

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02012/121266

発行日 平成26年7月17日 (2014. 7. 17)

(43) 国際公開日 **平成24年9月13日 (2012. 9. 13)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53	B
GO 1 N 33/535 (2006. 01)	GO 1 N 33/53	X
	GO 1 N 33/535	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 25 頁)

出願番号	特願2013-503564 (P2013-503564)	(71) 出願人	511073847
(21) 国際出願番号	PCT/JP2012/055736		橋田 誠一
(22) 国際出願日	平成24年2月29日 (2012. 2. 29)		徳島県徳島市南二軒屋町2丁目1-18
(31) 優先権主張番号	特願2011-64959 (P2011-64959)		シメトリー301
(32) 優先日	平成23年3月4日 (2011. 3. 4)	(72) 発明者	橋田 誠一
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		徳島県徳島市南二軒屋町2丁目1-18
			シメトリー301
		(72) 発明者	梅原 麻子
			徳島県徳島市川内町鶴島229-1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 糖尿病性疾患の進行度評価方法

(57) 【要約】

本発明は、糖尿病に起因する疾患の初期症状の診断と介入後のコントロール状態を的確に評価できる尿検査方法を提供することを課題とする。特に、糖尿病性腎症の初期症状の診断が的確にできる尿検査評価方法を提供することを課題とする。

本発明者は、上記の課題を解決するために、免疫複合体転移酵素免疫測定方法 (ICT-EIA法) を使用して、尿中に排出される以下の糖尿病関連抗原 (バイオマーカー) の評価を行ない、複数のバイオマーカーの組み合わせにより、糖尿病の進行状況と共に、腎臓の機能障害の進行状況も早期に把握できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

尿中の糖尿病関連の一つ以上のバイオマーカーを免疫複合体転移測定方法（ICT-EIA法）で測定することを特徴とする、糖尿病性疾患の進行度評価方法。

【請求項 2】

上記バイオマーカーがインスリン、レジスチン、アディポネクチン、レプチンおよびCRPの中から複数選択されることを特徴とする、請求項 1 に記載の糖尿病性疾患の進行度評価方法。

【請求項 3】

上記バイオマーカーとして、アディポネクチンと共に、レプチンまたはレジスチンが選択されることを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載の糖尿病性疾患の進行度評価方法。

10

【請求項 4】

糖尿病性疾患が糖尿病性腎症であることを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の糖尿病性疾患の進行度評価方法。

【請求項 5】

上記尿中のアディポネクチン濃度が $1 \sim 10 \text{ ng/mg Cre}$ の場合に、糖尿病性腎症の初期症状であるとして評価することを特徴とする、請求項 4 の糖尿病性疾患の進行度評価方法。

【請求項 6】

上記バイオマーカーとして、アディポネクチンと共に、インスリン及び/又はレジスチンが選択されることを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載の糖尿病性疾患の進行度評価方法。

20

【請求項 7】

上記バイオマーカーを組み合わせた指標として、アディポネクチンとレジスチンの積、アディポネクチンとインスリンの積、アディポネクチンとレジスチン、インスリンの3つの積のいずれか一つを用いて評価することを特徴とする、請求項 6 に記載の糖尿病性疾患の進行度評価方法。

【請求項 8】

肥満非糖尿病患者（OND）と糖尿病患者（DM）を識別するために評価することを特徴とする、請求項 7 に記載の糖尿病性疾患の進行度評価方法。

30

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれかの進行度評価方法を用いて、糖尿病患者及び/又は糖尿病予備群に対して、介入療法を行うことを特徴とする、糖尿病性疾患の予防または治療方法。

【請求項 10】

糖尿病性疾患が糖尿病性腎症であることを特徴とする、請求項 9 に記載の糖尿病性疾患の予防または治療方法。

【請求項 11】

尿中のアディポネクチン濃度が 1 ng/mg Cre 以上の場合に、介入療法を開始することを特徴とする、請求項 9 または 10 に記載の糖尿病性疾患の予防または治療方法。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

本発明は、糖尿病に起因する疾患の初期症状の診断と介入後のコントロール状態を的確に評価するための尿検査方法に関するものである。特に、糖尿病性の腎臓障害の初期症状の診断とコントロール状態を評価するための尿検査方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

国内における糖尿病患者は、2007年の国民健康・栄養調査に基き、糖尿病予備群も含め約2,210万人と推定されている（非特許文献1）。実際、40歳以上の男・女の3人に1人が糖尿病あるいは予備群と考えられ、この10年間で800万人以上増加して

50

いる。その背景には、わが国の生活習慣の欧米化による肥満・内臓脂肪蓄積を基盤としたメタボリックシンドロームの増加が考えられている。従って、糖尿病あるいは予備群の数は今後も増加の一途をたどると予想されている。

今後の糖尿病対策としては、これら糖尿病予備群の発症を防ぎ、更には糖尿病予備群を増加させないことが急務である。そのためには、糖尿病予備群を抽出し、現状を認識させ生活を変容させることが必須となっている。しかし、これら糖尿病予備群の抽出や認識・変容は、糖尿病予備群が検診に参加することにより初めて可能となる。一般に糖尿病患者は身体的症状が出るまで診療を受けない傾向にある。そこで、本発明者は、非観血的検査法による糖尿病予備群の積極的な参加を促す糖尿病予防の新戦略を提唱している。即ち、家庭で自ら採取し提供できる尿や乾燥ろ紙血を試料として、糖尿病リスクのプロファイリングを行い、現状を認識させ、さらに、その後の生活指導による糖尿病リスク軽減の評価を行うという手法である。本発明者らは、このために独自の超高感度測定法も開発しており、既に糖尿病リスクマーカーであるアディポネクチンに関して、尿や乾燥ろ紙血での検出方法を発表している（非特許文献2）。

10

しかし、糖尿病予備群の糖尿病への推移状況を的確に診断し、更には積極的な介入により、健康に引き戻すためのコントロール状態を適切に把握するためには、上記非観血的検査法を尿検査に限定して、検査に対する利便性を高め、採血という心理的な抵抗感を排除することが必要である。

一般的に、糖尿病性疾患の診断に用いられる尿検査項目としては、尿糖検査が挙げられる。しかし、尿中に尿糖が排出されてくるのは、通常、血糖値が約170mg/dl以上の場合の人であり、この値を示す人は、糖尿病予備群ではなく完全な糖尿病患者に該当する。高齢者の場合には、腎機能の低下で血糖値が170mg/dlより更に高くなっても尿糖が出ない場合もあることが指摘されている。

20

また、尿タンパクやCペプチド（CPR）についても尿検査が行なわれているが、数値に変動が現れるのは、糖尿病がかなり進行してからの場合が多く、糖尿病予備群に関して、糖尿病への推移状況を初期の段階で的確に評価することは困難な状況であった。

そこで、尿中に排出される特定のタンパク質に着目し、糖尿病性疾患の進行度を検査することが行なわれている。例えば、早期に糖尿病性腎症を検出し進展度を判定するために尿中のプラスミノゲンアクチベーターインヒビター-1を測定する方法（特許文献1）、あるいはサポシンBとトランスサイレチンを測定する方法（特許文献2）が知られている。

30

しかしながら、これらのマーカーが糖尿病性疾患（糖尿病性腎症）の進行度の評価になり得るかについては、十分な検証はまだなされていない状況である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】特開2006-61345号公報

【特許文献2】特表2008-175814号公報

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】厚生労働省健康局総務課生活習慣病対策室：平成19年国民健康・栄養調査の概要

【非特許文献2】橋田誠一ら、「高感度アディポネクチン測定法の開発とその運動・栄養指導への応用」徳島文理大学研究紀要第78号7～20頁（2009年）

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明の目的は、糖尿病に起因する疾患の初期症状の診断と介入後のコントロール状態を的確に評価できる尿検査方法を提供することにある。特に、糖尿病性腎症の初期症状の診断が的確にできる尿検査方法を提供することにある。

50

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者は、非特許文献2の免疫複合体転移測定方法（ICT-EIA法）を使用して、尿中に排出される以下の糖尿病関連抗原（バイオマーカー）の検出、評価を試みた。

【表1】

抗原	血漿（清）	尿	尿の標的／検査結果の指標
インスリン	○	○	食後高血糖
レジスチン	○	○	インスリン抵抗性
レプチン	○	○	肥満・インスリン抵抗性
アディポネクチン	○	○	インスリン抵抗性、腎機能

