

(19) 日本国特許庁(JP)

再 公 表 特 許(A1)

(11) 国際公開番号

W02016/167346

発行日 平成30年2月8日 (2018.2.8)

(43) 国際公開日 平成28年10月20日 (2016.10.20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	2 G O 4 5
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48	Z 4 B O 2 9
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	P 4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)	GO 1 N 33/53	D
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	GO 1 N 33/53	M
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 28 頁) 最終頁に続く		

出願番号	特願2017-512596 (P2017-512596)	(71) 出願人	597039984
(21) 国際出願番号	PCT/JP2016/062106		学校法人 川崎学園
(22) 国際出願日	平成28年4月15日 (2016.4.15)		岡山県倉敷市松島577番地
(31) 優先権主張番号	特願2015-84983 (P2015-84983)	(74) 代理人	100088904
(32) 優先日	平成27年4月17日 (2015.4.17)		弁理士 庄司 隆
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100124453
			弁理士 資延 由利子
		(74) 代理人	100135208
			弁理士 大杉 卓也
		(72) 発明者	西村 泰光
			岡山県倉敷市松島577 学校法人 川崎
			学園 川崎医科大学内
		(72) 発明者	大槻 剛巳
			岡山県倉敷市松島577 学校法人 川崎
			学園 川崎医科大学内
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 アスベスト曝露歴または中皮腫の検査方法

(57) 【要約】

本発明は、被験者から採取した血液を用いて、血液中に検出される免疫関連分子から選択された3以上の有限個の解析対象分子の測定値を取得する工程を含む、アスベスト曝露歴または中皮腫の検査方法、当該検査方法に用いられる検査用プログラム、または検査用装置に関するものである。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験者から採取した血液を用いて、血液中に検出される免疫関連分子から選択された 3 以上の有限個の解析対象分子の測定値を取得する工程を含む、アスベスト曝露歴または中皮腫の検査方法。

【請求項 2】

取得された解析対象分子の測定値を、予め作成された重回帰式を用いて解析する工程、および、重回帰式を用いて得られた結果に基づき、アスベスト曝露歴または中皮腫について判定する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の検査方法。

【請求項 3】

予め作成された重回帰式が、健常者、胸膜ブランク患者、および中皮腫担癌患者から採取した血液を用いて取得された免疫関連分子の測定値を分析することにより、以下の (a) から (c) のいずれかに示された 3 以上の有限個の免疫関連分子を、解析対象分子として選別し、当該解析対象分子の測定値を重回帰分析することにより作成されたものである、請求項 2 に記載の検査方法：

- (a) 健常者および胸膜ブランク患者からなるグループと、中皮腫担癌患者グループとの間で測定値に差を認める、3 以上の有限個の免疫関連分子；
- (b) 健常者グループと、胸膜ブランク患者および中皮腫担癌患者からなるグループとの間で測定値に差を認める、3 以上の有限個の免疫関連分子；
- (c) 胸膜ブランク患者グループと、健常者および中皮腫担癌患者からなるグループとの間で測定値に差を認める、3 以上の有限個の免疫関連分子。

【請求項 4】

血液中に検出される免疫関連分子は、血漿中サイトカイン、末梢血単核球の免疫担当細胞の表面に発現しているタンパク質、および当該免疫担当細胞が発現する遺伝子を含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 に記載の検査方法。

【請求項 5】

血漿中サイトカインが、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1ra、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12p40、IL-12p70、IL-13、IL-15、IL-17A、EGF、Eotaxin、G-CSF、GM-CSF、IFN- α 2、IFN- γ 、IP-10、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 、TNF- α 、TNF- β および VEGF を含み、

免疫担当細胞の表面に発現しているタンパク質が、CD4 陽性 T 細胞表面の CD25、CD69、CD25、GITR、CTLA-4、CXCR3、IL-1R1、IL-18R1、CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞表面の CD25、CD69、HLA-DR、CD45RO、CXCR3、FasL、NK 細胞表面の CD69、NKG2D、NKp46、CXCR3、FasL、および単球表面の HLA-DR、CD80、CD86 を含み、

免疫担当細胞が発現する遺伝子が、CD4 陽性 T 細胞の Foxp3 遺伝子、T-bet 遺伝子、GATA-3 遺伝子、RORC 遺伝子、TNF- α 遺伝子、IFN- γ 遺伝子、TGF- β 遺伝子、IL-4 遺伝子、IL-6 遺伝子、IL-10 遺伝子、IL-17A 遺伝子、IL-1R1 遺伝子、IL-18R1 遺伝子、Bcl-2 遺伝子、CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞の Notch1 遺伝子、EOMES 遺伝子、CREB1 遺伝子、Granzyme B 遺伝子、FasL 遺伝子、IFN- γ 遺伝子、TNF- α 遺伝子、IL-6 遺伝子、IL-1R1 遺伝子、IL-18R1 遺伝子、NK 細胞の NKp46 遺伝子、Granzyme B 遺伝子、FasL 遺伝子、TNF- α 遺伝子、IFN- γ 遺伝子、IL-6 遺伝子、および単球の TNF- α 遺伝子、IL-1 β 遺伝子、IL-12p35 遺伝子、IL-15 遺伝子、IL-18 遺伝子、IL-23 遺伝子を含む、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 に記載の検査方法。

【請求項 6】

被験者から採取した血液を用いて、血漿中 IFN- α 2、CD4 陽性 T 細胞の TNF- α 遺伝子、および血漿中 MCP1 である解析対象分子の測定値を取得し、当該測定値を以下の数式 1 で表される重回帰式を用いて解析し、重回帰式を用いて得られた結果である M-Score に基づき、中皮腫担癌である可能性が高い被験者を同定すること；

被験者から採取した血液を用いて、CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞表面の CXCR3、CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞の Granzyme B 遺伝子、および CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞の IL18R1 遺伝子である解析対象分子の測定値を取得し、当該測定値を以下の数式 2 で表される重回帰式を用いて測

10

20

30

40

50

定し、重回帰式を用いて得られた結果であるA-Scoreに基づき、アスベスト曝露歴のある可能性が高い被験者を同定すること；または、

被験者から採取した血液を用いて、CD4陽性T細胞のTNF- α 遺伝子、NK細胞表面のCXCR3、およびCD4陽性T細胞表面のGITRである解析対象分子の測定値を取得し、当該測定値を以下の数式3で表される重回帰式を用いて解析し、重回帰式を用いて得られた結果であるP-Scoreに基づき、アスベスト曝露歴はあるが中皮腫担癌ではない可能性が高い被験者を同定すること；

を含む、請求項2～5のいずれか1に記載の検査方法：

(数式1) $M\text{-Score} = d_1 + a_1 [IFN-\alpha 2] + b_1 [Ths_TNF-\alpha] + c_1 [MCP-1]$

(数式2) $A\text{-score} = d_2 + a_2 [CXCR3MFI_CTL] + b_2 [CTLs_GranzymeB] + c_2 [CTL_IL18R1]$

(数式3) $P\text{-score} = d_3 + a_3 [Ths_TNF-\alpha] + b_3 [CXCR3MFI_NK] + c_3 [GITR_Th]$

[ただし、数式1における a_1 、 b_1 、 c_1 、 d_1 はゼロでない任意の実数であり、 $[IFN-\alpha 2]$ は血漿中 $IFN-\alpha 2$ 濃度、 $[Ths_TNF-\alpha]$ はCD4陽性T細胞のTNF- α 遺伝子発現量、 $[MCP-1]$ は血漿中MCP-1濃度であり、数式2における a_2 、 b_2 、 c_2 、 d_2 はゼロでない任意の実数であり、 $[CXCR3MFI_CTL]$ はCD8陽性細胞傷害性T細胞表面のCXCR3量、 $[CTLs_GranzymeB]$ はCD8陽性細胞傷害性T細胞のGranzyme B遺伝子発現量、 $[CTL_IL18R1]$ はCD8陽性細胞傷害性T細胞のIL18R1遺伝子発現量であり、数式3における a_3 、 b_3 、 c_3 、 d_3 はゼロでない任意の実数であり、 $[Ths_TNF-\alpha]$ はCD4陽性T細胞のTNF- α 遺伝子発現量、 $[CXCR3MFI_NK]$ はNK細胞表面のCXCR3量であり、 $[GITR_Th]$ はCD4陽性T細胞表面のGITR量である。]

【請求項7】

M-Scoreがカットオフ値よりも高い場合に、被験者について中皮腫担癌の可能性が高いと同定されること；

A-scoreがカットオフ値よりも高い場合に、被験者についてアスベスト曝露歴がある可能性が高いと同定されること；または、

P-scoreがカットオフ値よりも高い場合に、被験者についてアスベスト曝露歴はあるが中皮腫担癌ではない可能性が高いと同定されること；

を含む、請求項6に記載の検査方法。

【請求項8】

被験者から採取した血液について、血液中に検出される免疫関連分子の測定値を取得するための試薬から選択された少なくとも3種以上の試薬を含む、アスベスト曝露歴または中皮腫の検査用試薬キット。

【請求項9】

血液中に検出される免疫関連分子が、血漿中サイトカイン、末梢血単核球の免疫担当細胞の表面に発現しているタンパク質、および当該免疫担当細胞が発現する遺伝子を含み、前記少なくとも3種の試薬が、血漿中サイトカイン検出用試薬、免疫担当細胞表面タンパク質の検出用試薬、及び、免疫担当細胞が発現する遺伝子の発現検出用試薬からなる群から選択され、

血漿中サイトカイン検出用試薬が、抗IL-1 α 抗体を含む試薬、抗IL-1 β 抗体を含む試薬、抗IL-1ra抗体を含む試薬、抗IL-2抗体を含む試薬、抗IL-3抗体を含む試薬、抗IL-4抗体を含む試薬、抗IL-5抗体を含む試薬、抗IL-6抗体を含む試薬、抗IL-7抗体を含む試薬、抗IL-8抗体を含む試薬、抗IL-10抗体を含む試薬、抗IL-12p40抗体を含む試薬、抗IL-12p70抗体を含む試薬、抗IL-13抗体を含む試薬、抗IL-15抗体を含む試薬、抗IL-17A抗体を含む試薬、抗EGF抗体を含む試薬、抗Eotaxin抗体を含む試薬、抗G-CSF抗体を含む試薬、抗GM-CSF抗体を含む試薬、抗 $IFN-\alpha 2$ 抗体を含む試薬、抗 $IFN-\gamma$ 抗体を含む試薬、抗IP-10抗体を含む試薬、抗MCP-1抗体を含む試薬、抗MIP-1 α 抗体を含む試薬、抗MIP-1 β 抗体を含む試薬、抗TNF- α 抗体を含む試薬、抗TNF- β 抗体を含む試薬および抗VEGF抗体を含む試薬を含み、

免疫担当細胞表面発現タンパク質の検出用試薬が、抗CD25抗体を含む試薬、抗CD69抗体を含む試薬、抗GITR抗体を含む試薬、抗CTLA-4抗体を含む試薬、抗CXCR3抗体を含む試薬、抗IL-1R1抗体を含む試薬、抗IL-18R1抗体を含む試薬、抗HLA-DR抗体を含む試薬、抗CD45R

10

20

30

40

50

O抗体を含む試薬、抗CXCR3抗体を含む試薬、抗FasL抗体を含む試薬、抗NKG2D抗体を含む試薬、抗Nkp46抗体を含む試薬、抗CD80抗体を含む試薬、および抗CD86抗体を含む試薬を含み、

免疫担当細胞が発現する遺伝子の発現検出用試薬が、Foxp3遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、T-bet遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、GATA-3遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、RORC遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、TNF- α 遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、IFN- γ 遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、TGF- β 遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、IL-4遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、IL-6遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、IL-10遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、IL-17A遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、IL-R1遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、IL-18R1遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、Bcl-2遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、Notch1遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、EOMES遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、CREB1遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、Granzyme B遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、FasL遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、TNF- α 遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、IL-1R1遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、Nkp46遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、IL-1 β 遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、IL-12p35遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、IL-15遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、IL-18遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、IL-23遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬を含む、
請求項8に記載のアスベスト曝露歴または中皮腫の検査用試薬キット。

10

20

【請求項10】

以下のいずれか1つの試薬の組み合わせを少なくとも含む、請求項8又は9に記載のアスベスト曝露歴または中皮腫の検査用試薬キット：

- 1) 抗IFN- α 2抗体を含む試薬、抗CD4抗体を含む試薬、TNF- α 遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、抗MCP-1抗体を含む試薬の組み合わせ；
- 2) 抗CD8抗体を含む試薬、抗CXCR3抗体を含む試薬、Granzyme B遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、IL18R1遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬の組み合わせ；
- 3) 抗CD4抗体を含む試薬、TNF- α 遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、抗CD56抗体を含む試薬、抗GITR抗体を含む試薬の組み合わせ。

