

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2015-121495

(P2015-121495A)

(43) 公開日 平成27年7月2日(2015.7.2)

(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 N	4 H O 4 5
<b>CO 7 K 11/00 (2006.01)</b>	CO 7 K 11/00 Z N A	
<b>GO 1 N 33/531 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/531 A	

審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 39 頁)

(21) 出願番号	特願2013-266063 (P2013-266063)	(71) 出願人	504139662 国立大学法人名古屋大学 愛知県名古屋市千種区不老町1番
(22) 出願日	平成25年12月24日 (2013.12.24)	(71) 出願人	000001096 倉敷紡績株式会社 岡山県倉敷市本町7番1号
		(74) 代理人	110000110 特許業務法人快友国際特許事務所
		(72) 発明者	大河内 美奈 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大 学法人名古屋大学内
		(72) 発明者	本多 裕之 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大 学法人名古屋大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ミルクアレルギー個体の属性の予測方法

(57) 【要約】

【課題】 ミルクアレルギー個体に関しその属性の予測に有用な方法を提供する。

【解決手段】 ミルクアレルギー個体の属性の予測方法を、ミルクアレルギー個体由来の抗体を含有する被験試料と、ミルクアレルギーの自然寛解群に対して肯定的な第1のエピトープセット、ミルクアレルギーの持続性群に対して肯定的な第2のエピトープセット及びミルクアレルギーの経口免疫療法における非耐性獲得群に対して肯定的な第3のエピトープセットからなる群から選択される1又は2以上のエピトープセットに含まれる1又は2以上のエピトープペプチドと接触させる工程と、前記1又は2以上のエピトープペプチドと前記被験試料中の抗体との特異的結合に関する結合情報を取得する工程と、を備えるようにする。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ミルクアレルギー個体の属性の予測方法であって、  
 ミルクアレルギー個体由来の抗体を含有する被験試料と、以下に示すエピトープセット

:

ミルクアレルギーの自然寛解群に対して肯定的な第 1 のエピトープセット、  
 ミルクアレルギーの持続性群に対して肯定的な第 2 のエピトープセット、及び  
 ミルクアレルギーの経口免疫療法における非耐性獲得群に対して肯定的な第 3 のエピトープセット

からなる群から選択される 1 又は 2 以上のエピトープセットに含まれる 1 又は 2 以上のエピトープペプチドと接触させる工程と、

前記 1 又は 2 以上のエピトープペプチドと前記被験試料中の抗体との特異的結合に関する結合情報を取得する工程と、

を備える、方法。

## 【請求項 2】

さらに、前記結合情報に基づいて前記ミルクアレルギー個体が、ミルクアレルギーに関して、自然寛解群、持続性群、経口免疫療法における耐性獲得群及び経口免疫療法における非耐性獲得群のいずれであるかの属性情報を取得する工程、  
 を備える、請求項 1 に記載の予測方法。

## 【請求項 3】

前記第 1 のエピトープセットは、配列番号 3 3 7 ~ 3 5 7 で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有するエピトープペプチドからなる群から選択される 1 又は 2 以上のエピトープペプチドからなる、請求項 1 又は 2 に記載の予測方法。

## 【請求項 4】

前記第 2 のエピトープセットは、配列番号 3 5 8 ~ 3 7 2 で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有するエピトープペプチドからなる群から選択される 1 又は 2 以上のエピトープペプチドからなる、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の予測方法。

## 【請求項 5】

前記第 3 のエピトープセットは、配列番号 3 7 3 ~ 3 7 6 で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有するエピトープペプチドからなる群から選択される 1 又は 2 以上のエピトープペプチドからなる、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の予測方法。

## 【請求項 6】

前記検出工程は、さらに、ミルクアレルギー個体に対して肯定的な第 4 のエピトープセットを構成する 1 又は 2 以上のエピトープペプチドと前記抗体との特異的結合を検出する工程である、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の予測方法。

## 【請求項 7】

前記第 4 のエピトープセットは、配列番号 3 7 7 ~ 3 8 3 で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有するエピトープペプチドからなる群から選択される 1 又は 2 以上のエピトープペプチドからなる、請求項 6 に記載の予測方法。

## 【請求項 8】

ミルクアレルギー個体の属性を予測するための装置であって、

以下に示すエピトープセット:

配列番号 3 3 7 ~ 3 5 7 で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有するエピトープペプチドからなる群から選択される 1 又は 2 以上のエピトープペプチドからなり、ミルクアレルギーの自然寛解群に対して肯定的な第 1 のエピトープセット、

配列番号 3 5 8 ~ 3 7 2 で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有するエピトープペプチドからなる群から選択される 1 又は 2 以上のエピトープペプチドからなり、ミルクアレルギーの持続性群に対して肯定的な第 2 のエピトープセット、及び

配列番号 3 7 3 ~ 3 7 6 で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有するエピトープペプチドからなる群から選択から選択される 1 又は 2 以上のエピトープペプチドからなり、経口免

10

20

30

40

50

疫療法における非耐性獲得群に対して肯定的な第3のエピトープセット

からなる群から選択される1又は2以上のエピトープセットに含まれる1又は2以上のエピトープペプチドを固相担体上に備え、

前記エピトープペプチドと前記ミルクアレルギー個体から採取した被験試料中の抗体との特異的結合に関する結合情報に基づき、前記ミルクアレルギー個体が、ミルクアレルギーに関して、自然寛解群、持続性群、経口免疫療法における耐性獲得群及び経口免疫療法における非耐性獲得群のいずれであるかの属性情報を取得するための装置。

【請求項9】

さらに、配列番号377～383で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有するエピトープペプチドからなる群から選択される1又は2以上のエピトープペプチドからなり、前記ミルクアレルギー個体に肯定的な第4のエピトープセットを、備える、請求項8に記載の装置。

10

【請求項10】

ミルクアレルギー個体の属性を予測するためのペプチドセットであって、

以下に示すエピトープセット：

配列番号337～357で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有するエピトープペプチドからなる群から選択される1又は2以上のエピトープペプチドからなり、ミルクアレルギーの自然寛解群に対して肯定的な第1のエピトープセット、

配列番号358～372で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有するエピトープペプチドからなる群から選択される1又は2以上のエピトープペプチドからなり、ミルクアレルギーの持続性群に対して肯定的な第2のエピトープセット、及び

20

配列番号373～376で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有するエピトープペプチドからなる群から選択される1又は2以上のエピトープペプチドからなり、ミルクアレルギーの経口免疫療法における非耐性獲得群に対して肯定的な第3のエピトープセット

からなる群から選択される1又は2以上のエピトープセットを含む、ペプチドセット。

【請求項11】

さらに、配列番号377～383で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有するエピトープペプチドからなる群から選択される1又は2以上のエピトープペプチドからなり、前記ミルクアレルギー個体に肯定的な第4のエピトープセットを、備える、請求項10に記載のペプチドセット。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本明細書は、ミルクアレルギー個体の属性の予測方法及びその利用に関する。

【背景技術】

【0002】

アレルギー疾患は、近年、日本において広範に認められている。乳児から小児期において、特に食物アレルギーが問題である。ミルクは子供における食物アレルギーの主な原因食物である。ミルクアレルギーの重症度は個体によって様々であり、皮膚、消化器系や呼吸器系の炎症を引き起こす恐れがある。

40

【0003】

ミルクアレルギーは、多くの場合、年齢とともに症状が軽減しアレルギー食物を食べることができるようになる（自然寛解あるいは耐性獲得）。多くのアレルギー個体は、6才未満に寛解する。

【0004】

従来、ミルクアレルギーを治療するためには、医師の指示のもとミルクアレルギーを除外した除去食を摂取し、定期的に継続的なアレルギー症状や抗原特異的IgE量の検査を実施していくことが主流となっている。また、近年、アレルギーの治療方法としては、経口免疫療法が一部の専門病院で実施されている。これはアレルギーとなる食物を少量ずつ継

50

続的に摂取することで耐性を獲得させる方法である。経口免疫療法は、アレルゲンの除去でも耐性を獲得しえなかった個体につき、学童期（6才ごろ）に治療を開始することが多い。

【0005】

こうしたミルクアレルギー疾患の検出方法には、IgEとIgGの反応性を利用できることが報告されている（特許文献1）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】国際公開第2010/110454

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

しかしながら、経口免疫療法は、治療中にアレルギー症状が必ず現れる。このため、個体にとって危険であるだけでなく、個体である小児の親としては子供が苦しむ状況を目の当たりにすることになるため精神的苦痛も大きい。しかも、経口免疫療法で必ずしも耐性を獲得するわけでもなく、耐性獲得が困難な個体も存在する。すなわち、経口免疫療法で耐性を獲得するか否かは実際に実施しないとわからない。

【0008】

アレルギー個体において、自然寛解するか、経口免疫療法で耐性を獲得するか、あるいは経口免疫療法でも治療困難であるかを特徴付けることが極めて有用である。

20

【0009】

そこで、本明細書は、ミルクアレルギー個体の属性の予測方法を提供する。また、本明細書は、ミルクアレルギー個体に関しその治療経過に有用なエピトープセット及びその利用を提供する。特に、ミルクアレルギー個体に関し、自然寛解群、持続アレルギー群、さらには持続アレルギー群内でも経口免疫療法による耐性獲得群と耐性獲得困難群とを判別するためのエピトープ及びその利用を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、ミルクアレルギー個体から経時的に血清を採取し、エピトープペプチドとの特異的結合を検出し、種々の解析を行った結果、ミルクアレルギー個体の属性を特徴付けるいくつかのエピトープペプチドを特定することができた。さらに、これらのエピトープペプチドを用いることにより、ミルクアレルギー個体の属性を判別し予測できることがわかった。本明細書によれば以下の手段が開示される。

30

【0011】

(1) ミルクアレルギー個体の属性の予測方法であって、

ミルクアレルギー個体由来の抗体を含有する被験試料と、以下に示すエピトープセット

：

ミルクアレルギーの自然寛解群に対して肯定的な第1のエピトープセット、  
 ミルクアレルギーの持続性群に対して肯定的な第2のエピトープセット、及び  
 ミルクアレルギーの経口免疫療法における非耐性獲得群に対して肯定的な第3のエピトープセット

40

からなる群から選択される1又は2以上のエピトープセットに含まれる1又は2以上のエピトープペプチドと接触させる工程と、

前記1又は2以上のエピトープペプチドと前記被験試料中の抗体との特異的結合に関する結合情報を取得する工程と、  
 を備える、方法。

(2) さらに、前記結合情報に基づいて前記ミルクアレルギー個体が、ミルクアレルギーに関して、自然寛解群、持続性群、経口免疫療法における耐性獲得群及び経口免疫療法における非耐性獲得群のいずれであるかの属性情報を取得する工程と、

50

を備える、(1)に記載の予測方法。

(3) 前記第1のエピトープセットは、配列番号337~357で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有するエピトープペプチドからなる群から選択される1又は2以上のエピトープペプチドからなる、(1)又は(2)に記載の予測方法。

(4) 前記第2のエピトープセットは、配列番号358~372で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有するエピトープペプチドからなる群から選択される1又は2以上のエピトープペプチドからなる、(1)~(3)のいずれかに記載の予測方法。

(5) 前記第3のエピトープセットは、配列番号373~376で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有するエピトープペプチドからなる群から選択される1又は2以上のエピトープペプチドからなる、(1)~(4)のいずれかに記載の予測方法。

(6) 前記検出工程は、さらに、ミルクアレルギー個体に対して肯定的な第4のエピトープセットを構成する1又は2以上のエピトープペプチドと前記抗体との特異的結合を検出する工程である、(1)~(5)のいずれかに記載の予測方法。

(7) 前記第4のエピトープセットは、配列番号377~383で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有するエピトープペプチドからなる群から選択される1又は2以上のエピトープペプチドからなる、(6)に記載の予測方法。

(8) ミルクアレルギー個体の属性を予測するための装置であって、

以下に示すエピトープセット：

配列番号337~357で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有するエピトープペプチドからなる群から選択される1又は2以上のエピトープペプチドからなり、ミルクアレルギーの自然寛解群に対して肯定的な第1のエピトープセット、

配列番号358~372で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有するエピトープペプチドからなる群から選択される1又は2以上のエピトープペプチドからなり、ミルクアレルギーの持続性群に対して肯定的な第2のエピトープセット、及び

配列番号373~376で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有するエピトープペプチドからなる群から選択される1又は2以上のエピトープペプチドからなり、経口免疫療法における非耐性獲得群に対して肯定的な第3のエピトープセット

からなる群から選択される1又は2以上のエピトープセットを固相担体上に備え、

前記エピトープペプチドと前記ミルクアレルギー個体から採取した被験試料中の抗体との特異的結合に関する結合情報に基づき、前記ミルクアレルギー個体が、ミルクアレルギーに関して、自然寛解群、持続性群、経口免疫療法における耐性獲得群及び経口免疫療法における非耐性獲得群のいずれであるかの属性情報を取得するための装置。

(9) さらに、配列番号377~383で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有するエピトープペプチドからなる群から選択される1又は2以上のエピトープペプチドからなり、前記ミルクアレルギー個体に肯定的な第4のエピトープセットをさらに、備える、(8)に記載の装置。

(10) ミルクアレルギー個体の属性を予測するためのペプチドセットであって、

以下に示すエピトープセット：

配列番号337~357で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有するエピトープペプチドからなる群から選択される1又は2以上のエピトープペプチドからなり、ミルクアレルギーの自然寛解群に対して肯定的な第1のエピトープセット、

配列番号358~372で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有するエピトープペプチドからなる群から選択される1又は2以上のエピトープペプチドからなり、ミルクアレルギーの持続性群に対して肯定的な第2のエピトープセット、及び

配列番号373~376で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有するエピトープペプチドからなる群から選択される1又は2以上のエピトープペプチドからなり、ミルクアレルギーの経口免疫療法における非耐性獲得群に対して肯定的な第3のエピトープセット

からなる群から選択される1又は2以上のエピトープセットを含む、ペプチドセット。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 2 】

【図 1】Robust Z-score 解析による各患者群におけるエピトープ分布を示す図である。

【図 2】 S 1 カゼイン及び S 2 カゼインのエピトープに対する各群におけるスコアが 2 以上となるペプチドを有する患者陽性率 % を示す図である。耐性獲得群 ( T ) 及び非耐性獲得群 ( P ) については、濃色ラインは経口免疫療法開始前 ( 0 M ) を示し、淡色ラインは治療後 ( 1 2 M ) を示す。自然寛解群 ( G 3、G 6 ) については、濃色ラインは発症時 ( 一才前後 ) を示し、淡色ラインは寛解時を示す。