10

CRP（C反応性蛋白）	○	○	炎症や細胞破壊
TNF- α	○	×	筋肉、脂肪組織や肝臓での糖の働きを抑制

20

【注記】 ○：検出可能、 ×：検出困難

上記表1に示されるように、尿中に存在するタンパク質は、血液中のタンパク質が腎臓で濾過されて、尿中に排出されるものである。健常人の尿中に排出されるタンパク質は、腎臓の糸球体の網目のサイズに依って大きな影響を受け、血中に存在するタンパク質の分子量が1万以下のものは、尿中に排出され易くなっている。また、分子量が約6万までのタンパク質は尿中にある程度排出される。しかし、6万以上のタンパク質は、あまり排出されないと考えられ、血中と尿の存在比は、タンパク質の分子量が大きくなるほど、血中から尿中に排出され難くなっていると考えられている。例えば、血中から尿へ排出される、糖尿病関連の主なバイオマーカーを表2（糖尿病関連生理活性物質の検出限界と血中及び尿中濃度の一覧表）に示す。表2に示されるように、タンパク質の分子量が大きくなるほど、尿中には排出され難くなっている。

30

【表2】

生理活性物質	分子量 (KD)	検出感度		血中濃度 (健常者) (ng/ml)	尿中濃度	尿/血中比
		ELISA	ICT-EIA			
		(pg/assay)				
Insulin	5.8	0.1(μ U)	0.0001(μ U)	1-10(μ U)	1-10(μ U)	1/1
Resistin	12.5		0.1	1-100	1-100	1/1
Leptin	16.0	1.5	0.0004	1-10	0.001-0.01	1/1,000
TNF- α	17.0	1.0	0.01	0.005-0.05	NT	
IL-6	21.5-28.0	0.05	0.0005	0.001-0.01	NT	
PAI-1	50.0	4.0	0.1	10-100	0.01-0.1	1/1000
CRP	105	6.0	0.001	< 4,000	0.001-1	1/1000
Adiponectin	440, 670	500	0.1	3,000-30,000	0.1-1	1/100,000

40

ND; 未検出

50

そこで、上記表 1 に記載の糖尿病性疾患のバイオマーカーを用いて、非肥満非糖尿病患者 (NONDM)、肥満非糖尿病患者 (ONDM)、糖尿病患者 (DM) の 3 群から尿を採取し、ICT-EIA 法で尿中のバイオマーカーを測定・評価した。その結果、図 1 と図 3 に示すように、糖尿病患者と非糖尿病患者 (糖尿病予備群) を明確に区別できるバイオマーカーとして、レジスチン、アディポネクチンを見出すことができた。更に、腎臓悪化の指標として汎用される尿中のアルブミン濃度と尿中のアディポネクチン濃度の相関関係を見たところ、図 2 に示すように、良好な直線関係を与えることが見出された。即ち、糖尿病が進行し、糖尿病性腎症になってくれば、心臓の糸球体の網目が壊れ、アディポネクチンのような分子量の大きいタンパク質が尿中に漏れて来ることになる。従って、尿中のアディポネクチン濃度を測定することにより、腎機能の悪化の程度 (糖尿病性腎症の進行状況) を評価できることを見出した。

10

更に、本発明者らは、上記 ICT-EIA 法で測定した尿中のアディポネクチン濃度と血清中のアディポネクチン濃度を対比し、その比 (尿中濃度 / 血中濃度) を取ることにより、腎機能の悪化の程度をより明確に評価できるパラメーターになることを見出した。即ち、図 7 に示されるように、腎機能の悪化の指標の尿中アルブミン濃度では捕捉が充分出来ない、初期の腎機能障害者も明瞭に識別できることを見出した。また、尿中に排出されるバイオマーカー (アディポネクチン、レジスチン、インスリン) を組み合わせることにより、図 10 に示されるように非侵襲的に糖尿病患者と糖尿病予備軍の患者 (肥満非糖尿病対象者) を識別できる指標 (パラメーター) として使用できることを見出した。本発明者は、以上の知見に基き、本発明を完成した。

20

即ち、本発明の要旨は以下の通りである。

(1) 尿中の糖尿病関連の一つ以上のバイオマーカーを免疫複合体転移測定方法 (ICT-EIA 法) で測定することを特徴とする、糖尿病性疾患の進行度評価方法。

(2) 上記バイオマーカーがインスリン、レジスチン、アディポネクチン、レプチンおよび CRP の中から複数選択されることを特徴とする、上記 (1) に記載の糖尿病性疾患の進行度評価方法。

(3) 上記バイオマーカーとして、アディポネクチンと共に、レプチンまたはレジスチンが選択されることを特徴とする、上記 (1) 又は (2) に記載の糖尿病性疾患の進行度評価方法。

(4) 糖尿病性疾患が糖尿病性腎症であることを特徴とする、上記 (1) ~ (3) のいずれかに記載の糖尿病性疾患の進行度評価方法。

30

(5) 尿中のアディポネクチン濃度が $1 \sim 10 \text{ ng/mg Cre}$ の場合に、糖尿病性腎症の初期症状であるとして評価することを特徴とする、上記 (4) の糖尿病性疾患の進行度評価方法。

(6) 上記バイオマーカーとして、アディポネクチンと共に、インスリン及び / 又はレジスチンが選択されることを特徴とする、上記 (1) 又は (2) に記載の糖尿病性疾患の進行度評価方法。

(7) 上記バイオマーカーを組み合わせた指標として、アディポネクチンとレジスチンの積、アディポネクチンとインスリンの積、アディポネクチンとレジスチン、インスリンの 3 つの積のいずれか一つを用いて評価することを特徴とする、上記 (6) に記載の糖尿病性疾患の進行度評価方法。

40

(8) 肥満非糖尿病患者 (OND) と糖尿病患者 (DM) を識別するために評価することを特徴とする、上記 (7) に記載の糖尿病性疾患の進行度評価方法。

(9) 上記バイオマーカーとして、レプチンと共に、インスリンまたはレジスチンの中から 1 つを選択して用いる、上記 (1) 又は (2) に記載の糖尿病性疾患の進行度評価方法。

(10) 糖尿病性疾患がインスリン抵抗性または高血糖であることを特徴とする、上記 (9) に記載の糖尿病性疾患の進行度評価方法。

(11) 尿中のアディポネクチン濃度を測定することによる、糖尿病性腎症の進行度 (腎機能の悪化の程度) を評価することを特徴とする、上記 (1) に記載の糖尿病性疾患の進

50

行度評価方法。

(12) 上記尿中のアディポネクチンの濃度と血清中のアディポネクチン濃度の比(尿中濃度/血中濃度)を指標とする、上記(11)に記載の糖尿病性疾患の進行度評価方法。

(13) 上記アディポネクチン濃度比(尿中濃度/血中濃度)が、 10×10^{-5} 以上の場合に、糖尿病性腎症の初期症状であるとして評価することを特徴とする、上記(12)の糖尿病性疾患の進行度評価方法。

(14) 上記(1)~(13)のいずれかの進行度評価方法を用いて、糖尿病患者及び/又は糖尿病予備群に対して、介入療法を行うことを特徴とする、糖尿病性疾患の予防または治療方法。

(15) 糖尿病性疾患が糖尿病性腎症であることを特徴とする、上記(14)に記載の糖尿病性疾患の予防または治療方法。

(16) 尿中のアディポネクチン濃度が 1 ng/mg Cre 以上の場合に、介入療法を開始することを特徴とする、上記(14)または(15)に記載の糖尿病性疾患の予防または治療方法。

(17) 糖尿病性疾患がインスリン抵抗性または高血糖であることを特徴とする、上記(14)に記載の糖尿病性疾患の予防または治療方法。

(18) 環境要因と日内変動を受け易く、変動し易い糖尿病性関連バイオマーカーの積分値として、一定時間蓄尿された尿中の当該バイオマーカーを評価することを特徴とする、糖尿病性疾患の進行度評価方法。

(19) 糖尿病性関連バイオマーカーがインスリンである、上記(18)に記載の糖尿病性疾患の進行度評価方法。

(20) 上記(18)または(19)のいずれかの進行度評価方法を用いて、糖尿病患者及び/又は糖尿病予備群に対して、介入療法を行うことを特徴とする、糖尿病性疾患の予防または治療方法。

(21) 糖尿病性疾患に関する介入療法を受けた被験者に関して、介入療法前後の尿中の糖尿病関連の一つ以上のバイオマーカーを免疫複合体転移測定方法(ICT-EIA法)で測定することにより、介入療法の適否と継続をスクリーニングする方法。

