

(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
2015年2月12日(12.02.2015)



(10) 国際公開番号
WO 2015/019976 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/50 (2006.01) G01N 33/483 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/070426
- (22) 国際出願日: 2014年8月4日(04.08.2014)
- (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 2013-162429 2013年8月5日(05.08.2013) JP
- (71) 出願人: 第一三共株式会社(DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒1030023 東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 松浦 知和(MATSUURA, Tomokazu); 〒1058461 東京都港区西新橋三丁目25番8号 東京慈恵会医科大学内 Tokyo (JP). 天野 克之(AMANO, Katsushi); 〒1058461 東京都港区西新橋三丁目25番8号 東京慈恵会医科大学内 Tokyo (JP). 杉田 知典(SUGITA, Tomonori); 〒1058461 東京都港区西新橋三丁目25番8号 東京慈恵会医科大学内 Tokyo (JP). 榎 紀子(MASUBUCHI, Noriko); 〒1408710 東京都品川区広町1丁目2番58号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP). 杉原 匡周(SUGIHARA, Masahiro); 〒1408710 東京都品川区広町1丁目2番58号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 庄司 隆, 外(SHOJI, Takashi et al.); 〒5320011 大阪府大阪市淀川区西中島五丁目6番13号 御幸ビル307号 Osaka (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, BN, 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, IR, IS, JP, KE, KG, 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, 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, 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, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: METHOD FOR INVESTIGATION OF LIVER DAMAGE TYPE

(54) 発明の名称: 肝障害のタイプの検査方法

(57) Abstract: Provided is an investigation method for determining liver damage type, using as an indicator the concentration of lithocholic acid (hereinafter abbreviated as LCA) in a biological sample derived from a test subject. Specifically, there is provided an investigation method in which the concentration of LCA in a biological sample taken from a test subject is measured, and using the measured LCA concentration as an indicator, the type of liver damage is determined to be hematocyte damage type, cholestatic type, or a mixed type thereof.

(57) 要約: 被験者由来の生物学的試料中のリトコール酸 (以下、LCAと略称する) の濃度を指標にして肝障害タイプを判別する検査方法を提供する。すなわち、被験者から採取された生物学的試料中のLCAの濃度の測定を行い、測定されたLCA濃度を指標にして、肝細胞障害型、胆汁鬱滞型、およびそれらの混合型の肝障害のタイプを判別する検査方法を提供する。



WO 2015/019976 A1

明 細 書

発明の名称：肝障害のタイプの検査方法

技術分野

[0001] 本発明は、肝障害の検査方法、詳しくは肝障害のタイプを判別する検査方法に関する。より詳しくは、本発明は、被験者から採取された生物学的試料中のLCAの濃度を測定し、測定されたLCA濃度を指標にして肝障害タイプを判別する検査方法に関する。

背景技術

[0002] 肝臓は消化管に付属する腺組織であり、胆汁の生成分泌、解毒作用、糖質代謝、タンパク質代謝、血液凝固因子の生成、ホルモン調節作用、並びに脂肪、グリコーゲン、タンパク質、およびビタミン等の各種生体構成要素の貯蔵等、生体にとって重要な数々の機能を有している。そのため、これら機能が、ウイルス感染、薬物や毒物、アルコールの過剰摂取等の原因により急性あるいは慢性的な障害を受けると、肝臓機能の恒常性の保持が崩され、重大な健康障害が生じる。人間ドック等において発見される疾病のうち肝機能障害が占める割合は高く、日本人成人の約30%が肝機能障害を持つと言われている。

[0003] 肝疾患に含まれる疾病は、その原因や臨床症候による分類がなされている。例えば、その原因により、ウイルス性肝炎、薬剤性肝障害、アルコール性肝障害、自己免疫性肝障害、代謝障害性肝障害等に分類することができる。また、その臨床症候別に、肝細胞障害型および胆汁鬱滞型に分類することができる。肝細胞障害は、ウイルス性肝炎、中毒性肝障害、脂肪肝、肝硬変等でみられる。肝細胞障害は、肝細胞の壊死、脂肪化、多核細胞化、核の空胞変性化等により生じる。肝細胞は、肝実質細胞とも言い、肝臓を構成する細胞の1つであり、肝臓のほとんど大部分を占める。肝細胞は、胆汁を分泌する外分泌細胞であると同時に、血漿タンパク質を頂端膜側に分泌し、グリコーゲンを蓄えて血糖を調節する内分泌細胞でもある。そのため、肝細胞が障

害を受けると肝機能の著しい低下が引き起こされる。胆汁鬱滞は、肝臓からの胆汁の排泄が何らかの原因により妨げられることにより生じ、その結果、肝内または肝外の胆道系の一部あるいは全般にわたって胆汁の流出異常をきたし、肝臓および血中に胆汁が貯留して黄疸や肝炎等の諸症状を引き起こす。

[0004] 現在、肝疾患の診断および治療は、患者の症状および血清生化学パラメータの値を指標にして、医師が経験に基づいて肝障害のタイプを診断し治療を開始するといった手法で進められている（非特許文献1）。生化学パラメータとしては、肝細胞の障害により肝細胞から逸脱する酵素、具体的にはアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（以下、ASTと略称する；グルタミン酸-オキサロ酢酸トランスアミナーゼ（GOT）ともいう）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（以下、ALTと略称する；グルタミン酸-ピルビン酸トランスアミナーゼ（GPT）ともいう）、 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ（以下、 γ -GTPと略称する）、アルカリホスファターゼ（以下、ALPと略称する）等が用いられている。

[0005] また、一般的に非臨床ならびに臨床においては、総胆汁酸（total bile acids；以下、TBAと略称する）の測定が行われている。胆汁酸は、哺乳類の胆汁に広範に認められるステロイド誘導体でコラン酸骨格を持つ化合物の総称であり、脂肪の消化吸収に重要な役割を果たす胆汁の主要な成分である。胆汁酸は、肝臓の肝細胞でコレステロール（Cholesterol）代謝により生成され（図1）、グリシンやタウリン（アミノ酸エチルスルホン酸）等と抱合した後、胆汁として分泌される。胆汁酸は、一次胆汁酸と二次胆汁酸とに大別される。一次胆汁酸は、肝臓で合成される胆汁酸であり、コール酸（以下、CAと略称することがある）、ケノデオキシコール酸（以下、CDCAと略称することがある）、およびCDCAと異性体の関係にあるウルソデオキシコール酸（以下、UDCAと略称することがある）等を例示できる。二次胆汁酸は、一次胆汁酸が胆管経由で腸管に排出されて腸内細菌による脱水酸化反応、脱水素反応、水素化反応、および脱

抱合反応により生成される胆汁酸であり、デオキシコール酸（以下、DCAと略称することがある）やLCA等を例示できる。これら例示した5種類の胆汁酸分画には、それぞれ、遊離型、グリシン抱合型、タウリン抱合型の3型が存在する。その他、一部の胆汁酸分画には、硫酸抱合型若しくはグルクロン酸抱合型が存在する。ヒトを含め多くの動物種では、一次胆汁酸として、コラン酸骨格の3、7、12位に水酸基を有したCAおよびCDCAが生成される。一方、一部の動物はその種に特有の胆汁酸を生成する。マウスでは α -ムリコール酸（以下、 α MCAと略称することがある）や β -ムリコール酸（以下、 β MCAと略称することがある）、並びにブタではヒオコール酸（以下、HCAと略称することがある）等、ヒトでは極少ない各動物種に特徴的な胆汁酸が見られる。 α MCAおよび β MCAは一次胆汁酸であり、タウリン抱合型も知られている。HCAは一次胆汁酸であり、腸内においてその7 α -脱水酸化によりヒオデオキシコール酸（以下、HDCA）が生成される。これら胆汁酸分画にもグリシン抱合型やタウリン抱合型が存在する。

[0006] 肝疾患の治療において肝障害の各タイプに適した治療を選択するためには、そのタイプの判別が重要である。従来、生化学パラメーターを基準に肝障害のタイプが判断されてきた。例えば、肝細胞障害型ではALTやASTの上昇を、また、胆汁鬱滞型ではALPや γ -GTPの上昇を一つの指標として、肝障害のタイプが判定されている。しかしながら、生化学パラメーターを基準とする判定方法では、肝障害のタイプの判断を誤る場合もあった。そのため、胆汁酸を構成する多くの分画の血清中の各濃度を測定し、その結果に基づいて肝障害のタイプを判別し、更に治療方針を決定する試みが行われてきている。

[0007] 今までに、肝障害の原因別分類と胆汁酸分画の濃度との間に種々の関係が報告されている（非特許文献2～6）が、一定の見解は得られておらず、臨床応用には至っていない。

[0008] また、肝障害の臨床症候別分類と胆汁酸分画の濃度との関連についてもい

くつか報告されている（非特許文献6～8）が、原因別分類と同様に、複数の結果が得られており、一定の見解は示されていない。一方、薬剤性肝障害における臨床症候別分類は、胆汁酸分画ではなく生化学パラメーターでの評価法が提唱されており（非特許文献9）、これに基づいて日本肝臓学会でも薬物性肝障害のスコアリングを提唱している（非特許文献10）。また、本発明者らは、ラットへの薬剤投与において生じた肝疾患と、胆管結紮処理や1-ナフチル イソチオシアネート（ANIT）投与等による代表的な胆汁鬱滞モデルとを比較し、胆汁酸分画濃度の測定により肝疾患の障害のタイプを判別できる可能性があることを報告している（非特許文献11）。しかしながら、臨床において、毛細胆管レベルの肝内胆汁鬱滞を早期に診断する明確なバイオマーカーは現状では報告されておらず、治療方針の決定が難しい場合が少なくない。

先行技術文献

非特許文献

[0009] 非特許文献1：重篤副作用疾患別対応マニュアル薬物性肝障害：10-30（平成20年4月、厚生労働省）

非特許文献2：IA Bouchier, CR Pennington, Serumbile acids in hepatobiliary disease. Gut. Jun;19(6):492-6 (1978).

非特許文献3：Fischer, S, Beuers, U, Spengler, U, Zwiebel, FM, Koebe, H-G, Hepatic levels of bile acids in end-stage chroniccholestatic liver disease. Clinica Chimica Acta. 251(2):173-86 (1993).

非特許文献4：Williams CN, Bile-acid metabolism and the liver. Clin Biochem. 9(3):149-52 (1976).

非特許文献5：Berr F, Pratschke E, Fischer S, Paumgartner G. Disorders of bile acid metabolism in cholesterol gallstonedisease. J Clin Invest. 90(3):859-68 (1992).

非特許文献6：Ostrow JD, Metabolism of bilesalts in cholestasis in humans. In: Tavoloni, N, Berk, PD (Eds), Hepatictransport and bile secre

tion. Raven, New York, pp.673-712 (1993).

非特許文献7: Burkard I, von Eckardstein A, Rentsch KM, Differentiated quantification of human bile acids in serum by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 826 (1-2):147-59 (2005).

非特許文献8: Palmeira CM, Rolo AP, Mitochondrially-mediated toxicity of bile acids. Toxicology. 203(1-3):1-15(2004).

非特許文献9: Danan G, Benichou C. Causality assessment of adverse reactions to drugs--I. A novel method based on the conclusions of international consensus meetings: application to drug-induced liver injuries. J Clin Epidemiol. 46(11):1323-30 (1993).

非特許文献10: 滝川 一、DDW-J 2004 ワークショップ薬物性肝障害診断基準の提案肝臓 46(2):85-90 (2005)

非特許文献11: 梶淵 紀子 (Noriko Masubuchi) ら、日本薬物動態学会第24回年会、第305頁、第2-P-43番、2009年。

非特許文献12: A. Stiehl, Bile Salt Sulphates in Cholestasis. European Journal of Clinical Investigation. 4 (1):59-63 (1974).

