

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-509603

(P2015-509603A)

(43) 公表日 平成27年3月30日(2015.3.30)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/92 (2006.01)	GO 1 N 33/92	Z 2 G O 4 5
GO 1 N 33/66 (2006.01)	GO 1 N 33/92	A
	GO 1 N 33/66	A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 66 頁)

(21) 出願番号	特願2014-560509 (P2014-560509)	(71) 出願人	508020155
(86) (22) 出願日	平成25年3月8日 (2013.3.8)		ビーエーエスエフ ソシエタス・ヨーロッパ
(85) 翻訳文提出日	平成26年11月6日 (2014.11.6)		ア
(86) 国際出願番号	PCT/IB2013/051862		B A S F S E
(87) 国際公開番号	W02013/132467		ドイツ連邦共和国 ルートヴィヒスハーフェン (番地なし)
(87) 国際公開日	平成25年9月12日 (2013.9.12)		D-67056 Ludwigshafen, Germany
(31) 優先権主張番号	12158827.1	(74) 代理人	100091096
(32) 優先日	平成24年3月9日 (2012.3.9)		弁理士 平木 祐輔
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100118773
(31) 優先権主張番号	61/608,672		弁理士 藤田 節
(32) 優先日	平成24年3月9日 (2012.3.9)	(74) 代理人	100122389
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 新井 栄一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肝疾患を評価するための手段および方法

(57) 【要約】

本発明は、肝障害の診断、および化合物のリスク層別のための毒物学的評価の分野に関する。特に、本発明は肝障害の診断方法に関する。本発明はまた、被験者において或る化合物がそのような肝障害を誘導しうるかどうかを決定するための方法、および肝障害の治療用の薬物の特定方法に関する。更に、本発明は肝障害の診断用の装置およびキットに関する。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

(a) 造血毒性に罹患していると疑われる被験者の試験サンプルにおいて、表1、2、3a、3b、4a、4b、7a、7b、7cまたは7dのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカーの量を決定し、

(b) 工程(a)において決定された量を参照体と比較することを含み、それにより肝障害が診断されることとなる、肝障害を診断するための方法。

## 【請求項 2】

被験者が、肝障害を誘導しうると疑われる化合物に接触された、請求項1記載の方法。

## 【請求項 3】

(a) 肝障害を誘導しうると疑われる化合物と接触された被験者のサンプルにおいて、表1、2、3a、3b、4a、4b、7a、7b、7cまたは7dのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカーの量を決定し、

(b) 工程(a)において決定された量を参照体と比較し、それにより、該化合物が肝障害を誘導する可能性を決定することを含む、被験者において或る化合物が肝障害を誘導しうかどうかを決定する方法。

## 【請求項 4】

化合物が、1-メチル-2-ピロリドン、ベザフィブラート (Bezafibrate)、カルベンダジム (Carbendazim)、ジメチルホルムアミド、ジモキシストロビン (Dimoxystrobin)、メタザクロル (Metazachlor)、N-アセチル-p-アミノフェノール、Wy-14643、17-アルファ-エチニルエストラジオール、17-アルファ-エチニルエストラジオール、タモキシフェン (Tamoxifen) および塩酸テトラサイクリンからなる群から選択される少なくとも1つの化合物である、請求項2または3記載の方法。

## 【請求項 5】

参照体が、(i) 肝障害に罹患している被験者または被験者群、あるいは(ii) 1-メチル-2-ピロリドン、ベザフィブラート、カルベンダジム、ジメチルホルムアミド、ジモキシストロビン、メタザクロル、N-アセチル-p-アミノフェノール、Wy-14643、17-アルファ-エチニルエストラジオール、17-アルファ-エチニルエストラジオール、タモキシフェンおよび塩酸テトラサイクリンからなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触された被験者または被験者群に由来する、請求項1~4のいずれか1項記載の方法。

## 【請求項 6】

試験サンプルと参照体とにおける、バイオマーカーに関する実質的に同じ量が、肝障害の指標となる、請求項5記載の方法。

## 【請求項 7】

参照体が、(i) 肝障害に罹患していないことが知られている被験者または被験者群、あるいは(ii) 1-メチル-2-ピロリドン、ベザフィブラート、カルベンダジム、ジメチルホルムアミド、ジモキシストロビン、メタザクロル、N-アセチル-p-アミノフェノール、Wy-14643、17-アルファ-エチニルエストラジオール、17-アルファ-エチニルエストラジオール、タモキシフェンおよび塩酸テトラサイクリンからなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触されていない被験者または被験者群に由来する、請求項1~4のいずれか1項記載の方法。

## 【請求項 8】

参照体が被験者集団におけるバイオマーカーに関する計算参照体である、請求項1~4のいずれか1項記載の方法。

## 【請求項 9】

参照体と比較して試験サンプルにおいて異なる、バイオマーカーの量が、肝障害の指標となる、請求項7または8記載の方法。

## 【請求項 10】

(a) 肝障害を治療しうると疑われる候補物質に接触された、肝障害に罹患している被験者のサンプルにおいて、表1、2、3a、3b、4a、4b、7a、7b、7cまたは7dのいずれかから

10

20

30

40

50

選択される少なくとも1つのバイオマーカーの量を決定し、

(b) 工程(a)において決定された量を参照体と比較し、それにより、肝障害を治療しうる物質を特定する工程を含む、肝障害を治療するための物質を特定する方法。

【請求項11】

参照体が、(i) 肝障害に罹患している被験者または被験者群、あるいは(ii) 1-メチル-2-ピロリドン、ベザフィブラート、カルベンダジム、ジメチルホルムアミド、ジモキシストロピン、メタザクロル、N-アセチル-p-アミノフェノール、Wy-14643、17-アルファ-エチニルエストラジオール、17-アルファ-エチニルエストラジオール、タモキシフェンおよび塩酸テトラサイクリンからなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触された被験者または被験者群に由来する、請求項10記載の方法。

10

【請求項12】

試験サンプルと参照体とにおいて異なる、バイオマーカーに関する量が、肝障害を治療しうる物質の指標となる、請求項11記載の方法。

【請求項13】

参照体が、(i) 肝障害に罹患していないことが知られている被験者または被験者群、あるいは(ii) 1-メチル-2-ピロリドン、ベザフィブラート、カルベンダジム、ジメチルホルムアミド、ジモキシストロピン、メタザクロル、N-アセチル-p-アミノフェノール、Wy-14643、17-アルファ-エチニルエストラジオール、17-アルファ-エチニルエストラジオール、タモキシフェンおよび塩酸テトラサイクリンからなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触されていない被験者または被験者群に由来する、請求項10記載の方法。

20

【請求項14】

参照体が被験者集団におけるバイオマーカーに関する計算参照体である、請求項10記載の方法。

【請求項15】

試験サンプルと参照体とにおける、バイオマーカーに関する実質的に同じ量が、肝障害を治療しうる物質の指標となる、請求項13または14記載の方法。

【請求項16】

被験者のサンプルにおいて肝障害を診断するための、表1、2、3a、3b、4a、4b、7a、7b、7cまたは7dのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカーあるいは該バイオマーカーに関する検出剤の使用。

30

【請求項17】

(a) サンプル中に存在するバイオマーカーの量の決定を可能にする、表1、2、3a、3b、4a、4b、7a、7b、7cまたは7dのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカーに関する検出剤を含む分析用ユニット、および、機能しうる形でそれに連結された、(b) 分析用ユニットにより決定された前記の少なくとも1つのバイオマーカーの量を保存参照体と比較し、それにより肝障害を診断することを可能にするデータプロセッサおよび保存参照体を含む評価ユニットを含む、肝障害に罹患していると疑われる被験者のサンプルにおいて肝障害を診断するための装置。

【請求項18】

保存参照体が、肝障害に罹患していることが知られている被験者または被験者群、あるいは1-メチル-2-ピロリドン、ベザフィブラート、カルベンダジム、ジメチルホルムアミド、ジモキシストロピン、メタザクロル、N-アセチル-p-アミノフェノール、Wy-14643、17-アルファ-エチニルエストラジオール、17-アルファ-エチニルエストラジオール、タモキシフェンおよび塩酸テトラサイクリンからなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触された被験者または被験者群に由来する参照体であり、該データプロセッサが、該分析用ユニットにより決定された少なくとも1つのバイオマーカーの量を該保存参照体と比較するための命令を実行し、ここで、参照体と比較した場合の試験サンプルにおける少なくとも1つのバイオマーカーの実質的に同じ量が肝障害の存在の指標となり、あるいは、参照体とは異なる、試験サンプルにおける少なくとも1つのバイオマーカーの量が、

40

50

肝障害の非存在の指標となる、請求項17記載の装置。

【請求項19】

保存参照体が、肝障害に罹患していないことが知られている被験者または被験者群、あるいは1-メチル-2-ピロリドン、ベザフィブラート、カルベンダジム、ジメチルホルムアミド、ジモキシストロピン、メタザクロル、N-アセチル-p-アミノフェノール、Wy-14643、17-アルファ-エチニルエストラジオール、17-アルファ-エチニルエストラジオール、タモキシフェンおよび塩酸テトラサイクリンからなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触されていない被験者または被験者群に由来する参照体であり、該データプロセッサが、該分析用ユニットにより決定された少なくとも1つのバイオマーカーの量を該保存参照体と比較するための命令を実行し、ここで、参照体とは異なる、試験サンプルにおける少なくとも1つのバイオマーカーの量が、肝障害の存在の指標となり、あるいは、参照体と比較した場合の試験サンプルにおける少なくとも1つのバイオマーカーの実質的に同じ量が肝障害の非存在の指標となる、請求項17記載の装置。

10

【請求項20】

肝障害を診断するためのキットであって、該キットが、表1、2、3a、3b、4a、4b、7a、7b、7cまたは7dのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカーに関する検出剤と、前記の少なくとも1つのバイオマーカーに関する標準体とを含み、その濃度が、(i)肝障害に罹患していることが知られている被験者または被験者群、あるいは1-メチル-2-ピロリドン、ベザフィブラート、カルベンダジム、ジメチルホルムアミド、ジモキシストロピン、メタザクロル、N-アセチル-p-アミノフェノール、Wy-14643、17-アルファ-エチニルエストラジオール、17-アルファ-エチニルエストラジオール、タモキシフェンおよび塩酸テトラサイクリンからなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触された被験者または被験者群から誘導され、あるいは(ii)肝障害に罹患していないことが知られている被験者または被験者群、あるいは1-メチル-2-ピロリドン、ベザフィブラート、カルベンダジム、ジメチルホルムアミド、ジモキシストロピン、メタザクロル、N-アセチル-p-アミノフェノール、Wy-14643、17-アルファ-エチニルエストラジオール、17-アルファ-エチニルエストラジオール、タモキシフェンおよび塩酸テトラサイクリンからなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触されていない被験者または被験者群から誘導される、キット。

20

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

本発明は、肝障害の診断、および化合物のリスク層別のための毒物学的評価の分野に関する。特に、本発明は肝障害の診断方法に関する。本発明はまた、被験者において或る化合物がそのような肝障害を誘導しうるかどうかを決定するための方法、および肝障害の治療用の薬物の特定方法に関する。更に、本発明は肝障害の診断用の装置およびキットに関する。

【背景技術】

【0002】

中毒は、しばしば、身体の代謝的に活性な主要臓器としての肝臓を冒す。最近、パラセタモールおよび類似作用薬またはペルオキシソーム増殖因子活性化受容体に対するアゴニストにより引き起こされうる幾つかの特定の型の肝毒性が確認された。

40

【0003】

パラセタモール毒性はパラセタモール(アセトアミノフェンとも称される)の過剰投与により生じる。パラセタモール中毒の主な帰結は肝障害であり、したがって、パラセタモール毒性は全世界における中毒の最も一般的な原因の1つである。更に、それは、特に米国においては、急性肝不全の最も一般的な原因であると報告されている(Larson 2005, *Hepatology* (Baltimore, Md.) 42 (6): 1364-72; Ryder 2001, *Clinical research* (ed.) 322 (7281): 290-2)。パラセタモール毒性および有害な肝毒性のリスクは血中パラセタモールレベルに基づいて診断されうる(Rumack 1975, *Pediatrics* 55 (6): 871-76)。し

50

かし、パラセタモールレベルは、パラセタモールにより実際に引き起こされる毒性を診断するために用いることができるに過ぎず、類似作用薬または化合物により引き起こされる毒性を診断するためには用いることができない。AST、ALT、ビリルビンおよび凝固遅延、特にプロトロンビン時間の上昇のような臨床パラメータもパラセタモール毒性において観察されうる。しかし、これらの臨床パラメータは必ずしもパラセタモール型中毒に特異的ではない。Bartlett 2004, *Journal of emergency nursing: JEN* (Emergency Department Nurses Associationの正式刊行物) 30 (3): 281-3。

【 0 0 0 4 】

ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPAR) は、種々の遺伝子の発現を調節する転写因子として機能する核内受容体タンパク質の一群である。PPARは細胞の発生および分化、代謝、炎症ならびに腫瘍形成の調節において必須の役割を果たしている。PPARアゴニストを識別するための、それほど包括的ではないが類似した高感度かつ特異的方法は、それぞれの受容体の活性化に関連した毒物学的作用の検出および早期診断に役立つであろう (Babaev, V.R.; Yancey, P.G.; Ryzhov, S.V.; Kon, V.; Breyer, M.D.; Magnuson, M.A., Fazio, S.; Linton, M.F. (2005) Conditional knockout of macrophage PPARgamma increases atherosclerosis in C75BL/6 and low-density lipoprotein receptor-deficient mice- *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25, 1647-1653; Berger, J.; Moller, D.E. (2002) The mechanism of action of PPARs. *Annu Rev Med*, 53, 409-435; Cheung, C.; Akiyama, T.E.; Ward, J.M.; Nicol, C.J.; Feigenbaum, L.; Vinson, C.; Gonzalez, F.J. (2004) Diminished hepatocellular proliferation in mice humanized for the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ . *Cancer Res*, 64, 3849-3854; Coleman, R.A.; Lewin, T.M.; Van Horn, C.G.; Gonzalez-Baro, M.R. (2002) Do long-chain acyl-CoA synthetases regulate fatty acid entry into synthetic versus degradative pathways? *J Nutr*, 132, 2123-2126; Devchand, P.R.; Keller, H.; Peters, J.M.; Vazquez, M.; Gonzalez, F.J.; Wahli, W. (1996) The PPAR $\alpha$ -leukotriene B<sub>4</sub> pathway to inflammation control. *Nature*, 384, 39-43; Ehrenborg, E.; Krook, A. (2009) Regulation of skeletal muscle physiology and metabolism by peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ . *Pharmacological Reviews*, 61(3), 373-393; Feige, J.N.; Gelman, L.; Michalik, L.; Desvergne, B.; Wahli, W. (2006) From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog. Lipid. Res.*, 45 (2), 120-159; Guan, Y.; Hao, C.; Cha, D.R.; Rao, R.; Lu, W.; Kohan, D.E.; Magnuson, M.A.; Redha, R.; Zhang, Y.; Breyer, M.D. (2005) Thiazolidinediones expand body fluid volume through PPARgamma stimulation and ENaC-mediated renal salt absorption. *Nat Med*, 11, 861-866; Heikkinen, S.; Auwerx, J.; Argmann, C.A. (2007) PPARgamma in human and mouse physiology. *Biochim Biophys Acta*, 1771 (8), 999-1013; Kawaguchi, H.; Akune, T.; Yamaguchi, M.; Ohba, S.; Ogata, N.; Chung, U.I.; Kubota, N.; Terauchi, Y.; Kadowaki, T.; Nakamura, K. (2005) Distinct effects of PPARgamma insufficiency on bone marrow cells, osteoblasts, and osteoclastic cells. *J Bone Miner Metab*, 23, 275-279; Lefebvre, P.; Chinetti, G.; Fruchart, J.C.; Staels, B. (2006) Sorting out the roles of PPAR in energy metabolism and vascular homeostasis. *J Clin Invest*, 116, 571-580; Marlow, L.A.; Reynolds, L.A.; Cleland, A.S.; Cooper, S.J.; Gumz, M.L.; Kurakata, S.; Fujiwara, K.; Zhang, Y.; Sebo, T.; Grant, C.; McIver, B.; Wadsworth, J.T.; Radisky, D.C.; Smallridge, R.C.; Copland, J.A. (2009) Reactivation of suppressed RhoB is a critical step for the inhibition of anaplastic thyroid cancer growth. *Cancer Res*, 69 (4), 1536-1544; Michalik, L.; Auwerx, J.; Berger, J.P.; Chatterjee, V.K.; Glass, C.K.; Gonzales, F.J.; Grimaldi, P.A.; Kadowaki, T.; Lazar, M.A.; O'Rahilly, S.; Palmer, C.N.; Plutzky, J.; Reddy, J.K.; Spiegelmann, B.M.; Staels, B.; Wahli, W. (2006). *International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptor*

s. Pharmacol Rev 58 (4), 726-741; Peraza, M.A.; Burdick, A.D.; Marin, H.E.; Gonzalez, F.J.; Peters, J.M. (2006) The toxicology of ligands for peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR), 90 (2), 269-295; Ramanan, S.; Kooshki, M.; Zhao, W.; Hsu, F.C.; Robbins, M.E. (2008) PPARalpha ligands inhibit radiation-induced microglial inflammatory responses by negatively regulating NF-kappaB and AP-1 pathways. Free Radic Biol Med, 45, 1695-1704; Reddy, J.K.; Hashimoto, T. (2001) Peroxisomal  $\alpha$ -oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ : an adaptive metabolic system. Annu Rev Nutr, 21, 193-230; Varga, T.; Czimmerer, Z.; Nagy, L. (2011) PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. Biochim Biophys Acta, 1812 (8), 1007-1022; Vidal-Puig, A.J.; Considine, R.V.; Jimenez-Linan, M.; Werman, A.; Pories, W.J.; Caro, J.F.; Flier, J.S (1997) Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. J Clin Invest, 99, 2416-2422; Ye Idandi, A.V.; Rao, M.S.; Reddy, J.K. (2000) Hydrogen peroxide generation in peroxisome proliferator-induced oncogenesis. Mutat res, 448, 159-177; Yu, S.; Reddy, J.K. (2007) Transcription coactivators for peroxisome proliferator-activated receptors. Biochim Biophys Acta, 1771 (8), 936-951を参照されたい)。

10

## 【0005】

PPARはレチノイドX受容体 (RXR) とヘテロ二量体を形成し、遺伝子のプロモーター領域 (すなわち、PPRE: ペルオキシソーム増殖因子ホルモン応答配列) に結合して、標的遺伝子の転写を増強または低減する。PPARのこの機能は内因性または外因性リガンド、コアクチベーターまたはコリプレッサータンパク質の結合により修飾されうる (YuおよびReddy, 前掲)。

20

## 【0006】

3つのタイプのPPARが特定されており、これらは、その組織分布において、それらの生理的機能において、および受容体発現をモジュレーションし潜在的副作用を誘導するリガンドの種類において異なる。

## 【0007】

PPAR $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) 発現は主に肝臓において見出されるが、心筋細胞、骨格筋細胞、腎臓の近位尿細管上皮細胞、ならびにマクロファージ、リンパ球および顆粒球を含む免疫細胞のような多数の他の細胞型においても存在する (Vargasら, 前掲)。PPAR $\alpha$  は酵素活性化により肝臓における脂肪酸のミトコンドリアおよびペルオキシソーム酸化ならびにミクロソーム酸化を調節する (ReddyおよびHashimoto, 前掲; Colemanら, 前掲)。更に、PPAR $\alpha$  リガンドはVLDL産生を低下させ、LDL粒子形成を減少させ、HDL粒子形成を増加させ、過剰コレステロールの肝排除を増加させ、肝臓および筋肉におけるリポタンパク質リパーゼ転写をアップレギュレーションし、これはトリグリセリド加水分解の増進を招く (Lefebvreら, 2006)。PPAR $\alpha$  は飢餓および寒冷馴化中に活性化されて、脂肪酸異化からエネルギーを与える (Vargaら, 前掲)。

30

## 【0008】

走化性炎症性エイコサノイドとしてのロイコトリエンB4は内因性リガンドとしてのPPAR $\gamma$  に結合して、それ自身の分解を誘導して、炎症応答をダウンレギュレーションする (Devchandら, 前掲)。また、PPAR $\gamma$  リガンドはIL-1、TNF $\alpha$ 、COX-2およびiNOSのような炎症性メディエーターのレベルを低下させる (Ramananら, 前掲)。PPAR $\gamma$  の活性化のための典型的な外因性リガンドはフィブラートである。

40

## 【0009】

PPAR $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) は2つのアイソフォーム、すなわち、遍在的に発現されるPPAR $\gamma$  1および発現が主に脂肪組織に限定されるPPAR $\gamma$  2として生じる (Vidal-Puigら, 前掲)。PPAR $\gamma$  は十分な栄養状態で活性化され、脂肪組織の発生、脂肪酸合成および主要グルコース利用組織 (例えば、骨格筋; Vargaら, 前掲) のインスリン感受性を調節する。更に、P

50

PAR はプロスタグランジンJ2のような内因性リガンドによる活性化の後で炎症をモジュレーションして (Marlowら, 前掲)、マクロファージからのコレステロール流出を刺激し、単球リクルートメントを抑制する (Babaevら, 前掲)。最後に、PPAR 抑制は骨芽細胞形成を促進する (Kawaguchiら, 前掲)。PPAR を活性化する化合物群はチアゾリジンジオンを含む。

【0010】

PPARベータ/デルタ (PPAR / ) は普遍的に発現される。主として、それは脂質およびリポタンパク質代謝、ミトコンドリア呼吸、骨格筋脂質酸化および骨格筋繊維の決定、発熱ならびに炎症および創傷治癒を調節する (EhrenborgおよびKrook, 前掲)。

【0011】

PPAR活性化化合物の毒性に関しては、受容体依存性メカニズムと受容体非依存性メカニズムとが識別される必要がある (Perazaら, 前掲)。

【0012】

PPAR 活性化は、げっ歯類においては肝癌発生を誘導するが、肝細胞においてヒトPPARのみを発現するマウスにおいては誘導せず、このことは受容体活性化の役割を証明している (Cheungら, 前掲)。PPAR により引き起こされるペルオキシソーム脂肪酸酸化系の大規模誘導は酸化ストレスを招いてDNA損傷を誘導し、これは肝腫瘍の形成を引き起こすと仮定される (Yeldandiら, 前掲)。

【0013】

PPAR 活性化リガンドは心肥大およびそれに続く心不全を引き起こす。腎上皮ナトリウムチャンネルのPPAR 依存的発現はナトリウム吸収の増加を招き、ついで流体中体積の増加およびそれに続く心負担過多を招くと考えられる (Guanら, 前掲)。

【0014】

リガンドによりモジュレーションされるPPARのタイプを識別する確立された方法はノックアウトマウスへのそれらの投与である (Heikkinenら, 前掲; Perazaら, 前掲; Vargara, 前掲)。PPARアゴニストを識別するための、それほど包括的ではないが類似した高感度かつ特異的方法は、それぞれの受容体の活性化に関連した毒物学的作用の検出および早期診断に役立つであろう

化合物の毒物学的特性、特に肝障害を、効率的な且つ信頼しうる様態で評価するための高感度かつ特異的方法は未だ利用できないが、それでも高く評価されるものであろう。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0015】

【非特許文献1】Larson 2005, *Hepatology* (Baltimore, Md.) 42 (6): 1364-72;

【非特許文献2】Ryder 2001, *Clinical research* (ed.) 322 (7281): 290-2

【非特許文献3】Rumack 1975, *Pediatrics* 55 (6): 871-76

【非特許文献4】Bartlett 2004, *Journal of emergency nursing: JEN* (Emergency Department Nurses Associationの正式刊行物) 30 (3): 281-3

【非特許文献5】Babaev, V.R.; Yancey, P.G.; Ryzhov, S.V.; Kon, V.; Breyer, M.D.; Magnuson, M.A., Fazio, S.; Linton, M.F. (2005) Conditional knockout of macrophage PPARgamma increases atherosclerosis in C75BL/6 and low-density lipoprotein receptor-deficient mice- *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25, 1647-1653;