【図 3】 カゼイン及び カゼインのエピトープに対する各群におけるスコアが 2 以上となるペプチドを有する患者陽性率 % を示す図である。耐性獲得群 ( T ) 及び非耐性獲得群 ( P ) については、濃色ラインは経口免疫療法開始前 ( 0 M ) を示し、淡色ラインは治療後 ( 1 2 M ) を示す。自然寛解群 ( G 3、G 6 ) については、濃色ラインは発症時 ( 一才前後 ) を示し、淡色ラインは寛解時を示す。

10

【図 4】 ラクトアルブミン及び ラクトアルブミンのエピトープに対する各群におけるスコアが 2 以上となるペプチドを有する患者陽性率 % を示す図である。耐性獲得群 ( T ) 及び非耐性獲得群 ( P ) については、濃色ラインは経口免疫療法開始前 ( 0 M ) を示し、淡色ラインは治療後 ( 1 2 M ) を示す。自然寛解群 ( G 3、G 6 ) については、濃色ラインは発症時 ( 一才前後 ) を示し、淡色ラインは寛解時を示す。

【図 5】自然寛解群に特徴的なエピトープを示す図である。

【図 6】持続性群に特徴的なエピトープを示す図である。

【図 7】経口免疫療法での非耐性獲得群に特徴的なエピトープを示す図である。

20

【図 8】全群に共通するエピトープを示す図である。

【図 9】自然寛解群に特徴的なエピトープに関する各群のスコアマップを示す図である。

【図 10】持続性群及び非耐性獲得群に特徴的なエピトープに関する各群のスコアマップを示す図である。

【図 11】エピトープを解析した患者群における、自然寛解群と持続性群についての判別結果と正診率の結果を示す図である。

【図 12】別の患者群における、自然寛解群と持続性群についての判別結果と正診率の結果を示す図である。

【図 13】エピトープを解析した患者群における、耐性獲得群と非耐性獲得群についての判別結果と正診率の結果を示す図である。

30

【図 14】別の患者群における、耐性獲得群と非耐性獲得群についての判別結果と正診率の結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

## 【 0 0 1 3 】

本明細書の開示は、ミルクアレルギー個体 ( 以下、単に個体ともいう。 ) のアレルギー状態診断、治療経過 ( 予後 ) の診断に際して、ミルクアレルギーに関し自然寛解群、持続性群、さらには持続性群内でも経口免疫療法による耐性獲得群と非耐性獲得群のいずれであるかに関する属性情報を予測して診断を補助する方法に関する。すなわち、本開示によれば、個体のミルクアレルギーの状態や治療経過を予測するのに好ましいエピトープセット及びその利用を提供する。個体由来の抗体試料と本明細書に開示されるエピトープセットとの反応性 ( 結合情報 ) を取得することで、個体のミルクアレルギーに関する状況ないし予後、すなわち、例えば、自然寛解するか ( 自然寛解しやすさ )、学童期 ( 6 才ごろ ) までアレルギーを持続するか ( アレルギーの持続しやすさ )、経口免疫療法で耐性を獲得するか ( 同療法による耐性の獲得しやすさ )、同療法によっても耐性獲得困難か ( 同療法による耐性獲得しにくさ ) について予測することができる。

40

## 【 0 0 1 4 】

このため、本開示によれば、個体の治療を、アレルギー状況や予後の予測に基づいて行うことができるため、個体及びその家族並びに医療従事者にも負担が少なく好ましい方向性で治療を受ける ( 施す ) ことができる。また、医療コストも低減することができる。特に、本開示は、経口免疫療法などの個体負担の大きい治療を実施するのに有用な指針を提

50

供することができる。

【0015】

さらに、本開示によれば、こうした特定のエピトープペプチドを保持した、ミルクアレルギーの予後を予測するためのアレイなどの装置（デバイス）も提供される。また、本開示によればこうした特定エピトープペプチドのエピトープセットの利用も提供する。

【0016】

以下、本明細書の開示を実施するための形態について説明する。なお、本明細書及び図面において、 $\alpha$ -ラクトアルブミン、 $\beta$ -ラクトグロブリン、 $s_1$ -カゼイン（ $S_1$ カゼイン）、 $s_2$ -カゼイン（ $S_2$ カゼイン）、 $\gamma$ -カゼイン、 $\delta$ -カゼインは、それぞれ a L、b L g、a S 1 C、a S 2 C、b C、k C などと表記されることがある。また、図面においては、持続性群は持続性アレルギー群と表記されることがあり、耐性獲得群は耐性化群と表記されることがあり、非耐性獲得群は非寛解群と表記されることがある。

10

【0017】

（ミルクアレルギー個体の属性の判別方法）

本明細書に開示されるミルクアレルギー個体の属性の予測方法は、ミルクアレルギー疾患と診断された個体のほかミルクアレルギー疾患の可能性のある個体について適用することができる。ミルクアレルギー疾患とは、ヒトにおいては、ウシ、ヒツジ、ヤギなど、ヒト以外の哺乳動物、典型的にはウシの乳、その加工品（飲料のほか食品も含む。）にアレルギー症状を呈する疾患をいう。本明細書において、個体とは、哺乳動物個体をいい、典型的にはヒトである。

20

【0018】

ミルクアレルギー疾患の可能性のある個体とは、既アレルギー症状を呈する個体のほか、アレルギー症状を呈しない個体も包含する。こうした個体の年齢は特に限定しないが、乳幼児から学童期（0才以上6才以下程度）において有用である。こうした年齢期において、ミルクアレルギー疾患の予後の予測が、治療方針や個体における治療負担に影響が大きいからである。

【0019】

（接触工程）

本予測方法は、個体由来の抗体を含有する被験試料と、特定の1又は2以上のエピトープセットを構成する1又は2以上のエピトープペプチドとを接触させる工程を備えることができる。接触工程により、被験試料中に存在する抗体とエピトープペプチドとが特異的結合を形成することができる。

30

【0020】

被験試料は、個体由来の抗体を含有する。被験試料は、抗体として少なくともIgEを含んでいればよい。本予測方法では、IgEとエピトープとの特異的結合を利用するからである。被験試料は、IgE以外の免疫グロブリンを含んでいてもよい。被験試料は、こうした抗体を含んでいる限り特に限定されないが、例えば、ミルクアレルギー疾患の可能性のある個体から採取される血液や血清などが用いられる。被験試料は、複数であってもよい。すなわち、予測対象となる個体につき2以上の被験試料を本明細書の開示の予測方法に供してもよい。

40

【0021】

本予測方法では、被験試料とミルクアレルギーの所定の属性群に関連付けられたエピトープペプチドとを接触させる。エピトープペプチドは、ミルクアレルギーのアレルゲンタンパク質のアミノ酸配列の一部により構成されている。ミルクアレルギー疾患においては、診断補助に用いるアレルゲンタンパク質としては、主要な6つのミルクアレルゲンタンパク質である $\alpha$ -ラクトアルブミン、 $\beta$ -ラクトグロブリン、 $s_1$ -カゼイン、 $s_2$ -カゼイン、 $\gamma$ -カゼイン、 $\delta$ -カゼインから選択される。好ましくは、アレルゲンタンパク質は、 $s_1$ -カゼイン、 $s_2$ -カゼイン、 $\gamma$ -カゼイン及び $\delta$ -カゼインからなる群から選択される1種又は2種以上である。これらのアレルゲンタンパク質は、本発明者らの検討によれば、ミルクアレルギーにおいて個体群の判定及び予後予測により好ましいことがわ

50

かっている。これらの特定のアレルゲンタンパク質からエピトープペプチドのアミノ酸配列からエピトープペプチドを構成することが好ましい。

【0022】

エピトープペプチドは、可能性あるアレルゲンタンパク質に関しアレルギー疾患に関連のあるエピトープと考えられる部位のアミノ酸配列を含むかあるいは当該部位のアミノ酸配列からなっていればよく、その長さや配列は特に限定されない。可能性あるアレルゲンタンパク質又はその部分のアミノ酸配列に基づいて、適当な長さ（例えば、12～20残基程度）で、そのアミノ酸配列に関しオーバーラップが8～17残基程度となるような必要な数のオーバーラップペプチドの集団から選択されることが好ましい。より好ましくは、アレルゲンタンパク質の一次構造をカバーするアミノ酸配列にわたって必要数のオーバーラップペプチドを準備する。一つのアレルゲンタンパク質について準備するオーバーラップペプチドの数は、カバーする一次構造の大きさやオーバーラップペプチドの長さ及びオーバーラップ残基数によって異なる。

10

【0023】

ミルクアレルギーなど複数のタンパク質がアレルゲンとして関与する場合には、これらの複数のアレルゲンタンパク質から選択される1種又は2種以上のアレルゲンタンパク質につき、オーバーラップペプチドをエピトープペプチドとして準備することができる。そして、準備したエピトープペプチドに対するミルクアレルギー個体の被験試料（血清等）の結合性（結合量）などの結合情報の比較から、ミルクアレルギー個体及びミルクアレルギー個体における各群を特徴付けるエピトープペプチドを見出すことができる。

20

【0024】

本予測方法では、被験試料と、以下のエピトープセットから選択される1又は2以上のエピトープセットに含まれる1又は2以上のエピトープペプチドと、を接触させる。エピトープセットは、ミルクアレルギー疾患に関し、第1のエピトープセット、第2のエピトープセット及び第3のエピトープセットから構成することができる。

【0025】

（第1のエピトープセット）

第1のエピトープセットは、3才又は6才ごろには自然寛解するミルクアレルギー個体群（自然寛解群）を特徴付けるエピトープセットである。第1のエピトープセットに含まれるエピトープペプチドは、ミルクアレルギーが6才ごろまでには自然寛解するという個体群を特徴付けるエピトープペプチドである。すなわち、自然寛解したことが確定診断された個体群のアレルギー発症時に採取した被験試料が特異的に結合するエピトープペプチドである。第1のエピトープセットは、以下のエピトープペプチドから構成される。第1のエピトープセットを構成する1又は2以上のエピトープペプチドを第1のエピトープセットとして用いることができる。

30

【0026】

【表 1】

AVE(G3,G6)>2、2AVE(T,P)<AVE(G3,G6)	ThrTyrLysGlnGluLysAsnMetalAlaIleAsnProSerLysGluAsn
aS2C7	TYKQEKNAINPSKEN
aS2C46	LysLysThrValAspMetGluSerThrGluValPheThrLysLysThr
aS2C48	KKTVDMESTEVFTKKT
aS2C49	ESTEVFTKTKLTEEE
aS2C50	EVFTKTKLTEEEKNR
aS2C51	TKTKLTEEEKNRLNF
aS2C52	TKLTEEEKNRLNFLKK
aS2C61	TEEEKNRLNFLKKISQ
aS2C62	KTVYQHOKAMKPIQP
aS2C63	YQHOKAMKPIQPKTK
bC32	QKAMKPIQPKTKVIP
bC33	GSVKVEAMAPKHKEM
bC34	KVKEAMAPKHKEMFPF
bC35	EAMAPKHKEMFPFKYP
bLG21	APKHKEMFPFKYPVEP
bLG22	WENGECAQKKIIAEKT
kC33	GECAQKKIIAEKTKIP
kC34	RHPHPLSFMAIIPPKK
kC35	HPHLSFMAIIPPKKNQD
kC36	LSFMAIIPPKKNQDKTE
kC37	MAIPPKKNQDKTEIPT
	PPKKNQDKTEIPTINT

AVE(G3,G6)>1、2AVE(T,P)<AVE(G3,G6)	LysIleThrValAspAspLysHisTyrGlnLysAlaLeuAsnGluIle
aS2C24	KITVDDKHQKALNEI
aS2C25	VDDKHQKALNEINQF
aS2C43	QLSTSEENSKKTVDM
bC30	LQPEVMGYSKVKEAMA
bC31	EVMGYSKVKEAMAPKH

10

20

30

【0027】

これらのエピトープペプチドは、ミルクアレルギー個体であって、6才ごろまでに自然寛解しなかったミルクアレルギー個体群（持続性群）の経口免疫療法前の結合情報に基づく Robust Z score 解析による Z スコア（以下、単にスコアともいう。）と自然寛解群の発症時のスコアにおいて有意差（耐性獲得群（T），非耐性獲得群（P）：治療前 vs 6歳までに自然寛解する群（G6），3歳までに自然寛解する群（G3）：発症時（1才ごろ））（ $p < 0.05$ ）があり、自然寛解群における平均スコアが2超（G3， $G6 > 2$ ）であり、持続性群のスコアの平均値の2倍よりも、自然寛解群におけるスコアが大きい（ $2AVE(T,P) < AVE(G6,G3)$ ）であるエピトープペプチドとして、後述するエピトープペプチド集団から選択されたものである。自然寛解群における平均スコアが1超であって2以下（ $2G3, G6 > 1$ ）であるものも併せて示す。こうしたエピトープは、少数の個体において自然寛解群を特徴付けるエピトープであり、このようなエピトープを用いることで、自然寛解群かどうかを判別しにくい個体についての判別の精度が向上する場合がある。

40

【0028】

なお、結合情報は、診断確定個体から採取した抗体含有試料とエピトープペプチドとの特異的結合に基づくものであり、一般的には、後述する標識物質を検出することによって得られるシグナルの強度（大きさ）に関する情報である。

50

【 0 0 2 9 】

第1のエピトープセットにおいては、好ましくは、a S 2 C 4 8、同 4 9、同 5 0、同 5 1、同 6 1、同 6 2、同 6 3、b C 3 2、同 3 3、同 3 4、b L G 2 1、同 2 2、k C 3 3、同 3 4、同 3 5、同 3 6 及び同 3 7 が挙げられ、これらからエピトープペプチドが選択されることが好ましい。

【 0 0 3 0 】

(第2のエピトープセット)

第2のエピトープセットは、6才ごろまでに自然寛解しなかったミルクアレルギー個体であるアレルギー持続性群(持続性群)を特徴付けるエピトープセットである。第2のエピトープセットに含まれるエピトープペプチドは、ミルクアレルギーが6才ごろまでに自然寛解しないで持続されるといふ個体群を特徴付けるエピトープペプチドである。すなわち、6才ごろまでに自然寛解しなかったことが確定診断された個体群の経口免疫療法前に採取した被験試料が特異的に結合するエピトープペプチドである。第2のエピトープセットは、以下のエピトープペプチドから構成される。第2のエピトープセットを構成する1又は2以上のエピトープペプチドを第2のエピトープセットとして用いることができる。

