

(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  
2009年12月17日(17.12.2009)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2009/151125 A1

- (51) 国際特許分類:  
A61K 31/202 (2006.01) A61P 1/16 (2006.01)  
A61K 31/232 (2006.01) A61P 3/06 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/060797
- (22) 国際出願日: 2009年6月12日(12.06.2009)
- (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 2008-156036 2008年6月13日(13.06.2008) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 持田製薬株式会社(MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1608515 東京都新宿区四谷一丁目7番地 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 矢野 崇 (YANO Takashi) [JP/JP]; 〒1608515 東京都新宿区四谷一丁目7番地 持田製薬株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 渡辺 望稔, 外(WATANABE Mochitoshi et al.); 〒1010032 東京都千代田区岩本町2丁目12番5号 早川トナカイビル3階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, 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, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, 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: DIAGNOSIS AND TREATMENT OF HEPATIC DISORDER

(54) 発明の名称: 肝障害の診断及び治療

(57) Abstract: Disclosed is a diagnosis or treatment method which utilizes the content of a specific fatty acid in plasma as a marker that reflects the condition of NASH or NAFLD, or utilizes the above-mentioned content in combination with another test, another marker or the like.

(57) 要約: 特定の血漿中脂肪酸の組成比を、NASH又はNAFLDの病態を反映するマーカーとして利用して、又は、他の検査、マーカー等と組み合わせた、診断方法、治療方法の提供。



WO 2009/151125 A1

## 明 細 書

**発明の名称：肝障害の診断及び治療**

### 技術分野

[0001] 本発明は、非アルコール性脂肪性肝疾患、特に非アルコール性脂肪肝炎の予防／改善・治療方法及びそれに用いられる医薬組成物に関する。

### 背景技術

[0002] ウィルス性肝疾患、自己免疫疾患性肝疾患、ヘマクロトーシスやWilson病等の代謝性肝疾患などを除外して、飲酒歴のない人に発生する単純脂肪肝から脂肪性肝炎、線維症、肝硬変までの肝障害を含む疾患群は、一括して非アルコール性脂肪性肝疾患（non-alcoholic fatty liver disease：以下、NAFLDと記す）と定義される。

[0003] NAFLDは、さらに、肝生検（病理所見）により、一般に予後良好と考えられている単純性脂肪肝と、予後不良な非アルコール性脂肪肝炎（non-alcoholic steatohepatitis：以下、NASHと記す）とに分類され、NASHは、NAFLDの重症型と考えられている。肝生検によりNASHと判定される炎症、脂肪化、線維化ないし肝硬変、肝がんの病態は、他因と同じであり、アルコール性肝障害、ウィルス性肝炎や薬剤性肝障害の否定できる肝炎の多くがNASHの病態であろうと推定される（非特許文献1参照）。

[0004] 米国では、人口の20%がNAFLD、3%がNASHであるとされる。日本でも一般診療においても比較的頻繁に遭遇する疾患であり、検診受診者におけるNAFLDの頻度は8%であり、NASHの頻度は少なくとも成人の0.5～1%と推定される。日本では、BMI $\geq$ 25の成人肥満者が、男性で1300万人、女性で1000万人いることから、国内のNAFLDは500～600万人、NASHは約30～50万人と推定される。また、NAFLDでのメタボリックシンドローム（以下、MetSと記す）診断基準に基づく、脂質代謝異常の合併頻度は約50%、高血圧の合併頻度は約30

%、高血糖の合併頻度は約30%、MetSの合併頻度は約40%であり（非特許文献1参照）、生活習慣病の増加に伴い、今後、NASHの症例数の増加ならびに低年齢層への拡大が予想される。さらに肝炎を経て一部は星状細胞活性化による肝硬変、あるいは肝がんへの進行が臨床的な問題である。

[0005] 日本肝臓学会の「NASH・NAFLDの診察ガイド」（非特許文献1）には、種々の病態改善を目指したNASHの治療方法が試みられ、その有効性が報告されているが、確立した治療法がないのが現状であることが記載されている。

[0006] 具体的には、ビグアナイド薬（メトホルミン）、PPAR- $\gamma$ アゴニストのチアゾリジン誘導体（ピオグリタゾン、ロシグリタゾン）などのインスリン抵抗性改善薬；ビタミン、ベタイン（コリン誘導体）、N-アセチルシステインなどの抗酸化剤；フィブレート系薬剤（PPAR- $\alpha$ アゴニスト）、HMG-CoA還元酵素阻害薬（スタチン）、プロブコールなどの高脂血症治療薬；ウルソデオキシコール酸、ポリエノホスファチジルコリン（EPL）などの肝保護剤；ロサルタンなどのアンジオテンシンII受容体拮抗剤などが記載される。

[0007] イコサペント酸（以下、EPA）ないし魚油のNASH・NAFLDに対する投与の報告例がある。たとえば、 $\omega$ 3多価不飽和脂肪酸（以下、PUFAsと記す）、具体的にはEPA-Eとドコサヘキサエン酸エチル（以下、DHA-Eと記す）との2種混合系によるNAFLD患者における肝炎の改善（非特許文献2参照）がある。

[0008] また、Tanakaらの最新の報告では、高純度EPA-Eを2700mg/日、12ヶ月間投与し、アスパルテートアミノトランスフェラーゼ（アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼともいう。以下、ASTと記す）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（アラニンアミノトランスフェラーゼともいう。以下、ALTと記す）酵素観察、炎症性サイトカイン、酸化ストレスマーカー評価ならびに投与観察期間後の肝生検により、NASHを改善することが示される（非特許文献3参照）。

[0009] また、NASHなどの脂肪肝の治療に、ペルオキシソーム及び・又はミトコンドリアにおける $\beta$ 酸化を促進する薬剤として $\omega$ 3PUFAsを適用する提案がある（特許文献1参照）。

[0010] NASHと血漿中脂肪酸との関係については、NASHと血漿中脂肪酸蓄積との関連を評価するためにNASH患者22人と健常者6人とで、血漿総脂肪酸濃度（エステル＋遊離）、及び、遊離脂肪酸濃度が比較され、NASH患者では、飽和脂肪酸と一価の脂肪酸濃度が高く、特にパルミチン酸（C16:0）、パルミトレイン酸（C16:1）、オレイン酸（C18:1）が高いことが示されている。デサチュラーゼ活性インデックスとしての、C18:1/C18:0、C20:4/C18:2は、NASH患者とコントロール群で有意差がなかったことが記載されている（非特許文献4参照）。

一方、 $\omega$ 3PUFAsは、レプチン欠損により肥満・脂肪肝を呈するob/obマウスの肝臓の成熟型SREBP1cを低下させ、脂肪酸合成酵素（FAS）、ステアロイルCoAデサチュラーゼ（SCD1）などの脂肪合成関連酵素の遺伝子の発現を抑制し、肝臓における脂肪酸の、パルミチン酸（C16:0）、パルミトレイン酸（C16:1）、オレイン酸（C18:1）を低下させたことが示されている（非特許文献5参照）。

[0011] NASH発症の機序として、肝細胞へのトリグリセリド（TG）の沈着（脂肪肝）が起こり（first hit）、さらに肝細胞障害要因（second hit）が加わり発症するとするtwo-hit-theoryが広く指示されている。SREBP1cは、脂肪酸合成酵素群の転写を亢進させることが知られており、脂肪肝発症（first hit）に関与するといわれ（非特許文献1参照）、 $\omega$ 3PUFAsはSREBP1cを低下させることが知られている。

しかし、肝生検でNASHと診断された被験者、つまり、second hitを経験した被験者に、一定期間 $\omega$ 3PUFAsを投与したときの特定の脂肪酸組成比の変動と、NASH治療効果との関係については調べられたことがなかった。つまり、 $\omega$ 3PUFAsによるNASH治療効果が、一定期間の特定の脂肪酸組成の変動により予測、又は評価できることは知られていない。

[0012] 現在のところ、NASHの確定診断には肝生検が必須とされている。また、疾患治癒の判定には各種マーカーが用いられているが、必ずしも病態をパラレルに反映しているとはいえず、やはり、肝生検が必要と考えられている。しかし、肝生検には、患者の身体的負担、医療従事者の負担が大きいという問題があり、NASH診断、病態を評価する、簡便な方法が求められている。

### **先行技術文献**

#### **特許文献**

[0013] 特許文献1：国際公開第2007/081773号パンフレット

#### **非特許文献**

[0014] 非特許文献1：日本肝臓学会編、「NASH・NAFLDの診察ガイド」、文光堂出版、2006年8月22日

非特許文献2：Alimentary Pharmacology & Therapeutics、2006年4月15日、第23巻、第8号、p. 1143-1151

非特許文献3：Journal of Clinical Gastroenterology、2008年、第42巻、第4号、p. 413-418

非特許文献4：Clinical Nutrition (2002) p. 21(3) 219-223

非特許文献5：Hepatology 38(6) (2003) p. 1529-1539

### **発明の概要**

#### **発明が解決しようとする課題**

[0015] 本発明は、NASHの病態を反映する、有効な指標を提供し、当該指標を利用した治療方法を提供することを目的とする。

#### **課題を解決するための手段**

[0016] 本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、特定の血漿中脂肪酸の組成比が、NASHの病態を反映するよいマーカーとなること、さらには、 $\omega 3$  PUFAsによるNAFLD、特にNASHの予防／改善・治療を行った被験者では、一定の検査、またはマーカーの組み合わせが、予防

／改善・治療効果の指標として有効であることをあわせて見出し、本発明を完成した。

[0017] すなわち、本発明は、当該指標を定期的に測定することによりNASH治療剤、例えば $\omega 3$  P U F A s等の効果を判定し、投与した薬剤に対する被験者の反応性を確認しながら治療をすすめることができる、NASH／NAFLDの治療方法、及び・又は肝硬変／肝癌への移行を抑制する方法を提供するものである。

[0018] さらに、本発明は、血漿中若しくは肝臓中の特定の脂肪酸組成比、一定の検査、又はマーカーの組み合わせを指標とする、NASHの診断方法を提供する。

[0019] さらに、本発明は、血漿中又は肝臓中の特定の脂肪酸組成比の高い被験者に $\omega 3$  P U F A sをはじめとするNASH治療剤の投与を開始する治療方法を提供する。

[0020] さらに、本発明は、血漿中又は肝臓中の特定の脂肪酸組成比により、治療薬の投与に反応性のある被験者をスクリーニングする方法を提供する。

[0021] さらに、本発明は、 $\omega 3$  P U F A sをはじめとするNASH治療剤の効果を判定しながら投与する方法を提供する。

[0022] すなわち、本発明は以下のものである。

〔１〕被験者の血漿中、血清中、又は肝臓中脂肪酸組成比を指標として、被験者の状態、又は治療効果を評価する、NASH又はNAFLDの予防／改善・治療方法、又は、被験者の管理方法。

〔２〕被験者の血漿中オレイン酸／ステアリン酸比、ステアリン酸／パルミチン酸比、オレイン酸／パルミチン酸比からなる群から選ばれる１以上を、被験者の状態、又は治療効果を評価するための指標として、該被験者に $\omega 3$ 多価不飽和脂肪酸、その製薬学上許容しうる塩及びエステルからなる群から選ばれる少なくとも一つを有効成分として含有する医薬組成物を投与する、非アルコール性脂肪肝炎の予防／改善・治療方法。

〔３〕（１）被験者の血漿中オレイン酸／ステアリン酸比、ステアリン酸／

パルミチン酸比、オレイン酸／パルミチン酸比から選ばれる 1 以上を算出し、

(2) 該被験者に $\omega$ 3 多価不飽和脂肪酸、その製薬学上許容しうる塩及びエステルからなる群から選ばれる少なくとも一つを有効成分として含有する医薬組成物を一定期間投与し、

(3) 再び、該被験者の血漿中オレイン酸／ステアリン酸比、ステアリン酸／パルミチン酸比、オレイン酸／パルミチン酸比から選ばれる 1 以上を算出し、

(4) 医薬組成物の投与前後の、オレイン酸／ステアリン酸比、ステアリン酸／パルミチン酸比、オレイン酸／パルミチン酸比から選ばれる 1 以上を比較して、被験者の状態、又は治療効果を評価し、

(5) その評価に基づいて該被験者に該医薬組成物を投与する、

(6) 非アルコール性脂肪肝炎の予防／改善・治療方法。

[0023] [4] (1) 被験者の血漿中のオレイン酸／ステアリン酸比、ステアリン酸／パルミチン酸比、オレイン酸／パルミチン酸比の少なくとも 1 つについて第 1 の決定を得る、

(2) 該被験者に $\omega$ 3 多価不飽和脂肪酸、その製薬学上許容しうる塩及びエステルからなる群から選ばれる少なくとも一つを有効成分として含有する医薬組成物を投与し、

