



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109952510 A

(43)申请公布日 2019.06.28

(21)申请号 201780028699.4

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所  
11256

(22)申请日 2017.05.11

代理人 杨宏军 李国卿

(30)优先权数据

2016-097337 2016.05.13 JP

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

G01N 33/50(2006.01)

2018.11.09

G01N 37/00(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2017/017933 2017.05.11

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/195871 JA 2017.11.16

(71)申请人 应用酵素医学研究所株式会社

地址 日本德岛县

(72)发明人 木户博 苟原诚 铃木宏一

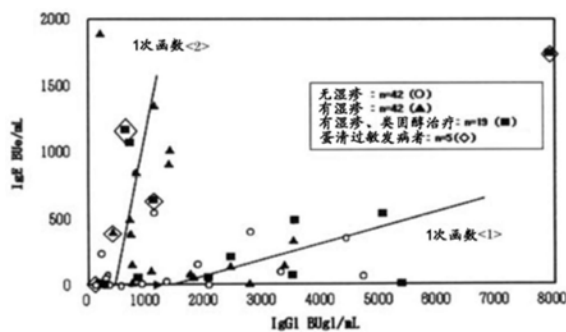
权利要求书1页 说明书19页 附图8页

(54)发明名称

收集用于预测过敏发病风险的数据的方法

(57)摘要

本发明提供预测婴幼儿对过敏原发生过敏的情况的风险的手段。使用DCP芯片,测定出生后6个月以内的婴儿的试样中的、针对蛋清的IgG1抗体效价和IgE抗体效价,将IgG1抗体效价作为X轴、将IgE抗体效价作为Y轴进行绘图而制作散点图,针对被分为两个区块的数据分布,算出可适用于各个区块的一次函数,得到两种一次函数,基于婴儿属于哪一区块来预测发生过敏的风险。



1. 收集数据的方法,其中,分别定量测定从婴儿采集的试样中的针对过敏原的IgG1及IgE的抗体效价,收集用于根据基于预先经统计处理的从IgG1向IgE的免疫球蛋白类别转换的程度而制定的判断基准来预测所述婴儿在婴幼儿期对所述过敏原发生过敏的风险的数据。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,使用DCP芯片,定量测定试样中的针对过敏原的IgG1及IgE的抗体效价。

3. 如权利要求1或2所述的方法,其特征在于,试样为血浆或血清。

4. 如权利要求1~3中任一项所述的方法,其特征在于,统计处理包含将IgG1抗体效价和IgE抗体效价进行绘图而制作散点图、并利用回归分析而求出的一次函数。

5. 如权利要求1~4中任一项所述的方法,其特征在于,预测对过敏原发生过敏的风险的方法包括以下的步骤(a)~(d):

步骤(a),分别定量测定从婴儿采集的试样中的针对过敏原的IgG1及IgE的抗体效价;

步骤(b),将IgG1抗体效价作为X轴、将IgE抗体效价作为Y轴进行绘图而制作散点图;

步骤(c),利用回归分析,以一次函数的形式算出IgG1抗体效价与IgE抗体效价的相关关系,所述一次函数为(1)适用于对过敏原发生过敏的风险低的婴儿的数据的一次函数1( $Y1 = aX1 - b$ ,其中, $a > 0$ 、 $b > 0$ )、及/或(2)适用于对过敏原发生过敏的风险高的婴儿的数据的一次函数2( $Y2 = cX2 - d$ ,其中, $c > a$ );

步骤(d),将属于一次函数1所适用的区块的婴儿预测为对过敏原发生过敏的风险低的婴儿,将属于一次函数2所适用的区块的婴儿预测为对过敏原发生过敏的风险高的婴儿。

6. 如权利要求1~5中任一项所述的方法,其特征在于,判断基准中还包含从婴儿采集的试样中的IgG2抗体效价。

7. 如权利要求6所述的方法,其特征在于,判断基准中包含从婴儿采集的试样中的IgG2抗体效价的方法包括以下的步骤(e)~(h):

步骤(e),分别定量测定从婴儿采集的试样中的针对过敏原的IgG1及IgG2的抗体效价;

步骤(f),将IgG1抗体效价作为X轴、将IgG2抗体效价作为Y轴进行绘图而制作散点图;

步骤(g),利用回归分析,以适用于对过敏原发生过敏的风险低的婴儿的数据的一次函数3( $Y3 = eX3 - f$ ,其中, $e > 0$ )的形式,算出IgG1抗体效价与IgG2抗体效价的相关关系;

步骤(h),将IgG1值显示为比一次函数的X轴截距(IgG1的抗体效价= $f/e$  Bug1/mL)低的值的婴儿预测为对过敏原发生过敏的风险高的婴儿。

8. 如权利要求1~7中任一项所述的方法,其特征在于,判断基准中还包含从婴儿采集的试样中的IgE抗体与过敏原的亲合性程度。

## 收集用于预测过敏发病风险的数据的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及收集数据的方法,其中,分别定量测定从婴儿采集的试样中的针对过敏原(allergen)的IgG1及IgE的抗体效价,收集用于根据基于预先经统计处理的从IgG1向IgE的免疫球蛋白类别转换的程度而制定的判断基准来预测上述婴儿对上述过敏原发生过敏的风险的数据。

### 背景技术

[0002] 过敏是指由原因物质侵入体内而引起的、对生物体带来不利后果的反应之一。人是通过以异种生物作为食物并进行消化·吸收来维持生命的,因此处于未消化完全的未消化异物不断地被摄入体内的状态,认为通常口服免疫耐受(免疫耐受)会发挥作用,以使得生物体对该未消化异物不发生防御反应(过敏反应)。但是,据报道出生人口的5-10%的婴儿在出生后1年以内会患上某种食物过敏,其发病机理、发病预测方法尚未完全查明。

[0003] 作为过敏,认为有IgE抗体参与的花粉症、特应性皮炎、食物过敏等已广为人知,但也存在下述见解:不仅IgE依赖性反应有参与,而且血液的IgE水平与过敏症状不一致的非IgE依赖性反应也有参与;由致敏物质侵入体内而诱导的抗原特异性抗体除了IgE以外还包括IgA、各种IgG,这些抗体的影响的总和形成了过敏症状。关于治疗,已知有供于包含一种以上抗原的疫苗接种程序的步骤、口服摄取抗原的脱敏疗法。就诊断而言,对测定来自各个人的生物样品中的针对抗原的特异性IgA、各种IgG、IgE抗体水平的步骤、抗原的皮内测试、或给皮肤带来微小损伤而使抗原渗透的划痕试验(点刺试验)的结果进行综合性判断,对过敏的进展状况、治疗实施评价,但尚无确定的诊断方法。迄今为止,报道了:上述疫苗接种程序的治疗可能性的评价方法(例如,参见专利文献1);可测定与唾液中的过敏原特异性免疫球蛋白(其是通过加入食物性过敏原物质、使其与唾液中的抗体发生抗原·抗体反应而产生的)的反应性,将健康者的IgE、IgG等的测定值进行比较,根据其相关关系进行免疫鉴定(例如,参见专利文献2)。近年来,各种抗原特异性免疫球蛋白的详细产生过程正在根据免疫球蛋白类别转换而被解析(例如,参见非专利文献1及2),因此迫切需要将过敏的病状与各种免疫球蛋白测定值相关联地进行评价。

[0004] 现有技术文献

[0005] 专利文献

[0006] 专利文献1:日本特表2007-524096号公报

[0007] 专利文献2:日本特开平11-142403号公报

[0008] 非专利文献

[0009] 非专利文献1:Xiong H,Dolpady J,Wabl M,Curotto de Lafaille MA,Lafaille

[0010] JJ.Sequential class switching is required for the generation of high affinity IgE antibodies.J Exp Med 2012;209:353-64.

[0011] 非专利文献2:Collins AM,Jackson KJ.A Temporal model of human IgE and IgG antibody function.Front Immunol 2013;4:235.

## 发明内容

[0012] 发明要解决的课题

[0013] 本发明的课题在于提供对婴幼儿发生过敏的风险进行预测的手段。

[0014] 用于解决课题的手段

[0015] 本申请发明人发现,使用DCP(高密度羧基化蛋白质,Densely carboxylated protein)芯片来测定出生后6个月以内的婴儿的血浆试样中的针对蛋清(Egg White:EW)的IgG1抗体效价和IgE抗体效价,将IgG1抗体效价作为X轴、将IgE抗体效价作为Y轴进行绘图而制作散点图,结果数据分布被分为两个区块。算出可适用于各个区块的一次函数,结果得到下述两种一次函数:在IgG1=1400BUg1处开始上升的一次函数[1];和在达到IgG1=1400BUg1之前开始上升的一次函数[2]。确认了:在出生后经过1年时有无过敏发病的诊断中,即使口服摄取蛋清也不显示异常症状、被诊断为获得免疫耐受的婴儿(以下,也称为“获得免疫耐受的婴儿”)属于上述一次函数[1]所适用的区块,另一方面,被诊断为蛋清过敏的多数婴儿在出生后6个月以内有持续至少1周以上的湿疹经历,属于上述一次函数[2]所适用的区块。

[0016] 通过上述方式确认了:测定婴儿的试样中的IgG1抗体效价和IgE抗体效价,基于预先经统计处理的从IgG1向IgE的免疫球蛋白类别转换(以下,也简称为“类别转换”)的程度,可预测对过敏原发生过敏的风险。此外还确认了:就获得免疫耐受的婴儿而言,呈现了显示IgG2增加的模式(pattern),与此相对,就被诊断为蛋清过敏的大部分婴儿而言,IgG1、IgG2均显示出低值,因此在从IgG1向IgG2的类别转换方面,在获得免疫耐受的婴儿与过敏发病者之间存在差异。

[0017] 此外还确认了,在属于一次函数[2]所适用的区块、在出生后6个月期间发生湿疹而向皮肤涂布类固醇进行治疗的情况下,在出生后经过1年时的食物过敏诊断中,与未涂布类固醇的婴儿相比,蛋清过敏的发病频率低,从而完成了本发明。

[0018] 发明的效果

[0019] 根据本发明,通过分别定量测定从婴儿采集的试样中的针对过敏原的IgG1及IgE的抗体效价,能够收集用于预测该婴儿在婴幼儿期对过敏原发生过敏的风险的数据。

[0020] 即,本发明如下所述。

[0021] [1]收集数据的方法,其中,分别定量测定从婴儿采集的试样中的针对过敏原的IgG1及IgE的抗体效价,收集用于根据基于预先经统计处理的从IgG1向IgE的免疫球蛋白类别转换的程度而制定的判断基准来预测上述婴儿在婴幼儿期对上述过敏原发生过敏的风险的数据。

[0022] [2]如上述[1]所述的方法,其特征在于,使用DCP芯片,定量测定试样中的针对过敏原的IgG1及IgE的抗体效价。

[0023] [3]如上述[1]或[2]所述的方法,其特征在于,试样为血浆或血清。

[0024] [4]如上述[1]~[3]所述的方法,其特征在于,统计处理包含将IgE抗体效价和IgG1抗体效价进行绘图而制作散点图、并利用回归分析而求出的一次函数。

[0025] [5]如上述[1]~[4]中任一项所述的方法,其特征在于,预测对过敏原发生过敏的风险的方法包括以下的步骤(a)~(d)。

[0026] 步骤(a),分别定量测定从婴儿采集的试样中的针对过敏原的IgG1及IgE的抗体效

价；

[0027] 步骤(b)，将IgG1抗体效价作为X轴、将IgE抗体效价作为Y轴进行绘图而制作散点图；

[0028] 步骤(c)，利用回归分析，以一次函数的形式算出IgG1抗体效价与IgE抗体效价的相关关系，所述一次函数为(1)适用于对过敏原发生过敏的风险低的婴儿的数据的一次函数1 ( $Y_1 = aX_1 - b$ , 其中,  $a > 0, b > 0$ )、及/或(2)适用于对过敏原发生过敏的风险高的婴儿的数据的一次函数2 ( $Y_2 = cX_2 - d$ , 其中,  $c > a$ )；

