

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-506609

(P2006-506609A)

(43) 公表日 平成18年2月23日(2006.2.23)

(51) Int.Cl.		F I			テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	P		4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/02	(2006.01)	GO 1 N 33/53	D		4 H O 4 5
CO 7 K 16/24	(2006.01)	C 1 2 Q 1/02			
		CO 7 K 16/24			

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 36 頁)

(21) 出願番号	特願2004-548932 (P2004-548932)	(71) 出願人	505167598
(86) (22) 出願日	平成15年11月6日 (2003.11.6)		セレスティス リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成17年7月6日 (2005.7.6)		オーストラリア国 ビクトリア州 カーネ
(86) 国際出願番号	PCT/AU2003/001464		ギー ダンデノン ロード 1046エイ
(87) 国際公開番号	W02004/042396	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開日	平成16年5月21日 (2004.5.21)		弁理士 清水 初志
(31) 優先権主張番号	2002952548	(74) 代理人	100128048
(32) 優先日	平成14年11月8日 (2002.11.8)		弁理士 新見 浩一
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)	(72) 発明者	ロゼル ジェイムス スチュアート
			オーストラリア国 ビクトリア州 グレン
			ハントリー ロズチャイルド ストリー
			ト 10

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞性免疫応答を測定する診断アッセイ法

(57) 【要約】

本発明は、全般的に診断アッセイ法、より詳しく述べると細胞性免疫反応性を測定するためのアッセイ法に関する。さらにより詳しく述べると、本発明は、全血または他の適した生体試料を用いて抗原に対する細胞性応答を測定するためのアッセイ法およびキットを提供する。アッセイ法は、免疫エフェクター分子に対するリガンドを用いて行ってもよく、または核酸レベルで、免疫エフェクター分子をコードする遺伝子の発現のスクリーニングを用いて行ってもよい。アッセイ法は、ヒト、家禽、獣医学、および野生動物での応用のための治療および診断プロトコールにおいて有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験者におけるCMI応答を測定する方法であって、

試料が抗原による刺激後に免疫エフェクター分子を産生することができる免疫系の細胞を含む、被験者からの試料を採取する段階、該試料を抗原と共にインキュベートする段階、および該免疫エフェクター分子の存在またはレベルによって、被験者が細胞性免疫応答を実行できることが示される、免疫エフェクター分子の存在またはレベルの上昇を測定する段階を含む、方法。

【請求項 2】

被験者がヒトである、請求項1記載の方法。

10

【請求項 3】

試料が全血である、請求項1または2記載の方法。

【請求項 4】

全血が抗原を含む管において採取される、請求項3記載の方法。

【請求項 5】

全血がヘパリンを含む管において採取される、請求項3記載の方法。

【請求項 6】

タイトルがヘパリンをさらに含む、請求項4記載の方法。

【請求項 7】

試料が抗原と共に約5時間～約50時間インキュベートされる、請求項1記載の方法。

20

【請求項 8】

全血が抗原と共に約5時間～約50時間インキュベートされる、請求項3記載の方法。

【請求項 9】

免疫エフェクター分子がサイトカインである、請求項1記載の方法。

【請求項 10】

サイトカインがIFN- γ である、請求項9記載の方法。

【請求項 11】

サイトカインがGM-CSFである、請求項9記載の方法。

【請求項 12】

サイトカインがインターロイキンである、請求項9記載の方法。

30

【請求項 13】

サイトカインがTNF α である、請求項9記載の方法。

【請求項 14】

被験者が病原体に感染している、請求項1または2記載の方法。

【請求項 15】

病原体がHBVである、請求項14記載の方法。

【請求項 16】

病原体がHIVである、請求項14記載の方法。

【請求項 17】

免疫細胞が、NK細胞、T細胞、B細胞、樹状細胞、マクロファージ、または単球から選択される、請求項1記載の方法。

40

【請求項 18】

免疫細胞がT細胞である、請求項17記載の方法。

【請求項 19】

インキュベーションが単糖の存在下で行われる、請求項7または8記載の方法。

【請求項 20】

単糖がデキストロースである、請求項19記載の方法。

【請求項 21】

抗原がペプチドである、請求項1記載の方法。

【請求項 22】

50

抗原がポリペプチドである、請求項1記載の方法。

【請求項23】

抗原がタンパク質である、請求項1記載の方法。

【請求項24】

抗原が糖タンパク質である、請求項1記載の方法。

【請求項25】

抗原が糖質である、請求項1記載の方法。

【請求項26】

抗原が、磷脂質、磷タンパク質、およびホスホリボタンパク質から選択される、請求項1記載の方法。

10

【請求項27】

抗原がTB特異的抗原である、請求項1記載の方法。

【請求項28】

TB特異的抗原がESAT-6に関する重複ペプチドである、請求項27記載の方法。

【請求項29】

TB特異的抗原がCFP-10に関する重複ペプチドである、請求項27記載の方法。

【請求項30】

TB特異的抗原がTB7に関する重複ペプチドである、請求項27記載の方法。

【請求項31】

抗原がヒト型結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) に由来するPPDである、請求項1記載の方法。

20

【請求項32】

抗原がトリ型結核菌 (*Mycobacterium avium*) に由来するPPDである、請求項1記載の方法。

【請求項33】

抗原がフィトヘマグルチニンである、請求項1記載の方法。

【請求項34】

抗原が破傷風トキソイドである、請求項1記載の方法。

【請求項35】

免疫エフェクターが、該免疫エフェクターに対して特異的な抗体によって検出される、請求項1記載の方法。

30

【請求項36】

免疫エフェクターがELISAを用いて検出される、請求項35記載の方法。

【請求項37】

免疫エフェクターがELISpotを用いて検出される、請求項45記載の方法。

【請求項38】

被験者におけるCMI応答を測定する方法によって被験者が細胞性免疫応答を実行する能力を評価することを含む、病原体感染症、自己免疫障害もしくは癌、またはそのような障害を発症する性向を有する被験者を治療する方法であって、

試料が抗原による刺激後に免疫エフェクター分子を産生することができる免疫系の細胞を含む、被験者からの試料を採取する段階、該試料を抗原と共にインキュベートする段階、該免疫エフェクター分子の存在またはレベルによって、被験者が細胞性免疫応答を実行できることが示される、免疫エフェクター分子の存在またはレベルの上昇を測定する段階、および適切な治療プロトコルを選択する段階を含む、方法。

40

【請求項39】

被験者がヒトである、請求項38記載の方法。

【請求項40】

試料が全血である、請求項38または39記載の方法。

【請求項41】

全血が抗原を含む管において採取される、請求項40記載の方法。

50

- 【請求項 4 2】
全血がヘパリンを含む管において採取される、請求項40記載の方法。
- 【請求項 4 3】
タイトルがヘパリンをさらに含む、請求項41記載の方法。
- 【請求項 4 4】
試料が抗原と共に約5時間～約50時間インキュベートされる、請求項38記載の方法。
- 【請求項 4 5】
全血が抗原と共に約5時間～約50時間インキュベートされる、請求項40記載の方法。
- 【請求項 4 6】
免疫エフェクター分子がサイトカインである、請求項38記載の方法。 10
- 【請求項 4 7】
サイトカインがIFN- γ である、請求項46記載の方法。
- 【請求項 4 8】
サイトカインがGM-CSFである、請求項46記載の方法。
- 【請求項 4 9】
サイトカインがインターロイキンである、請求項46記載の方法。
- 【請求項 5 0】
サイトカインがTNF α である、請求項46記載の方法。
- 【請求項 5 1】
免疫細胞が、NK細胞、T細胞、B細胞、樹状細胞、マクロファージ、または単球から選択 20
される、請求項38記載の方法。
- 【請求項 5 2】
免疫細胞がT細胞である、請求項51記載の方法。
- 【請求項 5 3】
インキュベーションが単糖の存在下で行われる、請求項44または45記載の方法。
- 【請求項 5 4】
単糖がデキストロースである、請求項53記載の方法。
- 【請求項 5 5】
抗原がペプチドから選択される、請求項38記載の方法。
- 【請求項 5 6】
抗原がポリペプチドから選択される、請求項38記載の方法。 30
- 【請求項 5 7】
抗原がタンパク質から選択される、請求項38記載の方法。
- 【請求項 5 8】
抗原が糖タンパク質から選択される、請求項38記載の方法。
- 【請求項 5 9】
抗原が糖質から選択される、請求項38記載の方法。
- 【請求項 6 0】
抗原が、磷脂質、磷脂タンパク質、およびホスホリポタンパク質から選択される、請求項 40
38記載の方法。
- 【請求項 6 1】
抗原がTB特異的抗原である、請求項38記載の方法。
- 【請求項 6 2】
TB特異的抗原がESAT-6に関する重複ペプチドである、請求項61記載の方法。
- 【請求項 6 3】
TB特異的抗原がCFP-10に関する重複ペプチドである、請求項61記載の方法。
- 【請求項 6 4】
TB特異的抗原がTB7に関する重複ペプチドである、請求項61記載の方法。
- 【請求項 6 5】
抗原がヒト型結核菌に由来するPPDである、請求項38記載の方法。 50

【請求項 66】

抗原がトリ型結核菌に由来するPPDである、請求項38記載の方法。

【請求項 67】

抗原がフィトヘマグルチニンである、請求項38記載の方法。

【請求項 68】

抗原が破傷風トキソイドである、請求項38記載の方法。

【請求項 69】

免疫エフェクターが、該免疫エフェクターに対して特異的な抗体によって検出される、請求項38記載の方法。

【請求項 70】

免疫エフェクターがELISAを用いて検出される、請求項69記載の方法。

【請求項 71】

免疫エフェクターがELISpotを用いて検出される、請求項70記載の方法。

【請求項 72】

多成分型である、被験者におけるCMI応答を測定するキットであって、
第一の区画が複数の採血管を含み、第二の区画が免疫エフェクター分子に関する抗体に基づく検出手段を含み、および第三の区画が

(1) 採血管に血液を採取する段階；

(2) 該管を混合する段階；

(3) 該管を直立させてインキュベートする段階；

(4) 該管を遠心して、血漿を採取する段階；および

(5) 血漿中の免疫エフェクター分子を検出する段階
を含む一連の説明書を含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、全般的に診断アッセイ法、より詳しく述べると細胞性免疫反応性を測定するためのアッセイ法に関する。さらにより詳しく述べると、本発明は、全血または他の適した生体試料を用いて抗原に対する細胞性反応を測定するためのアッセイ法およびキットを提供する。アッセイ法は、免疫エフェクター分子に対するリガンドを用いて行ってもよく、または核酸レベルで、免疫エフェクター細胞をコードする遺伝子の発現に関するスクリーニングを用いて行ってもよい。アッセイ法は、ヒト、家禽、獣医学、および野生動物に関して応用するための治療および診断プロトコールにおいて有用である。

【背景技術】

【0002】

先行技術に関する説明

本明細書において提供された参考文献の著書目録の詳細は、明細書の末尾に記載する。

【0003】

本明細書における先行技術に対する参照は、この先行技術が如何なる国においても共通の全般的知識の一部を形成すると認識しているわけではなく、認識したと解釈してはならず、または如何なる形でも示唆したと解釈してはならない。

【0004】

細胞性免疫(CMI)応答は、免疫コンピテンスのマーカーとして、ならびに内因性および外因性の抗原(すなわちワクチン)に対するT細胞応答を検出するためのマーカーとして、多くの感染疾患および自己免疫疾患の免疫学的診断にとって重要である。

【0005】

CMI応答を検出するための現在の方法には、即時型および遅延型過敏症の双方を測定する皮膚試験、リンパ球増殖アッセイ法、ならびに抗原と共に培養した精製単核球によって産生されたサイトカインの測定が含まれる。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 6 】

