(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
2011 年 3 月 10 日(10.03.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/027573 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 33/50 (2006.01) *G01N 33/15* (2006.01)
G01N 27/62 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2010/005434

(22) 国際出願日: 2010 年 9 月 3 日(03.09.2010)

(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 2009-205033 2009 年 9 月 4 日(04.09.2009) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人東北大学 **(TOHOKU UNIVERSITY)** [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目１番１号 Miyagi (JP). 学校法人 慶應義塾 **(KEIO UNIVERSITY)** [JP/JP]; 〒1088345 東京都港区三田二丁目１５番４５号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 阿部 高明 **(ABE, Takaaki)** [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目１番１号国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 曽我 朋義 **(SOGA, Tomoyoshi)** [JP/JP]; 〒9970017 山形県鶴岡市大宝寺字日本国４０３－１慶應義塾大学 先端生命科学研究所内 Yamagata (JP).

(74) 代理人: 廣田 雅紀 **(HIROTA, Masanori)**; 〒1070052 東京都港区赤坂二丁目８番５号若林ビル３階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

(54) Title: NOVEL RENAL DISEASE MARKER SUBSTANCE IN HUMAN

(54) 発明の名称 : ヒトにおける新たな腎疾患マーカー物質

(57) Abstract: Disclosed are: a method for accurately detecting a renal disease that cannot be detected by various conventional renal disease test methods, with implementing reduced burden on a subject (a donor of a test sample); a method for determining an early renal disease, which focuses on a renal disease marker substance that has a small blind GFR area; and a method for screening for a novel prophylactic/therapeutic agent for renal diseases, which can screen a novel prophylactic/therapeutic agent for renal diseases with high efficiency and focuses on a novel renal disease marker substance to which attention has not been given heretofore. These methods employ a step of detecting or quantifying at least one above-mentioned renal disease marker substance that occurs in a blood sample to be tested.

(57) 要約: 本発明は、これまでの腎疾患に対する様々な検査手段では検出することができなかった腎疾患についても、正確にかつ被験者（被検試料の提供者）への負担が少なく、腎疾患を判定することのできる方法を提供することを目的とする。また、本発明は、ブラインドＧＦＲエリアの少ない腎疾患マーカー物質に着目した、早期腎疾患を判定することのできる方法を提供することを目的とする。また、本発明は、これまでに着目されていなかった新たな腎疾患マーカー物質に着目した新規な腎疾患予防・治療剤を効率よくスクリーニングすることができる新たな腎疾患予防・治療剤のスクリーニング方法を提供することを目的とする。本発明は、これらの目的を達成するために、被検血液試料中に存在する、１種又は２種以上の本件腎疾患マーカー物質を検出又は定量する工程を利用する。

WO 2011/027573 A1

明　細　書

発明の名称 ： ヒトにおける新たな腎疾患マーカー物質

技術分野

[0001]　本発明は、ヒトにおける新たな腎疾患マーカー物質を利用した腎疾患の判定方法や、かかる腎疾患マーカー物質を利用した腎疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法に関する。

背景技術

[0002]　腎不全患者等の腎疾患を有する患者、特に腎透析を受ける患者の数は年々増加の一途を辿っており、現在２０万人の患者が維持透析治療を行っており、さらに毎年３万人以上が新たに透析導入に至っている。透析療法には、一人あたり年間約５００万円の費用がかかるため、２０万人に対して約１兆円の医療費が恒常的に必要となっている。また、近年、慢性腎臓病（Chronic Kidney Disease：ＣＫＤ）という疾患概念が提唱され、その予防・治療の重要性に対する認識が高まりを見せている。ＣＫＤはCommon Diseaseであり、糸球体濾過量（glomerular filtration rate:ＧＦＲ）６０未満の人口が１９２６万人にも上ることから、ＣＫＤ対策が急務の課題となっている。以上のような状況下において、腎不全やＣＫＤ等の腎疾患の症状の予防法や、そのような症状を緩和し、透析導入を遅らせる治療法が開発されれば、患者のＱＯＬ（クオリティオブライフ）に資するだけでなく、医療費の大幅な削減が可能となり社会に大きく貢献することが出来る。

[0003]　腎不全に罹患すると、健常の場合では腎臓より排泄される様々な物質が体内に蓄積する。これらの物質は、腎不全の病態を診断するマーカー物質として利用されることもある。例えば、尿中に排泄されるアルブミン等の腎疾患マーカータンパク質の増加を指標として腎疾患の検出・診断する方法等が一般的に用いられている。この他の方法として、例えば、腎疾患患者の血液中でヒトリポカリン型プロスタグランジンＤ合成酵素の濃度が上昇することを利用した腎疾患の検出方法（特許文献１参照）や、腎不全等の患者の血液中

や尿中でＥＮＤＯ１８０受容体ポリペプチドの濃度が上昇することを利用した腎症の診断方法（特許文献２参照）が知られている。

[0004] また、腎不全に罹患すると体内に蓄積する前述の物質の中でも、生体に毒性を有する物質は、いわゆる腎不全物質と呼ばれ、腎不全の病態自体を悪化させる物質として報告されてきた。しかしながら現在使用されているクレアチニン（creatinine）などの腎不全マーカー物質は腎機能の一部である糸球体濾過量（ＧＦＲ）を反映した物質がほとんどであり、尿細管機能などの他の腎機能を反映したものは少ない。また、クレアチニンの場合、腎機能を反映しないクレアチニンブラインドＧＦＲエリア（腎機能が悪化してきても、クレアチニンの上昇がまだ認められない時期）があるため、腎不全マーカー物質として十分ではなかった。さらに既存のマーカー物質では、腎不全の多彩な症状を一元的に評価する事は困難である。また、腎不全の悪化に関与する物質が何であるか、及び、腎不全悪化のメカニズムには不明な点が多かった。

[0005] 一方、キャピラリー電気泳動質量分析計（capillary electrophoresis mass spectrometry：ＣＥ－ＭＳ）は近年開発され、少量のサンプルから５００種類以上の物質を同時測定できる新たなシステムである。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開２００３－１４６９８０号公報

特許文献2：特表２００７－５１９３９４号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明の課題は、これまでの腎疾患に対する様々な検査手段では検出することができなかった腎疾患についても、正確にかつ被験者（被検試料の提供者）への負担が少なく、腎疾患を判定することのできる方法を提供することにある。また、本発明の別の課題は、ブラインドＧＦＲエリアの少ない腎疾

患マーカー物質に着目した、早期腎疾患を判定することのできる方法を提供することにある。また、本発明の別の課題は、これまでに着目されていなかった新たな腎疾患マーカー物質に着目した新規な腎疾患予防・治療剤を効率よくスクリーニングすることができる新たな腎疾患予防・治療剤のスクリーニング方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、腎疾患患者の血漿中の物質（陽イオン物質及び陰イオン物質）をＣＥ－ＭＳを用いて網羅的に解析し、推定糸球体濾過量（estimated glomerular filtration rate: ｅＧＦＲ）との間に正又は負の相関が有意に認められる物質を同定した。本発明者らは、これらの物質の中に、腎疾患との関連がこれまで知られていなかった物質や、ｅＧＦＲとの相関式が一次式に近似する物質が存在していることを見い出し、本発明を完成するに至った。

[0009] すなわち、本発明は、（１）被検血液試料中に存在するシスーアコニット酸（cis-aconitate）を検出又は定量する工程を有することを特徴とする腎疾患の判定方法や、（２）被検血液試料中に存在するシスーアコニット酸の検出結果又は定量結果をコントロールと比較することにより、被検血液試料の提供者が腎疾患であるかどうか、又は、該提供者の腎疾患の症状の程度を評価する工程をさらに有することを特徴とする上記（１）に記載の腎疾患の判定方法や、（３）被検血液試料中に存在するシスーアコニット酸の濃度がコントロールよりも高い場合に、被検血液試料の提供者が腎疾患であると評価し、又は、被検血液試料中に存在するシスーアコニット酸の濃度がコントロールよりも高い程度を、該提供者の腎疾患の症状の重さの程度であると評価することを特徴とする上記（２）記載の腎疾患の判定方法や、（４）腎疾患が、腎不全であることを特徴とする上記（１）～（３）のいずれかに記載の腎疾患の判定方法や、（５）被検血液試料中に存在するシスーアコニット酸を検出又は定量する工程を有することを特徴とする早期腎疾患の判定方法や、（６）腎疾患が、腎不全であることを特徴とする上記（５）に記載の早期腎疾患の判定方法に関する。

[0010] また、本発明は、（７）以下の工程Ａ～Ｄを有することを特徴とする腎疾患予防・治療剤のスクリーニング方法；腎機能が低下した非ヒト動物に被検物質を投与する工程Ａ；該非ヒト動物から血液試料を採取する工程Ｂ；該血液試料中に存在するシスーアコニット酸を検出又は定量する工程Ｃ；血液試料中に存在するシスーアコニット酸の検出結果又は定量結果をコントロールと比較することにより、前記非ヒト動物の腎機能を評価する工程Ｄ；に関する。

なお、本明細書における「被験者」、「被検試料の提供者」、「腎疾患非罹患者」、「健常者」は、便宜上、ヒトだけでなく、他の非ヒト動物含むが、ヒト及び非ヒト哺乳動物が好ましく、ヒトがより好ましい。

発明の効果

[0011] 本発明の腎疾患の判定方法によれば、これまでの腎疾患に対する様々な検査手段では検出することができなかった腎疾患についても、正確にかつ被験者（被検試料の提供者）への負担が少なく、腎疾患を判定することができる。また、本発明により初めて見い出された腎疾患マーカー物質についてさらに研究が進めば、腎疾患の様々な病態や症状に対応した腎疾患マーカー物質となり得ると考えられる。また、本発明の早期腎疾患の判定方法によれば、従来の腎疾患マーカー物質では十分になし得なかった、早期腎疾患の判定が可能となる。また、本発明の腎疾患予防・治療剤のスクリーニング方法によれば、これまでに着目されていなかった新たな腎疾患マーカー物質に着目した新規な腎疾患予防・治療剤を効率よくスクリーニングすることが可能となる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]腎疾患患者（慢性腎臓患者）４１人の患者背景を示す図である。

[図2]血漿中において、ｅＧＦＲと正又は負の相関が見い出されたカチオンを示す図である。左側の表は、スピアマンの相関係数によりｅＧＦＲと有意な負の相関が見い出されたカチオンを表し、右側の表は、ｅＧＦＲと有意な正の相関が見い出されたカチオンを表す。なお、物質名の背景が灰色の物質は

、ｅＧＦＲとの相関が有意であり、かつ、その相関が新規に見い出された物質である。

[図3]血漿中において、ｅＧＦＲと正又は負の相関が見い出されたアニオンを示す図である。左側の表は、ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたアニオンを表し、右側の表は、ｅＧＦＲと正の相関が見い出されたアニオンを表す。なお、物質名の背景が灰色の物質は、ｅＧＦＲとの相関が新規に見い出された物質である。ところで、ｅＧＦＲと負の相関がある物質とは、腎機能の改善に伴って、濃度が低下する物質であり、すなわち、腎機能の悪化に伴って、濃度が上昇する物質である。また、ｅＧＦＲと正の相関がある物質とは、腎機能の改善に伴って、濃度が上昇する物質であり、すなわち、腎機能の悪化に伴って、濃度が低下する物質である。

[図4]ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたカチオンについて、そのカチオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。

[図5]ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたカチオンについて、そのカチオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図6]ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたカチオンについて、そのカチオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図7]ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたカチオンについて、そのカチオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。

[図8]ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたカチオンについて、そのカチオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。

[図9]ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたカチオンについて、そのカチオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。

[図10]ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたカチオンについて、そのカチオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。

[図11]ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたカチオンについて、そのカチオン

の濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図12] ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたカチオンについて、そのカチオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。

[図13] ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたカチオンについて、そのカチオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。

[図14] ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたカチオンについて、そのカチオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図15] ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたカチオンについて、そのカチオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。

[図16] ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたカチオンについて、そのカチオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図17] ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたカチオンについて、そのカチオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図18] ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたカチオンについて、そのカチオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図19] ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたカチオンについて、そのカチオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、二次式で近似した図である。

[図20] ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたカチオンについて、そのカチオン

の濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、二次式で近似した図である。

[図21]ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたカチオンについて、そのカチオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、二次式で近似した図である。

[図22]ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたカチオンについて、そのカチオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、二次式で近似した図である。

[図23]ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたカチオンについて、そのカチオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、二次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図24]ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたカチオンについて、そのカチオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、二次式で近似した図である。

[図25]ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたカチオンについて、そのカチオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、二次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図26]ｅＧＦＲと正の相関が見い出されたカチオンについて、そのカチオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。なお、

[図27]ｅＧＦＲと正の相関が見い出されたカチオンについて、そのカチオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図28]ｅＧＦＲと正の相関が見い出されたカチオンについて、そのカチオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。

[図29]ｅＧＦＲと正の相関が見い出されたカチオンについて、そのカチオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図30]ｅＧＦＲと正の相関が見い出されたカチオンについて、そのカチオン

の濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。

[図31] ｅＧＦＲと正の相関が見い出されたカチオンについて、そのカチオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、二次式で近似した図である。

[図32] ｅＧＦＲと正の相関が見い出されたカチオンについて、そのカチオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、二次式で近似した図である。

[図33] ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたアニオンについて、そのアニオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図34] ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたアニオンについて、そのアニオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図35] ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたアニオンについて、そのアニオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図36] ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたアニオンについて、そのアニオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図37] ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたアニオンについて、そのアニオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図38] ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたアニオンについて、そのアニオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す

。

[図39] ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたアニオンについて、そのアニオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図40] ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたアニオンについて、そのアニオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図41] ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたアニオンについて、そのアニオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図42] ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたアニオンについて、そのアニオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図43] ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたアニオンについて、そのアニオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図44] ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたアニオンについて、そのアニオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図45] ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたアニオンについて、そのアニオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。

[図46] ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたアニオンについて、そのアニオン

の濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図47] ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたアニオンについて、そのアニオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図48] ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたアニオンについて、そのアニオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図49] ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたアニオンについて、そのアニオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図50] ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたアニオンについて、そのアニオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図51] ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたアニオンについて、そのアニオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図52] ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたアニオンについて、そのアニオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、二次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図53] ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたアニオンについて、そのアニオン

の濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、二次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図54]ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたアニオンについて、そのアニオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、二次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図55]ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたアニオンについて、そのアニオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、二次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図56]ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたアニオンについて、そのアニオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、二次式で近似した図である。

[図57]ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたアニオンについて、そのアニオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、二次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図58]ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたアニオンについて、そのアニオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、二次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図59]ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたアニオンについて、そのアニオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、二次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図60]ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたアニオンについて、そのアニオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、二次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す

。

[図61] ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたアニオンについて、そのアニオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、二次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図62] ｅＧＦＲと負の相関が見い出されたアニオンについて、そのアニオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、二次式で近似した図である。

[図63] ｅＧＦＲと正の相関が見い出されたアニオンについて、そのアニオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図64] ｅＧＦＲと正の相関が見い出されたアニオンについて、そのアニオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図65] ｅＧＦＲと正の相関が見い出されたアニオンについて、そのアニオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図66] ｅＧＦＲと正の相関が見い出されたアニオンについて、そのアニオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、一次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図67] ｅＧＦＲと正の相関が見い出されたアニオンについて、そのアニオンの濃度とｅＧＦＲとの相関関係を示し、二次式で近似した図である。なお、「＊」は、ｅＧＦＲとの負の相関が新規に発見されたものであることを示す。

[図68] ｅＧＦＲとの相関について、本件早期腎疾患マーカー物質と、シスタ

チンＣとを比較した結果を示す図である。

[図69] ｅＧＦＲとの相関について、本件早期腎疾患マーカー物質と、１－メチルアデノシンとを比較した結果を示す図である。

[図70] ｅＧＦＲとの相関について、本件早期腎疾患マーカー物質と、Ｎ－アセチルグルコサミンとを比較した結果を示す図である。

[図71] ｅＧＦＲとの相関について、本件早期腎疾患マーカー物質と、γ－ブチロベタインとを比較した結果を示す図である。

[図72] ｅＧＦＲとの相関について、本件早期腎疾患マーカー物質と、セバシン酸とを比較した結果を示す図である。

[図73] ｅＧＦＲとの相関について、本件早期腎疾患マーカー物質と、シス－アコニット酸とを比較した結果を示す図である。

[図74] ｅＧＦＲとの相関について、本件早期腎疾患マーカー物質と、ホモバニリン酸とを比較した結果を示す図である。

[図75]血漿サンプル中の本件早期腎疾患マーカー物質（γ－ブチロベタイン、Ｎ－アセチルグルコサミン）の濃度を、ｅＧＦＲ値に応じたグループ毎に示した図である。

[図76]血漿サンプル中の本件早期腎疾患マーカー物質（Ｎ－アセチルグルコサミン、１－メチルアデノシン）の濃度を、ｅＧＦＲ値に応じたグループ毎に示した図である。

[図77]血漿サンプル中の本件早期腎疾患マーカー物質（シス－アコニット酸、セバシン酸）の濃度を、ｅＧＦＲ値に応じたグループ毎に示した図である。

[図78]血漿サンプル中の本件早期腎疾患マーカー物質（ホモバニリン酸）の濃度を、ｅＧＦＲ値に応じたグループ毎に示した図である。

発明を実施するための形態

[0013] 本発明の腎疾患の判定方法（本発明の第１の発明）

本発明の腎疾患の判定方法としては、被検血液試料中に存在する、以下の腎疾患マーカー物質（以下、「本件腎疾患マーカー物質」とも表示する。）

から選ばれる１種又は２種以上の腎疾患マーカー物質を検出又は定量する工程を有する方法であれば特に制限されない。

（ｅＧＦＲとの負の相関を持つカチオンである腎疾患マーカー物質）：Ｎ－アセチルグルコサミン（N-acetylglucosamine）、γ－ブチロベタイン（γ-butyrobetaine）、オフタルム酸（ophthalmate）、Ｎ－ε－アセチルリジン（N-epsilon-acetyllysine）、シトシン（cytosine）、ヒポタウリン（hypotaurine）、７－メチルグアニン（7-methylguanine）、メチオニンスルホキシド（methionine sulfoxide）、アスパラギン（Ａｓｎ）；

（ｅＧＦＲとの正の相関を持つカチオンである腎疾患マーカー物質）：２－アミノ酪酸（2-aminobutyrate）、グルタミン酸（Ｇｌｕ）；

（ｅＧＦＲとの負の相関を持つアニオンである腎疾患マーカー物質）：イセチオン酸（isethionate）、グルコン酸（gluconate）、トランス－アコニット酸（trans-aconitate）、ピメリン酸（pimelate）、イソクエン酸（isocitrate）、Ｎ－アセチル－β－アラニン（N-acetyl-beta-alanine）、Ｎ－アセチルグルタミン酸（N-acetylglutamate）、セバシン酸（sebacate）、４－オキソペンタン酸（4-oxopentanoate）、シス－アコニット酸（cis-aconitate）、ホモバニリン酸（homovanillate）、アジピン酸（adipate）、シトラマレイン酸（citramalate）、２－イソプロピルマレイン酸（2-isopropylmalate）、トレオン酸（threonate）、Ｎ－アセチルアスパラギン酸（N-acetylaspartate）、４－ヒドロキシ－３－メトキシマンデル酸（4-hydroxy-3-methoxymandelate）、オキサミン酸（oxamate）、グルタル酸（glutarate）、アゼテート（azetate）、フタル酸（phthalate）、マロン酸（malonate）、シトラコン酸（citraconate）、キナ酸（quinate）、コハク酸（succinate）、システイン－Ｓ－硫酸（cysteine S-sulfate）、４－ヒドロキシ－３－メトキシ安息香酸（4-hydroxy-3-methoxybenzoate）；

（ｅＧＦＲとの正の相関を持つアニオンである腎疾患マーカー物質）：４－メチル－２－オキソペンタン酸（4-methyl-2-oxopentanoate）、２－オキソイソペンタン酸（2-oxoisopentanoate）、乳酸（lactate）、オクタン酸（oc

tanoate）、２－オキソグルタル酸（2-oxoglutarate）。なお、本発明の腎疾患の判定方法の精度をより高める観点からは、２種以上の本件腎疾患マーカー物質を併用する方法もある。

[0014] 本発明の腎疾患の判定方法によれば、被検血液試料の提供者が腎疾患であるかどうかや、該提供者の腎疾患の症状の程度を判定することができる。

[0015] 前述の本件腎疾患マーカー物質の中でも、推定糸球体濾過量（estimated glomerular filtration rate: ｅＧＦＲ）との相関係数がより高い点で、Ｎ－アセチルグルコサミン、γ－ブチロベタイン、Ｎ－ε－アセチルリジン、シトシン、オキサミン酸；２－アミノ酪酸、グルタミン酸；イセチオン酸、グルコン酸、トランス－アコニット酸、ピメリン酸、イソクエン酸、Ｎ－アセチル－β－アラニン、Ｎ－アセチルグルタミン酸、セバシン酸、４－オキソペンタン酸、シス－アコニット酸、ホモバニリン酸、アジピン酸、シトラマレイン酸、２－イソプロピルマレイン酸、トレオン酸、Ｎ－アセチルアスパラギン酸、４－ヒドロキシ－３－メトキシマンデル酸；４－メチル－２－オキソペンタン酸、２－オキソイソペンタン酸；を好適に例示することができる。

[0016] また、クレアチニンをはじめとする現在使用されている腎不全マーカー物質は、主に糸球体濾過率を指標としたマーカーである点、ｅＧＦＲを計算しなければならない点など不十分な点が多い。しかし、本件腎疾患マーカー物質の中でも、Ｎ－アセチルグルコサミン（図５）、γ－ブチロベタイン（図６）、Ｎ－ε－アセチルリジン（図１１）、ヒポタウリン（図１４）、７－メチルグアニン（図１６）、メチオニンスルホキシド（図１７）、アスパラギン（図１８）、２－アミノ酪酸（図２７）、グルタミン酸（図２９）、セバシン酸（図３３）、シス－アコニット酸（図３４）、ホモバニリン酸（図３５）、アジピン酸（図３６）、シトラマレイン酸（図３７）、２－イソプロピルマレイン酸（図３８）、Ｎ－アセチルアスパラギン酸（図３９）、４－ヒドロキシ－３－メトキシマンデル酸（図４０）、オキサミン酸（図４１）、グルタル酸（図４２）、アゼテート（図４３）、フタル酸（図４４）、

マロン酸（図４６）、シトラコン酸（図４７）、キナ酸（図４８）、コハク酸（図４９）、システインーＳ－硫酸（図５０）、４－ヒドロキシ－３－メトキシ安息香酸（図５１）、４－メチル－２－オキソペンタン酸（図６３）、２－オキソイソペンタン酸（図６４）、乳酸（図６５）、オクタン酸（図６６）の３１種類の腎疾患マーカー物質は、ｅＧＦＲとの相関式が一次式に近似しており、被験者（被検血液試料の提供者）のｅＧＦＲの複雑な計算式を必要とせずに、腎疾患の判定に用いることができるため、より簡便な腎疾患マーカー物質として好適に用いることができる。また、上記の３１種類の腎疾患マーカー物質は、早期の腎疾患の判定・検出に好適に用い得ると考えられる。

[0017] なお、上記の本件腎疾患マーカー物質のうち、腎機能の悪化に伴って濃度が上昇する本件腎疾患マーカー物質（ｅＧＦＲの低下と共に血液中に有意に蓄積する物質）としては、Ｎ－アセチルグルコサミン、γ－ブチロベタイン、オフタルム酸、Ｎ－ε－アセチルリジン、シトシン、ヒポタウリン、７－メチルグアニン、メチオニンスルホキシド、アスパラギンからなる陽イオン群や、イセチオン酸、グルコン酸、トランス－アコニット酸、ピメリン酸、イソクエン酸、Ｎ－アセチル－β－アラニン、Ｎ－アセチルグルタミン酸、セバシン酸、４－オキソペンタン酸、シス－アコニット酸、ホモバニリン酸、アジピン酸、シトラマレイン酸、２－イソプロピルマレイン酸、トレオン酸、Ｎ－アセチルアスパラギン酸、４－ヒドロキシ－３－メトキシマンデル酸、オキサミン酸、グルタル酸、アゼテート、フタル酸、マロン酸、シトラコン酸、キナ酸、コハク酸、システインーＳ－硫酸、４－ヒドロキシ－３－メトキシ安息香酸からなる陰イオン群を例示することができ、腎機能の悪化に伴って濃度が低下する本件腎疾患マーカー物質（ｅＧＦＲの低下と共に血液中に有意に減少する物質）としては、２－アミノ酪酸、グルタミン酸からなる陽イオン群や、４－メチル－２－オキソペンタン酸、２－オキソイソペンタン酸、乳酸、オクタン酸、２－オキソグルタル酸からなる陰イオン群を例示することができる。

[0018] また、本件腎疾患マーカー物質のうち、１－メチルアデノシン、シスーアコニット酸、ホモバニリン酸は、ｅＧＦＲが少し低下したグループ（ｅＧＦＲ３０－５９）においても、健常者における濃度と有意差が見られたため、早期腎疾患の判定・検出や、腎疾患の高感度での判定・検出に特に好適に用いることができ、中でも、シスーアコニット酸、ホモバニリン酸、中でも特にシスーアコニット酸は、健常者における濃度がかなり低いため、早期腎疾患の判定・検出や、腎疾患の高感度での判定・検出のために、とりわけ優れた腎疾患マーカーとなる。

[0019] また、上記の被検血液試料としては、被験者（被検血液試料の提供者）の血液に由来する試料である限り特に制限されず、血液試料そのものであってもよいし、その血液試料から得られた血清試料や血漿試料であってもよいが、検出や定量のより高い精度を得る観点から、血漿試料を好適に例示することができる。

[0020] 上記の本件腎疾患マーカー物質の検出又は定量方法としては、本件腎疾患マーカー物質を検出又は定量し得る限り、物理化学的方法であっても生物学的方法であってもよいが、検出感度の点で物理化学的方法を好適に例示することができ、中でも、液体クロマトグラフ質量分析計（ＬＣ／ＭＳ）、ガスクロマトグラフ質量分析計（ＧＣ／ＭＳ）やキャピラリー電気泳動質量分析計（ＣＥ－ＭＳ）等の質量分析計（ＭＳ）を用いた方法をより好適に例示することができ、少量のサンプルから数百種類以上の物質を同時測定できることから、ＣＥ－ＭＳを用いた方法を特に好適に例示することができる。

[0021] 本発明の腎疾患の判定方法においては、本件腎疾患マーカー物質の検出結果又は定量結果をコントロールと比較することにより、被検血液試料の提供者が腎疾患であるかどうか、又は、該提供者の腎疾患の症状の程度を評価する工程をさらに有することが好ましい。上記のコントロールとしては、腎疾患非罹患者（好ましくは健常者）の血液試料（より好適には、被検血液試料と同種の血液試料）中の本件マーカー物質の検出結果又は定量結果（好ましくは、後述の「基準値」）を好適に例示することができる。例えば、上記方

法にて定量した被検血液試料中の本件腎疾患マーカー物質を濃度換算し、その濃度を、腎疾患非罹患者の血液試料中の本件腎疾患マーカー物質濃度より設定した基準値と比較することによって、被検血液試料の提供者が腎疾患であるかどうかを評価することができる。ここで、「基準値」とは、陽性又は陰性を判定するための値をいう。この基準値は、例えば、腎機能の悪化に伴って濃度が上昇する本件腎疾患マーカー物質の場合は、「腎疾患非罹患者の血液試料中の特定の本件腎疾患マーカー物質の濃度の平均値」＋（α×標準偏差（ＳＤ）という数式において、αとして、０．５、１、２又は５を用いることによって、設定することができ、腎機能の悪化に伴って濃度が低下する本件腎疾患マーカー物質の場合は、「腎疾患非罹患者の血液試料中の特定の本件腎疾患マーカー物質の濃度の平均値」－（α×標準偏差（ＳＤ）という数式において、αとして０．５、１、２又は５を用いることによって、設定することができる。なお、濃度の分布が正規分布である集団では、いずれの数式においても、αとして２を用いることが多い。

[0022] 具体的には、腎疾患非罹患者の集団を対象として、その血液試料中の本件腎疾患マーカー物質を定量して、上記の式により基準値を設定し、その本件腎疾患マーカー物質が腎機能の悪化に伴って濃度が上昇するもの（Ｎ－アセチルグルコサミン、γ－ブチロベタイン、オフタルム酸、Ｎ－ε－アセチルリジン、シトシン、ヒポタウリン、７－メチルグアニン、メチオニンスルホキシド、アスパラギン、イセチオン酸、グルコン酸、トランス－アコニット酸、ピメリン酸、イソクエン酸、Ｎ－アセチル－β－アラニン、Ｎ－アセチルグルタミン酸、セバシン酸、４－オキソペンタン酸、シス－アコニット酸、ホモバニリン酸、アジピン酸、シトラマレイン酸、２－イソプロピルマレイン酸、トレオン酸、Ｎ－アセチルアスパラギン酸、４－ヒドロキシ－３－メトキシマンデル酸、オキサミン酸、グルタル酸、アゼテート、フタル酸、マロン酸、シトラコン酸、キナ酸、コハク酸、システイン－Ｓ－硫酸、４－ヒドロキシ－３－メトキシ安息香酸）である場合は、被検血液試料中のその本件腎疾患マーカー物質の濃度が、コントロール（好ましくは基準値）より

高い値を示した場合に、被検血液試料の提供者を陽性（腎疾患に罹患）と評価することができ、また、前述の被検血液試料中のその本件腎疾患マーカー物質の濃度がコントロールよりも高い程度を、該提供者の腎疾患の症状の重さの程度であると評価することができる。

[0023] 一方、用いる本件腎疾患マーカー物質が腎機能の悪化に伴って濃度が低下するもの（２－アミノ酪酸、グルタミン酸、４－メチル－２－オキソペンタン酸、２－オキソイソペンタン酸、乳酸、オクタン酸、２－オキソグルタル酸）である場合は、被検血液試料中のその本件腎疾患マーカー物質の濃度がコントロール（好ましくは基準値）より低い値を示した場合に、被検血液試料の提供者を陽性（腎疾患に罹患）と評価することができ、また、前述の被検血液試料中のその本件腎疾患マーカー物質の濃度がコントロールよりも低い程度を、該提供者の腎疾患の症状の重さの程度であると評価することができる。なお、基準値は、被検血液試料中の本件腎疾患マーカー物質を検出する度に毎回算出する必要はなく、例えば、様々な種類の血液試料についてあらかじめ基準値を測定しておき、血液試料の種類毎に検量線を作成しておけば、被検血液試料と同種の血液試料の基準値を検索するなどしてすぐに用いることができる。なお、本件腎疾患マーカー物質が検出できない場合は濃度０として扱えばよい。

[0024] また、本件腎疾患マーカー物質は、腎疾患の病態の管理に利用することもできる。腎疾患の病態を管理するには、例えば、上記方法にて定量した被検血液試料中の本件腎疾患マーカー物質を濃度換算し、その濃度からｅＧＦＲを評価すること等によって行なうことができる。本明細書において病態の管理とは、病状の重篤度の把握及び予後の観察をいう。

[0025] 本発明の腎疾患の判定方法により判定することができ、又は、病態の管理を行なうことのできる腎疾患としては、慢性腎不全、急性腎不全、糸球体腎炎、ネフローゼ症候群、腎硬化症、免疫複合体腎症、ループス腎炎、糖尿病性腎症、薬剤性腎障害、高血圧性腎障害、多発性嚢胞腎、ＩｇＡ腎症などを好適に例示することができ、中でも、慢性腎不全、急性腎不全、糖尿病性腎

症などをより好適に例示することができる。

[0026] 本発明の早期腎疾患の判定方法（本発明の第２の発明）

現在一般的に使用されている公知の腎疾患マーカー物質としては、クレアチニンやシスタチンＣが挙げられる。これらの公知の腎疾患マーカー物質の尿中の濃度は、ＧＦＲの低下と共に徐々に上昇するものの、特に末期の腎疾患では急激に上昇する二次曲線に近い上昇カーブを描く（図６８～７４参照）。また、上記の公知の腎疾患マーカー物質は、早期の腎疾患ではその濃度の上昇が緩やかであることから、早期の腎疾患を検出するには不向きであった。また、上記の公知の腎疾患マーカー物質の濃度からｅＧＦＲを算出する際にも複雑な計算式を必要とした。そこで、本発明者らは、ｅＧＦＲと有意な相関がある６４種類の腎疾患マーカー物質に関して、ｅＧＦＲとの関係をより詳細に検討し、ｅＧＦＲとの相関が一次式に近似する早期腎疾患マーカー物質を見い出した。

[0027] 本発明の早期腎疾患の判定方法としては、被検血液試料中に存在する、以下の早期腎疾患マーカー物質から選ばれる１種又は２種以上の腎疾患マーカー物質（以下、「本件早期腎疾患マーカー物質」とも表示する。）を検出又は定量する工程を有することを特徴とする判定方法であれば特に制限されない。

（ｅＧＦＲとの負の相関を持つカチオンである早期腎疾患マーカー物質）：１－メチルアデノシン、Ｎ－アセチルグルコサミン、γ－ブチロベタイン、３－メチルヒスチジン、ヒドロキシプロリン、トリメチルアミン－Ｎ－オキシド、アシンメトリックジメチルアルギニン（ＡＤＭＡ）、Ｎ－ε－アセチルリジン、キヌレニン、インドール－３－酢酸、ヒポタウリン、Ｎ，Ｎ－ジメチルグリシン、７－メチルグアニン、メチオニンスルホキシド、アスパラギン；

（ｅＧＦＲとの正の相関を持つカチオンである早期腎疾患マーカー物質）：バリン、２－アミノ酪酸、グアニド酢酸、グルタミン酸、ロイシン；

（ｅＧＦＲとの負の相関を持つアニオンである早期腎疾患マーカー物質）：

セバシン酸、シスーアコニット酸、ホモバニリン酸、アジピン酸、シトラマレイン酸、２ーイソプロピルマレイン酸、Ｎーアセチルアスパラギン酸、４ーヒドロキシー３ーメトキシマンデル酸、オキサミン酸、グルタル酸、アゼテート、フタル酸、クエン酸、マロン酸、シトラコン酸、キナ酸、コハク酸、システインーＳー硫酸、４ーヒドロキシー３ーメトキシ安息香酸；

