

(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2018-537665

(P2018-537665A)

(43) 公表日 平成30年12月20日(2018.12.20)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68 Z N A	2 G O 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	GO 1 N 33/53 M	
C 1 2 Q 1/686 (2018.01)	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/6851 (2018.01)	C 1 2 Q 1/686 Z	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-522116 (P2018-522116)
 (86) (22) 出願日 平成27年10月30日 (2015.10.30)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年6月27日 (2018.6.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2015/093319
 (87) 国際公開番号 WO2017/070916
 (87) 国際公開日 平成29年5月4日 (2017.5.4)

(71) 出願人 516171001
 チャン グァン メモリアル ホスピタル
 , リンコウ
 Chang Gung Memorial
 Hospital, Linkou
 台湾, 33305 タオユェン シティ,
 グェイシャン ディストリクト, フーシン
 ストリート, No. 5
 No. 5, Fusing St., Gui
 shan Dist., Taoyuan
 City, 33305, Taiwan
 (74) 代理人 110000671
 八田国際特許業務法人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 薬物アレルギー反応の起因薬物を同定するための方法及びキット

(57) 【要約】

薬物アレルギー反応の起因薬物を同定する方法及び同定キットを提供し、それは、生物サンプルからのリンパ球細胞と被疑薬又はその代謝産物とをインビトロで共培養して生成物を形成し、生成物中のグラニュライシンのタンパク質、ポリペプチド又はmRNAの発現レベルを検出して、対照値と比較することを含むことにより、被疑薬又はその代謝産物がリンパ球を活性化させる程度を確認することが可能となり、薬物アレルギー反応を引き起こす起因薬物を同定することができる。起因薬物は、西洋薬、漢方薬、ワクチン、及びT細胞活性化を誘導可能な抗原分子を含むことで、本発明は単一且つ簡単に行われる技術であり、迅速性、経済性、高感度、高特異性などの利点を有する。

【選択図】 図1

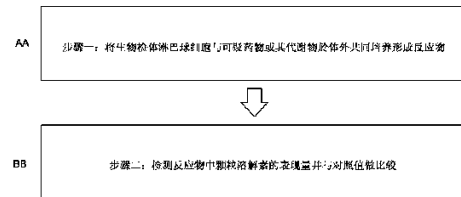


図1

AA STEP ONE: BIOLOGICAL SAMPLE LYMPHOCYTES AND A SUSPICIOUS DRUG OR THE METABOLITES THEREOF ARE CO-CULTURED IN VITRO TO FORM REACTANTS
 BB STEP TWO: THE EXPRESSION LEVEL OF THE GRANULYSIN IN THE REACTANTS IS DETECTED AND COMPARED WITH THE CONTROL VALUES

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

生物サンプルからのリンパ球細胞と被疑薬又はその代謝産物とをインビトロで共培養して生成物を形成するステップ 1 と、

生成物中のグラニューライシンのタンパク質、ポリペプチド又は mRNA の発現レベルを検出して対照値と比較し、グラニューライシンのタンパク質、ポリペプチド又は mRNA の発現レベルが対照値よりも 1.2 倍以上高かった場合、被疑薬又はその代謝産物が起因薬物であると判定するステップ 2 と、

を含むことを特徴とする、薬物アレルギー反応の起因薬物を同定する方法。

【請求項 2】

ステップ 2 では、グラニューライシンの発現レベルを検出するために、特異的な捕捉抗体及び検出抗体を用いて生成物中のグラニューライシンのタンパク質又はポリペプチドに対して反応することを特徴とする、請求項 1 に記載の薬物アレルギー反応の起因薬物を同定する方法。

【請求項 3】

ステップ 2 では、グラニューライシンの発現レベルを検出するために、特異的なオリゴヌクレオチドプライマー又はプローブを用いて生成物中のグラニューライシンの mRNA に対して反応することを特徴とする、請求項 1 に記載の薬物アレルギー反応の起因薬物を同定する方法。

【請求項 4】

リンパ球細胞は、末梢血液からの細胞又は生物個体から単離される体液を含み、より好ましい源は末梢血液であることを特徴とする、請求項 1 に記載の薬物アレルギー反応の起因薬物を同定する方法。