CMI応答を検出するほとんどのインビトロ試験は、全血からリンパ球を精製すること、これらのリンパ球を12時間～6日間、抗原と共に培養すること、および抗原に対するT細胞の反応性を検出することを含む。増殖アッセイ法のようなより古い確立された方法は、CMI応答性のマーカーとして、分裂T細胞による放射活性同位元素の取り込みを用いる。より最近では、抗原刺激に反応して特定のサイトカインを産生するT細胞数を検出するために、単細胞アッセイ法（ELISpot）のような技術が用いられている。

【 0 0 0 7 】

CMI応答性を測定するためにこれまでに用いられてきたアッセイ法があったとはいえ、CMI応答を容易かつ正確に測定するには実際に限界があったことから、これまで、感染疾患、自己免疫疾患および腫瘍学の診断における標準的で実際的な医学の実践にこれらのアッセイ法を大規模に採用することはできなかった。

【 発明の開示 】

【 0 0 0 8 】

発明の概要

本明細書を通して、本文がそうでないことを必要とする場合を除き、「含む（comprise）」という用語、または「含む（comprises）」もしくは「含む（comprising）」のようなその変化形は、述べられた要素もしくは整数または要素もしくは整数の群を含めるが、任意の他の要素もしくは整数、または要素もしくは整数の群を除外しないことを意味するものと理解されるであろう。

【 0 0 0 9 】

本発明は、免疫系のT細胞または他の細胞を含む被験者からの試料を、抗原と共にインキュベートすることによって、被験者におけるCMIを測定する方法を提供する。次に、IFN- γ もしくは他のサイトカイン、または免疫エフェクター分子の産生を検出する。免疫エフェクターの存在またはレベルにより、被験者の細胞性応答性レベルが示される。

【 0 0 1 0 】

好ましくは、試料は、抗原を含む適した容器において採取される全血である。選択的に、デキストロースのような単糖をインキュベーション混合物に加える。

【 0 0 1 1 】

したがって、本発明の一つの局面は、試料が抗原による刺激後に免疫エフェクター分子を産生することができる免疫系の細胞を含む、被験者からの試料を採取する段階、該試料を抗原と共にインキュベートする段階、および該免疫エフェクター分子の存在またはレベルによって、被験者が細胞性免疫応答を実行できることが示される、免疫エフェクター分子の存在またはレベルの上昇を測定する段階を含む、被験者におけるCMI応答を測定する方法を企図する。

【 0 0 1 2 】

好ましくは、被験者はヒトである。しかし、本発明は、霊長類、家畜動物、実験動物、ペット動物、および鳥類のみならず爬虫類および両生類のような哺乳類以外の動物を企図する。したがって、アッセイ法は、ヒト、家畜、獣医学および野生動物の治療および診断において適用を有する。

【 0 0 1 3 】

好ましい態様において、試料は、抗原を含む、またはそれに抗原が添加される採血管において採取された全血である。一般的に、血液はヘパリンの存在下で維持される。ヘパリンは、全血が加えられる、またはその後加えられる試験管に存在してもよい。採血管を用いることは、標準的な自動検査システムに適合して、これらは大規模でランダムアクセスサンプリングにおける分析に従う。採血管はまた、取り扱い費用を最小限にして、検査室での全血および血漿に対する曝露を減少させ、したがって、検査者が免疫不全ウイルス（HIV）またはB型肝炎ウイルス（HBV）のような病原体と接触するリスクを減少させる。さらに、インキュベーションを行うために採血管を用いることによって、アッセイはこれまでに用いた24ウェル培養ウェルプレートより一層感受性が高くなる。

【 0 0 1 4 】

したがって、本発明は、採血管、選択的に、デキストロースのような単糖およびインキュベーション段階を用いることを含む、増強されたCMIアッセイ法を提供する。インキュベーション段階は、好ましくは5時間～50時間である。

【 0 0 1 5 】

免疫エフェクター分子は、好ましくはIFN- γ のような、しかしこれに限定されないサイトカインである。免疫エフェクターの存在またはレベルは、分子自身のレベルで、または遺伝子が発現される程度に決定してもよい。

【 0 0 1 6 】

本発明はさらに、アッセイを行うために必要な試薬および区画を含むキットを提供する。一般的に、キットは一連の説明書をさらに含む。 10

【 0 0 1 7 】

アッセイはまた、自動または半自動であってもよく、自動の局面はコンピューターソフトウェアによって制御されてもよい。

【 0 0 1 8 】

本発明はさらに、微生物、寄生虫、もしくはウイルスによる感染、自己免疫状態または癌のような状態の治療法を企図する。方法は、被験者が細胞性免疫応答を実行できるか否かを評価して、次に、単独または他の治療と併用して標的抗原に対してCMIを誘導するような治療プロトコルを選択することを含む。

【 0 0 1 9 】

本明細書において用いる省略語のリストを表1に提供する。 20

【 0 0 2 0 】

(表1) 省略語

省略語	説明
CMI	細胞性免疫 (cell-mediated immunity)
CSF	コロニー刺激因子 (colony stimulating factor)
ELISA	酵素結合免疫吸着アッセイ法 (enzyme linked immunosorbent assay)
ELISpot	単細胞ELISA (single cell ELISA)
G-CSF	顆粒球CSF (granulocyte-CSF)
GM-CSF	顆粒球-マクロファージ-CSF (granulocyte, macrophage-CSF)
HBV	B型肝炎ウイルス (hepatitis B virus)
HIV	ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus)
IFN- γ	インターフェロン- γ (interferon-gamma)
PPD	結核菌精製タンパク質誘導体 (Mycobacterium-tuberculosis purified protein derivative)
TNF- α	腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor)

【 0 0 2 1 】

発明の詳細な説明

本発明は、被験者がCMI応答を実行する可能性または能力に関するアッセイ法を提供する。アッセイ法は、抗原刺激に反応した免疫系の細胞による免疫エフェクター分子の産生を測定することに基づく。免疫エフェクターは、エフェクターに対して特異的な抗体のようなリガンドを用いて、またはエフェクターをコードする遺伝子の発現レベルを測定することによって検出してもよい。したがって、本発明は、被験者におけるCMIの応答性を決定する手段を提供し、次に感染疾患、病態、免疫コンピテンスのレベル、および内因性ま 30 40 50

たは外因性の抗原に対するT細胞応答性のマーカーを診断する手段を提供する。

【0022】

したがって、本発明の一つの局面は、抗原による刺激後に免疫エフェクター分子を産生することができる免疫系の細胞を含む試料を被験者から採取する段階、該試料を抗原と共にインキュベートする段階、および該免疫エフェクター分子の存在またはレベルによって、被験者が細胞性免疫応答を実行できることが示される、免疫エフェクター分子の存在またはレベルの上昇を測定する段階を含む、被験者におけるCMI応答を測定する方法を企図する。

【0023】

「被験者」という用語には、霊長類、家畜動物（例えば、ヒツジ、ウシ、ブタ、ウマ、ロバ、ヤギ）、実験動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ハムスター）、ペット動物（例えば、イヌ、ネコ）、鳥類（例えば、家禽、飼育されるトリ）、爬虫類、および両生類を含む、ヒトまたはヒト以外の種が含まれる。したがって、本発明は、ヒトでの医薬品において適応を有すると共に、家畜、獣医学および野生動物への適応を有する。しかし、最も好ましくは、被験者はヒトであり、CMI応答アッセイ法は、病原性微生物、ウイルスおよび寄生虫に対する反応性に関してスクリーニングするため、自己免疫状態の発症の可能性またはモニタリングに関して、および腫瘍学的チャレンジに対する被験者の反応をモニターする場合に適応を有する。

【0024】

したがって、この好ましい態様に従って、本発明は、抗原による刺激後に免疫エフェクター分子を産生することができる免疫系の細胞を含む試料をヒト被験者から採取する段階、該試料を抗原と共にインキュベートする段階、および該免疫エフェクター分子の存在またはレベルによって、被験者が細胞性免疫応答を実行できることが示される、免疫エフェクター分子の存在またはレベルの上昇を測定する段階を含む、ヒト被験者におけるCMI応答を測定する方法を提供する。

【0025】

「免疫細胞」という用語には、ナチュラルキラー（NK）細胞、T細胞（CD4⁺および/またはCD8⁺細胞）、B細胞、マクロファージ、および単球を含むリンパ球、樹状細胞、または直接もしくは間接的な抗原刺激に反応してエフェクター分子を産生することができる他の任意の細胞の様な細胞が含まれる。便宜上、免疫細胞はリンパ球、より詳しくはTリンパ球である。

【0026】

免疫エフェクター分子は、抗原による細胞の活性化または刺激に反応して産生される任意の広範囲の分子であってもよい。IFN- γ のようなインターフェロン（IFN）は、特に有用な免疫エフェクター分子であるが、他には、補体または補体系路の成分のような数ある中でも、インターロイキン（IL）、例えばIL-2、IL-4、IL-10、またはIL-12、腫瘍壊死因子 α （TNF- α ）、顆粒球（G）-CSFまたは顆粒球マクロファージ（GM）-CSFのようなコロニー刺激因子（CSF）のような広範なサイトカインが含まれる。

【0027】

したがって、もう一つの好ましい態様において、本発明は、抗原による刺激後にIFN- γ 分子を産生することができる免疫系の細胞を含む試料を被験者から採取する段階、該試料を抗原と共にインキュベートする段階、および該IFN- γ 分子の存在またはレベルによって、被験者が細胞性免疫応答を実行できることが示される、IFN- γ 分子の存在またはレベルの上昇を測定する段階を含む、被験者におけるCMI応答を測定する方法を提供する。

【0028】

ヒトに応用される好ましい態様に関する限り、本発明はさらに、抗原による刺激後にIFN- γ 分子を産生することができる免疫系の細胞を含む試料を被験者から採取する段階、該試料を抗原と共にインキュベートする段階、および該IFN- γ 分子の存在またはレベルによって、被験者が細胞性免疫応答を実行できることが示される、IFN- γ 分子の存在またはレベルの上昇を測定する段階を含む、ヒト被験者におけるCMI応答を測定する方法をさらに

10

20

30

40

50

提供する。

【0029】

被験者から採取した試料は一般的に、採血管に入れられる。採血管には、血液吸引管または他の類似の容器が含まれる。便宜上、試料が全血である場合、採血管はヘパリン処理されている。または、血液を採取した後にヘパリンを試験管に加える。全血が好ましく、最も簡便な試料であるとはいえ、本発明は、リンパ液、脳脊髄液、組織液、ならびに鼻液および肺液のような呼吸液のような、免疫細胞を含む他の試料にも及ぶ。

【0030】

採血管を用いることは、標準的な自動検査システムに適合して、これらは、大規模およびランダムアクセスサンプリングにおける分析を受けやすい。採血管はまた、取り扱い費用を最小限にして、検査時の全血および血漿に対する曝露を減少させ、したがって、検査者がHIVまたはB型肝炎ウイルス(HBV)のような病原体に接触するリスクを減少させる。

10

【0031】

採血管と共にインキュベートする段階を組み合わせることは特に有効で、デキストロースのような試料糖の存在下で細胞をインキュベートする選択的な特徴と同様に、アッセイの感度を増加させる。

【0032】

CMIシステムの細胞は、被験者から血液を採取した後長期間経過すると、全血におけるCMI応答を実行する能力を失い、介入を行わなければ、応答はしばしば、採血後24時間では重度に低下または消失する。労力を省き、特殊なプラスチックウェアを用いることによって、診察室、診療所、外来施設および獣医師の診察室または農場のような診療場所で抗原によるCMI刺激を行うことができる。抗原刺激が終了した後、新鮮で活発な細胞はもはや必要ではない。IFN- γ および他のサイトカインまたは免疫エフェクター分子は血漿中で安定であり、このように、他の感染疾患または他の疾患の診断に用いられる標準的な血清試料と同様に、特殊な条件または迅速な時間を必要とすることなく、試料を保存または輸送することができる。