【 0 0 3 1 】

【表2】

AVE(T,P)>2、AVE(T,P)>2AVE(G3,G6)	TyrThrAspAlaProSerPheSerAspIleProAsnProIleGlySer
aS2C57-2	YTDAPSFSDIPNPIGS
aS1C34	RLKXKVPQLELVPNS
aS1C38	VPNSAEERLHSMKEGI
aS1C46	IGNQELAYFYPELFR
aS1C47	NQELAYFYPELFRQFY
aS1C48	LAYFYPELFRQFYQLD
aS1C57	LGTQYTDAPSFSDIPN
aS1C58	QYTDAPSFSDIPNPIG
aS1C59	DAPSFSDIPNPIGSEN
aS1C60	SFSDIPNPIGSENSEK
aS1C61	DIPNPIGSENSEKTTM
aS1C62	NPIGSENSEKTTMPLW
bC1	RELEELNVPGEIVESL
bC28	VVVPFLQPEVMGVSK
kC50	DSPEVIESPPEINTVQ

AVE(T,P)>1、AVE(T,P)>2AVE(G3,G6)	GluGluIleValProAsnSerValGluGlnLysHisIleGlnLysGlu
aS1C23-2	EEIVPNSVEQKHQKE
bC44-2	NLHLPLLLQSMHQF
aS1C8	RFFVAFPEVFGKEKV
aS1C9	VAPPEVFGKEKVNEL
aS1C16	SESTEDQAMEDIKQME
aS1C17	TEDQAMEDIKQMEAES
aS1C18	QAMEDIKQMEAESISS
aS1C28	QKEDVPSEYLGYLEQ
aS1C29	DVPSEYLGYLEQLLR
aS2C14	CKEVVRNANEESYSIG
bC2	EELNVPGEIVESLSS
bC15	DELQDKIHFFAQTQSL
bC19	TQSLVYFPFGPIPNLSL
bC57	KVLPVQKAVPYQORD

【 0 0 3 2 】

これらのエピトープペプチドは、ミルクアレルギー個体であって、持続性群の経口免疫療法前と自然寛解群の発症時とのスコアにおいて有意(T, P: 治療前 v s G 6, G 3:

10

20

30

40

50

発症時) ( $p < 0.05$ ) であり、持続性群における平均スコアが2超 ( $T, P > 2$ ) であり、自然寛解群のスコアの平均値の2倍よりも、持続性群のスコアの平均値が大きい ( $AVE(T, P) > 2 AVE(G6, G3)$ ) あるエピトープペプチドとして、後述するエピトープペプチド集団から選択されたものである。さらに、持続性群における平均スコアが1超であり2以下 ( $2 < T, P > 1$ ) であるものも併せて示す。こうしたエピトープは、少数の個体において持続性群を特徴付けるエピトープである、こうしたエピトープを用いることで、持続性群かどうかを判別しにくい個体についての判別の精度が向上する場合がある。

【0033】

第2のエピトープセットにおいては、好ましくは、a S 2 C 5 7 - 2、a S 1 C 3 4、同 3 8、同 4 6 - 4 8、同 5 7 - 6 2、b C 1、同 2 8、k C 5 0 が挙げられ、これらからエピトープペプチドが選択されることが好ましい。

10

【0034】

(第3のエピトープセット)

第3のエピトープセットは、持続性群にあって経口免疫療法によって耐性を獲得できなかった個体群を特徴付けるエピトープセットである。第3のエピトープセットに含まれるエピトープペプチドは、ミルクアレルギーが6才ごろまでに自然寛解せず持続され、しかも経口免疫療法を行っても耐性を獲得しない個体群を特徴付けるエピトープペプチドである。すなわち、自然寛解せずにアレルギーを持続し、経口免疫療法によって耐性を獲得しなかったことが確定診断された個体群の経口免疫療法前に採取した被験試料が特異的に結合するエピトープペプチドである。第3のエピトープセットは、以下のエピトープペプチドから構成される。第3のエピトープセットを構成する1又は2以上のエピトープペプチドを第3のエピトープセットとして用いることができる。

20

【0035】

【表 3】

AVE(P)>2, AVE(P)>2AVE(T)			
aS1C27	KHIQKEDVPSERYLGY	LysHisIleGlnLysGluAspValProSerGluArgTyrLeuGlyTyr	10
aS1C28	QKEDVPSERYLGYLEQ	GlnLysGluAspValProSerGluArgTyrLeuGlyTyrLeuGluGln	20
aS1C30	SERYLGYLEQLRLKK	SerGluArgTyrLeuGlyTyrLeuGlnLeuLeuArgLeuLysLys	30
bC19	TQSLVYFPFGPIPNLSL	ThrGlnSerLeuValTyrProPheProGlyProIleProAsnSerLeu	40

【 0 0 3 6 】

これらのエピトープペプチドは、持続性アレルギー個体であって、経口免疫療法によって耐性を獲得した個体群（耐性獲得群）の治療前におけるスコアと、持続性アレルギー個体であって、経口免疫療法によって耐性を獲得しなかった個体群（非耐性獲得群）の治療前における平均スコアにおいて有意（T治療前 vs P治療前）（ $p < 0.05$ ）であり、耐性獲得群（治療前）の平均スコアが2超であり（ $P > 2$ ）、非耐性獲得群のスコアの平均値が耐性獲得群のスコアの平均値の2倍よりも大きい（ $AVE(P) > 2 AVE(T)$ ）であるエピトープペプチドとして、後述するエピトープペプチド集団から選択されたも

のである。

【0037】

これら第1～第3のエピトープセットから選択される1又は2以上のエピトープセットに含まれる1又は2以上のエピトープペプチドを用いることで、ミルクアレルギー個体において、自然寛解群、持続性群、耐性獲得群及び非耐性獲得群を判別することができ、ミルクアレルギー疾患に関する診断を補助することができる。

【0038】

属性予測に用いるエピトープペプチドは、少なくとも第1～第3のエピトープセットから選択される1又は2以上のエピトープセットから選択される1又は2以上である。第1～第3のエピトープセットのうち1種の属性に特徴的な単独のエピトープセットを用いてアレルギー個体の属性を予測してもよいし、2又は3のエピトープセットを用いてアレルギー個体の属性を予測してもよい。また、1つのエピトープセットからは、少なくとも1つのエピトープペプチドを用いるが、好ましくは、複数個のエピトープペプチドを用いることが好ましい。例えば、既述したように、平均スコアが2超のエピトープペプチドから2以上を選択して用いることができる。

10

【0039】

さらに、ミルクアレルギー個体群に対して肯定的な第4のエピトープセットから選択される1又は2以上のペプチドをエピトープとして用いてもよい。第4のエピトープセットを用いることで、確度の高い群判別と経口免疫療法の効果予測（予後予測）が可能となる。特に、第4のエピトープセットは予後予測に有用である。第4のエピトープセットは、以下のエピトープペプチドから構成される。第4のエピトープセットを構成する1又は2以上のエピトープペプチドを第4のエピトープセットとして用いることができる。

20

【0040】

第4のエピトープセットに含まれるエピトープペプチドは、ミルクアレルギー個体（自然寛解群、持続性群（耐性獲得群、非耐性獲得群））において共通性の高いエピトープペプチドであり、ミルクアレルギー個体群（共通群）と特徴付けるエピトープセットである。すなわち、ミルクアレルギーであると確定診断された個体群のうち、持続性群の経口免疫療法前及び自然寛解群の発症時に採取した被験試料が特異的に結合するエピトープペプチドである。第4のエピトープセットを構成する1又は2以上のエピトープペプチドを第4のエピトープセットとして用いることができる。

30

【0041】

【表 4】

AVE(T,P)>2、AVE(G3,G6)>2、有意差なし		
aS1C22	SISSEIIVPNSVEQK	SerIleSerSerSerGluGluIleValProAsnSerValGluGlnLys
aS1C23	SSEIIVPNSVEQKHIQ	SerSerGluGluIleValProAsnSerValGluGlnLysHisIleGln
aS1C23-2	EIIVPNSVEQKHIQKE	GluGluIleValProAsnSerValGluGlnLysHisIleGlnLysGlu
aS1C24	EIVPNSVEQKHIQKED	GluIleValProAsnSerValGluGlnLysHisIleGlnLysGluAsp
aS1C35	KYKVPQLEIIVPNSAEE	LysTyrLysValProGlnLeuGluIleValProAsnSerAlaGluGlu
aS1C36	VPQLEIIVPNSAEERLH	ValProGlnLeuGluIleValProAsnSerAlaGluGluArgLeuHis
aS1C37	LEIIVPNSAEERLHSMK	LeuGluIleValProAsnSerAlaGluGluArgLeuHisSerMetLys

10

20

30

## 【0042】

40

これらのエピトープペプチドは、持続性群（耐性獲得群及び非耐性獲得群）の経口免疫療法治療前の平均スコアが2超であって、自然寛解群の発症時の平均スコアが2超である（T、P治療前>2、寛解群（発症時）>2）であるエピトープペプチドとして、後述するエピトープペプチド集団から選択されたものである。

## 【0043】

エピトープペプチドは、配列番号で特定されるアミノ酸配列を少なくとも部分配列として含んでいる限り、そのアミノ酸残基数は特に限定されない。エピトープペプチドは、公知の手法によりアミノ酸置換、欠失あるいは付加などの修飾が加えられていてもよい。用途に適した溶解性や抗原抗体反応性を付与することも可能である。

## 【0044】

50

エピトープペプチドは、連続するナンバリングが付与されている場合には、3アミノ酸残基がC末端側にずれたアミノ酸配列（16アミノ酸残基）を有している。したがって、表1～4において、連続するナンバリングが付与されているエピトープペプチドは、連続するナンバリングのエピトープペプチドのアミノ酸配列を1つのアミノ酸配列としてまとめることができる。好ましくは、後述する実施例において言及する図2～図4における患者陽性率が相対的に高く（例えば、好ましくは10%以上、より好ましくは20%以上、さらに好ましくは30%以上、一層好ましくは40%以上）の高さが近似している連続するエピトープペプチドをセットとすることが好ましい。また、同様に後述する図5～図8に示すように、エピトープ選択時におけるP値が低くて近似している連続しているエピトープペプチドをセットとすることが好ましい。

10

## 【0045】

連続するナンバリングのエピトープのセットとしては、2つの連続するナンバリングのエピトープのセット、3つの連続するナンバリングのエピトープのセット、4つの連続するナンバリングのエピトープのセット、5つの連続するナンバリングのエピトープのセット及び6つの連続するナンバリングのエピトープのセット等が挙げられる。これらのセットから、それぞれ、19アミノ酸残基のエピトープペプチド、22アミノ酸残基のエピトープペプチド、25アミノ酸残基のエピトープペプチド、28アミノ酸残基のエピトープペプチド及び31アミノ酸残基のエピトープペプチドを構成することができる。

## 【0046】

例えば、表1においては、aS2C48、同49、同50、同51、同52は連続している。この場合、aS248及び同49のエピトープペプチドは、共通するアミノ酸配列「EVFTKKTKLTEEE」（13アミノ酸残基）を有し、このN末端側に同48に基づいて、「EST」を有し、このC末端側に同49に基づいて「KNR」を有する、「EST EVFTKKTKLTEEEKNR KNR」のというアミノ酸19残基の配列を有するエピトープペプチドを構成することができる。同様にして連続するナンバリングのエピトープペプチドのセットである、同49と同50、同50と同51、同51と同52の各セットについて、3種類の各19アミノ酸残基の配列を有するエピトープペプチドを構成することができる。

20

## 【0047】

さらに、同48～50の3つの連続するナンバリングのエピトープペプチドのセットから、いずれにも共通する「TKKTKLTEEE」（10アミノ酸残基）を有し、このN末端側に、同48に基づいて、「ESTEVF」を有し、このC末端側に、同50に基づいて「KNR LNF」を有する、「ESTEVFTKKTKLTEEEKNR LNF」というアミノ酸22残基の配列を有するエピトープペプチドを構成することができる。同様にして、3つ連続するナンバリングのエピトープセットである、同49～51、同50～52の各セットについても、それぞれ22アミノ酸残基の配列を有するエピトープペプチドを構成することができる。

30

## 【0048】

以上のようにして、表1のbC32～35、bLG21～22、kC33～37について、2以上の連続するナンバリングのエピトープセットから新たなエピトープペプチドを構成することができる。また、表2のaS1C46～48、同57～62、表3のaS1C27～30、表4のaS1C22、23、23-2、24、同35～37についても、同様に2以上の連続するナンバリングのエピトープセットから新たなエピトープペプチドを構成することもできる。なお、これらの連続するナンバリングのエピトープペプチドセットに基づくエピトープペプチドのアミノ酸配列は個々には記載しないが、上述した表1の例に基づいて個々のアミノ酸配列を取得することができる。

40

## 【0049】

以上のようにして、新たに第1～第4（自然寛解群、持続性群、非耐性獲得群及び共通群）の各エピトープセットに基づいて取得したエピトープペプチドも、それぞれ各群（第1～第4）のエピトープペプチドを構成することができる。

50

## 【0050】

以上のようにして得られる、第1～第4のエピトープセットは、それぞれがミルクアレルギー患者の属性予測に有用なエピトープセットであるほか、これから選択される2以上のエピトープセットから選択される2以上のエピトープペプチドのセットもミルクアレルギー患者の属性予測に有用である。好ましくは第1～第3のエピトープセットから選択される2又は3以上のエピトープペプチドのセットがミルクアレルギー患者の属性予測に有用であり、より好ましくは第1～第3のエピトープセットから選択される3又は4以上のエピトープペプチドのセットがミルクアレルギー患者の属性予測に有用である。

## 【0051】

エピトープペプチドは公知のペプチド合成方法、例えば全自動ペプチド合成装置、酵母、大腸菌、哺乳動物細胞等による遺伝子組換えを用いた方法により製造することができる。

10

## 【0052】

エピトープペプチド、必要に応じて塩の形態、好ましくは生理学的に許容される酸付加塩の形態であってもよい。そのような塩としては、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）の塩、有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸）、その他、トリフルオロ酢酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）の塩等が挙げられる。

## 【0053】

エピトープセットを構成するエピトープセットを選択するエピトープペプチド集団としては、ヒトのミルクアレルギーのアレルゲンタンパク質である -ラクトアルブミン、<sub>s1</sub>-カゼイン、<sub>s2</sub>-カゼイン、<sub>s3</sub>-カゼイン、<sub>s4</sub>-ラクトグロブリン及び<sub>s5</sub>-カゼインに関し、それぞれ配列番号1～42、配列番号43～104、配列番号105～169、配列番号170～234、配列番号235～284及び配列番号285～336で表されるアミノ酸配列のエピトープペプチドを用いることができる。これらのエピトープペプチドは、これらのアレルゲンタンパク質のアミノ酸配列に対して作製したオーバーラップペプチド群である。オーバーラップペプチドは、アレルゲンタンパク質のN末端側からC末端側へと3アミノ酸残基づつずらして16アミノ酸残基のアミノ酸配列となるように構成され、連続するナンバリングが付与されている。特に、a S 1 C等のタンパク質名に続くナンバリング「xx」のさらに後に「-2」などの枝番が付与されている場合には、「xx」のナンバリングのアミノ酸配列から2残基C末端側にずらした16アミノ酸残基のアミノ酸配列からなるオーバーラップペプチドを意味している。これらの全てを用いることもできるし、一部を用いてもよい。一部を用いる場合には、各アレルゲンタンパク質からそれぞれ選択してもよいし、一部のアレルゲンタンパク質のエピトープペプチドを選択してもよい。

