

(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
2021年8月12日(12.08.2021)



(10) 国際公開番号

WO 2021/157631 A1

(51) 国際特許分類:

G01N 33/92 (2006.01)

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2021/004008

(22) 国際出願日:

2021年2月4日(04.02.2021)

(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 2020-016820 2020年2月4日(04.02.2020) JP

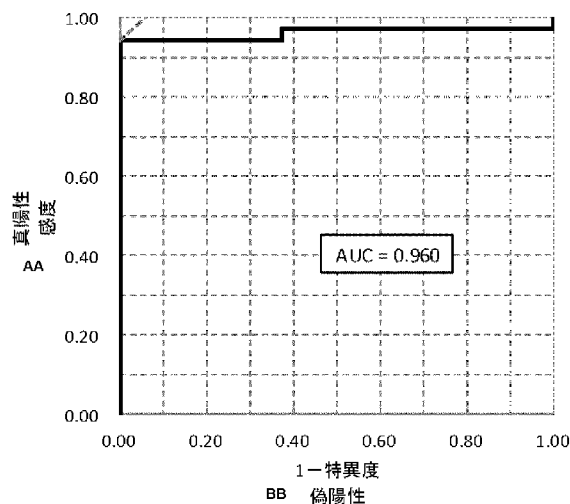
(71) 出願人: デンカ株式会社 (DENKA COMPANY LIMITED) [JP/JP]; 〒1038338 東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号 Tokyo (JP). 国立大学法人北海道大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION

HOKKAIDO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 Hokkaido (JP). 国立大学法人岡山大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION OKAYAMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7008530 岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号 Okayama (JP).

(72) 発明者: 佐藤 謙亨 (SATO, Noriyuki); 〒9591834 新潟県五泉市木越字鏡田1359-1 デンカ株式会社 五泉事業所 鏡田工場内 Niigata (JP). 伊藤 康樹 (ITO, Yasuki); 〒1038338 東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号 デンカ株式会社内 Tokyo (JP). 櫻井 俊宏 (SAKURAI, Toshihiro); 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海

(54) Title: METHOD FOR ASSISTING DETECTION OF NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS

(54) 発明の名称: 非アルコール性脂肪肝炎の検出を補助する方法



AA True positive sensitivity
BB 1-specificity false positive

(57) Abstract: Abstract Provided is a method that can assist in the detection of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) through simple manipulations that are extremely non-invasive by comparison with liver biopsy and are not dependent on the skill of a technician. The present invention is a method for assisting the detection of NASH wherein are included: a) measuring the abundance of LDL-TG included in a blood sample to be tested that has been isolated from a living body; b) measuring the abundance of one or more constituents selected from the group consisting of LDL-C, LDL subfraction-C,

添付公開書類：

一 国際調査報告（条約第21条(3)）

道大学内 Hokkaido (JP). 水田 正弘(MIZUTA, Masahiro); 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 惠 淑萍(HUI, Shu-Ping); 〒0600808 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 能祖 一裕(NOUSO, Kazuhiro); 〒7008530 岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号 国立大学法人 岡山大学内 Okayama (JP). 岡田 裕之(OKADA, Hiroyuki); 〒7008530 岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号 国立大学法人 岡山大学内 Okayama (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人 谷川国際特許事務所 (TANIGAWA AND PARTNERS, PATENT FIRM); 〒1020072 東京都千代田区飯田橋一丁目7番10号山京別館801 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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, 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, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

HDL-C, HDL subfraction-C, ApoB, ApoE, total cholesterol, ALT, and AST in the blood sample to be tested; and c) determining whether NASH has developed and/or the probability of NASH developing through the use of a combination of the abundance of LDL-TG and the abundance of the one or more constituents.

(57) 要約：要約 肝生検に比べ極めて侵襲性が低く、技術者の技量に依存することなく簡便な操作により、非アルコール性脂肪肝炎（NASH）の検出を補助することができる方法を提供する。本発明は、NASHの検出を補助する方法であって a) 生体から分離された被検血液試料中に含まれるLDL-TGの存在量を測定すること、b) 前記被検血液試料中に含まれるLDL-C、LDL亜分画-C、HDL-C、HDL亜分画-C、ApoB、ApoE、総コレステロール、ALT、およびASTからなる群から選ばれる少なくとも1つの成分の存在量を測定すること、ならびに c) 前記LDL-TGの存在量、および前記少なくとも1つの成分の存在量を組み合わせて用いることにより、NASHの発症および／またはその可能性を判定すること、を含む方法を提供する。

明 細 書

発明の名称：非アルコール性脂肪肝炎の検出を補助する方法

技術分野

[0001] 本発明は、非アルコール性脂肪肝炎の検出を補助する方法に関する。

背景技術

[0002] 非アルコール性脂肪性肝疾患（nonalcoholic fatty liver disease、以下「NAFLD」ともいう）は、組織診断又は画像診断で脂肪肝が認められ、ウイルス性肝炎、自己免疫性肝炎及びアルコール性肝障害などの肝疾患を除外した病態であり、肥満人口の増加に伴い全世界的に急増している。NAFLDは、病態がほとんど進行しないと考えられる非アルコール性脂肪肝（non alcoholic fatty liver、以下「NAFL」ともいう）と、進行性で肝硬変や肝癌の発症原因にもなる非アルコール性脂肪肝炎（nonalcoholic steatohepatitis、以下「NASH」ともいう）とに分類される。NASHに特徴的な病態としては、脂肪変性、風船様変性、炎症、線維化などがある。

[0003] 肝臓の脂肪変性から始まる種々の病態を鑑別し、NAFLとNASHを区別するためには、肝生検による確定診断を行う必要がある。しかしながら、肝生検は侵襲性の検査であり高額であるため様々な面で患者を消耗させる。また、肝生検では一定の確率でサンプリングエラーが起こるなど実施する技術者の力量に左右されることがあり、採取した検体の診断についても同様である。このため、患者は一定レベルの医療を受けるために特定の機関を訪れる必要があり、患者の負担が大きいという問題があった。

[0004] 一方、肝疾患に関し一般的に実施されている臨床検査項目としては、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、AST／ALT比等や、炎症・サイトカインのマーカであるTNF- α 、高感度CRP、フェリチン等、アポトーシスのマーカであるサイトケラチン18断片、線維化のマーカであるヒアルロン酸、4型コラーゲン7S等がある（特許文献1及び2）。しかしながら、NA

S Hに関連する複数の病態で検出されるような、N A S Hを疑うバイオマーカーとして確立されたものは存在していなかった。すなわち、N A S Hに関わる病態を総合的に反映するバイオマーカーはこれまで見出されていなかった。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開2010-94131号公報

特許文献2：特開2018-80943号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明の目的は、肝生検に比べ極めて侵襲性が低く、技術者の技量に依存することなく、簡便な操作により、N A S Hの検出を補助することができる方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0007] 本願発明者らは、鋭意研究の結果、生体から分離された被検血液試料中に含まれるLDL-TGの存在量を、該被検血液試料中に含まれるLDL-C、LDL亜分画-C、HDL-C、HDL亜分画-C、ApoB、ApoE、総コレステロール、ALT、ASTから選ばれる少なくとも1つの存在量と組み合わせて用いることにより、肝生検を実施しなくても簡便な操作によりN A S Hの検出を補助することができることを見出し、本発明を完成した。

[0008] すなわち、本発明は以下のとおりである。

[1] 非アルコール性脂肪肝炎の検出を補助する方法であって

a) 生体から分離された被検血液試料中に含まれるLDL-TGの存在量を測定すること、

b) 前記被検血液試料中に含まれるLDL-C、LDL亜分画-C、HDL-C、HDL亜分画-C、ApoB、ApoE、総コレステロール、ALT

、およびASTからなる群から選ばれる少なくとも1つの成分の存在量を測定すること、ならびに

c) 前記LDL-TGの存在量、および前記少なくとも1つの成分の存在量を組み合わせて用いることにより、非アルコール性脂肪肝炎の発症および／または非アルコール性脂肪肝炎を発症している可能性を判定すること、を含む方法。

[2] 前記LDL亜分画-Cがsmall, dense (sd) LDL-Cである、[1]に記載の方法。

[3] 前記HDL亜分画-CがApoE containing HDL-Cおよび／またはHDL 2-Cおよび／またはHDL 3-Cである、[1]に記載の方法。

[4] LDL-TGの存在量、ならびにLDL-C、LDL亜分画-C、HDL-C、HDL亜分画-C、ApoB、ApoE、総コレステロール、ALT、およびASTからなる群から選ばれる少なくとも1つの成分の存在量を変数とするモデル式を作成し、前記被検血液試料中に含まれる前記LDL-TGの存在量、および前記少なくとも1つの成分の存在量を前記モデル式に代入して求めたスコアが、非アルコール性脂肪肝を患う患者の血液試料について求めたスコアよりも高い場合に、非アルコール性脂肪肝炎を発症している可能性が高いと判定する、[1]～[3]のいずれかに記載の方法。