20

【0033】

インキュベーション段階は、5時間～50時間、より好ましくは5時間～40時間の範囲であってもよく、さらにより好ましくは8時間～24時間またはそのあいだの時間であってもよい。

30

【0034】

したがって、本発明のもう一つの好ましい態様は、被験者から全血試料を採取する段階、全血試料を抗原と共にインキュベートする段階、および該免疫エフェクター分子の存在またはレベルによって、被験者が細胞性免疫を実行できることが示される、IFN- γ のような免疫エフェクター分子の存在またはレベルの上昇を測定する段階を含む、ヒト被験者を含む被験者におけるCMI応答を測定する方法を企図する。

【0035】

一つの好ましい態様において、インキュベーション段階は、デキストロースのような単糖の存在下で行われる。

【0036】

CMIの測定能は、被験者が微生物、ウイルスまたは寄生虫のような病原体による感染に反応する能力、糖尿病のような自己免疫反応を実行する能力、または癌もしくは他の腫瘍状態に対して保護する能力を評価するために重要である。その結果、「被験者におけるCMI応答を測定する」という用語には、感染疾患および自己免疫疾患の免疫学的診断、免疫コンピテンスのマーカー、および内因性および/または外因性抗原に対するT細胞応答の検出(ワクチンの有効性の測定を含む)と共に炎症疾患および癌のマーカーが含まれる。

40

【0037】

本明細書において企図される自己免疫疾患には、中でも円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗磷脂質症候群、自己免疫性アジソン病、多発性硬化症、副腎の自己免疫疾患、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性卵巣炎および睾丸炎、ベーチェット病、水疱性

50

類天疱瘡、心筋症、腹腔スプルー-皮膚炎、慢性疲労症候群（CFIDS）、慢性炎症性脱髄疾患、慢性炎症、多発性ニューロパシー、チャージ-スト劳斯症候群、癰痕性類天疱瘡、CREST症候群、寒冷凝集疾患、クローン病、疱疹状皮膚炎、円板状狼瘡、本態性混合型寒冷グロブリン血症、線維筋痛、糸球体腎炎、グレーブス病、ギラン-バレー、橋本甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、IgAニューロパシー、インスリン依存型糖尿病（I型）、扁平苔癬、狼瘡、メニエール病、混合型結合組織疾患、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋炎、尋常性天疱瘡、悪性貧血、結節性多発動脈炎、多発性軟骨炎、ポリグランキュラー（polyglanular）症候群、リウマチ性多発筋痛、多発筋炎および皮膚筋炎、原発性無 γ グロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、レイノー現象、ライター症候群、リウマチ熱、リウマチ性関節炎、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、スティッフマン症候群、全身性紅斑性狼瘡、タカヤス動脈炎、側頭動脈炎/巨細胞動脈炎、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、血管炎、および白斑が含まれる。

10

【0038】

一般的に、これらの個体において可能性があるまたは実際のCMI応答性を評価することは重要である。

【0039】

意図される他の疾患状態には、炎症性疾患状態が含まれる。

【0040】

本発明によって企図される炎症性疾患状態の例には、損傷または疾患に罹患した組織を保護することを意味する、発赤、腫脹、疼痛、および特定の領域の熱感が起こる疾患および障害が含まれるがこれらに限定されない。本発明の方法を用いて治療することができる炎症疾患には、にきび、アングナ、関節炎、吸収性肺炎、疾患、膿胸、胃腸炎、炎症、腸インフルエンザ、NEC、壊死性全腸炎、骨盤内炎症性疾患、咽頭炎、PID、胸膜炎、喉のひりひりする痛み、発赤、発赤、咽喉炎、胃のインフルエンザ、および尿路感染症、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパシー、慢性炎症性脱髄性多発神経根ニューロパシー、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパシー、慢性炎症性脱髄性多発神経根ニューロパシーが含まれるが、これらに限定されない。

20

【0041】

癌治療も同様にいくぶんCMIに依存する。本明細書において企図される癌には、特殊な異なる細胞へとそれらの細胞が分化することなく、制御されない細胞増殖（例えば、腫瘍の形成）を特徴とする疾患および障害の群が含まれる。そのような疾患および障害には、ABL1癌原遺伝子、AIDS関連癌、聴神経腫、急性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病、腺嚢癌腫、副腎皮質癌、特発性骨髄化生、脱毛、胞状軟部肉腫、肛門癌、血管肉腫、再生不良性貧血、星状細胞腫、毛細管拡張性運動失調、基底細胞癌（皮膚）、膀胱癌、骨癌、腸癌、脳幹神経膠腫、脳およびCNS腫瘍、乳癌、CNS腫瘍、カルチノイド腫瘍、子宮頸癌、小児脳腫瘍、小児癌、小児白血病、小児軟組織肉腫、軟骨肉腫、絨毛膜癌、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、結腸直腸癌、皮膚T細胞リンパ腫、隆起型皮膚線維腫、癒着性の小さい丸い腫瘍、腺管癌、内分泌癌、子宮内膜癌、脳室上皮腫、食道癌、ユーイング肉腫、肝臓外胆管癌、眼癌、眼：黒色腫、網膜芽腫、ファロピー管癌、ファンコーニ貧血、線維肉腫、胆嚢癌、胃癌、消化管癌、消化管カルチノイド腫瘍、尿性器癌、胚細胞腫、妊娠性絨毛性疾患、神経膠腫、婦人科癌、血液悪性疾患、毛細胞白血病、頭頸部癌、肝細胞癌、遺伝性乳癌、組織球症、ホジキン病、ヒト乳頭腫ウイルス、胞状奇胎、高カルシウム血症、下咽頭癌、眼内黒色腫、島細胞癌、カポジ肉腫、腎癌、ランゲルハンス島-組織球症、咽頭癌、平滑筋肉腫、白血病、リ-フラウメニ症候群、口唇癌、脂肪肉腫、肝癌、肺癌、リンパ浮腫、リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、男性乳癌、腎臓の悪性棒状小体腫瘍、髓芽細胞腫、黒色腫、メルケル細胞癌、中皮腫、転移癌、口癌、多発性内分泌新生物、菌状息肉腫、骨髄異形成症候群、骨髄腫、骨髄増殖性障害、鼻腔癌、鼻咽頭癌、腎芽細胞腫、神経芽腫、神経線維腫、神経線維腫症、ナイメーヘン切断症候群、非黒色腫皮膚癌、肺の非小細胞癌（NSCLC）、眼癌、食道癌、口腔癌、口咽頭癌、骨肉腫、小孔卵巣癌、脾臓癌、副鼻腔癌、副甲状腺癌、耳下腺癌、陰茎癌、末梢神経外胚葉腫瘍

30

40

50

、下垂体癌、真正赤血球増加症、前立腺癌、まれな癌および関連癌、腎細胞癌、網膜芽腫、横紋筋肉腫、ロートムンド-トムソン症候群、唾液腺癌、肉腫、シュワン細胞腫、セザリー症候群、皮膚癌、肺小細胞癌（SCLC）、小腸癌、軟組織肉腫、脊髄腫瘍、扁平上皮癌（皮膚）、胃癌、滑膜肉腫、精巣癌、胸腺癌、甲状腺癌、移行上皮癌（膀胱）、移行上皮癌（腎臓、骨盤-/尿管）、絨毛性癌、尿道癌、泌尿器癌、ウロプラキンス、子宮肉腫、子宮癌、膣癌、外陰癌、ワルデンストレーママクログロブリン血症、ウィルムス腫瘍が含まれる。

【0042】

特定の生物、ウイルス、自己抗原、または癌細胞に対して特異的な任意の範囲の抗原を試験してもよい。または、より一般的な物質を用いて細胞性免疫応答の一般的な能力を試験してもよい。後者の例には、ヒト型結核菌（*M. tuberculosis*）および破傷風トキソイドからのPPDが含まれる。しかし、一般的に、如何なるペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質、糖質、糖タンパク質、磷脂質、燐タンパク質、ホスホリポタンパク質、または非タンパク質の化学物質をアッセイ系に用いてもよい。

10

【0043】

上記のように、免疫エフェクター分子の検出は、タンパク質または核酸レベルで行ってもよい。その結果、「免疫エフェクター分子の存在またはレベル」という用語には、直接および間接的なデータが含まれる。例えば、高レベルのIFN- γ mRNAは、IFN- γ のレベルの増加を示す間接的なデータである。

【0044】

免疫エフェクターに対するリガンドは、これらの分子を検出および/または定量するために特に有用である。免疫エフェクターに対する抗体は特に有用である。本明細書において企図されるアッセイの技術は当技術分野で既知であり、これには例えばサンドイッチアッセイ法、ELISA、およびELISpotが含まれる。「抗体」という用語には、抗体の一部、哺乳類化（例えば、ヒト化）抗体、組換え型または合成抗体ならびにハイブリッドおよび一本鎖抗体が含まれる。

20

【0045】

ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体はいずれも、免疫エフェクターまたはその抗原性断片による免疫によって得ることができ、いずれのタイプもイムノアッセイ法に利用することができる。双方のタイプの血清を得る方法は当技術分野で周知である。ポリクローナル抗血清は、あまり好ましくないが、適した実験動物に免疫エフェクターまたはその抗原性断片の有効量を注射すること、動物から血清を採取すること、および任意の既知の免疫吸着技術を用いて特異的血清を単離することによって比較的容易に調製される。この方法によって産生された抗体は実質的に如何なるタイプのイムノアッセイ法においても利用できるが、それらは産物がおそらく不均一であるために一般的にあまり好ましくない。

30

【0046】

イムノアッセイ法においてモノクローナル抗体を用いることは、それらを大量に産生できること、および産物が均一であることから特に好ましい。不死化細胞株と免疫原性調製物に対して感作したリンパ球とを融合することに由来するモノクローナル抗体産生のためのハイブリドーマ細胞株の調製は、当業者に周知の技術によって行うことができる。

40

【0047】

したがって、本発明のもう一つの局面は、試料または試料の少量を免疫エフェクターまたはその抗原性断片に対して特異的な抗体に、抗原-エフェクター複合体を形成するために十分な期間および条件で接触させる段階、および次に該複合体を検出する段階を含む、被験者からの免疫細胞を含む試料において、免疫エフェクターを検出する方法を企図する。

【0048】

試料には全血が含まれる。この方法には、平面または球状の固相支持体上のマイクロアレイおよびマクロアレイが含まれる。マイクロまたはマクロアレイは有用である。

50

【 0 0 4 9 】

米国特許第4,016,043号、第4,424,279号、および第4,018,653号を参照して認められようように、広範囲のイムノアッセイ技術が利用可能である。

【 0 0 5 0 】

以下は、一つのタイプのアッセイ法に関する説明である。非標識抗体を固相基質上に固定して、結合した分子に免疫エフェクターに関して試験すべき試料（例えば、抗原）を接触させる。適した期間、すなわち抗体-抗原複合体の形成を可能にするために十分な期間インキュベートした後、検出可能なシグナルを産生することができるレポーター分子によって標識した抗原特異的二次抗体を加えて、抗体-抗原-標識抗体のもう一つの複合体の形成をさせるために十分な期間インキュベートする。如何なる未反応材料も洗浄して除去して、抗原の有無をレポーター分子によって産生されたシグナルの観察によって決定する。結果は、肉眼的なシグナルを単に観察することによって定性的であってもよく、または既知量の抗原を含む対照試料と比較することによって定量的であってもよい。この一般的な技術は、任意の多くの改変と同様に当業者に周知である。

