

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2020年3月19日(19.03.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/054722 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/50 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
G01N 27/62 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2019/035557
- (22) 国際出願日: 2019年9月10日(10.09.2019)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2018-170955 2018年9月12日(12.09.2018) JP
- (71) 出願人: 株式会社島津製作所 (SHIMADZU CORPORATION) [JP/JP]; 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 Kyoto (JP). 学校法人聖路加国際大学 (ST. LUKE'S INTERNATIONAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1040044 東京都中央区明石町10番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 藤本 宏隆 (FUJIMOTO, Hirotaka); 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内 Kyoto (JP). 青木 豊 (AOKI, Yutaka); 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作

所内 Kyoto (JP). 佐藤 孝明 (SATO, Taka-Aki); 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内 Kyoto (JP). 木村 武志 (KIMURA, Takeshi); 〒1040044 東京都中央区明石町10番1号 学校法人聖路加国際大学内 Tokyo (JP). 増田 勝紀 (MASUDA, Katsunori); 〒1040044 東京都中央区明石町10番1号 学校法人聖路加国際大学内 Tokyo (JP). 平家 勇司 (HEIKE, Yuji); 〒1040044 東京都中央区明石町10番1号 学校法人聖路加国際大学内 Tokyo (JP). 鈴木 一彦 (SUZUKI, Kazuhiko); 〒1040044 東京都中央区明石町10番1号 学校法人聖路加国際大学内 Tokyo (JP). 宇山 静香 (UYAMA, Shizuka); 〒1040044 東京都中央区明石町10番1号 学校法人聖路加国際大学内 Tokyo (JP). 浅見 まり子 (ASAMI, Mariko); 〒1040044 東京都中央区明石町10番1号 学校法人聖路加国際大学内 Tokyo (JP). 浦山 ケビン (URAYAMA, Kevin); 〒1040044 東京都中央区明石町10番1号 学校法人聖路加国際大学内 Tokyo (JP). 林 邦好 (HAYASHI, Kuniyoshi); 〒1040044 東京都中央区明石町10番1号 学校法人聖路加国際大学内 Tokyo (JP).

(54) Title: METHOD FOR MEASURING COPD INDICATOR VALUE

(54) 発明の名称: COPD指標値の測定方法

(57) Abstract: The present invention is a method for measuring, on the basis of data obtained by analyzing a biological sample harvested from a subject, an amount of a metabolite related to the onset of chronic obstructive pulmonary disease from among a plurality of metabolites included in the biological sample, said amount being measured as a COPD indicator value. The COPD indicator value is the amount of at least one metabolite selected from among 24 metabolites, specifically glutaric acid, alpha-ketoisocaproic acid, phosphoglycerol, hydroxybutyric acid, arabinose, acetoacetic acid, ornithine, hydroxyproline, norvaline, isocitric acid, erythritol, myoinositol, threitol, 2-amino adipic acid, kynurenine, fucose, phenylalanine, arabitol, xylose, cystine, tyrosine, uric acid, mannose, and beta alanine. The results of measuring the indicator value can be useful in the diagnosis of illnesses related to chronic obstructive pulmonary disease.

(57) 要約: 本発明は、被検者から採取された生体試料を分析することで得られたデータに基づき、前記生体試料に含まれる複数種の代謝物のうち、慢性閉塞性肺疾患の発症に関連する代謝物の量をCOPD指標値として測定する方法であり、前記COPD指標値が、24種の代謝物であるグルタル酸、αケトイソカプロン酸、ホスホグリセロール、ヒドロキシ酪酸、アラビノース、アセト酢酸、オルニチン、ヒドロキシプロリン、ノルバリン、イソクエン酸、エリスリトール、ミオイノシトール、トレイトール、2-アミノアジピン酸、キヌレニン、フコース、フェニルアラニン、アラビトール、キシロース、シスチン、チロシン、尿酸、マンノース、ベータ・アラニンから選ばれる少なくとも1種の代謝物の量である。上記指標値を測定した結果は、慢性閉塞性肺疾患関連疾患の診断に役立てることができる。

(74) 代理人: 特許業務法人京都国際特許事務所 (KYOTO INTERNATIONAL PATENT LAW OFFICE); 〒6008091 京都府京都市下京区東洞院通四条下ル元恵王子町 3 7 番地 豊元四条烏丸ビル Kyoto (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第21条(3))

明 細 書

発明の名称：COPD指標値の測定方法

技術分野

[0001] 本発明は、血液や尿等の生体試料に含まれる物質のうち慢性閉塞性肺疾患の発症に関連する物質の量を測定する方法に関する。

背景技術

[0002] 慢性閉塞性肺疾患（COPD：chronic obstructive pulmonary disease）は、非可逆的な進行性の気流閉塞を特徴とする疾患であり、主にタバコ煙等の有害粒子を長期にわたり吸入曝露することによって引き起こされるといわれている（非特許文献1）。COPDは世界における慢性罹病率や死亡率が高い疾患のひとつであり、COPD罹病者は肺ガンになるリスクが高い（非特許文献2）。例えば、2004年のWHOの調査では、COPDは死因の第4位（総死亡の5.1%）に位置し（非特許文献3）、本邦においても2013年の死因の第9位に位置している（非特許文献4）。COPD罹病者は今後も増加が予想されることから、本疾患の予防や対策は急務で重要な課題となっている。

[0003] COPDは、一般的に、気管支拡張剤を投与した後のスパイロメータを用いた呼吸機能検査（スパイロメトリー）において、1秒率（1秒量／努力肺活量（FEV1/FVC））が70%未満であることに基づき診断される。ここで、「1秒率」とは、深く息を吸って一気に吐き出した量（努力肺活量）に対する最初の1秒間の吐出量の割合（%）をいう。1秒率は、肺の弾力性や気道の閉塞の程度を反映しており、1秒率が70%未満であることは、被検者に閉塞性換気障害（気流閉塞により起こる呼吸機能障害）が生じていることを表している。

[0004] しかしながら、閉塞性換気障害は、喘息や肺線維症のような、COPD以外の肺疾患の罹病者でもみられるため、スパイロメトリーにおいて1秒率が70%未満であった場合でも、直ちにCOPDであると診断することはでき

ない（非特許文献5）。また、従来は、COPDの代表的な病態は気流閉塞であると考えられてきたが、近年では複合した種々の病態の集合体であると考えられており、COPDの疾患概念が、肺局所の炎症性疾患から全身性炎症性疾患（虚血性心疾患、糖尿病、脂質異常症、骨粗しょう症などを併発する疾患）へと変化しつつある。そこで、1秒率に基づく診断に代わり、被検者から採取された血液や血清、血漿などの生体試料中の特定の成分をバイオマーカーとしてCOPDを診断する方法が考えられている（特許文献1～4）。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開2011-526684号公報

特許文献2：特開2013-152236号公報

特許文献3：特開2015-507196号公報

特許文献4：特開2015-509596号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：GOLD: Global Initiative for chronic Obstructive Pulmonary Disease: Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease update 2006. National Institute of Health, National Lung and Blood Institute. 2006.

非特許文献2：Tockman MS, Anthonisen NR, Wright E, et al.,: Airway obstruction and the risk of lung cancer. Ann Int Med 1987; 106: 512-8.

