

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-201894

(P2017-201894A)

(43) 公開日 平成29年11月16日(2017.11.16)

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)		
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	Z	4 B O 6 3
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A	
C 1 2 N	15/00	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A	
C 1 2 Q	1/34	(2006.01)	C 1 2 Q	1/34		

審査請求 未請求 請求項の数 17 O L (全 37 頁)

(21) 出願番号	特願2016-93963 (P2016-93963)	(71) 出願人	596165589
(22) 出願日	平成28年5月9日 (2016.5.9)		学校法人 聖マリアンナ医科大学
			神奈川県川崎市宮前区菅生2-16-1
		(74) 代理人	100079049
			弁理士 中島 淳
		(74) 代理人	100084995
			弁理士 加藤 和詳
		(74) 代理人	100099025
			弁理士 福田 浩志
		(72) 発明者	田中 逸
			神奈川県川崎市宮前区菅生2-16-1
			学校法人聖マリアンナ医科大学内
		(72) 発明者	永井 義夫
			神奈川県川崎市宮前区菅生2-16-1
			学校法人聖マリアンナ医科大学内

最終頁に続く

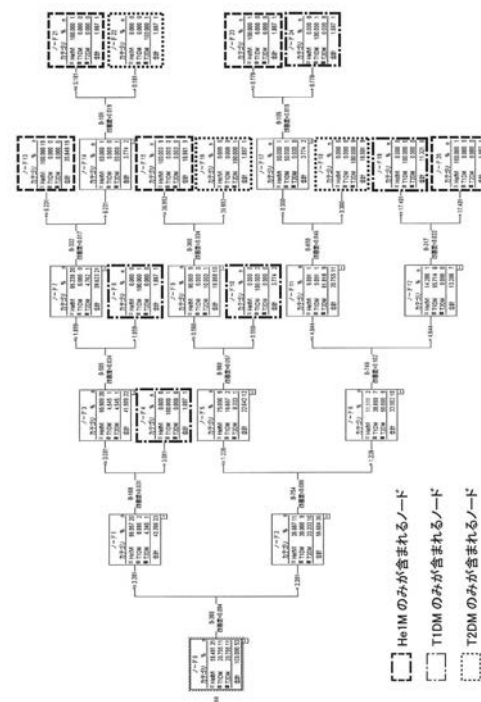
(54) 【発明の名称】 糖尿病の検査方法

(57) 【要約】

【課題】 糖尿病の検査方法を提供することを課題とする。

【解決手段】 被験者から採取された試料に含まれる腸内細菌叢全体の細菌の16SリボゾームRNA遺伝子を対象として、T-RFLP法によって末端標識制限酵素断片を得ること、及び、前記T-RFLP法によって得られた末端標識制限酵素断片の総量に対する特定の塩基長を有する末端標識制限酵素断片の存在比に基づいて、1型糖尿病の有無及び／又は2型糖尿病の有無を判定すること、を含む糖尿病の検査方法。

【選択図】 図2



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験者から採取された試料に含まれる腸内細菌叢全体の細菌の 16S リボゾーム RNA 遺伝子を対象として、T-RFLP 法によって末端標識制限酵素断片を得ること、及び、

前記 T-RFLP 法によって得られた末端標識制限酵素断片の総量に対する特定の塩基長を有する末端標識制限酵素断片の存在比に基づいて、1 型糖尿病の有無及び／又は 2 型糖尿病の有無を判定すること、

を含む糖尿病の検査方法。

【請求項 2】

前記 T-RFLP 法が、Bsl I、Hae III、Msp I 及び Alu I からなる群から選択される少なくとも 1 つの制限酵素を使用して末端標識制限酵素断片を得ることを含む、請求項 1 に記載の糖尿病の検査方法。

10

【請求項 3】

前記試料が糞便である、請求項 1 又は請求項 2 に記載の糖尿病の検査方法。

【請求項 4】

前記判定が、データマイニング法によって生成された決定木に従って被験者を分類することを含み、ここで前記データマイニング法は、1 型糖尿病であるか、2 型糖尿病であるか、又は 1 型糖尿病でも 2 型糖尿病でもないかを目的変数とし、かつ、前記末端標識制限酵素断片の総量に対する特定の塩基長を有する末端標識制限酵素断片の存在比を説明変数として行われる、請求項 1～請求項 3 のいずれか一項に記載の糖尿病の検査方法。

20

【請求項 5】

前記データマイニング法が C & R T 法である、請求項 4 に記載の糖尿病の検査方法。

【請求項 6】

前記 T-RFLP 法が、配列番号 1 に示されるフォワードプライマーを用いて核酸増幅を行い、得られた増幅産物を Bsl I により切断することを含むものであって、前記判定が、以下に示される末端標識制限酵素断片の総量に対する特定の塩基長を有する末端標識制限酵素断片の存在比の条件 (1)～(13) のうち少なくとも一つを含む、請求項 1～請求項 5 のいずれか一項に記載の糖尿病の検査方法。

(1) 塩基長が 366 bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 168 bp である断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、1 型糖尿病であると判定する。

30

(2) 塩基長が 366 bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 168 bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 505 bp である断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、1 型糖尿病であると判定する。

(3) 塩基長が 366 bp である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 754 bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 968 bp である断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、1 型糖尿病であると判定する。

(4) 塩基長が 366 bp である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 754 bp である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 749 bp である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 317 bp である断片の存在比が所定のしきい値以上である場合に、1 型糖尿病であると判定する。

40

(5) 塩基長が 366 bp である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 754 bp である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 749 bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 650 bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 106 bp である断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、1 型糖尿病であると判定する。

(6) 塩基長が 366 bp である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 754 bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 968 bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 366 bp である断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、2 型糖尿病であると判定する。

50

(7) 塩基長が366bpである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が754bpである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が749bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が650bpである断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、2型糖尿病であると判定する。

(8) 塩基長が366bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が168bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が505bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が332bpである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が106bpである断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、2型糖尿病であると判定する。

(9) 塩基長が366bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が168bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が505bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が332bpである断片の存在比が所定のしきい値以上である場合に、1型糖尿病でも2型糖尿病でもない判定する。

(10) 塩基長が366bpである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が754bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が968bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が366bpである断片の存在比が所定のしきい値以上である場合に、1型糖尿病でも2型糖尿病でもない判定する。

(11) 塩基長が366bpである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が754bpである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が749bpである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が317bpである断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、1型糖尿病でも2型糖尿病でもない判定する。

(12) 塩基長が366bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が168bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が505bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が332bpである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が106bpである断片の存在比が所定のしきい値以上である場合に、1型糖尿病でも2型糖尿病でもない判定する。

(13) 塩基長が366bpである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が754bpである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が749bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が650bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が106bpである断片の存在比が所定のしきい値以上である場合に、1型糖尿病でも2型糖尿病でもない判定する。

【請求項7】

前記T-RFLP法が配列番号2に示されるリバースプライマーを使用するものであって、請求項6に記載の条件(1)～(13)の所定のしきい値が、それぞれ以下の(1)～(13)に示す通り定められている、請求項6に記載の糖尿病の検査方法。

(1) 塩基長が366bpである断片の存在比が2.281以上であり、塩基長が168bpである断片の存在比が3.081未満である場合に、1型糖尿病であると判定する。

(2) 塩基長が366bpである断片の存在比が2.281以上であり、塩基長が168bpである断片の存在比が3.081以上であり、塩基長が505bpである断片の存在比が1.859未満である場合に、1型糖尿病であると判定する。

(3) 塩基長が366bpである断片の存在比が2.281未満であり、塩基長が754bpである断片の存在比が1.226以上であり、塩基長が968bpである断片の存在比が0.560未満である場合に、1型糖尿病であると判定する。

(4) 塩基長が366bpである断片の存在比が2.281未満であり、塩基長が754bpである断片の存在比が1.226未満であり、塩基長が749bpである断片の存在比が4.644未満であり、塩基長が317bpである断片の存在比が17.401以上である場合に、1型糖尿病であると判定する。

(5) 塩基長が366bpである断片の存在比が2.281未満であり、塩基長が754bpである断片の存在比が1.226未満であり、塩基長が749bpである断片の存在比が4.644以上であり、塩基長が650bpである断片の存在比が0.300以上で

10

20

30

40

50

あり、塩基長が106bpである断片の存在比が0.778未満である場合に、1型糖尿病であると判定する。

(6) 塩基長が366bpである断片の存在比が2.281未満であり、塩基長が754bpである断片の存在比が1.226以上であり、塩基長が968bpである断片の存在比が0.560以上であり、塩基長が366bpである断片の存在比が36.992未満である場合に、2型糖尿病であると判定する。

(7) 塩基長が366bpである断片の存在比が2.281未満であり、塩基長が754bpである断片の存在比が1.226未満であり、塩基長が749bpである断片の存在比が4.644以上であり、塩基長が650bpである断片の存在比が0.300未満である場合に、2型糖尿病であると判定する。

(8) 塩基長が366bpである断片の存在比が2.281以上であり、塩基長が168bpである断片の存在比が3.081以上であり、塩基長が505bpである断片の存在比が1.859以上であり、塩基長が332bpである断片の存在比が6.231未満であり、塩基長が106bpである断片の存在比が0.181未満である場合に、2型糖尿病であると判定する。

(9) 塩基長が366bpである断片の存在比が2.281以上であり、塩基長が168bpである断片の存在比が3.081以上であり、塩基長が505bpである断片の存在比が1.859以上であり、塩基長が332bpである断片の存在比が6.231以上である場合に、1型糖尿病でも2型糖尿病でもない判定する。

(10) 塩基長が366bpである断片の存在比が2.281未満であり、塩基長が754bpである断片の存在比が1.226以上であり、塩基長が968bpである断片の存在比が0.560以上であり、塩基長が366bpである断片の存在比が36.992以上である場合に、1型糖尿病でも2型糖尿病でもない判定する。

(11) 塩基長が366bpである断片の存在比が2.281未満であり、塩基長が754bpである断片の存在比が1.226未満であり、塩基長が749bpである断片の存在比が4.644未満であり、塩基長が317bpである断片の存在比が17.401未満である場合に、1型糖尿病でも2型糖尿病でもない判定する。

(12) 塩基長が366bpである断片の存在比が2.281以上であり、塩基長が168bpである断片の存在比が3.081以上であり、塩基長が505bpである断片の存在比が1.859以上であり、塩基長が332bpである断片の存在比が6.231未満であり、塩基長が106bpである断片の存在比が0.181以上である場合に、1型糖尿病でも2型糖尿病でもない判定する。

(13) 塩基長が366bpである断片の存在比が2.281未満であり、塩基長が754bpである断片の存在比が1.226未満であり、塩基長が749bpである断片の存在比が4.644以上であり、塩基長が650bpである断片の存在比が0.300以上であり、塩基長が106bpである断片の存在比が0.778以上である場合に、1型糖尿病でも2型糖尿病でもない判定する。

【請求項8】

以下の(4)、(7)又は(9)のうち少なくとも1つを含む、請求項7に記載の糖尿病の検査方法。

(4) 塩基長が366bpである断片の存在比が2.281未満であり、塩基長が754bpである断片の存在比が1.226未満であり、塩基長が749bpである断片の存在比が4.644未満であり、塩基長が317bpである断片の存在比が17.401以上である場合に、1型糖尿病であると判定する。

(7) 塩基長が366bpである断片の存在比が2.281未満であり、塩基長が754bpである断片の存在比が1.226未満であり、塩基長が749bpである断片の存在比が4.644以上であり、塩基長が650bpである断片の存在比が0.300未満である場合に、2型糖尿病であると判定する。

(9) 塩基長が366bpである断片の存在比が2.281以上であり、塩基長が168bpである断片の存在比が3.081以上であり、塩基長が505bpである断片の存在

10

20

30

40

50

比が 1.859 以上であり、塩基長が 332bp である断片の存在比が 6.231 以上である場合に、1 型糖尿病でも 2 型糖尿病でもない判定する。

【請求項 9】

前記 T-RFLP 法が、配列番号 1 に示されるフォワードプライマーを用いて核酸増幅を行い、得られた増幅産物を HaeIII により切断することを含むものであって、前記判定が、以下に示される末端標識制限酵素断片の総量に対する特定の塩基長を有する末端標識制限酵素断片の存在比の条件 (1) ~ (11) のうち少なくとも一つを含む、請求項 1 ~ 請求項 5 のいずれか一項に記載の糖尿病の検査方法。

(1) 塩基長が 85bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 315bp である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 58bp である断片が所定のしきい値未満である場合に、1 型糖尿病であると判定する。

(2) 塩基長が 85bp である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 177bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 236bp である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 203bp である断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、1 型糖尿病であると判定する。

(3) 塩基長が 85bp である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 177bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 236bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 265bp である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 45bp である断片の存在比が所定のしきい値以上である場合に、1 型糖尿病であると判定する。

(4) 塩基長が 85bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 315bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 79bp である断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、2 型糖尿病であると判定する。

(5) 塩基長が 85bp である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 177bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 236bp である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 203bp である断片の存在比が所定のしきい値以上である場合に、2 型糖尿病であると判定する。

(6) 塩基長が 85bp である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 177bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 236bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 265bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 45bp である断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、2 型糖尿病であると判定する。

(7) 塩基長が 85bp である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 177bp である断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、1 型糖尿病でも 2 型糖尿病でもない判定する。

(8) 塩基長が 85bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 315bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 79bp である断片の存在比が所定のしきい値以上である場合に、1 型糖尿病でも 2 型糖尿病でもない判定する。

(9) 塩基長が 85bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 315bp である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 58bp である断片の存在比が所定のしきい値以上である場合に、1 型糖尿病でも 2 型糖尿病でもない判定する。

(10) 塩基長が 85bp である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 177bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 236bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 265bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 45bp である断片の存在比が所定のしきい値以上である場合に、1 型糖尿病でも 2 型糖尿病でもない判定する。

(11) 塩基長が 85bp である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 177bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 236bp である断

10

20

30

40

50

片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 2 6 5 b p である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 4 5 b p である断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、1 型糖尿病でも 2 型糖尿病でもないと判定する。

【請求項 1 0】

前記 T-RFLP 法が配列番号 2 に示されるリバースプライマーを使用するものであって、請求項 9 に記載の条件 (1) ~ (11) の所定のしきい値が、それぞれ以下の (1) ~ (10) に示す通り定められている、請求項 9 に記載の糖尿病の検査方法。

(1) 塩基長が 8 5 b p である断片の存在比が 0. 3 9 2 以上であり、塩基長が 3 1 5 b p である断片の存在比が 7. 9 4 1 未満であり、塩基長が 5 8 b p である断片の存在比が 0. 1 1 4 未満である場合に、1 型糖尿病であると判定する。

(2) 塩基長が 8 5 b p である断片の存在比が 0. 3 9 2 未満であり、塩基長が 1 7 7 b p である断片の存在比が 4. 0 6 7 以上であり、塩基長が 2 3 6 b p である断片の存在比が 4. 1 4 0 未満であり、塩基長が 2 0 3 b p である断片の存在比が 2. 6 3 6 未満である場合に、1 型糖尿病であると判定する。

