

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7294709号  
(P7294709)

(45)発行日 令和5年6月20日(2023.6.20)

(24)登録日 令和5年6月12日(2023.6.12)

(51)国際特許分類

F I

G 0 1 N 33/50 (2006.01)

G 0 1 N 33/50

D

G 0 1 N 33/15 (2006.01)

G 0 1 N 33/15

Z

G 0 1 N 30/88 (2006.01)

G 0 1 N 33/50

Z

G 0 1 N 27/62 (2021.01)

G 0 1 N 30/88

E

G 0 1 N 27/62

V

請求項の数 4 (全17頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2022-12337(P2022-12337)  
 (22)出願日 令和4年1月28日(2022.1.28)  
 (62)分割の表示 特願2017-190024(P2017-190024)  
 )の分割  
 原出願日 平成29年9月29日(2017.9.29)  
 (65)公開番号 特開2022-64961(P2022-64961A)  
 (43)公開日 令和4年4月26日(2022.4.26)  
 審査請求日 令和4年2月24日(2022.2.24)

(73)特許権者 304023994  
 国立大学法人山梨大学  
 山梨県甲府市武田四丁目4番37号  
 (72)発明者 吉良 聡  
 山梨県甲府市武田四丁目4番37号 国立大学法人山梨大学内  
 (72)発明者 井原 達矢  
 山梨県甲府市武田四丁目4番37号 国立大学法人山梨大学内  
 (72)発明者 三井 貴彦  
 山梨県甲府市武田四丁目4番37号 国立大学法人山梨大学内  
 (72)発明者 武田 正之  
 山梨県甲府市武田四丁目4番37号 国立大学法人山梨大学内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 難治性夜間頻尿・夜間多尿症バイオマーカーの測定方法及び難治性夜間頻尿・夜間多尿症の予防剤又は改善剤のスクリーニング方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

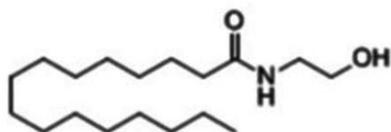
被検体から採取された血液サンプルから血漿成分が抽出された血漿サンプルを用意する工程と、

前記血漿サンプルから下記式(1)~(6)で表される化合物からなる群より選択される少なくとも1種の化合物の量を測定する工程と、

測定した前記1種の化合物の量と健常人群の前記1種の化合物の標準値とを比較する工程と、

を備えることを特徴とする夜間頻尿又は夜間多尿症の程度を判定するためのバイオマーカーの測定方法。

(1)

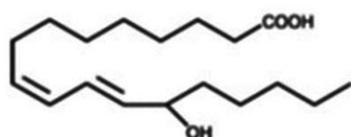


(2)

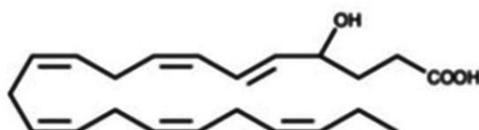


10

(3)

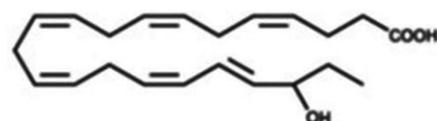


(4)

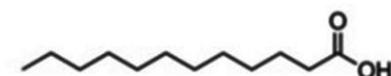


20

(5)



(6)



30

## 【請求項 2】

前記化合物の量を測定する工程は、液体クロマトグラフィー-質量分析計 (LC-MS) を用いて行うことを特徴とする請求項 1 記載の夜間頻尿又は夜間多尿症のバイオマーカーの測定方法。

## 【請求項 3】

前記夜間頻尿又は夜間多尿症が、難治性の夜間頻尿又は夜間多尿症であることを特徴とする請求項 1 および 2 記載の夜間頻尿又は夜間多尿症のバイオマーカーの測定方法。

## 【請求項 4】

被験物質を投与前の被検体から採取された血液サンプルから血漿成分が抽出された投与前血漿サンプルを用意する工程と、

40

前記投与前血漿サンプル中の、下記式 (1) ~ (6) で表される化合物からなる群より選択される少なくとも 1 種の化合物の量を測定する工程と、

前記被験物質を投与後の前記被検体から採取された血液サンプルから血漿成分が抽出された投与後血漿サンプルを用意する工程と、

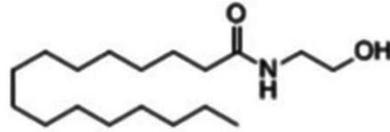
前記投与後血漿サンプル中の、下記式 (1) ~ (6) で表される化合物からなる群より選択される前記少なくとも 1 種の化合物の量を測定する工程と、

前記投与前血漿サンプルからと前記投与後血漿サンプルからの前記化合物の量の測定結果に基づいて夜間頻尿又は夜間多尿症の予防剤又は改善剤として有用な被験物質を選択する工程と、

