

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7638562号
(P7638562)

(45)発行日 令和7年3月4日(2025.3.4)

(24)登録日 令和7年2月21日(2025.2.21)

(51)国際特許分類

F I

G O 1 N 33/49 (2006.01)

G O 1 N 33/49 Z

G O 1 N 27/62 (2021.01)

G O 1 N 27/62 V

請求項の数 24 (全22頁)

(21)出願番号	特願2023-565456(P2023-565456)	(73)特許権者	523223755
(86)(22)出願日	令和4年4月11日(2022.4.11)		イファ ユニヴァーシティー - インダ
(65)公表番号	特表2024-517685(P2024-517685		ストリー コラボレーション ファウンデ
	A)		イション
(43)公表日	令和6年4月23日(2024.4.23)		大韓民国 0 3 7 6 0 ソウル ソデムン
(86)国際出願番号	PCT/KR2022/005190		ーグ イファヨデーギル 5 2
(87)国際公開番号	WO2022/225241	(74)代理人	110001818
(87)国際公開日	令和4年10月27日(2022.10.27)		弁理士法人R & C
審査請求日	令和5年10月23日(2023.10.23)	(72)発明者	キム, ヨン・ジュ
(31)優先権主張番号	10-2021-0053232		大韓民国 0 7 9 8 0 ソウル ヤンチョ
(32)優先日	令和3年4月23日(2021.4.23)		ン・ク モクドンソ - ロ 3 8 ナンバー
(33)優先権主張国・地域又は機関	韓国(KR)		1 2 0 - 9 0 2
		(72)発明者	ユ, ヨン・ア
			大韓民国 0 5 0 8 5 ソウル クァンジ
			ン・ク トゥクソム - ロ 5 1 0 ナンバ
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 レチノイドメタボロームを利用した早産の早期予測方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

生物学的試料内で、全トランスーレチナル (all trans-retinal)、13-シスーレチノイン酸 (13-cis-retinoic acid)、およびレチニルパルミテート (retinyl palmitate) からなる群より選択された1種以上のメタボロームを定量する段階を含む、早産予測のための情報提供方法。

【請求項2】

前記定量されたメタボロームのレベルを対照群と比較する段階をさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記定量されたメタボロームのレベルが対照群より高い場合、早産危険性があると予測する段階をさらに含む、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記対照群は、正常分娩産婦である、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

前記生物学的試料は、妊婦から分離されたものである、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

前記生物学的試料は、血液試料である、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

前記生物学的試料は、全血、血漿、および血清からなる群より選択された1種以上であ

る、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記メタボロームを定量する段階は、液体クロマトグラフィー質量分析計、核磁気共鳴分光器、紫外線分光器、赤外線分光器、蛍光分光器、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)、および質量分析計からなる群より選択された 1 種以上で行われるものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記早産は、肝機能障害によるものではない早産である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記生物学的試料は、肝機能障害を持たない妊婦から分離されたものである、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 11】

生物学的試料内で、全トランスレチナル (all trans-retinal)、13-シスレチノイン酸 (13-cis-retinoic acid)、およびレチニルパルミテート (retinyl palmitate) からなる群より選択された 1 種以上のメタボロームを定量することができる製剤を含む、早産予測用組成物。

【請求項 12】

前記生物学的試料は、妊婦から分離されたものである、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記生物学的試料は、血液試料である、請求項 11 に記載の組成物。

20

【請求項 14】

前記生物学的試料は、全血、血漿、および血清からなる群より選択された 1 種以上である、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 15】

生物学的試料内で、全トランスレチナル (all trans-retinal)、13-シスレチノイン酸 (13-cis-retinoic acid)、およびレチニルパルミテート (retinyl palmitate) からなる群より選択された 1 種以上のメタボロームを定量することができる製剤を含む、早産予測用キット。

【請求項 16】

前記生物学的試料は、妊婦から分離されたものである、請求項 15 に記載のキット。

30

【請求項 17】

前記生物学的試料は、血液試料である、請求項 15 に記載のキット。

【請求項 18】

前記生物学的試料は、全血、血漿、および血清からなる群より選択された 1 種以上である、請求項 15 に記載のキット。

【請求項 19】

試験対象の生物学的試料の入力を受ける入力部；

前記試料内で、全トランスレチナル (all trans-retinal)、13-シスレチノイン酸 (13-cis-retinoic acid)、およびレチニルパルミテート (retinyl palmitate) からなる群より選択された 1 種以上のメタボロームを定量する定量部；

40

前記定量されたメタボロームのレベルを対照群と比較する演算部；および

前記比較結果に応じて、前記試験対象の早産危険の有無を示す結果を表示する表示部を含む、早産予測用システム。

【請求項 20】

前記演算部で前記メタボロームのレベルが対照群より高いと演算される場合、前記表示部は、前記試験対象が早産危険性があると表示するものである、請求項 19 に記載のシステム。

【請求項 21】

前記生物学的試料は、妊婦から分離されたものである、請求項 19 に記載のシステム。

50

【請求項 2 2】

前記生物学的試料は、血液試料である、請求項 1 9 に記載のシステム。

【請求項 2 3】

前記生物学的試料は、全血、血漿、および血清からなる群より選択された 1 種以上である、請求項 1 9 に記載のシステム。

【請求項 2 4】

前記定量部は、液体クロマトグラフィー質量分析計、核磁気共鳴分光器、紫外線分光器、赤外線分光器、蛍光分光器、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)、および質量分析計からなる群より選択された 1 種以上でメタボロームを定量するものである、請求項 1 9 に記載のシステム。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、レチノイドメタボロームを利用した早産の早期予測方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

早産 (Preterm birth; PTB) は、3 7 週未満で出産することをいうが、近年、アジア地域 1 0 7 カ国の統計によれば、約 1 0 . 6 % の頻度で発生している。

【0 0 0 3】

韓国の場合、2 0 0 6 年には早産率が約 4 . 8 % であったが、2 0 1 6 年には 7 . 2 % と約 2 倍近く増加して、早産率が増加傾向にある。早産は、短期的には新生児および 5 才以下の児童の死亡率が増加する危険性があり、神経発達などの問題が発生する確率が高くなり、長期的には 2 型糖尿病、肥満、高血圧などの有病率が増加する危険性がある。

20

【0 0 0 4】

早産の発生機序は、まだ明確に解明されておらず、自然的陣痛とよく関連した危険因子は、生殖器系感染、多胎妊娠、第 2、第 3 三半期出血、以前の早産歴などがある。また、早産の約 7 5 % は、早期陣痛と羊膜破水、そしてこれと関連する子宮頸管無力症と絨毛膜炎などを伴って発生する。

【0 0 0 5】

韓国は低出産国であるにもかかわらず 3 7 週未満の早産率が着実に増加しており、産婦および新生児の健康を脅かし、さらに経済損失費用を招いている。これまで早産の克服のために胎児フィブロネクチン、CRP 測定、子宮頸部の長さ測定などにより早産を予測しているが、未だ早産予測率の感度が低いのが現状である。