(3) 塩基長が 8 5 b p である断片の存在比が 0. 3 9 2 未満であり、塩基長が 1 7 7 b p である断片の存在比が 4. 0 6 7 以上であり、塩基長が 2 3 6 b p である断片の存在比が 4. 1 4 0 以上であり、塩基長が 2 6 5 b p である断片の存在比が 3 8. 2 7 6 未満であり、塩基長が 4 5 b p である断片の存在比が 1. 3 2 8 以上である場合に、1 型糖尿病であると判定する。

(4) 塩基長が 8 5 b p である断片の存在比が 0. 3 9 2 以上であり、塩基長が 3 1 5 b p である断片の存在比が 7. 9 4 1 以上であり、塩基長が 7 9 b p である断片の存在比が 0. 8 5 6 未満である場合に、2 型糖尿病であると判定する。

(5) 塩基長が 8 5 b p である断片の存在比が 0. 3 9 2 未満であり、塩基長が 1 7 7 b p である断片の存在比が 4. 0 6 7 以上であり、塩基長が 2 3 6 b p である断片の存在比が 4. 1 4 0 未満であり、塩基長が 2 0 3 b p である断片の存在比が 2. 6 3 6 以上である場合に、2 型糖尿病であると判定する。

(6) 塩基長が 8 5 b p である断片の存在比が 0. 3 9 2 未満であり、塩基長が 1 7 7 b p である断片の存在比が 4. 0 6 7 以上であり、塩基長が 2 3 6 b p である断片の存在比が 4. 1 4 0 以上であり、塩基長が 2 6 5 b p である断片の存在比が 3 8. 2 7 6 以上であり、塩基長が 4 5 b p である断片の存在比が 1. 2 5 8 未満である場合に、2 型糖尿病であると判定する。

(7) 塩基長が 8 5 b p である断片の存在比が 0. 3 9 2 未満であり、塩基長が 1 7 7 b p である断片の存在比が 4. 0 6 7 未満である場合に、1 型糖尿病でも 2 型糖尿病でもないと判定する。

(8) 塩基長が 8 5 b p である断片の存在比が 0. 3 9 2 以上であり、塩基長が 3 1 5 b p である断片の存在比が 7. 9 4 1 以上であり、塩基長が 7 9 b p である断片の存在比が 0. 8 5 6 以上である場合に、1 型糖尿病でも 2 型糖尿病でもないと判定する。

(9) 塩基長が 8 5 b p である断片の存在比が 0. 3 9 2 以上であり、塩基長が 3 1 5 b p である断片の存在比が 7. 9 4 1 未満であり、塩基長が 5 8 b p である断片の存在比が 0. 1 1 4 以上である場合に、1 型糖尿病でも 2 型糖尿病でもないと判定する。

(10) 塩基長が 8 5 b p である断片の存在比が 0. 3 9 2 未満であり、塩基長が 1 7 7 b p である断片の存在比が 4. 0 6 7 以上であり、塩基長が 2 3 6 b p である断片の存在比が 4. 1 4 0 以上であり、塩基長が 2 6 5 b p である断片の存在比が 3 8. 2 7 6 以上であり、塩基長が 4 5 b p である断片の存在比が 1. 2 5 8 以上である場合に、1 型糖尿病でも 2 型糖尿病でもないと判定する。

(11) 塩基長が 8 5 b p である断片の存在比が 0. 3 9 2 未満であり、塩基長が 1 7 7 b p である断片の存在比が 4. 0 6 7 以上であり、塩基長が 2 3 6 b p である断片の存在比が 4. 1 4 0 以上であり、塩基長が 2 6 5 b p である断片の存在比が 3 8. 2 7 6 未満であり、塩基長が 4 5 b p である断片の存在比が 1. 3 2 8 未満である場合に、1 型糖尿病でも 2 型糖尿病でもないと判定する。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1】

以下の（２）、（６）又は（８）のうち少なくとも１つを含む、請求項 1 0 に記載の糖尿病の検査方法。

（２）塩基長が 8 5 b p である断片の存在比が 0. 3 9 2 未満であり、塩基長が 1 7 7 b p である断片の存在比が 4. 0 6 7 以上であり、塩基長が 2 3 6 b p である断片の存在比が 4. 1 4 0 未満であり、塩基長が 2 0 3 b p である断片の存在比が 2. 6 3 6 未満である場合に、1 型糖尿病であると判定する。

（６）塩基長が 8 5 b p である断片の存在比が 0. 3 9 2 未満であり、塩基長が 1 7 7 b p である断片の存在比が 4. 0 6 7 以上であり、塩基長が 2 3 6 b p である断片の存在比が 4. 1 4 0 以上であり、塩基長が 2 6 5 b p である断片の存在比が 3 8. 2 7 6 以上であり、塩基長が 4 5 b p である断片の存在比が 1. 2 5 8 未満である場合に、2 型糖尿病であると判定する。

（８）塩基長が 8 5 b p である断片の存在比が 0. 3 9 2 以上であり、塩基長が 3 1 5 b p である断片の存在比が 7. 9 4 1 以上であり、塩基長が 7 9 b p である断片の存在比が 0. 8 5 6 以上である場合に、1 型糖尿病でも 2 型糖尿病でもないと判定する。

【請求項 1 2】

前記 T－R F L P 法が、配列番号 3 に示されるフォワードプライマーを用いて核酸増幅を行い、得られた増幅産物を M s p I により切断することを含むものであって、前記判定が、以下に示される末端標識制限酵素断片の総量に対する特定の塩基長を有する末端標識制限酵素断片の存在比の条件（１）～（１２）のうち少なくとも一つを含む、請求項 1 ～請求項 5 のいずれか一項に記載の糖尿病の検査方法。

（１）塩基長が 2 9 3 b p である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 4 5 7 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 1 2 0 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上である場合に、1 型糖尿病であると判定する。

（２）塩基長が 2 9 3 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 1 5 0 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 1 9 4 b p である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 8 8 b p である断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、1 型糖尿病であると判定する。

（３）塩基長が 2 9 3 b p である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 4 5 7 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 1 2 0 b p である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 8 1 b p である断片が所定のしきい値未満である場合に、1 型糖尿病であると判定する。

（４）塩基長が 2 9 3 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 1 5 0 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 1 9 4 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 3 9 0 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 2 0 0 b p である断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、1 型糖尿病であると判定する。

（５）塩基長が 2 9 3 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 1 5 0 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 1 9 4 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 3 9 0 b p である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 4 5 b p である断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、1 型糖尿病であると判定する。

（６）塩基長が 2 9 3 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 1 5 0 b p である断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、2 型糖尿病であると判定する。

（７）塩基長が 2 9 3 b p である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 4 5 7 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 1 2 0 b p である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 8 1 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上である場合に、2 型糖尿病であると判定する。

（８）塩基長が 2 9 3 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 1

50bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が194bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が390bpである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が45bpである断片の存在比が所定のしきい値以上である場合に、2型糖尿病であると判定する。

(9) 塩基長が293bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が150bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が194bpである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が88bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が45bpである断片の存在比が所定のしきい値以上である場合に、2型糖尿病であると判定する。

(10) 塩基長が293bpである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が457bpである断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、1型糖尿病でも2型糖尿病でもないとは判定する。

(11) 塩基長が293bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が150bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が194bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が390bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が200bpである断片の存在比が所定のしきい値以上である場合に、1型糖尿病でも2型糖尿病でもないとは判定する。

(12) 塩基長が293bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が150bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が194bpである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が88bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が45bpである断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、1型糖尿病でも2型糖尿病でもないとは判定する。

【請求項13】

前記T-RFLP法が配列番号2に示されるリバースプライマーを使用するものであって、請求項12に記載の条件(1)～(12)の所定のしきい値が、それぞれ以下の(1)～(12)に示す通り定められている、請求項12に記載の糖尿病の検査方法。

(1) 塩基長が293bpである断片の存在比が9.740未満であり、塩基長が457bpである断片の存在比が1.620以上であり、塩基長が120bpである断片の存在比が0.312以上である場合に、1型糖尿病であると判定する。

(2) 塩基長が293bpである断片の存在比が9.740以上であり、塩基長が150bpである断片の存在比が3.879以上であり、塩基長が194bpである断片の存在比が2.617未満であり、塩基長が88bpである断片の存在比が1.179未満である場合に、1型糖尿病であると判定する。

(3) 塩基長が293bpである断片の存在比が9.740未満であり、塩基長が457bpである断片の存在比が1.620以上であり、塩基長が120bpである断片の存在比が0.312未満であり、塩基長が81bpである断片の存在比が7.009未満である場合に、1型糖尿病であると判定する。

(4) 塩基長が293bpである断片の存在比が9.740以上であり、塩基長が150bpである断片の存在比が3.879以上であり、塩基長が194bpである断片の存在比が2.617以上であり、塩基長が390bpである断片の存在比が0.750以上であり、塩基長が200bpである断片の存在比が0.542未満である場合に、1型糖尿病であると判定する。

(5) 塩基長が293bpである断片の存在比が9.740以上であり、塩基長が150bpである断片の存在比が3.879以上であり、塩基長が194bpである断片の存在比が2.617以上であり、塩基長が390bpである断片の存在比が0.750未満であり、塩基長が45bpである断片の存在比が1.263未満である場合に、1型糖尿病であると判定する。

(6) 塩基長が293bpである断片の存在比が9.740以上であり、塩基長が150bpである断片の存在比が3.879未満である場合に、2型糖尿病であると判定する。

(7) 塩基長が293bpである断片の存在比が9.740未満であり、塩基長が457

10

20

30

40

50

b pである断片の存在比が1.620以上であり、塩基長が120bpである断片の存在比が0.312未満であり、塩基長が81bpである断片の存在比が7.009以上である場合に、2型糖尿病であると判定する。

(8) 塩基長が293bpである断片の存在比が9.740以上であり、塩基長が150bpである断片の存在比が3.879以上であり、塩基長が194bpである断片の存在比が2.617以上であり、塩基長が390bpである断片の存在比が0.750未満であり、塩基長が45bpである断片の存在比が1.263以上である場合に、2型糖尿病であると判定する。

(9) 塩基長が293bpである断片の存在比が9.740以上であり、塩基長が150bpである断片の存在比が3.879以上であり、塩基長が194bpである断片の存在比が2.617未満であり、塩基長が88bpである断片の存在比が1.179以上であり、塩基長が45bpである断片の存在比が1.689以上である場合に、2型糖尿病であると判定する。

(10) 塩基長が293bpである断片の存在比が9.740未満であり、塩基長が457bpである断片の存在比が1.620未満である場合に、1型糖尿病でも2型糖尿病でもない判定する。

(11) 塩基長が293bpである断片の存在比が9.740以上であり、塩基長が150bpである断片の存在比が3.879以上であり、塩基長が194bpである断片の存在比が2.617以上であり、塩基長が390bpである断片の存在比が0.750以上であり、塩基長が200bpである断片の存在比が0.542以上である場合に、1型糖尿病でも2型糖尿病でもない判定する。

(12) 塩基長が293bpである断片の存在比が9.740以上であり、塩基長が150bpである断片の存在比が3.879以上であり、塩基長が194bpである断片の存在比が2.617未満であり、塩基長が88bpである断片の存在比が1.179以上であり、塩基長が45bpである断片の存在比が1.689未満である場合に、1型糖尿病でも2型糖尿病でもない判定する。

【請求項14】

以下の(1)、(6)、(7)又は(11)のうち少なくとも1つを含む、請求項13に記載の糖尿病の検査方法。

(1) 塩基長が293bpである断片の存在比が9.740未満であり、塩基長が457bpである断片の存在比が1.620以上であり、塩基長が120bpである断片の存在比が0.312以上である場合に、1型糖尿病であると判定する。

(6) 塩基長が293bpである断片の存在比が9.740以上であり、塩基長が150bpである断片の存在比が3.879未満である場合に、2型糖尿病であると判定する。

(7) 塩基長が293bpである断片の存在比が9.740未満であり、塩基長が457bpである断片の存在比が1.620以上であり、塩基長が120bpである断片の存在比が0.312未満であり、塩基長が81bpである断片の存在比が7.009以上である場合に、2型糖尿病であると判定する。

(11) 塩基長が293bpである断片の存在比が9.740以上であり、塩基長が150bpである断片の存在比が3.879以上であり、塩基長が194bpである断片の存在比が2.617以上であり、塩基長が390bpである断片の存在比が0.750以上であり、塩基長が200bpである断片の存在比が0.542以上である場合に、1型糖尿病でも2型糖尿病でもない判定する。

【請求項15】

前記T-RFLP法が、配列番号3に示されるフォワードプライマーを用いて核酸増幅を行い、得られた増幅産物をAluIにより切断することを含むものであって、前記判定が、以下に示される末端標識制限酵素断片の総量に対する特定の塩基長を有する末端標識制限酵素断片の存在比の条件(1)～(10)のうち少なくとも一つを含む、請求項1～請求項5のいずれか一項に記載の糖尿病の検査方法。

(1) 塩基長が44bpである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が58

b pである断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、1型糖尿病であると判定する。

(2) 塩基長が4 4 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が2 1 6 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が7 6 b pである断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、1型糖尿病であると判定する。

(3) 塩基長が4 4 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が2 1 6 b pである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が4 8 7 b pである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が8 3 b pである断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、1型糖尿病であると判定する。

(4) 塩基長が4 4 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が2 1 6 b pである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が4 8 7 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が2 0 3 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が8 3 0 b pである断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、1型糖尿病であると判定する。

(5) 塩基長が4 4 b pである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が5 8 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上である場合に、2型糖尿病であると判定する。

(6) 塩基長が4 4 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が2 1 6 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が7 6 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上である場合に、2型糖尿病であると判定する。

(7) 塩基長が4 4 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が2 1 6 b pである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が4 8 7 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が2 0 3 b pである断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、2型糖尿病であると判定する。

(8) 塩基長が4 4 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が2 1 6 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が7 6 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上である場合に、健常人であると判定する。

(9) 塩基長が4 4 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が2 1 6 b pである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が4 8 7 b pである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が8 3 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上である場合に、健常人であると判定する。

(10) 塩基長が4 4 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が2 1 6 b pである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が4 8 7 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が2 0 3 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が8 3 0 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上である場合に、健常人であると判定する。

【請求項16】

前記T-RFLP法が配列番号2に示されるリバースプライマーを使用するものであって、請求項15に記載の条件(1)～(10)の所定のしきい値が、それぞれ以下の(1)～(10)に示す通り定められている、請求項15に記載の糖尿病の検査方法。

(1) 塩基長が4 4 b pである断片の存在比が9. 0 2 8未満であり、塩基長が5 8 b pである断片の存在比が1. 0 6 2未満である場合に、1型糖尿病であると判定する。

(2) 塩基長が4 4 b pである断片の存在比が9. 0 2 8以上であり、塩基長が2 1 6 b pである断片の存在比が0. 8 6 1以上であり、塩基長が7 6 b pである断片の存在比が4. 1 2 1未満である場合に、1型糖尿病であると判定する。

(3) 塩基長が4 4 b pである断片の存在比が9. 0 2 8以上であり、塩基長が2 1 6 b pである断片の存在比が0. 8 6 1未満であり、塩基長が4 8 7 b pである断片の存在比が0. 7 6 2未満であり、塩基長が8 3 b pである断片の存在比が9. 7 4 4未満である場合に、1型糖尿病であると判定する。

