

(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2016-500825
(P2016-500825A)

(43) 公表日 平成28年1月14日(2016.1.14)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	P 4 H O 4 5
C O 7 K 17/00 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D
C O 7 K 16/24 (2006.01)	C O 7 K 17/00	
	C O 7 K 16/24	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 49 頁)

(21) 出願番号 特願2015-539807 (P2015-539807)
 (86) (22) 出願日 平成25年10月24日 (2013.10.24)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年6月23日 (2015.6.23)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/066674
 (87) 国際公開番号 W02014/066676
 (87) 国際公開日 平成26年5月1日 (2014.5.1)
 (31) 優先権主張番号 61/717,977
 (32) 優先日 平成24年10月24日 (2012.10.24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 500241985
 ザ シャーロット-メクレンバーグ ホスピタル オーソリティ ドゥーイング/ビジネス/アズ キャロライナズ ヘルスケア システム
 アメリカ合衆国ノースカロライナ州28232, シャーロット, ピー・オー・ボックス 32861
 (74) 代理人 100099623
 弁理士 奥山 尚一
 (74) 代理人 100096769
 弁理士 有原 幸一
 (74) 代理人 100107319
 弁理士 松島 鉄男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肝臓障害を特定するためのバイオマーカー

(57) 【要約】

個体において肝臓障害を特徴づけるための方法およびキットを提供する。本方法は、肝臓障害を検出するため、および肝臓障害に罹患している個体が命に関わる肝不全を起こす確度を予測するためのバイオマーカーとしての免疫性分析物の使用を採用する。血清アルブミンおよび他の特定された免疫性分析物の濃度の値を、個体から取得した血液試料から得るかまたは決定する。次いで、得られた濃度の値を、健全な肝臓を有する個体からの対応する濃度と比較する。濃度を比較することによって、所与の期間（例えば6か月）以内で命に関わる肝不全が発生して肝移植が必要となる個体の確度を特定することができる。

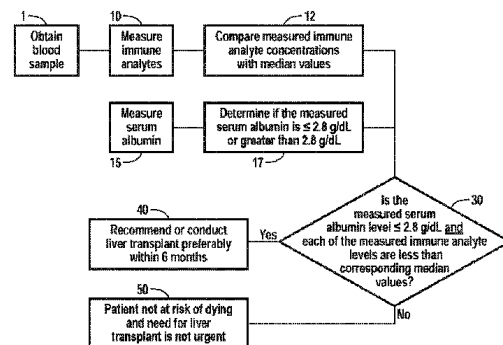


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

個体における肝臓障害を特徴づけるための方法であって、

(a) 前記個体由来の血液試料中の血清アルブミンの濃度の値を直接的または間接的に得るステップと、

(b) 前記個体由来の血液試料中の TNF 、 IL - 12 、 IL - 17 、 IL - 4 、 IL - 5 、 IL - 13 、 IL - 9 、 MIP - 1 、 RANTES 、 FGF b および PDGF - bb からなる群から選択される 1 種以上の免疫性分析物の濃度の値を直接的または間接的に得るステップと、

(c) ステップ (a) からの前記血清アルブミンの濃度の値が、 (i) 2 . 8 g / d L 以下であるかどうか、または、 (ii) 2 . 8 g / d L を超えるかどうかを判定するステップと、

(d) ステップ (b) からの前記 1 種以上の免疫性分析物の濃度を、健常個体からの対応する免疫性分析物の濃度の中央値と比較して、ステップ (b) からの前記 1 種以上の免疫性分析物の濃度のいずれかが、健常個体からの前記対応する免疫性分析物の濃度の中央値未満であるかどうかを判定するステップと、

(e) 前記個体を、

(i) ステップ (a) からの前記血清アルブミンの濃度の値が、 2 . 8 g / d L 以下であり、かつ、ステップ (b) からの前記 1 種以上の免疫性分析物の濃度のそれぞれが、健常個体からの前記対応する免疫性分析物の濃度の中央値未満である場合に、命に関わる肝臓障害を有するとして特定し、あるいは、

(ii) ステップ (a) からの前記血清アルブミンの濃度の値が、 2 . 8 g / d L を超え、および / または、ステップ (b) からの前記免疫性分析物の濃度のすべてが健常個体からの前記対応する免疫性分析物の濃度の中央値未満であるわけではない場合に、命に関わらない肝臓障害を有するとして特定するステップとを含む方法。

【請求項 2】

前記個体の特定の状況に適した医療を処方するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記個体が命に関わる肝臓障害を有するとして特定される場合に、前記処方が、前記個体に肝移植法を推奨することを含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記個体が命に関わる肝臓障害を有するとして特定される場合に、前記個体に肝移植を実施するステップをさらに含む、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記血液試料が血清試料である、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記個体がヒトである、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

ステップ (b) が、 TNF 、 IL - 12 、 IL - 17 、 IL - 4 、 IL - 5 、 IL - 13 、 IL - 9 、 MIP - 1 、 RANTES 、 FGF b 、 PDGF - bb および IL - 6 からなる群から選択される少なくとも 3 つの免疫性分析物の濃度の値を直接的または間接的に得ることを含む、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

ステップ (b) が、 TNF 、 IL - 12 、 IL - 17 、 IL - 4 、 IL - 5 、 IL - 13 、 IL - 9 、 MIP - 1 、 RANTES 、 FGF b 、 PDGF - bb および IL - 6 からなる群から選択される 4 つの免疫性分析物の濃度の値を直接的または間接的に得ることを含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

10

20

30

40

50

ステップ (b) が、 I L - 1 7 の濃度の値を得ることを含む、請求項 1 から 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 0】

ステップ (b) が、 R A N T E S の濃度の値を得ることを含む、請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 1】

ステップ (b) が、 P D G F b b の濃度の値を得ることを含む、請求項 1 から 1 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2】

ステップ (b) が、 I L - 4、 I L - 1 3、 I L - 9 および F G F b からなる群から選択される免疫性分析物の濃度の値を得ることを含む、請求項 9 から 1 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 1 3】

ステップ (b) が、 T N F および F G F b の濃度の値を得ることを含む、請求項 9 または 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 4】

ステップ (b) が、前記個体由来の血液試料中の I L - 6 の濃度の値を得ることをさらに含み、健常個体からの前記対応する免疫性分析物の濃度の中央値を超える I L - 6 濃度の値が、急性または亜急性肝障害を有するとして前記個体を特定することと一致する、請求項 1 から 1 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 1 5】

臨床試験に登録されている対象において肝臓障害を評価するための方法であって、

(a) 前記対象由来の血液試料中の血清アルブミンの濃度の値を直接的または間接的に得るステップと、

(b) 前記対象由来の血液試料中の T N F 、 I L - 1 2、 I L - 1 7、 I L - 4、 I L - 5、 I L - 1 3、 I L - 9、 M I P - 1 、 R A N T E S、 F G F b および P D G F - b b からなる群から選択される 1 種以上の免疫性分析物の濃度の値を直接的または間接的に得るステップと、

(c) ステップ (a) からの前記血清アルブミンの濃度の値が、 (i) 2 . 8 g / d L 以下であるかどうか、または、 (i i) 2 . 8 g / d L を超えるかどうかを判定するステップと、

30

(d) ステップ (b) からの前記 1 種以上の免疫性分析物の濃度を、健常対象からの対応する免疫性分析物の濃度の中央値と比較して、ステップ (b) からの前記 1 種以上の免疫性分析物の濃度のいずれかが、健常対象からの前記対応する免疫性分析物の濃度の中央値未満であるかどうかを判定するステップと、

(e) 前記対象を、

(i) ステップ (a) からの前記血清アルブミンの濃度の値が 2 . 8 g / d L 以下であり、かつ、ステップ (b) からの前記 1 種以上の免疫性分析物の濃度のそれぞれが健常対象からの前記対応する免疫性分析物の濃度の中央値未満である場合に、命に関わる肝臓障害を有するとして特定し、

40

(i i) ステップ (a) からの前記血清アルブミンの濃度が 2 . 8 g / d L を超えるか、またはステップ (b) からの前記免疫性分析物の濃度のすべてが健常対象からの前記対応する免疫性分析物の濃度の中央値未満であるわけではないか、あるいはその両方である場合に、命に関わらない肝臓障害を有するとして特定し、あるいは、

(i i i) ステップ (a) からの前記血清アルブミン濃度の値が 2 . 8 g / d L を超え、かつ、ステップ (b) からの前記 1 種以上の免疫性分析物の濃度のすべてが健常対象からの前記対応する免疫性分析物の濃度の中央値以上である場合に、正常な肝機能を有するとして特定するステップとを含む方法。

【請求項 1 6】

50

前記血液試料が血清試料である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

ステップ (b) が、TNF、IL-12、IL-17、IL-4、IL-5、IL-13、IL-9、MIP-1、RANTES、FGF_b、PDGF-bb および IL-6 からなる群から選択される少なくとも 3 つの免疫性分析物の濃度の値を直接的または間接的に得ることを含む、請求項 15 または 16 に記載の方法。

【請求項 18】

ステップ (b) が、TNF、IL-12、IL-17、IL-4、IL-5、IL-13、IL-9、MIP-1、RANTES、FGF_b、PDGF-bb および IL-6 からなる群から選択される 4 つの免疫性分析物の濃度の値を直接的または間接的に得ることを含む、請求項 15 から 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 19】

ステップ (b) が、IL-17、RANTES、PDGF-bb および IL-9 の濃度の値を直接的または間接的に得ることを含む、請求項 15 から 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

前記対象が命に関わる肝臓障害を有するとして特定される場合に、前記対象が臨床試験から除外される、請求項 15 から 19 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

前記対象が命に関わらない肝臓障害を有するとして特定される場合に、前記対象が臨床試験から除外される、請求項 15 から 19 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 22】

ステップ (a) ~ (e) が臨床試験の開始時に実施され、次いで臨床試験中に少なくとも 1 回反復して実施される、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 23】

臨床試験の経過中に、対象の正常な肝機能を有するとの特定が、命に関わらないまたは命に関わる肝臓障害を有するとの特定へと変化する場合に、前記対象を臨床試験から除外することをさらに含む、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

臨床試験の経過中に、対象の命に関わらない肝臓障害を有するとの特定が、命に関わる肝臓障害を有するとの特定へと変化する場合に、前記対象を臨床試験から除外することをさらに含む、請求項 22 に記載の方法。

30

【請求項 25】

TNF、IL-12、IL-17、IL-4、IL-5、IL-13、IL-9、MIP-1、RANTES、FGF_b、PDGF-bb、IL-6 および血清アルブミンからなる群から選択される免疫性分析物の検出および定量化に適した第 1 の抗体と、請求項 1 に記載の方法に従って個体において肝臓障害を特徴づけるための指示書とを含む、キット。

【請求項 26】

それぞれが TNF、IL-12、IL-17、IL-4、IL-5、IL-13、IL-9、MIP-1、RANTES、FGF_b、PDGF-bb、IL-6 および血清アルブミンからなる群から選択される免疫性分析物の検出に適した第 2、第 3 および第 4 の抗体をさらに含む、請求項 25 に記載のキット。

40

【請求項 27】

前記第 1 の抗体が、IL-9、IL-17、RANTES および PDGF-bb からなる群から選択される免疫性分析物に結合する、請求項 25 に記載のキット。

【請求項 28】

前記第 1、第 2、第 3 および第 4 の抗体が、IL-9、IL-17、RANTES および PDGF-bb のそれぞれを検出および定量化する、請求項 25 に記載のキット。

【請求項 29】

50

前記第 1 の抗体が固体支持体に結合している、請求項 2 5 に記載のキット。

【請求項 3 0】

前記第 1、第 2、第 3 および第 4 の抗体が固体支持体に結合している、請求項 2 6 に記載のキット。

【請求項 3 1】

前記固体支持体がマルチプレックスアッセイを提供し、前記マルチプレックスアッセイが、TNF、IL-12、IL-17、IL-4、IL-5、IL-13、IL-9、MIP-1、RANTES、FGF_b、PDGF-bb および IL-6 からなる群から選択される少なくとも 4 つの免疫性分析物の同時検出および定量化に適している、請求項 2 9 または 3 0 に記載のキット。

10

【請求項 3 2】

前記マルチプレックスアッセイが、IL-9、IL-17、RANTES および PDGF-bb のそれぞれを検出および定量化する、請求項 3 1 に記載のキット。

【請求項 3 3】

前記指示書が、健全な肝臓を有する個体における各免疫性分析物の濃度の中央値を収載する表をさらに含む、請求項 2 5 に記載のキット。

【請求項 3 4】

肝移植を受けることについて複数の患者の優先順位をつけるための方法であって、

(a) 第 1 の個体および第 2 の個体を含めた複数の個体由来のそれぞれの血液試料中の血清アルブミンの濃度の値を直接的または間接的に得るステップと、

20

(b) 第 1 の個体および第 2 の個体を含めた複数の個体由来のそれぞれの血液試料中の TNF、IL-12、IL-17、IL-4、IL-5、IL-13、IL-9、MIP-1、RANTES、FGF_b、PDGF-bb および IL-6 からなる群から選択される 1 種以上の免疫性分析物の濃度の値を直接的または間接的に得るステップと、

(c) 前記第 1 の個体に関連するステップ (b) からの前記 1 種以上の免疫性分析物の濃度を、健全個体からの対応する免疫性分析物の濃度の中央値と比較して、ステップ (b) からの前記 1 種以上の免疫性分析物の濃度のいずれかが、健全個体からの前記対応する免疫性分析物の濃度の中央値未満であるかどうかを判定するステップと、

(d) 前記第 2 の個体に関連するステップ (b) からの前記 1 種以上の免疫性分析物の濃度を、健全個体からの対応する免疫性分析物の濃度の中央値と比較して、ステップ (b) からの前記 1 種以上の免疫性分析物の濃度のいずれかが、健全個体からの前記対応する免疫性分析物の濃度の中央値未満であるかどうかを判定するステップと、

30

(e) (i) 前記第 1 の個体が、2.8 g/dL を超えるステップ (a) からの血清アルブミン濃度の値を有すること、または、(ii) ステップ (b) からの前記 1 種以上の免疫性分析物の濃度のいずれかが、健全個体からの前記対応する免疫性分析物の濃度の中央値未満であることを判定するステップと、

(f) (i) 前記第 2 の個体が、2.8 g/dL 以下であるステップ (a) からの血清アルブミン濃度の値を有すること、および、(ii) ステップ (b) からの前記 1 種以上の免疫性分析物の濃度のすべてが、健全個体からの前記対応する免疫性分析物の濃度の中央値未満であることを判定するステップと、

40

(g) 前記第 2 の個体を、前記第 1 の個体よりも肝臓障害が原因で死亡する危険性が高いとして同定するステップと

を含む方法。

【請求項 3 5】

前記第 1 の個体に肝移植を実施する前に、前記第 2 の個体に肝移植を実施することを推奨することをさらに含む、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記推奨を行ってから 6 か月以内に前記第 2 の個体に肝移植が実施される、請求項 3 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】**【0001】****[関連出願]**

本出願は、2012年10月24日に出願された米国特許仮出願第61/717、977号に対する優先権を主張するものであり、その開示全体は参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】**[発明の分野]**

ここに開示された発明は、一般に、哺乳動物において肝臓障害を特定するためおよび/または肝臓障害に罹患している哺乳動物の生存可能性を予測するためのバイオマーカーとしての免疫性分析物の使用に関する。

10

【背景技術】**【0003】**

薬物および化学物質に起因する肝臓損傷は、有病率および重要性が高まり続けている問題である。薬物性肝障害(DILI)は、米国における急性肝不全の共通原因であり、そのような症例の約13%を占める(1~3)。DILIはまた、その他の点では有望な新薬候補を放棄させることになる、または新薬を市場から撤退させることになる、最もよくある薬物有害事象であり、わずかに数か月間の使用後に起こることが多い。そうした出来事は、DILIを発生する者が経験する疼痛、苦痛および死亡の点から明白かつ重大な人的損失があるだけでなく、これらの薬物を開発した企業、その企業の株主および社会全体にとって重大な経済的損失がある。なぜなら、そうした不運な薬物の開発に投入されたりソ

20

【0004】

DILIの有病率はハーブ療法および栄養補助食品(HDS)の使用の増加によって悪化する。これらは「天然」であるので、安全であると考えられることが多い。しかし、これらの多くが重篤な肝臓損傷を引き起こし得ることは明らかである。近年では、米国におけるDILIの事例の約10%がHDSと関係しており(10)、さらに高い頻度が極東で報告されている(11)。

【0005】

DILIに加えて、哺乳動物の肝臓は、ウイルス感染による炎症(例えばA型、B型、C型またはE型肝炎)、胆汁流の閉塞、コレステロールまたはトリグリセリドの蓄積および肝臓への血流障害を含めた、他の様々な方法で損傷され得る。

30

【0006】

その病因にかかわらず、肝臓障害は診断が難しい場合がある。肝臓障害について一般に使用されるバイオマーカー、例えば血清アミノトランスフェラーゼ、アルカリホスファターゼおよび他の酵素は、感度および特異性が限られている(7、9)。さらに、肝臓障害に対する正確な予後を提供することは、よりいっそう困難である。急性肝不全に罹患している患者については、近い将来(例えば6か月の時間枠)に肝移植が必要になるどうかを予測するための信頼できる検査がない。移植手術用の肝臓の供給は限られているので、近い将来移植を必要とする患者と必要としない患者を区別することは非常に重要である。

40

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】****【0007】**

したがって、肝臓障害を正確に検出するため、および命に関わる肝臓障害に罹患している対象の所与の時間枠内における生存可能性を予測するための方法およびキットが緊急に必要な状況である。

【課題を解決するための手段】**【0008】**

本発明は、個体、例えば哺乳動物(例えばヒト)における肝臓損傷を特徴づけるための

50

方法を提供する。この方法は、例えば、命に関わる肝臓障害を起こしている個体と命に関わらない肝臓障害を起こしている患者を区別するのに使用することができる。この方法は、（例えば、DILI、ウイルス性肝炎、自己免疫性肝炎、虚血性肝炎などが原因で）肝臓障害の危険性がある個体をモニターするのに、ならびにそうした個体が命に関わる肝不全を起こしそうかどうか、および特定の時間枠内に肝移植を必要とするかどうかを判定するのに使用することもできる。本発明は、中でも、命に関わる肝臓障害の危険性の増大と相関する血中濃度レベルの協調的变化を示す免疫学的マーカー（すなわち、免疫性分析物および血清アルブミン）を首尾よく同定したことに基づく。

【0009】

したがって、一態様では、本発明は個体における肝臓障害を特徴づけるための方法を提供する。ある種の実施形態では、本方法は、個体由来の血液試料中の血清アルブミン濃度を直接的または間接的に得ることを含む。次いで、得られた血清アルブミン濃度を、あらかじめ決定された血清アルブミン濃度（例えば、 3.5 g/dL 、 3.2 g/dL または 2.8 g/dL ）と比較する。ある種の実施形態では、本方法は、個体由来の血液試料中のTNF、IL-12、IL-17、IL-4、IL-5、IL-13、IL-9、MIP-1、RANTES、FGF β 、PDGF- $\beta\beta$ およびIL-6からなる群から選択される1種以上の免疫性分析物の濃度（複数可）を直接的または間接的に得ることを含む。次いで、このようにして得られた1種以上の免疫性分析物の濃度を、健常個体（例えば、健常な肝臓を有する個体）の血液で見られる免疫性分析物の濃度と比較する。ある種の実施形態では、（1）個体の血清アルブミン濃度があらかじめ決定された血清アルブミン濃度（例えば 2.8 g/dL ）以下であり、（2）個体の血液中の1種以上の免疫性分析物の濃度が健常個体の血液中の対応する免疫性分析物の濃度の中央値未満である（しかしIL-6に関しては、適用可能な条件は、健常個体の血液中のIL-6の濃度の中央値を超える、個体の血液中の濃度である）場合、個体は命に関わる肝臓障害を有するとして特定される。ある種の実施形態では、個体の血清アルブミン濃度があらかじめ決定された血清アルブミン濃度（例えば 2.8 g/dL ）を超え、および/または、個体の血液中の得られた免疫性分析物濃度の少なくとも1つが健常個体の血液中の対応する免疫性分析物の濃度の中央値未満ではない（しかしIL-6に関しては、適用可能な条件は、健常個体の血液中のIL-6の濃度の中央値を超えない、個体の血液中の濃度である）場合、個体は命に関わらない肝臓障害を有するとして特定される。