[0029] 步骤(d)，将属于一次函数1所适用的区块的婴儿预测为对过敏原发生过敏的风险低的婴儿，将属于一次函数2所适用的区块的婴儿预测为对过敏原发生过敏的风险高的婴儿。

[0030] [6]如上述[1]~[5]中任一项所述的方法，其特征在于，判断基准中还包含从婴儿采集的试样中的IgG2抗体效价。

[0031] [7]如上述[6]所述的方法，其特征在于，判断基准中包含从婴儿采集的试样中的IgG2抗体效价的方法包括以下的步骤(e)~(h)。

[0032] 步骤(e)，分别定量测定从婴儿采集的试样中的针对过敏原的IgG1及IgG2的抗体效价；

[0033] 步骤(f)，将IgG1抗体效价作为X轴、将IgG2抗体效价作为Y轴进行绘图而制作散点图；

[0034] 步骤(g)，利用回归分析，以适用于对过敏原发生过敏的风险低的婴儿的数据的一次函数3 ( $Y_3 = eX_3 - f$ , 其中,  $e > 0$ )的形式算出IgG1抗体效价与IgG2抗体效价的相关关系；

[0035] 步骤(h)，将IgG1值显示为比一次函数的X轴截距 (IgG1的抗体效价 =  $f/e$  Bug1/mL) 低的值的婴儿预测为对过敏原发生过敏的风险高的婴儿。

[0036] [8]如上述[1]~[7]中任一项所述的方法，其特征在于，判断基准中还包含从婴儿采集的试样中的IgE抗体与过敏原的亲合性程度。

## 附图说明

[0037] [图1]示出蛋白质被固定化的DCP芯片的示意图。

[0038] [图2]为针对84个婴儿分别测定脐带血试样、以及出生后经过2个月时、经过4个月时、及经过6个月时采集的试样中的针对EW的(a) IgE抗体、(b) IgG1抗体、(c) IgG2抗体的抗体效价的坐标图。

[0039] [图3]为针对84个婴儿分别测定脐带血试样、以及出生后经过2个月时、经过4个月时、及经过6个月时采集的试样中的(a) IgE抗体、(b) IgG1抗体、(c) IgG2抗体抗 $\beta$ -乳球蛋白(BLG)的抗体效价的坐标图。

[0040] [图4]为针对84个婴儿将出生后经过2个月(a)、4个月(b)、6个月(c)时进行血液采集而得到的试样中的针对BLG的IgG1抗体效价与IgE抗体效价的相关关系进行绘图而得到的坐标图。

[0041] [图5]为针对84个婴儿将于出生后经过2个月(a)、4个月(b)、6个月(c)的各时间点进行血液采集而得到的试样中的针对EW的IgG1抗体效价与IgE抗体效价的相关关系进行绘图而得到的坐标图。

[0042] [图6]为在针对84个婴儿将出生后经过6个月时进行血液采集而得到的试样中的针对EW的IgG1抗体效价与IgE抗体效价的相关关系进行绘图而得到的坐标图中附加下述信息而得到的坐标图,所述信息为关于出生后6个月体检时有无湿疹、是否对湿疹部位涂布类固醇及出生后经过1年时蛋清过敏发病的诊断的信息。

[0043] [图7]为针对84个婴儿将出生后经过6个月时进行血液采集而得到的试样中的针对BLG (a) 和EW (b) 的IgG1抗体效价与IgG2抗体效价的相关关系进行绘图而得到的坐标图。

[0044] [图8]为针对84个婴儿将出生后经过6个月时进行血液采集而得到的试样中的针对EW的IgG2抗体效价和IgE抗体效价进行绘图而得到的坐标图。

[0045] [图9]为针对78个母乳·混合喂养的婴儿将出生后经过6个月时进行血液采集而得到的试样中的抗卵清蛋白(OVA)的IgG1抗体效价和IgE抗体效价进行绘图而得到的坐标图。

[0046] [图10]为分别将组1和组2中阻碍50%OVA的结合的过敏原的浓度、 $IC_{50}$  (nM) 的值进行绘图而得到的坐标图。

### 具体实施方式

[0047] 作为本发明的收集数据的方法,只要为用于分别定量测定从婴儿采集的试样中的针对过敏原的抗原特异性IgG1及IgE的抗体效价、并根据基于预先经统计处理的从IgG1向IgE的类别转换的程度而制定的判断基准来预测上述婴儿对上述过敏原发生过敏的风险的方法,则没有特别限制,可举出下述方法:作为本发明的婴儿,从可享有本发明方法的效果(预测发生过敏的风险)的方面考虑,不特别限定于儿童福利法上的定义“从出生后至小于1岁”,例如,从出生后经过4~8个月(据称免疫球蛋白的类别转换、尤其是从IgG1开始的类别转换变得明确)、优选经过5~7个月时(取平均值,以下也称为“出生后经过6个月时”)的婴儿采集试样,收集用于预测可确定该婴儿在出生后经过8~16个月(优选出生后经过10~14个月,更优选出生后经过11~13个月)时的婴幼儿期对过敏原发生过敏的风险是高还是低的数据。此外,通过在遍及出生后0~12个月的任一时期,经时地定量测定抗上述过敏原的IgE抗体效价、IgG1抗体效价、根据需要测定的IgG2抗体效价,从而也能够收集考虑到个体差别而用于综合预测的数据。需要说明的是,所谓类别转换,是指在针对侵入体内的异物的生物体反应中,各种抗原特异性抗体的基因座发生基因重建,从而在不改变可变部的情况下发生恒定区域(Fc区域)的转变,已知除了发生IgM→IgG3→IgG1→IgG2→IgG4的转变的路径外,还有IgM→IgG3→IgG1→IgE的路径。

[0048] 作为本发明中的过敏原,只要是可在人体中诱导产生抗体的任意抗原蛋白质或肽即可,没有特别限制,可示例蛋类、牛奶类、牛肉等肉类、鲑鱼、金枪鱼等鱼类、虾、蟹等甲壳类及软体动物类、谷类、豆类及坚果类、果实类、蔬菜类、啤酒酵母、明胶等的作为食物过敏原的肽,其中,可示例: $\alpha$ s1-酪素、 $\alpha$ s2-酪素、 $\beta$ -酪素、 $\kappa$ -酪素、 $\alpha$ -乳清蛋白、作为乳清过敏原的主要成分的 $\beta$ -乳球蛋白(BLG)等乳过敏原;卵类粘蛋白、卵清蛋白(OVA)、伴白蛋白、或作为它们的混合物的蛋清过敏原(EW)、蛋黄过敏原等蛋过敏原;麦醇溶蛋白、谷朊等小麦过敏原;荞麦过敏原;Ara h1等花生过敏原;11S球蛋白等芝麻过敏原;原肌球蛋白等甲壳类过敏原。需要说明的是,作为将抗体与过敏原的亲合性以 $IC_{50}$ 值(阻碍50%结合的过敏原的浓度)的形式算出时使用的过敏原,从将抗原浓度(nM)作为指标的方面考虑,优选分子量明确的

单一过敏原。

[0049] 上述过敏原肽中可以包含糖链修饰肽、磷酸化肽、酰化肽、乙酰化肽、甲基化肽、泛素化肽等化学修饰肽,所述化学修饰肽可以为天然的化学修饰肽,也可以为人工的化学修饰肽。此外,使用在结合于MHC II类分子的肽部分(7~15个氨基酸大小等)的N末端侧及/或C末端侧附加至少两个以上的氨基酸而得到的含有表位的肽作为包含过敏原表位的肽时,将以数倍至数十倍的高灵敏度与患者抗体反应,从这一方面考虑是优选的。就所述在结合于MHC II类分子的肽部分的N末端侧及/或C末端侧附加至少两个以上的氨基酸而得到的含有表位的肽等包含过敏原表位的肽而言,可以利用肽合成进行制作,但也可以以包含过敏原表位的蛋白酶分解肽的形式制作。作为所述蛋白酶,可举出胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、组织蛋白酶、赖氨酰肽链内切酶(Lysyl Endopeptidase)。

[0050] 作为本发明中的试样,只要为从婴儿采集的、且能够分别定量测定IgG、IgE抗上述过敏原的抗体效价的试样,则没有特别限定,可举出从婴儿采集的血液、血清、血浆、唾液、泪液、鼻涕、尿等体液,优选为血清、血浆。将血清用作试样的情况下,例如,可以从婴儿的上臂静脉采血,将得到的血液于4℃静置一夜后,进行离心分离,将其上清液作为血清使用。或者,也可以利用微毛细管来采集用微量采血针等低侵入性地穿刺耳垂、指尖而得到的50~100μL的微量血液并直接使用。

[0051] 作为本发明中成为发病风险的对象过敏,可举出由特定的过敏原的口服致敏、经皮致敏等带来下述症状的病状,所述症状呈现为皮肤症状(搔痒感、荨麻疹、血管性水肿、发红、湿疹)、粘膜症状(眼症状:结膜充血·水肿、搔痒感、流泪、眼睑水肿)、鼻症状(喷嚏、鼻涕、鼻塞)、口腔咽喉症状(口腔·嘴唇·舌头的不适感·肿胀、咽喉的痒·不适感)、消化器官症状(腹痛、恶心、呕吐、腹泻、血便)、呼吸器官症状(咽喉束勒感、咽喉水肿、沙哑声、咳嗽、喘鸣、呼吸困难、哮喘)、全身症状(过敏性休克、脉搏过快、虚脱状态、意识障碍、血压降低)等。

[0052] 作为用于预测对过敏原发生过敏的风险的判断基准,只要为基于预先经统计处理的从IgG1向IgE的类别转换的程度而制作的判断基准,则没有特别限制,作为本发明的婴儿中的从IgG1向IgE的类别转换的程度,可举出:IgG1充分蓄积后发生的向IgE的类别转换的程度;和IgG1充分蓄积前发生的向IgE的类别转换的程度。另外,也可以将从IgG1向IgG2的类别转换的程度加入至判断基准中,作为从IgG1向IgG2的类别转换的程度,可举出:IgG1充分蓄积后发生的向IgG2的类别转换的程度;和IgG1未充分蓄积、而且也未观察到IgG2的增加的情况。

[0053] 作为婴儿中IgG1充分蓄积后发生向IgE的类别转换的情况,可举出口服免疫耐受建立的情况,该情况下可预测为对过敏原发生过敏的风险低。另外,可以将同时也进行从IgG1向IgG2的类别转换的情况包括在口服免疫耐受建立的情况之内,该情况下可预测为对过敏原发生过敏的风险低。

[0054] 作为上述口服免疫耐受,可举出:婴儿经由母乳而口服摄取母亲所摄食的过敏原的未分解成分、或者婴儿口服摄取人造乳,由此,作为针对侵入婴儿的体内的未分解物的异物反应,由婴儿自身产生的IgG1的抗体值达到阈值后,IgE的抗体效价增加,之后转为减少。另外,还可包括:由婴儿自身产生的IgG1的抗体值达到阈值后,IgG2的抗体效价缓慢地持续增加。

[0055] 作为上述在由婴儿自身产生的IgG1充分蓄积前发生向IgE的类别转换的情况,可举出自皮肤发生经皮致敏的情况,在该情况下,婴儿中大多可观察到湿疹症状。可预测该婴儿中对过敏原发生过敏的风险高。

