



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104969070 B

(45)授权公告日 2017. 11. 07

(21)申请号 201480007297.2

(22)申请日 2014.01.29

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 104969070 A

(43)申请公布日 2015.10.07

(30)优先权数据  
2013-035128 2013.02.05 JP

(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

(73)专利权人 希森美康株式会社  
地址 日本兵库县

(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

(51)Int.Cl.  
G01N 33/564(2006.01)  
G01N 33/53(2006.01)  
G01N 33/543(2006.01)

(56)对比文件  
CN 101282995 A, 2008.10.08,  
Satoshi Numata, et al..Development of an ultra-sensitive enzyme immunoassay for human insulin autoantibodies.《Clinical Biochemistry》.2012, 第45卷

任卫东 等.糖尿病患者谷氨酸脱羧酶抗体测定的临床意义.《临床荟萃》.1999, 第14卷(第20期),

审查员 赵晓明

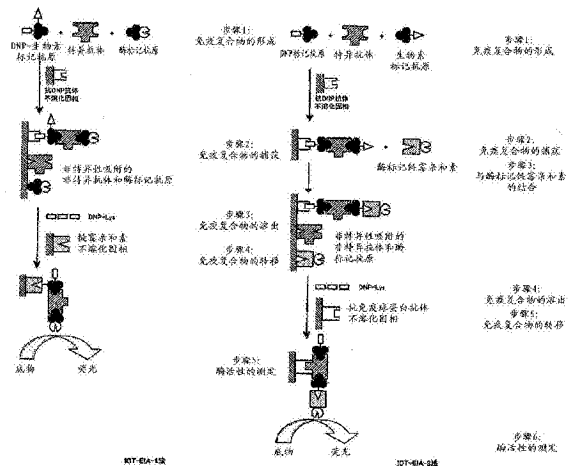
权利要求书1页 说明书15页 附图7页

(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. 下列试剂用于制造通过同时测定GAD抗体和胰岛素自身抗体来实施缓慢进行1型糖尿病的发病预知或诊断用试剂盒的用途:

- (1) DNP标记GAD抗原和生物素标记GAD抗原, 及
- (2) DNP标记胰岛素抗原及生物素标记胰岛素抗原,

其中所述GAD抗体和胰岛素自身抗体的测定通过根据免疫复合物转移酶联免疫测定法的以下6个反应工序实施:

- [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, 及由胰岛素自身抗体和DNP标记胰岛素抗原、生物素标记胰岛素抗原形成免疫复合物,
- [2] 使上述各免疫复合物与抗DNP抗体不溶化固相反应而在固相捕获各免疫复合物,
- [3] 使上述在固相捕获的各免疫复合物和酶标记链霉亲和素反应而向各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各免疫复合物使用DNP-赖氨酸从固相溶出,
- [5] 使上述从固相溶出的各免疫复合物与抗免疫球蛋白抗体不溶化固相反应而使各免疫复合物转移到抗免疫球蛋白抗体不溶化固相,
- [6] 使用各免疫复合物中含的标记酶与底物反应, 通过测定总和了生成物的荧光的荧光强度来测定各免疫复合物的浓度, 所述各免疫复合物的浓度反映总和了GAD抗体和胰岛素自身抗体的浓度。

2. 权利要求1所述的用途, 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。其发症与遗传因子和环境因子均相关。于是,代谢异常的经长时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β细胞被破坏,至胰岛素的绝对的缺乏而发症。对此胰腺β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β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,早期发症时显示高达70~80%的阳性率。但是,在发症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,在发症时期不足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,在发症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,可为在糖尿病发症后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.Nature347 (6289):151-156,1990