【0010】

ある種の実施形態では、本方法は、命に関わる肝臓障害を有するとして特定されたことを個体に通知することをさらに含む。他の実施形態では、本方法は、命に関わらない肝臓障害を有するとして特定されたことを個体に通知することをさらに含む。ある種の実施形態では、本方法は、個体の特定の状況（すなわち、命に関わるまたは命に関わらない肝臓障害を有する）に相応の医療を個体に提供することをさらに含む。例えば、ある種の実施形態では、本方法は、個体が命に関わる肝臓障害を有するとして特定される場合に、コルチコステロイド（例えばプレドニゾン）を個体に処方するステップをさらに含む。他の実施形態では、本方法は、個体が命に関わる肝臓障害を有するとして特定される場合に、肝移植法を個体に推奨するステップをさらに含む。ある種の実施形態では、本方法は、個体が命に関わる肝臓障害を有するとして特定される場合に、個体に対して肝移植を実施するステップをさらに含む。

【0011】

本発明に係る方法で用いられる血液試料は血清試料でもよい。あるいは、血液試料は血漿試料でもよい。一般に、個体について測定された免疫性分析物の濃度は、同じタイプの試料から測定された濃度（例えば濃度の中央値）と比較する必要がある（例えば、個体の血清中のIL-17の濃度は、健常個体からの血清試料で検出されるIL-17の濃度の中央値と比較する必要がある）。好ましい実施形態では、個体は哺乳動物、例えばヒトである。

【0012】

10

20

30

40

50

好ましい実施形態では、1種以上の免疫性分析物の濃度（複数可）を直接的または間接的に得ることは、TNF、IL-12、IL-17、IL-4、IL-5、IL-13、IL-9、MIP-1、RANTES、FGF β 、PDGF $\beta\beta$ およびIL-6からなる群から選択される、少なくとも3つ、より好ましくは4つの免疫性分析物の濃度を得ることを含む。好ましくは、本方法は、IL-17、RANTESおよび/またはPDGF $\beta\beta$ について濃度を得ることを含む。好ましくは、本方法は、IL-17、RANTESおよび/またはPDGF $\beta\beta$ ならびにIL-4、IL-13、IL-9およびFGF β からなる群から選択される、少なくとも1つのさらなる免疫性分析物について濃度を得ることを含む。ある種の実施形態では、本方法は、IL-17、RANTESおよび/またはPDGF $\beta\beta$ ならびにTNFとFGF β の両方について濃度を得ることを含む。前記の方法のいずれも、個体からの血液試料中のIL-6について濃度を得ることをさらに含むことができる。本明細書の他の個所で述べるように、健常個体のIL-6の濃度の中央値を超えるIL-6濃度は、命に関わる肝臓障害を有する個体と一致する。

10

【0013】

関連した態様では、本発明は、臨床試験に登録されている対象において肝臓障害を評価するための方法を提供する。この方法は、本明細書の上記および他の個所で述べるように、個体において肝臓障害を特徴づけるための方法のように実施することができる。しかしある種の実施形態では、臨床試験に登録される対象において肝臓障害を評価する方法は、命に関わる肝臓障害を有するか、命に関わらない肝臓障害を有するか、または正常な肝機能

命に関わる肝臓障害を有しているとして対象を特定するステップを含む。命に関わる肝臓障害および命に関わらない肝臓障害は、本明細書の上記および他の個所で述べるように特定される。正常な肝機能は、例えば、(i)対象の血液試料から得られた血清アルブミン濃度の値が、あらかじめ決定された血清アルブミン濃度（例えば2.8 g/dL、3.2 g/dLまたは3.5 g/dL）を超え、(ii)対象の血液試料から得られた1種以上の免疫性分析物の濃度のすべてが、健常対象の血液中の対応する免疫性分析物の濃度の中央値以上である（しかしIL-6に関しては、適用可能な条件は、健常個体の血液中のIL-6の濃度の中央値以下の、個体の血液中の濃度である）場合に特定することができる。

20

【0014】

ある種の実施形態では、対象は哺乳動物、例えばヒトである。ある種の実施形態では、臨床試験は、新薬（例えば、抗がん剤または抗炎症薬）を目的とする。ある種の実施形態では、対象はDILIの危険性がある。

30

【0015】

別の態様では、本発明は、肝臓障害に罹患している個体の生存可能性を評価するための方法を提供する。典型的には、個体は哺乳動物、例えばヒトである。ある種の実施形態では、本方法は、直接的または間接的のいずれかで、個体由来の血液試料中の血清アルブミン濃度（例えば血清試料）を得ることを含む。ある種の実施形態では、本方法は、直接的または間接的のいずれかで、個体由来の血液試料（例えば血清試料）中のTNF、IL-12、IL-17、IL-4、IL-5、IL-13、IL-9、MIP-1、RANTES、FGF β 、PDGF $\beta\beta$ およびIL-6からなる群から選択される1種以上の免疫性分析物の濃度を得ることを含む。目的の免疫性分析物の濃度を得た後に、個々に、健常個体（例えば、健常な肝臓を有する個体）の血液で見られる対応する免疫性分析物の濃度の中央値と値を比較する。本発明のある種の実施形態によれば、本方法は、患者の血液試料から得た1種以上の免疫性分析物の濃度のいずれかが、健常個体からの対応する免疫性分析物の濃度の中央値未満（しかしIL-6に関しては、適用可能な条件は、健常個体の血液中のIL-6の濃度の中央値を超える、個体の血液中の濃度である）かどうかを判定するステップを含む。目的の免疫性分析物の測定値の比較に加えて、個体の血液試料から得られた血清アルブミン濃度を、あらかじめ決定された濃度範囲またはカットオフ値（例えば、2~5 g/dL、2~4 g/dL、2~3 g/dL、2.5~3 g/dLまたは2.8 g/dL）と比較し、個体の血清アルブミン濃度が、(i)濃度範囲未満（

40

50

もしくはあらかじめ決定されたカットオフ値以下、または (i i) 濃度範囲内 (もしくはあらかじめ決定されたカットオフ値を超える) であるかどうかに関して判定を行う。

【 0 0 1 6 】

ある種の実施形態では、本方法は、肝臓障害から生存する確度が高い (例えば、次の 6 か月について生存の可能性が 9 0 % 以上である) または肝臓障害による死亡の確度が高い (例えば、肝移植が実施されない限り、次の 6 か月以内に死亡する可能性が 9 0 % 以上である) のいずれかとして、個体を特定するステップを含む。特定は、測定した免疫性分析物の濃度および血清アルブミン濃度の解析および比較に基づいて完了することができる。例えば、試料から測定した血清アルブミン濃度の値が、あらかじめ決定されたカットオフ値 (例えば 2 . 8 g / d L) を超える場合、または個体から得られた 1 種以上の免疫性分析物の濃度のいずれかが、健常個体の血液で見られる対応する免疫性分析物の濃度の中央値以上である (しかし I L - 6 に関しては、適用可能な条件は、健常個体の血液中の I L - 6 の濃度の中央値以下の、個体の血液中の濃度である) 場合に、肝臓障害から生存する確度が高いとして個体を特定することができる。逆に、個体から得られた血清アルブミン濃度が、あらかじめ決定されたカットオフ値 (例えば 2 . 8 g / d L) 以下である場合、および個体から得られた 1 種以上の免疫性分析物の濃度のすべてが、健常個体の血液で見られる対応する免疫性分析物の濃度の中央値未満である (しかし I L - 6 に関しては、適用可能な条件は、健常個体の血液中の I L - 6 の濃度の中央値を超える、個体の血液中の濃度である) 場合に、肝臓障害による死亡の確度が高いとして個体を特定することができる。

10

20

【 0 0 1 7 】

別の態様では、本発明は、第 1 の患者および第 2 の患者を含めた複数の患者に、肝移植を受けることについて優先順位をつけるための方法を提供する。その際、より早急に肝移植の必要がある患者を、肝移植を全く必要としない可能性がある (または少なくとも肝移植の緊急の必要性がより少ない) 患者よりも優先することができる。本発明のある種の実施形態によれば、それぞれの血液試料は、肝臓障害に罹患している (または罹患していると考えられる) 複数の個体から入手する。各試料について、血清アルブミンの濃度値を得 (例えば、適切なアッセイで測定し) 、 T N F 、 I L - 1 2 、 I L - 1 7 、 I L - 4 、 I L - 5 、 I L - 1 3 、 I L - 9 、 M I P - 1 、 R A N T E S 、 F G F b 、 P D G F - b b および I L - 6 からなる群から選択される 1 種以上の免疫性分析物に対するそれぞれの濃度値を得る (例えばアッセイする) 。

30

【 0 0 1 8 】

第 1 の個体から得られた免疫性分析物の濃度を、健常個体の血液で見られる対応する免疫性分析物の濃度の中央値と比較して、その個体の 1 種以上の免疫性分析物の濃度のいずれかが、健常個体の血液で見られる対応する免疫性分析物の濃度の中央値未満である (しかし I L - 6 に関しては、適用可能な条件は、健常個体の血液中の I L - 6 の濃度の中央値を超える、個体の血液中の濃度である) かどうかを判定することができる。同様に、第 2 の個体から得られた免疫性分析物の濃度を、健常個体の血液で見られる対応する免疫性分析物の濃度の中央値と比較して、その個体の 1 種以上の免疫性分析物の濃度のいずれかが、健常個体の血液で見られる対応する免疫性分析物の濃度の中央値未満である (重ねて、 I L - 6 に関しては、適用可能な条件は、健常個体の血液中の I L - 6 の濃度の中央値を超える、個体の血液中の濃度である) かどうかを判定することができる。

40

【 0 0 1 9 】

ある種の実施形態では、本方法は、以下の 1 つを判定するステップを含む。 (i) 第 1 の個体の試料が、あらかじめ決定された範囲またはカットオフ値 (例えば 2 . 8 g / d L) を超える血清アルブミン濃度の値を有すること、または、 (i i) 第 1 の個体の試料からの 1 種以上の免疫性分析物の濃度のいずれかが、健常個体の血液中の対応する免疫性分析物の濃度の中央値以上である (しかし I L - 6 に関しては、適用可能な条件は、健常個体の血液中の I L - 6 の濃度の中央値以下の、個体の血液中の濃度である) こと。ある種の実施形態では、本方法は、以下の 1 つを判定するステップを含む。 (i) 第 2 の個体の

50

試料が、あらかじめ決定された範囲（例えば、2.5～3.0 g/dL）未満であるまたはあらかじめ決定されたカットオフ値（例えば2.8 g/dL）以下である血清アルブミン濃度の値を有すること、および（ii）第2の個体の試料からの1種以上の免疫性分析物の濃度のすべてが、健常個体の血液で見られる対応する免疫性分析物の濃度の中央値未満である（しかしIL-6に関しては、適用可能な条件は、健常個体の血液中のIL-6の濃度の中央値を超える、個体の血液中の濃度である）こと。本発明のある種の実施形態によれば、第2の個体を、肝臓障害が原因で死亡する危険性が第1の個体よりも高いとして同定するステップを実施することができる。したがってある種の実施形態では、第1の個体について肝移植を実施する前に、第2の個体について肝移植を実施することを推奨するさらなるステップを行うことができる。その際、肝移植を受けることについて、第2の個体は、第1の個体よりも優先される。

10

【0020】

さらに別の態様では、本発明は、本発明に係る方法を実施するために使用することができるキットを提供する。ある種の実施形態では、キットは、（i）血清アルブミンならびに/またはTNF、IL-12、IL-17、IL-4、IL-5、IL-13、IL-9、MIP-1、RANTES、FGFb、PDGF-bbおよびIL-6からなる群から選択される免疫性分析物を検出および定量化するのに適している第1の抗体と、（ii）それぞれ、健常な肝臓を有する個体を代表する対応する免疫性分析物の中央濃度および血清アルブミンに関するあらかじめ決定された範囲（例えば2.5～3.0 g/dL）またはカットオフ値（例えば2.8 g/L）と比べた免疫性分析物および血清アルブミンの濃度に基づいて肝臓障害を特徴づけるための指示書とを含むことができる。ある種の実施形態では、指示書は、健常な肝臓を有する個体における免疫性分析物（例えば、TNF、IL-12、IL-17、IL-4、IL-5、IL-13、IL-9、MIP-1、RANTES、FGFb、PDGF-bb、IL-6）の濃度の中央値を収載する表をさらに含む。

20

【0021】

ある種の実施形態では、キットは、血清アルブミンならびに/またはTNF、IL-12、IL-17、IL-4、IL-5、IL-13、IL-9、MIP-1、RANTES、FGFb、PDGF-bbおよびIL-6からなる群から選択される免疫性分析物の検出に適している第2の抗体をさらに含む。ある種の実施形態では、第2の抗体は、第1の抗体と同じ免疫性分析物に結合するが、異なるエピトープに結合する。他の実施形態では、第2の抗体は、第1の抗体と異なる免疫性分析物に結合する。

30

【0022】

ある種の実施形態では、キットは、それぞれが血清アルブミンならびに/またはTNF、IL-12、IL-17、IL-4、IL-5、IL-13、IL-9、MIP-1、RANTES、FGFb、PDGF-bbおよびIL-6からなる群から選択される免疫性分析物の検出に適している第2の抗体および第3の抗体をさらに含む。ある種の実施形態では、第3の抗体は、第1のまたは第2の抗体と同じ免疫性分析物に結合するが、異なるエピトープに結合する。他の実施形態では、第3の抗体は、第1および第2の抗体と異なる免疫性分析物に結合する。

40

【0023】

ある種の実施形態では、キットは、それぞれが血清アルブミンならびに/またはTNF、IL-12、IL-17、IL-4、IL-5、IL-13、IL-9、MIP-1、RANTES、FGFb、PDGF-bbおよびIL-6からなる群から選択される免疫性分析物の検出に適している第2の抗体、第3の抗体および第4の抗体をさらに含む。ある種の実施形態では、第4の抗体は、第1の抗体、第2の抗体または第3の抗体と同じ免疫性分析物に結合するが、異なるエピトープに結合する。他の実施形態では、第4の抗体は、第1、第2および第3の抗体と異なる免疫性分析物に結合する。

【0024】

ある種の実施形態では、キットの第1の抗体は、IL-9、IL-17、RANTES

50

およびPDGF - bbからなる群から選択される免疫性分析物に結合する。ある種の実施形態では、キットの第1および第2の抗体は、IL - 9、IL - 17、RANTESおよびPDGF - bbからなる群から選択される免疫性分析物に結合する。ある種の実施形態では、キットの第1、第2および第3の抗体は、IL - 9、IL - 17、RANTESおよびPDGF - bbからなる群から選択される免疫性分析物に結合する。ある種の実施形態では、キットの第1、第2、第3および第4の抗体は、IL - 9、IL - 17、RANTESおよびPDGF - bbからなる群から選択される免疫性分析物に結合する。

【0025】

ある種の実施形態では、少なくとも1つの抗体（例えば、第1、第2、第3または第4の抗体）は、固体支持体に結合している。ある種の実施形態では、すべての抗体が固体支持体に結合している。固体支持体は、血清アルブミンならびに/またはTNF、IL - 12、IL - 17、IL - 4、IL - 5、IL - 13、IL - 9、MIP - 1、RANTES、FGF - b、PDGF - bbおよびIL - 6からなる群から選択される免疫性分析物（例えば3つまたは4つの分析物）の検出および定量化に適すると思われるような、マルチプレックスアッセイを提供することができる。ある種の実施形態では、マルチプレックスアッセイは、IL - 9、IL - 17、RANTESおよびPDGF - bbのそれぞれを検出および定量化する。

【0026】

このように本発明の実施形態を概括的に説明してきたが、ここで、必ずしも縮尺通りではない添付の図面を参照する。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】本発明のある種の実施形態による方法を示す図である。

【図2】本発明のある種の実施形態による1つの特定の方法を示す図である。

【図3】免疫応答の単純化モデルを示す図である。

【図4】特定の研究に対するコホートを示す流れ図を示す図である。

【図5】DILI発症時での血清における免疫性分析物のプロファイルを示す図である。

【図6】6か月の経過観察時点でのDILI対象の血清におけるサイトカインのプロファイルを示す図である。

【図7】DILI発症時でのDILI対象の血清におけるケモカインのプロファイルを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0028】

ここで、本発明の実施形態のすべてではないが、いくつかを示されている添付の図面を参照して、以下に、本発明をさらに十分に説明する。実際に、本発明は、多くの異なる形態で具体化され得、本明細書に示す実施形態に限定されると解釈されるべきでなく、むしろ、本開示が適用可能な法的必要条件を満たすために、これらの実施形態は提供される。本明細書および添付の特許請求の範囲で使用する場合、文脈において別段明記しない限り、単数形「1つ(a)」、「1つ(an)」、「その(the)」は複数の指示物を含む。

【0029】

その最も一般的な形態では、本発明は、個体における肝臓障害を特徴づけるための方法に関する。肝臓障害の起源は、例えば、ウイルス性肝炎、虚血性肝炎、自己免疫性肝炎、DILIまたは肝不全を引き起こす代謝疾患であり得る。したがってある種の実施形態では、肝臓障害の起源はDILIである。しかし、方法のいくつかの適用では、肝臓障害の起源は不明である。肝臓障害は、命に関わる肝臓障害でもあり得るし、命に関わらない肝臓障害でもあり得る。本明細書で使用する場合、用語「命に関わる肝臓障害」は、治療しない場合、定義された時間枠内で死亡する結果になる確率が高い肝臓障害を指す。本明細書で使用する場合、用語「命に関わらない肝臓障害」は、治療しない場合、定義された時間枠で死亡する結果になる確率が低い肝臓障害を指す。高確率とは70%を超える（例え

ば、少なくとも75%、80%、85%、90%、95%またはそれ以上)ものである。低確率とは30%未満(例えば、わずか25%、20%、15%、10%、5%またはそれ未満)ものである。定義された時間枠とは、例えば、数か月(例えば、3か月、6か月、9か月、1年)でもよいが、好ましくは6か月である。本明細書で使用する場合、用語「肝臓障害」は、肝不全(例えば、急性肝不全および亜急性肝不全)を含む。

【0030】

個体において肝臓障害を特徴づける方法のステップは、様々な状況で適用することができる。したがって、本発明は、臨床試験に参加する対象において肝臓障害を評価する方法、肝臓障害に罹患している個体の生存可能性を評価する方法、および肝移植を受けることについて、複数の患者において1種以上の患者の優先順位をつける方法を包含する。各方法は、急性肝臓病と関係があるバイオマーカーとして特定された特定の免疫性分析物の濃度レベルを解析することを含む。用いられる免疫性分析物バイオマーカーは、TNF、IL-12、IL-17、IL-4、IL-5、IL-13、IL-9、MIP-1、RANTES、FGFb、PDGF-bb、IL-6およびそれらの任意の組み合わせから選択することができる。ある種の免疫性分析物バイオマーカーの解析に加えて、肝臓障害と関係がある血清アルブミンについてあらかじめ決定された範囲(例えば、2~5g/dL、2~4g/dL、2~3g/dL、2.5~3g/dL)またはカットオフ値(例えば、3.5g/dL、3.2g/dLまたは2.8g/dL)に対して、患者の血清アルブミン濃度レベルを評価することもできる。ある種の実施形態では、血清アルブミンのあらかじめ決定された範囲は、2.5~3.0g/dLである。特定の好ましい実施形態では、血清アルブミンのあらかじめ決定されたカットオフ値は、2.8g/dLである。血清アルブミンのあらかじめ決定された範囲またはカットオフ値の選択は、関連する偽陽性および偽陰性率を考慮に基づいて行うことができる。

