

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2011年7月7日(07.07.2011)



(10) 国際公開番号

WO 2011/081110 A1

- (51) 国際特許分類:  
G01N 33/53 (2006.01) C07D 239/42 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/073453
- (22) 国際出願日: 2010年12月24日(24.12.2010)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2009-297509 2009年12月28日(28.12.2009) JP  
特願 2010-246867 2010年11月2日(02.11.2010) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人福岡大学 (FUKUOKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒8140180 福岡県福岡市城南区七隈八丁目19番1号 Fukuoka (JP). 日油株式会社 (NOF CORPORATION) [JP/JP]; 〒1506019 東京都渋谷区恵比寿四丁目20番3号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 渡辺俊明 (WATANABE Toshiaki) [JP/JP]; 〒8140180 福岡県福岡市城南区七隈八丁目19番1号 学校法人福岡大学内 Fukuoka (JP).
- (74) 代理人: 松尾憲一郎 (MATSUO Kenichiro); 〒8100042 福岡県福岡市中央区赤坂1丁目10番17号 しんくみ赤坂ビル7階 Fukuoka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, 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.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: METHOD FOR PREDIABETES SCREENING

(54) 発明の名称: 糖尿病前症の検査方法

(57) Abstract: Provided is a method for prediabetes screening by means of methylglyoxal-modified arginine derivative assay, with which it is possible to treat many samples as simply and as safely as with blood sugar assay, and to collect a blood sample taken during a primary health screening in one procedure without imposing any time restraints, complications or risks on the subject. The method for prediabetes screening by means of methylglyoxal-modified arginine derivative assay comprises assaying the methylglyoxal-modified arginine derivative in blood using an assay system which employs an antibody that specifically recognizes methylglyoxal-modified arginine derivative.

(57) 要約: この発明は、血糖値測定と同じように簡便で、安全かつ多検体処理を可能にするとともに、一次健康診断で実施される一回の採血で済み、かつ、被験者の拘束時間や煩雑さあるいは危険性などの問題を解決することができるメチルメチルグリオキサール修飾アルギニン誘導体測定による糖尿病前症の検査方法を提供する。この発明に係るメチルグリオキサール修飾アルギニン誘導体測定による糖尿病前症の検査方法は、メチルグリオキサール修飾アルギニン誘導体を特異的に認識する抗体を用いた測定系において、血液中のメチルグリオキサール修飾アルギニン誘導体を測定することからなっている。



WO 2011/081110 A1

## 明 細 書

**発明の名称：糖尿病前症の検査方法**

### 技術分野

[0001] この発明は、糖尿病前症の検査方法に関するものである。更に詳細には、この発明は、ピリミジン構造やイミダゾロン構造を有する生体内物質であるアルグピリミジン化合物やヒドロイミダゾロン化合物などの糖化タンパク質を血液マーカーとして測定することによる、特に糖尿病前症におけるインスリン抵抗性ならびに耐糖能障害の検査方法、およびそれに基づいて一次健康診断段階において糖尿病前症を簡便に検査することが可能な糖尿病前症検査方法に関するものである。

### 背景技術

[0002] 世界の糖尿病患者数は、2030年までには、現在の2億8、500万人から4億人を超えと言われていて、このうちの約9割が生活習慣病を主因とする肥満糖尿病患者にあたる。わが国でも、現在では、すでに肥満糖尿病患者が約1,000万人を超えていると推定され、患者数は年々増加の一途を辿っている。

[0003] ところが、実際に糖尿病の治療を受けている糖尿病患者は、未だ300万人足らずで、十分な診断を受けずに放置して治療が遅れたために腎症に至る患者は、毎年1万人ずつ増加し続けている。

[0004] しかも、近年、糖尿病前症（いわゆる糖尿病予備軍）の中でも、空腹時血糖値（Fasting Plasma Glucose: FPG）は正常であるのに、耐糖能障害（Impaired Glucose Tolerance: IGT）のために食後血糖値が極端に高くなり（かくれ糖尿病）、これにより心血管障害を引き起こす患者が増加していることが指摘されている。このため、米国糖尿病学会や世界保健機構は、糖尿病前症をれっきとした疾患と定め、生活習慣の質的改善と薬物治療による糖尿病前症のIGT改善の重要性を唱えている。このような糖尿病前症といわれる患者が、日本でも、推定1,000万人を超えている現状を考え合わせると、糖尿病疾患者

数は近い将来激増することは想像に難くない。

- [0005] 日本糖尿病学会は、糖尿病前症や糖尿病の診断基準として、一次健康診断では空腹時血糖値（FPG）、また二次健康診断では経口ブドウ糖負荷試験（Oral Glucose Tolerance Test: OGTT）の実施を指導してきた。糖尿病前症患者のIGTは、一次健康診断のFPG検査やグリコヘモグロビン（HbA1c）検査だけでは正確に診断することが困難であるところから、一次健康診断で糖尿病前症が疑われる被検者に対しては、OGTTの二次健康診断の受診を勧められている。このOGTTは、糖摂取という身体的負担を与えるうえに、検査のために休暇取得を余儀なくされることから、OGTTの二次健康診断の受診は、糖尿病前症の罹患率が高いが仕事に追われている中高年にとっては大きな負担になっているのも事実である。しかし、二次健康診断の受診を怠ってしまう潜在的な糖尿病前症の患者は、糖尿病やその合併症を自覚することなく未治療のまま真性の糖尿病に確実に進んでいき、重篤な合併症を発症するか、腎透析を余儀なくされる結果になる。
- [0006] かかる現状を鑑みると、現在の治療費だけでも既に数兆円レベルに達する腎透析患者の原疾患である糖尿病の患者の約半数が心筋梗塞や脳梗塞などの虚血性疾患で死亡していることを考え合わせると、このままでは糖尿病とその合併症に関わる医療費の高騰は避けられないのが実情である。
- [0007] 上述したように、一次健康診断では、通常、空腹時血糖（FPG）、随時血糖あるいはグリコヘモグロビン（HbA1c）を判定指標とした検査が実施されていて、FPG値が100 mg/dL以上、または HbA1c 値が5.2%以上であれば、インスリン抵抗性もしくはそれによるIGTの疑いありと診断されている。しかし、インスリン抵抗性によるIGTは、食後高血糖が主たる初期変化として現れてくることから、従来的一次健康診断で使用されている何れの指標も精度の点で不十分と言われている。
- [0008] そこで、現実的には、一次健康診断において、これらの指標を用いてインスリン抵抗性あるいはIGTが疑われる被検者に対して、二次健康診断あるいはそれ以降の健康診断で75g 経口ブドウ糖負荷試験（75g OGTT）、血中インスリン

、Homeostasis model assessment ratio (HOMA-R) などの検査が実施され、これらの手間のかかる試験によってインスリン抵抗性もしくはIGTが陽性であるかどうかの検査が行われ、糖尿病前症の確定診断がなされている。

[0009] そこで、もし一次健康診断で用いた同じ血糖測定用採血サンプルでOGTTと同等の精度で糖尿病前症を確定できる方法があれば、糖尿病前症患者の検出率は飛躍的に向上するとともに、二次健康診断でのOGTT検査は不要となり、世界保健機構などが提唱する糖尿病前症の早期診断ならびに治療による糖尿病化阻止戦略を推し進めることが可能となる。

[0010] ここで、二次健康診断またはそれ以降の糖尿病診断で使用される検査方法について簡単に説明する。

(1) 75g 経口ブドウ糖負荷試験 (75g OGTT)

この75g 経口ブドウ糖負荷試験 (75g OGTT) は、検査時点のIGTを示す検査であり、ブドウ糖75gを含んだ溶液を飲み干した後、時間経過に従って血糖値、尿糖、血中インスリン値などを測定して経時変化を観察することからなっている。国内の診断基準では、この OGTT の2時間血糖値が採用されている。この75g OGTT は、検査に時間がかかる一方で、ブドウ糖摂取後に重篤な高血糖を招く恐れがあるため慎重に実施すべきとされている。

[0011] (2) 血中インスリン値

近年では、血中インスリン値は、診断基準には含まれていないが、メタリックシンドロームと関連しても注目されている。肥満糖尿病あるいは糖尿病前症のIGTの大きな要因として、この血中インスリンの感受性の低下すなわちインスリン抵抗性があり、そのためIGTが認められる糖尿病前症あるいは肥満糖尿病患者の血中インスリン濃度は健常人と比べて高値を示す（例えば、早朝空腹時の血中インスリン濃度が15  $\mu$ U/mL 以上の場合は、明らかなインスリン抵抗性が陽性とされ、IGTが生じている可能性が高い）。

[0012] (3) Homeostasis model assessment ratio (HOMA-R)

