

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-80943

(P2018-80943A)

(43) 公開日 平成30年5月24日(2018.5.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/576 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/576	Z 4 B O 2 9
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	D 4 B O 6 3
<b>C 1 2 Q 1/52 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	P 4 H O 4 5
<b>CO 7 K 16/18 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/52	
<b>C 1 2 Q 1/04 (2006.01)</b>	CO 7 K 16/18	

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-221813 (P2016-221813)	(71) 出願人	593146877 株式会社特殊免疫研究所 東京都文京区後楽1丁目1番10号
(22) 出願日	平成28年11月14日(2016.11.14)	(71) 出願人	504176911 国立大学法人大阪大学 大阪府吹田市山田丘1番1号
		(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100144794 弁理士 大木 信人
		(72) 発明者	三善 英知 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法 人大阪大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 N A S H の検出方法

(57) 【要約】

【課題】本発明は、患者がN A S Hに罹患しているか否かを高い精度で、簡便かつ容易に判定することを可能とする新たな手法を提供することを目的とする。

【解決手段】患者より採取された試料における、C K - 1 8 もしくはその断片、F u c - H p t、及びM a c - 2 b pの量を測定し、得られた測定値を用いて、患者がN A S Hに罹患しているか否かを判定する方法。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

非アルコール性脂肪肝炎（NASH）の検出方法であって、

患者より採取された試料における、サイトケラチン 18（CK-18）及び/又はその断片、フコシル化ハプトグロビン（Fuc-Hpt）、ならびにMac-2 結合タンパク質（Mac-2bp）の量を測定すること、

得られた測定値と参照値とを用いて、患者がNASHであるか否かを判定し、患者におけるNASHの有無を検出することを含む、方法。

## 【請求項 2】

CK-18 及び/又はその断片、Fuc-Hpt、ならびにMac-2bpの測定値が、酵素結合免疫吸着（ELISA）法により得られる、請求項 1 に記載の方法。

10

## 【請求項 3】

CK-18 及び/又はその断片の量を、M5 抗体及びM6 抗体ならびに/あるいはM30 抗体及びM5 抗体もしくはM6 抗体を用いて測定することを含む、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

さらに、AST（アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ）及びALT（アラニンアミノトランスフェラーゼ）の活性を測定し測定値を得ることを含む、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 5】

NASHの診断方法において使用するためのキットであって、患者より採取された試料におけるCK-18 もしくはその断片、Fuc-Hpt、及びMac-2bpのそれぞれに対する抗体を含む、キット。

20

## 【請求項 6】

CK-18 もしくはその断片、Fuc-Hpt、及びMac-2bpをそれぞれ標識するための抗体及び/又は化合物をさらに含む、請求項 5 に記載のキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、患者試料中のCK-18 及び/又はその断片、Fuc-Hpt、ならびにMac-2bpの測定値を利用したNASHの検出/診断方法に関する。

30

## 【背景技術】

## 【0002】

非アルコール性脂肪性肝疾患（nonalcoholic fatty liver disease；NAFLD）はアルコールを発生原因としない脂肪肝の総称である。NAFLDは、肝硬変や肝癌へと進行する可能性がある非アルコール性脂肪肝炎（nonalcoholic steatohepatitis）（以下、「NASH」と記載する）と、進行せず良性の経過をたどる非アルコール性脂肪肝（nonalcoholic fatty liver）（以下、「NAFL」と記載する）とに区別される。日本国内においては、約100万～200万人がNASHに罹患していると考えられている。

40

## 【0003】

現在、NASHの確定診断は、肝生検により行われることが一般的である。しかしながら、肝生検は部位による肝組織像の差異（サンプリングエラー）が生じ得、例えば、51例のNAFLD患者の2つの肝生検サンプルについて、各々のグレーディング（grading）及びステージング（staging）を行ったところ、肝脂肪化について41例（78%）、線維化について21例（41%）の一致率が示され、2つのサンプル間で差が生じたことが報告されている（非特許文献1）。また、左葉と右葉からの肝生検サンプルにおいて、線維化のステージで1段階以上の違いが約30%認められたとの報告もある。さらに、肝生検は肝臓に針を刺して組織や細胞を一部採取する工程を含むものであることから、患者、臨床現場、及び医療経済に過度の負担を強いるものであると共に、合併症

50

等のリスクを生ずるものとなっている。このように様々な問題を生じ得ることから、肝生検に代わる新たなNASH診断法の開発が切望されている。

【0004】

近年、患者血清におけるバイオマーカーの発現量を指標にして、NASHを検出・判定する方法が開発されている。このようなバイオマーカーには、AST、ALT、AST/ALT比、血小板、血糖、空腹時インスリン、HOMA-IR、レプチン、アディポネクチン、レチノール結合タンパク質4、脂質過酸化物質、酸化LDL、チオレドキシン、TNF- $\alpha$ 、高感度CRP、フェリチン、ペントラキシン3、IL-6、オステオプロテグリン、CC-ケモカインリガンド-2、ICAM-1、サイトケラチン18 (CK-18) の断片、ヒアルロン酸、4型コラーゲン7S、TGF- $\beta$ 1、TIMP1、DHEA-S、インスリン様成長因子1 (IGF-1)、エンドセリン-1、フコシル化ハプトグロビン (Fuc-Hpt)、Mac-2結合タンパク質 (Mac-2bp) 等が含まれる。例えば、CK-18の断片は、健常者やNAFLD患者と比べてNASH患者において高値を示すことが報告されている (非特許文献2-4)。また、Fuc-HptとMac-2bpの2つのバイオマーカーを組み合わせることでNASHを良好に検出・判定できることが報告されている (非特許文献5)。

10

【0005】

しかしながら、バイオマーカーを利用したNASHの検出・判定方法は、いずれも研究段階であり、実用化に至ってはならず、一般臨床レベルで利用可能な高い精度を有する手法の確立が切望されている。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Ratzliff V. et al., J Hepatol, 2010, 53, 372-384

【非特許文献2】Wieckowska A. et al., Hepatology, 2006, 44, 27-33

【非特許文献3】Yilmaz Y. et al., World J Gastroenterol, 2007, 13, 837-844

【非特許文献4】Diab DL. et al., Clin Gastroenterol Hepatol, 2008, 6, 1249-1254

30

【非特許文献5】Kamada Y. et al., Hepatology, 2015, Jul. 21

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

一般的に、病気の検出・判定方法の「精度」は、「感度」及び「特異度」によって評価することができる。「感度」及び「特異度」は、病気の検出・判定の結果と病気の有無に基づいて表すことができ、「感度」は、(真陽性)/(真陽性+偽陰性)の割合で、「特異度」は、(真陰性)/(真陰性+偽陽性)の割合で示される。感度を高めることにより、病気の検出能を高めることができ、病気の見落としが生じる可能性を低下させることができる。一方、特異度を高めることによって、病気でないものを病気と誤判定する可能性を低下させることができる。「感度」及び「特異度」はトレードオフの関係にあり、いずれを重要視するかは、病気の種類や検出・判定方法の目的に応じて異なる。

40

【0008】

NASHの検出・判定方法においては、NAFLD患者の中からNASH患者を見落とすことなく拾い上げることができる高い感度と、NASH患者とNAFL患者とを区別して検出・判定することができる高い特異度が要求される。

【0009】

本発明は、一般臨床レベルで利用可能な高い感度と高い特異度を有すると共に、簡便・

50

容易に実施することを可能とする、新たなNASHの検出・判定方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、患者より採取された試料における、サイトケラチン18 (CK-18) 及び/又はその断片、フコシル化ハプトグロビン (Fuc-Hpt)、ならびにMac-2結合タンパク質 (Mac-2bp) の量を測定し、得られた測定値を利用して、患者がNASHに罹患しているか否かを高い精度で判定/診断し、患者におけるNASHの有無を検出できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

10

【0011】

すなわち、本発明は以下の発明を包含する。

[1] 非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の検出方法であって、

患者より採取された試料における、サイトケラチン18 (CK-18) 及び/又はその断片、フコシル化ハプトグロビン (Fuc-Hpt)、ならびにMac-2結合タンパク質 (Mac-2bp) の量を測定すること、

得られた測定値と参照値とを用いて、患者がNASHであるか否かを判定し、患者におけるNASHの有無を検出することを含む、方法。

[2] CK-18及び/又はその断片、Fuc-Hpt、ならびにMac-2bpの測定値が、酵素結合免疫吸着 (ELISA) 法により得られる、[1]の方法。

20

[3] CK-18及び/又はその断片の量を、M5抗体及びM6抗体ならびに/あるいはM30抗体及びM5抗体もしくはM6抗体を用いて測定することを含む、[2]の方法。