非特許文献3：World Health Organization: The global burden of disease: 2004 update. Geneva. WHO Press 2008.

非特許文献4：図説 国民衛生の動向 2015/2016. 53ページ、一般財団法人厚生労働統計協会.

非特許文献5：COPD診断と治療のためのガイドライン第4版：第II章 診断A、診断基準、p.28

非特許文献6：Svanes C, Sunyer J, Plana E, et al: Early life origins o

f chronic obstructive pulmonary disease. Thorax 2010; 65: 14-20.

非特許文献7: Postma DS, Kerkhof M, Boezen HM, et al: Asthma and chronic obstructive pulmonary disease: common gene, common environments? Am J Respir Crit Care Med 2011; 83: 1588-94.

非特許文献8: De Marco R, Accordini S, Marcon A, et al. Risk factors for chronic obstructive pulmonary disease in a European cohort of young adults. Am J Respir Crit Care Med 2011; 183: 891-7.

非特許文献9: Snider GL; Chronic obstructive pulmonary disease: risk factors, pathophysiology and pathogenesis. Annu Rev Med 1989; 40: 411-29.

非特許文献10: Lundback B, Lindberg A, Lindstrom M, et al: Not 15 but 50% of smokers develop COPD?—Report from the Obstructive Lung Disease in Northern Sweden Studies. Respir Med 2003; 97: 115-22.

非特許文献11: American Thoracic Society: Cigarette smoking and health. Am J Respir Crit Care Med 1996; 153: 861-5.

非特許文献12: Fletcher C, Peto R: The natural history of chronic airflow obstruction. Br Med J. 1977; 1: 1645-8.

非特許文献13: Laurell CB, Eriksson S: The electrophoretic alpha-1-globulin pattern of serum in alpha-anti-trypsin deficiency. Scand J Clin Lab Invest 1963; 15: 197-205.

非特許文献14: Serum Metabolite Biomarkers Discriminate Healthy Smokers from COPD Smokers. PLoS ONE 2015 10(12): e0143937.

非特許文献15: Biomarker Development for Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Am J Respir Crit Care Med. 2015; 192:1162-70.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 特許文献1～4に記載の方法では、主に、COPDの発症経路や発症機構に関与すると考えられているタンパク質やペプチド群、遺伝子をバイオマー

カとし、これらバイオマーカの血液中に含まれる量を測定することによりCOPDを診断している。ところが、上述したように、COPDは種々の病態の集合体であり、その発症経路や発症機構には不明な点が多い。

[0008] 例えば、COPDの最大の危険因子は喫煙である（非特許文献6～8）。COPD患者の約90%には喫煙歴があり、その発症率は年齢や喫煙の曝露量とともに増加し、高齢の喫煙者では約50%に、喫煙指数が60 pack-years以上の重喫煙者では約70%にCOPDが認められている（非特許文献9、10）。なお、喫煙指数pack-yearsは、（1日あたりの平均喫煙本数／20本）×総喫煙年数を表す。その一方で、喫煙者全体におけるCOPDの発症率は15～20%程度にすぎない（非特許文献11）。また、20 pack-yearsの喫煙者のCOPD発症率は約19%であり、60 pack-years以上の重喫煙者の約30%は呼吸機能が正常であるという報告もある（非特許文献11、12）。

[0009] このため、喫煙者におけるCOPDの発症のし易さには喫煙感受性の存在が疑われており、これまでCOPD関連候補遺伝子の検索（ゲノミクス）が行われてきたが、標本の大きさや均一性が不十分であること、人種差を考慮する必要があること等により、単一の遺伝子異常としての α 1-アンチトリプシン欠損症を除いて、COPD関連遺伝子の解明は未だ完全に行われていないのが現状である（非特許文献13）。

[0010] さらに、COPDの発症のし易さの解明のために従来行われてきたゲノミクスは、個体特有の遺伝子の検討に限定されている。前述したように、COPDの発症には遺伝的要因だけでなく、喫煙という環境因子や、加齢や感染、栄養状態などの生体内で起こりうる様々な状態変化が影響を及ぼす。従って、COPDは、前述したように全身性炎症性疾患と考えられ、COPDを正確に診断するためには、COPDの発症経路や病態、個体の遺伝的・環境的背景等、様々な角度からCOPDに影響を及ぼす因子を検討する必要がある。

[0011] 本発明が解決しようとする課題は、慢性閉塞性肺疾患関連疾患に関連する

と考えられる物質の量を測定することにより、その測定結果を慢性閉塞性肺疾患関連疾患の診断に役立てることである。

課題を解決するための手段

[0012] 上記課題を解決するために成された本発明は、

被検者から採取された生体試料を分析することで得られたデータに基づき、前記生体試料に含まれる複数種の代謝物のうち、慢性閉塞性肺疾患関連疾患に関連する代謝物の量をCOPD指標値として測定する方法であり、

前記COPD指標値が、24種の代謝物であるグルタル酸、 α ケトイソカプロン酸、ホスホグリセロール、ヒドロキシ酪酸、アラビノース、アセト酢酸、オルニチン、ヒドロキシプロリン、ノルバリン、イソクエン酸、エリスリトール、ミオイノシトール、トレイトール、2-アミノアジピン酸、キヌレニン、フコース、フェニルアラニン、アラビトール、キシロース、シスチン、チロシン、尿酸、マンノース、ベータ・アラニンから選ばれる少なくとも1種の代謝物の量であることを特徴とする。

[0013] 本発明において、慢性閉塞性肺疾患関連疾患（COPD関連疾患）とは、COPDの他、COPDの前段階の疾患、COPDによって併発される疾患（例えば虚血性心疾患、糖尿病、脂質異常症、骨粗しょう症など）をいう。

本発明者は、多数の被検者から採取した血液試料をクロマトグラフ質量分析装置を用いて分析し、該血液試料に含まれる多数の代謝物の量を網羅的に測定した結果を包括的に解析することにより、上述した24種の代謝物がCOPD発症に大きく関連することを見出した。このような解析手法はメタボロミクスといわれており、この手法を用いることにより、COPDに関連する複合的な病態の変化を包括的にとらえることができる。

[0014] 上述した24種の代謝物は、生体試料に含まれる多数の代謝物のうち堅牢な135種の代謝物の測定値について、COPD関連群と正常群の2群について統計解析を行った結果、COPD関連群に高い相関関係が見られた代謝物である。表1に135種の代謝物のリストを示す。表1に示す代謝物名に含まれる「-nTMS」、「-nTMS(m)」、「-メチルオキシム-nTMS」、又は「-メ

チルオキシム- n TMS(m)」 (n 及び m は自然数)は、ガスクロマトグラフ質量分析装置による分析時に添加された試薬に起因するものである。したがって、例えば表1中の「アスパラギン-2TMS」と「アスパラギン-3TMS」は同一の代謝物(アスパラギン)に由来する。前記24種の代謝物の測定値はいずれもCOPD指標値として単独でCOPDの診断に利用することができる。なお、2群比較の際のCOPD関連群は、スパイロメータを用いた呼吸機能検査による1秒率(FEV1/FVC)の値に基づき判定することができる。

[0015]

[表1]