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 肝障害は、臨床症候別に、肝細胞障害型および胆汁鬱滞型に分類することができ、各タイプに適した治療を選択するためにそのタイプの判別は重要であるにも関わらず、これらのタイプを判定できる技術は確立していない。そのため、現状では治療を進めながら医師らの経験に基づく総合的な判断により、投薬等の治療が施されている。従来、生化学パラメーターを基準に肝障害のタイプを判断する場合、肝細胞障害型ではALTやASTの上昇を、また、胆汁鬱滞型ではALPや γ -GTPの上昇を一つの指標としてきたが、これだけでは判断を誤ることがある。したがって、肝疾患発症の初期段階で肝障害のタイプをより明確に判別できるマーカーがあれば、治療方針の決定

が早期に可能になる。

[0011] 本発明の課題は、肝障害タイプの早期診断を可能にするために有用なバイオマーカーを見出し、該バイオマーカーを指標にした肝障害タイプの判別方法または肝障害タイプの判別を補助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

[0012] 本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意研究を行い、臨床血清検体を使用して24種の胆汁酸分画、肝線維化マーカー、酸化ストレスマーカーの濃度を測定し、得られた測定データの多変量解析により、リトコール酸の濃度が、肝障害タイプと関連することを見出した。具体的には、リトコール酸の濃度は、肝障害患者集団において、肝細胞障害型の肝障害では高い傾向を示し、逆に胆汁鬱滞型の肝障害では低い傾向を示した。更に、肝細胞障害型の肝障害では、ウルソデオキシコール酸の濃度が低い傾向を示し、また肝線維化マーカーであるIV型コラーゲンの濃度は高い傾向が認められた。一方、胆汁鬱滞型の肝障害では、デオキシコール酸の濃度は低い傾向を示し、血清硫酸抱合型胆汁酸 (serum sulfated bile acids; 以下、SSBAと略称する)、肝線維化マーカーであるIV型コラーゲンおよびヒアルロン酸 (以下、HAと略称する)、並びに酸化ストレスマーカーである活性酸素種 (reactive oxygen species; 以下、ROSと略称する) は高い傾向を示した。また、各種胆汁酸のタウリン抱合体およびグリシン抱合体も、その遊離型分画の濃度と同様の傾向を示した。肝障害のタイプによって特徴的な傾向を示すこれら胆汁酸分画を含むバイオマーカーを利用することにより、肝障害のタイプを判別することができることを明らかにし、本発明を達成した。

[0013] すなわち、本発明は以下に関する：

1. 被験者から採取された生物学的試料中のLCA濃度を測定することを含む、LCA濃度を指標とする肝障害タイプを判別する検査方法。
2. 測定されたLCA濃度を、予め設定されたLCA濃度のカットオフ値と比較することを更に含む、前記1.に記載の検査方法。

3. 測定されたLCA濃度が、予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別するLCA濃度のカットオフ値以上であるとき、肝障害のタイプは肝細胞障害型であると判定することを更に含む、前記1. に記載の検査方法。

4. 測定されたLCA濃度が、予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するLCA濃度のカットオフ値以下であるとき、肝障害のタイプは胆汁鬱滞型であると判定することを更に含む、前記1. に記載の検査方法。

5. 測定されたLCA濃度が、予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別するLCA濃度のカットオフ値を超えており、かつ予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するカットオフ値未満であるとき、肝障害のタイプは肝細胞障害型と胆汁鬱滞型との混合型であると判定することを更に含む、前記1. に記載の検査方法。

6. UDCAおよびIV型コラーゲンのいずれか1または両方の濃度を測定し、LCA濃度に加えてUDCAおよびIV型コラーゲンのいずれか1または両方の濃度を指標とすることを含み、

測定されたLCA濃度が、予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別するLCA濃度のカットオフ値以上であり、かつ測定されたUDCAおよび／またはIV型コラーゲンの濃度が、下記いずれか1であるとき、肝障害のタイプは肝細胞障害型であると判定することを更に含む、前記1. に記載の検査方法：

(1) UDCA濃度が予め設定されたUDCA濃度のカットオフ値以下である、

(2) IV型コラーゲン濃度が予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別するIV型コラーゲン濃度のカットオフ値以上である、

(3) UDCA濃度が予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別するUDCA濃度のカットオフ値以下であり、かつIV型コラーゲン濃度が予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別するIV型コラーゲン濃度のカットオフ値以上である。

7. DCA、SSBA、IV型コラーゲン、HA、およびROSのいずれか

1以上の濃度を測定し、LCA濃度に加えてDCA、SSBA、IV型コラーゲン、HA、およびROSの濃度を指標とすることを含み、

測定されたLCA濃度が、予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するLCA濃度のカットオフ値以下であり、かつ測定されたDCA、SSBA、IV型コラーゲン、HA、およびROSの濃度が、下記いずれか1または2以上であるとき、肝障害のタイプは胆汁鬱滞型であると判定することを更に含み、前記1.に記載の検査方法：

(4) DCA濃度が予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するDCA濃度のカット

オフ値以下である、

(5) SSBA濃度が予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するSSBA濃度のカ

ットオフ値以上である、

(6) IV型コラーゲン濃度が予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するIV型コラ

ーゲン濃度のカットオフ値以上である、

(7) HA濃度が予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するHA濃度のカットオフ

値以上である、

(8) ROS濃度が予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するROS濃度のカット

オフ値以上である。

8. IV型コラーゲンの濃度を測定し、LCA濃度に加えてIV型コラーゲン濃度を指標とすることを含み、

測定されたLCA濃度が、予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別するLCA濃度のカットオフ値を超えており、かつ予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するカットオフ値未満であり、更に測定されたIV型コラーゲンの濃度が、予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するIV型コラー

ゲンのカットオフ値以上であるとき、肝障害のタイプは肝細胞障害型と胆汁鬱滞型との混合型であると判定することを更に含む、前記 1. に記載の検査方法。

9. 予め設定された L C A 濃度のカットオフ値が、L C A 濃度の受信者動作特性曲線 (receiver operating characteristic Curve ; 以下、ROC 曲線と称する) から算出されるものである、前記 2. の検査方法。

10. 予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別する L C A 濃度のカットオフ値が、予め定めた肝細胞障害型の肝障害に関する L C A 濃度の R O C 曲線から算出されるものである、前記 3. 、 5. 、 6. 、または 8. に記載の検査方法。

11. 予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別する L C A 濃度のカットオフ値が、予め定めた胆汁鬱滞型の肝障害に関する L C A 濃度の R O C 曲線から算出されるものである、前記 4. 、 5. 、 6. 、または 8. に記載の検査方法。

12. 予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別する L C A 濃度のカットオフ値、予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別する U D C A 濃度のカットオフ値、および予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別する I V 型コラーゲン濃度のカットオフ値が、それぞれ、予め定めた肝細胞障害型の肝障害に関する L C A 濃度の R O C 曲線から算出されるもの、予め定めた肝細胞障害型の肝障害に関する U D C A 濃度の R O C 曲線から算出されるもの、および予め定めた肝細胞障害型の肝疾患に関する I V 型コラーゲン濃度の R O C 曲線から算出されるものである、前記 6. に記載の検査方法。

13. 予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別する L C A 濃度のカットオフ値、予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別する D C A 濃度のカットオフ値、予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別する S S B A 濃度のカットオフ値、予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別する I V 型コラーゲン濃度のカットオフ値、予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別する H A 濃度

のカットオフ値、および予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するROS濃度のカットオフ値が、それぞれ、予め定めた胆汁鬱滞型の肝障害に関するLCA濃度のROC曲線から算出されるもの、予め定めた胆汁鬱滞型の肝障害に関するDCA濃度のROC曲線から算出されるもの、予め定めた胆汁鬱滞型の肝障害に関するSSBA濃度のROC曲線から算出されるもの、予め定めた胆汁鬱滞型の肝障害に関するIV型コラーゲン濃度のROC曲線から算出されるもの、予め定めた胆汁鬱滞型の肝障害に関するHA濃度のROC曲線から算出されるもの、予め定めた胆汁鬱滞型の肝障害に関するROS濃度のROC曲線から算出されるものである、前記7.に記載の検査方法。

14. 前記生物学的試料が血液試料である、前記1. から13. のいずれか1つに記載の検査方法。

15. 前記生物学的試料が血清試料である、前記1. から14. のいずれか1つに記載の検査方法。

16. 前記1. から15. のいずれか1つに記載の検査方法によって肝障害のタイプが判定された被験者に対して、その肝障害のタイプに応じた肝障害治療剤を選択する方法。

発明の効果

[0014] 本発明により、被験者から採取された生物学的試料中のLCAの濃度の測定を行い、測定されたLCA濃度を指標にして肝障害タイプを判別する検査方法を提供することができる。

[0015] 本発明に係る検査方法は、単独で、または従来実施されてきた生化学パラメーターの測定と併せて使用することにより、臨床症候による肝障害タイプ、具体的には肝細胞障害型、胆汁鬱滞型、およびそれらの混合型の早期診断および治療方針の早期決定を可能とする。本発明に係る検査方法は、肝疾患の検査に使用することができ、肝疾患の診断および治療を補助する方法として極めて有用である。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]胆汁酸の代謝経路を示す図である。

[図2] L C A濃度のカットオフ値による肝障害タイプの判別方法を説明する図である。

[図3]肝細胞障害型の肝障害では、胆汁酸分画の中でL C Aの濃度は有意に上昇傾向を示し、U D C Aの濃度は有意に低下傾向を示したことを説明する模式図である。C AやU D C Aと異性体の関係にあるC D C Aの濃度は有意差はないものの低下傾向を示し、D C Aの濃度は有意差はないものの上昇傾向を示した。

[図4]胆汁鬱滞型の肝障害では、胆汁酸分画の中でL C AおよびD C Aの濃度はいずれも有意に上昇傾向を示したことを説明する模式図である。C D C A、U D C A、およびC Aの濃度は有意差はないもののいずれも低下傾向を示した。

発明を実施するための形態

[0017] 本明細書で使用する胆汁酸分画の各略称を表1に示す。本明細書において、胆汁酸分画の名称を表1に示した略称で記載することがある。

[0018]

[表1]

胆汁酸分画	略称
コール酸	C A
グリココール酸	G C A
タウロコール酸	T C A
デオキシコール酸	D C A
グリコデオキシコール酸	G D C A
タウロデオキシコール酸	T D C A
ケノデオキシコール酸	C D C A
グリコケノデオキシコール酸	G C D C A
タウロケノデオキシコール酸	T C D C A
ウルソデオキシコール酸	U D C A
グリコウルソデオキシコール酸	G U D C A
タウロウルソデオキシコール酸	T U D C A
リトコール酸	L C A
グリコリトコール酸	G L C A
タウロリトコール酸	T L C A
12-ケトリトコール酸	12_K L C A
α -ムリコール酸	α M C A
β -ムリコール酸	β M C A
タウロ- β -ムリコール酸	T β M C A
ヒオコール酸	H C A
グリコヒオコール酸	G H C A
タウロヒオコール酸	T H C A
ヒオデオキシコール酸	H D C A
グリコヒオデオキシコール酸	G H D C A
タウロヒオデオキシコール酸	T H D C A
硫酸抱合型胆汁酸	S S B A

[0019] 本発明は、肝障害の検査方法、より詳しくは肝障害タイプを判別する検査方法に関する。本発明に係る検査方法は、被験者から採取された生物学的試料中のL C Aの濃度を測定し、測定されたL C A濃度を指標にして肝障害タイプを判別するものである。L C A濃度を指標にして肝障害タイプを判別することは、測定されたL C A濃度を、予め設定されたL C A濃度のカットオ

フ値と比較することにより実施できる。本発明に係る検査方法として、被験者から採取された生物学的試料中のLCA濃度を測定すること、および、測定されたLCA濃度を予め設定されたLCA濃度のカットオフ値と比較することを更に含む、肝障害タイプを判別する検査方法を例示できる。

