

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/564			G 0 1 N 33/564	Z
33/53			33/53	K

審査請求 未請求 請求項の数 16 O L (全 11数)

(21)出願番号	特願2000 - 293184(P2000 - 293184)	(71)出願人	396020800 科学技術振興事業団 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
(22)出願日	平成12年9月26日(2000.9.26)	(71)出願人	000106106 サラヤ株式会社 大阪府大阪市東住吉区湯里2丁目2番8号
		(71)出願人	500450107 岩谷 良則 大阪府吹田市山田丘1 - 7 大阪大学医学部 保健学科内
		(74)代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 自己免疫性甲状腺炎の予後予測方法およびそれに用いるキット

(57)【要約】

【課題】 自己免疫甲状腺炎の予後のための方法を提供する。

【解決手段】 自己免疫性甲状腺炎の予後のための方法であって、被験体から得られた生物学的試料中の、リンパ球表面抗原またはそれに由来する因子を測定する工程、および得られた測定値を、自己免疫性甲状腺炎の病態と関連付け、予後のための指標値を設定する工程を包含する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 自己免疫性甲状腺炎の予後のための方法であって、

被験体から得られた生物学的試料中の、リンパ球表面抗原またはそれに由来する因子を測定する工程、および得られた測定値を、自己免疫性甲状腺炎の病態と関連付け、予後のための指標値を設定する工程、を包含する、方法。

【請求項 2】 自己免疫性甲状腺炎の予後のための方法であって、

被験体から得られた生物学的試料中の、体液性免疫による細胞傷害に関与する因子を測定する工程、および得られた測定値を、自己免疫性甲状腺炎の病態と関連付け、予後のための指標値を設定する工程、を包含する、方法。

【請求項 3】 前記因子が、可溶性 CD8、CD25、CD30 および CD154 から選択される群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】 前記因子が、前記リンパ球表面抗原に特異的に結合する抗体を用いて測定される、請求項 1 または 3 に記載の方法。

【請求項 5】 前記因子が、CD8 陽性細胞中の CD25 陽性細胞の比率として測定される、請求項 3 または 4 に記載の方法。

【請求項 6】 前記因子が、CD8 陽性細胞中の CD30 陽性細胞の蛍光強度として測定される、請求項 3 または 4 に記載の方法。

【請求項 7】 前記因子が、CD4 陽性細胞中の CD154 陽性細胞の蛍光強度として測定される、請求項 3 または 4 に記載の方法。

【請求項 8】 前記因子が、甲状腺特異的自己抗体である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 9】 自己免疫性甲状腺炎の予後のための方法であって、

被験体から得られた生物学的試料中の、リンパ球表面抗原またはそれに由来する第 1 の因子を測定する工程、該生物学的試料中の第 2 の因子を測定する工程、および該第 1 の因子の得られた測定値および該第 2 の因子の得られた測定値を、自己免疫性甲状腺炎の病態と関連付け、予後のための指標値を設定する工程、を包含する、方法。

【請求項 10】 前記第 2 の因子が、体液性免疫による細胞傷害に関与する因子である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】 前記第 2 の因子が、リンパ球表面抗原である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】 前記第 1 の因子が、CD8 陽性細胞中の CD25 陽性細胞の比率として測定され、前記第 2 の因子が、甲状腺特異的自己抗体である、請求項 10 に記載の方法。

*【請求項 13】 前記第 1 の因子が可溶性 CD8 であり、前記第 2 の因子が CD30 である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】 前記予後が、甲状腺機能が低下しないことを予測することである、請求項 1、2、9～13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】 自己免疫性甲状腺炎の予後のためのキットであって、

生物学的試料中の、リンパ球表面抗原またはそれに由来する第 1 の因子を測定する試薬、および該生物学的試料中の体液性免疫による細胞傷害に関与する因子であるかまたはリンパ球表面抗原である第 2 の因子を測定する試薬を含む、キット。

【請求項 16】 前記第 1 の因子を測定する試薬が、CD4、CD8 および CD25 から選択される群からなるリンパ球表面抗原に対するモノクローナル抗体を含み、そして、前記第 2 の因子を測定する試薬が、甲状腺特異的自己抗原を含む、請求項 15 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は臨床検査の分野に関する。より詳細には、自己免疫性甲状腺炎（橋本病）の予後に関し、自己免疫性甲状腺炎を有するヒトが、将来治療を要するようになるか否かを鑑別する方法およびそれに用いるキットに関する。

【0002】

【従来の技術】自己免疫性甲状腺炎（橋本病）は、甲状腺がびまん性に腫大する病態であって、若年から中年までの女性に多く発症する。潜在性の病態をも含めると、約 11～12 人に 1 人がこの病態を有し、本邦における患者数は約 1000 万人と推定されている。自己免疫性甲状腺炎の初期においては甲状腺機能は正常であるが、自己免疫機序によって甲状腺組織破壊が進行すると、甲状腺ホルモン補充療法が必要な甲状腺機能低下症に至る。甲状腺機能低下症は、中枢神経系を含む身体各臓器の機能が低下し、社会生活上大きな支障を生じる重篤な疾患である。

【0003】現在、自己免疫性甲状腺炎の予後のための方法はない。そのため、自己免疫性甲状腺炎と診断されたすべてのヒトは、定期的に検査を受け、甲状腺機能が正常であることを確認していく必要がある。一般に、自己免疫性甲状腺炎を持つヒトのなかで、将来甲状腺機能低下症に至るヒトは、約 20 に 1 人の割合であるにもかかわらず、延々と定期検診を受ける必要がある。このことは、自己免疫性甲状腺炎を持つヒトに、精神的、肉体的、および経済的負担を強いるとともに、医療全体の経済効率を甚だ悪くしている。

【0004】従って、自己免疫性甲状腺炎の予後のための方法の開発が切望されている。

*50 【0005】

【発明が解決しようとする課題】自己免疫甲状腺炎に関する上記課題にもかかわらず、従来、自己免疫甲状腺炎の病態を有するヒトについて、甲状腺機能低下症になって治療が必要になった群と、そうでない群について差異を調べた報告もない。本発明は、この2群を効率よく鑑別する方法を提供し、さらに、自己免疫甲状腺炎の予後のための方法を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記従来の課題を解決するために鋭意努力を重ねた結果、自己免疫性甲状腺炎の病態を有するヒトの末梢血中に存在する、リンパ球表面抗原またはそれに由来する因子、および体液性免疫による細胞傷害に関与する因子を測定し、これらの測定値から、自己免疫性甲状腺炎の病態を有するヒトにおいて、治療必要群と、不要群とを効率的に鑑別できること、そしてこのことを、自己免疫性甲状腺炎の実用的な予後のための方法として応用できることを示し、本発明を完成するに至った。

【0007】本発明は、自己免疫性甲状腺炎の予後のための方法に関し、この方法は、被験体から得られた生物学的試料中の、リンパ球表面抗原またはそれに由来する因子を測定する工程、および得られた測定値を、自己免疫性甲状腺炎の病態と関連付け、予後のための指標値を設定する工程を包含する。

