



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 02806544.1

[45] 授权公告日 2005 年 7 月 20 日

[11] 授权公告号 CN 1211660C

[22] 申请日 2002.3.1 [21] 申请号 02806544.1

[30] 优先权

[32] 2001.3.15 [33] JP [31] 73332/2001

[86] 国际申请 PCT/JP2002/001906 2002.3.1

[87] 国际公布 WO2002/075315 日 2002.9.26

[85] 进入国家阶段日期 2003.9.15

[71] 专利权人 第一化学药品株式会社

地址 日本东京

共同专利权人 曾根博仁 山田信博

[72] 发明人 曾根博仁 山田信博 海老沼宏幸

斋藤和典

审查员 刘 铭

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

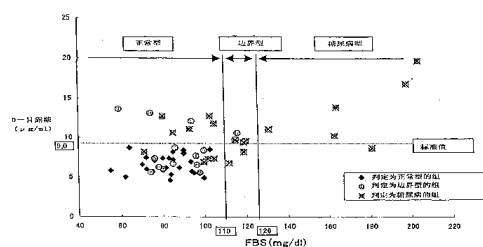
代理人 周承泽

权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 1 页

[54] 发明名称 前糖尿病状态的筛选方法及其筛选试剂

[57] 摘要

本发明提供一种筛选方法，通过该法，前糖尿病状态能够更准确地确定，并能够对病人无身体麻烦地处理许多试验样品，以及用于该法的诊断试剂。通过测定从受试者采集的体液中的 D-甘露糖浓度，更可取的是 D-甘露糖浓度和葡萄糖浓度，将它们与其相应的标准值比较，就能检出前糖尿病状态的病人。而且，甘露糖浓度的测定是通过在电子受体存在下使具有氧化活性的酶对样品中的甘露糖脱氢而进行的，并且定量地测定电子受体的生成的还原剂。



1. 前糖尿病状态的筛选方法，所述方法包括在采自受试者的体液中测定 D-甘露糖浓度，并将 D-甘露糖浓度与预先确定的 D-甘露糖浓度标准值比较。

5 2. 如权利要求 1 所述的前糖尿病状态的筛选方法，还包括在采自受试者的体液中测定葡萄糖浓度，并将葡萄糖浓度与预先确定的 D-葡萄糖浓度标准值比较。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的前糖尿病状态的筛选方法，其特征在于，所述体液是在禁食条件下的受试者的血液、血浆或血清。

10 4. 如权利要求 1 或 2 所述的前糖尿病状态的筛选方法，其特征在于，所述 D-甘露糖浓度的标准值是经统计学处理 D-甘露糖浓度所得的上限，D-甘露糖浓度是通过在禁食条件下测定从健康受试者采集的血液、血浆或血清获得的。

5. 前糖尿病状态的筛选试剂，所述试剂包含在电子受体存在下通过脱氢作用对甘露糖具有氧化活性的一种酶和对该酶有用的电子受体。

15 6. 如权利要求 5 所述的筛选试剂，其特征在于所述筛选试剂还包含葡萄糖清除剂。

7. 如权利要求 5 或 6 所述的筛选试剂，其特征在于所述酶是分类为 EC1.1.1.119 的葡萄糖脱氢酶。

20 8. 如权利要求 5 或 6 所述的筛选试剂，其特征在于，所述酶是来自葡糖杆菌属微生物的己醛糖脱氢酶。

9. 如权利要求 6 所述的筛选试剂，其特征在于，所述葡萄糖清除剂包括葡萄糖 6-位磷酸化酶和三磷酸腺苷。

10. 如权利要求 5 或 6 所述的筛选试剂，其特征在于，所述电子受体是作为辅酶的氧化的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸。

前糖尿病状态的筛选方法及其筛选试剂

5 技术领域

本发明涉及易检出葡萄糖耐量受损引起的前糖尿病状态的筛选方法，及其筛选试剂。

发明背景

10 在日本据估计现在糖尿病人数约有 690 万，如包括可称为前糖尿病状态的葡萄糖耐量受损的人，将达到 1370 万。而且，据说全国 40 岁以上人口的 1/10 是糖尿病人。