10

20

【0031】

免疫性分析物および/または血清アルブミンの濃度の値は、間接的または直接的に得ることができる。ある種の実施形態では、「間接的に得る」は、第三者、例えば診断に関する企業から濃度の値を得ることを指すが、「直接的に得る」は、(例えば、「組織内」の実験室を使用する)直接的な測定によって、濃度を得ることを指す。免疫性分析物は、適切なアッセイ(例えば、目的の特定の免疫性分析物を検出および/または定量化するために設計または構成されたマルチプレックスアッセイ)を用いて測定することによって得ることができる。同様に、当技術分野で周知のように、血清アルブミンの濃度の値を試料から直接的または間接的に得ることができる。適切なアッセイとしては、抗体に基づいたアッセイ(例えばELISA)および抗体に基づかないアッセイ(例えば質量分析)が挙げられる。あるいはある種の実施形態では、(例えば、PCRまたは任意の他の適切な増幅形態を使用して)対応するmRNAの発現を測定することによって、免疫性分析物および/または血清アルブミンを間接的に検出することができる。当業者なら容易に理解するように、PCRのような間接的な技法の使用は、十分なmRNAを含有する試料、好ましくは、目的の分析物を分泌する細胞(例えば組織または全血試料など)を必要とする。

30

【0032】

目的の特定の免疫性分析物のそれぞれの濃度の値を得た後、次いでこれらの値を、健常個体(例えば、健常な肝臓を有する個体)の血液(例えば、血清または血漿)で見られる対応する免疫性分析物の濃度の中央値と、個々に比較することができる。本発明のある種の実施形態によれば、(例えば患者の血液試料から)得られた免疫性分析物の濃度の1種以上のいずれかが、健常個体からの対応する免疫性分析物の濃度の中央値未満であるかどうかを判定するステップを含む。目的の免疫性分析物の測定値の比較に加えて、患者の血液試料から得られた血清アルブミンの濃度の値を、あらかじめ決定された範囲(例えば、2~5g/dL、2~4g/dL、2~3g/dLもしくは2.5~3g/dL)またはカットオフ値(例えば、3.5g/dL、3.2g/dLもしくは2.8g/dL)と比較し、試料からの血清アルブミン濃度の値が、(i)あらかじめ決定された範囲(もしくは、あらかじめ決定されたカットオフ値以下)未満、または(ii)あらかじめ決定され

40

50

た範囲内（もしくは、あらかじめ決定されたカットオフ値を超える）であるかどうかを判定する。

【0033】

本発明のある種の実施形態によれば、(1) 個体の血清アルブミン濃度が、あらかじめ選択された範囲（例えば 2.5 ~ 3.0 g/dL）またはカットオフ値（例えば 2.8 g/dL）以下であり、(2) 個体の血液中の1種以上の免疫性分析物の濃度が、健常個体の血液中の対応する免疫性分析物の濃度の中央値未満である（しかしIL-6に関しては、適用可能な条件は、健常個体の血液中のIL-6の濃度の中央値を超える、個体の血液中の濃度である）場合に、個体は、命に関わる肝臓障害を有するとして特定される。あるいは、個体の血清アルブミン濃度が、あらかじめ選択された範囲（例えば 2.5 ~ 3.0 g/dL）以内（もしくはそれを越える）もしくはあらかじめ選択されたカットオフ（例えば 2.8 g/dL）を超え、および/または、個体の血液中の免疫性分析物の濃度（複数可）のすべてが健常個体からの対応する免疫性分析物の濃度の中央値（複数可）未満というわけではない（しかしIL-6に関しては、適用可能な条件は、健常個体の血液中のIL-6の濃度の中央値を超えない個体の血液中の濃度である）場合に、個体は命に関わらない肝臓障害を有するとして特定される。本発明の他の実施形態によれば、(i) 対象の血液試料から得られた血清アルブミン濃度の値が、あらかじめ選択された範囲（例えば、3.0 ~ 4.0 g/dL または 3.5 ~ 5.0 g/dL）以内（もしくはそれを越える）またはあらかじめ選択されたカットオフ（例えば 2.8 g/dL、3.2 g/dL もしくは 3.5 g/dL）を超え、(ii) 対象の血液試料から得られた1種以上の免疫性分析物の濃度のすべてが、健常対象からの対応する免疫性分析物の濃度の中央値以上である場合に、個体（例えば、臨床試験における対象）は、正常な肝機能を有するとして特定される。

10

20

【0034】

臨床試験に参加している対象における肝臓障害の評価を含む本発明の方法については、対象が命に関わる肝臓障害を有するとして特定される場合に、対象を臨床試験から除くことができる。同様に、対象が命に関わらない肝臓障害を有するとして特定される場合に、対象を臨床試験から除くことができる。

【0035】

臨床試験に含まれる対象については、臨床試験中の複数の時点で（例えば、臨床試験より前、臨床試験開始直ぐ、および臨床試験中の1または複数の時点で）肝臓障害を評価する可能性がある。したがってある種の実施形態では、肝臓障害の評価を、臨床試験中に少なくとも2回実施する。したがって、肝臓障害（もしあれば）の程度を臨床試験の経過にわたって追跡することができる。ある種の実施形態では、臨床試験の経過中に、対象の正常な肝機能を有するとの特定が、命に関わらない肝臓障害を有するとの特定へと変化することを理由に、対象は臨床試験から除外される。ある種の実施形態では、臨床試験の経過中に、対象の正常な肝機能を有するとの特定が、命に関わる肝臓障害を有するとの特定へと変化することを理由に、対象は臨床試験から除外される。他の実施形態では、臨床試験の経過中に、対象の命に関わらない肝臓障害を有するとの特定が、命に関わる肝臓障害を有するとの特定へと変化する場合、対象は臨床試験から除外される。

30

40

【0036】

本発明のある種の実施形態によれば、肝臓障害から生存する確度が高い（例えば、次の6か月について生存の可能性が90%以上である）または肝臓障害による死亡の確度が高い（例えば、肝移植が実施されない限り、次の6か月以内に死亡する可能性が90%以上である）のいずれかとして患者を同定するステップは、測定した免疫性分析物の濃度および血清アルブミン濃度の解析および比較に基づいて完了することができる。例えば、試料から測定した血清アルブミン濃度の値が 2.8 g/dL を超える場合、または1種以上の、試料から測定した免疫性分析物の濃度のいずれかが、健常個体の血液で見られる対応する免疫性分析物の濃度の中央値未満である場合、肝臓障害から生存する確度が高いとして患者を特定することができる。また、試料から得られた血清アルブミン濃度の値が 2.8

50

g / d L 以下である場合、および試料からの 1 種以上の免疫性分析物の濃度のすべてが、健常個体の血液で見られる対応する免疫性分析物の濃度の中央値未満である場合、肝臓障害による死亡の確度が高いとして患者を特定することができる。

【0037】

本発明のある種の実施形態では、目的の免疫性分析物は、I L - 17、R A N T E S、P D G F - b b および F G F b を含む。例えば、I L - 17、R A N T E S、P D G F - b b および F G F b のそれぞれの濃度の値を得ることができ（例えば、測定またはアッセイする）、I L - 17、R A N T E S、P D G F - b b および F G F b のそれぞれについて健常個体（例えば、健常な肝臓）を代表する所与の中央濃度値と比較することができる。すなわち、血液試料から測定した I L - 17 の濃度の値を、健常個体を代表する I L - 17 の所与の中央濃度値と比較する、血液試料から測定した R A N T E S の濃度の値を、健常個体を代表する R A N T E S の所与の中央濃度値と比較する、などである。ある種の実施形態では、濃度の値が患者の血液試料から得られる最適な免疫性分析物は、I L - 17、R A N T E S、P D G F - b b および F G F b である。

10

【0038】

本発明のある種の実施形態では、目的の免疫性分析物は、I L - 17、T N F a、R A N T E S および F G F b を含む。例えば、I L - 17、T N F a、R A N T E S および F G F b のそれぞれの濃度の値を得ることができ（例えば、測定またはアッセイする）、I L - 17、T N F a、R A N T E S および F G F b のそれぞれについて健常個体（例えば、健常な肝臓）を代表する所与の中央濃度値と比較することができる。すなわち、血液試料から測定した I L - 17 の濃度の値を、健常個体を代表する I L - 17 の所与の中央濃度値と比較する、血液試料から P G F b の測定した濃度の値を、健常個体を代表する P G F b の所与の中央濃度値と比較する、などである。ある種の実施形態では、濃度の値が患者の血液試料から得られる最適な免疫性分析物は、I L - 17、T N F a、R A N T E S および F G F b である。

20

【0039】

本発明のある種の実施形態では、目的の免疫性分析物は、I L - 17、P D G F b b、R A N T E S および I L - 4 を含む。例えば、I L - 17、P D G F b b、R A N T E S および I L - 4 のそれぞれの濃度の値を得ることができ（例えば、測定またはアッセイする）、I L - 17、P D G F b b、R A N T E S および I L - 4 のそれぞれに対する健常個体（例えば、健常な肝臓）を代表する所与の中央濃度値と比較することができる。すなわち、血液試料から測定した I L - 17 の濃度の値を、健常個体を代表する I L - 17 の所与の中央濃度値と比較する、血液試料から測定した I L - 4 の濃度の値を、健常個体を代表する I L - 4 の所与の中央濃度値と比較する、などである。ある種の実施形態では、濃度の値が患者の血液試料から得られる最適な免疫性分析物は、I L - 17、P D G F b b、R A N T E S および I L - 4 である。

30

【0040】

本発明のある種の実施形態では、目的の免疫性分析物は、I L - 17、P D G F b b、R A N T E S および I L - 13 を含む。例えば、I L - 17、P D G F b b、R A N T E S および I L - 13 のそれぞれの濃度の値を得ることができ（例えば、測定またはアッセイする）、I L - 17、P D G F b b、R A N T E S および I L - 13 のそれぞれに対する健常個体（例えば、健常な肝臓）を代表する所与の中央濃度値と比較することができる。すなわち、血液試料から測定した I L - 17 の濃度の値を、健常個体を代表する I L - 17 の所与の中央濃度値と比較する、血液試料から測定した I L - 13 の濃度の値を、健常個体を代表する I L - 13 の所与の中央濃度値と比較する、などである。ある種の実施形態では、濃度の値が患者の血液試料から得られる最適な免疫性分析物は、I L - 17、P D G F b b、R A N T E S および I L - 13 である。

40

【0041】

本発明のある種の好ましい実施形態では、目的の免疫性分析物は、I L - 17、P D G F b b、R A N T E S および I L - 9 を含む。例えば、I L - 17、P D G F b b、

50

RANTES および IL - 9 のそれぞれの濃度の値を得ることができ（例えば、測定またはアッセイする）、IL - 17、PDGF bb、RANTES および IL - 9 のそれぞれに対する健常個体（例えば、健常な肝臓）を代表する所与の中央濃度値と比較することができる。すなわち、血液試料から測定した IL - 17 の濃度の値を、健常個体を代表する IL - 17 の所与の中央濃度値と比較する、血液試料から IL - 9 の測定した濃度の値を、健常個体を代表する IL - 9 の所与の中央濃度値と比較するなどである。ある種の実施形態では、濃度の値が患者の血液試料から得られる最適な免疫性分析物は、IL - 17、PDGF bb、RANTES および IL - 9 である。

【0042】

別の一実施形態では、目的の免疫性分析物は、IL - 17、RANTES、IL - 9 および IL - 6 を含む。例えば、IL - 17、RANTES、IL - 9 および IL - 6 のそれぞれの濃度の値を得ることができ（例えば、測定またはアッセイする）、IL - 17、RANTES、IL - 9 および IL - 6 のそれぞれに対する健常個体（例えば、健常な肝臓）を代表する所与の中央濃度値と比較することができる。すなわち、血液試料から測定した IL - 17 の濃度の値を、健常個体を代表する IL - 17 の所与の中央濃度値と比較する、血液試料から測定した IL - 6 の濃度の値を、健常個体を代表する IL - 6 の所与の中央濃度値と比較する、などである。ある種の実施形態では、濃度の値が患者の血液試料から得られる唯一の免疫性分析物は、IL - 17、RANTES、IL - 9 および IL - 6 である。目的の免疫性分析物が IL - 17、RANTES、IL - 9 および IL - 6 を含むまたはそれらからなるこれらの特定の実施形態では、(i) 患者の血液試料中の IL - 17、RANTES、IL - 9 の測定した濃度の値が健常個体を代表する中央値より低い、(ii) 患者の血液試料における IL - 6 の測定した濃度の値が健常個体を代表する中央値より高く、患者の血液試料における血清アルブミンの測定値があらかじめ決定された範囲（例えば、2 ~ 5 g / d L、2 ~ 4 g / d L、2 ~ 3 g / d L もしくは 2 . 5 ~ 3 . 0 g / d L）未満またはあらかじめ決定されたカットオフ値（例えば、3 . 5 g / d L、3 . 2 g / d L もしくは 2 . 8 g / d L）以下である場合に、死亡の確度が高いという特定が、予測または特定される。

【0043】

ある種の実施形態によれば、方法は、診断（すなわち特定）を個体または対象に通知する、および / または適切な療法を処方する、さらなるステップを含むことができる。命に関わらない肝臓障害を有するとして特定された個体または対象については、適切な療法は、支援的ケア、例えば、栄養摂取の向上ならびに水分補給および電解質の維持を含むことができる。命に関わる肝臓障害を有するとして特定された個体または対象については、適切な療法は、薬物治療（例えば、プレドニゾンのようなコルチコステロイド）を処方すること、および / または肝移植法を推奨することを含むことができる。本発明のある種の実施形態による方法は、肝移植が実施されない限り、肝臓障害による死亡の確度が高い（例えば、肝臓障害の発症から 6 か月以内に死亡する確率が 90 % を超える）として特定の患者を特定した後に、患者に対して肝移植を実施するステップをさらに含むことができる。

【0044】

本発明のある種の実施形態による方法は、どの患者（例えばヒトまたは他の哺乳動物）が肝臓障害（例えば、DILI）の発症から 6 か月以内の死亡の確度が高いかを正確に予測または同定することができる。例えば、本発明の実施形態による方法は、患者に対して肝臓障害による死亡の確度が高いことを特定または予測することができ、死亡の確度は、約 80 % ~ 100 %（例えば、85 % ~ 99 %、90 % ~ 99 % または 95 % ~ 99 %）である。すなわち、患者に対する肝臓障害による死亡の「高い確度」の判定または特定は、約 80 % ~ 100 %（例えば、85 % ~ 99 %、90 % ~ 99 % または 95 ~ 99 %）の精度を含み得る。

【0045】

同様に、本発明のある種の実施形態による方法は、どの患者（例えばヒトまたは他の哺乳動物）が肝臓障害の発症から 6 か月を超えて生存する確度が高いかを正確に予測または

10

20

30

40

50

特定することができる。例えば、本発明の実施形態による方法は、患者に対して生存の確度が高いことを特定または予測することができ、生存の確度は、約80%~100%(例えば、85%~99%、90%~99%または95%~99%)の、肝臓障害の発症から6か月を超える生存の可能性である。すなわち、患者に対する肝臓障害からの生存の「高い確度」の判定または特定は、約80%~100%(例えば、85%~99%、90%~99%または95%~99%)の精度を有し得る。

【0046】

図1は、本発明のある種の実施形態による方法を示す。図1に示すように、最初のステップは、患者から血液試料を得るステップ(1)を含むことができる。血液試料を1つまたは複数の解析技法にかけて、目的の免疫性分析物のそれぞれの濃度を測定する(10)および血清アルブミン濃度を測定する(15)ことができる。ステップ12では、目的の免疫性分析物(例えば、IL-17、PDGF bb、RANTESおよびIL-9)のそれぞれの測定した濃度を、これらの特定の分析物に対する中央値と比較することができる。健常個体を代表する免疫性分析物に対する中央値は、以下の表1に提供される値を含むことができる。

【0047】

【表1】

免疫性分析物	健常個体における中央値	健常個体における中央値の範囲
TNF α	17.1	10 - 25
IL-12	15.7	8 - 23
IL-17	45.2	35 - 55
IL-4	5.6	2 - 10
IL-5	3.0	1 - 8
IL-13	2.7	1 - 8
IL-9	13.6	5 - 20
MIP-1 β	84.1	70 - 95
RANTES	2529.0	2400 - 2650
FGF b	10.9	5 - 17
PDGF-bb	4207.0	4100 - 4300

表1:血液試料由来の免疫性分析物の測定値と比較するための、
免疫性分析物の中央値

【0048】

ステップ17では、(ステップ15からの)測定した血清アルブミン濃度を解析して、測定濃度が、2.8g/dLのあらかじめ決定されたカットオフ以下かどうかを判定することができる(これらの特定の実施形態による)。ステップ30は、試料中の測定した血清アルブミン濃度が、2.8g/dLのあらかじめ決定されたカットオフ(これらのある種の実施形態による)以下であるか、および目的の免疫性分析物の濃度のそれぞれが(例えば、健常な肝臓を有する)健常個体を代表する対応する中央値より低いかどうかを判定することを含む。血液試料からの測定濃度レベルが両方の要件を満たす判定が行われる場合、次いで、好ましくは判定の6か月以内での、または(肝臓障害が確認できるもしくはは既知の場合)肝臓障害発症の6か月以内での肝移植を推奨することを含むステップ40を実施することができる。測定濃度レベルがいずれかの(または両方の)要件を満たさない場合は、次いで、次の6か月以内にまたは(肝疾患が既知もしくはは確認できる場合)肝疾患の発症から6か月以内に患者は死亡する危険性がないと結論づけることを含むステップ50を実施することができる。ステップ50は、肝移植に対する患者の優先順位を下げるステップをさらに含むことができる。

【0049】

図2は、本発明によるある種の好ましい実施形態を示す。そのような実施形態では、患

者から血液試料を得ることを含む最初のステップ100を実施する。血液試料を、以下の4つの特定の免疫性分析物、すなわちIL-17、PDGF bb、RANTESおよびIL-9を測定することを含むステップ200にかける。さらに、試料中の血清アルブミン濃度を得る。続いて、測定した免疫性分析物の濃度を各免疫性分析物に対する参照濃度中央値レベルと比較することを含むステップ300を実施する。図2に示すこれらの特定の実施形態では、所与の免疫性分析物に対する測定濃度が参照濃度中央値未満であるかどうかに応じて、測定した免疫性分析物のそれぞれに「中央値未満」(「BM」)の値または「1」もしくは「0」のいずれかを割り当てる。ステップ400、500、600および700は、測定した目的の免疫性分析物のそれぞれにBMを割り当てることを含む(すなわち、IL-17についてステップ400、IL-9についてステップ500、PDGF bbについてステップ600およびRANTESについてステップ700)。目的の各免疫性分析物について一旦BMが割り当てられると、すべてのBM値を合計することによって「中央値未満の数(NBM)」を計算するステップ800を実施する。図2に示される実施形態については、4つの免疫性分析物のみを測定したので、最大NBMは4である。続いて、計算したNBMおよび測定した血清アルブミン濃度に基づいて、患者が生存するか生存しないかを判定または予測することを含むステップ900を実施する。例えば、(これらの特定の実施形態について)測定した血清アルブミン濃度が、2.8g/dLを超えるまたはNBMが4未満である場合は、患者は肝臓障害発症から少なくとも6か月間、肝臓障害から生き延びると予想される。しかし、測定した血清アルブミン濃度が、2.8g/dLを超えず、NBMが4に等しい場合は、患者は肝臓障害から生き延びるとは期待されず、肝移植がない限り、その発症から6か月以内に死亡すると予想される。