[5] 非アルコール性脂肪肝炎の検出を補助するための指標を求めるモデル式の作成方法であって、非アルコール性脂肪肝炎を患う患者および非アルコール性脂肪肝を患う患者の血液試料中のLDL-TGの存在量、ならびにLDL-C、LDL亜分画-C、HDL-C、HDL亜分画-C、ApoB、ApoE、総コレステロール、ALT、およびASTからなる群から選ばれる少なくとも1つの成分の存在量を測定し、測定した前記存在量を変数として用いてモデル式を作成する、モデル式の作成方法。

[6] [1]～[4]のいずれかに記載の、非アルコール性脂肪肝炎の検出を補助する方法に用いられる測定用キットであって、LDL-TGの測定用

試薬、ならびにLDL-C、LDL亜分画-C、HDL-C、HDL亜分画-C、ApoB、ApoE、総コレステロール、ALT、およびASTからなる群から選ばれる少なくとも1つの成分の測定用試薬を含む測定用キット。

[7] 前記LDL亜分画-Cがsmall, dense (sd) LDL-Cである、[6]に記載のキット。

[8] 前記HDL亜分画-CがApoE containing HDL-Cおよび／またはHDL2-Cおよび／またはHDL3-Cである、[6]に記載のキット。

[9] [1]～[4]のいずれかに記載のキットの、非アルコール性脂肪肝炎の検出を補助するためのキットとしての使用。

発明の効果

[0009] 本発明により、患者に対する負荷やリスクが大きい肝生検を極力使用することなく、また、肝生検を実施する技術者の力量に依存することなく、安全かつ簡便な操作によりNASHの検出を補助することができる。その結果、早期にNASHの治療を開始することができ、重症化や死に至る進行を防ぎ又は遅らせることができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]実施例20において、被検者から採取した血液中のLDL-TG量、sdLDL-C量、HDL2-C量、ApoE量およびALT量をモデル式に代入してNASHとNAFLを鑑別した場合のROC曲線を示す図である。
[図2]実施例36において、被検者から採取した血液中のLDL-TG量、HDL2-C量、ApoE量および総コレステロール量について、各項目のカットオフで2値化した2値変数をモデル式に代入してNASHとNAFLを鑑別した場合のROC曲線を示す図である。

発明を実施するための形態

[0011] 本発明は、生体から分離された被検血液試料中に含まれる少なくともLDL-TGの存在量と、該被検血液試料中に含まれるLDL-C、LDL亜分

画-C、HDL-C、HDL亜分画-C、ApoB、ApoE、総コレステロール、ALTおよびASTからなる群から選ばれる少なくとも1つの成分の存在量を組み合わせることにより、NASHの検出を補助する方法である。本発明の方法により、従来の肝疾患マーカーであるALTを単独で用いた方法や、LDL-TGを単独で用いた方法よりも精度良くNASHの検出を補助することができる。

[0012] 被検血液試料中に含まれるLDL-C、LDL亜分画-C、HDL-C、HDL亜分画-C、ApoB、ApoE、総コレステロール、ALTおよびASTからなる群から選ばれる少なくとも1つの成分は、いずれか1つの単独成分を選択してもよいし、2種類以上の成分を選択してもよい。

[0013] 本発明において、LDL-TGは低密度リポ蛋白（以下、LDLと称する）中のトリグリセリド（TG）を意味する。LDL-Cは低密度リポ蛋白（LDL）中のコレステロール（C）を意味する。LDL亜分画はLDLを粒子の大きさや密度または構成成分により細分類した分画であり、sdLDL、large, buoyant (lb) LDLなどが挙げられ、LDL亜分画-CとはLDL亜分画中のコレステロール（C）を意味する。sdLDL-Cは小粒子で高密度（ $d = 1.044 \sim 1.063 \text{ g/mL}$ ）のLDL中のコレステロール（C）を意味する。HDL-Cは高密度リポ蛋白（HDL）中のコレステロール（C）を意味する。HDL亜分画はHDLを粒子の大きさや密度または構成成分により細分類した分画であり、HDL2、HDL3、ApoE-containing HDLなどが挙げられ、HDL亜分画-CとはHDL亜分画中のコレステロール（C）を意味する。HDL2-Cは大粒子で低密度（ $d = 1.063 \sim 1.125 \text{ g/mL}$ ）のHDL中のコレステロール（C）を意味し、HDL3-Cは高密度（ $d = 1.125 \sim 1.210 \text{ g/mL}$ ）のHDL中のコレステロール（C）を意味する。ApoE-containing HDL-Cはアポリポタンパク質Eを多く含む高密度リポ蛋白（以下、ApoE-containing HDLと称する）中のコレステロール（C）を意味する。ApoBは、アポリポタンパク質Bを

意味する。ApoEは、アポリポタンパク質Eを意味する。

[0014] 本発明においては血液試料を被検試料とするため、肝生検と比べると極めて侵襲性が低く、一部分を切り出した特定のサンプルに依存しない肝臓全体の病態を総体的に把握することができる。また、被検血液試料の採取は容易であり、血液試料に含まれるLDL-TGやLDL-C、sdLDL-C、HDL-C、ApoE-containing HDL-C、HDL2-C、HDL3-C、ApoB、ApoE、総コレステロール、ALT、ASTの存在量の測定に自動分析装置対応の測定キットを使用すれば、日常診療や健康診断等と同程度の簡便な操作で測定することが可能である。本発明における血液試料としては、全血、血漿及び血清が挙げられる。

[0015] 以下に、本発明において、NASHの検出を補助する具体的な方法を説明する。

本発明においては、生体から分離された被検血液試料中に含まれるLDL-TGの存在量を測定する。また、該被検血液試料中に含まれるLDL-C、LDL亜分画-C、HDL-C、HDL亜分画-C、ApoB、ApoE、総コレステロール、ALTおよびASTからなる群から選ばれる少なくとも1つの成分の存在量を測定する。そして、測定したLDL-TGの存在量、および前記少なくとも1つの成分の存在量を組み合わせてNASHの検出を補助するための指標とする。

[0016] 本発明によるNASHの検出を補助する結果を得るためには、得られたデータ（血液中の各成分の存在量）に対して当業者に公知の統計的手法を組み合わせ適用し、評価することによりスコアを求める。スコアを求める方法としては、多数ある変数（血液中の各成分の存在量）の中からNASHの検出の補助に有効な変数の組合せを選択し、選択された変数の組合せを用いてモデル式を作成し、被検血液試料中の各成分の存在量をあてはめる方法が挙げられる。

[0017] モデル式を作成する際に用いる被検血液試料中の各成分の存在量の値として、測定値そのままの連続変数、測定値を対数変換などの変換を行った変換

値の連続変数、任意の値で2群に分けた2値変数、複数の任意の値で3群以上に分けた名義変数や順位変数が挙げられるが、いずれも用いることができ、いずれかに限定されるものではない。具体的には、2値変数を用いる場合は、各成分の測定値を任意の値と比較して、小さい場合は存在量を0、大きい場合は存在量を1とすればよい。ここで、任意の値としては、例えば、各成分単独でNASHとNAFLを鑑別する場合のROC曲線を求め、Youden Indexにより求めたカットオフ値を用いることができる。Youden Indexとは、ROC曲線におけるAUCが0.500となる斜点線から最も離れたポイント、つまり、(感度+特異度-1)が最大値となるポイントをカットオフ値に設定する方法である。

[0018] NASHの検出の補助に有効な変数の組合せの選択手法としては、ステップワイズ変数増減法、Lasso法、Elastic net法などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0019] 有効な変数の組合せを選択した後、回帰分析などの適切な手法によりNASHの検出の補助に最適なモデル式を作成する。モデル式の作成手法としては、最小二乗法、線形判別分析、ロジスティック回帰、最尤法、Lasso回帰、Ridge回帰、Elastic net回帰などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0020] 本発明において、NASHの検出を補助する指標となるスコアを求めるためのモデル式は、例えば下記一般式(1)で表される。