糖尿病已知是经葡萄糖耐量受损发展而成的，习惯上称为边界型。因此，通过尽早地检测这种状态并治疗病人就能够抑制向糖尿病的发展。

15 常规的葡萄糖耐量受损和糖尿病临床诊断，是通过测定禁食血糖水平和测定口服 75 克的葡萄糖耐量试验后 1 小时和/或 2 小时的血糖水平。禁食糖水平（下文称为“FBS”）因其低负荷而用于筛选。按照日本糖尿病病学会的诊断标准，低于 110mg/dl 水平判定为正常型，110 至 125mg/dl 为边界型，126mg/dl 或以上者为糖尿病型。由于上述的诊断结果，对糖尿病的疑似病例，再进行另一次口服的 75 克葡萄糖耐量试验以作出最终的决定（对于葡萄糖耐量试验后 2 小时的血糖水平）低于 140mg/dl 水平者判定为正常型，140 至 199mg/dl 为边界型，200mg/dl 或以上者为糖尿病型）。

然而，上述借助 FBS 手段的测定方法未必被认为是一种准确的测定方法，因为有某些因素诸如不稳定型糖尿病或受试验前晚餐的组成的影响。而且，75 克口服葡萄糖耐量试验至少需要 2 小时，频繁采血样，并给病人带来身体麻烦，因此，它并不是那么好的。

25 为了检测前糖尿病状态或糖尿病状态，作为例子已提出下列的方法。

（1）一种比较哺乳动物患者和健康人尿中的 D-chiro-肌醇的数量或增加比率，它们是在眼用蔗糖预定时间后，以同样的方式定量地测定的用于检出前糖尿病状态的方法已经出现(JP-A-2000-298131)。

30 （2）使用来自病人的尿样对哺乳动物患者筛选患糖尿病可能性的一种筛选方法，该方法包括几个步骤：1）在无菌环境下保持这种样品；2）分析这一种样品是

否存在（或缺乏）D-chiro-肌醇，这一步骤规定 D-chiro-肌醇缺乏，或 D-chiro-肌醇水平显著低时，表明体内没有作用，因为和受试者处于糖尿病的状态，此时，这种低水平至少是比非糖尿病水平低 3 个数量级（日本专利 No.2,834,321）。

（3）一种与糖尿病症状有关的胰岛素抗性的检出方法，该法测定 D-chiro-肌醇浓度作为来自哺乳动物患者尿样或血清样中与糖尿病症状有关的胰岛素抗性的指标（日本专利 No. 3,118,458）。

（4）一种筛选人胰岛素抗性的方法，它包含测定液中 D-chiro-肌醇浓度的步骤，测定体液中 myo-肌醇浓度的步骤，计算 myo-肌醇对 D-chiro-肌醇比率的步骤和比较这样计算出的比率与胰岛素抗性的特征性比率，此处，当计算出的比率超过胰岛素抗性的特征性比率时，此人看来可确定有胰岛素抗性（日本国际出版物 No. 10-507826）。

上述的（1）至（4）的筛选方法是使用尿液的检验方法，因此，不需要血样品或类似物，但尿样需要在葡萄糖耐量试验后一定时间内的尿样；在这一段时间内，受试者处于约束状态。从上述可见，这些方法对普查是不适合的。而且，它们还有一个问题是操作如此复杂，不可能处理许多试验样品。

发明内容

本发明的目的是提供一种筛选方法和筛选试剂，用此方法，由葡萄糖耐量受损所引起的前糖尿病状态能够更准确地测定，受试者不因身体情况，时间和费用而有沉重负担，有可能处理大量试验样品。

为了实现上述目标，本发明对于前糖尿病状态的筛选方法之一包含从受试者采集的体液中测定 D-甘露糖浓度，并将 D-甘露糖浓度与预定的 D-甘露糖浓度标准值作比较。

本发明对于前糖尿病状态的另一个筛选方法包含从受试者采集的体液中测定 D-甘露糖浓度和葡萄糖浓度，并将 D-甘露糖浓度与预定的 D-甘露糖浓度标准值作比较，将葡萄糖浓度与 D-葡萄糖预定浓度的标准值作比较。

