

(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2014-503829

(P2014-503829A)

(43) 公表日 平成26年2月13日(2014.2.13)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	S
<b>GO 1 N 33/573 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	D
	GO 1 N 33/573	A
	GO 1 N 33/53	N

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 40 頁)

(21) 出願番号	特願2013-551330 (P2013-551330)	(71) 出願人	513183223 イミュノサイエンシス ラブ, インコーポ レイテッド
(86) (22) 出願日	平成24年1月26日 (2012.1.26)		
(85) 翻訳文提出日	平成25年9月25日 (2013.9.25)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/022706		アメリカ合衆国, カリフォルニア州 90
(87) 国際公開番号	W02012/103324		035, ロサンジェルス, スイート 31
(87) 国際公開日	平成24年8月2日 (2012.8.2)		2, 822 サウス ロバートソン ブル バード
(31) 優先権主張番号	61/437, 244	(74) 代理人	100114775 弁理士 高岡 亮一
(32) 優先日	平成23年1月28日 (2011.1.28)	(74) 代理人	100121511 弁理士 小田 直
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腸および血液脳関門の透過性を検出する方法、およびその試験材料

(57) 【要約】

腸管バリアおよび/または血液脳関門透過性に関連する抗原の試験のための、方法、アッセイおよび装置を開示する。例えば、(1) 細菌毒素(好ましくはリポ多糖)への結合および(2) (a) 腸関連抗原および(b) 血液脳関門関連抗原の少なくとも1つから選択される組織抗原への結合について、血液、唾液または他の体液を試験することができる。腸管壁浸漏症候群(傍細胞であれ経細胞経路であれ、および細菌毒素であれ、ある他の原因であれ)と関連がある疾患および/または過剰な血液脳関門透過性と関連がある疾患(神経炎症および/または神経自己免疫状態の両方および特に筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、多発性硬化症、アルツハイマー病または末梢神経障害および大うつを含むことが本明細書中で企図される)の検出および診断を支援するために、試験結果の解析を使用することができる。

【選択図】 図4

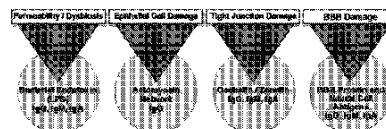


Figure 4

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ヒトの試料を試験する方法であって、  
細菌毒素に対する前記試料の第一の分画の結合からの第一のシグナルを測定することと

；  
（ a ）腸関連抗原および（ b ）血液脳関門関連抗原の少なくとも 1 つから選択されるネイティブ抗原に対する前記試料の第二の分画の結合からの第二のシグナルを測定することと、を含む、方法。

## 【請求項 2】

前記細菌毒素がリボ多糖を含む、請求項 1 に記載の方法。

10

## 【請求項 3】

前記ネイティブ腸関連抗原が、（ 1 ）腸管構造タンパク質；（ 2 ）タイトジャンクションタンパク質；（ 3 ）タイトジャンクションタンパク質に対する結合受容体；および（ 4 ）細胞間結合タンパク質からなる一覧から選択される、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記血液脳関門関連抗原が、（ 1 ）血液脳関門タンパク質；（ 2 ）グリア線維酸性タンパク質（ GFAP ）；（ 3 ）マトリクスメタロプロテイナーゼ（ MMP ）；（ 4 ）脳 ZOT 結合タンパク質；（ 5 ）脳 ZOT 受容体；（ 6 ）カルプロテクチン；および（ 7 ）ミエリン塩基性タンパク質からなる一覧から選択される、請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記腸管構造抗原がアクチン/アクトミオシンを含む、請求項 2 に記載の方法。

20

## 【請求項 6】

前記タイトジャンクション抗原がオクルジンおよびゾヌリンからなる群から選択される、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記結合受容体が、腸管 ZOT 受容体を含む、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記構造タンパク質がマトリクスメタロプロテイナーゼ - 3（ MMP - 3 ）を含む、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記血液脳関門関連抗原が、（ 1 ）血液脳関門タンパク質；（ 2 ）グリア線維酸性タンパク質（ GFAP ）；および（ 3 ）マトリクスメタロプロテイナーゼ（ MMP ）からなる一覧から選択される、請求項 1 に記載の方法。

30

## 【請求項 10】

請求項 1 に記載の方法を用いた試験を実験室から指示することと、  
試験結果を解析することと、  
を含む、腸管壁浸漏症候群が関連する疾患を診断する方法。

## 【請求項 11】

請求項 1 に記載の方法を用いた試験を実験室から指示することと、  
試験結果を解析することと、  
を含む、血液脳関門透過性が関連する疾患を診断する方法。

40

## 【請求項 12】

（ 1 ）細菌毒素；ならびに（ 2 ）（ a ）腸関連抗原および（ b ）血液脳関門関連抗原の少なくとも 1 つを含むネイティブ抗原を結合ペプチドとして有する、試験プレート。

## 【請求項 13】

前記腸関連抗原が、（ 1 ）腸管構造タンパク質；（ 2 ）タイトジャンクションタンパク質；および（ 3 ）タイトジャンクションタンパク質に対する結合受容体；および（ 4 ）細胞間結合タンパク質からなる一覧から選択される、請求項 12 に記載の試験プレート。

## 【請求項 14】

前記血液脳関門関連抗原が、（ 1 ）血液脳関門タンパク質；（ 2 ）グリア線維酸性タン

50

パク質 (GFAP) ; (3) マトリクスメタロプロテイナーゼ (MMP) 、 (4) 脳 ZOT 結合タンパク質 ; (5) 脳 ZOT 受容体 ; (6) カルプロテクチン ; および (7) ミエリン塩基性タンパク質からなる一覧から選択される、請求項 13 に記載の試験プレート。

【請求項 15】

前記血液脳関門関連抗原が、(1) 血液脳関門タンパク質 ; (2) グリア線維酸性タンパク質 (GFAP) ; (3) マトリクスメタロプロテイナーゼ (MMP) 、 (4) 脳 ZOT 結合タンパク質 ; (5) 脳 ZOT 受容体 ; (6) カルプロテクチン ; および (7) ミエリン塩基性タンパク質からなる一覧から選択される、請求項 12 に記載の試験プレート。

【請求項 16】

細菌毒素ならびに (a) 腸関連抗原および (b) 血液脳関門関連抗原の少なくとも 1 つから選択されるネイティブ抗原に対する患者由来試料の結合からシグナルを生成させる抗体試験パネルから試験結果を得ることと、

10

前記試験結果を解析することと、

を含む、解剖学的バリアの過剰な透過性が関連する疾患の診断を支援する方法。

【請求項 17】

前記試料が血液試料である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記試料が唾液試料である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

前記試験結果を解析する段階が、腸内微生物叢腸内毒素症に関する診断を、前記試験結果が、リポ多糖の細菌毒素に対する IgA、IgM および IgG のいずれかについての陽性結果およびオクルジンおよびゾヌリンに対する IgA、IgM および IgG の全てについての陰性結果およびアクトミシン (actomy sin) に対する IgG についての陰性結果を含む場合であり得ると考察することを含む、請求項 16 に記載の方法。

20

【請求項 20】

前記試験結果を解析する段階が、傍細胞経路を介する細菌性抗原による腸管バリアの破壊に関する診断を、前記試験結果が、リポ多糖の細菌毒素に対する IgA、IgM および IgG のいずれかについての陽性結果およびオクルジンまたはゾヌリンに対する IgA、IgM および IgG のいずれかについての陽性結果およびアクトミシン (actomy sin) に対する IgG についての陰性結果を含む場合であり得ると考察することを含む、

30

【請求項 21】

前記試験結果を解析する段階が、傍細胞経路を介する細菌性抗原以外による腸管バリアの破壊に関する診断を、前記試験結果が、リポ多糖の細菌毒素に対する IgA、IgM および IgG の全てについての陰性結果およびオクルジンまたはゾヌリンに対する IgA、IgM および IgG のいずれかについての陽性結果およびアクトミシン (actomy sin) に対する IgA についての陰性結果を含む場合であり得ると考察することを含む、

【請求項 22】

前記試験結果を解析する段階が、傍細胞経路を介する細菌性抗原による腸管バリアの破壊に関する診断を、前記試験結果が、リポ多糖の細菌毒素に対する IgA、IgM および IgG のいずれかについての陽性結果およびオクルジンおよびゾヌリンに対する IgA、IgM および IgG の全てについての陰性結果およびアクトミシン (actomy sin) に対する IgA についての陽性結果を含む場合であり得ると考察することを含む、請求項 16 に記載の方法。

40

【請求項 23】

前記試験結果を解析する段階が、細菌毒素により誘導される腸管バリアおよび血液脳関門の完全性の破壊に関する診断を、前記試験結果が、リポ多糖の細菌毒素に対する IgA、IgM および IgG のいずれかについての陽性結果およびオクルジンおよびゾヌリンに対する IgA、IgM および IgG のいずれかについての陽性結果、血液脳関門タンパク

50

質に対する I g A、I g M および I g G のいずれかについての陽性結果および神経抗原に対する I g A、I g M および I g G のいずれかについての陽性結果を含む場合であり得ると考察することを含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 24】

細菌毒素以外の要因による腸管バリアおよび血液脳関門の完全性の破壊に関する診断を、前記試験結果が、リポ多糖の細菌毒素に対する I g A、I g M および I g G のそれぞれについての陰性結果およびオクルジンおよびゾヌリンに対する I g A、I g M および I g G のいずれかについての陽性結果、血液脳関門タンパク質に対する I g A、I g M および I g G のいずれかについての陽性結果および神経抗原に対する I g A、I g M および I g G のいずれかについての陽性結果を含む場合であり得ると考察することを含む、請求項 16 に記載の方法。

10

【請求項 25】

前記試験結果を解析する段階が、腸管バリアの完全性の破壊を伴わず、血液脳関門の完全性の破壊を伴う腸内微生物叢腸内毒素症に関する診断を、前記試験結果が、リポ多糖の細菌毒素に対する I g A、I g M および I g G のいずれかについての陽性結果およびオクルジンおよびゾヌリンに対する I g A、I g M および I g G のそれぞれについての陰性結果、血液脳関門タンパク質に対する I g A、I g M および I g G のいずれかについての陽性結果および神経抗原に対する I g A、I g M および I g G のいずれかについての陽性結果を含む場合であり得ると考察することを含む、請求項 16 に記載の方法。

20

【請求項 26】

前記試験結果を解析する段階が、腸管バリアまたは腸内微生物叢腸内毒素症を伴わない、血液脳関門の完全性の破壊、神経炎症および神経自己免疫に関連する診断を、前記試験結果が、リポ多糖の細菌毒素に対する I g A、I g M および I g G のそれぞれについての陰性結果およびオクルジンおよびゾヌリンに対する I g A、I g M および I g G のそれぞれについての陰性結果、血液脳関門タンパク質に対する I g A、I g M および I g G のいずれかについての陽性結果および神経抗原に対する I g A、I g M および I g G のいずれかについての陽性結果を含む場合であり得ると考察することを含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 27】

前記試験結果を解析する段階が、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、多発性硬化症、アルツハイマー病または末梢神経障害および大うつのうち 1 つの診断を、前記試験結果が、血液脳関門タンパク質に対する I g A、I g M および I g G のいずれかについての陽性結果および神経抗原に対する I g A、I g M および I g G のいずれかについての陽性結果を含む場合であり得ると考察することを含む、請求項 16 に記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本願は、2011年1月28日出願の米国仮出願第61/437,244号の利益を請求し、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

40

【0002】

本発明は、腸管および血液脳関門浸透性の検出および診断における支援のための方法、アッセイ、およびキットに関する。

【背景技術】

【0003】

人間の体内の他の細胞器官と比べて、腸上皮細胞は、摂取した食品、酵母、細菌およびウイルスに由来する抗原の膨大な数にさらされている。これらの細菌抗原の一部は、他のものが宿主にとって有害なのに対し、粘膜免疫系に対して脅威とならない。これら抗原のために調製性 T セル機能または寛容を発達させるために、粘膜および全身性免疫系と相互

50

作用する上皮を、いくつかの分子が浸透させることにより、腸管免疫系は腸管内腔におけるこれら細菌抗原を監視する。しかしながら、これら抗原に対する腸管免疫系の不適當または過度の暴露は、調製性メカニズムの破壊を引き起こし、胃腸疾患(1)を導くことになる。したがって、抗原接種の生理機能の理解は、炎症や自己免疫反応(2)を含む、疾患の病因の理解の中心となる。

#### 【0004】

本明細書で説明するこれらの外部資料および全ての他の外部資料は、参照によりその全体が組み込まれる。組み込まれる参考文献中の用語の定義または使用は、本明細書に提供する用語の定義と矛盾しているか、または反している場合には、本明細書に提供するその用語の定義が適用され、参考文献中のその用語の定義は適用されない。

10

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0005】

腸管透過性の向上は、いくつかの自己免疫疾患(3-6)の始まりに先行する初期段階であると考えられている。この理由から、最近では消化管並びに神経系(7)を含む腸管外器官を対象とする、多くの病態の病因における腸管バリア機能障害の役割への関心が高まってきている。炎症、自己免疫およびがんへの生物学的出入口として、腸管バリア機能のこの調整不全は、Fasano(7)によりレビュー記事で論じられた。このレビュー記事ならびに以前のFasanoの記事(4)でFasanoは、消化管の主要な機能は、これまで伝統的に、栄養および電解質の消化と吸収、そして水分の恒常性に限って理解されてきたことを強調した。しかしながら、消化管の解剖学的および機能的な配置のより注意深い分析は、この臓器の極めて大事なもう1つの機能は、バリアメカニズムを介した、環境と宿主との間の巨大分子の輸送を調製するその能力であることを示している。消化管関連リンパ系組織および神経内分泌ネットワークと共に、細胞間のタイトジャンクションを伴う腸上皮のバリアは、非自己抗原に対する寛容と免疫の均衡を制御する。

20

#### 【0006】

ゾヌリン/オクルジンは、巨大分子の往来に関わり、したがって、免疫反応と寛容(7)間のバランスに関わる細胞間タイトジャンクションの生理的モジュレーターである。細かく調整された腸管バリアタンパク質が、環境要因に対し、個々の遺伝子的影響を受けやすい中で調節不全される場合、可能性は、セリアック病、クローン病および潰瘍性大腸炎、および関節炎のような腸外自己免疫疾患、狼瘡、甲状腺炎、糖尿病、さらには多発性硬化症(MS)、悪性腫瘍及び大うつ(8-14)のような、腸管疾患の両方で発生する。腸および脳関門機能障害の病態生理学に寄与することができる、したがって、腸管および腸管外自己免疫に関与にする主な環境要因の1つは、細菌性リポ多糖である(LPS)。腸微生物叢異常生命および細菌転移により、LPSは、最初に腸バリアおよび次いで血液脳関門機能不全(14)をもたらす、上皮細胞および炎症カスケードの活性化上において、Toll様受容体の活性化のために明らかに責任がある。“腸管壁浸漏”および“脳浸漏”症候群の誘導におけるLPSの役割は、図1に示されている。