【非特許文献6】Berger, J.; Moller, D.E. (2002) The mechanism of action of PPARs. *Annu Rev Med*, 53, 409-435;

【非特許文献7】Cheung, C.; Akiyama, T.E.; Ward, J.M.; Nicol, C.J.; Feigenbaum, L.; Vinson, C.; Gonzalez, F.J: (2004) Diminished hepatocellular proliferation in mice humanized for the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ . *Cancer Res*, 64, 3849-3854;

【非特許文献8】Coleman, R.A.; Lewin, T.M.; Van Horn, C.G.; Gonzalez-Baro, M.R. (2002) Do long-chain acyl-CoA synthetases regulate fatty acid entry into synthet

10

20

30

40

50

ic versus degradative pathways? *J Nutr*, 132, 2123-2126;

【非特許文献 9】Devchand, P.R.; Keller, H.; Peters, J.M.; Vazquez, M.; Gonzalez, F.J.; Wahli, W. (1996) The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature*, 384, 39-43;

【非特許文献 10】Ehrenborg, E.; Krook, A. (2009) Regulation of skeletal muscle physiology and metabolism by peroxisome proliferator-activated receptor. *Pharmacological Reviews*, 61(3), 373-393;

【非特許文献 11】Feige, J.N.; Gelman, L.; Michalik, L.; Desvergne, B.; Wahli, W. (2006) From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog. Lipid. Res.*, 45 (2), 120-159;

【非特許文献 12】Guan, Y.; Hao, C.; Cha, D.R.; Rao, R.; Lu, W.; Kohan, D.E.; Magnuson, M.A.; Redha, R.; Zhang, Y.; Breyer, M.D. (2005) Thiazolidinediones expand body fluid volume through PPARgamma stimulation and ENaC-mediated renal salt absorption. *Nat Med*, 11, 861-866;

【非特許文献 13】Heikkinen, S.; Auwerx, J.; Argmann, C.A. (2007) PPARgamma in human and mouse physiology. *Biochim Biophys Acta*, 1771 (8), 999-1013;

【非特許文献 14】Kawaguchi, H.; Akune, T.; Yamaguchi, M.; Ohba, S.; Ogata, N.; Chung, U.I.; Kubota, N.; Terauchi, Y.; Kadowaki, T.; Nakamura, K. (2005) Distinct effects of PPARgamma insufficiency on bone marrow cells, osteoblasts, and osteoclastic cells. *J Bone Miner Metab*, 23, 275-279;

【非特許文献 15】Lefebvre, P.; Chinetti, G.; Fruchart, J.C.; Staels, B. (2006) Sorting out the roles of PPAR in energy metabolism and vascular homeostasis. *J Clin Invest*, 116, 571-580;

【非特許文献 16】Marlow, L.A.; Reynolds, L.A.; Cleland, A.S.; Cooper, S.J.; Gumbz, M.L.; Kurakata, S.; Fujiwara, K.; Zhang, Y.; Sebo, T.; Grant, C.; McIver, B.; Wadsworth, J.T.; Radisky, D.C.; Smallridge, R.C.; Copland, J.A. (2009) Reactivation of suppressed RhoB is a critical step for the inhibition of anaplastic thyroid cancer growth. *Cancer Res*, 69 (4), 1536-1544;

【非特許文献 17】Michalik, L.; Auwerx, J.; Berger, J.P.; Chatterjee, V.K.; Glass, C.K.; Gonzales, F.J.; Grimaldi, P.A.; Kadowaki, T.; Lazar, M.A.; O'Rahilly, S.; Palmer, C.N.; Plutzky, J.; Reddy, J.K.; Spiegelmann, B.M.; Staels, B.; Wahli, W. (2006). *International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. Pharmacol Rev* 58 (4), 726-741;

【非特許文献 18】Peraza, M.A.; Burdick, A.D.; Marin, H.E.; Gonzalez, F.J.; Peters, J.M. (2006) The toxicology of ligands for peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR), 90 (2), 269-295;

【非特許文献 19】Ramanan, S.; Kooshki, M.; Zhao, W.; Hsu, F.C.; Robbins, M.E. (2008) PPARalpha ligands inhibit radiation-induced microglial inflammatory responses by negatively regulating NF-kappaB and AP-1 pathways. *Free Radic Biol Med*, 45, 1695-1704;

【非特許文献 20】Reddy, J.K.; Hashimoto, T. (2001) Peroxisomal  $\alpha$ -oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor: an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr*, 21, 193-230;

【非特許文献 21】Varga, T.; Czimmerer, Z.; Nagy, L. (2011) PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochim Biophys Acta*, 1812 (8), 1007-1022;

【非特許文献 22】Vidal-Puig, A.J.; Considine, R.V.; Jimenez-Linan, M.; Werman, A.; Pories, W.J.; Caro, J.F.; Flier, J.S (1997) Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, an

10

20

30

40

50

d regulation by insulin and glucocorticoids. J Clin Invest, 99, 2416-2422;

【非特許文献 2 3】Yeldandi, A.V.; Rao, M.S.; Reddy, J.K. (2000) Hydrogen peroxide generation in peroxisome proliferator-induced oncogenesis. Mutat res, 448, 159-177;

【非特許文献 2 4】Yu, S.; Reddy, J.K. (2007) Transcription coactivators for peroxisome proliferator-activated receptors. Biochim Biophys Acta, 1771 (8), 936-951

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

したがって、本発明の根底にある技術的課題は、前記の要求を満たすための手段および方法の提供として理解されうるのであろう。該技術的課題は、特許請求の範囲において特徴づけられ本明細書中に後記で説明されている実施形態により解決される。

【課題を解決するための手段】

【0017】

したがって、本発明は、

(a) 肝障害に罹患していると疑われる被験者の試験サンプルにおいて、表1、2、3a、3b、4a、4b、7a、7b、7cまたは7dのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカーの量を決定し、

(b) 工程(a)において決定された量を参照(体)と比較することを含み、それにより該肝障害が診断される(べき)こととなる、肝障害を診断するための方法に関する。

【0018】

本発明の方法の特定の実施形態においては、

(a) 肝障害に罹患していると疑われる男性または女性被験者を選択し、

(b) 前記の選択された被験者から試験サンプルを得、

(c) 分析のための準備において該サンプルを前処理し、

(d) 該試験サンプルにおいて、表1、2、3a、3b、4a、4b、7a、7b、7cまたは7dのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカーの量を決定し、

(e) 工程(d)において決定された量を参照体と比較し、

(f) 工程(e)の比較に基づいて、肝障害またはその症状のモニター、確認または分類により肝障害を診断することを含む、肝障害を診断するための方法を提供する。

【0019】

前記方法の好ましい実施形態においては、該被験者は、肝障害を誘導しうると疑われる化合物に接触している。

【0020】

本発明はまた、

(a) 肝障害を誘導しうると疑われる化合物と接触している被験者のサンプルにおいて、表1、2、3a、3b、4a、4b、7a、7b、7cまたは7dのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカーの量を決定し、

(b) 工程(a)において決定された量を参照体と比較し、それにより、該化合物が肝障害を誘導する可能性(能力)を決定することを含む、被験者において或る化合物が肝障害を誘導しうかどうかを決定する方法に関する。

【0021】

本発明の方法の特定の実施形態においては、

(a1) (i) 男性または女性の被験者を選択し、

(ii) 肝障害を誘導しうると疑われる化合物と該被験者を接触させ、あるいは

(a2) 肝障害を誘導しうる化合物に接触した男性または女性の被験者を選択し、

(b) 前記の選択された被験者から試験サンプルを得、

(c) 分析のための準備において該サンプルを前処理し、

(d) 該試験サンプルにおいて、表1、2、3a、3b、4a、4b、7a、7b、7cまたは7dのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカーの量を決定し、

(e) 工程 (d) において決定された量を参照体と比較し、  
(f) 工程 (e) の比較に基づいて、該化合物が肝障害を誘導しうるか否かを特定することを含む、被験者において或る化合物が肝障害を誘導しうるかどうかを決定するための方法を提供する。

【0022】

前記方法の好ましい実施形態においては、該化合物は、1-メチル-2-ピロリドン、ベザフィブラート (Bezafibrate)、カルベンダジム (Carbendazim)、ジメチルホルムアミド、ジモキシストロビン (Dimoxystrobin)、メタザクロル (Metazachlor)、N-アセチル-p-アミノフェノール、Wy-14643、17-アルファ-エチニルエストラジオール、17-アルファ-エチニルエストラジオール、タモキシフェン (Tamoxifen) および塩酸テトラサイクリンからなる群から選択される少なくとも1つの化合物である。

10

【0023】

本発明の方法のもう1つの好ましい実施形態においては、該参照体は、(i) 肝障害に罹患している被験者または被験者群、あるいは(ii) 1-メチル-2-ピロリドン、ベザフィブラート、カルベンダジム、ジメチルホルムアミド、ジモキシストロビン、メタザクロル、N-アセチル-p-アミノフェノール、Wy-14643、17-アルファ-エチニルエストラジオール、17-アルファ-エチニルエストラジオール、タモキシフェンおよび塩酸テトラサイクリンからなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触している被験者または被験者群に由来する。該方法のより好ましい実施形態においては、試験サンプルと参照体とにおける、バイオマーカーに関する実質的に同じ量が、肝障害の指標となる。

20

【0024】

本発明の方法のもう1つの好ましい実施形態においては、該参照体は、(i) 肝障害に罹患していないことが知られている被験者または被験者群、あるいは(ii) 1-メチル-2-ピロリドン、ベザフィブラート、カルベンダジム、ジメチルホルムアミド、ジモキシストロビン、メタザクロル、N-アセチル-p-アミノフェノール、Wy-14643、17-アルファ-エチニルエストラジオール、17-アルファ-エチニルエストラジオール、タモキシフェンおよび塩酸テトラサイクリンからなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触していない(されていない)被験者または被験者群に由来する。該方法のより好ましい実施形態においては、参照体と比較して試験サンプルにおいて異なる、バイオマーカーに関する量が、肝障害の指標となる。

30

【0025】

本発明の方法の更にもう1つ実施形態においては、該参照体は被験者集団に関するバイオマーカーに関する計算参照体である。該方法のより好ましい実施形態においては、参照体と比較して試験サンプルにおいて異なる、バイオマーカーの量が、肝障害の指標となる。

【0026】

本発明はまた、

(a) 肝障害を治療しうると疑われる候補物質に接触している、肝障害に罹患している被験者のサンプルにおいて、表1、2、3a、3b、4a、4b、7a、7b、7cまたは7dのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカーの量を決定し、

40

(b) 工程 (a) において決定された量を参照体と比較し、それにより、肝障害を治療しうる物質を特定する工程を含む、肝障害を治療するための物質を特定する方法を含む。

【0027】

本発明の方法の特定の実施形態においては、

(a1) (i) 男性または女性の被験者を選択し、

(ii) 肝障害を誘導しうると疑われる化合物と該被験者を接触させて、肝障害を誘発させ、あるいは

(a2) 肝障害に罹患している男性または女性の被験者を選択し、

(b) 前記の選択された被験者から試験サンプルを得、

(c) 分析のための準備において該サンプルを前処理し、

50

(d) 該試験サンプルにおいて、表1、2、3a、3b、4a、4b、7a、7b、7cまたは7dのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカの量を決定し、

(e) 工程(d)において決定された量を参照体と比較し、

(f) 工程(e)の比較に基づいて、肝障害を治療するための物質を特定し、選択することを含む、肝障害を治療するための物質を特定するための方法を提供する。

【0028】

前記方法の好ましい実施形態においては、該参照体は、(i) 肝障害に罹患している被験者または被験者群、あるいは(ii) 1-メチル-2-ピロリドン、ベザフィブラート、カルベンダジム、ジメチルホルムアミド、ジモキシストロピン、メタザクロル、N-アセチル-p-アミノフェノール、Wy-14643、17-アルファ-エチニルエストラジオール、17-アルファ-エチニルエストラジオール、タモキシフェンおよび塩酸テトラサイクリンからなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触している被験者または被験者群に由来する。該方法のより好ましい実施形態においては、試験サンプルと参照体とにおいて異なる、バイオマーカに関する量が、肝障害を治療する物質の指標となる。

10

【0029】

該方法のもう1つの好ましい実施形態においては、該参照体は、(i) 肝障害に罹患していないことが知られている被験者または被験者群、あるいは(ii) 1-メチル-2-ピロリドン、ベザフィブラート、カルベンダジム、ジメチルホルムアミド、ジモキシストロピン、メタザクロル、N-アセチル-p-アミノフェノール、Wy-14643、17-アルファ-エチニルエストラジオール、17-アルファ-エチニルエストラジオール、タモキシフェンおよび塩酸テトラサイクリンからなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触していない被験者または被験者群に由来する。該方法のより好ましい実施形態においては、試験サンプルと参照体とにおける、バイオマーカに関する実質的に同じ量が、肝障害を治療する物質の指標となる。

20

【0030】

前記方法の更にもう1つ実施形態においては、該参照体は被験者集団におけるバイオマーカに関する計算参照体である。該方法のより好ましい実施形態においては、試験サンプルと参照体とにおける、バイオマーカに関する実質的に同じ量が、肝障害を治療する物質の指標となる。

【0031】

本発明はまた、被験者のサンプルにおいて肝障害を診断するための、表1、2、3a、3b、4a、4b、7a、7b、7cまたは7dのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカあるいは該バイオマーカに関する検出剤の使用に関する。

30

【0032】

更に、本発明は、

(a) サンプル中に存在するバイオマーカの量の決定を可能にする、表1、2、3a、3b、4a、4b、7a、7b、7cまたは7dのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカに関する検出剤を含む分析用ユニット、および、機能する形でそれに連結された、

(b) 分析用ユニットにより決定された前記の少なくとも1つのバイオマーカの量を保存参照体と比較し、それにより肝障害を診断することを可能にするデータプロセッサおよび保存参照体を含む評価ユニットを含む、肝障害に罹患していると疑われる被験者のサンプルにおいて肝障害を診断するための装置に関する。

40

【0033】

本発明の装置の好ましい実施形態においては、該保存参照体は、肝障害に罹患していることが知られている被験者または被験者群、あるいは1-メチル-2-ピロリドン、ベザフィブラート、カルベンダジム、ジメチルホルムアミド、ジモキシストロピン、メタザクロル、N-アセチル-p-アミノフェノール、Wy-14643、17-アルファ-エチニルエストラジオール、17-アルファ-エチニルエストラジオール、タモキシフェンおよび塩酸テトラサイクリンからなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触している被験者または被験者群に由来する参照体であり、該データプロセッサは、該分析用ユニットにより決定された少

50

なくとも1つのバイオマーカの量を該保存参照体と比較するための命令を実行し、ここで、参照体と比較した場合の試験サンプルにおける少なくとも1つのバイオマーカの実質的に同じ量が肝障害の存在の指標となり、あるいは、参照体とは異なる、試験サンプルにおける少なくとも1つのバイオマーカの量が、肝障害の非存在の指標となる。

【0034】

本発明の装置のもう1つの好ましい実施形態においては、該保存参照体は、肝障害に罹患していないことが知られている被験者または被験者群、あるいは1-メチル-2-ピロリドン、ベザフィブラート、カルベンダジム、ジメチルホルムアミド、ジモキシストロピン、メタザクロル、N-アセチル-p-アミノフェノール、Wy-14643、17-アルファ-エチニルエストラジオール、17-アルファ-エチニルエストラジオール、タモキシフェンおよび塩酸テトラサイクリンからなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触していない被験者または被験者群に由来する参照体であり、該データプロセッサは、該分析用ユニットにより決定された少なくとも1つのバイオマーカの量を該保存参照体と比較するための命令を実行し、ここで、参照体とは異なる、試験サンプルにおける少なくとも1つのバイオマーカの量が、肝障害の存在の指標となり、あるいは、参照体と比較した場合の試験サンプルにおける少なくとも1つのバイオマーカの実質的に同じ量が肝障害の非存在の指標となる。

10

【0035】

更に、本発明は、肝障害を診断するためのキットに関するものであり、該キットは、表1、2、3a、3b、4a、4b、7a、7b、7cまたは7dのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカに関する検出剤と、前記の少なくとも1つのバイオマーカに関する標準体とを含み、その濃度は、肝障害に罹患していることが知られている被験者または被験者群から誘導され、あるいは、肝障害に罹患していないことが知られている被験者または被験者群から誘導される。

20

【0036】

特に、本発明は、

(a) パラセタモール誘導性肝毒性に罹患していると疑われる被験者の試験サンプルにおいて、表1または2のいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカの量を決定し、

(b) 工程(a)において決定された量を参照体と比較し、それによりパラセタモール誘導性肝毒性を診断することを含む、パラセタモール誘導性肝障害を診断するための方法に関する。

30

【0037】

本発明の方法の特定の実施形態においては、

(a) パラセタモール誘導性肝障害に罹患していると疑われる男性または女性被験者を選択し、

(b) 前記の選択された被験者から試験サンプルを得、

(c) 分析のための準備において該サンプルを前処理し、

(d) 該試験サンプルにおいて、表1または2のいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカの量を決定し、

40

(e) 工程(d)において決定された量を参照体と比較し、

(f) 工程(e)の比較に基づいて、パラセタモール誘導性肝障害またはその症状のモニター、確認または分類によりパラセタモール誘導性肝障害を診断することを含む、パラセタモール誘導性肝障害を診断するための方法を提供する。

【0038】

前記方法の好ましい実施形態においては、該被験者は、パラセタモール誘導性肝毒性を誘導しうると疑われる化合物に接触している。

【0039】

本発明はまた、被験者において或る化合物がパラセタモール誘導性肝毒性を誘導しうるかどうかを決定する方法であって、

50

(a) パラセタモール誘導性肝毒性を誘導しうると疑われる化合物と接触している被験者のサンプルにおいて、表1または2のいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカーの量を決定し、

(b) 工程(a)において決定された量を参照体と比較し、それにより、該化合物がパラセタモール誘導性肝毒性を誘導する可能性を決定することを含む方法に関する。

【0040】

本発明の方法の特定の実施形態においては、被験者において或る化合物がパラセタモール誘導性肝障害を誘導しうるとどうかを決定するための方法であって、

(a1) (i) 男性または女性の被験者を選択し、

(ii) パラセタモール誘導性肝障害を誘導しうると疑われる化合物と該被験者を接触させ、あるいは

(a2) パラセタモール誘導性肝障害を誘導しうる化合物に接触した男性または女性の被験者を選択し、

(b) 前記の選択された被験者から試験サンプルを得、

(c) 分析のための準備において該サンプルを前処理し、

(d) 該試験サンプルにおいて、表1または2のいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカーの量を決定し、

(e) 工程(d)において決定された量を参照体と比較し、

(f) 工程(e)の比較に基づいて、該化合物がパラセタモール誘導性肝障害を誘導しうるか否かを特定することを含む方法を提供する。

【0041】

前記方法の好ましい実施形態においては、該化合物は、1-メチル-2-ピロリドン、カルベンダジム、ジメチルホルムアミド、ジモキシストロピン、メタザクロルおよびN-アセチル-p-アミノフェノールからなる群から選択される少なくとも1つの化合物である。

【0042】

本発明の方法のもう1つの好ましい実施形態においては、該参照体は、(i) パラセタモール誘導性肝毒性に罹患している被験者または被験者群、あるいは(ii) 1-メチル-2-ピロリドン、カルベンダジム、ジメチルホルムアミド、ジモキシストロピン、メタザクロルおよびN-アセチル-p-アミノフェノールからなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触している被験者または被験者群に由来する。該方法のより好ましい実施形態においては、試験サンプルと参照体とにおける、バイオマーカーに関する実質的に同じ量が、パラセタモール誘導性肝毒性の指標となる。

【0043】

本発明の方法のもう1つの好ましい実施形態においては、該参照体は、(i) パラセタモール誘導性肝毒性に罹患していないことが知られている被験者または被験者群、あるいは(ii) 1-メチル-2-ピロリドン、カルベンダジム、ジメチルホルムアミド、ジモキシストロピン、メタザクロルおよびN-アセチル-p-アミノフェノールからなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触していない被験者または被験者群に由来する。該方法のより好ましい実施形態においては、参照体と比較して試験サンプルにおいて異なる、バイオマーカーに関する量が、パラセタモール誘導性肝毒性の指標となる。

【0044】

本発明の方法の更にもう1つ実施形態においては、該参照体は被験者集団に関するバイオマーカーに関する計算参照体である。該方法のより好ましい実施形態においては、参照体と比較して試験サンプルにおいて異なる、バイオマーカーの量が、パラセタモール誘導性肝毒性の指標となる。

【0045】

本発明はまた、

(a) パラセタモール誘導性肝毒性を治療しうると疑われる候補物質に接触している、パラセタモール誘導性肝毒性に罹患している被験者のサンプルにおいて、表1または2のいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカーの量を決定し、

(b) 工程(a)において決定された量を参照体と比較し、それにより、パラセタモール誘導性肝毒性を治療しうる物質を特定する工程を含む、パラセタモール誘導性肝毒性を治療するための物質を特定する方法を含む。

【0046】

本発明の方法の特定の実施形態においては、

- (a1) (i) 男性または女性の被験者を選択し、
- (ii) パラセタモール誘導性肝障害を誘導しうると疑われる化合物と該被験者を接触させて、パラセタモール誘導性肝障害を誘発させ、あるいは
- (a2) パラセタモール誘導性肝障害に罹患している男性または女性の被験者を選択し、
- (b) 前記の選択された被験者から試験サンプルを得、
- (c) 分析のための準備において該サンプルを前処理し、
- (d) 該試験サンプルにおいて、表1または2のいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカの量を決定し、
- (e) 工程(d)において決定された量を参照体と比較し、
- (f) 工程(e)の比較に基づいて、パラセタモール誘導性肝障害を治療するための物質を特定し、選択することを含む、パラセタモール誘導性肝障害を治療するための物質を特定するための方法を提供する。

10

【0047】

前記方法の好ましい実施形態においては、該参照体は、(i) パラセタモール誘導性肝毒性に罹患している被験者または被験者群、あるいは(ii) 1-メチル-2-ピロリドン、カルベンダジム、ジメチルホルムアミド、ジモキシストロピン、メタザクロルおよびN-アセチル-p-アミノフェノールからなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触している被験者または被験者群に由来する。該方法のより好ましい実施形態においては、試験サンプルと参照体とにおいて異なる、バイオマーカに関する量が、パラセタモール誘導性肝毒性を治療しうる物質の指標となる。

20

【0048】

該方法のもう1つの好ましい実施形態においては、該参照体は、(i) パラセタモール誘導性肝毒性に罹患していないことが知られている被験者または被験者群、あるいは(ii) 1-メチル-2-ピロリドン、カルベンダジム、ジメチルホルムアミド、ジモキシストロピン、メタザクロルおよびN-アセチル-p-アミノフェノールからなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触していない被験者または被験者群に由来する。該方法のより好ましい実施形態においては、試験サンプルと参照体とにおける、バイオマーカに関する実質的に同じ量が、パラセタモール誘導性肝毒性を治療しうる物質の指標となる。

30

【0049】

前記方法の更にもう1つ実施形態においては、該参照体は被験者集団におけるバイオマーカに関する計算参照体である。該方法のより好ましい実施形態においては、試験サンプルと参照体とにおける、バイオマーカに関する実質的に同じ量が、パラセタモール誘導性肝毒性を治療しうる物質の指標となる。

【0050】

本発明はまた、被験者のサンプルにおいてパラセタモール誘導性肝毒性を診断するための、表1または2のいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカあるいは該バイオマーカに関する検出剤の使用に関する。

40

【0051】

更に、本発明は、

- (a) サンプル中に存在するバイオマーカの量の決定を可能にする、表1または2のいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカに関する検出剤を含む分析用ユニット、および、機能しうる形でそれに連結された、
- (b) 分析用ユニットにより決定された前記の少なくとも1つのバイオマーカの量を保存参照体と比較し、それによりパラセタモール誘導性肝毒性を診断することを可能にするデータプロセッサおよび保存参照体を含む評価ユニットを含む、パラセタモール肝毒性に罹

