(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
2024年11月21日(21.11.2024)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2024/237259 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 33/50 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2024/017846

(22) 国際出願日： 2024年5月14日(14.05.2024)

(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 2023-081585 2023年5月17日(17.05.2023) JP

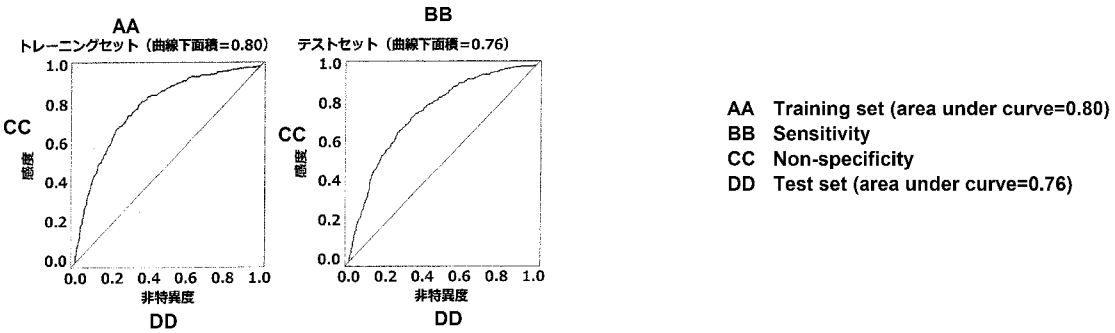
(71) 出願人: 株式会社島津製作所 (**SHIMADZU CORPORATION**) [JP/JP]; 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町１番地 Kyoto (JP). 学校法人聖路加国際大学 (**ST. LUKE'S INTERNATIONAL UNIVERSITY**) [JP/JP]; 〒1040044 東京都中央区明石町１０番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 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). 渡辺 真 (**WATANABE, Makoto**); 〒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). 越坂 卓也 (**KOSHIZAKA, Takuya**); 〒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). 大竹 淳矢 (**OHTAKE, Jyunya**); 〒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). 熊倉 泰久 (**KUMAKURA, Yasuhisa**); 〒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 EVALUATING ONSET RISK OF NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE, AND BIOMARKERS

(54) 発明の名称： 非アルコール性脂肪肝疾患の発症リスク評価方法、および、バイオマーカー

［図1］



(57) **Abstract:** [Problem] To provide a method for evaluating the onset risk of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) having excellent reliability, and biomarkers used for the method. [Solution] A method for evaluating the onset risk of NAFLD, the method including: an acquisition step for acquiring a sample derived from a body fluid of a subject; a detection step for detecting 14 types of compounds comprising lactic acid, alanine, acetylglycine, isoleucine, proline, serine, glutaric acid, α-ketoglutaric acid, creatinine, glutamic acid, asparagine, fructose, uric acid, and tryptophan in the sample; and a use step for using the detection amounts of all of the 14 compounds obtained by the detection step.

(57) 要約：【課題】信頼性に優れるＮＡＦＬＤの発症リスク評価方法およびそれに用いるバイオマーカーを提供すること。【解決手段】非アルコール性脂肪肝疾患の発症リスク評価方法は、被験者の体液に由来する試料を取得する取得工程と、試料中の乳酸、アラニン、アセチルグリシン、イソロイシン、プロリン、セリン、グルタル酸、α－ケトグルタル酸、クレアチニン、グルタミン酸、アスパラギン、フルクトース、尿酸およびトリプトファンからなる１４種類の化合物を検出する検出工程と、検出工程によって得られた１４種類の検出量の全てを使用する使用工程とを備える。

WO 2024/237259 A1

［続葉有］

(74) 代理人：吉 本　力 (YOSHIMOTO, Tsutomu)；〒5410059 大阪府大阪市中央区博労町３丁目４－１５ ＭＥＬＯＮ国際特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国（表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能）：AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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：

一　国際調査報告（条約第21条(3)）

明　細　書

発明の名称 ：

非アルコール性脂肪肝疾患の発症リスク評価方法、および、バイオマーカー

技術分野

[0001]　本発明は、非アルコール性脂肪肝疾患の発症リスク評価方法、および、それに用いるバイオマーカーに関する。

背景技術

[0002]　非アルコール性脂肪性肝疾患（ＮＡＦＬＤ：nonalcoholic fatty liver disease）は、アルコールやウィルスなどを原因としない脂肪肝の総称である。ＮＡＦＬＤには、肝細胞に脂肪が沈着するだけの単純性脂肪肝と、肝細胞が壊されて機能しなくなり、脂肪肝から炎症や線維化を伴い、肝硬変や肝がんなどに進行するリスクのある非アルコール性脂肪肝炎（ＮＡＳＨ：nonalcoholic steatohepatitis）とが含まれる。単純性脂肪肝から、非アルコール性脂肪肝炎を引き起こす場合があるため、ＮＡＳＨおよび単純性脂肪肝を含むＮＡＦＬＤの診断は重要である。そして、受診者が、現段階でＮＡＦＬＤに罹患しているか否かを診断すること以外に、発症リスク、すなわち、将来において、ＮＡＦＬＤに発症する可能性が高いか否かを診断することができれば、受診者に、ＮＡＦＬＤの予防対策を推奨することができるため、有意義である。

[0003]　このような発症リスクの予測方法としては、例えば、試料中のアシルカルニチン総量を測定する予測方法（特許文献１）、試料中の成長分化因子１５タンパク質の濃度を測定する予測又は断方法（特許文献２）、トリメチルアミン含有化合物のレベルを比較する方法（特許文献３）などが提案されている。しかしながら、これらに記載の方法は、せいぜい２００人規模を対象とした分析であり、信頼性の点で不十分である。

[0004]　一方、数千人規模を対象として分析した方法として、ヒト第２染色体上の

ＧＣＫＲ遺伝子の第27730940番目の一塩基多型、又は前記一塩基多型と連鎖不平衡状態にある一塩基多型などを検出するＮＡＦＬＤリスクの予測方法が提案されている（特許文献４）。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開２０２０－３４５６１号公報

特許文献2：特表２０２０－５２８１３８号公報

特許文献3：特表２０１２－５２８３４０号公報

特許文献4：特開２０２０－１２０６２５号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] しかしながら、特許文献４に記載の方法では、特定の塩基配列（ＳＮＰ）にハイブリダイズするプライマーおよびプローブを用いる遺伝子解析方法を採用するため、ベースとしての遺伝的背景（体質）による発症予測となり、内的・外的環境因子的なものは考慮されない。そのため、遺伝子解析方法以外の他の代替方法が望まれている。

[0007] したがって、信頼性に優れるＮＡＦＬＤの発症リスク評価方法およびそれに用いるバイオマーカーを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明の第１の態様の非アルコール性脂肪肝疾患の発症リスク評価方法は、被験者の体液に由来する試料を取得する取得工程と、前記試料中の乳酸、アラニン、アセチルグリシン、イソロイシン、プロリン、セリン、グルタル酸、α－ケトグルタル酸、クレアチニン、グルタミン酸、アスパラギン、フルクトース、尿酸およびトリプトファンからなる１４種類の化合物を検出する検出工程と、前記検出工程によって得られた１４種類の検出量の全てを使用する使用工程とを備える。

発明の効果

[0009] 本発明の第１の態様の発症リスク評価方法およびバイオマーカーによれば、高い信頼性に基づいて、将来における非アルコール性脂肪疾患の発症の有無を予測することができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図１は、実施例１（３１種類の特定化合物）における予測判別式の性能をＲＯＣ曲線で評価した際のグラフであり、右図は、サンプルコホートがトレーニングセットであり、右図は、サンプルコホートがテストセットである。図１において、縦軸は感度を示し、横軸は非特異度（１－特異度）を示す。

[図2]図２は、図１とは別のコホートに対して、実施例における予測判別式の性能をＲＯＣ曲線で評価した際のグラフである。

[図3]図３は、実施例２（２１種類の特定化合物）における予測判別式の性能をＲＯＣ曲線で評価した際のグラフであり、右図は、サンプルコホートがトレーニングセットであり、右図は、サンプルコホートがテストセットである。

[図4]図４は、実施例３（１５種類の特定化合物）における予測判別式の性能をＲＯＣ曲線で評価した際のグラフであり、右図は、サンプルコホートがトレーニングセットであり、右図は、サンプルコホートがテストセットである。

[図5]図５は、実施例４（１４種類の特定化合物）における予測判別式の性能をＲＯＣ曲線で評価した際のグラフであり、右図は、サンプルコホートがトレーニングセットであり、右図は、サンプルコホートがテストセットである。

発明を実施するための形態

[0011] １．第１の実施形態

本発明の第１の実施形態の発症リスク評価方法は、将来における非アルコール性脂肪肝疾患（以下、「ＮＡＦＬＤ」と略することもある。）の発症の有無を評価する方法であり、ＮＡＦＬＤの発症リスクを評価するためのバイ

