

(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2013-522637

(P2013-522637A)

(43) 公表日 平成25年6月13日(2013.6.13)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 P	4 B O 6 3
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 18 頁)

(21) 出願番号 特願2013-500451 (P2013-500451)  
 (86) (22) 出願日 平成23年3月21日 (2011. 3. 21)  
 (85) 翻訳文提出日 平成24年11月16日 (2012. 11. 16)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2011/054207  
 (87) 国際公開番号 W02011/113953  
 (87) 国際公開日 平成23年9月22日 (2011. 9. 22)  
 (31) 優先権主張番号 61/282, 701  
 (32) 優先日 平成22年3月19日 (2010. 3. 19)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 10157086.9  
 (32) 優先日 平成22年3月19日 (2010. 3. 19)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

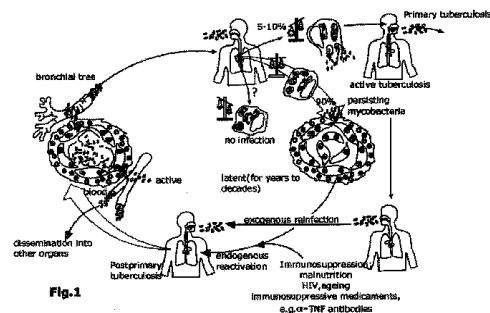
(71) 出願人 512242974  
 レッド フラッグ ディアグノスティック  
 ス ゲーエムペーハー  
 ドイツ連邦共和国 ホンブルク 6 6 4 2  
 4 ゲボイデ 7 シュタルターツェント  
 ユルム デア ウニクリニク  
 (74) 代理人 100079049  
 弁理士 中島 淳  
 (74) 代理人 100084995  
 弁理士 加藤 和詳  
 (74) 代理人 100085279  
 弁理士 西元 勝一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Mycobacterium tuberculosis 感染と関連した患者状況の in vitro 迅速判定法

(57) 【要約】

活動性結核または潜伏結核に関して Mycobacterium tuberculosis 感染の感染状況を全血から迅速判定するための in vitro 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、抗 CD 2 8 抗体、または抗 CD 2 8 抗体および抗 CD 4 9 d 抗体の存在下で精製ツベルクリン ( P P D ) を用いて刺激するステップ ; 1 . 5 時間 ~ 2 . 5 時間、特に 2 時間、3 5 ~ 3 9 、特に 3 7 で、任意に CO<sub>2</sub> を添加してインキュベートすることによって、抗原提示細胞 ( A P C ) により P P D をプロセッシングするステップ ; 次いで分泌阻害剤を添加するステップ ; 強く攪拌するステップ ; および、少なくとも 2 . 5 時間、3 5 ~ 3 9 の温度でさらにインキュベートするステップ、ならびに、抗原特異的 T 細胞の細胞内 I N F - 産生および細胞内 I L - 2 産生の両者からサイトカインプロファイルを決定するステップであって ; 活動性結核の存在が、 I F N - / I L - 2 二重陽性 T 細胞の減少を伴う、前記サイトカインプロファイルの I F N - 単独陽性細胞側へのシフトによって示されるステップ、を含む方法



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

活動性結核または潜伏結核に関して *Mycobacterium tuberculosis* 感染の感染状況を全血から迅速判定するための *in vitro* 法であって、以下のステップを含む方法。

- ・全血の第 1 試料中に存在する抗原特異的 T 細胞を、抗 CD 28 抗体、または抗 CD 28 抗体および抗 CD 49 d 抗体の存在下で精製ツベルクリン (purified protein derivative) (PPD) を用いて刺激するステップ；

- ・ 1.5 時間 ~ 2.5 時間、特に 2 時間、35 ~ 39 °C、特に 37 °C で、任意に CO<sub>2</sub> を添加してインキュベートすることによって、抗原提示細胞 (APC) により PPD をプロセッシングするステップ；

- ・次いで分泌阻害剤を添加するステップ；

- ・強く攪拌するステップ；および

- ・少なくとも 2.5 時間、35 ~ 39 °C の温度でさらにインキュベートするステップ、ならびに

- ・抗原特異的 T 細胞の細胞内 INF- $\gamma$  産生および細胞内 IL-2 産生の両者からサイトカインプロファイルを決定するステップであって；

- ・活動性結核の存在が、INF- $\gamma$  / IL-2 二重陽性 T 細胞の減少を伴う、前記サイトカインプロファイルの INF- $\gamma$  単独陽性細胞側へのシフトによって示されるステップ。

## 【請求項 2】

PPD による前記刺激に加え、SEB、ESAT-6 および CFP-10、ならびにノまたはワクチン抗原によりさらに刺激を行う、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記第 1 試料とオーセンティックな第 2 試料の全血中に存在する抗原特異的 T 細胞に PBS 0.9% NaCl または 5% グルコースなどの生理緩衝液を添加することによって陰性対照が行われる、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 試料とオーセンティックな第 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行われる、請求項 1 ~ 3 のうち少なくとも 1 項に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記第 1 試料とオーセンティックな第 4 試料の全血中に存在する抗原特異的 T 細胞に ワクチン抗原を添加することによってワクチン対照が行われる、請求項 1 ~ 4 のうち少なくとも 1 項に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記第 1 試料とオーセンティックな第 4 試料の全血中に存在する抗原特異的 T 細胞に ESAT-6 (early secreted antigenic target) および CFP-10 (culture filtrate protein) を添加することによって BCG ワクチン対照が行われる、請求項 1 ~ 5 のうち少なくとも 1 項に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記第 1 試料とオーセンティックな第 5 試料の全血中に存在する抗原特異的 T 細胞に ESAT-6 (early secreted antigenic target) および CFP-10 (culture filtrate protein) を添加することによって、該全血ドナーにおいて非結核性マイコバクテリアとの接触が起こったか否かについての対照が行われる、請求項 1 ~ 6 のうち少なくとも 1 項に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記分泌阻害剤が、プレフェルジン A またはモネンシンなどからなる群より選択される、請求項 1 ~ 7 のうち少なくとも 1 項に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 9】

前記サイトカインプロファイルの決定がフローサイトメトリーによって行われる、請求項 1 ~ 8 のうち少なくとも 1 項に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記試料の全血がヒトまたは動物に由来する、請求項 1 ~ 9 のうち少なくとも 1 項に記載の方法。