30

【0 0 0 6】

したがって、早い週数に早産の兆候がきた時、適切な治療を通して分娩週数を遅らせ、新生児の成熟度を高めることは、産婦と新生児の健康と生活の質とコストに重大な鍵となる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 7】

本発明の一例は、生物学的試料内のレチノイドメタボロームレベルを利用して早産を予測することができる、早産予測方法または早産予測のための情報提供方法を提供するためのものである。

40

【0 0 0 8】

本発明の他の一例は、生物学的試料内のレチノイドメタボロームレベルを利用して早産を予測することができる、早産予測用組成物を提供するためのものである。

【0 0 0 9】

本発明のさらに他の一例は、生物学的試料内のレチノイドメタボロームレベルを利用して早産を予測することができる、早産予測用キットに関する。

【0 0 1 0】

50

本発明のさらに他の一例は、生物学的試料内のレチノイドメタボロームレベルを利用して早産を予測することができる、早産予測用システムに関する。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明の一例は、生物学的試料内でレチノイドメタボロームを定量する段階を含む、早産予測方法、または早産予測のための情報提供方法に関する。

【0012】

本発明の他の一例は、生物学的試料内でレチノイドメタボロームを定量することができる製剤を含む、早産予測用組成物に関する。

【0013】

本発明のさらに他の一例は、生物学的試料内でレチノイドメタボロームを定量する定量用製剤、または定量装置を含む、早産予測用キットに関する。

【0014】

本発明のさらに他の一例は、生物学的試料内でレチノイドメタボロームを定量する定量部を含む、早産予測用システムに関する。

【0015】

以下、本発明をさらに詳しく説明する。

【0016】

本発明の一例は、生物学的試料内でレチノイドメタボロームを定量する段階を含む、早産予測のための情報提供方法、早産予測方法、早産診断のための情報提供方法、または早産診断方法に関する。

【0017】

本明細書における用語「早産」、「premature birth」、「preterm birth」、「PTB」などは同じ意味を持ち、37週未満での胎児の出産を意味する。

【0018】

本願実施例によれば、本発明による早産に対するレチノイドメタボロームマーカーは、産婦の血液試料を利用して分析したもので、早産群と満期分娩群で有意差を示し、これにより、本発明の一例によるレチノイドメタボロームマーカーを利用すれば、早産を予測することができる。

【0019】

本発明で用語、「早産の危険性診断」または「早産の危険性予測」とは、妊婦が早産をする可能性があるのか、早産の可能性が相対的に高いか、または早産の兆候を示す可能性があるか否かを判別することをいう。

【0020】

本発明は、早産危険性の高い妊婦を特別かつ適切な管理のより早産を遅延させたり防止するために用いることができる。また、本発明は早産を早期に診断して最も適切な治療方式を選択することによって治療決定を行うために臨床的に用いることができる。

【0021】

本明細書で用語「または」は、明確に内容が特定されない限り、「および／または」を含む意味で使用される。

【0022】

本発明で用語、「マーカー」、「診断用マーカー」、「診断するためのマーカー」、「診断マーカー (diagnosis marker)」または「標識子」とは、早産妊婦を予測して、正常分娩群と区分する基準となる物質で、前記対照群の試料に比べて早産と予測される妊婦の試料で有意な差を示す生体有機分子を意味する。本発明の一例によれば、前記マーカーなどは、生物学的試料内のメタボロームを含むことができる。

【0023】

前記「メタボローム (metabolite)」は、生体内代謝の結果として生成される物質であって、代謝物質、中間代謝物質、代謝中間体などと表記することができ、主に

10

20

30

40

50

細胞過程中発生する小分子の代謝産物全体 (metabolome) を意味する。例えば、本発明の一例によれば、前記メタボロームはレチノイドメタボロームであってもよい。具体的に、前記メタボロームは、全トランスレチナル (all trans-retinal)、13-シスレチノイン酸 (13-cis-retinoic acid)、およびレチニルパルミテート (retinyl palmitate) からなる群より選択された1種以上を含むものであってもよい。一例として、前記メタボロームは、全トランスレチナル (all trans-retinal) および13-シスレチノイン酸 (13-cis-retinoic acid) からなる群より選択された1種以上を含むものであってもよい。

【0024】

本明細書で用語「生物学的試料」は、試験対象、または試験個体、例えば妊婦から分離または採取された試料を意味する。前記生物学的試料は、妊婦由来の試料、具体的に妊婦の血液試料、例えば全血、血漿、および血清からなる群より選択された1種であってもよい。

【0025】

本発明の一例による早産予測のための情報提供方法、早産予測方法、早産診断のための情報提供方法、または早産診断方法は、前記定量されたメタボロームのレベルを対照群と比較する段階をさらに含むものであってもよい。

【0026】

例えば、前記メタボロームが全トランスレチナル (all trans-retinal)、13-シスレチノイン酸 (13-cis-retinoic acid)、およびレチニルパルミテート (retinyl palmitate) からなる群より選択された1種以上であり、前記定量されたメタボロームのレベルが対照群より高い場合、前記生物学的試料が分離された妊婦は、早産危険性があると予測する段階をさらに含むものであってもよい。前記対照群は、早産をせずに正常分娩した産婦、妊娠37週以上で分娩した産婦、または満期分娩した産婦であってもよい。

【0027】

本明細書で用語「増加」は、比較対照群、例えば、確立された対照群または標準対照群 (例えば、正常分娩をした産婦の生物学的試料、または妊娠37週以上で分娩した産婦の生物学的試料に示されたマーカーメタボロームの平均レベル) から量 (quantity) の増加、レベル (level) の増加、分布 (distribution) の増加、分布比率の増加、または濃度 (concentration) の増加などを意味する。具体的に、前記分布比率は、液体クロマトグラフィー質量分析計などの分析結果、生物学的試料内特定メタボロームの相対的含有量、または相対的濃度でありうる。

【0028】

例えば、前記増加は対照群値の1倍超、1.1倍以上、1.15倍以上、1.2倍以上、1.25倍以上、1.3倍以上、1.35倍以上、1.4倍以上、1.45倍以上、または1.5倍以上の増加または統計的に有意な増加であり得るが、通常の技術者なら絶対的な増加量が特定されなくても、対照群対比有意に増加された変化を明確に理解することができるであろう。前記対照群値は、例えば少なくとも2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、10個以上、15個以上、20個以上、25個以上、30個以上、または35個以上の対照群値の平均値であり得る。

【0029】

例えば、生物学的試料内全トランスレチナル (all trans-retinal) の濃度が対照群値の1.5倍以上である時、前記生物学的試料が分離された妊婦は、早産危険性があると予測することができる。

【0030】

例えば、生物学的試料内の13-シスレチノイン酸 (13-cis-retinoic acid) の濃度が、対照群値の1.4倍以上である時、前記生物学的試料が分離された妊婦は、早産危険性があると予測することができる。

10

20

30

40

50

【0031】

例えば、生物学的試料内レチニルパルミテート (retinyl palmitate) の濃度が、対照群値の1.5倍以上である時、前記生物学的試料が分離された妊婦は、早産危険性があると予測することができる。