【0008】本発明はまた、1つの局面で、自己免疫性甲状腺炎の予後のための方法に関し、この方法は、被験体から得られた生物学的試料中の、体液性免疫による細胞傷害に関与する因子を測定する工程、および得られた測定値を、自己免疫性甲状腺炎の病態と関連付け、予後のための指標値を設定する工程を包含する。

【0009】好ましくは、上記因子は、可溶性CD8、CD25、CD30およびCD154からなる群から選択される。

【0010】好ましくは、上記因子は、前記リンパ球表面抗原に特異的に結合する抗体を用いて測定される。

【0011】好ましくは、上記因子は、CD8陽性細胞中のCD25陽性細胞の比率として測定される。

【0012】好ましくは、上記因子は、CD8陽性細胞中のCD30陽性細胞の蛍光強度として測定される。

【0013】好ましくは、上記因子は、CD4陽性細胞中のCD154陽性細胞の蛍光強度として測定される。

【0014】本発明はまた、1つの局面で、自己免疫性甲状腺炎の予後のための方法に関し、この方法は、被験体から得られた生物学的試料中の、リンパ球表面抗原またはそれに由来する第1の因子を測定する工程、上記生物学的試料中の第2の因子を測定する工程、および上記第1の因子の得られた測定値および該第2の因子の得られた測定値を、自己免疫性甲状腺炎の病態と関連付け、予後のための指標値を設定する工程、を包含する。

【0015】好ましくは、上記第2の因子は、体液性免

疫による細胞傷害に関与する因子である。

【0016】好ましくは、上記第2の因子は、リンパ球表面抗原である。

【0017】好ましくは、上記第1の因子は、CD8陽性細胞中のCD25陽性細胞の比率として測定され、上記第2の因子は、甲状腺特異的自己抗体である。

【0018】好ましくは、上記第1の因子は可溶性CD8であり、上記第2の因子はCD30である。

【0019】好ましくは、上記予後は、甲状腺機能が低下しないことを予測することである。

【0020】本発明はまた、1つの局面で、自己免疫性甲状腺炎の予後のためのキットに関し、このキットは、生物学的試料中の、リンパ球表面抗原またはそれに由来する第1の因子を測定する試薬、および上記生物学的試料中の体液性免疫による細胞傷害に関与する因子であるかまたはリンパ球表面抗原である第2の因子を測定する試薬を含む。

【0021】好ましくは、上記第1の因子を測定する試薬は、CD4、CD8およびCD25からなる群から選択されるリンパ球表面抗原に対するモノクローナル抗体を含み、そして、上記第2の因子を測定する試薬は、甲状腺特異的自己抗原を含む。

【0022】代表的には、上記甲状腺特異的抗原は、当該分野で公知のゼラチン粒子などの担体に固定化されて用いられる。上記甲状腺特異的抗原の固定化に用いられる担体および固定化法は当該分野で公知である。

【0023】代表的には、上記甲状腺特異的抗原は、サイログロブリンもしくはマイクロゾームを含み得る。

【0024】

【発明の実施の形態】本発明は、代表的には、細胞性免疫および体液性免疫による細胞傷害機構を反映する検査項目から、およびこれらの検査項目を組み合わせた自己免疫疾患の予後のための方法を記載する。本明細書は、自己免疫疾患の例として、自己免疫性甲状腺炎を用いて本発明を説明するが、その他の組織破壊を特徴とする自己免疫疾患の予後のために適用可能であることはいうまでもない。

【0025】本明細書で用いる用語「予後」は、一般に、疾患について、その経過ならびに予想される運命、具体的には、患者の健康や機能が回復するか否か、それに必要な日数などを各症例について具体的に予測、推測を行うことをいう。本発明では、特に、自己免疫性甲状腺炎の病態を有するヒトが、将来、甲状腺機能が低下しないことを予測すること、または自己免疫性甲状腺炎の病態を有するヒトが、将来、甲状腺機能が低下することを予測することをいう。

【0026】以下、本発明について、より具体的に説明する。本発明の方法では、ヒト被験体から得られた生物学的試料、代表的にはヒト末梢血中の、リンパ球表面抗原またはそれに由来する因子を測定する。現在、ヒトリ

ンパ球表面抗原を認識するモノクローナル抗体の国際的な分類法が確立されており、各種モノクローナル抗体の認識する抗原決定基の生化学的特徴によって抗体のクラスター化が検討され、CD (cluster of differentiation) 分類と呼ばれている。リンパ球表面抗原は、一般に、このCD分類により表示され、CD3、CD4、CD5、CD8、CD19、CD25、CD28、CD30、CD95、CD122、CD152、CD154、CD161などが知られ、こ*

表1

抗体名	標識蛍光	製造会社	性質等
CD4	FITC	Pharmingen	ヘルパーT細胞
CD4	PerCP	Becton Dickinson	ヘルパーT細胞
CD5	PE	Becton Dickinson	CD5陽性B細胞測定用
CD8	FITC	Becton Dickinson	細胞傷害性/抑制性T細胞
CD8	PerCP	Becton Dickinson	細胞傷害性/抑制性T細胞
CD19	FITC	Becton Dickinson	B細胞
CD25	FITC	Becton Dickinson	IL-2Ra鎖
CD25	PE	Becton Dickinson	IL-2Ra鎖
CD28	PE	Becton Dickinson	刺激性/刺激受容体
CD30	PE	Colter	2型ヘルパー(Th2)細胞
CD95	PE	Becton Dickinson	Fas
CD122	PE	Becton Dickinson	IL-2Rβ鎖
CD152	PE	Pharmingen	CTLA-4抑制性/刺激受容体
CD154	PE	Becton Dickinson	CD40リガンド
CD161	PE	Becton Dickinson	NKT細胞
CCR5	PE	Pharmingen	I型ヘルパーT(Th1)細胞

本発明の方法では、通常、リンパ球表面抗原またはそれに由来する因子として、CD25、CD30、CD15 30 4、可溶性CD8などを測定する。本明細書で用いる用語「リンパ球表面抗原またはそれに由来する因子」とは、上記公知のCD分類によるリンパ球上に存在する表面抗原、およびこのリンパ球上の表面抗原から生じた物質をいい、代表的には、血清中に遊離の形態で存在し、免疫系に種々の作用を及ぼす物質を包含する。

【0029】代表的には、これらの因子は、CD8陽性細胞中のCD25陽性細胞の比率(%CD25/CD8)、CD8陽性細胞中のCD30陽性細胞の標準化蛍光強度(CD30/CD8)、CD4陽性細胞中のCD 40 154陽性細胞の標準化蛍光強度(%CD4/CD154)、可溶性CD8濃度などとして測定される。これらの測定は、当業者に周知の、市販のフローサイトメーター、免疫酵素抗体法などを用いて容易に行われる。