## 【請求項 11】

活動性 TB 患者と密接な接触のある個人または活動性 TB 患者と密接な接触を持ったことが疑われる個人から全血が採取される、接触者追跡調査に適用される、請求項 1 ~ 10 のうち少なくとも 1 項に記載の方法。

10

## 【請求項 12】

以下のように治療決定される、請求項 11 に記載の方法。

a . 前記サイトカインプロファイルにおいて、IFN - / IL - 2 二重陽性細胞の減少を伴う、IFN - 単独陽性細胞側へのシフトが検出された場合、INH などの予防、または 4 剤併用などの積極的治療が適応される。

b 1 . 診断検査において IFN - / IL - 2 二重陽性細胞により *Mycobacterium tuberculosis* の潜伏感染が明らかになり、且つ、以前の検査に関する情報が得られない場合、緊急の治療は不要であり、2 ~ 4 週間以内に患者を再検査する必要がある。

b 2 . 診断検査において IFN - / IL - 2 二重陽性細胞により *Mycobacterium tuberculosis* の潜伏感染が明らかになり、且つ、*Mycobacterium tuberculosis* の潜伏感染に対する以前の検査で *Mycobacterium tuberculosis* とこれまでに接触していないことが明らかになっていた場合、INH 療法などの予防が適応される。

20

c 1 . 患者が応答を示さない場合、緊急の治療は不要である。

c 2 . 患者が何らかの臨床症状を示す場合、再検査が適応される。

## 【請求項 13】

免疫抑制剤を投与される前の個人または HIV 感染などの免疫機能不全状態にある個人から全血が採取される、請求項 1 ~ 10 に記載の方法。

## 【請求項 14】

以下のように治療決定される、請求項 13 に記載の方法。

a . 前記サイトカインプロファイルにおいて、IFN - / IL - 2 二重陽性細胞の減少を伴う、IFN - 単独陽性細胞側へのシフトが検出された場合、INH などの予防、または 4 剤併用などの積極的治療、および任意に免疫抑制療法の先送りが適応される。

b 1 . 診断検査において IFN - / IL - 2 二重陽性細胞により *Mycobacterium tuberculosis* の潜伏感染が明らかになり、且つ、以前の検査に関する情報が得られない場合、免疫抑制療法が可能であり、2 ~ 4 週間以内に患者を再検査する必要がある。

b 2 . 診断検査において IFN - / IL - 2 二重陽性細胞により *Mycobacterium tuberculosis* の潜伏感染が明らかになり、且つ、*Mycobacterium tuberculosis* の潜伏感染に対する以前の検査で *Mycobacterium tuberculosis* とこれまでに接触していないことが明らかになっていた場合、INH 療法などの予防、および任意に免疫抑制療法の先送りが適応され、さらに 2 ~ 4 週間以内に患者を再検査する必要がある。

40

c 1 . 患者が応答を示さない場合、免疫療法の開始が予定される。

c 2 . 患者が何らかの臨床症状を示す場合、再検査が適応される。

## 【請求項 15】

活動性 TB 感染が疑われる個人から全血が採取される、請求項 1 ~ 10 に記載の方法。

## 【請求項 16】

以下のように治療決定される、請求項 15 に記載の方法。

50

a . 前記サイトカインプロファイルにおいて、IFN - / IL - 2 二重陽性細胞の減少を伴う、IFN - 単独陽性細胞側へのシフトが検出された場合、4 剤併用などの積極的治療が適応される。

b 1 . 診断検査においてIFN - / IL - 2 二重陽性細胞により *Mycobacterium tuberculosis* の潜伏感染が明らかになり、且つ、以前の検査に関する情報が得られない場合、急性感染の疑いは少なく、別の診断が考慮されるべきであり、2 ~ 4 週間以内に患者を再検査する必要がある。

b 2 . 診断検査においてIFN - / IL - 2 二重陽性細胞により *Mycobacterium tuberculosis* の潜伏感染が明らかになり、且つ、*Mycobacterium tuberculosis* の潜伏感染に対する以前の検査で *Mycobacterium tuberculosis* とこれまでに接触していないことが明らかになっていた場合、INH などの予防、または 4 剤併用などの積極的治療が適応され、2 ~ 4 週間以内に患者を再検査する必要がある。

c 1 . 患者が応答を示さない場合、緊急の治療は不要である。

c 2 . 患者が何らかの臨床症状を示す場合、再検査が適応される。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、全血から *Mycobacterium tuberculosis* 感染の感染状況を迅速判定するための *in vitro* 法に関する。

【背景技術】

【0002】

結核 (TBC) は、致命的な感染症の世界的統計において上位を占めており、約 5 ~ 10 % の *Mycobacterium tuberculosis* 感染者のみが生涯に結核を発症することになる (図 1)。この疾患は、検査診断による病原体の直接検出により臨床的に確認される。皮膚試験または免疫学的試験による間接的検出では、この疾患の臨床診断を十分に行うことができない。したがって、現在利用可能な診断検査では、結核感染が疑われる患者の感染状況に関して、短期、すなわち数時間以内に信頼できる情報を得ることは技術的に不可能である。

【0003】

結核の診断は、培養による病原体検出が利用可能であれば確実となる。しかし、これが容易に行えるのは、結核性の組織変化が気管支系、輸尿管 (efferent urinary tract) または腸と関連しており、排出され得る場合のみである。それ以外の場合は、針穿刺による材料入手、または試料採取による直接的な材料入手を試みることができる。これらの場合、従来 of 固形培地上では *Mycobacterium tuberculosis* の増殖が遅いため、結果を得るために 4 ~ 6 週間待つ必要があり、また液体培養では、最新のマイコバクテリア増殖検出法を用いて、既に約 2 週間後には検出が可能な場合がある。

【0004】

皮膚試験または免疫学的検出による間接的な検出、例えば Mendel - Mantoux 皮内ツベルクリン検査では、所定量のマイコバクテリア由来精製濾過抗原 (ツベルクリン) を表皮に注射する。試験対象者の免疫系がマイコバクテリアと以前接触したことがある場合、当該部位で 3 日以内に防御細胞の皮膚への移動を伴う防御反応が起こり、腫脹が生じる。これはクームス (Coombs) による IV 型反応である。この試験では、早ければ TBC 感染後 6 週間で陽性となる場合がある。試験部位において触知可能な硬結は、陽性反応と見なされる。これは、結核感染が起こったことを意味し得る。しかし、この試験では疾患の存在については分からない。陽性試験反応は、結核ワクチン接種後にも起こり得る。試験部位で皮膚が変化しないか、または発疹だけが見られる場合、結果は陰性であると見なされる。この場合、結核感染は高確率で排除される。