(22) 介入療法が、食事療法、運動療法または薬物療法である、上記(21)のスクリーニング方法。

(23) 糖尿病性疾患が糖尿病性腎症である、上記(21)または(22)に記載のスクリーニング方法。

(24) バイオマーカーがインスリンまたはアディポネクチンである、上記(21)~(23)のいずれかに記載のスクリーニング方法。

(25) バイオマーカーがインスリンであり、介入療法が薬物療法である、上記(21)~(24)のいずれかに記載のスクリーニング方法。

【発明の効果】

【0007】

本発明の尿中の糖尿病関連バイオマーカーの評価方法により、採取された単一の尿から、同時に多種のバイオマーカーの検査が可能となり、これらのバイオマーカーの検査結果から、糖尿病の進行状況と共に、腎臓の機能障害の進行状況も早期に把握することが可能となった。これらの尿検体は採血と異なり苦痛を伴わず簡便に採取可能であるため、対象者の積極的な検診への参加が期待できる。そのため、本発明の尿中のバイオマーカーの評価方法を用いた診断方法は、糖尿病性疾患の診断として、特に問題の多い糖尿病性腎症の早期発見や、糖尿病予備群の糖尿病リスクの判定や生活指導後の糖尿病リスクの軽減を評価する上で有用である。

【図面の簡単な説明】

【0008】

図1は健常者と肥満非糖尿病患者、糖尿病患者のそれぞれの尿中のアディポネクチンの濃度(ng/mg Cre)を測定し、対比した図である。糖尿病患者の尿中のアディポネクチン濃度が、健常者と肥満非糖尿病患者のそれより有意に高い数値を示した。

10

20

30

40

50

図2は尿中のアディポネクチンの濃度 ($\text{ng} / \text{mg Cre.}$) が、腎臓の機能障害の指標であるアルブミン尿の濃度 ($\mu\text{g} / \text{mg Cre.}$) と正の相関関係を有することを明らかにした図である。このことから、アディポネクチンの尿中濃度を検査することにより、腎臓の機能障害の様子と病態の進行状況を評価することができるようになった。

図3は健常者と肥満非糖尿病患者、糖尿病患者のそれぞれの尿中のレジスチンの濃度 ($\text{ng} / \text{mg Cre.}$) を測定し、対比した図である。糖尿病患者の尿中のレジスチン濃度が、健常者と肥満非糖尿病患者のそれより有意に高い数値を示した。

図4は健常者と肥満非糖尿病患者、糖尿病患者のそれぞれの尿中のレプチンの濃度 ($\text{pg} / \text{mg Cre.}$) を測定し、対比した図である。肥満非糖尿病患者の尿中のレプチン濃度が、健常者と糖尿病患者のそれより有意に高い数値を示した。尿中のレプチン濃度を評価することで、肥満への移行状況が早期に検知され、糖尿病（インスリン抵抗性等）の発症を回避するために介入療法を開始することができる。

図5は健常者（NDMNO）と肥満非糖尿病患者（NDMO）、糖尿病患者（DM）のそれぞれの尿中のインスリンの濃度 ($\mu\text{U} / \text{mg Cre.}$) を測定し、対比した図である。糖尿病患者の尿中のインスリン濃度が、健常者のインスリン濃度より、有意に高い数値を示した。また、肥満非糖尿病患者の尿中のインスリンの濃度も、糖尿病患者のインスリン濃度より低い数値ではあるが、健常者のインスリン濃度より高い数値を示した。このことは、肥満非糖尿病患者において、既にインスリン抵抗性が起こり始めていることを示している。

図6は経口ブドウ糖負荷試験（OGTT）を行なった被験者の試験開始後60分経過した後の乾燥濾紙血中のインスリン濃度 (U / ml) と、OGTT後2時間蓄尿の尿中インスリン量が正の相関関係にあることを示した図である。被験者の血中インスリン濃度が上昇（糖尿病が進行）しているほど、尿中に排出されるインスリン量は増大することが示されている。

図7は腎機能の悪化の指標である尿中アルブミン濃度と共に、糸球体濾過値（eGFR）、血清中のアディポネクチン濃度、尿中のアディポネクチン濃度、及びアディポネクチンの濃度比（尿中濃度 / 血清中濃度）を記載した4名の被験者の検査データを掲載した図である。アディポネクチンの濃度比（尿 / 血中の濃度比）を指標とすることにより、アルブミン尿が検出される腎機能障害者（被験者B）と共に、微量アルブミン尿が検出されない腎機能障害者（被験者C）についても識別が明確にできるようになる。

図8は図7に記載の4名の被験者の血清中アディポネクチン濃度 ($\mu\text{g} / \text{ml}$) をカラム分画毎に表示した図である。縦軸は血清中アディポネクチン濃度であり、被験者Aを基準にして相対比で表示した。横軸は、カラム分画の番号を表わす。

図9は図7に記載の4名の被験者の尿中アディポネクチン濃度 (ng / ml) をカラム分画毎に表示した図である。腎機能障害者（被験者CとD）においては、尿中に排出されるアディポネクチンは、血清中では少ない濃度の低分子（3量体）が尿中に多く排出されていることが分った。被験者の内、健常者（被験者AとB）の尿中には単分子が相対的に多く排出されており、腎機能障害者（被験者CとD）では、単分子よりも低分子が多く尿中に排出されていた。

図10は尿中のアディポネクチン濃度、レジスチン濃度、インスリン濃度を用いて、糖尿病予備軍である肥満非糖尿病患者（OND）と糖尿病患者（DM）あるいは健常者（非肥満非糖尿病患者NOND）を識別できるパラメーターを作成し、パラメーター間の有効性を評価した図である。腎障害指標のアディポネクチンと糖尿病指標のインスリンやレジスチンを組み合わせると、糖尿病性腎症の指標となり得ることを示している。

【発明を実施するための形態】

【0009】

- 本発明の第一の態様 -

本発明の第一の態様は、一つ以上のバイオマーカーを免疫複合体転移測定方法（ICT-EIA法）で評価することを特徴とする、糖尿病性疾患の評価診断方法に関する発明である。

10

20

30

40

50

本発明の「バイオマーカー」とは、尿中に排出され測定評価できる糖尿病のバイオマーカーのことであって、例えばインスリン、レジスチン、アディポネクチンおよびCRP（炎症性蛋白）を挙げることができる。好ましいバイオマーカーとしては、アディポネクチンまたはレジスチンを挙げることができる。

本発明の「糖尿病性疾患」とは、微小血管障害によって生じる糖尿病性神経障害・糖尿病性網膜症・糖尿病性腎症のことを言う。糖尿病性神経障害の内、自律神経障害としては、例えば胃腸障害（便秘/下痢）、発汗障害、起立性低血圧、インポテンツ等を挙げることが出来る。感覚神経障害としては、例えば末梢のしびれ、神経痛等を挙げることができる。糖尿病性網膜症とは、硝子体出血、牽引性網膜剥離、虹彩血管新生などにより失明に至る病気であり、その他に、白内障、緑内障をはじめとする眼科疾患の原因となっている。糖尿病性腎症とは、蛋白尿が進行し、徐々に体がむくむネフローゼ症候群という病態になり腎不全となって行く病気である。現在、日本において透析導入の原因の第一位となっている。なお、本発明の評価診断方法は、尿中のバイオマーカーを測定、評価する方法であるため、特に糖尿病性腎症の評価、診断に向く方法であると考えられる。

本発明の「免疫複合体転移酵素免疫測定方法（ICT-EIA法）」とは、非競合法（サンドイッチ）エンザイムイムノアッセイ法（EIA）の高感度化した改良方法に関するものである（非特許文献2参照）。ICT-EIA法では、使用する抗体の非特異吸着（バックグラウンド）を下げることで、多くの高分子生理活性物質のamolレベル以下（zmol）の測定が可能となっている（Hashida S, et al., Biotechnology Annual Review Volume 1, (1995) pp 403-451, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam参照）。

本発明の「糖尿病性疾患の進行度評価方法」とは、尿中の糖尿病関連の複数のバイオマーカーの濃度または存在量の変動を測定することにより、被験者の糖尿病性疾患の進行状況を的確に評価する方法である。この評価方法により、被験者の糖尿病性疾患の進行を抑制し改善するための治療剤の投与や生活指導等の介入療法が的確に行なえるようになる。

例えば、バイオマーカーとして、アディポネクチンを指標にした場合、尿中のアディポネクチン濃度が1~10ng/mgCreの場合には、糖尿病性腎症の初期症状であるとして評価することができる。そこで、尿中のアディポネクチン濃度が1ng/mgCre以上となった場合には、介入療法を開始すると糖尿病性腎症への進行を抑制回避できることになる。更には改善することができるようになる。