10

【 0 0 5 1 】

これらのアッセイ法において、本発明の免疫エフェクターに対して特異性を有する第一の抗体は固相表面に共有結合させるか、または受動的に結合させる。固相表面は典型的にガラスまたはポリマーであり、最も一般的に用いられるポリマーは、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、またはポリプロピレンである。固相支持体は、管、ビーズ、球体、マイクロプレートのディスク、またはイムノアッセイ法を行うために適した任意の他の表面の形であってもよい。結合プロセスは、当技術分野で周知であり、一般的にクロスリンク、共有結合、または物理的に吸着することからなり、ポリマー-抗体複合体は、試験試料に関して調製する際に洗浄される。試験すべき試料の少量を固相複合体に加えて、抗体中に存在する如何なるサブユニットも結合させるために十分な時間（例えば、2～120分またはより都合がよければ一晚）および適した条件（例えば、約20～約40℃）でインキュベートする。インキュベーション期間の後、抗体サブユニット固相を洗浄して、乾燥させ、抗原の一部に対して特異的な二次抗体と共にインキュベートする。二次抗体を、ハプテンに対する二次抗体の結合を示すために用いられるレポーター分子に結合させる。

20

【 0 0 5 2 】

このアッセイ法には多くの改変が存在する。特に有用な一つの改変は、全てまたは多くの成分を実質的に同時に混合する同時アッセイ法である。

30

【 0 0 5 3 】

本明細書において用いられるように「レポーター分子」とは、その化学的特性によって、抗原結合抗体の検出を可能にする分析的に同定可能なシグナルを提供する分子を意味する。検出は、定性的または定量的のいずれであってもよい。このタイプのアッセイ法において最も一般的に用いられるレポーター分子は、酵素、蛍光体、または放射性核種を含む分子（すなわち、放射性同位元素）、および化学発光分子である。適した蛍光体の例を表2に提供する。酵素イムノアッセイ法の場合、一般的にグルタルアルデヒドまたは過ヨウ素酸塩によって酵素を二次抗体に結合させる。しかし、容易に認識されるように、広範な異なる結合技術が存在し、これらは当業者に容易に利用可能である。一般的に用いられる酵素には、中でも西洋ワサビペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、およびアルカリホスファターゼなどが含まれる。特定の酵素と共に用いられる基質は一般的に、対応する酵素によって加水分解された場合に検出可能な色の変化を有する産物に関して選択される。適した酵素の例には、アルカリホスファターゼおよびペルオキシダーゼが含まれる。上記の色素産生基質よりむしろ蛍光産物を生じる蛍光原基質を用いることも同様に可能である。全ての場合において、酵素標識抗体を一次抗体-抗原複合体に加えて、結合させ、次に過剰な試薬を洗浄して除去する。適当な基質を含む溶液を抗体-抗原-抗体の複合体に加える。基質は、二次抗体に結合した酵素に反応して、定性的に可視シグナルを生じ、これを通常分光光度法によってさらに定量して試料中に存在した抗

40

50

原量の指標を得てもよい。この場合も、本発明は、実質的に同時アッセイ法に拡大される。

【 0 0 5 4 】

または、フルオレセインおよびローダミンのような蛍光化合物を、その結合能を変化させることなく抗体に化学的に結合させてもよい。特定の波長の光による照明によって活性化されると、蛍光色素標識抗体は光のエネルギーを吸収して、分子において励起状態を誘導し、その後光学顕微鏡によって視覚的に検出可能な特徴的な色の光を放出する。蛍光標識抗体を、一次抗体-抗原複合体に結合させる。未結合試薬を洗浄して除去後、残っている三次複合体を適当な波長の光に露出すると、認められた蛍光は対象抗原が存在することを示している。免疫蛍光およびEIA技術はいずれも当技術分野において非常に十分に確立

10

【 0 0 5 5 】

金コロイドを含む、用いてもよい広範な他の検出系が存在し、そのような検出系は全て本発明に含まれる。

【 0 0 5 6 】

本発明はまた、免疫エフェクターをコードする遺伝子配列のRNA発現産物を検出するためにPCR分析を含むような遺伝子アッセイ法も企図する。

【 0 0 5 7 】

一つの態様において、PCRは、その一つまたは双方が一般的に、識別可能なシグナルを発生することができる同じまたは異なるレポーター分子によって標識されるプライマー対を用いて行われる。蛍光体を用いることは、本発明の実践において特に有用である。適した蛍光体の例は、表2に記載の一覧から選択してもよい。他の標識には、発光および燐光と共に赤外線色素が含まれる。これらの色素または蛍光体も同様に抗体のレポーター分子として用いてもよい。

20

【 0 0 5 8 】

(表 2) 適した蛍光体の一覧

プローブ	Ex ¹ (nm)	Em ² (nm)
反応性および結合性プローブ		
ヒドロキシクマリン	325	386
アミノクマリン	350	455
メトキシクマリン	360	410
カスケードブルー	375; 400	423
ルシファーイエロー	425	528
NBD	466	539
R-フィコエリスリン (PE)	480; 565	578
PE-Cy5 結合体	480; 565; 650	670
PE-Cy7 結合体	480; 565; 743	767
APC-Cy7 結合体	650; 755	767
赤色 613号	480; 565	613
フルオレセイン	495	519
フルオX (FluorX)	494	520
BODIPY-FL	503	512
TRITC	547	574
X-ローダミン	570	576
リッサミンローダミン B	570	590
ペル CP (PerCP)	490	675
テキサスレッド	589	615
アロフィコシアニン (APC)	650	660
トルレッド (TruRed)	490, 675	695
アレクサフルオ (Alexa Fluor) 350	346	445
アレクサフルオ (Alexa Fluor) 430	430	545
アレクサフルオ (Alexa Fluor) 488	494	517
アレクサフルオ (Alexa Fluor) 532	530	555
アレクサフルオ (Alexa Fluor) 546	556	573
アレクサフルオ (Alexa Fluor) 555	556	573
アレクサフルオ (Alexa Fluor) 568	578	603
アレクサフルオ (Alexa Fluor) 594	590	617
アレクサフルオ (Alexa Fluor) 633	621	639
アレクサフルオ (Alexa Fluor) 647	650	688
アレクサフルオ (Alexa Fluor) 660	663	690
アレクサフルオ (Alexa Fluor) 680	679	702
アレクサフルオ (Alexa Fluor) 700	696	719
アレクサフルオ (Alexa Fluor) 750	752	779
Cy2	489	506
Cy3	(512); 550	570; (615)
Cy3,5	581	596; (640)
Cy5	(625); 650	670
Cy5,5	675	694

10

20

30

40

プローブ	Ex ¹ (nm)	Em ² (nm)
Cy7	743	767
核酸プローブ		
ヘキスト 33342	343	483
DAPI	345	455
ヘキスト 33258	345	478
SYTOX ブルー	431	480
クロモマイシン A3	445	575
ミスラマイシン	445	575
YOYO-1	491	509
SYTOX グリーン	504	523
SYTOX オレンジ	547	570
臭化エチジウム	493	620
7-AAD	546	647
アクリジンオレンジ	503	530/640
TOTO-1, TO-PRO-1	509	533
チアゾールオレンジ	510	530
ヨウ化プロピジウム (PI)	536	617
TOTO-3, TO-PRO-3	642	661
LDS 751	543; 590	712; 607
蛍光タンパク質		
Y66F	360	508
Y66H	360	442
EBFP	380	440
野生型	396, 475	50, 503
GFPuv	385	508
ECFP	434	477
Y66W	436	485
S65A	471	504
S65C	479	507
S65L	484	510
S65T	488	511
EGFP	489	508
EYFP	514	527
Ds レッド (DsRed)	558	583
その他のプローブ		
モノクロロバイメイン	380	461
カルセイン	496	517

1 Ex : 最大励起波長 (nm)

2 Em : 最大放出波長 (nm)

【 0 0 5 9 】

蛍光の放出を分析する如何なる適した方法も本発明に含まれる。この点において、本発明は、例えばLakowiczら、Biophys. J. 72 : 567、1997に開示されるような2光子および3光子時間分解蛍光分光法、例えばErikssonら、Biophys. J. 2 : 64、1993に開示されるような蛍光寿命画像、および例えばYouvanら、Biotechnology et alia 3 : 1~18、1997に開示されるような蛍光共鳴エネルギー転移が含まれるがこれらに限定されない技術を企図する。

【 0 0 6 0 】

発光および燐光はそれぞれ、当技術分野で既知の適した発光または燐光標識に由来してもよい。そのような標識を同定する如何なる光学的手段もこの点において用いてもよい。

10

20

30

40

50

【0061】

赤外線放射は、適した赤外線色素に由来してもよい。本発明において用いてもよい例としての赤外線色素には、Lewisら、Dyes Pigm 42(2) : 197、1999、Tawaら、Mater. Res. Soc. Symp. Proc. 488[Electrical, Optical, and Magnetic Properties of Organic Solid-State Materials IV]、885~890、Daneshvarら、J. Immunol. Methods 226(1~2) : 119~128、1999、Rapaportら、Appl. Phys. Lett. 74(3) : 329~331、1999およびDurigら、J. Raman Spectrosc. 24(5) : 281~285、1993に開示される色素が含まれるがこれらに限定されない。任意の適した赤外線分光法を用いて、赤外線色素に信号を送ってもよい。例えば、Rahmanら、J. Org. Chem. 63 : 6196、1998に記述されるフーリエ変換赤外線分光光度法をこの点において用いてもよい。

10

【0062】

適切には、電磁散乱は、光およびX線を含む入射電磁放射線の回折、反射、偏光、または屈折に由来してもよい。そのような散乱を用いて、mRNAレベルまたはタンパク質レベルを定量することができる。

【0063】

フローサイトメトリーは、蛍光体の放射を分析するために特に有用である。

【0064】

当技術分野で既知であるように、フローサイトメトリーは、液体の流れに浮遊させた粒子（例えば、標識mRNA、DNAまたはタンパク質）が一つまたはそれ以上のレーザービームの光路を通過する際の粒子の物理的および化学的特徴を迅速に分析することを含むハイスループット技術である。それぞれの粒子がレーザービームを横切ると、それぞれの細胞または粒子から放出される散乱光および蛍光が検出されて、例えば後述するような任意の適した追跡アルゴリズムを用いて記録される。

20

【0065】

最近のフローサイトメーターは、これらの作業を細胞100,000個/粒子 s^{-1} まで行うことができる。フィルターおよび二色性ミラーの光学的アレイを用いることによって、異なる波長の蛍光を分離して同時に検出することができる。さらに、異なる励起波長の多くのレーザーを用いてもよい。したがって、多様な蛍光体を用いて、例えば試料内の異なる免疫エフェクターまたは多数の被験者からの免疫エフェクターを標的として調べることができる。

30

【0066】

本発明の方法において用いてもよい適したフローサイトメーターには、一つの励起レーザー、一般的にその488 nmスペクトル線において15 mWで操作するアルゴンイオン空冷レーザーを用いて、光学パラメータ5~9個を測定する機器が含まれる（表3参照）。より進歩したフローサイトメーターは、アルゴンイオンレーザー（488 nmまたは514 nm）の他に、HeNeレーザー（633 nm）またはHeCdレーザー（325 nm）のような多数の励起レーザーを用いることができる。

【0067】

（表3）フローサイトメーターによって測定され得る例示的な光学パラメータ

パラメータ	頭字語	入射レーザービーム の検出角度	波長 (nm)
前方散乱光	FS	2-5°	488*
側方散乱光	SS	90°	488*
「緑色」蛍光	FL1	90°	510-540†
「黄色」蛍光	FL2	90°	560-580†
「赤色」蛍光	FL3	90°	>650#