【0032】

例えば、生物学的試料内全トランスレチナール (all trans-retinal) の濃度が2.48 ppb以上である時、前記生物学的試料が分離された妊婦は、早産危険性があると予測することができる。

【0033】

例えば、生物学的試料内13-シスレチノイン酸 (13-cis-retinoic acid) の濃度が、5.56 ppb以上である時、前記生物学的試料が分離された妊婦は、早産危険性があると予測することができる。

【0034】

例えば、生物学的試料内レチニルパルミテート (retinyl palmitate) の濃度が、100.33 ppb以上である時、前記生物学的試料が分離された妊婦は、早産危険性があると予測することができる。

【0035】

前記増加を示す用語、例えば「高い」、「より」、「より高い」、「有意に高い」、「統計的に有意に高い」等の用語は、前記記述された通り同じ意味で使用される。対照的に、用語「有意しないように」、「同等に」、「実質的に同じ」、「実質的に変化がない」等は、標準対照群の±10%以内、±5%以内、±3%以内、または±2%以内など、標準対照群値から変化が殆どない、または有意ではない変化を示すことを意味する。

【0036】

本明細書で用語「対照群」は、早産を予測するために本発明によるメタボロームのレベルを比較するための対象で、比較対照群、標準対照群、または正常対照群などの用語と互換可能に使用することができる。例えば、前記対照群は、早産をしなかった産婦、正常分娩をした産婦、または妊娠37週以上で分娩した産婦であり得る。

【0037】

前記メタボロームを定量する段階は、液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC/MS)、核磁気共鳴分光器、紫外線分光器、赤外線分光器、蛍光分光器、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)、および質量分析計からなる群より選択された1種以上で行われるものであり得る。

【0038】

本発明の一例による早産は、肝機能障害 (liver dysfunction) による早産ではないものであり得る。本願実施例によれば、本発明によるレチノイドメタボローム早産マーカーの有意差を示した早産群および正常対照群は、肝機能関連指標、具体的にアラニンアミノ基転移酵素 (alanine aminotransferase; ALT) およびアスパラギン酸アミノ基転移酵素 (aspartate aminotransferase; AST) 等の肝細胞損傷因子レベルの有意差を示されず、より具体的に妊娠3期で前記肝細胞損傷因子レベルの有意差を示さなかった。従って、本発明の一例による早産は、肝機能障害による早産ではない可能性がある。

【0039】

即ち、本発明の一例により早産を予測する対象妊婦は、肝機能障害を持たない妊婦であり得る。具体的に、前記妊婦は妊娠3期で肝機能障害を持たない妊婦であり得る。

【0040】

例えば、前記妊婦は、肝機能関連指標、または肝細胞損傷因子レベルが正常対照群と有意差がない妊婦であり得る。具体的に、前記妊婦は、妊娠3期で肝機能関連指標、または肝細胞損傷因子レベルが正常対照群と有意差がない妊婦であり得る。

【0041】

例えば、前記妊婦はアラニンアミノ基転移酵素 (alanine aminotran

10

20

30

40

50

sferase; ALT) および／またはアスパラギン酸アミノ基転移酵素 (aspartate aminotransferase; AST) レベルが正常対照群と有意差がない妊婦であり得る。例えば、前記妊婦は、AST 50 U/L 以下、45 U/L 以下、40 U/L 以下、35 U/L 以下、30 U/L 以下、25 U/L 以下、または20 U/L 以下である妊婦であり得る。

【0042】

例えば、前記妊婦は、ALT 50 U/L 以下、45 U/L 以下、40 U/L 以下、35 U/L 以下、30 U/L 以下、25 U/L 以下、20 U/L 以下、または15 U/L 以下である妊婦であり得る。

【0043】

例えば、前記妊婦はAST/ALT比率が、0.1~2、0.1~1.8、0.1~1.5、0.3~2、0.3~1.8、0.3~1.5、0.5~2、0.5~1.8、0.5~1.5、0.7~2、0.7~1.8、0.7~1.5、1~2、1~1.8、または1~1.5の妊婦であり得る。

【0044】

本発明のさらに他の一例は、生物学的試料内でレチノイドメタボロームを定量することができる製剤を含む、早産予測用組成物に関する。

【0045】

前記レチノイドメタボロームは前述した通りであり、例えば全トランスレチナル (all trans-retinal)、13-シスレチノイン酸 (13-cis-retinoic acid)、およびレチニルパルミテート (retinyl palmitate) からなる群より選択された1種以上を含むものであってもよい。例えば、前記メタボロームは、全トランスレチナル (all trans-retinal) および13-シスレチノイン酸 (13-cis-retinoic acid) からなる群より選択された1種以上を含むものであってもよい。

【0046】

前記製剤は、生物学的試料内でメタボロームの量 (quantity)、レベル (level)、分布 (distribution)、分布比率、または濃度 (concentration) を定量するものであってもよい。

【0047】

例えば、前記製剤は、全トランスレチナル (all trans-retinal)、13-シスレチノイン酸 (13-cis-retinoic acid)、およびレチニルパルミテート (retinyl palmitate) からなる群より選択された1種以上、一例として、全トランスレチナル (all trans-retinal) および13-シスレチノイン酸 (13-cis-retinoic acid) からなる群より選択された1種以上の増加、例えば量、レベル、分布、分布比率、または濃度の増加を定量することができるものであってもよい。

【0048】

前記メタボロームは、液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC/MS)、核磁気共鳴分光器、紫外線分光器、赤外線分光器、蛍光分光器、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)、および質量分析計からなる群より選択された1種以上で定量されるものであるが、これに制限されるものではない。

【0049】

本発明のさらに他の一例は、生物学的試料内でレチノイドメタボロームを定量する定量用製剤、または定量装置を含む、早産予測用キットに関する。前記レチノイドメタボロームは前述した通りである。

【0050】

前記キットは、全トランスレチナル (all trans-retinal)、13-シスレチノイン酸 (13-cis-retinoic acid)、およびレチニルパルミテート (retinyl palmitate) からなる群より選択された1種

10

20

30

40

50

以上、一例として全トランスレチナル (all trans-retinal) および13-シスレチノイン酸 (13-cis-retinoic acid) からなる群より選択された1種以上の増加、例えば、量、レベル、分布、分布比率、または濃度の増加を定量することができるものであってもよい。

【0051】

前記定量装置は、液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC/MS)、核磁気共鳴分光器、紫外線分光器、赤外線分光器、蛍光分光器、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)、および質量分析計からなる群より選択された1種以上であるが、これに制限されるものではない。

【0052】

本発明のさらに他の一例は、早産を予測または診断するための装置、装備、またはシステムに関する。具体的に、前記記述された早産予測方法、早産予測のための情報提供方法、早産診断方法、または早産診断のための情報提供方法の段階の全部または一部を行うことができる装置、装備、またはシステムに関する。前記装置、装備、またはシステムは、本発明の一例による早産予測用組成物、または早産予測用キットなどを使用して前記段階の全部または一部を行うものであってもよい。