【0030】本発明の方法ではまた、体液性免疫による細胞傷害に関与する因子として甲状腺特異的自己抗体を測定する。代表的には、この甲状腺特異的自己抗体は、市販のキットを用いて、血清中の抗甲状腺マイクロソーム抗体価または抗サイログロブリン抗体価として測定される。

*これらのリンパ球表面抗原を測定する方法は、当該分野で公知であり、Becton Dickinson社などの製造業社から上記リンパ球に特異的なモノクローナル抗体およびそれを含む測定用キットが市販されている。

【0027】表1に、これらのモノクローナル抗体の例を示す。

【0028】

【表1】

【0031】本発明の方法では、得られた上記因子の測定値を、自己免疫性甲状腺炎の病態と関連付け、予後のための指標値を設定する。上記因子の測定値と自己免疫性甲状腺炎の病態との関連付けは、上記因子の測定値を、該病態を持つヒトの健康状態、既に受けた臨床検査、病歴、現在服用している薬剤などの知見と比較して行う。予後のための指標値は、通常、上記因子の測定値を統計学的に処理し、関連付けた病態が重篤な症状に至る臨界値として、病態を的確に判断するに十分な診断感度および診断特異度を有するように設定される。代表的には、この指標値は、統計学的に母集団の99.7%を含む領域の境界値として設定され得る。この指標値は、上記因子の測定値の各々について設定され得るか、または上記因子を複数、代表的には2つを組み合わせ、それらの測定値を統計処理して算出された単一の値であり得る。疾患の予後は、所定の診断感度(鑑別されるべき被験体が検査陽性となる割合)および診断特異性(鑑別対象外の被験体が陰性となる割合)でもって、上記因子の測定値を上記指標値と比較して、将来、治療が不要であることまたは治療が必要であることを予測する。

【0032】本発明のキットは、当該分野で公知の方法 50 により適切に作製され得る。本発明のキットは、1つま

たはそれ以上の容器中に上記第1の因子を測定する試薬、上記第2の因子を測定する試薬を含み得る。キットはまた、自己免疫性甲状腺炎の予後における、上記試薬の使用を記載する説明書を含み得る。キットは、標識の検出のためなどに適切な試薬、洗浄溶液、希釈緩衝液などをさらに含み得る。

【0033】

【実施例】実施例を用いて本発明を説明する。以下の実施例は、本発明の例示であって、限定するものではない。

【0034】（実施例1：ヒト末梢血におけるCD8陽性細胞中のCD25陽性細胞の比率（%CD25/CD8）の測定）自己免疫性甲状腺炎の病態を持つ93人から採血し、下記に示す測定法により、CD8陽性細胞中のCD25陽性細胞の比率（%CD25/CD8）を測定した。

【0035】自己免疫性甲状腺炎の病態を有する93人は、あらかじめ、その病歴によって、治療必要群（54人）と不要群（39人）に分類した。この分類では、各個体の治療検査記録をさかのぼり、薬物治療を続けている個体を治療必要群とし、そして薬物治療を受けていない個体を治療不要群とした。いいかえれば、無投薬では、甲状腺機能低下状態に陥るため、サイロキシンによるホルモン補充療法を必要とする群が要治療群であり、そして無投薬でも甲状腺機能が正常に保たれている群が治療不要群である。なお、試料提供者の甲状腺機能は全員正常で、上記各群の年齢および性別に有意差はなかった。

【0036】自己免疫性甲状腺炎の病態を持つヒトについての測定結果を図1に示す。図1は、CD8陽性細胞中のCD25陽性細胞の比率（%CD25/CD8）の測定結果である。図中黒丸の各々は各個体を表す。縦軸は、橋本病治療不要群と治療必要群とを示し、横軸は%CD25/CD8を示す。図中黒丸群のほぼ中央にある縦棒は、%CD25/CD8の平均値である。そして図中の黒丸を取り囲む矩形の実線は、%CD25/CD8の平均値+3SD（平均値に加えて標準偏差の3倍以内の区間：統計学的に母集団の99.7%を含む領域）を示す。

【0037】図1に示されるように、自己免疫性甲状腺炎の病態を有するヒトにおいて、治療必要群の%CD25/CD8の平均値は、不要群の同平均値より約6%高く、治療必要群と不要群との間に有意差が認められた（ $p < 0.01$ ）。

【0038】（%CD25/CD8測定法）EDTA（ K_2 ）添加採血管（Becton Dickinson社）を用いてヒト末梢血を約2ml採取した。5mlポリスチレンラウンドチューブ（Becton Dickinson社）に、100 μ lの採取したEDTA添加ヒト末梢血、そして20 μ lのPE標識抗CD25マ

ウスモノクローナル抗体（Becton Dickinson社）、および20 μ lのFITC標識抗CD8マウスモノクローナル抗体（Becton Dickinson社）を添加し、15分間4#Cでインキュベートし、末梢血中のリンパ球と、各モノクローナル抗体を反応させ、各モノクローナル抗体とリンパ球との免疫複合体を形成させた。次に、2mlの溶血固定溶液（Becton Dickinson社）を加えて、10分間4#Cでインキュベートし、赤血球を溶血し、形成された免疫複合体を固定した。チューブを卓上多本架遠心機KN-70（久保田製作所）で1600rpm、10分間遠心分離して免疫複合体をペレット化した。得られたペレットを0.1%アジ化ナトリウム（和光純薬）を含むリン酸緩衝生理食塩水（白水製薬（株））3mlで洗浄し、1600rpm、5分間遠心分離によりペレットを回収した。ペレットを上記アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水に浮遊させ、フローサイトメーター（FACS Calibur：Becton Dickinson社）を用い、末梢血リンパ球中のCD8陽性細胞中のCD25陽性細胞比率（%CD25/CD8）を算出した。

【0039】まず、指示書に従って、同装置について、Compensationなどの調整を行った後、同装置に試料を取り込んだ。指示書に従って、最初、リンパ球サブセットに、次いでCD8およびCD25に論理的ゲーティングを設定した。同装置は、ゲーティングした各範囲について測定された各々の細胞の蛍光強度を解析用データとして出力する。得られた解析用データを基に、各ゲーティングした範囲の占める割合（%）、および平均蛍光強度（MFI）を算出し、末梢血リンパ球中のCD8陽性細胞におけるCD25陽性比率（%）を算出した。得られたデータについて、Window98上の統計ソフトStatFlex Ver5.0（アーテック社）を用いて統計解析を行った。群間の差の検定には、t検定（パラメトリックな分布を示すデータについて）またはMann-Whitney U検定（ノンパラメトリックな分布を示すデータについて）を用いた。相関の検定には、pearsonの相関係数を用いた。

【0040】（実施例2：抗甲状腺自己抗体の測定）自己免疫性甲状腺炎の病態を有するヒト93人から採血し、下記に示す測定法により、抗甲状腺自己抗体価（抗マイクログロブリン抗体価および抗サイログロブリン抗体価）を測定した。