1	1,5-アンヒドロ-D-グルシトール-4TMS	69	グリコール酸-2TMS
2	1-ヘキサデカノール-TMS	70	馬尿酸-TMS
3	2-アミノアジピン酸-3TMS	71	ヒスチジン-3TMS
4	2-アミノ酪酸-2TMS	72	ホモシステイン-3TMS
5	タウリン-3TMS	73	ヒポキサンチン-2TMS
6	エタノールアミン-3TMS	74	インドール-3-酢酸-2TMS
7	2-デオキシテトラロン酸-3TMS	75	3-インドール乳酸-3TMS
8	2-ヒドロキシ酪酸-2TMS	76	インドキシル硫酸-2TMS
9	2-ヒドロキシグルタル酸-3TMS	77	イソクエン酸-4TMS
10	2-ヒドロキシイソ酪酸-2TMS	78	イソロイシン-2TMS
11	2-ヒドロキシ-4-メチル吉草酸-2TMS	79	イソロイシン-TMS
12	2-ヒドロキシイソ吉草酸-2TMS	80	キヌレニン-3TMS
13	2-ピリドン-TMS	81	乳酸-2TMS
14	2-ヒドロキシ-2-イソプロピルこはく酸-3TMS	82	ラクチオール-9TMS
15	2-オキシ酪酸-メチルオキシム-TMS	83	ラウリン酸-TMS
16	2-オキシグルタル酸-メチルオキシム-2TMS	84	ロイシン-2TMS
17	2-オキシイソカプロン酸-メチルオキシム-TMS	85	ロイシン-TMS
18	3-(3-ヒドロキシフェニル)-3ヒドロキシプロピオン酸-3TMS	86	リシン-4TMS
19	3-アミノイソ酪酸-3TMS	87	2-ヒドロキシブタン二酸-3TMS
20	3-ヒドロキシ酪酸-2TMS	88	マルトース-メチルオキシム-8TMS
21	3-ヒドロキシイソ酪酸-2TMS	89	マンノース-メチルオキシム-5TMS
22	3-ヒドロキシイソ吉草酸-2TMS	90	マルガリン酸-TMS
23	3-インドールプロピオン酸-2TMS	91	メチオニン-2TMS
24	2-オキシ-3-メチル吉草酸-TMS	92	ミオイノシトール-6TMS
25	3-メチルヒスチジン-2TMS	93	ミリスチン酸-TMS
26	p-クレゾール-TMS	94	N-アセチルアスパラギン酸-2TMS
27	4-ヒドロキシ安息香酸-2TMS	95	ノルバリン-2TMS
28	ヒドロキシプロリン-3TMS	96	カプリル酸-TMS
29	ピログルタミン酸-2TMS	97	オレイン酸-TMS
30	アセト酢酸-メチルオキシム-TMS(1)	98	エタノールアミンリン酸-4TMS
31	アセト酢酸-メチルオキシム-TMS(2)	99	オルニチン-3TMS
32	アセツル酸-TMS	100	オルニチン-4TMS
33	アコニット酸-3TMS	101	オロト酸-3TMS
34	アジピン酸-2TMS	102	シュウ酸-2TMS
35	アラニン-2TMS	103	パルミチン酸-TMS
36	アロース-メチルオキシム-5TMS	104	パルミトレイン酸-TMS
37	アラビノース-4TMS	105	パラキサンチン-TMS
38	アラビトール-5TMS	106	フェノール-TMS
39	アスパラギン-2TMS	107	フェニルアラニン-2TMS
40	アスパラギン-3TMS	108	グリセロール3-リン酸-4TMS
41	アスパラギン酸-3TMS	109	リン酸-3TMS
42	3-アミノプロパン酸-3TMS	110	ピベコリン酸-2TMS
43	ホウ酸-3TMS	111	プロリン-2TMS
44	ヘキサン酸-TMS	112	ピロリン酸塩-4TMS
45	クエン酸-4TMS	113	ビルビン酸-メチルオキシム-TMS
46	シトルリン-4TMS	114	リビトール-5TMS
47	クレアチニン-3TMS	115	リボース-4TMS
48	システイン-3TMS	116	リブローース-4TMS
49	シスチン-4TMS	117	シロイノシトール-6TMS
50	デカン酸-TMS	118	セリン-3TMS
51	エリトリトール-4TMS	119	ステアリン酸-TMS
52	フルクトース-メチルオキシム-5TMS(1)	120	コハク酸-2TMS
53	フルクトース-メチルオキシム-5TMS(2)	121	スクロース-8TMS
54	フコース-メチルオキシム-5TMS	122	テオブロミン-TMS
55	フマル酸-2TMS	123	トレイトール-4TMS
56	グルコン酸-メチルオキシム-5TMS	124	トレオン酸-4TMS
57	グルコース-5TMS(1)	125	トレオニン-3TMS
58	グルコース-5TMS(4)	126	トリプトファン-2TMS
59	グルコース-メチルオキシム-5TMS(2)	127	トリプトファン-3TMS
60	グルコース-メチルオキシム-5TMS(3)	128	チロシン-3TMS
61	グルクロン酸-メチルオキシム-5TMS	129	尿素-2TMS
62	グルタミン酸-3TMS	130	尿酸-4TMS
63	グルタミン-3TMS	131	ウリジン-4TMS
64	グルタル酸-2TMS	132	バリン-2TMS
65	グリセリン酸-3TMS	133	キサンチン-3TMS
66	グリセロール-3TMS	134	キシリトール-5TMS
67	グリシン-2TMS	135	キシロース-メチルオキシム-4TMS
68	グリシン-3TMS		

[0016] これまでも、メタボロミクスを用いたCOPDのバイオマーカー探索により

、２３種の代謝物（ミオイノシトール、フマル酸など）をバイオマーカ候補とする報告がなされている（非特許文献１４）。しかし、現時点では、ＣＯＰＤ患者から採取された生体試料に含まれる代謝物が単独でＣＯＰＤの診断や病状（症状や呼吸機能など）の把握に有用なバイオマーカとなり得るとの報告はなされていない（非特許文献１５）。

[0017] ここで、「被検者から採取された生体試料」とは、該生体試料に含まれる代謝物の量を測定することができるものであれば血液、生体組織、糞便、尿等、どのようなものでも良いが、試料の採取のし易さ、代謝物の含有量の多さを考慮すると血液（全血、血清、又は血漿）が好ましい。血清としては、全血に対して抗凝固剤を添加せずに血球成分を凝固させてから得られる液性成分を使用することができる。また、血漿としては、全血に対して抗凝固剤を添加して血球成分を凝固させずに得られる液性成分を使用することができる。

[0018] また、生体試料の分析手法としては、クロマトグラフ質量分析（クロマトグラフＭＳ分析）に限らず、核磁気共鳴（ＮＭＲ）分光法、酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）及びラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）等の免疫学的分析法などを用いることができるが、定量的に生体試料に含まれる代謝物の量を測定することができる点でクロマトグラフＭＳ分析が優れている。クロマトグラフＭＳ分析とは、ガスクロマトグラフ、又は液体クロマトグラフと、これらクロマトグラフで分離された試料の検出装置としての質量分析装置を用いた分析をいう。質量分析装置としては、トリプル四重極型質量分析装置、Ｑ－ＴＯＦ型質量分析装置、ＴＯＦ－ＴＯＦ型質量分析装置、イオントラップ質量分析装置、又はイオントラップ飛行時間型質量分析装置が挙げられる。これらの質量分析装置を用いると、分析対象物（代謝物）以外の夾雑物を多く含む試料であっても高感度な分析が可能であり、分析安定性が向上するため、高い再現性で生体試料に含まれる代謝物の量を定量的に測定することができる。

