

(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2014-527177

(P2014-527177A)

(43) 公表日 平成26年10月9日(2014.10.9)

(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 L	4 B 0 6 3
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 P	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 9 7	
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 29 頁)

(21) 出願番号 特願2014-530213 (P2014-530213)
 (86) (22) 出願日 平成24年9月13日 (2012. 9. 13)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年5月13日 (2014. 5. 13)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2012/067928
 (87) 国際公開番号 W02013/037878
 (87) 国際公開日 平成25年3月21日 (2013. 3. 21)
 (31) 優先権主張番号 11181119.6
 (32) 優先日 平成23年9月13日 (2011. 9. 13)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 61/534, 058
 (32) 優先日 平成23年9月13日 (2011. 9. 13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 514063788
 ソヴィセル ゲーエムベーハー
 ドイツ連邦共和国 04103 ライプツ
 イヒ ドイチャー ブラッツ 5ペー
 (74) 代理人 100079049
 弁理士 中島 淳
 (74) 代理人 100084995
 弁理士 加藤 和詳
 (74) 代理人 100085279
 弁理士 西元 勝一
 (72) 発明者 バールマン フェルディナンド ハーマン
 ドイツ連邦共和国 66121 ザールブ
 リュッケン グロスヘルツォーク-フ
 リードリッヒ-シュトラッセ 85

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 特定のインフルエンザウイルス型の感染症の感染状態の迅速なインビトロ決定法

(57) 【要約】

全血の第1試料中に存在する抗原特異的T細胞を、所望によりCD28に対する抗体またはCD28とCD49dとに対する抗体が存在する状態で、特定のインフルエンザウイルス型の抗原を用いて刺激する工程；

35 から39、特に37で、所望によりCO₂を添加しながら、少なくとも0.5時間、とりわけ1.5時間から2.5時間、特に2時間の、充分な時間の培養により、抗原提示細胞 (APC) にインフルエンザ抗原を処理させる工程；

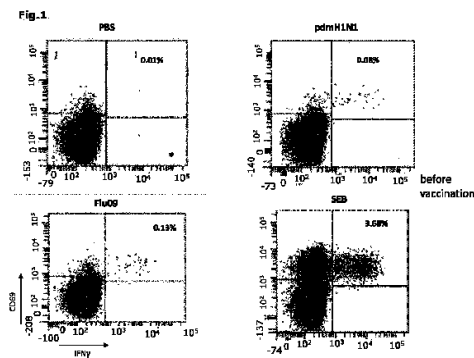
次に分泌阻害剤を添加する工程；

激しく混合する工程；

続いて35 から39 までの温度で、少なくとも1時間、とりわけ2.5時間の間、2回目の培養を行う工程、および

前記抗原特異的T細胞の細胞内INF 産生と細胞内IL 2産生の両方からプロファイルを決定する工程を含み、

急性インフルエンザ感染症の存在が、以前にインフルエンザウイルスに感染した患者または感染していない患



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

全血の第 1 試料中に存在する抗原特異的 T 細胞を、所望により CD 28 に対する抗体または CD 28 と CD 49 d とに対する抗体が存在する状態で、特定のインフルエンザウイルス型の抗原を用いて刺激する工程；

35 から 39 、特に 37 で、所望により CO₂ を添加しながら、十分な時間の培養、少なくとも 0.5 時間、とりわけ 1.5 時間から 2.5 時間、特に 2 時間の培養により、抗原提示細胞 (APC) にインフルエンザ抗原を処理させる工程；

次に分泌阻害剤を添加する工程；

激しく混合する工程；

続いて 35 から 39 までの温度で、少なくとも 1 時間、とりわけ 2.5 時間の間の、2 回目の培養を行う工程、および

前記抗原特異的 T 細胞の細胞内 INF 産生と細胞内 IL 2 産生の両方からプロファイルを決する工程

を含み、

前記インフルエンザウイルスに対するワクチン接種が成功した、以前に前記インフルエンザウイルスに感染した、または前記インフルエンザウイルスに感染していない患者の IFN 単一陽性 T 細胞 / IL 2 単一陽性 T 細胞の比が 1 よりも小さいのに対し、1 よりも大きい IFN 単一陽性 T 細胞 / IL 2 単一陽性 T 細胞の比を伴う IFN 単一陽性細胞へとプロファイルシフトしていることが、急性インフルエンザ感染症の存在を示す、

急性インフルエンザ感染であるか、または以前に克服したインフルエンザ感染の後の予備免疫もしくはワクチン接種に起因する誘導された免疫応答であるかに関して、前記インフルエンザウイルス型の感染の感染状態を全血から迅速に決定するためのインビトロ方法。

【請求項 2】

前記第 1 試料と同一になるよう調製された、第 2 試料の全血中に存在する抗原特異的 T 細胞に、0.9% NaCl 含有 PBS または 5% グルコース含有 PBS などの生理的緩衝液を添加することによって、陰性対照が実施される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記第 1 試料と同一になるよう調製された、第 3 試料の全血中に存在する抗原特異的 T 細胞に、SEB を添加することによって、陽性対照が実施される、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記第 1 試料と同一になるよう調製された、第 4 試料の全血中に存在する抗原特異的 T 細胞に、ワクチン接種用抗原を添加することによって、ワクチン接種対照が生じた、請求項 1 ~ 請求項 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記分泌阻害剤が、プレフェルジン A、モネンシンなどからなる群より選択される、請求項 1 ~ 請求項 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記プロファイルの決定がフローサイトメトリー、自動化顕微鏡法、または多重 ELISA 法によって達成される、請求項 1 ~ 請求項 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記各試料の全血がヒトまたは動物に由来する、請求項 1 ~ 請求項 6 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

20

30

40

50

本発明は、急性インフルエンザ感染症または以前のインフルエンザ感染またはワクチン接種に起因する継続性免疫化に関して、特定のインフルエンザウイルス型の感染症の感染状態を全血から迅速に決定するためのインビトロ方法に関する。

【背景技術】

【0002】

インフルエンザは、一般にフルと呼ばれており、それは鳥類および哺乳類を冒す、インフルエンザウイルスが原因の感染症である。この疾患の最も一般的な症状は、寒気、発熱、喉の痛み、筋肉痛、ひどい頭痛、咳、脱力感ノめまい、および全身の不快感である。

【0003】

突然変異または遺伝子再集合によって新しいインフルエンザウイルスは常に進化している。突然変異はそのウイルスの表面にあるヘマグルチニン抗原およびノイラミニダーゼ抗原に小さな変化を引き起こし得る。これは抗原連続変異と呼ばれ、抗原連続変異によって多種多様な株が徐々に生じて、以前に存在した株に対して免疫を有する人々に感染することができるものに進化する。次にこの新しい変異体がより古い株に置き換わってヒト集団に急速に広まり、多くの場合、流行病を引き起こす。しかしながら、連続変異によって作製される株はより古い株にまだ結構類似しているので、まだそれらに免疫を有する人々もいる。対照的に、インフルエンザウイルスが遺伝子再集合するとき、例えば鳥類株とヒト株の間の遺伝子再集合によって、インフルエンザウイルスは完全に新しい抗原を獲得する。これは抗原不連続変異と呼ばれる。全く新しい抗原を有するヒトインフルエンザウイルスが作製される場合、全ての人々が感受性となり、そして、その新規のインフルエンザが管理できないほど広まり、世界的流行を引き起こす。

10

20

【0004】

典型的には、インフルエンザは、そのウイルスを含むエアロゾルを作り出す咳またはくしゃみによって空気伝染する。インフルエンザは鳥の糞または鼻汁との直接的な接触、または汚染された表面との接触によっても伝染し得る。空気中のエアロゾルがほとんどの感染の原因であると考えられてきたが、その伝達手段は最も重要であるにもかかわらず、完全に解明されてはいない。

【0005】

インフルエンザは様々な種および株のウイルスによって引き起こされるので、どの年でも他の株が流行を引き起こしている間に絶滅する株もあり得、さらに別の株が世界的流行を引き起こすこともあり得る。典型的には、ある年の通常の2回のインフルエンザのシーズン(半球毎に1回)に世界中で3百万から5百万の重病の症例が存在し、最大で500,000件の死亡例が存在する。ある定義ではそれが毎年のインフルエンザの流行である。

30

【0006】

20世紀では3回のインフルエンザの世界的流行が起こり、数千万もの人々が死亡した。これらの世界的流行のそれぞれは、ヒトにおける新しい株のウイルスの出現によって引き起こされた。多くの場合、これらの新しい株は、既存のインフルエンザウイルスが他の動物種からヒトに広まるとき、または既存のヒトの株が通常は鳥またはブタに感染するウイルスから新しい遺伝子を抜き取るときに出現する。H5N1という名称の鳥類株が1990年代にアジアに出現した後、その株によってインフルエンザの新しい世界的流行についての心配が引き起こされたが、その株は人々の間で容易に広まる型には進化していない。2009年の4月に、最初に「豚インフルエンザ」と称され、インフルエンザA/H1N1としても知られているヒト、ブタ、および鳥インフルエンザの遺伝子を組み合わせた新しいインフルエンザ株が進化し、メキシコ、米国、および他のいくつかの国に出現した。世界保健機構は2009年6月11日に世界的流行の発生を公的に宣言した。

40

【0007】

ウイルスの分類ではインフルエンザウイルスはオルソミクソウイルス科の5つの属のうちの3つであるインフルエンザウイルスA、B、およびCを構成するRNAウイルスである。

50

【0008】

インフルエンザウイルス A

野生の水鳥が多く種類のインフルエンザ A の自然宿主である。時折、ウイルスが他の種に伝播し、そしてその時に家禽での壊滅的な流行の原因となり得、またはヒトインフルエンザの世界的流行が生じ得る。A 型ウイルスはこれらの 3 種類のインフルエンザの中で最も悪性のヒト病原体であり、そして、最も重症の病気の原因となる。インフルエンザ A ウイルスはこれらのウイルスに対する抗体反応に基づいて異なる血清型に細分化され得る。ヒトにおいて確認された血清型は、公知のヒトでの世界的流行による死亡数の順序で、

- ・ H 1 N 1、1918 年のスペイン風邪および 2009 年の豚インフルエンザの原因
- ・ H 2 N 2、1957 年のアジア風邪の原因
- ・ H 3 N 2、1968 年の香港風邪の原因
- ・ H 5 N 1、2004 年の鳥インフルエンザの原因
- ・ H 7 N 7、並外れた人畜共通感染力を有する [2 3]
- ・ H 1 N 2、ヒト、ブタおよび鳥類における地域的流行病
- ・ H 9 N 2
- ・ H 7 N 2
- ・ H 7 N 3
- ・ H 1 0 N 7

である。

【0009】

インフルエンザウイルス B

インフルエンザ B はほぼ例外なくヒトに感染し、そして、インフルエンザ A よりも一般的ではない。インフルエンザ B の感染に感受性がある他の動物はアザラシとフェレットのみである。この種類のインフルエンザは A 型よりも 2 ~ 3 倍遅い速度で突然変異を起こし、結果としてあまり遺伝的に分化しておらず、たった 1 つのインフルエンザ B 血清型が存在する。この低下した抗原変化速度が、(種交差性抗原不連続変異を阻害する)その限定的な宿主域と組み合わせさせて、インフルエンザ B の世界的流行が起こらない事を確実にしている。

【0010】

インフルエンザウイルス C

インフルエンザウイルス C はヒト、イヌおよびブタに感染し、時折、重病および地域的な流行の両方の原因となる。しかしながら、インフルエンザ C は他の型よりも一般的ではなく、通常、子供に軽度の病気を引き起こすだけである。