オマーカーとして、乳酸、アラニン、アセチルグリシン、イソロイシン、プロリン、セリン、グルタル酸、α－ケトグルタル酸、クレアチニン、グルタミン酸、アスパラギン、フルクトース、尿酸およびトリプトファンからなる１４種類の化合物を使用するものである。具体的には、第１の実施形態の評価方法は、取得工程、検出工程および使用工程を備える。以下、各工程を詳述する。

[0012] （取得工程）

本工程では、 被験者の体液に由来する試料を取得する。

[0013] 体液としては、血液、尿、唾液、汗、痰、糞便などが挙げられる。血液には、全血、血漿、血清などが含まれる。好ましくは、血液が挙げられ、より好ましくは、血清が挙げられる。血液は、低侵襲性であり、また、健康診断等におけるスクリーニングの対象試料であって入手が容易である。

[0014] 試料は、検出工程の前に、一時的に保管される。保管方法としては、冷凍保存、冷蔵保存または常温保存のいずれであってもよい。試料として血清または血漿を採用する場合は、全血の状態で保管されていてもよく、全血を遠心分離して得られた血清または血漿の状態で保管されていてもよい。

[0015] （検出工程）

本工程では、試料から、乳酸、アラニン、アセチルグリシン、イソロイシン、プロリン、セリン、グルタル酸、α－ケトグルタル酸、クレアチニン、グルタミン酸、アスパラギン、フルクトース、尿酸およびトリプトファンからなる１４種類の化合物の全てを少なくとも検出する。以下、これらの１４種類の化合物をまとめて、特定化合物とも称する。

[0016] この実施形態において、「化合物を検出する」とは、試料に含有されている特定化合物を、定量のために、直接または間接的に検出することを指し、具体的には、特定化合物そのものを検出するだけでなく、特定化合物に対してイオン化、解離、誘導体化などの処理化を実施して、処理化された特定化合物（イオン化物、解離物、誘導体など）を検出することも含む。

[0017] 検出方法としては、試料に含有される特定化合物を定量化できる方法であ

ればよく、例えば、ガスクロマトグラフィ（ＧＣ：Gas Chromatography）、液体クロマトグラフィ（ＬＣ：Liquid Chromatography）、質量分析（ＭＳ：mass spectrometry）、ガスクロマトグラフィ／質量分析（ＧＣ／ＭＳ）、液体クロマトグラフィ／質量分析（ＬＣ／ＭＳ）、核磁気共鳴分光法、免疫学的検出法などが挙げられる。血液試料に対して高感度での検出が可能な観点から、好ましくは、質量分析を用いた方法（ＭＳ、ＬＣ／ＭＳ、ＧＣ／ＭＳ）が挙げられ、より好ましくは、ＧＣ／ＭＳが挙げられる。

[0018] 質量分析を採用する場合は、イオン化の手段としては、例えば、電子化イオン法（ＥＩ：Electron Ionization）、エレクトロスプレーイオン化法（ＥＳＩ：Electrospray Ionization）、大気圧化学イオン化法（ＡＰＣＩ：Atmospheric Pressure Chemical Ionization）などが挙げられる。質量分離の手段としては、例えば、四重極型、磁場セクター型、飛行時間型、イオントラップ型、イオンサイクロトロン共鳴型などが挙げられる。また、例えば、トリプル四重極型（Ｑ－Ｑ）、タンデム飛行時間型（ＴＯＦ－ＴＯＦ）、四重極－飛行時間型（Ｑ－ＴＯＦ）、四重極－イオントラップ型（Ｑ－ＩＴ）、四重極－イオンサイクロトロン共鳴型（Ｑ－ＩＣＲ）、イオントラップ－飛行時間型（ＩＴ－ＴＯＦ）などのタンデム質量分離型なども挙げられる。

[0019] 検出工程を実施する前に、試料に対して前処理を実施してもよい。前処理としては、精製、誘導化などを目的とした処理が挙げられる。例えば、血清などを用いて質量分析により検出する場合は、除タンパク処理、誘導体化などを実施することが好ましい。

[0020] 除タンパク処理は、例えば、クロロホルム溶媒などの抽出溶媒、水などをそれぞれ試料に混合し、混合物を遠心分離して、遠心分離後の混合物の沈殿物を除去することにより実施される。

[0021] 誘導体化としては、例えば、トリメチルシリル化、ジメチルシリル化、ハロメチルシリル化などのシリル化；メチルエステル化などのエステル化；アシル化；アルキル化などが挙げられる。誘導体化可能な対象化合物が多い観点、活性水素を持つ多くの化合物に反応できる観点、マススペクトルにおい

て解析を容易にするピークを与える観点などから、好ましくは、シリル化、特に好ましくは、トリメチルシリル化が挙げられる。すなわち、特定化合物の誘導体、特に、特定化合物のトリメチルシリル化誘導体の検出量を使用することが好ましい。

[0022] トリメチルシリル化を採用する場合、例えば、凍結乾燥後の試料にメトキシアミン溶液を添加することによりオキシム化した後、トリメチルシリル化剤を添加すればよい。トリメチルシリル化剤としては、例えば、Ｎ，Ｏ－ビス（トリメチルシリル）トリフルオロアセトアミド（ＢＳＴＦＡ：N, O-bis（trimethylsilyl）trifluoroacetamide）、Ｎ－メチル－トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド（ＭＳＴＦＡ：N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide）などが挙げられる。

[0023] 特定化合物のトリメチルシリル化誘導体としては、例えば、

ビス（トリメチルシリル）乳酸(Lactic acid-2TMS)、

ビス（トリメチルシリル）アラニン(Alanine-2TMS)、

トリメチルシリルアセチルグリシン(Acetylglycine-TMS)、

ビス（トリメチルシリル）イソロイシン(Isoleucine-2TMS)、

ビス（トリメチルシリル）プロリン(Proline-2TMS)、

トリス（トリメチルシリル）セリン(Serine-3TMS)、

ビス（トリメチルシリル）グルタル酸(Glutaric acid-2TMS)、

ビス（トリメチルシリル）α－ケトグルタル酸－メチルオキシム(α-Ketoglutaric acid-methyloxime-2TMS)、

トリス（トリメチルシリル）クレアチニン(Creatinine-3TMS)、

トリス（トリメチルシリル）グルタミン酸(Glutamic acid-3TMS)、

トリス（トリメチルシリル）アスパラギン(Asparagine-3TMS)、

ペンタキス（トリメチルシリル）フルクトース－メチルオキシム(Fructose-methyloxime-5TMS)、

テトラキス（トリメチルシリル）尿酸(Uric acid-4TMS)、

ビス（トリメチルシリル）トリプトファン(Tryptophan-2TMS)

などが挙げられる。なお、特定化合物を誘導体化する際、一つの特定化合物（例えば、後述するGlycine）に対して、複数の誘導体（例えば、Glycine-2TMSおよびGlycine-3TMS）が得られる場合がある。その際は、複数の誘導体のうち、任意に、一つのみを選択してもよく、複数を選択してもよい。複数の誘導体を選択した場合は、後述する使用工程において、複数の誘導体のそれぞれに対して、所定の係数（後述）をそれぞれ設定する。また、係数を設定する際に、複数の誘導体化の検出量を足し合わせて設定してもよい。そして、複数の誘導体の検出量およびそれらに対応する複数の所定の係数を、予測判別式に代入する。一種類の特定化合物から複数の誘導体を使用した場合でも、選択される特定化合物の数は一種類として扱う。

[0024] 前処理の際に、試料に、特定化合物の安定同位体および／または内部標準物質を混合することが好ましい。安定同位体を混合することにより、血液などの体液に含まれる特定化合物の絶対量を測定することができる。また、内部標準物質を混合することにより、質量分析による定量化の精度を向上させることができる。安定同位体としては、分子内において一つ以上の炭素原子、水素原子、窒素原子または酸素原子が、炭素安定同位体（１２Ｃ、１３Ｃ）、水素安定同位体（１Ｈ、２Ｈ、Ｄ）、窒素安定同位体（１４Ｎ、１５Ｎ）、酸素安定同位体（１６Ｏ、１７Ｏ、１８Ｏ）に置換した化合物などが挙げられる。内部標準物質としては、体液に本来含まれていない物質であればよく、例えば、２－イソプロピルリンゴ酸、リビトール、トロパ酸などが挙げられる。

[0025] 前処理後の試料を、上記検出方法により検出する。検出方法の条件については、検出方法で使用される装置（例えば、ＧＣ／ＭＳ装置、ＬＣ／ＭＳ装置）が推奨する条件を参考に応じて適宜実施すればよい。

[0026] これにより、試料に含有される特定化合物のそれぞれの検出量が得られる。検出量は、検出方法や検出装置に応じて適宜決定されるが、例えば、濃度；マススペクトルまたはマスクロマトグラムなどのピーク面積・ピーク強度；光強度などとして出力される。この際、検出量は、変換してもよい。例え

