

(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2009-515143
(P2009-515143A)

(43) 公表日 平成21年4月9日(2009.4.9)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/569 F	4 H 0 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 P	
CO 7 K 14/35 (2006.01)	CO 7 K 14/35 Z N A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 24 頁)

(21) 出願番号 特願2008-532708 (P2008-532708)
 (86) (22) 出願日 平成18年9月7日 (2006.9.7)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年5月27日 (2008.5.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2006/066152
 (87) 国際公開番号 W02007/039400
 (87) 国際公開日 平成19年4月12日 (2007.4.12)
 (31) 優先権主張番号 05291998.2
 (32) 優先日 平成17年9月27日 (2005.9.27)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

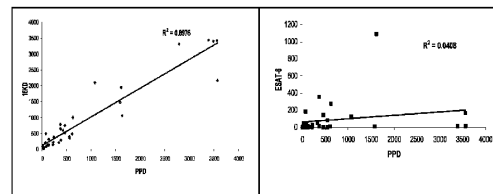
(71) 出願人 508092967
 アンスティテュ・ナシオナル・ドゥ・ラ・
 サンテ・エ・ドゥ・ラ・ルシエルシュ・メ
 ディカル (イ・エヌ・エス・エ・エール・
 エム)
 INSTITUT NATIONAL D
 E LA SANTE ET DE LA
 RECHERCHE MEDICALE
 (INSERM)
 フランス国、F-75013パリ、リュウ
 ・ドゥ・トルビア、101
 (74) 代理人 100081352
 弁理士 広瀬 章一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 結核関連免疫再構築症候群 (IRS) の診断方法

(57) 【要約】

本発明は、結核感染患者および結核とHIV の両方に感染した患者における結核関連免疫再構築症候群 (TB-IRS) の診断のための方法およびキットに関し、この方法は、ツベルクリン、即ちPPD (Purified Protein Derivative) と称されるマイコバクテリア抽出物、および16kDa蛋白質〔結核菌 (マイコバクテリウム・ツベルクローシス、Mycobacterium tuberculosis) 由来の2つの抗原であるESAT-6またはCFP-10ではない〕に対して暴露後の、Th1 応答における急性の増加を検出することを含む。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の工程からなる、結核菌（マイコバクテリウム・ツベルクローシス、*Mycobacterium tuberculosis*）(TB) に共感染した患者、およびTBのみに感染した患者における免疫再構築症候群（IRS）の *in vitro* 診断方法：

a) 前記患者の末梢血単核細胞（PBMC）または全血を、PPD(精製蛋白誘導体) と称されるマイコバクテリア抽出物及び / 又は16kDa 蛋白質（SEQ ID No.1）から選択されるマイコバクテリア抗原を有する培地でインキュベートすること、

b) 前記患者の末梢血単核細胞（PBMC）または全血を、陰性対照としてESAT-6（SEQ ID No.2）、CFP-10（SEQ ID No.3）および85B（SEQ ID No.4）から選択される結核菌（マイコバクテリウム・ツベルクローシス、*Mycobacterium tuberculosis*）由来の少なくとも1種の抗原を有する培地でインキュベートすること、および

c) b)における前記マイコバクテリア抗原と比べた、a)に記載の前記マイコバクテリア抗原に対するTh1 応答のレベルを検出すること；

ここで、b)に記載した抗原と比べた、または非刺激細胞もしくは非マイコバクテリア抗原で刺激された対照細胞と比べた、a)に記載の抗原の1つに対する1時点で測定したTh1 応答の250 %超の増加、またはTh1 応答における強い反応性が、IRS の指標となる。

【請求項 2】

工程b)が、ELISPOT 解析、またはフローサイトメトリーと組み合わせた細胞内サイトカイン染色または蛍光顕微鏡検査と定量により、抗原特異的T細胞の定量を行うことを含む、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

IFN- γ を産生するマイコバクテリア特異的Th1 細胞の定量を含む、請求項2記載の方法。

【請求項 4】

細胞単独で得られる平均バックグラウンドを差し引いた後に、500 超の SFC（スポット形成細胞） / 10^6 PBMC、例えば500 超、1000超または2000超のSFC の結果がIRS の指標となり、同時に、ESAT-6、85B、CFP-10に対して、典型的には500 / 10^6 PBMCより低いSFC または400 もしくは300 より低いSFC など、SFC が検出されないか最小である、請求項2または3記載の方法。

【請求項 5】

工程b)が、培養上清を集めることおよび、IL-2、IL-2R、IL-12p40、IL-15、IL-17、IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF、MIP-1 α 、MIP-1 β 、MCP-1、MIG、RANTES、IP-10 を含む、少なくとも1種のTh1 特異的サイトカインまたはケモカインを定量することを含む、請求項1～4のいずれかの項記載の方法。

【請求項 6】

多重サンドイッチ免疫検定法または個別のサイトカイン特異的サンドイッチ免疫検定法を用いて行う、請求項5記載の方法。

【請求項 7】

ELISによりIFN- γ 産生を定量する、請求項5記載の方法。

【請求項 8】

工程a)の末梢血単核細胞を約6～72時間インキュベートする、請求項1～7のいずれかの項記載の方法。

【請求項 9】

工程a)の末梢血単核細胞を、約1 μ g / mlのPPD 及び / 又は16kDa 蛋白質と共に、および別途、約1 μ g / mlのESAT-6組換え蛋白質と共にインキュベートする、請求項1～8のいずれかの項記載の方法。

【請求項 10】

工程a)の末梢血単核細胞を、約1 μ g / mlのPPD 及び / 又は16kDa 蛋白質と共に、および別途、CFP-10及び / 又は85B と共にインキュベートする、請求項1～9のいずれかの項

10

20

30

40

50

記載の方法。

【請求項 1 1】

対照細胞が、CMV 抽出物、HIV-1 p24、フィットヘマグルチニンと共に、および培地のみでインキュベートした細胞から選択される、請求項 1 ~ 10 のいずれかの項記載の方法。

【請求項 1 2】

結核に共感染した HIV 陽性患者における強力な抗レトロウイルス療法 (HAART) の過程で行われる、請求項 1 ~ 11 のいずれかの項記載の方法。

【請求項 1 3】

同時または連続の HAART および結核治療を受けている患者において行われる、請求項 1 ~ 12 のいずれかの項記載の方法。

【請求項 1 4】

TB のみに罹患した患者において行われる、請求項 1 ~ 11 のいずれかの項記載の方法。

【請求項 1 5】

結核 (TB) 患者または結核 (TB) と HIV に共感染した患者における免疫再構築症候群 (IRS) の診断キットであり、PPD (精製蛋白質誘導体) と称されるマイコバクテリア抽出物、及び 16kDa 蛋白質 (配列番号 1) から選ばれるマイコバクテリア抗原、並びに ESAT-6 (配列番号 2)、CFP-10 (配列番号 2) および 85B (配列番号 3) から選ばれる結核菌 (マイコバクテリウム・ツベルクローシス、Mycobacterium tuberculosis) からの少なくとも 1 種の抗原を含む、前記診断キット。

【請求項 1 6】

抗 IFN- 抗体などの、固体担体に結合した Th1 免疫応答特異的な抗サイトカイン / ケモカイン抗体の少なくとも 1 種をさらに含む、請求項 1 5 記載の診断キット。

【請求項 1 7】

固体担体が ELISPOT プレートである請求項 1 6 記載の診断キット。

【請求項 1 8】

固体担体が ELISA プレートである請求項 1 6 記載の診断キット。

【請求項 1 9】

HAART および結核治療の過程での、結核 (TB) 患者または結核 (TB) と HIV に共感染した患者における結核関連免疫再構築症候群 (TB-IRS) を検出するための、請求項 1 5 ~ 1 8 のいずれかの項記載のキットの使用。

