



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104737020 A

(43) 申请公布日 2015. 06. 24

(21) 申请号 201380052667. X

*A61K 45/00*(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 03. 27

*A61P 3/10*(2006. 01)

(30) 优先权数据

*A61P 13/12*(2006. 01)

2012-204969 2012. 08. 30 JP

*G01N 33/53*(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 04. 09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2013/060256 2013. 03. 27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/034168 JA 2014. 03. 06

(71) 申请人 桥田诚一

地址 日本德岛县

(72) 发明人 桥田诚一 山本真弓

(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 罗菊华

(51) Int. Cl.

*G01N 33/543*(2006. 01)

权利要求书1页 说明书8页 附图4页

(54) 发明名称

早期肾障碍的评价指标和其测定方法

(57) 摘要

本发明以提供肾功能疾病的初期症状的早期诊断指标和其评价方法作为课题。特别是,以提供可确切进行糖尿病性肾病的初期症状的诊断的评价指标和其评价方法作为课题。本发明人为了解决上述的课题,使用免疫复合物转移酶联免疫测定方法( ICT-EIA法),通过以尿中和血中的脂联素浓度的比作为评价指标,发现更确切进行肾功能的评价。结果,变得也可确切掌握肾脏的功能障碍的进行状况或介入疗法的效果。

1. 肾功能的评价指标,其特征在於,是用免疫复合物转移测定方法 (ICT-EIA 法) 测定的尿中的脂联素浓度的测定值除以血中的脂联素浓度的数值。

2. 权利要求 1 所述的肾功能的评价指标,其中上述脂联素浓度是高分子量 (HMW) 脂联素浓度。

3. 权利要求 1 或 2 的肾功能的评价指标,其特征在於是权利要求 1 或 2 的数值乘以  $10^4$  的数值。

4. 肾功能疾病的进行度评价方法,其特征在於,使用权利要求 1 ~ 3 所述的评价指标。

5. 权利要求 4 所述的肾功能疾病的进行度评价方法,其特征在於,肾功能疾病是糖尿病性肾病。

6. 肾功能疾病的预防或治疗方法,其特征在於,使用权利要求 1 ~ 3 的评价指标,对于肾功能疾病患者及 / 或其罹患危险者进行介入疗法。

7. 权利要求 6 所述的肾功能疾病的预防或治疗方法,其特征在於,肾功能疾病是糖尿病性肾病。

8. 权利要求 6 或 7 所述的糖尿病性疾病的预防或治疗方法,其中介入疗法是就餐疗法、运动疗法或药物疗法。

## 早期肾障碍的评价指标和其测定方法

### 【技术领域】

[0001] 本发明涉及用于确切评价糖尿病所致的肾功能疾病（特别是糖尿病性肾病）的初期症状的评价指标和其测定方法。

### 【背景技术】

[0002] 糖尿病导致由持续的高血糖所致的血管并发症，合并细小血管症（网膜症、肾症、神经障碍）和大血管症（心脑血管系统疾病）。在其中也是区分为细小血管症的糖尿病性肾病在 1998 年慢性肾小球肾炎是日本的透析疗法导入疾病的第 1 位，在 2009 年，在全透析疗法导入者数中占 44.5%（1 万 6549 人），在医学—医疗经济上成为大的问题。再者，透析疗法导入后的 5 年生存率是约 50%，现在仍然生命预后不良。因此，有早期发现糖尿病性肾病的发症，早期治疗的必要性，但糖尿病性肾病至成为末期缺乏临床症状，不积极进行检查时易漏过。从而，从糖尿病发症的早期积极进行检查，持续发症的诊断或病期的评价是不可或缺的。

[0003] 在糖尿病性肾病的诊断中，由肾活体检查的组织学诊断是必要的。但是，对全部的糖尿病患者施行肾活体检查是困难的，一般而言，除了临床经过或网膜症等的并发症的有无之外，综合判断尿检查—肾功能检查所见等而诊断的情况多。因此现在，糖尿病性肾病的早期诊断由微量白蛋白尿的出现进行。

[0004] 在日本，2005 年的日本糖尿病学会和日本肾脏学会的糖尿病性肾病合同委员会中，“糖尿病肾症的早期诊断基准”被改订。根据此基准，尿中白蛋白测定对象者在通常的试验纸法是示尿蛋白阴性或 1+ 程度的阳性的糖尿病患者。尿尽可能测定上午的随时尿，用免疫测定法定量尿中白蛋白值（同时也测定尿中肌酸酐值（Cr））、3 次测定中 2 次以上的尿中白蛋白值是 30 ~ 299mg/gCr，则作为微量白蛋白尿，诊断为糖尿病性早期肾症。在仅微量白蛋白尿中，由于也无法否定糖尿病性肾病以外的诸病态，尿中 IV 型胶原值的升高或提示肾肥大等的糖尿病性肾病变的存在的所见成为诊断的参考。

[0005] 另一方面，初期的慢性肾脏病（CKD：chronic kidney disease）一般而言缺乏自觉症状，自尿异常开始，缓慢地肾功能降低而向末期肾功能衰竭进展。从而，由采尿的尿异常地发现成为 CKD 早期检测的唯一的手段。在其中也是蛋白尿（包括微量白蛋白尿）与 CKD 的进展密切相关，称为最重要的所见。

[0006] 最近、在糖尿病患者中报告了被称为“GFRdecliner”（肾小球过滤量：GFR：Glomerular Filtration Rate）或“早期肾功能降低（early renal function decline）”的进行性的早期肾功能降低。无对其的明确的定义，但在不持续合并蛋白尿的糖尿病患者中，尽管肾功能在正常范围内（60mL/min/1.73m<sup>2</sup>以上），但进行性肾功能降低，与白蛋白尿的增减无关系，确认至肾功能衰竭期的病例。在确认不到白蛋白尿的增加的 GFRdecliner 的病例中，考虑了治疗的开始被延迟，无法充分地阻止向肾功能衰竭期的进行的可能性。因此，由定期的肾功能的评价，可早期鉴定 GFRdecliner，则与白蛋白尿的程度无关系，肾功能尚在正常时期开始用于肾保护的治疗成为可能，期待是否可使其后的肾功能的降低