[0021]
$$\text{スコア} = a + b \times [\text{LDL-TGの存在量}] + c \times [\text{LDL-Cの存在量}] + d \times [\text{sdLDL-Cの存在量}] + e \times [\text{HDL-Cの存在量}] + f \times [\text{ApoE-containing HDL-Cの存在量}] + g \times [\text{HDL2-Cの存在量}] + h \times [\text{HDL3-Cの存在量}] + i \times [\text{ApoBの存在量}] + j \times [\text{ApoEの存在量}] + k \times [\text{総コレステロールの存在量}] + l \times [\text{ALTの存在量}] + m \times [\text{ASTの存在量}] \cdots (1)$$

(式(1)中のaは切片を表し、b~mは各測定値に対する係数を表しており、a~mはa~mのそれぞれの数に同一の正の数に乗じた数であってもよ

い)

[0022] 存在量として測定値そのままの連続変数を用いる場合は、上記一般式(1)中、切片aは好ましくは-10~10であり、更に好ましくは-5~5である。係数bは好ましくは0.1~1.5であり、更に好ましくは0.2~1.0である。係数cは好ましくは-1.0~0であり、更に好ましくは-0.1~0である。係数dは好ましくは-1~0であり、更に好ましくは-0.5~0である。係数eは好ましくは-1.0~0であり、より好ましくは-0.2~0であり、更に好ましくは-0.1~0である。係数fは好ましくは-2~0であり、更に好ましくは-1.5~0である。係数gは好ましくは-1.0~0であり、更に好ましくは-0.3~0である。係数hは好ましくは-1.0~0であり、更に好ましくは-0.2~0である。係数iは好ましくは-1.0~0であり、更に好ましくは-0.2~0である。係数jは好ましくは0~10であり、更に好ましくは0~5である。係数kは好ましくは-1.0~0であり、更に好ましくは-0.1~0である。係数lは好ましくは-1.0~0であり、更に好ましくは-0.1~0である。係数mは好ましくは-1.0~0であり、更に好ましくは-0.2~0である。

[0023] 存在量として任意の値で2群に分けた2値変数を用いる場合で、例えば、前記任意の値を後述の比較例3および4、実施例21~36、実施例53~57で用いた値である、LDL-TGで17.6mg/dL、LDL-Cで116mg/dL、sdLDL-Cで34.3mg/dL、HDL-Cで47mg/dL、HDL2-Cで43.8mg/dL、HDL3-Cで22.7mg/dL、ApoE-containing HDL-C(AE-HDL)で4.2mg/dL、ApoBで88.9mg/dL、ApoEで3.4mg/dL、総コレステロール(TC)で178mg/dL、ALTで32単位、ASTで20単位とした場合は、上記一般式(1)中、切片aは好ましくは-100~100であり、更に好ましくは0~40である。係数bは好ましくは1~10であり、更に好ましくは2~5である。係数cは好まし

くは -5 、 $0 \sim 0$ であり、更に好ましくは $-3 \sim 0$ である。係数 d は好ましくは $-5 \sim 0$ であり、より好ましくは $-4 \sim 0$ であり、更に好ましくは $-3 \sim 0$ である。係数 e は好ましくは $-30 \sim 0$ であり、更に好ましくは $-20 \sim 0$ である。係数 f は好ましくは $-30 \sim 0$ であり、更に好ましくは $-20 \sim 0$ である。係数 g は好ましくは $-5 \sim 0$ であり、更に好ましくは $-3 \sim 0$ である。係数 h は好ましくは $-30 \sim 0$ であり、更に好ましくは $-20 \sim 0$ である。係数 i は好ましくは $-5 \sim 0$ であり、更に好ましくは $-3 \sim 0$ である。係数 j は好ましくは $0 \sim 10$ であり、更に好ましくは $0 \sim 3$ である。係数 k は好ましくは $-30 \sim 0$ であり、更に好ましくは $-20 \sim 0$ である。係数 l は好ましくは $-5 \sim 0$ であり、更に好ましくは $-2 \sim 0$ である。係数 m は好ましくは $-5 \sim 0$ であり、更に好ましくは $-2 \sim 0$ である。

[0024] 上記一般式(1)は本発明におけるモデル式の一例であり、上記一般式(1)の切片 a と係数 $b \sim m$ に同一の正の数に乗じたものをモデル式として用いてもよく、切片 a に任意の数を加えたり減じたりしたものをモデル式として用いてもよい。さらに、2値変数に分ける場合の境界となる値も任意に設定可能である。そのため、本発明に用いるモデル式の切片や係数は、上記の範囲に限定されるものではない。

[0025] 上記一般式(1)の様に、得られたモデル式に各種項目の存在量を代入することでスコアを求めることができる。求められたスコアと基準値を比較して、基準値よりも大きい場合にはNASHを発症している可能性が高い、基準値よりも小さい場合にはNASHを発症している可能性は低いと示すことができる。基準値は、感度、特異度、陽性的中率(PPV)、陰性的中率(NPV)を考慮し、目的に応じて任意に設定することができる。例えば、偽陰性を減らしたい場合には基準値を低く、偽陽性を減らしたい場合には基準値を高く設定することができる。本発明では、これらのバランスが良いとされているYouden Indexを用いて基準値の設定を行った。なお、本発明において記載した基準値は、単なる例に過ぎず、上記のように目的に応じて他の値を基準値として採用することができる。また、データを採取する患者

の集団が異なれば、最良の基準値も異なる。さらに、前述のようにモデル式の係数および切片に同一の正の数に乗じた場合や、モデル式の切片に任意の数を加えたり減じたりした場合、最良の基準値も連動して変化する。

[0026] 本発明において、NASHの検出の精度を示す指標としては、ROC曲線下面積（AUC（Area Under Curve））および正診率（被検患者中、NASHかNAFLかを正しく判定できた割合）を用いた。AUCに関しては、AUCが0.80以上のものは高精度であり、0.85以上は非常に高精度、0.90以上は極めて高精度である。したがって、本発明においても、AUCが0.80以上のものが好ましく、0.85以上のものがより好ましく、0.90以上のものが特に好ましい。正診率に関しては、正診率が75%以上のものは高精度であり、85%以上は非常に高精度、95%以上は極めて高精度である。したがって、本発明においても、正診率が75%以上のものが好ましく、85%以上のものがより好ましく、95%以上のものが特に好ましい。

[0027] 被検血液試料中の各成分の中でも、測定値そのままの存在量を用いた例では、LDL-TG、sdLDL-C、HDL2-C、ApoEおよびALTの組合せ（後述の実施例20）、測定値を2群に分けた2値変量を存在量として用いた例では、LDL-TG、HDL2-C、ApoEおよび総コレステロールの組合せ（後述の実施例36）を用いた場合には、AUC0.90以上且つ正診率95%を達成することができるため、極めて高精度にNASHを検出することができる。

[0028] なお、本発明においては、上述したモデル式を用いなくとも、被検血液試料に含まれるLDL-TGの存在量と、該被検血液試料に含まれるLDL-C、LDL亜分画-C、HDL-C、HDL亜分画-C、ApoB、ApoE、総コレステロール、ALT、ASTから選ばれる少なくとも1つの存在量と組み合わせた場合に、組み合わせた各成分の存在量がカットオフ値以上かカットオフ値以下かの組み合わせでNASHの発症の可能性を判定することができる。カットオフ値は、例えば各成分単独でNASHとNAFL

を鑑別する場合のROC曲線からYouden Indexを用いることにより求めることができる。

[0029] 具体的には、カットオフ値を実施例37～47で用いた値である、LDL-TGで17.6mg/dL、LDL-Cで116mg/dL、sdLDL-Cで34.3mg/dL、HDL-Cで47mg/dL、HDL2-Cで43.8mg/dL、HDL3-Cで22.7mg/dL、ApoE-containing HDL-C (AE-HDL)で4.2mg/dL、ApoBで88.9mg/dL、ApoEで3.4mg/dL、総コレステロール(TC)で178mg/dL、ALTで32単位、ASTで20単位とした場合は、LDL-TGの存在量がカットオフ値以上で、且つ、LDL-C、LDL亜分画-C、HDL-C、HDL亜分画-C、ApoB、総コレステロール、ALT、ASTから選ばれた検査項目のいずれかの存在量がカットオフ値以下となる場合、または、被検血液試料中に含まれるLDL-TGの存在量がカットオフ値以上で、且つ、ApoEの存在量がカットオフ値以上となる場合に、NASHの発症の可能性が高いと判定することができる。ただし、感度を優先するか、特異度を優先するかなどの目的に応じてカットオフ値は任意に設定可能であり、組合せはこの限りではない。もっとも、通常、カットオフ値は、実施例37～47で用いた上記の値(表5に記載の値)の±50%の範囲内、より好適には±30%の範囲内で設定することができる。

