(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
2008 年2 月14 日 (14.02.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/018596 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 33/72 (2006.01) *C12Q 1/37* (2006.01)
C07K 14/805 (2006.01) *G01N 30/88* (2006.01)
C12Q 1/26 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2007/065768

(22) 国際出願日: 2007 年8 月10 日 (10.08.2007)

(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2006-220678 2006 年8 月11 日 (11.08.2006) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): アークレイ株式会社 (ARKRAY, INC.) [JP/JP]; 〒6018045 京都府京都市南区東九条西明田町５７番地 Kyoto (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 米原 聡 (YONEHARA, Satoshi). 今井 敏博 (IMAI, Toshihiro).

(74) 代理人: 辻丸 光一郎, 外(TSUJIMARU, Koichiro et al.); 〒6008813 京都府京都市下京区中堂寺南町１３４ 京都リサーチパーク１号館３０１号室 Kyoto (JP).

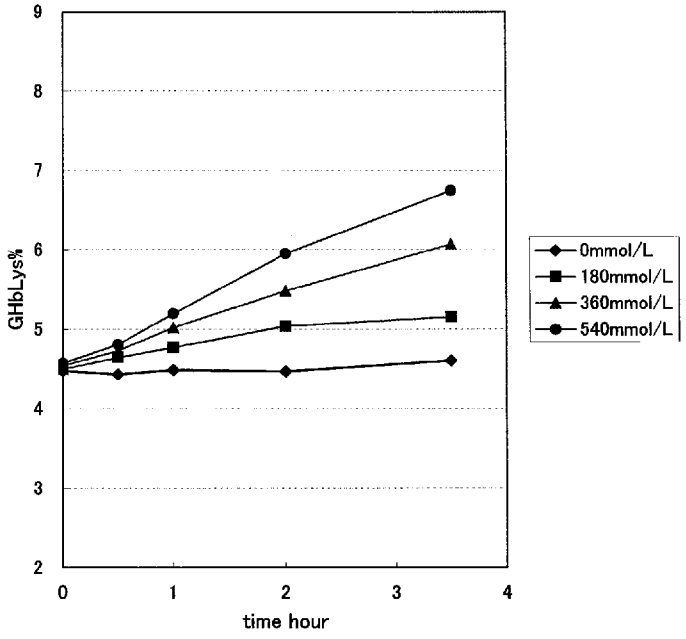
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

WO 2008/018596 A1

(54) **Title:** POSTPRANDIAL HYPERGLYCEMIA MARKER, METHOD FOR DETERMINATION THEREOF, AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 食後高血糖マーカー、その測定方法およびその用途



(57) **Abstract:** Disclosed is a novel method for the diagnosis of postprandial hyperglycemia by determining the blood glucose level indirectly. Postprandial hyperglycemia can be detected by measuring a lysine glycosylation rate (GHbLys%) of hemoglobin having a glycosylated side-chain amino group in lysine. The measurement of GHbLys% can be made, for example, by cleaving hemoglobin with a protease, reacting a glycosylated part of a side-chain amino group in the hemoglobin cleavage product with a fructosyl amino acid oxidase, and measuring the oxidation-reduction reaction between the glycosylated part with the fructosyl amino acid oxidase.

(57) 要約: 血糖値を間接的に測定することによって食後高血糖を診断する新たな方法を提供する。リジンの側鎖アミノ基が糖化されたヘモグロビンのリジン糖化率（ＧＨｂ

[続葉有]

(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, 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 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

Ｌｙｓ%）を測定することによって、食後高血糖を検出する。ＧＨｂＬｙｓ%の測定は、例えば、ヘモグロビンをプロテアーゼで切断し、得られたヘモグロビン切断物の側鎖アミノ基の糖化部分にフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを作用させ、前記糖化部分とフルクトシルアミノ酸オキシダーゼとの酸化還元反応を測定することによって決定できる。

明 細 書

食後高血糖マーカー、その測定方法およびその用途

技術分野

[0001] 本発明は、食後高血糖マーカー、その検出方法、およびその用途に関する。

背景技術

[0002] 生体の状態を示す指標として、各種タンパク質の糖化物について、糖化率の測定が行われている。中でも、血球中ヘモグロビン(Hb)の糖化物(以下、「Hb糖化物」ともいう)は、糖尿病の診断や治療等における重要な指標とされている。Hb糖化物には、Hbのβ鎖N末端アミノ酸(バリン)残基のα-アミノ基にグルコースが結合したもの(以下、「HbA1c」ともいう)、Hbのリジン残基の側鎖アミノ基にグルコースが結合したもの(以下、「GHbLys」ともいう)、Hbのアルギニン残基の側鎖アミノ基にグルコースが結合したもの等がある。特に、HbA1cは、生体内血糖値の過去(約1～2ヶ月)の履歴、具体的には、過去における普段の血糖値の平均値を反映することが知られている。HbA1cの値(HbA1c%)は、通常、総Hb量(もしくは総HbA量)に対するHbA1c量の割合(%)で表され、例えば、Hbのβ鎖N末端アミノ酸残基の糖化率、もしくは、β鎖N末端アミノ基の糖化率ともいう。

[0003] 近年、糖尿病の初期段階である食後高血糖の検出が着目されている。食後高血糖とは、すなわち、空腹時の血糖値が正常範囲内(110mg／dL以下)であっても、食後約1～2時間の血糖値が高くなる症状であり、一般的に、2時間後で140mg／dL以上とされている。この食後高血糖を放置すると、本格的な糖尿病に進行するおそれや、合併症、脳梗塞、心筋梗塞等の危険性が高まるという問題がある。したがって、糖尿病等の予防のために食後高血糖を検出することが重要になっている。しかしながら、食後高血糖の検出方法として採用される糖負荷試験は、例えば、患者にとって以下のような負担がかかる。まず、糖負荷試験を行うにあたって、患者は、検査前8時間以上(例えば、14時間以上)絶食し、空腹の状態で、試験用のでんぷん加水分解物(ブドウ糖)75gを服用する必要がある。その上、さらに、食後血糖は変化が早いことから、少なくとも、服用前、服用後30分後、60分後、120分後に採血を行い、血糖

値を測定しなければならない。また、採取した血液試料中で血球細胞によるグルコース消化が起こるため、迅速な測定が可能である施設内で、この試験を行う必要がある。このような理由から、食後高血糖の検出のために、血中グルコースを直接的に測定することは、患者にとって、時間的、身体的にも負担がかかる。そこで、このような直接的な方法ではなく、間接的に食後血糖を判断できる方法が望まれている。

[0004] しかしながら、前述のHbA1cは、糖尿病診断において非常に有効な指標ではあるが、あくまでも過去1～2ヶ月の平均血糖値を反映するため、HbA1cを指標として食後高血糖を検出することはできなかった。これは、以下のような原因によると考えられる。すなわち、短時間の血糖上昇では、HbA1cの前駆体である不安定型HbA1cは速やかに生成するが、不安定型HbA1cから安定型HbA1cは生成し難い。このため、安定型HbA1cの測定によって、慢性的な高血糖は判断できても、食後のみに高血糖を示す食後高血糖は判断できないと考えられている(非特許文献1)。つまり、安定型HbA1cは、過去における患者の普段の平均血糖値を示すものであって、食事に影響を受ける日内の血糖値変動が反映されないため、食後高血糖を把握するための指標にはならないということである。また、不安定型HbA1cは、測定自体が困難であるため、不安定型HbA1cの測定による食後高血糖の判断も実用的ではない。

非特許文献1:Journal of Laboratory and Clinical Medicine, Vol 147, 1, 1-2006, p21-26

発明の開示

[0005] そこで、本発明は、マーカーによって間接的に食後高血糖を検出すべく、新たな食後高血糖マーカーならびにその検出方法の提供を目的とする。

[0006] 本発明は、食後高血糖の診断のための食後高血糖マーカーであって、リジン残基が糖化されたヘモグロビン(以下、「GHbLys」ともいう)を含む。

[0007] 本発明の食後高血糖マーカーの測定方法は、前記マーカーが、本発明の食後高血糖マーカー(GHbLys)であり、前記食後高血糖マーカーの測定が、ヘモグロビン(以下、「Hb」ともいう)のリジン残基の糖化率の測定である。

[0008] 本発明の危険度決定方法は、被検体が糖尿病を発症する危険度を決定する方法であって、下記(a)工程を含む。

(a) 被検体から採取した血液試料について、本発明の測定方法により、Hbのリジン残基の糖化率を測定することによって、本発明の食後高血糖マーカーGHbLysを測定する工程

[0009] 本発明の診断方法は、被検体の食後高血糖を診断する方法であって、下記(c)工程を含む。

(c) 被検体から採取した血液試料について、本発明の測定方法により、Hbのリジン残基の糖化率を測定することによって、本発明の食後高血糖マーカーGHbLysを測定する工程

[0010] 本発明の平均血糖値の測定方法は、食後血糖値を反映した平均血糖値の測定方法であって、下記(x)～(y)を含むことを特徴とする。

(x) 平均血糖値マーカーを測定する工程であって、前記平均血糖値マーカーが、本発明の食後高血糖マーカーであり、被検体から採取した血液試料について、本発明の食後高血糖マーカーの測定方法により、Hbのリジン残基の糖化率を測定する工程

(y) Hbのリジン残基の糖化率と食後血糖値を反映した平均血糖値との関係式に、前記(x)工程で測定したHbのリジン残基の糖化率を代入して、食後血糖値を反映した平均血糖値を算出する工程

[0011] 本発明のマーカー測定用キットは、本発明の食後高血糖マーカーの測定方法に使用するキットであって、プロテアーゼ、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび酸化により発色する基質を含む。また、本発明のマーカー測定用キットは、本発明の平均血糖値の測定方法にも使用できる。

[0012] 本発明の危険度決定用キットは、本発明の糖尿病を発症する危険度の決定方法に使用するキットであって、プロテアーゼ、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび酸化により発色する基質を含む。

[0013] 本発明の食後高血糖診断用キットは、本発明の食後高血糖の診断方法に使用するキットであって、プロテアーゼ、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび酸化により発色する基質を含む。

[0014] 本発明者らは、鋭意研究の結果、リジン残基の側鎖アミノ基が糖化されたヘモグロ

ビン（GHbLys）の糖化率が、食後高血糖と相関関係を示すことを、初めて見出した。糖化Hbの一種であるHbA1cは、例えば、血糖値の動きに緩やかに応答して生成される。このため、数時間程度（例えば、5時間から12時間）の高血糖が持続されなければ、前述のような安定型HbA1cは生成し難く、HbA1c値（HbA1c%）の上昇は確認されない。このため、HbA1cの測定では、間接的に、過去約1～2ヶ月の血糖値の履歴を検出できるにとどまり、食後高血糖を検出できなかった。これに対して、GHbLysは、例えば、食後数十分～2時間程度という短時間であっても、高血糖状態に敏感に反応して生成され、また、血糖上昇と相関して、その量が増加することが、本発明者らによって明らかとなった。この新たな知見から、GHbLysを食後高血糖マーカーとして、その糖化率を測定することにより、食後高血糖を間接的に検出することが可能となったのである。食後高血糖は、いわゆる境界型糖尿病であり、この段階で十分な予防を図ることによって、糖尿病の進行の遅延や防止、合併症の抑制等が可能となる。このため、本発明により食後高血糖マーカーであるGHbLysを検出すれば、例えば、食後高血糖であるか否かを判断できる。さらに、本発明の食後高血糖マーカーGHbLysの測定により、例えば、糖尿病の発症危険度、すなわち、初期段階からの後期段階への進行の可能性を決定できる。したがって、本発明は、食後高血糖の診断や糖尿病の進行防止に極めて有用といえる。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]図1は、本発明の実施例1において、グルコース添加血のインキュベート時間と血漿グルコース濃度との関係を示すグラフである。

[図2]図2は、本発明の前記実施例1において、グルコース添加血のインキュベート時間と血球HbA1c%との関係を示すグラフである。

[図3]図3は、本発明の前記実施例1において、グルコース添加血のインキュベート時間と血球不安定型HbA1c%との関係を示すグラフである。

[図4]図4は、本発明の前記実施例1において、グルコース添加血のインキュベート時間と血球GHbLys%との関係を示すグラフである。

[図5]図5は、本発明の実施例2において、HbA1c%と、グルコースとのインキュベーション時間との関係を示すグラフである。

[図6]図6は、本発明の前記実施例2において、GHbLys%と、グルコースとのインキュベーション時間との関係を示すグラフである。

[図7]図7は、本発明の実施例3において、全血の保存時間とGHbLys%との関係を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

[0016] ＜食後高血糖マーカー＞ 本発明の食後高血糖マーカーは、前述のように、リジン残基が糖化されたヘモグロビン(GHbLys)である。具体的には、リジン残基の側鎖アミノ基(ε－アミノ基)が糖化されたHbである。試料中のGHbLysが食後高血糖の指標であることは、前述のように、本発明者らが初めて見出した事実である。このGHbLysを食後高血糖マーカーとすることによって、後述のように、食後高血糖か否かもしくはその程度、さらに、糖尿病(中期や後期への進行)の危険性を判断できる。

[0017] また、本発明において、GHbLysは、食後血糖値を反映した平均血糖値のマーカーでもある。前述のように、HbA1cは、過去の血糖値の履歴を示す指標であるが、これは普段の血糖値の平均値と相関しており、日内変動は反映されていない。このため、食後に血糖値が上昇する場合(食後高血糖の場合)であっても、HbA1cが指標となる平均血糖値には、それが反映されない。これに対して、GHbLysは、食後血糖値が反映された平均血糖値の指標となることが、本発明者らによって明らかとされた。このため、後述するように、本発明のマーカーGHbLysを測定して、食後血糖値を反映した平均血糖値を算出することにより、例えば、食後高血糖であるか否かを判断することも可能となる。

[0018] ＜食後高血糖マーカーの測定＞ 本発明の食後高血糖マーカーの測定方法は、前述のように、前記マーカーが、本発明の食後高血糖マーカーであり、前記食後高血糖マーカーの測定が、Hbのリジン残基の糖化率の測定である。

[0019] 本発明において、Hbのリジン残基の糖化率とは、通常、総Hbに対するリジン残基が糖化されたHbの割合を意味し、具体的には、Hbの総量(または濃度)に対するリジンが糖化されたHbの量(または濃度)の割合を意味する。リジン残基が糖化されたHb量(または濃度)は、例えば、リジン残基の糖化量(または糖化濃度)である。そして、前述のように、GHbLysはリジン残基が糖化されたHbであることから、本発明に

おいて、Hbのリジン残基の糖化率が、GHbLysの値といえる。本発明において、GHbLys値である前記糖化率を、以下、GHbLys%ともいう。

[0020] 本発明において、「総Hb」とは、例えば、HbA、HbA2およびHbF等のHb全般を含むことを意味してもよいし、総HbAでもよい。なお、総Hbは、例えば、糖化されていないHbと糖化されたHbとの両方を含む。また、本発明において、総Hbとは、例えば、Hb中の総リジン残基でもよいし、Hb中の特定のリジン残基であってもよい。この場合も、総Hbは、糖化されていないリジン残基と糖化されたリジン残基との両方を含む。

[0021] 本発明において、「リジン残基が糖化されたHb」は、例えば、リジン残基が糖化されたHbAを意味する。また、「リジン残基が糖化されたHb」は、Hb中の糖化されたリジン残基、または、Hb中の糖化された特定のリジン残基であってもよい。すなわち、前記糖化率は、例えば、Hb中の総リジン残基に対する糖化されたリジン残基の割合や、Hb中の特定のリジン残基に対する糖化された特定のリジン残基の割合を意味してもよい。