【0053】

例えば、前記装置、装備、またはシステムは、試験対象の生物学的試料、例えば試験対象妊娠婦から分離された血液試料を得て、前記試料中本発明によるマーカーメタボロームの量または濃度を定量し、前記量または濃度を対照群、例えば正常分娩した対照群産婦の数値と比較して、前記比較結果に基づいて、前記試験対象の早産の危険性の有無を示す結果を表示するものであってもよい。そこで、本発明の一例による装置、装備、またはシステムは、生物学的試料内でレチノイドメタボロームを定量する定量部を含むものであってもよい。

【0054】

具体的に、前記装置、装備、またはシステムは、試験対象の生物学的試料の入力を受ける入力部；前記試料内で本発明によるマーカーメタボロームを定量する定量部；前記定量されたメタボロームのレベルを対照群の数値と比較する演算部；および前記比較結果に基づいて、前記試験対象の早産危険性の有無を示す結果を表示する表示部を含むものであってもよい。

【0055】

前記マーカーメタボロームは、前述した通りであり、例えば、全トランスレチナル (all trans-retinal)、13-シスレチノイン酸 (13-cis-retinoic acid)、およびレチニルパルミテート (retinyl palmitate) からなる群より選択された1種以上を含むものであってもよい。一例として、前記マーカーメタボロームは、全トランスレチナル (all trans-retinal) および13-シスレチノイン酸 (13-cis-retinoic acid) からなる群より選択された1種以上を含むものであってもよい。

【0056】

前記演算部において、全トランスレチナル (all trans-retinal)、13-シスレチノイン酸 (13-cis-retinoic acid)、およびレチニルパルミテート (retinyl palmitate) からなる群より選択された1種以上のレベルが対照群より高いと演算される場合、前記表示部は、前記試験対象が早産の危険性があると表示するものであってもよい。

【0057】

前記生物学的試料は、妊婦から分離されてものであってもよい。前記生物学的試料は、血液試料であってもよく、一例として、全血、血漿、および血清からなる群より選択された1種以上であってもよい。

【0058】

前記定量部は、液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC/MS)、核磁気共鳴分光器

10

20

30

40

50

、紫外線分光器、赤外線分光器、蛍光分光器、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)、および質量分析計からなる群より選択された1種以上にメタボロームを定量するものであるが、これに制限されるものではない。

【発明の効果】

【0059】

本発明の一例によるレチノイドメタボローム早産マーカーを利用すると、早産を早期に予測することができ、比侵襲的で精度高い早産予測が可能である。

【図面の簡単な説明】

【0060】

【図1】本発明の一例による試験対象を選定する過程を示すフローチャート (flow chart) である。

10

【図2】RPC陽性でTBと比較してPTBに対して明確に区分された範疇を示す ($Q2 = 0.072$; $R2 = 0.085$)。

【図3】経路影響分析の散布図 (scatter plot) を示したもので、y軸はp-valueを示す。

【図4】レチノイド代謝産物分析により、早産産婦の血漿試料で変化を示すレチノイドメタボロームを示した図面である (39TB、20PTB)。

【図5】メタボロームに対するROC曲線分析を示した図面で、感度および特異度のROC曲線を利用した早産バイオマーカーの予測性能を示す。

【発明を実施するための形態】

20

【0061】

以下、本発明を下記の実施例によりさらに詳しく説明する。但し、これらの実施例は本発明を例示するためのものであり、本発明の範囲がこれらの実施例によって限定されるものではない。

【0062】

実験材料および方法

【0063】

実施例1. 研究対象

梨花 (イファ) 女子大学医療院で産前検診および分娩のために来院した妊婦を募集した。被験者をメタボロームプロファイルを分析するための探索グループ (discovery group) (10TBおよび11PTB) と、レチノイドメタボロームを分析するための検証グループ (validation group) (39TBおよび20PTB) に分けた。研究対象は、妊娠16週から35週5日の間の無症状単胎妊婦 (asymptomatic singleton pregnant women with asymptomatic) または早期陣痛 (preterm labor; PTL) および/または早期羊膜破水 (premature rupture of membrane; pPROM) がある入院妊婦であった。

30

【0064】

心電図検査で感知して、規則的な子宮収縮と20分内に4回以上の収縮、または60分内に8回以上の収縮がある患者を早期陣痛 (PTL) と診断した。早期羊膜破水 (pPROM) を診断するために、腹腔内羊水固着を感知するための滅菌検鏡検査と、膜破裂感知のためのニトラジン検査 (nitrazine test) を実施した。在胎期間は、最後の月経の初日と超音波検査を使用して決定された。妊婦が産前検診のために訪問したり分娩のために病院に入院した時、血液サンプルを採取してメタボローム分析を行う時まで -80°C で保管した。

40

【0065】

本研究は梨花女子大学病院機関審議委員会 (EUMC2018-07-007-010) の承認を受けた。すべての実験は承認された指針に従って行われ、すべての被験者から事前同意を得た。

【0066】

50

実施例 2．妊婦血液サンプルの準備

200 μ L の血漿サンプルを 600 μ L の溶媒混合物（アセトニトリル／メタノール／アセトン；1：1：1、v／v）で沈殿させた後、3 分間のボルテックスミキサーで混合して 30 分間 -20℃ で保管した。沈殿されたサンプルを 10,000 g、4℃ で 10 分間遠心分離した後、600 μ L の上澄み液を他の試験管に移し、緩やかな窒素ストリーム（gentle nitrogen stream）下で蒸発乾燥させた。残留物を 200 μ L の 50% メタノールに再構成した後、5 μ L（RPC 分離モード）サンプルを UPLC- LTQ- Orbitrap MS で分析した。

【0067】

実施例 3．LTQ- Orbitrap MS によるメタボロームプロファイリング

メタボロームプロファイリングは、ポジティブモード（ESI+）で作動する電気噴霧ソースが取り付けられた LTQ- Orbitrap Velos Pro ハイブリッド質量分析計（Thermo Fisher Scientific）と結合された Ultimate 3000 UHPLC システム（Thermo Fisher Scientific、米国、カリフォルニア州サンノゼ）を利用して行った。Acquity™ UPLC BEH C18 カラム（2.1mm×100mm、1.7 μ m、Waters、Milford, MA, USA）UPLC 分析カラムで逆相分離（reversed-phase separation）を行った。移動相溶媒は、95% 水、5% ACN および 0.1% ギ酸（移動相 A）および 95% ACN、5% 水 および 0.1% ギ酸（移動相 B）を使用した。溶出勾配は以下の通りであった：0～3 分まで 100% 移動相 A；3～10 分まで 50% 移動相 B に線形増加（linear increase）；10～12 分まで移動相 B を 50～90% まで線形増加（linear increase）；12～15 分まで 100% 移動相 A の線形増加維持；15～18 分まで 100% 移動相 A に再平衡化（re-equilibration）。カラムは 40℃ に維持され；総実行時間は 18 分であった。分析のために、各サンプルの 5 μ L の標本（aliquot）を注入した。サンプルは、分析中に自動サンプラー（autosampler）で 4℃ に維持された。