HOMA-R は、空腹時血糖値が140 mg/dL 以下の場合、IGTの値などとよく相関するといわれ、下記式に示す空腹時血糖値と空腹時血中インスリン濃度と

の関係によって計算される。

$$\text{HOMA-R} = \text{空腹時インスリン値} (\mu\text{U/mL}) \times \text{空腹時血糖値} (\text{mg/dL}) / 405$$

上記式において、HOMA-R が2.5以上の場合は、インスリン抵抗性があり、1.6以下では正常であるとされている。ただし、HOMA-Rは一次健康診断の項目外であり、インスリン治療中の患者には用いることができない。

[0013] (4) グルコースクランプ法

グルコースクランプ法は、グルコースとインスリンを注射し、血糖値の定常値を維持するポイントを定めることによって、インスリンが被験者の血糖値をどのくらい下げることができるのか、すなわち投与したインスリンの効果（生体のインスリン感受性）の程度を調べる方法である。このグルコースクランプ法は、現在使用されているインスリン抵抗性の測定においては、最も正確であるとされるが、処理が煩雑なので、一般病院でもあまり行われていないのが現状である。

[0014] ところで、酸化ストレス誘発因子として知られている最終糖化生成物（Advanced Glycation Endproducts: AGEs）を生成する反応として知られるメイラード反応は、生体内でも進行し、老化や既に発症した糖尿病合併症の進展に関与していることが知られている（例えば、非特許文献1参照）。

[0015] このメイラード反応は、前期段階と後期段階の2段階からなる反応であって、前期段階の反応では、タンパク質の側鎖アミノ基やN末端アミノ基と糖のカルボニル基が反応し、シッフ塩基を生成後、アマドリ転位化合物が生成される。このようにして生成した生体内に存在する該前期段階反応生成物としては、例えば、HbA1c や糖化アルブミン等が知られており、さまざまな病態、特に糖尿病に関与していることが知られている。他方、後期段階の反応では、上記前期段階反応生成物がさらに酸化・脱水・縮合・環状化等の複雑な反応を経由して、蛍光性、褐色化、分子内・分子間架橋および生物学的認識のうち少なくともどれか一つの特性を有する後期反応生成物である糖化タンパク質といわれる最終糖化生成物（AGEs）が生成される。つまり、アミノ酸、ペプチドあるいはタンパク質のアミノ基は、還元糖のアルデヒド基と非酵

素的に縮合・糖化され、糖化アミノ酸、糖化ペプチドあるいは糖化タンパク質（以下、「糖化タンパク質等」と略すこともある。）にそれぞれ変換することが知られている。

[0016] 上述したメイラード反応前期段階での反応性カルボニル生成物の一つであるメチルグリオキサール（以下、「MGO」と略すこともある。）は、特に血中に比較的多量に存在することが知られており、糖尿病患者での血清レベルが高値であること、またはストレプトゾトシンにより糖尿病を誘発したラットの眼球レンズに多量に存在することが報告されている（非特許文献2、3）。また、MGOは、生体内濃度レベルでタンパク質と反応して蛍光性の産物を生成し、AGEを生成する直接的なメディエーターとして機能するばかりではなく、糖尿病や老化との関連性（非特許文献4、5、6）あるいはインスリン抵抗性や血管障害との関連性（非特許文献7、8）なども報告されている。

[0017] このような機能を有するメチルグリオキサール（MGO）は、タンパク質を構成するアミノ酸側鎖、特に塩基性のリジンやアルギニン側鎖と化学反応し、組織再構成に関与するプロテアーゼやコラゲナーゼの酵素反応を阻害し組織障害を引き起こす一方で、代謝・調節に関わる機能タンパク質の活性中心を構成するアミノ酸側鎖を修飾失活させて代謝毒性に関与しているといわれている。しかしながら、MGOは、通常の状態、つまり酸化ストレスが亢進していない状態では、グリオキサラーゼによりd-乳酸に解毒されるが、酸化ストレスが亢進しているとされる血糖管理状態では、MGOの解毒機構に支障が生じ、神経細胞や血管内に障害を与えて、神経障害や網膜症、腎炎等の糖尿病性合併症の原因になっていると考えられている（例えば、特許文献1参照）。

[0018] そこで、MGOを糖尿病性合併症の指標として測定することは非常に有用であるけれども、MGOは化学的反応性が高く、またその含量変化のため制御困難などの理由から、その直接的な測定は極めて困難である。

[0019] ところが、生体内で解毒代謝されないで残存している過剰なMGOの一部は、その高い化学反応性により、タンパク質のアルギニン側鎖と反応して最終

糖化生成物（AGE）であるアルグピリミジン化合物（argpyrimidines： APs）やヒドロイミダゾロン化合物などのメチルグリオキサール-アルギニン付加物（methylglyoxal-arginine adduct）を生成すること（例えば、非特許文献 9、10 参照）が知られている。そこで、このメチルグリオキサール-アルギニン付加物に着目して、これを測定してMGOを間接的に測定する試みがなされている。

- [0020] 実際にMGOで修飾されたアミノ酸に対するポリクローナル抗体を使用した免疫組織学的研究では、ヒト動脈硬化病巣にはこのポリクローナル抗体により強く染色される部位が存在することが報告されている（例えば、非特許文献 11 参照）。さらに、アルグピリミジンを特異的に認識できるとされる抗モノクローナル抗体（例えば、特許文献 1、3、4 参照）を使用して、メチルグリオキサール-アルギニン付加物を測定した結果、糖尿病性腎症や虚血性脳梗塞における脳動脈障害部の特異的免疫染色に有用とする報告（例えば、非特許文献 12 参照）、糖尿病性網膜症発症部位との関連性を示唆する報告（例えば、非特許文献 13 参照）、および糖尿病患者における血管合併症発症に有用とされる報告（例えば、非特許文献 14 参照）がなされている。
- [0021] 上述したような背景から、アルグピリミジンまたはその部位を特異的に検出することにより糖化タンパク質を検出することは、臨床学上あるいは分析方法上非常に有用であると考えられる。そこで、上記抗モノクローナル抗体を使用したメチルグリオキサール-アルギニン付加物の測定方法が提示されている（例えば、特許文献 1、3、5 参照）。これらの先行技術文献には、いずれも既に発症した（血糖値が明らかに上昇した）糖尿病又は糖尿病合併症用マーカーとして利用できる可能性については記載されているが、インスリン抵抗性によるIGTを引き起こしている糖尿病前症の診断マーカーとしての有用性については一切記載も、示唆もされていない。
- [0022] かかる AGE 誘導体に対する抗体による免疫学的研究により、かかる AGE 誘導体は、老化・糖尿病や、糖尿病性腎炎等で陽性であることが報告されている（例えば、非特許文献 15、16、17 参照）。また、かかる AGE 誘導体

の一つであるカルボキシメチルリジンが、既に発症した（空腹時あるいは随時血糖値が明らかに上昇した）糖尿病の合併症診断用マーカーとして利用できることも記載されている（例えば、特許文献2参照）。しかしながら、この AGE 誘導体が、糖尿病前症に対する診断マーカーとして利用できるかどうかについては一切記載も、示唆もされていない。

### 先行技術文献

#### 特許文献

- [0023] 特許文献1：特開2004-309147号（特許第4146264号）  
特許文献2：特開平9-178740号  
特許文献3：特開平11-246600号（特許第4013312号）  
特許文献4：特開平11-246599号  
特許文献5：特開2004-309147号（特許第4146264号）

#### 非特許文献

- [0024] 非特許文献1：Bio Industry, Vol. 3, No. 7, p. 14, 1996  
非特許文献2：Biochem. Pharmacol., Vol. 46, pp. 805-811, 1993  
非特許文献3：Clin. Sci., Vol. 87, pp-21-29, 1994  
非特許文献4：Biochim. Biophys. Acta., Vol. 1270, pp. 36-43, 1995  
非特許文献5：J. Biol. Chem., Vol. 269, pp. 32299-32305, 1994  
非特許文献6：J. Biol. Chem., Vol. 267, pp. 4364-4369, 1992  
非特許文献7：Diabetes, Vol. 55, pp. 1289-1299, 2006  
非特許文献8：J. Cell Biochem., Vol. 103, pp. 1144-1157, 2008  
非特許文献9：Archives Of Biochemistry And Biophysics, 1997, Vol. 344, No. 1, pp. 29-36  
非特許文献10：Invest6. Ophthalmol. Vis. Sci., December 2003, vol. 44, no. 12, pp. 5287-5292  
非特許文献11：FEBS Letters, Vol. 410, pp. 313-318, 1997  
非特許文献12：The Journal Of Biological Chemistry 1999, Vol. 274, No. 26, pp. 18492-18502



