

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-502908
(P2008-502908A)

(43) 公表日 平成20年1月31日(2008.1.31)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/49 (2006.01)	GO 1 N 33/49 Z N A Y	2 G O 4 5
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	4 B O 2 4
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 79 頁)

(21) 出願番号 特願2007-516651 (P2007-516651)
 (86) (22) 出願日 平成17年6月15日 (2005. 6. 15)
 (85) 翻訳文提出日 平成18年12月12日 (2006. 12. 12)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2005/021002
 (87) 国際公開番号 W02006/009702
 (87) 国際公開日 平成18年1月26日 (2006. 1. 26)
 (31) 優先権主張番号 10/868, 437
 (32) 優先日 平成16年6月15日 (2004. 6. 15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 503343705
 バイエル ヘルスケア リミテッド ライ
 アビリティ カンパニー
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 1059
 1-5097, タリータウン, ベネデ
 イクト アベニュー 511
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 フォルカー, ミヒャエル
 ドイツ国 50678 ケルン, ユービ
 アリング 44

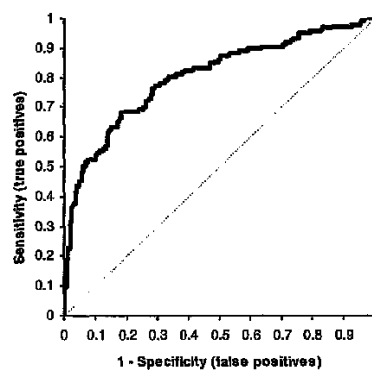
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肝臓疾患に関連する方法およびシステム

(57) 【要約】

本発明は患者における肝臓疾患の状態または進行の診断に補助するための、血清及び血漿のマーカ値を含む複数の血液マーカ値を使用する、診断方法、キット及びシステム、及び、関連するコンピュータ読み取り可能な媒体を提供する。本発明はまた、(1) 肝臓疾患の治療において有用な活性成分をスクリーニングするため；(2) 肝臓疾患に罹患しやすいか、罹患している患者に対する治療方法の選択に補助するため；及び、(3) 患者1人または複数における肝臓疾患の状態または進行をモニタリングする場合に有用な臨床プログラムの設計に補助するための、血清及び血漿のマーカ値を含む血液マーカ値を使用する方法およびシステム、及び関連するコンピュータ読み取り可能な媒体を提供する。

Receiver Operator Characteristic Curve
 Scheuer Modified Scoring System
 Validation Data



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

時点 1 つ以上において各時点に対する予測子値を測定することにより患者における肝臓疾患の状態または進行の診断を補助することを含む方法であって、予測子値の及び比較データセットの時点 1 つ以上における比較を用いて患者の肝臓疾患の状態または進行を確認し、そして、比較参照肝組織病理学的及び血液マーカーデータを相関させることにより誘導された線形または非線形関数アルゴリズムに血液マーカー 2 つ以上及び場合により補助的マーカー 1 つ以上の値を反映するデータを入力することにより患者の予測子値を計算する上記方法。

【請求項 2】

比較データセットが肝臓疾患に関連する数値 1 つ以上または数値の範囲を含み、そして血液マーカーが血清マーカーである請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

比較データセットが以下の試験、即ち、Scheuer 評点 (0 - 4)、変更 Ishak 評点 (HAI) A - インターフェイス肝炎 (0 - 4)、変更 Ishak 評点 (HAI) B - コンフルエント壊死 (0 - 6)、変更 Ishak 評点 (HAI) C - 斑紋状壊死 (0 - 4)、変更 Ishak 評点 (HAI) D - 門脈炎症 (0 - 4) 及び変更 HAI 評点 (Ishak 評点) (0 - 6) の 1 つ以上により決定される値に相当する値を含む請求項 3 記載の方法。

【請求項 4】

血液マーカーが N 末端プロコラーゲン I I I プロペプチド (PIIINP)、コラーゲン I V、コラーゲン V I、テネイシン、ラミニン、ヒアルロナン、MMP - 2、TIMP - 1、MMP - 9 / TIMP - 1 複合体、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アスパルテートアミノトランスフェラーゼ (AST) の少なくとも 2 つ以上から選択される血清マーカーである請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

血液マーカー 2 つ以上及び場合により患者体重、性別、年齢及び血清中トランスアミナーゼレベルからなる群から選択される補助的マーカー 1 つ以上の値を反映するデータを入力することにより予測子値を計算する請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

判別関数分析またはノンパラメトリック回帰分析のいずれかを用いて比較参照肝組織病理学的及び血液マーカーデータを相関付けることにより、線形または非線形の関数アルゴリズムを誘導する請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

比較参照肝組織病理学的及び血液マーカーデータが線維形成または線維溶解を示すデータ、肝臓疾患を示す上昇した血清中のマーカーのレベル、または、他の肝臓疾患の臨床症状を含む請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

比較参照肝組織病理学的及び血液マーカーデータが患者以外の対象 1 つ以上に対して測定されたデータに基づく請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

比較参照肝組織病理学的及び血液マーカーデータが患者に関連するデータに基づく請求項 7 記載の方法。

【請求項 10】

比較参照肝組織病理学的及び血液マーカーデータが患者及び患者以外の対象 1 つ以上に関連するデータに基づく請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

線形または非線形関数アルゴリズムが下記：

(a) 対象の第 1 の群に関する血液マーカー及び組織病理学的データを含むデータセットを編集すること；

10

20

30

40

50

(b) 判別関数分析、ノンパラメトリック回帰分析、分類ツリー及びニューラルネットワークからなる群から選択される分析方法少なくとも1つの適用を介して編集されたデータセットから線形または非線形の関数アルゴリズムを誘導すること；

(c) 工程(b)において誘導されたアルゴリズム内に対象の第2の群に関する血液マーカー値を含むデータを入力することにより、対象の第2の群に関するバリデーション生検評点を計算すること；

(d) 対象の第2の群に関する肝組織病理学的評点と工程(c)において計算されたバリデーション生検評点値を比較すること；および、

(e) 工程(c)において求められたバリデーション生検評点が対象の第2の群に関する肝組織病理学的評点と臨床的に許容される耐受性の水準内において相関していない場合、以下の操作(i)～(iii)、即ち、(i)アルゴリズムを、(1)対象の第1の群に関するデータセットを再検討すること、及び(2)分析方法を再検討または変更すること、を含む根拠に基づいて変更すること、(ii)変更されたアルゴリズム内に対象の第2の群に関する血液マーカー値を含むデータを入力することにより対象の第2の群に関するバリデーション生検評点値を計算すること、(iii)変更されたアルゴリズムを用いて計算されたバリデーション生検評点値が臨床的に許容される耐受性の水準内において対象の第2の群に関する肝組織病理学的評点に相関するかどうかを評価すること、をそのような耐受性が満足されるまで実施すること；

により誘導される請求項1記載の方法。

【請求項12】

アルゴリズムが判別関数分析またはニューラルネットワークの適用を介して誘導され、そして、血液マーカー値が血清マーカー値である請求項11記載の方法。

【請求項13】

患者の予測子値を時点2つ以上において測定する請求項1記載の方法。

【請求項14】

時点2つ以上において測定された患者の予測子値を患者の肝臓疾患の状態または進行を確認するために比較する請求項13記載の方法。

【請求項15】

患者の予測子値が判別評点であり、1つより多い判別評点を各時点において求め、そして、最高の判別評点が各時点における予測子値として選択される、請求項13記載の方法。

【請求項16】

トランスアミナーゼレベルがアラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)及びアスパルテートアミノトランスフェラーゼ(AST)のレベルを含む請求項5記載の方法。

【請求項17】

線形または非線形の関数アルゴリズムがニューラルネットワークを用いて誘導される請求項12記載の方法。

【請求項18】

以下の血清マーカー、即ち、N末端プロコラーゲンI I Iプロペプチド(PIIINP)、コラーゲンIV、コラーゲンVI、テネイン、ラミニン、ヒアルロナン、MMP-2、TIMP-1、MMP-9/TIMP-1複合体、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、アスパルテートアミノトランスフェラーゼ(AST)の2つ以上に関する濃度値により定義される線形または非線形の関数アルゴリズムを示すデータを含むデータフィールドを含むデータ構造を自身に保有するコンピュータ読み取り可能な媒体。

【請求項19】

線形または非線形の関数アルゴリズムが下記：

(a) 対象の第1の群に関する血液マーカー及び組織病理学的データを含むデータセットを編集すること；

(b) 判別関数分析、ノンパラメトリック回帰分析、分類ツリー及びニューラルネットワークからなる群から選択される分析方法少なくとも1つの適用を介して編集されたデータセットから線形または非線形の関数アルゴリズムを誘導すること；

10

20

30

40

50

(c) 工程 (b) において誘導されたアルゴリズム内に対象の第 2 の群に関する血液マーカー値を含むデータを入力することにより、対象の第 2 の群に関するバリデーション生検評点を計算すること；

(d) 対象の第 2 の群に関する肝組織病理学的評点と工程 (c) において計算されたバリデーション生検評点値を比較すること；および、

(e) 工程 (c) において求められたバリデーション生検評点が対象の第 2 の群に関する肝組織病理学的評点と臨床的に許容される耐受性の水準内において相関していない場合、以下の操作 (i) ~ (iii)、即ち、(i) アルゴリズムを、(1) 対象の第 1 の群に関するデータセットを再検討すること、及び (2) 分析方法を再検討または変更すること、を含む根拠に基づいて変更すること、(ii) 変更されたアルゴリズム内に対象の第 2 の群に関する血液マーカー値を含むデータを入力することにより対象の第 2 の群に関するバリデーション生検評点値を計算すること、(iii) 変更されたアルゴリズムを用いて計算されたバリデーション生検評点値が臨床的に許容される耐受性の水準内において対象の第 2 の群に関する肝組織病理学的評点に相関するかどうかを評価すること、をそのような耐受性が満足されるまで実施すること；

により誘導される請求項 18 記載のコンピュータ読み取り可能な媒体。

【請求項 20】

マイクロプロセッサにより読み取ってよく、そして、以下の血清マーカー、即ち、N 末端プロコラーゲン I I I プロペプチド (PIIIP)、コラーゲン IV、コラーゲン VI、テネイシン、ラミニン、ヒアルロナン、MMP-2、TIMP-1、MMP-9/TIMP-1 複合体、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アスパルテートアミノトランスフェラーゼ (AST) の 2 つ以上に関する濃度値により定義される線形または非線形の関数アルゴリズムを独自に識別するコード少なくとも 1 つを含む、コンピュータ読み取り可能な媒体中に保存されたデータ構造。

【請求項 21】

マイクロプロセッサにより読み取ってよく、そして、予測子関数及び請求項 1 に従って予測子関数から誘導された値を独自に識別するコード少なくとも 1 つを含む、コンピュータ読み取り可能な媒体中に保存されたデータ構造。

【請求項 22】

下記要素：

(a) マイクロプロセッサにより読み取ってよく、そして、予測子関数及び請求項 1 に従って予測子関数から誘導された値を独自に識別するコード少なくとも 1 つを含む、コンピュータ読み取り可能な媒体中に保存されたデータ構造；及び、

(b) N 末端プロコラーゲン I I I プロペプチド (PIIIP)、コラーゲン IV、コラーゲン VI、テネイシン、ラミニン、ヒアルロナン、MMP-2、TIMP-1 及び MMP-9/TIMP-1 複合体の少なくとも 2 つ以上の患者の値を含む患者の診断マーカーに関する値を検出して測定するイムノアッセイ 1 つ以上、を含む診断キット。

【請求項 23】

コンピュータ読み取り可能な媒体が ROM、EEPROM、フロッピー（登録商標）ディスク、ハードディスクドライブ、CD-ROM またはデジタルまたはアナログの情報リンクである請求項 22 記載の診断キット。

【請求項 24】

予測子関数及び請求項 1 に従って予測子関数から誘導された値を識別する取扱説明書を含む請求項 22 記載の診断キット。

【請求項 25】

下記要素：

(a) 予測子関数及び請求項 1 に従って予測子関数から誘導された値を独自に識別する取扱説明書；および、

(b) N 末端プロコラーゲン I I I プロペプチド (PIIIP)、コラーゲン IV、コ

10

20

30

40

50

ラーゲン V I、テネイシン、ラミニン、ヒアルロナン、M M P - 2、T I M P - 1 及び M M P - 9 / T I M P - 1 複合体の少なくとも 2 つ以上の患者の値を含む患者の診断マーカーに関する値を検出して測定するイムノアッセイ 1 つ以上、を含む診断キット。

【請求項 26】

下記要素：

(a) マイクロプロセッサにより読み取ってよく、そして、予測子関数及び請求項 1 に従って予測子関数から誘導された値を独自に識別するコード少なくとも 1 つを含む、コンピュータ読み取り可能な媒体中に保存されたデータ構造；及び、

(b) N 末端プロコラーゲン I I I プロペプチド (P I I I N P)、コラーゲン I V、コラーゲン V I、テネイシン、ラミニン、ヒアルロナン、M M P - 2、T I M P - 1 及び M M P - 9 / T I M P - 1 複合体の少なくとも 2 つ以上の患者のレベルを含む患者の診断マーカーに関する値を検出して測定するイムノアッセイ 1 つ以上、

を含む診断システム。

【請求項 27】

システムがポイントオブケアまたはリモートシステムである請求項 26 記載のシステム。

【請求項 28】

システムが更に N 末端プロコラーゲン I I I プロペプチド (P I I I N P)、コラーゲン I V、コラーゲン V I、テネイシン、ラミニン、ヒアルロナン、M M P - 2、T I M P - 1 及び M M P - 9 / T I M P - 1 複合体の少なくとも 2 つ以上の患者のレベルを入力するための手段を含む請求項 26 記載のシステム。

【請求項 29】

システムがプロセッサ、メモリ、インプット及びディスプレイを含む請求項 26 記載の方法。

【請求項 30】

プロセッサがマイクロプロセッサである請求項 26 記載の方法。

【請求項 31】

請求項 1 記載の方法により時点 1 つ以上において測定した患者の予測子 2 つ以上を評価することにより、患者における肝臓疾患の状態または進行の診断を補助することを含む方法。

【請求項 32】

方法が患者の予測子値に基づいて患者に関する治療経過の選択を補助することを含む、請求項 31 記載の方法。

【請求項 33】

方法が患者の予測子値に基づいて疾患分類の 1 つ以上への患者の分類を補助することを含む、請求項 31 記載の方法。

【請求項 34】

肝臓疾患に罹患した患者に化合物を投与すること、及び、その後、請求項 1 の方法に従って求められた患者の予測子値を評価することを含む肝臓疾患の治療において使用するための化合物を評価することを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は 2004 年 6 月 15 日に提出された米国特許出願 10 / 868, 437 の優先権を主張する。

【0002】

(発明の分野)

本発明は患者における肝臓疾患の状態または進行の診断を補助するための、血清及び血漿のマーカー値を含む複数の血液マーカー値を使用する、診断方法、キット及びシステム、及び、関連するコンピュータ読み取り可能な媒体を提供する。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 3 】

本発明はまた、(1) 肝臓疾患の治療において有用な活性成分をスクリーニングするため；(2) 肝臓疾患に罹患しやすいか、罹患している患者に対する治療方法の選択を補助するため；及び、(3) 患者1人または複数における肝臓疾患の状態または進行をモニタリングする場合に有用な臨床プログラムの設計を補助するための、血清及び血漿のマーカ―値を含む血液マーカ―値を使用する方法およびシステム、及び関連するコンピュータ読み取り可能な媒体を提供する。

【 背景技術 】

【 0 0 0 4 】

(発明の背景)

10

肝臓の進行性の線維性疾患は世界中の主要死亡原因である。肝臓における線維症の発病過程は肝星細胞（脂肪細胞または脂肪貯蔵またはI t o細胞とも称されている）及び過剰な細胞外マトリックス蛋白を合成分泌する他の肝細胞外マトリックス生成細胞（即ち門脈筋線維芽細胞及び線維芽細胞）の増殖及び活性化に非常に依存している（1）。この過程は全ての病因の肝臓疾患に共通である。慢性ウィルス性B型及びC型肝炎、アルコール性肝臓疾患、非アルコール性肝臓疾患及び自己免疫及び遺伝的な肝臓疾患は全て進行性の肝線維症の共通した最終経路及び最終的な肝硬変の発症を含んでいる。

【 0 0 0 5 】

肝線維症が小節がまだ形成されていない慢性傷害に応答した細胞外マトリックスの可逆的蓄積であるのに対し、肝硬変はこの過程における臨床上重要な段階が関与しており、それは常時ではないが通常は非可逆的であり、マトリックスの肥厚した帯が完全に実質を包囲して小節を形成するものである。肝硬変は肝不全、肝臓がん及び死亡の危険性の増大を伴う。結果として、有効であるためには、如何なる肝臓疾患の治療法も可逆的疾患（線維症）を有する患者を指向すべきであり、それには早期発見及び危険対象のモニタリングが必要である（2）。

20

【 0 0 0 6 】

肝線維症の診断は通常は肝生検の組織学的分析により行われる。単一の生検は診断、予後及び適切な管理を決定する場合に高度に情報性を有するものである（1A；2A）。肝線維症の検出における代理マーカ―の役割は未だ確立されていない。従って、肝生検は現時点では肝線維症の「比較参照 - 標準物質」の指標と見なされている。

30

【 0 0 0 7 】

しかしながら生検は高価（3A）であり、痛みを伴い（4A）、出血性または致死性（5A；6A）である。生検の処理は時間を要し、労働集約的である。全てのこれらの理由のため、肝生検の頻繁な反復は、疾患の進行または治療への応答のモニタリングに反復した生検を要することから、患者及び医師にとっても許容できないものと考えられる。

【 0 0 0 8 】

穿刺による生検が少量であること、及び、多くの肝臓疾患が散在性であることから、生検は患者の疾患状態を真に表す結果をもたらさない場合がある（7A）。生検の組織学的分析には経験と技術を要するが、なお主観的であり、観察者内及び観察者間での変動の両方が起こりやすい（8A；9A）。

40

【 0 0 0 9 】

肝線維症の代理マーカ―を発見する必要性は臨床的に大きい。このようなマーカ―は生検の代わりに線維症の程度を推定するために使用でき、或いは、これらは線維症の進行または後退、及び、生活習慣の変化、または抗線維症剤、抗ウィルス剤または他の治療への応答をフォローアップするために単一の肝生検と組み合わせて使用できる。理想的には、このようなマーカ―は自動化でき、患者への侵襲を殆ど伴わずに反復して実施できるような、正確で再現性のある試験に基づくものである。

【 0 0 1 0 】

マトリックスの合成及び分解の産物、及び、これらの過程に關与する酵素の血清試験は多くの研究において肝線維症の代理マーカ―として検討されている（10A～19A）。

50

これらのマーカーの診断上の性能は、個々の試験の一部は肝硬変の検出において(20A; 21A)、アルコール性肝臓疾患(ヒアルロン酸)(22A)または非アルコール性脂肪肝臓疾患(NAFLD)におけるより軽度の線維症(YKL-40)(23A)において信頼性を示しているものの、一般的には失望させられるものである。他のマーカーは抗ウィルス療法に起因する肝組織の変化を反映すると報告されている(11A; 24A; 25A)。

【0011】

生検及び血清マーカーは異なるもの、即ち肝内の動的過程を特徴付ける血清パラメータを比較するものであるのに対し、生検は固定された時点における線維症の発現を特徴付けるものである。線維性の組織が形成されていないにも関わらず、肝において高度に活性の線維症の過程が存在する場合がある。これとは対照的に、肝内に線維性組織の大型の集落があるが、線維症の活性は一時的に停止または中断されている場合がある。

10

【0012】

別の方法は一定範囲の重症度に渡り線維症を評価することができるアルゴリズムを作成するために多くの血清マーカーを組み合わせることである。慢性C型肝炎(CHC)(18A; 26A)及び慢性B型肝炎において、80%の陽性予測値(PPV)を有する有意な線維症を検出することができる5つのパラメーターが発見されている。しかしながら、これらの方法は患者の約50%において線維症の重症度を決定できておらず、そしてその後の独立したバリデーションはこれらのマーカーの利用性を疑問視している(非特許文献1)。

20

【0013】

以前の試験によれば、細胞外マトリックス蛋白(またはその切断フラグメント)の血清中濃度を用いて肝線維症の重症度及び進行度が評価されることが示唆されている(特許文献1および2)。異なる血清マーカーが検討されており、そして肝生検及び肝臓疾患の重症度との相関が認められている(6)。肝線維症の評価のために使用されているマーカーの一部はPIIPINP、ラミニン、ヒアルロンン、コラーゲンIV、TIMP-1、テネイシン、MMP-2及びフィブロネクチンである。これらのマーカーが測定されており、肝線維症を評価するその能力が示されている。それでもなお、診断の正確さ及び診断マーカーの特異性の何れも十分な臨床上の有用性を持って線維症評点を予測するには不十分である。

30

【0014】

マーカーの組み合わせが単純な生物学的指数であるPGA(プロトロンビン時間(PT)、血清ガンマグルトミルトランスペプチダーゼ(GGT)、アポリポ蛋白A1(ApoA1)を含む)の診断上の価値を増大させる試みにおいて使用されており、そして指数PGA(APGA指数にアルファ-2-マクログロブリン(A₂M)を加えたもの)が飲酒者におけるアルコール性肝臓疾患の診断に関して記載されている(7, 8)。PGA及びPGA指数は単一血清マーカーと組み合わせられているが(9, 10)、このような血清マーカーは肝臓疾患を評価する信頼性のある手段を与えていない。

【0015】

より最近では、 α_2 -マクログロブリン、 α_2 -グロブリン(またはヘパトグロビン)、 α_1 -グロブリン、アポリポ蛋白-A1、 α -グルタミルトランスペプチダーゼ及び総ビリルビンが肝線維症の状態を評価するために組み合わせられている(11)。誘導されたマーカーアルゴリズムは重度または比較的軽度の線維症の発見または除外の何れかのために、線維症スペクトルの最末端において強力な診断性能を示している。アルゴリズムは中等度の線維症を有する患者の発見のための有用な診断ツールとはなっていない。

40

【0016】

非特許文献2(「Pillette」)は肝線維症の組織病理学的評価の目的のための数学的アルゴリズムによる診断マーカーヒアルロネート、プロコラーゲンIIIのN末端ペプチド、ラミニン及び他の血清マーカーの相関付けを開示している。Pilletteは肝線維症の評価のための最良の形態測定的方法を決定したが、ヒアルロン酸のみを使用した

50

ものよりも優れている診断システムまたは方法を得るためにアルゴリズム的にマーカーを組み合わせたわけではない。

【0017】

非特許文献3(「Guechot」)は肝臓疾患を評価するための血清マーカーとしてのヒアルロン酸及びPIIINPの性能の比較評価を行っている。しかしながら、Guechotは2つのマーカーの何れかを単独で使用するよりも優れている肝線維症の血清マーカー系評価法を得るためにヒアルロン酸とPIIINPの結果を組み合わせる試みは行っていない。

【0018】

従って、患者における肝臓疾患の状態または進行を調べることを補助するための、肝臓疾患関連血液マーカー、例えば、血漿または血清マーカーの2つ以上を使用する、正確で、再現性があり、コンピュータ実施可能な方法、システム、キット及び媒体が求められている。このような方法、システム、キット及び媒体は危険な生検に患者を付すことなく、2時点以上において、医療従事者が患者の肝臓疾患の状態または進行を確認できるようにする。

10

【0019】

更にまた、このような方法、システム、キット及び媒体は、肝臓疾患関連の臨床治験の設計またはモニタリングにおいて、そして、肝臓疾患の治療において有用な薬剤のスクリーニングにおいて有用である。

【特許文献1】米国特許第5,316,914号明細書

20

【特許文献2】欧州特許第0283779号明細書

【非特許文献1】Rossi, et al., *Clinical Chemistry*, 49(3):450-4, 2003 Mar.

【非特許文献2】Pilette et al., *J. Hepatol.*, Vol. 28, No. 3, 1998, p. 439-446 (Chemical Abstracts, Vol. 130, No. 7, February 15, 1999 (Columbus, Ohio, U.S.; abstract no. 78389))

【非特許文献3】Guechot, et al., *Clinical Chemistry*, Vol. 42, No. 4 (April 1996) pp. 558-563 (XP002149459 Winston; U.S.)

30

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0020】

(発明の要旨)

本発明は患者における肝臓疾患の状態または進行の診断を補助するための、血清及び血漿のマーカー値を含む複数の血液マーカー値を使用する、診断方法、キット及びシステム、及び、関連するコンピュータ読み取り可能な媒体を提供する。

【0021】

本発明はまた、(1)肝臓疾患の治療において有用な活性成分をスクリーニングするため；(2)肝臓疾患に罹患しやすいか、罹患している患者に対する治療方法の選択を補助するため；及び、(3)患者1人または複数における肝臓疾患の状態または進行をモニタリングする場合に有用な臨床プログラムの設計を補助するための、血清及び血漿のマーカー値を含む血液マーカー値を使用する方法およびシステム、及び関連するコンピュータ読み取り可能な媒体を提供する。

40

【0022】

本発明はポイントオブケアまたはリモートの肝臓疾患診断を促進し、そして、時点2つ以上において肝臓疾患の状態または進行をモニタリングする場合に医療従事者を支援する。有意義な点は、潜在的に不正確であり危険な肝生検の代替を、本発明が医療意思決定者に提供することである。

【0023】

50

本発明は肝臓疾患関連マーカー値2つ以上を利用したコンピュータ実施可能なアルゴリズム法を使用する。本発明の予測値は肝臓疾患の状態または進行をモニターした臨床試験においてバリデーションされている。これらの臨床試験は、分析を独立した時点において実施することにより横断的に、そして分析を2時点以上において実施することにより長期的に本発明をバリデーションしている。

【0024】

従って本発明は、

(a) 細胞外マトリックス合成(線維形成)及び細胞外マトリックス分解(線維溶解)の動的過程を測定し;そして、

(b) 肝線維症の組織学的評点の予測を介して、線維症の程度および肝組織内で生じている動的変化を反映する結果を得る;

ために使用できる。

【0025】

本発明は特に肝生検が極めて危険である患者の診断及び治療を補助することにおいて有用である。このような患者は凝固障害に罹患し、生検を避け、或いは専門的組織病理学が利用できない場合がある。更にまた、本発明は遺伝性のヘモクロマトーシス、原発性胆汁性肝硬変及び原発性硬化性胆管炎のような慢性の肝臓疾患に関連した肝線維症を評価するために医療意思決定者により使用できる。更に、本発明は特に、線維症が不均一に分散しており、試料採取の誤りが多大な問題を呈する場合において有用である。

【0026】

1つの実施形態において、本発明は、時点1つ以上において各時点に対する予測子値を測定することにより患者における肝臓疾患の状態または進行の診断を補助することを含む方法であって、予測子値の及び比較データセットの時点1つ以上における比較を医療意思決定者が用いることにより患者の肝臓疾患の状態または進行を確認し、そして、比較参照肝組織病理学的及び血液マーカー、例えば、血漿または血清のマーカーのデータを相関させることにより誘導された線形または非線形関数アルゴリズムに血液マーカー2つ以上、例えば、血漿または血清マーカー2つ以上、及び場合により補助的マーカー1つ以上に関するデータを入力することにより患者の予測子値を計算する上記方法を提供する。

【0027】

「比較データセット」とは組織病理学的状態の何れかの定性的または定量的な指標を反映する何れかのデータを含むことができる。1つの実施形態において、比較データセットは組織病理学的状態に関連する1つ以上の数値、または数値の範囲を含むことができる。例えば、比較データセットは種々の整数のセット、例えば、整数0~5を含んでよく、この場合、これらの6整数の異なる群が異なる肝臓疾患状態に相関してよく、例えば、0~1が軽度の疾患状態、2~3が中等度の疾患状態に相関し、そして4~5が重度の疾患状態に相関してよい。従って、比較データセットは確立された肝生検評点システム、例えば、Schuerer評点システム(0~4)及び変更組織学的活性(「HAI」)の線維症評点(Ishak評点)(0~6)に相関させてよい。

【0028】

好ましい実施形態においては、血液マーカーはN末端プロコラーゲンI I Iプロペプチド(PIIIP)、コラーゲンIV、コラーゲンVI、テネイシン、ラミニン、ヒアルロンタン、MMP-2、TIMP-1、MMP-9/TIMP-1複合体、アラニン-アミノトランスフェラーゼ(ALT)、アスパルテートアミノトランスフェラーゼ(AST)の少なくとも2つ以上から選択される血清マーカーである。補助的マーカーは、例えば、患者の体重、性別、年齢及びトランスアミナーゼレベルが挙げられるが、これらに限定されない。

【0029】

本発明の別の実施形態においては、判別関数分析またはノンパラメトリック回帰分析のいずれかを用いて比較参照肝組織病理学的及び血液マーカー、例えば、血漿及び血清のマーカーのデータを相関付けることにより、線形または非線形の関数アルゴリズムを誘導す

