

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02018/135561

発行日 令和2年1月9日 (2020.1.9)

(43) 国際公開日 平成30年7月26日 (2018.7.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	Q 2 G O 4 5
<b>GO 1 N 33/48 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/48	M 4 B O 6 3
<b>C 1 2 Q 1/06 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/06	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N 5/0783	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 19 頁)

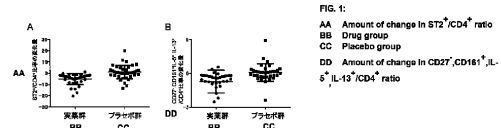
出願番号 特願2018-562418 (P2018-562418)	(71) 出願人 304021831 国立大学法人千葉大学 千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2018/001327	
(22) 国際出願日 平成30年1月18日 (2018.1.18)	
(31) 優先権主張番号 特願2017-9544 (P2017-9544)	(74) 代理人 100107984 弁理士 廣田 雅紀
(32) 優先日 平成29年1月23日 (2017.1.23)	(74) 代理人 100102255 弁理士 小澤 誠次
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国 (JP)	(74) 代理人 100096482 弁理士 東海 裕作
	(74) 代理人 100188352 弁理士 松田 一弘
	(74) 代理人 100113860 弁理士 松橋 泰典
	(74) 代理人 100131093 弁理士 堀内 真

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アレルゲン免疫療法の治療効果判定法

(57) 【要約】

本発明の課題はアレルギー性鼻炎に対するアレルゲン免疫療法の治療効果を、精度よく判定する方法等を提供することである。アレルギー性鼻炎に対するアレルゲン免疫療法開始前後において、ST2<sup>+</sup>のCD4<sup>+</sup>T細胞の細胞数の変動と、CD27<sup>-</sup>、CD161<sup>+</sup>、IL-5<sup>+</sup>、及びIL-13<sup>+</sup>からなる群から選択される1種又は2種以上のCD4<sup>+</sup>T細胞の細胞数の変動を解析し、共に減少している場合、アレルゲンを用いた免疫療法は、アレルギー性鼻炎患者に対して有効であると判定できる。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下の工程 ( a ) 及び ( b ) を備えたことを特徴とする、アレルギー性鼻炎に対するアレルギー免疫療法の治療効果の判定方法。

( a ) アレルギー免疫療法開始後のアレルギー性鼻炎患者から得られた末梢血単核球含有試料、又は該末梢血単核球含有試料をアレルギー存在下で培養して得られた T 細胞含有試料中に含まれる以下の CD 4 陽性 T 細胞 ( i ) 及び CD 4 陽性 T 細胞 ( ii ) の細胞数を測定する工程；

( i ) S T 2 陽性の CD 4 陽性 T 細胞

( ii ) CD 2 7 陰性、CD 1 6 1 陽性、IL - 5 陽性、及び IL - 1 3 陽性からなる群から選択される 1 種又は 2 種以上の CD 4 陽性 T 細胞

( b ) 前記 CD 4 陽性 T 細胞 ( i ) の細胞数と、前記 CD 4 陽性 T 細胞 ( ii ) の細胞数とを、それぞれのコントロール値と比較する工程であって、両者がそれぞれのコントロール値よりも低い場合、前記アレルギーを用いた免疫療法は、前記アレルギー性鼻炎患者に有効である可能性が高いことを示す、前記工程 ( b ) ；

10

## 【請求項 2】

工程 ( a ) において、T 細胞含有試料中に含まれる CD 4 陽性 T 細胞 ( i ) 及び CD 4 陽性 T 細胞 ( ii ) の細胞数を測定することを特徴とする請求項 1 に記載の判定方法。

## 【請求項 3】

アレルギー性鼻炎が、ダニアレルギー性鼻炎であり、アレルギー免疫療法が、ダニ抗原を用いたアレルギー免疫療法であることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の判定方法。

20

## 【請求項 4】

CD 4 陽性 T 細胞 ( ii ) が、CD 2 7 陰性であることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の判定方法。

## 【請求項 5】

CD 4 陽性 T 細胞 ( ii ) が、CD 2 7 陰性、CD 1 6 1 陽性、IL - 5 陽性で、かつ IL - 1 3 陽性の CD 4 陽性 T 細胞であることを特徴とする請求項 4 に記載の判定方法。

## 【請求項 6】

以下の CD 4 陽性 T 細胞 ( i ) に特異的に結合する抗体、及び以下の CD 4 陽性 T 細胞 ( ii ) に特異的に結合する抗体、又はそれらの標識物を含むことを特徴とする、アレルギー性鼻炎に対するアレルギー免疫療法の治療効果の判定用キット。

30

( i ) S T 2 陽性の CD 4 陽性 T 細胞

( ii ) CD 2 7 陰性、CD 1 6 1 陽性、IL - 5 陽性、及び IL - 1 3 陽性からなる群から選択される 1 種又は 2 種以上の CD 4 陽性 T 細胞

## 【請求項 7】

アレルギー性鼻炎が、ダニアレルギー性鼻炎であり、アレルギー免疫療法が、ダニ抗原を用いたアレルギー免疫療法であることを特徴とする請求項 6 に記載のキット。

## 【請求項 8】

CD 4 陽性 T 細胞 ( ii ) が、CD 2 7 陰性であることを特徴とする請求項 6 又は 7 に記載のキット。

40

## 【請求項 9】

CD 4 陽性 T 細胞 ( ii ) が、CD 2 7 陰性、CD 1 6 1 陽性、IL - 5 陽性で、かつ IL - 1 3 陽性の CD 4 陽性 T 細胞であることを特徴とする請求項 8 に記載のキット。

## 【請求項 10】

以下の CD 4 陽性 T 細胞 ( i ) 及び CD 4 陽性 T 細胞 ( ii ) からなることを特徴とする、アレルギー性鼻炎に対するアレルギー免疫療法の治療効果の判定用バイオマーカー。

( i ) S T 2 陽性の CD 4 陽性 T 細胞

( ii ) CD 2 7 陰性、CD 1 6 1 陽性、IL - 5 陽性、及び IL - 1 3 陽性からなる群から選択される 1 種又は 2 種以上の CD 4 陽性 T 細胞

## 【請求項 11】

50

アレルギー性鼻炎が、ダニアレルギー性鼻炎であり、アレルゲン免疫療法が、ダニ抗原を用いたアレルゲン免疫療法であることを特徴とする請求項10に記載のバイオマーカー。

【請求項12】

CD4陽性T細胞(ii)が、CD27陰性であることを特徴とする請求項10又は11に記載のバイオマーカー。

【請求項13】

CD4陽性T細胞(ii)が、CD27陰性、CD161陽性、IL-5陽性で、かつIL-13陽性のCD4陽性T細胞であることを特徴とする請求項12に記載のバイオマーカー。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アレルギー性鼻炎に対するアレルゲン免疫療法の治療効果の判定方法、判定用キット、及び判定用バイオマーカーに関する。

【背景技術】

【0002】

アレルギー性鼻炎は、本来無害であるはずの外来抗原に対して、免疫系が過剰に反応することにより生じる、くしゃみ、鼻みず、鼻づまり等の鼻粘膜におけるアレルギー性疾患である。ここ数十年来、生活様式や生活環境の変化に伴い、アレルギー性鼻炎を罹患する患者が急増し、患者におけるQOL(Quality Of Life)の低下や医療費負担の増大が問題となっている。特に、ダニ等のハウスダストが原因で生じるアレルギー性鼻炎患者は、スギ花粉症等の花粉症患者と同様に、年々増加の一途をたどっている。

