

(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2005-512068

(P2005-512068A)

(43) 公表日 平成17年4月28日(2005.4.28)

(51) Int. Cl.⁷

GO 1 N 33/53

F I

GO 1 N 33/53

P

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 28 頁)

(21) 出願番号	特願2003-550652 (P2003-550652)	(71) 出願人	504079863 ユニバーシティ オブ ワイオミング アメリカ合衆国、82071 ワイオミ ング州、ララミー、ピー. オー. ボックス 3672、リサーチ プロダクツ センタ ー オフィス
(86) (22) 出願日	平成14年12月9日 (2002. 12. 9)	(74) 代理人	100104411 弁理士 矢口 太郎
(85) 翻訳文提出日	平成16年6月7日 (2004. 6. 7)	(74) 代理人	100104215 弁理士 大森 純一
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/039198	(74) 代理人	100099656 弁理士 山口 康明
(87) 国際公開番号	W02003/049599		
(87) 国際公開日	平成15年6月19日 (2003. 6. 19)		
(31) 優先権主張番号	60/338, 389		
(32) 優先日	平成13年12月7日 (2001. 12. 7)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 喘息の診断に用いる方法および組成物

(57) 【要約】

【課題】

【解決手段】 喘息患者を診断し、最もその患者のためになる治療方針を特定するための診断方法が提供されている。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

喘息患者がロイコトリエン型喘息か、サイトカイン型喘息かを決定する方法であって、

a) 患者に肺機能検査を実施する工程と、

b) 前記患者から生物サンプルを採取する工程と、

c) 少なくとも1つのサイトカインに対する結合親和性を有する少なくとも1つの第1薬剤、および少なくとも1つのロイコトリエンに対する結合親和性を有する少なくとも1つの第2薬剤を、前記サンプルと接触させ、免疫複合体を形成させる工程と、

d) 前記免疫複合体を、前記第1および第2薬剤に対する結合親和性を有する少なくとも1つの検出可能な標識試薬と接触させる工程と、

e) 前記検出可能な標識試薬の結合関数として、前記生物サンプル中の少なくとも1つのサイトカインおよび少なくとも1つのロイコトリエンのレベルを決定する工程を有し、

前記肺機能検査後のロイコトリエンのレベルの上昇は、ロイコトリエン型喘息患者を示し、上昇したサイトカインのレベルの存在する状態で正常なロイコトリエンのレベルを有するサンプルは、サイトカイン型喘息を示すものである。

10

【請求項 2】

請求項1の方法において、前記肺機能検査は、メタコリン、ヒスタミン、マニトール、アデノシン、F E L D (ネコのふけ)、チリダニアレルゲン、特定のアレルギー、およびそれらの任意の組み合わせを有するグループから選択された薬剤の投与を有するものである。

20

【請求項 3】

請求項1の方法において、前記少なくとも1つのサイトカインは、I L - 4、I L - 9、I L - 16、G M - C S F、およびそれらの任意の組み合わせを有するグループから選択されるものである。

【請求項 4】

請求項1の方法において、前記薬剤は、前記少なくとも1つのサイトカインおよび前記少なくとも1つのロイコトリエンに対する親和性を有するモノクローナル抗体であり、前記試薬は、前記モノクローナル抗体に対する結合親和性を有し、検出できる標識2次抗体である。

【請求項 5】

請求項1の方法において、前記生物サンプルは、唾液、痰、血液、気管支洗浄液、血漿、およびそれらの任意の組み合わせを有するグループから選択されるものである。

30

【請求項 6】

請求項1の方法において、前記ロイコトリエンは、ロイコトリエンC4、ロイコトリエンD4、およびロイコトリエンE4を有するグループから選択されるものである。

【請求項 7】

請求項1の方法であって、この方法は、任意にさらに、外因性ロイコトリエンを有するサンプルを増強し、競合結合アッセイで前記患者サンプルに存在するロイコトリエンの置換を評価し、前記外因性ロイコトリエンが検出可能な標識を有するものである。

【請求項 8】

請求項1の方法において、前記サイトカインレベルは、前記肺機能検査実施後、約4～6時間測定されるものである。

40

【請求項 9】

請求項1の方法を実施するキットであって、

前記少なくとも1つのサイトカインおよび前記少なくとも1つのロイコトリエンに免疫学的に特異的な複数のモノクローナル抗体と、前記モノクローナル抗体に親和性を有する複数の2次抗体と、検出可能な標識および任意に固体の支持体を有する前記2次抗体とを有するものである。

【請求項 10】

請求項9のキットであって、このキットは、さらにメタコリンを有するものである。

50

【請求項 1 1】

請求項 9 のキットにおいて、前記抗体は、IL - 4、IL - 9、IL - 16、GM - C S F、およびそれらの任意の組み合わせを有するグループから選択されたサイトカインに対する結合親和性を有するものである。

【請求項 1 2】

喘息発作を有する患者がロイコトリエン型喘息か、サイトカイン型喘息かを決定する方法であって、

- a) 前記患者から生物サンプルを採取する工程と、
- b) 少なくとも 1 つのサイトカインに対する結合親和性を有する少なくとも 1 つの第 1 薬剤、および少なくとも 1 つのロイコトリエンに対する結合親和性を有する少なくとも 1 つの第 2 薬剤と、前記サンプルとを接触させ、免疫複合体を形成させる工程と、
- c) 前記免疫複合体を、前記第 1 および第 2 薬剤に対する結合親和性を有する、少なくとも 1 つの検出可能な標識試薬と接触させる工程と、
- e) 前記検出可能な標識試薬の結合関数として、前記生物サンプル中の少なくとも 1 つのサイトカインおよび少なくとも 1 つのロイコトリエンのレベルを決定する工程を有し、前記肺機能検査後のロイコトリエンのレベルの上昇は、ロイコトリエン型喘息患者を示し、上昇したサイトカインのレベルの存在する状態で正常なロイコトリエンのレベルを有するサンプルは、サイトカイン型喘息を示すものである。

10

【請求項 1 3】

請求項 12 の方法において、前記少なくとも 1 つのサイトカインは、IL - 4、IL - 9、IL - 16、GM - C S F およびそれらの任意の組み合わせを有するグループから選択されるものである。

20

【請求項 1 4】

請求項 12 の方法において、前記薬剤は、前記少なくとも 1 つのサイトカインおよび前記少なくとも 1 つのロイコトリエンに対する親和性を有するモノクローナル抗体であり、前記試薬は、前記モノクローナル抗体に対する結合親和性を有し、検出できる標識 2 次抗体である。

【請求項 1 5】

請求項 12 の方法において、前記生物サンプルは、唾液、痰、血液、気管支洗浄液、血漿、およびそれらの任意の組み合わせを有するグループから選択されるものである。

30

【請求項 1 6】

請求項 12 の方法において、前記ロイコトリエンは、ロイコトリエン C 4、ロイコトリエン D 4、およびロイコトリエン E 4 を有するグループから選択されるものである。

【請求項 1 7】

請求項 12 の方法であって、この方法は、任意にさらに、外因性ロイコトリエンを有するサンプルを増強し、競合結合アッセイで前記患者サンプルに存在するロイコトリエンの置換を評価し、前記外因性ロイコトリエンが検出可能な標識を有するものである。

【請求項 1 8】

喘息患者がロイコトリエン型喘息かを決定する方法であって、

- a) 患者に肺機能検査を実施する工程と、
- b) 前記患者から生物サンプルを採取する工程と、
- c) 前記サンプルを、少なくとも 1 つのロイコトリエンに対する結合親和性を有する少なくとも 1 つの薬剤と接触させ、それにより免疫複合体を形成する工程と、
- d) 前記免疫複合体を、前記第 1 薬剤に対する結合親和性を有する、少なくとも 1 つの検出可能な標識試薬と接触させる工程と、
- e) 前記検出可能な標識試薬との結合関数として、前記生物サンプル中の少なくとも 1 つのロイコトリエンレベルを決定する工程とを有し、前記肺機能検査後のロイコトリエンレベルの上昇は、ロイコトリエン型喘息の患者を示すものである。

40

【請求項 1 9】

50

請求項 18 の方法において、前記肺機能検査は、メタコリン、ヒスタミン、マニトール、アデノシン、F E L D (ネコのふけ)、チリダニアレルゲン、特定のアレルギー、およびそれらの任意の組み合わせから選択された薬剤の投与を有するものである。

【請求項 20】

請求項 18 の方法において、前記薬剤は、前記少なくとも 1 つのロイコトリエンに対するモノクローナル抗体であり、前記試薬は、前記モノクローナル抗体に対する結合親和性を有する、検出可能な標識 2 次抗体であるものである。

【請求項 21】

請求項 18 の方法において、前記生物サンプルは、唾液、痰、血液、気管支洗浄液、血漿、およびそれらの任意の組み合わせを有するグループから選択されるものである。

10

【請求項 22】

請求項 18 の方法において、前記ロイコトリエンは、ロイコトリエン C 4、ロイコトリエン D 4、およびロイコトリエン E 4 を有するグループから選択されるものである。

【請求項 23】

請求項 18 の方法であって、この方法は、任意にさらに、外因性ロイコトリエンを有するサンプルを増強し、競合結合アッセイで前記患者サンプルに存在するロイコトリエンの置換を評価し、外因性ロイコトリエンが検出可能な標識を有するものである。

【請求項 24】

請求項 18 の方法を実施するキットであって、前記少なくとも 1 つのロイコトリエンに免疫学的に特異的な少なくとも 1 つのモノクローナル抗体と、前記モノクローナル抗体に親和性を有する少なくとも 1 つの 2 次抗体と、検出可能な標識および任意に固体の支持体を有する前記 2 次抗体とを有するものである。

20

【請求項 25】

請求項 24 のキットであって、このキットは、さらにメタコリンを有するものである。

【請求項 26】

請求項 24 のキットであって、このキットは、さらに検出可能なロイコトリエンを有するものである。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、喘息の診断に関するものである。具体的には、本発明は、特定のタイプの治療に反応する喘息患者と反応しない喘息患者とを識別し、それによって前記疾患の治療管理を能率的にするための組成物および方法を提供する。

30

【背景技術】

【0002】

本明細書では、本発明が関係する技術分野をさらに十分に説明するために、いくつかの出版物を著者名、出版年、出版ジャーナルによって括弧内で参照している。これらの各文献および特許文書の開示は、本明細書において参照によって組み込まれる。