10

20

30

40

50

る。比較参照肝組織病理学的及び血液マーカーデータ、例えば、血漿及び血清のマーカーデータは線維形成または線維溶解を示すデータ、上昇した肝臓疾患血清マーカー、または、他の肝臓疾患の臨床症状が挙げられる。

【0030】

1つの実施形態において、比較参照肝組織学的及び血液マーカーデータ、例えば、血漿及び血清マーカーデータは診断された患者以外の対象1人または複数に関するデータに基づく。別の実施形態においては、比較参照肝組織学的及び血液マーカーデータ、例えば、血漿及び血清マーカーデータは診断された患者から以前に得られたデータに基づいており、そして場合により他の対象1人または複数から得たデータにも基づいている。

【0031】

1つの実施形態において、線形または非線形関数アルゴリズムは、下記：

(a) 対象の第1の群に関する血液マーカーデータ、例えば、血漿及び血清マーカー、及び組織病理学的データを含むデータセットを編集すること；

(b) 分析方法の適用を介して編集されたデータセットから線形または非線形の関数アルゴリズムを誘導すること；

(c) 工程(b)において誘導されたアルゴリズム内に対象の第2の群に関する血液マーカーデータ、例えば、血漿及び血清マーカーデータ値を含むデータを入力することにより第2の群に関するバリデーション生検評点を計算すること；

(d) 対象の第2の群に関する肝組織病理学的評点と工程(c)において計算されたバリデーション生検評点値を比較すること；および、

(e) 工程(c)において求められたバリデーション生検評点が対象の第2の群に関する肝組織病理学的評点と臨床的に許容される耐受性の水準内において相関していない場合、以下の操作(i)~(iii)、即ち、(i)アルゴリズムを、(1)対象の第1の群に関するデータセットを再検討すること、及び(2)分析方法を再検討または変更すること、を含む根拠に基づいて変更すること、(ii)変更されたアルゴリズム内に対象の第2の群に関する血液マーカーデータ、例えば、血漿及び血清マーカーデータ値を含むデータを入力することにより対象の第2の群に関するバリデーション生検評点値を計算すること、(iii)変更されたアルゴリズムを用いて計算されたバリデーション生検評点値が臨床的に許容される耐受性の水準内において対象の第2の群に関する肝組織病理学的評点に相関するかどうかを評価すること、をそのような耐受性が満足されるまで実施すること；

により、比較参照肝組織学的及び血液マーカーデータ、例えば、血漿及び血清マーカーデータを相関付けることにより誘導される。

【0032】

分析方法は判別関数分析及びノンパラメトリック回帰分析を含む統計学的方法、並びに、分類ツリー及びニューラルネットワークのような方法を包含してよい。

【0033】

別の実施形態においては、本発明はマイクロプロセッサにより読み取ってよく、そして本明細書に記載した態様において誘導された線形または非線形関数アルゴリズムを独自に識別するコード少なくとも1つを含むコンピュータ読み取り可能な媒体中に保存されたデータ構造を提供する。

【0034】

別の実施形態においては、下記要素：

(a) マイクロプロセッサにより読み取ってよく、そして、本明細書に記載した態様において誘導された線形または非線形関数アルゴリズムを独自に識別するコード少なくとも1つを含むコンピュータ読み取り可能な媒体中に保存されたデータ構造；及び、

(b) 患者の血清マーカー値を検出して測定するイムノアッセイ1つ以上、を含む診断キットを提供する。

【0035】

別の実施形態においては、本発明は、組成物を投与した患者における肝臓疾患の状態または進行を診断する場合に有用なデータを評価することを含む、組成物が肝臓疾患の治療

10

20

30

40

50

において有用であるかどうかを決定するためのコンピュータ実施可能な方法及びシステムを提供し、ここで、

(a) 各時点对する予測子値を時点1つ以上においてアルゴリズム的に求めることにより医療従事者により診断を行い；

(b) 予測子値及び比較データセットの時点1つ以上の比較を健康管理業務知恵強者が使用することにより患者の肝臓疾患の状態または進行を確認し；そして、

(c) 比較参照肝組織病理学的及び血液マーカー、例えば、血漿または血清マーカーデータを相関させることにより誘導された線形または非線形関数アルゴリズムに血液マーカー、例えば、血漿または血清マーカー2つ以上に関するデータを入力することにより患者の予測子値を計算する。

10

【0036】

本発明の上記した方法、システム及びキットはまた、医療従事者により使用されることにより、(1) 肝臓疾患に罹患しやすいか、罹患している患者に対する治療方法を決定するため；及び、(2) 患者1人または複数における肝臓疾患の状態または進行をモニタリングする場合に有用な臨床プログラムを設計することができる。

【0037】

本発明のこれら及び他の特徴は本発明の詳細な説明において更に説明する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0038】

本明細書においては以下の用語は以下に記載するそれぞれの意味を有する。

20

【0039】

「抗体」とは患者の診断用血清マーカーエピトープに結合する何れかの抗体、例えば、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体またはそのフラグメントを意味する。モノクローナル及び/またはポリクローナル抗体を本発明の方法及び系において使用してよい。「抗体」または他の同様の用語は本明細書においては、モノクローナルであるかポリクローナルの何れかである全免疫グロブリン、並びにマーカーに特異的に結合する免疫反応性のフラグメント、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂ およびF(v)が挙げられる。「抗体」という用語はまた結合-蛋白、特にヒアルロン酸結合蛋白(HABP)も含む。好ましい血清マーカー抗体は上記する通りである。

【0040】

本発明の試験において使用するヒト液体試料は患者の診断マーカーを含有する何れかの試料、例えば、血液、血清、血漿、尿、痰または気管支肺胞洗浄液(BAL)または何れかの他の体液であることができる。典型的には、血清または血漿試料を使用する。

30

【0041】

本発明において使用する抗体は当該分野でよく知られている手法により調製でき、そして典型的にはマーカー、即ち単離された、天然に存在する蛋白として、組み換え発現蛋白として、または、天然蛋白の抗原部分を呈示する合成ペプチドとしての何れかの試料に対して作成される。第2の抗体を検出基、例えば、アルカリホスファターゼ、セイヨウワサビパーオキシダーゼ、蛍光染料または診断試験において生体分子を検出するために一般的に有用な何れかの他の標識部分にコンジュゲートする。コンジュゲートは当該分野でよく知られている手法で調製する。

40

【0042】

「イムノアッセイ」は血清マーカーに結合する抗体に試料を反応させることにより生物学的試料中の患者診断用の血清マーカーの存在を検出するものであり、反応は抗体と血清マーカーとの間の免疫複合体の形成を可能にする時間と条件の下で実施される。次にこのような免疫複合体の定量的測定を行う。

【0043】

1つの型においては、使用する抗体は血清マーカー、血清マーカーの免疫原性フラグメントまたは抗血清マーカー結合イディオタイプ抗体である免疫原を哺乳類(例えば、ウサギ、ヤギ、マウス、ブタ等)に投与することにより作製された抗体である。他の有用なイ

50

ムノアッセイは一般的に血清マーカー結合抗体の使用を特徴とする（それらが上記した免疫原の1つに対して作製されたものであるかどうかに関わらない）。やはり血清マーカーに結合する第2の抗体を使用するサンドイッチイムノアッセイフォーマットを用いてよく、2抗体の一方を固定化し、他方を標識してよい。

【0044】

好ましいイムノアッセイは標識され第1の抗体に結合する第2の抗体を用いて血清マーカー及び血清マーカー結合抗体との間の固定化複合体を検出する。或いは第2の抗体もまた血清マーカーに結合するサンドイッチフォーマットが第1のバージョンの特徴となる。サンドイッチイムノアッセイの操作法においては、血清マーカー結合抗体は不溶性物質に結合したキャプチャー抗体であることができ、そして、第2の血清マーカー結合抗体は標識抗体であることができる。上記したサンドイッチイムノアッセイの操作法は後に記載する抗体と共に使用できる。

10

【0045】

本発明において使用する試験は尿、血漿、血清、腹水またはリンパ液を含む試料中の血液マーカー、例えば、血漿または血清のマーカーを測定するために使用できる。血清マーカーを検出するためのイムノアッセイキットもまた本発明において使用でき、そして血清マーカー結合抗体及び生物学的試料中の血清マーカーへの抗体の結合を測定するための手段を含む。好ましい実施形態においては、キットは上記した第2の抗体または競合する抗原の1つを含む。

【0046】

「比較データセット」は本明細書において以前に定義した通りである。

20

【0047】

「比較参照肝組織病理学的及び血液マーカーデータ」及び「組織病理学的データ」は例えば、線維形成または線維溶解、界面肝炎、壊死、炎症、壊死炎症、上昇した肝臓疾患血清マーカーまたは他の肝臓疾患の臨床兆候を示す血清または血漿のデータが挙げられるが、これらに限定されない。即ち、比較参照肝組織病理学的及び血液マーカーデータは例えば、Scheuer 評点(0-4)及びHAI 評点(Ishak 評点)(0-6)を使用する肝生検試験1つ以上の適用を反映するデータが挙げられるが、これらに限定されない。他の比較参照肝組織病理学的及び血液マーカーデータは変更Ishak 評点(HAI) A-インターフェイス肝炎(0-4)、変更Ishak 評点(HAI) B-コンフルエント壊死(0-6)、変更Ishak 評点(HAI) C-斑紋状壊死(0-4)、変更Ishak 評点(HAI) D-門脈炎症(0-4)に関するものであることができる。

30

【0048】

これら及び他の適用可能な評点システムは当該分野でよく知られている。例えば、Scheuer et al., "Liver Biopsy Interpretation" (W.B. Saunders 2000); Scheuer, J. Hepatol, 1991; 13: 372-374; Ishak, et al., J. Hepatol. 1995; 22: 696-699を参照できる。アルコール性肝臓疾患のような疾患における線維症のパターンに関して存在している相違点のために、評点システムは非ウイルス性肝臓疾患の症例においては評点を割り付ける目的のために変更する必要がある。

40

【0049】

「比較参照肝組織病理学的及び血液マーカーデータ」は全てのこのような変更された評点及び評点システムから求められた値を反映するデータを含む。

【0050】

比較参照肝組織病理学的及び血液マーカー、例えば、血漿及び血清のマーカーデータはまた例えば、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)及びアスパルテートアミノトランスフェラーゼ(AST)のようなトランスアミナーゼの上昇した血清中濃度を反映するデータ、及び、黄疸のような症状の定性的または定量的な評価を含む。

【0051】

「バリデーション生検評点」とは肝組織病理学的及び血液マーカーデータ値をアルゴリ

50

ズムに入力することにより求められる値である。

【0052】

「判別関数分析」とは、どの変数が2つ以上の天然に存在する相互に排他的な群の間を判別するかを決定するために使用される手法である。判別関数分析の根拠となる基本的な考え方は、相互に独立していてもしていなくてもよい予測子変数のセットに関して群が異なっているかどうかを決定すること、及び、次にそれらの変数を使用して群の構成要素資格 (membership) (例えば、新規症例の) を予測することである。

【0053】

判別関数分析はカテゴリカルである結果値 (2つ以上の相互に排他的な水準) で開始する。モデルは、これらの水準がANOVA (分散分析) のように連続的またはカテゴリカル (ただし好ましくは連続的) でありえる予測子変数のセットにより判別することができる。と推定し、そして、ANOVAのように、根拠となる判別関数が線形であると推定する。判別分析は「分配変動」ではない。これは確かに予測子変数のセット内の正規の相関を求めるものであり、そしてこれらの相関を用いて結果変数の全水準に渡る全ての予測子変数の全変動のパーセントを説明する固有関数を構築する。

10

【0054】

分析の出力は結果変数の水準に関わらず「判別評点」を発生させる予測子変数の組み合わせを使用する線形判別関数 (固有関数) のセットである。総変動のパーセントを各関数に関して呈示する。更にまた、各固有関数について、結果変数の各水準内の予測子変数の組み合わせに基づいて判別評点を与えるFisherの判別関数のセットを作成する。

20

【0055】

通常は幾つかの変数を試験で使用するによりどれが群間の判別に寄与するかを調べる。この場合、全分散及び共分散のマトリックスを作成する。同様にプールされた群内の分散及び共分散のマトリックスを作成してよい。群間に有意差 (全変数に関して) が有るか無いかを決定するために多変量F試験によるこれらの2マトリックスの比較を行う。この手続きは多変量分散分析、即ちMANOVAと同一である。MANOVAの場合のように、多変量試験をまず実施し、そして統計学的に有意であれば、次に、変数のどれが群に渡って有意差のある平均を有するかを調べる。

【0056】

定量的変数1つ以上を含有する観察及び観察の群を定義する分類変数のセットにつき、判別の手続きは群の1つに各観察を分類する判別基準を作成する。どの程度良好に判別基準が「機能する」かを知るために、異なる症例、即ち判別基準を推定するために使用しなかった症例を分類 (演繹的) することが必要である。新しい症例の分類のみが判別基準の予測的有効性を評価することができる。

30

【0057】

誘導された基準をバリデーションするために、分類を他のデータセットに適用することができる。判別基準を誘導するために使用されたデータセットはトレーニングまたはカリブレーションデータセットまたは患者トレーニングコホートと称される。判別基準の性能をバリデーションするために使用されるデータセットはバリデーションデータセットまたはバリデーションコホートと称される。

40

【0058】

判別基準 (関数またはアルゴリズム) は一般化自乗距離の尺度を求める。これらの距離はプールされた共分散マトリックスに基づいている。近接性を測定するためにはマハラノビスまたはユークリッドの距離の何れかを使用することができる。これらの距離は、結果水準の群分けを識別するために使用でき、従って変数の水準の可能な減少を測定する。

【0059】

「プールされた共分散マトリックス」とは分析において各サブ集団に対する共分散マトリックスの成分を加算することにより形成される数的マトリックスである。

【0060】

「予測子」とは依存または応答変数または「予測子値」を発生させるために関数に適用

50

してよい何れかの変数である。本発明の1つの実施形態においては、予測子値は患者の血液マーカー（例えば、血漿または血清マーカー）1つ以上の判別関数分析を介して求められた判別評点であってよい。例えば、線形モデルは、依存（または応答）変数 Y と予測子変数のセット、即ち X の間に、下記：

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + \dots + b_k X_k$$

となるような（線形の）関係を特定する。この式において、 b_0 は切片に関する回帰係数であり、そして b_i 値はデータから計算された回帰係数（変数 1 から k までにに関する）である。

【0061】

「分類ツリー」は予測子変数 1 つ以上に関するその測定から得られるカテゴリカル依存変数の分類における症例またはオブジェクトの構成要素資格を予測するために使用する。分類ツリー分析はいわゆるデータマイニングにおいて使用される主要な手法の 1 つである。分類ツリーの目標はカテゴリカル依存変数に対する応答を予測または説明することであり、そしてそれにより、使用可能な手法は判別分析、クラスター分析、ノンパラメトリック統計および非線形推定のより伝統的な方法において使用される手法と大きく共通している。

10

【0062】

分類ツリーの柔軟性はそれらを極めて魅力的な分析の選択肢としているが、これはその使用がより伝統的な方法の排除のために推奨されることを意味するわけではない。実際は、より伝統的な方法の典型的により厳密な理論的及び分散的な予測が適合する場合は、伝統的な方法が好ましい場合がある。しかしながら、予備的な手法として、または、伝統的な方法が失敗した場合の最終救済の手法として、分類ツリーは多くの研究者の見解においては優れているものである。分類ツリーは医薬（診断）、コンピュータサイエンス（データ構造）、植物学（分類）および心理学（決定理論）に至るほど多様な応用分野において広範に使用されている。分類ツリーは容易に図式化できるため、厳密な数的解釈のみが可能である場合よりも解釈が容易になる。

20

【0063】

「ニューラルネットワーク」は認知系及び脳の神経機能における学習の（仮説化）過程の後にモデル化される分析手法であり、いわゆる既存データからの学習の過程を実施した後に、新しい観察（特定の変数に関する）を他の観察（同じか他の変数）から予測することができる。ニューラルネットワークはデータマイニング手法の 1 つである。第 1 の工程は特定のネットワークアーキテクチャー（各々が特定数の「ニューロン」よりなる特定数の「レイヤー」を含む）を設計することである。ネットワークの大きさ及びストラクチャーは検討される現象の性質（例えば、形式的複雑性）に合致する必要がある。後者は明らかにこの早期の段階において十分わかっていないため、この作業は容易ではなく、複数の「試行と錯誤」を含む場合が多い。

30

【0064】

次にニューラルネットワークを「トレーニング」の過程に付す。この相においては、コンピュータメモリは入力（変数）の数に反復過程を適用してネットワークのウエイトを調節することにより、「トレーニング」を実施する対象となる試料データを旨適に予測するニューロンとして機能する。既存データセットからの学習の相の後に、新しいネットワークが準備され、次にそれを使用して予測を作成する。

40

【0065】

本発明の 1 つの実施形態においてニューラルネットワークは 1 つ以上のパーソナルまたはメインフレームコンピュータまたは治療装置のコンピュータ化された点のメモリを含むことができる。

【0066】

「コンピュータ」とは特定のコンピュータハードウェアシステム及び特定のソフトウェアオペレーティングシステムの組み合わせを指す。本発明のコンピュータまたはコンピュータ化システムはハンドヘルド（hand held）の計算機を含むことができる。有用

50

なハードウェアシステムの例は何れかの型の適当なデータプロセッサを含む。「コンピュータ」という用語はまた例えば、DOS、Windows（登録商標）、OS/2またはLinux（登録商標）のようなオペレーティングシステムを有するパーソナルコンピュータ（PC）；Macintosh（登録商標）コンピュータ；オペレーティングシステムとしてのJAV A（登録商標）-OSを有するコンピュータ；及びグラフィカルワークステーション、例えば、Sun Microsystems（登録商標）及びSilicon Graphics（登録商標）のコンピュータ、及び何らかのバージョンのUNIX（登録商標）オペレーティングシステムを有する他のコンピュータ、例えば、AIX（登録商標）またはSun Microsystems（登録商標）のSOLARIS（登録商標）；オペレーティングシステムのシンバージョン、ハンドヘルド装置のようなコントロールスケジューラを実行するエンベデッドコンピュータ；既知で入手可能なオペレーティングシステムを特徴とする何れかの他の装置；並びに、メモリ内蔵型のデータプロセッサを有する何れかの型の装置が挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0067】

本発明はパーソナルコンピュータ上で実行されるコンピュータプログラムのコンピュータ実施可能なインストラクションの一般的な意味において記載されているが、当業者の知るとおり本発明は他のプログラムモジュールとの組み合わせにおいて実施してもよい。一般的にプログラムモジュールは特定のタスクを行うか、特定の抽象データ型を実施するルーチン、プログラム、コンポーネント及びデータ構造を含む。更にまた当業者の知るとおり、本発明は他のコンピュータシステムの形状、例えば、ハンドヘルド装置、マルチプロセッサシステム、マイクロプロセッサ系またはプログラム可能な消費者エレクトロニクス、ミニコンピュータ、メインフレームコンピュータ等を用いて実施してもよい。本発明はまた通信ネットワークを介して連絡されたりリモートプロセッシング装置によりタスクを実施する分散コンピューティング環境にあってもよい。分散コンピューティング環境においては、プログラムモジュールはローカル及びリモートのメモリ記憶装置の両方に位置してよい。

【0068】

本発明の実施のための純粋に説明のためのシステムは、プロセッシングユニット、システムメモリ、及び、プロセッシングユニットにシステムメモリを含む種々のシステムコンポーネントを連結させるシステムバスを含む従来のパーソナルコンピュータを含む。システムバスは数種のバスストラクチャー、例えば、メモリーバスまたはメモリーコントローラ、ペリフェラルバス、及び種々の従来のバスアーキテクチャー、例えば、PCI、VESA、マイクロチャンネル、ISA及びEISA等の何れかを用いたローカルバスを含む数種のうちの何れかであってよい。システムメモリはリードオンリーメモリー（ROM）及びランダムアクセスメモリー（RAM）を含む。スタートアップ時のようなパーソナルコンピュータ内のエレメントの間の情報の伝達を支援するベーシックルーチンを含むベーシックインプット/アウトプットシステム（BIOS）をROM内に記憶してよい。

【0069】

パーソナルコンピュータは更に、ハードディスクドライブ、磁気ディスクドライブ、例えば、リムーバブルディスクとの読み書き用、及び光ディスクドライブ、例えば、CD-ROMディスク用、または他の光学媒体との読み書き用のものを含む。ハードディスクドライブ、磁気ディスクドライブ及び光ディスクドライブはハードディスクドライブインターフェイス、磁気ディスクドライブインターフェイス及び光ディスクドライブインターフェイスによりそれぞれシステムバスに連結される。ドライブ及びそれらの関連するコンピュータ読み取り可能な媒体は、パーソナルコンピュータ用のデータ、データ構造、コンピュータ実行可能なインストラクション等の持久記憶装置を与えるものである。上記したコンピュータ読み取り可能な媒体の説明はハードディスク、リムーバブル磁気ディスク及びCDに言及しているが、当業者の知るとおり、コンピュータにより読み取り可能な他の型の媒体、例えば、磁気カセット、フラッシュメモリーカード、デジタルビデオディスク、Bernoulliカートリッジ等もまた例示されるオペレーション環境において使用し

てよい。

【0070】

多くのプログラムモジュール、例えば、オペレーティングシステム、1つ以上のアプリケーションプログラム、他のプログラムモジュール及びプログラムデータをドライブのRAM内に記憶してよい。ユーザーはキーボード及びポインティング装置、例えば、マウスを介してパーソナルコンピュータにコマンド及び情報を入力する。他の入力装置は、マイクロフォン、ジョイスティック、ゲームパッド、サテライトディッシュ、スキャナーなどを含み得る。これらおよびその他の入力装置は、システムバスに連結されたシリアルポートインターフェイスを介してプロセッシングユニットに連結されている場合が多いが、他のインターフェイス、例えば、パラレルポート、ゲームポートまたはユニバーサルシリアルバス(USB)により連結されてもよい。モニターまたは他の型のディスプレイ装置もまたビデオアダプターのようなインターフェイスを介してシステムバスに連結される。モニターのほかに、パーソナルコンピュータは典型的にはスピーカー及びプリンターのような他の周辺出力装置(図示せず)を含む。

10

【0071】

パーソナルコンピュータはリモートコンピュータのようなりモートコンピュータ1つ以上への論理的連結を用いてネットワーク環境内で作動する。リモートコンピュータはサーバー、ルーター、ピア装置または他の一般的なネットワークノードであってよく、そして典型的にはパーソナルコンピュータに関して記載したエレメントの多くまたは全てを含んでよい。論理的連結はローカルエリアネットワーク(LAN)及び広域ネットワーク(WAN)を含む。このようなネットワーク環境は事務所内に通常存在するもの、企業全体にわたるコンピュータネットワーク(例えば、病院コンピュータ)、イントラネット及びインターネットである。

20

【0072】

LANネットワーク環境において使用する場合は、パーソナルコンピュータはネットワークインターフェイスまたはアダプターを介してローカルネットワークに連結できる。WANネットワーク環境において使用する場合は、パーソナルコンピュータは典型的にはインターネットのような広域ネットワーク全体にわたる通信を確立するためのモデムまたは他の手段を含む。モデムは内蔵または外付けであってよく、シリアルポートインターフェイスを介してシステムバスに連結する。ネットワーク環境において、パーソナルコンピュータまたはその部分に対して相対的に示されるプログラムモジュールはリモートメモリ記憶装置内に記憶してよい。示されるネットワーク連結は例示に過ぎず、コンピュータ間の通信連結を確立する他の手段も使用してよい。

30

【0073】

本発明の1つの純粋に説明のための実施プラットフォームはメインメモリ少なくとも8メガバイト及びギガバイトのハードディスクドライブを有するIBM互換パーソナルコンピュータ上において、ユーザーインターフェイスとしてのMicrosoft Windows(登録商標)及び何れかの種類のデータベース管理ソフトウェア、例えば、Paradoxと共に実施するシステムである。予測機能を実施するアプリケーションソフトウェアは何れかの種類の言語、例えば、C++で書かれることができ、そして後述するコンピュータ読み取り可能な媒体上に記憶される。ユーザーはコマンド及び患者の診断マーカを反映する情報をキーボード及びポインティング装置、例えば、マウスを介してパーソナルコンピュータに入力する。

40

【0074】

好ましい実施形態において、本発明は予測子関数及び後述するとおり誘導された値を独自に識別するコード少なくとも1つを含むマイクロプロセッサにより読み取られるべきコンピュータ読み取り可能な媒体中に記憶されたデータ構造を提供する。好ましいコンピュータ使用可能な媒体は不揮発性ハードコード型媒体、例えば、リードオンリーメモリー(ROM)または消去可能な電氣的にプログラムできるリードオンリーメモリー(EEPROM)、記録可能な型の媒体、例えば、フロッピー(登録商標)ディスク、ハードディス

50

クドライブ及びCD-ROM、及び、伝送型の媒体、例えば、デジタル及びアナログの通信リンクを含む。

【0075】

「データ構造」はエレメント内の関係を反映するオペレーションのセットと共に関連するデータエレメントの集合を包含できる。データ構造はコンピュータのような装置内のデータとその記憶のアロケーションの組織化を反映すると見なすことができる。

【0076】

即ち、データ構造は待ち行列、スタック、リンクリスト、ヒープ、ディクショナリ及びツリー、または個人の名称及びアドレスのような概念的集団のような、より良好なアルゴリズム効率のための通常はメモリ内の情報の組織化を含む。これはリストの長さまたはサブツリーのノードの数のような冗長な情報を包含してよい。データ構造はディスク上のもののようなデータの大部分へのアクセスが極めて緩徐である場合にも効率的である外部データ構造であってよい。データ構造はアクティブなデータ構造とは対照的な、外部のスレッドまたはプロセスにより変更できるのみのパッシブデータ構造であることができる。アクティブまたは機能的なデータ構造は別の通常はより一般的なデータ構造の外部の挙動を与えるように内部のオペレーションを実施する関連のスレッドまたはプロセスを有する。データ構造はまたその旧バージョンを温存する持続的データ構造であることもでき、即ち、前のバージョンが最新バージョンに追加して照会されてよい。データ構造は同じデータ構造のより小型または単純である例より部分的なる帰納的データ構造であることができる。データ構造はまたアブストラクトデータ型、即ち如何なる特定の実施とも独立して厳密に特定されるデータ値及び関連するオペレーションのセットであることもできる。

10

20

【0077】

データ構造のこれらの例は本明細書に記載する全ての例示的实施形態の場合と同様、説明を目的とするのみであり、限定するものではない。

【0078】

本発明の診断システムはポイントオブケアにおいて有用なハンドヘルドの装置を含んでよく、または、患者の治療の地点から離れて作動するシステムであってよい。いずれの場合においても、本明細書に記載したアルゴリズムまたは他の分析手法に従って本発明の診断方法を実施するための何れかの有用な言語においてプログラムされている付属ソフトウェアを含むことができる。

30

【0079】

「ポイントオブケア試験」とは迅速な時間枠で実施できるリアルタイムの診断試験を指し、これにより実施される試験はこのシステムを使用しない相当する試験よりも速く行われる。ポイントオブケア試験は迅速に、そしてオンサイトで、例えば、院内、ベッドサイド、緊急検査室、緊急処置室または他のこのような場所において、特に迅速で正確な結果が必要な場合に実施することができる。患者は来院することができるが、そのような来院は必要ではない。ポイントオブケアは例えば、緊急処置室、手術室、病院検査室及び他の臨床実験室、医院、野外、または迅速で正確な結果が望まれる何れかの状況を含む。

【0080】

「患者」という用語は動物、好ましくは哺乳類、そして最も好ましくはヒトを指す。

40

【0081】

「医療従事者(health care provider)」または「医療意思決定者(health care decision maker)」とは患者を診断または治療するか、または患者の診断または治療において支援することを認可された何れかの個人を含む。肝臓疾患を治療するための有用な新薬を発見するという意味において、医療従事者は患者を診断または治療するか、または患者の診断または治療において支援することを認可されていない個人であることができる。

【0082】

「血液マーカー」または「血液マーカー、例えば、血漿または血清マーカー」とは、例えば、血清マーカーN末端プロコラーゲンI I Iプロペプチド(PIIIP)、コラー

50

ゲンIV、コラーゲンVI、テネイシン、ラミニン、ヒアルロナン、MMP-2、TIMP-1及びMMP-9/TIMP-1複合体が挙げられるが、これらに限定されない。「血液マーカー、例えば、血漿または血清マーカー」とは「肝臓疾患血清マーカー遺伝子ポリペプチド」と互換的に使用する。「補助的マーカー」は例えば、体重、性別、年齢及びのトランスアミナーゼ、例えば、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)及びアスパルテートアミノトランスフェラーゼ(AST)の患者の血清中濃度を含む。