[0020] 本発明に係る検査方法において、LCA濃度に加えて、LCAとは別のバイオマーカーであって肝障害のタイプに関連するバイオマーカーの濃度を測定してもよく、LCA濃度および該バイオマーカーの濃度を指標にして、肝障害のタイプを判別することができる。

[0021] LCAとは別のバイオマーカーであって肝障害のタイプに関連するバイオマーカーとして、肝細胞障害型の肝障害に関連するUDCAおよびIV型コラーゲンを例示できる。また、胆汁鬱滞型の肝障害に関連するバイオマーカーとして、DCA、SSBA、IV型コラーゲン、HA、およびROSを例示できる。

[0022] 本発明に係る検査方法は、単独で実施することもできるし、あるいは従来実施されてきた生化学パラメーターの測定等の種々の検査方法と併せて実施することができる。

[0023] 本明細書において「肝障害のタイプ」とは、肝障害の症候によって分類されるタイプを意味する。肝障害の症候とは、肝障害の患者が示す様々な訴えや診察所見をいう。具体的には「肝障害のタイプ」として、肝細胞障害型および胆汁鬱滞型を挙げることができる。肝細胞障害型では、肝臓を構成する細胞の1つであって肝臓のほとんど大部分を占める肝実質細胞が障害を受けて、肝機能の著しい低下が引き起こされる。胆汁鬱滞型は、肝臓からの胆汁の排泄が何らかの原因により妨げられることにより生じ、その結果、肝内または肝外の胆道系の一部あるいは全般にわたって胆汁の流出異常をきたし、肝臓および血中に胆汁が貯留して黄疸や肝炎等の諸症状を引き起こす。

[0024] 本発明に係る検査方法では、肝細胞障害型および胆汁鬱滞型を判別することができ、また、肝細胞障害型および胆汁鬱滞型の両方に分類されるタイプ、すなわち混合型を判別することができる。

- [0025] 本発明に係る検査方法の対象となる「被験者」は、肝機能障害があると診断された者、または／および何らかの検査結果により肝機能障害があると疑われる者を意味し、ウイルス性肝炎、薬剤性肝障害、アルコール性肝障害、自己免疫性肝障害、代謝障害性肝障害等に分類される肝疾患を有する、または／および該肝疾患を有すると疑われる者を包含する。好ましくは肝機能障害があると診断された者である。
- [0026] 本明細書において「生物学的試料」は、胆汁酸分画が含まれているものであれば特に限定されず、胆汁酸分画に加えて、肝繊維化マーカーおよび／または酸化ストレスマーカーが含まれ得るものを好ましくは挙げることができる。具体的には、被験者から単離された血液、該血液から調製された血清や血漿、好ましくは血清を例示できる。
- [0027] 本明細書において「肝障害治療剤」、「肝障害の治療方法」とは、例えば、重篤副作用疾患別対応マニュアル薬物性肝障害に記載されている肝障害治療剤および肝障害の治療方法、各医療施設において行われている投薬方法および治療方法等が挙げられる。肝細胞障害型の場合、例えば、グリチルリチン製剤で抗アレルギー作用のある強力ネオミノファーゲンシー製剤の静注や、肝細胞膜保護作用を有するUDCAの経口投与を行う。肝細胞障害が重症化し、劇症肝炎に陥った場合、例えば、中心静脈栄養法（IVH）や人工肝補助療法を用いる。胆汁鬱滞型の場合、例えば、脂溶性ビタミンの不足を補うため、ビタミンAやビタミンKを投与し、次に薬物治療としてUDCA、プレドニゾロン、フェノバルビタール、タウリン、コレスチミドなどを使用する。
- [0028] LCAは、胆汁酸の一種である。胆汁酸は、肝臓の肝細胞でコレステロール代謝により生成され、グリシンやタウリン（アミノ酸エチルスルホン酸）等と抱合した後、胆汁として分泌され、脂肪の消化吸収に重要な役割を果たす。LCAは、肝臓で合成された一次胆汁酸の一つであるCDCAが、胆管経由で腸管に排出され、7- α デヒドロキシラーゼによる脱水酸化反応を受けて生成された二次胆汁酸である。

[0029] 肝障害患者集団において、肝細胞障害型の肝障害患者と胆汁鬱滞型の肝障害患者との間で血清中のLCA濃度の比較を行ったところ、LCAの濃度は、肝細胞障害型の肝障害患者では高い傾向を示し、逆に胆汁鬱滞型の肝障害患者では低い傾向を示した。更に、胆汁鬱滞型の肝障害では、血清中のDCAの濃度は低い傾向を示し、SSBAの濃度は高い傾向を示した。一方、肝細胞障害型の肝障害では、血清中のUDCAの濃度は低い傾向を示した。また、各種胆汁酸のタウリン抱合体およびグリシン抱合体も、その遊離型分画の濃度と同様の傾向を示した。胆汁鬱滞型の肝障害では、胆汁鬱滞によりDCAやLCAの生成が抑えられ、これに伴ってCA、CDCA、およびUDCAの濃度は上昇し、これとは逆に肝細胞障害型の肝障害では、脂溶性の高いDCAやLCAの生成が亢進し、CA、CDCAおよびUDCAの生成が抑えられると考えることができる。

[0030] また、LCA以外にも、胆汁鬱滞型の肝障害では、肝線維化マーカーであるIV型コラーゲンおよびHA、並びに酸化ストレスマーカーであるROSの血清中の濃度が高い傾向を示した。一方、肝細胞障害型の肝障害では、IV型コラーゲンの血清中の濃度が高い傾向を示した。

[0031] 肝障害のタイプの判別は、各測定項目について、予め設定されたカットオフ値と比較することにより実施できる。「カットオフ値」とは、陽性と陰性の範囲を区別する値をいう。各測定項目のカットオフ値は、肝障害のタイプにより個別に設定することができる。カットオフ値の設定は、自体公知の方法によって実施できる。例えば、診断検査の有用性を検討する手法として一般的に用いられているROC解析により、カットオフ値の設定を行うことができる。ROC解析では、閾値を変化させていった場合に、それぞれの閾値における感度 (Sensitivity) を縦軸に、FPF (False Positive Fraction、偽陽性率: $1 - \text{特異度 (Specificity)}$) を横軸にプロットしたROC曲線が作成される。ROC曲線では、全く診断能のない検査は、対角線上の直線となるが、診断能が向上するほど、対角線が左上方に弧を描くような曲線となり、診断能100%の

検査は、左辺—上辺上を通る曲線となる。カットオフ値の設定としては、例えば、感度と特異度の優れた独立変数のROC曲線は、左上隅に近づいていくという事実から、この左上隅との距離が最小となる点をカットオフ値にする方法がある。また、ROC曲線における曲線下面積 (area under the curve、AUCと略称される) が0.500となる斜点線から最も離れたポイントをカットオフ値にする方法、つまり、(感度+特異度-1)を計算して、その最大値となるポイントであるヨーデン指標 (Youden index) をカットオフ値に設定することもできる。ここで、感度とは、真の陽性率を意味する。また、特異度とは真の陰性率を意味する。更に、別の方法として、各測定項目と肝障害のタイプの頻度との関係から、カットオフ値を定量的に設定することも可能である。

[0032] 本発明に係る検査方法による肝障害のタイプの判別を、図2を用いて説明する。LCA濃度が、予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別するLCA濃度のカットオフ値以上であるとき、肝障害のタイプは肝細胞障害型であると判定する。LCA濃度が、予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するLCA濃度のカットオフ値以下であるとき、肝障害のタイプは胆汁鬱滞型であると判定する。また、LCA濃度が、予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別するLCA濃度のカットオフ値を超えるものであって、かつ胆汁鬱滞型の肝障害を識別するLCA濃度のカットオフ値未満であるとき、肝障害のタイプは肝細胞障害型と胆汁鬱滞型の両方のタイプ、すなわち混合型であると判定する。更に、より詳しく判別するならば、LCA濃度が、予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するLCA濃度のカットオフ値を超えるものであるとき、肝障害のタイプは混合型を含まない肝細胞障害型であると判定する。また、LCA濃度が、予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別するLCA濃度のカットオフ値未満であるとき、肝障害のタイプは混合型を含まない胆汁鬱滞型であると判定する。

[0033] 本発明に係る検査方法において、LCAの濃度の測定に加えて、UDCAおよびIV型コラーゲンのいずれか1または両方の濃度を測定してもよく、

測定されたUDCAおよび／またはⅠⅤ型コラーゲンの濃度を予め設定されたそれぞれのカットオフ値と比較し、測定されたLCA濃度が予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別するLCA濃度のカットオフ値以上であり、かつ測定されたUDCAおよび／またはⅠⅤ型コラーゲンの濃度が下記いずれか1であるとき、肝障害のタイプは肝細胞障害型であると判定することができる：(1)UDCA濃度が予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別するUDCA濃度のカットオフ値以下である、(2)ⅠⅤ型コラーゲン濃度が予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別するⅠⅤ型コラーゲン濃度のカットオフ値以上である、および(3)UDCA濃度が予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別するUDCA濃度のカットオフ値以下であり、かつⅠⅤ型コラーゲン濃度が予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別するⅠⅤ型コラーゲン濃度のカットオフ値以上である。

[0034] 本発明に係る検査方法において、LCAの濃度の測定に加えて、DCA、SSBA、ⅠⅤ型コラーゲン、HA、およびROSのいずれか1以上の濃度を測定してもよく、各測定値を予め設定されたそれぞれのカットオフ値と比較し、測定されたLCA濃度が予め設定されたLCA濃度のカットオフ値以下であり、かつ測定されたDCA、SSBA、ⅠⅤ型コラーゲン、HA、およびROSの濃度が下記いずれか1または2以上であるとき、肝障害のタイプは胆汁鬱滞型であると判定することができる：(4)DCA濃度が予め設定されたDCA濃度のカットオフ値以下である、(5)SSBA濃度が予め設定されたSSBA濃度のカットオフ値以上である、(6)ⅠⅤ型コラーゲン濃度が予め設定されたⅠⅤ型コラーゲン濃度のカットオフ値以上である、(7)HA濃度が予め設定されたHA濃度のカットオフ値以上である、および(8)ROS濃度が予め設定されたROS濃度のカットオフ値以上である。

[0035] 本発明に係る検査方法においてはまた、LCAの濃度の測定に加えて、ⅠⅤ型コラーゲンの濃度を測定し、各測定値を予め設定されたそれぞれのカットオフ値と比較し、測定されたLCA濃度が予め設定された肝細胞障害型の

肝障害を識別するL C A濃度のカットオフ値を超えるものであり、かつ胆汁鬱滞型の肝障害を識別するL C A濃度のカットオフ値未満であり、更に測定されたI V型コラーゲンの濃度が予め設定されたI V型コラーゲンのカットオフ値以上であるとき、肝障害のタイプは肝細胞障害型と胆汁鬱滞型との混合型であると判定することができる。

[0036] 本発明に係る検査方法において使用する各測定項目のカットオフ値の具体例を表2-1および表2-2に示す。表2-1は肝細胞障害型の肝障害を識別するバイオマーカーのカットオフ値の具体例である。表2-2は胆汁鬱滞型の肝障害を識別するバイオマーカーのカットオフ値の具体例である。例示したカットオフ値は、後述する実施例において、肝障害治療薬の適用がない肝障害患者を対象にし、該肝障害患者から採取された血清試料を生物学的試料として用いて各バイオマーカーの濃度を測定し、測定された各バイオマーカー濃度について、肝障害患者集団と肝細胞障害型肝障害患者または胆汁鬱滞型肝障害患者との比較を、ROC解析を使用して行い、ヨーデン指標を求めることにより予め定めたカットオフ値である。カットオフ値は、測定施設や測定する母集団ごとに設定することも可能である。上記同様の試料を対象にして目的のバイオマーカー濃度の測定データを蓄積し、上記同様の解析手法で解析を行うことにより、その設定を適宜変更することもできる。また、血清試料とは別の試料を使用してバイオマーカーの濃度の測定を行うときは、該使用する試料を対象にした各バイオマーカー濃度の測定データについて、上記同様の解析手法で解析を行うことにより、カットオフ値を適宜設定できる。

