



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104969070 A

(43) 申请公布日 2015. 10. 07

(21) 申请号 201480007297. 2

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 01. 29

G01N 33/564(2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/53(2006. 01)

2013-035128 2013. 02. 05 JP

G01N 33/543(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 08. 04

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2014/052600 2014. 01. 29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/123131 JA 2014. 08. 14

(71) 申请人 桥田诚一

地址 日本德岛县

(72) 发明人 桥田诚一

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 郑天松

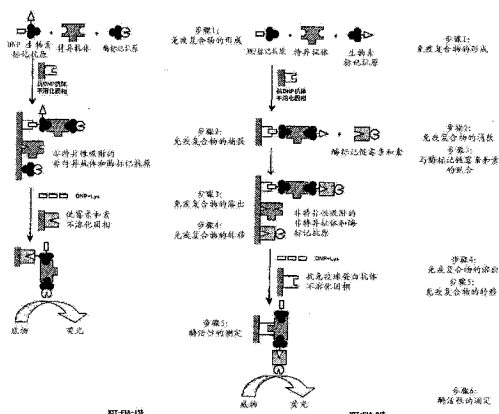
权利要求书1页 说明书15页 附图8页

(54) 发明名称

作为 1 型糖尿病的早期诊断指标的 GAD 抗体的高灵敏度测定方法

(57) 摘要

本发明旨在提供 GAD 抗体的测定方法。特别是,旨在提供超以往的 ELIZA 法的,高灵敏度的 GAD 抗体测定方法。为了解决上述的课题,通过使用 2 点结合免疫复合物转移酶联免疫测定方法 (ICT-EIA 法),构建血中的 GAD 抗体的测定方法,ELIZA 法的 33 倍以上的高灵敏度测定变得可能。结果,变得可在发症初期检测 1 型糖尿病等,变得可实施确实的介入疗法。



1. GAD 抗体测定方法,其特征在于是 GAD 抗体的 2 点结合免疫复合物转移酶联免疫测定方法 (ICT-EIA 法),用以下的 5 个反应工序 (a 法) 或 6 个反应工序 (b 法) 测定:

(a) 5 个反应工序:

[1] 由 GAD 抗体和 DNP- 生物素标记 GAD 抗原、酶标记 GAD 抗原形成免疫复合物,

[2] 使上述免疫复合物与抗 DNP 抗体不溶化固相反应而在固相捕获免疫复合物,

[3] 将上述在固相捕获的免疫复合物使用 DNP- 赖氨酸从固相溶出,

[4] 使上述从固相溶出的免疫复合物与链霉亲和素不溶化固相反应而使免疫复合物转移到链霉亲和素不溶化固相,

[5] 使用免疫复合物中含的标记酶与底物反应,通过测定生成物的荧光来测定免疫复合物的浓度 (GAD 抗体的浓度),或者

(b) 6 个反应工序:

[1] 由 GAD 抗体和 DNP 标记 GAD 抗原、生物素标记 GAD 抗原形成免疫复合物,

[2] 使上述免疫复合物与抗 DNP 抗体不溶化固相反应而在固相捕获免疫复合物,

[3] 使上述在固相捕获的免疫复合物和酶标记链霉亲和素反应而向免疫复合物结合酶标记链霉亲和素,

[4] 在上述固相将酶标记链霉亲和素化的免疫复合物使用 DNP- 赖氨酸从固相溶出,

[5] 使上述从固相溶出的免疫复合物与抗免疫球蛋白抗体不溶化固相反应而使免疫复合物转移到抗免疫球蛋白抗体不溶化固相,

[6] 使用免疫复合物中含的标记酶与底物反应,通过测定生成物的荧光来测定免疫复合物的浓度 (GAD 抗体的浓度)。

2. 权利要求 1 所述的 GAD 抗体测定方法,其特征在于,用上述 6 个反应工序 (b 法) 测定。

3. 权利要求 1 或 2 所述的 GAD 抗体测定方法,其特征在于,上述酶是  $\beta$ -D- 半乳糖苷酶。

## 作为 1 型糖尿病的早期诊断指标的 GAD 抗体的高灵敏度测定方法

### 【技术领域】

[0001] 本发明涉及,用于确切评价一诊断作为 1 型糖尿病的初期症状的评价指标的 GAD 抗体的高灵敏度测定方法。

### 【背景技术】

[0002] 糖尿病被定义为“是由胰岛素作用的不足的慢性高血糖作为主征,伴随各种的特征性的代谢异常的疾病群。其发病与遗传因子和环境因子均相关。于是,代谢异常的经长期间的持续容易导致特有的并发症,也促进动脉硬化症。另外,随代谢异常的程度,显示从无症状至酮酸中毒或昏睡的宽范围的病态。”(非专利文献 1)。在日本,强烈疑似糖尿病的人及无法否定其可能性的状态的人(罹患危险者)被确定合计约 2,210 万人,今后也预计进一步增加(非专利文献 2)。糖尿病,根据成因被分类为 1 型糖尿病、2 型糖尿病、由特定的原因的其他糖尿病及妊娠糖尿病的 4 类,在其中也是 1 型糖尿病患者占 5~10%、2 型糖尿病患者占 90~95%,几乎全部糖尿病是 2 型糖尿病患者。糖尿病的发症原因随各分类而不同,1 型糖尿病被认为是,通过分泌胰岛素的胰腺的  $\beta$  细胞被破坏,至胰岛素的绝对的缺乏而发病。对此胰腺  $\beta$  细胞破坏的机制尚未被明确地解明,但被认为与自身免疫反应相关,作为其抗原,在胰腺  $\beta$  细胞特异性地表达的胰岛素被视为重要。

[0003] 1 型糖尿病被认为是自身免疫疾病之一,从 1 型糖尿病患者检测出数种的胰岛关联自身抗体(胰岛素自身抗体、GAD(谷氨酸脱羧酶)抗体、IA(胰岛素瘤相关抗原)-2 抗体等)。特别是,在这些之中,最近受关注的是 GAD 抗体。GAD 抗体是针对谷氨酸脱羧酶(谷氨酸脱羧酶:GAD)的自身抗体。由 Baekkeskov 等报告,在 1 型糖尿病患者血清中存在与胰岛的 64kDa 的蛋白质反应的抗体,得知此 64kDa 的蛋白质是 GAD(非专利文献 3)。在 GAD 中存在 65kDa 的 GAD65 和 67kDa 的 GAD67 的 2 种同种型,1 型糖尿病患者的 GAD 抗体是针对 GAD65 的自身抗体(非专利文献 4)。作为 GAD 抗体的阳性率,早期发病时显示高达 70~80%的阳性率。但是,在发病 5 年往后,阳性率成 50%以下,10 年后降低至 20%(非专利文献 5)。另外,GAD 抗体与胰岛素自身抗体、IA-2 抗体相比,在发病时期不足 9 岁时阳性率低达 70%,但在 10 岁以上时,阳性率变高至 90%,即使是成人,阳性率也高达 85%(非专利文献 6)。

[0004] 当从糖尿病患者检测到胰岛关联自身抗体时,诊断为 1 型糖尿病。但是,在瘦形的 2 型糖尿病患者之中见到,在发病时检测不到胰岛关联自身抗体,显示可由就餐或经口血糖降低药治疗的状态,但缓慢地胰岛素分泌能力降低,平均 3 年转到胰岛素依赖性糖尿病(1 型糖尿病)的例。在此时间点的患者血清中胰岛关联自身抗体单独或重复示阳性,小林等将这样的亚型的 1 型糖尿病命名为缓缓地进行 1 型糖尿病(Slowly progressive IDDM; SPIDDM)(非专利文献 7)。

[0005] 作为 SPIDDM 的诊断基准,虽尚未确立,可为在糖尿病发病后 6~12 个月之间可用就餐疗法或经口血糖降低剂治疗,及 GAD 抗体是阳性(非专利文献 8)或 GAD 抗体、IA-2 抗

体、胰岛素自身抗体之中只要 1 个是阳性（非专利文献 9）。SPIDDM 的胰岛关联自身抗体阳性被报告率是 GAD 抗体 69%、IA-2 抗体 39%、胰岛素自身抗体 29%，GAD 抗体被报告与 IA-2 抗体、胰岛素自身抗体比显著地更高（非专利文献 9）。

[0006] 如上所述,对 GAD 抗体而言,在 SPIDDM 中阳性率最高,被视为在诊断 1 型糖尿病上非常重要的诊断指标。但是,由以往的酶联免疫测定法(ELISA 法)检测灵敏度低,所以难以早期的发现或检测低浓度的自身抗体。

[0007] 因此,期待关于 GAD 抗体的,新的高灵敏度酶联免疫测定法的开发,期望早期的 SPIDDM 的发现和由胰岛素疗法的早期治疗。

[0008] 【现有技术文献】

[0009] 【非专利文献】

[0010] 非专利文献 1:清野裕、南條輝志男、田嶋尚子等:糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告、糖尿病 53 卷 6 号:450-467、2010

[0011] 非专利文献 2:厚生労働省健康局総務課生活習慣病対策室、2007 年国民健康・栄養調査結果の概要、2008

[0012] 非专利文献 3:Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S et al: Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 347(6289):151-156, 1990

[0013] 非专利文献 4: Kaufman DL, Erlander MG, Clare-Salzler M, et al: Autoimmunity to two forms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 89(1):283-292, 1992

[0014] 非专利文献 5:春日明、丸山太郎、小澤ゆか子等:日本人糖尿病患者における GAD65 抗体の検討 - 新の測定法, radioligand binding assay を用いて -, 糖尿病 39 卷 7 号:497-502、1996

[0015] 非专利文献 6:Gorus FK, Goubert P, Semakula C, et al: IA-2-autoantibodies complement GAD65-autoantibodies in new-onset IDDM patients and help predict impending diabetes in their siblings. The Belgian Diabetes Registry. *Diabetologia* 40(1):95-99, 1997

[0016] 非专利文献 7: Kobayashi T, Sawano S, Itoh T, et al: Islet-cell antibodies in Insulin-dependent and non-insulin dependent diabetics in Japan: their prevalence and clinical significance. In *clinico-genetic genesis of diabetes mellitus*. Mimura G, Baba S, Goto Y, Kobberling J, Eds. Amsterdam, Excerpta Med 150-160, 1982(ICS No. 597)

[0017] 非专利文献 8: Stenstrom G, Gottsater A, Bakhtadze E, et al: Latent autoimmune diabetes in adults: definition, prevalence,  $\beta$ -cell function, and treatment. *Diabetes* 54(Suppl 2):S68-72, 2005

[0018] 非专利文献 9: 田中昌一郎、栗田卓也、島田朗等: 緩徐進行 1 型糖尿病 (slowly progressive insulin-dependent diabetes mellitus: SPIDDM) の臨床的特徴 - 日本糖尿病学会 1 型糖尿病調査研究委員会緩徐進行 1 型糖尿病分科会報告 (第一報) -, 糖尿病 54 卷 1 号:65-75、2011

**【发明内容】**

**【0019】 【发明要解决的技术课题】**

**【0020】** 本发明的目的在于提供用于早期检测 1 型糖尿病、特别是关于 SPIDDM 的发病,进行适宜的生活指导或治疗的, GAD 抗体的高灵敏度酶联免疫测定方法。

**【0021】 【解决课题的技术方案】**

**【0022】** 一般市售的对 GAD 抗体的 ELISA 试剂盒是第 3 代的 ELISA 法。首先,在不溶化 GAD 抗原的固相上捕获 GAD 抗体,接下来,使生物素标记 GAD 结合,最后,使过氧化物酶标记亲和素反应,测定酶活性。在此方法中,过氧化物酶标记亲和素的非特异信号残留,尚可高灵敏度化。另外,残留了测定与 GAD 结合的全部的物质(IgG 以外的免疫球蛋白或结合蛋白质)的问题。