在本发明的筛选方法中，体液更可取的是受试者在禁食条件下的血液、血浆或血清。而且，D-甘露糖浓度的标准值更可取的是在禁食条件下通过测定从健康人采集的血液、血浆或血清所得的 D-甘露糖浓度经统计学处理所得的上限。

按照本发明的筛选方法，有可能更准确地检测出不稳定型糖尿病患者（这类病人很可能被使用 FBS 的常规判断方法所漏检），以及显示正常的 FBS 值的前糖尿病状

态诸如葡萄糖耐量潜在受损的病人。

另一方面，本发明前糖尿病状态的筛选试剂包含在电子受体存在下通过脱氢作用对甘露糖具有氧化活性的酶和用于该酶的电子受体。

本发明的筛选试剂更可取地还包含葡萄糖清除剂。而且，酶更可取的是葡萄糖
5 脱氢酶，该酶分类为 EC1.1.1.119，更可选择的是己醛糖脱氢酶，它来自属于葡萄糖杆菌（*Gluconobacter*）属的微生物。另外，葡萄糖清除剂应更可取地包含葡萄糖 6-位磷酸化酶和腺苷三磷酸。而且，电子受体更可取的是辅酶 NADP。

本发明的筛选试剂能够定量地测定 D-甘露糖和处理大量的试验样品，因为它使用一种直接对 D-甘露糖反应的酶，而不通过复杂的酶偶联系统，它经脱氢作用而且
10 有氧化活性。而且，因为本发明的筛选几乎不受样品中葡萄糖的影响，使用葡萄糖清除剂使之能够更准确地定量测定 D-甘露糖。

附图的简述

（图 1）表示用本发明的前糖尿病状态筛选方法，在葡萄糖耐量试验之前，所
15 得的血浆中 D-甘露糖浓度和葡萄糖浓度比较的结果。

实施本发明的最佳方式

用本发明的筛选方法所检测的前糖尿病状态是一种状态或情况即当经进餐而糖流入血液时，血糖不能充分地吸收到外周组织中，例如骨骼肌、肝脏和脂肪组织，
20 导致血糖水平上升，也就是葡萄糖耐量受损。此处，应用本发明的受试者主要是人类，但可以包括哺乳动物如牲畜和宠物。在本发明中，“受试者”包括这样的哺乳动物。

在对受试者筛选前糖尿病状态的本发明方法中，测定从受试者采集的体液中 D-甘露糖的浓度，将这浓度与预定的标准值比较。而且，当筛选进行得更准确时，就
25 进行测定 D-甘露糖浓度和葡萄糖浓度，并且这些浓度分别与预定的标准值比较。

作为上述的体液，可提及采集自受试者的尿液、血液或类似物。体液更可取的尤其是血液、血浆或血清，因为当使用它们时，血葡萄糖水平也可测定，更可取的是在禁食条件下采集的样品。

根据受试者体液测定的 D-甘露糖浓度来制定前糖尿病状态的 D-甘露糖浓度标
30 准值，可说明如下：首先，在体液中（更可取的是血液、血浆或血清）D-甘露糖浓度由许多健康人测定（更可取的是几十个至几百个人），这些人根据糖尿病诊断标准

初步判定既不是前糖尿病，也不是糖尿病；其次，正常范围是由它们经统计处理而确定的，然后取这一正常范围的上限或类似值。

这标准值可通过对许多受试者进行初步的试验更准确地确定。因此，在本发明中，从下述的例子估计，D-甘露糖浓度在血液中的标准值约为 9 μ g/ml，尽管没有特殊限制。这样，在下述的例子中，D-甘露糖浓度在血液中低于 9 μ g/ml 被判定为正常，9 μ g/ml 或以上被判定为前糖尿病状态的疑似病例。

作为测定 D-甘露糖浓度的方法，可用常规的方法。其中优选能处理许多受试者的方法，特别优选使用下述的筛选试剂。

此外，作为葡萄糖浓度的标准值，优选使用日本糖尿病学会的糖尿病诊断标准（低于 110mg/dL 水平判定为正常型，110 至 125mg/dL 为边界型，126mg/dL 或以上为糖尿病型），它用作 FBS 标准。葡萄糖浓度可通过使用商业上可获得的用于自动分析仪或者类似设备的试剂来测定。