非特許文献13 : Current Eye Research 2001, Vol. 23, No. 2, pp. 106-115

非特許文献14 : The Journal Of Biological Chemistry 1998, Vol. 273, No. 12, pp. 6928-6936

非特許文献15 : J. Clin. Invest., 85, 380-384, 1990

非特許文献16 : J. Biol. Chem., 263, 3758-3764, 1989

非特許文献17 : J. Clin. Invest., 89, 1102-1112, 1992

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0025] 本発明者は、糖尿病前症の診断を有効、迅速かつ簡便に実施する技術を開発するため鋭意検討・研究した結果、生体検体中の生体内物質であるアルグピリミジン化合物（以下、「AP化合物」ともいう）やヒドロイミダゾロン化合物などのメチルグリオキサール修飾アルギニン誘導体を診断マーカーとして測定することによって、インスリン抵抗性またはそれによるIGT（IGT）の検査を、有効、迅速かつ簡便に実施できるインスリン抵抗性またはIGT検査方法を見出すとともに、それに基づいた糖尿病前症の検査をする糖尿病前症方法、とりわけ一次健康診断において実施可能な糖尿病前症の検査方法を見出した。

[0026] つまり、本発明者は、メチルグリオキサール（MGO）タンパク結合体であるAP化合物などのメチルグリオキサール修飾アルギニン誘導体がIGT誘発因子として作用している可能性もあることに着目して鋭意研究・検討の結果、メチルグリオキサール修飾アルギニン誘導体の増加と、IGTの進行との間に密接な関連性を見出して、生体検体中のメチルグリオキサール修飾アルギニン誘導体の測定によってIGTの検査が可能となり糖尿病前症を一次健康診断で検査できることを見出した。

[0027] また、本発明者は、メチルグリオキサール修飾アルギニン誘導体を選択的に認識可能なモノクローナル抗体を用いて、血中APと肥満による内臓脂肪の増加との関連性を調べた結果、血中メチルグリオキサール修飾アルギニン誘導体と内臓脂肪の増加との間に相関関係があることを見出した。したがって、

この発明は、これらの知見を基にして完成するに至った。

[0028] さらに、本明細書で使用する用語「糖尿病前症」または「前症」とは、空腹時血糖（FPG）においては平常値または平常値よりやや高い値、つまり100 mg/dL以上で110 mg/dL未満あるいは126 mg/dL未満である場合にその発症が疑われ、糖負荷（OGTT）試験において糖負荷2時間後の血糖値が140-199 mg/dlである場合に該当する（日本糖尿病学会ガイドライン2010/2009新区分）。つまり、糖尿病前症または前症の患者は、日本では、いわゆる糖尿病の予備軍といわれる患者である。ただし、米国糖尿病学会や世界保健機構では、前症は、すでに食後高血糖などによって動脈硬化が進行するリスクが高いいっきとした疾患であることを認めている。ちなみに、空腹時血糖（FPG）が126 mg/dL以上であるか、または糖負荷（OGTT）による血糖値が200 mg/dl以上である場合は、糖尿病と診断される。

[0029] したがって、この発明の目的は、血液検体などの検体中のAP化合物やヒドロイミダゾロン化合物などのメチルグリオキサール修飾アルギニン誘導体を測定することによってとりわけ糖尿病前症におけるインスリン抵抗性もしくはIGTの有無を検査することからなる糖尿病前症の検査方法を提供することである。

[0030] この発明は、その好ましい態様として、AP化合物やヒドロイミダゾロン化合物などのメチルグリオキサール修飾アルギニン誘導体を特異的に認識する抗体、例えばモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を用いた測定系、好ましくはEnzyme-linked immunosorbent assayの意味“Enzyme-linked immunosorbent assay（以下、ELISA測定系と略すこともある）測定系を用いて、血液などの生体検体中のメチルグリオキサール修飾アルギニン誘導体を測定することによる糖尿病前症の検査方法を提供することを目的としている。

[0031] また、この発明は、そのより好ましい態様として、検体中のAP化合物やヒドロイミダゾロン化合物などのメチルグリオキサール修飾アルギニン誘導体と、抗メチルグリオキサールモノクローナル抗体などの一次抗体とを反応さ

せる一次抗体反応工程と；血清アルブミン（BSA）などのタンパク質とメチルグリオキサール（MGO）とを反応させて得られるタンパク質－メチルグリオキサール（MGO）コンジュゲートを固相化する固相化工程と；該固相化タンパク質－MGOコンジュゲートに、該一次抗体反応工程で処理した該検体を添加して該タンパク質－MGOコンジュゲートのMGOと、該検体中の一次抗体とを反応させるMGO－一次抗体反応工程と；および該MGO－一次抗体反応工程で反応させた一次抗体を、標識二次抗体と反応させて、該標識二次抗体を測定する測定工程と；によって糖尿病前症の検査方法を提供することを目的としている。

[0032] さらに、この発明は、そのより好ましい態様として、検体中のメチルグリオキサール（MGO）値を、標準サンプル中のメチルグリオキサール（MGO）値の検量線に基づいて定量される糖尿病前症の検査方法を提供することを目的としている。

[0033] この発明は、別の形態として、上記の糖尿病前症におけるインスリン抵抗性またはIGT検査による結果に基づいて糖尿病前症を検査することからなる糖尿病前症の検査方法を提供することを目的としている。この発明の糖尿病前症の検査方法は、基準血糖値が特に110 mg/dl未満である血液検体についての検査が有用である。

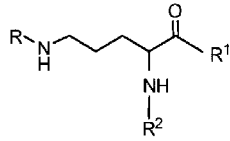
[0034] この発明は、さらに別の形態として、上記測定方法によって糖尿病前症を検査するための測定用キットを提供することを目的としている。

[0035] なお、本明細書において、単に「AP化合物」または「アルグピリミジン化合物」もしくは関連した用語を例に挙げて説明した場合でも、その用語に限定して解釈をすべき場合を除いて、その用語は、AP化合物に加えて、ハイドロイミダゾロン化合物などのメチルグリオキサール修飾アルギニン誘導体を包含して解釈すべきである。

### 課題を解決するための手段

[0036] 上記目的を達成するために、この発明は、血液などの生体検体中の一般式 [1] :

[化1]

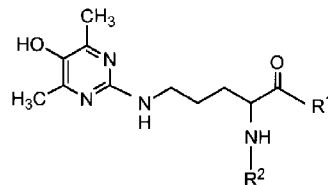


(式中、Rは、N含有複素環式基を意味し、R<sup>1</sup>は、水素原子、ヒドロキシ基、タンパク質残基またはペプチド残基を意味し、R<sup>2</sup>は、水素原子、アセチル基、タンパク質残基またはペプチド残基を意味する。)

で表されるメチルグリオキサール修飾アルギニン誘導体を測定することによる糖尿病前症の検査方法を提供する。

[0037] この発明は、その好ましい態様として、メチルグリオキサール修飾アルギニン誘導体を測定することによる糖尿病前症の検査方法であって、メチルグリオキサール修飾アルギニン誘導体 [I] が、一般式 [II] :

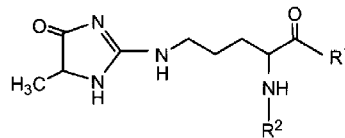
[化2]



(式中、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は前記と同じ意味を有する。)

で表されるアルグピリミジン化合物、または一般式 [III] :

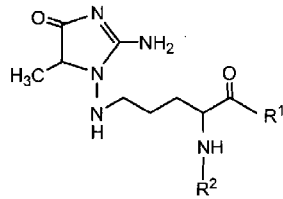
[0038] [化3]



(式中、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は前記と同じ意味を有する。)、もしくは一般式 [IV] :

[0039]

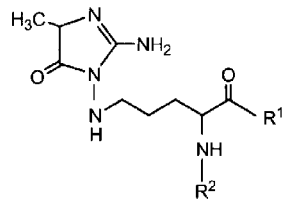
[化4]



(式中、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は前記と同じ意味を有する。)、もしくは一般式 [V]

:

[0040] [化5]

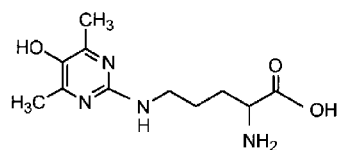


(式中、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は前記と同じ意味を有する。)

で表されるヒドロイミダゾロン化合物であることからの糖尿病前症の検査方法を提供する。

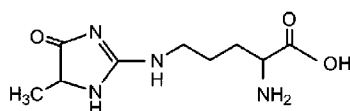
[0041] この発明は、そのより好ましい態様として、アルグピリミジン化合物 [II] が、式 [VI] :

[化6]