(3) 該被験者の血漿中のオレイン酸／ステアリン酸比、ステアリン酸／パルミチン酸比、オレイン酸／パルミチン酸比の少なくとも 1 つについて第 2 の決定を得る、

(4) 該被験者の状態を評価するために、第 1 の決定と第 2 の決定とを比較する、

(5) 非アルコール性脂肪肝炎の予防／改善・治療に適する該医薬組成物の適切な治療的用量を決定するために、第 1 と第 2 の決定の比較に基づいて、該被験者の治療を評価するステップを含む、

(6) 非アルコール性脂肪肝炎に罹患している被験者の、非アルコール性脂

肪肝炎を予防／改善・治療する方法。

〔５〕前記比較するステップが、第１の決定と第２の決定とを比較したときに、該被験者の血漿中のオレイン酸／ステアリン酸比、ステアリン酸／パルミチン酸比、オレイン酸／パルミチン酸比の少なくとも１つが低下しているかどうかの決定をさらに含む、〔４〕に記載の方法。

〔６〕前記医薬組成物が、第２の決定の前に１ヶ月間投与される、〔４〕又は〔５〕に記載の方法。

[0024] 〔７〕前記被験者の状態、又は治療効果の評価が、他の検査、又はマーカーを組み合わせて行われる、〔１〕ないし〔６〕のいずれかに記載の治療方法。

〔８〕前記予防／改善・治療方法を３ヶ月間以上続ける、〔１〕ないし〔７〕のいずれかに記載の治療方法。

〔９〕前記医薬組成物が、食事療法と併用される、〔１〕ないし〔８〕のいずれかに記載の治療方法。

〔１０〕前記ＮＡＳＨ又はＮＡＦＬＤの予防／改善・治療方法、又は、被験者の管理方法に用いられる、 $\omega$ ３多価不飽和脂肪酸、その製薬学上許容する塩及びエステルからなる群から選ばれる少なくとも一つを有効成分として含有する医薬組成物。

〔１１〕被験者の血漿中オレイン酸／ステアリン酸比、ステアリン酸／パルミチン酸比及びオレイン酸／パルミチン酸比からなる群から選ばれる１以上の値を、被験者の状態又は治療効果を評価するための指標として投与される、非アルコール性脂肪肝炎の予防／改善・治療に用いられるための、 $\omega$ ３多価不飽和脂肪酸、その製薬学上許容する塩及びエステルからなる群から選ばれる少なくとも一つを有効成分として含有する医薬組成物。

〔１２〕（１）被験者の血漿中オレイン酸／ステアリン酸比、ステアリン酸／パルミチン酸比及びオレイン酸／パルミチン酸比からなる群から選ばれる１以上の値を算出し、

（２） $\omega$ ３多価不飽和脂肪酸、その製薬学上許容する塩及びエステルから

なる群から選ばれる少なくとも一つを有効成分として含有する医薬組成物が、該血漿が採取された後の一定期間にわたって投与されたときの該被験者の血漿中オレイン酸／ステアリン酸比、ステアリン酸／パルミチン酸比及びオレイン酸／パルミチン酸比からなる群から選ばれる 1 以上の値を算出し、

(3) (1) 及び (2) で算出された値を比較して、被験者の状態又は治療効果が評価され、

(4) その評価に基づいて投与される、非アルコール性脂肪肝炎予防及び又は治療用医薬組成物。

[0025] [13] 非アルコール性脂肪肝炎又は N A F L D 患者の血漿中オレイン酸／ステアリン酸比、ステアリン酸／パルミチン酸比、オレイン酸／パルミチン酸比からなる群から選ばれる 1 以上の値を低下させるための、 $\omega$ 3 多価不飽和脂肪酸、その製薬学上許容しうる塩及びエステルからなる群から選ばれる少なくとも一つを有効成分として含有する医薬組成物。

[14] 非アルコール性脂肪肝炎、または N A F L D 患者の血漿中オレイン酸／ステアリン酸比、ステアリン酸／パルミチン酸比及びオレイン酸／パルミチン酸比からなる群から選ばれる 1 以上を低下させるための、 $\omega$ 3 多価不飽和脂肪酸、その製薬学上許容しうる塩及びエステルからなる群から選ばれる少なくとも一つを有効成分として含有する、非アルコール性脂肪肝炎、又は N A F L D 患者の血中脂肪酸組成改善用医薬組成物。

[15] 前記血漿中オレイン酸／ステアリン酸比、ステアリン酸／パルミチン酸比及びオレイン酸／パルミチン酸比が、血漿遊離脂肪酸 (p l a s m a f r e e f a t t y a c i d) の組成比である、[10] ないし [14] のいずれかに記載の医薬組成物。

[16] 被験者の血漿中、血清中、又は肝臓中の脂肪酸組成比を、被験者の状態、又は治療効果を評価するための指標として、N A S H 又は N A F L D の予防／改善・治療、又は、被験者の管理に用いられる医薬を製造するための、 $\omega$ 3 多価不飽和脂肪酸、その製薬学上許容しうる塩及びエステルからなる群から選ばれる少なくとも一つの使用。

〔１７〕被験者の血漿中オレイン酸／ステアリン酸比、ステアリン酸／パルミチン酸比、オレイン酸／パルミチン酸比からなる群から選ばれる１以上を、被験者の状態、又は治療効果を評価するための指標として、NASH又はNAFLDの予防／改善・治療、又は、被験者の管理に用いられる医薬を製造するための、 $\omega$ ３多価不飽和脂肪酸、その製薬学上許容しうる塩及びエステルからなる群から選ばれる少なくとも一つの使用。

〔１８〕被験者の血漿中、血清中、又は肝臓中の脂肪酸組成比を、被験者の状態、又は治療効果を評価するための指標として、NASH又はNAFLDの予防／改善・治療、又は、被験者の管理に用いられるための $\omega$ ３多価不飽和脂肪酸、その製薬学上許容しうる塩及びエステルからなる群から選ばれる少なくとも一つ。

〔１９〕被験者の血漿中オレイン酸／ステアリン酸比、ステアリン酸／パルミチン酸比、オレイン酸／パルミチン酸比からなる群から選ばれる１以上を、被験者の状態、又は治療効果を評価するための指標として、NASH又はNAFLDの予防／改善・治療、又は、被験者の管理に用いられるための $\omega$ ３多価不飽和脂肪酸、その製薬学上許容しうる塩及びエステルからなる群から選ばれる少なくとも一つ。

## 発明の効果

[0026] 本発明により、NASHの予防／改善・治療効果を評価する指標が提供され、この指標を用いてより効果的にNASHの予防／改善・治療を行うことが可能となる。さらに、特定の血漿中脂肪酸の組成比、他の検査、又はマーカーを指標として、簡便にNAFLD、NASHの予防／改善・治療効果が得られている被験者、効果が得られていない被験者を見分けることが可能となる。そして、効果が得られていない被験者に対しては、用量の変更、治療方針の変更を行い、より有効な治療を選択することができるため、臨床上有用である。治療効果の評価が容易であるため、肝生検の実施回数を減らすことができ、医師、患者の負担が軽減し、さらには医療事故等のリスクを減少することができる。

[0027] さらに、1～3ヶ月程度の比較的短期的な脂肪酸変動を観察することにより、被験者の状態を把握でき、その時点において治療が奏功しているか、奏功する見込みがあるかを判定できる。本発明で提供される指標は、NASHの他の検査値、マーカー変動に先んじてNASHの病態を反映するため、指標として有用であり、この指標を治療方法に応用することで、被験者により適した治療を提供することが可能となる。

### 発明を実施するための形態

[0028] 以下に本発明を詳細に説明する。

本発明の第1の態様は、被験者の血漿中、血清中、又は肝臓中脂肪酸組成比を指標として、被験者の状態、又は治療効果を評価する、NASH又はNAFLDの予防／改善・治療方法、又は、被験者の管理方法である。

[0029] 好ましくは、被験者の血漿中、血清中、又は肝臓中脂肪酸組成比を指標として、被験者に $\omega 3$  PUFAsを含有する医薬組成物を投与する、NASH又はNAFLDの予防／改善・治療方法、又は、被験者の管理方法である。

[0030] 本発明の指標（マーカー）として用いられる脂肪酸としては、特に限定されないが、好ましくは、脂肪酸24分画等の公知の手法により測定できる脂肪酸である。例えばミリスチン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸（16：1）、ステアリン酸又はオレイン酸等が挙げられ、中でも、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸が好ましく、とりわけオレイン酸が好ましい。脂肪酸は、全脂肪酸中のモル%で算出することが望ましい。特に好ましくは、2種以上の脂肪酸の比であり、2種以上の脂肪酸についてその比を算出する場合、具体的な脂肪酸組成比としては、例えばオレイン酸（OA）／ステアリン酸（SA）比、ステアリン酸（SA）／パルミチン酸（PA）比、オレイン酸（OA）／パルミチン酸（PA）比、パルミトレイン酸／パルミチン酸比、ステアリン酸／ミリスチン酸比、パルミチン酸／ミリスチン酸比、等が挙げられ、OA／SA比、SA／PA比、OA／PA比が好ましい。例えば、上記の脂肪酸の3種、4種を組み合わせ用いて指標としてもよい。

脂肪酸24分画は、脂肪酸を不飽和脂肪酸も含め、特定の24種類に分画

しガスクロマトグラフィーにより定量する検査方法である。具体的には、血漿中の脂肪酸を、例えばF o l c hらの方法（F o l c h J. ら J. B i o l. C h e m. 226, 497-509 (1957)）により抽出する。トリコサン酸（T r i c o s a n o i c a c i d, C23:0）を内部標準として、各脂肪酸を三フッ化ホウ素とメタノールにてメチルエステル体とし、各脂肪酸のメチルエステル体を、例えば、S H I M A Z U G C-17Aなどのガスクロマトグラフィー装置（島津製作所社製）およびB P X 70などのキャピラリーカラム（0.25mm I D×30m, S G E I n t e r n a t i o n a l L t d. 製）を用いて測定、定量することができるが、これらに限定されない。

[0031] すなわち、本発明の治療方法は、望ましくは、血漿中脂肪酸組成比を指標とする治療効果又は疾患の程度の評価と医薬組成物の投与とが並行してまたは交互に繰り返し行われる治療方法である。

[0032] より具体的には、

（１）被験者の血漿中オレイン酸／ステアリン酸比、ステアリン酸／パルミチン酸比、オレイン酸／パルミチン酸比から選ばれる１以上を算出し、

（２）該被験者に $\omega$ 3多価不飽和脂肪酸、その製薬学上許容しうる塩及びエステルからなる群から選ばれる少なくとも一つを有効成分として含有する医薬組成物を一定期間投与し、

（３）その後、再び、該被験者の血漿中オレイン酸／ステアリン酸比、ステアリン酸／パルミチン酸比、オレイン酸／パルミチン酸比から選ばれる１以上を算出し、

（４）医薬組成物の投与前後の、オレイン酸／ステアリン酸比、ステアリン酸／パルミチン酸比、オレイン酸／パルミチン酸比から選ばれる１以上を比較して、被験者の状態、又は治療効果を評価し、

（５）その評価に基づいて該被験者に該医薬組成物を一定期間投与し、

（６）所望により、又は必要に応じて、（３）ないし（５）を繰り返す、

（７）非アルコール性脂肪肝炎の予防／改善・治療方法である。

- [0033] また、本発明の医薬組成物は、望ましくは、血漿中脂肪酸組成比を指標とする治療効果又は疾患の程度の評価と医薬組成物の投与とが交互に繰り返される医薬組成物である。
- [0034] 治療前後の脂肪酸組成比を比較して治療効果の評価を行う場合、例えば、 $OA/SA$ 比を指標として用いた場合には、一定期間治療を行った後における被験者の $OA/SA$ 比が、治療前における $OA/SA$ 比の値と比較して減少していれば、 $NASH$ 又は $NAFLD$ の予防／改善・治療効果が得られると評価できる。本発明の医薬組成物についても同様に、医薬組成物を一定期間投与した後における被験者の $OA/SA$ 比が、投薬前における $OA/SA$ 比の値と比較して減少していれば、医薬組成物による治療効果が発揮されていると評価できる。 $SA/PA$ 比、 $OA/PA$ 比についても、同様に評価できる。
- [0035] 治療効果の評価は、 $OA/SA$ 比、 $SA/PA$ 比、又は $OA/PA$ 比のいずれか1つを指標として評価できるが、これらの脂肪酸比のうち2つ以上を用いて評価することが望ましく、その指標のひとつに $OA/SA$ 比が含まれることが望ましい。
- [0036] 本明細書において脂肪酸組成比は、特に記載のない限り、血漿中、血清中、肝臓における脂肪酸組成比のいずれを用いてもよい。また、血液中の $LDL$ 、 $VLDL$ など特定の分画における脂肪酸組成比を指標にすることもできる。しかし、測定の簡便さの点から、血漿中、又は血清中の脂肪酸組成比を用いることが望ましい。脂肪酸組成比の算出に用いる各脂肪酸の単位は特に限定されず、モル、モル%、重量、重量%等いずれを用いてもよいが、経時的に脂肪酸組成比を比較して評価する場合には、統一した単位、脂肪酸組成比の算出方法を用いる。とりわけ、全脂肪酸中のモル%により算出するのが望ましい。質量／体積濃度( $\mu g/ml$ など)、体積モル濃度( $mol/L$ など)などが用いられてもよい。
- [0037] また、本明細書において血漿中脂肪酸とは、特に記載のない限り、血漿中総脂肪酸(plasma total fatty acid)を指すが、