【0050】

別の態様では、本発明は、肝移植を受けることについて、第1の患者および第2の患者を含めた複数の患者に優先順位をつけるための方法を提供する。その際、肝移植が全く必要でない可能性がある患者、または少なくとも肝移植の緊急の必要性が少ない患者よりも、より早急に肝移植の必要がある患者を優先することができる。本発明のある種の実施形態によれば、それぞれの血液試料を、肝臓障害に罹患している(または罹患していると考えられる)複数の個体から入手する。各試料について、血清アルブミンの濃度値を得(例えば、適切なアッセイで測定する)、TNF、IL-12、IL-17、IL-4、IL-5、IL-13、IL-9、MIP-1、RANTES、FGF b、PDGF bbおよびIL-6からなる群から選択される1種以上の免疫性分析物に対するそれぞれの濃度値を得(例えばアッセイする)。第1の個体から得られた免疫性分析物濃度の値を、健常個体からの対応する免疫性分析物の濃度の中央値と比較して、試料から測定した1種以上の免疫性分析物の濃度のいずれかが、健常個体からの対応する免疫性分析物の濃度の中央値未満であるかどうかを判定することができる。同様に、第2の個体から得られた免疫性分析物の濃度の値を、健常個体からの対応する免疫性分析物の濃度の中央値と比較して、試料から測定した1種以上の免疫性分析物の濃度のいずれかが、健常個体からの対応する免疫性分析物の濃度の中央値未満であるかどうかを判定することができる。次に、以下の1つを判定するためのステップを実施する。(i)第1の個体の試料が、あらかじめ決定されたカットオフ値(例えば2.8g/dL)を超える血清アルブミン濃度の値を有する、または(ii)第1の個体の試料からの1種以上の免疫性分析物の濃度のいずれかが、健常個体からの対応する免疫性分析物の濃度の中央値未満である。第2の個体に関しては、以下の1つを判定するためのステップを実施する。(i)第2の個体の試料が、あらかじめ決定されたカットオフ値(例えば2.8g/dL)以下である血清アルブミン濃度の値を有する、および(ii)第2の個体の試料からの1種以上の免疫性分析物の濃度のすべてが、健常個体からの対応する免疫性分析物の濃度の中央値未満である。本発明のある種の実施形態によれば、肝臓障害が原因で死亡する危険性が第1の個体よりも高いとして、第2の個体を同定するステップを実施することができる。したがってある種の実施形態では、第1の個体に肝移植を実施する前に、第2の個体に肝移植を実施することを推奨するさらなるステップを行うことができる。その際、肝移植を受けることについて

、第2の個体は、第1の個体よりも優先される。好ましくは、肝移植法は、（既知または確認できる場合は）肝臓障害の発症から、または肝臓障害が原因で死亡する危険性が高いとして第2の個体を特定した日から6か月以内に、第2の個体について実施する。

【0051】

本発明のある種の実施形態による、肝移植を受けることについて複数の患者に優先順位をつける方法は、本明細書に開示される免疫性分析物の任意の特定の群の解析を含むことができる。例として、各試料について、先に述べたように、IL-9、IL-17、RANTESおよびPDGF-bb；IL-17、RANTES、PDGF-bbおよびFGFb；IL-17、TNF、RANTESおよびFGFb；IL-17、PDGFbb、RANTESおよびIL-4；ならびにIL-17、PDGFbb、RANTESおよびIL-13の濃度の値が利用可能である。

10

【0052】

さらに別の態様では、本発明は、肝臓障害を特徴づけるために使用することができるキットを提供する。いくつかの実施形態では、キットは、臨床試験に参加する対象において肝臓障害を評価するために使用される。他の実施形態では、キットは、（肝移植がない場合に）肝臓障害から患者が生存するか死亡するかを予測または特定するのに使用される。これらのキットは、肝移植を受けることについて複数の患者の優先順位をつけることを支援することもできる。本発明のある種の実施形態によれば、キットは、（i）TNF、IL-12、IL-17、IL-4、IL-5、IL-13、IL-9、MIP-1、RANTES、FGFb、PDGF-bbおよびIL-6からなる群から選択される免疫性分析物を検出および/または定量化するように構成された、少なくとも1つの抗体に基づいたアッセイ、ならびに（ii）本明細書に開示される方法のいずれか（例えば、範囲またはカットオフ値（例えば2.8g/dL）と比較した場合の、個体からの血液試料中の血清アルブミン濃度、および健全な肝臓を有する個体を代表する中央濃度値と比較した場合の、血液試料中の測定した免疫性分析物の濃度の値に基づいて、肝臓障害に罹患している個体の生存可能性を特定することを行うこと）を実行するための指示書を含むことができる。特定の好ましい実施形態では、少なくとも1つの抗体に基づいたアッセイは、TNF、IL-12、IL-17、IL-4、IL-5、IL-13、IL-9、MIP-1、RANTES、FGFb、PDGF-bbおよびIL-6からなる群から選択される免疫性分析物を同時に検出および/または定量化するように構成されたマルチプレックスアッセイを含む。

20

30

【0053】

本発明のある種の実施形態によるキットは、本明細書に開示される免疫性分析物の任意の特定の群の免疫性分析物を検出および/または定量化するように構成される、1つまたは複数の抗体に基づいたアッセイを含むことができる。例として、各試料について、1つまたは複数の抗体に基づいたアッセイを、免疫性分析物の次の特定の群のいずれかを特に検出および/または定量化するように構成することができる。IL-9、IL-17、RANTESおよびPDGF-bb；IL-17、RANTES、PDGF-bbおよびFGFb；IL-17、TNF、RANTESおよびFGFb；IL-17、PDGFbb、RANTESおよびIL-4；ならびにIL-17、PDGFbb、RANTESおよびIL-13。

40

【0054】

特定の好ましい実施形態では、少なくとも1つの抗体に基づいたアッセイは、IL-9、IL-17、RANTESおよびPDGF-bbからなる群から選択される免疫性分析物を検出および定量化する。より好ましくは、少なくとも1つの抗体に基づいたアッセイは、IL-9、IL-17、RANTESおよびPDGF-bbのそれぞれを検出および定量化する。特定の好ましい実施形態では、少なくとも1つの抗体に基づいたアッセイは、IL-9、IL-17、RANTESおよびPDGF-bbのそれぞれを同時に検出および/または定量化するように構成されるマルチプレックスアッセイを含む。

【0055】

50

本発明のある種の実施形態によるキットは、健全な肝臓を有する個体における目的の各免疫性分析物の濃度の中央値を収載する表を含むこともできる。例えば、指示書は表 1 に提供される値のいずれかを含むことができる。

【実施例】

【0056】

本発明のある種の実施形態を、以下の研究によってさらに例示するが、これは、本発明を限定するものとして決して解釈すべきではない。すなわち、記載される特定の方法及び結果は、好ましい実施形態を含めた本発明のある種の実施形態の例示であり、本発明を限定するものではない。

【0057】

よく特徴づけられ、注意深く研究された急性 D I L I を患っている対象の血清において 27 個の免疫性分析物のレベルを測定し、次いで、プロスペクティブ（前向き）米国薬物性肝障害ネットワークにおいて少なくとも 1 年間その患者を追跡する研究を行った。このネットワークおよびその主要な方法は、以前に記載されており（10、25、26）、登録された最初の 300 人の対象における発見が記載されている（10）。本研究では、急性 D I L I を有する 78 人の対象からの結果を、血清プロテオミックプロファイルが最近報告された（27）40 人の正常な対照（例えば、健全な肝臓を有するボランティアの血液ドナー）のものと比較した。以下に述べるように、選定性および適応性の細胞応答における著しい変化が観察され、本発明のある種の実施形態により、4 つの血清免疫性分析物（インターロイキン 9、インターロイキン 17、血小板由来増殖因子 b b および R A N T E S）ならびに血清アルブミンレベルに対する初期急性症状における結果に基づいて、転帰を早期予測するための新しい手段が開発された。

【0058】

[研究対象]

薬物性肝障害ネットワーク（D I L I N）のプロスペクティブ・スタディ（前向き研究）の一部として D I L I を有する対象から血清試料を収集し、ここでは、疑わしい D I L I を有する対象を登録し、詳細な臨床データを収集した（25）。本研究で研究した D I L I を有する対象は、B e l l ら（27）によって最近記載されたように、2004 年 12 月から 2010 年 7 月の間の登録された、すべて急性 D I L I（例えば、登録より 2 週間前以内に発症）を有する 78 人の対象であった。臨床データは D I L I N 因果関係委員会によって精査され、ここでこのケースが本物の D I L I として認められるかどうかに関して最終的な判定が行われ、関与する薬物のそれぞれに D I L I を引き起こした確率を割り当てた（26）。肝臓損傷のタイプおよび R 値は記載された通りであった（10、27）。可能な限り、少なくとも 6 か月間対象を追跡して、慢性 D I L I の発生の回復またはエビデンスがあるかどうかを評価した。血液試料を収集し、D I L I N 中央試料貯蔵所に送って、処理し、- 80 で保管した。健全対照（ボランティア血液ドナー）からの血清は、血液バンクから得た（27）。

【0059】

[組み入れ / 除外基準]

以下の判定基準のいずれかによって証明されるような記録化された臨床的に有意な D I L I を有する、2 歳を超える大人および子供を D I L I N 前向き研究に含めた。1) > 2 . 5 m g / d L の黄疸または血清ビリルビン、および A L T、A S T またはアルカリホスファターゼのいずれかの上昇、2) < 2 . 5 m g / d L の黄疸および血清ビリルビンがないが、血清 A L T もしくは A S T の 2 つ以上の上昇 (> 5 × U L N) または血清アルカリホスファターゼの上昇がある (> 2 × U L N)、ならびに、3) 既知の既存の肝疾患を有する人において、> 5 × ベースライン値の血清 A L T もしくは A S T の上昇または > 2 × ベースライン値の血清アルカリホスファターゼの上昇。また、以下に基づいて対象を除外した。1) 急性肝障害の他の既知の原因、例えば急性胆管炎、急性ウイルス性肝炎または自己免疫性肝疾患、2) アセトアミノフェン肝毒性、および、3) D I L I 発症より前の肝移植、4) インフォームドコンセントを与えなかったこと、または症例確認の手順に従

10

20

30

40

50

うことができないもしくは従う気がないこと。

【0060】

[Bio-plexアッセイによる免疫性分析物のプロファイリング]

血清中の免疫性分析物の濃度を、ヒト27-plexアッセイ[14種のサイトカイン(IL-1、IL-1ra、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、IFN-、TNF-);7種のケモカイン(エオタキシン、IL-8、IP-10、MCP-1、MIP-1、MIP-1、RANTES);および6種の増殖因子(IL-7、塩基性FGF、G-CSF、GM-CSF、PDGF-BB、VEGF)]を使用して測定し、Bio-Rad(Hercules、CA、USA)から提供されたBio-plexサスペンションアレイシステムを用いて測定した。

10

【0061】

製造者の指示書に従って、(発症時および6か月の経過観察時における)DILI対象および健常対照の血清を処理し、解析した。簡単に述べると、試料を試料希釈剤中に1:4(v:v)に希釈し、捕捉抗体結合磁気ビーズと共に30分間(室温、300rpmの攪拌)インキュベートした。Bio-plex Pro洗浄ステーション中で3回洗浄してから、試料を、ビオチン標識した検出抗体と共に30分間暗所(室温、300rpmの攪拌)でインキュベートした。ストレプトアビジン-フィコエリトリンを添加して、各捕獲分析物を検出し、Bioplexアレイリーダーを使用して定量化した。分析物の濃度を、このアッセイと共に提供される組換え体標準物質に由来する検量線を使用して、Bio-plex Managerソフトウェアを用いて計算した。

20

【0062】

[DILI対象のサイトカインヒートマップ]

DILI対象間の免疫応答パターンを確立および比較するのに使用するサイトカインヒートマップを作成するために、図3に示すように、それらの発現および主としてそれらに関係する免疫プロセスを本来引き起こす、主要な既知の転写因子に基づいて、サイトカインを以下のようにグループ化した。先天免疫(NF- κ B依存的)と関係があるサイトカイン:IL-1、IL-6、TNF- α ;適応性細胞免疫(T-betまたはROR γ t依存的)と関係があるサイトカイン:IL-12p70、IFN- γ 、IL-2、IL-15、IL-17;適応性体液免疫(Gata3またはIRF-4依存的)と関係があるサイトカイン:IL-4、IL-5、IL-13、IL-9、および免疫抑制/炎症の消散と関係があるサイトカイン:IL-1ra、IL-10(29~33)。図3は、免疫応答の単純化モデルを示す。図3に示すように、免疫性の刺激は、NF- κ Bの核移行、および損傷組織による早期/先天性のサイトカイン産生(IL-1、IL-6、TNF- α)を引き起こす。この早期の炎症状態が持続する場合は、その状態は、細胞性(T-bet依存的/TH1型:IL-12p70、IFN- γ 、IL-2、IL-15)または体液性(Gata3依存的/TH2型:IL-4、IL-5、IL-13)応答のいずれかを支持する適応免疫プロセスを活性化する。この炎症状態は、抗炎症性プロセス(IL-10、IL-1ra)を引き起こすことによって、最終的にそれ自体を消散し得る。炎症状態が消散されない場合は、先天性および抗炎症性プロセスが相乗的に作用して、ROR γ t依存的/TH17型:IL-17またはIRF4依存的TH9型IL-9適応免疫へ進む。

30

40

【0063】

血清免疫性分析物の濃度に対する正常範囲は、40人の健常対照から得られた測定値に基づき、平均 \pm 1標準偏差(SD)として記録した。健常対象の平均より高いまたは低い、DILI対象の血清における濃度1SDを、異常であると定義した。発症時のDILIコホート間における異常なサイトカイン発現の共通の反復性パターンに基づいて、4つの主な免疫プロファイルを特定した。1)少なくとも1つの先天性のおよび1つまたは複数の適応性の細胞性および体液性サイトカイン濃度が正常より高いそれらのプロファイルについて「混合免疫性DILI」、2)1つまたは複数の先天性サイトカイン濃度が正常よ

50

り高く、正常より高い適応性サイトカインがないプロファイルについて「先天免疫性DILI」、3) 1つまたは複数の適応性の細胞性または体液性サイトカイン濃度が正常より高いプロファイルについて「適応免疫性DILI」、ならびに4) 1つのみ(またはなし)の血清が異常なサイトカイン濃度であるプロファイルについて「非免疫性DILI」。上記の判定基準のいずれかに一致しない免疫プロファイルは、「未分類のDILI」としてラベルした。

【0064】

[統計方法]

平均および標準偏差を含めた記述統計、または数値およびパーセンテージを計算した。間隔尺度で測定したデータについては、スチューデントのt検定または分散分析(ANOVA)を使用した。データが正常に分布しなかった場合は、ウィルコクソン順位和検定またはクラスカル・ウォリスの検定を用いた。対応t検定またはウィルコクソン符号順位検定を使用して、ベースライン値と6か月時点での値を比較した。名目データについては、カイ二乗またはフィッシャーの正確確率検定を用いた。スピアマンの相関を使用して、間隔尺度で測定した変数間の直線関係について検定した。特に明記しない限り、0.05未満の両側P値を統計的に有意であるとみなした。すべての解析について、SAS(登録商標)バージョン9.2を使用した。

10

【0065】

以下のモデリングプロセスを使用して、早期死亡(DILI発症の6か月以内)の予測のために、27個の免疫性分析物と2つの臨床検査結果(血清アルブミンまたは総ビリルビン)の間の変数を選択した。サンプルサイズおよび比較的多数の変数のため、目標は、早期死亡を高度に予測する少数の変数を有する安定モデル(34)を見つけることであった。第1ステップでは、単変量解析を行って、ウィルコクソン順位和検定を使用してDILI発症の6か月以内に死亡したものと生存したものを比較した。高度な選択性にするために、 $p < 0.01$ レベルで統計的に有意な変数のみを、第2のステップで考慮した。以下の3群のそれぞれの中の免疫性分析物が相関する可能性が高いことが期待された。すなわち、サイトカイン、ケモカインおよび増殖因子である。したがって第2のステップでは、各群内のペアワイズ相関を検討した。早期死亡と関連が最も高い(P値が最低の)免疫性分析物を用いて開始した。この免疫性分析物と有意に相関しない群内の免疫性分析物のみを、さらに考慮するために保持した。残りの免疫性分析物のペアワイズ相関が有意であった場合は、早期死亡と関連が最も低い免疫性分析物をペアから除外した。第3ステップでは、発現のヒートマッププロファイルに基づいて、十分にモジュレートされていない群内の免疫性分析物を除外した。最終ステップとして、残りの免疫性分析物と臨床検査値の間のペアワイズ相関を検討することによって、最終的な変数セットを得た。ペアワイズ相関が有意であったならば、早期死亡と関連が低い変数をペアから除外した。

20

30

【0066】

一旦最終的な変数セットが選択されると、各変数について曲線下面積(AUC)を推定して、その潜在的な予測的および診断的値を調べた。これらの変数のすべてを用いるロジスティック回帰モデルを適合させて、予測因子としての変数の線形結合に適合させたモデルに基づいて、AUCを推定した。免疫性分析物の値が歪められる傾向があり得るので、これらの変数の線形結合は、早期死亡に対する最良の予測因子でなくてもよい。したがって、次のバイナリー変数を予測因子として作成した。免疫性分析物を観察された中央値で二分し、臨床検査値を確立された臨床的カットポイントに基づいて二分した。一方がバイナリー免疫性分析物のみに基づき、他方は、バイナリー免疫性分析物と臨床検査データの両方に基づく、2つの略式のバイナリー変数を作成した。免疫性分析物と臨床検査データの両方に基づくバイナリー変数は、早期死亡に対して最高の予測能力を有するはずである。このバイナリー変数は、変数(免疫性分析物および臨床検査値)の値がすべて関連性の方向に基づいて早期死亡を予測したバイナリーカテゴリーに落ちる場合、1の値を有し、そうでなければ0の値を有する。早期死亡に対するこのバイナリー変数の予測能力を、陽性的中率(PPV)、陰性適中率(NPV)および精度(正確な予測のパーセント)によ

40

50

って評価した。比較のために、感度および特異性も同様に推定した。

【0067】

<結果>

[研究コホートの特徴]

既に述べたように、図4に示すように、合計で78人のDILIおよび40人の健常対象を研究に含めた(27)。図4は、78人のDILI対象および40人の健常対照(ボランティア血液ドナー)からの血清を研究で解析したことを図表で示す。急性DILIを有するそうした患者の中で、10人がDILI発症の6か月以内に死亡し、37人が6か月の経過観察通院に戻り、これらの人々の中の32人から血清試料を得た。

【0068】

上記のように、37人の対象が6か月の経過観察を完了し、これらの対象の内、32人のDILI患者について経過観察の血清試料を得た(様々な理由のため、5人の患者が6か月での血清試料を提供しなかった)。10人の対象(12.8%)がDILI発症の6か月以内に死亡したことが分かり、一方、DILIを発症してから315日後に、非DILIが原因で1人が死亡した。肝移植を受けた人はいなかった。6か月の経過観察通院を完了しなかった、生存している31人の対象に対する理由の評価により、それらの大部分は、仕事または長すぎる旅行行程とスケジュールの調整が見つからないことが原因であることがわかった。