【0003】

欧米人口の 5 % もの人が喘息にかかっていると考えられ (Fleming ら, BMJ 294:279-283, 1987)、喘息は小児期に最も多くみられる慢性疾患であり、全小児の 20 ~ 25 % が今までに喘鳴を経験している。19 世紀および 20 世紀の医学の進歩は、喘息を診断できる疾患として確立させたが、喘息は分類が難しい異成分からなる健康問題である (Kaliner ら, J. Am. Med. Assoc. 258:2851-2871, 1987)。最近の統計では、ワイオミング州が米国で第 1 位の男性肺疾患の死亡率であることが示されている (Amodio ら, Ladies Home Journal, pp 200, 1998)。病因学的分類によれば、喘息には外因性つまりアトピー性喘息と、内因性つまり特発性喘息との 2 種類が存在する (Falliers ら, Ann Allergy, Vol. 53, pages 113-117, 1984)。現在の研究では、喘息はマスト細胞、T リンパ球 (特に Th₂ 細胞)、マクロファージ、

40

50

顆粒球、血小板、好塩基球、上皮細胞などの様々な細胞が関与し、気管支の反応性が亢進した慢性炎症性疾患として特徴付けられている (Chanarinら, *Drugs*, Vol. 47, pages 12-24, 1994; Einarssonら, *Ann NY Acad Sci*, Vol. 762, pages 89-100)。喘息は臨床的にも病理学的にも特徴付けることができる。臨床的には、喘息は間欠的な喘鳴、息切れ、および時に痰の出る咳を生じる再発性の疾患とすることができる。病理学的には、喘息の特徴は、平滑筋の収縮、粘膜の浮腫、炎症、および粘液分泌のために気道が閉塞することなどである (Kalinerら, *J. Am. Med. Assoc.* 258:2851-2871, 1987)。この疾患には太い気道と細い気道のいずれも関与するが、喘息の病態生理学的現象として認識されているのは、細い気道要素 (小気管支および細気管支) の減少により、気道に抵抗性が生じ、努力呼気肺活量と流速が低下し、肺の空気トラップが過膨張することである。多数の生物化合物が、喘息の誘発と促進との両方に関与していることが示された。

10

【0004】

例えば、喘息反応はアスピリンの摂取と運動によって誘発されうる。喘息反応の症状は、急速な収縮刺激期、後半の持続期、亜急性の慢性炎症期の3段階に分けることができる (Holgateら, *Clin Allergy*, Vol. 15, pages 221-234, 1985; Kay, *Asthma: Clinical Pharmacology and Therapeutic Progress*, pp 1-10, 1986)。前記即時型の反応は、通常、いずれもプロスタグランジンおよびロイコトリエン科である、ヒスタミンおよび収縮刺激作用を持つアラキドン酸代謝物が放出される肺のマスト細胞の活性化と関連している。しかし、ヒスタミンと、ロイコトリエンC₄、D₄、およびE₄とは重篤な喘息反応で主要な役割を果たしているように思われるが、これだけが関与している媒介物質ではない。いくつかのサイトカインが、直接刺激あるいはそれがない場合は症状の軽減のどちらかによって、喘息に関与しているように思われる。

20

【0005】

1980年からの公衆衛生統計では、米国における喘息の有病率は4.3%、または950万例以上の個々の症例があることが示している。さらに、一般的に、有病率は小児および高齢の成人集団で最も高い (Pendersenら, *Allergy*, Vol. 36, pages 175-181; Wilderら, *Vital Health Stat*, Vol. 10, pages 1-49, 1973)。喘息の有病率を正確に診断することが難しいのは、診断に様々な方法が用いられていることによる可能性がある。有病率を検討する方法には、質問票、電話調査、身体検査、肺機能検査、アレルギー皮膚検査、気管支負荷試験を利用するものなどがある (Bonner, *Clin Chest Med*, Vol. 5, pages 557-565, 1984)。喘息反応および関与する代謝物はすべての患者において同じではないので、正確な診断はより困難である。明らかに、特定の種類の薬剤を投与することで恩恵を受ける喘息患者を特定するための正確な診断方法が必要である。

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

40

【0006】

本発明によれば、変質したサイトカインおよびロイコトリエンのプロフィールを基にした、改善された喘息の診断法および治療法が提供されている。本発明の方法により、臨床医は、前記疾患の治療に利用できる様々な治療プロトコールから最も利益を受ける可能性の高い喘息患者を正確に特定することができる。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明の1つの実施例は、患者がロイコトリエン型喘息患者か、サイトカイン型喘息患者か、あるいは喘息患者かを決定するため、識別を付けて喘息を診断する方法を有する。さらに、本発明は、サイトカイン型喘息患者がIL-4型、IL-16型、GM-CSF

50

型かの喘息患者を決定する方法も有する。

【0008】

1つの実施例では、喘息発作の症状を持つ患者が、サイトカインおよびロイコトリエンレベルの検査を受ける。ロイコトリエンおよびサイトカインはいずれも、直接ELISAアッセイ、あるいは競合的蛋白結合測定法を用いて測定することができる。血液、痰、気管支洗浄液(brochial lavage)、唾液など、これだけに限らないが、あらゆる体液を検査することができる。代わりに、細胞を患者から分離し、ロイコトリエンおよびサイトカインの有無と、そのレベルとを評価することもできる。また、前記方法には、前記患者に肺機能検査を施行することも含み、喘息発作の症状を示している患者の検査も含むことができる。前記方法は、喘息症状が生じた直後に実施することもでき、また 10
適当な期間が経ってから実施される検査を含むこともできる。例えば、肺機能検査あるいは喘息発作の4~6時間後に、次の検査を実施することができる。

【0009】

本発明の別の実施例では、本発明の方法を用いた診断後、前記患者に対して適切な治療プロトコルを決定する方法も有する。ロイコトリエン型喘息患者はロイコトリエンを標的とした薬剤で治療するが、サイトカイン型喘息患者には、特定のサイトカインタイプに対する拮抗薬を投与する。そのような拮抗薬が利用できない場合は、従来のステロイド療法を施行する必要がある。

【0010】

また、本発明は、喘息を識別して診断するキットも含む。このキットは、検出可能な標識を付けることができ、ロイコトリエンに結合する薬剤、またこれだけに限らないが、IL-4、IL-16、およびGM-CSFのサイトカインに結合する薬剤を制限なく含む。そのような分子は、イムノアッセイあるいはハイブリッド形成法/増幅アッセイを用いて検出可能である。従って、本発明のキットには、抗体と、検出可能な基質あるいは標識と、ポリヌクレオチドのプロブあるいはプライマーおよび管と、そのようなアッセイを行うための容器あるいは固定支持体とを含めることができる。 20

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

米国では毎年、1000万人以上の人々が喘息があると検診されている。ほとんどの治療方針が、喘息患者は同質な集団を有するという仮定に基づいている。本発明によれば、非常 30
に明確な代謝の違いが喘息患者の集団には存在することが発見された。また、これらの代謝の違いが、臨床医を特定の治療タイプに導くのにも有用であることも発見された。予備研究では、我々は、喘息患者の集団のおよそ半数が食事療法に反応し、それによって薬剤の必要性を低下させることができることを証明した(Broughtonら, AJCN Vol. 65, pages 1011-1017)。この予備研究では、喘息患者の集団に、メタコリンで誘導される呼吸困難回復に対する、(n-3)多価不飽和脂肪酸(PUFA)摂取の効果を決定した。(n-3)PUFA摂取の効果を予測するためのロイコトリエン排泄能が評価された。また、高濃度の(n-3)PUFAを摂取した後、患者の呼吸パラメータも評価された。1週間ごとの24時間尿中ロイコトリエンレベルと共に、努力性肺活量(FVC)と、努力呼気肺活量/秒(FEV₁)と、最大呼気流量(PEF)と 40
、努力呼気流量25%-75%(FEF₂₅₋₇₅)とが測定された。(n-3)PUFA摂取が多くなると、被験者(反応者)の40%以上でメタコリン気管支誘発試験の用量が好転した。FEV₁、FVC、PEF、およびFEF₂₅₋₇₅の値を20%低下させる吸入誘発量(PD₂₀)は、有意な呼吸低下がみられなかったために、計算できなかった。反対に、(n-3)PUFAの摂取が増すことで、一部の患者(無反応者)がさらに呼吸容量の低下を示すようになった。高度の(n-3)PUFA摂取による5シリーズのロイコトリエン排泄は、無反応者よりも反応者で有意に大きかった。(n-3)PUFAの摂取により、尿中の4シリーズ:5シリーズロイコトリエンの比率が1未満となることで、呼吸器系に利益が得られることが予測できるであろう。この所見と同様に重要なこと 50
に、無反応の集団で何が異なるのかを決定し、異なる喘息患者間でどのような先天的代謝

の違いが存在しているかを決定することは、同様に重要なことになった。

【0012】

従って、本発明の1つの実施例では、標準的なプロトコールに従って、患者に肺機能検査を実施する方法が提供されている。手短に言えば、メタコリン負荷を行い、直後に痰のサイトカインおよびロイコトリエンのレベルを測定する。

【0013】

本発明のさらなる実施例では、様々な用量のメタコリンが患者に投与される。患者から唾液を回収し、前記サンプル中のロイコトリエンを単離し、測定する。その後、様々なメタコリン投与時のロイコトリエンのレベルによって、喘息患者をロイコトリエン陽性（反応者）あるいは陰性（中間あるいは無反応者）に分類する。ロイコトリエンレベルが高い患者はロイコトリエン型喘息とみなし、ロイコトリエンレベルが低い患者は非ロイコトリエン型喘息、つまりサイトカイン型喘息と見なされた。適当な時間の後（4、5、あるいは6時間後など）、採血を行い、血漿のIL-4、IL-16、およびGM-CSFレベルが検査された。血漿、唾液、痰のプロフィールに基づいて、サイトカイン型喘息患者が支配的にIL-4型、IL-16型、あるいはGM-CSF型喘息かが決定された。

【0014】

従って、本発明の方法により、臨床医はサイトカインおよびロイコトリエンの発現レベルのプロフィールによって、喘息患者を分類することができ、そのプロフィールを基に、適切な治療プロトコールを考案することができる。