30

【請求項11】

被験者から採取した血液を用いて得られた、血液中に検出される免疫関連分子から選択された3以上の有限個の解析対象分子の測定値を、予め作成した重回帰式を用いて解析するデータ解析手段、および、重回帰式を用いて得られた結果に基づき、アスベスト曝露歴または中皮腫について判定するための判定手段として、コンピューターを機能させる、アスベスト曝露歴または中皮腫の検査用プログラム。

40

【請求項12】

健常者、胸膜ブランク患者、および中皮腫担癌患者から採取した血液を用いて取得された免疫関連分子の測定値を分析することにより、以下の(a)から(c)のいずれかに示された3以上の有限個の免疫関連分子を、解析対象分子として選別する選別手段、および、当該解析対象分子の測定値を重回帰分析することにより、重回帰式を作成する作成手段として、コンピューターを機能させるための、請求項11に記載の検査用プログラム：

- (a) 健常者および胸膜ブランク患者からなるグループと、中皮腫担癌患者グループとの間で測定値に差を認める、3以上の有限個の免疫関連分子；
- (b) 健常者グループと、胸膜ブランク患者および中皮腫担癌患者からなるグループとの

50

間で測定値に差を認める、3以上の有限個の免疫関連分子；

(c) 胸膜ブランク患者グループと、健常者および中皮腫担癌患者からなるグループとの間で測定値に差を認める、3以上の有限個の免疫関連分子。

【請求項13】

被験者から採取した血液を用いて得られた、血液中に検出される免疫関連分子から選択された3以上の有限個の解析対象分子の測定値を、予め作成した重回帰式を用いて解析するデータ解析手段、および、重回帰式を用いて得られた結果に基づき、アスベスト曝露歴または中皮腫について判定するための判定手段を備えた、アスベスト曝露歴または中皮腫の検査用装置。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、被験者から採取した血液中の免疫関連分子について解析を行うことにより、アスベスト曝露歴または中皮腫を検査する方法、アスベスト曝露歴または中皮腫の検査用試薬キット、アスベスト曝露歴または中皮腫の検査を行うための検査用プログラム、および検査用装置に関する。

【0002】

本出願は、参照によりここに援用されるところの日本出願、特願2015-084983号優先権を請求する。

【背景技術】

20

【0003】

近年、中皮腫の発病率が増加傾向にあり、アスベスト（石綿）への曝露歴が発症に深く関係していることが明らかにされている。中皮腫は潜伏期間が数十年間と長く、アスベストを吸入してから20～50年後に発症することが多く、発症前には異常所見が認められない。発症後の自覚症状としては、息切れ、胸郭より下の疼痛、咳、原因不明の体重減少などの自覚症状があるが、特徴的な症状に乏しく、早期発見が難しい。発見時からの病状が進行している患者が多く、かつ悪化も急速であることから、予後が極めて厳しい状況である。診断後の半数生存期間は、シスプラチンとペメトレキサドの併用の場合で12ヶ月であり、本治療を凌駕する化学療法は临床上適用されていない。早期診断に基づく外科的切除としては胸膜切除／肺剥皮術（P/D）が主流であるが、本術式の場合には残存腫瘍の存在が問題になっている。悪性中皮腫も他の悪性腫瘍と同様に、早期に正確な診断をした上で治療法を選択することが最も重要となる。しかしながら悪性中皮腫には、現状では有効な早期診断指標は存在しない。実際の症例は、咳嗽や呼吸不全などの症状を以って受診する、又は、健康診断やその他の疾病のために偶然撮影された胸部レントゲンにて、胸膜中皮腫を疑われて、専門家を受診するという状況である。

30

【0004】

従来、アスベスト曝露歴は、職歴や居住歴を基盤とした調査と、実際の症例では胸部レントゲン検査による胸膜ブランクの検出により確認されていた。アスベスト曝露は比較的高濃度曝露であれば、肺の線維化が惹起される石綿肺（じん肺症の代表的な疾病）、あるいは肺癌を生じる。比較的低濃度曝露の場合には、悪性中皮腫とともに他の良性疾患と考えられる胸膜ブランク（壁側胸膜に胼胝様の不規則な白板状の肥厚）、良性石綿胸水あるいは、びまん性胸膜肥厚などを生じる。これらは胸部レントゲンにより偶然検出される場合も多い。また悪性中皮腫を発症している状態（中皮腫担癌）については、症状の出た症例を胸部レントゲンやCT/PETなどで検討して、最終的には病理診断を行うことにより診断がなされている。アスベスト取扱工場の労働者のみならず、アスベスト取扱工場の周辺住民、震災などの瓦礫処理従事者や瓦礫の周辺住民、建築物解体工事従事者等が、アスベスト曝露のハイリスク群と考えられる。しかしながら現在の臨床では、アスベストによる健康障害のスクリーニング法は、胸部レントゲンやCTによるものが主であり、ハイリスク群について中皮腫のバイオマーカーとしてメソテリンや、メソテリン関連蛋白（SMRP）の血清中の測定などが、試験的に実施されている。

40

50

【 0 0 0 5 】

従来のハイリスク群の放射線診断技術によるスクリーニングは、被曝の問題が生じる。放射線診断は頻度が制限されることから、悪性中皮腫は急速に進展増悪してしまうため、スクリーニングに限界がある。また、メソテリンやSMRPなどはがん細胞の産生する物質であり、がん細胞が増殖することによって血液中にもこれらの物質が増加すると考えられる。よってがん細胞産生物質を単一測定することは、中皮腫の早期治療を目指した早期発見のツールとして利用することが難しい。

【 0 0 0 6 】

中皮腫とアスベスト曝露歴とが関係することは明らかであるものの、詳細な発症機序等については不明な点が多く、有効なマーカーが見つかっていないのが現状である。血清TNF- α 濃度がアスベスト肺に関連する肺癌の初期診断の指標となり得ること、MCP-1が中皮の癌化促進に関与すること、CD4陽性T細胞でのCXCR3発現や、CXCL10/IP10の血漿中濃度が、アスベスト曝露による病態判別の指標の候補となり得ることが開示されている（非特許文献1～3）。また血中サイトカイン濃度変化の重回帰分析により求められる予測式が示す値は、中皮腫患者において、健常人および胸膜ブランク陽性者よりも高値となることが示されている（非特許文献4）。

10

【 0 0 0 7 】

アスベストの日本での使用量の推移から、悪性中皮腫の発症は約40年前後を経て生じると想定され、今後2030年前後までで日本でも約10万人の中皮腫の発症が生じると予測され、現在アスベストに曝露しているハイリスク群もあることから、長期の観測が必要である。国際的な状況も同様であり、現在でもアスベストの輸出・輸入も行われていることから、世界保健機構（WHO）がアスベスト由来健康障害の撲滅宣言を発する状況にある。

20

【 先行技術文献 】

【 非特許文献 】

【 0 0 0 8 】

【 非特許文献 1 】 Partanen, R., et al.: Occup. Environ. Med., 52, 316-319 (1995)

【 非特許文献 2 】 Chew, S.H., et al.: Carcinogenesis, 35, 164-172 (2014)

【 非特許文献 3 】 Maeda, M., et al.: Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 45, 795-803 (2011)

30

【 非特許文献 4 】 西村泰光：科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書（平成24年6月11日）

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 9 】

本発明は、中皮腫発症の早期診断、中皮腫の進展の程度、中皮腫の発症・進展の危険度、治療効果の判定、予後診断に適用可能な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 】

【 0 0 1 0 】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、被験者より採取した血液について免疫関連分子から選択された3以上の有限個の解析対象分子の測定値を取得することにより、アスベスト曝露歴、中皮腫、胸膜ブランクの有無の判定を容易に行なうことが可能となることを見出し、本発明を完成した。

40

【 0 0 1 1 】

すなわち本発明は、以下よりなる。

1．被験者から採取した血液を用いて、血液中に検出される免疫関連分子から選択された3以上の有限個の解析対象分子の測定値を取得する工程を含む、アスベスト曝露歴または中皮腫の検査方法。

2．取得された解析対象分子の測定値を、予め作成された重回帰式を用いて解析する工程、および、重回帰式を用いて得られた結果に基づき、アスベスト曝露歴または中皮腫につ

50

いて判定する工程をさらに含む、前項 1 に記載の検査方法。

3. 予め作成された重回帰式が、健常者、胸膜ブランク患者、および中皮腫担癌患者から採取した血液を用いて取得された免疫関連分子の測定値を分析することにより、以下の (a) から (c) のいずれかに示された 3 以上の有限個の免疫関連分子を、解析対象分子として選別し、当該解析対象分子の測定値を重回帰分析することにより作成されたものである、前項 2 に記載の検査方法：

(a) 健常者および胸膜ブランク患者からなるグループと、中皮腫担癌患者グループとの間で測定値に差を認める、3 以上の有限個の免疫関連分子；

(b) 健常者グループと、胸膜ブランク患者および中皮腫担癌患者からなるグループとの間で測定値に差を認める、3 以上の有限個の免疫関連分子；

(c) 胸膜ブランク患者グループと、健常者および中皮腫担癌患者からなるグループとの間で測定値に差を認める、3 以上の有限個の免疫関連分子。

4. 血液中に検出される免疫関連分子は、血漿中サイトカイン、末梢血単核球の免疫担当細胞の表面に発現しているタンパク質、および当該免疫担当細胞が発現する遺伝子を含む、前項 1 ~ 3 のいずれか 1 に記載の検査方法。

5. 血漿中サイトカインが、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1ra、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12p40、IL-12p70、IL-13、IL-15、IL-17A、EGF、Eotaxin、G-CSF、GM-CSF、IFN- α 2、IFN- γ 、IP-10、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 、TNF- α 、TNF- β および VEGF を含み、

免疫担当細胞の表面に発現しているタンパク質が、CD4 陽性 T 細胞表面の CD25、CD69、CD25、GITR、CTLA-4、CXCR3、IL-1R1、IL-18R1、CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞表面の CD25、CD69、HLA-DR、CD45RO、CXCR3、FasL、NK 細胞表面の CD69、NKG2D、NKp46、CXCR3、FasL、および単球表面の HLA-DR、CD80、CD86 を含み、

免疫担当細胞が発現する遺伝子が、CD4 陽性 T 細胞の Foxp3 遺伝子、T-bet 遺伝子、GATA-3 遺伝子、RORC 遺伝子、TNF- α 遺伝子、IFN- γ 遺伝子、TGF- β 遺伝子、IL-4 遺伝子、IL-6 遺伝子、IL-10 遺伝子、IL-17A 遺伝子、IL-1R1 遺伝子、IL-18R1 遺伝子、Bcl-2 遺伝子、CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞の Notch1 遺伝子、EOMES 遺伝子、CREB1 遺伝子、Granzyme B 遺伝子、FasL 遺伝子、IFN- γ 遺伝子、TNF- α 遺伝子、IL-6 遺伝子、IL-1R1 遺伝子、IL-18R1 遺伝子、NK 細胞の NKp46 遺伝子、Granzyme B 遺伝子、FasL 遺伝子、TNF- α 遺伝子、IFN- γ 遺伝子、IL-6 遺伝子、および単球の TNF- α 遺伝子、IL-1 β 遺伝子、IL-12p35 遺伝子、IL-15 遺伝子、IL-18 遺伝子、IL-23 遺伝子を含む、前項 1 ~ 4 のいずれか 1 に記載の検査方法。

6. 被験者から採取した血液を用いて、血漿中 IFN- α 2、CD4 陽性 T 細胞の TNF- α 遺伝子、および血漿中 MCP1 である解析対象分子の測定値を取得し、当該測定値を以下の数式 1 で表される重回帰式を用いて解析し、重回帰式を用いて得られた結果である M-Score に基づき、中皮腫担癌である可能性が高い被験者を同定すること；

被験者から採取した血液を用いて、CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞表面の CXCR3、CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞の Granzyme B 遺伝子、および CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞の IL18R1 遺伝子である解析対象分子の測定値を取得し、当該測定値を以下の数式 2 で表される重回帰式を用いて測定し、重回帰式を用いて得られた結果である A-Score に基づき、アスベスト曝露歴のある可能性が高い被験者を同定すること；または、

