非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法において、

前記体液は、血液である、非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法。

【請求項 7】

2 - アミノアジピン酸の測定試薬を含む、非アルコール性脂肪肝疾患検出用キット。

【請求項 8】

2 - アミノアジピン酸を含む、非アルコール性脂肪肝疾患検出用バイオマーカー。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0009

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0009】

本発明の第 1 の態様によると、非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法は、哺乳動物の体液に由来する試料を取得することと、前記試料における 2 - アミノアジピン酸の検出を行うことと、を備える。

本発明の第２の態様によると、第１の態様の非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法において、前記検出における、２ - アミノアジピン酸に対応する検出信号の大きさに基づいて得られた、前記哺乳動物が、非アルコール性脂肪肝疾患を患っているか否かについての情報を出力する。

本発明の第３の態様によると、第２の態様の非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法において、前記検出信号の大きさに基づいて、前記試料における２ - アミノアジピン酸の濃度を算出し、算出された前記濃度が所定の閾値に基づく条件を満たしているか否かに基づいて得られた、前記哺乳動物が非アルコール性脂肪肝疾患を患っているか否かについての情報を出力する。

本発明の第４の態様によると、第１から第３までのいずれかの態様の非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法において、前記検出は、ガスクロマトグラフィ、液体クロマトグラフィ、質量分析、ガスクロマトグラフィ／質量分析、液体クロマトグラフィ／質量分析、核磁気共鳴分光法、および免疫学的検出法の少なくとも一つにより行われる。

本発明の第５の態様によると、第１から第４までのいずれかの態様の非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法において、前記哺乳動物は、人間である。

本発明の第６の態様によると、第１から第５までのいずれかの態様の非アルコール性脂肪肝疾患の検出方法において、前記体液は、血液である。

本発明の第７の態様によると、非アルコール性脂肪肝疾患検出用キットは、２ - アミノアジピン酸の測定試薬を含む。

本発明の第８の態様によると、非アルコール性脂肪肝疾患検出用バイオマーカーは、２ - アミノアジピン酸を含む。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2019/024293
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl. G01N33/53(2006.01)i, G01N30/72(2006.01)i, G01N30/88(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) Int. Cl. G01N33/53, G01N30/72, G01N30/88 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2019 Registered utility model specifications of Japan 1996-2019 Published registered utility model applications of Japan 1994-2019 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPlus/MEDLINE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2018-502286 A (METABOLON, INC.) 25 January 2018, claim 1, table 2, paragraphs [0105], [0106] & US 2017/0370954 A1, claim 1, table 2, paragraphs [0108], [0109] & WO 2016/081534 A1 & EP 3221463 A1 & CN 107002113 A	1-8
X	JP 2011-503547 A (METABOLON, INC.) 27 January 2011, paragraphs [0036], [0047], tables 1, 6B & US 2010/0279956 A1, paragraphs [0047], [0060], tables 1, 6B & US 2015/0377910 A1 & WO 2009/059150 A2 & EP 2546649 A2 & EP 2930512 A2	1-8
X	WO 2013/002381 A1 (AJINOMOTO CO., INC.) 03 January 2013, claim 1, paragraph [0230] & US 2014/0113378 A1, claim 1, paragraphs [0286]-[0288]	1-8
☒ 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 06.09.2019		Date of mailing of the international search report 17.09.2019
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/024293

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LAI, Yi-syuan et al., Mass-spectrometry-based serum metabolomics of a C57BL/6J mouse model of high-fat-diet-induced non-alcoholic fatty liver disease development, Journal of agricultural and food chemistry, 09 September 2015, vol. 63, no. 35, pp. 7873-7884	1-8
X	JP 2016-65873 A (METANOMICS HEALTH GMBH) 28 April 2016, paragraphs [0037], [0038], table 3A & US 2013/0126722 A1, paragraphs [0036], [0037], table 3A & US 2015/0355197 A1 & WO 2012/000770 A1 & EP 2863227 A1 & EP 3273247 A1 & CA 2799032 A1	1-8
A	JP 2010-500566 A (LIPOMICS TECHNOLOGIES, INC.) 07 January 2010, claims & US 2010/0233724 A1, claims & WO 2008/021192 A2 & EP 2057473 A2 & CA 2662987 A1 & CN 101523221 A & AU 2007284733 A1	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/024293

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 extra sheet]

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

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

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/JP2019/024293
--

(continuation of Box No. III)

Claims 1-8 have the shared feature of a "biomarker for detecting non-alcoholic fatty liver disease." However, this feature does not make a contribution over the prior art in the light of the content disclosed in document 1, and thus this feature cannot be said to be a special technical feature. Claims 1-8 are therefore considered to set forth different inventions that are independent of one another with respect to 12 different biomarkers. No other identical or corresponding special technical feature exists between these inventions. The claims are thus classified as 12 inventions having the following respective special technical features.