在下文，对于本发明的前糖尿病状态的筛选方法将参照优选实施例进行解释。

首先，在优选禁食条件下按照常规的方式，采集受试者血液，更优选在其后分离血浆或血清（在下文简称为样品）。这里，受试者意思是指所有的检验前糖尿病状态的人，包括健康人、疑似糖尿病和糖尿病患者。

然后，在电子受体例如辅酶 NADP 存在下，由一种经脱氢作用对甘露糖具有氧化活性的酶例如己醛糖脱氢酶作用于这种样品，定量地测定电子受体所生成的还原剂以便测出 D-甘露糖浓度。而且，通过使用商业上可获得的分析试剂，也可测出同一样品中的葡萄糖浓度。

这样所测得的血液中 D-甘露糖浓度和葡萄糖浓度与各自的标准值比较，以判定受试者是否处在前糖尿病状态。例如，作为结果的特异性判断，受试者具有超过标准值的 D-甘露糖浓度和在诊断标准正常范围之内的葡萄糖浓度，将被怀疑有葡萄糖耐量受损。因此，对这样的受试者，建议使用 75 克口服葡萄糖耐量试验再检验。

此外，对于葡萄糖浓度超过标准值的受试者，葡萄糖耐量受损的概率很高，但是，即使在这种情况下，如果 D-甘露糖浓度不超过标准值，可怀疑为短暂的血糖上升。在这样的例子，在询问受试者有关膳食摄取等以求证实之后，判断短暂的葡萄糖耐量受损的可能性。

如上所述，通过测定在禁食条件下血液中 D-甘露糖浓度，对于当只用 FBS 判断时，几乎不能被检出的葡萄糖耐量潜在受损的人却能很容易被检出。而且，在血液中 D-甘露糖浓度，当与血中葡萄糖水平由于进餐等所引起的波动相比较时，显示

出很小的波动。因此，对于怀疑为短暂的血糖上升的受试者，有可能从 D-甘露糖浓度判断血糖上升是否是短暂的。

此外，通过测定在禁食条件下血液中 D-甘露糖浓度和葡萄糖浓度，并将它们各自分别与各自的标准值比较，就有要能检测出具有葡萄糖耐量受损或糖尿病的受试者和只通过 75 克口服葡萄糖耐量试验才可被检出的受试者（它的血中葡萄糖水平在葡萄糖耐量试验后 2 小时所测得的是 140mg/dL 或以上）。

其次将解释对于前糖尿病状态的上述筛选方法所使用的试剂。

在本发明中所用的酶不受特别的限制，只要它们在电子受体存在下经脱氢作用对甘露糖有氧化活性。但是，更可取的是分类于 EC1.1.1.119 的酶。例如，具体地可提出的是 NADP 依赖性葡萄糖脱氢酶，它可从弱氧化醋杆菌（*Acetobacter suboxydans*）获得的如在 OKAMOTO 的文章中所描述的（*J. Biochem.* 53(5), 1963, pp348-353），NADP 依赖性己醛糖脱氢酶，它可从蜡状葡萄糖杆菌（*Gluconobacter cerinus*）获得，如在 AVIGAD 等的文章中所描述的（*J. Biol. Chem.* 243(8), 1968, PP1936-1941），NAD 依赖性己醛糖脱氢酶，如在 DAHMS 等的文章中所描述的（*J. Biol. Chem.* 247(7), 1972, PP2222-2227）等。