【0041】実施例1と同様に、自己免疫性甲状腺炎の病態を持つ93人は、治療必要群（54人）と不要群（39人）に分類した。なお、試料提供者の甲状腺機能は全員正常で、上記各群の年齢および性別に有意差はなかった。

【0042】自己免疫性甲状腺炎の病態を持つヒトについての測定結果を図2および図3に示す。図2は、抗サ

イログロブリン抗体 (TGH A) および図 3 は、抗マイクロゾーム抗体の血清抗体価のそれぞれ測定結果である。図中黒丸の各々は各個体を表す。縦軸は、橋本病治療不要群と治療必要群とを示し、横軸は血清中の抗サイログロブリン抗体価または抗マイクロゾーム抗体価を、試料が凝集反応を示す最大希釈倍数で示しており、図中の (2 乗倍) は、実際の試料の希釈倍数が、横軸目盛の 2 乗であることを示す。一般に、この希釈倍数 (これを血清抗体価と呼ぶ) が大きいほど、試料に含まれる抗サイログロブリン抗体または抗マイクロゾーム抗体の濃度は高い。図 2 中黒丸群のほぼ中央にある縦棒は、抗サイログロブリン抗体の血清抗体価の平均値を示す。そして図中の黒丸を取り囲む矩形の実線は、抗サイログロブリン抗体の血清抗体価の平均値 + 3 S D (標準偏差) を示す。

【0043】図 2 に示されるように、治療必要群の中で、抗サイログロブリン抗体の血清抗体価が、治療不要群のその平均値 + 3 S D の値を超えるヒトが、31.5% (17 人 / 54 人) 存在した。そして、自己免疫性甲状腺炎の病態を有するヒトにおいて、治療必要群の抗サイログロブリン抗体の血清抗体価の平均値は、不要群の同平均値より約 30 倍高く、治療必要群と不要群との間に有意差が認められた ($p < 0.01$)。

【0044】抗甲状腺マイクロゾーム抗体の血清抗体価においても、治療必要群と不要群との間に有意差が認められた ($p < 0.05$) (図 3)。

【0045】(甲状腺特異的自己抗体の測定法) 甲状腺特異的自己抗体は、抗甲状腺マイクロゾーム抗体または抗サイログロブリン抗体の血清抗体価として、微小粒子状ゼラチンを担体として用いる受身凝集反応により、セロディア AMC キットまたはセロディア ATG キット (富士レビオ社、東京、日本) を用いて測定した。

【0046】実施例 1 と同様に採取したヒト末梢血を、3000 rpm、15 分間遠心分離し、血清と血球に分離し、血清を検体として用いた。

【0047】(実施例 3 : %CD25 / CD8 と抗サイログロブリン抗体の組み合わせによる評価) 自己免疫性甲状腺炎の病態を持つ 93 人について実施例 1 で得られた %CD25 / CD8 の測定値を、実施例 2 で得られた抗サイログロブリン抗体の測定血清抗体価に対してプロットした。図 4 は治療不要群のヒトについて、そして図 5 は治療必要群についての結果である。

【0048】図 4 中の白丸は治療不要群の個々の個体に関する測定値を、そして図中の白丸を取り囲む楕円は母集団の 99.7% を含む領域 (平均値 + 3 S D) を示す。これは、当業者に公知のマハラノビス距離に従って求めた等確率楕円と呼ばれるものである (例えば、「バイオサイエンスの統計学」、市原清志著、南江堂、1990 年、234 - 236 頁を参照のこと)。

【0049】図 5 中の黒丸は治療必要群個々の個体に関

する測定値を、そして図中の黒丸を取り囲む楕円は、図 4 に示される楕円と同じ治療不要群の平均値 + 3 S D の値を示す。また図 5 中の点線で囲まれた矩形の領域は、%CD25 / CD8 値が 14% 以下であって、抗サイログロブリン抗体の血清抗体価が 320 の 2 乗倍以下である領域である。

【0050】図 5 に示されるように、治療必要群 54 人中 25 人が上記平均値 + 3 S D の領域外にあり、そして 54 人中 28 人が上記点線の矩形領域内にあった。

【0051】従って、診断感度 (疾患を有するヒトが検査陽性である割合) および診断の特異性 (疾患を有さないヒトが検査陰性である割合) は、上記平均値 + 3 S D をカットオフ値 (指標値) として、楕円で囲まれる領域の外のヒトを検査陽性とした場合、診断感度は 25 人 / 54 人 = 46.2%、そして診断特異性は 38 人 / 39 人 = 97.4% と高く、治療必要群と治療不要群とを効率よく鑑別できた。

【0052】また、図 5 に示される点線、つまり、%CD25 / CD8 が 14%、および抗サイログロブリン抗体値が 320 の 2 乗倍をカットオフ値とし、図 5 で示される点線で囲まれた矩形領域の外のヒトを検査陽性とした場合、診断感度は 28 人 / 54 人 = 51.9%、そして診断特異性は 38 人 / 39 人 = 97.4% と高く、治療必要群と治療不要群とを効率よく鑑別できることがわかった。

【0053】(実施例 4 : ヒト末梢血における CD25 陽性細胞の全リンパ球に対する割合の測定) 実施例 1 と同様に、自己免疫性甲状腺炎の病態を持つ 93 人を、治療必要群 (54 人) と不要群 (39 人) に分類した。なお、試料提供者の甲状腺機能は全員正常で、上記各群の年齢および性別に有意差はなかった。

【0054】治療必要群と不要群のヒト末梢血における CD25 陽性細胞の全リンパ球に対する割合を、20 μ l の PE 標識抗 CD25 マウスモノクローナル抗体 (Becton Dickinson 社)、および 20 μ l の FITC 標識抗 CD8 マウスモノクローナル抗体 (Becton Dickinson 社) を添加する代わりに、20 μ l の PE 標識抗 CD25 マウスモノクローナル抗体 (Becton Dickinson 社) のみを添加したことを除いて、実施例 1 に示した %CD25 / CD8 測定法とほぼ同様の測定法で測定した。この結果、治療必要群の測定値と不要群の測定値との間には有意差が認められた (図 6) ($p < 0.05$)。

【0055】(実施例 5 : ヒト末梢血における CD8 陽性細胞中の CD30 陽性細胞の蛍光強度 (CD30 / CD8) の測定) 実施例 1 と同様に、自己免疫性甲状腺炎の病態を持つ 52 人を、治療必要群 (25 人) と不要群 (27 人) に分類した。なお、試料提供者の甲状腺機能は全員正常で、上記各群の年齢および性別に有意差はなかった。