[0030] このように被検血液試料中に含まれるLDL-TGの存在量と、該被検血液試料中に含まれるLDL-C、LDL亜分画-C、HDL-C、HDL亜分画-C、ApoB、ApoE、総コレステロール、ALT、ASTから選ばれる少なくとも1つの存在量と組み合わせて用いることにより、従来は肝生検を行う必要があったNASHとNAFLの鑑別を、簡便な操作により容易に且つ精度良く補助することができる。

[0031] 本発明においては、非アルコール性脂肪肝炎が疑われるか又は非アルコール性脂肪肝炎に罹患するヒトの被検血液試料中のLDL-TGと、LDL-

C、LDL亜分画-C、HDL-C、HDL亜分画-C、ApoB、ApoE、総コレステロール、ALT、およびASTからなる群から選ばれる少なくとも1つの成分を検出する方法も提供される。

すなわち、非アルコール性脂肪肝炎が疑われる又は非アルコール性脂肪肝炎に罹患するヒトの被検血液試料中のLDL-TGと、LDL-C、LDL亜分画-C、HDL-C、HDL亜分画-C、ApoB、ApoE、総コレステロール、ALT、およびASTからなる群から選ばれる少なくとも1つの成分を検出する方法であって、

ヒトから血液試料を得る工程、及び

前記血液試料内のLDL-TGの存在量と、LDL-C、LDL亜分画-C、HDL-C、HDL亜分画-C、ApoB、ApoE、総コレステロール、ALT、およびASTからなる群から選ばれる少なくとも1つの成分の存在量を測定する工程を含み、

ここで、前記LDL-TGの存在量および前記少なくとも1つの成分の存在量を変数とするモデル式を作成し、前記血液試料中に含まれる前記LDL-TGの存在量、および前記少なくとも1つの成分の存在量を前記モデル式に代入して求めたスコアが、非アルコール性脂肪肝炎を患う患者の血液試料について求めたスコアよりも高い方法、も提供される。

[0032] また、上記した本発明の方法により非アルコール性脂肪肝炎の検出が補助された場合、非アルコール性脂肪肝炎が検出された患者に、有効量の非アルコール性脂肪肝炎治療薬を投与することにより、非アルコール性脂肪肝炎を治療することができる。治療薬としては、糖尿病合併例ではピオグリタゾン、糖尿病非合併例ではビタミンE等を挙げることができる。

[0033] 本発明において、血液試料中に含まれるLDL-C、sdLDL-C、HDL2-C、HDL3-C、HDL-C、ApoE-containing HDL-C、ApoB、ApoE、総コレステロール、ALT、ASTの存在量を測定する方法としては、従来から公知の方法を用いることができる。例えば、各種脂質項目の測定方法としては、超遠心法、電気泳動法又は高速

液体クロマトグラフィー等の分画分離操作により対象のリポ蛋白を分離した後に、定量操作によりトリグリセリドやコレステロールを定量する方法や、分画操作を行うことなく第1工程で対象のリポ蛋白以外の全てのリポ蛋白中のトリグリセリドやコレステロールを除去した後に、第2工程で対象のリポ蛋白中のトリグリセリドやコレステロールを測定する方法等が挙げられる。

ApoBやApoEを測定する方法としては、これらに特異的な抗体を用いたELISA法や免疫非濁法が挙げられる。ALTの測定方法としては、LDH-UV法（JSCC常用基準法）が、ASTの測定方法としては、MDH-UV法（JSCC常用基準法）が挙げられる。

[0034] 具体的には、LDL-TG量の測定方法としてはWO2013/157642に記載された方法を用いることができ、LDL-C量の測定方法としてはWO98/47005に記載された方法を用いることができ、sdLDL-C量の測定方法としてはWO08/105486に記載された方法を用いることができ、HDL-C量の測定方法としてはWO98/26090に記載された方法を用いることができ、HDL2-CおよびHDL3-C量の測定方法としてはIto Y et al. (2014) “Development of a homogeneous assay for measurement of high-density lipoprotein-subclass cholesterol,” *Clinica Chimica Acta*, 427:86-93.に記載された方法を用いることができ、ApoE-containing HDL-C量の測定方法としては特開2014-030393に記載された方法を用いることができるが、各種項目の量を測定するものであれば、上記各方法に限定されるものではない。

[0035] 以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

実施例

[0036] NAFL患者8名、NASH患者34名からなる全42名の集団から採取

した血液中のLDL-TG量、LDL-C量、sdLDL-C量、HDL-C量、HDL2-C量、HDL3-C量、ApoE-containing HDL-C量、ApoB量、ApoE量、総コレステロール量、ALT量、AST量について、自動分析装置を用いて測定した。LDL-C量、HDL-C量、ApoB量、ApoE量、総コレステロール量、ALT量AST量の測定には、臨床検査の場で一般に用いられている自動分析装置用の各測定用試薬を用いた。LDL-TG量の測定には、LDLTG-EX “SEIKEN”（デンカ生研社製）、sdLDL-C量の測定にはsdLDL-EX「生研」（デンカ生研社製）、HDL2-C量およびHDL3-C量の測定にはIto Y et al. (2014) “Development of a homogeneous assay for measurement of high-density lipoprotein-subclass cholesterol,” Clinica Chimica Acta, 427:86-93. の方法、ApoE-containing HDL-C量の測定には特開2014-030393の方法を用いた。

[0037]（比較例1および2、実施例1～20）

比較例1および2、実施例1～20には、表1に示す項目を用い、その存在量として、測定値そのままの連続変数をそれぞれ用いた。

[0038]

[表1]

No.	項目
比較例1	ALT
比較例2	LDL-TG
実施例1	LDL-TG, LDL-C
実施例2	LDL-TG, ApoB
実施例3	LDL-TG, sdLDL-C, ALT
実施例4	LDL-TG, TC, ALT
実施例5	LDL-TG, AE-HDL, ApoB
実施例6	LDL-TG, sdLDL-C, HDL-C
実施例7	LDL-TG, LDL-C, HDL-C
実施例8	LDL-TG, HDL-C, ApoB
実施例9	LDL-TG, HDL3-C, ApoB, AST
実施例10	LDL-TG, ApoE, TC, ALT
実施例11	LDL-TG, sdLDL-C, ApoE, ALT
実施例12	LDL-TG, sdLDL-C, HDL2-C, AST
実施例13	LDL-TG, sdLDL-C, AE-HDL, ALT
実施例14	LDL-TG, sdLDL-C, HDL-C, ALT
実施例15	LDL-TG, HDL3-C, ApoB, ALT
実施例16	LDL-TG, sdLDL-C, HDL2-C, ALT
実施例17	LDL-TG, HDL2-C, ApoB, ALT
実施例18	LDL-TG, sdLDL-C, AE-HDL, ApoE, ALT
実施例19	LDL-TG, sdLDL-C, HDL2-C, ApoE, AST
実施例20	LDL-TG, sdLDL-C, HDL2-C, ApoE, ALT

AE-HDL : ApoE-containing HDL-C, TC : 総コレステロール

[0039] 各組合せでロジスティック回帰により求めたモデル式を表2に示す。このモデル式に示す項目名に、各項目の測定値を代入することでスコア値が得られる。

[0040]

[表2]

No.	モデル式
比較例1	+1.861 -0.009ALT
比較例2	-2.374 +0.228LDL-TG
実施例1	-0.119 +0.381LDL-TG -0.042LDL-C
実施例2	+0.568 +0.418LDL-TG -0.067ApoB
実施例3	-2.064 +0.454LDL-TG -0.090sdLDL-C -0.018ALT
実施例4	+3.258 +0.560LDL-TG -0.051TC -0.020ALT
実施例5	+3.375 +0.473LDL-TG -0.483AE-HDL -0.077ApoB
実施例6	+2.215 +0.392LDL-TG -0.109sdLDL-C -0.055HDL-C
実施例7	+2.559 +0.410LDL-TG -0.047LDL-C -0.040HDL-C
実施例8	+4.375 +0.485LDL-TG -0.054HDL-C -0.084ApoB
実施例9	+3.941 +0.582LDL-TG -0.131HDL3-C -0.082ApoB -0.038AST
実施例10	+0.673 +0.537LDL-TG +1.028ApoE -0.056TC -0.022ALT
実施例11	-4.591 +0.426LDL-TG -0.097sdLDL-C +0.873ApoE -0.020ALT
実施例12	+3.155 +0.668LDL-TG -0.181sdLDL-C -0.114HDL2-C -0.056AST
実施例13	+1.513 +0.569LDL-TG -0.125sdLDL-C -0.685AE-HDL -0.022ALT
実施例14	+3.140 +0.592LDL-TG -0.145sdLDL-C -0.082HDL-C -0.023ALT
実施例15	+2.843 +0.536LDL-TG -0.120HDL3-C -0.071ApoB -0.016ALT
実施例16	+2.272 +0.627LDL-TG -0.159sdLDL-C -0.115HDL2-C -0.024ALT
実施例17	+3.727 +0.716LDL-TG -0.097HDL2-C -0.102ApoB -0.021ALT
実施例18	-1.302 +0.682LDL-TG -0.205sdLDL-C -1.299AE-HDL +2.205ApoE -0.034ALT
実施例19	-0.058 +0.941LDL-TG -0.356sdLDL-C -0.244HDL2-C +3.273ApoE -0.113AST
実施例20	-1.512 +0.819LDL-TG -0.279sdLDL-C -0.216HDL2-C +2.652ApoE -0.041ALT