50

患していると疑われる被験者のサンプルにおいてパラセタモール誘導性肝毒性を診断するための装置に関する。

【0052】

本発明の装置の好ましい実施形態においては、該保存参照体は、パラセタモール誘導性肝毒性に罹患していることが知られている被験者または被験者群、あるいは1-メチル-2-ピロリドン、カルベンダジム、ジメチルホルムアミド、ジモキシストロピン、メタザクロルおよびN-アセチル-p-アミノフェノールからなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触している被験者または被験者群に由来する参照体であり、該データプロセッサは、該分析用ユニットにより決定された少なくとも1つのバイオマーカの量を該保存参照体と比較するための命令を実行し、ここで、参照体と比較した場合の試験サンプルにおける少なくとも1つのバイオマーカの実質的に同じ量がパラセタモール誘導性肝毒性の存在の指標となり、あるいは、参照体とは異なる、試験サンプルにおける少なくとも1つのバイオマーカの量が、パラセタモール誘導性肝毒性の非存在の指標となる。

10

【0053】

本発明の装置のもう1つの好ましい実施形態においては、該保存参照体は、パラセタモール誘導性肝毒性に罹患していないことが知られている被験者または被験者群、あるいは1-メチル-2-ピロリドン、カルベンダジム、ジメチルホルムアミド、ジモキシストロピン、メタザクロルおよびN-アセチル-p-アミノフェノールからなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触していない被験者または被験者群に由来する参照体であり、該データプロセッサは、該分析用ユニットにより決定された少なくとも1つのバイオマーカの量を該保存参照体と比較するための命令を実行し、ここで、参照体とは異なる、試験サンプルにおける少なくとも1つのバイオマーカの量が、パラセタモール誘導性肝毒性の存在の指標となり、あるいは、参照体と比較した場合の試験サンプルにおける少なくとも1つのバイオマーカの実質的に同じ量がパラセタモール誘導性肝毒性の非存在の指標となる。

20

【0054】

更に、本発明は、パラセタモール誘導性肝毒性を診断するためのキットに関するものであり、該キットは、表1または2のいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカに関する検出剤と、前記の少なくとも1つのバイオマーカに関する標準体とを含み、その濃度は、パラセタモール誘導性肝毒性に罹患していることが知られている被験者または被験者群から誘導され、あるいは、パラセタモール誘導性肝毒性に罹患していないことが知られている被験者または被験者群から誘導される。

30

【0055】

特に、本発明は、

(a) PPARアルファアゴニスト誘導性肝障害に罹患していると疑われる被験者の試験サンプルにおいて、表3aまたは3bのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカの量を決定し、

(b) 工程(a)において決定された量を参照体と比較し、それによりPPARアルファアゴニスト誘導性肝障害を診断することを含む、PPARアルファアゴニスト誘導性肝障害を診断するための方法に関する。

40

【0056】

本発明の方法の特定の実施形態においては、

(a) PPARアルファアゴニスト誘導性肝障害に罹患していると疑われる男性または女性被験者を選択し、

(b) 前記の選択された被験者から試験サンプルを得、

(c) 分析のための準備において該サンプルを前処理し、

(d) 該試験サンプルにおいて、表3aまたは3bのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカの量を決定し、

(e) 工程(d)において決定された量を参照体と比較し、

(f) 工程(e)の比較に基づいて、PPARアルファアゴニスト誘導性肝障害またはその症状

50

のモニター、確認または分類により肝障害を診断することを含む、PPARアルファアゴニスト誘導性肝障害を診断するための方法を提供する。

【0057】

前記方法の好ましい実施形態においては、該被験者は、PPARアルファアゴニスト誘導性肝障害を誘導しうると疑われる化合物に接触している。

【0058】

本発明はまた、被験者において或る化合物がPPARアルファアゴニスト誘導性肝障害を誘導しうかどうかを決定する方法であって、

(a) PPARアルファアゴニスト誘導性肝障害を誘導しうると疑われる化合物と接触している被験者のサンプルにおいて、表3aまたは3bのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカーの量を決定し、

(b) 工程(a)において決定された量を参照体と比較し、それにより、該化合物がPPARアルファアゴニスト誘導性肝障害を誘導する可能性を決定することを含む方法に関する。

【0059】

本発明の方法の特定の実施形態においては、被験者において或る化合物がPPARアルファアゴニスト誘導性肝障害を誘導しうかどうかを決定するための方法であって、

(a1) (i) 男性または女性の被験者を選択し、

(ii) PPARアルファアゴニスト誘導性肝障害を誘導しうると疑われる化合物と該被験者を接触させ、あるいは

(a2) PPARアルファアゴニスト誘導性肝障害を誘導しうる化合物に接触した男性または女性の被験者を選択し、

(b) 前記の選択された被験者から試験サンプルを得、

(c) 分析のための準備において該サンプルを前処理し、

(d) 該試験サンプルにおいて、表3aまたは3bのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカーの量を決定し、

(e) 工程(d)において決定された量を参照体と比較し、

(f) 工程(e)の比較に基づいて、該化合物がPPARアルファアゴニスト誘導性肝障害を誘導しうるか否かを特定することを含む方法を提供する。

【0060】

前記方法の好ましい実施形態においては、該化合物は、ベザフィブラート(Bezafibrat e)およびWy-14643からなる群から選択される少なくとも1つの化合物である。

【0061】

本発明の方法のもう1つの好ましい実施形態においては、該参照体は、(i) PPARアルファアゴニスト誘導性肝障害に罹患している被験者または被験者群、あるいは(ii) ベザフィブラートおよびWy-14643からなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触している被験者または被験者群に由来する。該方法のより好ましい実施形態においては、試験サンプルと参照体とにおける、バイオマーカーに関する実質的に同じ量が、PPARアルファアゴニスト誘導性肝障害の指標となる。

【0062】

本発明の方法のもう1つの好ましい実施形態においては、該参照体は、(i) PPARアルファアゴニスト誘導性肝障害に罹患していないことが知られている被験者または被験者群、あるいは(ii) ベザフィブラートおよびWy-14643からなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触していない被験者または被験者群に由来する。該方法のより好ましい実施形態においては、参照体と比較して試験サンプルにおいて異なる、バイオマーカーに関する量が、PPARアルファアゴニスト誘導性肝障害の指標となる。

【0063】

本発明の方法の更にもう1つ実施形態においては、該参照体は被験者集団に関するバイオマーカーに関する計算参照体である。該方法のより好ましい実施形態においては、参照体と比較して試験サンプルにおいて異なる、バイオマーカーの量が、PPARアルファアゴニスト誘導性肝障害の指標となる。

10

20

30

40

50

## 【0064】

PPARアルファアゴニスト作用性化合物とPPARガンマアゴニスト作用性化合物とを識別するために、試験サンプルにおいて、表4aまたは4bのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカの量を更に決定することが好ましい。それにより、ある化合物がPPARガンマアゴニストでもあるかどうかを診断される。したがって、本発明の方法は、好ましい実施形態においては、

(c) 被験者の試験サンプルにおいて、表4aまたは4bのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカの量を決定し、

(d) 工程(a)において決定された量を参照体と比較し、それにより、該化合物がPPARガンマアゴニストでもかるか、あるいは本明細書に記載されているPPARガンマ誘導性障害を誘導しうるかどうかを決定する工程を更に含む。

10

## 【0065】

本発明はまた、

(a) PPARアルファアゴニスト誘導性肝障害を治療しうると疑われる候補物質に接触している、PPARアルファアゴニスト誘導性肝障害に罹患している被験者のサンプルにおいて、表3aまたは3bのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカの量を決定し、

(b) 工程(a)において決定された量を参照体と比較し、それにより、PPARアルファアゴニスト誘導性肝障害を治療しうる物質を特定する工程を含む、PPARアルファアゴニスト誘導性肝障害を治療するための物質を特定する方法を含む。

## 【0066】

本発明の方法の特定の実施形態においては、

(a1) (i) 男性または女性の被験者を選択し、

(ii) PPARアルファアゴニスト誘導性肝障害を誘導しうると疑われる化合物と該被験者を接触させて、PPARアルファアゴニスト誘導性肝障害を誘発させ、あるいは

(a2) PPARアルファアゴニスト誘導性肝障害に罹患している男性または女性の被験者を選択し、

(b) 前記の選択された被験者から試験サンプルを得、

(c) 分析のための準備において該サンプルを前処理し、

(d) 該試験サンプルにおいて、表3aまたは3bのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカの量を決定し、

30

(e) 工程(d)において決定された量を参照体と比較し、

(f) 工程(e)の比較に基づいて、PPARアルファアゴニスト誘導性肝障害を治療するための物質を特定し、選択することを含む、PPARアルファアゴニスト誘導性肝障害を治療するための物質を特定するための方法を提供する。

## 【0067】

前記方法の好ましい実施形態においては、該参照体は、(i) PPARアルファアゴニスト誘導性肝障害に罹患している被験者または被験者群、あるいは(ii) ベザフィブラートおよびWy-14643からなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触している被験者または被験者群に由来する。該方法のより好ましい実施形態においては、試験サンプルと参照体とにおいて異なる、バイオマーカに関する量が、PPARアルファアゴニスト誘導性肝障害を治療しうる物質の指標となる。

40

## 【0068】

該方法のもう1つの好ましい実施形態においては、該参照体は、(i) PPARアルファアゴニスト誘導性肝障害に罹患していないことが知られている被験者または被験者群、あるいは(ii) ベザフィブラートおよびWy-14643からなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触していない被験者または被験者群に由来する。該方法のより好ましい実施形態においては、試験サンプルと参照体とにおける、バイオマーカに関する実質的に同じ量が、PPARアルファアゴニスト誘導性肝障害を治療しうる物質の指標となる。

## 【0069】

前記方法の更にもう1つ実施形態においては、該参照体は被験者集団におけるバイオマ

50

ーカーに関する計算参照体である。該方法のより好ましい実施形態においては、試験サンプルと参照体とにおける、バイオマーカーに関する実質的に同じ量が、PPARアルファアゴニスト誘導性肝障害を治療しうる物質の指標となる。

【0070】

本発明はまた、被験者のサンプルにおいてPPARアルファアゴニスト誘導性肝障害を診断するための、表3aまたは3bのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカーあるいは該バイオマーカーに関する検出剤の使用に関する。

【0071】

更に、本発明は、

(a) サンプル中に存在するバイオマーカーの量の決定を可能にする、表3aまたは3bのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカーに関する検出剤を含む分析用ユニット、および、機能しうる形でそれに連結された、

10

(b) 分析用ユニットにより決定された前記の少なくとも1つのバイオマーカーの量を保存参照体と比較し、それによりPPARアルファアゴニスト誘導性肝障害を診断することを可能にするデータプロセッサおよび保存参照体を含む評価ユニットを含む、PPARアルファアゴニスト誘導性肝障害に罹患していると疑われる被験者のサンプルにおいてPPARアルファアゴニスト誘導性肝障害を診断するための装置に関する。

【0072】

本発明の装置の好ましい実施形態においては、該保存参照体は、PPARアルファアゴニスト誘導性肝障害に罹患していることが知られている被験者または被験者群、あるいはベザフィブラートおよびWy-14643からなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触している被験者または被験者群に由来する参照体であり、該データプロセッサは、該分析用ユニットにより決定された少なくとも1つのバイオマーカーの量を該保存参照体と比較するための命令を実行し、ここで、参照体と比較した場合の試験サンプルにおける少なくとも1つのバイオマーカーの実質的に同じ量がPPARアルファアゴニスト誘導性肝障害の存在の指標となり、あるいは、参照体とは異なる、試験サンプルにおける少なくとも1つのバイオマーカーの量が、PPARアルファアゴニスト誘導性肝障害の非存在の指標となる。

20

【0073】

本発明の装置のもう1つの好ましい実施形態においては、該保存参照体は、PPARアルファアゴニスト誘導性肝障害に罹患していないことが知られている被験者または被験者群、あるいはベザフィブラートおよびWy-14643からなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触していない被験者または被験者群に由来する参照体であり、該データプロセッサは、該分析用ユニットにより決定された少なくとも1つのバイオマーカーの量を該保存参照体と比較するための命令を実行し、ここで、参照体とは異なる、試験サンプルにおける少なくとも1つのバイオマーカーの量が、PPARアルファアゴニスト誘導性肝障害の存在の指標となり、あるいは、参照体と比較した場合の試験サンプルにおける少なくとも1つのバイオマーカーの実質的に同じ量がPPARアルファアゴニスト誘導性肝障害の非存在の指標となる。

30

【0074】

更に、本発明は、PPARアルファアゴニスト誘導性肝障害を診断するためのキットに関するものであり、該キットは、表3aまたは3bのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカーに関する検出剤と、前記の少なくとも1つのバイオマーカーに関する標準体とを含み、その濃度は、PPARアルファアゴニスト誘導性肝障害に罹患していることが知られている被験者または被験者群から誘導され、あるいは、PPARアルファアゴニスト誘導性肝障害に罹患していないことが知られている被験者または被験者群から誘導される。

40

【0075】

前記を考慮して、本発明はまた、

(a) PPARガンマアゴニスト誘導性障害に罹患していると疑われる被験者の試験サンプルにおいて、表4aまたは4bのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカーの量を決定し、

50

(b) 工程 (a) において決定された量を参照体と比較し、それによりPPARガンマアゴニスト誘導性障害を診断することを含む、PPARガンマアゴニスト誘導性障害を診断するための方法を含む。

【0076】

本発明の方法の特定の実施形態においては、

(a) PPARガンマアゴニスト誘導性障害に罹患していると疑われる男性または女性被験者を選択し、

(b) 前記の選択された被験者から試験サンプルを得、

(c) 分析のための準備において該サンプルを前処理し、

(d) 該試験サンプルにおいて、表4aまたは4bのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカーの量を決定し、

(e) 工程 (d) において決定された量を参照体と比較し、

(f) 工程 (e) の比較に基づいて、PPARガンマアゴニスト誘導性障害またはその症状のモニター、確認または分類によりPPARガンマアゴニスト誘導性障害を診断することを含む、PPARガンマアゴニスト誘導性障害を診断するための方法を提供する。

【0077】

前記方法の好ましい実施形態においては、該被験者は、PPARガンマアゴニスト誘導性障害を誘導しうると疑われる化合物に接触している。

【0078】

本発明はまた、被験者において或る化合物がPPARガンマアゴニスト誘導性障害を誘導しうかどうかを決定する方法であって、

(a) PPARガンマアゴニスト誘導性障害を誘導しうると疑われる化合物と接触している被験者のサンプルにおいて、表4aまたは4bのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカーの量を決定し、

(b) 工程 (a) において決定された量を参照体と比較し、それにより、該化合物がPPARガンマアゴニスト肝障害を誘導する可能性を決定することを含む方法に関する。

【0079】

本発明の方法の特定の実施形態においては、被験者において或る化合物がPPARガンマアゴニスト誘導性障害を誘導しうかどうかを決定するための方法であって、

(a1) (i) 男性または女性の被験者を選択し、

(ii) PPARガンマアゴニスト誘導性障害を誘導しうると疑われる化合物と該被験者を接触させ、あるいは

(a2) PPARガンマアゴニスト誘導性障害を誘導しうる化合物に接触した男性または女性の被験者を選択し、

(b) 前記の選択された被験者から試験サンプルを得、

(c) 分析のための準備において該サンプルを前処理し、

(d) 該試験サンプルにおいて、表4aまたは4bのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカーの量を決定し、

(e) 工程 (d) において決定された量を参照体と比較し、

(f) 工程 (e) の比較に基づいて、該化合物がPPARガンマアゴニスト誘導性障害を誘導しうるか否かを特定することを含む方法を提供する。

【0080】

前記方法の好ましい実施形態においては、該化合物は、塩酸ピオグリタゾン (Pioglitazone hydrochloride) およびマレイン酸ロシグリタゾン (Rosiglitazone maleate) からなる群から選択される少なくとも1つの化合物である。

【0081】

本発明の方法のもう1つの好ましい実施形態においては、該参照体は、(i) PPARガンマアゴニスト誘導性障害に罹患している被験者または被験者群、あるいは(ii) 塩酸ピオグリタゾンおよびマレイン酸ロシグリタゾンからなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触している被験者または被験者群に由来する。該方法のより好ましい実施形態に

10

20

30

40

50

おいては、試験サンプルと参照体とにおける、バイオマーカーに関する実質的に同じ量が、PPARガンマアゴニスト誘導性障害の指標となる。

【0082】

本発明の方法のもう1つの好ましい実施形態においては、該参照体は、(i) PPARガンマアゴニスト誘導性障害に罹患していないことが知られている被験者または被験者群、あるいは(ii) 塩酸ピオグリタゾンおよびマレイン酸ロシグリタゾンからなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触していない被験者または被験者群に由来する。該方法のより好ましい実施形態においては、参照体と比較して試験サンプルにおいて異なる、バイオマーカーに関する量が、PPARガンマアゴニスト誘導性障害の指標となる。

【0083】

本発明の方法の更にもう1つ実施形態においては、該参照体は被験者集団に関するバイオマーカーに関する計算参照体である。該方法のより好ましい実施形態においては、参照体と比較して試験サンプルにおいて異なる、バイオマーカーの量が、PPARガンマアゴニスト誘導性障害の指標となる。

【0084】

本発明はまた、

(a) PPARガンマアゴニスト誘導性障害を治療しうると疑われる候補物質に接触された、PPARガンマアゴニスト誘導性肝障害に罹患している被験者のサンプルにおいて、表4aまたは4bのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカーの量を決定し、

(b) 工程(a)において決定された量を参照体と比較し、それにより、PPARガンマアゴニスト誘導性障害を治療しうる物質を特定する工程を含む、PPARガンマアゴニスト誘導性障害を治療するための物質を特定する方法を含む。

【0085】

本発明の方法の特定の実施形態においては、

(a1) (i) 男性または女性の被験者を選択し、

(ii) PPARガンマアゴニスト誘導性肝障害を誘導しうると疑われる化合物と該被験者を接触させて、PPARガンマアゴニスト誘導性肝障害を誘発させ、あるいは

(a2) PPARガンマアゴニスト誘導性肝障害に罹患している男性または女性の被験者を選択し、

(b) 前記の選択された被験者から試験サンプルを得、

(c) 分析のための準備において該サンプルを前処理し、

(d) 該試験サンプルにおいて、表4aまたは4bのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカーの量を決定し、

(e) 工程(d)において決定された量を参照体と比較し、

(f) 工程(e)の比較に基づいて、PPARガンマアゴニスト誘導性肝障害を治療するための物質を特定し、選択することを含む、PPARガンマアゴニスト誘導性肝障害を治療するための物質を特定するための方法を提供する。

【0086】

前記方法の好ましい実施形態においては、該参照体は、(i) PPARガンマアゴニスト誘導性障害に罹患している被験者または被験者群、あるいは(ii) 塩酸ピオグリタゾンおよびマレイン酸ロシグリタゾンからなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触された被験者または被験者群に由来する。該方法のより好ましい実施形態においては、試験サンプルと参照体とにおいて異なる、バイオマーカーに関する量が、PPARガンマアゴニスト誘導性障害を治療しうる物質の指標となる。

【0087】

該方法のもう1つの好ましい実施形態においては、該参照体は、(i) PPARガンマアゴニスト誘導性障害に罹患していないことが知られている被験者または被験者群、あるいは(ii) 塩酸ピオグリタゾンおよびマレイン酸ロシグリタゾンからなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触していない被験者または被験者群に由来する。該方法のより好ましい実施形態においては、試験サンプルと参照体とにおける、バイオマーカーに関する

10

20

30

40

50

実質的に同じ量が、PPARガンマアゴニスト誘導性障害を治療しうる物質の指標となる。

【0088】

前記方法の更にもう1つ実施形態においては、該参照体は被験者集団におけるバイオマーカーに関する計算参照体である。該方法のより好ましい実施形態においては、試験サンプルと参照体とにおける、バイオマーカーに関する実質的に同じ量が、PPARガンマアゴニスト誘導性障害を治療しうる物質の指標となる。

【0089】

本発明はまた、被験者のサンプルにおいてPPARガンマアゴニスト誘導性肝障害を診断するための、表4aまたは4bのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカーあるいは該バイオマーカーに関する検出剤の使用に関する。

10

【0090】

更に、本発明は、

(a) サンプル中に存在するバイオマーカーの量の決定を可能にする、表4aまたは4bのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカーに関する検出剤を含む分析用ユニット、および、機能しうる形でそれに連結された、

(b) 分析用ユニットにより決定された前記の少なくとも1つのバイオマーカーの量を保存参照体と比較し、それによりPPARガンマアゴニスト誘導性障害を診断することを可能にするデータプロセッサおよび保存参照体を含む評価ユニットを含む、PPARガンマアゴニスト誘導性障害に罹患していると疑われる被験者のサンプルにおいてPPARガンマアゴニスト誘導性障害を診断するための装置に関する。

20

【0091】

本発明の装置の好ましい実施形態においては、該保存参照体は、PPARガンマアゴニスト誘導性障害に罹患していることが知られている被験者または被験者群、あるいは塩酸ピオグリタゾンおよびマレイン酸ロシグリタゾンからなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触された被験者または被験者群に由来する参照体であり、該データプロセッサは、該分析用ユニットにより決定された少なくとも1つのバイオマーカーの量を該保存参照体と比較するための命令を実行し、ここで、参照体と比較した場合の試験サンプルにおける少なくとも1つのバイオマーカーの実質的に同じ量がPPARガンマアゴニスト誘導性障害の存在の指標となり、あるいは、参照体とは異なる、試験サンプルにおける少なくとも1つのバイオマーカーの量が、PPARガンマアゴニスト誘導性障害の非存在の指標となる。

30

【0092】

本発明の装置のもう1つの好ましい実施形態においては、該保存参照体は、PPARガンマアゴニスト誘導性障害に罹患していないことが知られている被験者または被験者群、あるいは塩酸ピオグリタゾンおよびマレイン酸ロシグリタゾンからなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触していない被験者または被験者群に由来する参照体であり、該データプロセッサは、該分析用ユニットにより決定された少なくとも1つのバイオマーカーの量を該保存参照体と比較するための命令を実行し、ここで、参照体とは異なる、試験サンプルにおける少なくとも1つのバイオマーカーの量が、PPARガンマアゴニスト誘導性障害の存在の指標となり、あるいは、参照体と比較した場合の試験サンプルにおける少なくとも1つのバイオマーカーの実質的に同じ量がPPARガンマアゴニスト誘導性障害の非存在の指標となる。

40

【0093】

更に、本発明は、PPARガンマアゴニスト誘導性障害を診断するためのキットに関するものであり、該キットは、表4aまたは4bのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカーに関する検出剤と、前記の少なくとも1つのバイオマーカーに関する標準体とを含み、その濃度は、PPARガンマアゴニスト誘導性障害に罹患していることが知られている被験者または被験者群から誘導され、あるいは、PPARガンマアゴニスト誘導性障害に罹患していないことが知られている被験者または被験者群から誘導される。

【0094】

したがって、本発明は、

50

(a) PXRアゴニスト誘導性肝障害に罹患していると疑われる被験者の試験サンプルにおいて、表7a、7b、7cまたは7dのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカの量を決定し、

(b) 工程(a)において決定された量を参照体と比較し、それによりPXRアゴニスト誘導性肝障害を診断することを含む、PXRアゴニスト誘導性肝障害を診断するための方法に関する。

【0095】

本発明の方法の特定の実施形態においては、

(a) PXRアゴニスト誘導性肝障害に罹患していると疑われる男性または女性被験者を選択し、

(b) 前記の選択された被験者から試験サンプルを得、

(c) 分析のための準備において該サンプルを前処理し、

(d) 該試験サンプルにおいて、表7a、7b、7cまたは7dのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカの量を決定し、