[0013] 非专利文献4:Kaufman DL,Erlander MG,Clare-Saizler 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-新しい測定法,radio ligand 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/mI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/mI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(SIowly 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 $amOI$ 水平以下( $zmoI$ )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-新しい測定法, radio ligand 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0.1U/mI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] 重组体一人-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/0.48mI加溶解于DMF的13mM SATA 10μI,于30℃温育30分钟。温育后,向反应液加4M羟胺10μI,于30℃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(5mI)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 0.18mI后,加0.1M磷酸钠缓冲液(pH 7.0)0.72mI,加溶解于DMF的4mM EMCS 0.1mI,于30℃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β-D-半乳糖苷酶3mg溶解于缓冲液E 0.52mI,加溶解于DMF的50mM N,N'-(o-亚苯基)二马来酰亚胺(OPDM)(Sigma-Aldrich)26.3μI,于30℃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(5mI)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 $^{\circ}$ 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 $\mu$ I,于30 $^{\circ}$ C温育5分钟后,加100mM NEM20 $\mu$ I,于30 $^{\circ}$ 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(5mI)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 $^{\circ}$ 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 $\mu$ I,于30 $^{\circ}$ C温育5分钟后,加100mM NEM 20 $\mu$ I,于30 $^{\circ}$ 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UITrogeI 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/0.48mI加溶解于DMF的13mM SATA 10 $\mu$ I,30 $^{\circ}$ C、温育30分钟。温育后,向反应液加4M羟胺10 $\mu$ I,于30 $^{\circ}$ 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(5mI)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 0.1mI后,加0.1M磷酸钠缓冲液(pH 7.0)0.8mI,加溶解于DMF的0.6mM EMCS 0.1mI,于30 $^{\circ}$ 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)0.9mI,加溶解于DMF的0.2mM EMCS 0.1mI,于30 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $\mu$ I,于30 $^{\circ}$ C温育5分钟后,加100mM NEM 20 $\mu$ I,30 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C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10mI。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 10mI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50μI加缓冲液A 150μI而稀释后,再加13.6μI的0.4M HCl而酸性化。1分钟后,加72.8μI的上述的DC液,振荡6分钟之后,加13.6μI的0.4M NaOH而中和。中和后以1500×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(100μI)和将DNP化标记GAD及β-D-半乳糖苷酶标记GAD、1.0μM无活性β-D-半乳糖苷酶溶解于缓冲液A的混合液(100μI)混合,于4℃温育16小时,形成由酶标记抗原—GAD抗体—补充用标记抗原的三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(2mI)清洗2次后,与溶解于缓冲液A的2mM DNP-Lys(150μI)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(2mI)清洗3次后,将转移到珠上的β-D-半乳糖苷酶活性使用0.2mM 4-甲基伞形花酰β-D-吡喃半乳糖苷(荧光底物;4MUG)(200μI)于30℃温育,加0.1M甘氨酸钠缓冲液(pH 10.5)(2mI)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(100μI)加将DNP标记GAD和生物素标记GAD、1.0μM无活性β-D-半乳糖苷酶溶解于缓冲液B的混合液(100μI)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三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100μI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(2mI)清洗2次后,与溶解于缓冲液A的2mM DNP-Lys(150μI)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℃在210次/分的振荡下进行。再将珠用缓冲液C(2mI)清洗3次后,将转移到珠上的β-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 $\mu$ I)于30 $^{\circ}$ C温育,加0.1M甘氨酸钠缓冲液(pH 10.5)(2mI)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Speaman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 $\mu$ I中各自含10 $\mu$ I、20 $\mu$ I、30 $\mu$ I、50 $\mu$ I的1型糖尿病患者血清。结果,ICT-EIA-1法中至20 $\mu$ I见到荧光强度成比例地增加,但20 $\mu$ I往后未见到荧光强度的大的增加。另外,至20 $\mu$ I可确认荧光强度的升高,但见到与10 $\mu$ I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 $\mu$ I。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 $\mu$ I。

[0130] ICT-EIA-2法是制备成在健康者血清100 $\mu$ I中含各自1 $\mu$ I、2 $\mu$ I、5 $\mu$ I、10 $\mu$ I、20 $\mu$ I、30 $\mu$ I、40 $\mu$ I、50 $\mu$ I的1型糖尿病患者血清。结果,ICT-EIA-2法至5 $\mu$ I见到荧光强度的增加,但5 $\mu$ I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 $\mu$ I。

[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/mI及100U/mI,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/mI,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/mI,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、3.0pmoI/管。结果,在3.0pmoI/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3.0pmoI/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 <sup>※</sup> (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。

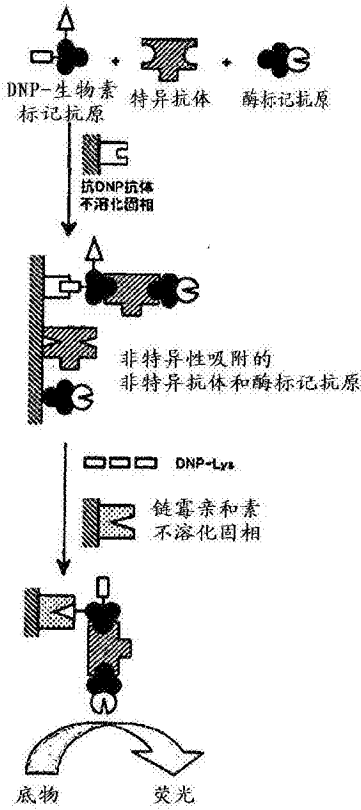
[0189] 另外,通过2种各自身抗体的荧光强度相重合,由各自身抗体的有无,阳性者和阴性者之间荧光强度的差变大,所以这些自身抗体阳性患者的早期的检测变得容易。