在本发明中，上述的酶特别优选的是己醛糖脱氢酶，它来自属于 *Gluconobacter* 属的微生物。作为属于 *Gluconobacter* 属的微生物，可提到的例如有，浅井氏葡糖杆菌 *Gluconobacter asaii* (G. asaii) IFO 3276, *Gluconobacter cerinus* (G. Cerinus) IFO 3267, 弗尼葡糖杆菌 *Gluconobacter frateurii* (G. frateurii) IFO 3264, 氧化葡糖杆菌 *Gluconobacter oxidans* (G. oxydans) IFO 14819 等。为了获取酶，首先，应通过培养这些微生物从中收集细胞，用超声波或其他设施破碎细胞，制备出破碎的溶液；然后，将所得的破碎的溶液精制，可使用以下技术的任何一种，或者如有需要联合使用，例如硫酸铵分级，柱层析包括离子交换层析，疏水层析，羟基磷灰石凝胶、凝胶渗透等。

所用的甘露糖脱氢酶浓度并不特别受限制，但优选是在 0.1 至 100 单位 (u) /ml 范围，更可取的是 1 至 10 单位(u)/ml。这里，上述的 1 个酶单位(u)定义为按下列方法测定，每分钟生成 1 μ mol NADPH 所需的酶量。

即 0.3ml 和 10mM 的 NADP, 0.85ml 的精制水和 0.3ml 的 500mM 的 D-甘露糖与 1.5ml 的 200mM 的 Tris-HCl(pH9.0)混和，在 37°C 预培育 5 分钟，然后 0.05ml 的样品与这种预培育的溶液混和，在 37°C 开始其反应，在 340nm 处每分钟测定吸光度的增加。作为空白，精制的水用于替代 D-甘露糖。滴度通过以下公式测定，代入

从用上述的测定方法测定的样品和空白各自的吸光度。

公式 1

$$u/ml = ((\Delta OD \text{ 样品/分钟} - \Delta OD \text{ 空白/分钟}) \times 3 / (6.3 \times 0.05)) \times \text{稀释倍率}。$$

在本发明中，作为电子受体，可选择性地挑选使用一种或二种或更多的辅酶，

- 5 例如 NAD 和 NADP，氧甲基吩嗪，甲基硫酸盐(phenazine melhosulfate)二氯酚，靛酚、铁氰化物等。特别优选的是辅酶 NADP。所用的电子受体浓度优选在 0.1 至 10mmol/L，更优选 0.5 至 2mmol/L。

- 此外，为了定量地测定电子受体的还原剂，可合并使用通过还原电子受体而显色的一种显色剂。这样的显色剂可选择性地挑选，取决于所用的电子受体。例如，
10 为了定量地测定 NADPH 这种辅酶 NADP 的还原剂，一种比色方法以甲基吩嗪甲基硫酸盐或黄递酶作为电子载体，并且让四唑盐与其共存，使生成的甲臌染料进行比色测定。

- 而且，因为在本发明中所用的甘露糖脱氢酶除了与甘露糖外也可与葡萄糖反应，尤其是当测定在生物样品诸如血清或血浆中的甘露糖时，结果受葡萄糖不小的影响。
15 因此，为了提高对生物样品测定的精度，优选合并使用葡萄糖清除剂。作为葡萄糖清除剂，优选使用含有葡萄糖 6-位磷酸化酶和 ATP 的清除剂。

- 作为葡萄糖 6-位磷酸化酶，可提到的有葡萄糖激酶，己糖激酶等，并且商业上可获得的酶也可使用，没有特别限制，只要属于 EC2.7.1.2 或 EC2.7.1.1 即可。更可取的是使用葡萄糖激酶，它对葡萄糖表现出高度特异性。其用量取决于样品中的葡萄糖量，但通常为 0.1 至 50u/ml。此外，对葡萄糖磷酸化所需的 ATP 量，取决于样品中的葡萄糖量，通常是 1 至 20mM。而且，为加速葡萄糖的磷酸化，通常镁离子如无机或有机盐应含有大约 5 至 50mM 的量。为清除葡萄糖，葡萄糖磷酸化在 20 至 50°C，pH6 至 10 的缓冲液中进行。更可取的是在 25 至 37°C，加入后立即反应约 10 分钟。