また、図7に示すように、尿中のアディポネクチン濃度と血清中のアディポネクチン濃度の濃度比（尿中濃度/血中濃度）を指標とすることにより、微量アルブミン尿が検出されない腎機能障害者についても識別が明確にできるようになった。上記濃度比が、 10×10^{-5} 以上の場合に、糖尿病性腎症の初期症状であるとして評価できることになる。より明確には、上記濃度比が 20×10^{-5} 以上の場合に糖尿病性腎症の初期症状として判断できることになる。

更に、上記尿中のバイオマーカーとして、インスリン、レジスチン、アディポネクチン、レプチンおよびCRPの中から複数選択し、それらを組み合わせて指標として使用することができる。例えば、図10に示されるように、アディポネクチンとレジスチンの積、アディポネクチンとインスリンの積、アディポネクチンとレジスチン、インスリンの3つの積のいずれか一つを用いて、被験者の糖尿病性疾患の進行状況を的確に評価することができる。即ち、糖尿病予備軍である、肥満非糖尿病患者（OND）と糖尿病患者（DM）あるいは健常者（非肥満非糖尿病患者NOND）を識別できる指標（パラメーター）とすることができる。即ち、腎障害指標となる尿中のアディポネクチン濃度と糖尿病指標の尿中のインスリンやレジスチンの濃度を組み合わせて指標とすると、糖尿病性疾患（糖尿病性腎症を含む）の進行度を表わす、より適切な指標になり得ることが示めされている。

同様に、尿中のレプチン濃度を中心にして、インスリンまたはレジスチンの尿中濃度を組み合わせることにより、糖尿病性疾患（糖尿病性腎症を含む）の進行度を表わす指標として、より適切なものになることが分かる。

10

20

30

40

50

- 本発明の第二の態様 -

本発明の第二の態様は、上記の糖尿病性疾患の進行度評価方法を用いて、糖尿病患者及び/又は糖尿病予備群に対して、介入療法を行うことを特徴とする、糖尿病性疾患の予防または治療方法に関する発明である。

本発明の「介入療法」とは、プロトコルに基づく生活習慣（食事・身体活動中心）の改善または公知の高脂血症治療剤、糖尿病疾患治療剤の服用を言う。即ち、食事療法や運動療法を生活習慣の中に取り入れ、必要カロリーと消費カロリーのコントロールを行なうものであり、精神的なストレスを軽減するよう指導して、糖尿病の発症にかかわる要因を削除軽減することを行なう。更には、初期症状の糖尿病患者に対しては、バイオマーカーの数値を下げるための薬物療法を行なうことを介入療法として含むものである。上記の糖尿病性疾患の進行度評価方法を用いて、早期の介入療法を開始することにより、重症度への移行を抑制、回避し、症状を改善し、健康な状態に戻すことができる。

10

- 本発明の第三の態様 -

本発明の第三の態様は、上記の介入療法の結果を判定し、被験者に対する介入療法の適否、継続の可否を判断する方法に関する発明である。

本発明の「スクリーニングする方法」とは、介入療法前後の尿中の糖尿病関連の一つ以上のバイオマーカーの数値（免疫複合体転移測定方法（ICT-EIA法）で測定された値）を比較対比し、介入療法が被験者に対して適否であるか否かを評価し、その介入療法の継続の是非をスクリーニングする方法のことを言う。例えば、バイオマーカーとしてアディポネクチンを指標とし、尿中のアディポネクチン濃度が1 ng / mg Cre以上となった場合に介入療法を行ない、介入療法後に尿中のアディポネクチン濃度を測定し、アディポネクチン濃度が以前より低くなっていない場合には、その介入療法は、該当する被験者には適していなかったことになる。その場合には、介入療法の内容を変化させ、被験者の現状に適合したものにすることができる。

20

糖尿病性疾患が糖尿病性腎症の場合、2008年の統計では、人工透析の要因の第一位に挙げられている。従って、糖尿病性腎症の進行を抑制、回避できれば、糖尿病患者にとって大きな朗報になる。そのため、本スクリーニング方法を用いて、被験者にとって一番適切な介入療法を、尿中のバイオマーカーの測定、評価から、早期に簡易に決定して行けることになる。

なお、本発明の第二の態様と第三の態様で使用される用語で、第一の態様と共通する用語は同じ意味を表わすものである。そのため、特に言及することをしていない。

30

【実施例】

【0010】

次に実施例を挙げて本発明を更に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

(実施例1) 尿中のアディポネクチンの測定と健常者と糖尿病患者、肥満糖尿病者の3群間の比較

(1) 試薬と方法

[方法]

測定方法は、非特許文献2に記載の免疫複合体転移酵素免疫測定法（ICT-EIA法）を準用した。

40

[抗原]

標準リコンビナント・ヒト・アディポネクチンはBioVendor Lab Med Inc社（Palackecko, Czech Republic）より購入した。

[抗体]

モノクローナル抗ヒト・アディポネクチン抗体（BAF1065及びMAB10651）はR&D Systems Inc.（MN, USA）より購入した。

[尿サンプル]

被験者の早朝第一尿（10mL）に1/50容量の5%BSAおよび5%NaN₃を加え、透析まで4で保存した。24時間以内に採取した尿を透析した。

50

透析は、透析用セルロースチューブ（透析膜UC8-32-25、三光純薬、東京）を用い、緩衝液（0.1M NaClを含む0.01Mリン酸ナトリウム緩衝液pH7.0）に対して1.5mlの上記尿サンプルの透析を行なった。透析後、透析尿の重量を秤量し、希釈倍率による補正を行なった。透析尿は直ちにマイクロチューブ（Safe-Lock Tubes 1.5ml）に分注し、-20℃で凍結保存を行なった。尚、尿中クレアチニン濃度は市販キット（クレアチニン-テストワコー、和光純薬、大阪）により測定した。

（2）尿中のアディポネクチンの測定

上記透析尿サンプル100μlを用いて、尿中のアディポネクチン濃度を測定した。健康者の尿中アディポネクチン濃度は、 0.4 ± 0.4 (SD) ng/mgクレアチニン（範囲；0.01~3.14 ng/mgクレアチニン）であった。また、肥満非糖尿病患者の尿中アディポネクチン濃度は、 0.5 ± 0.4 (SD) ng/mgクレアチニン（範囲；0.1~2.4 ng/mgクレアチニン）であり、糖尿病患者の尿中アディポネクチン濃度は、 2.9 ± 9.8 (SD) ng/mgクレアチニン（範囲；0.1~48.8 ng/mgクレアチニン）であった。その結果を図1に示す。図1から明らかのように、糖尿病患者の尿中アディポネクチン濃度は、健康者と肥満非糖尿病患者のそれより有意に（ $p < 0.001$ 、 < 0.05 ）高値を示した。

（実施例2）尿中のアディポネクチン濃度とアルブミン濃度との対比

糖尿病患者では、試験紙法による尿蛋白が陰性の病期であっても、すでに組織学的変化が始まっている。この初期の病変（早期腎症）を診断する指標の一つとして尿中微量アルブミンが測定され、微量アルブミン尿を呈する症例の多くは後に持続性蛋白尿を呈し、糖尿病性腎症に移行することが明らかにされている。従って、尿中アルブミンを測定し、早期糖尿病性腎症の有無を確認して、対策を講じることが重要である。また、糸球体障害の指標であるので糸球体に組織変化をもたず腎疾患の原発性腎疾患でも有用であるとされている。

そこで、実施例1の透析尿サンプルを用いて、Human Albumin ELISA kit (Assay Pro, St Charles, MO) を使用して、尿中アルブミン（クレアチニン基準）の測定を行なった。その測定結果と、実施例2のアディポネクチンの測定結果を合わせて、図2に示す。

図2に示されるように、尿中アディポネクチンと尿中アルブミンは良好な相関関係を有することが分かった。即ち、尿中のアディポネクチン濃度を測定することにより、尿サンプル提供者の糖尿病への進行度が判明すると共に、腎臓の障害レベルが判別できることが明らかになった。即ち、尿中のアディポネクチン濃度が1 ng/mg Creより少ない場合であると、尿中アルブミン濃度が30 μg/mg Cre以下の正常値を示すことになる。このことは、腎臓に障害が起きておらず、アディポネクチン（分子量44万）の漏出がほとんど見られない状況であることを表わしている。また、尿中のアディポネクチン濃度が1~10 ng/mg Creの範囲にある場合には、尿中アルブミン濃度が30~300 μg/mg Creの範囲の値を示すことになる。この尿中アルブミン濃度の範囲になると、腎臓に初期の機能障害が起きていることを表わしている。その結果、アディポネクチン（分子量44万）の漏出が次第に起きて来る状況になったことを表わしている。更に尿中のアディポネクチン濃度が10 ng/mg Creより大きくなる場合には、尿中アルブミン濃度が300 μg/mg Creより大きくなり、腎臓に機能障害が顕著に起きていることを表わしている。