【請求項 5】

生成物中のグラニューライシン発現レベルを捕捉抗体及び検出抗体により同定する方法は、酵素結合免疫吸着アッセイ又は酵素結合免疫スポットアッセイであることを特徴とする、請求項 2 に記載の薬物アレルギー反応の起因薬物を同定する方法。

【請求項 6】

薬物アレルギー反応は、スティーブンス・ジョンソン症候群、中毒性表皮壊死症、好酸球増多および全身症状を伴う薬物発疹、斑丘疹性発疹、重症型多形性紅斑及び固定薬疹を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の薬物アレルギー反応の起因薬物を同定する方法。

【請求項 7】

前記起因薬物は、西洋薬、漢方薬、ワクチン、及び T 細胞活性化を誘導可能な抗原分子を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の薬物アレルギー反応の起因薬物を同定する方法。

【請求項 8】

試験キットと、検出キットとを備える薬物アレルギー反応の起因薬物を同定するための同定キットであって、

前記試験キットは、試薬と、生物サンプルからのリンパ球細胞と、被疑薬又はその代謝産物とをインビトロで共培養して生成物を形成し、

前記検出キットを前記試験キットから形成される生成物と反応して、生成物中のグラニューライシンのタンパク質、ポリペプチド又は mRNA の発現レベルを検出し、グラニューライシンのタンパク質、ポリペプチド又は mRNA の発現レベルが対照値よりも 1.2 倍以上高かった場合、この被疑薬又はその代謝産物が起因薬物であると判定することを特徴とする、薬物アレルギー反応の起因薬物を同定する同定キット。

【請求項 9】

前記検出キットは、グラニューライシンタンパク質の発現レベルを検出するために、グラニューライシンに対して特異的な捕捉抗体の 1 種及び検出抗体の 1 種を含むことを特徴とする、請求項 8 に記載の同定キット。

10

20

30

40

50

【請求項 10】

前記検出キットは、グラニューライシン mRNA の発現レベルを検出するために、グラニューライシンに対して 1 対の特異的なオリゴヌクレオチドプライマー又はプローブを含むことを特徴とする、請求項 8 に記載の同定キット。

【請求項 11】

生成物中のグラニューライシン発現レベルを捕捉抗体及び検出抗体により同定する方法は、酵素結合免疫吸着アッセイ又は酵素結合イムノスポットアッセイであることを特徴とする、請求項 9 に記載の同定キット。

【請求項 12】

薬物アレルギー反応は、スティーブンス・ジョンソン症候群、中毒性表皮壊死症、好酸球増多および全身症状を伴う薬物発疹、斑丘疹性発疹、重症型多形性紅斑及び固定薬疹を含むことを特徴とする、請求項 8 に記載の同定キット。

10

【請求項 13】

前記起因薬物は、西洋薬、漢方薬、ワクチン、及び T 細胞活性化を誘導可能な抗原分子を含むことを特徴とする、請求項 8 に記載の同定キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、起因薬物を同定するための方法及びキットに関し、特に、薬物アレルギー反応の起因薬物を同定するための方法及びキットに関する。本発明は、リンパ球と被疑薬又はその代謝産物とをインビトロで共培養して生成物を形成し、生成物中のグラニューライシンのタンパク質、ポリペプチド又は mRNA のレベルを定量し、対照と比較することにより、薬物アレルギー反応を起こす起因薬物を同定するため、単一且つ簡単に行われる技術であり、迅速性、経済性、高感度、高特異性などの利点を有するものである。

20

【背景技術】

【0002】

薬物アレルギー反応は、軽症型の斑丘疹性発疹 (maculopapular eruptions, MPE)、重症型多形性紅斑 (erythema multiforme majus, EMM) 及び固定薬疹 (fixed drug eruption, FDE) を含み、薬物が誘発し、潜在的に致命的な免疫疾患から、好酸球増多および全身症状を伴う薬物発疹 (Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms, DRESS)、スティーブンス・ジョンソン症候群 (Stevens-Johnson syndrome, SJS) 及び中毒性表皮壊死症 (Toxic epidermal necrolysis, TEN) を含み、重篤かつ生命を脅かす重度皮膚有害反応 (severe cutaneous adverse reactions, SCAR) までのものである。

