

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5759372号
(P5759372)

(45) 発行日 平成27年8月5日(2015.8.5)

(24) 登録日 平成27年6月12日(2015.6.12)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N 33/68	(2006.01)	GO 1 N 33/68	
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	V
CO 7 K 14/47	(2006.01)	CO 7 K 14/47	
CO 7 K 16/18	(2006.01)	CO 7 K 16/18	

請求項の数 4 (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願2011-518307 (P2011-518307)	(73) 特許権者	504162763 原 正則 新潟県新潟市西区坂井東5丁目31番30号
(86) (22) 出願日	平成22年6月9日(2010.6.9)	(73) 特許権者	304027279 国立大学法人 新潟大学 新潟県新潟市西区五十嵐2の町8050番地
(86) 国際出願番号	PCT/JP2010/003837	(73) 特許権者	502285457 学校法人順天堂 東京都文京区本郷2-1-1
(87) 国際公開番号	W02010/143423	(73) 特許権者	591125371 デンカ生研株式会社 東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号
(87) 国際公開日	平成22年12月16日(2010.12.16)		
審査請求日	平成25年5月31日(2013.5.31)		
(31) 優先権主張番号	特願2009-139188 (P2009-139188)		
(32) 優先日	平成21年6月10日(2009.6.10)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 糖尿病性腎症の検査方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

糖尿病患者から採取された尿中のポドカリキシンを可溶化することにより尿試料溶液を得、尿試料溶液について尿中ポドカリキシンを検出し、尿中クレアチニンの値で補正した尿中ポドカリキシン値を指標として用いることを特徴とする、糖尿病性腎症の発症を判定するための、糖尿病性腎症の検査方法。

【請求項2】

尿中ポドカリキシン値が基準値よりも高い場合に、糖尿病性腎症であると判定される、請求項1に記載の検査方法。

【請求項3】

基準値が、健常人の尿中ポドカリキシン値の95%信頼区間の上限値である、請求項2に記載の検査方法。

【請求項4】

尿中ポドカリキシンの検出を、免疫学的手法により行う、請求項1~3のいずれか1に記載の検査方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、尿中のポドカリキシンを検出することを含む、糖尿病性腎症の検査方法、および抗ポドカリキシン抗体を含む、当該検査方法に用いる糖尿病性腎症検査用試薬に関する

る。

【0002】

本出願は、参照によりここに援用されるところの日本出願特願2009-139188号優先権を請求する。

【背景技術】

【0003】

糖尿病性腎症は糖尿病の3大合併症のひとつであり、近年血液透析導入の原因疾患の第1位となっている。糖尿病性腎症は、糖尿病にかかってから10年以上が経過し、糖尿病のコントロールが悪く、高血糖状態が長期間続くことにより発症する。糸球体濾過量は増加し、糸球体のなかの血圧が高くなり（糸球体高血圧）、糸球体の毛細血管からの血漿タンパク質の透過性が高まって、アルブミン尿が出現する。さらに病態が進むと、糸球体の基底膜の目が粗くなり、よりサイズの大きい蛋白も排泄されるようになり、蛋白尿になる。蛋白尿が高度になると低蛋白血症になり、糸球体濾過機能の減少と相まって浮腫が起きる。さらに進行すると、体内の老廃物や水分、塩分の排泄が損なわれ、腎不全状態となり、最終的には血液透析か腎移植が必要になる。

10

【0004】

末期腎不全の原因疾患としての糖尿病性腎症患者の比率・数は年々増加しており、糖尿病性腎症の診断・治療は、大きな課題となっている。糖尿病性腎症の透析患者の予後は不良であることが多く、透析療法が必ずしも患者の生命予後、QOLの向上に大きな貢献をもたらしていないのが現状である。また、糖尿病性腎症の臨床診断は、腎生検が困難なことから糖尿病に併発した持続性蛋白尿、腎機能障害、高血圧等の知見から行われている。しかし、持続性蛋白尿が出現すると治療が難しく、5～6年の経過で末期腎不全に陥る場合が多い。そのため、通常の尿試験紙法で尿蛋白が陽性となる前に早期に腎病変を診断して、早期治療を行うことが、臨床医学の立場から強く望まれている。