- 25 而且，作为清除葡萄糖的方法，例如，采用葡萄糖氧化酶和过氧化氢酶的常规方法也可使用。

作为本发明中所用的缓冲溶液，可用通常的 pH6 至 10 的缓冲液如磷酸盐缓冲液，甘氨酸缓冲液、Tris-HCl 缓冲液、Good 氏缓冲液、硼酸缓冲液等。

- 作为在本发明中所用的前糖尿病状态的筛选试剂，葡萄糖清除剂和用于定量测定的酶可分别混合。更具体化的试剂更可取的是由两种试剂构成，即第一种试剂包
30 含电子受体和葡萄糖清除剂，第二种试剂包含甘露糖脱氢酶。

在将定量测定甘露糖的试剂加入样品后，反应就进行，在反应溶液中被还原的电子受体的测定，例如可通过测定在电子受体的还原剂的特异性吸收波长的吸光度，或者测定经电子受体还原剂所显色的显色剂的显色强度来进行。

其后，本发明将结合有关的实施例具体描述。然而，应当提及的是本发明绝不仅限于这些实施例。

酶的制备实施例（由 *Gluconobacter asaii* 制备己醛糖脱氢酶）

Gluconobacter asaii（保管号 No. IFO 3276，保管机构：Foundation, Institute for Fermentation, 17-85, Juso-honmachi 2-chome, Yodogawa-Ku, Osaka-shi, Osaka, Japan）

在含 0.5%酵母浸膏和 1%果糖的培养基中，于 28°C 摇瓶培养 24 小时，接着经离心收集细胞。细胞悬浮于 20mM 磷酸盐缓冲液（pH7），用超声波振荡器在冰冷却下处理，然后，通过离心分离后从破碎的溶液中除去细胞残渣，得到粗酶溶液。

加硫酸铵粉末于这粗酶溶液中，溶于其中，使硫酸铵达 30%饱和，蛋白沉淀经离心分离移去。所得上清液上 Batyl Toyopearl 柱吸附酶，酶用含有 30 至 0 饱和度的量的硫酸铵的 20mM 磷酸盐缓冲液（pH7）洗脱。

测定被洗脱的每一级分的酶活性，收集有活性的级分、活性的级分通过对 20mM 磷酸盐缓冲液（pH7）透析脱盐。然后，该样品上 DEAE Toyopearl 柱吸附酶，酶用含 0 至 0.25M 的 NaCl 的 20mM 磷酸盐缓冲液（pH7）洗脱。

测定被洗脱的每一级分的酶活性，收集活性级分，并且，活性的级分对 20mM 磷酸盐缓冲液（pH7）透析脱盐。然后，此样品上羟基磷灰石柱吸附酶，酶用 20 至 150mM 磷酸盐缓冲液（pH7）洗脱。被洗脱的各级分进行酶活性测定并回收活性的级分，这将用作精制的酶溶液。

实施例

对 59 人作为被怀疑是糖尿病的受试者进行 75 克口服葡萄糖耐量试验，血液取样可在糖耐量（禁食状态）之前即该，或糖耐量之后，分别在 30 分钟、60 分钟和 120 分钟时进行，使用血糖测定使用的血液采样管。然后，分离血浆、在各血浆中的葡萄糖浓度用商业上可获得的自动分析仪“Pureauto S-GLU”（商品名，由 Daiichi pure Chemicals Co., Ltd.制造）的试剂进行测定。

另一方面，D-甘露糖浓度测定通过使用定量测定用的试剂包括下面提及的第一试剂和第二试剂进行。即，256μl 的第一试剂加入到 8μl 的每一血浆中，在 37°C 反

应 5 分钟，然后，加入 56μl 的第二试剂，同样在 37°C 反应 5 分钟。然后，吸光度通过用主波长 450nm 和次波长 700nm 的双波长两点检测法来测定。这些操作是用 Hitachi 7150 型自动分析仪进行的。作为标准物质，以水溶液的形式使用，商业上获得的 D-甘露糖。而且，对于可能在这测定系统中引起测定误差如溶血作用的样品，
5 独立制备空白试剂，在第二试剂中除去己醛糖脱氢酶，并且同时测定相关的样品，然后，所得的非特异性显色从特异显色中减去，以校正测定误差。