30

#### 【0007】

図1は、消化管異常が腸バリアの完全性を損なうことができ、循環に未消化抗原の侵入を増やし、その結果免疫系に挑戦することを強調している。これら抗原に対する反応は、炎症促進性サイトカインの生産、抗体の配列、および増加した腸管バリア透過性(あるいは“腸管壁浸漏”症候群)をもたらす、免疫および炎症性カスケードを活性化する。仮に、腸管バリア機能障害が調製されてない場合、結果は神経炎症、神経侵襲および神経変性になり得る。

40

#### 【0008】

したがって、最初に血液脳関門の開口、続いて、神経炎症および神経変性(15-25)をもたらす可能性がある炎症を含む、免疫系に挑戦できる巨大抗原分子に対する腸管透過性の測定のための非侵襲的方法、装置、アッセイのための必要性がある。これら必要性およびその他は、本発明によって満たされる。

50

## 【課題を解決するための手段】

## 【0009】

本発明の独創性のある主題は、ヒト由来の試料が、腸管および/または血液脳関門透過性の検出および診断を支援するために検査することができる、装置、システム、アッセイおよび方法を提供する。

## 【0010】

本発明の特定の様態において、試料の1つまたは複数の部分は、細菌毒素への結合(1)および、(a)腸関連抗原および(b)血液脳関門関連抗原の少なくとも1つから選択されるネイティブ抗原への結合(2)について試験される。特定の態様では、細菌毒素は有利にリポ多糖類を含むことができる。

10

## 【0011】

腸管透過性の検査の場合、ネイティブ腸関連抗原は、(1)腸管構造タンパク質；(2)タイトジャンクションタンパク質；(3)タイトジャンクションタンパク質への結合受容体；および(4)細胞間結合タンパク質からなる一覧から好ましくは選択される。本発明の特定の様態の実施例では、検査は、アクチン/アクトミオシン、オクルジンおよび/またはゾヌリン、腸管ZO2受容体、およびマトリックスメタロプロテイナーゼ3(MMP-3)の1つまたは複数の抗体を発生する。

## 【0012】

血液脳関門透過性の検査の場合、血液脳関門関連抗原は好ましくは、(1)血液脳関門タンパク質；(2)グリア線維酸性タンパク質(GFAP)；(3)マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)、(4)脳ZO2結合タンパク質、(5)脳ZO2受容体；(6)カルプロテクチン；および(7)ミエリン塩基性タンパク質からなる一覧から選択される。本発明の特定の様態の実施例では、検査は、(1)血液脳関門タンパク質；(2)グリア線維酸性タンパク質(GFAP)；および(3)マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の1つまたは複数の抗体を発生する。

20

## 【0013】

診断の観点から、上記に記載された方法の1つまたは複数からの検査結果の分析は、腸管壁浸漏症候群または/および過度の血液脳関門透過性に関連する疾患の検出または/および診断を支援するために使用することができる。

## 【0014】

本発明の特定の様態において、各成分に結合する試料の検出は、ELISAアッセイ、RIAアッセイ、ラテックス凝集、ビーズアッセイ、プロテオミクスアッセイ、および当業者に周知の他の免疫測定法が含まれるが、これらに限定されない免疫測定法を用いて実行することができる。

30

## 【0015】

本発明の特定の様態において、例えば、結合ペプチドとして：(1)細菌毒素、(a)血液脳幹関連抗原および(b)血液脳幹関連抗原の少なくとも1つを含む(2)ネイティブ抗原を有する改善された試験プレートを含む、イノムアッセイを実施するための試験プレートおよびキットも提供されることができる。

## 【0016】

腸管壁浸漏症候群に関連した疾患の検出、診断、または別の方法で識別するために使用される特に好ましい検査板では、腸関連抗原は、(1)腸構造タンパク質；(2)タイトジャンクションタンパク質；(3)タイトジャンクションタンパク質への結合受容体；および(4)細胞間結合タンパク質からなる一覧から有利に選択されることができる。

40

## 【0017】

過度の血液脳幹透過性に関連した疾患の検出、診断、または別の方法で識別するために使用される特に好ましい検査板では、血液脳関門関連抗原は、(1)血液脳関門タンパク質；(2)グリア線維酸性タンパク質(GFAP)；(3)マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)、(4)脳ZO2結合タンパク質；(5)脳ZO2受容体；(6)カルプロテクチン；および(7)ミエリン塩基性タンパク質からなる一覧から有利に選択される

50

ことがきできる。

【0018】

検査キットは、腸管壁浸漏症候群に関連する抗原の第一のセット、および過度脳血液関門浸透性に関連する抗原の第二のセット両方のために集散的に検査する、1つまたは複数の板を含むことができると企図されている。

【0019】

より一般的な観点から、方法および装置は、細菌毒素および(a)腸関連抗原および(b)血液自然脳関門関連抗原の少なくとも1つから選択されるネイティブ抗原に対し患者由来試料の結合からシグナルを生成させるシグナルを生成させる抗体検査パネルから、検査結果を取得し解析することを含む、解剖学的バリアの過剰な透過性に関連する疾患の検出および診断を支援するために本明細書で企図されている。

10

【0020】

これら企図された方法、装置の全てにおいて、試料は、例えば全血試料、血清/血清試料、唾液試料、または他の体液に由来する試料を含む、任意の適切な生体試料を含むことができる。

【0021】

本明細書で企図された方法および装置は、(1)腸内微生物叢腸内毒素症および(2)腸管バリアの破壊に関連する疾患の差動的な診断を支援するために使用することができることが、またさらに企図されている。例えば、近年企図されているように、診断結果が、リポ多糖類の細菌毒素に対するIgA、IgM、およびIgGのいずれかの陽性結果および、オクルジンおよびゾヌリンに対するIgA、IgM、およびIgGのすべての陰性結果と、アクトミオシンに対するIgGの陰性結果を含む場合、腸内細菌毒素症に関連する診断が示される傾向があり得る。

20

【0022】

鑑別診断はまた、傍細胞経路が原因の腸管バリアの破壊と経細胞経路間とを鑑別することにより支援されるように企図されている。

【0023】

傍細胞経路を介した破壊に関しては、検査結果が、リポ多糖類の細菌毒素に対するIgA、IgM、およびIgGいずれかの陽性結果および、オクルジンまたはゾヌリンに対するIgA、IgM、およびIgGすべての陰性結果と、アクトミオシンに対するIgGの陰性結果を含む場合、細菌抗原による腸管バリアの破壊に関する診断が示される傾向にある。これとは対照的に、検査結果が、リポ多糖類の細菌毒素に対するIgA、IgM、およびIgGすべての陰性結果および、オクルジンまたはゾヌリンに対するIgA、IgM、およびIgGいずれかの陽性結果と、アクトミオシンに対するIgGの陰性結果を含む場合、細菌抗原以外のものによる腸管バリアの破壊に関する診断が示される傾向にある。

30

【0024】

経細胞経路を介した破壊に関しては、診断結果が、リポ多糖類の細菌毒素に対するIgA、IgM、およびIgGいずれかの陽性結果および、オクルジンおよびゾヌリンに対するIgA、IgM、およびIgGすべての陰性結果と、アクトミオシンに対するIgGの陽性結果を含む場合、細菌抗原による腸管バリアの破壊に関する診断が示される傾向にある。

40

【0025】

また、本明細書に記載の発見によれば、診断結果が、リポ多糖類の細菌毒素に対するIgA、IgM、およびIgGいずれかの陽性結果および、オクルジンおよびゾヌリンに対するIgA、IgM、およびIgGいずれかの陽性結果と、血液脳関門タンパク質に対するIgA、IgM、およびIgGいずれかの陽性結果と、ニューロン抗原に対するIgA、IgM、およびIgGいずれかの陽性結果を含む場合、細菌毒素によって誘発される腸管および血液脳関門完全性の両方の破壊に関する診断が示される傾向にある。

【0026】

これとは対照的に、診断結果が、リポ多糖類の細菌毒素に対するIgA、IgM、およ

50

び I g G それぞれの陰性結果および、オクルジンおよびゾヌリンに対する I g A、I g M、および I g G いずれかの陽性結果と、血液脳関門タンパク質に対する I g A、I g M、および I g G いずれかの陽性結果と、ニューロン抗原に対する I g A、I g M、および I g G いずれかの陽性結果を含む場合、細菌毒素以外によって誘発される腸管および血液脳関門の完全性の両方の破壊に関する診断があり得る。

【0027】

腸内微生物叢腸内毒素症は、腸管バリア整合性における破壊を伴わずに生じることができ、血液脳関門整合性における破壊はこれを伴うことがさらに企図されている。例えば、診断結果が、リポ多糖類の細菌毒素に対する I g A、I g M、および I g G いずれかの陽性結果および、オクルジンおよびゾヌリンに対する I g A、I g M、および I g G それぞれの陰性結果と、血液脳関門に対する I g A、I g M、および I g G いずれかの陽性結果および、ニューロン抗原に対する I g A、I g M、および I g G いずれかの陽性結果を含む場合、そのような状況での腸内微生物叢腸内毒素症に関する診断が示される傾向がある。

10

【0028】

同様に、例えば、診断結果が、リポ多糖類の細菌毒素に対する I g A、I g M、および I g G それぞれの陰性結果ならびに、オクルジンおよびゾヌリンに対する I g A、I g M、および I g G それぞれの陰性結果と、血液脳関門タンパク質に対する I g A、I g M、および I g G いずれかの陽性結果と、ニューロン抗原に対する I g A、I g M、および I g G いずれかの陽性結果を含む場合、腸管バリアまたは腸内微生物叢腸内毒素症との関連性を伴わない血液脳関門整合性、神経炎症、神経自己免疫における破壊に関する診断があり得る。

20

【0029】

特異的疾患に関して、本明細書で企図されている検査結果の比較は、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、多発性硬化症、アルツハイマー病、または末梢神経障害、および大うつ病の検出および診断を支援するために使用されることができる。検査結果が、血液脳関門タンパク質に対する I g A、I g M、および I g G いずれかの陽性結果と、ニューロン抗原に対する I g A、I g M、および I g G いずれかの陽性結果を含む場合、そのような条件があり得ると考えられている。

30

【発明の効果】

【0030】

本発明の独創性のある主題の様々な目的、特徴、態様および利点は、添付の図面および表と共に、以下の発明を実施するための形態からより明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】腸管壁浸漏および脳浸漏症候群の誘導における L P S の現在理解されている役割を示す先行技術の図である。

【図2】炎症および神経免疫疾患の病因における T h 1 7 リンパ球の炎症および活性化の L P S の現在理解されている役割（炎症反応の L P S 誘導、サイトカインの生産、および循環における T h 1 7 陽性細胞数の増加）を示す先行技術の図である。

40

【図3】脳機能障害に対する腸の現在理解されている病因を示す先行技術の図である。これは、どのように粘膜免疫寛容の損失が、もし調製されていないとすれば、腸管バリア機能障害を誘発するカスケード、全身性炎症、神経炎症、神経侵襲および神経変性を引き起こすことができるか、ということを示している。

【図4】異常な腸管透過性および血液脳関門透過性に関わるトリガーおよびメカニズムが、腸管透過性識別（I P I）および/または血液脳関門透過性識別（B B P I）のための検査の次世代のために使用されることができる、本発明の提案されたシナリオを示す図である。

【図5】本発明の特定の態様に係る自己免疫疾患の病因における異常な腸管透過性の提案された役割を示す図である。

50

【図6】免疫測定法を行うための試料マイクロタイタープレートのレイアウトを示す図であり、マイクロタイタープレートは、本発明における特定の態様に係る12種類の抗原およびペプチドを備える12種類の列を有する。

【図7】腸管およびBBBタンパク質由来の12種類の異なる抗原もしくはペプチドおよび関連組織抗原（抗原またはペプチドは透明である）に対するIgG/IgM/IgAを測定する、本発明における特定の態様に係る試料マイクロタイタープレートのレイアウトを示す図である。

【図8】品質管理の目的で、陰性対照および陽性対照を用いてIgG/IgM/IgAを毎週測定する、本発明の特定の態様に係る試料マイクロタイタープレートのレイアウトを示す図である（抗原またはペプチドは透明である）。

【図9】胃の自己免疫を備える健康なドナーおよび患者における、細菌リポ多糖類およびオクルジン/ゾヌリンに対するIgG、IgMおよびIgAの比較を示す図である。健康なドナーの細菌リポ多糖類に対するIgG、IgM、IgAおよびIgG+IgM+IgGのパーセント上昇は、左のグラフのライトバーに、平均値を超えた2つの標準偏差での胃の自己免疫を備えた患者は、右のグラフのダークバーに示されている。

【発明を実施するための形態】

【0032】

表1は、本発明の特定の様態によれば、環境要因（LPS）、腸管およびBBBタンパク質と、3人の健常者（試料1-3）の最初のセット中の関連抗原を表わす、12種類の抗原に対して検査されたIgG、IgMおよびIgA抗体値を示す。

【0033】

表2は、本発明の特定の様態によれば、環境要因（LPS）、腸管およびBBBタンパク質と、3人の健常者（試料4-6）の第二のセット中の関連抗原を表わす、12種類の抗原に対して検査されたIgG、IgMおよびIgA抗体値を示す。

【0034】

表3は、本発明の特定の様態によれば、環境要因（LPS）、腸管およびBBBタンパク質と、3人の健常者（試料7-9）の第3のセット中の関連抗原を表わす、12種類の抗原に対して検査されたIgG、IgMおよびIgA抗体値を示す。

【0035】

表4は、本発明の特定の様態によれば、環境要因（LPS）、腸管およびBBBタンパク質と、セリアック病や腸透過性を備える3人の患者（試料10-12）中の関連抗原を表わす、12種類の抗原に対して検査されたIgG、IgMおよびIgA抗体値を示す。

【0036】

表5は、本発明の特定の様態によれば、環境要因（LPS）、腸管およびBBBタンパク質と、グルテン失調を備える3人の患者（試料13-15）中の関連抗原を表わす、12種類の抗原に対して検査されたIgG、IgMおよびIgA抗体値を示す。

【0037】

表6は、本発明の特定の様態によれば、環境要因（LPS）、腸管およびBBBタンパク質と、多発性硬化症（MS）を備える3人の患者（試料16-18）中の関連抗原を表わす、12種類の抗原に対して試験されたIgG、IgMおよびIgA抗体値を示す。

【0038】

表7は、本発明の特定の様態によれば、LPS、オクルジン/ゾヌリンおよび血液中のアクトミオシンネットワークに対する特定の抗体の臨床的解釈を示している。

【0039】

表8は、本発明の特定の様態によれば、LPS、オクルジン/ゾヌリン、口腔液中のアクトミオシンに対する特定の抗体の上昇したレベルの臨床的解釈を示している。

【0040】

表9は、本発明の特定の様態によれば、LPSおよびオクルジン/ゾヌリン、血液脳関門タンパク質と血液中のニューロン抗原に対する特定の抗体の上昇したレベルの臨床的解釈を示している。