20

【0005】

試験紙法による尿蛋白が陰性の早期から、糖尿病性腎症患者を診断する手法として、放射線免疫測定法、酵素免疫測定法、ラテックス凝集免疫比濁法、免疫沈降法による尿中のアルブミン測定が行われている。かかる手法の指標としては、尿中アルブミン排泄量「ALB/Cre」が用いられている。尿中アルブミン排泄量（mg/gCre）は $100 \times$ 尿中アルブミン濃度（mg/L） \div 尿中クレアチニン濃度（mg/dL）により求めることができる。尿中アルブミン排泄量「ALB/Cre」が、30mg/gCre未満の場合は第I期（腎症前期）、30～300mg/gCre未満の場合は第II期（早期腎症期）、300mg/gCre以上の場合は第III期（顕性腎症期）に相当する。尿中アルブミン排泄量が30mg/gCre未満の場合は、腎症を発症していない段階と判定される。微量アルブミンを呈することにより糖尿病性腎症であると診断され、これは第II期に相当し、病理学的に軽度から中等度のび慢性病変が既に存在し、結節性病変の存在も知られている時期である。したがって、尿中アルブミンの診断では必ずしも真の初期腎症を判断することができず、糖尿病性腎症の早期診断のための指標が求められている。

30

【0006】

尿中アルブミン濃度に替えて、フォンヴィレブランド因子（von Willebrandfactor）切断酵素を診断の指標に用いる方法が開示されている（特許文献1）。具体的には、フォンヴィレブランド因子切断酵素の量または酵素活性について、vWFの量を免疫学的手法を用いて分析することにより、糖尿病性腎症患者における腎障害の進展度の予測および予後の改善を行う手段が開示されている。

40

【0007】

腎疾患に関連して、尿中ポドカリキシンを測定することによる、簡便な腎障害の検査手段が開示されている（特許文献2）。ポドカリキシンは、腎糸球体を構成するタコ足細胞（ポドサイト）の表面に存在し、濾過機能を担っている糖タンパク質である。ポドサイトは、糸球体基底膜のボウマン腔側に位置し、糸球体濾過機構に重要な役割をもつため、ポドサイトの障害の程度を把握することは、腎疾患において極めて重要な意味を持つことが

50

知られている（非特許文献1）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】特開2008-216137号公報

【特許文献2】国際公開WO2002/037099号

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Hara et al., Nephron69: 397-403 (1995)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、従来の方法より早期に糖尿病性腎症を発見するための検査方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは上記課題を解決するために、尿中ポドカリキシン排泄量「PCX/Cre」が健常人の値よりも高い場合に糖尿病性腎症の可能性があることに着目し、尿中ポドカリキシンを検出することにより糖尿病性腎症の検査を行い得ることを見出し、本発明を完成した。

【0012】

すなわち、本発明は以下よりなる。

1. 尿中ポドカリキシンを検出することを特徴とする、糖尿病性腎症の検査方法。
2. 糖尿病性腎症の病期区分が少なくとも第I期のものである、前項1に記載の検査方法。
3. 尿中ポドカリキシン値が基準値よりも高い場合に、糖尿病性腎症であると判定される、前項1または2に記載の検査方法。
4. 基準値が、健常人の尿中ポドカリキシン値の95%信頼区間の上限値である、前項3に記載の検査方法。
5. 糖尿病性腎症の進展および/または糖尿病性腎症の病期区分が判定される、前項1または2に記載の糖尿病性腎症の検査方法。
6. 尿中ポドカリキシン値が、尿中成分の値で補正されたものである、前項1～5のいずれか1項に記載の検査方法。
7. 尿中成分が尿中クレアチニンである、前項6に記載の検査方法。
8. 尿中ポドカリキシンの検出を、免疫学的手法により行う、前項1～7のいずれか1に記載の検査方法。
9. 尿中ポドカリキシンを検出するための抗ポドカリキシン抗体を含む、前項8に記載の検査方法に用いる、糖尿病性腎症検査用試薬。
10. 抗ポドカリキシン抗体を用いた尿中ポドカリキシンを検出するための試薬を含む、前項8に記載の検査方法に用いる、糖尿病性腎症検査用試薬キット。