被験者から採取した血液を用いて、CD4 陽性 T 細胞の TNF- α 遺伝子、NK 細胞表面の CXCR3、および CD4 陽性 T 細胞表面の GITR である解析対象分子の測定値を取得し、当該測定値を以下の数式 3 で表される重回帰式を用いて解析し、重回帰式を用いて得られた結果である P-Score に基づき、アスベスト曝露歴はあるが中皮腫担癌ではない可能性が高い被験者を同定すること；

を含む、前項 2 ~ 5 のいずれか 1 に記載の検査方法：

(数式 1) $M\text{-Score} = d_1 + a_1 [IFN-\alpha 2] + b_1 [Ths_TNF-\alpha] + c_1 [MCP-1]$

(数式 2) $A\text{-score} = d_2 + a_2 [CXCR3MFI_CTL] + b_2 [CTLs_GranzymeB] + c_2 [CTL_IL18R1]$

(数式 3) $P\text{-score} = d_3 + a_3 [Ths_TNF-\alpha] + b_3 [CXCR3MFI_NK] + c_3 [GITR_Th]$

〔ただし、数式 1 における a_1 、 b_1 、 c_1 、 d_1 はゼロでない任意の実数であり、[IFN

10

20

30

40

50

- $\alpha 2$] は血漿中 IFN- $\alpha 2$ 濃度、[Ths_TNF- α] は CD4 陽性 T 細胞の TNF- α 遺伝子発現量、[MCP-1] は血漿中 MCP-1 濃度であり、数式 2 における a_2 , b_2 , c_2 , d_2 はゼロでない任意の実数であり、[CXCR3MFI_CTL] は CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞表面の CXCR3 量、[CTLs_GranzymeB] は CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞の Granzyme B 遺伝子発現量、[CTL_IL18R1] は CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞の IL18R1 遺伝子発現量であり、数式 3 における a_3 , b_3 , c_3 , d_3 はゼロでない任意の実数であり、[Ths_TNF- α] は CD4 陽性 T 細胞の TNF- α 遺伝子発現量、[CXCR3MFI_NK] は NK 細胞表面の CXCR3 量であり、[GITR_Th] は CD4 陽性 T 細胞表面の GITR 量である。]

7. M-Score がカットオフ値よりも高い場合に、被験者について中皮腫担癌の可能性が高いと同定されること；

A-score がカットオフ値よりも高い場合に、被験者についてアスベスト曝露歴がある可能性が高いと同定されること；または、

P-score がカットオフ値よりも高い場合に、被験者についてアスベスト曝露歴があるが中皮腫担癌ではない可能性が高いと同定されること；

を含む、前項 6 に記載の検査方法。

8. 被験者から採取した血液について、血液中に検出される免疫関連分子の測定値を取得するための試薬から選択された少なくとも 3 種以上の試薬を含む、アスベスト曝露歴または中皮腫の検査用試薬キット。

9. 血液中に検出される免疫関連分子が、血漿中サイトカイン、末梢血単核球の免疫担当細胞の表面に発現しているタンパク質、および当該免疫担当細胞が発現する遺伝子を含み、前記少なくとも 3 種の試薬が、血漿中サイトカイン検出用試薬、免疫担当細胞表面タンパク質の検出用試薬、及び、免疫担当細胞が発現する遺伝子の発現検出用試薬からなる群から選択され、

血漿中サイトカイン検出用試薬が、抗 IL-1 α 抗体を含む試薬、抗 IL-1 β 抗体を含む試薬、抗 IL-1 α 抗体を含む試薬、抗 IL-2 抗体を含む試薬、抗 IL-3 抗体を含む試薬、抗 IL-4 抗体を含む試薬、抗 IL-5 抗体を含む試薬、抗 IL-6 抗体を含む試薬、抗 IL-7 抗体を含む試薬、抗 IL-8 抗体を含む試薬、抗 IL-10 抗体を含む試薬、抗 IL-12p40 抗体を含む試薬、抗 IL-12p70 抗体を含む試薬、抗 IL-13 抗体を含む試薬、抗 IL-15 抗体を含む試薬、抗 IL-17A 抗体を含む試薬、抗 EGF 抗体を含む試薬、抗 Eotaxin 抗体を含む試薬、抗 G-CSF 抗体を含む試薬、抗 GM-CSF 抗体を含む試薬、抗 IFN- $\alpha 2$ 抗体を含む試薬、抗 IFN- γ 抗体を含む試薬、抗 IP-10 抗体を含む試薬、抗 MCP-1 抗体を含む試薬、抗 MIP-1 α 抗体を含む試薬、抗 MIP-1 β 抗体を含む試薬、抗 TNF- α 抗体を含む試薬、抗 TNF- β 抗体を含む試薬および抗 VEGF 抗体を含む試薬を含み、

免疫担当細胞表面発現タンパク質の検出用試薬が、抗 CD25 抗体を含む試薬、抗 CD69 抗体を含む試薬、抗 GITR 抗体を含む試薬、抗 CTLA-4 抗体を含む試薬、抗 CXCR3 抗体を含む試薬、抗 IL-1R1 抗体を含む試薬、抗 IL-18R1 抗体を含む試薬、抗 HLA-DR 抗体を含む試薬、抗 CD45RO 抗体を含む試薬、抗 CXCR3 抗体を含む試薬、抗 FasL 抗体を含む試薬、抗 NKG2D 抗体を含む試薬、抗 NKP46 抗体を含む試薬、抗 CD80 抗体を含む試薬、および抗 CD86 抗体を含む試薬を含み、

免疫担当細胞が発現する遺伝子の発現検出用試薬が、Foxp3 遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、T-bet 遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、GATA-3 遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、RORC 遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、TNF- α 遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、IFN- γ 遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、TGF- β 遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、IL-4 遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、IL-6 遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、IL-10 遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、IL-17A 遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、IL-R1 遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、IL-18R1 遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、Bcl-2 遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、Notch1 遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、EOMES 遺伝子にハイブ

10

20

30

40

50

リダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、CREB1 遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、Granzyme B遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、FasL遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、TNF- α 遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、IL-1R1遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、NKp46遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、IL-1 β 遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、IL-12p35遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、IL-15遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、IL-18遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、IL-23遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬を含む、

前項 8 に記載のアスベスト曝露歴または中皮腫の検査用試薬キット。

10

10. 以下のいずれか 1 つの試薬の組み合わせを少なくとも含む、前項 8 又は 9 に記載のアスベスト曝露歴または中皮腫の検査用試薬キット：

1) 抗IFN- α 2抗体を含む試薬、抗CD4抗体を含む試薬、TNF- α 遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、抗MCP-1抗体を含む試薬の組み合わせ；

2) 抗CD8抗体を含む試薬、抗CXCR3抗体を含む試薬、Granzyme B遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、IL18R1遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬の組み合わせ；

3) 抗CD4抗体を含む試薬、TNF- α 遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む試薬、抗CD56抗体を含む試薬、抗GITR抗体を含む試薬の組み合わせ。

11. 被験者から採取した血液を用いて得られた、血液中に検出される免疫関連分子から選択された 3 以上の有限個の解析対象分子の測定値を、予め作成した重回帰式を用いて解析するデータ解析手段、および、重回帰式を用いて得られた結果に基づき、アスベスト曝露歴または中皮腫について判定するための判定手段として、コンピューターを機能させる、アスベスト曝露歴または中皮腫の検査用プログラム。

20

12. 健常者、胸膜ブランク患者、および中皮腫担癌患者から採取した血液を用いて取得された免疫関連分子の測定値を分析することにより、以下の (a) から (c) のいずれかに示された 3 以上の有限個の免疫関連分子を、解析対象分子として選別する選別手段、および、当該解析対象分子の測定値を重回帰分析することにより、重回帰式を作成する作成手段として、コンピューターを機能させるための、前項 11 に記載の検査用プログラム：

(a) 健常者および胸膜ブランク患者からなるグループと、中皮腫担癌患者グループとの間で測定値に差を認める、3 以上の有限個の免疫関連分子；

30

(b) 健常者グループと、胸膜ブランク患者および中皮腫担癌患者からなるグループとの間で測定値に差を認める、3 以上の有限個の免疫関連分子；

(c) 胸膜ブランク患者グループと、健常者および中皮腫担癌患者からなるグループとの間で測定値に差を認める、3 以上の有限個の免疫関連分子。

13. 被験者から採取した血液を用いて得られた、血液中に検出される免疫関連分子から選択された 3 以上の有限個の解析対象分子の測定値を、予め作成した重回帰式を用いて解析するデータ解析手段、および、重回帰式を用いて得られた結果に基づき、アスベスト曝露歴または中皮腫について判定するための判定手段を備えた、アスベスト曝露歴または中皮腫の検査用装置。

40

【発明の効果】

【0012】

本発明の検査方法により、被験者より採取した血液について免疫関連分子から選択された 3 以上の有限個の解析対象分子の測定値を取得することにより、アスベスト曝露歴、中皮腫、胸膜ブランクの有無の判定を容易に行なうことができる。アスベスト曝露歴、中皮腫、胸膜ブランクの有無の結果を総合的に判断することで、中皮腫発症の早期診断、中皮腫の進展の程度、中皮腫の発症・進展の危険度、治療効果の判定、予後診断を、従来の検査方法と比較して、迅速かつ容易に、高精度で検査を行うことができる。また、本発明の検査方法は血液を検体とすることから、中皮腫の危険度の高い被験者について継続的に検査をしてモニタリングを行うことができ、中皮腫の早期診断および治療が可能となる。ま

50

た本発明の検査方法によれば、約10～20mlの採血で行うことができ、従来のレントゲン撮影による方法に比べて、より頻回に実施することが可能である。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】細胞表面マーカーのうち差異を認めたものの代表例を示す。(実施例1)

【図2】遺伝子のmRNA量のうち差異を認めたものの代表例を示す。(実施例1)

【図3】遺伝子のmRNA量のうち差異を認めたものの代表例を示す。(実施例1)

【図4】血漿中サイトカイン濃度のうち、差異を認めたものの代表例を示す。(実施例1)

【図5】M-Scoreに関する解析結果を示す図である。(実施例2)

10

【図6】A-Scoreに関する解析結果を示す図である。(実施例2)

【図7】P-Scoreに関する解析結果を示す図である。(実施例2)

【図8】M-ScoreとP-Scoreの相関を示す。(実施例2)

【図9】各スコアのROC曲線と、カットオフ値を示す図である。(実施例2)

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明は、被験者から採取した血液に関して、血液中に検出される免疫関連分子から選択された3以上の有限個の解析対象分子の測定値を、取得する工程を含む、アスベスト曝露歴または中皮腫の検査方法に関する。本発明の検査方法は、中皮腫の発症の有無、中皮腫の進展の程度、中皮腫の発症・進展の危険度等を評価するための診断材料を提供するものである。胸膜プラークとは、主として壁側胸膜に生じる両側性の不規則な白板状の肥厚である。胸膜プラーク自体は肺機能障害を伴わず良性の病変である。胸膜プラークは中皮腫に転化するものではないが、胸膜プラーク有所見者は無所見者に比べてアスベストの累積曝露量が多いことが知られている。中皮腫は、アスベストへの曝露歴が発症に深く関係していると考えられているが、同じくアスベスト曝露で生じる胸膜プラークが全例で認められることはなく、胸膜プラークが前がん状態とは捉えられない。本発明の検査方法は、中皮腫担癌の有無に関するスコア、アスベスト曝露歴の有無に関するスコア、アスベスト曝露歴はあるが中皮腫担癌でない場合のスコアを得て、当該スコアを診断材料として用いることにより総合的に、中皮腫の発症・進展の危険度、中皮腫の進展の程度等を予測または評価することができる。

20

30

【0015】

本発明において被験者とは、検査対象となる者であればいかなる者であってもよい。本発明における被験者は一般的な健康診断や人間ドック等の対象者であってもよいし、中皮腫に関する検査の対象、例えば中皮腫に対する検査、早期診断のための検査、あるいは疾患のステージ、悪性度、治療効果の判定、予後診断などの検査について検査対象となる者であってもよい。

【0016】

本発明では、被験者から採取した血液を検査の検体として用いる。本明細書において、検体とは生体から採取したものをいい、検体に対して何らかの処理を行い、検査に供されるものを試料ということとする。採取した血液を処理して血漿に分離したもの、末梢血単核球を分離したもの、さらに各種表面抗原の発現に基づき分離した細胞群を血液由来試料ということとする。血液から血液由来試料を調製する方法は、自体公知の方法によることができ、特に限定されない。腫瘍細胞が産生し、血液中に漏れ出る分子については、腫瘍細胞のサイズが増大すれば血液中の量も多くなると考えられる。従来では、血液中の分子は早期診断指標というよりは、発見時の補助診断項目あるいは治療後の再発の有無のモニターとして用いられる状況にあった。一方、本発明は被験者の血液中の免疫関連分子を検出することにより、悪性中皮腫の発症を検出し得る。