【0056】治療必要群と不要群のヒト末梢血におけるCD8陽性細胞中のCD30陽性細胞の蛍光強度(CD30/CD8)を、20 μ lのPE標識抗CD25マウスモノクローナル抗体(Becton Dickinson社)を添加する代わりに、20 μ lのPE標識抗CD30マウスモノクローナル抗体(Colter社)を添加したことを除いて、実施例1に示した%CD25/CD8測定法とほぼ同様の測定法で測定した。要約すれば、上記モノクローナル抗体を添加した試料を、フローサイトメーター装置に取り込んだ後、製造業者の指示書に従って論理的ゲーティングを施して解析用データを出力した。得られたデータから平均蛍光強度(MFI)を算出しCD30の蛍光測定値とした。なお蛍光測定値は、QuantibRITE PE(Becton Dickinson社)を用いて標準化(定量化)した(標準化蛍光強度)。その結果、治療必要群の測定値と不要群の測定値との間には有意差が認められた(図7)($p < 0.05$)。

【0057】(実施例6:ヒト末梢血におけるCD4陽性細胞中のCD154陽性細胞の蛍光強度(CD154/CD4)の測定)実施例1と同様に、自己免疫性甲状腺炎の病態を持つ45人を、治療必要群(31人)と不要群(14人)に分類した。なお、試料提供者の甲状腺機能は全員正常で、上記各群の年齢および性別に有意差はなかった。

【0058】治療必要群と不要群のヒト末梢血におけるCD4陽性細胞中のCD154陽性細胞の蛍光強度(CD154/CD4)を、20 μ lのPE標識抗CD25マウスモノクローナル抗体(Becton Dickinson社)、および20 μ lのFITC標識抗CD8マウスモノクローナル抗体(Becton Dickinson社)を添加する代わりに、20 μ lのPE標識抗CD154マウスモノクローナル抗体(Becton Dickinson社)、および20 μ lのFITC標識抗CD4マウスモノクローナル抗体(Becton Dickinson社)を添加したことを除いて、実施例5に示したCD30/CD8測定法と同様の測定法で測定した。その結果、治療必要群の測定値と不要群の測定値との間に有意差が認められた(図8)($p < 0.05$)。

【0059】(実施例7:ヒト末梢血における可溶性CD8濃度の測定)実施例1と同様に、自己免疫性甲状腺炎の病態を持つ57人を、治療必要群(26人)と不要群(31人)に分類した。なお、試料提供者の甲状腺機能は全員正常で、上記各群の年齢および性別に有意差はなかった。

【0060】自己免疫性甲状腺炎の病態を持つヒトの末梢血における可溶性CD8濃度をヒト末梢血における可溶性CD8濃度を、CELL FREE Human ELISA sCD8 kit(ENDOGEN社、Wo

burn, USA)を用いて測定した。測定結果を図9に示す。図9に示されるように、治療必要群では、可溶性CD8濃度が180U/ml以下のヒトが13名、可溶性CD8濃度が180U/ml~260U/mlのヒトが12名、そしてCD8濃度が260U/ml以上のヒトが1名存在した。その一方、治療不要群では、可溶性CD8濃度が180U/ml以下のヒトが6名、可溶性CD8濃度が180U/ml~260U/mlのヒトが16名、そして可溶性CD8濃度が260U/ml以上のヒトが9名存在した。このように、治療不要群では、可溶性CD8濃度が高い傾向にあり、治療必要群の測定値と不要群の測定値との間には有意差が認められた($p < 0.05$)。

【0061】(実施例8:可溶性CD8濃度とCD30/CD8の組み合わせによる評価)実施例1と同様に、自己免疫性甲状腺炎の病態を持つ57人を、治療必要群(26人)と不要群(31人)に分類した。被験体は実施例7と同じである。なお、試料提供者の甲状腺機能は全員正常で、上記各群の年齢および性別に有意差はなかった。

【0062】上記57人について、ヒトの末梢血におけるCD30陽性細胞の抗原蛍光強度を測定した。CD30陽性細胞の蛍光強度は、実施例5に記載のように測定した。測定結果を図10に示す。

【0063】実施例7で、可溶性CD8濃度が180U/ml~260U/mlであった治療必要群のヒト12名および治療不要群のヒト16名について、CD30陽性細胞の蛍光強度の測定結果の内訳は、CD30蛍光強度値が340以下のヒトが治療必要群で12名、そして治療不要群で9名存在し、CD30蛍光強度値が340以上のヒトが治療必要群で0名、そして治療不要群で7名存在した。

【0064】ここで、(i)可溶性CD8濃度が180U/ml以下、および可溶性CD8濃度が180U/ml~260U/mlであってかつCD30蛍光強度が340以下のヒトを治療が必要、そして(ii)可溶性CD8濃度が260U/ml以上、および可溶性CD8濃度が180U/ml~260U/mlであってかつCD30抗原蛍光強度が340以上のヒトを治療が不要とすれば、将来、甲状腺が低下しないヒトを鑑別する検査の診断感度(鑑別されるべき被験体が検査陽性となる割合)は $9 + 7 = 16$ 人/ 22 人 $= 54.5\%$ 、そして診断特異性(鑑別対象外の被験体が陰性となる割合)は $12 + 13 = 25$ 人/ 26 人 $= 96.2\%$ と高く、治療必要群と治療不要群を効率よく鑑別できることがわかった。

【0065】なお、図11は、可溶性CD8濃度が180U/ml~260U/mlの境界領域にあるヒトについて、CD30蛍光強度(標準化蛍光強度)を、可溶性CD8濃度をプロットしたグラフであって、本発明の効

果を示す。白丸が治療不要群の個体、黒丸が治療必要群の個体に関するプロットを表し、そして各個体の大部分を取り囲む楕円の一部である曲線は、マハラノビス距離に従って求めた等確率楕円である。

【0066】

【発明の効果】自己免疫性甲状腺炎（橋本病）の病態を持つヒトの予後のための方法およびそれに用いるキットが提供され、将来、甲状腺低下症になり治療が必要になるか否かを高い診断感度と診断特異性で予測することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】自己免疫性甲状腺炎の病態を持つヒトの、CD8陽性細胞中のCD25陽性細胞比率（%CD25 / CD8）の測定結果を示す図である。

【図2】自己免疫性甲状腺炎の病態を持つヒトの、抗サイログロブリン抗体の血清抗体価の測定結果を示す図である。

【図3】自己免疫性甲状腺炎の病態を持つヒトの、抗マイクログローム抗体の血清抗体価の測定結果を示す図である。

【図4】自己免疫性甲状腺炎の病態を持つが治療不要のヒトの、CD8陽性細胞中のCD25陽性細胞比率（%CD25 / CD8）を、抗サイログロブリン抗体の血清

抗体価に対してプロットした図である。

【図5】自己免疫性甲状腺炎の病態を持つが要治療のヒトの、CD8陽性細胞中のCD25陽性細胞比率（%CD25 / CD8）を、抗サイログロブリン抗体の血清抗体価に対してプロットした図である。