【0068】

実施例 4．レチノイドメタボローム検証のための標準原液の準備

TB と PTB の代謝経路を分析するために、レチノイドメタボロームを分析することにした。レチノール（retinol；ROH）、レチニルアセテート（retinyl acetate；RAc）、レチニルパルミテート（retinyl palmitate；RP）、全トランスレチナール（all-trans retinal；at-RAL）、全トランスレチノイン酸（all-trans retinoic acid；at-RA）、13 シス-レチノイン酸（13 cis-retinoic acid；13 cis-RA）、レチニルアセテート-D6（retinyl acetate-D6；RAc-D6）、全トランスレチナール-D6（all-trans retinal-D6；at-RAL-D6）、および全トランスレチノイン酸-D6（all-trans retinoic acid-D6；at-RA-D6）に対して、レチノイドの全ての表示された分析参照標準（analytical reference standards）および内部標準（internal standards）の保存溶液を最終濃度が 2000 ppm になるようにメタノールに均一に溶解した。レチノール-D6（ROH-D6）は、例外的に 1000 ppm の最終濃度で製造した。溶液は使用するまで -20℃ の温度で保管した。ターゲットレチノイドの最終定量化のための検量線（calibration curve）は、800～0.05 ppb 範囲で、このような標準ストック溶液（standard stock solutions）を 4 倍連続希釈して製造した。ROH、RAc、at-RAL および at-RA 標準は、Cayman Chemicals, Inc.（Ann Arbor, Michigan）から入手し、RP、13 cis-RA は、Sigma Aldrich Corp.（St. Louis, USA, Missouri）から入手した。前記で言及した 4 個の同位元素標識された内部標準（internal standards）は全て Cambridge Isotopes Labor

10

20

30

40

50

atories, Inc. (Tewksbury, USA, Massachusetts) から購入した。

【0069】

実施例5．サンプルの準備

血漿サンプルで標的レチノイドを効果的に抽出するために、液体-液体抽出方法を使用した。200 μ L の血漿サンプルそれぞれに、同位元素標識された内部標準混合物 (internal standard mixture) を添加し、200 μ L のアセトニトリル (acetonitrile) で血清タンパク質を沈殿させる前に、しばらくボルテックスした。1分間ボルテックスした後、1.2 mL のメチル-tert-ブチルエーテル (methyl-tert-butylether) を各チューブに追加で添加し、再び1分間ボルテックスした。次に、サンプルを13,000 rpm、4℃で10分間遠心分離し、上部有機層を最終的に新しい試験管に移した。移送された上澄み液 (supernatant) を室温にて窒素ガスで乾燥して残留物をメタノール20 μ L で再構成した。5分間のボルテックスした後、上澄み液を最終的にきれいなガラスMSバイアルチューブに移して、追加LC-MS/MS分析のためにキャップを閉じた。

【0070】

実施例6．LC-MS/MS分析

血漿サンプル抽出物のクロマトグラフィー分離は、Accucore C18 カラム (2.1 $\times$ 100 mm、2.6 μ m の粒子の大きさ、Thermo Scientific^T, USA) で行われ、温度は実験中ずっと30℃に維持した。サンプルの注入体積は2 μ L に固定された。標的レチノイドは、80%のアセトニトリル (A) および100%メタノール (B) で構成された移動相組成下で22分以内に分離し、二つとも0.1%のギ酸で変形された。移動相システムは、初期に相A (phase A) の100%で等溶媒モードで7分間維持され、流速を0.2 mL/分から0.4 mL/分に線形的に増加させた。その後、直ちに相B (phase B) 100%に変更し、15分まで維持し、流速を0.4 mL/分に維持した。さらに2分間、システムは、線形勾配を徐々に100%相A (phase A) に戻り、流速を0.2 mL/分に再び減少させた。再平衡になるために、5分間条件を維持した。その後、ESI (electrospray ionization) 源が取り付けられたAgilent 6460C Triple Quadrupole LC-MS/MSシステムを使用してカラム流出物を分析した。質量分析計は、窒素を噴霧ガスとして使用してカチオンモードで作動した。加熱されたアトマイザーの温度は、4,500のイオンスプレー電圧で300℃に設定された。レチノイドの定量化は、レチノール (ROH)、レチノール-D6 (ROH-D6)、レチニルアセテート (RAc)、レチニルアセテート-D6 (RAc-D6) およびレチニルパルミテート (RP) に対して[M+H-fatty acid-H₂O]⁺の前駆体イオンを選択し、at-RAL、at-RAL-D6、at-RA、9cis-RA、13cis-RAおよびat-RA-D6に対して[M+H]⁺を選択して、多重反応モニタリング (MRM) モードで行った。前述のすべての分析物質の最適化したMRM遷移、MSパラメータおよびLC保持時間が表1に要約されている。最終定量化のために、標的レチノイドの各ピーク領域を当該内部標準の反応に対して正規化した (ROHの場合0.5 ppm ROH-D6 ; RAcおよびRPの場合0.25 ppm RAc-D6 ; at-RALの場合0.25 ppm at-RAL-D6 ; at-RA、9cis-RA、13cis-RAの場合1 ppm at-RA-D6) 。

【0071】

10

20

30

40

50

【表 1】

ターゲット分析物 (target analytes) に対する LC 保持時間 (LC retention times)、MRM 遷移 (MRM transitions) および MS パラメータ (MS parameters)

* 内部標準

分析物	R _t (分)	極性	前駆体 (m/z)	生成物 (m/z)	断片化 エネルギー (V)	衝突 エネルギー (V)
13 シス-レチノイン酸	3.128	陽性	301.2	123.1	105	12
9 シス-レチノイン酸	3.334	陽性	301.2	123.1	105	12
全トランスレチノイン酸	3.530	陽性	301.1	159.1	115	18
レチノイン酸-D6*	3.531	陽性	307.2	165.2	115	18
全トランスレチナール	4.679	陽性	285.2	161.1	115	2
レチナール-D6*	4.679	陽性	291.2	69	95	22
レチノール	3.674	陽性	269.2	93.1	115	18
レチノール-D6*	3.674	陽性	275.2	96	110	14
レチニルアセテート	6.889	陽性	269.2	96	108	21
レチニルアセテート-D6*	6.889	陽性	275.2	96	115	16
レチニルパルミテート	13.982	陽性	269.1	96	111	21

【0072】

実施例 7. 統計的分析

研究グループの基本特性は、連続変数に対する Student's t-test と範疇型変数に対するカイ二乗検定を使用して比較された。TB および PTB の妊婦の血漿で代謝プロファイルの変異から変数のリストを得るために多変量分析を行った。

【0073】

多変量分析は、Umetrics (Umea, Sweden) の SIMCA-P ソフトウェア v14.0 を使用して行った。

【0074】

経路影響分析およびヒートマップ視角化は、ウェブベースのメタボロミクスデータ処理ツールおよび視角化メタボロミクスである Metaboanalyst 3.0 (Montreal, QC, Canada) によって行われた。

【0075】

経路マッピングおよび化学的類似性分析は、R バージョン 3.2.2、MetaMap および Cytoscape 3.4.0 (Boston, MA, USA) によって生成された。

【0076】

LC-MS/MS を用いた検証では、サンプリング時間に在胎期間に合わせて調整された一般化された線形モデルを使用して、ディファレンシャルメタボロームレベルを分析した。