[0022] GHbLys%は、例えば、下記式より算出できる。

$$GHbLys\% = (GHbLys / 総Hb) \times 100$$

[0023] 前記式において、GHbLysとしては、例えば、GHbLys量(例えば、Hbのリジン残基の糖化量)またはGHbLys濃度(例えば、Hbのリジン残基の糖化濃度)があげられる。また、総Hbとしては、例えば、Hbの総量もしくはHb濃度、または、HbAの総量もしくはHbA濃度があげられる。前記式に基づいて、例えば、Hbのリジン残基の糖化量(Hbのリジン残基の糖化濃度)と、試料中の総Hb量(Hb濃度)または総HbA量(HbA濃度)との比(100分率)を算出することによって、GHbLys%を求めることができる。

[0024] 食後高血糖とは、前述のように、一般的に、食後約1～2時間の血糖値が高くなる症状をいい、通常、200mg／dL以上で糖尿病、140mg／dL以上で境界型と分類される。本発明の測定方法によれば、食後約1～2時間における血糖値(グルコース濃度)の測定に代えて、本発明の食後高血糖マーカーGHbLysの測定によって、例えば、食後高血糖の判断が可能である。また、食後高血糖マーカーGHbLysの測定

によって、さらに、前述のように、食後血糖値を反映した平均血糖値への換算も可能である。

[0025] 本発明は、GHbLys%が食後高血糖と相関関係を示すこと、すなわち、GHbLys%の測定によって食後高血糖が検出できることを明らかにした点が特徴である。このため、GHbLys%の測定方法自体は何ら制限されず、従来公知の測定方法が採用できる。GHbLys%の測定方法としては、例えば、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法、免疫法、酵素法、電気泳動法、質量分析法等があげられる。

[0026] 以下に、一例として、酵素法によるGHbLys%の測定方法を示す。本発明は、これらには制限されない。

[0027] 酵素法によるGHbLys%の測定方法は、例えば、下記(A)～(C)工程を含む。なお、プロテアーゼによる切断対象を「Hb」としているが、これは、糖化されたHbの意味も含む。また、切断物として得られるリジンやリジン残基を含むペプチドは、糖化されたリジンや、糖化されたリジン残基を含むペプチドの意味も含む。

(A) Hbをプロテアーゼで切断する工程

(B) 得られたHb切断物におけるリジン残基の糖化部分にフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ(以下、「FAOD」という)を作用させる工程

(C) 前記糖化部分とFAODとの酸化還元反応を測定することにより、Hbのリジン残基の糖化率を決定する工程

[0028] (A)プロテアーゼ処理

Hbからプロテアーゼによって切り出される切断物には、通常、リジン、糖化されたリジン(糖化リジン)、リジン残基を含むペプチド(リジンペプチド)、または、糖化されたリジン残基を含むペプチド(糖化リジンペプチド)が含まれる。Hbにおいて糖化が確認されているリジン残基としては、例えば、α鎖の61番目、40番目、7番目、16番目、139番目、127番目、β鎖の66番目、17番目、8番目、61番目、65番目、132番目、144番目等が報告されている。これらの中でも、糖化率の測定に特に有用なのは、例えば、α鎖の61番目、40番目、127番目、β鎖の66番目、17番目である(X. Zhang et al., J. Chromatogr. B759 (2001) 1-15、R. Shapiro et al., J. Biol. Chem. 255 (1980) 3120)。前記プロテアーゼ処理によるHbの切断パターンは、制限

されず、例えば、使用するプロテアーゼによって適宜決定できる。切り出されるペプチドの長さは、制限されず、プロテアーゼによって適宜設定できる。具体例としては、アミノ酸残基数が、例えば、2～6個であり、より好ましくは2～4個である。切り出されるペプチドの配列は、例えば、プロテアーゼの種類等によって異なるが、例えば、α鎖の127番目リジンを含むペプチドの場合、Leu－Asp－Lys－PheやLeu－Asp－Lys等が考えられる。

[0029] 前記プロテアーゼとしては、例えば、メタロプロテアーゼ、セリンプロテアーゼ、セリンカルボキシペプチダーゼ、プロテイナーゼK、ブロメライン、パパイン、ブタ膵臓由来トリプシン、Bacillus subtilis由来プロテアーゼ、Aspegillus oryzae由来プロテアーゼ等が使用でき、好ましくはエンドプロテアーゼである。市販品としては、例えば、メタロプロテアーゼ（アークレイ社製）、プロテアーゼA「アマノ」G（天野エンザイム社製）、プロテアーゼM「アマノ」G（天野エンザイム社製）、プロテアーゼS「アマノ」G（天野エンザイム社製）、ペプチダーゼR（天野エンザイム社製）、パパインM－40（天野エンザイム社製）、商品名プロテアーゼN（フルカ社製）、商品名プロテアーゼN「アマノ」（天野製薬社製）、Bacillus属由来メタロプロテイナーゼ（東洋紡社製：商品名トヨチーム）等があげられる。

[0030] 中でも、リジンもしくは糖化リジン、または、リジンペプチドもしくは糖化リジンペプチドを切り出す場合には、例えば、国際公開第2002／006519号パンフレットに記載のプロテアーゼ等を使用することが好ましい。これらのプロテアーゼは、例えば、後述する切断促進化合物の存在下で使用すれば、極めて迅速且つ特異的にHbの切断を行うことができる。

[0031] Hbの切断は、例えば、Hbを含む試料へのプロテアーゼの添加によって行える。

[0032] プロテアーゼ処理の反応液におけるプロテアーゼの添加割合は、例えば、0．001～300,000KU／Lの範囲であり、好ましくは0.01～30,000KU／Lであり、特に好ましくは0.1～10，000KU／Lである。前記反応液中のHb濃度が0.005mMの場合、プロテアーゼの添加割合は、例えば、0.01～300,000KU/Lの範囲であり、好ましくは0.05～30,000KU／Lであり、特に好ましくは0.1～10,000KU／Lである。ここで、プロテアーゼの活性「U」は、1分間に1マイクロモルのチロシンに相当する2

75nmの吸光度の増加を与える酵素量を1Uとする。

[0033] 前記プロテアーゼ処理は、例えば、緩衝液中で行うことが好ましい。前記緩衝液としては、例えば、トリス塩酸緩衝液、EPPS緩衝液、PIPES緩衝液、リン酸緩衝液、ADA緩衝液、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液、MES緩衝液、MOPS緩衝液、HEPES緩衝液、リンゴ酸緩衝液等が使用できる。前記反応液のpHは、例えば、4～10の範囲であり、好ましくは6～9である。前記pHは、例えば、前述のような緩衝液によって調整してもよい。

[0034] プロテアーゼ処理の条件は、制限されない。具体例として、処理温度は、例えば、10～40℃の範囲であり、好ましくは25～37℃、処理時間は、例えば、1～100分程度であり、好ましくは1～10分である。

[0035] 前記試料は、Hbが含まれる試料であればよく、特に制限されない。具体例としては、例えば、全血試料、血球試料、それらの溶血試料等があげられる。全血試料や血球試料の溶血方法は、制限されず、例えば、浸透圧差を利用する方法、超音波による方法等が使用できる。浸透圧差を利用する場合、全血（または血球）に対して、例えば、2～100倍体積量の精製水を添加して溶血させればよい。また、界面活性剤を試料に添加して溶血することもできる。

[0036] 前記プロテアーゼ処理は、例えば、以下に示すような促進化合物の存在下で行ってもよい。前記促進化合物の存在下で、Hbをプロテアーゼ処理すれば、例えば、短時間でリジンやリジンペプチドを切り出すことができる。このため、例えば、プロテアーゼ処理の効率化・短縮化が可能になる。また、効率良いプロテアーゼ処理が可能であるため、例えば、処理に使用するプロテアーゼの増量も不要となる。なお、前記促進化合物によって、Hbからリジンやリジンペプチドを効率良く切断できるメカニズムは不明であるが、前記促進化合物の共存により、Hbがプロテアーゼで処理され易い構造に変化していると推測される。

[0037] 前記促進化合物としては、例えば、下記式（I）で表される化合物があげられる。

R－X ・・・(I)

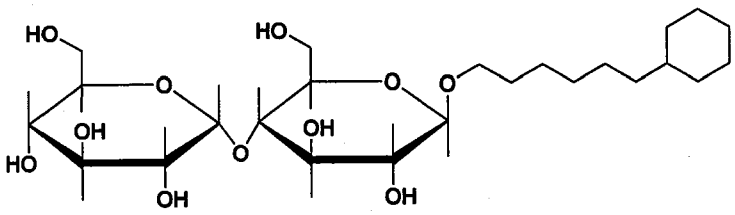
[0038] 前記式（I）において、Rは、炭素数が9以上のアルキル基、置換アルキル基、アシル基または置換アシル基である。具体例としては、炭素数9～16の直鎖アルキル基もし

くは直鎖アシル基、炭素数10～40であり主鎖炭素数が9～16である分枝鎖アルキル基もしくは分枝鎖アシル基、または、シクロアルキルで置換された直鎖アルキル基等があげられる。シクロアルキルの炭素数は、例えば、3～8であり、前記直鎖アルキル基は、シクロアルキルを除く直鎖の炭素数が、4～13であることが好ましい。前記シクロアルキルは、例えば、シクロヘキシル、シクロペンチル、シクロブチル等があげられる。

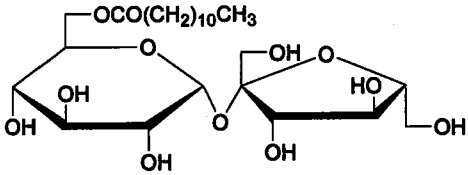
[0039] 前記式(I)において、Xは、糖残基である。前記糖残基は、例えば、単糖または二糖の残基が好ましい。前記単糖としては、例えば、マンノシド、グルコシド、チオグルコシド等があげられ、二糖としては、マルトシド、フルクトピラノシル-グルコピラノシド、チオマルトシド等があげられる。前記糖の構造は、例えば、α、β、D、Lのいずれでもよい。また、糖の環式構造に結合する水素や、OH基の水素は、例えば、Na、K、ハロゲン等で置換されてもよい。なお、本発明において、Rと糖残基の環式構造との結合を介している原子(例えば、－O－、－S－等)は、糖残基の構成要素とする。

[0040] 前記式(I)の促進化合物の具体例としては、例えば、以下のものがあげられる。例えば、n-ドデシル-β-D-マルトシド(n-ドデシル-β-D-マルトピラノシド)、6-シクロヘキシルヘキシル-β-D-マルトシド、スクロースモノラウレート(β-D-フルクトピラノシル-α-D-グルコピラノシドモノドデカノエート)、n-デシル-β-D-マルトシド(n-デシル-β-D-マルトピラノシド)、n-ノニル-β-D-チオマルトシド(n-ノニル-β-D-チオマルトシド)、5-シクロヘキシルペンチル-β-D-マルトシド、ウンデシル-β-D-マルトシド、n-ドデシル-α β-D-マルトシド、ヘキサデシル-β-D-マルトシド、および、3-オキサトリデシル-α-D-マンノシド等である。これらの化合物の化学式を以下に示す。これらの化合物は、いずれか一種類でもよいし、二種類以上を併用してもよい。これらの中でも、前記式(I)におけるR(アルキル鎖)の炭素数が12以上である、n-ドデシル-β-D-マルトシド、スクロースモノラウレート、ヘキサデシル-β-D-マルトシド等が好ましい。また、Rの炭素数が同じ場合、例えば、炭素数が同じアルキル基とアシル基との場合、より好ましくはアシル基であり、n-ドデシル-β-D-マルトシド(n-ドデシル-β-D-マルトピラノシド)が好ましい。

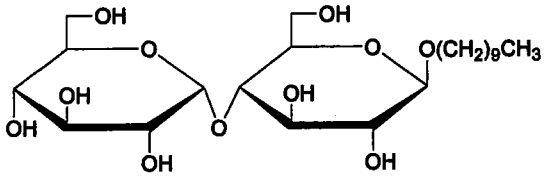
[0041] [化1]



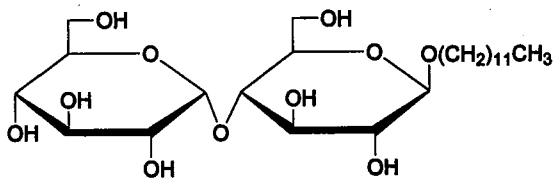
6-Cyclohexylhexyl-β-D-maltoside



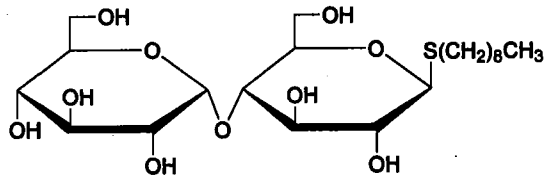
Sucrose monolaurate



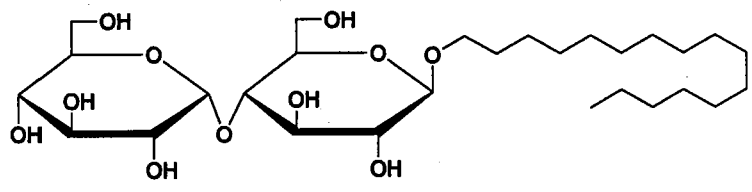
n-Decyl-β-D-maltoside



n-Dodecyl-β-D-maltoside

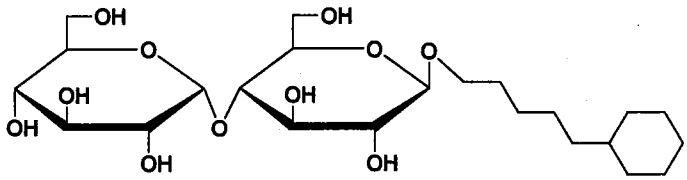


n-Nonyl-β-D-thiomaltoside

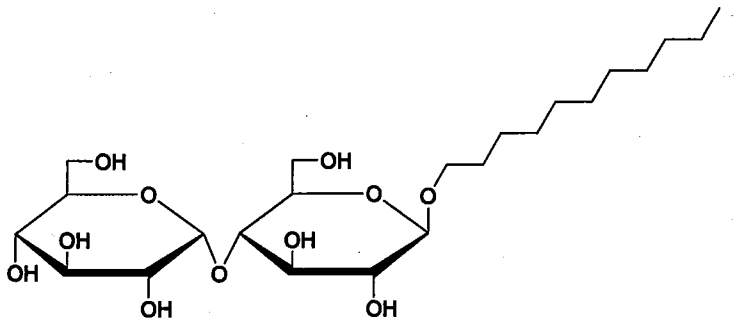


n-Hexadecyl-β-D-maltoside

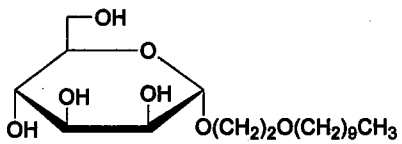
[化2]



5-Cyclohexylpentyl-β-D-maltoside



Undecyl-β-D-maltoside



3-Oxatridecyl-α-D-mannoside

[0042] プロテアーゼ処理の前記反応液における前記促進化合物の添加割合は、例えば、0．01～200mMの範囲であり、好ましくは0．4～100mMである。前記反応液中のHb濃度が0．005mMの場合、前記促進化合物の添加割合は、例えば、0．4～100mMの範囲であり、好ましくは1～100mMである。なお、前記促進化合物とプロテアーゼとの添加順序は、制限されず、同時でもよいし、それぞれを順不同で添加することもできる。

[0043] 前記促進化合物を共存させる場合、プロテアーゼ処理の条件は、前述と同様に制限されない。処理時間は、制限されず、特に上限は制限されない。例えば、0.1～60分程度でプロテアーゼ処理を行うことができる。処理時間の具体例としては、例えば、0．1～45分が好ましく、より好ましくは0.2～20分、特に好ましくは0.2～5分である

。前記促進化合物の存在下でプロテアーゼ処理を行えば、より迅速にアミノ酸やペプチドを切り出すことができる。このため、前述のような処理時間であっても、十分に切断処理が可能である。