AE-HDL : ApoE-containing HDL-C, TC : 総コレステロール

[0041] NASHを陽性とした場合のROC曲線下面積（AUC）、Youden Indexにて設定した基準値、前記基準値とスコア値を比較して判定した場合の感度、特異度、PPV（陽性的中率）、NPV（陰性的中率）、正診率を表3-1及び表3-2に示す。また、これらの代表として、実施例20のROC曲線を図1に示す。

[0042]

[表3-1]

No.	項目	AUC	基準値	感度	特異度	PPV	NPV	正診率
比較例1	ALT	0.500	1.565	64.7%	50.0%	84.6%	25.0%	61.9%
比較例2	LDL-TG	0.787	1.638	64.7%	87.5%	95.7%	36.8%	69.0%
実施例1	LDL-TG LDL-C	0.838	0.950	94.1%	62.5%	91.4%	71.4%	88.1%
実施例2	LDL-TG ApoB	0.849	-0.323	100.0%	62.5%	91.9%	100.0%	92.9%
実施例3	LDL-TGs dLDL-C ALT	0.886	1.851	79.4%	87.5%	96.4%	50.0%	81.0%
実施例4	LDL-TG TC ALT	0.912	1.140	88.2%	87.5%	96.8%	63.6%	88.1%
実施例5	LDL-TG AE-HDL ApoB	0.871	0.671	94.1%	75.0%	94.1%	75.0%	90.5%
実施例6	LDL-TG sdLDL-C HDL-C	0.875	0.524	94.1%	75.0%	94.1%	75.0%	90.5%
実施例7	LDL-TG LDL-C HDL-C	0.875	0.726	94.1%	75.0%	94.1%	75.0%	90.5%
実施例8	LDL-TG HDL-C ApoB	0.879	0.792	94.1%	75.0%	94.1%	75.0%	90.5%
実施例9	LDL-TG HDL3-C ApoB AST	0.915	1.492	85.3%	87.5%	96.7%	58.3%	85.7%
実施例10	LDL-TG ApoE TC ALT	0.945	2.099	85.3%	100.0%	100.0%	61.5%	88.1%
実施例11	LDL-TG sdLDL-C ApoE ALT	0.908	-0.102	94.1%	75.0%	94.1%	75.0%	90.5%
実施例12	LDL-TG sdLDL-C HDL2-C AST	0.912	0.941	91.2%	87.5%	96.9%	70.0%	90.5%

[0043]

[表3-2]

No.	項目	AUC	基準値	感度	特異度	PPV	NPV	正診率
実施例13	LDL-TG sdLDL-C AE-HDL ALT	0.919	1.255	91.2%	87.5%	96.9%	70.0%	90.5%
実施例14	LDL-TG sdLDL-C HDL-C ALT	0.919	1.375	91.2%	87.5%	96.9%	70.0%	90.5%
実施例15	LDL-TG HDL3-C ApoB ALT	0.912	-0.274	97.1%	75.0%	94.3%	85.7%	92.9%
実施例16	LDL-TG sdLDL-C HDL2-C ALT	0.923	0.626	94.1%	87.5%	97.0%	77.8%	92.9%
実施例17	LDL-TG HDL2-C ApoB ALT	0.934	1.182	94.1%	87.5%	97.0%	77.8%	92.9%
実施例18	LDL-TG sdLDL-C AE-HDL ApoE ALT	0.952	1.435	91.2%	100.0%	100.0%	72.7%	92.9%
実施例19	LDL-TG sdLDL-C HDL2-C ApoE AST	0.971	0.853	91.2%	100.0%	100.0%	72.7%	92.9%
実施例20	LDL-TG sdLDL-C HDL2-C ApoE ALT	0.960	0.797	94.1%	100.0%	100.0%	80.0%	95.2%

AE-HDL : ApoE-containing HDL-C, TC : 総コレステロール

[0044] 表3-1及び表3-2が示すように、従来の肝疾患マーカーであるALT単独の比較例1や、LDL-TG単独の比較例2と比較して、実施例1～20ではいずれもAUCが大きく、正診率が高いことから、NASHかNAFLかを、より高い確率で予測することが可能であることが示された。

[0045] (比較例3および4、実施例21～36)

比較例3および4、実施例21～36には、表4に示す項目を用い、その存在量として、各項目単独でROC曲線をもとめた際のYouden Indexにて求めたカットオフ値で2群に分けた2値変数をそれぞれ用いた。

[0046] [表4]

No.	項目
比較例3	ALT
比較例4	LDL-TG
実施例21	LDL-TG, TC
実施例22	LDL-TG, LDL-C
実施例23	LDL-TG, sdLDL-C, AE-HDL
実施例24	LDL-TG, ApoE, TC
実施例25	LDL-TG, ApoB, ALT
実施例26	LDL-TG, sdLDL-C, ALT
実施例27	LDL-TG, LDL-C, ApoE
実施例28	LDL-TG, LDL-C, ALT
実施例29	LDL-TG, HDL-C, TC
実施例30	LDL-TG, AE-HDL, TC
実施例31	LDL-TG, ApoB, ApoE, AST
実施例32	LDL-TG, ApoE, TC, AST
実施例33	LDL-TG, sdLDL-C, HDL-C, ApoE
実施例34	LDL-TG, sdLDL-C, HDL3-C, ALT
実施例35	LDL-TG, sdLDL-C, HDL2-C, HDL3-C
実施例36	LDL-TG, HDL2-C, ApoE, TC

AE-HDL : ApoE-containing HDL-C, TC : 総コレステロール

[0047] 比較例3および4、実施例21～36で用いた各項目のカットオフ値を表5に示す。

[0048]

[表5]

項目	カットオフ値
LDL-TG	17.6mg/dL
LDL-C	116mg/dL
sdLDL-C	34.3mg/dL
HDL-C	47mg/dL
HDL2-C	43.8mg/dL
HDL3-C	22.7mg/dL
AE-HDL	4.2mg/dL
ApoB	88.9mg/dL
ApoE	3.4mg/dL
TC	178mg/dL
ALT	32単位
AST	20単位

AE-HDL : ApoE-containing HDL-C, TC : 総コレステロール

[0049] 各組合せでロジスティック回帰により求めたモデル式を表6に示す。このモデル式に示す項目名に、各項目の測定値がカットオフ値と比較して大きい場合は1を、カットオフ値と比較して小さい場合は0を代入することでスコア値が得られる。

[0050] [表6]

No.	モデル式
比較例3	1.705 -0.606ALT
比較例4	0.539 +2.552LDL-TG
実施例21	16.200 +2.719LDL-TG -16.354TC
実施例22	1.579 +3.017LDL-TG -2.154LDL-C
実施例23	18.522 +2.755LDL-TG -2.328sdLDL-C -17.194AE-HDL
実施例24	15.865 +2.983LDL-TG +2.057ApoE -17.533TC
実施例25	1.625 +3.197LDL-TG -1.443ApoB -1.115ALT
実施例26	1.711 +2.980LDL-TG -1.563sdLDL-C -1.167ALT
実施例27	0.306 +3.132LDL-TG -2.157LDL-C +1.791ApoE
実施例28	1.924 +3.507LDL-TG -2.051LDL-C -1.386ALT
実施例29	33.270 +2.416LDL-TG -16.307HDL-C -17.299TC
実施例30	32.653 +2.416LDL-TG -16.001AE-HDL -16.989TC
実施例31	0.754 +3.114LDL-TG -2.093ApoB +2.205ApoE -0.826AST
実施例32	16.862 +3.321LDL-TG +2.518ApoE -17.977TC -1.27AST
実施例33	17.162 +2.604LDL-TG -2.789sdLDL-C -16.987HDL-C +2.073ApoE
実施例34	18.786 +3.016LDL-TG -1.864sdLDL-C -17.446HDL3-C -1.595ALT
実施例35	19.209 +3.238LDL-TG -2.869sdLDL-C -2.833HDL2-C -17.123HDL3-C
実施例36	16.382 +3.207LDL-TG -1.803HDL2-C +2.013ApoE -17.636TC