【0011】

インフルエンザ A 感染症および B ウイルス感染症の予防として、ワクチン接種があり得る。インフルエンザウイルスは、免疫系によって認識されるその構造を頻繁に変更している。様々な種類のインフルエンザウイルス、例えば、「通常の」季節性インフルエンザ病の原因であるインフルエンザウイルス、例えば H 3 N 2 とより危険なウイルス、例えば H 5 N 1 (鳥インフルエンザ) が同時に活動することがあり得る。通常、先進国の人々はインフルエンザに対するワクチン接種を受けることができる。多くの場合、家禽は群れの壊滅を避けるためにワクチンの接種を受ける。最も一般的なヒト用ワクチンは、3 種類のウイルス株に対する精製不活性化抗原を含有する三価インフルエンザワクチン (T I V) である。典型的には、このワクチンは 2 種類のインフルエンザ A ウイルス亜型と 1 種類のインフルエンザ B ウイルス株に由来する物質を含む。T I V にはその疾患を伝染させるリスクが無く、そして、T I V は非常に低い反応性を有する。インフルエンザウイルスは急速に進化し、そして、新しい株が短時間でより古い株に置き換わるので、ある年に製剤されたワクチンは次の年には効果が無いことがあり得る。インフルエンザを治療するために抗ウイルス薬を使用することができ、ノイラミニダーゼ阻害剤 (タミフルまたはリレンザなど) が特に効果的である。

【0012】

10

20

30

40

50

H3N2 およびより危険な株、例えば H5N1 (鳥インフルエンザ)

通常、先進国の人々はインフルエンザに対するワクチン接種を受けることができる。多くの場合、家禽は群れの壊滅を避けるためにワクチンの接種を受ける。最も一般的なヒト用ワクチンは、3種類のウイルス株に対する精製不活性化抗原を含有する三価インフルエンザワクチン(TIV)である。典型的には、このワクチンは2種類のインフルエンザAウイルス亜型と1種類のインフルエンザBウイルス株に由来する物質を含む。TIVにはその疾患を伝染させるリスクが無く、そして、TIVは非常に低い反応性を有する。インフルエンザウイルスは急速に進化し、そして、新しい株が短時間でより古い株に置き換わるので、ある年に製剤されたワクチンは次の年には効果が無いことがあり得る。インフルエンザを治療するために抗ウイルス薬を使用することができ、ノイラミニダーゼ阻害剤(タミフルまたはリレンザなど)が特に効果的である。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

国際公開第2007/107714A2号は、被験者(individual)において細胞内の病原体の感染を評価する、および/または細胞内の病原体の感染をモニターする方法であって、その被験者が細胞内の病原体の抗原に応答して(a)IFNのみを分泌するT細胞、(b)IL2のみを分泌するT細胞、または(c)IFNとIL2の両方を分泌するT細胞を有するか決定すること、および所望によりこのサイトカインプロファイルにおけるどのような変化も測定することを含む方法を開示する。詳細が記載される病原体はCMV、肝炎ウイルス、EBVまたはHSVである。これらのウイルスはインフルエンザウイルスのようにその抗原パターンを急速に変化させることはないので、国際公開第2007/107714A2号から分かる方法は、本発明の根底にある問題の解決には容易に適用され得ない。

20

【0014】

PLoS one誌、第6巻、第3号、E17813頁のアーバン・セスターらの論文は、T細胞ベースのIFN放出アッセイでは活動性結核(TB)を治療が成功した病気または潜在性の結核菌(M. tuberculosis)感染症と区別することができないことを開示している。その論文の筆者らは、生体外でフローサイトメトリーによって測定された抗原特異的T細胞のIFNとIL2のサイトカインプロファイルがインビボでのTB疾患の活動性と相関し得ると推論した。活動性TBを有する24人の患者とTBの治療が成功した28人の患者のCD4発現T細胞における抗原特異的サイトカインプロファイルを、フローサイトメトリーを使用して測定するためにツベルクリン(PPD)、ESAT6およびCFP10を刺激として使用した。また、潜在性結核菌感染症とBCGワクチン接種のそれぞれと合致する免疫を有する25人の被験者を動員した。サイトカイン分泌性PPD反応性CD4発現T細胞の出現頻度は、TBが治療された患者と比べて活動性TBを有する患者で高かったが(中央値でCD4発現T細胞の0.39%に対して0.81%、 $p=0.02$)、被験者基準では群間での区別は出現頻度の部分的な一致のため不可能であった。サイトカインプロファイルを評価すると、IFNとIL2の両方を分泌するPPD特異的CD4発現T細胞が、治療されたTB、潜在性感染およびBCGワクチン接種において優勢であったが、活動性TBではそのサイトカインプロファイルはIFNのみを分泌する細胞へと変えられた($p<0.0001$)。ESAT6またはCFP10反応性CD4発現T細胞のサイトカインプロファイルはそれらの群の間で異ならなかった。受信者操作特性(ROC)分析により、PPD特異的IFN/IL2二重陽性T細胞の56%より低い出現頻度が、非活性状態との有効な区別を可能とする活動性TBの正確なマーカーである(特異度100%、感度70%)ことが明らかになった。結論として、IFN/IL2二重陽性PPD特異的循環CD4T細胞の56%よりも低い出現頻度は活動性TBの強力な指標である。

30

40

【0015】

ワクチン接種前に患者が未感染であるか、現時点で活動性インフルエンザを患っていない

50

いか、そして、その場合、その患者に「通常の」インフルエンザウイルスが感染しているのか、または、例えばH5N1が感染しているのか分かることが望ましい。

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明は、様々なインフルエンザ株に対するT細胞性免疫応答を全血試料中のT細胞の抗原特異的刺戟を助力として検出および特徴解析することができたという観察に基づいている。インフルエンザ反応性T細胞は、白血球の固定と赤血球の溶解の後に細胞内サイトカイン染色とその後のフローサイトメトリーによる全ての各T細胞の中でのインフルエンザ反応性T細胞の出現頻度の分析を助力として検出できた。いくつかの被験者では低レベルの既存のインフルエンザ特異的T細胞が観察され、全ての被験者でワクチン接種後にインフルエンザ特異的T細胞の明確な増加が観察された。興味深いことに、この増加にはワクチン接種から1週間後に最も優勢であった活性化T細胞のサイトカインプロファイルの変化が伴った。いくつかの他のワクチン未接種の被験者は急性インフルエンザ感染症を示唆する臨床的徴候を示し、それらの被験者で新規に誘導された免疫応答を確認するためにインフルエンザ特異的T細胞の分析が実施された。これらの被験者では、活性化T細胞のサイトカインプロファイルにさらに一層顕著な変化が存在した。本発明のインビトロ方法により被験者の実際の感染状態の決定が可能になる。

10

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1-1】世界的流行性インフルエンザのワクチンを使用する免疫により、世界的流行性インフルエンザと季節性インフルエンザの両方の抗原に対する特異的CD4発現T細胞応答が誘導される。

20

【図1-2】世界的流行性インフルエンザのワクチンを使用する免疫により、世界的流行性インフルエンザと季節性インフルエンザの両方の抗原に対する特異的CD4発現T細胞応答が誘導される。

【図1-3】世界的流行性インフルエンザのワクチンを使用する免疫により、世界的流行性インフルエンザと季節性インフルエンザの両方の抗原に対する特異的CD4発現T細胞応答が誘導される。

【図1-4】世界的流行性インフルエンザのワクチンを使用する免疫により、世界的流行性インフルエンザと季節性インフルエンザの両方の抗原に対する特異的CD4発現T細胞応答が誘導される。

30

【図2-1】エフェクターメモリー表現型を有するTh1細胞がワクチン接種によって主に誘導される。

【図2-2】エフェクターメモリー表現型を有するTh1細胞がワクチン接種によって主に誘導される。

【図3-1】既存の免疫が抗原特異的CD4発現T細胞の強力な誘導を妨げる。

【図3-2】既存の免疫が抗原特異的CD4発現T細胞の強力な誘導を妨げる。

【図4】ワクチンにより誘導された抗体は季節性抗原とわずかな交差反応性しか示さない。

【図5-1】PdmH1N1特異的CD4発現T細胞のサイトカイン発現プロファイルの差異によって、メモリー応答またはワクチン接種応答が急性感染と区別される。

40

【図5-2】PdmH1N1特異的CD4発現T細胞のサイトカイン発現プロファイルの差異によって、メモリー応答またはワクチン接種応答が急性感染と区別される。

【発明を実施するための形態】

【0018】

本発明の方法は、急性インフルエンザ感染であるか、ワクチン接種に起因する誘導された免疫応答または以前に克服したインフルエンザ感染に起因する予備免疫であるかに関して、特定のインフルエンザウイルス型の感染症の感染状態をヒトおよび動物の全血から迅速に決定するためのインビトロ方法であって、

・全血の第1試料中に存在する抗原特異的T細胞を、所望によりCD28に対する抗体ま

50

たはCD28とCD49dとに対する抗体が存在する状態で、前記インフルエンザウイルス型の抗原を用いて刺激する工程；

・35 から39、特に37で、所望によりCO₂を添加しながら、少なくとも0.5時間、とりわけ1.5時間から2.5時間、特に2時間の、十分な時間の培養により、抗原提示細胞（APC）にインフルエンザ抗原を処理させる工程；

・次に分泌阻害剤を添加する工程；

・激しく混合する工程；

・続いて35 から39、特に37で、少なくとも1時間、特に2.5時間、とりわけ3.5時間から6時間、特に4時間の間、所望によりCO₂を添加しながら、2回目の培養を行う工程；

・前記抗原特異的T細胞の細胞内IFN γ 産生と細胞内IL-2産生の両方からプロファイルを決める工程；

を含み、

・以前に前記インフルエンザウイルスに感染したかまたは感染していない患者であって前記インフルエンザウイルスに対するワクチン接種が成功した患者のIFN γ 単一陽性T細胞/IL-2単一陽性T細胞の比が1よりも小さいのに対し、1よりも大きいIFN γ 単一陽性T細胞/IL-2単一陽性T細胞の比を伴うIFN γ 単一陽性細胞へとプロファイルシフトしていることが、急性インフルエンザ感染症の存在を示す方法である。

【0019】

本発明によれば、前記第1試料と同一になるよう調製された（authentic）、第2試料の全血中に存在する抗原特異的T細胞に、0.9%NaCl含有PBSまたは5%グルコース含有PBSなどの生理的緩衝液を添加することによって、陰性対照を実施することができる。

【0020】

前記第1試料と同一になるよう調製された、第3試料の全血中に存在する抗原特異的T細胞に、SEBを添加することによって、陽性対照を実施することができる。

【0021】

本発明のさらに別の実施形態では、前記第1試料と同一になるよう調製された、第4試料の全血中に存在する抗原特異的T細胞に、ワクチン接種用抗原を添加することによって、ワクチン接種対照が生じ得る。本発明に従う方法では分泌阻害剤は、プレフェルジンA、モネンシンなどからなる群より選択される。そのサイトカインプロファイルの決定はフローサイトメトリー、自動化顕微鏡法、または多重ELISA法によって達成され得る。

【実施例】

【0022】

本発明は、特許請求の範囲を限定するものとされない以下のより具体的な実施例と説明によってさらに例示される。抗原特異的抗体応答の誘導は世界的流行性H1N1ワクチンまたは季節性インフルエンザ（フル）ワクチンによるワクチン接種の後によく特徴解析されている。しかしながら、世界的流行性H1N1に対する細胞性免疫応答の動態および季節性インフルエンザワクチンに対する交差反応性は、抗原特異的T細胞のサイトカインプロファイルの変化に関してこれまで知られていない。