[0044] また、前記促進化合物としては、例えば、前記式(I)の化合物の他に、例えば、ニトロ化合物があげられる。前記ニトロ化合物は、いずれか一種類でもよいし、二種類以上を併用してもよい。また、前記式(I)の化合物と併用してもよい。前記ニトロ化合物としては、例えば、亜硝酸やその塩があげられる。亜硝酸塩としては、特に制限されないが、例えば、亜硝酸カリウム、亜硝酸アミル、亜硝酸ブチル、ニトログリセリン、亜硝酸ナトリウム、パラニトロクロルベンゼン、トリニトロトルエン、ニトロベンゼン等があげられる。プロテアーゼ処理の前記反応液における前記ニトロ化合物の添加割合は、制限されない。具体例としては、例えば、前記反応液中のHb濃度が0．005mMの場合、前記ニトロ化合物の添加割合は、例えば、0．005mM以上が好ましく、より好ましくは0．05～2mMである。また、前記促進化合物として、例えば、WO02／27012に示すようにテトラゾリウム化合物を用いてもよい。

[0045] また、例えば、試料中のアスコルビン酸やタンパク質等の還元物質による影響を軽減するために、次工程のFAOD処理に先立って、試料にテトラゾリウム化合物を添加することが好ましい(例えば、特開2000-210100号公報参照)。テトラゾリウム化合物の添加は、例えば、プロテアーゼ処理の前後いずれでもよい。前記テトラゾリウム化合物としては、特に制限されないが、例えば、以下のものがあげられる。例えば、2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium salt、2-(4-iodophenyl)-3-(2,4-dinitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium salt、2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium salt、2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium salt、3,3'-(1,1'-biphenyl-4,4'-diyl)-bis(2,5-diphenyl)-2H-tetrazolium salt、3,3'-[3,3'-dimethoxy-(1,1'-biphenyl)-4,4'-diyl]-bis[2-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium salt]、2,3-diphenyl-5-(4-chlorophenyl)tetrazolium salt、2,5-diphenyl-3-(p-diphenyl)tetrazolium salt、2,3-diphenyl-5-(p-diphenyl)tetrazolium salt、2,5-diphenyl-3-(4-styrylphenyl)tetrazolium salt、2,5-diphenyl-3-(m-tolyl)tetrazolium salt、2,5-diphe

nyl-3-(p-tolyl)tetrazolium salt、2,3-diphenyl-5-(2-thienyl)tetrazolium salt、2-benzothiazoyl-3-(4-carboxy-2-methoxyphenyl)-5-[4-(2-sulfoethylcarbamoyl)phenyl]-2H-tetrazolium salt、2,2'-dibenzothiazolyl-5,5'-bis[4-di(2-sulfoethyl)carbamoylphenyl]-3,3'-(3,3'-dimethoxy-4,4'-biphenylene)ditetrazolium salt、3-(4,5-dimethyl-2-thiazoyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium salt、2,3-diphenyl-5-cyanotetrazolium salt、2,3-diphenyl-5-carboxytetrazolium salt、2,3-diphenyl-5-methyltetrazolium salt、2,3-diphenyl-5-ethyltetrazolium salt等である。これらの中でも特に好ましくは、2-(4-iodophenyl)-3-(2,4-dinitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium saltである。

[0046] 前記テトラゾリウム化合物の添加量は、特に制限されない。例えば、試料1μL当たり、0.001～100μmolになるように添加することが好ましく、より好ましくは0.005～30μmolの範囲、特に好ましくは、0.01～10μmolの範囲である。

[0047] (B)FAOD処理

つぎに、前記プロテアーゼ処理により得られたHb切断物をFAODで処理し、リジンの側鎖アミノ基(ε-アミノ基)の糖化部分にFAODを作用させる。このFAOD処理によって、リジンのε-アミノ基に結合した糖が遊離し、過酸化水素が生成される。

[0048] GHbLys%の測定方法に使用するFAODは、例えば、少なくとも、アミノ酸側鎖のアミノ基(例えば、ε-アミノ基)が糖化されたアミノ酸またはペプチドに作用して、下記式(1')に示す反応を触媒する酵素(FAOD－S)が好ましい。

$$R^1\text{-}CO\text{-}CH_2\text{-}NH\text{-}R^2 + H_2O + O_2$$
$$\rightarrow R^1\text{-}CO\text{-}CHO + NH_2\text{-}R^2 + H_2O_2 \quad \cdots(1')$$

[0049] 前記式(1')において、R^1は、水酸基もしくは糖化反応前の糖に由来する残基(糖残基)を意味する。前記糖残基(R^1)は、反応前の糖がアルドースの場合はアルドース残基であり、反応前の糖がケトースの場合、ケトース残基である。例えば、反応前の糖がグルコースの場合は、アマドリ転位により、反応後の構造はフルクトース構造をとるが、この場合、糖残基(R^1)は、グルコース残基(アルドース残基)となる。この糖残基(R^1)は、例えば、

$$-[CH(OH)]_n-CH_2OH$$

で示すことができ、nは、0～6の整数である。

[0050] 前記式(1')において、R^2は下記式(4')で示すことができる。下記式(4')において「－$(CH_2)_4$－」は、リジンの側鎖基のうち、糖化されたアミノ基以外の部分を示す。

$$-(CH_2)_4-CH(NH-R^6)-CO-R^7 \quad \cdots(4')$$

[0051] また、前記式(4')において、R^6は、水素、アミノ酸残基またはペプチド残基であり、例えば、下記式(5')で示すことができる。なお、下記式(5')において、nは0以上の整数であり、R^3は、アミノ酸側鎖基を示し、アミノ酸側鎖基は全て同一でも、異なっていても良い。

$$-(CO-CR^3H-NH)_n-H \quad \cdots(5')$$

[0052] また、前記式(4')において、R^7は、水酸基、アミノ酸残基またはペプチド残基であり、例えば、下記式(4')で示すことができる。なお、下記式(6')において、nは0以上の整数であり、R^3は、前述と同様にアミノ酸側鎖基を示し、アミノ酸側鎖基は全て同一でも、異なっていても良い。

$$-(NH-CHR^3-CO)_n-OH \quad \cdots(6')$$

[0053] 前記糖化されたアミノ酸側鎖に特異的に作用するFAOD－Sとしては、例えば、フサリウム属由来FAOD(日本生物工学会大会　平成12年度「Fusarium oxysporum由来アミノ酸オキシダーゼの基質特異性の変換;藤原真紀　他」)等があげられる。

[0054] なお、FAODは、さらに、前記式(1')以外の基質特異性を有してもよい。このようなFAODとしては、糖化されたα－アミノ基と糖化されたアミノ酸側鎖基との両方に作用するFAOD(以下、「FAOD－αS」という)があげられる。具体例としては、例えば、市販の商品名FOD(旭化成社製)、ギベレラ属由来FAOD(特開平8－154672号公報)、フサリウム属由来FAOD(特開平7－289253号公報)、アスペルギルス属由来FAOD(WO99／20039)等があげられる。このようなFAODの場合、前記プロテアーゼとして、例えば、国際公開第2002／006519号パンフレット等に記載のプロテアーゼを組合せることが好ましい。前記プロテアーゼは、N末端のα位アミノ基が糖化されたアミノ酸を生成(遊離)し難いプロテアーゼである。すなわち、リジンやリジンを含むペプチドを特異的に切断するプロテアーゼである。このようなプロテアーゼと前記FAOD－αSとを組合せることによって、例えば、FAODが、他の糖化部位(例

えば、α位アミノ基の糖化部位）に作用することを抑制できる。

[0055] なお、糖化されたα－アミノ基に作用するFAODの触媒反応とは、例えば、α－アミノ基が糖化されたアミノ酸またはペプチドに作用して、α－ケトアルデヒドおよび過酸化水素を発生する反応である。これは、前記式（1’）の反応において、R^2が下記式（2）のアミノ酸残基またはペプチド残基として表される反応である。以下、このような反応を触媒する酵素を「FAOD－α」という。

$$-CHR^3-CO-R^4 \qquad \cdots(2)$$

[0056] 前記式（2）において、R^3はアミノ酸側鎖基を示し、R^4は水酸基、アミノ酸残基またはペプチド残基を示す。R^4は、例えば、下記式（3）で示すことができる。下記式（3）において、nは、0以上の整数であり、R^3は、前述と同様に、アミノ酸側鎖基を示し、アミノ酸側鎖基は全て同一でも、異なっていても良い。

$$-(NH-CHR^3-CO)_n-OH \qquad \cdots(3)$$

[0057] FAOD処理は、前記プロテアーゼ処理と同様に緩衝液中で行うことが好ましい。前記緩衝液としては、特に制限されず、前記プロテアーゼ処理と同様の緩衝液が使用できる。FAOD処理の条件は、制限されない。反応液のpHは、例えば、6～9であり、処理温度は、例えば、10～38℃の範囲であり、好ましくは25～37℃である。処理時間も特に制限されず、例えば、0.1～60分、好ましくは0.1～5分である。

[0058] FAOD処理の反応液におけるFAODの添加割合は、例えば、0.01～50KU/Lの範囲であり、好ましくは0.5～10KU／Lである。FAODの活性「U」は、フルクトシルバリンまたはフルクトシルリジンを基質として1分間に1マイクロモルの過酸化水素を生成する量を1Uとする。

[0059] （C）酸化還元反応の測定

つぎに、前記糖化部分とFAODとの酸化還元反応の測定を行う。この測定は、例えば、前記反応により生じる過酸化水素量の測定や、前記反応で消費される酸素量の測定があげられる。過酸化水素の測定や酸素の測定は、従来公知の技術により行うことが可能である。一例として、前記過酸化水素量は、例えば、ペルオキシダーゼ（POD）と酸化により発色する基質（以下、「発色基質」という）とを用いて測定できる。すなわち、PODを触媒とする発色基質と過酸化水素との反応により前記基質を発色さ

せ、この発色程度の測定により行うことができる。また、過酸化水素量は、例えば、POD等を用いた酵素的手法の他に、電気的手法等によって測定することもできる。

[0060] 前記発色基質としては、制限されず、例えば、N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミンナトリウム(商品名DA－64、和光純薬工業社製)、N,N,N',N',N",N"-ヘキサ(3-スルホプロピル)-4,4',4"-トリアミノトリフェニルメタンヘキサナトリウム塩(例えば、商品名TPM－PS、同仁化学社製)、10-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-3,7-ビス(ジメチルアミノ)フェノチアジンまたはその塩(例えば、商品名DA－67、和光純薬社製)、N－(カルボキシメチルアミノカルボニル)－4, 4'－ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミンナトリウム、オルトフェニレンジアミン(OPD)、トリンダー試薬と4－アミノアンチピリンとを組み合わせた基質等があげられる。トリンダー試薬としては、例えば、フェノール、フェノール誘導体、アニリン誘導体、ナフトール、ナフトール誘導体、ナフチルアミン、ナフチルアミン誘導体等があげられる。また、4－アミノアンチピリンの他に、アミノアンチピリン誘導体、バニリンジアミンスルホン酸、メチルベンズチアゾリノンヒドラゾン(MBTH)、スルホン化メチルベンズチアゾリノンヒドラゾン(SMBTH)等も使用できる。

[0061] POD反応は、前記プロテアーゼ処理と同様に緩衝液中で行われることが好ましい。前記緩衝液としては、例えば、前述のような緩衝液が使用できる。POD処理の条件は、特に制限されない。POD反応の反応液のpHは、例えば、5～9であり、処理温度は、例えば、10～40℃の範囲であり、好ましくは25～37℃である。処理時間も特に制限されず、例えば、0.1～5分である。

[0062] 前記反応液におけるPODの添加割合は、例えば、0.01～300KU/Lの範囲であり、好ましくは0.5～40KU／Lである。また、前記反応液における発色基質の添加割合は、例えば、0.001～10mMの範囲であり、好ましくは0.005～2mMである。PODの活性「U」は、1分間に1マイクロモルのグアイヤコールを酸化できる量を1Uとする

[0063] 前記発色基質を用いた場合、例えば、その発色(例えば、反応液の吸光度)を分光光度計等で測定すればよい。具体的には、反応液の吸光度測定や透過率測定等があげられる。また、測定波長は制限されず、例えば、使用した発色基質の種類に応じ

て適宜決定できる。過酸化水素量（または過酸化水素濃度）は、例えば、Hbにおけるリジンの糖化量（または糖化濃度）に対応する。このため、測定した吸光度から、Hbのリジンの糖化量を算出できる。そして、下記式に示すように、このHbのリジンの糖化量（または糖化濃度）と試料中の全Hb量（Hb濃度）との比（100分率）を算出することによって、GHbLys％を求めることができる。なお、総Hb量は、従来公知の方法や、市販の試薬キットによって測定できる。

GHbLys％＝（Hbのリジンの糖化量/総Hb量）×100

[0064] 吸光度からのHbのリジンの糖化量の算出は、例えば、検量線を用いることによって行える。前記検量線は、例えば、Hbのリジンの既知糖化量と吸光度との関係をプロットした検量線がある。例えば、リジンの糖化量が既知であるHb標準物について、前述と同様にして吸光度測定を行い、この標準物の吸光度測定値と既知糖化量との関係を示す検量線を作成しておく。そして、この検量線に前述のように測定した吸光度を代入することによって、HbのLysの糖化量が算出できる。

[0065] また、前述のような促進化合物等の存在下で試料を処理した場合、同じ試料を用いることによって、Hb量をより正確に測定することができる。そして、これに伴い、GHbLys％をより正確に求めることができる。すなわち、まず、プロテアーゼによるHbの切断に先立って、前記Hbを含む試料に前記促進化合物を添加し、前記促進化合物を添加した試料の光学的変化量を測定する。そして、この光学的変化量から前記試料中のHb量を算出する。他方、前記促進化合物が添加された前記試料中のHbをプロテアーゼによって切断した後、前記糖化部分とFAODとの酸化還元反応を測定することにより、Hbのリジン糖化量を測定する。そして、前記Hb量と前記リジン糖化量とからGHbLys値（GHbLys％）を求めることが好ましい。なお、Hb量は、前述のようにプロテアーゼ処理に先立って行ってもよいし、プロテアーゼ処理後に行ってもよい。

[0066] この例では、プロテアーゼの添加に先立って、Hbを含む試料に前記促進化合物を添加し、例えば、前記試料の吸光度測定を行う。そして、測定した吸光度と予め準備した検量線とからHb量を求めればよい。このように、前記促進化合物でHbを処理しておけば、Hbの量を容易かつ正確に求めることができる。そのメカニズムは不明であ

るが、前記促進化合物によって、Hbの構造が変化し、不安定なHbの形状が安定化されているためと推測される。前記検量線は、例えば、既知Hb量(既知Hb濃度)である複数のHb含有試料を前述の方法により測定し、これらの測定値と既知Hb量(既知Hb濃度)とから作成することができる。なお、吸光度の測定波長は特に制限されないが、例えば、400～660nmの範囲であり、前記化合物による試料の処理時間は、例えば、0．2～30分の範囲である。この方法によりHb測定を行う場合、試料への前記化合物の添加後であってプロテアーゼの添加前に吸光度測定を行う以外は、前述と同様にして引き続きプロテアーゼ処理等を行い、Hbのリジンの糖化量(濃度)を求めることができる。このため、より簡便な測定方法となる。

[0067] GHbLys%の測定において、各処理工程は、前述のように別々に行ってもよいが、例えば、以下に示すような組み合わせで各処理を同時に行ってもよい。また、プロテアーゼ、FAOD、POD、発色基質の添加順序も特に制限されない。