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

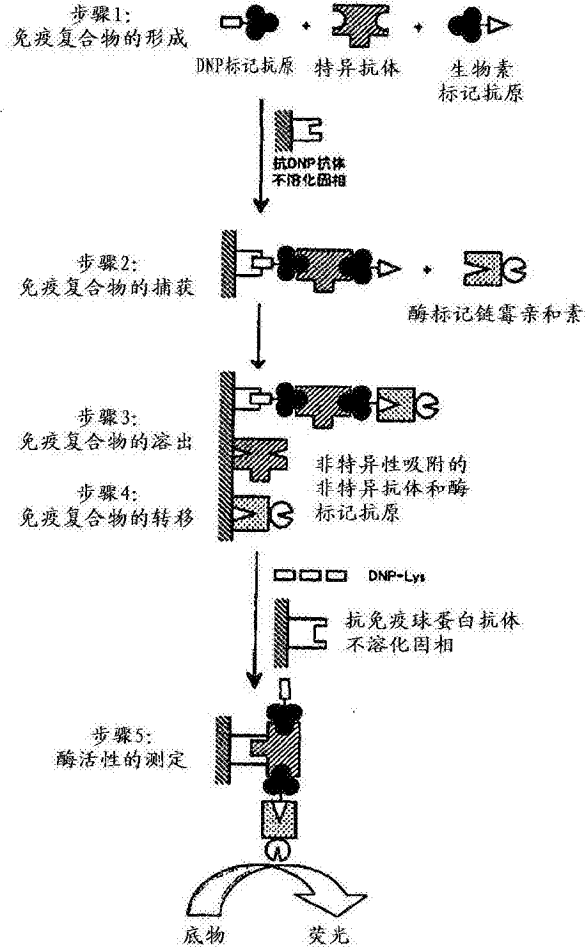
[0191] **【工业实用性】**

[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)的发病初期。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病预知或诊断1型糖尿病及SPIDDM。