【0083】

「肝臓疾患」とは肝線維形成または線維溶解を伴う何れかの疾患を含む。このような疾患は例えば、肝硬変、アルコール性肝臓疾患、脂肪肝、脂肪肝炎、非アルコール性肝臓疾患、例えば、非アルコール性脂肪肝炎、ウィルス感染により生じる肝感染症、例えば、B型肝炎およびC型肝炎の感染症、他の病原体への応答、例えば、住血吸虫症、遺伝性ヘモクロマトーシス、原発性胆汁性肝硬変および原発性硬化性胆管炎、メトトレキセートのような薬剤への反応及び胆管閉塞のような遺伝障害が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0084】

「バリデーションコホートマーカー評点値」とはトレーニングコホートから得られた判別ウエイト及びバリデーションコホートにおける各患者に対するマーカー値の線形組み合わせから誘導された数的評点を意味する。

【0085】

「患者診断マーカーカットオフ値」とは所定の感度または特異性が達成されるマーカーの組み合わせのマーカー値を意味する。「レシーバーオペレーター特徴曲線-Scheuer変更評点システムバリデーションデータ」：分岐Scheuer評点システムに基づいたバリデーションコホートにおいて生じたデータを用いて作成したレシーバーオペレーター特徴曲線。「レシーバーオペレーター特徴曲線-Ischak変更評点システムバリデーションデータ」：分岐Ischak評点システムに基づいたバリデーションコホートにおいて生じたデータを用いて作成したレシーバーオペレーター特徴曲線。「陰性予測力」(NPV)：所定のカットオフを超えてマーカー値(またはマーカー値のセット)が上昇しない場合の疾患を有さない確率。

20

【0086】

「陽性予測値」(「PPV」)：所定のカットオフを超えてマーカー値(またはマーカー値のセット)が上昇する場合の疾患を有さない確率。

30

【0087】

「レシーバーオペレーター特徴曲線」(「ROC」)は患者コホート内及び非患者コホート内のマーカーの感度の分布及び1-特異性値の間の機能的関連のグラフ表示である。

【0088】

「曲線下面積」(「AUC」)はレシーバーオペレーター特徴曲線の下部の面積を示す数である。この数が1に近いほど、多くのマーカー値は疾患及び非疾患のコホートの間を判別する。

【0089】

「McNemarカイ自乗検定」(「McNemar²検定」)は2つの相関した割合(共通の分子を有するが異なる分母を有する割合)が相互に有意差があるかどうか調べるために使用される統計学的検定である。

40

【0090】

「ノンパラメトリック回帰分析」とは各変数の分布または各変数の推定における誤差に関する推測を殆どまたは全く行わない2変量データに関する直線のフィットを可能にする統計学的手法のセットである。例は、位置のTheil推定子、Passing-Bablok回帰及びDeming回帰である。

【0091】

「カットオフ値」は特定された感度または特異性を定義するマーカー(またはマーカーのセット)の数値である。

50

【0092】

肝線維症を評価するための現在の比較参照標準は肝生検である。生検においては、肝から無作為に採取した組織試料を切片化し、これを熟練者が顕微鏡観察する。

【0093】

肝生検には多くの問題が関わっており、例えば、以下に示す不確実性要因、即ち、肝内の線維症の分布（クラスター線維症の場合は、針は線維症に罹患していない肝の領域をヒットする可能性がある）、試料調製の失敗（例えば、組織材料不足）及び病理学者の主観が関わってくる。更にまた、肝の線維症の状態は通常は評点を用いて説明されるが、多くの異なる、そして恐らくは矛盾した評点システムが存在する（例えば、Scheuer評点、Ishak評点等）。例えば、2種の異なる評点システムを用いて異なる2時点において同じ患者の同じ生検試料を2人の独立した病理学者が評点しなければならない場合がある。この場合に2人の病理学者が同じ結果に到達する試験の数は僅か36%～46%の範囲である。

10

【0094】

ヌクレオチド配列に関して「等価である」という用語は機能的に等価なポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むものと理解される。等価なヌクレオチド配列は1つ以上のヌクレオチドの置換、付加または欠失により異なる配列、例えば、対立遺伝子変異体を包含し、従って、遺伝子コードの縮重により異なる配列を含む。「等価な」とはまた、血液（例えば、血清）マーカー蛋白の哺乳類相同体のアミノ酸配列に機能的に等価であるが異なるアミノ酸配列、例えば、少なくとも1つ、ただし30、20、10、7、5または3の相違、例えば、置換、付加または欠失を有するアミノ酸配列を指すためにも使用する。

20

【0095】

本明細書においては、「肝臓疾患血清マーカー遺伝子」という用語は（1）本明細書に記載する肝臓疾患血清マーカー蛋白を含む肝臓疾患血液（例えば、血清）マーカー蛋白をコードし；そして（2）エクソン及び（場合により）イントロン配列の両方を含むオープンリーディングフレームを伴う核酸を指す。「肝臓疾患血清マーカー遺伝子」はエクソン配列を含むことができるが、場合により例えば、関連または未関連の染色体遺伝子から誘導されるイントロン配列を含んでよい。「イントロン」という用語は蛋白に翻訳されず、一般的にエクソン間に観察される所定の遺伝子内に存在するDNA配列を指す。遺伝子は更に調節配列、例えば、プロモーター、エンハンサー等を含むことができる。「肝臓疾患血清マーカー遺伝子」は例えば、本明細書に記載する配列番号1～3に相補、等価または相同であるヌクレオチド配列を含む。

30

【0096】

「相同性」、「～の相同体」、「相同である」または「同一性」または「同様性」とは2ポリペプチド間または2核酸分子間の配列の同様性を指し、同一性はより厳密な比較である。相同性及び同一性は各々、比較目的のためにアラインしてよい各配列内のある位置を比較することにより求めることができる。比較配列内のある位置が同じ塩基またはアミノ酸で占有されている場合、分子はその位置において同一である。核酸配列間の相同性または同様性または同一性の程度は核酸配列により共有される位置における同一またはマッチしたヌクレオチドの数の関数である。

40

【0097】

「パーセント同一」という用語は2アミノ酸配列間または2ヌクレオチド配列間の配列の同一性を指す。同一性は比較目的のためにアラインしてよい各配列内のある位置を比較することにより求めることができる。比較配列内の等価な位置が同じ塩基またはアミノ酸で占有されている場合、分子はその位置において同一であり；等価な部位が同じか同様のアミノ酸残基（例えば、立体及び/または電子的な性質において同様）により占有されている場合、分子はその位置において相同（同様）であると称する。相同性、同様性または同一性のパーセントとしての表示は、比較配列により共有される位置における同一または同様のアミノ酸の数の関数を指す。種々のアライメントのアルゴリズム及び/またはプロ

50

グラム、例えば、FASTA、BLASTまたはENTREZを使用してよい。FASTA及びBLASTはGCG配列分析パッケージ(University of Wisconsin, Madison, Wis.)の一部として入手可能であり、そして例えば、デフォルト設定で使用できる。ENTREZはNational Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, Md.を経て入手可能である。1つの実施形態において、2配列のパーセント同一性はギャップウエイト1でGCGプログラムにより求めることができ、例えば、各アミノ酸ギャップはそれが2配列の間の単一のアミノ酸またはヌクレオチドのミスマッチがあると仮定してウエイトする。配列同一性を求めるための他の手法は当該分野でよく知られている。

10

【0098】

本発明において使用する好ましい核酸は肝臓疾患血清マーカー遺伝子の哺乳類相同体の核酸配列に少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%同一であり、そしてより好ましくは90%、そして更に好ましくは少なくとも95%同一または相補である配列を有する。本発明で使用する特に好ましい核酸は肝臓疾患血液(例えば、血清)マーカー遺伝子の哺乳類相同体の核酸配列に少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%同一であり、そしてより好ましくは90%、そして更に好ましくは少なくとも95%同一または相補である配列を有する。

イムノアッセイ

20

N末端プロコラーゲンI I Iプロペプチド(PIIINP)、コラーゲンIV、コラーゲンVI、テネイシン、ラミニン、ヒアルロナン、MMP-2、TIMP-1、MMP-9/TIMP-1複合体を検出し濃度を測定するために血清イムノアッセイを選択した。病歴の間に収集された他の診断マーカーには体重、性別及び年齢、及び、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)およびアスパルテートアミノトランスフェラーゼ(AST)のようなトランスアミナーゼのレベルを含めた。

【0099】

(PIIINP)、コラーゲンIV、コラーゲンVI、テネイシン、ラミニン、ヒアルロナン、MMP-2、TIMP-1、MMP-9/TIMP-1のレベルはサンドイッチ有無のアッセイを使用することにより測定した。1つの実施形態において、本発明のイムノアッセイの実施はキャプチャー抗体がマーカーのエピトープの1つに特異的に結合するヒト体液試料との2抗体の反応を用いた。異なるエピトープ特異性の第2の抗体はこの複合体を検出するために使用する。好ましくは、抗体はモノクローナル抗体であるが、ポリクローナル抗体も使用できる。試験に使用する抗体は両方とも分析対象である蛋白に特異的に結合する。

30

【0100】

ヒト体液より得た患者の診断マーカーの濃度を測定し、線維症の程度を評価するために方法及び系を誘導した。

【0101】

種々の血清マーカーの検出において使用できる抗体を作製するための原料または方法は以下に総括する通りである。

40

【0102】

【化1-1】

血清分析使用した代表的な抗マーカー抗体

試験試薬	クローン	抗体供給元/比較参照
コラーゲン IV R1	IV-4H12	Fuji/ アクセション番号 FERM BP-2847 (米国特許 5,316,914 参照)
コラーゲン IV R2	T59106R	Biodesign Int'l Corp./ Biodesign カタログ番号:

10

【0103】

【化1-2】

		A33125H
PIIINP R1	P3P296/3/27	Hoechst/アクセション番号 ECCAC 87042308
PIIINP R2	35J23	Bayer (ATCC アクセション 番号 ____)

20

【0104】

【化2】

代表的抗原原料

コラーゲン VI	Rockland Immunochemicals Inc. (Gilbertsville, PA)(カタログ 番号 009-001-108)
テネイシン	Chemicon Int'l Inc. (Temecula, CA)(カタログ番号 CC065)
ラミニン	Sigma (カタログ番号 L6274)
ヒアルロン酸 (HA)	ウシ鼻軟骨 / <i>Tengblad, Biochemica et Biophysica Acta, 1979, 578, 281-289.</i>

30

40

【0105】

【化3】

代表的ヌクレオチド配列

ヒト TIMP1 mRNA	配列番号 : 1
ヒト MMP2 mRNA	配列番号 : 2
ヒト MMP9 mRNA	配列番号 : 3

10

肝線維症の血清マーカーを検出するために使用する抗体対

HA試験では、HAに対しては抗体が作製されていないため、上記の表で引用した比較参照に従ってウシ鼻軟骨から単離した特異的HA結合蛋白(HABP)を使用した。HAは高度に反復した構造を有し、HA特異的コア蛋白をサンドイッチ試験フォーマットにおいて使用することができる。FITCコンジュゲートコア蛋白をキャプチャーするため、及び検出のために、アルカリホスファターゼで標識したモノクローナル抗ビオチンと組み合わせたビオチニル化コア蛋白を使用した。

【0106】

コラーゲンIVに関する試験ではBiodesignより入手したポリクローナル抗体(T59106R)(Biodesignカタログ番号T59106R)と対にしたFujiiより入手したモノクローナル抗体(IV-4H12)(アクセッション番号FERMBP-2847)を使用した。全試験は磁気粒子分離手法を用いた不均一免疫アッセイであった。

20

【0107】

PIIINPに関する試験ではHoechstより入手したモノクローナル抗体(アクセッション番号ECCAC87042308)と対にしたAmerican Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209において2004年5月24日にブダペスト条約下に寄託したBayerのモノクローナル抗体(ATCCPTA-__)を使用した。

30

【0108】

コラーゲンVI、ラミニン及びテネシンの検出のための抗体は上記の表に記載した原料に由来する血清マーカーに相当する抗原を入手し、そして、その抗原を血清マーカーとして用いることにより、後に詳述するハイブリドーマ形成プロトコルに従って作製することができる。

【0109】

TIMP-1、MMP-2およびMMP-9の検出のための抗体は(1)後に詳述するポリヌクレオチド発現プロトコルに従って上記の表に記載したマーカーmRNA配列に相補であるDNA配列を発現することにより、これらのマーカーに対する抗原を製造すること；及び(2)このような抗原を血清マーカーとして使用することにより、後に詳述するハイブリドーマ発現プロトコルに従って作製することができる。

40

【0110】

ハイブリドーマ発現プロトコル及びポリヌクレオチド発現プロトコルにおける引用は後に呈示する引用のセクションにおいて別途列挙する。

ポリヌクレオチドの発現：

図5はヒトTIMP1 mRNAのヌクレオチド配列を示す(配列番号1)。

【0111】

図6はヒトMMP2 mRNAのヌクレオチド配列を示す(配列番号2)。

【0112】

50

図7はヒトMMP9 mRNAのヌクレオチド配列を示す(配列番号3)。

【0113】

これら及び他の肝臓疾患血清マーカー遺伝子を発現するためには、挿入されたコーディング配列の転写及び翻訳に必要なエレメントを含有する発現ベクター内に遺伝子を挿入することができる。肝線維症血清マーカーポリペプチドをコードする配列及び適切な転写及び翻訳の制御エレメントを含有する発現ベクターを構築するためには、当業者に周知の方法を使用することができる。これらの方法としては、インビトロの組み換えDNA法、合成法及びインビボの遺伝子組み換えが挙げられる。このような手法は例えば、Sambrook et al., (3)及びAusubel et al., (4)に記載されている。

10

【0114】

種々の発現ベクター/宿主系を用いて肝臓疾患血清マーカーポリペプチドをコードする配列を含有させ、そして発現させることができる。これらには、例えば、組み換えバクテリオファージ、プラスミドまたはコスミドDNA発現ベクターで形質転換した細菌のような微生物;コウボ発現ベクターで形質転換したコウボ、ウイルス発現ベクター(例えば、バキュロウイルス)を感染させた昆虫細胞、ウイルス発現ベクター(例えば、カリフラワーマザイクウイルス、CaMV;タバコモザイクウイルス、TMV)または細菌発現ベクター(例えば、TiまたはpBR322プラスミド)で形質転換した植物細胞系、または動物細胞系が包含されるが、これらに限定されない。

20

【0115】

制御エレメントまたは調節配列は、宿主細胞蛋白と相互作用して転写及び翻訳を実施するベクターのエンハンサー、プロモーター、5'及び3'未翻訳領域の領域である。このようなエレメントはその長さ及び特異性において変動することができる。利用されるベクター系及び宿主に応じて、任意の数の適当な転写及び翻訳エレメント、例えば、構成及び誘導プロモーターを使用することができる。例えば、細菌系においてクローニングする場合は、プロモーター、例えば、BLUESCRIPTファージミド(Stratagene, LaJolla, Calif)またはpSPORT1プラスミド(Life Technologies)等のような誘導プロモーターを使用できる。バキュロウイルスポリヘドリンプロモーターも昆虫細胞において使用できる。植物細胞のゲノム(例えば、ヒートショック、RUBISCO及び保存蛋白遺伝子)または植物ウイルス(例えば、ウイルスプロモーターまたはリーダー配列)から誘導されたプロモーターまたはエンハンサーをベクターにクローニングすることができる。哺乳類細胞系においては、哺乳類遺伝子由来または哺乳類ウイルス由来のプロモーターが好ましい。「肝線維症遺伝子」ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の複数のコピーを含有する細胞系統を作製することが必要である場合は、SV40またはEBVに基づくベクターを適切な選択可能なマーカーと共に使用できる。

30

細菌及びコウボの発現系

細菌系においては、肝臓疾患血清マーカーポリペプチドのために意図される使用に応じて多くの発現ベクターを選択できる。例えば、抗体の誘導のために大量の肝臓疾患血清マーカーポリペプチドが必要な場合は、容易に精製される融合蛋白の高レベル発現を指向するベクターを使用できる。このようなベクターは例えば、多機能E.coliクローニング及び発現ベクター、例えば、BLUESCRIPT(Stratagene)が挙げられるが、これらに限定されない。BLUESCRIPTベクターにおいて、肝臓疾患血清マーカーポリペプチドをコードする配列はハイブリッド蛋白が形成されるように - ガラクトシダーゼのアミノ末端Met及びそれに続く7残基に対する配列とインフレームにベクター内にライゲーションすることができる。pINベクター[Van Heeke & Schuster, (17)]またはpGEXベクター(Promega, Madison, Wis.)もまたグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)との融合蛋白として外来のポリペプチドを発現するために使用することができる。一般的にこのような融合蛋白は可溶性であり、グルタチオンアガロースビーズへの吸着、その後の遊離グルタチオン

40

50

存在下の溶離により、容易に溶解細胞から精製することができる。このような系において製造した蛋白は、目的のクローニングされたポリペプチドが随時 GST 部分から放出されるようにヘパリン、トロンビンまたは第 X a 因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計することができる。

【0116】

コウボであるサッカロマイセス・セレビスシアエ (*Saccharomyces cerevisiae*) において、アルファ因子、アルコールオキシダーゼ及び PGH のような構成または誘導プロモーターを含有する多くのベクターを使用することができる。例えば、Ausubel et al., (4) 及び Grant et al., (18) を参照できる。

植物及び昆虫の発現系

植物発現ベクターを使用する場合は、肝臓疾患血清マーカーポリペプチドをコードする配列の発現は多くのプロモーターの何れかにより駆動することができる。例えば、CaMV の 35S 及び 19S プロモーターのようなウィルスプロモーターを単独または TMV 由来のオメガリーダー配列と組み合わせて使用できる [Takamatsu, (19)]。或は、RUBISCO の小サブユニットのような植物プロモーターまたはヒートショックプロモーターを使用することもできる [Coruzzi et al., (19); Broglie et al., (21); Winter et al., (22)]。これらのコンストラクトは直接の DNA 形質転換によるか、または、病原体媒介トランスフェクションにより植物細胞内に導入できる。このような手法は多くの一般的に入手できる論文に記載されている (例えば、Hobbs or Murray, MCGRAW HILL YEARBOOK OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, (23))。

【0117】

昆虫系もまた肝臓疾患血清マーカーポリペプチドの発現のために使用できる。例えば、1つのこのような系においては、*Autographa californica* の核ポリヘドロシスウィルス (AcNPV) をベクターとして使用することにより、*Spodoptera frugiperda* 細胞または *Trichoplusia larvae* において外来性遺伝子を発現させる。肝臓疾患血清マーカーポリペプチドをコードする配列をポリヘドリン遺伝子のようなウィルスの非必須領域内にクローニングし、そしてポリヘドリンプロモーターの制御下に置く。肝臓疾患血清マーカーポリペプチドの挿入が良好に行われれば、ポリヘドリン遺伝子は不活性となり、被覆蛋白を搔いた組み換えウィルスが作製される。次に、内部で肝臓疾患血清マーカーポリペプチドを発現させることができる *S. frugiperda* 細胞または *Trichoplusia larvae* を感染させるために組み換えウィルスを用いることができる [Engelhard et al., (24)]。

哺乳類発現系

哺乳類宿主細胞中で肝臓疾患血清マーカーポリペプチドを発現するために多くのウィルス系の発現系を使用することができる。例えば、発現ベクターとしてアデノウィルスを使用する場合は、後期プロモーター及びトリパーティリーダー配列を含むアデノウィルス転写/翻訳複合体内に肝臓疾患血清マーカーポリペプチドをコードする配列をライゲーションすることができる。ウィルスゲノムの非必須 E1 または E3 領域内の挿入を用いて感染宿主細胞内で肝臓疾患血清マーカーポリペプチドを発現することができる生存ウィルスを得ることができる [Logan & Shenk, (25)]。所望により、ラウス肉腫ウィルス (RSV) エンハンサーのような転写エンハンサーを用いて哺乳類宿主細胞内での発現を増大させることができる。

【0118】

プラスミド内に含有させて発現させられるものよりも大型の DNA フラグメントを送達するためにヒト人工染色体 (HAC) を使用することもできる。6M ~ 10M の HAC を構築し、そして、従来を送達法 (例えば、リボソーム、ポリカチオン性アミノ重合体また

10

20

30

40

50

はベシクル)を介して細胞に送達する。

【0119】

特異的開始シグナルもまた肝臓疾患血清マーカーポリペプチドをコードする配列のより効率的な翻訳を達成するために用いることができる。このようなシグナルはATG開始コドン及び隣接する配列を包む。肝臓疾患血清マーカーポリペプチドをコードする配列、その開始コドン及び上流の配列が適切な発現ベクターに挿入された場合、更に別の転写または翻訳制御シグナルは必要ない。しかしながら、コーディング配列またはそのフラグメントのみが挿入された場合、外来性の翻訳制御シグナル(ATG開始コドンを含む)を与えなければならない。開始コドンは全インサートの翻訳を確実にするためには正しいリーディングフレーム内に存在しなければならない。外来性の翻訳エレメント及び開始コドンは天然及び合成の両方の種々の起源のものであることができる。発現の効率は使用される特定の細胞系に対して適切であるエンハンサーを含めることにより改善させることができる [Scharf et al., (26)]。

宿主細胞

宿主細胞系統は、所望の態様において、挿入された配列の発現をモジュレートするか、または、発現された肝線維症血清マーカーポリペプチドをプロセッシングするその能力に関して選択することができる。このようなポリペプチドの修飾は例えば、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、ホスホリル化、脂質化及びアシル化が挙げられるが、これらに限定されない。ポリペプチドの「プレプロ」型を切断する翻訳後プロセッシングもまた正確な挿入、折り畳み及び/または機能を促進するために用いることができる。翻訳後の活性のための特定の細胞内機構及び特徴的機序を有する種々の宿主細胞(例えば、CHO、HeLa、MDCK、HEK293およびWI38)がAmerican Type Culture Collection (ATCC; 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209)から入手可能であり、そして外来の蛋白の正しい修飾及びプロセッシングを確保するために選択することができる。

【0120】

安定な発現は組み換え蛋白の長期の高収率の生産のために好ましい。例えば、複製ウィルス起点及び/または内因性発現エレメント及び選択可能なマーカー遺伝子を同じか別のベクター上に含有できる発現ベクターを用いて肝臓疾患血清マーカーポリペプチドを安定に発現する細胞系統を形質転換することができる。ベクターの導入の後、細胞をリッチ化培地中12日間成育させ、その後選択培地に切り替える。選択マーカーの目的は選択への耐性を付与することであり、その存在により導入された肝線維症血清マーカーポリペプチド遺伝子配列を良好に発現する細胞の成育及び回収が可能となる。安定に形質転換された細胞の耐性クローンは、細胞型に適する組織培養法を用いて増殖させることができる。例えば、R.I. Freshney, (27)を参照できる。

【0121】

何れかの数の選択系を用いて形質転換された細胞系統を回収することができる。これらには例えば、単純疱疹ウィルスチミジンキナーゼ [Wigler et al., (28)] 及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ [Lowy et al., (29)] 遺伝子が包含され、これらはそれぞれ tk^r または apr^t 細胞内で使用できる。更にまた、代謝拮抗物質、抗生物質または除草剤耐性を選択基準として使用できる。例えば、dhfr はメトトレキセートに対する耐性を与え [Wigler et al., (30)]、npt はアミノグリコシド、ネオマイシン及び G418 に対する耐性を与え [Colbere Garapin et al., (31)]、そして als および pat はそれぞれクロルスルフロン及びホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼに対する耐性を与える。その他の選択可能な遺伝子も報告されている。例えば、trpB は細胞がトリプトファンの代わりにインドールを利用できるようにし、或いは、hisD は細胞がヒスチジンの代わりにヒスチノールを利用できるようにする [Hartman & Mulligan, (32)]。アントシアニン、⁻グルクロニダーゼ及びその基質 GUS

及びルシフェラーゼ及びその基質ルシフェリンのような目視可能なマーカーを用いて形質転換体を発見し、そして特定のベクターに起因する一過性または安定な蛋白発現の量を定量することができる [Rhodes et al. , (33)]。

発現および遺伝子産物の検出

マーカー遺伝子発現の存在は肝臓疾患血清マーカーポリペプチド遺伝子も存在することを示唆するが、その存在及び発現は確認する必要がある。例えば、肝臓疾患血清マーカーポリペプチドをコードする配列をマーカー遺伝子配列内に挿入する場合、肝臓疾患血清マーカーポリペプチドをコードする配列を含有する形質転換された細胞はマーカー遺伝子の機能の非存在により識別できる。或いは、マーカー遺伝子は単一のプロモーターの制御下に肝線維症血清マーカーポリペプチドをコードする配列と直列に置くことができる。誘導または選択に応答したマーカー遺伝子の発現は通常は肝線維症血清マーカーポリペプチドの発現を示す。

【 0 1 2 2 】

或いは、肝臓疾患血清マーカーポリペプチドを含有し、肝線維症血清マーカーポリペプチドを発現する宿主細胞は、当該分野でよく知られている種々の操作法により識別することもできる。これらの操作法は例えば、DNA - DNA または DNA - RNA ハイブリダイゼーション及び蛋白バイオアッセイまたはイムノアッセイの手法であり、これらには核酸または蛋白の検出及び/または定量的ための膜、溶液またはチップ系の技術が使用される。例えば、肝臓疾患血清マーカーポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の存在は、プローブまたはフラグメントまたは肝臓疾患血清マーカーポリペプチドをコードするフラグメントを用いた DNA - DNA または DNA - RNA ハイブリダイゼーションまたは増幅により検出することができる。核酸増幅系の試験では肝線維症血清マーカーポリペプチドを含有する形質転換体を検出するために肝線維症血清マーカーポリペプチドをコードする配列から選択されたオリゴヌクレオチドを使用する。

【 0 1 2 3 】

ポリペプチドに特異的なポリクローナルまたはモノクローナル抗体の何れかを用いた肝線維症血清マーカーポリペプチドの発現を検出して測定するための種々のプロトコルが当該分野で知られている。例としては、酵素結合免疫吸着試験 (E L I S A)、ラジオイムノアッセイ (R I A) 及び蛍光活性化細胞ソーティング (F A C S) が挙げられる。肝臓疾患血清マーカーポリペプチド上の2つの非干渉エピトープに反応性のモノクローナル抗体を用いた2部位モノクローナル系イムノアッセイを使用することができ、または、競合的結合試験を使用することができる。これら及び他の試験は Hampton et al. , (34) 及び Maddox et al. , (35) に記載されている。

【 0 1 2 4 】

広範な種類の標識及びコンジュゲーションの手法が当該分野でよく知られており、そして種々の核酸及びアミノ酸の試験において使用することができる。肝線維症血清マーカーポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関連する配列を検出するための標識されたハイブリダイゼーションまたは PCR プローブを作製するための手段はオリゴ標識、ニック翻訳、末端標識または標識されたヌクレオチドを使用する PCR 増幅を含む。或いは、肝臓疾患血清マーカーポリペプチドをコードする配列を mRNA プローブの製造のためのベクター内にクローニングすることができる。このようなベクターは当該分野で知られており、市販されており、そして標識されたヌクレオチド及び適切な RNA ポリメラーゼ、例えば、T7、T3 または SP6 を添加することによりインビトロで RNA プローブを合成するために使用できる。これらの操作法は種々の市販のキットを用いて実施できる (Amersham Pharmacia Biotech , Promega および US Biochemical)。検出を容易にするために使用できる適当なレポーター分子または標識は放射性核種、酵素および蛍光、ケミルミネセントまたは発色性の物質、並びに基質、コファクター、阻害剤、磁気粒子等を含む。

ポリペプチドの発現及び精製

肝臓疾患血清マーカーポリペプチドをコードするヌクレオチド配列で形質転換した宿主

10

20

30

40

50

細胞は蛋白の発現及び細胞培養物からの回収に適する条件下に培養できる。形質転換された細胞により生産されたポリペプチドは配列及び/または使用したベクターに応じて分泌されるか、細胞内に保存される。当業者の知るとおり、肝線維症血清マーカーポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターは原核細胞または真核細胞の膜を介して可溶性の肝線維症血清マーカーポリペプチドの分泌を指向する、または膜結合肝線維症血清マーカーポリペプチドの膜挿入を指向するシグナル配列を含有するように設計することができる。