【0015】

具体的には、ロイコトリエン、インターロイキン（IL-4、IL-16など）、およびGM-CSFの発現レベルの違いが、インターロイキン型喘息と、特定のサイトカイン型喘息とを識別する方法を提供している。現在、喘息治療の費用は1ヵ月で200ドルを超える可能性があり、そのような治療は前記診断された症例の約半数において効果がない。本発明の診断法により、臨床医は評価されている喘息患者のタイプを特定することによって、理想的な治療法を特定することができる。従って、本発明の診断法を行うことで、前記患者にとっては大きなお金の節約になり、前記臨床医にとっては治療のための正しい薬剤が選択することができるようになる。

以下の定義は、本発明の理解を促すために提供されている。

【0016】

"ロイコトリエン"はエイコサノイドの代謝生成物（通常はアラキドン酸）であり、炎症とアレルギー反応の媒介のような生理活性を持つと想定されている。ロイコトリエンは中央に環を持たないという点で、関連するプロスタグランジンおよびトロンボキサンとは異なる。これらの分子は、白血球（leukocyte）との関連で発見され、共役二重結合を含むため、ロイコトリエンと命名された。文字のA~Fは6種類の代謝物を特定し、これまでは、二重結合の数を示す下付き文字で分けられている（例えばロイコトリエンC₄）。

【0017】

"サイトカイン"は低分子量蛋白質と類似したホルモンであり、多種類の細胞から分泌され、免疫反応の強度と持続期間を制御し、細胞間の情報伝達にも関与している。典型的なサイトカインには、インターフェロン、インターロイキン（IL-3、IL-4、IL-5、IL-8、IL-10、IL-13、およびIL-16）、GM-CSF、IFN- γ 、およびリンホカインがある。

【0018】

"免疫反応"とは、ウイルス抗原などの抗原によって、免疫系が機能している宿主で生じる任意の反応を示す。免疫反応は、免疫グロブリンあるいは抗体の生成が関与する体液性か、様々な種類のBリンパ球、Tリンパ球、樹状細胞、マクロファージ、抗原提示細胞などが関与する細胞性かのどちらか、またはその両方であってもよい。また、免疫反応には、サイトカイン、リンホカインなどの様々なエフェクター分子の生成あるいは産生も関与する。免疫反応は*in vitro*と、様々な細胞系あるいは動物系との両方で測定す

10

20

30

40

50

ることできる。そのような免疫反応は、前記宿主を疾患から守るために重要であり、予防あるいは治療に用いることができる。

【0019】

"抗体"あるいは"抗体分子"は、抗体やそのフラグメントを含む、特定の抗原に結合する任意の免疫グロブリンである。前記用語は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、および二重特異性抗体を含む。本明細書で用いられるように、抗体あるいは抗体分子は、そのままの免疫グロブリン分子と、当技術分野でFab、Fab'、F(ab')₂、F(v)、および遺伝子組換えにより作成したSfvとして知られるそれらの部分のような免疫グロブリン分子の中の免疫活性がある部分と、の両方を考慮する。

【0020】

抗体に関して、"免疫学的に特異的"という用語は、1つ以上の蛋白質エピトープあるいは対象化合物に結合する抗体を指すが、これは抗原性のある生物分子が混合したサンプル中では、実質的に他の分子を認識、結合することはない。

【0021】

"直接結合アッセイ"は、当技術分野で一般的に知られており、HarlowおよびLane(1988)の方法に従って行われる。一般に、直接結合アッセイとは、抗ペプチド抗体あるいはリガンドを含む抗血清を加え、ペプチドに結合させるアッセイを指す。その後、前記抗体あるいはリガンドの結合を直接標識によって検出するか、あるいは1次抗体あるいはリガンドに結合する2次標識抗体あるいはリガンドかによって検出する。

【0022】

"競合結合アッセイ"は、当技術分野で一般的に知られており、HarlowおよびLane(1988)の方法に従って行われる。一般に、競合結合アッセイとは、特定の抗体に対する既知の標識リガンドの結合を遮断する能力により、未知物質を検出、定量するアッセイを指す。

【0023】

本明細書で用いる"固体基質"という表現は、ろ紙、多孔ディッシュ、マイクロチップ、誘導体化した磁粉などを含むが、これだけに限らない。

【0024】

"タグ"、"タグ配列"、あるいは"蛋白質タグ"という用語は化学成分を指し、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、あるいはアミノ酸のいずれかであり、ペプチド、あるいは蛋白質などの化学物質であり、別の配列に加えた時に、特にその配列あるいは蛋白質の検出または単離にさらに有用性が加わるか、有用な特徴を与える。従って、例えば、プライマーあるいはプローブ配列に、ホモ重合体の核酸配列や、捕捉したオリゴヌクレオチドに相補的な核酸配列を加えることができ、その後、延長した生成物およびハイブリダイズした生成物が単離しやすくなる。蛋白質タグの場合は、ヒスチジン残基(連続した4~8個のヒスチジン残基)を蛋白質のN末端あるいはC末端に加えることができ、金属キレートクロマトグラフィーにより蛋白質が単離しやすくなる。代わりに、アミノ酸配列、ペプチド、蛋白質、エピトープを発現した融合パートナー、または特定の抗体や他の分子(例えば、フラグエピトープ、c-mycエピトープ、A型インフルエンザウイルスの赤血球凝集素蛋白質、プロテインA、セルロース結合ドメイン、カルモジュリン結合蛋白、マルトース結合蛋白、キチン結合蛋白、およびグルタチオンS-トランスフェラーゼなどの膜貫通型エピトープ)と反応する結合決定基をタンパク質に加えることができ、アフィニティークロマトグラフィーや免疫親和性クロマトグラフィーなどの方法で蛋白質が単離しやすくなる。化学タグ分子には、ビオチンなどの分子が含まれ、核酸あるいは蛋白質に加え、アビジン試薬などとの相互作用により単離、検出しやすくすることができる。他に多数のタグ成分が知られており、当業者によって想像することができるものである、この定義の範囲内であると考えられる。

【0025】

"N-3多価不飽和脂肪酸"は魚に発見され、特定部分の喘息患者集団では、摂取することによりメタコリンで誘導される呼吸困難を回復させることが分かった。

10

20

30

40

50

【0026】

"サンプル"あるいは"患者サンプル"あるいは"生物サンプル"は、一般に特定のロイコトリエンあるいはサイトカインプロフィールを検査することができるサンプルを指す。サンプルには、血液、血清、血漿、尿、唾液、痰、気管支洗浄液などが含まれるが、これだけに限らない。最も好ましくは、前記サンプルは、唾液、痰、血液、および/または血漿サンプルである。

【0027】

"肺機能検査"は、肺に取り込まれる空気の量と、それがどのくらい速く放出されるかを測定する検査である。肺機能検査は、肺機能に対する様々な疾患や成分の影響を決定するために、実施されることも多い。例えば、肺機能検査は喘息発作の性質を評価、モニターするために用いられ、また喘息発作に対する、ある薬剤に考えられる治療効果を測定するためにも用いることができる。そのような検査のガイドラインは、当技術分野で標準となっており、例えばThe American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine Vol 161:309-329, 2000などにみられ、図3で説明している。簡単に述べると、肺機能を変化させる薬剤を投与し、適当な時間、呼吸をモニターする。そのような薬剤には、メタコリン、ヒスチジン、マニトール、アデノシン、FELD(ネコのふけ)、チリダニアルゲン、および特定のアレルゲンが含まれるが、これだけに限らない。

【0028】

"メタコリン負荷"とは、メタコリンを投与し、肺機能を評価する肺機能検査の一種である。本明細書で述べる"メタコリン負荷"は、"従来のメタコリン負荷"あるいは「連続メタコリン負荷」である。典型的には、従来のメタコリン負荷では、図3に示したものと同様のプロトコルを用いる。従来のメタコリン負荷で用いるメタコリンの通常濃度および蓄積量は、0.025 mg/ml (0.125単位)、0.25 mg/ml (1.375単位)、2.5 mg/ml (13.875単位)、10 mg/ml (63.875単位)とすることができ、1単位はメタコリン1ミリグラムに相当する。典型的には、連続メタコリン負荷では、低用量のメタコリンを用いる。連続メタコリン負荷で考えられるメタコリンの濃度と蓄積量は、0.025 mg/ml (0.125単位)、0.25 mg/ml (1.375単位)、0.5 mg/ml (3.875単位)、1 mg/ml (8.875単位)、2 mg/ml (18.875単位)、2.5 mg/ml (31.375単位)、10 mg/ml (81.375単位)、25 mg/ml (206.375単位)である。連続メタコリン負荷では、メタコリンを単一用量とすることができる。この単一用量の負荷では、メタコリンの総量として15 mg/mlまたはそれ以下、あるいは8 mg/mlまたはそれ以下を投与する。

【0029】

I. ロイコトリエン特異的およびインターロイキン特異的な抗体の調整

本発明では、ロイコトリエンC₄、D₄、およびE₄と、インターロイキン4および16をと含む、ロイコトリエンおよびサイトカインに免疫特異的に結合できる抗体と、本発明の診断法に用いる顆粒球マクロファージコロニー刺激因子と、を提供する。前記分子を検出する抗体は、標準的なプロトコルに従った一般的な方法で調整したが、R & D Systems (ミネソタ州ミネアポリス)およびAssay Designs, Inc. (ミシガン州アナーバー)から市販されているものを購入することもできる。

【0030】

インターロイキン蛋白質あるいはロイコトリエンを含む、サイトカインに対する免疫特異的なポリクローナル抗体あるいはモノクローナル抗体は、喘息患者を評価するために分子を検出、定量するように設計された様々なアッセイで用いられる。そのようなアッセイには、(1)フローサイトメトリック分析、(2)唾液、痰、血液、気管支洗浄液、および血漿を含む、患者の体液中にあるサイトカインおよび/またはロイコトリエンの免疫化学的検出/特定、(3)様々な細胞抽出液の免疫プロット分析(例えば、ドットプロット、ウエスタンプロット)があるが、これだけに限らない。さらに、抗サイトカイン抗体あ

10

20

30

40

50

るいは抗ロイコトリエン抗体をサイトカイン、インターロイキン蛋白質、および関連するサブユニットの精製（アフィニティークラム精製、免疫沈降など）に用いることができる。

【0031】

II. 前記開示された方法を実施するためのキット

生物サンプル中のIL-4、IL-16、GM-CSF、インターロイキンC₄、D₄、およびE₄を含むロイコトリエンおよびサイトカインを検出しやすくするためのキットが提供される。サイトカインおよびインターロイキンを検出する典型的なアプローチは以下の通りである：