20

30

## 【0054】

こうしたエピトープペプチド集団から本明細書に開示される特定のエピトープペプチドを選択するには、自然寛解群、持続性群、耐性獲得群及び非耐性獲得群として確定診断されたアレルギー個体から採取（自然寛解群については発症時（おおよそ1才前後）、持続性群（耐性獲得群及び非耐性獲得群については経口免疫療法前（おおよそ6才前後））した抗体（IgE）を含む被験試料と、エピトープペプチド集団を構成するエピトープペプチドとの接触工程を行い、抗原抗体反応に基づく特異的結合に関する結合情報を取得し、結合情報に関してRobust Z-scoreに基づく解析を行い、さらに、各群に特徴的なエピトープペプチドを抽出するための検定（t-test）等を行うことによって得ることができる。

40

## 【0055】

被験試料とエピトープペプチドとの接触工程に関し、公知の抗原抗体反応における種々の実施態様を適宜適用することができる。例えば、複数個のエピトープペプチドを適合な材料で構成された基板状の固相担体上にアレイ化した状態で被験試料と接触させてもよいし、エピトープペプチドをビーズ状の固相担体に固定化した状態で被験試料と接触させて

50

もよい。また、固相担体を用いることなく液性媒体内で接触反応を行ってもよい。

【0056】

接触工程に供されるエピトープペプチドは、適当な固相担体に固定化されていることが好ましい。固相担体は、抗原抗体反応の反応系で溶媒に不溶な担体であれば、その材質及び形状は特に制限されず、公知の固相担体が使用できる。固相担体の形状としては、使用目的に応じて適宜の形状を選択すれば良く、例えば、テストプレート状、ビーズ状、球状、ディスク状、チューブ状、フィルター状等が挙げられる。好ましくは、固相担体は、テストプレート状、ディスク状、フィルター状等の平板状である。また、その材質としては、通常の免疫測定法用担体として用いられるもの、例えば、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリアクリルアミド等の合成樹脂、または、これらに公知の方法によりスルホン酸基、アミノ基などの反応性官能基を導入したもの、ガラス、多糖類、シリカゲル、多孔性セラミックス、金属酸化物等が挙げられる。

10

【0057】

固相担体へのエピトープペプチドの固定化方法は、物理的吸着法、共有結合法、イオン結合法、架橋法などの公知の方法が使用できるが、特に限定されない。当業者であれば、公知の方法から適宜選択してエピトープペプチドを固相担体に固定化することができる。

【0058】

接触工程では、固相担体に固定化されたエピトープペプチドに対して被験試料をそれぞれ供給して、エピトープペプチドと抗体との抗原抗体反応を生じさせる条件を付与する。抗原抗体反応が生じる条件は、当業者であれば容易に設定でき、例えば、適当な緩衝液でpHを調整し、適当な時間程度反応させることで、抗原抗体反応を生じさせることができる。なお、被験試料中の抗体とエピトープペプチドとの特異的結合を検出するには、非特異的な結合を排除するためのコントロール実験を実施する。典型的には、適当なコントロール液を準備し、当該コントロール液も被験試料に用いるのと同様の固相担体に対して供給し、各エピトープペプチドについてシグナル強度を測定することが行われる。

20

【0059】

(結合情報取得工程)

本予測方法は、被験試料中の抗体(少なくともIgE)とエピトープペプチドとの特異的結合に関する結合情報を取得する工程を備えることができる。結合情報を取得することで、それぞれの被験試料中の抗体のエピトープペプチドに対する特異的結合の強度(換言すれば、エピトープペプチドに対して反応する抗体量)に基づき、被験試料の採取源であるミルクアレルギー個体の群判別及び予後予測に用いることができるようになる。

30

【0060】

抗体とエピトープペプチドとの特異的結合に基づく結合情報は、こうした標識物質に基づくシグナルの種類に応じた検出装置を用いて所定のシグナルの大きさとして取得できる。結合情報は、被験試料中のエピトープペプチドに特異的に結合したIgE量に関連付けることができる。特異的結合に関する結合情報は、抗原抗体反応等における公知の方法により取得できる。概して、固相担体上の抗原抗体反応は、イムノアッセイに用いられる周知の標識物質などを利用して検出することができる。標識物質としては、蛍光物質、発光物質、色素、酵素、補酵素、あるいはラジオアイソトープ等が挙げられる。標識物質は、エピトープペプチドに結合する抗体に対する二次抗体に直接結合して用いることもできる。また、標識物質を認識する抗体やアビジン-ビオチン系などを利用して間接的に用いることもできる。

40

【0061】

(属性情報取得工程)

本予測方法は、結合情報に基づいて前記ミルクアレルギー個体が、ミルクアレルギーに関して、自然寛解群、持続性群、経口免疫療法における耐性獲得群及び経口免疫療法における非耐性獲得群のいずれであるかの属性情報を取得する工程を備えることができる。属性情報を取得することで、ミルクアレルギー個体の属性、すなわち、自然寛解群、持続性群、耐性獲得群及び非耐性獲得群のいずれであるかを判別又は予測することができる。ミ

50

ルクアレルギー個体の属性を判別し予測することにより、ミルクアレルギー個体についての診断を補助することができ、効果的な治療方針を決定できる。

【0062】

ミルクアレルギー個体の属性情報の取得、すなわち、属性の判別ないし予測は、例えば以下のように行うことができる。

【0063】

(1) 第1のエピトープセットを用いたアレルギー個体が自然寛解群であるかどうかの判別

自然寛解群を特徴付けることができる第1のエピトープセットをミルクアレルギー個体に適用することで、アレルギー個体が自然寛解群であるかどうかを判別できる。アレルギー個体が自然寛解群であるか否かを判別できれば、負担の多い経口免疫療法を予定せずすみ、個体負担も軽減され医療コストも低減される。

【0064】

例えば、アレルギー個体の被験試料において第1のエピトープセットに含まれる1又は2以上のエピトープペプチドの結合情報の総和や平均値に基づいて、当該総和又は平均値が予め確定診断された自然寛解群の結合情報の閾値(総和又は平均値)以上あるいはより大きい場合には、自然寛解群と判断することができる。すなわち、ミルクアレルギー個体が将来的に自然寛解するであろうという予後の予測が可能になる。なお、アレルギー個体が、自然寛解群に相反する群である持続性群であることも同時に判別できる。

【0065】

さらに、アレルギー個体の被験試料から取得した、第1のエピトープセット及び第4のエピトープセットに含まれる2以上のエピトープペプチドに対する結合情報の総和又は平均値に基づいて、当該総和又は平均値が予め確定診断された自然寛解群の対応する結合情報の閾値(総和又は平均値)以上あるいはより大きい場合には、自然寛解群と判断することができる。

【0066】

また、アレルギー個体が自然寛解群であるか否かについて、同時に、相反する群である持続性群を特徴付ける第2のエピトープセットを用いて、第2のエピトープセットのエピトープペプチドに対する結合情報を組み合わせることで、より高い確度で自然寛解群か持続性群かを判別できる。第1のエピトープセットと第2のエピトープセットとを組み合わせる場合、例えば、第2のエピトープセットにおける結合情報の平均値/第1のエピトープセットにおける結合情報の平均値を用いることができる。この比が1以上である場合には、アレルギー個体を持続性群と判別でき、同比が1未満である場合には、自然寛解群と判別できる。

【0067】

以上の自然寛解群の判別に関しては、2以上の判別手法を組み合わせることもできる。2以上の判別手法を組み合わせるときにおいて、それらの判別結果が相違する場合には、予め取得した正診率等に基づいて判別結果の優先順位を決めておくことが好ましい。

【0068】

(2) 第2のエピトープセットを用いたアレルギー個体が持続性群であるかどうかの判別  
持続性群を特徴付けることができる第2のエピトープセットをミルクアレルギー個体に適用することで、アレルギー個体が持続性群であるかどうかを判別できる。

【0069】

例えば、アレルギー個体の被験試料において第2エピトープセットに含まれる1又は2以上のエピトープペプチドの結合情報の総和や平均値に基づいて、当該総和又は平均値が予め確定診断された持続性群の結合情報の閾値(総和又は平均値)以上あるいはより大きい場合には、持続性群と判断することができる。すなわち、ミルクアレルギー個体が将来的に自然寛解せずアレルギー症状を持続するであろうという予後の予測が可能になる。

【0070】

10

20

30

40

50

さらに、アレルギー個体の被験試料から取得した、第2のエピトープセット及び第4のエピトープセットに含まれる2以上のエピトープペプチドに対する結合情報の総和又は平均値に基づいて、当該総和又は平均値が予め確定診断された持続性群の対応する結合情報の閾値（総和又は平均値）以上あるいはより大きい場合には、持続性群と判断することができる。

【0071】

また、アレルギー個体が持続性群であるか否かについて、同時に、相反する群である自然寛解群を特徴付ける第1のエピトープセットを用いて、第2のエピトープセットのエピトープペプチドに対する結合情報を組み合わせることで、より高い確度で自然寛解群か持続性群かを判別できる。第1のエピトープセットと第2のエピトープセットとを組み合わせる場合、例えば、第2のエピトープセットにおける結合情報の平均値/第1のエピトープセットにおける結合情報の平均値を用いることができる。この比が1以上である場合には、アレルギー個体を持続性群と判別でき、同比が1未満である場合には、自然寛解群と判別できる。

10

【0072】

以上の持続性群の判別に関しては、2以上の判別手法を組み合わせることもできる。2以上の判別手法を組み合わせるときにおいて、それらの判別結果が相違する場合には、予め取得した正診率等に基づいて判別結果の優先順位を決めておくことが好ましい。例えば、自然寛解群か持続性群かの判別にあたり、2以上の判別手法を組み合わせるとき、持続性群とする判別結果を優先すると規定しておくことができる。持続する可能性がある場合には経過観察が好ましいからである。

20

【0073】

(3) 第3のエピトープセットを用いたアレルギー個体が非耐性獲得群であるかどうかの判別

持続性群のなかでも非耐性獲得群を特徴付けることができる第3のエピトープセットをミルクアレルギー個体に適用することで、アレルギー個体が非耐性獲得群であるかどうかを判別できる。アレルギー個体が非耐性獲得群であると判別できることで、経口免疫療法を回避するなど治療方針の決定に役立てることができる。

【0074】

例えば、アレルギー個体の被験試料において第3のエピトープセットに含まれる1又は2以上のエピトープペプチドの結合情報の総和や平均値に基づいて、当該総和又は平均値が予め確定診断された非耐性獲得群の結合情報の閾値（総和又は平均値）以上あるいはより大きい場合には、非耐性獲得群と判断することができる。すなわち、ミルクアレルギー個体が将来的に自然寛解せずアレルギー症状を持続ししかも経口免疫療法を行っても耐性を獲得できないであろうという予後の予測が可能になる。

30

【0075】

さらに、アレルギー個体の被験試料から取得した、第3のエピトープセット及び第4のエピトープセットに含まれる2以上のエピトープペプチドに対する結合情報の総和又は平均値に基づいて、当該総和又は平均値が予め確定診断された非耐性獲得群の対応する結合情報の閾値（総和又は平均値）以上あるいはより大きい場合には、非耐性獲得群と判断することができる。

40

【0076】

さらにまた、アレルギー個体の被験試料から取得した、第2のエピトープセット、第3のエピトープセット及び第4のエピトープセットに含まれる3以上のエピトープペプチドに対する結合情報の総和又は平均値に基づいて、当該総和又は平均値が予め確定診断された非耐性獲得群の対応する結合情報の閾値（総和又は平均値）以上あるいはより大きい場合には、非耐性獲得群と判断することができる。

【0077】

また、アレルギー個体が耐性獲得群か非耐性獲得群であるか否かについて、耐性獲得群を特徴付ける第2のエピトープセットを組み合わせることで、より高い確度で自然寛解群

50

か持続性群かを判別できる。第3のエピトープセットと第2のエピトープセットとを組み合わせ用いる場合、例えば、第3のエピトープセットにおける結合情報の平均値/第2のエピトープセットにおける結合情報の平均値を用いることができる。この比が予め確定診断された非耐性獲得群の個体から得られた所定の閾値以上あるいはより大きい場合には、アレルギー個体を非耐性獲得群と判別でき、同比が所定値未満あるいは以下である場合には、耐性獲得群と判別できる。

【0078】

以上の非耐性獲得群の判別に関しては、2以上の判別手法を組み合わせ用いることもできる。この場合においても、それらの判別結果が相違する場合には、予め取得した正診率等に基づいて判別結果の優先順位を決めておくことが好ましい。例えば、耐性獲得群と非耐性獲得群の判別にあたり、2以上の判別手法を組み合わせるとき、非耐性獲得群とする判別結果を優先すると規定しておくことができる。例えば、アレルギー重症化に寄与するエピトープペプチド（共通群+持続性群+非耐性獲得群）に対するIgE抗体結合量が高い場合、又は非耐性獲得群を特徴付けるエピトープペプチドに対するIgE抗体結合量が高い場合には、いずれも非耐性獲得群と予測されるからである。

10

【0079】

以上の属性情報取得工程は、結合情報取得工程で得られたシグナル情報を利用してコンピュータを用いて行うこともできる。

【0080】

（ミルクアレルギー個体の属性を予測するための装置）

20

本明細書の開示によれば、ミルクアレルギー個体の属性を予測するための装置も提供される。本装置は、以下に示すエピトープセット：

配列番号337～357で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有するエピトープペプチドからなる群から選択される1又は2以上のエピトープペプチドからなり、自然寛解群に対して肯定的な第1のエピトープセット、

配列番号358～372で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有するエピトープペプチドからなる群から選択される1又は2以上のエピトープペプチドからなり、持続性アレルギー群に対して肯定的な第2のエピトープセット、及び

配列番号373～376で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有するエピトープペプチドからなる群から選択される1又は2以上のエピトープペプチドからなり、経口免疫療法における非耐性獲得群に対して肯定的な第3のエピトープセット

30

からなる群から選択される1又は2以上のエピトープセットを固相担体上に備えている。

【0081】

本装置によれば、エピトープペプチドとミルクアレルギー個体から採取した被験試料中の抗体との特異的結合に関する結合情報に基づき、ミルクアレルギー個体の属性、すなわち、自然寛解群、持続性群、経口免疫療法における耐性獲得群及び非耐性獲得群のいずれかであるかの属性情報を取得することができる。