【0069】

研究に含まれるすべての対象の詳細な人口統計および肝臓化学情報を以下の表2に示す。

【0070】

10

20

【表 2】

	DILIの発症 (n=78)	6か月の経過観察 (n=32)	健常対照 (n=40)
年齢、平均± SD(y)	48 ± 17.9	51 ± 14.2	49.2 ± 13.1
女性(%)	55	55	28
自己報告された人種(%)			
白人	73	73	95
黒人	10	10	5
その他	16	15	0
不明	1	0	0
肥満指数、平均± SD(kg/m ²)	27.1 ± 6.5		30.5 ± 6.9
アルコール使用(%)	40		
既存の肝疾患(%)	8		
過去の薬物アレルギー(%)	53		
糖尿病(%)	32		
好酸球絶対数/μL(平均±SD)	173± 235		
肝臓生化学、平均±SD			
ALT (U/L)	1065 ± 1382	55±131	17± 5
AST (U/L)	1003 ± 1249	38±47	24 ± 5
アルカリホスファターゼ(U/L)	336± 465	89±33	63± 14
総ビリルビン(mg/dL)	8.1 ± 7.4	0.9±0.7	0.6 ± 0.2
INR	1.8 ± 1.2	1.1±0.4	

表2:研究対象に関する選択された人口統計上、臨床上および検査上の特徴

略語:DILI、薬物性肝障害;SD、標準偏差;ALT、アラニンアミノトランスフェラーゼ;AST、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ;INR、国際標準化比

【0071】

簡単に述べると、DILIコホートの平均年齢は48(±17.9)歳であった。性別分布は55%が女性であり、患者の大部分(73%)がコーカサス人であった。78人のうちの6人(8%)のDILI対象は既存の肝疾患を有しており、25人(32%)は潜在的な糖尿病を呈していた。表3に示すように、DILI対象の59%、22%、15%および4%がそれぞれ、肝細胞性、胆汁うっ滞性、混合性または不明な、肝臓損傷のパターンを示した。これらのパーセンテージは、DILIコホート全体のものと類似している(10)。

【0072】

10

20

30

【表 3】

肝障害のパターン(%)	
肝細胞性	59
胆汁うっ滞性	22
混合性	15
不明	4
肝障害の重症度(%)	
軽度	11
中度	49
重度/致死	26
不明	14
肝臓関連死亡(%)	6
慢性DILI(%)	5

表3:研究対象における選択されたDILIの特徴および転帰[n= 78]

10

【0073】

20

[縦モード解析：免疫性分析物およびDILIの経過]

DILIの実験モデルおよびレトロスペクティブ（後向き）臨床研究（15～18、20～24）によって、急性肝障害と関係がある免疫活性化機構が仮定された。障害のパターンおよび重症度にかかわらず、DILIと関係がある免疫成分を特徴づけるために、DILI発症（n=78）、6か月の経過観察（n=32）および健常対照（n=40）の間で、免疫性分析物の血清レベルを比較した。3つの群は、高い不均一性を示した。27個の免疫性分析物のうちの26個について、結果は正常に分布されなかった。

【0074】

ウィルコクソン順位和検定を実施して、以下の表3に示すように、どのサイトカイン、ケモカインまたは増殖因子が、DILIで変化しているかを評価した。10個の免疫性分析物の血清レベルの分布は、健常対照、発症時でのDILIと6か月の経過観察時点でのDILIの間で有意に異なっていた。これらの10個は、IL-4、IL-5、IL-7、IL-8、IL-9、IFN- γ 、エオタキシン、RANTES、PDGF-bbおよびMCP-1であった。さらに、4つの免疫性分析物の血清レベルが対照と発症時でのDILIの間で異なって分布し（IL-6、IL-13、IP-10、塩基性FGF）、4つ（IL-2、IL-15、VEGF、MIP-1）が対照と6か月の経過観察時点でのDILIの間で異なって分布した（表4）。6か月の経過観察試料を有する対象（n=32）について、ベースラインと経過観察試料の差を検討した。8つの免疫性分析物（IL-5、IL-8、IP-10、IFN- γ 、塩基性FGF、MIP-1、GM-CSFおよびVEGF）について、有意な変化が観察された（表4）。全体的に見て、研究した27個の免疫性分析物の間で、19個が、健常対照と発症時および/または6か月の経過観察時点でのDILIの間に有意な差を示した。

30

40

【0075】

【表4】

	DILI発症			6か月の経過観察			対照		
	中央	最少	最大	中央	最少	最大	中央値	最少	最大
先天免疫と 関係がある サイトカイン									
IL-1 β	0.9	0.0	48.2	1.5	0.0	18.8	1.2	0.0	4.8
IL-6 ^b	11.0	0.4	970.5	7.7	0.1	47.4	5.1	2.2	45.7
TNF α	17.1	0.0	326.5	27.0	0.0	298.5	22.7	0.0	116.6
適応性細胞免疫									
IL-12	15.7	0.0	2186	24.9	2.8	636.3	16.0	5.7	294.8
IFN γ ^{a,d}	41.6	0.0	285.1	51.5	5.7	626.5	58.5	11.5	413.0
IL-2 ^c	2.4	0.0	660.5	0.0	0.0	93.2	4.2	0.0	148.8
IL-15 ^c	2.4	0.0	28.9	0.0	0.0	19.7	3.6	0.0	94.2
IL-17	45.2	0.0	156.7	53.3	0.0	153.4	52.7	23.5	118.3
適応性体液免疫									
IL-4 ^a	5.6	0.0	12.7	5.6	1.0	10.2	9.8	1.2	12.9
IL-5 ^{a,d}	3.0	0.0	68.4	4.2	0.2	69.1	3.8	1.5	27.6
IL-13 ^b	2.7	0.0	130.1	4.0	0.0	95.7	3.24	0.2	95.0
IL-9 ^a	13.6	0.0	2194.0	11.2	0.0	795.7	20.0	11.2	99.1
免疫抑制/消散									
IL-1ra	137.7	4.7	1406	126.6	41.1	663.3	145.4	18.8	284.4
IL-10	4.3	0.0	2494	2.7	0.0	373.3	3.0	0.0	287.5
ケモカイン									
エオタキシン ^a	41.2	0.0	195.3	44.8	0.0	365.7	106.4	3.3	808.0
IL-8 ^{a,d}	69.1	7.4	4636.0	28.6	4.1	141.5	28.5	8.6	82.0
IP-10 ^{b,d}	1378.5	71.9	48050	749.9	177.7	7337.5	625.8	20.1	1663
MCP-1 ^a	22.64	0.0	399.3	23.8	0.0	66.2	42.4	12.1	147.5
MIP-1 α	3.4	0.0	80.1	3.9	0.0	27.6	3.5	1.7	30.3
MIP-1 β ^{c,d}	84.1	15.6	473.6	72.5	15.2	223.4	95.7	5.3	190.2
RANTES ^a	2529.0	190.0	65180	2615.2	441.4	43545	7227.4	14.5	65180
増殖因子									
IL-7 ^a	7.0	0.0	165.0	10.4	0.7	103.2	9.4	5.0	104.1
FGF b ^{b,d}	10.9	0.0	67.9	21.5	0.0	164.5	16.6	0.0	108.2
G-CSF	19.0	5.7	425.1	17.8	2.7	118.7	21.7	9.3	61.4
GM-CSF ^d	0.0	0.0	86.7	0.0	0.0	23.6	0.0	0.0	413.4
PDGF-bb ^a	4207.0	65.3	28757	3595.1	697.2	23350	12037	12.1	34353
VEGF ^{c,d}	62.4	0.0	620.8	42.3	3.1	136.6	84.4	19.0	411.6

表4:DILIの発症時、6か月の経過観察時、および対照における、免疫性分析物の血清レベルの概要。すべての結果はpg/mLである。

^a 対照試料に対するすべての分布の比較は、ウィルコクソン順位和検定により統計的に有意である(p<0.05)。

^b 対照試料に対する発症の分布の比較は、ウィルコクソン順位和検定により統計的に有意である(p<0.05)。

^c 対照試料に対する6か月の経過観察の分布の比較は、ウィルコクソン順位和検定により統計的に有意である(p<0.05)。

^d 発症の分布と6か月の経過観察の分布の差の比較は、対応t検定またはウィルコクソン符号順位検定により統計的に有意である(p<0.05)。

〔D I L I対象の免疫性分析物パターン（複数可）の比較解析〕

対照群、D I L I発症群およびD I L I 6か月群において観察された不均一性をより良く理解するためのフレームワーク提供するために、個々のD I L I対象の免疫プロファイルの評価および比較した。これらの免疫プロファイルは、サイトカインの血清レベルに基づいて、および既知の免疫成分を考慮して確立した。個々の免疫性分析物の機能および起源は判定することができるが、サイトカインは、ネットワーク（相乗作用、拮抗作用）において実際に機能する。例えば、免疫プロセスの単純化モデル（図3）では、免疫性刺激（例えば、薬物または他の化学物質に起因する細胞損傷）は、NF- κ Bの核移行、および損傷組織による早期/先天性のサイトカイン産生（IL-1、IL-6、TNF- α ）を引き起こす。この早期の炎症状態が持続する場合、その状態は、細胞性（T-bet依存性/TH1型：IL-12p70、IFN- γ 、IL-2、IL-15；ROR γ t依存性/TH17型：IL-17）または体液性（Gata3依存性/TH2型：IL-4、IL-5、IL-13；IRF4依存性/TH9型：IL-9）応答のいずれかを支持する適応免疫プロセスを活性化する（29、30、33）。通常、免疫応答は、最終的に、抗炎症性プロセス（IL-10、IL-1ra）を引き起こすことによって、それ自体を消散する（32）。

10

【0077】

各免疫性分析物を「正常な」健常対照の値と比較することによって、D I L I対象に対する血清サイトカインプロファイルを判定した。健常対照の平均値より高いまたは低い1SDを超えるサイトカイン測定値を「異常」とみなした。図5に示すように、このアプローチを使用すると、疾患発症時でのD I L I対象間において、4つの異なる免疫プロファイルが明らかになった（n=78）。19人の対象（24.3%）は、1つまたは複数の早期/先天性サイトカインが正常より高い「先天免疫」パターンを示した。21人の患者（26.9%）は、少なくとも1つの適応性サイトカインが正常より高い「適応免疫」免疫パターンを示した。4人の対象は、「混合免疫性D I L I」パターン（早期と先天性の両方のサイトカインが正常より高い）を有しており、8人が「非免疫性D I L I」プロファイル（1以下の異常なサイトカインレベル）を有していた。最終的に、26人の対象（33.3%）は分類されなかった（2以上の異常なサイトカインレベル）。注目すべきことに、「適応免疫」サイトカインプロファイルを有する21人の対象の間で、典型的なTH1およびTH2適応応答はまれであった。図5に示すように、むしろD I L I発症時には、TH17（D I L Iコホート全体の15.4%）およびTH9（D I L Iコホート全体の6.4%）の増大が、この群において優勢であった。

20

30

【0078】

さらに、図5は、D I L I発症に近接して（発症の14日以内）得られた血清中の個々のサイトカイン濃度であって、各患者について記録し、健常の「正常の」平均 \pm SD値と比較した濃度を示す。D I L I発症時での異常な血清サイトカイン濃度は、正常な対照に対する平均のものよりも高い（赤）または低い（青）値であると定義した。発症時のD I L I対象のプロファイルは、パターンの観察された類似性および分析物の生理的役割に関する知識に基づいて定義した。

【0079】

同様の方法体系を使用して、6か月の経過観察試料およびデータが利用可能な32人のD I L I対象を比較すると、図6に示すように、12人（37.5%）が正常または正常な血清サイトカインレベルより低いことを示し、17人（53.1%）のD I L I対象が、適応性サイトカインの正常血清レベルより高いことを示した。32人のコホートの間で、過剰発現した適応性サイトカインは、主としてTH1（6/32）または細胞性/体液性の複合型（6/32）であった。図6に示すように、ほんの数人の対象がTH17（4/32）またはTH9プロファイル（1/32）を示した。

40

【0080】

特に図6は、6か月の経過観察時点でのD I L I対象の血清におけるサイトカインのプロファイルを示す。6か月の経過観察の血清における個々のサイトカイン濃度を各患者に

50

ついて記録し、健常の「正常の」平均±SD値と比較した。6か月の経過観察時点での異常な血清サイトカイン濃度は、正常な対照に対する平均のものよりも高い（赤）または低い（青）測定SDであると定義した。6か月の経過観察時点でのDILI対象のプロファイルは、パターンの観察された類似性および分析物の生理的役割に関する知識に基づいて定義した。

【0081】

[サイトカインプロファイリングの方法体系の検証]

DILI発症のコホートにおける先天性対適応性サイトカイン群の精度を試験するために、したがって、本発明者らのサイトカインプロファイリングの方法体系の妥当性を試験するために、個々のケモカインの発現プロファイルを解析した。3つのNF B依存性(MIP1、MIP1、MCP-1)(35、36)および1つのIRF3依存性(IP10)ケモカイン(37)についてヒートマップを作成し、上記のサイトカインプロファイルと比較した。

10

【0082】

既に述べたように、図7に示すように、健常対照の平均値より高いまたは低い1SDを超えるケモカイン測定値を「異常」とみなした。19人の「先天免疫」患者の間で、14人(73.6%)は、正常より高い1つまたは複数のNF B依存性ケモカインも示し、一方4人(21%)のみが異常に上昇したIP10の発現を有していた。21人の「適応免疫」患者を用いて同じ比較を実施すると、図7に示すように、5人(23.8%)のみが1つまたは複数の正常より高いNF B依存性ケモカインを有していたが、すべてが正常より高い先天性サイトカイン発現も示した。最終的に、5/26(19.2%)の未分類のDILI患者が、過免疫のDILI患者で観察されたものと類似している、正常より高いMIP1、MIP1またはMCP-1の発現を示した。

20

【0083】

特に、図7は、DILI発症時でのDILI対象の血清におけるケモカインのプロファイルを示す。血清中の個々のケモカイン濃度をDILI発症時での各患者について記録し、健常の「正常の」平均±SD値と比較した。発症時の異常な血清ケモカイン濃度は、正常な健常対照に対する平均のものよりも高い（赤）または低い（青）測定値であると定義した。3つのNF B依存性(MIP1、MIP1、MCP-1)および1つのIRF3依存性(IP10)ケモカインの発現を、以前に確立されたサイトカインプロファイルと比較した。

30

【0084】

[DILIの免疫性分析物および臨床的特徴]

臨床的特徴とサイトカインレベルの間の相関を調査した。いくつかのサイトカイン、ケモカインおよび増殖因子は、高ビリルビン血症(血清総ビリルビン>1.2mg/dL)および自己報告された黄疸と有意に関係があることが分かった。以下の表5を参照されたい。予想通り、高ビリルビン血症と自己報告された黄疸の間に有意な関連があった(自己報告された黄疸に対する血清総ビリルビンの中央値=8.7mg/dL、黄疸を報告していない対象に対する中央値=0.9mg/dL、 $p < .001$)。高ビリルビン血症または自己報告された黄疸を有するものは、他のDILI対象のものとは有意差がない平均血清ALTおよびASTレベルを有していた。ほぼすべての免疫性分析物に対する中央値は、高ビリルビン血症または自己報告された黄疸を有する対象に関して、それらを有さないものと比較して高かった。次の臨床的特徴および測定したサイトカインのいずれかについて、有意な関連がないことが明らかであった。性別、年齢、DILIのパターン、DILIの重症度、発症時の血清ALT、最大の血清ALT、発症時の血清AP、最大の血清AP、R値(すなわち、 $[\text{血清ALT}/\text{ULN ALT}] \div [\text{血清AP}/\text{ULN AP}]$)、BMI、好酸球絶対数値、感染症歴、精神疾患歴、心疾患歴、全身系動脈高血圧歴、腎疾患歴、肺疾患歴、胃腸疾患歴、悪性疾患歴(データ非表示)。さらに、免疫性分析物の濃度またはプロファイルと原因となる薬物(抗感染剤、抗癌剤、抗高血圧剤、脂質低下剤、免疫抑制剤および抗癌化学療法剤)の主な治療クラスの間には有意な関連はなかった。

40

50

【 0 0 8 5 】

【 表 5 】

	血清総ビリルビン>1.2 mg/dL			血清総ビリルビン0~1.2 mg/dL			p値*
	中央	最少	最大	中央	最少	最大	
IL-1β	1.0	0.0	48.2	0.6	0.0	2.5	0.035
IL-1ra	145.6	29.1	719.6	81.6	4.7	1406	0.007
IL-5	3.1	0.5	68.4	2.1	0.0	6.5	0.0156
IL-7	8.0	1.4	165.0	3.7	0.0	13.8	0.0131
IL-8	82.7	15.6	4636	42.7	7.4	463.1	0.0043
IP-10	2163.6	222.6	48050	835.2	71.9	39266	0.0124
MIP-1α	3.6	0.0	80.1	1.4	0.0	12.0	0.0184
MIP-1β	99.5	19.3	473.8	54.7	15.6	158.4	0.0011
PDGF-bb	4819	65.3	28757	1772.5	130.9	15951	0.0101

表5:血清総ビリルビンの上昇と有意に関係がある、DILI発症時での免疫性分析物の血清レベル

すべての結果はpg/mLである。

* 分布の比較は、ウィルコクソン順位和検定により統計的に有意である(p<0.05)。

10

20

【 0 0 8 6 】

[免疫性分析物およびDILIの転帰]

免疫性分析物プロファイルならびにベースラインでの血清アルブミンおよび総ビリルビンの臨床検査の結果を、DILI発症の6か月以内の早期死亡を予測するパターンについて検討した。モデリングプロセスによって、予測に使用するための以下の5つの変数が選択された：4つの免疫性アナリスト（IL-9、IL-17、PDGF-bbおよびRANTES）ならびに血清アルブミン。表6に示すように、単変量解析に基づいて、モデリングプロセスのステップ1によって、7つのサイトカイン（TNF、IL-12、IL-17、IL-4、IL-5、IL-13、IL-9）、2つのケモカイン（MIP-1、Rantes）、2つの増殖因子（FGFb、PDGF-bb）およびアルブミンが、DILI発症の6か月以内での死亡と有意に（0.01のレベルで）関係があることが示された。4つのサイトカイン（TNF、IL-12、IL-4、IL-5）および1つの増殖因子（FGFb）は、（P値に基づいて）最も高くランクづけされたサイトカインIL-17および最も高くランクづけされた増殖因子PDGF-bbとそれらが有意に相関するので、ステップ2で除外した。サイトカインIL-13は、サイトカインの発現プロファイルのヒートマップに基づいて十分にモジュレートされない（例えば、表5を参照されたい）、ステップ3で除外した。ケモカインMIP-1は、増殖因子PDGF-bbと有意に相関するので、最終ステップで除外した。

30

【 0 0 8 7 】

40

【表 6】

	死亡[n = 10]			生存[n = 68]			p値*
	中央	最少	最大	中央	最少	最大	
サイトカイン							
TNFα	0.5	0.0	30.9	20.1	0.0	326.5	0.001
IL-12	3.1	0.0	27.4	16.7	0.0	2185.6	<0.001
IL-17	8.6	0.0	156.7	47.4	0.0	139.1	<0.001
IL-4	2.3	0.0	5.8	5.8	0.5	12.7	<0.001
IL-5	1.1	0.0	4.9	3.0	0.0	68.4	0.006
IL-13	0.7	0.0	4.0	2.8	0.0	130.1	<0.001
IL-9	6.7	0.0	17.1	15.5	0.0	2194.2	0.003
ケモカイン							
MIP-1β	55.1	19.3	133.1	92.4	15.6	473.8	0.006
RANTES	1412.8	190.0	2301.2	2740.6.8	761.4	65180	<0.001
増殖因子							
FGFb	0.0	0.0	15.7	13.5	0.0	67.9	0.003
PDGF-bb	487.0	65.3	7313.1	4719.4	130.9	28757	<0.001
臨床検査							
アルブミン	2.3	1.8	2.8	3.1	1.8	4.9	0.001