ば、特定化合物の検出量が、マススペクトルのピーク面積として出力される場合には、そのピーク面積を、濃度に変換してもよい。すなわち、検出装置から直接出力された検出量のみならず、当該検出量を別のパラメータに変換した量も、第１の実施形態における「検出量」に含まれる。変換は、例えば、内部標準法、絶対検量線法などの公知の方法などが挙げられ、検出装置付属の解析機能、別の解析装置、手動などのいずれの手段を用いて変換してもよい。第１の実施形態では、検出量として、濃度を採用することが好ましく、血清１ｍＬ中に存在する特定化合物の濃度（μｇ）を採用することが特に好ましい。

[0027] （使用工程）

本工程では、前記検出工程によって得られた１４種類の検出量の全てを少なくとも使用する。具体的には、特定化合物における１４種類の検出量の全てを使用し、その使用結果に基づいて、将来において、被験者がＮＡＦＬＤに罹患するリスクを評価する。この使用によって、被験者に対して、ＮＡＦＬＤの発症リスクの高低が評価される

[0028] 例えば、被験者の試料から検出された特定化合物における全１４種類の検出量を、所定の式に使用する、具体的には、予測判別式に代入する。そして、得られた結果から、将来において被検者がＮＡＦＬＤを発症する可能性が高いか否かを評価する。

[0029] 予測判別式には、１４種類からなる特定化合物の検出量のそれぞれに、特定化合物ごとの所定の係数を乗じた値を合算した総和（具体的には、後述する式（１）の右辺第２項）が含まれる。すなわち、化合物（１４種類）の検出量ごとに、化合物ごとに予め決定された特有の係数を乗じる。これにより、化合物ごとに１４つの値が得られるため、これらの値を合算して総和を導出し、この総和を予測判別式に代入する。

[0030] このような予測判別式の一例としては、下記式（１）および（２）が挙げられる。

[0031]

[数1]

$$[\text{予測スコア}] = [\text{定数K}] + \Sigma([\text{各化合物の係数}] \times [\text{各化合物の検出量}]) \quad \cdots(1)$$

$$[\text{ハザード比}] = e^{[\text{予測スコア}]} \quad \cdots(2)$$

[0032] そして、予測判別式による算出結果、すなわちハザード比を、被験者が、将来（例えば、１～３年以内）にＮＡＦＬＤに罹患するか否かの判断基準にする。例えば、ハザード比が、４以上である場合、罹患するリスクが高いと判断し、ハザード比が、１以上４未満である場合、罹患するリスクが中程度と判断し、１未満である場合は、罹患する可能性が低いと判断する。

[0033] なお、定数Ｋ、および、各化合物の所定の係数（１４種類の係数）は、例えば、予め多量の健常者の試料およびＮＡＦＬＤ患者の試料を測定したデータを取得し、このデータを統計学的な機械学習法（ＬＡＳＳＯなど）を用いて算出・検証する方法により得られる。第１の実施形態では、発明者らが既に、健常者の３年以内のＮＡＦＬＤ罹患の追跡データを多量に採取して算出した結果として、後述する実施例の表２～８に記載しており、これらの定数Ｋおよび各化合物の係数を用いればよい。

[0034] そのほか、上記式（１）（２）によって算出されるハザード比を用いる以外の方法としては、例えば、(i)被験者の試料から検出された特定化合物の検出量を用いた値（被験者の値）と、試料採取後所定期間健常のままであった者、または、試料採取時には健常であったが所定期間以内にＮＡＦＬＤに罹患した者の試料から検出された特定化合物の検出量を用いた値（正常群の値、またはＮＡＦＬＤ予備群の値）と比較し、(ii)被験者の値が正常群の値、またはＮＡＦＬＤ予備群の値よりも高いかまたは低いかを基準にして、将来のＮＡＦＬＤ発症のリスクが高いまたは低いと判断することとしてもよい。具体的には、(i)被験者の検出量を上記式（１）右辺第２項に代入して得られた値と、正常群またはＮＡＦＬＤ予備群の検出量を上記式（１）右辺第２項に代入して得られた結果とを比較する。そして、(ii)被験者の値がＮＡＦＬ

Ｄ予備群の値（ＮＡＦＬＤ発症の閾値）と同等またはそれよりも高い（または、低い）場合は、被験者は、将来においてＮＡＦＬＤに発症するリスクが高いと判断し、被験者の値が正常群の値（正常の閾値）と同等またはそれよりも低い（または、高い）は、被験者は将来においてＮＡＦＬＤ発症リスクが低いと判断していてもよい。本使用工程の一部または全部は、コンピュータにより処理されてもよい。

[0035] 第１の実施形態の評価方法は、被験者が、将来において、ＮＡＦＬＤに罹患するか否かを予測することができる。この結果、被験者に対してＮＡＦＬＤの発症リスクの高低が評価される。そのため、例えば、医療従事者が、この判別方法実施による判断結果を医師に提示すれば、医師は、その判断結果に基づいて、受診者に対して、ＮＡＦＬＤ予防利用の方針に役立てることができる。具体的には、本評価方法の後、特に使用工程後において、治療工程を実施すればよい。治療工程としては、ＮＡＦＬＤの治療において公知方法が挙げられ、例えば、食事療法、運動療法、薬物療法、外科療法などが挙げられる。食事療法、運動療法、外科療法などは体重の減量を目的としたものが有効であり、薬物療法に用いられる投薬としては、例えば、抗酸化剤、糖尿病治療薬などが有効である。これら療法は、被験者の状況に応じて、適宜組み合わせて適用される。

[0036] ２．そのほかの実施形態

上記第１の実施形態では、１４種類の特定化合物の検出結果を用いているが、本発明は、３１種類の特定化合物の検出量を含んでいればよく、例えば、その他の化合物の検出量も加えていてもよい。すなわち、１５種類以上の化合物の検出量を用いていてもよい。以下に例示する。

[0037] ２－１．３１種類の特定化合物

本実施形態では、ＮＡＦＬＤの発症リスクを評価するためのバイオマーカーとして、乳酸、アラニン、アセチルグリシン、イソロイシン、プロリン、セリン、グルタル酸、α－ケトグルタル酸、クレアチニン、グルタミン酸、アスパラギン、フルクトース、尿酸およびトリプトファンからなる１４種類

の化合物に加えて、さらに、ピルビン酸、２－アミノ酪酸、コハク酸、スレオニン、デカン酸、メチオニン、フェニルアラニン、キシロース、アラビノース、α－アミノアジピン酸、リジン、１－ヘキサデカノール、チロシン、ミオイノシトール、ウリジン、グリシンおよびロイシンを使用するものである。すなわち、乳酸、アラニン、アセチルグリシン、イソロイシン、プロリン、セリン、グルタル酸、α－ケトグルタル酸、クレアチニン、グルタミン酸、アスパラギン、フルクトース、尿酸、トリプトファン、ピルビン酸、２－アミノ酪酸、コハク酸、スレオニン、デカン酸、メチオニン、フェニルアラニン、キシロース、アラビノース、α－アミノアジピン酸、リジン、１－ヘキサデカノール、チロシン、ミオイノシトール、ウリジン、グリシンおよびロイシンからなる３１種類の化合物をＮＡＦＬＤ発症リスク評価用のバイオマーカーとして用いる。これらの３１種類の化合物をまとめて、特定化合物とも称する。

[0038] これら３１種類の化合物をバイオマーカーとして使用すること以外は、上記実施形態と同様である。すなわち、本実施工程の評価方法では、第１の実施形態で上述したように、取得工程、検出工程および使用工程を備える。本実施形態においても、第１の実施形態と同様の採用効果を奏する。

[0039] なお、検出工程において、３１種類の特定化合物のトリメチルシリル化誘導体としては、上記１４種類の特定化合物のトリメチルシリル化誘導体に加えて、例えば、

トリメチルシリルピルビン酸－メチルオキシム(Pyruvic acid-methyloxime-TMS)、

ビス（トリメチルシリル）２－アミノ酪酸(2-Aminobutyric acid-2TMS)、

ビス（トリメチルシリル）コハク酸(Succinic acid-2TMS)、

トリス（トリメチルシリル）スレオニン(Threonine-3TMS)、

トリメチルシリルデカン酸(Decanoic acid-TMS)、

ビス（トリメチルシリル）メチオニン(Methionine-2TMS)、

ビス（トリメチルシリル）フェニルアラニン(Phenylalanine-2TMS)、

テトラキス（トリメチルシリル）キシロース－メチルオキシム(Xylose-methyloxime-4TMS)、
テトラキス（トリメチルシリル）アラビノース－メチルオキシム(Arabinose-methyloxime-4TMS)、
トリス（トリメチルシリル）α－アミノアジピン酸（Aminoadipic acid-3TMS）、
テトラキス（トリメチルシリル）リジン(Lysine-4TMS)、
トリメチルシリル１－ヘキサデカノール(1-Hexadecanol-TMS)、
トリス（トリメチルシリル）チロシン(Tyrosine-3TMS)、
ヘキサキス（トリメチルシリル）ミオイノシトール(myo-Inositol-6TMS)、
テトラキス（トリメチルシリル）ウリジン(Uridine-4TMS)、
ビス（トリメチルシリル）グリシン(Glycine-2TMS)および／またはトリス（トリメチルシリル）グリシン(Glycine-3TMS)、
ビス（トリメチルシリル）ロイシン(Leucine-2TMS)、
などが挙げられる。また、使用工程では、少なくとも３１種類の検出量を使用する。具体的には、少なくとも３１種類の特定化合物（またはその誘導体）の検出量（濃度など）のそれぞれに、特定化合物ごとの所定の係数を乗じた値を合算し、それによって得られた総和を予測判別式に使用すればよい。