【発明の効果】

【0013】

尿中ポドカリキシンを測定して本発明の検査方法を実施することにより、糖尿病性腎症を早期に発見することができる。本発明の検査方法により、尿中アルブミン排泄量「ALB/Cre」により第I期（腎症前期）に分類された患者であっても、腎症リスクが高い患者に分類することが可能となる。本発明の検査方法により、早期に糖尿病性腎症を発見することは、腎症進行の予防にもつながる。

また、尿中ポドカリキシン排泄量「PCX/Cre」は、糖尿病性腎症の進行に伴って高くなる傾向があり、本発明の検査方法により、糖尿病性腎症の病態を把握することが可能となる。尿中ポドカリキシン排泄量は、糸球体の機能亢進状態ならびにそれに続く進行

10

20

30

40

50

性の障害を反映しているため、活動的な糸球体障害を効果的に診ることが可能である。本発明の検査方法により、簡便に糖尿病性腎症の病態をモニタリングすることができ、治療方針等を速やかに決定することができると考えられる。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】糖尿病および糖尿病性腎症患者の尿中ポドカリキシン排泄量「PCX/Cre」を糖尿病性腎症の病期区分に従い分類した図を示す。(実施例2)

【図2】eGFR<60を除いた糖尿病および糖尿病性腎症患者の尿中ポドカリキシン排泄量「PCX/Cre」を糖尿病性腎症の病期区分に従い分類した図を示す。(実施例2)

10

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明は被験者の尿中ポドカリキシンを検出することにより糖尿病性腎症の検査を行うことを特徴とする。本明細書において、検体である尿は、いかなる被験者から得られたものであってもよいが、糖尿病を罹患した患者から得られたものが好ましい。糖尿病の診断は、従来より公知の手段により行えばよい。尿の採取方法は問わないが、早朝尿もしくは随時尿を用いることが好ましい。また本発明の検査方法に必要な尿の量は10~200 μ L程度である。本発明の検査方法は、従来の健康診断等の一般的な尿検査と同時に行われてもよいし、糖尿病の疑いのある被験者や、糖尿病と診断された患者について別途尿を採取して行われてもよい。また本発明の検査方法は、糖尿病患者について、糖尿病性腎症の発症または進行をモニタリングする目的として、行われてもよい。

20

【0016】

検体である尿の処理は、尿に処理液を添加して混合することにより行うことができる。処理液は、尿のpH調整、尿沈渣のマスクングおよび、ポドカリキシンの可溶化が可能なものであればいかなるものであってもよいが、好ましくは、緩衝液にキレート剤および界面活性剤などを添加した溶液が例示される。緩衝液、キレート剤は、公知のものであればいずれであってもよく、界面活性剤は、非イオン界面活性剤を用いることが好ましい。処理液としては、例えば2M TES-NaOH(pH7.0)に、0.2MEDTAと2%(Vol./Vol.) Triton X-100を含む溶液が例示される。かかる処理液10 μ Lを、尿検体90 μ Lに添加して混合することにより、尿試料溶液を得ることが可能である。

30

【0017】

尿試料溶液からポドカリキシンを検出する方法は様々な方法が考えられる。尿中ポドカリキシンの検出の一例として、免疫学的手法が挙げられる。免疫学的手法は、例えば、免疫染色法(蛍光抗体法、酵素抗体法、重金属標識抗体法、放射性同位元素標識抗体法を含む)、電気泳動法による分離と蛍光、酵素、放射性同位元素などによる検出方法との組み合わせ(ウェスタンブロット法、蛍光二次元電気泳動法を含む)、酵素免疫測定吸着法(ELISA)、ドット・プロット法、ラテックス凝集法(LA: Latex Agglutination-Turbidimetric Immunoassay)、イムノクロマト法などにより行うことができるが、ELISA法もしくはLA法を用いることが好ましい。定量性の観点からELISA法のうちサンドイッチ法を用いることが好ましい。サンドイッチ法では、抗ポドカリキシン抗体を固相化したマイクロタイプレートに尿試料溶液を添加し、抗原・抗体反応をさせ、さらに酵素標識した抗ポドカリキシン抗体を添加し、抗原・抗体反応をさせ、洗浄後、酵素基質と反応・発色させ、吸光度を測定して尿中のポドカリキシンを検出すると共に尿中ポドカリキシン濃度を算出することができる。