**【0023】** 从而,使用本发明人开发的 2 点结合免疫复合物转移酶联免疫测定法(Immune Complex Transfer Enzyme Immunoassay; 往后称为 ICT-EIA 法)进行锐意探讨 GAD 抗体的测定。即, ICT-EIA 法是指,为了解决作为 ELISA 法中的大的问题的,酶标记抗原或酶标记第 2 抗体的向非特异性的固相的吸附,从在抗原不溶化固相捕获或非特异性地吸附的总抗体之中仅从固相解离下特异抗体,转移到别的新的固相的方法(Hashida S, Hashinaka K 及 Ishikawa E: Ultrasensitive enzyme immunoassay, In Biotechnology Annual Review Volume 1, El-gewely, M. R. ed., Elsevier Science Publishers B. V., 403-451, 1995)。

**【0024】** 本发明人,如图 1 所示改良 ICT-EIA 法,开发了可高灵敏度检测抗 GAD IgG 抗体的 ICT-EIA-1 法。另外,除了直接酶标记 GAD 的 ICT-EIA-1 法之外,为了防止抗原表位的立体障碍而开发了抗 GAD IgG 抗体的 ICT-EIA-2 法。结果,通过使用本发明的 ICT-EIA-1 法或 ICT-EIA-2 法,变得可以通常的 ELISA 试剂盒的约 33 倍的高灵敏度测定 GAD 抗体。

**【0025】** 再者,本发明人使用 ICT-EIA-2 法探讨了作为 1 型糖尿病及 SPIDDM 的诊断指标的 IA-2 抗体和胰岛素自身抗体的测定。结果得知,例如在胰岛素自身抗体的情况中,只要使用 ICT-EIA-2 法,就可以与 ELISA 试剂盒相比 1,000 倍的高灵敏度进行检测。

**【0026】** 通过使用本发明的测定方法,用 ELISA 试剂盒可检测曾无法检测的 SPIDDM 的患者。即,如图 7 所示,显示 2 型糖尿病患者的 17% 是 SPIDDM 的患者的可能性。

**【0027】** 本发明人,使用作为本发明的改良 ICT-EIA 法的 ICT-EIA-1 法和 ICT-EIA-2 法,可制作 GAD 抗体和胰岛素自身抗体的高灵敏度检测法,但根据患者也有阳性信号低的例,在 1 型糖尿病及 SPIDDM 的发病预知或诊断上,仅独立测定这些自身抗体是不充分的。原因在于,随患者的病态或病态的进展状况而阳性率有优劣。从而,为了提高 1 型糖尿病及 SPIDDM 的诊断精确度,探讨了将胰岛素自身抗体及 GAD 抗体的主要的 2 种检测法组合的同时检测法。锐意探讨的结果,如图 8 所示,通过 2 种各自身抗体的荧光强度重合,随各自身抗体的有无而阳性者和阴性者之间荧光强度的差变大,从而阳性患者的早期的检测变得可能。结果,变得可更有精度地发病预知或诊断 1 型糖尿病及 SPIDDM。

**【0028】** 本发明人基于这些见解完成了本发明。

**【0029】** 即,本发明的要点如下。

**【0030】** (1) GAD 抗体测定方法,其特征在于是 GAD 抗体的 2 点结合免疫复合物转移酶联免疫测定方法( ICT-EIA 法),用以下的 5 个反应工序(a 法: ICT-EIA-1 法)或 6 个反应工序

(b 法 :ICT-EIA-2 法 ) 测定 :

[0031] (a) 5 个反应工序 :

[0032] [1] 由 GAD 抗体和 DNP- 生物素标记 GAD 抗原、酶标记 GAD 抗原形成免疫复合物,

[0033] [2] 使上述免疫复合物与抗 DNP 抗体不溶化固相反应,在固相捕获免疫复合物,

[0034] [3] 将上述在固相捕获的免疫复合物使用 DNP- 赖氨酸从固相溶出,

[0035] [4] 使上述从固相溶出的免疫复合物与链霉亲和素不溶化固相反应,使免疫复合物转移到链霉亲和素不溶化固相,

[0036] [5] 使用免疫复合物中含的标记酶,与底物反应,通过测定生成物的荧光来测定免疫复合物的浓度 (GAD 抗体的浓度),或者

[0037] (b) 6 个反应工序 :

[0038] [1] 由 GAD 抗体和 DNP 标记 GAD 抗原、生物素标记 GAD 抗原形成免疫复合物,

[0039] [2] 使上述免疫复合物与抗 DNP 抗体不溶化固相反应,在固相捕获免疫复合物,

[0040] [3] 使上述在固相捕获的免疫复合物和酶标记链霉亲和素反应,向免疫复合物结合酶标记链霉亲和素,

[0041] [4] 将在上述固相酶标记链霉亲和素化的免疫复合物使用 DNP- 赖氨酸从固相溶出,

[0042] [5] 使上述从固相溶出的免疫复合物与抗免疫球蛋白抗体不溶化固相反应,使免疫复合物转移到抗免疫球蛋白抗体不溶化固相,

[0043] [6] 使用免疫复合物中含的标记酶,与底物反应,通过测定生成物的荧光来测定免疫复合物的浓度 (GAD 抗体的浓度)。

[0044] (2) 上述 (1) 所述的 GAD 抗体测定方法,其特征在于,用上述 6 个反应工序 (b 法) 测定。

[0045] (3) 上述 (1) 或 (2) 所述的 GAD 抗体测定方法,其特征在于,上述酶是  $\beta$ -D- 半乳糖苷酶。

[0046] (4) 评价受试者的糖尿病的进行状况的方法,其使用上述 (1) ~ (3) 之任一项的 GAD 抗体测定方法测定血清中的 GAD 抗体的浓度。

[0047] (5) 测定受试者血清中的 GAD 抗体的浓度的方法,其为了评价受试者的糖尿病的进行状况,使用上述 (1) ~ (3) 之任一项的 GAD 抗体测定方法。

[0048] (6) 判断介入疗法的开始时期的方法,其使用上述 (1) ~ (3) 之任一项的 GAD 抗体测定方法测定血清中的 GAD 抗体的浓度,将 0.1U/ml 以上的受试者作为糖尿病初期。

[0049] (7) 测定受试者的血清中的 GAD 抗体的浓度的方法,其为了评价 GAD 抗体的浓度是 0.1U/ml 以上的糖尿病初期的受试者,使用上述 (1) ~ (3) 之任一项的 GAD 抗体测定方法。

[0050] (8) 为了评价在血清中共有 GAD 抗体和胰岛素自身抗体的缓慢进行 1 型糖尿病 (Slowly progressive IDDM ;SPIDDM) 的受试者,用上述 (2) 的 ICT-EIA-2 法测定受试者血清中的 GAD 抗体的同时,用同样的 ICT-EIA-2 法个别地测定胰岛素自身抗体的方法。

[0051] (9) 上述 (1) ~ (3) 之任何的 GAD 抗体测定方法,其为了评价 1 型糖尿病及 SPIDDM 的初期患者,添加试剂至可检测胰岛素自身抗体。

[0052] 【发明效果】

[0053] 可用本发明的改良 ICT-EIA 法 (ICT-EIA-1 法及 ICT-EIA-2 法) 测定的血清中的

GAD 抗体浓度的灵敏度相比以往的 ELISA 法高 33 倍。再者,由于通过进一步提高与 GAD 抗体反应的 GAD 标记体的亲和性,可实现 10 倍左右的高灵敏度化,与至今的 ELISA 法比较数百倍的高灵敏度化变得可能。由此,由本发明的 GAD 抗体测定方法,可早期检测关于 1 型糖尿病或 SPIDDM 的发病,进行适宜的生活指导或治疗。

[0054] 再者,通过个别地测定胰岛素自身抗体,精度高的 1 型糖尿病或 SPIDDM 的诊断变得可能。另外,为了操作的简便性,在本发明的 GAD 抗体测定试剂盒之中,通过添加胰岛素自身抗体的检测试剂,变得可同时测定 2 种抗体的合计。由此,由患者的病态或病态的进展状况,在各自的抗体的阳性率产生差异,可避免忽略发病。即,由本发明的改良 ICT-EIA 法,变得可再提高 1 型糖尿病及 SPIDDM 的诊断准确度。

### 【附图说明】

[0055] 图 1 是表示本发明中使用的 2 点结合免疫复合物转移酶联免疫测定法 (ICT-EIA-1 法及 ICT-EIA-2 法) 的顺序的图。

[0056] 图 2 是表示对 GAD 抗体的各 ICT-EIA 法及市售的 ELISA 试剂盒的检测灵敏度的比较的图。将用健康者的血清稀释的 1 型糖尿病患者血清使用 ICT-EIA-1 法及 ICT-EIA-2 法、市售的 ELISA 试剂盒测定,比较 GAD 抗体的检测灵敏度。○表示 ICT-EIA-1 法、●表示 ICT-EIA-2 法、◇表示由 ELISA 试剂盒的测定。

[0057] 图 3 是表示由 ICT-EIA-1 法的受试者的血清中的 GAD 抗体水平的测定结果的图。将各对象者血清中的 GAD 抗体用 ICT-EIA-1 法测定。虚线表示截止值 (荧光强度;1.8)、n. d 表示未检测。●表示非糖尿病对象者、◆表示胰岛素未治疗的 2 型糖尿病患者、◇表示胰岛素治疗中的 2 型糖尿病患者、◆表示胰岛素治疗不明的 2 型糖尿病患者、□表示胰岛素治疗中的 1 型糖尿病患者、■表示胰岛素治疗不明的 1 型糖尿病患者。黑色的标记表示由过量的 GAD 添加而抑制的血清。

[0058] 图 4 是表示由 ICT-EIA-2 法的受试者的血清中的 GAD 抗体水平的测定结果的图。将各对象者血清中的 GAD 抗体用 ICT-EIA-2 法测定。虚线表示截止值 (荧光强度;8.1)、n. d 表示未检测。●表示非糖尿病对象者、◆表示胰岛素未治疗的 2 型糖尿病患者、◇表示胰岛素治疗中的 2 型糖尿病患者、◆表示胰岛素治疗不明的 2 型糖尿病患者、□表示胰岛素治疗中的 1 型糖尿病患者、■表示胰岛素治疗不明的 1 型糖尿病患者。黑色的标记表示由过量的 GAD 添加而抑制的血清。

[0059] 图 5 是表示糖尿病患者中的对 GAD 抗体的 ELISA 法及 ICT-EIA-1 法的相关性的图。

[0060] 图 6 是表示糖尿病患者中的对 GAD 抗体的 ELISA 法及 ICT-EIA-2 法的相关性的图。

[0061] 图 7 是综合由 ICT-EIA-2 法及 ELISA 试剂盒的胰岛素自身抗体及 GAD 抗体的阳性率的图。当使用 ICT-EIA-2 法评价时,在 2 型糖尿病患者中,胰岛素自身抗体及 GAD 抗体都有的是 17% (5 名);在 1 型糖尿病患者中,胰岛素自身抗体及 GAD 抗体都有的是 52% (11 名)。另外,当使用 ELISA 试剂盒时,在 2 型糖尿病患者中,胰岛素自身抗体及 GAD 抗体都有的是 7% (2 名);在 1 型糖尿病患者中,胰岛素自身抗体及 GAD 抗体都有的是 13% (3 名)。特别是,从被诊断为 2 型糖尿病的患者中的 5 名检测到胰岛素自身抗体及 GAD 抗体,由此想到这些患者是 SPIDDM。