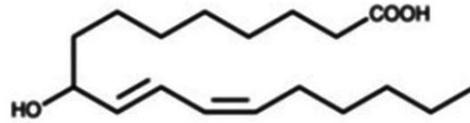
50

を備えたことを特徴とする夜間頻尿又は夜間多尿症の予防剤又は改善剤のスクリーニング方法。

(1)

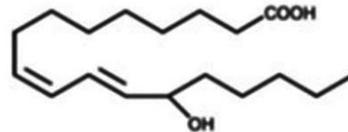


(2)



10

(3)

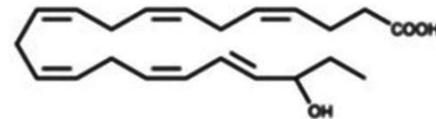


(4)

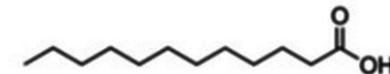


20

(5)



(6)



30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、難治性夜間頻尿・夜間多尿症バイオマーカーの測定方法及び難治性夜間頻尿・夜間多尿症の予防剤又は治療剤のスクリーニング方法に関する。

【背景技術】

【0002】

夜間頻尿とは、「夜間、排尿のために1回以上起きなければならない」という訴えであり、夜間多尿とは24時間の尿量のうち、夜間（通常患者が就寝中である8時間）の割合が多い場合をいう。本邦において、夜間頻尿・夜間多尿を有する患者は加齢とともに増加し、頻度の高い下部尿路症状の一つである。日本人男性において、夜間頻尿の罹患率割合は50歳以上で61.8%、70歳以上では90%以上と極めて高いことが非特許文献1において報告されている。QOL(Quality Of Life)への影響も大きく、睡眠の質の低下や昼間の倦怠感の出現、社会生活への影響が生じ、高齢者においては夜間頻尿が転倒発生の要因となり、大腿骨頸部骨折のリスクを増加させる。

40

【0003】

夜間頻尿・夜間多尿の診断には、排尿日誌が広く用いられている。患者は、排尿日誌に

50

、排尿時の時間・1回排尿量・尿漏れの有無・1回飲水量等を、3～7日間記載することが求められる。しかし、排尿日誌は、昼夜を問わず24時間記入が必要であり、記入そのものの自体に手間を要し、更には記入漏れ・ミス等が起こることがあり、全ての排尿に関して記録を要するという心理的負荷が生じるため、患者への負担が大きく、また、記入者の主観が入るため信憑性や客観性も十分とはいえないのが現状である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【文献】特開2015-49050

【非特許文献】

【0005】

【文献】Urology, 2006年, 第68巻, p.560-564

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

特許文献1には、排尿障害のバイオマーカーとして尿中のある種の化合物を用いることが記載されている。しかしながら、尿中の代謝物質であり測定ごとにクレアチニン補正をしなければいけないという課題がある。またさらには、それらは過活動膀胱または頻尿を呈する排尿障害を検査・検出することはできるが、現時点では治療方法や内服薬も限られておりかつ各種治療に反応の有無の判別や治療抵抗性を鑑別することができない夜間頻尿・夜間多尿という排尿障害を検査・検出することはできないという課題もある。

【課題を解決するための手段】

【0007】

以上のような課題を解決するため、本発明による夜間頻尿又は夜間多尿症の検査用バイオマーカーは、下記式(1)～(6)で表される化合物からなる群より選択される少なくとも1種の化合物を含むことを特徴とする。

【0008】

10

20

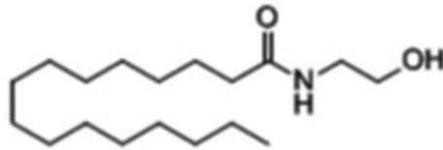
30

40

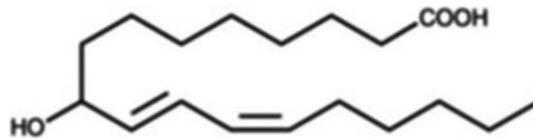
50

## 【化1】

(1)

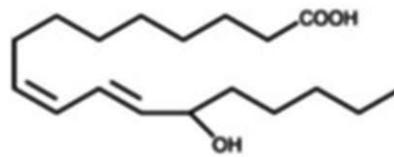


(2)

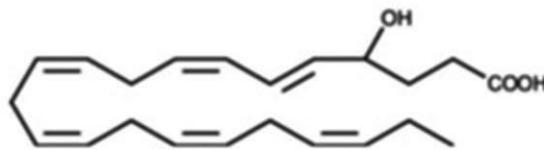


10

(3)

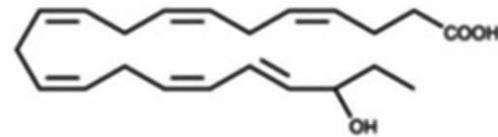


(4)



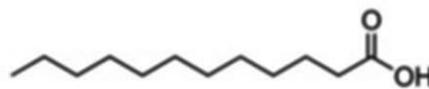
20

(5)



30

(6)