AE-HDL : ApoE-containing HDL-C, TC : 総コレステロール

[0051] NASHを陽性とした場合のROC曲線下面積（AUC）、Youden Indexにて設定した基準値、前記基準値とスコア値を比較して判定した場合の感度、特異度、PPV（陽性的中率）、NPV（陰性的中率）、正診率を表7-1及び表7-2に示す。また、これらの代表として、実施例36のROC曲線を図2に示す。

[0052] [表7-1]

No.	項目	AUC	基準値	感度	特異度	PPV	NPV	正診率
比較例3	ALT	0.574	1.705	64.7%	50.0%	84.6%	25.0%	61.9%
比較例4	LDL-TG	0.761	3.091	64.7%	87.5%	95.7%	36.8%	69.0%
実施例21	LDL-TG TC	0.877	2.565	82.4%	87.5%	96.6%	53.8%	83.3%
実施例22	LDL-TG LDL-C	0.855	1.579	91.2%	62.5%	91.2%	62.5%	85.7%
実施例23	LDL-TG sdLDL-C AE-HDL	0.899	1.756	73.5%	87.5%	96.2%	43.8%	76.2%
実施例24	LDL-TG ApoE TC	0.915	1.315	82.4%	87.5%	96.6%	53.8%	83.3%
実施例25	LDL-TG ApoB ALT	0.860	1.625	88.2%	75.0%	93.8%	60.0%	85.7%

[0053]

[表7-2]

No.	項目	AUC	基準値	感度	特異度	PPV	NPV	正診率
実施例26	LDL-TG sdLDL-C ALT	0.866	1.711	88.2%	75.0%	93.8%	60.0%	85.7%
実施例27	LDL-TG LDL-C ApoE	0.873	1.282	88.2%	75.0%	93.8%	60.0%	85.7%
実施例28	LDL-TG LDL-C ALT	0.879	1.924	88.2%	75.0%	93.8%	60.0%	85.7%
実施例29	LDL-TG HDL-C TC	0.903	2.079	85.3%	87.5%	96.7%	58.3%	85.7%
実施例30	LDL-TG AE-HDL TC	0.903	2.079	85.3%	87.5%	96.7%	58.3%	85.7%
実施例31	LDL-TG ApoB ApoE AST	0.866	0.866	88.2%	75.0%	93.8%	60.0%	85.7%
実施例32	LDL-TG ApoE TC AST	0.926	0.936	88.2%	87.5%	96.8%	63.6%	88.1%
実施例33	LDL-TG sdLDL-C HDL-C ApoE	0.921	2.063	91.2%	75.0%	93.9%	66.7%	88.1%
実施例34	LDL-TG sdLDL-C HDL3-C ALT	0.943	1.340	91.2%	87.5%	96.9%	70.0%	90.5%
実施例35	LDL-TG sdLDL-C HDL2-C HDL3-C	0.936	-0.377	94.1%	87.5%	97.0%	77.8%	92.9%
実施例36	LDL-TG HDL2-C ApoE TC	0.932	0.150	100.0%	75.0%	94.4%	100.0%	95.2%

AE-HDL : ApoE-containing HDL-C, TC : 総コレステロール

[0054] 表7-1及び表7-2が示すように、従来の肝疾患マーカーであるALT単独の比較例3や、LDL-TG単独の比較例4と比較して、実施例21～

36ではいずれもAUCが大きく、正診率が高いことから、NASHかNAFLかを、より高い確率で予測することが可能であることが示された。

[0055] (実施例37～47)

実施例37～47には、表8に示す項目を用い、モデル式を用いることなく、被検血液試料中に含まれる各成分の存在量がカットオフ値以上かカットオフ値以下かの組み合わせで評価した。各項目のカットオフ値には表5に示した値を用いた。

[0056] [表8]

No.	項目
実施例37	LDL-TG, LDL-C
実施例38	LDL-TG, sdLDL-C
実施例39	LDL-TG, HDL-C
実施例40	LDL-TG, HDL2-C
実施例41	LDL-TG, HDL3-C
実施例42	LDL-TG, AE-HDL
実施例43	LDL-TG, ApoB
実施例44	LDL-TG, ApoE
実施例45	LDL-TG, TC
実施例46	LDL-TG, ALT
実施例47	LDL-TG, AST

AE-HDL : ApoE-containing HDL-C, TC : 総コレステロール

[0057] 実施例37～47で評価した各項目の測定値の組合せ、該当者数、および、該当者中のNASH患者の割合を表9に示す。

[0058]

[表9]

No.	各項目の測定値の組合せ	該当者数	該当者中の NASH患者
実施例37	LDL-TGがカットオフ値以上、 且つLDL-Cがカットオフ値以下	12	100%
実施例38	LDL-TGがカットオフ値以上、 且つsdLDL-Cがカットオフ値以下	13	100%
実施例39	LDL-TGがカットオフ値以上、 且つHDL-Cがカットオフ値以下	8	100%
実施例40	LDL-TGがカットオフ値以上、 且つHDL2-Cがカットオフ値以下	20	95%
実施例41	LDL-TGがカットオフ値以上、 且つHDL3-Cがカットオフ値以下	14	100%
実施例42	LDL-TGがカットオフ値以上、 且つAE-HDLがカットオフ値以下	10	100%
実施例43	LDL-TGがカットオフ値以上、 且つApoBがカットオフ値以下	10	100%
実施例44	LDL-TGがカットオフ値以上、 且つApoEがカットオフ値以上	17	94%
実施例45	LDL-TGがカットオフ値以上、 且つTCがカットオフ値以下	9	100%
実施例46	LDL-TGがカットオフ値以上、 且つALTがカットオフ値以下	12	100%
実施例47	LDL-TGがカットオフ値以上、 且つASTがカットオフ値以下	1	100%

AE-HDL : ApoE-containing HDL-C, TC : 総コレステロール

[0059] 表9が示すように、実施例37～47の測定値の組合せの該当者は、NASH患者である割合が高いことから、これらの項目の測定値の組合せでNASHの発症の可能性を判定することができることが示された。

[0060] (実施例48～52)

実施例48～52には、表10に示す項目を用い、その存在量として、測定値そのままの連続変数をそれぞれ用いた。

[0061]

[表10]

No.	項目
実施例48	LDL-TG, HDL2-C, ApoE, TC
実施例49	LDL-TG, HDL-C, ApoE, TC
実施例50	LDL-TG, sdLDL-C, HDL-C, ApoE, ALT
実施例51	LDL-TG, HDL-C, ApoB, ApoE, ALT
実施例52	LDL-TG, LDL-C, HDL-C, ApoE, ALT

TC：総コレステロール

[0062] 各組合せでロジスティック回帰により求めたモデル式を表11に示す。このモデル式に示す項目名に、各項目の測定値を代入することでスコア値が得られる。

[0063] [表11]

No.	モデル式
実施例48	+1.850 +0.388LDL-TG -0.017HDL2-C +0.745ApoE -0.047TC
実施例49	+1.906 +0.384LDL-TG -0.011HDL-C +0.721ApoE -0.046TC
実施例50	+1.501 +0.719LDL-TG -0.244sdLDL-C -0.152HDL-C +2.248ApoE -0.036ALT
実施例51	+2.691 +0.654LDL-TG -0.097HDL-C -0.105ApoB +1.181ApoE -0.023ALT
実施例52	+1.025 +0.508LDL-TG -0.052LDL-C -0.072HDL-C +0.917ApoE -0.020ALT

TC：総コレステロール

[0064] NASHを陽性とした場合のROC曲線下面積（AUC）、設定した基準値、前記基準値とスコア値を比較して判定した場合の感度、特異度、PPV（陽性的中率）、NPV（陰性的中率）、正診率を表12に示す。

[0065]

[表12]