で表されるアルグピリミジン、またはヒドロイミダゾロン化合物 [III] が、式 [VII] :

[化7]



で表されるヒドロイミダゾロンであることからなる糖尿病前症の検査方法を提供する。

[0042] この発明は、AP化合物やヒドロイミダゾロン化合物などのメチルグリオキサール修飾アルギニン誘導体の特異的に認識する抗体、例えばモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を用いた測定系、好ましくはELISA 測定系によって、血液などの検体中のメチルグリオキサール修飾アルギニン誘導体を測定することからなる糖尿病前症の検査方法を提供する。

[0043] この発明の好ましいより具体的態様は、上記測定系が、検体中のアルグピリミジン化合物と、抗メチルグリオキサールモノクローナル抗体などの一次抗体とを反応させる一次抗体反応工程と；血清アルブミン（BSA）とメチルグリオキサール（MGO）とを反応させて得られる血清アルブミン（BSA）-メチルグリオキサール（MGO）コンジュゲートを固相化する固相化工程と；該固相化工程にて固相化した該BSA-MGOコンジュゲートに、該一次抗体反応工程で処理した該検体を添加して該BSA-MGOコンジュゲートのMGOと、該検体中の一次抗体とを反応させるMGO-一次抗体反応工程と；および該MGO-一次抗体反応工程で反応させた一次抗体を、標識二次抗体と反応させて、該標識二次抗体を測定する測定工程と；からなる糖尿病前症の検査方法を提供する。

[0044] この発明は、さらに好ましい態様として、測定したメチルグリオキサール値を、標準サンプルの検量線に基づいて検体中のメチルグリオキサール量を定量することからなる糖尿病前症の検査方法を提供する。

[0045] この発明は、さらに別の形態として、上記の糖尿病前症におけるインスリン抵抗性またはIGT検査方法による結果に基づいて糖尿病前症の有無を検査することからなる糖尿病前症の検査方法を提供することである。この発明の糖尿病前症の検査方法は、基準血糖値が特に110 mg/dl未満である血液検体についての検査において有用である。

[0046] この発明は、さらに別の形態として、上記測定方法によって糖尿病前症を検査するための下記組成からなる糖尿病前症の検査用キットを提供する：

[0047] AP化合物やヒドロイミダゾロン化合物などのメチルグリオキサール修飾ア

ルギニン誘導体；1次抗体；メチルグリオキサール（MGO）とウシ血清アルブミン（BSA）とのBSA-MGOコンジュゲートを固相化した固相化プレート；2次抗体；標識抗体（例えばHRP標識抗体等）ならびに標準検体の標準曲線。

### 発明の効果

[0048] この発明に係るAP測定方法は、血糖値測定と同じ血液サンプルで簡便でかつ多検体処理を可能にするものであり、一次健康診断で実施される一回の採血で済む。これまでの二次健康診断での被験者の拘束時間や煩雑さあるいは危険性などの問題によりあまり普及していなかった糖尿病前症診断が、ELISAなどによりAP化合物を測定する技術を用いることで容易かつ安全に実施出来るという大きな効果がある。従って、この発明は、糖尿病前症におけるインスリン抵抗性あるいはIGT検査をより簡便化し、血糖値などの測定だけでは困難である潜在的な糖尿病前症の早期診断を可能にすることで、米国糖尿病学会や世界保健機関が提唱する糖尿病前症から糖尿病への移行を防ぐための早期治療（糖尿病の未病治療）が実現可能となり、その後の糖尿病進展あるいは合併症の発症を予防可能となるばかりでなく、これらに関わる治療費の大幅な削減が可能となるなど、その効果は計り知れないものがあると期待される。

### 図面の簡単な説明

- [0049] [図1] 図1はB6マウス6週齢を基準としたB6マウス10-27週齢の血糖値変化を示す図である。
- [図2] 図2はB6マウス6週齢を基準としたB6マウス10-27週齢の血中インスリン値変化を示す図である。
- [図3] 図3はB6マウス6週齢を基準としたB6マウス10-27週齢の内臓脂肪量変化を示す図である。
- [図4] 図4は、B6マウス6週齢を基準としたB6マウス10-27週齢の血中AP値変化を示す図である。
- [図5] 図5は対照群ラットとフルクトース群ラットの糖（グルコース）負荷前（0分）ならびに糖負荷後の血糖値の時間的推移を示す図である。

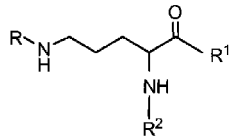
[図6] 図6は対照群ラットとフルクトース群ラットの各々血中AP値を示す図である。

### 発明を実施するための形態

[0050] この発明では、一次健康診断で採血される血液サンプル中に含まれる成分の生体内物質であるメチルグリオキサール修飾アルギニン誘導体を血液マーカーとして測定して、その測定結果から糖尿病前症におけるインスリン抵抗性ならびにIGTの有無を検査し、その結果を基にして糖尿病前症の検査をする糖尿病前症の査方法を提供している。

[0051] この発明に係るインスリン抵抗性もしくはIGTの検査においては、血液などの生体検体中に含まれる一般式 [I] :

[化8]

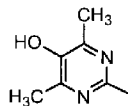


(式中、Rは、N含有複素環式基を意味し、R<sup>1</sup>は、水素原子、ヒドロキシ基、タンパク質残基またはペプチド残基を意味し、R<sup>2</sup>は、水素原子、アセチル基、タンパク質残基またはペプチド残基を意味する。)

で表されるメチルグリオキサール修飾アルギニン誘導体が測定される。

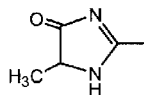
[0052] この発明において、上記メチルグリオキサール修飾アルギニン誘導体 [I] における記号Rで表されるN含有複素環式基としては、式 [VI] :

[化9]



で表されるピリミジニル基、または式 [VII] :

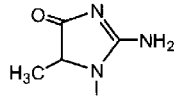
[0053] [化10]





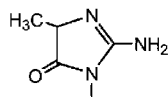
で表されるヒドロイミダゾロニル基、もしくは式 [VIII] :

[0054] [化11]



で表されるヒドロイミダゾロニル基、もしくは式 [IX] :

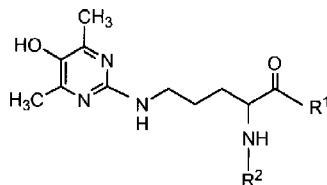
[0055] [化12]



で表されるヒドロイミダゾロニル基などが挙げられる。

[0056] 換言すると、この発明に使用するメチルグリオキサール修飾アルギニン誘導体 [I] としては、一般式 [II] :

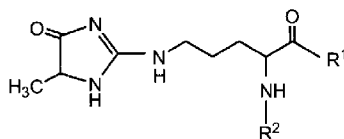
[化13]



(式中、 $R^1$ および $R^2$ は前記と同じ意味を有する。)

で表されるアルグピリミジン化合物、または一般式 [III] :

[0057] [化14]

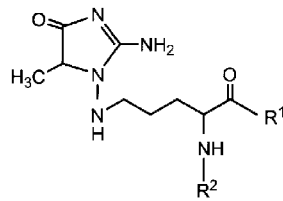


(式中、 $R^1$ および $R^2$ は前記と同じ意味を有する。)

で表されるヒドロイミダゾロン化合物、もしくは一般式 [IV] :

[0058]

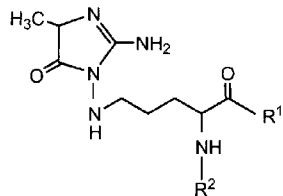
[化15]



(式中、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は前記と同じ意味を有する。)

で表されるヒドロイミダゾロン化合物、もしくは一般式 [V] :

[0059] [化16]

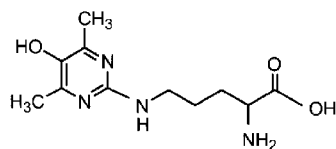


(式中、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は前記と同じ意味を有する。)

で表されるヒドロイミダゾロン化合物などが挙げられる。

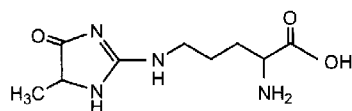
[0060] 更に具体的には、アルグピリミジン化合物 [II] が、式 [VI] :

[化17]



で表されるアルグピリミジン、またはヒドロイミダゾロン化合物 [III] が、式 [VII] :

[0061] [化18]