## 【0009】

また、本発明による夜間頻尿又は夜間多尿症の検査方法は、血液中の、下記式(1)～(6)で表される化合物からなる群より選択される少なくとも1種の化合物の量を指標とすることを特徴とする。

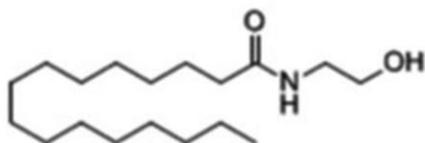
## 【0010】

40

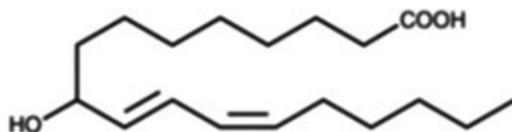
50

## 【化2】

(1)

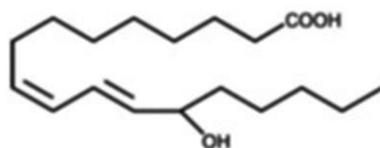


(2)

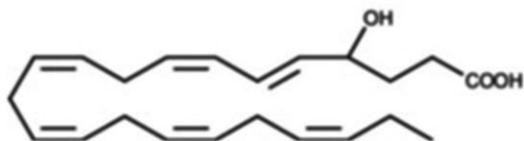


10

(3)

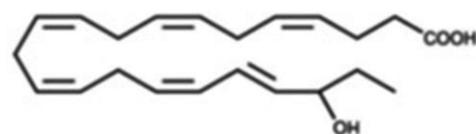


(4)

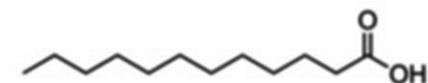


20

(5)



(6)



30

## 【0011】

また、本発明による夜間頻尿又は夜間多尿症の予防又は改善剤のスクリーニング方法は、血液中の、下記式(1)～(6)で表される化合物からなる群より選択される少なくとも1種の化合物の量を指標とすることを特徴とする。

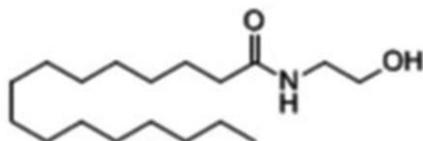
## 【0012】

40

50

## 【化 3】

(1)

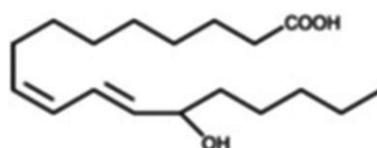


(2)

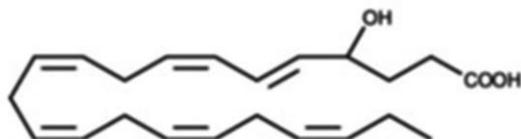


10

(3)

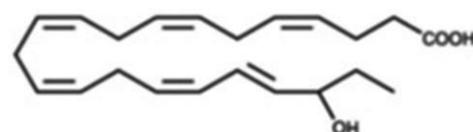


(4)

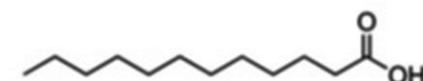


20

(5)



(6)



30

## 【図面の簡単な説明】

【0013】

【図 1】は化合物としてパルミトイルエタノールアミド(PEA)とラウリン酸(Lauric acid)、さらにそれらを組合せたモデル(MLR)の、真陽性感度と偽陽性率(1-特異度)をプロットした図である。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明のバイオマーカーは、下記式(1)~(6)で表される化合物である。  
 下記式(1)で表される化合物は、パルミトイルエタノールアミド(PEA)である。  
 下記式(2)で表される化合物は、9-ヒドロキシオクタデカジエン酸(9-HODE)である。  
 下記式(3)で表される化合物は、13-ヒドロキシオクタデカジエン酸(13-HODE)である。  
 下記式(4)で表される化合物は、4-ヒドロキシドコサヘキサエン酸(4-HDoHE)である。  
 下記式(5)で表される化合物は、20-ヒドロキシドコサヘキサエン酸(20-HDoHE)である。  
 下記式(6)で表される化合物は、ラウリン酸(Lauric acid)である。

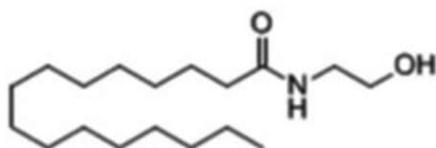
40

50

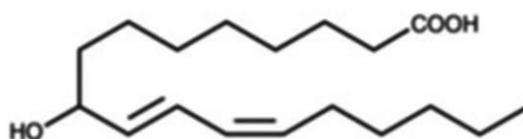
【 0 0 1 5 】

【 化 4 】

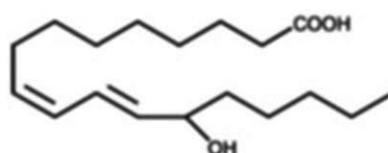
(1)