40

【0018】

免疫学的手法において用いられる抗ポドカリキシン抗体は、ポドカリキシンを検出する抗体であればよい。本発明において用いられる抗ポドカリキシン抗体は、公知のものであってもよく、また今後開発される抗体であってもよく、特に限定されないが、例えばモノクローナル・ポリクローナル抗体や標識化抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体ならびにこれ

50

らの結合活性断片などが挙げられる。

【0019】

本発明において用いられる尿中ポドカリキシン値は、尿中ポドカリキシン濃度であってもよいが、尿中ポドカリキシン濃度を尿中に安定に排泄される尿中成分の値（尿中成分値）により補正したものであることが望ましい。尿中成分としては、特に尿中クレアチニンが好ましい。尿中クレアチニンはクレアチニンの産生が筋肉の量に依存することから、一

個体において疾患にかかわらずほぼ一定であると考えられている。尿中排泄物質の検査においては、尿量誤差を回避するため、クレアチニン1g当りの量により目的とする尿中排泄物質の量を補正する手法が一般的に用いられており、これによりクレアチニン単位グラム当たりの尿中排泄物質を比較することが可能になる。尿中ポドカリキシン濃度を、尿中

クレアチニン濃度により補正して得られる補正値を、尿中ポドカリキシン排泄量（PCX / Cre）と称し、尿中ポドカリキシン排泄量は、以下の式により算出することができる。

10

<式> PCX / Cre : 尿中ポドカリキシン排泄量 ($\mu g / g$) = $100 \times$ 尿中ポドカリキシン濃度 (ng / mL) \div 尿中クレアチニン濃度 (mg / dL)

【0020】

本発明の検査方法により得られた尿中ポドカリキシン値、好ましくは尿中ポドカリキシン排泄量「PCX / Cre」が基準値より高い場合、糖尿病性腎症であると判定することができる。基準値は適宜設定することができるが、健常人の尿中ポドカリキシン値、好ましくは尿中ポドカリキシン排泄量「PCX / Cre」を用いることができる。健常人には

、糖尿病患者ではない被験者のみならず糖尿病性腎症を発症していない糖尿病患者が含まれていてもよいが、好ましくは糖尿病患者でない被験者が望ましく、さらに糖尿病患者ではなく、他の腎機能マーカーで陰性を示した被験者が望ましい。他の腎機能マーカーとしては、推算糸球体濾過量（eGFR : estimated glomerular filtration rate）や、尿蛋白が例示される。さらに好ましくは、複数の健常人について尿中ポドカリキシン値、好ましくは尿中ポドカリキシン排泄量「PCX / Cre」を得、当該尿中ポドカリキシン排泄量の95%信頼区間の上限値を基準値として用いる。

20

【0021】

95%信頼区間は公知の手法により求めることができる。健常人の尿中ポドカリキシン値が正規分布している場合は以下の式によって求めることができる。

30

95%信頼区間 = 健常人尿中ポドカリキシン値の平均 \pm t \times 健常人尿中ポドカリキシン値の標準偏差

なお、tは自由度であり、健常人の検体数によって変動するため、t分布表に基づき選択すればよい。一般に95%信頼区間の場合tは1.96である。

一方、健常人の尿中ポドカリキシン値が正規分布していない場合は中央値を含んだ95%を占める範囲を基準範囲とし、その上限値を尿中ポドカリキシン値の基準値とする。

本発明において基準値は、 $50 \mu g / g \sim 300 \mu g / g$ 、好ましくは $75 \mu g / g \sim 200 \mu g / g$ 、より好ましくは $100 \mu g / g \sim 180 \mu g / g$ である。