【図6】自己免疫性甲状腺炎の病態を持つヒトの末梢血における、CD25陽性細胞の全リンパ球に対する割合の測定結果を示す図である。

【図7】自己免疫性甲状腺炎の病態を持つヒトの、CD8陽性細胞中のCD30陽性細胞蛍光強度（CD30 / CD8）の測定結果を示す図である。

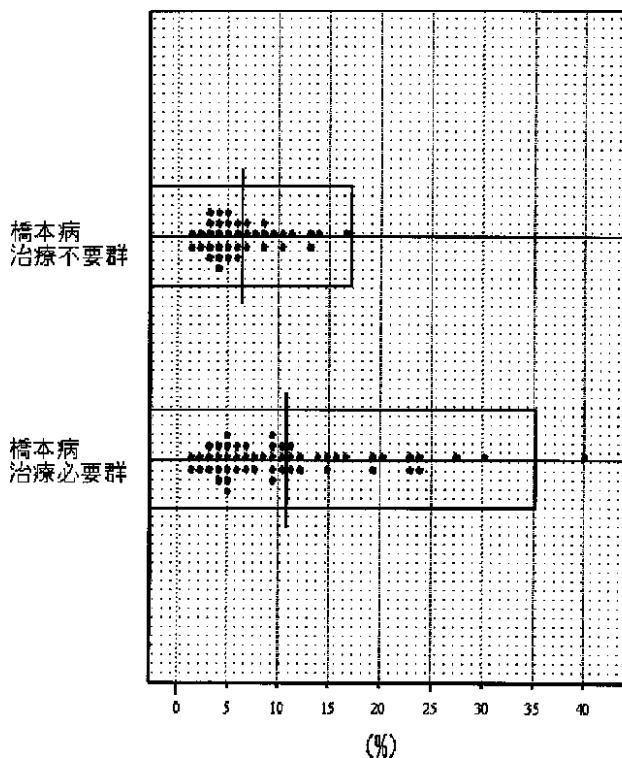
【図8】自己免疫性甲状腺炎の病態を持つヒトの、CD4陽性細胞中のCD154陽性細胞蛍光強度（CD154 / CD4）の測定結果を示す図である。

【図9】自己免疫性甲状腺炎の病態を持つヒト末梢血における、可溶性CD8濃度の測定結果を示す図である。

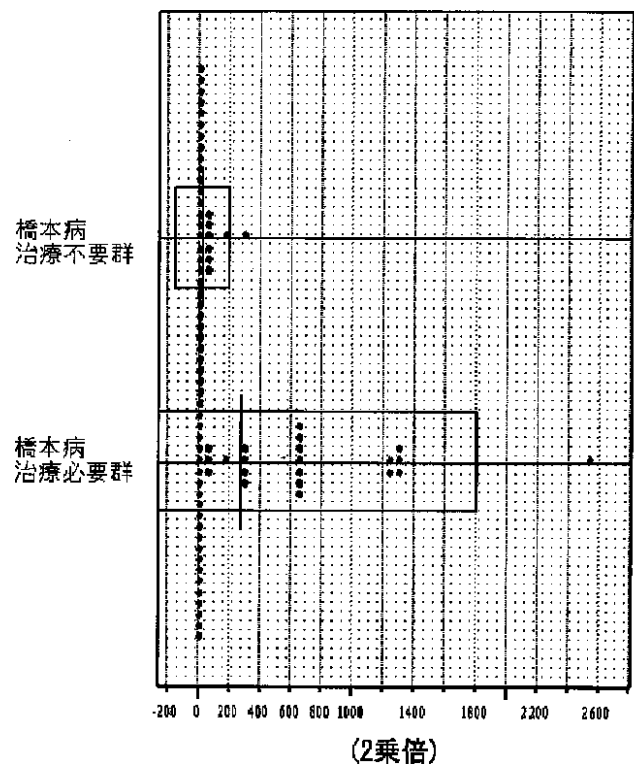
【図10】自己免疫性甲状腺炎の病態を持つヒト末梢血における、CD30陽性細胞の標準化抗原蛍光強度の測定結果を示す図である。