[4] さらに、AST (アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ) 及びALT (アラニンアミノトランスフェラーゼ) の活性を測定し測定値を得ることを含む、[1]~[3]のいずれかの方法。

[5] NASHの診断方法において使用するためのキットであって、患者より採取された試料におけるCK-18もしくはその断片、Fuc-Hpt、及びMac-2bpのそれぞれに対する抗体を含む、キット。

[6] CK-18もしくはその断片、Fuc-Hpt、及びMac-2bpをそれぞれ標識するための抗体及び/又は化合物をさらに含む、[5]のキット。

30

【発明の効果】

【0012】

本発明によれば、患者がNASHに罹患しているか否かを高い精度で、簡便かつ容易に診断/判定することができ、患者におけるNASHの有無を検出することができる。

【0013】

また、本発明によれば、肝生検を用いることなく、低侵襲的な手法により、NAFLD患者より、NASH患者を高い精度で選別することができる。

【図面の簡単な説明】

【0014】

40

【図1】図1は、NAFL患者 (左) 及びNASH患者 (右) の血清試料中におけるCK-18の断片の測定値 (M30抗体による検出) を示すプロット図である。

【図2】図2は、NAFL患者 (左) 及びNASH患者 (右) の血清試料中におけるFuc-Hptの測定値を示すプロット図である。

【図3】図3は、NAFL患者 (左) 及びNASH患者 (右) の血清試料中におけるMac-2bpの測定値を示すプロット図である。

【図4】図4は、NAFL患者 (左) 及びNASH患者 (右) の血清試料中におけるCK-18及びその断片の測定値 (M5抗体による検出) を示すプロット図である。

【図5】図5は、患者血清試料中におけるCK-18の断片量 (M30抗体による検出) に基づくNASH診断能を示すROC (Receiver Operating Cha

50

r a c t e r i s t i c C u r v e ) 曲線である。

【図6】図6は、患者血清試料中におけるF u c - H p t量に基づくN A S H診断能を示すR O C曲線である。

【図7】図7は、患者血清試料中におけるM a c - 2 b p量に基づくN A S H診断能を示すR O C曲線である。

【図8】図8は、患者血清試料中におけるC K - 1 8及びその断片量(M 5抗体による検出)に基づくN A S H診断能を示すR O C曲線である。

【図9】図9は、患者血清試料中におけるF u c - H p t量及びM a c - 2 b p量の組み合わせに基づくN A S H診断能を示すR O C曲線である。

【図10】図10は、患者血清試料中におけるC K - 1 8の断片量(M 3 0抗体による検出)及びF u c - H p t量の組み合わせに基づくN A S H診断能を示すR O C曲線である。

【図11】図11は、患者血清試料中におけるC K - 1 8の断片量(M 3 0抗体による検出)及びM a c - 2 b p量の組み合わせに基づくN A S H診断能を示すR O C曲線である。

【図12】図12は、患者血清試料中におけるC K - 1 8の断片量(M 3 0抗体による検出)、F u c - H p t量及びM a c - 2 b p量の組み合わせに基づくN A S H診断能を示すR O C曲線である。

【図13】図13は、患者血清試料中におけるC K - 1 8の断片量(M 3 0抗体による検出)、C K - 1 8及びその断片量(M 5抗体による検出)、F u c - H p t量及びM a c - 2 b p量の組み合わせに基づくN A S H診断能を示すR O C曲線である。

【図14】図14は、患者血清試料中におけるC K - 1 8の断片量(M 3 0抗体による検出)、C K - 1 8及びその断片量(M 5抗体による検出)、F u c - H p t量、M a c - 2 b p量、A S T活性ならびにA L T活性の組み合わせに基づくN A S H診断能を示すR O C曲線である。

【図15】図15は、N A F L D f i b r o s i s s c o r e ( N F S ) に基づくN A S H診断能を示すR O C曲線である。

【図16】図16は、F I B 4 i n d e x に基づくN A S H診断能を示すR O C曲線である。

【図17】図17は、B A R D s c o r e に基づくN A S H診断能を示すR O C曲線である。

【発明を実施するための形態】

【0015】

#### 1. N A S H の 診 断 / 検 出 方 法

本発明は、患者より採取された試料における、サイトケラチン18(C K - 1 8)及び/又はその断片、フコシル化ハプトグロビン(F u c - H p t)、ならびにM a c - 2 結合タンパク質(M a c - 2 b p)等のタンパク質マーカーの量を測定し、当該測定値を利用して、該患者がN A S Hに罹患しているか否か診断/判定し、患者におけるN A S Hの有無を検出する方法に関する。

【0016】

(タンパク質マーカーの定量)

本発明において「患者」とは、明らかな飲酒歴のない(エタノール換算で1日20g未満の飲酒量)脂肪肝患者(いわゆるN A F L D患者)が挙げられる。N A F L D患者には、N A S H患者及びN A F L患者が含まれ得るが、本発明によればN A S H患者を、N A F L D患者の集団より高い精度で選別することができる。

【0017】

本発明において「患者より採取された試料」としては、患者由来の体液を挙げることで、患者より比較的低侵襲的に採取可能な試料を用いることができる。体液としては例えば、血液、血清、血漿、リンパ液、髄液、尿、精液、唾液、汗、涙、腹水、羊水等が挙げられるが、これらに限定はされない。好ましくは、患者より採取された試料は、血液、血清、又は血漿であり、より好ましくは血清である。

【0018】

10

20

30

40

50

本発明において、患者より採取された試料は、そのまま利用してもよいし、あるいは採取された試料より目的のタンパク質マーカーが精製又は粗精製された形態のものを利用してもよい。

【0019】

目的のタンパク質マーカーの精製又は粗精製は、タンパク質の精製もしくは粗精製に一般的に用いられる手法により行うことができ、例えば、超遠心分離法、限外濾過法、ゲル濾過カラム、高速液体クロマトグラフィー（High performance liquid chromatography、HPLC）、フィルター法、ポリマーによる沈殿法、抗体やレクチンによる吸着法等の一又は複数を組み合わせた手法により行うことができる。

10

【0020】

本発明の「タンパク質マーカー」としては、CK-18及び/又はその断片、Fuc-Hpt、ならびにMac-2bpが挙げられる。

【0021】

ヒトのCK-18は公知であり、GenBank等の公知のデータベース（例えば、UniProtKB/Swiss-Prot: P05783.2; NCBI Reference Sequence: NP\_954657.1; NCBI Reference Sequence: NP\_000215.1等）にそのアミノ酸配列情報及び遺伝子配列情報等が開示されており、本発明においてはこれらの情報を利用することができる。

20

【0022】

本発明において利用可能なCK-18の断片は、検出・定量可能なCK-18の断片であればよく、特に限定されるものではないが、CK-18がカスパーゼにより切断されて生じる断片等が挙げられる。CK-18がカスパーゼにより切断されて生じる断片は公知であり、CK-18のAsp・Ala・Leu・Asp-Ser部位をカスパーゼが認識・切断し生じた断片のうち、C末端にAsp・Ala・Leu・Aspのアミノ酸配列を有する断片を利用することができる（Thomas Luftら、BLOOD, VOL. 110, No. 13, pp. 4535-4542, 2007）。本明細書において、CK-18の断片を「CK-18F」と記載する場合がある。

【0023】

「Fuc-Hpt」は、ヒトのハプトグロビンにおけるN末端（メチオニン末端）より184番目、207番目、211番目、及び241番目より選択される一以上の位置におけるアスパラギンに結合した糖鎖にフコースが結合して修飾（フコシル化）されてなるハプトグロビンである（特開2009-168470号公報）。ヒトのハプトグロビンは公知であり、GenBank等の公知のデータベース（例えば、GenBank: AAA88080.1; GenBank: AH003344.2等）にそのアミノ酸配列情報及び遺伝子配列情報等が開示されており、本発明においてはこれらの情報を利用することができる。

30

【0024】

「Mac-2bp」は公知であり、ヒトのMac-2bpはGenBank等の公知のデータベース（例えば、GenBank: AAA36193.1; GenBank: L13210.1）にそのアミノ酸配列情報及び遺伝子配列情報等が開示されており、本発明においてはこれらの情報を利用することができる。本発明において、Mac-2bpはレクチンと結合していても、していなくてもよいが、好ましくは、Mac-2bpに関し、下記「捕捉手段」及び「標識手段」としてレクチンは利用しない。