[0062] 图 8 是表示对胰岛素自身抗体及 GAD 抗体的 ICT-EIA-2 法的同时检测的操作顺序

的图。即,在本发明的同时检测法中,通过使用将胰岛素自身抗体及 GAD 抗体的各标记体合为 1 个检测系统,可以 1 次的测定检测各自自身抗体的合计的信号。另外,通过 2 种各自自身抗体的荧光强度重合,由各自自身抗体的有无,在阳性者和阴性者之间荧光强度的差变大,所以这些自身抗体阳性患者的早期的检测容易。从而,在阳性血清的情况中,由于可再进行每种自身抗体的检查,鉴定自身抗体的种类,进行解析,鉴定,所以可更加正确地发症预知或诊断 1 型糖尿病及 SPIDDM。

[0063] 图 9 是表示由 ICT-EIA-2 法及 ICT-EIA-1 法、ELISA 试剂盒的胰岛素自身抗体的检测灵敏度的比较的图。将用健康者的胰岛素除去血清稀释的 1 型糖尿病患者的血清使用 ICT-EIA 法和 ELISA 试剂盒测定,比较检测灵敏度。●表示 ICT-EIA-2 法、○表示 ICT-EIA-1 法、◇表示由 ELISA 试剂盒的测定。再有,上图表示全部的信号,下图表示特异信号。

#### [0064] 【实施方式】

[0065] 本发明的“免疫复合物转移酶联免疫测定方法 (ICT-EIA 法)”是指与非竞争结合法 (夹心) 酶免疫测定法 (EIA) 的高灵敏度化的改良方法相关的方法 (参照非专利文献 1)。如图 1 所示,用 ICT-EIA 法可降低使用的抗体的非特异吸附 (背景),所以多种高分子生理活性物质的  $10^{-1}$  水平以下 ( $10^{-2}$ ) 的测定变得可能 (参照 Hashida S, et al., *Biotechnology Annual Review Volume 1*, (1995) pp403-451, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam)。

[0066] 本发明的“GAD 抗体”是指针对谷氨酸脱羧酶 (谷氨酸脱羧酶 :GAD) 的自身抗体。GAD 是从 L-谷氨酸合成  $\gamma$ -氨基酪酸 (GABA) 的酶,多在脑或胰岛  $\beta$  细胞中表达。胰岛  $\beta$  细胞中的 GABA 的作用被认为是担负胰岛素的合成或分泌的调节。GAD 抗体在 1 型糖尿病发病的数年前出现,GAD 抗体的发症预知率高达 60% 以上 (Kawasaki E, Gill RG, Eisenbarth GS : *Type 1 diabetes mellitus. in : G. S. Eisenbarth (Ed.) Molecular Mechanisms of Endocrine and Organ Specific Autoimmunity.*, R. G. Landes Company, Austin, Texas, 149-182, 1999)。另外,1 型糖尿病发症时的阳性率是 70 ~ 80% (春日明、丸山太郎、小澤ゆか子等 : 日本人糖尿病患者における GAD65 抗体の検討 - 新の測定法, radioligand binding assay を用いて -, 糖尿病 39 卷 7 号 : 497-502, 1996)。另一方面,在 SPIDDM 中阳性率大致是 100%。因此,在 SPIDDM 的检测中, GAD 抗体的测定变得重要 (川崎英二、江口胜美 : 抗 GAD 抗体、日本临床、66 卷增刊号 4, 295-300, 2008)。

[0067] 本发明的“酶”只要是进行由荧光的浓度测定而底物的分解物发荧光的酶,就不特别限定,例如,可举出  $\beta$ -D-半乳糖苷酶、辣根-过氧化物酶、碱性磷酸酶。

[0068] 本发明的“胰岛素自身抗体”是指针对胰岛素的抗体,是对于胰腺  $\beta$  细胞特异性的抗体。胰岛素自身抗体作为 1 型糖尿病发症预测指标有用,如果胰岛素自身抗体呈阳性,则被认为有转到将来胰岛素依赖性糖尿病的可能性。例如,胰岛素自身抗体的阳性率随发症年龄而不同,在小儿发症的 1 型糖尿病中显示约 70%。

[0069] 本发明的“评价糖尿病的进行状况的方法”是指通过测定血清中的 GAD 抗体的浓度或胰岛素自身抗体的浓度,确切评价受试者的糖尿病性疾病的进行状况的方法。由此评价方法,变得可确切实施用于抑制受试者的糖尿病性疾病的进行并对其进行改善的治疗剂的施用或生活指导等的介入疗法。例如,在 GAD 抗体的情况中,如果血清中的 GAD 抗体的浓度是 0.1 U/ml 以上,则诊断为是糖尿病初期,开始介入疗法,实施抑制-改善糖尿病的进

行。

[0070] 本发明的“介入疗法”是指基于流程的生活习惯（就餐—身体活动中心）的改善或胰岛素疗法。即，是将就餐疗法或运动疗法并入生活习惯之中，进行必要热和消费热的控制，通过指导减轻精神的应激，进行删除减轻糖尿病的发症中涉及的要因。还有，对于初期症状的 SPIDDM 患者而言，应作为介入疗法含尽可能早期进行胰岛素疗法。使用上述的糖尿病性疾病的进行度评价方法，通过开始早期的介入疗法，可抑制、避免胰岛素分泌能力的降低，改善症状。

### 【实施例】

[0071] 接下来举实施例再说明本发明，但本发明不限于这些。

[0072] **【实施例 1：对 GAD 抗体的 ICT-EIA 法】**

[0073] **【(1) 试剂类】**

[0074] (a) 一般试剂：

[0075] 牛血清白蛋白 (BSA) 从 Nacalai tesque (京都)，链霉亲和素从和光纯药工业 (大阪) 购入。此外的一般试剂从 Nacalai tesque 及和光纯药工业购入。

[0076] (b) 抗体：

[0077] 兔抗 2,4-二硝基苯基 (DNP)-牛血清白蛋白 (BSA) 血清从山羊公司 (群马) 购入。

[0078] (b) 抗原：

[0079] 重组体—人—GAD65 从 RSR Limited (Cardiff, UK) 购入。

[0080] (c) 缓冲液：

[0081] 以含 0.1M NaCl、0.1% BSA、1mM MgCl<sub>2</sub> 及 0.1% NaN<sub>3</sub> 的 0.01M 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0) 作为缓冲液 A、以含 0.4M NaCl、0.1% BSA、1mM MgCl<sub>2</sub> 及 0.1% NaN<sub>3</sub> 的 0.01M 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0) 作为缓冲液 B、以含 0.1M NaCl、0.01% BSA、1mM MgCl<sub>2</sub> 及 0.1% NaN<sub>3</sub> 的 0.01M 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0) 作为缓冲液 C、以含 0.1M NaCl 的 0.01M 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0) 作为缓冲液 D、以含 5mM EDTA 的 0.1M 磷酸钠缓冲液 (pH 6.0) 作为缓冲液 E。

[0082] (d) ELISA 试剂盒：

[0083] GAD 抗体的 ELISA 试剂盒从 RSR Limited (Cardiff, UK) 购入。

[0084] **【(2) 标记化抗原等】**

[0085] (a) DNP 化标记 GAD, β-D-半乳糖苷酶标记 GAD：

[0086] [1] 导入巯基的 GAD 的制备：

[0087] 向溶解于 0.1M Tris-HCl, pH8.5 的 GAD 溶液 0.4mg/0.48ml 加溶解于 DMF 的 13mM SATA 10 μl, 于 30°C 温育 30 分钟。温育后，向反应液加 4M 羟胺 10 μl, 于 30°C 温育 5 分钟。温育后，反应液由缓冲液 E, 使用由平衡化的 Sephadex G-50 (5ml) 柱的离心脱盐法 (文献) 去除过量的试剂，将得到的巯基导入 GAD 供于以下的标记。GAD 每 1 分子导入有 4.0 分子的巯基。

[0088] [2] 导入马来酰亚胺基的 DNP 的制备：

[0089] 使 DNP-Lys 1.8mg 溶解于 DMF 0.18ml 后，加 0.1M 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0) 0.72ml, 加溶解于 DMF 的 4mM EMCS 0.1ml, 于 30°C 温育 30 分钟，调制导入马来酰亚胺基的 DNP-Lys。

[0090] [3] 导入马来酰亚胺基的 β-D-半乳糖苷酶的制备：

[0091] 使  $\beta$ -D-半乳糖苷酶 3mg 溶解于缓冲液 E 0.52ml, 加溶解于 DMF 的 50mM N,N'-(*o*-亚苯基)二马来酰亚胺(OPDM)(Sigma-Aldrich) 26.3  $\mu$ l, 于 30°C 温育 30 分钟。温育后, 反应液由缓冲液 E 使用由平衡化的 Sephadex G-50 (5ml) 柱的离心脱盐法(文献)、去除过量的试剂, 将得到的导入马来酰亚胺基的  $\beta$ -D-半乳糖苷酶供于以下的标记。 $\beta$ -D-半乳糖苷酶每 1 分子导入有 15.6 分子的马来酰亚胺基。

[0092] [4]DNP 化标记 GAD 的调节:

[0093] 将导入马来酰亚胺基的 DNP 和导入巯基的 GAD 混合至各自成 160  $\mu$ M 和 17  $\mu$ M, 于 4°C 温育 17 小时。温育后, 向反应液加溶解于缓冲液 E 的 100mM ME 10  $\mu$ l, 于 30°C 温育 5 分钟后, 加 100mM NEM 20  $\mu$ l, 于 30°C 温育 5 分钟, 阻断未反应的巯基及马来酰亚胺基。反应液由 0.1M 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0) 使用由平衡化的 Sephadex G-50 (5ml) 柱的离心脱盐法(文献)、去除过量的试剂, 得到 DNP 化标记抗原缀合物(捕获用)。

[0094] [5]  $\beta$ -D-半乳糖苷酶标记 GAD 的调节:

[0095] 将导入马来酰亚胺基的  $\beta$ -D-半乳糖苷酶和导入巯基的 GAD 混合至各自成 3.4  $\mu$ M 和 8.5  $\mu$ M, 于 4°C 温育 17 小时。温育后, 向反应液加溶解于缓冲液 E 的 100mM ME 10  $\mu$ l, 于 30°C 温育 5 分钟后, 加 100mM NEM 20  $\mu$ l, 于 30°C 温育 5 分钟, 阻断未反应的巯基及马来酰亚胺基。接下来, 将反应液添加到由缓冲液 C 平衡化的 Ultrogel AcA22 (1.5 $\times$ 45cm), 得到  $\beta$ -D-半乳糖苷酶标记抗原缀合物(检测用)。

[0096] (b)DNP 化生物素化标记 GAD:

[0097] [1] 导入巯基的 GAD 的制备:

[0098] 向溶解于 0.1M Tris-HCl, pH8.5 的 GAD 溶液 0.4mg/0.48ml 加溶解于 DMF 的 13mM SATA 10  $\mu$ l, 30°C、温育 30 分钟。温育后, 向反应液加 4M 羟胺 10  $\mu$ l, 于 30°C 温育 5 分钟。温育后, 将反应液由缓冲液 E, 使用由平衡化的 Sephadex G-50 (5ml) 柱的离心脱盐法(文献) 去除过量的试剂, 将得到的巯基导入 GAD 供于以下的标记。GAD 每 1 分子导入有 4.2 分子的巯基。