表6:DILI発症の6か月以内の死亡と有意に関係がある、DILI発症時での免疫性分析物の血清レベル

分析物の結果はpg/mLである。

* 分布の比較は、ウィルコクソン順位和検定により統計的に有意である(p \leq 0.01)。

【 0 0 8 8 】

低い免疫性分析物値および低い血清アルブミン値は、IL-9について0.79(0.65、0.93)、IL-17について0.86(0.67、1.0)、PDGF-BBについて0.84(0.68、1.0)、Rantesについて0.90(0.81-0.98)、および血清アルブミンについて0.83(0.73、0.94)の推定AUC(95%CI)を伴って早期死亡を予測した。ロジスティック回帰モデルに基づくこれらの変数の線形結合のAUC(95%CI)は、0.98(0.95、1.0)であった。免疫性分析物の値が非常に歪められたので、バイナリー変数を作成して、これらの変数を組み合わせ、これらの変数からの情報をまとめた。4つの免疫性分析物の観察された中央値および(クラスC肝疾患を有する対象を特定するために、Child-Turcotte-Pughスコアリングシステムで使用された)アルブミンに対する2.8g/dLという既知のカットポイントを使用して、連続変数をバイナリー変数に二分した。表7に示すように、2.8g/dLを超える血清アルブミンのベースライン値を有するDILIコホートの対象はすべて100%のNPVを伴って生存したが、DILI発症の6か月以内に死亡したものはすべて100%の感度を有するこのカットオフ以下の値であった。4つの免疫性分析物の値がすべて観察された中央値以下であった場合、最終的な4つの免疫性分析物(IL-9、IL-17、PDGF-bbおよびRANTES)に基づくバイナリー変数は、推定されたPPV、NPVならびにそれぞれ67%、97%および92%の精度を有していた。4つのバイナリー免疫性分析物とバイナリー血清アルブミンの組み合わせは、急性DILIで死亡するものまたは少なくとも6か月間生存する(および通常は完全に回復する)ものの最適な識別を提供した。このベンチマークを使用して、IL-9 > 13.6、IL-17 > 45.2、PDGF-bb > 4207、RANTES > 2529

30

40

50

またはアルブミン $> 2.8 \text{ g/dL}$ を有する 69 人の対象のうち 67 人 (97% の NPV) が、6 か月時点で急性 DILI 事象から生存し、一方、 $IL-9 < 13.6$ 、 $IL-17 < 45.2$ 、 $PDGF-bb < 4207$ 、 $RANTES < 2529$ およびアルブミン 2.8 g/dL を有する 8 人の対象のうち 7 人 (88% の PPV) が、DILI 発症の 6 か月以内に死亡した (表 7)。全体的な予測精度は、 $74/77 = 96\%$ (95% CI、92% ~ 100%) である。早期死亡の予測能力について、ベースライン MELD スコアも調査した。表 8 に示すように、MELD スコア (38) はまた、4 つの免疫性分析物とアルブミンの組み合わせたバイナリー変数と同様ではないが、いくらかの精度で予測した。残念ながら、MELD スコアの計算に必要なすべてのデータは、6 か月以内に死亡した 10 人のうちの 6 人を含めた、78 人の研究対象のうち 34 人からしか入手できなかった。欠けていることの多い値は、血清クレアチニンおよび INR であった。

【0089】

【表7】

	急性死 (<6 か月)	6か月で の生存	感度(95 % CI)	特異性(9 5% CI)	陽性的 中率(98 % CI)	陰性的 中率(95 % CI)	精度(95 % CI)
血清アルブミン (N=74)*							
≤ 2.8 g/dL	9	26	100%	60%	26%	100%	65% (54%, 76%)
> 2.8 g/dL	0	39	(N/A)	(48%, 725)	(11%, 40%)	(N/A)	
4つの免疫性分析物 (IL-9, IL_17, PDG F-bb RANTES) (N=78)							
すべての免疫性 分析物が中央値 未満**	8	4					
少なくとも1つが 中央値を超える	2	64	80% (55%, 100%)	94% (89%, 100%)	67% (40%, 675)	97% (93%, 100%)	92% (86%, 98%)
4つの免疫性分析物 (IL-9, IL_17, PDG F-bb RANTES)および血清アルブミン (N=77)***							
中央値未満のす べての免疫性分 析物**およびア ルブミン ≤ 2.8 g/ dL	7	1					
中央値を超える 少なくとも1つの 免疫性分析物ま たはアルブミン $>$ 2.8 g/dL	2	67	78% (51%, 100%)	99% (96%, 100%)	88% (65%, 100%)	97% (93%, 100%)	96% (92%, 100%)

表7:DILI発症の6か月以内の死亡を予測するバイナリー変数

* DILI発症時での血清アルブミン値が欠けているため、4人の対象を除外した。

** IL-9 <13.6 、IL_17 <45.2 、PDGF-bb <4207 、RANTES <2529 であり、数は78人の対象についての観察された中央値である。

*** 血清アルブミンの結果が欠けており、4つの免疫性分析物すべての値が中央値以下であったために、分類を判定することができない1人の対象を除外した。

【表 8】

MELDスコア	n	実際の死亡	予測された死亡
>40	2	0/2 = 0%	71.3%
30-39	5	4/5 = 80%	52.6%
20-29	10	2/10 = 20%	19.6%
10-19	16	0/16 = 0%	6.0%
<10	1	0/1 = 0%	1.9%

表8:実際の死亡対DILI対象に対するベースラインでのMELDスコアを使用した予測(n=34)

10

【0091】

上述した研究は、少なくとも以下の主な発見を提供する。1) 血清免疫性分析物のプロファイルは、急性DILIにおいて変化する、2) そのようなプロファイルを異なるタイプに分類することができる、3) プロファイルは、DILIの潜在的な薬物原因にも、肝細胞性、胆汁うっ滞性または「混合性」であろうとなかろうとDILIのパターンにも、またベースラインまたはその後の時点でのR値にも、特異的ではないまたは相関しない、および、4) 本発明のある種の実施形態によれば、DILI発症時での低い血清アルブミン値および4つの免疫性分析物のみ(IL-17、IL-9、PDGF-bbおよびRANTES)の集計変数は、急性DILI事象の後6か月間生存するものおよび生存しないものを予測する。したがって、そうした本発明による実施形態は、生存するまたは生存しないと思われる対象を急性DILIの経過の初期に予測する能力を有利に提供する。

20

【0092】

DILIの病原を理解することを進めることについては、異なる免疫応答パターンが、有用な新しい洞察を提供するDILI対象のサイトカインプロファイリングの解析から示唆される。DILIは通常、宿主のタンパク質に結合する薬物(または薬物代謝産物)に対する過剰増殖性の免疫応答が原因であることが多いことが明らかになりつつある。例えば、血清アルブミンは、薬物由来ハプテンのよくある「シュレッパー」として関与しており、これらの複合体は、肝臓損傷をもたらす第四の免疫応答と呼ばれている(7、39~41)。肝細胞または胆管細胞に主に向けられるそうした応答は、他の器官および組織、特に皮膚、腎臓または骨髄を攻撃する可能性がある(42)。DILI[自己免疫性様または免疫アレルギー性]の免疫的特徴づけに関する現在のパラダイムは、疾患の臨床病理学的な症状発現、自己抗体の存在(適応免疫)、好酸球(先天免疫)および/または皮膚の発疹に基づく(7、43)。自己免疫性型のDILIは、発症が遅延する傾向があり、再攻撃の際に緩徐に発達する傾向がある(44)。免疫アレルギー性様DILIの徴候である皮膚発疹は、先天免疫または適応免疫の成分によって引き起こされ得る(例えばDRSS症候群、全身性エリテマトーデス)(45、46)。まとめると、プロトタイプの自己免疫性様または免疫アレルギー性のDILIの分類は重複を示し、これは、臨床経験、米国DILINデータベースのデータ、ならびにDILINからの臨床報告[(47~49)およびGhabrilら、Russoら、未発表の知見]と矛盾しない。上記のサイトカインおよびケモカインのプロファイル解析は、DILIにおける先天免疫性成分を強調し(19/78人の対象)、大部分は細胞性である、DILI発症時での異なる適応免疫性成分を示す(21/78人の対象)。興味深いことに、異常な、典型的な、または標準のTH1およびTH2適応性サイトカイン発現は、研究したDILIコホートにおいてまれであったが(4/78人の対象)、過剰増殖性のTH17およびTH9先天免疫応答はより広く認められた(17/78人の対象)。

30

40

【0093】

個々の薬物を研究する最近の研究によって、DILIにおけるTH17経路の大きな貢献に関するエビデンスが提供された(19、50)。本発明者らは、「適応免疫性DIL

50

I」の顕著な特徴となる、IL-17の異常な血清濃度を発見したが、TH17経路がその病状に寄与する機構は、依然として解明されていない。自己反応性のTH17細胞は、多発性硬化症および大腸炎などの慢性の自己免疫性状態と関係づけられており、主として調節不全のTH17経路によって引き起こされる(51、52)。自己反応性に特に重点を置いた、「適応免疫性DILI」におけるTH17細胞のさらなる特徴づけは、IL-17が細胞性自己免疫と関連しているかどうかを明らかにし得る。関節リウマチでは、IL-17が自己抗体産生を促進できることが最近示された(53)。それにもかかわらず、本発明者らはDILI発症時において、異常なTH17産生と自己抗体の存在の間に相関がないことを発見した。慢性の肝臓病状/障害(アルコール性肝疾患、非アルコール性脂肪性肝炎、自己免疫性肝疾患)の多くの例において、TH17成分が特定され(50)、これによって、DILI発症時において正常より高い血清IL-17濃度を示す患者は、長期持続性かつ解決されない肝障害を有する素因がある[または傾向が強い]可能性があることが示唆される。

10

【0094】

主な臨床的ジレンマは、(原因薬物を速やかに中止すると仮定して)急性DILIを有するほどの対象が無事に回復するか、およびどの患者が、薬物中止にもかかわらず肝不全に進行し、6か月以内に死亡するかまたは肝移植を必要とするかを知ることである。本発明のある種の実施形態は、DILIの経過の極初期に対象を分類するための重要な情報を提供する。

20

【0095】

本発明のある種の実施形態によれば、単一のバイナリー予測因子は、疾患経過の初期に、血清アルブミンおよび4つの免疫性分析物(すなわち、IL-9、IL-17、PDGF-bbおよびRANTES)のみの必要とする測定値を比較的使用しやすい。本発明のある種の実施形態によれば、この特定のバイナリー予測因子は、急性DILIによる死亡の予測において高い精度を示す[表6]。免疫性分析物の測定値を解析するのに用いられる根本的に異なる2つの戦略、すなわち、既知の生物学的機能および免疫性分析物の制御に基づく戦略ならびにこれらの研究において観察された結果に基づく統計学的/数学的戦略は、2つの主な発見、1)IL-17(および程度の差はあるがIL-9)は、発症時でのDILIの病状(より正確には「適応免疫性DILI」)に対する重要な要因であること、ならびに2)低IL-17/IL-9血清濃度は、DILIの予後不良と関係がある、または相反的に、「適応免疫性DILI」は、予後良好と関係があること、をもたらしように収束したことは、特に重要である。

30

【0096】

前述の説明および関連する図面に提示された教示の利益を有する、本明細書に示す本発明の多くの改変および他の実施形態を、本発明が関係する当業者なら想到するであろう。したがって、本発明は、開示する特定の実施形態に限定されるものではないこと、ならびに改変および他の実施形態が添付の特許請求の範囲内に含まれることが意図されることを理解されたい。本明細書において特定の用語を用いたが、それらは、一般的かつ説明的意味でのみ使用され、限定のためではない。

【0097】

以下は引用文献(それぞれが、参照により本明細書に組み込まれる)を示す。

40

【表 9 A】

1. Ostapowicz, G., R. J. Fontana, F. V. Schiody, A. Larson, T. J. Davern, S. H. Han, T. M. McCashland, A. O. Shakil, J. E. Hay, L. Hynan, J. S. Crippin, A. T. Blei, G. Samuel, J. Reisch, and W. M. Lee. 2002. Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Ann Intern Med* 137:947-954.
2. Reuben, A., D. G. Koch, and W. M. Lee. 2010. Drug-induced acute liver failure: results of a U.S. multicenter, prospective study. *Hepatology* 52:2065-2076. 10
3. Bjornsson, E. 2010. Review article: drug-induced liver injury in clinical practice. *Aliment Pharmacol Ther* 32:3-13.
4. Navarro, V. J., and J. R. Senior. 2006. Drug-related hepatotoxicity. *N Engl J Med* 354:731-739.
5. Watkins, P. B., and L. B. Seeff. 2006. Drug-induced liver injury: summary of a single topic clinical research conference. *Hepatology* 43:618-631. 20
6. Abboud, G., and N. Kaplowitz. 2007. Drug-induced liver injury. *Drug Saf* 30:277-294.
7. Bonkovsky, H. L., S. I. Shedlofsky, D. P. Jones, and M. Russo. 2012. "Drug-induced liver injury". Chapter 25 in Boyer TD, Manns MP and Sanyal A (Eds), Zakin and Boyer's *Hepatology - a textbook of liver disease*, 6th edition, Saunder-Elsevier, Philadelphia, pp417-461.
8. Chalasani, N., and E. Bjornsson. 2010. Risk factors for idiosyncratic drug-induced liver injury. *Gastroenterology* 138:2246-2259. 30
9. Au, J. S., V. J. Navarro, and S. Rossi. 2011. Review article: Drug-induced liver injury--its pathophysiology and evolving diagnostic tools. *Aliment Pharmacol Ther* 34:11-20.
10. Chalasani, N., R. J. Fontana, H. L. Bonkovsky, P. B. Watkins, T. Davern, J. Serrano, H. Yang, and J. Rochon. 2008. Causes, clinical features, and outcomes from a prospective study of drug-induced liver injury in the United States. *Gastroenterology* 135:1924-1934, 1934 e1921-1924. 40
11. Wai, C. T., B. H. Tan, C. L. Chan, D. S. Sutedja, Y. M. Lee, C. Khor, and S. G. Lim. 2007. Drug-induced liver injury at an Asian center: a prospective study. *Liver Int* 27:465-474.
12. Zimmerman, H. J. 1999. *Hepatotoxicity: the adverse effects of drugs and other chemicals on the liver*. 2nd edition, Lippincott Williams & Wilkins.

【表 9 B】

13. Sgro, C., F. Clinard, K. Ouazir, H. Chanay, C. Allard, C. Guilleminet, C. Lenoir, A. Lemoine, and P. Hillon. 2002. Incidence of drug-induced hepatic injuries: a French population-based study. *Hepatology* 36:451-455.
14. Shi, Q., H. Hong, J. Senior, and W. Tong. 2010. Biomarkers for drug-induced liver injury. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 4:225-234.
15. Takayama, H., Y. Miyake, K. Nouse, F. Ikeda, H. Shiraha, A. Takaki, H. Kobashi, and K. Yamamoto. 2011. Serum levels of platelet-derived growth factor-BB and vascular endothelial growth factor as prognostic factors for patients with fulminant hepatic failure. *J Gastroenterol Hepatol* 26:116-121. 10
16. Pachkoria, K., M. I. Lucena, E. Crespo, F. Ruiz-Cabello, S. Lopez-Ortega, M. A. Fernandez, M. Romero-Gomez, A. Madrazo, J. A. Duran, A. M. de Dios, Y. Borraz, J. M. Navarro, and R. J. Andrade. 2008. Analysis of IL-10, IL-4 and TNF-alpha polymorphisms in drug-induced liver injury (DILI) and its outcome. *J Hepatol* 49:107-114. 20
17. Laverty, H. G., D. J. Antoine, C. Benson, M. Chaponda, D. Williams, and B. Kevin Park. 2010. The potential of cytokines as safety biomarkers for drug-induced liver injury. *Eur J Clin Pharmacol* 66:961-976.
18. Aithal, G. P., L. Ramsay, A. K. Daly, N. Sonchit, J. B. Leathart, G. Alexander, J. G. Kenna, J. Caldwell, and C. P. Day. 2004. Hepatic adducts, circulating antibodies, and cytokine polymorphisms in patients with diclofenac hepatotoxicity. *Hepatology* 39:1430-1440. 30
19. Li, J., X. Zhu, F. Liu, P. Cai, C. Sanders, W. M. Lee, and J. Uetrecht. 2010. Cytokine and autoantibody patterns in acute liver failure. *J Immunotoxicol* 7:157-164.
20. Feng, D., Y. Wang, Y. Xu, Q. Luo, B. Lan, and L. Xu. 2009. Interleukin 10 deficiency exacerbates halothane induced liver injury by increasing interleukin 8 expression and neutrophil infiltration. *Biochem Pharmacol* 77:277-284.
21. Kobayashi, M., S. Higuchi, K. Mizuno, K. Tsuneyama, T. Fukami, M. Nakajima, and T. Yokoi. 2010. Interleukin-17 is involved in alpha-naphthylisothiocyanate-induced liver injury in mice. *Toxicology* 275:50-57. 40
22. Higuchi, S., M. Kobayashi, Y. Yoshikawa, K. Tsuneyama, T. Fukami, M. Nakajima, and T. Yokoi. 2011. IL-4 mediates dicloxacillin-induced liver injury in mice. *Toxicol Lett* 200:139-145.

【表 9 C】

23. Kobayashi, E., M. Kobayashi, K. Tsuneyama, T. Fukami, M. Nakajima, and T. Yokoi. 2009. Halothane-induced liver injury is mediated by interleukin-17 in mice. *Toxicol Sci* 111:302-310.
24. Higuchi, S., M. Kobayashi, A. Yano, K. Tsuneyama, T. Fukami, M. Nakajima, and T. Yokoi. 2011. Involvement of Th2 cytokines in the mouse model of flutamide-induced acute liver injury. *J Appl Toxicol*. 10
25. Fontana, R. J., P. B. Watkins, H. L. Bonkovsky, N. Chalasani, T. Davern, J. Serrano, and J. Rochon. 2009. Drug-Induced Liver Injury Network (DILIN) prospective study: rationale, design and conduct. *Drug Saf* 32:55-68.
26. Rockey, D. C., L. B. Seeff, J. Rochon, J. Freston, N. Chalasani, M. Bonacini, R. J. Fontana, and P. H. Hayashi. 2010. Causality assessment in drug-induced liver injury using a structured expert opinion process: comparison to the Roussel-Uclaf causality assessment method. *Hepatology* 51:2117-2126. 20
27. Bell, L. N., R. Vuppalanchi, P. B. Watkins, H. L. Bonkovsky, J. Serrano, R. J. Fontana, M. Wang, J. Rochon, and N. Chalasani. 2012. Serum proteomic profiling in patients with drug-induced liver injury. *Aliment Pharmacol Ther* 35:600-612.
28. Steuerwald, N., J. Parsons, H. J. Norton, D. Saha, L. P. Chalasani, L. N. Bell, R. J. Fontana, P. B. Watkins, J. Serrano, and H. L. Bonkovsky. 2011. Chemokine/cytokine profiles in patients with acute DILI: results from the US Drug-Induced Liver Injury Network. *Hepatology* 54:Abstract 359. 30
29. Egwuagu, C. E. 2009. STAT3 in CD4+ T helper cell differentiation and inflammatory diseases. *Cytokine* 47:149-156.
30. Jutel, M., and C. A. Akdis. 2011. T-cell subset regulation in atopy. *Curr Allergy Asthma Rep* 11:139-145.
31. Maeda, S., L. C. Hsu, H. Liu, L. A. Bankston, M. Iimura, M. F. Kagnoff, L. Eckmann, and M. Karin. 2005. Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. *Science* 307:734-738. 40
32. Mandal, P., M. T. Pritchard, and L. E. Nagy. 2010. Anti-inflammatory pathways and alcoholic liver disease: role of an adiponectin/interleukin-10/heme oxygenase-1 pathway. *World J Gastroenterol* 16:1330-1336.
33. Mumm, J. B., and M. Oft. 2010. Subversion and coercion: the art of redirecting tumor immune surveillance. *Curr Top Microbiol Immunol* 344:25-39.