40

* 488 nm励起レーザーを用いる

† 帯域フィルターの幅

ロングパスフィルター

50

【0068】

例えば、Biggsら、Cytometry 36: 36~45、1999は、粒子の免疫表現型を調べる（すなわち分類する）目的で、三つの励起レーザーを用いて11-パラメータのフローサイトメーターを構築して、前方および側方散乱測定の外に識別可能な蛍光体9個を用いることを示した。現在市販のパラメータの最大数は17である：前方散乱、側方散乱、およびそれぞれが蛍光検出器5個を備えた励起レーザー3個。パラメータの全てを適切に用いることができるか否かは、吸光係数、量子収量、および全ての蛍光体のあいだでのスペクトルの重複量に強く依存する（Malemedら、「Flow cytometry and sorting」、第二版、ニューヨーク州、Wiley-Liss、1990）。しかし、本発明は、如何なる特定のフローサイトメーターまたは如何なる特定の組のパラメータに限定されないと理解されるであろう。この点において、本発明はまた、通常のフローサイトメーターの代わりに、例えばFuら、Nature Biotechnology 17: 1109~1111、1999によって開示される小型フローサイトメーターを用いることを企図する。

10

【0069】

本発明のアッセイ法は、ハイスループットスクリーニングのために、または被験者1人から多数の免疫エフェクターに関してスクリーニングするために、自動または半自動であってもよい。自動化は、コンピューターソフトウェアによって簡便に制御される。

【0070】

したがって、本発明は、製品が以下を含む、一つまたはそれ以上の免疫エフェクターの存在、非存在、またはレベルを評価するためのコンピュータープログラム製品を企図する

20

- (1) 標識 mRNA または抗体に関連するレポーター分子の同一性を入力値として受信するコード；
- (2) レポーター分子のレベルおよび / またはレポーター分子が結合している分子の同一性を決定するために、該入力値を参照値と比較するコード；および
- (3) コードを保存するコンピューター読み取り可能な媒体。

【0071】

本発明のなもう一つの局面は、コンピューターが以下を含む、一つまたはそれ以上の免疫エフェクターの存在、非存在、またはレベルを評価するためのコンピューターに拡大される：

30

- (1) 機械読み取り可能なデータが標識 mRNA または抗体に関連したレポーター分子を同定する入力値を含む、機械読み取り可能なデータをコードするデータ保存材料を含む機械読み取り可能なデータ保存媒体；
- (2) 機械読み取り可能なデータを処理する説明書を保存するための作業メモリ；
- (3) レポーター分子またはそれが結合する分子の同一性またはレベルの評価を提供するために該値と比較するため、該機械読み取り可能なデータを処理するための、該作業メモリおよび機械読み取り可能なデータ保存媒体に共役させた中央処理装置；および
- (4) 比較の結果を受信するための該中央処理装置に共役させた出力ハードウェア。

【0072】

これらの態様のバージョンを図1に示し、中央処理装置（「CPU」）20、例えばRAM（ランダムアクセスメモリ）または「コア」メモリであってもよい作業メモリ22、マストレージメモリ24（一つまたはそれ以上のディスク装置またはCD-ROMドライブのような）、一つまたはそれ以上のブラウン管（「CRT」）ディスプレイ端末26、一つまたはそれ以上のキーボード28、一つまたはそれ以上の入力ライン30、および一つまたはそれ以上の出力ライン40を含み、これら全てが通常の双方向システムバス50によって接続されている、コンピューター11を含むシステム10を示す。

40

【0073】

入力ライン30によってコンピューター11に接続された入力ハードウェア36は、多様な方法で実行してもよい。例えば、本発明の機械読み取り可能なデータを、電話線または専用データライン34によって接続したモデムまたは複数のモデム32を用いることによって入力

50

してもよい。またはもしくはさらに、入力ハードウェア36は、CDを含んでもよい。または、ディスプレイ端末26、キーボード28に接続したROMドライブまたはディスクドライブ24を入力装置として用いてもよい。

【0074】

出力ライン40によってコンピューター11に接続した出力ハードウェア46も同様に、通常の装置によって実行してもよい。例として、出力ハードウェア46には、本発明に記述の合成ポリヌクレオチド配列または合成ポリペプチド配列を表示するためのCRTディスプレイ端末26が含まれてもよい。出力ハードウェアにはまた、ハードコピー出力を生じるプリンター42、または後に使用するためのシステム出力を保存するためのディスクドライブ24が含まれてもよい。

10

【0075】

操作にあたって、CPU 20は、様々な入力および出力装置36, 46を用いることを統合して、マストレージ24からのデータアクセスならびに作業メモリ22へのおよび作業メモリからのアクセスを統合し、そしてデータ処理段階の順序を決定する。多くのプログラムを用いて、本発明の機械読み取り可能なデータを処理してもよい。例としてのプログラムは、例えば以下の段階を用いてもよい：

- (1) 標識 mRNA または抗体に関連したレポーター分子を同定する入力値を入力する段階；
- (2) レポーター分子のレベルおよび / またはレポーター分子が結合した分子の同一性を決定するために、該入力値を参照値と比較することを含むアクセスする段階；および
- (3) 評価の結果を出力する段階。

20

【0076】

図2は、図1のシステム10のようなシステムによって行うことができる免疫エフェクターのレベルを評価するために、機械読み取り可能なデータ、または一連の説明書をコードすることができる磁気データ保存媒体100の断面を示す。媒体100は、通常であってもよい適した基板101、およびその極性または方向性が磁氣的に変化する磁気ドメイン（肉眼では見えない）を含む、通常であってもよい適したコーティング102を片面または両面に有する通常のフロッピーディスクまたはハードディスクとなりうる。媒体100は、ディスクドライブまたは他のデータ保存装置24の軸を受ける開口部を有してもよい。媒体100のコーティング102の磁気ドメインは、通常であってもよいように、図1のシステム10のようなシステムによって実行されるための機械読み取り可能なデータをコードするために偏光または方向性を有する。

30

【0077】

図3は、図1のシステム10のようなシステムによって実行することができる本発明の合成分子を設計するために、そのような機械読み取り可能なデータまたは一連の説明書をコードすることができる光学的に読み取り可能なデータ保存媒体110の断面を示す。媒体110は、通常のコンパクトディスク読み取り専用メモリ（CD-ROM）または光学的に読み取り可能で磁気光学的に書き込み可能な磁気光学ディスクのような書き換え可能媒体となりうる。媒体100は、好ましくは通常であってもよい適した基板111、および通常、基板111の片面に存在する通常であってもよい適したコーティング112を有する。

【0078】

CD-ROMの場合、周知であるように、コーティング112は、反射性であり、機械読み取り可能なデータをコードするために複数のピット113が刻まれている。ピットの配列はコーティング112の表面から反射するレーザー光によって読み取られる。好ましくは実質的に透明である保護コーティング114を、コーティング112の上部に提供する。

40

【0079】

本発明はさらに、被験者が細胞性応答を実行する能力を評価するためのキットを企図する。キットは通常、全血のような被験者からの試料を入れる一つまたはそれ以上の区画を有する区画された形である。その区画またはもう一つの区画はまた、試料がデキストロースのような単糖を含むまたは含まない全血である場合にヘパリンを含むように適合させてもよい。単糖は、異なる容器において維持してもよい。

50

【0080】

一般的に、キットは、一連の説明書と共に販売用に包装されている形である。説明書は一般的に、抗原による刺激後に免疫エフェクター分子を産生することができる免疫系の細胞を含む試料を被験者から採取する段階、該試料を抗原と共にインキュベートする段階、および該免疫エフェクター分子の存在またはレベルによって、該被験者が細胞性免疫応答を実行できることが示される、免疫エフェクター分子の存在またはレベルの上昇を測定する段階を含む、被験者におけるCMI応答を測定するための方法の形であろう。

【0081】

本発明はさらに、被験者におけるCMI応答を測定する方法によって被験者が細胞性免疫応答を実行する能力を評価することを含み、抗原による刺激後に免疫エフェクター分子を産生することができる免疫系の細胞を含む試料を被験者から採取する段階、該試料を抗原と共にインキュベートする段階、該免疫エフェクター分子の存在またはレベルによって、該被験者が細胞性免疫応答を実行できることが示される、免疫エフェクター分子の存在またはレベルの上昇を測定する段階、および適切な治療プロトコルを選択する段階を含む、病原体感染症、自己免疫障害、もしくは癌、またはそのような障害を発症する性向を有する被験者を治療する方法を提供する。

10

【0082】

本発明を、以下の非制限的な実施例によってさらに説明する。

【0083】

実施例1

20

アッセイ法の開発

ヘパリン添加血液試料を、同意を得たボランティアまたはドナーから採取した。血液試料は、Vacuette（登録商標）管（グライナー・バイオワン（Greiner Bio-one）、ドイツ）に採取した。

【0084】

血液の少量を、多くの異なる大きさの採血管のみならず、ウシ全血IFN- γ 試験（Bovigam（登録商標）、CSLリミテッド）またはヒトQuantiferon（登録商標）試験（セレスティスリミテッド（Cellestis Limited）、オーストラリア）の製造元によって推奨される標準的な24ウェル組織培養プレートにおいて、ヒト型結核菌タンパク質誘導体（PPD、セレスティスリミテッド、オーストラリア）、破傷風トキソイド（CSLリミテッド、オーストラリア）、フィトヘマグルチニン（セレスティスリミテッド、オーストラリア）、または生理食塩液対照と共にインキュベートした。

30

【0085】

いくつかの実験において、インキュベーションを開始する前にデキストロースを様々な濃度で血液に加えた。

【0086】

抗原刺激した血液試料を37℃で16～24時間インキュベートした後、上記の沈降した血球から血漿を採取した。それぞれの血漿試料中に存在するIFN- γ の量を、製造元の説明書どおりにQuantiferon-TB（登録商標）ELISA（セレスティスリミテッド、オーストラリア）を用いて定量した。破傷風トキソイド抗原によって刺激した試料および生理食塩液対照も同様に、製造元の説明書どおりにIFN- γ に関するより感度の高いELISA（Quantiferon-CMI；セレスティスリミテッド、オーストラリア）を用いて調べた。

40

【0087】

それぞれのELISAプレート上で行ったIFN- γ 標準物質に関するELISAの吸光度の値を用いて、標準曲線を作製して、そこから各試験血漿試料に存在するIFN- γ の量をIU/mlの値に変換した。

【0088】

実施例2

抗原と共に培養する前の血液へのデキストロース添加効果の評価

血液試料2例をボランティアから採取して、24ウェル組織培養プレートの個々のウェル

50

に1 mlを8個加えた。Quantiferon-TB試験に提供された抗原4個、生理食塩液対照（Nil）、ヒト型結核菌PPD（Hu PPD）、トリ型結核菌PPD（Av PPD）およびフィットヘマグルチニン（マイトゲン）を、血液を含むウェル1試料あたり2個ずつに加えた。1試料2個のウェルの1組に、デキストロースを最終濃度2 mg/mlで加えた。プレートを1分間振とうさせてから、湿潤大気中で37℃で20時間インキュベートした。血漿試料を採取して、IFN-γ濃度をQuantiferon-TB（登録商標）ELISAを用いて定量した。

【0089】

データは、抗原と共にインキュベートする前に血液にデキストロースを加えると、PPD抗原（表4）のいずれかによって刺激した場合にIFN-γ産生の増加（1.4～2.2倍）が起ることを証明している。対照的に、生理食塩液陰性対照によって刺激した血液にデキストロースを加えてもIFN-γの増加を検出しなかった。マイトゲンによって刺激した血液試料に関して、ドナーの1人に関して検出されたIFN-γのわずかな増加を認め、他のドナーではわずかな減少を認めた。