【0023】

19人の免疫応答性被験者に世界的流行性H1N1ワクチンであるパンデムリックスを接種し、そして、世界的流行性H1N1と季節性インフルエンザワクチンに特異的なCD4発現T細胞の出現頻度をワクチン接種前と接種から1週間、2週間および10週間の後に細胞内サイトカイン染色（IFN γ 、IL-2、IL-17）を用いてモニターした。黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）エンテロトキシンB（SEB）での刺激が陽性対照として働いた。サイトカイン分析とは別に、特異的T細胞の表現型をメモリーマーカーおよび成熟マーカーにより特徴解析した。また、特異的抗体の誘導をELISAと中和アッセイによりモニターした。加えて、7人の急性H1N1感染症の患者を分析した。

10

20

30

40

50

【0024】

ワクチン接種の前では、世界的流行性H1N1特異的CD4発現T細胞のレベルは事例の68%において検出限界未満であった。対照的に、季節性インフルエンザに対する免疫は79%において検出可能であった。ワクチン接種後に特異的T細胞応答は全ての事例において検出限界よりも上に上昇した。出現頻度の中央値は463%上昇し(IQR 291~715%)、そして、追跡調査期間を通じて変動しなかった。興味深いことに、季節性ワクチンに対するT細胞のレベルの中央値が同時に0.10%から0.24%まで上昇したが、SEB反応性T細胞がワクチン接種後に特に誘導されることはなかった。ワクチン接種前後のインフルエンザ特異的細胞はIFNとIL2を共発現していたが、IL17は検出可能ではなかった。対照的に、活動性H1N1感染症の患者のT細胞は主にIFNだけを発現した。その細胞性免疫と対照的に、H1N1世界的流行性抗体応答だけが誘導され、季節性インフルエンザワクチンに対する交差反応性抗体は誘導されなかった。

10

【0025】

結論として、世界的流行性H1N1ワクチン接種は、H1N1反応性T細胞性免疫の特異的誘導の他に、季節性インフルエンザワクチンに対する交差防御的T細胞応答も誘導する。加えて、サイトカインプロファイル作成は、活動性H1N1感染症の患者を特定するための診断手段として適用され得る。

【0026】

試験対象

2009年の10月/11月に19人の免疫応答性被験者の間でワクチン接種試験を実施した。それらの被験者の中で10人(平均年齢43.64±10.05歳)が約3週間(平均18.9±7.9日)前に季節性インフルエンザに対するワクチン接種(ベグリバク(Begrivac)2009/2010、ノバルティス社、ドイツ、マールブルク)を前もって受けていたが、9人(平均年齢37.8±15.9歳)は受けていなかった。全ての被験者が1標準用量のpdmH1N1ワクチン(パンデムリックス、グラクソ・スミスクライン・バイオロジカルスs.a.社、ベルギー、リクサンサール)を受容し、そして、全ての被験者がインフォームドコンセントを提出した。パンデムリックスを用いるワクチン接種の前、ならびにその1週間、2週間、および10週間の後に全血試料を採取した。急性感染における細胞性免疫の特徴を解析するため、臨床的/疫学的またはウイルス学的な基準でインフルエンザA/H1N1感染症と新たに診断された7人の被験者(平均年齢49.28±11.07歳)の追加の全血試料を分析した。

20

30

【0027】

インフルエンザ特異的CD4発現T細胞の定量と表現型分析

ヘパリン処理した全血試料に由来するT細胞を、以前に記述されているように[1]インビトロで6時間刺激した。1回の刺激当たり総計で450μlの血液を使用した。ベルギー、リクサンサールのグラクソ・スミスクライン・バイオロジカルスs.a.社の好意により提供されたPdmH1N1抗原(A/カリフォルニア(H1N1))に由来する、30μg/mlのHA含量のpdmH1N1が世界的流行性ワクチンパンデムリックスに使用されている)と季節性インフルエンザ2009/2010ワクチンであるベグリバク(Flu09、30μg/mlのHA含量;ノバルティス社、ドイツ、ニュルンベルク)を、それぞれ1μg/mlの抗CD28と抗CD49d(クローンL293と9F10;BD社、ドイツ、ハイデルベルク)が存在する状態で刺激として使用して抗原特異的活性化とサイトカイン発現を誘導した。陰性対照および陽性対照としてそれぞれリン酸緩衝生理食塩水(PBS)と2.5μg/mlの黄色ブドウ球菌エンテロトキシンB(SEB、シグマ社、ドイツ、ダイセンホーフエン)を用いて細胞を刺激した。刺激された細胞を固定し、そして、ある力価の抗CD4(クローンSK3)、抗CD69(クローンL78)、抗IFN(クローン4S.B3)、抗IL2(クローンMQ1-17H12)、抗IL17A(クローンSCPL1362)、抗CD152(CTLA4、クローンBNI3;全てBD由来)および抗CD127(クローンeBioRDR5、イーバイオサ

40

50

イエンス NatuTec社、ドイツ、フランクフルト)を使用して免疫染色した。少なくとも10,000個のCD4発現T細胞をFACS Canto II(BD社)上でFACSdivaソフトウェアV6.1.3.を使用して分析した。抗原特異的CD4発現T細胞の分析のため、抗原で刺激された後の活性化CD4発現T細胞の出現頻度からそれぞれの陰性対照を減算した。検出限界は0.05%のIFN γ 産生CD69陽性CD4発現T細胞であった。

【0028】

インフルエンザ特異的抗体応答の定量

標準的ELISA(ピロテック(Virotech)社、ドイツ、リュッセルスハイム)を製造業者の指示に従って使用してpdmH1N1特異的IgG誘導の動態を分析した。また、ベグリバクを用いるワクチン接種を前もって受けていない対象の血清試料中のpdmH1N1と季節性インフルエンザワクチン(H1N1季節性、H3N2、インフルエンザB)の個々の成分に対するウイルス中和抗体の存在を、以前に記述されている方法[2、3]に基づくそれぞれのマイクロ中和アッセイにより決定した。詳しく述べると、加熱不活化した(30分、56 $^{\circ}$ C)血清を使用してウイルス希釈剤[EMEM(バイオクローム(Biochrom)社、ドイツ)+0.1%抗生物質+2%FBS(バイオクローム社、ドイツ)]中に1:10から1:1280までの2倍段階希釈物を二組調製した。その希釈された血清を等体積(100 μ l)のインフルエンザAウイルス[A/カリフォルニア/7/2009に由来するNYMC X-179A(H1N1)]を 2×10^3 TCID₅₀/mlで含有するウイルス希釈剤と混合し、湿室中で90分間(37 $^{\circ}$ C、5%のCO₂)保温し、そして、100 μ lを96ウェルプレート中のMDC細胞単一層(ECC、英国、ソールズベリー)に移動した。ウイルス希釈剤中のインフルエンザウイルス(ウイルス対照)またはウイルス希釈剤のみ(細胞対照)を含む8つの対照ウェルが各プレートに含まれた。1時間の保温の後に100 μ lの重層媒体[1:1のウイルス希釈剤と3.2%カルボキシメチルセルロース(CMC、シグマ・アルドリッチ社)]を24時間から28時間、各ウェルに添加した。その後、その単一層を氷冷アセトン:メタノール(40%:60%;10分、室温)で固定した。ダルベッコA洗浄緩衝液(1000mlの脱イオン水中に8.0gのNaCl、2.9gのNa₂HPO₄、0.2gのKClおよび0.2gのK₂HPO₄を溶解、pH7.3)中の1%ウシ血清アルブミン(メルク社、ドイツ)、0.1%チメロサル(シグマ・アルドリッチ社)を用いて固定した細胞を37 $^{\circ}$ C、5%のCO₂で30分間ブロッキング処理した後、それらの細胞は続いてブロッキング緩衝液中に1:10,000に希釈した25 μ lの核タンパク質に対する抗インフルエンザモノクローナル抗体(MAB8251、ミリポア社)およびブロッキング緩衝液中に1:1000に希釈した25 μ l/ウェルのホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスIgG(P0161、ダコ・サイトメーション(DakoCytomation)社、デンマーク)と共にそれぞれ37 $^{\circ}$ C、5%のCO₂で30分間保温され、そして、0.03%のH₂O₂を含む、3 α -アミノ-9 β -エチルカルバゾール(シグマ・アルドリッチ社)を4.0mlのN,N-ジメチルホルムアミド(シグマ・アルドリッチ社)および16mlの0.05M酢酸緩衝液(pH4.95~5.05)中に溶解して新規に調製したものをウェル当たり50 μ l使用して基質反応を30分間実施した。自動化ELISPOIT計測器(AIDディアグノスティカ(Diagnostika)GmbH社、ドイツ、シュトラスベルク)を使用して免疫染色されたフォーカスの数を計測し、記録した。中和抗体の力価は、免疫染色されたフォーカスの数を対照値の50%以下まで低下させる最大希釈度の逆数として表された。

【0029】

結果

世界的流行性インフルエンザワクチンを用いた免疫により、世界的流行性インフルエンザ抗原と季節性インフルエンザ抗原の両方に対して応答する特異的CD4発現T細胞が誘導される。

【0030】

10

20

30

40

50

インフルエンザ特異的細胞性免疫の誘導を19人の被験者において世界的流行性インフルエンザワクチンであるパンデムリックスを用いた免疫の前ならびに免疫から1週間、2週間、および10週間の後に評価した。これらの被験者の中で10人は季節性インフルエンザワクチンを用いるワクチン接種を前もって受けていた。世界的流行性インフルエンザ抗原(pdmH1N1)と交差反応性季節性インフルエンザ抗原(Flu09)の両方について特異的であるCD4発現T細胞の出現頻度を全血試料より生体外で直接的に決定した。抗原特異的CD4発現T細胞は、インビトロの特異的刺激の後の活性化マーカーCD69とサイトカインIFNの誘導を基にフローサイトメトリーを用いて特定された。19人全ての被験者における基準T細胞頻度を評価すると、pdmH1N1に特異的な低レベルのCD4発現T細胞(中央値(IQR)0.03%(0.04%))と季節性イン

10

【0031】

図1:世界的流行性インフルエンザのワクチンを使用する免疫により、世界的流行性インフルエンザと季節性インフルエンザの両方の抗原に対する特異的CD4発現T細胞応答が誘導される。世界的流行性インフルエンザワクチンを用いた免疫の前ならびに免疫から1週間、2週間、および10週間の後に採取された全血試料をリン酸緩衝生理食塩水(PBS、陰性対照)、世界的流行性H1N1抗原(pdmH1N1)、2009季節性インフルエンザワクチンベグリバク(Flu09)および黄色ブドウ球菌エンテロトキシンB(SEB、陽性対照)でそれぞれ刺激し、そして、フローサイトメトリーを用いて反応性CD4発現T細胞(CD69陽性/IFN陽性)の数を計測した。季節性ワクチンによるワクチン接種を前もって受けていなかった1人の代表的な被験者についての典型的なドットプロットが示されている。数値は抗原反応性CD4発現T細胞のパーセンテージを表す。代表例(図1)に示されているように、ワクチン接種前に存在した低レベルの特異的T細胞がワクチン接種後に増加し、そして、ワクチン接種から1週間後にピーク値が認められた(図1および表1)。全般的に、パンデムリックスを用いるワクチン接種によって、そのワクチン中に存在するpdmH1N1抗原に対する特異的CD4発現T細胞の出現頻度が最も強力に誘導された(1週間後の4.63倍の中央値の増加、表1)。興味深いことに、あまり明白ではないが、これに伴って、季節性インフルエンザ抗原に対して交差反応する細胞のパーセンテージが同時に増加した(2.71倍の中央値の増加)。対照的に、陽性対照刺激であるSEBに対して反応性を有するT細胞の出現頻度は時間が経っても変化しなかった(図1および表1)。これらの結果は、世界的流行性インフルエンザワクチンであるパンデムリックスを用いるワクチン接種によって、世界的流行性H1N1抗原に対する特異的CD4発現T細胞性免疫であって、季節性インフルエンザワクチンの抗原と交差反応する特異的CD4発現T細胞性免疫が誘導されることを示している。エフェクターメモリー表現型を有するTh1細胞がワクチン接種によって主に誘導される。