ICT-EIA-1法



ICT-EIA-2法

图1

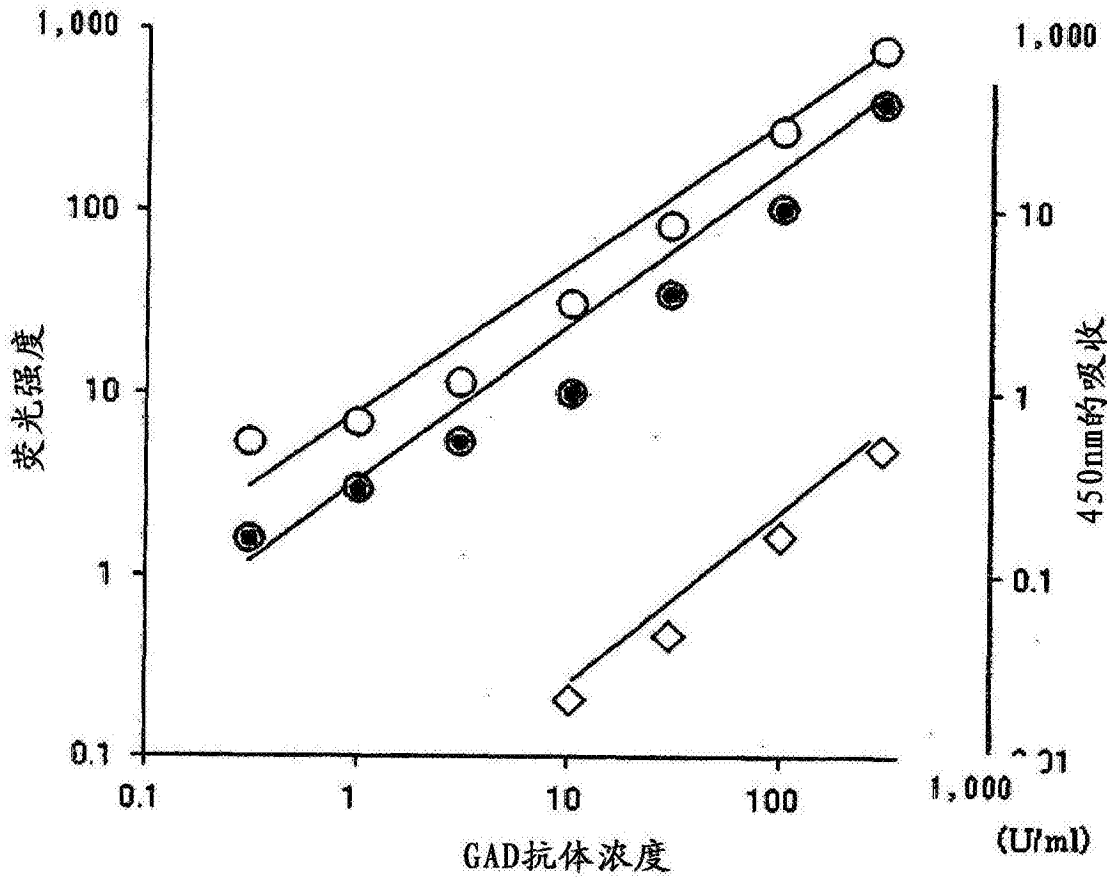


图2

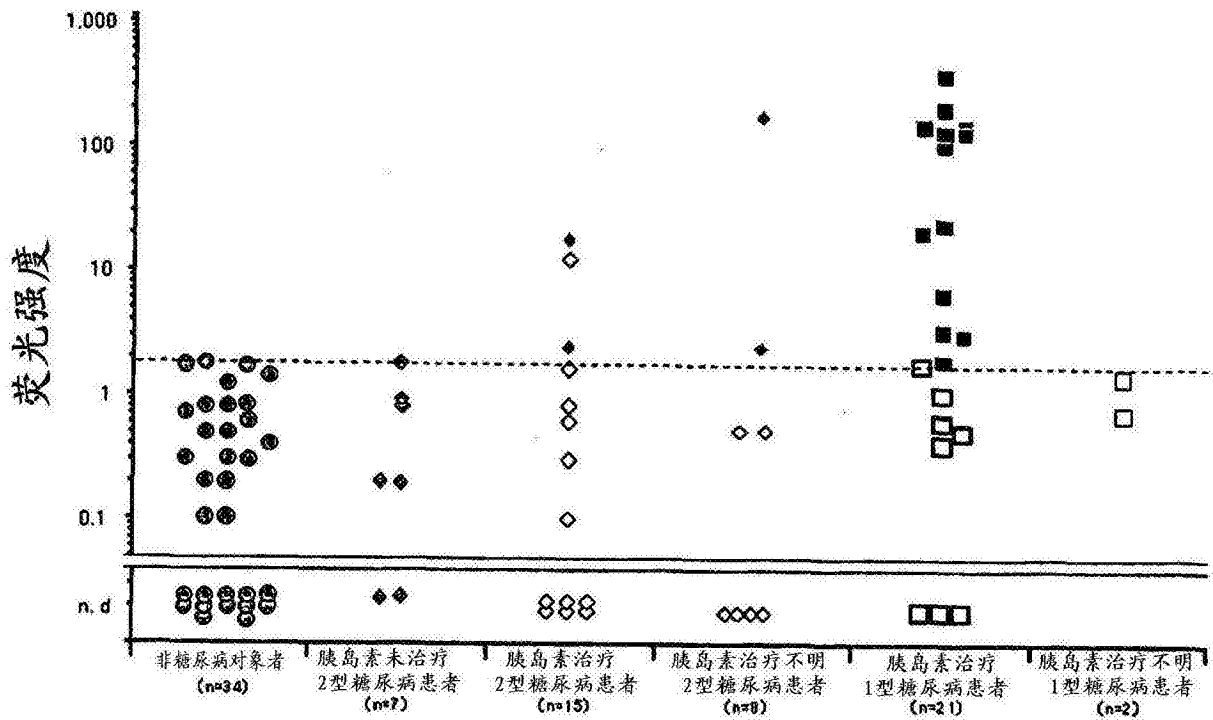