【0125】

上記した通り、他の構築法を用いて肝臓疾患血清マーカーポリペプチドをコードする配列を可溶性蛋白の精製を容易にするポリペプチドドメインをコードするヌクレオチド配列に結合させることができる。このような精製促進ドメインは例えば、金属キレート形成ペプチド、例えば、固定化された金属上の精製を可能にするヒスチジン-トリプトファンモジュール、固定化された免疫グロブリン上の精製を可能にする蛋白Aドメイン、及び、FLAG伸長/アフィニティー精製系において利用されるドメインが挙げられるが、これらに限定されない(ImmuneX Corp., Seattle, Wash.)。第Xa因子またはエンテロキナーゼに特異的なもののような切断可能なリンカー配列(Invitrogen, San Diego, CA)を精製ドメインと肝臓疾患血清マーカーポリペプチドの間に包含させることも精製を容易にするために使用することができる。このような発現ベクターの1つは肝臓疾患血清マーカーポリペプチド及びチオレドキシンの前の6ヒスチジン残基またはエンテロキナーゼ切断部位を含有する融合蛋白の発現を可能にする。ヒスチジン残基はPorath et al., (36)の記載の通りIMAC(固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー)による精製を容易にし、エンテロキナーゼ切断部位は融合蛋白からの「肝線維症遺伝子」の精製のための手段を提供する。融合蛋白を含有するベクターはKroll et al., (37)に開示されている。

化学合成

肝臓疾患血清マーカーポリペプチドをコードする配列は全体または部分的に、当該分野で知られた化学的方法を用いて合成できる(Caruthers et al., (38)及びHorn et al., (39))。或いは、肝臓疾患血清マーカーポリペプチドそのものを、そのアミノ酸配列を合成するための化学的方法、例えば、固相法を用いた直接ペプチド合成[Merrifield, (40)及びRoberge et al., (41)]を用いて製造することができる。蛋白合成は手動または自動で実施できる。自動合成は例えば、Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer(Perkin Elmer)を用いて達成できる。場合により、肝線維症血清マーカーポリペプチドのフラグメントを個別に合成し、化学的方法を用いて組み合わせて完全長の分子を作製することができる。

【0126】

新しく合成されたペプチドはその後、分取高速液体クロマトグラフィーにより精製することができる[Creighton, (42)]。合成の肝臓疾患血清マーカーポリペプチドの組成は、アミノ酸分析または配列決定により確認できる(例えば、Edman分解法; Creighton, (42)参照)。更にまた、肝臓疾患血清マーカーポリペプチドのアミノ酸配列の何れかの部分を、直接の合成の間の改変、及び/または、他の蛋白由来の配列との化学的方法を用いた複合化に付し、変異体ポリペプチドまたは融合蛋白を製造することができる。

ハイブリドーマ形成プロトコル

第I段階: 免疫化

BALB/cマウス及びSwiss Websterマウス(群当たり5匹)を完全フロイントアジュバント(CFA)で乳化した上記発見された肝臓疾患血清マーカー(異なる用量)の何れかで腹腔内免疫化し、その後、不完全フロイントアジュバントで乳化した免疫原を3回ブーストする(2週間間隔)。マウスは各ブースト後1週間に放血させ、ELISAで免疫原に対して滴定する。最高力価を有するマウスを融合用を選択する。

第 I I 段階：細胞融合及びハイブリドーマの選択

融合用に選択したマウスを前回の免疫化に使用した抗原と同じ用量でブーストする。ブーストは脾臓摘出及び細胞融合の4日前に行う。抗原調製品はアジュバントを用いることなく腹腔内に与する。

【0127】

融合の当日、マウスを屠殺し、脾臓を無菌的に摘出する。脾臓をピンセットで粉砕し、篩を通して整粒する。細胞を I s c o v e 変性 E a g l e 培地 (I M D M) を用いて2回洗浄し、血球計を用いて計数する。

【0128】

マウスミエローマ細胞系統 P 3 x 6 3 A g 8 . 6 5 3 を静置された対数期の培養物から採取し、I M D M で洗浄し、血球計を用いて計数する。

10

【0129】

ミエローマ及び脾細胞を1:5比で混合し、遠心分離する。上澄みを廃棄する。試験管底部をたたくことにより細胞ペレットを穏やかに際懸濁する。P E G (M W 1 4 5 0) の50%溶液1ミリリットルを30秒かけて滴下する。ペレットをピペットを用いて30秒間穏やかに混合する。得られた細胞懸濁液を更に30秒間攪乱することなく放置する。I M D M 5ミリリットルを90秒間かけて添加し、その後即座に5mLを添加する。得られた細胞懸濁液を5分間未攪乱のまま放置する。細胞懸濁液を遠心分離し、ペレットをH A T 培地 (1 0 % F B S 、 2 m M L - グルタミン、0.6%2-メルカプトエタノール (0.04%溶液)、ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン及び10%O r i g e n 成長因子を含有するI M D M) 中に再懸濁する。細胞をミリリットル当たり5E5個となるように再懸濁する。細胞を96穴プレートにプレーティングする。200μLまたは2E5個の細胞を各ウェルに添加する。

20

【0130】

プレートを100%湿度7%CO₂雰囲気下37°Cでインキュベートする。融合後7時間に培地を除去し、10%FBS、2mM L-グルタミン、0.6%2-メルカプトエタノール保存溶液(0.04%)、ヒポキサンチン及びチミジンを含有するI M D M と交換する。典型的には、ハイブリドーマの生育中のコロニーは融合後約7日に顕微鏡で観察される。これらのコロニーは融合後約10~14日に裸眼で目視可能となる。

【0131】

融合後10~14日に上澄みを生育中のハイブリドーマコロニーと共にウェルから採取する。上澄みの容量は約150~200μLであり、ミリリットル当たり抗体10~100μgを含有する。この上澄みを、血清のスクリーニングに用いたものと同様の試験を用いて特異的抗体に関して試験する。陽性ハイブリドーマコロニーを96穴プレートから24穴プレートに移す。3~5日後、24穴プレートの上澄みを試験して特異的抗体の存在を確認する。24穴プレートの1つのウェルの上澄みの容量は約2mLである、抗体10~100μg/mLを含有する。陽性ウェルの細胞をT-25及びT-75フラスコ内で増殖させる。細胞はT-75フラスコ内で凍結する。陽性ウェルの細胞はまた限界希釈によってもクローニングされる。ハイブリドーマ細胞はウェル当たり0.25個の細胞密度またはウェル4個おきに1個となるように96穴プレートにプレーティングする。生育中のコロニーはハイブリドーマを最初に選択した場合と同様の試験法を用いて10~14日に試験する。陽性クローンは増殖させて凍結する。

30

40

第 I I I 段階：生産

ハイブリドーマ細胞をT-162フラスコに増殖させ、その後これらをローラーボトルに移して細胞上澄みの生産を行う。細胞が10%未満の生存となるまで、ローラーボトル中約2週間細胞を成育させる。培養上澄みをこれらのローラーボトルから回収して精製に付す。

イムノアッセイの簡単な説明

全抗体はB a y e r I m m u n o 1 システムのためにフォーマットされた不均質E L I S A 型試験に付した。系は蛍光標識キャプチャー抗体(R1と記載)及びアルカリホ

50

スファターゼ標識タグ抗体 (R2 と記載) を使用する。抗体コンジュゲートを生理学的緩衝液に 2 ~ 50 mg / L の濃度で溶解する。免疫反応性試薬を試験すべき抗原を含有する患者試料の固定量と共にインキュベートする。常時、患者の試料をまず反応キュベットにピペティングし、その 30 秒後に R1 を入れる。R2 は通常は R1 添加後 30 秒 ~ 20 分に添加する。混合物は最大 20 分間インキュベートするが、イムノアッセイの他の実施形態ではインキュベーション時間は延長または短縮される。その後、免疫磁気粒子を混合物に添加する。粒子は粒子表面にコンジュゲートした抗フルオレセイン抗体と共にポリアクリルアミドビーズを含有する酸化鉄よりなる。粒子は Bayer Health Care Diagnostics より市販されている。

【0132】

抗原及び R1 及び R2 コンジュゲートから形成されたサンドイッチ免疫複合体と共に免疫磁気粒子をインキュベートすると、サンドイッチ免疫複合体は免疫磁気粒子上の抗フルオレセイン抗体により R1 抗体のフルオレセイン標識を介してキャプチャーされる。形成された超複合体は外部の磁場により沈殿される。全ての未結合の物質、特に R2 アルカリホスファターゼコンジュゲートは洗浄により除去される。次に洗浄した複合体を p - ニトロフェノールホスフェート溶液に再懸濁する。発色比率は抗原の量に正比例するキュベット内に残存するホスファターゼの量に比例する。定量は、6 点検量線及び 3 乗回帰または Rodbard フィットにより作成した検量線により行う。

(a) 試験の性能

試験の各々の性能は単独で調べた。感度および特異性、試験間及び試験内の変動、干渉、直線性及び平行性を各イムノアッセイに関して調べた。全ての試験は高い臨床化学の基準に合致していることがわかった。男女の健常者及び 18 ~ 75 歳の年齢範囲に関して得られた結果の範囲は「正常」値を確立するものと決定された。試験はある範囲の病理学的障害を有する対象に適用した。

(b) 統計学的バックグラウンド

1, 021 対象における肝線維症の観察試験 (「European Liver Fibrosis」または「ELF」試験) を行い、得られたデータを分析した。使用した肝線維症評点システムは以下の通りである。

- Scheuer 評点 (0 - 4)、
- 変更 Ishak 評点 (HAI) A - インターフェイス肝炎 (0 - 4)、
- 変更 Ishak 評点 (HAI) B - コンフルエント壊死 (0 - 6)、
- 変更 Ishak 評点 (HAI) C - 斑紋状壊死 (0 - 4)、
- 変更 Ishak 評点 (HAI) D - 門脈炎症 (0 - 4)、
- 変更 HAI 評点 (Ishak 評点) (0 - 6)。

【0133】

段階的な判別分析を適用し；以下の血清パラメーター関数を相当する評点型への主要な影響を有していたものとして表 1 に示した。

【0134】

【表 1 - 1】

表1

評点型	代理パラメーター		
Scheuer 評点:	$\ln(TIMP-1)$	$\ln(\text{コラーゲン VI} / \text{ヒアルロン})$	$\ln(\text{ヒアルロン} / \text{ラミニン})$
変更 Ishak 評点 A - インターフェイス肝炎:	$\ln(TIMP-1)$	$\ln(\text{コラーゲン VI} / \text{ヒアルロン})$	$\ln(\text{コラーゲン VI} / \text{テネイン})$
変更 Ishak 評点 B - コンフルエント壊死:	$\ln(\text{ヒアルロン})$	$\ln(\text{コラーゲン VI} / \text{MMP-2})$	
変更 Ishak 評点 C - 斑紋状壊死:	$\ln(\text{ヒアルロン})$	$\ln(\text{MMP-9} / \text{TIMP-1} / \text{複合体} / \text{テネイン})$	

【0135】

【表 1 - 2】

評点型	代理パラメーター		
変更Ishak評点 D - 門脈炎症 :	$\ln(\text{ラミニン})$	$\ln(\text{コラーゲン VI / TIMP-I})$	
変更Ishak評点 - 段階 :	$\ln(\text{TIMP-I})$	$\ln(\text{コラーゲン VI / ヒアルロンン})$	$\ln(\text{ヒアルロンン / ラミニン})$

相当する判別分析によれば線形の判別関数が得られ、これを生検評点の計算及び予測に使用した。誘導されたアルゴリズムを各々の既知の評点システム（例えば、Scheuer 評点、Ishak 評点、Metavir 評点、Ludwig 評点、HAI 評点）に適用した。例えば、アルゴリズムを用いて患者の生検評点を予測（例えば、評点 0、1、2、3、・・・）するか、または、患者が属する評点群（カテゴリ）（例えば、軽度の線維症；評点 0 ~ 1）を予測するために使用できる。

10

【0136】

使用される判別関数は N 末端プロコラーゲン I I I プロペプチド (PIIINP)、コラーゲン IV、コラーゲン VI、テネイシン、ラミニン、ヒアルロンン、MMP-2、TIMP-1 および MMP-9 / TIMP-1 複合体並びに患者の年齢、性別及びトランスアミナーゼレベル、最も特徴的には ALT (アラニンアミノトランスフェラーゼ)、AST (アスパルテートアミノトランスフェラーゼ) 及び GLDH (グルタメートデヒドロゲナーゼ) を数的因子、即ちマルチプリケーター及びサマンドまたはその組み合わせと共に列挙したのから得られるマーカーの組み合わせを包含し、そのような数的因子は -1000 ~ +1000 ナノグラム / mL (ng / mL) の値を有する。

20

【0137】

本明細書に記載する値は特段の記載が無い限り、ナノグラム / ミリリットル (ng / mL) 単位である。当業者であればこのような値を何れかの有用な単位に容易に変換し、相応に本明細書に開示するアルゴリズムにおいて使用する値を変更することができる。

【0138】

異なる評点システムを用いて発見された生検評点を予測することは、異なる数的因子と組み合わせられた年齢、性別及びトランスアミナーゼ値とのマーカー PIIINP、コラーゲン IV、コラーゲン VI、テネイシン、ラミニン、ヒアルロンン、MMP-2、TIMP-1 および MMP-9 / TIMP-1 の異なる組み合わせを用いる異なるアルゴリズムの開発を要した。

30

【0139】

判別関数は比較すべき組織病理学的評点と同様に多くの異なる関数のアレイとして（アルゴリズム 1、2、3、4、5、6、1b、2b、3b、4b、5b、6b 参照）または、記号論理的回帰とも称される場合が多い 1 つの単一の判別関数（例えば、4a、5a、6a、4c、5c、6c、7、7a、8、8a、9、10、11、12 参照）としてセットアップする。判別関数は計算されたバイオマーカー誘導肝評点を固有にもたらず、記号論理的回帰はバイナリ結果を評価するためのツールとして、またはマーカー評点を計算するためのツールとしてのその使用に応じて、1 つまたは複数のカットオフ値を必要とする。マーカー評点を得るためには、判別関数は疾患の等級より 1 減じた数程多くの異なるカットオフ値を必要とする。

40

【0140】

組織病理学的評点を計算するためには、個体の血清マーカーまたは他のパラメーターの結果を等式の各々に代入して判別評点を計算する必要がある。数個の判別関数のセットを使用するモデルにおいては、各関数は異なる評点を表す。代入した値を用いた計算において最高の数的判別評点を与える関数は計算されたバイオマーカー誘導肝臓疾患評点としてのその関連疾患評点を与える。

(c) Scheuer 評点に関するアルゴリズム

以下のアルゴリズム 1 ~ 6 及び 4a ~ 6a は Scheuer 評点システムにより評価さ

50

れた生検と肝臓疾患患者の群の血清マーカー濃度を相関させることにより計算した。全てのアルゴリズムは患者の1群(マーカー発見コホート)からのマーカー結果及び病理評点を用いて誘導し、次に患者の別の群(バリデーションコホート)における生検評点を予測するために使用した(計算評点)。計算された評点は単一の病理学者により求められた評点と(事例B)、3人の病理学者の統一見解評点と(事例C)及び全ての病理学者に行き渡る範囲と(事例A)比較した。カッパ値はアルゴリズムの検出力を評価するために計算した。新しい診断方法の検出力(感度、特異性、陽性予測値(PPV)、陰性予測値(NPV)及びレシーバーオペレーター特異的分析における曲線下面積(ROCAUC))を評価するために通常使用される基準を使用できるように、組織学的分析により誘導された肝臓疾患評点及び血清マーカーアルゴリズムから誘導された計算評点を評点0~1を陰性読み取り値及び評点2~4を陽性読み取り値(Scheuer評点)とするように2分割した。従って、真陽性、真陰性、擬似陰性及び擬似陽性に関する両方の方法の換算性を評価して、各アルゴリズムの感度、特異性、NPV、PPV及びROCAUCを求めた。アルゴリズム4a、5a、6aを参照できる。全ての例において、各々の異なるアルゴリズムを評価するための絶対基準として生検の結果を用いた。

アルゴリズムで使用した略記法:

【0141】

【化 4】

略記	マーカー	
Col IV または COL_IV:	IV型 コラーゲン	
Col VI または COL_VI:	VI型 コラーゲン	
Hya または HYA または HA:	ヒアルロン酸	
TIMP-1 または TIMP1:	1 型メタロプロテイナーゼ組織阻害剤	
Lam または LAM:	ラミニン	
PIIINP:	III型プロコラーゲンアミノ末端プロペプチド	10
MMP2:	2型 マトリックスメタロプロテイナーゼ	
MMP9 または MMP9/TIMP1:	9型 マトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP9); および TIMP-1 と複合体化した MMP9 (MMP9/TIMP1).	
Ten または TEN:	テネイシン	
CRATIO:	VI 型コラーゲンの 分析値 で割った IV 型コラーゲンの 分析値 [ng/mL]	20

アルゴリズム1: (CoIVIとヒアルロン酸、ラミニン及びTIMP-1使用)

- [0] : $-108.861+0.283*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-1.050*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+35.372*\text{LOG}(\text{TIMP1})$
- [1] : $-114.231+0.195*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-0.654*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+36.158*\text{LOG}(\text{TIMP1})$
- [2] : $-120.649-0.998*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-2.102*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+36.925*\text{LOG}(\text{TIMP1})$
- [3] : $-123.672-1.281*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-1.344*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+37.163*\text{LOG}(\text{TIMP1})$
- [4] : $-133.207-2.186*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-1.602*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+38.188*\text{LOG}(\text{TIMP1})$

30

アルゴリズム2: (CoIVIとヒアルロン酸、ラミニン及びTIMP-1使用)

【 0 1 4 2 】

【化5】

- [0] : $-75.18797+23.04542*\text{LOG}(\text{TIMP1})-0.583641*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-0.140956*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})$
 [1] : $-76.1526+23.15895*\text{LOG}(\text{TIMP1})-0.963402*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-0.009472*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})$
 [2] : $-78.62662+23.32161*\text{LOG}(\text{TIMP1})-1.227332*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-0.067969*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})$
 [3] : $-83.09285+23.64493*\text{LOG}(\text{TIMP1})-2.181493*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-0.300241*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})$
 [4] : $-93.89732+24.86246*\text{LOG}(\text{TIMP1})-2.841299*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-0.136885*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})$

10

アルゴリズム3: (CoIVIとヒアルロン酸、CoIV及びPIIINP使用)

- [0] : $-95.39661+17.66025*\text{LOG}(\text{HYAL})-0.820836*\text{LOG}(\text{COL_IV})+0.245778*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{PIIINP})-17.79663*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{TIMP1})-14.96754*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{MMP2})-0.279356*\text{LOG}(\text{LAM}/\text{MMP9T})$
 [1] : $-95.84457+17.62365*\text{LOG}(\text{HYAL})-0.667854*\text{LOG}(\text{COL_IV})+0.155707*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{PIIINP})-18.0407*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{TIMP1})-14.42688*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{MMP2})-0.554323*\text{LOG}(\text{LAM}/\text{MMP9T})$
 [2] : $-99.13575+17.76656*\text{LOG}(\text{HYAL})-0.978731*\text{LOG}(\text{COL_IV})-0.12995*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{PIIINP})-18.69948*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{TIMP1})-14.49353*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{MMP2})-0.647247*\text{LOG}(\text{LAM}/\text{MMP9T})$
 [3] : $-104.4554+18.38886*\text{LOG}(\text{HYAL})-0.202832*\text{LOG}(\text{COL_IV})-0.157058*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{PIIINP})-18.70409*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{TIMP1})-14.49716*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{MMP2})-0.340197*\text{LOG}(\text{LAM}/\text{MMP9T})$
 [4] : $-119.8887+20.14719*\text{LOG}(\text{HYAL})+0.959792*\text{LOG}(\text{COL_IV})-0.80876*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{PIIINP})-18.69873*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{TIMP1})-15.57103*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{MMP2})-0.229757*\text{LOG}(\text{LAM}/\text{MMP9T})$

20

【0143】

【化6】

アルゴリズム4 (CoIVIとヒアルロン酸、ラミニン及びTIMP-1使用)

30

-
- [0] $-84.8884+1.314094*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})+2.163728*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+26.86543*\text{LOG}(\text{TIMP1})$
 [1] $-87.1291+1.152303*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})+2.507536*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+27.13607*\text{LOG}(\text{TIMP1})$
 [2] $-89.7304+0.766894*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})+2.361471*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+27.43159*\text{LOG}(\text{TIMP1})$
 [3] $-94.3078-0.074816*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})+2.251909*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+27.81493*\text{LOG}(\text{TIMP1})$
 [4] $-104.774-1.087963*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})+2.110437*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+28.88894*\text{LOG}(\text{TIMP1})$
-

40

アルゴリズム4a (CoIVIとヒアルロン酸、ラミニン及びTIMP-1使用のバイナリアルゴリズム)

-
- logit $-8.33001-1.104523*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-0.127521*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+0.841806*\text{LOG}(\text{TIMP1})$
-

【0144】

【化7】

アルゴリズム5 (CoIVIとヒアルロン酸、CoIV、PIIINP、MMP2使用)

[0]	$ \begin{aligned} & -510.728+22.96526*(\text{LOG}(\text{HYAL})) - 66.83994*(\text{LOG}(\text{COL_IV})) - \\ & 114.5438*(\text{LOG}(\text{COL_VI})/\text{LOG}(\text{HYAL})) - \\ & 8.772354*(\text{LOG}(\text{PIIINP})) + 29.61084*(\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{HYAL})) + 155.1575*(\text{LOG}(\text{MMP2})) - \\ & 523.6594*(\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{MMP2})) - \\ & 184.6677*(\text{LOG}(\text{HYAL})/\text{LOG}(\text{MMP2})) \end{aligned} $	10
[1]	$ \begin{aligned} & -507.105+21.13922*(\text{LOG}(\text{HYAL})) - 64.02849*(\text{LOG}(\text{COL_IV})) - \\ & 116.0789*(\text{LOG}(\text{COL_VI})/\text{LOG}(\text{HYAL})) - \\ & 8.710835*(\text{LOG}(\text{PIIINP})) + 28.83564*(\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{HYAL})) + 154.0848*(\text{LOG}(\text{MMP2})) - \\ & 513.7398*(\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{MMP2})) - \\ & 174.771*(\text{LOG}(\text{HYAL})/\text{LOG}(\text{MMP2})) \end{aligned} $	10
[2]	$ \begin{aligned} & -517.258+21.9922*(\text{LOG}(\text{HYAL})) - 67.10076*(\text{LOG}(\text{COL_IV})) - \\ & 122.2884*(\text{LOG}(\text{COL_VI})/\text{LOG}(\text{HYAL})) - \\ & 7.559512*(\text{LOG}(\text{PIIINP})) + 30.00615*(\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{HYAL})) + 156.4279*(\text{LOG}(\text{MMP2})) - \\ & 527.1177*(\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{MMP2})) - \\ & 182.0914*(\text{LOG}(\text{HYAL})/\text{LOG}(\text{MMP2})) \end{aligned} $	20
[3]	$ \begin{aligned} & -521.186+17.72648*(\text{LOG}(\text{HYAL})) - 61.20226*(\text{LOG}(\text{COL_IV})) - \\ & 120.3493*(\text{LOG}(\text{COL_VI})/\text{LOG}(\text{HYAL})) - \\ & 7.928957*(\text{LOG}(\text{PIIINP})) + 30.4852*(\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{HYAL})) + 155.6176*(\text{LOG}(\text{MMP2})) - \\ & 493.4266*(\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{MMP2})) - \\ & 146.0582*(\text{LOG}(\text{HYAL})/\text{LOG}(\text{MMP2})) \end{aligned} $	20
[4]	$ \begin{aligned} & -562.9+30.0182*(\text{LOG}(\text{HYAL})) - 71.36396*(\text{LOG}(\text{COL_IV})) - \\ & 124.3929*(\text{LOG}(\text{COL_VI})/\text{LOG}(\text{HYAL})) - \\ & 7.39815*(\text{LOG}(\text{PIIINP})) + 31.28702*(\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{HYAL})) + 160.534*(\text{LOG}(\text{MMP2})) - \\ & 566.915*(\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{MMP2})) - \\ & 223.449*(\text{LOG}(\text{HYAL})/\text{LOG}(\text{MMP2})) \end{aligned} $	30

【 0 1 4 5 】

【化 8】

アルゴリズム 5a (ColVIとヒアルロン酸、ColIV、PIIINP、MMP2使用のバイナリアルゴリズム)

logit	$-19.3878+2.217337*(\text{LOG}(\text{HYAL}))-2.493531*(\text{LOG}(\text{COL_IV}))-$ $6.686058*(\text{LOG}(\text{COL_VI})/\text{LOG}(\text{HYAL}))+1.04518*(\text{LOG}(\text{PIIINP}))+1.356867*(\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{HYAL}))+2.546269*(\text{LOG}(\text{MMP2}))+16.17252*(\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{MMP2}))-$ $11.51533*(\text{LOG}(\text{HYAL})/\text{LOG}(\text{MMP2}))$
--------------	---

アルゴリズム 6 (ヒアルロン酸とColIV、PIIINP、TIMP-1使用)

[0]	$-139.611-0.550172*(\text{LOG}(\text{HYAL}))+31.12324*(\text{LOG}(\text{COL_IV}))-$ $17.36457*(\text{LOG}(\text{PIIINP}))+24.38884*(\text{LOG}(\text{TIMP1}))$
[1]	$-142.886-0.287819*(\text{LOG}(\text{HYAL}))+31.77958*(\text{LOG}(\text{COL_IV}))-$ $17.39204*(\text{LOG}(\text{PIIINP}))+24.28051*(\text{LOG}(\text{TIMP1}))$
[2]	$-141.391-0.36426*(\text{LOG}(\text{HYAL}))+30.81993*(\text{LOG}(\text{COL_IV}))-$ $16.4064*(\text{LOG}(\text{PIIINP}))+24.5837*(\text{LOG}(\text{TIMP1}))$
[3]	$-148.365+0.453879*(\text{LOG}(\text{HYAL}))+31.74657*(\text{LOG}(\text{COL_IV}))-$ $16.61532*(\text{LOG}(\text{PIIINP}))+24.50483*(\text{LOG}(\text{TIMP1}))$
[4]	$-164.746+1.023888*(\text{LOG}(\text{HYAL}))+33.94289*(\text{LOG}(\text{COL_IV}))-$ $16.35512*(\text{LOG}(\text{PIIINP}))+24.66699*(\text{LOG}(\text{TIMP1}))$

10

20

アルゴリズム 6a (ヒアルロン酸とColIV、PIIINP、TIMP-1使用のバイナリ結果)

logit	$-19.3878+2.217337*(\text{LOG}(\text{HYAL}))-2.493531*(\text{LOG}(\text{COL_IV}))-$ $6.686058*(\text{LOG}(\text{COL_VI})/\text{LOG}(\text{HYAL}))+1.04518*(\text{LOG}(\text{PIIINP}))+1.356867*(\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{HYAL}))+2.546269*(\text{LOG}(\text{MMP2}))+16.17252*(\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{MMP2}))-$ $11.51533*(\text{LOG}(\text{HYAL})/\text{LOG}(\text{MMP2}))$
--------------	---

以下の表 2 はアルゴリズム 1、2 及び 3 の診断性能を示す。カラム C は所定のアルゴリズムに関する 3 病理学者の統一見解評点とマーカーに基づく結果の間の比較の結果を報告するものであり；カラム A は 3 人の異なる病理学者により報告された評点の範囲とマーカーに基づく結果の間の比較の結果を報告するものであり；カラム B は試験の中核的な病理学者（単一の病理学者）により報告された評点とマーカーに基づく結果の間の比較の結果を報告するものである。ヒット率はマーカーに基づくアルゴリズム及び病理学者の S c h e u e r 評点により同一であると報告された評点のパーセントであり；カップ値は結果群の間の一致を報告するものであり、L__カップ及びU__カップはカップ値に関する信頼区間の下限及び上限を示し（95% C I）、N P V は 2 分割された評点システムに関する陰性予測値であり、P P V は 2 分割システムに関する陽性予測値である。

30

【 0 1 4 6 】

表 3 はアルゴリズム 4、5 及び 6 の診断性能を示す。カラム C は所定のアルゴリズムに関する 3 病理学者の統一見解評点とマーカーに基づく結果の間の比較の結果を報告するものであり；カラム A は 3 人の異なる病理学者により報告された評点の範囲とマーカーに基づく結果の間の比較の結果を報告するものであり；カラム B は試験の中核的な病理学者（単一の病理学者）により報告された評点とマーカーに基づく結果の間の比較の結果を報告するものであり；ヒット率はマーカーに基づくアルゴリズム及び病理学者の S c h e u e r 評点により同一であると報告された評点のパーセントであり；カップ値は結果群の間の一致を報告するものであり、L__カップ及びU__カップはカップ値に関する信頼区間の下限及び上限を示し（95% C I）、N P V は 2 分割された評点システムに関する陰性予測値であり、P P V は 2 分割システムに関する陽性予測値である。