【0005】

10

20

30

40

50

結論として、皮内ツベルクリン検査は極めて限定的にしか信頼できない。一方では粟粒結核または免疫抑制などのまさに深刻な経過において陰性のままである場合があり、他方では過去のワクチン接種または非定型マイコバクテリアとの接触により偽陽性反応が引き起こされる。

#### 【0006】

他の可能な診断法として、免疫学的試験法、いわゆるインターフェロン-ガンマ (IFN- $\gamma$ ) 試験も2005年より利用できるようになった。この試験では、血液由来の防御細胞が、*Mycobacterium tuberculosis* 由来の抗原混合物で刺激される。これらの細胞が結核感染により病原体と以前に接触したことがある場合は、これらの細胞が生成するメッセンジャーIFN- $\gamma$  量が増加する。IFN- $\gamma$  量は、細胞上清中で決定することができ、感染対象者の血液試料においては、同時に行われることになる陰性対照のレベルと比べ明らかに高いレベルとなる。刺激には、抗原であるESAT-6 (early secreted antigenic target)、CFP-10 (culture filtrate protein)、およびTb7.7が用いられる。これらは感染初期に形成され、いわゆる非結核性マイコバクテリアの大部分、またはBCGワクチン接種に使用されるマイコバクテリアのワクチン株によっては産生されない。これにより、真性結核感染と非定型マイコバクテリアによる感染またはワクチン接種により獲得された免疫との間の試験の極めて高い特異性が説明される。IFN- $\gamma$  試験のための2種類の試験系、すなわち、ELISAによってIFN- $\gamma$  産生を検出する、Cellestis社のQuantiferon-TB (登録商標) Gold In-Tube、およびIFN- $\gamma$  産生に加えてElispotによって産生するTリンパ球の数も検出する、Oxford Immunotec社のT.SPOT.TB試験が、現在欧州連合において認可されている。両試験においては、血液 (Quantiferon-TB (登録商標) Gold In-Tube) または単離単核血液細胞 (T.SPOT.TB) を抗原とともに20時間インキュベートする必要があるため、試験結果が得られるのは早くても翌日になる。M. tuberculosisとの過去の接触に対するこれら試験の感度は、複数の研究において82~100%であると記載されており、低リスク対照における特異性は98%であると記載されている。しかし、この試験の成績には、実際面では困難性と不確実性が関連している。インキュベーションの時間枠、および37°Cの一定温度が必要であることにより誤差が生じ、検査室における方法自体に経験が必要であることによっても同様に誤差が生じる。したがって、実際は、感度および特異性について記載された値には全く届かない。感度または特異性が100%を下回る全ての試験方法と同様に、その有意性は真性感染の有病率とともに減少する。したがって、これらのin vitro試験は有病率が低い集団または職業グループに対する適用にも向いていない。

#### 【0007】

Marcia Valeria B. S. Martinsらは、Tuberculosis (2007) 87、202-211において、血中のPPD特異的IFN- $\gamma$  産生CD4+T細胞のレベルにより、PPDに対するin vivo応答が予測されることを報告した。Uma Devi Ranganathanらは、Vaccine 28 (2010)、152-161において、HIV1型EnvおよびM. tuberculosisに対するCD8+T細胞の応答を新生仔マウスにおいて引き起こす、アポトーシス促進性組換え*Mycobacterium tuberculosis* について開示した。Stefan Winklerらは、Microbes and Infection 7 (2005) 1161-1169において、中央アフリカの活動性肺結核患者における特異的なT細胞サイトカイン応答の増加について報告した。Corine Bronkeらは、Human immunology 66、950-961 (2005)において、HLA-DR3拘束性のサイトメガロウイルス特異的および*Mycobacterium tuberculosis* 特異的なCD4+T細胞の直接的なEx Vivo検出について発表した。Vernon C. MainoおよびLouis Pickerは、フローサイトメトリーによるサイトカイン発現の細胞内検出について記載した (Cytome

10

20

30

40

50

try 34:207-215 (1998)。T. Meierらは、Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2005) 24:529-536において、臨床診療における新規市販酵素結合イムノスポットアッセイ (T SPOT-TB) の結核診断に対する感度について報告した。Holden T. Maeckerらは、BMC Immunology 2005、6:13において、サイトカインフローサイトメトリーアッセイの標準化について報告した。Maria A. Suniらは、フローサイトメトリーによる、全血における抗原特異的T細胞サイトカイン発現の検出を開示した (Journal of Immunological Methods 212 (1998) 89-98)。Streitz Mらは、BCGワクチン接種集団において、ツベルクリン特異的T細胞応答の診断特異性が低いことを報告した。サブユニット抗原 (例えば、ESAT-6、CFP-10) に基づく試験は、結核の潜伏感染の診断に有用ではあるが、活動性肺結核に対する信頼できる免疫学的検査は存在しない。注目すべきことに、既存の全ての免疫学的結核検査は、T細胞応答の大きさに基づくものであるが、T細胞応答の質の診断の可能性については今まで調査されてこなかった。これには、マイコバクテリア抗原特異的T細胞の表面マーカーの発現および官能性が含まれる ((2007) Loss of Receptor on Tuberculin-Reactive T-Cells Marks Active Pulmonary tuberculosis. PLoS ONE 2(8): e735 doi:10.1371/journal.pone.0000735)。

#### 【0008】

国際公開第2008/113119号には、対象者から採取された少量の未希釈全血において細胞性免疫 (CMI) の測定を行うための方法およびキットが開示されている。具体的には、例えば50 $\mu$ L~500 $\mu$ Lの容量の未希釈全血試料における反応を測定する方法である。したがって、小児、成人または高齢のヒト対象者を含めた対象者における、キャピラリー採取および迅速検査が容易になる。