10

20

30

40

50

## 【0041】

抗原の増加した摂取は、発病には必要条件である。条件の数は、腸管の透過性を増やし、ひいては抗原接種を増加することで知られている。内腔に由来する免疫分子または抗原の摂取は、免疫介在活動、I g A および I g M 抗体の形態の腸内および、抗原特異的 I g A、I g M、I g G および免疫複合体 (26、27) の製造を備える腸外の両方をもたらすかもしれない可能性がある。

## 【0042】

I . 血液脳関門分裂および神経炎症の誘導上の細菌毒素および炎症性サイトカインの影響  
血液脳関門 (BBB) は、中枢神経系の内部環境と安定性を維持する。BBB への構造的および機能的変化は、自己免疫疾患をもたらすことがあり、特に、多発性硬化症 (28) のような神経系の自己免疫疾患である。

10

## 【0043】

BBB は、感染症、毒素、興奮毒性、または外傷 (23) のような、環境要因に応じて壊死性細胞死が起こることがある脳実質に由来する壊死性傷害に通常は応じる白血球を分ける。BBB は、2層からなる。第1層は、腸上皮細胞 (24、28) のそれとの構造的類似点を備える大量のタイトジャンクションを有する微小血管内皮細胞で構成されている。第2層は、グリア突起 (29) により形成されるグリア境界膜である。内皮細胞とアストロサイト間の血管周囲腔は、未熟樹状細胞 (29) のように作用するマクロファージによって取り込まれる。したがって、上皮 TJ バリアを開くことができる因子は、BBB および神経組織 (30 - 33) の両方を破壊することができる。これは、中枢神経系炎症 (29、34 - 35) に必須である、菌体内毒素、炎症性サイトカイン、酵素およびエフェクター細胞 Th 1、Th 17 を含む。

20

## 【0044】

エンドトキシン、サイトカイン、ケモカイン、接着分子、およびそのほかによる BBB の分裂、ならびに、中枢神経系の中への全身性コンパートメントに由来する自己反応性 T 細胞の輸送は、MS 病変 (36 - 38) の開発において重要な役割を果たすことが、堅く確立されている。しかしながら、ヒト Th 1 対 Th 17 リンパ球を比較した時、ヒト Th 17 リンパ球は、Th 1 リンパ球よりも BBB を越え速く移動する。確かに BBB を越えるその遊走時の IL - 17 - および IL - 22 - 発現 CD 4 < + > CD 45 RO < + > 記憶リンパ球の膨大な量は、In vitro および In vivo (35) で BBB を通過する Th 17 リンパ球の能力を確認した IL - 17 + および IL - 22 + マーカーを発現した。BBB 内皮細胞 (ECS) を浸透させる Th 17 リンパ球によって使用される BBB 内皮細胞は、IL - 17 R と IL - 22 R 発現した。血清アルブミン (BSA)、BBB を越えるウシ巨大分子のような、細胞または抗原のこの拡散は、IL - 17 および IL - 22 がヒト BBB - ECS の単層に添加されたとき、著しく強化された。BBB - ECS のこの強化された透過性は、オクルジンおよびゾヌリン、2つの重要なタイトジャンクションタンパク質 (39) の発現での減少と関連していた。

30

## 【0045】

これらの結果は、炎症が、BBB タイトジャンクションへの Th 17 の結合をもたらす血液脳関門内皮細胞上の IL - 17 および IL - 22 受容体の Th 17 リンパ球発現の活性化を引き起こす、LPS および他の細菌毒素によって誘発されることを強く示唆している。これは、CNS 炎症 (40 - 44) をもたらす循環性 CD 4 < + > リンパ球および可溶性分子に対する BBB の透過処理および BBB の誘導とブリーチにおいて重要な役割を果たす、神経細胞破壊、循環中 (IL - 17 および IL - 22 の作用を介した細胞共発現 IL - 17、IL - 22 および グランザイム B) への神経細胞抗原および BBB タンパク質の放出をもたらす、CD 4 細胞によるインターフェロンガンマおよび Th 17 による グランザイム B の放出、Th 17 および BBB を越える自己反応性 T 細胞の遊出に至る、タイトジャンクションを破壊する。炎症性および神経免疫疾患の病因における Th 17 リンパ球の役割は、図 2 に示されている。この作用機構に基づいて、腸透過性の細菌毒素誘導および、BBB タンパク質構造の分解は、LPS だけでなく、タイトジャンクションタン

40

50

パク質およびBBBタンパク質に対する抗体生産をもたらすことができる。したがって、本発明の特定の様態に係る神経炎症に取り組むための手順は、マトリックスメタロプロテアーゼおよび関連受容体抗体のような、LPS、オクルジン、クローディン、BBBタンパク質、タイトジャンクション、酵素の検査とともに始まる。臨床医はそれに基づき、胃腸バリア機能障害の修復を計画でき、続いて、全身性炎症を湿し、血液脳関門上の修復とともに終了する。

#### 【0046】

血液脳関門内皮細胞上のIL-17およびIL-22受容体の発現は、BBBタイトジャンクションへのTh17細胞の結合をもたらす。これは、自己反応性CD4細胞および神経変性に至るタイトジャンクションを分裂させる。Th17細胞は次いで、BBBを越え、グランザイムBの放出によるニューロンの殺害のための段階を設定する。神経細胞抗原のこの放出は、神経自己免疫および神経変性の悪循環をもたらす。

10

#### 【0047】

ここで提示された情報に基づいて、消化管が多くの神経変性疾患のための出発点であると仮定されている。それは、大量のリポ多糖類(LPS)を放出する、不均衡なマイクロフローラとともに始まる。大量のLPSエンドトキシンは、オクルジンおよびゾヌリン含むTJとそれらのタンパク質の分解や解離をもたらす、炎症誘発性サイトカインTNF- $\alpha$ およびIL-1 $\beta$ の発現上昇を誘導する。これは、BBBへ進む血流における炎症が続いている。炎症は、経浸潤、神経炎症、神経自己免疫、そして最後に、神経変性をもたらすBBBを開く。図3は、神経変性に至る病態生理学を示す；人間の腸管バリア機能障害が対処されていない場合、人間は神経炎症と考えられる神経変性を、時間をかけて開発することができた。多くの自己免疫疾患は、複数のトリガー、症状、および神経系障害を有する。個々の多くが、LPS、TJs、およびBBBタンパク質に対し高水準の抗体を生産する神経自己免疫の場合には、免疫および神経系が関係している。これら2つのシステムのための共通点は消化管で、その重要性は提示されている(43)。

20

#### 【0048】

したがって、本発明の特定の様態において、オクルジンのようなTJタンパク質、LPSのような菌体内毒素、およびBBBタンパク質に対する抗体の検出および測定は、GIおよび腸管バリア完全性を評価するためだけでなく、全身性炎症、神経炎症、神経侵襲および神経変性の根本的な原因を判断および/または診断するための最善の方法である。また、腸上皮の病変は速やかに修復されるべきである。そうでなければ、これは、複雑な自己免疫疾患および神経免疫疾患をもたらし得る炎症カスケードを駆動する循環の中に食物タンパク質、共生および病原性細菌の浸透を可能にし得る。

30

#### 【0049】

##### II. 小糖分子対巨大抗原分子に対する透過性の測定

腸管透過性を評価するための現在の方法論は、ラクツロースとマンニトールを使用する。過去40年間にわたって、それは便利な臨床ツールだった。ラクツロース吸収は、腸バリアにおける涙液を示唆しており、したがって、腸管透過性である。俗説に対し、この小分子の吸収は、涙液というより微小リークを実際には示している。ラクツロースは、比較的低い分子サイズを有し、腸管膜を介したこの物質の転移は、食品または他のタンパク質の転移およびそれらに対する免疫応答のための状況を反映しない。さらに、ラクツロース/マンニトール検査は、経細胞経路ではなく傍細胞経路のみを介した小分子の転移を測定する。

40

#### 【0050】

したがって、抗原であり、免疫系に挑戦する、細菌内毒素(食品タンパク質のサイズに匹敵する)のような巨大分子を使用して、巨大分子腸管透過性識別(LMIP1)は評価されるべきである。さらに、BBB透過性に関していくつかの証拠は、BBB透過性における変化は、MSおよび実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)(45-50)の主要な誘発因子であることを明らかにしたものの、BBB透過性の測定のための公認の血液検査は現在のところ存在しない。しかしながら、動物モデルにおいて、BBBの形態学的および

50

機能的変化は、バリア損傷障害（7、11、28）を測定するためにゾヌリン/オクルジンを使用することによって実証された。

【0051】

図4に示されるように、本発明の方法論の重点は、バリアからの解放に際し抗原となる巨大分子上にあり、血液、血清、および/または唾液試料で検出されるそれらに対する特異性IgG、IgMおよび/またはIgA抗体の生産をもたらす免疫系に挑戦する能力を有する。

【0052】

菌体内毒素や食物タンパク質のような巨大抗原分子に対する腸管バリア透過性の評価は、胃腸や自己免疫疾患の病因の理解において重要になってきている。科学的証拠は、多くの胃腸や自己免疫疾患は、エンドトキシンの増加した転移および腸壁（7、51-55）を介した好気性と嫌気性細菌に由来する他の細菌毒素を伴うことを示している。この増加した転移およびそれに関する炎症は、タイトジャンクションタンパク質の分解と、オクルジン/ゾヌリンのようなタイトジャンクションタンパク質およびLPSのような菌体内毒素に対し、以降の免疫応答を誘発することがある。確かに、ラットおよびヒトの上皮細胞は、有意な量のゾヌリンを分泌する細菌毒素またはグリアジンにさらされる。ゾヌリンのこの放出は、傍細胞経路（7、51）を介して腸管透過性をもたらす、タイトジャンクション複合体に由来するタンパク質ZO-1の離脱が続いている。そして、多くの慢性疾患は、LPSおよび病原性細菌（24、25）の他の抗原に対するIgAおよびIgMの増加した血清値が伴う。これらの条件は、腸炎症および粘膜バリア透過性を引き起こし、それにより、腸壁の細胞およびタイトジャンクションタンパク質の解離間の拡大部は、アクトミオシンネットワークおよび防護壁の損失を誘発することができる。防護壁のこの損失は、細菌転移を増加させ、従って血清エンドトキシン、タイトジャンクションタンパク質、およびアクトミオシンの濃度を高める可能性がある。

10

20

【0053】

本発明の特定の様態によれば、LPS、タイトジャンクションタンパク質（オクルジン/ゾヌリン）およびアクトミオシンに対する増加した血清IgAおよびIgMは、腸管バリア浸透性の存在およびバリアを越える巨大分子の輸送を示す。細菌のエンドトキシンは、Tリンパ球に対するスーパー抗原として作用する細菌毒素を介して、または、分子模擬態と呼ばれるメカニズムによって自己免疫を引き起こしている可能性がある。多くの細菌は、神経組織を含むヒト組織抗原に非常に類似する抗原部位を有する。腸管バリア透過性が放置されている場合、次いで、抗原の炎症性カスケードおよびそれらに対して生産された抗体は、順番に様々な組織の中に入り、最初の炎症および、次いで、神経自己免疫を含む自己免疫を誘発するだろう。したがって、抗原性腸管バリア透過性が、その経過を実行させる場合、継続的な変性は、抗原および、全身性炎症を引き起こすことができ、神経炎症、神経侵襲および神経変性をもたらす、付随する追加の免疫反応をもたらす、細胞性血液脳関門透過性の誘導が続く。

30

【0054】

したがって、本発明の特定の様態によれば、慢性炎症や自己免疫性症状を備える患者は、細菌LPS、タイトジャンクションタンパク質およびアクトミオシンに対するIgA、IgGおよび/またはIgMの測定により、巨大抗原分子に対する増加した腸透過性の生存のために確認されるべきである。最後に、LPSおよびオクルジン/ゾヌリンに対するIgA、IgGおよび/またはIgM抗体の測定に加え、これら抗体はまた、神経免疫疾患を備える患者における、BBBタンパク質、酵素、随伴性受容体および神経細胞抗原に対して測定されるべきである。細菌毒素および、組織損傷および自己免疫に至る、放出されたTJタンパク質、LPSおよび他の細菌抗原に対する抗体の生産によるTJ分解のこの多段階プロセスは、図5に図示されている。

40

【0055】

本発明の特定の様態によれば、LPS、オクルジン/ゾヌリンおよび他のタイトジャンクションタンパク質、プラスBBBタンパク質、血液中の神経細胞抗体（IgG、IgM

50

およびIgA)の検出および測定が、腸管/BBB透過性および神経自己免疫の評価に最適な方法になり得るのに対し、口腔液中のIgA、およびIgMならびに、TJタンパク質およびLPSに対する血液中のIgG、IgMおよびIgAの測定および検出は、腸管バリア機能の評価に最適なアッセイになり得る。

#### 【0056】

細菌抗原(LPS)は、オクルジンおよびLPSがマクロファージおよび樹状細胞に提示される、タイトジャンクションおよびその後の粘膜下層への遊走を介した、タイトジャンクションの開口ならびにオクルジンおよびLPSの継世を引き起こす、タイトジャンクションの分解およびゾヌリン放出を誘発する。マクロファージは、TおよびB細胞へこれらの抗原を提示する；これは異常な免疫応答、体液性(オクルジンおよびLPSに対するIgA、IgMおよびIgG)および細胞性の両方が続く。体液性および細胞性免疫間のこの相互作用は、自己免疫疾患の典型的な組織損傷に至る、腸上皮組織およびその他の抗原を標的にする自己免疫プロセスのための最終的な原因である。

10

#### 【0057】

以下は、数人の検査患者についての代表的なアッセイの説明、ならびにそれらの使用および解析である。本明細書に記載の材料および方法と同様または同等の他の材料および方法は、本発明の実施または検査において使用することができるが、好ましい方法および材料については、特定の態様によれば、本発明をさらに説明するために、発明を例示的なアッセイの説明に記載されている。

#### 【0058】

20

##### E L I S A アッセイ

##### A. 材料および方法 プレートおよび試料調製：

E . c o l i 0 5 5 : 8 5 由来のリポ多糖類；E . c o l i K - 2 3 5、緑膿菌、シュドモナス、サルモネラ腸炎、ネズミチフス菌、クレブシエラ肺炎、モルガネラ、ハフニアールベイ、シトロバクター・コセリ、アクチン、アクトミオシン、ミエリン塩基性タンパク質とa - Bクリスタリンは、Sigma - Aldrich社(ST . Loui s、MO)から購入された。グリア原線維酸性タンパク質(GFAP)は、Boehringer Mannheim社(Indianapolis、IN)から購入された。また、ゾヌリンペプチド1、2、3、腸ZOT受容体、ミエリン塩基性タンパク質87 - 106、ペプチド87 - 106、細胞間結合タンパク質、マトリックスメタロプロテアーゼ - 3、本研究で命名されたS100 - Bのカルシウム結合領域、BBB - 1 M S E L E K A M V A L I D V F H Q Y S G R E G D K H K L K K、BBB - 2 S E L K E L I N N E L S H F L E E I K E Q E V V D K V M E T、BBB - 3 L D N D G D G E C D F Q E F M A F V A M V T T A C H E F F E H E、脳ZOT結合タンパク質 - 1、- 2、カルプロテクチン(MRP - 8)、および脳ZOTレセプターも使用された。