【0022】

糖尿病性腎症の病期分類としては、第I期（腎症前期）、第II期（早期腎症期）、第III期（顕性腎症期）が一般的である。第I期（腎症前期）では、尿中アルブミンは正常値を示し、病理組織学的特徴としてはび慢性病変は存在しないか軽度のものが存在する。第II期（早期腎症期）では、尿中に微量アルブミンを呈し、病理組織学的には軽度から中等度のび慢性病変が存在し、結節性病変が時に存在することが知られている。第III期（顕性腎症期）では、尿中に持続性蛋白が呈し、病理組織学的には中等度から高度のび慢性病変が存在し、結節性病変が多くの場合存在することが知られている。

40

【0023】

本発明の検査方法により、上記病期分類における第II期、第III期のみならず、第I期の糖尿病性腎症について、判定することが可能となる。従来の尿中アルブミン測定による場合は、第I期が腎症を発症していない段階と判定されるが、本発明の検査方法によれば、

50

第I期を判定することができ、糖尿病性腎症を早期に診断することが可能である。

また、尿中ポドカリキシン排泄量「PCX/Cre」は、進行中の糸球体の機能亢進状態ならびにそれに続く進行性の障害を反映する。このため、尿中ポドカリキシン排泄量の増大を確認することにより、糖尿病性腎症の病態の進展を判定および/または予測することができる。糖尿病性腎症の病態の進展を判定および/または予測する場合、被験者の尿中ポドカリキシン値を経時的に測定することが好ましく、尿中ポドカリキシン値が上昇した場合に、糖尿病性腎症の病態の進展と判定される。また、尿中ポドカリキシンの排泄量に基づいて、糖尿病性腎症の病期分類を行うことも可能である。

【0024】

進行中の糸球体の機能亢進状態により、糖尿病性腎症の病態の進展を判定および/または予測する、あるいは、糖尿病性腎症の病期分類を行う方法においては、糸球体が活動的であり、糸球体硬化が進んでいない状態の被験者を対象とすることが好ましい。このような被験者は他の腎機能マーカーで陰性を示した被験者であることが好ましく、例えばeGFRが60以上の被験者が挙げられる。

【0025】

本発明は、尿中ポドカリキシンを検出するための、抗ポドカリキシン抗体を含む、前記の検査方法に用いる、糖尿病性腎症検査用試薬および、抗ポドカリキシン抗体を含む試薬を含む、前記の検査方法に用いる、糖尿病性腎症検査用試薬キットにも及ぶ。検査用試薬または、検査用試薬キットに含まれる抗ポドカリキシン抗体は、例えば酵素などにより標識化されたものであってもよい。また、検査用試薬キットは2種類以上の抗ポドカリキシン抗体を含んでもよく、当該抗体は互いに異なるエピトープを認識する抗体であることが好ましい。さらに当該キットには、処理液、発色基質等の試薬および、試験に必要な器具等を含むことができる。

【実施例】

【0026】

以下に本発明の実施例を示し、本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではなく、本発明の技術的思想を逸脱しない範囲内で種々の応用が可能である。

【0027】

(実施例1)尿中ポドカリキシン濃度の測定

ポドカリキシン濃度の測定には、2種類の抗ヒトポドカリキシンモノクローナル抗体を用いた。これらの2種類の抗体は、ヒトポドカリキシンの異なる2つのエピトープを各々認識し、それぞれ抗ヒトポドカリキシンモノクローナル抗体a(以下単に「抗体a」と称する)と、抗ヒトポドカリキシンモノクローナル抗体b(以下単に「抗体b」と称する)である。本実施例では、抗体a固相化マイクロタイタープレート(分割型マイクロプレートGF8高:Nunc社)と、西洋ワサビPeroxidase(以下「HRP」と略す)により標識化した抗体bを用いた。