[0019] 上記ＣＯＰＤ指標値としては、アラビノース、オルニチン、キヌレニン、２

-アミノアジピン酸、シスチン、チロシン、ミオイノシトール、尿酸、ベータ・アラニン、マンノースのいずれかの測定値を用いることができる。

上記10種の代謝物は、135種の代謝物の測定値について、COPD関連群と正常群の2群間でt検定を行ったところ、COPD関連群と正常群との間に有意な差が認められたものである。従って、上記10種の代謝物の量をCOPD指標値として測定し、該COPD指標値と所定の閾値との比較により、COPD関連疾患の有無を診断することができる。所定の閾値は、多数の被検者について、前記10種の代謝物の生体試料中に含まれる量を測定したときの平均値や中央値等とすることができる。

[0020] また、上記COPD指標値としては、グルタル酸、ヒドロキシプロリン、キシロース、ホスホグリセロール、オルニチンのいずれかの測定値を用いるようにしても良い。

上記5種の代謝物は、従属変数としてCOPD関連疾患の有無に加えて、調整因子として年齢、性別、喫煙歴を投入したモデルについて135種の代謝物の測定値のロジスティック回帰分析を行ったところ、P値が0.05よりも小さく、COPD発症の有無との間に高い相関関係が見られた代謝物である。従って、これら5種の代謝物の測定値をCOPD指標値として測定し、これと所定の閾値との比較により、COPD発症の有無を診断することができる。

[0021] また、上記COPD指標値としては、エリスリトール、オルニチン、ミオイノシトール、トレイトール、2-アミノアジピン酸、キヌレニン、フコース、フェニルアラニン、アラビトール、アラビノースのいずれかの測定値を用いることが好ましい。

上記10種の代謝物は、従属変数としてCOPD関連疾患の有無において、135種の代謝物の測定値についてROC解析し、そのAUC値を求めたところ、その値が大きかった代謝物である。従って、これら10種の代謝物の測定値をそれぞれCOPD指標値として測定し、これと所定の閾値との比較により、COPD発症の有無を診断することができ、しかも、誤診断を少

なくすることができる。

[0022] また、上記COPD指標値としては、グルタル酸、 α ケトイソカプロン酸、ホスホグリセロール、ヒドロキシ酪酸、アラビノース、アセト酢酸、オルニチン、ヒドロキシプロリン、ノルバリン、イソクエン酸のいずれかの測定値を用いることが好ましい。

上記10種の代謝物は、従属変数としてCOPD関連疾患の有無、調整因子として年齢、性別、喫煙歴を投入したモデルについて135種の代謝物の測定値についてC統計量を求めたところ、その値が大きかった代謝物である。従って、これら10種の代謝物の測定値をそれぞれCOPD指標値として測定し、これと所定の閾値との比較により、COPD発症の有無を診断することができ、しかも、誤診断を少なくすることができる。

発明の効果

[0023] 本発明では、メタボロミクスの解析手法を用いてCOPD関連疾患との相関が強い代謝物を探索することによって見出した代謝物の生体試料中の量をCOPD指標値として測定するため、該COPD指標値を、COPD関連疾患の診断に役立てることができる。

発明を実施するための形態

[0024] 本発明者は、被検者から採取した生体試料（血清）をクロマトグラフ質量分析装置（クロマトグラフMS）を用いて分析し、該生体試料に含まれる多数の代謝物の量を網羅的に測定した。そして、それらの測定値を様々な手法を用いて解析することにより、COPD関連疾患の有無に大きく関連すると思われる代謝物を探索した。表2にCOPDの発症に関連する代謝物を探索するための生体試料を採取した被検者のベースライン特性を示す。表2のベースライン特性を示す被検者の抽出方法、生体試料の調製及び分析方法、代謝物の測定方法、測定結果の解析等について以下に説明する。

[0025]

[表2]

	COPD関連群 (1秒率が70%未満)	正常群 (1秒率が70%以上)	P値
対象者数	692	5,918	
性別(女性:%)	31.5	54.8	<.0001
年齢(歳:中央値)	63	53	<.0001
喫煙率(%)	54.6	35.1	<.0001

[0026] <被検者の抽出>

研究倫理委員会の承認のもと、2015年10月から2016年9月までの1年間に聖路加国際病院附属クリニック予防医療センターを訪れた人間ドック受診者（約4万5000人）の中から約1万人の受診者をランダムにサンプリングし、そのうち本実験への不参加を表明した者、測定データが欠損している者、及び除外基準を満たす者を除外した残りの6610人の対象者を被検者とした。なお、除外基準は、喫煙を開始してから20年が経過した頃から発症し始めるという先行研究の知見から、人間ドックの受診時に40歳以下であることとした。

[0027] 聖路加国際病院附属クリニック予防医療センターは東京都中央区にあり、人間ドック受診者の多くの居住地域は東京近傍にある。従って、今回の被検者のCOPDに関連する外的要因（大気汚染等の環境要因）は略均一である。また、今回の被検者は全て日本人とすることで、民族的要因も均一にした。

[0028] 6610人の被検者の集団の中央値年齢は54歳（四分位範囲47～63歳）であり、そのうち3467名（52.5%）は女性であった。また、被検者集団の喫煙率は37.1%であり、1秒率が70%未満の被検者は692人（10.5%）であった。以下、1秒率が70%未満の被検者集団をCOPD関連群、1秒率が70%以上の被検者集団（5918人）を正常群と

いう。表2から分かるように、COPD関連群は女性よりも男性の方が統計的に有意に多かった。また、年齢及び喫煙率は、ともに、COPD関連群の方が正常群よりも高かった。

なお、臨床検査では、気管支拡張剤投与後のスパイロメータを用いた呼吸機能検査による1秒率の値が70%未満の患者をCOPDであると判定しているが、本実験では気管支拡張剤投与を行っていない。従って、上記COPD関連群には、実際にCOPDを発症している被検者だけでなくCOPD関連疾患がある被検者が含まれる。

[0029] <試料の調製>

(1) 前処理

6610人の被検者から採取された血液を、所定時間放置した後、遠心分離し、上澄み（血清）を採取した。採取した血清は分析までの間、 -80°C で保管した。なお、被検者から血液を採取してから血清を冷凍するまでの時間は血清中の代謝物の測定値に影響を及ぼす。そこで、今回は、血液を採取してから冷凍するまでの時間が5～8時間であった被検者が全体の約半数を占めるように、当該被検者を選定した。

[0030] (2) 本処理

-80°C で保存されていた血清を 25°C 、5分で解凍した。解凍後の血清を、 $10,000\times g$ 、 4°C 、1minで遠心分離した後、氷上静置し、これに、第1混合液（メタノール／水／クロロホルム、2.5：1：1） $250\mu\text{L}$ に、内部標準溶液（2-イソプロピルリンゴ酸： 0.1mg/mL ） $6\mu\text{L}$ を添加し、ボルテックスミキサーを用いて混合して第2混合液を得た。