20

【0003】

舌下免疫療法は、アレルギー性鼻炎に対する根治が望める治療法として注目を集めている。舌下免疫療法による治療効果は、通常、アレルギー性鼻炎患者の自覚症状に基づくアンケートに基づき判定されるが、自覚症状にはプラセボ効果も含まれると考えられ、客観性に乏しいことが問題とされていた。

【0004】

アレルギー性鼻炎を治療すると、T細胞のバランスが変動することが知られている。例えば、T細胞の卵白アルブミン(OVA)により誘発したアレルギー性気道疾患モデルマウスに対して、アレルゲン免疫療法を行うと、ST2陽性のCD4陽性T細胞数が減少することが報告されている(非特許文献1)。また、草花粉患者に対して舌下免疫療法を行うと、CD27陰性、CD161陽性のCD4陽性T細胞の割合は、コントロールのプラセボを投与した場合と比べ、違いが認められたことが報告されている(特許文献1)。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】国際公開第2012/148549号パンフレット

【非特許文献】

40

【0006】

【非特許文献1】Mucosal Immunol. 2014 Mar;7(2):379-90.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の課題は、アレルギー性鼻炎に対するアレルゲン免疫療法の治療効果を、精度よく判定する方法等を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を続けている。その過程において、アレ

50

ルゲン免疫療法後のアレルギー性鼻炎患者由来の末梢血単核球含有試料を、アレルギー存在下で培養することにより、アレルギー特異的T細胞を含むT細胞含有試料を調製し、CD4陽性(+)T細胞群中に含まれる2種類の細胞、すなわち、ST2<sup>+</sup>のCD4<sup>+</sup>T細胞(i)と、CD27陰性(-)、CD161<sup>+</sup>、IL-5<sup>+</sup>、及びIL-13<sup>+</sup>からなる群から選択される1種又は2種以上のCD4<sup>+</sup>T細胞(ii)とを検出し、治療前後におけるCD4<sup>+</sup>T細胞の細胞数の変動を解析したところ、上記CD4<sup>+</sup>T細胞(i)及びCD4<sup>+</sup>T細胞(ii)の細胞数が共に減少する場合、アレルギーを用いた免疫療法は、アレルギー性鼻炎患者に対して有効であると精度よく判定できることを見だし、本発明を完成するに至った。

【0009】

すなわち、本発明は以下のとおりである。

〔1〕以下の工程(a)及び(b)を備えたことを特徴とする、アレルギー性鼻炎に対するアレルギー免疫療法の治療効果の判定方法(以下、「本件判定方法」ということがある)。

(a)アレルギー免疫療法開始後のアレルギー性鼻炎患者から得られた末梢血単核球含有試料、又は該末梢血単核球含有試料をアレルギー存在下で培養して得られたT細胞含有試料中に含まれる以下のCD4陽性T細胞(i)及びCD4陽性T細胞(ii)の細胞数を測定する工程；

(i)ST2陽性のCD4陽性T細胞

(ii)CD27陰性、CD161陽性、IL-5陽性、及びIL-13陽性からなる群から選択される1種又は2種以上のCD4陽性T細胞

(b)前記CD4陽性T細胞(i)の細胞数と、前記CD4陽性T細胞(ii)の細胞数とを、それぞれのコントロール値と比較する工程であって、両者がそれぞれのコントロール値よりも低い場合、前記アレルギーを用いた免疫療法は、前記アレルギー性鼻炎患者に有効である可能性が高いことを示す、前記工程(b)；

〔2〕工程(a)において、T細胞含有試料中に含まれるCD4陽性T細胞(i)及びCD4陽性T細胞(ii)の細胞数を測定することを特徴とする上記〔1〕に記載の判定方法。

〔3〕アレルギー性鼻炎が、ダニアレルギー性鼻炎であり、アレルギー免疫療法が、ダニ抗原を用いたアレルギー免疫療法であることを特徴とする上記〔1〕又は〔2〕に記載の判定方法。

〔4〕CD4陽性T細胞(ii)が、CD27陰性であることを特徴とする上記〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の判定方法。

〔5〕CD4陽性T細胞(ii)が、CD27陰性、CD161陽性、IL-5陽性で、かつIL-13陽性のCD4陽性T細胞であることを特徴とする上記〔4〕に記載の判定方法。

〔6〕以下のCD4陽性T細胞(i)に特異的に結合する抗体、及び以下のCD4陽性T細胞(ii)に特異的に結合する抗体、又はそれらの標識物を含むことを特徴とする、アレルギー性鼻炎に対するアレルギー免疫療法の治療効果の判定用キット(以下、「本件判定用キット」ということがある)。

(i)ST2陽性のCD4陽性T細胞

(ii)CD27陰性、CD161陽性、IL-5陽性、及びIL-13陽性からなる群から選択される1種又は2種以上のCD4陽性T細胞

〔7〕アレルギー性鼻炎が、ダニアレルギー性鼻炎であり、アレルギー免疫療法が、ダニ抗原を用いたアレルギー免疫療法であることを特徴とする上記〔6〕に記載のキット。

〔8〕CD4陽性T細胞(ii)が、CD27陰性であることを特徴とする上記〔6〕又は〔7〕に記載のキット。

〔9〕CD4陽性T細胞(ii)が、CD27陰性、CD161陽性、IL-5陽性で、かつIL-13陽性のCD4陽性T細胞であることを特徴とする上記〔8〕に記載のキット。

。

10

20

30

40

50

〔10〕以下のCD4陽性T細胞(i)及びCD4陽性T細胞(ii)からなることを特徴とする、アレルギー性鼻炎に対するアレゲン免疫療法の治療効果の判定用バイオマーカー(以下、「本件判定用バイオマーカー」ということがある)。

(i) ST2陽性のCD4陽性T細胞

(ii) CD27陰性、CD161陽性、IL-5陽性、及びIL-13陽性からなる群から選択される1種又は2種以上のCD4陽性T細胞

〔11〕アレルギー性鼻炎が、ダニアレルギー性鼻炎であり、アレゲン免疫療法が、ダニ抗原を用いたアレゲン免疫療法であることを特徴とする上記〔10〕に記載のバイオマーカー。

〔12〕CD4陽性T細胞(ii)が、CD27陰性であることを特徴とする上記〔10〕又は〔11〕に記載のバイオマーカー。

〔13〕CD4陽性T細胞(ii)が、CD27陰性、CD161陽性、IL-5陽性で、かつIL-13陽性のCD4陽性T細胞であることを特徴とする上記〔12〕に記載のバイオマーカー。

【0010】

本発明の実施の他の形態として、上記工程(a)及び(b)を備えたことを特徴とする、アレルギー性鼻炎に対するアレゲン免疫療法の治療効果の診断方法や、アレルギー性鼻炎に対するアレゲン免疫療法の治療効果の判定に用いるための上記CD4陽性T細胞(i)及びCD4陽性T細胞(ii)を挙げることができる。