40

【0025】

本発明の「タンパク質マーカー」には、上記CK-18及び/又はその断片、Fuc-Hpt、ならびにMac-2bpに加えて、AST（アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ）、ALT（アラニンアミノトランスフェラーゼ）、VCAM-1、IV型コラーゲン・7S、ヒアルロン酸等から選択される一又は複数を含めることができる。これらはGenBank等の公知のデータベースにそのアミノ酸配列情報及び遺伝子配列情報等が

50

開示されており、本発明においてはこれらの情報を利用することができる。例えば、A S TはGenBank : M37400 . 1やGenBank : AAA35563 . 1にそのアミノ酸配列情報及び遺伝子配列情報等が開示されており、また、A L TはNCBI Reference Sequence : NP\_005300 . 1やGenBank : D10355 . 1にそのアミノ酸配列情報及び遺伝子配列情報等が開示されており、本発明においてはこれらの情報を利用することができる。C K - 18及び/又はその断片、F u c - H p t、ならびにM a c - 2 b pに加えて、さらにこれらのタンパク質マーカ-を利用することによってN A S Hの診断/検出の精度をより高めることができる。

**【0026】**

試料中の各タンパク質マーカ-の定量は、タンパク質の定量解析において一般的に用いられる手法により行うことができ、例えば、酵素結合免疫吸着 ( E L I S A ) 法 ( サンドイッチ法、競合法 )、フローサイトメトリー法、ウェスタンブロット法、ナノトラッキング法 ( ナノサイト ( 登録商標 ) ) 等を利用することができるが、これらに限定はされない。好ましくはE L I S A法である。

10

**【0027】**

例えば、本発明の一例においては、固相担体に結合された各タンパク質マーカ-に対する抗体 ( 捕捉手段 ) と、試料とを接触させ、さらに、各タンパク質マーカ-に結合可能な標識手段を接触させ、これにより捕捉抗体 - タンパク質マーカ- - 標識手段からなるサンドイッチ複合体を形成する。次いで、当該複合体における標識手段を検出・定量することによって、試料中の各タンパク質マーカ-を検出・定量することができる。

20

**【0028】**

「捕捉手段」として利用可能な抗体は、標的となるタンパク質マーカ-と結合可能なものであればよく、ポリクローナル抗体であってもよいし、モノクローナル抗体であってもよいが、好ましくは、標的となるタンパク質マーカ-の特異的な検出を可能とするモノクローナル抗体である。

**【0029】**

抗体の種類は、特に限定されるものではなく、I g G、I g M、I g A、I g E、I g Dのいずれの種類も利用することができる。また、抗体には、標的となるタンパク質マーカ-と結合することが可能な抗体断片も含まれる。本発明において利用可能な「抗体断片」には、例えばF a b、F a b'、F ( a b' )<sub>2</sub>、F v、F a c b、F d等が含まれるが、これらに限定はされない。

30

**【0030】**

捕捉手段を固相化するための固相担体には、ラテックス、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリカーボネート、ポリビニルトルエン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ナイロン、ポリメタクリレート、ゼラチン、アガロース、セルロース、セファロース、ガラス、金属、セラミックス又は磁性体等 ( これらに限定はされない ) の材質、ならびにこれらの組み合わせからなるものを利用することができる。固相担体の形状は特に限定されることなく、プレート、ディッシュ、ビーズ、球、スティック等の形状とすることができる。固相担体への捕捉手段となる抗体の結合は、当業者に周知の方法を用いて行うことができ、例えば物理的吸着法、共有結合法、イオン結合法等によって行うことができる。一つの固相担体に対して、標的となるタンパク質マーカ-が異なる複数種の捕捉手段が固相化されていてもよいし、あるいは、異なる捕捉手段はそれぞれ別々の固相担体に固相化されていてもよい。

40

**【0031】**

「標識手段」としては、標的となるタンパク質マーカ-と結合可能な抗体や化合物を利用することができる。

**【0032】**

標識手段となる抗体は、ポリクローナル抗体であってもよいし、モノクローナル抗体であってもよいが、好ましくは、標的となるタンパク質マーカ-の特異的な検出を可能とするモノクローナル抗体である。また、抗体には、標的となるタンパク質マーカ-と結合す

50

ることが可能な抗体断片も含まれる。本発明において利用可能な「抗体断片」には、上述したものが挙げられる。

【0033】

標識手段として利用される抗体と、捕捉手段として利用される抗体とは、互いの結合が干渉しないように両者の結合部位（エピトープ）は異なるものであることが好ましい。また、標識手段として利用される抗体と、捕捉手段として利用される抗体とは、両者を区別して検出できるように、異なる動物種から産生されたものを利用することができる。

【0034】

本発明において捕捉手段、及び標識手段として利用可能な抗体は、抗体製造において一般的に用いられる手法（Kennetら、Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, New York, 1980）によって製造されたものを用いても良いし、あるいは市販のものを用いても良い。

【0035】

例えば、CK-18及び/又はその断片の捕捉手段又は標識手段として利用可能な抗体としては、CK-18の中間部（284位～396位のアミノ酸位置）を認識・結合できる抗体を利用することができ、またCK-18の断片の捕捉手段又は標識手段として利用可能な抗体としては、CK-18の断片のC末のAspを特異的に認識・結合できる抗体を利用することができる。

【0036】

例えば、CK-18及び/又はその断片の捕捉手段として、CK-18の中間部（284位～396位のアミノ酸位置）に対応する領域を認識・結合できる抗体を使用し、標識手段として、CK-18の断片のC末のAspを特異的に認識・結合できる抗体を使用してもよいし、あるいは、標識手段として、CK-18の中間部（284位～396位のアミノ酸位置）に対応する領域を認識・結合できる抗体を使用してもよい。標識手段として、CK-18の断片のC末のAspを特異的に認識・結合できる抗体、及び、CK-18の中間部（284位～396位のアミノ酸位置）に対応する領域を認識・結合できる抗体を使用する場合には、それぞれ別個の解析系において用いることが好ましい。

【0037】

本発明においては、CK-18及び/又はその断片の捕捉手段又は標識手段として、抗CK18マウスモノクローナル抗体（M5；VLVbio AB Nacka, Sweden）、抗CK18マウスモノクローナル抗体（M6；VLVbio AB Nacka, Sweden）、抗CK18フラグメント抗体（M30；VLVbio AB Nacka, Sweden）を利用することができる。好ましくは、捕捉手段として抗CK18マウスモノクローナル抗体（M5；VLVbio AB Nacka, Sweden）、又は抗CK18マウスモノクローナル抗体（M6；VLVbio AB Nacka, Sweden）を利用することができ、標識手段として、抗CK18フラグメント抗体（M30；VLVbio AB Nacka, Sweden）、抗CK18マウスモノクローナル抗体（M5；VLVbio AB Nacka, Sweden）、又は抗CK18マウスモノクローナル抗体（M6；VLVbio AB Nacka, Sweden）を利用することができる。なお、本明細書中、「抗CK18マウスモノクローナル抗体（M5；VLVbio AB Nacka, Sweden）」を単に「M5抗体」、抗CK18マウスモノクローナル抗体（M6；VLVbio AB Nacka, Sweden）を単に「M6抗体」、抗CK18フラグメント抗体（M30；VLVbio AB Nacka, Sweden）を単に「M30抗体」と呼ぶ場合がある。上述のCK-18の断片のC末のAspを特異的に認識・結合できる抗体には「M30抗体」が含まれ、CK-18及びその断片に含まれるサイトケラチン18の中間部（サイトケラチン18の284位～396位のアミノ酸位置）に対応する領域を認識・結合できる抗体には、「M5抗体」及び「M6抗体」が含まれる。なお、本明細書中、「CK-18及びその断片」を、単に「CK-18」と記載する場合がある。

10

20

30

40

50

## 【0038】

Fuc-Hptの捕捉手段として利用される抗体は、標識手段として利用するレクチンの非特異的な結合を回避すべく、Fc部分の糖鎖よりフコースを除去する(脱フコシル化)か、Fc部分を除去した抗体断片を用いることが好ましい。

## 【0039】

標識手段となる化合物としては、アプタマーやレクチン等が挙げられるが、これらに限定はされない。例えば、Fuc-Hptのフコシル化糖鎖に結合可能なレクチン(ヒヨクチャワンタケレクチン、スギタケレクチン等)を利用することができる。

## 【0040】

「標識手段」である抗体や化合物は、検出可能な標識化合物により標識することができる。このような標識化合物としては、例えば蛍光色素(FITC(フルオレセインイソシアネート)、PE(フィコエリスリン)、PerCP(ペリオジニクロロフィルプロテイン)、APC(アロフィコシアニン)、Alexa Fluor(登録商標)等)、酵素(ペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ等)、放射性物質、アビジン、ビオチン等が挙げられるが、これらに限定はされない。