(4) 塩基長が4 4 b pである断片の存在比が9. 0 2 8値以上であり、塩基長が2 1 6

b pである断片の存在比が0.861未満であり、塩基長が487bpである断片の存在比が0.762以上であり、塩基長が203bpである断片の存在比が0.749以上であり、塩基長が830bpである断片の存在比が0.317未満である場合に、1型糖尿病であると判定する。

(5) 塩基長が44bpである断片の存在比が9.028未満であり、塩基長が58bpである断片の存在比が1.062以上である場合に、2型糖尿病であると判定する。

(6) 塩基長が44bpである断片の存在比が9.028以上であり、塩基長が216bpである断片の存在比が0.861以上であり、塩基長が76bpである断片の存在比が0.405以上である場合に、2型糖尿病であると判定する。

(7) 塩基長が44bpである断片の存在比が9.028以上であり、塩基長が216bpである断片の存在比が0.861未満であり、塩基長が487bpである断片の存在比が0.762以上であり、塩基長が203bpである断片の存在比が0.749未満である場合に、2型糖尿病であると判定する。

(8) 塩基長が44bpである断片の存在比が9.028以上であり、塩基長が216bpである断片の存在比が0.861以上であり、塩基長が76bpである断片の存在比が4.121以上である場合に、健常人であると判定する。

(9) 塩基長が44bpである断片の存在比が9.028以上であり、塩基長が216bpである断片の存在比が0.861未満であり、塩基長が487bpである断片の存在比が0.762未満であり、塩基長が83bpである断片の存在比が9.744以上である場合に、健常人であると判定する。

(10) 塩基長が44bpである断片の存在比が9.028以上であり、塩基長が216bpである断片の存在比が0.861未満であり、塩基長が487bpである断片の存在比が0.762以上であり、塩基長が203bpである断片の存在比が0.749以上であり、塩基長が830bpである断片の存在比が0.317以上である場合に、健常人であると判定する。

【請求項17】

以下の(3)、(5)又は(8)のうち少なくとも1つを含む、請求項16に記載の糖尿病の検査方法。

(3) 塩基長が44bpである断片の存在比が9.028以上であり、塩基長が216bpである断片の存在比が0.861未満であり、塩基長が487bpである断片の存在比が0.762未満であり、塩基長が83bpである断片の存在比が9.744未満である場合に、1型糖尿病であると判定する。

(5) 塩基長が44bpである断片の存在比が9.028未満であり、塩基長が58bpである断片の存在比が1.062以上である場合に、2型糖尿病であると判定する。

(8) 塩基長が44bpである断片の存在比が9.028以上であり、塩基長が216bpである断片の存在比が0.861以上であり、塩基長が76bpである断片の存在比が4.121以上である場合に、健常人であると判定する。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、糖尿病の検査方法に関する。

【背景技術】

【0002】

糖尿病は罹患率の高いcommon diseaseである。糖尿病であると診断するためには、空腹時血糖値が126mg/dL以上である場合を除き、75g経口糖負荷試験(75gOGTT)及びヘモグロビンA_{1c}(HbA_{1c})を検査する必要がある。HbA_{1c}は末梢血を用いた検査が可能であり患者への負担は比較的少ないが、貧血等により検査値が影響を受けるという問題点がある。一方、75gOGTTは検査に2時間を要し、簡便な検査ではなく再現性も十分に高いとはいえない。また、75gOGTTは検査に2時間を要するために、二次検査を指示されても医療機関を受診しない者も多く、早期

10

20

30

40

50

の治療介入を阻んでいる。

糖尿病のスクリーニングのための検査としては、空腹時血糖値及び／又はHbA_{1c}が検査されることが多い。しかし、空腹時血糖値が基準値を超えない場合であっても、75g OGTTでは基準値を超え糖尿病であると診断される場合もあり、空腹時血糖値はスクリーニングのための検査としては充分とはいえない。また、HbA_{1c}と空腹時血糖値とを組み合わせても糖尿病を検出できない場合もある。

【0003】

1型糖尿病と2型糖尿病との鑑別診断は、臨床経過及び病態、抗グルタミン酸デカルボキシラーゼ抗体（抗GAD抗体）等の膵自己抗体の有無を総合的に判断して行われている。抗GAD抗体は1型糖尿病の診断マーカーとして重要であるが、1型糖尿病患者において必ずしも陽性を示すとは限らず、また、抗GAD抗体が基準値以下である1型糖尿病患者も存在する。そのため、1型糖尿病と2型糖尿病との鑑別に苦慮する場合が少なくない。

10

【0004】

近年、腸内細菌叢が様々な疾患により変化することが明らかになり、具体的な菌種や菌属と疾患との関連についての研究が進められている。糖尿病との関連においては、糖尿病モデル動物の糖尿病の発症と関連する可能性がある腸内細菌が同定されている（特許文献1）。しかし、ヒトの腸内細菌叢にはおよそ1500種の腸内細菌が存在するといわれているが、これらのうち、菌種が同定されているのは約300種に過ぎない。未同定の菌種については、そのゲノムを解読しても菌種を同定することは現時点ではできない。未同定の菌種が糖尿病と関わっているか否かについても報告されておらず、数多く存在する未同定の菌種と糖尿病との関連は不明である。

20

糖尿病と腸内細菌叢との関連について探索し、新たな検査方法が提供されれば、既存の検査方法に代わる検査、若しくは、既存の検査方法を補う検査になり得ると考えられる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】再公表特許公報第2013-146319号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0006】

糖尿病は罹患率が高い重要な疾患であるにも関わらず、糖尿病の診断のためには75g OGTTなどの時間がかかる検査を要する場合がある。そのため、簡便かつ侵襲性が低い新たな検査が望まれている。本発明は、1型糖尿病の有無及び／又は2型糖尿病の有無を判定する、簡便かつ侵襲性が低い新たな糖尿病の検査方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

上記課題を解決するための手段は以下のとおりである。

<1> 被験者から採取された試料に含まれる腸内細菌叢全体の細菌の16SリボゾームRNA遺伝子を対象として、T-RFLP法によって末端標識制限酵素断片を得ること、及び、前記T-RFLP法によって得られた末端標識制限酵素断片の総量に対する特定の塩基長を有する末端標識制限酵素断片の存在比に基づいて、1型糖尿病の有無及び／又は2型糖尿病の有無を判定すること、を含む糖尿病の検査方法。

40

<2> 前記T-RFLP法が、BslI、HaeIII、MspI及びAluIからなる群から選択される少なくとも1つの制限酵素を使用して末端標識制限酵素断片を得ることを含む、<1>に記載の糖尿病の検査方法。

<3> 前記試料が糞便である、<1>又は<2>に記載の糖尿病の検査方法。

<4> 前記判定が、データマイニング法によって生成された決定木に従って被験者を分類することを含み、ここで前記データマイニング法は、1型糖尿病であるか、2型糖尿病であるか、又は1型糖尿病でも2型糖尿病でもないかを目的変数とし、かつ、前記末端標

50

識制限酵素断片の総量に対する特定の塩基長を有する末端標識制限酵素断片の存在比を説明変数として行われる、＜1＞～＜3＞のいずれか一つに記載の糖尿病の検査方法。

＜5＞ 前記データマイニング法がC & R T法である、＜4＞に記載の糖尿病の検査方法。

【0008】

＜6＞ 前記T-RFLP法が、配列番号1に示されるフォワードプライマーを用いて核酸増幅を行い、得られた増幅産物をBslIにより切断することを含むものであって、前記判定が、以下に示される末端標識制限酵素断片の総量に対する特定の塩基長を有する末端標識制限酵素断片の存在比の条件（1）～（13）のうち少なくとも一つを含む、＜1＞～＜5＞のいずれか一つに記載の糖尿病の検査方法。

（1）塩基長が366bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が168bpである断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、1型糖尿病であると判定する。

（2）塩基長が366bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が168bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が505bpである断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、1型糖尿病であると判定する。

（3）塩基長が366bpである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が754bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が968bpである断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、1型糖尿病であると判定する。

（4）塩基長が366bpである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が754bpである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が749bpである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が317bpである断片の存在比が所定のしきい値以上である場合に、1型糖尿病であると判定する。

（5）塩基長が366bpである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が754bpである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が749bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が650bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が106bpである断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、1型糖尿病であると判定する。

（6）塩基長が366bpである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が754bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が968bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が366bpである断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、2型糖尿病であると判定する。

（7）塩基長が366bpである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が754bpである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が749bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が650bpである断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、2型糖尿病であると判定する。

（8）塩基長が366bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が168bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が505bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が332bpである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が106bpである断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、2型糖尿病であると判定する。

（9）塩基長が366bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が168bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が505bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が332bpである断片の存在比が所定のしきい値以上である場合に、1型糖尿病でも2型糖尿病でもない判定する。

（10）塩基長が366bpである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が754bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が968bpである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が366bpである断片の存在比が所定のしきい値以上である場合に、1型糖尿病でも2型糖尿病でもない判定する。

（11）塩基長が366bpである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が

10

20

30

40

50

7 5 4 b pである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が7 4 9 b pである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が3 1 7 b pである断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、1型糖尿病でも2型糖尿病でもないと判定する。

(1 2) 塩基長が3 6 6 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が1 6 8 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が5 0 5 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が3 3 2 b pである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が1 0 6 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上である場合に、1型糖尿病でも2型糖尿病でもないと判定する。

(1 3) 塩基長が3 6 6 b pである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が7 5 4 b pである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が7 4 9 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が6 5 0 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が1 0 6 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上である場合に、1型糖尿病でも2型糖尿病でもないと判定する。

< 7 > 前記 T-RFLP 法が配列番号 2 に示されるリバースプライマーを使用するものであって、< 6 > に記載の条件 (1) ~ (1 3) の所定のしきい値が、それぞれ以下の (1) ~ (1 3) に示す通り定められている、< 6 > に記載の糖尿病の検査方法。

(1) 塩基長が3 6 6 b pである断片の存在比が2. 2 8 1 以上であり、塩基長が1 6 8 b pである断片の存在比が3. 0 8 1 未満である場合に、1型糖尿病であると判定する。

(2) 塩基長が3 6 6 b pである断片の存在比が2. 2 8 1 以上であり、塩基長が1 6 8 b pである断片の存在比が3. 0 8 1 以上であり、塩基長が5 0 5 b pである断片の存在比が1. 8 5 9 未満である場合に、1型糖尿病であると判定する。

(3) 塩基長が3 6 6 b pである断片の存在比が2. 2 8 1 未満であり、塩基長が7 5 4 b pである断片の存在比が1. 2 2 6 以上であり、塩基長が9 6 8 b pである断片の存在比が0. 5 6 0 未満である場合に、1型糖尿病であると判定する。

(4) 塩基長が3 6 6 b pである断片の存在比が2. 2 8 1 未満であり、塩基長が7 5 4 b pである断片の存在比が1. 2 2 6 未満であり、塩基長が7 4 9 b pである断片の存在比が4. 6 4 4 未満であり、塩基長が3 1 7 b pである断片の存在比が1 7. 4 0 1 以上である場合に、1型糖尿病であると判定する。

(5) 塩基長が3 6 6 b pである断片の存在比が2. 2 8 1 未満であり、塩基長が7 5 4 b pである断片の存在比が1. 2 2 6 未満であり、塩基長が7 4 9 b pである断片の存在比が4. 6 4 4 以上であり、塩基長が6 5 0 b pである断片の存在比が0. 3 0 0 以上であり、塩基長が1 0 6 b pである断片の存在比が0. 7 7 8 未満である場合に、1型糖尿病であると判定する。

(6) 塩基長が3 6 6 b pである断片の存在比が2. 2 8 1 未満であり、塩基長が7 5 4 b pである断片の存在比が1. 2 2 6 以上であり、塩基長が9 6 8 b pである断片の存在比が0. 5 6 0 以上であり、塩基長が3 6 6 b pである断片の存在比が3 6. 9 9 2 未満である場合に、2型糖尿病であると判定する。

(7) 塩基長が3 6 6 b pである断片の存在比が2. 2 8 1 未満であり、塩基長が7 5 4 b pである断片の存在比が1. 2 2 6 未満であり、塩基長が7 4 9 b pである断片の存在比が4. 6 4 4 以上であり、塩基長が6 5 0 b pである断片の存在比が0. 3 0 0 未満である場合に、2型糖尿病であると判定する。

(8) 塩基長が3 6 6 b pである断片の存在比が2. 2 8 1 以上であり、塩基長が1 6 8 b pである断片の存在比が3. 0 8 1 以上であり、塩基長が5 0 5 b pである断片の存在比が1. 8 5 9 以上であり、塩基長が3 3 2 b pである断片の存在比が6. 2 3 1 未満であり、塩基長が1 0 6 b pである断片の存在比が0. 1 8 1 未満である場合に、2型糖尿病であると判定する。

(9) 塩基長が3 6 6 b pである断片の存在比が2. 2 8 1 以上であり、塩基長が1 6 8 b pである断片の存在比が3. 0 8 1 以上であり、塩基長が5 0 5 b pである断片の存在比が1. 8 5 9 以上であり、塩基長が3 3 2 b pである断片の存在比が6. 2 3 1 以上である場合に、1型糖尿病でも2型糖尿病でもないと判定する。

10

20

30

40

50

(10) 塩基長が 366 bp である断片の存在比が 2.281 未満であり、塩基長が 754 bp である断片の存在比が 1.226 以上であり、塩基長が 968 bp である断片の存在比が 0.560 以上であり、塩基長が 366 bp である断片の存在比が 36.992 以上である場合に、1 型糖尿病でも 2 型糖尿病でもないと判定する。

(11) 塩基長が 366 bp である断片の存在比が 2.281 未満であり、塩基長が 754 bp である断片の存在比が 1.226 未満であり、塩基長が 749 bp である断片の存在比が 4.644 未満であり、塩基長が 317 bp である断片の存在比が 17.401 未満である場合に、1 型糖尿病でも 2 型糖尿病でもないと判定する。

(12) 塩基長が 366 bp である断片の存在比が 2.281 以上であり、塩基長が 168 bp である断片の存在比が 3.081 以上であり、塩基長が 505 bp である断片の存在比が 1.859 以上であり、塩基長が 332 bp である断片の存在比が 6.231 未満であり、塩基長が 106 bp である断片の存在比が 0.181 以上である場合に、1 型糖尿病でも 2 型糖尿病でもないと判定する。

(13) 塩基長が 366 bp である断片の存在比が 2.281 未満であり、塩基長が 754 bp である断片の存在比が 1.226 未満であり、塩基長が 749 bp である断片の存在比が 4.644 以上であり、塩基長が 650 bp である断片の存在比が 0.300 以上であり、塩基長が 106 bp である断片の存在比が 0.778 以上である場合に、1 型糖尿病でも 2 型糖尿病でもないと判定する。