40

【0017】

血液中に検出される免疫関連分子とは、血液中に存在する分子であって、生体内の免疫システムに関与する分子である。血液中に検出される免疫関連分子は、血漿中サイトカイ

50

ン、末梢血単核球の免疫担当細胞の表面に発現しているタンパク質、および当該免疫担当細胞が発現する遺伝子を含む。本発明において得られる、血液中に検出される免疫関連分子から選択された3以上の有限個の解析対象分子の測定値とは、血液中に分泌されている解析対象分子の濃度や、血液中に含まれる細胞における解析対象分子の発現量等である。より具体的には、血漿中サイトカインの濃度、末梢血単核球の免疫担当細胞の表面に発現しているタンパク質の発現量（発現の度合い）、および当該免疫担当細胞が発現する遺伝子の発現量から選択されるものである。

【0018】

血漿中サイトカインとは、血液から分離した血漿中に含まれるサイトカインであればいかなるものであってもよい。サイトカインとは、細胞から放出され、種々の細胞間情報伝達分子となる微量生理活性タンパク質であり、血液を介して細胞表面の高親和性受容体などに結合し、多面的な生物活性を発現させる。血漿中サイトカインの具体例としては、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1ra、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12p40、IL-12p70、IL-13、IL-15、IL-17A、EGF、Eotaxin、G-CSF、GM-CSF、IFN- α 2、IFN- γ 、IP-10、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 、TNF- α 、TNF- β およびVEGFが挙げられる。血漿中サイトカイン濃度の測定は、自体公知の方法によることができ、特に限定されない。

10

【0019】

免疫担当細胞とは、生体内で免疫反応に関与する細胞であり、具体的にはB細胞、T細胞（CD4陽性T細胞（ヘルパーT細胞）、CD8陽性T細胞（細胞傷害性T細胞）、および調節性T細胞等）、ナチュラルキラー（NK）細胞を含むリンパ球系細胞、単球、マクロファージ、および樹状細胞を含む抗原提示細胞、好中球、好酸球、好塩基球、および肥満細胞を含む顆粒球が挙げられる。本発明の検査方法において、かかる免疫担当細胞の細胞表面に発現しているタンパク質の発現量（発現の度合い）、または、免疫担当細胞内で発現する遺伝子の発現量は、自体公知の方法により測定することができ、特に制限されない。免疫担当細胞の細胞表面に発現しているタンパク質の発現量（発現の度合い）は、抗体等により染色し、フローサイトメトリーを行うことにより測定することができる。免疫担当細胞が発現する遺伝子の発現量は、当該遺伝子の細胞内のmRNA量やタンパク質量を検出することにより、測定することができ、さらに免疫システムを刺激した後に測定することが好ましい。

20

【0020】

免疫担当細胞の表面に発現しているタンパク質の具体例としては、CD4陽性T細胞表面のCD25、CD69、GITR、CTLA-4、CXCR3、IL-1R1、IL-18R1、CD8陽性細胞傷害性T細胞表面のCD25、CD69、HLA-DR、CD45RO、CXCR3、FasL、NK細胞表面のCD69、NKG2D、NKp46、CXCR3、FasL、および単球表面のHLA-DR、CD80、CD86が挙げられる。

30

【0021】

免疫担当細胞が発現する遺伝子の具体例としては、CD4陽性T細胞のFoxp3遺伝子、T-bet遺伝子、GATA-3遺伝子、RORC遺伝子、TNF- α 遺伝子、IFN- γ 遺伝子、TGF- β 遺伝子、IL-4遺伝子、IL-6遺伝子、IL-10遺伝子、IL-17A遺伝子、IL-1R1遺伝子、IL-18R1遺伝子、Bcl-2遺伝子、CD8陽性細胞傷害性T細胞のNotch1遺伝子、EOMES遺伝子、CREB1遺伝子、Granzyme B遺伝子、FasL遺伝子、IFN- γ 遺伝子、TNF- α 遺伝子、IL-6遺伝子、IL-1R1遺伝子、IL-18R1遺伝子、NK細胞のNKp46遺伝子、Granzyme B遺伝子、FasL遺伝子、TNF- α 遺伝子、IFN- γ 遺伝子、IL-6遺伝子、および単球のTNF- α 遺伝子、IL-1 β 遺伝子、IL-12p35遺伝子、IL-15遺伝子、IL-18遺伝子、IL-23遺伝子が挙げられる。

40

【0022】

本発明の3以上の有限個の解析対象分子は、血漿中サイトカイン、末梢血単核球の免疫担当細胞の表面に発現しているタンパク質、および当該免疫担当細胞が発現する遺伝子から選択され、好ましくは上記に具体的に例示した各分子から選択される。解析対象分子は、感度および特異度を上げるために3以上選択されることが好ましく、検査の煩雑さと、感度および特異度の観点から5以下であることが好ましい。

【0023】

50

本発明では、免疫関連分子の測定値に基づき、アスベスト曝露歴または中皮腫の検査を行うが、免疫関連分子の測定値を多変量解析して得られた式を本発明の検査において用いることができる。多変量解析としては、説明変数と目的変数との関係を利用できるものが好ましく、例えば、判別分析、主成分分析、因子分析、数量化理論一類、数量化理論二類、数量化理論三類、回帰分析（MLR、PLS、PCR、ロジスティック）、多次元尺度法、目的変数ありクラスタリング、ニューラルネットワーク、アンサンブル学習法、等が例示でき、フリーソフトや市販されているものを用いて式を作成することができる。これらの内、特に好ましいのは重回帰分析である。免疫関連分子から選別された解析対象分子の測定値を説明変数として、例えば、中皮腫担癌の被験者の同定、アスベスト曝露歴の被験者の同定、アスベスト曝露歴はあるが中皮腫担癌ではない被験者の同定を目的変数として、重回帰分析を行って重回帰式を求めることが好ましい。以下重回帰式を例にして本発明を説明する。

10

20

30

40

50

【0024】

解析対象分子は次のようにして選別することができる。まず、健常者、胸膜ブランク患者、中皮腫担癌患者から採取した血液について、免疫関連分子の測定値を取得する。取得した測定値について重回帰分析を行い、区別することを目的とするグループ間で差異を認める免疫関連分子を解析対象分子として選別することができる。差異を認める免疫関連分子は、目的とするグループ間の区別において影響度の大きいものが選択される。選択された免疫関連分子の測定値は、目的とするグループ間の区別を行うための重回帰式において説明変数として用いられる。また上記測定値についての重回帰分析により、重回帰式における係数および決定項（定数）を設定することができる。

【0025】

すなわち健常者、胸膜ブランク患者、中皮腫担癌患者とは、本発明の検査方法による検査結果を導くための標準となりうる者の群をいう。健常者は、広義の意味で定義することができ、健常者に含まれるヒトが、何らかの疾患を有していても、胸膜ブランクおよび中皮腫担癌でないと判断される場合には、健常者に含めることができる。胸膜ブランク患者は、胸膜ブランクが認められる患者群であり、中皮腫担癌でない患者から構成される。中皮腫担癌患者は、中皮腫担癌であると診断された患者群、中皮腫担癌のステージが明らかな患者群、中皮腫担癌の悪性度が明らかな患者群などから構成され、胸膜ブランクを併発している患者が含まれていてもよい。健常者、胸膜ブランク患者、中皮腫担癌患者から取得された測定値を用いて重回帰分析を行うことにより、目的とするグループ間の区別のための重回帰式を作成し、重回帰式により得られるスコアのカットオフ値を設定することができる。

【0026】

本発明は、得られた重回帰式を用いて、以下の工程により、検査を行う。
（A）被験者から採取した血液を用いて、血液中に3以上の有限個の解析対象分子の測定値を取得する工程；
（B）取得された解析対象分子の測定値を、予め作成された重回帰式を用いて解析する工程であり、好ましくは目的とするグループ間の区別のためのスコアを算出する工程；
（C）予め設定したカットオフ値と、前記（B）で算出したスコアを比較する工程；
（D）前記（B）で得た重回帰式のスコアが、予め設定したカットオフ値と比較して特定のグループに属する場合に、被験者が当該特定のグループに属すると判定される工程。

【0027】

一旦重回帰式を作成したとしても、追加で、健常者、胸膜ブランク患者、中皮腫担癌患者から採取した血液について、免疫関連分子の測定値を取得し、取得した測定値を含めて重回帰分析を行うことにより、解析対象分子の選択、重回帰式における係数や決定項、目的とするグループ間の区別のためのカットオフ値を随時更新することができる。更新は、被験者による検査を行うときに、同時に行っても良い。

【0028】

本発明においては、以下の（a）から（c）から選択される、区別することを目的とす

るグループ間について、3以上の有限個の免疫関連分子を解析対象分子として選別し、当該解析対象分子の測定値を重回帰分析することにより、重回帰式が作成されることが好ましい。

(a) 健常者および胸膜ブランク患者からなるグループと、中皮腫担癌患者グループとの間で測定値に差を認める、3以上の有限個の免疫関連分子。

(b) 健常者グループと、胸膜ブランク患者および中皮腫担癌患者からなるグループとの間で測定値に差を認める、3以上の有限個の免疫関連分子。

(c) 胸膜ブランク患者グループと、健常者および中皮腫担癌患者からなるグループとの間で測定値に差を認める、3以上の有限個の免疫関連分子。

【0029】

解析対象分子は上記手法に沿って選別されたものであればよく、特に限定されない。例えば、検査目的と解析対象分子の組み合わせは以下の3つが例示される。

(1) 被験者から採取した血液を用いて、血漿中IFN- α 2、CD4陽性T細胞のTNF- α 遺伝子、および血漿中MCP-1である解析対象分子の測定値を取得し、当該測定値を重回帰式を用いて解析し、重回帰式を用いて得られた結果であるスコア(M-Score)に基づき中皮腫担癌である可能性が高い被験者を同定する。

(2) 被験者から採取した血液を用いて、CD8陽性細胞傷害性T細胞表面のCXCR3、CD8陽性細胞傷害性T細胞のGranzyme B遺伝子、およびCD8陽性細胞傷害性T細胞のIL-18R1遺伝子である解析対象分子の測定値を取得し、当該測定値を重回帰式を用いて測定し、重回帰式を用いて得られた結果であるスコア(A-Score)に基づき、アスベスト曝露歴のある可能性

(3) 被験者から採取した血液を用いて、CD4陽性T細胞のTNF- α 遺伝子、NK細胞表面のCXCR3、およびCD4陽性T細胞表面のGITRである解析対象分子の測定値を取得し、当該測定値を重回帰式を用いて解析し、重回帰式を用いて得られた結果であるスコア(P-Score)に基づき、アスベスト曝露歴はあるが中皮腫担癌ではない可能性が高い被験者を同定する。

【0030】

上記(1)～(3)における重回帰式は以下の数式1～3により示される。

(数式1) $M\text{-Score} = d_1 + a_1 [IFN-\alpha 2] + b_1 [Ths_TNF-\alpha] + c_1 [MCP-1]$

(数式2) $A\text{-Score} = d_2 + a_2 [CXCR3MFI_CTL] + b_2 [CTLs_GranzymeB] + c_2 [CTL_IL18R1]$

(数式3) $P\text{-Score} = d_3 + a_3 [Ths_TNF-\alpha] + b_3 [CXCR3MFI_NK] + c_3 [GITR_Th]$

ただし、数式1における a_1 、 b_1 、 c_1 、 d_1 はゼロでない任意の実数であり、 $[IFN-\alpha 2]$ は血漿中IFN- α 2濃度、 $[Ths_TNF-\alpha]$ はCD4陽性T細胞のTNF- α 遺伝子発現量、 $[MCP-1]$ は血漿中MCP-1濃度であり、数式2における a_2 、 b_2 、 c_2 、 d_2 はゼロでない任意の実数であり、 $[CXCR3MFI_CTL]$ はCD8陽性細胞傷害性T細胞表面のCXCR3量、 $[CTLs_GranzymeB]$ はCD8陽性細胞傷害性T細胞のGranzyme B遺伝子発現量、 $[CTL_IL18R1]$ はCD8陽性細胞傷害性T細胞のIL-18R1遺伝子発現量であり、数式3における a_3 、 b_3 、 c_3 、 d_3 はゼロでない任意の実数であり、 $[Ths_TNF-\alpha]$ はCD4陽性T細胞のTNF- α 遺伝子発現量、 $[CXCR3MFI_NK]$ はNK細胞表面のCXCR3量であり、 $[GITR_Th]$ はCD4陽性T細胞表面のGITR量である。 a_1 、 b_1 、 c_1 、 d_1 、 a_2 、 b_2 、 c_2 、 d_2 、 a_3 、 b_3 、 c_3 、 d_3 の具体的な値は、重回帰分析により設定されたものであればよい。