第一试剂：

- 125mM Tris-HCl 缓冲液
- 10 1.25mM NADP
- 1.25% Tween 20
- 0.75mM WST-1
- 6.25u/ml 黄递酶
- 12.5u/ml 葡萄糖激酶
- 15 10mM ATP
- 2mM 醋酸镁
- (pH8.5)

第二试剂：

- 20 20mM 磷酸盐缓冲液
- 23u/ml 己醛糖脱氢酶（在上述制备实施例中所获得的酶）
- (pH7.0)

测定结果示于图 1。

即，从 75 克口服葡萄糖耐量试验结果看，受试者依照日本糖尿病学会的诊断标准判定为三组即正常型，边界型和糖尿病型。结果受试者 24 人判定为正常型，15
25 人为边界型，20 人为糖尿病型。在图 1 中，判定为正常型的人用◆表示，判定为边界型的人用○表示、判定为糖尿病型的人用 X 表示。

另一方面，在图 1 中，纵座标轴代表 D-甘露糖浓度，横座标轴代表在葡萄糖耐量前即该的血浆中葡萄糖浓度（在禁食条件下血糖水平：FBS），并标绘出相应的受
30 试者。

FBS 低于 110mg/dL 水平分类为正常型，110 至 125mg/dL 水平分类为边界型，126mg/dL 或以上水平分类为糖尿病型。仅用 FBS 分类，正常型是 46 人，边界型是

7 人，糖尿病型是 6 人。

而且，在本实例中，D-甘露糖浓度的标准值是通过统计学方法，依照日本糖尿病学会的诊断标准，从判定为正常型 24 人的 D-甘露糖浓度计算而得。具体地假定判定为正常型的 24 人的 D-甘露糖浓度显示正态分布，估计健康人正常值范围是“平均值 ± 2 SD”，健康人正常值范围是 $6.6 \pm 2.4 \mu\text{g/ml}$ ，计算得上限是 $9 \mu\text{g/ml}$ 。此外，计算得这上限的 95%置信区间是 7.3 至 $10.7 \mu\text{g/ml}$ 。可是，在这实施例 5 中，设定标准值是 $9 \mu\text{g/ml}$ 作为上限。

结果，受试者 13 人超过 FBS 标准值， 110mg/dl 的，且根据口服葡萄糖耐量试验的结果判定为边界型或糖尿病型，他们中有 10 人超过血浆中 D-甘露糖浓度标准值。也就是发现能够用 FBS 检出的边界型或糖尿病受试者的 70-80%也能够用 D-甘露糖浓度测定检出。10

而，按 FBS 的结果被判定为正常型的 46 人，包含按口服葡萄糖耐量试验的结果被分类为边界型或糖尿病型即怀疑是葡萄糖耐量受损的 22 人。虽然这些受试者是处在边界型状态或糖尿病型状态，但是，在初次试验只使用 FBS 的常规诊断系统中15 他的仍被分类为正常型而漏检。然而，按照在使用血浆由 D-甘露糖浓度的本发明，就发现上述 22 个受试者中有 8 人超过标准值。

另一方面，对于在 FBS 和口服葡萄糖耐量试验两者都分类为正常型的 24 个受试者（图 1 中◆），证实没有人血浆中 D-甘露糖浓度超过标准值。

从这些结果，发现通过测定血浆中 D-甘露糖浓度，有可能高概率地检出或查明20 患有轻度葡萄糖耐量受损的边界型受试者，也就是这些受试者是处于前糖尿病状态，由于他们自身的正常 FBS 值，至少一直被漏检。

工业可应用性

如上文提及，本发明提供一种前糖尿病状态的筛选方法，用此方法有可能更准确25 地发现不稳定型糖尿病病人和葡萄糖耐量轻度受损的前糖尿病病人，这些人通过禁食条件下的常规测定方法使用血糖值，很容易被漏检。因此，有可能在早期发现葡萄糖耐量轻度受损等的前糖尿病受试者，在早期阶段用药物或其他手段适当的治疗，以使阻止向糖尿病进展，并且进一步监检治疗过程。

而且，通过将本发明的筛选方法加入到目前到用的糖尿病检验方法中，有可能30 应用本发明构建全面的糖尿病诊断系统，例如，做一组检验项目的测定，并开发用于此这目的的软件等。