被験者の状態、又は治療効果を評価するための指標として血漿中遊離脂肪酸（*plasma free fatty acid*）を用いてもよい。また、肝臓中脂肪酸とは、特に記載のない限り、肝臓中総脂肪酸を指すが、場合により、肝臓中遊離脂肪酸を用いてもよい。

[0038] 脂肪酸組成の測定は、本発明の属する技術分野における通常の知識を有する者が実施しうるいかなる方法を用いて行ってもよいが、常法に従って行うことが特に好ましい。

[0039] 血漿中総脂肪酸組成は、被験者から採血して血漿を取り出し、*F o l c h*法などの方法により抽出した脂質から加水分解により遊離させた全ての脂肪酸について、ガスクロマトグラフィーなどにより分画して定量値、組成値を得て、脂肪酸組成比を算出することができる。臨床検査の一項目である全脂質中脂肪酸分画（例えば、*S R L*株式会社等の受託臨床検査事業者によって実施可能である）を実施し、得られた個々の脂肪酸の値から算出することもできる。

[0040] 血漿中遊離脂肪酸組成は、*F o l c h*法などの方法により抽出した脂質を薄層板展開を行うことで遊離型のみを掻きとり、抽出後に加水分解をおこないメチルエステル化処理の後、ガスクロマトグラフィーなどにより分画して定量値、組成値を得て、脂肪酸組成比を算出することができる。血清にも応用可能である。

[0041] 肝臓の脂肪酸組成比も、常法に従い、測定可能である。例えば、*F o l c h*法などの方法に従い、肝臓組織5－10mgからクロロホルム／メタノール（2：1 *v o l / v o l*）により脂質を抽出し、クロマトグラフィーにより分画する。これらの測定方法、算出方法等は特に限定されず、本発明の属する技術分野における通常の知識を有する者が実施しうる任意の方法を用いることができることは言うまでもない。

[0042] 本発明において、 $\omega 3$  *P U F A s*を含有する医薬組成物とは、 $\omega 3$ 多価不飽和脂肪酸（ $\omega 3$  *P U F A s*）、その製薬学上許容しうる塩及びエステルからなる群から選ばれる少なくとも一つを有効成分として含有する医薬組成物

をいう。

[0043] 医薬組成物を一定期間投与して、その投薬前後で脂肪酸組成比を比較して治療効果を評価する場合、医薬組成物が投与される一定期間とは、特に限定されないが、7日間以上1年以下であることが望ましく、好ましくは14日以上9ヶ月以下、より好ましくは1ヶ月以上6ヶ月以下、いっそう好ましくは1ヶ月以上3ヶ月以下、よりいっそう好ましくは1ヶ月である。

[0044] 本発明の $\omega 3$  P U F A sを含有する医薬組成物を被験者に投与すると、多くの被験者のO A / S A比は低下傾向を示し、投薬開始から1～2月間程度は、O A / S A比の低下率は大きく、次第に低下率は小さくなる。ここで、本明細書において、脂肪酸組成比の低下率とは、一定期間あたり脂肪酸組成比の低下した割合をいい、例えば、O A / S A比の1ヶ月あたりの低下率は、 $(\text{投薬前のO A / S A比} - \text{1ヶ月投与後のO A / S A比}) / \text{投薬前のO A / S A比} \times 100 (\%)$ と算出する。

[0045] 本発明の治療方法の好ましい態様は、 $\omega 3$  P U F A sを含有する医薬組成物を1ヶ月ないし2ヶ月間投与し、被験者の血漿中O A / S A比、S A / P A比、O A / P A比のいずれか1以上の値を投薬前後で比較する。投薬後のO A / S A比、S A / P A比、O A / P A比のいずれかが、投薬前と比較して低下していれば、本発明の医薬組成物のN A S H治療効果が得られると判断できる。

[0046] また、本発明の治療方法の好ましい態様では、 $\omega 3$  P U F A sを含有する医薬組成物を投与開始から1ヵ月後、2ヶ月後など、経時的に被験者の血漿中O A / S A比を測定し、投薬開始前のO A / S A比の値と比較する。N A S H治療効果が得られるためには、投薬開始から1ヶ月の間のO A / S A比の低下率が、望ましくは1%以上、より望ましくは2%以上、さらに望ましくは3%以上、いっそう望ましくは5%以上である。投薬開始から1～2ヶ月間の低下率が大きければ、より本発明の医薬組成物のN A S H治療効果が期待できる被験者であるので、そのまま $\omega 3$  P U F A sを含有する医薬組成物の投与を継続する。投薬開始から2ヶ月あたりからその低下率が小さくな

るが、その後は低下したOA/SA比の値を維持するように、投薬を継続することが望ましい。

被験者に $\omega 3$ PUFAsを数か月以上投薬すると、投薬開始当初は変動していた血漿中の脂肪酸組成の変動がなくなることがある。例えば、 $\omega 3$ PUFAsの投薬中に、一定期間におけるOA/SA比が不変となることがある。この場合には、脂肪酸の測定数値を治療前と比較したり、他の検査を併用して、治療効果が得られているか判断する。

[0047] 一方、本発明の治療方法の好ましい態様は、本発明の医薬組成物を1ヶ月投薬した後のOA/SA比、SA/PA比、OA/PA比のいずれか1以上が、又は2以上が、投薬前と比較して上昇、または不変の場合には、より治療効果を高めるために、(1)  $\omega 3$ PUFAsの用量の増加、(2) 他の薬剤の追加、変更、(3) 食事療法の追加、変更、(4) 運動療法の追加、変更等を行うことが望ましい。

これに対して、OA/SA比、SA/PA比、OA/PA比のいずれか1以上が、又は2以上が、投薬前と比較して低下の場合には、治療効果があり、治療を続けることが有効である。

[0048] また、本発明の治療方法の好ましい態様では、本発明の医薬組成物を投与開始から2ヶ月の間のOA/SA比の低下率が小さい被験者に対しても、上記の治療効果を高めるための手段をとることが望ましい。2ヶ月あたりのOA/SA比の低下率が小さいとは、特に限定されないが、0.5%以下である。

[0049] すなわち、本発明の好ましい態様は、本発明の $\omega 3$ PUFAsを含有する医薬組成物を投薬開始してから1ヶ月間のOA/SA比の低下率を、被験者の状態、又は治療効果を評価するための指標として、該被験者に $\omega 3$ PUFAsを含有する医薬組成物を投与する、非アルコール性脂肪肝炎の予防/改善・治療方法である。

[0050] より好ましくは、本発明の $\omega 3$ PUFAsを含有する医薬組成物を投薬開始してから1ヶ月間のOA/SA比の低下率を、被験者の状態、又は治療効

果を評価するための指標として、1ヶ月あたりのO A / S A 比の低下率が1%以上になるように、該被験者に $\omega$ 3 P U F A s を含有する医薬組成物を投与する、非アルコール性脂肪肝炎の予防／改善・治療方法である。

[0051] とりわけ好ましくは、本発明の $\omega$ 3 P U F A s を含有する医薬組成物を投薬開始してから1ヶ月間のO A / S A 比の低下率を、被験者の状態、又は治療効果を評価するための指標として、1ヶ月間のO A / S A 比の低下率が1%以上になるように、該被験者に $\omega$ 3 P U F A s を含有する医薬組成物を投与し、その後、O A / S A 比の低下率が小さくなった後は、その低下率を維持するように $\omega$ 3 P U F A s を含有する医薬組成物を投与する、非アルコール性脂肪肝炎の予防／改善・治療方法である。

[0052] 本発明の好ましい態様は、上記非アルコール性脂肪肝炎の予防／改善・治療方法に用いられる、 $\omega$ 3 P U F A s を含有する医薬組成物である。

[0053] 本発明によれば、1～3ヶ月程度の比較的短期的な脂肪酸変動を観察することにより、被験者の状態を把握でき、現時点での治療が奏功しているか、現時点での治療で十分か、治療を変更する必要があるか、奏功する見込みがあるかを評価することができる。N A S H 治療を反映する他の検査、マーカーの変動に先んじて、評価ができるため、被験者により適した治療を提供することが可能となる。

[0054] 本発明の予防／改善・治療方法は、少なくとも1ヶ月以上継続されることが望ましく、好ましくは3ヶ月以上、より好ましくは6ヶ月以上、さらに好ましくは1年以上、いっそう好ましくは3年以上、よりいっそう好ましくは5年以上の期間にわたり継続される。後述する他の検査、又はマーカーを指標にして治療を終了できると評価されるまで継続されることが望ましい。

[0055] 本発明の医薬組成物は、少なくとも1ヶ月以上投与されることが望ましく、好ましくは3ヶ月以上、より好ましくは6ヶ月以上、さらに好ましくは1年以上、いっそう好ましくは3年以上、よりいっそう好ましくは5年以上の期間にわたり投与される。後述する他の検査、又はマーカーを指標にして治療を終了できると評価されるまで投与されることが望ましい。

[0056] 治療効果の評価に基づいて該被験者に前記医薬組成物を投与する場合には、NASH治療にとって望ましい被験者の状態、又は治療効果を得るために、（１） $\omega 3$  PUFAsの用量の増減、（２）他の薬剤の追加、用量の増減、中止、又は休薬、（３）食事療法、又は運動療法の追加、変更等を、所望により、又は必要に応じて行ってもよい。

[0057] 被験者の状態、又は治療効果の判断は、被験者自身又は医師が、被験者の身体的、精神的症状から判断し、判断手法は特に限定されないが、例えば、KleinerらのNASスコアを用いた場合には、スコアが改善することをいう。Kleinerらは、NAFLDの肝組織所見の中から3項目、すなわち脂肪肝（steatosis）、肝細胞風船様腫大（hepatocellular ballooning）、実質炎症（lobular inflammation）の程度をスコア化し（NAFLD activity score: NAS）、NASが5以上をNASHとした。望ましい被験者の状態、又は治療効果とはNASスコアが1以上低下することが望ましく、より望ましくは2低下、さらに望ましくはNASスコアが4以下になることである。

[0058] Matteoniらは、NAFLDを病理所見から、type 1: 脂肪肝のみ、type 2: 脂肪肝プラス小葉内の炎症（lobular inflammation）、type 3: 脂肪肝プラス肝細胞風船様腫大（肝細胞膨化: ballooning degeneration）、type 4: 脂肪肝、肝細胞風船様腫大プラス肝線維化あるいはマロリー一体形成に分類し、type 3、4をNASHと診断することを提唱した。Bruntらは、NASHの病理所見を炎症（grading）と線維化の程度（staging）で評価・分類することを提案し、NASHの病理分類として広く用いられている。被験者の状態、又は治療効果はこれらの分類を使って判断してもよい。望ましい被験者の状態、又は治療効果とは、例えば、Matteoniらの分類を用いて、type 3がtype 2になる、type 4がtype 3になる等が挙げられ、例えば、Bruntらの分類を用いて、炎症（

g r a d i n g) が改善すること、及び・又は、線維化の程度 (s t a g i n g) が改善することなどをいう。

[0059] 本発明の第2の態様は、被験者の血漿中オレイン酸／ステアリン酸比が3以上の被験者に投与を開始し、血漿中オレイン酸／ステアリン酸比が2.6未満になるまで投与を継続し、さらに、血漿中オレイン酸／ステアリン酸比が2.6未満に維持するよう本発明の医薬組成物の投与を継続する、非アルコール性脂肪肝炎、又はNAFLDの予防／改善・治療方法である。この場合、血漿中脂肪酸組成比は、血漿中の総脂肪酸組成を用い、測定単位はモル、又はモル%を用いて算出する。血漿脂肪酸24分画の検査数値を用いて算出することが望ましい。