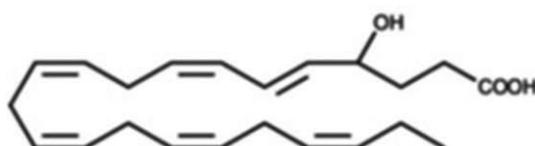
(2)



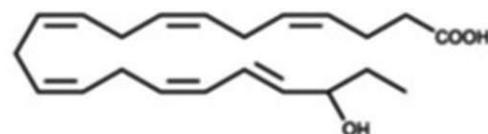
(3)



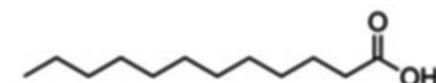
(4)



(5)



(6)



10

20

30

【 0 0 1 6 】

前記式(1)～(6)で表される化合物は各々、難治性夜間頻尿・夜間多尿の検査・検出用バイオマーカーとして用いる事ができる。これらの化合物を1種単独で用いることもでき、複数種を適宜組み合わせ使用してもよい。本発明のバイオマーカーは、生体から採取された血漿中の前記式(1)～(6)で表される化合物からなる群より選択される少なくとも1種の化合物を含む。

40

【 0 0 1 7 】

前記式(1)～(6)で表される化合物は各々、難治性夜間頻尿・夜間多尿の検査・検出に用いることができる。これらを用いることで、薬物治療や行動療法などの夜間頻尿・夜間多尿に対する一般的な治療効果の有無をある程度予測することが見込まれる。本発明による難治性夜間頻尿・夜間多尿の検査方法は、生体から採取された血漿中の前記式(1)～(6)で表される化合物からなる群より選択される少なくとも1種の化合物の量を指標とする。

【 0 0 1 8 】

50

本発明による難治性夜間頻尿・夜間多尿の検査方法は、次の工程を含むことが望ましい。

( a ) 被験体から血漿サンプルを採取する工程

( b ) 採取した血漿サンプルから前記式 ( 1 ) ~ ( 6 ) で表される化合物の量を測定する工程

( c ) 測定した前記式 ( 1 ) ~ ( 6 ) で表される化合物の量に基づいて、難治性夜間頻尿・夜間多尿であるかどうかを判定する工程

【 0 0 1 9 】

工程 ( a ) における被験体から血漿サンプルの採取は以下のように行う。

【 0 0 2 0 】

対象となる被験体から血液サンプルを採取し、例えば通常の方法で血液の遠心分離を行い、血漿成分のみを抽出し、血漿サンプルとする。

10

【 0 0 2 1 】

本発明の測定方法の対象、すなわち工程 ( a ) の被験体は、特に限定されず、ヒト及び他の哺乳動物、サル、チンパンジー、牛、豚、犬、猫、ラットやマウスなどが挙げられる。

【 0 0 2 2 】

工程 ( b ) における化合物の量の測定は以下のように行う。

【 0 0 2 3 】

前記式 ( 1 ) ~ ( 5 ) で表される化合物は水溶性代謝物であり、例えば以下に示す方法により抽出できる。まず血漿サンプル50  $\mu$  L に内部標準入りのメタノールを450  $\mu$  L 加えて攪拌後、さらにクロロホルム500  $\mu$  L と純水200  $\mu$  L を加えて攪拌する。攪拌後、4  
、2,300  $\times$  g で5分間遠心分離し、分離した水相400  $\mu$  L を分画分子量5 k D a の限外ろ過  
フィルターを用いて除タンパクする。ろ液を遠心乾固した後、純水25  $\mu$  L で再溶解する。

20

【 0 0 2 4 】

このようにして得られた抽出物を、キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計 (CE-TOFMS) を用いて、血漿中の水溶性代謝物を測定する。装置としては、例えばAgilent CE-TOFMS system (Agilent Technologies 社)を用い、キャピラリーとしては、例えば Fused silica capillary i.d. 50  $\mu$  m  $\times$  80 cm (ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ社)を用いることができる。

【 0 0 2 5 】

この場合の測定条件は、例えば、

Run buffer : Anion

Buffer Solution (ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ社 p/n : I3302-1023)

Rinse buffer : Anion

Buffer Solution (ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ社 p/n : I3302-1023)

Sample injection : Pressure

injection 50 mbar,

25 sec

CE voltage : Positive,

30 kV

MS ionization : ESI

Negative

MS capillary voltage : 3,500 V

MS scan range : m/z

50-1,000

Sheath liquid : HMT

Sheath Liquid (ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ社 p/n : H3301-1020)

とすることができる。

【 0 0 2 6 】

また前記式 ( 6 ) で表される化合物は脂溶性代謝物であり、例えば以下に示す方法によ

50

り抽出できる。まず血漿サンプル200  $\mu$ Lに内部標準入りのメタノールを800  $\mu$ L加え攪拌後、4 で1時間のメタノール抽出を行う。メタノール抽出後、4 、3,000 rpmで10分間遠心