30

#### 【0059】

90%以上の純度を備えるすべてのペプチドHPLCグレードは、EZ Biolab社(Carmel、IN)により合成された。本願を通して、本文が逆の意味を支持しない限り、本明細書に記載のすべての範囲は、それらのエンドポイントを含むものとして解釈されるべきであり、また、オープンエンドの範囲は、商業的実用価値を含むように解釈されるべきである。同様に、本文が逆の意味を示さない限り、すべての値の一覧は、中間値を含むと考察するべきである。

40

#### 【0060】

図6に示されるように、抗原およびペプチドは、1.0mg/mLの濃度でメタノールに溶解され、次いで、0.1M炭酸水素ナトリウム緩衝液、pH9.5で1:100に希釈し、その50μlをポリスチレン平底ELISAプレートの各ウェルに添加された。

#### 【0061】

プレートは、4で1晩インキュベートされ、次いで、0.05%Tween20(pH7.4)を含むトリス塩酸緩衝液(TBS)200μlで3回洗浄された。免疫グロブ

50

リンの非特異的結合は、TBS中の2%のウシ血清アルブミン(BSA)200MLの添加によって防止され、4 1晩でインキュベートされた。プレートは洗浄され、品質管理(QC)を行った後、使用されるまで4 に保たれた。

#### 【0062】

酵素コンジュゲートには以下のものが含まれていた：アフィニティー精製抗体ホスファターゼ標識ヤギ抗ヒトIgG(Jackson ImmunoResearch社、カタログ番号109-055-008)；アフィニティー精製抗体ホスファターゼ標識ヤギ抗ヒトIgA(Jackson ImmunoResearch社、カタログ番号L09-055-011)；および、アフィニティー精製抗体ホスファターゼ標識ヤギ抗ヒトIgM(Jackson ImmunoResearch社、カタログ番号L09-055-043)。

10

#### 【0063】

さらに本明細書に記載する方法に含まれる他の追加の試薬および材料には、以下のものが含まれていた：リン酸緩衝生理食塩水粉末(Sigma社、カタログ番号P3813-10PAK)、ウシ血清アルブミン(Biocell社、カタログ番号3203-00)、アジ化ナトリウム(Sigma社、カタログ番号S-2002)、Tween20(Sigma社、カタログ番号P1379-1000ML)、グリセロール(Sigma社、カタログ番号G5516-500ML)、水酸化ナトリウム(Sigma社、カタログ番号S-5881)、塩化マグネシウム(Sigma社、カタログ番号8266)、ジエタノールアミン(Sigma社、カタログ番号D-8885)、1.0Nの塩酸溶液(Sigma社、カタログ番号H3162 IGA)、基質錠：p-NPP(パラニトロフェニルリン酸)(Sigma社、カタログ番号S-0942)5mg、および蒸留水(D<sub>2</sub>O)。

20

#### 【0064】

図6に示されているように、マイクロウェルプレートは準備され、12種類の腸脳関連抗原またはペプチドでコーティングされた。標準物質および陽性対照ならびに希釈した患者試料をこれらのウェルに添加し、異なる抗原を認識する自己抗体は最初のインキュベーション中に結合した。これらのウェルを洗浄し、全ての未結合蛋白質を除去した後、精製したアルカリホスファターゼ標識ウサギ抗ヒトIgG/IgM/IgA未結合コンジュゲートを、さらなる洗浄ステップにより除去された。

30

#### 【0065】

結合したコンジュゲートを、黄色の反応生成物を与えるパラニトロフェニルホスフェート(PNPP)基質で可視化し、この強度は、試料中の自己抗体の濃度に比例する。水酸化ナトリウムは各ウェルに添加され、反応を停止させた。色の強度を405nmで読み取った。

#### 【0066】

無地の赤の上端またはレッドタイガー(red tiger)の上端(SSTチューブ)を検体採取に用いられたが、特定の態様では、他の検体採取器具が、このアッセイのために企図される。

#### 【0067】

血液試料を、無菌静脈穿刺技術を用いて採取し、血清を、標準的な手順を用いて得た。特定の態様では、このアッセイのための血清は最小値が約100μlであることが好ましく、したがって、これは、血液の約1ml以上に相当する。

40

#### 【0068】

##### B. 検査アッセイ手順

LPS、腸管および/またはBBBタンパク質に対するIgG、IgMおよび/またはIgA抗体のための分析手順について、これから説明する。いくつかの態様において、検査アッセイを開始する前に、全ての試薬を室温に戻した。この検査アッセイ手順には、所望の数および所望の種類抗原ならびに/またはペプチドでコーティングした所望の数のウェルもしくはプレートの準備が含まれる。マイクロタイターウェルを準備した後、1：

50

100で希釈された対照標準物質約100μlは、マルチチャンネルピペッターを用いて行うことができ、図7に示すように、マイクロタイタープレートのA列およびB列に添加された。図7に示すように、1:100で希釈された患者の検査試料(ここでは血清)約100μlは、第1臨床検体のC列およびD列、第2臨床検体のE列およびF列、ならびに第3臨床検体のG列およびH列の2つ組のウェルに添加された。

【0069】

図8に示すように、別々のプレート上で、2つ組の臨床検体と同様に周期的な(すなわち毎週)陰性対照および陽性対照の実験が行われた。

【0070】

次いで、これらのプレートは室温で約60分間インキュベートされた。インキュベーション後、ウェルを次いで空にして、ELISA洗浄器を用いてPBSで4回洗浄された。最適に希釈したアルカリホスファターゼ標識ヤギ抗ヒトIgA約100μlは、IgAプレートに添加され、酵素標識IgG約100μlはIgGプレートに添加され、抗IgMはIgMプレートに最適な希釈で添加された。

10

【0071】

次いで、各プレートは室温で約30~約60分間インキュベートされた。コンジュゲートのインキュベーション終了約10分前に、基質溶液は、錠剤が完全に溶解するまでよく混合された基質緩衝液約5mlとp-ニトロフェニルリン酸錠剤の約5mgを混合することによって調製された。ELISA洗浄器を使用して、PBSでの洗浄を4回繰り返した。次いで、基質溶液約100μlは各ウェルに添加された。次いで、プレートは、直射日光への暴露を回避しながら、室温で約30分間インキュベートされた。反応は、3NのNaOH約50μlを添加することにより停止された。これらのウェルの色の強度を、マイクロタイタープレートリーダーを用いてブランクウェルに対して405nmで読み取り、標準物質、対照および未知試料の吸光度値を記録した。

20

【0072】

C. 結果の計算

405nmでプレートの読み取りを行い、光学密度値(OD<sub>405</sub>)を得た後、列AおよびBにおいて、陰性対照の平均OD、陽性対照の平均ODおよび各臨床検体の平均ODを標準物質の平均ODで除し、各指標値(IV)を得た。

【0073】

各2つ組試料の平均ODを標準物質対照値の平均ODにより除することによって、12種類の異なる抗原に対して各抗体に対する指標値(IV)を計算した(例えば、ウェルC1およびD1の平均ODをウェルA1およびB1の平均ODで、ウェルC2およびD2の平均ODをウェルA2およびB2の平均ODで、ウェルC3およびD3の平均ODをウェルA3およびB3の平均ODで除する、など)。

30

【0074】

次に、確立された参照範囲と結果を比較した。

指標 = 患者の平均OD / 標準物質の平均OD

【表1】

40

ゾヌリン/オクルジンに対する指標計算	
Cal 1 (OD)	0.48
Cal 2 (OD)	0.50
試料3A (OD)	3.4
試料3B (OD)	3.2
指標	6.7

【0075】

D. 結果の解釈

i. セリアック病、グルテン免疫反応性および感受性ならびにクローン病患者における

50

## I g G / I g M / I g A 抗体のパターン

9名の健常対象者(表1から3)のI g G、I g MおよびI g A抗体パターンの例およびセリアック病および腸管透過性のある3名の患者(表4)、グルテン運動失調のある3名の患者(表5)および多発性硬化症の3名の患者(表6)とのそれらの比較をそれぞれ表1-6で示す。

## 【0076】

セリアック病およびグルテン免疫反応性/感受性/自己免疫との間のデータ解釈および臨床検査による鑑別を表7から9で示す。

## 【0077】

i i . セリアック病および腸管透過性、グルテン運動失調がある患者およびMS患者における、腸、B B Bタンパク質および関連抗原に対するI g G、I g MおよびI g A抗体のパターン

指標の計算に基づき、9名の健常対照者(表1から3)、セリアック病および腸管透過性のある3名の患者(表4)、グルテン運動失調のある3名の患者(表5)および多発性硬化症の3名の患者(表6)のI g G、I g MおよびI g A抗体のパターンをそれぞれ表1-6で示す。健常対象全員において、抗体指標が1.5より高いかもしれないが、2.0よりも著しく大きくはないであろうL P SおよびM B Pを除き、他の抗原に対する抗体指標は、1.5よりも小さいかまたはきわめて小さいことに留意されたい(表1-3)。

## 【0078】

セリアック病患者において、脱アミド化 - グリアジン33マーペプチド、組織トランスグルタミナーゼ(t T g)およびグリアジン - t T g複合体に対するI g GおよびI g Aにより確認した場合、抗体のパターンは患者によって変動する。

## 【0079】

例えば、表4の試料10で、これらの抗体は、L P S、ゾヌリン/オクルジン、腸管Z O T受容体、細胞間結合タンパク質、M M P - 3、 - Bクリスタリンおよびミエリン塩基性タンパク質に対して顕著に高いが、このことから、腸管透過性亢進に加えて、患者がB B B透過性を抱えている可能性があることが示唆される。表4の試料11は、細胞間結合タンパク質および腸管Z O T受容体に対する抗体の顕著な上昇を示し、L P Sに対して中程度の上昇を示したが、B B Bタンパク質および神経抗原に対しては上昇せず、このことから、セリアック病に加え、患者が腸管透過性、B B B透過性、神経自己免疫およびお

## 【0080】

3名のグルテン運動失調患者(試料13から15)におけるガット・トゥ・ブレイン(g u t - t o - b r a i n)に相当する12種類の異なる抗原に対するI g G、I g MおよびI g A抗体のレベルを表5で示す。これらの患者におけるグルテン運動失調は、脱アミド化 - グリアジン33 - マーペプチド、t T g - 2、グリアジン - t T g複合体、t T g - 6および小脳抗原に対するI g GおよびI g A抗体の存在により確認した。これらの患者において、抗体のパターンは、Z O T結合タンパク質、脳Z O T受容体、 - Bクリスタリン、カルプロテクチン、G F A Pおよび細胞間結合タンパク質に対して顕著により高く、バリア損傷障害が確認される。

## 【0081】

3名のMS患者(試料16から18)における12種類の試験抗原に対するこれらの抗体のレベルを表6でまとめる。MSの診断は、異常なM R Iに加え、M B P、ミエリン突起膠細胞糖タンパク質(M O G)、 - Bクリスタリン、プロテオリピドタンパク質、リンパ球活性化および炎症性サイトカイン産生に対する抗体検出に基づいて行われた(44)。神経抗原、B B Bタンパク質およびゾヌリン/オクルジンに対して抗体レベルの顕著な上昇を検出した。これは、実際にMS患者においてB B B機能不全があることを示すものである。

## 【0082】

i i i . 消化管自己免疫を有する患者における細菌性リポ多糖およびオクルジン/ゾヌ

10

20

30

40

50

リンに対する I g G、I g M および I g A 抗体の測定

腸管透過性は胃腸自己免疫疾患で顕著である(4)。図9は、健常対照および消化管自己免疫がある患者における、細菌エンドトキシン(リポ多糖)およびタイトジャンクションの構造(オクルジン/ゾヌリン)に対する抗体の上昇を比較する図表を示す。

【0083】

腸上皮全域にわたる抗原性巨大分子の過剰な侵入によって、複数の炎症性サイトカインの産生が開始され、全身性慢性炎症が起こり始め、その継続的向上が持続し得る(56)。これは、最終的な自己免疫疾患に導く3要因(遺伝的脆弱性、環境曝露および腸管透過性)にとって必須の要素と思われる。

【0084】

本発明のある態様によれば、本明細書中で、L P S、オクルジン/ゾヌリンおよびアクトミシンネットワークに対する抗体上昇が、健康な腸管バリアの破壊を同定するバイオマーカーであり、L P S、オクルジン/ゾヌリン、他の細胞間結合タンパク質、B B B タンパク質+神経抗原(例えば、M B P、 $\alpha$ -B クリスタリン、G F A P、カルプロテクチンおよび脳Z O T タンパク質)に対する抗体上昇が、健康な腸管バリアの破壊だけでなく、B B B 完全性の破綻も示すという仮説が立てられる。

【0085】

本発明のある態様による、口腔液中のL P S、オクルジン/ゾヌリンおよびアクトミシンに対する抗体レベル上昇の臨床的解釈は表8で示す。

【0086】

本発明のある態様による、L P S、オクルジン/ゾヌリン、血液脳関門タンパク質および神経抗原に対する抗体の血中レベル上昇の臨床的解釈を表9で示す。

【0087】

症例

2つの異なる症例報告、第一にセリアック病患者および第二に多発性硬化症患者の症例を次のとおり与える。

【0088】

A. 症例報告#1: セリアック病および腸管バリア機能不全の患者

身長5'4"、体重106 lbsで、線維筋痛様の症候群および体重減少(過去6ヶ月、月に1から2 lbs)を伴い、便秘、下痢および全身にわたる疼痛を含むG I 障害のある38歳女性を内科医が診察した。実験室研究から、C B C が異常であり、ヘモグロビン9.9 g/dL、M C V が77 fL、赤血球沈降速度54 mm/1<sup>st</sup> hrであり、葉酸およびビタミンB12濃度は低いが、肝臓酵素レベルおよび高感度C-反応性タンパク質が高いことが明らかとなった。A N A、リウマチ因子、T3、T4およびT S H レベルを含む詳細な生化学および免疫学的プロファイルを調べたところ、全ての試験が正常範囲内であった。胃腸の不快感、軽度の発熱および頭痛について繰り返し訴えた後、G I 検査のために患者を専門機関に紹介した。

【0089】

大腸内視鏡検査および十二指腸生検を行い、免疫組織学的評価から、全体的な絨毛萎縮があり、M a r s h I I I 分類であることが明らかとなった。この時点で、グリアジンおよびトランスグルタミナーゼに対するI g G およびI g A 濃度を調べた。グリアジンおよびトランスグルタミナーゼに対するI g G およびI g A の両者とも、参照範囲よりも3から5倍高かった。