【請求項 2 0】

TB のみに罹患した患者における免疫再構築症候群 (TB-IRS) を検出するための、請求項 1 5 ~ 1 8 のいずれかの項記載のキットの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、結核 (TB) 感染患者および HIV に共感染した患者における、結核関連免疫再構築症候群 (immune restoration syndrome associated with tuberculosis, TB-IRS) の診断のための方法およびキットに関し、これは、ツベルクリン、即ち PPD (purified protein derivative, 精製蛋白質誘導体) と称されるマイコバクテリアの抽出物、及び / 又は 16 kDa 蛋白質 [結核菌 (マイコバクテリウム・ツベルクローシス、Mycobacterium tuberculosis) からの ESAT-6 または CFP-10 抗原に対してではない] に曝した後の急性 Th1 反応を検出することを含む。

【背景技術】

【0002】

ジドブジンの単独治療を受けているマイコバクテリウム・アビウム・コンプレックス (Mycobacterium avium complex) に感染した HIV 感染患者において最初に報告された (1)、結核に罹患した患者における免疫再構築症候群 (IRS) は、強力な抗レトロウイルス治療 (HAART) の時期に対応して極めて高い頻度 (29 ~ 36%) で生じるようになった (2)。IRS はまた、より低い頻度ではあるが、HIV 陰性患者における TB 治療の開始後にも生じうる。

10

20

30

40

50

【0003】

典型的には、IRS は、結核 (TB) および HIV に共感染し、HAART を受けたことがなく、HIV 疾患が進行した患者において、両方の治療が同時にまたは短い間隔で開始された場合に生じる。通常、臨床症状としては熱、リンパ節障害、呼吸およびその他の初期の TB 症状の悪化がある (2)。IRS の主要な基準の定義が提案され、別の説明 (薬剤耐性、その他の日和見感染 (OI)) ができず副次的特徴として免疫回復の証拠を有すれば、HAART に応答している患者における日和見感染 (opportunistic infection, OI) または腫瘍の典型的でない呈示 ($1 \log_{10}$ コピー/ml より大きい血漿 HIV RNA レベルにおける低下) を含む根本的な日和見性の事象が何であってもよい (3)。

【0004】

10

しかし、IRS は 3 つの臨床的に関連する問題を生じる：第 1 に、IRS は治療の失敗や耐性、またはその他の日和見性の疾患と区別されるべきであるので診断が難しい；第 2 に、いくつかの生命を脅かす症例における IRS 治療は、依然として経験的にステロイドによっており、これはかかる免疫無防備状態の患者において導入することは心配である；第 3 に、IRS リスク因子の決定により臨床医がその治療方針、即ち HAART 導入を遅らせるか否かを決定するのを助けることができる (4)。

【0005】

従って、現在、依然として IRS の診断のための信頼できる試験法の強い要望がある。IRS の病態生理学は全体としてはまだ解明されていない。急性の前炎症性サイトカイン (IL-6) 産生が IRS の間に生じることが実証された (5、6) が、その起源は不明である。加えて、強い有力な仮説は、IRS は、HAART が血漿のウイルス量 (VL) を減少させた後に、記憶 T 細胞の再循環または増殖のいずれかによる、マイコバクテリア特異的 T リンパ球応答の急性回復と関連するであろうというものである (7、8)。この仮説は示唆されているだけで、PPD に対する DTH 皮膚試験の回復以外はまだ実証されていない (9)。HIV-陰性 TB 感染患者においても同様に、IRS は TB 特異的 Th 1 免疫の増加を反映しているという仮説がたてられている。

20

【0006】

本発明に関し、我々は HIV と TB の両方に感染した患者について、将来予想されるマルチセンターでの検討を行った。我々は、マイコバクテリア特異的 (PPD) Th 1 IFN- γ 産生細胞が IRS の間に急速に増加すること、その一方、対照として試験された CMV、HIV p24 特異的応答は増加しなかったことを見出した。さらに、きわめて少数の IRS+患者のみが IRS の間に低レベルであるが ESAT-6 特異的応答を示し、そして IRS-患者は急性の PPD 特異的応答を生じなかった。これらの発見は IFN- γ 、IL-2、IL-12、IP10 および MIG などの PPD 特異的 Th 1 サイトカインのピークと関連したが、我々は Th 2 サイトカインは検出しなかった；TNF- α 、IL-6、IL-1、IL-10、RANTES および MCP-1 などのその他の炎症性ケモカインやサイトカインも検出された。我々はまた、16kDa 蛋白質抗原での刺激に応答した Th 1 特異的サイトカインの急激な放出も同定した。

30

【0007】

従って、我々はここに、HIV と TB の両方に感染した患者および TB のみの患者において、マイコバクテリア抗原に対する Th 1 応答の急性増加を検出することからなる TB-IRS の新規な診断試験を提供する。

40

【発明の開示】

【0008】

第 1 の態様において、本発明は、以下の工程からなる、結核菌 (マイコバクテリウム・ツベルクローシス、Mycobacterium tuberculosis) (TB) に共感染した患者、および TB のみに感染した患者における免疫再構築症候群 (IRS) の *in vitro* 診断の方法に関する：

- a) 前記患者の末梢血単核細胞 (PBMC) または全血を、PPD (精製蛋白誘導体、精製ツベルクリン) と称されるマイコバクテリア抽出物及び / 又は 16kDa 蛋白質 (SEQ ID No.1) から選択されるマイコバクテリア抗原を有する培地でインキュベートすること、
- b) 前記患者の末梢血単核細胞 (PBMC) または全血を、陰性対照として ESAT-6 (SEQ ID No.

50

2)、CFP-10 (SEQ ID No.3)および85 B (SEQ ID No.4)から選択されるマイコバクテリウム・ツベルクローシス (*Mycobacterium tuberculosis*) 由来の少なくとも1種の抗原を有する培地でインキュベートすること、

c)b)における前記マイコバクテリア抗原と比べた、a)に記載の前記マイコバクテリア抗原に対するTh1 応答のレベルを検出すること；

ここで、b)に記載した抗原と比べた、または非刺激細胞もしくは非マイコバクテリア抗原で刺激された対照細胞と比べた、a)に記載の抗原の1つに対する1時点で測定したTh1 応答の250 %超の増加、またはTh1 応答における強い反応性が、IRS の指標となる。

【0009】

好ましい態様において、工程a)およびb)は同時に行う。

本発明方法の別の好ましい態様において、非刺激細胞もしくは非マイコバクテリア抗原で刺激された対照細胞と比べた、b)に記載の抗原の1つに対する1時点で測定したTh1 応答の増加または反応性は、ゼロであるかまたは極わずかである。

【0010】

この試験は、TB-IRSにおいて、PPD および16kDa 蛋白質に対して特異的にTh1 応答が急激に増加するが、ESAT-6、CFP-10および85 Bなどのその他のマイコバクテリア抗原に対してはそうでないという我々の発見に基づいている。ここで急激な増加とは、典型的にはバックグラウンドの250%超、さらには500 ~ 5000%超の増加、または対照細胞に比べてTh1 応答が少なくとも250 %超 (例えば、300 %超、400 %超、もしくは500 %超でも) と理解されよう。「反応性なしまたは極わずか」とは、対照細胞に対してTh1 応答のほとんど意味のない増加、例えば200 %以下、典型的には100 %または50 %以下と理解されよう。

【0011】

%での上記増加は、工程a)に記載された抗原について得られたTh1 試験 (例えばIFN-放出試験などのようなサイトカイン放出試験) で得られた測定値を、工程b)に記載の抗原、または非刺激細胞もしくは非マイコバクテリア抗原で刺激された対照細胞で得られた測定値で単に割ることにより当業者が算出する。