【発明の効果】

【0011】

本発明を用いることにより、舌下免疫療法等のアレゲン免疫療法の有効性を客観的かつ精度よく評価することができ、また、早期の効果予測が可能となるため、アレゲン免疫治療患者の負担軽減や医療費削減等の効果が期待される。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】図1Aは、舌下免疫療法による治療前後での実薬群(n=36)及びプラセボ群(n=40)のST2<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>比率の変化量を測定した結果を示す図である。図1Bは、舌下免疫療法による治療前後での実薬群(n=38)及びプラセボ群(n=35)のCD27<sup>-</sup>・CD161<sup>+</sup>・IL-5<sup>+</sup>・IL-13<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>比率の変化量を測定した結果を示す図である。図中の及びは、各群のダニアレルギー患者一人ひとりを示す。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本件判定方法としては、アレゲン免疫療法開始後、治療中又は治療後のアレルギー性鼻炎患者から得られた末梢血単核球含有試料(末梢血単核球画分)、又はかかる末梢血単核球含有試料をアレゲン存在下で培養して得られたT細胞含有試料(アレゲン特異的T細胞を含有する試料)中に含まれるST2陽性のCD4陽性T細胞(i)(以下、「治療後CD4陽性T細胞(i)」ということがある)の細胞数と、前記末梢血単核球含有試料又はT細胞含有試料中に含まれるCD27陰性、CD161陽性、IL-5陽性、及びIL-13陽性からなる群から選択される1種又は2種以上のCD4陽性T細胞(ii)(以下、「治療後CD4陽性T細胞(ii)」ということがある)の細胞数とを測定する工程(a);及び前記「治療後CD4陽性T細胞(i)」の細胞数を、コントロール値(以下、「コントロール値(i)」ということがある)と比較し、かつ、前記「治療後CD4陽性T細胞(ii)」の細胞数を、コントロール値(以下、「コントロール値(ii)」ということがある)と比較する工程(b)であって、「治療後CD4陽性T細胞(i)」の細胞数が「コントロール値(i)」よりも低く、かつ「治療後CD4陽性T細胞(ii)」の細胞数が、「コントロール値(ii)」よりも低い場合、前記アレゲンを用いた免疫療法は、前記アレルギー性鼻炎患者に有効である可能性が高いことを示す、前記工程(b);の工程(a)及び(b)を順次備えた方法であれば特に制限されず、工程(a)の前に、アレゲン免疫療法後のアレルギー性鼻炎患者から採取された血液試料(血液、血清、血漿

10

20

30

40

50

等)から、末梢血単核球画分を調製する工程(p)をさらに備えた方法であってもよい。

【0014】

また、本件判定用キットとしては、ST2陽性のCD4陽性T細胞(i)(以下、単に「CD4陽性T細胞(i)」ということがある)に特異的に結合する抗体(以下、「抗CD4陽性T細胞(i)抗体」ということがある)、及び、CD27陰性、CD161陽性、IL-5陽性、及びIL-13陽性からなる群から選択される1種又は2種以上のCD4陽性T細胞(ii)(以下、単に「CD4陽性T細胞(ii)」ということがある)に特異的に結合する抗体(以下、「抗CD4陽性T細胞(ii)抗体」ということがある)、並びに/又は、「抗CD4陽性T細胞(i)抗体」の標識物、及び「抗CD4陽性T細胞(ii)抗体」の標識物を含む、アレルゲン免疫療法の治療効果の判定に用いるためのキットであれば特に制限されず、本件判定用キットは、アレルゲン免疫療法の治療効果を判定(診断)するためのキットに関する用途発明であり、これらキットには、一般にこの種の判定キットに用いられる成分、例えば担体、pH緩衝剤、安定剤の他、取扱説明書、アレルゲン免疫療法の治療効果を判定するための説明書等の添付文書が通常含まれる。

10

【0015】

また、本件判定用バイオマーカーとしては、「CD4陽性T細胞(i)」及び「CD4陽性T細胞(ii)」からなる、アレルギー性鼻炎に対するアレルゲン免疫療法の治療効果の判定(診断)用バイオマーカーであれば特に制限されない。

【0016】

本明細書において、「アレルギー性鼻炎」とは、ある種の外因性物質の摂取又は接触により生体内に抗体が作られ、同じ外因性物質(アレルゲン[抗原])の再摂取又は再接触により抗原抗体反応が生じて、アレルギー性鼻炎の症状(鼻閉、発作性反復性のくしゃみ、及び/又は水性鼻漏)が現れる、鼻粘膜におけるI型アレルギー性(IgE抗体によるアレルギー性)の炎症を意味する。

20

【0017】

本明細書において、「アレルギー性鼻炎に対するアレルゲン免疫療法」とは、アレルギー性鼻炎患者に、アレルギー性鼻炎の原因物質であるアレルゲンを投与することにより、アレルゲンに曝露された場合に引き起こされるアレルギー性鼻炎の症状を軽減(改善)する治療法を意味する。アレルゲン免疫療法におけるアレルゲンの投与形態としては、特に制限されず、経口投与、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、舌下投与、点眼投与、吸入投与、経皮投与、経鼻投与等を挙げることができ、舌下投与が好ましい。

30

【0018】

本明細書において、アレルゲンとしては、具体的に、ハウスダスト(例えば、カビ、真菌の孢子、織物の繊維、動物の鱗屑、ダニ[チリダニ、ツメダニ、コナダニ等]、昆虫の死骸)抗原や、花粉(例えば、スギ花粉、ヒノキ花粉、ブタクサ花粉、イネ花粉、ケヤキ花粉、カモガヤ花粉、シラカバ花粉、コナラ花粉、ハンノキ花粉、マツ属花粉)などを挙げることができる。

【0019】

上記アレルギー性鼻炎は、始発時期から通年性のアレルギー性鼻炎と、季節性のアレルギー性鼻炎とに分類される。かかる通年性のアレルギー性鼻炎は、上記ハウスダスト抗原等が原因で、年間を通じて発症し得るものである。一方、上記季節性のアレルギー性鼻炎は、上記花粉等のアレルゲンが原因で、一年の特定の時期に発症し得るものである。

40

【0020】

上記アレルギー性鼻炎やアレルゲン免疫療法としては、ダニが原因で生じるアレルギー性鼻炎(ダニアレルギー性鼻炎)や、ダニ抗原を用いたアレルゲン免疫療法が好ましい。

【0021】

本明細書において、「CD4陽性」、「ST2陽性」及び「CD161陽性」とは、CD(cluster of differentiation)4抗原、ST2抗原及びCD161抗原をT細胞表面上に発現することを意味する。また、本明細書において、「CD27陰性」とは、CD27抗原をT細胞表面上に発現しないことを意味する。また、本明細書において、「IL-

50

5 陽性」及び「I L - 1 3 陽性」とは、I L ( Interleukin ) - 5、及び I L - 1 3 を T 細胞内に発現することを意味する。

【 0 0 2 2 】

上記「C D 4 陽性 T 細胞 ( ii ) 」としては、具体的には、C D 2 7 陰性の C D 4 陽性 T 細胞；C D 1 6 1 陽性の C D 4 陽性 T 細胞；I L - 5 陽性の C D 4 陽性 T 細胞；I L - 1 3 陽性の C D 4 陽性 T 細胞；C D 2 7 陰性で、かつ C D 1 6 1 陽性の C D 4 陽性 T 細胞；C D 2 7 陰性で、かつ I L - 5 陽性の C D 4 陽性 T 細胞；C D 2 7 陰性で、かつ I L - 1 3 陽性の C D 4 陽性 T 細胞；C D 1 6 1 陽性で、かつ I L - 5 陽性の C D 4 陽性 T 細胞；C D 1 6 1 陽性で、かつ I L - 1 3 陽性の C D 4 陽性 T 細胞；I L - 5 陽性で、かつ I L - 1 3 陽性の C D 4 陽性 T 細胞；C D 2 7 陰性、C D 1 6 1 陽性で、かつ I L - 5 陽性の C D 4 陽性 T 細胞；C D 2 7 陰性、C D 1 6 1 陽性で、かつ I L - 1 3 陽性の C D 4 陽性 T 細胞；C D 1 6 1 陽性、I L - 5 陽性で、かつ I L - 1 3 陽性の C D 4 陽性 T 細胞；C D 2 7 陰性、C D 1 6 1 陽性、I L - 5 陽性で、かつ I L - 1 3 陽性の C D 4 陽性 T 細胞を挙げることができ、C D 2 7 陰性の C D 4 陽性 T 細胞が好ましく、C D 2 7 陰性、C D 1 6 1 陽性、I L - 5 陽性で、かつ I L - 1 3 陽性の C D 4 陽性 T 細胞がより好ましい。