此外，因为本发明的前糖尿病状态的筛选试剂有一个简单的反应系统，就能够很容易地应用于各种自动分析仪并适合于处理许多试验样品。

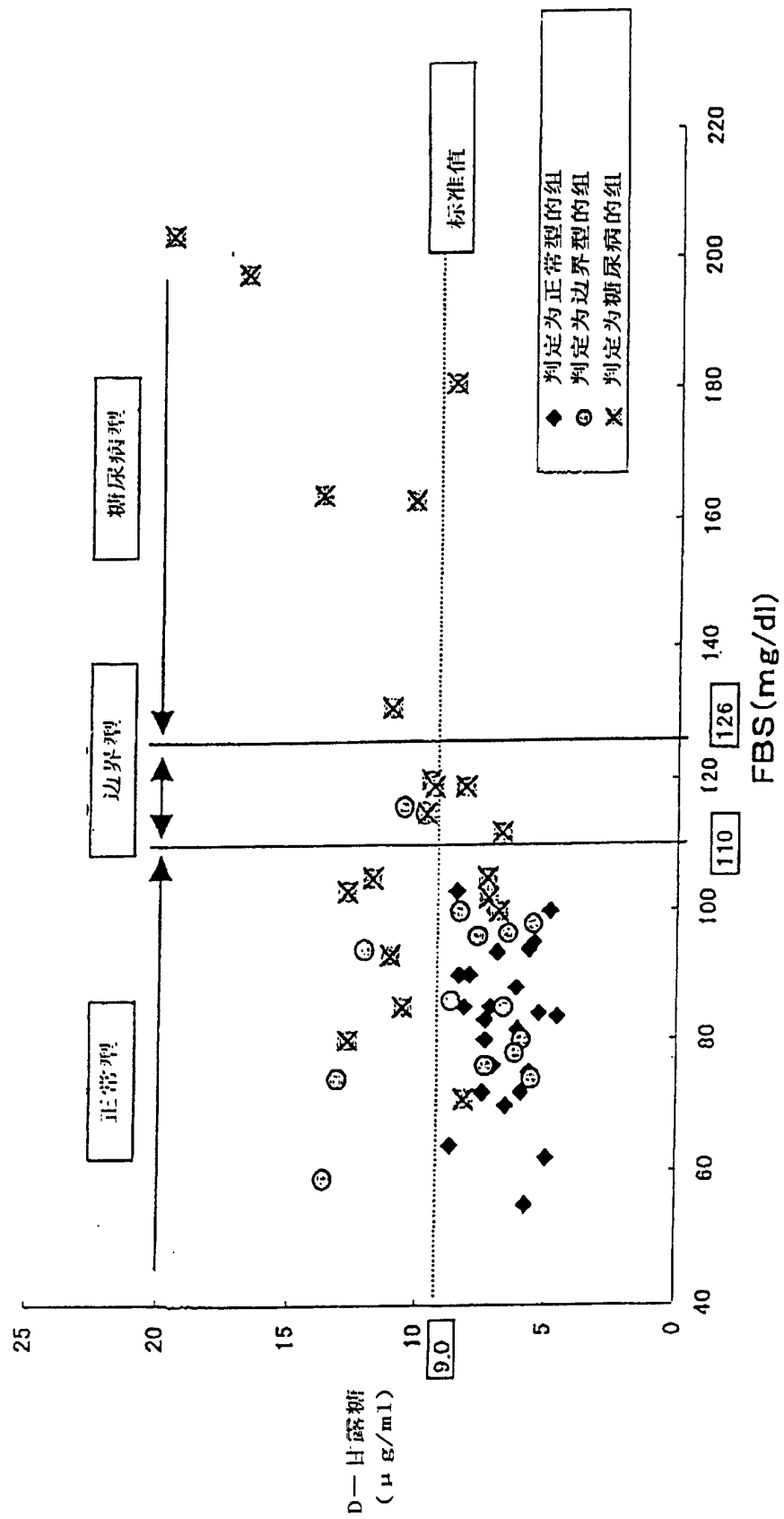


图 1