【0077】

P T Bの診断精度は、R O C曲線のA U Cを適用して要約された。統計的に、 $p < 0.05$ は有意と見なされた。

【0078】

統計的分析には、社会科学のための統計パッケージ（S P S S、バージョン2.0 C h i c a g o, I L, U S A）とオンラインM E D C A L Cソフトウェアが使用された。

【0079】

実験結果

【0080】

1. 実験対象の臨床的特性

早産（P T B）のメタボロミクスの特性を確認して（探索グループ；T B、 $n = 10$ ；P T B、 $n = 11$ ；表2）、標的メタボロームを検証するために（検証グループ；T B、 $n = 39$ ；P T B、 $n = 20$ ；表3）、妊娠16週から40週5日の間の妊婦から末梢血液を収集した（図1）。図1は、試験対象を選定する過程を示すフローチャート（f l o w c h a r t）である。探索グループの早産産婦および満期産婦の臨床学的特徴を表2に示し、検証グループの早産産婦および満期産婦の臨床学的特徴を表3および表4に示した。

【0081】

サンプリングおよび分娩時の在胎期間（g e s t a t i o n a l a g e）等の臨床的要因は、探索グループ（d i s c o v e r y g r o u p）および検証グループ（v a l i d a t i o n g r o u p）共に、早産群と満期群間で有意に異なっていた（ $p < 0.05$ 、表3）。表3は、検証グループの対象者（s u b j e c t s f o r v a l i d a t i o n）の臨床的特性を示したものである。白血球数、およびC-反応性タンパク質（C - r e a c t i v e p r o t e i n）は、検証グループで二つのグループ間に有意差があった（ $p < 0.05$ ）。妊娠3期妊婦のアラニンアミノ基転移酵素（a l a n i n e a m i n o t r a n s f e r a s e；A L T）およびアスパラギン酸アミノ基転移酵素（a s p a r t a t e a m i n o t r a n s f e r a s e；A S T）のような肝機能酵素と、脂質プロファイル（l i p i d p r o f i l e s）は、早産グループ（P r e t e r m b i r t h）と満期グループ（T e r m b i r t h）間有意差がなかった（表4）。満期分娩産婦では、絨毛羊膜炎（c h o r i o a m n i o n i t i s）がなかったが、早産女性では2人の患者が確認された。

【0082】

10

20

30

40

50

【表 2】

非標的メタボロームプロファイル分析のための被験者

(探索グループ; discovery group) の臨床的特性 (n=21)

	正常分娩 (n=10)	早産 (n=11)	P 値
	中央値 (IQR)	中央値 (IQR)	(p-value)
産婦の年齢	33.0 (4.8)	33.0 (4.8)	0.669*
GAS	38.5 (1.6)	31.4 (7.4)	<0.001*
パリティ			0.423 [†]
不妊, n	3	4	
多胎児, n	7	7	
妊娠歴			0.237 [†]
0, n	3	7	
≥ 1, n	7	4	
WBC (×10 ³ /ml)	9.8 (2.9)	10.3 (8.4)	0.468*
C-反応性タンパク質 (mg/dl)	–	0.5 (0.9)	–
AST (IU/L)	21.0 (7.3)	21.0 (3.0)	0.809*
ALT (IU/L)	14.5 (3.8)	14.0 (9.0)	1.000*
AST/ALT 比率	1.4 (0.6)	1.4 (0.7)	0.918*
TC (mg/dl)	259.5 (29.0)	253.0 (36.0)	0.512*
TG (mg/dl)	259.0 (115.5)	178.0 (148.0)	0.114*
BUN (mg/dl)	7.0 (1.6)	6.0 (6.0)	0.863*
クレアチニン (mg/dl)	0.7 (0.1)	0.6 (0.2)	0.223*
BUN/クレアチニン比率	10.1 (2.9)	10.1 (8.8)	0.705*
pregBMI	25.2 (3.3)	25.0 (3.7)	0.029*
GAD	38.5 (1.6)	33.0 (8.6)	<0.001*
分娩方式			0.063 [†]
正常分娩, n	7	3	
帝王切開, n	3	8	
出生体重 (Kg)	3.3 (0.3)	2.0 (1.5)	<0.001*
性別, n(%)			0.426 [†]
男, n	7	7	
女, n	3	4	
APGAR 1 分	10.0 (0.0)	6.0 (6.0)	<0.001*
APGAR 5 分	10.0 (0.0)	9.0 (3.0)	0.003*

【0083】

データは中央値（四分位数範囲；IQR）で表示されている。

*Mann Whitney test, p<0.05;

†χ² test, p<0.05

GAS：サンプリング時在胎期間（gestational age at sampling）；

PregBMI：分娩時体質量指数（body mass index at delivery）；

GAD：分娩時在胎期間（gestational age at delivery）。

【0084】

【表3】

検証グループの研究対象者 (subjects for validation) の
臨床的特性

	正常分娩 (<i>n</i> =39)	早産 (<i>n</i> =20)	<i>p</i> -値
産婦の年齢	33.3±0.7	32.7±1.0	0.626 *
GAS	23.0±0.8	27.6±1.6	0.010*
preBMI	21.0±0.4	21.7±0.7	0.397 *
パリティ			0.488 [†]
不妊	16(42.1)	8(40.0)	
多胎児	21(57.9)	12(60.0)	
妊娠歴			0.416 [†]
0	25(64.1)	11(55.0)	
≥ 1	14(35.9)	9(45.0)	
WBC(×10 ³ /ml)	8.8±0.4	11.6±0.6	<0.001*
C-反応性タンパク質(mg/dl)	0.3±0.1	0.8±0.2	0.034*
pregBMI	26.8±0.6	26.4±0.8	0.397
GAD	39.0±0.2	33.3±1.0	<0.001*
分娩方式			0.026 [†]
正常分娩	23(59.0)	5(25.0)	
帝王切開	16(41.0)	15(75.0)	
出生体重(Kg)	3.2±0.1	22.0±0.2	<0.001*
性別, <i>n</i> (%)			0.651 [†]
男	25(64.1)	14(70.0)	
女	14(35.9)	6(30.0)	
APGAR 1 分	9.7±0.1	7.9±0.5	0.002 *
APGAR 5 分	9.9±0.1	8.9±0.4	0.009 *

【0085】

連続変数のデータは、平均±SEで表示した。

*Student's *t*-test, *p*<0.05;

†*χ*² test, *p*<0.05

TB: 満期分娩 (term birth);

PTB: 早産 (preterm birth);

GAS: サンプルング時在胎期間 (gestational age at sampling);

PreBMI: 妊娠前体質量指数 (body mass index before pregnancy);

PregBMI: 分娩時体質量指数 (body mass index at delivery);

WBC: 白血球 (white blood cell);

GAD: 分娩時在胎期間 (gestational age at delivery);

APGAR: アプガースコア (Appearance, Pulse, Grimace,

Activity, Respiration, Apgar score)

【0086】

【表4】

満期分娩および早産産婦のレチノイド代謝と関連する血液指数 (n=59)