20

30

【0032】

ワクチン誘導性pdmH1N1特異的CD4発現T細胞の表現型の特性の変化をより詳細に分析するために、我々は様々な機能性マーカー(IFN、IL2、IL17、CD69、CTLA4)とメモリーマーカーであるCD127の発現をモニターした。

40

【0033】

図2:エフェクターメモリー表現型を有するTh1細胞がワクチン接種によって主に誘導される。パンデムリックスを用いるワクチン接種後のpdmH1N1特異的CD4発現T細胞の表現型の特徴解析。(A)ワクチン接種から1週間後の(季節性インフルエンザに対するワクチン接種を前もって受けていなかった)代表的な被験者の血液試料における、pdmH1N1抗原で刺激されたCD4発現T細胞のIFNおよびCD69、IL2、IL17、CTLA4およびCD127の発現のフローサイトメトリー分析。(B)全てのIFN陽性CD4発現T細胞のCTLA4シグナルの平均蛍光強度(MFI)、および(C)pdmH1N1抗原を用いる刺激の後の全ての試験された被験者

50

の全ての I F N 陽性 C D 4 発現 T 細胞の中の C D 1 2 7 発現細胞のパーセンテージが時間に関して示されている (第 10 週で $n = 10$)。棒は中央値と四分位範囲 (I Q R) を表す。

【 0 0 3 4 】

パンデムリックスワクチン接種から 1 週間後の p d m H 1 N 1 特異的 T 細胞の代表的なドットプロットに示されているように、エフェクターサイトカインである I L 2 と I F N の C D 6 9 との顕著な共発現によって、特異的 T 細胞は主に T h 1 エフェクター型細胞であり、一方 I L 1 7 発現細胞は検出されなかったことが示された (図 2 A)。出現頻度の動態と合致して、T 細胞活性化の最も重要な陰性共刺激性表面受容体である C T L A 4 はパンデムリックスワクチン接種から 1 週間後にピークに達し、その後、ほとんどワクチン接種前のレベルにまで減少した ($p < 0.0001$ 、図 2 B)。他方、C D 1 2 7 発現インフルエンザ特異的 C D 4 発現 T 細胞のパーセンテージの中央値 (I Q R) は最初、ワクチン接種後の第 1 週の間 97.6% (5.0%) から 80.0% (12.1%) まで減少したが、追跡調査中に 10 週間後に 98.0% (6.0%) まで再び増加した。これはエフェクターメモリー細胞への分化へと続くナイーブ T 細胞の活性化を意味する ($p < 0.0001$ 、図 2 C)。季節性インフルエンザワクチンに特異的な C D 4 発現 T 細胞は同様の発現プロファイルと特性を示した (データを示さず)。まとめると、インフルエンザ特異的 C D 4 発現 T 細胞の表現型の特徴解析により、ワクチン接種直後の期間にダイナミックな変化を示す主に T h 1 エフェクターメモリー細胞の誘導がワクチンによって引き起こされることが示された。

10

20

【 0 0 3 5 】

既存の免疫が抗原特異的 C D 4 発現 T 細胞の強力な誘導を妨げる

基底レベル、およびパンデムリックスワクチン接種後のインフルエンザ特異的免疫の誘導における、季節性インフルエンザ抗原に対する既存の細胞性免疫の影響を評価するために、被験者群を、季節性インフルエンザワクチンを用いるワクチン接種を前もって受けていなかった被験者と受けていた被験者とに分けた。

【 0 0 3 6 】

図 3 : 既存の免疫が抗原特異的 C D 4 発現 T 細胞の強力な誘導を妨げる。季節性インフルエンザワクチンを用いるワクチン接種を前もって受けていない被験者 (A) と前もって受けた被験者 (B) における世界的流行性 H 1 N 1 抗原 (p d m H 1 N 1)、季節性インフルエンザワクチンベグリバク (F l u 0 9) および黄色ブドウ球菌エンテロトキシン B (S E B、陽性対照) に対して特異的な反応性 C D 4 発現 T 細胞の出現頻度が時間に関して示されている。検出限界 (0.05% の I F N 産生 C D 6 9 陽性 C D 4 発現 T 細胞) は水平線によって表されている。(C) 世界的流行性インフルエンザワクチンによるワクチン接種後の第 1 週の間での p d m H 1 N 1、F l u 0 9 および S E B に特異的な C D 4 発現 T 細胞の出現頻度の上昇がワクチン接種前に得られた基準頻度の倍数として表された。試験された被験者はワクチン接種前の状態 (季節性インフルエンザに対して前もってワクチン接種されたか否か) によって細分化された。各被験者の T 細胞頻度ならびに中央値および I Q R が示されている。

30

【 0 0 3 7 】

両方の群におけるインフルエンザ反応性 C D 4 発現 T 細胞と S E B 反応性 C D 4 発現 T 細胞の動態が図 3 A および B に示されている。興味深いことに、p d m H 1 N 1 特異的 T 細胞の頻度上昇の中央値は、季節性インフルエンザに対するワクチン接種を前もって受けた被験者と比べて (2.94 倍) 前もって受けていない被験者で有意に高かった (7.15 倍、 $p = 0.01$ 、図 3 C)。注目すべきことに、その 2 群の間のこの差異は、季節性インフルエンザ抗原に対して反応する C D 4 発現 T 細胞についても見出された (4.03 倍対 1.74 倍、 $p = 0.0041$)。S E B 反応性 T 細胞の出現頻度はそれらの群のいずれにおいても上昇しなかった ($p = 0.11$ 、図 3 C)。これらの結果は、既存の免疫がパンデムリックスによるワクチン接種後のインフルエンザ特異的 C D 4 発現 T 細胞のあまり明白ではない誘導と関連を有することを示している。

40

50

【0038】

ワクチン誘導性抗体は季節性抗原とわずかな交差反応性しか示さない

パンデムリックスワクチンの細胞性応答および液性応答に対する効果を比較するため、インフルエンザ特異的抗体の誘導を測定した。重要なことに、ワクチン接種によって p d m H 1 N 1 特異的 I g G の力価の著しい連続的な増加が誘導され、それはワクチン接種から約 2 週間後にピークに達し、そして、その後の 8 週間にわたってほとんど一定のままであった。

【0039】

図 4 : ワクチンにより誘導された抗体は季節性抗原とわずかな交差反応性しか示さない。世界的流行性 H 1 N 1 抗原に対する特異的抗体応答の誘導を、季節性インフルエンザワクチンを用いるワクチン接種を前もって受けていない被験者 (A) および前もって受けた被験者 (B) において E L I S A によりモニターした。ワクチン接種を前もって受けていない被験者 (C) と前もって受けた被験者 (D) の血清試料を p d m H 1 N 1 と季節性インフルエンザワクチンの単一の成分 (H 1 N 1 季節性、 H 3 N 2 、 インフルエンザ B (I n f B)) に対するウイルス中和抗体について試験した。 I C 5 0 値は 5 0 % のウイルス中和を引き起こすそれぞれの血清希釈度を表す。

10

【0040】

これらの動態はワクチン接種前の状態と無関係であった (図 4 A および B) 。パンデムリックスが誘導した抗体の交差反応性の可能性を評価するため、季節性インフルエンザに対するワクチン接種を前もって受けていない被験者に由来する血漿試料をそれぞれ p d m H 1 N 1 と季節性インフルエンザワクチン (H 1 N 1 季節性、 H 3 N 2 、 インフルエンザ B) の個々の混合物に対する中和抗体の存在について分析した。 E L I S A からの結果と一致して (図 4 A) 、 p d m H 1 N 1 特異的中和抗体の最大力価がパンデムリックスワクチン接種後の最初の 2 週間以内に既に誘導され、そして、その力価が第 1 0 週を通じて変動しなかった (図 4 C) 。対照的に、季節性 H 1 N 1 の力価はわずかな増加しか観察されなかった。これは季節性 H 1 N 1 インフルエンザ株に対するごくわずかな中和交差反応性を表している。同じく、 H 3 N 2 中和抗体の力価とインフルエンザ B 中和抗体の力価に対して有意な効果は全くなかった。季節性インフルエンザに対するワクチン接種を前もって受けていた被験者は、パンデムリックスワクチン接種後にほとんど変動しない、より高レベルの季節性ワクチンの成分に対する中和抗体を有した (図 4 D) 。興味深いことに、世界的流行性インフルエンザワクチンでの免疫前の p d m H 1 N 1 中和抗体の力価もわずかに増加した。これは、季節性ワクチンによって誘導されたある程度の交差反応性を表している可能性がある。注目すべきことに、それらの力価はパンデムリックスワクチン接種後に増加を示したが、季節性インフルエンザに対するワクチン接種を前もって受けなかった被験者におけるそれらのレベルに達しなかった。したがって、これらの結果は、パンデムリックスを用いるワクチン接種が季節性 H 1 N 1 抗原に対するある程度の交差反応性と共に p d m H 1 N 1 特異的抗体応答を誘導することを実証している。細胞性免疫と合致して、既存の液性免疫はパンデムリックスを用いるワクチン接種後の p d m H 1 N 1 特異的力価のあまり明白ではない誘導と関連を有した。

20

30

【0041】

p d m H 1 N 1 特異的 C D 4 発現 T 細胞のサイトカイン発現プロファイルの差異がワクチン接種応答を急性感染症から区別する

以前の研究から、急性ウイルス感染症または細菌感染症は抗原特異的 T 細胞のサイトカイン発現プロファイルの変化を伴うことが示されている。世界的流行性 H 1 N 1 インフルエンザウイルスによる急性感染症においてもこのことが当てはまるかどうか検討するため、ワクチン接種後に誘導された特異的 T 細胞の I F N / I L 2 発現プロファイルを世界的流行性 H 1 N 1 インフルエンザの症候性感染症を患う 7 人の患者のプロファイルとの比較により分析した。以前に記載されているように全血を世界的流行性インフルエンザ抗原および季節性インフルエンザ抗原で刺激し、そして、 I F N および I L 2 の単一発現または二重発現について C D 4 発現 T 細胞をフローサイトメトリーにより分析した