(Invention 1) Claims 1-8 (partial)

An invention relating to 2-aminoadipic acid as a biomarker for detecting non-alcoholic fatty liver disease.

(Invention 2) Claims 1-8 (partial)

An invention relating to 2-oxocaproic acid as a biomarker for detecting non-alcoholic fatty liver disease.

(Invention 3) Claims 1-8 (partial)

An invention relating to 2-oxoglutaric acid as a biomarker for detecting non-alcoholic fatty liver disease.

(Invention 4) Claims 1-8 (partial)

An invention relating to alanine as a biomarker for detecting non-alcoholic fatty liver disease.

(Invention 5) Claims 1-8 (partial)

An invention relating to glutamic acid as a biomarker for detecting non-alcoholic fatty liver disease.

(Invention 6) Claims 1-8 (partial)

An invention relating to tyrosine as a biomarker for detecting non-alcoholic fatty liver disease.

(Invention 7) Claims 1-8 (partial)

An invention relating to lactic acid as a biomarker for detecting non-alcoholic fatty liver disease.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP2019/024293
--

(Invention 8) Claims 1-8 (partial)

An invention relating to uric acid as a biomarker for detecting non-alcoholic fatty liver disease.

(Invention 9) Claims 1-8 (partial)

An invention relating to valine as a biomarker for detecting non-alcoholic fatty liver disease.

(Invention 10) Claims 1-8 (partial)

An invention relating to pyruvic acid as a biomarker for detecting non-alcoholic fatty liver disease.

(Invention 11) Claims 1-8 (partial)

An invention relating to phenylalanine as a biomarker for detecting non-alcoholic fatty liver disease.

(Invention 12) Claims 1-8 (partial)

An invention relating to proline as a biomarker for detecting non-alcoholic fatty liver disease.

Document 1: JP 2010-500566 A (TETHYS BIOSCIENCE INC.) 07 January 2010, claims & US 2010/0233724 A1, claims & WO 2008/021192 A2 & EP 2057473 A2 & CA 2662987 A1 & CN 101523221 A & AU 2007284733 A1

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 9 / 0 2 4 2 9 3	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/53(2006, 01)i, G01N30/72(2006, 01)i, G01N30/88(2006, 01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/53, G01N30/72, G01N30/88			
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 1971-2019年 日本国実用新案登録公報 1996-2019年 日本国登録実用新案公報 1994-2019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/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPUS/MEDLINE/BIOSIS (STN)			
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	
X	JP 2018-502286 A (メタボロン、インコーポレイテッド) 2018.01.25, 請求項1、表2、段落[0105]、[0106] & US 2017/0370954 A1, 請求項1、表2、段落[0108]、[0109] & WO 2016/081534 A1 & EP 3221463 A1 & CN 107002113 A	1-8	
X	JP 2011-503547 A (メタボロン、インコーポレイテッド) 2011.01.27, 段落[0036]、[0047]、表1、表6 B & US 2010/0279956 A1, 段落[0047]、[0060]、表1、表6 B & US 2015/0377910 A1 & WO 2009/059150 A2 & EP 2546649 A2 & EP 2930512 A2	1-8	
☒ 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 06.09.2019		国際調査報告の発送日 17.09.2019	
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) 海野 佳子 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	2 J 3906

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 9 / 0 2 4 2 9 3
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	WO 2013/002381 A1 (味の素株式会社) 2013.01.03, 請求項 1、段落 [0230] & US 2014/0113378 A1, 請求項 1、段落 [0286]-[0288]	1-8
X	Yi-syuan LAI et al., Mass-spectrometry-based serum metabolomics of a C57BL/6J mouse model of high-fat-diet-induced non-alcoholic fatty liver disease development, Journal of agricultural and food chemistry, 2015.09.09, Vol.63, No.35, PP.7873-7884	1-8
X	JP 2016-65873 A (メタノミクス ヘルス ゲーエムベーハー) 2016.04.28, 段落 [0037]、[0038]、表 3A & US 2013/0126722 A1, 段落 [0036]、[0037]、表 3A & US 2015/0355197 A1 & WO 2012/000770 A1 & EP 2863227 A1 & EP 3273247 A1 & CA 2799032 A1	1-8
A	JP 2010-500566 A (テシス バイオサイエンス, インコーポレイテッド) 2010.01.07, 特許請求の範囲 & US 2010/0233724 A1, 特許請求の範囲 & WO 2008/021192 A2 & EP 2057473 A2 & CA 2662987 A1 & CN 101523221 A & AU 2007284733 A1	1-8