[0056] 作为上述经皮致敏,可举出在IgG1抗体值达到阈值之前即发生强的从IgG1向IgE的类别转换而不属于口服免疫耐受的机理的情况,作为该不属于口服免疫耐受的机理的情况,可举出下述情况:以母亲所摄取的过敏原的未分解成分经由母乳而附着于婴儿的皮肤、或者环境中的过敏原直接附着于皮肤为契机,皮肤的屏障(barrier)功能因湿疹等而降低,由此过敏原侵入婴儿的体内。

[0057] 作为对上述从IgG1向IgE的类别转换的程度进行统计处理的方法,例如,可举出下述方法:将从婴儿采集的试样中的IgG1抗体效价作为X轴、将IgE抗体效价作为Y轴进行绘图而制作散点图,利用回归分析以一次函数的形式算出IgG1抗体效价与IgE抗体效价的相关关系。通过进行该统计处理,从而即使是对于类别转换的时期、IgG1的阈值而言存在个体差别、因过敏原而导致的差异的数据,也能够针对函数的可适用范围(区块)中的数据组整体进行预测,在这一方面是有利的。

[0058] 作为由上述统计处理算出的一次函数,可举出:(1)一次函数1( $Y_1 = aX_1 - b$ ,其中, $a > 0$ 、 $b > 0$ ),其适用于对过敏原发生过敏的风险低的婴儿的数据;及(2)一次函数2( $Y_2 = cX_2 - d$ ,其中, $c > a$ ),其适用于对过敏原发生过敏的风险高的婴儿的数据。

[0059] 上述一次函数1在由对过敏原发生过敏的风险低的婴儿的数据构成的情况下可适用于散点图上的全部数据,上述一次函数2在仅由对过敏原发生过敏的风险高的婴儿的数据构成的情况下可适用于散点图上的全部数据。难以使上述任一种一次函数适用于散点图上的全部数据时,可以将数据分为两个区块,针对每个区块算出适用于上述对过敏原发生过敏的风险低的婴儿的数据的上述一次函数1、和适用于上述对过敏原发生过敏的风险高的婴儿的数据的一次函数2。作为难以使上述一种一次函数适用于散点图上的全部数据时分为两个区块的方法,可举出采取下述的统计学上适当的措施:在上述各一次函数1和一次函数2中,以相关系数高的方式组成程序;数据收集者、数据分析者等本领域技术人员根据实际的数据分布状况进行判断而分为两个区块;等等。

[0060] 作为上述IgG1的阈值,可以在上述一次函数1中以与坐标图上的一次函数1的上升位置一致的IgG1的抗体效价 $= b/a$  Bug 1/mL的形式算出。另外,在上述一次函数2中,坐标图上的上升的位置处的IgG1的抗体效价( $d/c$ ) (其中,优选 $d > 0$ ) 小于 $b/a$  Bug1/mL。对于超过IgG1的阈值的婴儿而言,即使IgE抗体效价高,也可以预测发生过敏的风险较低。

[0061] 在本发明的用于预测发生过敏的风险的数据中,可以包含出生后6个月的婴儿的试样(通过出生后6个月进行体检等得到的)中的IgG2的抗体效价,可以将下述情况预测为发生过敏的风险较高,所述情况为:由于IgG1抗体效价在达到上述阈值之前发生向IgE的类别转换,因而IgG2的抗体效价停留在低值。另外,可以将出生后6个月的体检中有发生持续至少1周以上的皮疹的经历的情况进一步包含在用于预测为发生过敏的风险较高的判断基准中。

[0062] 本发明中,接受对过敏原发生过敏的风险的预测的受试婴儿通过输入受试婴儿自身的数据能够包含在本发明的收集数据的方法中的婴儿内,能够使本发明中的判断基准的精度较高。

[0063] 利用本发明的收集用于预测发生过敏的风险的数据的方法时,能够使过敏发病风险降低。作为该降低方法,可举出针对被预测为过敏发病风险高的婴儿将类固醇向皮疹部位经皮施予(涂布)等防止过敏发病的方法、口服免疫耐受的促进方法。作为上述类固醇的经皮施予方法,例如如特应性皮炎诊疗准则2016年版(日本皮肤科学会准则)(日皮会志:126(2):121-155,2016)所示,可举出下述方法:按照准则,根据重症程度将各种强度等级的类固醇(steroid)以通常1天1~2次的方式涂布于皮疹部位。作为上述口服免疫耐受的促进方法,可举出下述方法:持续且安全地口服摄取相当于母乳中包含的抗原性减弱的微量抗原的抗原。

[0064] 本发明中,作为分别定量测定IgG1及IgE、以及IgG2的抗体效价的方法,只要为能够将婴儿采集的试样中的、与过敏原结合的IgG1、IgE、及IgG2各抗体的浓度定量为抗体效价(Binding Unit:BU)/mL的方法,则没有特别限定,优选可举出下述方法:使用能够将各种抗原固定化、并能够在存在针对该固定化了的特定抗原的抗体的情况下定量测定抗原抗体反应的芯片进行测定,具体而言,可举出Kamemura N,et al.J Allergy Clin Immunol 2012;130:113-121、Suzuki K. et al. Anal Chim Acta 2011;706:321-327中记载的进行定量测定的方法。

[0065] 在本发明的用于预测发生过敏的风险的数据中,可以包含出生后6个月的婴儿的试样中的IgE抗体与过敏原的亲合性程度。具体而言,就在试样中确认到能够测定IgE抗体与抗原(过敏原)的亲合性的量的IgE抗体的婴儿而言,测定了IgE的亲合性时,可以在IgE与过敏原的亲合性高的情况下预测为发生过敏的风险较高,可以在IgE抗体与过敏原的亲合性低的情况下预测为发生过敏的风险较低。作为能够进行上述亲合性的测定的IgE量,要求为测定的可靠界限值以上。每个过敏原的测定界限值不同,例如IgE与OVA的亲合性的情况下,可举出100BUe/mL以上。

[0066] 作为测定上述IgE抗体与特定的过敏原的亲合性的方法,可举出利用FACS、BIACORE、RIA、ELISA等已知的测定手段来测定抗体的亲合性的方法,可优选示例ELISA竞争抑制法,即,利用抗原抗体反应中的竞争抑制,对抗体与过敏原的结合活性定量地进行比较分析。作为具体的步骤,向包含与过敏原结合的IgE抗体的试样中,从浓度0(试样中不存在过敏原)至达到在一定时间内过敏原能够与全部IgE抗体结合的充分的浓度为止,添加阶段性制备的已知浓度的过敏原作为竞争物质,并使其反应一定时间(前阶段反应)。在包含特定浓度的过敏原的溶液中,与过敏原的亲合性较大的IgE抗体与添加的过敏原结合的比例较高,与过敏原的亲合性较小的IgE抗体与添加的过敏原结合的比例较低。

[0067] 作为上述阶段性制备的已知浓度,可使用本领域技术人员基于试样中存在的抗体量等而适当确定的浓度,例如,在稀释血浆的情况下,可举出0nM、0.1nM、1.0nM、10nM、100nM、1000nM(最终浓度)等过敏原的浓度。需要说明的是,竞争抑制中使用的过敏原的浓度根据各过敏原的不同而不同。作为上述前阶段反应中的一定时间,例如,可举出15分钟~2小时、优选30分钟~1小时。

[0068] 将上述前阶段反应后的溶液供于固定化有过敏原的DCP芯片等结合灵敏度非常高的载体,利用使上述游离抗体与被固定化的过敏原结合等以往已知的方法进行反应,进而与标记二次抗体反应,然后算出标记量。关于上述亲合性较低的IgE抗体,前阶段反应后的溶液中存在的游离一次抗体的量较多,与被固定化的过敏原结合的抗体量增多。另一方面,

关于上述亲和性较高的抗体,前阶段反应后的溶液中存在的游离一次抗体的量较少,因此与被固定化的过敏原结合的抗体量减少。

[0069] 如上所述,就以标记二次抗体的标记量的形式检测的各抗体与抗原(过敏原)的亲合性而言,判定为:若检测量较少,则亲和性较高,若检测量较多,则亲和性较低。对于IgE抗体与过敏原的亲合性的数值化而言,在针对前阶段反应中不存在竞争过敏原的浓度为0的溶液将检测到的标记二次抗体的标记量作为100%的情况下,可以将标记量成为50%的抗原浓度(例如上述例子中,为(nM))表示为IC<sub>50</sub>值。

[0070] 作为上述标记二次抗体,可举出HiLyte Fluor 555、Atto532、Cy3、Alexa Fluor 555、Cy5、FITC、罗丹明等荧光标记二次抗体、过氧化物酶、碱性磷酸酶等酶标记二次抗体、磁珠标记二次抗体、红外标记二次抗体等。

[0071] 作为上述芯片,由于在非特异性吸附少的方面有利,因而在载体的表面形成有碳层的芯片是优选的,由于在用于固定肽的方面有利,因而导入有化学修饰基团的芯片、进行了活化处理的芯片是优选的,其中,优选DCP芯片。

[0072] 作为上述载体,可举出金、银、铜、铝、钨、钼、铬、铂、钛、镍等金属;不锈钢、硬铝等合金;上述金属与陶瓷的层叠体;玻璃;硅;纤维;木材;纸;聚碳酸酯、塑料;及塑料与上述金属、陶瓷等的混合体。

[0073] 作为在上述载体的表面形成的碳层,可举出由金刚石、类金刚石碳(DLC)、无定形碳、石墨、碳化钨、碳化铌、碳化硅、碳化钽、碳化钼、碳化钽、碳化钛、碳化铀、碳化钨、碳化锆、碳化钼、碳化铬、碳化钒等形成的层。

[0074] 作为向上述载体的表面或在载体的表面形成的碳层导入的化学修饰基团,可举出氨基、羧基、环氧基、甲酰基、羟基等。

[0075] 作为导入上述氨基的方法,可举出下述方法:在氨气中对芯片的载体的表面、碳层进行紫外线照射的方法;在氯气中对芯片的载体的表面、碳层照射紫外线而进行氯化,并在氨气中对该经氯化的芯片的载体的表面、碳层进行紫外线照射的方法;使亚甲基二胺、乙二胺等多元胺类与经氯化的芯片的载体的表面、碳层反应的方法。

[0076] 作为导入上述羧基的方法,例如,可举出下述方法:使草酸、丙二酸、琥珀酸、马来酸、富马酸、邻苯二甲酸等二羧酸或聚丙烯酸、聚甲基丙烯酸、偏苯三甲酸、丁烷四甲酸等多元羧酸与上述经氨基化的芯片的载体的表面、碳层反应。

[0077] 作为导入上述环氧基的方法,例如,可举出下述方法:使合适的多元环氧化合物与上述那样经氨基化的芯片的载体的表面、碳层反应的方法;使有机过氧酸与碳层所含有的C=C双键反应的方法。作为有机过氧酸,可举出过氧乙酸、过氧苯甲酸、过氧邻苯二甲酸、过氧甲酸、三氟过氧乙酸等。

[0078] 作为导入上述甲酰基的方法,可举出使戊二醛与上述经氨基化的芯片的载体的表面、碳层反应的方法。

[0079] 对于导入了上述化学修饰基团的芯片而言,也可以在利用活化试剂进行活化处理后使过敏原肽固定化。作为使过敏原肽固定化的方法,可举出下述方法:利用向基板表面导入的羧基(-COOH基),并使用1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(WSCD·HCl:水溶性碳二亚胺盐酸盐)、N-羟基丁二酰亚胺(NHS)、其他化学交联剂,以共价键使具有氨基(-NH<sub>2</sub>基)的过敏原肽固定化。