【0082】

本装置は、さらに、配列番号377～383で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有するエピトープペプチドからなる群から選択される1又は2以上のエピトープペプチドからなり、前記ミルクアレルギー疾患に共通性の高い第4のエピトープセットをさらに、備えることもできる。

40

【0083】

判別を効率的に行うために、第1のエピトープセット、第2のエピトープセット、第3のエピトープセットを、固相担体上においてそれぞれ別々の領域に固定化されていてもよい。また、同様に、第4のエピトープセットもこれらの領域と別個に同一の固相担体上に固定化されていてもよい。

【0084】

（ミルクアレルギー個体の属性を予測するためのペプチドセット）

本明細書の開示によれば、ミルクアレルギー個体の属性を検査するためのペプチドセッ

50

トも提供される。本ペプチドセットは、以下に示すエピトープセット：

配列番号 337 ~ 357 で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有するエピトープペプチドからなる群から選択される 1 又は 2 以上のエピトープペプチドからなり、自然寛解群に対して肯定的な第 1 のエピトープセット、

配列番号 358 ~ 372 で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有するエピトープペプチドからなる群から選択される 1 又は 2 以上のエピトープペプチドからなり、持続性アレルギー群に対して肯定的な第 2 のエピトープセット、及び

配列番号 373 ~ 376 で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有するエピトープペプチドからなる群から選択される 1 又は 2 以上のエピトープペプチドからなり、経口免疫療法における非耐性獲得群に対して肯定的な第 3 のエピトープセット

からなる群から選択される 1 又は 2 以上のエピトープセットを含むことができる。さらに、本ペプチドセットは、配列番号 377 ~ 383 で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有するエピトープペプチドからなり、ミルクアレルギー個体に対して肯定的な第 4 のエピトープセットを備えていてもよい。本ペプチドセットによれば、ミルクアレルギー個体の群を判別し予後を予測することができるようになる。本ペプチドセットについては、各エピトープセットについて既に説明した各種実施態様を適用することが可能である。

#### 【0085】

以下、本発明を、具体例を挙げて説明するが、以下の実施例は、本発明を説明するものであって本発明を限定するものではない。

#### 【実施例 1】

#### 【0086】

牛乳タンパク質全 6 種類 (a-S1 casein、a-S2 casein、a-lactalbumin、b-lactoglobulin、b-casein、k-casein、) 由来のペプチド 336 種 (16 残基の長さ、3 残基ずらし) (配列番号 1 ~ 336) を全網羅したペプチドアレイを作製し、ミルクアレルギー患者血清の I g E エピトープ解析を行った。抗原である牛乳を摂取する経口免疫療法 (経口免疫療法) を実施し、牛乳 200 ml に到達した患者群、200 ml 摂取困難群、経口免疫療法を行わずに除去食を継続した対照群について解析を行い、患者群の判別に有用なエピトープ配列を決定した。

#### 【0087】

(血清試料の種類)

以下の 4 群のミルクアレルギー患者血清を用いた。

(1) 自然寛解群 1 (3 歳までの間に自然寛解した群 (略称 G3、11 名))

発症前後 “1 歳” と医師の判断によるアレルギー解除日の前後に採血を行った “寛解前後” の 2 経時のサンプルでアッセイを行った。

(ミルク特異的 I g E 量)

発症時 (1 歳前後) 0.35 ~ 12 U<sub>A</sub>/ml (CAP-RAST クラス 1-3)

寛解時 (1-2 歳) 0.35 ~ 1.6 U<sub>A</sub>/ml (CAP-RAST クラス 1-3)

(2) 自然寛解群 2 (6 歳までの間に自然寛解した群 (略称 G6、9 名))

(発症時 “1 歳” 時と “寛解前後” の 2 経時のサンプルでアッセイを行った。

(ミルク特異的 I g E 量)

発症時 (1 歳前後) 0.35 ~ 21 U<sub>A</sub>/ml (CAP-RAST クラス 1-4)

寛解時 (2-5 歳) 0.35 ~ 18.8 U<sub>A</sub>/ml (CAP-RAST クラス 1-3)

(3) 耐性獲得群 (アレルギーを維持して自然寛解しなかったが経口免疫療法を実施した後、2 ~ 3 週間の牛乳除去期間を経て牛乳 200 cc を摂取できた耐性獲得群、略称 T、8 名)

4 名は経口免疫療法を行う直前を 0 M とした時の 1 年前、0 M、12 M、24 M の 4 経時、残りの 4 名は 0 M、12 M の 2 経時のサンプルでアッセイを行った。

(ミルク特異的 I g E 量)

治療前 3.8 ~ 65 U<sub>A</sub>/ml (CAP-RAST クラス 3-5)

1 年後 1.3 ~ 32 U<sub>A</sub>/ml (CAP-RAST クラス 2-4)

(4) 非耐性獲得群 (アレルギーを維持して自然寛解しなかったが経口免疫療法により耐性を獲得できなかった群: 略称 P、9名)

4名は、1年前、0 M、12 M、24 Mの4経時、残りの5名は0 M、12 Mの2経時のサンプルでアッセイを行った。

(ミルク特異的 I g E 量)

治療前	14 ~ >100 U <sub>A</sub> /ml (CAP-RAST クラス3-6)
1年後	5.0 ~ 82 U <sub>A</sub> /ml (CAP-RAST クラス3-5)

【0088】

(ペプチドアレイの作製)

ペプチドは化学合成し、精製率70%以上で精製した。ペプチド濃度2.0 mg/mlで、0.1% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS)、1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC)を含む20 mMリン酸緩衝溶液 (pH 8.5)をスポットティング溶液として用いて、ガラス基板上にペプチド336種を固定化した高集密なミルクペプチドアレイを作製した。

【0089】

(ペプチドの固定化)

アレイ上へのペプチド固定化のため、ドライオーブンで加熱処理 (1 h、80 °C) した後、2×SSC (0.3 M NaCl and 0.03 M sodium citrate), 0.2% SDS, 100 mM dithiothreitol (DTT) 溶液に浸漬 (15 min、室温) 後、95 °C に加熱した2×SSC, 0.2% SDS溶液に浸漬 (5 min) した。次に、滅菌水中でアレイを10回振とうさせる操作を3回行った。その後、遠心乾燥を行った。

【0090】

(イムノアッセイ)

ブロッキング溶液 (50 mM Ethanolamine)、0.1% SDS、0.1 M Tris(hydroxymethyl)aminomethane) に浸漬した (90 min、室温) 後、PBS-T (1×PBS、0.1% Tween20) に浸漬した (5 min、室温、3回)。これにより、スライド基板上の未反応アミノ基のブロッキングを行った。次に、ミルクアレルギー患者から採取した血清を1% Ovalbumin (OVA, Albumin, Chicken Egg) を含むPBS-T溶液で10倍希釈した後、その溶液をカバーガラス (Gasket slide 4 microarray/slide format, G2534-60013, Agilent Technologies) に100 ml アプライし、その上にアレイのペプチドが固定されている面を重ね合わせ、ハイブリダイゼーション用チャンバ (Microarray hybridization chamber, stainless steel, G2534A, Agilent Technologies) で固定した後、ハイブリダイゼーションオープン (Hybridization Oven, G2545A, Agilent Technologies) で攪拌しながら反応させた (30 min、37 °C、20 rpm)。血清反応後、ハイブリダイゼーションオープンからアレイを取り出し、PBS-T中でカバーガラスを外し、PBS-T (1×PBS、0.1% Tween20) に浸漬した (5 min、室温、3回)。

【0091】

次に、Alexa555で標識したMouse Anti-Human IgG4, Fc Fragment Specific (HP6025, Calbiochem) とAlexa 647で標識したAffinity Purified Secondary Antibodies against Human IgE (Fc) (A116UN, American Qualex Antibodies) を1% OVA、PBS-T溶液で500倍希釈した後、血清を作用させた場合と同様の手順にて、ハイブリダイゼーションオープンで攪拌した (30 min、37 °C、20 rpm)。抗体反応後、ハイブリダイゼーションオープンからアレイを取り出し、PBS-T中でカバーガラスを外した。PBS-T (1×PBS、0.1% Tween20) で洗浄 (5 min、室温、3回) 後、さらに、滅菌水中でアレイを10回程度振とうさせる操作を3回行い、900 rpmで3 min遠心乾燥させた。以上の操作を終えたペプチドアレイを、マイクロアレイスキャナー (scanner model G2505B, software G2565BA/DA, Agilent Technologies) で検出した。

【0092】

得られた画像データは、数値解析ソフト (Gene Pix Pro 7, Agilent Technologies) を用いて解析し、それぞれのスポットの蛍光強度を数値化した。基板内n=3の平均蛍光強度

10

20

30

40

50

をペプチドに対する蛍光強度値として評価した。また、イムノアッセイのコントロール実験として、血清を作用させずに二次抗体のみを反応する条件（血清無し）についても実験を実施し、“血清あり - 血清無し”の蛍光強度を用いて解析を行った。

【0093】

（アレイデータの標準化）

各患者を特徴づけるエピトープを解析し、患者群間を判別する有用なペプチドを取得するため、各患者のIgE蛍光シグナル強度を標準化した。ミルクペプチドアレイを用いたアレルギー患者のIgE蛍光シグナルは、ほとんどのペプチドで数十～数百付近のノイズレベルの値をとるが、数十種類のエピトープとなるペプチドが数千、数万のシグナル値をとる非正規分布をとる。そこで、非正規分布サンプルに対して標準化を行う解析方法として、Robust Z-score解析を適用した。Robust Z-scoreは以下の計算式で算出した。この解析によれば、非正規分布をとる蛍光シグナル値の標準化が可能となり、中央値から距離をスコア化して患者間の比較が可能となる。

10

【0094】

【数1】

$$\text{Robust Z-score} = \frac{\text{X-median (sample)}}{1.48 \times \text{MAD (sample)}}$$

20

$$\text{MAD (sample)} = \text{median}(|X_i - m|)$$

【0095】

また、上記式のmはサンプル群の中央値である。また、式中のXは次の式で表される。

【0096】

【数2】

$$X = \log_{10} \left( \frac{\text{Fluorescent signal of the spot}}{\text{Fluorescent signal of the background}} \right)$$

30

【0097】

以上の式で算出されたスコアが2以上となるペプチドをエピトープペプチドとし、各群におけるかかるエピトープペプチドの分布を調べた。なお、本アレイのペプチドライブラリーは、16残基長、3残基シフトで合成しているため、各13残基の共通配列を有する。抗体エピトープは複数の配列にまたがってシグナルとして検出されると考えられることから、今回のRobust Z-score解析ではあるペプチドの前後2配列がZ-score < 2の場合は、その配列を含めた5配列の中央値をとって値を置き換えることによりノイズ除去を行った。ただし、タンパク由来の末端配列に関しては前後2配列が取れる範囲内で中央値に置き換えた。Z-score=2を閾値とし、2以上のペプチドは黄色に2未満は黒色に色づけした結果を図1に示す。

40

【0098】

図1に示すように、スコアによって選択されたエピトープペプチドについての蛍光強度は、血清サンプルの経時変化に対して変化が少ないことがわかった。各患者群に共通して、治療の前後（0Mと12M）でヒートマップに大きな変化はみられなかった。また、持続性群と自然寛解群のエピトープは異なり、a-S1 caseinおよびb-caseinに主に持続性群のエピトープが多く、自然寛解群はa-S1 caseinのほか、a-lactalbumin以外に散在していることが示唆された以上ことから、患者群判別にエピトープ解析が有用であることが示唆

50

された。

【0099】

また、図2～図4に、各群におけるスコアが2以上となるペプチドを有する患者割合率%を示す。図2～図4に示すように、図1と同様、患者群ごとに陽性率の高いエピトープは特徴的であり、患者群判別にエピトープ解析が有用であることが示唆された。

【0100】

(患者群判別に有効なエピトープの解析)

そこで、各スコアによるT検定を行い、各患者群に有用なエピトープを解析した。

【0101】

自然寛解群については、T及びP(治療前:経口免疫療法による治療開始前(以下、同じ。))のスコアと、G6及びG3(いずれも発症時(1才前後、以下、同じ。))のスコアと、において有意差があり( $p < 0.05$ )、かつ、G3及びG6の平均スコアが2超であり、G6及びG3のスコアの平均値がT及びPにおけるスコアの平均値の2倍よりも大きくなるエピトープ(セット1)を解析した。さらに、上記の有意差を有し、かつG3及びG6の平均スコアが1超であり、G6及びG3のスコアの平均値が、T及びPにおけるスコアの平均値の2倍よりも、大きくなるエピトープも解析した(セット2)。結果を図5に示す。

10

【0102】

持続性群については、T及びP(いずれも治療前)のスコアと、G6及びG3(いずれも発症時)のスコアとにおいて有意差があり( $p < 0.05$ )、かつ、T及びPの平均スコアが2超であり、T及びPの治療前のスコアの平均値が、G3及びG6の発症時のスコアの平均値の2倍よりも大きいエピトープを解析した(セット1)。さらに、上記の有意差を有し、かつT及びPの平均スコアが1超であり、T及びPの治療前のスコアの平均値が、G3及びG6の発症時のスコアの平均値の2倍よりも大きいエピトープを解析した(セット2)。結果を図6に示す。

20

【0103】

非耐性獲得群については、T(治療前)のスコアとP(治療前)のスコアにおいて有意差があり( $p < 0.05$ )、かつ、Pのスコアが2超であり、Pのスコアの平均値がTのスコアの平均値の2倍以上大きいエピトープを解析した。結果を図7に示す。

【0104】

さらに、全群に共通性の高いエピトープとして、T及びP(いずれも治療前)の平均スコアが2超であって、G3及びG6(いずれも発症時)のスコアが2超であるエピトープを解析した。結果を図8に示す。

30

【0105】

さらに、各群について自然寛解群に特徴的であるとしたエピトープペプチドに関するスコア(2未満、2以上、5以上)のマップを図9に示し、各群について持続性群及び非耐性獲得群に特徴的であるとしたエピトープペプチドに関するスコア(2未満、2以上、5以上)のマップを図10に示す。

【0106】

図5及び図6に示すように、自然寛解群に特徴的なエピトープペプチドと持続性群について特徴的なエピトープは異なっていることがわかった。自然寛解群には、aS2C46-52、aS2C61-63、bC32-35、bLG21,22、kC33-37などが有用であることがわかった。持続性群に特徴的な配列は主にa-S1 caseinにあり、特にaS1C46-48、aS1C57-62が有用であることがわかった。

40

【0107】

また、図7に示すように、持続性群における非耐性獲得群に特徴的なエピトープペプチドも見出すことができた。すなわち、治療前のT群とP群の判別にはaS1C27,28,30が有用であることが示唆された。さらに、図8に示すように、全群に共通性の高い、すなわち、アレルギー患者に共通する特徴的なエピトープ(共通群)も見出すことができた。aS1C22-24およびaS1C35-37は、各群の平均Z-score 2であり、患者群によらずエピトープになり