以上のように、アディポネクチンの尿中濃度を検査することにより、腎臓の機能障害の様子と病態の進行状況を評価することができると見出された。更に、同じ尿サンプルを用いて、実施例4のレジスチンを同時評価することによって、糖尿病の有無、病態への進行状況等が同時に明らかとなってくる。具体的には尿検査のみによって、簡便に糖尿病性腎症の早期発見、早期対応が可能となっている。

本発明の高い利便性から、尿を用いた健康診断の参加率を向上させることができ、糖尿病予備群の捕捉が容易になっている。また、その後の介入療法の効果の判定も容易である

ことから、糖尿病予備群の病態改善が観察し易くなっている。

(実施例3) 尿中のレジスチンの測定と健常者と糖尿病患者、肥満糖尿病者の3群間の比較

(1) 試薬と方法

[方法]

測定方法は、実施例1と同じICT-EIA法を使用し、同じ尿サンプルを使用した。

[抗原]

標準リコンビナント・ヒト・レジスチンはBioVendor Lab Med Inc社(Palacke ch o, Czech Republic)のHuman Resistin ELISA kitに標準として添付されているものを購入、使用した。

[抗体]モノクローナル抗ヒト・レジスチン抗体(1843055及び184320)はR&D Systems Inc.(MN, USA)より購入した。

(2) 尿中のレジスチンの測定

実施例1の透析尿サンプルを用いて、尿中のレジスチン濃度を測定した。健常者の尿中レジスチン濃度は、 18.6 ± 20.9 (SD) ng/mgクレアチニン(範囲; 0.5 ~ 139.4 ng/mgクレアチニン)であった。また、肥満非糖尿病患者の尿中レジスチン濃度は、 15.4 ± 17.2 (SD) ng/mgクレアチニン(範囲; 4.1 ~ 73.0 ng/mgクレアチニン)であり、糖尿病患者の尿中レジスチン濃度は、 30.0 ± 36.2 (SD) ng/mgクレアチニン(範囲; 2.2 ~ 159.3 ng/mgクレアチニン)であった。その結果を図3に示す。図3から明らかなように、糖尿病患者の尿中レジスチン濃度は、健常者と肥満非糖尿病患者のそれより有意に($p < 0.05$)高値を示した。

(実施例4) 尿中のレプチンの測定と健常者と糖尿病患者、肥満糖尿病者の3群間の比較

(1) 試薬と方法

[方法]

測定方法は、実施例1と同じICT-EIA法を使用し、同じ尿サンプルを使用した。

[抗原]

標準リコンビナント・ヒト・レプチンはPeprotech EC(London, UK)を購入した。

[抗体]

モノクローナル抗ヒト・レプチン抗体(3D10及び16C9)は日本臨床医学研究所(京都)より購入した。

(2) 尿中のレプチンの測定

実施例1の透析尿サンプルを用いて、尿中のレプチン濃度を測定した。健常者の尿中レプチン濃度は、 5.2 ± 8.2 (SD) pg/mgクレアチニン(範囲; 0.1 ~ 77.7 pg/mgクレアチニン)であった。また、肥満非糖尿病患者の尿中レプチン濃度は、 34.5 ± 146.3 (SD) pg/mgクレアチニン(範囲; 1.4 ~ 874.0 pg/mgクレアチニン)であり、糖尿病患者の尿中レプチン濃度は、 6.0 ± 7.5 (SD) pg/mgクレアチニン(範囲; 0.6 ~ 1165 pg/mgクレアチニン)であった。その結果を図4に示す。図4から明らかなように、肥満非糖尿病患者の尿中レプチン濃度は、健常者と糖尿病患者のそれより有意($p < 0.01$, 0.001)に高値を示す傾向にあった。

レプチンは脂肪組織によって作り出され、エネルギーの取り込みと消費の制御に重要な役割を果たす16kDaのペプチドホルモンであり、食欲と代謝の調節を行うとされている。従って、肥満非糖尿病患者の血中のレプチン濃度は高く、それを反映して、尿中のレプチン濃度も高くなっている。この尿中のレプチン濃度を測定することにより、肥満への移行状況が早期に検知され、インスリン抵抗性等の発症を回避するために介入療法を開始することができる。

(実施例5) 尿中のインスリン濃度と血中のインスリン濃度との比較

(1) 試薬と方法

[方法]

測定方法は、実施例1と同じICT-EIA法を使用し、血液サンプルと尿サンプルについては、非特許文献2の方法に従って採取した。

本実施例の目的は、糖尿病の検査であるブドウ糖付加試験(OGTT)における、血中インスリン濃度と尿中インスリン濃度の相関性を検証することである。そのため、OGTT後60分後に血液を濾紙法(乾燥濾紙血)により採取すると共に、OGTT後2時間の蓄尿を採取し、サンプルとした。

[血液サンプル]

乾燥濾紙血サンプルは、OGTT後60分後に穿刺具を用いて血液を濾紙(Schleicher Schuell、ドイツ)に塗布し、風乾させた後、4℃で保存した。

乾燥濾紙血をパンチャー(セントラル科学)で打ち出したディスク(直径1/8インチ)1個に、500 μ lの緩衝液(0.1M NaCl、0.1%BSA、1mM MgCl₂、0.1%NaN₃を含む0.01%Mリン酸Na緩衝液pH7.0)を加え、4℃で24時間抽出した。なお、1ディスク当たり約2.4~2.7 μ lの血液が含まれている。

[抗原]

標準リコンビナント・ヒト・インスリンはMillipore(St Charles, MO)を購入した。

[抗体]

モノクローナル抗ヒト・インスリン抗体(16E9及び6F7)は日本臨床医学研究所(京都)より購入した。

(2) 血中インスリンと尿中インスリンの測定

実施例1の尿サンプルを用いて、尿中のインスリン濃度を測定した。健常者の尿中インスリン濃度は、4.3 \pm 2.8(SD) μ U/mgクレアチニン(範囲;0.6~13.3 μ U/mgクレアチニン)であった。また、肥満非糖尿病患者の尿中インスリン濃度は、9.0 \pm 5.5(SD) μ U/mgクレアチニン(範囲;1.8~25.8 μ U/mgクレアチニン)であり、糖尿病患者の尿中インスリン濃度は、13.8 \pm 17.6(SD) μ U/mgクレアチニン(範囲;10.3~90.0 μ U/mgクレアチニン)であった。その結果を図5に示す。図5から明らかなように、糖尿病患者の尿中インスリン濃度は、健常者と肥満非糖尿病患者のそれより有意に(p<0.001)高値を示した。

即ち、糖尿病患者の尿中のインスリン濃度が、健常者のインスリン濃度より、有意に高い数値を示し、また、肥満非糖尿病患者の尿中のインスリンの濃度が、糖尿病患者のインスリン濃度より低い数値ではあるものの、健常者のインスリン濃度より高い数値を示している。この結果から、肥満非糖尿病患者において、既にインスリン抵抗性が起こり始めていることを示している。そして、糖尿病患者になれば更にインスリン抵抗性が高まっていくことが、尿中のインスリン濃度の数値ときれいに相関していることが示された。

また、上記被験者に経口ブドウ糖負荷試験(Oral glucose tolerance test:OGTT)を行なったところ、ブドウ糖水溶液を服用後60分経過後の乾燥濾紙血中のインスリン濃度(U/ml)と、OGTT後2時間蓄尿の尿中インスリン量は、図6に示すように良好な相関性を示すことが明らかとなった。

血中インスリン濃度は、食事や行動による影響を受け、数値が変動し易いバイオマーカーである。そのため、採血の時間や採血スケジュールが厳しく制約されることになる。そのため、病院でないと検査できない種類の診断方法である。しかし、尿中インスリン濃度は、2時間蓄尿であるため数値変動も少なく、家庭でも容易に採取でき、それを試験機関に送付して評価することが可能である。従って、蓄尿の尿中インスリン濃度(尿中の総インスリン量)の測定を健康診断のバイオマーカーとすることにより、家庭でも容易にブドウ糖付加試験が実施でき、糖尿病予備群の発見が容易になり、早期介入療法が開始できることになった。