10

【0090】

（表4）それぞれの血漿試料に関して認められたIFN-γの濃度IU/ml
血液を濃度2 mg/mlでデキストロース添加または非添加で抗原によって刺激した。

		刺激抗原		
		HuPPD	AvPPD	マイトゲン
ドナー1	- デキストロース	96.20	54.68	28.67
	+ デキストロース	142.25	76.50	25.71
デキストロースによる増加倍率		1.48	1.40	0.90
ドナー2	- デキストロース	71.34	31.55	108.72
	+ デキストロース	134.47	67.62	122.76
デキストロースによる増加倍率		1.88	2.14	1.13

20

【0091】

実施例3

採血管と24ウェル組織培養プレートとにおける、抗原と共に血液をインキュベートする効果の決定

30

血液バンクドナー15人からのヘパリン添加血液を、Quantiferon-TB（登録商標）キットに供給されたHuPPD溶液125 μlを含む24ウェルプレートとVacuette（登録商標）管の双方に分配した。24ウェルプレートを1分間振とうさせて、20秒間攪拌して混合してから湿潤大気において37℃で20時間インキュベートした。翌日、血漿試料を各インキュベーションウェルおよび管から採取して、IFN-γの相対量をQuantiferon-TB（登録商標）ELISAを用いて推定した。

【0092】

表5は、全ての血液試料に関して、採血管においてインキュベートした試料に関して検出されたIFN-γの量が増加したことを示す。この増加は、24ウェルプレートにおいて産生されたIFN-γの量の1.1倍～16.3倍の範囲であり、増加の平均値は4.7倍であった。IFN-γ産生の増加がより小さい血液試料は一般的に、HuPPDに対して非常に低いレベルの反応を示す血液試料であった。

40

【0093】

（表5）24ウェル組織培養プレートまたは2 ml採血管のいずれかにおいてHuPPDと共にインキュベートした血液試料1 mlから検出されたIFN-γの量

ドナー	HuPPD 24ウェル(対照)	HuPPD 採血管	増加倍率 (管/24ウェル)
1	0.025*	0.044	1.8
2	0.056	0.765	13.7
3	0.230	0.852	3.7
4	0.069	0.428	6.2
5	0.034	0.058	1.7
6	0.084	0.135	1.6
7	1.196	0.725	3.7
8	0.030	0.215	7.2
9	0.087	1.422	16.3
10	0.032	0.057	1.8
11	0.029	0.032	1.1
12	0.037	0.138	3.7
13	0.036	0.057	1.6
14	0.067	0.121	1.8
15	0.292	0.213	4.2
平均増加倍率			4.7

10

20

* 吸光度 @ 450/620 nm

【0094】

実施例4

採血管において抗原と共に血液をインキュベートした効果-2

30

ヘパリン添加血液20例を血液バンクドナーから得て、1 mlずつを24ウェル組織培養トレーの個々のウェル3個に分配した。それぞれのウェルに、125 μ lの生理食塩液、HuPPD、またはマイトゲンを加えた。振とうさせた後、培養トレーを湿潤大気において37℃で20時間インキュベートしてから血漿試料を採取した。

【0095】

血液1 mlを、上記と同じ抗原を予め加えたVacurette(登録商標)管(グライナー・バイオワン、ドイツ)に1試料あたり2本ずつ加えた。キャップをした管をボルテックスミキサーによって20秒間混合して、37℃で20時間インキュベートした後、血漿試料を採取した。

【0096】

血漿試料は全て、標準的なQuantiferon-TB(登録商標)ELISAシステムを用いてIFN- γ 含有量に関して試験した。検出閾値はこのELISAシステムにおいて2 IU/mlであった。

40

【0097】

表6に示すデータは、ヒトPPDによって刺激した血液試料に関して、24ウェル組織培養プレートよりむしろ採血管において、血液のインキュベーションを行った場合に検出されたIFN- γ に増加を認めたことを示している。ドナー血液試料20例中5例では、組織培養プレートまたは採血管のいずれかにおいてPPD抗原に対する反応は無視できる程度であった。残りの血液試料15例に関して、12例は管内インキュベーションによってIFN- γ の増加を認めたが、1例は変化せず、2例は減少を示した。

【0098】

タンパク質抗原HuPPDに関する結果とは対照的に、マイトゲンであるフィトヘマグルチ

50

ニンの存在下で採血管において血液をインキュベートすると、一般的に24ウェルプレートにおいてインキュベートした同じ試料について認められた場合よりIFN- γ 産生レベルは低くなった。そのような差は、抗原 / 抗原提示細胞 / T細胞相互作用によって刺激された免疫メカニズムと比較して、直接作用するマイトゲンによって誘導されたT細胞刺激の異なるメカニズムによると期待される可能性がある。

【0099】

(表6) 24ウェル組織培養プレートまたは採血管のいずれかにおいてHuPPDまたはマイトゲンと共にインキュベートした血液試料1 mlから検出されたIFN- γ の量

ドナー	ヒト PPD 24- ウェル	ヒト PPD 管	管 /24- ウェル	マイトゲン 24ウェル	マイトゲン 管	管 /24- ウェル
1	*3.32	1.79 ⁺	NA	7.69	3.52	0.46
2	52.52	93.05	1.77	83.34	61.94	0.74
3	20.46	51.87	2.54	1.13	13.13	NA
4	2.02	7.72	3.82	10.04	7.95	0.79
5	71.19	120.82	1.70	6.85	3.45	0.05
6	3.55	4.11	1.16	12.32	13.32	1.08
7	0.00	0.09	NA	8.77	5.29	0.60
8	3.05	4.61	1.51	76.98	68.58	0.89
9	22.55	54.33	2.41	65.02	47.53	0.73
10	21.79	13.06	0.60	8.14	5.80	0.71
11	5.86	13.47	2.30	-0.56	-0.79	NA
12	3.63	6.53	1.80	21.79	16.34	0.75
13	28.62	28.77	1.01	30.58	22.52	0.74
14	2.67	10.52	3.93	28.26	19.16	0.68
15	0.43	0.51	NA	8.10	5.71	0.71
16	39.90	118.11	2.96	2.75	1.88	NA
17	7.57	4.47	0.59	6.14	3.55	0.58
18	1.77	1.91	NA	14.05	9.07	0.65
19	2.59	5.63	2.17	2.46	7.91	3.22
20	0.68	0.27	NA	11.80	8.73	0.74
	平均増加倍率		2.02	平均増加倍率		0.73

NA 24ウェルプレートまたは管のいずれかに関して、2 IU/ml未満は、IFN- γ 検出に関して適用できない。

* それぞれの生理食塩液陰性対照の値を差し引いた後のIU/mlでのIFN- γ の濃度

+ 1試料あたり管2本からの結果の平均値

【0100】

表7は、24ウェルおよび管内でのインキュベーションの双方からの生理食塩液対照試料に関するELISA吸光度の値(450/620 nm)を示す。データは、血液を採血管においてインキュベートした場合に陰性対照値が増加しなかったことを示している。したがって、HuPPDに反応して産生されたIFN- γ の量が増加して、バックグラウンドのIFN- γ 反応が増加しなかったことから、管内インキュベーションに関するシグナル対ノイズ比は、標準的な24ウェルインキュベーション法に関して認められた場合より有意に高い。

【0101】

(表7) 24ウェル組織培養プレートまたはL採血管のいずれかにおいて生理食塩液と共にインキュベートしてQuantiferon-TB(登録商標)ELISAを用いて定量した血液試料1 mLのIFN- γ 反応のバックグラウンド(OD@450/620 nm)

ドナー	24ウェル	管 A	管 B	管の平均値	24ウェル管の平均値
1	0.024	0.023	0.027	0.025	-0.001
2	0.02	0.02	0.023	0.022	-0.002
3	0.033	0.024	0.025	0.025	0.009
4	0.026	0.026	0.023	0.025	0.002
5	0.021	0.021	0.022	0.022	0.000
6	0.069	0.063	0.060	0.062	0.008
7	0.024	0.022	0.023	0.023	0.002
8	0.023	0.025	0.039	0.032	-0.009
9	0.021	0.021	0.021	0.021	0.000
10	0.021	0.024	0.021	0.023	-0.002
11	0.022	0.026	ND	0.026	-0.004
12	0.023	0.024	0.022	0.023	0.000
13	0.017	0.018	0.017	0.018	-0.001
14	0.018	0.021	0.021	0.021	-0.003
15	0.019	0.020	ND	0.020	-0.001
16	0.017	0.016	0.021	0.019	-0.002
17	0.017	0.015	0.016	0.016	0.002
18	0.02	0.018	0.018	0.018	0.002
19	0.02	0.019	0.021	0.020	0.000
20	0.018	0.020	0.018	0.019	-0.001
24ウェル管のODの平均値					0.000

10

20

【0102】

実施例5

デキストロース添加および非添加で採血管において破傷風トキソイドと共に血液をインキュベートする効果

ヘパリン添加血液20例を血液バンクドナーから採取して、1 mlずつを24ウェル組織培養トレーの個々のウェル3個に分配した。それぞれのウェルに、125 μ lの生理食塩液、破傷風トキソイド、または破傷風トキソイド+デキストロースを加えた。混合した後、培養ト

30

【0103】

血液1 mlを、上記と同じ抗原を予め加えたVacuette（登録商標）管（グライナー・バイオワン、ドイツ）に加えた。キャップをした管をボルテックスミキサーによって20秒間混合して、37 で20時間インキュベートした後、血漿試料を採取した。

【0104】

生理食塩液対照、破傷風トキソイド、および破傷風類毒素+デキストロースによって刺激した血液からの試料を、検出閾値が0.05 IU/mlである感度の高いQuantiferon-CMI ELISAを用いて試験した。結果から、24ウェル組織培養トレーと比較すると、採血管では、破傷風トキソイドと共にインキュベートしておいた血液に関して、検出されたIFN- γ の量が生理食塩液対照に関する値を超えて平均で4.5倍増加したことが示される（表8）。その上、破傷風トキソイドおよびデキストロースを含む管からの結果は、24ウェルトレーと比較してIFN- γ 産生に7.8倍より大きい増加を示した（表8）。

40

【0105】

（表8）

24ウェル組織培養プレートまたは採血管のいずれかにおいてデキストロース添加または非添加で破傷風トキソイドと共にインキュベートした血液試料1 mlから検出されたIFN- γ の量（IU/ml）

ドナー	24ウェル	管	管+デキストロース	破傷風トキソイド	破傷風トキソイド +デキストロース
				管/24ウェル	管/24ウェル
1	1.58	1.34	7.15	0.85	4.53
2	12.345	22.15	23.29	1.79	1.89
3	0.118	0.38	0.55	3.22	4.64
4	0.406	4.20	3.04	10.34	7.50
5	0.38	2.85	5.26	7.50	13.84
6	13.66	17.96	20.80	1.31	1.52
7	0.406	1.86	1.98	4.59	4.87
8	0.337	1.10	3.25	3.26	9.65
9	26.488	29.92	28.69	1.13	1.08
10	0.074	0.10	0.35	1.28	4.68
11	0.015	0.11	0.09	7.40	5.67
12	0.843	4.43	12.56	5.26	14.90
13	1.703	9.15	20.91	5.37	12.28
14	0.777	6.46	3.45	8.31	4.44
15	0.258	2.31	8.75	8.96	33.92
16	5.528	28.08	27.13	5.08	4.91
17	0.092	0.09	0.18	1.00	1.94
18	0.323	2.05	5.14	6.35	15.92
19	4.162	28.39	29.22	6.82	7.02
20	3.587	1.54	5.50	0.43	1.53
平均増加倍率				4.51	7.84

10

20

30

【 0 1 0 6 】

表9は、高感度の IFN- γ ELISAを用いて調べた場合の、24ウェルおよび管内インキュベーションの双方からの生理食塩液対照試料に関して検出された IFN- γ の量 (IU/ml) を示す。データから、血液を採血管においてインキュベートした場合に陰性対照値がわずかに減少したことが示されている。したがって、破傷風トキソイドに反応して産生された IFN- γ の量が増加して、バックグラウンド IFN- γ 反応がわずかに減少することから、管内インキュベーションの場合のシグナル対ノイズ比は、標準的な24ウェルインキュベーション法に関して認められた場合より有意に高い。