[0031] その後、血清と前記第2混合液を、 37°C 、30分間、 $1,200\text{rpm}$ で振盪した後、 25°C 、5分間、 $16,000\times g$ で遠心分離し、上清 $150\mu\text{L}$ を、水 $140\mu\text{L}$ を予め加えたチューブに添加し、ボルテックスミキサーを用いて混合して、第3混合液を得た。

次に、上記第3混合液を、 25°C 、5分間、 $16,000\times g$ で遠心し、その上清 $180\mu\text{L}$ を新しいチューブに回収した。これを、室温、60分間、スピ

ードメモリを「7」に設定して遠心エバポレーターで濃縮した。

濃縮した第3混合液の上清（濃縮液）を -80°C 、30分で凍結した後、これをオーバーナイトで乾燥したものをサンプルとした。得られたサンプルは分析までデシケーターで保存した。

[0032] <試料のGCMS分析>

デシケーターで保存されていたサンプルに、メトキシアミン溶液（ 20 mg/mL /ピリジンで溶解） $80\text{ }\mu\text{L}$ を添加した後、これを 37°C 、30分間、 $1,200\text{ rpm}$ で振盪した。続いて、N-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド $40\text{ }\mu\text{L}$ を添加し、 37°C 、30分間、 $1,200\text{ rpm}$ で振盪した後、 25°C 、5分間、 $16,000\times g$ で遠心分離し、その上清 $50\text{ }\mu\text{L}$ をガラスバイアルに入れ、このバイアルをGCMSのオートサンプラーにセットした。

[0033] GCMSには、株式会社島津製作所製のトリプル四重極型ガスクロマトグラフ質量分析計（GCMS-TQ8040）を用いた。GCMSの分析条件を以下に示す。

- (1) カラム：DB-5（（5%-フェニル）-メチルポリシロキサン、無極性）、長さ 30 m 、内径 0.25 mm 、膜厚 $1.00\text{ }\mu\text{m}$
- (2) カラムオープン温度： 80°C
- (3) インジェクション温度： 280°C
- (4) インジェクションモード：スプリット
- (5) ヘリウムガス流量： 39 cm/sec
- (6) カラム温度： $0-2.5\text{ min}; 80^{\circ}\text{C}$ 、 $2.5-18.5\text{ min}; 80-280^{\circ}\text{C}$ に上昇、 $18.5-23.0\text{ min}; 280^{\circ}\text{C}$
- (7) MSイオン源温度： 200°C
- (8) インターフェイス温度： 250°C
- (9) 検出器電圧： 0.2 kV
- (10) 質量範囲： $m/z\ 85-500$

[0034] <データ解析>

＜代謝物の測定＞

試料のマススペクトルからピークを網羅的に検出し、それらのピーク情報（質量電荷比及び信号強度）をMSライブラリに格納されている多数の代謝物に特異的な物質の質量電荷比と比較することで、代謝物を同定し、135種類の代謝物の測定値（以下、MSデータという。）を求めた。

[0035] ＜統計解析＞

MSデータを取得した被検者について、統計解析に必要な臨床情報、検査データを、聖路加国際病院の研究倫理委員会の承諾のもと、聖路加国際大学情報システムセンターから入手し、臨床情報、検査データとMSデータの突合わせを行った。被検者の臨床情報及び検査データは全て被検者を表す管理番号で管理されており、データの突き合わせの際に、被検者が特定されないようにした。

[0036] 統計解析には、単変量解析として対応のないt検定、多変量解析としてロジスティック回帰分析を用いた。診断能力の評価には、各代謝物単独のモデルでは、ROC曲線より算出されたAUC値を用い、調整因子を用いた多変量解析モデルでは、C統計量を用いた。

[0037] 表3は、135種の代謝物の測定値について、COPD関連群と正常群のt検定を行った結果を示している。表3には、COPD関連群と正常群の間で統計学的に有意な差が認められた10種の代謝物（オルニチン、キヌレニン、2-アミノアジピン酸、シスチン、チロシン、ミオイノシトール、尿酸、アラビノース、マンノース、ベータ・アラニン）のP値及びt統計量を、P値が小さいものから順に列挙している。なお、表3において、「mEn（mは実数、nは整数）」は「 $m \times 10^n$ 」を意味する。例えば「4.14E-14」は「 4.14×10^{-14} 」となる。

[0038]

[表3]

代謝物名	P値	t統計量 (正常－疾患あり)
オルニチン	4.14.E-14	-7.69
キヌレニン	2.81.E-12	-7.09
2-アミノアジピン酸	5.75.E-09	-5.88
シスチン	2.62.E-08	-5.62
チロシン	5.23.E-08	-5.49
ミオイノシトール	1.12.E-07	-5.36
尿酸	4.85.E-07	-5.07
アラビノース	1.29.E-06	-4.88
マンノース	1.58.E-06	-4.84
ベータ アラニン	2.67.E-06	-4.73

[0039] 表3に示すように、10種の代謝物は、いずれもP値が小さいほどt統計量の絶対値が大きく、いずれも負の値であったことから、COPD関連群よりも正常群の被検者の方が代謝産物の量が少なかったことが分かる。

以上の結果から、上記10種の代謝物の測定値はCOPD指標値として有用であり、いずれも測定値と所定の閾値とを比較し該閾値よりも大きいときはCOPD関連疾患であると診断することができる。

[0040] 表4は、従属変数としてCOPD関連群／正常群、調整因子として年齢、性別、喫煙歴を投入し、COPD関連群と135種の代謝産物の測定値との関連を、ロジスティック回帰分析で検討した結果を示している。表4には、ロジスティック回帰分析の結果、P値が小さかった5種の代謝物（グルタル酸、ヒドロキシプロリン、キシロース、ホスホグリセロール、オルニチン）

を回帰係数、標準誤差、P値とともに列挙している。表4に示すように、5種の代謝物のうちグルタル酸のP値が最も小さく、グルタル酸とCOPD関連疾患との間に強い相関が認められた。表4にはあわせて、調整因子での調整を行わなかった時の順位、t統計量、及びP値を記載した。このように調整因子で調整を行うことで指標としての有用性が増す。

[0041] [表4]

代謝物名	回帰係数	標準誤差	P値	t 統計量 (正常-疾患あり)	P 値	順位
グルタル酸	0.213424	0.052555	4.89E-05	-3.12	1.84.E-03	30
ヒドロキシプロリン	0.136386	0.045777	0.002888	-3.93	9.03.E-05	21
キシロース	0.093029	0.038117	0.014663	-2.23	2.64.E-02	49
ホスホグリセロール	0.146775	0.063595	0.021001	-3.11	1.96.E-03	31
オルニチン	0.438445	0.196923	0.025982	-7.69	4.14.E-14	1

[0042] 次に、各代謝物の測定値をCOPD指標値としたときの、その診断能力（つまり、COPD関連疾患の診断精度の高さ）を検討するため、従属変数をCOPD関連群／正常群として、135種の代謝物についてROC解析（Receiver Operating Characteristic analysis）を行った。その結果、10種の代謝物（エリスリトール、オルニチン、ミオイノシトール、トレイトール、2-アミノアジピン酸、キヌレニン、フコース、フェニルアラニン、アラビノース、アラビノース）がCOPDの診断に有用であることが分かった。表5は、COPDの判定に有用な10種の代謝物のROC曲線（ROC curve）のAUC値を示している。

