

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02010/143423

発行日 平成24年11月22日 (2012.11.22)

(43) 国際公開日 平成22年12月16日 (2010.12.16)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	2 G O 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 V	4 H O 4 5
CO 7 K 14/47 (2006.01)	CO 7 K 14/47	
CO 7 K 16/18 (2006.01)	CO 7 K 16/18	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 16 頁)

出願番号	特願2011-518307 (P2011-518307)	(71) 出願人	504162763 原 正則 新潟県新潟市西区坂井東5丁目31番30号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2010/003837		
(22) 国際出願日	平成22年6月9日 (2010.6.9)	(71) 出願人	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
(31) 優先権主張番号	特願2009-139188 (P2009-139188)	(71) 出願人	502285457 学校法人順天堂 東京都文京区本郷2-1-1
(32) 優先日	平成21年6月10日 (2009.6.10)	(71) 出願人	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
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

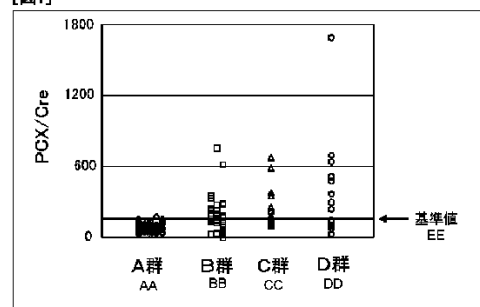
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 糖尿病性腎症の検査方法

(57) 【要約】

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。かかる課題は、尿中ポドカリキシンを測定することを特徴とする、糖尿病性腎症の検査方法、糖尿病性腎症を少なくとも第1期から判定する当該検査方法、前記検査方法のための検査用試薬、および前記検査方法のための検査用試薬キットによる。本発明は、尿中ポドカリキシンが、尿中アルブミンよりも早期から鋭敏に、糖尿病性腎症の発症および病態を反映していることを見出したことに基づく。

【図1】



AA... GROUP A
BB... GROUP B
CC... GROUP C
DD... GROUP D
EE... STANDARD VALUE

【特許請求の範囲】**【請求項 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。

【請求項 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、請求項 1 に記載の検査方法。

【請求項 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、請求項 1 または 2 に記載の検査方法。

【請求項 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、請求項 3 に記載の検査方法。

10

【請求項 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、請求項 1 または 2 に記載の糖尿病性腎症の検査方法。

【請求項 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、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の検査方法。

【請求項 7】

尿中成分が尿中クレアチニンである、請求項 6 に記載の検査方法。

【請求項 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、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 に記載の検査方法。

20

【請求項 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、請求項 8 に記載の検査方法に用いる、糖尿病性腎症検査用試薬。

【請求項 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、請求項 9 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。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】**

30

【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。

【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。

40

【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

50

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。

【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) ÷ 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。

10

20

【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。

【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、腎系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、系球体基底膜のポウマン腔側に位置し、系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知られている(非特許文献1)。

30

【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W02002/037099号

【非特許文献】

40

【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

50

」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1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、請求項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9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。

10

20

【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/Cr」により第1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。

30

また、尿中ポドカリキシン排泄量「PCX/Cr」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/Cr」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）

40

【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/Cr」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）

【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10～200μ

50

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。

【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、尿沈渣のマスキングおよび、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2 M T E S - N a O H (p H 7 . 0) に、0 . 2 M E D T A と 2 % (V o l . / V o l .) T r i t o n X - 1 0 0 を含む溶液が例示される。かかる処理液10 μLを、尿検体90 μL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。

10

【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（E L I S A）、ドット・プロット法、ラテックス凝集法（L A : 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、E L I S A 法もしくはL A 法を用いることが好ましい。定量性の観点からE L I S A 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ター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。

20

【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らの結合活性断片などが挙げられる。

30

【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、一人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值を、尿中ポドカリキシン排泄量（P C X / C r e）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。

40

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

【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

50

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。

10

【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。

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 μ g/g ~ 300 μ g/g、好ましくは75 μ g/g ~ 200 μ g/g、より好ましくは100 μ g/g ~ 180 μ g/gである。

20

【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。

30

【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、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。

40

【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

50

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。

10

【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。

20

【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)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 $^{\circ}$ Cで30分間、遮光で静置した。その後、313mM H₂SO₄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450nmと630nmで各ウェルの吸光度を測定した。そして、波長450nmの吸光度から波長630nm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。

30

40

<式> PCX/Cre:尿中ポドカリキシン排泄量(μ 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)

【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

50

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 μ g/gである。

【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%

10

【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。

20

【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。

30

【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。

【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%

40

【0034】

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

50

【手続補正書】

【提出日】平成23年12月16日(2011.12.16)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項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。

【請求項2】

糖尿病性腎症の病期区分が少なくとも第1期のものである、請求項1に記載の検査方法。

【請求項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、請求項1または2に記載の検査方法。

【請求項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、請求項3に記載の検査方法。

【請求項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、請求項1または2に記載の糖尿病性腎症の検査方法。

【請求項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、請求項1～5のいずれか1項に記載の検査方法。

【請求項7】

尿中成分が尿中クレアチニンである、請求項6に記載の検査方法。

【請求項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、請求項1～7のいずれか1に記載の検査方法。

【請求項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、請求項8に記載の検査方法に用いる、糖尿病性腎症検査用試薬。

【請求項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、請求項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。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正の内容】