[0037]

[表2-1]

		カットオフ値
胆汁酸分画	LCA (nmol/mL)	≥ 0.0195
	UDCA (nmol/mL)	≤ 0.903
肝繊維化マーカー	TypeIV collagen (ng/ml)	≥ 128

[0038] [表2-2]

		カットオフ値
胆汁酸分画	LCA (nmol/mL)	≤ 0.0241
	DCA (nmol/mL)	≤ 0.175
	SSBA (nmol/mL)	≥ 21.1
酸化ストレスマーカー	ROS (U)	≥ 216
肝繊維化マーカー	TypeIV collagen (ng/ml)	≥ 288
	HA (ng/ml)	≥ 47

[0039] 本発明に係る検査方法を、上記表2-1および表2-2に例示した具体的なカットオフ値を使用して実施する場合の具体例を説明する。

[0040] 本発明に係る検査方法の具体例として、
 被験者から採取された血清試料中のLCA濃度を測定する工程、
 測定されたLCA濃度を、予め設定されたLCA濃度のカットオフ値と比較する工程、および
 測定されたLCA濃度が、予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別するLCA濃度のカットオフ値以上であるとき、肝障害のタイプは肝細胞障害

型であると判定する工程を含み、

ここで、該カットオフ値が 0.0195 nmol/L である、
肝障害タイプを判別する検査方法を挙げることができる。

[0041] また、別の具体例として、

被験者から採取された血清試料中のLCA濃度を測定する工程、
測定されたLCA濃度を、予め設定されたLCA濃度のカットオフ値と比較する工程、および

測定されたLCA濃度が、予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別するLCA濃度のカットオフ値以下であるとき、肝障害のタイプは胆汁鬱滞型であると判定する工程を含み、

ここで該カットオフ値が 0.0241 nmol/L である、
肝障害タイプを判別する検査方法を挙げることができる。

[0042] 更に別の具体例として、

被験者から採取された血清試料中のLCA濃度を測定する工程、
測定されたLCA濃度を、予め設定されたLCA濃度のカットオフ値と比較する工程、および

測定されたLCA濃度が、予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別するLCA濃度のカットオフ値を超えており、かつ予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するカットオフ値未満であるとき、肝障害のタイプは肝細胞障害型と胆汁鬱滞型との混合型であると判定する工程を含み、

ここで、予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別するLCA濃度のカットオフ値が 0.0195 nmol/L であり、かつ予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するLCA濃度のカットオフ値が 0.0241 nmol/L である、

肝障害タイプを判別する検査方法を挙げることができる。

[0043] また、別の具体例として、

被験者から採取された血清試料中のLCA濃度を測定する工程、
測定されたLCA濃度を、予め設定されたLCA濃度のカットオフ値と比

較する工程、

更に、UDCAおよびI V型コラーゲンのいずれか1または両方の濃度を測定する工程、

測定されたUDCAおよび／またはI V型コラーゲンの濃度を、予め設定されたLCA濃度のカットオフ値と比較する工程、および

測定されたLCA濃度が、予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別するLCA濃度のカットオフ値以上であり、かつ測定されたUDCAおよび／またはI V型コラーゲンの濃度が、下記いずれか1であるとき、肝障害のタイプは肝細胞障害型であると判定する工程：

(1) UDCA濃度が予め設定されたUDCA濃度のカットオフ値以下である、

(2) I V型コラーゲン濃度が予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別するI V型コラーゲン濃度のカットオフ値以上である、

(3) UDCA濃度が予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別するUDCA濃度のカットオフ値以下であり、かつI V型コラーゲン濃度が予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別するI V型コラーゲン濃度のカットオフ値以上である、

を含み、

ここで、予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別するLCA濃度のカットオフ値が 0.0195 nmol/L であり、予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別するUDCA濃度のカットオフ値が 0.903 nmol/L であり、かつ予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別するI V型コラーゲン濃度のカットオフ値が 128 ng/ml である、肝障害タイプを判別する検査方法を挙げることができる。

[0044] また、別の具体例として、

被験者から採取された血清試料中のLCA濃度を測定する工程、

測定されたLCA濃度を、予め設定されたLCA濃度のカットオフ値と比較する工程、

更に、DCA、SSBA、IV型コラーゲン、HA、およびROSのいずれか1以上の濃度を測定する工程、

前記更なる測定により得られた各測定値を予め設定されたそれぞれのカットオフ値と比較する工程、および

測定されたLCA濃度が、予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するLCA濃度のカットオフ値以下であり、かつ測定されたDCA、SSBA、IV型コラーゲン、HA、およびROSの濃度が、下記いずれか1または2以上であるとき、肝障害のタイプは胆汁鬱滞型であると判定する工程：

(4) DCA濃度が予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するDCA濃度のカットオフ値以下である、

(5) SSBA濃度が予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するSSBA濃度のカットオフ値以上である、

(6) IV型コラーゲン濃度が予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するIV型コラーゲン濃度のカットオフ値以上である、

(7) HA濃度が予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するHA濃度のカットオフ値以上である、

(8) ROS濃度が予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するROS濃度のカットオフ値以上である。

を含み、

ここで、予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するLCA濃度のカットオフ値が 0.0241 nmol/L であり、予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するDCA濃度のカットオフ値が 0.175 nmol/L であり、予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するSSBA濃度のカットオフ値が 21.1 nmol/L であり、予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するIV型コラーゲン濃度のカットオフ値が 288 ng/ml であり、予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するHA濃度のカットオフ値が 47 ng/ml であり、かつ予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するROS濃度のカットオフ値が 216 U である、

肝障害タイプを判別する検査方法を挙げることができる。

[0045] また、別の具体例として、

被験者から採取された血清試料中のL C A濃度を測定する工程、

測定されたL C A濃度を、予め設定されたL C A濃度のカットオフ値と比較する工程、

更に、該血清試料中のI V型コラーゲンの濃度を測定する工程、

I V型コラーゲンの測定値を予め設定されたI V型コラーゲンのカットオフ値と比較する工程、および

測定されたL C A濃度が、予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別するL C A濃度のカットオフ値を超えており、かつ予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するカットオフ値未満であり、更に測定されたI V型コラーゲンの濃度が、予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するI V型コラーゲンのカットオフ値以上であるとき、肝障害のタイプは肝細胞障害型と胆汁鬱滞型との混合型であると判定する工程

を含み、

ここで、予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別するL C A濃度のカットオフ値および予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するL C A濃度のカットオフ値がそれぞれ0. 0195 nmol/Lおよび0. 0241 nmol/Lであり、かつ、予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するI V型コラーゲンのカットオフ値が288 ng/mlである、

肝障害タイプを判別する検査方法を挙げることができる。

[0046] 胆汁酸分画の濃度の測定は、該測定に従来より使用されている方法を使用して実施できる。例えば、液体クロマトグラフ/タンデム質量分析(LC-MS/MS)法やガスクロマトグラフ質量分析(GC/MS)法を挙げることができる。また、胆汁酸や硫酸抱合型胆汁酸の濃度は、市販の胆汁酸測定キットを使用してその測定を実施できる。例えば、硫酸抱合型胆汁酸の濃度の測定はユーバスティック・オート、胆汁酸(USBA)キット((株)エル・ピーエス)を用いて実施できる。測定方法はこれらに限定されず、胆汁

酸やその分画の測定が可能であればいずれの方法も使用できる。

[0047] I V型コラーゲンの濃度の測定は、該測定に従来より使用されている方法を使用して実施できる。例えば、市販のI V型コラーゲン測定用試薬キットを使用して、I V型コラーゲンの濃度を測定することができる。かかる方法として、I V型コラーゲンに対する抗体を使用した酵素免疫法（E I A）や酵素免疫固相法（E L I S A）を例示できる。具体的には、生物学的試料に抗ヒトI V型コラーゲン ウサギポリクローナル抗体を添加してI V型コラーゲン・7 S -抗ヒトI V型コラーゲン ウサギポリクローナル抗体複合体（複合体1）を形成させ、その後、ヨウ素125（¹²⁵I）等の放射性同位体で標識したトI V型コラーゲン・7 S（標識抗原）を加え、当該試料中のI V型コラーゲン・7 Sと結合し得なかった抗ヒトI V型コラーゲン・7 S ウサギポリクローナル抗体と複合体（複合体2）を形成させ、更に抗ウサギγグロブリンヤギ血清（ヤギ抗体）を加えて、抗ウサギγグロブリンヤギ血清（ヤギ抗体）を加えると、ヤギ抗体は複合体2と反応し、標識抗原-抗ヒトI V型コラーゲン・7 S ウサギポリクローナル抗体-ヤギ抗体複合体を形成させ、生じた沈澱を回収して沈殿物の放射活性を測定することにより、I V型コラーゲン・7 S濃度を測定することができる。

[0048] H Aの濃度の測定は、該測定に従来より使用されている方法を使用して実施できる。例えば、市販のH A測定用試薬キットを使用して、H Aの濃度を測定することができる。かかる方法として、H Aに対する抗体を使用した酵素免疫固相法（E L I S A）を例示できる。

[0049] R O Sの濃度の測定は、該測定に従来より使用されている方法を使用して実施できる。例えば、市販のR O S測定用試薬キットを使用して、R O Sの濃度を測定することができる。具体的には、鉄等の金属イオンを触媒とするフェントン反応を利用し、過酸化物（R O O H）からフリーラジカル（R O O ·やR O ·）を発生させ、N, N-ジエチル-1, 4-フェニレンジアミン硫酸塩（D E P P Dと略称する）と反応させ、該反応により生成したD E P P D · +を波長505 nmの吸収を測定することによりフリーラジカル

を生成する物質の総量を測定することができる。

[0050] 本発明には、本発明に係る検査方法によって肝障害のタイプが判定された被験者に対して、その肝障害のタイプに応じた肝障害治療剤を選択する方法が包含される。

[0051] また、本発明には、本発明に係る検査方法によって肝障害のタイプが判定された被験者に対して、その肝障害のタイプに応じた治療を行う治療方法が包含される。

[0052] 肝障害のタイプに応じた肝障害治療剤や肝障害の治療方法としては、例えば、重篤副作用疾患別対応マニュアル薬物性肝障害に記載されている肝障害治療剤および肝障害の治療方法、各医療施設において行われている投薬方法および治療方法等が挙げられる。肝細胞障害型の場合、例えば、グリチルリチン製剤で抗アレルギー作用のある強力ネオミノファーゲンシー製剤の静注や、UDCAの経口投与を行う。肝細胞障害が重症化し、劇症肝炎に陥った場合、例えば、中心静脈栄養法（IVH）や人工肝補助療法を用いる。胆汁鬱滞型の場合、例えば、脂溶性ビタミンの不足を補うため、ビタミンAやビタミンKを投与し、次に薬物治療としてUDCA、プレドニゾロン、フェノバルビタール、タウリン、コレスチミドなどを使用する。

[0053] 以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定して解釈されない。

実施例 1

[0054] 肝障害タイプの早期診断を可能にするために有用なバイオマーカールを見出すことを目的として、肝障害患者および健常ボランティアより得た血清試料を使用して、胆汁酸分画濃度、並びに酸化ストレスマーカーおよび肝線維マーカーの測定を行った。血清試料の採取および一連の実験は、試料提供者である患者および健常ボランティアの同意を得て行なったものである。