10

【 0 0 2 3 】

上記末梢血単核球含有試料としては、アレルギー免疫療法後のアレルギー性鼻炎患者から調製された、末梢血単核球 ( 単核細胞 ) を含む試料であればよく、ここで末梢血単核球含有試料中の末梢血単核球の純度は、通常少なくとも 5 0 % であり、好ましくは少なくとも 8 0 %、より好ましくは少なくとも 8 5 %、さらに好ましくは少なくとも 9 0 %、さらにより好ましくは少なくとも 9 5 % である。末梢血単核球含有試料は、アレルギー免疫療法後のアレルギー性鼻炎患者から採取された血液試料 ( 血液、血清、血漿等 ) から、公知の方法、例えば、密度勾配遠心分離法により調製することができる。上記アレルギー免疫療法開始後の期間としては、特に制限されず、例えば、開始後 2 カ月 ~ 3 年 ( 6 0 ~ 約 1 0 0 0 日 ) の範囲内、好ましくは、1 8 0 ~ 7 0 0 日、より好ましくは 3 0 0 ~ 4 0 0 日である。

20

【 0 0 2 4 】

本件判定方法の工程 ( a ) において、測定対象の試料としては、「治療後 C D 4 陽性 T 細胞 ( i ) 」及び「治療後 C D 4 陽性 T 細胞 ( ii ) 」の検出感度を高める観点から、T 細胞含有試料が好ましい。T 細胞含有試料に含まれる細胞全体に対する T 細胞の割合としては、特に制限されず、例えば 2 0 ~ 6 0 % の範囲内であり、好ましくは 3 0 ~ 4 0 % である。

30

【 0 0 2 5 】

本明細書において、T 細胞含有試料は、末梢血単核球含有試料を、アレルギー ( 好ましくは、アレルギー免疫療法に用いるアレルギーと由来が同じもの ) 存在下で培養し、「C D 4 陽性 T 細胞 ( i ) 」や「C D 4 陽性 T 細胞 ( ii ) 」を含むアレルギー特異的 T 細胞を増殖させることにより調製できる。末梢血単核球含有試料の培養期間としては、特に制限されず、例えば 1 ~ 1 0 日間、好ましくは 4 ~ 8 日間である。また、末梢血単核球含有試料の培養に用いる培養液としては、特に制限されず、例えば、5 ~ 2 0 % のウシ胎児血清 ( Fetal bovine serum ; F B S ) を含む動物細胞培養用基礎培養液 ( D M E M 、 E M E M 、 R P M I - 1 6 4 0 、 - M E M 、 F - 1 2 、 F - 1 0 、 M - 1 9 9 、 A I M - V 等 ) を挙げることができる。また、末梢血単核球含有試料の培養に用いる培養液には、必要に応じて、I L - 2、I L - 7、I L - 3 3 等のサイトカインや、抗 C D 3 抗体、P M A ( Phorbol 12-Myristate 13-Acetate )、イオノマイシン等の T 細胞増殖刺激物質、ストレプトマイシン、ペニシリン等の抗生物質などを添加することもできる。添加したサイトカインの培養液中の濃度 ( 終濃度 ) としては、サイトカインの種類に応じて適宜至適濃度を選択することができ、例えば、サイトカインが I L - 2 の場合、例えば、3 ~ 6 0 ( J I U / m L ) の範囲内であり、好ましくは 1 0 ~ 2 0 ( J I U / m L ) である。また、サイトカインが I L - 3 3 の場合、例えば、1 0 ~ 6 0 0 ( n g / m L ) の範囲内であり、好ましくは 5 0 ~ 2 0 0 ( n g / m L ) である。また、培養液中のアレルゲンの濃度として

40

50

は、アレルゲン特異的T細胞を増殖できる濃度であれば特に制限されず、通常0.1~50 $\mu$ g/mLの範囲内であり、好ましくは1~10 $\mu$ g/mLである。培養温度は、通常30~40の範囲内であり、好ましくは約37である。培養時のCO<sub>2</sub>濃度は、通常約1~10%の範囲内であり、好ましくは約5%である。また、培養時の湿度は、通常約70~100%の範囲内であり、好ましくは約95~100%の範囲内である。

【0026】

本件判定方法の工程(a)において、「治療後CD4陽性T細胞(i)」及び「治療後CD4陽性T細胞(ii)」の細胞数を測定する方法としては、「CD4陽性T細胞(i)」及び「CD4陽性T細胞(ii)」、又はそれらの由来成分(例えばCD4、ST2、CD161、CD27、IL-5、及び/又はIL-13タンパク質や、CD4、ST2、CD161、CD27、IL-5、及び/又はIL-13遺伝子のmRNA)を特異的に検出し、「CD4陽性T細胞(i)」及び「CD4陽性T細胞(ii)」の細胞数の増減を測定できる方法であれば特に制限されず、例えば、「抗CD4陽性T細胞(i)抗体」及び「抗CD4陽性T細胞(ii)抗体」を用いて、T細胞におけるCD4、ST2、CD161、CD27、IL-5、及び/又はIL-13タンパク質の発現を解析する方法、具体的には、ウエスタンブロッティング法、フローサイトメトリー、ELISA法、EIA法、RIA法等の方法や、T細胞におけるCD4、ST2、CD161、CD27、IL-5、及び/又はIL-13遺伝子のmRNAの発現を解析する方法、具体的には、定量RT-PCR(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)法、RT-PCR法、サザンブロッティング法等の方法を挙げることができる。「CD4陽性T細胞(i)」におけるCD4及びST2や、「CD4陽性T細胞(ii)」におけるCD4、CD161、及びCD27は、細胞表面受容体であることから、簡便性を考慮すると、フローサイトメトリーを用いることが好ましい。

10

20

【0027】

本件判定方法において、「コントロール値(i)」としては、「CD4陽性T細胞(i)」の細胞数が、アレルゲン免疫療法を受けたことにより減少しているか否かを判定(判断)するための指標(対照)値であれば特に制限されず、例えば、アレルゲン免疫療法開始前のアレルギー性鼻炎患者(好ましくは、判定対象と同一の患者)から得られた末梢血単核球含有試料、又はかかる末梢血単核球含有試料をアレルゲン存在下で培養して得られたT細胞含有試料中に含まれる「CD4陽性T細胞(i)」(以下、「治療前CD4陽性T細胞(i)」ということがある)の細胞数や、「治療前CD4陽性T細胞(i)」及び「治療後CD4陽性T細胞(i)」の細胞数に基づき、統計解析ソフトウェアを用いたROC(Receiver Operating Characteristic)曲線等を用いて算出された閾値(カットオフ値)を挙げることができる。コントロール値として用いる「治療前CD4陽性T細胞(i)」の細胞数は、本件判定方法を実施する際、その都度測定したものをを用いてもよいし、予め測定したものをを用いてもよい。