[0099] [2] 导入马来酰亚胺基的 DNP 的制备:

[0100] 使 DNP-Lys 1.0mg 溶解于 DMF 0.1ml 后, 加 0.1M 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0) 0.8ml, 加溶解于 DMF 的 0.6mM EMCS 0.1ml, 于 30°C、温育 30 分钟, 调制导入马来酰亚胺基的 DNP-Lys。

[0101] [3] 导入马来酰亚胺基的生物素的制备:

[0102] 向生物素-Lys 1.0mg 加 0.1M 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0) 0.9ml, 加溶解于 DMF 的 0.2mM EMCS 0.1ml, 于 30°C 温育 30 分钟, 调制导入马来酰亚胺基的生物素-Lys。

[0103] [4]DNP 化生物素化标记 GAD 的调制:

[0104] 将导入马来酰亚胺基的 DNP 和导入马来酰亚胺基的生物素以同量的比例合并, 制成导入马来酰亚胺基的 DNP 和导入马来酰亚胺基的生物素的混合液。将混合液及导入巯基的 GAD 混合至各自成 78  $\mu$ M 和 19  $\mu$ M, 于 4°C 温育 17 小时。温育后, 向反应液加溶解于缓冲液 E 的 100mM ME 10  $\mu$ l, 于 30°C 温育 5 分钟后, 加 100mM NEM 20  $\mu$ l, 30°C 温育 5 分钟, 阻断未反应的巯基及马来酰亚胺基。将反应液使用透析用纤维素管(三光纯药株式会社东京), 对于缓冲液 (0.1M 磷酸钠缓冲液 pH 7.0) 进行透析, 去除过量的试剂, 得到 DNP 化生物素化标记抗原缀合物(捕获用)。GAD 每 1 分子导入有 1.3 分子的 DNP 及 2.9 分子的生物素。

**[0105] 【(3) 实验材料等】****[0106] (a) 固相的制备：**

[0107] 将亲和性纯化的抗 DNP-IgG 及抗人 IgG-IgG 与直径 6.4mm 的聚苯乙烯珠 (Immunochemical、冈山) 于室温浸渍一夜后,用缓冲液 A 清洗,于 4℃ 保存。将生物素化 BSA 与直径 6.4mm 的聚苯乙烯珠于室温浸渍一夜后,用 0.1M 磷酸钠缓冲液 (pH 7.5) 清洗,再在链霉亲和素溶液中于室温浸渍一夜后,用缓冲液 A 清洗,于 4℃ 保存。

**[0108] (b) 血液样品：**

[0109] 血清样品在绝食 12 小时后的早晨空腹时采血 (NIPRO、22G 座付,大阪)、室温静置 30 分钟后,用离心机 (台式冷却离心机 2800KUBOTA,株式会社久保田制作所,东京) 以 3000rpm 离心 10 分钟,得到血清。血清于负 20℃ 保存。

**[0110] (c) 葡聚糖-炭的调节：**

[0111] 将炭 (Nacalai Tesque) 1.2g 用蒸馏水清洗数次后,用蒸馏水定容至 10ml。向其加葡聚糖 (Sigma) 0.3g 搅拌。接下来,将甲基纤维素 (Sigma-Aldric) 30mg 加载到缓冲液 A 10ml 之上,不搅拌而于 4℃ 经 16 小时溶解。向制备的葡聚糖-炭液以相同的比例混合甲基纤维素液,搅拌 15 分钟而作为葡聚糖-炭 (往后称为 DC) 液,于 4℃ 保存。

**[0112] (d) 由 DC 液的血清处理：**

[0113] 向血清 50  $\mu$ l 加缓冲液 A 150  $\mu$ l 而稀释后,再加 13.6  $\mu$ l 的 0.4M HCl 而酸性化。1 分钟后,加 72.8  $\mu$ l 的上述的 DC 液,振荡 6 分钟之后,加 13.6  $\mu$ l 的 0.4M NaOH 而中和。中和后以 1500 $\times$ g 离心 15 分钟,取出上清,将此上清再 1 次同样地离心,完全地除去 DC 之后,于 4℃ 保存。

**[0114] 【(4) 方法】****[0115] (a) 对 GAD 抗体的 ICT-EIA-1 法：**

[0116] 将 20 倍稀释的血清 (100  $\mu$ l) 和将 DNP 化标记 GAD 及  $\beta$ -D-半乳糖苷酶标记 GAD、1.0  $\mu$ M 无活性  $\beta$ -D-半乳糖苷酶溶解于缓冲液 A 的混合液 (100  $\mu$ l) 混合,于 4℃ 温育 16 小时,形成由酶标记抗原-GAD 抗体-补充用标记抗原的 3 者组成的免疫复合物。接下来,向此反应液加亲和性纯化抗 DNP-IgG 不溶化固相聚苯乙烯珠 1 个,使反应 0.5 小时而在珠上补充免疫复合物。将此珠用缓冲液 C (2ml) 清洗 2 次后,与溶解于缓冲液 A 的 2mM DNP-Lys (150  $\mu$ l) 反应 0.5 小时而使免疫复合物从珠溶出。除去抗 DNP-IgG 不溶化固相聚苯乙烯珠之后,向溶出液加亲和性纯化抗人 IgG-IgG 不溶化固相聚苯乙烯珠 1 个,再反应 0.5 小时,使免疫复合物转移到第 2 珠上。与珠的反应全部于 25℃ 在 210 次/分的振荡下进行。再将珠用缓冲液 C (2ml) 清洗 3 次后,将转移到珠上的  $\beta$ -D-半乳糖苷酶活性使用 0.2mM 4-甲基伞形花酰  $\beta$ -D-吡喃半乳糖苷 (荧光底物;4MUG) (200  $\mu$ l) 于 30℃ 温育,加 0.1M 甘氨酸钠缓冲液 (pH 10.5) (2ml) 停止反应后,使用荧光分光光度计 (F-2500、日立) 测定。再有,使用激发波长 360nm、荧光波长 450nm,荧光强度以  $10^{-8}$ M 4MU 作为 100 而进行换算。

**[0117] (b) 对 GAD 抗体的 ICT-EIA-2 法：**

[0118] 向 20 倍稀释的稀释血清 (100  $\mu$ l) 加将 DNP 标记 GAD 和生物素标记 GAD、1.0  $\mu$ M 无活性  $\beta$ -D-半乳糖苷酶溶解于缓冲液 B 的混合液 (100  $\mu$ l) 而混合,于 4℃ 温育 16 小时,形成由 DNP 标记抗原-自身抗体-生物胞素标记抗原的 3 者组成的免疫复合物。接下来,

向此反应液加亲和性纯化抗 DNP-IgG 不溶化聚苯乙烯珠 1 个,使反应 0.5 小时而在珠上补充免疫复合物。其后,仅将溶液吸出,向其中添加 100  $\mu$ l 链霉亲和素标记酶,再使反应 0.5 小时而使生物素标记 GAD 和链霉亲和素标记酶结合。将此珠用缓冲液 C(2ml) 清洗 2 次后,与溶解于缓冲液 A 的 2mM DNP-Lys(150  $\mu$ l) 反应 0.5 小时而使免疫复合物从珠溶出。除去抗 DNP-IgG 不溶化固相聚苯乙烯珠之后,向溶出液加亲和性纯化抗人 IgG-IgG 不溶化固相聚苯乙烯珠 1 个,再使反应 0.5 小时,使免疫复合物转移到第 2 珠上。与珠的反应全部于 25 $^{\circ}$ C 在 210 次/分的振荡下进行。再将珠用缓冲液 C(2ml) 清洗 3 次后,将转移到珠上的  $\beta$ -D-半乳糖苷酶活性使用 0.2mM 4-甲基伞形花酰  $\beta$ -D-吡喃半乳糖苷(荧光底物;4MUG)(200  $\mu$ l) 于 30 $^{\circ}$ C 温育,加 0.1M 甘氨酸钠缓冲液(pH 10.5)(2ml) 停止反应后,使用荧光分光光度计(F-2500、日立)测定。再有,使用激发波长 360nm、荧光波长 450nm,荧光强度以  $10^{-8}$ M 4MU 作为 100 而进行换算。

[0119] 【实施例 2:ICT-EIA-1 法及 ICT-EIA-2 法、ELISA 法的检测灵敏度的比较】

[0120] 【(1) 对象者等】

[0121] (a) 对象者:

[0122] 从非糖尿病对象者(73 名)、高胰岛素血症患者(9 名)、抗甲状腺剂(甲巯咪唑)施用中的格雷夫斯病患者(30 名)、桥本病(20 名)、2 型糖尿病患者(30 名;胰岛素未治疗:7 名、胰岛素治疗中:15 名、胰岛素治疗不明:8 名)、1 型糖尿病患者(24 名;胰岛素治疗中:21 名、胰岛素治疗不明:3 名)采集样品。

[0123] (b) 知情同意:

[0124] 对在本研究中进行的试验,得到德岛文理大学伦理委员会(承认编号第 4 号)的承认而进行。在对象者中进行知情同意,在得到同意的情况下实施试验。

[0125] (c) 统计处理:

[0126] 截止值的设定作为非糖尿病对象者的荧光强度的平均值 +2SD。另外,对 2 个变量间的相关关系,算出 Spearman 的次序相关系数。在统计解析中,使用 SPSS20.0.0,统计学显著水平设定为 5%。

[0127] 【(2) 血清使用量的探讨】

[0128] 将 ICT-EIA-1 法及 ICT-EIA-2 法的血清使用量使用 1 型糖尿病患者血清进行探讨。在 1 型糖尿病患者血清的稀释中,使用健康者的血清。

[0129] 在 ICT-EIA-1 法中制备为健康者血清 100  $\mu$ l 中各自含 10  $\mu$ l、20  $\mu$ l、30  $\mu$ l、50  $\mu$ l 的 1 型糖尿病患者血清。结果,ICT-EIA-1 法中至 20  $\mu$ l 见到荧光强度成比例地增加,但 20  $\mu$ l 往后未见到荧光强度的大的增加。另外,至 20  $\mu$ l 可确认荧光强度的升高,但见到与 10  $\mu$ l 的荧光强度相比差仅 1.3 倍。因此,将由 ICT-EIA-1 法的血清的最大使用量设为 10  $\mu$ l。但是,在本试验中,各对象者的血清的余量少,所以在各对象者的 GAD 抗体的测定中将使用血清量设为 5  $\mu$ l。

[0130] ICT-EIA-2 法是制备成在健康者血清 100  $\mu$ l 中含各自 1  $\mu$ l、2  $\mu$ l、5  $\mu$ l、10  $\mu$ l、20  $\mu$ l、30  $\mu$ l、40  $\mu$ l、50  $\mu$ l 的 1 型糖尿病患者血清。结果,ICT-EIA-2 法至 5  $\mu$ l 见到荧光强度的增加,但 5  $\mu$ l 往后见到荧光强度的减少倾向。因此,由 ICT-EIA-2 法的血清的最大使用量设为 5  $\mu$ l。