40

【 0 1 4 7 】

【表 2】

表2

	アルゴリズム 1			アルゴリズム 2			アルゴリズム 3		
	C	A	B	C	A	B	C	A	B
ヒット率 (%) [0]	33.3	38.9	35.0	17.1	40.0	13.7	20.0	41.4	16.8
ヒット率 (%) [1]	36.8	42.7	36.0	80.7	81.6	75.8	74.6	77.2	71.7
ヒット率 (%) [2]	25.8	42.4	19.0	0.0	36.8	0.0	0.0	34.2	5.1
ヒット率 (%) [3]	26.1	34.8	22.2	6.4	17.0	5.2	12.8	21.3	9.3
ヒット率 (%) [4]	63.0	63.0	55.9	62.5	62.5	52.9	43.8	43.8	47.1
ヒット率 (%) 全て	35.9	42.9	33.8	42.2	54.2	36.7	39.5	51.2	36.7
N	468	468	793	301	301	626	301	301	626
カッパ	0.175	0.268	0.151	.	0.199	.	0.124	0.310	0.121
L_カッパ	0.119	0.211	0.109	.	0.134	.	0.056	0.235	0.077
U_カッパ	0.231	0.325	0.192	.	0.265	.	0.191	0.385	0.165
P(カッパ=0)	<0.0001	<0.0001	<0.0001	.	<0.0001	.	<0.0001	<0.0001	<0.0001
NPV (%) [0-1]	61.6	63.8	62.8	91.8	92.4	85.5	88.0	89.1	81.6
PPV (%) [2-4]	66.1	75.1	66.3	31.6	46.2	35.4	35.0	48.7	39.0
ヒット率 (%) 全て	63.5	68.4	64.2	68.4	74.4	65.8	67.4	73.4	64.9
カッパ	0.268	0.372	0.280	0.261	0.417	0.226	0.252	0.404	0.219
L_カッパ	0.182	0.291	0.214	0.160	0.315	0.152	0.146	0.299	0.142
U_カッパ	0.354	0.454	0.346	0.363	0.520	0.300	0.358	0.508	0.295
P(カッパ=0)	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
感度	0.539	0.584	0.540	0.712	0.794	0.613	0.651	0.740	0.578
特異性	0.729	0.791	0.739	0.679	0.730	0.671	0.681	0.732	0.674

10

20

【 0 1 4 8 】

【表 3 - 1】

表3

	C	C	C	B	B	B	A	A	A
	Alg.4	Alg.5	Alg.6	Alg.4	Alg.5	Alg.6	Alg.4	Alg.5	Alg.6
ヒット率 (%) 全て	32.8	36.1	34.4	35.8	35.5	34.3	43.1	45.8	44.1
ヒット率 (%) [0]	53.6	43.5	47.8	52.3	43.2	45.8	62.2	50.7	56.7
ヒット率 (%) [1]	18.6	35.4	33.6	24.9	30.6	27.8	27.9	43.4	42.1
ヒット率 (%) [2]	15.8	13.2	15.8	18.2	20.8	20.8	29.4	35.9	35.7
ヒット率 (%) [3]	27.7	38.3	25.5	31.9	36.3	29.7	37.8	50.0	34.1
ヒット率 (%) [4]	65.6	46.9	43.8	57.4	48.5	50.0	71.4	50.0	48.6
N	299	299	299	600	600	600	299	299	299

30

40

【 0 1 4 9 】

【表 3 - 2】

表3 (続き)

	C	C	C	B	B	B	A	A	A
	Alg.4	Alg. 5	Alg. 6	Alg. 4	Alg. 5	Alg. 6	Alg. 4	Alg 5	Alg 6
カッパ	0.146	0.176	0.154	0.174	0.176	0.164	0.274	0.302	0.280
L_カッパ	0.079	0.107	0.086	0.125	0.127	0.116	0.204	0.230	0.209
U_カッパ	0.213	0.246	0.223	0.223	0.225	0.212	0.344	0.374	0.351
P(カッパ=0)	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
バイナリ結果:	Alg 4b	Alg 5b	Alg6b	Alg4b	Alg5b	Alg6b	Alg4b	Alg5b	Alg6b
PPV (%) [2-4]	57.1	55.8	55.7	61.5	57.1	55.8	59.4	57.8	58.6
NPV (%) [0-1]	75.3	77.0	75.5	77.3	78.8	77.4	78.9	80.3	77.4
ヒット率 (%) 全て	67.2	66.6	66.2	70.5	67.8	66.5	70.2	69.2	68.6
カッパ	0.328	0.329	0.315	0.391	0.358	0.331	0.389	0.382	0.363
L_カッパ	0.221	0.224	0.208	0.317	0.285	0.258	0.284	0.280	0.258
U_カッパ	0.436	0.434	0.422	0.466	0.431	0.405	0.493	0.485	0.468
P(カッパ=0)	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
感度	65.0	70.1	66.7	66.9	73.3	71.6	69.3	73.9	69.5
特異性	68.7	64.3	65.9	72.8	64.3	63.2	70.8	66.3	68.0
N(AUC)	299	299	299	600	600	600	299	299	299
AUC(ROC)	0.748	0.756	0.768	0.765	0.765	0.771	0.839	0.846	0.860

(d) I s h a k 評点に関するアルゴリズム

以下のアルゴリズム 1 b、2 b、3 b、4 b、5 b、6 b、4 c、5 c 及び 6 c は I s h a k 評点システムにより評価された生検と肝臓疾患患者の群の血清マーカー濃度を相関させることにより計算した。

【0150】

全てのアルゴリズムは患者の 1 群 (マーカー発見コホート) からのマーカー結果及び病理評点を用いて誘導し、次に患者の別の群 (バリデーションコホート) における生検評点を予測するために使用した (計算評点)。計算された評点は、単一の病理学者により求め

10

20

30

40

50

られた評点と（事例 B）、3人の病理学者の統一見解評点と（事例 C）及び全ての病理学者に行き渡る範囲と（事例 A）比較した。カッパ値はアルゴリズムの検出力を評価するために計算した。

【0151】

新しい診断方法の検出力（感度、特異性、陽性予測値（PPV）、陰性予測値（NPV）及びレシーバーオペレーター特異的分析における曲線下面積）を評価するために通常使用される基準を使用できるように、組織学的分析により誘導された肝臓疾患評点及び血清マーカーアルゴリズムから誘導された計算評点を評点0～2を陰性読み取り値及び評点3～6を陽性読み取り値（Ishak評点）とするように2分割した。従って、真陽性、真陰性、擬似陰性及び擬似陽性に関する両方の方法の換算性を評価して、各アルゴリズムの感度、特異性、NPV、PPV及びROCAUCを求めた。アルゴリズム4a、5a、6aを参照できる。全ての例において、各々の異なるアルゴリズムを評価するための絶対基準として生検の結果を用いた。

10

【0152】

【化9】

アルゴリズム 1b: (ColVIとヒアルロン酸、ラミニン及びTIMP-1使用)

- [0] : $-107.752-0.347*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-1.493*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+34.879*\text{LOG}(\text{TIMP1})$
- [1] : $-112.550-0.301*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-1.086*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+35.617*\text{LOG}(\text{TIMP1})$
- [2] : $-114.626-0.760*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-1.270*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+35.819*\text{LOG}(\text{TIMP1})$
- [3] : $-121.339-2.065*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-2.910*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+36.593*\text{LOG}(\text{TIMP1})$
- [4] : $-119.289-1.009*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-1.271*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+36.449*\text{LOG}(\text{TIMP1})$
- [5] : $-125.551-2.966*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-2.536*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+36.797*\text{LOG}(\text{TIMP1})$
- [6] : $-133.055-3.256*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-2.329*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+37.695*\text{LOG}(\text{TIMP1})$

20

アルゴリズム 2b: (ColVIとヒアルロン酸、ラミニン及びTIMP-1使用)

30

- [0] : $-75.94035+23.20826*\text{LOG}(\text{TIMP1})-0.911827*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-0.295297*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})$
- [1] : $-76.0885+23.14058*\text{LOG}(\text{TIMP1})-1.221511*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-0.155608*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})$
- [2] : $-80.17664+23.6506*\text{LOG}(\text{TIMP1})-1.41651*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-0.210415*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})$
- [3] : $-79.12945+23.42277*\text{LOG}(\text{TIMP1})-1.582733*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-0.175959*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})$
- [4] : $-83.24617+23.7777*\text{LOG}(\text{TIMP1})-2.174834*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-0.311583*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})$
- [5] : $-89.60186+24.2615*\text{LOG}(\text{TIMP1})-3.237993*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-0.914309*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})$
- [6] : $-95.5774+25.11333*\text{LOG}(\text{TIMP1})-3.293235*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})-0.347014*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})$

40

【0153】

【化 1 0】

アルゴリズム 3b: (CoIVIとヒアルロン酸、CoIV及びPIIINP使用)

- [0] : $-100.6452+17.18813*\text{LOG}(\text{HYAL})+15.20461*\text{LOG}(\text{COL_IV}/\text{HYAL})+0.515498*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{PIIINP})$
 $+3.309452*\text{LOG}(\text{LAM})-15.47806*\text{LOG}(\text{COL_IV}/\text{MMP2})-17.50773*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{TIMP1})$
- [1] : $-98.87092+17.18161*\text{LOG}(\text{HYAL})+14.7876*\text{LOG}(\text{COL_IV}/\text{HYAL})+0.530071*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{PIIINP})$
 $+3.067209*\text{LOG}(\text{LAM})-14.74001*\text{LOG}(\text{COL_IV}/\text{MMP2})-17.62455*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{TIMP1})$
- [2] : $-104.8869+17.78543*\text{LOG}(\text{HYAL})+15.25944*\text{LOG}(\text{COL_IV}/\text{HYAL})+0.352181*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{PIIINP})$
 $+3.175207*\text{LOG}(\text{LAM})-15.56044*\text{LOG}(\text{COL_IV}/\text{MMP2})-17.97986*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{TIMP1})$ 10
- [3] : $-102.8131+17.32281*\text{LOG}(\text{HYAL})+14.69307*\text{LOG}(\text{COL_IV}/\text{HYAL})+0.176959*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{PIIINP})$
 $+2.822227*\text{LOG}(\text{LAM})-15.15272*\text{LOG}(\text{COL_IV}/\text{MMP2})-18.37351*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{TIMP1})$
- [4] : $-109.2574+18.44309*\text{LOG}(\text{HYAL})+15.53464*\text{LOG}(\text{COL_IV}/\text{HYAL})-0.152374*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{PIIINP})$
 $+2.957847*\text{LOG}(\text{LAM})-15.02773*\text{LOG}(\text{COL_IV}/\text{MMP2})-18.59138*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{TIMP1})$
- [5] : $-116.8556+19.00778*\text{LOG}(\text{HYAL})+15.47539*\text{LOG}(\text{COL_IV}/\text{HYAL})+0.436656*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{PIIINP})$
 $+3.995456*\text{LOG}(\text{LAM})-15.54302*\text{LOG}(\text{COL_IV}/\text{MMP2})-18.53013*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{TIMP1})$
- [6] : $-127.2084+21.66093*\text{LOG}(\text{HYAL})+17.77795*\text{LOG}(\text{COL_IV}/\text{HYAL})-0.631902*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{PIIINP})$
 $+3.589129*\text{LOG}(\text{LAM})-16.1393*\text{LOG}(\text{COL_IV}/\text{MMP2})-18.40445*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{TIMP1})$ 20

アルゴリズム 4b (CoIVIとヒアルロン酸、ラミニン及びTIMP-1使用)

-
- [0] : $-$
 $85.3739+0.961665*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})+1.975774*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+26.93966*\text{LOG}(\text{TIMP1})$
- [1] : $-$
 $86.2963+0.913679*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})+2.357299*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+27.03427*\text{LOG}(\text{TIMP1})$ 30
- [2] : $-$
 $89.8724+0.593663*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})+2.211646*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+27.50832*\text{LOG}(\text{TIMP1})$
- [3] : $-$
 $90.0047+0.396858*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})+2.230884*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+27.45883*\text{LOG}(\text{TIMP1})$ 40
- [4] : $-94.3636-$
 $0.0239*\text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL})+2.264267*\text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})+27.95567*\text{LOG}(\text{TIMP1})$
-

【 0 1 5 4 】

【化 1 1】

$$[5] \quad -98.1958- \\ 1.374361 * \text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL}) + 1.418031 * \text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM}) + 28.09921 * \text{LOG}(\text{TIMP1})$$

$$[6] \quad -106.131- \\ 1.60933 * \text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL}) + 1.83107 * \text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM}) + 29.03373 * \text{LOG}(\text{TIMP1})$$

アルゴリズム 4c (CoVIとヒアルロン酸、ラミニン及びTIMP-1使用のバイナリ結果)

10

$$\text{logit} \quad -8.5031 - 1.124282 * \text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL}) - 0.111367 * \text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM}) + 0.853129 * \text{LOG}(\text{TIMP1})$$

アルゴリズム 5b (CoVIとヒアルロン酸、CoIV、PIIINP、MMP2使用)

$$[0] \quad -509.93 + 21.03464 * (\text{LOG}(\text{HYAL})) - 65.28201 * (\text{LOG}(\text{COL_IV})) - \\ 115.3817 * (\text{LOG}(\text{COL_VI})/\text{LOG}(\text{HYAL})) - \\ 7.871581 * (\text{LOG}(\text{PIIINP})) + 30.02069 * (\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{HYAL})) + 154.8779 * (\text{LOG}(\text{MM} \\ \text{P2})) + 510.2511 * (\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{MMP2})) - 169.4857 * (\text{LOG}(\text{HYAL})/\text{LOG}(\text{MMP2}))$$

20

$$[1] \quad -503.533 + 19.84081 * (\text{LOG}(\text{HYAL})) - 62.38579 * (\text{LOG}(\text{COL_IV})) - \\ 116.4901 * (\text{LOG}(\text{COL_VI})/\text{LOG}(\text{HYAL})) - \\ 8.121259 * (\text{LOG}(\text{PIIINP})) + 29.14816 * (\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{HYAL})) + 153.1154 * (\text{LOG}(\text{MM} \\ \text{P2})) + 502.5139 * (\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{MMP2})) - 163.8827 * (\text{LOG}(\text{HYAL})/\text{LOG}(\text{MMP2}))$$

$$[2] \quad -510.288 + 18.37673 * (\text{LOG}(\text{HYAL})) - 62.65484 * (\text{LOG}(\text{COL_IV})) - \\ 117.3728 * (\text{LOG}(\text{COL_VI})/\text{LOG}(\text{HYAL})) - \\ 7.333193 * (\text{LOG}(\text{PIIINP})) + 29.35728 * (\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{HYAL})) + 154.7774 * (\text{LOG}(\text{MM} \\ \text{P2})) + 497.5602 * (\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{MMP2})) - 153.9391 * (\text{LOG}(\text{HYAL})/\text{LOG}(\text{MMP2}))$$

30

$$[3] \quad -516.935 + 20.14755 * (\text{LOG}(\text{HYAL})) - 65.87736 * (\text{LOG}(\text{COL_IV})) - \\ 123.3229 * (\text{LOG}(\text{COL_VI})/\text{LOG}(\text{HYAL})) - \\ 6.496054 * (\text{LOG}(\text{PIIINP})) + 30.54844 * (\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{HYAL})) + 156.3209 * (\text{LOG}(\text{MM} \\ \text{P2})) + 514.0645 * (\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{MMP2})) - 166.8154 * (\text{LOG}(\text{HYAL})/\text{LOG}(\text{MMP2}))$$

$$[4] \quad -522.377 + 14.67237 * (\text{LOG}(\text{HYAL})) - 59.18186 * (\text{LOG}(\text{COL_IV})) - \\ 122.7296 * (\text{LOG}(\text{COL_VI})/\text{LOG}(\text{HYAL})) - \\ 6.823173 * (\text{LOG}(\text{PIIINP})) + 30.7857 * (\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{HYAL})) + 155.904 * (\text{LOG}(\text{MMP2} \\)) + 478.6378 * (\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{MMP2})) - 127.6343 * (\text{LOG}(\text{HYAL})/\text{LOG}(\text{MMP2}))$$

40

【 0 1 5 5 】

【化 1 2】

アルゴリズム 5b (続き)

[5]	$-526.233+18.20806*(\text{LOG}(\text{HYAL}))-61.05469*(\text{LOG}(\text{COL_IV}))-$ $120.2586*(\text{LOG}(\text{COL_VI})/\text{LOG}(\text{HYAL}))-$ $7.691697*(\text{LOG}(\text{PIIINP}))+31.24435*(\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{HYAL}))+155.7383*(\text{LOG}(\text{MMP2}))+489.0154*(\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{MMP2}))-140.9856*(\text{LOG}(\text{HYAL})/\text{LOG}(\text{MMP2}))$	
[6]	$-563.804+28.52903*(\text{LOG}(\text{HYAL}))-70.11008*(\text{LOG}(\text{COL_IV}))-$ $125.5272*(\text{LOG}(\text{COL_VI})/\text{LOG}(\text{HYAL}))-$ $6.321247*(\text{LOG}(\text{PIIINP}))+31.79617*(\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{HYAL}))+160.3625*(\text{LOG}(\text{MMP2}))+555.8114*(\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{MMP2}))-210.7424*(\text{LOG}(\text{HYAL})/\text{LOG}(\text{MMP2}))$	10

アルゴリズム 5c (CoIVIとヒアルロン酸、CoIV、PIIINP、MMP2使用の
バイナリ結果)

logit	$-20.8717+2.11973*(\text{LOG}(\text{HYAL}))-2.531717*(\text{LOG}(\text{COL_IV}))-$ $7.252597*(\text{LOG}(\text{COL_VI})/\text{LOG}(\text{HYAL}))+1.083647*(\text{LOG}(\text{PIIINP}))+1.493234*(\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{HYAL}))+2.794571*(\text{LOG}(\text{MMP2}))+16.07724*(\text{LOG}(\text{COL_IV})/\text{LOG}(\text{MMP2}))-$ $10.7448*(\text{LOG}(\text{HYAL})/\text{LOG}(\text{MMP2}))$	20
--------------	--	----

アルゴリズム 6b (ヒアルロン酸とCoIV、PIIINP、TIMP-1 使用)

[0]	$-140.369-0.35106*(\text{LOG}(\text{HYAL}))+31.3799*(\text{LOG}(\text{COL_IV}))-$ $17.39524*(\text{LOG}(\text{PIIINP}))+24.34635*(\text{LOG}(\text{TIMP1}))$	30
[1]	$-143.724-0.15137*(\text{LOG}(\text{HYAL}))+32.39861*(\text{LOG}(\text{COL_IV}))-$ $17.67661*(\text{LOG}(\text{PIIINP}))+24.06137*(\text{LOG}(\text{TIMP1}))$	
[2]	$-143.915+0.002613*(\text{LOG}(\text{HYAL}))+31.49065*(\text{LOG}(\text{COL_IV}))-$ $17.03323*(\text{LOG}(\text{PIIINP}))+24.55546*(\text{LOG}(\text{TIMP1}))$	

【 0 1 5 6 】

【化 1 3】

$$[3] \quad -141.045 - 0.097252 * (\text{LOG}(\text{HYAL})) + 30.88321 * (\text{LOG}(\text{COL_IV})) - \\ 16.27152 * (\text{LOG}(\text{PIIINP})) + 24.43888 * (\text{LOG}(\text{TIMP1}))$$

$$[4] \quad -148.921 + 0.314333 * (\text{LOG}(\text{HYAL})) + 32.14539 * (\text{LOG}(\text{COL_IV})) - \\ 16.54838 * (\text{LOG}(\text{PIIINP})) + 24.51316 * (\text{LOG}(\text{TIMP1}))$$

アルゴリズム 6(b)(続き)

$$[5] \quad -154.316 + 1.19843 * (\text{LOG}(\text{HYAL})) + 32.1963 * (\text{LOG}(\text{COL_IV})) - \\ 17.33983 * (\text{LOG}(\text{PIIINP})) + 24.91516 * (\text{LOG}(\text{TIMP1}))$$

$$[6] \quad -166.646 + 1.258962 * (\text{LOG}(\text{HYAL})) + 34.30716 * (\text{LOG}(\text{COL_IV})) - \\ 16.25685 * (\text{LOG}(\text{PIIINP})) + 24.63731 * (\text{LOG}(\text{TIMP1}))$$

10

アルゴリズム 6c (ヒアルロン酸とCOLIV、PIIINP、TIMP-1使用のバイナリ結果)

$$\text{logit} \quad -7.86615 + 0.590389 * (\text{LOG}(\text{HYAL})) + 0.329412 * \\ (\text{LOG}(\text{COL_IV})) + 0.981143 * (\text{LOG}(\text{PIIINP})) + 0.314869 * (\text{LOG}(\text{TIMP1}))$$

20

以下の表 4 はアルゴリズム 1 a、2 a 及び 3 a の診断性能を示す。カラム C は所定のアルゴリズムに関する 3 病理学者の統一見解評点とマーカーに基づく結果の間の比較の結果を報告するものであり；カラム A は 3 人の異なる病理学者により報告された評点の範囲とマーカーに基づく結果の間の比較の結果を報告するものであり；カラム B は試験の中核的な病理学者（単一の病理学者）により報告された評点とマーカーに基づく結果の間の比較の結果を報告するものである。ヒット率はマーカーに基づくアルゴリズム及び病理学者の S c h e u e r 評点により同一であると報告された評点のパーセントである。

30

【0157】

カッパ値は結果群の間の一致を報告するものである。L__カッパ及びU__カッパはカッパ値に関する信頼区間の下限及び上限を示し（95%CI）、NPVは2分割された評点システムに関する陰性予測値であり、そしてPPVは2分割システムに関する陽性予測値である。

【0158】

【表 4】

	表4									
	アルゴリズム 1a			アルゴリズム 2a			アルゴリズム 3a			
	C	A	B	C	A	B	C	A	B	
ヒット率 (%) [0]	28.7	31.5	29.5	45.7	58.6	41.0	45.7	57.1	39.8	
ヒット率 (%) [1]	25.0	34.0	29.2	50.8	60.7	50.8	27.9	41.0	37.7	
ヒット率 (%) [2]	10.7	24.0	9.7	0.0	22.4	1.1	1.7	15.5	1.1	
ヒット率 (%) [3]	23.0	27.9	20.2	0.0	3.1	0.0	9.4	12.5	6.9	
ヒット率 (%) [4]	22.2	37.8	25.6	0.0	0.0	0.0	0.0	7.7	3.3	
ヒット率 (%) [5]	32.0	44.0	24.4	4.5	18.2	2.6	0.0	18.2	2.6	10
ヒット率 (%) [6]	57.4	57.4	51.1	71.9	71.9	60.9	43.8	43.8	52.2	
ヒット率 (%) すべて	27.1	34.6	27.3	28.9	39.5	28.1	22.3	32.6	25.2	
N	468	468	794	301	301	627	301	301	627	
カッパ	0.138	0.228	0.136	.	.	.	0.031	0.093	0.041	
L_カッパ	0.090	0.177	0.100	.	.	.	-0.02	0.039	0.006	
U_カッパ	0.186	0.279	0.173	.	.	.	0.084	0.147	0.076	
P(カッパ=0)	<0.0001	<0.0001	<0.0001	.	.	.	0.2293	0.0003	0.0152	
NPV (%) [0-2]	57.2	59.4	59.1	89.9	91.0	83.9	77.8	80.4	75.1	20
PPV (%) [3-6]	71.9	79.5	74.2	40.2	50.9	41.5	47.3	55.4	48.1	
ヒット率 (%) 全て	63.0	67.3	65.0	71.4	76.1	67.6	66.4	71.1	64.8	
カッパ	0.274	0.362	0.312	0.330	0.450	0.271	0.259	0.366	0.238	
L_カッパ	0.191	0.283	0.249	0.223	0.346	0.195	0.147	0.257	0.160	
U_カッパ	0.356	0.441	0.374	0.437	0.554	0.347	0.371	0.475	0.316	
P(カッパ=0)	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	
感度	0.524	0.561	0.537	0.703	0.770	0.617	0.558	0.626	0.547	
特異性	0.757	0.816	0.781	0.717	0.758	0.697	0.714	0.752	0.699	30

以下の表 5 はアルゴリズム 4 b、5 b 及び 6 b の診断性能を示す。カラム C は所定のアルゴリズムに関する 3 病理学者の統一見解評点とマーカーに基づく結果の間の比較の結果を報告するものであり；カラム A は 3 人の異なる病理学者により報告された評点の範囲とマーカーに基づく結果の間の比較の結果を報告するものであり；カラム B は試験の中核的な病理学者（単一の病理学者）により報告された評点とマーカーに基づく結果の間の比較の結果を報告するものであり；ヒット率はマーカーに基づくアルゴリズム及び病理学者の S c h e u e r 評点により同一であると報告された評点のパーセントであり；カッパ値は結果群の間の一致を報告するものであり、L_カッパ及びU_カッパはカッパ値に関する信頼区間の下限及び上限を示し（95% C I）、NPV は 2 分割された評点システムに関する陰性予測値であり、PPV は 2 分割システムに関する陽性予測値である。全ての表において、「バイナリ結果」は、低マーカー評点の群を「陰性」及び高マーカー評点の群を「陽性」と示すマーカー評点の群が形成されることを意味する。この方法を用いて、感度、特異性、NPV、PPV および ROC AUC に関する統計学的分析が可能となるバイナリまたは 2 分割結果を定義することができる。

【 0 1 5 9 】

【表 5 - 1】

表5

	C	C	C	B	B	B	A	A	A
	Alg. 4b	Alg. 5b	Alg 6b	Alg. 4b	Alg. 5b	Alg. 6b	Alg. 4b	Alg.5b	Alg 6b
ヒット率 (%)すべて	27.4	28.4	28.1	28.8	26.6	28.5	38.1	39.1	39.8
ヒット率 (%) [0]	44.9	34.8	43.5	43.9	29.0	41.9	54.8	40.9	50.7
ヒット率 (%) [1]	21.7	41.7	40.0	31.2	32.8	30.4	37.7	52.9	53.5
ヒット率 (%) [2]	3.4	12.1	6.9	6.7	12.2	8.9	9.3	21.4	14.3
ヒット率 (%) [3]	12.5	12.5	9.4	5.7	17.1	15.7	21.9	31.3	31.4
ヒット率 (%) [4]	26.9	15.4	11.5	27.3	14.5	10.9	36.0	36.0	28.0
ヒット率 (%) [5]	18.2	45.5	40.9	12.8	35.9	33.3	26.3	55.0	47.6
ヒット率 (%) [6]	65.6	34.4	34.4	53.7	43.3	44.8	71.4	37.5	38.7
N	299	299	299	601	601	601	299	299	299
カッパ	0.129	0.098	0.147	0.137	0.133	0.148	0.253	0.182	0.281
L_カッパ	0.070	0.043	0.089	0.095	0.092	0.106	0.189	0.124	0.217
U_カッパ	0.188	0.152	0.205	0.180	0.174	0.189	0.318	0.241	0.345
P(カッパ=0)	<	<	<	<	<	<	<	<	<
	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

10

20

30

40

【 0 1 6 0 】

【表 5 - 2】

表5(続き)	C	C	C	B	B	B	A	A	A	
	Alg. 4b	Alg. 5b	Alg 6b	Alg. 4b	Alg. 5b	Alg. 6b	Alg. 4b	Alg. 5b	Alg 6b	
バイナリ結果 :	Alg. 4c	Alg. 5c	Alg 6c	Alg 4c	Alg 5c	Alg 6c	Alg. 4c	Alg. 5c	Alg. 6c	10
PPV (%) [3-6]	54.8	56.0	54.7	60.7	56.4	55.1	55.6	57.4	56.8	
NPV (%) [0-2]	74.9	79.1	77.5	76.6	78.4	78.5	76.0	82.3	79.4	
ヒット率 (%) 全て	66.6	68.2	66.9	70.2	67.7	66.7	67.6	70.6	68.9	20
カッパ	0.301	0.355	0.326	0.376	0.350	0.336	0.321	0.402	0.367	
L_カッパ	0.192	0.251	0.220	0.301	0.276	0.263	0.212	0.300	0.262	
U_カッパ	0.411	0.460	0.432	0.452	0.423	0.409	0.430	0.504	0.471	
P(カッパ=0)	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	30
感度	60.7	70.5	67.9	63.6	71.0	72.3	62.2	74.3	70.5	
特異性	70.1	66.8	66.3	74.3	65.7	63.2	70.7	68.4	67.9	
N(AUC)	299	299	299	601	601	601	299	299	299	40
AUC(ROC)	0.756	0.764	0.775	0.769	0.769	0.775	0.840	0.846	0.862	

(e) Scheuer 評点に関するレシーバーオペレーター特性 (ROC) 曲線

患者を Scheuer 評点に関するカテゴリ無 / 軽度線維症 (評点 0 ~ 1) 及び中等度 / 重度線維症 (評点 2 ~ 4) に分類すること、及び、2 分割結果に関するアルゴリズムを計算することにより、以下の結果が得られた。

【0161】

【化 1 4】

アルゴリズム7:

LOGIT=

7.11957755-0.67952658

LOG(TIM P1)+1.01832374*LOG(COL_VI/HYAL)+0.09461778*LOG(HYAL/LAM)

アルゴリズム8:

LOGIT=

8.6908419-0.76944684*LOG(HYAL)-0.47836706*LOG(COL_IV)+0.43870798*LOG(COL_VI/PIIINP)

+0.74453459*LOG(COL_VI/TIMP1)+0.05605262*LOG(HYAL/MMP2)-

0.01871531*LOG(LAM/MMP9T)

10

アルゴリズムを使用して S c h e u e r 評点に関するカテゴリ無 / 軽度線維症 (評点 0 ~ 1) 及び中等度 / 重度線維症 (評点 2 ~ 4) についてレシーバーオペレーター特性曲線を計算した。計算された評点は単一の病理学者により求められた評点と (事例 B) 、 3 人の病理学者の統一見解評点と (事例 C) 及び全ての病理学者に行き渡る範囲と (事例 A) 比較した。曲線下面積 (A U C) 値が計算されている。

20

【 0 1 6 2】

表 6 はアルゴリズム 7 および 8 の診断性能を示す。カラム C は所定のアルゴリズムに関する 3 病理学者の統一見解評点とマーカーに基づく結果の間の比較の結果を報告するものであり ; カラム A は 3 人の異なる病理学者により報告された評点の範囲とマーカーに基づく結果の間の比較の結果を報告するものであり ; カラム B は試験の中核的な病理学者 (単一の病理学者) により報告された評点とマーカーに基づく結果の間の比較の結果を報告するものである。表によれば、「バイナリ結果」は、評点 0 および 1 の群を「陰性」及び評点 2 ~ 4 点の群を「陽性」と示すマーカー評点の群が形成されることを意味する (S c h e u e r) 。 A U C はレシーバーオペレーター特性分析における曲線下面積を意味する。 N は検査した対象の数である。

30

【 0 1 6 3】

【表 6】

表6

	アルゴリズム7			アルゴリズム8		
	C	A	B	C	A	B
AUC	0.759	0.899	0.759	0.746	0.871	0.756
N	295	295	569	291	291	562

40

(f) I s h a k 評点に関するレシーバーオペレーター特性 (R O C) 曲線

患者を I s h a k 評点に関するカテゴリ無 / 軽度線維症 (評点 0 ~ 2) 及び中等度 / 重度線維症 (評点 3 ~ 6) に分類すること、及び、 2 分割結果に関するアルゴリズムを計算することにより、以下の結果が得られた。

【 0 1 6 4】

【化 1 5】

アルゴリズム 7a:

LOGIT =

$$7.22920269 - 0.68033581 * \text{LOG}(\text{TIMP1}) + 1.04300795 * \text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{HYAL}) + 0.08483109 * \text{LOG}(\text{HYAL}/\text{LAM})$$

アルゴリズム 8a:

LOGIT =

$$8.92321331 - 1.28340678 * \text{LOG}(\text{HYAL}) - 0.54350583 * \text{LOG}(\text{COL_IV}/\text{HYAL}) + 0.47836792 * \text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{PIIINP}) + 0.02076678 * \text{LOG}(\text{LAM}) + 0.07719237 * \text{LOG}(\text{COL_IV}/\text{MMP2}) + 0.76194671 * \text{LOG}(\text{COL_VI}/\text{TIMP1})$$

10

アルゴリズムを使用して I s h a k 評点に関するカテゴリ無 / 軽度線維症 (評点 0 ~ 2) 及び中等度 / 重度線維症 (評点 3 ~ 6) についてレシーバーオペレーター特性曲線を計算した。計算された評点は単一の病理学者により求められた評点と (事例 B)、3 人の病理学者の統一見解評点と (事例 C) 及び全ての病理学者に行き渡る範囲と (事例 A) 比較した。表 7 に示す通り曲線下面積 (A U C) 値が計算されている。

【 0 1 6 5】

表 7 はアルゴリズム 7 a 及び 8 a の診断性能を示す。カラム C は所定のアルゴリズムに関する 3 病理学者の統一見解評点とマーカーに基づく結果の間の比較の結果を報告するものであり ; カラム A は 3 人の異なる病理学者により報告された評点の範囲とマーカーに基づく結果の間の比較の結果を報告するものであり ; カラム B は試験の中核的な病理学者 (単一の病理学者) により報告された評点とマーカーに基づく結果の間の比較の結果を報告するものである。表によれば、「バイナリ結果」は、評点 0 および 2 の群を「陰性」及び評点 3 ~ 6 点の群を「陽性」と示すマーカー評点の群が形成されることを意味する (I s h a k)。A U C はレシーバーオペレーター特性分析における曲線下面積を意味する。N は検査した対象の数である。

20

【 0 1 6 6】

【表 7】

30

表 7

	アルゴリズム 7a			アルゴリズム 8a		
	C	A	B	C	A	B
AUC	0.763	0.887	0.763	0.751	0.861	0.757
N	295	295	570	292	292	564(g)

群分けされた評点及び複数のマーカー

肝線維症血清マーカー P I I I N P、コラーゲン I V、コラーゲン V I、テネイシン、ラミニン、ヒアルロナン、M M P - 2、T I M P - 1 および M M P - 9 / T I M P - 1 複合体並びに年齢、性別及びトランスアミナーゼ値もまた、I s h a k 評点を以下の 3 群、即ち第 1 群 I s h a k 評点 0 および 1 ; 第 2 群 : I s h a k 評点 2、3 及び 4、及び、第 3 群 : I s h a k 評点 5 及び 6 に群分けすることにより、無 / 軽度線維症、中等度線維症および重度線維症の群に患者を層化するために有用である。個々のマーカー、例えば、ヒアルロナン、P I I I N P、M M P 2、コラーゲン I V 及び T I M P - 1 は肝線維症の重症度に相関しているが、マーカーの組み合わせが明らかに優れた診断性能を与える。試験のこの特徴は群分けされた評点により評価されたものとして肝線維症の重症度への個々のマーカーの相関を示すが、アルゴリズム 9、1 0 及び 1 1 はアルゴリズムに 1 つより多いマーカーを組み合わせることにより達成できる改善点を例示している。

40

50

ヒアルロン酸

ヒアルロン酸は肝線維症の段階との歴史的に最も良好な関連を示している。ヒアルロン酸に関する判別関数（自然対数単位）は全ての他のアルゴリズムの開発のためにも使用された訓練コホートに対して開発された。判別評点（ D_{HA} ）は以下の通り示される。

【0167】

$$D_{HA} = -3.97 + 1.016 \ln(HA)$$

生検の読み取り値と比較した場合の判別評点の検討によれば、Ishak 評点は以下の通り群分けされることが示唆される。

【0168】

【化16】

10

Ishak 評点	疾患状態
0-1	無または軽度の線維症
2-4	中等度の線維症
5-6	重度の線維症

20

上記した態様でIshakシステムを変更すると以下のトレーニングセットの判別関数が得られた。

【0169】

$$D_{HA} = -3.70 + 0.992 \ln(HA)$$

全マーカーのバリデーションのために使用されたバリデーションセットから得られたヒアルロン酸マーカーの結果のプロセッシングによれば、このマーカー単独に基づいた3群の明確に区別される分離が示されている。カットオフ値は重度及び中等度の線維症を検出するための85%感度を達成するために選択した。これらの群を非/軽度線維症群から分離する特異性を計算した。以下の表7aはカットオフ値をそれぞれの特異性と共に示す。

【0170】

30

【表7a】

表7a

85%感度におけるカットオフ及び
無または軽度線維症と比較した特異性

ヒアルロン酸

疾患状態	カットオフ	特異性
重度線維症	-0.135	43.1%
中等度線維症	-1.23	22.9%

40

3型プロコラーゲン（PIIINP）のアミノ末端プロペプチド

トレーニングコホートにおいて求めたこのマーカーに関する判別関数は以下の通りである。

【0171】

50

$$D_{PIIINP} = -2.657 + 1.646 * \ln(PIIINP)$$

バリデーション群のPIIINP濃度から誘導された判別評点を計算すると、群間に明確な分離が存在している。85%感度水準においてマーカーPIIINPが無/軽度および中等度各々重度の疾患の間を分離する特異性を以下の表7bに示す。

【0172】

【表7b】

表7b

85%感度におけるカットオフ及び

無または軽度線維症と比較した特異性

10

PIIINP

疾患状態	カット オフ	特異性
重度線維症	-0.135	65.3%
中等度線維症	-0.855	30.5%

20

マトリックスメタロプロテイナーゼ2 (MMP2)

再度トレーニングコホートにおいて求めたこの試験に関する判別関数は以下の通りである。

【0173】

$$D_{MMP2} = -15.0 + 2.354 \ln(MMP2)$$

バリデーション群のMMP2濃度から誘導された判別評点を計算すると、群間に明確な分離が存在している。85%感度水準においてマーカーMMP2が無/軽度および中等度各々重度の疾患の間を分離する特異性を以下の表7cに示す。

【0174】

【表7c】

30

表7c

85%感度におけるカットオフ及び

無または軽度線維症と比較した特異性

MMP2

疾患状態	カット オフ	特異性
重度線維症	-0.276	43.3%
中等度線維症	-0.664	12.7%

40

コラーゲンIV

再度トレーニングコホートにおいて求めたコラーゲンIVに関する判別関数は以下の通りである。

50

【 0 1 7 5 】

$$D_{C o 1 4} = - 1 1 . 3 4 1 + 2 . 2 7 3 L n (\text{コ ラ ー ゲ ン I V})$$

バリデーション群のコラーゲンIV濃度から誘導された判別評点を計算すると、群間に明確な分離が存在している。85%感度水準においてマーカーコラーゲンIVが無/軽度および中等度各々重度の疾患の間を分離する特異性を以下の表7dに示す。

【 0 1 7 6 】

【 表 7 d 】

表7d

85%感度におけるカットオフ及び

10

無または軽度線維症と比較した特異性

コラーゲン IV

疾患状態	カット オフ	特異性
重度線維症	-0.421	52.6%
中等度線維症	-0.887	22.6%

20

I型メタロプロテイナーゼ組織阻害剤 (T I M P - 1)

群分けされたIshak範疇を有意に判別する唯一の他の単一のマーカーはTIMP-1であった。この判別関数は以下の通りである。

【 0 1 7 7 】

$$D_{T I M P 1} = - 1 3 . 2 8 9 + 2 . 0 3 6 * L n (T I M P - 1)$$

バリデーション群のコラーゲンIV濃度から誘導された判別評点を計算すると、群間に明確な分離が存在している。85%感度水準においてマーカーTIMP-1が無/軽度および中等度各々重度の疾患の間を分離する特異性を以下の表7eに示す。

30

【 0 1 7 8 】

【 表 7 e 】

表7e

85%感度におけるカットオフ及び

無または軽度線維症と比較した特異性

TIMP-1

疾患状態	カット オフ	特異性
重度線維症	-0.673	34.1%
中等度線維症	-1.014	21.1%

40

(h) 複数のマーカー

試験のこの特徴は診断アルゴリズム内に1つより多い血清マーカーを組み合わせることにより達成できる改善点を示している。

50

【 0 1 7 9 】

アルゴリズム 9 は P I I N P 及びコラーゲン I V を含む。マーカー発見コホートから誘導された判別関数は以下の通りである。

$$D_{M1} = -7.522 + 1.21 \text{Ln}(\text{コラーゲンIV}) + 0.947 \text{Ln}(P I I I N P)$$

バリデーション群のアルゴリズム 9 から誘導された判別評点を計算すると、群間に明確な分離が存在している。85%感度水準においてアルゴリズム 9 が無/軽度および中等度各々重度の疾患の間を分離する特異性を以下の表 7 f に示す。

【 0 1 8 0 】

【表 7 f】

10

表 7f

85%感度におけるカットオフ及び
無または軽度線維症と比較した特異性

アルゴリズム 9

疾患状態	カット オフ	特異性
重度線維症	-0.074	71.9%
中等度線維症	-0.862	24.8%

20

数値は 85%感度水準において顕著な特異性の増大を示しているが、アルゴリズム 9 と P I I I N P 単独の特異性を重度疾患に関する比較、即ち相関比例に関する M c N e m a r 試験は増大は 0.05 水準では優位でないことを示している。0.07 の厳密な p は有意性の傾向を示すことに留意しなければならない。アルゴリズム 9 は全ての単一のマーカーにより誘導される I s h a k 評点より高性能であることを示しているが 0.1 水準では有意であり。中等度疾患軍と比較した特異性には有意な増大は無い。

30

【 0 1 8 1 】

アルゴリズム 10

ヒアルロン酸をマーカー発見コホートとともにアルゴリズム 9 に加えることにより以下の判別関数を得た(アルゴリズム 10)。

$$D_{M o d e I I I} = -6.704 + 0.749 \text{Ln}(\text{コラーゲンIV}) + 0.607 \text{Ln}(\text{ヒアルロン酸}) + 0.436 \text{Ln}(P I I I N P)$$

バリデーション群のアルゴリズム 10 から誘導された判別評点を計算すると、群間に明確な分離が存在している。85%感度水準においてアルゴリズム 10 が無/軽度および中等度各々重度の疾患の間を分離する特異性を以下の表 7 g に示す。

40

【 0 1 8 2 】

【表 7 g】

表7g

85%感度におけるカットオフ及び
無または軽度線維症と比較した特異性

アルゴリズム 10

疾患状態	カット オフ	特異性
重度線維症	-0.080	79.3%
中等度線維症	-0.919	31.4%

10

McNemar²は高度に有意であり、アルゴリズム10がPIIINP単独または何れの他の単一のマーカーよりも遥かに優れていることを示している。アルゴリズム10はまた0.05有意水準においてアルゴリズム9より優れている。

【0183】

20

アルゴリズム11 (PIIINP、コラーゲンIV、ヒアルロン酸及びMMP2)

バリデーション群のアルゴリズム11から誘導された判別評点を計算すると、群間に明確な分離が存在している。85%感度水準においてアルゴリズム11により達成される無/軽度および中等度各々重度の疾患の間を分離する特異性を以下の表7hに示す。

【0184】

【表7h】

表7h

85%感度におけるカットオフ及び
無または軽度線維症と比較した特異性

30

アルゴリズム 11

疾患状態	カット オフ	特異性
重度線維症	-0.229	80.6%
中等度線維症	-0.662	32.5%

40

アルゴリズム11は各単一のマーカーの結果と比較して85%感度水準において特異性の改善を示しているが、アルゴリズム10を超えたアルゴリズム11の改善は調べた試料サイズでは有意性に到達しておらず、McNemar² = 2.18、p = 0.14である。感度に到達していなかった性能の全ての他の改善に関しては、より大きい患者コホートが検討されれば起こる可能性が高いものである。

【0185】

2. 肝臓疾患の進行の長期にわたるモニタリング

試験開始時及び終了時に採取した肝生検試料を用いて2年間に渡り85名の患者をモニタリングした。血清は全患者より、そして、試験期間の異なる1~8時点において採取し

50

た。

【 0 1 8 6 】

マーカー誘導計算病理評点は以下の記号論理的回帰により計算した。

【 0 1 8 7 】

【 化 1 7 】

$$D = -10.06 + 0.814 \ln(\text{CRATIO}) + 0.640 \ln(\text{HYALURON}) + 0.639 \ln(\text{MMP2}) + 0.431 \ln(\text{P3NP}) \quad (\text{アルゴリズム12})$$

アルゴリズム 1 2 において、C R A T I O はコラーゲン V I 及びコラーゲン I V の血清値の比率を意味する。 10

【 0 1 8 8 】

以下の表 8 は試験バリデーションコホートの患者から得た判別評点 (アルゴリズム 1 2) がどのようにしてその相当する組織病理学的評点の周囲にクラスタリングするかをまとめたものである。

【 0 1 8 9 】

【 表 8 】

表8

Ishak 評点	n	平均	SD	SE	平均の95%CI		メジアン	メジアンの95%CI	
					下	上		下	上
0	155	-0.770	0.823	0.066	-0.900	-0.639	-0.890	-1.040	-0.730
1	125	-0.612	0.795	0.071	-0.753	-0.471	-0.620	-0.820	-0.480
2	90	-0.203	1.041	0.109	-0.421	0.016	-0.325	-0.500	-0.090
3	70	-0.001	1.102	0.132	-0.264	0.261	-0.220	-0.400	0.280
4	55	0.291	1.126	0.152	-0.013	0.596	0.170	-0.190	0.550
5	39	0.907	1.176	0.188	0.526	1.288	0.690	0.260	1.290
6	67	1.538	1.396	0.171	1.197	1.878	1.520	1.310	1.890

個々の評点に対して照会可能とするカットオフ値は、分離すべき相当する判別評点の平均を取ることにより確立した。計算された肝臓疾患評点を使用してノンパラメトリックの回帰を計算することにより傾きを得た (疾患重症度 v s 時間 ; 回帰係数の T h e i l 推定子)。各傾きに関して定義された信頼変数 を用いて各傾きにつき 9 5 % 信頼区間を計算した。 は以下の値を有する。 40

= 傾き > 0 であり 9 5 % C I がゼロを含まない場合 1 (陽性)

傾きに関する 9 5 % C I がゼロを含まない場合 0

傾きが負であり 9 5 % C I がゼロを含まない場合 - 1 (陰性)

従って、 は以下の通り定義した。

= I s h a k 評点が少なくとも 2 水準減少した場合 - 1 (改善)

I s h a k 評点が ± 1 の場合 0 (不変) 50

I s h a k 評点が少なくとも2水準増大した場合1（進行）

これら2つの定義を用いて、85人の患者の結果について、3×3の換算表をセットアップすることにより表9に示す以下の結果を得た。

【0190】

【表9】

表9

傾き (v)	病理変化 (w)			合計
	-1	0	1	
-1	1	11	0	12
0	6	41	7	54
1	1	13	5	19
合計	8	65	12	85

10

20

表9は疾患の進行（病理評価）を有していた12患者につき、何れの患者も低下した判別評点を有していなかったことを示している。更にまた、疾患の改善を示した患者については、1人のみが正の傾きを有していた。全体として、換算性は0.1水準で有意であり、肝臓疾患の進行及び後退を長期的にモニタリングする血清マーカーに基づくアルゴリズムの能力を照明していた。

多施設（「ELF」）試験の別の分析

ELF試験において収集されたデータをデータの統計学的分析のための別の方法を用いて再分析した。

30

【0191】

ELF試験における本発明の実施形態の性能を2種の広範に許容されている組織学的段階付けシステムと比較した。組織学的段階付けは欠点のある予測に基づいている。第1に全段階付けシステムは、「無」から「肝硬変」への線維症の範囲を示す段階を区別するために生検試料にカテゴリカルな値を病理学者が割り付けることを必要とする。この病理範囲は継続的な変数の評点によりより正確に示されるはずである。第2にScheuer及びIshak組織学的段階付けシステムは両方とも段階間の進行の直線性を予測しているが、4の段階は必ずしも2の段階の二倍悪いわけではないことは広く認識されている。（30A；31A）。

40

【0192】

この第2の予測を対象として、本発明の実施形態を用いて線維症のある範囲に渡ってアルゴリズム評点の分布を調べることにより組織学的疾患重症度と共にどのように評点変動するかを調べた。以前の代理マーカー試験は、専門家の意見及び組織学的段階を経由する進行は直線的であるという予想に基づいて、「無または軽度の線維症」及び「中等度または重度の線維症」を示すものとして捕らえられる2群に組織学的段階を自由に二分化していた。次にこれらの二分化段階を用いて血清マーカー評点に組織学的性能を比較した。

【0193】

本分析においては、肝組織学的段階の群分け及びマーカー評点とのその相関に関しては予測を行わなかった。マーカーデータをプロットしたところ、Scheuerの段階2及び3、及び、Ishakの段階3及び4の間の点における組織学段階の二分化に相関した

50

明確な分割の2つの自然な群分けが判明した。データは、これらの段階の変化が疾患の進行における生物学的に有意な通過点を表すことを示している。

【0194】

特に9種の血清線維症マーカー及び肝線維症の間の関係を、前に記載したELF試験における13施設において慢性肝臓疾患の検査の部分として得られた1,021対象由来の肝生検試料の組織学的検査により調べた。試験への患者の採用は図1に示す通りである。

【0195】

ELF試験においては、対象は、6ヶ月より長期に渡り持続している異常な生化学的肝機能試験値として定義される慢性肝臓疾患の検査のための肝生検を受ける予定である場合に的確と見なした。更に別の参加基準はインフォームドコンセントを出す能力、18歳より年長、及び75歳未満とした。患者はその年齢がこの範囲に属さない場合；リウマチ性、腎または肺の疾患を含む肝線維症以外に関連する何れかの障害を有する場合；心臓血管疾患またはガンを有する場合；代償不全の証拠を伴う進行肝硬変（Child-PughクラスC）；アスピリン常用；または肝細胞癌または薬物誘導肝臓疾患を有する場合には試験から除外した。

【0196】

採用した1,021対象のうち、各診断カテゴリ中の数は慢性C型肝炎496；アルコール性肝臓疾患64；原発性胆汁性肝硬変または原発性硬化性胆管炎53；脂肪肝61；B型肝炎61；肝移植後の再発性疾患48；自己免疫性肝炎45；ヘモクロマトーシス32；特発性肝硬変19；BおよびC型肝炎4；その他（未知の病因の肉芽腫性疾患および正常者を含む）138であった。弾性が試料の63%に相当し；平均年齢は44.1歳、標準偏差=12.8年、範囲=19~25歳であった。GA、GT、GVまたは体型測定群において対象間の有意差はなかった。

【0197】

日常的な血液検査に加えて血清試料も肝生検時に採取し、迅速に処理した。Bayer IMMUNO 1TMシステム上で実行するために9種の異なるイムノアッセイを開発した。上記したBayer Immuno 1システム用のフォーマットされた異種ELISA型試験を使用した。肝線維症に関連する基本的機序の知見に基づいて、分子標的のフルパネルをマトリックスの合成または分解の代理マーカーとして選択した。試験に使用した抗体対及びその入手元は、異なる肝線維症評点の間を判別する変数を決定するための判別関数分析の使用に関する本明細書に記載した考察との関連において前に記載した抗体対及び入手元と同様であった。血清マーカー評点の何れも不明確とは考えられなかった。

【0198】

全生検試料は現地において、そして、1人の中核的病理学者（A）により分析された。臨床的詳細または生化学的試料は45対象において不完全であり、残り976生検試料中55検体は不十分な長さ（<12mm）及び少量過ぎる門脈管のため完全な組織学的分析のためには不十分であると考えられた。生検試料、血清試料及び臨床的詳細は群G_Aを構成する最終分析の対象となった921対象について入手可能であった。

【0199】

3人の熟練した肝病理学者が試験に参加した。中核的な病理学者（A）はScheuer（27）及びIschak（28）の段階付けシステムを用いて921生検試料を評価した。慢性のウイルスまたは免疫性の肝炎以外の条件については、基準の記載の変更を行うことにより線維症（例えば、アルコール性及び非アルコール性の脂肪肝炎、細静脈周囲及び細胞周囲の線維症により置換された門脈及び門脈周囲の線維症）の分布が反映されるようにした。この群はG_Aと標記し、そして試験及びバリデーションセットを誘導することはこの群の試料から行うものとした。病理学者A及びBは別々の試験において呈示される慢性肝臓疾患の範囲が反映されるスライドの「コーティング」セットを使用することにより、最初はその評点を調和させた後に試験の生検試料を評価した。病理学者CはA及びBと同じIschak及びScheuerのシステムに関する記載を使用した。この群は「コーティング」を受けることなく生検試料を段階付けした。病理学者Aは病理学者B及びCにより独立

10

20

30

40

50

してやはり段階付けされた G_c と標記される 620 検体の「統一見解セット」を含む全 921 生検試料を再段階付けした。個々の線維症の段階 (Scheuer 0~4 及び Ishak 0~6) を記録した。

【0200】

このようにして、4シリーズの段階付けセットを作成した。中核病理学者のものは R_{A_1} 及び R_{A_2} と標記し、病理学者 B のものは R_B そして病理学者 C のものは R_C とした。これらの段階付けの比較により観察者内変動 (R_{A_1} vs R_{A_2})、研究セッティングを反映する「コーチング」された病理学者間の観察者間変動 (R_{A_1} vs R_B) 及び個別に作業を行うが共有の評点システムを使用する熟練肝臓病理学者間の観察者間変動 (R_{A_1} vs R_C および R_B vs R_C) の検討が可能となる。これらの後者の比較は臨床慣行において関連する状況を正確に反映している。

10

(a) 分析手法

血清マーカーを組み合わせたアルゴリズムを誘導するために 400 症例 (G_T) の群を生検試料のある 921 患者の群から無作為に選択した。マーカーのアルゴリズムへの付加が群間の全体的な一般化距離を増大させればそれを含めることによりアルゴリズムを開発した。臨床化学及び血液学的試験の結果もまたこの方法により調べた。旨適アルゴリズムを選択肢、次にそのアルゴリズムの性能を病理学者 A により割り付けられた段階付けを用いてバリデーション群 (G_V) と標記される G_A の 521 生検試料の残余セットにおいてバリデーションした。このアルゴリズムが組織学的な線維症の段階付けの間を区別する能力に関連する性能特性の分析を用いて、より低い組織学的線維症段階付けを有する症例間をより高い段階付けのものから区別するブレイクポイントを発見し、これにより肝線維症の真の生物学的進行を反映するバイナリ結果を作成した。この方法は線維症の進行の直線性に関する予測を回避するものである。アルゴリズムの性能の再現性は病理学者 B および C により割り付けられた生検試料の段階付けに対抗するその性能を測定することにより評価した。

20

【0201】

体型測定画像分析は Kontron 画像分析器及び Pico Sirius Red / Fast Green で 836 検体の適当な生検試料を染色した後に検出された総肝組織の比率として線維症の面積を測定するための実地編集を可能にする相互プログラムを用いて実施した。線維性組織について陽性染色された全切片の比率を各場合につき測定し、平均値を求めた (20A)。

30

【0202】

適用した統計学的方法はバイナリ群分けされた生検試料の段階に関する分散分析 (ANOVA)、判別式分析及び記号論理的回帰を使用した。カッパ統計値を計算することにより病理学者間の一致を調べた。感度、特異性、陽性予測値 (PPV)、陰性予測値 (NPV) およびバイナリ結果の優勢度を ROC 分析を用いて調べた。全ての分析は SPSS (登録商標) ソフトウェアパッケージ (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) を用いて実施した。

(b) 結果

全ての場合において、Scheuer 段階付けに関する病理学者間の一致は Ishak 段階付けに関するものを超えていた。病理学者 A により割り付けられた段階付けの 2 セット (R_{A_1} および R_{A_2}) の間の一致の水準は高値であった (カッパ > 0.9 (Scheuer) 及び 0.76 (Ishak))。

40

【0203】

試験の主要目的は有意な組織学的線維症を発見する血清マーカーの能力を調べることであった。 G_T 及び G_V における各マーカーに関する平均、メジアン及び平均の標準誤差 (SEM) を求めた。多変量 ANOVA によれば組み合わせた全てのマーカーに関して群間の差は無かった (Hotelling の $T = 0.01$ 、 $F = 1.14$ 、 $df_1 = 9$ 、 $df_2 = 911$ 、 $p = 0.33$)。関連する個々の t 検定の検討によれば何れの個々のマーカーに関しても群間に有意差は無かった。カイ自乗検定によれば各群に関し病因論的分割に

50

差は無かった（尤度比カイ自乗 = 6.34、df = 6、p = 0.38）（データ示さず）。

【0204】

血清マーカーを組み合わせたアルゴリズムがG_T群において生検試料の段階の間を区別する能力を各評点システムについて評価した。

【0205】

種々の組み合わせにおいてヒアルロン酸、コラーゲンIV、コラーゲンVI、ラミニン、プロコラーゲンIIIのアミノ末端ペプチド(PIIINP)、メタロプロテイナーゼ1組織阻害剤(TIMP-1)及びマトリックスメタロプロテイナーゼ2(MMP-2)を組み込んだアルゴリズムを用いた場合も同様の性能特性が観察された。他の血清マーカー、肝機能試験を含む臨床化学試験の結果または血小板数及びプロトロンビン時間を含む血液学的指標を追加してもアルゴリズムの性能は向上しなかった。

10

【0206】

本発明者等は段階の全範囲(Scheuer段階0~4、Ishak段階0~6)に渡る生検試料群の最大の分離をもたらしたアルゴリズムに関して結果を提示した。全ての同様の組み合わせから得られた結果は、各スケール内の生検試料の段階を2分割できることを示していた。図2aはScheuer段階付けシステムに関する3マーカーの「ベストフィット」モデルに関する累積分布を示す。図2bはIshakシステムにおけるモデルに関する累積分布を示す。モデルはヒアルロン酸、プロコラーゲンIIIのアミノ末端ペプチド(PIIINP)、メタロプロテイナーゼ1組織阻害剤(TIMP-1)及び年齢に関する値を含んでいた。これらのアルゴリズムに関する式は以下に示す通りである。