[0060] 本発明の第3の態様は、検査、若しくはマーカー、又はこれらの組み合わせを被験者の状態、又は治療効果を評価するための指標として、該被験者に $\omega 3$  P U F A sを含有する医薬組成物を投与する、非アルコール性脂肪肝炎、又はNAFLDの予防／改善・治療方法である。ここでいう検査、マーカーは、特に限定されず、脂肪酸組成比をマーカーのひとつとしてもよい。また、脂肪酸のモル%をマーカーのひとつとしてもよい。例えば、血漿中オレイン酸のモル%が健常人の平均値より高い被験者に対して、血漿中オレイン酸の測定数値を指標として、該被験者に $\omega 3$  P U F A sを含有する医薬組成物を投与することができる。

[0061] 検査、マーカーとしては、例えば、画像診断（超音波（エコー）、CT、MRIなど）、インスリン抵抗性検査（HOMA-IRなど）、血中インスリン値、食後血糖値、BMI、血中酸化ストレスマーカー（チオレドキシン、マロンジアルデヒド、4-hydroxynonenal、一酸化窒素など）、8-イソプロスタン、アディポサイトカイン（アディポネクチン、TNF $\alpha$ 、レプチン、MCP1、レジスチンなど）、線維化マーカー（ヒアルロン酸、IV型コラーゲン、プロコラーゲンIIIポリペプチド（PIIIP）、TIMP-1（Tissue inhibitor of metalloproteinase-1）、CTGF（connective tiss

ue growth factor) など)、sTNF-R、血小板数、血清フェリチン、血清鉄、ALT、AST、ALT/AST比、 $\gamma$ -GTP、ALP (アルカリホスターゼ)、KICG、高感度CRP、トリグリセリド (TG)、LDL-C、HDL-C、総コレステロール、遊離脂肪酸 (FFA)、リン脂質、アルブミン、トータルプロテイン、トータルビリルビン、キニノーゲン、17-OH-oleic acid [ $\omega$ 1-OH-oleic acid], 18-OH-oleic acid [ $\omega$ -oleic acid]、PDGF-A、PDGF-B、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-6などが挙げられ、これらの検査は、本発明の属する技術分野における通常の知識を有する者が実施しうる任意の方法で行うことができる。好ましくは、常法に従って実施することが可能である。

[0062] 特に、本発明の医薬組成物の治療効果を評価するための指標として望ましいものとしては、AST、ALT、ALP、トータルビリルビン、チオレドキシン、フェリチン、MCP1、ヒアルロン酸、IV型コラーゲン、TIMP-1、CTGF、TG、アルブミン、トータルプロテイン、17-OH-oleic acid [ $\omega$ 1-OH-oleic acid], 18-OH-oleic acid [ $\omega$ -oleic acid]などが挙げられる。画像診断と組み合わせるのがより望ましい。

[0063] これらの検査、マーカーは、被験者の状態に合わせて組み合わせて選択されることが望ましい。

[0064] 例えば、前記Matteoniらの分類でtype 4 (脂肪肝、肝細胞風船様腫大プラス肝線維化あるいはマロリー体形成肝線維化) に分類される被験者は、ヒアルロン酸、IV型コラーゲン、TIMP-1、アルブミン、トータルプロテイン、ALP、トータルビリルビンのいずれか1以上と、その他の検査 (HOMA-IR、血中インスリン値、BMI、TGなど) と組み合わせて治療効果を評価する。

[0065] 例えば、前記Matteoniらの分類でtype 3 (脂肪肝プラス肝細胞風船様腫大) に分類される被験者は、MCP1、AST、ALT、チオレ

ドキシン、フェリチン、血小板数、血中インスリン値、BMI、などにより評価されることが望ましい。

[0066] これらの望ましい検査、マーカーは、 $\omega 3$  PUFAsによるNASHの治療効果、すなわち、病理所見の改善などを反映して段階的に検査数値が改善するので、これらを測定することにより、肝生検の検査の必要性を減らし、被験者負担を軽減できる。

[0067] これらの検査、マーカーは、 $\omega 3$  PUFAsによるNASH治療効果が得られると段階的に検査数値が改善するため、NASH治療の進行状況を把握するために有効である。また、これらの検査、マーカーは、疾患が治癒し、治療を終了する指標（目標値）を設定するために使用可能である。疾患が治癒したといえる場合の目標値設定は、各検査数値の正常値とすることができる。

[0068] 本発明の医薬組成物は、これらの検査、又はマーカーを指標にして、目標とするマーカー値を達成するために投与される。本発明の医薬組成物は、NASH又はNAFLD患者の画像による所見、検査値、又はマーカー値を改善させるための、 $\omega 3$  PUFAsを有効成分として含有する医薬組成物である。本発明の治療方法は、これらの検査、マーカーを指標にして、目標値を達成するために、 $\omega 3$  PUFAsを含有する医薬組成物を投与する、NASHの予防／改善・治療方法である。

[0069] 本発明の第4の態様は、NASH又はNAFLD患者の血漿、血清、又は肝臓中の脂肪酸組成比を改善させるための、 $\omega 3$  PUFAsを有効成分として含有する医薬組成物である。また、NASH又はNAFLD患者の血漿中遊離脂肪酸組成比を改善するための $\omega 3$  PUFAsを有効成分として含有する医薬組成物である。

[0070] 被験者の脂肪酸組成比を改善させるとは、例えば、OA/SA比についていえば、医薬組成物の一定期間投与後のOA/SA比の値が、投与前の値と比較して、低下することをいう。SA/PA比、又はOA/PA比についても同様に判断する。本発明の第4の態様の医薬組成物の製造方法及び使用方

法は、第1の態様の治療方法で使用する医薬組成物と同様である。

[0071] 本発明の第5の態様は、 $\omega 3$  PUFAsを有効成分として含有する医薬組成物の投与による治療に応答する見込みのあるNASH、又はNAFLD患者を選択する方法である。 $\omega 3$  PUFAsに応答する見込みのあるNASH（又はNAFLD）患者とは、特に身体的症状の有無は問わないが、血漿中脂肪酸組成比のOA/SA比が高値の被験者である。健常人の平均のOA/SA比と比較してより高値を示す被験者であり、具体的には、血漿中OA/SA比が1.5以上のヒトを意味し、より好ましくは、2以上、とりわけ好ましくは3以上のヒトを意味する。ここでの測定単位はモル、モル%である。

[0072] また、本願発明の $\omega 3$  PUFAsを有効成分として含有する医薬組成物の投与による治療に応答する見込みのあるNASH、又はNAFLD患者とは、投薬開始前と、 $\omega 3$  PUFAsを有効成分として含有する医薬組成物の投薬開始から1ヶ月ないし3ヶ月後の血中脂肪酸濃度を測定し、OA/SA比、SA/PA比、OA/PA比から選ばれる1以上を比較して、血中脂肪酸比が低下している被験者である。

望ましくは、これらの血中脂肪酸比の低下率が大きい被験者であり、望ましくは、前記の望ましい脂肪酸組成比の低下率を示す被験者であって、このような被験者は、本発明の医薬組成物により、大きな治療効果が得られる。

上記被験者を対象として本願の医薬組成物の投与を継続することが好ましい。

[0073] すなわち、(1) 被験者の血漿中オレイン酸/ステアリン酸比、ステアリン酸/パルミチン酸比、オレイン酸/パルミチン酸比から選ばれる1以上を算出し、

(2) 該被験者に $\omega 3$  多価不飽和脂肪酸、その製薬学上許容しうる塩及びエステルからなる群から選ばれる少なくとも一つを有効成分として含有する医薬組成物を一定期間投与し

(3) その後、再び、該被験者の血漿中オレイン酸/ステアリン酸比、ステ

アリン酸／パルミチン酸比、オレイン酸／パルミチン酸比から選ばれる 1 以上を算出し、

(4) 医薬組成物の投与前後の、オレイン酸／ステアリン酸比、ステアリン酸／パルミチン酸比、オレイン酸／パルミチン酸比から選ばれる 1 以上を比較して、投与後の数値が低下している被験者に対して医薬組成物の投与を継続する、非アルコール性脂肪肝炎の予防／改善・治療方法である。

[0074] また、定期的に血漿中の OA／SA 比、SA／PA 比、OA／PA 比の 1 以上を測定し、その値が前回測定時に比較して上昇している被験者では、肝病変（NASH、又は NAFLD）が進展している可能性がある。

このような被験者には、これらの値が正常の範囲を超えているか否かに関わらず、早期に治療及び予防的治療を開始することができる。このような被験者は、 $\omega 3$  PUFAs への反応性が期待できる。

すなわち、本願発明の  $\omega 3$  PUFAs を有効成分として含有する医薬組成物の投与による治療に応答する見込みのある NASH、又は NAFLD 患者とは、血漿中の OA／SA 比、SA／PA 比、OA／PA 比の 1 以上を測定して、過去 1 年以内の値と比較して、その値が上昇している被験者である。特に、血漿中脂肪酸組成比の OA／SA 比が前回の測定時と比較して 0.5 以上、より好ましくは 1.0 以上、さらに好ましくは 1.5 以上上昇した被験者を選択する。このとき、前回の測定は、過去 1 年以内に、より望ましくは過去 6 ヶ月以内に行われていることが望ましい。被験者の選択は、上記の指標による判断に加えて、肝機能の検査値の変動も考慮して判断されることが望ましい。このように選択した被験者に対して、NASH 治療効果を持つ任意の薬剤を投与する。薬剤は、被験者の身体状態に応じて適宜選択できるが、 $\omega 3$  PUFAs を使用することが好ましい。薬剤の投与は、患者の身体状況を観察しながら、用量の増減、他の薬剤の追加を行うことができる。

[0075] 本願発明の  $\omega 3$  PUFAs を有効成分として含有する医薬組成物の投与による治療に応答する見込みのある NASH、又は NAFLD 患者とは、血中遊離脂肪酸濃度の高い被験者である。血中遊離脂肪酸濃度の測定は、本発明

の属する技術分野における通常の知識を有する者が実施しうる任意の方法によって、一般的に測定可能である。また、例えば、SRL株式会社等の受託臨床検査事業者に委託する等によっても測定可能である。基準値は140～850 ( $\mu\text{Eq/L}$ ) とされるが、食事の影響を受けやすいため、例えば、一夜絶食するなど条件を一定にして測定することが望ましい。血中遊離脂肪酸濃度の高い状態が長く続いている被験者が望ましく、例えば6ヶ月以上、より望ましくは1年以上継続している被験者が望ましい。血中遊離脂肪酸濃度が高いとは、健常者の血中遊離脂肪酸濃度の平均値と比較して高値を示すことをいう。

[0076] 本願発明の $\omega 3$  PUFAsを有効成分として含有する医薬組成物の投与による治療に応答する見込みのあるNASH、又はNAFLD患者とは、本発明の医薬組成物投与により、血中トリグリセリド値(TG)が低下する被験者である。中でも、投薬開始前に血中のTG濃度は基準値以上で、本発明の医薬組成物投与開始から1～6ヶ月程度は、TGの低下がほとんど見られないうが、その後次第にTG値の低下が見られる被験者がより望ましい。

[0077] 本願発明の $\omega 3$  PUFAsを有効成分として含有する医薬組成物の投与による治療に応答する見込みのあるNASH、又はNAFLD患者とは、NASHの初期の被験者である。例えば、Bruntらの分類によれば、線維化分類(staging)のステージ1もしくは2の被験者である。Bruntらは、NASHの病理所見を炎症(grading)と線維化の程度(staging)で評価・分類した。中でも線維化の程度(staging)は、以下の4段階に分類されている。

ステージ1：中心静脈周囲性線維化(肝細胞周囲性) 限局性、あるいは広範囲、

ステージ2：中心静脈周囲性線維化と門脈域の線維化、

ステージ3：中心静脈周囲性線維化と架橋形成を伴う門脈域の線維化、

ステージ4：肝硬変

[0078] 本願発明の $\omega 3$  PUFAsを有効成分として含有する医薬組成物の投与に

よる治療に応答する見込みのあるNASH、又はNAFLD患者とは、体内の酸化度が高い被験者である。例えば、活性酸素種（ROS）の産生が促進している被験者、鉄の過剰蓄積のある被験者である。血清フェリチンの上昇、血清チオレドキシン濃度、8-イソプロスタン値の上昇により評価することができる。

[0079] 本願発明の $\omega$ 3PUFAsを有効成分として含有する医薬組成物の投与による治療に応答する見込みのあるNASH、又はNAFLD患者とは、炎症が高度に起こっている被験者である。例えば、MCP1、高感度CRPなどの測定により評価できる。

[0080] 本願発明の $\omega$ 3PUFAsを有効成分として含有する医薬組成物の投与による治療に応答する見込みのあるNASH、又はNAFLD患者とは、AST、ALTが上昇している被験者である。