区分	正常分娩 (n=39)	早産 (n=20)	p-値 (p-value)
AST (IU/L)	16.92±0.70	17.75±1.38	0.554
ALT (IU/L)	11.79±1.17	12.95±2.00	0.597
AST/ALT	1.69±0.09	1.62±0.11	0.642
TC (mg/dl)	263.64±7.07	257.75±9.96	0.630
TG (mg/dl)	307.23±24.90	264.85±29.62	0.303
BUN (mg/dl)	8.41±0.53	7.50±0.77	0.328
クレアチニン (mg/dl)	0.57±0.02	0.50±0.03	0.066
BUN/クレアチニン	14.75±0.56	15.60±1.08	0.441

【0087】

データは平均±SEで示した。

*Student's t-test

【0088】

2. 産婦血漿サンプルのメタボロームプロファイリング

早産に特異的なメタボロームおよび代謝経路を解明するために、LTQ-Orbitrap Velos Pro hybrid質量分析計と結合された超高性能液体クロマトグラフィー (ultra-high performance liquid chromatography; UPLC) を使用して非標的メタボロームプロファイリングを行った。満期 (TB) および早産 (PTB) 産婦の血漿で代謝プロファイルの変異から変数のリストを得るために多変量分析を行った。部分最小二乗判別分析 (partial least-squares discriminant analysis; PLS-DA) の点数プロットを適用して、PTBとTBグループを区別するのに使用することができるメタボロミクスパターンを識別した。図2は、RPC陽性でTBと比較してPTBに対して明確に区分された範疇を示している ($Q^2=0.072$; $R^2=0.085$)。図2に示されているように、PLS-DA点数プロット (score plots) は、早産産婦 (赤色) と満期分娩産婦 (青色) の血漿メタボロームが異なって分類された。1より大きい変数重要尺度 (variable importance in projection; VIP) 値および0.05より小さいp-値に基づいて、235個の可変イオン (235 variable ions) 中15個のメタボロームが決定された。具体的なデータは表5に示す。

【0089】

10

20

30

40

50

【表 5】

UPLC-LTQ-Orbitrap MSによって識別された可変イオンに対する多変量分析の順位結果

番号	RT_Mass	検出方法	VIP 値	p-値	変化	Fold 変化(P/C)
1	11.61_163.0094	RP	2.66	1.51E-03	↑	7.41
2	11.36_319.2058	RP	2.41	3.60E-02	↑	1.94
3	10.92_274.2816	RP	2.09	2.63E-02	↓	0.79
4	5.96_90.5243	RP	2.05	2.74E-02	↑	6.51
5	11.63_270.2154	RP	1.98	1.72E-02	↑	3.34
6	11.35_133.1127	RP	1.85	2.50E-02	↓	0.34
7	11.58_121.102	RP	1.54	3.07E-02	↑	8.11
8	10.97_106.0885	RP	1.53	4.25E-02	↓	0.73
9	10.2_95.0765	RP	1.34	4.65E-02	↑	2.60
10	11.53_834.6856	RP	1.30	3.95E-02	↑	61.76
11	2.16_90.5248	RP	1.29	4.76E-02	—	—
12	11.36_145.0167	RP	1.19	1.44E-02	↑	1.75
13	10.99_334.3113	RP	1.16	3.45E-02	↓	0.61
14	9.22_95.0809	RP	1.00	3.87E-02	↑	2.48
15	11.42_117.0732	RP	0.97	4.47E-02	↑	9.68
16	9.67_369.1706	RN	1.35	2.13E-02	↑	6.51
17	11.5_685.5345	RN	1.35	5.63E-03	↑	11.66
18	0.82_313.0628	RN	0.98	4.40E-02	↑	2.20

【0090】

3. 代謝経路と関連する早産

母体血漿のメタボローム変化が早産とどのように関連しているかをよりよく理解するために、代謝経路を分析した。経路分析 (pathway impact analysis) は、包括的な代謝データ分析、視角化および解釈のために、KEGGデータベースとMetaboAnalyst 3.0に基づいて行われた。経路分析 (impact pathway analysis) の結果は図3に示した。図3は、経路影響分析の散布図 (scatter plot) を示したもので、y軸はp-valueを示す。x軸は経路位相分析 (pathway topology analysis) を示し、y軸は経路濃縮分析 (pathway enrichment analysis) を示す。レチノール (retinol) 代謝、リノール酸 (linoleic acid) 代謝、D-アルギニン (D-arginine) およびD-オルニチン (D-ornithine) 代謝を含む代謝経路が早産と関連があるが示された。

【0091】

4. 標的血漿メタボロームの分析

レチノイド代謝に関与するメタボロームを標的として分析し、早産の根底にある病理学的メカニズムを調査した。レチノイドメタボロームは、LC-MS (TB、n=39; PTB、n=20) を使用して妊婦の血漿で分析された。在胎期間を調整した時、PTBのレチノイドメタボロームがTBに比べて顕著に変化した(図4)。図4は、レチノイド代謝産物分析により、早産産婦の血漿試料で変化を示すレチノイドメタボロームを示した図面である(39TB、20PTB)。レチノール数値は、TBに比べてPTBで有意に減少したが、レチニルパルミテート、全トランス(AT)-レチナールおよび13-シス-レチノイン酸(13cis-RA)は有意に増加した($p < 0.05$)。

【0092】

5. 早産に対する予測性能

早産の診断精度は、ROC (receiver operating characteristic) 曲線のAUC (area under the curve) を適用して検証した。レチノイドメタボロームは、早産予測に対して有意な($p < 0.01$; 表6、図5) 0.6以上の予測値を示した。図5は、メタボロームに対するROC曲線分析を示した図面で、感度および特異度のROC曲線を利用した早産バイオマーカーの予測性能を示す。メタボローム中、AT-レチナール(AT-retinal) (AUC 0.808、95%CI: 0.683-0.933) および13cis-RA (AUC 0.826、95%CI: 0.723-0.930) は、レチノールメタボローム中向上した予測能を示した。早産危険群と正常群を区分するメタボローム濃度値の基準であるCut-off valueは、感度と特異度を加えた値中最も高い値のデータ値に相当するメタボローム濃度値で導き出された。

【0093】

【表6】

早産予測のためのレチノール関連メタボロームの効能

代謝産物	AUC	p-値	Cut-off 値 (ppb)	SENS	SPEC	PPV	NPV	精度
AT-レチナール	0.808	<0.001	2.48	75.0%	84.2%	68.2%	86.5%	79.7%
13 シス-RA	0.826	<0.001	5.56	85.0%	68.4%	58.6%	90.0%	74.6%
9 シス-RA	0.679	0.026	9.56	45.0%	92.1%	69.2%	76.1%	74.6%
レチニル パルミテート	0.670	0.035	100.33	40.0%	94.7%	72.7%	75.0%	74.6%

【0094】

統計的分析のために、ROC (Receiver Operating Characteristics) 曲線分析を行い、 $p < 0.05$ は有意であるとみなされた。

AUC: 曲線下面積 (Area under the curve);

SENS: 感度 (Sensitivity);