【0090】

絨毛萎縮を考慮して、セリアック病のグリアジンおよびトランスグルタミナーゼ陽性診断を行った。本患者に輸血し、抗炎症薬を処方し、グルテン不含食を開始した。3ヵ月後、本患者の全体的な胃腸不快感は改善し、体重が4ポンド増加したものの、本患者のC R P は高いままであり、身体の疼痛および軽度発熱が継続した。これを考慮し、炎症および軽度発熱の根本的原因を判定するために、L P S、ゾヌリン/オクルジンおよび細胞間結合タンパク質に対する抗体を調べた。表4、試料10で与えられる結果から、健常対象と

10

20

30

40

50

比較して、本患者（試料10）ではLPS、ゾヌリン/オクルジンおよび細胞間結合タンパク質に対するIgG、IgMおよびIgA抗体レベルが3から6倍高いことが示され、このことから、セリアック病に加えて、本患者において細菌移行、タイトジャンクション損傷および大きな抗原性分子に対する腸管壁浸漏症候群があることが示唆された。

#### 【0091】

したがって、グルテン不含食に加え、レクチン不含食+プロバイオティクス・グルタミン、N-アセチルシステイン、EPA/DHA、ビタミンD、ラクトフェリン、キシリトールおよびボスウェル酸の実行を進め、本患者に腸管壁浸漏症候群に対する治療を行った。このプロバイオティックレジメ+レクチンおよびグルテン不含食の開始から30日後、本患者の臨床状態は顕著に改善し、発熱が37に低下し、さらに61bs体重が増加した。60日後、腸管壁浸漏症候群に対する治療をプロバイオティクスのみに減らしたが、グルテン不含食は継続した。1年後、全ての臨床検査を繰り返し、グリアジン、トランスグルタミナーゼ、CRO、LPSおよびゾヌリン/オクルジンに対する反復試験は正常範囲内となったが、これは、腸管壁浸漏に対する管理+グルテン不含食がセリアック病および腸管壁浸漏症候群に罹患したこの患者の治療に有効であったことをさらに示すものであった。

10

#### 【0092】

考察：絨毛萎縮に加えて、セリアック病の患者の大多数が腸管壁浸漏症候群にも罹患していることが文献において確立されている。このため、グルテン不含食で改善するのはセリアック病患者のおよそ50%のみであり、患者らの絨毛構造が正常に戻ったのはこのような治療の6ヶ月後であった。腸管壁浸漏症候群がセリアック病において誘導されるメカニズムは、一部の患者では、特異的なグリアジンペプチドが上皮細胞に結合し、タイトジャンクションタンパク質に対して損傷を生じさせ、ゾヌリン/オクルジンおよび粘膜下から血液へのクロードインの放出を引き起こすという事実によるものである。この特定の場合において、本患者の症状の一部はグルテン不含食で改善したが、グルテン不含食は、LPS移行および消化管透過性亢進により誘導される炎症性カスケードを改善しなかった。しかし、グルテン不含食+自然療法を用いたタイトジャンクションタンパク質修復のための治療（57から61）の実行から30-90日後、臨床症状および臨床検査の結果の両方が正常に戻った。したがって、セリアック病患者については、抗原性である大きな分子に対する腸管壁浸漏についてスクリーニングし、セリアック病に対してだけでなく、消化管バリアを修復するための治療も行うべきであると結論付けられる。本発明の発明の主題は、この能力を提供する。

20

30

#### 【0093】

B. 症例報告#2：多発性硬化症、消化管バリアおよび血液-脳関門透過性がある患者身長5'8"、体重182lbsの38歳男性は、四肢脱力を伴う3週間の進行性の頸部、背部および筋肉痛という病歴後、神経科医を紹介された。紹介前日、本患者は、刺痛を伴う排尿困難ならびに階段を昇ることができないほどの胸部および肢の知覚障害を発症した。入院の僅か2年前、本患者には家族の問題があり、非常に落ち込んでいたが、それに対して何ら助けを求めなかった。本患者の全体的な既往歴は、他に、ビタミンB12および鉄サプリメントで治療を受けた原因不明の軽度の小球性貧血を除き、特になかった。

40

#### 【0094】

本患者が軽微な脳卒中に罹患していた可能性があるか否かまたはある種の神経もしくは自己免疫障害に罹患していた可能性があるか否かを明らかにするために、一連の免疫学的プロファイルおよび神経学的検査を開始した。

#### 【0095】

臨床検査から、化学およびCBC検査が正常であり、ヘモグロビンの結果が10.8g/dLであることが明らかになった。ANA、リウマチ因子、免疫複合体、総免疫グロブリン、カルジオリピド(cardiolipid)抗体および甲状腺機能試験を含む免疫学的プロファイルは正常範囲内であった。

#### 【0096】

50

さらなる試験中、脳脊髄液および血液を回収し、マイコバクテリウム、ボレリア菌 ( *Borrelia* )、CMV、EBV、ヘルペス6型、HTLV-1および-2および梅毒について試験したところ、全て陰性であった。CSFタンパク質は0.7g/L、グルコースは2.3 mmol/Lであった。

【0097】

神経学的検査から、矯正視力が低下し、右眼で6/48、左眼で6/36であり、眼球運動は正常であることが明らかとなった。本患者は、両肢に錐体筋衰弱があり、歩行が緩徐であった。ピン刺激痛覚検査から、両側でD10以下の片側感覚レベルであることが分かった。

【0098】

脳のMRIスキャンから、MS患者で観察されている、軽度の全身性萎縮を伴う軽度の白質の異常が示された。

【0099】

しかし、グルテン感受性、セリアック病および腸管壁浸漏症候群の可能性を排除するために、AGA、tTG抗体およびラクツロース/マンニトール試験を行った。セリアックスクリーニングから、IgGおよびIgA抗-グリアジン抗体の両方が参照領域の3から6倍高いが、トランスグルタミナーゼに対するIgGおよびIgAに対して完全に陰性であることが明らかになった。さらに、ラクツロース/マンニトール試験結果は極めて異常であった。結果的に、次のさらなる試験を行った：LPS、ゾヌリン/オクルジン、腸管ZO2受容体、細胞間結合タンパク質、MMP-3、脳ZO2結合タンパク質、脳ZO2受容体、カルプロテクチン、GFAP、 $\alpha$ -Bクリスタリン、BBBタンパク質およびMBPに対するIgG、IgMおよびIgA抗体。表6、試料17でまとめた結果から、MBPおよびGFAPに対する抗体レベルの顕著な上昇が示され、これにより異常なMRI知見およびMSの診断が裏付けられた。さらに、ゾヌリン/オクルジン、カルプロテクチンおよびBBBタンパク質に対する抗体の顕著な上昇から、本患者において消化管およびBBB透過性亢進を伴うGI管病変が示唆された(表6)。これらの試験結果に基づき、本患者に1gの静脈内メチルプレドニゾロンを5日間にわたり与えたところ、幾分臨床的改善が見られた。この点で、本患者に $\alpha$ -セロンを処方したところ、15日後に顕著な改善が見られた。さらに、損傷のあるBBBおよび消化管バリアを修復するために200mgのミノサイクリンIVグルタチオン+プロバイオティクス・グルタミン、N-アセチルシステイン、EPA/DHA、ビタミンD、ラクトフェリン、キシリトールおよびボスウェル酸を与えた。この治療計画から3ヵ月後、患者の全身的健康は顕著に改善した。

【0100】

当業者にとって当然のことながら、既に記載されたものの他に、本明細書中の発明の概念から逸脱することなく多くのさらなる変更が可能である。したがって、発明の主題は、付属の特許請求の範囲を除き、限定されるものではない。さらに、明細書および特許請求の範囲の両方を読み取る際、用語は全て、内容と適合する最も広く可能なように解釈されるべきである。特に、「含む (comprises)」および「含むこと (comprising)」という用語は、包括的に要素、構成要素または段階を指すものと解釈すべきであり、これは、参照の要素、構成要素または段階が存在し得るかまたは利用され得るかまたは、明確には言及されていない他の要素、構成要素または段階と組み合わせられ得ることを指す。明細書、特許請求の範囲が、A、B、C...およびNからなる群から選択される何かの少なくとも1つを指す場合、その文章は、A+NまたはB+Nなどではなく、その群からの1つの要素のみを必要とするように解釈されるべきである。

【0101】

参考文献

1. Walker WA, Sanderson IR. Epithelial barrier function to antigens. *Ann NY Acad Sci*. 664:10-17, 1992.

2. Walker WA, Isselbacher KJ. Uptake and t

10

20

30

40

50

- ransfer of macromolecules by the intestine. *Gastroenterol*. 67:531-550, 1974.
3. Arrieta MC, Bistriz L, Meddings JB. Alterations in intestinal permeability. *Gut*. 55:1512-1520, 2006.
4. Fasano A, Shea-Donohue T. Mechanisms of disease: the role of intestinal barrier function in the pathogenesis of gastrointestinal autoimmune diseases. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2(9):416-422, 2005. 10
5. Sapon A, Lammers KM, Mazzarella G, et al. Differential mucosal IL-17 expression in two gliadin-induced disorders: gluten sensitivity and the autoimmune enteropathy celiac disease. *Int Arch Allergy Immunol*. 152:75-80, 2010.
6. Sapon A, Lammers KM, Casolaro V, et al. Divergence of gut permeability and mucosal immune gene expression in two gluten-associated conditions: celiac disease and gluten sensitivity. *BMC Med*. 9:23, 2011. 20
7. Fasano A. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity and cancer. *Physiol Rev*, 91:151-175, 2011.
8. Shor DB, Barzilai O, Ram M, et al. Gluten sensitivity in multiple sclerosis: experimental myth or clinical truth? *Ann NY Acad Sci*, 1173:343-349, 2009. 30
9. Vojdani A, O'Bryan T, Green JA, et al. Immune response to dietary proteins, gliadin and cerebellar peptides in children with autism. *Nutr Neurosci*. 7(3):151-161, 2004.
10. Correale J, Villa A. The blood-brain-barrier in multiple sclerosis: functional roles and therapeutic targeting. *Autoimmunity*. 40:148-160, 2007.
11. Morgan L, Shah B, Rivers LE, et al. Inflammation and dephosphorylation of the tight junction protein occludin in an experimental model of multiple sclerosis. *Neurosci*. 147:664-673, 2007. 40
12. Skardelly M, Armbruster FP, Meixensberger J, et al. Expression of zonulin, c-kit, glial fibrillary acidic protein in human gliomas. *Transl Oncol*. 2:117-120, 2009.
13. Yacyshyn B, Meddings J, Sadowski D, et al. Multiple sclerosis patients have peri 50

- peral blood CD45RO+B cells and increased intestinal permeability. *Dig Dis Sci*. 41 (12): 2493-2498, 1996.
14. Garate I, Garcia-Bueno B, Madrigal, JLM et al. Origin and consequences of brain toll-like receptor 4 pathway stimulation in an experimental model of depression. *J Neuroinflamm*. 8:151, 1-31, 2011.
15. Al-Sadi RM, Ma TY. IL-1 causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J Immunol*. 178:4641-4649, 2007. 10
16. Matysiak-Budnik T, Thomas-Collignon A, Megraud F, Heyman M. Alterations of epithelial permeability by *Helicobacter* and IL-1beta in vitro: protective effect of rebamipide. *Dig Dis Sci*, 2001; 46:1558-1566.
17. Turner JR. "Putting the squeeze" on the tight junction: understanding cytoskeletal regulation. *Semin Cell Dev Biol*, 2000; 11:301-308. 20
18. Ma TY, Hoa NT, Tran DD, Bui V, Pedram A, Mills S, Merryfield M. Cytochalasin B modulation of Caco-2 tight junction barrier: role of myosin light chain kinase. *Am J Physiol*, 2000; 279:G875-G885.
19. Ma TY, Tran D, Hoa N, Nguyen D, Merryfield M, Tarnawski A. Mechanism of extracellular calcium regulation of intestinal epithelial tight junction permeability: role of cytoskeletal involvement. *Microsc Res Tech*, 2000; 51:156-168. 30
20. Al-Sadi R, Ye D, Dokladny K, Ma TY. Mechanism of IL-1-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J Immunol*. 2008; 180:5653-5661.
21. Shen L, Black ED, Witkowski ED, Lencer WI, Guerriero V, Schneeburger EE, Turner JR. Myosin light chain phosphorylation regulates barrier function by remodeling tight junction structure. *J Cell Sci*, 2006; 119:2095-2106. 40
22. Hecht G, Pestic L, Nikcevic G, Koutsouris A, Tripuraneni J, Lorimer Dd, Nowak G, Guerriero, Jr V, Elson El, Lanerolle PD. Expression of the catalytic domain of myosin light chain kinase increases paracellular permeability. *Am J Physiol*, 1996; 271:C1678-1684.
23. Ma TY, Boivin MA, Ye E, Pedram A, Said H 50

- M. Mechanism of TNF- modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier: role of myosin light-chain kinase protein expression. *Am J Physiol*, 2005; 288: G422 - G430.
24. Mae M, Kudara M, Leunis JC. The gut-brain barrier in major depression: intestinal mucosal dysfunction with an increased translocation of LPS from gram negative bacteria (leaky gut) plays a role in the inflammatory pathophysiology of depression. *Euro Endocrinol Lett*, 2008; 29: 117 - 124. 10
25. Mae M, Coucke F, Ategis JC. Normalization of the increased translocation of endotoxin from gram negative enterobacteria (leaky gut) is accompanied by a remission of chronic fatigue syndrome. *Neuro Endocrinol Lett*, 2007; 28(6): 101 - 116.
26. Walker-Smith JA, Ford RP, Phillips AD. The spectrum of gastrointestinal allergies to food. *Ann Allergy*, 1984; 53: 629 - 636. 20
27. Juvonen P, Jakobsson I, Lindberg T. Macromolecular absorption and cow's milk allergy. *Arch Dis Child*, 1990; 65: 300 - 303.
28. Huang XN, Fu J, Wang WZ. The effects of Fasudil on the permeability of the rat blood-brain barrier and blood-spinal cord barrier following experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 239: 61 - 67, 2011. 30
29. Lassmann H, Zimprich F, Vass K, Hickey WF. Microglial cells are a component of the perivascular glia limitans. *J Neurosci Res*, 1991; 28: 236 - 243.
30. Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004; 286: C1213 - C1228.
31. Chen ML, et al. Disruption of tight junctions and induction of proinflammatory cytokine responses in colonic epithelial cells by *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun*, 2006; 74: 6581 - 6589. 40
32. LaPierre LA. The molecular structure of the tight junction. *Adv Drug Deliv*, 2000; 41: 255 - 264.
33. Wong V, Gumbiner BM. A synthetic peptide corresponding to the extracellular domain of occludin perturbs the tight junction permeability barrier. *J Cell Biol*, 19 50

97; 136(2): 399-409.

34. Engelhardt B, Rasochoff RM. The ins and outs of the T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol*, 2005; 26(9): 485-495.