[0040] ２－２．２１種類の特定化合物

本実施形態では、ＮＡＦＬＤの発症リスクを評価するためのバイオマーカーとして、乳酸、アラニン、アセチルグリシン、イソロイシン、プロリン、セリン、グルタル酸、α－ケトグルタル酸、クレアチニン、グルタミン酸、アスパラギン、フルクトース、尿酸およびトリプトファンからなる１４種類の化合物に加えて、さらに、３－ヒドロキシ酪酸、ロイシン、グリシン、メチオニン、グルコース、チロシンおよびミオ－イノシトールを使用するものである。すなわち、乳酸、アラニン、アセチルグリシン、イソロイシン、プロリン、セリン、グルタル酸、α－ケトグルタル酸、クレアチニン、グルタミン酸、アスパラギン、フルクトース、尿酸、トリプトファン、３－ヒドロ

キシ酪酸、ロイシン、グリシン、メチオニン、グルコース、チロシンおよびミオ－イノシトールからなる２１種類の化合物をＮＡＦＬＤ発症リスク評価用のバイオマーカーとして用いる。これらの２１種類の化合物をまとめて、特定化合物とも称する。

[0041] これら２１種類の化合物をバイオマーカーとして使用すること以外は、上記実施形態と同様である。すなわち、本実施工程の評価方法では、第１の実施形態で上述したように、取得工程、検出工程および使用工程を備える。本実施形態においても、第１の実施形態と同様の採用効果を奏する。

[0042] なお、検出工程において、２１種類の特定化合物のトリメチルシリル化誘導体としては、上記１４種類の特定化合物のトリメチルシリル化誘導体に加えて、例えば、

ビス（トリメチルシリル）３－ヒドロキシ酪酸(3-Hydroxybutyric acid-2TMS)、

ビス（トリメチルシリル）ロイシン(Leucine-2TMS)、

ビス（トリメチルシリル）グリシン(Glycine-2TMS)および／またはトリス（トリメチルシリル）グリシン(Glycine-3TMS)、

ビス（トリメチルシリル）メチオニン(Methionine-2TMS)、

ペンタキス（トリメチルシリル）グルコース－メチルオキシム(Glucose-methyloxime-5TMS)、

トリス（トリメチルシリル）チロシン(Tyrosine-3TMS)、

ヘキサキス（トリメチルシリル）ミオ－イノシトール(myo-Inositol-6TMS)

などが挙げられる。また、使用工程では、少なくとも２１種類の検出量を使用する。具体的には、少なくとも２１種類の特定化合物の検出量のそれぞれに、特定化合物ごとの所定の係数を乗じた値を合算し、それによって得られた総和を予測判別式に使用すればよい。

[0043] ２－３．１５種類の特定化合物

本実施形態では、ＮＡＦＬＤの発症リスクを評価するためのバイオマーカーとして、乳酸、アラニン、アセチルグリシン、イソロイシン、プロリン、

セリン、グルタル酸、α－ケトグルタル酸、クレアチニン、グルタミン酸、アスパラギン、フルクトース、尿酸およびトリプトファンからなる１４種類の化合物に加えて、さらに、グリシンを使用するものである。すなわち、乳酸、アラニン、アセチルグリシン、イソロイシン、プロリン、セリン、グルタル酸、α－ケトグルタル酸、クレアチニン、グルタミン酸、アスパラギン、フルクトース、尿酸、および、グリシンからなる１５種類の化合物をＮＡＦＬＤ発症リスク評価用のバイオマーカーとして用いる。これらの１５種類の化合物をまとめて、特定化合物とも称する。

[0044] これら１５種類の化合物をバイオマーカーとして使用すること以外は、上記実施形態と同様である。すなわち、本実施工程の評価方法では、第１の実施形態で上述したように、取得工程、検出工程および使用工程を備える。本実施形態においても、第１の実施形態と同様の採用効果を奏する。

[0045] なお、検出工程において、１５種類の特定化合物のトリメチルシリル化誘導体としては、上記１４種類の特定化合物のトリメチルシリル化誘導体に加えて、例えば、ビス（トリメチルシリル）グリシン(Glycine-2TMS)および／またはトリス（トリメチルシリル）グリシン(Glycine-3TMS)などが挙げられる。また、使用工程では、少なくとも１５種類の検出量を使用する。具体的には、少なくとも１５種類の特定化合物の検出量のそれぞれに、特定化合物ごとの所定の係数を乗じた値を合算し、それによって得られた総和を予測判別式に使用すればよい。

[0046] ３．態様

上述した例示的な実施形態は、以下の態様の具体例であることが当業者により理解される。

[0047] （第１項）一態様に係る非アルコール性脂肪肝疾患の発症リスク評価方法は、前記試料中の乳酸、アラニン、アセチルグリシン、イソロイシン、プロリン、セリン、グルタル酸、α－ケトグルタル酸、クレアチニン、グルタミン酸、アスパラギン、フルクトース、尿酸およびトリプトファンからなる１４種類の化合物を検出する検出工程と、前記検出工程によって得られた１４

種類の検出量の全てを使用する使用工程とを備えていてよい。この評価方法によれば、被験者が、将来において、ＮＡＦＬＤに罹患するか否かを予測することができる。

[0048] （第２項）第１項に記載の評価方法において、前記１４種類の化合物に加えて、グリシンを検出し、前記使用工程において、前記検出工程によって得られた１５種類の検出量の全てを使用してもよい。この評価方法によれば、ＮＡＦＬＤに罹患するか否かをより一層確実に予測することができる。

[0049] （第３項）第１項に記載の評価方法において、前記１４種類の化合物に加えて、３－ヒドロキシ酪酸、ロイシン、グリシン、メチオニン、グルコース、チロシンおよびミオ－イノシトールを検出し、前記使用工程において、前記検出工程によって得られた２１種類の検出量の全てを使用してもよい。この評価方法によれば、ＮＡＦＬＤに罹患するか否かをより一層確実に予測することができる。

[0050] （第４項）第１項に記載の評価方法において、前記１４種類の化合物に加えて、ピルビン酸、２－アミノ酪酸、コハク酸、スレオニン、デカン酸、メチオニン、フェニルアラニン、キシロース、アラビノース、α－アミノアジピン酸、リジン、１－ヘキサデカノール、チロシン、ミオイノシトール、ウリジン、グリシンおよびロイシンを検出し、前記使用工程において、前記検出工程によって得られた３１種類の検出量の全てを使用してもよい。この評価方法によれば、ＮＡＦＬＤに罹患するか否かをより一層確実に予測することができる。

[0051] （第５項）第１項～第４項のいずれか一項に記載の評価方法において、前記使用工程では、前記検出工程によって得られた前記１４種類の化合物の検出量のそれぞれに、前記１４種類の化合物ごとの所定の係数を乗じた値を少なくとも合算してもよい。この評価方法によれば、被験者が、将来において、ＮＡＦＬＤに罹患するか否かをより一層確実に予測することができる。

[0052] （第６項）第１項～第５項のいずれか一項に記載の評価方法において、前記検出工程では、前記１４種類の化合物またはこれらの誘導体の濃度を得て

もよい。この評価方法によれば、被験者が、将来において、ＮＡＦＬＤに罹患するか否かをより一層確実に予測することができる。

[0053] （第７項）第６項に記載の評価方法において、前記誘導体は、シリル化、アシル化、エステル化またはアルキル化によって誘導体化されたものであってもよい。この評価方法によれば、感度よく誘導体を検出できるため、ＮＡＦＬＤに罹患するか否かをより一層正確に予測することができる。

[0054] （第８項）第１項～第７項のいずれか一項に記載の評価方法において、前記検出工程は、ガスクロマトグラフィ、液体クロマトグラフィ、質量分析、ガスクロマトグラフィ／質量分析、液体クロマトグラフィ／質量分析、核磁気共鳴分光法、または、免疫学的検出法により実施されてもよい。この評価方法によれば、感度が良好な検出方法を使用しているため、ＮＡＦＬＤに罹患するか否かをより一層正確に予測することができる。

[0055] （第９項）第１項～第８項のいずれか一項に記載の評価方法において、前記体液は、血液であってもよい。この評価方法によれば、測定試料が入手し易く、被験者への侵襲性が低いため、被験者の診断に対する負担を軽減することができる。

[0056] （第１０項）一態様に係る非アルコール性脂肪肝疾発症リスク評価用バイオマーカーは、乳酸、アラニン、アセチルグリシン、イソロイシン、プロリン、セリン、グルタル酸、α－ケトグルタル酸、クレアチニン、グルタミン酸、アスパラギン、フルクトース、尿酸およびトリプトファンからなる１４種類の化合物を含んでいてもよい。このバイオマーカーによれば、被験者が、将来において、ＮＡＦＬＤに罹患するか否かを予測することができる。