<8> <6>又は<7>に記載の糖尿病の検査方法であって、<6>又は<7>に記載の条件(1)～(13)をいずれか2つ以上含む、糖尿病の検査方法。

【0009】

<9> 前記 T-RFLP 法が、配列番号 1 に示されるフォワードプライマーを用いて核酸増幅を行い、得られた増幅産物を HaeIII により切断することを含むものであって、前記判定が以下に示される、末端標識制限酵素断片の総量に対する特定の塩基長を有する末端標識制限酵素断片の存在比の条件(1)～(11)のうち少なくとも一つを含む、<1>～<5>のいずれか一つに記載の糖尿病の検査方法。

(1) 塩基長が 85 bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 315 bp である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 58 bp である断片が所定のしきい値未満である場合に、1 型糖尿病であると判定する。

(2) 塩基長が 85 bp である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 177 bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 236 bp である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 203 bp である断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、1 型糖尿病であると判定する。

(3) 塩基長が 85 bp である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 177 bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 236 bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 265 bp である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 45 bp である断片の存在比が所定のしきい値以上である場合に、1 型糖尿病であると判定する。

(4) 塩基長が 85 bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 315 bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 79 bp である断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、2 型糖尿病であると判定する。

(5) 塩基長が 85 bp である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 177 bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 236 bp である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 203 bp である断片の存在比が所定のしきい値以上である場合に、2 型糖尿病であると判定する。

(6) 塩基長が 85 bp である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 177 bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 236 bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 265 bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 45 bp である断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、2 型糖尿病であると判定する。

10

20

30

40

50

(7) 塩基長が 8 5 b p である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 1 7 7 b p である断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、1 型糖尿病でも 2 型糖尿病でもないと判定する。

(8) 塩基長が 8 5 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 3 1 5 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 7 9 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上である場合に、1 型糖尿病でも 2 型糖尿病でもないと判定する。

(9) 塩基長が 8 5 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 3 1 5 b p である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 5 8 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上である場合に、1 型糖尿病でも 2 型糖尿病でもないと判定する。

10

(10) 塩基長が 8 5 b p である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 1 7 7 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 2 3 6 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 2 6 5 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 4 5 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上である場合に、1 型糖尿病でも 2 型糖尿病でもないと判定する。

(11) 塩基長が 8 5 b p である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 1 7 7 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 2 3 6 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 2 6 5 b p である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 4 5 b p である断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、1 型糖尿病でも 2 型糖尿病でもないと判定する。

20

< 1 0 > 前記 T-RFLP 法が配列番号 2 に示されるリバースプライマーを使用するのであって、請求項 9 に記載の条件 (1) ~ (11) の所定のしきい値が、それぞれ以下の (1) ~ (10) に示す通り定められている、< 9 > に記載の糖尿病の検査方法。

(1) 塩基長が 8 5 b p である断片の存在比が 0. 3 9 2 以上であり、塩基長が 3 1 5 b p である断片の存在比が 7. 9 4 1 未満であり、塩基長が 5 8 b p である断片の存在比が 0. 1 1 4 未満である場合に、1 型糖尿病であると判定する。

(2) 塩基長が 8 5 b p である断片の存在比が 0. 3 9 2 未満であり、塩基長が 1 7 7 b p である断片の存在比が 4. 0 6 7 以上であり、塩基長が 2 3 6 b p である断片の存在比が 4. 1 4 0 未満であり、塩基長が 2 0 3 b p である断片の存在比が 2. 6 3 6 未満である場合に、1 型糖尿病であると判定する。

30

(3) 塩基長が 8 5 b p である断片の存在比が 0. 3 9 2 未満であり、塩基長が 1 7 7 b p である断片の存在比が 4. 0 6 7 以上であり、塩基長が 2 3 6 b p である断片の存在比が 4. 1 4 0 以上であり、塩基長が 2 6 5 b p である断片の存在比が 3 8. 2 7 6 未満であり、塩基長が 4 5 b p である断片の存在比が 1. 3 2 8 以上である場合に、1 型糖尿病であると判定する。

(4) 塩基長が 8 5 b p である断片の存在比が 0. 3 9 2 以上であり、塩基長が 3 1 5 b p である断片の存在比が 7. 9 4 1 以上であり、塩基長が 7 9 b p である断片の存在比が 0. 8 5 6 未満である場合に、2 型糖尿病であると判定する。

(5) 塩基長が 8 5 b p である断片の存在比が 0. 3 9 2 未満であり、塩基長が 1 7 7 b p である断片の存在比が 4. 0 6 7 以上であり、塩基長が 2 3 6 b p である断片の存在比が 4. 1 4 0 未満であり、塩基長が 2 0 3 b p である断片の存在比が 2. 6 3 6 以上である場合に、2 型糖尿病であると判定する。

40

(6) 塩基長が 8 5 b p である断片の存在比が 0. 3 9 2 未満であり、塩基長が 1 7 7 b p である断片の存在比が 4. 0 6 7 以上であり、塩基長が 2 3 6 b p である断片の存在比が 4. 1 4 0 以上であり、塩基長が 2 6 5 b p である断片の存在比が 3 8. 2 7 6 以上であり、塩基長が 4 5 b p である断片の存在比が 1. 2 5 8 未満である場合に、2 型糖尿病であると判定する。

(7) 塩基長が 8 5 b p である断片の存在比が 0. 3 9 2 未満であり、塩基長が 1 7 7 b p である断片の存在比が 4. 0 6 7 未満である場合に、1 型糖尿病でも 2 型糖尿病でもな

50

いと判定する。

(8) 塩基長が 85bp である断片の存在比が 0.392 以上であり、塩基長が 315bp である断片の存在比が 7.941 以上であり、塩基長が 79bp である断片の存在比が 0.856 以上である場合に、1 型糖尿病でも 2 型糖尿病でもない判定する。

(9) 塩基長が 85bp である断片の存在比が 0.392 以上であり、塩基長が 315bp である断片の存在比が 7.941 未満であり、塩基長が 58bp である断片の存在比が 0.114 以上である場合に、1 型糖尿病でも 2 型糖尿病でもない判定する。

(10) 塩基長が 85bp である断片の存在比が 0.392 未満であり、塩基長が 177bp である断片の存在比が 4.067 以上であり、塩基長が 236bp である断片の存在比が 4.140 以上であり、塩基長が 265bp である断片の存在比が 38.276 以上であり、塩基長が 45bp である断片の存在比が 1.258 以上である場合に、1 型糖尿病でも 2 型糖尿病でもない判定する。

(11) 塩基長が 85bp である断片の存在比が 0.392 未満であり、塩基長が 177bp である断片の存在比が 4.067 以上であり、塩基長が 236bp である断片の存在比が 4.140 以上であり、塩基長が 265bp である断片の存在比が 38.276 未満であり、塩基長が 45bp である断片の存在比が 1.328 未満である場合に、1 型糖尿病でも 2 型糖尿病でもない判定する。

<11> <9>又は<10>に記載の糖尿病の検査方法であって、<9>又は<10>に記載の条件(1)～(11)をいずれか2つ以上含む、糖尿病の検査方法。

【0010】

<12> 前記 T-RFLP 法が、配列番号 3 に示されるフォワードプライマーを用いて核酸増幅を行い、得られた増幅産物を MspI により切断することを含むものであって、前記判定が以下に示される、末端標識制限酵素断片の総量に対する特定の塩基長を有する末端標識制限酵素断片の存在比の条件(1)～(12)のうち少なくとも一つを含む、<1>～<5>のいずれか一つに記載の糖尿病の検査方法。

(1) 塩基長が 293bp である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 457bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 120bp である断片の存在比が所定のしきい値以上である場合に、1 型糖尿病であると判定する。

(2) 塩基長が 293bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 150bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 194bp である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 88bp である断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、1 型糖尿病であると判定する。

(3) 塩基長が 293bp である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 457bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 120bp である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 81bp である断片が所定のしきい値未満である場合に、1 型糖尿病であると判定する。

(4) 塩基長が 293bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 150bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 194bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 390bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 200bp である断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、1 型糖尿病であると判定する。

(5) 塩基長が 293bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 150bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 194bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 390bp である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 45bp である断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、1 型糖尿病であると判定する。

(6) 塩基長が 293bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 150bp である断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、2 型糖尿病であると判定する。

(7) 塩基長が 293bp である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 4

10

20

30

40

50

5 7 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が1 2 0 b pである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が8 1 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上である場合に、2型糖尿病であると判定する。

(8) 塩基長が2 9 3 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が1 5 0 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が1 9 4 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が3 9 0 b pである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が4 5 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上である場合に、2型糖尿病であると判定する。

(9) 塩基長が2 9 3 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が1 5 0 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が1 9 4 b pである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が8 8 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が4 5 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上である場合に、2型糖尿病であると判定する。

(10) 塩基長が2 9 3 b pである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が4 5 7 b pである断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、1型糖尿病でも2型糖尿病でもないとは判定する。

(11) 塩基長が2 9 3 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が1 5 0 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が1 9 4 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が3 9 0 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が2 0 0 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上である場合に、1型糖尿病でも2型糖尿病でもないとは判定する。

(12) 塩基長が2 9 3 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が1 5 0 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が1 9 4 b pである断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が8 8 b pである断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が4 5 b pである断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、1型糖尿病でも2型糖尿病でもないとは判定する。

<13> 前記T-RFLP法が配列番号2に示されるリバースプライマーを使用するのであって、<12>に記載の条件(1)~(12)の所定のしきい値が、それぞれ以下の(1)~(12)に示す通り定められている、<12>に記載の糖尿病の検査方法。

(1) 塩基長が2 9 3 b pである断片の存在比が9. 7 4 0未満であり、塩基長が4 5 7 b pである断片の存在比が1. 6 2 0以上であり、塩基長が1 2 0 b pである断片の存在比が0. 3 1 2以上である場合に、1型糖尿病であると判定する。

(2) 塩基長が2 9 3 b pである断片の存在比が9. 7 4 0以上であり、塩基長が1 5 0 b pである断片の存在比が3. 8 7 9以上であり、塩基長が1 9 4 b pである断片の存在比が2. 6 1 7未満であり、塩基長が8 8 b pである断片の存在比が1. 1 7 9未満である場合に、1型糖尿病であると判定する。

(3) 塩基長が2 9 3 b pである断片の存在比が9. 7 4 0未満であり、塩基長が4 5 7 b pである断片の存在比が1. 6 2 0以上であり、塩基長が1 2 0 b pである断片の存在比が0. 3 1 2未満であり、塩基長が8 1 b pである断片の存在比が7. 0 0 9未満である場合に、1型糖尿病であると判定する。

(4) 塩基長が2 9 3 b pである断片の存在比が9. 7 4 0以上であり、塩基長が1 5 0 b pである断片の存在比が3. 8 7 9以上であり、塩基長が1 9 4 b pである断片の存在比が2. 6 1 7以上であり、塩基長が3 9 0 b pである断片の存在比が0. 7 5 0以上であり、塩基長が2 0 0 b pである断片の存在比が0. 5 4 2未満である場合に、1型糖尿病であると判定する。

(5) 塩基長が2 9 3 b pである断片の存在比が9. 7 4 0以上であり、塩基長が1 5 0 b pである断片の存在比が3. 8 7 9以上であり、塩基長が1 9 4 b pである断片の存在比が2. 6 1 7以上であり、塩基長が3 9 0 b pである断片の存在比が0. 7 5 0未満であり、塩基長が4 5 b pである断片の存在比が1. 2 6 3未満である場合に、1型糖尿病であると判定する。

10

20

30

40

50

(6) 塩基長が 293 bp である断片の存在比が 9.740 以上であり、塩基長が 150 bp である断片の存在比が 3.879 未満である場合に、2 型糖尿病であると判定する。

(7) 塩基長が 293 bp である断片の存在比が 9.740 未満であり、塩基長が 457 bp である断片の存在比が 1.620 以上であり、塩基長が 120 bp である断片の存在比が 0.312 未満であり、塩基長が 81 bp である断片の存在比が 7.009 以上である場合に、2 型糖尿病であると判定する。

(8) 塩基長が 293 bp である断片の存在比が 9.740 以上であり、塩基長が 150 bp である断片の存在比が 3.879 以上であり、塩基長が 194 bp である断片の存在比が 2.617 以上であり、塩基長が 390 bp である断片の存在比が 0.750 未満であり、塩基長が 45 bp である断片の存在比が 1.263 以上である場合に、2 型糖尿病であると判定する。

10

(9) 塩基長が 293 bp である断片の存在比が 9.740 以上であり、塩基長が 150 bp である断片の存在比が 3.879 以上であり、塩基長が 194 bp である断片の存在比が 2.617 未満であり、塩基長が 88 bp である断片の存在比が 1.179 以上であり、塩基長が 45 bp である断片の存在比が 1.689 以上である場合に、2 型糖尿病であると判定する。

(10) 塩基長が 293 bp である断片の存在比が 9.740 未満であり、塩基長が 457 bp である断片の存在比が 1.620 未満である場合に、1 型糖尿病でも 2 型糖尿病でもない判定する。

(11) 塩基長が 293 bp である断片の存在比が 9.740 以上であり、塩基長が 150 bp である断片の存在比が 3.879 以上であり、塩基長が 194 bp である断片の存在比が 2.617 以上であり、塩基長が 390 bp である断片の存在比が 0.750 以上であり、塩基長が 200 bp である断片の存在比が 0.542 以上である場合に、1 型糖尿病でも 2 型糖尿病でもない判定する。

20

(12) 塩基長が 293 bp である断片の存在比が 9.740 以上であり、塩基長が 150 bp である断片の存在比が 3.879 以上であり、塩基長が 194 bp である断片の存在比が 2.617 未満であり、塩基長が 88 bp である断片の存在比が 1.179 以上であり、塩基長が 45 bp である断片の存在比が 1.689 未満である場合に、1 型糖尿病でも 2 型糖尿病でもない判定する。

<14> <12>又は<13>に記載の糖尿病の検査方法であって、<12>又は<13>に記載の条件(1)～(12)をいずれか2つ以上含む、糖尿病の検査方法。

30

【0011】

<15> 前記 T-RFLP 法が、配列番号 3 に示されるフォワードプライマーを用いて核酸増幅を行い、得られた増幅産物を A l u I により切断することを含むものであって、前記判定が以下に示される、末端標識制限酵素断片の総量に対する特定の塩基長を有する末端標識制限酵素断片の存在比の条件(1)～(10)のうち少なくとも一つを含む、<1>～<5>のいずれか一つに記載の糖尿病の検査方法。

(1) 塩基長が 44 bp である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 58 bp である断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、1 型糖尿病であると判定する。

40

(2) 塩基長が 44 bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 216 bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 76 bp である断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、1 型糖尿病であると判定する。

(3) 塩基長が 44 bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 216 bp である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 487 bp である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 83 bp である断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、1 型糖尿病であると判定する。

(4) 塩基長が 44 bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 216 bp である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 487 bp である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 203 bp である断片の存在比が所定の

50

しきい値以上であり、塩基長が 8 3 0 b p である断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、1 型糖尿病であると判定する。

(5) 塩基長が 4 4 b p である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 5 8 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上である場合に、2 型糖尿病であると判定する。

(6) 塩基長が 4 4 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 2 1 6 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 7 6 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上である場合に、2 型糖尿病であると判定する。