35. Aloisi F, Ria F, Adorini L. Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunol Today*, 2000; 21(3): 141-147.

36. Ghirnikar RS, Lee YL, Eng LF. Inflammation in traumatic brain injury: role of cytokines and chemokines. *Neurochem Res*, 1998; 23(3): 329-340.

37. Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, Biulian F, Arbour N, Becher B, Prat A. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med*, 2007; 13: 1173-1176.

38. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol*, 2005; 23: 683-747.

39. Biernacki K, Prat A, Blain M, Antel JP. Regulation of Th1 and Th2 lymphocyte migration by human adult brain endothelial cells. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2001; 60(12): 1127-1136.

40. Wosik K, Cayrol R, Dodelet-Devillers A, Berthelet F, Bernard M, Moumdjian R, Bouthillier A, Reudelhuber TL, Prat A. Angiotensin II controls occluding function and is required for blood-brain barrier maintenance: relevance to multiple sclerosis. *J Neurosci*, 2007; 27(34): 9032-9042.

41. Kawanokuchi J, Shimizu K, Nitta A, Yamada K, Mizuno T, Takeuchi H, Suzumura A. Production and function of IL-17 in microglia. *J Neuroimmunol*, 2008; 194: 54-61.

42. Ganor Y, Teichberg VI, Levite M. TCR activation eliminate glutamate receptor GLUR3 from the cell surface of normal human T cells via an autocrine/paracrine granzyme B-mediated proteolytic cleavage. *J Immunol*, 2007; 178: 683-692.

43. Vojdani A, Lambert J. A gut feeling for immune dysregulation and neuroinflammation. *The Autism File USA*, 2009; 31: 56-64.

44. Vojdani A, Vojdani E, Cooper EL. Antibio

10

20

30

40

50

- dies to myelin basic protein, myelin oligodendrocytes peptides, - - crystallin, lymphocyte activation and cytokine production in patients with multiple sclerosis. *J Internal Med*, 2003; 254: 363 - 74.
45. Kirk J, Plumb J, Mirakhur M, et al. Tight junctional abnormality in multiple sclerosis white matter affects all calibers of vessel and is associated with blood-brain barrier leakage and active demyelination. *J Pathol*. 2003; 201: 319 - 327. 10
46. Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev*, 2005; 57: 173 - 185.
47. Leech S, Kirk J, Plumb J, et al. Persistent endothelial abnormalities and blood-brain barrier leak in primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2007; 33: 86 - 98.
48. Persidsky Y, Ramirez SH, Haorah J, et al. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2006, 1: 223 - 236. 20
49. Reijerkerk A, Kooij G, van der Pol SM, et al. Tissue-type plasminogen activator is a regulator of monocyte diapedesis through the brain endothelial barrier. *J Immunol*, 2008; 181: 3567 - 3574.
50. Wosik K, Cayrol R, Dodelet-Devillers A, et al. Angiotensin II controls occluding function and is required for blood-brain barrier maintenance: relevance to multiple sclerosis. *J Neurosci*, 2007; 27: 9032 - 9042. 30
51. El Asmar, Panigrahi P, Bamford P, et al. Host-dependent zonulin secretion causes the impairment of the small intestine barrier function after bacterial exposure. *Gastroenterol*, 2002; 123: 1607 - 1615. 40
52. Balkovetz DF, Katz J. Bacterial invasion of paracellular route: divide and conquer. *Microbes Infect*, 2003; 5: 613 - 619.
53. Kuula H et al. Local systemic responses in matrix metalloproteinase 8-deficient mice during *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontitis. *Infect Immun*, 2009; 77(2): 850 - 859.
54. Cywes C, Wessels M. R. Group A *Streptococcus* tissue invasion by CD44-mediated c 50

- ell signalling. *Nature*, 2001; 414: 648 - 652.
55. Y Xu, Q Yu. E-cadherin negatively regulated CD44-hyaluronan interaction and CD44-mediated tumor invasion and branching morphogenesis. *J Biol Chem*, 2003; 278: 8661 - 8668.
56. Garrote J, Gomez-Gonzalez E, Bernardo D, Arranz E, Chirido F. Celiac disease pathogenesis: the proinflammatory cytokine network. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2008; 47 (Suppl 1).
57. Maldonado Galdeano C, Perdigon G. The probiotic bacillum *Lactobacillus casei* induces activation of the mucosal immune system through innate immunity. *Clin Vaccine Immunol*, 2006, 13 (2): 219 - 226.
58. Wakabayashi H, Takakura N, Yamauchi K, et al. Modulation of immunity-related gene expression in small intestine of mice by oral administration of lactoferrin. *Clin Vaccine Immunol*, 2006; 13 (2): 239 - 245.
59. Han S, Jeong SY, Nam YJ, et al. Xylitol inhibits inflammatory cytokine expression induced by lipopolysaccharides from *Porphyromonas gingivalis*. *Clin Diag Lab Immunol*, 2005; 12 (11): 1285 - 1291.
60. Chevrier MR, Ryan AE, Lee DY-W, et al. *Boswellia carterii* extract inhibits the cytokines and promotes Th2 cytokines in vitro. *Clin Diag Lab Immunol*, 2005; 575 - 580.
61. Syrovets T, Buchele B, Krauss C, et al. Acetyl-boswellic acids inhibit lipopolysaccharide-mediated TNF-alpha induction in monocytes by direct interaction with kinases. *J Immunol*, 2005; 174: 498 - 506.

【表 2】

表 1—健常対象#1-3 における環境因子(LPS)、腸管 BBB タンパク質および関連抗原に相当する 12 種類の異なる抗原に対して試験した、IgG、IgM および IgA 抗体レベル

	*LPS	ゾヌリン-オクルジン	腸管 ZOT 受容体	細胞間結合タンパク質	** MMP3	脳 ZOT 結合タンパク質	脳 ZOT 受容体	カルプロテクチン	*** GFAP	α-B クリスタリン	BBB タンパク質	ミエリン塩基性タンパク質
Cal 1	0.743	0.752	0.532	0.764	0.551	0.535	0.757	0.762	0.542	0.763	0.546	0.78
Cal 2	0.658	0.678	0.539	0.694	0.542	0.539	0.677	0.688	0.543	0.695	0.556	0.703
試料 1(OD)	1.482	0.379	0.39	1.034	0.39	0.391	0.37	0.882	0.362	0.377	0.396	0.828
指標	1.455	0.358	0.376	0.791	0.365	0.586	0.358	0.764	0.391	0.383	0.364	0.703
指標	2.10	0.52	0.72	1.25	0.69	0.91	0.51	1.14	0.69	0.52	0.69	1.03
試料 2(OD)	0.844	0.324	0.334	0.326	0.334	0.589	0.322	0.314	0.371	0.32	0.335	0.783
指標	0.619	0.261	0.263	0.245	0.256	0.255	0.259	0.243	0.314	0.261	0.26	0.599
指標	1.04	0.41	0.56	0.39	0.54	0.79	0.41	0.38	0.63	0.40	0.54	0.93
試料 3(OD)	1.287	0.253	0.715	0.25	0.658	0.229	0.388	0.218	0.219	0.209	0.229	2.02
指標	1.332	0.195	0.607	0.199	0.421	0.206	0.31	0.197	0.197	0.196	0.2	1.307
指標	1.87	0.31	1.23	0.31	0.99	0.41	0.49	0.29	0.38	0.28	0.39	2.24

\*リポ多糖 \*\*マトリクスメタロプロテイナーゼ 3 \*\*\*グリア線維酸性タンパク質  
指標=患者の平均 OD/標準物質の平均 OD

【表 3】

表 2—健常対象#4-6 における環境因子(LPS)、腸管 BBB タンパク質および関連抗原に相当する 12 種類の異なる抗原に対して試験した、IgG、IgM および IgA 抗体レベル

	*LPS	ゾヌリン-オクルジン	腸管 ZOT 受容体	細胞間結合タンパク質	** MMP3	脳 ZOT 結合タンパク質	脳 ZOT 受容体	カルプロテクチン	*** GFAP	α-B クリスタリン	BBB タンパク質	ミエリン塩基性タンパク質
Cal 1	0.709	0.71	0.539	0.731	0.551	0.544	0.725	0.727	0.555	0.739	0.557	0.747
Cal 2	0.685	0.687	0.543	0.698	0.543	0.54	0.695	0.699	0.543	0.706	0.56	0.728
試料 4(OD)	0.244	0.557	0.265	0.244	0.692	0.278	0.262	0.529	0.433	0.292	0.479	0.308
指標	0.221	0.525	0.207	0.233	0.501	0.22	0.22	0.488	0.459	0.196	0.492	0.21
指標	0.33	0.77	0.44	0.33	1.09	0.46	0.34	0.71	0.81	0.34	0.87	0.35
試料 5(OD)	1.276	0.189	0.206	0.2	0.2	0.17	0.199	0.199	0.182	0.183	0.195	0.175
指標	1.317	0.229	0.233	0.228	0.234	0.279	0.231	0.216	0.216	0.228	0.224	0.235
指標	1.86	0.30	0.41	0.30	0.40	0.41	0.30	0.29	0.36	0.28	0.38	0.28
試料 6(OD)	0.237	0.477	0.236	0.395	0.231	0.219	0.661	0.232	0.676	0.226	0.228	1.185
指標	0.198	0.426	0.202	0.365	0.233	0.194	0.493	0.202	0.495	0.192	0.2	0.796
指標	0.31	0.65	0.40	0.53	0.42	0.38	0.81	0.30	1.07	0.29	0.38	1.34

\*リポ多糖 \*\*マトリクスメタロプロテイナーゼ 3 \*\*\*グリア線維酸性タンパク質  
指標=患者の平均 OD/標準物質の平均 OD

10

20

30

40

【表 4】

表 3—健常対象#7-9 における環境因子(LPS)、腸管 BBB タンパク質および関連抗原に相当する 12 種類の異なる抗原に対して試験した、IgG、IgM および IgA 抗体レベル

	*LPS	ゾヌリン-オクジン	腸管 ZOT 受容体	細胞間結合タンパク質	** MMP3	脳 ZOT 結合タンパク質	脳 ZOT 受容体	カルプロテクチン	*** GFAP	α-B クリスタリン	BBB タンパク質	ミエリン塩基性タンパク質
Cal 1	0.786	0.778	0.557	0.787	0.551	0.557	0.795	0.807	0.546	0.814	0.57	0.832
Cal 2	0.708	0.738	0.54	0.636	0.555	0.558	0.746	0.75	0.559	0.772	0.51	0.77
試料	0.293	0.26	0.278	0.845	0.281	0.262	0.285	0.409	0.255	0.245	0.27	0.282
7(OD)	0.281	0.235	0.236	0.52	0.249	0.247	0.233	0.358	0.268	0.211	0.212	0.285
指標	0.38	0.33	0.47	0.96	0.48	0.46	0.34	0.49	0.47	0.29	0.45	0.35
試料	0.189	0.201	0.174	0.623	0.203	0.176	0.167	0.181	0.204	0.137	0.182	0.139
8(OD)	0.198	0.185	0.237	0.522	0.21	0.221	0.194	0.199	0.209	0.207	0.199	0.218
指標	0.26	0.25	0.37	0.80	0.37	0.36	0.23	0.24	0.37	0.22	0.35	0.22
試料	1.307	0.237	0.889	0.238	0.251	0.238	0.248	0.226	0.233	0.228	0.239	1.026
9(OD)	1.264	0.235	0.624	0.228	0.228	0.218	0.215	0.228	0.212	0.213	0.213	0.934
指標	1.72	0.31	1.38	0.33	0.43	0.41	0.30	0.29	0.40	0.28	0.42	1.22

\*リポ多糖 \*\*マトリクスメタロプロテイナーゼ 3 \*\*\*グリア線維酸性タンパク質  
 指標=患者の平均 OD/標準物質の平均 OD

【表 5】

表 4—セリアック病および腸管透過性のある患者における環境因子(LPS)、腸管 BBB タンパク質および関連抗原に相当する 12 種類の異なる抗原に対して試験した、IgG、IgM および IgA 抗体レベル

	*LPS	ゾヌリン-オクジン	腸管 ZOT 受容体	細胞間結合タンパク質	** MMP3	脳 ZOT 結合タンパク質	脳 ZOT 受容体	カルプロテクチン	*** GFAP	α-B クリスタリン	BBB タンパク質	ミエリン塩基性タンパク質
Cal 1	0.698	0.527	0.703	0.541	0.707	0.719	0.704	0.537	0.697	0.53	0.718	0.706
Cal 2	0.68	0.524	0.67	0.526	0.679	0.685	0.681	0.525	0.678	0.535	0.674	0.689
試料	3.789	3.741	2.146	3.745	2.13	0.466	1.217	0.758	0.598	1.285	1.009	2.127
10(OD)	3.8	3.769	1.896	3.762	2.089	0.39	0.975	0.921	0.528	1.166	0.98	1.695
指標	5.51	7.15	2.94	7.04	3.04	0.61	1.58	1.58	0.82	2.30	1.43	2.74
試料	1.396	0.621	2.017	3.11	0.694	0.418	0.53	0.419	0.495	0.406	0.466	0.444
11(OD)	1.237	0.572	1.973	2.713	0.651	0.393	0.444	0.453	0.455	0.442	0.375	0.433
指標	1.91	1.14	2.91	5.46	0.97	0.58	0.70	0.82	0.69	0.80	0.60	0.63
試料	3.56	3.775	1.454	1.943	1.985	3.765	2.012	3.827	2.674	3.713	3.76	2.02
12(OD)	3.648	3.773	1.727	1.941	1.952	3.735	2.012	3.837	3.498	2.894	3.789	2.051
指標	5.23	7.18	2.32	3.64	2.84	5.34	2.91	7.22	4.49	6.20	5.42	2.92

\*リポ多糖 \*\*マトリクスメタロプロテイナーゼ 3 \*\*\*グリア線維酸性タンパク質  
 指標=患者の平均 OD/標準物質の平均 OD

【表 6】

表 5—グルテン運動失調患者における環境因子 (LPS)、腸管 BBB タンパク質および関連抗原に相当する 12 種類の異なる抗原に対して試験した、IgG、IgM および IgA 抗体レベル