10

## 【0041】

標識手段の検出は、標識手段に付された標識化合物を当該化合物の検出に適した方法で検出することによって行うことができる。

## 【0042】

試料中の各タンパク質マーカーの定量は、その活性値を検出・定量することによって行っても良い。例えば、ASTの活性は、確立されたMDH-UV法に準拠して行うことができる。すなわち、ASTは、 $\alpha$ -ケトグルタル酸のケト基とL-アスパラギン酸のアミノ基の転移反応を触媒して、オキサロ酢酸とグルタミン酸を生成する。この反応に共役して、リンゴ酸脱水素酵素(MDH)は生成したオキサロ酢酸の存在下で、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型(NADH)を $\alpha$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型(NAD)に変える。この時のNADHの減少速度を波長330~350nmで測定することにより、ASTの活性を求めることができる。また、ALTの活性は、確立されたLDH-UV法に準拠して行うことができる。すなわちALTは、 $\alpha$ -ケトグルタル酸のケト基とL-アラニンのアミノ基の転移反応を触媒して、ピルビン酸とグルタミン酸を生成する。この反応に共役して、乳酸脱水素酵素(LDH)は生成したピルビン酸の存在下で、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド還元型(NADH)を $\alpha$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型(NAD)に変える。この時のNADHの減少速度を波長330~350nmで測定することにより、ALTの活性を求めることができる。

20

30

## 【0043】

(判定方法)

患者より採取された試料におけるタンパク質マーカー量の測定値を、各タンパク質マーカーの「参照値」と比較することによって、当該患者がNAFLDに罹患しているか否か診断/判定することができる。なお、本明細書において、NAFLDを「判定」、「診断」、「検出」とするとは、医師によるものではなく、*in vitro*での検査による結果に基づいた、「判定」、「診断」、「検出」の補助であってもよい。

40

## 【0044】

本発明においては、NAFLD患者より採取された試料におけるタンパク質マーカー量の測定値と、NAFLD患者より採取された試料におけるタンパク質マーカー量の測定値を利用して、NAFLD患者群とNAFLD患者群とを分ける判別式(判別関数)を作成し、当該判別式を利用して、患者がNAFLDに罹患しているか否かを判定することができる。

## 【0045】

すなわち、本発明においては、NAFLDに罹患していることが既知である患者及びNAFLDに罹患していることが既知である患者(すなわち、非NAFLD患者)より採取された試料における上述の各タンパク質マーカー量を測定し、これらの測定値を利用して、NA

50

S H患者及びN A F L患者（非N A S H患者）を分類する判別式を作成し、当該判別式に基づいてN A S H患者及びN A F L患者を判別するカットオフ値（参照値）を求める。次いで、被験者（患者）より採取された試料における各タンパク質マーカール量を同様に測定し、得られた測定値を当該判別式に代入し、当該判別式から得られた結果を参照値と比較することによって、患者がN A S Hに罹患しているか否かを判定する。

【0046】

判別式は、線形判別法（ロジスティック回帰分析、フィッシャーの判別分析、ナイーブベイズ分類器、単純パーセプトロン、線形サポートベクターマシン等）や、非線形判別法（カーネル法、ニューラルネットワーク、k近傍法、判別木、アンサンブル法等）等、公知の手法に利用して作成することができる。

10

【0047】

カットオフ値（参照値）は、判別式を使用して作成されたROC（Receiver Operating Characteristic Curve）曲線より求めることができる。ROC曲線に示される「真陽性（感度）」及び「偽陽性（1 - 特異度）」に関し、「真陽性（感度）」 - 「偽陽性（1 - 特異度）」が最大となる値（Youden index）をカットオフ値（参照値）とすることができる。

【0048】

判別式の性能（判定の精度）は、ROC曲線下の面積（Area under the curve, AUC）より確認することができる。AUCは0.5 ~ 1の範囲の数値であらわされ、1に近づくほど高い精度を有することを示す。本発明において好ましくは、AUCは0.9以上である。

20

【0049】

本発明において、判別式、ROC曲線、及び/又は、カットオフ値（参照値）は、公知の統計解析ソフトを使用して得てもよい。

【0050】

本発明の一実施形態においては、N A S Hに罹患していることが既知である患者及びN A F Lに罹患していることが既知である患者より採取された試料における上述の各タンパク質マーカール量を測定し、これらの測定値よりロジスティック回帰分析に基づいて、N A S H患者及びN A F L患者（非N A S H患者）を分類するロジスティックモデル式（判別式）を作成し、また、当該判別式に基づいてROC曲線を作成し、ROC曲線において「真陽性（感度）」 - 「偽陽性（1 - 特異度）」が最大となる値をN A S H患者及びN A F L患者を判別するカットオフ値（参照値）とする。次いで、被験者（患者）より採取された試料における各タンパク質マーカール量を同様に測定し、得られた測定値を当該判別式に代入し、当該判別式から得られた結果（スコア）を参照値と比較し、当該判別式から得られた結果（スコア）が参照値以上である場合に、当該被験者（患者）がN A S Hに罹患していると判定する。

30

【0051】

## 2. N A S Hの診断/検出方法において使用するためのキット

本発明はまた、上述の方法において使用するためのキットに関する。

【0052】

本キットには、上述のタンパク質マーカールを捕捉するための各捕捉手段を含めることができる。捕捉手段には、上述のCK - 18及び/又はその断片、Fuc - Hpt、ならびにMac - 2bpと結合することが可能な抗体を含めることができる。例えば、CK - 18の中間部（284位 ~ 396位のアミノ酸位置）に対応する領域を認識・結合できる抗体（M5抗体やM6抗体）等を含めることができる。好ましくは捕捉手段である抗体は固相担体に結合されている。

40

【0053】

加えて/あるいは、本キットには、上述のタンパク質マーカールを標識するための各標識手段を含めることができる。標識手段には、上述のCK - 18及び/又はその断片、Fuc - Hpt、及びMac - 2bpと結合することが可能な抗体や化合物を含めることがで

50

きる。例えば、CK-18の断片のC末のAspを特異的に認識・結合できる抗体(M30抗体等)やFuc-Hptのフコシル化糖鎖に結合可能なレクチン(ヒドロチャワンタケレクチン、スギタケレクチン等)等を含めることができる。

【0054】

本キットにはさらに、タンパク質マーカーと捕捉手段/標識手段と結合反応に適当な緩衝液、当該結合反応の非特異的な結合を阻害するためのブロッキング試薬、標識手段を検出するための検出試薬等を含めることができる。

【0055】

以下、実施例により本発明を具体的に説明する。但し、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

10

【実施例】

【0056】

実施例1: CK-18及び/又はその断片、Fuc-Hpt、ならびにMac-2bpの測定

1. 測定系及び測定条件

(1-1) M30抗体を用いたCK-18の断片のELISA測定系の作製

抗CK18マウスモノクローナル抗体(M5; VLVbio AB Nacka, Sweden)を、100mMの炭酸塩緩衝液(pH9.5)中に5µg/mLの濃度にて調製した抗体液を、96ウェルマイクロタイタープレートに100µL/ウェル充填し、4で一晩インキュベートして固相化した。

20

【0057】

次に、0.1% Tween 20含有リン酸緩衝液(PBS-T)で3回洗浄した後、3%ウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝液(PB)(ブロッキング液)を各ウェル充填し、4で一晩インキュベートしてブロッキングを行った。

【0058】

次いで、ブロッキング液を取り除き、PBS-Tで2回洗浄した後、以下の実験に利用した。

【0059】

(1-2) 検体におけるCK-18の断片の検出・測定

CK-18の断片の検出は、ペルオキシダーゼ(HRP)で標識した抗CK18フラグメント抗体(M30; VLVbio AB Nacka, Sweden)を使用した。

30

組換えヒトCK18の断片を1%BSA含有PBS-Tで希釈して検量標準品とした。

【0060】

試験検体25µL及び検量標準品25µLをそれぞれ、(1-1)で作製した測定系のウェルに添加し、続いてHRP標識した抗CK18フラグメント抗体(M30)75µLを添加して、25で1時間インキュベートした。

【0061】

インキュベート終了後、各ウェルをPBS-Tで5回洗浄し、テトラメチルベンジジン(Kem-En-Tec Diagnostics A/S, Taastrup, Denmark)の溶液100µLを基質として各ウェルに添加した。暗所にて、室温で30分間インキュベートした後、100µLの1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加えて、反応を終了させた。