No.	項目	AUC	基準値	感度	特異度	PPV	NPV	正診率
実施例48	LDL-TG HDL-C ApoE TC	0.868	1.224	88.2%	87.5%	96.8%	63.6%	88.1%
実施例49	LDL-TG HDL-C ApoE TC	0.871	1.129	88.2%	87.5%	96.8%	63.6%	88.1%
実施例50	LDL-TG sdLDL-C HDL-C ApoE ALT	0.952	1.408	91.2%	100.0%	100.0%	72.7%	92.9%
実施例51	LDL-TG HDL-C ApoB ApoE ALT	0.949	1.866	88.2%	100.0%	100.0%	66.7%	90.5%
実施例52	LDL-TG LDL-C HDL-C ApoE ALT	0.938	1.383	91.2%	87.5%	96.9%	70.0%	90.5%

TC：総コレステロール

[0066] 表12が示すように、表3-1に示した従来の肝疾患マーカーであるALT単独の比較例1や、LDL-TG単独の比較例2と比較して、実施例48～52ではいずれもAUCが大きく、正診率が高いことから、NASHかNAFLかを、より高い確率で予測することが可能であることが示された。

[0067] (実施例53～57)

実施例53～57には、表13に示す項目を用い、その存在量として、各項目単独でROC曲線をもとめた際のYouden Indexにて求めたカットオフ値で2群に分けた2値変数をそれぞれ用いた。各項目のカットオフ値には表5に示した値を用いた。

[0068]

[表13]

No.	項目
実施例53	LDL-TG, sdLDL-C, HDL2-C, ApoE, ALT
実施例54	LDL-TG, HDL-C, ApoE, TC
実施例55	LDL-TG, sdLDL-C, HDL-C, ApoE, ALT
実施例56	LDL-TG, HDL-C, ApoB, ApoE, ALT
実施例57	LDL-TG, LDL-C, HDL-C, ApoE, ALT

TC：総コレステロール

[0069] 各組合せでロジスティック回帰により求めたモデル式を表14に示す。このモデル式に示す項目名に、各項目の測定値がカットオフ値と比較して大きい場合は1を、カットオフ値と比較して小さい場合は0を代入することでスコア値が得られる。

[0070] [表14]

No.	モデル式
実施例53	+1.700 +3.014LDL-TG -3.423sdLDL-C -2.927HDL2-C +2.730ApoE -0.779ALT
実施例54	+31.556 +2.766LDL-TG -15.705HDL-C +1.717ApoE -17.414TC
実施例55	+18.173 +2.942LDL-TG -2.558sdLDL-C -17.418HDL-C +1.700ApoE -1.446ALT
実施例56	+18.042 +3.333LDL-TG -17.296HDL-C -2.175ApoB +1.356ApoE -1.280ALT
実施例57	+17.192 +3.464LDL-TG -2.069LDL-C -16.33HDL-C +1.110ApoE -1.306ALT

TC：総コレステロール

[0071] NASHを陽性とした場合のROC曲線下面積（AUC）、設定した基準値、前記基準値とスコア値を比較して判定した場合の感度、特異度、PPV（陽性的中率）、NPV（陰性的中率）、正診率を表15に示す。

[0072]

[表15]

No.	項目	AUC	基準値	感度	特異度	PPV	NPV	正診率
実施例53	LDL-TG sdLDL-C HDL2-C ApoE ALT	0.934	0.314	94.1%	75.0%	94.1%	75.0%	90.5%
実施例54	LDL-TG HDL-C ApoE TC	0.934	1.203	85.3%	87.5%	96.7%	58.3%	85.7%
実施例55	LDL-TG sdLDL-C HDL-C ApoE ALT	0.938	2.251	88.2%	87.5%	96.8%	63.6%	88.1%
実施例56	LDL-TG HDL-C ApoB ApoE ALT	0.936	0.624	94.1%	75.0%	94.1%	75.0%	90.5%
実施例57	LDL-TG LDL-C HDL-C ApoE ALT	0.904	0.862	94.1%	75.0%	94.1%	75.0%	90.5%

TC：総コレステロール

[0073] 表15が示すように、表7-1に示した従来の肝疾患マーカーであるALT単独の比較例3や、LDL-TG単独の比較例4と比較して、実施例53～57ではいずれもAUCが大きく、正診率が高いことから、NASHかNAFLかを、より高い確率で予測することが可能であることが示された。

請求の範囲

- [請求項1] 非アルコール性脂肪肝炎の検出を補助する方法であって
- a) 生体から分離された被検血液試料中に含まれるLDL-TGの存在量を測定すること、
 - b) 前記被検血液試料中に含まれるLDL-C、LDL亜分画-C、HDL-C、HDL亜分画-C、ApoB、ApoE、総コレステロール、ALT、およびASTからなる群から選ばれる少なくとも1つの成分の存在量を測定すること、ならびに
 - c) 前記LDL-TGの存在量、および前記少なくとも1つの成分の存在量を組み合わせて用いることにより、非アルコール性脂肪肝炎の発症および／または非アルコール性脂肪肝炎を発症している可能性を判定すること、を含む方法。
- [請求項2] 前記LDL亜分画-Cがsmall, dense (sd) LDL-Cである、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記HDL亜分画-CがApoE containing HDL-Cおよび／またはHDL2-Cおよび／またはHDL3-Cである、請求項1に記載の方法。
- [請求項4] LDL-TGの存在量、ならびにLDL-C、LDL亜分画-C、HDL-C、HDL亜分画-C、ApoB、ApoE、総コレステロール、ALT、およびASTからなる群から選ばれる少なくとも1つの成分の存在量を変数とするモデル式を作成し、前記被検血液試料中に含まれる前記LDL-TGの存在量、および前記少なくとも1つの成分の存在量を前記モデル式に代入して求めたスコアが、非アルコール性脂肪肝を患う患者の血液試料について求めたスコアよりも高い場合に、非アルコール性脂肪肝炎を発症している可能性が高いと判定する、請求項1～3のいずれかに記載の方法。
- [請求項5] 非アルコール性脂肪肝炎の検出を補助するための指標を求めるモデル式の作成方法であって、非アルコール性脂肪肝炎を患う患者および

非アルコール性脂肪肝を患う患者の血液試料中のLDL-TGの存在量、ならびにLDL-C、LDL亜分画-C、HDL-C、HDL亜分画-C、ApoB、ApoE、総コレステロール、ALT、およびASTからなる群から選ばれる少なくとも1つの成分の存在量を測定し、測定した前記存在量を変数として用いてモデル式を作成する、モデル式の作成方法。

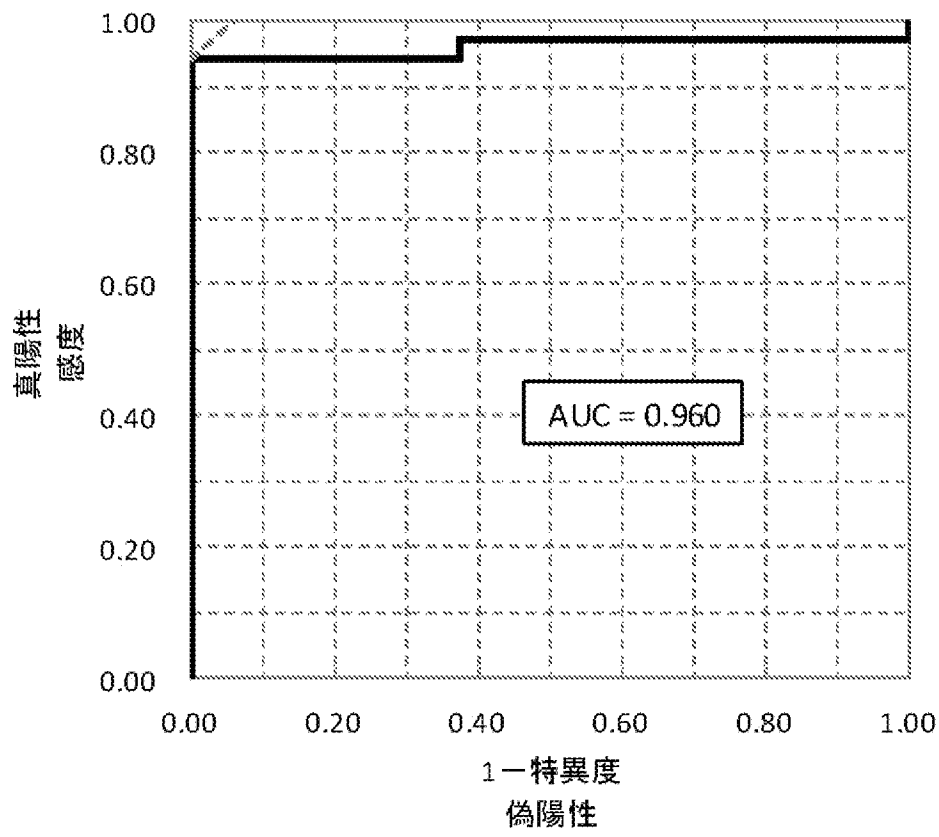
[請求項6] 請求項1～4のいずれかに記載の、非アルコール性脂肪肝炎の検出を補助する方法に用いられる測定用キットであって、LDL-TGの測定用試薬、ならびにLDL-C、LDL亜分画-C、HDL-C、HDL亜分画-C、ApoB、ApoE、総コレステロール、ALT、およびASTからなる群から選ばれる少なくとも1つの成分の測定用試薬を含む測定用キット。