40

50

。S E Bを用いる刺激がインフルエンザに無関係の特異性を有する細胞についての陽性対照として働いた。

【 0 0 4 2 】

図 5 : P d m H 1 N 1 特異的 C D 4 発現 T 細胞のサイトカイン発現プロファイルの差異によって、メモリー応答またはワクチン接種応答が急性感染と区別される。(A) 世界的流行性インフルエンザワクチンによるワクチン接種後の(季節性インフルエンザに対するワクチン接種を前もって受けていない)健康な 1 人の被験者および(B) 症状の発生後 1 週間以内の急性世界的流行性 H 1 N 1 インフルエンザ感染症の 1 人の患者の血液試料中の、p d m H 1 N 1 抗原を用いる刺激後の C D 4 発現 T 細胞における I F N と I L 2 の発現のフローサイトメトリー分析の代表的なドットプロット。(C) 世界的流行性イン 10
フルエンザワクチンで免疫した後の 1 9 人の被験者全ておよび(D) 急性世界的流行性 H 1 N 1 インフルエンザ感染症の 7 人の患者の p d m H 1 N 1 特異的 C D 4 発現 T 細胞について時間に対する I F N / I L 2 サイトカインプロファイル作成を実施した。1 μ l の全血当たりの I F N 単一陽性(黒色の円)、I F N / I L 2 二重陽性(灰色の円)および I L 2 単一陽性(白色の円) C D 4 発現 T 細胞の絶対数の中央値と I Q R が示されている。S E Bを用いる刺激(陽性対照)の後の各値がワクチン接種群(E) と感染患者(F) について示されている。

【 0 0 4 3 】

ワクチン接種前後のインフルエンザ特異的 I F N / I L 2 サイトカインプロファイルおよび急性感染患者におけるインフルエンザ特異的 I F N / I L 2 サイトカイン 20
プロファイルの代表的なドットプロットが図 5 A および B に示されている。興味深いことに、ワクチン被接種者における T 細胞応答は I F N と I L 2 の両方を共発現する多機能性 C D 4 発現 T 細胞によって全般的に占められたが、単一サイトカイン産生細胞は多くなかった(図 5 C)。後者の中では、専ら I L 2 を発現する細胞が、I F N のみを産生する細胞よりも全般的に優位を占めた。この比率はワクチン接種からわずか 1 週間後に変化した。その後、プロファイルはワクチン接種前に見出されるプロファイルへ大きく正常化した(図 5 C)。図 5 D に示されているように、このサイトカインプロファイルは、急性感染症の患者で見出される、I F N のみを発現する細胞が最も数が多く I L 2 単一産生細胞は全く存在しないプロファイルと、著しく異なっていた。注目すべき 30
ことに、S E B 反応性 C D 4 発現 T 細胞のサイトカインプロファイルはワクチン接種(図 5 E) または急性感染症(図 5 F) による影響を受けなかったため、これらのプロファイルは実にインフルエンザ特異的である。これらの結果は、世界的流行性 H 1 N 1 インフルエンザに関するワクチン接種応答と急性感染症とを区別することが、H 1 N 1 特異的 C D 4 発現 T 細胞のサイトカインプロファイルの作製によって可能になり得ることを示唆する。

【 0 0 4 4 】

【表 1】

表 1：世界的流行性インフルエンザワクチンでの免疫前後の抗原特異的 CD 4 発現 T 細胞頻度の動態と、全ての被験者（n = 19）におけるワクチン接種後の第 1 週の間の増加倍率

		pdmH1N1	Flu09	SEB
出現頻度 (%) の中央値 (IQR)	基線 (0週間)	0.03% (0.04%)	0.10% (0.07%)	3.40% (2.53%)
	1週間	0.18% (0.18%)	0.24% (0.18%)	3.21% (3.34%)
	2週間	0.14% (0.19%)	0.21% (0.19%)	3.13% (2.45%)
	10週間	0.12% (0.14%)	0.24% (0.18%)	4.01% (3.05%)
特異的 T 細胞における増加倍率の中央値 (IQR)	1週対基線	4.63 (4.16)	2.71 (2.26)	1.03 (0.25)

10

20

それぞれの陰性対照を減算した値から計算された抗原特異的 CD 4 発現 T 細胞（CD 6 9 陽性、IFN- γ 陽性）の出現頻度の中央値（IQR）を示す。

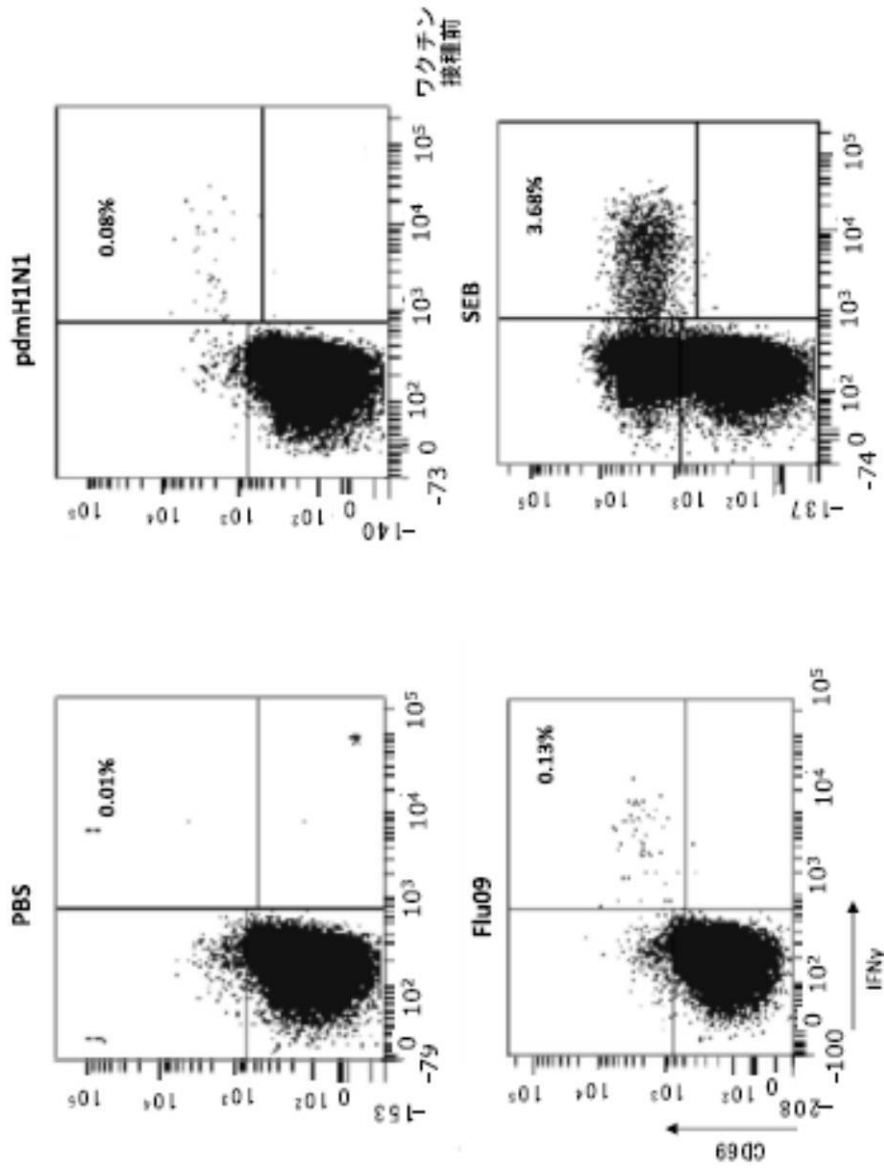
【 0 0 4 5 】

参照文献

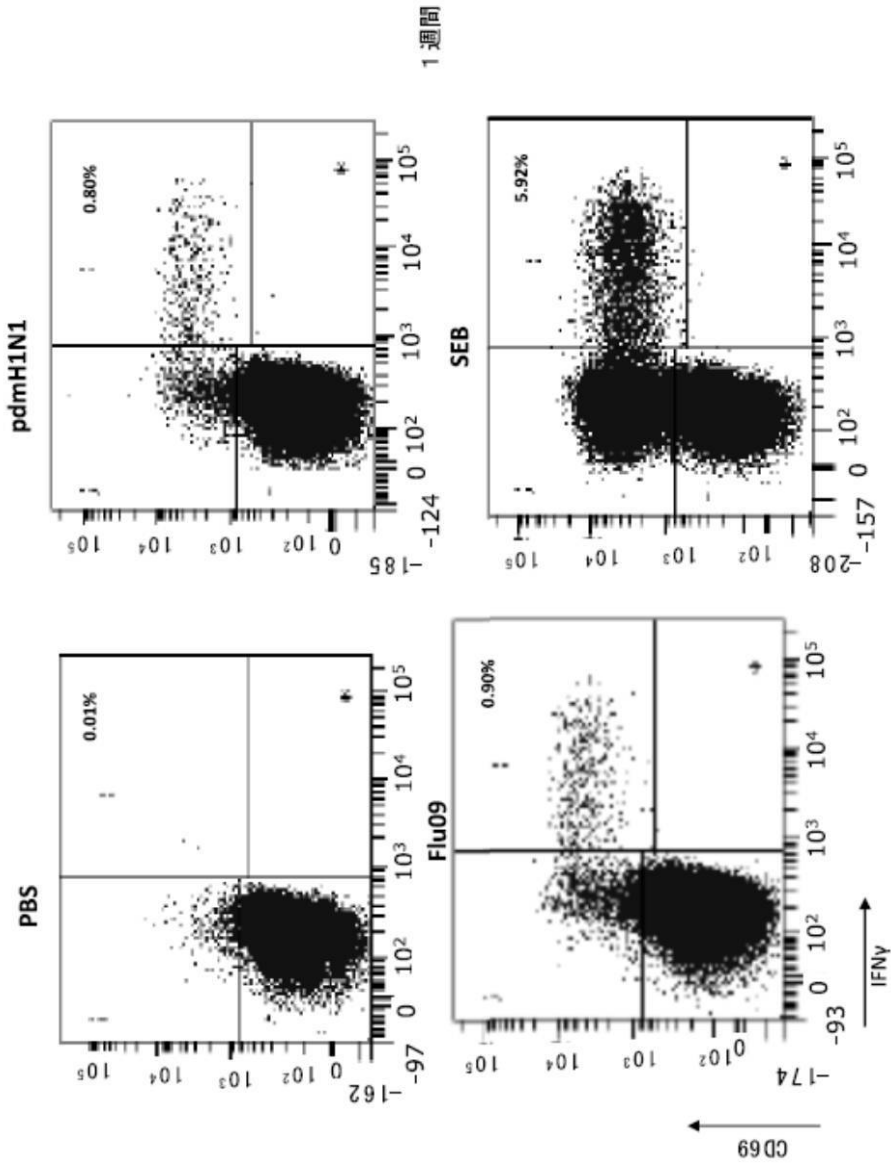
- 1 . Sester, U., et al., PD-1 expression and IL 2 loss of cytomegalovirus- specific T cells correlates with viremia and reversible functional anergy. Am J Transplant, 2008. 8(7): p. 1486-97.
- 2 . Zielinska, E., et al., Development of an improved microneutralization assay for respiratory syncytial virus by automated plaque counting using imaging analysis. Virol J, 2005. 2: p. 84.
- 3 . Rowe, T., et al., Detection of antibody to avian influenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays. J Clin Microbiol, 1999. 37(4): p. 937-43.