图3

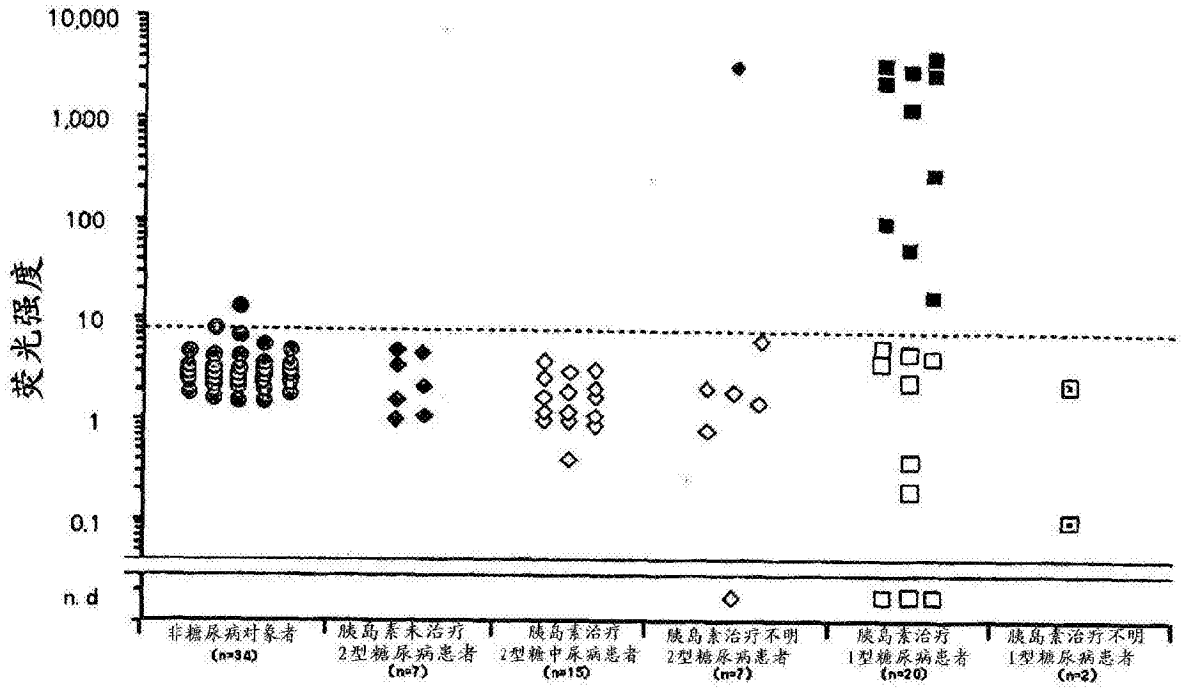


图4

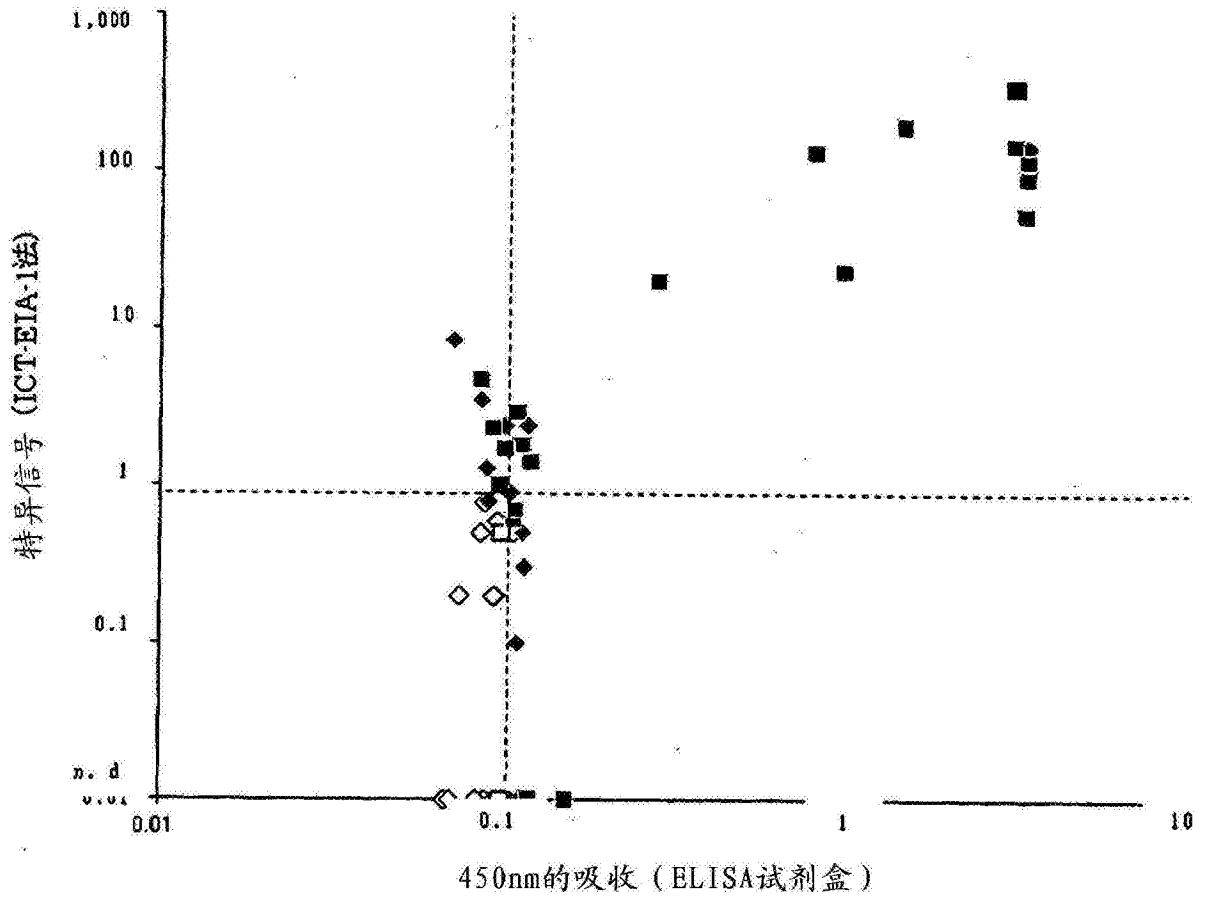