50

やすいことが示唆された。

【0108】

また、図9及び図10に示すように、自然寛解群、持続性群及び非耐性獲得群にそれぞれ特徴的であると解析されたエピトープのスコア分布によって各群を容易に視認できることもわかった。

【0109】

以上のことから、これらのペプチド配列を用いて患者群の判別が可能であり、各群のエピトープパターンを解析することで治療指針を提供できる可能性が示唆された。

【実施例2】

【0110】

本実施例では、エピトープを解析した各群の各個体の自然寛解群に特徴的なエピトープ（セット1）についての蛍光シグナル（T、P：治療前、G3、G6：発症時）の平均値と、同じく各個体の持続性群に特徴的なエピトープ（セット1）についての蛍光シグナルの平均値と、をそれぞれ算出した。そして、シグナル比として（持続性群に特徴的なエピトープの蛍光シグナルの平均値）/（自然寛解群に特徴的なエピトープの蛍光シグナルの平均値）を算出した。そして、当該シグナル比が1以上のとき持続性群とし、1未満のとき自然寛解群として判別した。判別結果と正診率の結果を図11に示す。

【0111】

図11に示すように、各群を、シグナル比でそれぞれ特徴付けることができた。また、シグナル比1以上及び1未満で判別した持続性群と自然寛解群についての正診率は、それぞれ94.1%（16/17）及び84.2%（16/19）であった。

【0112】

さらに、別に準備された確定診断（T、P、G3、G6）済みのミルクアレルギー患者（20人）の血清（T、P：治療前、G3、G6：発症時）につき、実施例1と同様にアレイを用いた解析を行い、さらに、上記と同様にしてシグナル比を得て、上記と同様に持続性群と自然寛解群とを判別した。判別結果と正診率の結果を図12に示す。

【0113】

図12に示すように、エピトープを解析した群でないミルクアレルギー患者においても、シグナル比によって持続性群と自然寛解群とを特徴付けることができた。また、シグナル比1以上及び1未満で判別した持続性群と自然寛解群についての正診率は、それぞれ76.9%（10/13）及び100%（7/7）であった。

【0114】

以上の結果から、実施例1で取得したエピトープセットは、ミルクアレルギー患者について持続性群と自然寛解群とを判別できることがわかった。

【実施例3】

【0115】

本実施例では、エピトープを解析した持続性群の各個体（17名）の持続性群、非耐性獲得群及び共通群のそれぞれに特徴的なエピトープ（持続性群についてはセット1）についての蛍光シグナル（治療前）の総和（データ1）と、各個体の非耐性獲得群に特徴的なエピトープについての蛍光シグナルの総和（データ2）と、をそれぞれ算出した。そして、データ1については、26000以上を非耐性獲得群と判別し、26000未満を耐性獲得群と判別した。また、データ2については、1000以上を非耐性獲得群と判別し、1000未満を耐性獲得群と判別した。さらに、データ1とデータ2の判別結果のうち、非耐性獲得群との判別結果を優先して採用して最終的な判別結果とした。判別結果と個体の正診状況との対比結果を図13に示す。

【0116】

図13に示すように、データ1及びデータ2を利用しても、概ね検体症状（耐性獲得群及び非耐性獲得群）を判別できた。耐性獲得群と非耐性獲得群とについての正診率は、それぞれ87.5%（7/8）及び77.8%（7/9）であった。

【0117】

10

20

30

40

50

さらに、別に準備された確定診断済みのミルクアレルギー患者（13人）の血清（治療前）につき、実施例1と同様にアレイを用いた解析を行い、さらに、上記と同様にしてデータ1及びデータ2を得て、上記と同様に耐性獲得群と非耐性獲得群とを判別した。判別結果と正診率の結果を図14に示す。

【0118】

図14に示すように、エピトープを解析した群でないミルクアレルギー患者においても、データ1及びデータ2を用いて、概ね耐性獲得群と非耐性獲得群とを判別できた。耐性獲得群と非耐性獲得群とについての正診率は、それぞれ71.4%（5/7）及び83.3%（5/6）であった。

【0119】

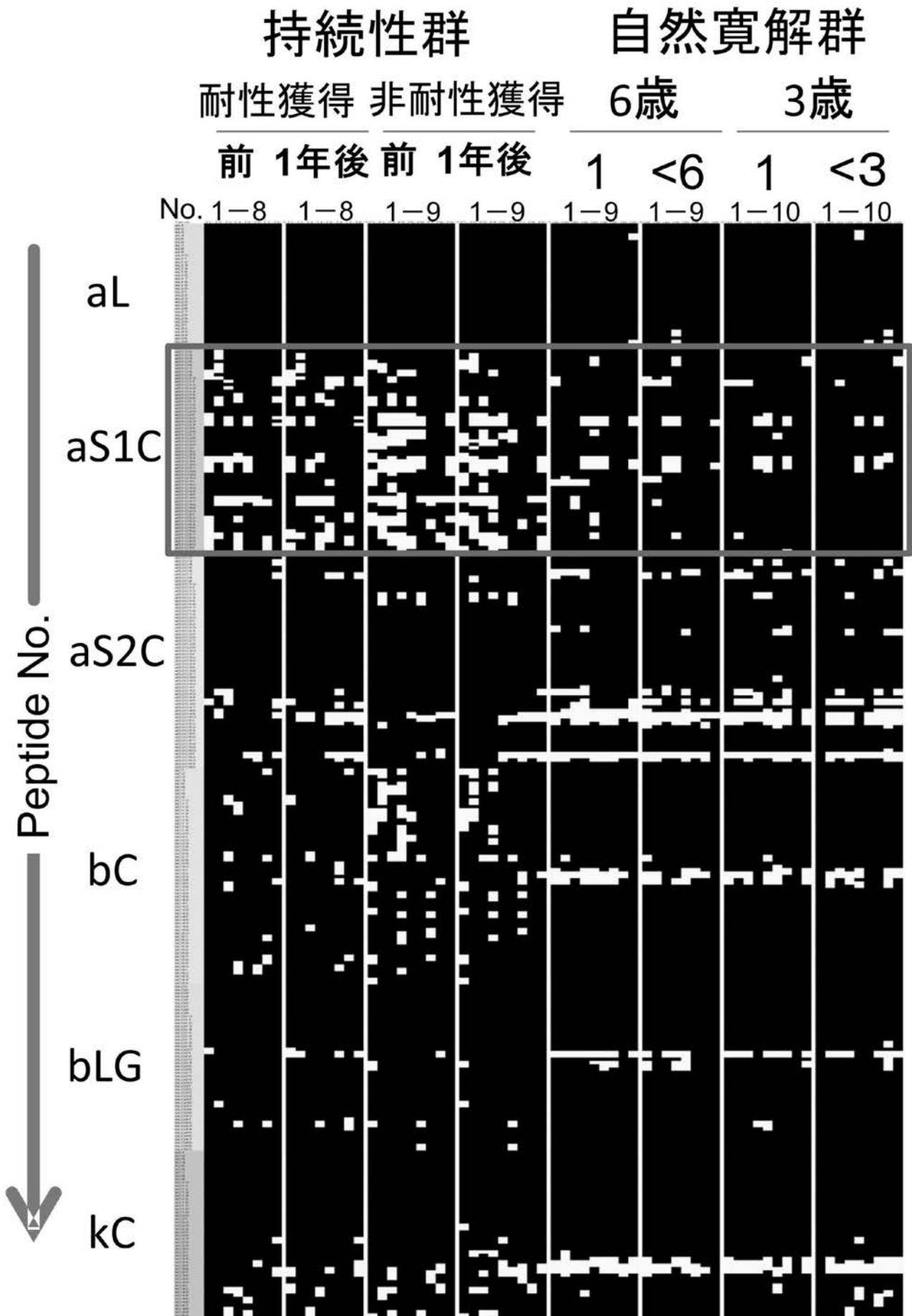
以上の結果から、実施例1で取得したエピトープセットは、ミルクアレルギー患者について耐性獲得群と非耐性獲得群とを判別できることがわかった。これにより、経口免疫療法による治療効果を予測できるようになることがわかった。