【0031】

上記(1)～(3)における重回帰式は、各々以下の数式が例示される。

(数式1) $M\text{-Score} = 2.43056 + 0.00460 \times [IFN-\alpha 2] + 0.56948 \times [Ths_TNF-\alpha] + 0.00075 \times [MCP-1]$

(数式2) $A\text{-Score} = 0.76825 - 0.00248 \times [CXCR3MFI_CTL] + 0.52846 \times [CTLs_GranzymeB] - 0.72952 \times [CTL_IL18R1]$

(数式3) $P\text{-Score} = 0.22813 - 0.66572 \times [Ths_TNF-\alpha] - 0.01333 \times [CXCR3MFI_NK] - 0.00733 \times [GITR_Th]$

【0032】

上記数式1により得られた被験者のM-Scoreがカットオフ値よりも高い場合に、被験者

について中皮腫担癌の可能性が高いと同定され、上記数式2により得られた被験者のA-Scoreがカットオフ値よりも高い場合に、被験者についてアスベスト曝露歴がある可能性が高いと同定され、上記数式3により得られた被験者のP-Scoreがカットオフ値よりも高い場合に、被験者についてアスベスト曝露歴があるが中皮腫担癌ではない可能性が高いと同定される。中皮腫担癌の可能性が高いと同定された場合は、被験者について速やかに胸部レントゲンやCT/PET、病理診断に移行すべきである。中皮腫担癌の可能性は低いが、アスベスト曝露歴があると同定された場合は、被験者を検査のモニタリング対象とすることができ、比較的頻回（例：2～3回/年）で継続的に本発明の検査方法を行い、経過を観察することが好ましい。中皮腫担癌の可能性が低く、アスベスト曝露歴がないと同定された場合は、被験者を綿密な検査のモニタリングの対象外とすることができるが、元来ハイリスクグループであれば1～2年に一度の採血によるモニタリングが望ましい。

10

【0033】

本発明は、被験者から採取した血液について、血液中に検出される免疫関連分子の測定値を取得するための試薬から選択された少なくとも3種以上の試薬を含む、アスベスト曝露歴または中皮腫の検査用試薬キットも包含する。前記少なくとも3種以上の試薬により、血液中に検出される免疫関連分子から選択された3以上の有限個の解析対象分子の測定値を取得することができる。前記少なくとも3種の試薬は、血漿中サイトカインに結合し得る抗体を含む血漿中サイトカイン検出用試薬、免疫担当細胞の表面に発現しているタンパク質に結合し得る抗体を含む免疫担当細胞表面タンパク質の検出用試薬、及び、免疫担当細胞における遺伝子発現を検出し得るポリヌクレオチドを含む、前記遺伝子の発現検出用試薬から選択される。

20

【0034】

本明細書において、血漿中サイトカインや免疫担当細胞の表面に発現しているタンパク質等の特定のタンパク質に結合し得る抗体は、自体公知の抗体であってもよいし、既存の一般的な製造方法によって製造した抗体や市販の抗体を用いることができる。抗体は、ポリクローナル抗体であってもよいし、モノクローナル抗体であってもよい。抗体は、標識物質により標識されていてもよい。標識物質は、具体的には、酵素、放射性同位元素、蛍光色素、ビオチン、染料ゾルおよび金コロイドやラテックス粒子等の不溶性担体を用いることができる。また、標識は公知の方法で行うことができるが、標識物質は抗体に結合させていてもよい。上記抗体は試薬（試薬組成物）として本発明の検出用試薬キットに含まれる。抗体を含む試薬は、生理食塩水、緩衝液等で希釈した状態、又は凍結乾燥形態等の長期間保存可能な試薬が例示される。抗体に、添加剤（例えば担体、賦形剤、希釈剤等）、安定化剤等を含有する溶液に溶解した後、凍結乾燥されて試薬が調製されていてもよい。安定化剤としては、グルコース等の単糖類、サッカロース、マルトース等の二糖類、マンニトール、ソルビトール等の糖アルコール、塩化ナトリウム等の中性塩、グリシン等のアミノ酸、ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体（プルロニック）、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル（トウイーン）等の非イオン系界面活性剤、ヒトアルブミン等が例示され、1～10w/v%程度が添加されていることが好ましい。また本発明の検出用試薬キットには、適宜、ブロッキング溶液、反応溶液、反応停止液等が含まれていてもよい。

30

40

【0035】

本明細書において、ポリヌクレオチドは塩基・糖・リン酸からなるヌクレオチドが2以上リン酸エステル結合した生体高分子を指し、DNAおよびRNA等の核酸を含む。本発明のポリヌクレオチドは、少なくとも15ヌクレオチド（塩基）、好ましくは17ヌクレオチド（塩基）の長さを有するものである。当該ポリヌクレオチドは特定の遺伝子に特異的にハイブリダイズし得るプローブ、特定の遺伝子に特異的にアニーリングし得るプライマー、当該プライマーと対になって核酸断片を増幅し得るプライマーとして機能するものである。当該ポリヌクレオチドの塩基配列は、発現を検出する遺伝子の塩基配列に100%相補的な配列である必要はなく、1塩基～5塩基ほど（好ましくは1～4塩基ほど、より好ましくは1～2塩基ほど）欠失していてもよいし、相補的でない塩基が置換、挿入又は付加されて

50

いてもよい。また、ポリヌクレオチドがプライマーである場合は17～25ヌクレオチド程度とすることが好ましく、プローブである場合は10～30ヌクレオチド程度とすることが好ましい。プライマーは、一対のプライマーセットとして本発明の検出用試薬キットに含まれてもよい。

【0036】

プライマー及びプローブは、公知のプライマー又はプローブ設計ソフトウェアを用いて設計することができる。公知のソフトウェアとしては例えば、OLIGO Primer Analysis Software (Molecular Biology Insights社)、Beacon Designer (PREMIER Biosoft社)、Primer Expressソフトウェア (ライフテクノロジーズ社)、Primer3web version 4.0.0 Pick primers from a DNA sequence (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>) 等を利用することができる。またポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドの合成法として当技術分野で公知の方法、例えば、ホスホトリエチル法、ホスホジエステル法等により、通常用いられるDNA自動合成装置を利用して合成することができる。上記ポリヌクレオチドは、乾燥した状態もしくはアルコール沈澱の状態、固体の試薬として、又は、水、生理食塩水、もしくは適当な緩衝液 (例: TE緩衝液等) 中に溶解した状態の試薬として本発明の検出用試薬キットに含まれることもできる。試薬には、添加剤 (例えば担体、賦形剤、希釈剤等)、安定化剤等が含有されていてもよい。安定化剤の具体例は上述の通りである。また、本発明の検査用試薬キットには、核酸増幅反応に必要な試薬、例えば、DNA合成酵素、緩衝液、dNTPミックスや、インターカレーター、塩化マグネシウム等が含まれていてもよい。インターカレーターは、PCR法等の核酸増幅反応による増幅産物を染色することにより、増幅産物の有無を検出することができる。インターカレーターとしては、エチジウムブロマイド、Sybergreenなどが例示される。またリアルタイムPCRによる増幅産物の検出のために、蛍光物質等で標識されたポリヌクレオチドが本発明の検査用試薬キットに含まれていてもよい。

【0037】

血液から、血漿や末梢血単核球、又は各種表面抗原の発現に基づき分離した細胞群等の血液由来試料を調製するために、自公知の種々の試薬が知られている。例えば、CD4陽性T細胞を検出するための抗CD4抗体を含む試薬、CD8陽性細胞傷害性T細胞を検出するための抗CD8抗体を含む試薬、NK細胞を検出するための抗CD56抗体を含む試薬等が例示される。また各種細胞群を分離 (ソーティング) するための試薬として、抗CD3抗体を含む試薬、抗CD56抗体を含む試薬、抗CD19抗体を含む試薬、抗CD4抗体を含む試薬、抗CD8抗体を含む試薬、抗HLA-DR抗体を含む試薬が例示される。また、単球を検出するためには抗CD14抗体を含む試薬を用いることができる。本発明のアスベスト曝露歴または中皮腫の検査用試薬キットは、上記の血液由来試料を調製するための試薬の1種以上を含んでいてもよい。

【0038】

各種抗体又はポリヌクレオチドの具体例は、後述する実施例に記載のものが挙げられる。

【0039】

また、本発明は被験者から採取した血液を用いて得られた、血液中に検出される免疫関連分子から選択された3以上の有限個の解析対象分子の測定値を、予め作成した重回帰式を用いて解析するデータ解析手段、および、重回帰式を用いて得られた結果に基づき、アスベスト曝露歴または中皮腫について判定するための判定手段として、コンピューターを機能させる、アスベスト曝露歴または中皮腫の検査用プログラムも包含する。本発明の検査用プログラムは、さらに測定値を記憶させるための記憶手段としてコンピューターを機能させるものであってもよい。本発明の検査用プログラムはさらに、健常者、胸膜プラーク患者、および中皮腫担癌患者から採取した血液を用いて取得された免疫関連分子の測定値を分析することにより、上記(a)から(c)のいずれかに示された3以上の有限個の免疫関連分子を、解析対象分子として選別する選別手段、および、当該解析対象分子の測定値を重回帰分析することにより、重回帰式を作成する作成手段として、コンピューターを機能させるための検査用プログラムであってもよい。

【 0 0 4 0 】

本発明はさらに、被験者から採取した血液を用いて得られた、血液中に検出される免疫関連分子から選択された3以上の有限個の解析対象分子の測定値を、予め作成した重回帰式を用いて解析するデータ解析手段、および、重回帰式を用いて得られた結果に基づき、アスベスト曝露歴または中皮腫について判定するための判定手段を備えた、アスベスト曝露歴または中皮腫の検査用装置も包含する。本発明の検査用装置は、被験者から採取した血液を用いて得られた、血液中に検出される免疫関連分子から選択された3以上の有限個の解析対象分子の測定値を測定するための測定手段、上記判定手段に基づく判定結果を示すための表示手段を備えていてもよい。

【 0 0 4 1 】

本発明の検査方法、検査用プログラム、および検査用装置は、1つのバイオマーカーによるものではなく、マルチマーカーによる検査を主体としたものであり、被験者の状態（アスベスト曝露歴および悪性中皮腫に関する状態）をより詳しく反映することができる。これにより、より正確に中皮腫の早期診断、発症・進展の危険度、治療効果の判定、予後診断などを行うことができる。

【 実施例 】

【 0 0 4 2 】

本発明の理解を助けるために以下に実施例を示して具体的に本発明を説明するが、本発明は本実施例に限定されるものでないことはいうまでもない。

【 0 0 4 3 】

（実施例1） 免疫関連分子の測定

岡山労災病院および兵庫医科大学病院の倫理委員会の承認を得て、以下の表1に示す健康なボランティア（健常者）（HV）、胸膜プラーク陽性患者（PL）、中皮腫担癌患者（MM）から、血液を採取し、以下の表2に示す免疫関連分子について解析を行った。

【 表 1 】

Profile of specimens

Age (number)

Group	All, Male, Female	Total (analyzed for plasma cytokines)	Analyzed for cell surface markers and mRNAs
Healthy Volunteers (HV)	All	50.69±11.53 (27)	45.90±10.47 (21)
	Male	43.64±6.53 (16)	43.64±6.53 (10)
	Female	47.81±10.27 (11)	44.71±8.49 (11)
Pleural Plaque-Positive (PL)	All	66.21±4.30 (29)	63.77±2.80 (13)
	Male	66.21±4.30 (29)	63.77±2.80 (13)
	Female	(0)	(0)
Malignant Mesothelioma (MM)	All	67.60±8.12 (30)	66.50±8.02 (24)
	Male	68.04±8.84 (24)	66.72±9.02 (18)
	Female	65.83±4.31 (6)	65.83±4.31 (6)