40

【0062】

各ウェルの吸光度(波長450nm)をマイクロプレートリーダー(E-Max; Molecular Devices, Sunnyvale, CA)を用いて、CK-18の断片量を測定した。

【0063】

(2-1) Fuc-HptのELISA測定系の作製

抗ヒトハプトグロビン抗体(Dako, Carpinteria, CA)をパパイソ消化してFab断片とし、これを100mMの炭酸塩緩衝液(pH9.5)中に5µg/mLの濃度にて調製した抗体液を、96ウェルマイクロタイタープレートに100µL/ウ

50

エル充填し、4 で一晩インキュベートして固相化した。

【0064】

次に、上記(1-1)に記載したのと同様の手法にてブロッキングを行い、PBS-Tで洗浄した後、以下の実験に利用した。

【0065】

(2-2) 検体におけるFuc-Hptの検出・測定

Fuc-Hptの検出は、ビオチンで標識したヒヨロチャワンタケレクチン(J-オイルミルズ)、及びHRPで標識したアビジン(Novus biological, LLC)を使用した。

組換えFuc-Hptを1%BSA含有PBS-Tで希釈して検量標準品とした。

10

【0066】

試験検体50 $\mu$ L及び検量標準品50 $\mu$ Lをそれぞれ、(2-1)で作製した測定系のウェルに添加し、室温にて1時間インキュベートした。

【0067】

続いて、1/1000希釈したビオチン化ヒヨロチャワンタケレクチン50 $\mu$ Lを添加して、室温にて1時間インキュベートした。

【0068】

インキュベート終了後、各ウェルをPBS-Tで3回洗浄した後、HRP標識アビジン50 $\mu$ Lを添加して、室温にて1時間インキュベートした。

【0069】

インキュベート終了後、上記(1-2)に記載したのと同様の手法にて、反応を終了させた後、各ウェルの吸光度(波長450nm)を上記(1-2)に記載したのと同様の手法にて測定した。

20

【0070】

(3-1) Mac-2bpのELISA測定系の作製

C末端にFLAGタグを含む完全及び部分長組換えヒトMac-2bpsを、HEK293細胞で発現させ、ANTI-FLAG M2アフィニティーゲル(Sigma-Aldrich)を用いて精製した。得られた組換えヒトMac-2bpsタンパク質を免疫抗原としてマウスに投与し、常法に従って、抗ヒトMac-2bpsマウスモノクローナル抗体を作製し、ヒトMac-2bpsに対して特に強い反応性を示した二つのクローン、8A2及び67A1を得、これらの抗体を以下の実験に利用した。

30

【0071】

8A2をペプシン消化してのF(ab')<sup>2</sup>断片とし、これを100mMの炭酸塩緩衝液(pH9.5)中に0.5 $\mu$ g/mLの濃度にて調製した抗体液を、96ウェルマイクロタイタープレートに100 $\mu$ L/ウェル充填し、4 で一晩インキュベートして固相化した。

【0072】

次に、0.1%Tween 20含有リン酸緩衝液(PBS-T)で3回洗浄した後、1%ウシ血清アルブミン及び0.05%アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝液(PB)(ブロッキング液)200 $\mu$ Lを各ウェル充填し、4 一晩インキュベートしてブロッキングを行った。

40

【0073】

次いで、ブロッキング液を取り除き、PBS-Tで2回洗浄した後、以下の実験に利用した。

【0074】

(3-2) 検体におけるMac-2bpの検出・測定

Mac-2bpの検出は、HRPで標識した67A1を使用した。

組換えヒトMac-2bpsを1%BSA含有PBS-Tで希釈して検量標準品とした。

【0075】

50

試験検体 100  $\mu$ L 及び検量標準品 100  $\mu$ L をそれぞれ、(3 - 1) で作製した測定系のウェルに添加し、4 にて1時間インキュベートした。

【0076】

インキュベート終了後、各ウェルを PBS - T で4回洗浄した後、100  $\mu$ L のHRP 標識67A1を添加して、4 にて30分間インキュベートした。

【0077】

インキュベート終了後、上記(1 - 2)に記載したのと同様の手法にて、反応を終了させた後、各ウェルの吸光度(波長450nm)を上記(1 - 2)に記載したのと同様の手法にて測定した。

【0078】

(4 - 1) M5抗体を用いたCK - 18及びその断片のELISA測定系の作製  
抗CK18マウスモノクローナル抗体(M6; VLVbio AB Nacka, Sweden)を、100mMの炭酸塩緩衝液(pH9.5)中に5  $\mu$ g/mLの濃度にて調製した抗体液を、96ウェルマイクロタイタープレートに100  $\mu$ L/ウェル充填し、4で一晩インキュベートして固相化した。

【0079】

次に、上記(1 - 1)に記載したのと同様の手法にてブロッキングを行い、PBS - Tで洗浄した後、以下の実験に利用した。

【0080】

(4 - 2) 検体におけるCK - 18及びその断片の検出・測定  
CK - 18及びその断片の検出は、ペルオキシダーゼ(HRP)で標識した抗CK18マウスモノクローナル抗体(M5; VLVbio AB Nacka, Sweden)を使用した。

【0081】

上記(1 - 2)に記載したのと同様の手法にて、試験検体25  $\mu$ L及び検量標準品25  $\mu$ Lをそれぞれ、(4 - 1)で作製した測定系のウェルに添加し、続いてHRP標識した抗CK18マウスモノクローナル抗体(M5)75  $\mu$ Lを添加して、25 で1時間インキュベートした。

【0082】

インキュベート終了後、上記(1 - 2)に記載したのと同様の手法にて、反応を終了させた後、各ウェルの吸光度(波長450nm)を上記(1 - 2)に記載したのと同様の手法にて、CK - 18及びその断片の量を測定した。

【0083】

(5 - 1) 検体におけるAST活性の検出・測定  
AST活性は、確立されたMDH - UV法にしたがって、AST試薬・L「コクサイ」(シスメックス株式会社)を製造元の指示書に従って利用して行った。

【0084】

(6 - 1) 検体におけるALT活性の検出・測定  
ALT活性は、確立されたLDH - UV法にしたがって、ALT試薬・L「コクサイ」(シスメックス株式会社)を製造元の指示書に従って利用して行った。

【0085】

2. 試験検体  
試験検体として、NAFL患者(58名)、及びNASH患者(95名)それぞれより採取された血清試料を用いた。

【0086】

3. 測定結果  
上記各ELISA測定系を用いた、NAFL患者及びNASH患者の血清試料におけるCK - 18及び/又はその断片、Fuc - Hpt及びMac - 2bpの測定結果を図1 ~ 4に示す。

【0087】

10

20

30

40

50

図1は、NAFL患者（左）及びNASH患者（右）の血清試料に基づいて測定されたCK-18の断片量（HRP標識したM30抗体による検出）をそれぞれプロットした結果を示す。

【0088】

図2は、NAFL患者（左）及びNASH患者（右）の血清試料に基づいて測定されたFuc-Hpt量をそれぞれプロットした結果を示す。

【0089】

図3は、NAFL患者（左）及びNASH患者（右）の血清試料に基づいて測定されたMac-2bp量をそれぞれプロットした結果を示す。

【0090】

図4は、NAFL患者（左）及びNASH患者（右）の血清試料に基づいて測定されたCK-18及びその断片量（HRP標識したM5抗体による検出）をそれぞれプロットした結果を示す。

【0091】

また、CK-18及び/又はその断片、Fuc-Hpt又は、Mac-2bpの各測定値に基づくNASH診断能についてのROC（Receiver Operating Characteristic Curve）曲線を図5～8に示す。ROC曲線は、ロジスティック回帰分析による判別式に基づき、JMP Pro11.0ソフトウェア（SAS Institute Inc, Cary, VC）を用いて作成した。ROC曲線の横軸は偽陽性（1 - 特異度）を、縦軸は真陽性（感度）を示す。得られたROC曲線において「真陽性（感度） - 偽陽性（1 - 特異度）」の値が最大となる点をカットオフ値として示す。

【0092】

図5は、CK-18の断片量（HRP標識したM30抗体による検出）に基づくROC曲線を示し、AUC（Area Under Curve）は0.733であり、カットオフ値（U/L）は331.0を示し、その時の感度（%）は71.6、特異度（%）は69.0を示した。また、特異度（%）が90であるとき、感度（%）はおおよそ30程度であることが示された。

【0093】

図6は、Fuc-Hpt量に基づくROC曲線を示し、AUCは0.759であり、カットオフ値（U/mL）は544.2を示し、その時の感度（%）は69.5、特異度（%）は72.4を示した。また、特異度（%）が90であるとき、感度（%）はおおよそ40程度であることが示された。