		*LPS	ゾ ヌ リン- オク ルジ ン	腸 管 ZOT 受 容 体	細 胞 間 結 合 タ ン パ ク 質	** MMP3	脳 ZOT 結 合 タ ン パ ク 質	脳 ZOT 受 容 体	カ ル プ ロ テ ク チ ン	*** GFAP	α-B ク リ ス タ リ ン	BBB タ ン パ ク 質
Cal 1	0.722	0.513	0.709	0.514	0.722	0.719	0.695	0.52	0.716	0.525	0.714	0.729
Cal 2	0.696	0.515	0.692	0.512	0.697	0.698	0.699	0.523	0.697	0.527	0.7	0.716
試料	1.911	0.801	0.344	1.575	0.284	3.602	3.772	3.676	1.577	3.612	0.723	3.603
13(OD)	1.886	0.713	0.281	1.53	0.221	3.618	3.759	3.686	1.257	3.674	0.481	3.63
指標	2.68	1.47	0.45	3.03	0.36	5.10	5.40	7.06	2.01	6.93	0.85	5.01
試料	1.674	0.351	0.742	0.281	1.532	2.4	2.538	1.335	3.708	1.336	3.701	0.579
14(OD)	1.644	0.283	0.625	0.202	1.553	1.805	2.454	1.226	3.692	1.264	3.648	0.516
指標	2.34	0.62	0.98	0.47	2.17	2.97	3.58	2.46	5.24	2.47	5.20	0.76
試料	1.205	1.564	0.321	0.744	0.285	3.805	3.636	0.469	0.638	3.668	1.296	1.25
15(OD)	1.18	1.536	0.266	0.735	0.276	3.776	3.657	0.489	0.486	3.679	1.254	1.281
指標	1.68	3.02	0.42	1.44	0.40	5.35	5.23	0.92	0.80	6.98	1.80	1.75

\*リポ多糖 \*\*マトリクスメタロプロテイナーゼ 3 \*\*\*グリア線維酸性タンパク質  
指標=患者の平均 OD/標準物質の平均 OD

10

20

【表 7】

表 6—多発性硬化症 (MS) における環境因子 (LPS)、腸管 BBB タンパク質および関連抗原に相当する 12 種類の異なる抗原に対して試験した、IgG、IgM および IgA 抗体レベル

		*LPS	ゾ ヌ リン- オク ルジ ン	腸 管 ZOT 受 容 体	細 胞 間 結 合 タ ン パ ク 質	** MMP3	脳 ZOT 結 合 タ ン パ ク 質	脳 ZOT 受 容 体	カ ル プ ロ テ ク チ ン	*** GFAP	α-B ク リ ス タ リ ン	BBB タ ン パ ク 質
Cal 1	0.692	0.498	0.693	0.493	0.705	0.69	0.694	0.506	0.697	0.519	0.704	0.723
Cal 2	0.649	0.469	0.713	0.508	0.721	0.721	0.721	0.516	0.719	0.54	0.726	0.748
試料	1.855	3.82	0.445	0.349	1.447	0.546	1.478	0.508	1.287	3.705	3.804	3.834
16(OD)	1.882	3.83	0.291	0.227	1.244	0.496	1.259	0.35	1.218	3.704	3.828	3.845
指標	2.79	7.91	0.52	0.58	1.89	0.74	1.93	0.84	1.77	7.00	5.34	5.22
試料	0.467	3.814	0.266	0.244	0.385	1.235	0.517	3.677	3.653	0.525	3.834	3.782
17(OD)	0.398	3.827	0.152	0.253	0.437	1.223	0.451	3.693	3.704	0.466	3.834	3.778
指標	0.65	7.90	0.30	0.50	0.58	1.74	0.68	7.21	5.20	0.94	5.36	5.14
試料	0.618	0.439	0.353	0.221	0.662	0.587	1.226	0.405	1.273	3.665	3.84	2.721
18(OD)	0.458	0.292	0.38	0.194	0.528	0.44	1.31	0.29	1.306	3.726	3.848	2.77
指標	0.80	0.76	0.52	0.41	0.83	0.73	1.79	0.68	1.82	6.98	5.38	3.73

30

40

【表 8】

表 7—血中の LPS、オクルジン/ゾヌリンおよびアクトミオシンネットワークに対する抗体の解釈

LPS IgA	+	+	-	+	-
LPS IgM	+	+	-	+	-
LPS IgG	+	+	-	+	-
オクルジン/ ゾヌリン IgG	-	+	+	-	-
オクルジン/ ゾヌリン IgM	-	+	+	-	-
オクルジン/ ゾヌリン IgA	-	+	+	-	-
アクトミオ シン IgG	-	-	-	+	+
臨床適応	腸内微生物 叢腸内毒素 症	傍細胞経路を 介した細菌性 抗原による腸 管バリアの完 全性の破壊	傍細胞経路を 介した、細菌 性抗原以外の 要因による腸 管バリアの完 全性の破壊	経細胞経路を 介した細菌性 抗原による腸 管バリアの完 全性の破壊	慢性活動性肝 炎および原発 性胆汁性肝硬 変で見られる 粘膜上皮およ び他の組織細 胞の細胞骨格 に対する自己 免疫

10

20

【表 9】

表 8—口腔液中の LPS、オクルジン/ゾヌリンおよびアクトミオシンネットワークに対する抗体の解釈

LPS IgA+IgM	+	+	-	+	-
オクルジン/ ゾヌリン IgA	-	+	+	-	-
アクトミオ シン IgA	-	-	-	+	+
臨床適応	腸内微生物 叢腸内毒素 症	傍細胞を介 した細菌性 抗原による 腸管バリア の完全性の 破壊	傍細胞経路 を介した細 菌性抗原以 外の要因に よる腸管バ リアの完全 性の破壊	経細胞経路 を介した細 菌性抗原に よる腸管バ リアの完全 性の破壊	粘膜上皮お よび他の組 織細胞の細 胞骨格に対 する自己免 疫

30

40

【表 10】

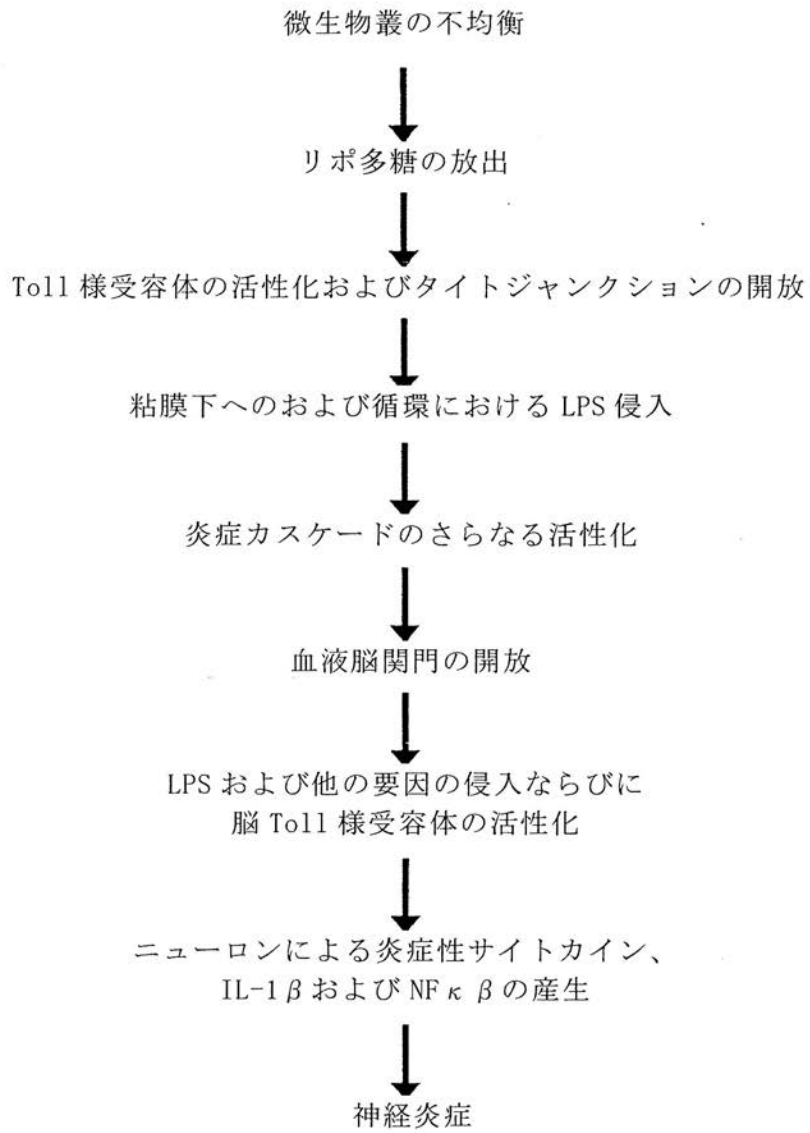
表 9—血中の LPS、オクルジン/ゾヌリン、血液脳関門タンパク質および神経抗原に対する抗体の解釈

LPS IgA	+	+	—	+	—
LPS IgM	+	+	—	+	—
LPS IgG	+	+	—	+	—
オクルジン/ ゾヌリン IgG	—		+	—	—
オクルジン/ ゾヌリン IgM	—	+	+	—	—
オクルジン/ ゾヌリン IgA	—	+	+	—	—
BBB タンパク 質 IgG、IgM、 IgA	—	+	+	+	+
神経抗原 IgG、IgM、IgA	—	+	+	+	+
臨床適応	腸内微生物 叢腸内毒素 症	結果として 神経炎症お よび神経自 己免疫とな る、おそらく 細菌毒素に より誘導さ れる、腸管 および BBB 完 全性の破壊	結果として 神経炎症お よび神経自 己免疫とな る、細菌毒素 以外の要因 による、腸管 および BBB 完 全性の破壊	結果として 神経自己免 疫を生じる、 腸管バリア の完全性の 破壊がある かまたはな いが、BBB の 破壊を伴う、 腸内微生物 叢腸内毒素 症	腸管バリア または腸内 微生物叢腸 内毒素症と 関連のない、 BBB の破壊、 神経炎症お よび神経自 己免疫