【表 2】

Surface molecules, mRNAs and cytokines assayed

Objects	Surface molecules	Notes	mRNAs in fresh cells	mRNAs in stimulated cells	Notes
CD4 ⁺ (Th)	CD25, CD69	Activated cell markers	Foxp3, T-bet, GATA-3, RORC		Master regulators for Treg, Th1, Th2 and Th17
	CD25, GITR, CTLA-4	Regulatory markers		TNF- α , IFN- γ , TGF- β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A	Cytokine production
	CXCR3	Migration for periphery/Th1 marker	IL-1R1, IL-18R1		IL-1 family receptors/IL-1R1 as Th17 marker
	IL-1R1, IL-18R1	IL-1 family receptors/IL-1R1 as Th17 marker	Bcl-2		Anti-apoptotic gene
CD8 ⁺ (CTL)	CD25, CD69, HLA-DR	Activated cell markers	Notch1, EOMES, CREB1		Differentiation regulators
	CD45RO	Effector/memory marker	Granzyme B, FasL	Granzyme B, FasL	Cytotoxicity
	CXCR3	Migration for periphery	IFN- γ	TNF- α , IFN- γ , IL-6	Cytokine production
	FasL	Cytotoxicity	IL-1R1, IL-18R1		IL-1 family receptors
CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD56 ⁺ (NK)	CD69	Activated cell marker	NKp46		Activating receptor
	NKG2D, NKp46	Activating receptors	Granzyme B, FasL	Granzyme B, FasL	Cytokine production
	CXCR3	Migration for periphery	TNF- α , IFN- γ	TNF- α , IFN- γ , IL-6	Cytotoxicity
	FasL	Cytotoxicity			
Monocyte	HLA-DR	Antigen presentation	TNF- α , IL-1 β , IL-12p35, IL-15, IL-18, IL-23		Cytokine production
	CD80, CD86	Costimulatory molecules			
Cytokines					
Plasma		IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, EGF, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, INF- α 2, IFN- γ , IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , TNF- α , TNF- β , and VEGF			

10

20

【0044】

上記健常者、胸膜ブランク陽性患者、中皮腫担癌患者から採取した血液を遠心分離処理を行い、血漿を得た。血漿についてHuman Cytokine Magnetic 30-Plex kit (ライフテクノロジーズジャパン株式会社)を用いて、29種のサイトカインの濃度を、HCYT MAG-60K-PX 29 (Merck Millipore)によりLuminex機 (Bio-Rad社製)にて測定した (Plasma cytokines)。

30

【0045】

また同じ血液を用いて、末梢血単核細胞 (PBMC) をFicoll密度勾配遠心分離法によって単離した。得られたPBMCを、常法に従って抗体により染色した後、フローサイトメーター (FACS Calibur、BD Bioscience社製)にて蛍光強度を測定して、Monocyte region (単球)、CD3+CD4⁺細胞 (CD4陽性ヘルパーT細胞: Th)、CD3+CD8 β +細胞 (CD8陽性細胞傷害性T細胞: CTL)、CD3-CD56+細胞 (ナチュラルキラー細胞: NK)の各々について、細胞表面マーカー (Cell surface markers (Surface molecules))の発現を確認した。

【0046】

同様にして得られたPBMCについて、抗体により染色した後、フローサイトメーター (FACS Aria、BD Bioscience社製)にて蛍光強度を測定して、Monocyte region (単球)、CD4⁺CD8 β -細胞 (CD4陽性ヘルパーT細胞: Th)、CD4-CD8 β +細胞 (CD8陽性細胞傷害性T細胞: CTL)、CD4-CD8 β -CD56+細胞 (ナチュラルキラー細胞: NK)を分画した。分画した各細胞群について、前処理をせずに各種mRNA発現量を測定 (Fresh)、あるいは、PMA/イオノマイシンで1日間刺激を行った後に、各種mRNA発現量を測定した (Stimulated with PMA/IM)。mRNA発現量の測定はリアルタイムPCRを用いて常法に従って行った。

40

【0047】

CD4陽性、CD8陽性、及びCD56陽性の確認には、それぞれCD4、CD8及びCD56に対するモノクローナル抗体を用いて染色して各細胞を分画した。単球についてはフローサイトメーターでFSC、SSCと表される細胞の顆粒または細胞内構造によって区分した。RNAの抽出にはRNA抽出キットとしてRNeasy mini Kit (Qiagen)を用い、cDNAの合成にはcDNA合成キットであるPrime Script^(R) II 1st strand cDNA Synthesis kit (TaKaRa)を用い、遺伝子発

50

現を観察した。

【 0 0 4 8 】

膜表面分子の検出に用いた抗体は以下の通りである。なおAria抗体は、分画（ソーティング）用であり、Calibur抗体は発現度観察用である。

< Aria 抗体リスト >

BD Pharmingen	FITC Mouse Anti-Human CD3 (抗CD3抗体)	
BD Pharmingen	PE Mouse Anti-Human CD56 (抗CD56抗体)	
BD Pharmingen	PE-Cy5 Mouse Anti-Human CD19 (抗CD19抗体)	
BD Pharmingen	Anti-CD4 (Human) mAb-FITC (抗CD4抗体)	
BECKMAN COULTER	Anti-CD8beta (Human) mAb-PC5 (抗CD8抗体)	10
eBioscience	anti-human HLA-DR PE LN3 100 tests, (PE) (抗HLA-DR抗体)	

< Calibur 抗体リスト >

BD Pharmingen	FITC Mouse Anti-Human CD3 (抗CD3抗体)	
BD Pharmingen	PE-Cy5 Mouse Anti-Human CD56 (抗CD56抗体)	
BECKMAN COULTER	Anti-CD8beta (Human) mAb-PC5 (抗CD8抗体)	
BECKMAN COULTER	Anti-CD4 (Human) mAb-PC5 (抗CD4抗体)	
BECKMAN COULTER	Anti-CD14 (Human) mAb-FITC (抗CD14抗体)	
eBioscience	anti-human HLA-DR PE LN3 100 tests, (PE) (抗HLA-DR抗体)	
R&D Systems	BD Pharmingen PE Mouse Anti-Human CD183(CXCR3) (抗CXCR3抗体)	
BD Pharmingen	PE Mouse Anti-Human CD25 (抗CD25抗体)	20
BECKMAN COULTER	Anti-CD86 (B7-2) (Human) mAb-PE (抗CD86抗体)	
BECKMAN COULTER	Anti-CD335 (Nkp46) (Human) mAb-PE (抗Nkp46抗体)	
Bio Legend	PE anti-human CD45RO Antibody (抗CD45RO抗体)	
Bio Legend	PE anti-human CD218a (IL-18R α) Antibody (抗IL-18R1抗体)	
Bio Legend	Anti-Human CD69 PE (FN50) 100 tests, (PE) (抗CD69抗体)	
Bio Legend	PE anti-human CD80 (B7-1, B71) 100 tests, (PE) (抗CD80抗体)	
Bio Legend	Anti-human CD178 (CD95 Ligand) (抗FasL抗体)	
eBioscience	Anti-human CD314 (NKG2D) (抗NKG2D抗体)	
R&D Systems	Anti CTLA-4 , Human (Goat) (抗CTLA-4抗体)	
R&D Systems	Anti GITR/TNFRSF18 , Human (Mouse) (抗GITR抗体)	30
R&D Systems	Anti IL-1 Receptor 1 , Human (Goat) (抗IL-1R1抗体)	

【 0 0 4 9 】

mRNA発現量の測定は、Sybergreen を用いて、Mx3000P QPCR System (Agilent Technologies, Inc.,) によりリアルタイムPCR法を用いて行った。リアルタイムPCR法にて用いたプライマーは、オープンソースのネットサービス: Primer3web version 4.0.0 Pick primers from a DNA sequence (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>) を利用して設計し、北海道システム・サイエンス社に委託して調製した。用いたプライマーの塩基配列を以下の表3に示す。なお表3中、F: フォワードプライマー、R: リバースプライマー、Fresh: 新鮮細胞、PMA/IM: PMAとionomycin刺激後の細胞、4+: CD4陽性T細胞、8+: CD8陽性T細胞、NK: NK細胞、Mono: 単球、R: 受容体を意味する。

【表 3】

Fresh	Primer	F (5' - 3')	R(5' - 3')
	GAPDH	GAGTCAACGGATTTGGTCGT (配列番号1)	TTGATTTTGGAGGGATCTCG (配列番号2)
4+	Bcl2	GTGACTTCCGATCAGGAAGG (配列番号3)	CTTCCAGACATTCGAGACC (配列番号4)
	IL-1β R	AGTCTTGCCCTGAGGTCTTGG (配列番号5)	TAGATGAAGGTGACCGTCGC (配列番号6)
	IL-18R1	TAGTGCCTGGAGGAGCTGTT (配列番号7)	ATTGGGGCAAGAATGTGAAG (配列番号8)
	Foxp3	TCCCAGAGTTCCCTCCACAAC (配列番号9)	AGAAGCAGCGGACACTCAAT (配列番号10)
	Tbet	CCGTGACTGCCTACCAGAAT (配列番号11)	TCATGCTGACTGCTCGAAAC (配列番号12)
	GATA3	CTCATTAAAGCCCAAGCGAAG (配列番号13)	TTTTTCGGTTTCTGGTCTGG (配列番号14)
	RoRc	AAATCTGTGGGGACAAGTGG (配列番号15)	TCCCTCTGCTTCTTGGACAT (配列番号16)
	CD183	ACACCTTCCTGCTCCACCTA (配列番号17)	GTTCCAGGTAGCGGTCAAAGC (配列番号18)
8+	Notch1	ACTGTGAGGACCTGGTGGAC (配列番号19)	TTGTAGGTGTTGGGGAGGTC (配列番号20)
	EOMES	CCACTGCCCACTACAATGTG (配列番号21)	TTCCCGAATGAAATCTCCTG (配列番号22)
	OREB1	ACTGTAACGGTGCCCAACTCC (配列番号23)	GAATGGTAGTACCCGGCTGA (配列番号24)
	GranzymeB	TCCCTGTGAAAAGACCCATC (配列番号25)	TTCGCACTTTTCGATCTTCCT (配列番号26)
	IFN γ	TGACCAGAGCATCCAAAAGA (配列番号27)	CTCTTCGACCTCGAAACAGC (配列番号28)
	FasL	CTGGTTGCCTTGGTAGGATT (配列番号29)	TTCATTGATCACAAGGCCAC (配列番号30)
	IL-1bR	GAATGTCAGGTACACATGCC (配列番号31)	CAACGCCATAAGACAGGAGG (配列番号32)
	IL-18R1	TAGTGCCTGGAGGAGCTGTT (配列番号33)	ATTGGGGCAAGAATGTGAAG (配列番号34)
	PRF1	CAACTTTGCAGCCCAAGA (配列番号35)	GGGTGCCGTAGTTGGAGATA (配列番号36)
NK	NKp46	CAGTGAAGCTCCTGGTCACA (配列番号37)	CTTCCCAAGTGGAAGCTCTG (配列番号38)
	cRel	GCCGATGACATAGTCGAAT (配列番号39)	TCTCTCCCATGCTGTCACTG (配列番号40)
	TNF-R1	TGCAGGAAGAACCAGTACCG (配列番号41)	AGGCACAACCTCGTGCCTC (配列番号42)
	TNF-R2	CGTTCTCCAACACGACTTCA (配列番号43)	CAGTGCTGGGTTCTGGAGTT (配列番号44)
	GranzymeB	TCCCTGTGAAAAGACCCATC (配列番号45)	TTCGCACTTTTCGATCTTCCT (配列番号46)
	IFN γ	TGACCAGAGCATCCAAAAGA (配列番号27)	CTCTTCGACCTCGAAACAGC (配列番号28)
	TNF α	TGTTCTCAGCCTCTTCTCC (配列番号47)	TTATCTCTCAGCTCCACGCC (配列番号48)
	FasL	CTGGTTGCCTTGGTAGGATT (配列番号29)	TTCATTGATCACAAGGCCAC (配列番号30)
Mono	IL-12p35	GATGGCCCTGTGCCTTAGTA (配列番号49)	TCAAGGGAGGATTTTGTGG (配列番号50)
	IL-12p40	AAGGAGGCGAGGTTCTAAGC (配列番号51)	ATCCACCATGACCTCAATGG (配列番号52)
	IL-15	GAAGCCAACCTGGGTGAATGT (配列番号53)	ACTTTGCAACTGGGGTGAAC (配列番号54)
	TNF α	TGTTCTCAGCCTCTTCTCC (配列番号47)	TTATCTCTCAGCTCCACGCC (配列番号48)
	IL-1 β	TTCGACACATGGGATAACGA (配列番号55)	TCTTTCAACACGCAGGACAG (配列番号56)
	IL-18	ATAGAGGCCGATTTCTTGG (配列番号57)	TCCGGGGTGCATTATCTCTA (配列番号58)
	IL-23A	GTTCCCCATATCCAGTGTGG (配列番号59)	GACTGAGGCTTGAATCTGC (配列番号60)
PMA/IM	Primer	F (5' - 3')	R(5' - 3')
	GAPDH	GAGTCAACGGATTTGGTCGT (配列番号1)	TTGATTTTGGAGGGATCTCG (配列番号2)
4+	IFN γ	TGACCAGAGCATCCAAAAGA (配列番号27)	CTCTTCGACCTCGAAACAGC (配列番号28)
	IL-4	ACTGCACAGCAGTTCCACAG (配列番号61)	CTCTGGTTGGCTTCCTTCAC (配列番号62)
	IL-10	AACCTGCCTAACATGCTTCG (配列番号63)	CATTCTTCACCTGCTCCACG (配列番号64)
	IL-17A	ACCAATCCCCAAAAGGTCCCTC (配列番号65)	CCGACGGACACCAAGTATCTT (配列番号66)
	TNF α	TGTTCTCAGCCTCTTCTCC (配列番号47)	TTATCTCTCAGCTCCACGCC (配列番号48)
	TGF β 1	TTCAACACATCAGAGCTCCG (配列番号67)	ATAACCACTCTGGCGAGTCG (配列番号68)
	IL-6	AGGAGACTTGCCTGGTGAAG (配列番号69)	CAGGGGTGGTTATTGCATCT (配列番号70)
	IL-9	ACCAGACCATGCTTCACTGA (配列番号71)	TCTTCAGAAATGTCAGCGCG (配列番号72)
	IL-13	CTATGCATCCGCTCCTCAAT (配列番号73)	TTTACAACTGGGCCACCTC (配列番号74)
8+	GranzymeB	TCCCTGTGAAAAGACCCATC (配列番号25)	TTCGCACTTTTCGATCTTCCT (配列番号26)
	IFN γ	TGACCAGAGCATCCAAAAGA (配列番号27)	CTCTTCGACCTCGAAACAGC (配列番号28)
	TNF α	TGTTCTCAGCCTCTTCTCC (配列番号47)	TTATCTCTCAGCTCCACGCC (配列番号48)
	FasL	CTGGTTGCCTTGGTAGGATT (配列番号29)	TTCATTGATCACAAGGCCAC (配列番号30)
	IL-6	AGGAGACTTGCCTGGTGAAG (配列番号69)	CAGGGGTGGTTATTGCATCT (配列番号70)
	PRF1	CAACTTTGCAGCCCAAGA (配列番号35)	GGGTGCCGTAGTTGGAGATA (配列番号36)
NK	GranzymeB	TCCCTGTGAAAAGACCCATC (配列番号25)	TTCGCACTTTTCGATCTTCCT (配列番号26)
	IFN γ	TGACCAGAGCATCCAAAAGA (配列番号27)	CTCTTCGACCTCGAAACAGC (配列番号28)
	TNF α	TGTTCTCAGCCTCTTCTCC (配列番号47)	TTATCTCTCAGCTCCACGCC (配列番号48)
	FasL	CTGGTTGCCTTGGTAGGATT (配列番号29)	TTCATTGATCACAAGGCCAC (配列番号30)
	IL-6	AGGAGACTTGCCTGGTGAAG (配列番号69)	CAGGGGTGGTTATTGCATCT (配列番号70)
Mono	IL-12p35	GATGGCCCTGTGCCTTAGTA (配列番号49)	TCAAGGGAGGATTTTGTGG (配列番号50)
	IL-12p40	AAGGAGGCGAGGTTCTAAGC (配列番号51)	ATCCACCATGACCTCAATGG (配列番号52)
	IL-15	GAAGCCAACCTGGGTGAATGT (配列番号53)	ACTTTGCAACTGGGGTGAAC (配列番号54)
	TNF α	TGTTCTCAGCCTCTTCTCC (配列番号47)	TTATCTCTCAGCTCCACGCC (配列番号48)
	IL-10	AACCTGCCTAACATGCTTCG (配列番号63)	CATTCTTCACCTGCTCCACG (配列番号64)
	IL-1 β	TTCGACACATGGGATAACGA (配列番号55)	TCTTTCAACACGCAGGACAG (配列番号56)
	IL-18	ATAGAGGCCGATTTCTTGG (配列番号57)	TCCGGGGTGCATTATCTCTA (配列番号58)
	IL-6	AGGAGACTTGCCTGGTGAAG (配列番号69)	CAGGGGTGGTTATTGCATCT (配列番号70)
	IL-23A	GTTCCCCATATCCAGTGTGG (配列番号59)	GACTGAGGCTTGAATCTGC (配列番号60)