[0081] 本願発明の $\omega$ 3PUFAsを有効成分として含有する医薬組成物の投与による治療に応答する見込みのあるNASH、又はNAFLD患者とは、アディポネクチン遺伝子、TNF遺伝子の1塩基遺伝子多型性（SNP）のある被験者にも好ましく用いられる。

[0082] 本発明の治療方法は、上記 $\omega$ 3PUFAsに反応する見込みのある被験者を選択し、被験者の脂肪酸組成比、他の検査、若しくはマーカー、又はこれらの組み合わせを指標に、EPA-E等の $\omega$ 3PUFAsを有効成分とする医薬組成物を、必要があれば、その他の併用薬、食事制限などを組み合わせて治療し、検査数値の目標値を達成するまで投与する、NASHの治療方法でもある。

[0083] 本発明の第6の態様は、肝生検によってNASHと診断され、かつ、血漿中トリグリセリド（TG）が正常値より高い（高トリグリセライド血症）の被験者のための、 $\omega$ 3PUFAsを有効成分として含有する、NASHの改善、治療用医薬組成物である。動脈硬化性疾患予防ガイドライン2007年版（日本動脈硬化学会編集・発行）における診断基準に従い、血漿中TGが高い、又は高トリグリセライド血症とは、空腹時採血による検査により、ト

リグリセリドが $150\text{ mg/dL}$ 以上を示すことをいう。

[0084] また、「脂質異常症の被験者」にも望ましく用いられる。「脂質異常症」の語は、動脈硬化性疾患予防ガイドライン2007年版（日本動脈硬化学会編集・発行）における診断基準に従い、高LDLコレステロール血症、すなわち、空腹時採血による血清中LDLコレステロール値が $140\text{ mg/dL}$ 以上、低HDLコレステロール血症、すなわち、空腹時採血による血清中HDLコレステロール値が $40\text{ mg/dL}$ 未満、及び高トリグリセライド（トリグリセリドと同義、以下同）血症、すなわち、空腹時採血による血清中トリグリセライド値が $150\text{ mg/dL}$ 以上、の少なくとも一つに該当する状態を意味する。

また、「脂質異常症」の語は、米国の国立衛生研究所（NIH）が2001年5月に発行したATP IIIガイドライン（ATP III Guidelines At-A-Glance Quick Desk Reference）に従って、血清中LDLコレステロール値が $130\text{ mg/dL}$ 以上、血清総コレステロール値が $200\text{ mg/dL}$ 以上、血清中HDLコレステロール値が $40\text{ mg/dL}$ 未満の少なくとも一つに該当する状態であってもよい。

[0085] 本発明の第7の態様は、「肝生検によってNASHと診断された被験者」又は、「画像診断等によって脂肪肝と判定された被験者で、かつ、AST又はALTの上昇を認める被験者」のための、 $\omega 3\text{ PUFAs}$ を有効成分として含有するNASHの改善、治療用医薬組成物である。

[0086] 「脂肪肝」の判定は、肝細胞の $1/3$ 以上に脂肪滴が存在すれば脂肪肝と診断されるが、広義には、肝細胞の $10\%$ 以上に脂肪肝を認めれば脂肪肝と診断する。一般的に脂肪肝の判定は、超音波、エコー、CT、MRIなど画像診断によって行われるが、特に限定されない。例えば、エコー輝度からbright liverと表現される所見を認めれば脂肪肝と診断できる。

[0087] AST（GOTともいう）、ALT（GPTともいう）の上昇とは、通常、正常上限の2～4倍になることをいい、ASTの正常値は $10\sim 40\text{ IU/L}$ 程度、ALTの正常値は $5\sim 40\text{ IU/L}$ 程度といわれているが、正常

値（基準値）は診断の目安であって、医療施設によっても異なる。AST、及びALTが正常でも肝生検によってNASHと診断されることもある。

[0088] 本発明の医薬組成物は、このような被験者に対して好ましく用いられ、投薬開始時期は特に限定されないが、好ましくは、上記診断を初めて受けてから、3年以内に投薬を開始することが望ましく、より望ましくは1年以内に投薬を開始することが望ましい。

[0089] 本発明の第8の態様は、肝生検によってNASHと診断され、かつ、AST、又はALTの上昇を認める被験者のAST、又はALTを低下させるための、 $\omega 3$  PUFAsを有効成分として含有するNASHの改善、治療用医薬組成物である。AST、又はALTを低下させるとは、投薬開始前の検査数値を低下させればよいが、好ましくは投薬開始前の検査数値の2/3に、より好ましくは1/2に、さらに好ましくは正常値（基準値）といわれる程度にまで低下させることが望ましい。

本発明の医薬組成物の使い方は上述のとおりである。

[0090] 本発明の第9の態様は、被験者の血漿中、血清中、又は肝臓中のOA/SA比、SA/PA比、OA/PA比、他の検査、若しくはマーカー、又はこれらの組み合わせを、肝生検によるNASH確定診断に代わるNASH発症のマーカーとして使用する方法である。ここでの脂肪酸組成比、他の検査、又はマーカーは、本発明の第1から3の態様で記載したとおり組み合わせて使用され、診断の信頼性を高めることができる。

[0091] 本発明の第10の態様は、被験者の脂肪酸組成比、他の検査、若しくはマーカー、又はこれらの組み合わせを指標として、脂肪肝をもつ被験者の中で、NASHに移行する可能性の高い被験者を見出す方法である。例えば、被験者のOA/SA比、SA/PA比、又はOA/PA比が継続的に高値を示す場合には、NASH発症の危険性が高い。OA/SA比が1ヶ月以上、3ヶ月以上、6ヶ月以上、1年以上高値が持続する場合、NASH発症の危険性が高まる。

[0092] 本発明の第11の態様は、脂肪肝をもつ被験者の中で、NASHに移行す

る可能性の高い被験者を見出し、検査値を指標に治療を開始する時期を見出し、治療を開始するNASHの予防方法である。OA/SA比が1ヶ月以上、3ヶ月以上、6ヶ月以上、1年以上高値が持続する場合、又は、OA/SA比が前回の測定と比較して、上昇が続いている被験者は、他の検査、マーカーと総合的に判断して、NASHの予防を開始することが望ましい。

[0093] 本発明の第12の態様は、 $\omega 3$ PUFAsを有効成分として含有する、NASHによる肝臓の線維化を改善するための医薬組成物である。改善するための指標としては、OA/SA比を指標とすることができる。本発明の医薬組成物は、好ましくは、食事療法と組み合わせて、血漿中OA/SA比を指標として、それが前回の測定値より低下するように投与する。

[0094] すなわち、好ましくは食事療法と組み合わせて、血漿中OA/SA比が前回の測定値と比較して低下するように投与される、 $\omega 3$ PUFAsを有効成分として含有する、NASHによる肝臓の線維化を改善するための医薬組成物である。

[0095] 対象となる被験者は、好ましくは、すでに肝臓が線維化している被験者である。具体的には、好ましくは、例えば、Matteoniらの分類によれば、type 3後期からtype 4に分類される被験者（脂肪肝プラス肝細胞風船様腫大プラス肝線維化あるいはマロリー形成）である。例えば、線維化マーカー（ヒアルロン酸、IV型コラーゲン、TIMP-1など）で肝の線維化が起きていると判断される被験者が好ましい。

[0096] 本発明の第13の態様は、 $\omega 3$ PUFAsを有効成分として含有する、脂肪肝を有する被験者の肝臓の線維化を抑制するための医薬組成物である。また、 $\omega 3$ PUFAsを有効成分として含有する、NAFLD、又はNASH患者の、肝臓への移行を抑制するための医薬組成物である。本発明の非アルコール性脂肪肝の予防/改善・治療方法を用いることができる。

[0097] 本発明の第14の態様は、本願発明の $\omega 3$ PUFAsを用いるNASH又はNAFLDの予防/改善・治療方法、又は被験者の管理方法を宣伝する方法である。本願発明のNASH又はNAFLDの治療方法、又は被験者の管

理方法に用いられる $\omega 3$  P U F A sを含有する医薬組成物を宣伝する方法である。

医師や被験者に対して、本願発明のN A S H又はN A F L Dの治療方法、又は被験者の管理方法に関する情報を提供する。具体的には、被験者の一定期間における特定の脂肪酸組成の変動により、 $\omega 3$  P U F A sによるN A S H治療効果の予測・評価ができること等の情報を提供し、宣伝することができる。宣伝方法の手段は問わないが、例えば、パンフレットの配布、電子媒体の頒布、インターネットを通じた情報提供などが挙げられる。

[0098] 以上、本発明を実施するための最良の形態を説明したが、本発明の範囲から離れることなく好ましい変更を行うことが可能であることは言うまでも無い。

[0099] 以上述べてきた本発明の各態様で用いた用語について、さらに詳しく以下に説明する。

[0100] 多価不飽和脂肪酸（P U F A s）は、分子内に複数の炭素－炭素二重結合を有する脂肪酸と定義され、二重結合の位置により、 $\omega 3$ 、 $\omega 6$ などに分類される。 $\omega 3$  P U F A sとしては、 $\alpha$ －リノレン酸、E P A、ドコサヘキサエン酸（以下、D H Aと記す）などが例示される。本発明で用いられる「P U F A s」の語は、特に断らない限りは、多価不飽和脂肪酸だけでなく、その製薬上許容される塩、あるいはエステル、アミド、リン脂質、グリセリドなどの多価不飽和脂肪酸誘導体も含む意味で用いられる。

[0101] 本発明で用いられる $\omega 3$  P U F A sは、合成品、半合成品又は天然品のいずれでもよく、これらを含有する天然油の形態でもよい。ここで、天然品とは、 $\omega 3$  P U F A sを含有する天然油から公知の方法によって抽出されたもの、粗精製されたもの、あるいはそれらを更に高度に精製したものを意味する。半合成品は、微生物などにより産生された多価不飽和脂肪酸を含み、また該多価不飽和脂肪酸あるいは天然の多価不飽和脂肪酸にエステル化、エステル交換等の化学処理を施したものも含まれる。本発明では、 $\omega 3$  P U F A sとして、これらのうちの1種を単独で、あるいは2種以上を組み合わせ

用いることができる。

[0102] 本発明では、 $\omega 3$  P U F A sとして、具体的には、E P A、D H A、 $\alpha$ -リノレン酸及びこれらの製薬学上許容しうる塩及びエステルが例示される。製薬学上許容しうる塩及びエステルは、ナトリウム塩、カリウム塩などの無機塩基、ベンジルアミン塩、ジエチルアミン塩などの有機塩基、アルギニン塩、リジン塩などの塩基性アミノ酸との塩及びエチルエステル等のアルキルエステルやモノ-、ジ-及びトリ-グリセリド等のエステルが例示される。好ましくはエチルエステルであり、特にE P A-E及び・又はD H A-Eが好ましい。とりわけ好ましいのは、E P A-E（イコサペント酸エチルエステル）である。

[0103]  $\omega 3$  P U F A sの純度は特に限定されないが、通常、本剤組成物の全脂肪酸中の $\omega 3$  P U F A sの含量として、好ましくは25質量%以上、さらに好ましくは50質量%以上、さらに好ましくは70質量%以上、より好ましくは85質量%以上であり、とりわけ好ましくは本剤組成物が $\omega 3$  P U F A s以外の他の脂肪酸成分を実質的に含まない態様である。

[0104] 例えば、E P A-E及びD H A-Eを用いる場合、E P A-E/D H A-Eの組成比及び全脂肪酸中のE P A-E+D H A-Eの含量比は特に問われないが、好ましい組成比として、E P A-E/D H A-Eは、0.8以上であることが好ましく、更に好ましくは、1.0以上、より好ましくは、1.2以上である。E P A-E+D H A-Eは高純度のもの、例えば、全脂肪酸及びその誘導体中のE P A-E+D H A-E含量比が40質量%以上のものが好ましく、55質量%以上のものがさらに好ましく、84質量%以上のものがさらに好ましく、96.5質量%以上のものが更に好ましい。他の長鎖飽和脂肪酸含量は少ないことが好ましく、長鎖不飽和脂肪酸でも $\omega 6$ 系、特にアラキドン酸含量は少ないことが望まれ、2質量%未満が好ましく、1質量%未満がさらに好ましい。

[0105] 本発明の組成物に用いられるE P A-E及び・又はD H A-Eは、魚油あるいは魚油の濃縮物に比べ、飽和脂肪酸やアラキドン酸等の心血管イベント

に対して好ましくない不純物が少なく、栄養過多やビタミンA過剰摂取の問題もなく作用効果を発揮することが可能である。また、エステル体のため主にトリグリセリド体である魚油等に比べて酸化安定性が高く、通常の酸化防止剤添加により十分安定な組成物を得ることが可能である。