【0028】

まず、被験者から得た尿90 μ Lと、2M TES-NaOH、0.2M EDTA、2%(Vol./Vol.) Triton X-100、pH7.0の溶液10 μ Lを混合した。混合して得られた尿試料溶液100 μ Lを、抗体a固相化マイクロタイタープレートのウェルへ加えた。37 $^{\circ}$ Cで1時間静置後、ウェルから尿試料溶液をデカンテーションにより除去した。3.6mM Na₂HPO₄、1.4mM KH₂PO₄、145mM NaCl、0.05%(Vol./Vol.) Tween 20(以下「PBS-T」と略す)を、マイクロタイタープレートのウェルに200 μ L/ウェルで添加し、デカンテーションによりPBS-Tの除去を行い、洗浄を行った。この洗浄の工程を計3回行った。その後、HRP標識化抗体b溶液を、100 μ L/ウェルで添加した。37 $^{\circ}$ Cで1時間静置後、HRP標識化抗体b溶液をデカンテーションにより除去した。PBS-Tを200 μ L/ウェルで添加し、デカンテーションによりPBS-Tの除去を行い、洗浄を行った。この洗浄の工程を計3回行った。その後、TMB One-Step Substrate System(Dako社)

10

20

30

40

50

をHRP酵素反応の基質溶液として用いて、100 μ L / ウェルで添加し、25 で30分間、遮光で静置した。その後、313 mM H_2SO_4 溶液を反応停止溶液として100 μ L / ウェルで添加し、マルチスキャンアセントとAscent Software for Multiskan (大日本製薬株式会社) を使用し、波長450 nmと630 nmで各ウェルの吸光度を測定した。そして、波長450 nmの吸光度から波長630 nmの吸光度を引いた値を測定値とした。検量線の標準品として腎臓から抽出したNativeなヒトポドカリキシンを使用し、検体中のポドカリキシン濃度を導き出した。そして尿中ポドカリキシン濃度を尿中クレアチニン濃度により補正した尿中ポドカリキシン排泄量を以下の式から算出した。

<式> $PCX / Cre : \text{尿中ポドカリキシン排泄量} (\mu g / g) = 100 \times \text{尿中ポドカリキシン濃度} (ng / mL) \div \text{尿中クレアチニン濃度} (mg / dL)$

10

【0029】

(実施例2) 糖尿病性腎症における尿中ポドカリキシン排泄量の臨床的意義

実施例1の方法により、糖尿病および糖尿病性腎症患者71症例の尿中ポドカリキシン排泄量(クレアチニン補正值)を求め、それを糖尿病性腎症の病期分類に従って分類した。健常人群をA群、糖尿病性腎症第I期(腎症前期)の患者群をB群、糖尿病性腎症第II期(早期腎症期)の患者群をC群、糖尿病性腎症第III期(顕性腎症)の患者群をD群とする。実施例1の方法により求めた尿中ポドカリキシン排泄量「PCX / Cre」が基準値より高値を示した検体は糖尿病性腎症であることを意味する。基準値は健常人66例(本実施例では糖尿病患者は含まない)から得た尿より求めた尿中ポドカリキシン排泄量「PCX / Cre」の95%信頼区間の上限値であり、その基準値は161 $\mu g / g$ である。

20

【0030】

糖尿病および糖尿病性腎症患者の尿中ポドカリキシン排泄量「PCX / Cre」を糖尿病性腎症の病期区分に従い分類したものを、表1と図1に示す。

【表1】

	健常人	糖尿病性腎症		
		第I期 (腎症前期)	第II期 (早期腎症)	第III期 (顕性腎症)
基準値以上 (例数)	1/66 例	18/39 例	8/17 例	9/15 例
基準値以上(%)	1.5%	46.2%	47.1%	60.0%

30

【0031】

表1、図1より病態が悪化するに従って、尿中ポドカリキシン排泄量「PCX / Cre」が基準値以上である検体の割合が上昇していることが分かった。さらに、微量アルブミン尿が出現する前の正常アルブミン尿の段階(第I期)から、尿中ポドカリキシン排泄量「PCX / Cre」が基準値以上である症例が、46.2%存在することが分かった。これは、微量アルブミン尿が出現する前にポドカリキシンが尿中へ排泄されていることを意味している。尿中ポドカリキシンを検出することにより、糖尿病性腎症の病期区分により第I期(腎症前期)に分類された患者を、腎症リスクが高い患者に分類することが可能であることがわかった。