[0080] 作为上述DCP芯片,可举出:在基板(其是在硅基板表面对碳层进行DLC处理而得到的基板)或载玻片的表面施以对含有氨基的化合物或其聚合物及/或共聚物进行处理而得到的静电层,进而对二羧酸或多元羧酸等反复进行处理,然后利用N-羟基丁二酰亚胺及/或碳二亚胺类进行活化而得到的芯片;向载体的表面、上述碳层导入化学修饰基团而得到的芯片;进一步进行活化处理而得到的芯片;等等。

[0081] 使上述过敏原肽固定化于芯片时,为了维持蛋白质/肽的功能、以及/或者为了增加蛋白质/肽与基板的结合量,可举出将选自下述物质中的一种或两种以上以点样(spotting)添加剂的形式混合而进行点样,所述物质为PEG(聚乙二醇,polyethylene glycol);DMSO(二甲基亚砷,dimethyl sulfoxide);甘氨酸;PBS(磷酸缓冲生理盐水);甘油、葡萄糖、果糖、甘露糖、半乳糖、木糖、肌醇、山梨糖醇、海藻糖、或环糊精等的溶解液。这些点样添加剂也可以溶解于CAPS(3-环己氨基丙磺酸,N-Cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid)缓冲液、磷酸缓冲液等缓冲液中使用。

[0082] 在对上述芯片进行肽的固定化后,优选进行封闭(blocking)处理。所述封闭处理能够使背景降低,同时相对地提升荧光强度、显色强度,使测定灵敏度提高。作为上述封闭剂,优选使用不含生物体成分的封闭剂。通过使用不含生物体成分的成分,与使用包含牛血清白蛋白等生物体成分的封闭剂的情况相比,能够减少与动物性过敏原的交叉反应,防止背景噪声、信号衰退。具体而言,可举出Pierce Protein-Free Blocking Buffer(Thermo Fisher公司制)、**blp**k 噪声消除试剂(Merckmillipore公司制)、Pro-Block(ScyTec公司制)、Blockmaster(JSR公司制)等无蛋白封闭缓冲液(Protein-Free blocking buffer)。优选在将这些封闭剂以未稀释的方式添加后,进行封闭反应一夜,然后对封闭剂进行洗涤,除去水分。

[0083] 作为本发明中使用芯片来定量测定抗体效价的方法,只要为至少能够对试样中的针对过敏原的IgG1抗体、IgE抗体、根据需要检测的IgG2抗体进行检测、并定量测定抗体效价的已知的免疫测定法即可,没有特别限定,可优选举出在上述芯片上进行的使用标记二次抗体的ELISA法,作为标记二次抗体,可示例HiLyte Fluor 555、Atto532、Cy3、Alexa Fluor 555、Cy5、FITC、罗丹明等荧光标记二次抗体、过氧化物酶、碱性磷酸酶等酶标记二次抗体、磁珠标记二次抗体、红外标记二次抗体、标记抗人IgE抗体、标记抗人IgG抗体、标记抗人IgA抗体、标记抗人IgM抗体、标记抗过敏原抗体。作为上述二次抗体,也可以使用抗体的Fab片断、F(ab')<sub>2</sub>片断等,Fab片断可通过用木瓜蛋白酶等对抗体进行处理而制备,F(ab')<sub>2</sub>片断可通过用胃蛋白酶等对抗体进行处理而制备。

[0084] 作为上述使过敏原固定化的芯片、以及使用其的IgG1、IgE、根据需要测定的IgG2抗体等抗体的定量测定方法,也可以使用已知的芯片、方法,具体而言,例如可包含日本特开2006-267058号公报、日本特开2006-267063号公报、日本特开2015-169616号公报中记载的芯片、方法。

[0085] 以下,利用实施例对本发明具体地进行说明,但本发明的技术范围并不限定于这些示例。

[0086] 实施例

[0087] [实施例1]

[0088] (检体)

[0089] 在德岛大学的伦理委员会的批准和健康保险鸣门医院(德岛县)的伦理委员会的批准(批准编号:#1314)的基础上,作为基于充分的知情同意而得到批准的临床检体,将由健康保险鸣门医院提供的、84名新生儿的脐带血试样、出生后经过2个月时、经过4个月时、及经过6个月时采集的血液(血浆试样)、以及各新生儿的母体的血液(母体血浆试样)用作检体。将84名新生儿及其母体的详情示于以下的表1。

[0090] [表1]

对象	84组母子
性别	男婴 42人(50%)
	女婴 42人(50%)
喂养法	母乳 31人(37%)
	混合喂养 47人(56%)
[0091]	人工喂养 6人(7%)
至6个月有无湿疹	有湿疹 42人(50%)
	无湿疹 42人(50%)
出生后一年时是否	鸡蛋的去除(以口服负荷试验或自家
去除过敏原	摄取时的反应为基准去除)5人(6%)
	牛奶的去除 0人(0%)

[0092] 上述84名婴儿利用母乳(推定包含来自母体的蛋类抗原)、人工喂养(推定包含来自牛奶的奶类抗原)、及混合喂养(推定包含蛋类抗原及奶类抗原)中的任一者进行营养摄取,出生后6个月以内未摄取辅食。在出生后经过6个月时的体检中,半数的婴儿中观察到湿疹。

[0093] [测定步骤]

[0094] (芯片的制作)

[0095] 关于作为过敏原的抗原蛋白质,使用全蛋清(Egg White-EW)(德岛大学制)、OVA(SIGMA公司制)及 $\beta$ -乳球蛋白(BLG,SIGMA公司制)。

[0096] 对二氧化硅玻璃表面施以含有氨基的静电层,进一步在避光的状态下于室温将利用聚丙烯酸而导入有带负电荷的羧基的基板在化学交联剂(100mM WSC·HCl,100mM NHS,0.1M磷酸钾缓冲液(pH为6.0))中振荡30分钟,同时进行再活化处理。将反应后的化学交联剂丢弃,然后将基板在MilliQ水中振荡,同时进行2次洗涤,每次1分钟,然后立即使用台式离心机(Allegra<sup>TM</sup>X-22R Centrifuger,Beckman Coulter公司制)将水分除去,制备活化芯片。

[0097] (过敏原的偶联反应)

[0098] 在添加有5~30%的DMSO或5~30%的PEG300的溶液中,以0.25~1.0mg/mL的浓度溶解作为抗原蛋白质的EW(德岛大学制)、OVA(SIGMA公司制)及BLG,制备抗原蛋白质溶液。将该制备的各抗原蛋白质溶液分注于384孔平底板(Corning公司制),利用微阵列制作装置(OmniGridAccent,DIGILAB公司制),以4nL在上述活化芯片上点样,然后于15℃~30℃干燥1~18小时,将抗原蛋白质固定化。将固定化有蛋白质的DCP芯片的示意图示于图1。

[0099] (未反应活性基团的封闭反应)

[0100] 在上述固定化有抗原蛋白质的芯片上,向反应孔槽(孔)中添加作为封闭试剂的Blockmaster(JSR公司制),在避光下以冷藏(4℃)的方式静置,使其反应一整夜。

[0101] (与过敏原特异抗体的捕捉反应)

[0102] 利用抽吸器(VARIABLE SPEED PUMP, BIORAD公司制)将上述封闭试剂抽吸除去后,再次转移至反应板,添加8mL洗涤液(50mM TTBS)后,晃动5分钟,然后利用抽吸器抽吸除去洗涤液。以同样的方式洗涤3次后,进一步用纯化水(MilliQ水)洗涤3次。利用离心机(Allegra(商标), X-22R Centrifuge (BECKMAN COULTER公司制))离心除去水滴(以2000rpm进行1分钟),从而将芯片表面的水滴除去。用样品稀释液(20mM磷酸缓冲液(phosphate buffer), pH7.4/0.3M KCl/0.05% Tween20)进行适当稀释,制备经稀释的一次抗体液,将10 μL该经稀释的一次抗体液添加至反应孔,在避光下于37℃静置2小时。

[0103] (与二次抗体的反应)

[0104] 利用抽吸器(VARIABLE SPEED PUMP、BIORAD公司制)将通过上述操作得到的稀释检体液(一次抗体)抽吸除去后,将芯片转移至洗涤用盒,添加10μL洗涤液(50mM TTBS)后,使用Double-Shaker NR3重复3次洗涤操作(每次5分钟)来进行洗涤,然后进一步加入纯化水(MilliQ水)进行3次洗涤,每次1分钟。利用上述离心机,离心除去水滴(以2000rpm进行1分钟),从而将芯片表面的水滴除去。接着,将经荧光标记的二次抗体(HiLyte Fluor(商标)或555标记抗人(conjugated anti human) IgE (HyTest公司制)(作为稀释液,使用IMMUNOSHOT Platimun/1%牛血清白蛋白。最终稀释浓度为10μg/mL)、HiLyte Fluor(商标)或555标记抗人IgG1(Thermo Fisher Scientific公司制)(作为稀释液,使用20mM磷酸缓冲液、pH7.4/1%牛血清白蛋白/0.3MKCl/0.05% Tween20。最终稀释浓度为1.5μg/mL)、HiLyte Fluor(注册商标)或555标记抗人IgG2(Bio-Rad Laboratories株式会社制,(作为稀释液,使用20mM磷酸缓冲液、pH7.4/1%牛血清白蛋白/0.3M KCl/0.05% Tween20。最终稀释浓度为1.5μg/mL)制备为二次抗体液。将该二次抗体液以10μL分注于载玻片(slide)上的各反应孔,在避光下于37℃静置2小时。

[0105] [被捕捉于抗原的抗体的检测]

[0106] 利用抽吸器将上述经稀释的二次抗体液抽吸除去后,将芯片放入洗涤用盒中,使用Double-Shaker NR3(TAITEC公司制),重复进行3次洗涤操作,每次5分钟。然后,加入纯化水(MilliQ水)漂洗3次,每次1分钟,利用上述离心机将水滴除去而使其干燥。利用荧光扫描仪(3D Gene Scanner, 东丽公司制)对荧光强度进行测定(Ex:532nm, Em:570nm),将从各芯片得到的点样的荧光强度进行数值化。对于测定单位而言,作为利用抗原抗体反应与抗原结合的抗体效价,以Binding Unit (BU)表示,根据固定化于芯片的已知浓度的各标准抗体的荧光强度的标准曲线来进行测定并表示。需要说明的是,作为标准抗体,使用IgE标准抗体、IgG标准抗体、IgG2标准抗体、IgG3标准抗体、IgG4标准抗体、IgA标准抗体。以下,IgE以BU<sub>e</sub>表示,1BU<sub>e</sub>=2.3ng, IgG1以BU<sub>g1</sub>表示,1BU<sub>g1</sub>=1.0μg, IgG2以BU<sub>g2</sub>表示,1BU<sub>g2</sub>=1.0μg, IgG3以BU<sub>g3</sub>表示,1BU<sub>g3</sub>=1.0μg, IgG4以BU<sub>g4</sub>表示,1BU<sub>g4</sub>=1.0μg, IgA以BU<sub>a</sub>表示,1BU<sub>a</sub>=1.0μg。

[0107] [试验例1]

[0108] 针对84名婴儿,分别测定脐带血试样、以及出生后经过2个月时、经过4个月时、及经过6个月时采集的血浆试样中的针对EW的IgE抗体、IgG1抗体、IgG2抗体的抗体效价。将结果示于图2(a)~(c)。

[0109] (结果)