【配列表フリーテキスト】

【0120】

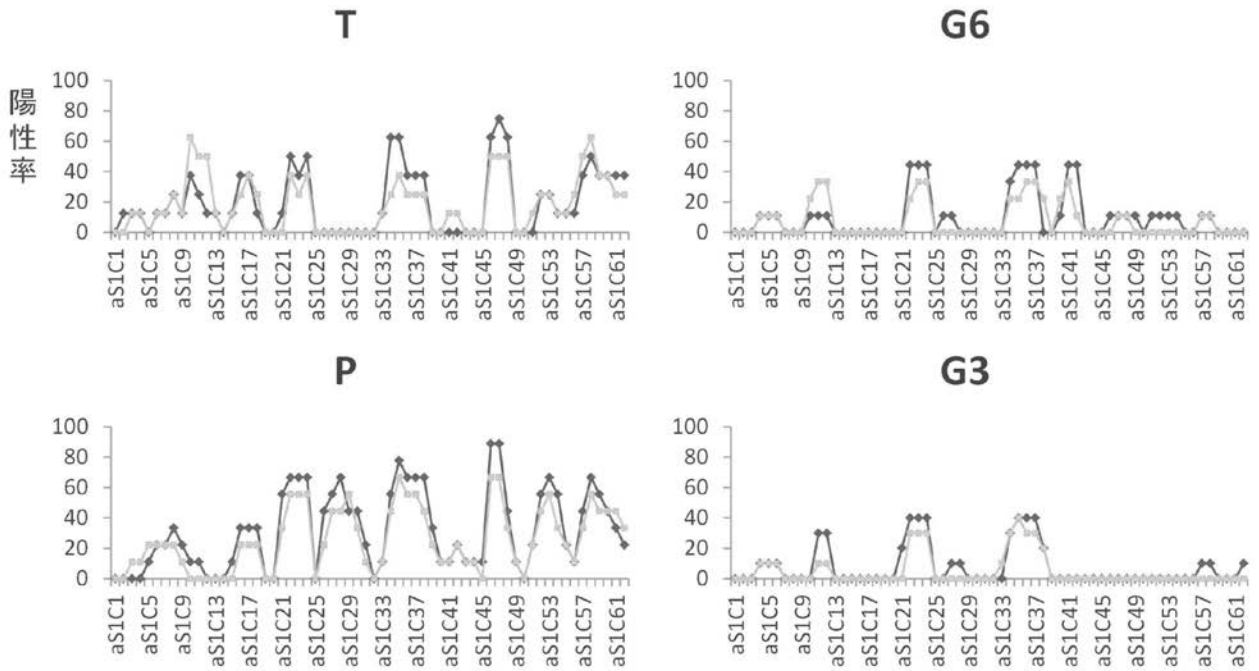
配列番号1～383：エピトープペプチド

【図1】

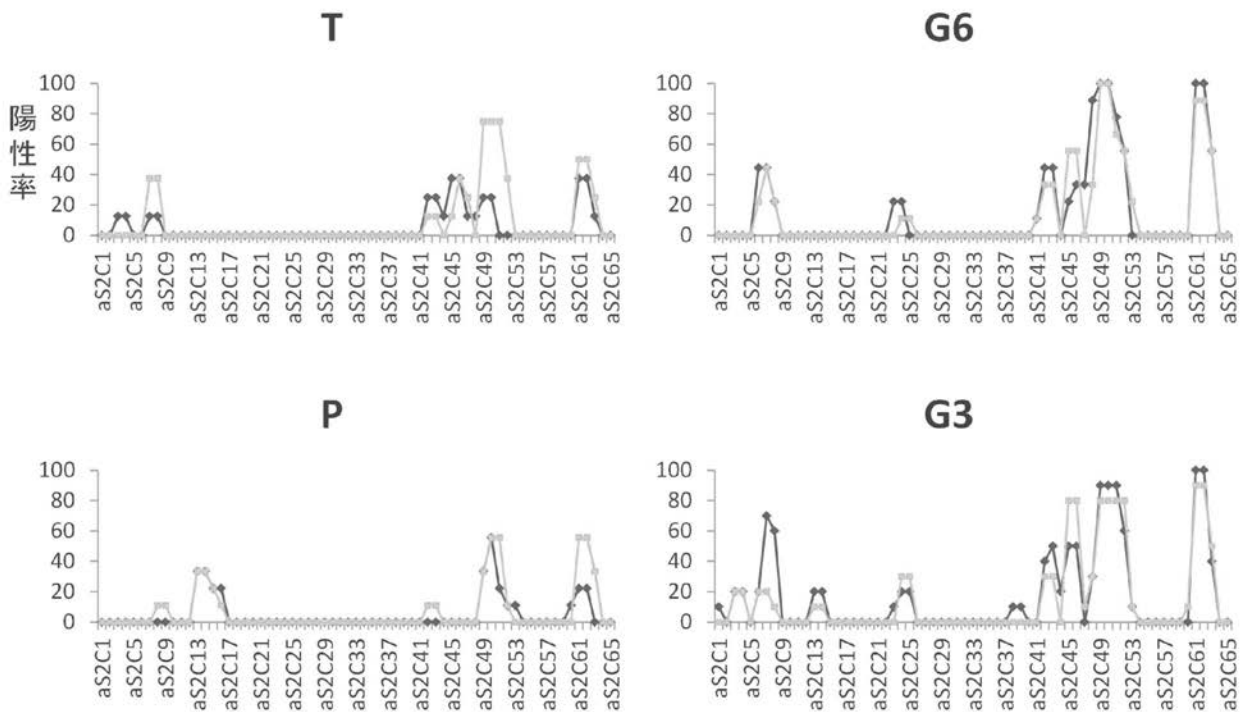


【図2】

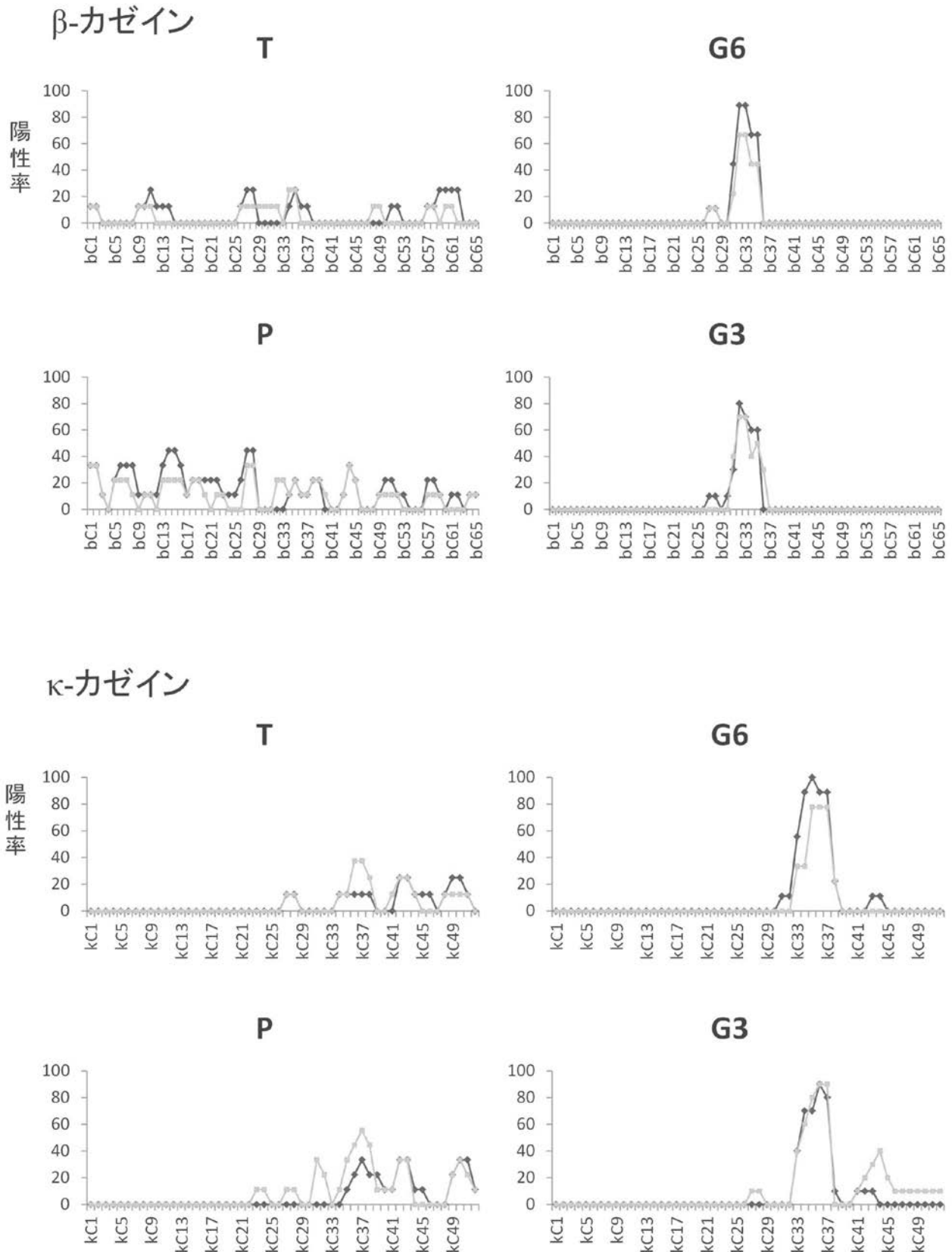
### $\alpha$ S1-カゼイン



### $\alpha$ S2-カゼイン

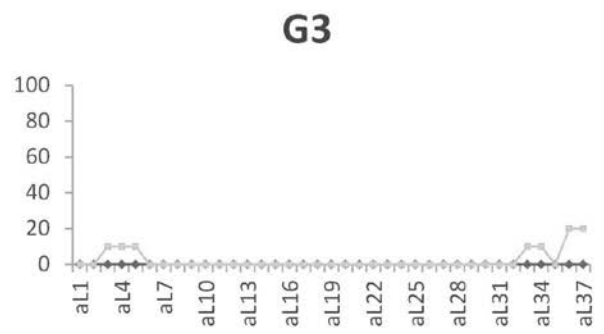
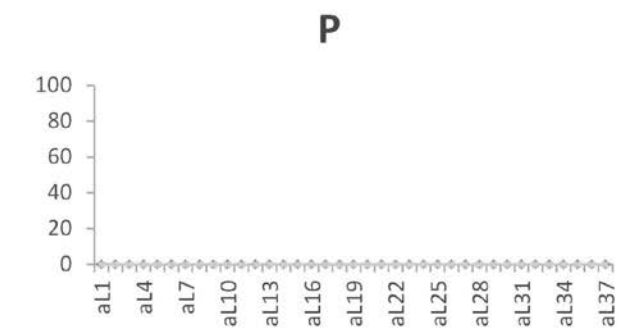
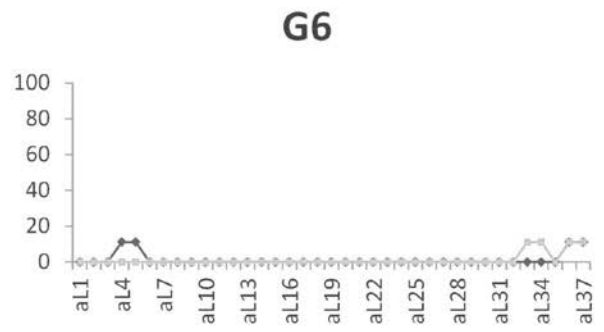
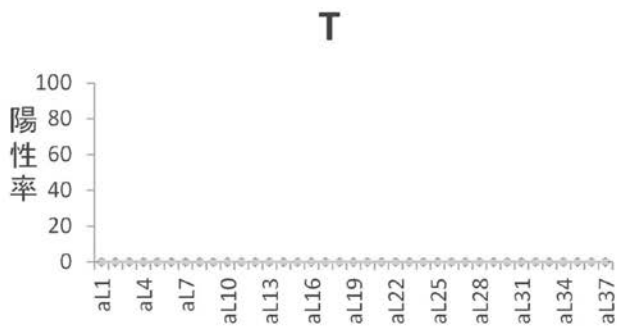


【図3】

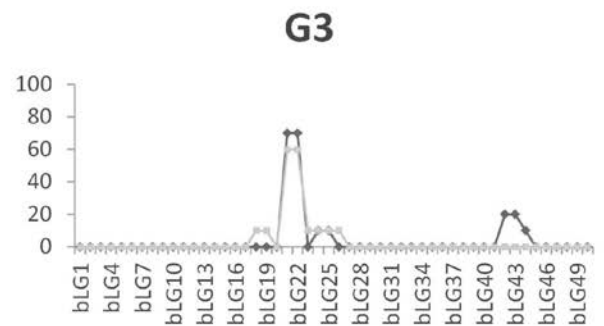
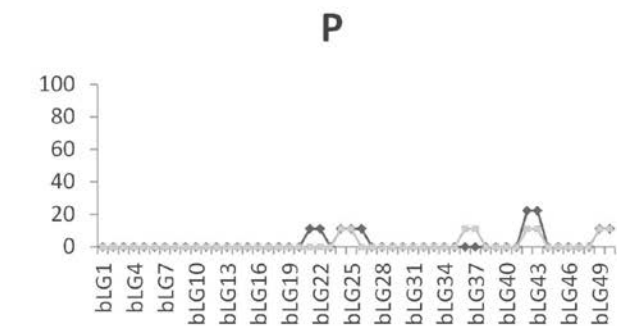
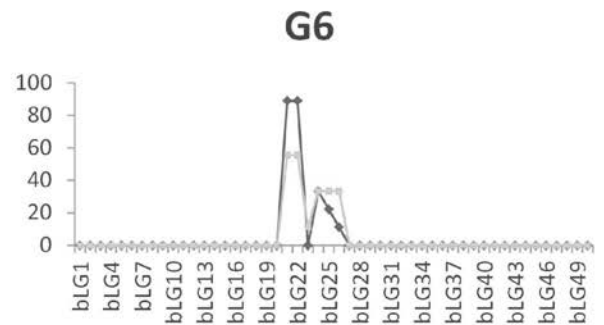
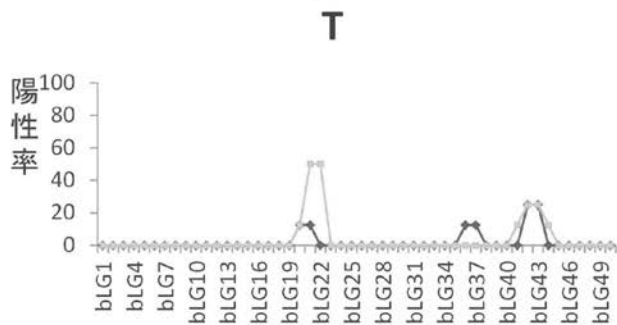


【図4】

### α-ラクトアルブミン



### β-ラクトグロブリン



【 図 5 】

### ●自然寛解群に特徴的なエピトープ

T,P:治療前 vs. G6,G3:発症時(p&lt;0.05) かつ

 $AVE(G3,G6)>2$  &  $2AVE(T,P)<AVE(G6,G3)$      $AVE(G3,G6)>1$  &  $2AVE(T,P)<AVE(G6,G3)$ 

No.	P value	No.	P value
aS2C7	0.015	aS2C24	0.0035
aS2C46	0.03	aS2C25	0.00056
aS2C48	1.2E-05	aS2C43	0.029
aS2C49	4.2E-06	bC30	0.04
aS2C50	4.1E-06	bC31	0.0012
aS2C51	8.7E-05		
aS2C52	0.0028		
aS2C61	3.50E-06		
aS2C62	1.90E-07		
aS2C63	6.60E-03		
bC32	3.2E-08		
bC33	1.1E-06		
bC34	8.7E-05		
bC35	0.0037		
bLG21	8.7E-05		
bLG22	4.0E-07		
kC33	1.6E-05		
kC34	6.8E-05		
kC35	5.2E-05		
kC36	3.5E-05		
kC37	0.00018		

【 図 6 】

### ●持続性群に特徴的なエピトープ

T,P:治療前 vs. G6,G3:発症時(p&lt;0.05) かつ

 $AVE(T,P)>2$  &  $AVE(T,P)>2AVE(G6,G3)$      $AVE(T,P)>1$  &  $AVE(T,P)>2AVE(G6,G3)$ 

No.	P value	No.	P value
aS2C57-2	0.0005	aS1C23-2	0.0041
aS1C34	0.035	bC44-2	0.0018
aS1C38	0.024	aS1C8	0.011
aS1C46	0.0002	aS1C9	0.0032
aS1C47	1.40E-05	aS1C16	0.025
aS1C48	0.00091	aS1C17	0.025
aS1C57	0.012	aS1C18	0.031
aS1C58	0.0006	aS1C28	0.027
aS1C59	0.00065	aS1C29	0.021
aS1C60	0.0047	aS2C14	0.043
aS1C61	0.00081	bC2	0.024
aS1C62	0.026	bC15	0.0014
bC1	0.034	bC19	0.013
bC28	0.035	bC57	0.0042
kC50	0.048		

【 図 7 】

### ● 経口免疫療法で非耐性獲得群が有するエピトープ

T治療前 vs. P治療前(p&lt;0.05) かつ

AVE(P)&gt;2 &amp; AVE(P)&gt;2AVE(T)

No.	P value
aS1C27	0.033
aS1C28	0.03
aS1C30	0.014
bC19	0.018

【 図 8 】

### ● 全群に共通性の高いエピトープ

AVE(T,P) 治療前&gt;2、G3,G6発症時&gt;2 (有意差なし)

No.	Z-score		P value
	AVE(T,P)	AVE(G3,G6)	
aS1C23-2	5.00	4.29	0.657
aS1C22	4.95	3.23	0.352
aS1C23	4.60	3.86	0.715
aS1C24	4.57	3.23	0.390
aS1C35	6.35	3.10	0.0837
aS1C36	4.96	3.18	0.364
aS1C37	5.32	3.50	0.351



【 図 1 0 】

# 持続性アレルギー群に特徴的なIgEエピトープ

## 持続性アレルギー群 vs. 自然寛解群

■ ≥ 5 > □ ≥ 2 >

### 持続性群/経口免疫療法

### 自然寛解群

Name/No.	耐性化									6歳までに寛解									3歳までに寛解									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
aS1C34	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
aS1C38	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
aS1C46	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
aS1C47	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
aS1C48	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
aS1C57	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
aS1C58	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
aS1C59	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
aS1C60	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
aS1C61	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
aS1C62	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
aS2C57-2	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
bC1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
bC28	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
kC50	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

TTEST: p value<0.05; AVE(T,P)>2; AVE(T,P)>2AVE(G3,G6)

## 非寛解群に特徴的なエピトープ(持続性アレルギー群:非寛解 vs. 耐性化)

Name/No.	耐性化									6歳までに寛解									3歳までに寛解									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
aS1C27	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
aS1C28	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
aS1C30	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
bC19	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

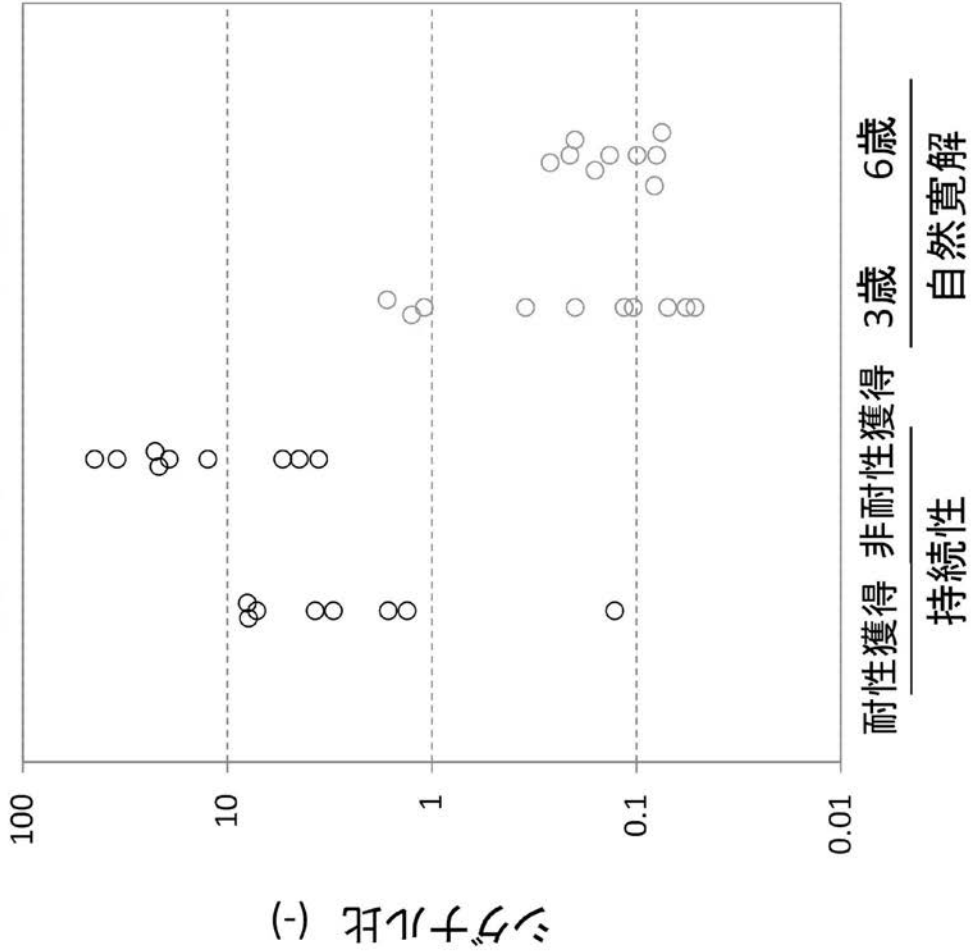
TTEST: p value<0.05; AVE(P)>2; AVE(P)>2AVE(T)