【0012】

ESAT-6、85 B およびCFP-10は結核菌 (マイコバクテリウム・ツベルクローシス、*Mycobacterium tuberculosis*) (Mtb)から単離された抗原であり、一方PPD は、Mtb およびBCG (Mtbに対する一般的ワクチンとして使用されるBacille of Calmette et Guerinは当分野においてよく知られ、デンマーク、コペンハーゲンのStatens Serum Institute により販売されているPPD を含む複数の市販原料から得ることができる) の両方からの抽出物からなる。PPD、即ちツベルクリンは、Mtb およびBCG の混合物から蛋白質を抽出することにより得られ、BCG またはMtb のいずれかに対して生じる細胞性免疫、即ちTh1 応答の存在を試験するのに共通して使用される。例えば、large Master Batch, Connaught Tuberculin (CT68) から調製されたConnaught Laboratories LimitedのTubersol (登録商標) から得ることができる。ESAT-6蛋白質は、Harboe et al., 1996、Sorensen et al., 1995 に記載のようにM. ツベルクローシス (*M. tuberculosis*) の短期間培養物のろ液から精製された主要な分泌抗原である。ここでは、ESAT-6、CFP-10および85 Bは細胞溶解物、精製または組換え技術により得ることができる。例えば、ESAT-6はStatens Serum Institute からの組換え蛋白質として入手できる。

【0013】

ツベルクリン、即ちマイコバクテリア抽出物からのPPD (purified protein derivative、精製蛋白誘導体) は、M. ツベルクローシス (*M. tuberculosis*) のゲノム内のみ位置する遺伝子によりコードされ、そしてBCG には含まれないESAT-6 (early secreted antigenic target 6)、CFP-10 (culture filtrate protein 10)および85 Bとは異なる、というのはPPD は、BCG 亜株および病原性が低いか非病原性のいくつかの非結核性マイコバクテリアの種に共有されるその他の抗原をも含有するからである。

【0014】

10

20

30

40

50

これらの抗原の配列はこの明細書に含まれる配列表にも示される。

Th1 応答の連続測定が可能でない場合、試験は、IRS の間または直後の一時点で採取した1つの血液試料に基づき、そして工程a)に記載の抗原の1つに対するが、工程b)に記載の抗原に対してではない、IFN- γ 産生マイコバクテリア特異的Th1細胞の定量などのTh1 応答を検出するELISPOT または任意のアッセイにより、抗原特異的T細胞の定量を行うことを含む。

【0015】

ここで、強い反応性とは、細胞単独で得られる平均バックグラウンドを差し引いた後に、工程a)に記載の抗原に対する、500 超の SFC (ELISpot-forming-cells, ELISスポット形成細胞) / 10^6 PBMC、例えば500 超、1000超または2000超またはそれより大きいSFC の結果と規定され、IRS の指標となり、同時に、典型的には500 ~ 0 / 10^6 PBMCのSFC など、ESAT-6、85B、CFP-10に対するSFC が検出されないか最小である。あるいは工程b)に記載の抗原に比べて工程a)に記載の抗原に対する250 %以上のより大きいTh1 応答がIRS の指標となる。

10

【0016】

好ましくは、細胞単独で得られる平均バックグラウンドは100 以下の SFC / 10^6 PBMCである。

その結果、a)抗原のSFC / 抗原なしのSFC のパーセンテージ (%) はTB-IRSを示すいき値、即ち 250%超、特に 500%超を与える。

【0017】

その結果、a)抗原のSFC / b)抗原のSFC のパーセンテージ (%) はTB-IRSを示すいき値、即ち 250%超を与える。

20

ELISPOT法は、Th1 応答を検出する任意の方法、即ちELISpot によりその他のTh1 サイトカインを産生するT細胞を計量すること、またはフローサイトメトリーと組み合わせた細胞内サイトカイン染色または蛍光顕微鏡検査と定量のいずれかによる、T細胞により放出されるTh1 サイトカインの定量に代えてもよい。

【0018】

別法としてまたは同時に、試験法は、工程a)およびb)で得られた培養上清を集め、非刺激細胞と比較した工程a)およびb)に記載の抗原で刺激された細胞の培養上清中の少なくとも1種のTh1 特異的サイトカイン、即ちIL-2, IL-2R, IL-12p40, IL-15, IL-17, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, MIG, RANTES, IP-10 を定量することを含んでもよい。

30

【0019】

かかる分析法は多重サンドイッチ免疫検定法または個別のサイトカイン特異的サンドイッチ免疫検定法を用いて行うことができる。

これらの本発明の別法または同時試験法の1つの特定の面において、少なくとも1種のTh1 特異的サイトカインの定量は、ELISA またはRIA によりIFN- γ 産生を定量することを含む。

【0020】

好ましくは、工程a)の末梢血単核細胞を約6~72時間インキュベートする。さらに、有利には、工程a)の末梢血単核細胞を、約1 μ g/mlの前記「工程a)」のPPD 抗原及び/又は16kDa 蛋白質と共に、および別に約1 μ g/mlの前記「工程b)」のESAT-6抗原組換え蛋白質と共にインキュベートする。PBMCはまた、陰性対照としてCFP-10または85B と共にインキュベートしてもよい。

40

【0021】

対照細胞は抗原なしでまたは非マイコバクテリア抗原と共にインキュベートした細胞から選択される。例えば、CMV 抽出物、HIV-1 p24、フィトヘマグルチニンを用いることができる。培地のみでの培養はバックグラウンドを測定するための陰性対照となる。

【0022】

本発明の方法は、TBの過程で、特に結核に共感染したHIV 陽性患者における強力な抗レ

50

トロウイルス療法 (HAART) の過程で行われる。とりわけ、同時または連続のHAART および結核治療を受けている患者において行われる。

【0023】

HAART は当分野ではよく知られており、ヌクレオシドアナログ逆転写酵素阻害剤 (NARTI) もしくは (NRTI)、非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤 (NNARTI) およびプロテアーゼ阻害剤 (PI) または HIV の標的細胞への侵入を阻害もしくはウイルス DNA の組み込みを阻害するその他の分子、または HIV 複製を有意に阻止し CD4 T 細胞の再構成を可能にするその他の任意の新規抗レトロウイルス分子による複合治療の複数のプロトコルを含む。

【0024】

第2の態様では、本発明は上記の方法を行うためのキットに関する。

このように、本発明は、TB患者または結核 (TB) と HIV に共感染した患者における免疫再構築症候群 (IRS) の診断キットに関し、これは PPD (精製蛋白質誘導体) と称されるマイコバクテリア抽出物、及び / 又は 16kDa 蛋白質 (配列番号 1) から選ばれるマイコバクテリア抗原、並びに ESAT-6 (配列番号 2)、CFP-10 (配列番号 2) および 85B (配列番号 3) から選ばれる Mtb 毒性関連結核菌 (マイコバクテリウム・ツベルクローシス、*Mycobacterium tuberculosis*) からの少なくとも 1 つの抗原を含む。別の例では、本キットは 16kDa 蛋白質および ESAT-6、CFP-10 および 85B のうちの少なくとも 1 つを含む。

【0025】

さらに、本キットは抗 IFN- γ 抗体などの、固体担体に結合した Th1 免疫応答特異的なサイトカイン / ケモカイン抗体の少なくとも 1 種を含んでもよい。キットの固体担体は ELISPOT プレート及び / 又は ELISA プレートであってもよい。

【0026】

第3の態様において、本発明は、HAART および結核治療の過程での TB 患者または結核 (TB) と HIV に共感染した患者における TB 関連免疫再構築症候群 (TB-IRS) を検出するための上記方法およびキットの使用に関する。