- a) 患者からのサンプル中のIL-4、IL-16、GM-CSF、およびインターロイキンの有無を決定し、あればその分子の発現レベルを決定する。または、
- b) これだけに限らないが、サイトカインおよび/またはインターロイキンに結合する抗体、あるいはその合成に参与する核酸およびハイブリッドを形成し、それを任意に増幅する核酸配列（mRNAなど）を含む、サイトカインあるいはインターロイキンを検出することができる、特定の結合分子を1かそれ以上用いる。サイトカインおよびインターロイキンは、IL-4、IL-16、IL-9、GM-CSF、ロイコトリエンC₄、ロイコトリエンD₄、およびロイコトリエンE₄、あるいはそれらの任意の組み合わせから成るグループから選択される。随意的に前記特定の結合分子が標識を有することで、前記特定の結合分子のその結合パートナーへの結合を検出できるようなる。

【0032】

"特定の結合ペア"は特定の結合分子（sbm）および結合パートナー（bp）を有し、互いに特定の特異性を持ち、通常の状態では、他の分子に優先して互いに結合する。特別な結合ペアの例は、抗原と抗体、リガンドと受容体、および相補的なヌクレオチド配列である。当業者であれば他にも多くの例を知っており、本明細書に記載される必要はない。さらに、"特定の結合ペア"という用語は、前記特定の結合分子および前記結合パートナーのいずれかあるいは両方が、高分子の一部を有する場合にも当てはまる。前記特定の結合ペアが核酸配列である実施例では、前記アッセイの条件下で互いにハイブリッド形成できる長さとし、好ましくは10ヌクレオチド長以上、より好ましくは15あるいは20ヌクレオチド長以上とする。

【0033】

DNAに基づく方法を利用し、サイトカインおよびロイコトリエン型喘息患者を識別する好適な実施例では、前記サンプル中の核酸が例えばPCRを使って最初に増幅され、前記サンプル中にある他の配列と比較される際、分析対象物の量が増加する。このため、標的配列がサンプル中にあれば、高い感度で検出することができる。しかし、この最初の工程は、当技術分野でますます重要になりつつある高感度の配列技術を利用することで、省略することもできる。

【0034】

さらに別の実施例では、本発明は、結合、精製、除去、定量、あるいは一般的に検出する生物成分のための免疫検出法を提供する。一般に、免疫結合法には、蛋白質あるいはペプチドを含むことが疑われるサンプルを入手し、場合によって、免疫複合体を形成させるのに効果的な条件下で、本発明に従って前記サンプルを抗体と接触させる方法を含む。

【0035】

前記免疫結合法には、サンプル中の反応を検出するか、あるいはその量を定量する方法が含まれ、この方法では、結合プロセス中に生成された免疫複合体を検出あるいは定量することが必要である。

【0036】

患者の唾液からのIL-4、IL-16、GM-CSF、あるいはロイコトリエンC₄/D₄/E₄の同時分析では、その患者がロイコトリエンC₄、D₄、あるいはE₄陽性であれば、ロイコトリエン型喘息患者と特定された。従って、C₄/D₄受容体拮抗薬であるアコレート（ザフィルルカスト）、シグレア（Sigulair）（モンテルカスト

10

20

30

40

50

)、ジフロ(ジロートン)などの薬剤、あるいは5リポキシゲナーゼ阻害薬および食物n-3脂肪酸がそのような患者に利益をもたらすと考えられる。IL-16、IL-4の発現レベルが上昇し、ロイコトリエンC₄の発現レベルが低いことが特定される場合、そのような患者は特定の新規IL-4受容体拮抗薬を投与することで利益を受けるが、基本的に前記ロイコトリエン型喘息に対する薬剤の投与では利益は得られない可能性が高い。そのような患者は中間反応者と呼ぶ。最後に、IL-16レベルが上昇し、IL-4レベルが中等度で、ロイコトリエンC₄レベルが低いことが観察された場合、そのような患者は無反応者と分類される。これらの喘息患者にはIL-16あるいはIL-4受容体拮抗薬を投与し、標準的なステロイド療法で利益を受ける可能性が最も高い。

【0037】

抗原の検出に関して、前記分析される生物サンプルは、サイトカイン(インターロイキンを含む)あるいはロイコトリエンを含むことが疑われるすべてのサンプルである。適切なサンプルとしては、唾液、痰、気管支洗浄液、単離細胞、細胞膜の標品、前記蛋白質含有組成物のいずれかを分離あるいは生成した形のもの、あるいは血液およびリンパ液を含む気道組織および接触する生物体液が含まれる。

【0038】

免疫複合体(1次免疫複合体)を形成させるのに有効な条件下および十分な時間の下で前記選択された前記生物サンプルを抗体と接触させることは、一般的に、単に前記組成物をサンプルに加え、抗体が存在する任意の抗原と免疫複合体を形成し、つまり結合するのに十分な時間の間、その混合液をインキュベートするという問題である。この後、通常は、組織切片、ELISAプレート、ドットプロット、あるいはウエスタンプロットの前記サンプルの抗体組成物を洗浄し、非特異的な結合抗体種を除去し、1次免疫複合体内に特異的に結合した抗体のみを検出できるようにする。

【0039】

一般的に、免疫複合体生成の検出は当技術分野において周知であり、多数のアプローチを応用することで達成可能である。これらの方法は一般的に、放射性、蛍光性、生物学的、あるいは当技術分野で標準的に利用される酵素的なタグあるいは標識、そのような標識あるいはマーカーの検出に基づいている。そのような標識の利用に関する米国特許は、米国特許第3,817,837号、第3,850,752号、第3,939,350号、第3,996,345号、第4,277,437号、第4,275,149号、第4,366,241号などであり、それぞれ本明細書の参考文献に盛り込まれている。当然、2次抗体など、2次的に結合するリガンドを用いてさらなる利点に気付くかもしれない。前記2次抗体は、任意に色標識あるいはラテックス標識とすることができる。代わりに、ビオチン/アビジンリガンド結合配列を用いてもよい。これらの標識法および検出法は、すべて当技術分野で既知である。

【0040】

本発明の免疫検出法は、喘息の診断および特性指摘において、明らかに有用である。ここで、サイトカイン(インターロイキンを含む)あるいはロイコトリエンのいずれかが含まれると疑われた、生物あるいは臨床サンプルが用いられる。

【0041】

1つの広いの捉え方では、本発明は、生物サンプル中のインターロイキンを含むサイトカインのレベルおよびロイコトリエンの発現レベルを検出するために用いるキットを含む。そのようなキットは、IL-4、IL-16、およびGM-CSF遺伝子に対応する核酸を増幅するためのプライマーを1対若しくはそれ以上有する。前記キットはまた、緩衝液、ヌクレオチド塩基、およびハイブリッド形成および/または増幅反応に用いるその他の組成物を有する。各溶液あるいは組成物はバイアル瓶あるいは瓶に入れることができ、すべてのバイアル瓶は市販用箱に密に詰めておくことができる。本発明の別の実施例では、生物標本中のIL-4、IL-16、GM-CSF、およびロイコトリエン抗原の検出に用いるキットを含む。そのようなキットは、IL-4、IL-16、GM-CSF、およびロイコトリエンに免疫学的に特異的な抗原あるいは抗体のフラグメントと、および

10

20

30

40

50

これらの分子を含む免疫複合体の形成を評価する方法とを有する。

【0042】

以下の例は、本発明の実施例を説明するために示すものであって、決して本発明を限定する意図はない。

【0043】

例 1

以下の資料と方法は、例 1 の実行を実施しやすくするために提供されている。

【0044】

被験者

メタコリンに対して非特異的な気管支反応を示し、1 秒間努力呼気容量 (FEV₁) が 70% 以上と予測された、喫煙しないアトピー体質の喘息患者 34 名、および喫煙しない非喘息の健常対照被験者 17 名をワイオミング州ラミー地区から募集した。全体的な健康状態、血圧に作用する薬剤の使用、喘息およびエイコサノイド合成、および魚 (または魚油) の消費について、被験者を審査した。どの量においても魚油サプリメントを摂取していた被験者候補、あるいは魚の摂取パターンが 1 食/週以上の被験者候補は選択しなかった。出血障害があるか、血液凝固時間が遅延した既往のある患者は、この研究では考察しなかった。喘息被験者は、サルブタモール、ステロイドなどの吸入剤、およびテオフィリンの経口摂取のような様々な治療を受けていた。試験開始前の 6 週間の間に、上気道感染あるいは喘息の悪化がみられた被験者はいなかった。前記研究中、非ステロイド性抗炎症薬は使用できないようにした。前記研究は、ワイオミング大学 (University of Wyoming) のヒト被験者審査委員会の承認を受け、研究デザインおよび予想を注意深く説明した後、すべての参加者からインフォームドコンセントを得た。喘息被験者 29 名および対照被験者 15 名が研究を終了した。

【0045】

参加者全員について 7 日間の食事記録を調査し、通常の (n - 6) PUFA 摂取を決定した。前記研究中、3 日間の食事分析を 1 回ランダムに実施し、食事パターンおよび (n - 6) PUFA 摂取の変化をモニターした。被験者は 1 カ月の研究に参加し、(n - 3) : (n - 6) 比率が 2 における、呼吸パラメータ、尿代謝物、および免疫細胞の生成物プロフィールでの (n - 3) PUFA の効果を検討した。前記療法は、(n - 3) : (n - 6) PUFA 比率を 1 : 2 とした 1 カ月の補充療法から成る。魚油の投与は、それぞれの被験者で個別に行い、3 日間のランダムに行った食事記録分析を基に試験中必要であれば変更した。カプセル入り魚油は、Shaklee Corporation (カリフォルニア州ハイワード) から、惜しみなく寄付された。被験者には、研究週の始めごとに、適当な数の魚油カプセルを 1 日の割り当てに分けたものを与えた。