1:溶血処理＋プロテアーゼ処理

2:プロテアーゼ処理＋FAOD処理

3:FAOD処理＋POD処理

4:プロテアーゼ処理＋FAOD処理＋POD処理

[0068] なお、GHbLysは、生体内ならびに採取した血液内等において安定である。このため、例えば、採血の時期や、採血後に測定を行う時期は、何ら制限されない。Hbの寿命の間(一般に4ヶ月程度)、GHbLysは安定である。このため、例えば、従来のように、食事を基準にして決められた所定時間での採血や複数回の測定を行う必要がなく、任意に採血や測定を行うことができる。採血後の試料について、例えば、すぐにGHbLys%の測定を行ってもよいし、保存後に、GHbLys%の測定を行ってもよい。

[0069] GHbLys%の測定方法は、このような酵素法には限定されず、前述のように、例えば、HPLC法、免疫法、電気泳動法、質量分析法等であってもよい。例えば、まず、Hbから、リジンまたはリジンを含むペプチドを切り出し、HPLCによって、リジンの側鎖アミノ基が糖化された糖化物(糖化リジンまたは糖化リジンペプチド)と糖化されていない非糖化物(リジンまたはリジンペプチド)とに分離精製する。そして、この精製物を、キャピラリー電気泳動やLC-MSに供して、定量を行ってもよい。

[0070] また、これらの方法においても、例えば、前述のように、リジンやリジンペプチドを特異的に切り出すプロテアーゼを使用したり、前記促進化合物存在下でプロテアーゼ処理を行ってもよい。これらの方法により、例えば、リジンや糖化リジン、リジンペプチドや糖化リジンペプチドを効率良く切り出すことができる。このため、例えば、切り出した糖化リジンや糖化リジンペプチドを抗原とする免疫法も有用である。また、HPLC法や電気泳動法での分離を向上することも可能である。なお、本発明は、食後高血糖マーカーとして、Hbのリジン残基の糖化率(GHbLys%)を測定することが特徴であって、GHbLys%の測定方法自体は、何ら制限されない。

[0071] <食後高血糖マーカーの検出>

本発明の食後高血糖マーカーの検出方法は、前記マーカーが本発明の食後高血糖マーカーであり、前記食後高血糖マーカーの検出が、Hbのリジン残基の糖化の検出である。Hbのリジンの糖化の検出は、前記食後高血糖マーカーの測定により行うことができる。

[0072] <糖尿病の危険度決定方法>

本発明は、被検体が糖尿病を発症する危険度を決定する方法であって、下記(a)工程を含む。

(a) 被検体から採取した血液試料について、本発明の測定方法により、Hbのリジン残基の糖化率を測定することによって、本発明の食後高血糖マーカーを測定する工程

[0073] 前述のように、GHbLys%が食後高血糖と相関関係を示すことが、本発明者らにより明らかとされた。そして、前述のように、食後高血糖は、糖尿病の初期段階であることが知られている。このため、任意の時の患者血液におけるGHbLys%の測定によって、例えば、糖尿病を発生する危険度の有無や、危険度の程度(糖尿病中期および後期への進行等)を決定できる。前記被検体としては、制限されず、例えば、ヒト、ヒトを除く哺乳類、その他の動物があげられる。

[0074] 本発明の危険度決定方法において、さらに、下記(b)工程を含むことが好ましい。なお、後述する(b1)～(b5)は、危険度の判断方法の具体例であるが、本発明は、これらには限定されない。

(b) 前記(a)工程において測定したHbのリジン残基の糖化率を用いて、下記(b1)～(b5)からなる群から選択された少なくとも一つの方法により、前記被検体が糖尿病を発症する危険度を決定する工程

[0075] (b1)は、健常者から採取した血液におけるHbのリジン残基の糖化率と食後高血糖患者から採取した血液におけるHbのリジン残基の糖化率との境界値を評価基準として設定し、前記評価基準よりも、前記(a)工程において測定した被検体のリジン残基の糖化率が相対的に高い場合に、糖尿病発症の危険度が相対的に高いと決定する方法である。

[0076] この方法の具体例を示す。予め、評価基準となる境界値の設定を行う。まず、健常者と食後高血糖患者について、任意の時に血液試料を採取し、GHbLys%を測定する。そして、これらの結果から、健常者の測定値GHbLys%と食後高血糖患者の測定値GHbLys%との境界値を決定し、前記境界値を評価基準とする。ここで設定した評価基準は、一般的な評価基準値として用いることができる。このため、例えば、被検体について危険度の決定を行う度に、評価基準(境界値)を設定することは不要である。他方、危険度の決定が求められる被検者について、任意の時に血液試料を採取し、GHbLys%を測定する。そして、この測定値と前記評価基準とを比較する。この測定値が前記評価基準より高い値を示した場合(測定値＞境界値)は、糖尿病の危険性が相対的に高いと判断し、前記評価基準より低い値を示した場合(測定値＜境界値)は、糖尿病の危険性が相対的に低いと判断する。

[0077] 境界値を決定するための健常者と食後高血糖患者とは、例えば、従来公知の方法による血糖値の測定によって分類できる。前記方法としては、例えば、試験用のでんぷん加水分解物75g(例えば、商品名トレーランG75;味の素社製)を空腹時に服用して、食後30分から2時間の血糖値を測定する方法があげられる(日本糖尿病学会「糖負荷試験における糖尿病診断基準委員会の指針」)。

[0078] (b2)は、健常者から採取した血液におけるHbのリジン残基の糖化率と空腹時の健常者から採取した血液の血糖値との関係式に、空腹時の被検者から採取した血液の血糖値を代入して求めたHbのリジン残基の糖化率の計算値を評価基準として設定し、前記評価基準よりも、前記(a)工程において測定した被検体のリジン残基の糖化

率(GHbLys%)が相対的に高い場合に、相対的に危険度が高いと決定する方法である。

[0079] この方法の具体例を示す。予め、評価基準の設定を行う。まず、健常者について、任意の時に血液試料を採取し、GHbLys%を測定する。また、前記健常者について、空腹時の血液を採取し、空腹時血糖値を測定する。そして、健常者のGHbLys%と、健常者の空腹時の血糖値との関係式を求めておく。前記関係式としては、例えば、「GHbLys%=(a×空腹時血糖値)+b」のような一次式等を用いることができる。ここで求めた関係式は、一般的な評価の標準式として用いることができる。このため、例えば、被検体について危険度の決定を行う度に、関係式を求めることは不要である。つぎに、危険度の決定が求められる被験者について、空腹時血糖値を測定する。先に求めた関係式を用いて、前記被験者の空腹時血糖値(測定値)からGHbLys%計算値を求める。このGHbLys%計算値を評価基準とする。他方、前記被検者について、任意の時に血液試料を採取し、GHbLys%を測定する。そして、この測定値と前記評価基準(GHbLys%計算値)とを比較する。このGHbLys%測定値が、評価基準よりも高い値を示した場合(測定値>GHbLys%計算値)は、糖尿病の危険性が相対的に高いと判断し、前記評価基準より低い値を示した場合(測定値<GHbLys%計算値)は、糖尿病の危険性が相対的に低いと判断する。

[0080] なお、GHbLys%測定に使用する血液試料は、前述のように制限されず、任意の時に採取できる。また、合わせて空腹時血糖値を測定する場合、例えば、空腹時血液試料を用いてGHbLys%を測定してもよい。

[0081] 空腹時血糖値は、例えば、前回の食事から10～14時間後の血液試料について、従来公知の方法により測定することが好ましい。具体例としては、前回の食事を20時(もしくは22時)までに済ませ、当日の8時以降に血液試料を採取する方法が、一般的である。

[0082] (b3)は、空腹時の被検体から採取した血液の血糖値を評価基準として設定し、他方、健常者から採取した血液におけるヘモグロビンのリジン残基の糖化率と空腹時の健常者から採取した血液の血糖値との関係式に、前記(a)工程において測定した被検体のリジン残基の糖化率を代入して、被検体の空腹時血糖値の計算値を求め、前

記評価基準よりも、被検体の空腹時血糖値の計算値が相対的に高い場合に、危険度が相対的に高いと決定する方法である。

[0083] この方法の具体例を示す。予め、評価基準の設定を行う。危険度の決定が求められる被験者について、空腹時に血液試料を採取し、空腹時血糖値を測定する。この空腹時血糖を評価基準とする。他方、健常者について、任意の時に血液試料を採取し、GHbLys%を測定する。また、前記健常者について、空腹時の血液を採取し、空腹時血糖値を測定する。そして、健常者のGHbLys%と、健常者の空腹時の血糖値との関係式を求めておく。前記関係式としては、前記(b2)と同様に、例えば、「GHbLys%=(a×空腹時血糖値)+b」のような一次式等を用いることができる。この関係式は、前述と同様に、一般的な評価の標準式として用いることができる。このため、例えば、被検体について危険度の決定を行う度に、関係式を求めることは不要である。続いて、危険度の決定が求められる前記被験者について、任意の時に血液試料を採取し、GHbLys%を測定する。先に求めた関係式を用いて、前記被験者の測定値GHbLys%から、空腹時血糖値の計算値を求める。この被験者のGHbLys%から求めた空腹時血糖値の計算値が、前記評価基準よりも高い値を示した場合(計算値>測定した空腹時血糖値)は、糖尿病の危険性が相対的に高いと判断し、前記評価基準より低い値を示した場合(計算値<測定した空腹時血糖値)は、糖尿病の危険性が相対的に低いと判断する。

[0084] なお、GHbLys%測定に使用する血液試料は、前述のように制限されず、任意の時に採取できる。また、合わせて空腹時血糖値を測定する場合、空腹時血液試料を用いてGHbLys%を測定してもよい。

[0085] (b4)は、健常者から採取した血液におけるHbのリジン残基の糖化率と健常者から採取した血液におけるHbのβ鎖N末端アミノ酸残基の糖化率との関係式に、被検者から採取した血液におけるHbのβ鎖N末端アミノ酸残基の糖化率を代入して求めたHbのリジン残基の糖化率の計算値を評価基準として設定し、前記評価基準よりも、前記(a)工程において測定した被検体のリジン残基の糖化率が相対的に高い場合に、危険度が相対的に高いと決定する方法である。

[0086] この方法の具体例を示す。予め、評価基準の設定を行う。まず、健常者について、

任意の時に血液試料を採取し、GHbLys％を測定する。また、前記健常者について、任意の時に血液試料を採取し、HbA1c％を測定する。そして、健常者のGHbLys％と、健常者のHbA1c％との関係式を求めておく。前記関係式としては、例えば、「GHbLys％＝(a×HbA1c％)＋b」のような一次式等を用いることができる。ここで求めた関係式は、一般的な評価の標準式として用いることができる。このため、例えば、被検体について危険度の決定を行う度に、関係式を求めることは不要である。つぎに、危険度の決定が求められる被験者について、任意の時に血液試料を採取し、HbA1c％を測定する。先に求めた関係式を用いて、前記被験者のHbA1c％測定値からGHbLys％計算値を求める。このGHbLys％計算値を評価基準とする。他方、前記被検者について、任意の時に血液試料を採取し、GHbLys％を測定する。そして、この測定値と前記評価基準(GHbLys計算値)とを比較する。このGHbLys％測定値が、前記評価基準よりも高い値を示した場合(測定値＞GHbLys計算値)は、糖尿病の危険性が相対的に高いと判断し、前記評価基準より低い値を示した場合(測定値＜GHbLys計算値)は、糖尿病の危険性が相対的に低いと判断する。

[0087] なお、GHbLys％測定に使用する血液試料は、前述のように制限されず、任意の時に採取できる。また、HbA1c％測定に使用する血液試料も、制限されず、任意の時に採取できる。HbA1c％とGHbLys％とを測定する場合、同じ血液試料を用いて両者を測定することもできる。また、HbA1c％の測定方法については後述する。

[0088] (b5)は、被検体から採取した血液におけるHbのβ鎖N末端アミノ酸残基の糖化率を評価基準として設定し、他方、健常者から採取した血液におけるHbのリジン残基の糖化率と前記Hbのβ鎖N末端アミノ酸残基の糖化率との関係式に、前記(a)工程において測定した被検体のリジン残基の糖化率を代入して、被検体のHbのβ鎖N末端アミノ酸残基の糖化率の計算値を求め、前記評価基準よりも、被検体のヘモグロビンのβ鎖N末端アミノ酸の糖化率の計算値が相対的に高い場合に、危険度が相対的に高いと決定する方法である。

[0089] この方法の具体例を示す。予め、評価基準の設定を行う。危険度の決定が求められる被験者について、任意の時に血液試料を採取し、HbA1c％を測定する。このHbA1c％測定値を評価基準とする。他方、健常者について、任意の時に血液試料を

採取し、GHbLys%を測定する。また、健常者について、任意の時に血液試料を採取し、HbA1c%を測定する。そして、健常者のGHbLys%と、健常者のHbA1c%との関係式を求めておく。前記関係式としては、前記(b4)と同様に、例えば、「GHbLys%＝(a×HbA1c%)＋b」のような一次式等を用いることができる。この関係式は、前述と同様に、一般的な評価の標準式として用いることができる。このため、例えば、被検体について危険度の決定を行う度に、関係式を求めることは不要である。つぎに、危険度の決定が求められる前記被験者について、任意の時に血液試料を採取し、GHbLys%を測定する。先に求めた関係式を用いて、前記被験者のGHbLys%測定値から、HbA1c%の計算値を求める。この測定値(HbA1c%)と前記評価基準(HbA1c%計算値)とを比較する。この測定値(HbA1c%)が、前記評価基準(HbA1c%計算値)よりも低い値を示した場合(測定値＜HbA1c%計算値)は、糖尿病の危険性が相対的に高いと判断し、前記評価基準(HbA1c%計算値)より高い値を示した場合(測定値＞HbA1c%計算値)は、糖尿病の危険性が相対的に低いと判断する。

[0090] なお、GHbLys%測定に使用する血液試料は、前述のように制限されず、任意の時に採取できる。また、HbA1c%測定に使用する血液試料も、制限されず、任意の時に採取できる。HbA1c%とGHbLys%とを測定する場合、同じ血液試料を用いて両者を測定することもできる。

[0091] これらの他にも、例えば、被検者のHbA1c%とGHbLys%とを測定し、両者の差(GHbLys%－HbA1c%)や比率(GHbLys%／HbA1c%)を単に計算して診断することも可能である。

[0092] さらに、これらの診断においては、例えば、相対的に差が大きいほど、糖尿病の危険性が高いことを示すといえる。具体的には、例えば、空腹時血糖値の計算値と空腹時血糖値の測定値との差、GHbLys%計算値とGHbLys%測定値との差、HbA1c%計算値とHbA1c%測定値との差、GHbLys%とHbA1c%の比率等であり、これらの差や比率が相対的に大きいほど、糖尿病の危険性が高いと判断することができる。

[0093] また、本発明においては、例えば、GHbLysの測定だけでなく、あわせて、HbA1c

の測定を行うことが好ましい。HbA1cを測定することによって、例えば、GHbLys測定により、被検者の糖尿病の危険度を判断するだけでなく、すでに糖尿病を患っているか否かも判断することが可能である。

[0094] ＜食後高血糖の診断＞

本発明は、被検体の食後高血糖を診断する方法であって、下記(c)工程を含む、診断方法である。

(c) 被検体から採取した血液試料について、本発明の測定方法により、Hbのリジン残基の糖化率を測定することによって、本発明の食後高血糖マーカーを測定する工程

[0095] 前述のように、GHbLys%が食後高血糖と相関関係を示すことが、本発明者らにより明らかとされた。このため、任意の時の患者血液におけるGHbLys%を測定することによって、食後高血糖か否かを決定することができる。

[0096] 本発明の食後高血糖診断方法において、さらに、下記(d)工程を含むことが好ましい。なお、後述する(d1)～(d5)は、食後高血糖の判断方法の具体例であるが、本発明は、これらには限定されない。

(d) 前記(c)工程において測定したHbのリジン残基の糖化率を用いて、下記(d1)～(d5)からなる群から選択された少なくとも一つの方法により、前記被検体の食後高血糖を判断する工程