【図11】自己免疫性甲状腺炎の病態を持つヒト末梢血における、可溶性CD8濃度に対し、CD30の蛍光強度の測定値をプロットした図である。

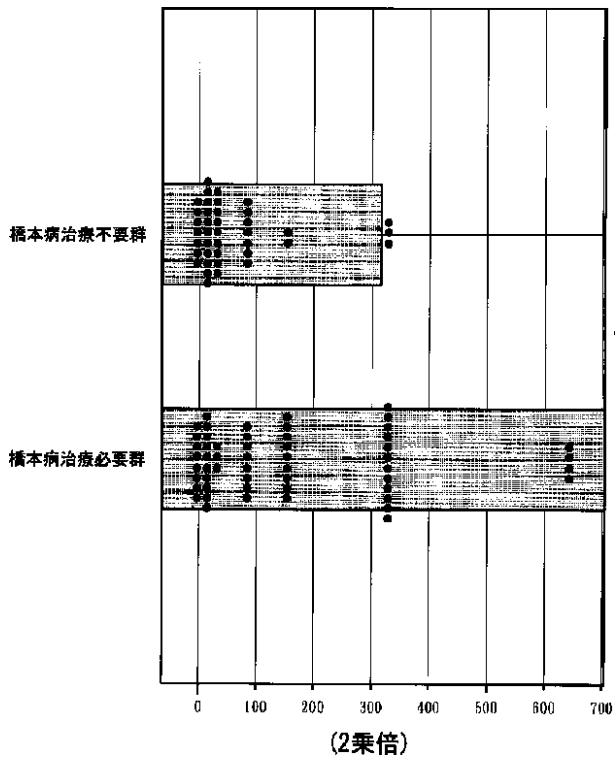
【図1】



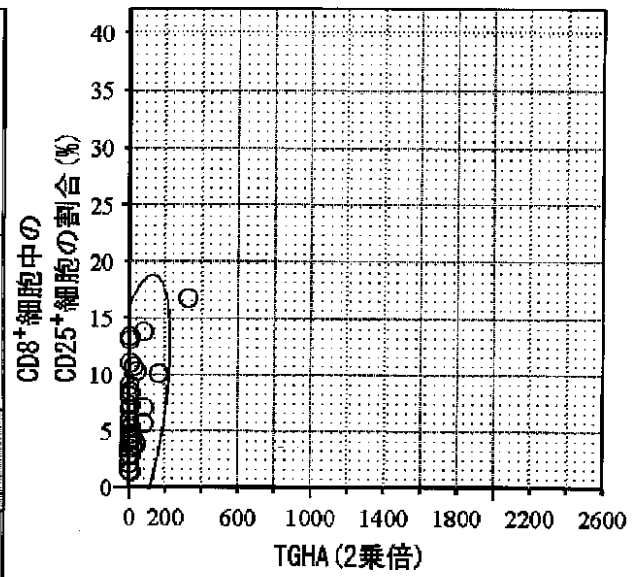
【図2】



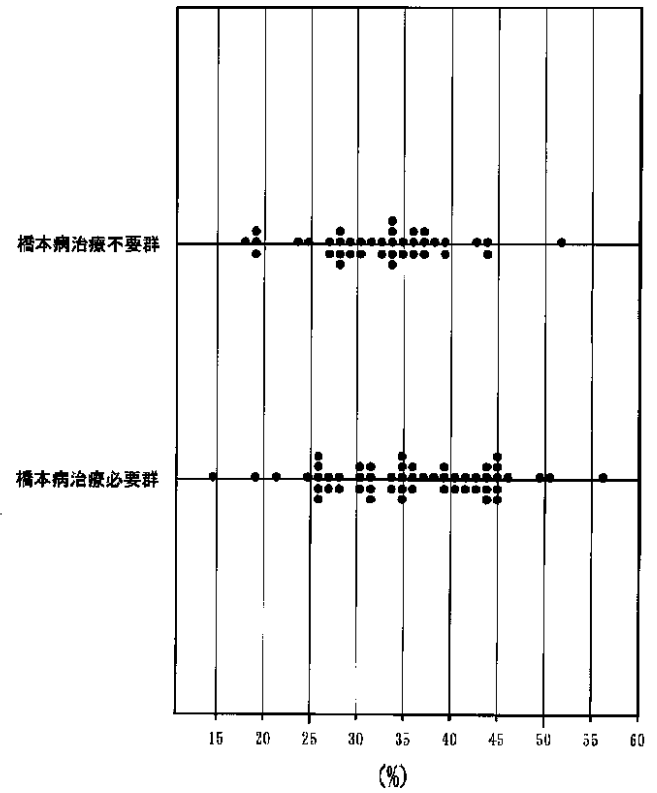
【図3】



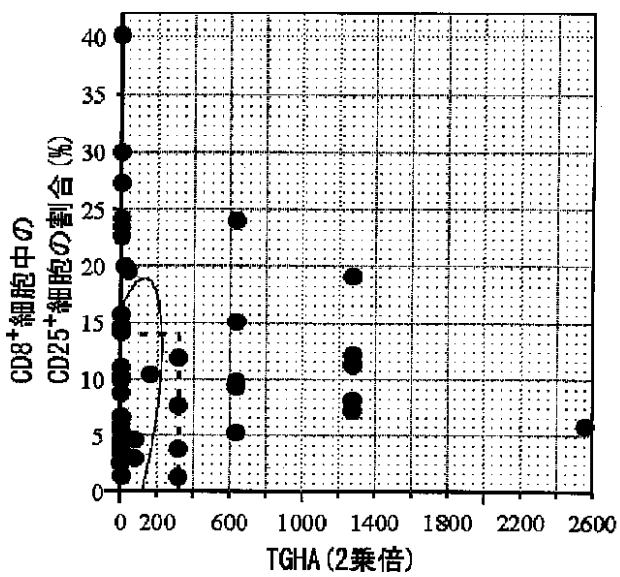
【図4】



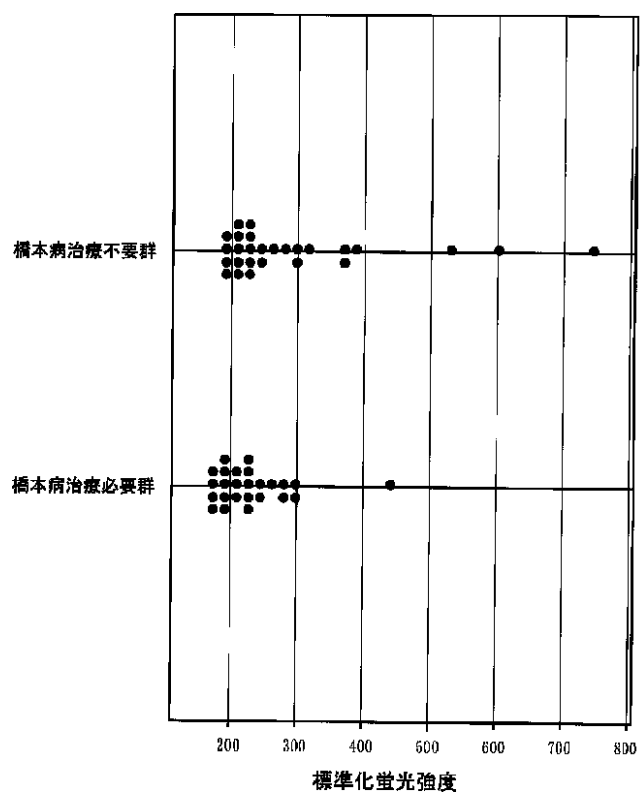
【図6】



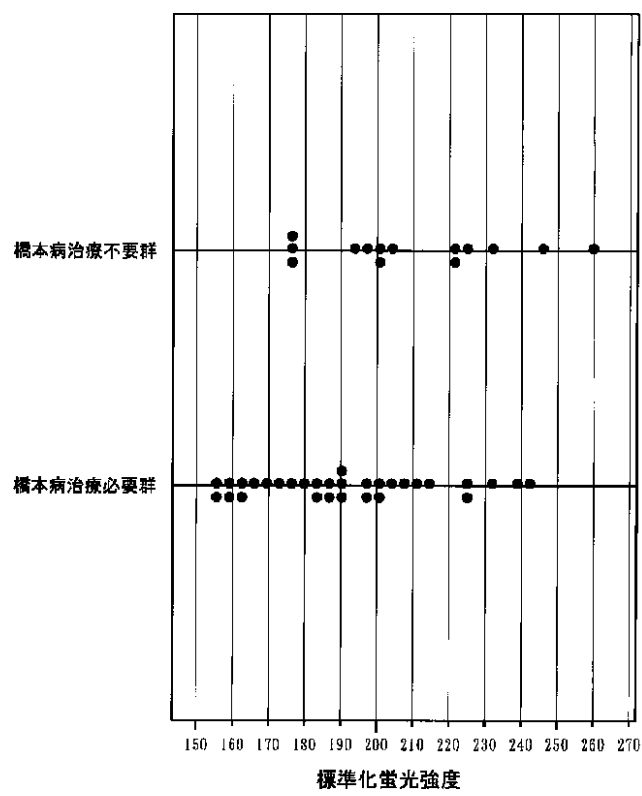
【図5】



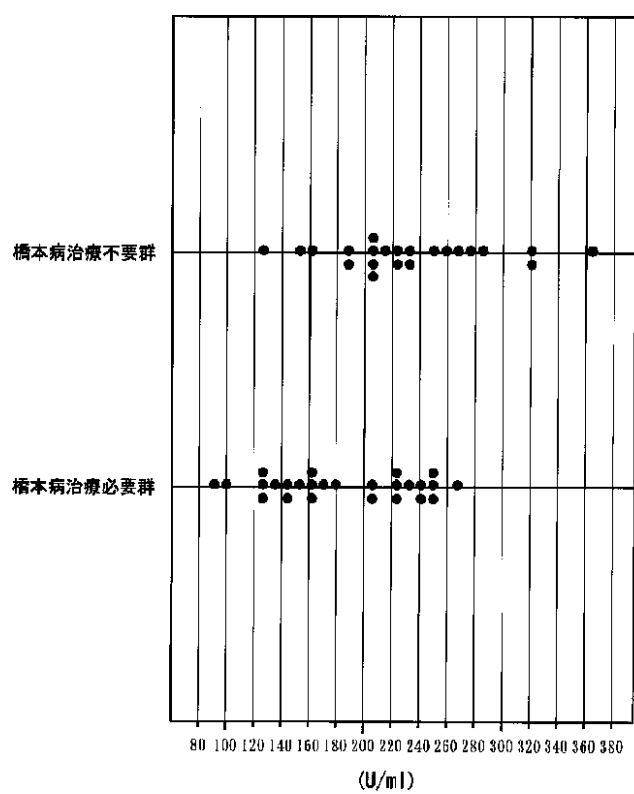
【図 7】



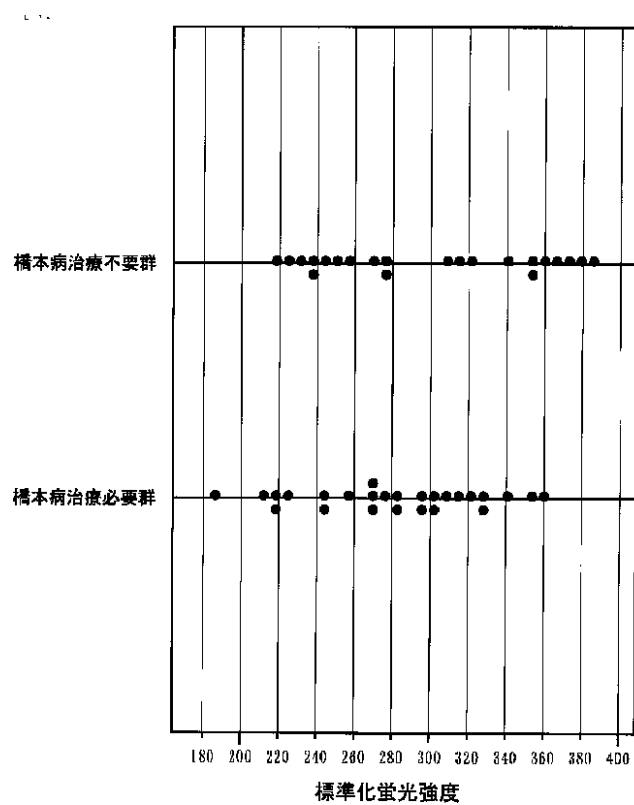
【図 8】



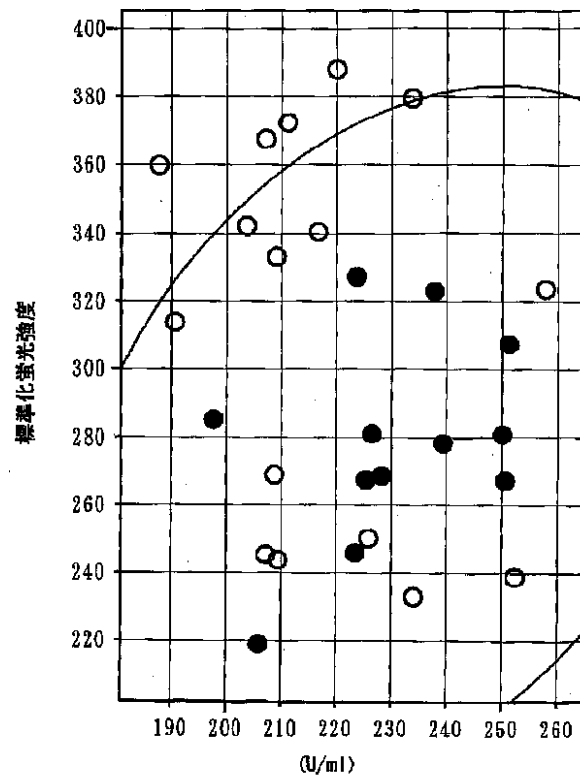
【図 9】



【図 10】



【図 11】



フロントページの続き

(72)発明者 古田 太郎
 大阪府柏原市玉手町24 - 12 サラヤ株式会
 社バイオケミカル研究所内
 (72)発明者 山本 尚子
 大阪府柏原市玉手町24 - 12 サラヤ株式会
 社バイオケミカル研究所内

(72)発明者 岩谷 良則
 大阪府吹田市山田丘1 - 7 大阪大学医学
 部保健学科内
 (72)発明者 渡邊 幹夫
 大阪府吹田市山田丘1 - 7 大阪大学医学
 部保健学科内

专利名称(译)	预测自身免疫性甲状腺炎预后的方法和用于其的试剂盒		
公开(公告)号	JP2002098701A	公开(公告)日	2002-04-05
申请号	JP2000293184	申请日	2000-09-26
[标]申请(专利权)人(译)	独立行政法人科学技術振興機構 莎羅雅株式會社		
申请(专利权)人(译)	科学技術振興事業団 サラヤ株式會社 岩谷 義		