30

【0028】

また、本件判定方法において、「コントロール値(ii)」としては、「CD4陽性T細胞(ii)」の細胞数が、アレルゲン免疫療法を受けたことにより減少しているか否かを判定(判断)するための指標(対照)値であれば特に制限されず、例えば、アレルゲン免疫療法開始前のアレルギー性鼻炎患者(好ましくは、判定対象と同一の患者)から得られた末梢血単核球含有試料、又はかかる末梢血単核球含有試料をアレルゲン存在下で培養して得られたT細胞含有試料中に含まれる「CD4陽性T細胞(ii)」(以下、「治療前CD4陽性T細胞(ii)」ということがある)の細胞数や、「治療前CD4陽性T細胞(ii)」及び「治療後CD4陽性T細胞(ii)」の細胞数に基づき、統計解析ソフトウェアを用いたROC曲線等を用いて算出された閾値(カットオフ値)を挙げることができる。コントロール値として用いる「治療前CD4陽性T細胞(ii)」の細胞数は、本件判定方法を実施する際、その都度測定したものをを用いてもよいし、予め測定したものをを用いてもよい。

40

【0029】

50

本件判定方法の工程 ( a ) において、 T 細胞含有試料を用いて細胞数を測定する場合、 C D 4 陽性 T 細胞全体の細胞数に対する「治療後 C D 4 陽性 T 細胞 ( i ) 」の細胞数の割合 ( 比率 ) ( 以下、「治療後比率 ( i ) 」ということがある ) ; 及び C D 4 陽性 T 細胞全体の細胞数に対する「治療後 C D 4 陽性 T 細胞 ( ii ) 」の細胞数の比率 ( 以下、「治療後比率 ( ii ) 」ということがある ) ; をそれぞれ算出し、本件判定方法の工程 ( b ) において、「治療後比率 ( i ) 」及び「治療後比率 ( ii ) 」が、それぞれ C D 4 陽性 T 細胞全体の細胞数に対する「治療前 C D 4 陽性 T 細胞 ( i ) 」の細胞数の比率 ; 及び C D 4 陽性 T 細胞全体の細胞数に対する「治療前 C D 4 陽性 T 細胞 ( ii ) 」の細胞数の比率 ; よりも減少しているか否かを比較することが好ましい。

#### 【 0 0 3 0 】

本件判定用キットにおける「抗 C D 4 陽性 T 細胞 ( i ) 抗体」としては、上記末梢血単核球画分に含まれる「 C D 4 陽性 T 細胞 ( i ) 」由来の物質 ( 通常はタンパク質 ) をエピトープとして特異的に結合する抗体であれば特に制限されず、具体的には、抗 S T 2 抗体及び抗 C D 4 抗体から選択される 1 種又は 2 種の抗体を挙げることができる。また、本件判定用キットにおける「抗 C D 4 陽性 T 細胞 ( ii ) 抗体」としては、上記末梢血単核球画分に含まれる「 C D 4 陽性 T 細胞 ( ii ) 」由来の物質 ( 通常はタンパク質 ) をエピトープとして特異的に結合する抗体であれば特に制限されず、具体的には、抗 C D 2 7 抗体、抗 C D 1 6 1 抗体、抗 I L - 5 抗体、抗 I L - 1 3 抗体、及び抗 C D 4 抗体からなる群から選択される 1 種又は 2 種以上の抗体を挙げることができる。

#### 【 0 0 3 1 】

上記「抗 C D 4 陽性 T 細胞 ( i ) 抗体」及び「抗 C D 4 陽性 T 細胞 ( ii ) 抗体」の由来、種類、クラス、形態等は特に制限されず、「抗 C D 4 陽性 T 細胞 ( i ) 抗体」及び「抗 C D 4 陽性 T 細胞 ( ii ) 抗体」には、例えば、ヒト由来の抗体 ; マウス、ラット等の非ヒト動物由来の抗体 ; ポリクローナル抗体、オリゴクローナル抗体 ( 数種 ~ 数十種の抗体の混合物 )、モノクローナル抗体 ; 抗体の一部領域 ( 例えば、定常領域 ) を異なる生物種由来の領域に置換したキメラ抗体又はヒト化抗体、モノクローナル抗体をペプシンで消化して得られる F ( a b )<sub>2</sub> 抗体フラグメント、F ( a b )<sub>2</sub> 抗体フラグメントを還元して得られる F a b 抗体フラグメント、モノクローナル抗体をパインで消化して得られる F a b 等の抗体フラグメント、抗体重 ( H ) 鎖可変領域と抗体軽 ( H ) 鎖可変領域とを、アミノ酸架橋によって連結させた s c F v 等の組換え抗体 ; などが含まれる。

#### 【 0 0 3 2 】

本件判定用キットの標識物における標識物質としては、ペルオキシダーゼ ( 例えば、horseradish peroxidase )、アルカリフォスファターゼ、 $\alpha$ -D - ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコ - ス - 6 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ、アルコール脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、ペニシリナーゼ、カタラーゼ、アポグルコースオキシダーゼ、ウレアーゼ、ルシフェラーゼ若しくはアセチルコリンエステラーゼ等の酵素 ; A P C、P E、F I T C、A l e x a F l u o r 4 8 8、A l e x a F l u o r 6 4 7、A l e x a F l u o r 7 0 0、P E - T e x a s R e d、P E - C y 5、P E - C y 7 等の蛍光物質 ; 緑色蛍光タンパク質 ( Green Fluorescence Protein ; G F P )、シアン蛍光タンパク質 ( Cyan Fluorescence Protein ; C F P )、青色蛍光タンパク質 ( Blue Fluorescence Protein ; B F P )、黄色蛍光タンパク質 ( Yellow Fluorescence Protein ; Y F P )、赤色蛍光タンパク質 ( Red Fluorescence Protein ; R F P )、ルシフェラーゼ ( luciferase ) 等の蛍光タンパク質 ; <sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>125</sup>I 若しくは <sup>131</sup>I 等の放射性同位体 ; ビオチン、アビジン等を挙げることができる。

#### 【 0 0 3 3 】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

#### 【 実施例 】

#### 【 0 0 3 4 】

[ ダニアレルギー性鼻炎患者由来の末梢血単核球画分の調製 ]

ダニアレルギー性鼻炎患者（表 1 参照）に対して、ダニ舌下錠（Stallergenes社製）を用いた舌下免疫療法（実薬群）と、コントロールとしてプラセボ（Stallergenes社製）を用いた舌下免疫療法（プラセボ群）を、二重盲検比較試験にて行った。当該治療前及び治療後 1 年間における実薬群及びプラセボ群の患者から、末梢血を採取し、定法にしたがって末梢血単核球画分を調製し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。

【 0 0 3 5 】

【表 1】

年齢	16～50歳	
症状	ダニに起因する通年性アレルギー性鼻炎症状を2年以上有する患者	10
	ヤケヒョウダニ、又はコナヒョウダニに対する血清特異的 I g E 抗体検査により、クラス 2 以上の陽性患者	
	ヤケヒョウダニ、又はコナヒョウダニに対する血清特異的 I g E 抗体検査により、クラス 2 以上の陽性患者	
	平均総合鼻症状スコア（くしゃみ、鼻汁、鼻閉、鼻搔痒感）が、7 点（中等症）以上の患者	

【 0 0 3 6 】

[ ダニ抗原特異的な末梢血単核球の調製 1 ]

上記 [ ダニアレルギー性鼻炎患者由来の末梢血単核球画分の調製 ] の項目に記載の方法にしたがって調製した末梢血単核球画分を解凍し、培養液（RPMI - 1640、WAKO製）中で、 $37^{\circ}\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  条件下で4時間培養した後、Cell Trace細胞増殖アッセイ用試薬（Thermo Fisher Scientific社製）で染色し、培養液を、 $6.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  のダニ抗原（INDOOR biotechnologies社製）、 $20 \text{ JIU}/\text{mL}$  のヒト IL - 2（イムネース [ シオノギ製薬社製 ] ）、及び  $100 \text{ ng}/\text{mL}$  のヒト IL - 33（R&D Systems社製）を含む培養液と交換し、 $37^{\circ}\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  条件下で7日間培養した。