【 0 1 0 7 】

(表9) 24ウェル組織培養プレートまたは採血管のいずれかにおいて生理食塩液と共にインキュベートして高感度の IFN- γ ELISAを用いて試験した血液試料1 mlからのバックグラウンド IFN- γ 反応 (IU/ml)

ドナー	24 ウェル	管 A	管 B	管の平均値	24ウェル管の平均値
1	0.166	0.137	0.137	0.137	0.029
2	0.039	0.038	0.028	0.033	0.006
3	0.044	0.010	0.016	0.013	0.031
4	0.030	0.025	0.028	0.027	0.004
5	0.029	0.024	0.024	0.024	0.005
6	0.571	0.539	0.568	0.554	0.018
7	0.030	0.029	0.029	0.029	0.001
8	0.044	0.020	0.017	0.019	0.026
9	0.085	0.067	0.067	0.067	0.018
10	0.041	0.030	0.032	0.031	0.010
11	0.026	0.030	ND	0.026	0.000
12	0.024	0.026	0.022	0.024	0.000
13	0.043	0.032	0.032	0.032	0.011
14	0.036	0.032	0.036	0.034	0.002
15	0.034	0.030	ND	0.015	0.019
16	0.045	0.034	0.038	0.036	0.009
17	0.043	0.034	0.036	0.035	0.008
18	0.038	0.043	0.043	0.043	-0.005
19	0.045	0.031	0.027	0.029	0.016
20	0.074	0.029	0.036	0.033	0.042
24ウェル管のODの平均値					0.012

10

20

【 0 1 0 8 】

生理食塩液陰性対照血液インキュベーションウェルにデキストロースを加えた場合の効果調べるために、ドナー20人中9人からの血液を、24ウェルプレートにおいてデキストロース添加および非添加で生理食塩液対照と共に培養した。データは、デキストロースを生理食塩液対照刺激血液試料に加えた場合に、検出されたIFN- γ の量のバックグラウンドレベルに有意差がなかったことを示している（表10）。

【 0 1 0 9 】

（表10）24ウェル組織培養プレートにおいてデキストロース添加またはデキストロース非添加で生理食塩液と共にインキュベートして、高感度のIFN- γ ELISAを用いて試験した血液試料からのバックグラウンドIFN- γ 反応（OD@450/620 nm）

30

ドナー	24 ウェル	24ウェル+デキストロース
2	0.035	0.036
7	0.029	0.028
12	0.016	0.019
13	0.025	0.022
14	0.022	0.021
16	0.026	0.032
17	0.024	0.017
19	0.025	0.019
20	0.036	0.025

40

【 0 1 1 0 】

実施例6

管内（In-Tube）と培養プレート刺激の比較

本発明のアッセイ法は、試験抗原による全血の刺激に対するCMI応答として産生されたIFN- γ を定量する。血液1 mlの陰性対照（Nil）、陽性対照（マイトゲン）および試験抗原のパネルによる刺激を、24ウェル培養プレートにおいて行う。

【 0 1 1 1 】

50

「管内 (In-Tube)」刺激培養法は、アッセイ系において用いるために開発されたもう一つの技術である。この方法は、血液試料1 mlを採取する際に直ちに血液刺激を開始する目的で、ヘパリン添加採血管にNil、マイトゲン、または試験刺激抗原のいずれかを加えることを用いる。デキストロースはまた、IFN- γ 反応を増強するために管に加える。

【0112】

この実験は、二つの血液培養法、すなわち培養プレートと管内とを比較することを目的とした。

【0113】

結核であると診断された患者からのヘパリン添加血を、24ウェル培養プレート (コーニング-コスター (Corning-Costar)) においてNil (陰性対照)、マイトゲン (フィットヘマグルチニン; 陽性対照) およびTB特異的抗原 (ESAT-6、CFP-10およびTB7.7の25量体部分に関する重複抗原) によって刺激した。血液をまた、ヘパリンと共に管において同じNil、PHA、およびTB特異的抗原によって採血管 (グライナー) 3本に採取した。血液試料を37で16~24時間インキュベートしてから上記の沈降した血球から血漿を採取した。血漿試料をELISA、および場合によってはTB ELISA (特異的抗原反応が >15 IU/mlである場合) を用いて調べ、IFN- γ 濃度を決定した。

【0114】

患者10人からの培養プレートおよび管内の結果を比較した。Nilの値をそれぞれのTB特異的抗原反応から差し引いた。データが有効である (TB ELISAに関する添付文書通り) と見なされるためには、「特異的抗原マイナスNil」結果の患者の「マイトゲンマイナスNil」結果が >0.5 IU/mlでなければならなかった。結果を表11に示す。

【0115】

(表11) 培養プレートおよび採血管 (管内) 全血刺激の比較

被験者	培養プレート法			管内 (In-Tube) 法			培養プレート	管内	特異的抗原の 変化倍率 (管内対 プレート)
	Nil	特異的抗原	マイトゲン	Nil	特異的抗原	マイトゲン	特異的抗原 - Nil	特異的抗原 - Nil	
1	0.18	282.90	128.70	1.30	424.90	52.50	282.72	423.60	1.50
2	0.10	2.46	15.182*	0.29	7.55	4.15	2.36	7.27	3.08
3	0.12	1.01	17.017*	0.20	5.51	17.377*	0.89	5.31	5.99
4	0.09	2.72	6.52	0.08	5.95	5.57	2.64	5.88	2.23
5	0.07	2.96	8.25	0.06	3.89	2.31	2.89	3.83	1.32
6	0.07	5.04	19.76*	0.09	10.31	11.77	4.98	10.21	2.05
7	0.30	1.34	19.868*	0.46	4.14	21.063*	1.05	3.68	3.52
8	1.22	2.05	11.11	0.61	1.81	4.02	0.83	1.21	1.44
9	0.09	1.22	14.66	0.16	2.17	11.23	1.13	2.01	1.78
10	0.11	4.26	12.65	0.62	9.27	17.05*	4.15	8.65	2.08
平均値									2.50

* プレートリーダーの範囲外のOD

【0116】

データは、現在の培養プレート法と比較して管内システムを用いると、IFN- γ 反応の増加が得られることを示している (平均変化倍率 = 2.50)

【0117】

当業者は、本明細書に記述の本発明が、特に記述した以外の変更および改変を受けることを認識するであろう。そのような変更および改変は全て本発明に含まれると理解すべきである。本発明にはまた、本明細書において個々にまたは集合的に言及または示した段階、特徴、組成物、および化合物の全て、ならびに任意の二つまたはそれ以上の段階または

特徴の任意の全ての組み合わせが含まれる。

【 0 1 1 8 】

参考文献

Biggs *et al.*, *Cytometry* 36: 36-45, 1999.

Daneshvar *et al.*, *J. Immunol. Methods* 226(1-2): 119-128, 1999.

Durig *et al.*, *J. Raman Spectrosc.* 24(5): 281-285, 1993.

10

Eriksson *et al.*, *Biophys. J.* 2: 64, 1993.

Fu *et al.*, *Nature Biotechnology* 17: 1109-1111, 1999.

Lakowicz *et al.*, *Biophys. J.* 72: 567, 1997.

Lewis *et al.*, *Dyes Pigm.* 42(2): 197, 1999.

20

Malemed *et al.*, "Flow cytometry and sorting", 2nd Ed., New York, Wiley-Liss, 1990).

Rahman *et al.*, *J. Org. Chem.* 63: 6196, 1998.

Rapaport *et al.*, *Appl. Phys. Lett.* 74(3): 329-331, 1999.

Tawa *et al.*, *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* 488 [Electrical, Optical and Magnetic Properties of Organic Solid-State Materials IV], 885-890.

30

Youvan *et al.*, *Biotechnology et alia* 3: 1-18, 1997.

【図面の簡単な説明】

【 0 1 1 9 】

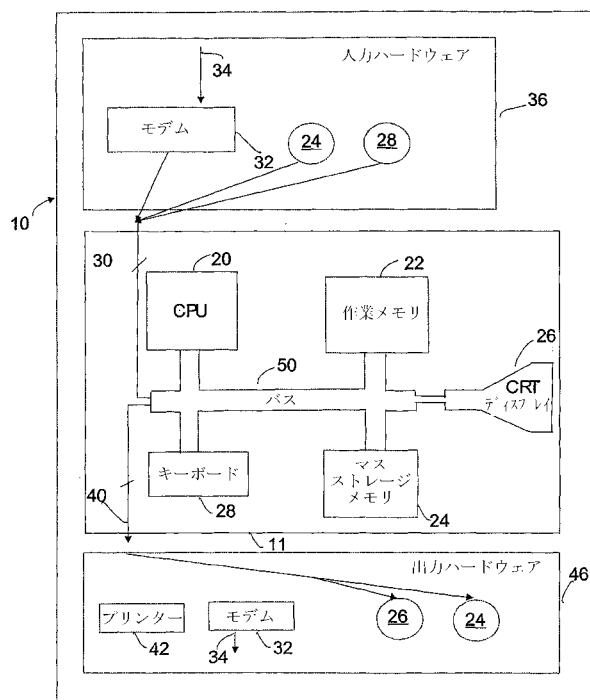
【図 1】保存媒体によってコードされる説明書を実行するために用いられるシステムの略図である。

40

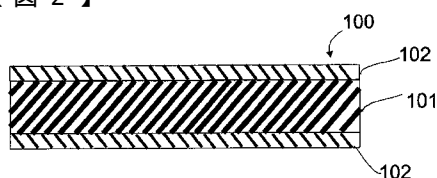
【図 2】磁気保存媒体の横断面の略図である。

【図 3】光学的に読み取り可能なデータ保存システムの断面の略図である。

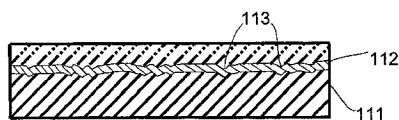
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【手続補正書】

【提出日】平成17年2月3日(2005.2.3)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験者におけるCMI応答を測定する方法であって、

試料が抗原による刺激後に免疫エフェクター分子を産生することができる免疫系の細胞を含む、被験者からの全血試料を採取する段階、単糖の存在下で該試料を抗原と共にインキュベートする段階、および該免疫エフェクター分子の存在またはレベルによって、被験者が細胞性免疫応答を実行できることが示される、免疫エフェクター分子の存在またはレベルの上昇を測定する段階を含む、方法。

【請求項 2】

被験者がヒトである、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

単糖がデキストロースである、請求項1または2記載の方法。

【請求項 4】

全血が抗原を含む管において採取される、請求項3記載の方法。

【請求項 5】

全血がヘパリンを含む管において採取される、請求項3記載の方法。

【請求項 6】

管がヘパリンをさらに含む、請求項4記載の方法。

【請求項 7】

試料が抗原と共に約5時間～約50時間インキュベートされる、請求項1記載の方法。

【請求項 8】

免疫エフェクター分子がサイトカインである、請求項1記載の方法。

【請求項 9】

サイトカインがIFN- γ である、請求項8記載の方法。

【請求項 10】

サイトカインがGM-CSFである、請求項8記載の方法。

【請求項 11】

サイトカインがインターロイキンである、請求項8記載の方法。

【請求項 12】

サイトカインがTNF α である、請求項8記載の方法。

【請求項 13】

被験者が病原体に感染している、請求項1または2記載の方法。

【請求項 14】

病原体がHBVである、請求項13記載の方法。

【請求項 15】

病原体がHIVである、請求項13記載の方法。

【請求項 16】

免疫細胞が、NK細胞、T細胞、B細胞、樹状細胞、マクロファージ、または単球から選択される、請求項1記載の方法。

【請求項 17】

免疫細胞がT細胞である、請求項16記載の方法。

【請求項 18】

抗原がペプチドである、請求項1記載の方法。

【請求項 19】

抗原がポリペプチドである、請求項1記載の方法。

【請求項 20】

抗原がタンパク質である、請求項1記載の方法。

【請求項 21】

抗原が糖タンパク質である、請求項1記載の方法。

【請求項 22】

抗原が糖質である、請求項1記載の方法。

【請求項 23】

抗原が、磷脂質、磷タンパク質、およびホスホリポタンパク質から選択される、請求項1記載の方法。

【請求項 24】

抗原がTB特異的抗原である、請求項1記載の方法。

【請求項 25】

TB特異的抗原がESAT-6に関する重複ペプチドである、請求項24記載の方法。

【請求項 26】

TB特異的抗原がCFP-10に関する重複ペプチドである、請求項24記載の方法。

【請求項 27】

TB特異的抗原がTB7に関する重複ペプチドである、請求項24記載の方法。

【請求項 28】

抗原がヒト型結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) に由来するPPDである、請求項1記載の方法。