[請求項7] 前記LDL亜分画-Cがsmall, dense (sd) LDL-Cである、請求項6に記載のキット。

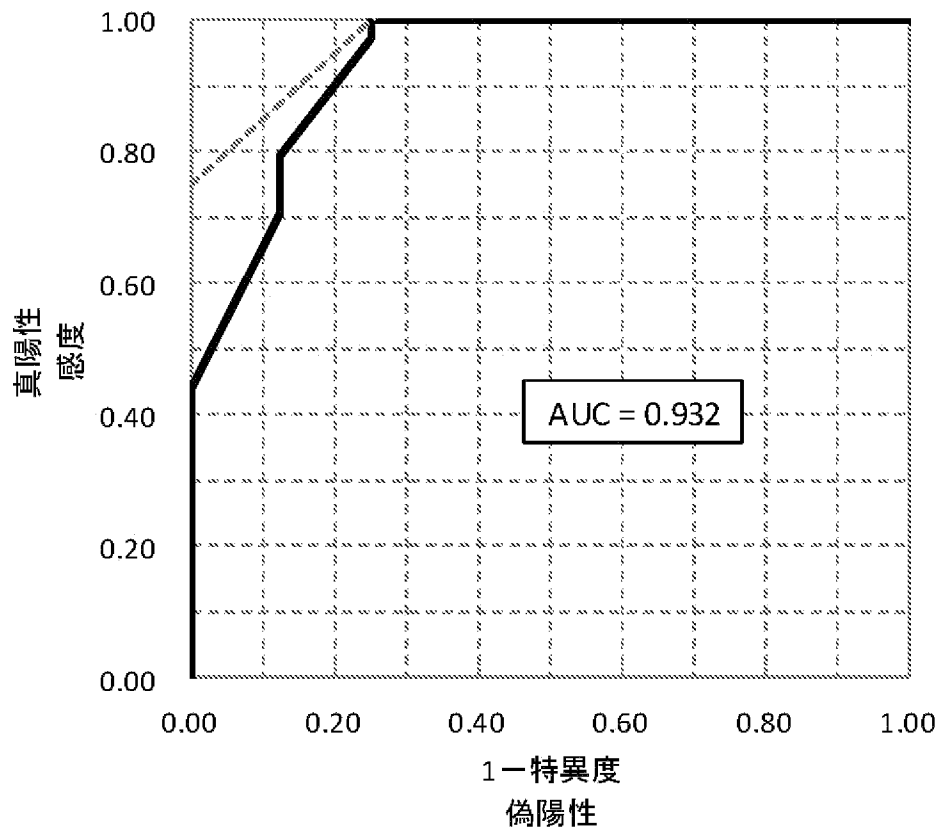
[請求項8] 前記HDL亜分画-CがApoE containing HDL-Cおよび／またはHDL2-Cおよび／またはHDL3-Cである、請求項6に記載のキット。

[請求項9] 請求項6～8のいずれかに記載のキットの、非アルコール性脂肪肝炎の検出を補助するためのキットとしての使用。

[図1]



[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/004008

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/92 (2006.01) i

FI: G01N33/92 C; G01N33/92 A

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)

G01N33/92

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 1971-2021

Registered utility model specifications of Japan 1996-2021

Published registered utility model applications of Japan 1994-2021

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.
A	JP 2018-508774 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 29 March 2018 (2018-03-29) claim 1	1-9
A	WO 2005/109006 A1 (AJINOMOTO CO., INC.) 17 November 2005 (2005-11-17) claim 1	1-9
A	WO 2012/105590 A1 (ASTELLAS PHARMA INC.) 09 August 2012 (2012-08-09) claim 1	1-9
A	WO 2011/158769 A1 (CHIBA UNIVERSITY) 22 December 2011 (2011-12-22) claim 1, paragraphs [0004]-[0005]	1-9
A	WO 2019/175962 A1 (DENKA SEIKEN CO., LTD.) 19 September 2019 (2019-09-19) claim 1	1-9



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

"I" 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

25 March 2021 (25.03.2021)

Date of mailing of the international search report

06 April 2021 (06.04.2021)

Name and mailing address of the ISA/

Japan Patent Office

3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,

Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/004008

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	FUJII, Yuki et al., "Low-Density Lipoprotein(LDL)-Triglyceride and Its Ratio to LDL-Cholesterol as Diagnostic Biomarkers for Nonalcoholic Steatohepatitis", The journal of Applied Laboratory Medicine, 01 May 2020, vol. 5, no. 6, pp. 1206-1215 abstract, fig. 1	1, 6, 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2021/004008

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 2018-508774 A	29 Mar. 2018	US 2018/0031585 A1 claim 1 WO 2016/130961 A1 EP 3256860 A1 CA 2975893 A1 CN 107407683 A	
WO 2005/109006 A1	17 Nov. 2005	US 2007/0037287 A1 claim 1 EP 1739431 A1	
WO 2012/105590 A1	09 Aug. 2012	(Family: none)	
WO 2011/158769 A1	22 Dec. 2011	US 2013/0089871 A1 claim 1, paragraphs [0009]-[0010] EP 2584361 A1 CN 102971630 A	
WO 2019/175962 A1	19 Sep. 2019	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） G01N 33/92(2006.01)i FI: G01N33/92 C; G01N33/92 A														
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）） G01N33/92 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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2021年</td> </tr> </table> 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）			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2021年	日本国実用新案登録公報	1996-2021年	日本国登録実用新案公報	1994-2021年				
日本国実用新案公報	1922-1996年													
日本国公開実用新案公報	1971-2021年													
日本国実用新案登録公報	1996-2021年													
日本国登録実用新案公報	1994-2021年													
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 2018-508774 A (ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア) 29.03.2018 (2018-03-29) 請求項 1	1-9												
A	WO 2005/109006 A1 (味の素株式会社) 17.11.2005 (2005-11-17) 請求項 1	1-9												
A	WO 2012/105590 A1 (アステラス製薬株式会社) 09.08.2012 (2012-08-09) 請求項 1	1-9												
A	WO 2011/158769 A1 (国立大学法人千葉大学) 22.12.2011 (2011-12-22) 請求項 1、段落[0004]～[0005]	1-9												
A	WO 2019/175962 A1 (デンカ生研株式会社) 19.09.2019 (2019-09-19) 請求項 1、	1-9												
P, X	FUJII, Yuki et al., Low-Density Lipoprotein(LDL)-Triglyceride and Its Ratio to LDL-Cholesterol as Diagnostic Biomarkers for Nonalcoholic Steatohepatitis, The journal of Applied Laboratory Medicine, 2020.05.01, Vol.5, No.6, PP.1206-1215 abstract, Fig.1	1, 6, 9												
☐ 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。														
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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）</td> <td>“&” 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td></td> </tr> </table>			* 引用文献のカテゴリー	“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	“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	“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	“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	“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	“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）	“&” 同一パテントファミリー文献	“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	
* 引用文献のカテゴリー	“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													
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	“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													
“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	“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													
“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）	“&” 同一パテントファミリー文献													
“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														
国際調査を完了した日 25.03.2021	国際調査報告の発送日 06.04.2021													
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） 海野 佳子 2J 3906 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/JP2021/004008

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2018-508774	A	29.03.2018	US 2018/0031585 A1 請求項 1	
				WO 2016/130961 A1	
				EP 3256860 A1	
				CA 2975893 A1	
				CN 107407683 A	
WO	2005/109006	A1	17.11.2005	US 2007/0037287 A1 請求項 1	
				EP 1739431 A1	
WO	2012/105590	A1	09.08.2012	(ファミリーなし)	
WO	2011/158769	A1	22.12.2011	US 2013/0089871 A1 請求項 1、段落[0009]～ [0010]	
				EP 2584361 A1	
				CN 102971630 A	
WO	2019/175962	A1	19.09.2019	(ファミリーなし)	