[标]发明人	古田 太郎 山本 尚子 岩谷 良則 渡邊 幹夫		
发明人	古田 太郎 山本 尚子 岩谷 良則 渡邊 幹夫		
IPC分类号	G01N33/564 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/564.Z G01N33/53.K		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：为自身免疫性甲状腺炎的预后提供一种方法。一种自身免疫性甲状腺炎的预后方法，该方法包括以下步骤：测量得自受试者的生物样品中的淋巴细胞表面抗原或由其衍生的因子，以及 包括将测量值与自身免疫性甲状腺炎的病理状况相关联并设置预后指标值的步骤。

4、CD161などが知られ、こ* 表1

抗体名	標識蛍光	製造会社	性質等
CD4	FITC	Pharmingen	ヘルパーT細胞
CD4	PerCP	Becton Dickinson	ヘルパーT細胞
CD5	PE	Becton Dickinson	CD5陽性B細胞測定用
CD8	FITC	Becton Dickinson	細胞傷害性/抑制性T細胞
CD8	PerCP	Becton Dickinson	細胞傷害性/抑制性T細胞
CD19	FITC	Becton Dickinson	B細胞
CD25	FITC	Becton Dickinson	IL-2Ra鎖
CD25	PE	Becton Dickinson	IL-2Ra鎖
CD28	PE	Becton Dickinson	刺激性副刺激受容体
CD30	PE	Colter	2型ヘルパー(Th2)細胞
CD95	PE	Becton Dickinson	Fas
CD122	PE	Becton Dickinson	IL-2Rβ鎖
CD152	PE	Pharmingen	CTLA-4抑制性副刺激受容体
CD154	PE	Becton Dickinson	CD40リガンド
CD161	PE	Becton Dickinson	NKT細胞
CCR5	PE	Pharmingen	1型ヘルパーT(Th1)細胞