[0131] 【(3) 本申请发明方法和 ELISA 法的检测灵敏度比较】

[0132] 除了 ICT-EIA-1 法及 ICT-EIA-2 法、第 1 代 ELISA 法、第 2 代 ELISA 法、第 3 代 ELISA 法、第 3 代改良型 ELISA 法、ELISA 试剂盒之外,对于由 ICT-EIA-3 法(由 DNP-生物素标记 GAD 及 GAD 抗体、酶标记 GAD 的 3 者形成免疫复合物)的 GAD 抗体的检测灵敏度,使用 GAD 抗体阳性糖尿病血清进行比较。再有,在 GAD 抗体阳性糖尿病血清的稀释中,使用健康者的血清。

[0133] 再有,第 1 代 ELISA 法、第 2 代 ELISA 法、第 3 代 ELISA 法是指以下的 ELISA 法。第 1 代的 ELISA 法是指,由不溶化为固相的抗原捕获血清中的要测定的特异抗体,接下来使酶标记的抗免疫球蛋白抗体(第 2 抗体)与此特异抗体反应而进行标记,最后,测定酶活性的方法。但是,血清中的大量地存在的非特异抗体非特异性地吸附于固相,此非特异抗体与酶标记第 2 抗体结合,也一同测定此酶的酶活性,由此背景变高,测定微量的特异抗体变得困难。从而,为弥补此第 1 代的缺点而开发了第 2 代的 ELISA 法。

[0134] 第 2 代的 ELISA 法是指,由不溶化于固相的第 2 抗体,首先捕获也含血清中的要测定的特异抗体的总免疫球蛋白;接下来,使酶标记抗原与此捕获的总抗体中的特异抗体反应,最后,测定酶活性的方法。但是,此方法也是,酶标记抗原吸附于固相而背景仍然高。另外,在固相上不溶化的第 2 抗体也捕获了要测定的特异抗体以外的非特异抗体,所以在固相上的第 2 抗体量有限,仅可少量使用血清样品。从而,进一步开发了第 3 代的 ELISA 法。

[0135] 第 3 代的 ELISA 法是指,由在固相上不溶化的抗原,首先捕获血清中的要测定的特异抗体,接下来使酶标记抗原与此捕获的特异抗体反应,最后,测定酶活性的方法。但是,在此方法中,虽然相比第 2 代检测灵敏度更升高,但背景仍是高的状态。另外,由于用此方法也检测全部的亚类的抗体或抗体以外的抗原结合物质,所以难以判断是否是自身抗体。

[0136] 本次,在使用第 1 代 ELISA 法及第 2 代 ELISA 法时,无法检测 GAD 抗体。由第 3 代 ELISA 法及第 3 代改良型 ELISA 法的检测灵敏度是 10U/ml 及 100U/ml,第 3 代改良型 ELISA 法相比第 3 代 ELISA 法灵敏度更高 10 倍。

[0137] 第 3 代改良型 ELISA 法及 ELISA 试剂盒的检测灵敏度均为 10U/ml,但第 3 代改良型 ELISA 法的非特异性的荧光强度高。

[0138] 另一方面,由 ICT-EIA-1 法及 ICT-EIA-2 法的检测灵敏度均为 0.3U/ml,与 ELISA 试剂盒比,灵敏度高 30 倍(参照图 2)。另外,在比较 ICT-EIA-1 法及 ICT-EIA-2 法时,检测灵敏度相同,但荧光强度的特异性/非特异性比(S/N 比)是 ICT-EIA-1 法高,荧光强度值也是,在 GAD 抗体的高浓度区域,ICT-EIA-1 法显示高的值。

[0139] 【实施例 3:ICT-EIA-1 法及 ICT-EIA-2 法的特异性探讨】

[0140] 【(1) 用于得到充分的抑制效果的 GAD 添加量的探讨】

[0141] 为了探讨 ICT-EIA-1 法及 ICT-EIA-2 法的特异性,进行高浓度的 GAD 溶液的添加,但由于 GAD 非常地高价且贵重,从而进行了 GAD 溶液的添加量的探讨。

[0142] 使用 ICT-EIA-1 法添加 GAD 至 GAD 的添加量各自成 0.1、0.3、1.0、3.0pmol/管。结果,在 3.0pmol/管中确认 80%以上的抑制。因此,在之后的特异性试验中,GAD 溶液的添加量就添加至成 3.0pmol/管。

[0143] 【(2) ICT-EIA-1 法及 ICT-EIA-2 法的特异性探讨】

[0144] 与 1 型糖尿病患者血清相同地使用作为自身免疫疾病的格雷夫斯病以及桥本病患者血清探讨 ICT-EIA-1 法及 ICT-EIA-2 法的特异性。结果示于以下的表 1。

[0145] 【表 1】

[0146]

测定法	血清	荧光强度 GAD 添加		抑制率 (%)
		(-)	(+)	
ICT-EIA-1 法	1 型糖尿病患者	227.6	2.3	99.0
	格雷夫斯病患者	1.5	1.6	0.0
ICT-EIA-2 法	1 型糖尿病患者	5,051.1	5.3	99.9
	格雷夫斯病患者	4.6	5.8	0.0

[0147] 如上述表 1 所示,1 型糖尿病患者血清是,由过量的 GAD 添加,ICT-EIA-1 法及 ICT-EIA-2 法均见荧光强度降低 99% 以上。另一方面,在格雷夫斯病患者血清中,ICT-EIA-1 法及 ICT-EIA-2 法均几乎见不到荧光强度的降低。因此,ICT-EIA-1 法及 ICT-EIA-2 法显示由本法特异性地测定到 GAD 抗体。

[0148] 【实施例 4:ICT-EIA-1 法及 ICT-EIA-2 法的再现性】

[0149] 使用稀释 50、100 倍的 1 型糖尿病患者血清探讨 ICT-EIA-1 法的同时再现性。结果示于以下的表 2。

[0150] 【表 2】

[0151]

	1 型糖尿病患者血清(稀释倍数)	n 数	荧光强度(平均值±SD)	CV 值(%)
ICT-EIA-1 法	100 倍	10	124.0±6.7	5.4
	50 倍	10	214.1±9.2	4.8
ICT-EIA-2 法	100 倍	10	1918.9±91.5	4.8
	50 倍	10	3184.5±152.0	5.2

[0152] 如上述表 2 所示,同时再现性良好,达 4.8 ~ 5.4% (n = 10)。

[0153] 另外,相同地使用稀释 50、100 倍的 1 型糖尿病患者血清探讨 ICT-EIA-2 法的同时再现性。结果也显示于上述表 2,同时再现性良好,达 4.8 ~ 5.2% (n = 10)。

[0154] 【实施例 5:由 ICT-EIA 法的 GAD 抗体的检测评价】

[0155] 【(1) 由 ICT-EIA-1 法的 GAD 抗体的检测】

[0156] 使用 ICT-EIA-1 法测定非糖尿病对象者 (32 名)、2 型糖尿病患者 (30 名)、1 型糖尿病患者 (23 名) 的血清 (参照图 3)。截止值设为荧光强度 1.8。

[0157] 结果,显示超越截止值的荧光强度的是,在非糖尿病对象者中是 1/33 名。在 2 型糖尿病患者中是 3/29 名。另一方面,在 1 型糖尿病患者中是 11/22 名。

[0158] 对于超越截止值的对象者,由与上述实施例 2(1) 同样的方法,进行阳性的确认。再有,向血清添加过量的 GAD,将荧光强度被抑制 50% 以上判断为阳性。但是,即使抑制率不是 50% 以上,只要荧光强度是截止值的 3 倍以上,且抑制率接近 50%,就将其也判断为阳性。结果,2 型糖尿病患者的 4 名中 3 名被抑制 48 ~ 100%、1 型糖尿病患者的 13 名中 13 名被抑制 40 ~ 100%。另外,非糖尿病对象者的 1 名不被抑制。结果显示,在超越截止值的对象者之中除非糖尿病对象者及 2 型糖尿病患者的 1 部分之外的几乎全部对象者是阳性。

结果示于表 3。

[0159] 【表 3】

[0160]

对象者	胰岛素治疗	测定法	自身抗体阳性者的检测 (阳性者/总数)	阳性率 (%)
非糖尿病对象者	-	ICT-EIA-1'法	0/32	0
		ICT-EIA-2 法	0/34	0
		ELISA 法	1/34	3
2 型糖尿病患者	-	ICT-EIA-1'法	0/7	0
		ICT-EIA-2 法	0/7	0
		ELISA 法	2/7	29
	+	ICT-EIA-1'法	3/15	20
		ICT-EIA-2 法	0/15	0
		ELISA 法	6/15	40
	不明	ICT-EIA-1'法	2/8	25
		ICT-EIA-2 法	1/7	14
		ELISA 法	6/7	86
1 型糖尿病患者	+	ICT-EIA-1'法	13/21	62
		ICT-EIA-2 法	10/20	50
		ELISA 法	15/20	75
	不明	ICT-EIA-1'法	0/2	0
		ICT-EIA-2 法	0/2	0
		ELISA 法	2/2	100

[0161] 另外,自未向对象者血清添加高浓度 GAD 时的荧光强度减添加高浓度 GAD 时的荧光强度,作为特异 GAD 抗体值(往后称为特异信号)表示。将此时的截止值设为 0.7。

[0162] 结果,显示超越截止值的荧光强度的是,在非糖尿病对象者中是 0/32 名、在 2 型糖尿病患者中是 9/30 名。另一方面,在 1 型糖尿病患者中是 17/23 名。

[0163] 【(2) 由 ICT-EIA-2 法的 GAD 抗体的检测】

[0164] 使用 ICT-EIA-2 法测定非糖尿病对象者(34 名)、2 型糖尿病患者(29 名)、1 型糖尿病患者(22 名)的血清(参照图 4)。将截止值设为荧光强度 8.1。

[0165] 结果,显示超越截止值的荧光强度的是,在非糖尿病对象者中是 3/34 名。在 2 型糖尿病患者中是 1/29 名。另一方面,在 1 型糖尿病患者中是 10/22 名。

[0166] 对于超越截止值的对象者,由与实施例 2(1) 同样的方法进行阳性的确认。再有,判断用与 ICT-EIA-1 法同样的基准进行。结果,2 型糖尿病患者的 1 名被抑制 94%、1 型糖尿病患者的 10 名被抑制 88 ~ 100%。另外,非糖尿病对象者的 3 名几乎不被抑制。结果显示,在超越截止值的对象者之中,除非糖尿病对象者之外的几乎全部对象者是阳性(参照表 3)。

[0167] 另外,与上述 (1) 相同地求出特异信号。截止值设为荧光强度 0.4。

[0168] 结果,显示超越截止值的荧光强度的是,在非糖尿病对象者中是 0/34 名。在 2 型糖尿病患者中是 23/29 名。另一方面,在 1 型糖尿病患者中是 17/22 名。

[0169] 【实施例 5:ELISA 法及 ICT-EIA-1 法或 ICT-EIA-2 法的相关关系】

[0170] 从 1 型糖尿病患者及 2 型糖尿病患者的结果探讨 ELISA 法及 ICT-EIA-1 法或

ICT-EIA-2 法之间的相关关系。在 ICT-EIA 法中使用特异信号,未检测到特异信号是, ICT-EIA 法及 ELISA 法均除外而进行相关关系的探讨。结果,在 ELISA 法及 ICT-EIA-1 法之间见到显著的相关关系 ( $r = 0.555$ 、 $p < 0.000$ ) (参照图 5)。另外,仅在 ICT-EIA-1 法及 ELISA 法均为阳性的患者中探讨相关关系的结果,再见到显著的相关关系 ( $r = 0.794$ 、 $p < 0.000$ )。[0171] 在 ELISA 法及 ICT-EIA-2 法之间也见到显著的相关关系 ( $r = 0.494$ 、 $p < 0.001$ ) (参照图 6)。另外,仅在 ICT-EIA-2 法及 ELISA 法均为阳性的患者中探讨相关关系的结果,再见到显著的相关关系 ( $r = 0.786$ 、 $p < 0.000$ )。