(e) 工程(d)において決定された量を参照体と比較し、

(f) 工程(e)の比較に基づいて、PXRアゴニスト誘導性肝障害またはその症状のモニター、確認または分類により肝障害を診断することを含む、PXRアゴニスト誘導性肝障害を診断するための方法を提供する。

【0096】

前記方法の好ましい実施形態においては、該被験者は、PXRアゴニスト誘導性肝障害を誘導しうると疑われる化合物に接触されたものである。

【0097】

本発明はまた、被験者において或る化合物がPXRアゴニスト誘導性肝障害を誘導しうるかどうかを決定する方法であって、

(a) PXRアゴニスト誘導性肝障害を誘導しうると疑われる化合物と接触された被験者のサンプルにおいて、表7a、7b、7cまたは7dのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカの量を決定し、

(b) 工程(a)において決定された量を参照体と比較し、それにより、該化合物がPXRアゴニスト誘導性肝障害を誘導する可能性を決定することを含む方法に関する。

【0098】

本発明の方法の特定の実施形態においては、被験者において或る化合物がPXRアゴニスト誘導性肝障害を誘導しうるかどうかを決定するための方法であって、

(a1) (i) 男性または女性の被験者を選択し、

(ii) PXRアゴニスト誘導性肝障害を誘導しうると疑われる化合物と該被験者を接触させ、あるいは

(a2) PXRアゴニスト誘導性肝障害を誘導しうる化合物に接触した男性または女性の被験者を選択し、

(b) 前記の選択された被験者から試験サンプルを得、

(c) 分析のための準備において該サンプルを前処理し、

(d) 該試験サンプルにおいて、表7a、7b、7cまたは7dのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカの量を決定し、

(e) 工程(d)において決定された量を参照体と比較し、

(f) 工程(e)の比較に基づいて、該化合物がPXRアゴニスト誘導性肝障害を誘導しうるか否かを特定することを含む方法を提供する。

【0099】

前記方法の好ましい実施形態においては、該化合物は、17-アルファ-エチニルエストラジオール、17-アルファ-エチニルエストラジオール、タモキシフェン(Tamoxifen)および塩酸テトラサイクリンからなる群から選択される少なくとも1つの化合物である。

【0100】

本発明の方法のもう1つの好ましい実施形態においては、該参照体は、(i) PXRアゴニ

10

20

30

40

50

スト誘導性肝障害に罹患している被験者または被験者群、あるいは (ii) 17-アルファ-エチニルエストラジオール、17-アルファ-エチニルエストラジオール、タモキシフェンおよび塩酸テトラサイクリンからなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触された被験者または被験者群に由来する。該方法のより好ましい実施形態においては、試験サンプルと参照体とにおける、バイオマーカーに関する実質的に同じ量が、PXRアゴニスト誘導性肝障害の指標となる。

【0101】

本発明の方法のもう1つの好ましい実施形態においては、該参照体は、(i) PXRアゴニスト誘導性肝障害に罹患していないことが知られている被験者または被験者群、あるいは (ii) 17-アルファ-エチニルエストラジオール、17-アルファ-エチニルエストラジオール、タモキシフェンおよび塩酸テトラサイクリンからなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触していない被験者または被験者群に由来する。該方法のより好ましい実施形態においては、参照体と比較して試験サンプルにおいて異なる、バイオマーカーに関する量が、PXRアゴニスト誘導性肝障害の指標となる。

10

【0102】

本発明の方法の更にもう1つ実施形態においては、該参照体は被験者集団に関するバイオマーカーに関する計算参照体である。該方法のより好ましい実施形態においては、参照体と比較して試験サンプルにおいて異なる、バイオマーカーの量が、PXRアゴニスト誘導性肝障害の指標となる。

20

【0103】

本発明はまた、

(a) PXRアゴニスト誘導性肝障害を治療しうると疑われる候補物質に接触された、PXRアゴニスト誘導性肝障害に罹患している被験者のサンプルにおいて、表7a、7b、7cまたは7dのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカーの量を決定し、

(b) 工程(a)において決定された量を参照体と比較し、それにより、PXRアゴニスト誘導性肝障害を治療しうる物質を特定する工程を含む、肝障害を治療するための物質を特定する方法を含む。

【0104】

本発明の方法の特定の実施形態においては、

(a1) (i) 男性または女性の被験者を選択し、

(ii) PXRアゴニスト誘導性肝障害を誘導しうると疑われる化合物と該被験者を接触させて、PXRアゴニスト誘導性肝障害を誘発させ、あるいは

(a2) PXRアゴニスト誘導性肝障害に罹患している男性または女性の被験者を選択し、

(b) 前記の選択された被験者から試験サンプルを得、

(c) 分析のための準備において該サンプルを前処理し、

(d) 該試験サンプルにおいて、表7a、7b、7cまたは7dのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカーの量を決定し、

(e) 工程(d)において決定された量を参照体と比較し、

(f) 工程(e)の比較に基づいて、PXRアゴニスト誘導性肝障害を治療するための物質を特定し、選択することを含む、PXRアゴニスト誘導性肝障害を治療するための物質を特定するための方法を提供する。

30

40

【0105】

前記方法の好ましい実施形態においては、該参照体は、(i) PXRアゴニスト誘導性肝障害に罹患している被験者または被験者群、あるいは (ii) 17-アルファ-エチニルエストラジオール、17-アルファ-エチニルエストラジオール、タモキシフェンおよび塩酸テトラサイクリンからなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触された被験者または被験者群に由来する。該方法のより好ましい実施形態においては、試験サンプルと参照体とにおいて異なる、バイオマーカーに関する量が、PXRアゴニスト誘導性肝障害を治療しうる物質の指標となる。

【0106】

50

該方法のもう1つの好ましい実施形態においては、該参照体は、(i) PXRアゴニスト誘導性肝障害に罹患していないことが知られている被験者または被験者群、あるいは(ii) 17-アルファ-エチニルエストラジオール、17-アルファ-エチニルエストラジオール、タモキシフェンおよび塩酸テトラサイクリンからなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触していない被験者または被験者群に由来する。該方法のより好ましい実施形態においては、試験サンプルと参照体とにおける、バイオマーカーに関する実質的に同じ量が、PXRアゴニスト誘導性肝障害を治療しうる物質の指標となる。

【0107】

前記方法の更にもう1つ実施形態においては、該参照体は被験者集団におけるバイオマーカーに関する計算参照体である。該方法のより好ましい実施形態においては、試験サンプルと参照体とにおける、バイオマーカーに関する実質的に同じ量が、PXRアゴニスト誘導性肝障害を治療しうる物質の指標となる。

10

【0108】

本発明はまた、被験者のサンプルにおいてPXRアゴニスト誘導性肝障害を診断するための、表7a、7b、7cまたは7dのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカーあるいは該バイオマーカーに関する検出剤の使用に関する。

【0109】

更に、本発明は、

(a) サンプル中に存在するバイオマーカーの量の決定を可能にする、表7a、7b、7cまたは7dのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカーに関する検出剤を含む分析用ユニット、および、機能しうる形でそれに連結された、

20

(b) 分析用ユニットにより決定された前記の少なくとも1つのバイオマーカーの量を保存参照体と比較し、それによりPXRアゴニスト誘導性肝障害を診断することを可能にするデータプロセッサおよび保存参照体を含む評価ユニットを含む、PXRアゴニスト誘導性肝障害に罹患していると疑われる被験者のサンプルにおいてPXRアゴニスト誘導性肝障害を診断するための装置に関する。

【0110】

本発明の装置の好ましい実施形態においては、該保存参照体は、PXRアゴニスト誘導性肝障害に罹患していることが知られている被験者または被験者群、あるいは17-アルファ-エチニルエストラジオール、17-アルファ-エチニルエストラジオール、タモキシフェンおよび塩酸テトラサイクリンからなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触された被験者または被験者群に由来する参照体であり、該データプロセッサは、該分析用ユニットにより決定された少なくとも1つのバイオマーカーの量を該保存参照体と比較するための命令を実行し、ここで、参照体と比較した場合の試験サンプルにおける少なくとも1つのバイオマーカーの実質的に同じ量が肝障害の存在の指標となり、あるいは、参照体とは異なる、試験サンプルにおける少なくとも1つのバイオマーカーの量が、PXRアゴニスト誘導性肝障害の非存在の指標となる。

30

【0111】

本発明の装置のもう1つの好ましい実施形態においては、該保存参照体は、PXRアゴニスト誘導性肝障害に罹患していないことが知られている被験者または被験者群、あるいは17-アルファ-エチニルエストラジオール、17-アルファ-エチニルエストラジオール、タモキシフェンおよび塩酸テトラサイクリンからなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触していない被験者または被験者群に由来する参照体であり、該データプロセッサは、該分析用ユニットにより決定された少なくとも1つのバイオマーカーの量を該保存参照体と比較するための命令を実行し、ここで、参照体とは異なる、試験サンプルにおける少なくとも1つのバイオマーカーの量が、PXRアゴニスト誘導性肝障害の存在の指標となり、あるいは、参照体と比較した場合の試験サンプルにおける少なくとも1つのバイオマーカーの実質的に同じ量がPXRアゴニスト誘導性肝障害の非存在の指標となる。

40

【0112】

更に、本発明は、PXRアゴニスト誘導性肝障害を診断するためのキットに関するもので

50

あり、該キットは、表7a、7b、7cまたは7dのいずれかから選択される少なくとも1つのバイオマーカーに関する検出剤と、前記の少なくとも1つのバイオマーカーに関する標準体とを含み、その濃度は、PXRアゴニスト誘導性肝障害に罹患していることが知られている被験者または被験者群から誘導され、あるいは、PXRアゴニスト誘導性肝障害に罹患していないことが知られている被験者または被験者群から誘導される。

【0113】

特に、本発明はまた、以下の特定の方法、使用、装置およびキットを含む。

【0114】

以下の定義および説明は、必要に応じて変更を加えて、本発明の前記実施形態および後記実施形態の全てに適用される。

10

【0115】

本発明において言及されている方法は前記工程から実質的になることが可能であり、あるいは更なる工程を含むことが可能である。更なる工程は、サンプル前処理、または該方法により得られた診断結果の評価に関するものでありうる。好ましい更なる評価工程が本明細書中に記載されている。該方法は部分的または全体的に自動化により補助されうる。例えば、バイオマーカーの量の決定に関する工程はロボットによる及び自動化された読取装置により自動化されうる。同様に、量の比較に関する工程は、実行されると自動的に比較を行うプログラムコードを含む適当なデータ処理装置、例えばコンピュータにより自動化されうる。そのような場合の参照体は保存参照体、例えばデータベースから提供される。該方法は、好ましくは、被験者のサンプルに対してエクスピボ (ex vivo) で行われる、すなわち、ヒトまたは動物の身体に対して行われるのではない方法であると理解されるべきである。

20

【0116】

本明細書中で用いる「診断」なる語は、被験者が、本明細書に記載されている中毒、疾患または障害のような状態に罹患している又はそのような状態に対する素因を有する確率を評価することを意味する。素因の診断は、被験者が未来の所定時間枠内に該状態を発生する可能性の予測または予後と称されることもある。当業者により理解されるとおり、そのような評価は、診断される被験者の100%に関して補正されることが好ましいものの、通常、そのように補正されない可能性がある。しかし、該用語は、統計的に有意な比率の被験者該状態に罹患している又は該状態の素因を有すると確認されうることを要する。比率が統計的に有意であるかどうかは、種々の良く知られた統計評価手段、例えば、信頼区間の決定、p値決定、スチューデントt検定、マン・ホイットニー (Mann-Whitney) 検定などを用いて、更なる苦勞を伴うことなく、当業者により決定されうる。詳細はDowdyおよびWearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, New York 1983に見出される。好ましい信頼区間は少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%または少なくとも95%である。p値は、好ましくは、0.2、0.1、0.05である。

30

【0117】

本発明による診断はまた、状態またはその症状およびその素因のモニター、確認および分類を含む。モニターは、既に診断された状態または素因を追跡し続けることを意味する。モニターは、例えば、該状態または素因の進行を決定すること、該状態の進行に対する特定の治療の影響、あるいは素因を有する被験者における該状態の発生に対する予防的手段 (例えば、予防的治療または食事) の影響を決定することを含む。該治療、予防的手段または食事は調節可能であり、該モニターの一態様として該調節の影響が調べられうる。更に、該状態またはその素因の進行をモニターする場合、該モニターは、モニター頻度を決定すること、ならびに追加的なモニター手段、例えば、追加的な生化学的または他の健康パラメータの測定を推奨および/または実施することをも含む。確認は、他の指標またはマーカーを用いて既に決定された状態または該状態の素因の診断を補強または確認することに関するものである。確認は、1つの態様においては、確認された状態またはその素因に基づく治療手段の投与または適合化をも含む。分類は、(i) 該状態を、例

40

50

えば、該状態に伴う症状の強度に対応する種々の等級に割り当てること、または(ii)該状態に伴う種々の段階、疾患または障害を識別することに関するものである。分類は、1つの態様においては、分類された状態またはその素因に基づく治療手段の投与または適合化をも含む。該状態の素因は、リスクの度合、すなわち、被験者が後に該状態を発生する確率に基づいて分類されうる。更に、分類はまた、好ましくは、本発明の方法により試験される化合物に作用様式を割り当てることを含む。特に、本発明の方法は、作用様式が未知の化合物の特定の作用様式の決定を可能にする。これは、好ましくは、該化合物に典型的なバイオマーカープロファイルまたは少なくとも1つのバイオマーカーに関して決定された量を、参照体としての作用様式が既知の化合物に関して決定されたバイオマーカープロファイルまたはバイオマーカーの量と比較することにより達成される。作用様式の分類は、化合物の毒性の、より一層信頼しうる評価を可能にする。なぜなら、該化合物の分子標的が特定されるからである。疾患または状態を診断することを目的とした本発明の方法は、毒物学的作用に関して化合物をスクリーニングし、それを報告するために、および化合物の開発において、例えば、安全性の増大、または薬物の開発、または有効濃度の特定において用いられうる。

10

20

30

40

50

**【0118】**

本発明においては、化合物は、肝障害を誘導しうるものとしても特定されうる。そのような特定は、好ましくは、該化合物の製造、取扱い、貯蔵および/または輸送ならびにその用途に関して提案することをも含む。そのような提案は、製造、取扱い、貯蔵、輸送および/または適用に関する安全性プロトコルを確立すること、その毒性の可能性に応じて該化合物を標識すること、ヒト、動物および/または環境に対する曝露を制限することを含む。更に、化合物を、肝障害を惹起するものとして特定する場合には、好ましくは、安全性レベル、例えばLD50/LC50および/またはED50/EC50値ならびに誘導閾値を決定する。

**【0119】**

本明細書中で用いる「肝障害」なる語は、肝機能の欠損を引き起こす又は他の疾患を引き起こす若しくは他の疾患を伴う、肝臓または肝細胞のいずれかの損傷または欠損を意味する。したがって、本明細書中で用いる肝障害なる語は、一般に、パラセタモール誘導性肝毒性、PPARアルファアゴニスト誘導性肝障害および/またはPXRアゴニスト誘導性肝障害を含む。好ましくは、本明細書中で用いる肝障害は、化合物または薬物の投与により誘導される又は該投与の結果である、すなわち、いわゆる、毒素誘導性肝障害である。

**【0120】**

肝障害の前記徴候の症状および臨床徴候は当業者に良く知られており、毒物学の標準的な書物、例えばH. Marquardt, S. G. Schafer, R. O. McClellan, F. Welsch (編), "Toxicology", Chapter 13: The Liver, 1999, Academic Press, Londonに詳細に記載されている。

**【0121】**

本明細書中で用いるパラセタモール誘導性肝毒性は、好ましくは、肝臓の機能の欠損、特に肝臓損傷を意味する。より好ましくは、該用語は急性肝不全を含む。

**【0122】**

好ましくは、本発明の方法により決定される少なくとも1つのバイオマーカーは、該肝障害がパラセタモール誘導性肝毒性である場合、表1または2のいずれかから選択される。

**【0123】**

本明細書中で用いるPPARアルファアゴニスト誘導性肝障害は、好ましくは、肝臓の機能の欠損をも意味する。好ましくは、PPARアルファアゴニスト誘導性肝障害は、病的に増進したペロキシソーム増殖、酸化ストレスおよび/もしくはDNA損傷を伴う障害、ならびに/または肝癌を含む。

**【0124】**

好ましくは、本発明の方法により決定される少なくとも1つのバイオマーカーは、該肝障害がPPARガンマアゴニスト誘導性肝障害である場合、表3aまたは3bのいずれかから選択

される。

【0125】

本明細書中で用いるPPARガンマアゴニスト誘導性障害は、好ましくは、脂肪組織および/または心臓の機能の欠損を意味する。好ましくは、PPARアルファアゴニスト誘導性障害は心臓障害であり、より好ましくは、心肥大、心不全、心臓容積過負荷および/または腎機能の欠損である。

【0126】

好ましくは、本発明の方法により決定される少なくとも1つのバイオマーカーは、該肝障害がPPARガンマアゴニスト誘導性障害である場合、表4aまたは4bのいずれかから選択される。

10

【0127】

本明細書中で用いるPXRアゴニスト誘導性肝障害は、好ましくは、肝臓の機能の欠損をも意味する。好ましくは、PXRアゴニスト誘導性肝障害は、Cyp3A4ファミリーの肝臓酵素の病的増加（肝臓酵素誘導）、酸化ストレスおよび/もしくはDNA損傷を伴う障害ならびに/または肝癌を含む。

【0128】

好ましくは、本発明の方法により決定される少なくとも1つのバイオマーカーは、該肝障害がPXRアゴニスト誘導性障害である場合、表7a、7b、7cまたは7dのいずれかから選択される。

【0129】

該表に挙げられているバイオマーカーの2以上の組合せが診断を更に補強することが本発明において判明した。なぜなら、該バイオマーカーのそれぞれは、見掛け上は統計的に独立した診断予測因子だからである。更に、マーカーの存在量に対する他の組織からの影響が相殺されるため、肝障害に対する特異性も有意に増加する。したがって、本明細書中で用いる「少なくとも1つ」なる語は、好ましくは、添付の表のいずれかに記載されているバイオマーカーの少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個または少なくとも10個の組合せに関するものである。好ましくは、該表のいずれかに列挙されている全てのバイオマーカーが本発明の方法に従い組合せて決定されるべきである。

20

【0130】

個々の表からの肝障害または他の障害に関する及び該表に記載されている適応症に関するバイオマーカーの好ましい群または組合せは以下のとおりである。

30

【0131】

表1（パラセタモール誘導性肝障害）：ホスファチジルコリン（C16:0,C20:5）、パルミチン酸（C16:0）、リノール酸（C18:cis[9,12]2）、TAG（C16:0,C18:2）または補酵素Q9。

【0132】

表2（パラセタモール誘導性肝障害）：ホスファチジルコリン（C16:1,C18:2）、リゾホスファチジルコリン（C18:1）、4-ヒドロキシフェニルピルパート、フィトスフィンゴシンまたはホスファチジルコリン（C18:0,C18:1）。

40

【0133】

表3aおよび3b（PPARアルファアゴニスト誘導性肝障害）：コレステロール、カンペステロール、myo-イノシトール-2-ホスファート、脂質画分、リゾホスファチジルコリン（C18:0）またはアラキドン酸（C20:cis[5,8,11,14]4）。

【0134】

表4aおよび4b（PPARガンマアゴニスト誘導性障害）：ドコサヘキサエン酸（C22:cis[4,7,10,13,16,19]6）、オルニチン、トレオニン、ホスファチジルコリン（C18:0,C22:6）またはリシン。

【0135】

したがって、好ましくは、前記の少なくとも1つのバイオマーカーは、前記の群から選

50

扱われる少なくとも1つのバイオマーカーであり、あるいは前記の少なくとも1つのバイオマーカーは、前記の群のバイオマーカーからなる又はそれらを含むバイオマーカーの組合せである。前記のバイオマーカーおよびバイオマーカーの組合せは、後記実施例に更に詳細に記載されているとおり、格別な高い診断的価値を有する鍵バイオマーカーとして特定されている。

#### 【0136】

更にまた、公知代謝産物、遺伝的突然変異、転写産物および/もしくはタンパク質の量または酵素活性を含む他のバイオマーカーまたは臨床的パラメータが尚も決定されうる。本発明の方法に従い決定されうるそのような追加的な臨床的または生化学的パラメータは当技術分野で良く知られている。

10

#### 【0137】

本明細書中で用いる「バイオマーカー」なる語は、サンプル中の存在または濃度が状態（好ましくは、本明細書に記載されている肝障害）の存在もしくは非存在または強度の指標となる化合物を意味する。該化合物は、好ましくは、代謝産物またはそれに由来するアナライトである。アナライトは、生物において見出される実際の代謝産物と同一でありうる化合物である。しかし、該用語は、内因的に生じる又は単離もしくはサンプル前処理中に生じる又は本発明の方法の実施の結果として（例えば、精製および/または決定工程中に）生じるそのような代謝産物の誘導体をも含む。特定の場合には、該アナライトは、化学的特性、例えば溶解度により更に特徴づけられる。該特性により、該アナライトは、精製および/または決定プロセス中に得られる極性または脂質画分中に見出されうる。したがって、化学的特性、好ましくは溶解度は、精製および/または決定プロセス中に得られる極性または脂質画分中のアナライトの存在をもたらずであろう。したがって、精製および/または決定プロセス中に得られる極性または脂質画分中のアナライトの存在として考慮される化学的特性、特に溶解度は、該アナライトを更に特徴づけ、その特定を補助するであろう。これらの化学的特性がどのようにして決定され、考慮されうるかについての詳細は、後記実施例で見出される。好ましくは、該アナライトは定性的および定量的な状態で代謝産物を表し、したがって、被験者における又は少なくとも該被験者の試験サンプルにおける代謝産物の存在または非存在または量に関して結論づけることを必然的に可能にする。バイオマーカー、アナライトおよび代謝産物は本明細書中では単数形で言及されているが、該用語の複数形をも含む。すなわち、それらは、同じ分子種の複数のバイオマーカー、アナライトまたは代謝産物分子を含む。更に、本発明のバイオマーカーは必ずしも1つの分子種には対応していない。むしろ、該バイオマーカーは化合物の立体異性体またはエナンチオマーを含みうる。更に、バイオマーカーは異性体分子の生物学的クラスの異性体の集合をも表しうる。該異性体は幾つかの場合には同一の分析的特徴を示し、したがって、後記実施例に適用されている方法を含む種々の分析方法によっては区別されない。しかし、該異性体は、少なくとも同一の総和式パラメータを共有し、したがって例えば脂質の場合、脂肪酸および/またはスフィンゴ塩基部分において同一鎖長および同一数の二重結合を共有する。

20

30

#### 【0138】

本明細書中で用いる「試験サンプル」なる語は、本発明の方法による肝障害の診断のために使用されるサンプルを意味する。好ましくは、該試験サンプルは生物学的サンプルである。生物学的起源からのサンプル（すなわち、生物学的サンプル）は、通常、複数の代謝産物を含む。本発明の方法において使用される好ましい生物学的サンプルは、体液、好ましくは血液、血漿、血清、唾液、胆汁、尿または脳脊髄液からのサンプル、あるいは細胞、組織または器官、好ましくは肝臓に由来するサンプル（例えば、生検）である。より好ましくは、該サンプルは血液、血漿または血清サンプル、最も好ましくは血漿サンプルである。生物学的サンプルは、本明細書に特定されている被験体に由来する。前記の種々のタイプの生物学的サンプルを得るための技術は当技術分野で良く知られている。例えば、血液サンプルは採血により入手可能であり、一方、組織または器官サンプルは例えば生検により得られる。