（ｅＧＦＲとの正の相関を持つアニオンである早期腎疾患マーカー物質）：

４ーメチルー２ーオキソペンタン酸、２ーオキソイソペンタン酸、乳酸、オクタン酸；

なお、本発明の早期腎疾患の判定方法の精度をより高める観点からは、２種以上の本件早期腎疾患マーカー物質を併用する方法もある。

[0028] また、本件早期腎疾患マーカー物質のうち、１ーメチルアデノシン、シスーアコニット酸、ホモバニリン酸は、ｅＧＦＲが少し低下したグループ（ｅＧＦＲ３０－５９）においても、健常者における濃度と有意差が見られたため、早期腎疾患の判定・検出や、腎疾患の高感度での判定・検出に特に好適に用いることができ、中でも、シスーアコニット酸、ホモバニリン酸、中でも特にシスーアコニット酸は、健常者における濃度がかなり低いため、早期腎疾患の判定・検出や、腎疾患の高感度での判定・検出のために、とりわけ優れた腎疾患マーカーとなる。

[0029] 本発明の早期腎疾患の判定方法によれば、被検血液試料の提供者が早期腎疾患であるかどうかや、該提供者の早期腎疾患の症状の程度を判定することができる。

[0030] 前述の本件早期腎疾患マーカー物質のうち、１ーメチルアデノシン、３ーメチルヒスチジン、ヒドロキシプロリン、トリメチルアミンーＮーオキシド、アシンメトリックジメチルアルギニン（ＡＤＭＡ）、キヌレニン、インドールー３ー酢酸、Ｎ，Ｎージメチルグリシン、バリン、グアニド酢酸、ロイシン、クエン酸は、腎疾患との関連は知られていたが、ｅＧＦＲとの相関式が一次式に近似する事、すなわち、早期腎疾患マーカー物質として用い得ることは本発明者らが初めて明らかにしたものである。

[0031] 本発明の腎疾患予防・治療剤のスクリーニング方法（本発明の第３の発明）

本発明の腎疾患予防・治療剤のスクリーニング方法としては、腎機能が低下した非ヒト動物に被検物質を投与する工程Ａ；該非ヒト動物から血液試料を採取する工程Ｂ；該血液試料中に存在する、腎疾患マーカー物質（Ｎ－アセチルグルコサミン、γ－ブチロベタイン、オフタルム酸、Ｎ－ε－アセチルリジン、シトシン、ヒポタウリン、７－メチルグアニン、メチオニンスルホキシド、アスパラギン、２－アミノ酪酸、グルタミン酸、イセチオン酸、グルコン酸、トランス－アコニット酸、ピメリン酸、イソクエン酸、Ｎ－アセチル－β－アラニン、Ｎ－アセチルグルタミン酸、セバシン酸、４－オキソペンタン酸、シス－アコニット酸、ホモバニリン酸、アジピン酸、シトラマレイン酸、２－イソプロピルマレイン酸、トレオン酸、Ｎ－アセチルアスパラギン酸、４－ヒドロキシ－３－メトキシマンデル酸、オキサミン酸、グルタル酸、アゼテート、フタル酸、マロン酸、シトラコン酸、キナ酸、コハク酸、システイン－Ｓ－硫酸、４－ヒドロキシ－３－メトキシ安息香酸、４－メチル－２－オキソペンタン酸、２－オキソイソペンタン酸、乳酸、オクタン酸、２－オキソグルタル酸）から選ばれる１種又は２種以上の腎疾患マーカー物質を検出又は定量する工程Ｃ；血液試料中に存在する腎疾患マーカー物質の検出結果又は定量結果をコントロールと比較することにより、前記非ヒト動物の腎機能を評価する工程Ｄ；を有している限り特に制限されないが、前記工程Ｄとしては、腎機能の悪化に伴って濃度が上昇する本件腎疾患マーカー物質の濃度が、コントロールよりも低い場合、又は、腎機能の悪化に伴って濃度が低下する本件腎疾患マーカー物質の濃度が、コントロールよりも高い場合に、前述の被検物質を腎疾患の予防・治療剤と評価する工程Ｄ’を好適に例示することができる。

[0032] 上記非ヒト動物としては、非ヒト哺乳動物を好適に例示することができ、中でも、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、サル、ウシ、ブタ、ウマ、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、イヌ等を好適に例示することができる。

実施例 1

[0033] ［腎疾患患者の背景］

東北大学病院受診中の慢性腎臓病患者４１人から、後述のＣＥ－ＭＳ解析の対象となる血漿サンプルを採取した。なお、本研究計画は東北大学倫理委員会にて予め承認を受けており、患者個人各々に情報提供した後、患者各々から承認を得て血漿サンプルの採取を行った。これらの患者の背景は、平均年齢が６２．９±１４．６歳であり、４１人中２６人が男性、１５人が女性であった。これらの患者の推定糸球体濾過量（estimated glomerular filtration rate：ｅＧＦＲ）を、日本腎臓学会により推奨される推定式を用いて算出したところ、平均で２４．４±１３．９ｍｌ／ｍｉｎ／１．７３m^2であり、また、全ての患者がＣＫＤ（慢性腎不全）の基準である６０ｍｌ／ｍｉｎ／１．７３m^2以下に分類されていた。なお、ｅＧＦＲを算出するための上記推定式は男性の場合は、「ｅＧＦＲ＝１９４×［年齢］$^{-0.287}$×［血中クレアチニン（ｍｇ／ｄｌ）］$^{-1.094}$」であり、女性の場合は、「ｅＧＦＲ＝１９４×［年齢］$^{-0.287}$×［血中クレアチニン（ｍｇ／ｄｌ）］$^{-1.094}$×［０．７３９］」である。これらの慢性腎臓患者４１人の患者背景を図１に示す。

[0034] 図１に示されているように、これらの患者の慢性腎臓病の原因（原疾患）としては、アルポート症候群が１人（２．４％）、アレルギー性腎症が１人（２．４％）、ＡＮＣＡ関連腎症が１人（２．４％）、大動脈炎症候群が１人（２．４％）、両側腎梗塞が１人（２．４％）、糖尿病性腎症が８人（１９．５％）、巣状糸球体硬化症が３人（７．３％）、糸球体硬化症が４人（９．７％）、水腎症が１人（２．４％）、ＩｇＡ腎症が９人（２１．９％）、リポ蛋白糸球体症が１人（２．４％）、ループス腎症が２人（４．８％）、膜性増殖性糸球体炎が１人（２．４％）、膜性腎症が２人（４．８％）、多発嚢胞腎が１人（２．４％）、原発性腎症が２人（４．８％）、腎結核が１人（２．４％）、サルコイドーシスが１人（２．４％）であった。また、これらの患者の基礎疾患としては、１０人が心血管病、１２人が糖尿病、４０人が高血圧を罹患していた。さらに、これらの患者４１人中１１人が喫煙

者であった。これらの患者が内服している薬剤の種類としては、アロプリノールが１２人（２９．２%）、アンジオテンシン受容体拮抗薬が３０人（７３．１%）、ＡＳＴ－１２０が５人（１２．１%）、エリスロポエチンが６人（１４．６%）、スタチンが８人（１９．５%）であった。

実施例 2

[0035] ［腎疾患患者の血漿中の物質の解析］

本発明者らは、実施例１で採取した腎疾患患者全員の血漿サンプルについて、ＣＥ－ＭＳを用いて網羅的解析を行い、これら血漿サンプルに含まれる物質の分析を行なった。具体的には以下のような方法で行なった。

[0036] 内標準物質を調整したメタノール溶液を、実施例１で得られた各血漿サンプルに添加して撹拌し、さらにクロロホルムを加えて撹拌し、４６００ｇで５分間遠心分離した後、上清を限外ろ過フィルター（分画分子量５０００）にとり、４℃、９１００ｇで２時間遠心分離した後、ろ液を遠心濃縮してＣＥ－ＴＯＦＭＳにて測定を行った。その際、３１２種類の陽イオンと１９３種類の陰イオンを網羅的に同時測定した。その結果、６６種類の陽イオンと５０種類の陰イオンが、慢性腎不全患者の血漿中より検出された。検出された物質（以下、「検出物質」と表示する。）の分子量は７３．０ｍ／ｚから４６０．１ｍ／ｚの間であった。検出物質のうち、腎不全時に蓄積する物質を検索するために、本発明者らは、検出物質とｅＧＦＲの相関を、スピアマン順位相関検定を用いて解析した。検出物質のうち陽イオン（Ｃａｔｉｏｎ）の結果を図２に示し、陰イオン（Ａｎｉｏｎ）の結果を図３に示す。なお、図２及び図３はそれぞれ相関係数の高い順に上から表示している。これらの検出物質のうち、相関関係についてのＰ値が０．０５以下であった物質を、ｅＧＦＲと有意な相関があると見なした。そしてさらに解析を進め、ｅＧＦＲと有意な相関がある陰イオン、陽イオンの中でも、ｅＧＦＲの低下とともに有意に蓄積する物質３０種類と、ｅＧＦＲ低下とともに有意に減少する物質３５種類の合計６５種類の物質が同定された。

[0037] 図２に示すように、陽イオンでｅＧＦＲの低下とともに有意に蓄積する物

質として、クレアチニン（creatinine）、シンメトリックジメチルアルギニン（ＳＤＭＡ）、グアジニノコハク酸（guanidino succinate）、シトルリン（citrulline）、１－メチルアデノシン（1-methyladenosine）、Ｎ－アセチルグルコサミン（N-acetylgulusosamine）、γ－ブチロベタイン（γ-butyrobetaine）、オフタルム酸（ophthalmate）、３－メチルヒスチジン（3-methylhistidine）、ヒドロキシプロリン（hydroxyproline）、トリメチルアミン－Ｎ－オキシド（trimethylamine N-oxide）、アラントイン（allantoin）、アシンメトリックジメチルアルギニン（ＡＤＭＡ）、Ｎ－ε－アセチルリジン（N-epsilon-acetyllysine）、キヌレニン（kynurenine）、シトシン（cytosine）、インドール－３－酢酸（indole-3-acetate）、ヒポタウリン（hypotaurine）、Ｎ，Ｎ－ジメチルグリシン（n,n-dimethylglycine）、７－メチルグアニン（7-methylguanine）、メチオニンスルホキシド（methionine sulfoxide）、アスパラギン（Ａｓｎ）が同定された。また、図２に示すように、陽イオンでｅＧＦＲの低下とともに有意に減少する物質として、トリプトファン（Ｔｒｐ）、バリン（Ｖａｌ）、チロシン（Ｔｙｒ）、２－アミノ酪酸（2-aminobutyrate）、グアニド酢酸（guanidoacetate）、グルタミン酸（Ｇｌｕ）、ロイシン（Ｌｅｕ）が同定された。

[0038] 一方、図３に示すように、陰イオンでｅＧＦＲの低下とともに有意に蓄積する物質として、イセチオン酸（isethionate）、グルコン酸（gluconate）、トランス－アコニット酸（trans-aconitate）、ピメリン酸（pimelate）、３－インドキシル硫酸（3-indoxylsulfate）、イソクエン酸（isocitrate）、Ｎ－アセチル－β－アラニン（N-acetyl-beta-alanine）、Ｎ－アセチルグルタミン酸（N-acetylglutamate）、セバシン酸（sebacate）、４－オキソペンタン酸（4-oxopentanoate）、シス－アコニット酸（cis-aconitate）、ホモバニリン酸（homovanillate）、アジピン酸（adipate）、シトラマレイン酸（citramalate）、２－イソプロピルマレイン酸（2-isopropylmalate）、トレオン酸（threonate）、馬尿酸（hippurate）、Ｎ－アセチルアスパラギン酸（N-acetylaspartate）、４－ヒドロキシ－３－メトキシマンデル酸（4-

hydroxy-3-methoxymandelate）、オキサミン酸（oxamate）、グルタル酸（glutarate）、アゼテート（azetate）、フタル酸（phthalate）、クエン酸（citrate）、マロン酸（malonate）、シトラコン酸（citraconate）、キナ酸（quinate）、コハク酸（succinate）、システインーＳ－硫酸（cysteine S-sulfate）、４－ヒドロキシ－３－メトキシ安息香酸（4-hydroxy-3-methoxybenzoate）が同定された。

また、図３に示すように、陰イオンでｅＧＦＲの低下とともに有意に減少する物質として、４－メチル－２－オキソペンタン酸（4-methyl-2-oxopentanoate）、２－オキソイソペンタン酸（2-oxoisopentanoate）、乳酸（lactate）、オクタン酸（octanoate）、ピルビン酸（pyruvate）、２－オキソグルタル酸（2-oxoglutarate）が同定された。

[0039] ｅＧＦＲと有意な相関が認められたこれらの６４種類の物質（陽イオン及び陰イオン）のうち、クレアチニン（creatinine）を始めとするいくつかの物質は、これまでに腎不全との相関が報告されている物質であった。これらの６４種類の物質のうち、ｅＧＦＲとの有意な相関関係が新規に見い出された合計４３種類（１１種類の陽イオン、３２種類の陰イオン）の物質については、図２又は３において、物質名の背景を灰色とした。例えば、陽イオンでｅＧＦＲの低下とともに有意に蓄積する物質の中でも、Ｎ－アセチルグルコサミン（N-acetylglucosamine）、γ－ブチロベタイン（γ-butyrobetaine）、オフタルム酸（ophthalmate）、Ｎ－ε－アセチルリジン（N-epsilon-acetyllysine）、シトシン（cytosine）、ヒポタウリン（hypotaurine）、７－メチルグアニン（7-methylguanine）、メチオニンスルホキシド（methionine sulfoxide）、アスパラギン（Ａｓｎ）は、今回の研究で、腎不全との相関が初めて見い出された物質であった。

[0040] また、陽イオンでｅＧＦＲの低下とともに有意に減少する物質の中でも、２－アミノ酪酸（2-aminobutyrate）、グルタミン酸（Ｇｌｕ）は、今回の研究で、腎不全との相関が初めて見い出された物質であった。

[0041] 一方、陰イオンでｅＧＦＲの低下とともに有意に蓄積する物質に関しては

、その大部分が今回新たに腎不全との相関が発見された物質であった。具体的には、イセチオン酸（isethionate）、グルコン酸（gluconate）、トランスーアコニット酸（trans-aconitate）、ピメリン酸（pimelate）、イソクエン酸（isocitrate）、Ｎーアセチルーβーアラニン（N-acetyl-beta-alanine）、Ｎーアセチルグルタミン酸（N-acetylglutamate）、セバシン酸（sebacate）、４ーオキソペンタン酸（4-oxopentanoate）、シスーアコニット酸（cis-aconitate）、ホモバニリン酸（homovanillate）、アジピン酸（adipate）、シトラマレイン酸（citramalate）、２ーイソプロピルマレイン酸（2-isopropylmalate）、トレオン酸（threonate）、Ｎーアセチルアスパラギン酸（N-acetylaspartate）、４ーヒドロキシー３ーメトキシマンデル酸（4-hydroxy-3-methoxymandelate）、オキサミン酸（oxamate）、グルタル酸（glutarate）、アゼテート（azetate）、フタル酸（phthalate）、マロン酸（malonate）、シトラコン酸（citraconate）、キナ酸（quinate）、コハク酸（succinate）、システインーＳー硫酸（cysteine S-sulfate）、４ーヒドロキシー３ーメトキシ安息香酸（4-hydroxy-3-methoxybenzoate）が、今回の研究で、腎不全との相関が初めて見い出された物質であった。

[0042] また、陰イオンでｅＧＦＲの低下とともに有意に減少する物質の中では、４ーメチルー２ーオキソペンタン酸（4-methyl-2-oxopentanoate）、２ーオキソイソペンタン酸（2-oxoisopentanoate）、乳酸（lactate）、オクタン酸（octanoate）、２ーオキソグルタル酸（2-oxoglutarate）が、今回の研究で、腎不全との相関が初めて見い出された物質であった。

[0043] 以上のように、ｅＧＦＲの低下と有意に相関のある合計４３種類のこれらの物質は、腎疾患マーカー物質として使用し得ることが新たに示された。

実施例 3

[0044] ［早期腎疾患マーカー物質の検索］

現在一般的に使用されている公知の腎疾患マーカー物質としては、クレアチニンやシスタチンＣが挙げられる。これらの公知の腎疾患マーカー物質の尿中の濃度は、ＧＦＲの低下と共に徐々に上昇するものの、特に末期の腎疾

患では急激に上昇する二次曲線に近い上昇カーブを描く。また、上記の公知の腎疾患マーカー物質は、早期の腎疾患ではその濃度の上昇が緩やかであることから、早期の腎疾患を検出するには不向きであった。また、上記の公知の腎疾患マーカー物質の濃度からｅＧＦＲを算出する際にも複雑な計算式を必要とした。そこで、本発明者らは、上記実施例２でｅＧＦＲと有意な相関があると認められた６４種類の腎疾患マーカー物質に関して、ｅＧＦＲとの関係をより詳細に検討し、より早期に腎不全等の腎疾患を検出し得る腎疾患マーカー物質や、ｅＧＦＲをより簡単に算出し得る腎疾患マーカー物質の選抜を試みた。

[0045] 具体的には、実施例２で見い出された６４種類の腎疾患マーカー物質のそれぞれについて、横軸をｅＧＦＲの値とし、縦軸をその腎疾患マーカー物質の血漿中濃度としたグラフを作成し（図４～６７）、その腎疾患マーカー物質の血漿中濃度とｅＧＦＲとの間のスピアマンの相関係数が高く、かつ、その相関式一次式に近似して増減する物質を選抜した。なお、一次式に近似する変化を示す腎疾患マーカー物質の場合、ｅＧＦＲとの関係は、その腎疾患マーカー物質の血漿中濃度をＩｎ（Ｃｐ）で表した際に、Ｉｎ（Ｃｐ）＝β１（ｅＧＦＲ）＋αと示される。一方、クレアチニンやシスタチンＣのように二次式に近似する物質の場合、血漿中濃度はＩｎ（Ｃｐ）＝β１（ｅＧＦＲ）^{2}＋β２（ｅＧＦＲ）＋αとして示される。ここで、（ｅＧＦＲ）^{2}を独立の変数として扱い、その際の対数尤度比（log likelihood ratio）を計算する事によって、相関式が一次式あるいは二次式のどちらにより近似するかを評価した。この結果、陽イオンでｅＧＦＲが低下するとともに体内に有意に蓄積する２２種類の物質（図４～２５）の中でも、１－メチルアデノシン、Ｎ－アセチルグルコサミン、γ－ブチロベタイン、３－メチルヒスチジン、ヒドロキシプロリン、トリメチルアミン－Ｎ－オキシド、アシンメトリックジメチルアルギニン（ＡＤＭＡ）、Ｎ－ε－アセチルリジン、キヌレニン、インドール－３－酢酸、ヒポタウリン、Ｎ，Ｎ－ジメチルグリシン、７－メチルグアニン、メチオニンスルホキシド、アスパラギンは、ｅＧＦＲとの

相関式が一次式に近似する事が分かった。また、陽イオンでｅＧＦＲが低下するとともに有意に減少する７種類の物質（図２６～３２）の中でも、バリン、２－アミノ酪酸、グアニド酢酸、グルタミン酸、ロイシンはｅＧＦＲとの相関式が一次式に近似する事が分かった。一方、陰イオンでｅＧＦＲが低下するとともに有意に蓄積する３０種類の物質（図３３～６２）の中でも、セバシン酸、シス－アコニット酸、ホモバニリン酸、アジピン酸、シトラマレイン酸、２－イソプロピルマレイン酸、Ｎ－アセチルアスパラギン酸、４－ヒドロキシ－３－メトキシマンデル酸、オキサミン酸、グルタル酸、アゼテート、フタル酸、クエン酸、マロン酸、シトラコン酸、キナ酸、コハク酸、システイン－Ｓ－硫酸、４－ヒドロキシ－３－メトキシ安息香酸は、ｅＧＦＲとの相関式が一次式に近似する事が分かった。さらに、陰イオンでｅＧＦＲが低下するとともに有意に減少する５種類の物質（図６３～６７）のなかでも、４－メチル－２－オキソペンタン酸、２－オキソイソペンタン酸、乳酸、オクタン酸は、ｅＧＦＲとの相関式が一次式に近似する事が分かった。

[0046] 以上のことから、１－メチルアデノシン、Ｎ－アセチルグルコサミン、γ－ブチロベタイン、３－メチルヒスチジン、ヒドロキシプロリン、トリメチルアミン－Ｎ－オキシド、アシンメトリックジメチルアルギニン（ＡＤＭＡ）、Ｎ－ε－アセチルリジン、キヌレニン、インドール－３－酢酸、ヒポタウリン、Ｎ，Ｎ－ジメチルグリシン、７－メチルグアニン、メチオニンスルホキシド、アスパラギン、バリン、２－アミノ酪酸、グアニド酢酸、グルタミン酸、ロイシン、セバシン酸、シス－アコニット酸、ホモバニリン酸、アジピン酸、シトラマレイン酸、２－イソプロピルマレイン酸、Ｎ－アセチルアスパラギン酸、４－ヒドロキシ－３－メトキシマンデル酸、オキサミン酸、グルタル酸、アゼテート、フタル酸、クエン酸、マロン酸、シトラコン酸、キナ酸、コハク酸、システイン－Ｓ－硫酸、４－ヒドロキシ－３－メトキシ安息香酸、４－メチル－２－オキソペンタン酸、２－オキソイソペンタン酸、乳酸、オクタン酸は、ｅＧＦＲとの相関式が一次式に近似する腎疾患マ

ーカー物質であることが示された。腎疾患マーカー物質の中でも、腎疾患の初期から濃度が変化し、腎疾患が進行するにつれて、一次式に近い形で直線的に濃度が上昇する上記の４３種類の腎疾患マーカー物質は、早期腎疾患の判定・検出に好適に用い得る早期腎疾患マーカー物質と考えられる。なお、早期腎疾患マーカー物質のうち、１－メチルアデノシン、３－メチルヒスチジン、ヒドロキシプロリン、トリメチルアミン－Ｎ－オキシド、アシンメトリックジメチルアルギニン（ＡＤＭＡ）、キヌレニン、インドール－３－酢酸、Ｎ，Ｎ－ジメチルグリシン、バリン、グアニド酢酸、ロイシン、クエン酸は、腎疾患との関連は知られていたが、ｅＧＦＲとの相関式が一次式に近似する事、すなわち、早期腎疾患マーカー物質として用い得ることは本発明者らが初めて明らかにしたものである。また、かかる４３種類の早期腎疾患マーカー物質は、被験者（被検血液試料の提供者）のｅＧＦＲの複雑な計算式を必要とせずに、腎疾患の判定に用いることができるため、より簡便な腎疾患マーカー物質として好適に用いることができると考えられる。

実施例 4

[0047] ［シスタチンＣとの比較］

現在一般的に使用されている公知の腎疾患マーカー物質のうち、クレアチニンについては既に図１９において、ｅＧＦＲとの相関式が二次式に近似することを示した。そこで、現在、クレアチニンに代わる腎不全マーカー物質と言われているシスタチンＣについても、ｅＧＦＲとの相関式を調べることとした。具体的には、実施例１で採取した腎疾患患者全員の血漿サンプルについて、実施例２と同様にＣＥ－ＭＳを用いて、これら血漿サンプルに含まれるシスタチンＣの分析を行った。次いで、この分析結果を利用して、ｅＧＦＲとシスタチンＣとの相関関係を調べた。その結果を図６８に示す。この結果から分かるように、シスタチンＣもまた、ｅＧＦＲの低下と共に徐々に血中濃度が上昇するものの、特に末期の腎疾患では急激に上昇する二次曲線に近い上昇カーブを描いた。したがって、クレアチニンだけでなく、シスタチンＣもまた、本件早期腎疾患マーカー物質のようには、早期腎疾患の判定

には不向きであることが示された。なお、参考のため、図６９～７４に、ｅＧＦＲとの相関について、本件早期腎疾患マーカー物質と、公知の腎疾患マーカー物質（クレアチニン及びシスタチンＣ）とを比較した図を６つ示す。これらの図に示されるように、本件早期腎疾患マーカー物質は、ｅＧＦＲの落ち込みに対して、クレアチニンやシスタチンＣよりも敏感な濃度変化を示した。以上の結果から、本件早期腎疾患マーカー物質は、従来の腎疾患マーカー物質と比較して、早期腎疾患の判定において、特に優れていることが示された。

実施例 5

[0048] ［腎疾患患者の血漿中の腎疾患マーカー物質濃度と、健常者の血漿中のかかる濃度との比較］

前述の実施例２や３において、腎疾患患者の血漿中の腎疾患マーカー物質の濃度や、かかる患者のｅＧＦＲの解析を行った。この解析結果を、健常者場合と比較するために、健常者の血漿中の腎疾患マーカー物質の濃度を測定することとした。

[0049] まず、健常者１８人から、前述のＣＥ－ＭＳ解析の対象となる血漿サンプルを採取した。これらの健常者の背景は、平均年齢が５５歳であり、全員が男性であった。これらの健常者のｅＧＦＲを、日本腎臓学会により推奨される前述の推定式を用いて算出したところ、全ての健常者が正常の基準である６０ｍｌ／ｍｉｎ／１．７３m^2以上に分類されていた。

[0050] これらの健常者から採取した血漿サンプルについて、前述の実施例２記載の方法と同じ方法でＣＥ－ＭＳ解析を行い、γ－ブチロベタイン、Ｎ－アセチルグルコサミン、１－メチルアデノシン、シス－アコニット酸、セバシン酸、ホモバニリン酸の計６種類の物質の濃度を測定した。次いで、これらの各物質の濃度の平均値を算出した。また、前述の実施例２で腎疾患患者の血漿サンプル中の濃度を測定した物質のうち、前述の６種類の各物質の濃度について、腎疾患患者のｅＧＦＲ値に応じた３つのグループ（ｅＧＦＲ３０－５９、ｅＧＦＲ１５－２９、ｅＧＦＲ１５＞）毎に平均値を算出した。前述

の６種類の各物質について、健常者のグループ（ｎｏｍａｌ）、ｅＧＦＲが３０－５９の腎疾患患者のグループ（ｅＧＦＲ３０－５９）、ｅＧＦＲが１５－２９の腎疾患患者のグループ（ｅＧＦＲ１５－２９）、ｅＧＦＲが１５以下の腎疾患患者のグループ（ｅＧＦＲ１５＞）ごとに表示した結果を図７５～７８に示す。なお、図７５の下段において、健常者のうちの２人のＮ－アセチルグルコサミン濃度が他の全員の該濃度と極端に離れていたため、この２人のＮ－アセチルグルコサミン濃度を異常値として除外したものを図７６の上段に示している。また、図７５～７８の左側のパネルは、測定濃度を個別にドットとして表したものであり、右側のパネルは、グループ毎に平均した棒グラフを表したものである。

[0051] 図７５～７８の結果から分かるように、６種類の物質のうち、１－メチルアデノシン、シス－アコニット酸、ホモバニリン酸は、ｅＧＦＲが低下するにつれて物質濃度が上昇する傾向が見られた上に、ｅＧＦＲが少し低下したグループ（ｅＧＦＲ３０－５９）においても、健常者における濃度と有意差が見られ、中でも、シス－アコニット酸、ホモバニリン酸、中でも特にシス－アコニット酸は、健常者における濃度がかなり低いかったため（図７７及び７８）、特に優れた腎疾患マーカーとなることが示された。

産業上の利用可能性

[0052] 本発明は、腎疾患の判定の分野や、腎疾患の予防・治療剤のスクリーニングの分野に好適に利用することができる。

請求の範囲

[請求項1] 被検血液試料中に存在するシスーアコニット酸（cis-aconitate）を検出又は定量する工程を有することを特徴とする腎疾患の判定方法。

[請求項2] 被検血液試料中に存在するシスーアコニット酸の検出結果又は定量結果をコントロールと比較することにより、被検血液試料の提供者が腎疾患であるかどうか、又は、該提供者の腎疾患の症状の程度を評価する工程をさらに有することを特徴とする請求項１に記載の腎疾患の判定方法。

[請求項3] 被検血液試料中に存在するシスーアコニット酸の濃度がコントロールよりも高い場合に、被検血液試料の提供者が腎疾患であると評価し、又は、被検血液試料中に存在するシスーアコニット酸の濃度がコントロールよりも高い程度を、該提供者の腎疾患の症状の重さの程度であると評価することを特徴とする請求項２記載の腎疾患の判定方法。

[請求項4] 腎疾患が、腎不全であることを特徴とする請求項１～３のいずれかに記載の腎疾患の判定方法。

[請求項5] 被検血液試料中に存在するシスーアコニット酸を検出又は定量する工程を有することを特徴とする早期腎疾患の判定方法。

[請求項6] 腎疾患が、腎不全であることを特徴とする請求項５に記載の早期腎疾患の判定方法。

[請求項7] 以下の工程Ａ～Ｄを有することを特徴とする腎疾患予防・治療剤のスクリーニング方法。腎機能が低下した非ヒト動物に被検物質を投与する工程Ａ；

該非ヒト動物から血液試料を採取する工程Ｂ；

該血液試料中に存在するシスーアコニット酸を検出又は定量する工程Ｃ：

血液試料中に存在するシスーアコニット酸の検出結果又は定量結果をコントロールと比較することにより、前記非ヒト動物の腎機能を評価

する工程Ｄ；

[図1]

CKD患者の背景

年齢	62.8 ± 14.6 (27-84)	
性別(男／女)	26/25	
クレアチニン	2.64 ± 1.60 (0.8-7.4)	
eGFR	24.4 ± 13.9(5.9-57.0)	
CKDの原疾患	Alport syndrome	1 (2.4%)
	analgesic-induced nephropathy	1 (2.4%)
	ANCA related nephropathy	1 (2.4%)
	aortitis syndrome	1 (2.4%)
	bilateral renal infarction	1 (2.4%)
	DM nephropathy	8 (19.5%)
	FSGS	3 (7.3%)
	glomeruloscrelosis	4 (9.7%)
	hydronephrosis	1 (2.4%)
	IgA nephropathy	9 (21.9%)
	lipoprotein glomerulopathy	1 (2.4%)
	lupus nephropathy	2 (4.8%)
	membrane proliferative glomerulonephritis	1 (2.4%)
	membranous nephropathy	2 (4.8%)
	polycystic kidney	1 (2.4%)
	primary renal disease	2 (4.8%)
	renal tubercurosis	1 (2.4%)
	sarcoidosis	1 (2.4%)
基礎疾患	cardiovascular disease	10 (24.3%)
	diabetes mellitus	12 (29.2%)
	hypertension	40 (97.5%)
	smoking	11 (26.8%)
内服薬	allopurinol	12 (29.2%)
	ARB	30 (73.1%)
	AST-120	5 (12.1%)
	erythropoietin	6 (14.6%)
	statin	8 (19.5%)

[図2]

Cation

eGFRの減少とともに蓄積する物質

Compound	Spearman correlation coefficients	p value
Creatinine	-0.965	<0.001
SDMA	-0.946	<0.001
Guanidinosuccinate	-0.933	<0.001
Citrulline	-0.801	<0.001
1-Methyladenosine	-0.772	<0.001
N-Acetylglucosamine	-0.751	<0.001
gamma-Butyrobetaine	-0.734	<0.001
Ophthalmate	-0.687	<0.001
3-Methylhistidin	-0.669	<0.001
Hydroxyproline	-0.666	<0.001
Trimethylamine N-oxide	-0.665	<0.001
Allantoin	-0.653	<0.001
ADMA	-0.614	<0.001
N-epsilon-Acetyllysine	-0.602	<0.001
Kynurenine	-0.579	<0.001
Cytosine	-0.570	<0.001
Indole-3-acetate	-0.475	0.002
Hypotaurine	-0.447	0.004
N,N-Dimethylglycine	-0.428	0.006
7-Methylguanine	-0.408	0.010
Methionine sulfoxide	-0.405	0.010
Asn	-0.337	0.033
Cysteine-glutathione disulphide	-0.279	0.077
Gln	-0.273	0.083
Arg	-0.271	0.087
His	-0.267	0.091
Ethanolamine phosphate	-0.261	0.096
Gly	-0.258	0.102
Piperazine	-0.253	0.110
beta-Ala	-0.243	0.124
Ornithine	-0.192	0.244
Homoarginine ; N6-N6-N6-Trimethyllysine	-0.183	0.248
Sarcosine	-0.182	0.250
Pipecolate	-0.122	0.439
o-Acetylcarnitine	-0.118	0.453
Pro	-0.113	0.474
Butanoate	-0.108	0.491
5-Methyltetrahydrofolate	-0.088	0.576
Ala	-0.070	0.665
5-Oxoproline	-0.032	0.837
Taurine	-0.024	0.879
Ser	-0.0003	0.998

eGFRの減少とともに減少する物質

Compound	Spearman correlation coefficients	p value
Trp	0.688	<0.001
Val	0.478	0.002
Tyr	0.453	0.004
4-Aminobutyrate	0.453	0.004
Guanidoacetate	0.441	0.005
Glu	0.422	0.007
Leu	0.386	0.014
Asp	0.262	0.097
Hypoxanthine	0.259	0.101
Ile	0.225	0.153
Lys	0.219	0.166
Glycerophosphorylcholine	0.211	0.182
Guanosine	0.207	0.190
1-Methyl-2-pyrrolidone	0.207	0.190
Carnitine	0.202	0.201
Inosine	0.193	0.228
Urocanate	0.181	0.251
1-Methylnicotinamide	0.165	0.294
Thr	0.152	0.336
Met	0.121	0.444
Betaine	0.098	0.535
Creatine	0.084	0.593
Phe	0.068	0.712
alpha-Aminoadipate	0.045	0.775

過去に報告のない物質（P 0.05）

[図3]