【表 9 D】

34. Peduzzi, P., J. Concato, E. Kemper, T. R. Holford, and A. R. Feinstein. 1996. A simulation study of the number of events per variable in logistic regression analysis. *J Clin Epidemiol* 49:1373-1379.
35. Ciesielski, C. J., E. Andreakos, B. M. Foxwell, and M. Feldmann. 2002. TNFalpha-induced macrophage chemokine secretion is more dependent on NF-kappaB expression than lipopolysaccharides-induced macrophage chemokine secretion. *Eur J Immunol* 32:2037-2045. 10
36. Jaruga, B., F. Hong, W. H. Kim, R. Sun, S. Fan, and B. Gao. 2004. Chronic alcohol consumption accelerates liver injury in T cell-mediated hepatitis: alcohol dysregulation of NF-kappaB and STAT3 signaling pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287:G471-479.
37. Taima, K., T. Imaizumi, K. Yamashita, A. Ishikawa, T. Fujita, H. Yoshida, S. Takanashi, K. Okumura, and K. Satoh. 2006. Expression of IP-10/CXCL10 is upregulated by double-stranded RNA in BEAS-2B bronchial epithelial cells. *Respiration* 73:360-364. 20
38. Wiesner, R., E. Edwards, R. Freeman, A. Harper, R. Kim, P. Kamath, W. Kremers, J. Lake, T. Howard, R. M. Merion, R. A. Wolfe, and R. Krom. 2003. Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. *Gastroenterology* 124:91-96.
39. Callan, H. E., R. E. Jenkins, J. L. Maggs, S. N. Lavergne, S. E. Clarke, D. J. Naisbitt, and B. K. Park. 2009. Multiple adduction reactions of nitroso sulfamethoxazole with cysteinyl residues of peptides and proteins: implications for hapten formation. *Chem Res Toxicol* 22:937-948. 30
40. Meng, X., R. E. Jenkins, N. G. Berry, J. L. Maggs, J. Farrell, C. S. Lane, A. V. Stachulski, N. S. French, D. J. Naisbitt, M. Pirmohamed, and B. K. Park. 2011. Direct evidence for the formation of diastereoisomeric benzylpenicilloyl haptens from benzylpenicillin and benzylpenicillenic acid in patients. *J Pharmacol Exp Ther* 338:841-849.
41. Whitaker, P., X. Meng, S. N. Lavergne, S. El-Ghaiesh, M. Monshi, C. Earnshaw, D. Peckham, J. Gooi, S. Conway, M. Pirmohamed, R. E. Jenkins, D. J. Naisbitt, and B. K. Park. 2011. Mass spectrometric characterization of circulating and functional antigens derived from piperacillin in patients with cystic fibrosis. *J Immunol* 187:200-211. 40
42. Bonkovsky, H. L., and J. Brisbane. 1976. Colitis and hepatitis caused by methyl dopa. *JAMA* 236:1602-1603.

【表 9 E】

43. Tujios, S., and R. J. Fontana. 2011. Mechanisms of drug-induced liver injury: from bedside to bench. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 8:202-211.
- Steuerwald et al Serum immune analytes in DILI 09-14-2012
44. Uetrecht, J. 2009. Immunoallergic drug-induced liver injury in humans. *Semin Liver Dis* 29:383-392.
45. Nakashima, H., M. Akahoshi, and K. Masutani. 2006. Th1/Th2 balance of SLE patients with lupus nephritis. *Rinsho Byori* 54:706-713. 10
46. Cacoub, P., P. Musette, V. Descamps, O. Meyer, C. Speirs, L. Finzi, and J. C. Roujeau. 2011. The DRESS syndrome: a literature review. *Am J Med* 124:588-597.
47. Chalasani, N., R. Vuppalanchi, V. J. Navarro, R. J. Fontana, H. L. Bonkovsky, H. Barnhart, D. Kleiner, and J. H. Hoofnagle. 2012. Acute liver injury due to flavocoxid (Limbrel®), a medical food for osteoarthritis: a case series. *Ann Intern Med* In press. 20
48. Orman, E. S., H. S. Conjeevaram, R. Vuppalanchi, J. W. Freston, J. Rochon, D. E. Kleiner, and P. H. Hayashi. 2011. Clinical and histopathologic features of fluoroquinolone-induced liver injury. *Clin Gastroenterol Hepatol* 9:517-523 e513. 20
49. Vuppalanchi, R., P. H. Hayashi, N. Chalasani, R. J. Fontana, H. Bonkovsky, R. Saxena, D. Kleiner, and J. H. Hoofnagle. 2010. Duloxetine hepatotoxicity: a case-series from the drug-induced liver injury network. *Aliment Pharmacol Ther* 32:1174-1183.
50. Hammerich, L., F. Heymann, and F. Tacke. 2011. Role of IL-17 and Th17 cells in liver diseases. *Clin Dev Immunol* 2011:345803. 30
51. Aranami, T., and T. Yamamura. 2008. Th17 Cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS). *Allergol Int* 57:115-120.
52. Seiderer, J., I. Elben, J. Diegelmann, J. Glas, J. Stallhofer, C. Tillack, S. Pfennig, M. Jurgens, S. Schmechel, A. Konrad, B. Goke, T. Ochsenkuhn, B. Muller-Myhsok, P. Lohse, and S. Brand. 2008. Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn's disease and analysis of the IL17F p.His161Arg polymorphism in IBD. *Inflamm Bowel Dis* 14:437-445. 40
53. Hickman-Brecks, C. L., J. L. Racz, D. M. Meyer, T. P. LaBranche, and P. M. Allen. 2010. Th17 cells can provide B cell help in autoantibody induced arthritis. *J Autoimmun* 36:65-75.

【 図 1 】

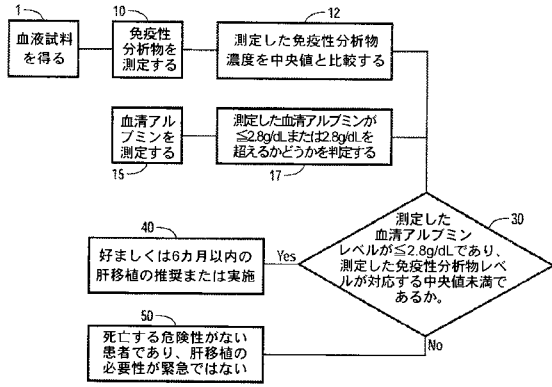


図 1

【 図 2 】

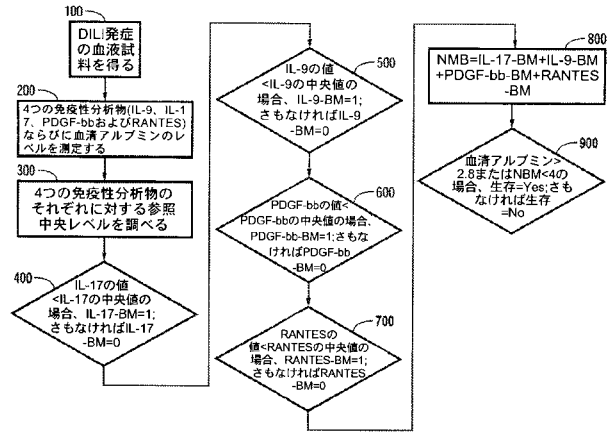


図 2

【 図 3 】

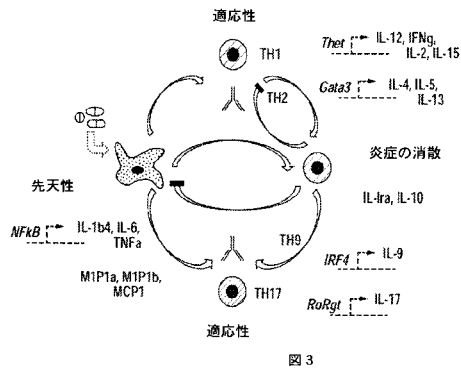


図 3

【 図 4 】

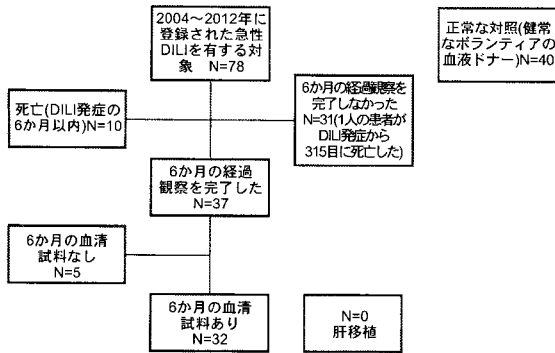


図 4

【 図 5 - 1 】

健康ドナーの平均値 STDEV	先天性炎症				細胞性炎症				体液性炎症				炎症の消滅			
	IL-1b	IL-6	TNFA	IL-17	IL-1b	IL-2	IFNg	IL-15	IL-4	IL-5	IL-13	IL-9	IL-10	IL-17	IL-10	IL-17
3.97	258.40	101.75	2185.59	218.69	10.25	0.00	17.55	12.68	68.37	30.11	16.68	1008.44	203.84	17.36	150.45	47.36
0.75	603.20	289.74	324.94	87.94	660.69	2.91	90.45	57.72	2.61	10.90	43.18	41.67	12.87	47.36	152.74	12.87
11.32	26.63	175.54	387.4	77.25	6.13	2.77	39.33	4.13	12.88	41.67	12.87	47.36	152.74	44.04	72.60	44.04
0.45	177.05	34.35	136.84	37.79	23.05	8.06	46.05	4.86	19.98	20.40	8.46	44.04	72.60	44.04	72.60	44.04

健康ドナーの平均値 STDEV	先天性炎症				細胞性炎症				体液性炎症				炎症の消滅			
	IL-1b	IL-6	TNFA	IL-17	IL-1b	IL-2	IFNg	IL-15	IL-4	IL-5	IL-13	IL-9	IL-10	IL-17	IL-10	IL-17
3.97	258.40	101.75	2185.59	218.69	10.25	0.00	17.55	12.68	68.37	30.11	16.68	1008.44	203.84	17.36	150.45	47.36
0.75	603.20	289.74	324.94	87.94	660.69	2.91	90.45	57.72	2.61	10.90	43.18	41.67	12.87	47.36	152.74	12.87
11.32	26.63	175.54	387.4	77.25	6.13	2.77	39.33	4.13	12.88	41.67	12.87	47.36	152.74	44.04	72.60	44.04
0.45	177.05	34.35	136.84	37.79	23.05	8.06	46.05	4.86	19.98	20.40	8.46	44.04	72.60	44.04	72.60	44.04

図 5

【 図 5 - 2 】

「先天免疫」

N=19	先天性炎症			細胞性炎症			体液性炎症			炎症の消滅			
	IL-1b	IL-6	TNFa	L-12p70	IFNγ	IL-2	IL-15	IL-17	IL-4	IL-5	IL-13	IL-9	IL-10
DP026116	2.20	17.33	71.68	20.33	80.41	15.68	17.18	77.48	8.31	3.53	2.82	13.20	7.43
DP052684	2.78	97.03	0.00	15.66	51.58	2.39	15.15	7.93	1.25	0.77	1.75	13.07	24.93
DP069111	2.41	19.35	51.91	54.77	96.01	20.95	15.02	52.94	7.11	6.46	9.64	36.90	9.58
DP118185	2.38	37.74	30.88	27.37	80.01	1.78	0.00	24.47	5.71	4.91	4.01	17.11	2.41
DP040322	2.46	46.23	19.54	21.51	60.12	3.76	3.87	37.60	4.62	2.55	3.04	16.03	8.66
DP037819	2.95	17.95	38.08	5.82	18.38	0.00	0.00	72.17	3.83	0.82	1.11	8.63	0.00
DP039103	2.70	22.08	41.90	36.22	47.01	14.46	8.91	49.74	4.73	7.15	7.66	17.65	33.18
DP063334	48.28	48.18	31.97	11.92	75.78	9.54	1.53	47.35	6.21	3.82	5.35	15.57	16.95
DP077582	0.95	19.35	70.88	17.21	42.78	13.88	27.6	38.67	5.28	2.38	2.06	15.51	9.78
DP016163	0.00	11.34	3.02	7.56	18.09	0.00	0.00	40.04	5.38	0.71	0.45	12.98	4.69
DP036428	0.00	11.34	0.00	1.38	0.00	0.00	0.33	37.00	7.00	0.74	0.70	0.00	1.69
DP016272	0.44	38.49	1.33	3.47	15.66	0.00	0.00	3.13	3.30	0.53	0.60	0.60	0.26
DP062114	0.26	20.52	12.61	22.04	50.71	0.00	0.00	32.01	10.26	2.16	1.43	12.98	0.26
DP012313	1.45	21.90	25.67	5.34	24.42	0.00	0.00	0.00	11.56	7.26	2.84	17.77	10.96
DP056532	0.69	310.38	10.36	5.34	24.42	0.00	0.00	0.00	4.86	3.38	1.50	2.63	2.57
DP079983	0.93	16.32	15.92	19.76	39.73	2.15	0.00	28.09	4.63	2.68	1.51	10.02	0.83
DP098832	2.05	890.37	17.59	15.34	70.79	0.00	0.00	18.39	5.42	2.99	1.84	11.02	12.66
DP059540	1.26	16.42	16.07	19.58	50.13	3.99	3.72	44.31	6.45	3.37	2.84	17.48	5.34

図 5 (続き)

【 図 5 - 4 】

「正常な免疫」

N=8	先天性炎症			細胞性炎症			体液性炎症			炎症の消滅			
	IL-1b	IL-6	TNFa	L-12p70	IFNγ	IL-2	IL-15	IL-17	IL-4	IL-5	IL-13	IL-9	IL-10
DP054617	0.79	9.70	7.32	9.59	38.32	0.80	2.50	62.49	8.67	2.34	3.24	9.65	3.18
DP037605	1.35	8.90	46.60	28.49	67.35	6.97	0.00	55.77	11.20	3.79	2.26	23.36	5.49
DP038461	1.04	7.34	10.31	10.12	47.20	3.99	0.00	46.73	8.54	3.12	2.70	20.25	8.11
DP011671	1.40	9.62	32.61	29.25	82.43	2.69	3.87	28.77	6.94	3.73	4.21	17.27	12.90
DP038683	0.53	3.02	8.96	9.50	34.07	0.00	2.16	40.00	9.74	1.64	2.34	4.15	2.22
DP047128	0.80	3.45	18.09	16.29	41.48	1.07	4.91	39.61	10.61	2.99	2.17	2.80	4.27
DP040279	1.07	11.03	26.59	19.09	42.01	2.30	4.80	79.89	4.58	5.24	3.87	10.23	14.93
DP022562	1.33	5.73	36.57	18.39	64.51	7.40	10.71	51.94	6.76	5.96	12.57	34.48	8.38

図 5 (続き)

【 図 5 - 3 】

「適応免疫」

N=21	先天性炎症			細胞性炎症			体液性炎症			炎症の消滅			
	IL-1b	IL-6	TNFa	L-12p70	IFNγ	IL-2	IL-15	IL-17	IL-4	IL-5	IL-13	IL-9	IL-10
DP009746	12.01	79.44	326.50	2.81	152.60	11.40	2.94	56.55	5.00	1.25	1.29	11.90	0.00
DP009218	2.27	18.76	96.86	30.66	285.08	11.28	6.59	44.25	7.37	5.86	4.77	23.80	6.49
DP024939	2.63	14.03	70.37	37.13	11.00	16.67	28.87	34.43	7.47	3.44	8.73	0.17	14.80
DP038986	3.22	18.02	120.91	35.93	91.00	12.32	11.34	122.26	11.27	9.64	13.47	33.35	11.05
DP006535	4.74	33.88	31.71	47.34	51.78	5.08	3.77	84.97	8.75	7.49	5.50	33.28	5.12
DP007606	1.82	11.64	33.11	15.47	25.82	3.41	0.00	80.77	37.74	9.34	3.90	12.98	9.40
DP007927	0.91	14.30	20.69	14.74	30.20	6.13	0.00	49.13	4.85	3.08	1.20	17.29	4.26
DP051515	1.72	10.97	44.54	44.79	38.32	25.27	13.26	114.68	5.83	5.03	19.33	9.65	3.65
DP010600	0.61	5.79	23.42	8.61	30.74	5.08	6.79	188.74	7.77	2.25	1.66	14.29	2.83
DP013276	2.07	11.56	34.73	58.44	20.31	15.39	16.72	138.08	3.94	7.13	2.62	7.80	13.83
DP073552	1.50	8.62	36.57	35.04	47.94	7.33	8.00	83.06	6.47	5.62	4.28	20.91	4.91
DP042205	0.37	5.18	15.51	6.18	53.52	2.03	5.54	88.91	6.32	1.72	6.29	37.77	3.45
DP039316	1.09	4.86	4.39	12.83	51.58	3.45	16.22	86.16	7.94	1.70	2.70	17.01	11.95
DP008033	0.63	4.40	11.73	12.18	56.59	0.00	0.00	81.40	8.38	1.80	2.92	17.63	2.26
DP005511	1.55	7.56	37.76	54.23	75.14	5.26	0.00	189.31	7.16	7.31	7.35	37.21	1.97
DP038450	3.42	28.17	116.57	35.93	45.73	14.12	12.38	40.33	5.53	13.34	7.57	24.39	18.78
DP008354	3.20	16.25	38.88	31.96	65.94	23.82	9.97	50.39	6.60	4.41	3.58	44.43	5.63
DP017770	0.74	33.68	8.20	10.92	37.80	5.26	0.00	42.75	7.61	0.53	1.48	30.26	0.00
DP006144	0.68	20.59	23.61	14.90	48.67	4.54	21.97	47.44	7.53	2.96	1.75	115.87	13.30
DP004716	0.13	6.70	3.37	17.25	28.73	0.00	0.76	29.06	3.82	1.28	1.97	316.98	1.33
DP037177	1.28	9.08	46.60	22.00	50.13	7.63	1.71	23.96	5.78	7.63	3.27	113.63	4.20

図 5 (続き)

【 図 6 - 1 】

DIL発症時に「混合免疫」

継着ドナーの平均値	先天性炎症			細胞性炎症			体液性炎症			炎症の消滅			
	IL-1b	IL-6	TNFa	L-12p70	IFNγ	IL-2	IL-15	IL-17	IL-4	IL-5	IL-13	IL-9	IL-10
SD	0.08	7.38	24.28	51.24	58.47	23.64	15.50	22.43	2.66	5.23	15.35	15.57	52.20