【実施例 1】

【0027】

IRS は HIV と結核に共感染した患者におけるマイコバクテリア特異的 Th1 細胞により誘導される

1-患者および方法

1.1.1 患者

29 人の続発的に TB- HIV に共に感染した未治療の患者を、抗 TB 治療開始時に見込みをもって対象に入れた。この包含の基準は：HIV-1 感染、以前に HAART を行っていない、CD4 のカウントが 200 細胞 / mm³ 以下、包含およびさらなる HAART 開始の指示の長くとも 1 週間以内に抗 TB 療法を開始。次に、結核菌 (*M. tuberculosis*) 感染が証明された (陽性培養または組織学的所見) 場合に確実に対象に包含した。抗マイコバクテリア療法 (T_{BK}) の開始時および HAART の開始時 (M₀) および HAART 開始後 1、3、6、および 12 ヶ月 (M_{1,3,6,12}) に患者を評価した。さらに、IRS 患者 (IRS+) を IRS 期間 (T_{IRS}) および 20 日後に評価した。IRS は以下のように定義される (3)：炎症性反応の回帰 (熱、CRP 上昇)、もともと存在した障害の拡大、またはマイコバクテリウム抵抗性がなく、陽性の培養試料がなく、その他の診断がなく、かつ HAART に対する応答を有する (HIV-RNA 減少 > 1 log コピー / ml) 新たな障害 (リンパ節、胸膜炎) の発生。HAART 開始後 3 ヶ月以内に IRS を経験しなかった患者は IRS- と判定された。

【0028】

この研究は Saint-Louis Hospital Institutional-Ethical-Committee により受け入れられ、患者全員がインフォームドコンセントに署名した。

1.1.2 方法

マイコバクテリア特異的 Th1 細胞の定量のための ELISPOT アッセイ

IFN- γ を産生する抗原特異的 Th1 細胞を、マイコバクテリア抽出物 (PPD, 1 μ g/ml ; Statens Serum Institute、コペンハーゲン、デンマーク) および ESAT-6 組換え蛋白質 (

10

20

30

40

50

1 $\mu\text{g/ml}$ 、Statens Serum Institute、コペンハーゲン、デンマークより供与)で40時間刺激後、(10)に記載のようにしてELISpotにより新鮮末梢血単核細胞(PBMC)において予測定量した。対照は、CMV抽出物(Behring)、HIV-1 p24(Protein-Sciences)、フィットヘマグルチニン(Murex)、および培地単独を含む。スポットをELISpot読み取り装置(Zeiss)を用いて計測し、データはスポット形成細胞(SFC)/ 10^6 PBMCとして表した。細胞単独で得られた平均バックグラウンドを差し引いた後SFC/ 10^6 PBMCが50より大きい場合、結果は陽性と判断された。

サイトカイン/ケモカイン産生の定量

新鮮PBMCを、上記と同様の抗原でサイトカイン/ケモカイン産生を刺激した。培養上清をインキュベーション2日目に集め、低温保存した。25種類の炎症性および免疫調節性サイトカイン/ケモカイン(IL-1, IL-1RA, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p40, IL-13, IL-15, IL-17, IFN-, IFN-, TNF-, GM-CSF, MIP-1, MIP-1, MCP-1, MIG, RANTES, IP-10, Eotaxin)の定量を(11)に記載のflowmetric Luminex(登録商標)法(Luminex 100TM, Clinisciences)に基づいて多重サンドイッチ免疫検定(Human 25-plex(登録商標), Biosource)を用いて4人の患者(IRS+3人とIRS-1人)について行った。IFN-産生はBiocource ELIZAキットにより同じ上清で定量した。

リンパ球表現型決定

CD4およびCD8 T-リンパ球表現型を、以下の抗体を用いて標準法による4色フローサイトメリー(7)によって新鮮全血で分析した:抗HLA-DR-FITC(Immunotech)、抗-CD25-PE(Becton Dickinson)、抗-CD4-PerCPCy5(Becton Dickinson)、または抗-CD8-PerCP(Becton Dickinson)、抗-CD3-APC(Becton Dickinson)。染色された細胞を上記FACScalibur(Becton Dickinson)で解析した。

統計的分析

群の間の比較は必要により²およびスチューデントt検定を用いて行った。

1.2 結果

抗TB治療開始時に29人の続発的にTB-HIVに共感染した未治療の患者を見込みをもって対象に入れた。次いで10人を以下の理由により除いた:4人は結核が証明されなかった、5人は移動し、1人は急にICUに移された。残りの19人をHAART開始後少なくとも3ヶ月間追跡した。そのうち7人(39%)は、 M_0 から中央値で23日(12-85)以内にIRSを経験した。IRS臨床症状を表1に挙げる。

【0029】

10

20

30

【表 1】

患者	年齢	性別	結核位置	CD4/mm ³	VI log/ml	HAAARTまでの期間(日)	HAAART	ΔCD4 M ₃ -M ₀	IRS臨床症状
1	30	F	胸膜炎	26	4.7	36	3TC TFV EFV	86	腹膜炎、気管支肉芽腫
2	41	M	肝臓、リンパ節	9	5.7	15	AZT 3TC T20	125	熱、肝炎
3	43	M	肺	16	5.04	14	AZT 3TC EFV	15	心膜炎
4	32	F	肺、骨髄、リンパ節、肝臓	15	6.5	63	3TC D4T NFV	107	熱、腹部リンパ節膨張、
5	35	M	肺、リンパ節	115	5.8	40	AZT 3TC EFV	94	熱、腹膜炎、腹部リンパ節膨張
6	32	F	肺	24	5.7	27	FTC TFV EFV	367	熱、肺胞肺炎、リンパ節膨張
7	49	M	粟粒性、肝周囲リンパ節	6	5	10	TFV FTC LPV/rtv	14*	熱、腹痛、リンパ節膨張
A	36	M	リンパ節	15	4.96	39	AZT 3TC ABC	71	無
B	38	M	肺、リンパ節、脾臓	8	5.6	20	AZT 3TC NFV	53	無
C	38	M	肝臓、リンパ節	22	5.7	27	AZT 3TC EFV	20	無
D	37	M	肺	32	5.4	14	AZT 3TC EFV	49	無
E	30	F	肺、肝臓、脾臓	43	4.8	61	AZT 3TC ABC	-7	無
F	26	F	腹部リンパ節、腸骨	47	5.0	76	AZT 3TC LPV/rtv	47	無
G	34	M	腹部リンパ節	131	5.1	50	TFV 3TC RTV ATZ	80	無
H	31	M	肺	198	5.9	24	AZT 3TC EFV	-88	無
I	61	M	肺、リンパ節	166	5.5	111	3TC DDI EFV	18	無
J	52	M	肺、肝臓、脾臓	219	4.7	53	3TC ABC TFV DDI	80	無
K	35	M	肺	267	5.2	23	AZT 3TC ABC	74	無
L	63	M	リンパ節、肺、尿生殖器	60	5.7	89	AZT 3TC EFV	354	無

10

20

30

40

【0030】

3人の患者は迅速な回復のための経口ステロイド療法を受けた；その中の1人について

50

は IRS の時点で HAART を一時的に停止した。IRS の患者 (IRS+) および IRS のない患者 (IRS-) は人種、年齢、性別、結核の広がりまたは T_{BK} と M_0 間の期間 (それぞれ 27 日対 45 日、NS) に関して違いはなかった。 M_0 における CD4 カウントの中央値は、IRS+ 患者においてそれほど著しくはないがより低く (IRS+ で中央値 $32/\text{mm}^3$ に対し、IRS- で $60/\text{mm}^3$ 、 $p = 0.053$)、 M_3 においては IRS+ で中央値 $107/\text{mm}^3$ に対し、IRS- で $51/\text{mm}^3$ (NS) と上昇した。検出不可のウイルス量に達する時間には違いはなかった。