[0110] 由图2(a)可见,就针对EW的IgE的抗体效价而言,在脐带血中,因EW抗原(其是经由胎盘而从母体转移来的)而在胎儿期产生的低亲和性IgE以微量被检测到。在数据上,婴儿是否摄取母乳没有显示出区别,但对于IgE抗体效价而言,在摄取母乳的婴儿中,出生后4个月以后急剧上升。作为原因,认为是母亲所食入的蛋的未分解成分经由母乳侵入婴儿的体内,发生针对蛋清过敏原的抗体反应,IgE抗体效价上升,这可以理解为多数婴儿自然体验的口服免疫耐受的一个过程。另一方面,也有基本上未确认到IgE抗体效价上升的婴儿,推测其原因在于:在所述婴儿中,母乳所包含的抗原量少、或者婴儿的免疫系统发育缓慢,因此,出生后6个月为止的期间的抗原特异性IgG1的蓄积不充分,从IgG1向IgE的类别转换的切换缓慢。

[0111] 由图2(b)及(c)可见,针对EW的IgG1及IgG2的抗体效价在脐带血中显著高,但急剧减少。图2(b)及(c)显示:刚出生后的婴儿的情况下,从母体通过胎盘转移至胎儿的来自母体的大量IgG1、IgG2被检测到,婴儿自身所产生的针对EW的IgG1、IgG2在来自母体的IgG消失的出生后2~4个月以后开始被检测到。另外,由图2(a)可见,IgE尽管不进行母子转移,但是在脐带血中检测到针对蛋清(EW)的IgE,该结果与本申请发明人已确认的事项(Kamemura N, et al. Low-affinity allergen-specific IgE in cord blood and affinity maturation after birth. J Allergy Clin Immunol 2014;133:904-905)一致,即,其是因在胎儿期通过胎盘向胎儿转移的IgG-抗原复合体而使得胎儿被抗原致敏、胎儿自身所产生的低亲和性IgE被检测到的结果。关于EW,认为显示出免疫耐受模式的组与不显示免疫耐受模式的组混在一起,因此进一步继续进行了研究。

[0112] [试验例2]

[0113] 针对上述84名婴儿,分别测定脐带血试样、以及出生后经过2个月时、经过4个月时、及经过6个月时采集的试样中的针对BLG的IgE抗体、IgG1抗体、IgG2抗体的抗体效价。将结果示于图3(a)~(c)。

[0114] 由图3(a)可见,针对BLG的IgE抗体效价在出生后2个月以内为微量,显示出微量的抗原致敏。牛奶中含有少量但母乳中本来不含有的BLG的抗原性较强,因此在人工乳的制造过程中进行将其尽量除去的操作,但就现在的技术而言难以完全地除去,在育儿用奶粉中,以0.5~1.3%左右的量残留于奶粉中,因此由于摄取人工乳而被BLG致敏。确认了对于大多数的婴儿而言,在BLG抗原致敏的情况下建立了山型的“免疫耐受模式”(抗体量自刚出生起增加,然后降低)。由于全部84名婴儿在1年的时间点均获得针对奶类的免疫耐受,因此推测即使是未获得上述山型的“免疫耐受模式”、直至6个月仍在上升的情形,之后也在直至1岁为止的期间建立了同样的“免疫耐受模式”的过程。

[0115] 对于出生后6个月为止的各种抗BLG抗体的出现而言,确认了:按照免疫球蛋白基因座的位置的顺序,存在以(IgM)→IgG3→IgG1→IgG2→IgG4的方式进行的类别转换、和以IgG3→IgG1→IgE的方式进行的类别转换,但各免疫球蛋白的出现存在时间差;IgG1和IgE在增加后会走向减少过程,但IgG2在多数情况下维持增加倾向(虽然也有例外)。对于经时变化而言,确认了:IgG1的出现早,观察到许多在出生后2个月或4个月显示峰值的例子,另一方面,IgG2、IgE晚于IgG1而开始增加。对于此次调查的84名婴儿而言,在1年后的抗原负荷试验中不存在被诊断为奶类过敏的婴儿,全部被诊断为口服免疫耐受状态。因此,认为图3(a)~(c)显示出获得口服免疫耐受的情况下的IgE、IgG1、IgG2的变化模式。

[0116] [实施例2]

[0117] [针对BLG的IgE抗体效价与IgG1抗体效价的相关]

[0118] 针对上述84个婴儿,分别测定出生后经过2个月、4个月、6个月时进行血液采集而得到的血浆中的针对BLG的IgE抗体效价和IgG1抗体效价,将IgG1抗体效价作为X轴、将IgE抗体效价作为Y轴进行绘图而制作散点图。将结果示于图4(a)(出生后2个月)、(b)(出生后4个月)、及(c)(出生后6个月)。

[0119] (结果)

[0120] 图4(a)及(b)中,对于出生后2个月及4个月时的针对BLG的IgG1抗体效价与IgE抗体效价的关系进行了回归分析,均是从IgG1超过2000BUg1/mL的时间点才开始IgG1→IgE的类别转换。

[0121] 图4(c)中,对于出生后6个月时的针对BLG的IgG1抗体效价与IgE抗体效价的关系进行了回归分析。与出生后2个月~4个月同样,得到了IgG1在2000BUg1/mL处开始上升的一次函数( $Y=0.1677X-335.4$ )。图4(a)~(c)中均确认到随着受到抗原致敏的时间经过、IgG1发生蓄积,大部分情况下,向IgE的移行是在IgG1超过2000BUg1/mL时才发生的。由于不存在发生奶类过敏的幼儿,因此确认了在BLG的情况下,在获得了口服免疫耐受、可预测为过敏的发病风险低的模式中,在可适用上述一次函数的范围内存在数据,开始从IgG1向IgE的移行的阈值为2000BUg1。需要说明的是,与IgG1→IgE的类别转换相关的阈值和一次函数根据抗原的种类而显示出不同的值,但推测在任意的抗原的情况下均以类似的模式进行类别转换。

[0122] [实施例3]

[0123] [针对EW的IgE抗体效价与IgG1抗体效价的相关]

[0124] 针对上述84个婴儿,分别测定出生后经过2个月、4个月、6个月时进行血液采集而得到的血浆中的针对EW的IgE抗体效价和IgG1抗体效价,将IgG1抗体效价作为X轴、将IgE抗体效价作为Y轴进行绘图而制作散点图。将结果示于图5(a)(出生后2个月)、(b)(出生后4个月)、及(c)(出生后6个月)。

[0125] (结果)

[0126] 由图5(a)可见,就出生后2个月而言,IgG1的抗体效价停留在低值,未进行IgG1的蓄积。另外,还认为存在有从母体转移来的IgG1的出生后2个月的抗体效价不具有参考价值。由图5(b)可见,就出生后4个月而言,确认了针对EW的IgG1的蓄积。虽然有例外情况,但对于大部分的婴儿而言,出生后4个月的坐标图表明存在与BLG类似的从IgG1向IgE的类别转换的阈值。

[0127] 另一方面,图5(c)中,对于可适用于整个散点图中分布的数据的一次函数而言,根据实际的数据分布状况,将数据分为两个区块,然后利用GraphPad Prism ver.6.07的软件算出可适用于各组的一次函数,结果,关于针对EW的IgG1和IgE的抗体效价的相关关系,得到了在IgG1=1400BUg1处开始上升的一次函数<1>( $Y=0.1274X-178.36, X \geq 1400$ 的情况)和在比IgG1=1400BUg1小的值处开始上升的一次函数<2>( $Y=2.131X-852.94, X < 1400, Y \geq 300$ 的情况)。属于可适用一次函数[2]的区块的婴儿中的90.9%在出生后6个月以内有持续1周以上的湿疹的既往历史,并且在1年的时间点发生鸡蛋过敏的5名婴儿中的4名属于该区块,因此预测为食物过敏的高风险组。需要说明的是,1名发生蛋清过敏但不属于该区块

的例外婴幼儿不属于一次函数<1>、<2>中的任一者,显示出高的IgE和高的IgG1,如后文所述,IgG1→IgG2的类别转换较不充分,IgG2停留在稍超过200BUg2/mL的低值。

[0128] [实施例4]

[0129] [出生后6个月体检中湿疹的有无和类固醇治疗]

[0130] (EW)

[0131] 在上述图5(c)的基础上,附加上关于出生后6个月体检时有无湿疹和是否向湿疹部位涂布类固醇的信息,出湿疹的婴儿(有湿疹组)以▲(三角)表示,将无湿疹的婴儿(无湿疹组)作为○(圆圈),将为湿疹患者且类固醇治疗者记载为(■),将在1年的时间点蛋清过敏发病者记载为◇,重新表示于图6中。需要说明的是,类固醇的介入大多数是在出生后4个月至6个月之间进行的。

[0132] 由图6可见,在可适用上述一次函数<2>的区块中,湿疹以高比率(约90.9%)发生。特别地,针对湿疹症状明显的19人,按照“特应性皮炎诊疗准则”以1天1~2次的方式向湿疹部位涂布类固醇剂。需要说明的是,尽管IgG1值低但IgE抗体效价急剧增加的婴儿基本上为伴有湿疹的婴儿,推测母乳中包含的EW抗原与由于湿疹而使得屏障功能被阻碍的皮肤接触,引起经皮致敏。对于该IgE增加的机理而言,推测是由经皮致敏机理(其与由口服致敏引起的IgG1→IgE类别转换不同)引起IgG1→IgE类别转换的结果。即,推测在达到免疫耐受发动的IgG1的阈值之前,因经皮致敏机理而发生IgG1→IgE类别转换,IgE抗体效价急剧增加。

[0133] (BLG)

[0134] 由于在出生后6个月体检中BLG特异性IgE抗体效价均低(虽然在出现湿疹症状的婴儿中也存在这种现象),因此预测对BLG发生过敏的风险非常低。需要说明的是,BLG的情况下,认为出生后2个月时已达到免疫耐受发动的IgG1的阈值的婴儿占半数以上也是过敏的发病率低的原因之一。即,表明若类别转换进展、IgG1超过阈值,则即使湿疹发病而产生经皮致敏风险,也不易发生上述一次函数(2)的状况。

[0135] [类固醇治疗法的准则和过敏发病]

[0136] 针对上述84人,在出生后经过1年时进行针对蛋和牛奶的食物摄取试验,进行过敏发病的诊断,如图6所示,确定了5人发生蛋清过敏。不存在属于奶类过敏的婴儿。50%的婴儿(42名)患湿疹,其中19名涂布了类固醇激素剂,但涂布例在上述一次函数<1>、<2>两组间大致均等地分布。上述一次函数<1>的组是预测为已建立口服免疫耐受的组,因此无论是否涂布类固醇激素剂,都没有发生蛋清过敏。因此,若根据本检查方法认定为一次函数<1>的组,则类固醇激素剂的经皮施予中推荐基于强度弱的类固醇激素剂的对症疗法。另一方面,对于上述一次函数<2>的组而言,推测已发生经皮致敏,并且蛋清过敏的发病集中,因此推测已实施的类固醇的经皮施予法不充分,强度超过对症疗法的强类固醇激素剂是合适的。由此推测,通过使用本发明的“收集用于预测过敏发病风险的数据的方法”,能够为了防止经皮致敏而在合适的时期选择合适强度的类固醇激素剂。

[0137] [实施例5]

[0138] [针对BLG、EW的IgG2抗体效价与IgG1抗体效价的相关]

[0139] 图7为示出针对BLG(a)、EW(b)的出生后经过6个月时的84人的IgG1→IgG2类别转换的坐标图。在诱导口服免疫耐受的情况下,除了IgG1→IgE类别转换以外,几乎同时发生IgG1→IgG2类别转换。对于IgG2的产生而言,由于之后向IgG4进行类别转换,因此推定其对