30

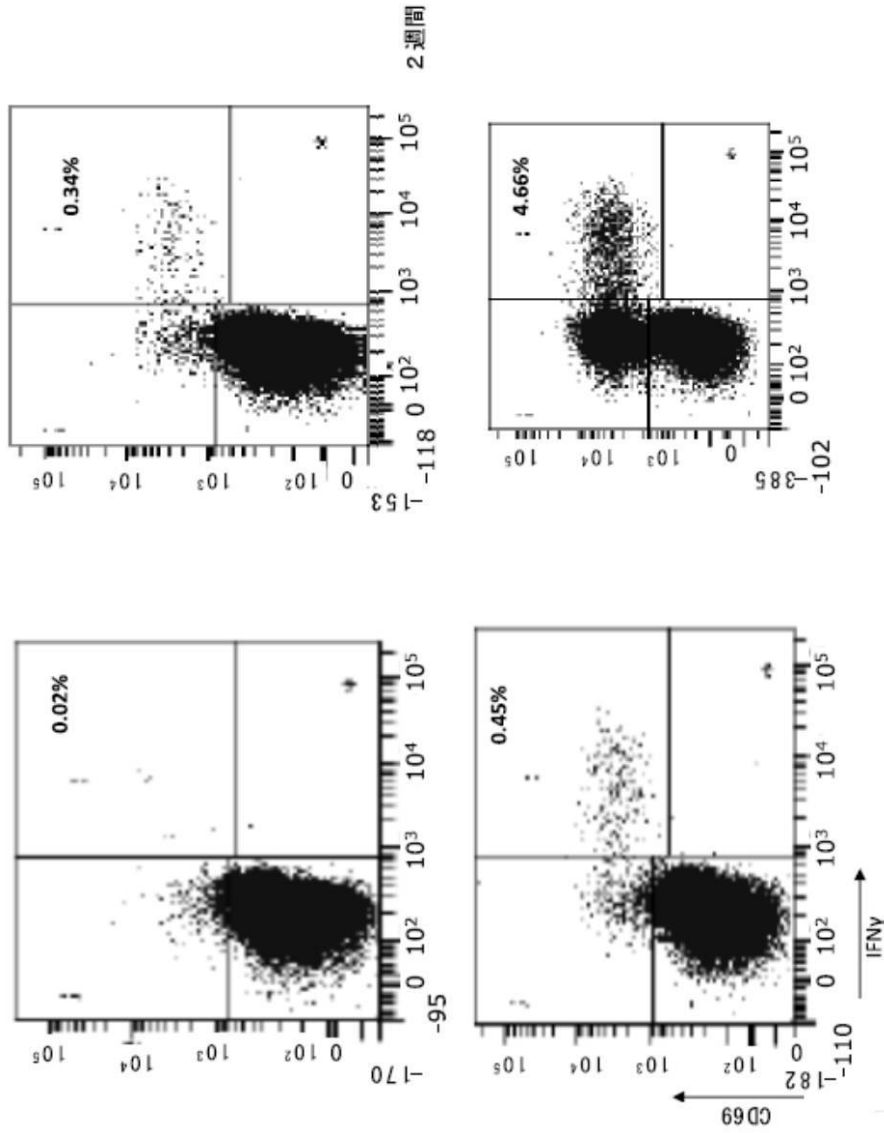
【 図 1 - 1 】



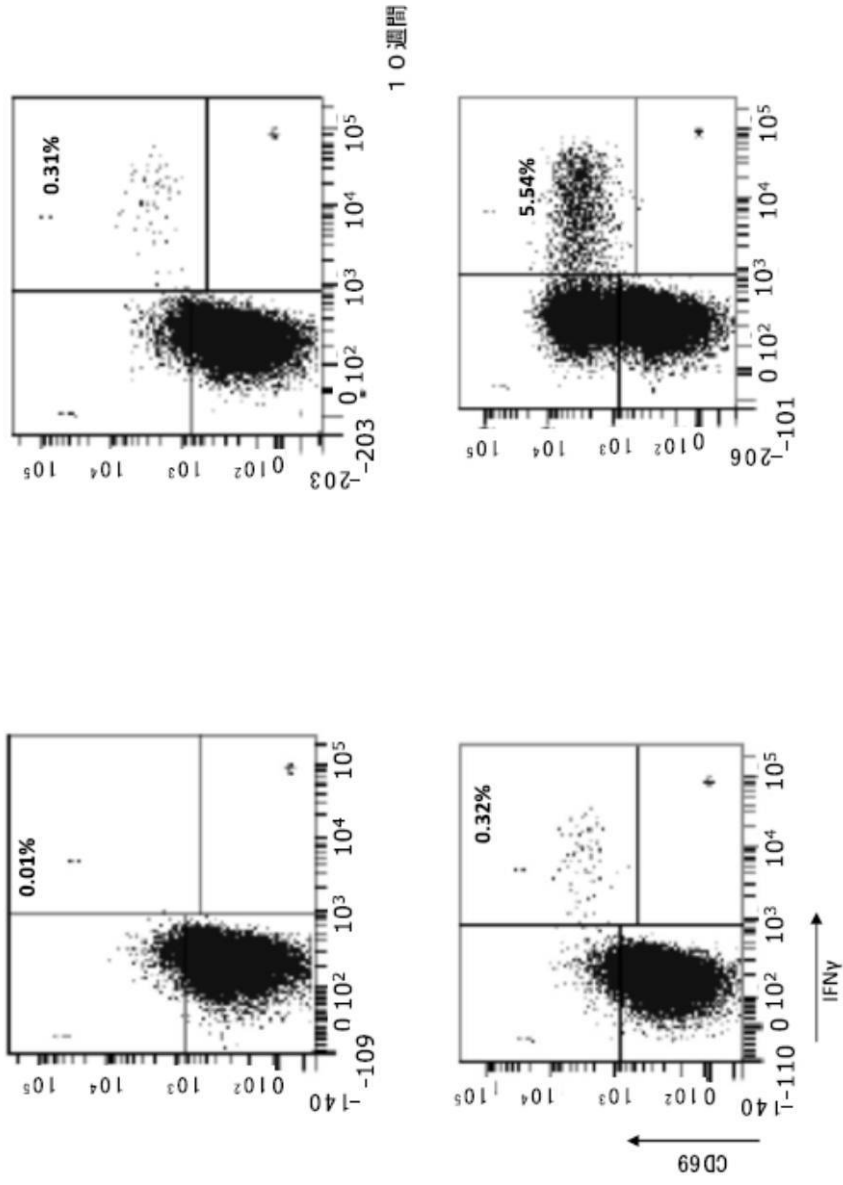
【 図 1 - 2 】



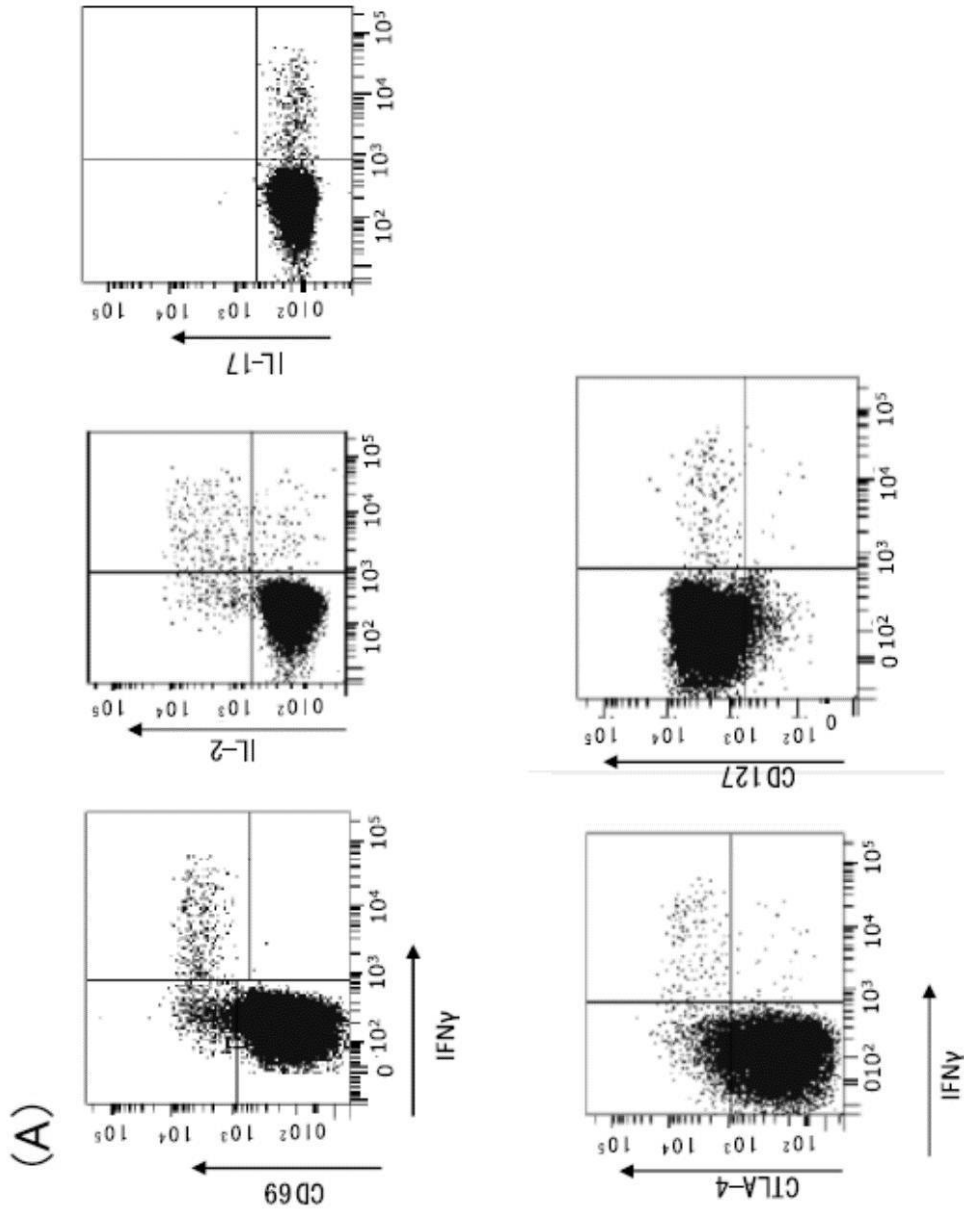
【 図 1 - 3 】



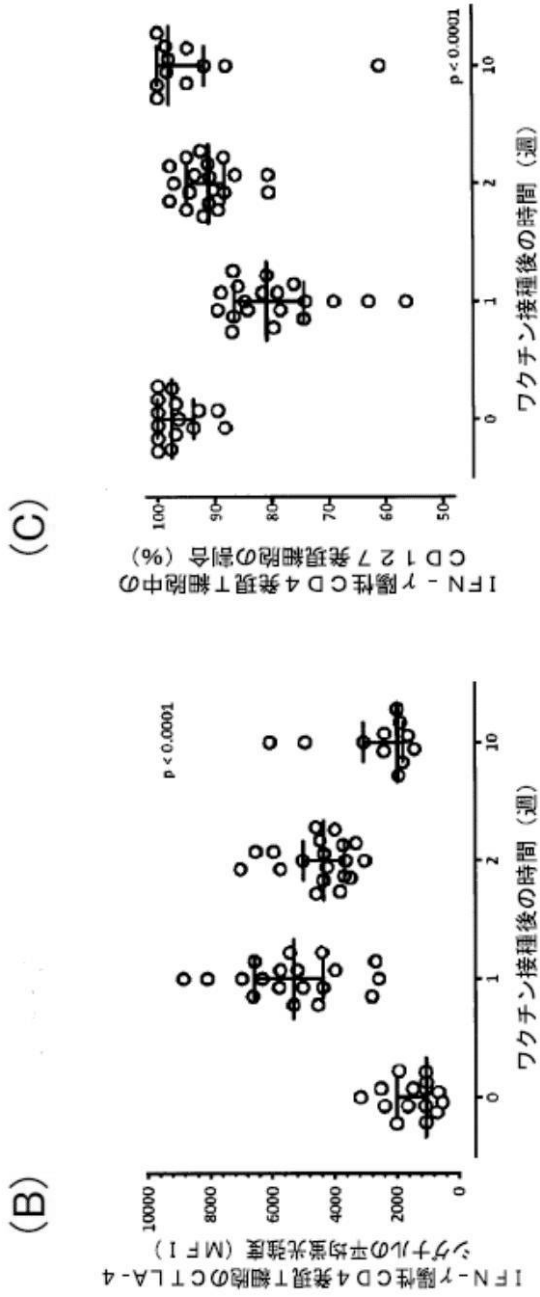
【 図 1 - 4 】



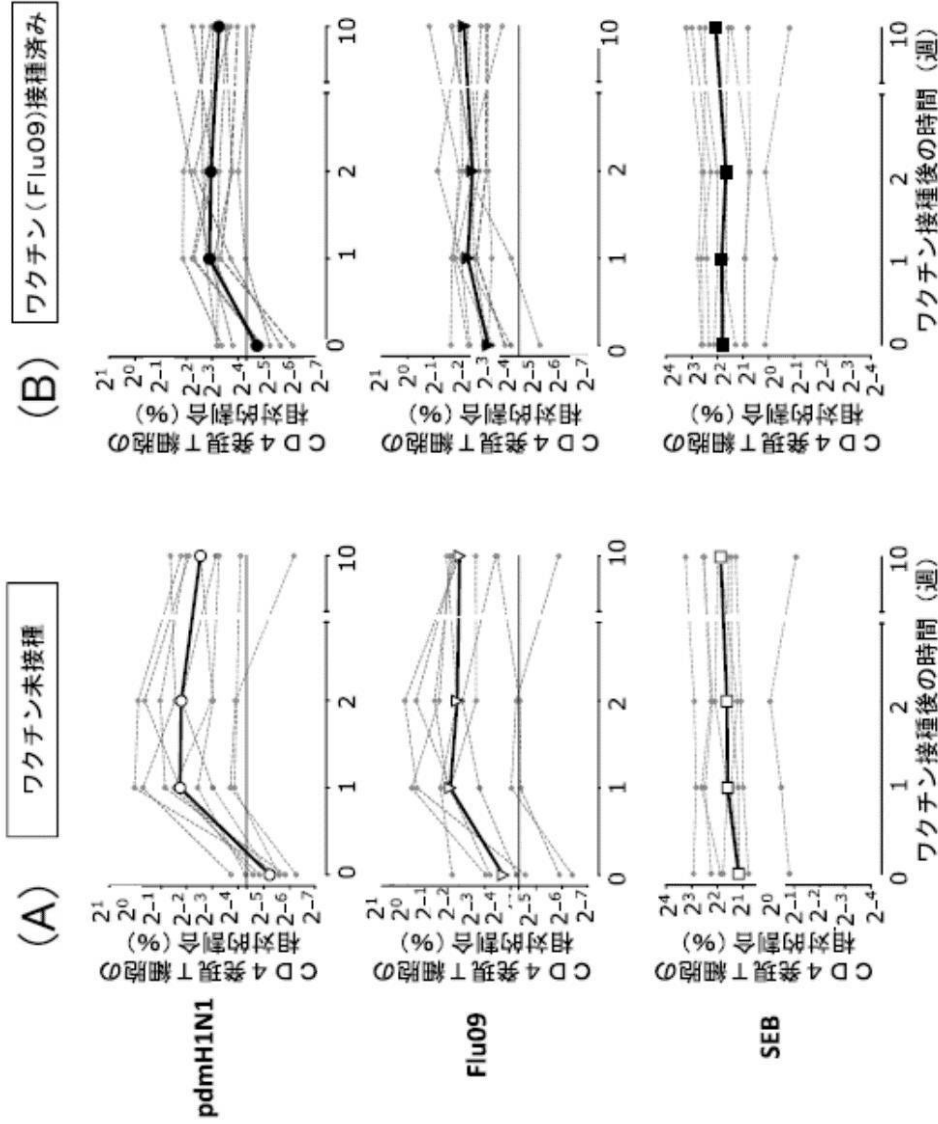
【 図 2 - 1 】



【 図 2 - 2 】

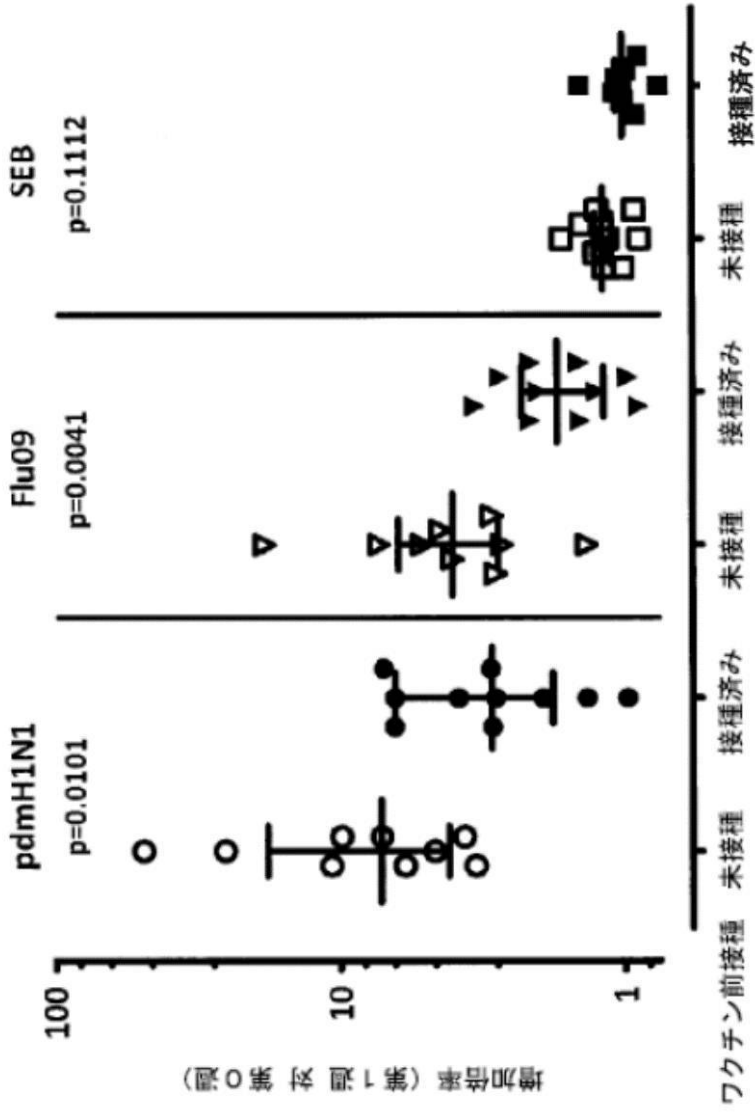


【図 3 - 1】

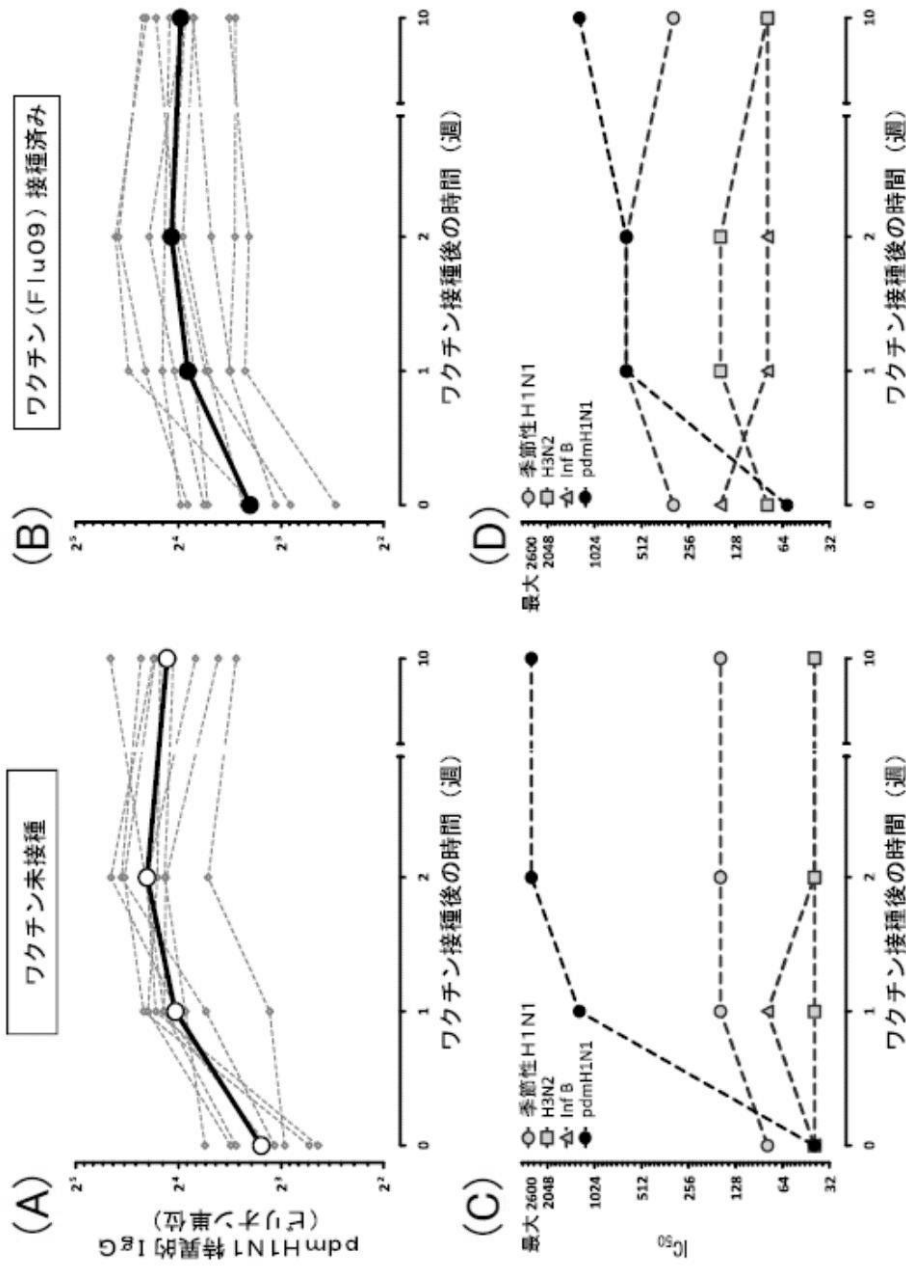


【 図 3 - 2 】

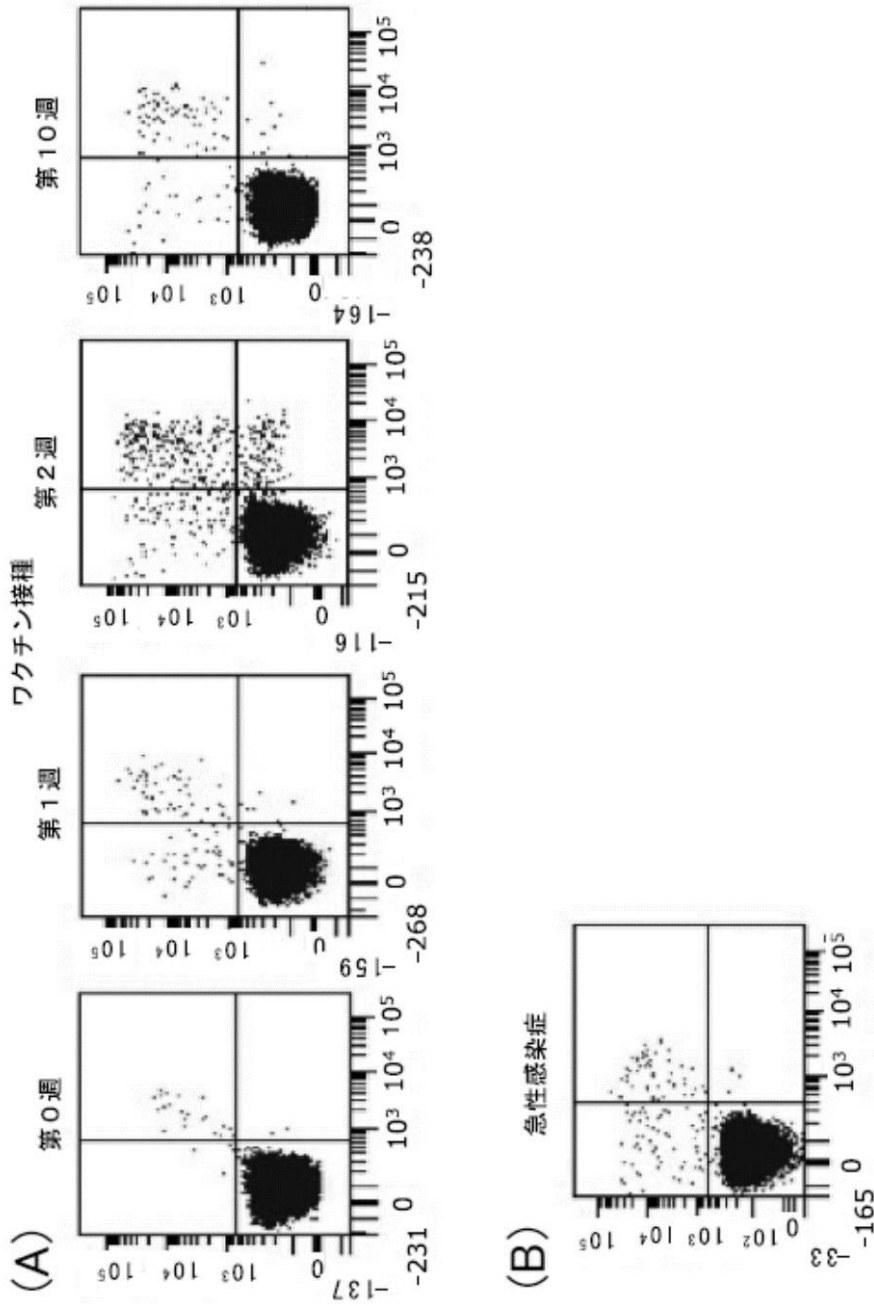
(C)



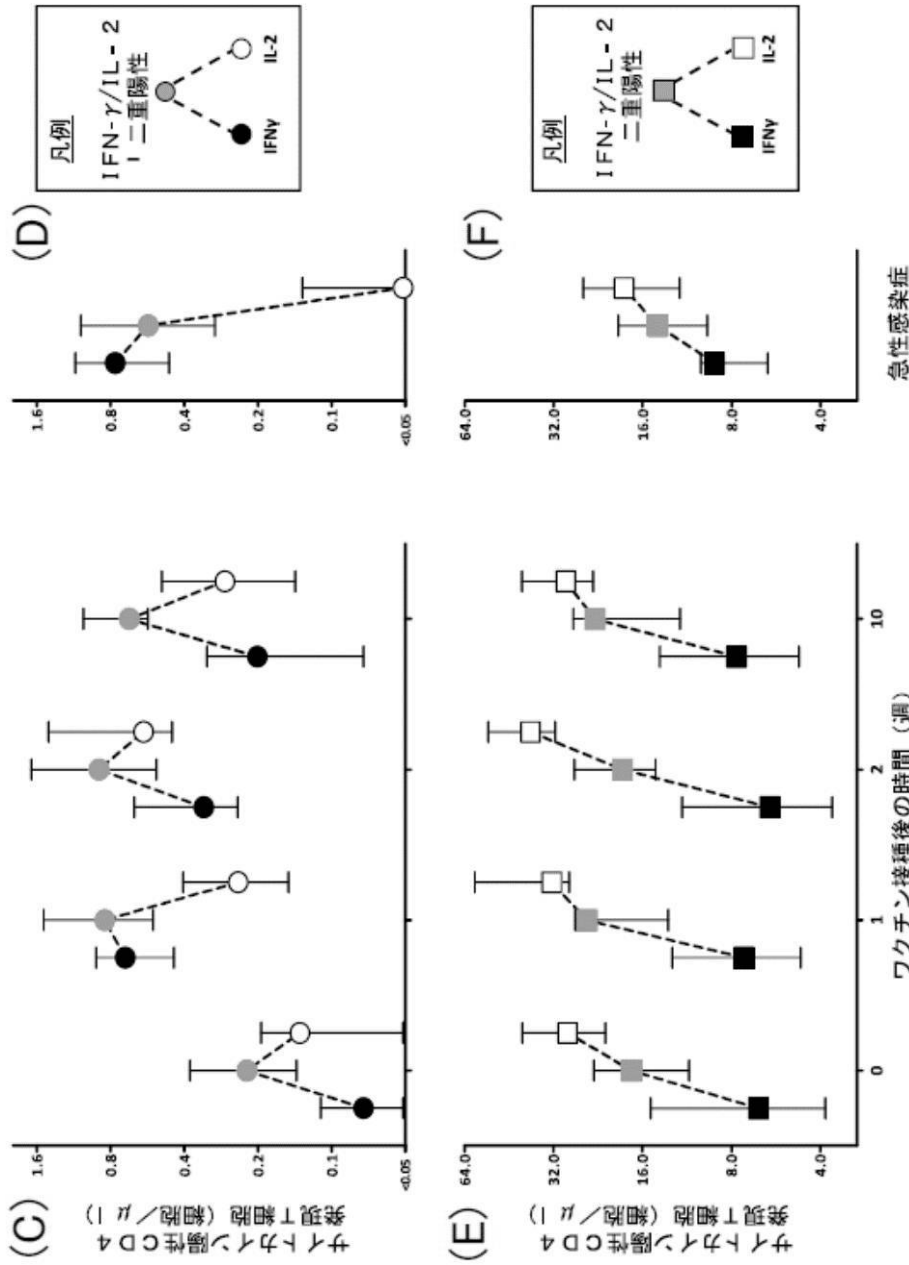
【 図 4 】



【図 5 - 1】



【 図 5 - 2 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2012/067928

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/50 G01N33/569 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, EMBASE, 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	WO 2007/107714 A2 (LALVANI AJIT [GB]; MILLINGTON KERRY [GB]) 27 September 2007 (2007-09-27)	1-7
Y	abstract page 4 - page 8	1-7
Y	URBAN SESTER ET AL: "Whole-Blood Flow-Cytometric Analysis of Antigen-Specific CD4 T-Cell Cytokine Profiles Distinguishes Active Tuberculosis from Non-Active States", PLOS ONE, PUBLIC LIBRARY OF SCIENCE, vol. 6, no. 3, 15 March 2011 (2011-03-15), pages E17813-1, XP002631779, ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0017813 chapter materials and methods	1-7
	----- -/--	
<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
1 October 2012		17/10/2012
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 Rosin, Oliver