[0055] 1. 対象試料

第一三共株式会社および慈恵医科大学内の倫理委員会の承認に基づき、約2年間において、ウイルス性、自己免疫性、アルコール性、遺伝性等の肝障

害の疑いのある患者150例より血清サンプル304検体を採取した。また、健常者由来の血清試料をボランティアより採血して用いた。血清試料は、バイオマーカー測定まで -80°C で保存した

[0056] 2. 評価項目

各胆汁酸分画、具体的にはCA、DCA、CDCA、UDCA、LCA、12_KLCA、 α MCA、 β MCA、HDCA、GCA、GDCA、GCDCA、GUDCA、GLCA、GHCA、GHDCA、TCA、TDCA、TCDCA、TUDCA、TLCA、T β MCA、THCA、およびTHDCAの24種の胆汁酸分画、並びに硫酸抱合型胆汁酸SSBAの濃度を測定した。

[0057] また、生化学パラメーターであるALT、AST、ALP、 γ -GTP、総ビリルビン（以下、T.BILと略称する）、直接ビリルビン（以下、D.BILと略称する）、TBA、アルブミン（以下、ALBと略称する）、プロトロンビン時間（以下、PTと略称する）の濃度を測定した。更に、酸化ストレスマーカーである8-OHdGおよびROS、並びに肝線維化マーカーであるIV型コラーゲンおよびHAの濃度を測定した。

[0058] 3. 測定方法

全24種の胆汁酸分画は、LC-MS/MS法により測定した。定量下限は、12-KLCAのみを 0.03nmol/mL とし、その他の測定対象物質を 0.01nmol/mL とした。定量上限は、12-KLCAおよびCAのみを 10nmol/mL とし、その他の測定対象物質を 30nmol/mL とした。内部標準（IS）にはナプタラムを用いた。カラムにはACQUITY UPLC BEH C18、 1.7m 、 $2.1\times 50\text{mm}$ （Waters社製）、移動相には0.1%ギ酸とアセトニトリルを用い、それらの比を測定時間により変化させた。イオン化法はエレクトロスプレーイオン化（ESIと略称する）法ネガティブを、検出法は選択イオンレコーディング（Selected Ion Recording; SIRと略称する）を選択した。前処理方法は除タンパク法とした。硫酸抱合型胆汁酸濃度は

300 μ L 血清およびユーバスティック・オート、胆汁酸 (USBA) キット ((株)エル・ピーエス) を用いて、BioMajesty JCA-BM2250 (JEOL) により測定した。

[0059] 酸化ストレスマーカーである8-OHdGおよびROSの測定は次のように実施した。8-OHdGは日本老化制御研究所販売の試薬キットを用いて測定した。ROSは鉄等の金属イオンを触媒とするフェントン反応を利用し、過酸化水素 (ROOH) からフリーラジカル (ROO \cdot やRO \cdot) を発生させ、N,N-ジエチル-1,4-フェニレンジアミン硫酸塩 (DEPPD と略称する) と反応させた。生成したDEPPD \cdot +は、波長505 nmに吸収をもち、この吸光度を測定することによりフリーラジカルを生成する物質の総量を測定した。

[0060] 生化学パラメーターは、臨床検査において通常実施されている方法により測定した。

[0061] 肝線維化マーカーであるI V型コラーゲン \cdot 7SおよびHAの測定は次のように実施した。I V型コラーゲン \cdot 7Sは抗ヒトI V型コラーゲン ウサギポリクローナル抗体と反応し、I V型コラーゲン \cdot 7S-抗ヒトI V型コラーゲン ウサギポリクローナル抗体複合体 (複合体1) を形成する。ヨウ素125 (125I) 標識ヒトI V型コラーゲン \cdot 7S (標識抗原) を加えると、検体中のI V型コラーゲン \cdot 7Sと結合し得なかった抗ヒトI V型コラーゲン \cdot 7S ウサギポリクローナル抗体は標識抗原と反応し、標識抗原-抗ヒトI V型コラーゲン \cdot 7S ウサギポリクローナル抗体複合体 (複合体2) を形成し、更に、抗ウサギ γ -グロブリンヤギ血清 (ヤギ抗体) を加えると、ヤギ抗体は複合体2と反応し、標識抗原-抗ヒトI V型コラーゲン \cdot 7S ウサギポリクローナル抗体-ヤギ抗体複合体を形成し、沈殿する。未反応の標識抗原を除去した後、沈殿物の放射能を測定し、I V型コラーゲン \cdot 7S濃度を求めた。HAは、HA ELISAキット (コスモ・バイオ株式会社製) を用いて測定した。

[0062] 4. データ解析方法

各種バイオマーカーの変動と総合的に判断された肝障害の症候との相関を解析した。肝障害患者150例より得られた血清サンプル304検体を解析対象とし、背景情報の要約統計量を算出した。同一症例の検体間の相関は考慮せずに解析を実施した。

[0063] 肝障害の症候別タイプ識別に関連するバイオマーカーを検討するために、患者背景因子を調整因子とした多変量ロジスティック回帰モデルを用いて、バイオマーカー候補因子の総合的に判断された肝障害症候（肝細胞障害あるいは胆汁鬱滞）に対するオッズ比とその95%信頼区間を算出した。バイオマーカー候補因子は、胆汁酸分画濃度、酸化ストレスマーカー、肝繊維化マーカーとした。患者背景因子は、性別、年齢、BMI、飲酒、肝障害治療薬（抗ウイルス剤、肝庇護剤、胆汁酸製剤、アミノ酸製剤・低アルブミン血漿改善薬、ビタミンK製剤）、合併症（脂質異常症、糖尿病、閉塞性黄疸、胆石）とした。

[0064] 肝障害症候の有無は、独立な3人の評価者による判定結果に基づき、2人以上が判定した結果を採用した。集計解析単位は検体とし、同一症例の検体間の相関は考慮しないこととした。統計学的検定を行う際の有意水準は両側5%とした。

[0065] 上記バイオマーカー解析において、基準値がない指標については、健常者の測定値の97.5%点（正規分布であれば平均+2SDに相当）を基準値として設定し、基準値を超えた値を高値、基準値以下である値を低値に区分した。

[0066] 次に、肝障害の症候に関連すると認められたバイオマーカーについて客観的な評価尺度を求めるために、肝障害治療薬の適用がない患者由来の血清試料を対象にし、各バイオマーカーの肝障害症候の有無を識別するカットオフ値を算出した。カットオフ値の算出には様々な手法があるが、肝障害症候の有無に対するROC解析に基づき、感度と特異度の和が最大となる値とした。

[0067] 5. 結果

血清サンプルを得た患者の背景情報を表 3 に示した。

[0068]

[表3]

		肝障害患者	
評価検体数		304	
性別	男	126 (41.4)	
	女	178 (58.6)	
年齢 (歳)	平均値 (標準偏差)	61.0 (15.2)	
	<65	160 (52.6)	
	>=65	144 (47.4)	
BMI (kg/m ²)	平均値 (標準偏差)	23.6 (3.9)	
	<25	198 (65.1)	
	>=25	95 (31.3)	
	算出不能	11 (3.6)	
飲酒	無	247 (81.3)	
	有	50 (16.4)	
	不明	7 (2.3)	
肝障害治療薬 普飲 (以前から) 服用している薬剤	抗ウイルス剤 (インターフェロン)	有 24 (7.9)	
	肝保護剤 (グリテルリチン製剤等)	有 44 (14.5)	
	胆汁酸製剤 (ウルソデオキシコール酸)	有 166 (54.6)	
	アミノ酸製剤 or 低アルブミン血症改善薬	有 69 (22.7)	
	胆汁酸吸着剤	有 5 (1.6)	
	Vit K製剤	有 51 (16.8)	
	ユベラN/EPL	有 35 (11.5)	
	漢方薬 (インテンコウトウなど)	有 3 (1.0)	
	その他	有 3 (1.0)	
	その他併用薬 普飲 (以前から) 服用している薬剤	高脂血症治療薬 (スタチン)	有 21 (6.9)
高脂血症治療薬 (エゼチミブ)		有 10 (3.3)	
高脂血症治療薬 (フィブラート系)		有 3 (1.0)	
高脂血症治療薬 (トコフェロールニコチン酸エステル/EPL)		有 31 (10.2)	
合併症	降圧薬	有 109 (35.9)	
	糖尿病治療薬	有 33 (10.9)	
	脂質異常症	有 57 (18.8)	
	糖尿病	有 61 (20.1)	
	閉塞性黄疸	有 12 (3.9)	
生化学パラメータ	胆石	有 58 (19.1)	
	その他	有 36 (11.8)	
	ALT (U/L)	中央値 (4分位範囲) 56.0 (30.5, 92.5)	
	AST (U/L)	中央値 (4分位範囲) 55.0 (37.5, 99.5)	
	ALP (U/L)	中央値 (4分位範囲) 290.0 (231.0, 420.5)	
	γ-GTP (U/L)	中央値 (4分位範囲) 67.0 (32.0, 156.0)	
	T.BIL (mg/dl)	中央値 (4分位範囲) 1.1 (0.7, 1.7)	
	D.BIL (mg/dl)	中央値 (4分位範囲) 0.1 (0.1, 0.3)	
	TBA (μmol/L)	中央値 (4分位範囲) 18.0 (7.7, 42.3)	
	ALB (g/dl)	中央値 (4分位範囲) 3.7 (3.2, 4.1)	
PT (%)	中央値 (4分位範囲) 84.0 (73.0, 96.0)		
胆汁酸分画濃度	LCA (nmol/mL)	中央値 (4分位範囲) 0.0324 (0.0154, 0.0747)	
	12_KLCA (nmol/mL)	中央値 (4分位範囲) 0.0393 (0.0199, 0.0832)	
	UDCA (nmol/mL)	中央値 (4分位範囲) 0.6915 (0.0721, 4.9150)	
	HDCA (nmol/mL)	中央値 (4分位範囲) 0.0000 (0.0000, 0.0055)	
	CDCA (nmol/mL)	中央値 (4分位範囲) 0.4340 (0.1070, 1.1700)	
	DCA (nmol/mL)	中央値 (4分位範囲) 0.2090 (0.0220, 0.7135)	
	αMCA (nmol/mL)	中央値 (4分位範囲) 0.0000 (0.0000, 0.0030)	
	βMCA (nmol/mL)	中央値 (4分位範囲) 0.0000 (0.0000, 0.0040)	
	CA (nmol/mL)	中央値 (4分位範囲) 0.1020 (0.0404, 0.3495)	
	GLCA (nmol/mL)	中央値 (4分位範囲) 0.0224 (0.0105, 0.0719)	
	GUDCA (nmol/mL)	中央値 (4分位範囲) 2.9600 (0.2165, 12.2000)	
	GHDCA (nmol/mL)	中央値 (4分位範囲) 0.0000 (0.0000, 0.0022)	
	GCDCA (nmol/mL)	中央値 (4分位範囲) 3.7000 (1.6100, 8.6450)	
	GDCA (nmol/mL)	中央値 (4分位範囲) 0.4890 (0.0366, 1.2650)	
	GHCA (nmol/mL)	中央値 (4分位範囲) 0.0442 (0.0213, 0.1125)	
	GCA (nmol/mL)	中央値 (4分位範囲) 0.9725 (0.4075, 3.0050)	
	TLCA (nmol/mL)	中央値 (4分位範囲) 0.0092 (0.0021, 0.0311)	
	TUDCA (nmol/mL)	中央値 (4分位範囲) 0.1520 (0.0165, 1.0800)	
	THDCA (nmol/mL)	中央値 (4分位範囲) 0.0000 (0.0000, 0.0001)	
	TCDCa (nmol/mL)	中央値 (4分位範囲) 0.7400 (0.2945, 2.9950)	
	TDCA (nmol/mL)	中央値 (4分位範囲) 0.0867 (0.0205, 0.2635)	
	TpMCA (nmol/mL)	中央値 (4分位範囲) 0.0013 (0.0000, 0.0482)	
	THCA (nmol/mL)	中央値 (4分位範囲) 0.0076 (0.0012, 0.0254)	
	TCA (nmol/mL)	中央値 (4分位範囲) 0.2435 (0.0648, 1.0300)	
	SBBA (nmol/mL)	中央値 (4分位範囲) 15.80 (8.78, 28.46)	
	酸化ストレスマーカー	8-OHdG (ng/mL)	中央値 (4分位範囲) 0.16 (0.12, 0.22)
		ROS (U)	中央値 (4分位範囲) 219.5 (182.5, 258.0)
	肝線維化マーカー	Typ eIV collagen (ng/mL)	中央値 (4分位範囲) 186.5 (136.0, 258.0)
		HA (ng/mL)	中央値 (4分位範囲) 136.0 (51.5, 388.0)