(7) 塩基長が 4 4 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 2 1 6 b p である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 4 8 7 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 2 0 3 b p である断片の存在比が所定のしきい値未満である場合に、2 型糖尿病であると判定する。

(8) 塩基長が 4 4 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 2 1 6 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 7 6 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上である場合に、健常人であると判定する。

(9) 塩基長が 4 4 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 2 1 6 b p である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 4 8 7 b p である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 8 3 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上である場合に、健常人であると判定する。

(10) 塩基長が 4 4 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 2 1 6 b p である断片の存在比が所定のしきい値未満であり、塩基長が 4 8 7 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 2 0 3 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上であり、塩基長が 8 3 0 b p である断片の存在比が所定のしきい値以上である場合に、健常人であると判定する。

< 1 6 > < 1 5 > に記載の条件 (1) ~ (10) の所定のしきい値が、それぞれ以下の (1) ~ (10) に示す通り定められている、< 1 5 > に記載の糖尿病の検査方法。

(1) 塩基長が 4 4 b p である断片の存在比が 9. 0 2 8 未満であり、塩基長が 5 8 b p である断片の存在比が 1. 0 6 2 未満である場合に、1 型糖尿病であると判定する。

(2) 塩基長が 4 4 b p である断片の存在比が 9. 0 2 8 以上であり、塩基長が 2 1 6 b p である断片の存在比が 0. 8 6 1 以上であり、塩基長が 7 6 b p である断片の存在比が 4. 1 2 1 未満である場合に、1 型糖尿病であると判定する。

(3) 塩基長が 4 4 b p である断片の存在比が 9. 0 2 8 以上であり、塩基長が 2 1 6 b p である断片の存在比が 0. 8 6 1 未満であり、塩基長が 4 8 7 b p である断片の存在比が 0. 7 6 2 未満であり、塩基長が 8 3 b p である断片の存在比が 9. 7 4 4 未満である場合に、1 型糖尿病であると判定する。

(4) 塩基長が 4 4 b p である断片の存在比が 9. 0 2 8 値以上であり、塩基長が 2 1 6 b p である断片の存在比が 0. 8 6 1 未満であり、塩基長が 4 8 7 b p である断片の存在比が 0. 7 6 2 以上であり、塩基長が 2 0 3 b p である断片の存在比が 0. 7 4 9 以上であり、塩基長が 8 3 0 b p である断片の存在比が 0. 3 1 7 未満である場合に、1 型糖尿病であると判定する。

(5) 塩基長が 4 4 b p である断片の存在比が 9. 0 2 8 未満であり、塩基長が 5 8 b p である断片の存在比が 1. 0 6 2 以上である場合に、2 型糖尿病であると判定する。

(6) 塩基長が 4 4 b p である断片の存在比が 9. 0 2 8 以上であり、塩基長が 2 1 6 b p である断片の存在比が 0. 8 6 1 以上であり、塩基長が 7 6 b p である断片の存在比が 0. 4 0 5 以上である場合に、2 型糖尿病であると判定する。

(7) 塩基長が 4 4 b p である断片の存在比が 9. 0 2 8 以上であり、塩基長が 2 1 6 b p である断片の存在比が 0. 8 6 1 未満であり、塩基長が 4 8 7 b p である断片の存在比が 0. 7 6 2 以上であり、塩基長が 2 0 3 b p である断片の存在比が 0. 7 4 9 未満である場合に、2 型糖尿病であると判定する。

(8) 塩基長が 4 4 b p である断片の存在比が 9. 0 2 8 以上であり、塩基長が 2 1 6 b

10

20

30

40

50

pである断片の存在比が0.861以上であり、塩基長が76bpである断片の存在比が4.121以上である場合に、健常人であると判定する。

(9) 塩基長が44bpである断片の存在比が9.028以上であり、塩基長が216bpである断片の存在比が0.861未満であり、塩基長が487bpである断片の存在比が0.762未満であり、塩基長が83bpである断片の存在比が9.744以上である場合に、健常人であると判定する。

(10) 塩基長が44bpである断片の存在比が9.028以上であり、塩基長が216bpである断片の存在比が0.861未満であり、塩基長が487bpである断片の存在比が0.762以上であり、塩基長が203bpである断片の存在比が0.749以上であり、塩基長が830bpである断片の存在比が0.317以上である場合に、健常人であると判定する。

<17> <15>又は<16>に記載の糖尿病の検査方法であって、<15>又は<16>に記載の条件(1)～(10)をいずれか2つ以上含む、糖尿病の検査方法。

【発明の効果】

【0012】

本発明によれば、簡便かつ侵襲性が低い、新たな1型糖尿病の有無及び／又は2型糖尿病の有無を判定する糖尿病の検査方法を提供することができる。この検査方法により受診者の負担を軽減することができ、受診率の向上も見込まれる。

また、本発明によれば、未同定の細菌を含む腸内細菌叢全体の解析により、新たな機序の糖尿病の検査方法を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】T-RFLP法の結果の一例を示す。

【図2】BslIを用いた本発明の一実施形態にかかる糖尿病の検査方法における、決定木の例を示す。

【図3】HaeIIIを用いた本発明の一実施形態にかかる糖尿病の検査方法における、決定木の例を示す。

【図4】MspIを用いた本発明の一実施形態にかかる糖尿病の検査方法における、決定木の例を示す。

【図5】AluIを用いた本発明の一実施形態にかかる糖尿病の検査方法における、決定木の例を示す。

【発明を実施するための形態】

【0014】

以下、本発明を実施するための形態について説明する。ただし、本発明は以下の実施形態に限定されるものではない。

本発明の検査方法は、被験者から採取された試料に含まれる腸内細菌叢全体の細菌の16SリボゾームRNA遺伝子を対象として、T-RFLP法を実施すること、及び、T-RFLP法によって得られた末端標識制限酵素断片の断片長及び存在比に基づいて、1型糖尿病の有無及び／又は2型糖尿病の有無を判定すること、を含む検査方法である。

【0015】

本明細書において「～」を用いて示された数値範囲は、「～」の前後に記載される数値をそれぞれ最小値及び最大値として含む範囲を示す。

また、本明細書において組成物中のある成分の量について言及する場合、組成物中に当該成分に該当する物質が複数存在する場合には、特に別途定義しない限り、当該量は、組成物中に存在する当該複数の物質の合計量を意味する。

また、本明細書において「工程」との語は、独立した工程だけではなく、他の工程と明確に区別できない場合であってもその工程の所期の目的が達成されれば、本用語に含まれる。

また、本明細書において、「腸内細菌叢全体の細菌」は、被験者の腸内細菌叢に含まれる個々の細菌ではなく、腸内細菌叢に含まれる細菌の集団を意味する。

【0016】

＜腸内細菌叢全体の細菌の採取＞

糞便に含まれる細菌は腸内細菌叢全体の細菌の種類及び量を反映しているため、腸内細菌叢の解析には一般的に糞便が用いられる。したがって、被験者の糞便の一部を採取することにより、腸内細菌叢全体の細菌を採取することができる。糞便に代えて被験者の腸の内容物を採取して試料としてもよい。

採取した糞便等の試料は、例えば、T r i s－E D T A 緩衝液などに懸濁してT－R F L P法の実施まで保管してもよい。

【0017】

＜核酸の抽出＞

細菌からの核酸の抽出は、ビーズ・フェノール法、塩化ベンジル法などの従来知られた方法により行うことができる。例えば、核酸抽出を阻害する細菌の細胞壁にダメージを与えた後に、エタノールやイソプロパノール等のアルコールを用いて核酸を沈殿させればよい。細菌の細胞壁にダメージを与える方法の例としては、酵素により細胞壁を溶解する方法、激しく振動させて菌体を破碎する方法、ホモジナイザーを用いて菌体を破碎する方法、が挙げられる。激しく振動させて菌体を破碎する方法において、激しく振動させる際にガラスビーズ、ジルコニアビーズ等を用いればより効率良く菌体を破碎することができる。採取した糞便は、核酸を抽出する前に水や緩衝液等に懸濁し遠心分離することにより洗浄してもよい。

細菌からの核酸の抽出は、市販のキットを用いて行うこともできる。例えば、P o w e r F e c a l D N A I s o l a t i o n K i t (M O B I O L a b o r a t o r i e s 社)、Q I A a m p D N A S t o o l (登録商標、キアゲン社)が挙げられる。また、公知の文献に記載の方法により行ってもよい (Appl Environ Microbiol 69 : 1251-1262, 2003など)。

抽出した核酸は、さらに70%エタノールを用いた沈殿を行うなどの方法によって、洗浄及び／又は精製してもよい。また、核酸抽出の過程や核酸抽出の前後において、熱処理などの核酸増幅の阻害を防止するための処理を行ってもよい。

【0018】

＜末端標識制限酵素断片長多型 (T－R F L P) 法＞

16SリボゾームRNA (16S rRNA) 遺伝子を対象としたT－R F L P法は、一般に以下の(1)～(3)を含む。しかし、他の工程を含むことに何ら制限はない。(1) 16S rRNA遺伝子上の全細菌に共通な配列を対象として、標識したプライマーを使用して核酸増幅を行う。(2) 増幅産物の末端を制限酵素で切断する。(3) キャピラリー電気泳動装置などを用いて電気泳動して末端標識断片の断片長及び存在比を測定する。

T－R F L P法は公知の方法であり、Kobayashi T. et al., Biosci Microbiota Food Health. 2013 ;32 (4) :pp129-37やNagashima K. et al., Appl Environ Microbiol. 2003 , 69, 1251-1262.などを参照して行うこともできる。

【0019】

(1) 核酸の増幅

核酸の増幅方法は、特に制限されない。核酸増幅法としては、P C R法、N A S B A (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) 法、T M A (Transcription-Mediated Amplification) 法、S D A (Strand Displacement Amplification) 法等が挙げられ、中でもP C R法が好ましい。

【0020】

以下、増幅についてP C R法を例に挙げて説明するが、本発明は、この例に制限されない。

【0021】

まず、鋳型核酸とフォワードプライマー及びリバースプライマーとを含むP C R反応液を調製する。P C R反応液における各種プライマーの添加割合は、特に制限されない。

【0022】

核酸の増幅に用いるプライマーセット（フォワードプライマー及びリバープライマー）は、細菌種によらず細菌の16S rRNA遺伝子を増幅できるプライマーセットが好ましい。当業者は、公知の細菌の16S rRNA遺伝子領域の塩基配列を基に適切なプライマーセットを設計することができる。細菌種によらず共通の塩基配列を有する16S rRNA遺伝子領域に結合するプライマーは、当分野ではユニバーサルプライマーとして公知である。したがって、当業者はこれらのユニバーサルプライマーの中から適切なフォワードプライマー及びリバープライマーを選択し、核酸増幅を行いT-RFLP法に用いることができる。

【0023】

このようなプライマーセットとしては、以下に示す表1に示すものが特に好ましい。表1中、「名称」は当分野で通常用いられているユニバーサルプライマーの名称である。例えば、制限酵素としてBslI又はHaeIIIを用いてT-RFLP法を行う場合には、516f（配列番号1）と1510r（配列番号2）とを組み合わせる用いることが好ましく、制限酵素としてMspI又はAluIを用いてT-RFLP法を行う場合には、27f（配列番号3）と1510rとを組み合わせる用いることが好ましい。27fに代えて35f（配列番号4）を用いることも好ましい。35fを用いた場合には、T-RFLP法によって得られる制限酵素末端断片の断片長は、27fを用いた場合よりも10bp短くなる。

フォワードプライマー27f、35f又は516fのそれぞれに組み合わせるリバープライマーとしては、27f、35f又は516fのそれぞれより下流側（3'側）の位置の相補鎖側に結合するリバープライマーであればいずれでもよい。例えば、926r（5'-CCGTC AATTCCTTTGAGTTT-3'）（配列番号5）、1406r（5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3'）（配列番号6）などが挙げられるがこれらに限定はされない。

【0024】

【表1】

フォワードプライマー		リバープライマー	
名称	配列(5'→3')	名称	配列(5'→3')
516f	TGCCAGCAGCGCGGTA	1510r	GGTTACCTTGTTACGACTT
27f	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1510r	GGTTACCTTGTTACGACTT
35f	CCTGGCTCAGGATGAACG	1510r	GGTTACCTTGTTACGACTT

【0025】

核酸の増幅に用いるフォワードプライマー及びリバープライマーの少なくとも一方は標識されたものを用いる。なお、フォワードプライマーが標識されていることが好ましい。標識物質の種類は特に制限されず、公知の標識を使用すればよい。例えば、6-カルボキシ-2', 4', 7', 4, 7-ヘキサクロロフルオレセイン（HEX）、6-カルボキシフルオレセイン（FAM）及び6-カルボキシ-4, 7, 2', 7'-テトラクロロフルオレセイン（TET）、5（6）-カルボキシ-X-ローダミン（ROX）、Cy5、Cy3などの蛍光色素が挙げられる。

【0026】

プライマーを標識する方法はこの分野で周知である。具体的には、標識物質をプライマーに含まれるオリゴヌクレオチドに結合させればよい。蛍光標識された塩基が、プライマーの5'末端から数えて1～3番目のいずれかの位置に存在することが、蛍光標識の効率及び核酸増幅効率の観点から好ましく、5'末端に存在することが特に好ましい。蛍光標識物質はオリゴヌクレオチドに直接結合させてもよいし、リンカー等を介して間接的に結合させてもよい。

蛍光標識物質のオリゴヌクレオチドへの結合は、Merker Gene Technologies社製のOliGro（登録商標）等の市販のラベリングキットを用いて行うこともできる。

【0027】

PCR反応液におけるその他の組成成分は、特に制限されず、従来公知の成分が挙げら

れ、その割合も特に制限されない。他の組成成分としては、DNAポリメラーゼ、ヌクレオシド三リン酸（dNTP）等のヌクレオチド、溶媒等が挙げられる。PCR反応液において、各組成成分の添加順序は何ら制限されない。

【0028】

核酸の増幅に用いるDNAポリメラーゼは特に制限されない。例えば、従来公知の耐熱性細菌由来のポリメラーゼが使用できる。具体例としては、テルムス・アクアティカス（*Thermus aquaticus*）由来DNAポリメラーゼ（米国特許第4889818号明細書及び米国特許第5079352号明細書を参照）（Taqポリメラーゼ（商品名））、テルムス・テルモフィラス（*Thermus thermophilus*）由来DNAポリメラーゼ（国際公開第91/09950号を参照）（rTth DNA polymerase）、ピロコッカス・フリオサス（*Pyrococcus furiosus*）由来DNAポリメラーゼ（国際公開第92/9689号を参照）（Pfu DNA polymerase；Stratagene社製）、テルモコッカス・リトラリス（*Thermococcus litoralis*）由来DNAポリメラーゼ（欧州特許第0455430号明細書を参照）（Vent（商標）；New England Biolabs社製）等が商業的に入手可能である。中でも、テルムス・アクアティカス（*Thermus aquaticus*）由来の耐熱性DNAポリメラーゼが好ましい。