で表されるヒドロイミダゾロンである。

[0062] この発明において、AP 化合物の測定は、AP 化合物を特異的に認識する抗体

を用いた測定系を用いて行われる。かかる抗体としては、AP 化合物を特異的に認識する抗体であればいずれも使用することができ、またモノクローナル抗体であっても、ポリクローナル抗体であってもよい。また、測定系としては、上記AP化合物の特異的認識可能抗体を用いたELISA 測定系が好ましく、ELISA 測定系を使用することにより、血液中の AP 化合物を簡便かつ精度よく、しかも多数の検体を同時に処理することが可能である。なお、この発明に使用される ELISA 測定系は、当該技術分野で慣用されている測定系を使用することができるが、特定の ELISA 測定系に限定されるものではなく、AP化合物の特異的認識可能抗体を用いた測定系であればいずれも使用できる。

[0063] この発明に係る糖尿病前症におけるインスリン抵抗性もしくはIGT検査方法における ELISA 測定系は：検体中のアルグピリミジン化合物と一次抗体とを反応させる一次抗体反応工程；

血清アルブミン（BSA）とメチルグリオキサール（MGO）とを反応させて得られる血清アルブミン（BSA）－メチルグリオキサール（MGO）コンジュゲートを固相化する固相化工程；

該固相化工程にて固相化した該BSA－MGOコンジュゲートに、該一次抗体反応工程で処理した該検体を添加して該BSA－MGOコンジュゲートのMGOと、該検体中の一次抗体とを反応させるMGO－一次抗体反応工程；および

該MGO－一次抗体反応工程でMGOと反応させた一次抗体を、標識二次抗体と反応させて、発色により該標識二次抗体を測定する測定工程；

とからなっている。

[0064] この発明において、一次抗体を被験検体である血液検体に添加し、被験検体に存在するアルグピリミジン（AP）化合物と反応させる。この発明において一次抗体として使用する抗モノクローナル抗体としては、特に先行技術文献記載の抗 MGO モノクローナル抗体を使用するのがよい（例えば、特許文献 1、2、3 参照）。ただし、この発明に使用できる抗体は、抗モノクローナル抗体に限定されるものではなく、アルグピリミジン構造を認識できる抗体であればいずれも使用することができ、ポリクローナル抗体でもよい。

- [0065] 一方、メチルグリオキサール (MGO) とウシ血清アルブミン (BSA) とを反応させてコンジュゲートを作成し、得られたBSA-MGOコンジュゲートをプレートのウェル中に常法により固相化する。この固相化BSA-MGOコンジュゲートに上記被験検体を添加して、上記被験検体に残存する抗MGOモノクローナル抗体を固相化BSA-MGOコンジュゲートのMGOと反応させて、MGOと抗MGOモノクローナル抗体とを反応させる。次に、固相化BSA-MGOコンジュゲートのMGOと反応させた抗MGO抗体を二次抗体としての標識抗体、例えばHRP標識抗体と反応させた後、発色させてMGOを測定する。
- [0066] 他方、標準検体としてBOC-アルグピリミジンを含む溶液を作成し、上記と同様に処理して発色させてアルグピリミジン量を測定して、標準曲線を作成する。この標準検体の標準曲線に基づいて該検体中のメチルグリオキサール量を測定することによって被験検体中のアルグピリミジン量を算出する。これによって被験者の糖尿病前症を検査することができる。
- [0067] この発明において、糖尿病前症におけるインスリン抵抗性もしくはIGTの検査は、マウスモデルまたはラットモデルを使用してアルグピリミジン (AP) 値を測定することによっても行うことができる。使用するマウスモデルとしては、例えば、正常 (対照) マウスおよび加齢による糖尿病前症マウスなどを使用することができる。使用するラットモデルとしては、例えば、正常 (対照) ラットおよびフルクトース負荷による糖尿病前症ラットなどを使用することができる。
- [0068] ただし、一般に、ELISAによる測定値は、用いる抗体や標準物質などによって変動すること、また同一の抗体と標準物質を用いてELISAで測定した場合でも、その値は種によって異なることが考えられる。そこで、アルグピリミジン (AP) 測定による糖尿病前症もしくは肥満糖尿病の診断方法としては、アルグピリミジン (AP) 実測値による方法の他に、アルグピリミジン (AP) の正常値と病態モデルの測定値の比を算出し、その比に基づいて糖尿病前症を検査する方法が考えられる。
- [0069] この発明において、マウスモデルまたはラットモデルを使用してアルグピリ

ミジン（AP）実測値による糖尿病前症におけるインスリン抵抗性またはIGTを検査することによって糖尿病前症を検査する場合は、測定したアルグピリミジン（AP）値が下記の場合にインスリン抵抗性またはIGTありと判定することができ、さらにAP値の範囲に基づいて糖尿病前症を判定することができる。すなわち、

[0070] （１）マウスモデルを使用する場合：

正常（B6マウス 6 週齢）マウスの場合、

アルグピリミジン（AP）値＝0.05～0.08 nmol/mg protein以下；インスリン抵抗性またはIGTなし（－）。

糖尿病前症マウス（加齢B6マウス 27 週齢）の場合、

アルグピリミジン（AP）値＝0.10 ～ 0.14 nmol/mg protein；インスリン抵抗性またはIGTあり（＋）。

[0071] （２）ラットモデルを使用する場合：

正常（対照）ラットを使用したとき、

アルグピリミジン（AP）値が、0.10～0.13 nmol/mg protein；インスリン抵抗性またはIGTなし（－）。もしくは

フルクトース負荷（境界型）ラットを使用したとき、

アルグピリミジン（AP）値 = 0.13 ～ 0.30 （好ましくは0.20） nmol/mg protein；軽度のインスリン抵抗性またはIGTあり（＋）。

[0072] この発明によれば、上記AP測定方法によって測定した結果に基づいてインスリン抵抗性またはIGTが陽性であるかどうかの評価をすることが可能である。したがって、この発明は、上記AP測定方法によってAPを測定することによって、その実測値あるいは正常値を 1 とした場合の比率から、糖尿病前症におけるインスリン抵抗性またはIGTの有無の評価を可能にし、空腹時血糖が正常もしくはほぼ正常範囲にあっても糖尿病前症と検査することができる糖尿病前症の検査方法を提供する。

[0073] また、この発明は、上記AP測定方法にてインスリン抵抗性またはIGTの推移をモニターすることも可能である。さらに、この発明は、上記AP測定方法に

てインスリン抵抗性またはIGTの程度をモニターすることによって、糖尿病とりわけ糖尿病前症の予防ならびに治療に有効な薬剤のスクリーニングをすることも可能である。

[0074] さらにまた、この発明は、上記AP測定方法にてインスリン抵抗性またはIGTを検査するためのインスリン抵抗性またはIGTの検査用キットを提供する。このインスリン抵抗性またはIGTの検査用キットは、標準アルグピリミジン（AP）化合物と、1次抗体としての抗AP抗体、好ましくは抗APモノクローナル抗体と、メチルグリオキサール（MGO）とウシ血清アルブミン（BSA）とのBSA-MGOコンジュゲートを固相化した固相化プレートと、2次抗体としての抗メチルグリオキサール（MGO）抗体、好ましくは抗MGO抗体と、標識抗体（例えばHRP標識抗体等）ならびに標準検体の標準曲線とからなるのが好ましい。このような構成からなるインスリン抵抗性またはIGTの検査用キットを使用することによって、血液中のアルグピリミジン（AP）化合物を簡便にかつ迅速に算出することができ、これによって糖尿病前症におけるインスリン抵抗性またはIGTを簡便にかつ迅速に検査することができると共に、糖尿病前症検査のためのインスリン抵抗性またはIGTの評価およびモニター／スクリーニングをすることができる。

[0075] 以下、この発明を実施例により具体的に説明する。なお、この発明は下記実施例に限定されるものでは一切なく、また下記実施例は、この発明をより詳細に説明するための例示的説明に過ぎず、この発明を限定する意図では一切ない。

## 実施例 1

[0076] 本実施例では、糖尿病前症マウスの作製方法について説明する。

5週齢のC57BL/6J（以下、「B6 マウス」と略す）は、日本チャールス・リバー（株）より購入した。動物は入荷後、動物飼育室内に搬入し、12時間の明暗サイクル下、餌として実験動物固形飼料（オリエンタル酵母（株））を、飲料水として水道水を自由に摂取できるようにした環境下にて目的週齢まで飼育し、実験に用いた。

## 実施例 2

[0077] 上記マウスにネンブタール注射液 1 mL/kg 体重を腹腔内投与して十分麻酔し、体重測定後、ヘパリン処理注射器にて心臓から採血した。得られた血液は 4°C、1,000 g で 10 分間遠心分離し、血漿サンプルを得た。また、採血後に内臓脂肪を採取し、マウスを安楽死させた。採取した内臓脂肪量を測定し、その結果を図 3 に示す。