[0097] (d1)は、健常者から採取した血液におけるHbのリジン残基の糖化率と食後高血糖患者から採取した血液におけるHbのリジン残基の糖化率との境界値を評価基準として設定し、前記評価基準よりも、前記(c)工程において測定した被検体のリジン残基の糖化率が相対的に高い場合に、被検体を食後高血糖と判断する方法である。前記(d1)は、前述の(b1)と同様に行うことができる。具体的には、被検体のGHbLys%測定値が前記評価基準より高い値を示した場合(測定値＞境界値)は、食後高血糖の可能性が相対的に高いと判断し、前記評価基準より低い値を示した場合(測定値＜境界値)は、食後高血糖の可能性が相対的に低いと判断する。

[0098] (d2)は、健常者から採取した血液におけるHbのリジン残基の糖化率と空腹時の健常者から採取した血液の血糖値との関係式に、空腹時の被検者から採取した血液の

血糖値を代入して求めたHbのリジン残基の糖化率の計算値を評価基準として設定し、前記評価基準よりも、前記(c)工程において測定した被検体のリジン残基の糖化率が相対的に高い場合に、前記被検体を食後高血糖と判断する方法である。前記(d2)は、前述の(b2)と同様に行うことができる。具体的には、被検体のGHbLys%測定値が、前記評価基準よりも高い値を示した場合(測定値>GHbLys%計算値)は、食後高血糖の可能性が相対的に高いと判断し、前記評価基準より低い値を示した場合(測定値<GHbLys%計算値)は、食後高血糖の可能性が相対的に低いと判断する。

[0099] (d3)は、空腹時の被検体から採取した血液の血糖値を評価基準として設定し、他方、健常者から採取した血液におけるHbのリジン残基の糖化率と空腹時の健常者から採取した血液の血糖値との関係式に、前記(c)工程において測定した被検体のリジン残基の糖化率を代入して、被検体の空腹時血糖値の計算値を求め、前記評価基準よりも、被検体の空腹時血糖値の計算値が相対的に高い場合に、食後高血糖と判断する方法である。前記(d3)は、前述の(b3)と同様に行うことができる。具体的には、被検体の空腹時血糖値の計算値が、前記評価基準(空腹時血糖値の測定値)よりも高い値を示した場合(計算値>測定値)は、食後高血糖の可能性が相対的に高いと判断し、前記評価基準(空腹時血糖値の測定値)より低い値を示した場合(計算値<測定値)は、食後高血糖の可能性が相対的に低いと判断する。

[0100] (d4)は、健常者から採取した血液におけるHbのリジン残基の糖化率と健常者から採取した血液におけるHbのβ鎖N末端アミノ酸残基の糖化率との関係式に、被検者から採取した血液におけるHbのβ鎖N末端アミノ酸残基の糖化率を代入して求めたHbのリジン残基の糖化率の計算値を評価基準として設定し、前記評価基準よりも、前記(c)工程において測定した被検体のリジン残基の糖化率が相対的に高い場合に、前記被検体を食後高血糖と判断する方法である。前記(d4)は、前述の(b4)と同様に行うことができる。具体的には、被検体のGHbLys%測定値が、前記評価基準(GHbLys%計算値)よりも高い値を示した場合(測定値>計算値)は、食後高血糖の可能性が相対的に高いと判断し、前記評価基準(GHbLys%計算値)より低い値を示した場合(測定値<計算値)は、食後高血糖の可能性が相対的に低いと判断する

。

[0101] (d5)は、被検体から採取した血液におけるHbのβ鎖N末端アミノ酸残基の糖化率を評価基準として設定し、他方、健常者から採取した血液におけるHbのリジン残基の糖化率と前記Hbのβ鎖N末端アミノ酸残基の糖化率との関係式に、前記(a)工程において測定した被検体のリジン残基の糖化率を代入して、被検体のHbのβ鎖N末端アミノ酸残基の糖化率の計算値を求め、前記評価基準よりも、被検体のヘモグロビンのβ鎖N末端アミノ酸の糖化率の計算値が相対的に高い場合に、食後高血糖と判断する方法である。前記(d5)は、前述の(b5)と同様に行うことができる。具体的には、被検体のHbA1c%計算値が、前記評価基準(HbA1c%測定値)よりも高い値を示した場合(計算値>測定値)は、食後高血糖の可能性が相対的に高いと判断し、前記評価基準(HbA1c%測定値)より低い値を示した場合(計算値<測定値)は、食後高血糖の可能性が相対的に低いと判断する。

[0102] これらの他にも、例えば、被検者のHbA1c%とGHbLys%とを測定し、両者の差(GHbLys%－HbA1c%)や比率(GHbLys%／HbA1c%)を単に計算して診断することも可能である。

[0103] さらに、これらの診断においては、相対的に差が大きいほど、食後高血糖の程度が高いことを示すといえる。具体的には、例えば、空腹時血糖値の計算値と空腹時血糖値の測定値との差、GHbLys%計算値とGHbLys%測定値との差、HbA1c%計算値とHbA1c%測定値との差、GHbLys%とHbA1c%の比率等であり、これらの差や比率が相対的に大きいほど、食後高血糖の程度が高いと判断することができる。

[0104] また、本発明においては、GHbLysの測定だけでなく、あわせて、HbA1cの測定を行うことが好ましい。HbA1cを測定することによって、例えば、GHbLys測定により、被検者の食後高血糖を診断するだけでなく、すでに糖尿病を患っているか否かも判断することが可能である。

[0105] (HbA1c%の測定方法)

HbA1c%の測定方法は、制限されず、例えば、従来公知の方法(例えば、酵素法、HPLC法、免疫法、電気泳動法、質量分析法等)が採用できる。一例として、以下

に、酵素法による測定方法を示す。

[0106] 酵素法によるHbA1c%の測定方法は、例えば、Hbをプロテアーゼ処理して、β鎖N末端バリンまたはβ鎖N末端バリンを含むペプチド(末端ペプチド)を切り出し、バリンのα－アミノ基の糖化部分にFAODを作用させる以外は、前述のGHbLys%の測定方法と同様である。

[0107] 前記プロテアーゼとしては特に制限されないが、前述のようなものが使用できる。中でも、β鎖N末端に特異的に作用してN末端ペプチドの切断を触媒するプロテアーゼが好ましく、例えば、特開2000－300294号公報、特開2004－344052号公報等に開示されるプロテアーゼがあげられる。また、β鎖N末端バリンの切断を触媒するプロテアーゼとしては、例えば、国際公開第2000／50579号パンフレット(日本国特許3668801)、国際公開第2000／61732号パンフレット、特開2002－315600号公報等に開示されているプロテアーゼがあげられる。

[0108] HbA1cの測定方法に使用するFAODは、特に制限されないが、α-アミノ基が糖化されたアミノ酸またはペプチドに作用して、α-ケトアルデヒドおよび過酸化水素を発生する反応を触媒する酵素(前記FAOD－α)が好ましい。

[0109] このようなFAOD－αの具体例としては、例えば、商品名FPOX-CE(キッコーマン社製)、商品名FPOX－EE(キッコーマン社製)、国際公開第2004／029251号パンフレットに記載のフルクトシルアミンオキシダーゼ、特開2004－275013号公報や特開2004－275063号公報記載のフルクトシルアミンオキシダーゼ、ペニシリウム属由来のFAOD(特開平8－336386号公報)等が使用できる。

[0110] プロテアーゼ処理によって、例えば、Hbβ鎖N末端からフルクトシルVal-Hisが切り出された場合、このFAOD処理によって、Valのα-アミノ基に結合した糖が遊離し、α-ケトアルデヒド(糖残基)、Val-Hisおよび過酸化水素が生成される。

[0111] そして、例えば、下記式からHbA1c値を算出することができる。HbA1c値は、例えば、Hbのβ鎖N末端バリンの糖化率であり、HbA1c%ともいう。 HbA1c%＝(HbA1c/総Hb)×100

[0112] 前記式において、HbA1cとしては、例えば、Hbのβ鎖N末端バリンの糖化量(または糖化濃度)があげられる。また、総Hbとしては、例えば、Hbの総量(もしくはHb濃

度)もしくはHbAの総量(もしくはHbA濃度)、または、Hbのβ鎖N末端バリンの総量(糖化されたバリンを含む)があげられる。前記式に示すように、例えば、Hbのβ鎖N末端バリンの糖化量(HbA1c濃度)と、試料中の総Hb量(Hb濃度)との比(100分率)を算出することによって、HbA1c%を求めることができる。

[0113] 前記糖化量の算出は、HbのLysの糖化量と同様に、例えば、発色基質の発色程度を測定することにより行うことができる。具体的には、例えば、Hbのβ鎖N末端の既知糖化量と吸光度との関係をプロットした検量線を用いることによって行える。例えば、β鎖N末端糖化量が既知であるHb標準物について、前述と同様にして吸光度測定を行い、この標準液の吸光度測定値と既知糖化量との関係を示す検量線を作成しておく。そして、この検量線に前述のように測定した吸光度を代入することによって、β鎖N末端の糖化量が算出できる。

[0114] (HbA1cとGHbLysの測定)

HbA1cおよびGHbLysは、例えば、FAODの基質特異性を利用することによって、同じ試料を用いて連続的に測定することも可能である。すなわち、Hbを含む試料をプロテアーゼ処理し、β鎖N末端バリンもしくはβ鎖N末端ペプチドと、リジンもしくはリジンを含むペプチドとを切り出す。そして、まず、α-アミノ基の糖化部分(例えば、バリンの糖化部分)に特異的に作用し且つアミノ酸側鎖の糖化部分には作用し難いFAOD－αで処理することによって、HbA1cを測定する。その後、さらに、リジン側鎖の糖化部分に特異的に作用し且つα－アミノ基の糖化部分には作用し難いFAOD－Sで処理することによって、GHbLysを測定すればよい。また、FAODの処理順序は、これには制限されず、例えば、FAOD－Sで処理することによってGHbLysを測定した後、FAOD－αで処理することによってHbA1cを測定してもよい。

[0115] また、全血試料を用いて血球内Hbの糖化率を測定する場合、前述のような促進化合物を使用することによって、さらに以下のような効果を得ることも可能である。血球内タンパク質の糖化率の測定にあたって、通常、全血試料に溶血処理が施され、溶血試料として使用される。この際、溶血試料中には血清中の糖化タンパク質(例えば、糖化アルブミン)が共存する。しかし、前記促進化合物の存在下でプロテアーゼ処理を行えば、メカニズムは不明であるが、前述のような糖化Hbの切断は促進されるも

のの、糖化アルブミンの切断は抑制される。このため、例えば、試料中に糖化アルブミン等が混在し、その糖化部位にもFAODが作用するという問題も回避でき、測定精度をより一層向上することが可能である。なお、このような問題は、例えば、プロテアーゼがHbにもアルブミンにも作用し、且つ、後に添加するFAODが、いずれのタンパク質切断物にも作用する場合に生じるものである。したがって、この問題は、前述のように目的タンパク質の目的部位(FAODが作用する糖化アミノ酸や糖化ペプチド)を選択的に切り出すプロテアーゼを選択することによっても解消できる。

[0116] ＜平均血糖値の測定方法＞

本発明の平均血糖の測定方法は、食後血糖値を反映した平均血糖値の測定方法であって、下記(x)～(y)を含むことを特徴とする。

(x) 平均血糖値マーカーを測定する工程であって、前記平均血糖値マーカーが、本発明の食後高血糖マーカーであり、本発明の食後高血糖マーカーの測定方法により、Hbのリジン残基の糖化率を測定する工程

(y) Hbのリジン残基の糖化率と食後血糖値を反映した平均血糖値との関係式に、前記(x)工程で測定したHbのリジン残基の糖化率を代入して、食後血糖値を反映した平均血糖値を算出する工程

[0117] 前述のように、HbA1cは、過去の普段の平均血糖値の指標であって、日内変動を反映した平均血糖値の指標とはならない。これに対して、本発明のマーカーは、食後血糖値を反映した平均血糖値の指標となることが明らかとなった。このため、本発明の平均血糖値マーカー(食後高血糖マーカー)を測定することによって、食後血糖値を反映した平均血糖値を算出することが可能となる。そして、この算出した平均血糖値が、例えば、健常者の平均血糖値よりも相対的に高い場合には、食後高血糖の可能性があると判断することができる。また、あわせてHbA1cの測定を行うことによって、より信頼性に優れる判断結果を得ることもできる。

[0118] 前記関係式は、特に制限されないが、例えば、以下のようにして作成することができる。食後血糖値が異なる複数の患者から採血し、GHbLys%を測定する。一方、同じ複数の患者から、食後を含む所定のタイミングで複数回採血を行い、各血液サンプルについて血糖値を測定する。各サンプルの血糖値を合計して、各患者の平均値を

算出する。この平均値が、食後の血糖値が反映された平均血糖値となる。なお、血糖値測定用サンプルの採血のタイミングは、例えば、早朝空腹時、就寝前、食直前、食直後、食後30分、食後1時間、食後2時間である。そして、各患者について、GHbLy s%と食後血糖値が反映された平均血糖値とをプロットすることによって、検量線が作成できる。

[0119] ＜キット＞

本発明のマーカー測定用キットは、前記本発明の食後高血糖マーカーの測定方法に使用するキットであって、プロテアーゼ、FAOD、PODおよび酸化により発色する基質を含む。これを用いれば、前述の本発明の食後高血糖マーカーの測定方法を、簡易且つ簡便に行うことができる。本発明のキットにおける前記構成成分は、前述と同様のものが使用できる。また、本発明のキットは、本発明の食後高血糖マーカーの測定において使用できる前述の物質を、適宜含んでもよい。前記物質としては、例えば、前記促進化合物やテトラゾリウム化合物等があげられる。

[0120] 本発明の危険度決定用キットは、本発明の糖尿病を発症する危険度の決定方法に使用するキットであり、プロテアーゼ、FAOD、PODおよび酸化により発色する基質を含む。また、本発明の食後高血糖診断用キットは、本発明の食後高血糖の診断方法に使用するキットであって、プロテアーゼ、FAOD、PODおよび酸化により発色する基質を含む。これらのキットの構成は、例えば、前記本発明のマーカー測定用キットと同様であってもよい。

[0121] 以下、実施例および比較例により本発明を更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い。

実施例 1

[0122] 実験の一日前に、グルコースを0．85重量%生理食塩水に溶解して、所定濃度のグルコース溶液を調製した。前記濃度は、500mM、900mM、1900mM、3500mMとした。ブランク(BLK)は、0．85重量%生理食塩水を使用した(グルコース濃度0mM)。

[0123] 健常者の血液をヘパリンNa管に採取し、遠心分離によって血漿と血球とに分離した。分離した血球3mLをスクリュー管(13．5ml)に分取し、さらに、分離した血漿2．

7ml、および、前記生理食塩水0．3mL（ブランク）または各グルコース溶液0．3mlを、それぞれ混合して、グルコース添加血を調製した。なお、グルコース添加血におけるグルコース濃度は、それぞれ、0mM、50mM、90mM、190mM、350mMとなる。これらのグルコース添加血をウェーブローダーで混合しながら37度のインキュベーターで保温し、保温開始から所定時間（3時間、6時間、24時間）後に、1．25mlずつ分取した。分取したグルコース添加血を遠心分離によって血球と血漿とに分離し、血漿を、糖化アルブミンとグルコース濃度の測定用試料とした。他方、分離した血球から0．6mlを分取し、これに約10倍体積量の1．3％（w／v）食塩水を添加し、室温で10分間転倒混和して血球を洗浄した。その後、遠心分離によって血球と上清とに分離し、上清を除去した。前記血球を、再度、前記食塩水により洗浄し、回収した血球を、糖化Hbの測定用試料とした。

[0124] HbA1cおよび不安定型HbA1cの測定は、前記血球試料をそのまま用いて、HPLC法であるADAMS－A1c HA－8160（アークレイ社製）により行った。