[0172] 在 ELISA 法中,从 1 型糖尿病患者 (22 名) 和 2 型糖尿病患者 (29 名) 之中检测计 31 名的阳性者,但用 EICT-EIA-1 法,从用 ELISA 法程阴性的中检测到 8 名的阳性者,用 ICT-EIA-2 法可检测 16 名的阳性者。结果示于以下的表 4。

[0173] 【表 4】

[0174]

	阳性者数 / 全阳性者数* (人)	检测率 (%)
ELISA 试剂盒	13/39	33
ICT-EIA-1' 法	8/39	21
ELISA 试剂盒 + ICT-EIA-1' 法	18/39	46
ELISA 试剂盒	7/47	15
ICT-EIA-2 法	16/47	34
ELISA 试剂盒 + ICT-EIA-2 法	24/47	51

[0175] ※ 经 ELISA 试剂盒及 ICT-EIA 法的两方或一方测定为阳性者的全数

[0176] 【参考例 1 : 由 ELISA 法的 GAD 抗体的检测】

[0177] 用 ELISA 试剂盒测定非糖尿病对象者 (34 名)、2 型糖尿病患者 (29 名)、1 型糖尿病患者 (22 名) 的血清。将截止值设为吸光度 0.10。结果,显示超越截止值的吸光度的是,在非糖尿病对象者中是 1/34 名。在 2 型糖尿病患者中是 14/29 名。另一方面,在 1 型糖尿病患者中是 17/22 名 (参照表 3)。

[0178] 【实施例 6 : 由 ICT-EIA-2 法的胰岛素自身抗体的检测灵敏度】

[0179] (1) 探讨样品 :

[0180] 使用胰岛素自身抗体阳性者的血清进行比较。

[0181] (2) 检测方法 :

[0182] 基于公知文献 (Cli Biochem. 2012, 45 (13-14) :1086-91) 中记载的方法,测定上述的胰岛素自身抗体。

[0183] 上述文献方法的特征在于,为了减作为 ICT-EIA-1 法的问题的胰岛素标记体和抗体的立体障碍,将胰岛素用低分子 DNP 或生物素标记,接下来使这些标记体和抗体反应而使免疫复合物形成。

[0184] 使用上述文献方法和 ELISA 试剂盒测定用健康者的胰岛素除去血清稀释的胰岛

素自身抗体阳性者（1 型糖尿病患者）的血清，比较检测灵敏度。

[0185] (3) 检测灵敏度：

[0186] 如图 9 所示，相对于 ELISA 试剂盒，ICT-EIA-2 法可以 1,000 倍高灵敏度检测胰岛素自身应对。另外，与 ICT-EIA-1 法比较，则灵敏度高 10 倍。

[0187] **【实施例 7：对胰岛素自身抗体及 GAD 抗体的 ICT-EIA-2 法的同时检测方法】**

[0188] 在本同时检测法中，如图 8 所示，使用将胰岛素自身抗体及 GAD 抗体用的各标记体合为 1 个检测系统。在本检测方法中使用的 ICT-EIA-2 法，作为其特征之一，如果换标记抗原，则可在相同的固相及以相同的操作检测各种抗体。从而，通过将胰岛素自身抗体及 GAD 抗体用的 2 种各标记抗原等的使用试剂作为一个使用，可以 1 次测定检测各自身抗体的合计的信号。

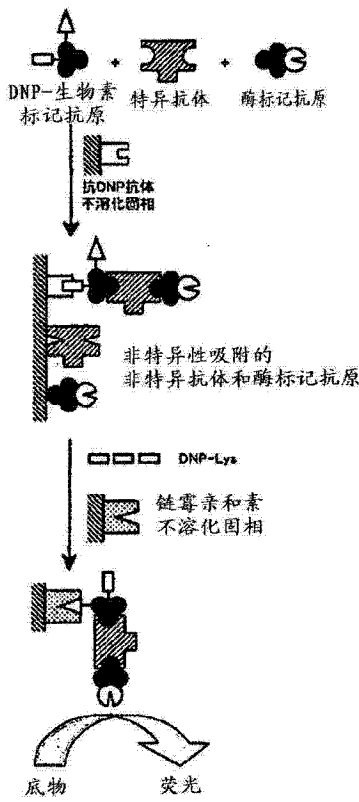
[0189] 另外，通过 2 种各自身抗体的荧光强度相重合，由各自身抗体的有无，阳性者和阴性者之间荧光强度的差变大，所以这些自身抗体阳性患者的早期的检测变得容易。

[0190] 由以上，变得可更加正确地发症预知或诊断 1 型糖尿病及 SPIDDM。

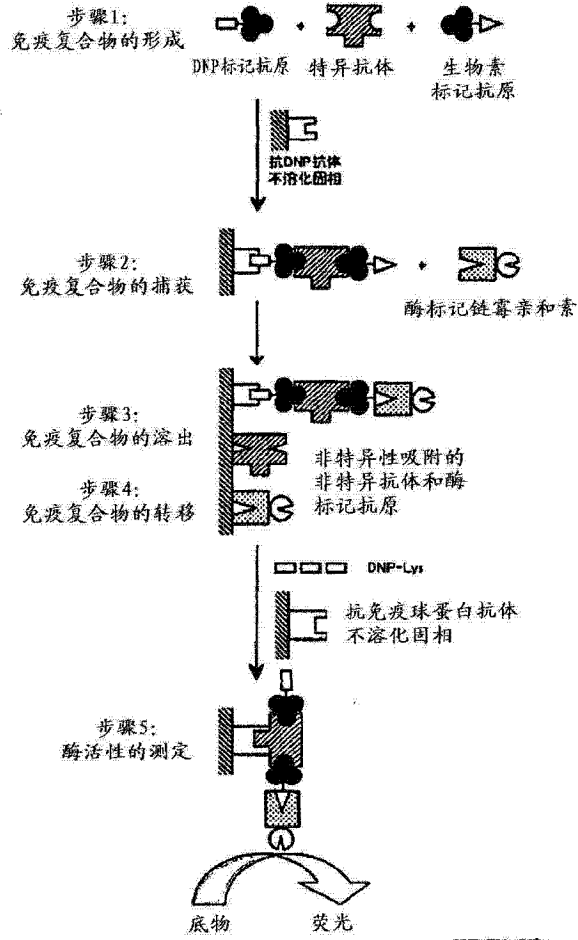
[0191] **【工业实用性】**

[0192] 本发明的 GAD 抗体测定方法是使以往的 ELISA 法的 30 倍以上的高灵敏度的 GAD 抗体的检测和测定变得可能的方法。因此，使用本发明，变得可检测、诊断 1 型糖尿病或缓慢进行 1 型糖尿病（SPIDDM）的发症初期。然后，通过就餐或运动等的生活改善及早期实施胰岛素疗法，可试图治疗或阻止症状的进行。如此，由本发明的 GAD 抗体测定方法，可诊断 1 型糖尿病或缓慢进行 1 型糖尿病的初期症状，在更初期的阶段阻止这些的进行。