【0046】

ベースラインのサンプルとするため、前記研究直前の 2 日前に 24 時間の尿サンプルを不透明なビンに 2 回収集した。サンプルはギ酸で最終濃度が 3 mM となるまで酸性とし、最終濃度が 10% になるまでメタノールで希釈した。研究直前にベースラインの値とするため、FVC、太い気道の許容量を評価する FEV₁、中間の気道の許容量を評価する PEF、および細い気道を評価する FEF_{2.5-7.5} の値を得た。4 週間の魚油補充療法の期間中、各週の最終日に 24 時間の尿標本を入手して、考えられるエイコサノイド代謝の連続的变化をモニターし、食事のコンプライアンスをモニターした。ベースラインと治療中の尿量を測定した後、200 ml 単位で LT を抽出し、その後の分析用に -80 で冷凍した。

【0047】

研究プロトコール

ベースライン時および 4 週間の治療期間後、患者は治験に参加している医師の診察室に行き、メタコリン (Provocholine, Roche Laboratories, ニュージャージー州ナットレー) 負荷後の FVC、FEV₁、FEF_{2.5-7.5}、および PEF を決定することで、呼吸状態を評価した。Salter Lab シリーズ 890

0ネブライザ (Salter Labs、カリフォルニア州アルビン) を用い、流速 7 ~ 8 L/min、投与合計量が 0、0.125、1.375、13.88、63.88 累積単位となるように、連続した濃度で連続 5 回吸入することで、メタコリンを投与した。すべての呼吸パラメータは 5 分以内に決定した。ベースラインの食塩水 (NaCl 0.9% + フェノール 0.4%、pH 7.0) 溶液と比較して FEV₁ が 20% 若しくはそれ以上低下した場合、または 63.88 累積単位を投与した場合は、前記治療を中止した。FEV₁ が 15% ~ 19% 低下した場合、累積単位が 63.88 を越えないところまで、その濃度あるいは次に高い濃度で負荷を繰り返した。メタコリン負荷時の FVC、FEV₁、FEF_{2.5-7.5}、および PEF の値は、Brentwood 2000 スパイロメーター (Brentwood) を使用し、前記主治医が入手した。前記被験者の半数からメタコリン負荷時に痰を採取し、分析まで -70 で保存した。

【0048】

ロイコトリエンの分析

採取したばかりの酸性化尿 200 ml からおよび以下に説明する細胞培養液 2 ml からロイコトリエンを抽出した。プロスタグランジン B₁ (PGB₁) 100 ng をその 200 ml 単位に加え、内部標準として用いた。メタノール 10 ml、水 5 ml、ヘキサン 5 ml で順次、予洗した C18 カートリッジ (Supelclean LC-18, Supelco, Inc., ペンシルバニア州ベルフォンテ) から固相抽出によりロイコトリエンを、単離した。サンプルをカートリッジに載せた後、カートリッジをメタノール/水 10 ml (1:9、v/v)、水 10 ml、ヘキサン 5 ml で順次洗浄し、その後メタノール 2 ml で LT を溶出した。溶出した後、その後の分析に用いるため、LT の抽出液を -80 でメタノール中に保存した。分析では、サンプルを窒素雰囲気下で蒸発乾燥させ、得られた残留物を 5 mM の酢酸アンモニウムと 1 mM EDTA を含むメタノール: 水 (65:35、v/v)、pH 4.68 の HPLC 溶媒システムに再溶解した。すべてのサンプルは 2 回分析し、平均を統計分析に用いた。前記ロイコトリエンは、Partisphere C-18 カラム (6 mm x 12.5 cm、Whatman、オレゴン州ヒルズバロ) の流速 1.0 ml/min で逆相高圧液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) によって分離し、Hewlett-Packard 10409A Diode Array 分光光時計 (Hewlett-Packard、ニューヨーク州リバプール) を使って 280 nm でモニタリングすることによって定量した。すべてのロイコトリエンを、それぞれ特有の UV 吸収スペクトルおよび既知の標準との保持時間の比較によって、特定した。ロイコトリエンは、標準物質の吸光係数を用い、内部 PGB₁ 標準に対して定量した (Orning et al., Eur. J. Biochem., Vol. 120, pages 44-45, 1981)。ロイコトリエン E₄、E₅、および N-アセチル LTE₄ (N-ac-LTE₄) は Caymen Chemical (ミシガン州アナーバー) から購入した。

【0049】

細胞培養

研究開始時および (n=3) 脂肪酸の摂取期間後、抗凝固薬としてヘパリンを用い、各被験者から 21 ml の静脈全血を単離した。免疫細胞 (1 次末梢単球) をフィコール (ficoll) の濃度勾配をつけて単離し、RPMI + 10% ウシ胎児血清 (FBS) 緩衝液中、 2×10^6 cells/ml で培養した。フィットヘマグルチニン (PHA) あるいはリボポリサッカライド (LPS) で 48 時間細胞を刺激し、サイトカイン酸性を誘導するか、A23187 で 4 時間刺激し、ロイコトリエン合成を刺激した。ロイコトリエンは上述のとおり分析した。以下の会社から購入したキットを用いて、ELISA アッセイによって、サイトカイン、INF-、IL-3、IL-4、IL-5、IL-8、IL-10、IL-13、および IL-16 を分析した。INF-、IL-10、および IL-13 は Research Diagnostics, Inc., ニュージャージー州フランダーズ、IL-4 および IL-5 は Assay Designs, Inc., ミシガン州アナーバー、IL-3、IL-8、および IL-16 は Biosource Inte

ernational、カリフォルニア州カマリロからそれぞれ購入した。ELISAアッセイはサンドイッチ法とした。最初に検討するサイトカイン抗体は、インキュベーションによりマイクロタイタープレートに結合する。次に前記サンプルをウェルに加え、インキュベートして抗原-抗体複合体を形成させる。次に前記ウェルを3回洗い、西洋わさびペルオキシダーゼと結合した2次抗体とインキュベートする。さらに3回洗浄後、前記ウェルに過酸化水素とTMBあるいは別の基質をインキュベートし、色を展開する。このアッセイで色が展開されたものを用い、サイトカインの有無を評価し、色の展開度により生合成レベルを定量する。

【0050】

統計

各アッセイの複製数は、その検出力を統計的に分析して決定し、治療間の生理学的に有意な違いを検出した。前記デザインで用いた分散の推定値は、これまでの実験から計算している。例えば、食事により15%低下した場合に、尿中のロイコトリエンレベルに重要な差があると判断した。排泄された総LTを測定する方法の違い、各メタコリン投与量でのFVC、FEV₁、FEF₂₅₋₇₅、およびPEFの減少、これらのパラメータそれぞれのPD₂₀をANOVAで評価した。統計分析は、すべてSAS(Statistical Analysis Systems Institute, Inc.、ノースカロライナ州カリー)により行った。全体的に差が検出された時は、DuncanのPLSD法(Duncan's protected least significant difference test)を利用し、特定の治療の差を評価した。有意とはP<0.05とした。値は平均+SEMの表記で表し、他に記載がない限り、反応症例は一般的にn=17、無反応症例はn=12、喘息のない対照ではn=15とした。

10

20

【0051】

結果

メタコリン気管支誘発試験中の肺機能検査

(n-3):(n-6)PUFA比率1:2で(n-3)PUFAを摂取した場合、総サンプル集団の呼吸パラメータは、本質的にベースラインの反応と比較して変化がなかった。これらのデータを検討すると、終了した参加者(反応者)17名では呼吸能が実際に改善し、無反応の喘息被験者12名では変化がなかったことが明らかとなった。肺に関する結果をさらに検討すると、(n-3)PUFA摂取による反応者のグループの変化は、15名の被験者で顕著な呼吸器系の改善、2名の被験者で呼吸機能のわずかな改善のみであった。さらに、無反応者をより綿密に精査すると、他の7名でみられた呼吸困難の程度と同様ではなかった無反応者が5名おり、一緒に平均を取ると、すべての喘息患者でみられる平均に近かった。これら後者の無反応者5名、および完全に呼吸器系の利益が得られなかった前述の反応者2名をここで「中間群」と呼ぶグループにひとまとめにした。反応者のデータを別にまとめると、メタコリン負荷を増強することで、メタコリン63.88単位でさえも、事実上、呼吸器パラメータの低下はない。前記中間群はメタコリンの蓄積量13.88単位を達成することができたが、無反応者群としては、通常メタコリンの蓄積量13.88を超えて継続することはできず、メタコリン1.375単位で呼吸困難の悪化が示され、これはメタコリンを13.88単位に増量すると悪化した。

30

40

【0052】

ロイコトリエンの定量

ベースラインと比較し、反応者の4シリーズLTの平均尿中排泄量は低下したが、LTE₅排泄は(n-3)PUFAの摂取に応じて増加した。逆に、無反応者の4シリーズLTの尿中排泄量は軽度には低下しなかったが、LTE₅の排泄量は有意に増加した。痰のLTは明らかであったが、反応者と無反応者を比較すると、顕著に異なる合成パターンを示していた。

【0053】

サイトカインのプロフィール

サイトカインのプロフィールは有意に異なる症例もあり、非常にわずかしき差がない症

50

例もあった。特に、(n-3) P U F A 摂取に応じて培養した免疫細胞では、P H A 細胞の刺激に応じて、喘息反応者と中間群で I L - 3、I L - 8、I L - 10、I L - 13 に変化がないか、わずかな増加が示され、無反応の参加者ではわずかな低下が示された。L P S 刺激に応じて、無反応の集団では I L - 3 が変化しなかったが、反応した集団では、(n-3) P U F A 摂取に応じて顕著な増加が示された。同時に、P H A 刺激後に (n-3) P U F A を摂取した後、I L - 5 の産生は反応者で急速に増加することが示された。I L - 10 は、P H A の刺激に応じて (n-3) P U F A 摂取後に変化がないか、増加したが、L P S を刺激すると、3 群すべてで I L - 10 の産生が有意に低下した。P H A あるいは L P S で細胞を刺激した場合、I N F - は (n-3) P U F A の摂取に応じて無反応者で減少した。逆に、P H A あるいは L P S で細胞を刺激した場合、(n-3) P U F A の摂取後、I N F - は反応者といわゆる中間群でいずれも増加した。I L - 4 合成は (n-3) P U F A 摂取によりすべての群で低下したが、P H A あるいは L P S で刺激後、I L - 16 は無反応者で低下し、反応者で増加した。中間群では、L P S 刺激細胞で (n-3) P U F A 摂取後、I L - 16 が 9 倍低下したが、P H A 刺激細胞では事実上、変化はなかった。