[0057] （第１１項）第１０項に記載の非アルコール性脂肪肝疾発症リスク評価用バイオマーカーは、乳酸、アラニン、アセチルグリシン、イソロイシン、プロリン、セリン、グルタル酸、α－ケトグルタル酸、クレアチニン、グルタミン酸、アスパラギン、フルクトース、尿酸、トリプトファン、および、グリシンからなる１５種類の化合物を含んでいてもよい。このバイオマーカーによれば、ＮＡＦＬＤに罹患するか否かをより一層確実に予測することがで

きる。

[0058] （第１２項）第１０項に記載の非アルコール性脂肪肝疾発症リスク評価用バイオマーカーは、乳酸、アラニン、アセチルグリシン、イソロイシン、プロリン、セリン、グルタル酸、α－ケトグルタル酸、クレアチニン、グルタミン酸、アスパラギン、フルクトース、尿酸、トリプトファン、３－ヒドロキシ酪酸、ロイシン、グリシン、メチオニン、グルコース、チロシンおよびミオ－イノシトールからなる２１種類の化合物を含んでいてもよい。このバイオマーカーによれば、ＮＡＦＬＤに罹患するか否かをより一層確実に予測することができる。

[0059] （第１３項）第１０項に記載の非アルコール性脂肪肝疾発症リスク評価用バイオマーカーは、乳酸、アラニン、アセチルグリシン、イソロイシン、プロリン、セリン、グルタル酸、α－ケトグルタル酸、クレアチニン、グルタミン酸、アスパラギン、フルクトース、尿酸、トリプトファン、ピルビン酸、２－アミノ酪酸、コハク酸、スレオニン、デカン酸、メチオニン、フェニルアラニン、キシロース、アラビノース、α－アミノアジピン酸、リジン、１－ヘキサデカノール、チロシン、ミオイノシトール、ウリジン、グリシンおよびロイシンからなる３１種類の化合物を含んでいてもよい。このバイオマーカーによれば、ＮＡＦＬＤに罹患するか否かをより一層確実に予測することができる。

[0060] ＜実施例＞

以下の実施例では、健常者が３年以内に腹部超音波所見によりＮＡＦＬＤと診断された患者から得られた血清（ＮＡＦＬＤ予備群）と、３年間健常者である患者からから得られた血清（正常群）とを用いてＧＣ／ＭＳを実施し、ＮＡＦＬＤ予備群と正常群とにおいて、濃度の異なる血清中の成分を探索した分析結果を説明する。

[0061] （対象者）

２０１５年１０月から２０１６年９月までに病院を訪れた日本人の人間ドック受診者からランダムに抽出した者のうち、採用基準を満たした４，４９

５人の血清を試料として用いた。採用基準は、以下の（１）～（５）のいずれにも該当しないこととした。

（１）研究参加に不同意を表明した者

（２）アルコール摂取量において、男性：エタノール換算３０ｇ／日以上、女性：エタノール換算２０ｇ／日以上である者

（３）肝疾患で治療中の現病歴を有する者

（４）糖尿病、脂質異常症、高尿酸血症の少なくとも一つについて治療中の現病歴を有する者

（５）悪性疾患について治療中の現病歴を有する者

[0062] 上記採用基準を満たした者はいずれも人間ドックで腹部超音波所見が得られており、病院内の研究倫理審査委員会の承諾の下に臨床情報と血清を分析した結果を突合した。

[0063] （前処理）

対象者から採血した後、遠心分離にて血清を抽出し、採血から６時間以内に－８０℃で冷凍した。冷凍保存後の血清を２５℃で５分間放置して解凍した。解凍後の血清を遠心分離に供し、その上清を、規定量の４０種の安定同位体が入ったチューブに採取した（表１は、測定対象である代謝物４０種類に対応する安定同位体のうち、３１種類の代謝物に対応する安定同位体のみを表記した）。採取した血清に、クロロホルム混合溶媒（メタノール／水／クロロホルム＝２．５：１：１）２５０μＬ、内部標準溶液（２－イソプロピルリンゴ酸；０．１ｍｇ／ｍＬ）６μＬを混合および振とうし、遠心分離を実施した後、さらに、水１４０μＬを混合および振とうし、遠心分離を実施して、内部標準・安定同位体含有の試料を得た。この試料１８０μＬを、室温、６０分間の条件で遠心エバポレーターを用いて濃縮し、－８０℃に３０分放置して凍結させた後、凍結乾燥機を用いて一晩乾燥させた。

[0064]

[表1]

Stable Isotope
Pyruvic acid (1-13C, 99%)
Sodium L-Lactate-2-d1
DL-2-Aminobutyric-d6 Acid
N-Acetyl-d3-glycine-2,2-d2
Succinic acid (13C4, 99%)
Pentanedioic-d6 Acid
Decanoic acid-1,2-13C2, 99 atom % 13C
α-Ketoglutaric acid (13C5, 99%)
Creatinine-d3 (methyl-d3)
D-Xylose (1-13C5, 99%)
D-Arabinose-$^{13}C_5$, ≥99% ^{13}C, ≥98% (CP)
DL-α-Aminoadipic-2,5,5-d3 Acid
D-Fructose (13C6, 99%)
n-Hexadecyl-1,1,2,2-d4 Alcohol
Uric acid (1,3-15N2, 98%)
myo-Inositol-1,2,3,4,5,6-d6
Uridine-5,6-d2
L-Alanine (15N, 98%)
Glycine (15N, 98%)
L-Leucine (15N, 98%)
L-Isoleucine (15N, 98%)
L-Proline (15N, 98%)
L-Serine (15N, 98%)
L-Threonine (15N, 98%)
L-Methionine (15N, 98%)
L-Glutamic acid (15N, 98%)
L-Phenylalanine (15N, 98%)
L-Asparagine·H2O (15N2, 98%)
L-Lysine·2HCl (15N2, 98%)
L-Tyrosine (15N, 98%)
L-Tryptophan (15N2, 98%)

[0065] （誘導体化）

乾燥させた試料に、メトキシアミン塩酸塩を含むピリジン溶液（メトキシアミン塩酸塩；２０ｍｇ／ｍＬ）８０μＬ、および、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４０μＬを順次混合および振とうした後、遠心分離を実施した。これにより得られた試料の上清５０μＬを、ＧＣ／ＭＳのオートサンプラー内に設置した。

[0066] （ＧＣ／ＭＳ測定）

下記の条件で、試料に対して、ガスクロマトグラフィ質量分析法を実施した。

＜ガスクロマトグラフィの条件＞

システム：ＧＣＭＳ－ＴＱ８０４０（島津製作所社製）

カラムオーブン温度：８０℃

インジェクション温度：２８０℃

インジェクションモード：スプリット導入法

キャリアガス：ヘリウム

キャリアガス流量：３９ｃｍ／ｓｅｃ

分離カラム：ＤＢ－５（アジレントテクノロジー社製）

固定相：（５％－フェニル）－メチルポリシロキサン（無極性）

カラム長さ：３０．０ｍ、カラム内径：０．２５ｍｍ、カラム膜厚：１．００μｍ

カラム温度プログラム：８０℃（０分）／８０℃（２．５分）／２８０℃（１８．５分）／２８０℃（２３．０分）

＜質量分析の条件＞

システム：ＧＣＭＳ－ＴＱ８０４０（島津製作所社製）

イオン源温度：２００℃

インターフェイス温度：２５０℃

検出器電圧：０．２ｋＶ

測定モード：ＭＲＭモード

走査範囲：ｍ／ｚ　８２－５００

[0067] （検出量の算出）

各保持時間においてｍ／ｚを走査して得られた検出強度から、各保持時間におけるマススペクトルを出力した。過去に得られた血清試料におけるマススペクトルのデータに基づいて、マススペクトルにおける各ピークに対応する代謝物（４０種）とその代謝物に対応する安定同位体を同定した。各代謝物に対応する検出強度を、各代謝物に対応する安定同位体の検出強度を用いて標準化して、試料における濃度（単位μｇ／ｍＬ）を、検出量として算出した。

[0068] （データ解析）

臨床診断情報およびＧＣ／ＭＳにより得られた検出量をもとに、正常群と発症群とが判別可能となる代謝物の組み合わせを、機械学習手法の１つであるＬＡＳＳＯを用いて、検討した。具体的には、ＬＡＳＳＯ実行前に、被験者をトレーニングセットおよびテストセットの２つのグループに分け、トレーニングセットで予測判別式を開発し、テストセットにおいてその検証（バリデーション）を実施した。ＬＡＳＳＯ実行では、１０分割交差検証を実装したロジスティック回帰を適用した。