DIL発症時に「先天免疫」

DIL発症時に「先天免疫」	先天性炎症			細胞性炎症			体液性炎症			炎症の消滅			
	IL-1b	IL-6	TNFa	L-12p70	IFNγ	IL-2	IL-15	IL-17	IL-4	IL-5	IL-13	IL-9	IL-10
DP098222	13.34	43.36	288.37	638.23	626.47	0.00	0.00	0.00	8.57	89.12	95.73	10.94	393.32
DP009452	18.83	24.81	143.58	56.36	82.65	6.72	5.54	67.49	5.12	15.76	28.23	6.37	22.64

DIL発症時に「正常な免疫」

DIL発症時に「正常な免疫」	先天性炎症			細胞性炎症			体液性炎症			炎症の消滅			
	IL-1b	IL-6	TNFa	L-12p70	IFNγ	IL-2	IL-15	IL-17	IL-4	IL-5	IL-13	IL-9	IL-10
DP026142	1.43	9.25	56.53	10.47	98.47	4.89	1.71	57.55	9.34	2.29	1.68	18.86	3.26
DP040948	0.21	1.99	2.66	6.09	26.58	0.00	1.98	66.31	6.73	1.72	2.27	11.38	0.56
DP037845	3.48	18.11	27.34	56.73	96.47	25.38	19.73	113.00	7.03	10.48	8.74	24.48	12.31
DP053360	0.48	36.73	16.09	12.40	11.22	93.18	1.50	76.68	1.87	1.37	1.77	0.00	1.15
DP077622	1.72	36.63	42.19	20.81	72.24	33.16	0.66	45.40	7.67	3.73	2.97	18.81	0.40
DP006240	0.00	1.82	0.00	6.52	31.83	0.00	0.00	64.36	9.15	0.53	0.52	6.79	0.00
DP030022	5.83	20.67	101.10	117.89	183.17	0.00	0.00	73.12	6.75	13.56	11.12	12.33	21.92

図 6

【 6 - 2 】

DLIL発症時に「通病免疫」

DLIL発症時	先天性免疫					細胞性免疫					体液性免疫					炎症の消滅	
	IL-1b	IL-6	TNF α	IL-2/70	IFN γ	IL-2	IFN γ	IL-2	IFN γ	IL-2	IFN γ	IL-4	IL-5	IL-13	IL-9	IL-10	IL-1 α
DP006561	1.45	7.65	27.55	20.19	21.42	2.26	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DP007631	2.88	7.98	32.64	18.82	25.27	3.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DP001541	0.97	4.76	14.00	13.59	26.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DP002225	0.20	1.47	5.43	7.72	54.48	3.18	2.58	1.09	2.4	1.1	1.03	1.92	2.28	11.92	2.27	18.16	12.0
DP017796	0.22	4.17	4.73	81.81	11.37	5.78	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DP005170	0.92	5.70	16.06	17.25	44.11	1.89	4.44	28.63	5.00	3.25	4.14	14.75	1.20	150.45	12.77	524.35	12.77
DP004742	2.11	11.11	59.23	46.23	188.16	7.92	15.2	39.25	9.15	33.89	14.73	795.68	14.73	795.68	12.77	524.35	12.77

図6 (続き)

【 6 - 3 】

DLIL発症時に「正常な免疫」

DLIL発症時	先天性免疫					細胞性免疫					体液性免疫					炎症の消滅	
	IL-1b	IL-6	TNF α	IL-2/70	IFN γ	IL-2	IFN γ	IL-2	IFN γ	IL-2	IFN γ	IL-4	IL-5	IL-13	IL-9	IL-10	IL-1 α
DP004314	0.32	2.66	15.51	9.03	26.58	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DP004218	0.94	6.15	25.48	13.33	36.80	4.27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DP003492	0.91	3.04	10.19	13.13	28.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DP006677	0.10	0.07	0.47	4.29	20.32	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DP007902	8.73	22.30	93.04	131.46	208.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DP004652	0.91	2.24	8.14	24.15	6.69	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DP007842	1.46	4.21	21.52	22.17	58.27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DP009102	8.76	11.17	52.84	63.19	226.51	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DP0054537	1.96	6.26	31.94	38.99	64.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DP007845	0.00	0.00	0.00	2.81	5.65	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DP0097542	1.68	7.76	26.59	25.73	58.66	6.13	4.44	10.16	6.16	3.95	3.61	16.42	0.86	189.50	15.29	210.20	15.29
DP147735	3.34	12.14	66.45	77.59	162.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

図6 (続き)

【 7 - 1 】

DLIL発症時に「通病免疫」

DLIL発症時	先天性免疫					細胞性免疫					体液性免疫					炎症の消滅	
	IL-1b	IL-6	TNF α	IL-2/70	IFN γ	IL-2	IFN γ	IL-2	IFN γ	IL-2	IFN γ	IL-4	IL-5	IL-13	IL-9	IL-10	IL-1 α
DP002816	2.20	17.23	71.66	20.33	80.41	13.69	17.18	77.48	6.31	3.53	2.82	13.20	0.77	1.75	13.07	0.77	1.75
DP002284	2.25	10.40	40.00	15.66	51.58	2.39	15.16	2.53	1.29	0.77	1.75	13.07	0.77	1.75	13.07	0.77	1.75
DP008111	2.41	18.35	51.91	54.77	56.01	20.95	15.02	52.94	7.71	6.46	9.64	36.30	6.46	9.64	36.30	6.46	9.64
DP148185	2.36	31.74	30.88	27.97	80.01	1.78	0.00	24.47	6.71	4.91	4.01	17.11	4.91	4.01	17.11	4.91	4.01
DP010496	2.95	17.95	36.08	5.92	18.38	0.00	0.00	1.17	3.63	0.82	1.11	6.63	0.82	1.11	6.63	0.82	1.11
DP002819	3.31	20.97	41.90	36.22	47.01	14.46	8.91	49.74	7.15	7.66	17.65	0.00	3.82	5.35	15.57	3.82	5.35
DP003334	48.24	488.55	31.97	11.92	75.78	4.88	4.31	56.04	2.27	3.96	2.38	20.30	3.96	2.38	20.30	3.96	2.38
DP017592	0.91	19.35	0.84	17.21	42.78	13.82	2.76	38.67	5.28	0.71	0.45	12.88	0.71	0.45	12.88	0.71	0.45
DP016165	0.90	17.23	3.02	7.56	18.09	0.00	0.00	40.04	5.39	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DP008428	0.00	117.34	0.00	1.38	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.74	0.70	0.00	0.74	0.70	0.00	0.74	0.70
DP008274	0.25	30.92	13.61	22.04	50.71	0.00	0.00	39.91	10.26	2.16	1.49	12.38	2.16	1.49	12.38	2.16	1.49
DP012313	1.45	21.90	25.67	21.64	73.14	6.72	7.60	53.28	11.56	7.26	2.84	17.77	7.26	2.84	17.77	7.26	2.84
DP009832	0.69	370.38	10.36	5.34	24.42	0.00	0.00	0.00	4.86	3.38	1.50	2.63	3.38	1.50	2.63	3.38	1.50
DP013983	0.93	16.32	18.92	19.76	38.73	2.15	0.00	26.06	4.63	2.68	1.51	10.02	2.68	1.51	10.02	2.68	1.51
DP008832	2.05	590.37	17.59	15.34	70.79	0.00	0.00	18.59	8.42	2.99	1.94	11.02	2.99	1.94	11.02	2.99	1.94
DP009840	1.26	16.82	16.07	19.58	50.13	3.89	3.72	44.31	6.43	3.37	2.94	17.48	3.37	2.94	17.48	3.37	2.94

図7

【 7 - 2 】

DLIL発症時に「正常な免疫」

DLIL発症時	先天性免疫					細胞性免疫					体液性免疫					炎症の消滅	
	IL-1b	IL-6	TNF α	IL-2/70	IFN γ	IL-2	IFN γ	IL-2	IFN γ	IL-2	IFN γ	IL-4	IL-5	IL-13	IL-9	IL-10	IL-1 α
DP003746	2.01	79.44	320.50	2.81	382.00	11.40	2.94	58.56	5.00	1.25	1.29	11.90	1.25	1.29	11.90	1.25	1.29
DP009218	3.27	18.78	86.56	30.66	266.60	11.28	6.59	44.25	7.37	5.86	4.77	23.60	5.86	4.77	23.60	5.86	4.77
DP024939	2.53	14.03	70.87	37.13	16.02	18.67	28.83	34.43	0.47	3.44	8.73	8.73	0.47	8.73	8.73	0.47	8.73
DP038896	3.22	18.02	120.85	35.93	91.00	12.22	11.34	322.28	11.27	9.84	13.47	33.35	11.27	9.84	13.47	33.35	11.27
DP006535	2.30	33.88	31.71	47.34	51.78	5.08	3.77	394.37	8.75	7.49	5.50	33.28	7.49	5.50	33.28	7.49	5.50
DP007606	1.82	11.64	33.11	15.47	25.82	3.41	0.00	60.77	3.74	9.34	3.90	12.98	9.34	3.90	12.98	9.34	3.90
DP007927	0.91	14.30	20.69	14.74	30.20	6.13	0.00	38.13	4.86	3.08	1.20	17.29	3.08	1.20	17.29	3.08	1.20
DP0051515	1.72	10.97	44.54	44.79	38.32	25.27	15.20	114.68	5.83	5.03	19.33	9.05	5.03	19.33	9.05	5.03	19.33
DP010600	0.61	5.79	23.42	8.61	30.74	5.08	6.79	156.71	5.77	2.25	1.66	14.29	2.25	1.66	14.29	2.25	1.66
DP013276	2.07	11.56	34.73	58.44	20.31	15.39	15.72	339.06	5.44	7.13	2.82	7.60	7.13	2.82	7.60	7.13	2.82
DP007352	1.50	8.82	36.57	36.04	47.94	7.33	8.09	90.06	8.47	5.82	4.28	20.81	5.82	4.28	20.81	5.82	4.28
DP042205	0.97	5.18	15.51	6.18	53.52	2.03	5.54	98.91	6.32	1.72	6.29	37.77	1.72	6.29	37.77	1.72	6.29
DP003033	1.09	4.98	4.39	12.83	51.58	3.45	18.22	86.16	7.94	1.70	2.70	17.01	1.70	2.70	17.01	1.70	2.70
DP008931	1.55	7.56	37.78	54.23	75.14	5.28	0.00	80.11	6.36	1.80	2.92	17.63	1.80	2.92	17.63	1.80	2.92
DP008140	3.42	28.87	118.87	36.93	48.73	14.12	12.28	40.83	15.81	7.15	7.31	37.21	7.15	7.31	37.21	7.15	7.31
DP008354	2.20	16.28	31.96	65.94	23.62	9.97	50.39	6.60	4.41	3.68	4.43	24.39	3.68	4.43	24.39	3.68	4.43
DP017770	0.44	33.68	6.21	10.92	37.90	5.26	0.00	42.75	7.61	0.53	1.46	219.20	0.53	1.46	219.20	0.53	1.46
DP005144	0.68	20.59	23.61	14.90	48.67	4.54	21.97	47.44	7.53	2.96	1.75	116.97	2.96	1.75	116.97	2.96	1.75
DP004716	0.13	6.70	3.97	17.25	28.73	0.00	7.56	28.05	3.82	1.28	1.97	316.98	1.28	1.97	316.98	1.28	1.97
DP003777	1.28	9.08	46.60	22.00	50.13												

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2013/066674

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/50 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EL-MOWAFY A M ET AL: "Eicosapentaenoic acid ablates valproate-induced liver oxidative stress and cellular derangement without altering its clearance rate: Dynamic synergy and therapeutic utility", BIOCHIMICA AND BIOPHYSICA ACTA. MOLECULAR AND CELL BIOLOGY OF LIPIDS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1811, no. 7, 27 April 2011 (2011-04-27), pages 460-467, XP028378738, ISSN: 1388-1981, DOI: 10.1016/J.BBALIP.2011.04.014 [retrieved on 2011-05-05] figures 1, 3 ----- -/--	1,5,15, 16,25, 26,34
<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 another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
10 January 2014		12/03/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Trommsdorff, Marion

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2013/066674

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>GANG TAN ET AL: "Hydrogen Sulfide Attenuates Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity, Liver Cirrhosis and Portal Hypertension in Rats", PLOS ONE, vol. 6, no. 10, 14 October 2011 (2011-10-14), page e25943, XP055095411, ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0025943 table 2</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1,5-8, 13-18, 20-25, 29-31, 33-36
X	<p>TSE-MIN CHEN ET AL: "Single dose intravenous thioacetamide administration as a model of acute liver damage in rats", INTERNATIONAL JOURNAL OF EXPERIMENTAL PATHOLOGY, vol. 89, no. 4, 17 August 2008 (2008-08-17), pages 223-231, XP055095565, ISSN: 0959-9673, DOI: 10.1111/j.1365-2613.2008.00576.x figures 4, 5</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-8, 13-18, 20-25, 29-31, 33-36
A	<p>NURY STEUERWALD ET AL: "CHEMOKINE/CYTOKINE PROFILES IN PATIENTS WITH ACUTE DILI: RESULTS FROM THE US DRUGINDUCED LIVER INJURY NETWORK", HEPATOLOGY; THE 62ND ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LIVER DISEASES: THE LIVER MEETING 2011, WILEY, USA; SAN FRANCISCO, CALIFORNIA, USA, vol. 54, no. Suppl. 1, 1 October 2011 (2011-10-01), page 529A, XP008166572, ISSN: 0270-9139, DOI: 10.1002/HEP.24666 [retrieved on 2011-09-30] abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-8, 13-18, 20-26, 29-31, 33-36
A	<p>US 2008/161203 A1 (SU CHUN-LIN [TW] ET AL) 3 July 2008 (2008-07-03)</p> <p>the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-8, 13-18, 20-26, 29-31, 33-36

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2013/066674

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>HUGH G LAVERTY ET AL: "The potential of cytokines as safety biomarkers for drug-induced liver injury", EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL PHARMACOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 66, no. 10, 6 August 2010 (2010-08-06), pages 961-976, XP019840409, ISSN: 1432-1041 the whole document</p> <p>-----</p>	1
T	<p>NURY M. STEUERWALD ET AL: "Profiles of Serum Cytokines in Acute Drug-Induced Liver Injury and Their Prognostic Significance", PLOS ONE, vol. 8, no. 12, 27 December 2013 (2013-12-27), page e81974, XP055095423, DOI: 10.1371/journal.pone.0081974 the whole document</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/US2013/066674**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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
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(a).

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:

see additional sheet

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 fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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.:
- 1-8, 13-18, 20-26, 29-31, 33-36(all partially)

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 Application No. PCT/ US2013/ 066674

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-8, 13-18, 20-26, 29-31, 33-36(all partially)

A method of characterizing liver damage in an individual, the method comprising measuring serum albumin and at least TNFa concentrations in a blood sample from the individual and comparing said levels to normal concentrations in order to define how seriously damaged the liver is, a kit comprising at least an antibody against TNFa.

2-11. claims: 1-36(partially)

A method of characterizing liver damage in an individual, the method comprising measuring serum albumin concentration and concentration of at least an analyte selected from IL-12; IL-17; IL-4; IL-5; IL-13; IL-9; MIP- 10; RANTES; FGF b; and PDGF-bb in a blood sample from the individual and comparing said levels to normal concentrations in order to define how seriously damaged the liver is, a kit comprising at least an antibody against one of these analytes.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2013/066674

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2008161203 A1	03-07-2008	TW 200827717 A	01-07-2008
		US 2008161203 A1	03-07-2008

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

(74) 代理人 100114591

弁理士 河村 英文

(74) 代理人 100125380

弁理士 中村 綾子

(74) 代理人 100142996

弁理士 森本 聡二

(74) 代理人 100154298

弁理士 角田 恭子

(74) 代理人 100166268

弁理士 田中 祐

(74) 代理人 100170379

弁理士 徳本 浩一

(74) 代理人 100179154

弁理士 児玉 真衣

(74) 代理人 100180231

弁理士 水島 亜希子

(74) 代理人 100184424

弁理士 増屋 徹

(72) 発明者 ボンコフスキー, ハーバート・エル

アメリカ合衆国ノースカロライナ州 2 8 2 3 2, シャーロット, ピー・オー・ボックス 3 2 8 6
1

(72) 発明者 フーロー, デイヴィッド

アメリカ合衆国ノースカロライナ州 2 8 2 3 2, シャーロット, ピー・オー・ボックス 3 2 8 6
1

(72) 発明者 ノートン, エイチ・ジェイムズ

アメリカ合衆国ノースカロライナ州 2 8 2 3 2, シャーロット, ピー・オー・ボックス 3 2 8 6
1

(72) 発明者 ストイアーワールド, ニュリ

アメリカ合衆国ノースカロライナ州 2 8 2 3 2, シャーロット, ピー・オー・ボックス 3 2 8 6
1

Fターム(参考) 4H045 AA30 BA60 CA40 DA75 EA50

专利名称(译)	用于识别肝损伤的生物标志物		
公开(公告)号	JP2016500825A	公开(公告)日	2016-01-14
申请号	JP2015539807	申请日	2013-10-24
[标]申请(专利权)人(译)	夏洛特梅克伦堡医院管理局D B-CAROLINA保健SYST		
申请(专利权)人(译)	夏洛特 - Mekurenbagu医院管理局做/业务/ AS卡罗莱纳州的医疗体系		
[标]发明人	ボンコフスキーハーバートエル フーローデイヴィッド ノートンエイチジェイムズ ストイアーワールドニユリ		
发明人	ボンコフスキー,ハーバート・エル フーロー,デイヴィッド ノートン,エイチ・ジェイムズ ストイアーワールド,ニユリ		
IPC分类号	G01N33/53 C07K17/00 C07K16/24		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N2333/49 G01N2333/503 G01N2333/523 G01N2333/525 G01N2333/54 G01N2333/5406 G01N2333/5409 G01N2333/5412 G01N2333/5425 G01N2333/5434 G01N2333/5437 G01N2333/765 G01N2800/08 G01N2800/085 G01N2800/52 G01N2800/60		
FI分类号	G01N33/53.P G01N33/53.D C07K17/00 C07K16/24		
F-TERM分类号	4H045/AA30 4H045/BA60 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA50		
代理人(译)	河村 英文 中村 綾子 角田 恭子 田中 宇 徳本 光一		
优先权	61/717977 2012-10-24 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译) 提供了表征个体肝损伤的方法和试剂盒。该方法利用免疫分析物作为生物标记物来检测肝损伤并预测患有肝损伤的人患有威胁生命的肝衰竭的可能性。从个体获得的血液样品中获得或确定血清白蛋白和其他鉴定的免疫分析物的浓度值。然后将所得浓度值与来自健康肝脏个体的相应浓度进行比较。通过比较浓度，可以确定个体在给定时间段（例如6个月）内发生威胁生命的肝衰竭并需要进行肝移植的可能性。	(21) 出願番号 特願2015-539807 (P2015-539807) (86) (22) 出願日 平成25年10月24日 (2013.10.24) (83) 翻訳文提出日 平成27年6月23日 (2015.6.23) (86) 国際出願番号 PCT/US2013/066674 (87) 国際公開番号 WO2014/066676 (87) 国際公開日 平成26年5月1日 (2014.5.1) (31) 優先権主張番号 61/717,977 (32) 優先日 平成24年10月24日 (2012.10.24) (33) 優先権主張国 米国 (US)	(71) 出願人 500241985 ザ シャーロット-メクレンバーグ ホス ビタル オーソリティ ドゥーイング/ビ ジネス/アズ キャロライナス ヘルスケ ア システム アメリカ合衆国ノースカロライナ州282 32, シャーロット, ビー・オー・ボック ス 32861 (74) 代理人 100099623 弁理士 奥山 尚一 (74) 代理人 100096769 弁理士 有原 幸一 (74) 代理人 100107319 弁理士 松島 鉄男
	最終頁に続く	