10

【0054】

(n-3) P U F A 摂取に対する反応よりも重要であったのは、P H A あるいは L P S による細胞刺激後の様々なサイトカイン産生の違いであった。(n-3) P U F A を摂取した場合、I N F - 、I L - 3、I L - 8、I L - 10、および I L - 13 はばらつき、一部の症例では、非喘息対照群でかなり異なったが、ベースラインで (n-3) P U F A を摂取した場合に反応した喘息患者および無反応の喘息患者では、これらの代謝物の差は有意に異なっていた。これらのサイトカインが異なる場合は、(n-3) P U F A の摂取に応じており、L P S 刺激時の I L - 3、あるいは P H A 刺激時の I L - 10 でも同様であった。しかし、これらの5つのサイトカインとは異なり、I L - 4、-5、-16 は、ベースラインでの検査時と (n-3) P U F A 摂取時のいずれもかなり変化した。より重要なことに、反応者と比較すると、ベースラインでの I L - 4 は無反応の喘息で 1.25 倍高かったが、事実上、(n-3) P U F A 摂取後の反応者と同等であった。しかし、中間群はベースライン時に反応者よりも 2.2 倍高い I L - 4 レベルを示し、これは (n-3) P U F A を摂取することで 2.7 倍高く上昇した。I L - 5 はベースライン時に反応した喘息患者で 1.3 倍高く、2.2 倍まで増加したが、これは (n-3) P U F A を摂取した場合、無反応の喘息患者でもみられた。中間群は無反応者と比べ、さらに大きな違いが示され、ベースラインで 2 倍、(n-3) P U F A 摂取で 2.3 倍高かった。細胞刺激に反応した I L - 16 合成は、ベースライン時で反応した喘息患者と比べ、無反応の喘息患者で 7.4 倍高く、中間の喘息患者で 8.6 倍高かった。(n-3) P U F A が消費された場合、反応者の I L - 16 放出が中間群で見られる量よりも 3.3 倍、無反応者で見られる量よりも 1.4 倍高くなる程度まで、I L - 16 の放出は中間群と無反応者で有意に減少し、反応者で増加した。

20

30

【0055】

前記喘息患者の痰はこれと同程度のばらつきを示し、I L - 4 および I L - 16 の産生ではさらに大きな差が示された。前記無反応の喘息患者の痰には、前記反応した喘息患者で見られる量よりも、それぞれ I L - 16 が 6.4 倍、I L - 4 が 11 倍多く含まれていた。

40

【0056】

考察

魚油にみられる (n-3) 多価不飽和脂肪酸 (P U F A) を摂取することで、特定のタイプの喘息患者で呼吸障害の回復に関連する上述の違いを持つ患者において、L T 酸性パターンが顕著に変化する。現在、(n-3) P U F A は、喘息の管理を助ける重要な食事療法になると考えられている。前記スルフィドペプチドロイコトリエン (S P - L T) は、皮膚 (乾癬) (Brain, et al., J. Invest. Dermatol., Vol. 83, pages 70-73, 1984)、肺 (アレルギー性喘息) (Cha 50

narin, Drugs, Vol. 47, pages 12-24, 1994)、関節(関節リウマチ)(Kremerら, Arth. Rheum, Vol. 33, pages 810-820, 1990)、および心臓(心筋梗塞)(Brainら, Pharmacol. Ther., Vol. 46, pages 57-66, 1990)の炎症性疾患と結びつけられてきた。最近の魚あるいは魚製品の消費を増やすようにという奨励は、(n-3)PUFAが食事中の(植物油にみられる)(n-6)PUFAと食事の比率1:5~1:2.5で存在する時、病態生理学的に宿主となるリスクを低下させ得るエイコサノイドの全体的な産生を低下させる、と示した研究が発端となっている。

【0057】

事前研究において、我々は、(n-3)PUFA:(n-6)PUFAの比率1:2の魚油の食事サプリメントが、検討した患者の40%以上で喘息症状を軽減させることを見出した。この研究では、これらの所見が確認され、喘息患者集団の50%近くに、(n-3)PUFAの摂取によって利益がもたらされる可能性があることが示されている。さらに、魚油の平均有効量は、EPAおよびDHAが1日約3.3gであることが示された。

【0058】

DHAとEPAを1年間1g/日摂取することで、アレルギー性喘息患者のFEV₁値を有益に変化させることが事前に報告されていた(Dryら, Int Arch Allergy Appl Immunol, Vol. 95, pages 156-157, 1991)。1日5.4gのEPAおよびDHAを10週間使用した同様の研究では、ヒスタミン負荷後の全被験者集団において、いかなる作用も示されなかった。しかし、11名中6名の被験者は、軽度の呼吸器改善を示した。その後の研究(Armら, Am Rev Respir Dis, Vol. 139, pages 1395-1400, 1989)では、max-EPA(オメガ-3生成物)として(n-3)PUFAを消費した被験者は、ヒスタミン負荷後、すぐに呼吸器系の改善を示さなかったが、回復期に有意な改善を示した。これらの所見は、今回のデータと併せて考察すると、十分長期にわたり、あるいは十分高濃度で消費した場合、喘息患者の集団の一部で(n-3)PUFAが喘息パラメータの改善に有益である可能性が示されている。

【0059】

前記サイトカインに関するデータは、場合によって、つまりIL-3およびIL-10では、(n-3)PUFAの摂取に応じて細胞刺激後のプロファイルが有意に変化し、IL-8、IL-13、およびINF- γ ではほとんど変化しない可能性を示していた。しかし、無反応の喘息患者、中間の喘息患者、反応した喘息患者の間には、IL-4、-5、および-16産生に基本的な有意差があり、無反応者は、反応者にみられるよりもIL-4および-16レベルが有意に高く、IL-5レベルが低いことを示している。逆に、中間群の喘息患者では、(n-3)PUFAを摂取していない場合に反応者よりもIL-4、-5、および-16のレベルが有意に高く、(n-3)PUFA摂取後はIL-5レベルが同等で、IL-16レベルが低かった。反応を示した喘息患者では、喘息反応の誘発を大きくロイコトリエンに依存しているようにみえたが、無反応および中間群の喘息患者は、(n-3)PUFAを摂取することで、IL-16と関連すると考えられる利益を示し、その喘息反応は、あまりロイコトリエンに依存していないように見える。この所見は、なぜLT受容体拮抗薬およびLTの生合成を遮断する薬剤のみが、喘息患者、つまりロイコトリエン型喘息患者の約半数で利益があるように見えるのかを、一部説明していると考えられる。喘息患者集団の残りの半数は、むしろサイトカイン型喘息と考えられ、これらの結果を基に、IL-4あるいはIL-16、またはその両方の産生増加によって生じている可能性がある。これらの結果と、喘息患者の痰中に喘息前にサイトカインおよびロイコトリエンがあるか否かとに基づき、痰や別の体液に存在する違いを利用し、喘息タイプとデザインのタイプ間で特異的に治療方法を区別することができる。従って、前記治療方法には、ザフィルルカスト、モンテルカストなどのLT C₄、LT D₄、およびLT E₄結合を遮断する薬剤、あるいはジロートン、つまりLT型喘息患者でLT合成を司る5リボキシゲナーゼの阻害薬を投与することなどが可能性としてあげられる。IL-4あ

るいはIL-16受容体拮抗薬は、サイトカイン型喘息の治療に投与することができる。現在のところ、検討されているIL-4拮抗薬はあるが、IL-16拮抗薬は文献で特定されていない。IL-16が関与した症例では、IL-16拮抗薬が開発されるまで、患者を標準的なステロイド療法で治療することになる。

【0060】

反応者で報告された呼吸器パラメータの有益な変化は、主に、5シリーズSP-LT産生の全体的な増加に起因している可能性が高い。5シリーズ：4シリーズの比率が1を超えるまで、5シリーズLTの増加が4シリーズLTの合成減少と関連しているLT生合成に必要なシフトは、メタコリン負荷に対する反応改善を媒介するために重要であると思われる。さらに、無反応者の(n-3)PUFA摂取が無効であることは、4シリーズLTの合成低下よりも5シリーズLT産生の増加がないことによるものと考えられる。異なるタイプの喘息患者で、LTおよびサイトカインプロファイルのいずれにも有意な差があるということは、反応者および無反応者の喘息患者にある違いを説明する上で、新規且つ重要である。モルモットの回腸では、5シリーズLTが生物学的にあまり強力ではないことが示され(Hammarstrom, J. Biol. Chem, Vol. 255, pages 7093-7094, 1980)、SP-LTの放出が亢進している間、エイコサペンタエン酸が、モルモットの肺の実質片でアナフィラキシー性のシクロオキシゲナーゼ産物の放出を抑制することが示されたため(Simmetら, Arch. Pharm, Vol. 335, pages 652-659, 1987)、反応者における(n-3)PUFAの摂取と関連した呼吸器系の利益は、5シリーズLTが喘息反応を誘発できないことと関連しているか、4シリーズLT受容体における5シリーズLTの競合阻害によるものである可能性がある。無反応者では、(n-3)PUFA摂取の効果がないことが、サイトカイン型喘息反応か、ロイコトリエンで誘導される喘息反応かの有無に寄与しているかもしれない。

10

20

【0061】

要約すれば、軽度の呼吸問題を軽減するため、ロイコトリエン型喘息では、食事に(n-3)PUFA源、つまり魚や魚油を取り入れることができれば、薬理的介入は必要ないと考えられる。しかし、これでも改善しない場合は、この喘息患者群はロイコトリエン合成を阻害するか、ロイコトリエンの結合を遮断する薬剤に頼る必要があるかもしれない。その他の喘息患者では、特別な治療薬が開発されるまで、新たにIL-4療法を行うかステロイド療法を継続することが、この喘息を治療する唯一の手段と考えられる。

30

【0062】

例2

異なるタイプの喘息患者が様々なサイトカインおよびロイコトリエンプロファイルを示すことを確認するため、また、さらにサイトカイン型喘息のサブカテゴリーを分類するため、以下の実験を行った。

【0063】

材料および方法：

まず、従来メタコリン負荷を行った。肺機能検査に用いるメタコリンの通常濃度および蓄積量(括弧内)は、0.025mg/ml(0.125単位)、0.25mg/ml(1.375単位)、2.5mg/ml(13.875単位)、10mg/ml(63.875単位)とし、ここで1単位はメタコリン1ミリグラムに相当する。メタコリン負荷の直後に、被験者から痰を回収し、ロイコトリエン、IL-4、およびIL-16のレベルをアッセイした。