PCR反応液中のDNAポリメラーゼの添加割合は、目的核酸を増幅する目的で当業界において通常用いられる割合であればよい。

【0029】

ヌクレオシド三リン酸としては、通常、dNTP（例えば、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、dUTP等）が挙げられる。PCR反応液中のdNTPの添加割合は、目的核酸を増幅する目的で当業界において通常用いられる割合であればよい。

溶媒としては、Tris-HCl、Tricine、MES（2-morpholinoethanesulfonic acid）、MOPS（3-morpholinopropanesulfonic acid）、HEPES（4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid）、CAPS（N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid）等の緩衝液が挙げられ、市販のPCR用緩衝液やPCRキットに付属の緩衝液等をそのまま使用すればよい。

また、PCR反応液には、グリセロール、ヘパリン、ベタイン、NaN₃、KCl、MgCl₂、MgSO₄等が含まれていてもよい。

【0030】

PCRは、通常、（i）二本鎖核酸の一本鎖核酸への解離（解離工程）、（ii）プライマーの鋳型核酸へのアニーリング（アニーリング工程）、（iii）DNAポリメラーゼによるプライマーからの核酸配列の伸長（伸長工程）の3工程を含む。各工程の条件は特に制限されない。解離工程の条件は、例えば、90℃～99℃、1秒間～120秒間が好ましく、92℃～95℃、1秒間～60秒間がより好ましい。アニーリング工程の条件は、例えば、40℃～70℃、1秒間～300秒間が好ましく、45℃～60℃、5秒間～60秒間がより好ましい。また、伸長工程の条件は、例えば、50℃～80℃、1秒間～300秒間が好ましく、50℃～80℃、5秒間～120秒間がより好ましい。サイクル数も特に制限されない。3工程を1サイクルとして、例えば、10サイクル以上が好ましい。上限は特に制限されない。

例えば、合計100サイクル以下、好ましくは70サイクル以下、より好ましくは50サイクル以下である。各工程の温度変化は、例えば、サーマルサイクラー等を用いて自動的に制御すればよい。なお、アニーリング工程と伸長工程とを同じ温度条件とし、2工程でPCRを行ってもよい。

【0031】

（2）制限酵素による切断

T-RFLP法に使用する制限酵素は、増幅した16SrRNA遺伝子領域を切断できるものであれば、特に限定されない。当業者は、使用したプライマーの配列から、16SrRNAの遺伝子配列が既知の細菌の増幅産物の配列を予測することができる。さらに、増幅産物の配列から、増幅産物に含まれる制限酵素認識部位を知ることができる。

T-RFLP法に使用する制限酵素としては、例えば、BslI、HaeIII、Ms

p I、A l u I、H h a I、M b o l I、M a e I I、H p a I I、R s a Iなどが挙げられる。B s l I、H a e I I I、M s p I及びA l u Iが特に好ましい。

制限酵素処理は公知の方法によって行うことができる。適当なユニット数の制限酵素及び緩衝液を含む反応液と、増幅した核酸とを混合し、使用する制限酵素に適した温度及び時間でインキュベーションすればよい。

【0032】

(3) 末端標識断片の断片長及び存在比の測定

T-RFLP法によって得られた末端標識制限酵素断片の断片長及び存在比を測定する。末端標識断片の断片長は当業者に公知の方法によって測定することができる。例えば、制限酵素により切断した試料を、塩基長スタンダードと共にキャピラリー電気泳動し、泳動距離を基に塩基長スタンダードから作成した標準曲線から求めてもよい。末端標識断片の存在比は当業者に公知の方法によって測定することができる。例えば、末端標識断片の標識のシグナル強度から把握してもよい。末端標識断片の断片長及び存在比は、例えば、DNAシーケンサのキャピラリー電気泳動装置を用いて末端標識断片の標識を検出することにより測定してもよい。例えば、Thermo Fisher Scientific社製のABI PRISM 3130x1を用いてキャピラリー電気泳動を行い、GeneMapper ver. 4.0を用いて結果を解析し、末端標識断片の断片長、各断片長のピーク面積、蛍光強度を得ることができる。

【0033】

4つの試料を、Thermo Scientific社製のABI PRISM 3130x1を用いてキャピラリー電気泳動を行った結果を、得られた末端標識断片の断片長と蛍光強度の関係として示した例を図1に示す。

ある末端標識断片の存在比は、図1のようなキャピラリー電気泳動によって得られた結果から、末端標識断片の断片長とその標識シグナルの強度を用いて、目的とする末端標識断片に相当するピークの面積及び全てのピークの面積の合計から、以下の式を用いて算出することができる。

目的とする末端標識断片の存在比(%) = 目的とする末端標識断片に相当するピーク面積 / 総ピーク面積 × 100

Thermo Fisher Scientific社製GeneMapper ver. 4.0は、ピーク面積の計算に好適に用いられる。

【0034】

<データマイニング法による決定木の生成>

本発明の一実施形態において、データマイニング法によって生成された決定木に従って被験者を分類する決定木を生成する場合には、データマイニング法のアルゴリズムは特に制限されない。アルゴリズムとしては、Classification and regression trees (C&RT)法、Chi-squared automatic interaction detection (CHAID)法、Quick, Unbiased, Efficient, Statistical Tree (QUEST)法、C5.0法が広く用いられており、好ましい方法として例示される。

C&RT法は特に好ましいアルゴリズムである。C&RT法による決定木の生成について以下に記載する。

C&RT法は、目的変数に対してできるだけ等質なデータサブセットを作成すべく、対象を2つに分別することにより決定木を構築する方法である。目的変数を診断情報(1型糖尿病患者、2型糖尿病患者、健常人(1型糖尿病でも2型糖尿病でもない者))とし、説明変数を制限酵素断片の断片長及び存在比とする。

具体的には、データの不純度(Gini係数)を算出し、元のデータ(親ノードのデータ)を2つのサブセット(子ノードのデータ)に分割するとき、子ノードの不純度が親ノードの不純度に対してどの程度改善されたかを示す改善度を分別作業の評価基準として構

築していく。

そして、改善度が最大となるような分別点（分別変数及びその値）を再帰的に探索する過程を、停止規則を満たすまで反復する（日本国特許第5645761号）。

【0035】

不純度 $g(t)$ および改善度 $f(t)$ は、以下のように算出される。

【0036】

【数1】

$$g(t) = \sum_{j \neq 1} p(j|t)p(i|t) \quad 10$$

【0037】

【数2】

$$f(t) = g(t) - P_L g(t_L) - P_R g(t_R)$$

【0038】

ただし、数式1および数式2において、

【0039】

【数3】

$$p(j|t) = p(j, t) / p(t) \quad 20$$

【0040】

【数4】

$$p(j, t) = \pi(j) N_j(t) / N_j \quad 30$$

【0041】

【数5】

$$p(t) = \sum_j p(j, t)$$

である。 40

【0042】

ここで、 $\pi(j)$ は、カテゴリ j の事前確率、 $N_j(t)$ は、ノード t におけるカテゴリ j のケース数、 N_j は、ルートノードにおけるカテゴリ j のケース数である。また、 P_L は、ノード t において1つ目の子ノードに送られるケースの割合であり、 P_R は、ノード t において2つ目の子ノードに送られるケースの割合である。

C & R T法においては、改善度 $f(t)$ が最大となるように分別する。すなわち、不純度が最も大きく減少するように分別する。

なお、C & R T法による決定木の生成には、分岐の条件として上述したようにGini係数を使用する他に、Twoing、最小2乗偏差(LSD)等を使用する方法を用いてもよい。

【0043】

生成された決定木中の各ノードにおいて、下流側に子ノードを持たない、決定木の末端に位置する葉ノードは不純度が0であり、1型糖尿病患者、2型糖尿病患者又は健常人（1型糖尿病でも2型糖尿病でもない者）のいずれかのみが含まれるノードである（ただし、再帰的計算を中止した結果として末端に位置するノードは除く）。決定木の最も上流に位置する根ノードから1型糖尿病患者、2型糖尿病患者又は健常人のいずれかのみが含まれる葉ノードに至る経路を辿ることによって、当該葉ノードの臨床情報（1型糖尿病患者、2型糖尿病患者又は健常人）について判定することができる。ある被験者について根ノードから葉ノードへの経路を辿るためには、当該被験者のT-RFLP法の結果が、決定木において根ノードから当該葉ノードに至る分岐点に設定された条件を全て満たすことを確認すればよい。ある被験者について根ノードから葉ノードへの経路を辿る場合、根ノードから当該葉ノードに至る分岐点に設定された条件を全て満たせば、条件を適用する順序はいずれでもよい。

図2に示すBs1Iを用いたT-RFLP法の結果から生成した決定木を例として具体的に説明する。ノード4は1型糖尿病患者のみが含まれる葉ノードであり、根ノードには全ての被験者が含まれる。根ノードに含まれる被験者は、腸内細菌叢全体に含まれる細菌をBs1Iを用いて切断して得られた制限酵素断片の断片長が366bpである断片の存在比が2.281以上であるとき子ノードであるノード1に分類される。次に、ノード1に含まれる被験者は、断片長168bpである断片の存在比が3.081未満である場合に1型糖尿病患者のみが含まれる葉ノード4に分類される。この結果から、ある被験者において、Bs1Iを用いて切断された制限酵素断片の断片長が366bpである断片の存在比が2.281以上であり、かつ、断片長168bpである断片の存在比が3.081未満である場合には、1型糖尿病であると判定することができる。この結果から、ある被験者において、Bs1Iを用いて切断された制限酵素断片の断片長が366bpである断片の存在比が2.281以上であり、かつ、断片長168bpである断片の存在比が3.081未満である場合には、1型糖尿病であると判定することができる。

【0044】

生成された決定木において、親ノードから子ノードへの分岐の条件は、末端標識制限酵素断片の断片長の断片長及び存在比の組み合わせである。このうち、末端標識制限酵素断片の断片長の存在比をしきい値と呼ぶ。決定木を生成する際に得られた各ノードにおいて子ノードへの分岐の条件となるしきい値の数値は、他の被験者についても所定のしきい値として適用することができる。決定木を生成して得た所定のしきい値を用いて、決定木を生成する際に対象とされた被験者以外の被験者について、1型糖尿病であるか、2型糖尿病であるか、又は、1型糖尿病でも2型糖尿病でもないことを判定することができる。

また、末端標識制限酵素断片の断片長もまた、決定木を生成する際に対象とされた被験者以外の被験者について適用することができる。

【0045】

根ノードから葉ノードへの経路は、1つを単独で用いてもよいし、他の経路と組み合わせて用いてもよい。例えば、1つの決定木において全ての葉ノードを用いる場合には、全ての被験者について1型糖尿病の有無及び2型糖尿病の有無を判定することができる。

【0046】

決定木の生成には、説明変数として使用する末端標識制限酵素断片の断片長の存在比は、1種類の制限酵素を用いたT-RFLP法から得られたもののみを用いてもよいし、2種類の制限酵素を用いて別々に行ったT-RFLP法から得られた末端標識制限酵素断片の断片長の存在比を合わせて用いてもよい。

【0047】

1種類の制限酵素によるT-RFLP法による末端標識制限酵素断片の断片長の存在比を用いて生成した決定木の特定の葉ノードと、別の種類の制限酵素によるT-RFLP法による末端標識制限酵素断片の断片長の存在比を用いて生成した決定木の特定の葉ノードによる判定とを組み合わせ用いてもよい。一方の判定はもう一方の判定を相補うことができる。また、判定に適用する葉ノードの数は特に制限されず、複数の根ルートから葉ノードに至る経路を用いてもよい。組み合わせに用いる複数の葉ノードは、1型糖尿病患者が含まれる葉ノード、2型糖尿病葉ノード、健常人が含まれる葉ノード、又はこれらの一

部若しくは全てを含んでもよい。

【0048】

[解析例]

以下、本発明を解析例により具体的に説明するが、本発明はこれらの解析例に限定されるものではない。

【0049】

[解析例1]

<被験者>

発症5年以内の1型糖尿病患者11名、2型糖尿病患者11名、及び、1型糖尿病及び2型糖尿病ではないと診断された健常人31名を被験者とした。

10

【0050】

<腸内細菌叢全体の細菌の採取及びDNA抽出>

被験者の便を500mg採取し9容量の滅菌蒸留水中に懸濁した。10分間静置後、得られた懸濁液0.1mLを0.9mLの滅菌蒸留水に加え、18000×gで5分間遠心した。ペレットを1mLの滅菌蒸留水で洗浄し、さらに遠心した後に、40mM EDTA及び100mM Tris-HCl (pH9.0)を含む溶液250μLに懸濁した。得られた懸濁液を0.6gのガラスビーズ(直径0.1mm)が入った試験管に移し、ビーズ粉砕機を用いて便を粉砕した。得られた懸濁液100μLにベンジルクロライド150μLと10%ドデシル硫酸ナトリウム50μLを加え、50℃で30分間激しく振盪した。続いて、3M酢酸ナトリウムを150μL加え、15分間氷冷した後に、18000×gで10分間遠心した。上層を回収し、等量のイソプロパノールを加えてDNAを沈殿させた。70%エタノールでペレットを洗浄し、次いでDNAペレットを乾燥し、1mL当たり50μgのRNaseを含有するトリスEDTA (TE) 緩衝液(10mM Tris-HCl [pH8.0]、0.1mM EDTA) 100μLに溶解し、37℃で30分間インキュベートした。次に、illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GEヘルスケア・ジャパン株式会社)を用いてDNAを精製し、得られたDNAを定法に従って定量した。

20

【0051】

<PCR法>

抽出したDNAを鋳型としてPCR法を行った。1×PCR緩衝液、各200μMのdATP、dTTP、dGTP及びdCTPのヌクレオチド-3リン酸、1.5mMのMgCl₂、各0.1μMのフォワードプライマー及びリバープライマー、及び、便から抽出したDNA10ng、0.5UのHotStarTaq DNAポリメラーゼ(株式会社キアゲン)を含むPCR反応液を調製した。フォワードプライマーとしてFAM(登録商標、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社)で標識したユニバーサルプライマー516f(5'-TGCCAGCAGCCGCGGTA-3')、リバープライマーとしてユニバーサルプライマー1510r(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')を使用した。PCR反応液は1テスト当たり20μL使用した。

30

PCR法は、95℃で15分間処理した後、95℃で30秒間、50℃で30秒間、及び、72℃で1分間を1サイクルとして、30サイクル繰り返し、続いて72℃で10分間の最終的な伸長反応を行った。

40

【0052】

<PCR産物の精製及び制限酵素BslI処理>

20μLのPCR産物を、MultiScreenFBフィルタープレート(メルク株式会社)を用いて精製した。精製したPCR産物に、10μL当たり0.5UのBslI(商品名:Fast Digest BslI、Thermo Fisher Scientific社、USA)を加え、37℃で10分間、制限酵素処理を行った。

【0053】

<T-RFLP法>

制限酵素で切断処理を行ったPCR産物2μLを、4倍希釈したGeneScan25

50

00サイズスタンダード (Thermo Fisher Scientific 社、USA) 0.5 μ L 及び脱イオンホルムアミド 12 μ L に混合し、96 $^{\circ}$ C で2分間変性処理を行い直ちに氷冷してキャピラリー電気泳動の試料とした。ABI PRISM 3130x1 (Thermo Fisher Scientific 社、USA) を用いて、インジェクション時間40秒、泳動時間40分でキャピラリー電気泳動を行い、HEX により標識された制限酵素断片の末端の断片長及びピーク面積をABI PRISM 3130x1 のGeneMapper ver. 4.0ソフトウェアを用いて算出した。得られた結果の例を図1に示す。