抑制或改善。由这些,仅用微量白蛋白尿进行糖尿病性肾病的早期诊断有局限,要求作为 GFRdecliner 的预测因子的更敏锐的糖尿病性肾病的早期临床的指标的开发。

[0007] 但是,对于与白蛋白尿的程度无关系,肾功能尚在正常时期时开始用于肾保护的治疗成为可能的指标或测定方法,尚处于未进行充分的探讨的情况。再有,关注到血中的特定的蛋白质,进行着检查糖尿病性疾病的进行度。例如,报告有通过测定血中的脂联素,早期判断糖尿病的进展度的方法(非专利文献 1)。

[0008] 【现有技术文献】

[0009] 【非专利文献】

[0010] 非专利文献 1:桥田诚一等,“高灵敏度脂联素测定法的开发和向其运动—营养指导的应用”德岛文理大学研究纪要第 78 号 7~20 页(2009 年)

## 【发明内容】

[0011] 【发明要解决的技术课题】

[0012] 本发明的目的是提供用于早期检测肾障碍、进行适宜的生活指导、使肾障碍缓解—退缩的肾障碍风险的指标和其测定评价方法。

[0013] 【解决课题的技术方案】

[0014] 本发明人应用利用非专利文献 1 的免疫复合物转移测定方法(ICT-EIA 法)的高分子脂联素测定方法,作为新的肾变异的指标对尿中高分子脂联素的可能性进行了探讨(PCT/JP2012/055736)。其中,本发明人进行再探讨,评价探讨具体的患者的数据。结果,由患者的肾小球过滤能力的差异,在血中和尿中的脂联素浓度见到差异。即,肾小球过滤能力变差,则尿中脂联素浓度变高,所以相对于血中的脂联素浓度求出尿中滤出的脂联素比时,得知在肾小球过滤能力差的患者中,与健康人比较示数十倍高的值。因此,本发明人发现尿中 / 血中脂联素比可成为与白蛋白尿的倾向不同的新的肾障碍的早期指标。

[0015] 再者,本发明人发现,在健康者的尿中脂联素值中单分子脂联素所占的比例高,所以由不测定单分子脂联素的脂联素测定方法更加明白尿中 / 血中脂联素比的差。即发现,通过更特异性地测定 HMW 脂联素,测定评价尿中 / 血中脂联素比,以此尿中 / 血中脂联素比作为指标,可作为肾障碍的早期指标使用。本发明人基于以上的见解完成本发明。

[0016] 即,本发明的要点如下。

[0017] (1) 肾功能的评价指标,其特征在于是用免疫复合物转移测定方法(ICT-EIA 法)测定的尿中的脂联素浓度的测定值除以血中的脂联素浓度的数值。

[0018] (2) 上述(1)所述的肾功能的评价指标,其中上述脂联素浓度是高分子量(HMW)脂联素浓度。

[0019] (3) 上述(1)或(2)的肾功能的评价指标,其特征在于是上述(1)或(2)的数值乘以  $10^4$  的数值。

[0020] (4) 肾功能疾病的进行度评价方法,其特征在在于,使用上述(1)~(3)所述的评价指标。

[0021] (5) 上述(4)所述的肾功能疾病的进行度评价方法,其特征在在于,肾功能疾病是糖尿病性肾病。

[0022] (6) 肾功能疾病的预防或治疗方法,其特征在在于,使用上述(1)~(3)的评价指标,

对于肾功能疾病患者及 / 或其罹患危险者进行介入疗法。

[0023] (7) 上述 (6) 所述的肾功能疾病的预防或治疗方法,其特征在于,肾功能疾病是糖尿病性肾病。

[0024] (8) 上述 (6) 或 (7) 所述的糖尿病性疾病的预防或治疗方法,其中介入疗法是就餐疗法、运动疗法或药物疗法。

#### [0025] 【发明效果】

[0026] 由本发明的 ICT-EIA 法取所得到的尿中和血中的脂联素浓度的比,通过将其作为肾功能的评价指标,从而与白蛋白尿的程度无关系,肾功能尚在正常时期时开始用于肾保护的治疗变得可能。结果,通过使用本发明的肾功能的评价指标的评价方法,作为糖尿病性疾病的诊断,对于特别是问题多的糖尿病性肾病的早期发现或糖尿病罹患危险者的肾功能障碍的判断或介入疗法后的效果判断也有用。

#### 【附图说明】

[0027] 图 1 是表示本发明中使用的免疫复合物转移酶联免疫测定法 (ICT-EIA 法) 的概略的图。

[0028] 图 2 是关于受试者 A ~ D 的肾功能进行 CKD 阶段分类的图。受试者 A 和 B 是健康人,受试者 C 和 D 中预计肾功能的降低。

[0029] 图 3 是使用受试者 A ~ D 的血清样品和尿样品,由 Superdex 柱依分子量进行分级分离,探讨血中及尿中脂联素分子存在样式的图。● :表示血中的脂联素浓度 (左轴)、◇ :表示透析尿中的脂联素浓度 (右轴)。级分 No. 46 前后的峰是 HMW 脂联素,级分 No. 51 前后的峰是 MMW 脂联素,级分 No. 58 前后的峰是 LMW 脂联素。另外,低分子区域的级分 No. 78 前后的峰对应于单分子脂联素。

[0030] 图 4 是测定受试者 50 名的尿中脂联素浓度 (ng/mgCr) 和肾功能指标的 eGFR (mL/min/1.73m<sup>2</sup>),评价其相关关系的有无的图。显示尿中的脂联素浓度与 eGFR 成负的相关关系。

[0031] 图 5 是表示,集约图 4 中得到的评价数据,整理为 eGFR 的各阶段 (G1、G2、G3a),在各阶段之中的尿中脂联素浓度的平均值和偏差的图。尿中脂联素浓度在阶段 G2 相比阶段 G1 更显著地变高。

[0032] 图 6 是表示,与图 5 同样地集约图 4 中得到的评价数据,整理为 eGFR 的各阶段 (G1、G2、G3a),在各阶段之中的尿中白蛋白浓度的平均和偏差的图。尿中白蛋白浓度在阶段 G3a 相比阶段 G2 更显著地变高。