[0193] 另外，通过将胰岛素自身抗体及 GAD 抗体的标记抗原等的使用试剂作为一体使用，变得可更加正确地发症预知或诊断 1 型糖尿病及 SPIDDM。



ICT-EIA-1法



ICT-EIA-2法

步骤1:  
免疫复合物的形成

步骤2:  
免疫复合物的捕获

步骤3:  
与酶标记链霉亲和素的结合

步骤4:  
免疫复合物的溶出

步骤5:  
免疫复合物的转移

步骤6:  
酶活性的测定

图 1

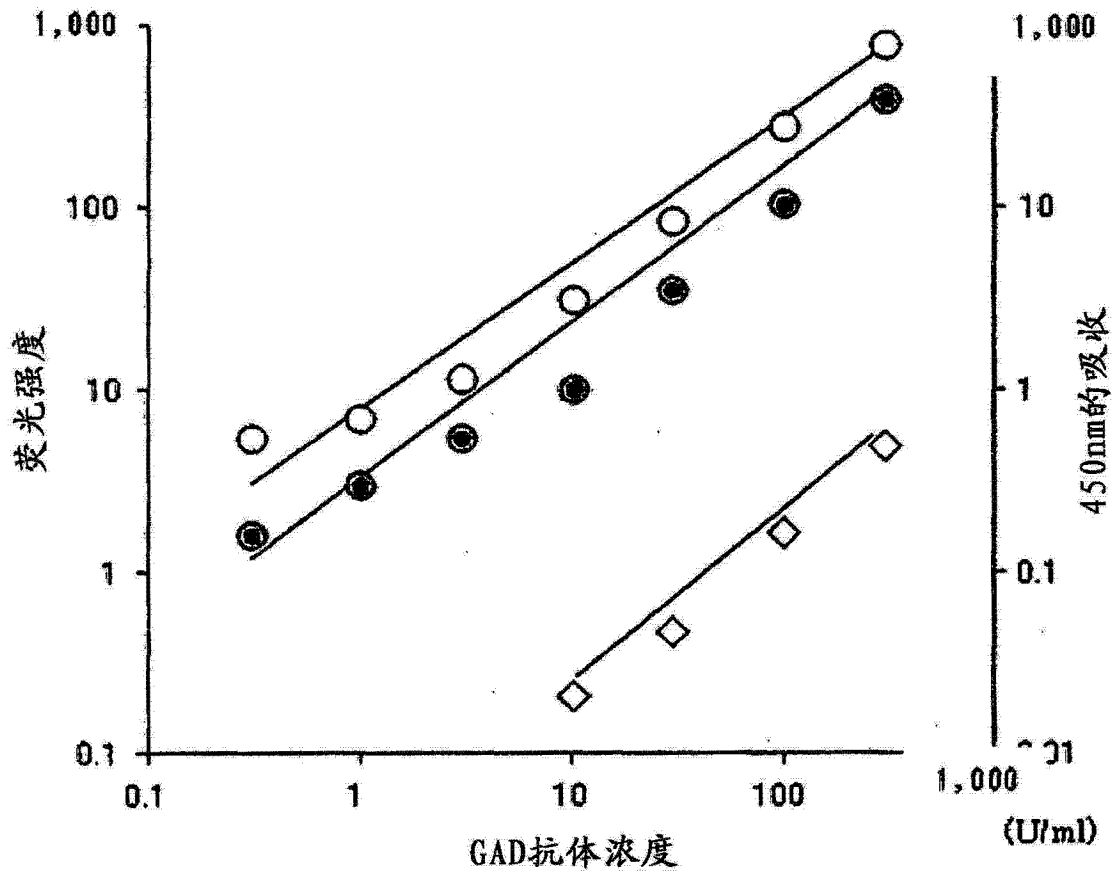


图 2

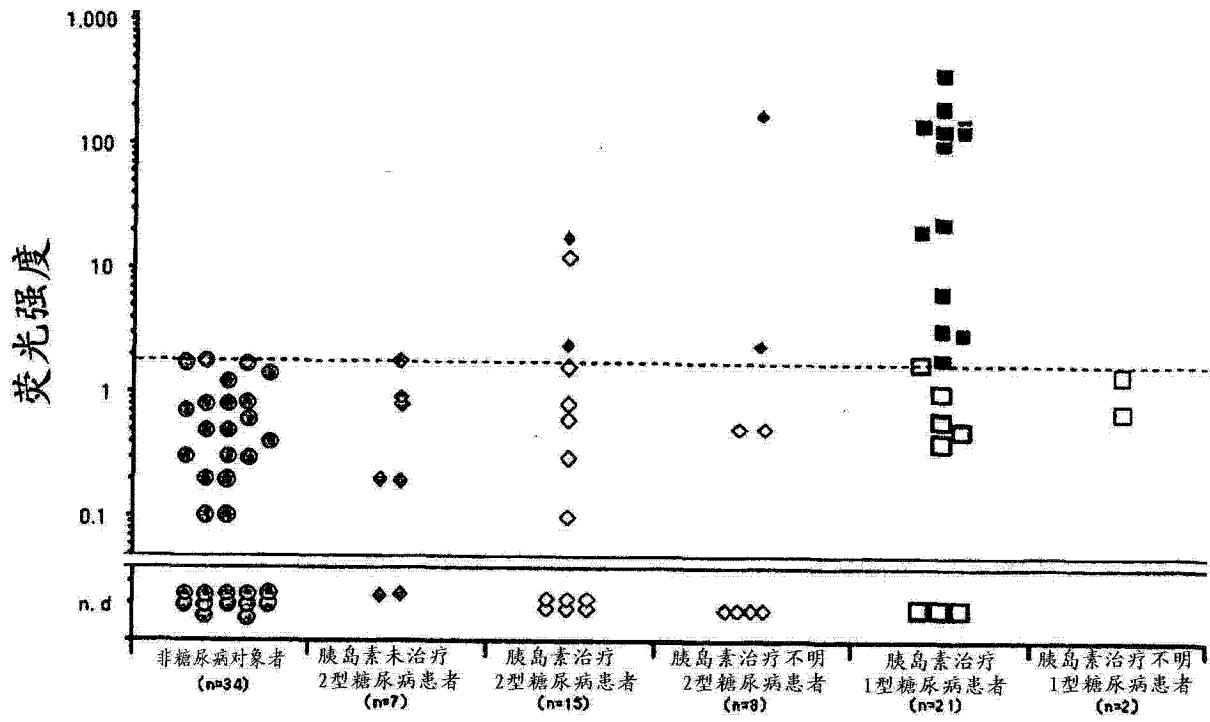


图 3

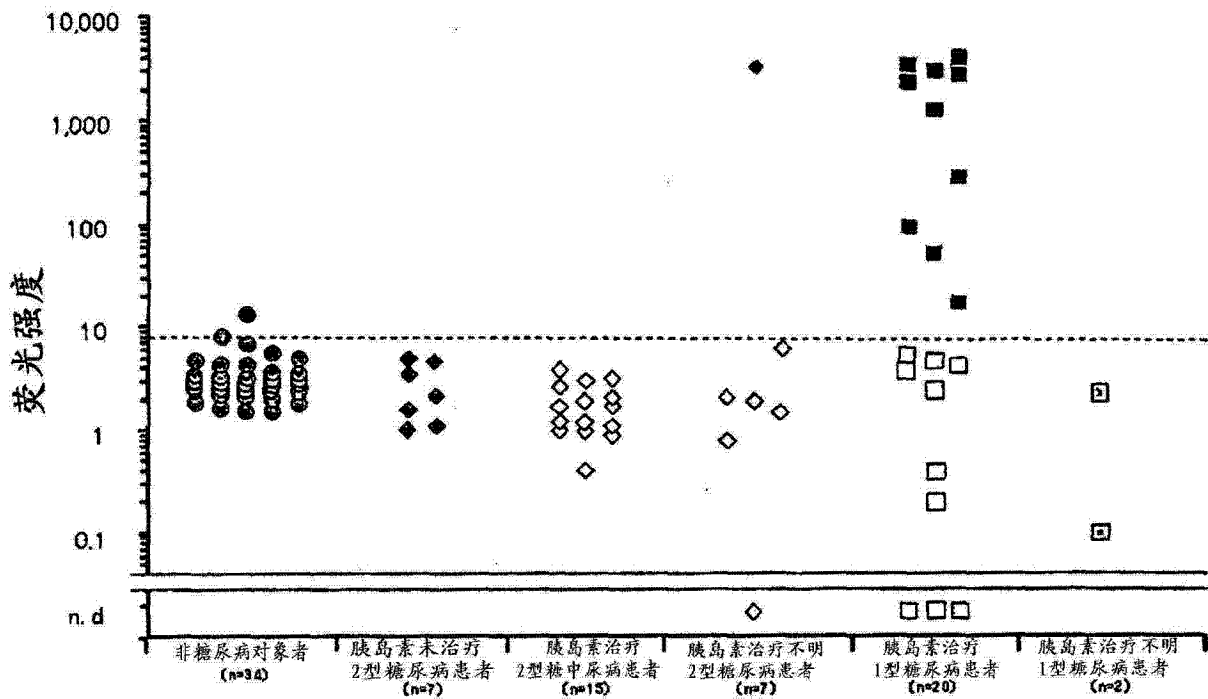


图 4

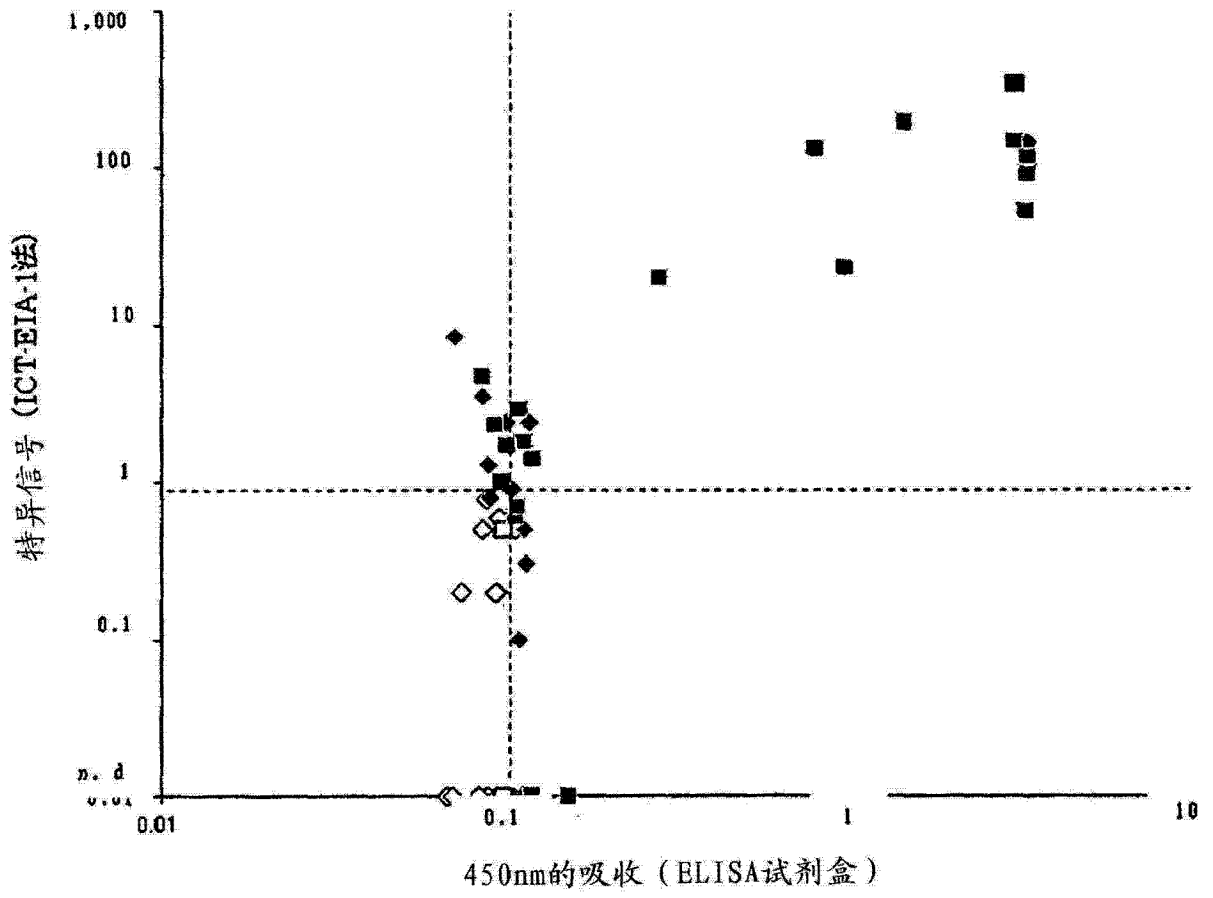


图 5

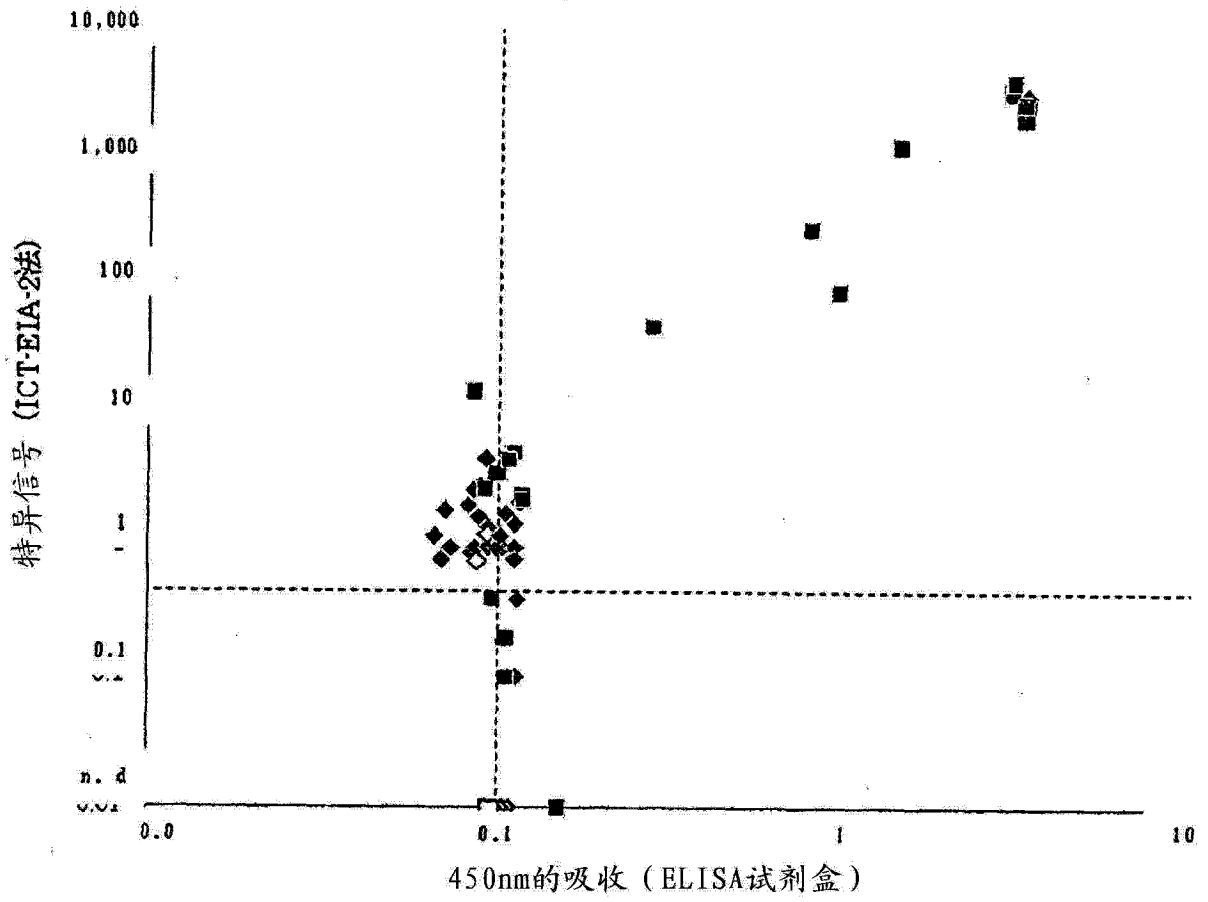
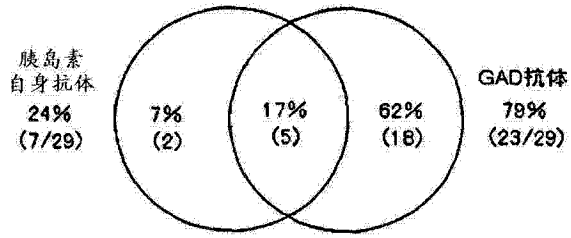
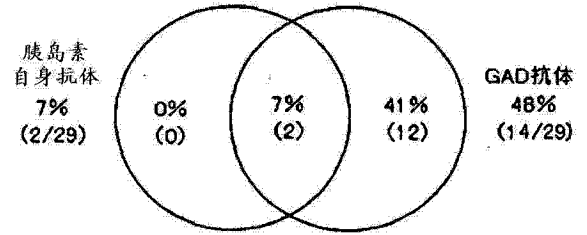