#### 【0009】

米国特許出願公開第2001/0006789号には、かつてないほどの明瞭さで抗原特異的T細胞の定量および特性の評価を行うための新規アプローチが、これは重要なことに全血で行われるため、臨床免疫検査室における日常的な使用に適していることが開示されている。この方法によれば、単一の全血培養物から、複数のサイトカインを発現する複数のT細胞サブセットを同時に測定することができる、改良された、全血におけるサイトメトリックな細胞内サイトカインアッセイが提供される。全血における抗原特異的サイトカイン応答の評価には、天然試料中に存在する全てのタイプのMHC自己抗原提示細胞の存在下でT細胞の活性化が評価されるという重要な利点がある。また、薬剤の存在下で培養を行うか、または薬剤を投与されているヒトもしくは動物の血液を分析することによって、抗原などの特定刺激に対するT細胞の応答についての全身環境の効果 (すなわち薬剤による増強または抑制) を反映し得る培養系 (全血) が可能になるという利点もある。

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0010】

本発明の目的は、従来技術の欠点を回避する方法であって、迅速で信頼性があり、さらに急性感染と潜伏感染との区別を可能とする診断法を提供することである。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0011】

この目的は、活動性結核または潜伏結核に関して *Mycobacterium tuberculosis* 感染の感染状況を全血から迅速判定するための *in vitro* 法によって達成され、該方法は以下のステップを含む。

・全血の第1試料中に存在する抗原特異的T細胞を、抗CD28抗体、または抗CD28抗体および抗CD49d抗体の存在下で精製ツベルクリン (purified protein derivative) (PPD) を用いて刺激するステップ；

- ・ 1 . 5 時間 ~ 2 . 5 時間、特に 2 時間、 3 5 ~ 3 9 、特に 3 7 で、任意に C O<sub>2</sub> を添加してインキュベートすることによって、抗原提示細胞 ( A P C ) により P P D をプロセッシングするステップ；
- ・ 次いで分泌阻害剤を添加するステップ；
- ・ 強く攪拌するステップ；および
- ・ 少なくとも 2 . 5 時間、 3 5 ~ 3 9 の温度でさらにインキュベートするステップ、ならびに
- ・ 抗原特異的 T 細胞の細胞内 I N F - 産生および細胞内 I L - 2 産生の両者からサイトカインプロファイルを決定するステップであって；
- ・ 活動性結核の存在が、 I F N - / I L - 2 二重陽性 T 細胞の減少を伴う、前記サイトカインプロファイルの I F N - 単独陽性細胞側へのシフトによって示されるステップ。

10

**【 0 0 1 2 】**

本発明の方法のある実施形態においては、 P P D による前記刺激に加え、 P B S 、 S E B 、 E S A T - 6 、 C F P - 1 0 および / またはワクチン抗原によりさらに刺激を行ってよい。これは、抗原特異的細胞が存在する場合、これらが *Mycobacterium tuberculosis* との接触によるものであるのか、非結核性マイコバクテリアとの接触によるものであるのか、またはワクチン応答によるものであるのかを決定するために行うことができる。

**【 0 0 1 3 】**

本発明の別の実施形態においては、バッファー、特に、例えば P B S 0 . 9 % N a C l または 5 % グルコースなどの生理学的に許容されるバッファーを、前記第 1 試料とオーセンティックな ( 「 ~ とオーセンティック」とは、 「 ~ と同一の供給源に由来する」ことを意味する ) 第 2 試料の全血中に存在する抗原特異的細胞に添加することによって、陰性対照が行われる。

20

**【 0 0 1 4 】**

本発明の別の実施形態においては、前記第 1 試料とオーセンティックな第 3 試料の全血中に存在する抗原特異的 T 細胞に S E B を添加することによって、陽性対照を行うことができる。

**【 0 0 1 5 】**

ある実施形態においては、前記第 1 試料とオーセンティックな第 4 試料の全血中に存在する抗原特異的 T 細胞に、 E S A T - 6 ( e a r l y s e c r e t e d a n t i g e n i c t a r g e t ) および C F P - 1 0 ( c u l t u r e f i l t r a t e p r o t e i n ) を添加することによって、ワクチン対照、具体的には、 B C G ワクチン対照を行うことができる。あるいは、前記第 1 試料とオーセンティックな第 4 試料の全血中に存在する抗原特異的 T 細胞に、 E S A T - 6 ( e a r l y s e c r e t e d a n t i g e n i c t a r g e t ) および C F P - 1 0 ( c u l t u r e f i l t r a t e p r o t e i n ) を添加することによって、全血ドナーにおいて非結核性マイコバクテリアとの接触が起こったか否かについての対照を行うことができる。

30

**【 0 0 1 6 】**

別の実施形態においては、前記第 1 試料とオーセンティックな第 5 試料の全血中に存在する抗原特異的 T 細胞にワクチン抗原を添加することによって、ワクチン対照を行うことができる。

40

**【 0 0 1 7 】**

本発明の方法のさらに別の実施形態においては、前記分泌阻害剤は、プレフェルジン A またはモネンシンなどからなる群より選択される。

**【 0 0 1 8 】**

本発明によれば、前記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などの適切な方法によって行われる。

**【 0 0 1 9 】**

50

本発明の方法は、ヒト全血試料または動物全血試料に適用することができる。

【0020】

本発明の方法は、特に、活動性TB患者と密接な接触のある個人または活動性TB患者と密接な接触を持ったことが疑われる個人から全血が採取される、接触者追跡調査に適用される。さらに、本発明の診断検査の結果に応じ、以下のように治療決定または治療計画が定められる。

a. 前記サイトカインプロファイルにおいて、IFN- $\gamma$  / IL-2二重陽性細胞の減少を伴う、IFN- $\gamma$  単独陽性細胞側へのシフトが検出された場合、INHなどの予防、または4剤併用などの積極的治療が適応される。

b1. 診断検査においてIFN- $\gamma$  / IL-2二重陽性細胞によりMycobacterium tuberculosisの潜伏感染が明らかになり、且つ、以前の検査に関する情報が得られない場合、緊急の治療は不要であり、2~4週間以内に患者を再検査する必要がある。

b2. 診断検査においてIFN- $\gamma$  / IL-2二重陽性細胞によりMycobacterium tuberculosisの潜伏感染が明らかになり、且つ、Mycobacterium tuberculosisの潜伏感染に対する以前の検査でMycobacterium tuberculosisとこれまでに接触していないことが明らかになっていた場合、INH療法などの予防が適応される。