Anion

eGFRの減少とともに蓄積する物質

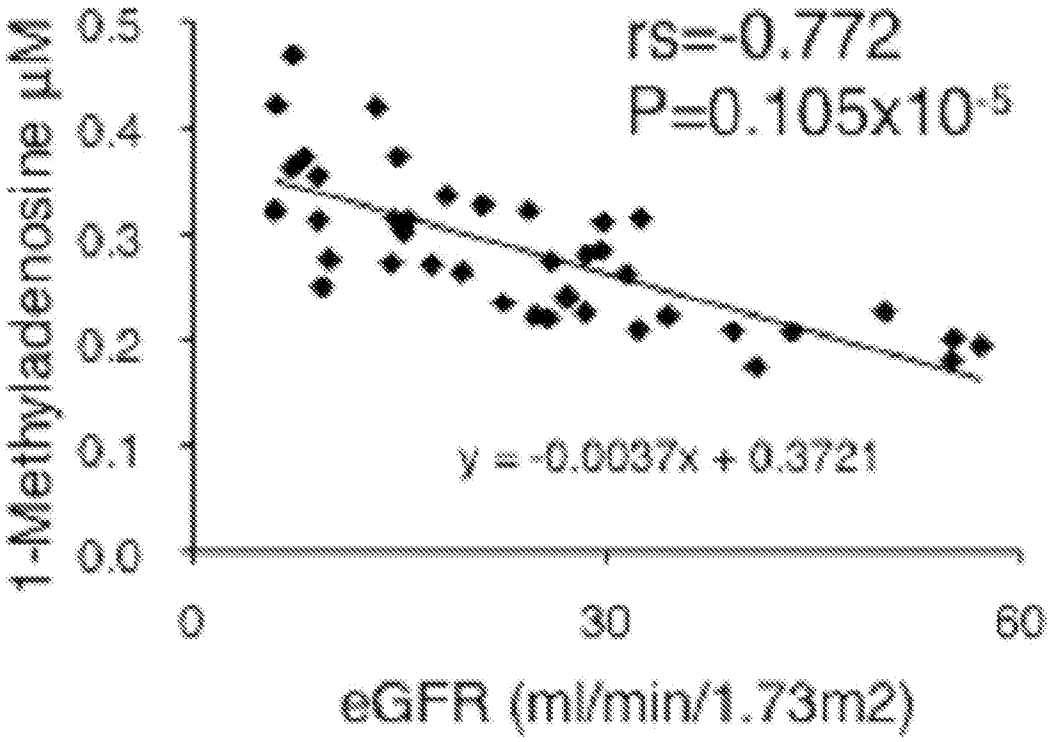
Compound	Spearman correlation coefficients	*p* value
Isethionate	-0.929	<0.001
Gluconate	-0.929	<0.001
trans-Aconitate	-0.869	<0.001
Pimelate	-0.847	<0.001
3-Indoxyl sulfate	-0.834	<0.001
isocitrate	-0.825	<0.001
N-Acetyl-beta-alanine	-0.805	<0.001
N-Acetylglutamate	-0.782	<0.001
Sebacate	-0.751	<0.001
4-Oxopentanoate	-0.725	<0.001
cis-Aconitate	-0.719	<0.001
Homovanillate	-0.711	<0.001
Adipate	-0.677	<0.001
Citramalate	-0.670	<0.001
2-Isopropylmalate	-0.669	<0.001
Threonate	-0.631	<0.001
Hippurate	-0.608	<0.001
N-Acetylaspartate	-0.594	<0.001
4-Hydroxy-3-methoxymandelate	-0.572	<0.001
Oxamate	-0.559	<0.001
Glutarate	-0.465	0.003
Azelate	-0.463	0.003
phthalate	-0.456	0.003
citrate	-0.454	0.004
Malonate	-0.440	0.005
Citraconate	0.401	0.011
Quinate	-0.392	0.013
Succinate	-0.362	0.021
Cysteine S-sulfate	-0.343	0.030
4-Hydroxy-3-methoxybenzoate	-0.322	0.041
Glycerophosphate	-0.284	0.072
2-Hydroxyoctarate	-0.208	0.189
Malate	-0.157	0.321
2-Hydroxypentanoate	-0.139	0.379
Heptanoate	-0.128	0.416
Laurate	-0.100	0.527
5-Oxoproline	-0.067	0.671
Mucate	-0.064	0.686

eGFRの減少とともに減少する物質

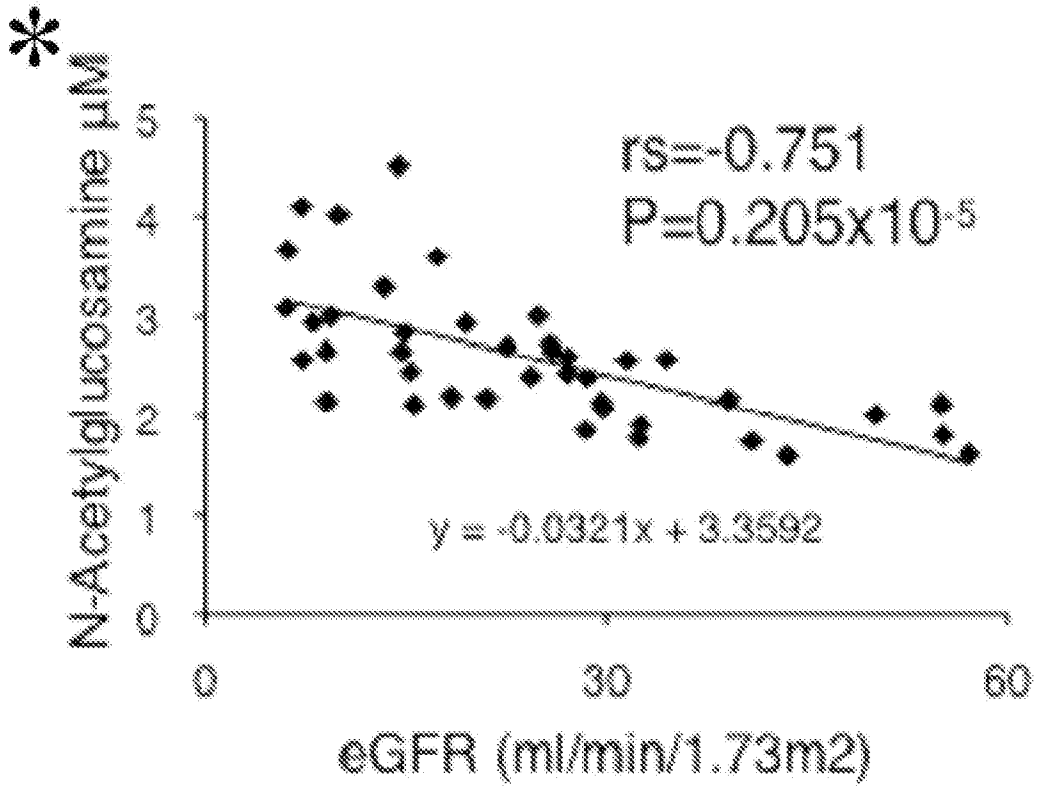
Compound	Spearman correlation coefficients	*p* value
4-Methyl-2-oxopentanoate	0.573	<0.001
2-Oxoisopentanoate	0.645	<0.001
Lactate	0.349	0.027
Octanoate	0.348	0.027
2-Oxoglutarate	0.331	0.036
Pyruvate	0.305	0.053
2-Hydroxyisobutyrate,2-Hydroxybutyrate	0.226	0.152
Fumarate	0.155	0.327
3-Hydroxybutyrate	0.094	0.553
Pelargonate	0.063	0.689
Pentanoate,3-Methylbutanoate	0.021	0.892
Decanoate	0.015	0.923
Hexanoate	0.011	0.946

過去に報告のない物質（P<0.05）

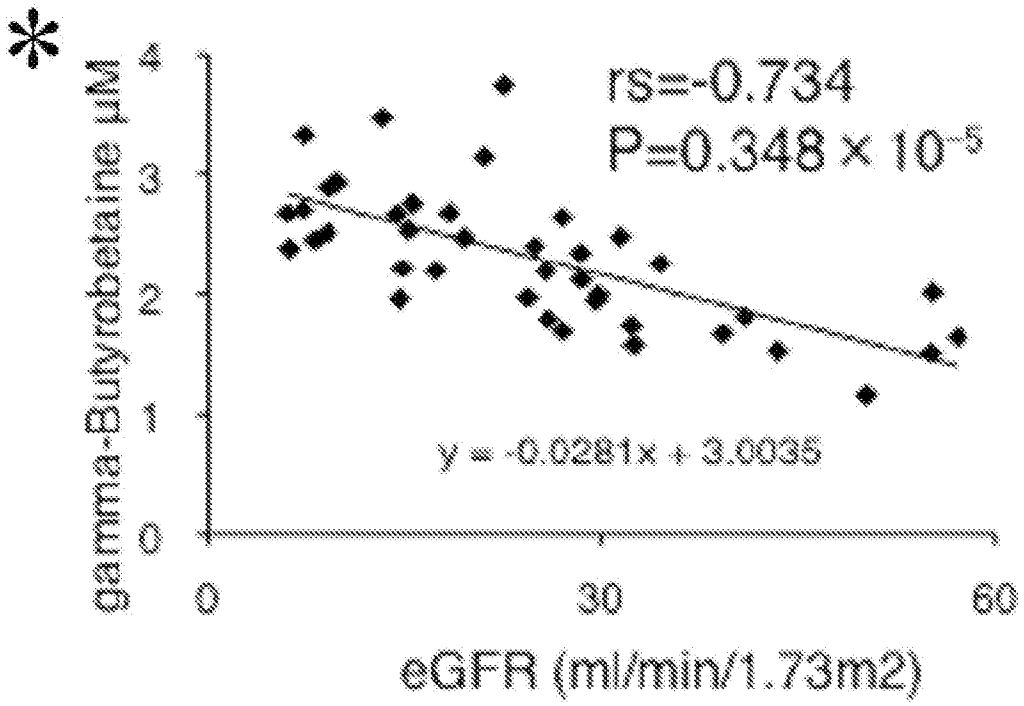
[図4]


1-Methyladenosine μM
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
rs=-0.772
P=0.105x10-5
y = -0.0037x + 0.3721
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

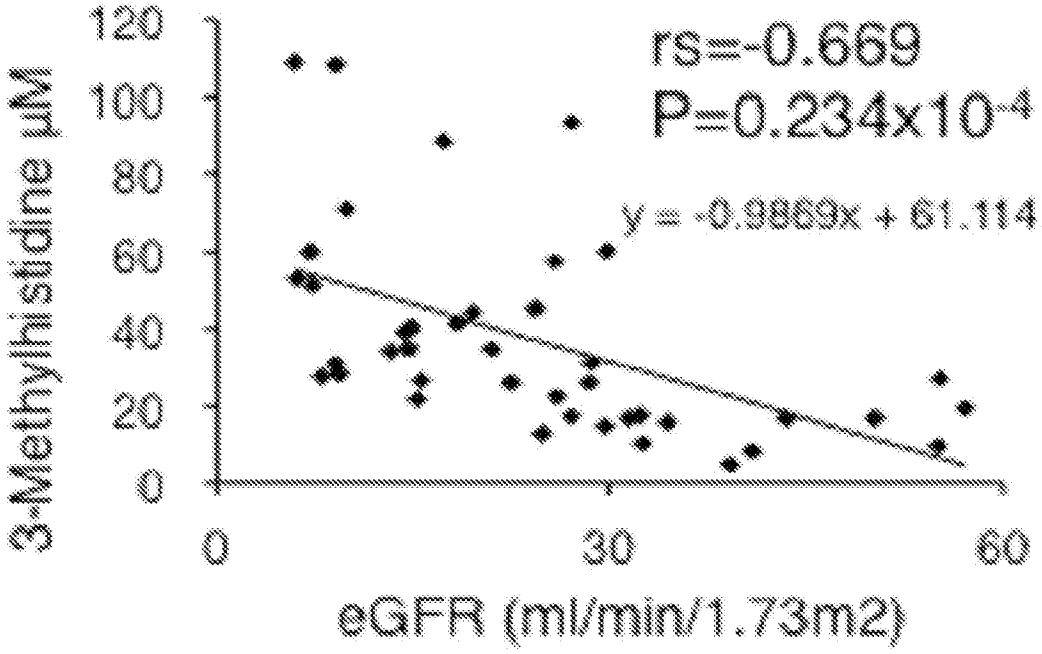
[図5]


*
N-Acetylglucosamine μM
5
4
3
2
1
0
rs=-0.751
P=0.205x10-5
y = -0.0321x + 3.3592
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

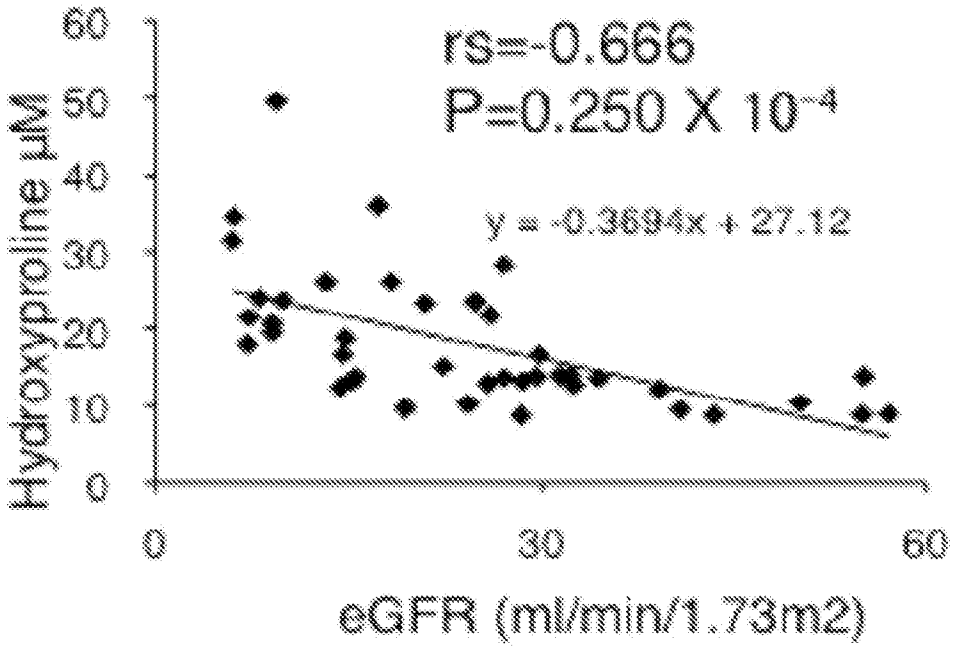
[図6]


*
gamma-Butyrobetaine μM
4
3
2
1
0
rs=-0.734
P=0.348 × 10-5
y = -0.0281x + 3.0035
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

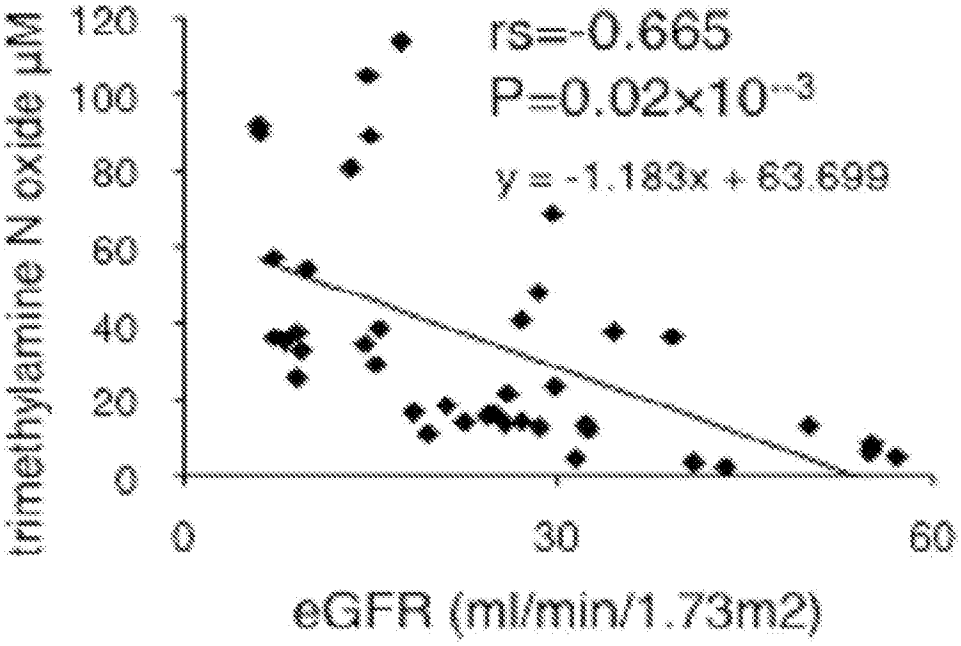
[図7]


3-Methylhistidine μM
120
100
80
60
40
20
0
rs=-0.669
P=0.234x10-4
y = -0.9869x + 61.114
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

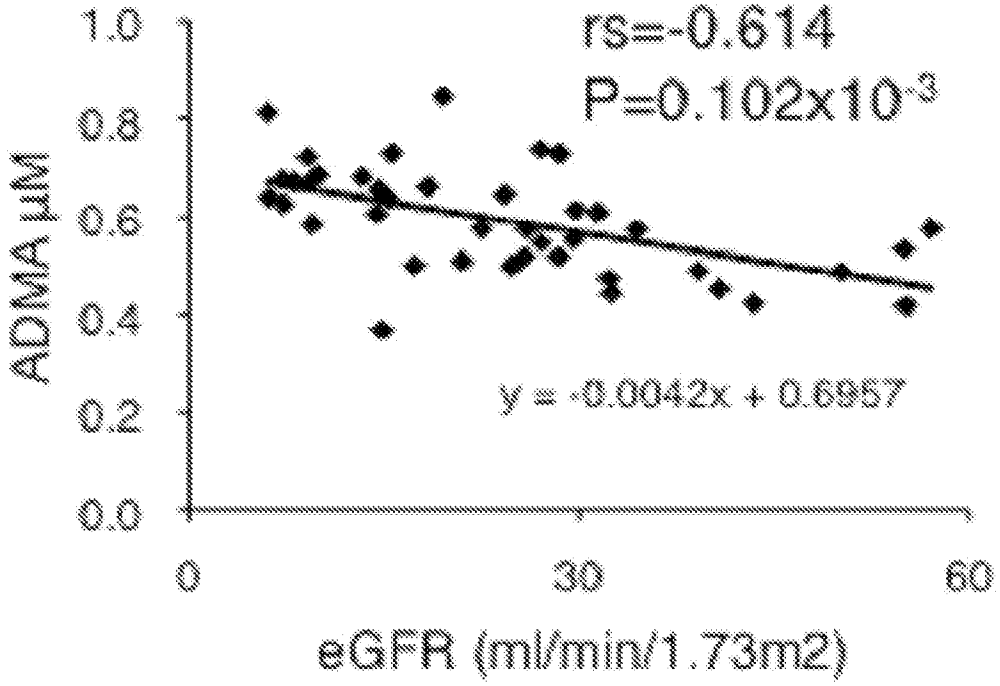
[図8]


rs=-0.666
P=0.250 X 10⁻⁴
y = -0.3694x + 27.12
Hydroxyproline μM
60
50
40
30
20
10
0
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

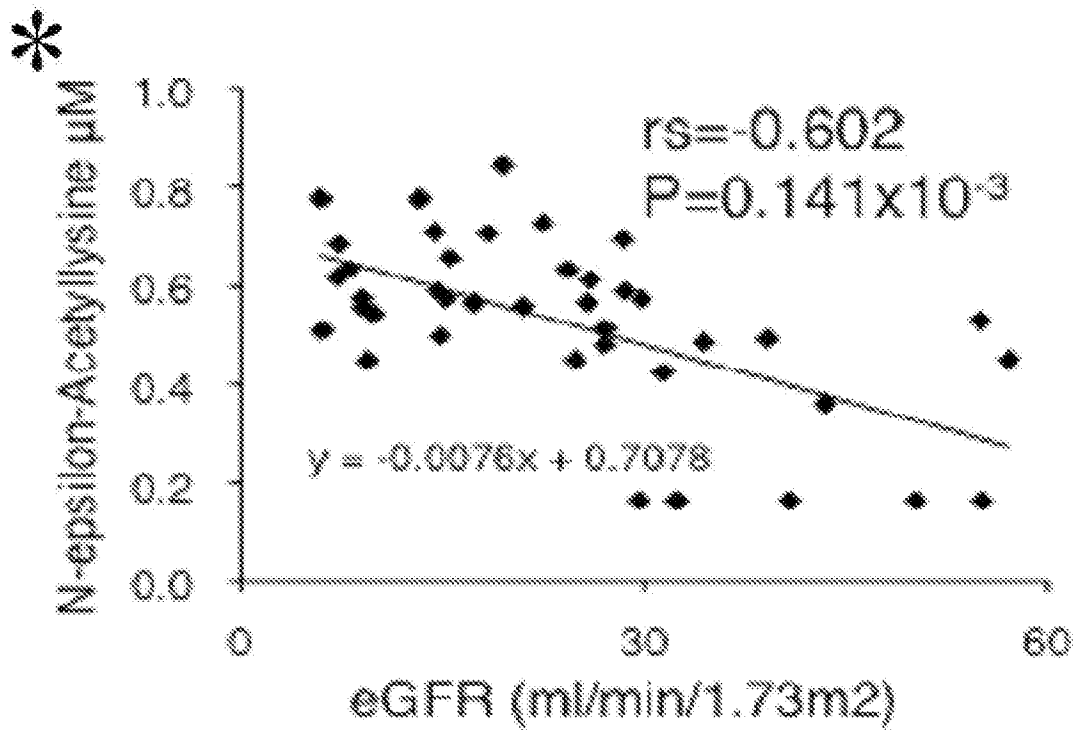
[図9]


rs=-0.665
P=0.02×10⁻³
y = -1.183x + 63.699
trimethylamine N oxide μM
120
100
80
60
40
20
0
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

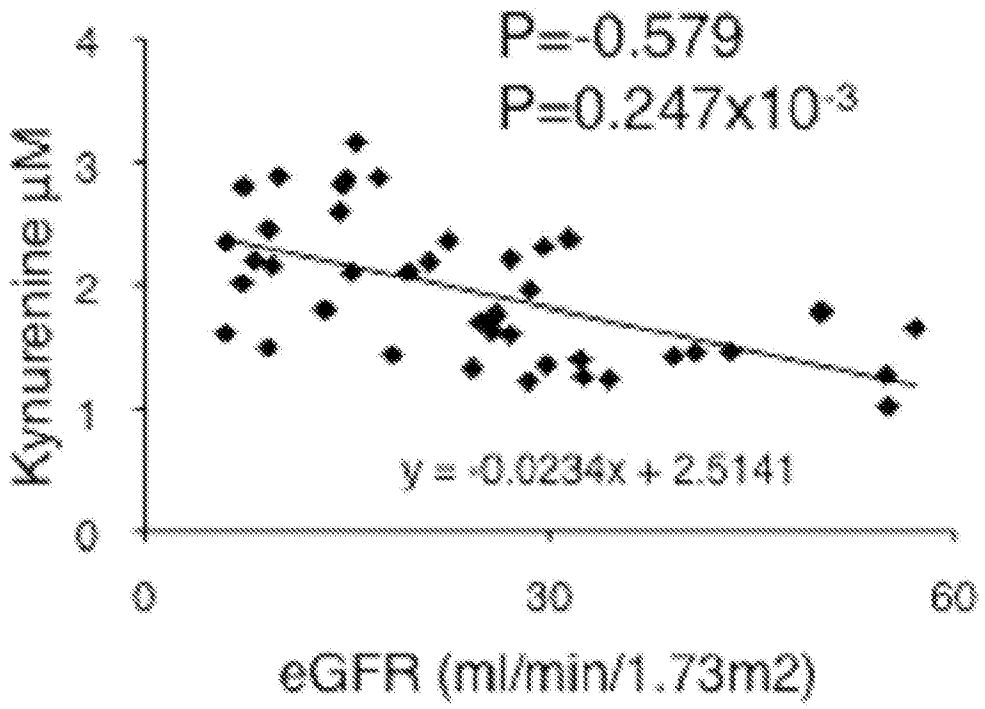
[図10]


rs=-0.614
P=0.102x10-3
y = -0.0042x + 0.6957
ADMA μM
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

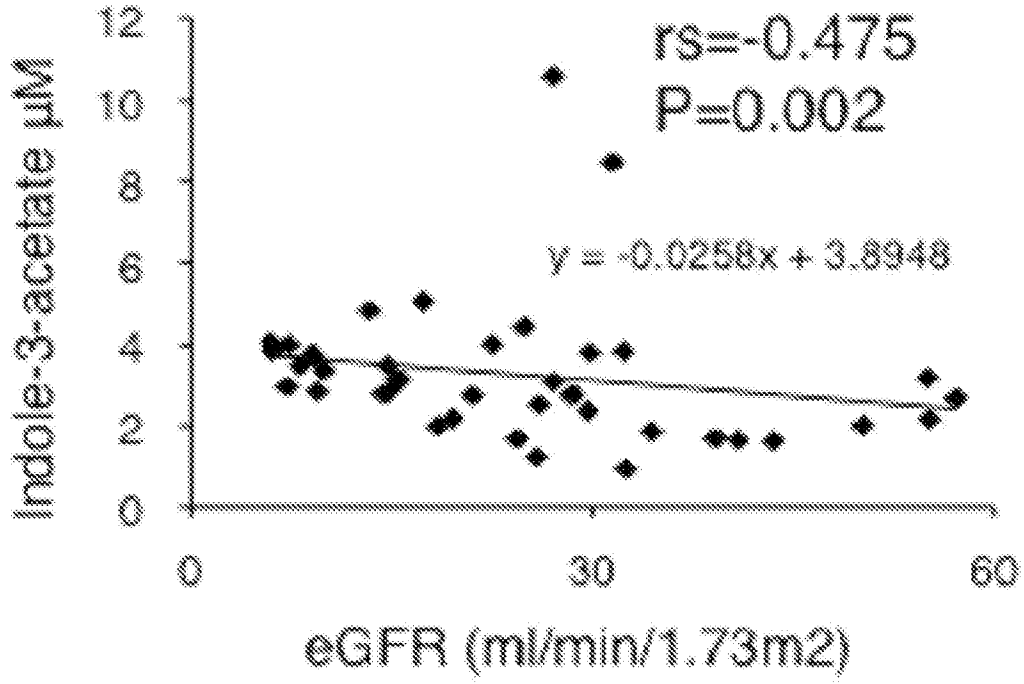
[図11]


*
rs=-0.602
P=0.141x10-3
y = -0.0076x + 0.7078
N-epsilon-Acetyllysine μM
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

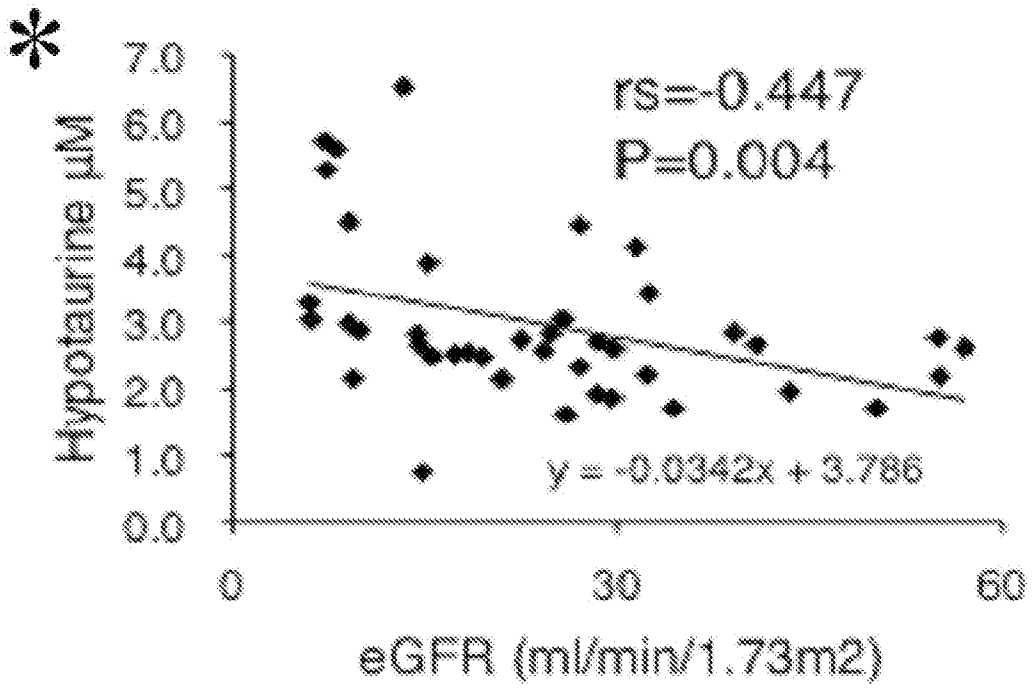
[図12]


P=-0.579
P=0.247x10-3
Kynurenine μM
4
3
2
1
0
y = -0.0234x + 2.5141
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

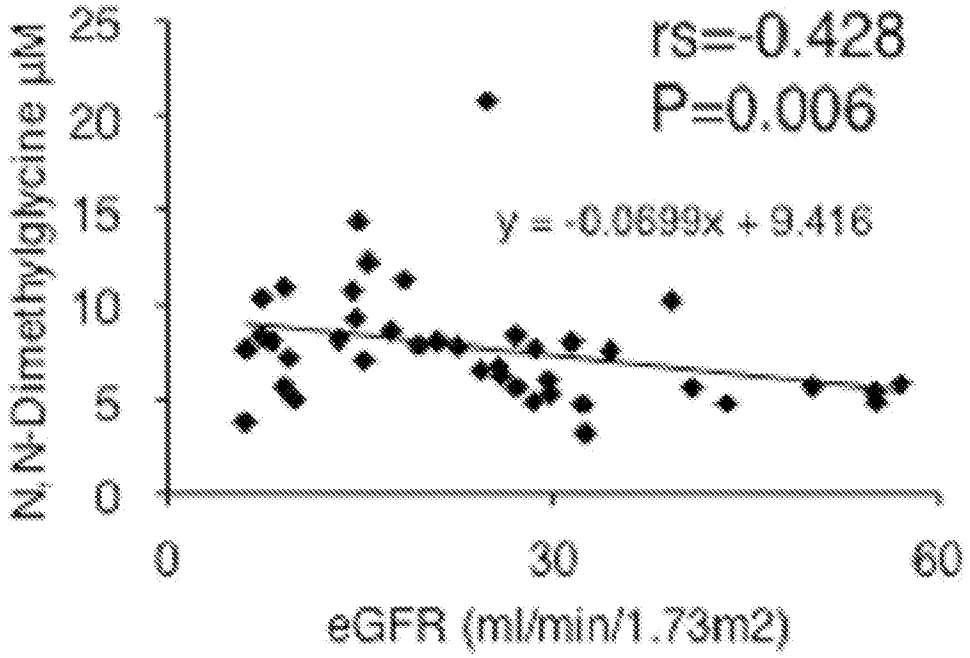
[図13]


rs=-0.475
P=0.002
Indole-3-acetate μM
12
10
8
6
4
2
0
y = -0.0258x + 3.8948
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

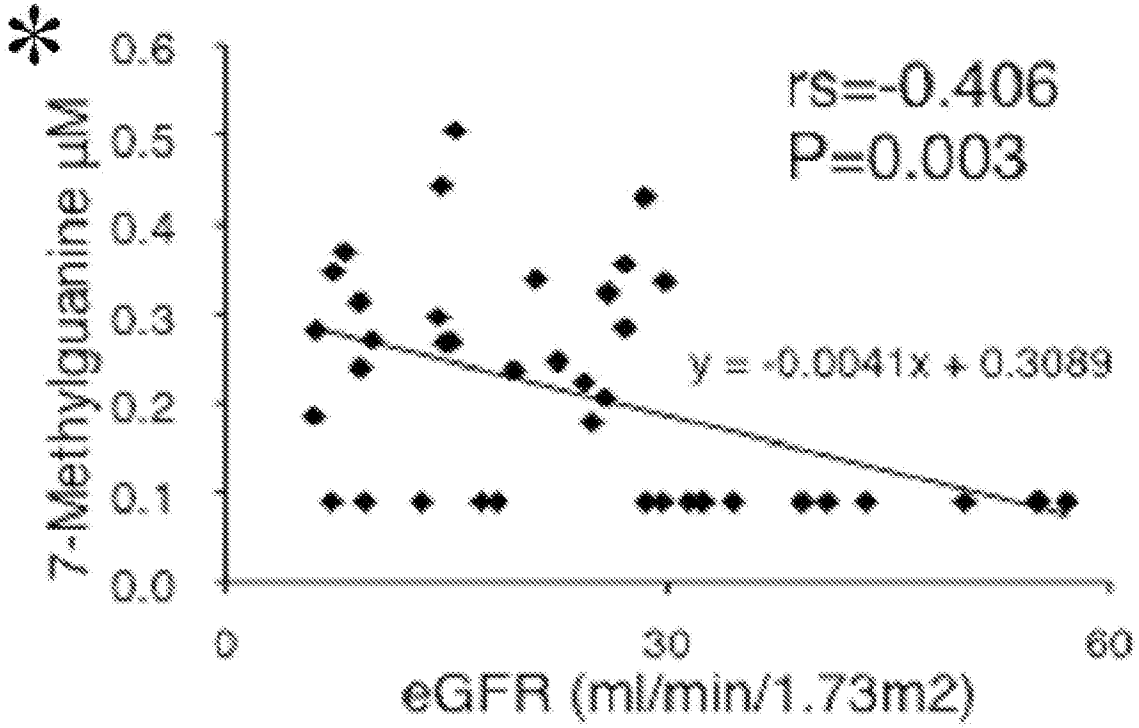
[図14]


*
Hypotaurine μM
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
rs=-0.447
P=0.004
y = -0.0342x + 3.786
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

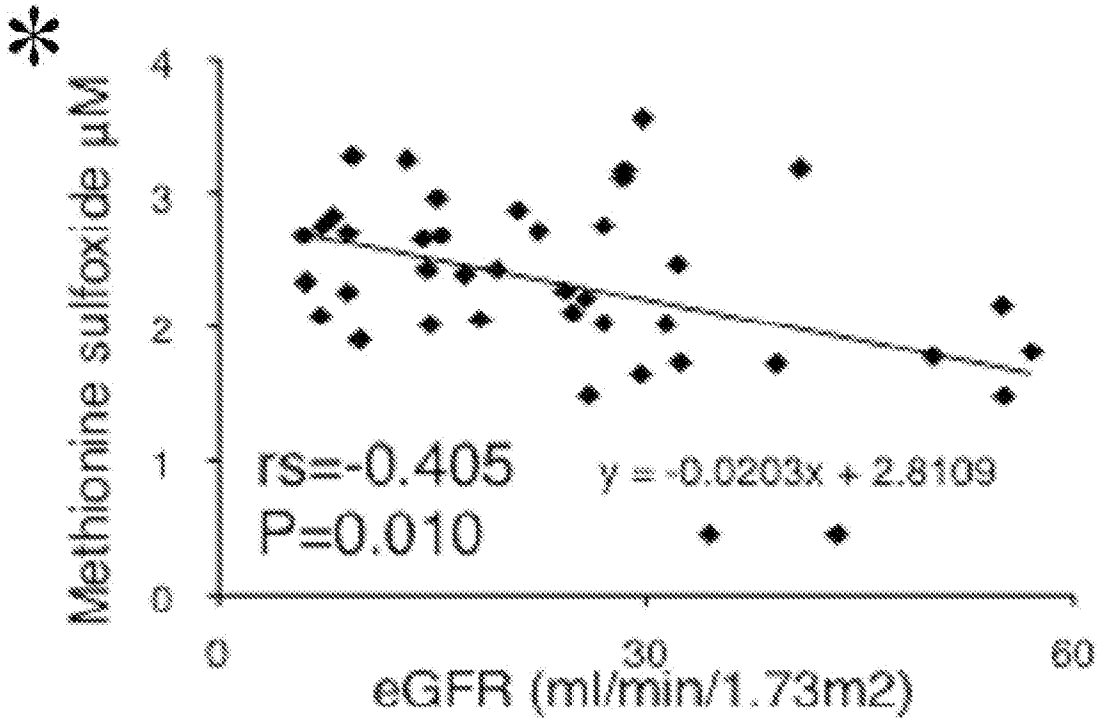
[図15]