【 図 1 1 】

# 蛍光シグナルによる正診率の判別

シグナル比 =  $\frac{\text{持続性に特徴的な蛍光シグナルの平均値}}{\text{自然寛解に特徴的な蛍光シグナルの平均値}}$

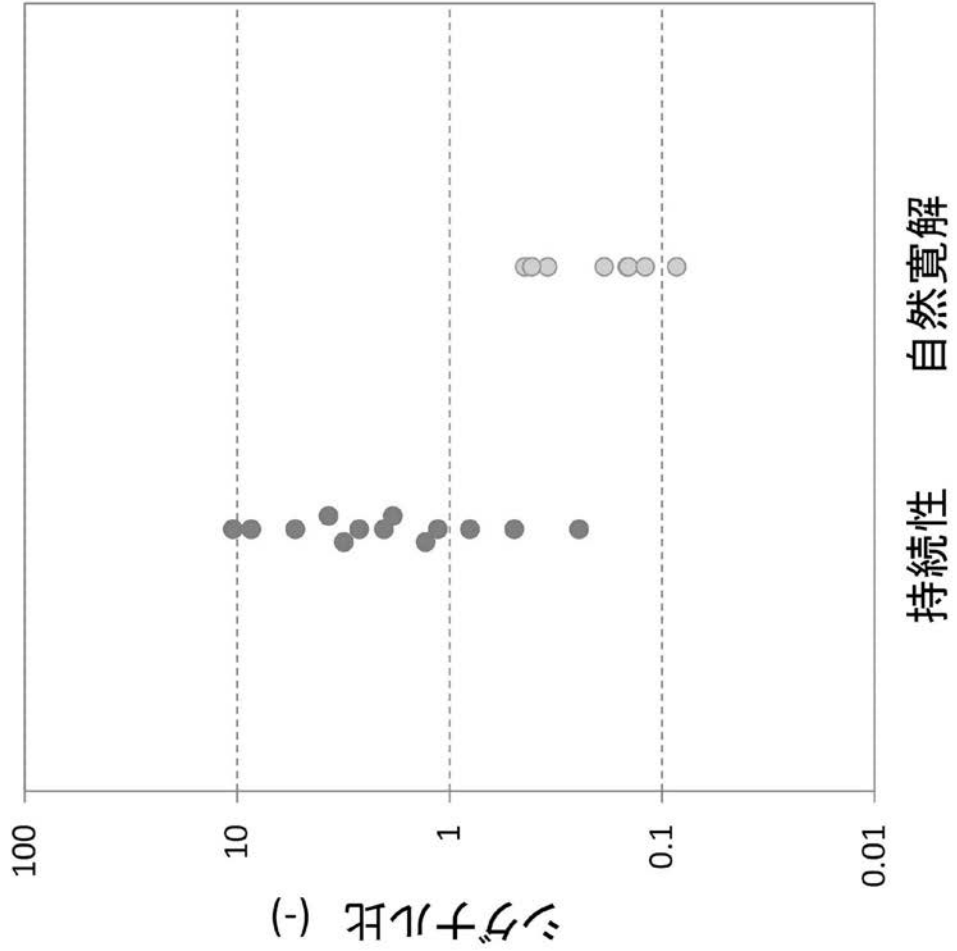
1以上で持続性群、1未満で自然寛解群と判定



# Blind data : 異なる検体群の判別

シグナル比 =  $\frac{\text{持続性に特徴的な蛍光シグナルの平均値}}{\text{自然寛解に特徴的な蛍光シグナルの平均値}}$

1以上で持続性群、1未満で自然寛解群と判定



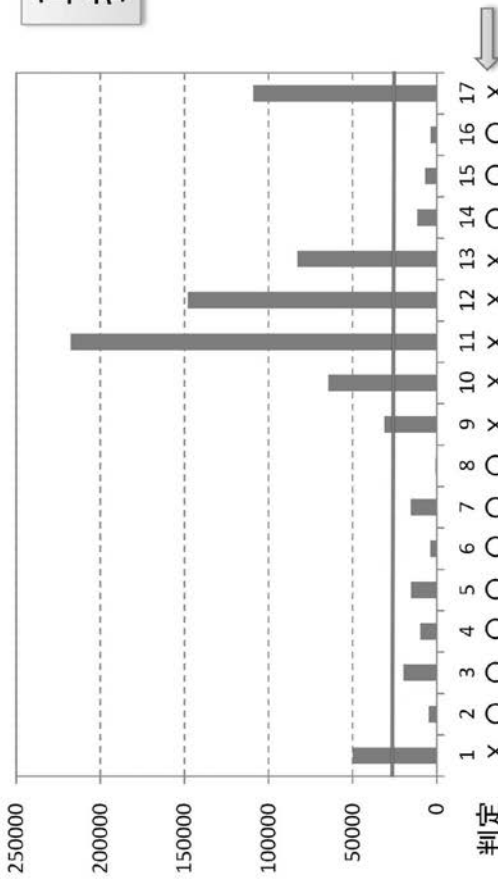
患者群	正診率(%)
持続性群	76.9
自然寛解群	100
計	85.0

【図 13】

# 経口免疫療法の治療予測

共通+持続性+非寛解  
特徴的ペプチド

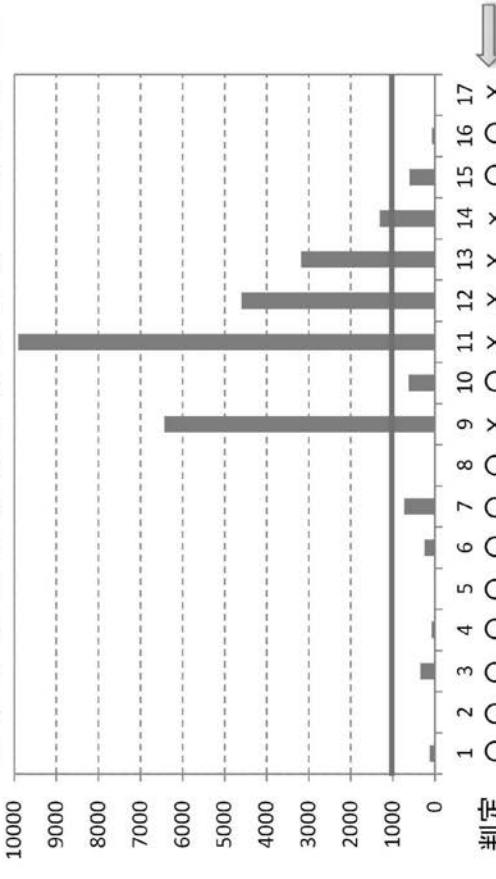
データ1



正解14人、不正解3人  
推定率: 82.4%

非寛解群に  
特徴的なペプチド

データ2



推定 →

Xを優先して判定

検体症状

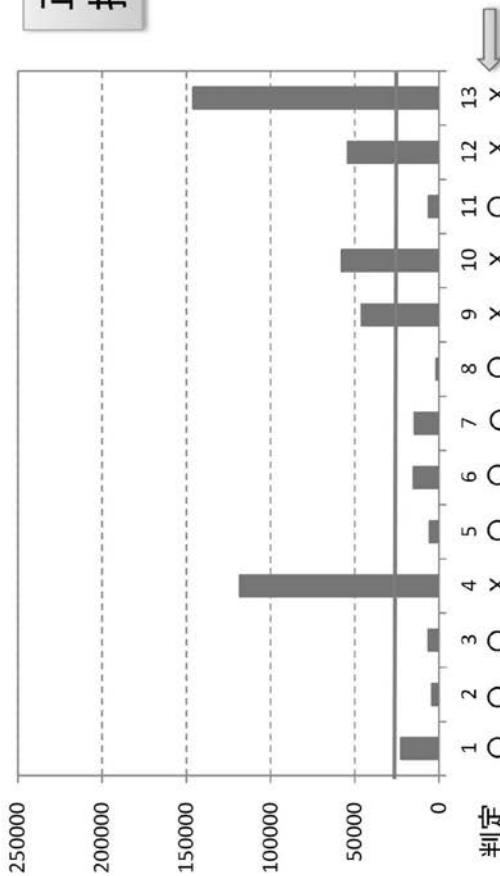
耐性獲得

非耐性獲得

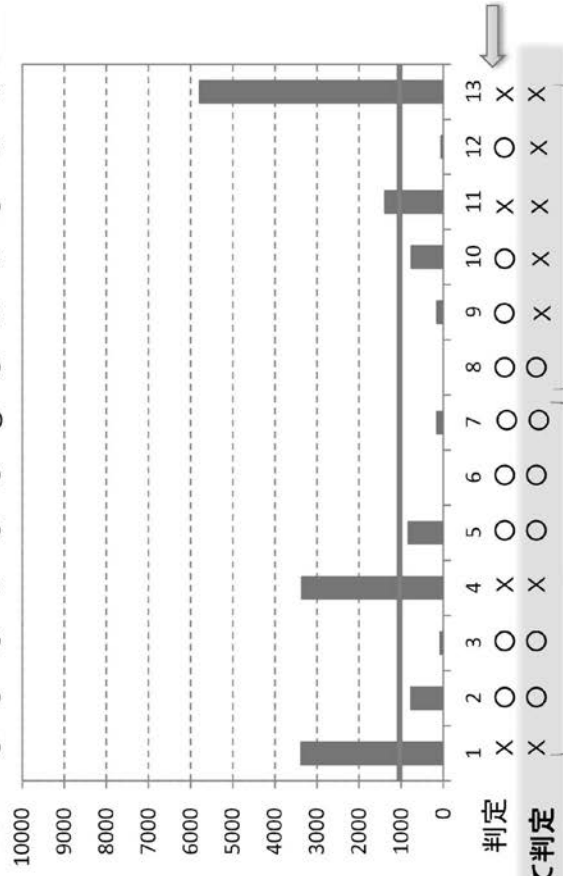
【図 1 4】

# Blind data: 経口免疫療法の治療予測

共通+持続性+非寛解  
特徴的ペプチド  
データ1



非寛解群に  
特徴的なペプチド  
データ2



推定 → Xを優先して判定

検体症状 2年以内に200ml摂取可能 200ml未満

## フロントページの続き

特許法第30条第2項適用申請有り <http://www.eaaci-wao2013.com/SiteSpecific/EAACI2013/StartPage.aspx> (平成25年6月22日掲載) (刊行物等) <http://www.eaaci-wao2013.com/SiteSpecific/EAACI2013/StartPage.aspx>を通じて取得されるアブストラクト(平成25年6月22日掲載) (刊行物等) ヨーロピアン アカデミー オブ アレルギー アンド クリニカル イムノロジー アンド ワールド アレルギー オーガナイズーション ワールド アレルギー (European Academy of Allergy and Clinical Immunology & World Allergy Organization World Allergy (EAACI/WAO)、MiCo - Milano Congressi, Piazzale Carlo Magno, 1 20149 Milan Italy (平成25年6月25日開催) (刊行物等) 中部経済連合会発行(平成25年7月23日発行)、中部経済連合会 第8回NEXT30産学フォーラムの配布資料 (刊行物等) 中部経済連合会第8回NEXT30産学フォーラム、中京大学 豊田キャンパス(愛知県豊田市貝津町床立101) (平成25年7月23日開催) (刊行物等) バイオ関連化学シンポジウム発行(平成25年9月27日発行)の第7回バイオ関連化学シンポジウム講演要旨集の第67頁 (刊行物等) 第7回バイオ関連化学シンポジウム、国立大学法人名古屋大学東山キャンパス(愛知県名古屋市千種区不老町1番) (平成25年9月29日開催)における発表資料 (刊行物等) 日本小児アレルギー学会誌(第27巻、第3号/2013年) 第50回日本小児アレルギー学会 プログラム・抄録集、日本小児アレルギー学会発行(平成25年8月20日発行)の第369頁 (刊行物等) 第50回日本小児アレルギー学会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市西区みなとみらい1-1-1) (平成25年10月19日開催)

(72)発明者 吉田 安子

愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内

(72)発明者 小郷 和彦

大阪府寝屋川市下木田町14番5号 倉敷紡績株式会社技術研究所内

Fターム(参考) 4H045 AA10 AA20 AA30 BA17 CA43 DA86 EA50 FA10

专利名称(译)	MIL-ALERGIC个体属性的预测方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2015121495A</a>	公开(公告)日	2015-07-02
申请号	JP2013266063	申请日	2013-12-24
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人名古屋大学 仓敷纺绩株式会社		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人名古屋大学 仓敷纺绩株式会社		
[标]发明人	大河内美奈 本多裕之 吉田安子 小郷和彦		
发明人	大河内 美奈 本多 裕之 吉田 安子 小郷 和彦		
IPC分类号	G01N33/53 C07K11/00 G01N33/531		
FI分类号	G01N33/53.N C07K11/00.ZNA G01N33/531.A		
F-TERM分类号	4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA17 4H045/CA43 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA10		
其他公开文献	JP6347459B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种可用于预测牛奶过敏个体属性的方法。 解决方案：预测牛奶过敏个体属性的方法是测试样品，其中包含衍生自牛奶过敏个体的抗体，对牛奶过敏的自然缓解组呈阳性以及牛奶过敏持续存在的第一个表位。在牛奶过敏的口服免疫疗法中，对于选自对本组呈阳性的第二种表位和对非抗性获得性组呈阳性的第三种表位的一个或多个表位组 该方法进一步包括与一种或多种所包括的表位肽接触的步骤，以及获得关于一种或多种表位肽与测试样品中的抗体之间的特异性结合的结合信息的步骤。 [选择图]无

(21) 出願番号	特願2013-266063 (P2013-266063)	(71) 出願人	504139662 国立大学法人名古屋大学 愛知県名古屋市千種区不老町1番
(22) 出願日	平成25年12月24日 (2013.12.24)	(71) 出願人	000001096 倉敷紡績株式会社 岡山県倉敷市本町7番1号
		(74) 代理人	110000110 特許業務法人快友国際特許事務所
		(72) 発明者	大河内 美奈 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内
		(72) 発明者	本多 裕之 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内

最終頁に続く