[0033] 图 7 是以上述的 eGFR 的阶段 G1 中的尿中脂联素浓度和尿中白蛋白浓度的各平均作为 1,算定阶段 G2 和 G3a 的各受试者的尿中脂联素浓度和尿中白蛋白浓度的相对值,将该数值在 eGFR 的每各阶段表示的图。

#### [0034] 【实施方式】

##### [0035] 【本发明的第一的实施方式】

[0036] 本发明的第一的实施方式是涉及肾功能的评价指标的发明,其特征在于,使用免疫复合物转移测定方法 (ICT-EIA 法) 评价的血中和尿中的脂联素浓度的数值,取其比 (尿中的脂联素浓度 / 血中的脂联素浓度)。

[0037] 本发明的“免疫复合物转移酶联免疫测定方法 (ICT-EIA 法)”是关于非竞争结合法 (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 Vol. 1, (1995) pp 403-451, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam*)。

[0038] 本发明的“脂联素”是指自脂肪细胞分泌的脂肪细胞因子之一, 是由 244 个的氨基酸组成的蛋白质, 被报告在血中以 3 聚体 (LMW: 低分子量) 作为基本结构, 存在 6 聚体 (MMW: 中分子量)、18 聚体 (HMW: 高分子量) 等数种的多聚体。其血中浓度以高达  $5 \sim 10 \mu\text{g/mL}$  的浓度存在, 被报告有抗动脉硬化作用或胰岛素抵抗性改善作用等的生理活性。再者近年、这些的生理作用和多聚体结构的作用被关注, 高分子多聚体水平或高分子多聚体 / 总量比是, 在内脏脂肪型肥胖或糖尿病、糖耐量、胰岛素抵抗性、冠状动脉疾病、代谢综合征等的各种各样的病态、再者由就餐疗法或手术的减量效果等中, 也示相比脂联素总量更相关强, 示脂联素的分子别定量的重要性。再者, 在由肥胖所致的胰岛素抵抗性中, 也看出高分子量的脂联素特别相关。另外, 根据对于脂联素和肾障碍探讨的报告, 在脂联素缺损小鼠中, 见到肾脏的足细胞的足突起的融合, 确认白蛋白尿。也有报告说, 向该处补充脂联素, 则见到肾脏的病理组织的正常化及白蛋白尿的改善, 提示脂联素有对于肾障碍有保护性的作用的可能性 (Sharma Ketal: *Adiponectin regulates albuminuria and podocyte function in mice. J Clin Invest 118(5):1645-1656, 2008.*)。

[0039] 再有知, 在 ICT-EIA 法中测定主要 HMW 脂联素, 测定一部分 MMW 脂联素和单分子。但是, 虽然是非常弱的反应, 但已知也测定 LMW 脂联素。

[0040] 本发明的“肾功能”是指肾脏的肾小球的过滤及再吸收功能。

[0041] 本发明的“评价指标”是指尿中的脂联素浓度除以血中的脂联素浓度的数值, 例如在健康人的情况中, 如见于受试者 A 和 B, 是  $0.3 \times 10^{-4}$  以下。另一方面, 在被提示是早期的肾功能障碍 (微量白蛋白尿) 的受试者 D 中, 成  $4.0 \times 10^{-4}$ 。如此, 本发明的评价指标成 10 倍以上的数值的差异, 是易区别的指标。可使此数值再乘以  $10^4$ , 作为整数, 也会使评价变容易。

[0042] 【本发明的第二的实施方式】

[0043] 本发明的第二的实施方式是涉及肾功能疾病的预防或治疗方法的发明, 其特征在于, 是使用上述的评价指标进行肾功能疾病的进行度评价方法的方法, 还有, 对于有肾功能障碍的患者进行介入疗法。

[0044] 本发明的“进行度评价方法”是指通过测定尿中的脂联素浓度 / 血中的脂联素的比的变动来确切评价受试者的肾功能疾病的进行状况的方法。由此评价方法, 变得确切进行用于抑制受试者的肾功能疾病的进行而改善的治疗剂的施用或生活指导等的介入疗法。

[0045] 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) 的改善或公知的高脂血症治疗剂、糖尿病疾病治疗剂的服用。即, 指导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, 减轻精神性的应激, 进行删除减轻糖尿病性肾疾病的发症中涉及的要因。还有, 对于初期症状的肾功能疾病患者, 作为介入疗法含进行用于降低本发明的评价指标的数值的药物疗法。使用上述的肾功能疾病的进行度评价方法, 通

过开始早期的介入疗法,抑制、回避例如糖尿病性肾病等的重症度的向肾功能障碍的迁移,改善症状,返回健康的状态。

[0046] 再有,在本发明的第二的实施方式中使用的用语中,与第一的实施方式共通的用语表示相同的含意。因此,不特别言及。

### 【实施例】

[0047] 接下来举实施例再说明本发明,但本发明不限于这些。

[0048] **【实施例 1 :由 ICT-EIA 法的血中和尿中的脂联素浓度的测定】**

[0049] **【(1) 试剂】**

[0050] **【(a) 抗原】**

[0051] 标准重组体—人·脂联素从 Bio Vendor Lab Med Inc 公司 (Palackecko, Czech Republic) 购入。

[0052] **【(b) 抗体】**

[0053] 单克隆抗人—脂联素抗体 (BAF1065 及 MAB10651) 从 R&D Systems Inc. (MN, USA) 购入。

[0054] **【(c) 缓冲液】**

[0055] 缓冲液 A :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 (pH7.0)、

[0056] 缓冲液 B :含 5mM EDTA 的 0.1M 磷酸钠缓冲液 (pH6.0)、

[0057] 缓冲液 C :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 (pH7.0)、

[0058] 缓冲液 D :含 0.4M NaCl、0.1% BSA、1mM MgCl<sub>2</sub>及 0.1% NaN<sub>3</sub>的 0.05M 磷酸钠缓冲液 (pH7.0)、

[0059] 缓冲液 E :含 0.1M NaCl 的 0.01M 磷酸钠缓冲液 (pH7.0)