[0043]

[表5]

代謝物名	AUC
エリスリトール	0.616
オルニチン	0.594
ミオイノシトール	0.590
トレイトール	0.588
2-アミノアジピン酸	0.587
キヌレニン	0.586
フコース	0.581
フェニルアラニン	0.575
アラビトール	0.575
アラビノース	0.574

[0044] ROC曲線 (ROC curve) は、縦軸を真陽性率、つまり感度、横軸を偽陽性率、つまり「1－特異度」を尺度としてプロットしたものである。すなわち、COPD関連群の被検者全体に対する、陽性と判断された被検者の割合より感度を計算し、正常群の被検者全体に対する、陽性と判断された被検者（非COPD）の割合より偽陽性率を計算する。同様にして他のカットオフ値での感度と偽陽性率を計算し、このようにして求めた値をグラフにプロットすることによりROC曲線が得られる。AUC値はROC曲線と横軸で囲まれた部分の面積の値である。AUC値が大きいほどCOPD関連疾患の有無を診断する精度が高いと判断することができる。ROC曲線からAUCを求めた結果、AUCの大きかった代謝物はエリスリトール（AUC＝0.616）、オルニチン（AUC＝0.594）、ミオイノシトール（AUC＝0.590）であった。

[0045] 一方、表6は、表5に示す結果が得られたROC解析と同じ従属変数に、

調整因子として年齢、性別、喫煙歴を投入したモデルについて135種の代謝物のROC解析を行った結果、C統計量が高かった10種の代謝物を示している。C統計量はROC曲線と横軸とで囲まれた面積の大きさ（AUC）に相当し、C統計量が1に近づくほど診断能力が高いことを示している。表6には、135種の代謝物のうちC統計量が多い順に10種の代謝物（グルタル酸、 α -ケトイソカプロン酸、ホスホグリセロール、ヒドロキシ酪酸、アラビノース、アセト酢酸、オルニチン、ヒドロキシプロリン、ノルバリン、イソクエン酸）のC統計量を列挙している。これら10種の代謝物の測定値はいずれも、COPD関連疾患と統計学的に相関しており、COPD関連疾患の有無を判定する指標として有用であり、特に、C統計量が最も大きかったグルタル酸（C統計量：0.751）の測定値は、COPD発症との間で強い相関がみられ、COPD発症の可能性の有無を判定する指標として優れているといえる。表6にはあわせて、調整因子での調整を行わなかった時の順位、及びAUC値を記載した。このように調整因子で調整を行うことで指標としての有用性が増す。

[0046]

[表6]

代謝物名	C統計量	AUC	順位
グルタル酸	0.751437	0.531	60
α -ケトイソカプロン酸	0.748056	0.509	105
ホスホグリセロール	0.747839	0.542	40
ヒドロキシ酪酸	0.747456	0.494	133
アラビノース	0.747267	0.574	10
アセト酢酸	0.747211	0.519	87
オルニチン	0.746983	0.594	2
ヒドロキシプロリン	0.746954	0.559	22
ノルバリン	0.746950	0.505	113
イソクエン酸	0.746903	0.572	13

[0047] このように、被検者の生体試料に含まれる24種の代謝物の量を測定した結果は、被検者におけるCOPDの有無の診断に利用することができる。

すなわち、COPDの診断方法は、被検者から採取された生体試料を分析装置で分析すること、前記分析装置で得られたデータから、24種の代謝物であるグルタル酸、 α ケトイソカプロン酸、ホスホグリセロール、ヒドロキシ酪酸、アラビノース、アセト酢酸、オルニチン、ヒドロキシプロリン、ノルバリン、イソクエン酸、エリスリトール、ミオイノシトール、トレイトール、2-アミノアジピン酸、キヌレニン、フコース、フェニルアラニン、アラビトール、キシロース、シスチン、チロシン、尿酸、マンノース、ベータ・アラニンから選ばれる少なくとも1種の代謝物の量であるCOPD指標値を求めること、前記COPD指標値を所定の閾値と比較した結果に基づき、前記被検者におけるCOPDの有無を診断すること、を含む。

[0048] また、COPDを診断する別の方法は、

被検者において被検者から採取された生体試料をクロマトグラフ質量分析装置で分析すること、

前記クロマトグラフ質量分析装置で得られたデータから、24種の代謝物であるグルタル酸、 α ケトイソカプロン酸、ホスホグリセロール、ヒドロキシ酪酸、アラビノース、アセト酢酸、オルニチン、ヒドロキシプロリン、ノルバリン、イソクエン酸、エリスリトール、ミオイノシトール、トレイトール、2-アミノアジピン酸、キヌレニン、フコース、フェニルアラニン、アラビトール、キシロース、シスチン、チロシン、尿酸、マンノース、ベータ・アラニンから選ばれる少なくとも1種の代謝物の量であるCOPD指標値を求めること、前記COPD指標値を所定の閾値と比較した結果に基づき、前記被検者におけるCOPDの有無を診断すること、を含む。

請求の範囲

【請求項1】 被検者から採取された生体試料を分析することで得られたデータに基づき、前記生体試料に含まれる複数種の代謝物のうち、慢性閉塞性肺疾患関連の有無と関連する代謝物の量をCOPD指標値として測定する方法であり、

前記COPD指標値が、24種の代謝物であるグルタル酸、 α ケトイソカプロン酸、ホスホグリセロール、ヒドロキシ酪酸、アラビノース、アセト酢酸、オルニチン、ヒドロキシプロリン、ノルバリン、イソクエン酸、エリスリトール、ミオイノシトール、トレイトール、2-アミノアジピン酸、キヌレニン、フコース、フェニルアラニン、アラビトール、キシロース、シスチン、チロシン、尿酸、マンノース、ベータ・アラニンから選ばれる少なくとも1種の代謝物の量である、COPD指標値の測定方法。

【請求項2】 請求項1に記載のCOPD指標値の測定方法において、

前記COPD指標値が、アラビノース、オルニチン、キヌレニン、2-アミノアジピン酸、シスチン、チロシン、ミオイノシトール、尿酸、ベータ・アラニン、マンノースのいずれかの代謝物の量である、COPD指標値の測定方法。

【請求項3】 請求項1に記載のCOPD指標値の測定方法において、

前記COPD指標値が、グルタル酸、ヒドロキシプロリン、キシロース、ホスホグリセロール、オルニチンのいずれかの代謝物の量である、COPD指標値の測定方法。

【請求項4】 請求項1に記載のCOPD指標値の測定方法において、

前記COPD指標値が、エリスリトール、オルニチン、ミオイノシトール、トレイトール、2-アミノアジピン酸、キヌレニン、フコース、フェニルアラニン、アラビトール、アラビノースのうちのいずれか代謝物の量である、COPD指標値の測定方法。

【請求項5】 請求項1に記載のCOPD指標値の測定方法において、

前記C O P D指標値が、グルタル酸、 α ケトイソカプロン酸、ホスホグリセロール、ヒドロキシ酪酸、アラビノース、アセト酢酸、オルニチン、ヒドロキシプロリン、ノルバリン、イソクエン酸のうちのいずれかの代謝物の量である、C O P D指標値の測定方法。