[0125] 一方、GHbLysの測定には、前記血球試料を下記溶血試薬で51倍（体積）に希釈して調製した溶血試料を使用した。前記溶血試料20μLと下記プロテアーゼ試薬76μLとを混合して、37℃で5分間インキュベートした。さらに、下記発色試薬19μLを添加して37℃で3分間インキュベートして、3分間における吸光度増加量を測定した（波長751nmおよび571nm）。吸光度測定には、自動分析装置（商品名JCA－BM8、日本電子社製）を使用した。751nmの吸光度は、GHbLys濃度を示し、571nmの吸光度は、Hb濃度を示す。

[0126] [表1]

（溶血試薬：ｐＨ９．４）

ＣＨＥＳ	８０ｍｍｏｌ／Ｌ
ＭＯＰＳ	８０ｍｍｏｌ／Ｌ
ポリオキシエチレンラウリルエーテル	９ｇ／Ｌ

（プロテアーゼ試薬：ｐＨ５．５）

ＷＳＴ－３（同仁化学研究所製）	２ｍｍｏｌ／Ｌ
NaN_3	０．６ｍｍｏｌ／Ｌ
ＮａＣｌ	１００ｍｍｏｌ／Ｌ
$CaCl_2$	２ｍｍｏｌ／Ｌ
中性プロテアーゼ（アークレイ社製）	４ＭＵ／Ｌ
ＭＥＳ	１ｍｍｏｌ／Ｌ

（発色試薬：ｐＨ７）

ＤＡ－６４（和光純薬工業社製）	８０μｍｏｌ／Ｌ
ＦＡＯＤＬ（アークレイ社製）＊	３６ＫＵ／Ｌ
Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ	３８０ｍｍｏｌ／Ｌ
NaN_3	０．５ｍｍｏｌ／Ｌ

＊　ギベレラ由来ＦＡＯＤ（ＦＡＯＤ－αＳ）

[0127] そして、予め作成したHb濃度（g／L）またはGHbLys濃度（g／L）と、吸光度との関係を示す検量線に、測定したそれぞれの吸光度を代入してGHbLys濃度およびHb濃度を求め、下記式からGHbLys％を算出した。なお、前記検量線は、Hb濃度（g／L）およびGHbLys濃度（g／L）が既知である検体群について、吸光度とHb濃度（g／L）またはGHbLys濃度（g／L）とをプロットして作成した。

GHbLys（％）＝（GHbLys濃度／Hb濃度）×100

[0128] グルコースの測定には、測定キットである商品名リキテックGlu HK（ロシュ・ダイアグノスティックス社製）を使用し、前記キットのメーカーにより提示された分析パラメーターならびに使用説明書に基づいて測定した。なお、吸光度測定には、前記自動分析装置を使用した。

[0129] これらの結果を、図1～4に示す。図1は、グルコース添加血のインキュベート時間と血漿グルコース濃度との関係を示すグラフである。図2は、グルコース添加血のインキ

ュベート時間と血球HbA1c%との関係を示すグラフである。図3は、グルコース添加血のインキュベート時間と血球不安定型HbA1c%との関係を示すグラフである。図4は、グルコース添加血のインキュベート時間と血球GHbLys%との関係を示すグラフである。

[0130] 図1は、血漿グルコース濃度の変動を示す。同図に示すように、血球細胞がグルコースを消化するため、グルコース濃度は経時的に低下しているが、インキュベート開始から24時間後の試料についてもグルコースの残存が確認された。図2は、血球の安定型HbA1c%の変動を示す。同図に示すように、安定型HbA1c%は、グルコースとのインキュベート開始から6時間経過後においても測定値の上昇が見られなかった。また、グルコース濃度を350mMとしても、24時間後に測定値が0．8%程度上昇するにとどまった。これは、前述のように、不安定型HbA1cから安定型HbA1cに変化し難いためである。つぎに、図3は、血球の不安定型HbA1c%の変動を示す。不安定型HbA1c%は、試料に添加したグルコース濃度に従って変動を示したが、図1に示すように血漿中のグルコース濃度が低くなると、それに伴って同様に減少した。これは、不安定型HbA1cの生成が、グルコース濃度と平衡関係にあり、グルコースの減少に伴って再びHbに戻るためである。これに対して、図4に示すように、血球のGHbLysは、次のような挙動を示した。すなわち、同図に示すように、GHbLys%は、試料に添加したグルコース濃度に従って変動し、且つ、3時間という短時間のインキュベートでも生成が確認された。さらに、GHbLys%は、インキュベート時間に対応して測定値も上昇した。すなわち、GHbLysは、安定型HbA1cや不安定型HbA1cとは異なり、短時間の血糖値上昇でも生成される糖化タンパク質であり、その測定値は、短時間の血糖値上昇にも敏感に対応する指標といえる。

[0131] なお、グルコース無添加の測定試料(BLK)について、試料調製から14日目に再度測定を行った。その結果、グルコース濃度は0であり、また、HbA1c%およびGHbLys%はいずれも変動が見られなかった。このことから、生成した糖化物は、分解することなく存在することを確認した。このため、これらの値は、Hbの寿命とグルコース濃度のみに依存することは明らかである。

[0132] 以上の結果から、GHbLysを測定すれば、例えば、食後の短時間にのみ血糖値が

上昇する食後高血糖であっても、間接的に血糖値を検出できることがわかった。

実施例 2

[0133] 健常者の全血をヘパリンリチウム入りの採血管により採取した。この血液を室温で2時間放置して血球を沈降させ、血球画分と血漿画分とに分離した。分離した血漿0.5mLにグルコース100mgを添加して溶解させ、室温で3時間放置することによって、グルコース添加血漿を調製した。そして、前述の分離した血球と血漿(グルコース無添加血漿、グルコース添加血漿)とを下記割合で混合し、緩やかに攪拌し、37℃で保温した。混合開始から0分後、30分後、1時間後、2時間後、3.5時間後の試料について、下記方法によりHbA1c%とGHbLys%の測定を行った。

[0134] [表2]

	試料1	試料2	試料3	試料4
血球	0.3mL	0.3mL	0.3mL	0.3mL
Glc無添加血漿	0.3mL	0.2mL	0.1mL	−
Glc添加血漿	−	0.1mL	0.2mL	0.3mL
Glc濃度 (mmol/L)	0	180	360	540

[0135] <HbA1c%測定方法> 試料0.065mLと精製水0.065mLとを混合し、下記組成の試薬R1を0.078mL添加して37℃で5分間インキュベートした。ここで、この反応液について、658nmにおける1回目の吸光度測定(A_1)と、571nmにおける吸光度測定(B_1)とを行った。つぎに、前記反応液に、下記組成の試薬R2を0.0185mL添加して37℃で5分間インキュベートした。ここで、この反応液について、658nmにおける吸光度測定(A_2)を行った。そして、HbA1c濃度(Hbのβ鎖N末端バリンの糖化濃度)に相当する吸光度を算出した。この算出は、2回目の吸光度(A_2)に、容量変化を補正する0.081/0.1095を乗じ、得られた値から、1回目の吸光度(A_1)を差し引くことで算出した。これを、HbA1c吸光度という。なお、1回目の571nmにおける吸光度(B_1)は、試料中のHb濃度に相当する。続いて、予め準備した検量線から、各試料について、HbA1c濃度およびHb濃度を算出した。前記検量線は、HbA1c濃度と吸光度との関係を示す検量線と、Hb濃度と吸光度との関係を示す検量線である。そして、算出したHbA1c濃度の値を算出したHb濃度の値で割って、さらに1

00倍した値を、HbA1c%として求めた。前記検量線は、HbA1c濃度およびHb濃度が既知である標準物質を用いて、同様の方法により吸光度を測定し、各濃度と吸光度との関係をプロットすることによって作成した。これらの吸光度測定には、自動分析装置BM-8(日本電子社製)を使用した。

[0136] [表3]

(R1:pH7)	
FPOX-CE(キッコーマン社)	1.5KU/L
POD	10KU/L
KNO_2	4mmol/L
ドデシルマルトシド	2.5g/L
PIPES緩衝剤	30mmol/L
(R2:pH5.5)	
メタロプロテアーゼ(アークレイ社)	1800KU/L
DA-67(和光純薬工業社)	0.03mmol/L
ヘキサデシルトリメチルアンモニウム	0.1g/L
$CaCl_2$	5mmol/L
Tris緩衝剤	200mmol/L

[0137] <GHbLys%測定方法> 試料0.065mLと精製水0.065mLとを混合し、下記組成の試薬R1を0.078mL添加して37℃で5分間インキュベートした。ここで、この反応液について、658nmにおける1回目の吸光度測定(A_1')と、571nmにおける吸光度測定(B_1')とを行った。つぎに、前記反応液に、下記組成の試薬R2を0.0185mL添加して37℃で5分間インキュベートした。ここで、この反応液について、658nmにおける吸光度測定(A_2')を行った。そして、GHbLys濃度(Hbのリジン側鎖の糖化濃度)に相当する吸光度を算出した。この算出は、2回目の吸光度(A_2')に、容量変化を補正する0.081/0.1095を乗じ、得られた値から1回目の吸光度(A_1')を差し引くことで算出した。これを、GHbLys吸光度という。なお、1回目の571nmにおける吸光度(B_1')は、試料中のHb濃度に相当する。続いて、予め準備した検量線から、各試料について、GHbLys濃度およびHb濃度を算出した。前記検量線は、GHbLys濃度と吸光度との関係を示す検量線と、Hb濃度と吸光度との関係を示す検

量線である。そして、算出したGHbLys濃度の値を算出したHb濃度で割って、さらに100倍した値を、GHbLys%として求めた。前記検量線は、GHbLys濃度およびHb濃度が既知である標準物質を用いて、同様の方法により吸光度を測定し、各濃度と吸光度との関係をプロットすることによって作成した。これらの吸光度測定には、自動分析装置BM-8(日本電子社製)を使用した。

[0138] [表4]

（Ｒ１：ｐＨ７）

ＦＡＯＤＬ（アークレイ社）＊	５ＫＵ／Ｌ
ＰＯＤ	１０ＫＵ／Ｌ
KNO_2	４ｍｍｏｌ／Ｌ
ドデシルマルトシド	２．５ｇ／Ｌ
ＰＩＰＥＳ緩衝剤	３０ｍｍｏｌ／Ｌ

＊　ギベレラ由来ＦＡＯＤ（ＦＡＯＤ－αＳ）

（Ｒ２：ｐＨ５．５）

メタロプロテアーゼ（アークレイ社）	１８００ＫＵ／Ｌ
ＤＡ－６７（和光純薬工業社）	０．０３ｍｍｏｌ／Ｌ
ヘキサデシルトリメチルアンモニウム	０．１ｇ／Ｌ
$CaCl_2$	５ｍｍｏｌ／Ｌ
Ｔｒｉｓ緩衝剤	２００ｍｍｏｌ／Ｌ

[0139] これらの結果を、図5および図6に示す。図5は、各試料のHbA1c%と、各試料におけるグルコースとのインキュベート時間との関係を示すグラフである。図6は、各試料のGHbLys%と、各試料におけるグルコースとのインキュベート時間との関係を示すグラフである。両図において、◇◆はグルコース濃度0mmol／Lの試料1、■はグルコース濃度180mmol／Lの試料2、▲はグルコース濃度360mmol／Lの試料3、●はグルコース540mmol／Lの試料4の結果を示す。

[0140] 図5に示すように、試料におけるグルコース濃度を0mmol／Lから540mmol／Lに変化させた試料であっても、各試料間のHbA1c%の値はほとんど変化が見られなかった。また、同じグルコース濃度の試料であって、グルコースとのインキュベート時間を0時間～3．5時間に変化させた場合であっても、HbA1c%にほとんど変化は見ら

れなかった。このことから、グルコースとのインキュベーション時間0～3．5時間の範囲において、試料中のグルコース濃度にかかわらず、HbA1cがほとんど生成されていないことがわかる。これに対して、図6に示すように、GHbLys％は、試料中のグルコース濃度の増加に応じて測定値が増加している。さらに、グルコースとのインキュベート時間の増加に応じても、GHbLys％の測定値が増加している。このことから、試料中のグルコース濃度ならびにインキュベーション時間に依存して、GHbLysが生成されていることがわかる。

[0141] さらに、これらの結果から、以下に示すように、GHbLys％の測定にあわせてHbA1c％を測定すれば、食後高血糖と糖尿病とを区別できることも証明された。図5に示すように、グルコースとのインキュベート時間が単時間であるとHbA1cは増加しない。他方、糖尿病のように、空腹時においても血糖値が高い場合、Hbとグルコースとの接触時間も長くなるため、HbA1cが生成される。このため、HbA1cは、食後高血糖ではなく、糖尿病の指標となる。一方、GHbLysは、食後高血糖で生成される。したがって、GHbLys％とHbA1c％の両方を測定すれば、GHbLys％測定により、食後高血糖か否かを判断でき、さらに、HbA1c％測定により、すでに糖尿病に進行しているか否かを判断することができる。

実施例 3

[0142] 前記実施例2と同様にして、糖尿病患者および健常者から全血を採取した。この全血を室温で1日放置した後、冷蔵庫に保存した（0～25日）。保存後の全血を緩やかに攪拌した後、全血0．02mLに精製水0．50mLを添加して溶血した。この溶血試料を用いて、前記実施例2と同様にしてGHbLys％の測定を行った。

[0143] この結果を図7に示す。図7は、全血の保存時間とGHbLys％との関係を示すグラフである。同図において、◆は健常者試料、■は糖尿病患者試料の結果を示す。

[0144] 同図に示すように、GHbLys％の測定値は、全血を0日から25日放置した場合であってもほとんど変動しなかった。このことから、被検者の生体内における血液、また、被検者から採取した血液においてGHbLys％は変動しないといえる。つまり、従来の直接的な血糖値の測定方法とは異なり、GHbLys％の測定によれば、例えば、採血時期や採取した血液の分析時期等は、何ら制限されず、患者や医療機関の労力

を軽減できる。

実施例 4

[0145] 糖尿病患者は、恒常的な高血糖を示すが、I型患者とII型患者とによって、その抑制方法は異なっている。まず、I型患者は、体内でインスリンを生産できないため、外部よりインスリンを注入する。この食前に注射したインスリンによって、速やかに血糖は低下する。しかし、血糖に応じたインスリン量を生体が分泌するわけではないため、一時的なインスリン不足により、食後高血糖が発生し、その後、血糖が低下するという挙動を示す。したがって、I型患者は、インスリンの投与によって、インスリン未投与の状態よりも、普段の平均血糖値を表すHbA1c%は低い値を示すが、食後高血糖の指標となるGHbLys%は、依然高い値を示すと考えられる。一方、II型患者は、ある程度、血糖に応じたインスリン量を体内で生産できるため、緩やかな血糖変動を示す。したがって、II型患者は、インスリン未投与であっても、インスリン未投与のI型患者と比較して、普段の平均血糖値を示すHbA1c%は低い値を示す。そして、インスリンや、小腸での糖の吸収を遅らせる遅延剤等を使用することによって、食後高血糖は発生し難い。このため、糖吸収遅延剤の投与によって、糖吸収遅延剤未投与の状態よりも、食後高血糖の指標となるGHbLys%が低い値を示すと考えられる。そこで、I型患者には、インスリンを投与し(糖吸収遅延剤は未投与)、II型患者には、インスリンと共に糖吸収遅延剤を投与し、GHbLys%を測定して、食後高血糖を示すGHbLys%と血糖の平均値を示すHbA1c%との関係を確認した。

[0146] まず、糖尿病患者27人を、インスリンのみを投与しているI型患者と、インスリンと糖吸収遅延剤を投与しているII型患者とに分類した。そして、各患者について、HbA1c%とGHbLys%の測定を行った。HbA1c%は、市販の測定器(商品名ADAMS A1c HA－8160、アークレイ社製)を用いて、その使用説明書に従って測定した。GHbLys%は、前記実施例2と同様の方法により測定した。HbA1c%、GHbLys%、および、これらの差(GHbLys%－HbA1c%)の結果を、下記表に示す。