40

50

## 【0139】

前記サンプルは、好ましくは、それらが本発明の方法に使用される前に、前処理される。後記に更に詳細に記載されているとおり、該前処理は、該化合物を遊離させ若しくは分離するために又は過剰な物質もしくは廃棄物を除去するために必要な処理を含みうる。適当な技術は、遠心分離、抽出、分画、限外濾過、タンパク質沈殿およびそれに続く濾過および精製、ならびに/または化合物の濃縮(富化)を含む。更に、化合物の分析に適した形態または濃度の該化合物を得るために、他の前処理が行われる。例えば、本発明の方法においてガスクロマトグラフィー結合質量分析を用いる場合、該ガスクロマトグラフィーの前に該化合物を誘導体化することが必要であろう。適当かつ必要な前処理は、本発明の方法を行うために用いられる手段に左右され、当業者に良く知られている。前記の前処理サンプルも、本発明に従い用いられる「サンプル」なる語に含まれる。

10

## 【0140】

本明細書中で用いる「被験者」なる語は、動物、好ましくは哺乳動物、例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ハムスター、ブタ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、サルまたはウシ、そしてまた、好ましくはヒトを意味する。より好ましくは、該被験者はげっ歯類、最も好ましくはラットである。本発明の方法を使用して診断されうる他の動物としては、魚類、鳥類または爬虫類が挙げられる。好ましくは、該被験者は、肝障害を誘導しうると疑われる化合物に接触された又は接触している。肝障害を誘導すると疑われる化合物と接触された被験者は、例えば、スクリーンアッセイ、例えば化合物の毒性に関するスクリーニングアッセイにおいて使用されるラットのような実験用動物でありうる。肝障害を誘導しうると疑われる化合物と接触された被験者はまた、適当な療法を選択するために診断される被験者でありうる。好ましくは、本明細書中で用いられる肝障害を誘導しうる化合物は1-メチル-2-ピロリドン、ベザフィブラート(Bezafibrate)、カルベンダジム(Carbendazim)、ジメチルホルムアミド、ジモキシストロビン(Dimoxystrobin)、メタザクロル(Metazachlor)、N-アセチル-p-アミノフェノール、Wy-14643、17-アルファ-エチニルエストラジオール、17-アルファ-エチニルエストラジオール、タモキシフェン(Tamoxifen)および塩酸テトラサイクリンである。

20

## 【0141】

好ましくは、本発明の方法により決定される少なくとも1つのバイオマーカーは、被験者が女性である場合には、表1、7aまたは7bのいずれかから選択される。

30

## 【0142】

好ましくは、本発明の方法により決定される少なくとも1つのバイオマーカーは、被験者が男性である場合には、表2、3a、3b、4a、4b、7cまたは7dのいずれかから選択される。

## 【0143】

本明細書中で用いる「量を決定する」なる語は、該バイオマーカー、すなわち、該代謝産物またはアナライトの少なくとも1つの特徴的特性を決定することを意味する。本発明における特徴的特性は、バイオマーカーの生化学的特性を含む物理的および/または化学的特性を特徴づける特性である。そのような特性には、例えば、分子量、粘度、密度、電荷、スピン、光学活性、色、蛍光、化学発光、元素組成、化学構造、他の化合物との反応性、生物学的測定系において応答を惹起する能力(例えば、レポーター遺伝子の誘導)などが含まれる。該特性に関する値は特徴的特性として利用可能であり、当技術分野で良く知られている技術により決定されうる。更に、該特徴的特性は、標準的な操作、例えば数学的計算、例えば掛け算、割り算または対数計算によりバイオマーカーの物理的および/または化学的特性の値から誘導される任意の特性でありうる。最も好ましくは、少なくとも1つの特徴的特性はバイオマーカーおよびその量の決定および/または化学的特定を可能にする。したがって、該特性値は、好ましくは、該特性値が誘導されたバイオマーカーの存在量に関する情報をも含む。例えば、バイオマーカーの特性値は質量スペクトルにおけるピークでありうる。そのようなピークはバイオマーカーの特徴的情報、すなわち、m/z(質量対電荷比)の情報、およびサンプル中のバイオマーカーの存在量(すなわち、そ

40

50

の量)に関する強度値を含む。

【0144】

前記のとおり、本発明の方法に従い決定される少なくとも1つのバイオマーカーは、好ましくは、定量的または半定量的に決定されうる。定量的決定のためには、絶対的または厳密な量が決定され、あるいは、前記の特徴的特性に関して決定された値に基づいてバイオマーカーの相対量が決定されるであろう。バイオマーカーの厳密な量が決定できない又は決定されない場合に、相対量が決定されうる。そのような場合においては、バイオマーカーが存在する量が、該バイオマーカーを第2の量で含む第2のサンプルに対して増加するか減少するかが決定されうる。したがって、バイオマーカーの定量分析は、バイオマーカーの半定量分析と称されることがあるものを含む。

10

【0145】

更に、本発明の方法において行う決定は、好ましくは、前記の分析工程の前に化合物分離工程を用いることを含む。好ましくは、該化合物分離工程は、サンプルに含まれる少なくとも1つのバイオマーカーの時間分解分離をもたらす。したがって、本発明に従い好ましくは用いられる分離のための適当な技術には、全てのクロマトグラフィー分離技術、例えば液体クロマトグラフィー(LC)、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、ガスクロマトグラフィー(GC)、薄層クロマトグラフィー、サイズ排除またはアフィニティクロマトグラフィーが含まれる。これらの技術は当技術分野で良く知られており、更なる苦勞を伴うことなく当業者により適用されうる。最も好ましくは、LCおよび/またはGCは、本発明の方法で想定されるクロマトグラフィー技術である。バイオマーカーのそのような決定のための適当な装置は当技術分野で良く知られている。好ましくは、質量分析、特に、ガスクロマトグラフィー質量分析(GC-MS)、液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS)、直接注入質量分析またはフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析(FT-ICR-MS)、毛管電気泳動質量分析(CE-MS)、高速液体クロマトグラフィー共役質量分析(HPLC-MS)、四重極質量分析、任意の連続結合質量分析、例えばMS-MSまたはMS-MS-MS、誘導結合プラズマ質量分析(ICP-MS)、熱分解質量分析(Py-MS)、イオン移動度質量分析または飛行時間型質量分析(TOF)が用いられる。最も好ましくは、LC-MSおよび/またはGC-MSは、後記で詳細に記載されているとおりに用いられる。該技術は、例えば、Nissen 1995, *Journal of Chromatography A*, 703: 37-57、US 4,540,884またはUS 5,397,894(それらの開示内容を参照により本明細書に組み入れることとする)に開示されている。質量分析技術の代わりに又はそれに加えて、以下の技術が化合物の決定に用いられうる：核磁気共鳴(NMR)、磁気共鳴撮像(MRI)、フーリエ変換赤外分析(FT-IR)、紫外(UV)分光法、屈折率(RI)、蛍光検出、放射化学検出、電気化学検出、光散乱(LS)、分散ラマン分光法またはフレームイオン化検出(FID)。これらの技術は当業者に良く知られており、更なる苦勞を伴うことなく適用されうる。本発明の方法は、好ましくは、自動化により補助される。例えば、サンプル加工または前処理はロボットにより自動化されうる。データ処理および比較は、好ましくは、適当なコンピュータプログラムおよびデータベースにより補助される。前記の自動化は、本発明の方法をハイスループット法で用いることを可能にする。

20

30

【0146】

更に、バイオマーカーは特異的な化学的または生物学的アッセイによっても決定されうる。該アッセイは、サンプル中のバイオマーカーを特異的に検出することを可能にする手段を含む。好ましくは、該手段はバイオマーカーの化学構造を特異的に認識する能力を有し、あるいは、バイオマーカーを、他の化合物とのその反応性または生物学的測定系において応答を惹起するその能力(例えば、レポーター遺伝子の誘導)に基づいて、特異的に特定する能力を有する。バイオマーカーの化学構造を特異的に認識しうる手段は、好ましくは、バイオマーカーに特異的に結合する検出剤、より好ましくは、抗体、または化学構造体と特異的に相互作用する他のタンパク質、例えば受容体もしくは酵素もしくはアプタマーである。特異的抗体は、例えば、当技術分野で良く知られた方法により、バイオマーカーを抗原として使用して得られうる。本明細書に記載されている抗体には、ポリクロー

40

50

ナル抗体およびモノクローナル抗体の両方、ならびに該抗原またはハプテンに結合しうる Fv、Fab および F(ab)<sub>2</sub> フラグメントのようなそれらのフラグメントが含まれる。本発明はまた、所望の抗原特異性を示す非ヒトドナー抗体のアミノ酸配列がヒトアクセプター抗体の配列と組合されたヒト化ハイブリッド抗体をも含む。更に、一本鎖抗体も含まれる。該ドナー配列は、通常、少なくとも、該ドナーの抗原結合性アミノ酸残基を含むが、該ドナー抗体の構造的および/または機能的に関連した他のアミノ酸残基をも含む。そのようなハイブリッドは、当技術分野で良く知られた幾つかの方法により製造されうる。該代謝産物を特異的に認識しうる適当なタンパク質は、好ましくは、バイオマーカーの代謝変換に参与する酵素である。該酵素は、バイオマーカー、例えば代謝産物を基質として利用することが可能であり、あるいは基質をバイオマーカー、例えば代謝産物に変換しうる。更に、該抗体は、バイオマーカーを特異的に認識するオリゴペプチドを得るための基礎として使用されうる。これらのオリゴペプチドは、例えば、該バイオマーカーに対する酵素の結合ドメインまたはポケットを含む。抗体および/または酵素に基づく適当なアッセイは RIA (ラジオイムノアッセイ)、ELISA (酵素結合イムノソルベントアッセイ)、サンドイッチ酵素免疫試験、電気化学発光サンドイッチイムノアッセイ (ECLIA)、解離増強ラントニド蛍光イムノアッセイ (DELFI A) または固相免疫試験でありうる。バイオマーカーに特異的に結合するアプタマーは、当技術分野で良く知られた方法により得られうる (Elington 1990, Nature 346:818-822; Vater 2003, Curr Opin Drug Discov Devel 6(2): 253-261)。更に、バイオマーカーはまた、他の化合物とのその反応性に基づいて、すなわち、特異的化学反应により特定されうる。更に、バイオマーカーは、生物学的測定系において応答を惹起するその能力により、サンプルにおいて決定されうる。生物学的応答は、サンプルに含まれる代謝産物の存在および/または量を示す測定結果として検出される。該生物学的応答は、例えば、遺伝子発現の誘導、または細胞もしくは生物の表現型応答でありうる。

10

20

30

40

50

**【0147】**

「参照体」なる語は、少なくとも1つのバイオマーカーの特徴的特性の値、そして好ましくは、肝障害に相関されうるバイオマーカーの量を示す値を意味する。

**【0148】**

そのような参照体は、好ましくは、肝障害に罹患している被験者または被験者群に由来するサンプルから、あるいは1-メチル-2-ピロリドン、ベザフィブラート (Bezafibrate)、カルベンダジム (Carbendazim)、ジメチルホルムアミド、ジモキシストロビン (Dimoxystrobin)、メタザクロル (Metazachlor)、N-アセチル-p-アミノフェノール、Wy-14643、17-アルファ-エチニルエストラジオール、17-アルファ-エチニルエストラジオール、タモキシフェン (Tamoxifen) および塩酸テトラサイクリンに接触された被験者または被験者群に由来するサンプルから得られる。被験者または被験者群は、該化合物が生物利用可能性となるそれぞれの局所または全身投与方法により、該化合物に接触されうる。

**【0149】**

好ましくは、前記化合物は、後記実施例および後記表に記載されているとおり、参照体が由来する被験者または被験者群の個体に投与されうる。

**【0150】**

特に、1-メチル-2-ピロリドン、カルベンダジム (Carbendazim)、ジメチルホルムアミド、ジモキシストロビン、メタザクロルおよびN-アセチル-p-アミノフェノールはパラセタモール誘導性肝障害を誘導しうるであろう。特に、塩酸ピオグリタゾン (Pioglitazone hydrochloride) およびマレイン酸ロシグリタゾン (Rosiglitazone maleate) はPPARガンマアゴニスト誘導性障害を誘導する能力を有し、したがって、好ましくは、PPARアルファアゴニスト作用性化合物とPPARガンマアゴニスト作用性化合物とを識別するために本発明の方法において適用されうる。17-アルファ-エチニルエストラジオール、17-アルファ-エチニルエストラジオール、タモキシフェンおよび塩酸テトラサイクリンはPXRアゴニスト誘導性肝障害を誘導しうるであろう。

**【0151】**

その代替手段であるが、それでもなお、同様に好ましいものとして、該参照体は、1-メチル-2-ピロリドン、ベザフィブラート (Bezafibrate)、カルベンダジム (Carbendazim)、ジメチルホルムアミド、ジモキシストロピン (Dimoxystrobin)、メタザクロル (Metazachlor)、N-アセチル-p-アミノフェノール、Wy-14643、17-アルファ-エチニルエストラジオール、17-アルファ-エチニルエストラジオール、タモキシフェン (Tamoxifen) および塩酸テトラサイクリンに接触していない被験者または被験者群、あるいは肝障害に関して、そしてより好ましくは他の疾患に関して健康な被験者または被験者群に由来するサンプルから得られうる。

【0152】

肝障害に関して前記に記載されている参照体の説明は、必要に応じて変更を加えて、本発明の方法で診断されることになるPPARガンマアゴニスト誘導性障害、例えば心臓障害にも適用される。そのような場合、参照体に使用される化合物は、好ましくは、塩酸ピオグリタゾンおよびマレイン酸ロシグリタゾンであると理解されるであろう。

10

【0153】

該参照体は、バイオマーカーの量に関して前記で記載されているとおりに決定されうる。特に、参照体は、好ましくは、被験者群の個体のそれぞれからのサンプル中の少なくとも1つのバイオマーカーのそれぞれの相対量または絶対量を別々に決定し、ついで、本明細書に記載されている統計的技術を用いて該相対量もしくは絶対量またはそれらから誘導されるいずれかのパラメータに関する中央値または平均値を決定することにより、本明細書に記載されている被験者群のサンプルから得られる。あるいは、該参照体は、好ましくは、本明細書に記載されている被験者群のサンプルの混合物から、サンプル中の少なくとも1つのバイオマーカーのそれぞれの相対量または絶対量を決定することにより得られうる。そのような混合物は、好ましくは、該群の個体のそれぞれから得られたサンプルからの等体積の部分からなる。

20

【0154】

更に、該参照体は、同様に好ましくは、計算参照体、最も好ましくは、個体の集団に由来する少なくとも1つのバイオマーカーのそれぞれに関する相対量または絶対量の平均値または中央値でありうるであろう。個体の該集団は、本発明の方法により調べられる被験者が由来する集団である。しかし、計算参照体を決定するために調べられる被験者の集団は、好ましくは、見掛け上健康な被験者 (例えば、非治療者) からなるか、あるいは該集団内の試験被験者の存在による有意な平均値または中央値の変化に対して統計的に抵抗するのに十分に大きな数の見掛け上健康な被験者を含むと理解されるべきである。該集団の個体の少なくとも1つのバイオマーカーの絶対量または相対量は、本明細書に記載されているとおりに決定されうる。適当な参照値、好ましくは平均値または中央値の計算方法は当技術分野で良く知られている。適当な参照体を計算するための他の技術には、更なる苦勞を伴うことなく被験者の所定コホートに基づいて所定の特異性および感度を有するアッセイ系で実施可能であり同様に当技術分野で良く知られている受信者動作特性 (ROC) 曲線計算を用いる最適化が含まれる。前記の被験者の集団または群は複数の被験者、好ましくは、少なくとも5、10、50、1,000または10,000名の被験者から全集団までを含む。より好ましくは、この文脈で言及される被験者群は、所定集団を統計的に代表するサイズを有する被験者群、すなわち、統計的に代表的なサンプルである。本発明の方法により診断される被験者および複数の被験者は同一種、そして好ましくは同一の性別のものであると理解されるべきである。

30

40

【0155】

より好ましくは、該参照体は適当なデータ保存媒体、例えばデータベースにおいて保存され、したがって将来の診断にも利用可能である。これは、肝障害に対する素因を効率的に診断することを可能にする。なぜなら、対応参照サンプルが得られた被験者が実際に肝障害を発生することが (将来において) 確認されたら、適当な参照結果がデータベースにおいて確認可能だからである。

【0156】

50

「比較する」なる語は、少なくとも1つのバイオマーカーの定性的または定量的決定の量が参照体と同じであるか異なるかどうかを評価することを意味する。

【0157】

参照結果が、肝障害に罹患している被験者もしくは被験者群または1-メチル-2-ピロリドン、ベザフィブラート、カルベンダジム、ジメチルホルムアミド、ジモキシストロピン、メタザクロル、N-アセチル-p-アミノフェノール、Wy-14643、17-アルファ-エチニルエストラジオール、17-アルファ-エチニルエストラジオール、タモキシフェンもしくは塩酸テトラサイクリンに接触された被験者もしくは被験者群に由来するサンプルから得られた場合、肝障害は、試験サンプルおよび前記参照体から得られた量の間の同一性または類似性の度合に基づいて、すなわち、少なくとも1つのバイオマーカーに関して同一の定性的または定量的組成に基づいて診断されうる。同一量には、統計的に有意な様態では異なっておらず、好ましくは、少なくとも該参照体の第1～第99百分位数、第5～第95百分位数、第10～第90百分位数、第20～第80百分位数、第30～第70百分位数、第40～第60百分位数の区間内にある量、より好ましくは該参照体の第50、第60、第70、第80、第90または第95百分位数である量が含まれる。肝障害に罹患している被験者もしくは被験者群または1-メチル-2-ピロリドン、ベザフィブラート、カルベンダジム、ジメチルホルムアミド、ジモキシストロピン、メタザクロル、N-アセチル-p-アミノフェノール、Wy-14643、17-アルファ-エチニルエストラジオール、17-アルファ-エチニルエストラジオール、タモキシフェンもしくは塩酸テトラサイクリンに接触された被験者もしくは被験者群からサンプルから得られた参照体は、肝障害を診断するために、または被験者において化合物が肝障害を誘導しうるかどうかを決定するために、本発明の方法において適用されうる。そのような場合、好ましくは、参照体と実質的に同じである、少なくとも1つのバイオマーカーの量は、肝障害の存在、または肝障害を誘導しうる化合物の指標となり、一方、参照体と異なる、少なくとも1つのバイオマーカーの量は、肝障害の非存在、または肝障害を誘導し得ない化合物の指標となる。

10

20

【0158】

更に、肝障害に罹患している被験者もしくは被験者群または1-メチル-2-ピロリドン、ベザフィブラート、カルベンダジム、ジメチルホルムアミド、ジモキシストロピン、メタザクロル、N-アセチル-p-アミノフェノール、Wy-14643、17-アルファ-エチニルエストラジオール、17-アルファ-エチニルエストラジオール、タモキシフェンもしくは塩酸テトラサイクリンに接触された被験者もしくは被験者群に由来するサンプルから得られた参照体は、肝障害を治療するための物質を特定するために適用されうる。そのような場合、好ましくは、参照体と異なる、少なくとも1つのバイオマーカーの量は、肝障害を治療するのに適した物質の指標となり、一方、参照体と実質的に同じである、少なくとも1つのバイオマーカーの量は、肝障害を治療し得ない物質の指標となる。

30

【0159】

参照結果が、1-メチル-2-ピロリドン、ベザフィブラート、カルベンダジム、ジメチルホルムアミド、ジモキシストロピン、メタザクロル、N-アセチル-p-アミノフェノール、Wy-14643、17-アルファ-エチニルエストラジオール、17-アルファ-エチニルエストラジオール、タモキシフェンもしくは塩酸テトラサイクリンに接触していない又は肝障害に罹患していない被験者または被験者群に由来するサンプルから得られた場合、該肝障害は、試験サンプルおよび前記参照体から得られた試験量の間の相違、すなわち、少なくとも1つのバイオマーカーに関する定性的または定量的組成における相違に基づいて診断されうる。

40

【0160】

前記の計算参照体が用いられる場合にも同じことが当てはまる。

【0161】

該相違は少なくとも1つのバイオマーカーの絶対量または相対量の増加（バイオマーカーのアップレギュレーションと称されることがある；実施例も参照されたい）または該量の減少もしくはバイオマーカーの検出可能な量の非存在（バイオマーカーのダウンレギュ

50

レーションと称されることがある；実施例も参照されたい）でありうる。好ましくは、相対量または絶対量における相違は有意である、すなわち、参照体の第45～第55百分位数、第40～第60百分位数、第30～第70百分位数、第20～第80百分位数、第10～第90百分位数、第5～第95百分位数、第1～第99百分位数の区間の外にある。

【0162】

1-メチル-2-ピロリドン、ベザフィブラート、カルベンダジム、ジメチルホルムアミド、ジモキシストロピン、メタザクロル、N-アセチル-p-アミノフェノール、Wy-14643、17-アルファ-エチニルエストラジオール、17-アルファ-エチニルエストラジオール、タモキシフェンもしくは塩酸テトラサイクリンに接触していない又は肝障害に罹患していない被験者または被験者群に由来するサンプルから得られた参照体は、肝障害を診断するために、または被験者において化合物が肝障害を誘導しうるかどうかを決定するために、本発明の方法において適用されうる。そのような場合、好ましくは、参照体と異なる、少なくとも1つのバイオマーカーの量は、肝障害の存在、または肝障害を誘導しうる化合物の指標となり、一方、参照体と実質的に同じである、少なくとも1つのバイオマーカーの量は、肝障害の非存在、または肝障害を誘導し得ない化合物の指標となる。更に、1-メチル-2-ピロリドン、ベザフィブラート、カルベンダジム、ジメチルホルムアミド、ジモキシストロピン、メタザクロル、N-アセチル-p-アミノフェノール、Wy-14643、17-アルファ-エチニルエストラジオール、17-アルファ-エチニルエストラジオール、タモキシフェンもしくは塩酸テトラサイクリンに接触していない又は肝障害に罹患していない被験者または被験者群に由来するサンプルから得られた参照体は、肝障害を治療するための物質を特定するために適用されうる。そのような場合、好ましくは、参照体と実質的に同じである、少なくとも1つのバイオマーカーの量は、肝障害を治療するのに適した物質の指標となり、一方、参照体と異なる、少なくとも1つのバイオマーカーの量は、肝障害を治療するのに適さない物質の指標となる。

10

20

【0163】

好ましい参照体は、添付の表において言及されているもの、または後記実施例に従い得られうるものである。更に、相対的な相違、すなわち、個々のバイオマーカーに関する量の増加または減少は、好ましくは、後記表に列挙されているものである。更に、好ましくは、観察される相違の度合、すなわち、増加または減少は、好ましくは、後記表に示されている要因による増加または減少である。

30

【0164】

好ましくは、少なくとも1つのバイオマーカーは、表1、2、3a、4aまたは7aから選択された場合、1-メチル-2-ピロリドン、ベザフィブラート、カルベンダジム、ジメチルホルムアミド、ジモキシストロピン、メタザクロル、N-アセチル-p-アミノフェノール、Wy-14643、17-アルファ-エチニルエストラジオール、17-アルファ-エチニルエストラジオール、タモキシフェンまたは塩酸テトラサイクリンに接触されていない被験者または被験者群に由来するサンプル、あるいは該表に示されている健康な被験者または被験者群から得られたサンプルから得られた参照体と比較して増加する。

【0165】

好ましくは、少なくとも1つのバイオマーカーは、表3b、4bまたは7bから選択された場合、1-メチル-2-ピロリドン、ベザフィブラート、カルベンダジム、ジメチルホルムアミド、ジモキシストロピン、メタザクロル、N-アセチル-p-アミノフェノール、Wy-14643、17-アルファ-エチニルエストラジオール、17-アルファ-エチニルエストラジオール、タモキシフェンまたは塩酸テトラサイクリンに接触されていない被験者または被験者群に由来するサンプル、あるいは該表に示されている健康な被験者または被験者群から得られたサンプルから得られた参照体と比較して減少する。

40

【0166】

該比較は、好ましくは、自動化により補助される。例えば、2つの異なるデータセット（例えば、特徴的特性の値を含むデータセット）の比較のためのアルゴリズムを含む適当なコンピュータプログラムが用いられうる。そのようなコンピュータプログラムおよびア