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/067928

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	G. PEDERSEN ET AL: "Pandemic Influenza Vaccination Elicits Influenza-Specific CD4+ Th1-cell Responses in Hypogammaglobulinaemic Patients: Four case reports", SCANDINAVIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 74, no. 2, 6 July 2011 (2011-07-06), pages 210-218, XP055022455, ISSN: 0300-9475, DOI: 10.1111/j.1365-3083.2011.02561.x the whole document -----	1-7
Y	BROWN DEBORAH M ET AL: "CD4 T cell responses to influenza infection.", SEMINARS IN IMMUNOLOGY JUN 2004 LNKD- PUBMED:15130501, vol. 16, no. 3, June 2004 (2004-06), pages 171-177, XP002672020, ISSN: 1044-5323 the whole document -----	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/067928

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007107714 A2	27-09-2007	AU 2007228598 A1	27-09-2007
		EP 2005182 A2	24-12-2008
		JP 2009529865 A	27-08-2009
		US 2009170120 A1	02-07-2009
		WO 2007107714 A2	27-09-2007

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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, 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, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(72) 発明者 フリザー ダニーロ

ドイツ連邦共和国 6 9 1 2 0 ハイデルベルク ハントシュースハイマー ラントシュトラッセ
9 / 1

(72) 発明者 セスター マルティナ

ドイツ連邦共和国 6 6 4 2 4 ホンブルク リンデンシュトラッセ 1 1

(72) 発明者 セスター アーバン

ドイツ連邦共和国 6 6 4 2 4 ホンブルク リンデンシュトラッセ 1 1

Fターム(参考) 4B063 QA19 QQ08 QR48 QS33 QS36 QX02