[0147] [表5]

<Ⅱ型患者>

GHbLys%	HbA1c%	GHbLys%−HbA1c%
6.82	7.19	−0.37
6.95	7.20	−0.25
6.39	6.65	−0.26
7.20	7.52	−0.32
7.52	7.96	−0.44
6.39	6.60	−0.21
7.13	7.17	−0.04
6.01	6.32	−0.31
7.23	7.50	−0.27
5.64	5.96	−0.32
6.05	6.24	−0.19
6.33	6.70	−0.37

<Ⅰ型患者>

GHbLys%	HbA1c%	GHbLys%−HbA1c%
6.64	6.53	0.11
6.55	6.03	0.52
6.23	5.95	0.28
5.40	5.21	0.19
7.23	7.08	0.15
10.91	10.17	0.74
8.86	8.09	0.77
8.38	8.23	0.15
10.99	9.38	1.61
7.80	7.62	0.18
7.74	7.56	0.18
5.90	5.72	0.18
8.49	8.43	0.06
9.64	8.75	0.89

[0148] 前記表に示すように、インスリンを投与しているI型患者は、HbA1c%よりもGHbLys%が大きい値を示し、糖吸収遅延剤を投与しているII型患者は、HbA1c%よりもGHbLys%が小さい値を示した。前述のように、インスリンを投与しているI型患者は、食後高血糖を示し易く、インスリンと糖吸収遅延剤とを投与しているII型患者は、食後高血糖を示し難い。このため、前記表1に示すように、I型患者について、食後の血糖

値を示すGHbLys%がHbA1c%よりも大きな値を示し、「GHbLys%－HbA1c%」が、II型患者の「GHbLys%－HbA1c%」よりも大きい値を示したことは、GHbLys%が、食後の血糖値を反映していることを裏付けているといえる。また、これらの結果から、GHbLys%の検出だけでなく、GHbLys%とHbA1c%との関係により、食後高血糖（境界型糖尿病）を判断できることもわかった。

産業上の利用可能性

[0149] 以上のように、本発明によれば、GHbLysの測定によって、食後高血糖を間接的に検出することが可能である。食後高血糖は、いわゆる境界型糖尿病であり、この段階で十分な予防を図ることによって、糖尿病の進行の遅延や防止、合併症の抑制等が可能となる。このため、本発明は、食後高血糖の診断方法として極めて有用である。

請求の範囲

[1] 食後高血糖の診断のための食後高血糖マーカーであって、

リジン残基が糖化されたヘモグロビンを含むことを特徴とする食後高血糖マーカー。

[2] 前記食後高血糖マーカーが、食後血糖値を反映した平均血糖値マーカーである、請求の範囲1記載の食後高血糖マーカー。

[3] 食後高血糖マーカーの測定方法であって、

前記マーカーが請求の範囲1記載の食後高血糖マーカーであり、

前記食後高血糖マーカーの測定が、ヘモグロビンのリジン残基の糖化率の測定であることを特徴とする測定方法。

[4] 前記リジン残基の糖化率の測定方法が、高速液体クロマトグラフィー法、免疫法、酵素法および電気泳動法からなる群から選択された少なくとも一つである、請求の範囲3記載の測定方法。

[5] 前記リジン残基の糖化率の測定方法が、酵素法であって、下記(A)～(C)工程を含む、請求の範囲3記載の測定方法。

(A) ヘモグロビンをプロテアーゼで切断する工程

(B) 得られたヘモグロビン切断物におけるリジン残基の糖化部分にフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを作用させる工程

(C) 前記糖化部分とフルクトシルアミノ酸オキシダーゼとの酸化還元反応を測定することにより、ヘモグロビンのリジン残基の糖化率を決定する工程

[6] 前記ヘモグロビン切断物が、リジン、糖化されたリジン、リジン残基を含むペプチド、および、糖化されたリジン残基を含むペプチドからなる群から選択された少なくとも一つを含む、請求の範囲5記載の測定方法。

[7] 前記ヘモグロビン切断物が、アミノ酸残基数2～6個のペプチドを含む、請求の範囲5記載の測定方法。

[8] 試料中に含まれる前記食後高血糖マーカーの検出方法であって、前記試料が、全血試料、血球試料、または、これらの溶血試料である、請求の範囲3記載の測定方法。

[9] ヘモグロビンの総量と、リジン残基が糖化されたヘモグロビンの量とから、前記ヘモグロビンのリジン糖化率を算出する、請求の範囲3記載の測定方法。

[10] 前記リジン残基が糖化されたヘモグロビンの量が、前記リジン残基の糖化量である、請求の範囲9記載の測定方法。

[11] 被検体が糖尿病を発症する危険度を決定する方法であって、

下記(a)工程を含むことを特徴とする危険度決定方法。

(a) 被検体から採取した血液試料について、請求の範囲3記載の測定方法により、ヘモグロビンのリジン残基の糖化率を測定することによって、請求の範囲1記載の食後高血糖マーカーを測定する工程

[12] さらに(b)工程を含む、請求の範囲11記載の危険度決定方法。

(b) 前記(a)工程において測定したヘモグロビンのリジン残基の糖化率を用いて、下記(b1)～(b5)からなる群から選択された少なくとも一つの方法により、前記被検体が糖尿病を発症する危険度を決定する工程

(b1) 健常者から採取した血液におけるヘモグロビンのリジン残基の糖化率と食後高血糖患者から採取した血液におけるヘモグロビンのリジン残基の糖化率との境界値を評価基準として設定し、

前記評価基準よりも、前記(a)工程において測定した被検体のリジン残基の糖化率が相対的に高い場合に、危険度が相対的に高いと決定する。

(b2) 健常者から採取した血液におけるヘモグロビンのリジン残基の糖化率と空腹時の健常者から採取した血液の血糖値との関係式に、空腹時の被検者から採取した血液の血糖値を代入して求めたヘモグロビンのリジン残基の糖化率の計算値を評価基準として設定し、

前記評価基準よりも、前記(a)工程において測定した被検体のリジン残基の糖化率が相対的に高い場合に、相対的に危険度が高いと決定する。

(b3) 空腹時の被検体から採取した血液の血糖値を評価基準として設定し、

他方、健常者から採取した血液におけるヘモグロビンのリジン残基の糖化率と空腹時の健常者から採取した血液の血糖値との関係式に、前記(a)工程において測定した被検体のリジン残基の糖化率を代入して、被検体の空腹時血糖値の計算値を求

め、

前記評価基準よりも、被検体の空腹時血糖値の計算値が相対的に高い場合に、危険度が相対的に高いと決定する。

（b4） 健常者から採取した血液におけるヘモグロビンのリジン残基の糖化率と健常者から採取した血液におけるヘモグロビンのβ鎖N末端アミノ酸残基の糖化率との関係式に、被検者から採取した血液におけるヘモグロビンのβ鎖N末端アミノ酸残基の糖化率を代入して求めたヘモグロビンのリジン残基の糖化率の計算値を評価基準として設定し、

前記評価基準よりも、前記(a)工程において測定した被検体のリジン残基の糖化率が相対的に高い場合に、危険度が相対的に高いと決定する。

（b5） 被検体から採取した血液におけるヘモグロビンのβ鎖N末端アミノ酸残基の糖化率を評価基準として設定し、

他方、健常者から採取した血液におけるヘモグロビンのリジン残基の糖化率と健常者から採取した血液におけるヘモグロビンのβ鎖N末端アミノ酸残基の糖化率との関係式に、前記（a）工程において測定した被検体のリジン残基の糖化率を代入して、被検体のヘモグロビンのβ鎖N末端アミノ酸残基の糖化率の計算値を求め、

前記評価基準よりも、被検体のヘモグロビンのβ鎖N末端アミノ酸の糖化率の計算値が相対的に高い場合に、危険度が相対的に高いと決定する。

[13] 被検体の食後高血糖を診断する方法であって、

下記（c）工程を含むことを特徴とする診断方法。

（c） 被検体から採取した血液試料について、請求の範囲3記載の測定方法により、ヘモグロビンのリジン残基の糖化率を測定することによって、請求の範囲1記載の食後高血糖マーカーを測定する工程

[14] さらに（d）工程を含む、請求の範囲13記載の診断方法。

（d） 前記(c)工程において測定したヘモグロビンのリジン残基の糖化率を用いて、下記（d1）～（d5）からなる群から選択された少なくとも一つの方法により、前記被検体の食後高血糖を判断する工程

（d1） 健常者から採取した血液におけるヘモグロビンのリジン残基の糖化率と食後

高血糖患者から採取した血液におけるヘモグロビンのリジン残基の糖化率との境界値を評価基準として設定し、

前記評価基準よりも、前記(c)工程において測定した被検体のリジン残基の糖化率が相対的に高い場合に、食後高血糖と判断する。

（d2） 健常者から採取した血液におけるヘモグロビンのリジン残基の糖化率と空腹時の健常者から採取した血液の血糖値との関係式に、空腹時の被検者から採取した血液の血糖値を代入して求めたヘモグロビンのリジン残基の糖化率の計算値を評価基準として設定し、

前記評価基準よりも、前記(c)工程において測定した被検体のリジン残基の糖化率が相対的に高い場合に、食後高血糖と判断する。

（d3） 空腹時の被検体から採取した血液の血糖値を評価基準として設定し、

他方、健常者から採取した血液におけるヘモグロビンのリジン残基の糖化率と空腹時の健常者から採取した血液の血糖値との関係式に、前記（c）工程において測定した被検体のリジン残基の糖化率を代入して、被検体の空腹時血糖値の計算値を求め、

前記評価基準よりも、被検体の空腹時血糖値の計算値が相対的に高い場合に、食後高血糖と判断する。

（d4） 健常者から採取した血液におけるヘモグロビンのリジン残基の糖化率と健常者から採取した血液におけるヘモグロビンのβ鎖N末端アミノ酸残基の糖化率との関係式に、被検者から採取した血液におけるヘモグロビンのβ鎖N末端アミノ酸残基の糖化率を代入して求めたヘモグロビンのリジン残基の糖化率の計算値を評価基準として設定し、

前記評価基準よりも、前記(c)工程において測定した被検体のリジン残基の糖化率が相対的に高い場合に、食後高血糖と判断する。

（d5） 被検体から採取した血液におけるヘモグロビンのβ鎖N末端アミノ酸残基の糖化率を評価基準として設定し、

他方、健常者から採取した血液におけるヘモグロビンのリジン残基の糖化率と健常者から採取した血液におけるヘモグロビンのβ鎖N末端アミノ酸残基の糖化率との関

係式に、前記(a)工程において測定した被検体のリジン残基の糖化率を代入して、被検体のヘモグロビンのβ鎖N末端アミノ酸残基の糖化率の計算値を求め、

前記評価基準よりも、被検体のヘモグロビンのβ鎖N末端アミノ酸の糖化率の計算値が相対的に高い場合に、食後高血糖と判断する。

[15] 請求の範囲3記載の食後高血糖マーカーの測定方法に使用するキットであって、

プロテアーゼ、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび酸化により発色する基質を含むことを特徴とするマーカー測定用キット。

[16] 請求の範囲11記載の糖尿病を発症する危険度の決定方法に使用するキットであって、

プロテアーゼ、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび酸化により発色する基質を含むことを特徴とする危険度決定用キット。

[17] 請求の範囲13記載の食後高血糖の診断方法に使用するキットであって、

プロテアーゼ、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび酸化により発色する基質を含むことを特徴とする食後高血糖診断用キット。

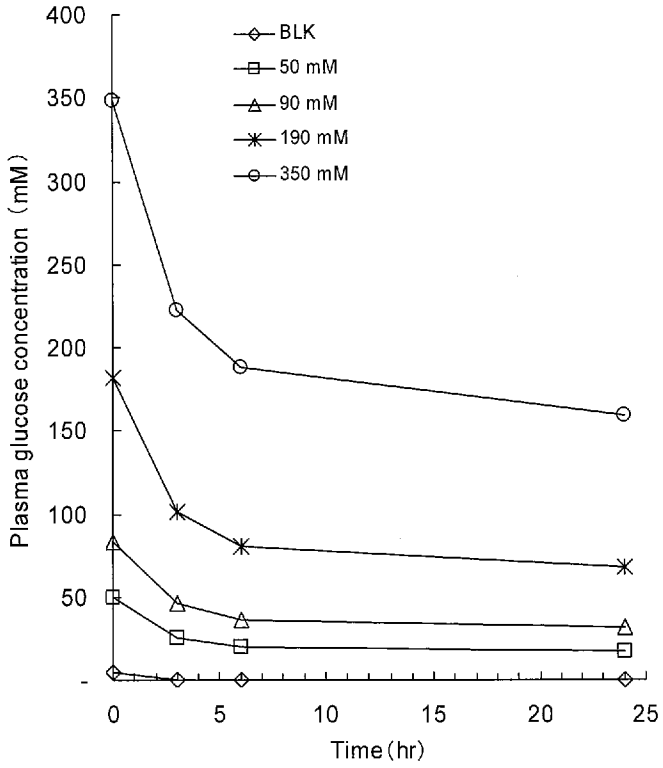
[18] 食後血糖値を反映した平均血糖値の測定方法であって、

下記(x)工程～(y)工程を含むことを特徴とする平均血糖値測定方法。

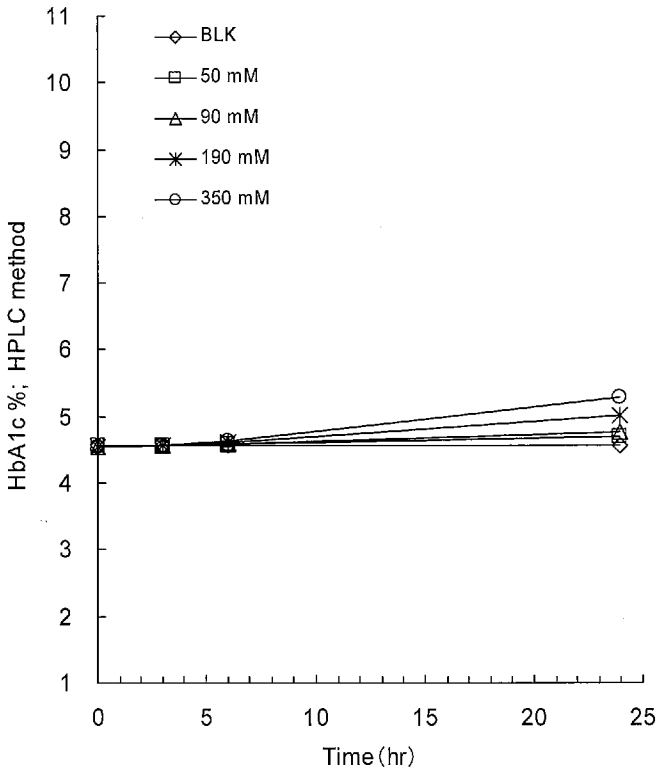
(x) 平均血糖値マーカーを測定する工程であって、前記平均血糖値マーカーが、請求の範囲1記載のマーカーであり、被検体から採取した血液試料について、請求の範囲3記載の食後高血糖マーカーの測定方法により、ヘモグロビンのリジン残基の糖化率を測定する工程

(y) ヘモグロビンのリジン残基の糖化率と食後血糖値を反映した平均血糖値との関係式に、前記(x)工程で測定したヘモグロビンのリジン残基の糖化率を代入して、食後血糖値を反映した平均血糖値を算出する工程