N,N-Dimethylglycine μM
25
20
15
10
5
0
rs=-0.428
P=0.006
y = -0.0699x + 9.416
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

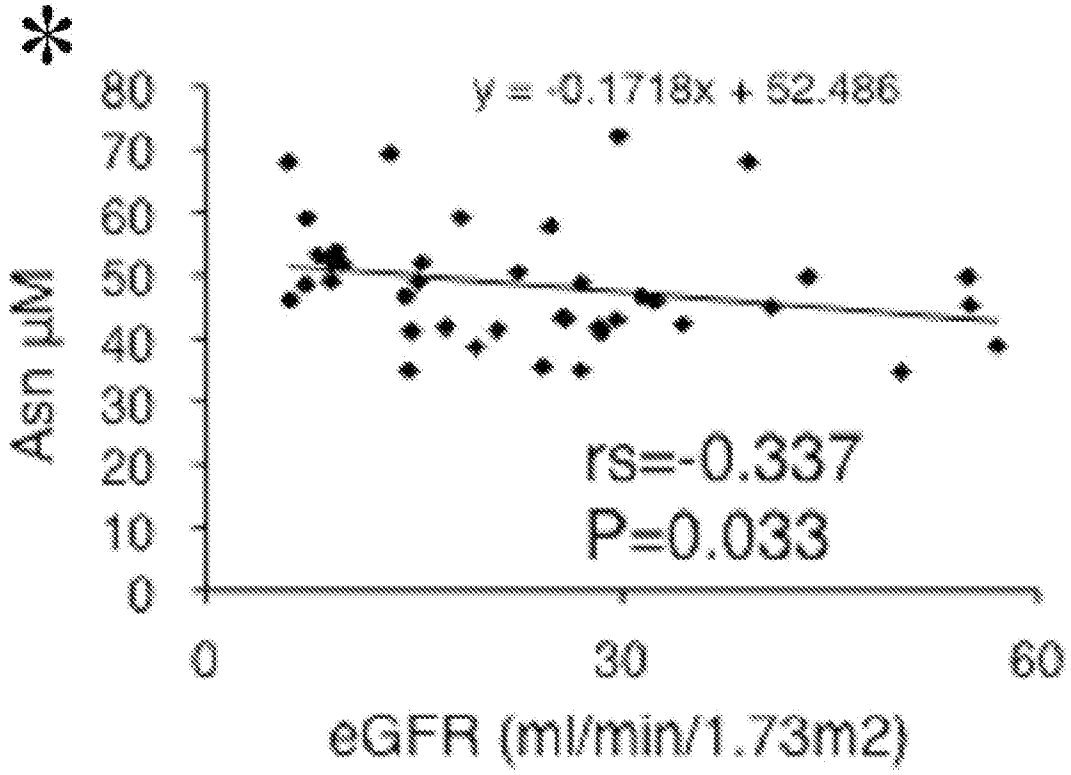
[図16]


*
7-Methylguanine μM
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
rs=-0.406
P=0.003
y = -0.0041x + 0.3089
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

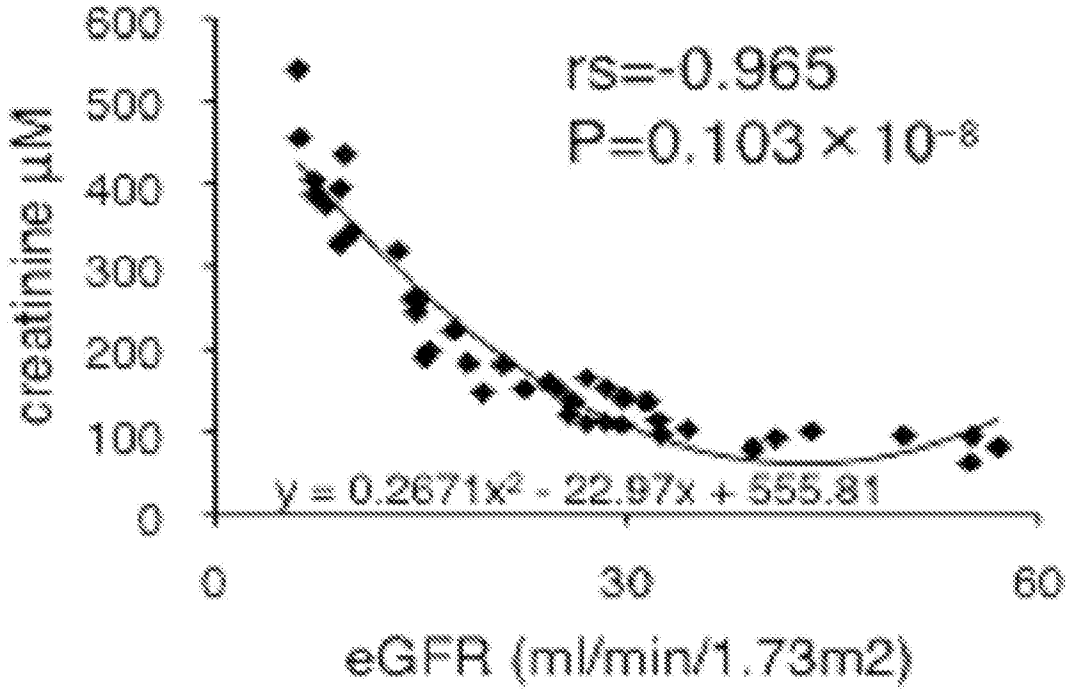
[図17]


*
Methionine sulfoxide μM
4
3
2
1
0
rs=-0.405
P=0.010
y = -0.0203x + 2.8109
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

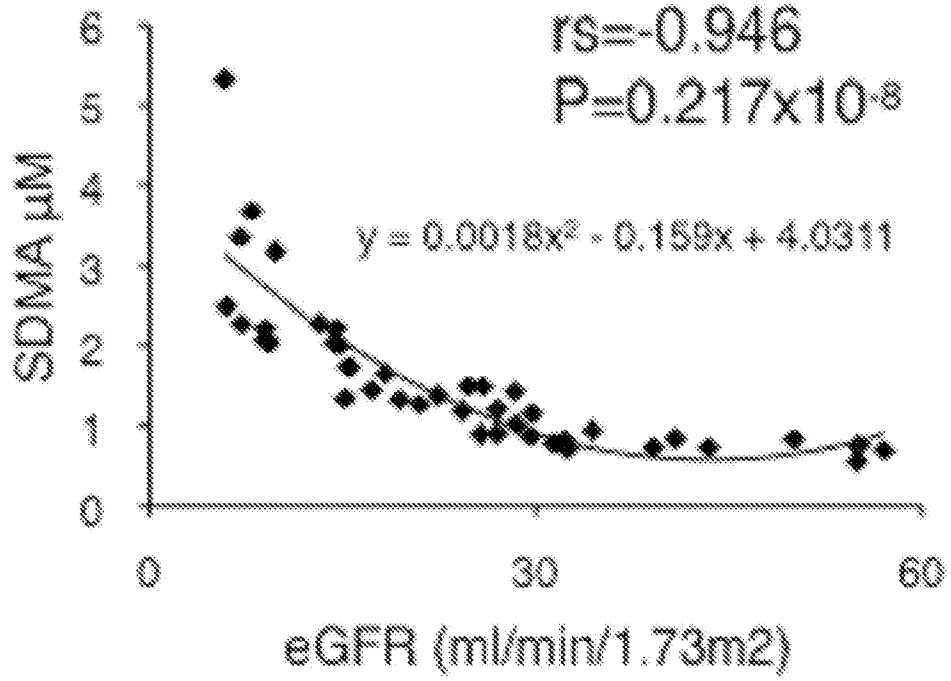
[図18]


*
y = -0.1718x + 52.486
Asn μM
80
70
60
50
40
30
20
10
0
rs=-0.337
P=0.033
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

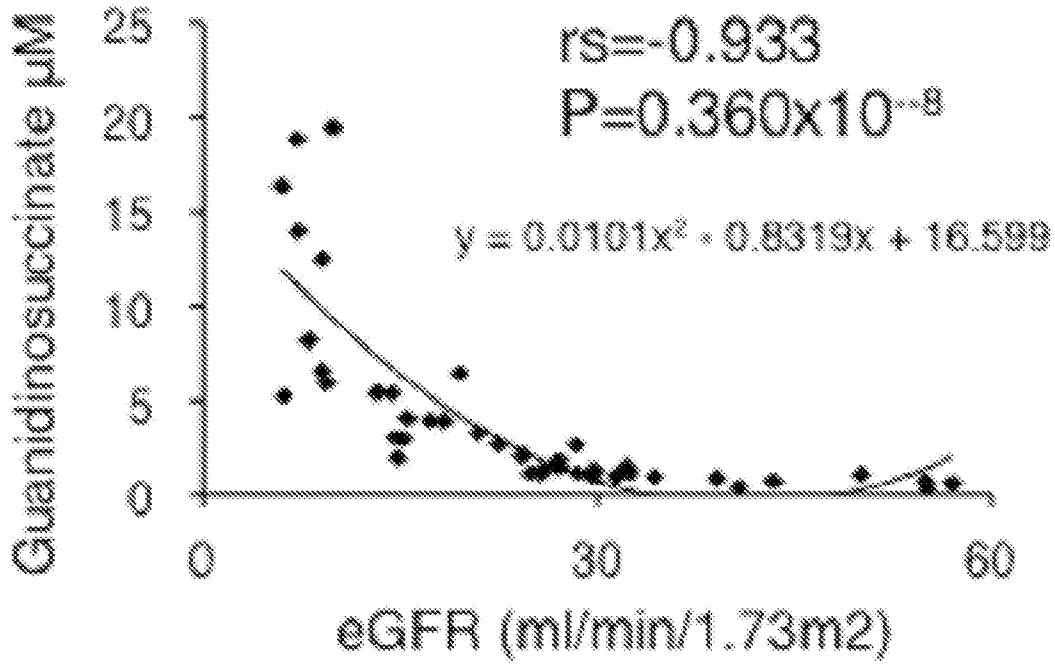
[図19]


creatinine μM
600
500
400
300
200
100
0
rs=-0.965
P=0.103 × 10⁻⁸
y = 0.2671x² - 22.97x + 555.81
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

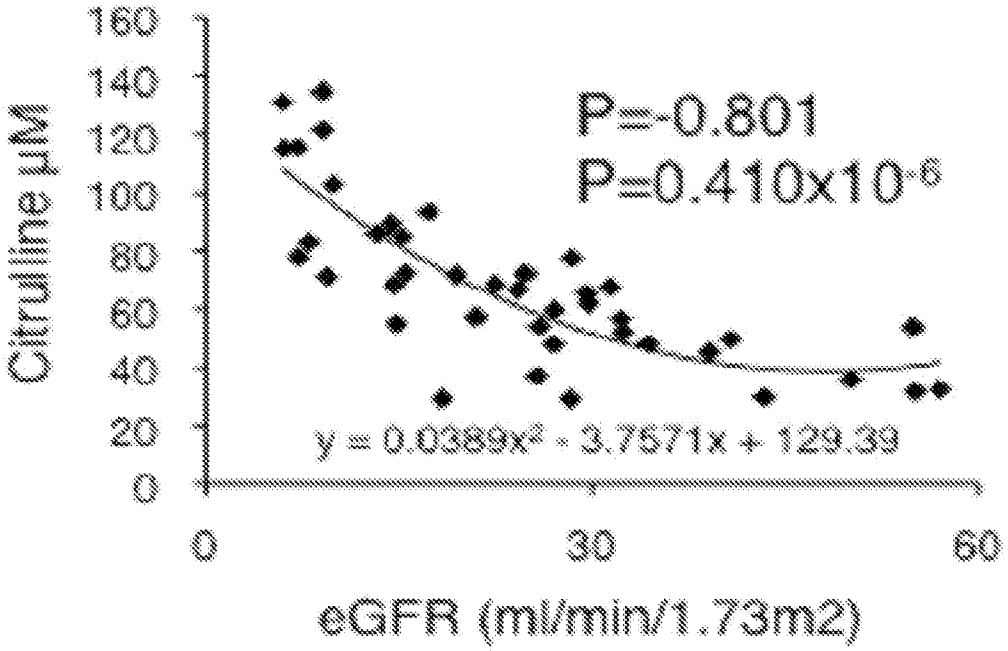
[図20]


rs=-0.946
P=0.217x10-8
y = 0.0018x2 - 0.159x + 4.0311
SDMA μM
6
5
4
3
2
1
0
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

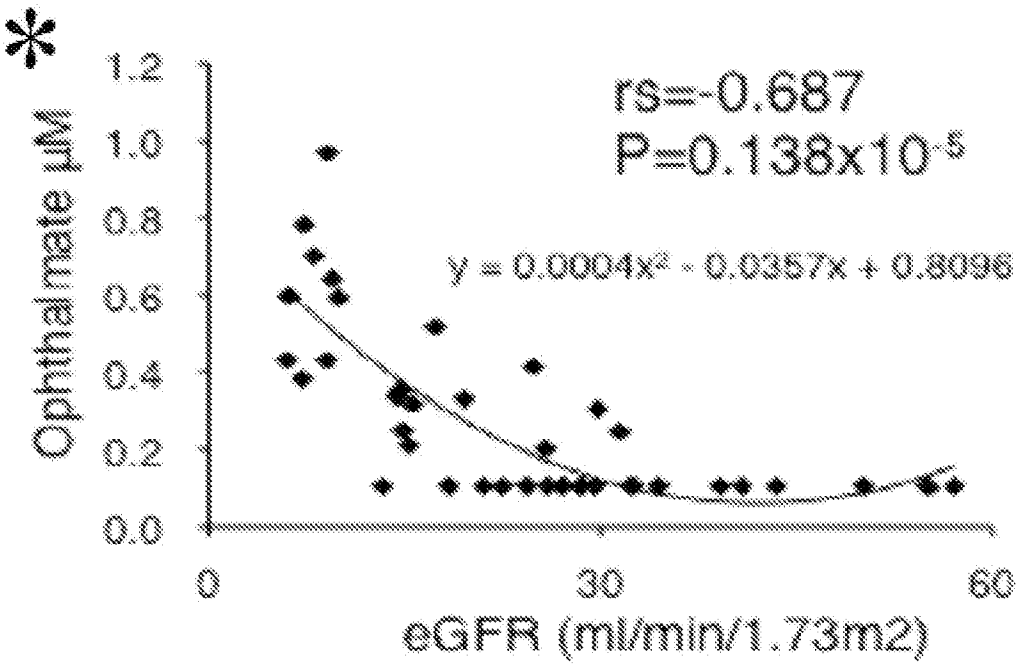
[図21]


rs=-0.933
P=0.360x10-8
y = 0.0101x2 - 0.8319x + 16.599
Guanidinosuccinate μM
25
20
15
10
5
0
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

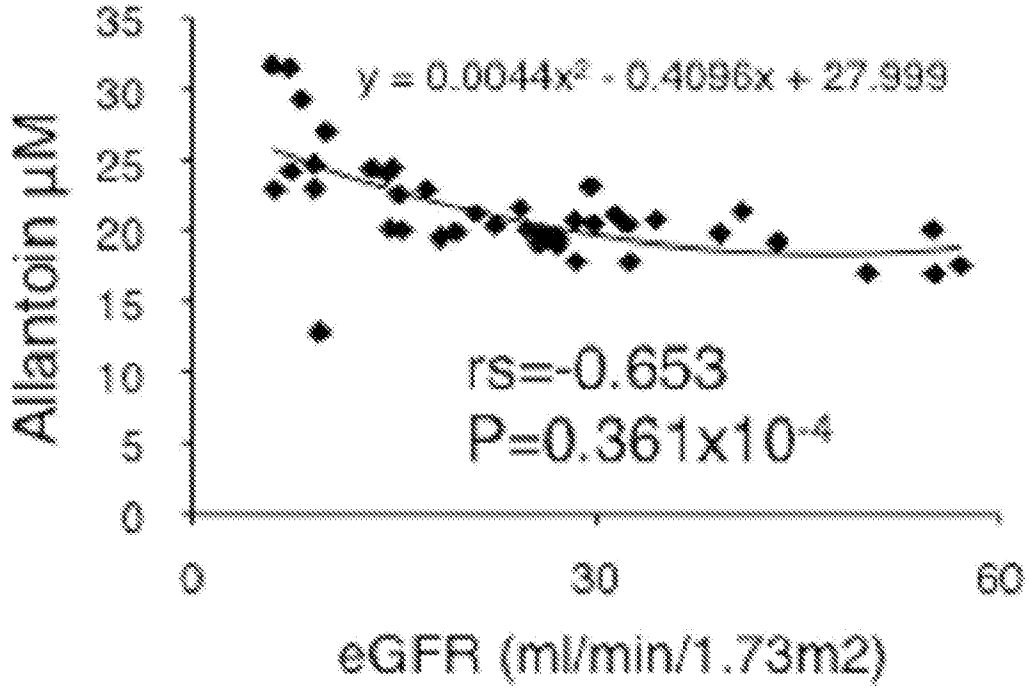
[図22]


Citrulline μM
160
140
120
100
80
60
40
20
0
P=-0.801
P=0.410x10-6
y = 0.0389x2 - 3.7571x + 129.39
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

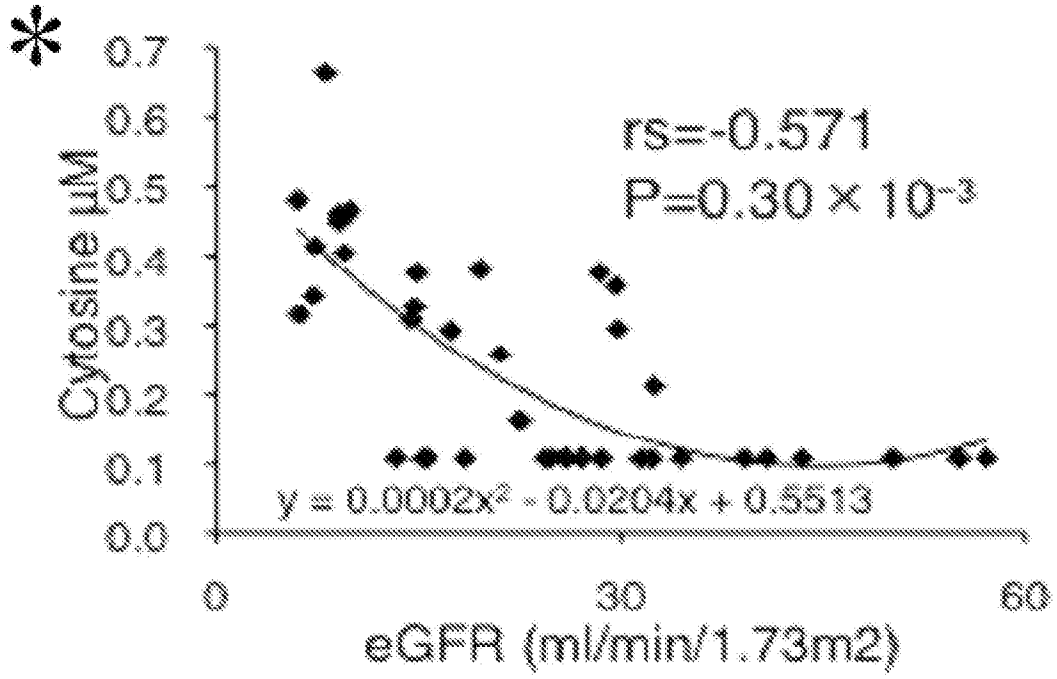
[図23]


*
Ophthalmate μM
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
rs=-0.687
P=0.138x10-5
y = 0.0004x2 - 0.0357x + 0.8096
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

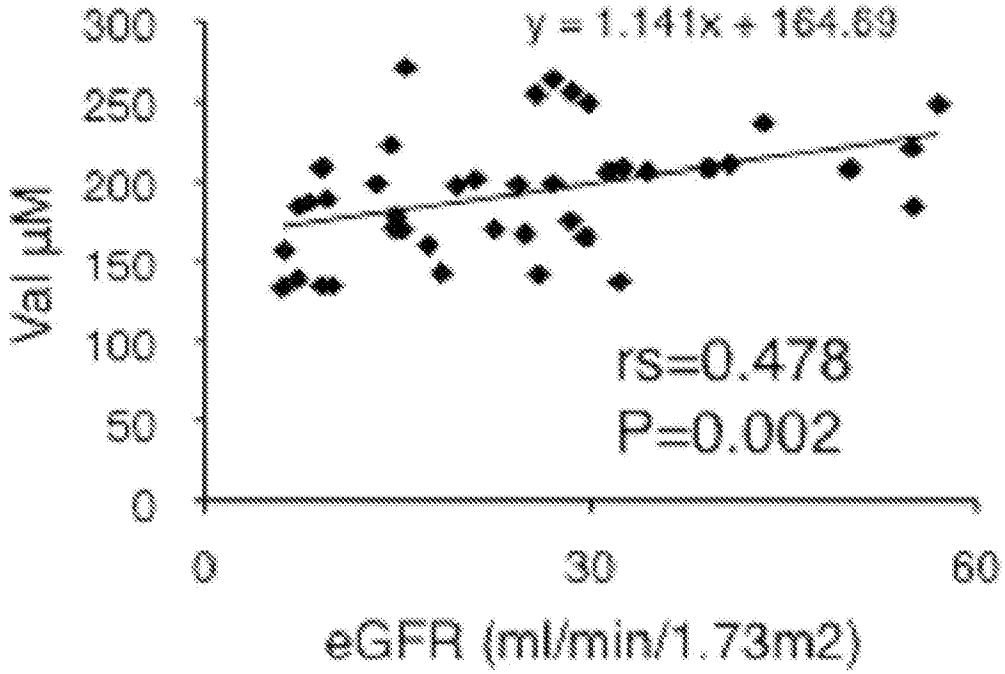
[図24]


y = 0.0044x² - 0.4096x + 27.999
rs=-0.653
P=0.361x10⁻⁴
Allantoin μM
35
30
25
20
15
10
5
0
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

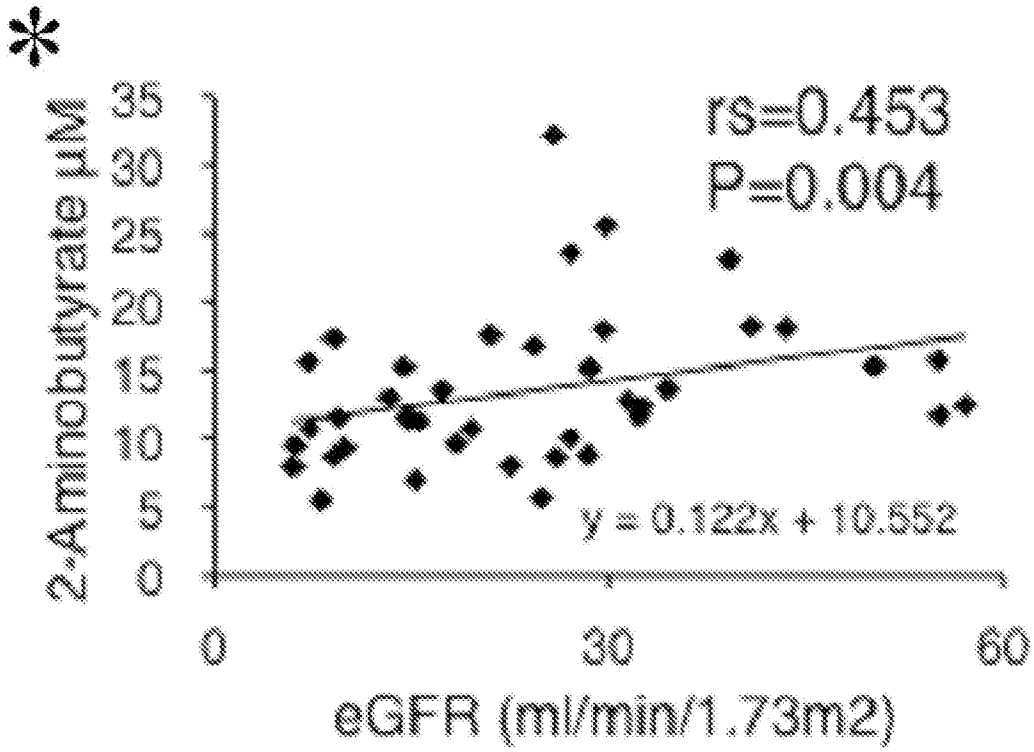
[図25]


rs=-0.571
P=0.30 × 10⁻³
y = 0.0002x² - 0.0204x + 0.5513
Cytosine μM
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

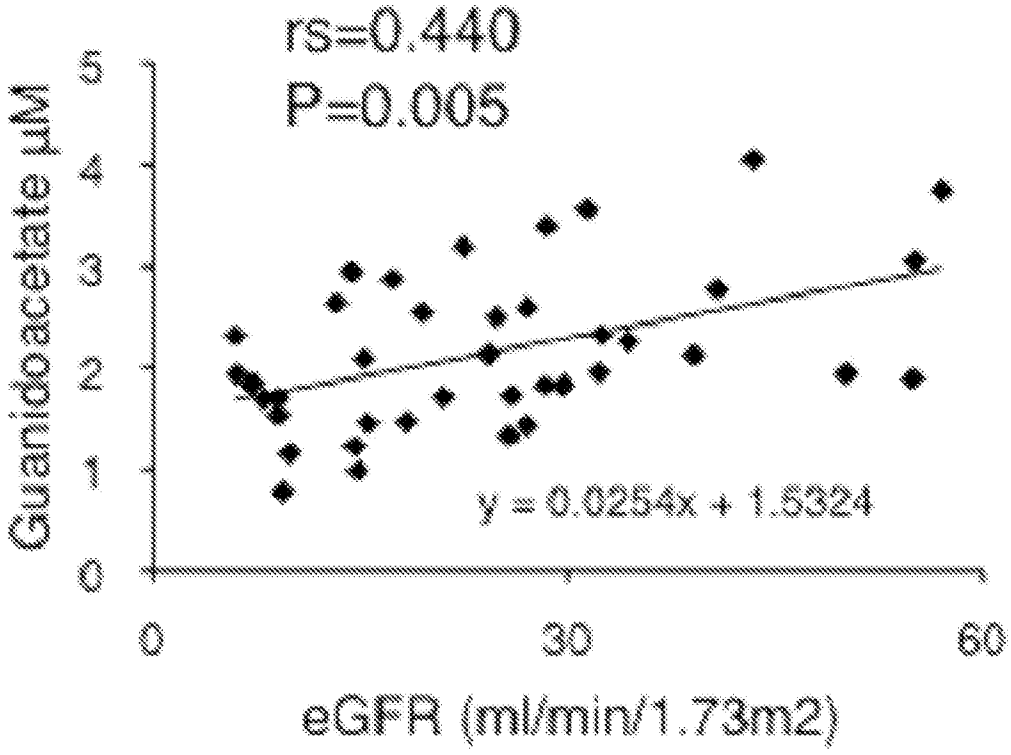
[図26]


y = 1.141x + 164.69
Val μM
300
250
200
150
100
50
0
rs=0.478
P=0.002
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

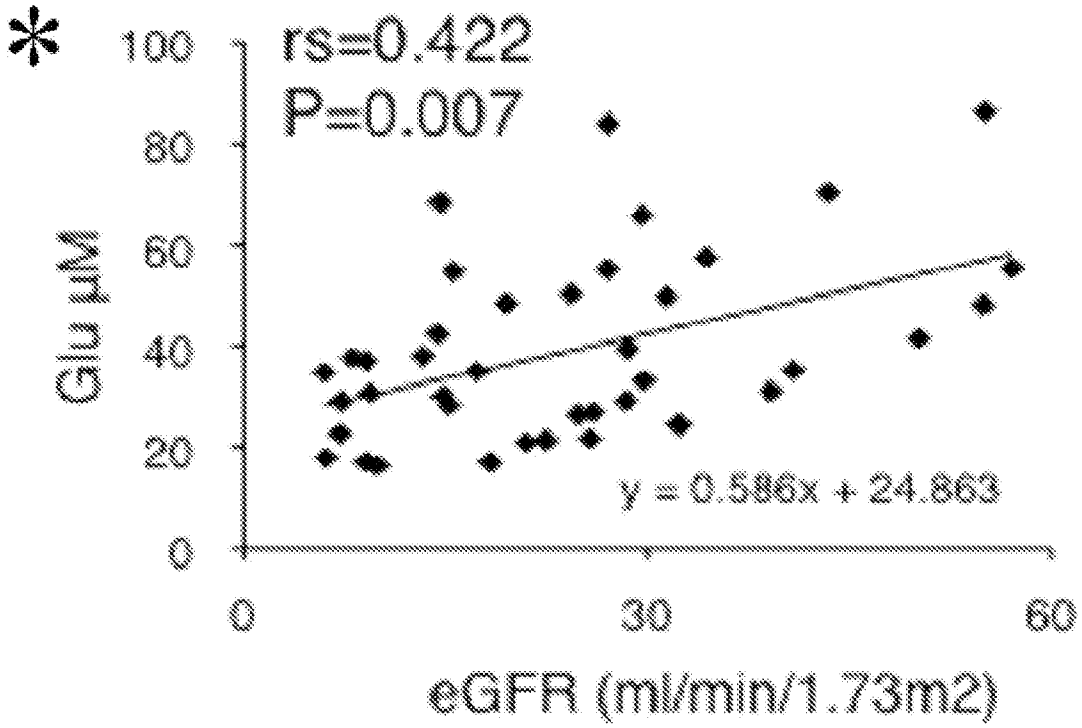
[図27]


*
2-Aminobutyrate μM
35
30
25
20
15
10
5
0
rs=0.453
P=0.004
y = 0.122x + 10.552
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

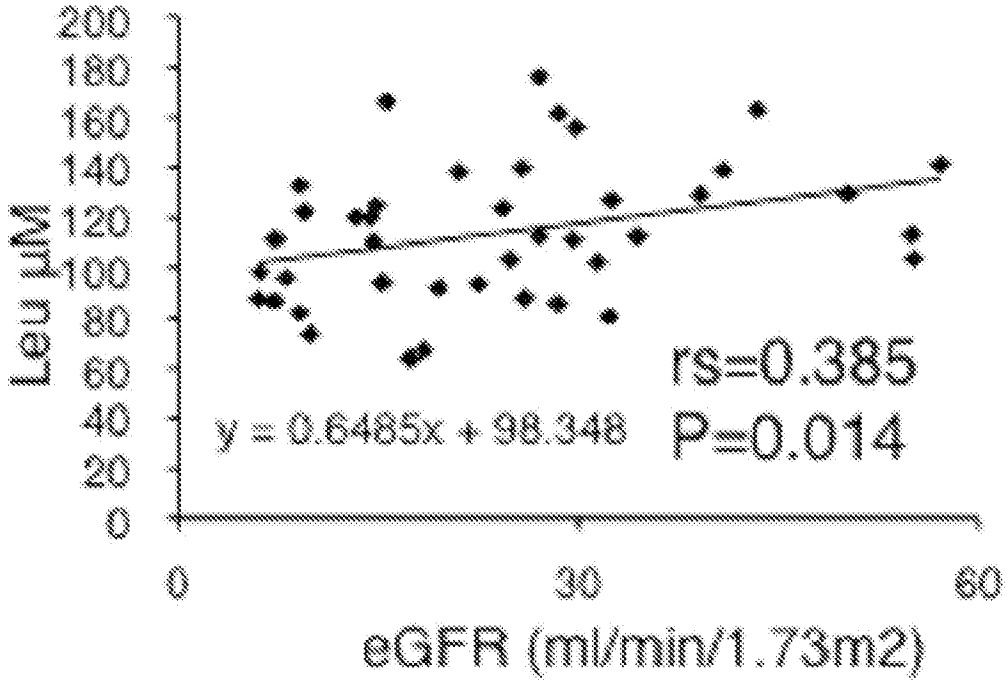
[図28]


rs=0.440
P=0.005
Guanidoacetate μM
5
4
3
2
1
0
y = 0.0254x + 1.5324
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

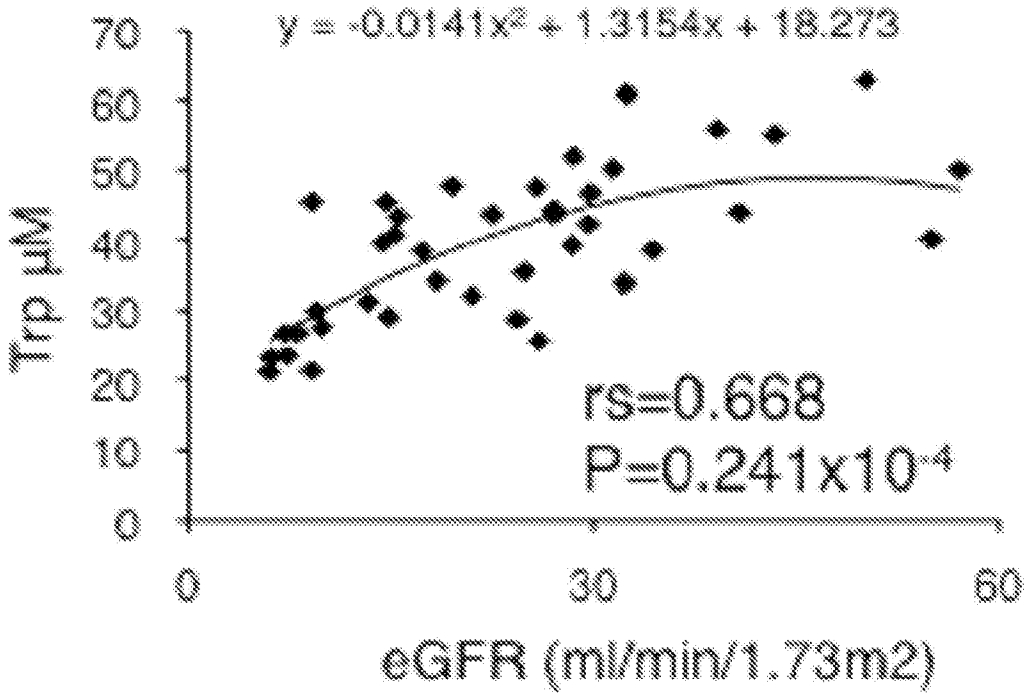
[図29]


*
rs=0.422
P=0.007
Glu μM
100
80
60
40
20
0
y = 0.586x + 24.863
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