[0060] **【(d) 血液样品】**

[0061] 将受试者的血清样品在 12 小时绝餐后的早朝空腹时采血 (NIPRO, 22G 座付, 大阪)、于室温静置 30 分钟后,用离心机 (日立微量高速离心机 CF16RXII, 日立工机, 东京) 以 3000rpm 离心 10 分钟,得到血清。血清于负 30℃ 冷冻保存。

[0062] **【(e) 尿样品】**

[0063] 向受试者的晨尿 (10mL) 加 1/50 容量的 5% BSA 及 5% NaN<sub>3</sub>,于 4℃ 保存至透析。24 小时以内透析采集的尿。

[0064] 透析使用透析用纤维素管 (透析膜 UC8-32-25、三光纯药、东京),对于缓冲液 (含 0.1M NaCl 的 0.01M 磷酸钠缓冲液 pH7.0) 进行 1.5ml 的上述尿样品的透析。透析后,称量透析尿的重量,进行由稀释倍率的补正。透析尿立即分注于微管 (Safe-Lock Tubes 1.5ml),于 -20℃ 进行冷冻保存。再有,尿中肌酸酐浓度由市售试剂盒 (肌酸酐—测试 WAKO、和光纯药、大阪) 测定。

[0065] **【(2) 方法】**

[0066] 测定方法使用基于非专利文献 1 中记载的 ICT-EIA 法的方法。即,准备将市售 ELISA 试剂盒附带的标准高分子人—脂联素标准液用缓冲液 D 稀释的 100 μL、或者将尿及

血清用缓冲液 D 稀释 40,000 倍的 100  $\mu$ L, 向其加将酶被标记抗体及捕获用被标记抗体溶解于缓冲液 D 的混合液 100  $\mu$ L, 于 4 $^{\circ}$ C 温育 16 小时, 使由酶被标记抗体—脂联素—捕获用被标记抗体的 3 者组成的免疫复合物形成。接下来, 向此反应液加抗 DNP-IgG 不溶化聚苯乙烯珠 1 个, 使反应 0.5 小时, 在珠上捕获免疫复合物。将此珠用缓冲液 A (2mL) 清洗 2 次后, 溶解于缓冲液 C 的 2mMDNP-Lys (150  $\mu$ L), 并使反应 0.5 小时, 从珠使免疫复合物溶出。除去抗 DNP-IgG 不溶化聚苯乙烯珠之后, 向溶出液加链霉亲和素不溶化聚苯乙烯珠 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, 使用转移到珠上的  $\beta$ -D-吡喃半乳糖苷 (荧光底物; 4MUG) (400  $\mu$ L) 于 30 $^{\circ}$ C 温育, 加 0.1M 甘氨酸钠缓冲液 (pH10.5) (2mL) 而停止反应后, 使用荧光分光光度计 (F-2500, 日立) 进行测定。再有, 使用激发波长 360nm 荧光波长 450nm, 荧光强度以  $10^{-8}$ M4MU 作为 100 而进行换算 (Hashida Sand Ishikawa E: Detection of one milliattomole of ferritin by novel and ultrasensitive enzyme immunoassay. J Biochem 108:960-964. 1990.)。

[0067] 【(3) 测定结果】

[0068] 【(a) 受试者】

[0069] 为了评价作为肾功能指标的尿中脂联素, 筛选有不同的性别、年龄、肾功能的对象者, 进行血中及尿中脂联素的探讨。以年轻的有健康的肾功能的 20 ~ 29 岁女性 A、有健康的肾功能的 40 ~ 49 岁女性 B、与年龄一同作为肾功能推定指标的 eGFR (mL/min/1.73m<sup>2</sup>) 见降低倾向的 50 ~ 59 岁男性 C、eGFR 不变成 C, 但被提示处于微量白蛋白尿倾向, 肾小球的过滤能力的降低的 60 ~ 69 岁肥胖男性 D 作为对象者。

[0070] 【(b) 评价结果】

[0071] 首先, 从一般生物化学检查的结果、血中肌酸酐浓度及年龄和性别算出 eGFR。结果示于表 1。受试者 A 是 97.4mL/min/1.73m<sup>2</sup>、受试者 B 是 107.2mL/min/1.73m<sup>2</sup>、受试者 C 是 48.2mL/min/1.73m<sup>2</sup>、受试者 D 是 50.0mL/min/1.73m<sup>2</sup>。

[0072] 【表 1】

[0073]

受试者	A	B	C	D
性别	女	女	男	男
年龄 (岁)	22	40	58	64
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	17.2	19.2	22.3	29.6
内脏脂肪截面积 (cm <sup>2</sup> )	34.8	56.6	50.4	118.7
HbA1c (%)	4.7	5.2	5.4	6.0
尿中白蛋白 ( $\mu$ g/mg Cr)	3.88	1.29	4.79	33.6
血清肌酸酐 (mg/dL)	0.48	0.44	1.23	1.16

eGFR(mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	97.4	107.2	48.2	50.0
血清脂联素(μg/mL)	21.3	20.7	2.58	14.8
尿中脂联素(ng/mg Cr)	0.56	0.30	2.16	5.93
尿中/血中脂联素比	$0.3 \times 10^{-4}$	$0.1 \times 10^{-4}$	$8.4 \times 10^{-4}$	$4.0 \times 10^{-4}$

[0074] 从上述表 1 的 eGFR 值,受试者 C 和 D 的肾功能,如图 2 所示,根据 CKD 阶段分类,则对应于阶段 3(GFR30 ~ 50mL/min/1.73m<sup>2</sup>) 的 GFR 中度降低。另外,由 ICT-EIA 法的尿中白蛋白浓度是,受试者 A 是 3.88 μg/Cr、受试者 B 是 1.29 μg/Cr、受试者 C 是 4.79 μg/Cr、受试者 D 是 33.6 μg/Cr。无法以单次诊断,但受试者 D 的值对应于微量白蛋白尿的范围。

[0075] 由 ICT-EIA 法的血中脂联素浓度在受试者 A 中高达 21.3 μg/mL,在受试者 B 中也与 A 同样地高达 20.7 μg/mL。但是在受试者 C 中,低于 2.58 μg/mL 和 4 μg/mL,因此示低脂联素血症。受试者 D 是 14.8 μg/mL,有性别或年龄、基础疾病,尽管无运动习惯,但也示高值。