【0094】

図7は、Mac-2bp量に基づくROC曲線を示し、AUCは0.868であり、カットオフ値（ $\mu\text{g/mL}$ ）は1.26を示し、その時の感度（%）は92.6、特異度（%）は70.7を示した。また、特異度（%）が90であるとき、感度（%）はおおよそ60程度であることが示された。

【0095】

図8は、CK-18及びその断片量（HRP標識したM5抗体による検出）に基づくROC曲線を示し、AUCは0.783であり、カットオフ値（U/L）は627.0を示し、その時の感度（%）は73.1、特異度（%）は75.9を示した。また、特異度（%）が90であるとき、感度（%）はおおよそ28程度であることが示された。

【0096】

さらに、CK-18及び/又はその断片、Fuc-Hpt、Mac-2bp、AST及びALTより選択される2以上のタンパク質マーカーの組み合わせの測定値に基づくNASH診断能についてのROC曲線を図9～14に示す。各判別式において、得られたROC曲線において「真陽性（感度） - 偽陽性（1 - 特異度）」の値が最大となるpの値をカットオフ値として示す。

【0097】

10

20

30

40

50

図9は、Fuc-Hpt量及びMac-2bp量の組み合わせについて以下の判別式：

$\text{Logit}(p) = -3.744 + 0.0019 \times \text{Fuc-Hpt} + 1.711 \times \text{Mac-2bp}$  ; (Fuc-HptはFuc-Hpt量の値を、Mac-2bpはMac-2bp量の値を示す)

に基づくROC曲線を示し、AUCは0.896であり、カットオフ値(p)は0.442を示し、その時の感度(%)は88.4、特異度(%)は75.9を示した。また、特異度(%)が90であるとき、感度(%)はおよそ70程度であることが示された。

【0098】

図10は、CK-18の断片量(HRP標識したM30抗体による検出)及びFuc-Hpt量の組み合わせについて以下の判別式：

$\text{Logit}(p) = -1.402 + 0.0017 \times \text{Fuc-Hpt} + 0.0018 \times \text{CK-18F}$  ; (Fuc-HptはFuc-Hpt量の値を、CK-18FはCK-18の断片量の値を示す)

に基づくROC曲線を示し、AUCは0.800であり、カットオフ値(p)は0.509であり、その時の感度(%)は77.9、特異度(%)は67.2を示した。また、特異度(%)が90であるとき、感度(%)はおよそ40程度であることが示された。

【0099】

図11は、CK-18の断片量(HRP標識したM30抗体による検出)及びMac-2bp量の組み合わせについて以下の判別式：

$\text{Logit}(p) = -3.339 + 1.707 \times \text{Mac-2bp} + 0.0018 \times \text{CK-18F}$  ; (Mac-2bpはMac-2bp量の値を、CK-18FはCK-18の断片量の値を示す)

に基づくROC曲線を示し、AUCは0.883であり、カットオフ値(p)は0.466であり、その時の感度(%)は89.5、特異度(%)は72.4を示した。また、特異度(%)が90であるとき、感度(%)はおよそ65程度であることが示された。

【0100】

図12は、CK-18の断片量(HRP標識したM30抗体による検出)、Fuc-Hpt量及びMac-2bp量の組み合わせについて以下の判別式：

$\text{Logit}(p) = -4.32 + 1.720 \times \text{Mac-2bp} + 0.0017 \times \text{Fuc-Hpt} + 0.0015 \times \text{CK-18F}$  ; (Mac-2bpはMac-2bp量の値を、Fuc-HptはFuc-Hpt量の値を、CK-18FはCK-18の断片量の値を示す)

に基づくROC曲線を示し、AUCは0.906であり、カットオフ値(p)は0.563であり、その時の感度(%)は86.3、特異度(%)は79.3を示した。また、特異度(%)が90であるとき、感度(%)はおよそ70程度であることが示された。カットオフ値(p)が0.747である場合に、特異度(%)が90を示す。

【0101】

図13は、CK-18の断片量(HRP標識したM30抗体による検出)、CK-18及びその断片量(HRP標識したM5抗体による検出)、Fuc-Hpt量ならびにMac-2bp量の組み合わせについて以下の判別式：

$\text{Logit}(p) = -4.28 + 1.641 \times \text{Mac-2bp} + 0.0018 \times \text{Fuc-Hpt} - 0.00055 \times \text{CK-18F} + 0.0012 \times \text{CK-18}$  ; (Mac-2bpはMac-2bp量の値を、Fuc-HptはFuc-Hpt量の値を、CK-18FはCK-18の断片量の値を、CK-18はCK-18及び/又はその断片量の値を示す)

に基づくROC曲線を示し、AUCは0.908であり、カットオフ値は0.489であり、その時の感度(%)は89.3、特異度(%)は77.6を示した。また、特異度(%)が90であるとき、感度(%)はおよそ70程度であることが示された。カットオフ値(p)が0.755である場合に、特異度(%)が90を示す。

【0102】

10

20

30

40

50

図14は、CK-18の断片量(HRP標識したM30抗体による検出)、CK-18及びその断片量(HRP標識したM5抗体による検出)、Fuc-Hpt量、Mac-2bp量、AST活性値ならびにALT活性値の組み合わせについて以下の判別式：

$$\text{Logit}(p) = -5.24 + 1.584 \times \text{Mac-2bp} + 0.0016 \times \text{Fuc-Hpt} + 0.00033 \times \text{CK-18F} - 0.00011 \times \text{CK-18} + 0.0761 \times \text{AST} - 0.024 \times \text{ALT};$$

(Mac-2bpはMac-2bp量の値を、Fuc-HptはFuc-Hpt量の値を、CK-18FはCK-18の断片量の値を、CK-18はCK-18及びその断片量の値を、ASTはAST活性の値を、ALTはALT活性の値を示す)

に基づくROC曲線を示し、AUCは0.928であり、カットオフ値は0.667を示し、その時の感度(%)は79.6、特異度(%)は91.4を示した。カットオフ値(p)が0.648である場合に、特異度(%)が90を示す。

#### 【0103】

以上の結果より、NASH患者の血清中におけるCK-18及び/又はその断片、Fuc-HptならびにMac-2bpの各測定値は、NAFL患者の血清中におけるそれらの値よりも有意に高いことが確認された(図1-図4)。

#### 【0104】

また、CK-18の断片量(HRP標識したM30抗体による検出)、Fuc-Hpt量及びMac-2bp量の3つの組み合わせ、また、CK-18の断片量(HRP標識したM30抗体による検出)、CK-18及びその断片量(HRP標識したM5抗体による検出)、Fuc-Hpt量ならびにMac-2bp量の4つの組み合わせ、さらに、CK-18の断片量(HRP標識したM30抗体による検出)、CK-18及びその断片量(HRP標識したM5抗体による検出)、Fuc-Hpt量、Mac-2bp量、AST活性値ならびにALT活性値の6つの組み合わせ、に基づくROC曲線においては、いずれもAUCが0.9を超え、このAUC値は、CK-18及び/又はその断片を単独で、Fuc-Hptを単独で、Mac-2bpを単独で、Fuc-HptとMac-2bpとの2つの組み合わせで、CK-18の断片とFuc-Hptとの2つの組み合わせで、又はCK-18の断片とMac-2bpとの2つの組み合わせで用いた場合に得られたAUC値と比べて高いものであり、より優れた診断能を有することが確認された。そして、CK-18の断片量(HRP標識したM30抗体による検出)、Fuc-Hpt量及びMac-2bp量の3つの組み合わせ、また、CK-18の断片量(HRP標識したM30抗体による検出)、CK-18及びその断片量(HRP標識したM5抗体による検出)、Fuc-Hpt量ならびにMac-2bp量の4つの組み合わせ、さらに、CK-18の断片量(HRP標識したM30抗体による検出)、CK-18及びその断片量(HRP標識したM5抗体による検出)、Fuc-Hpt量、Mac-2bp量、AST活性値ならびにALT活性値の6つの組み合わせを用いた場合には、特異度(%)が90である場合においても、およそ70程度の感度(%)を有し、これらタンパク質マーカーを用いた手法が特異度及び感度がいずれも優れた判定を実現できることが確認された。

#### 【0105】

実施例2：その他スコアリングシステムによるNASHの診断

近年、タンパク質マーカーに限定されることなく、一般臨床検査で測定可能な複数の因子を組み合わせたスコアリングシステムが、NASHの診断に利用することが報告されている。以下に、代表的なスコアリングシステムを示す。