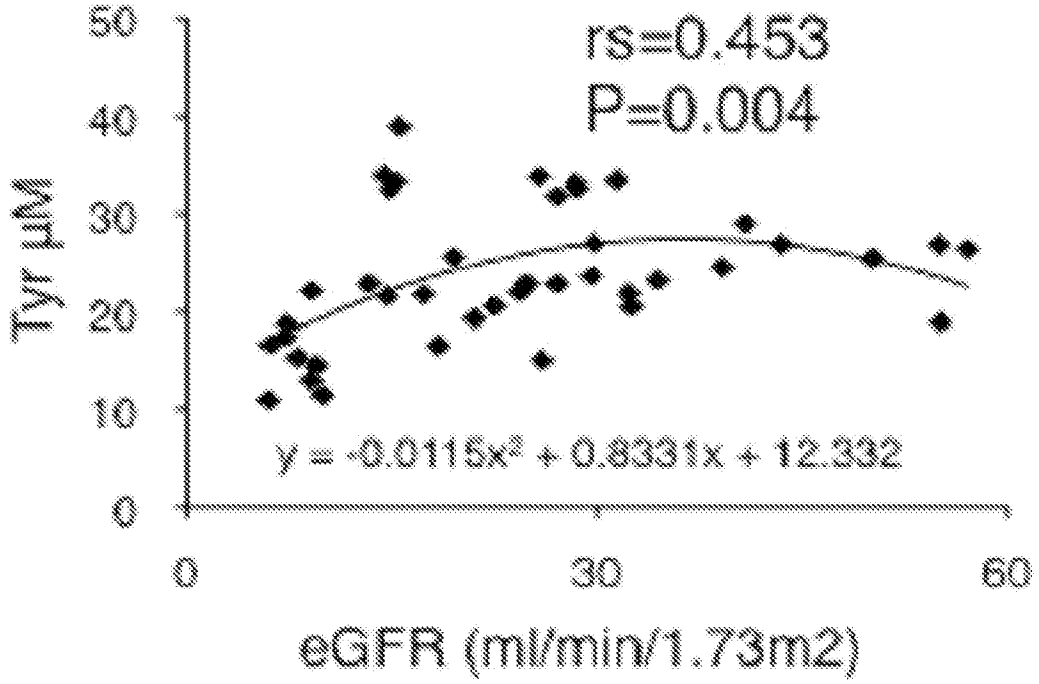
[図30]


200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Leu μM
y = 0.6485x + 98.348
rs=0.385
P=0.014
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

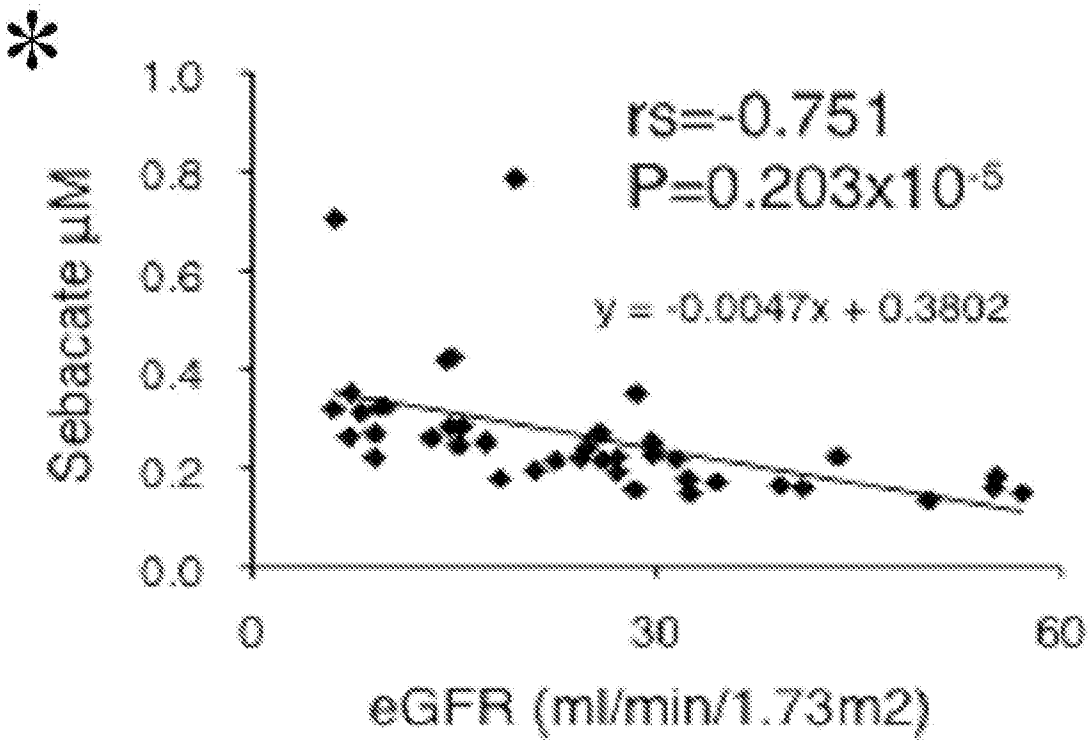
[図31]


y = -0.0141x² + 1.3154x + 18.273
70
60
50
40
30
20
10
0
Trp μM
rs=0.668
P=0.241x10⁻⁴
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

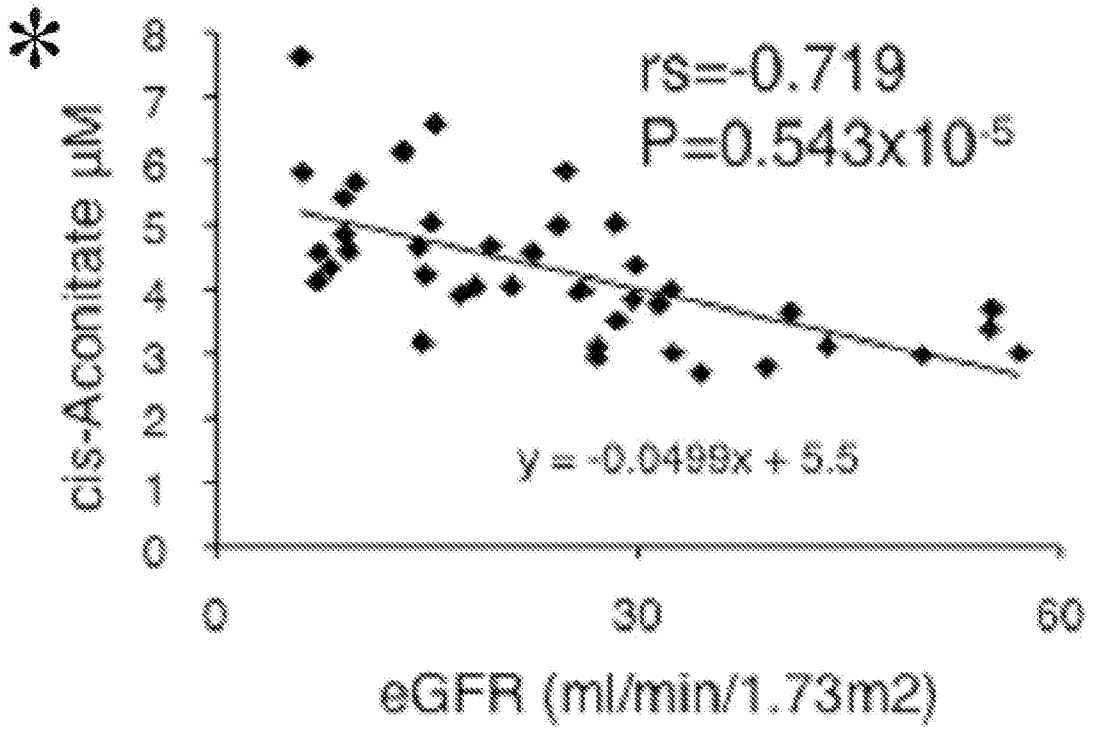
[図32]


rs=0.453
P=0.004
Tyr μM
50
40
30
20
10
0
y = -0.0115x² + 0.8331x + 12.332
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

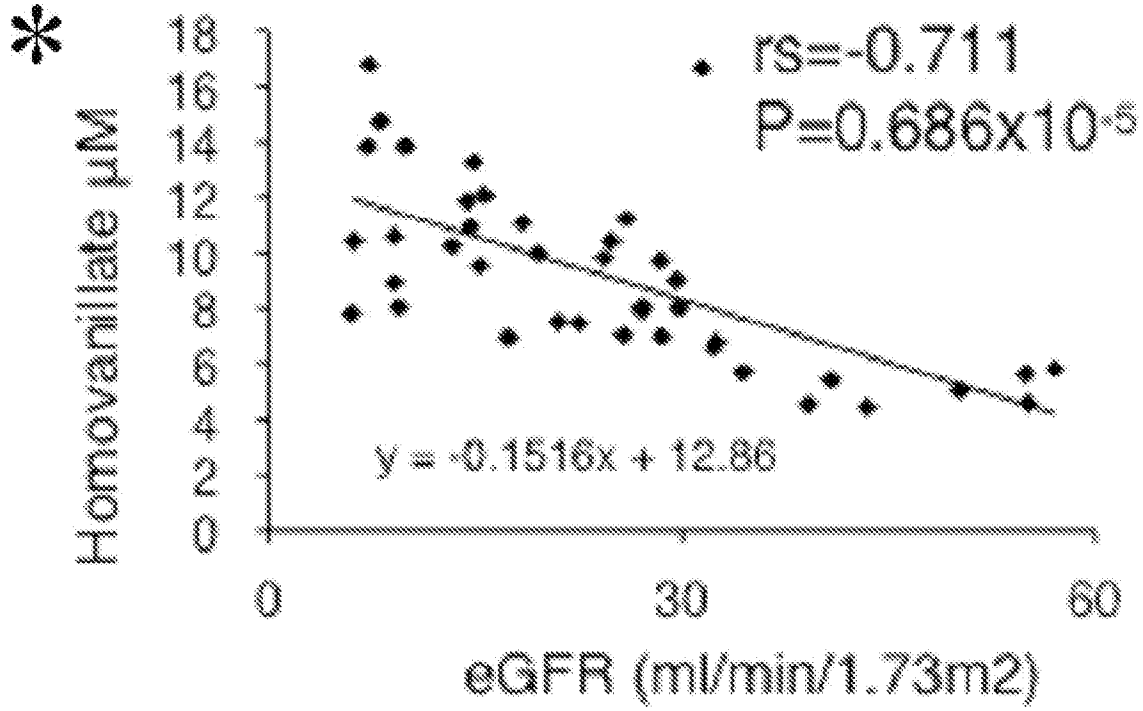
[図33]


*
rs=-0.751
P=0.203x10⁻⁵
Sebacate μM
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
y = -0.0047x + 0.3802
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

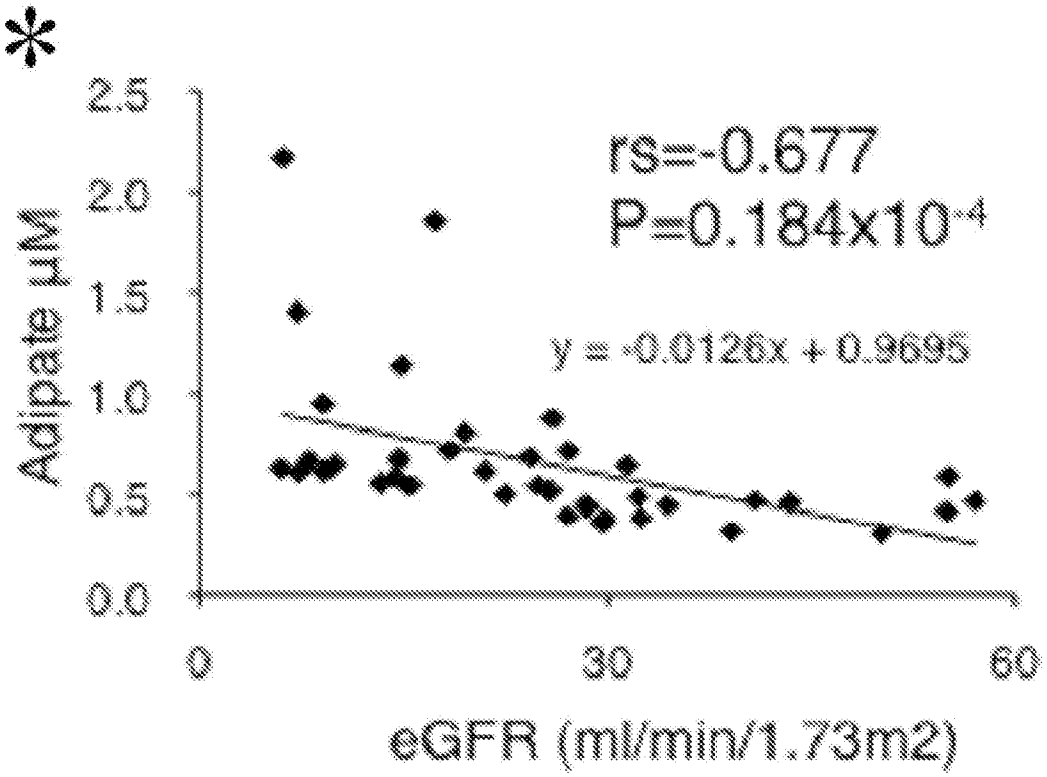
[図34]


*
rs=-0.719
P=0.543x10-5
y = -0.0499x + 5.5
cis-Aconitate μM
0
1
2
3
4
5
6
7
8
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

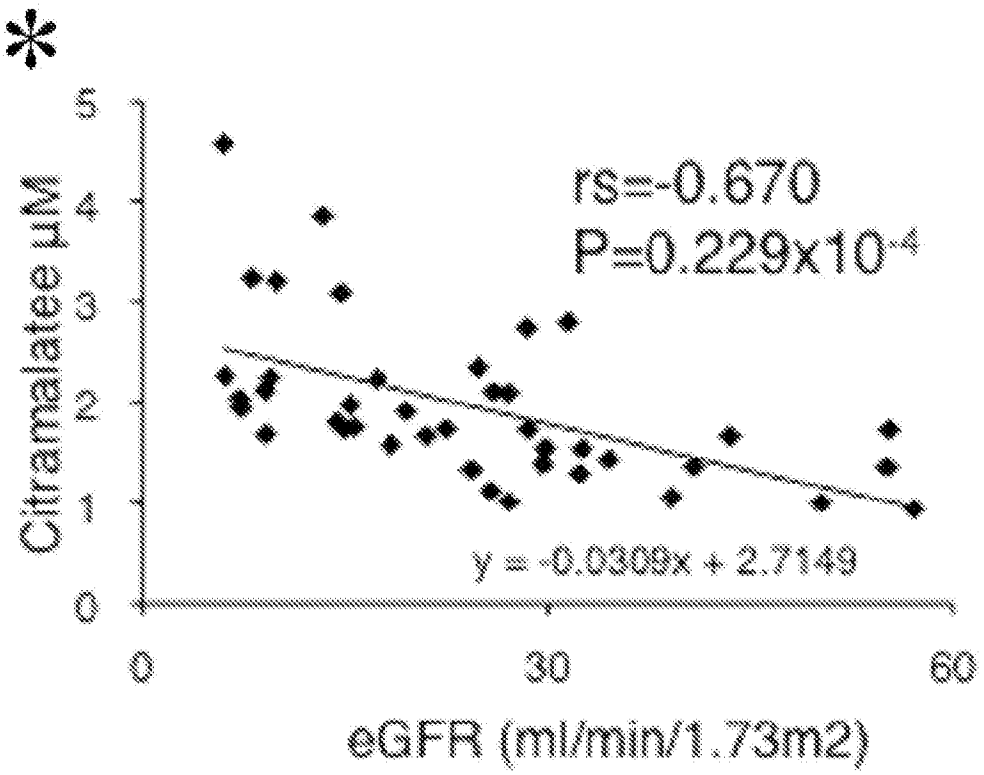
[図35]


*
rs=-0.711
P=0.686x10-5
y = -0.1516x + 12.86
Homovanillate μM
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

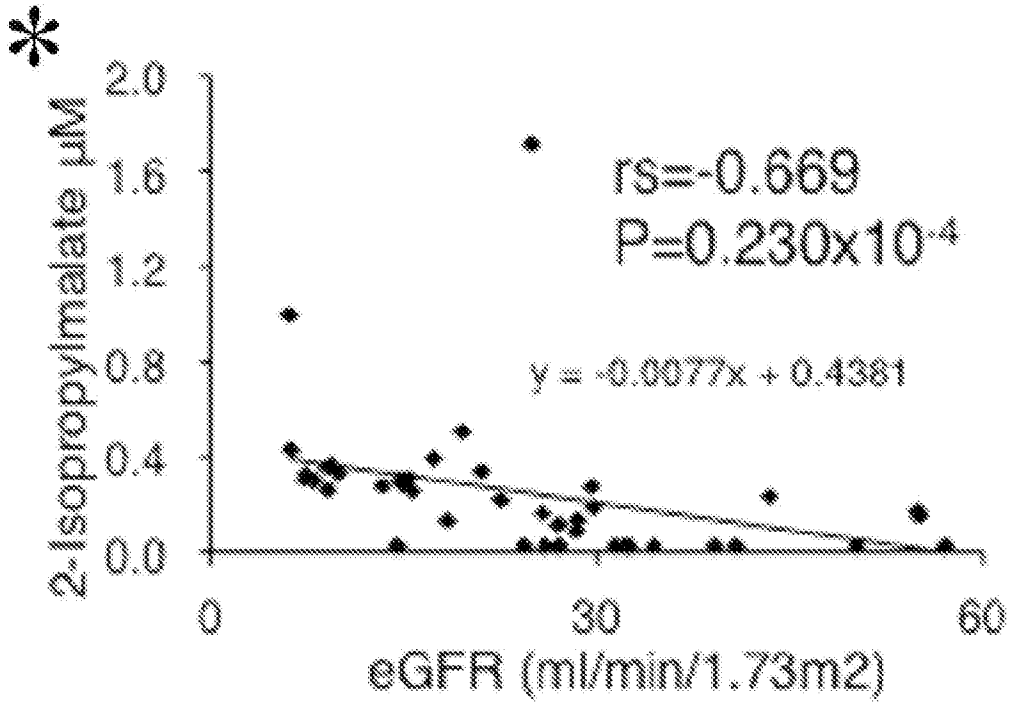
[図36]


*
rs=-0.677
P=0.184x10-4
y = -0.0126x + 0.9695
Adipate μM
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

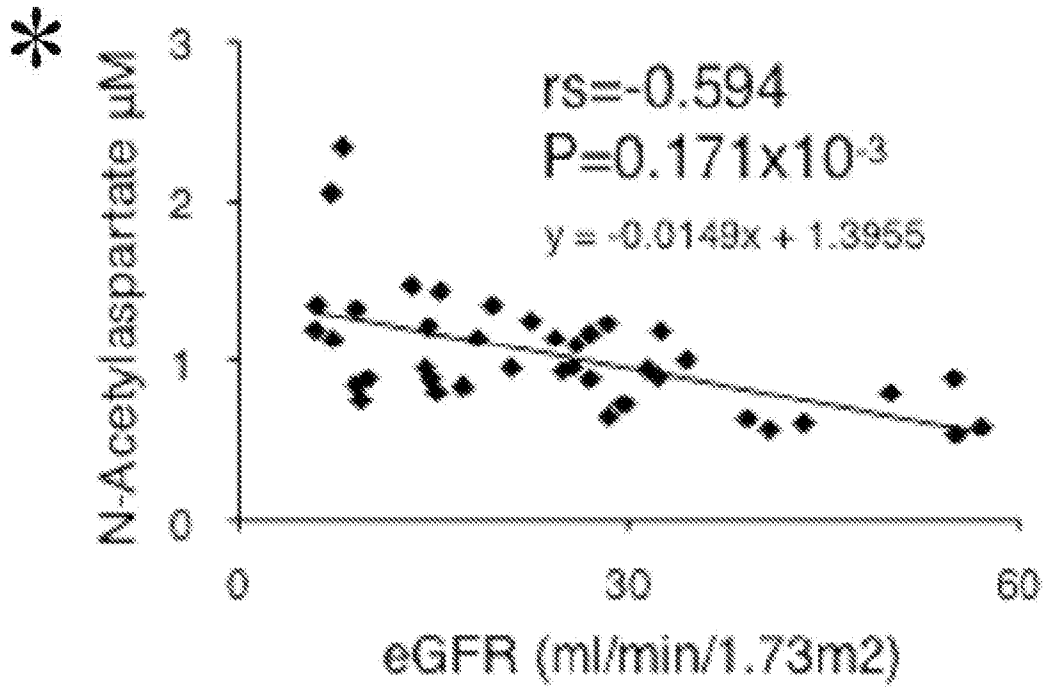
[図37]


*
rs=-0.670
P=0.229x10-4
y = -0.0309x + 2.7149
Citramalatee μM
5
4
3
2
1
0
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

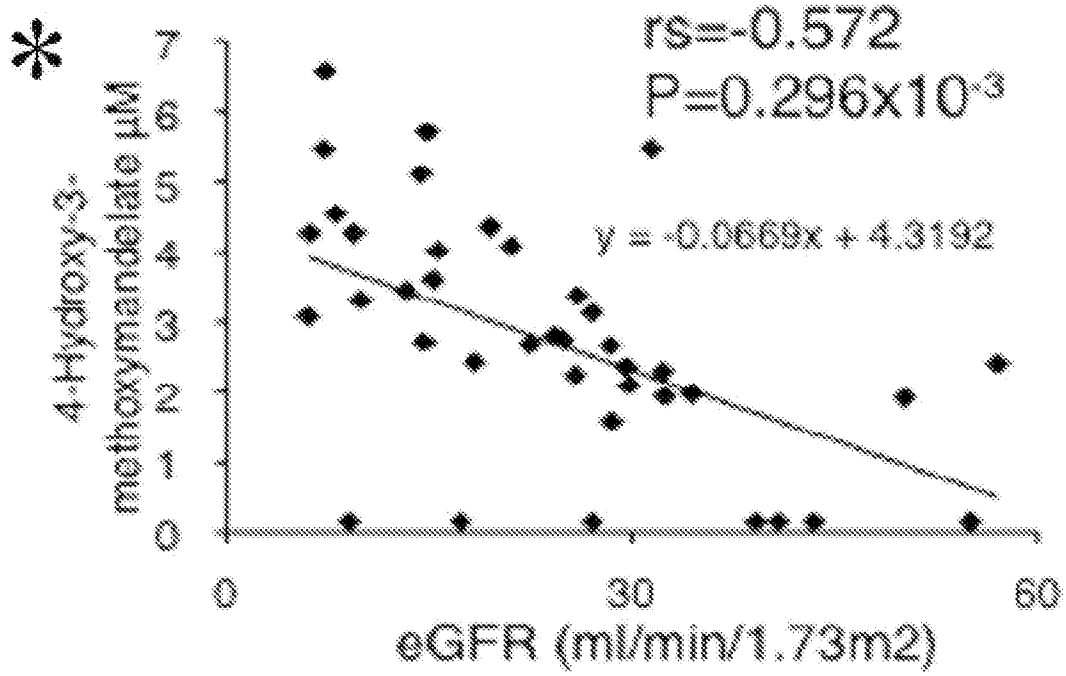
[図38]


*
2-Isopropylmalate μM
2.0
1.6
1.2
0.8
0.4
0.0
rs=-0.669
P=0.230x10-4
y = -0.0077x + 0.4381
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

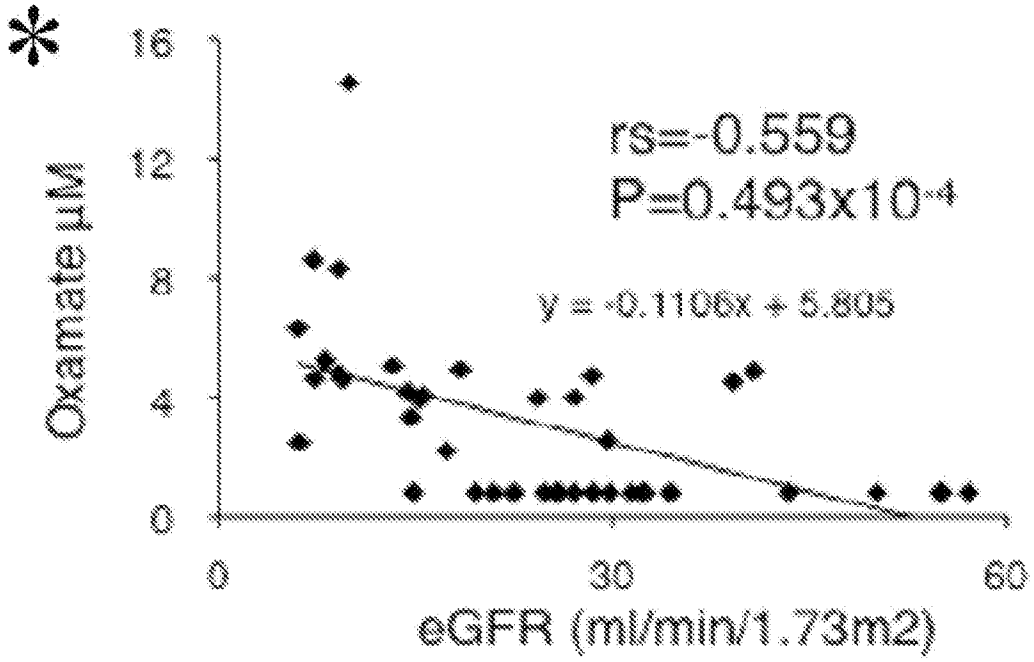
[図39]


*
N-Acetylaspartate μM
3
2
1
0
rs=-0.594
P=0.171x10-3
y = -0.0149x + 1.3955
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

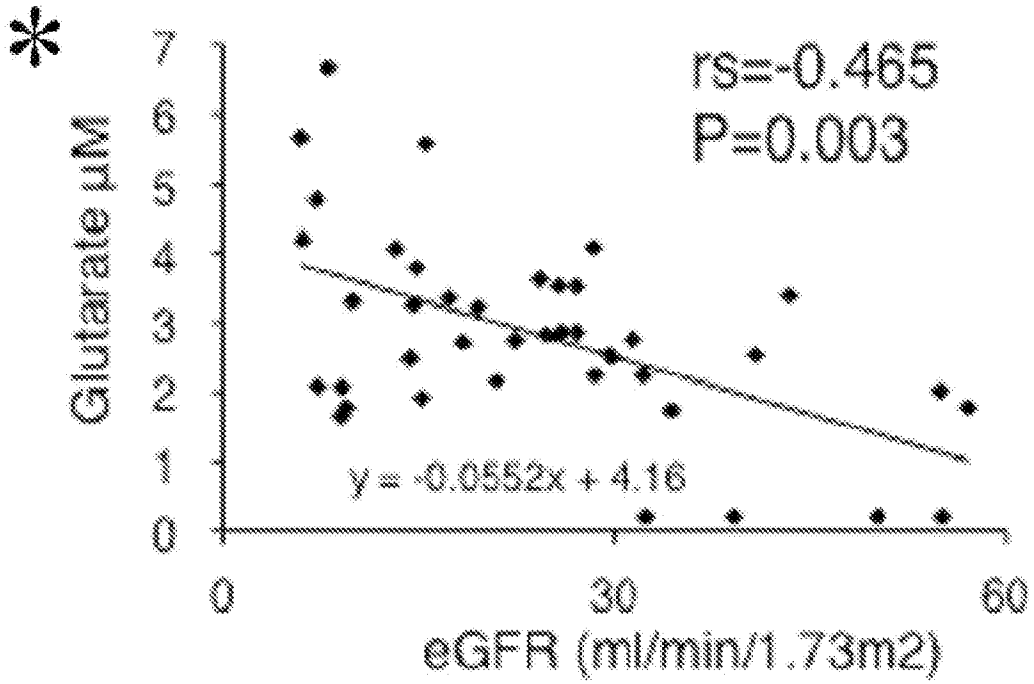
[図40]


*
rs=-0.572
P=0.296x10-3
y = -0.0669x + 4.3192
4-Hydroxy-3-methoxymandelate μM
0
1
2
3
4
5
6
7
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

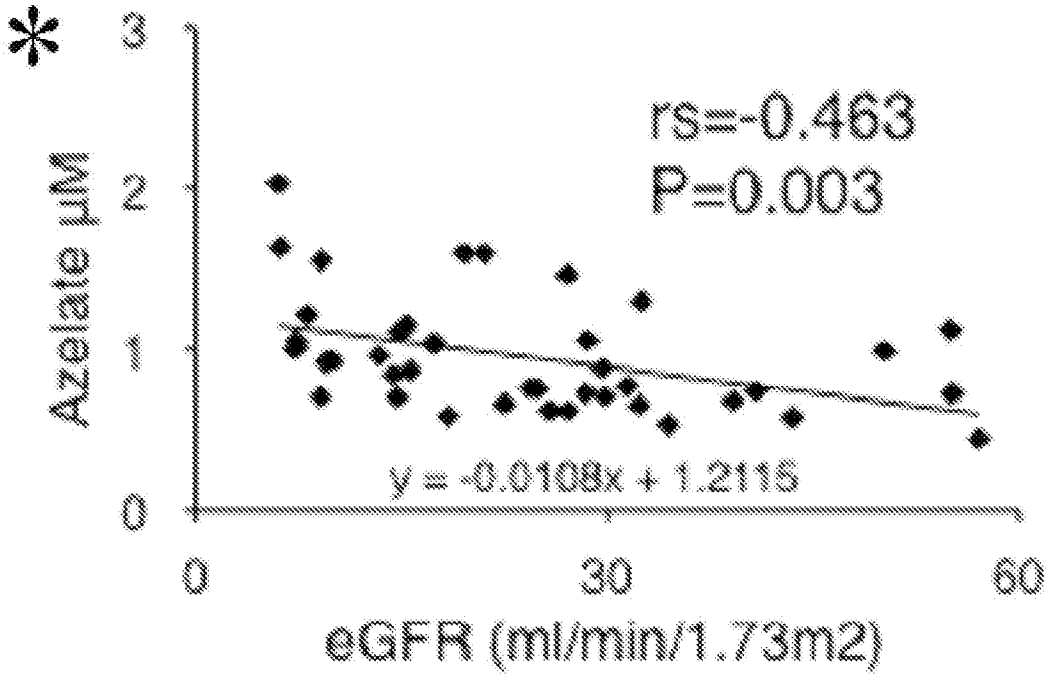
[図41]


*
rs=-0.559
P=0.493x10-4
y = -0.1106x + 5.805
Oxamate μM
0
4
8
12
16
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

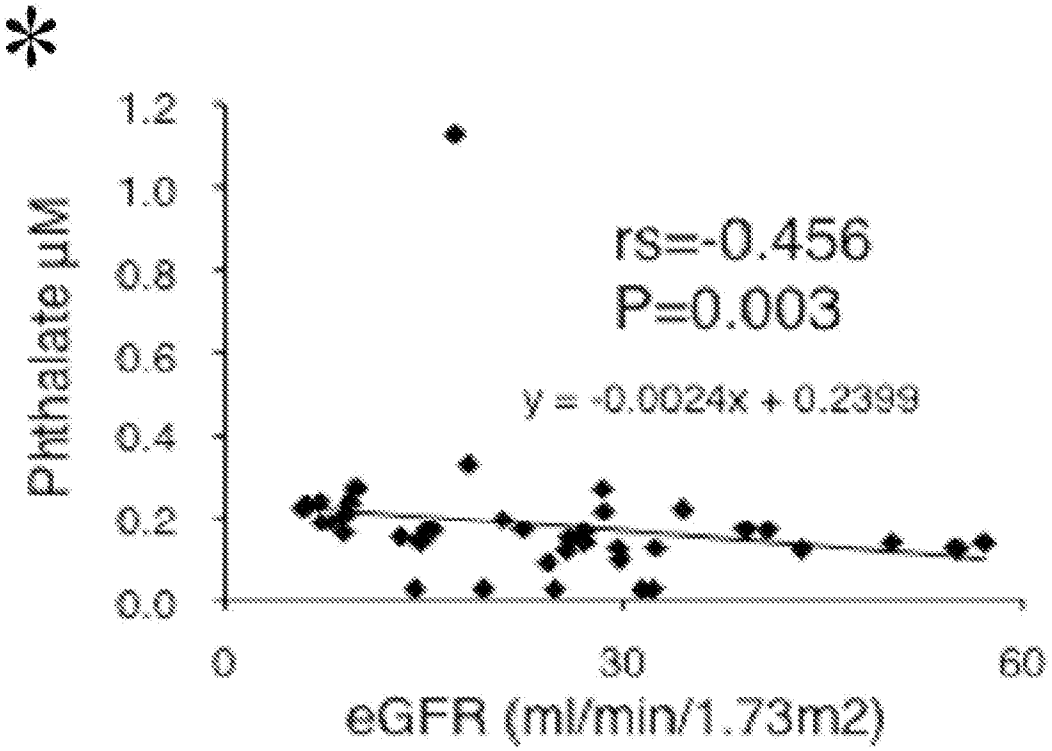
[図42]


*
rs=-0.465
P=0.003
Glutarate μM
7
6
5
4
3
2
1
0
y = -0.0552x + 4.16
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

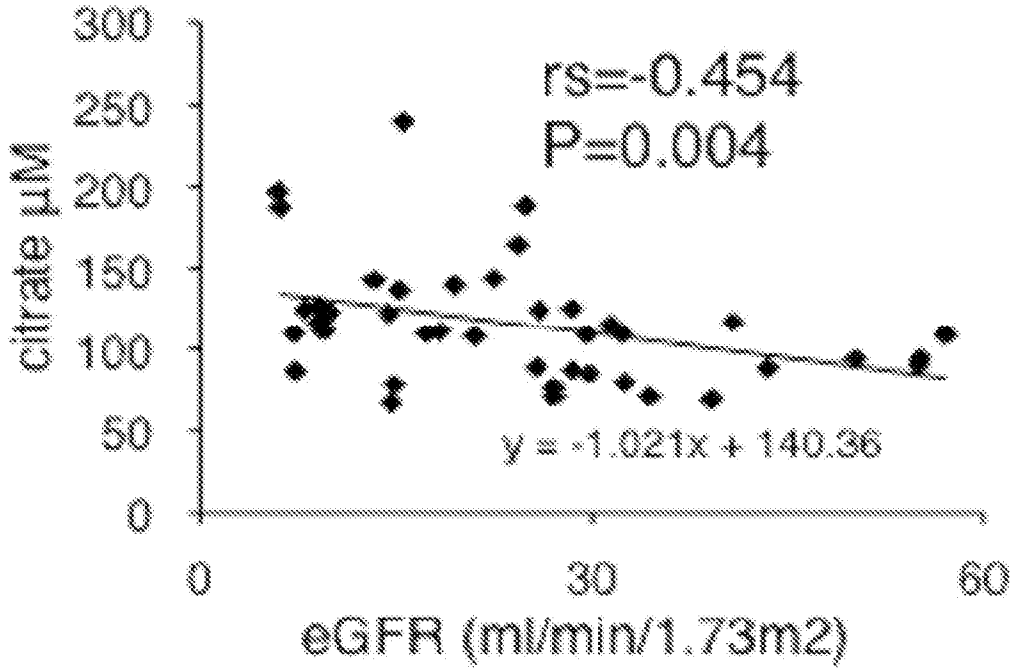
[図43]