于建立口服免疫耐受而言是重要的 (James LK, et al. Long-term tolerance after allergen immunotherapy is accompanied by selective persistence of blocking antibodies. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:509-516; Sugimoto M, et al. Differential response in allergen-specific IgE, IgGs, and IgA levels for predicting outcome of oral immunotherapy. *Pediatr Allergy Immunol* 2016;27 (3): 276-282)。

[0140] 图7(a)中示出了针对BLG的IgG1→IgG2类别转换。将IgG1抗体效价作为X轴、将IgG2抗体效价作为Y轴进行绘图而制作散点图时,关于其一次函数,得到( $Y=0.2289X-457.8, X \geq 2000$ 的情况)。该情况下,IgG1的阈值为2000BUg1,是与IgG1→IgE的类别转换中的阈值相同的值。这表明在口服免疫耐受建立的BLG的情况下,从IgG1向IgE的类别转换和从IgG1向IgG2的类别转换在超过IgG1的阈值后几乎同时地进行。图7(b)示出了针对EW的IgG1→IgG2类别转换。将IgG1抗体效价作为X轴、将IgG2抗体效价作为Y轴进行绘图而制作散点图时,关于其一次函数,得到( $Y=0.0293X+41.0$ )。认为与IgG1→IgE的类别转换中的阈值相同,因此推测IgG1→IgG2的阈值为1400BUg1。需要说明的是,发生蛋清过敏的5个婴儿的IgG2值全部为200BUg2以下,表明IgG2的产生的低水平参与了蛋清过敏的发病。

[0141] [实施例6]

[0142] [针对EW的IgE抗体效价与IgG2抗体效价的相关]

[0143] 84个婴儿中,5人发生蛋清过敏,因此针对基于IgG1的类别转换的IgG2与IgE的相关,分别测定了针对EW的IgG2抗体效价和IgE抗体效价,并制作散点图。将结果示于图8。将5个蛋清过敏发病者以◇表示,有湿疹的42人以▲表示,无湿疹的42人以○表示。

[0144] 由图8可见,蛋清过敏发病者中,与IgE的增加水平相比,IgG2的增加显著地低。在从IgG1向IgE的类别转换进行、从IgG1向IgG2的类别转换未进行的情况下,确认了在经过一年后以高的概率出现蛋清过敏。作为其原因,由于5个蛋清过敏发病的婴儿中4人为湿疹的发病者,因此推测基于湿疹的蛋清过敏原的经皮致敏成为诱因。剩下的1个蛋清过敏发病婴儿在出生后6个月的时间点没有湿疹,也未观察到IgE值、IgG1值、IgG2值中的任一者的上升,因此推测在出生后6个月以后发生了某种抗原致敏。

[0145] [实施例7]

[0146] [IgE抗体与过敏原的亲合性的测定]

[0147] 将OVA(其为EW的主要成分之一)作为分子量明确的单一过敏原使用。上述84个婴儿中,针对被认为具有暴露于母乳中包含的OVA的风险的母乳喂养婴儿31人和混合喂养婴儿47人的共计78人,分别测定经过6个月时采集的血浆试样中的针对OVA的IgE抗体、IgG1抗体的抗体效价。另外,测定IgE抗体与OVA的亲合性。

[0148] (芯片的制作)

[0149] 关于作为过敏原的抗原蛋白质,使用OVA(SIGMA公司制),除此之外,按照实施例1的[测定步骤](芯片的制作)及(过敏原的偶联反应)的步骤,制作固定化有OVA作为抗原蛋白质的DCP芯片。

[0150] (与OVA特异抗体的捕捉反应)

[0151] 使用前,将封闭试剂(Blockmaster(JSR公司制))添加至反应孔中,在避光下以冷藏(4℃)方式静置整夜后,利用抽吸器(VARIABLE SPEED PUMP、BIORAD公司制)将上述封闭

试剂抽吸除去后,再次转移至反应板,添加8mL洗涤液(50mM TTBS)后,晃动5分钟,然后利用抽吸器将洗涤液抽吸除去。同样地进行3次洗涤后,进一步用纯化水(MilliQ水)洗涤3次。利用离心机(Allegra(商标)、X-22R Centrifuge(BECKMAN COULTER公司制)),离心除去水滴(以2000rpm进行1分钟),从而将芯片表面的水滴除去。

[0152] (一次抗体反应)

[0153] 在IgE测定中,利用样品稀释液(20mM phosphate buffer,pH7.4/0.3M KCl/0.05%Tween20)将各婴儿的血浆稀释至2-5倍,在IgG1和IgG2的测定中,利用上述样品稀释液将各婴儿的血浆稀释至50倍,然后,以每个10 $\mu$ L的量添加至DCP芯片的孔中,在避光下于37 $^{\circ}$ C静置1小时。

[0154] (与二次抗体的反应)

[0155] 利用抽吸器(VARIABLE SPEED PUMP,BIORAD公司制)将通过上述操作得到的经稀释的血浆(一次抗体)抽吸除去后,将芯片转移至洗涤用盒,添加10 $\mu$ L洗涤液(50mM TTBS)后,使用Double-Shaker NR3重复3次洗涤操作(每次5分钟)来进行洗涤后,进一步加入纯化水(MilliQ水)来洗涤3次,每次1分钟。利用上述离心机,离心除去水滴(以2000rpm进行1分钟),从而将芯片表面的水滴除去。接着,制备经荧光标记的二次抗体(HiLyte Fluor(商标)或555标记抗人IgE(HyTest公司制))(作为稀释液,使用IMMUNO SHOT Platimun/1%牛血清白蛋白。最终稀释浓度为10 $\mu$ g/mL)、HiLyte Fluor(商标)或555标记抗人IgG1(Thermo Fisher Scientific公司制)(作为稀释液,使用20mM磷酸缓冲液、pH7.4/1%牛血清白蛋白/0.3M KCl/0.05%Tween20。最终稀释浓度为1.5 $\mu$ g/mL)、HiLyte Fluor(注册商标)或555标记抗人IgG2(Bio-Rad Laboratories株式会社制)(作为稀释液,使用20mM磷酸缓冲液、pH7.4/1%牛血清白蛋白/0.3M KCl/0.05%Tween20。最终稀释浓度为1.5 $\mu$ g/mL)。将该二次抗体液以10 $\mu$ L分注于各反应孔中,在避光下于37 $^{\circ}$ C静置2小时。

[0156] 将出生后经过6个月时进行血液采集而得到的血浆中的针对OVA的IgG1抗体效价作为X轴、将IgE抗体效价作为Y轴进行绘图而制作散点图。将结果示于图9。

[0157] 由图9可见,根据分布于整个散点图的数据将数据分为两个区块,然后利用GraphPad Prism ver.6.07软件算出可适用于各组的一次函数。区块1是IgG1显示2000BUg1/mL的组,区块2是IgG1为2000BUg1/mL以下且IgE显示300BUe/mL以上的组。关于针对OVA的IgG1和IgE的抗体效价的相关关系,得到在IgG1=2000BUg1处开始上升的一次函数1( $Y=0.1086X-160.2, X \geq 2000$ 的情况)(以下,也称为“1次函数<1>”)、和在比IgG1=2000BUg1小的值处开始上升的一次函数2( $Y=1.372X-47.619, X < 2000, Y \geq 300$ 的情况)(以下,也称为“1次函数<2>”)。

[0158] 针对上述78个母乳喂养婴儿和混合喂养婴儿,在图9中,从属于1次函数<1>的、由虚线包围的IgG1为2000BUg1/mL以上且显示可测定IgE抗体的抗原亲和性的100BUe/mL以上的婴儿中随机选择10名作为组[1]。另外,从属于一次函数<2>的、由实线包围的IgG1为2000BUg1/mL以下且IgE抗体显示500BUe/mL以上的婴儿中随机选择10名作为组[2]。

[0159] 针对属于组[1]的10名婴儿和属于组[2]的10名婴儿的合计20名婴儿,对各血浆试样中的IgE与OVA的亲合性进行研究。向各婴儿的血浆中等量加入溶解于样品稀释液(20mM磷酸缓冲液,pH7.4/0.3M KCl/0.05%Tween20)中的OVA(0、0.2、2、20、200、2000nM),进行前阶段反应(竞争抑制反应),即,于25 $^{\circ}$ C使OVA的最终浓度调节为(0、0.1、1、10、100、2000nM)

的反应液反应30分钟。将该溶液供于上述DCP芯片,于37℃反应1小时。

[0160] 然后,利用抽吸器进行抽吸除去后,将芯片转移至洗涤用盒,添加10mL洗涤液(50mM TTBS)后,使用Double-Shaker NR3重复3次洗涤操作(每次5分钟)来进行洗涤,然后进一步加入纯化水(MillliQ水)洗涤3次,每次1分钟。利用上述离心机,离心除去水滴(以2000rpm进行1分钟),从而将芯片表面的水滴除去。接着,利用抗体稀释液(IMMUNO SHOT Platimun/1%牛血清白蛋白)将555标记抗人IgE抗体稀释至最终稀释浓度10 $\mu$ g/mL来制备二次抗体,将制备的二次抗体液分注于滑片上的各反应孔,在避光下于37℃静置2小时,与抗人IgE二次抗体反应。再次添加10 $\mu$ L洗涤液(50mM TTBS)后,使用Double-Shaker NR3重复3次洗涤操作(每次5分钟)来进行洗涤,然后进一步加入纯化水(MillliQ水)洗涤3次,每次1分钟。针对残留荧光量,利用荧光扫描仪(3D Gene Scanner,东丽公司制)测定荧光强度(Ex:532nm,Em:570nm),由此将从各芯片得到的点样的荧光强度数值化。将不存在竞争过敏原、即将浓度为0的卵清蛋白作为竞争物质添加时的荧光强度作为100%时,将荧光强度显示为50%的抗原浓度示于以下的表2的“IgE IC<sub>50</sub>”的项目中。另外,在图10中示出了将属于一次函数[1]和一次函数[2]的各婴儿中的IC<sub>50</sub>值图式化而得到的图。

[0161] [表2]

婴儿 No	奶类喂养	组	OVA特异抗体		
			IgE (BUe/mL)	IgE IC <sub>50</sub>	IgG1 (BUg1/mL)
2	混合乳	[1]	434.94	25.36	4552.76
5	混合乳	[1]	243.75	57.21	3081.56
9	混合乳	[1]	108.74	90.33	4439.77
10	混合乳	[2]	771.02	9.24	1287.60
12	混合乳	[1]	169.68	6.97	2417.21
13	混合乳	[1]	720.1	75.29	5975.70
24	混合乳	[1]	159.09	7.77	1680.21
34	混合乳	[2]	1258.83	6.53	1002.23
[0162] 45	混合乳	[1]	221.61	61.26	2415.57
47	混合乳	[2]	825.15	1.85	790.77
49	母乳	[1]	446.78	8.69	3189.44
64	母乳	[1]	452.37	78.03	6142.96
71	母乳	[2]	1176.20	8.28	737.87
73	混合乳	[1]	469.79	47.33	2145.00
74	混合乳	[2]	916.93	15.41	593.76
76	混合乳	[2]	928.63	4.64	522.47
80	母乳	[2]	1567.23	6.68	410.28
81	母乳	[2]	503.95	5.29	480.41
82	母乳	[2]	903.92	6.31	434.81
83	母乳	[2]	1517.27	18.81	168.12

[0163] (结果)