(実施例6) 尿中のアディポネクチン濃度と血清中のアディポネクチン濃度の濃度比(尿

10

20

30

40

50

中濃度 / 血中濃度) を指標とする糖尿病性疾患の進行度の評価試験

(1) 試薬と方法

測定方法は、実施例 1 と同じ I C T - E I A 法を使用し、男女各 2 名の血液サンプルと尿サンプルについては、非特許文献 2 の方法に従って採取した。

上記血液サンプルと尿サンプルをカラムクロマトグラフィー処理を行い、フラクション・コレクターで各 1 m l を採取、分画した。その分画に含まれる、アディポネクチンの量を測定し、得られたアディポネクチンの量を積分した。

カラムは、S u p e r d e x 2 0 0 (2 . 6 x 6 0 c m) を使用し、流出液は、1 0 m M N a P B、p H 7 . 0、0 . 1 M N a C l、0 . 0 1 % B S A、0 . 1 % N a N 3 の組成の緩衝液を用いた。溶出条件は、1 m L / m i n、1 m L 分画で行った。

10

(2) 測定結果

カラム分画のアディポネクチン濃度の測定結果を図 8 と図 9 に示す。図 8 は、4 名の被験者の血清中アディポネクチン濃度 ($\mu g / m l$) をカラム分画毎に表示した図である。縦軸は血清中アディポネクチン濃度であり、被験者 A を基準にして相対比で表示した。横軸は、カラム分画の番号を表わす。図 9 は、4 名の被験者の尿中アディポネクチン濃度 ($n g / m l$) をカラム分画毎に表示した図である。図 8 と図 9 の対比から、腎機能障害者 (被験 C と D) の場合には、尿中に排出されるアディポネクチンは、血清中では少ない濃度の低分子 (3 量体) が多く排出されていることが示された。被験者の内、健常者 (被験者 A と B) の尿中には単分子が相対的に多く排出されており、腎機能障害者 (被験 C と D) では、単分子よりも低分子が多く尿中に排出されていた。

20

これらの結果をまとめると、図 7 に示される表が得られる。図 7 に示すように、尿中のアディポネクチン濃度と血清中のアディポネクチン濃度の濃度比 (尿中濃度 / 血中濃度) を指標とすることにより、微量アルブミン尿が検出されない初期症状の腎機能障害者についても識別が明確にできるようになった。即ち、上記濃度比が、 $1 0 \times 1 0^{-5}$ 以上の場合に、糖尿病性腎症の初期症状であるとして判断できることになる。より明確には、上記濃度比が $2 0 \times 1 0^{-5}$ 以上の場合に糖尿病性腎症の初期症状として判断できることになる。

以上のことから、尿中のバイオマーカーの濃度を選択し、同一の血清中のバイオマーカーの濃度を測定して、その濃度比 (尿中濃度 / 血中濃度) を指標とすることにより、糖尿病性疾患の進行度の評価が充分行なえることが示された。

30

(実施例 7) 尿中のバイオマーカーとしてアディポネクチン、インスリン、レジスチンを使用し、複数組み合わせる指標とする糖尿病性疾患の進行度の評価試験

実施例 1 に準じて得られた尿中アディポネクチン濃度、実施例 3 に準じて得られた尿中レジスチン濃度、実施例 5 に準じて得られた尿中インスリン濃度は、糖尿病が進行し、腎機能が障害を受けるに従い、それぞれの排出量が増大する。そこで、これらの濃度を指標として、それぞれの数値の積を取ることにより、腎機能障害の程度を拡大して評価できないかを検討した。

まず、アディポネクチンとレジスチンの積を取って指標としたところ、図 1 0 に示されるように、健常人 (非肥満非糖尿病対象者) と糖尿病予備軍である肥満非糖尿病対象者の間では、有意な差は見られなかったが、肥満非糖尿病対象者と糖尿病患者の間では、明確な数値上の相違が見出せた。このように、アディポネクチンとレジスチンの積を指標とすれば、肥満非糖尿病対象者と糖尿病患者を明確に識別できることが明らかとなった。

40

更に、アディポネクチンとインスリンの積を取って指標としたところ、同様に、肥満非糖尿病対象者と糖尿病患者を明確に識別できることが明らかとなった。そこで、アディポネクチンとレジスチン、インスリンの 3 種の積を取って指標としたところ、数値的に大きな差を示して、肥満非糖尿病対象者と糖尿病患者を明確に識別できることが明らかとなった。

以上のように、尿中のバイオマーカーの積を使用して、糖尿病性疾患の進行度の評価が充分行なえることが示された。

【産業上の利用可能性】

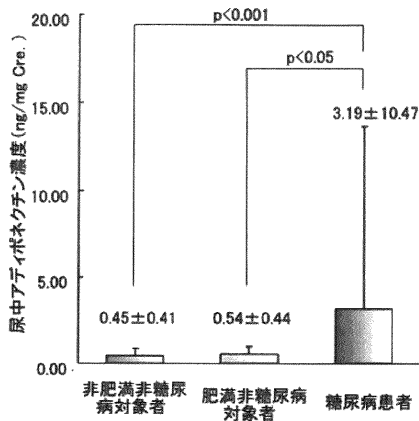
50

【 0 0 1 1 】

本発明の尿中糖尿病関連バイオマーカーの評価方法は、採取された単一の尿から、多種のバイオマーカーの検査が可能であり、得られたバイオマーカーの数値から、糖尿病の進行状況と共に、腎臓の機能障害の進行状況も早期に把握することが可能である。また、尿検体は採血と異なり苦痛を伴わず簡便に採取できるため、対象者の積極的な検診への参加が期待できる。そのため、本発明の評価方法を用いて、健康診断への応用と介入療法と組み合わせての医療システムの構築が可能となる。