[0069] その結果、判別可能な代謝物として、下記表２に示すように、３１種の化合物が選出され、これらの回帰係数が算出され、予測判別式が下記式（１）（２）に記載の通り導出され、ハザード比と発症率との関係が表３の通り算出された。なお、予測判別式については、所定の定数（右辺第１項）と、各係数を乗じた各化合物検出量の総和（右辺第２項）とを合算した式が、予測スコア（下記式（１））となっている。この予測スコアは、対数ハザード比であり、１ｅ［予測スコア］を計算することにより、ハザード比（ＮＡＦＬＤ発症の一般集団におけるハザードの中央値に対するハザード比）が導かれる。このハザード比は、一般集団のハザードをｒｅｆｅｒｅｎｃｅ（ハザード比＝１）とした場合の個人ごとのハザード比であって、高値を示すほどＮＡＦＬＤに発症するリスクが高いことを示す。具体的な判断基準は、表３に

示す。

[0070] [表2]

代謝物	係数	代謝物	係数
定数K	-2.40391	Glutamic acid-3TMS	2.75080
Pyruvic acid-methyloxime-TMS	-3.62478	Phenylalanine-2TMS	0.31922
Lactic acid-2TMS	0.49902	Xylose-methyloxime-4TMS	-14.35933
Alanine-2TMS	1.29249	Arabinose-methyloxime-4TMS	-0.01182
2-Aminobutyric acid-2TMS	-0.33578	Asparagine-3TMS	-0.41965
N-Acetylglycine-TMS	-0.01481	α-Aminoadipic acid-3TMS	-0.01972
Isoleucine-2TMS	0.75419	Fructose-methyloxime-5TMS(2)	-0.03558
Succinic acid-2TMS	0.04018	Lysine-4TMS	-0.08390
Proline-2TMS	0.03107	1-Hexadecanol-TMS	1.51069
Serine-3TMS	-0.80263	Tyrosine-3TMS	0.37611
Threonine-3TMS	0.96646	Uric acid-4TMS	0.25277
Glutaric acid-2TMS	-0.03950	myo-Inositol-6TMS	-2.25953
Decanoic acid-TMS	-0.77793	Uridine-4TMS	-0.12601
Methionine-2TMS	-0.35423	Glycine-2TMS	-0.19429
α-Ketoglutaric acid-methyloxime-2TMS	-0.18526	Leucine-2TMS	-0.00320
Creatinine-3TMS	0.39279	Tryptophan-2TMS	-0.20818

[0071] [数2]

$$[\text{予測スコア}] = [\text{定数K}] + \Sigma([\text{各化合物の係数}] \times [\text{各化合物の検出量}]) \quad \cdots(1)$$

$$[\text{ハザード比}] = e^{[\text{予測スコア}]} \quad \cdots(2)$$

[0072] 表２のＴＭＳは、トリメチルシリル化誘導体(trimethylsilylated derivative)を示す。式１において、右辺第2項は、３１種の化合物の総和であり、定数K、および各化合物の係数は、表２に記載の通りであり、各化合物の検出量は、血清１ｍＬ中に存在する特定化合物の濃度μｇとした。

[0073]

[表3]

ハザード比	発症率/年	95%信頼区間		2年発症率	3年発症率
		下限	上限		
0.5以下	0.4%	0.1%	1.3%	0.8%	1.2%
0.5から1以下	1.1%	0.7%	1.8%	2.2%	3.2%
1から2以下	2.9%	2.1%	4.2%	5.8%	8.5%
2から4以下	7.6%	5.3%	10.8%	14.6%	21.1%
4より大きい	10.0%	5.9%	16.8%	19.0%	27.1%

[0074] 予測判別式について、時間依存性受信者動作特性（time-dependentＲＯＣ）分析を実施し、この結果を図１に示す。定量的評価のため、このときのＡＵＣが算出したところ、トレーニングセットおよびテストセットで、それぞれ、０．８０および０．７６という良好な値であった。このため、実施例の評価方法は、識別性能が良好であることが分かる。また、４，４９５人という多量の正常群およびＮＡＦＬＤ予備群のデータに基づいているため、信頼性が高い。

[0075] また、別のコホートとして、別時期に病院を訪れた日本人の人間ドック受診者からランダムに抽出した者のうち、上記採用基準を満たした８６２人の血清を試料として用いた。この別コホートについても、ＲＯＣ分析を実施し、この結果を図２に示す。このときのＡＵＣは、０．７７であった。

[0076] ＜実施例２＞

上記４０種の代謝物から不安定要素を有する６種の代謝物（Leucine-TMS, Decanoic acid-TMS,1-Hexadecanol-TMS,Uridine-4TMS,2-Aminoadipic acid-3TMS,Histidine-3TMS）を、分析の安定性をより高めるために除外した以外は上記実施例１（４，４９５人のコホート）と同様にして、３４種の代謝物（特定化合物）の値をＬＡＳＳＯ法に供した。その結果、判別可能な代謝物として、下記表４に示すように、２1種の代謝物が選出され、これらの回帰係数が算出され、また、下記表５に示すように、ハザード比と発症率との関係が

算出された。

[0077] [表4]

化合物	係数	化合物	係数
定数K	-0.87955	Methionine-2TMS	-0.02911
Lactic acid-2TMS	0.42707	α-Ketoglutaric acid-methyloxime-2TMS	0.84303
Alanine-2TMS	1.14453	Creatinine-3TMS	0.96745
3-Hydroxybutyric acid-2TMS	-0.02811	Glutamic acid-3TMS	2.42947
Leucine-2TMS	0.00606	Asparagine-3TMS	-0.63128
Acetylglycine-TMS	-1.42833	Fructose-methyloxime-5TMS	-26.44789
Isoleucine-2TMS	0.27348	Glucose-methyloxime-5TMS	1.76058
Proline-2TMS	0.11992	Tyrosine-3TMS	0.01743
Glycine-3TMS	-0.50910	Uric acid-4TMS	0.26972
Serine-3TMS	-0.29387	myo-Inositol-6TMS	-0.41412
Glutaric acid-2TMS	0.15692	Tryptophan-2TMS	-0.77229

[0078] [表5]

ハザード比	発症率／年	95%信頼区間		2年発症率	3年発症率
		下限	上限		
0.5以下	0.3%	0.1%	0.7%	0.5%	0.8%
0.5から1以下	1.2%	0.5%	1.8%	2.3%	3.5%
1から2以下	3.1%	2.3%	4.3%	6.2%	9.1%
2から4以下	6.8%	4.9%	9.5%	13.1%	19.0%
4より大きい	19.1%	13.8%	26.4%	34.5%	47.0%

[0079] 上記２１種の代謝物を用いて、実施例１と同様にしてＲＯＣ分析を実施し、この結果を図３に示す。このときのＡＵＣは、トレーニングセットおよびテストセットで、ともに０．７９という良好な値であった。

[0080] ＜実施例３＞

上記４０種の代謝物から不安定要素を有する６種の代謝物（Leucine-TMS, Decanoic acid-TMS,1-Hexadecanol-TMS,Uridine-4TMS,2-Aminoadipic acid-3TMS,Histidine-3TMS）を除外し、さらに、代謝物の数が少なくように設定したモードを実行した以外は上記実施例１（４，４９５人のコホート）と同様にして、１５種の代謝物（特定化合物）の値をＬＡＳＳＯ法に供した。その結果、判別可能な代謝物として、下記表６に示すように、１５種の代謝物が

選出され、これらの回帰係数が算出され、また、下記表７に示すように、ハザード比と発症率との関係が算出された。

[0081] [表6]

化合物	係数	化合物	係数
定数K	-0.93492	Glutaric acid-2TMS	0.10929
Lactic acid-2TMS	0.41309	α-Ketoglutaric acid-methyloxime-2TMS	0.27619
Alanine-2TMS	1.16622	Creatinine-3TMS	0.31658
Acetylglycine-TMS	-1.16451	Glutamic acid-3TMS	2.83357
Isoleucine-2TMS	0.01125	Asparagine-3TMS	-0.24578
Proline-2TMS	0.15301	Fructose-methyloxime-5TMS	-11.92795
Glycine-3TMS	-0.52138	Uric acid-4TMS	0.24772
Serine-3TMS	-0.23099	Tryptophan-2TMS	-0.57015

[0082] [表7]

ハザード比	発症率／年	95%信頼区間		2年発症率	3年発症率
		下限	上限		
0.5以下	0.3%	0.1%	0.9%	0.6%	1.0%
0.5から1以下	1.0%	0.7%	1.6%	2.1%	3.1%
1から2以下	3.9%	2.9%	5.1%	7.6%	11.2%
2から4以下	7.7%	5.6%	10.5%	14.8%	21.4%
4より大きい	15.2%	9.9%	23.4%	28.1%	39.0%

[0083] 上記１５種の代謝物を用いて、実施例１と同様にしてＲＯＣ分析を実施し、この結果を図４に示す。このときのＡＵＣは、トレーニングセットおよびテストセットで、ともに０．７８という良好な値であった。

[0084] ＜実施例４＞

実施例１～３で共通する１４種類の化合物を、判別可能な化合物として選出した（下記表８参照）。また、下記表９に示すように、ハザード比と発症率との関係を算出した。

[0085]

[表8]