分離して上清を回収する。この上清溶液にpH 3.0以下の塩酸5 mLを加え、メタノール4.5mLおよび純水4.5mLでコンディショニング済みの固相抽出用カートリッジにアプライする。カートリッジに純水4.5mLおよびヘキサン3mLで洗浄を行い、メタノール500  $\mu$ Lで溶出する。溶出液を窒素乾固した後、50%アセトニトリル50  $\mu$ Lで再溶解する。

【0027】

このようにして得られた抽出物を、液体クロマトグラフィー -三連四重極型質量分析計 (LC-MS) を用いて、血漿中の脂溶性代謝物測定する。装置としては、例えばAgilent LC-MS system (Agilent Technologies 社)を用い、カラムとしては、例えばColumn 2 .6  $\mu$ m C8 100A 150  $\times$  2.1mm (Kinetex社)を用いることができる。

10

【0028】

この場合の測定条件は、例えば、

Mobile phase A : アセトニトリル (0.1% ギ酸)

Mobile phase B : 純水

(0.1% ギ酸)

Sample injection : 5  $\mu$ L

Flow rate : 0.4mL/min

Column temp : 40

MS ionization : AJS

ESI Negative, Positive

Scan type : MRM

とすることができる。

20

【0029】

工程(c)における難治性夜間頻尿・夜間多尿であるかどうかの判定は以下のように行う。

【0030】

判定対象の被験体から測定した上記代謝物である化合物の測定結果を、健常な被験体から測定した上記代謝物である化合物の測定結果を標準値として比較し、標準値よりも高いほど、難治性夜間頻尿・夜間多尿の程度が高いと判定する。

30

【0031】

また、式(1)~(6)で表される化合物は各々、難治性夜間頻尿・夜間多尿の予防剤又は改善剤のスクリーニングに用いることができる。

【0032】

本発明による難治性夜間頻尿・夜間多尿の予防剤又は改善剤のスクリーニング方法は、次の工程を含むことが望ましい。

(d) 被験物質投与前の被験体から投与前血漿サンプルを採取する工程

(e) 投与前血漿サンプルから式(1)~(6)で表される化合物の量を測定する工程

(f) 被験体に被験物質を投与する工程

(g) 被験物質を投与後の被験体から投与後血漿サンプルを採取する工程

(h) 投与後血漿サンプルから式(1)~(6)で表される化合物の量を測定する工程

(i) 投与前血漿サンプルからと投与後血漿サンプルからの式(1)~(6)で表される化合物の量の測定結果に基づいて夜間頻尿又は夜間多尿症の予防剤又は改善剤として有用な被験物質を選択する工程

40

【0033】

工程(d)では、被験物質投与前の被験体から投与前血漿サンプルを採取する。方法は上述した測定方法の工程(a)と同様に行う。

【0034】

工程(e)では、投与前血漿サンプルから式(1)~(6)で表される化合物の量を測

50

定する。方法は上述した測定方法の工程（b）と同様に行う。

【0035】

工程（f）では、被験体に被験物質を投与する。被験物質は、夜間頻尿又は夜間多尿症の予防剤又は改善剤となる可能性のある物質であり、例えば、各種化合物や食品素材、食品素材から抽出された物質等である。

【0036】

工程（g）では、被験物質を投与後の被験体から投与後血漿サンプルを採取する。方法は上述した検査方法の工程（a）と同様に行う。

【0037】

工程（h）では、投与後血漿サンプルから式（1）～（6）で表される化合物の量を測定する。方法は上述した測定方法の工程（b）と同様に行う。

10

【0038】

工程（i）では、投与前血漿サンプルからと投与後血漿サンプルからの式（1）～（6）で表される化合物の量の測定結果に基づいて夜間頻尿又は夜間多尿症の予防剤又は改善剤として有用な被験物質を選択する。具体的には、被験物質投与後の式（1）～（6）で表される化合物の測定値と、被験物質投与前の式（1）～（6）で表される化合物の測定値とを比較して、被験物質投与後の式（1）～（6）で表される化合物の量の変化を確認する。その結果、投与後の式（1）～（6）のいずれかで表される化合物の測定値が投与前も測定値よりも高い場合に、投与した被験物質を予防剤又は改善剤として選択する。

【0039】

20

また、式（1）～（6）で表される化合物は各々、難治性夜間頻尿・夜間多尿の治療効果判定にも用いることができる。この場合、上述のスクリーニング方法と同様に行うことができる。具体的には、以下の工程により治療判定を行うことができる。