*
rs=-0.463
P=0.003
Azelate μM
3
2
1
0
y = -0.0108x + 1.2115
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

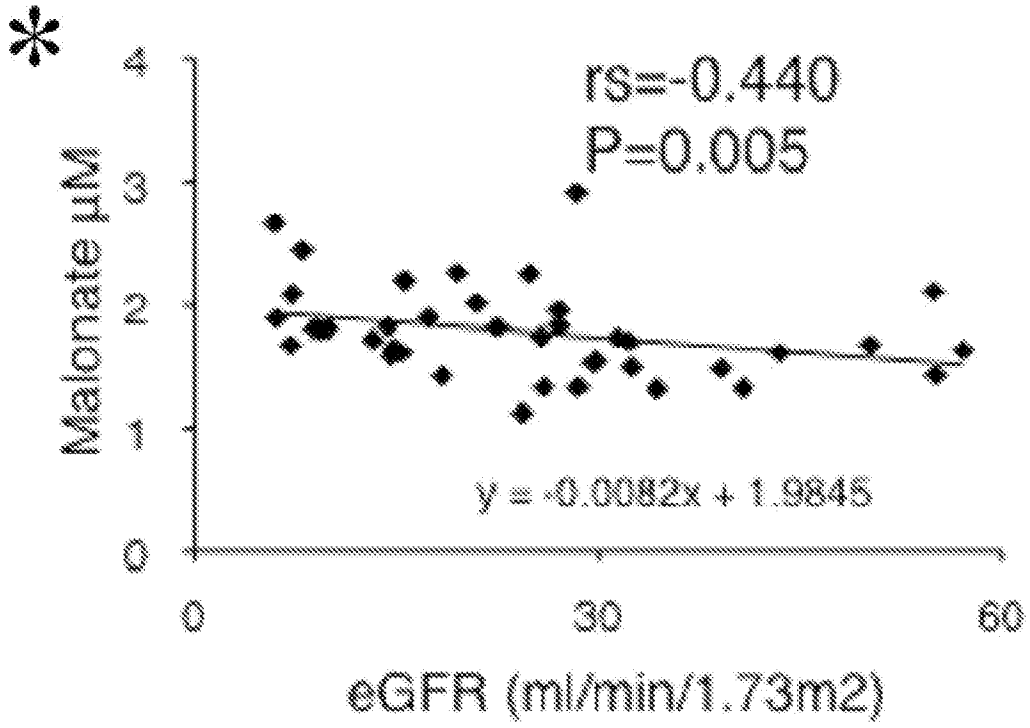
[図44]


*
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Phthalate μM
rs=-0.456
P=0.003
y = -0.0024x + 0.2399
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

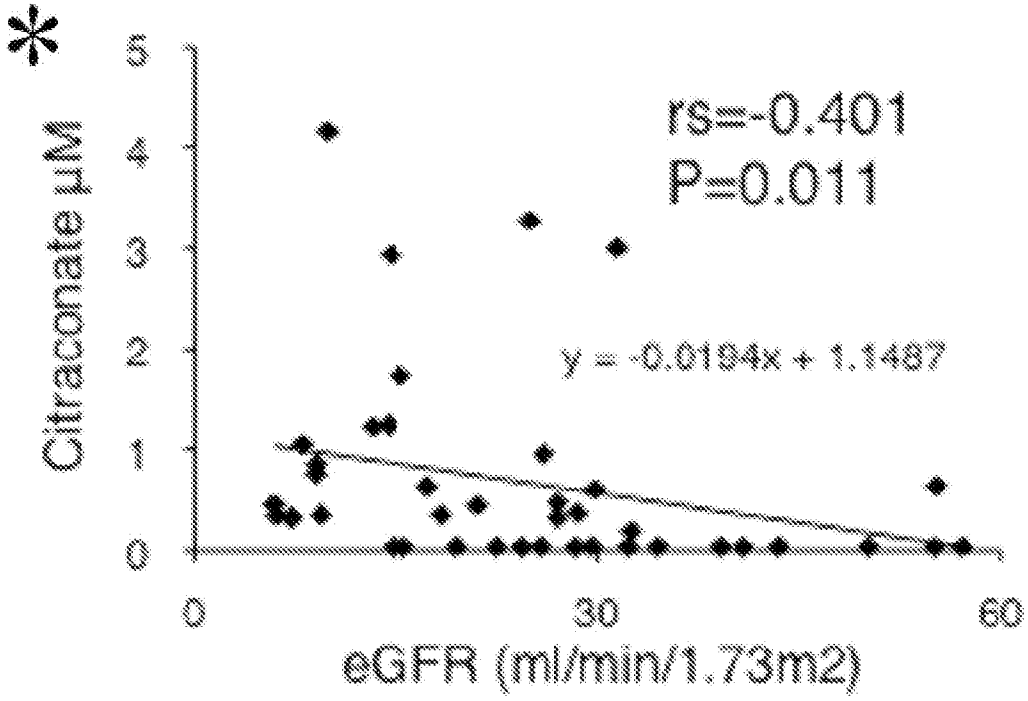
[図45]


300
250
200
150
100
50
0
citrate μM
rs=-0.454
P=0.004
y = -1.021x + 140.36
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

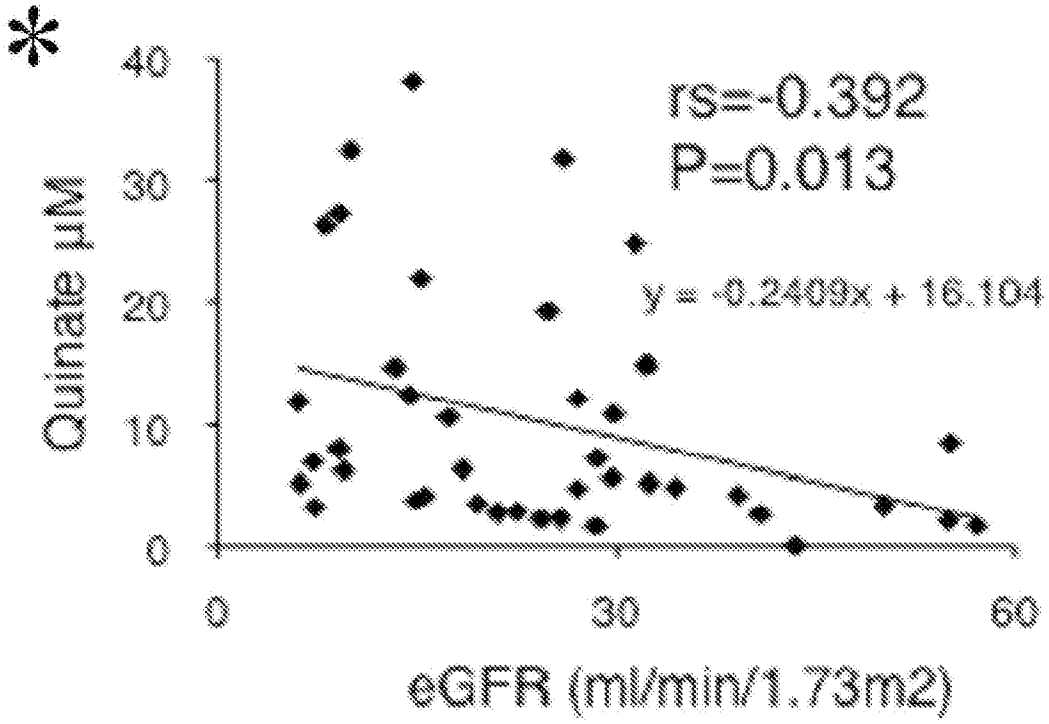
[図46]


*
rs=-0.440
P=0.005
Malonate μM
4
3
2
1
0
y = -0.0082x + 1.9845
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

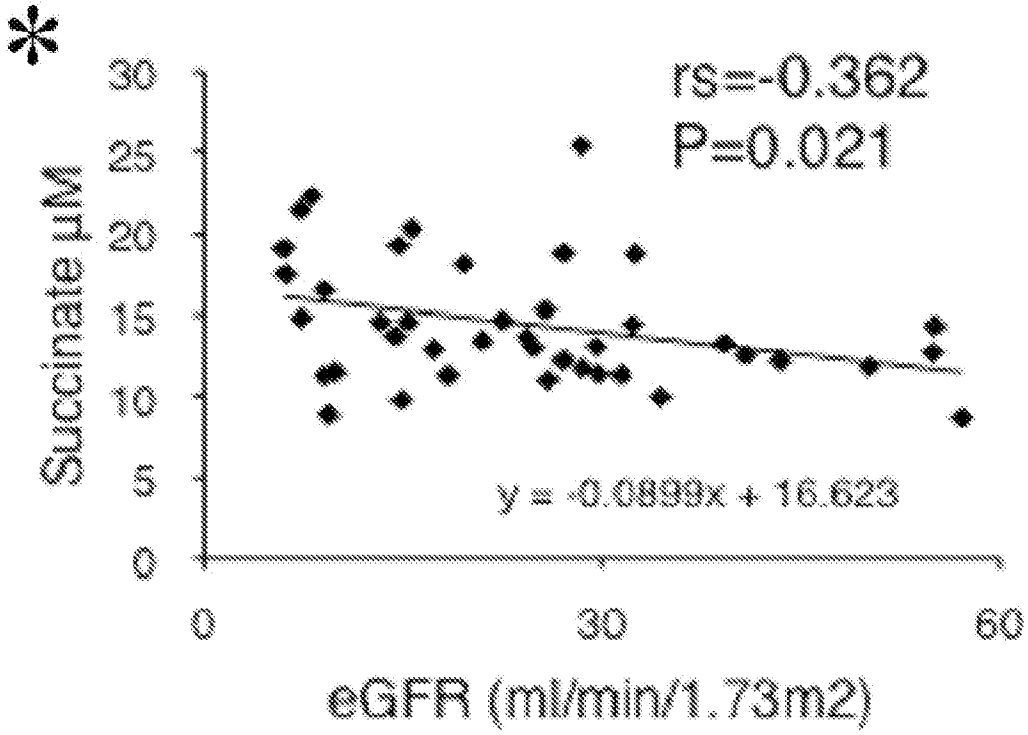
[図47]


*
rs=-0.401
P=0.011
Citraconate μM
5
4
3
2
1
0
y = -0.0194x + 1.1487
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

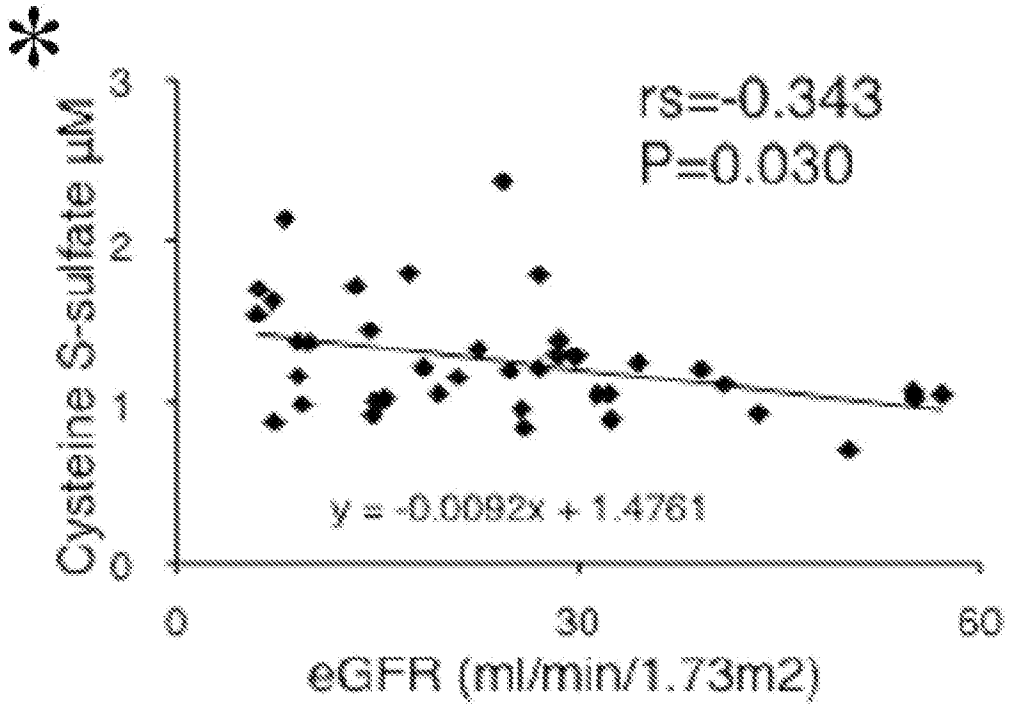
[図48]


*
rs=-0.392
P=0.013
y = -0.2409x + 16.104
Quinate μM
40
30
20
10
0
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

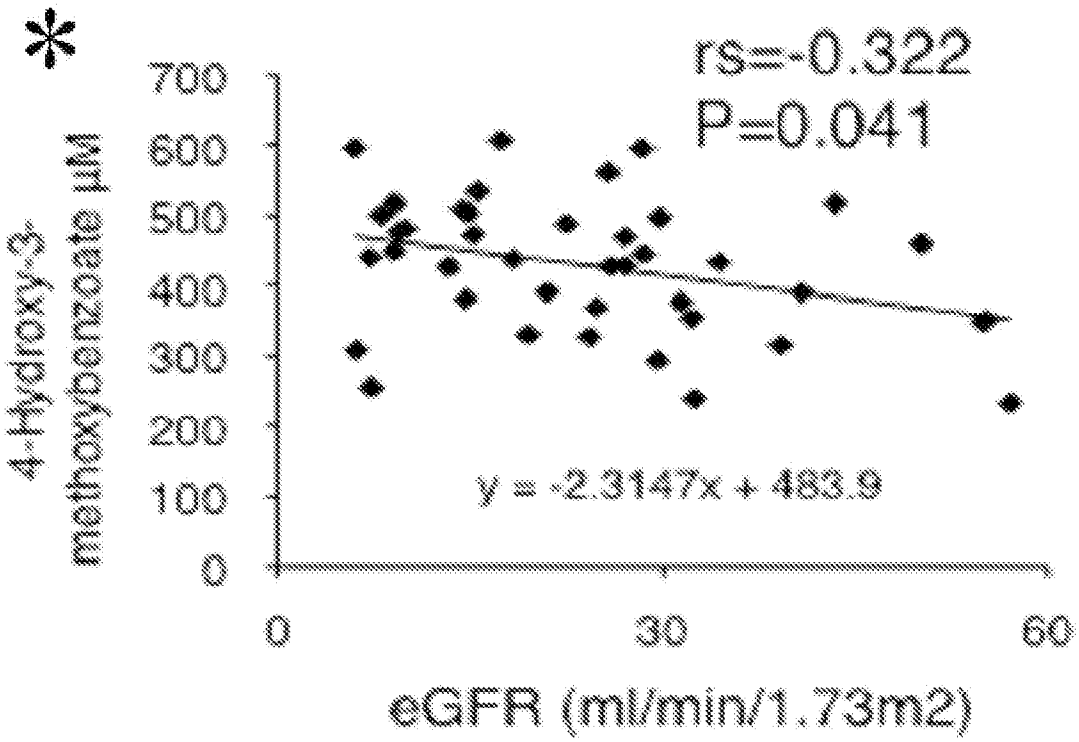
[図49]


*
rs=-0.362
P=0.021
y = -0.0899x + 16.623
Succinate μM
30
25
20
15
10
5
0
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

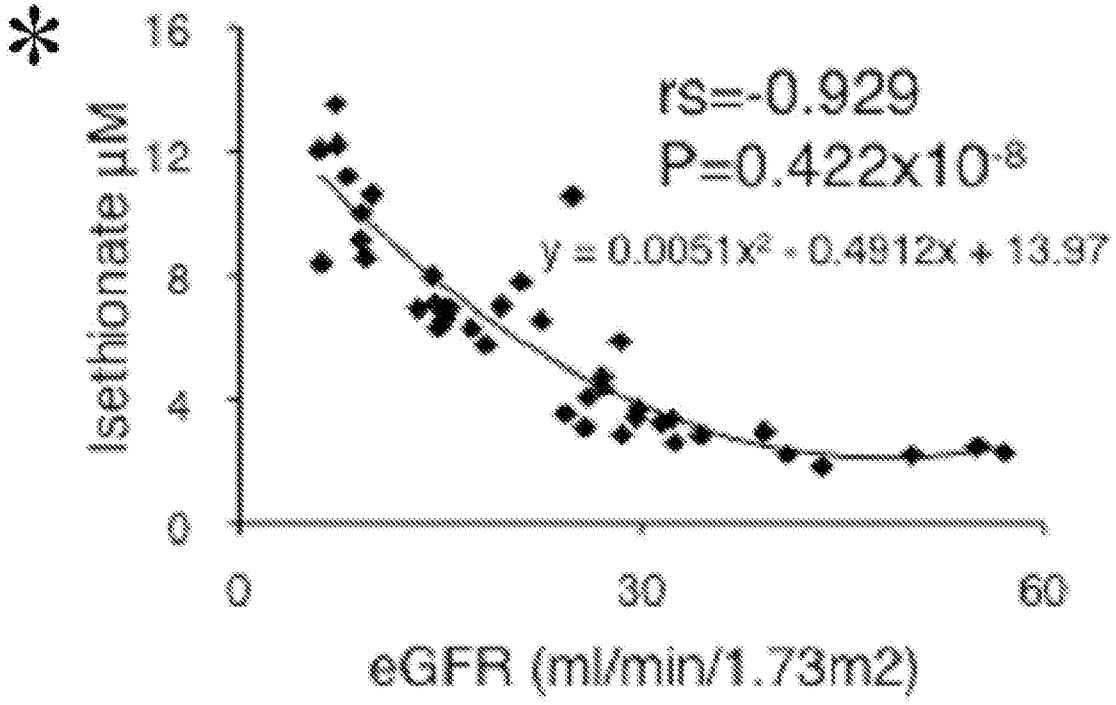
[図50]


*
rs=-0.343
P=0.030
Cysteine S-sulfate μM
3
2
1
0
y = -0.0092x + 1.4761
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

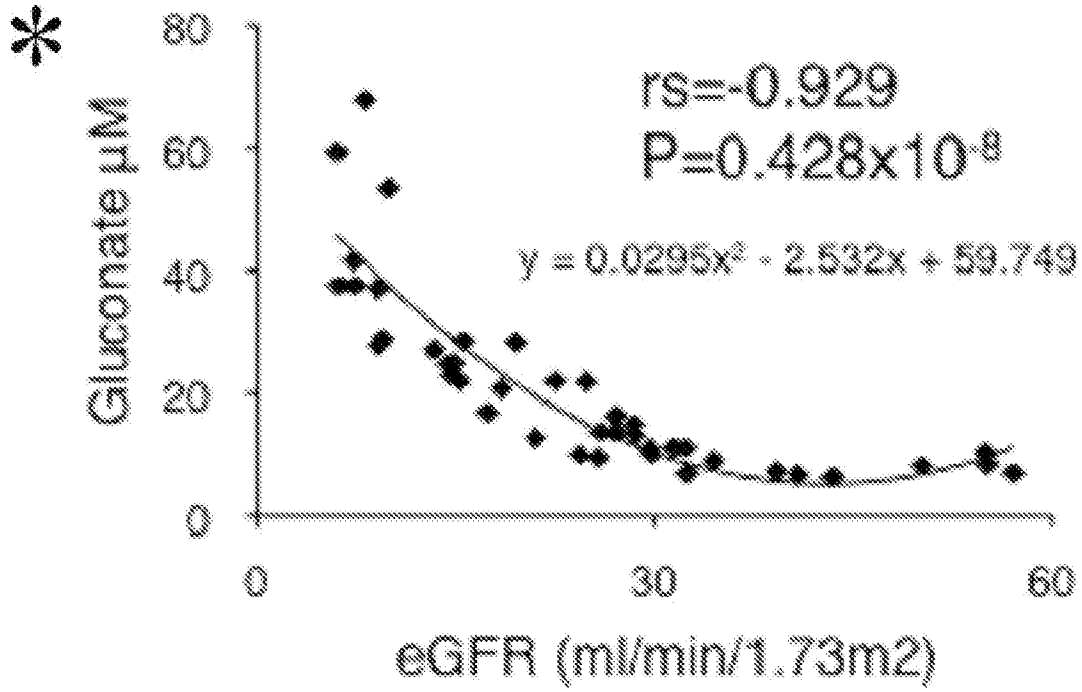
[図51]


*
rs=-0.322
P=0.041
4-Hydroxy-3-methoxybenzoate μM
700
600
500
400
300
200
100
0
y = -2.3147x + 483.9
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

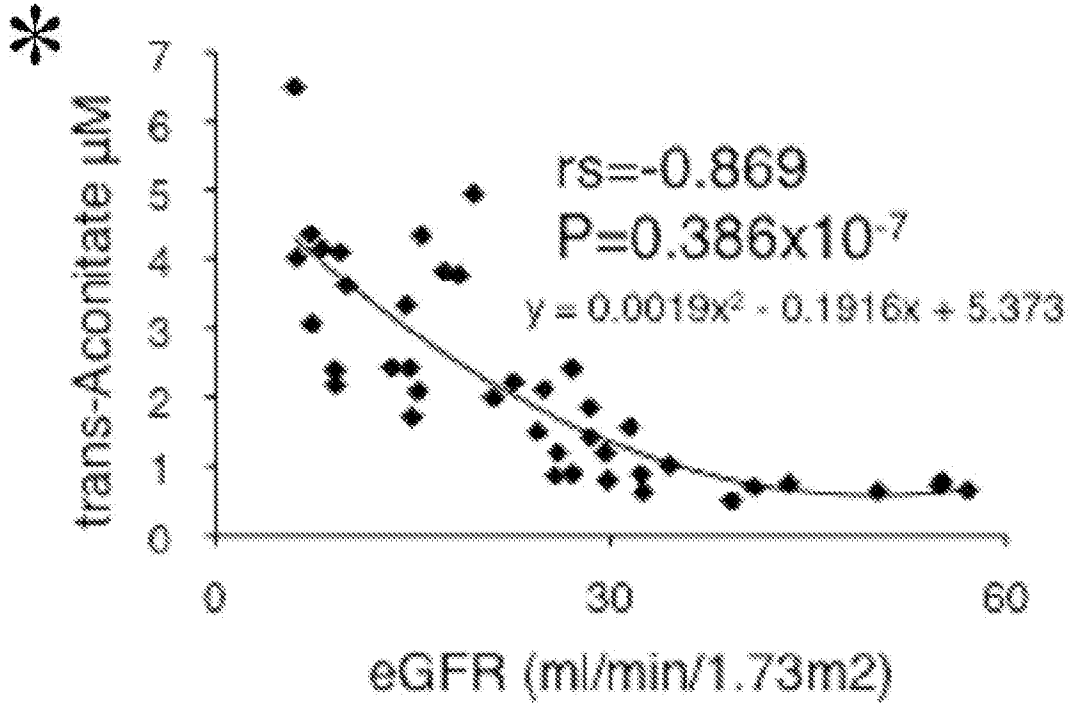
[図52]


*
16
12
8
4
0
Isethionate μM
rs=-0.929
P=0.422x10-8
y = 0.0051x2 - 0.4912x + 13.97
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

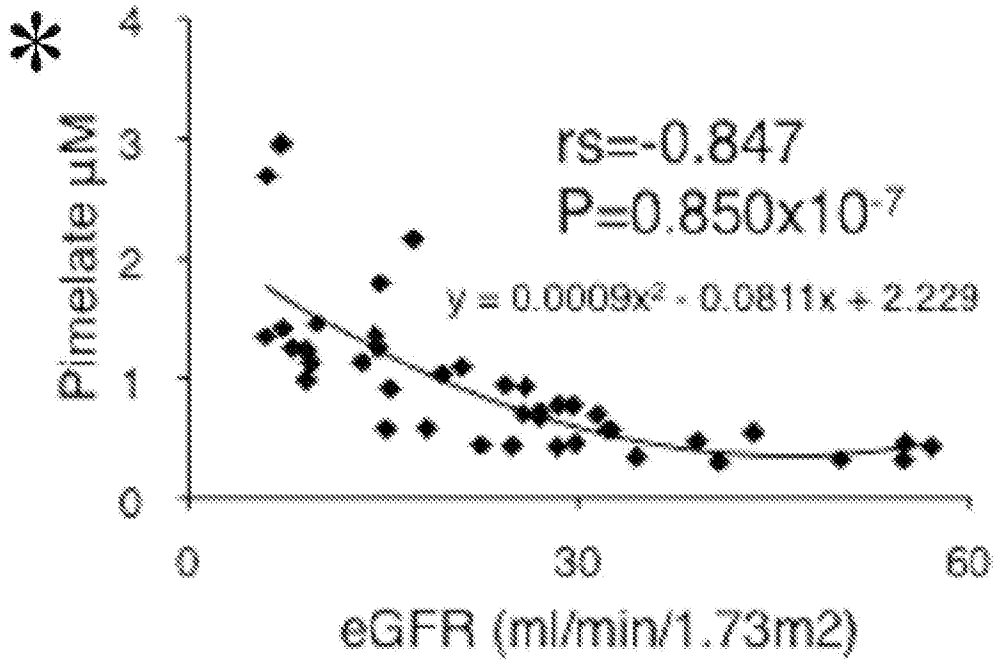
[図53]


*
80
60
40
20
0
Gluconate μM
rs=-0.929
P=0.428x10-8
y = 0.0295x2 - 2.532x + 59.749
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

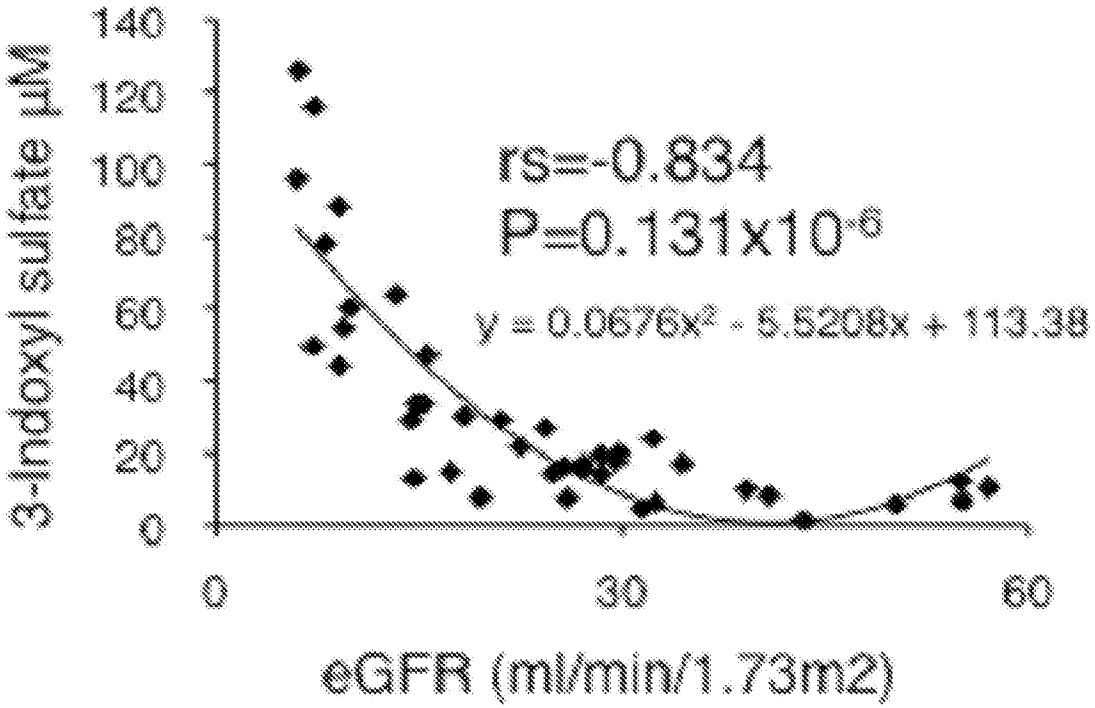
[図54]


*
trans-Aconitate μM
7
6
5
4
3
2
1
0
rs=-0.869
P=0.386x10-7
y = 0.0019x2 - 0.1916x + 5.373
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

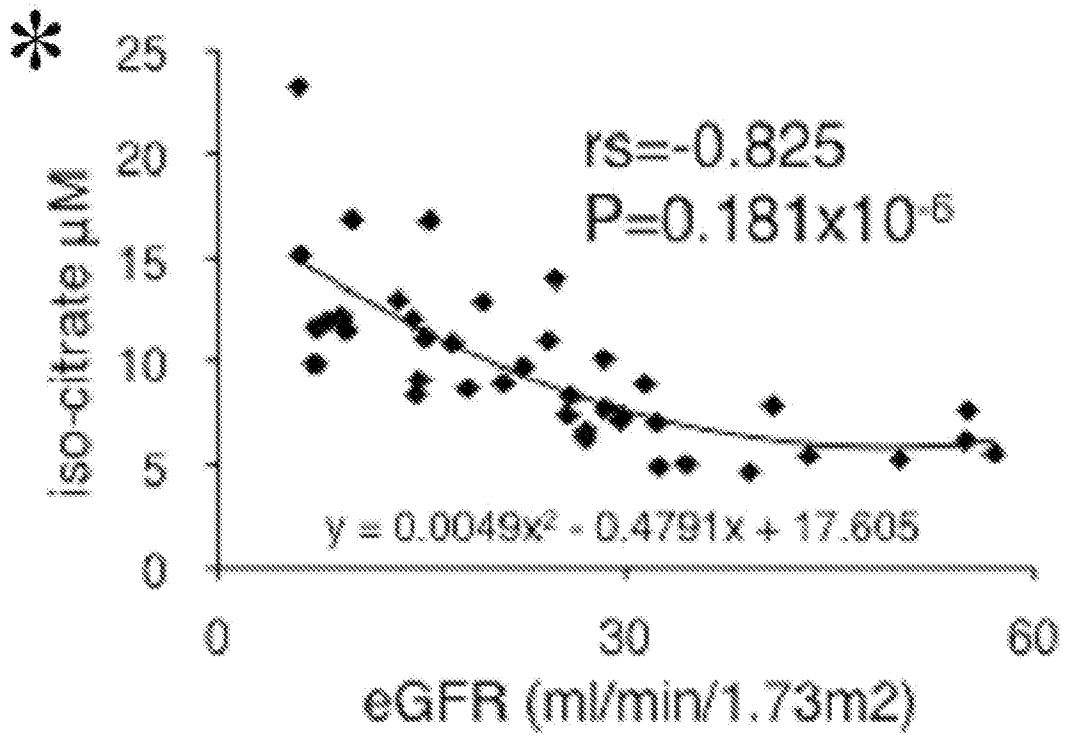
[図55]


*
Pimelate μM
4
3
2
1
0
rs=-0.847
P=0.850x10-7
y = 0.0009x2 - 0.0811x + 2.229
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

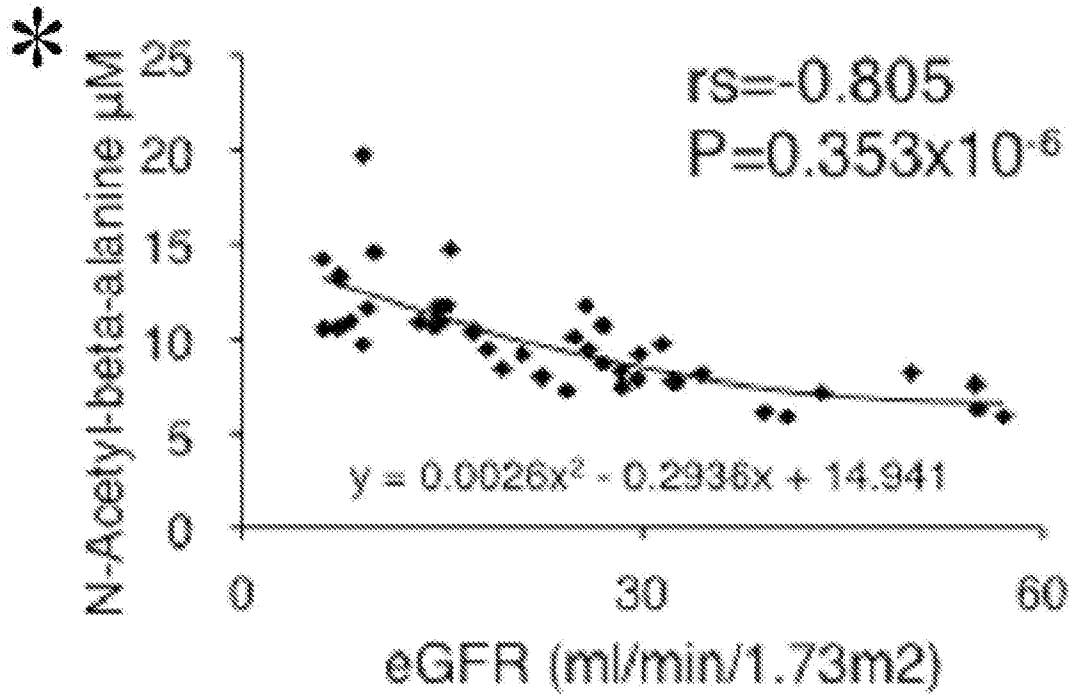
[図56]


3-Indoxyl sulfate μM
140
120
100
80
60
40
20
0
rs=-0.834
P=0.131x10-6
y = 0.0676x2 - 5.5208x + 113.38
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