#### 【0106】

##### 1) NAFLD fibrosis score (NFS)

計算式： $-1.675 + 0.037 \times \text{Age (年)} + 0.094 \times \text{BMI (kg/m}^2) + 1.13 \times \text{IFG/糖尿病 (あり=1、なし=0)} + 0.99 \times \text{AST/ALT} - 0.013 \times \text{血小板数 (} \times 10^9 / \text{L)} - 0.66 \times \text{アルブミン (g/dl)}$

##### 2) FIB4 index

計算式： $\text{Age} \times \text{AST (U/L)} / \text{血小板数 (} \times 10^9 / \text{L)} / \text{ALT (U/L)}$

10

20

30

40

50

### 3) BARD score

計算式：スケール0～4点；BMI  $28 \text{ kg/m}^2$  1点；AST/ALT 0.8  
2点；糖尿病あり 1点

#### 【0107】

上記各スコアリングシステムに基づき、JMP Pro 11.0ソフトウェア(SAS Institute Inc, Cary, VC)を用いて、ROC曲線を作成した(図15～17)。NASH診断能についてのROC曲線を図15～17に示す。ROC曲線の横軸は偽陽性(1-特異度)を、縦軸は真陽性(感度)を示す。

#### 【0108】

図15は、患者110名を対象とした、NFSに基づくROC曲線を示し、AUCは0.614であり、カットオフ値は-0.658を示し、その時の感度(%)は34.1、特異度(%)は94.1を示した。また、特異度(%)が90であるとき、感度(%)はおよそ35程度であることが示された。

10

#### 【0109】

図16は、患者153名を対象とした、FIB4 indexに基づくROC曲線を示し、AUCは0.738であり、カットオフ値は1.37を示し、その時の感度(%)は61.1、特異度(%)は93.1を示した。また、特異度(%)が90であるとき、感度(%)はおよそ60程度であることが示された。

#### 【0110】

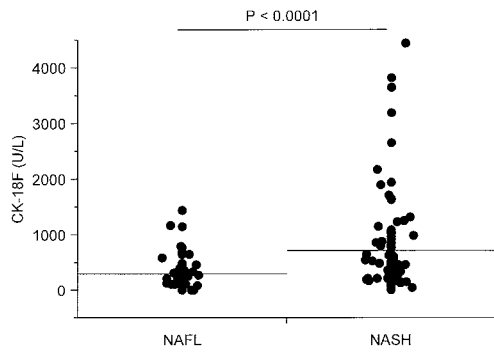
図17は、患者94名を対象とした、BARD scoreに基づくROC曲線を示し、AUCは0.692であり、カットオフ値は2を示し、その時の感度(%)は52.6、特異度(%)は77.8を示した。また、特異度(%)が90であるとき、感度(%)はおよそ35程度であることが示された。

20

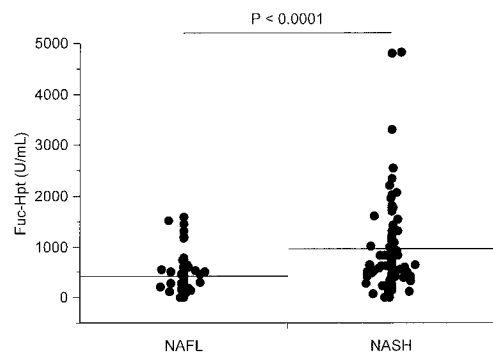
#### 【0111】

これらのAUCは、上記実施例1のタンパク質マーカーの組み合わせによる判別式に基づくAUCと比べて顕著に低く、また特異度(%)が90であるときの感度(%)も低いことが確認された。このことから実施例1に記載のタンパク質マーカーの組み合わせに基づくNASH診断法の高い精度・有用性が確認された。