[0106] このEPA-Eは、日本において、閉塞性動脈硬化症（ASO）及び高脂血症治療薬として入手可能な高純度EPA-E（96.5質量%以上）含有軟カプセル剤（商品名エパデール：持田製薬社製）を用いることができる。また、EPA-EとDHA-Eの混合物は、たとえば、米国で高TG血症治療薬として市販されているロバザ（Lovaza：グラクソ・スミス・クライン：EPA-E約46.5質量%、DHA-E約37.5質量%含有する軟カプセル剤）を使用することもできる。

[0107]  $\omega 3$ PUFAsとして、精製魚油も使用できる。また、 $\omega 3$ PUFAsのモノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリドまたはこれらの組合せなども好ましい態様の一つである。例えばインクロメガ（Incro Omega）F2250、F2628、E2251、F2573、TG2162、TG2779、TG2928、TG3525及びE5015（クロダ インターナショナル ピーエルシー（Croda International PLC、Yorkshire、England））、及びEPAX6000FA、EPAX5000TG、EPAX4510TG、EPAX2050TG、EPAX7010EE、K85TG、K85EE及びK80EE（プロノバ バイオファーマ（Pronova Biopharma、Lysaker、Norway））などの種々の $\omega 3$ PUFAs、その塩及びエステルを含有する製品が市販されており、これらを手に入して使用することもできる。

[0108] 本発明の医薬組成物及び治療方法は、 $\omega 3$ PUFAsの他に、他の薬剤と組み合わせて、併用して用いられてもよい。本発明における他の薬剤は、特に限定されないが、本発明の効果を減弱しないことが好ましく、例えば、肝庇護剤、血糖降下剤、高脂血症治療薬、降圧剤、抗酸化剤、抗炎症剤などが例示される。

[0109] ここで肝庇護剤としては、例えば、ウルソデオキシコール酸やベタインがあげられる。また、血糖降下剤としては、例えば、メトホルミンのようなビグアナイド薬、インスリンやインスリン誘導体、トルブタミド、グリクラジド、グリベンクラミド、グリメピリドのようなスルホニルウレア剤、ナテグリニド、レパグリニド、ミチグリニドのような速効型インスリン分泌促進剤、アカルボース、ボグリボース、ミグリトールのような $\alpha$ グルコシダーゼ阻害剤、ピオグリタゾン、ロジグリタゾン、トログリタゾンのようなチアゾリジン類等があげられる。また、高脂血症治療薬としては、例えば、プラバスタチン、シンバスタチン、アトルバスタチン、フルバスタチン、ピタバスタチン、ロスバスタチン、セリバスタチンのようなHMG-C<sub>o</sub>A還元酵素阻害剤やシンフィブラート、クロフィブラート、クリノフィブラート、ベザフィブラート、フェノフィブラートのようなフィブラート系薬剤、あるいはオルリスタットのような脂肪分解酵素阻害剤、エゼチミブがあげられる。また、降圧剤としては、例えば、カプトプリル、アラセプリル、イミダプリル、エナラプリル、シラザプリル、テモカプリル、デラプリル、リシノプリル、ベナゼプリルのようなアンジオテンシン変換酵素阻害剤、ロサルタン、バルサルタン、カンデサルタン、テルミサルタン、オルメサルタン、イルベサルタン、エプロサルタンのようなアンジオテンシン受容体阻害剤、アリスキレンのようなレニン阻害剤、アムロジピン、ニフェジピン、ベニジピン、ニカルジピン、ニルバジピン、シルニジピン、アゼルニジピン、マニジピン、ニトレンジピン、パルニジピン、ニソルジピン、エホニジピン、フェロジピン、アラニジピン、ジルチアゼム、ベラパミル、ベプリジルのようなカルシウム拮抗剤等があげられる。また、抗酸化剤としては、例えば、ビタミンCやビタミンE等のビタミン類、Nアセチルシステイン、プロブコールなどがあげられる。また、抗炎症剤としては、例えば、ペントキシフィリン等のサイトカイン産生抑制剤、ロイコトリエン受容体拮抗剤、ロイコトリエン生合成阻害剤、NSAIDs、COX-2選択的阻害剤、M2/M3拮抗剤、コルチコステロイド、ファルネシル酸プレドニゾロンなどのステロイド、Hi（

ヒスタミン) 受容体拮抗剤、サラゾスルファピリジン、メサラジンなどのアミノサリチル酸、等があげられる。また、免疫抑制剤としては、例えば、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、タクロリムスなどがあげられる。また、C型肝炎ウイルス(HCV)用の抗ウイルス薬としては、例えば、インターフェロン、プロテアーゼ阻害剤、ヘリカーゼ阻害剤、ポリメラーゼ阻害剤などがあげられる。

[0110] 本発明において予防とは、疾患の発症を予防することのみでなく、発症時期を遅延させることおよび発症率を低下させることも含む。本発明において改善とは、疾患の何らかのパラメーターを改善することのみでなく、患者の自覚症状や生活の質(Quality of Life)を改善することを含む。また、本発明において治療とは、既に疾患を発症した患者に薬物を投与することのみでなく、疾患を発症するリスクの高い患者に薬物を投与する予防的治療も含む。

[0111] 本発明において、有効成分の「併用」とは、有効成分を組合せて用いることであり、 $\omega 3$ PUFAs及び他の薬剤を共に含む配合剤として投与すること、及び $\omega 3$ PUFAsと他の薬剤とがそれぞれ別個の製剤として同時期にもしくは時間差をおいて別々に投与されることを含む。「別個の製剤として同時期にしくは時間差をおいて別々に投与される」態様には、(1)  $\omega 3$ PUFAsを投与される被験者に、他の薬剤を有効成分として含有する組成物を投与する態様、及び(2) 他の薬剤を投与される被験者に、 $\omega 3$ PUFAs有効成分として含有する組成物を投与する態様が含まれる。また、「併用」とは必ずしも被験者の体内、例えば血中において同時に存在する場合に限られないが、本発明において「併用」とは、いずれか一方の薬剤の作用・効果が被験者の体内に発現している状態で他方の薬剤を投与する使用態様をいう。本発明の組成物を用いてNAFLDもしくはNASHに関連する疾患の予防／改善または治療効果が得られるような使用態様である。好ましくは、被験者の体内、例えば血中において同時に存在する使用態様が望ましく、また好ましくは、被験者に対して、一方の薬剤を投与してから24時間以内

に他方の薬剤を投与する使用態様が好ましい。

[0112] 本発明の医薬における併用の形態は、特に限定されず、有効成分が組み合わされていればよい。このような薬剤の形態としては、例えば（１）有効成分を同時製剤化して得られる単一の製剤の投与、（２）有効成分を別々に製剤化して得られる２種類の製剤を組合せてキットとし、または組み合わせないで別々に用意し、同一投与経路での同時投与に使用する。（３）有効成分を別々に製剤化して得られる２種類の製剤を組合せてキットとし、または組み合わせないで別々に用意し、同一投与経路で時間差をおいて投与する。（４）有効成分を別々に製剤化して得られる２種類の製剤を組合せてキットとし、または組み合わせないで別々に用意し、異なる投与経路（同一被験者の異なる部位から投与する）で同時に投与する。（５）有効成分を別々に製剤化して得られる２種類の製剤を組合せてキットとし、または組み合わせないで別々に用意し、異なる投与経路（同一被験者の異なる部位から投与する）で時間差をおいて投与する。

[0113] これらの時間差をおいて投与する場合は、例えば、 $\omega 3$  P U F A s と他の薬剤の順序での投与、または逆の順序での投与がある。同時に投与する場合、投与経路が同一であれば投与直前に両薬剤を混合してもよく、別々に投与しても良い、また種々の目的で計画的に投与時期をずらして用いることができる。具体的な例としては、一方の薬剤を投与し、その効果が発現し始める時期もしくは十分に発現している間に、他方の薬剤を投与して作用させる方法がある。また、一方の薬剤を徐放化して１日１回投与とし、他方の薬剤を１日複数回、例えば２ないし３回投与としてもよいし、同様に１日１回投与としてもよい。両薬ともに１日１回投与、さらには１日１回同時投与あるいは配合剤とすれば、被験者の服薬の負担を軽減し、服薬コンプライアンスが向上して予防／改善・治療効果及び副作用軽減効果も増すことが期待され、好ましい。また、例えば、両薬剤を投与し、その効果が発現し始める時期もしくは十分に発現している時期に、一方の薬剤の投薬を中止する方法がある。薬剤の投薬を中止する場合には、段階的に薬剤の用量を減量してもよい。ま

た、例えば、一方の薬剤の休薬期間に他方の薬剤を投与する方法が挙げられる。

[0114] 望ましくは、 $\omega 3$  P U F A s 及び他の薬剤を併用した治療効果が、併用の場合と同じ用量の $\omega 3$  P U F A s 及び他の薬剤を個々に用いて得られる治療効果の和よりも大きな効果を得られる態様が好ましい。ここでの治療効果とは、N A F L D もしくは N A S H に関連する疾患の予防／改善または治療効果あるいは肝硬変や肝癌への進行抑制であれば、特に限定されないが、上述の脂肪酸比の改善の他、例えば、画像検査（超音波、C T、M R I など）、肝生検あるいは血漿中の線維化マーカー（I V 型コラーゲン、ヒアルロン酸、T I M P - 1 等）により測定した肝線維化の程度、血清 A S T や A L T 値の減少、A S T / A L T 比の減少、アディポネクチンの増加、T N F  $\alpha$  減少、高感度 C R P の減少や血中酸化ストレスマーカー（フェリチン、チオレドキシン）の減少、H O M A - I R 改善などが例示される。その他の N A F L D もしくは N A S H に関連する生化学的・病理学的あるいは病態パラメータにより予防／改善または治療効果をモニタリングしてもよい。

[0115] 本発明の組成物に用いられる $\omega 3$  P U F A s 及び他の薬剤の投与量及び投与期間は対象となる作用を現すのに十分な量及び期間とされるが、その剤形、投与方法、1日当たりの投与回数、症状の程度、体重、年齢等によって適宜増減することができる。

[0116] 経口投与する場合は、例えば E P A - E 及び・又は D H A - E として 0. 1 ~ 1 0 g / 日、好ましくは 0. 3 ~ 6 g / 日、より好ましくは 0. 6 ~ 4 g / 日、さらに好ましくは 0. 9 ~ 2. 7 g / 日を 1 ないし 3 回に分けて投与するが、必要に応じて全量を 1 回あるいは数回に分けて投与してもよい。また、他の薬剤の投与量に応じて減量することも可能である。投与時間は食中ないし食後が好ましく、食直後（30分以内）投与が更に好ましい。上記投与量を経口投与する場合、投与期間は1年以上、好ましくは2年以上、より好ましくは3. 5年以上、更に好ましくは5年以上であるが、N A S H に関連する病態あるいは生化学的指標などが継続している間、N A S H の発症

及び・又は再発の危険度が高い状態が続いている間は投与を継続することが望ましい。また、例えば1日おきに投与する、1週間に2～3日投与する態様や、場合により1日～3ヵ月程度、好ましくは1週間～1ヵ月程度の休薬期間を設けることもできる。

[0117] 本発明の組成物に用いられる他の薬剤の投与量は、その薬剤単独での用法・用量の範囲内で使用されることが好ましいが、その種類、剤形、投与方法、1日当たりの投与回数は、症状の程度、体重、性別、年齢等によって適宜増減することができる。 $\omega 3$  P U F A s の投与量に応じて減量することも可能である。副作用軽減の観点で1日投与量をできるだけ減量し、徐放化錠を使用して1日1回投与とすることがより好ましい。上記投与量を経口投与する場合、投与期間は1年以上、好ましくは2年以上、より好ましくは3、5年以上、更に好ましくは5年以上であるが、N A S Hに関連する病態あるいは生化学的指標などが継続している間、N A S Hの発症及び・又は再発の危険度が高い状態が続いている間は投与を継続することが望ましい。また、例えば1日おきに投与する、1週間に2～3日投与する態様や、場合により1日～3ヵ月程度、好ましくは1週間～1ヵ月程度の休薬期間を設けることもできる。

[0118]  $\omega 3$  P U F A s 及び他の薬剤の併用では、 $\omega 3$  P U F A s 及び・又は他の薬剤の用量を一般的に使用される通常の用量より低く設定することも可能である。例えば、個々の薬剤を単独で治療効果を得るには不十分な用量を用いることも可能である。これにより、薬剤投与による副作用を軽減することができる利点を有する。

[0119]  $\omega 3$  P U F A s 及び・又は他の薬剤単独の用量が、治療効果を得るには不十分な用量であって、 $\omega 3$  P U F A s 及び他の薬剤を併用した治療効果が、併用の場合と同じ用量の $\omega 3$  P U F A s 及び他の薬剤を個々に用いて得られる治療効果の和よりも大きな効果を得られるような使用態様も望ましい。