[0164] 对于组[1]的IC<sub>50</sub>值而言,中央值显示为52.27nM,平均值显示为45.82nM。对于组[2]的IC<sub>50</sub>值而言,中央值显示为6.605nM,平均值显示为8.30nM。由图10可见,对于IC<sub>50</sub>(nM)值而言,确认了在组[1]和组[2]这两组之间存在显著性差异(P=0.001)(基于Mann-Whitney U检验)。根据这些结果判明,属于1次函数[1](其是对过敏原发生过敏的风险低的婴儿所属的一次函数)的婴儿中的IgE以与抗原的低亲和性为特征,属于1次函数[2](其适用于对过敏原发生过敏的风险高的婴儿的数据)的婴儿中的IgE以与抗原的高亲和性为特征,确认了在预测过敏的发病风险方面,显示抗原亲和性的IC<sub>50</sub>值的测定可作为重要的指标使用。

[0165] (总结)

[0166] 根据以上的结果判明,属于一次函数1的IgE以显示与抗原OVA的低亲和性为特征,属于一次函数2的IgE以显示与抗原OVA的高亲和性为特征,可判定包含显示与过敏原的低

亲和性的IgE的婴儿的过敏发病风险低,包含显示高亲和性的IgE的婴儿对蛋发生过敏的风险高,确认了在预测过敏的发病风险方面,显示亲和性的IC<sub>50</sub>值的测定是重要的指标。

高密度羧基化蛋白质 (DCP) 芯片

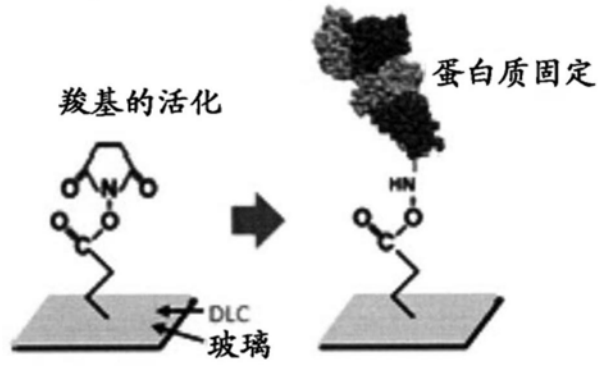


图1

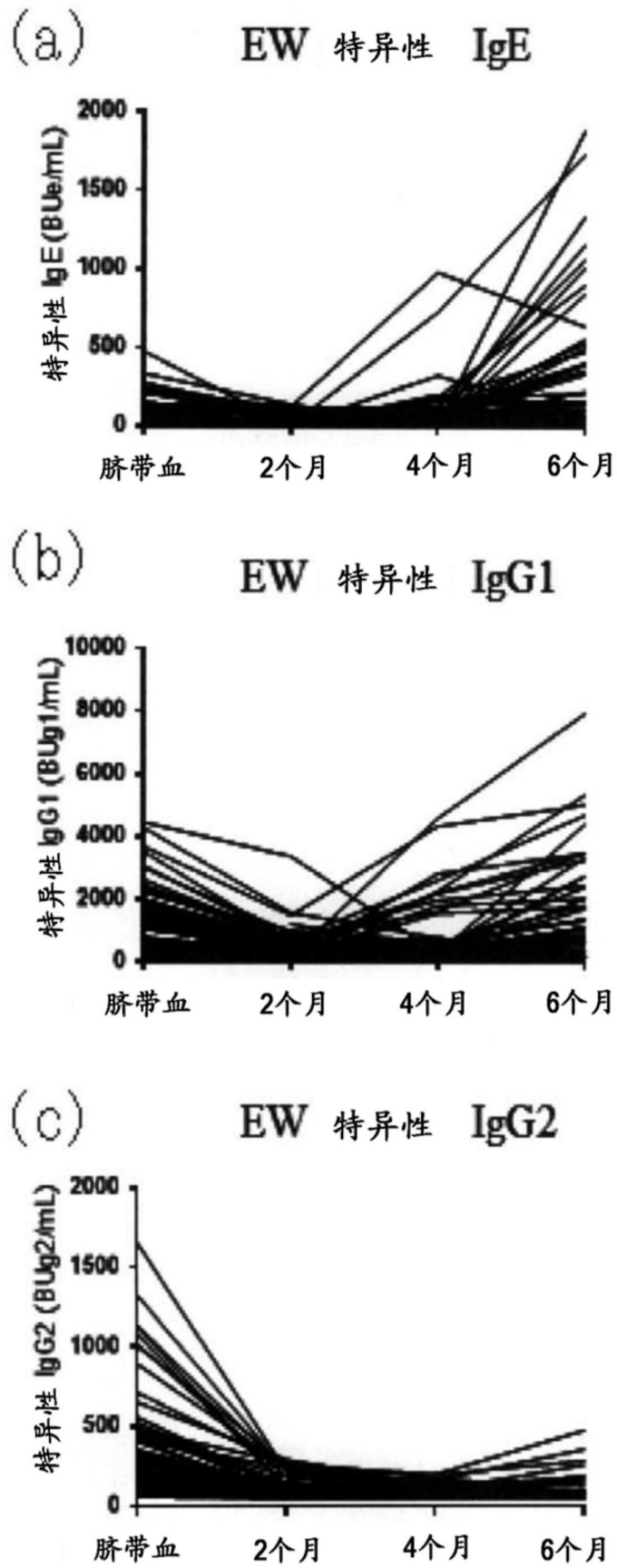


图2

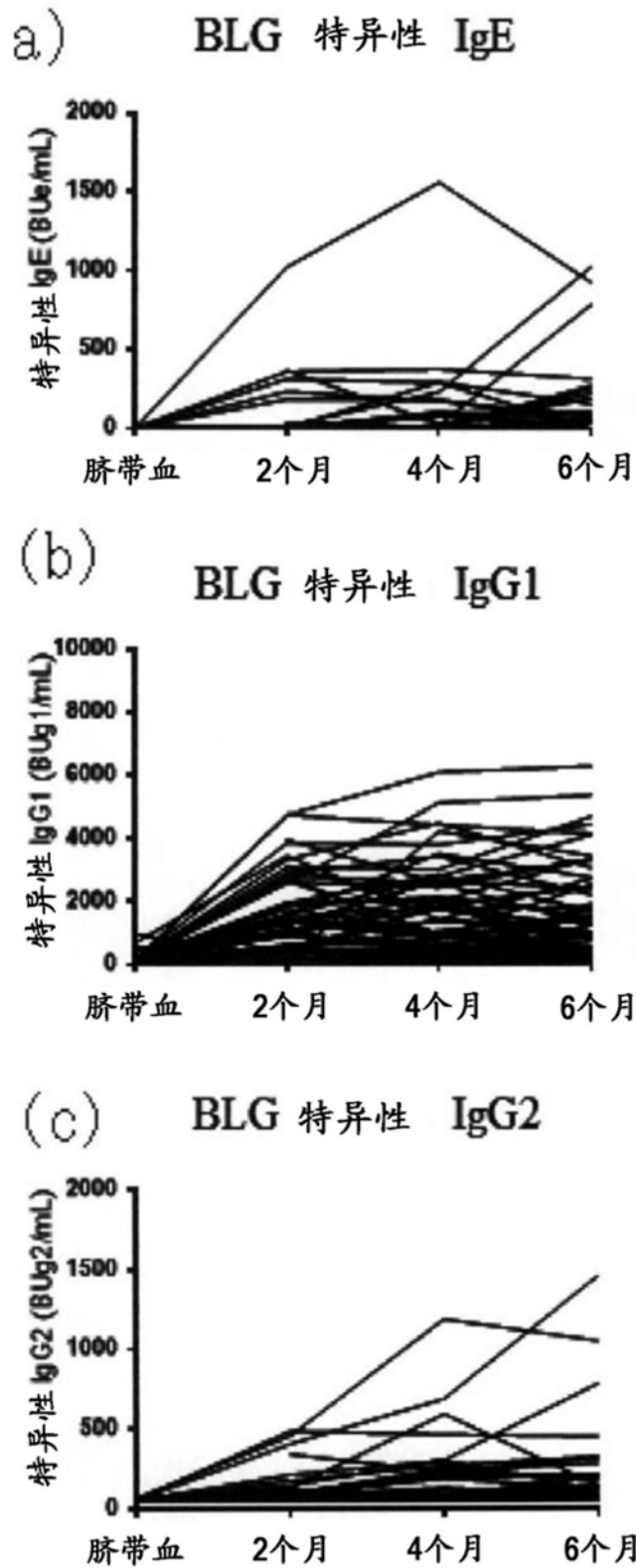
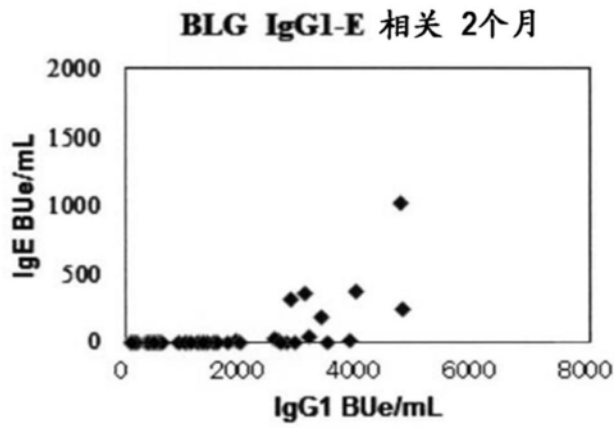
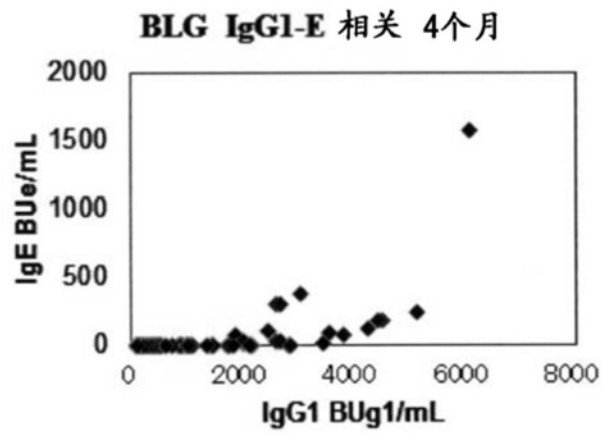


图3

(a)



(b)



(c)

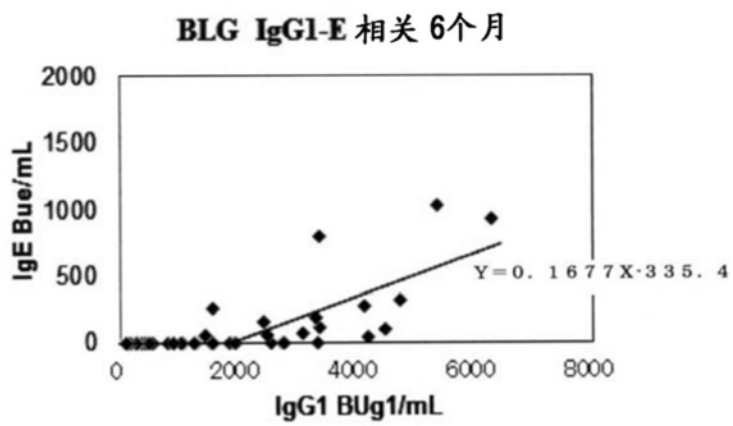
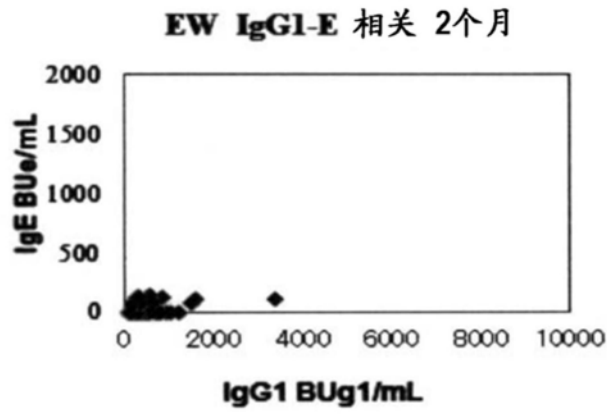
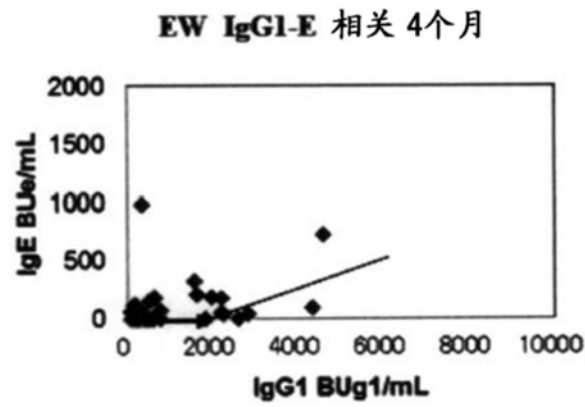