【 0 0 3 1 】

IFN- γ を産生する PPD 特異的細胞の数は、2 つの群において基準日 (M_0) では違いがなかったが、IRS の間はその割り合いは急激に増加し、7 人の IRS+ 患者においては $2970 \text{ SFC}/10^6 \text{ BMC}$ の中央値 (範囲 616-3744) に達した (図 1 A および B、左側)。この爆発的反応性は IRS+ 患者においてこの抗原に限られ、CMV 特異的応答には影響しなかった。IRS- 患者では急性の PPD 特異的応答は 1 人の患者を除いて生じず (中央値 $430 \text{ SFC}/10^6 \text{ PBMC}$)、この患者は臨床的 IRS はなく M_3 において $1500 \text{ SFC}/10^6 \text{ PBMC}$ を超える急激な増加を示し、この時点で HAART は接着力が乏しいためもはや有効でなかった。さらに、IRS- 患者は IRS+ 患者よりも CMV により応答した (中央値 $415 \text{ SFC}/10^6 \text{ PBMC}$ 対 $150 \text{ SFC}/10^6 \text{ PBMC}$) (図 1 A および 1 B)。

【 0 0 3 2 】

2 種のマイコバクテリア抗原に対する反応性を比較すると、PPD 反応性と対比して、3 人の IRS+ 患者のみが IRS の間に、 $58,142$ および $318 \text{ SFC}/10^6 \text{ PBMC}$ の頻度で ESAT-6 特異的陽性応答を示した (図 1 B)。さらに、IRS のない 2 人の患者のみが、両者とも $\text{CD4} > 100/\text{mm}^3$ と、追跡中に ESAT-6 抗原を認識した (データ示さず)。

【 0 0 3 3 】

4 人の患者 (IRS+ 3 人、IRS- 1 人) について広範なプロテオミク解析を行い、抗原刺激 PBMC 上清において化学発光により 25 種の炎症性および免疫調節性サイトカイン/ケモカインの *in vitro* 産生を評価した。IRS 間に 2 つの異なるパターンが観察された。第 1 に、PPD 特異的 IFN- γ 産生はその他の PPD 特異的 Th1 関連サイトカイン/ケモカイン (IL-2, IL-12, IP10 および MIG) と共にピークに達したが (図 1 C)、Th2 サイトカイン調節は生じなかった (IL-4, IL-5, IL-13, IL-15)。第 2 に、炎症性サイトカイン/ケモカイン (TNF- α , IL-6, IL-1, IL-10, RANTES および MCP-1) (図 1 D) はピークに達し、非刺激細胞および抗原刺激細胞の両方により産生された。さらに、PPD 特異的サイトカイン/ケモカイン産生は IRS+ 患者において CMV 特異的応答を大きく超えたが、一方、CMV 反応性は IRS- 患者において優勢であった (図 1 D 右)。

【 0 0 3 4 】

最後に、 CD3^+ 、 CD4^+ および CD8^+ T 細胞の全血 4 色フローサイトメトリー解析により、PPD 特異的 IFN- γ 産生応答と全く同じ動態 (データ示さず) に続き、活性化マーカー (HLA-DR, CD25^+) の発現は IRS の間に明確に増加し、一方予想されるように、これらのマーカーは IRS のない患者において HAART の間に減少することが示された。

1.3 結論

抗 TB および HAART 療法を開始した、HIV および TB の両方に感染した患者の予測的連続検討の結果から、IRS は、HAART により生じる免疫再構築の間の前炎症性事象を伴う TB 特異的 Th1 応答の悪化に対応することが最初に証明された。

【 0 0 3 5 】

PPD 特異的応答の回復が HAART による免疫再構築の特徴であることはよく知られている (12-15)。我々の予測的検討は、IRS として報告された急性の炎症性臨床症状と同時に生じる PPD 特異的応答の極めて急激で強力かつ再生可能な動態をはっきり示すことにより他のものとは異なる。この急な応答は IRS の間に HAART を中止しコルチコステロイドを投与された 1 人の IRS+ 患者のみに欠如し、一方、1 人の IRS- 患者は IRS の臨床診断がないが、HAART および免疫ウイルス学的コントロールが不十分であるにもかかわらず同様のピークを示した。かかる発見は、おそらくこれまでの研究の後ろ向きな特徴のため未だ証明されていなかった。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 6 】

さらに、我々はマイコバクテリア特異的応答はPPDに含まれるいくつかの持続的抗原に限られることをここに示す。実際、マイコバクテリアの分泌蛋白質ESAT-6に対する弱い応答は、ESAT-6が抗マイコバクテリア療法後には残らないか、IRSに關与するT細胞を刺激しないことを示唆する。この発見は診断に重要である。というのは、ESAT-6に基づく新しい結核診断試験(16)はこの急性の応答を見逃したであろうから。

【 0 0 3 7 】

IFN- γ 産生マイコバクテリア特異的T細胞の急激な増幅は、その他のTh1および前炎症性サイトカイン/ケモカインの急な発生に關連し、IRS+患者において産生された高濃度のseric IL-6を示すStone et al.(6)の結果と一致する。ここで我々は、両方の現象は共通して報告された臨床所見(2)の突然の始まりと關連することを示す：リンパ節膨張および機能性肉芽腫形成(17)。従って、我々はIRSに対して2段階の病態生理学を提案する：第1の事象はTB肉芽腫病変拡大の原因である、Th2とバランスのとれないPPD特異的Th1応答の過度の回復であり、これは直ちに、全身の炎症性症候群を誘導する、非特異的前炎症性サイトカインおよびケモカインの急速な放出を生じさせる。この後者の発見は、重篤なIRS患者における全身性抗炎症剤及び/又は免疫抑制剤の使用を裏付ける。

【 0 0 3 8 】

この機序は、おそらく抗TB療法中に同等の逆説的反應を経験する非HIV患者にも拡張できる。非HIV患者の中には、IFN- γ 分泌が活性なTB感染中に消失し、抗マイコバクテリア治療の間に再出現する場合がある(18)。IFN- γ 産生の脱阻害(desinhibition)は、免疫が大きく抑制された患者における免疫応答の回復と共に特に強いかもしれない。このマイコバクテリア抗原への生理学的応答が何人かの患者において非常に強くなり、時に生命を脅かすようになる理由について説明する因子は明らかでないが、Th1機能を調節する遺伝的要因が、既にP.Price(19)により提案されたようにIRSおよびその重篤度に対する素因を決定しているかもしれない。

【 0 0 3 9 】

結論として、いくつかのマイコバクテリア抗原に対するTh1応答の急性の増加が、HIVおよびTBの両方に感染した患者においてIRSを引き起こすようである。

【 実施例 2 】

【 0 0 4 0 】

IRS はツベルクリン(PPD) および16kDa 蛋白質に対して特異的な爆発的Th1 応答と關連する

(材料および方法)

被検者および患者

CD4細胞数の中間値が基準日(TB診断の期間、 T_{TB})で $58/\text{mm}^3$ であるHIVとTBの両方に感染した14人の患者(IRS+7人、IRS-7人)を、基準日、およびIRS+患者についてはIRSの期間(またはその後の期間)またはIRS-の患者についてはHAARTの開始後の1~6ヶ月において抗マイコバクテリア応答について試験した。