[0120]  $\omega 3$  P U F A s 単独の用量が、治療効果を得るには不十分な用量とは、被験者の個々の状態や体型により変動し、限定されるものではないが、例えば

、E P A - E 及び・又はD H A - E の場合、1 日あたりの投与量が、0. 1 g 以上 2 g 未満、好ましくは 0. 2 g 以上 1. 8 g 以下、さらに好ましくは 0. 3 g 以上～0. 9 g 以下、また好ましくは、0. 3 g 以上～0. 6 g 以下である。

[0121] 他の薬剤及び $\omega$ 3 P U F A s の 1 日投与量、投与回数あるいは投与比率は、特に限定されないが、肝線維化の程度、血清 A S T や A L T の減少、A S T / A L T 比の減少、アディポネクチンの増加、T N F  $\alpha$  の減少や血中酸化ストレスマーカーの減少、H O M A - I R 改善などの検査値を確認しながら適宜増減できる。

[0122] 本発明の医薬組成物は、有効成分を化合物（精製の際に不可避免的に含まれる他の成分を含む場合もある）をそのまま投与するか、或いは一般的に用いられる適当な担体または媒体、賦形剤、結合剤、滑沢剤、着色剤、香味剤、必要に応じて滅菌水や植物油、更には無害性有機溶媒あるいは無害性溶解補助剤（たとえばグリセリン、プロピレングリコール）、乳化剤、懸濁化剤（例えばツイーン 80、アラビアゴム溶液）、等張化剤、p H 調整剤、安定化剤、無痛化剤、矯味剤、着香剤、保存剤、抗酸化剤、緩衝剤、着色剤などの添加剤と適宜選択組み合わせで適当な医薬用製剤に調製することができる。添加剤として、たとえば乳糖、部分 $\alpha$ 化デンプン、ヒドロキシプロピルセルロース、マクロゴール、トコフェロール、硬化油、ショ糖脂肪酸エステル、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、酸化チタン、タルク、ジメチルポリシロキサン、二酸化ケイ素、カルナウバロウなどを含有する。

[0123] 特に、 $\omega$ 3 P U F A s は高度に不飽和であるため、抗酸化剤たとえばブチレート化ヒドロキシトルエン、ブチレート化ヒドロキシアニソール、プロピルガレート、没食子酸、医薬として許容されうるキノン及び $\alpha$ -トコフェロールから選ばれる少なくとも 1 種を抗酸化剤として有効量含有させることが望ましい。

[0124] 製剤の剤形は、本発明の有効成分の併用形態によっても異なり、特に限定されないが、経口製剤としては、例えば、錠剤、フィルムコーティング錠、

カプセル剤、マイクロカプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、経口用液体製剤、シロップ剤、ゼリー剤、吸入剤の形で、非経口製剤としては、例えば、軟膏、坐剤、注射剤（乳濁性、懸濁性、非水性）あるいは用時乳濁または懸濁して用いる固形注射剤、輸液製剤、経皮吸収剤などの外用剤で、経口及び静脈内あるいは動脈内、吸入、直腸内、腔内あるいは外用を問わず被験者に投与されるが、経口服用できる被験者に対しては、簡便な経口製剤が望ましく、とりわけカプセルたとえば、軟質カプセルやマイクロカプセルに封入して、あるいは錠剤、フィルムコーティング錠での経口投与が好ましい。また、腸溶製剤や徐放化製剤として経口投与してもよく、透析患者や嚥下困難な患者などにはゼリー剤として経口投与することも好ましい。

[0125] 本発明の組成物は、 $\omega 3$  P U F A s と他の薬剤とを別々に製剤して得られる２種類の製剤を組み合わせる場合には、それぞれ公知の方法により製剤化する。また、本発明の組成物は、 $\omega 3$  P U F A s と他の薬剤とを有効成分とする配合剤とすることができる。

[0126] 本発明の医薬組成物を、 $\omega 3$  P U F A s と他の薬剤とを有効成分とする配合剤とする場合には、配合剤の剤形は特に限定されず、経口製剤としては、例えば、錠剤、フィルムコーティング錠、カプセル剤、マイクロカプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、経口用液体製剤、シロップ剤、ゼリー剤の形で、非経口製剤としては、例えば、注射剤、輸液製剤、経皮吸収剤などの外用剤で被験者に投与される。例えば、徐放化した製剤、あるいは、２剤を時間差で放出する製剤なども含む。

[0127] 本発明の配合剤は、有効成分に加え、薬学的に許容され得る賦形剤を含むことができる。適宜、公知の抗酸化剤、コーティング剤、ゲル化剤、矯味剤、着香剤、保存剤、抗酸化剤、乳化剤、pH調整剤、緩衝剤、着色剤などを含有させてもよい。

[0128] 本発明の配合剤は、本発明の属する技術分野における通常の知識を有する者が実施する任意の方法によって製剤化することができる。好ましくは、常法に従って製剤化することが可能である。 $\omega 3$  P U F A s の粉末は、例え

ば、(A) EPA-E、(B) 食物繊維、(C) デンプン加水分解物及び・又は低糖化還元デンプン分解物、及び(D) 水溶性抗酸化剤を含有する水中油型乳化液を、高真空下で乾燥させ、粉碎処理する(特開平10-99046)など公知の方法により得られる。得られたEPA-Eの粉体と、ビグアナイド系血糖降下薬の粉体とを用いて、好ましくは常法に従い、顆粒剤、細粒剤、散剤、錠剤、フィルムコーティング錠、チュアブル錠、徐放錠、口腔内崩壊錠(OD錠)などを得ることができる。チュアブル錠であれば、例えば、EPA-Eをヒドロキシプロピルメチルセルロースなどの水溶性高分子溶液中に乳化し、得られた乳化液を乳糖などの添加剤に噴霧して粉粒体を得(特開平8-157362)、ビグアナイド系血糖降下薬の粉体と混合して打錠することなど公知の方法により得ることができる。徐放錠であれば、例えば(1) EPA-E及びビグアナイド系血糖降下薬のいずれかを内層に、他方を外層に形成する、(2) 各成分を含有する円盤状のマトリックスを2層に重ねる、(3) 一成分を含有する粒状カプセルを他方の成分を含有するマトリックス中に埋め込む、(4) 両剤を予め混合した後に何らかの徐放のための工夫が施される、などが挙げられる。各有効成分は放出速度を調整されていることが望ましく、両剤同時に放出されてもよいし、別々に時間差で放出されてもよい。口腔内崩壊錠であれば、例えば特開平8-333243など、口腔用フィルム製剤であれば、例えば特開2005-21124など、公知の方法に準じて製造することができる。

[0129] 本発明の配合剤は、有効成分の薬理作用を発現できるように、放出、吸収されることが望ましい。本発明の配合剤は、有効成分の放出性に優れる、有効成分の吸収性に優れる、有効成分の分散性に優れる、配合剤の保存安定性に優れる、被験者の服用利便性、あるいはコンプライアンスに優れる製剤の少なくともいずれか1以上の効果を持つことが望ましい。

[0130] 本発明の組成物は、動物とりわけ哺乳動物のNAFLD、特にNASHの予防/改善または治療、再発予防あるいは肝硬変や肝癌への進行抑制に有効である。哺乳動物とは、例えば、ヒトやウシ、ウマ、ブタなどの家畜動物や

イヌ、ネコ、ウサギ、ラット、マウスなどの家庭用動物等があげられ、好ましくはヒトである。特に、糖尿病、高脂血症、高TG血症、メタボリックシンドローム、高血圧、インスリン抵抗性を有するNASH患者において好ましく用いられる。尿酸値の高い被験者、全身の炎症状態の高い被験者、 $\omega 3$  PUFAs以外に多種類の薬剤を服用している被験者、 $\omega 3$  PUFAs以外の薬剤を服用により副作用の経験のある被験者などにも有効である。また、配合剤やキット剤とすることで被験者の服薬の負担を軽減し、服薬コンプライアンスを高めることで更に予防／改善または治療効果を高めることができる。

[0131] 以下に本発明の実施例を示すが、本発明は、実施例に限定して解釈されるべきではない。

### 実施例 1

[0132] NASHと確定診断された被験者を2群（各群15例）に分けて、EPA-E群にはエパデルS900（EPA-E900mg含有）を、コントロール群にはプラセボを、それぞれ1日2回服用させる。被験者の状況に応じて投与量を適宜増減する。被験者のクライテリア、モニタリング、組織検査、統計学的解析等はAmerican Journal of Gastroenterology、2001年、第96巻、p. 2711-2717の方法に準じ、1年間の投与期間中経時的にALT、AST等の血液生化学検査、血漿中脂肪酸組成の測定を行うと共に、投与終了後に肝生検を行い、組織学的評価を行う。

[0133] EPA-E群は、コントロール群と比較して、ALT、AST等の血液生化学パラメーターの平均値は治療前に比べ低下する。また、EPA-E群では、肝組織の病理学的検査像についても、Bruntらの方法による線維化ステージの平均はステージ2から1へ改善がみられる。

[0134] EPA-E群15例の中で、Bruntらの方法によるスコアの投薬前後における変化が1または2であった症例（有効群）と0であった症例（無効群）とに分けて、1年間の投与期間中経時的な血漿中脂肪酸組成の変化を解析する。投与開始前のOA/SA比は、有効群と無効群の両群において差が

ない。投与開始から2ヶ月間におけるOA/SA比は、両群とも低下傾向を示すものの、有効群は無効群と比較して、投与開始から2ヶ月間のOA/SA比の低下率が大きい。ここで2ヶ月間のOA/SA比の低下率は、(投与開始前のOA/SA比－投与開始後2ヶ月におけるOA/SA比)/投与開始前のOA/SA比×100(%)で算出する。投与開始後2ヶ月後の時点において、有効群のOA/SA比は、無効群と比較して低値を示す。2ヶ月以降のOA/SA比の変化は、両群ともそれぞれ若干低下傾向を示すが、投与開始から2ヶ月間と比較してその変化は小さい。有効群では、ヒアルロン酸、IV型コラーゲン、TIMP-1の値が段階的に低下する。一方、無効群では、ヒアルロン酸、IV型コラーゲン、TIMP-1の値は、ほとんど変化しない。

## 実施例 2

[0135] NASHと確定診断された被験者を、過去1年以内にOA/SA比が前回の測定時と比較して上昇した被験者(OA/SA上昇群)と、それ以外の群(OA/SA非上昇群)とに分けて、EPA-E群にはエパデールS900(EPA-E900mg含有)を1日2回服用させる。被験者の状況に応じて投与量を適宜増減する。被験者のクライテリア、モニタリング、組織検査、統計学的解析等はAmerican Journal of Gastroenterology、2001年、第96巻、p. 2711-2717の方法に準じ、1年間の投与期間中経時的にALT、AST等の血液生化学検査、血漿中脂肪酸組成の測定を行うと共に、投与終了後に肝生検を行い、組織学的評価を行う。Kleinerらの方法によるNASスコアにより治療効果を評価する。

[0136] OA/SA上昇群、OA/SA下降群の両群とも、1年間の投薬によりNASスコアの改善が見られる。しかし、OA/SA上昇群では、OA/SA非上昇群と比較して、NASスコアの改善度が大きい。

## 実施例 3

[0137] 肝線維化のあるNASH患者、すなわち、Bruntらの線維化の程度(Staging)による評価でstage 1または2に分類される被験者(

15例)を集めて試験を行う。1ヶ月毎の血中OA/SA比が前回の測定値より低下するように、食事制限、運動療法を行うとともに、EPA-E900mgを1日2回投与し、1年間経過を観察する。被験者の中で、OA/SA比に変化が見られない被験者には、EPA-E900mgを1日3回投与とする。

[0138] 投与開始から1ヶ月間におけるOA/SA比低下率が5%以上であった被験者をA群とし、投与開始から1ヶ月間におけるOA/SA比低下率が1%未満であった被験者をB群とする。ここで1ヶ月間におけるOA/SA比低下率は、(投与開始前のOA/SA比-投与開始後1ヶ月におけるOA/SA比)/投与開始前のOA/SA比 × 100 (%)で算出する。

[0139] 治療開始から1年後に肝生検を実施すると、A群はStage2の被験者は1または0に、Stage1の被験者は0に、線維化が改善する。一方、B群は、わずかな線維化改善が見られるが、A群ほど改善しない。

#### 実施例 4

[0140] アディポネクチン遺伝子SNP276の型には、T/T、G/T、G/Gがあるが、G/G型の人、T/T型の人より、アディポネクチンの血中濃度が低いといわれている。