## 実施例 3

[0078] 血糖値の測定はグルテストセンサー（株式会社三和化学研究所）を用いて行った。また、血中インスリン値の測定は、超高感度マウスインスリン測定キット（森永生科学研究所）を用いて行った。血糖値および血中インスリンの測定結果は図 1 および図 2 にそれぞれ示す。

## 実施例 4

[0079] 血液 AP の測定は次のようにして行った。まず、固相化用タンパク質を調製し、マイクロプレートに固相化して調整した。固相化用タンパク質は、牛血清アルブミン (BSA) (1  $\mu$ g/mL) と MGO (40  $\mu$ M) を、遮光下 37°C で 24 時間インキュベートさせて固相化用蛋白質である BSA-MGO コンジュゲートを作成して調製した。この BSA-MGO コンジュゲートを 0.5  $\mu$ g/ウエルとなるように 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) にて希釈し、96 ウエルマイクロプレートの各ウエルに 100  $\mu$ L 添加した。次いで、37°C で 2 時間静置して固相化させた後、プレートを 0.05% リン酸緩衝液-ツイーン（登録商標）で 3 回洗浄して、プレートをブロッキング液にてブロッキングした。

[0080] 次に、血漿サンプルあるいはスタンダード液を、1 次抗体である抗メチルグリオキサール (MGO) モノクローナル抗体と反応させた。血漿サンプルは、リン酸緩衝液 (pH 7.4) によってタンパク量が 1  $\mu$ g/50  $\mu$ L になるように希釈調整し、その血漿サンプル 200  $\mu$ L を、10 mM リン酸緩衝液にて 150 倍に希釈した抗 MGO モノクローナル抗体と 37°C で 1 時間反応させた。一方、各種濃度の BOC-アルグピリミジンを含むスタンダード液を、上記と同様に、10 mM リン酸緩衝液にて 150 倍に希釈した抗 MGO モノクローナル抗体と 37°C で 1 時間反応

させた。

[0081] その後、上記で得られた血漿サンプルあるいはスタンダード液と抗MGO抗体との反応液を、プレートの各ウエルに100 $\mu$ L添加し、37 $^{\circ}$ Cで1時間静置して固相化タンパク質との競合反応を行なった。十分反応させた後、プレートを0.05% リン酸緩衝液-ツイーン（登録商標）で洗浄した。各ウエルにブロッキング液にて10,000倍に希釈したビオチン標識2次抗体を100 $\mu$ L添加し、37 $^{\circ}$ Cで1時間静置した。洗浄後、プレートに発色用溶液を100 $\mu$ L添加し、室温で15分程度静置した後、0.5 M 硫酸を100 $\mu$ L添加し反応を停止させた。反応停止後10分以内に、450 nmにて吸光度を測定した。測定結果は図4に示す。

[0082] B6マウスの加齢による糖尿病前症化についての図1に示す結果から、B6マウス10-27週齢の空腹時血糖値は、B6マウス6週齢の場合と差は無かった。しかし、図2に示すように、B6マウス27週齢の血中インスリン濃度は、6週齢に較べて3倍以上に有意に増加していた。また、図3に示すように、B6マウス27週齢の内臓脂肪量は6週齢に較べて顕著に増加していた。さらに図4に示すように、B6マウス27週齢の血液AP値は6週齢に較べて最大で2倍程度にまで有意に増加していた。

[0083] 以上のように、B6マウス27週齢は、6週齢と較べて血糖値は変わらないにも拘らず、インスリン濃度が顕著に増加し、さらにインスリン抵抗性の主因と言われる内臓脂肪の蓄積が観察された。従って、B6マウス27週齢では6週齢時と較べて加齢による明白な糖尿病前症が生じており、27週齢時で増加を認められた血液APは糖尿病前症患者におけるインスリン抵抗性あるいはIGTの検査として有用であり、糖尿病前症の診断に用いることが可能と考えられる。

## 実施例 5

[0084] 6週齢の雄性SDラットを、12時間の明暗サイクルの下、実験動物固形飼料（オリエンタル酵母株式会社）ならびに水道水を自由に摂取できるようにして1週間予備飼育した後、実験に用いた。IRモデルラットは、水道水の代



わりに15%フルクトース水を4週間自由飲水させることにより作製した（以下、フルクトース群と略すことがある）。他方、別のラットには水道水を自由飲水させた（以下、対照群と略すことがある）。

- [0085] 上記ラットを用いて、糖負荷による耐糖能を調べるために次のような試験を行った。上記のように15%フルクトース水あるいは対照群として水道水で4週間飼育したラットを19時間絶食し、尾静脈からAPならびに空腹時血糖値（0分）測定用の血液サンプルを採取した。次に、糖（グルコース 2 g/kg）をラットの腹腔内に投与し、30～120分後に尾静脈採血し、それぞれ血糖値を測定した。血糖値測定にはグルテストセンサー（株式会社三和化学研究所）を用いた。その結果を、縦軸に血糖値、横軸に糖負荷後の時間経過をとり、対照群とフルクトース群の血糖値の時間的推移を測定した。図5に示すように、フルクトース群では正常である対照群と較べて空腹時血糖値は変わらないものの、糖負荷30分後の血糖値は有意に上昇しており、IGTが認められた。このことから、フルクトース群では糖尿病前症が生じていることが確認された。

## 実施例 6

- [0086] 実施例5で別途採取調製したラットの血漿よりアルグピリミジン（AP）を測定した。ラットの尾静脈から採血した血漿サンプルにリン酸緩衝液（pH 7.4）を用いてタンパク量が $1\mu\text{g}/50\mu\text{L}$ になるように調整し、実施例4と実質的に同様に、処理して、その血漿アルグピリミジン（AP）値を450 nmの吸光度で測定した。図6示すように、フルクトース群のAP値は、対照群よりも有意に増加した。
- [0087] 以上の実験結果より、フルクトース群では糖尿病前症の発現が確認され、さらに血液APも増加していた。既にフルクトース投与によりネズミは高インスリン血症、インスリン抵抗性ならびにIGTなどを呈することが知られているが、さらに今回の結果も踏まえると、血液AP値の測定は糖尿病前症におけるインスリン抵抗性あるいはIGT検査として有用であり、本疾患の検査に用いることができると考えられる。

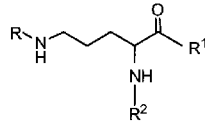
### 産業上の利用可能性

[0088] この発明に係るAP測定方法は、一次健康診断において血糖値測定用のサンプルを用いることが出来、さらに簡便で多検体が同時に処理可能である。そこで、AP測定による糖尿病前症の検査が一次健康診断で実施されれば、血糖値などの測定だけでは検出が困難であるかくれ糖尿病などの糖尿病前症の早期掘り起こしが可能となる。このように一次健康診断で糖尿病前症の診断ができれば、二次健康診断でのOGTTなどのような、被検者に対する長い拘束時間や糖負荷による危険性を回避することが可能となる。その結果、糖尿病への移行を防ぐための早期治療、つまり糖尿病の未病治療が実現可能となり、その後の糖尿病への進展あるいは合併症の発症を予防可能となるばかりでなく、これらに関わる治療費の大幅な削減が可能となるなど、計り知れない効果をもたらすものと期待できる。

## 請求の範囲

[請求項1] 一般式 [I]:

[化1]

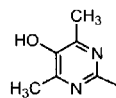


(式中、Rは、N含有複素環式基を意味し、R<sup>1</sup>は、水素原子、ヒドロキシ基、タンパク質残基またはペプチド残基を意味し、R<sup>2</sup>は、水素原子、アセチル基、タンパク質残基またはペプチド残基を意味する。)

で表されるメチルグリオキサール修飾アルギニン誘導体を測定することによって、糖尿病前症におけるインスリン抵抗性ならびに耐糖能障害 (IGT) の有無を検査し、その結果を基にして糖尿病前症の検査をすることを特徴とする糖尿病前症の検査方法。

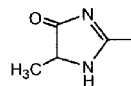
[請求項2] 請求項1に記載する糖尿病前症の検査方法であって、記号Rで表されるN含有複素環式基が、式 [VI] :

[化2]



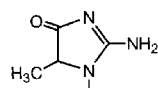
で表されるピリミジニル基、または式 [VII] :

[化3]



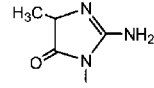
で表されるヒドロイミダゾロニル基、もしくは式 [VIII] :

[化4]



で表されるヒドロイミダゾロニル基、もしくは式 [IX] :

[化5]

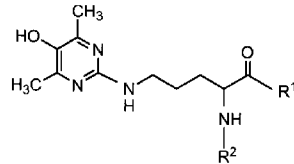


で表されるヒドロイミダゾロニル基であることを特徴とする糖尿病前症の検査方法。

[請求項3]