40

【0064】

結果：

プロファイルは、前記サイトカインレベルによって評価した。これらの実験結果およびその後の喘息タイプの決定は、表1にまとめている。

【0065】

【表 1 - 1】

Table I:

従来のメタコリン負荷に反応した、
患者の痰中ロイコトリエンおよびサイトカインプロフィール

#	タイプ	被験者	サイトカイン		ロイコトリエン
			IL-16	IL-4	
1	無反応者	1-1	359.500	44.5	137.3
2	無反応者	18-1	291.667	39	223.0
3	無反応者	33-1	280.500	35.75	85.5
4	無反応者	52-1	281.000	47.1	37.9
5	無反応者	53-1	357.500	9.6	16.7
6	無反応者	55-1	361.667	113.1	729.0
7	無反応者	56-1	302.000	1.8	173.8
		average	319.119	41.550	200.439
		*average			112.346
8	中間反応者	24-1	1006.667		151.6
9	中間反応者	47-1	931.667	9.6	202.3
10	中間反応者	49-1	906.667	29.4	93.6
11	中間反応者	51-1	611.667	128.75	16.5
12	中間反応者	54-1	1220.000	21.9	0.0
		平均	935.333	47.413	92.790

10

20

【0066】

【表 1 - 2】

13	反応者	13-1	32.000	1.2333	272.7
14	反応者	15-1	30.750	0	208.6
15	反応者	20-1	95.833	4.8	260.1
16	反応者	21-1	130.000	6.2	564.3
17	反応者	32-1	119.167	2.75	302.6
18	反応者	34-1	89.000	1.9	115.7
19	反応者	44-1	173.000	0	498.6
20	反応者	46-1	121.000	0	265.1
21	反応者	48-1	83.000	20.7	486.1
22	反応者	50-1	72.500	0	232.4
		平均	94.625	3.758	320.603

30

40

【0067】

従来のメタコリン負荷に反応して高いロイコトリエンレベルを示した患者は、ロイコトリエン型喘息と命名する。メタコリン負荷に反応して、痰中のロイコトリエン産生が低いあるいはない場合は、喘息患者をサイトカイン型喘息と特定した。血漿IL-4およびI

50

L - 16 プロフィールを用い、被験者が主に I L - 4 型喘息あるいは I L - 16 型喘息のどちらかを特定した。

【0068】

考察：

これらの実験の結果は、ロイコトリエン型喘息患者とサイトカイン型喘息患者を区別し、サイトカイン型喘息患者は異なるサブグループにさらに分類することが可能であることを示している。そのような決定によって、特定の目標とする喘息治療に有益な情報が得られる。

【0069】

例3

本実施例では2つの目的が達成された。まずは、連続的なメタコリン負荷プロトコールが開発された。このプロトコールでは、最小レベルのメタコリンを利用しており、肺機能検査で喘息反応を誘発する。第2に、様々な時間で様々な体液のサイトカインおよびロイコトリエンレベルを検査し、どの体液およびアッセイプロトコールが喘息サブタイプの決定に最も効果的であるかを決定した。

【0070】

まず、これらの異なる喘息サブタイプを識別するために必要なメタコリンの最小レベルを決定するため、試験を実施した。様々な用量のメタコリンを投与し、喘息発作を誘導し、測定可能なロイコトリエンおよび/またはサイトカイン(インターロイキン-4 (I L - 4)、I L - 16、あるいは顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(G M - C S F))のレベルを示す最小量を決定した。メタコリン負荷の直後、および4~6時間後に、様々な体液サンプルを採取した。これらのサンプルは、以下に示すとおり、ロイコトリエンおよびサイトカインのレベルを測定した。

【0071】

材料および方法：

メタコリン試験

典型的に肺機能検査に用いられるメタコリンの通常濃度および蓄積量(括弧内)は、0.025 mg/ml (0.125 単位)、0.25 mg/ml (1.375 単位)、2.5 mg/ml (13.875 単位)、および10 mg/ml (63.875 単位)であり、ここで1単位はメタコリン1ミリグラムに相当し、さらに連続的なメタコリン量を検討した。典型的には、多くの喘息患者が低い累積量の範囲で喘息反応を示すため、前記即時のプロトコールで、より低い、連続的なメタコリンの用量を検討した。この修正した検査では、次のメタコリン濃度と蓄積量を検討し、それは、0.025 mg/ml (0.125 単位)、0.25 mg/ml (1.375 単位)、0.5 mg/ml (3.875 単位)、1 mg/ml (8.875 単位)、2 mg/ml (18.875 単位)、2.5 mg/ml (31.375 単位)、10 mg/ml (81.375 単位)、25 mg/ml (206.375 単位)であった。

【0072】

ロイコトリエンおよびサイトカインの測定

メタコリンを投与するごとに、参加者は5 mlの蒸留水で口をすすいで、唾液を回収し、内容物を事前にラベルした保存容器に喀出するように依頼した。このサンプルは、ロイコトリエンを保持するC-18カートリッジを用いて濃縮した。ロイコトリエンはE L I S A アッセイにより、分離、測定した。次に、異なるメタコリンの検査レベルで分離した複数の唾液サンプルを基に、喘息患者を主にロイコトリエン陽性であるか、ロイコトリエン陰性であるかを定義し、これまで反応者として知られていたロイコトリエン型喘息患者か、あるいはこれまで無反応者あるいは中間喘息患者として知られた非ロイコトリエン型喘息患者かを定義した。唾液が使用に適した体液ではない場合、痰を利用するために必要であれば、等張食塩水を使用し、ネブライザを使用して複数回吸入することで痰を分離し、ロイコトリエンのレベルを決定した。肺機能検査と唾液および痰の分離後4、5、および6時間に、被験者は代謝検査室に戻り、E D T A を用いた静脈穿刺(venapunc

10

20

30

40

50

ture)で5mlの全血を単離した。分画遠心分離で血漿を分離し、血漿IL-4、IL-16、GM-CSFレベルをELISAによって確認した。このアッセイでは血漿を用いたが、全血を用いることもできる。全血を利用する場合は、血液サンプルの分離中に抗凝固剤を含めることが好ましい。メタコリン負荷後4、5、および6時間で採血した血液サンプルを検討し、ピークはどれかを決定することで、血漿サイトカインプロファイルを決定した。

【0073】

結果：

メタコリン負荷に反応して患者が高いロイコトリエンレベルを示した場合、この患者はロイコトリエン型喘息と判断した。メタコリン負荷に反応して、唾液中のロイコトリエン産生が低いあるいはない場合は、喘息患者をサイトカイン型喘息と特定した。次に血漿および唾液の血漿IL-4およびIL-16プロファイルと、痰のGM-CSFプロファイルとを用いて、被験者を主にIL-4型喘息、IL-16型喘息、またはGM-CSF型喘息のいずれかに特定した。

10

【0074】

表2は、ロイコトリエン反応を誘導するために投与した、特定のメタコリン用量を示している。表3-5は、測定したサイトカインおよび測定した体液を示している。

【0075】

【表2】

20

Table II:

ロイコトリエン反応を誘導できるメタコリンの用量
メタコリンの累積量 (単位)

	被験者	0.125	1.370	3.875	8.875	18.875	31.38	81.38	206.38	Cum.
LK	1	陽性	陽性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陽性	陽性
LK	2	陰性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	0	0	陽性
LK	3	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	0	0	0	陰性
LK	4	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陰性	0	陽性
LK	5	陽性	N/A	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
LK	6	陰性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	0	0	陽性
LK	7	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陽性	陰性		陰性
LK	8	陰性	陰性	陰性	陰性	陽性	陽性	陰性	0	陰性
LK	9	陰性	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陽性	陰性
LK	10	陰性	陰性	陰性	0	0	0	0	0	陰性
LK	11	陰性	陰性	陽性	陰性	陰性	0	0	0	陰性

30

【0076】

N/A - 試験結果が明確に陰性でも陽性でもなかったことを示す。「0」は、反応が決定的であるか、低用量で反応がなかったため、試験が行われなかったことを示す。

【0077】

【表 3 - 1】

Table III:

連続的なメタコリン負荷に応じた I L - 4 レベル

	被験者		血漿	合計
IL 4	1		0.00	0.00
IL 4	2		73.75	73.75
IL 4	3		71.25	71.25
IL 4	4		15.60	15.60
IL 4	5		15.60	15.60
IL 4	6		42.00	42.00
IL 4	7		12.60	12.60

10

【0078】

【表 3 - 2】

IL 4	8		61.25	61.25
IL 4	9		78.75	78.75
IL 4	10		42.00	42.00
IL 4	11		0.00	0.00

20

【0079】

【表 4】

Table IV:

連続的なメタコリン負荷に応じた I L - 16 レベル

	被験者	痰	血漿	合計
IL 16	1	23.50	7.70	31.20
IL 16	2	57.00	29.00	86.00
IL 16	3	51.00	103.00	154.00
IL 16	4	24.50	63.00	87.50
IL 16	5	10.40	47.00	57.40
IL 16	6	29.00	26.00	55.00
IL 16	7	138.00	68.00	206.00
IL 16	8	143.00	55.50	198.50
IL 16	9	18.50	59.00	77.50
IL 16	10	105.50	70.50	176.00
IL 16	11	78.00	88.00	166.00

30

40

【0080】

【表 5】

Table V

連続的なメタコリン負荷に応じたGM-CSFレベル

	被験者		唾液	痰	血漿	合計
GM-CSF	1		0	0	17.4	17.4
GM-CSF	2		0	0	5.2	5.2
GM-CSF	3		0	0	0	0
GM-CSF	4		0	0	0	0
GM-CSF	5		0	0	13.5	13.5
GM-CSF	6		0	9	0	9
GM-CSF	7		0	0	6.5	6.5
GM-CSF	8		0	16.5	0	16.5
GM-CSF	9		16.5	12.3	17.4	46.2
GM-CSF	10		0	0	0	0
GM-CSF	11		0	0	16.8	16.8

10

【0081】

この検査では、反応者、中間反応者、無反応者が特有のサイトカインおよびロイコトリ
 エンプロフィールを示し、これにより特定の喘息の診断を決定することができ、従って、
 最も効果的な治療プロトコルを選択することができる。