40

【0032】

次に、尿中ポドカリキシン排泄量「PCX / Cre」が活動的な糸球体障害を診ることが可能か否かを検討した。そこで、糖尿病および糖尿病性腎症患者71症例から糸球体硬化が進み、尿排泄を許容し得るボウマン腔側の間隙スペースが減少していると考えられるeGFR < 60未満の症例を除いた46症例についての尿中ポドカリキシン排泄量「PCX / Cre」のサブ解析を行った。

【0033】

eGFR < 60を除いた糖尿病および糖尿病性腎症患者の尿中ポドカリキシン排泄量「PCX / Cre」を糖尿病性腎症の病期区分に従い分類したものを表2と図2に示す。

50

【表 2】

	健常人	糖尿病性腎症		
		第Ⅰ期 (腎症前期)	第Ⅱ期 (早期腎症)	第Ⅲ期 (顕性腎症)
基準値以上 (例数)	1/66 例	15/33 例	6/10 例	3/3 例
基準値以上(%)	1.5%	45.5%	60.0%	100.0%

【0034】

10

糖尿病性腎症の病期分類で糖尿病および糖尿病性腎症患者71症例の結果とeGFR<60未満の症例を除いた46症例の結果を比較すると、尿中ポドカリキシン排泄量「PCX/Cre」が基準値以上である症例の割合が第Ⅰ期では同等、第Ⅱ期、第Ⅲ期ではeGFR<60未満の症例を除いた46症例が大きく上回っていることがわかる(表1、表2、図1、図2)。つまり、尿中ポドカリキシン排泄量は現在進行中の糸球体の機能亢進状態ならびにそれに続く進行性の障害を反映していることが分かった。つまり、尿中ポドカリキシン排泄量「PCX/Cre」を以って、活動的な糸球体障害を診るのに適した検査方法を提供することが可能となる。

【産業上の利用可能性】

【0035】

20

上記説明したとおり、尿中ポドカリキシン排泄量「PCX/Cre」は、糖尿病性腎症の診断の指標として用いられている尿中アルブミン排泄量「ALB/Cre」よりも早期から、糖尿病性腎症の発症を鋭敏に反映していることが判明した。また、尿中ポドカリキシン排泄量「PCX/Cre」を糖尿病性腎症の診断マーカーとして使用することで、早期に糖尿病性腎症を発見し、かつ障害の程度(病態の進展)を的確に判別することができる。本発明の検査方法により、糖尿病性腎症の重症化を予防し医療費の費用軽減することが可能となり、かつ治療方針等の速やかな決定を行うことができ、有用である。

フロントページの続き

- (74)代理人 100088904
弁理士 庄司 隆
- (74)代理人 100124453
弁理士 資延 由利子
- (74)代理人 100135208
弁理士 大杉 卓也
- (74)代理人 100152319
弁理士 曾我 亜紀
- (72)発明者 原 正則
新潟県新潟市西区坂井東5丁目31番30号
- (72)発明者 斎藤 亮彦
新潟県新潟市中央区旭町通一番町757 国立大学法人新潟大学大学院 医歯学総合研究科 機能分子医学寄附講座内
- (72)発明者 富野 康日己
東京都文京区本郷2-1-1 順天堂大学内
- (72)発明者 浅沼 克彦
東京都文京区本郷2-1-1 順天堂大学内
- (72)発明者 黒澤 寛之
新潟県五泉市木越字鏡田1359-1 デンカ生研株式会社鏡田工場内
- (72)発明者 小笠原 真也
新潟県五泉市木越字鏡田1359-1 デンカ生研株式会社鏡田工場内
- (72)発明者 平山 吉朗
新潟県五泉市木越字鏡田1359-1 デンカ生研株式会社鏡田工場内