（j）治療前の被験体から投与前血漿サンプルを採取する工程

（k）治療前血漿サンプルから式（1）～（6）で表される化合物の量を測定する工程

（l）被験体に治療を施す工程

（m）治療後の被験体から投与後血漿サンプルを採取する工程

（n）治療後血漿サンプルから式（1）～（6）で表される化合物の量を測定する工程

（o）治療前血漿サンプルからと治療後血漿サンプルからの式（1）～（6）で表される化合物の量の測定結果に基づいて夜間頻尿又は夜間多尿症の治療効果を判定する工程

30

【実施例】

【0040】

以下、本発明を実施例に基づきさらに詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【実施例1】

【0041】

1. 被験者の選定と血液サンプルの採取

65歳以上80歳未満の男性の中で、山梨大学医学部付属病院泌尿器科通院中の方を対象にして平均夜間排尿回数が1.5回未満の方を健常人群、1.5回以上の方を夜間頻尿患者群として組み入れた。（組み入れ基準の詳細は、後程表1として示す。）特に、夜間頻尿群に組み入れられた患者は、薬物療法等各種様々な夜間頻尿・夜間多尿に対する治療を行ったが、奏功していない難治性夜間頻尿・夜間多尿を呈する方々である。被験者から、当日朝から絶食していただき、午前中に採血を採取した。採取した血液はEDTA入り試験管に採取し、0・3000rpm・10分で遠心した後に血漿成分のみ-80℃凍結保存した。

40

【0042】

2. 被験者に対する排尿日誌および国際前立腺症状スコア（IPSS；International Prostate Symptom Score）の実施

サンプル採取日までに、3日間連続で被験者は排尿日誌に、排尿時間と排尿量を記録した。さらに、IPSSを実施した。IPSSは世界共通で使われている排尿障害に関する問診票であり、被験者が記載した。（男性下部尿路症状・前立腺肥大症診療ガイドライン 2017年

50

)

## 【0043】

各群組み入れ基準を表1に示す。

## 【0044】

## 【表1】

	健常人群	夜間頻尿患者群
排尿日誌	平均夜間排尿回数が 1.5 回未満	平均夜間排尿回数が 1.5 回以上
国際前立腺症状スコア (IPSS)	8 点未満	基準なし
残尿量 <sup>※1</sup>	残尿量が 100 mL 以下	残尿量が 100 mL 以下
夜間多尿指数 <sup>※2</sup>	0.7 未満	0.7 未満
組み入れ患者数	21 人	45 人

※1 残尿量；排尿後に膀胱に残っている尿量。超音波検査で測定。

※2 夜間多尿指数；夜間尿量/24 時間尿量

10

## 【0045】

両群において、共通除外基準を以下に列挙する。

- ・尿路上皮悪性腫瘍と診断された者
- ・下部尿路痛症候群を有する者
- ・24時間尿量が40mL/kg以上の多尿患者
- ・心疾患・肝疾患・腎障害など重篤な合併症を有する患者
- ・その他、医師の判断により対象として不適当と判断された患者

20

## 【0046】

これらの結果からは、夜間頻尿患者群は夜間2回トイレのために起床する必要がある、いわゆる夜間頻尿・夜間多尿を呈する患者でありその中でも各種治療に抵抗性の難治性夜間頻尿・夜間多尿群であり、一方、健常人群は夜間排尿回数が1回未満でありかつIPSSが8点未満と、下部尿路障害があったとしても軽度である患者群にあたと推測された。

30

## 【0047】

## 3. バイオマーカーの測定

## 3-1 水溶性代謝物質の測定

## 3-1-1 血液からの代謝物質の抽出

血漿サンプル50 $\mu$ Lに内部標準入りのメタノールを450 $\mu$ L加え攪拌後、さらにクロロホルム500 $\mu$ L、純水200 $\mu$ Lを加えよく攪拌した。攪拌後、4、2,300 $\times$ gで5分間遠心分離し、分離した水相400 $\mu$ Lを分画分子量5 kDaの限外ろ過フィルターを用いて除タンパクした。ろ液を遠心乾固した後、純水25 $\mu$ Lで再溶解し、分析に供した。

## 【0048】

## 3-1-2 キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計 (CE-TOFMS) による血漿中の水溶性代謝物測定

CE-TOFMSを用いて、夜間頻尿患者および健常人の血漿サンプル中の代謝物質を網羅的に測定した。

40

## 【0049】

## 3-1-3 陰イオン性代謝物質測定条件・装置に関しては以下の通り

Agilent CE-TOFMS system (Agilent Technologies 社)

Capillary : Fused

silica capillary i.d. 50  $\mu$ m  $\times$  80 cm (ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ社)

50

## 測定条件

Run buffer : Anion  
 Buffer Solution (ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ社p/n : I3302-1023)  
 Rinse buffer : Anion  
 Buffer Solution (ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ社p/n : I3302-1023)  
 Sample injection : Pressure  
 injection 50 mbar, 25 sec  
 CE voltage : Positive,  
 30 kV  
 MS ionization : ESI  
 Negative  
 MS capillary voltage : 3,500 V  
 MS scan range : m/z  
 50-1,000  
 Sheath liquid : HMT  
 Sheath Liquid (ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ社p/n : H3301-1020)