[請求項6]

請求項1に記載のC O P D指標値の測定方法において、

前記C O P D指標値がグルタル酸の量である、C O P D指標値の測定方法。

[請求項7]

請求項1～6のいずれかに記載のC O P D指標値の測定方法において、

前記C O P D指標値が、生体試料をクロマトグラフMS分析することによって得られたデータに基づき測定された代謝物の量である、C O P D指標値の測定方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/035557

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. G01N33/50 (2006.01) i, G01N27/62 (2006.01) i, G01N33/68 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. G01N33/50, G01N27/62, G01N33/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2019
Registered utility model specifications of Japan	1996-2019
Published registered utility model applications of Japan	1994-2019

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

CAPLUS/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHEN, Q. et al., "Serum Metabolite Biomarkers Discriminate Healthy Smokers from COPD Smokers", PLOS ONE, 16 December 2015, vol. 10, no. 12, pp. 1-20, e0143937	1, 3, 5-7
A	WANG, L. et al., "Metabonomic Profiling of Serum and Urine by 1H NMR-Based Spectroscopy Discriminates Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Healthy Individuals", PLOS ONE, June 2013, vol. 8, no. 6, pp. 1-9, e65675	1, 3, 5-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14 November 2019 (14.11.2019)

Date of mailing of the international search report
26 November 2019 (26.11.2019)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/035557

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	UBHI, B. K. et al., "Metabolic profiling detects biomarkers of protein degradation in COPD patients", European Respiratory Journal, 2012, vol. 40, pp. 345-355	1, 3, 5-7
A	WANG, C. et al., "Metabolic changes of different high-resolution computed tomography phenotypes of COPD after budesonide-formoterol treatment", International Journal of COPD, 2017, vol. 12, pp. 3511-3521	1, 3, 5-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/035557

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

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

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

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

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

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

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

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
The invention in claims 1, 3, and 5-7 (parts selecting glutaric acid as metabolite)

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.

<Continuation of Box No. III>

Claim 1 discloses a "method for measuring, as a COPD index value, the amount of metabolites related to the presence or absence of chronic obstructive pulmonary disease among the multiple types of metabolites contained in biological samples, wherein the amount of metabolites is measured on the basis of data obtained by analyzing the biological samples collected from subjects" wherein as the COPD index value, at least one among 24 types of metabolites consisting of "glutaric acid, α -ketoisocaproic acid, phosphoglycerol, hydroxybutyric acid, arabinose, acetoacetic acid, ornithine, hydroxyproline, norvaline, isocitric acid, erythritol, myo-inositol, threitol, 2-aminoadipic acid, kynurenine, fucose, phenylalanine, arabitol, xylose, cystine, tyrosine, uric acid, mannose, beta alanine " is selected. Thus, the invention, among the inventions in claim 1, in which the glutaric acid is selected as a metabolite shares with the invention, among the inventions in claim 1, in which any other than the glutaric acid is selected as a metabolite the technical feature of a "method for measuring, as a COPD index value, the amount of metabolites related to the presence or absence of chronic obstructive pulmonary disease among the multiple types of metabolites contained in biological samples, wherein the amount of metabolites is measured on the basis of data obtained by analyzing the biological samples collected from subjects."

In addition, since document 1 (CHEN, Q. et al., "Serum Metabolite Biomarkers Discriminate Healthy Smokers from COPD Smokers," PLOS ONE, 16 December 2015, vol. 10, no. 12, pp. 1-20, e0143937) discloses myoinositol as serum metabolites with different expression by COPD smokers and healthy smokers, said technical feature does not make a contribution over the prior art and cannot be said to be a special technical feature. In addition, there do not exist other identical or corresponding special technical features between the invention, among the inventions in claim 1, in which the glutaric acid is selected as a metabolite, and among the inventions in claim 1, in which any other than the glutaric acid is selected as a metabolite.

Thus, the claims are classified into the 24 inventions having the special technical features below, respectively.

(Invention 1) Invention in claims 1, 3, and 5-7 (parts in which the glutaric acid is selected as a metabolite)

(Invention 2) Invention in claims 1 and 7 (parts in which the α -ketoisocaproic acid is selected as a metabolite)

(Invention 3) Invention in claims 1, 3, 5, and 7 (parts in which the phosphoglycerol is selected as a metabolite)

(Invention 4) Invention in claims 1, 5, 7 (parts in which the hydroxybutyric acid is selected as a metabolite)

(Invention 5) Invention in claims 1-2, 4-5, and 7 (parts in which the arabinose is selected as a metabolite)

(Invention 6) Invention in claims 1 and 7 (parts in which the acetoacetic acid is selected as a metabolite)

(Invention 7) Invention in claims 1-5 and 7 (parts in which the ornithine is selected as a metabolite)

(Invention 8) Invention in claims 1, 3, 5, and 7 (parts in which the hydroxyproline is selected as a metabolite)

(Invention 9) Invention in claims 1, 5, and 7 (parts in which the norvaline is selected as a metabolite)

(Invention 10) Invention in claims 1, 5, and 7 (parts in which the isocitric acid is selected as a metabolite)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/035557

(Invention 11) Invention in claims 1, 4, and 7 (parts in which the erythritol is selected as a metabolite)

(Invention 12) Invention in claims 1-2, 4, and 7 (parts in which the myo-inositol is selected as a metabolite)

(Invention 13) Invention in claims 1, 4, and 7 (parts in which the threitol is selected as a metabolite)

(Invention 14) Invention in claims 1-2, 4, and 7 (parts in which the 2-aminoadipic acid is selected as a metabolite)

(Invention 15) Invention in claims 1-2 and 7 (parts in which the kynurenine is selected as a metabolite)

(Invention 16) Invention in claims 1, 4, and 7 (parts in which the fucose is selected as a metabolite)

(Invention 17) Invention in claims 1, 4, and 7 (parts in which the phenylalanine is selected as a metabolite)

(Invention 18) Invention in claims 1, 4, and 7 (parts in which the arabitol is selected as a metabolite)

(Invention 19) Invention in claims 1, 3, and 7 (parts in which the xylose is selected as a metabolite)

(Invention 20) Invention in claims 1-2 and 7 (parts in which the cystine is selected as a metabolite)

(Invention 21) Invention in claims 1-2 and 7 (parts in which the tyrosine is selected as a metabolite)

(Invention 22) Invention in claims 1-2 and 7 (parts in which the uric acid is selected as a metabolite)

(Invention 23) Invention in claims 1-2 and 7 (parts in which the mannose is selected as a metabolite)

(Invention 24) Invention in claims 1-2 and 7 (parts in which the beta alanine is selected as a metabolite)