【 0 0 3 7 】

[ ダニ抗原特異的な末梢血単核球の調製 2 ]

上記 [ ダニアレルギー性鼻炎患者由来の末梢血単核球画分の調製 ] の項目に記載の方法にしたがって調製した末梢血単核球画分を解凍し、培養液（RPMI - 1640、WAKO社製）中で、 $37^{\circ}\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  条件下で4時間培養した後、Cell Trace細胞増殖アッセイ用試薬（Thermo Fisher Scientific社製）で染色し、培養液を、 $6.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  のダニ抗原（INDOOR biotechnologies社製）及び  $20 \text{ JIU}/\text{mL}$  のヒト IL - 2（イムネース [ シオノギ製薬社製 ] ）を含む培養液と交換し、 $37^{\circ}\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  条件下で7日間培養した。その後、培養液を  $50 \text{ ng}/\text{mL}$  の PMA（Phorbol 12-Myristate 13-Acetate）（SIGMA社製）及び  $1 \mu\text{M}$  のイオノマイシン（Calbiochem社製）を含む培養液と交換し、 $37^{\circ}\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  条件下で4時間培養した。

【 0 0 3 8 】

[ セルソーティング及びフローサイトメトリ解析 1 ]

上記 [ ダニ抗原特異的な末梢血単核球の調製 1 ] の項目に記載の方法にしたがって調製した単核球（単核細胞）を、蛍光物質で標識した2種類の細胞表面マーカー（CD4及びST2）に対する抗体（表 2 参照）を用いて30分間、 $4^{\circ}\text{C}$  条件下で抗原抗体反応を行った。その後、 $\text{CD}4^{+}\text{T}$ 細胞群と、 $\text{ST}2^{+}$ の $\text{CD}4^{+}\text{T}$ 細胞群とを、フローサイトメーター（FACSCant II、BD Biosciences社製）を用いて解析し、 $\text{CD}4^{+}\text{T}$ 細胞に対する $\text{ST}2^{+}$ の $\text{CD}4^{+}\text{T}$ 細胞の割合（ $\text{ST}2^{+}/\text{CD}4^{+}$ 比率）を測定した。また、舌下免疫療法による治療前後での $\text{ST}2^{+}/\text{CD}4^{+}$ 比率の変化量を、式（「舌下免疫療法による治療後における $\text{ST}2^{+}/\text{CD}4^{+}$ 比率」 - 「舌下免疫療法による治療前における $\text{ST}2^{+}/\text{CD}4^{+}$ 比率」 = 「 $\text{ST}2^{+}/\text{CD}4^{+}$ 比率の変化量」）を基に算出した（図 1 A 参照）。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 9 】

## [ セルソーティング及びフローサイトメトリー解析 2 ]

上記 [ ダニ抗原特異的な末梢血単核球の調製 2 ] の項目に記載の方法にしたがって調製した単核細胞を、蛍光物質で標識した 3 種類の細胞表面マーカー ( CD 4、CD 2 7、及び CD 1 6 1 ) に対する抗体 ( 表 2 参照 ) を用いて 3 0 分間、4 条件下で抗原抗体反応を行った。次いで、細胞内に存在する 2 種類のマーカー ( IL - 5 及び IL - 1 3 ) を検出するために、単核細胞を、蛍光物質で標識した 2 種類の細胞内マーカー ( IL - 5 及び IL - 1 3 ) に対する抗体 ( 表 3 参照 ) と、細胞内染色キット ( Transcription Buffer set、BD Pharmingen社製 ) を用いて製品添付のプロトコールにしたがって免疫蛍光染色法を行った。その後、CD 4<sup>+</sup> T細胞群と、CD 2 7<sup>-</sup>、CD 1 6 1<sup>+</sup>、IL - 5<sup>+</sup> ( 産生 )、及び IL - 1 3<sup>+</sup> ( 産生 ) の CD 4<sup>+</sup> T細胞群とを、フローサイトメーター ( FACSCa ntII、BD Biosciences社製 ) を用いて解析し、CD 4<sup>+</sup> T細胞に対する CD 2 7<sup>-</sup>、CD 1 6 1<sup>+</sup>、IL - 5<sup>+</sup> で、かつ IL - 1 3<sup>+</sup> の CD 4<sup>+</sup> T細胞の割合 ( CD 2 7<sup>-</sup>・CD 1 6 1<sup>+</sup> IL - 5<sup>+</sup>・IL - 1 3<sup>+</sup> / CD 4<sup>+</sup> 比率 ) を測定し、舌下免疫療法による治療前後での CD 2 7<sup>-</sup>・CD 1 6 1<sup>+</sup> IL - 5<sup>+</sup>・IL - 1 3<sup>+</sup> / CD 4<sup>+</sup> 比率の変化量を、式 ( 「舌下免疫療法による治療後における CD 2 7<sup>-</sup>・CD 1 6 1<sup>+</sup> IL - 5<sup>+</sup>・IL - 1 3<sup>+</sup> / CD 4<sup>+</sup> 比率」 - 「舌下免疫療法による治療前における CD 2 7<sup>-</sup>・CD 1 6 1<sup>+</sup> IL - 5<sup>+</sup>・IL - 1 3<sup>+</sup> / CD 4<sup>+</sup> 比率」 = 「CD 2 7<sup>-</sup>・CD 1 6 1<sup>+</sup> IL - 5<sup>+</sup>・IL - 1 3<sup>+</sup> / CD 4<sup>+</sup> 比率の変化量」 ) を基に算出した ( 図 1 B 参照 )。

10

## 【 0 0 4 0 】

## 【表 2】

20

細胞表面マーカー	抗体
CD 4	anti-CD4-PerCPCy5.5、BD Bioscience 社製
CD 2 7	anti-CD27-Brilliant violet、BD Bioscience 社製
CD 1 6 1	anti-CD161-PE、BioLegend 社製
ST 2	anti-ST2-PE、LifeSpan BioSciences 社製

## 【 0 0 4 1 】

## 【表 3】

30

細胞内マーカー	抗体
IL - 5	anti-IL-5-APC、BD Bioscience 社製
IL - 1 3	anti-IL-13-PE、BioLegend 社製

## 【 0 0 4 2 】

## [ 結果 ]

ST 2<sup>+</sup> / CD 4<sup>+</sup> 比率の変化量は、プラセボ群では減少しなかった ( 1 . 1 ± 0 . 9 5 ) のに対して、実薬群では - 5 . 0 ± 0 . 8 2 と減少していた ( 図 1 A 参照 )。また、CD 2 7<sup>-</sup>・CD 1 6 1<sup>+</sup> IL - 5<sup>+</sup>・IL - 1 3<sup>+</sup> / CD 4<sup>+</sup> 比率の変化量についても同様に、プラセボ群では減少しなかった ( 0 . 1 5 ± 0 . 2 2 ) のに対して、実薬群では - 1 . 2 ± 0 . 2 8 と減少していた ( 図 1 B 参照 )。

40

## 【 0 0 4 3 】

そこで、ST 2<sup>+</sup> / CD 4<sup>+</sup> 比率の変化量の閾値 ( カットオフ値 ) を 0 に設定し、実薬群の中で上記変化量が減少する ( 0 未満になる ) 真陽性患者の割合 ( 感度 ) と、プラセボ群の中で上記変化量が減少しない ( 0 超になる ) 真陰性患者の割合 ( 特異度 ) と、実薬群及びプラセボ群全体に対する上記真陽性患者及び真陰性患者合計の割合 ( 正診率 ) とを算出した。その結果、ST 2<sup>+</sup> / CD 4<sup>+</sup> 比率の変化量減少を指標にすると、舌下免疫療法