審査官 長谷 潮

- (56)参考文献 国際公開第2002/037099(WO, A1)
国際公開第2007/102787(WO, A1)
国際公開第2008/084331(WO, A2)
Tsukasa Nakamura, Pioglitazone Reduces Urinary Podocyte Excretion in Type 2 Diabetes Patients With Microalbuminuria, *Metabolism*, 2001年10月, Vol. 50, No. 10, pp. 1193-1196
Katsue Kanno, Urinary sediment podocalyxin in children with glomerular diseases, *Nephron Clin Pract.*, 2003年, Vol. 95, pp. c91-c99
原 正則, 腎疾患の診療に役立つ新しい検査 尿中podocyte検査, 尿中ポドカリキシン定量, 腎と透析, 2008年10月25日, Vol.65, No.4, pp. 488-491
Nakamura T. et al., Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy, *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2000年, Vol. 15, No. 9, pp.1379-1383
関根盛、原正則, 腎障害の新しいマーカーについて-尿中ポドサイト, ポドカリキシンと臨床病理学的意義-, *Ther.Res.*, 2008年, Vol.29 No.11, p.1900-1904
Stefanie U. Vogelmann, Urinary excretion of viable podocytes in health and renal disease, *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003年 3月11日, Vol. 285, pp. F40-F48
Masanori Hara, Apical Cell Membranes Are Shed into Urine from Injured Podocytes: A Novel Phenomenon of Podocyte Injury, *J Am Soc Nephrol*, 2005年, Vol. 16, pp. 408-416
P. HABARA, A Novel Method for the Estimation of Podocyte Injury: Podocalyxin-Positive Elements in Urine, *Folia Biologica*, 2008年, Vol. 54, pp. 162-167
JJ Li, Podocyte biology in diabetic nephropathy, *Kidney International*, 2007年, Vol. 72, pp. S36-S42

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

G 0 1 N 3 3 / 6 8

G 0 1 N 3 3 / 5 3

C 0 7 K 1 4 / 4 7

C 0 7 K 1 6 / 1 8

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

P u b M e d

专利名称(译)	检测糖尿病肾病的方法		
公开(公告)号	JP5759372B2	公开(公告)日	2015-08-05
申请号	JP2011518307	申请日	2010-06-09
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人，新泻 学校法人顺天堂 电化生研株式会社		
申请(专利权)人(译)	正德原 国立大学法人，新泻 学校法人顺天堂 デンカ生研株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	正德原 国立大学法人，新泻 学校法人顺天堂 デンカ生研株式会社		
[标]发明人	原正則 斎藤亮彦 富野康日己 浅沼克彦 黒澤寛之 小笠原真也 平山吉朗		
发明人	原 正則 斎藤 亮彦 富野 康日己 浅沼 克彦 黒澤 寛之 小笠原 真也 平山 吉朗		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 C07K14/47 C07K16/18		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N2800/042 G01N2800/347		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/53.V C07K14/47 C07K16/18		
代理人(译)	庄司隆 Shinobe百合子		
审查员(译)	潮长谷		
优先权	2009139188 2009-06-10 JP		
其他公开文献	JPWO2010143423A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的一个目的是提供一种比传统方法更早地检测糖尿病肾病的试验方法。这样的受试者的特征在于测量尿podocalyxin，糖尿病肾病的测试方法，至少来自I期的测定糖尿病肾病的测试方法，测试方法的测试试剂，并根据测试试剂盒的测试方法。本发明基于以下发现：尿中足糖萼蛋白比尿白蛋白更早地反映糖尿病肾病的发病和病理状况。

(21) 出願番号	特願2011-518307 (P2011-518307)	(73) 特許権者	504162763
(86) (22) 出願日	平成22年6月9日 (2010. 6. 9)	原 正剛	
(86) 国際出願番号	PCT/JP2010/003837	新潟県新潟市西区坂井東5丁目31番30号	
(87) 国際公開番号	W02010/143423		
(87) 国際公開日	平成22年12月16日 (2010. 12. 16)	(73) 特許権者	304027279
審査請求日	平成25年5月31日 (2013. 5. 31)	国立大学法人 新潟大学	
(31) 優先権主張番号	特願2009-139188 (P2009-139188)	新潟県新潟市西区五十嵐2の町8050番地	
(32) 優先日	平成21年6月10日 (2009. 6. 10)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(73) 特許権者	502285457
		学校法人順天堂	
		東京都文京区本郷2-1-1	
		(73) 特許権者	581125371
		デンカ生研株式会社	
		東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号	
			最終頁に続く