c1. 患者が応答を示さない場合、緊急の治療は不要である。

c2. 患者が何らかの臨床症状を示す場合、再検査が適応される。

【0021】

本発明の方法はさらに、免疫抑制剤を投与される前の個人またはHIV感染などの免疫機能不全状態にある個人から採取された全血を検査するために用いることができる。本発明の診断検査の結果に応じ、以下のように治療決定または治療計画が定められる。

a. 前記サイトカインプロファイルにおいて、IFN- $\gamma$  / IL-2二重陽性細胞の減少を伴う、IFN- $\gamma$  単独陽性細胞側へのシフトが検出された場合、INHなどの予防、または4剤併用などの積極的治療、および任意に免疫抑制療法の先送りが適応される。

b1. 診断検査においてIFN- $\gamma$  / IL-2二重陽性細胞によりMycobacterium tuberculosisの潜伏感染が明らかになり、且つ、以前の検査に関する情報が得られない場合、免疫抑制療法が可能であり、2~4週間以内に患者を再検査する必要がある。

b2. 診断検査においてIFN- $\gamma$  / IL-2二重陽性細胞によりMycobacterium tuberculosisの潜伏感染が明らかになり、且つ、Mycobacterium tuberculosisの潜伏感染に対する以前の検査でMycobacterium tuberculosisとこれまでに接触していないことが明らかになっていた場合、INH療法などの予防、および任意に免疫抑制療法の先送りが適応され、さらに2~4週間以内に患者を再検査する必要がある。

c1. 患者が応答を示さない場合、免疫療法の開始が予定される。

c2. 患者が何らかの臨床症状を示す場合、再検査が適応される。

【0022】

本発明の方法はさらに、活動性TB感染が疑われる個人から採取された全血を検査するために用いることができる。

【0023】

本発明の診断検査の結果に応じ、以下のように治療決定または治療計画が定められる。

a. 前記サイトカインプロファイルにおいて、IFN- $\gamma$  / IL-2二重陽性細胞の減少を伴う、IFN- $\gamma$  単独陽性細胞側へのシフトが検出された場合、4剤併用などの積極的治療が適応される。

b1. 診断検査においてIFN- $\gamma$  / IL-2二重陽性細胞によりMycobacterium tuberculosisの潜伏感染が明らかになり、且つ、以前の検査に関する情報が得られない場合、急性感染の疑いは少なく、別の診断が考慮されるべきであり、

10

20

30

40

50

2～4週間以内に患者を再検査する必要がある。

b 2 . 診断検査において I F N - / I L - 2 二重陽性細胞により *Mycobacterium tuberculosis* の潜伏感染が明らかになり、且つ、*Mycobacterium tuberculosis* の潜伏感染に対する以前の検査で *Mycobacterium tuberculosis* とこれまでに接触していないことが明らかになっていた場合、I N H などの予防、または 4 剤併用などの積極的治療が適応され、2～4 週間以内に患者を再検査する必要がある。

c 1 . 患者が応答を示さない場合、緊急の治療は不要である。

c 2 . 患者が何らかの臨床症状を示す場合、再検査が適応される。

【図面の簡単な説明】

10

【0024】

【図1】*M. tuberculosis* の感染サイクルを示す図である。

【図2】サイトカイン I F N - の分析のみにより同定された、抗原特異的 T 細胞のフローサイトメトリ分析を示す図である。活動性結核 ( A - T B ) と治療に成功した結核 ( T - T B ) との区別は、P P D、E S A T - 6 または C F P - 1 0 による刺激とは独立した I F N - 単独の分析だけを行うことでは不可能であることが分かった。E S A T - 6 および C F P - 1 0 により、*M. tuberculosis* と接触のあった患者 ( E S A T - 6 陽性および / または C F P - 1 0 陽性 ) と純粋な B C G ワクチン応答を示す患者 ( E S A T - 6 陰性および C F P - 1 0 陰性、図示せず ) との区別のみ可能となる。

【図3】活動性結核に罹患している患者 ( A - T B ) および結核の治療に成功した対象 ( T - T B ) における P P D 特異的 T 細胞の頻度分布を示す図である。T 細胞を、C D 6 9 を介した活性化および P P D による I F N - の特異的誘導によって同定した。A - T B 患者の P P D 特異的 T 細胞の頻度は有意に高いが、重なりが大きいいため、個々の症例において、I F N - 単独の分析によって活動性結核 ( A - T B ) と治療に成功した結核 ( T - T B ) とを区別することは不可能であることが分かる。

20

【図4】結核治療に成功した 4 人の患者における P P D 応答性 T 細胞の I F N - / I L - 2 サイトカインプロファイルの例を示す図である。I F N - 単独陽性、I F N - / I L - 2 二重陽性、および I L - 2 単独陽性の T 細胞の割合を図左側に数値化する。大部分の細胞が両方のサイトカインを発現する。

【図5】活動性結核に罹患している 4 人の患者における P P D 応答性 T 細胞の I F N - / I L - 2 サイトカインプロファイルの例を示す図である。I F N - 単独陽性、I F N - / I L - 2 二重陽性、および I L - 2 単独陽性の T 細胞の割合を図右側に数値化する。活動性結核に罹患している患者は、I F N - / I L - 2 二重陽性 T 細胞の減少を伴う、サイトカインプロファイルの I F N - 単独陽性細胞側へのシフトを示す。

30

【図6】活動性結核に罹患している患者 ( A - T B ) および結核の治療に成功した患者 ( T - T B ) におけるサイトカインプロファイルのまとめの図である。点線は I F N - / I L - 2 二重陽性 T 細胞の上限 ( 5 6 % ) を表し、これより下では活動性結核が 1 0 0 % の特異性、且つ、7 0 % の感度で診断可能である。この上限は受信者動作特性 ( R O C ) 分析により確定された。

【発明を実施するための形態】

40

【0025】

本発明を以下の実施例によりさらに説明する。

【実施例】

【0026】

有利には、本発明の方法において、抗原特異的細胞の I N F - 産生は、細胞内で測定される。したがって、抗原特異的 T 細胞を結核抗原 P P D ( p u r i f i e d p r o t e i n d e r i v a t i v e )、E S A T - 6 ( e a r l y s e c r e t e d a n t i g e n i c t a r g e t ) および C F P - 1 0 ( c u l t u r e f i l t r a t e p r o t e i n ) で刺激する時間を、これまでの試験では 2 0 時間であったところを、6 時間に短縮することができる ( 図 2 )。I N F - 発現 P P D 応答性 T 細胞は、活動