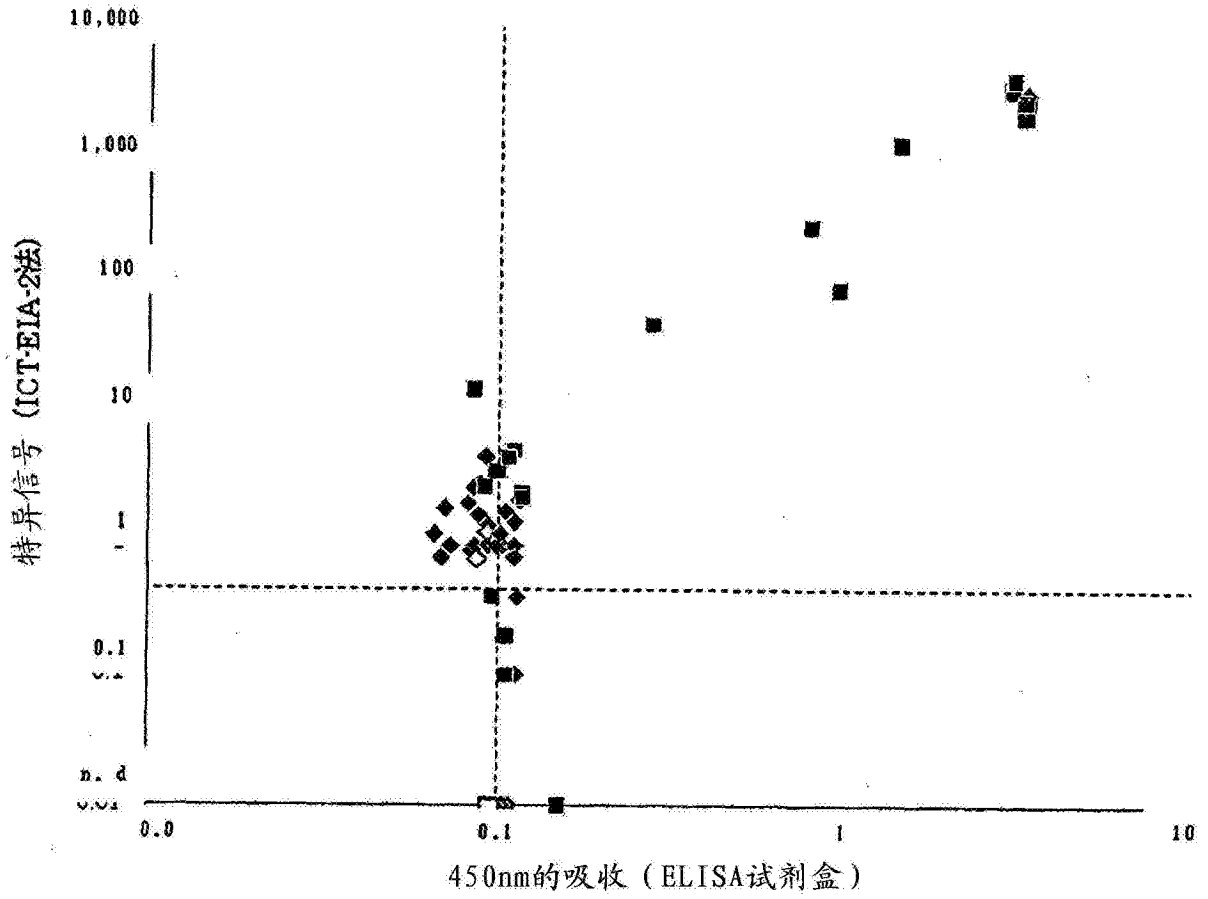
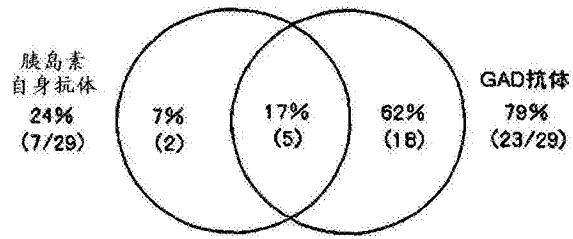