化合物	係数	化合物	係数
定数K	2.16984		
Lactic acid-2TMS	0.41309	α-Ketoglutaric acid-methyloxime-2TMS	0.27619
Alanine-2TMS	1.16622	Creatinine-3TMS	0.31658
Acetylglycine-TMS	-1.16451	Glutamic acid-3TMS	2.83357
Isoleucine-2TMS	0.01125	Asparagine-3TMS	-0.24578
Proline-2TMS	0.15301	Fructose-methyloxime-5TMS	-11.92795
Serine-3TMS	-0.23099	Uric acid-4TMS	0.24772
Glutaric acid-2TMS	0.10929	Tryptophan-2TMS	-0.57015

[0086] [表9]

ハザード比	発症率／年	95%信頼区間		2年発症率	3年発症率
		下限	上限		
0.5以下	0.2%	0.1%	0.8%	0.5%	0.7%
0.5から1以下	1.1%	0.7%	1.7%	2.2%	3.3%
1から2以下	4.1%	3.1%	5.3%	8.0%	11.7%
2から4以下	7.3%	5.3%	10.1%	14.1%	20.4%
4より大きい	14.2%	9.0%	22.5%	26.4%	36.9%

[0087] 上記１４種類の特定化合物を用いて、実施例１と同様にしてＲＯＣ分析を実施し、この結果を図５に示す。このときのＡＵＣは、トレーニングセットおよびテストセットで、それぞれ、０．７７および０．７８という良好な値であった。

請求の範囲

[請求項1] 被験者の体液に由来する試料を取得する取得工程と、

前記試料中の乳酸、アラニン、アセチルグリシン、イソロイシン、プロリン、セリン、グルタル酸、α－ケトグルタル酸、クレアチニン、グルタミン酸、アスパラギン、フルクトース、尿酸およびトリプトファンからなる１４種類の化合物を検出する検出工程と、

前記検出工程によって得られた１４種類の検出量の全てを使用する使用工程と

を備える、非アルコール性脂肪肝疾患の発症リスク評価方法。

[請求項2] 前記検出工程において、前記１４種類の化合物に加えてグリシンを検出し、

前記使用工程において、前記検出工程によって得られた１５種類の検出量の全てを使用する、請求項１に記載の発症リスク評価方法。

[請求項3] 前記検出工程において、前記１４種類の化合物に加えて、３－ヒドロキシ酪酸、ロイシン、グリシン、メチオニン、グルコース、チロシンおよびミオ－イノシトールを検出し、

前記使用工程において、前記検出工程によって得られた２１種類の検出量の全てを使用する、請求項１に記載の発症リスク評価方法。

[請求項4] 前記検出工程において、前記１４種類の化合物に加えて、ピルビン酸、２－アミノ酪酸、コハク酸、スレオニン、デカン酸、メチオニン、フェニルアラニン、キシロース、アラビノース、α－アミノアジピン酸、リジン、１－ヘキサデカノール、チロシン、ミオイノシトール、ウリジン、グリシンおよびロイシンを検出し、

前記使用工程において、前記検出工程によって得られた３１種類の検出量の全てを使用する、請求項１に記載の発症リスク評価方法。

[請求項5] 前記使用工程では、前記１４種類の化合物の検出量のそれぞれに、前記１４種類の化合物ごとの所定の係数を乗じた値を少なくとも合算する、請求項１に記載の発症リスク評価方法。

[請求項6] 前記検出工程では、前記１４種類の化合物またはこれらの誘導体の濃度を得る、請求項１に記載の発症リスク評価方法。

[請求項7] 前記誘導体は、シリル化、アシル化、エステル化またはアルキル化によって誘導体化されたものである、請求項６に記載の発症リスク評価方法。

[請求項8] 前記検出工程は、ガスクロマトグラフィ、液体クロマトグラフィ、質量分析、ガスクロマトグラフィ／質量分析、液体クロマトグラフィ／質量分析、核磁気共鳴分光法、または、免疫学的検出法により実施される、請求項１に記載の発症リスク評価方法。

[請求項9] 前記体液は、血液である、請求項１に記載の発症リスク評価方法。

[請求項10] 乳酸、アラニン、アセチルグリシン、イソロイシン、プロリン、セリン、グルタル酸、α－ケトグルタル酸、クレアチニン、グルタミン酸、アスパラギン、フルクトース、尿酸およびトリプトファンからなる１４種類の化合物を含む、非アルコール性脂肪肝疾発症リスク評価用バイオマーカー。

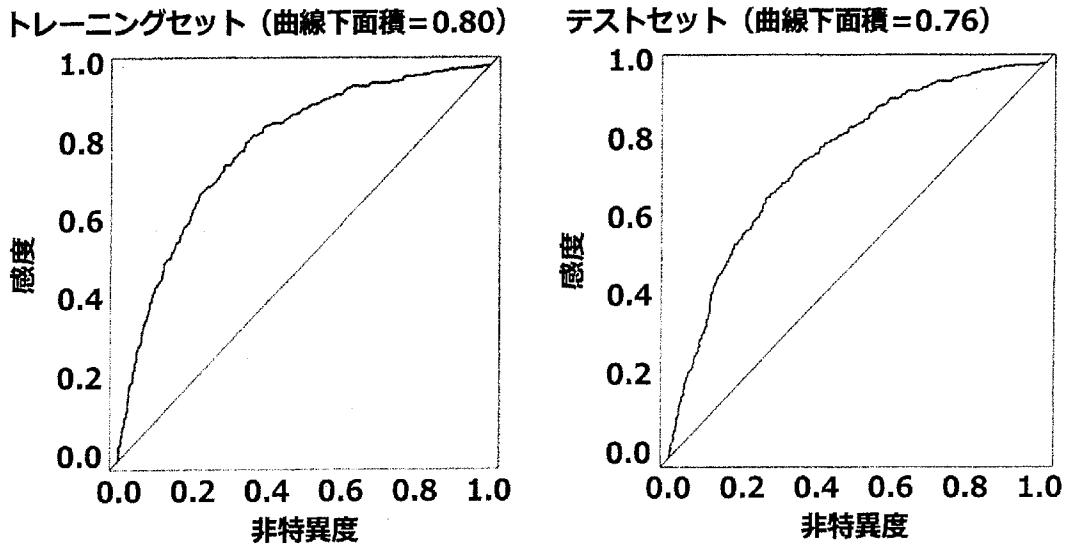
[請求項11] 乳酸、アラニン、アセチルグリシン、イソロイシン、プロリン、セリン、グルタル酸、α－ケトグルタル酸、クレアチニン、グルタミン酸、アスパラギン、フルクトース、尿酸、トリプトファンおよびグリシンからなる１５種類の化合物を含む、請求項１０に記載のバイオマーカー。

[請求項12] 乳酸、アラニン、アセチルグリシン、イソロイシン、プロリン、セリン、グルタル酸、α－ケトグルタル酸、クレアチニン、グルタミン酸、アスパラギン、フルクトース、尿酸、トリプトファン、３－ヒドロキシ酪酸、ロイシン、グリシン、メチオニン、グルコース、チロシンおよびミオ－イノシトールからなる２１種類の化合物を含む、請求項１０に記載のバイオマーカー。

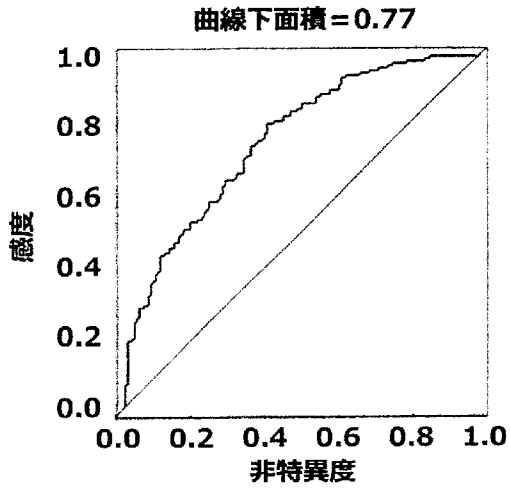
[請求項13] 乳酸、アラニン、アセチルグリシン、イソロイシン、プロリン、セリン、グルタル酸、α－ケトグルタル酸、クレアチニン、グルタミン

酸、アスパラギン、フルクトース、尿酸、トリプトファン、ピルビン酸、２－アミノ酪酸、コハク酸、スレオニン、デカン酸、メチオニン、フェニルアラニン、キシロース、アラビノース、α－アミノアジピン酸、リジン、１－ヘキサデカノール、チロシン、ミオイノシトール、ウリジン、グリシンおよびロイシンからなる３１種類の化合物を含む、請求項１０に記載のバイオマーカー。