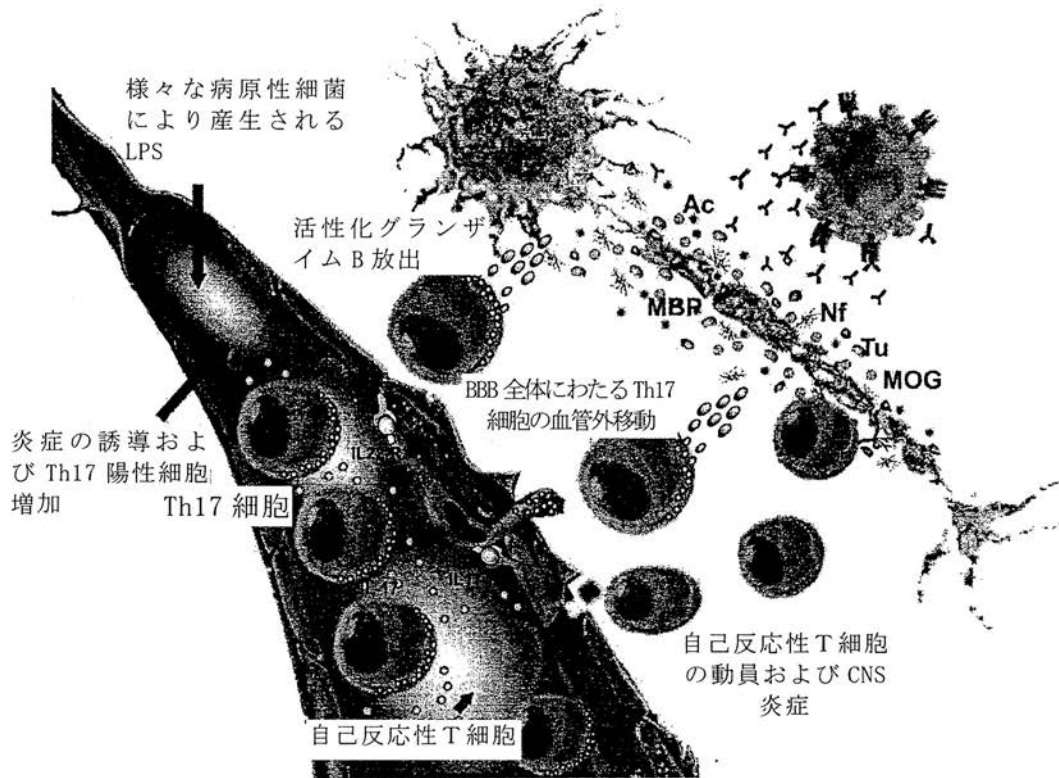
10

20

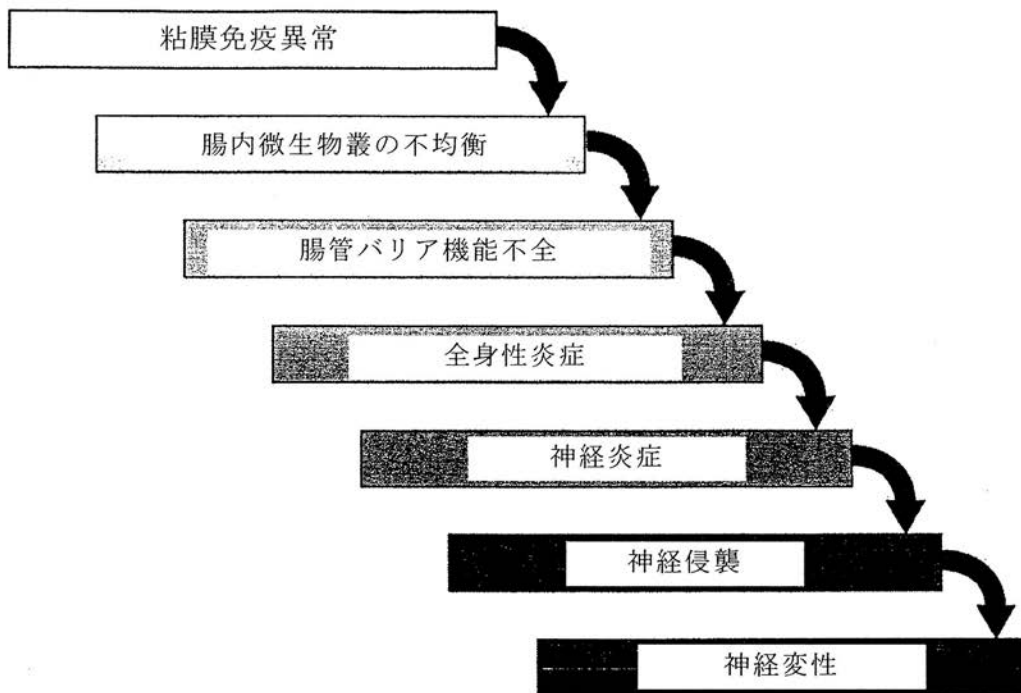
【 図 1 】



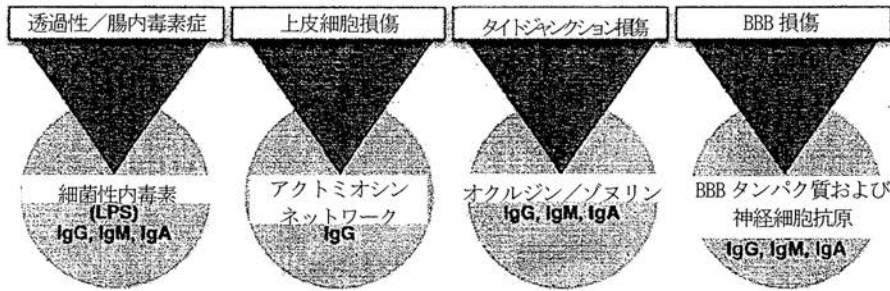
【 図 2 】



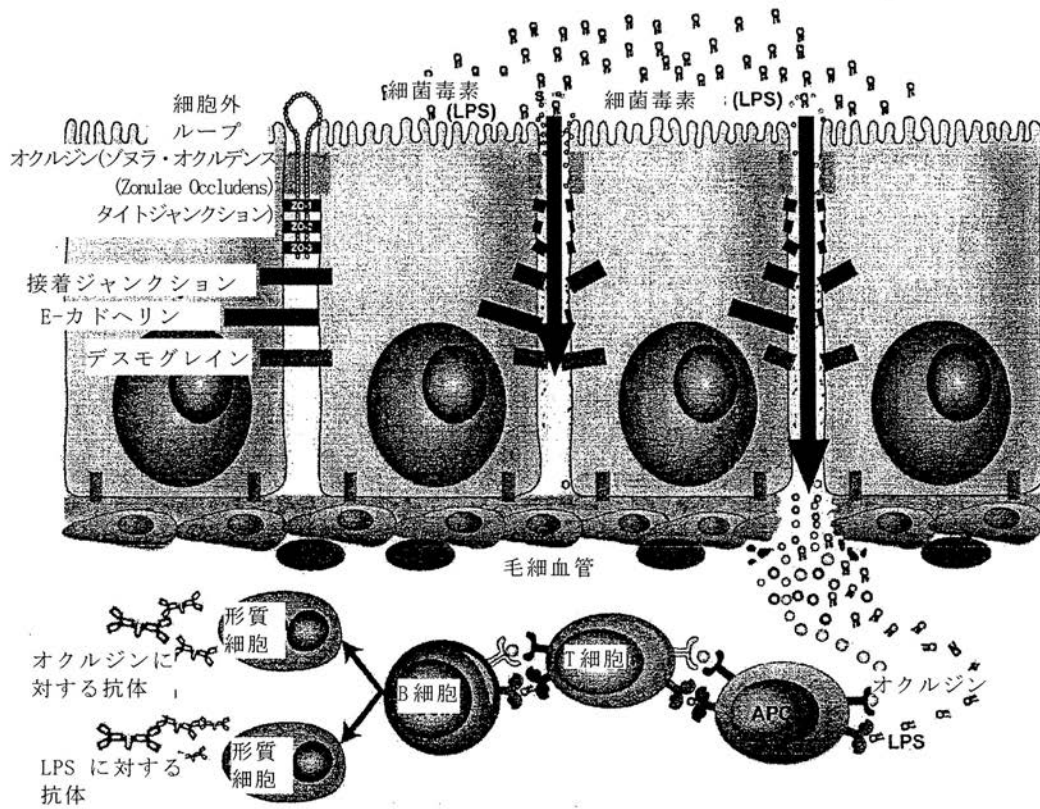
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】

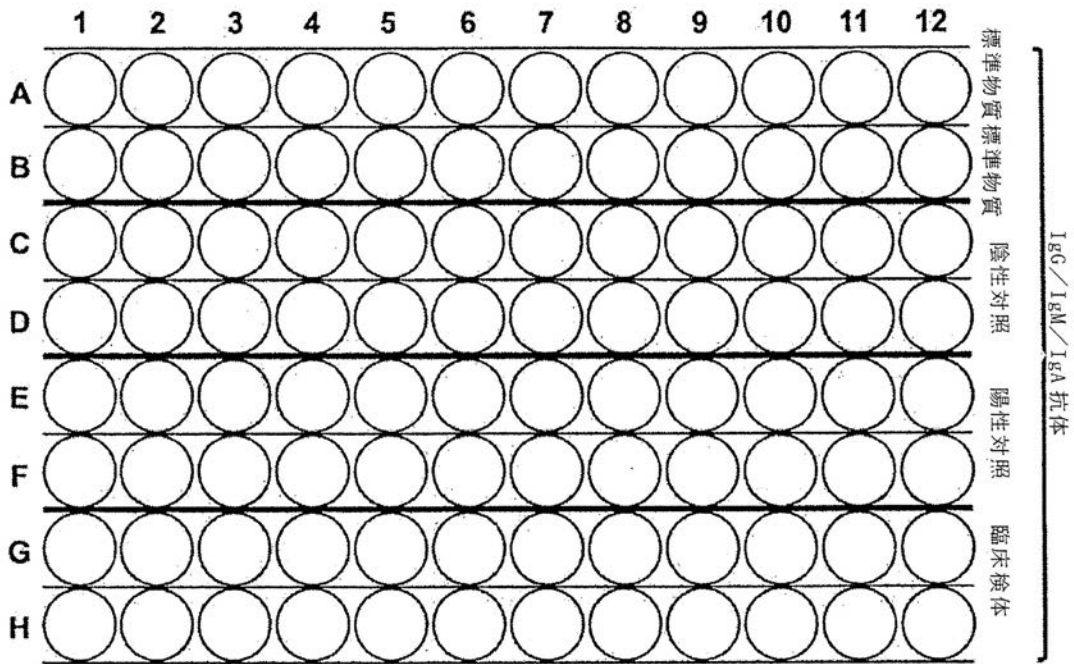
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	リボ多糖	ソニン/オウルシ	腸管抗原受容体	細菌結合タンパク質	マトリックスメタエポライトゼ	脂質結合タンパク質	脂質受容体	カルボテクチン	グリア線維性タンパク質	αBクリスタリン	BBタンパク質	ミエリン塩基性タンパク質
B	リボ多糖	ソニン/オウルシ	腸管抗原受容体	細菌結合タンパク質	マトリックスメタエポライトゼ	脂質結合タンパク質	脂質受容体	カルボテクチン	グリア線維性タンパク質	αBクリスタリン	BBタンパク質	ミエリン塩基性タンパク質
C	リボ多糖	ソニン/オウルシ	腸管抗原受容体	細菌結合タンパク質	マトリックスメタエポライトゼ	脂質結合タンパク質	脂質受容体	カルボテクチン	グリア線維性タンパク質	αBクリスタリン	BBタンパク質	ミエリン塩基性タンパク質
D	リボ多糖	ソニン/オウルシ	腸管抗原受容体	細菌結合タンパク質	マトリックスメタエポライトゼ	脂質結合タンパク質	脂質受容体	カルボテクチン	グリア線維性タンパク質	αBクリスタリン	BBタンパク質	ミエリン塩基性タンパク質
E	リボ多糖	ソニン/オウルシ	腸管抗原受容体	細菌結合タンパク質	マトリックスメタエポライトゼ	脂質結合タンパク質	脂質受容体	カルボテクチン	グリア線維性タンパク質	αBクリスタリン	BBタンパク質	ミエリン塩基性タンパク質
F	リボ多糖	ソニン/オウルシ	腸管抗原受容体	細菌結合タンパク質	マトリックスメタエポライトゼ	脂質結合タンパク質	脂質受容体	カルボテクチン	グリア線維性タンパク質	αBクリスタリン	BBタンパク質	ミエリン塩基性タンパク質
G	リボ多糖	ソニン/オウルシ	腸管抗原受容体	細菌結合タンパク質	マトリックスメタエポライトゼ	脂質結合タンパク質	脂質受容体	カルボテクチン	グリア線維性タンパク質	αBクリスタリン	BBタンパク質	ミエリン塩基性タンパク質
H	リボ多糖	ソニン/オウルシ	腸管抗原受容体	細菌結合タンパク質	マトリックスメタエポライトゼ	脂質結合タンパク質	脂質受容体	カルボテクチン	グリア線維性タンパク質	αBクリスタリン	BBタンパク質	ミエリン塩基性タンパク質

【 図 7 】

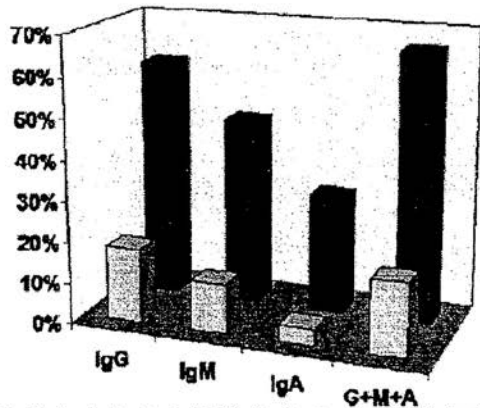
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

標準物質 標準物質 臨床検体#1 臨床検体#2 臨床検体#3  
IgG/IgM/IgA抗体

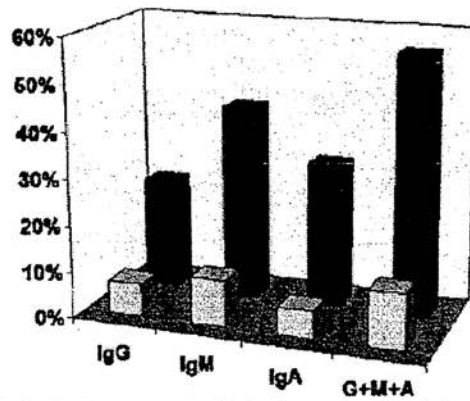
【 図 8 】



【 図 9 】





平均を上回る2標準偏差での、健常血液ドナー(明るい色のバー)および消化管自己免疫の患者(暗い色のバー)における、細菌性リポ多糖に対するIgG、IgM、IgAおよびIgG+IgM+IgAの%上昇



平均を上回る2標準偏差での、健常血液ドナー(明るい色のバー)および消化管自己免疫の患者(暗い色のバー)における、オクルジン/ソナリンに対するIgG、IgM、IgAおよびIgG+IgM+IgAの%上昇

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2012/022706
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>G01N 33/53(2006.01); C07K 14/195(2006.01); C07K 16/12(2006.01)</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N 33/53; G01N 33/542		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: intestinal permeability, blood brain barrier permeability, lipopolysaccharide		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MAES, M. et al., "THE GUT-BRAIN BARRIER IN MAJOR DEPRESSION: INTESTINAL MUCOSAL DYSFUNCTION WITH AN INCREASED TRANSLOCATION OF LPS FROM GRAM NEGATIVE ENTEROBACTERIA(LEAKY GUT) PLAYS A ROLE IN THE INFLAMMATORY PATHOPHYSIOLOGY OF DEPRESSION", NEUROENDOCRINOLOGY LETTERS, 28 Feb 2008, vol.29, no.1, pp.117-124 See abstract, tables 1-3, p. 119 left column line 24 - p.120 left column line 47	1-9,12-15
A	VOJDANI, A. et al., "A GUT FEELING FOR IMMUNE DYSREGULATION & NEUROINFLAMMATION, THE AUTISM FILE", 24 Nov 2009, vol.31, pp.56-64 See introduction, fig 6, p.62 left column line 15 - p.63 right column line 15	1-9,12-15
A	MAES, M. et al., "NORMALIZATION OF THE INCREASED TRANSLOCATION OF ENDOTOXIN FROM GRAM NEGATIVE ENTEROBACTERIA (LEAKY GUT) IS ACCOMPANIED BY A REMISSION OF CHRONIC FATIGUE SYNDROME", NEUROENDOCRINOLOGY LETTERS, 31 Dec 2007, vol.8, no.6, pp.101-106 See abstract, p.101 left column line 1 - p.102 left column line 41	1-9,12-15
A	US 2010-0190191 A1 (DODDS W. JEAN) 29 July 2010 See abstract, paragraphs [0029],[0076], claims 1,7	1-9,12-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 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 07 SEPTEMBER 2012 (07.09.2012)		Date of mailing of the international search report <b>10 SEPTEMBER 2012 (10.09.2012)</b>
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer CHO, Hyun Kyung  Telephone No. 82-42-481-5629

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/US2012/022706**

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2003-0170747 A1 (DAMIR JANIGRO et al.) 11 September 2003 See abstract, paragraphs [0007],[0010], claim 1	1-9, 12-15

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2012/022706

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

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

1.  Claims Nos.: 10-11, 16-27  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
: Claims 10-11, 16-27 pertain to diagnostic methods for treatment of the human by therapy, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(e).

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

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

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims, it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
**PCT/US2012/022706**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2010-0190191 A1	29.07.2010	AU 2009-314258 A1	20.05.2010
		AU 2010-206913 A1	29.07.2010
		CA 2743485 A1	20.05.2010
		CA 2743714 A1	29.07.2010
		CA 2771948 A1	29.07.2010
		EP 2356454 A2	17.08.2011
		EP 2382469 A2	02.11.2011
		US 2010-0120168 A1	13.05.2010
		US 2010-0120169 A1	13.05.2010
		US 2010-0120170 A1	13.05.2010
		US 2010-0190190 A1	29.07.2010
		US 2011-0076701 A1	31.08.2011
		US 2011-0111415 A1	12.05.2011
		US 2011-0111521 A1	12.05.2011
		US 7794954 B2	14.09.2010
		US 7799532 B2	21.09.2010
		US 7867720 B2	11.01.2011
		US 7892763 B2	22.02.2011
		US 8012769 B2	08.09.2011
		WO 2010-056681 A2	20.05.2010
		WO 2010-056681 A3	20.05.2010
		WO 2010-085367 A2	29.07.2010
		WO 2010-085367 A3	18.11.2010
WO 2010-085367 A3	29.07.2010		
US 2003-0170747 A1	11.09.2003	US 2004-0009581 A1	15.01.2004
		US 6884591 B2	26.04.2005
		US 7144708 B2	05.12.2006

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T J, 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, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI , NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(72)発明者 ヴォジダニ, アリスト

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 90035, ロサンジェルス, スイート 312, 822  
サウス ロバートソン ブルバード, シーノオー イミュノサイエンス ラブ, インコーポレイ  
テッド

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2014503829A5</a>	公开(公告)日	2016-02-04
申请号	JP2013551330	申请日	2012-01-26
[标]申请(专利权)人(译)	免疫亲和科学的顺爱公司		
申请(专利权)人(译)	免疫亲和科学的顺爱公司		
[标]发明人	ヴォジダニアリスト		
发明人	ヴォジダニ,アリスト		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/573		
FI分类号	G01N33/53.S G01N33/53.D G01N33/573.A G01N33/53.N		
优先权	61/437244 2011-01-28 US		
其他公开文献	JP6068362B2 JP2014503829A		

摘要(译)

公开了用于测试与肠屏障和/或血脑屏障通透性相关的抗原的方法，测定法和装置。例如，为了结合(1)细菌毒素(优选脂多糖)和(2)选自(a)肠相关抗原和(b)血脑屏障相关抗原中的至少一种的组织抗原，可以测试血液，唾液或其他体液。与肠壁漏气综合征相关的疾病(无论是细胞旁或跨细胞途径，细菌毒素或其他原因)和/或与血脑屏障通透性过高相关的疾病(本文预期包括神经炎症和/或神经自身免疫病，特别是肌萎缩性侧索硬化，帕金森氏病，多发性硬化，阿尔茨海默氏病或周围神经病和重度抑郁。测试结果的分析可用于协助检测和诊断。[选择图]图4