【0054】

<データマイニング>

T-RFLP法によって得られた末端標識制限酵素断片の断片長及びその存在比と、被験者の臨床情報 (1型糖尿病、2型糖尿病又は1型糖尿病でも2型糖尿病でもない健常人) とを対応付け、C&RT法によりデータマイニングを行って決定木を生成した。存在比は前述の通り算出することができる。

【0055】

<解析例1の結果>

得られた決定木を図2に示す。1型糖尿病患者は、ノード4、ノード8、ノード10、ノード19及びノード24に含まれた。2型糖尿病患者は、ノード18及びノード22に含まれた。健常人は、ノード13、ノード15、ノード20、ノード12及びノード13

【0056】

ノード4には1型糖尿病患者のみが含まれる。これは、制限酵素としてBsl Iを用いてT-RFLP法を行い、塩基長が366bpである断片の存在比が2.281以上であり、断片長が168bpである断片の存在比が3.081未満である場合に1型糖尿病であると判定できることを示す。以下同様に、塩基長が366bpである断片の存在比が2.281以上であり、塩基長が168bpである断片の存在比が3.081以上であり、塩基長が505bpである断片の存在比が1.859未満である場合に (ノード8)、1型糖尿病であると判定できることを示す。塩基長が366bpである断片の存在比が2.281未満であり、塩基長が754bpである断片の存在比が1.226以上であり、塩基長が968bpである断片の存在比が0.560未満である場合に (ノード10)、1型糖尿病であると判定できることを示す。塩基長が366bpである断片の存在比が2.281未満であり、塩基長が754bpである断片の存在比が1.226未満であり、塩基長が749bpである断片の存在比が4.644未満であり、塩基長が317bpである断片の存在比が17.401以上である場合に (ノード19)、1型糖尿病であると判定できることを示す。塩基長が366bpである断片の存在比が2.281未満であり、塩基長が754bpである断片の存在比が1.226未満であり、塩基長が749bpである断片の存在比が4.644以上であり、塩基長が650bpである断片の存在比が0.300以上であり、塩基長が106bpである断片の存在比が0.778未満である場合に (ノード24)、1型糖尿病であると判定できることを示す。塩基長が366bpである断片の存在比が2.281未満であり、塩基長が754bpである断片の存在比が1.226以上であり、塩基長が968bpである断片の存在比が0.560以上であり、塩基長が366bpである断片の存在比が36.992未満である場合に (ノード16)、2型糖尿病であると判定できることを示す。塩基長が366bpである断片の存在比が2.281未満であり、塩基長が754bpである断片の存在比が1.226未満であり、塩基長が749bpである断片の存在比が4.644以上であり、塩基長が650bpである断片の存在比が0.300未満である場合に (ノード18)、2型糖尿病であると判定できることを示す。塩基長が366bpである断片の存在比が2.281以上であり、塩基長が168bpである断片の存在比が3.081以上であり、塩基長が505bpである断片の存在比が1.859以上であり、塩基長が332bpである断片の存在比が6.231未満であり、塩基長が106bpである断片の存在比が0.181未満である

場合に（ノード 22）、2 型糖尿病であると判定できることを示す。塩基長が 366 bp である断片の存在比が 2.281 以上であり、塩基長が 168 bp である断片の存在比が 3.081 以上であり、塩基長が 505 bp である断片の存在比が 1.859 以上であり、塩基長が 332 bp である断片の存在比が 6.231 以上である場合に（ノード 13）、1 型糖尿病でも 2 型糖尿病でもないとは判定できることを示す。塩基長が 366 bp である断片の存在比が 2.281 未満であり、塩基長が 754 bp である断片の存在比が 1.226 以上であり、塩基長が 968 bp である断片の存在比が 0.560 以上であり、塩基長が 366 bp である断片の存在比が 36.992 以上である場合に（ノード 15）、1 型糖尿病でも 2 型糖尿病でもないとは判定できることを示す。塩基長が 366 bp である断片の存在比が 2.281 未満であり、塩基長が 754 bp である断片の存在比が 1.226 未満であり、塩基長が 749 bp である断片の存在比が 4.644 未満であり、塩基長が 317 bp である断片の存在比が 17.401 未満である場合に（ノード 20）、1 型糖尿病でも 2 型糖尿病でもないとは判定できることを示す。塩基長が 366 bp である断片の存在比が 2.281 以上であり、塩基長が 168 bp である断片の存在比が 3.081 以上であり、塩基長が 505 bp である断片の存在比が 1.859 以上であり、塩基長が 332 bp である断片の存在比が 6.231 未満であり、塩基長が 106 bp である断片の存在比が 0.181 以上である場合に（ノード 21）、1 型糖尿病でも 2 型糖尿病でもないとは判定できることを示す。塩基長が 366 bp である断片の存在比が 2.281 未満であり、塩基長が 754 bp である断片の存在比が 1.226 未満であり、塩基長が 749 bp である断片の存在比が 4.644 以上であり、塩基長が 650 bp である断片の存在比が 0.300 以上であり、塩基長が 106 bp である断片の存在比が 0.778 以上である場合に（ノード 23）、1 型糖尿病でも 2 型糖尿病でもないとは判定できることを示す。

【0057】

全ての 1 型糖尿病患者はノード 4、ノード 8、ノード 10、ノード 19、又は、ノード 24 のいずれかに含まれ、決定木の根ノードからこれらのノードに至る経路を辿れば、全ての 1 型糖尿病患者を 1 型糖尿病患者であると判定することが可能であった。全ての 2 型糖尿病患者はノード 18 又はノード 22 に含まれ、決定木の根ノードからこれらのノードに至る経路を辿れば、全ての 2 型糖尿病患者を 2 型糖尿病患者であると判定することが可能であった。また、全ての健常人はノード 13、ノード 15、ノード 21、又は、ノード 23 のいずれかに含まれ、決定木の根ノードからこれらのノードに至る経路を辿れば、全ての健常人を健常人であると判定することが可能であった。

また、ノード 19 に含まれる 1 型糖尿病患者は 11 名中 6 名であり、図 2 に示す決定木において、根ノードからノード 19 に至る経路のみによって感度 55%、特異度 100% の判定をすることができた。ノード 18 に含まれる 2 型糖尿病患者は 11 名中 9 名であり、図 2 に示す決定木において、根ノードからノード 18 に至る経路のみによって感度 82%、特異度 100% の判定をすることができた。また、ノード 13 に含まれる健常人は 31 名中 19 名であり、図 2 に示す決定木において、根ノードからノード 13 に至る経路のみによって感度 61%、特異度 100% の判定をすることができた。

【0058】

[解析例 2～4]

制限酵素として、HaeIII（商品名：Fast Digest HaeIII、Thermo Fisher Scientific 社、USA）（解析例 2）、MspI（商品名：Fast Digest MspI、Thermo Fisher Scientific 社、USA）（解析例 3）、又は、AluI（商品名：Fast Digest AluI、Thermo Fisher Scientific 社、USA）（解析例 4）を用いて T-RFLP 法を行った。制限酵素として HaeIII を用いた場合には、解析例 1 と同じフォワードプライマー及びリバースプライマーを使用した。制限酵素として MspI 又は AluI を用いた場合には、フォワードプライマーとして FAM（で標識したユニバーサルプライマー 27f（5'-AGAGTTTGATCMTGGCTC

AG-3')、リバースプライマーとしてユニバーサルプライマー1510r(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')を使用した。

各制限酵素による増幅産物の処理条件は、解析例1と同様の条件で行った。

【0059】

＜解析例2の結果＞

得られた決定木を図3に示す。1型糖尿病患者は、ノード10、ノード16及びノード19に含まれた。2型糖尿病患者は、ノード8、ノード15及びノード18に含まれた。健常人は、ノード6、ノード7、ノード9、ノード17及びノード20に含まれた。

【0060】

ノード10には1型糖尿病患者のみが含まれる。これは、制限酵素としてHaeIIIを用いてT-RFLP法を行い、塩基長が85bpである断片の存在比が0.392以上であり、塩基長が315bpである断片の存在比が7.941未満であり、塩基長が58bpである断片の存在比が0.114未満である場合に、1型糖尿病であると判定できることを示す。以下同様に、塩基長が85bpである断片の存在比が0.392未満であり、塩基長が177bpである断片の存在比が4.067以上であり、塩基長が236bpである断片の存在比が4.140未満であり、塩基長が203bpである断片の存在比が2.636未満である場合に、1型糖尿病であると判定できることを示す(ノード16)。塩基長が85bpである断片の存在比が0.392未満であり、塩基長が177bpである断片の存在比が4.067以上であり、塩基長が236bpである断片の存在比が4.140以上であり、塩基長が265bpである断片の存在比が38.276未満であり、塩基長が45bpである断片の存在比が1.328以上である場合に、1型糖尿病であると判定できることを示す(ノード19)。塩基長が85bpである断片の存在比が0.392以上であり、塩基長が315bpである断片の存在比が7.941以上であり、塩基長が79bpである断片の存在比が0.856未満である場合に、2型糖尿病であると判定できることを示す(ノード8)。塩基長が85bpである断片の存在比が0.392未満であり、塩基長が177bpである断片の存在比が4.067以上であり、塩基長が236bpである断片の存在比が4.140未満であり、塩基長が203bpである断片の存在比が2.636以上である場合に、2型糖尿病であると判定できることを示す(ノード15)。塩基長が85bpである断片の存在比が0.392未満であり、塩基長が177bpである断片の存在比が4.067以上であり、塩基長が236bpである断片の存在比が4.140以上であり、塩基長が265bpである断片の存在比が38.276以上であり、塩基長が45bpである断片の存在比が1.258未満である場合に、2型糖尿病であると判定できることを示す(ノード18)。塩基長が85bpである断片の存在比が0.392未満であり、塩基長が177bpである断片の存在比が4.067未満である場合に、1型糖尿病でも2型糖尿病でもないと判定できることを示す(ノード6)。塩基長が85bpである断片の存在比が0.392以上であり、塩基長が315bpである断片の存在比が7.941以上であり、塩基長が79bpである断片の存在比が0.856以上である場合に、1型糖尿病でも2型糖尿病でもないと判定できることを示す(ノード7)。塩基長が85bpである断片の存在比が0.392以上であり、塩基長が315bpである断片の存在比が7.941未満であり、塩基長が58bpである断片の存在比が0.114以上である場合に、1型糖尿病でも2型糖尿病でもないと判定できることを示す(ノード9)。塩基長が85bpである断片の存在比が0.392未満であり、塩基長が177bpである断片の存在比が4.067以上であり、塩基長が236bpである断片の存在比が4.140以上であり、塩基長が265bpである断片の存在比が38.276以上であり、塩基長が45bpである断片の存在比が1.258以上である場合に、1型糖尿病でも2型糖尿病でもないと判定できることを示す(ノード17)。塩基長が85bpである断片の存在比が0.392未満であり、塩基長が177bpである断片の存在比が4.067以上であり、塩基長が236bpである断片の存在比が4.140以上であり、塩基長が265bpである断片の存在比が38.276未満であり、塩基長が45bpである断片の存在比が1.328未満である場合に、1型糖尿病でも2型糖

尿病でもないとは判定できることを示す（ノード 20）。

【0061】

全ての 1 型糖尿病患者は、ノード 10、ノード 16、又は、ノード 19 のいずれかに含まれ、決定木の根ノードからこれらのノードに至る経路を辿れば、全ての 1 型糖尿病患者を 1 型糖尿病患者であると判定することが可能であった。全ての 2 型糖尿病患者は、ノード 8、ノード 15 又はノード 18 のいずれかに含まれ、決定木の根ノードからこれらのノードに至る経路を辿れば、全ての 2 型糖尿病患者を 2 型糖尿病患者であると判定することが可能であった。また、全ての健常人はノード 6、ノード 7、ノード 9、ノード 17、又は、ノード 20 のいずれかに含まれ、決定木の根ノードからこれらのノードに至る経路を辿れば、全ての健常人を健常人であると判定することが可能であった。

10

また、ノード 16 に含まれる 1 型糖尿病患者は 11 名中 7 名であり、図 3 に示す決定木において、根ノードからノード 16 に至る経路のみによって感度 64%、特異度 100% の判定をすることができた。ノード 18 に含まれる 2 型糖尿病患者は 11 名中 8 名であり、図 3 に示す決定木において、根ノードからノード 18 に至る経路のみによって感度 73%、特異度 100% の判定をすることができた。また、ノード 7 に含まれる健常人は 31 名中 22 名であり、図 3 に示す決定木において、根ノードからノード 7 に至る経路のみによって感度 71%、特異度 100% の判定をすることができた。

【0062】

<解析例 3 の結果>

得られた決定木を図 4 に示す。1 型糖尿病患者は、ノード 9、ノード 14、ノード 16、ノード 18 及びノード 20 に含まれた。2 型糖尿病患者は、ノード 4、ノード 15、ノード 19 及びノード 21 に含まれた。健常人は、ノード 6、ノード 17 及びノード 22 に含まれた。

20

【0063】

ノード 9 には 1 型糖尿病患者のみが含まれる。これは、制限酵素として MspI を用いて T-RFLP 法を行い、塩基長が 293 bp である断片の存在比が 9.740 未満であり、塩基長が 457 bp である断片の存在比が 1.620 以上であり、塩基長が 120 bp である断片の存在比が 0.312 以上である場合に、1 型糖尿病であると判定できることを示す。以下同様に、塩基長が 293 bp である断片の存在比が 9.740 以上であり、塩基長が 150 bp である断片の存在比が 3.879 以上であり、塩基長が 194 bp である断片の存在比が 2.617 未満であり、塩基長が 88 bp である断片の存在比が 1.179 未満である場合に、1 型糖尿病であると判定できることを示す（ノード 14）。塩基長が 293 bp である断片の存在比が 9.740 未満であり、塩基長が 457 bp である断片の存在比が 1.620 以上であり、塩基長が 120 bp である断片の存在比が 0.312 未満であり、塩基長が 81 bp である断片の存在比が 7.009 未満である場合に、1 型糖尿病であると判定できることを示す（ノード 16）。塩基長が 293 bp である断片の存在比が 9.740 以上であり、塩基長が 150 bp である断片の存在比が 3.879 以上であり、塩基長が 194 bp である断片の存在比が 2.617 以上であり、塩基長が 390 bp である断片の存在比が 0.750 以上であり、塩基長が 200 bp である断片の存在比が 0.542 未満である場合に、1 型糖尿病であると判定できることを示す（ノード 18）。塩基長が 293 bp である断片の存在比が 9.740 以上であり、塩基長が 150 bp である断片の存在比が 3.879 以上であり、塩基長が 194 bp である断片の存在比が 2.617 以上であり、塩基長が 390 bp である断片の存在比が 0.750 未満であり、塩基長が 45 bp である断片の存在比が 1.263 未満である場合に、1 型糖尿病であると判定できることを示す（ノード 20）。塩基長が 293 bp である断片の存在比が 9.740 以上であり、塩基長が 150 bp である断片の存在比が 3.879 未満である場合に、2 型糖尿病であると判定できることを示す（ノード 4）。塩基長が 293 bp である断片の存在比が 9.740 未満であり、塩基長が 457 bp である断片の存在比が 1.620 以上であり、塩基長が 120 bp である断片の存在比が 0.312 未満であり、塩基長が 81 bp である断片の存在比が 7.009 以上である場合に、2