SPEC: 特異度 (Specificity);

PPV: 陽性予測度 (Positive predictive value);

NPV: 陰性予測度 (Negative predictive value);

OR: オッズ比 (Odd ratio);

AT: 全トランス (all trans);

RA: レチノイン酸 (Retinoic acid);

Cut-off value: 臨界値

【0095】

結論

本発明は、血漿メタボロームプロファイルと代謝経路を確認して、早産の病因メカニズムを裏付け、妊婦の早産予測のためのバイオマーカーを解明した。本発明によれば、早産群のメタボロームプロファイルが満期出産群に比べて有意に異なり、全トランス-レチナール（A T - r e t i n a l）および13-シス-レチノイン酸（13 c i s - R A）がレチノールメタボローム中早産の向上した予測を示した。

【0096】

本発明で、妊娠2期または分娩時母体血液を収集した。調整された在胎期間にもかかわらず、早産群の血漿メタボロームプロファイルは、満期分娩群と異なっており、レチノイドメタボロームの変化が早産と関連していた。

【0097】

血液中ビタミンAは、レチノール結合タンパク質であるRBPと1:1複合体で血漿に運搬される。本発明によれば、血漿レチノール数値は、TBに比べてPTBで減少したが、AT-レチナール（A T - r e t i n a l）と13 c i s - R Aレベルと関連するRBP数値は、PTBで増加し、これらのメタボロームは正の相関があった。RBPは、レチノールだけでなくAT-レチナール（A T - r e t i n a l）および13 c i s - R Aと結合することができ、Stra6受容体を介して標的組織に伝達されることができる。高いレベルのレチノイン酸（ATRAおよび13 c i s - R A）の特定代謝産物は、重要な器官発生および胚発生期間の間、遺伝子活性に影響を与えて催奇性（t e r a t o g e n i c i t y）を誘発し得る。

【0098】

まとめると、本発明は、TBおよびPTB母体血漿間のメタボロームプロファイルおよびターゲットメタボロームの変化を解明した。特に、全トランス-レチナール（A T - r e t i n a l）および13 c i s - レチノイン酸（13 c i s - R A）は、早産に対する予測精度が優れていた。

10

20

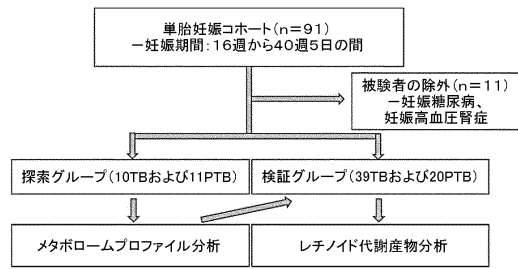
30

40

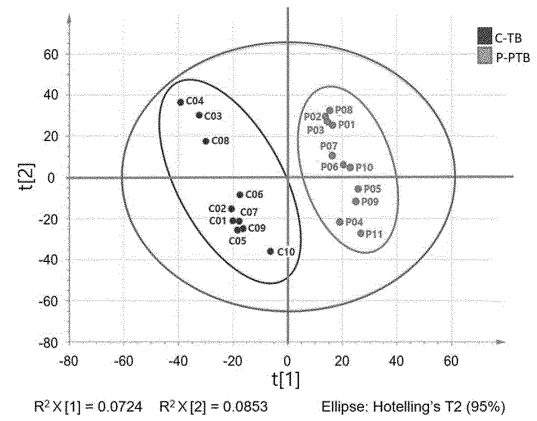
50

【図面】

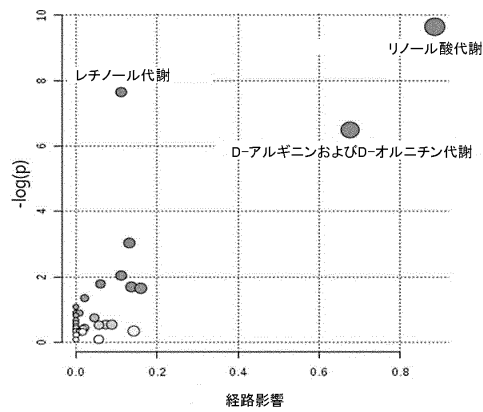
【図 1】



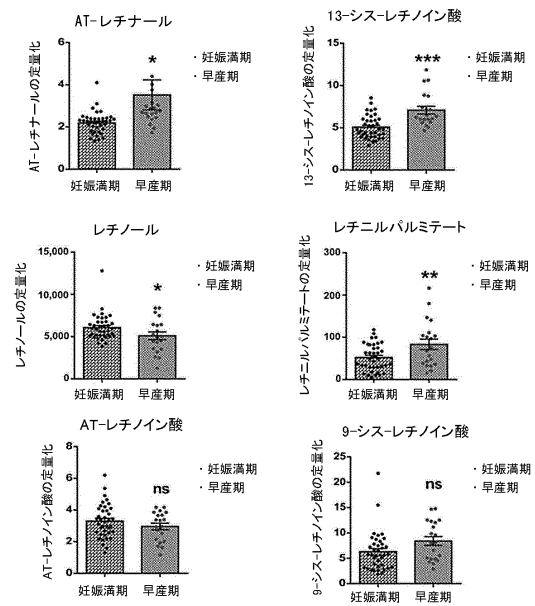
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

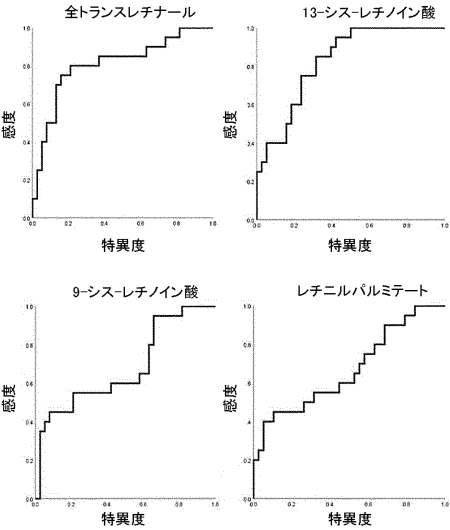
20

30

40

50

【図 5】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

- 401

(72)発明者 アンサリ, アブザール

大韓民国 10325 キョンギ - ド ゴヤン - シ イルサンドン - ク ワイ・シティ - ロ 51 - 14
エイ - 102

(72)発明者 キム, ソ - ミン

大韓民国 21058 インチョン ケヤン - ク ケサンセ - ロ・33ボン - ギル 26 103 - 408

(72)発明者 パク, スンファ

大韓民国 07997 ソウル ヤンチョン - ク モクドンソ - ロ 155 105 - 1902

(72)発明者 イ, ガ - イン

大韓民国 31233 チュンチョンナム - ド チョナン - シ ドンナム - ク モクチョン - ウプ シ
ンケ・1 - ギル 41 111 - 806

審査官 倉持 俊輔

(56)参考文献 米国特許第08883512 (US, B1)

国際公開第2020/168118 (WO, A1)

特表2013-515255 (JP, A)

国際公開第2020/127161 (WO, A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-33/98,

CAplus/REGISTRY (STN)