图4

(a)



(b)



(c)

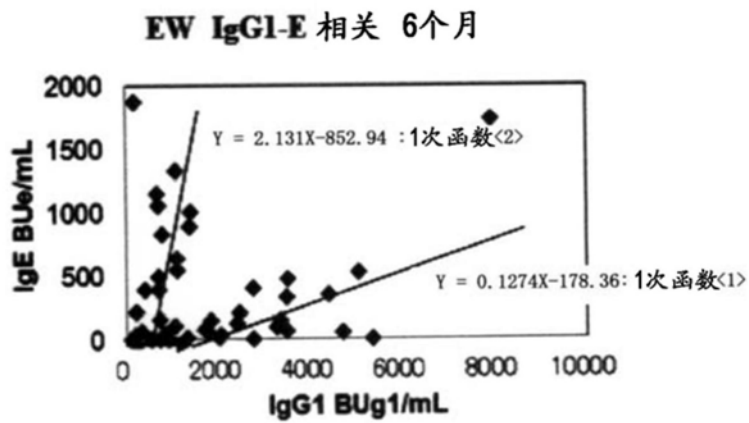


图5

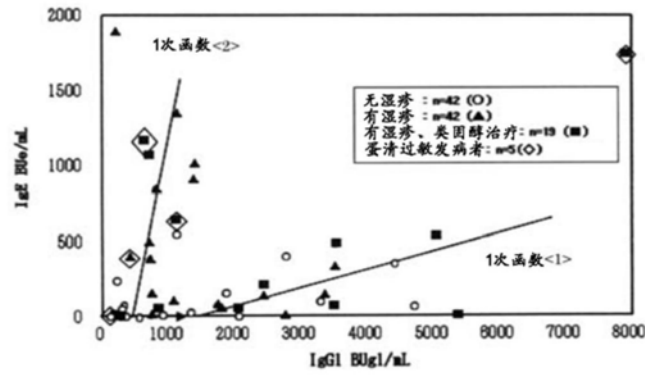
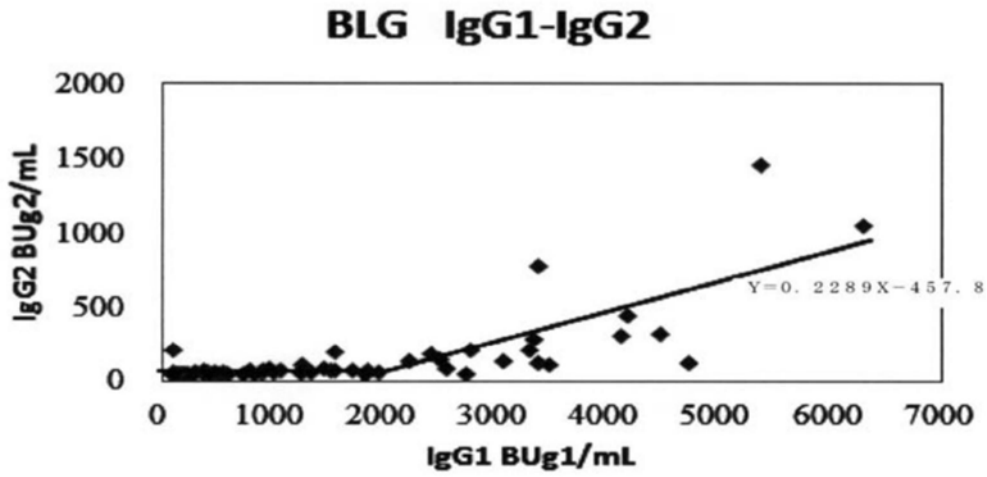


图6

(a)



(b)

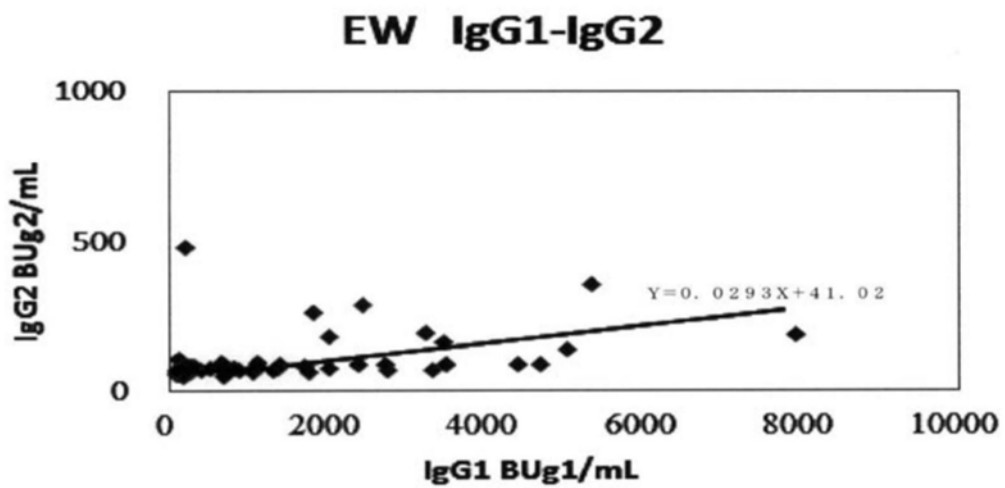


图7

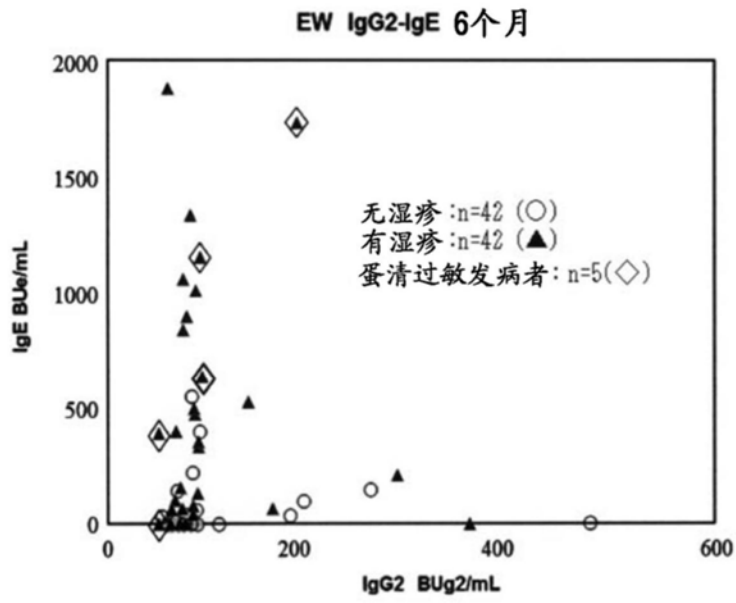


图8

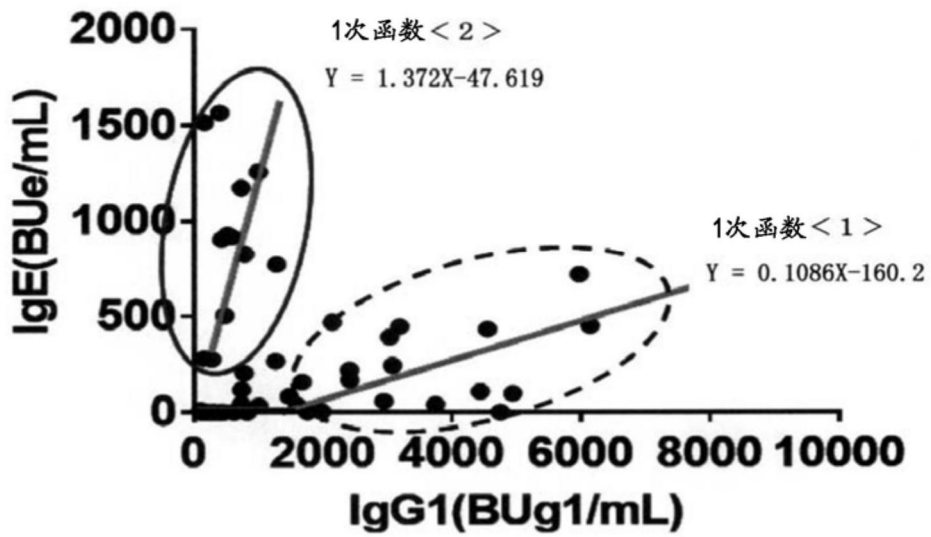


图9

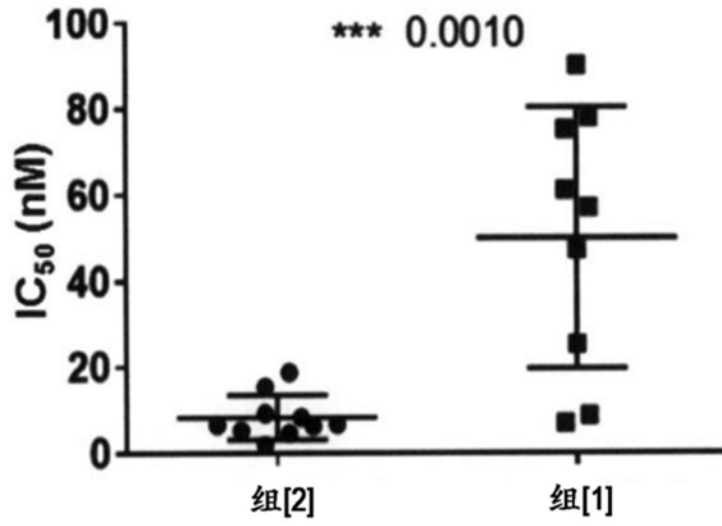


图10

专利名称(译)	收集用于预测过敏发病风险的数据的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN109952510A</a>	公开(公告)日	2019-06-28
申请号	CN201780028699.4	申请日	2017-05-11
[标]发明人	木户博 铃木宏一		
发明人	木户博 苛原诚 铃木宏一		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/50 G01N37/00		
CPC分类号	G01N33/6854 G01N37/00 G01N2800/24 G01N2800/50 G16B40/00		
代理人(译)	杨宏军 李国卿		
优先权	2016097337 2016-05-13 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供预测婴幼儿对过敏原发生过敏的情况的风险的手段。使用DCP芯片，测定出生后6个月以内的婴儿的试样中的、针对蛋清的IgG1抗体效价和IgE抗体效价，将IgG1抗体效价作为X轴、将IgE抗体效价作为Y轴进行绘图而制作散点图，针对被分为两个区块的数据分布，算出可适用于各个区块的一次函数，得到两种一次函数，基于婴儿属于哪一区块来预测发生过敏的风险。