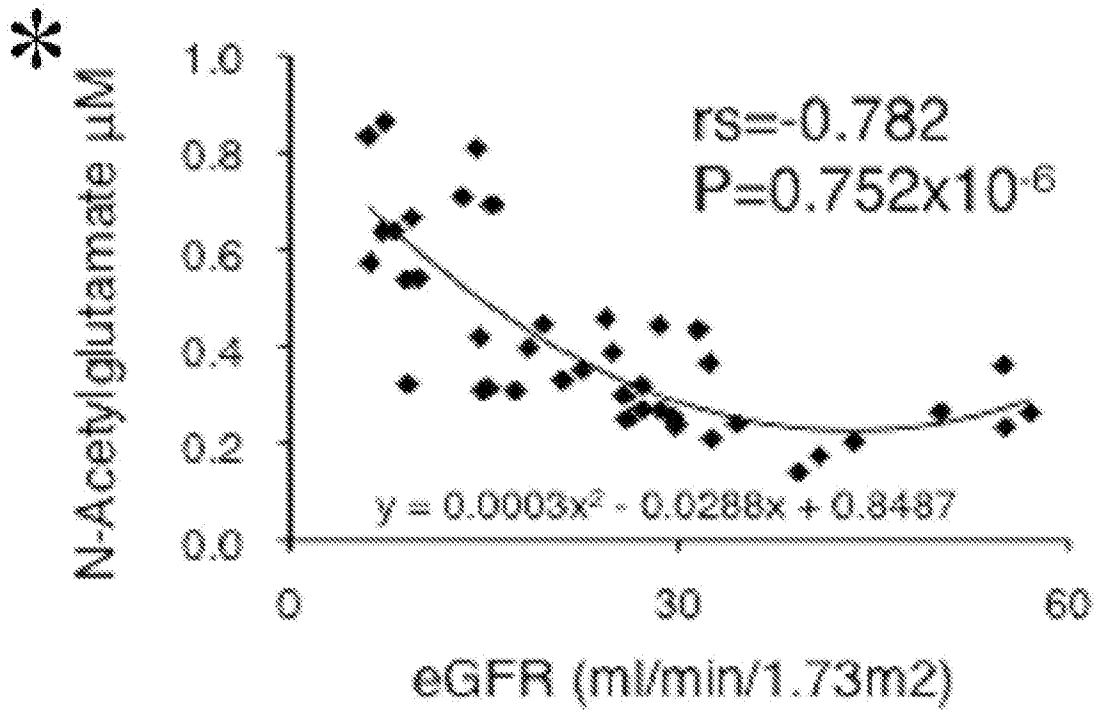
[図57]


*
iso-citrate μM
25
20
15
10
5
0
rs=-0.825
P=0.181x10-6
y = 0.0049x2 - 0.4791x + 17.605
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

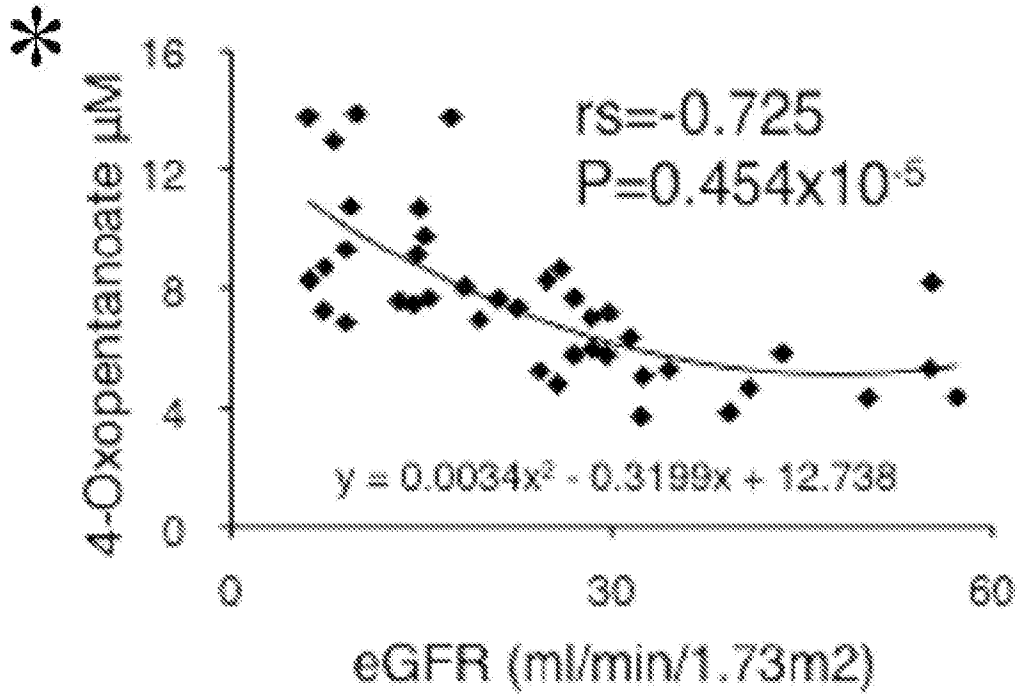
[図58]


*
N-Acetyl-beta-alanine μM
25
20
15
10
5
0
rs=-0.805
P=0.353x10-6
y = 0.0026x2 - 0.2936x + 14.941
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

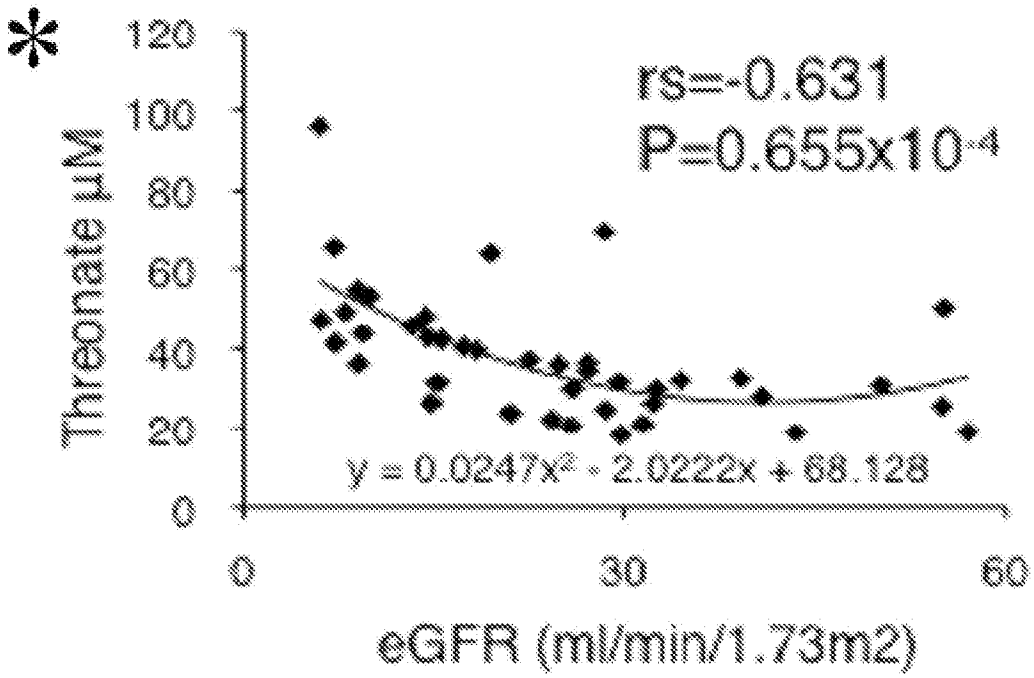
[図59]


*
N-Acetylglutamate μM
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
rs=-0.782
P=0.752x10-6
y = 0.0003x2 - 0.0288x + 0.8487
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

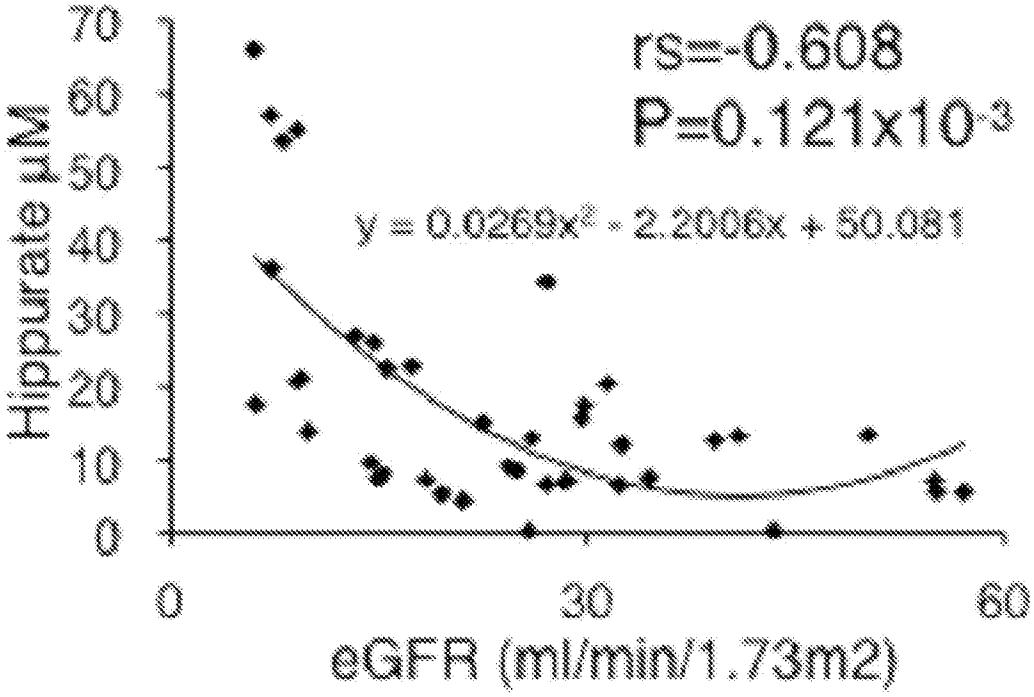
[図60]


*
4-Oxopentanoate μM
16
12
8
4
0
rs=-0.725
P=0.454x10-5
y = 0.0034x2 - 0.3199x + 12.738
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

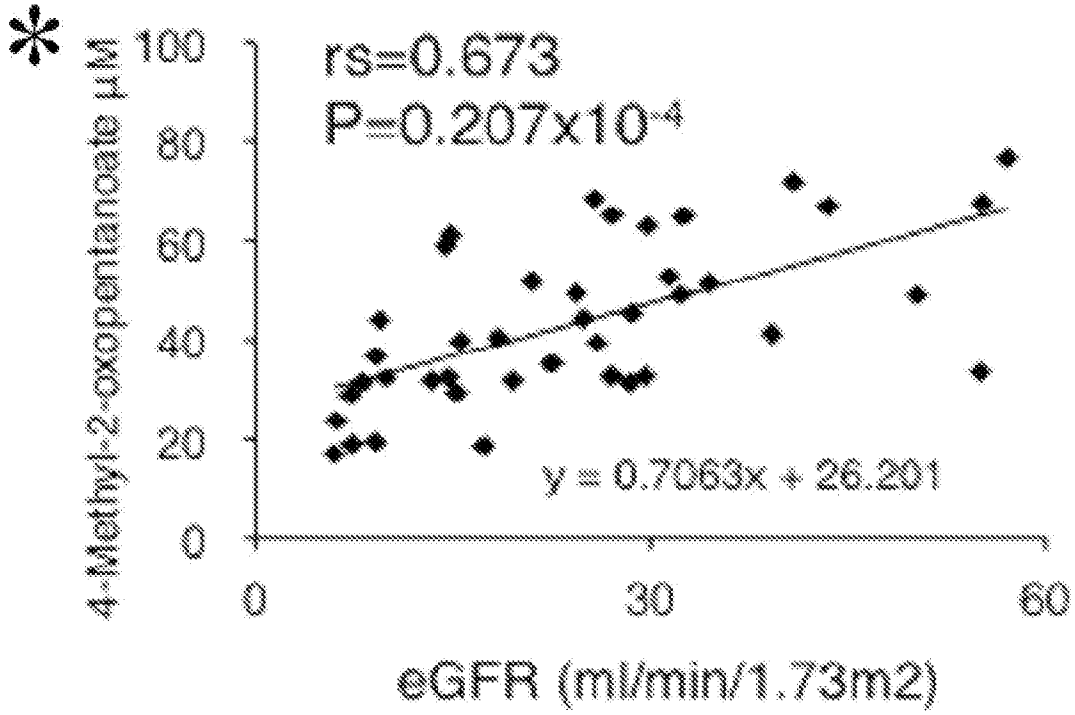
[図61]


*
Threonate μM
120
100
80
60
40
20
0
rs=-0.631
P=0.655x10-4
y = 0.0247x2 - 2.0222x + 68.128
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

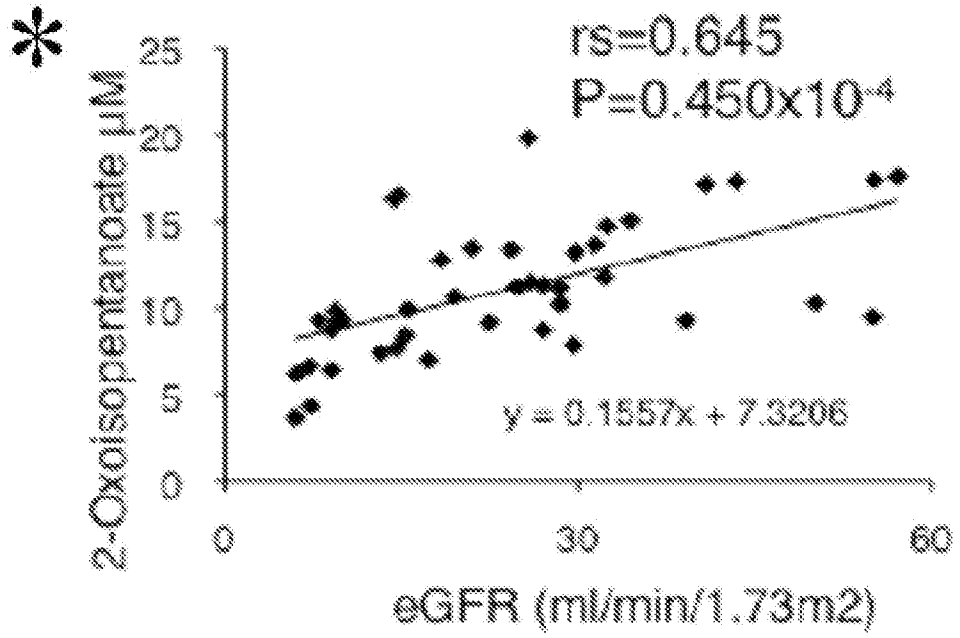
[図62]


rs=-0.608
P=0.121x10-3
y = 0.0269x2 - 2.2006x + 50.081
Hippurate μM
70
60
50
40
30
20
10
0
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

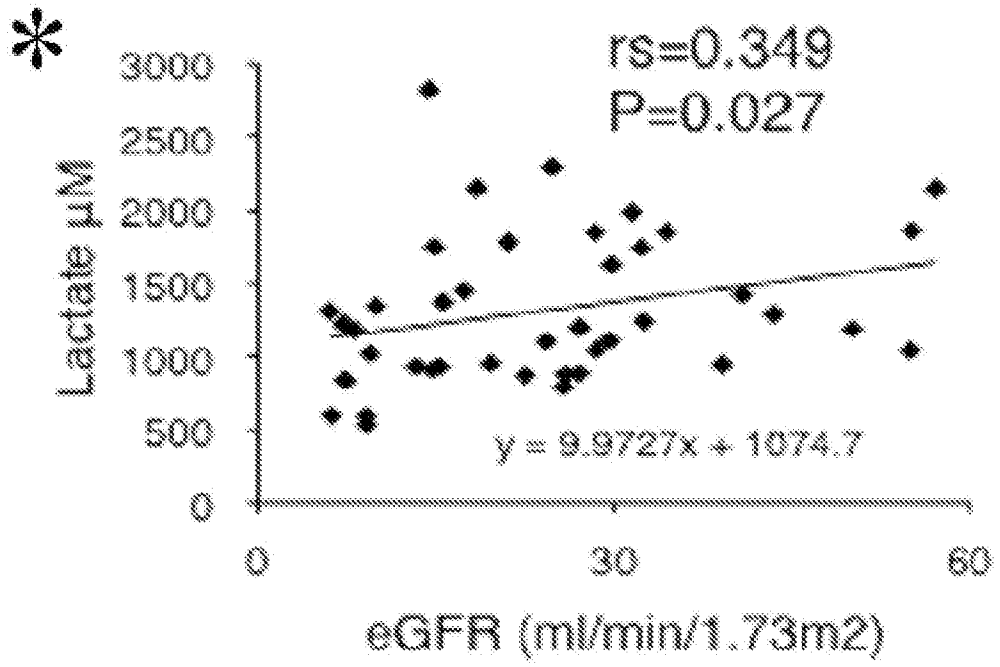
[図63]


rs=0.673
P=0.207x10-4
y = 0.7063x + 26.201
4-Methyl-2-oxopentanoate μM
100
80
60
40
20
0
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

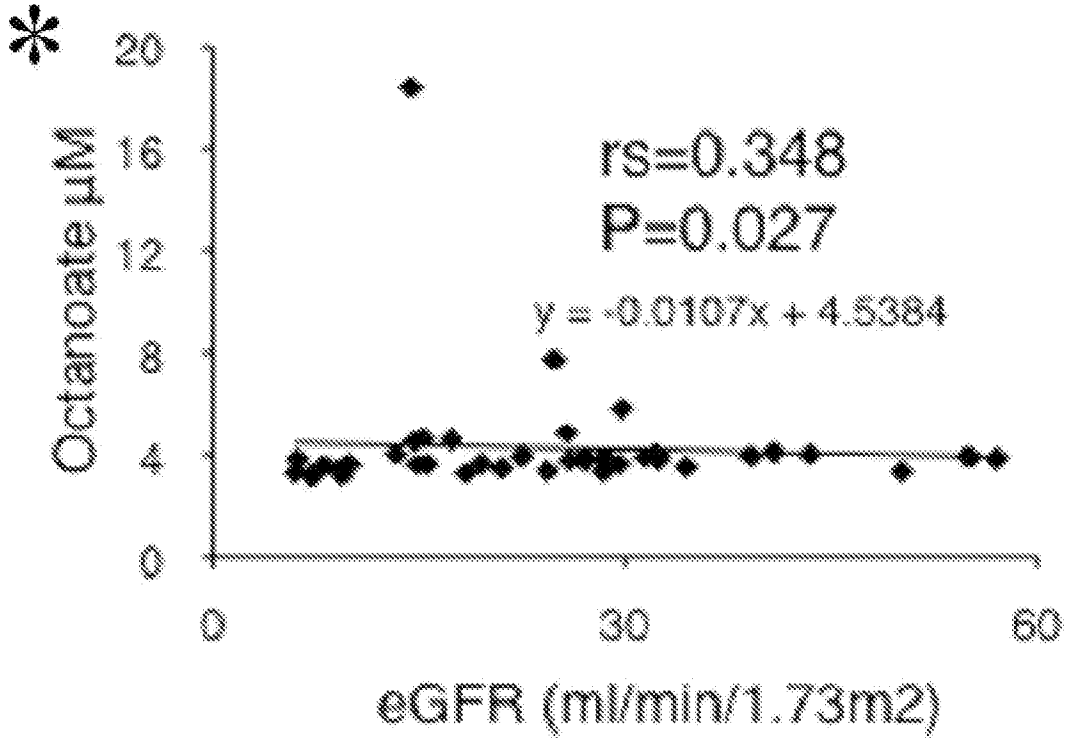
[図64]


*
rs=0.645
P=0.450x10-4
2-Oxoisopentanoate μM
25
20
15
10
5
0
y = 0.1557x + 7.3206
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

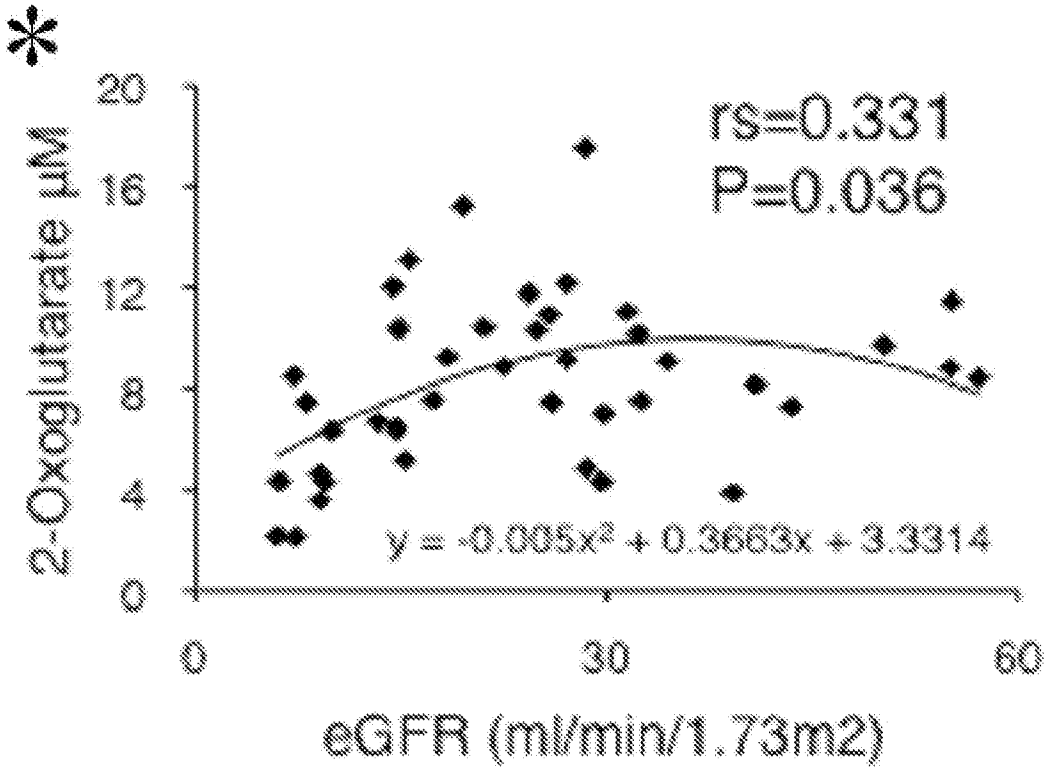
[図65]


*
rs=0.349
P=0.027
Lactate μM
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
y = 9.9727x + 1074.7
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

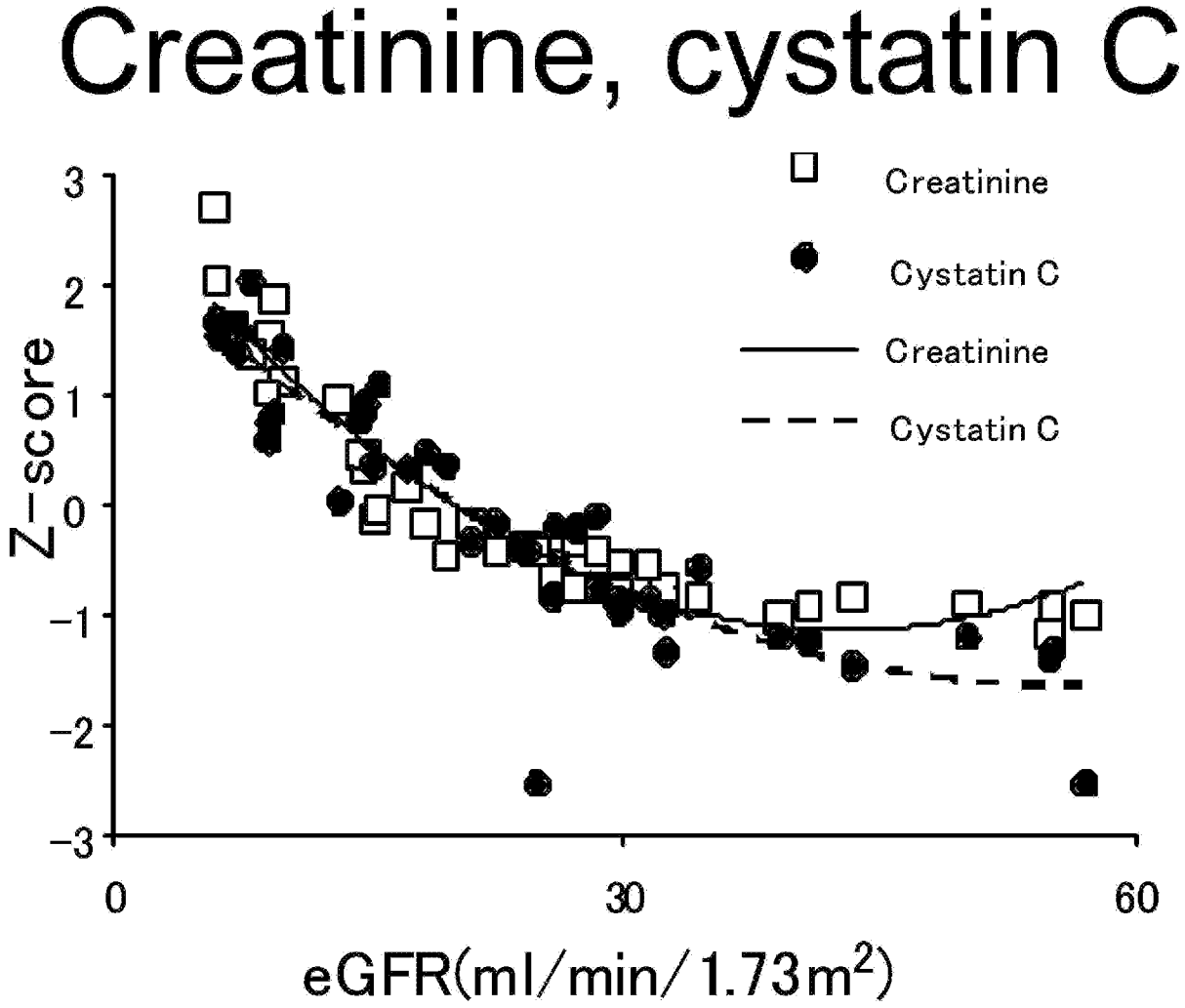
[図66]


*
Octanoate μM
20
16
12
8
4
0
rs=0.348
P=0.027
y = -0.0107x + 4.5384
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

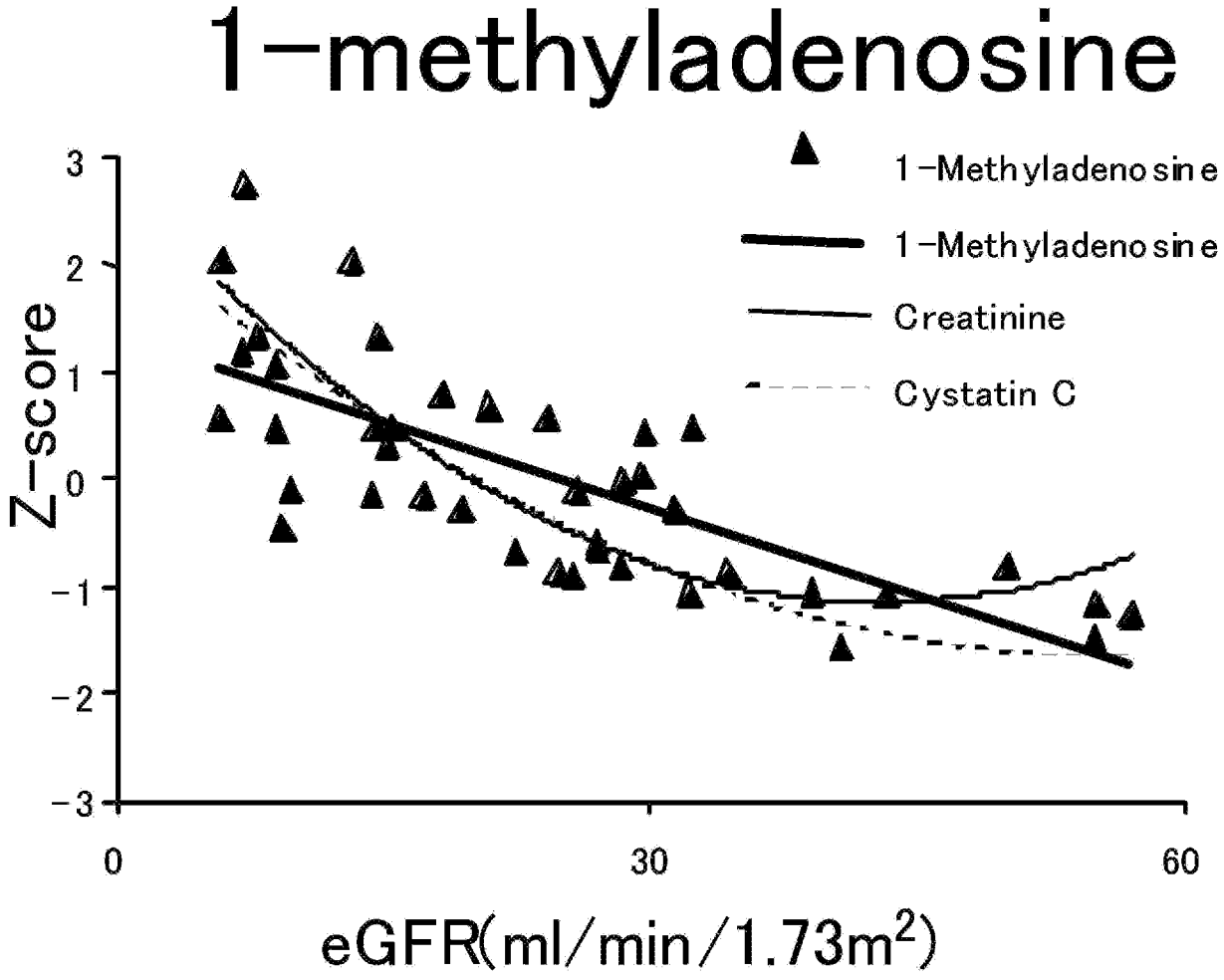
[図67]


*
2-Oxoglutarate μM
20
16
12
8
4
0
rs=0.331
P=0.036
y = -0.005x² + 0.3663x + 3.3314
0
30
60
eGFR (ml/min/1.73m2)

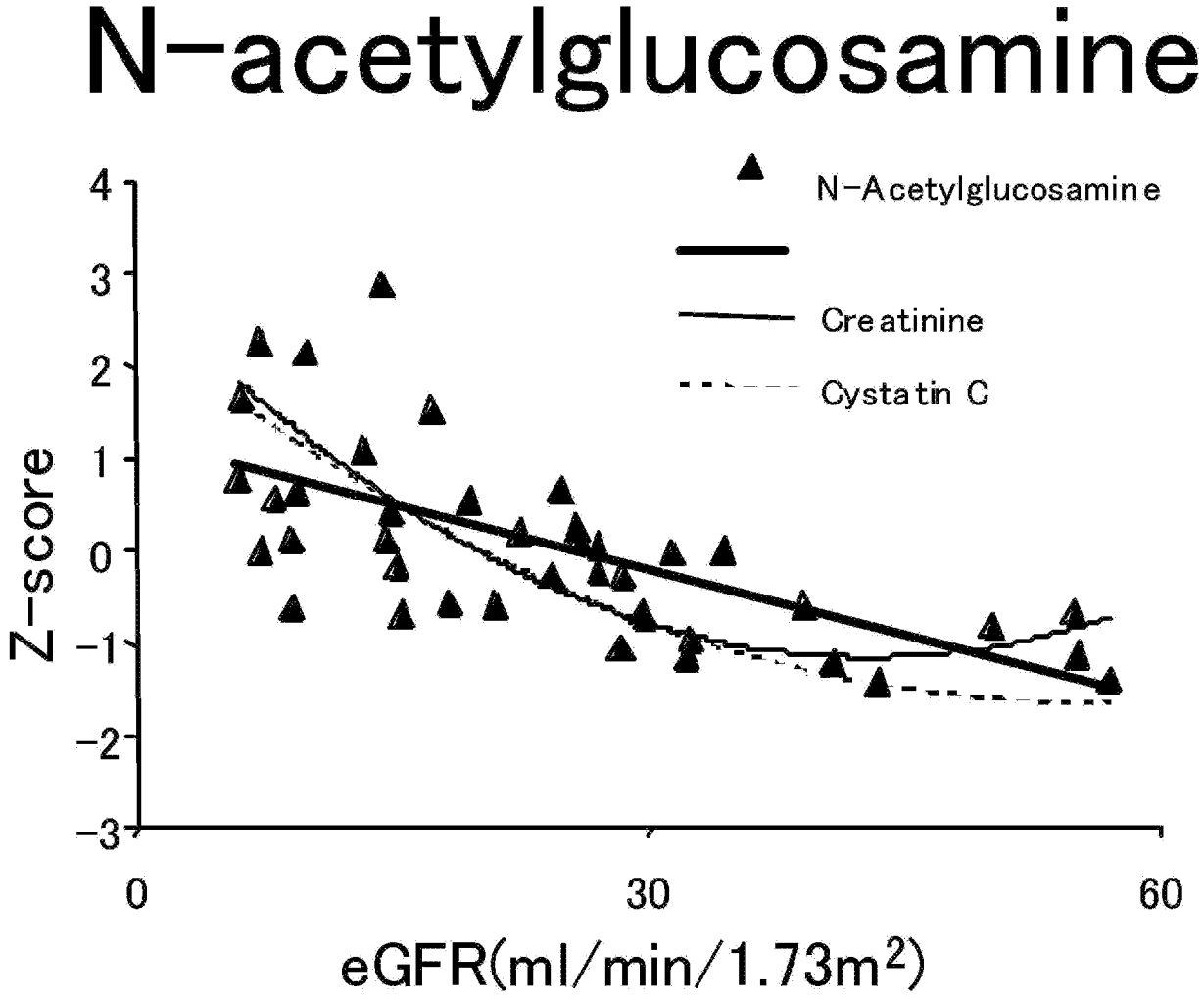
[図68]


Creatinine, cystatin C
Creatinine
Cystatin C
Creatinine
Cystatin C
Z-score
3
2
1
0
−1
−2
−3
0
30
60
eGFR(ml/min/1.73m2)