数値は人数 (%)あるいは中央値 (4分位範囲) を表記した。

[0069] タイプ識別された肝障害の症候を規定するバイオマーカーについて、共変量調整による多変量解析を行った結果を表4および表5に示した。

[0070] [表4]

胆汁酸分画濃度	LCA	評価後体数	肝細胞障害型				胆汁うっ滞型		
			肝障害後体数 (%)	オッズ比 (95%信頼区間)	P値	肝障害後体数 (%)	オッズ比 (95%信頼区間)	P値	
		<=97.5pct	144	90 (62.5)	1.00	-	70 (48.6)	1.00	-
		>97.5pct	160	125 (78.1)	2.06 (1.16, 3.66)	0.014	32 (20.0)	0.29 (0.16, 0.53)	<0.0001
	UDCA	<=97.5pct	148	109 (73.6)	1.00	-	47 (31.8)	1.00	-
	UDCA	>97.5pct	156	106 (67.9)	0.31 (0.12, 0.77)	0.0112	55 (35.3)	1.69 (0.71, 4.01)	0.235
	CDCA	<=97.5pct	268	194 (72.4)	1.00	-	85 (31.7)	1.00	-
	CDCA	>97.5pct	36	21 (58.3)	0.50 (0.22, 1.13)	0.0950	17 (47.2)	1.98 (0.88, 4.48)	0.0991
	DCA	<=97.5pct	232	160 (69.0)	1.00	-	93 (40.1)	1.00	-
	DCA	>97.5pct	72	55 (76.4)	1.48 (0.74, 2.94)	0.267	9 (12.5)	0.26 (0.11, 0.58)	0.001
	CA	<=97.5pct	261	187 (71.6)	1.00	-	85 (32.6)	1.00	-
	CA	>97.5pct	43	28 (65.1)	0.75 (0.34, 1.65)	0.470	17 (39.5)	1.36 (0.63, 2.93)	0.427
	SSBA	<=97.5pct	201	137 (68.2)	1.00	-	50 (24.9)	1.00	-
	SSBA	>97.5pct	103	78 (75.7)	1.02 (0.49, 2.09)	0.967	52 (50.5)	5.05 (2.45, 10.41)	<0.0001
酸化ストレスマーカー	8-OHdG	<=97.5pct	292	210 (71.9)	1.00	-	96 (32.9)	1.00	-
		>97.5pct	12	5 (41.7)	0.26 (0.07, 0.96)	0.0434	6 (50.0)	1.40 (0.35, 5.57)	0.637
	ROS	<=97.5pct	157	111 (70.7)	1.00	-	36 (22.9)	1.00	-
		>97.5pct	147	104 (70.7)	0.84 (0.47, 1.52)	0.570	66 (44.9)	2.68 (1.49, 4.80)	0.001
肝線維化マーカー	TypeIVcollagen	<=150	80	47 (58.8)	1.00	-	20 (25.0)	1.00	-
		>150	162	128 (79.0)	2.19 (1.05, 4.56)	0.036	62 (38.3)	3.54 (1.62, 7.74)	0.0015
	HA	<=50	58	38 (65.5)	1.00	-	13 (22.4)	1.00	-
		>50	182	130 (71.4)	1.20 (0.57, 2.56)	0.629	70 (38.5)	3.66 (1.58, 8.47)	0.0024

調整因子: 性, 年齢, BMI, 飲酒, 肝障害治療薬(抗ウイルス剤, 肝保護剤, 胆汁酸製剤, アミノ酸製剤・低アルブミン血症改善薬, Vit K製剤), 合併症(脂質異常症, 糖尿病, 閉塞性黄疸, 胆石)

[0071] [表5]

胆汁酸分画濃度	L2_KLCA	評価後体数	肝細胞障害型				胆汁うっ滞型		
			肝障害後体数 (%)	オッズ比 (95%信頼区間)	P値	肝障害後体数 (%)	オッズ比 (95%信頼区間)	P値	
		<=97.5pct	235	165 (70.2)	1.00	-	77 (32.8)	1.00	-
		>97.5pct	69	50 (72.5)	0.88 (0.45, 1.71)	0.700	25 (36.2)	1.03 (0.53, 1.98)	0.939
	GLCA	<=97.5pct	182	113 (62.1)	1.00	-	74 (40.7)	1.00	-
	GLCA	>97.5pct	122	102 (83.6)	2.17 (1.13, 4.15)	0.0195	28 (23.0)	0.56 (0.30, 1.04)	0.0655
	GUDCA	<=97.5pct	140	104 (74.3)	1.00	-	45 (32.1)	1.00	-
	GUDCA	>97.5pct	164	111 (67.7)	0.16 (0.05, 0.47)	0.0009	57 (34.8)	2.08 (0.78, 5.55)	0.143
	GCDCA	<=97.5pct	168	114 (67.9)	1.00	-	36 (21.4)	1.00	-
	GCDCA	>97.5pct	136	101 (74.3)	1.29 (0.69, 2.42)	0.430	66 (48.5)	4.25 (2.23, 8.10)	<0.0001
	GDCA	<=97.5pct	255	169 (66.3)	1.00	-	94 (36.9)	1.00	-
	GDCA	>97.5pct	49	46 (93.9)	7.34 (2.11, 25.53)	0.0017	8 (16.3)	0.35 (0.15, 0.84)	0.0182
	GCA	<=97.5pct	220	154 (70.0)	1.00	-	50 (22.7)	1.00	-
	GCA	>97.5pct	84	61 (72.6)	1.08 (0.54, 2.16)	0.824	52 (61.0)	6.11 (3.06, 12.23)	<0.0001
	TLCA	<=97.5pct	209	132 (63.2)	1.00	-	68 (32.5)	1.00	-
	TLCA	>97.5pct	95	83 (87.4)	4.68 (2.01, 10.88)	0.0003	34 (35.8)	1.15 (0.59, 2.24)	0.678
	TUDCA	<=97.5pct	152	105 (69.1)	1.00	-	46 (30.3)	1.00	-
	TUDCA	>97.5pct	152	110 (72.4)	0.56 (0.22, 1.42)	0.221	56 (36.8)	3.20 (1.18, 8.64)	0.0221
	TCDCA	<=97.5pct	175	113 (64.6)	1.00	-	41 (23.4)	1.00	-
	TCDCA	>97.5pct	129	102 (79.1)	2.31 (1.17, 4.54)	0.0152	61 (47.3)	3.32 (1.76, 6.29)	0.0002
	TDCA	<=97.5pct	256	172 (67.2)	1.00	-	88 (34.4)	1.00	-
	TDCA	>97.5pct	48	43 (89.6)	3.60 (1.31, 9.89)	0.0131	14 (29.2)	0.85 (0.39, 1.83)	0.675
	TCA	<=97.5pct	222	154 (69.4)	1.00	-	52 (23.4)	1.00	-
	TCA	>97.5pct	82	61 (74.4)	1.17 (0.57, 2.40)	0.670	50 (61.0)	7.54 (3.65, 15.60)	<0.0001

調整因子: 性, 年齢, BMI, 飲酒, 肝障害治療薬(抗ウイルス剤, 肝保護剤, 胆汁酸製剤, アミノ酸製剤・低アルブミン血症改善薬, Vit K製剤), 合併症(脂質異常症, 糖尿病, 閉塞性黄疸, 胆石)

[0072] 肝細胞障害型で有意に関連のあると認められた因子は、LCA (OR=2.06、P=0.0140)、UDCA (OR=0.31、P=0.0112) およびIV型コラーゲン (OR=2.19、P=0.0357) である。LCAおよびIV型コラーゲンの濃度は高い傾向を示し、UDCAの濃度は低い傾向を示した(表4)。UDCAと異性体の関係にあるCDCA (OR=0.50、P=0.0950) や同様に一次胆汁酸であるCA (OR=0.75、P=0.4702) の濃度は、関連性は弱いが高い傾向を示した

(図3)。胆汁酸のタウリン抱合体およびグリシン抱合体を考慮すると、TCDCA (OR=2.31、P=0.0152)、GDCA (OR=7.34、P=0.0017)、TDCA (OR=3.60、P=0.0131)、GLCA (OR=2.17、P=0.0195) およびTLCA (OR=4.68、P=0.0003) の濃度が有意に高く、GUDCA (OR=0.16、P=0.0009) は有意に低い傾向を示した。

[0073] 一方、胆汁鬱滞型で有意に関連のあると認められた因子は、LCA (OR=0.29、P<0.0001)、DCA (OR=0.26、P=0.0010)、SSBA (OR=5.05、P<0.0001)、IV型コラーゲン (OR=3.54、P=0.0015)、HA (OR=3.66、P=0.0024)、およびROS (OR=2.68、P=0.0010) である。LCAおよびDCAの濃度は低い傾向を示し、これら以外の因子の濃度は高い傾向を示した(表4)。一方、関連は弱い、CDCA (OR=1.98、P=0.0991)、UDCA (OR=1.69、P=0.2353) およびCA (OR=1.36、P=0.4269) の濃度は高い傾向が認められ、肝細胞障害型と対照的な結果が得られた(図4)。胆汁酸のタウリン抱合体およびグリシン抱合体を考慮すると、GCDCA (OR=4.25、P<0.0001)、TCDCA (OR=3.32、P=0.0002)、GCA (OR=6.11、P<0.0001)、TCA (OR=7.54、P<0.0001)、およびTUDCA (OR=3.20、P=0.0221) の濃度は有意に高く、GDCA (OR=0.35、P=0.0182) は低い傾向を示した。IV型コラーゲンは肝線維化の指標であるが、胆汁鬱滞型でも肝細胞障害型と同様に濃度が高い傾向が認められた。

[0074] 肝障害の症候に関連すると認められたバイオマーカーについて、肝障害治療薬の適用がない患者由来の血清試料を対象にし、肝障害のタイプの判定の基準として用いることのできるカットオフ値を算出した結果は、表2-1および表2-2に示した。表2-1は肝細胞障害型の肝障害を識別するバイオマーカーのカットオフ値である。表2-2は胆汁鬱滞型の肝障害を識別する

バイオマーカーのカットオフ値である。

[0075] 上記多変量解析の結果を、肝細胞障害型と胆汁鬱滞型との間で比較すると、LCAが前者は増加、後者は低下と対照的な結果が得られた。この結果から、LCAが肝障害症候の判別に有用なマーカーとなることが示唆された。肝細胞障害型では、二次胆汁酸であるLCAが高値を示し、この代謝亢進に伴い、LCAの親化合物であるCDCAの異性体のUDCAが低値を示したと考えることができる。これに対し、胆汁鬱滞においては、鬱滞により一次胆汁酸のCDCAやCAが関連は弱いものの上昇傾向にあり、これに伴い、胆汁酸の腸管への排出が抑制されて、DCAやLCAの濃度が低下したと考えることができる。また、肝細胞障害型では、TCDC A、GDCA、TDC A、GLCA、およびTLCAが有意に上昇し、GUDCAは有意に低下した。これはLCAの有意な上昇や有意差はないものの上昇傾向が認められたDCAの変化に伴い、その抱合体の生成も亢進したと考えることができる。GUDCAはUDCAの低下とともに減少傾向にあったが、CDCAのタウリン抱合体であるTCDC Aは上昇傾向にあった。上記結果から、肝細胞障害型では一次胆汁酸から脂溶性の高い二次胆汁酸への代謝が亢進することが示唆された。胆汁鬱滞型では、GDC A、TCDC A、GCA、TCA、およびTUDCAで有意な上昇が認められ、GDCAは低下した。このことから、胆汁鬱滞によりCDCAおよびCAの両抱合反応が亢進したと考えることができる。SSBAは、胆道性疾患で上昇が報告されており（非特許文献12）、本試験においても高値を示したが、肝細胞障害型では有意な変動は認められなかった。