【 0 0 5 0 】

## 3-2 脂溶性代謝物質の測定

## 3-2-1 血液からの代謝物質の抽出

血漿サンプル200  $\mu$ Lに内部標準入りのメタノールを800  $\mu$ L加え攪拌後、4 で1時間のメタノール抽出を行った。メタノール抽出後、4 、3,000 rpmで10分間遠心分離して上清を回収した。この上清溶液にpH 3.0以下の塩酸5 mLを加え、メタノール4.5mLおよび純水4.5mLでコンディショニング済みの固相抽出用カートリッジにアプライした。カートリッジに純水4.5mLおよびヘキサン3mLで洗浄を行い、メタノール500  $\mu$ Lで溶出した。溶出液を窒素乾固した後、50%アセトニトリル50  $\mu$ Lで再溶解し、分析に供した。

【 0 0 5 1 】

## 3-2-2 液体クロマトグラフィー -三連四重極型質量分析計 (LC-MS) による血漿中の脂溶性代謝物測定

LC-MSを用いて、夜間頻尿患者および健常人の血漿サンプル中の代謝物質を網羅的に測定した。

## 3-2-3 脂溶性代謝物質測定条件・装置に関しては以下の通り

Agilent LC-MS system (Agilent Technologies  
 社)  
 Column 2.6  $\mu$ m C8 100A 150  $\times$  2.1mm (Kinetex社)

## 測定条件

Mobile phase A : アセトニトリル (0.1% ギ酸)  
 Mobile phase B : 純水  
 (0.1% ギ酸)

Sample injection : 5  $\mu$ L  
 Flow rate : 0.4mL/min  
 Column temp : 40  
 MS ionization : AJS

ESI Negative, Positive

Scan type : MRM

【 0 0 5 2 】

上記3-1、2で測定した化合物中の中で、健常人群と比較して夜間頻尿患者群で有意差があるとして検出された測定結果を表2に示す。

【 0 0 5 3 】

10

20

30

40

50

【表 2】

血液中代謝物質の結果

Compound name	Ratio <sup>†</sup>	p-value (Welch) <sup>‡</sup>
Palmitoylethanolamide	1.35	1.90E-05
4-HDoHE	1.87	1.35E-04
Lauric acid	1.10	4.00E-04
Thiaproline	0.76	2.44E-03
5-Methoxyindoleacetic acid	1.28	2.72E-03
9-KODE	1.66	5.55E-03
13-KODE	1.71	5.89E-03
9-HODE	1.37	6.07E-03
20-HDoHE	1.50	7.06E-03
13-HODE	1.36	7.62E-03
Arachidonylethanolamide	1.34	1.18E-02
Eicosapentaenoic acid	1.57	1.33E-02
Imidazolelactic acid	1.20	1.34E-02
Glycerol	0.86	1.71E-02
5-Hydroxylysine	1.23	2.03E-02
Docosahexaenoic acid	1.30	2.60E-02
19, 20-diHDoPE	1.33	2.82E-02
NG, NG-Dimethyl-L-arginine	1.10	3.87E-02
Betaine	1.16	4.21E-02
12-HETE	1.26	4.58E-02
Arachidonic acid	1.26	4.84E-02

※Ratio;患者群/健常人群

※Welch' s t test

【 0 0 5 4 】

次に、表 2 の血中の代謝物質の中で、排尿日誌の各パラメーターの中で夜間頻尿/夜間多尿の臨床症状の内、最も核となる『夜間排尿回数(夜間入眠中にトイレに起きる回数)』と相関をもつ代謝物質を検討した結果を、以下に示す[表 3]。

【 0 0 5 5 】

10

20

30

40

50

【表 3】

## 夜間頻尿関連因子

Compound name	<i>r</i>	<i>p</i>
Palmitoylethanolamide	0.518	8.48E-06
4-HDoHE	0.542	1.13E-05
9-HODE	0.498	2.13E-05
13-HODE	0.432	2.90E-04
Lauric acid	0.429	3.25E-04
20-HDoHE	0.419	1.19E-03

※ $|r| > 0.4$  で相関ありとした。

## 【0056】

表3に示すように、前記式(1)~(6)で表される化合物の血中濃度は、健常人群と夜間頻尿群との間で有意差が認められた。さらには、前記式(1)~(6)で表される化合物の血中濃度は『夜間排尿回数』と相関をもつことが明らかになった。

## 【0057】

## 4 バイオマーカー解析

更に検討を進め、夜間頻尿/夜間多尿患者と健常人の鑑別能を上げるため、多変量解析手法の一つである多重ロジスティック回帰分析を行い、6種の疾患関連因子候補の中から2種を組み合わせたモデルを作成した。解析にはJMP ver 12.0.0 (SAS Institute社)を使用した。

## 【0058】

2個のマーカー候補を組み合わせた結果を図1に示す。図1は化合物としてパルミトイルエタノールアミド(PEA)とラウリン酸(Lauric acid)、さらにそれらを組合せたモデル(MLR)の、真陽性感度と偽陽性率(1-特異度)をプロットした図である。それぞれの(the area under the

receiver operating characteristic curves, AUC)は、

PEA : AUC=0.78942

Lauric acid : AUC=0.73228

MLR(PEA+Lauric acid) : AUC=0.84550

であり、2個のマーカー候補を組み合わせた結果、鑑別能が向上し、夜間頻尿/夜間多尿患者と健常人を高精度に分類することが可能であった。

## 【0059】

これらの結果から、前記式(1)~(6)で表される化合物は、夜間頻尿・夜間多尿の患者の中でも、特に薬物療法等に難治性の夜間頻尿・夜間多尿のバイオマーカーとして有用であることが確認された。