[0076] 与血液同样地测定的尿中脂联素浓度在受试者 A 中是 0.56ng/mgCr,受试者 B 中是 0.30ng/mgCr。另外,受试者 C 的尿中脂联素浓度是 2.16ng/mgCr,相比受试者 A 或 B 更高,受试者 D 也同样地示高达 5.93ng/mgCr 的值。

[0077] 接下来,求出相对于血中的脂联素浓度而尿中滤出的脂联素浓度的比时,受试者 A 是  $0.3 \times 10^{-4}$ 、B 是  $0.1 \times 10^{-4}$ ,与此相比,受试者 C 和 D 是  $8.4 \times 10^{-4}$  和  $4.0 \times 10^{-4}$ ,示数十倍高的值。如此,图 2 所示的受试者的肾功能的阶段可用本发明的评价指标(尿中/血中脂联素比)明确地区别,即使是如受试者 D 一样对应于微量白蛋白尿的范围的对象者,也可通过使用此评价指标早期诊断,变得可开始早期介入疗法。

[0078] 【实施例 2:受试者 A ~ D 的血液及尿中的脂联素的存在样式的探讨】

[0079] 由使用 Superde×200 的分子筛柱,分子量不同地分级分离稀释的受试者 A ~ D 的血清及尿,其分级分离由 ICT-EIA 法进行测定。结果知,血清中的各对象者的脂联素存在样式与至今的血中样式同样地几乎是 HMW 脂联素和 MMW 脂联素。

[0080] 【(a) 尿中的脂联素的存在样式】

[0081] 尿中的脂联素如以下的表 2 所示,在肾功能正常的受试者 A、B 中,作为绝对量非常少,但与至今同样地检测到 HMW、MMW、LMW 及单分子脂联素。

[0082] 【表 2】

[0083]

	HMW 脂联素/ 总 (%)	MMW 脂联素/ 总 (%)	LMW 脂联素/ 总 (%)	单分子脂联素/ 总 (%)
<b>A</b>	<b>22.8</b>	<b>9.2</b>	<b>33.1</b>	<b>34.9</b>
<b>B</b>	<b>18.0</b>	<b>8.2</b>	<b>23.4</b>	<b>50.4</b>
<b>C</b>	<b>0.0</b>	<b>13.7</b>	<b>73.0</b>	<b>13.3</b>
<b>D</b>	<b>9.8</b>	<b>16.6</b>	<b>58.4</b>	<b>15.2</b>

[0084] 如上述表 2 所示,特别在受试者 A、B 中知,相对单分子脂联素多。另一方面知,作为肾功能降低者的受试者 C、D 均 LMW 脂联素的峰占大半。另外,在受试者 C 中检测不到 HMW 脂联素。

[0085] 【(b) 血中的脂联素的存在样式】

[0086] 受试者 A ~ D 的血清中的脂联素存在样式如图 3(●) 所示知,几乎是 HMW 脂联素和 MMW 脂联素。尿中的脂联素的存在样式示显著地不同。从而,测定此尿中和血中的 HMW 脂联素的浓度,取比(尿中脂联素浓度/血中脂联素浓度),则作为更显著的指标,可成评价肾功能障碍的初期症状。

[0087] 【实施例 3:对肾功能的指标 eGFR 的尿中的脂联素值和白蛋白值的相关性的评价】

[0088] 【(a) 对 eGFR 的相关性】

[0089] 在健康诊断中,基于实施例 1 测定从受试者 70 名采集的尿中的脂联素浓度 (ng/mgCr) 和白蛋白浓度 ( $\mu$ g/mgCre)。另外,同时从受试者的血中肌酐浓度及年龄和性别算出 eGFR。

[0090] 结果,在尿中的白蛋白浓度和 eGFR 之间确认不到显著的相关关系,但在尿中的脂联素浓度和 eGFR 之间,如图 4 所示,确认显著的负的相关关系。再有,在血中的脂联素浓度 ( $\mu$ g/mL) 和 eGFR 之间,未发现显著的相关关系。

[0091] 【(b) 对 eGFR 的各阶段 (G1、G2、G3a) 的相关性】

[0092] 从前项的受试者 70 名的 eGFR 值,将受试者分类到图 2 所示的各阶段。

[0093] 将分类到阶段 G1 (90 以上)、阶段 G2 (60 ~ 89)、阶段 G3a (45 ~ 59) 的对象者的尿中脂联素浓度 (ng/mgCr) 和尿中白蛋白浓度 ( $\mu$ g/mgCre) 综合。

[0094] 结果示于图 5 和 6。比较在上述各阶段间的尿中脂联素浓度及尿中白蛋白浓度,则尿中脂联素浓度在 G2 期相比 G1 期示更显著地高的值。另一方面,尿中白蛋白浓度在 G3a 期中,相比 G2 期示更显著地高的值。

[0095] 以上的结果示尿中脂联素浓度相比尿中白蛋白浓度更作为肾障碍预测指标有用。

[0096] 【(c) 在 eGFR 的各阶段的尿中脂联素浓度和尿中白蛋白浓度的相对值】

[0097] 将 eGFR 的阶段 G1 的受试者的尿中脂联素浓度和尿中白蛋白浓度的中位值各自作为 1。接下来,算定阶段 G2 和阶段 G3a 的受试者的尿中脂联素浓度和尿中白蛋白浓度各自成何倍。

[0098] 结果示于图 7。即,在阶段 G2 中,尿中脂联素相对值与尿中白蛋白相对值比,示显著地高的值。

[0099] 以上的结果示尿中脂联素相对值作为肾障碍预测指标的有用性。

[0100] 【工业实用性】

[0101] 本发明的肾功能障碍的评价指标和其评价方法以与在采集的尿中存在的脂联素浓度及同时采集的血液中的脂联素浓度的比作为评价指标的数值,从得到的评价指标的数值早期掌握肾脏的初期功能障碍的状况变得可能。另外,使用本发明的评价方法,构建向健康诊断的应用和介入疗法的组合的医疗系统变得可能。