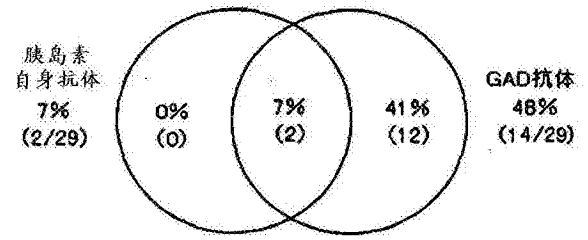
图5



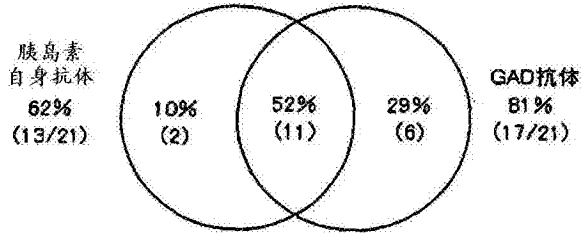
2型糖尿病患者



2型糖尿病患者

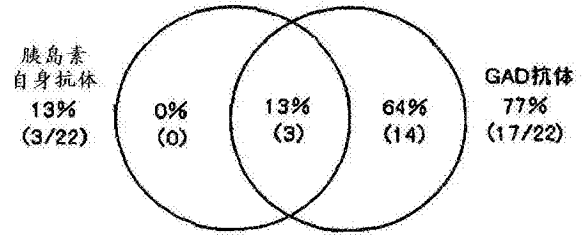


1型糖尿病患者



ICT-EIA-2法

1型糖尿病患者



ELISA 试剂盒

图7

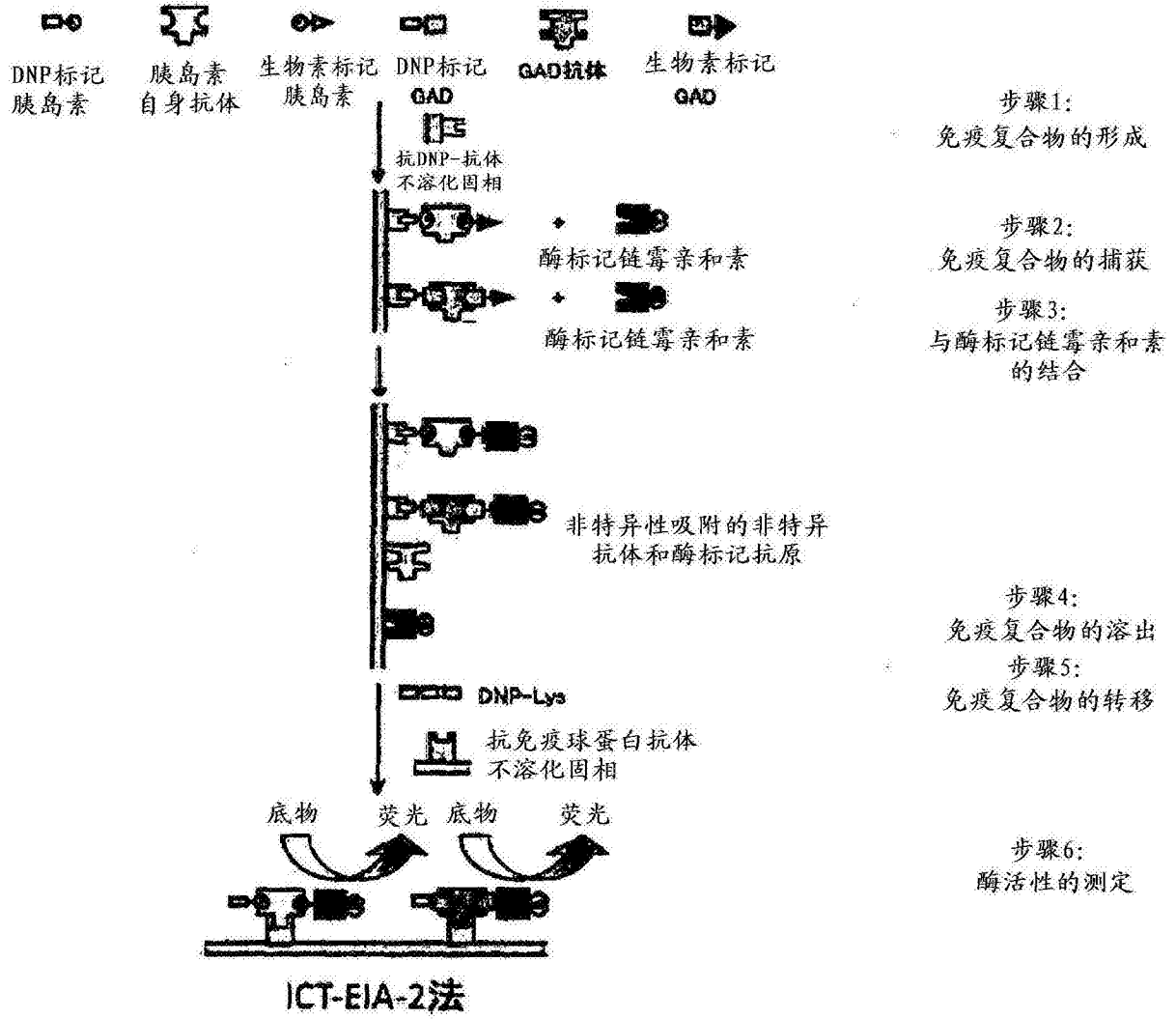


图8

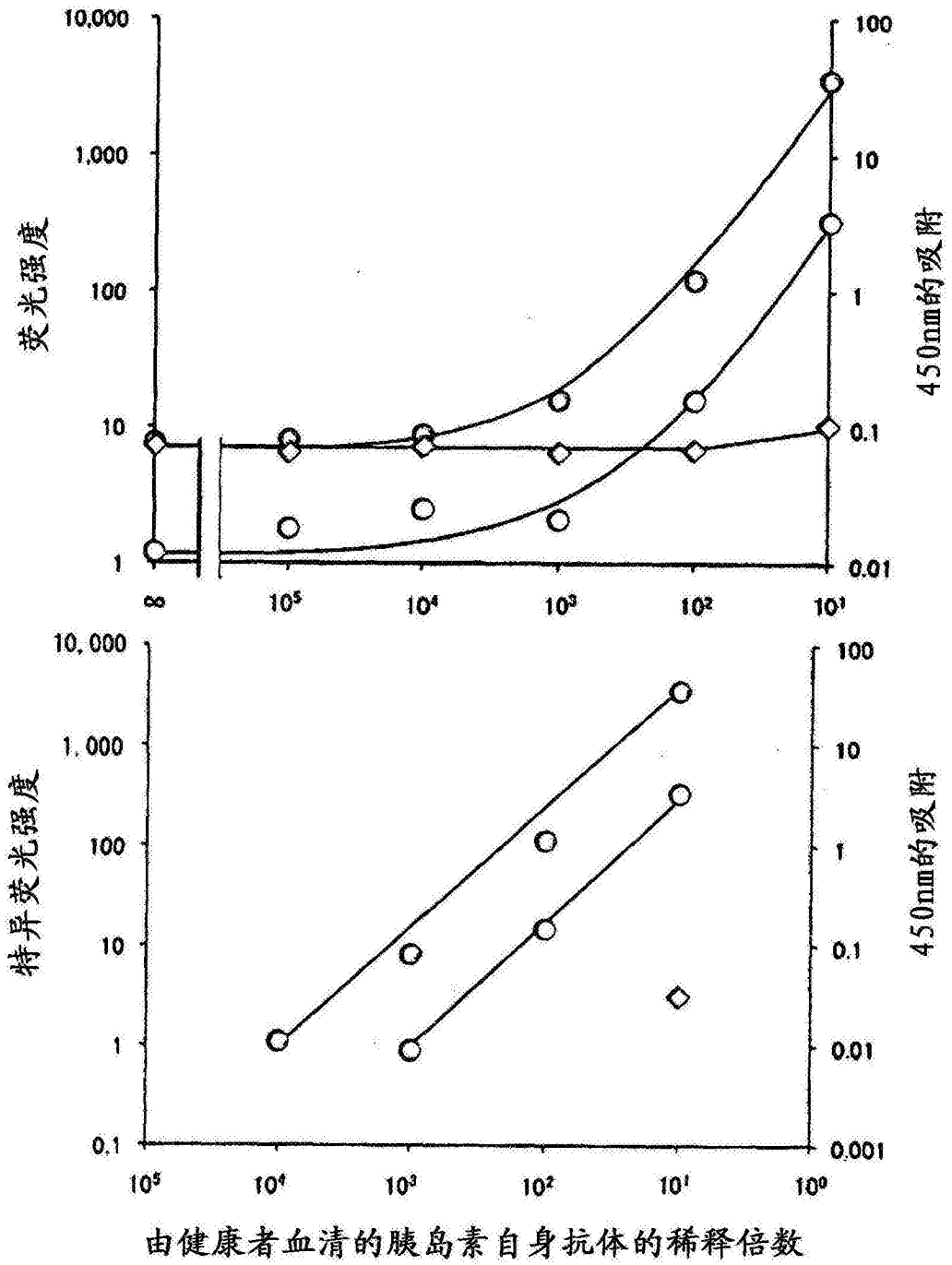


图9

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="#">CN104969070B</a>	公开(公告)日	2017-11-07
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)	希森美康株式会社		
[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		
审查员(译)	赵晓明		
优先权	2013035128 2013-02-05 JP		
其他公开文献	CN104969070A		
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。