【 0 0 4 1 】

対照として、BCGを接種したTBおよびHIV陰性の4人、および非接種の1人を試験した。HIV陰性であるがTB陽性の4人の患者、およびHIV陽性であるがTB陰性の患者1人もまた対照として試験した。

【 0 0 4 2 】

アッセイ：

IFN- γ を産生する抗原特異的Th1細胞を、以下の2系列のアッセイを用いて新鮮および凍結末梢血の単核細胞(PBMC)において定量した：

・既報(Martinez V, JID 2005)のように、対照抗原で刺激40間後のELISpotはフィットヘマグルチニン(Murex)および培地のみを含んでいた。スポットをELISpot読み取り装置(Zeiss)を用いて計測し、データをスポット形成細胞(SFC)/ 10^6 PBMCで表した。細胞単独で得られた平均バックグラウンドを差し引いた後50より大きいSFC/ 10^6 PBMCの場合、結果は

陽性と考えられる。

・ IFN- γ 産生細胞の細胞内サイトカイン染色 (ICS) を、PPD (10 μ g/ml)、天然16kDa で16時間刺激後、または刺激せずに測定し、分泌はブレフェルダイン A (blebeldine A) でブロックし、染色はFACSCalibur で分析した。

【 0 0 4 3 】

抗原

マイコバクテリア抽出物 (PPD, 1 μ g/ml; Statens-Serum-Institute、コペンハーゲン、デンマーク)、ESAT-6組換え蛋白質 (1 μ g/ml、米国コロラドのコロラド州立大学の研究所より供与)。天然16kDa 蛋白質はICSUより供与された。ICSU (米国) より供与された以下の抗原も試験した：組換えAcr1 (HSPX)、天然38kDa、組換えAra-およびMan-LAM (それぞれ5、20、5、20および20 μ g/ml)。Acr, TB10.4, TB10.3, Apa, 組換えPhosI (パリ、パスツール研究所、Claude Leclercより供与) を最適化濃度で試験した。RD1, CFP10抗原を市販のT-spot TB(登録商標) test (Oxford Immunotech, Oxford, Chapman A, A IDS 2002) において製造者の推奨に従い試験した。

10

【 0 0 4 4 】

純度が少なくとも80%でHPLCで確認した均質性を有する、16kDa 蛋白質の配列にまたがる、10個のアミノ酸が重複する合成20-mer隣接ペプチド14種 (Genepep(登録商標)) を、個々に試験するか、最適濃度でプールした。

【 0 0 4 5 】

(結果)

20

IRS における標的化抗原の同定

IRS において認められたツベルクリン製剤に含まれる抗原が何であることを正確に規定し、確実な診断アッセイのための基礎を用意するために、このツベルクリン特異的応答の標的化抗原をELISpot IFN- γ で探した (結果は表 2 に示す)。

表 2 : スポット形成細胞 (SFC)/ 10^6 PBMC で表したELISpot IFN- γ 抗原特異的 T 細胞定量
 ND = 実施せず、 N_{pos} = 陽性結果の数 / 試験した数、 T_{TB} = 抗マイコバクテリア療法開始
 、¹ : IRS+およびIRS- データ(SFC/ 10^6 PBMC)間の非母数のマン・ホイットニー検定、^{*}
 : $p < 0.05$, § : $p = 0.07$

【 0 0 4 6 】

【表 2】

	TB-BCG 非接種 n=1		TB-BCG 接種 n=4		HIV+TB- n=1		HIV-TB+患者 n=4		HIV+TB+ T _{TB} n=11		HIV+BK+IRS- n=7		p ¹
	N pos	SFC /10 ⁶ PBMC	N pos	SFC /10 ⁶ PBMC (median)	N pos	SFC /10 ⁶ PBMC	N pos	SFC /10 ⁶ PBMC (median)	N pos	SFC /10 ⁶ PBMC (median)	N pos	SFC /10 ⁶ PBMC (median)	
PPD	0	43	4	303	0	0	4	420	7	80	6	425	*
Rec ESAT6	0	26		17	0	23	4	227		12	1/5	10	NS
CFP-10		ND		ND		ND		ND	0/1	2	2/3	100	NS
天然16kDa (AcrI)	1	53	4	577	0	7	4	572	7	90	6	480	*
Rec 16kD	0	13	3/3	357	0	10	2		0	0	2	7	NS
16kD ペプチド	0	0	2/3	440	0	0	1/2	28	5/9	0	1/3	0	§
Acr2	0	0	2/2	473	0	23	3	172	2	0	1	0	NS
天然 38kDa	1	270	3/3	1200	0	10	2/2	123	3/10	30	3/4	155	NS
Rec38kDa (phosI)	1	93	3/3	1673	0	17	2/2	220	5	43	2/4	87	NS
Apa	0	0	2/1	43	0	13	1	43	4/10	35	1/4	9	NS
TB 10.4	0	7	2/2	2020	0	17	4	432	9/10	103	5	127	NS
TB 10.3	0	0	2/2	1050	0	0	3	205	5/10	40	4	73	NS
Ara LAM		ND	0/2	13		ND	0/2	0	0/1	0	2	30	NS
Man LAM	0	0	1/2	100	0	0	2	48	3	7	2	27	NS

まず、我々は、試験したすべての被検者において、HIV 感染患者のような高度な免疫無防備状態の被検者であっても、ELISpot で定量したPPD および16kDa 特異的応答の間に高い相関性を見出した (図2)。この高い相関性はその他の抗原では見られなかった。

【0048】

PPD について観察されるように、IRS の時期は16kDa 特異的応答は試験したIRS+患者において急激に上がり (表3)、IRS-患者においてよりも著しく高い (表2)。これは試験したその他の抗原、特にRD1 抗原 (ESAT-6およびCFP-10) ではそうではなかった。

IRS におけるツベルクリンおよび16kDa 特異的 T細胞の表現型特性決定

IRS の時期、PPD および16kDa 特異的細胞の14%はCD8+であり、80%はCD4+であり、全CD4 の35%までを発現する。これらのCD4 T細胞は活性化され (100%がHLA-DR+)、TNF-
を共に産生するが、IL-2は産生せず、エフェクター記憶細胞である (84%がCD45RA-CD-
27- である)。

10

【0049】

(結論)

我々の結果は、IRS がPPD および天然16kDa 特異的Th1細胞応答の両方に関連するが、その他のTB抗原に対するT細胞応答には関連しないことを実証する。これらの発見により、IRS は、休止状態からのTB抗原に対する、しかし分泌抗原またはその他の活性結核関連抗原に対するものではない、エフェクター記憶CD4 T細胞の爆発的再活性化によることが示唆される。応答は天然蛋白質および16kDa の免疫優性ペプチドによって誘導されうる。従って、これらの結果はIRS の免疫学的診断のための独自の手段を提供し、TBの再発とIRS とを区別することを可能にする。

20

(参考文献)