50

性結核に罹患している患者において、潜伏結核に罹患している患者または結核の治療に成功した患者と比較して、有意に高い頻度で既に測定されているが、範囲の重なりが極めて大きいため、個々の患者について、疾患のこれら2つのステージを互いに区別することができない(図3)。ESAT-6およびCFP-10により、M. tuberculosisと接触のあった患者(ESAT-6陽性またはCFP-10陽性)と純粋なBCGワクチン応答を示す患者(ESAT-6陰性およびCFP-10陰性、図示せず)との区別のみが可能になる。しかし、活動性結核と、潜伏結核に罹患している患者または結核の治療に成功した患者との区別は、PPD特異的T細胞におけるCD69を介した活性化、ならびにIFN- $\gamma$ およびインターロイキン-2(IL-2)の同時測定によって可能である。大部分のPPD応答性T細胞は、潜伏結核または治療に成功した結核においてINF- $\gamma$ およびIL-2をいずれも発現するが(図4)、活動性結核においては、サイトカインプロファイルはIFN- $\gamma$ 単独陽性細胞側へシフトする(図5)。受信者動作特性(ROC)分析により、IFN- $\gamma$ /IL-2二重陽性PPD応答性T細胞の上限が確定され、これを下回る場合に100%の特異性で活動性結核の診断が可能である。ここに示した集団では、この上限は56%のIFN- $\gamma$ /IL-2二重陽性T細胞であり、それによって、活動性結核に罹患している患者(A-TB)を結核の治療に成功した患者(T-TB)と70%の感度で区別することができる(図6)。

10

#### 【0027】

他の実施形態では、サイトカインプロファイルの決定は、標識抗体を用いたフローサイトメトリーによって行われる。したがって、INF- $\gamma$ の測定に加え、PD-1(programmed death-1)、CTLA-4(cytotoxic T-lymphocyte antigen 4)、TIM-3(T-cell immunoglobulin domain and mucin domain 3)などの別の機能的に関連する表面分子、あるいはインターロイキン-2、TNF- $\alpha$ (tumor necrosis factor)またはIP-10(chemokine (C-X-C motif) ligand 10)などの別のサイトカイン類を同時に定量することも可能である。

20

#### 【0028】

抗原特異的CD4T細胞をフローサイトメトリーによって分析するため、特異的T細胞の活性化およびサイトカイン産生のための抗原刺激によって刺激し、次いで刺激された細胞の数を特異的抗体によって検出する。Mycobacterium tuberculosis(MTB)特異的T細胞の検査には、抗原であるPPD、ESAT-6およびCFP-10が用いられる。活動性結核を潜伏性結核/治療に成功した結核と区別するためには、PPDを用いた試験が行われ、潜伏性結核感染/治療に成功した結核感染を以前のワクチン接種と区別するためには、ESAT-6およびCFP-10を用いた試験が行われる。PBSは陰性対照となり、これにより、非特異的に反応するT細胞などのバックグラウンドシグナルを定めることができる。SEBは、陽性対照となる。

30

#### 【0029】

前記刺激は、全血から直接行うことが出来る。まず、全血を各1 $\mu$ g/mLの濃度のCD28特異的抗体およびCD49d特異的抗体と混合し、各抗原(PPD:7.32 $\mu$ g/mL、ツベルクリンRT-50; Statens Serum Institute、コペンハーゲン、デンマーク)と混合する。ESAT-6およびCFP-10をカバーするMtb由来ペプチドプールを用いて刺激を行った。CFP-10ペプチドおよびESAT-6ペプチドのプールは、11アミノ酸が重複する15アミノ酸長からなっており、全ペプチドがHPLC精製されている[純度>80%、Haririら、Nature Medicine 2011;17;372-376]。

40

#### 【0030】

2時間のインキュベーション時間(37 $^{\circ}$ C、6%CO $_2$ )の後、サイトカインを細胞内に蓄積させるため、10 $\mu$ g/mLのプレフェルジンA(BFA)の添加によって刺激により誘導されたサイトカインのエキソサイト-シスを停止させる。続いて、さらに4時間

50

インキュベートする ( 37 °C、6% CO<sub>2</sub> )。

【 0031 】

この刺激を6時間後に中断し、細胞を固定する。まず、2 mM EDTAを各試料に添加し、10秒間攪拌した後、室温で15分間インキュベートする。1 mLの全血あたり9 mLのBecton Dickinson溶解溶液を用いて、室温で10分間インキュベーションすることにより、白血球の固定および赤血球溶解を行う。遠心分離および上清の吸引後、得られた細胞ペレットを2 mLのFACSバッファー ( PBS - 5% FCS - 0.5% BSA - 0.07% NaN<sub>3</sub> ) で洗浄する。洗浄は、FACSバッファーを添加し、続いて遠心分離および上清を吸引することにより行われる。最後に、固定した細胞をFACSバッファー中に集める。ここで、細胞を直接染色するか、または冷蔵庫内に4°Cにて1晩保存することができる。刺激された細胞を特異的な蛍光色素標識抗体で染色するため、細胞をFACSチューブに再分配する。各染色混合物あたり、約225~300 μLの全血からの白血球を使用する。まず、各試料あたり2 mLのサポニンバッファー ( FACSバッファー / 0.1%サポニン ) を10分間添加する。遠心分離およびSAPバッファーの吸引後、各試料あたりそれぞれ全量50 μLのFACSバッファー / 0.1%サポニン中に抗体混合物を添加する ( 抗CD4クローンSK3、抗IFN-γクローン4S.B3、抗IL-2クローンMQ1-17H12、および抗CD69クローンL78 ) 。前記抗体は光感受性であるため、暗所にて室温で30分間インキュベートする。次いで、細胞を3 mLのFACSバッファーで洗浄し、未結合の抗体を除去する。最後に、細胞ペレットを150 μLの1%パラホルムアルデヒド溶液中に集め、フローサイトメトリーによって分析する。