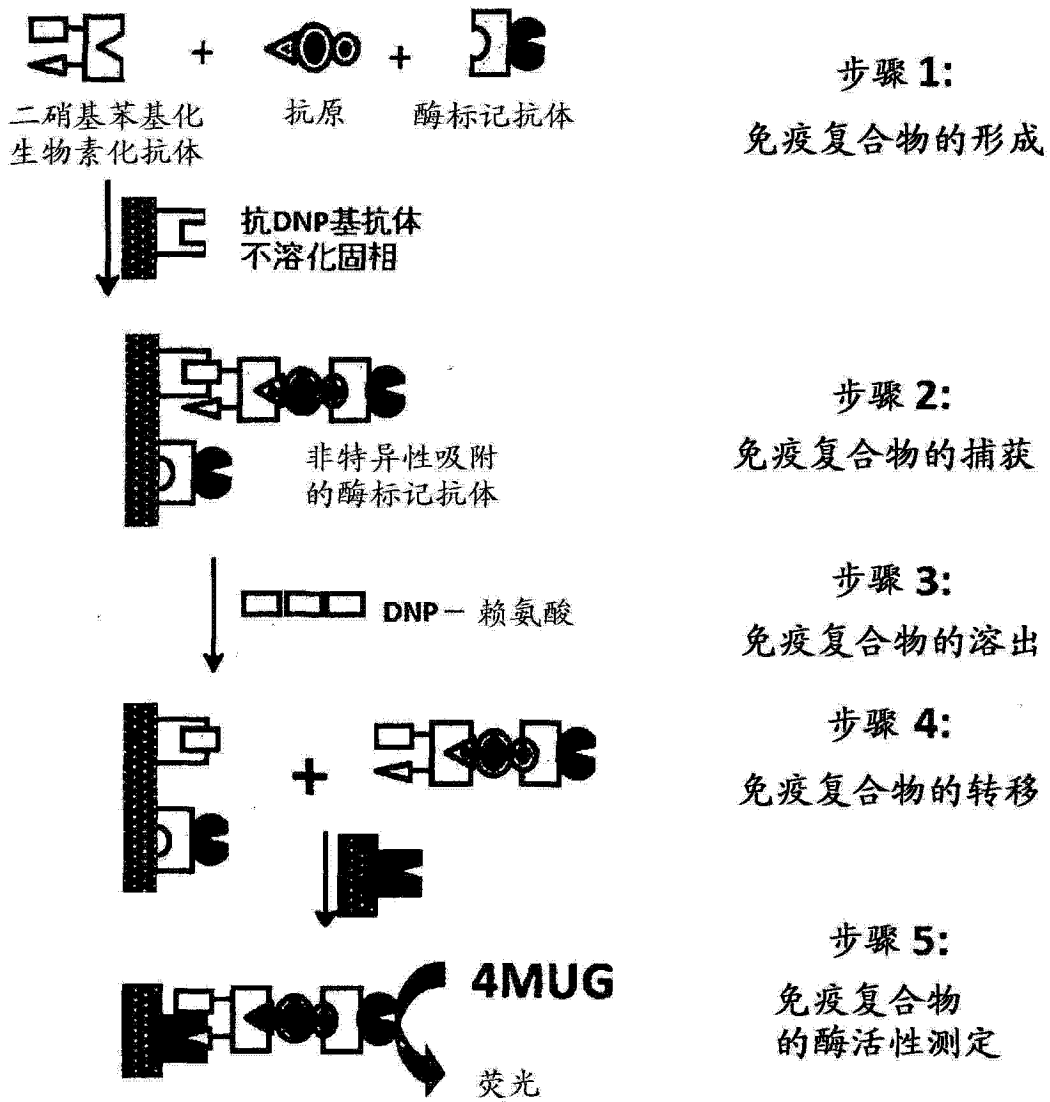


图 1

			白蛋白尿期 (mg/g)				
			A1		A2	A3	
			最佳和高-正常		高	非常高和肾病变	
			<10	10~29	30~299	300~1999	≥2000
GFR 阶段 (ml/min/ 1.73m <sup>2</sup> )	G1 高和最佳	>105					
		90~104	对象者B				
			对象者A				
G2 弱		75~89					
		60~74					
G3a 弱-温和		45~59	对象者C	对象者D			
	G3b 温和-剧烈	30~44					
G4 剧烈		15~29					
G5 肾衰竭		<15					