【0082】

表6は、前記研究から得られた様々な患者プロフィールを示している。

【0083】

【表 6 - 1】

試験	被験者	痰	血漿	合計	M-	M-	M-	タイプ	R/Nm/N
					31.38	81.38	206.38		
IL4	1	0	0	0					
IL16	1	23.5	7.7	31.2					
LK	1				Neg	陽性	陽性	LT	反応
GM-CSF	1	0	17.4	17.4					
IL4	2	0	0	73.75					
IL16	2	57	29	86					
LK	2				陽性	0	0	LT	反応
GM-CSF	2	0	5.2	5.2					
IL4	3	0	0	71.25					
IL16	3	51	103	154					
LK	3				0	0	0	IL-4	無反応
GM-CSF	3	0	0	0					
IL4	4	0	0	15.6					
IL16	4	24.5	63	87.5					
LK	4				陽性	Neg	0	LT	反応
GM-CSF	4	0	0	0					
IL4	5	0	0	15.6					
IL16	5	10.4	47	57.4					
LK	5				陽性	陽性	陽性	LT	反応
GM-CSF	5	0	13.5	13.5					
IL4	6	0	0	42					
IL16	6	29	26	55					
LK	6				陽性	0	0	LT	反応
GM-CSF	6	9	0	9					
IL4	7	0	0	12.6					
IL16	7	138	68	206					
LK	7				陽性	陰性	陰性	IL-16	中間
GM-CSF	7	0	6.5	6.5					
IL4	8	0	0	61.25					
IL16	8	143	55.5	198.5					
LK	8				陽性	陰性	0	IL-4	中間
GM-CSF	8	16.5	0	16.5					
IL4	9	0	0	78.75					
IL16	9	18.5	59	77.5					
LK	9				陰性	陰性	陽性	IL-4	無反応
GM-CSF	9	12.3	17.4	46.2				GM-CSF型	

10

20

30

40

【 0 0 8 4 】

【表 6 - 2】

IL4	10	0	0	42					
IL16	10	105.5	70.5	176					
LK	10				0	0	0	IL-16	無反応
GM-CSF	10	0	0	0					
IL4	11	0	0	0					
IL16	11	78	88	166					
LK	11				0	0	0	IL-16	中間
GM-CSF	11	0	16.8	16.8					

10

【0085】

表 6 に示したとおり、特定のメタコリン量でロイコトリエンレベルを決定し、続いてサイトカインレベルを決定すると、臨床医は喘息患者の診断（例えば、ロイコトリエン型、IL-4 型、IL-16 型、あるいは GM-CSF 型）が可能となる。これらの決定は、臨床医に適切な治療行為を選択するための重要な基準を提供する。

【0086】

考察：

前述の研究の結果は図 5 にまとめてある。喘息発作中あるいはその直後にロイコトリエンレベルの上昇を示した患者は、ロイコトリエン陽性喘息、つまり反応者とみなされる。これらの患者は、ロイコトリエンを標的とした治療で利益を受ける可能性がより高い。ロイコトリエンレベルの上昇は示さなかったが、サイトカインレベルの上昇を示した患者は、サイトカイン型喘息、つまり中間反応者と無反応者とみなされる。これらの患者は、どのサイトカインが最も上昇しているかによって、さらに IL-4 喘息、IL-16 喘息、あるいは GM-CSF 型と区別することができる。従って、患者は、喘息発作中、および喘息発作の直後に、最も上昇したロイコトリエンあるいはサイトカインを特異的に抑制する治療薬に、反応を示す可能性が最も高い。

20

【0087】

また、特にロイコトリエン型喘息で肺機能検査を実施するのに、低用量のメタコリンを用いることを決定した。低レベルのメタコリンを用いることができるということは、2つの利点を告げている。まず、これにより医師は、患者を特別な診断を行う病院に紹介する必要がなく、臨床の場で気管支誘発試験、すなわち喘息の検査を実施することができる。このため、病院で実施する代わりに臨床の場で実施することができれば、より多くの医師が喘息の検査を行い、全体的な検査費用を低く押さえることができる。第 2 に、低用量のメタコリンを使用することで、喘息に関連したサイトカインおよびロイコトリエンの放出誘導を可能としながら、すべての喘息エピソードが引き起こされる可能性を低くすることができる。これにより、患者に考えられる健康上のリスク、医師の医療責任を減少させ、尚且つ、関係者全員に対するリスクをはるかに低く抑えて、喘息の診断と分類が可能となる。

30

40

【0088】

さらに、唾液あるいは痰中のロイコトリエンは、喘息発作あるいは肺機能検査の誘発直後に測定することが最も正確であることが確認された。しかし、血中あるいは血漿中のサイトカインは、エピソードの約 4 時間後に最もよく測定できる。前述の臨床パラメータの特定は、喘息患者の診断および管理において、医師の助けとなる。

【0089】

いくつかの本発明の好適な実施例を上述し、具体的に例示してきたが、本発明をそのような実施例に限定する意図はない。本請求項に示す通り、本発明の本質および範囲から逸脱しない範囲において、そこに様々な修正を加えることができるものである。

【図面の簡単な説明】

50

【0090】

【図1】図1は、インターロイキン4およびインターロイキン16に対する反応を基にした喘息患者の分類を示したグラフである。

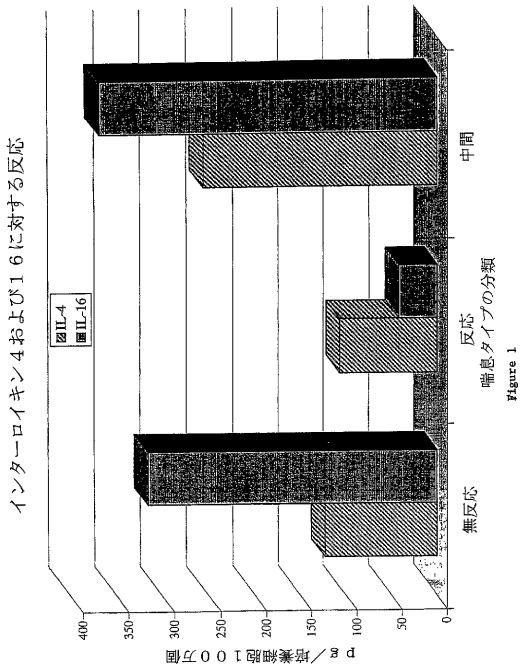
【図2】図2は、ロイコトリエン型喘息患者の評価に用いる基盤の写真である。

【図3】図3は、典型的な肺機能検査のプロトコルを示している。

【図4】図4は、本発明を実行するために利用できるテストストリップを示している。

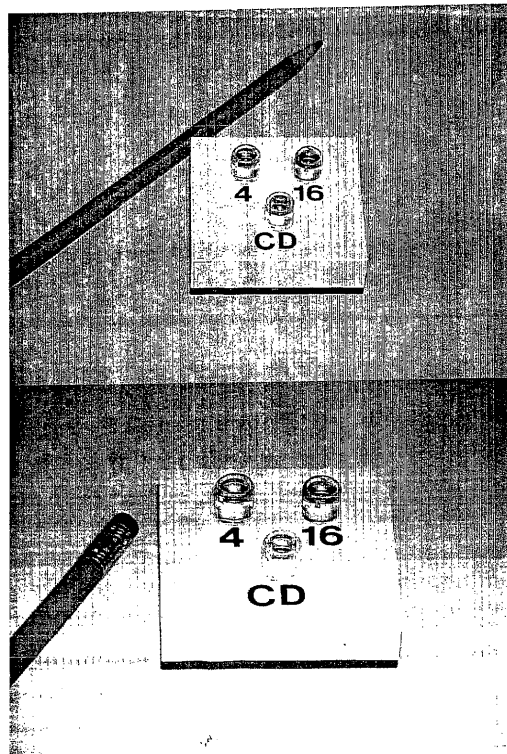
【図5】図5は、メタコリン負荷後、様々な喘息患者のロイコトリエンおよびサイトカインプロフィールを示した表である。

【図1】



【図2】

Figure 2



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/39198
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : A61K 39/395, 49/00 US CL : 424/9.1, 141.1 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) U.S. : 424/9.1, 141.1		
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)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4,366,241 A (TOM et al.) 28 December 1982 (28.12.82), see the entire document.	1-25
A.	US 6,156,503 A (DRAZEN et al.) 05 December 2000 (05.12.00), see the entire document.	1-26
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
26 February 2003 (26.02.2003)	23 MAY 2003	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Raymond J. Henley III Telephone No. 703-308-1235	

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,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,IE,IT,LU,MC,NL,PT,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,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE, ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,M Z,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72) 発明者 ブロートン、ケネス、シェーン

アメリカ合衆国、82070 ワイオミング州、ララミー、エヌ・ピアス ストリート 988

(72) 発明者 ドリスキル、ジョン、ゴードン

アメリカ合衆国、82071 ワイオミング州、ララミー、ユニバーシティ オブ ワイオミング
、クレーン ホール 430

专利名称(译)	用于诊断哮喘的方法和组合物		
公开(公告)号	JP2005512068A	公开(公告)日	2005-04-28
申请号	JP2003550652	申请日	2002-12-09
申请(专利权)人(译)	怀俄明大学		
[标]发明人	ブロートンケネスシェーン ドリスキルジョンゴードン		
发明人	ブロートン、ケネス、シェーン ドリスキル、ジョン、ゴードン		
IPC分类号	A61K31/221 A61K49/00 A61P11/00 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/537 G01N33/543		
CPC分类号	A61K31/221 A61P11/00 G01N33/6863 G01N33/92 G01N2333/535 G01N2333/5406 G01N2333/5425 G01N2333/5446 G01N2800/122		
FI分类号	G01N33/53.P		
代理人(译)	矢口太郎 大森純一 山口泰明		
优先权	60/338389 2001-12-07 US		
其他公开文献	JP4489431B2 JP2005512068A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了一种用于评估哮喘患者的诊断方法，以识别最能使患者受益的治疗策略。

13	反応者	13-1	32.000	1.2333		272.7
14	反応者	15-1	30.750	0		208.6
15	反応者	20-1	95.833	4.8		260.1
16	反応者	21-1	130.000	6.2		564.3
17	反応者	32-1	119.167	2.75		302.6
18	反応者	34-1	89.000	1.9		115.7
19	反応者	44-1	173.000	0		498.6
20	反応者	46-1	121.000	0		265.1
21	反応者	48-1	83.000	20.7		486.1
22	反応者	50-1	72.500	0		232.4
			平均	94.625	3.756	320.603