50

ルゴリズムは当技術分野で良く知られている。前記にもかかわらず、比較は手動でも行われうる。

【0167】

肝障害に関して前記に示されている比較を行うための説明は、必要に応じて変更を加えて、本発明の方法で診断されるPPARガンマアゴニスト誘導性障害、例えば心臓障害に当てはまる。

【0168】

「肝障害を治療するための物質」なる語は、本明細書に記載されている肝障害を誘導する生物学的メカニズムを直接的に妨げる化合物を意味する。あるいは、同様に好ましいものとして、該化合物は、肝障害に関連した症状の発生または進行を妨げうる。本発明の方法により特定される物質は有機および無機化合物、例えば小分子、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、例えばsiRNA、リボザイムまたはマイクロRNA分子、ペプチド、ポリペプチド、例えば抗体または他の人工もしくは生物学的重合体、例えばアプタマーでありうる。好ましくは、該物質は、薬物、プロドラッグ、または薬物もしくはプロドラッグの開発のためのリード物質として適している。

10

【0169】

本発明の方法が、肝障害の治療用薬物を特定するために又は化合物の毒物学的評価（すなわち、化合物が肝障害を誘導しうるかどうかの決定）のために使用される場合、統計上の理由により、複数の被験者の試験サンプルが調べられうると理解されるべきである。好ましくは、試験被験者のそのようなコホート内のメタボロームは、例えば、調べられている化合物以外の要因により生じる相違を避けるために、可能な限り類似しているべきである。該方法に用いられる被験者は、好ましくは、実験用動物、例えばげっ歯類、より好ましくはラットである。該実験用動物は、好ましくは、本発明の方法の完了後に犠死に付されると更に理解されるべきである。コホート試験および参照動物の全被験者は、異なる環境の影響を避けるために、同一条件下で維持される。適当な条件およびそのような動物の提供方法はWO2007/014825に詳細に記載されている。該条件を参照により本明細書に組み入れることとする。

20

【0170】

したがって、本発明の1つの態様においては、該方法は、薬物、プロドラッグまたは更なる臨床開発のための薬物もしくはプロドラッグ候補を特定し、および/または特定された選択された物質を確認することを含む工程を更に含む。そのような臨床開発は、好ましくは、該物質の薬理学的研究、該物質の毒物学的決定、動物およびヒト薬物試験（全てのフェーズの臨床試験を含む）を含む。

30

【0171】

したがって、肝障害、特に、パラセタモール、PPARアルファアゴニスト誘導性肝障害またはPPARガンマアゴニスト誘導性肝障害を治療するための物質を特定することを目的とした本発明の方法は、好ましくは、追加的な工程を含む。好ましくは、更なる工程は、該物質を使用して、その薬理学的および/または毒物学的パラメータ、例えばED50/EC50および/またはLD50/LC50閾値を特定するために前臨床研究を行うこと、例えば該物質の治療効果および安全性を決定するために臨床試験を行うこと、ならびに特定された物質を製薬上許容される形態で製剤化することを含む。

40

【0172】

該物質は、好ましくは、局所または全身投与用に製剤化されうる。通常、薬物は筋肉内または皮下に投与される。しかし、物質の性質および作用様式に応じて、それは他の経路によっても投与されうる。該物質は、好ましくは、通常の剤形での投与用に製剤化され、通常の手法に従い、特定された物質を標準的な医薬担体と一緒にすることにより製剤化される。これらの方法は、所望の製剤に適するように成分を混合、顆粒化および圧縮または溶解することを含む。製薬上許容される担体または希釈剤の形態および特性は、それと一緒にされる有効成分の量、投与経路および他の良く知られた変数によって決まると理解されるであろう。担体は、製剤のその他の成分に適合性でありその被投与者に有害でな

50

いという意味において、許容されるものでなければならない。使用される医薬担体には、固体、ゲルまたは液体が含まれうる。限定的なものではないが、固体担体の例としては、ラクトース、白土、スクロース、タルク、ゼラチン、寒天、ペクチン、アカシア、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸などが挙げられる。限定的なものではないが、液体担体の典型例としては、リン酸緩衝食塩水、シロップ油、水、エマルジョン、種々のタイプの湿潤剤などが挙げられる。同様に、該担体または希釈剤には、当技術分野で良く知られた時間遅延物質、例えばグリセリルモノステアレートまたはグリセリルジステアラートの単独体または口ウとの混合物が含まれうる。そのような適当な担体には、前記のもの、および当技術分野（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania）で良く知られている他のものが含まれる。希釈剤は、該組合せの生物活性に影響を及ぼさないように選択される。限定的なものではないが、そのような希釈剤の例としては、蒸留水、生理食塩水、リンガー液、ブドウ糖液およびハンクス液が挙げられる。また、医薬組成物または製剤は他の担体、アジュバントまたは無毒性、非治療性、非免疫原性安定剤などをも含む。薬物としての物質の製剤化は、品質、医薬安全性および有効性を確保するために、GMP標準化条件下などで行われる、と理解されるべきである。

10

#### 【0173】

本発明の方法は、好ましくは、本発明の装置により実施されうる。本明細書中で用いる装置は少なくとも前記のユニット（単位）を含む。該装置のユニットは、機能しうる形で互いに連結されている。機能しうる状態でユニットを連結する方法は、該装置内に含まれるユニットのタイプに左右されるであろう。例えば、少なくとも1つのバイオマーカーを自動的に定性的または定量的に決定するための手段が分析用ユニットにおいて適用される場合、前記の自動的に作動するユニットにより得られたデータは、評価ユニットにより、例えば、データプロセッサであるコンピュータ上で実行されるコンピュータプログラムにより、診断を促進させるために処理されうる。好ましくは、該ユニットは、そのような場合には単一装置に含まれる。しかし、該分析用ユニットと該評価ユニットとは物理的に分離していることも可能である。そのような場合、機能的な連結は、データ輸送を可能にする、それらの単位間のワイヤ接続およびワイヤレス接続により達成されうる。ワイヤレス接続は、ワイヤレスLAN（WLAN）またはインターネットを用いるものでありうる。ワイヤ接続はそれらの単位間の光および非光ケーブル接続により達成されうる。ワイヤ接続に使用されるケーブルは、好ましくは、ハイスループットデータ輸送に適したものである。

20

30

#### 【0174】

少なくとも1つのバイオマーカーを決定するための好ましい分析用ユニットは、本明細書に記載されている、少なくとも1つのバイオマーカーを特異的に認識する抗体、タンパク質またはアプタマーのような検出剤、および該検出剤を被験サンプルと接触させるための領域を含む。該検出剤は該接触用領域上に固定化されることが可能であり、あるいはサンプルがローディングされた後で該領域に適用されることが可能である。該分析用単位は、好ましくは、検出剤と少なくとも1つのバイオマーカーとの複合体の量を定性的および/または定量的に決定するために適合化される。検出剤が少なくとも1つのバイオマーカーに結合したら、少なくとも1つのバイオマーカー、該検出剤またはそれらの両方の、少なくとも1つの測定可能な物理的または化学的特性が変化して、該変化が、好ましくは該分析用ユニット内に含まれる検出器により測定されうる、と理解される。しかし、試験ストリップのような分析用ユニットが使用される場合、該検出器および該分析用ユニットは、測定のためだけに一緒にされる別個の成分でありうる。少なくとも1つの測定可能な物理的または化学的特性における検出された変化に基づいて、該分析用ユニットは、本明細書に記載されているとおりに少なくとも1つのバイオマーカーに関する強度値を計算しうる。ついで該強度値は更なる処理および評価のために該評価ユニットへ輸送される。最も好ましくは、少なくとも1つのバイオマーカーの量は、本明細書に記載されている検出剤を使用するELISA、EIAまたはRIAに基づく技術により決定されうる。あるいは、本明細書に記載されている分析用ユニットは、好ましくは、バイオマーカーを分離するための手段

40

50

、例えばクロマトグラフィー装置、およびバイオマーカーの決定のための手段、例えば分光装置を含む。適当な装置は前記で詳細に記載されている。本発明の系において用いられる化合物分離のための好ましい手段は、クロマトグラフィー装置、より好ましくは、液体クロマトグラフィー、HPLCおよび/またはガスクロマトグラフィーのための装置を含む。化合物の決定のための好ましい装置は、質量分析装置、より好ましくは、GC-MS、LC-MS、直接注入質量分析、FT-ICR-MS、CE-MS、HPLC-MS、四重極質量分析、連続結合質量分析、(MS-MSまたはMS-MS-MSを含む)、ICP-MS、Py-MSまたはTOFを含む。該分離および決定手段は、好ましくは、互いに結合されている。LC-MSおよび/またはGC-MSは、本発明に従い言及されている分析用ユニットにおいて使用される。

【0175】

本発明の装置の評価ユニットは、好ましくは、本明細書に記載されている比較を行うための命令を実行するように適合化されたデータ処理装置またはコンピュータを含む。更に、該評価ユニットは、好ましくは、保存参照体を含むデータベースを含む。本明細書中で用いるデータベースは適当な保存媒体上のデータ収集体を含む。更に、該データベースは、好ましくは、データベース管理システムを更に含む。該データベース管理システムは、好ましくは、ネットワークに基づく階層的またはオブジェクト指向データベース管理システムである。更に、該データベースは連合(federal)または統合データベースでありうる。より好ましくは、該データベースは、分散(連合)システム、例えばクライアント・サーバー・システムとして実行される。より好ましくは、該データベースは、該データ収集体に含まれるデータと試験データセットとを検索アルゴリズムが比較するのを可能にするように構成される。特に、そのようなアルゴリズムを使用することにより、該データベースは、肝障害の指標となる類似または同一データセットに関して検索されうる(例えば、クエリ検索)。したがって、同一または類似データセットが該データ収集物において特定されれば、該試験データセットは肝障害に関連づけられるであろう。該評価ユニットはまた、好ましくは、肝障害の確定診断に基づく治療的もしくは予防的介入またはライフスタイル適応のための推奨を伴う更なるデータベースを含む、またはそれに機能しうる形で連結されていることが可能である。そのような更なるデータベースは、好ましくは、肝障害を予防または治療するために試験サンプルが得られた被験者に対する適当な推奨を特定するために、該評価ユニットにより得られた診断結果を用いて自動的に検索されうる。

【0176】

本発明の装置の好ましい実施形態においては、該保存参照体は、肝障害に罹患していることが知られている被験者または被験者群、あるいは1-メチル-2-ピロリドン、ベザフィブラート(Bezafibrate)、カルベンダジム(Carbendazim)、ジメチルホルムアミド、ジモキシストロピン(Dimoxystrobin)、メタザクロル(Metazachlor)、N-アセチル-p-アミノフェノール、Wy-14643、17-アルファ-エチニルエストラジオール、17-アルファ-エチニルエストラジオール、タモキシフェン(Tamoxifen)および塩酸テトラサイクリンからなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触された被験者または被験者群に由来する参照体であり、該データプロセッサは、該分析用ユニットにより決定された少なくとも1つのバイオマーカーの量を該保存参照体と比較するための命令を実行し、ここで、参照体と比較した場合の試験サンプルにおける少なくとも1つのバイオマーカーの実質的に同じ量が肝障害の存在の指標となり、あるいは、参照体とは異なる、試験サンプルにおける少なくとも1つのバイオマーカーの量が、肝障害の非存在の指標となる。

【0177】

本発明の装置のもう1つの好ましい実施形態においては、該保存参照体は、肝障害に罹患していないことが知られている被験者または被験者群、あるいは1-メチル-2-ピロリドン、ベザフィブラート、カルベンダジム、ジメチルホルムアミド、ジモキシストロピン、メタザクロル、N-アセチル-p-アミノフェノール、Wy-14643、17-アルファ-エチニルエストラジオール、17-アルファ-エチニルエストラジオール、タモキシフェンおよび塩酸テトラサイクリンからなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触していない被験者

10

20

30

40

50

または被験者群に由来する参照体であり、該データプロセッサは、該分析用ユニットにより決定された少なくとも1つのバイオマーカーの量を該保存参照体と比較するための命令を実行し、ここで、参照体とは異なる、試験サンプルにおける少なくとも1つのバイオマーカーの量が、肝障害の存在の指標となり、あるいは、参照体と比較した場合の試験サンプルにおける少なくとも1つのバイオマーカーの実質的に同じ量が肝障害の非存在の指標となる。

【0178】

したがって、該装置は、推奨を行うエキスパートシステムが含まれる場合に特に、医療もしくは実験検査スタッフまたは患者により特別な医学的知識を伴うことなく使用される。該装置は運搬可能な形態に適合化されるため、該装置は患者に身近な用途にも適している。

10

【0179】

「キット」なる語は、好ましくは別々に又は単一容器内で提供される、前記成分の集合体を意味する。該容器は、本発明の方法を行うための説明をも含む。これらの説明はマニュアルの形態であることが可能であり、あるいは、本発明の方法において注目される比較を行いうる、コンピュータまたはデータ処理装置上で実行された場合にそれに応じて診断を確定するコンピュータプログラムコードにより提供されることが可能である。該コンピュータプログラムコードは、データ保存媒体または装置、例えば光学的または磁氣的保存媒体（例えば、コンパクトディスク（CD）、CD-ROM、ハードディスク、光学保存媒体またはディスク）上で提供され、あるいはコンピュータまたはデータ処理装置上で直接的に提供される。本発明のキットに関して言及される場合の「標準体」は、(i) 肝障害に罹患していることが知られている被験者または被験者群、あるいは1-メチル-2-ピロリドン、ベザフィブラート、カルベンダジム、ジメチルホルムアミド、ジモキシストロピン、メタザクロル、N-アセチル-p-アミノフェノール、Wy-14643、17-アルファ-エチニルエストラジオール、17-アルファ-エチニルエストラジオール、タモキシフェンおよび塩酸テトラサイクリンからなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触された被験者または被験者群において存在する、あるいは(ii) 肝障害に罹患していないことが知られている被験者または被験者群、あるいは1-メチル-2-ピロリドン、ベザフィブラート、カルベンダジム、ジメチルホルムアミド、ジモキシストロピン、メタザクロル、N-アセチル-p-アミノフェノール、Wy-14643、17-アルファ-エチニルエストラジオール、17-アルファ-エチニルエストラジオール、タモキシフェンおよび塩酸テトラサイクリンからなる群から選択される少なくとも1つの化合物に接触していない被験者または被験者群に由来する少なくとも1つのバイオマーカーの量に類似している、溶液中に存在する場合の又は所定体積の溶液中に溶解した少なくとも1つのバイオマーカーの量である。

20

30

【0180】

好都合なことに、本明細書中で特定されている少なくとも1つのバイオマーカーの量は、肝障害、特に、1-メチル-2-ピロリドン、ベザフィブラート、カルベンダジム、ジメチルホルムアミド、ジモキシストロピン、メタザクロル、N-アセチル-p-アミノフェノール、Wy-14643、17-アルファ-エチニルエストラジオール、17-アルファ-エチニルエストラジオール、タモキシフェンおよび塩酸テトラサイクリンにより誘導される肝障害の診断を可能にすることが、本発明の根底をなす研究において判明した。該方法の特異性および精度は、より多数の又は更には全ての前記バイオマーカーを決定することにより、より一層改善されるであろう。これらの特異的バイオマーカーに関するメタボロームの定量的および/または定性的組成における変化は、該毒性の他の兆候が臨床的に明らかとなる前であっても、肝障害の指標となる。肝障害を診断するために現在用いられている形態学的、生理学的および生化学的パラメータは、本発明により提供されるバイオマーカー決定と比較して低い特異性および低い感度を示す。本発明のおかげで、化合物による肝障害はより効率的に且つより高い信頼性で評価される。更に、前記知見に基づいて、肝障害の治療に有用である薬物に関するスクリーニングアッセイが実施可能である。一般に、本発明は、表1、2、3a、3b、4a、4b、7a、7b、7cまたは7dのいずれかから選択される被験者のサンプル

40

50

における少なくとも1つのバイオマーカーまたは該バイオマーカーに関する検出剤の、肝障害を診断するための、または化合物が肝障害を誘導しうるかどうかを決定するための、または肝障害を治療しうる物質を特定するための使用を含む。更に、本発明は、一般に、被験者のサンプルにおける少なくとも1つのバイオマーカーまたはそれに関する検出剤の、肝障害の治療に感受性である被験者を特定するための使用を含む。本発明の場合に使用される好ましい検出剤は、本明細書に記載されているものである。更に、本発明の方法は装置内に有利に組込まれうる。更に、該方法を実施することを可能にするキットが提供されうる。

#### 【0181】

本発明はまた、表1、2、3a、3b、4a、4b、7a、7b、7cまたは7dのいずれかに列挙されているバイオマーカーに関する特性値を含むデータ収集体に関する。「データ収集体」なる語は、物理的および/または論理的に一緒にグループ化されたデータの収集体を意味する。したがって、該データ収集体は、単一のデータ保存媒体内で、または機能しうる形で互いに連結されている物理的に分離したデータ保存媒体内で実行されうる。好ましくは、該データ収集体はデータベースにより実行されうる。したがって、本明細書中で用いるデータベースは適当な保存媒体上にデータ収集体を含む。更に、該データベースは、好ましくは、データベース管理システムを更に含む。該データベース管理システムは、好ましくは、ネットワークに基づく階層的またはオブジェクト指向データベース管理システムである。更に、該データベースは連合(federal)または統合データベースでありうる。より好ましくは、該データベースは、分散(連合)システム、例えばクライアント・サーバー・システムとして実行される。より好ましくは、該データベースは、該データ収集体に含まれるデータと試験データセットとを検索アルゴリズムが比較するのを可能にするように構成される。特に、そのようなアルゴリズムを使用することにより、該データベースは、肝障害の指標となる類似または同一データセットに関して検索されうる(例えば、クエリ検索)。したがって、同一または類似データセットが該データ収集物において特定されれば、該試験データセットは肝障害に関連づけられるであろう。したがって、該データ収集体から得られた情報は、被験者から得られた試験データセットに基づいて肝障害を診断するために用いられうる。

#### 【0182】

更に、本発明は、該データ収集体を含むデータ保存媒体に関する。本明細書中で用いる「データ保存媒体」なる語は、CD、CD-ROM、ハードディスク、光学的保存媒体またはディスクのような単一の物理的実体に基づくデータ保存媒体を含む。更に、該用語は、前記データ収集体を与える状態で、好ましくは、クエリ検索のための適当な方法で、機能しうる形で互いに連結された物理的に分離した実体からなるデータ保存媒体を更に含む。

#### 【0183】

本発明はまた、

(b) 本発明のデータ保存媒体に、機能しうる形で連結された

(a) サンプルの少なくとも1つのバイオマーカーの特性値を比較するための手段を含むシステム(系)を含む。

#### 【0184】

本明細書中で用いる「システム(系)」なる語は、機能しうる形で互いに連結された種々の手段を意味する。該手段は単一の装置において実行されることが可能であり、あるいは物理的に分離した装置において実行されることが可能である。バイオマーカーの特性値を比較するための手段は、好ましくは、前記の比較用アルゴリズムに基づいて作動する。該データ保存媒体は、好ましくは、前記データ収集体またはデータベースを含み、ここで、該保存データセットのそれぞれは肝障害の指標となる。したがって、本発明のシステムは、該データ保存媒体内に保存されたデータ収集体に試験データセットが含まれるかどうかを確認することを可能にする。したがって、本発明のシステムは、肝障害を診断する際の診断手段として適用されうる。該システムの好ましい実施形態においては、サンプルのバイオマーカーの特性値を決定するための手段が含まれる。「バイオマーカーの特性値を

10

20

30

40

50

決定するための手段」なる語は、好ましくは、バイオマーカーの決定のための前記装置、例えば、質量分析装置、ELISA装置、NMR装置、またはアナライトに関する化学的もしくは生物学的アッセイを行うための装置を意味する。

【0185】

前記の全ての参考文献を、それらの全開示内容、および前記説明において明示的に記載されているそれらの具体的な開示内容に関して、参照により本明細書に組み入れることとする。

【0186】

以下の実施例は、本発明を例示するためのものであるに過ぎない。それらは、いかなる点においても、本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。

10

【0187】

(実施例)

実施例：肝障害に関連したバイオマーカー

それぞれ5匹の雄および雌のラットの群に1日1回、28日間にわたって、示されている化合物を投与した（化合物、適用用量および投与の詳細に関しては後記表5を参照されたい）。

【0188】

該研究における各用量群は性別当たり5匹のラットからなるものであった。それぞれの5匹の雄および雌の動物の追加的な群を対照として用いた。処理（治療）期間を開始する前に、供給時に62～64日齢である動物を収容および環境条件に7日間馴化させた。該動物集団の全動物を同じ一定温度（20～24±3）および同じ一定湿度（30～70%）で維持した。該動物集団の動物に自由に摂食させた。使用される食餌は化学的または微生物学的汚染物を実質的に含有していなかった。飲料水も自由に摂取させた。したがって、該水は、European Drinking Water Directive 98/83/EGに定められているとおりに化学的および微生物学的汚染物含有していなかった。照明期間は12時間の明期およびそれに続く12時間の暗期であった（6:00～18:00の12時間の明期および18:00～6:00の12時間の暗期）。該研究は、German Animal Welfare Act and the European Council Directive 86/609/EEに従い、AAALACにより承認された実験室において行われた。該試験系は、げっ歯類における反復投与28日間経口毒性研究のための化学物質の試験に関するOECD 407指針に従い準備された。後記表1～4における試験物質（化合物）を、後記表5に記載されているとおりに投与した。

20

30

【0189】

第7日、14日および28日の朝、絶食麻酔動物の後眼窩静脈叢から採血した。各動物に関して、EDTAを抗凝固剤として使用して1mlの血液を集めた。該サンプルを遠心分離して血漿を得た。全ての血漿サンプルをN<sub>2</sub>雰囲気中で覆い、ついで分析まで-80 で保存した。

【0190】

質量分析に基づく代謝産物プロファイリング分析のために、血漿サンプルを抽出し、極性および無極性（脂質）画分を得た。GC-MS分析のために、該無極性画分を酸性条件下でメタノールで処理して脂肪酸メチルエステルを得た。両方の画分をO-メチル-ヒドロキシアミン塩酸塩およびピリジンで更に誘導体化して、オキシ基をO-メチルオキシムに変換し、ついでシリル化剤で誘導体化した後、分析を行った。LC-MS分析において、両方の画分を適当な溶媒混合物中で再構成させた。逆相分離カラム上の勾配溶出によりHPLCを行った。フルスクリーン分析と並行して標的および高感度MRM（多反応モニター）プロファイリングを可能にする質量分析検出を、W02003073464に記載されているとおりに適用した。

40

【0191】

ステロイドおよびそれらの代謝産物をオンラインSPE-LC-MS（固相抽出-LC-MS）により測定した。カテコールアミンおよびそれらの代謝産物を、Yamadaら（Yamada 2002, Journal of Analytical Toxicology, 26(1): 17-22）に記載されているとおりに、オンラインSPE-LC-MSにより測定した。

【0192】

50

包括的な分析妥当性評価工程の後、各アナライトに関するデータをプールサンプルからのデータに対して標準化した。これらのサンプルを、プロセスの可変性の原因を明らかにするために全プロセスにわたって並行して実施した。性別、処理持続期間および代謝産物に特異的な処理群値の有意性を、WELCH検定を用いて、処理群の平均をそれぞれの非処理対照群の平均と比較することにより決定し、対照に対する処理の比およびp値で定量化した。

【0193】

毒性パターンごとの最も重要なバイオマーカーの特定を、後記表におけるアナライトのランク付けにより行った。したがって、与えられたパターンの参照処理における代謝変化（表に示されている）を他の無関連処理における同じ代謝産物の変化と比較した。各代謝産物に関して、T値を、該参照および対照処理に関して得、ウェルチ検定により比較して、これらの2つの群が有意に異なっているかどうかを評価した。該パターンに関する最も重要な代謝産物を示すために、それぞれのTVALUEの最大絶対値を採用した。