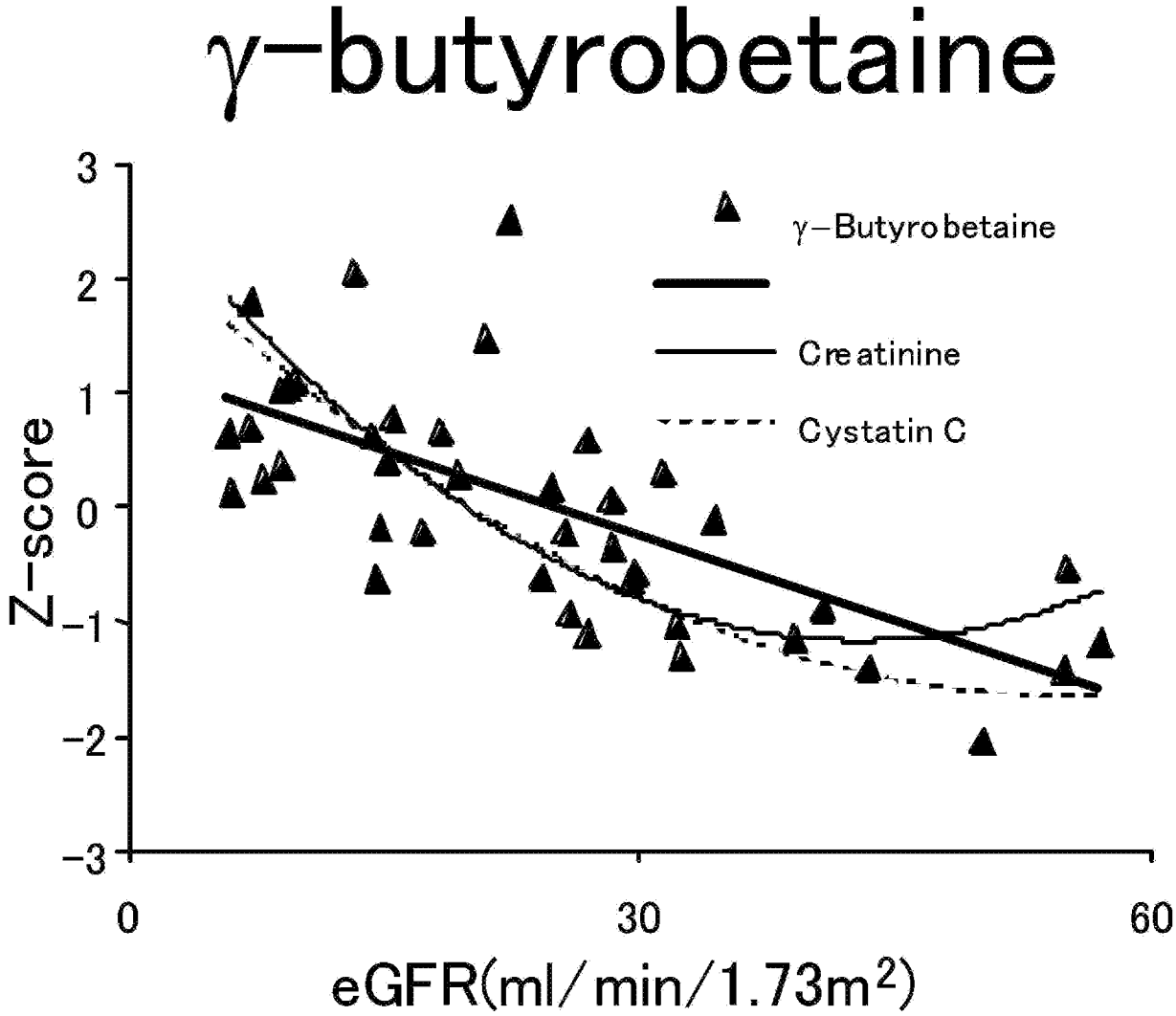
[図69]


1-methyladenosine
1-Methyladenosine
1-Methyladenosine
Creatinine
Cystatin C
Z-score
3
2
1
0
-1
-2
-3
0
30
60
eGFR(ml/min/1.73m2)

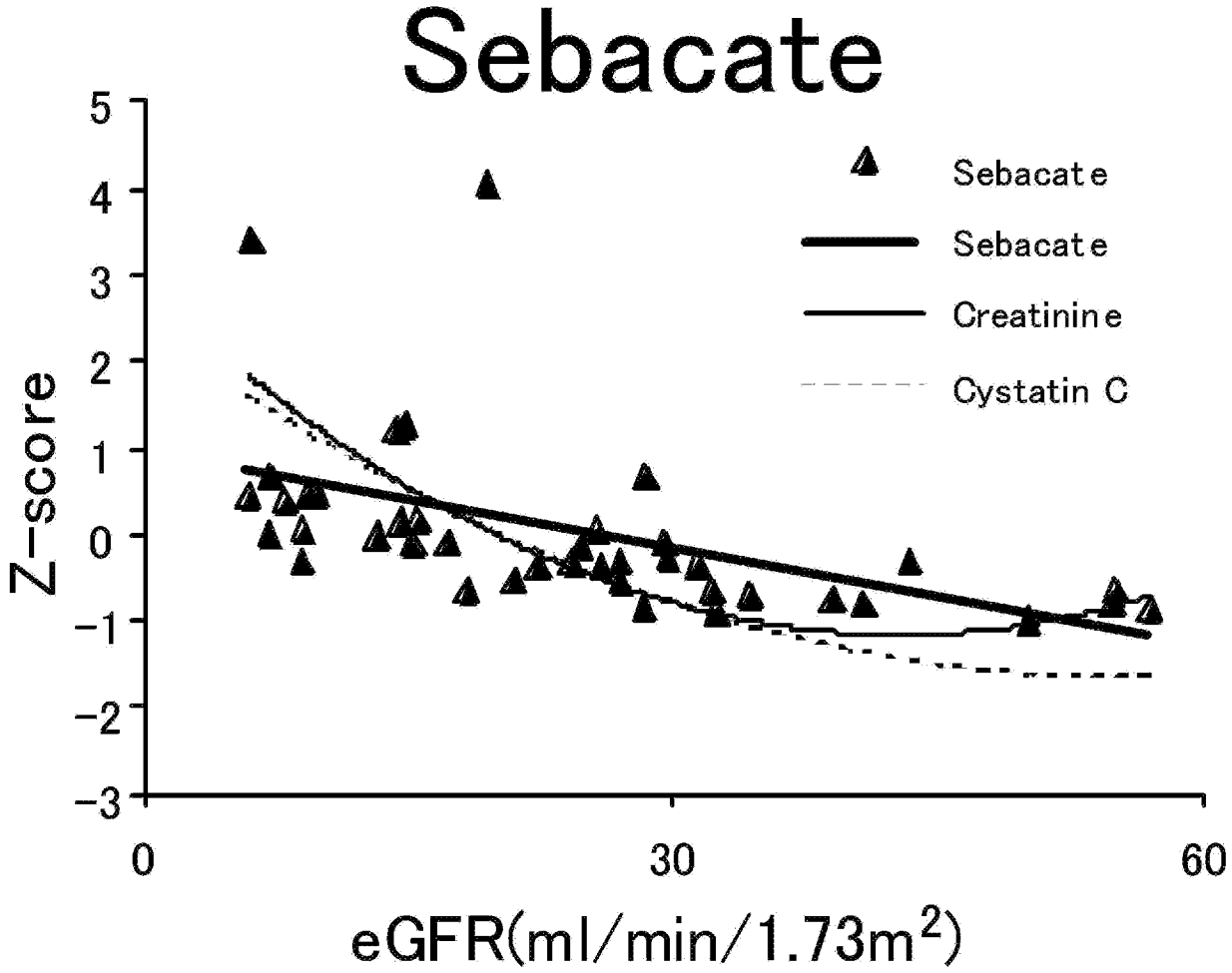
[図70]


N-acetylglucosamine
N-Acetylglucosamine
Creatinine
Cystatin C
Z-score
4
3
2
1
0
-1
-2
-3
0
30
60
eGFR(ml/min/1.73m2)

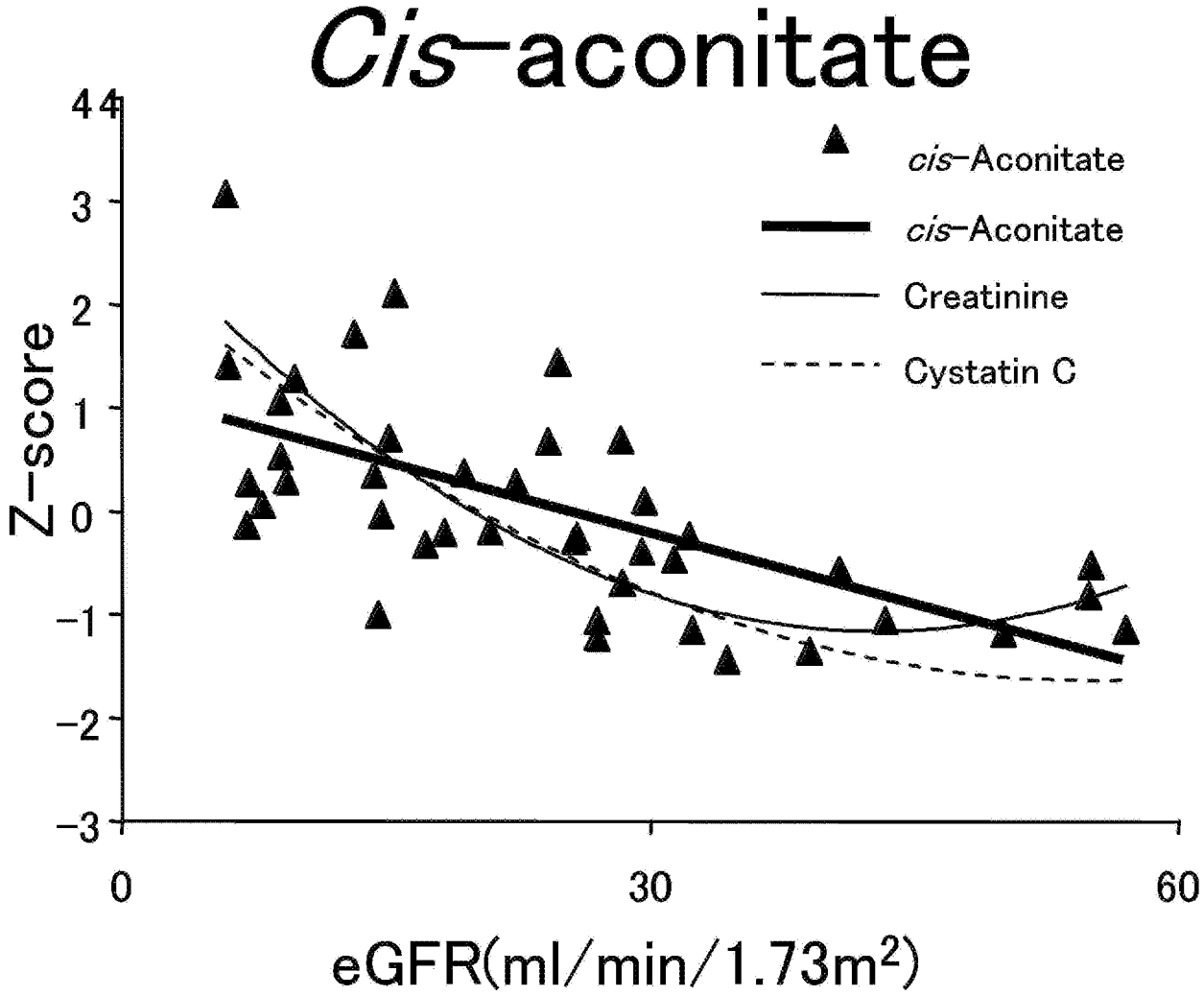
[図71]


γ-butyrobetaine
γ-Butyrobetaine
Creatinine
Cystatin C
Z-score
3
2
1
0
−1
−2
−3
0
30
60
eGFR(ml/min/1.73m2)

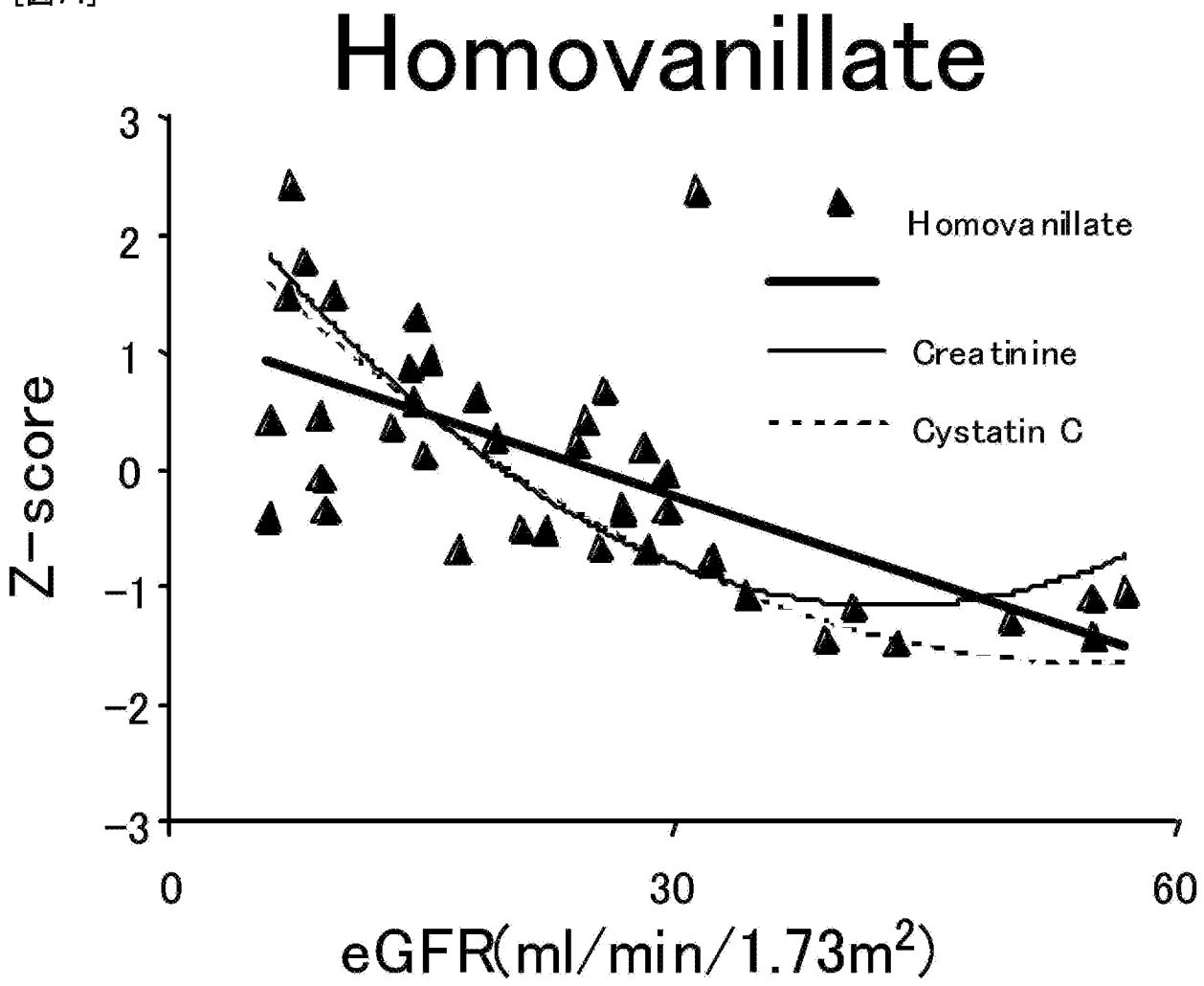
[図72]


Sebacate
Sebacate
Sebacate
Creatinine
Cystatin C
Z-score
5
4
3
2
1
0
−1
−2
−3
0
30
60
eGFR(ml/min/1.73m2)

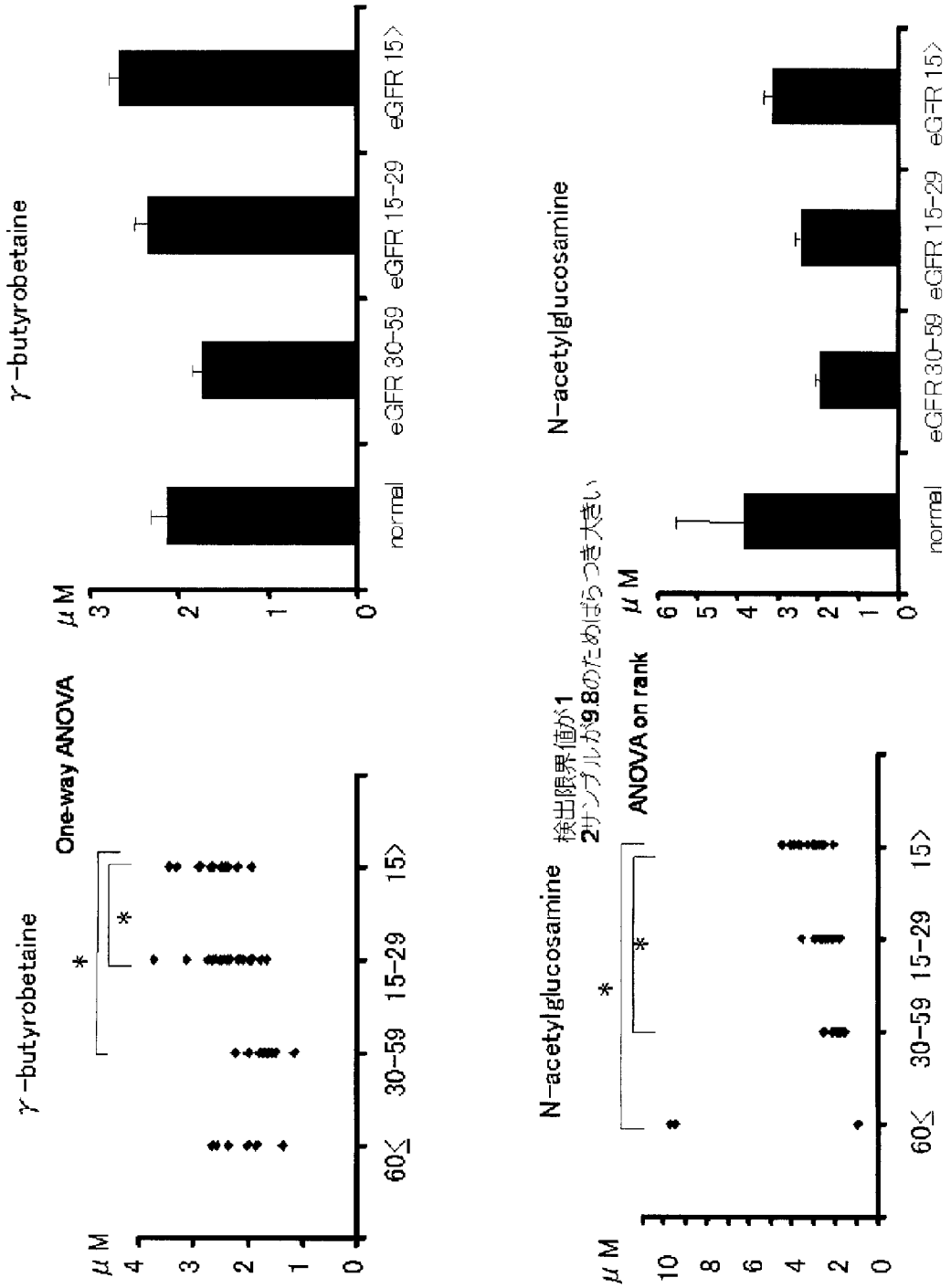
[図73]


Cis-aconitate
cis-Aconitate
cis-Aconitate
Creatinine
Cystatin C
Z-score
4
3
2
1
0
−1
−2
−3
0
30
60
eGFR(ml/min/1.73m2)

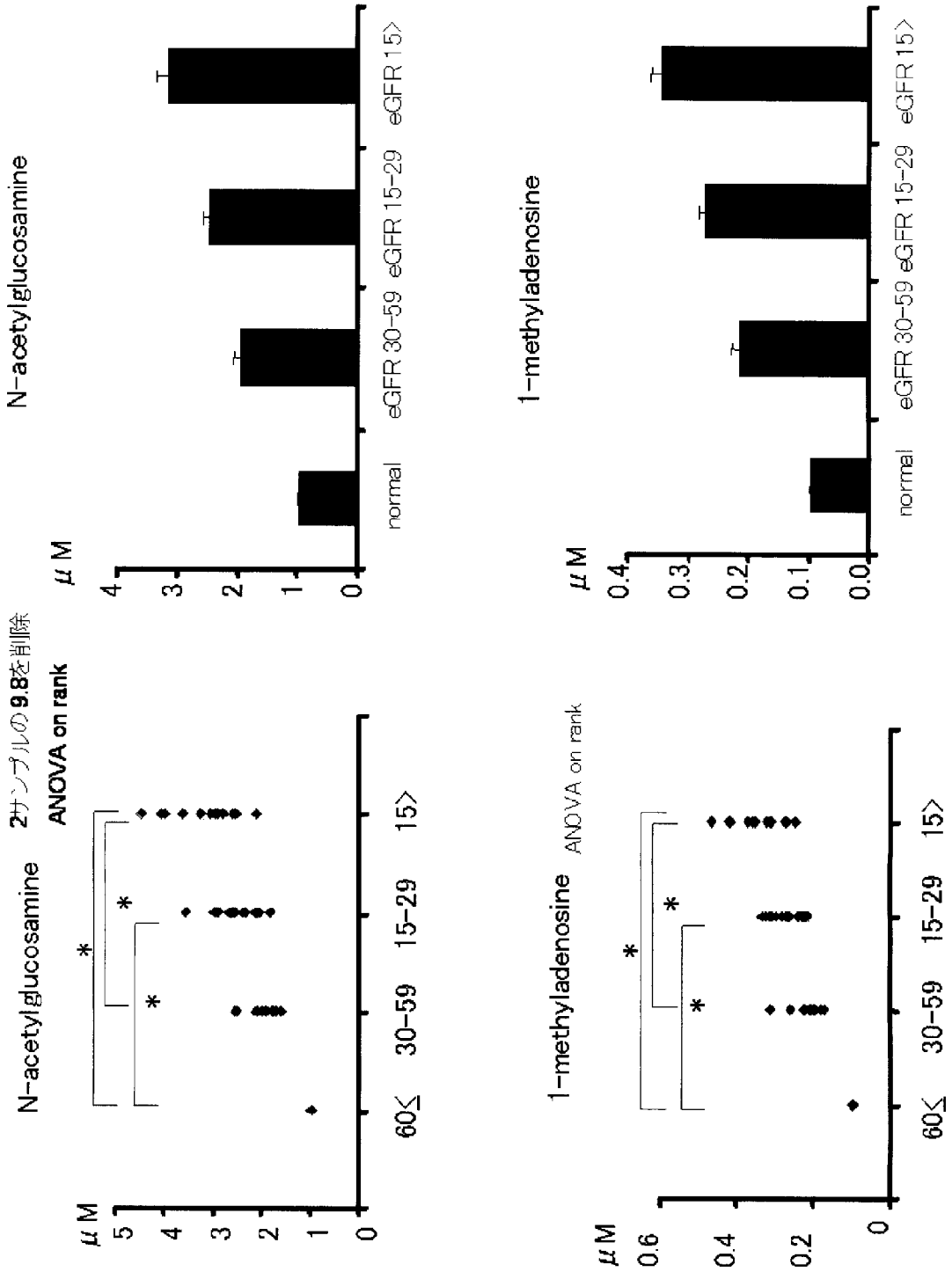
[図74]


Homovanillate
Homovanillate
Creatinine
Cystatin C
Z-score
3
2
1
0
−1
−2
−3
0
30
60
eGFR(ml/min/1.73m2)

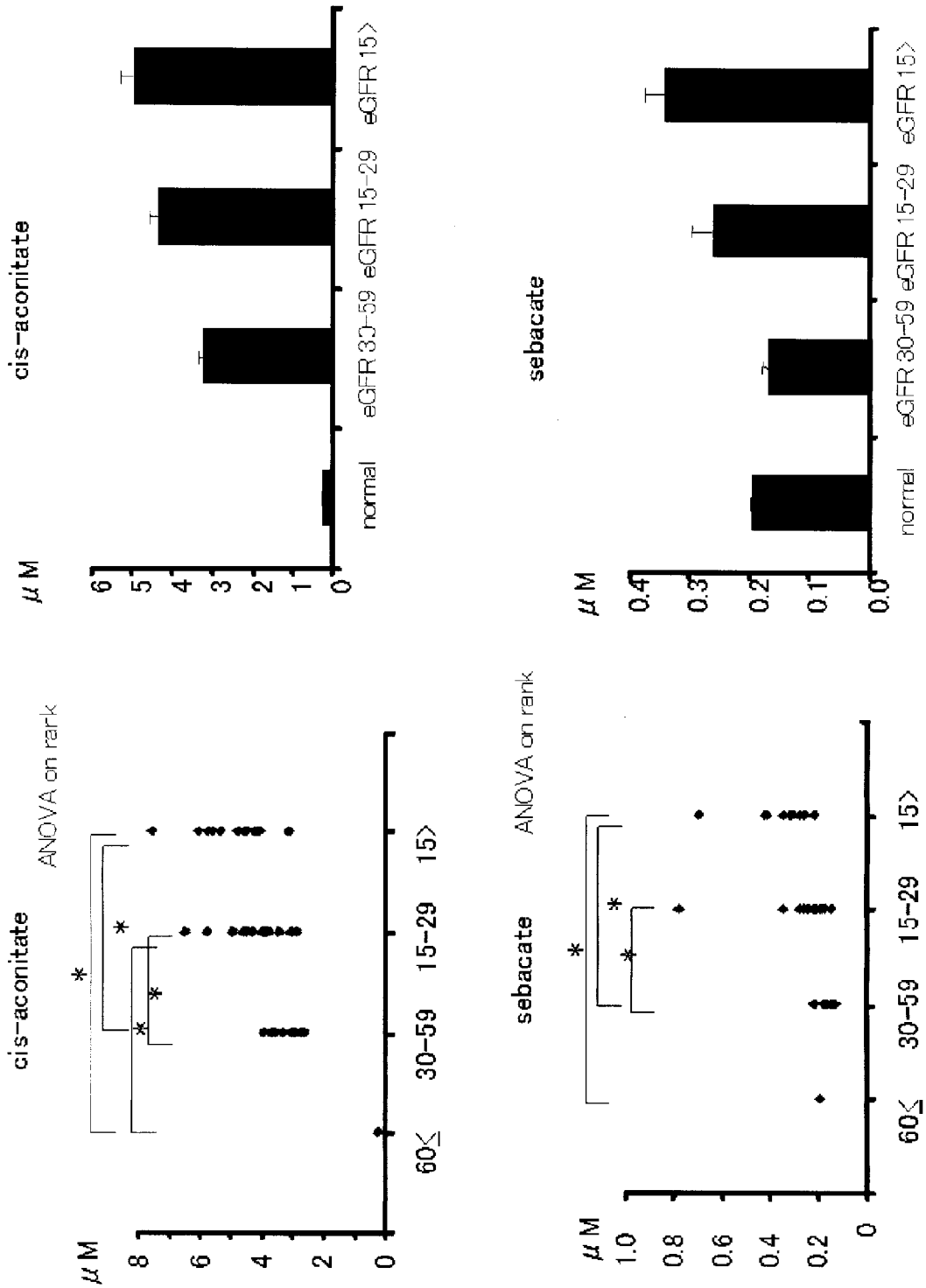
[図75]


γ-butyrobetaine
One-way ANOVA
μM
60≦
30-59
15-29
15>
γ-butyrobetaine
μM
normal
eGFR 30-59
eGFR 15-29
eGFR 15>
N-acetylglucosamine
ANOVA on rank
検出限界値が1
2サンプルが9.8のためばらつき大きい
μM
60≦
30-59
15-29
15>
N-acetylglucosamine
μM
normal
eGFR 30-59
eGFR 15-29
eGFR 15>

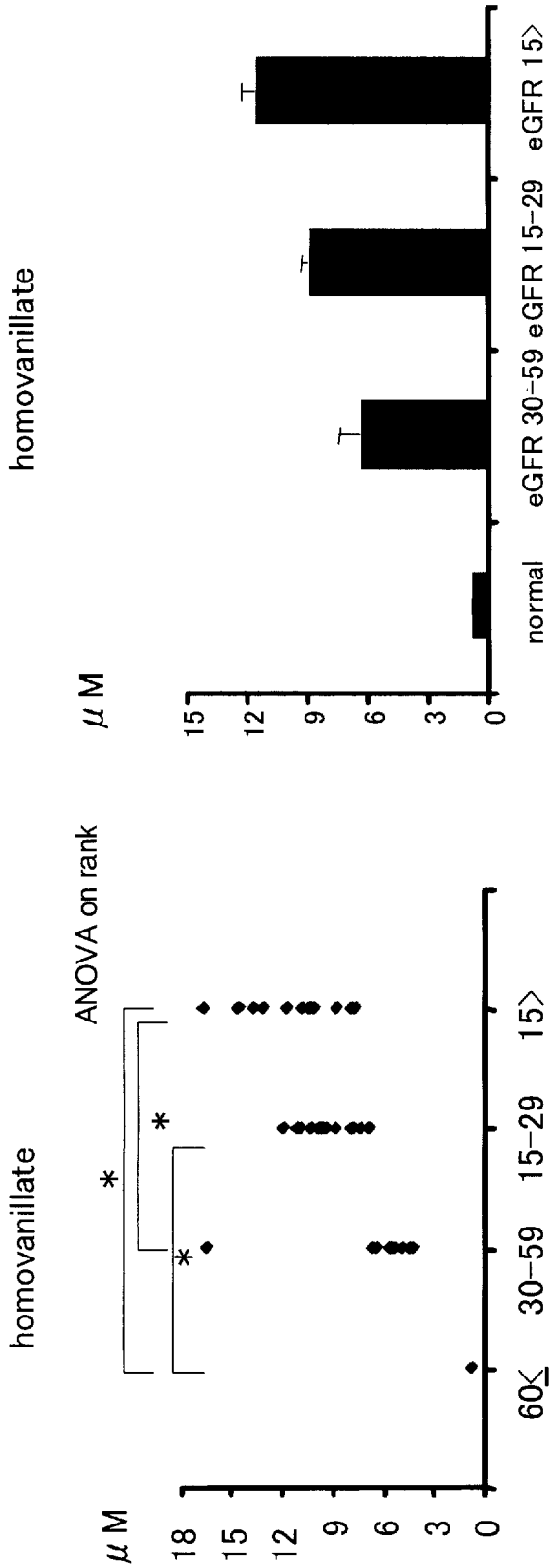
[図76]


N-acetylglucosamine
2サンプルの9.8を削除
ANOVA on rank
μM
5
4
3
2
1
0
*
*
*
60≤
30-59
15-29
15>
N-acetylglucosamine
μM
4
3
2
1
0
normal
eGFR 30-59
eGFR 15-29
eGFR 15>
1-methyladenosine
ANOVA on rank
μM
0.6
0.4
0.2
0
*
*
*
60≤
30-59
15-29
15>
1-methyladenosine
μM
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
normal
eGFR 30-59
eGFR 15-29
eGFR 15>

[図77]


cis-aconitate
μM
6
5
4
3
2
1
0
normal
eGFR 30-59
eGFR 15-29
eGFR 15>
cis-aconitate
ANOVA on rank
μM
8
6
4
2
0
60≤
30-59
15-29
15>
sebacate
μM
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
normal
eGFR 30-59
eGFR 15-29
eGFR 15>
sebacate
ANOVA on rank
μM
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
60≤
30-59
15-29
15>

[図78]


homovanillate
μM
18
15
12
9
6
3
0
ANOVA on rank
*
*
*
60≦
30−59
15−29
15>
homovanillate
μM
15
12
9
6
3
0
normal
eGFR 30−59
eGFR 15−29
eGFR 15>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/005434

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G01N33/50(2006.01)i, *G01N27/62*(2006.01)i, *G01N33/15*(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)
G01N33/50, G01N27/62, G01N33/15

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), CAplus(STN), BIOSIS(STN), MEDLINE(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2000-146980 A (Japan Science and Technology Corp.), 26 May 2000 (26.05.2000), entire text; all drawings & US 7109044 B1 & EP 1111387 A1 & WO 2000/014543 A1 & DE 69939544 D & AU 5449199 A & AU 750574 B & CA 2342897 A & AT 408145 T	1-7
A	JP 2007-519394 A (Quark Bioteck, Inc.), 19 July 2007 (19.07.2007), entire text; all drawings & US 2007/0072244 A1 & US 2009/0202566 A1 & EP 1624788 A & WO 2004/100759 A2	1-7

☒ 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 27 September, 2010 (27.09.10)	Date of mailing of the international search report 12 October, 2010 (12.10.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/005434

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2008-538173 A (Raven Biotechnologies, Inc.), 16 October 2008 (16.10.2008), & US 2006/0172349 A1 & EP 1846032 A & WO 2006/083852 A2 & CA 2596115 A	1-7
A	Alberghini A, Recalcati S, Tacchini L, Santambrogio P, Campanella A, Cairo G., Loss of the von Hippel Lindau tumor suppressor disrupts iron homeostasis in renal carcinoma cells., J Biol Chem., 2005, Vol.280, No.34, Page.30120-30128	1-7
P,A	Takafumi TOYOHARA et al., "CKD Kanja no Nyodokusho Busshitsu to Soki Shindan Marker no Morateki Kaiseki", The Japanese Journal of Nephrology, 25 May 2010 (25.05.2010), vol.52, no.3, page 340	1-7
P,A	Yasutoshi AKIYAMA et al., "CE-MS o Mochiita Ketsueki Toseki Zengo no Nyodokusho Busshitsu Jokyo Koritsu no Morateki Kaiseki", The Japanese Journal of Nephrology, 25 May 2010 (25.05.2010), vol.52, no.32, page 378	1-7

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１０／００５４３４

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　G01N33/50(2006.01)i, G01N27/62(2006.01)i, G01N33/15(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（ＩＰＣ））

Int.Cl.　G01N33/50, G01N27/62, G01N33/15

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	１９７１－２０１０年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１０年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１０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）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII),CAplus(STN),BIOSIS(STN),MEDLINE(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	JP 2000-146980 A (科学技術振興事業団) 2000.05.26, 全文、全図 & US 7109044 B1 & EP 1111387 A1 & WO 2000/014543 A1 & DE 69939544 D & AU 5449199 A & AU 750574 B & CA 2342897 A & AT 408145 T	1-7
A	JP 2007-519394 A (クアーク・バイオテック・インコーポレイテッド) 2007.07.19, 全文、全図 & US 2007/0072244 A1 & US 2009/0202566 A1 & EP 1624788 A & WO 2004/100759 A2	1-7

☑　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 ２７．０９．２０１０	国際調査報告の発送日 １２．１０．２０１０
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 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）　２Ｊ　４０７５ 草川　貴史 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	JP 2008-538173 A（レイベン　バイオテクノロジーズ，インコーポレイティド）2008.10.16, & US 2006/0172349 A1 & EP 1846032 A & WO 2006/083852 A2 & CA 2596115 A	1-7
A	Alberghini A, Recalcati S, Tacchini L, Santambrogio P, Campanella A, Cairo G., Loss of the von Hippel Lindau tumor suppressor disrupts iron homeostasis in renal carcinoma cells., J Biol Chem., 2005, Vol.280,No.34, Page.30120-30128	1-7
P,A	豊原敬文　他，ＣＫＤ患者の尿毒症物質と早期診断マーカーの網羅的解析，日本腎臓学会誌, 2010.05.25, Vol.52,No.3, Page.340	1-7
P,A	秋山泰利　他，ＣＥ－ＭＳを用いた血液透析前後の尿毒症物質除去効率の網羅的解析，日本腎臓学会誌, 2010.05.25, Vol.52,No.32, Page.378	1-7