10

20

30

40

各種分子の測定結果を、図 1 ~ 図 4 に示す。図 1 は細胞表面マーカーのうち差異を認めたものの代表例を示す。図 2 および図 3 は、遺伝子の mRNA 量のうち差異を認めたものの代表例を示す。図 4 は血漿中サイトカイン濃度のうち、差異を認めたものの代表例を示す。

【 0 0 5 1 】

(実施例 2) 免疫関連分子についての重回帰分析

実施例 1 により得られた免疫関連分子の測定値について、網羅的に重回帰分析を行った。重回帰分析は SPSS version 22 (IBM社) を用いて行った。健常者群、胸膜ブランク患者群、中皮腫患者群の計 3 群の測定値を用いて、以下の 1) ~ 3) の判別を行うために、解析を行った。

1) 中皮腫担癌か否か、すなわち [健常者群 + 胸膜ブランク患者群] のグループと [中皮腫患者群] グループを判別する。

2) アスベスト曝露があるかどうか、すなわち [健常者群] グループと [胸膜ブランク患者群 + 中皮腫患者群] のグループを判別する。

3) アスベスト曝露はあるが中皮腫担癌ではない、すなわち [胸膜ブランク患者群] グループと [健常者群 + 中皮腫患者群] のグループを判別する。

【 0 0 5 2 】

重回帰分析により、上記 1) ~ 3) を判別するためのスコアを算出する予測式 (重回帰式) を以下の通り構築した。

1) 重回帰分析による中皮腫担癌である被験者の同定と予測式

$$M\text{-Score} = 2.43056 + 0.00460 \times [\text{IFN-}\alpha 2] + 0.56948 \times [\text{Ths_TNF-}\alpha] + 0.00075 \times [\text{MCP-1}]$$

[IFN- α 2] : 血漿中インターフェロン (IFN) α 2 の濃度

[Ths_TNF- α] : CD4 陽性 T 細胞の TNF- α の遺伝子発現量

[MCP-1] : 血漿中 MCP-1 の濃度

2) 重回帰分析によるアスベスト曝露歴のある被験者の同定と予測式

$$A\text{-Score} = 0.76825 - 0.00248 \times [\text{CXCR3MFI_CTL}] + 0.52846 \times [\text{CTLs_GranzymeB}] - 0.72952 \times [\text{CTL_IL18R1}]$$

[CXCR3MFI_CTL] : CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞の CXCR3 (ケモカイン受容体の一種) の細胞表面の発現量

[CTLs_GranzymeB] : CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞の Granzyme B の遺伝子発現量

[CTL_IL18R1] : CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞の IL-18R1 の遺伝子発現量

3) 重回帰分析によるアスベスト曝露歴があるが中皮腫非担癌である被験者の同定と予測式

$$P\text{-Score} = 0.22813 - 0.66572 \times [\text{Ths_TNF-}\alpha] - 0.01333 \times [\text{CXCR3MFI_NK}] - 0.00733 \times [\text{GITR_Th}]$$

[Ths_TNF- α] : CD4 陽性 T 細胞の TNF- α の遺伝子発現量

[CXCR3MFI_NK] : NK 細胞の細胞膜表面の CXCR3 の発現量

[GITR_Th] : CD4 陽性 T 細胞膜表面の GITR の発現量

なお上記のうち、遺伝子発現量は mRNA 発現量であり、[Ths_TNF- α] と [CTLs_GranzymeB] は、PMA/ イオノマイシン刺激後の細胞における mRNA 発現である。

【 0 0 5 3 】

上記予測式にて用いられる各解析対象分子の測定値は、各グループ間において変動が認められた。しかしながら、単独ではマーカーとなり得ないものも含まれていた。3 つの解析対象分子の測定値にて、上記予測式を用いてスコアを算出することにより、中皮腫担癌、アスベスト曝露歴、アスベスト曝露歴があるが中皮腫非担癌の被験者を、簡便かつ正確に判別することができることがわかった (図 5 ~ 7) 。

図 8 には、M-Score と P-Score の相関関係を示す。両者は有意に負の相関関係を示すことがわかった。中皮腫担癌患者と胸膜ブランク陽性患者の M-Score、P-Score は大きく異なっていることから、これらの Score を用いて中皮腫の発症を予測することができると考えられた。

10

20

30

40

50

図 9 に、M-Score、P-Score、A-Scoreの感度及び特異度についての R O C 分析 (Receive r Operating Characteristic curve) の結果を示した。本発明の免疫関連分子による重回帰分析では、単独のバイオマーカーに比べて、感度および特異度が優れていると考えられた。また、本発明の検査方法により、中皮腫担癌、アスベスト曝露歴、アスベスト曝露歴があるが中皮腫非担癌を判別するカットオフ値が設定可能であることがわかった。

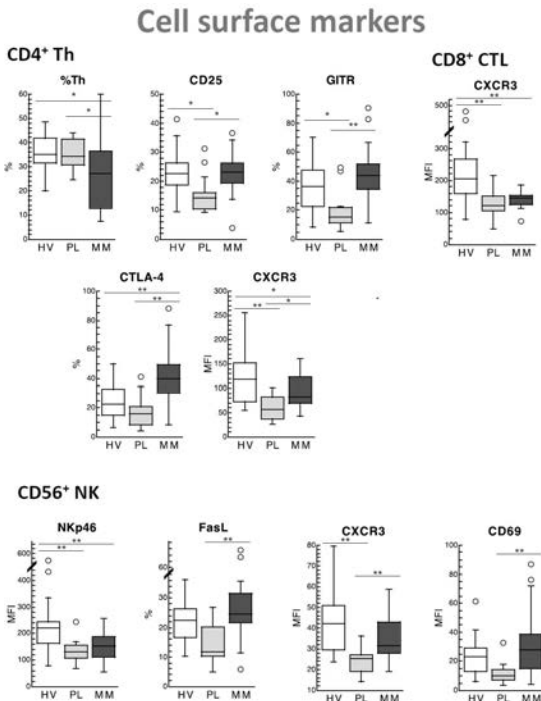
【産業上の利用可能性】

【0054】

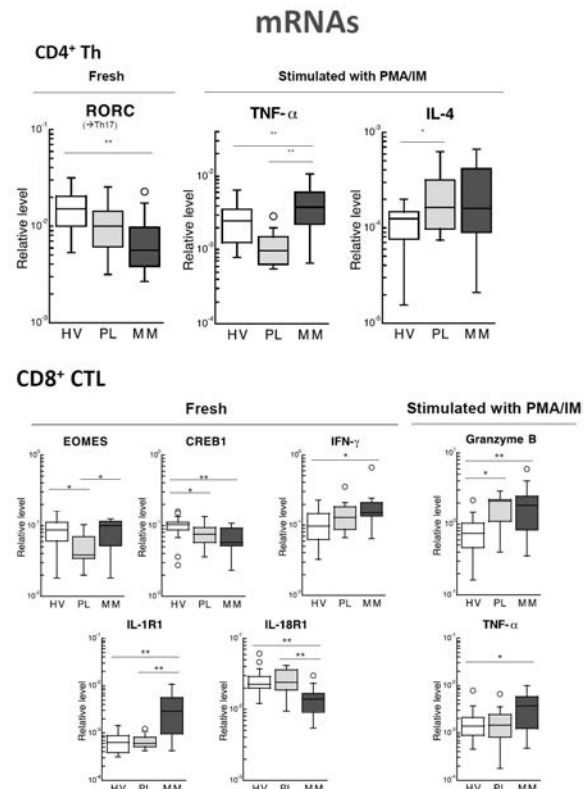
以上詳述したように、本発明は被験者の血液を用いて簡便に検出することのできる免疫関連分子について、3以上の有限個の解析対象分子を用いて、重回帰分析を行うことにより、正確に中皮腫が否か、アスベスト曝露歴があるかどうか、アスベスト曝露歴はあるが中皮腫担癌でないかどうかを判別することができる。本邦では、2030年前後まで10万人程度、アスベストによる中皮腫が発症すると予測されている。本発明の検査方法を臨床応用することにより、早期発見につながるとともに、ひいては早期発見による早期治療が可能になる。加えて、本発明の方法により、取扱工場周辺・建造物解体業者・瓦礫処理従事者・瓦礫周辺居住一般市民を対象として、アスベスト曝露歴または中皮腫の簡易なスクリーニングを行うことも可能となる。さらに、アスベストに対する不安感多くの国民が抱いていることから、通常の間人ドッグや健康診断のオプション項目として採用することも可能である。