20

【0207】

これらの分析において用いたアルゴリズムに関する式は以下の通りである。

【0208】

【化18】

Scheuer:

$$\text{評点} = \frac{1}{1+e^{-z}}$$

$$Z = -0.132 \ln(\text{age}) + 0.97 \ln(\text{Hyaluronic Acid}) + 0.772 \ln(\text{PIIINP}) + 0.477 \ln(\text{TIMP1}) - 8.821$$

30

Ishak:

$$\text{評点} = \frac{1}{1+e^{-z}}$$

式中、

$$Z = -0.196 \cdot \ln(\text{年齢}) + 0.959 \cdot \ln(\text{ヒアルロン酸}) + 0.761 \cdot \ln(\text{PIIINP}) + 0.539 \cdot \ln(\text{TIMP1}) - 8.92$$

40

分布を検討したところ、Ishak段階3またはScheuer段階2において自然分割(natural division)を示していた。これはScheuer 0~2、Ishak 0~3及びScheuer 3~4、Ishak 4~6にそれぞれ相当する「無/軽度」及び「中等度/重度」の線維症の2カテゴリを発生させる各システム上の段階(データ示さず)の間の一般化された距離の検討により立証された(図4参照)。記号論理的回帰を用いて上記モデルに各システムに関する2分割段階付けをフィットさせた。記号論理的評点は試験(G_T)及びバリデーション(G_V)群の患者に関して得られた。表10(a)は両方の群における各2分割システムに関するAUCを示す。両方のシステムともAUCの項については同一の結果を示す。G_Vコホートに関してはAUCは0.8

50

0.4であり；Scheuerについては $SE = 0.023$ ； $p < 0.0001$ ；95%CI = 0.758 ~ 0.851；IshakについてはAUCは0.804であり； $SE = 0.023$ ； $p < 0.0001$ ；95%CI = 0.758 ~ 0.850であった。

【0209】

図1について、中央の水平な直線はメジアン、斜線部はメジアンに関する推定95%CIを示す。末端の線は25及び75パーセンタイルである。破線はデータの「許容範囲」を示す。十字及び円は潜在的な「非適格者」を示す。プロットされたデータはScheuer段階0~2及び3~4の生検試料に関する判別評点の分布を示す。

【0210】

特定の慢性肝臓疾患におけるアルゴリズムの性能を評価した。コホートにおける3種の最も一般的な肝障害に関するAUCもScheuer及びIshakの段階システムの両方に関して表10(a)及び(b)に示す。データは多様な慢性肝臓疾患を有する患者の全コホートから得られた400被験(G_T)及び521バリデーション(G_V)試料に関する；そしてC型肝炎、非アルコール性脂肪肝疾患及びアルコール性肝臓疾患を有する患者に関する、2分割結果(Scheuerについては0、1、2；3、4、そしてIshakについては0、1、2、3；4、5、6)を検出する場合のアルゴリズムの性能を示している。レシーバーオペレーター特徴曲線の曲線下面積、標準誤差(SE)、関連p値及びAUCに関する95%信頼区間を示す。

【0211】

【表10a】

表10(a)

レシーバーオペレーター特徴曲線の曲線下面積

群及びシステム別

群	システム	面積	SE	p	面積の95%CI
G_T	Scheuer**	0.863	0.0212	<0.0001	0.822 ~ 0.905
G_V	Scheuer**	0.804	0.0235	<0.0001	0.758 ~ 0.851
G_T	Ishak*	0.860	0.0211	<0.0001	0.818 ~ 0.901
G_V	Ishak*	0.804	0.0234	<0.0001	0.758 ~ 0.850

【0212】

10

20

30

【表 10 b】

表10(b)

サブグループの性能					
群	システム	面積	SE	p	面積の95%CI
C型肝炎 G _v	Scheuer**	0.773	0.0386	<0.0001	0.697 ~ 0.848
C型肝炎 G _v	Ishak*	0.842	0.0391	<0.0001	0.765 ~ 0.919
NAFLD G _v	Scheuer**	0.870	0.1040	0.0002	0.666 ~ 1.000
NAFLD G _v	Ishak*	0.931	0.0373	<0.0001	0.858 ~ 1.000
アルコール G _v	Scheuer**	0.944	0.0555	<0.0001	0.836 ~ 1.000
アルコール G _v	Ishak*	0.923	0.0671	<0.0001	0.792 ~ 1.000

* 2分割(0、1、2、3);(4、5、6)

** 2分割(0、1、2);(3、4)

Scheuer 段階付けシステムを使用した場合、C型肝炎ではAUC = 0.773 ; SE = 0.0386 ; p < 0.0001 ; 0.697 ~ 0.848 ; NAFLDではAUC = 0.870 ; SE = 0.104 ; p < 0.0002 ; 95%CI = 0.666 ~ 1.000 ; アルコール性肝臓疾患 (ALD) ではAUC = 0.944 ; SE = 0.0555 ; p < 0.0001 ; 95%CI = 0.836 ~ 1.000であった。

【0213】

表11a及び11bはIshak(11a)及びScheuer(11b)システムの両方に関する異なる評点閾値におけるバリデーション(G_v)曲線に関する特定の座標を示す。

【0214】

10

20

30

【表 1 1 a】

表11(a)

G_vにおけるROC曲線の特定の座標

Ishak 評点システム—アルゴリズム: 病理学者A				
評点	感度	特異性	陽性 予測力	陰性 予測力
0.066	95%	25%	31%	93%
0.102	90%	41%	35%	92%
0.130	85%	52%	39%	91%
0.178	80%	66%	46%	90%
0.241	69%	80%	56%	88%
0.285	63%	85%	60%	86%
0.364	53%	90%	66%	84%
0.468	44%	95%	76%	83%
0.820	19%	99%	90%	77%
病理学者B及びCと相対比較したアルゴリズムの性能				
0.102 ^B	87.9%	42.8%	37.2%	90.2%
0.102 ^C	89.3%	42.2%	34.2%	92.2%

10

20

30

40

【 0 2 1 5 】

【表 1 1 b】

表11(b)

G_vにおけるROC曲線の特定の座標

Scheuer 評点システム—アルゴリズム: 病理学者A				
評点	感度	特異性	陽性 予測力	陰性 予測力
0.063	95%	24%	31%	93%
0.102	90%	41%	35%	92%
0.130	85%	53%	40%	91%
0.179	80%	67%	46%	90%
0.238	69%	80%	55%	88%
0.273	64%	85%	60%	87%
0.358	54%	90%	65%	84%
0.457	47%	95%	75%	83%
0.507	44%	96%	80%	83%
0.826	19%	99%	90%	77%
病理学者B及びCと相対比較したアルゴリズムの性能				
0.102 ^B	86.7%	51.2%	40.7%	90.9%
0.102 ^C	86.5%	49.5%	36.2%	91.7%

G_v コホートに関するROC曲線の特定の座標は表に示す通りである、感度、特異性、陽性予測値及び陰性予測値はアルゴリズム閾値評点の範囲に対して計算している。更にまた性能特性は、0.102のアルゴリズム閾値評点、即ち病理学者Aにより段階付けされたシリーズにおける有意な線維症の検出において90%の感度を与えた評点を用いて病理学者BおよびCにより割り付けられた段階付けと比較したアルゴリズムについて示す。データはIshak段階付け(12a)及びScheuer段階付け(12b)との比較について示す。

10

20

30

40

50

【0216】

感度及び特異性のほかに、陽性及び陰性の予測値を示す。Scheuer 段階3または4の線維症の検出に関する感度は0.102の閾値アルゴリズム評点において90%であり、NPV = 92%であった。特異性は0.82の閾値評点において99%であり、PPV = 90%であった。Ishak 段階4~6の相当する値は0.102の閾値において90%及び92%であった。

【0217】

アルゴリズムの性能は0.102の閾値を用いて他の2病理学者により割り付けられた生検試料の段階との比較により評価した。Scheuer 段階3または4の線維症の検出に関する感度は0.102の閾値アルゴリズム評点においてBで86.7%及びCで86.5%であり、それぞれNPV = 90.9%及び91.7%であった。0.102の閾値アルゴリズム評点を用いた場合、Ishak 段階4~6の相当する値はBで感度 = 87.9% ; NPV = 90.2%であり、Cで感度 = 89.3% ; NPV = 92.2%であった。

10

【0218】

病理学者Aにより段階付けされたG_vコホートにおいて示された3つの最も優勢な慢性肝臓疾患、即ち慢性C型肝炎(CHC)、非アルコール性脂肪肝臓疾患(NAFLD)及びアルコール性肝臓疾患(ALD)におけるアルゴリズムの性能に関する結果を表12aおよび12bに示す。これらの表はROC座標、感度、特異性及び陰性及び陽性の予測値を90%を超える結果を与えるアルゴリズム評点閾値に関して示したものである。

20

【0219】

【表 1 2 a】

表12a

G_v患者における感度及び特異性

Scheuer 段階付け					
疾患	評点	感度	特異性	PPV	NPV
C型肝炎	0.063	95%	29%	27.7%	94.9%
	0.067	90%	31%	27.5%	92.3%
	0.090	85%	43%	29.9%	91.1%
	0.126	80%	58%	35.2%	91.0%
	0.190	63%	80%	47.9%	88.5%
	0.219	52%	85%	50.0%	86.2%
	0.268	47%	90%	57.8%	85.6%
	0.426	38%	95%	70.0%	84.3%
	0.564	30%	99%	89.5%	83.3%
NAFLD	0.375	89%	96%	80%	98%
	0.462	78%	98%	87%	96%
ALD	0.087	100.0%	16.7%	75.0%	100.0%
	0.431	93.3%	100.0%	100.0%	85.7%

10

20

30

40

【 0 2 2 0 】

【表 1 2 b】

表12b

Ishak 段階付け					
疾患	評点	感度	特異性	PPV	NPV
C型肝炎	0.065	100%	28%	19.2%	100.0%
	0.067	95%	29%	18.5%	96.8%
	0.076	91%	33%	19.0%	95.9%
	0.130	86%	56%	25.2%	96.0%
	0.177	80%	72%	32.9%	95.6%
	0.196	77%	80%	40.0%	95.5%
	0.230	69%	85%	44.6%	94.2%
	0.286	61%	90%	51.2%	93.1%
	0.418	50%	95%	62.1%	91.7%
	0.710	30%	99%	84.6%	89.3%
NAFLD	0.381	100%	88%	40%	100%
	0.462	75%	90%	37%	98%
	0.855	25%	98%	49%	94%
ALD	0.092	100.0%	12.5%	83.8%	100.0%
	0.447	92.3%	87.5%	97.1%	71.5%
	0.621	84.6%	100.0%	100.0%	59.0%

10

20

30

40

G V コホートに関する ROC 曲線の特定の座標は表に示す通りである、感度、特異性、陽性予測値及び陰性予測値はアルゴリズム閾値評点の範囲に対して計算している。データは Scheuer 段階付け (1 2 a) 及び Ishak 段階付け (1 2 b) との比較につい

50

て示す。各々の場合において、表 (a) は S c h e u e r 段階付けを指し、そして (b) は I s h a k 段階付けを指す。0 . 0 6 5 の閾値において、I s h a k の線維症段階 4 ~ 6 については、感度 = 1 0 0 %、陰性予測値 = 1 0 0 %であった。

【 0 2 2 1 】

0 . 3 7 5 のアルゴリズム評点閾値を用いた線維症段階 3 または 4 に関する S c h e u e r システムとの N A F L D の比較では、感度 = 8 9 %、特異性 = 9 6 %、P P V = 8 0 % 及び N P V = 9 8 % であった。アルコール性肝臓疾患においては、0 . 0 8 7 の閾値を用いた S c h e u e r 線維症段階 3 または 4 の検出に関して、感度 = 1 0 0 % 及び N P V = 1 0 0 % であったのに対し、0 . 4 3 1 の閾値では感度 = 9 3 . 3 %、特異性 = 1 0 0 %、P P V = 1 0 0 % 及び N P V = 8 5 . 7 % であった。

10

【 0 2 2 2 】

通常は、臨床医学者および病理学者は肝線維症の 3 カテゴリを S c h e u e r 段階の 0、1 ; 2、3 および 4 に相当する「軽度」、「中等度」及び「重度」の線維症として区別する。軽度から中等度の線維症への線維は疾患の進行の有意な工程として認識される場合が多く、予後及び患者の管理に影響する決定事項に関して重要な画期的なものであることを反映している。従って、データは段階 0、1、2 及び 3、4 の間のアルゴリズム判別評点の分布に基づく二分化よりもむしろ S c h e u e r 段階 0、1 及び 2、3、4 の間の二分化を用いて分析した。

【 0 2 2 3 】

結果は性能が同等の水準であることを明らかにした。中等度 / 重度線維症の検出に関する 9 0 % 感度を与える結果を S c h e u e r 段階 0、1 : 2、3、4 (A) 及び 0、1、2 : 3、4 (B) の間の二分化に関して以下の表 1 3 に示す。データはまた 9 0 % 感度で第 4 段階の線維症 (肝硬変) を検出する能力についても分析した (C) 。

20

【 0 2 2 4 】

【 表 1 3 】

表13

Scheuer評点	AUC	SE	P	面積の95%CI	DST	感度	特異性
A=0,1 v 2,3,4	0.782	0.0213	<0.0001	0.740 ~ 0.823	-0.864	90.3%	29.6%
B=0,1,2 v 3,4	0.804	0.0236	<0.0001	0.757 ~ 0.850	-0.671	90.5%	37.5%
C=0,1,2,3 v 4	0.887	0.0256	<0.0001	0.837 ~ 0.937	0.025	90.7%	69.2%

30

表 1 3 に示すデータは多様な慢性肝臓疾患を有する患者の全コホートから得られた 4 0 0 被験 (G_T) 及び 5 2 1 パリレーション (G_V) 試料に関する 2 分割結果 (S c h e u e r について A = 0、1 : 2 ~ 4、B = 0、1、2 : 3、4 および C = 0、1、2、3 : 4) を検出する場合のアルゴリズムの性能を示している。レシーバーオペレーター特徴曲線の曲線下面積 (A U C)、関連する標準誤差及び 9 5 % 信頼区間の p 値を含んでいる。線維症の検出に関する感度及び特異性は特定の判別評点閾値 (D S T) について示す。「 A 」は中等度及び重度の肝線維症から軽度のものを区別するために従来使用されている 2 分割を示す。「 B 」はコホートにおける評点の分布の分析から誘導された軽度と中等度の線維症の間の区別を示す示唆された 2 分割である。「 C 」は重度の線維症 / 肝硬変と軽度 / 中等度の線維症の間の区別を示す。

40

(d) 結論

E L F 試験の分析は、肝線維症の血清マーカーを組み合わせる本発明の実施形態を用いて 9 0 % の感度で慢性肝臓疾患を有する患者における有意な肝線維症を発見することがで

50

きることを確認するものであった。本発明は3種の異なる病理学者の評点と比較して同様の水準の感度を与えるものであり、これが種々の状況において同様の正確さで使うことができることを説明している。

【0225】

本発明の実施形態は熟練病理学者間の一致、画像分析との一致、個々の線維症マーカーの性能、及び、本発明者等の臨床慣行において遭遇する最も一般的な条件の3つを含む慢性肝臓疾患の範囲を診断する場合の本発明の性能の水準を評価することによりバリデーションされている。

【0226】

試験した患者コホートは広範な慢性肝臓疾患に罹患した患者を包含していた。このコホートを評価する場合の本発明の実施形態の性能は、広範な肝障害における線維症の有意な程度を有する患者を発見するためにこれを使用できることを示している。アルゴリズムの閾値評点の変化に伴う感度及び特異性の変化は、使用した試験閾値に応じて、有意な肝線維症の存在尾または非存在の何れかを検出するために、高精度で本発明を使用できることを明らかにしている。

【0227】

更にまた、この結果は、進行性の慢性肝臓疾患を有する患者において線維症を防止することを意図する治療介入のモニタリングにおいて本発明が有用であることを示している。肝線維症が可逆的過程であることを認識することは、抗線維症治療の開発において大きな利益をもたらしている。抗線維症薬の評価はその薬効を研究者が測定できるようにする診断試験の使用に依存している。肝生検試料の反復及び頻繁な使用は倫理的も現実的でもなく；生検試料は試料採取の誤り及び解釈の変動を生じさせる場合がある。本発明は新しい抗線維症治療の評価において使用される結果尺度としての組織学的段階の変化を評価するためのより現実的で許容できる代替法を提供する。

【0228】

更にまた本発明者等は、疾患の進行またはアルコール摂取の減少のような生活習慣の改善への応答、C型肝炎またはアルコール性肝臓疾患、および、NAFLD及びC型肝炎における体重減少をモニタリングする場合に有用である。

【0229】

上記した結果は、臨床の肝臓分野での慣行において遭遇する3種の最も一般的な状態であるC型肝炎、NAFLD及びアルコール性肝臓疾患の状態及び進行を診断する場合に本発明の実施形態が特に良好に機能することを示している。これらの状態の各々において、適切な試験閾値を選択することにより、90%を超えるPPVまたはNPVが得られ、これらの疾患を有する患者における有意な線維症の存在を確認または否定するための臨床慣行において本発明が大きな用途を有していることを示している。

【0230】

C型肝炎に関する最近の研究によれば、容易に入手できる生化学的及び血液学的試験を組み合わせた指標に関して同様の水準の性能が報告されている。Forns, et al., Hepatology 2002; 36; 986-992; Wai, et al., Hepatology 38, 518-526, 2003。これらの試験は線維症が有意になる時点に関する予測を行っており、そして試験セットにおけるデータの分析から線維症の段階的時点を誘導するよりはむしろ、アルゴリズムを誘導するために2変量の記号論理的回帰を使用していた。

【0231】

C型肝炎の状態または進行の診断において、本発明は抗ウイルス治療の潜在的利点とタイミングを決定するために使用できる。我々の分析によれば、非アルコール性脂肪肝臓疾患を有する患者において、本発明は有意な線維症を有さない比較的良性的脂肪症を有する大多数から有意な線維症の危険性を有する患者の少数を区別するために使用できる(32A)。

【0232】

10

20

30

40

50

アルコール性肝臓疾患を有する患者において、本発明者等の結果は、本発明の実施形態が最高水準の性能を有することを示しており、100%の感度及び特異性が達成されている。

【0233】

これらのデータは本発明の実施形態が有意な線維症の危険性を有する患者を発見するため、及び、殆ど肝線維症を有さないアルコール性肝臓疾患患者の大多数を発見するための両方に使用できることを示している。

【0234】

【化19】

引用文献:

10

1. Friedman SL

The cellular basis of hepatic fibrosis: Mechanism and treatment strategies.

N Engl J Med 1993; 328: 1828-1835

2. Friedman SL

Molecular mechanism of hepatic fibrosis and principle of therapy

J Gastroenterol 1997; 32: 424-430

20

3. Hayasaka A, Saisho H

Serum markers as tools to monitor liver fibrosis

【0235】

【化 2 0】

Digestion 1998; 59: 381-384

4. Schuppan D, Stolzel U, Oesterling C, Somasundaram R
Serum assays for liver fibrosis.
J Hepatol 1995; 22 (Suppl 2): 82-88
5. Murawaki Y, Ikuta Y, Nishimura Y, Koda M, Kawasaki H 10
Serum markers for connective tissue turnover in patients with chronic hepatitis C:
A comparative analysis.
J Hepatol 1995; 23: 145-152
6. Wong VS, Hughes V, Trull A, Wight DGD, Petrik J, Alexander GJM 20
Serum hyaluronic acid is a useful marker of liver fibrosis in chronic hepatitis C
virus infection
J Viral Hepatitis 1998; 5: 187-192
7. Poynard T, Aubert A, Bedossa P, Abella A, Naveau S, Paraf F, Chapu JC
A simple biological index for detection of alcoholic liver disease in drinkers
Gastroenterology 1991; 100: 1397-1402
8. Naveau S, Poynard T, Benattat C, Bedossa P, Chaput JC 30
Alpha-2 macroglobulin and hepatic fibrosis:diagnostic interest
Dig Dis Sci 1994; 11: 2426-2432
9. Oberti F, Valsesia E, Pilette C, Rousselet MC, Bedossa P, Aube C, Gallois Y,
Rifflet H, Maiga MY, Penneau-Fontbonne D, Cales P
Noninvasive diagnosis of hepatic fibrosis and cirrhosis
Gastroenterology 1997; 113: 1609-1616 40
10. Teare JP, Sherman D, Greenfield SM, Simpson J, Catterall AP, Murray-Lyon IM,
Peters TJ, Williams R, Thompson RPH
The Lancet 1993; 342: 895-898

【 0 2 3 6】

【化 2 1】

11. *Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poynard T, Lancet* 2001; 357: 1069-75.

ELF研究に関連する引用文献:

- 1A. Desmet V, Fevery J. Liver biopsy. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1995;9:811-828.
- 2A. Scheuer PJ. Chronic hepatitis: what is activity and how should it be assessed? *Histopathology* 1997;30:103-105. 10
- 3A. Pasha T, Gabriel S, Therneau T, Dickson ER, Lindor KD. Cost-effectiveness of ultrasound-guided liver biopsy. *Hepatology* 1998;27:1220-1226.
- 4A. Gilmore IT, Burroughs A, Murray-Lyon IM, Williams R, Jenkins D, Hopkins A. Indications, methods, and outcomes of percutaneous liver biopsy in England and Wales: an audit by the British Society of Gastroenterology and the Royal College of Physicians of London. *Gut* 1995;36:437-441. 20
- 5A. McGill DB, Rakela J, Zinsmeister AR, Ott BJ. A 21-year experience with major hemorrhage after percutaneous liver biopsy. *Gastroenterology* 1990;99:1396-1400.
- 6A. Sherlock S, Dooley J. Diseases of the liver and biliary system. 10 ed. London: Blackwell Scientific, 1997. 30
- 7A. Regev A, Berho M, Jeffers LJ, Milikowski C, Molina EG, Pylsopoulos NT, Feng ZZ, Reddy KR, Schiff ER. Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic HCV infection. *American Journal of Gastroenterology* 2002;97:2614-2618.
- 8A. Theodossi A, Skene AM, Portmann B, Knill-Jones RP, Patrick RS, Tate RA, Kealey W, Jarvis KJ, O'Brian DJ, Williams R. Observer variation in assessment of liver biopsies including analysis by kappa statistics. *Gastroenterology* 1980;79:232-241. 40
- 9A. Scheuer PJ, Lefkowitz JH. Liver biopsy interpretation. 6 ed. London: W.B.Saunders, 2002.

【 0 2 3 7 】

【化 2 2】

- 10A. Yamauchi M, Mizuhara Y, Maezawa Y, Toda G. Serum tenascin levels in chronic liver disease. *Liver* 1994;14:148-153.
- 11A. McHutchison JG, Blatt LM, de Medina M, Craig JR, Conrad A, Schiff ER, Tong MJ. Measurement of serum hyaluronic acid in patients with chronic hepatitis C and its relationship to liver histology. Consensus Interferon Study Group. *Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2000;15:945-951. 10
- 12A. Hayasaka A, Schuppan D, Ohnishi K, Okuda K, Hahn EG. Serum concentrations of the carboxyterminal cross-linking domain of procollagen type IV (NC1) and the aminoterminal propeptide of procollagen type III (PIIP) in chronic liver disease. *J Hepatol* 1990;10:17-22.
- 13A. Schuppan D, Cantaluppi MC, Becker J, Veit A, Bunte T, Troyer D, Schuppan F, Schmid M, Ackermann R, Hahn EG. Undulin, an extracellular matrix glycoprotein associated with collagen fibrils. *J Biol Chem* 1990;265:8823-8832. 20
- 14A. Murawaki Y, Ikuta Y, Koda M, Kawasaki H. Serum type III procollagen peptide, type IV collagen 7S domain, central triple-helix of type IV collagen and tissue inhibitor of metalloproteinases in patients with chronic viral liver disease: relationship to liver histology. *Hepatology* 1994;20:780-787.
- 15A. Kasahara A, Hayashi N, Mochizuki K, Oshita M, Katayama K, Kato M, Masuzawa M, Yoshihara H, Naito M, Miyamoto T, Inoue A, Asai A, Hijioka T, Fusamoto H, Kamada T. Circulating matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 as serum markers of fibrosis in patients with chronic hepatitis C. Relationship to interferon response. *J Hepatol* 1997;26:574-583. 30
- 16A. Murawaki Y, Ikuta Y, Okamoto K, Koda M, Kawasaki H. Serum matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1) concentration in patients with chronic liver disease. *J Hepatol* 1999;31:474-481. 40
- 17A. Trinchet JC. Clinical use of serum markers of fibrosis in chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995;22:89-95.

【 0 2 3 8】

【化 2 3】

- 18A. Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poynard T. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet* 2001;357:1069-1075.
- 19A. Castera L, Hartmann DJ, Chapel F, Guettier C, Mall F, Lons T, Richardet JP, Grimbert S, Morassi O, Beaugrand M, Trinchet JC. Serum laminin and type IV collagen are accurate markers of histologically severe alcoholic hepatitis in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2000;32:412-418. 10
- 20A. Pilette C, Rousselet MC, Bedossa P, Chappard D, Oberti F, Rifflet H, Maiga MY, Gallois Y, Cales P. Histopathological evaluation of liver fibrosis: quantitative image analysis vs semi-quantitative scores. Comparison with serum markers. *Journal of Hepatology* 1998;28:439-446.
- 21A. Guechot J, Laudat A, Loria A, Serfaty L, Poupon R, Giboudeau J. Diagnostic accuracy of hyaluronan and type III procollagen amino-terminal peptide serum assays as markers of liver fibrosis in chronic viral hepatitis C evaluated by ROC curve analysis. *Clin Chem* 1996;42:558-563. 20
- 22A. Murawaki Y, Ikuta Y, Koda M, Nishimura Y, Kawasaki H. Clinical significance of serum hyaluronan in patients with chronic viral liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 1996;11:459-465. 30
- 23A. Johansen JS, Christoffersen P, Moller S, Price PA, Henriksen JH, Garbarsch C, Bendtsen F. Serum YKL-40 is increased in patients with hepatic fibrosis. *J Hepatol* 2000;32:911-920.
- 24A. Nojgaard C, Johansen JS, Krarup HB, Holten-Andersen M, Moller A, Bendtsen F, Danish Viral Hepatitis Study Group. Effect of antiviral therapy on markers of fibrogenesis in patients with chronic hepatitis C. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 2003;38:659-665. 40
- 25A. Patel K, Lajoie A, Heaton S, Pianko S, Behling CA, Bylund D, Pockros PJ, Blatt LM, Conrad A, McHutchison JG. Clinical use of hyaluronic acid as a predictor of fibrosis change in hepatitis C. *Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2003;18:253-257.

【 0 2 3 9】

【化 2 4】

- 26A. Myers RP, Benhamou Y, Imbert-Bismut F, Thibault V, Bochet M, Charlotte F, Ratziu V, Bricaire F, Katlama C, Poynard T. Serum biochemical markers accurately predict liver fibrosis in HIV and hepatitis C virus co-infected patients. *AIDS* 2003;17:721-725.
- 27A. Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J Hepatol* 1991;13:372-374. 10
- 28A. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, Denk H, Desmet V, Korb G, MacSween RN, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995;22:696-699.
- 29A. Bedossa P, Poynard T, Naveau S, Martin ED, Agostini H, Chaput JC. Observer variation in assessment of liver biopsies of alcoholic patients. *Alcohol Clin Exp Res* 1988;12:173-178. 20
- 30A. Arthur MJ. Reversibility of liver fibrosis and cirrhosis following treatment for hepatitis C. *Gastroenterology* 2002;122:1525-1528.
- 31A. Rosenberg WM. Rating fibrosis progression in chronic liver diseases. *Journal of Hepatology* 2003;38:357-360.
- 32A. Teli MR, James OF, Burt AD, Bennett MK, Day CP. The natural history of nonalcoholic fatty liver: a follow-up study. *Hepatology* 1995;22:1714-1719. 30
- 33A. Lichtinghagen R, Huegel O, Seifert T, Haberkorn CI, Michels D, Flemming P, Bahr M, Boeker KH. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and their inhibitors in peripheral blood cells of patients with chronic hepatitis C. *Clin Chem* 2000;46:183-192.
- 34A. Tran A, Benzaken S, Saint-Paul MC, Guzman-Granier E, Hastier P, Pradier C, Barjoan EM, Demuth N, Longo F, Rampal P. Chondrex (YKL-40), a potential new serum fibrosis marker in patients with alcoholic liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000;12:989-993. 40

【 0 2 4 0】

【化 2 5】

- 35A. Guyader D, Jacquelinet C, Moirand R, Turlin B, Mendler MH, Chaperon J, David V, Brissot P, Adams P, Deugnier Y. Noninvasive prediction of fibrosis in C282Y homozygous hemochromatosis. *Gastroenterology* 1998;115:929-936.
- 36A. Beaton M, Guyader D, Deugnier Y, Moirand R, Chakrabarti S, Adams P. Noninvasive prediction of cirrhosis in C282Y-linked hemochromatosis. *Hepatology* 2002;36:673-678.