【0050】

【表 3】

1. French MA, Mallal SA, Dawkins RL. Zidovudine-induced restoration of cell-mediated immunity to mycobacteria in immunodeficient HIV-infected patients. *Aids* 1992;6:1293-1297.
2. Lawn SD, Bekker LG, Miller RF. Immune reconstitution disease associated with mycobacterial infections in HIV-infected individuals receiving antiretrovirals. *Lancet Infect Dis* 2005;5:361-373. 10
3. French MA, Price P, Stone SF. Immune restoration disease after antiretroviral therapy. *Aids* 2004;18:1615-1627.
4. Dean GL, Edwards SG, Ives NJ, Matthews G, Fox EF, Navaratne L, *et al.* Treatment of tuberculosis in HIV-infected persons in the era of highly active antiretroviral therapy. *Aids* 2002;16:75-83.
5. Morlese JF, Orkin CM, Abbas R, Burton C, Qazi NA, Nelson MR, *et al.* Plasma IL-6 as a marker of mycobacterial immune restoration disease in HIV-1 infection. *Aids* 2003;17:1411-1413. 20
6. Stone SF, Price P, Keane NM, Murray RJ, French MA. Levels of IL-6 and soluble IL-6 receptor are increased in HIV patients with a history of immune restoration disease after HAART. *HIV Med* 2002;3:21-27.
7. Li TS, Tubiana R, Katlama C, Calvez V, Ait Mohand H, Autran B. Long-lasting recovery in CD4 T-cell function and viral-load reduction after highly active antiretroviral therapy in advanced HIV-1 disease. *Lancet* 1998;351:1682-1686.
8. Autran B, Carcelain G, Li TS, Blanc C, Mathez D, Tubiana R, *et al.* Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science* 1997;277:112-116. 30
9. Narita M, Ashkin D, Hollender ES, Pitchenik AE. Paradoxical worsening of tuberculosis following antiretroviral therapy in patients with AIDS. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:157-161.
10. Martinez V, Costagliola D, Bonduelle O, N'go N, Schnuriger A, Theodorou I, *et al.* Combination of HIV-1-specific CD4 Th1 cell responses and IgG2 antibodies is the best predictor for persistence of long-term nonprogression. *J Infect Dis* 2005;191:2053-2063. 40

【表 4】

11. Carson RT, Vignali DA. Simultaneous quantitation of 15 cytokines using a multiplexed flow cytometric assay. *J Immunol Methods* 1999;227:41-52.
12. Havlir DV, Schrier RD, Torriani FJ, Chervenak K, Hwang JY, Boom WH. Effect of potent antiretroviral therapy on immune responses to *Mycobacterium avium* in human immunodeficiency virus-infected subjects. *J Infect Dis* 2000;182:1658-1663. 10
13. Wendland T, Furrer H, Vernazza PL, Frutig K, Christen A, Matter L, *et al.* HAART in HIV-infected patients: restoration of antigen-specific CD4 T-cell responses in vitro is correlated with CD4 memory T-cell reconstitution, whereas improvement in delayed type hypersensitivity is related to a decrease in viraemia. *Aids* 1999;13:1857-1862.
14. Hengel RL, Allende MC, Dewar RL, Metcalf JA, Mican JM, Lane HC. Increasing CD4+ T cells specific for tuberculosis correlate with improved clinical immunity after highly active antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002;18:969-975. 20
15. Foudraine NA, Hovenkamp E, Notermans DW, Meenhorst PL, Klein MR, Lange JM, *et al.* Immunopathology as a result of highly active antiretroviral therapy in HIV-1-infected patients. *Aids* 1999;13:177-184.
16. Mori T, Sakatani M, Yamagishi F, Takashima T, Kawabe Y, Nagao K, *et al.* Specific detection of tuberculosis infection: an interferon-gamma-based assay using new antigens. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:59-64. 30
17. Lawn SD, Macallan DC. Hypercalcemia: a manifestation of immune reconstitution complicating tuberculosis in an HIV-infected person. *Clin Infect Dis* 2004;38:154-155.
18. Hirsch CS, Toossi Z, Othieno C, Johnson JL, Schwander SK, Robertson S, *et al.* Depressed T-cell interferon-gamma responses in pulmonary tuberculosis: analysis of underlying mechanisms and modulation with therapy. *J Infect Dis* 1999;180:2069-2073. 40
19. Price P, Morahan G, Huang D, Stone E, Cheong KY, Castley A, *et al.* Polymorphisms in cytokine genes define subpopulations of HIV-1 patients who experienced immune restoration diseases. *Aids* 2002;16:2043-2047.

【図面の簡単な説明】

【 0 0 5 2 】

【図 1】図 1 A ~ 1 D は IRS 患者および IRS ではない患者の PPD 特異的反応性を示す。左欄は IRS + 患者のデータを表し、右欄は IRS- 患者のデータを表す。図 1 A は、PPD(赤色) または CMV(青緑色) での PBMC 刺激 40 時間後の IRS+ および IRS- の全患者で行われた ELISpo 50

t IFN- γ アッセイの、スポット形成細胞(SFC) / 10^6 PBMC で表した全結果を示す。 図 1 B、1 C、1 D は IRS+患者 1 人および IRS- の患者 1 人からの代表的結果を示す。 図 1 B は、PPD、ESAT6(赤色) と対照抗原 (CMV、HIV₁p24) (青緑色) で刺激後の IFN- γ ELISpot を示す。図 1 C、1 D は、IRS + および IRS- の 2 人の代表的患者において PPD (赤色)、CMV(青緑色) および培地単独での in vitro PBMC 刺激後の発光で測定した産生を示し、図 1 C は IFN- γ ()、IL-2 ()、IP-10() について、図 1 D は TNF- α ()、IL-6()、IL-1 β () について示す。

【図 2】 PPD および天然 16kDa(左)、ESAT-6 (右) 特異的細胞の ELISpot 定量 (SFC/ 10^6 PBMC)(n = 37) の回帰曲線を示す。

【図 3】 スポット形成細胞(SFC) / 10^6 PBMC で表した、ELISpot により測定した 1 人の IRS+患者における抗原特異的細胞の数の動態を示す。 T_{TB} = 抗マイコバクテリア療法開始、T_{IRS} = IRS の期間、M₃ = HAART 開始後 3 ヶ月。

10

【図 1 A】

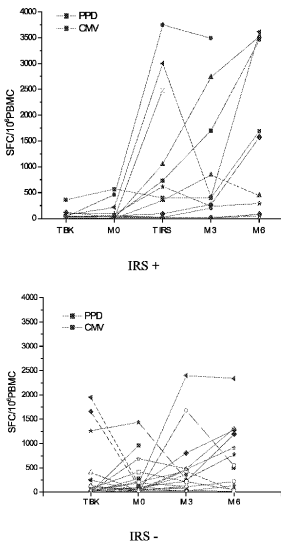


FIGURE 1A

【図 1 B】

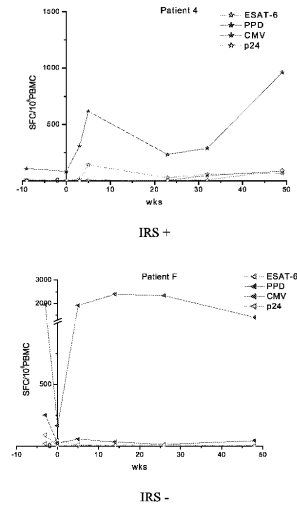
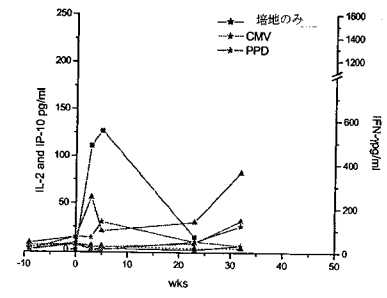
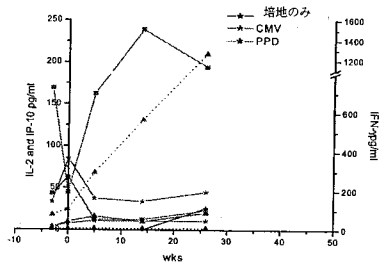