The invention in claim 1, among the inventions in claim 1, in which any other than the glutaric acid is selected as a metabolite is not an invention in the same category that includes all matters specifying the invention, among the inventions in claim 1, in which the glutaric acid is selected as a metabolite. In addition, as a result of examining claim 1 classified as invention 1, the invention in claim 1, among the inventions in claim 1, in which any other than the glutaric acid is selected as a metabolite is not an invention that can be examined without substantially additional prior art search and judgment. There are no other circumstances to consider that it would be more efficient to examine the invention in claim 1, among the inventions in claim 1, in which any other than the glutaric acid is selected as a metabolite together with the invention in claim 1, among the inventions in claim 1, in which the glutaric acid is selected as a metabolite. Thus, the invention in claim 1, among the inventions in claim 1, in which any other than the glutaric acid is selected as a metabolite cannot be classified as invention 1.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. G01N33/50(2006.01)i, G01N27/62(2006.01)i, G01N33/68(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. G01N33/50, G01N27/62, G01N33/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2019年
日本国実用新案登録公報	1996-2019年
日本国登録実用新案公報	1994-2019年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	CHEN, Q. et al., Serum Metabolite Biomarkers Discriminate Healthy Smokers from COPD Smokers, PLOS ONE, 2015.12.16, Vol. 10, No. 12, pp. 1-20, e0143937	1, 3, 5-7
A	WANG, L. et al., Metabonomic Profiling of Serum and Urine by 1H NMR-Based Spectroscopy Discriminates Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Healthy Individuals, PLOS ONE, 2013.06, Vol. 8, No. 6, pp. 1-9, e65675	1, 3, 5-7

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

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14.11.2019

国際調査報告の発送日

26.11.2019

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A/J P）
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

磯田 真美

2 J

6202

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	UBHI, B.K. et al., Metabolic profiling detects biomarkers of protein degradation in COPD patients, European Respiratory Journal, 2012, Vol. 40, pp. 345-355	1, 3, 5-7
A	WANG, C. et al., Metabolic changes of different high-resolution computed tomography phenotypes of COPD after budesonide-formoterol treatment, International Journal of COPD, 2017, Vol. 12, pp. 3511-3521	1, 3, 5-7

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

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

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

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

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

（特別ページ参照）

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

請求項1、3、5－7に係る発明において、代謝物としてグルタル酸を選択した部分

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

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

(第 III 欄の続き)

請求項 1 には、「被験者から採取された生体試料を分析することで得られたデータに基づき、前記生体試料に含まれる複数種の代謝物のうち、慢性閉塞性肺疾患関連の有無と関連する代謝物の量を COPD 指標値として測定する方法」が記載されており、COPD 指標値として、「グルタル酸、 α ケトイソカプロン酸、ホスホグリセロール、ヒドロキシ酪酸、アラビノース、アセト酢酸、オルニチン、ヒドロキシプロリン、ノルバリン、イソクエン酸、エリスリトール、ミオイノシトール、トレイトール、2-アミノアジピン酸、キヌレニン、フコース、フェニルアラニン、アラビトール、キシロース、シスチン、チロシン、尿酸、マンノース、ベータ・アラニン」の 24 種の代謝物から少なくとも 1 種が選択されることが記載されている。よって、請求項 1 に係る発明において、代謝物としてグルタル酸を選択した発明は、請求項 1 に係る発明において、代謝物としてグルタル酸以外を選択した発明と、「被験者から採取された生体試料を分析することで得られたデータに基づき、前記生体試料に含まれる複数種の代謝物のうち、慢性閉塞性肺疾患関連の有無と関連する代謝物の量を COPD 指標値として測定する方法」という共通の技術的特徴を有する。

一方、文献 1 (CHEN, Q. et al., Serum Metabolite Biomarkers Discriminate Healthy Smokers from COPD Smokers, PLOS ONE, 2015.12.16, Vol. 10, No. 12, pp. 1-20, e0143937) には、COPD smokers と healthy smokers とにより発現の異なる serum metabolites として Myoinositol が開示されていることから、上記技術的特徴は、先行技術に対する貢献をもたらすものではないため、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、請求項 1 に係る発明において、代謝物としてグルタル酸を選択した発明と、請求項 1 に係る発明において、グルタル酸以外の代謝物を選択した発明との間には、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

してみると、請求の範囲は、各々下記の特別な技術的特徴を有する 24 の発明に区分される。

(発明 1) 請求項 1、3、5-7 に係る発明において、代謝物としてグルタル酸を選択した発明

(発明 2) 請求項 1、7 に係る発明において、代謝物として α ケトイソカプロン酸を選択した発明

(発明 3) 請求項 1、3、5、7 に係る発明において、代謝物としてホスホグリセロールを選択した発明

(発明 4) 請求項 1、5、7 に係る発明において、代謝物としてヒドロキシ酪酸を選択した発明

(発明 5) 請求項 1-2、4-5、7 に係る発明において、代謝物としてアラビノースを選択した発明

(発明 6) 請求項 1、7 に係る発明において、代謝物としてアセト酢酸を選択した発明

(発明 7) 請求項 1-5、7 に係る発明において、代謝物としてオルニチンを選択した発明

(発明 8) 請求項 1、3、5、7 に係る発明において、代謝物としてヒドロキシプロリンを選択した発明

(発明 9) 請求項 1、5、7 に係る発明において、代謝物としてノルバリンを選択した発明

(発明 10) 請求項 1、5、7 に係る発明において、代謝物としてイソクエン酸を選択した発明

(発明 11) 請求項 1、4、7 に係る発明において、代謝物としてエリスリトールを選択した発明

(発明 12) 請求項 1-2、4、7 に係る発明において、代謝物としてミオイノシトールを選択した発明

(特別ページへ続く)

(特別ページの続き)

(発明 1 3) 請求項 1、4、7に係る発明において、代謝物としてトレイトールを選択した発明

(発明 1 4) 請求項 1－2、4、7に係る発明において、代謝物として 2－アミノアジピン酸を選択した発明

(発明 1 5) 請求項 1－2、7に係る発明において、代謝物としてキヌレニンを選択した発明

(発明 1 6) 請求項 1、4、7に係る発明において、代謝物としてフコースを選択した発明

(発明 1 7) 請求項 1、4、7に係る発明において、代謝物としてフェニルアラニンを選択した発明

(発明 1 8) 請求項 1、4、7に係る発明において、代謝物としてアラビトールを選択した発明

(発明 1 9) 請求項 1、3、7に係る発明において、代謝物としてキシロースを選択した発明

(発明 2 0) 請求項 1－2、7に係る発明において、代謝物としてシスチンを選択した発明

(発明 2 1) 請求項 1－2、7に係る発明において、代謝物としてチロシンを選択した発明

(発明 2 2) 請求項 1－2、7に係る発明において、代謝物として尿酸を選択した発明

(発明 2 3) 請求項 1－2、7に係る発明において、代謝物としてマンノースを選択した発明

(発明 2 4) 請求項 1－2、7に係る発明において、代謝物としてベータ・アラニンを選択した発明

請求項 1 に係る発明において、代謝物としてグルタル酸以外を選択した発明は、請求項 1 に係る発明において、代謝物としてグルタル酸を選択した発明の発明特定事項を全て含む同一カテゴリーの発明ではない。そして、請求項 1 に係る発明において、代謝物としてグルタル酸以外を選択した発明は、発明 1 に区分された請求項 1 について調査した結果、実質的に追加的な先行技術調査や判断を必要とすることなく調査を行うことが可能である発明ではなく、請求項 1 に係る発明において、代謝物としてグルタル酸を選択した発明とまとめて調査を行うことが効率的であるといえる他の事情もないことから、請求項 1 に係る発明において、代謝物としてグルタル酸以外を選択した発明を発明 1 に区分することはできない。