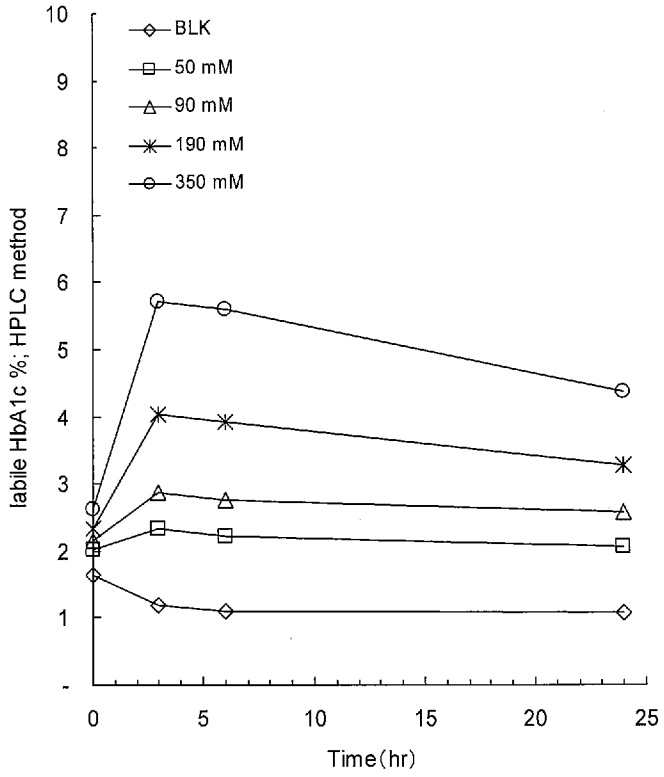
[図1]


400
350
300
250
200
150
100
50
-
Plasma glucose concentration (mM)
BLK
50 mM
90 mM
190 mM
350 mM
0
5
10
15
20
25
Time (hr)

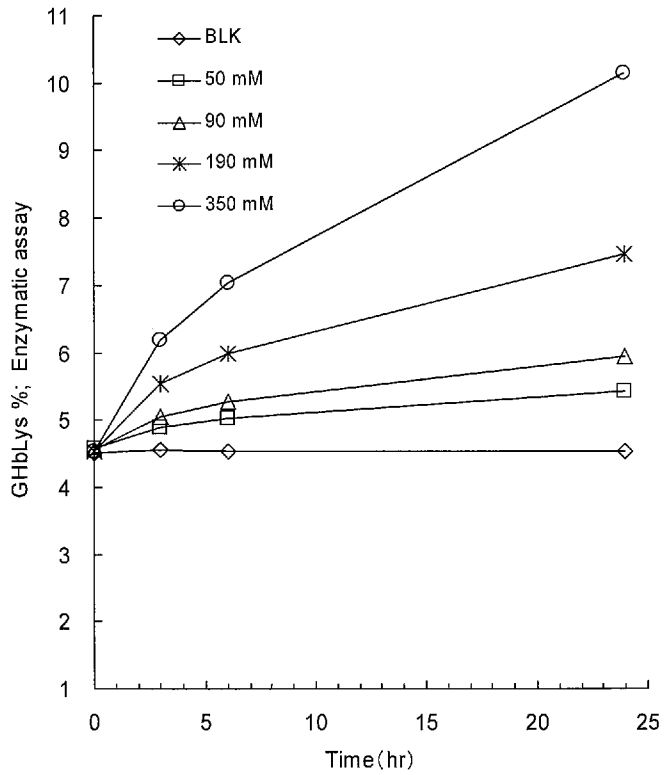
[図2]


11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
HbA1c %; HPLC method
BLK
50 mM
90 mM
190 mM
350 mM
0
5
10
15
20
25
Time (hr)

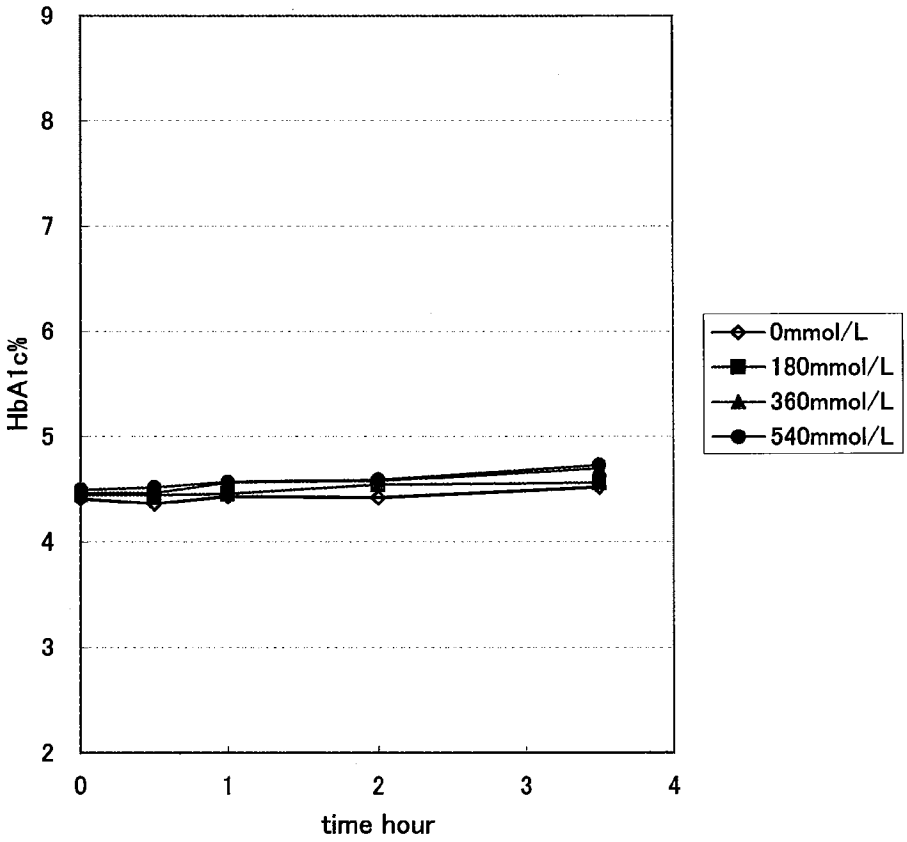
[図3]


BLK
50 mM
90 mM
190 mM
350 mM
labile HbA1c %; HPLC method
Time(hr)

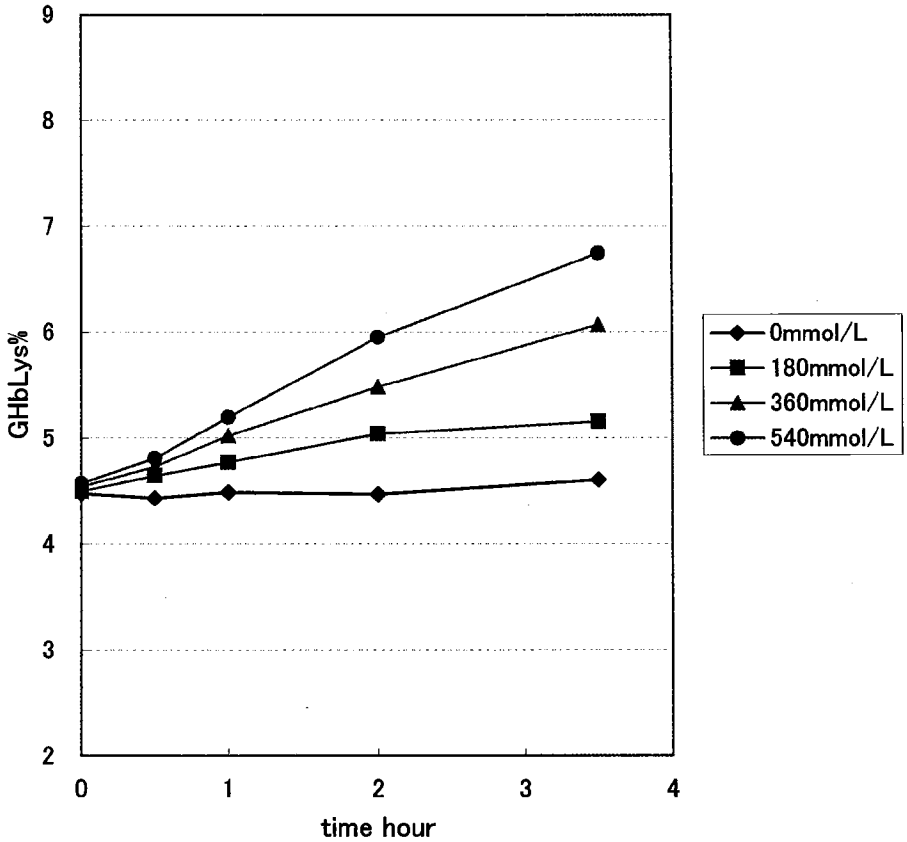
[図4]


BLK
50 mM
90 mM
190 mM
350 mM
GHbLys %; Enzymatic assay
Time(hr)

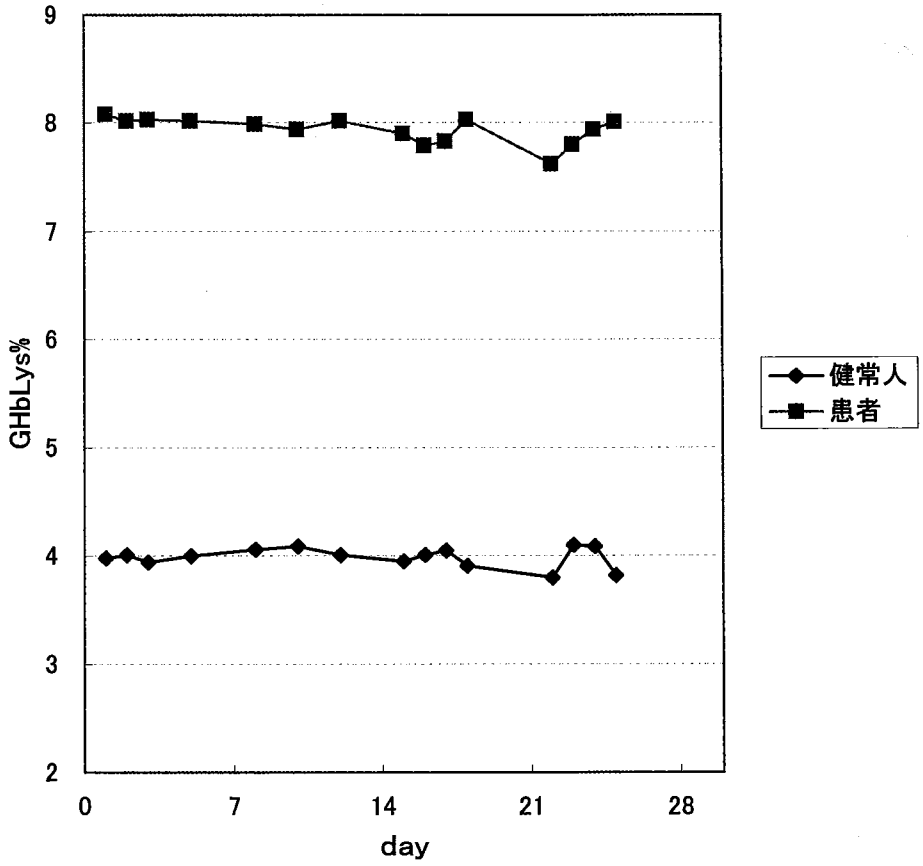
[図5]


HbA1c%
time hour
0mmol/L
180mmol/L
360mmol/L
540mmol/L

[図6]


GHbLys%
time hour
0mmol/L
180mmol/L
360mmol/L
540mmol/L

[図7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2007/065768

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G01N33/72(2006.01)i, *C07K14/805*(2006.01)i, *C12Q1/26*(2006.01)i, *C12Q1/37*(2006.01)i, *G01N30/88*(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)
G01N33/72, C07K14/805, C12Q1/26, C12Q1/37, G01N30/88

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	1996-2007
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2007	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2007

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JMEDPlus(JDream2), JSTPlus(JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	Kiyoshi KUNIKA et al., "Affinity Chromatography 3rd report: Kettochi no Hendo o Kokando ni Han'ei suru So-Glycohemoglobin (T-GHb) Oyobi GHb$\alpha_{Lv}\beta_{L}$(T-GHb-HbA_{1c}) no Seisei Dotai", Eisei Kensa, 1990 Nen, Vol.39, No.10, pages 1559 to 1565, particularly, Summary, 2 Sokutei Sosa Hoho, IV Kosatsu, Fig. 2	1-3/4-12,18
X/Y	WO 2002/006519 A1 (Arkray, Inc.), 24 January, 2002 (24.01.02), Claims & US 2003/0162242 A1 & EP 1304385 A1	15-17/4-12, 18
A	JP 2001-264336 A (International Reagents Corp.), 26 September, 2001 (26.09.01), (Family: none)	1-12,15-18

☒ 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
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 09 October, 2007 (09.10.07)	Date of mailing of the international search report 23 October, 2007 (23.10.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2007/065768

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 2005-062067 A (Arkray, Inc.), 10 March, 2005 (10.03.05), (Family: none)	1-12,15-18
A	JP 2001-057897 A (Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.), 06 March, 2001 (06.03.01), (Family: none)	1-12,15-18
A	Kiyoshi KUNIKA et al., "Affinity Chromatography 1st report: Valine Oyobi Lysine Zanki no Toka o Keisoku suru Kokando So-Glycohemoglobin (T-GHb) Sokuteiho", Eisei Kensa, 1990 Nen, Vol.39, No.8, pages 1272 to 1277	1-12,15-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2007/065768

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.: 13, 14
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 13 and 14 pertain to diagnostic methods to be practiced on the human body and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of the PCT Rule 39.1(iv), to search.

2. [ ] 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:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [ ] 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.:

4. [ ] 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.:

Remark on Protest

the

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..

[ ] 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.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００７／０６５７６８

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　G01N33/72(2006.01)i, C07K14/805(2006.01)i, C12Q1/26(2006.01)i, C12Q1/37(2006.01)i, G01N30/88(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.　G01N33/72, C07K14/805, C12Q1/26, C12Q1/37, G01N30/88

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	１９７１－２００７年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２００７年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２００７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）

JMEDPlus(JDream2)、JSTPlus(JDream2)

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	関連する請求の範囲の番号
X/Y	国香　清　他、「アフィニティクロマトグラフィ第３報：血糖値の変動を高感度に反映する総グリコヘモグロビン（T-GHｂ）及びGHｂ$\alpha_{LV}\beta_{L}$(T-GHｂ－ＨｂＡ$_{1c}$)の生成動態」、衛生検査、1990 年、第 39 巻、第 10 号、第 1559 頁～1565 頁、特に、Summary, 2 測定操作方法、IV 考察の項、図２等	1-3/4-12, 18
X/Y	WO 2002/006519 A1（アークレイ株式会社）2002.01.24 【特許請求の範囲】 & US 2003/0162242 A1 & EP 1304385 A1	15-17/ 4-12, 18

☑ 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 ０９．１０．２００７	国際調査報告の発送日 ２３．１０．２００７
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）　２Ｊ　３４９６ 白形　由美子 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	関連する請求の範囲の番号
A	JP 2001-264336 A（国際試薬株式会社）2001.09.26（ファミリーなし）	1-12，15-18
A	JP 2005-062067 A（アークレイ株式会社）2005.03.10（ファミリーなし）	1-12，15-18
A	JP 2001-057897 A （第一化学薬品株式会社）2001.03.06（ファミリーなし）	1-12，15-18
A	国香　清　他、「アフィニティクロマトグラフィ　第１報：バリン及びリジン残基の糖化を計測する高感度総グリコヘモグロビン（T-GHb）測定法」、衛生検査、1990 年、第 39 巻、第 8 号、第 1272～1277 頁	1-12，15-18

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００７／０６５７６８

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．☑ 請求の範囲１３、１４ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲１３、１４は、診断方法に関するものであって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。

２．☐ 請求の範囲＿＿＿＿＿＿＿＿ は、有意義な国際調査をする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．☐ 請求の範囲＿＿＿＿＿＿＿＿ 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。

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の範囲について作成した。

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の範囲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ので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲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ので、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の範囲について作成した。

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。