30

【0003】

SCAR は、薬物特異的な T リンパ球細胞 (drug-specific T cells) に関すると考えられている。従来、リンパ球形質転換試験 (lymphocyte transformation test, LTT) は、T 細胞が介在する薬物アレルギー反応を検出するために広く使用され、インビトロでの T リンパ球細胞 (T lymphocytes) を活性化及び増殖させる細胞培養法であり、患者の血液から単離されるリンパ球をインビトロで培養し、被疑薬で細胞を刺激し、1 週間後、放射性元素である重水素 (^3H) で標識したチミジンが DNA に取り込まれる量を測定することにより、T リンパ球細胞の増殖状況を観察する。しかし、その方法は、SCAR に対する感度が非常に低く、SJS/TEN 患者に対する薬物試験は陰性結果になることがある。また、放射線測定の操作では、その分析の実施は、経験のある技術者と高価な機械の必要、放射線によって引き起こす潜在的な健康上のリスク、放射線技師免許を持つ者及び放射線の許容量が限定される作業環境に制限される。

40

【0004】

50

もう1つの薬物アレルギー反応を検出する方法は、インターフェロン (interferon gamma, IFN-)、インターロイキン (interleukin, IL) - 2, 5, 13などのサイトカイン (cytokines) の合成および分泌量を検出するものである。その方法は、Tリンパ球細胞が活性化する場合、培養上清液におけるサイトカインのレベル、フローサイトメトリー (flow cytometry) により細胞におけるサイトカインのレベル、ポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 又は逆転写PCR (reverse transcription-PCR, RT-PCR) により細胞におけるサイトカインの遺伝子発現レベルを測定するものである。これらのサイトカインは、薬物アレルギー患者の起因薬物を同定するために使用可能であるが、薬物過敏症に特異性はなく、感度も非常に低いため、臨床使用に適さない。また、この方法では、血液細胞の表面上の免疫分子を検出するために、より多くの血液サンプル及び高価なフローサイトメーターを必要とし、感度が低くて、試薬の費用が増加し、費やす時間及び労力も増加する。

10

20

30

40

50

【0005】

発明者は、グラニューライシン (Granulysin, GNLY) がスティーブンス・ジョンソン症候群 / 中毒性表皮壊死症における表皮細胞死を引き起こす重要な因子であることを最初に報告した。この発現はスティーブンス・ジョンソン症候群 / 中毒性表皮壊死症に対する診断と治療方法に応用することができる (登録番号TW I 333978)。しかし、この特許は、グラニューライシンにより重度皮膚有害反応の起因薬物を同定する方法が開示されていない。

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】****【0006】**

従って、従来 of LTT方法は、感度が低く、高価な方法であり、その実施は、経験のある技術者と放射線技師免許が必要であり、環境に制限される。また、フローサイトメトリーによる細胞中のグラニューライシンの測定は、感度が低いため、SCARの起因薬物を同定するように他の方法との組み合わせが必要となる。現在、薬物アレルギー反応の起因薬物を同定するための、高感度性、高信頼性を有し、且つ低コストの方法がまだ開発されていないため、従来技術に関してはまだ改善の余地がある。

【課題を解決するための手段】**【0007】**

本発明は、薬物アレルギー反応の起因薬物を同定する方法である。その方法は、ステップ1: 生物サンプルからのリンパ球細胞と被疑薬又はその代謝産物とをインビトロで共培養して生成物を形成することと、ステップ2: 生成物中のグラニューライシンのタンパク質、ポリペプチド又はmRNAの発現レベルを検出して対照値と比較し、グラニューライシンのタンパク質、ポリペプチド又はmRNAの発現レベルが対照値よりも1.2倍以上高かった場合、この被疑薬又はその代謝産物はリンパ球を活性化させる程度がより高いと判定して、それは薬物アレルギー反応を引き起こす可能性がある起因薬物であることを含む。