10

引用した刊行物: ポリヌクレオチドおよびハイブリドーマ形成プロトコールの発現:

- (1) Sambrook et al., *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 2d ed., (1989)
- (2) Ausubel et al., *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, John Wiley & Sons, New York, N.Y., (1989).
- (3) Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.* 264, 5503-5509, (1989)
- (4) Grant et al., *Methods Enzymol.* 153, 516-544, (1987)
- (5) Takamatsu, *EMBO J.* 6, 307-311, (1987)
- (6) Coruzzi et al., *EMBO J.* 3, 1671-1680, (1984)
- (7) Broglie et al., *Science* 224, 838-843, (1984)
- (8) Winter et al., *Results Probl. Cell Differ.* 17, 85-105, (1991)
- (9) *MCGRAW HILL YEARBOOK OF SCIENCE AND TECHNOLOGY*, McGraw Hill, New York, N.Y., pp. 191-196, (1992)
- (10) Engelhard et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91, 3224-3227, (1994)
- (11) Logan & Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 3655-3659, (1984)
- (12) Scharf et al., *Results Probl. Cell Differ.* 20, 125-162, (1994)
- (13) Freshney R.I., ed., *ANIMAL CELL CULTURE*, (1986)
- (14) Wigler et al., *Cell* 11, 223-232, (1977)
- (15) Lowy et al., *Cell* 22, 817-823, (1980)
- (16) Wigler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 3567-3570, (1980)
- (17) Colbere-Garapin et al., *J. Mol. Biol.* 150, 114, (1981)
- (18) Hartman & Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 8047-8051, (1988)
- (19) Rhodes et al., *Methods Mol. Biol.* 55, 121-131, (1995)
- (20) Hampton et al., *SEROLOGICAL METHODS: A LABORATORY MANUAL*, APS Press, St. Paul, Minn., (1990)
- (21) Maddox et al., *J. Exp. Med.* 158, 1211-1216, (1983)

20

30

40

【 0 2 4 1 】

50

【化 2 6】

- (22) Porath et al., Prot. Exp. Purif. 3, 263-281, (1992)
- (23) Kroll et al., DNA Cell Biol. 12, 441-453, (1993)
- (24) Caruthers et al., Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 215-223, (1980)
- (25) Horn et al. Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 225-232, (1980)
- (26) Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-2154, (1963)
- (27) Roberge et al., Science 269, 202-204, (1995)
- (28) Creighton, PROTEINS: STRUCTURES AND MOLECULAR PRINCIPLES, WH and Co.,
New York, N.Y., (1983)

10

【図面の簡単な説明】

【 0 2 4 2】

【図 1】図 1 は発明の詳細な説明において参照する E L F 試験における対象の採用及び参加を示すフローチャートである。

【図 2 a】図 2 a は判別評点に対する累積 p 評点のグラフを示し、そして、本発明の方法により確認される S c h e u e r 段階評点の累積分布を反映している。図 2 b は判別評点に対する累積 p 評点のグラフを示し、本発明の方法により確認される I s h a k 段階評点の累積分布を反映している。

20

【図 2 b】図 2 b は判別評点に対する累積 p 評点のグラフを示し、そして、本発明の方法により確認される S c h e u e r 段階評点の累積分布を反映している。図 2 b は判別評点に対する累積 p 評点のグラフを示し、本発明の方法により確認される I s h a k 段階評点の累積分布を反映している。

【図 3 a】図 3 a は本発明に従って求めたレシーバーオペレーター特徴曲線 - S c h e u e r 変更評点システムバリデーションデータを示す。図 3 b は本発明に従って求めたレシーバーオペレーター特徴曲線 - I s h a k 変更評点システムバリデーションデータを示す。

【図 3 b】図 3 b は本発明に従って求めたレシーバーオペレーター特徴曲線 - S c h e u e r 変更評点システムバリデーションデータを示す。図 3 b は本発明に従って求めたレシーバーオペレーター特徴曲線 - I s h a k 変更評点システムバリデーションデータを示す。

30

【図 4】図 4 は S h e u e r 線維症評点 v s 本発明に従って求めた判別評点を示すバリデーションデータセット (G v) に対する B o x 及び W h i s k e r プロットを示す。

【図 5】図 5 はヒト T I M P 1 m R N A のヌクレオチド配列を示す (配列番号 1) 。

【図 6 - 1】図 6 - 1 はヒト M M P 2 m R N A のヌクレオチド配列を示す (配列番号 2) 。

【図 6 - 2】図 6 - 1 の続き。

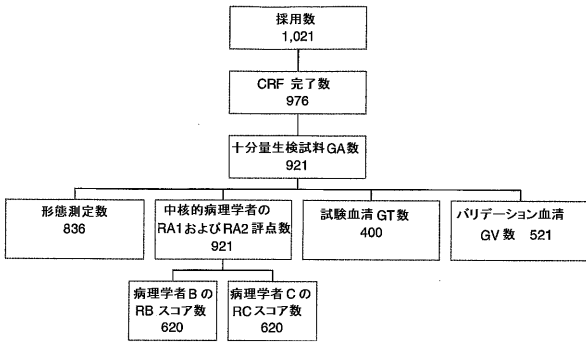
【図 7 - 1】図 7 - 1 はヒト M M P 9 m R N A のヌクレオチド配列を示す (配列番号 3) 。

40

【図 7 - 2】図 7 - 1 の続き。

【 図 1 】

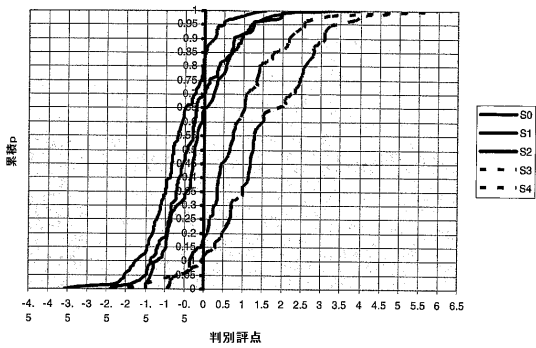
Figure 1



【 図 2 a 】

Figure 2a

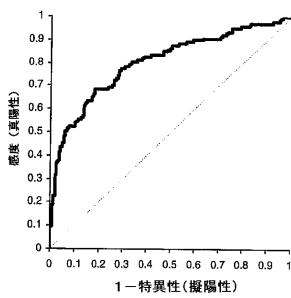
Scheuer等級による累積分布



【 図 3 a 】

Figure 3a

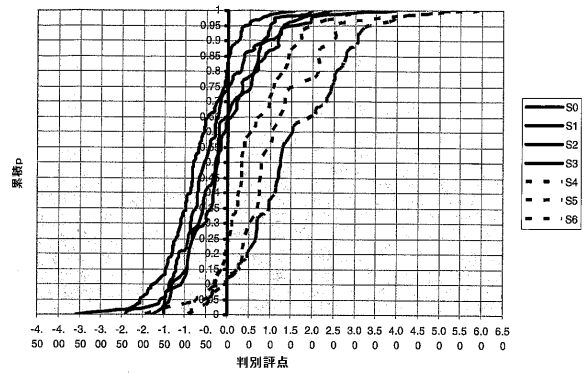
レシーバーオペレーター特徴曲線
Scheuer修正評点システム
バリデーションデータ



【 図 2 b 】

Figure 2b

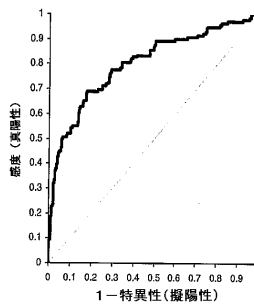
Ishak等級による累積分布



【 図 3 b 】

Figure 3b

レシーバーオペレーター特徴曲線
Ishak 修正評点システム
バリデーションデータ



【 図 4 】

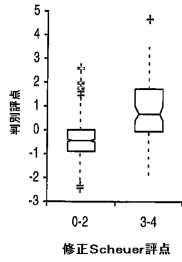


Figure 4: Sheuer線維症評点vs判別評点を示すバリエーションデータセット (Gv) に対するBox及びWhiskerプロット

【 図 5 】

FIGURE 5 (配列番号 1)

ref|NM_003254.1| ホモサピエンスマトロプロテイナーゼ1 組織阻害剤
(赤血球強化活性、コラゲナーゼ阻害剤) (TIMP1), mRNA

```
AGGGGCGCTTAGCGTGCCGCATCGCCGAGATCCAGCGCCAGAGACACCAG
AGAACCCACCATGGCCCCCTTTGAGCCCTGGCTTCTGGCATCTGTTGTTGC
TGTGGGTGATAGCCCCAGCAGGGCCTGCACCTGTGTCCACCCACCCACA
GACGGCCTTCTGCAATTCGACCTCGTCAATCAGGGCCAAGTTCTGGGGACAC
CAGAAGTCAACCAGACCACCTTATACAGCGTTATGAGATCAAGATGACCAA
GATGTATAAAGGGTTCCAAGCCTTAGGGATGCCGCTGACATCCGGTTCTGCT
ACACCCCGCATGGAGAGTGTCTGCGGATCTTCCACAGGTCCCAACCCG
CAGCGAGGAGTTTCTCATTTGCTGGAACCTGCAGGATGGACTCTTGACACAT
ACTACCTGCAGTTCTGCTGCCCTGGAACAGCCTGAGCTTAGCTCAGCGCG
GGGCTTACCAAGACCTACACTGTGGCTGTGAGGAATGCACAGTGTTCCTC
GTTTATCCATTCCTGCAAACTGCAGATGGCACTATTGCTGTGGACGGAC
CAGCTCTCCAAGGCTCTGAAAAGGGCTTCCAGTCCCGTCACTTGCCTGCCT
GCCTCGGGAGCCAGGGCTGTGACCTTGGCAGTCCCTGCGGTCCAGATAGCC
TGAATCTGCGCGGAGTGAAGCTGAAGCCTGCACAGTTCACCCCTGTTCCCA
CTCCCATCTTCTCCGGCAATGAAATAAAGAGTTACCACCCAGC
```

【 図 6 - 2 】

FIGURE 6 (2枚中2枚目) (配列番号 2) (続き)

ref|NM_004530.1| ホモサピエンスマトロプロテイナーゼ2
(ゼラチナーゼA、7.2 kDaゼラチナーゼ、7.2 kDa I V型
コラゲナーゼ) (MMP2) mRNA (続き)

```
GGCGGACTGTGACGCCACGTGACAAGCCCATGGGGCCCTGCTGGTGGCCAC
ATTCTGGCCTGAGCTCCCGAAAAGATGATGCGGTATACGAGGCCCCACAG
GAGGAGAAGGCTGTGTTCTTTCAGGGGAATGAATACTGGATCTACTAGCCA
GCACCTTGGAGCGAGGGTACCCCAAGCCACTGACCAGCCTGGGACTGCCCC
TGATGTCCAGCGAGTGGATGCCGCTTTAACTGGAGCAAAAACAAGAAGACA
TACATCTTGTGGAGCAAAATCTGGAGATACAATGAGGTGAAGAAGAAAA
TGGATCCTGGCTTTCCTCAAGCTCATCGCAGATGCCGTAATGCCATCCCGAT
AACCTGGATGCCGCTGCTGGACCTGCAGGGCGGCGGTACAGCTACTTCTCA
AGGGTGCCTATTACCTGAAGCTGGAGAACCAAGTCTGAAGAGCGTGAAGTT
TGGAAGCATCAAAATCCGACTGGCTAGGCTGTGAGCTGGCCCTGGCTCCAC
AGGCCCTTCTCTCCACTGCCTTCGATACACCGGCGCTGGAGAAGTGAAGAA
GGACCCGGAGGGGCTGGCAGCCGCTTCAAGCTTCAAGCTAATCAGCAT
TCTACTCTACTGGTAAATTAAGATCCAGAGATGGCTCCTCCCGGTGCC
CAAGAATAGATGCTGACTGTACTCTCCAGGGCGCCCTTCCCCTCAAAATCC
CACCACCCCTCAGAGCCACCCCTAAAGAGATCCTTTGATATTTCAACGCAGC
CCTGCTTTGGGCTGCCCTGGTGTGCCACACTTCCAGGCTTCTCTCTTCAACA
CCTTCTGTGGCTCACAAGAACCTTGGAGCAATGGAGACTGTCTCAAGAGGG
CACTGGTGGCCCGACAGCTTGGCAGAGGGCAGTGGACAGGGCATGGCCAG
GTGGCCACTCCAGACCCCTGGCTTTTCACTGCTGGCTGACCTTAGAACCTTCTT
ACATTAGCAGTTTGTGATGACACTTGTGTTTTTCTTTGGGTCTTGTGTTTTT
TTTTCCACTTAGAAAATGCAATTTCTGACAGAAAGGACTCAGTTGTCTGAAGT
CACTGCACAGTGCATCTCAGCCACATAGTGTGGTTCCTCTGTTCACTCTAC
TTAGCATGTCCCTACCGAGTCTCTCTCCACTGGATGGAGGAAAACCAAGCCG
TGGCTTCCCGCTCAGCCCTCCCTGCCCTCCC
TTCACCAATTCCTCCAGGAAATGTCAACAAGATGAATAAAGACACCTACT
GAGTGGC
```

【 図 6 - 1 】

FIGURE 6 (2枚中1枚目) (配列番号 2)

ref|NM_004530.1| ホモサピエンスマトロプロテイナーゼ2
(ゼラチナーゼA、7.2 kDaゼラチナーゼ、7.2 kDa I V型
コラゲナーゼ) (MMP2), mRNA

```
TGTTTCCGCTGCATCCAGACTTCTCAGCGGGTGGCTGGAGGCTGCCATCTG
GGGCTTTAAACATACAAAGGGATTGCCAGGACCTGCGGCGGCGCGCGGGC
GCGGGGGCTGGGGCGCGGGGGCCGACCATGAGCCGCTGAGCCGGGCAAC
CCCAGGCCACCGAGCCAGCGGACCTCGGAGCGCAGCCCTGCGCCGCGGAC
AGGCTTCAACCCAGCGCGGAGGGCCACACGCACCGAGCCAGCGACCCCC
GGGCGACGCGCGGGCCAGGGAGCGCTACGATGGAGCGCTAATGGCCCG
GGCGCGCTCACGGTTCCTTGGAGGCGCTGTCTCTCTGGCTGGCTGGAG
CCACGCCCGCCGCGCGCTCGCCATCATCAAGTTCCCGGCGATGTCGCC
CCAAAACGGCAAAAGAGTTGGCAGTGAATACCTGAACACCTTCTATGGCTG
CCCCAAGGAGAGCTGCAACCTGTTTGTGCTGAAGGACACATAAAGAAGATG
CAGAAGTCTTTGGACTGCCCCAGACAGGTGATCTGACCAAGAATACCATCG
AGACCATGCGGAAGCCAGCTGCGGCAACCCAGATGTGGCCAACTACAACCT
CTTCCCTCGCAAGCCCAAGTGGGACAAGAACCAGATCATACAGGATCAIT
GGCTACACACCTGATCTGGACCCAGAGACAGTGGATGATGCTTGTCTGCTG
CTTCCAAAGTCTGGAGCGATGTGACCCCACTGCGGTTTTCTCAATCCATG
GAGAGGCAGACATCATGATCAACTTTGGCCGCTGGGAGCATGGCGATGGATA
CCCCTTTCAGCGTAAGGACGGACTCTGGCTATGCTCTGCCCCAGGCACTG
GTGTTGGGGGAGACTCCCATTTTGTGATGACGATGAGCTATGGACCTTGGG
AGGCCAAGTGGTCCGTGTGAAGTATGGCAACGCCGATGGGGAGTACTGCAAG
TTCCCTTCTTGTCAATGGCAAGGAGTACAACAGCTGCACTGATACTGGCCG
CAGCGATGGCTTCTCTGGTGTCCACCACTACAACCTTGAAGAAGGATGGCA
AGTACGGCTTCTGTCCCATGAAGCCCTGTACACCTGAGGGCGCAACCTGAA
GGACAGCCCTGCAAGTTCATTCGCTTCCAGGGCACATCTATGACAGCTG
CACCACCTGAGGGCGCAGCGATGGCTACCGCTGTGTGCGGCAACCTGAGG
TAGCAGCCGACAGAAGATGAGTGTCTGCGCTGAGACCCGATGCTCACTGT
GTGTTGGGAACTCAGAAGGTGCCCTGTGTCTTCCCTTCACTTCTTCTGGCA
ACAATATGAGAGCTGCACAGCGCCGCGCAGTGCAGGAAAGATGTGGT
TGGCAGCCAGCCAACTACGATGACGACCGCAAGTGGGGCTTCTGCCCTGAC
CAAGGTTACAGCCTTCTCTGTTGGCAGCCAGATGTTGGCCACGCCATGG
GGCTGTAGGCACTCCCAAGACCTTGGGGCCCTGTGTTGGCAACCACTTAC
CACCAGAACTTCCGCTGTCCAGGATGACATCAAGGGCATTAGGAGCTC
TATGGGGCTCTCTGACATTTGACCTTGGACCGGCCCAACCCACACTGGG
CCCTGTCACTCTGAGATCTGCAACAGGACATGATTTGATGGCATCGCTC
AGATCCGTTGGTGGATCTTCTTCAAGGACCGGTTTCACTT
```

【 図 7 - 1 】

FIGURE 7 (2枚中1枚目) (配列番号 3)

ref|NM_004994.1| ホモサピエンスマトロプロテイナーゼ9
(ゼラチナーゼB、9.2 kDaゼラチナーゼ、9.2 kDa I V型コラゲ
ナーゼ) (MMP9), mRNA

```
AGACACCTCTGCCCTCACCATGAGCCTCTGGCAGCCCTGGTCTGGTGTCTC
TGGTGTGGGCTGTGCTTGTGTCGCCCCAGACAGCGCCAGTCCACCCCTGTG
CTTCTCCCTGGAGACCTGAGAACCAATCTCACCGACAGGCAGCTGGCAGAGG
AATACCTGTACCGCTATGGTTACACTCGGGTGGCAGAGATGCGTGGAGAGTC
GAAATCTCTGGGCGCTGCGTGTCTTCTCCAGAAGCAACTGTCCCTGCCCG
AGACCGGTGAGCTGGATAGCGCCACGCTGAAGGCCATGCGAACCCACGGTG
CGGGTCCCAGACCTGGGCAAGTCCAAACCTTTGAGGGCGACCTCAAGTGG
CACACCACAACATCACTATTGGATCCAAACTCTCGGAAGACTTACACCTA
GGCGGGTATTGACGACGCTTGTGCCCGGCTTCCGACTGTGGAGCGGGT
CAGCCCGCTCACTTCACTCGGTGTACAGCCGGGACGACAGATCGTCACT
GACGTTGGTGTGCGGAGCACGGAGACGGGTATTCCTTCGACGGGAAGGAG
GGCTCTGGCACACGCCTTCTCTGTCGCCCGGCATTCAGGAGAGCCCAT
TTCGACGATGACGAGTTGTGGTCCCTGGGCAAGGGCGTGTGGTTCACACTCG
GTTTGGAAACGAGATGGCGGCGCTGCCACTTCCCTTCACTTCCGAGGGCC
GCTCCTACTGCTTGCACCCAGCGGCTGCTCCGCGCTTCCCTGCTGCCAGCG
AGTACCAGGCCAACTACGACCCGACGACCGGTTTGGCTTCTGCCCCAGCG
AGAGACTTACACCCGGGACGGCAATGCTGATGGGAAACCCCTGCCAGTTTCC
ACGCTACCCCTGGTGGCCACCACCGCAACTACGACCCGGCAAGGCTTCT
CGGCTTCTGCCGACCCGAGCTGACTCGACGGTGTGGGGGCAACTCGCG
GGGAGCTGTGCTTCTCCCTTCACTTCTCGGGTAAAGGAGTACTCGACCTG
TACCAGCGAGGGCCGCGGAGATGGGCGGCTTGGTGGCTACCACCTGCA
TTTGACAGCGACAAGAAGTGGGCTTCTGCCCGACCAAGGATACAGTTTGT
TCTCTGTGGCGGCGATGAGTTGGCCACCGCTTATGGTCTTCCCTGCCGAA
GTGCCGAGGGCGCTCATGTACCTATGTACCCTTCACTGAGGGGGCCCCCTT
GCATAAGGACGACGCTGAATGGCATCCGGCACTTATGGTCTTCCCTGCCG
CCTGAGCCACGGCTTCAACCCACACCGCAGCCACCGGCTCCCGCA
CGGCTTGCACCCGACCCCTTGTCCACCCCTCAGAGCGCCACAGCT
GGCCCCACAGTTCCTCCCTCAGTGGCCCCACAGTTCCTCCCTGCTGGCC
TTCACGGCCACTACTGTGCTTTGAGTCCGGTGGACGATGCTCAACGTTGA
ACATCTTGCAGCCATCGCGGAGATTGGGAACAGCTGTATTGTTCAAGGAT
GGGAAGTACTGGCGATTTCTGAGGGCAGGGGACCGCGGCAAGGGCCCTT
TCTTATCGCCGACAAGTGGCCGCGCTGCCCGCAAGCTGCTGCTGCTT
GAGGAGCGCTTCCAAAGAGCTTCTTCTTCTTCCGCGGCA
```

【 図 7 - 2 】

FIGURE 7 (2枚中1枚目)(配列番号3)(続き)

ref|NM_004994.1| ホモサピエンスマトリックスメタロプロテイナーゼ9
(ゼラチナーゼB、92kDaゼラチナーゼ、92kDa | V型コラゲ
ナーゼ) (MMP9) mRNA(続き)

```
GGTGTGGGTGTACACAGGCGCGTCGGTGCTGGGCCGAGGCGTCTGGACAAG
CTGGGCCTGGGAGCCGACGTGGCCAGGTGACCGGGCCCTCCGGAGTGGCA
GGGGGAAGATGCTGCTGTTACAGCGGGCGGCCTCTGGAGGTTGACGTGAA
GGCGCAGATGGTGGATCCCCGAGCGCCAGCGAGGTGGACCGGATGTTCCCC
GGGTGCCTTTGGACACGCACGACGTCTTCCAGTACCGAGAGAAAGCCTATT
TCTGCCAGGACCGCTTCTACTGGCGCGTGAGTTCGGGAGTGAGTTGAACCAG
GTGGACCAAGTGGGCTACGTGACCTATGACATCCTGCAGTCCCTGAGGACT
AGGGCTCCCGTCTGCTTTGCAGTGCATGTAATCCCACCTGGGACCAACCC
TGGGGAAGGAGCCAGITTGCCGGATACAACTGGTATTCTGTTCTGGAGGAA
AGGGAGGAGTGGAGGTGGGCTGGGCCCTCTCTCACCTTTGTTTTTGTG
GAGTGTCTTCTAATAAACTGGATTCTTAACCTTT
```

【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成18年12月25日 (2006.12.25)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 配列表

【 補正方法 】 追加

【 補正の内容 】

【 配列表 】

200850290800001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US05/21002
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8): A01N 1/02(2006.01);A61K 31/765(2006.01);C12M 1/00(2006.01);G01N 31/00(2006.01),33/53(2006.01),35/00(2006.01) USPC: 424/78.37;435/2,7.9,7.91. 283.1;436/8,15,43 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) U.S. : 424/78.37; 435/2, 7.9, 7.91. 283.1; 436/8, 15, 43 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) West, caplus, biosis, biotechno, medline, scisearch, toxdit, wwpids, eplus, Commerical databases		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/86304 (VOLKER et al) 15 November 2001 (15.11.2001), see entire document.	1-18, 25, 31-34
Y		19-24, 26-30
Y	US 2004/0053242 A1 18 March 2004 (24.03.2004), see entire document.	1-34
Y	US 6,000,828 (LEET) 14 December 1999 (19.12.1999), see entire document.	19-24, 26-30
Y	PILETTE et al. Histopathological evaluation of Liver Fibrosis: quantitative image analysis vs semi-quantitative scores. 1998. Vol. 28, pages 439-446.	1-34
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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	"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
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 16 September 2006 (16.09.2006)		Date of mailing of the international search report 20 OCT 2006
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer J. Hines <i>Julia Hines</i> Telephone No. 571-272-0500

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

- (72) 発明者 ベッカ, ミヒャエル
ドイツ国 5 9 4 6 9 エンゼ, エルレンヴェーク 5
- (72) 発明者 クロル, ヴェルナー
ドイツ国 4 2 6 5 9 ゴーリンゲン, プファフェンベルガー ヴェーグ 3 1 0
- (72) 発明者 クノア, アンドレアス
ドイツ国 4 0 6 9 9 エアクラート, トリルザー グラーベン 1 0
- (72) 発明者 ウンガー, シルビア
ドイツ国 6 9 1 1 7 ハイデルベルク, フィッシャーガッセ 2
- (72) 発明者 ゲールマン, マティアス
ドイツ国 5 1 3 7 3 レーバクーゼン, アルテ ランドシュトラッセ 1 4 0
- (72) 発明者 ヘンニグ, ガイド
ドイツ国 5 0 8 5 9 ケルン, ネルツヴェーク 1 7
- (72) 発明者 ブルヒャルト, エルマー-ラインホルト
ドイツ国 5 8 2 3 9 シュヴェーアテ, ドルフシュトラッセ 2 8
- (72) 発明者 アーサー, マイケル ジェイ.
イギリス国 エスオー5 1 6 ビーワイ ハンプシャー, ウェスト ウェロー, スラブ レーン, スラブ ファーム
- (72) 発明者 パート, アレスター ディー.
イギリス国 エヌイー 6 1 3 ジェイエル ノースアンバーランド, フェアモアー モーフェ, ザ ギャブレス
- (72) 発明者 ピンザニ, マッシーモ
イタリア国 イ - 5 0 0 1 8 スカンデッチ, ヴィア ステファノ ウッジ 5 4
- (72) 発明者 シュバン, デートレフ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 9 2, ニーダム, グレンデール ロード 3 1
- (72) 発明者 シェル, ロバート ピー.
アメリカ合衆国 コネチカット, オックスフォード, ترام ドライブ 4 5
- (72) 発明者 ペトリ, クリストフ
ドイツ国 5 1 3 7 3 レーバクーゼン, ガイベルシュトラッセ 3
- (72) 発明者 ローゼンバーグ, ウイリアム
イギリス国 エスオー5 3 1 イーアール ハンプシャー, イーストレイ, チャンドラーズ
フォード, レイクウッド ロード 9

Fターム(参考) 2G045 AA13 AA25 CA25 CA26 DA20 DA30 DA36 FB03 JA01
4B024 AA11 CA04 CA12 GA11 HA12

专利名称(译)	与肝病有关的方法和系统		
公开(公告)号	JP2008502908A	公开(公告)日	2008-01-31
申请号	JP2007516651	申请日	2005-06-15
[标]申请(专利权)人(译)	拜尔健康护理有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	拜耳医药保健有限责任公司		
[标]发明人	フォルカーミヒャエル ベッカミヒャエル クロルヴェルナー クノアアンドレアス ウンガーシルビア ゲールマンマティアス ヘンニグガイド ブルヒャルトエルマーラインホルト アーサーマイケルジェイ パートアレスターディー ピンザニマッシーモ シュパンデートレフ シェルロパートピー ペトリクリストフ ローゼンバーグウイリアム		
发明人	フォルカー, ミヒャエル ベッカ, ミヒャエル クロル, ヴェルナー クノア, アンドレアス ウンガー, シルビア ゲールマン, マティアス ヘンニグ, ガイド ブルヒャルト, エルマー-ラインホルト アーサー, マイケル ジェイ. パート, アレスター ディー. ピンザニ, マッシーモ シュパン, デートレフ シェル, ロパート ピー. ペトリ, クリストフ ローゼンバーグ, ウイリアム		
IPC分类号	G01N33/49 G01N33/68 G01N33/53 C12N15/09 G06F19/24		
CPC分类号	C12Q1/6883 G01N33/6893 G01N2800/085 G16B40/00 G16H50/20 Y02A90/26		
FI分类号	G01N33/49.ZNA.Y G01N33/68 G01N33/53.D C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/DA20 2G045/DA30 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/JA01 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA12 4B024/GA11 4B024/HA12		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	10/868437 2004-06-15 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及使用多种血液标记值(包括血清和血浆标记值)的诊断方法,试剂盒和系统,以帮助诊断患者的肝病状态或进展以及相关的计算机可读以提供一个平台。本发明还涉及(1)筛选可用于治疗肝脏疾病的活性成分;(2)协助为患有或患有肝病的病人选择治疗方法;和和方法用于使用血液标记值包含有用的临床方案,以协助在血清和血浆的标记值在监测状态或(3)患者的一种或多种肝脏疾病的进展的情况下,设计系统和相关的计算机可读介质。