10

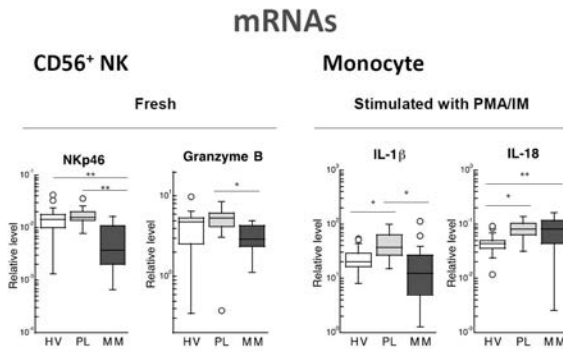
【図 1】



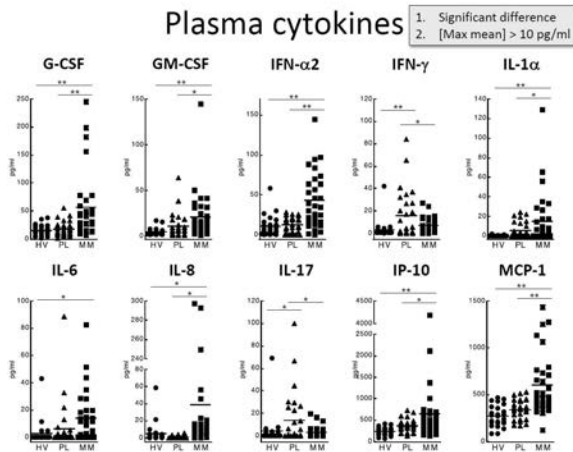
【図 2】



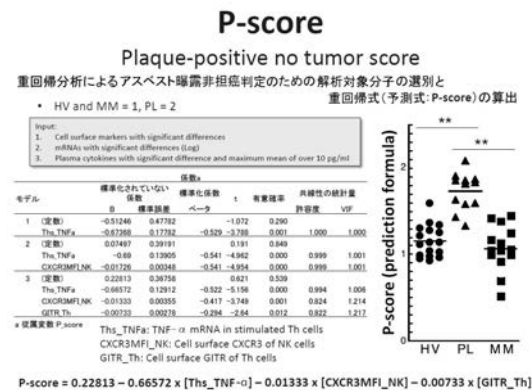
【図 3】



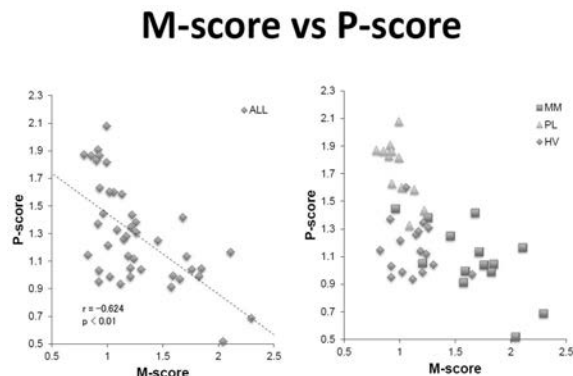
【図 4】



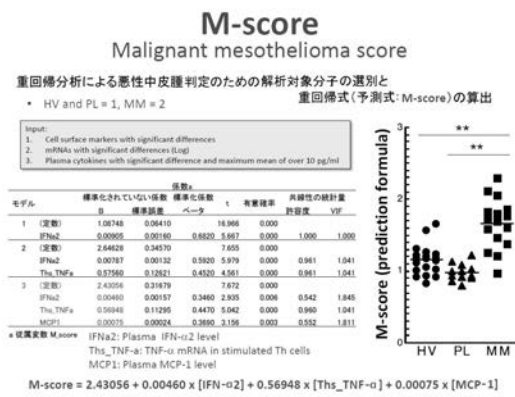
【図 7】



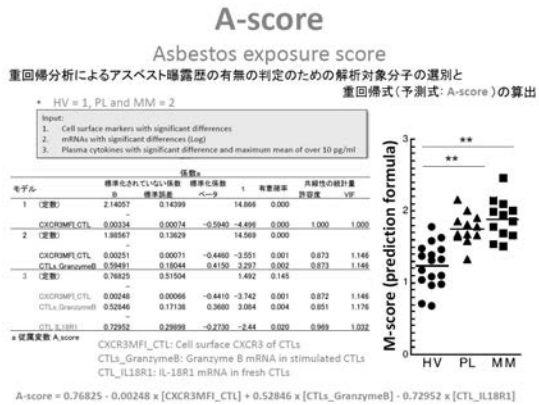
【図 8】



【図 5】

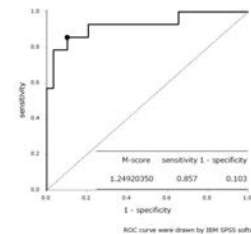


【図 6】

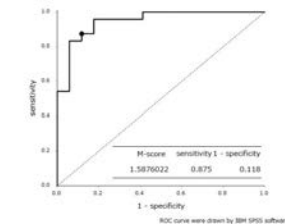


【図 9】

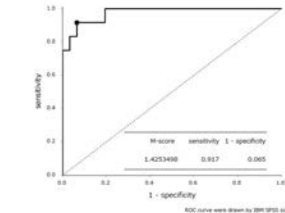
ROC curve M-score (Mesothelioma)



ROC curve A-score (Asbestos exposure)



ROC curve P-score (PL-posi. no tumor)



【配列表】

2016167346000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2016/062106
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/68(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/48(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) G01N33/68, C12M1/00, C12M1/34, C12Q1/68, G01N33/48		
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 1996-2016 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MURAKAMI S et al., Cytokine alternation and speculated immunological pathophysiology in silicosis and asbestos-related diseases, Environ Health Prev Med., 2009.07, 14(4), 216-222	1-5, 8-9, 11-13
A		6-7, 10
Y	MAEDA M et al., Decreased CXCR3 expression in CD4+ T cells exposed to asbestos or derived from asbestos-exposed patients, Am J Respir Cell Mol Biol., 2011.10, 45(4), 795-803	1-5, 8-9, 11-13
A		6-7, 10
Y	WO 2012/128108 A1 (Hiroyuki TSUDA), 27 September 2012 (27.09.2012), claims; fig. 5	1-5, 8-9, 11-13
A	(Family: none)	6-7, 10
☒ 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 30 June 2016 (30.06.16)		Date of mailing of the international search report 12 July 2016 (12.07.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/062106

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2012/074085 A1 (Yakult Honsha Co., Ltd.), 07 June 2012 (07.06.2012), paragraph [0022] & US 2013/0302327 A1 paragraph [0035] & EP 2647708 A1	2-3, 11-13
A	US 2012/0077695 A1 (OSTROFF Rachel M.), 29 March 2012 (29.03.2012), entire text; all drawings & WO 2012/047618 A2 & EP 2622104 A2	1-13

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 6 / 0 6 2 1 0 6	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/68(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/48(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. G01N33/68, C12M1/00, C12M1/34, C12Q1/68, G01N33/48			
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 1971-2016年 日本国実用新案登録公報 1996-2016年 日本国登録実用新案公報 1994-2016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) PubMed			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
Y	MURAKAMI S et al., Cytokine alternation and speculated immunological pathophysiology in silicosis and asbestos-related diseases, Environ Health Prev Med., 2009.07, 14(4), 216-222	1-5, 8-9, 11-13	
A		6-7, 10	
Y	MAEDA M et al., Decreased CXCR3 expression in CD4+ T cells exposed to asbestos or derived from asbestos-exposed patients, Am J Respir Cell Mol Biol., 2011.10, 45(4), 795-803	1-5, 8-9, 11-13	
A		6-7, 10	
☒ 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 30.06.2016		国際調査報告の発送日 12.07.2016	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 赤坂 祐樹 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 6 / 0 6 2 1 0 6
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y A	WO 2012/128108 A1 (津田 洋幸) 2012.09.27, 請求の範囲、図5 (ファミリーなし)	1-5, 8-9, 11-13 6-7, 10
Y	WO 2012/074085 A1 (株式会社ヤクルト本社) 2012.06.07, 段落 [0022] & US 2013/0302327 A1 (段落[0035]) & EP 2647708 A1	2-3, 11-13
A	US 2012/0077695 A1 (OSTROFF Rachel M.) 2012.03.29, 全文、全図 & WO 2012/047618 A2 & EP 2622104 A2	1-13

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
 C 1 2 Q 1/68 Z N A A
 C 1 2 M 1/34

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 松崎 秀紀
 岡山県倉敷市松島 5 7 7 学校法人 川崎学園 川崎医科大学内

(72)発明者 李 順姫
 岡山県倉敷市松島 5 7 7 学校法人 川崎学園 川崎医科大学内

(72)発明者 武井 直子
 岡山県倉敷市松島 5 7 7 学校法人 川崎学園 川崎医科大学内

F ターム(参考) 2G045 AA26 CA25 CA26 DA14 DA36 JA01
 4B029 AA07 BB11 FA12
 4B063 QA01 QA19 QQ53 QR55 QS34 QX02

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

专利名称(译)	石棉暴露或间皮瘤检查的历史		
公开(公告)号	JPWO2016167346A1	公开(公告)日	2018-02-08
申请号	JP2017512596	申请日	2016-04-15
申请(专利权)人(译)	学校法人川崎学园		
[标]发明人	西村 泰光 大槻 剛巳 松崎 秀紀 李 順姫 武井 直子		
发明人	西村 泰光 大槻 剛巳 松崎 秀紀 李 順姫 武井 直子		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/48 G01N33/53 C12Q1/68 C12M1/34		
CPC分类号	C12M1/00 C12M1/34 C12Q1/68 G01N33/48 G01N33/68		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/48.Z G01N33/53.P G01N33/53.D G01N33/53.M C12Q1/68.ZNA.A C12M1/34		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/JA01 4B029/AA07 4B029/BB11 4B029/FA12 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ53 4B063/QR55 4B063/QS34 4B063/QX02		
代理人(译)	庄司隆 Shinobe百合子		
优先权	2015084983 2015-04-17 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明使用从受试者收集的血液，包括获得选自血液中检测到的免疫相关分子，石棉接触史或培养基中的三个或更多个有限数量的待分析分子的测量值的步骤。皮肤病的检查方法，检查方法所用的检查程序或检查装置技术领域本发明涉及皮肤病的检查方法，该检查方法所使用的检查程序或检查装置。

(1) 日本国特許庁 (JP)	再 公 表 特 許 (A1)	(11) 国際公開番号
		WO2016/167346
発行日 平成30年2月8日 (2018.2.8)	(43) 国際公開日	平成28年10月20日 (2016.10.20)
(5) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/68 (2006.01)	G O I N 33/68	2 G 0 4 5
G 0 1 N 33/48 (2006.01)	G O I N 33/48	4 B 0 2 9
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G O I N 33/53	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)	G O I N 33/53	D
C 1 2 M 1/68 (2006.01)	G O I N 33/53	M
	審査請求 未請求	予備審査請求 未請求 (全 28 頁) 最終頁に続く
出願番号 特願2017-512596 (P2017-512596)	(71) 出願人 597039984	
(21) 国際出願番号 PCT/JP2016/062106	学校法人 川崎学園	
(22) 国際出願日 平成28年4月15日 (2016.4.15)	岡山県倉敷市松島5 7 7 番地	
(31) 優先主張番号 特願2015-84983 (P2015-84983)	(74) 代理人 100088904	
(32) 優先日 平成27年4月17日 (2015.4.17)	弁理士 庄司 隆	
(33) 優先主張国 日本国 (JP)	(74) 代理人 100124453	
	弁理士 賀能 由利子	
	(74) 代理人 100135208	
	弁理士 大杉 卓也	
	(72) 発明者 西村 泰光	
	岡山県倉敷市松島5 7 7 学校法人 川崎	
	学園 川崎医科大学内	
	(72) 発明者 大槻 剛己	
	岡山県倉敷市松島5 7 7 学校法人 川崎	
	学園 川崎医科大学内	
	最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】	アスベスト曝露歴または中皮腫の検査方法	