【請求項 29】

抗原がトリ型結核菌 (*Mycobacterium avium*) に由来するPPDである、請求項1記載の方法。

【請求項 30】

抗原がフィトヘマグルチニンである、請求項1記載の方法。

【請求項 31】

抗原が破傷風トキソイドである、請求項1記載の方法。

【請求項 32】

免疫エフェクターが、該免疫エフェクターに対して特異的な抗体によって検出される、請求項1記載の方法。

【請求項 33】

免疫エフェクターがELISAを用いて検出される、請求項32記載の方法。

【請求項 34】

免疫エフェクターがELISpotを用いて検出される、請求項32記載の方法。

【請求項 35】

被験者におけるCMI応答を測定する方法によって被験者が細胞性免疫応答を実行する能力を評価することを含む、病原体感染症、自己免疫障害もしくは癌、またはそのような障害を発症する性向を有する被験者を治療する方法であって、

試料が抗原による刺激後に免疫エフェクター分子を産生することができる免疫系の細胞を含む、被験者からの全血試料を採取する段階、単糖の存在下で該試料を抗原と共にインキュベートする段階、該免疫エフェクター分子の存在またはレベルによって、被験者が細胞性免疫応答を実行できることが示される、免疫エフェクター分子の存在またはレベルの上昇を測定する段階、および適切な治療プロトコルを選択する段階を含む、方法。

【請求項 36】

被験者がヒトである、請求項35記載の方法。

【請求項 37】

試料が全血である、請求項35または36記載の方法。

【請求項 38】

全血が抗原を含む管において採取される、請求項37記載の方法。

【請求項 39】

全血がヘパリンを含む管において採取される、請求項37記載の方法。

【請求項 40】

管がヘパリンをさらに含む、請求項38記載の方法。

【請求項 41】

全血が抗原と共に約5時間～約50時間インキュベートされる、請求項35または37記載の方法。

【請求項 42】

免疫エフェクター分子がサイトカインである、請求項35記載の方法。

【請求項 43】

サイトカインがIFN- γ である、請求項42記載の方法。

【請求項 44】

サイトカインがGM-CSFである、請求項42記載の方法。

【請求項 45】

サイトカインがインターロイキンである、請求項42記載の方法。

【請求項 46】

サイトカインがTNF α である、請求項42記載の方法。

【請求項 47】

免疫細胞が、NK細胞、T細胞、B細胞、樹状細胞、マクロファージ、または単球から選択される、請求項35記載の方法。

【請求項 48】

免疫細胞がT細胞である、請求項47記載の方法。

【請求項 49】

抗原がペプチドから選択される、請求項35記載の方法。

【請求項 5 0】

抗原がポリペプチドから選択される、請求項35記載の方法。

【請求項 5 1】

抗原がタンパク質から選択される、請求項35記載の方法。

【請求項 5 2】

抗原が糖タンパク質から選択される、請求項35記載の方法。

【請求項 5 3】

抗原が糖質から選択される、請求項35記載の方法。

【請求項 5 4】

抗原が、燐脂質、燐タンパク質、およびホスホリボタンパク質から選択される、請求項35記載の方法。

【請求項 5 5】

抗原がTB特異的抗原である、請求項35記載の方法。

【請求項 5 6】

TB特異的抗原がESAT-6に関する重複ペプチドである、請求項55記載の方法。

【請求項 5 7】

TB特異的抗原がCFP-10に関する重複ペプチドである、請求項55記載の方法。

【請求項 5 8】

TB特異的抗原がTB7に関する重複ペプチドである、請求項55記載の方法。

【請求項 5 9】

抗原がヒト型結核菌に由来するPPDである、請求項35記載の方法。

【請求項 6 0】

抗原がトリ型結核菌に由来するPPDである、請求項35記載の方法。

【請求項 6 1】

抗原がフィトヘマグルチニンである、請求項35記載の方法。

【請求項 6 2】

抗原が破傷風トキソイドである、請求項35記載の方法。

【請求項 6 3】

免疫エフェクターが、該免疫エフェクターに対して特異的な抗体によって検出される、請求項35記載の方法。

【請求項 6 4】

免疫エフェクターがELISAを用いて検出される、請求項63記載の方法。

【請求項 6 5】

免疫エフェクターがELISpotを用いて検出される、請求項64記載の方法。

【請求項 6 6】

多成分型である、被験者におけるCMI応答を測定するキットであって、
第一の区画が複数の採血管を含み、第二の区画が免疫エフェクター分子に関する抗体に基づく検出手段を含み、および第三の区画が

(1) 採血管に血液を採取する段階；

(2) 該管を混合する段階；

(3) 該管を直立させてインキュベートする段階；

(4) 該管を遠心して、血漿を採取する段階；および

(5) 血漿中の免疫エフェクター分子を検出する段階

を含む一連の説明書を含む、キット。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2003/001464
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. Cl. ⁷ : G01N 33/53; C12Q 1/68		
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) G01N 33/53; C12Q 1/68		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPIDS; MEDLINE; HCA (cell mediated immunity; immunocompetence; diagnos* or immunoassay or assay; TB or tuberculosis or tetanus toxoid; tube; dextrose; sugar; <i>in vitro</i> or cultur*; cytokine or interferon or interleukin or tumor necrosis factor or colony stimulating factor		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,Y	Kabilan L. et al., (1990), Eur. J. Immunol., vol. 20, pp 1085-1089. "Detection of intracellular expression and secretion of interferon- γ at the single-cell level after activation of human T cells with tetanus toxoid <i>in vitro</i> ." Whole document.	1-72
X,Y	Benyoucef, S. et al., (1997), Pathologie Biologie, vol. 45(5), pp. 400-403. "An interferon- γ (IFN- γ) based whole blood assay to detect T cell response to antigens in HIV-1 infected patients". Whole document.	1-72
☒ 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 "B" 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		Date of mailing of the international search report 22 JAN 2004
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustalia.gov.au Facsimile No. (02) 6285 3929		Authorized officer JULIE GALE Telephone No : (02) 6283 2272

		International application No. PCT/AU2003/001464
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,Y	Pais, T.F. et al., (1998), Immunology, vol. 95, pp. 69-75. "Analysis of T cells recruited during delayed-type hypersensitivity to purified protein derivative (PPD) versus challenge with tuberculosis infection", Whole document.	1-72
X,Y	Whist, S.K. et al., (2000), Veterinary Immunology and Immunopathology, vol. 73, pp. 207-218. "The use of interleukin-2 receptor expression as a marker of cell-mediated immunity in goats experimentally infected with <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> ." Whole document.	1-72
X,Y	Streeton, J.A. et al., (1998), International Journal of Tuberculosis and Lung Cancer, vol. 2(6), pp. 443-450. "Sensitivity and specificity of a gamma interferon blood test for tuberculosis infection". Whole document.	1-72
X,Y	Baird, M. A. et al., (1995), Immunology and Cell Biology, vol. 73, pp. 537-543. "Dendritic cell presentation of PPD and 19 kDa protein of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> and emergent T helper cell phenotype". Whole document.	1-72
X,Y	Brock, I. Et al., (2001), International Journal of Tuberculosis and Lung Cancer, vol. 5(5), pp. 462-467. "Performance of whole blood IFN- γ test for tuberculosis diagnosis based on PPD or the specific antigens ESAT-6 and CFP-10". Whole document.	1-72
X,Y	De Groote, D. et al., (1996), Cancer Detection and Prevention, vol. 20(3), pp. 207-213. "Ex vivo cytokine production by whole blood cells from cancer patients". Whole document.	1-72
X,Y	Shearer, G.M. and Clerici, M. (1994), Clinical Chemistry, vol. 40/11(B), pp. 2162-2165. "In vitro analysis of cell-mediated immunity: clinical relevance". Whole document.	1-72
X,Y	van Crevel, R. et al., (1999), Journal of Immunological Methods, vol. 222, pp. 145-153. "Disease-specific ex vivo stimulation of whole blood for cytokine production: applications in the study of tuberculosis". Whole document.	1-72

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AU2003/001464

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,Y	Katyal, R.K. et al., (2001), Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, vol. 8(2), pp. 339-345. "Cell-mediated immune response to tuberculosis antigens: comparison of skin testing and measurement of <i>in vitro</i> gamma interferon production in whole-blood culture". Whole document.	1-72
X,Y	US 5,494,799 A1 (Wood et al.) 27 February 1996. Whole document.	1-72
X,Y	US 5,334,504 A1 (Wood et al.) 2 August 1994 Whole document.	1-72

Information on patent family members

International application No.

PCT/AU2003/001464

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report		Patent Family Member			
US	5494799	AU	71659/87	EP	0296158
		WO	8705400	US	5334504
US	5334504	AU	71659/87	EP	0296158
				WO	8705400
END OF ANNEX					

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

フロッピー

(72)発明者 ワイルド スティーブン ポール .

オーストラリア国 ビクトリア州 キルシス サウス ウォータームーア アベニュー 49

(72)発明者 コスグリフ アンゲラ

オーストラリア国 ビクトリア州 プラフラン トリニアン ストリート 8

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA05 QQ03 QQ08 QQ43 QQ52 QQ79 QR08 QR32 QR43

QR44 QR48 QR56 QR62 QR69 QR77 QS25 QS33 QS34 QS36

QX01

4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA01 EA50

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2006506609A5	公开(公告)日	2010-04-15
申请号	JP2004548932	申请日	2003-11-06
[标]申请(专利权)人(译)	塞尔雷斯蒂斯有限公司		
申请(专利权)人(译)	Seresutisu有限公司		
[标]发明人	ロゼルジェイムススチュアート ワイルドスティーブンポール コスグリフアンゲラ		
发明人	ロゼル ジェイムス スチュアート ワイルド スティーブン ポール. コスグリフ アンゲラ		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/02 C07K16/24		
CPC分类号	G01N33/5047 G01N33/5091		
FI分类号	G01N33/53.P G01N33/53.D C12Q1/02 C07K16/24		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/ /QR08 4B063/QR32 4B063/QR43 4B063/QR44 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR69 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4H045/AA11 4H045/ /AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA01 4H045/EA50		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	2002952548 2002-11-08 AU		
其他公开文献	JP2006506609A JP4502814B2		

摘要(译)

本发明一般涉及诊断测定，更具体地涉及测量细胞免疫反应性的测定。更具体地，本发明提供了使用全血或其他合适的生物样品测量细胞对抗原反应的测定和试剂盒。可以使用针对免疫效应分子的配体进行测定，或者可以使用筛选编码免疫效应分子的基因的表达在核酸水平进行测定。测定法可用于人类，家禽，兽医学和野生动物中的应用的诊断和治疗方案。