[0141] アディポネクチン遺伝子SNP276の型がG/G型のNASH患者とG/G型以外のNASH患者(各群15例)に対して、EPA-E900mg 1日2回、1年間投与する。Kleinerらの方法によるNASスコアにより1年後の治療効果を評価する。G/G型のNASH患者群、G/G型以外のNASH患者群の両群とも、1年間の投薬によりNASスコアの改善が見られる。しかし、G/G型のNASH患者群では、G/G型以外のNASH患者群と比較して、NASスコアの改善度が大きい。

#### 実施例 5

[0142] NASHと確定診断された被験者に、本発明の治療方法を用いて治療を行う。

治療開始前に被験者の血漿中脂肪酸組成を測定し、OA/SA比を算出す

ると3.5である。エパデールS900（EPA-E900mg含有）を1日2回服用させる。1ヵ月後、被験者のOA/SA比は3.5のままである。被験者に食事指導を行い、運動療法を追加する。投薬開始から3ヵ月後、被験者のOA/SA比は3.4に低下する。エパデールS900（EPA-E900mg含有）を1日3回に増量する。投薬開始から6ヵ月後、被験者のOA/SA比は3.2に低下する。その後、食事制限、運動療法を継続するとともに、エパデールS900（EPA-E900mg含有）を1日3回の投薬も継続する。OA/SA比は3.2、3.1付近で維持される。

- [0143] 1年間の投与期間中経時的にALT、AST等の血液生化学検査、血漿中脂肪酸組成の測定を行うと共に、投与終了後に肝生検を行い、組織学的評価を行う。Bruntらの方法による線維化ステージの平均はステージ2から1へ改善がみられる。ALT、AST、ヒアルロン酸、IV型コラーゲン、TIMP-1の値も1年間にわたり低下する。

## 実施例 6

- [0144] 肝生検によりNASHと診断された被験者30例を2群に分けて、治療群20例には高純度EPA-E（96.5質量%以上 商品名：エパデールS）2700mg/日、コントロール群10例にはプラセボを12ヶ月間投薬する。

被験者は、投薬開始前、投薬開始から1ヶ月後、3ヶ月後、6ヵ月後、12ヵ月後等の時点で、次の各種検査が実施され、治療効果が評価される。

検査項目は、血漿中総脂肪酸、血漿中遊離脂肪酸、肝臓超音波、体重、ALT、AST、HbA1c、血糖値、HOMA-IR、TNF $\alpha$ 、sTNF-R1、R2、フェリチン、チオレドキシン、TGF- $\beta$ 1、TIMP-1、ヒアルロン酸、などであり、適宜選択される。被験者の治療効果は、投薬開始から12ヵ月後に、NASスコアにより評価される。

治療群は、コントロール群と比較して、投薬開始から12ヶ月後の平均のNASスコア改善度が大きい。 $\omega$ 3PUFAsはNASH治療薬として有用である。

- [0145] 治療群20例において、NASスコア改善度と、投薬開始から1ヶ月間の血

中脂肪酸比の変動との関係を見る。投薬開始から1ヶ月間の血中脂肪酸比の変動は、投薬開始前と、 $\omega 3$  P U F A sの投薬開始から1ヵ月後の血中脂肪酸濃度を測定し、

(1) オレイン酸／ステアリン酸比、(2) ステアリン酸／パルミチン酸比、

(3) オレイン酸／パルミチン酸比、(4) パルミトレイン酸／パルミチン酸比

のうちのいずれか1以上の比を算出し、投薬開始前と、投薬開始から1ヶ月後の数値を比較する。

N A Sスコアが改善している被験者、すなわち、 $\omega 3$  P U F A sを投薬することにより、N A S H治療効果の得られる被験者の、投薬開始から1ヶ月後の前記血中脂肪酸濃度の比は、投薬開始前と比較して低下する。

すなわち、特に、投薬開始から1ヶ月後のオレイン酸／ステアリン酸比が、投薬開始前の数値と比較して低下している被験者は、 $\omega 3$  P U F A sの投薬によりN A S H治療効果の得られる被験者であり、このような被験者を対象に $\omega 3$  P U F A sの投与を継続して、N A S Hの治療をすることができる。

N A Sスコア改善度がより大きい被験者、すなわち、 $\omega 3$  P U F A sを投薬することにより、より大きなN A S H治療効果の利益を得られる被験者は、投薬開始から1ヶ月間の前記血中脂肪酸比の低下率が大きい傾向がみられる。 $\omega 3$  P U F A sにより治療効果が得られるかどうかは、投薬開始前と、投薬開始から1ヵ月後の血中脂肪酸を測定し、特定の血中脂肪酸比の低下率をみることによって予測可能である。

[0146] 前記血中脂肪酸比の算出に用いられる血中脂肪酸は、血漿中総脂肪酸、血漿中遊離脂肪酸のいずれを用いてもよい。また、血中脂肪酸比の低下率は、投薬開始前と一定期間投薬後の変動の比較のみではなく、投薬期間内における一定期間の変動を比較してもよい。

$\omega 3$  P U F A sの投薬によるN A S H治療効果は、血中脂肪酸比の変動の

みではなく、 $\text{TNF } \alpha$ 、フェリチン、チオレドキシン、TIMP-1、 $\text{TGF-} \beta \text{ 1}$ などを適宜組み合わせて、総合的に評価してもよい。

## 請求の範囲

- [請求項1] 被験者の血漿中のオレイン酸／ステアリン酸比、ステアリン酸／パルミチン酸比、及びオレイン酸／パルミチン酸比からなる群から選ばれる1以上の値を被験者の状態、又は治療効果を評価するための指標として投与される、 $\omega$ 3多価不飽和脂肪酸、その製薬学上許容しうる塩及びエステルからなる群から選ばれる少なくとも一つを有効成分として含有する非アルコール性脂肪肝炎予防及び・又は治療用の医薬組成物。
- [請求項2] 被験者の血漿中オレイン酸／ステアリン酸比、ステアリン酸／パルミチン酸比、及びオレイン酸／パルミチン酸比からなる群から選ばれる1以上の値を、被験者の状態、又は治療効果を評価するための指標として用いる、該被験者に $\omega$ 3多価不飽和脂肪酸、その製薬学上許容しうる塩及びエステルからなる群から選ばれる少なくとも一つを有効成分として含有する医薬組成物を投与する、非アルコール性脂肪肝炎の予防／改善・治療方法。
- [請求項3] (1) 被験者の血漿中オレイン酸／ステアリン酸比、ステアリン酸／パルミチン酸比及びオレイン酸／パルミチン酸比からなる群から選ばれる1以上の値を算出し、  
(2) 該被験者に $\omega$ 3多価不飽和脂肪酸、その製薬学上許容しうる塩及びエステルからなる群から選ばれる少なくとも一つを有効成分として含有する医薬組成物を一定期間投与し、  
(3) その後、再び、該被験者の血漿中オレイン酸／ステアリン酸比、ステアリン酸／パルミチン酸比、オレイン酸／パルミチン酸比から選ばれる1以上の値を算出し、  
(4) 医薬組成物の投与前後の、オレイン酸／ステアリン酸比、ステアリン酸／パルミチン酸比及びオレイン酸／パルミチン酸比からなる群から選ばれる1以上の値を比較して、被験者の状態、または治療効果を評価し、

(5) その評価に基づいて該被験者に該医薬組成物を投与する、

(6) 非アルコール性脂肪肝炎の予防／改善・治療方法。

[請求項4]

(1) 被験者の血漿中のオレイン酸／ステアリン酸比、ステアリン酸／パルミチン酸比、オレイン酸／パルミチン酸比の少なくとも1つについて第1の決定を得る、

(2) 該被験者に $\omega$ 3多価不飽和脂肪酸、その製薬学上許容しうる塩及びエステルからなる群から選ばれる少なくとも一つを有効成分として含有する医薬組成物を投与する、

(3) 該被験者の血漿中のオレイン酸／ステアリン酸比、ステアリン酸／パルミチン酸比、オレイン酸／パルミチン酸比の少なくとも1つについて第2の決定を得る、

(4) 該被験者の状態を評価するために、第1の決定と第2の決定とを比較する、

(5) 非アルコール性脂肪肝炎の予防／改善・治療に適する該医薬組成物の適切な治療的用量を決定するために、第1と第2の決定の比較に基づいて、該被験者の治療を評価するステップを含む、

(6) 非アルコール性脂肪肝炎に罹患している被験者の、非アルコール性脂肪肝炎を予防／改善・治療する方法。

[請求項5]

非アルコール性脂肪肝炎、またはNAFLD患者の血漿中オレイン酸／ステアリン酸比、ステアリン酸／パルミチン酸比及びオレイン酸／パルミチン酸比からなる群から選ばれる1以上を低下させるための、 $\omega$ 3多価不飽和脂肪酸、その製薬学上許容しうる塩及びエステルからなる群から選ばれる少なくとも一つを有効成分として含有する、非アルコール性脂肪肝炎、又はNAFLD患者の血中脂肪酸組成改善用医薬組成物。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/060797

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/202(2006.01)i, A61K31/232(2006.01)i, A61P1/16(2006.01)i, A61P3/06(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)

A61K31/202, A61K31/232, A61P1/16, A61P3/06

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 | 1996-2009 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2009 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2009 |

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

BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                            | Relevant to claim No. |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X<br>Y    | WO 2007/81773 A2 (RELIANT PHARMACUETICALS, INC.),<br>19 July, 2007 (19.07.07),<br>Claims 1 to 54<br>& US 2007/0265340 A1 & EP 1973536 A                                                                                                       | 1, 5<br>1, 5          |
| X<br>Y    | M. CAPANNI, Prolonged n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation ameliorates hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a pilot study, Alimentary Pharmacology and Therapeutics, Vol.23, 2006, Pages 1143-1151 | 1, 5<br>1, 5          |

☒ 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  
29 June, 2009 (29.06.09)

Date of mailing of the international search report  
07 July, 2009 (07.07.09)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/060797

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                     | Relevant to claim No. |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y         | ALLARD JOHANE, Alteration in fatty acid composition in liver biopsies of patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) compared to those with reported normal liver biopsy, Gastroenterology, Vol.130, No.4, 2006, Page A595 | 1,5                   |
| A         | WO 2008/21192 A2 (LIPOMICS TECHNOLOGIES, INC.), 21 February, 2008 (21.02.08), Full text & EP 2057473 A                                                                                                                                 | 1,5                   |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/060797

## 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.: 2 - 4  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 2 to 4 include the methods for treatment of the human body by surgery or therapy.
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:

The inventions of claims 1 and 5 are not novel, as disclosed in WO 2007/81773 A2 and M. CAPANNI, Alimentary Pharmacology and Therapeutics, Vol.23, 2006, Pages 1143-1151. Therefore, the inventions have no special technical feature.

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

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K31/202 (2006.01) i, A61K31/232 (2006.01) i, A61P1/16 (2006.01) i, A61P3/06 (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 (I P C))

Int.Cl. A61K31/202, A61K31/232, A61P1/16, A61P3/06

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   | 1 9 2 2 - 1 9 9 6 年 |
| 日本国公開実用新案公報 | 1 9 7 1 - 2 0 0 9 年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1 9 9 6 - 2 0 0 9 年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1 9 9 4 - 2 0 0 9 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)

BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>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<br>請求項の番号 |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| X<br>Y          | WO 2007/81773 A2 (RELIANT PHARMACUETICALS, INC.) 2007.07.19, 請求項 1 - 5 4 & US 2007/0265340 A1 & EP 1973536 A                                                                                                                                  | 1, 5<br>1, 5   |
| X<br>Y          | M. CAPANNI, Prolonged n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation ameliorates hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a pilot study, Alimentary Pharmacology and Therapeutics, Vol.23, 2006, Pages 1143-1151 | 1, 5<br>1, 5   |

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 9 . 0 6 . 2 0 0 9

国際調査報告の発送日

0 7 . 0 7 . 2 0 0 9

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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)

長部 喜幸

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 2

4 C

3 2 2 9

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                                                                                                                        |                |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 引用文献の<br>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<br>請求項の番号 |
| Y                     | ALLARD JOHANE, Alteration in fatty acid composition in liver biopsies of patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) compared to those with reported normal liver biopsy, Gastroenterology, Vol.130, No.4, 2006, Page A595 | 1,5            |
| A                     | WO 2008/21192 A2 (LIPOMICS TECHNOLOGIES, INC.) 2008.02.21, 全文 & EP 2057473 A                                                                                                                                                           | 1,5            |

## 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 2-4 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、  
請求項2-4は、人の身体の手術又は治療による処置を包含するものである。
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ろの国際調査機関は認めた。

請求項1、5に係る発明は、W0 2007/81773 A2、及び、M. CAPANNI, Alimentary Pharmacology and Therapeutics, Vol.23, 2006, Pages 1143-1151に記載されており、新規性が認められないから、特別な技術的特徴を有しない。

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。