图 6

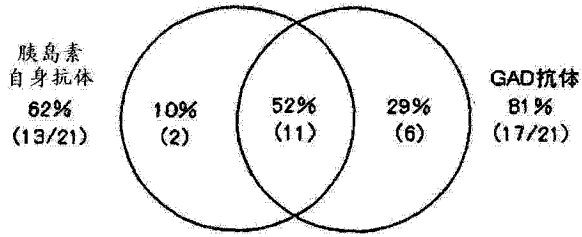
2型糖尿病患者



2型糖尿病患者

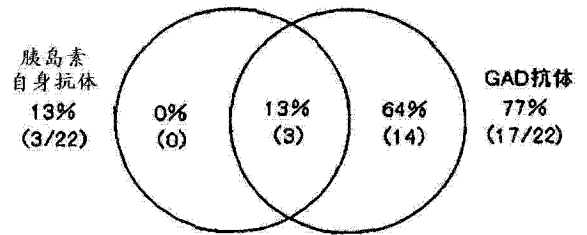


1型糖尿病患者



ICT-EIA-2法

1型糖尿病患者



ELISA 试剂盒

图 7

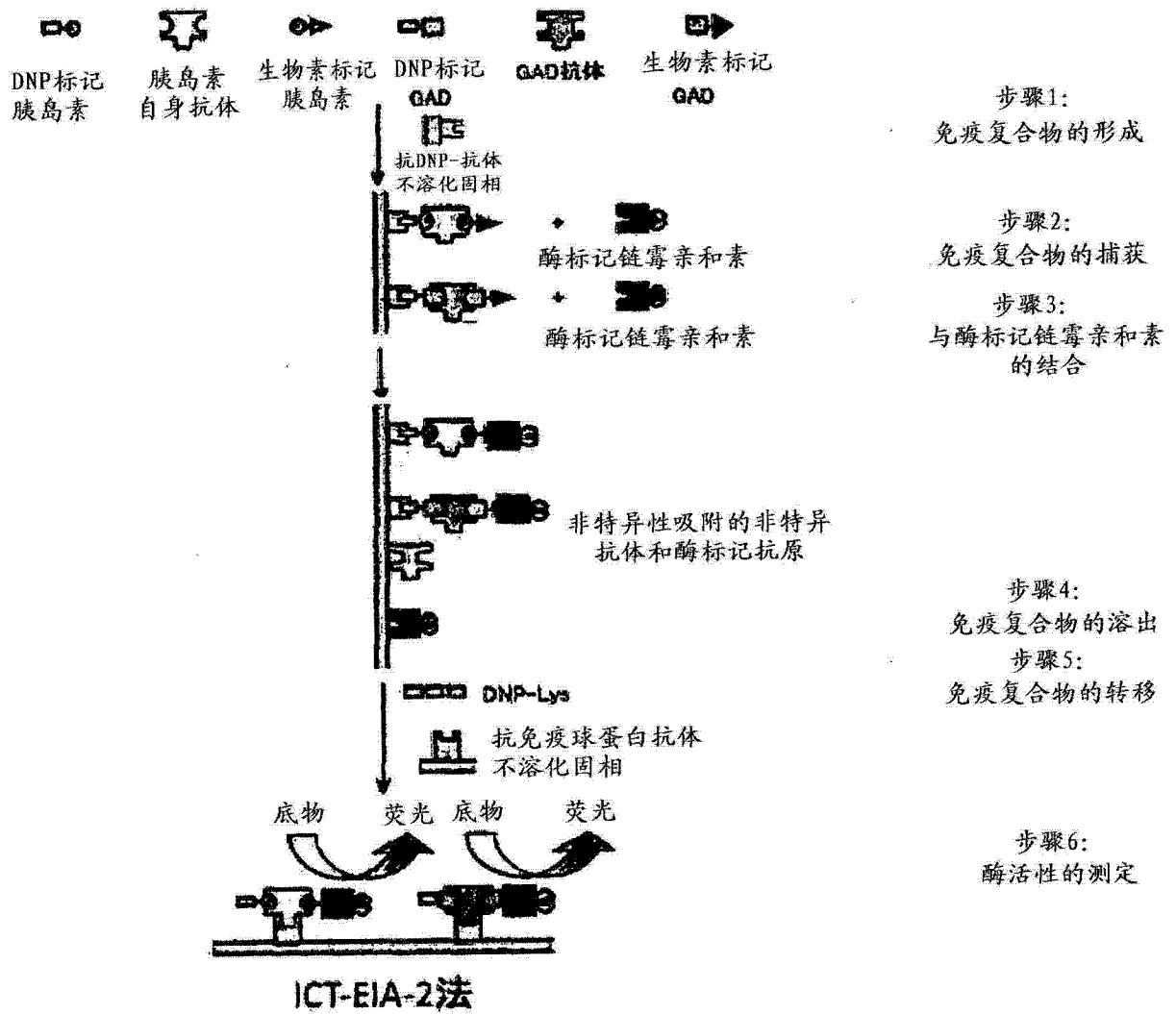


图 8

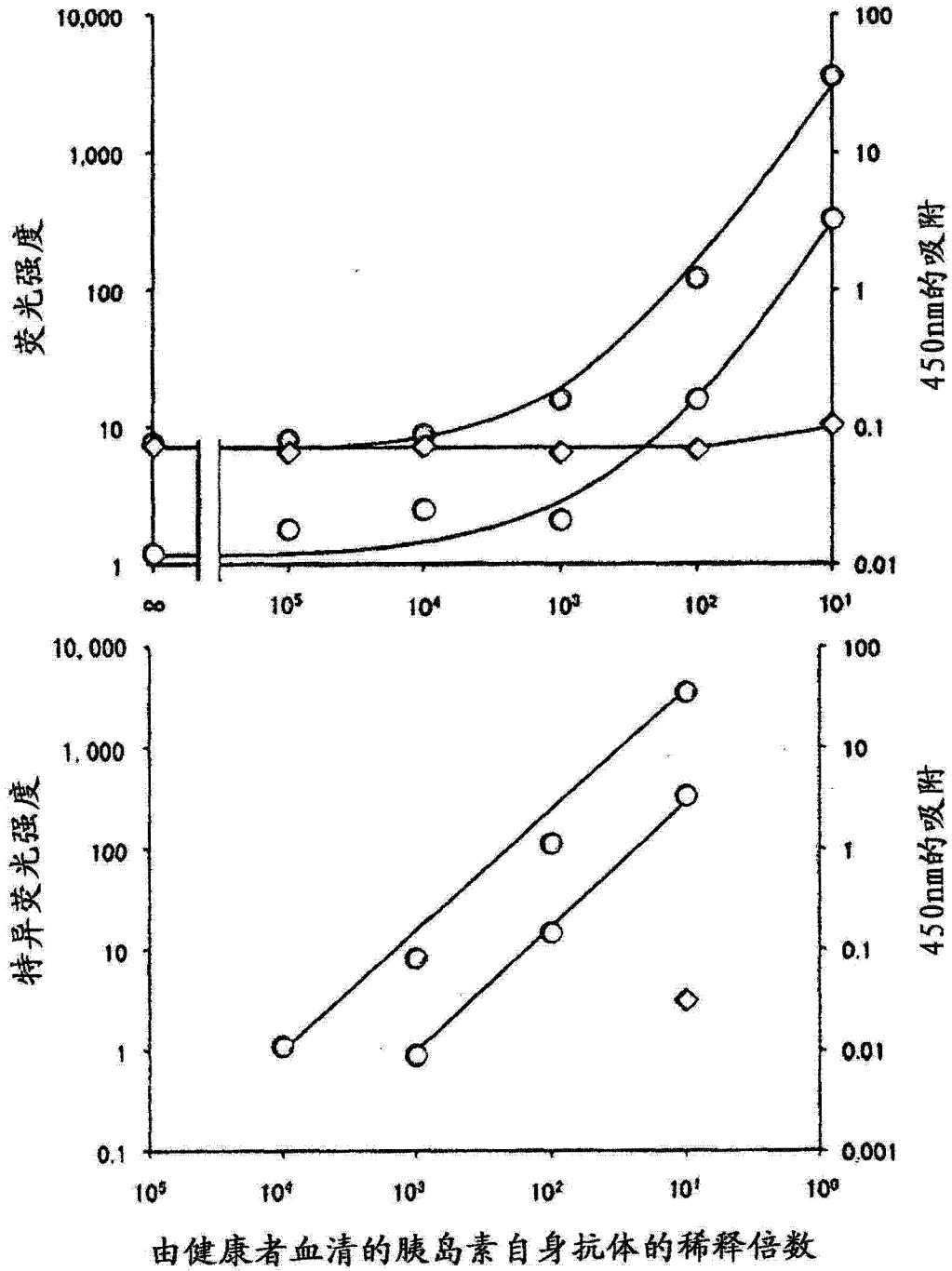


图 9

专利名称(译)	作为1型糖尿病的早期诊断指标的GAD抗体的高灵敏度测定方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN104969070A</a>	公开(公告)日	2015-10-07
申请号	CN201480007297.2	申请日	2014-01-29
[标]申请(专利权)人(译)	桥田诚一		
申请(专利权)人(译)	桥田诚一		
当前申请(专利权)人(译)	桥田诚一		
[标]发明人	桥田诚一		
发明人	桥田诚一		
IPC分类号	G01N33/564 G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/564 G01N2800/042		
优先权	2013035128 2013-02-05 JP		
其他公开文献	CN104969070B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明旨在提供GAD抗体的测定方法。特别是，旨在提供超以往的ELIZA法的，高灵敏度的GAD抗体测定方法。为了解决上述的课题，通过使用2点结合免疫复合物转移酶联免疫测定方法(ICT-EIA法)，构建血中的GAD抗体的测定方法，ELIZA法的33倍以上的高灵敏度测定变得可能。结果，变得可在发症初期检测1型糖尿病等，变得可实施确实的介入疗法。