【要約の続き】

者であってワクチン接種が成功した患者の I F N 単一陽性 T 細胞 / I L 2 単一陽性 T 細胞の比と比べて大きい I F N 単一陽性 T 細胞 / I L 2 単一陽性 T 細胞の比が伴う I F N 単一陽性細胞へのプロファイルシフトによって示される、

急性インフルエンザ感染、または以前に克服したインフルエンザ感染の後の予備免疫もしくはワクチン接種に起因する誘導された免疫応答に関して、前記インフルエンザウイルス型の感染の感染状態を全血から迅速に決定するためのインビトロ方法。

【選択図】 図 1 - 1

专利名称(译)	快速体外测定特定流感病毒类型的感染感染状态		
公开(公告)号	JP2014527177A	公开(公告)日	2014-10-09
申请号	JP2014530213	申请日	2012-09-13
[标]申请(专利权)人(译)	徐Vie的单元门的Em-基于硬		
申请(专利权)人(译)	Soviseru有限公司		
[标]发明人	パールマンフェルディナンドハーマン フリザーダニーロ セスターマルティナ セスターアーバン		
发明人	パールマン フェルディナンド ハーマン フリザー ダニーロ セスター マルティナ セスター アーバン		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/53 G01N33/543 C12Q1/04		
CPC分类号	G01N33/56983 G01N33/50 G01N33/569 G01N33/6866 G01N33/6869 G01N2333/11 G01N2333/55 G01N2333/57 G01N2333/70521 G01N2333/7055		
FI分类号	G01N33/569.L G01N33/53.P G01N33/543.597 C12Q1/04		
F-TERM分类号	4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QX02		
代理人(译)	中岛敦		
优先权	2011181119 2011-09-13 EP 61/534058 2011-09-13 US		
其他公开文献	JP6170923B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种用于根据急性流感感染或预免疫的潜伏性流感感染快速测定来自全血的流感病毒型感染的感染状态的体外方法，包括以下步骤：任选地在抗CD28或CD28和CD49d的抗体存在下，用流感病毒类型的抗原刺激存在于全血第一样品中的抗原特异性T细胞；。通过孵育足够的时间，特别是通过在35°C至39°C下孵育至少1小时，特别是1.5小时至2.5小时，特别是2小时，由抗原呈递细胞（APC）处理流感抗原，特别是在37°C，任选地加入CO₂；。然后加入分泌抑制剂；。进行强烈混合；。随后在35°C至39°C的温度下进行至少1小时，特别是2.5小时的时间段的第二孵育步骤。从细胞内INF-γ产生和抗原特异性T细胞的细胞内IL-2产生两者确定谱；其中。急性流感感染的存在通过向IFN-γ单阳性细胞的分布移位指示，伴随IFN-γ/ IL-2单阳性T细胞的比例比IFN-γ/ IL- 2个单阳性T细胞的患者成功接种疫苗，预感染或未感染流感病毒。