FIGURE 1B

【 図 1 C 】



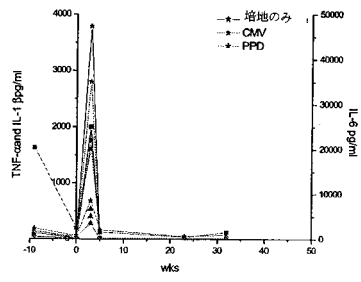
IRS +



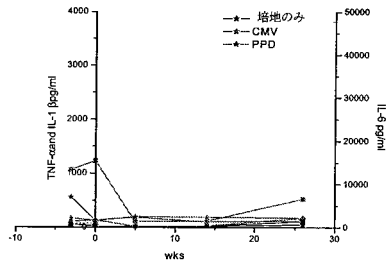
IRS -

FIGURE 1C

【 図 1 D 】



IRS +



IRS -

FIGURE 1D

【 図 2 】

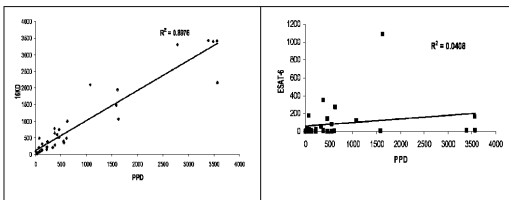


FIGURE 2

【 図 3 】

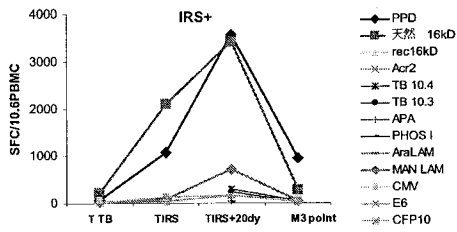


FIGURE 3

【配列表】

2009515143000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2006/066152

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/50		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, PAJ, WPI Data, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/006952 A2 (STATENS SERUMINSTITUT [DK]; ANDERSEN PETER [DK]; ROSENKRANDS IDA [DK];) 22 January 2004 (2004-01-22) claims 6-10,20-22; examples 2,3; table 1; sequence 24 page 4 last paragraph, page 31 first paragraph, page 34 lines 20-35, page 41 to 43 first paragraph ----- -/-	15-20
<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 document 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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
15 February 2007	09/03/2007	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Mulder, Lonneke	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/066152

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NICOL M P ET AL: "Enzyme-linked immunospot assay responses to early secretory antigenic target 6, culture filtrate protein 10, and purified protein derivative among children with tuberculosis: Implications for diagnosis and monitoring of therapy" CLINICAL INFECTIOUS DISEASES, vol. 40, no. 9, May 2005 (2005-05), pages 1301-1308, XP008060172 ISSN: 1058-4838	15-17
Y	page 1302, right-hand column; figures 1-5; table 2 page 1303, right-hand column, paragraph 2	1-6, 8-11,14
X	ELLIOTT A M ET AL: "The immune response to Mycobacterium tuberculosis in HIV-infected and uninfected adults in Uganda: application of a whole blood cytokine assay in an epidemiological study." THE INTERNATIONAL JOURNAL OF TUBERCULOSIS AND LUNG DISEASE : THE OFFICIAL JOURNAL OF THE INTERNATIONAL UNION AGAINST TUBERCULOSIS AND LUNG DISEASE. MAR 1999, vol. 3, no. 3, March 1999 (1999-03), pages 239-247, XP002365574 ISSN: 1027-3719	15,16,18
Y	Table 3; Page 240, right-hand column, section 'Whole blood assay and measurement of cytokines'table 3	1,5-7, 11-14
Y	HENGEL RICHARD L ET AL: "Increasing CD4+ T cells specific for tuberculosis correlate with improved clinical immunity after highly active antiretroviral therapy." AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES 1 SEP 2002, vol. 18, no. 13, 1 September 2002 (2002-09-01), pages 969-975, XP002419407 ISSN: 0889-2229 page 969 - page 970 page 974; figure 1	1-14

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/066152

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	BOURGARIT ANNE ET AL: "Explosion of tuberculin-specific Th1-responses induces immune restoration syndrome in tuberculosis and HIV co-infected patients" AIDS (HAGERSTOWN), vol. 20, no. 2, January 2006 (2006-01), pages F1-F7, XP002418216 ISSN: 0269-9370 page F5, right-hand column, first paragraph the whole document	1-20
P,X	BELL HELEN C ET AL: "Pulmonary Mycobacterium celatum immune restoration disease: immunopathology and response to corticosteroid therapy." AIDS (LONDON, ENGLAND) 18 NOV 2005, vol. 19, no. 17, 18 November 2005 (2005-11-18), pages 2047-2049, XP002418217 ISSN: 0269-9370 page 2047, right-hand column, paragraph 2	1-20
A	PAI M ET AL: "Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review" December 2004 (2004-12), LANCET INFECTIOUS DISEASES, XX, US, PAGE(S) 761-776, XP004812171 ISSN: 1473-3099 page 762, right-hand column, paragraph 2 - page 763, left-hand column, paragraph 2 tables 2-5 abstract	7
A	FOUDRAINE N A ET AL: "Immunopathology as a result of highly active antiretroviral therapy in HIV-1-infected patients." AIDS (LONDON, ENGLAND) 4 FEB 1999, vol. 13, no. 2, 4 February 1999 (1999-02-04), pages 177-184, XP002419408 ISSN: 0269-9370 page 178; figure 1 page 183	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2006/066152

Patent document cited in search report	Publication data	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004006952	A2	AU 2003242504 A1 EP 1523331 A2	02-02-2004 20-04-2005

フロントページの続き

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

(72)発明者 オートラン、ブリジット

フランス国、F - 7 5 0 1 7 パリ、ブルバール・ペレール、9 2 テール

(72)発明者 ブルガリ、アンヌ

フランス国、F - 7 5 0 1 1 パリ、リュウ・セブラン、9 6

(72)発明者 カルスラン、ギスレーヌ

フランス国、F - 9 2 1 3 0 イシ・レ・ムリノー、リュウ・アンリ・タリエル、2 4

(72)発明者 マルティネ、パレリー

フランス国、F - 7 5 0 1 5 パリ、リュウ・ウジェーヌ・ミリヨン、7

(72)発明者 ジケル、ブリジット

フランス国、F - 7 5 0 1 4 パリ、リュウ・ダゲール、8

(72)発明者 セレーニ、ダニエル

フランス国、F - 7 5 0 0 5 パリ、リュウ・デ・ベルナルダン、3

Fターム(参考) 4H045 AA11 AA30 BA10 CA11 DA86 EA29 EA52

专利名称(译)	诊断结核相关免疫重建综合征 (IRS) 的方法		
公开(公告)号	JP2009515143A	公开(公告)日	2009-04-09
申请号	JP2008532708	申请日	2006-09-07
[标]申请(专利权)人(译)	研究所国立Rasante埃杜拉尔外壳格哈德·李医学等NS强麦EM 法国国家健康医学研究院		
申请(专利权)人(译)	国立研究所德拉桑特等德拉RECHERCHE医疗 (李NTT ES等强麦EM)		
[标]发明人	オートランブリジット ブルガリアンヌ カルスランギスレーヌ マルティネバレリー ジケルブリジット セレーニダニエル		
发明人	オートラン、ブリジット ブルガリ、アンヌ カルスラン、ギスレーヌ マルティネ、バレリー ジケル、ブリジット セレーニ、ダニエル		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/53 C07K14/35		
CPC分类号	G01N33/5091 G01N2333/35 G01N2333/52 G01N2333/57		
FI分类号	G01N33/569.F G01N33/53.P C07K14/35.ZNA		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/DA86 4H045/EA29 4H045/EA52		
优先权	2005291998 2005-09-27 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及在结核病 (TB) 和HIV共感染的患者中诊断免疫恢复综合征 (IRS) 的方法和试剂盒, 包括检测暴露于结核菌素杆菌的分支杆菌提取物后的Th1应答的增加, 称为PPD。 , 并且不会增加ESAT-6, CFP-10和/或85B。