[0076] 測定した肝線維化マーカーは、肝細胞障害型および胆汁鬱滞型でともに有意な上昇が認められた。測定した酸化ストレスマーカーのうち、8-OHdGは肝細胞障害型で有意な低下傾向を示したが、健常者集団に比べてその値に大きな変化がなく、カットオフ値を超えた患者集団の例数が少ないため、肝細胞障害型との関連について明確な判断はできなかった。また、活性酸素のROSが胆汁鬱滞型で高値を示したが、肝細胞障害型では有意な変化は認

められなかった。

[0077] 従来から肝疾患の検査に用いられている生化学パラメーターは、今回測定したバイオマーカーとの相関は低く、これら生化学パラメーターのみでは肝障害症候の判別を的確に行うことは困難である。

[0078] 以上の結果より、LCAの濃度は肝細胞障害型および胆汁鬱滞型のそれぞれに特有でありかつ有意な変化を示すことから、肝障害症候別タイプを判別するマーカーとして有用であることが示唆された。また、一次胆汁酸やSSBAについても、LCAの濃度による肝障害症候別タイプの判別を補完し得るマーカーとして、肝細胞障害型、胆汁鬱滞型混合型、およびこれらの混合型の判定に有効である。

産業上の利用可能性

[0079] 以上説明したとおり、本発明は肝障害タイプを判別する検査方法を提供するものであり、本発明により臨床症候による肝障害タイプ、具体的には肝細胞障害型、胆汁鬱滞型、およびそれらの混合型の早期診断および治療方針の早期決定が可能になる。このように、本発明は、肝疾患の検査の分野において極めて有用である。

請求の範囲

- [請求項1] 被験者から採取された生物学的試料中のリトコール酸（以下、LCAと略称する）濃度を測定することを含み、LCA濃度を指標とする肝障害タイプを判別する検査方法。
- [請求項2] 測定されたLCA濃度を、予め設定されたLCA濃度のカットオフ値と比較することを更に含み、請求項1に記載の検査方法。
- [請求項3] 測定されたLCA濃度が、予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別するLCA濃度のカットオフ値以上であるとき、肝障害のタイプは肝細胞障害型であると判定することを更に含み、請求項1に記載の検査方法。
- [請求項4] 測定されたLCA濃度が、予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するLCA濃度のカットオフ値以下であるとき、肝障害のタイプは胆汁鬱滞型であると判定することを更に含み、請求項1に記載の検査方法。
- [請求項5] 測定されたLCA濃度が、予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別するLCA濃度のカットオフ値を超えており、かつ予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するカットオフ値未満であるとき、肝障害のタイプは肝細胞障害型と胆汁鬱滞型との混合型であると判定することを更に含み、請求項1に記載の検査方法。
- [請求項6] ウルソデオキシコール酸（以下、UDCAと略称する）およびI V型コラーゲンのいずれか1または両方の濃度を測定し、LCA濃度に加えてUDCAおよびI V型コラーゲンのいずれか1または両方の濃度を指標とすることを含み、
測定されたLCA濃度が、予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別するLCA濃度のカットオフ値以上であり、かつ測定されたUDCAおよび／またはI V型コラーゲンの濃度が、下記いずれか1であるとき、肝障害のタイプは肝細胞障害型であると判定することを更に含み、請求項1に記載の検査方法：

(1) U D C A濃度が予め設定されたU D C A濃度のカットオフ値以下である、

(2) I V型コラーゲン濃度が予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別するI V型コラーゲン濃度のカットオフ値以上である、

(3) U D C A濃度が予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別するU D C A濃度のカットオフ値以下であり、かつI V型コラーゲン濃度が予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別するI V型コラーゲン濃度のカットオフ値以上である。

[請求項7]

デオキシコール酸（以下、D C Aと略称する）、血清硫酸抱合型胆汁酸（*serum sulfated bile acids*；以下、S S B Aと略称する）、I V型コラーゲン、ヒアルロン酸（以下、H Aと略称する）、および活性酸素種（*reactive oxygen species*；以下、R O Sと略称する）のいずれか1以上の濃度を測定し、L C A濃度に加えてD C A、S S B A、I V型コラーゲン、H A、およびR O Sの濃度を指標とすることを含み、

測定されたL C A濃度が、予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するL C A濃度のカットオフ値以下であり、かつ測定されたD C A、S S B A、I V型コラーゲン、H A、およびR O Sの濃度が、下記いずれか1または2以上であるとき、肝障害のタイプは胆汁鬱滞型であると判定することを更に含む、請求項1に記載の検査方法：

(4) D C A濃度が予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するD C A濃度のカット

オフ値以下である、

(5) S S B A濃度が予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するS S B A濃度のカ

ットオフ値以上である、

(6) I V型コラーゲン濃度が予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するI V型コラ

ーゲン濃度のカットオフ値以上である、

(7) H A濃度が予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するH A濃度のカットオフ

値以上である、

(8) R O S濃度が予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するR O S濃度のカット

オフ値以上である。

[請求項8] I V型コラーゲンの濃度を測定し、L C A濃度に加えてI V型コラーゲン濃度を指標とすることを含み、

測定されたL C A濃度が、予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別するL C A濃度のカットオフ値を超えており、かつ予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するカットオフ値未満であり、更に測定されたI V型コラーゲンの濃度が、予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するI V型コラーゲンのカットオフ値以上であるとき、肝障害のタイプは肝細胞障害型と胆汁鬱滞型との混合型であると判定することを更に含む、請求項1に記載の検査方法。

[請求項9] 予め設定されたL C A濃度のカットオフ値が、L C A濃度の受信者動作特性曲線 (receiver operating characteristic Curve ; 以下、ROC曲線と称する) から算出されるものである、請求項2に記載の検査方法。

[請求項10] 予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別するL C A濃度のカットオフ値が、予め定めた肝細胞障害型の肝障害に関するL C A濃度のR O C曲線から算出されるものである、請求項3、5、6、または8に記載の検査方法。

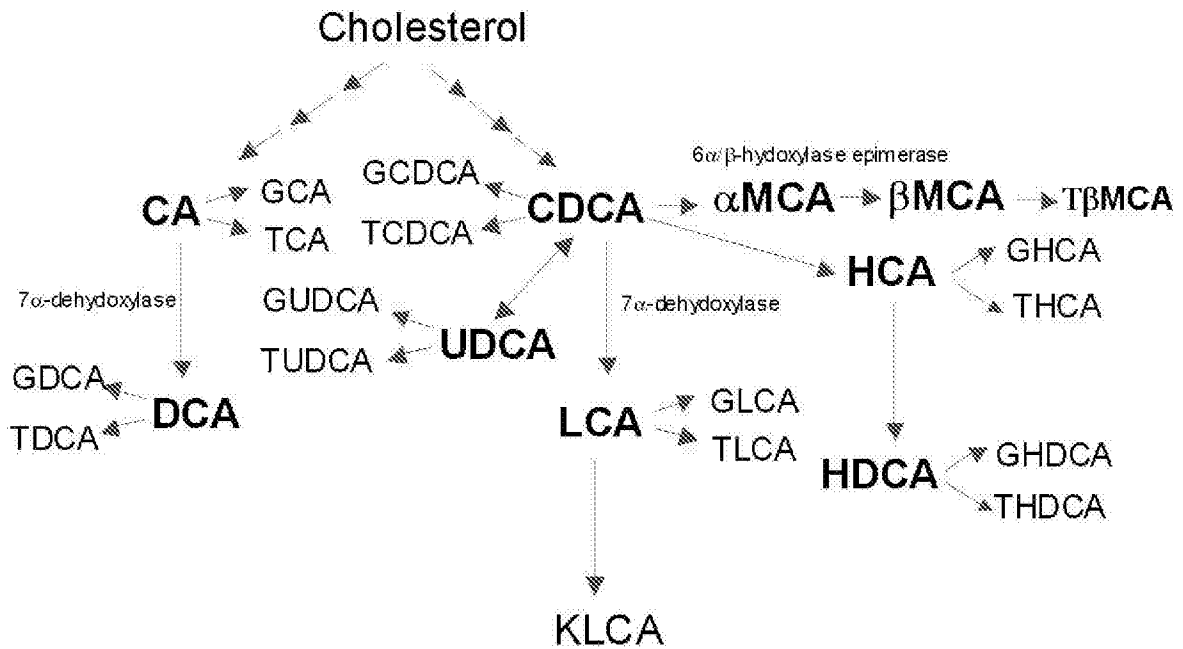
[請求項11] 予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するL C A濃度のカットオフ値が、予め定めた胆汁鬱滞型の肝障害に関するL C A濃度のR O C曲線から算出されるものである、請求項4、5、6、または8に記載の検査方法。

- [請求項12] 予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別するL C A濃度のカットオフ値、予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別するU D C A濃度のカットオフ値、および予め設定された肝細胞障害型の肝障害を識別するI V型コラーゲン濃度のカットオフ値が、それぞれ、予め定めた肝細胞障害型の肝障害に関するL C A濃度のR O C曲線から算出されるもの、予め定めた肝細胞障害型の肝障害に関するU D C A濃度のR O C曲線から算出されるもの、および予め定めた肝細胞障害型の肝疾患に関するI V型コラーゲン濃度のR O C曲線から算出されるものである、請求項6に記載の検査方法。
- [請求項13] 予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するL C A濃度のカットオフ値、予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するD C A濃度のカットオフ値、予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するS S B A濃度のカットオフ値、予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するI V型コラーゲン濃度のカットオフ値、予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するH A濃度のカットオフ値、および予め設定された胆汁鬱滞型の肝障害を識別するR O S濃度のカットオフ値が、それぞれ、予め定めた胆汁鬱滞型の肝障害に関するL C A濃度のR O C曲線から算出されるもの、予め定めた胆汁鬱滞型の肝障害に関するD C A濃度のR O C曲線から算出されるもの、予め定めた胆汁鬱滞型の肝障害に関するS S B A濃度のR O C曲線から算出されるもの、予め定めた胆汁鬱滞型の肝障害に関するI V型コラーゲン濃度のR O C曲線から算出されるもの、予め定めた胆汁鬱滞型の肝障害に関するH A濃度のR O C曲線から算出されるもの、予め定めた胆汁鬱滞型の肝障害に関するR O S濃度のR O C曲線から算出されるものである、請求項7に記載の検査方法。
- [請求項14] 前記生物学的試料が血液試料である、請求項1から13のいずれか1項に記載の検査方法。
- [請求項15] 前記生物学的試料が血清試料である、請求項1から14のいずれか1