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 9 / 0 2 4 2 9 3

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

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

1. ☐ 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

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

請求項1－8は、[非アルコール性脂肪肝疾患検出のためのバイオマーカー] という共通の技術的特徴を有している。しかしながら、当該技術的特徴は、文献1の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。そのため、請求項1－8には、12の異なるバイオマーカーについて各々独立した異なる発明が記載されているものと認められ、これらの発明の間には、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。そして、請求の範囲は、各々下記の特別な技術的特徴を有する12の発明に区分される。

続きは別紙参照。

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

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

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

様式PCT/ISA/210（第1ページの続葉（2））（2015年1月）

第Ⅲ欄の続き

- (発明 1) 請求項 1－8 (部分的)
非アルコール性脂肪肝疾患検出のためのバイオマーカーとしての 2－アミノアジピン酸に係る発明。
- (発明 2) 請求項 1－8 (部分的)
非アルコール性脂肪肝疾患検出のためのバイオマーカーとしての 2－オキソカプロン酸に係る発明。
- (発明 3) 請求項 1－8 (部分的)
非アルコール性脂肪肝疾患検出のためのバイオマーカーとしての 2－オキソグルタル酸に係る発明。
- (発明 4) 請求項 1－8 (部分的)
非アルコール性脂肪肝疾患検出のためのバイオマーカーとしてのアラニンに係る発明。
- (発明 5) 請求項 1－8 (部分的)
非アルコール性脂肪肝疾患検出のためのバイオマーカーとしてのグルタミン酸に係る発明。
- (発明 6) 請求項 1－8 (部分的)
非アルコール性脂肪肝疾患検出のためのバイオマーカーとしてのチロシンに係る発明。
- (発明 7) 請求項 1－8 (部分的)
非アルコール性脂肪肝疾患検出のためのバイオマーカーとしての乳酸に係る発明。
- (発明 8) 請求項 1－8 (部分的)
非アルコール性脂肪肝疾患検出のためのバイオマーカーとしての尿酸に係る発明。
- (発明 9) 請求項 1－8 (部分的)
非アルコール性脂肪肝疾患検出のためのバイオマーカーとしてのバリンに係る発明。
- (発明 10) 請求項 1－8 (部分的)
非アルコール性脂肪肝疾患検出のためのバイオマーカーとしてのピルビン酸に係る発明。
- (発明 11) 請求項 1－8 (部分的)
非アルコール性脂肪肝疾患検出のためのバイオマーカーとしてフェニルアラニンに係る発明。
- (発明 12) 請求項 1－8 (部分的)
非アルコール性脂肪肝疾患検出のためのバイオマーカーとしてのプロリンに係る発明。

文献 1 : JP 2010-500566 A (テシス バイオサイエンス, インコーポレイテッド) 2010.01.07, 特許請求の範囲 & US 2010/0233724 A1, 特許請求の範囲 & WO 2008/021192 A2 & EP 2057473 A2 & CA 2662987 A1 & CN 101523221 A & AU 2007284733 A1

フロントページの続き

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

- (72)発明者 青木 豊
日本国京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内
- (72)発明者 佐藤 孝明
日本国京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内
- (72)発明者 木村 武志
日本国東京都中央区明石町10番1号 学校法人聖路加国際大学内
- (72)発明者 増田 勝紀
日本国東京都中央区明石町10番1号 学校法人聖路加国際大学内
- (72)発明者 平家 勇司
日本国東京都中央区明石町10番1号 学校法人聖路加国際大学内
- (72)発明者 宇山 静香
日本国東京都中央区明石町10番1号 学校法人聖路加国際大学内
- (72)発明者 鈴木 一彦
日本国東京都中央区明石町10番1号 学校法人聖路加国際大学内
- (72)発明者 浅見 まり子
日本国東京都中央区明石町10番1号 学校法人聖路加国際大学内
- (72)発明者 浦山 ケビン
日本国東京都中央区明石町10番1号 学校法人聖路加国際大学内
- (72)発明者 林 邦好
日本国東京都中央区明石町10番1号 学校法人聖路加国際大学内

(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。