【 図 1 】

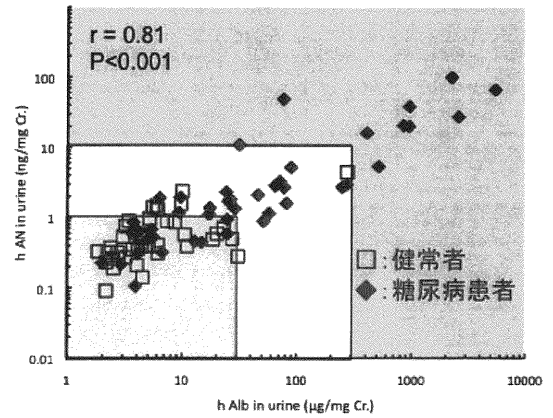
図 1



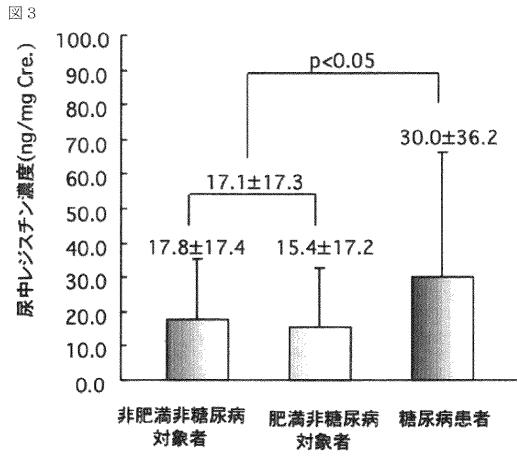
【 図 2 】

図 2

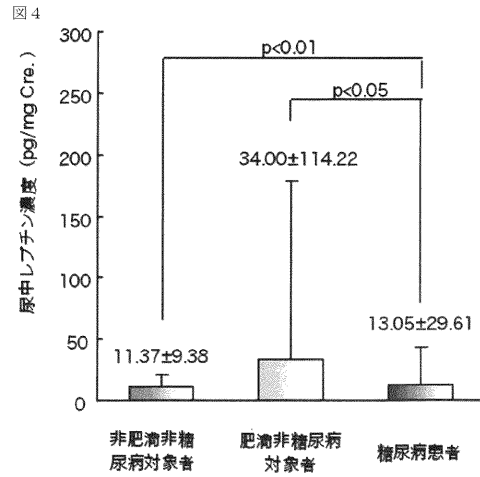
尿中アディポネクチン濃度とアルブミン尿との関係



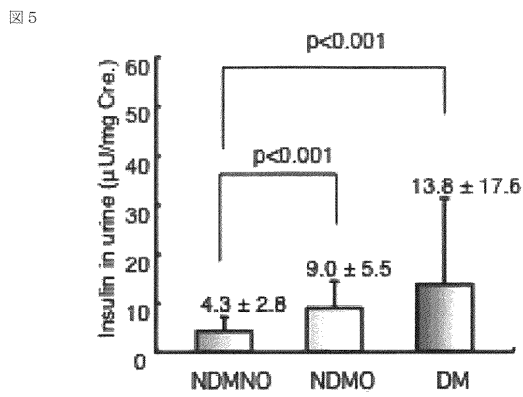
【 図 3 】



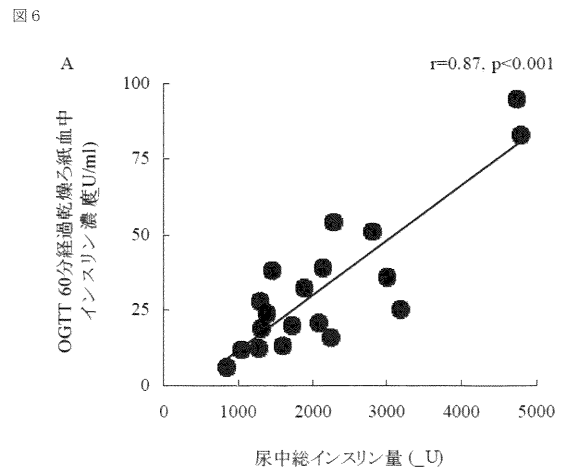
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】

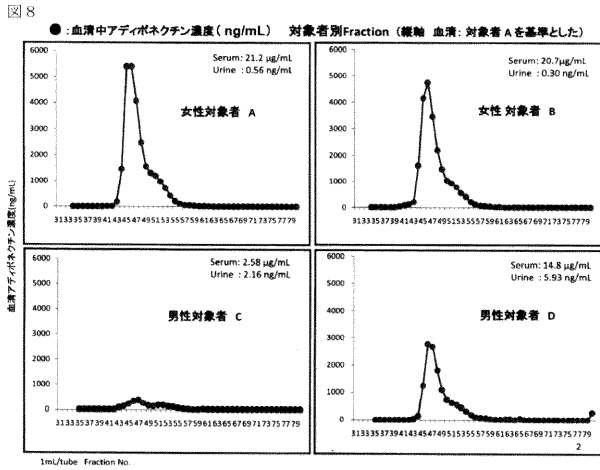


【 図 7 】

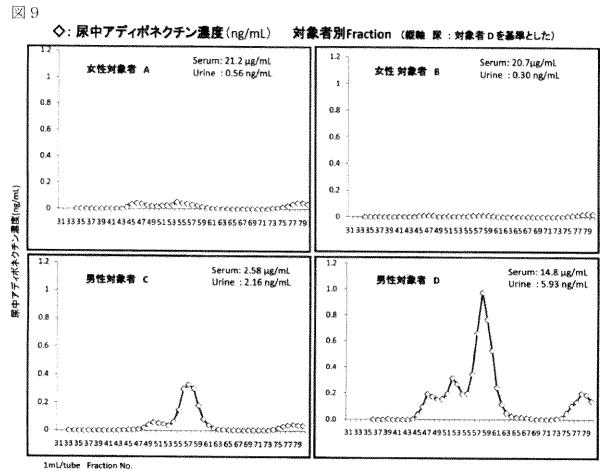
図 7

対象者	尿中Albumin (mg/g Cr)	eGFR (mL/min/1.73m ²)	血中Adiponectin (μg/mL)	尿中Adiponectin (ng/mg Cr)	尿中/血中 Adiponectin比
A(女性)	3.88	97.4	21.3	0.56	3.6×10^{-5}
B(女性)	1.29	107.2	20.7	0.30	1.4×10^{-5}
C(男性)	4.79	48.2	2.58	2.16	83.7×10^{-5}
D(男性)	33.6	50.0	14.8	5.93	40.1×10^{-5}

【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】

図 10

	非肥満非糖尿病 対象者 NOND (n=70)	肥満非糖尿病 対象者 OND (n=17)	糖尿病患者 DM (n=20)	p値 DM vs NOND	p値 DM vs OND
アディポネクチン・ レジスチン(種)	4.85 ± 4.07	3.81 ± 2.16	17.6 ± 13.3	<0.001	<0.01
アディポネクチン・ インスリン(種)		3.07 ± 2.40	8.81 ± 5.87	-	<0.01
アディポネクチン・ レジスチン・ インスリン(種)		24.4 ± 40.1	143.7 ± 134.0	-	<0.01

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2012/055736
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/543(2006.01)i, A61B10/00(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N33/543, A61B10/00, G01N33/53 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2012 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2012 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2012 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Mamiko NISHIOKA et al., "Development of the Diabetic Risk Evaluation using Resistin and Insulin Receptor-alpha in Urine and the Application to Exercise/Nutrition Education", Technical bulletin of Tokushima Bunri University, 2008, no.76, pages 1 to 19, Introduction, Methods(5.) Result(3.), fig. 14, Study	1-8(Partial)
A	Yusuke MIYAZAWA et al., "Development of a highly sensitive enzyme immunoassay for insulin and application to evaluation of the diabetic risk by urine in the morning", Technical bulletin of Tokushima Bunri University, 2009, no.77, pages 19 to 28, 3.8, 3.9, 4	1-8(Partial)
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 May, 2012 (30.05.12)		Date of mailing of the international search report 12 June, 2012 (12.06.12)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/055736

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Takuma NARITA et al., "A new method ot detect the clinical sign of intraglomerular hypertension in human and its significance in analysis of mechanisms of development and progression of early stage of diabetic nephropathy", Akita Igaku, 2005, vol.32, no.2, pages 89 to 93, 3. Rinsho Oyo	1-8 (Partial)
A	Naoki KANEMATSU et al., "Development of a novel highly sensitive immunoassay for adiponectin using dried blood on filter paper disc and application to assess changes in adiponectin due to exercise / tea-catechin intake", Technical bulletin of Tokushima Bunri University, 2009, no.78, pages 7 to 23, fig. 1	1-8 (Partial)
A	Mamiko NISHIOKA et al., "Nyochu Resistin Oyobi Nyochu Insulin Juyotai α ni yoru Tonyobyoo Risk Shihyo no Kochiku to Eiyoo Management eno Oyo", Eiyogaku Zasshi, 2007, vol.65, no.5, Supplement, page 158	1-8 (Partial)
A	Mamiko NISHIOKA et al., "Nyochu Resistin Oyobi Yuri Insulin Juyotai α ni yoru Tonyobyoo Risk Shihyo no Kochiku to Eiyoo Assessment eno Oyo", The Japanese Society of Nutrition and Food science Taikai Koen Yoshishu, 2008, vol.62nd, page 285	1-8 (Partial)
A	GLASSOCK Richard J., Diabetic Nephropathy: Staging and Progression, Diabetes Front, 2010, Vol.21, No.6, Page.728	1-8 (Partial)
A	JP 2009-85685 A (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd.), 23 April 2009 (23.04.2009), abstract (Family: none)	1-8 (Partial)
A	JP 2001-116751 A (Eiji ISHIKAWA), 27 April 2001 (27.04.2001), abstract (Family: none)	1-8 (Partial)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/055736

Box No. II	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <p>1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 9-11 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Claims 9-11 pertain to prophylactic or therapeutic method, and thus relate to a subject matter on which it is not required to carry out an international search under the provision of PCT Rule 39.1(iv).</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>	
Box No. III	Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: See extra sheet.</p> <p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</p> <p>4. <input checked="" type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: In claims 1 to 8, the parts relating to assaying insulin as a biomarker.</p> <p>Remark on Protest</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/055736

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

(Takuma NARITA et al., "A new method of detect the clinical sign of intraglomerular hypertension in human and its significance in analysis of mechanisms of development and progression of early stage of diabetic nephropathy", Akita Igaku, 2005, vol.32, no.2, pages 89 to 93) discloses the evaluation of the progression level of diabetes by assaying multiple kinds of biomarkers in urine. Therefore, the matter per se is not a special technical feature. As (Naoki KANEMATSU et al., "Development of a novel highly sensitive immunoassay for adiponectin using dried blood on filter paper disc and application to assess changes in adiponectin due to exercise / tea-catechin intake", Technical bulletin of Tokushima Bunri University, 2009, no.78, pages 7 to 23) discloses, the ICT-EIA method is merely one of commonly employed immunoassay methods and, therefore, the assay method is not a special one.