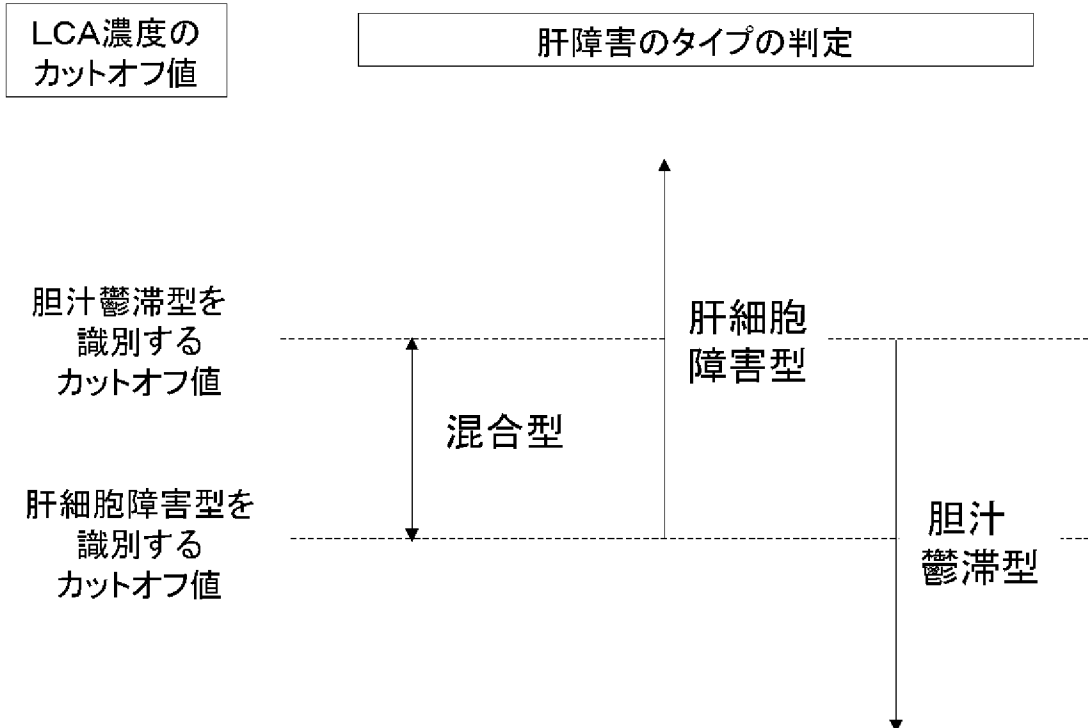
項に記載の検査方法。

- [請求項16] 請求項 1 から 15 のいずれか 1 項に記載の検査方法によって肝障害のタイプが判定された被験者に対して、その肝障害のタイプに応じた肝障害治療剤を選択する方法。

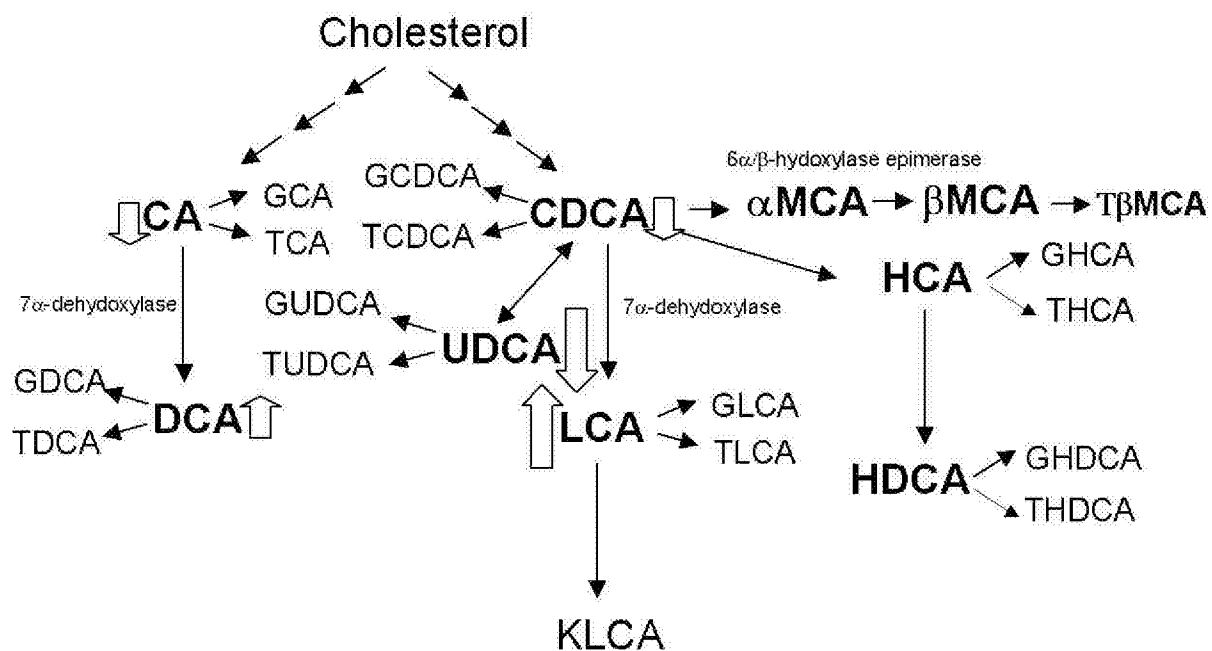
[図1]



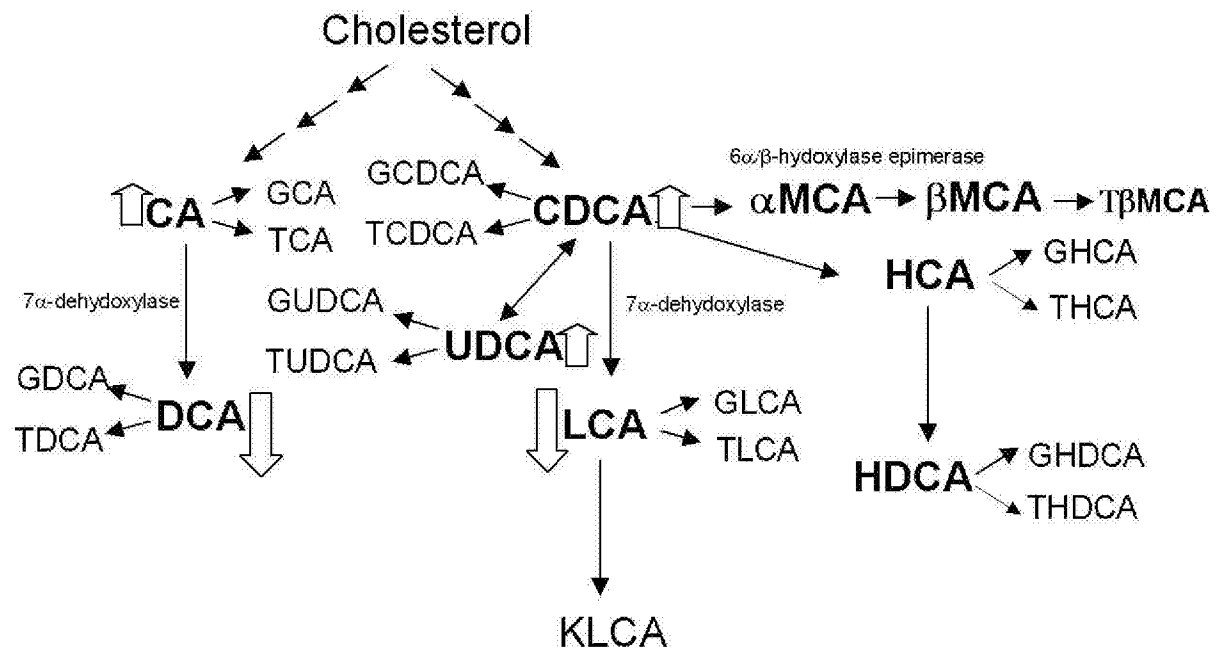
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/070426

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/50(2006.01) i, G01N33/483(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)

G01N33/50, G01N33/483

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	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/EMBASE/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/A	JP 06-009686 A (Hoechst AG.), 18 January 1994 (18.01.1994), entire text; particularly, paragraph [0013] & EP 534316 A1 & CA 2078588 A1	1-2/3-15
X/A	Kimihide NAKAMURA, Isao MAKINO, "Digestive system disease. State of arts (Ver.2). II. Liver and bile and pancreas. Advance on the basic and clinical research of the pathophysiology. Cholestasis and cholestatic factors", Journal of Clinical and Experimental Medicine, separate volume (June), 30 June 1999 (30.06.1999), pages 12 to 14	1-2/3-15

 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
24 October, 2014 (24.10.14)Date of mailing of the international search report
11 November, 2014 (11.11.14)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/070426

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	JP 56-126744 A (Sankyo Co., Ltd.), 05 October 1981 (05.10.1981), entire text; all drawings; particularly, fig. 4, 5 (Family: none)	1-2/3-15
A	JP 2012-002610 A (National Institute of Biomedical Innovation), 05 January 2012 (05.01.2012), entire text (Family: none)	1-15
A	Lucangioli SE et al., Lithocholic acid as a biomarker of intrahepatic cholestasis of pregnancy during ursodeoxycholic acid treatment, Ann Clin Biochem, 2009.01, Vol.46, No.1, Page.44-49	1-15
A	Tsuneo KIMURA, "Tanjusan no Kansaiho Shogaisei ni Kansuru Kenkyu", Japanese Journal of Gastroenterology, 1980, vol.77, no.2, pages 185 to 194	1-15
A	JP 2013-504310 A (The Chinese University of Hong Kong), 07 February 2013 (07.02.2013), entire text; all drawings & US 2011/0098192 A1 & EP 2475781 A1 & WO 2011/029899 A1 & AU 2010294193 A & CN 102741426 A	1-15
A	JP 11-171898 A (Tosoh Corp.), 29 June 1999 (29.06.1999), entire text; all drawings & US 6060255 A & EP 911343 A2	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/070426

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.: 16
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
(See extra sheet)

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying 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/JP2014/070426

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

It appears that the invention set forth in the aforesaid claim may involve a determination by a medical doctor and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. G01N33/50(2006.01)i, G01N33/483(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. G01N33/50, G01N33/483		
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 1971-2014年 日本国実用新案登録公報 1996-2014年 日本国登録実用新案公報 1994-2014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), CAplus/MEDLINE/EMBASE/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/A	JP 06-009686 A（ヘキスト・アクチエンゲゼルシャフト）1994.01.18, 全文、特に、段落【0013】等参照 & EP 534316 A1 & CA 2078588 A1	1-2/3-15
X/A	中村公英, 牧野勲, 消化器疾患 state of arts (Ver.2) II. 肝・胆・すい病態生理の基礎的・臨床的研究の進歩 胆汁うっ滞と cholestatic factors, 別冊・医学のあゆみ, 別冊(6月), 1999.06.30, Page.12-14	1-2/3-15
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願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 24. 10. 2014	国際調査報告の発送日 11. 11. 2014	
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） 草川 貴史 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	2 J 4 0 7 5

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	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/A	JP 56-126744 A (三共株式会社) 1981. 10. 05, 全文・全図、特に、第4図、第5図等参照 (ファミリーなし)	1-2/3-15
A	JP 2012-002610 A (独立行政法人医薬基盤研究所) 2012. 01. 05, 全文等参照 (ファミリーなし)	1-15
A	Lucangioli SE、他3名, Lithocholic acid as a biomarker of intrahepatic cholestasis of pregnancy during ursodeoxycholic acid treatment, Ann Clin Biochem, 2009. 01, Vol. 46, No. 1, Page. 44-49	1-15
A	木村恒夫, 胆汁酸の肝細胞障害性に関する研究, 日本消化器病学会雑誌, 1980, Vol. 77, No. 2, Page. 185-194	1-15
A	JP 2013-504310 A (ザ チャイニーズ ユニバーシティ オブ ホンコン) 2013. 02. 07, 全文・全図等参照 & US 2011/0098192 A1 & EP 2475781 A1 & WO 2011/029899 A1 & AU 2010294193 A & CN 102741426 A	1-15
A	JP 11-171898 A (東ソー株式会社) 1999. 06. 29, 全文・全図等参照 & US 6060255 A & EP 911343 A2	1-15

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 16 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、当該請求の範囲に記載された発明は、医者による判断を含み得るものとも解され、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. 請求項 _____ 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この国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求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ため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求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ため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求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。