10

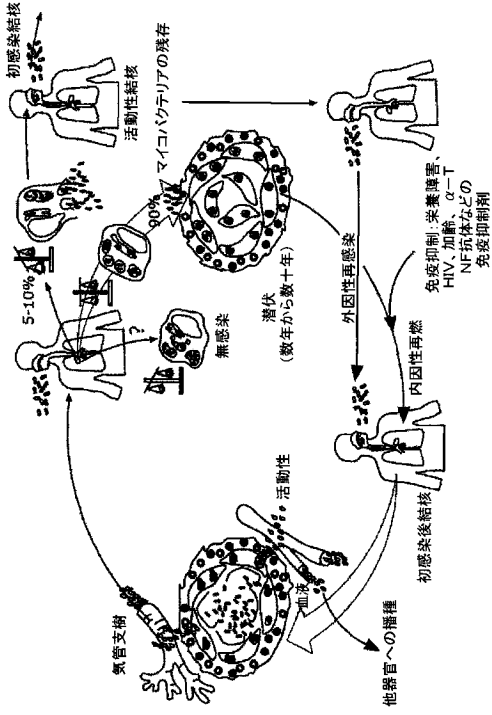
20

【 0032 】

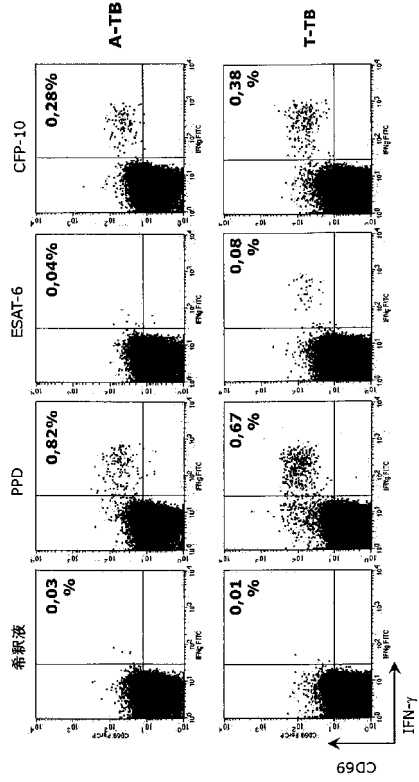
治療に成功した結核では、PPDによる特異的刺激によって、大部分の抗原特異的T細胞がIFN-γおよびIL-2をいずれも発現することが分かる。驚くべきことに、活動性結核が存在する場合、サイトカインプロファイルは、IFN-γ単独陽性細胞側へシフトし、同時にIFN-γ / IL-2二重陽性T細胞の減少を伴うことになる。潜伏結核感染または治療に成功した結核感染は、ESAT-6およびCFP-10による刺激によってワクチン応答と判別可能である。ESAT-6およびCFP-10により、M. tuberculosisと接触のあった患者 ( ESAT-6陽性および / またはCFP-10陽性 ) と純粋なBCGワクチン応答を示す患者 ( ESAT-6陰性およびCFP-10陰性 ) との区別が可能である。