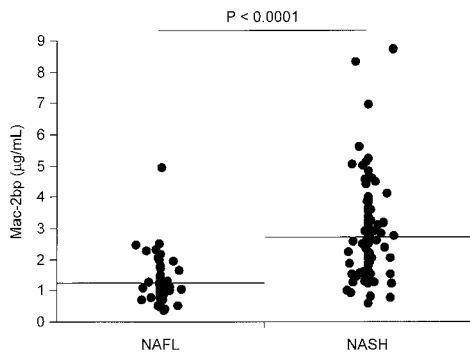
【 図 1 】



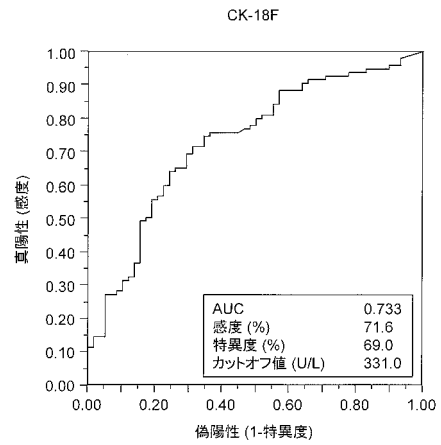
【 図 2 】



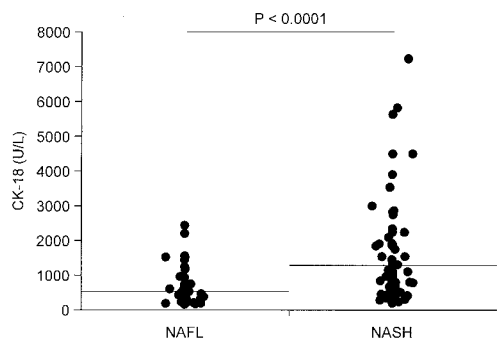
【 図 3 】



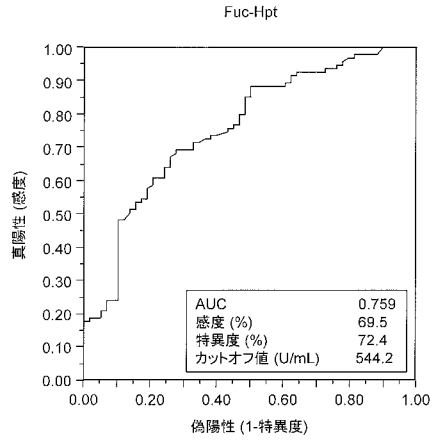
【 図 5 】



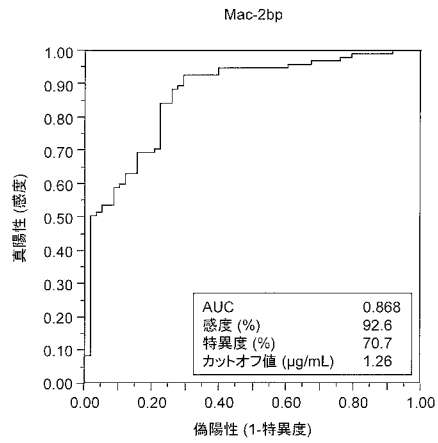
【 図 4 】



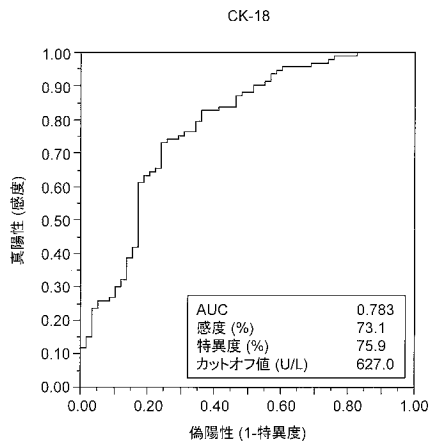
【 図 6 】



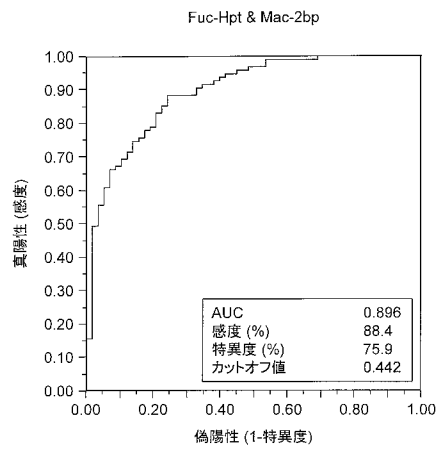
【 図 7 】



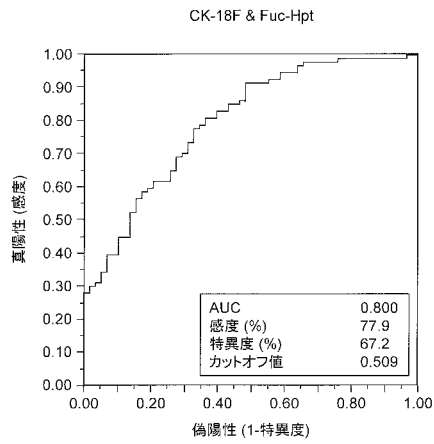
【 図 8 】



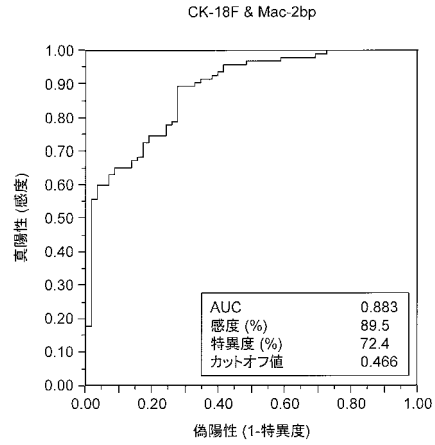
【 図 9 】



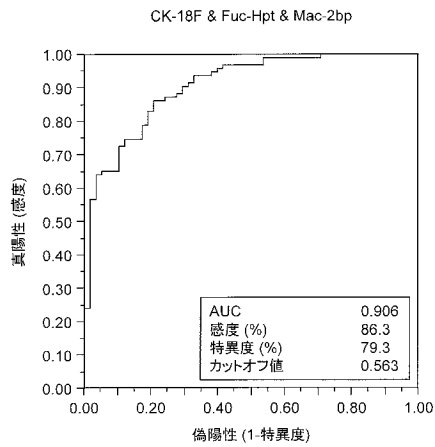
【 図 1 0 】



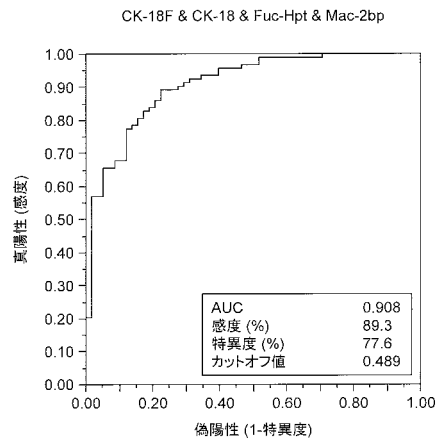
【 図 1 1 】



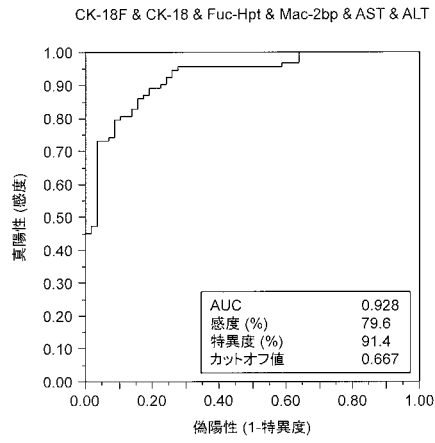
【 図 1 2 】



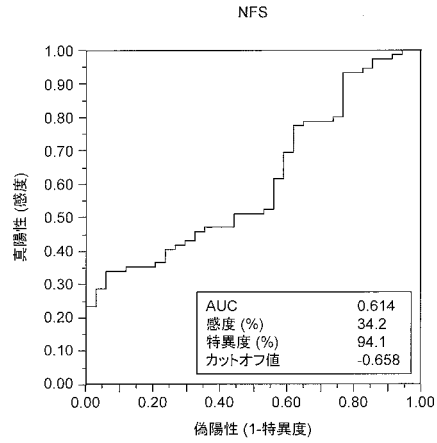
【 図 1 3 】



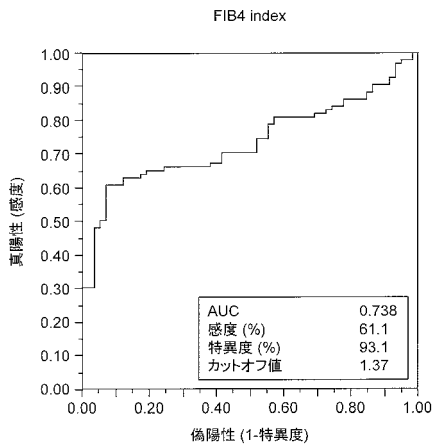
【 図 1 4 】



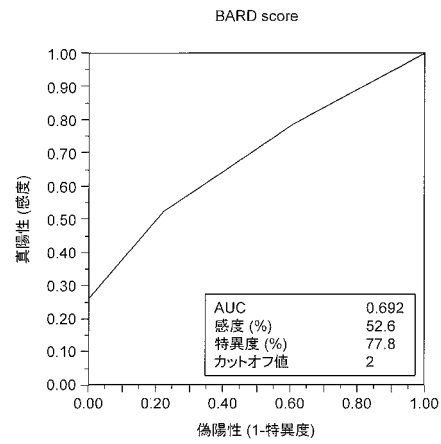
【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



【 図 1 7 】



---

 フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>C 1 2 M 1/34 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/04	
	C 1 2 M 1/34	E
	C 1 2 M 1/34	F
	C 1 2 M 1/34	B

(72)発明者 鎌田 佳宏  
 大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内

(72)発明者 伊藤 行夫  
 東京都文京区後楽 1 - 1 - 1 0 株式会社特殊免疫研究所内

(72)発明者 南 俊夫  
 東京都文京区後楽 1 - 1 - 1 0 株式会社特殊免疫研究所内

F ターム(参考) 4B029 AA07 BB11 BB16 BB17 CC01 FA12 FA13  
 4B063 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ26 QQ79 QR06 QR48 QR72 QR77  
 QS02 QS07 QS33 QX01  
 4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75 EA50 FA71

专利名称(译)	如何检测NASH		
公开(公告)号	<a href="#">JP2018080943A</a>	公开(公告)日	2018-05-24
申请号	JP2016221813	申请日	2016-11-14
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社特殊免疫研究所 国立大学法人大阪大学		
申请(专利权)人(译)	株式会社特殊免疫研究所 国立大学法人大阪大学		
[标]发明人	三善英知 鎌田佳宏 伊藤行夫 南俊夫		
发明人	三善 英知 鎌田 佳宏 伊藤 行夫 南 俊夫		
IPC分类号	G01N33/576 G01N33/53 C12Q1/52 C07K16/18 C12Q1/04 C12M1/34		
FI分类号	G01N33/576.Z G01N33/53.D G01N33/53.P C12Q1/52 C07K16/18 C12Q1/04 C12M1/34.E C12M1/34.F C12M1/34.B		
F-TERM分类号	4B029/AA07 4B029/BB11 4B029/BB16 4B029/BB17 4B029/CC01 4B029/FA12 4B029/FA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ26 4B063/QQ79 4B063/QR06 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS02 4B063/QS07 4B063/QS33 4B063/QX01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA71		
代理人(译)	Nobuto 滤纸冲		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

需要解决的问题：提供一种新颖的技术，使患者能够轻松地确定患者是否患有高准确度的NASH。解决方案：测量取自患者的样品中的CK-18或其片段的量，Fuc-Hpt和Mac-2bp的量，并使用获得的测量值确定患者是否受NASH影响如何判断是否。【选型图】无

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 公開特許公報(A)	(11) 特許出願公開番号 特開2018-80943 (P2018-80943A) (43) 公開日 平成30年5月24日(2018.5.24)
(51) Int. Cl.	FI	テーマコード(参考)
GO1N 33/576 (2006.01)	GO1N 33/576	4B029
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53	D 4B063
C12Q 1/52 (2006.01)	GO1N 33/53	P 4H045
C07K 16/18 (2006.01)	C12Q 1/52	
C12Q 1/04 (2006.01)	C07K 16/18	
	審査請求 未請求	請求項の数 6 O L (全 22 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号 特願2016-221813 (P2016-221813)	(71) 出願人 593146877	
(22) 出願日 平成28年11月14日(2016.11.14)	株式会社特殊免疫研究所 東京都文京区後楽1丁目1番10号	
	(71) 出願人 504176911	
	国立大学法人大阪大学 大阪府吹田市山田丘1番1号	
	(74) 代理人 100091096	
	弁理士 平本 祐輔	
	(74) 代理人 100118773	
	弁理士 藤田 聡	
	(74) 代理人 100144794	
	弁理士 大木 信人	
	(72) 発明者 三善 英知	
	大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法 人大阪大学内	最終頁に続く
(54) 【発明の名称】 NASHの検出方法		