30

40

50

型糖尿病であると判定できることを示す（ノード15）。塩基長が293bpである断片の存在比が9.740以上であり、塩基長が150bpである断片の存在比が3.879以上であり、塩基長が194bpである断片の存在比が2.617以上であり、塩基長が390bpである断片の存在比が0.750未満であり、塩基長が45bpである断片の存在比が1.263以上である場合に、2型糖尿病であると判定できることを示す（ノード19）。塩基長が293bpである断片の存在比が9.740以上であり、塩基長が150bpである断片の存在比が3.879以上であり、塩基長が194bpである断片の存在比が2.617未満であり、塩基長が88bpである断片の存在比が1.179以上であり、塩基長が45bpである断片の存在比が1.689以上である場合に、2型糖尿病であると判定できることを示す（ノード21）。塩基長が293bpである断片の存在比が9.740未満であり、塩基長が457bpである断片の存在比が1.620未満である場合に、1型糖尿病でも2型糖尿病でもないとして判定できることを示す（ノード6）。塩基長が293bpである断片の存在比が9.740以上であり、塩基長が150bpである断片の存在比が3.879以上であり、塩基長が194bpである断片の存在比が2.617以上であり、塩基長が390bpである断片の存在比が0.750以上であり、塩基長が200bpである断片の存在比が0.542以上である場合に、1型糖尿病でも2型糖尿病でもないとして判定できることを示す（ノード17）。塩基長が293bpである断片の存在比が9.740以上であり、塩基長が150bpである断片の存在比が3.879以上であり、塩基長が194bpである断片の存在比が2.617未満であり、塩基長が88bpである断片の存在比が1.179以上であり、塩基長が45bpである断片の存在比が1.689未満である場合に、1型糖尿病でも2型糖尿病でもないとして判定できることを示す（ノード22）。

【0064】

全ての1型糖尿病患者は、ノード9、ノード14、ノード16、ノード18、又は、ノード20のいずれかに含まれ、決定木の根ノードからこれらのノードに至る経路を辿れば、全ての1型糖尿病患者を1型糖尿病患者であると判定することが可能であった。11人のうち10人の2型糖尿病患者は、ノード4、ノード15、ノード19、又は、ノード21のいずれかに含まれ、決定木の根ノードからこれらのノードに至る経路を辿れば、2型糖尿病患者を2型糖尿病患者であると判定することが可能であった。また、全ての健常人はノード6、ノード11、又は、ノード22のいずれかに含まれ、決定木の根ノードからこれらのノードに至る経路を辿れば、全ての健常人を健常人であると判定することが可能であった。

また、ノード9に含まれる1型糖尿病患者は11名中5名であり、図4に示す決定木において、根ノードからノード9に至る経路のみによって感度45%、特異度100%の判定を行うことができた。ノード15に含まれる2型糖尿病患者は11名中5名であり、図4に示す決定木において、根ノードからノード15に至る経路のみによって感度45%、特異度100%の判定をすることができた。また、ノード17に含まれる健常人は31名中27名であり、図4に示す決定木において、根ノードからノード17に至る経路のみによって感度87%、特異度96%の判定をすることができた。

【0065】

<解析例4の結果>

得られた決定木を図5に示す。1型糖尿病患者は、ノード6、ノード12、ノード16及びノード18に含まれた。2型糖尿病患者は、ノード5、ノード7及びノード14に含まれた。健常人は、ノード11、ノード15及びノード17に含まれた。

【0066】

ノード6には1型糖尿病患者のみが含まれる。これは、制限酵素としてA1uIを用いてT-RFLP法を行い、塩基長が44bpである断片の存在比が9.028未満であり、塩基長が58bpである断片の存在比が1.062未満である場合に、1型糖尿病であると判定できることを示す。以下同様に、塩基長が44bpである断片の存在比が9.028以上であり、塩基長が216bpである断片の存在比が0.861以上であり、塩基

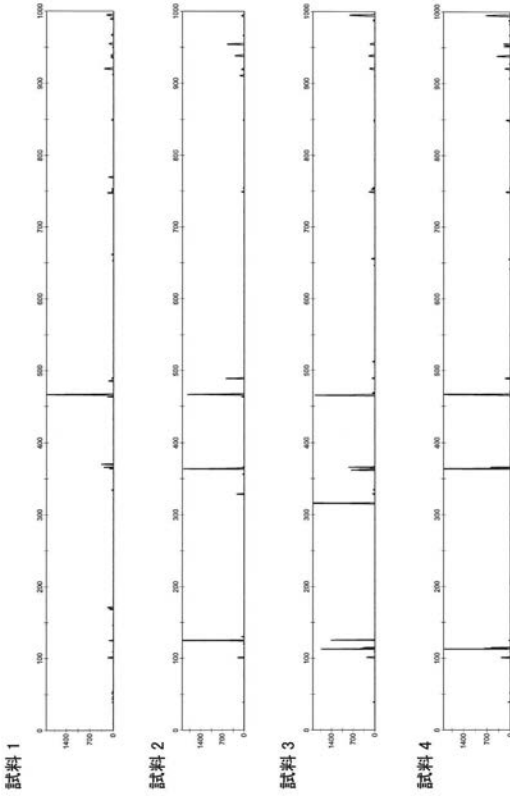
長が76bpである断片の存在比が4.121未満である場合に、1型糖尿病であると判定できることを示す(ノード12)。塩基長が44bpである断片の存在比が9.028以上であり、塩基長が216bpである断片の存在比が0.861未満であり、塩基長が487bpである断片の存在比が0.762未満であり、塩基長が83bpである断片の存在比が9.744未満である場合に、1型糖尿病であると判定できることを示す(ノード16)。塩基長が44bpである断片の存在比が9.028値以上であり、塩基長が216bpである断片の存在比が0.861未満であり、塩基長が487bpである断片の存在比が0.762以上であり、塩基長が203bpである断片の存在比が0.749以上であり、塩基長が830bpである断片の存在比が0.317未満である場合に、1型糖尿病であると判定できることを示す(ノード18)。塩基長が44bpである断片の存在比が9.028未満であり、塩基長が58bpである断片の存在比が1.062以上である場合に、2型糖尿病であると判定できることを示す(ノード5)。塩基長が44bpである断片の存在比が9.028以上であり、塩基長が216bpである断片の存在比が0.861以上であり、塩基長が76bpである断片の存在比が0.405以上である場合に、2型糖尿病であると判定できることを示す(ノード7)。塩基長が44bpである断片の存在比が9.028以上であり、塩基長が216bpである断片の存在比が0.861未満であり、塩基長が487bpである断片の存在比が0.762以上であり、塩基長が203bpである断片の存在比が0.749未満である場合に、2型糖尿病であると判定できることを示す(ノード14)。塩基長が44bpである断片の存在比が9.028以上であり、塩基長が216bpである断片の存在比が0.861以上であり、塩基長が76bpである断片の存在比が4.121以上である場合に、健常人であると判定できることを示す(ノード11)。塩基長が44bpである断片の存在比が9.028以上であり、塩基長が216bpである断片の存在比が0.861未満であり、塩基長が487bpである断片の存在比が0.762未満であり、塩基長が83bpである断片の存在比が9.744以上である場合に、健常人であると判定できることを示す(ノード15)。塩基長が44bpである断片の存在比が9.028以上であり、塩基長が216bpである断片の存在比が0.861未満であり、塩基長が487bpである断片の存在比が0.762以上であり、塩基長が203bpである断片の存在比が0.749以上であり、塩基長が830bpである断片の存在比が0.317以上である場合に、健常人であると判定できることを示す(ノード17)。

【0067】

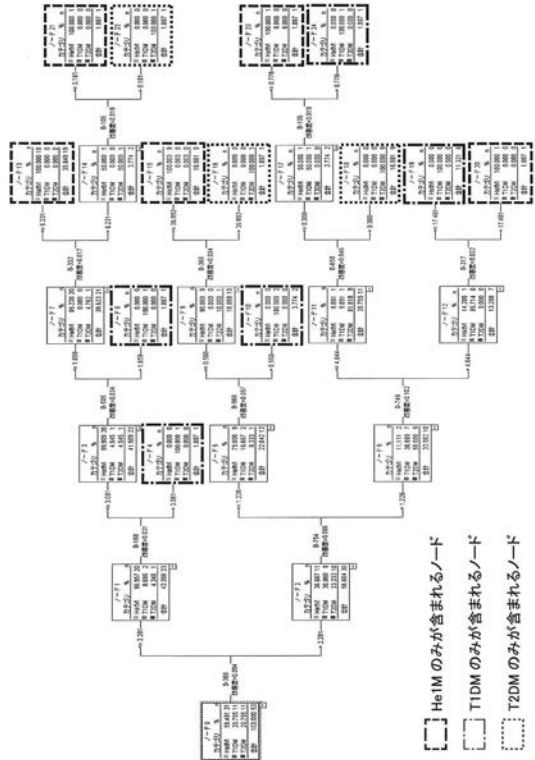
1型糖尿病患者11人のうち10人は、ノード6、ノード12、ノード16、又は、ノード18のいずれかに含まれ、決定木の根ノードからこれらのノードに至る経路を辿れば、1型糖尿病患者を1型糖尿病患者であると判定することが可能であった。2型糖尿病患者11人のうち9人は、ノード5、ノード7、又は、ノード14のいずれかに含まれ、決定木の根ノードからこれらのノードに至る経路を辿れば、2型糖尿病患者を2型糖尿病患者であると判定することが可能であった。また、全ての健常人はノード11、ノード15、又は、ノード17のいずれかに含まれ、決定木の根ノードからこれらのノードに至る経路を辿れば、全ての健常人を健常人であると判定することが可能であった。

また、ノード16に含まれる1型糖尿病患者は11名中5名であり、図5に示す決定木において、根ノードからノード16に至る経路のみによって感度45%、特異度100%の判定を行うことができた。ノード5に含まれる2型糖尿病患者は11名中5名であり、図5に示す決定木において、根ノードからノード5に至る経路のみによって感度45%、特異度100%の判定をすることができた。また、ノード11に含まれる健常人は31人中19人であり、根ノードからノード11に至る経路のみによって感度61%、特異度100%の判定をすることができた。

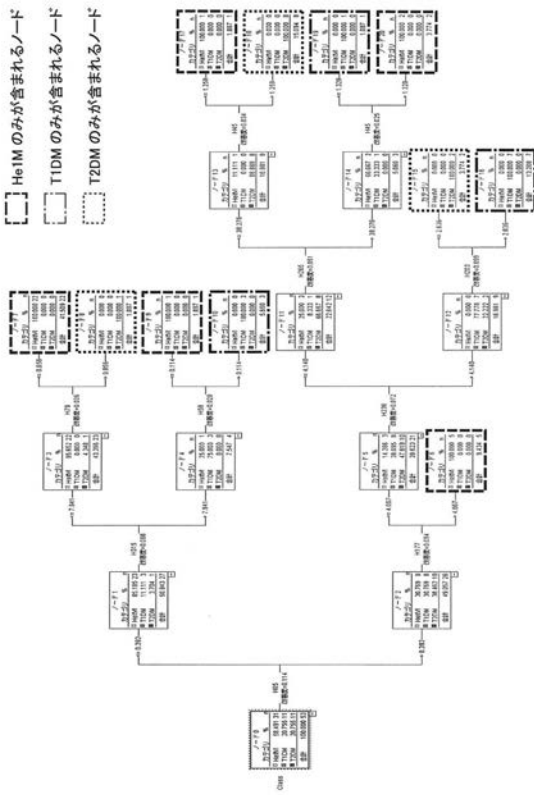
【図 1】



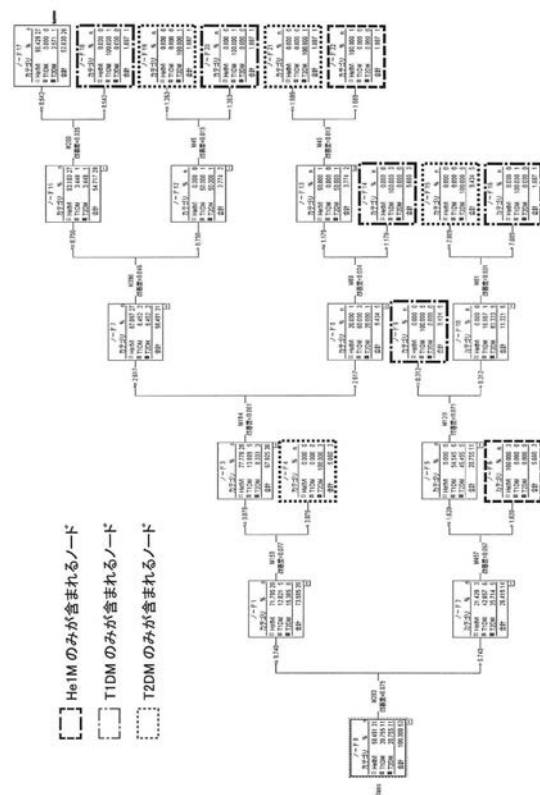
【図 2】



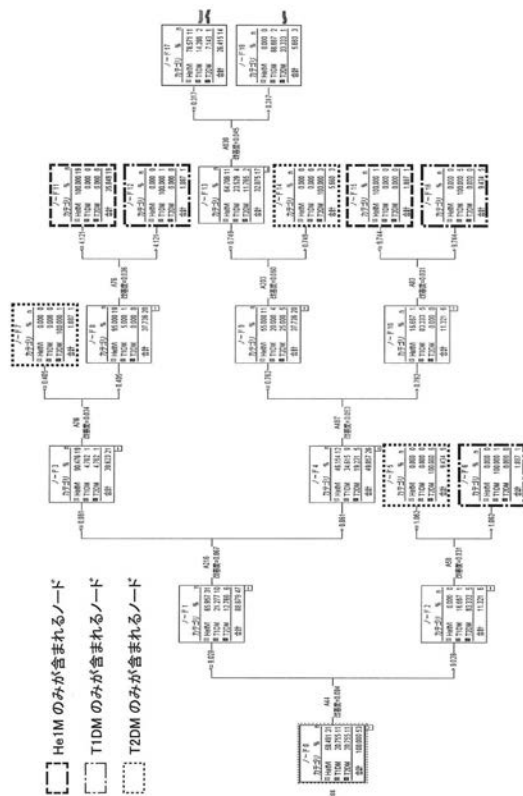
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【配列表】

2017201894000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 小林 登史夫

東京都目黒区緑が丘 1-10-17

(72)発明者 島田 朗

埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷 3-8 学校法人埼玉医科大学内

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA12 QA19 QQ03 QQ06 QQ52 QR14 QR32 QR62 QS16
QS25 QS28 QS40 QX01