30

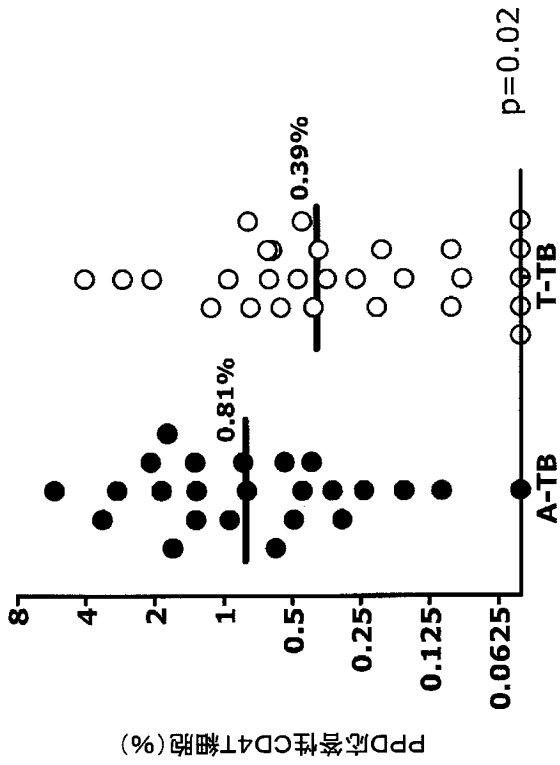
【図 1】



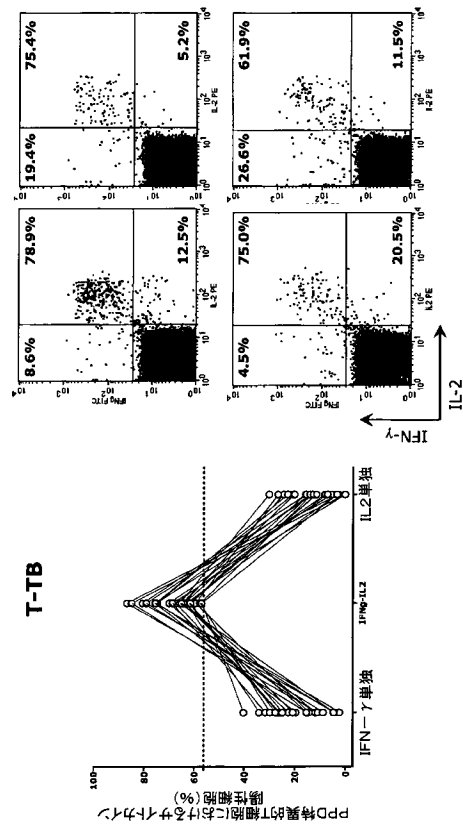
【図 2】



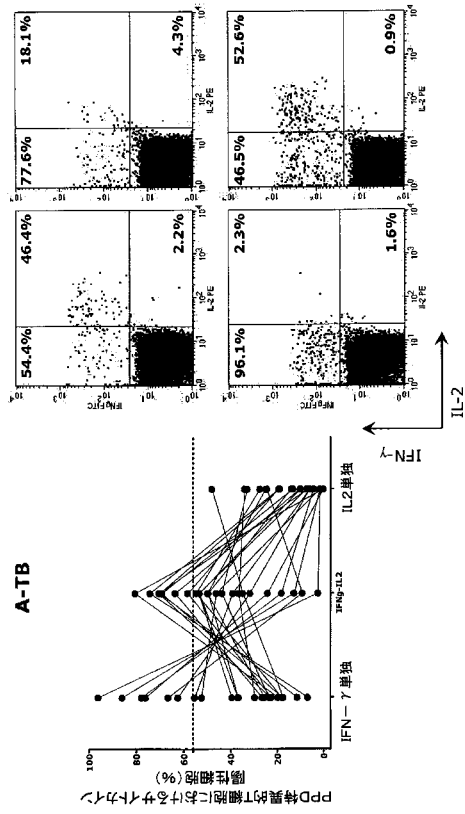
【図 3】



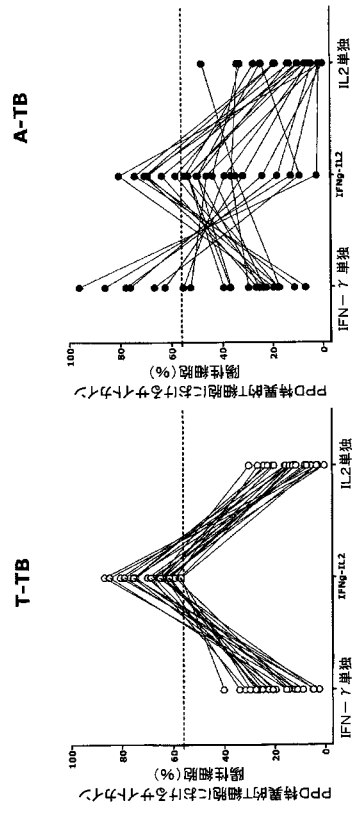
【図 4】



【 図 5 】



【 図 6 】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2011/054207
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/50 G01N33/569 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SARGENTINI VALERIA ET AL: "Cytometric detection of antigen-specific IFN-gamma/IL-2 secreting cells in the diagnosis of tuberculosis.", BMC INFECTIOUS DISEASES, vol. 9, 99, 2009, pages 1-10, XP002631778, ISSN: 1471-2334 the whole document ----- -/--	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 7 April 2011		Date of mailing of the international search report 06/07/2011
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 Hinchliffe, Philippe

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/054207

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>MILLINGTON KERRY A ET AL: "Dynamic relationship between IFN-gamma and IL-2 profile of Mycobacterium tuberculosis-specific T cells and antigen load",            JOURNAL OF IMMUNOLOGY, AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 178, no. 8, 15 April 2007 (2007-04-15), pages 5217-5226, XP002448599, ISSN: 0022-1767            the whole document</p> <p>-----</p>	1-10
T	<p>SESTER URBAN ET AL: "Whole-blood flow-cytometric analysis of antigen-specific CD4 T-cell cytokine profiles distinguishes active tuberculosis from non-active States.",            PLOS ONE, vol. 6, no. 3, E17813, 2011, pages 1-7, XP002631779, ISSN: 1932-6203            abstract</p> <p>-----</p>	1-10

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International application No.  
PCT/EP2011/054207**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-10

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP2011/ 054207

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-10

A method for the determination of TB infection status in an individual based upon pre-stimulation of a blood sample followed by flow cytometry wherein active TB is diagnosed by a particular profile.

---

2. claims: 11, 12

The process of claim 1 used for contact tracing and therapy.

---

3. claims: 13, 14

The process of claim 1 using immunosuppressed persons samples and therapy.

---

4. claims: 15, 16

The process of claim 1 wherein the blood sample comes from a person suspected of having an active TB infection and therapy.

---

---

 フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 バールマン フェルディナント ヘルマン  
 ドイツ連邦共和国 ザールブリュッケン 6 6 1 2 1 グロースヘルツォーク フリードリッヒ  
 ストラーセ 8 5

(72) 発明者 フリゼール、ダニーロ  
 ドイツ連邦共和国 ハイデルベルク 6 9 1 2 0 ハントシュースハイマー ラントストラーセ  
 9 / 1

(72) 発明者 ゼスター、マルティナ  
 ドイツ連邦共和国 ホンブルク 6 6 4 2 4 リンデンストラーセ 1 1

(72) 発明者 ゼスター、ウルバン  
 ドイツ連邦共和国 ホンブルク 6 6 4 2 4 リンデンストラーセ 1 1

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QQ06 QQ08 QS33

## 【要約の続き】

。

专利名称(译)	Invitro快速测定与结核分枝杆菌感染相关的患者状态的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2013522637A</a>	公开(公告)日	2013-06-13
申请号	JP2013500451	申请日	2011-03-21
[标]申请(专利权)人(译)	红旗鹿诊断坚持虚幻的Em-基于硬		
申请(专利权)人(译)	迪诺逻辑, 对数的ゲーエムペーハー阿格红旗		
[标]发明人	パールマンフェルディナントヘルマン フリゼールダニーロ ゼスターマルティナ ゼスターウルバン		
发明人	パールマン フェルディナント ヘルマン フリゼール、ダニーロ ゼスター、マルティナ ゼスター、ウルバン		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 C12Q1/04		
CPC分类号	G01N33/5695 G01N33/6863 G01N33/6866 G01N33/6869 G01N2333/55 G01N2333/57 G01N2800/56		
FI分类号	G01N33/53.P G01N33/543.597 C12Q1/04		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ06 4B063/QQ08 4B063/QS33		
代理人(译)	中岛敦		
优先权	61/282701 2010-03-19 US 2010157086 2010-03-19 EP		
其他公开文献	JP5925184B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

一种体外方法, 用于从活体或潜伏性结核病的全血中快速测定结核分枝杆菌感染的感染状态, 包括以下步骤: 刺激第一个样本中存在的抗原特异性T细胞在抗CD28或CD28和CD49d的抗体存在下用纯化的蛋白质衍生物(PPD)的血液; 通过在35°C下孵育1.5小时至2.5小时, 特别是2小时, 通过抗原呈递细胞(APC)处理PPD。C.到39 & deg;C., 特别是在37度;C., 任选加入CO2; 然后加入分泌抑制剂; 影响强烈的混合; 在35°C的温度下再孵育至少2.5小时。C., 从细胞内INF-γ产生和抗原特异性T细胞的细胞内IL-2产生确定细胞因子谱; 其中活性结核病的存在通过细胞因子谱向IFN-γ单阳性细胞的转变表明, 伴随着IFN-γ/ IL-2双阳性T细胞的减少。