50

における実薬群及びプラセボ群を、高い精度（感度、特異度、及び正診率）で判定できることが示された（表4の「ST2<sup>+</sup>」参照）。

【0044】

また、CD27<sup>-</sup>・CD161<sup>+</sup>IL-5<sup>+</sup>・IL-13<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>比率の変化量のカットオフ値も同様に0に設定し、実薬群の中で上記変化量が減少する（0未満になる）真陽性患者の割合（感度）と、プラセボ群の中で上記変化量が減少しない（0超になる）真陰性患者の割合（特異度）と、実薬群及びプラセボ群全体に対する上記真陽性患者及び真陰性患者合計の割合（正診率）とを算出した。その結果、CD27<sup>-</sup>・CD161<sup>+</sup>IL-5<sup>+</sup>・IL-13<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>比率の変化量減少を指標にすると、舌下免疫療法における実薬群及びプラセボ群を、高い精度で判定できることが示された（表4の「CD27<sup>-</sup>・CD161<sup>+</sup>IL-5<sup>+</sup>・IL-13<sup>+</sup>」参照）。

10

【0045】

さらに、上記2種類の変化量を組み合わせた場合の感度、特異度、及び正診率を算出した。すなわち、実薬群の中でST2<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>比率の変化量が減少し（0未満になり）、かつCD27<sup>-</sup>・CD161<sup>+</sup>IL-5<sup>+</sup>・IL-13<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>比率の変化量が減少する（0未満になる）真陽性患者の割合（感度）と、プラセボ群の中でST2<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>比率の変化量が減少しない（0超になる）か、或いはCD27<sup>-</sup>・CD161<sup>+</sup>IL-5<sup>+</sup>・IL-13<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>比率の変化量が減少しない（0超になる）かのいずれか一方又は両方を示す真陰性患者の割合（特異度）と、実薬群及びプラセボ群全体に対する上記真陽性患者並びに真陰性患者合計の割合（正診率）とを算出すると、上記2種類の変化量を単独で用いた場合と比べ、舌下免疫療法における実薬群及びプラセボ群をより高い精度で判定できることが示された（表4の「ST2<sup>+</sup>及びCD27<sup>-</sup>・CD161<sup>+</sup>IL-5<sup>+</sup>・IL-13<sup>+</sup>」参照）。かかる判定精度は、従来平均調整症状スコア（AASS; Average Adjusted Symptom Score）（文献「Allergy. 2016 Jul 29. doi: 10.1111/all.12996.」参照）変化率減少（-30%未満）を基にした判定精度（表5の「AASS」参照）や、上記2種類以外の単独の変化量、すなわち、IL-5<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>比率の変化量減少（表5の「IL-5<sup>+</sup>」参照）や、CD27<sup>-</sup>/CD4<sup>+</sup>比率の変化量減少（表5の「CD27<sup>-</sup>」参照）や、IL-5<sup>+</sup>・IL-13<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>比率の変化量減少（表5の「IL-5<sup>+</sup>・IL-13<sup>+</sup>」参照）や、CD27<sup>-</sup>・CD161<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>比率の変化量減少（表5の「CD27<sup>-</sup>・CD161<sup>+</sup>」参照）を基にした判定精度と比べても、優れていることが示された。

20

30

【0046】

【表4】

	ST2 <sup>+</sup>	CD27 <sup>-</sup> ・CD161 <sup>+</sup> IL-5 <sup>+</sup> ・IL-13 <sup>+</sup>	ST2 <sup>+</sup> 及びCD27 <sup>-</sup> ・CD161 <sup>+</sup> IL-5 <sup>+</sup> ・IL-13 <sup>+</sup>
感度	97.2	92.1	93.5
特異度	67.5	57.1	81.0
正診率	81.6	74.0	87.3
カットオフ値	0	0	0

40

表中の「カットオフ値」は、統計解析ソフトウェアを用いて生成したROC（Receiver Operating Characteristic）曲線を用いて算出した。

【0047】

【表 5】

	AASS	IL-5 <sup>+</sup>	CD27 <sup>-</sup>	IL-5 <sup>+</sup> , IL-13 <sup>+</sup>	CD27 <sup>-</sup> , CD161 <sup>+</sup>
感度	85.1	90.2	63.2	80.0	52.6
特異度	55.8	50.0	56.8	58.1	48.7
正診率	70.5	72.7	60.0	68.9	50.7
カットオフ値	-30%	0.5	1.0	0	0

表中の「カットオフ値」は、統計解析ソフトウェアを用いて生成したROC (Receiver Operating Characteristic) 曲線を用いて算出した。

10

## 【0048】

一般に、症状変化率が、-30%以上（症状改善率が30%以下）の場合、プラセボ効果が区別できず、有効と判定しないとされている（文献「J. Allergy Clin. Immunol. 2010; 126: 969-75」参照）。そこで、実薬群において、AASS変化率のカットオフ値を-30%に設定し、AASS変化率が-30%未満の症状改善を示す有効（Responder；R）群と、AASS変化率が-30%以上の症状改善を示さない無効（Non-responder；NR）群とを判定できるか調べたところ、ST2<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>比率の変化量減少（-2.5未満）と、CD27<sup>-</sup>・CD161<sup>+</sup>・IL-5<sup>+</sup>・IL-13<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>比率の変化量減少（-0.74未満）とを組み合わせると（表6の「ST2<sup>+</sup>及びCD27<sup>-</sup>・CD161<sup>+</sup>・IL-5<sup>+</sup>・IL-13<sup>+</sup>」参照）、単独の変化量減少、すなわち、ST2<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>比率の変化量減少（表6の「ST2<sup>+</sup>」参照）、CD27<sup>-</sup>・CD161<sup>+</sup>・IL-5<sup>+</sup>・IL-13<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>比率の変化量減少（表6の「CD27<sup>-</sup>・CD161<sup>+</sup>・IL-5<sup>+</sup>・IL-13<sup>+</sup>」参照）、IL-5<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>比率の変化量減少（表7の「IL5<sup>+</sup>」参照）、CD27<sup>-</sup>/CD4<sup>+</sup>比率の変化量減少（表7の「CD27<sup>-</sup>」参照）、又はCD27<sup>-</sup>・CD161<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>比率の変化量減少（表7の「CD27<sup>-</sup>・CD161<sup>+</sup>」参照）を用いた場合と比べ、R群及びNR群を精度（感度、特異度、及び正診率）よく判定できることが示された。また、ST2<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>比率の変化量減少（-2.5未満）と、CD27<sup>-</sup>/CD4<sup>+</sup>比率の変化量減少（1未満）とを組み合わせ

20

30

以上。以上の結果は、アレルゲンを用いた免疫療法開始前後のCD4<sup>+</sup>T細胞全体に占めるST2<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>T細胞数と、CD27<sup>-</sup>、CD161<sup>+</sup>、IL-5<sup>+</sup>、又はIL-13<sup>+</sup>のCD4<sup>+</sup>T細胞数とを測定し、両者が減少している場合、アレルゲンを用いた免疫療法は、アレルギー性鼻炎患者に対して有効であると精度よく判定できることを示している。

## 【0049】

【表 6】

	ST2 <sup>+</sup>	CD27 <sup>-</sup> . CD161 <sup>+</sup> IL-5 <sup>+</sup> . IL-13 <sup>+</sup>	ST2 <sup>+</sup> 及びCD27 <sup>-</sup> . CD161 <sup>+</sup> IL-5 <sup>+</sup> . IL-13 <sup>+</sup>
感度	74.2	47.0	82.1
特異度	100	75.0	100
正診率	78.3	50.0	85.3
カットオフ値	-2.5	-0.74	ST2 <sup>+</sup> : -2.5 CD27 <sup>-</sup> . CD161 <sup>+</sup> IL-5 <sup>+</sup> . IL-13 <sup>+</sup> : -0.74