## 【産業上の利用可能性】

## 【0060】

本発明による難治性夜間頻尿・夜間多尿症バイオマーカーの測定方法及び難治性夜間頻尿・夜間多尿症の予防剤又は改善剤のスクリーニング方法は、難治性夜間頻尿・夜間多尿症の検査やそれらの予防剤又は改善剤の開発に用いることで、精度の良い、安定した方法を提供することができる。

10

20

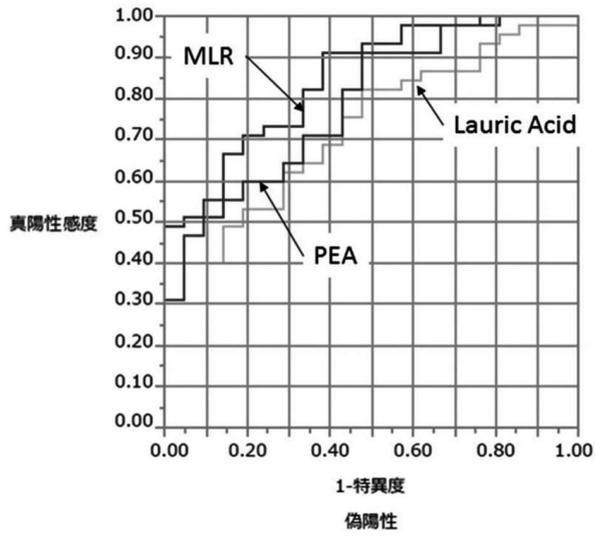
30

40

50

【 図面 】

【 図 1 】



10

20

30

40

50

## フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I  
G 0 1 N 27/62 X

(72)発明者 中込 宙史

山梨県甲府市武田四丁目4番37号 国立大学法人山梨大学内

(72)発明者 橋本 由佳

茨城県つくば市御幸が丘21 アステラス製薬株式会社内

審査官 三木 隆

(56)参考文献

特開2013-147430(JP,A)

特開2015-049050(JP,A)

米国特許出願公開第2009/0012173(US,A1)

井原達矢, 脂肪酸代謝産物のPalmitoylethanolamide(PEA)は膀胱上皮のGPCR55を介し排尿反射を誘発し夜間頻尿の原因となる, 日本排尿機能学会誌, 2020年, Vol.31 No.1, Page.275

吉良聡, 夜間頻尿における新規標的分子の網羅的探索:尿を用いたメタボロミクス解析の検討, 日本排尿機能学会誌, 2018年, Vol.29 No.1, Page.198

Kira Satoru, Urinary metabolites identified using metabolomic analysis as potential biomarkers of nocturia in elderly men, World Journal of Urology, 2020年, Vol.38 No.10, Page.2563-2569

武田 正之, 複雑系ネットワークと動的恒常性破綻による下部尿路機能障害発症機序の研究, <https://kaken.nii.ac.jp/ja/file/KAKENHI-PROJECT-15H04972/15H04972seika.pdf>

井原達矢, 血中脂肪酸濃度の概日リズム障害と夜間頻尿の関連性:創薬の可能性, 月刊メディカル・サイエンス・ダイジェスト, 2021年07月25日, Vol.47 No.8, Page.435-438

今村直樹, 夜間頻尿に対する危険因子とQuality Of Life(QOL)障害についての検討, 日本排尿機能学会誌, 2011年, Vol.22 No.1, Page.170

Petter Hedlund, Cannabinoids and the endocannabinoid system in lower urinary tract function and dysfunction, Neurourol Urodyn, 2014年01月, Vol.33 No.1, Page.46-53

Satoru Kira, Metabolomics analysis of blood identifies potential biomarkers and possible treatment targets for nocturia, Ther Adv Urol, 2019年05月17日, Vol.11, Page.1-7

Satoru Kira, Liquid chromatography-mass spectrometry identification of serum biomarkers for nocturia in aged men, WorldJUrol, 2019年01月23日, Vol.37 No.10, Page.2199-2205

V. Kiran Vemuri, Pharmacotherapeutic targeting of the endocannabinoid signaling system: Drugs for obesity and the metabolic syndrome, Physiol Behav, 2007年11月21日, Vol.93 No.4-5, Page.671-686

吉良聡, Liquid chromatography-mass spectrometry identification of serum biomarkers for nocturia in aged men, 排尿障害プラクティス, 2021年06月30日, Vol.29 No.1, Page.79-81

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 3 3 / 5 0

G 0 1 N 3 3 / 1 5

G 0 1 N 3 0 / 8 8

G 0 1 N 2 7 / 6 2