請求項 1 または 2 に記載の糖尿病前症の検査方法であって、メチルグリオキサール修飾アルギニン誘導体 [I] が、一般式 [II] :

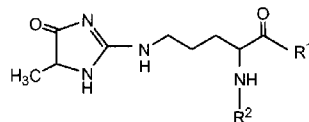
[化6]



(式中、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は前記と同じ意味を有する。)

で表されるアルグピリミジン化合物、または一般式 [III] :

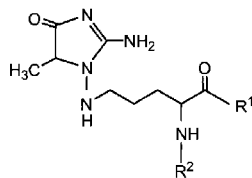
[化7]



(式中、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は前記と同じ意味を有する。)

で表されるヒドロイミダゾロン化合物、もしくは一般式 [IV] :

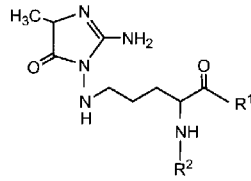
[化8]



(式中、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は前記と同じ意味を有する。)

で表されるヒドロイミダゾロン化合物、もしくは一般式 [V] :

[化9]



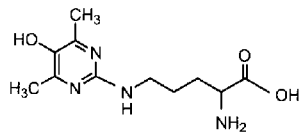
(式中、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は前記と同じ意味を有する。)

で表されるヒドロイミダゾロン化合物であることを特徴とする糖尿病前症の検査方法。

[請求項4]

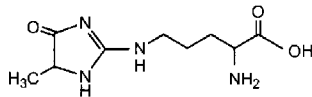
こ請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の糖尿病前症の検査方法であって、前記メチルグリオキサール修飾アルギニン誘導体 [I] が、式 [VI] :

[化10]



で表されるアルグピリミジン、または式 [VII] :

[化11]



で表されるヒドロイミダゾロンであることを特徴とする糖尿病前症の検査方法。

[請求項5]

請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の糖尿病前症の検査方法であって、前記メチルグリオキサール修飾アルギニン誘導体を、該メチルグリオキサール修飾アルギニン誘導体を認識する抗体を用いた測定系で測定することを特徴とする糖尿病前症の検査方法。

[請求項6]

請求項 5 に記載の糖尿病前症の検査方法であって、前記抗体が前記メチルグリオキサール修飾アルギニン誘導体を特異的に認識するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体であることを特徴とする糖

尿病前症の検査方法。

[請求項7] 請求項5または6に記載の糖尿病前症の検査方法であって、該測定系がE L I S A測定系であることを特徴とする糖尿病前症の検査測定方法。

[請求項8] 請求項5ないし7のいずれか1項に記載の糖尿病前症の検査方法であって、該測定系が：

検体中のメチルグリオキサール修飾アルギニン誘導体と一次抗体とを反応させる一次抗体反応工程；

血清アルブミンとメチルグリオキサールとを反応させて得られる血清アルブミン-メチルグリオキサールコンジュゲートを固相化する固相化工程；

該固相化工程にて固相化した該血清アルブミン-メチルグリオキサールコンジュゲートに、該一次抗体反応工程で処理した該検体を添加して該血清アルブミン-メチルグリオキサールコンジュゲートのメチルグリオキサールと、該検体中の一次抗体とを反応させるメチルグリオキサール-一次抗体反応工程；および

該メチルグリオキサール-一次抗体反応工程で反応させた一次抗体を、標識二次抗体と反応させて、該標識二次抗体を測定する測定工程；

からなることを特徴とする糖尿病前症の検査方法。

[請求項9] 請求項8に記載の糖尿病前症の検査方法であって、該一次抗体が抗メチルグリオキサールモノクローナル抗体であることを特徴とする糖尿病前症の検査方法。

[請求項10] 請求項1ないし9のいずれか1項に記載の糖尿病前症の検査方法であって、該方法が、さらに測定したメチルグリオキサール値を、標準検体の検量線に基づいて該検体中のメチルグリオキサール量を定量することを特徴とする糖尿病前症の検査方法。

[請求項11] 請求項1ないし10のいずれか1項に記載の糖尿病前症の検査方法で

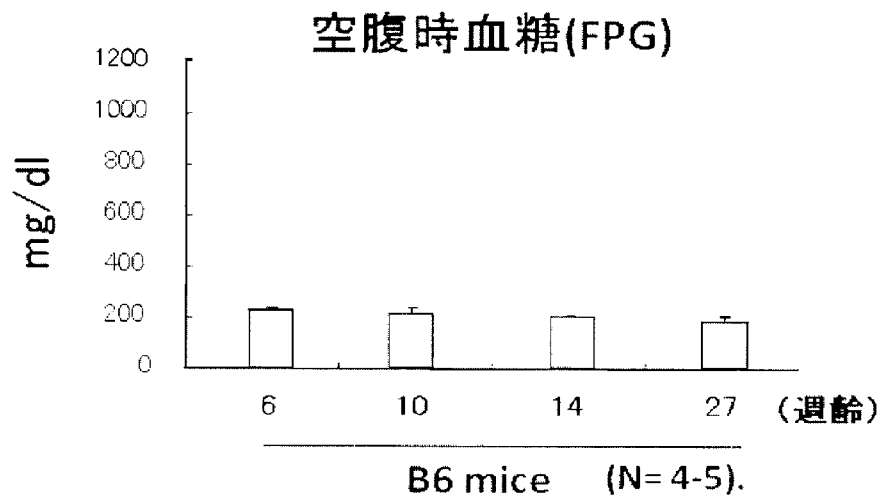
あって、血液検体中のメチルグリオキサル修飾アルギニン誘導体の測定を行うことを特徴とする糖尿病前症の検査方法。

[請求項12] 請求項1ないし11のいずれか1項に記載の糖尿病前症の検査方法であって、該血液検体の基準血糖値が110 mg/dL未満もしくは126 mg/dL未満であることを特徴とする糖尿病前症の検査方法。

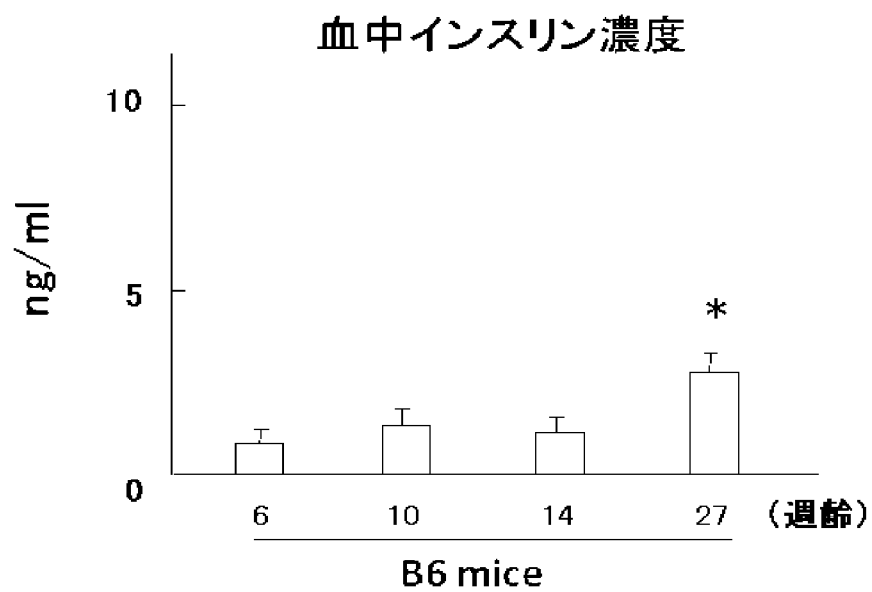
[請求項13] 請求項1に記載の糖尿病前症におけるインスリン抵抗性ならびにIGTの有無を検査し、その結果を基にして糖尿病前症の検査をするための下記組成からなるメチルグリオキサル修飾アルギニン誘導体測定による糖尿病前症におけるインスリン抵抗性ならびにIGTの検査用キットであることを特徴とする糖尿病前症検査用キット：

メチルグリオキサル修飾アルギニン誘導体；1次抗体；メチルグリオキサル（MGO）とウシ血清アルブミン（BSA）とのBSA-MGOコンジュゲートを固相化した固相化プレート；2次抗体；標識抗体（例えばHRP標識抗体等）ならびに標準検体の標準曲線。

[図1]



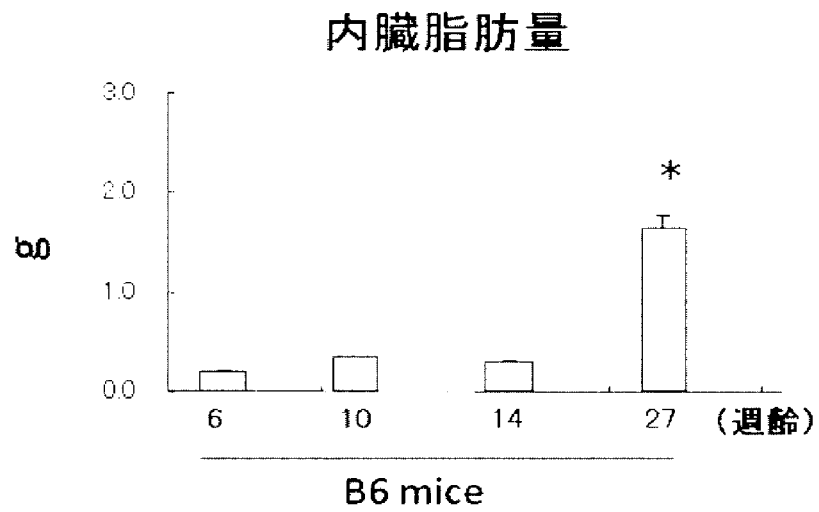
[図2]



\* : P<0.05 vs. 6 week aged B6 mice (N= 4-5).