10

【0194】

該ラットの処理後の肝障害および毒性ならびに他の障害の指標となる血漿代謝産物の群の変化を以下の表に示す。

【0195】

表1: 雌ラットにおけるパラセタモール誘導性肝障害に関するマーカー; 有意なアップレギュレーション変化 (p-値 0.2) が (\*) で示されている。幾つかの代謝産物 (#で示されているもの) に関しては、追加的な情報が表6に示されている。

20

【表 1】

代謝産物	1-メチル-2-ピロリドン			ジモキシストロピン			メタザクロル			N-アセチル-p-アミノフェノール			ジメチルホルムアミド		
	f7	f14	f28	f7	f14	f28	f7	f14	f28	f7	f14	f28	f7	f14	f28
ホスファチジルコリン (C16:0,C20:5)#	1.32 *	1.45 *	1.35 *	1.33 *	1.54 *	1.15 *	1.18 *	1.46 *	1.26 *	1.3 *	1.34 *	1.51 *	1.15 *	1.31 *	1.26 *
パルミチン酸 (C16:0)	1.91 *	1.95 *	3.53 *	1.99 *	1.89 *	2.03 *	1.96 *	2.83 *	2.86 *	1.16 *	1.5 *	2.03 *	1.93 *	2.08 *	1.93 *
リノール酸 (C18:cis[9,12]2)	2.52 *	2.4 *	4.46 *	2.12 *	2.2 *	2.2 *	2.33 *	3.2 *	3.43 *	1.43 *	1.82 *	2.68 *	1.9 *	2.33 *	2.37 *
TAG (C16:0,C18:2)#	2.46 *	3.6 *	3.51 *	3.49 *	4.36 *	3.68 *	2.65 *	3.69 *	3.73 *	3.18 *	3.05 *	3.06 *	1.52 *	2.1 *	2.2 *
補酵素 Q9	2.46 *	2.57 *	3.27 *	1.51 *	1.91 *	1.78 *	2.3 *	2.09 *	1.75 *	2.22 *	1.38 *	1.19 *	2.14 *	2.56 *	2.29 *
TAG (C18:1,C18:2)#	3.73 *	3.82 *	7.38 *	4.18 *	3.37 *	4.49 *	2.65 *	2.74 *	3.09 *	2.55 *	3.62 *	5.69 *	2.68 *	3.4 *	2.61 *
ジホモ-ガンマ-リノレン酸 (C20:cis[8,11,14]3)	2.37 *	2.16 *	3.96 *	2.95 *	2.58 *	3.54 *	2.69 *	4.76 *	4.48 *	1.1	1.58 *	2.14 *	1.85 *	2.42 *	2.01 *
TAG No 05#	3.11 *	5.32 *	10.76 *	2.89 *	3.02 *	4.39 *	2.27 *	4.68 *	5.27 *	2.43 *	2.93 *	4.45 *	1.78 *	2.75 *	2.51 *

グリセロール, 脂質画 分	2.24 *	2.33 *	5.75 *	2.08 *	2.44 *	2.58 *	1.89 *	2.34 *	3.13 *	1.45 *	1.63 *	2.24 *	1.64 *	1.88 *	1.89 *
ヘプタデカン酸 (C17:0)	1.46 *	1.39 *	2.17 *	1.81 *	1.73 *	2.84 *	1.53 *	1.98 *	2.08 *	1.37 *	1.34 *	1.62 *	1.39 *	1.63 *	1.55 *
エイコサン酸 (C20:0)	1.77 *	1.8 *	2.79 *	2.23 *	2.54 *	2.08 *	2.17 *	3.19 *	2.49 *	1.52 *	1.32 *	1.66 *	1.88 *	1.66 *	1.79 *
TAG No 01#	3.21 *	4.15 *	11.51 *	2.62 *	1.93 *	2.61 *	1.87 *	1.99 *	3.16 *	1.54 *	2.19 *	3.83 *	2.26 *	2.87 *	3.81 *
14-メチルヘキサデカ ン酸	1.15 *	0.93 *	1.35 *	1.27 *	1.15 *	1.31 *	1.18 *	1.17 *	1.19 *	1 1	1.12 *	1.16 *	1.18 *	1.24 *	1.14 *
グリセロールホスフ アート, 脂質画分#	1.86 *	1.72 *	2.59 *	1.68 *	1.69 *	1.98 *	2.41 *	3.43 *	2.93 *	1.08 *	1.37 *	1.95 *	2.37 *	1.97 *	2.35 *
TAG (C18:2,C18:2)#	3.44 *	3.56 *	7.33 *	3.69 *	3.82 *	5.11 *	2.42 *	2.51 *	4.34 *	2.5 *	3.36 *	5.53 *	2.25 *	2.95 *	2.54 *
コレステロール	1.73 *	2.16 *	2.38 *	1.66 *	1.7 *	1.75 *	2.52 *	2.96 *	2.72 *	1.14 *	1.44 *	1.41 *	2.41 *	2.26 *	2.1 *
TAG (C18:2,C18:3)#	4.16 *	3.61 *	11.21 *	3.61 *	2.41 *	3.9 *	2.42 *	2.89 *	4.18 *	1.98 *	3.02 *	6.2 *	2.45 *	2.99 *	4.52 *
TAG (C16:0,C18:1,C18:3)#	3.94 *	4.14 *	11.37 *	4.17 *	5.45 *	3.93 *	2.84 *	3.67 *	5.22 *	3.08 *	3.13 *	4.62 *	1.45 *	2.5 *	2.06 *



【表2】

代謝産物	カルベンダジム			メタザクロル			N-アセチル-p-アミノフェノール	
	m7	m14	m28	m7	m14	m28	m7	m14
ホスファチジルコリン (C16:1,C18:2)#	1.85 *	2.27 *	1.34 *	1.29 *	2.11 *	2.32 *	1.11 *	1.4 *
リゾホスファチジルコリン (C18:1)#	1.41 *	1.23 *	1.05	1.1 *	1.49 *	1.33 *	1.02 *	1.16 *
4-ヒドロキシフェニルピル バート	1.76	1.54 *	1.57 *	2.23 *	2.59 *	3.26 *	3.04 *	4.89 *
フィトスフィンゴシン	1.13 *	1.32 *	1.34 *	2.08 *	2.86 *	3.2 *	1.33	1.6 *
ホスファチジルコリン (C18:0,C18:1)#	1.06 *	1.55 *	1.22 *	1.56 *	2.37 *	2.06 *	1.27 *	1.44 *
ホスファチジルコリン (C16:0,C20:5)#	1.33 *	1.42 *	1.49 *	1	1.47 *	1.67 *	1.38 *	1.21 *
グリセロール-3-ホスファ ート, 極性画分	1	1.34 *	1.29 *	1.04	1.63 *	1.52 *	1.25	1.53 *
ホスファチジルコリン (C18:0,C18:2)#	1.11 *	1.32 *	1.09	1.4 *	1.55 *	1.51 *	1.24 *	1.21 *
アルファ-トコフェロール	1.31 *	1.08 *	1.2 *	1.8 *	1.3 *	1.49 *	1.21 *	1.27 *

10

20

30

40

## 【0197】

表3a: 雄ラットにおけるPPARアルファアゴニスト誘導性肝障害に関するマーカー; 有意なアップレギュレーション変化 (p-値 0.1) が (\*) で示されている。幾つかの代謝産物 (#で示されているもの) に関しては、追加的な情報が表6に示されている。

【表 3 a】

代謝産物	ベザフィブラート			Wy-14643		
	m7	m14	m28	m7	m14	m28
グリシン	1.79 *	1.58 *	1.95 *	1.98 *	1.9 *	2.03 *
アスコルビン酸	1.54 *	1.32 *	1.55 *	1.1 *	1.27 *	1.23 *
リゾホスファチジル コリン (C18:1)#	1.44 *	1.92 *	1.22 *	1.51 *	1.54 *	1.36 *
ホスファチジルコリ ン (C16:0,C20:5)#	1.4 *	1.4 *	1.21 *	1.19 *	1.09 *	1.19 *
リゾホスファチジル コリン (C18:2)#	1.4 *	1.68 *	1.33 *	1.34 *	1.65 *	1.38 *
ジホモ-ガンマ-リノレ ン酸 (C20:cis[8,11,14]3)	3.63 *	4.4 *	3.24 *	1.95 *	1.71 *	1.49 *
キヌレン酸	1.89 *	5.15 *	2.04 *	1.4 *	1.73 *	3.35 *
マンノース	1.32 *	1.34 *	1.23 *	1.08	1.22 *	1.05 *
リゾホスファチジル エタノールアミン (C22:5)#	1.59 *	1.9 *	1.29 *	1.2 *	1.4 *	1.59 *
パントテン酸	2.36 *	2.3 *	3.51 *	1.43 *	1.77 *	2.34 *
グルコース	1.54 *	1.29 *	1.32 *	1.13 *	1.27 *	1.3 *

10

20

30

## 【 0 1 9 8 】

表3b: 雄ラットにおけるPPARアルファアゴニスト誘導性肝障害に関するマーカー; 有意なダウンレギュレーション変化 (p-値 < 0.1) が (\*) で示されている。幾つかの代謝産物 (#で示されているもの) に関しては、追加的な情報が表6に示されている。

【表 3 b】

代謝産物	ベザフィブラート			Wy-14643		
	m7	m14	m28	m7	m14	m28
コレステロール	0.37 *	0.48 *	0.43 *	0.43 *	0.38 *	0.33 *
カンペステロール	0.24 *	0.31 *	0.21 *	0.31 *	0.23 *	0.2 *
myo-イノシトール-2-ホスファート, 脂質画分	0.28 *	0.37 *	0.38 *	0.4 *	0.31 *	0.27 *
リゾホスファチジルコリン (C18:0)#	0.79 *	0.85 *	0.86 *	0.98 *	0.94 *	0.93 *
アラキドン酸 (C20:cis[5,8,11,14]4)	0.26 *	0.31 *	0.29 *	0.34 *	0.23 *	0.21 *
エイコサン酸 (C20:0)	0.51 *	0.67 *	0.52 *	0.62 *	0.48 *	0.63 *
ドコサヘキサエン酸 (C22:cis[4,7,10,13,16,19]6)	0.25 *	0.25 *	0.14 *	0.21 *	0.1 *	0.08 *
リゾホスファチジルエタノールアミン (C22:0)	0.27 *	0.32 *	0.18 *	0.29 *	0.24 *	0.21 *
ステアリン酸 (C18:0)	0.42 *	0.45 *	0.39 *	0.44 *	0.37 *	0.38 *
コリンプラスマローゲン No 03#	0.49 *	0.63 *	0.54 *	0.62 *	0.53 *	0.52 *
リグノセリン酸 (C24:0)	0.54 *	0.44 *	0.44 *	0.44 *	0.34 *	0.27 *
ホスファチジルコリン (C18:2,C20:4)#	0.65 *	0.66 *	0.56 *	0.66 *	0.56 *	0.45 *
リゾホスファチジルコリン (C17:0)#	0.51 *	0.51 *	0.36 *	0.57 *	0.53 *	0.44 *
ベヘン酸 (C22:0)	0.44 *	0.58 *	0.51 *	0.45 *	0.38 *	0.28 *
ネルボン酸 (C24:cis[15]1)	0.4 *	0.44 *	0.39 *	0.54 *	0.61 *	0.52 *
ベータ-シトステロール	0.24 *	0.3 *	0.2 *	0.25 *	0.24 *	0.16 *
14-メチルヘキサデカン酸	0.93 *	0.89 *	0.83 *	0.87 *	0.87 *	0.83 *
16-メチルヘプタデカン酸	0.29 *	0.25 *	0.16 *	0.43 *	0.24 *	0.24 *
threo-スフィンゴシン	0.56 *	0.52 *	0.55 *	0.47 *	0.39 *	0.23 *
コリンプラスマローゲン No 02#	0.46 *	0.52 *	0.49 *	0.42 *	0.41 *	0.43 *

10

20

30

40

erythro-スフィンゴシン	0.49 *	0.4 *	0.43 *	0.29 *	0.32 *	0.17 *
ノルメタネフリン	0.6 *	0.5 *	0.78 *	0.6 *	0.56 *	0.65 *
ホスファチジルコリン (C18:0,C20:3)#	0.48 *	0.56 *	0.57 *	0.52 *	0.46 *	0.56 *
ホスファチジルコリン (C18:0,C22:6)#	0.36 *	0.33 *	0.27 *	0.5 *	0.4 *	0.3 *
3-O-メチルスフィンゴシン (d18:1)#	0.48 *	0.44 *	0.39 *	0.29 *	0.36 *	0.25 *
コリンプラスマローゲン (C18,C20:4)	0.47 *	0.5 *	0.51 *	0.59 *	0.65 *	0.5 *
17-メチルオクタデカン酸	0.24 *	0.24 *	0.17 *	0.26 *	0.22 *	0.22 *
5-O-メチルスフィンゴシン (d18:1)#	0.4 *	0.41 *	0.4 *	0.29 *	0.33 *	0.2 *
イソパルミチン酸 (C16:0)	0.53 *	0.53 *	0.47 *	0.46 *	0.35 *	0.32 *
コリンプラスマローゲン No 01#	0.87 *	0.82 *	0.55 *	0.57 *	0.61 *	0.53 *
ヘプタデカン酸 (C17:0)	0.69 *	0.83 *	0.52 *	0.52 *	0.45 *	0.41 *
補酵素 Q10	0.46 *	0.58 *	0.48 *	0.71 *	0.54 *	0.63 *
ドコサペンタエン酸 (C22:cis[7,10,13,16,19]5)	0.43 *	0.62 *	0.31 *	0.29 *	0.18 *	0.11 *
ホスファチジルコリン No 04#	0.23 *	0.25 *	0.24 *	0.35 *	0.33 *	0.28 *
アルギニン	0.65 *	0.59 *	0.62 *	0.56 *	0.54 *	0.6 *
ホスファチジルコリン No 02#	0.35 *	0.37 *	0.47 *	0.68 *	0.65 *	0.47 *
スフィンゴミエリン (d18:1,C16:0)#	0.88 *	0.83 *	0.71 *	0.92 *	0.83 *	0.75 *
アルファ-トコフェロール	0.75 *	0.77 *	0.64 *	0.71 *	0.56 *	0.53 *
ホスファチジルコリン (C18:0,C20:4)#	0.78 *	0.78 *	0.75 *	0.7 *	0.65 *	0.72 *
トリコサン酸 (C23:0)	0.5 *	0.72 *	0.54 *	0.47 *	0.28 *	0.32 *
スフィンゴミエリン (d18:2,C16:0)#	0.72 *	0.67 *	0.49 *	0.52 *	0.4 *	0.29 *
メタネフリン	0.5 *	0.44 *	0.55 *	0.39 *	0.23 *	0.6 *

10

20

30

40

		*	*	*	*	*
シトシン	0.89 *	0.84	0.79 *	0.74 *	0.69 *	0.71 *
trans-4-ヒドロキシプロリン	0.71 *	0.57 *	0.72 *	0.61 *	0.45 *	0.42 *

## 【0199】

表4a: 雄ラットにおけるPPARガンマアゴニスト誘導性肝障害に関するマーカー; 有意なアップレギュレーション変化 (p-値 0.1) が (\*) で示されている。幾つかの代謝産物 (#で示されているもの) に関しては、追加的な情報が表6に示されている。

10

## 【表4a】

代謝産物	塩酸ピオグリタゾン			マレイン酸ロシグリタゾン		
	m7	m14	m28	m7	m14	m28
ホスファチジルコリン (C16:0,C20:5)#	1.09	1.13 *	1.11 *	1.07 *	1.11 *	1.06
ホスファチジルコリン (C16:0,C16:0)#	1.11 *	1.14 *	1.18	1.14 *	1.22 *	1.07

20

## 【0200】

表4b: 雄ラットにおけるPPARガンマアゴニスト誘導性肝障害に関するマーカー; 有意なダウンレギュレーション変化 (p-値 0.1) が (\*) で示されている。幾つかの代謝産物 (#で示されているもの) に関しては、追加的な情報が表6に示されている。

【表 4 b】

代謝産物	塩酸ピオグリタゾン			マレイン酸ロシグリタゾン		
	m7	m14	m28	m7	m14	m28
ドコサヘキサエン酸 (C22:cis[4,7,10,13,16,19]6)	0.76 *	0.71 *	0.7 *	0.57 *	0.66 *	0.83 *
オルニチン	0.9 *	0.84 *	0.83 *	0.85 *	0.86 *	0.78 *
トレオニン	0.83 *	0.84 *	0.86 *	0.74 *	0.74 *	0.87 *
ホスファチジルコリン (C18:0,C22:6)#	0.83 *	0.86 *	0.92	0.87 *	0.9 *	0.84 *
リシン	0.86	0.84 *	0.89 *	0.78 *	0.77 *	0.86 *
ホスファート (無機及び有機ホスファート)	0.99	0.83 *	0.82 *	0.76 *	0.66 *	0.69 *
バリン	0.89 *	0.86 *	0.8 *	0.74 *	0.74 *	0.84 *
イソロイシン	0.94	0.86 *	0.83 *	0.7 *	0.72 *	0.78 *
プロリン	0.88 *	0.82 *	0.82 *	0.89 *	0.88 *	0.93 *
アラニン	0.81 *	0.76 *	0.65 *	0.78 *	0.83 *	0.88 *
シトルリン	0.96	0.9 *	0.84 *	0.88 *	0.79	0.86 *
ロイシン	0.92	0.83 *	0.77 *	0.74 *	0.66 *	0.78 *
フェニルアラニン	1	0.9 *	0.82 *	0.85 *	0.84 *	0.81 *

10

20

30

【表 5】

表 5: 化合物及び投与

化合物	同義語	CAS 番号	投与量	詳細
1-メチル-2-ピロリドン	N-メチルピロリドン	872-50-4	食餌中の 10,000 ppm	食餌中の混合物
ベザフィブラート	na	41859-67-0	ガバージュ による 600 mg/kg 体重	0.5% CMC (Tylose CB30000) を含有する飲料 水中, 投与体積: 10 ml/kg bw
カルベンダジム	1H-ベンゾイミ ダゾール-2-イ ルアミノギ酸 メチルエステ ル	10605-21-7	食餌中の 50,000 ppm (第 0-6 日), 食餌中の 10,000 ppm (第 7 日以 降)	食餌中の混合物
ジメチルホルムアミド	na	68-12-2	食餌中の 5,000 ppm	食餌中の混合物
ジモキシストロビン	(E)-2-(メトキシ シイミノ)-N- メチル-2-[アル ファ-(2,5-キシ リルオキシ)-o- トリル]アセト アミド	149961-52-4	食餌中の 3,000 ppm	食餌中の混合物
メタザクロール	N-(2,6-ジメチ ルフェニル)- N-(ピラゾール -1-イルメチル) クロロアセト アミド	67129-08-2	食餌中の 20,000 ppm	食餌中の混合物
N-アセチル-p-アミノフェノール	パラセタモー ル	103-90-2	ガバージュ による 1,500 mg/kg 体重	アクア・ビデス ト(aqua bidest.) 中, 投与体積: 10 ml/kg 体重

10

20

30

40

塩酸ピオグリタゾン	アクトス (Actos)	112529-15-4	ガバージュ による 100 mg/kg 体重	0.5% CMC (Ty- lose CB30000) を含有する飲料 水中, 投与体積: 10 ml/kg bw
マレイン酸ロシグリタゾン	na	155141-29-0	ガバージュ による 5 mg/kg 体重	0.5% CMC (Ty- lose CB30000) を含有する飲料 水中, 投与体積: 10 ml/kg bw
Wy-14643	4-クロロ-6- (2,3-キシリジ ノ)-2-ピリミジ ニルチオ酢酸	50892-23-4	1,000 ppm	食餌中の混合物

10

20

## 【 0 2 0 1 】

表6: 選択されたアナライトの化学的/物理的特性。これらのバイオマーカーはここでは化学的及び物理的特性により特徴づけられている。

代謝産物	フラグメンテーションパターン (GC-MS) 及び説明
3-O-メチルスフィンゴシン (d18:1)	酸メタノリシス並びにピリジン中の2% O-メチルヒドロキシアミン-塩酸塩での及びそれに続く N-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオルオロ酢酸での誘導体化の後で、電子衝撃(EI)イオン化質量分析を適用する GC/MS で検出された場合、3-O-メチルスフィンゴシン (d18:1) は以下の特徴的イオンフラグメントを示す: MS (EI, 70 eV): m/z (%): 204 (100), 73 (18), 205 (16), 206 (7), 354 (4), 442 (1).
5-O-メチルスフィンゴシン (d18:1)	酸メタノリシス並びにピリジン中の2% O-メチルヒドロキシアミン-塩酸塩での及びそれに続く N-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオルオロアセトアミドでの誘導体化の後で、電子衝撃(EI)イオン化質量分析を適用する GC/MS で検出された場合、5-O-メチルスフィンゴシン (d18:1) は以下の特徴的イオンフラグメントを示す: MS (EI, 70 eV): m/z (%): 250 (100), 73 (34), 251 (19), 354 (14), 355 (4), 442 (1).
コレステロールエステル No 01	代謝産物はコレステロールエステルのクラスに属する。それは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用する LC/MS で検出された場合、以下の特徴的イオン種を示す: 正荷電イオン種の質量対電荷比 (m/z)は 369.2 (+/- 0.5)である。
コリンプラスマローゲン No 01	代謝産物はコリンプラスマローゲンのクラスに属する。それは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用する LC/MS で検出された場合、以下の特徴的イオン種を示す: 正荷電イオン種の質量対電荷比 (m/z)は 772.6 (+/- 0.5)である。
コリンプラスマローゲン No 02	代謝産物はコリンプラスマローゲンのクラスに属する。それは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用する LC/MS で検出された場合、以下の特徴的イオン種を示す: 正荷電イオン種の質量対電荷比 (m/z)は 767 (+/- 0.5)である。
コリンプラスマローゲン No 03	代謝産物はコリンプラスマローゲンのクラスに属する。それは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用する LC/MS で検出された場合、以下の特徴的イオン種を示す: 正荷電イオン種の質量対電荷比 (m/z)は 768.8 (+/- 0.5)である。
DAG (C18:1,C18:2)	DAG (C18:1,C18:2) は、C18:1 脂肪酸単位と C18:2 脂肪酸単位との組合せを含有するジアシルグリセロールの総和パラメータを代表する。イオン化種の質量対電荷比 (m/z)は 641.6 Da (+/- 0.5 Da)である。