【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1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。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2010/003837
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/53(2006.01)i, G01N33/493(2006.01)i, G01N33/70(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) G01N33/53, G01N33/493, G01N33/70 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 1996-2010 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010 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/Y	Masanori HARA, "Jin Shikkan no Shinryo ni Yakudatsu Atarashii Kensa Nyochu Podocyte Kensa, Nyochu Podocalyxin Teiryo", Kidney and dialysis, 25 October 2008 (25.10.2008), vol.65, no.4, pages 488 to 491	1,8-10/2-7
Y/A	Nakamura T. et al., Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy, Nephrol.Dial.Transplant., 2000, Vol.15(9), p.1379-83	2-5/1,6-10
Y/A	Shigeru SEKINE, Masanori HARA, "Jin Shogai no Atarashii Marker ni Tsuite -Nyochu Podocyte, Podocalyxin to Rinsho Byorigakuteki Igi-", Ther.Res., 2008, vol.29, no.11, pages 1900 to 1904	6,7/1-5,8-10
<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 04 August, 2010 (04.08.10)		Date of mailing of the international search report 17 August, 2010 (17.08.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/003837

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2008-122410 A (Masanori HARA), 29 May 2008 (29.05.2008), & US 2004/0058395 A1 & EP 1336845 A1 & WO 2002/037099 A1 & AU 9030901 A	1-10
A	JP 06-011507 A (Fujirebio Inc.), 21 January 1994 (21.01.1994), (Family: none)	1-10
P,X	Masanori HARA, "Nyo Tanpaku Nyochu Bio Marker (1)Podocyte Kensa, Nyochu Podocalyxin Teiryō Kensa", Jinzo, 25 March 2010 (25.03.2010), vol.32, no.3, pages 196 to 200	1-10

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2010/003837									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/53(2006.01)i, G01N33/493(2006.01)i, G01N33/70(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. G01N33/53, G01N33/493, G01N33/70											
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>1971-2010年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2010年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2010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	1971-2010年	日本国実用新案登録公報	1996-2010年	日本国登録実用新案公報	1994-2010年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2010年										
日本国実用新案登録公報	1996-2010年										
日本国登録実用新案公報	1994-2010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/Y	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, 2008.10.25, Vol.65 No.4, p.488-491	1,8-10/2-7									
Y/A	Nakamura T. et al., Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy, Nephrol.Dial.Transplant., 2000, Vol.15(9), p.1379-83	2-5/1,6-10									
<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 04.08.2010		国際調査報告の発送日 17.08.2010									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 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) 白形 由美子	2J 3496								
		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 0 / 0 0 3 8 3 7
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
Y/A	関根盛, 原正則, 腎障害の新しいマ-カ-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, Vol. 29 No. 11, p. 1900-1904	6, 7/1-5, 8-10
A	JP 2008-122410 A (原 正則) 2008. 05. 29, & US 2004/0058395 A1 & EP 1336845 A1 & WO 2002/037099 A1 & AU 9030901 A	1-10
A	JP 06-011507 A (富士レビオ株式会社) 1994. 01. 21, (ファミリーなし)	1-10
PX	原正則, 尿たんぱく 尿中バイオマ-カ-(1)Podocyte 検査, 尿中ポドカリキシン定量検査, 腎臓, 2010. 03. 25, Vol. 32 No. 3, p. 196-200	1-10

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, 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, 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, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(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3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

Fターム(参考) 2G045 AA16 AA25 CB03 DA44 FB03

4H045 AA11 AA30 CA42 CA44 DA75 DA86 EA50

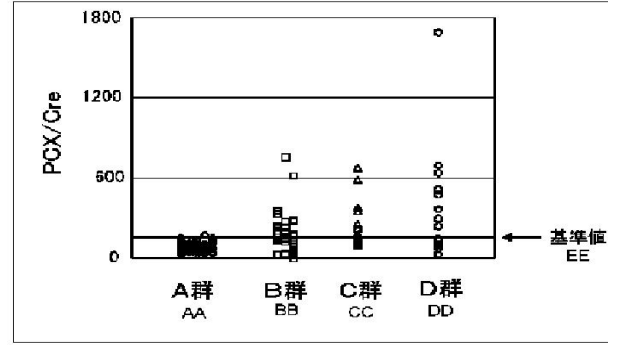
(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	检测糖尿病肾病的方法		
公开(公告)号	JPWO2010143423A1	公开(公告)日	2012-11-22
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		
[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		
F-TERM分类号	2G045/AA16 2G045/AA25 2G045/CB03 2G045/DA44 2G045/FB03 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA42 4H045/CA44 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA50		
代理人(译)	庄司隆 Shinobe百合子		
优先权	2009139188 2009-06-10 JP		
其他公开文献	JP5759372B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

与常规方法相比，提供了一种早期检测糖尿病性肾病的测试方法。具体提供：一种糖尿病肾病的测试方法，包括检测尿足中的podocalyxin；测试方法，还包括至少在第一阶段评估糖尿病肾病；用于测试方法的测试试剂；以及用于该测试方法的测试试剂盒。本发明基于以下发现：与尿白蛋白相比，尿podocalyxin在早期阶段以高敏感性反映了糖尿病性肾病的发展和状况。

【图1】



AA... GROUP A
BB... GROUP B
CC... GROUP C
DD... GROUP D
EE... STANDARD VALUE