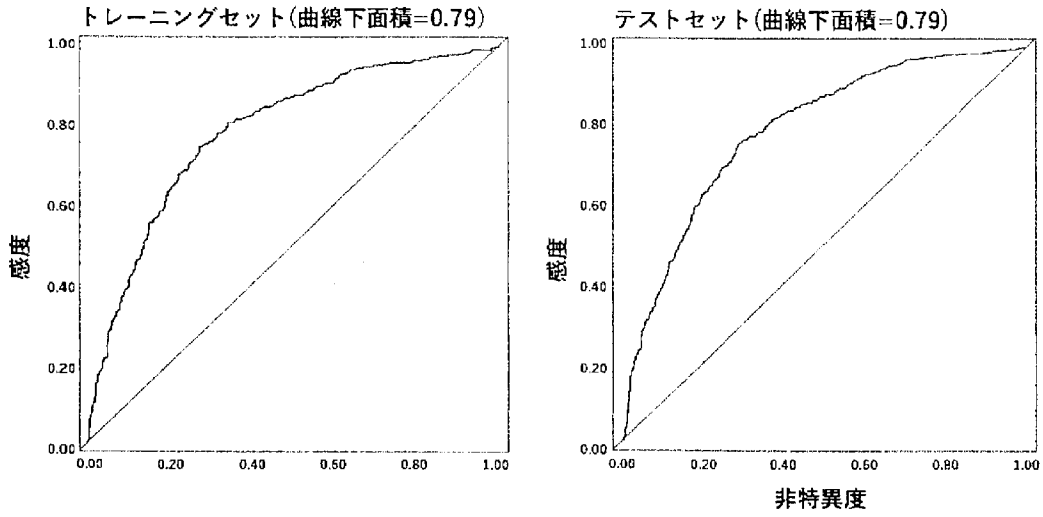
[図1]


トレーニングセット（曲線下面積＝0.80）
感度
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0.0 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0
非特異度
テストセット（曲線下面積＝0.76）
感度
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0.0 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0
非特異度

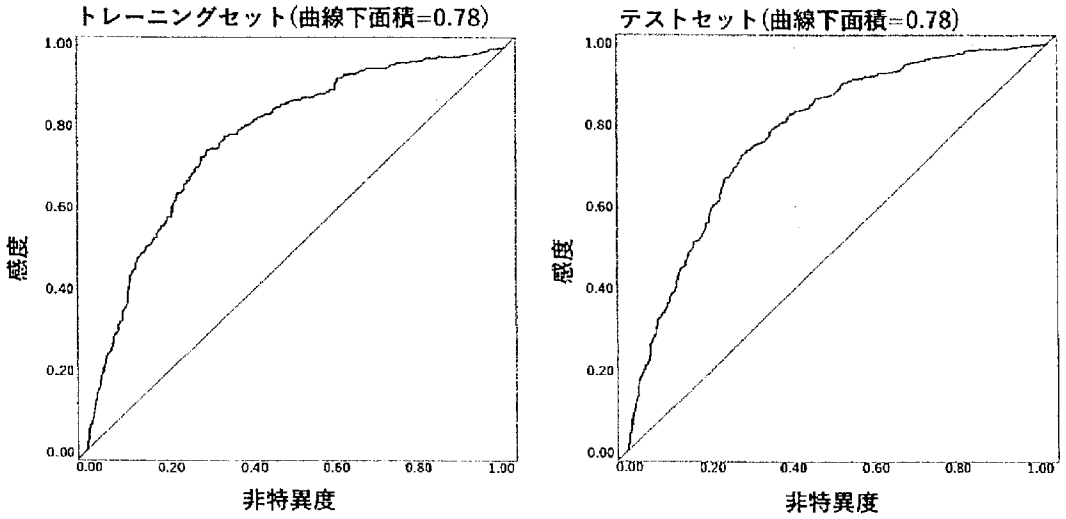
[図2]


曲線下面積＝0.77
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
感度
0.0 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0
非特異度

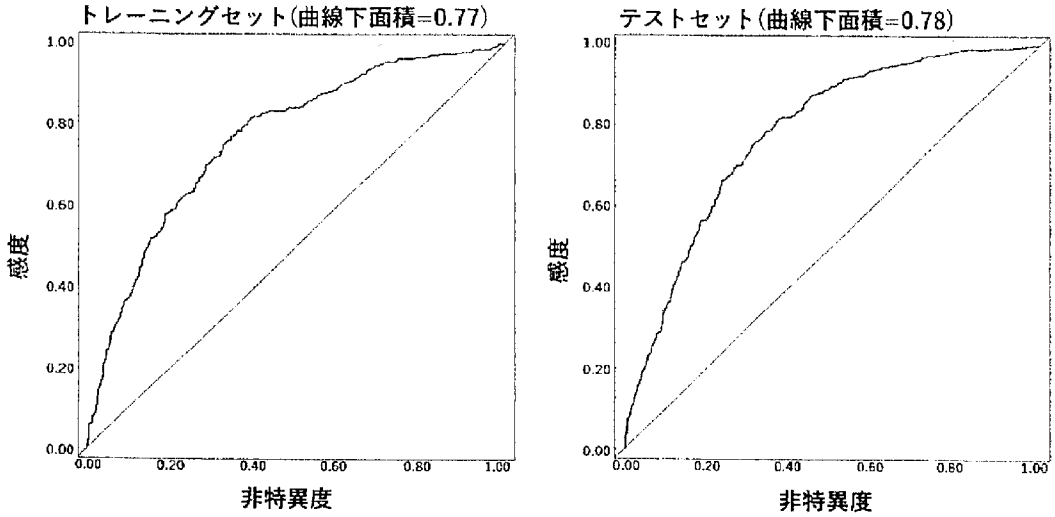
[図3]


トレーニングセット(曲線下面積=0.79)
テストセット(曲線下面積=0.79)
感度
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
0.00 0.20 0.40 0.60 0.80 1.00
非特異度

[図4]


トレーニングセット(曲線下面積=0.78)
テストセット(曲線下面積=0.78)
感度
非特異度
0.00
0.20
0.40
0.60
0.80
1.00

[図5]


トレーニングセット(曲線下面積=0.77)
テストセット(曲線下面積=0.78)
感度
非特異度
0.00
0.20
0.40
0.60
0.80
1.00

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/017846

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/50(2006.01)i
FI: G01N33/50 D

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N33/50

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 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2020/066162 A1 (SHIMADZU CORPORATION) 02 April 2020 (2020-04-02) paragraphs [0020]-[0027], [0034]-[0056]	1-13
Y	WO 2013/002381 A1 (AJINOMOTO CO., INC.) 03 January 2013 (2013-01-03) paragraphs [0017], [0021], [0027], [0080], [0084]	1-13
Y	JP 2016-065873 A (METANOMICS HEALTH GMBH) 28 April 2016 (2016-04-28) pp. 26-38, tables 1A-5A	1-13
Y	JP 2018-502286 A (METABOLON, INC.) 25 January 2018 (2018-01-25) paragraphs [0119]-[0120], [0144], [0151], [0160], [0171], [0177], [0190]-[0192], tables 2, 3, 13, 18, 24, 30, 41	1-13

☐ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"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	Date of mailing of the international search report
13 June 2024	**25 June 2024**

Name and mailing address of the ISA/JP	Authorized officer
Japan Patent Office (ISA/JP) **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/017846

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2020/066162 A1	02 April 2020	(Family: none)	
WO 2013/002381 A1	03 January 2013	US 2014/0113378 A1 in particular, abstract, claims	
JP 2016-065873 A	28 April 2016	US 2013/0126722 A1 in particular, paragraphs [0011]-[0015], tables 1A-5A EP 2863227 A1	
JP 2018-502286 A	25 January 2018	US 2017/0370954 A1 in particular, tables 2, 3, 13, 18, 24, 30, 41 CN 107002113 A	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/017846

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

G01N 33/50(2006.01)i
FI: G01N33/50 D

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

G01N33/50

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	１９７１－２０２４年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２４年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２４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）

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
Y	WO 2020/066162 A1 (株式会社島津製作所) 02.04.2020 (2020-04-02) [0020]-[0027],[0034]-[0056]	1-13
Y	WO 2013/002381 A1 (味の素株式会社) 03.01.2013 (2013-01-03) [0017],[0021],[0027],[0080],[0084]	1-13
Y	JP 2016-065873 A (メタノミクス ヘルス ゲーエムベーハー) 28.04.2016 (2016-04-28) p26-38,[表１A]～[表5A]	1-13
Y	JP 2018-502286 A (メタボロン, インコーポレイテッド) 25.01.2018 (2018-01-25) [0119]-[0120],[0144],[0151],[0160],[0171],[0177],[0190]-[0192],表2,3,13,18,24,30,41	1-13

☐ 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
“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
“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抵触するものではなく、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	国際調査報告の発送日
13.06.2024	25.06.2024

名称及びあて先

日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）

中村　直子 2J 4406

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/017846

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2020/066162 A1	02.04.2020	（ファミリーなし）	
WO 2013/002381 A1	03.01.2013	US 2014/0113378 A1 特に、abstract,claims	
JP 2016-065873 A	28.04.2016	US 2013/0126722 A1 特に、p11-15, table1A-5A EP 2863227 A1	
JP 2018-502286 A	25.01.2018	US 2017/0370954 A1 特に、table2,3,13,18,24,30,41 CN 107002113 A	