Accordingly, it is not considered that the invention of claim 1 of the present application has a special technical feature.

Consequently, claims 1-8 of the present application involves the following invention groups.

First invention group: In the inventions in claims 1-8, the parts relating to a method for evaluating the progression level of a diabetic disease characterized by comprising assaying one or more kinds of diabetes-related biomarkers in urine, said biomarkers including insulin as an essential factor that is combined with other biomarker(s) selected from the group consisting of resistin, adiponectin, leptin and CRP.

Second invention group: In the inventions in claims 1-8, the parts relating to a method for evaluating the progression level of a diabetic disease characterized by comprising assaying one or more kinds of diabetes-related biomarkers in urine, said biomarkers including resistin as an essential factor that is combined with other biomarker(s) selected from the group consisting of adiponectin, leptin and CRP.

Third invention group: In the inventions in claims 1-8, the parts relating to a method for evaluating the progression level of a diabetic disease characterized by comprising assaying one or more kinds of diabetes-related biomarkers in urine, said biomarkers including adiponectin as an essential factor that is combined with other biomarker(s) selected from the group consisting of leptin and CRP.

Fourth invention group: In the inventions in claims 1-8, the parts relating to a method for evaluating the progression level of a diabetic disease characterized by comprising assaying one or more kinds of diabetes-related biomarkers in urine, said biomarkers including leptin combined with CRP.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 2 / 0 5 5 7 3 6									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/543(2006.01)i, A61B10/00(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/543, A61B10/00, G01N33/53											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2012年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2012年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2012年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2012年	日本国実用新案登録公報	1996-2012年	日本国登録実用新案公報	1994-2012年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2012年										
日本国実用新案登録公報	1996-2012年										
日本国登録実用新案公報	1994-2012年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X	西岡麻未子等, 尿中レジスチン及び遊離インスリン受容体 α による糖尿病リスク指標の構築, 徳島文理大学研究紀要, 2008, No. 76, Page. 1-19, はじめに 方法 (5.) 結果 (3.) 図14 考察	1-8 (部分的)									
A	宮澤友輔等, 高感度インスリン測定法の開発と尿中及び乾燥ろ紙血中インスリンによる糖尿病リスク指標の構築, 徳島文理大学研究紀要, 2009, No. 77, Page. 19-28, 3. 8 3. 9 4	1-8 (部分的)									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献									
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの									
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの									
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 30.05.2012		国際調査報告の発送日 12.06.2012									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 三木 隆	2 J 3 3 1 2								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3252									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 2 / 0 5 5 7 3 6
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	成田琢磨等, 人の糸球体内圧上昇を検出する新しい方法の導入による糖尿病性腎症極早期病変の病態解析とその発症進展防止に関する臨床研究, 秋田医学, 2005, Vol. 32, No. 2, Page. 89-93, 3. 臨床応用	1-8 (部分的)
A	兼松直毅等, 高感度アディポネクチン測定法の開発とその運動・栄養指導への応用, 徳島文理大学研究紀要, 2009, No. 78, Page. 7-23, 図 1	1-8 (部分的)
A	西岡麻未子等, 尿中レジスチン及び尿中インスリン受容体 α による糖尿病リスク指標の構築と栄養マネジメントへの応用, 栄養学雑誌, 2007, Vol. 65, No. 5, Supplement, Page. 158	1-8 (部分的)
A	西岡麻未子等, 尿中レジスチン及び遊離インスリン受容体 α による糖尿病リスク指標の構築と栄養アセスメントへの応用, 日本栄養・食糧学会大会講演要旨集, 2008, Vol. 62nd, Page. 285	1-8 (部分的)
A	GLASSOCK Richard J., Diabetic Nephropathy: Staging and Progression, Diabetes Front, 2010, Vol. 21, No. 6, Page. 728	1-8 (部分的)
A	JP 2009-85685 A (株式会社医学生物学研究所) 2009. 04. 23, 【要約】 (ファミリーなし)	1-8 (部分的)
A	JP 2001-116751 A (石川 榮治) 2001. 04. 27, 【要約】 (ファミリーなし)	1-8 (部分的)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 2 / 0 5 5 7 3 6

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 9-11 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、請求項9～11は予防または治療方法に関するであって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査を行うことができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。
別紙参照

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

請求項1～8のインスリンをバイオマーカーとして測定することに関する部分

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2009年7月)

第III欄

成田琢磨等, 人の糸球体内圧上昇を検出する新しい方法の導入による糖尿病性腎症極早期病変の病態解析とその発症進展防止に関する臨床研究, 秋田医学, 2005, Vol.32, No.2, Page.89-93 に尿中の複数のマーカーを測定することにより、糖尿病の進行度を評価することが記載されているから、これ自体発明の特別な技術的特徴にはならないし、また、兼松直毅等, 高感度アディポネクチン測定法の開発とその運動・栄養指導への応用, 徳島文理大学研究紀要, 2009, No.78, Page.7-23 に記載されているように、ICT-EIA法も一般的な免疫測定法の1つに過ぎず、その測定方法に関しても特徴的なものではない。すると、本願の請求項1は発明の特別な技術的特徴を有するものとは認められない。

したがって、本願の請求項1～8は以下の発明群を含む。

第1発明: 請求項1～8に記載された発明における、尿中の糖尿病関連の一つ以上のバイオマーカーとしてインスリンを必須の要素として含み、かつ、レジスチン、アディポネクチン、レプチン、CRPからなる群の他のバイオマーカーと組み合わせて測定することを特徴とする糖尿病性疾患の進行度評価方法に関する部分。

第2発明: 請求項1～8に記載された発明における、尿中の糖尿病関連の一つ以上のバイオマーカーとしてレジスチンを必須の要素として含み、かつ、アディポネクチン、レプチン、CRPからなる群の他のバイオマーカーと組み合わせて測定することを特徴とする糖尿病性疾患の進行度評価方法に関する部分。

第3発明: 請求項1～8に記載された発明における、尿中の糖尿病関連の一つ以上のバイオマーカーとしてアディポネクチンを必須の要素として含み、かつ、レプチン、CRPからなる群の他のバイオマーカーと組み合わせて測定することを特徴とする糖尿病性疾患の進行度評価方法に関する部分。

第4発明: 請求項1～8に記載された発明における、尿中の糖尿病関連の一つ以上のバイオマーカーとしてレプチンとCRPを組み合わせて測定することを特徴とする糖尿病性疾患の進行度評価方法に関する部分。

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	评估糖尿病疾病进展程度的方法		
公开(公告)号	JPWO2012121266A1	公开(公告)日	2014-07-17
申请号	JP2013503564	申请日	2012-02-29
[标]申请(专利权)人(译)	桥田诚一		
申请(专利权)人(译)	桥田诚一		
[标]发明人	橋田誠一 梅原麻子		
发明人	橋田 誠一 梅原 麻子		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/68 G01N2333/4703 G01N2333/4737 G01N2333/575 G01N2333/62 G01N2800/042		
FI分类号	G01N33/53.B G01N33/53.X G01N33/535		
优先权	2011064959 2011-03-04 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的目的是提供一种尿分析方法，其能够准确地评估由糖尿病引起的疾病的初始症状和干预后的控制状态。特别地，本发明的目的是提供一种尿液检查评估方法，其能够准确地诊断糖尿病性肾病的初始症状。为了解决上述问题，本发明人使用免疫复合物转移酶免疫测定法（ICT-EIA法）来评价尿中排出的以下糖尿病相关抗原（生物标志物）。结果，他们发现可以通过组合多种生物标记物在早期掌握糖尿病的进展和肾功能障碍的进展，从而完成了本发明。

生理活性物质	分子量 (KD)	检出感度		血中濃度 (健康者) (ng/ml)	尿中濃度 (健康者)	尿/血中比
		ELISA	ICT-EIA			
Insulin	5.8	0.1(μU)	0.0001(μU)	1-10(μU)	1-10(μU)	1/1
Resistin	12.5		0.1	1-100	1-100	1/1
Leptin	16.0	1.5	0.0004	1-10	0.001-0.01	1/1,000
TNF-α	17.0	1.0	0.01	0.005-0.05	NT	
IL-6	21.5-28.0	0.05	0.0005	0.001-0.01	NT	
PAI-1	50.0	4.0	0.1	10-100	0.01-0.1	1/1000
CRP	105	6.0	0.001	< 4,000	0.001-1	1/1000
Adiponectin	440, 670	500	0.1	3,000-30,000	0.1-1	1/100,000

ND: 未検出