10

表中の「カットオフ値」は、統計解析ソフトウェアを用いて生成したROC曲線を用いて、少なくとも特異度が75%以上になるように(NR群の75%以上が正しく判定できるように)設定した。

【0050】

【表 7】

	IL-5 <sup>+</sup>	CD27 <sup>-</sup>	IL-5 <sup>+</sup> . IL-13 <sup>+</sup>	CD27 <sup>-</sup> . CD161 <sup>+</sup>	ST2 <sup>+</sup> 及びCD27 <sup>-</sup>
感度	20.0	72.7	24.0	45.4	89.7
特異度	83.3	80.0	80.0	80.0	80.0
正診率	29.2	73.7	33.3	50	88.2
カットオフ値	-2.0	1.0	1.0	-0.4	ST2 <sup>+</sup> : -2.5 CD27 <sup>-</sup> : 1.0

20

表中の「カットオフ値」は、統計解析ソフトウェアを用いて生成したROC曲線を用いて、少なくとも特異度が75%以上になるように設定した。

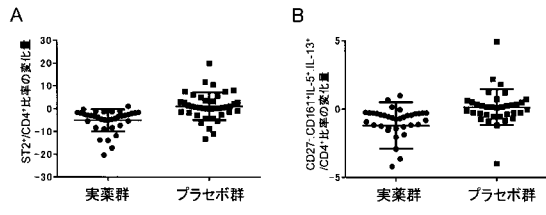
【産業上の利用可能性】

【0051】

30

本発明は、舌下免疫療法等のアレルゲン免疫療法の早期効果予測や、アレルゲン免疫治療患者の負担軽減、医療費削減等に資するものである。

【 図 1 】



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/001327

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
Int.Cl. G01N33/53(2006.01)i, C12N5/078(2010.01)i, C12Q1/06(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. G01N33/53, C12N5/078, C12Q1/06		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
	Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
	Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2018
	Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
	Published registered utility model applications of Japan	1994-2018
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE /BIOSIS (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	櫻井大樹, バイオマーカー, 効果予測因子, Monthly Book ENTONI, 15 May 2016, no. 193, pp. 52-58, non-official translation (SAKURAI, Taiki, biomarker, Effect prediction factors)	1-17
A	鈴木元彦, 舌下免疫療法の今後, Monthly Book ENTONI, 15 May 2016, no. 193, pp. 60-67, non-official translation (SUZUKI, Motohiko, Furture of sublingual immunotherapy)	1-17
A	中山俊憲, 岩村千秋, 免疫学的解析, バイオマーカーの検討, スギ花粉症に対する舌下免疫療法の有効性, 効果予測法の確立研究 平成 21 年度総括・分担研究報告書, 2010, pp. 9-11, non-official translation (NAKAYAMA, Toshinori, IWAMURA, Chiaki, Research on establishing immunotherapy analysis, biomarker review, effectiveness of sublingual immunotherapy for cedar pollen allergy, and effect prediction method, 2009 Research report on generalization and allotment)	1-17
A	米倉修二ほか, III. 耳鼻科 2. スギ花粉症に対する舌下免疫療法の バイオマーカーからの有効性評価, アレルギー・免疫, 15 January 2015, vol. 22, no. 2, pp. 268-275, non-official translation (YONEKURA, Syuji et al., III. Ear-nose-and-throat clinic 2. Effectiveness evaluation from biomarker of sublingual immunotherapy for cedar pollen, Allergy and Immunity)	1-17
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 13 April 2018 (13.04.2018)		Date of mailing of the international search report 24 April 2018 (24.04.2018)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer  Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 8 / 0 0 1 3 2 7									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/53(2006.01)i, C12N5/078(2010.01)i, C12Q1/06(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/53, C12N5/078, C12Q1/06											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2018年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2018年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2018年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2018年	日本国実用新案登録公報	1996-2018年	日本国登録実用新案公報	1994-2018年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2018年										
日本国実用新案登録公報	1996-2018年										
日本国登録実用新案公報	1994-2018年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/REGISTRY/MEDLINE /BIOSIS (STN)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
A	櫻井大樹, バイオマーカー、効果予測因子, Monthly Book ENTONI, 2016.05.15, No.193, PP.52-58	1-17									
A	鈴木元彦, 舌下免疫療法の今後, Monthly Book ENTONI, 2016.05.15, No.193, PP.60-67	1-17									
A	中山俊憲、岩村千秋, 免疫学的解析、バイオマーカーの検討、スギ花粉症に対する舌下免疫療法の有効性、効果予測法の確立研究 平成21年度 総括・分担研究報告書, 2010, PP.9-11	1-17									
☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。		☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。									
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 13.04.2018		国際調査報告の発送日 24.04.2018									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 海野 佳子	2 J 3906								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3252									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2018/001327
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	米倉修二ほか, III. 耳鼻科 2. スギ花粉症に対する舌下免疫療法のバイオマーカーからの有効性評価, アレルギー・免疫, 2015. 01. 15, Vol. 22, No. 2, PP. 268-275	1-17

## フロントページの続き

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. Alexa Fluor

(出願人による申告)平成28年度、国立研究開発法人日本医療研究開発機構、免疫アレルギー疾患等実用化研究事業、「免疫療法による花粉症治療の新しい展開を目指した研究」委託研究開発、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(74)代理人 100150902

弁理士 山内 正子

(74)代理人 100141391

弁理士 園元 修一

(74)代理人 100198074

弁理士 山村 昭裕

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(72)発明者 伊原 史英

千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8番1号 国立大学法人千葉大学大学院医学研究院内

(72)発明者 岡本 美孝

千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8番1号 国立大学法人千葉大学大学院医学研究院内

(72)発明者 中山 俊憲

千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8番1号 国立大学法人千葉大学大学院医学研究院内

(72)発明者 櫻井 大樹

千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8番1号 国立大学法人千葉大学大学院医学研究院内

Fターム(参考) 2G045 AA25 CA18 DA36 FB03

4B063 QA01 QA19 QQ08 QR48 QX02

4B065 AA90X AC20 BD39 CA46

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	过敏原免疫疗法疗效评价方法		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2018135561A1</a>	公开(公告)日	2020-01-09
申请号	JP2018562418	申请日	2018-01-18
申请(专利权)人(译)	国立大学法人千叶大学		
[标]发明人	岡本美孝 中山俊憲 櫻井大樹		
发明人	伊原 史英 岡本 美孝 中山 俊憲 櫻井 大樹		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/48 C12Q1/06 C12N5/0783		
CPC分类号	C12Q1/06 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/53.Q G01N33/48.M C12Q1/06 C12N5/0783		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA18 2G045/DA36 2G045/FB03 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B063/QX02 4B065/AA90X 4B065/AC20 4B065/BD39 4B065/CA46		
代理人(译)	松桥保典 堀内申 马萨科·亚莫 Enmoto修一		
优先权	2017009544 2017-01-23 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明的目的是提供一种用于准确确定变应原免疫疗法对变应性鼻炎的治疗效果的方法。开始过敏性鼻炎的变应原免疫治疗前后，ST4+CD4+T细胞和CD27<sup>-</sup>，CD161<sup>+</sup>，IL-5<sup>+</sup>和IL-13的数量变化+分析选自+的一个或多个CD4+T细胞的数目，如果两者均减少，则用变应原进行免疫治疗表示变应性鼻炎。可以确定对患者有效。