图 2

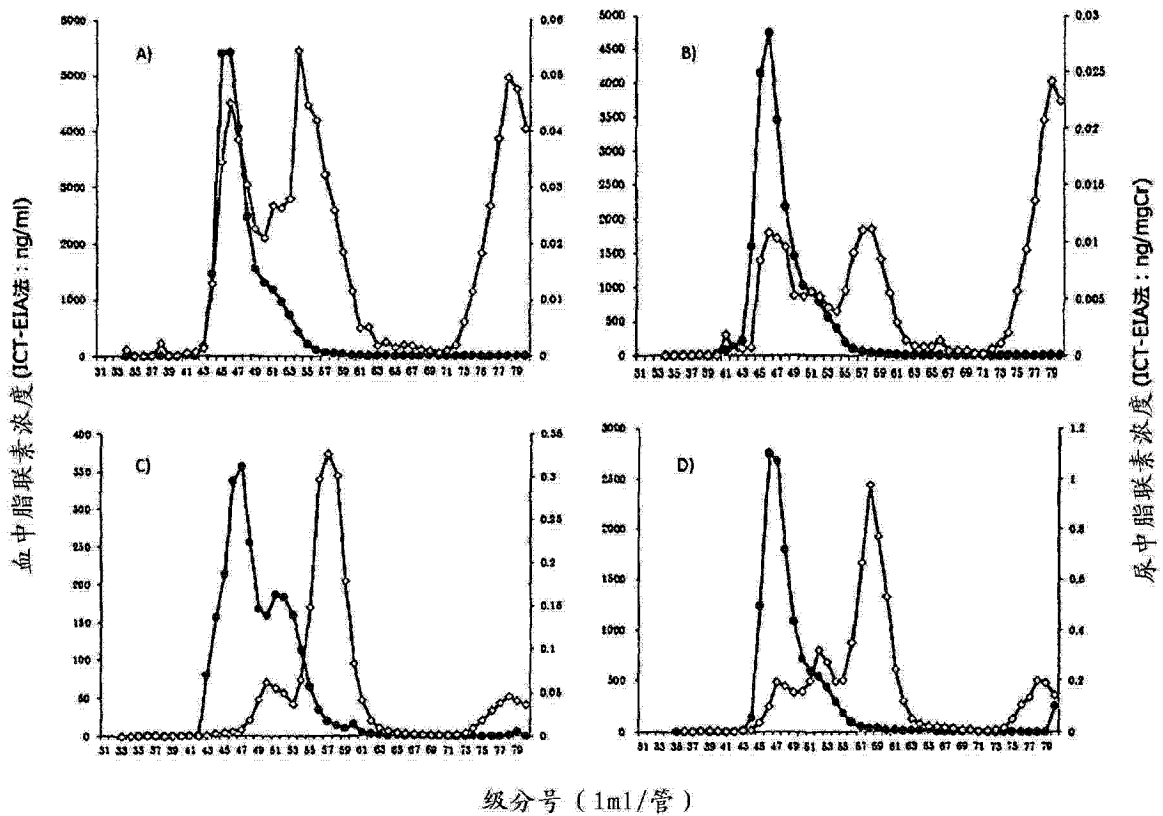


图 3

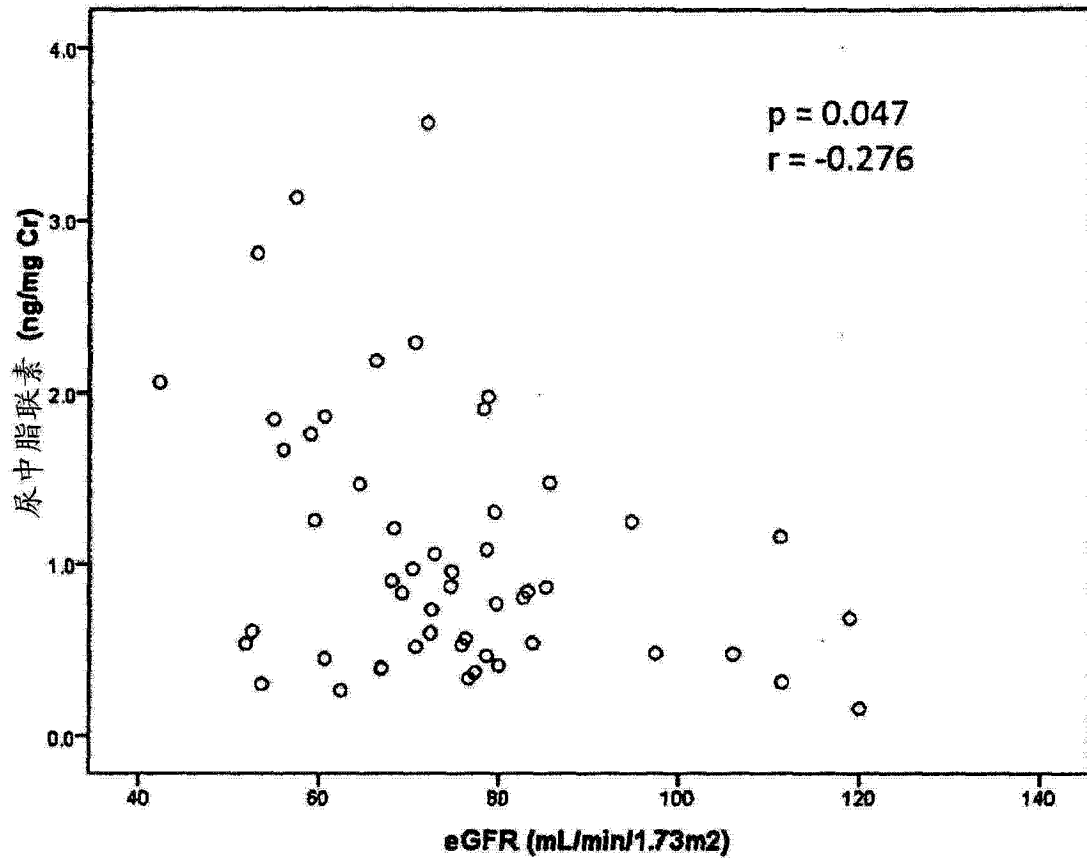


图 4

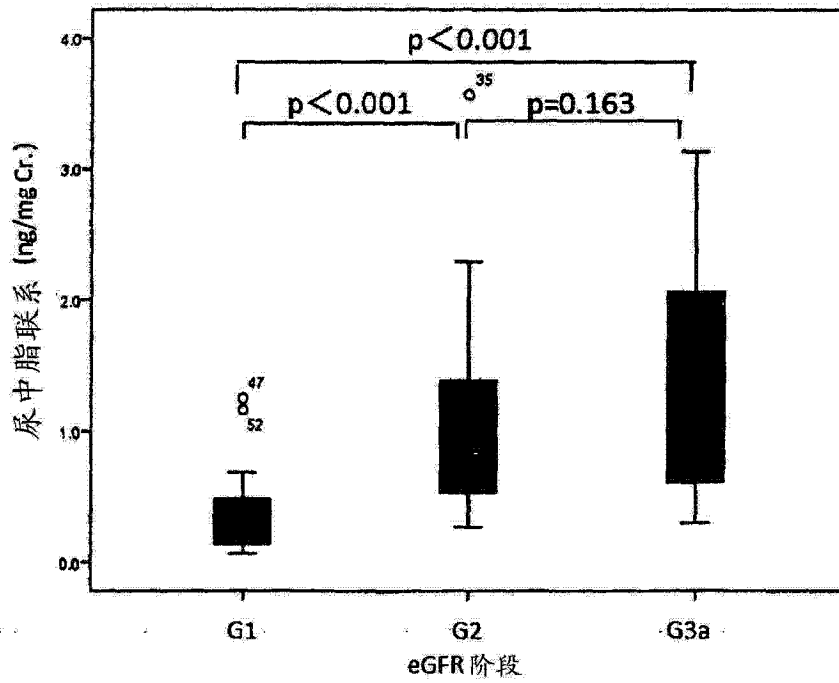


图 5

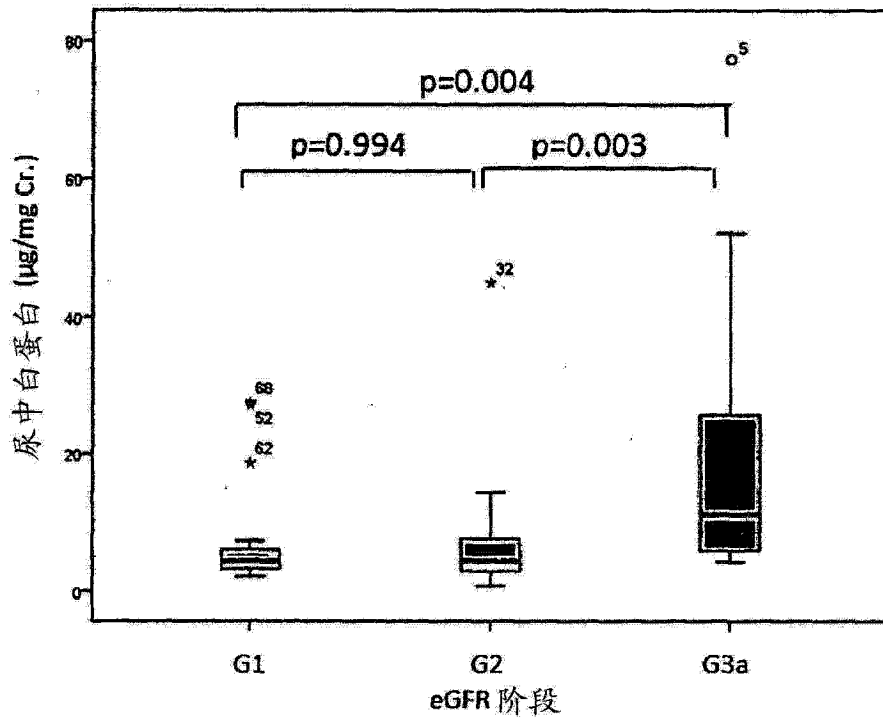


图 6

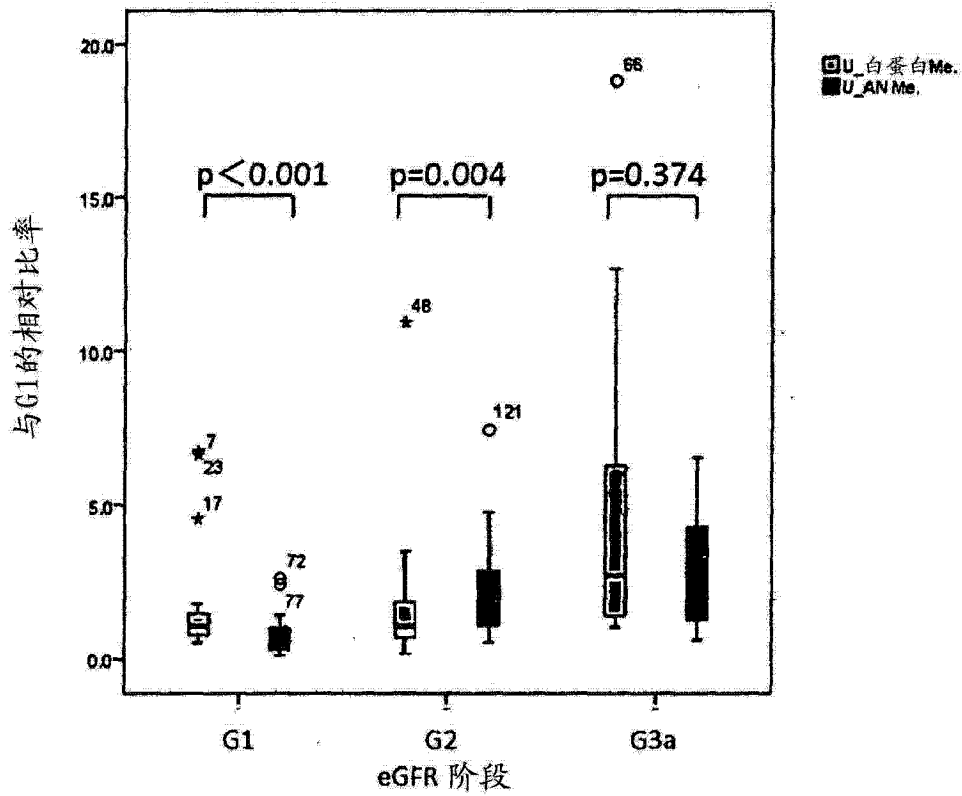


图 7

专利名称(译)	早期肾障碍的评价指标和其测定方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN104737020A</a>	公开(公告)日	2015-06-24
申请号	CN201380052667.X	申请日	2013-03-27
[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 山本真弓		
发明人	桥田诚一 山本真弓		
IPC分类号	G01N33/543 A61K45/00 A61P3/10 A61P13/12 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/74 G01N2333/575 G01N2800/347 A61P3/10 A61P13/12		
优先权	2012204969 2012-08-30 JP		
其他公开文献	CN104737020B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明以提供肾功能疾病的初期症状的早期诊断指标和其评价方法作为课题。特别是，以提供可确切进行糖尿病性肾病的初期症状的诊断的评价指标和其评价方法作为课题。本发明人为了解决上述的课题，使用免疫复合物转移酶联免疫测定方法(ICT-EIA法)，通过以尿中和血中的脂联素浓度的比作为评价指标，发现更确切进行肾功能的评价。结果，变得也可确切掌握肾脏的功能障碍的进行状况或介入疗法的效果。

	HMW 脂联素 总 (%)	MMW 脂联素 总 (%)	LMW 脂联素 总 (%)	单分子脂联素 总 (%)
A	22.8	9.2	33.1	34.9
B	18.0	8.2	23.4	50.4
C	0.0	13.7	73.0	13.3
D	9.8	16.6	58.4	15.2