<p>酸メタノリシス並びにピリジン中の 2% O-メチルヒドロキシアミン-塩酸塩での及びそれに続く N-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミドでの誘導体化の後で、電子衝撃(EI)イオン化質量分析を適用する GC/MS で検出された場合、エイコサエン酸 (C20:1)は以下の特徴的イオンフラグメントを示す: MS (EI, 70 eV): m/z (%): 55 (100), 69 (75), 41 (57), 83 (54), 74 (53), 97 (45), 110 (20), 292 (13), 293 (13), 124 (12), 250 (9), 152 (8), 138 (8), 208 (7), 324 (2).</p>	<p>酸メタノリシス並びにピリジン中の 2% O-メチルヒドロキシアミン-塩酸塩での及びそれに続く N-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミドでの誘導体化の後で、電子衝撃(EI)イオン化質量分析を適用する GC/MS で検出された場合、エイコサエン酸 (C20:1)は以下の特徴的イオンフラグメントを示す: MS (EI, 70 eV): m/z (%): 55 (100), 69 (75), 41 (57), 83 (54), 74 (53), 97 (45), 110 (20), 292 (13), 293 (13), 124 (12), 250 (9), 152 (8), 138 (8), 208 (7), 324 (2).</p>
<p>グリセロールホスファート, 脂質画分</p>	<p>グリセロールホスファート, 脂質画分は、抽出及び極性画分と脂質画分との抽出物の分離の後で脂質画分中に存在する、グリセロール-2-ホスファート又はグリセロール-3-ホスファート部分を含有する代謝産物の総和パラメータを代表する。</p>
<p>リゾホスファチジルコリン (C17:0)</p>	<p>リゾホスファチジルコリン (C17:0) は、C17:0 脂肪酸単位を含有するリゾグリセロホスホリルコリンの総和パラメータを代表する。エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用する LC/MS で検出された場合、正荷電イオン種の質量対電荷比 (m/z)は 510.4 Da (+/- 0.5 Da)である。</p>
<p>リゾホスファチジルコリン (C18:0)</p>	<p>リゾホスファチジルコリン (C18:0) は、C18:0 脂肪酸単位を含有するリゾグリセロホスホリルコリンの総和パラメータを代表する。エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用する LC/MS で検出された場合、正荷電イオン種の質量対電荷比 (m/z)は 546.6 Da (+/- 0.5 Da)である。</p>
<p>リゾホスファチジルコリン (C18:1)</p>	<p>リゾホスファチジルコリン (C18:1) は、C18:1 脂肪酸単位を含有するリゾグリセロホスホリルコリンの総和パラメータを代表する。エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用する LC/MS で検出された場合、正荷電イオン種の質量対電荷比 (m/z)は 522.2 Da (+/- 0.5 Da)である。</p>
<p>リゾホスファチジルコリン (C18:2)</p>	<p>リゾホスファチジルコリン (C18:2) は、C18:2 脂肪酸単位を含有するリゾグリセロホスホリルコリンの総和パラメータを代表する。エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用する LC/MS で検出された場合、正荷電イオン種の質量対電荷比 (m/z)は 542.4 Da (+/- 0.5 Da)である。</p>
<p>リゾホスファチジルコリン (C20:4)</p>	<p>リゾホスファチジルコリン (C20:4) は、C20:4 脂肪酸単位を含有するリゾグリセロホスホリルコリンの総和パラメータを代表する。エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用する LC/MS で検出された場合、正荷電イオン種の質量対電荷比 (m/z)は 544.4 Da (+/- 0.5 Da)である。</p>
<p>リゾホスファチジルエタノールアミン (C22:5)</p>	<p>リゾホスファチジルエタノールアミン (C22:5) は、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用する LC/MS で検出された場合、以下の特徴的イオン種を示す: 正荷電イオン種の質量対電荷比 (m/z)は 528.2 (+/- 0.5)である。</p>

ホスファチジルコリン (C16:0,C16:0)	ホスファチジルコリン (C16:0/C16:0) は、2 個の C16:0 脂肪酸単位の組合せを含有するグリセロホスホコリンの総和パラメータを代表する。イオン化種の質量対電荷比 (m/z) は 734.8 Da (+/- 0.5 Da) である。
ホスファチジルコリン (C16:0,C20:5)	ホスファチジルコリン (C16:0,C20:5) は、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用する LC/MS で検出された場合、以下の特徴的イオン種を示す: 正荷電イオン種の質量対電荷比 (m/z) は 780.8 (+/- 0.5) である。
ホスファチジルコリン (C16:1,C18:2)	ホスファチジルコリン (C16:1, C18:2) は、C16:1 脂肪酸単位と C18:2 脂肪酸単位との組合せを含有するグリセロホスホコリンの総和パラメータを代表する。エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用する LC/MS で検出された場合、正荷電イオン種の質量対電荷比 (m/z) は 756.8 Da (+/- 0.5 Da) である。
ホスファチジルコリン (C18:0,C18:1)	ホスファチジルコリン (C18:0, C18:1) は、C18:0 脂肪酸単位と C18:1 脂肪酸単位との組合せを含有するグリセロホスホコリンの総和パラメータを代表する。エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用する LC/MS で検出された場合、正荷電イオン種の質量対電荷比 (m/z) は 788.6 Da (+/- 0.5 Da) である。
ホスファチジルコリン (C18:0,C18:2)	ホスファチジルコリン (C18:0, C18:2) は、C18:0 脂肪酸単位と C18:2 脂肪酸単位との組合せを含有するグリセロホスホコリンの総和パラメータを代表する。エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用する LC/MS で検出された場合、正荷電イオン種の質量対電荷比 (m/z) は 786.6 Da (+/- 0.5 Da) である。
ホスファチジルコリン (C18:0,C20:3)	ホスファチジルコリン (C18:0,C20:3) は、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用する LC/MS で検出された場合、以下の特徴的イオン種を示す: 正荷電イオン種の質量対電荷比 (m/z) は 812.6 (+/- 0.5) である。
ホスファチジルコリン (C18:0,C20:4)	ホスファチジルコリン (C18:0, C20:4) は、C18:0 脂肪酸単位と C20:4 脂肪酸単位との組合せを含有するグリセロホスホコリンの総和パラメータを代表する。エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用する LC/MS で検出された場合、正荷電イオン種の質量対電荷比 (m/z) は 810.8 Da (+/- 0.5 Da) である。
ホスファチジルコリン (C18:0,C22:6)	ホスファチジルコリン (C18:0, C22:6) は、C18:0 脂肪酸単位と C22:6 脂肪酸単位との組合せを含有するグリセロホスホコリンの総和パラメータを代表する。エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用する LC/MS で検出された場合、正荷電イオン種の質量対電荷比 (m/z) は 834.8 Da (+/- 0.5 Da) である。

ホスファチジルコリン (C18:1,C18:2)	ホスファチジルコリン (C16:0/C20:3 C18:1/C18:2) は、C18:1 脂肪酸単位と C18:2 脂肪酸単位との組合せを含有するグリセロホスホリコリンの総和パラメータを代表する。イオン化種の質量対電荷比 (m/z) は 784.6 Da (+/- 0.5 Da) である。
ホスファチジルコリン (C18:2,C20:4)	ホスファチジルコリン (C16:0/C22:6 C18:2/C20:4) は、C16:0 脂肪酸単位と C22:6 脂肪酸単位との組合せ又は C18:2 脂肪酸単位と C20:4 脂肪酸単位との組合せを含有するグリセロホスホリコリンの総和パラメータを代表する。イオン化種の質量対電荷比 (m/z) は 806.6 Da (+/- 0.5 Da) である。 代謝産物はグリセロホスホリコリンのクラスに属する。それは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用する LC/MS で検出された場合、以下の特徴的イオン種を示す: 正荷電イオン種の質量対電荷比 (m/z) は 808.4 (+/- 0.5) である。
ホスファチジルコリン No 02	代謝産物はグリセロホスホリコリンのクラスに属する。それは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用する LC/MS で検出された場合、以下の特徴的イオン種を示す: 正荷電イオン種の質量対電荷比 (m/z) は 796.8 (+/- 0.5) である。
ホスファチジルコリン No 04	スフィンゴミエリン (d18:1,C23:0) は、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用する LC/MS で検出された場合、以下の特徴的イオン種を示す: 正荷電イオン種の質量対電荷比 (m/z) は 801.8 (+/- 0.5) である。
スフィンゴミエリン (d18:1,C24:0)	スフィンゴミエリン (d18:1, C24:0) は、d18:1 長鎖基本単位と C24:0 脂肪酸単位との組合せを含有するスフィンゴミエリンの総和パラメータを代表する。エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用する LC/MS で検出された場合、正荷電イオン種の質量対電荷比 (m/z) は 815.8 Da (+/- 0.5 Da) である。
スフィンゴミエリン (d18:2,C16:0)	スフィンゴミエリン (d18:2,C16:0) は、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用する LC/MS で検出された場合、以下の特徴的イオン種を示す: 正荷電イオン種の質量対電荷比 (m/z) は 723.6 (+/- 0.5) である。
スフィンゴミエリン (d18:2,C18:0)	スフィンゴミエリン (d18:2,C18:0) は、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用する LC/MS で検出された場合、以下の特徴的イオン種を示す: 正荷電イオン種の質量対電荷比 (m/z) は 729.8 (+/- 0.5) である。
TAG (C16:0,C16:1)	代謝産物は、C16:0 脂肪酸単位と C16:1 脂肪酸単位との組合せを含有するトリアシルグリセリドの総和に相当する。それは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用する LC/MS で検出された場合、以下の特徴的イオン種を示す: 正荷電イオン種の質量対電荷比 (m/z) は 549.6 (+/- 0.5) である。

TAG (C16:0,C18:1,C18:3)	TAG (C16:0,C18:1,C18:3) は、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用する LC/MS で検出された場合、以下の特徴的イオン種を示す: 正荷電イオン種の質量対電荷比 (m/z)は 855.6 (+/- 0.5)である。
TAG (C16:0,C18:2)	代謝産物は、C16:0 脂肪酸単位と C18:2 脂肪酸単位との組合せを含有するトリアシルグリセリドの総和に相当する。それは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用する LC/MS で検出された場合、以下の特徴的イオン種を示す: 正荷電イオン種の質量対電荷比 (m/z)は 575.6 (+/- 0.5)である。
TAG (C18:1,C18:2)	代謝産物は、C18:1 脂肪酸単位と C18:2 脂肪酸単位との組合せを含有するトリアシルグリセリドの総和に相当する。それは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用する LC/MS で検出された場合、以下の特徴的イオン種を示す: 正荷電イオン種の質量対電荷比 (m/z)は 601.6 (+/- 0.5)である。
TAG (C18:2,C18:2)	代謝産物は、C18:2 脂肪酸単位と C18:2 脂肪酸単位との組合せを含有するトリアシルグリセリドの総和に相当する。それは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用する LC/MS で検出された場合、以下の特徴的イオン種を示す: 正荷電イオン種の質量対電荷比 (m/z)は 599.6 (+/- 0.5)である。
TAG (C18:2,C18:3)	代謝産物は、C18:2 脂肪酸単位と C18:3 脂肪酸単位との組合せを含有するトリアシルグリセリドの総和に相当する。それは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用する LC/MS で検出された場合、以下の特徴的イオン種を示す: 正荷電イオン種の質量対電荷比 (m/z)は 597.6 (+/- 0.5)である。
TAG (DAG-断片)	代謝産物はトリアシルグリセリドのクラスに属する。それは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用する LC/MS で検出された場合、以下の特徴的イオン種を示す: 正荷電イオン種の質量対電荷比 (m/z)は 600.6 (+/- 0.5)である。
TAG No 01	代謝産物はトリアシルグリセリドのクラスに属する。それは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用する LC/MS で検出された場合、以下の特徴的イオン種を示す: 正荷電イオン種の質量対電荷比 (m/z)は 547.6 (+/- 0.5)である。
TAG No 02	代謝産物はトリアシルグリセリドのクラスに属する。それは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用する LC/MS で検出された場合、以下の特徴的イオン種を示す: 正荷電イオン種の質量対電荷比 (m/z)は 695.6 (+/- 0.5)である。
TAG No 05	代謝産物はトリアシルグリセリドのクラスに属する。それは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用する LC/MS で検出された場合、以下の特徴的イオン種を示す: 正荷電イオン種の質量対電荷比 (m/z)は 879.6 (+/- 0.5)である。

TAG No 059	代謝産物はトリアシルグリセリドのクラスに属する。それは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用する LC/MS で検出された場合、以下の特徴的イオン種の質量対電荷比(m/z)は 904 (+/-0.5)である。
TAG No 07	代謝産物はトリアシルグリセリドのクラスに属する。それは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用する LC/MS で検出された場合、以下の特徴的イオン種の質量対電荷比(m/z)は 853.6 (+/- 0.5)である。

10

20

30

40

表7a: 雌ラットにおけるPXRアゴニスト誘導性障害に関するマーカー; 有意なアップレギュレーション変化 (p-値 0.2) が (\*) で示されている。幾つかの代謝産物に関しては、追加的な情報が表6に示されているかもしれない。

【表7a】

化合物	17-アルファ-エチニルエストロジオール			17-アルファ-エチニルエストラジオール			タモキシフェン			塩酸テトラサイクリン		
	f7	f14	f28	f7	f14	f28	f7	f14	f28	f7	f14	f28
トレオニン	1,27*	1,37*	1,38*	1,49*	2,00*	1,31*	1,17*	1,05*	0,98	1,30*	1,17*	1,21*
Xylitol	1,18*	1,65*	1,62*	1,25*	1,30*	1,07	1,29*	1,63*	1,71*	1,52*	1,44*	1,29*
TAG (C18:2,C18:2)	1,85	3,16*	1,98*	1,45	2,39*	5,56*	3,21*	2,84*	2,20*	1,64*	1,49*	1,74*
TAG (C18:1,C18:2,C18:3)	1,52*	2,65*	1,52*	1,13	2,17*	6,20*	2,78*	2,96*	2,18*	1,16*	1,40*	1,28
3-メトキシチロシン	1,05	1,59*	1,23	1,17*	1,38*	1,21*	1,26*	1,61*	1,38*	1,06	1,27*	1,18*

10

20

30

40

表7b: 雌ラットにおけるPXRアゴニスト誘導性障害に関するマーカー; 有意なダウンレギュレーション変化 (p-値 < 0.2) が (\*) で示されている。幾つかの代謝産物に関しては、追加的な情報が表6に示されているかもしれない。

【表7b】

化合物	17-アルファ-エチニルエストロジオール			17-アルファ-エチニルエストラジオール			タモキシフェン			塩酸テトラサイクリン		
	f7	f14	f28	f7	f14	f28	f7	f14	f28	f7	f14	f28
パルミチン酸 (C16:cis[9]1)	NA	0,47*	0,45*	0,70*	0,41*	1,41*	0,91	0,69*	0,60*	0,65*	0,80	0,59*
16-メチルヘプタデカン酸	NA	0,31*	0,29*	0,29*	0,39*	1,09	0,73*	0,97	0,78*	0,72*	0,75*	0,69*
17-メチルオクタデカン酸	NA	0,43*	0,46*	0,20*	0,53*	1,21	0,80*	0,92	0,89*	0,80*	0,64*	0,73*
ウラシル	0,75*	0,81*	0,84	0,70*	0,81*	0,96	0,86*	0,86*	0,64*	0,76*	0,85*	0,88*
ケトロイシン	0,85*	0,73*	0,82*	0,67*	0,65*	0,78*	0,92	0,71*	0,77*	0,80*	0,73*	0,63*
リゾホスファチジルコリン (C20:4)	0,80*	0,93*	0,90*	0,76*	0,88*	0,97	0,92*	0,96*	0,91*	0,98*	0,96	0,92*
リゾホスファチジルコリン (C20:4)	0,73*	0,80*	0,73*	0,67*	0,83*	0,95	0,88*	0,84*	0,81*	0,94*	0,88	0,82*
TAG (C42:9) (DAG-断片) (推定)	0,24*	0,17*	0,31*	0,28*	0,30*	0,15*	0,56*	0,65*	0,81*	0,76*	0,78	0,85*
ホスファチジルコリン (C18:0,C20:3)	0,28*	0,66*	0,51*	0,28*	0,63*	1,12	0,81*	0,89*	0,88*	0,62*	0,91	0,82*
ノルメタネアリン	0,81*	1,01	0,96	0,83*	0,60*	0,87*	0,84	1,15	0,89	0,92*	0,84	0,81*

10

20

30

40

表7c: 雄ラットにおけるPXRアゴニスト誘導性障害に関するマーカー; 有意なアップレギュレーション変化 (p-値 0.2) が (\*) で示されている。幾つかの代謝産物に関しては、追加的な情報が表6に示されているかもしれない。

【表7c】

化合物	17-アルファ-エチニルエストラジオール			タモキシフェン			塩酸テトラサイクリン			17-アルファ-エチニルエストラジオール		
	m7	m14	m28	m7	m14	m28	m7	m14	m28	m7	m14	m28
トレオニン	1,32*	1,43*	1,44*	0,96	1,22*	1,10*	1,20*	1,11*	1,28*	1,24*	1,46*	1,25*
セリン	1,32*	1,50*	1,19*	1,17*	1,25*	1,14*	1,05*	1,10*	1,26*	1,26*	1,33*	1,29*
キシリトール	1,60*	1,14*	2,34*	1,57*	2,05*	1,75*	1,04*	1,16	1,86*	1,32*	2,32*	1,51*
3-メトキシチロシン	1,53*	1,87*	2,07*	1,17*	1,31*	1,39*	1,11*	1,34*	1,62*	1,51*	2,11*	2,04*

10

20

30

40

【0205】

表7d: 雄ラットにおけるPXRアゴニスト誘導性障害に関するマーカー; 有意なダウンレギュレーション変化 (p-値 0.2) が (\*) で示されている。幾つかの代謝産物に関しては、追加的な情報が表6に示されているかもしれない。

50

【表 7 d】

化合物	17-アルファ-エチ ニルエストラジオ ール			タモキシフェン			塩酸テトラサイク リン			17-アルファ-エチ ニルエストラジオ ール		
	m7	m14	m28	m7	m14	m28	m7	m14	m28	m7	m14	m28
	ベータ-シトステロール	0,18*	0,54*	0,69	0,75*	0,83*	0,73*	0,36*	0,43*	0,30*	0,30*	0,38*
カンペステロール	0,14*	0,38*	0,59*	0,59*	0,74*	0,55*	0,33*	0,58*	0,37*	0,30*	0,33*	0,49*
ミリスチン酸 (C14:0)	0,19*	0,40*	0,61	0,65*	0,60*	0,61*	0,63*	0,66*	0,72*	0,47*	0,35*	0,39*
パルミチン酸 (C16:cis[9]1)	0,41*	0,43*	0,59	0,57*	0,43*	0,32*	0,71*	0,70*	0,83	0,39*	0,26*	0,27*
未知脂質 (28000473)	0,19*	0,39*	0,55*	0,31*	0,46*	0,37*	0,56*	0,78*	0,61*	0,24*	0,49*	0,39*
16-メチルヘプタデカン酸	0,27*	0,45*	0,56*	0,58*	0,60*	0,48*	0,72*	0,68*	0,58*	0,31*	0,55*	0,41*
17-メチルオクタデカン酸	0,21*	0,38*	0,52*	0,61*	0,64*	0,48*	0,79*	0,68*	0,66*	0,25*	0,40*	0,33*
チロシン	0,91*	0,91*	0,88*	0,77*	0,85*	0,86	0,79*	0,76*	0,92*	1,06	0,90*	0,82*
ウラシル	0,77*	0,78*	0,81*	0,86*	0,75*	0,79*	0,77*	0,79*	0,80*	0,90*	0,80*	0,79*
リゾホスファチジルコリン (C18:1)	0,45*	0,63*	0,83*	0,78*	0,84*	0,81*	0,95*	0,98	0,93*	0,58*	0,76*	0,87*
ホスファチジルコリン (C16:1,C18:2)	0,25*	0,59*	0,91	0,76*	0,69*	0,74*	0,77*	0,65*	0,77	0,24*	0,42*	0,73*
ホスファチジルコリン No 02	0,29*	0,69*	1,14	0,53*	0,60*	0,62*	0,76*	0,83*	0,72*	0,24*	0,53*	0,84*
ホスファチジルコリン (C18:1,C18:2)	0,43*	0,72*	1,09*	0,79*	0,83*	0,99	0,69*	0,74*	0,77*	0,35*	0,77*	1,03
PC No 04 (推定)	0,20*	0,46*	0,82*	0,44*	0,56*	0,54*	0,77*	0,74*	0,76	0,17*	0,42*	0,64*
未知脂質 (68000034)	0,73*	0,58*	0,62*	0,74*	0,59*	0,45*	0,70*	0,78*	1,02	0,67*	0,53*	0,59*
リゾホスファチジルコリン (C20:4)	0,80*	0,81*	0,92*	0,90*	0,89*	0,88*	0,89*	0,83*	0,82*	0,78*	0,83*	0,88*
リゾホスファチジルコリン (C20:4)	0,66*	0,62*	0,74*	0,77*	0,79*	0,70*	0,85*	0,77*	0,72*	0,66*	0,66*	0,68*
スフィンゴミエリン (d18:1,C16:0)	0,30*	0,67*	0,65*	0,66*	0,73*	0,71*	0,87	0,94*	0,81*	0,32*	0,40*	0,65*
ホスファチジルコリン (C16:0,C20:4)	0,62*	0,88*	1,01	0,87*	0,96*	0,97*	0,65*	0,77*	0,78*	0,44*	0,87*	0,99*

## 【 國際調查報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/IB2013/051862
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
See the Extra Sheet		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC: A61B5/-; A61B19/-; A61K31-; A61P-		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPODOC, WPI, CNPAT, CNKI, ISI web of Science: biomarker, liver, disorder, disease, diagnos-, metabonomic-, identify, compound		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOHN, C. L. et al., Metabonomics and its role in drug development and disease diagnosis Expert Rev. Mol. Diagn. Vol.4, No.2, Pages 189-199, 2004	3-20
X	THIERRY, P. et al., The diagnostic value of biomarkers(SteatoTest) for the prediction of liver steatosis., Comparative Hepatology Vol.4, No.10, 23. Dec. 2005	3-20
X	WU, Y.B. et al., Duo Zhong Sheng Hua Zhi Biao Lian He Jian Ce Zai Gan Bing Zhen Duan Zhong De Ying Yong. J Med. Theor. & Prac., Vol.23, No.3, Pages 327-328, Mar. 2010	3-20
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&amp;” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 08 Jul.2013(08.07.2013)		Date of mailing of the international search report <b>22 Aug. 2013 (22.08.2013)</b>
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451		Authorized officer <b>WANG Kewei</b> Telephone No. (86-10)62413746

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/IB2013/051862

**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.: 1, 2, 4(part)-9(part), 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 an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fee.
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/IB2013/051862

**Continuation of: Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

The subject matter of claims 1 and 16 is attributed to a method for diagnosis of human or animal disease and does not meet the criteria set out in Rules 39.1(iv) PCT. Claims 2 and 4 (part)-9 (part) refer to claim 1. They also do not meet the criteria set out in Rules 39.1(iv) PCT.

The search report is made on the basis of the following subject matter for claim 16: the use of at least one biomarker selected from any one of 1, 2, 3a, 3b, 4a, 4b, 7a, 7b, 7c or 7d or detection agent for the said biomarker in the manufacture of an agent for diagnosing a liver disorder in a subject.

**Continuation of: A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

A61B 5/00 (2006.01) i

A61B 19/00 (2006.01) i

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(74)代理人 100111741

弁理士 田中 夏夫

(74)代理人 100169971

弁理士 菊田 尚子

(74)代理人 100182992

弁理士 江島 孝毅

(72)発明者 ウォーク, ティルマン ベー .

ドイツ連邦共和国 1 4 5 3 2 クラインマハノヴ, レッシングシュトラッセ 1 5

(72)発明者 ラヴェンツヴァーイ, ベナード ヴァン

ドイツ連邦共和国 6 7 1 2 2 アルトリップ, ラインシュトラッセ 6

(72)発明者 メラート, ヴェルナー

ドイツ連邦共和国 6 7 4 5 4 ハスロッホ, アルテ ツィーゲライ 9

(72)発明者 ファビアン, エリック

ドイツ連邦共和国 6 7 3 4 6 シュパイヤー, ジークベルトシュトラッセ 3

(72)発明者 シュトラウス, フォルカー

ドイツ連邦共和国 6 7 0 9 8 パート デュルクハイム, カール - レーダー - アレー 2 1 デー

(72)発明者 カンプ, ヘニッケ

ドイツ連邦共和国 6 7 2 9 4 ビシュハイム, キルヒハイムボランダー シュトラッセ 9

(72)発明者 ヴィーマー, ヤン ツェー

ドイツ連邦共和国 1 3 5 0 3 ベルリン, ヘニツヒスドルファー シュトラッセ 1 3 9 アー

(72)発明者 ルーサー, ラルフ

ドイツ連邦共和国 1 3 1 5 8 ベルリン, ハウプトシュトラッセ 2

(72)発明者 ヘロルド, ミヒャエル マンフレッド

ドイツ連邦共和国 1 0 5 5 1 ベルリン, クヴィッツォフシュトラッセ 8 7

(72)発明者 プロコディーヌ, アレクサンドル

ドイツ連邦共和国 1 3 1 8 9 ベルリン, エッセンングラーベン 1 0 1

Fターム(参考) 2G045 AA25 CA26 DA31 DA60 DA61 DA69 FA36