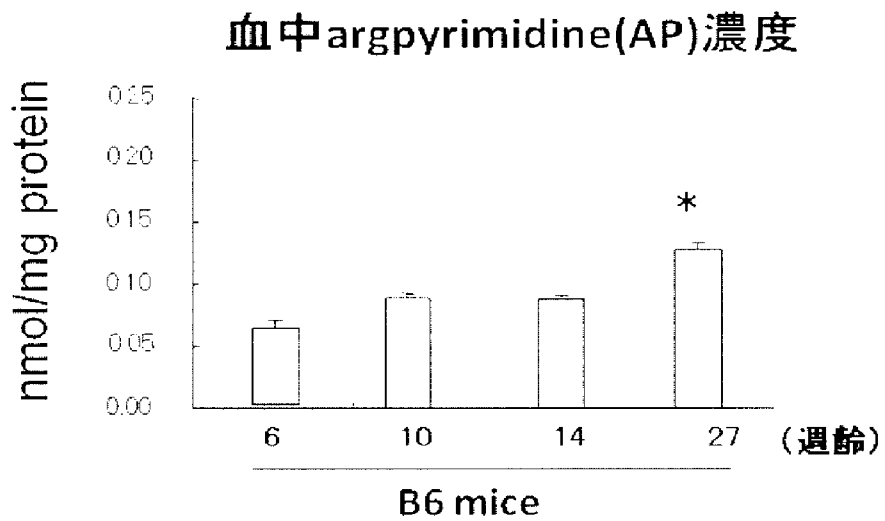


[図3]



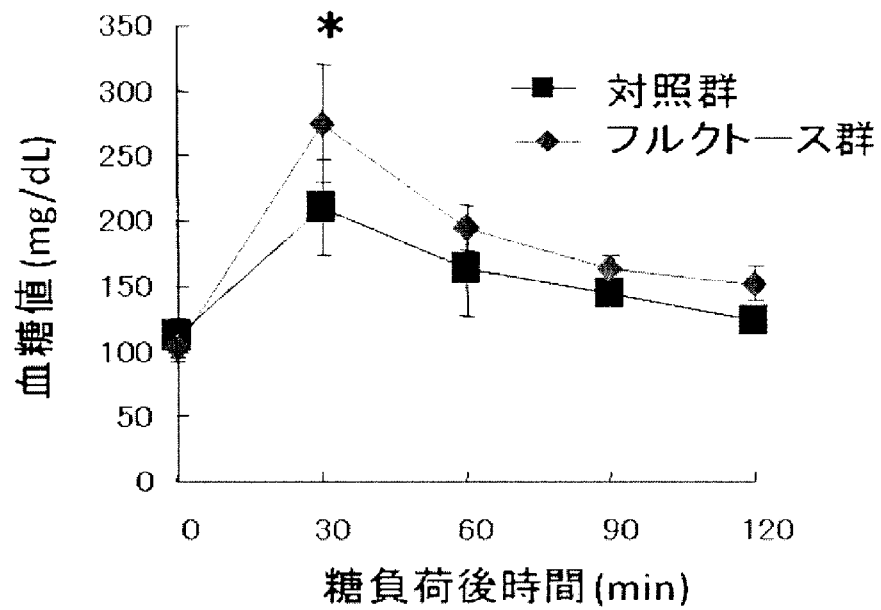
\* : P<0.05 vs. 6 week aged B6 mice (N= 4-5).

[図4]



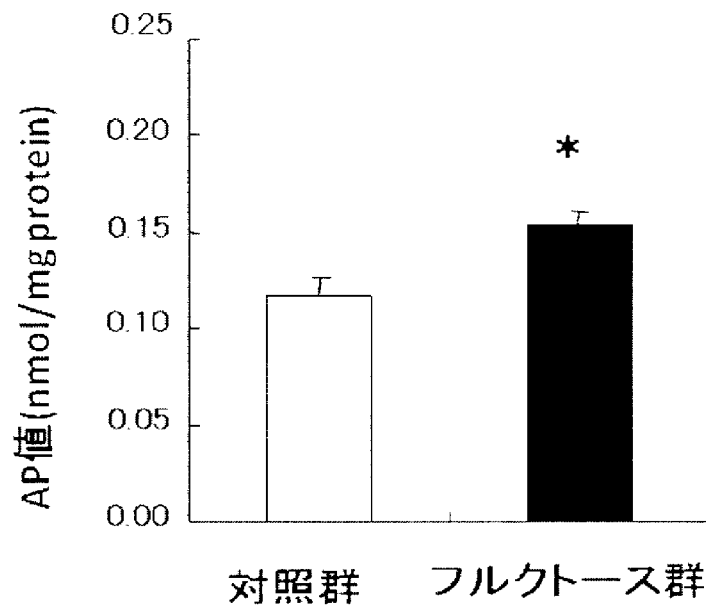
\* : P<0.05 vs. 6 week aged B6 mice (N= 4-5).

[図5]



\* :  $P < 0.05$  vs. 対照群 (N=7-8)

[図6]



\* :  $P < 0.05$  vs. 対照群 (N=7-8)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/073453

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/53(2006.01) i, C07D239/42(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, C07D239/42

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	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), CAPlus (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2004-309147 A (Mitsubishi Kagaku Bio-Clinical Laboratories, Inc.), 04 November 2004 (04.11.2004), claim 4; paragraph [0001] (Family: none)	1-13
A	JP 11-246600 A (NOF Corp.), 14 September 1999 (14.09.1999), paragraphs [0005], [0003] (Family: none)	1-13
A	JP 11-246599 A (NOF Corp.), 14 September 1999 (14.09.1999), claim 1; paragraph [0007] (Family: none)	1-13

 Further documents are listed in the continuation of Box C. 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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
18 March, 2011 (18.03.11)Date of mailing of the international search report  
05 April, 2011 (05.04.11)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/073453

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SHAMSI F. A. et al., Immunological Evidence for Methylglyoxal-derived Modifications in Vivo, J. Biol. Chem., 1998.03.20, Vol.273, No.12, P.6928-6936	1-13
A	WILKER S. C. et al., Chromatographic Quantification of Argpyrimidine, a Methylglyoxal-Derived Product in Tissue Proteins: Comparison with Pentosidine, Anal. Biochem., 2001.03.15, Vol.290, No.2, P.353-358	1-13

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, C07D239/42(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, C07D239/42

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

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2011年
日本国実用新案登録公報	1996-2011年
日本国登録実用新案公報	1994-2011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)、CAplus(STN)

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
A	JP 2004-309147 A (株式会社三菱化学ビーシーエル) 2004. 11. 04, 請求項4、【0001】 (ファミリーなし)	1-13
A	JP 11-246600 A (日本油脂株式会社) 1999. 09. 14, 【0005】、【0003】 (ファミリーなし)	1-13
A	JP 11-246599 A (日本油脂株式会社) 1999. 09. 14, 請求項1、【0007】 (ファミリーなし)	1-13

C欄の続きにも文献が列挙されている。

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

「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  
 「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  
 「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)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
 「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  
 「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  
 「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  
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18. 03. 2011

国際調査報告の発送日

05. 04. 2011

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)

海野 佳子

2 J

3906

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

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	SHAMSI F. A. et al., Immunological Evidence for Methylglyoxal-derived Modifications in Vivo, J. Biol. Chem., 1998.03.20, Vol.273, No.12, P.6928-6936	1-13
A	WILKER S. C. et al., Chromatographic Quantification of Argpyrimidine, a Methylglyoxal-Derived Product in Tissue Proteins: Comparison with Pentosidine, Anal. Biochem., 2001.03.15, Vol.290, No.2, P.353-358	1-13