【0008】

上述した対照値は、培養培地又は薬を溶解する溶媒を含む培養培地に培養する生物サンプルからのリンパ球中のグラニューライシンの発現レベルの値を示す。

【0009】

その中、ステップ2では、グラニューライシンの発現レベルを検出するために、特異的な捕捉抗体及び検出抗体を用いて生成物中のグラニューライシンのタンパク質又はポリペプチドに対して反応する。

【0010】

その中、ステップ2では、グラニューライシンの発現レベルを検出するために、特異的なオリゴヌクレオチドプライマー又はプローブを用いて生成物中のグラニューライシンのmRNAに対して反応する。

【 0 0 1 1 】

その中、生成物中のグラニューライシン発現レベルを捕捉抗体及び検出抗体により同定する方法は、酵素結合免疫吸着アッセイ又は酵素結合イムノスポットアッセイである。

【 0 0 1 2 】

その中、リンパ球は、末梢血液からの細胞又は生物個体から単離される体液を含み、より好ましい源は末梢血液である。

【 0 0 1 3 】

その中、薬物アレルギー反応は、スティーブンス・ジョンソン症候群、中毒性表皮壊死症、好酸球増多および全身症状を伴う薬物発疹、斑丘疹性発疹、重症型多形性紅斑及び固定薬疹を含む。

10

【 0 0 1 4 】

その中、起因薬物は、西洋薬、漢方薬、ワクチン、及びT細胞活性化を誘導可能な抗原分子を含む。

【 0 0 1 5 】

薬物アレルギー反応の起因薬物を同定するための同定キットは、試験キットと、検出キットとを備え、試験キットは、試薬と、生物サンプルからのリンパ球細胞と、被疑薬又はその代謝産物とをインビトロで共培養して生成物を形成し、検出キットを試験キットから形成される生成物と反応して、生成物中のグラニューライシンのタンパク質、ポリペプチド又はmRNAの発現レベルを検出し、グラニューライシンのタンパク質、ポリペプチド又はmRNAの発現レベルが対照値よりも1.2倍以上高かった場合、この被疑薬又はその代謝産物が起因薬物であると判定する。

20

【 0 0 1 6 】

その中、検出キットは、生成物中のグラニューライシンタンパク質又はポリペプチドの発現レベルを検出するために、グラニューライシンに対して特異的な捕捉抗体の1種及び検出抗体の1種を含む。

【 0 0 1 7 】

その中、検出キットは、生成物中のグラニューライシンmRNAの発現レベルを検出するために、グラニューライシンmRNA又はゲノムDNAに対して1対の特異的なオリゴヌクレオチドプライマー又はプローブを含む。

【 0 0 1 8 】

その中、生成物中のグラニューライシン発現レベルを捕捉抗体及び検出抗体により同定する方法は、酵素結合免疫吸着アッセイ又は酵素結合イムノスポットアッセイである。

30

【 0 0 1 9 】

その中、薬物アレルギー反応は、スティーブンス・ジョンソン症候群、中毒性表皮壊死症、好酸球増多および全身症状を伴う薬物発疹、斑丘疹性発疹、重症型多形性紅斑及び固定薬疹を含む。

【 0 0 2 0 】

その中、起因薬物は、西洋薬、漢方薬、ワクチン、及びT細胞活性化を誘導可能な抗原分子を含む。

【 発明の効果 】

40

【 0 0 2 1 】

本発明は、リンパ球と被疑薬又はその代謝産物とをインビトロで共培養して生成物を形成し、オリゴヌクレオチドプライマー、プローブ、抗グラニューライシンタンパク質又はポリペプチドの捕捉抗体と検出抗体により活性化リンパ球細胞が発現するグラニューライシンと結合するステップであり、その中、インビトロ培養の条件は、被疑薬又はその代謝産物の濃度、細胞培養培地の組成及び細胞培養の時間を含む。本発明は単一旦つ簡単に行われる技術、迅速性、経済性、高感度、高特異性などの利点を有する。

【 0 0 2 2 】

本発明の技術、手段及び効果に関して、上述した本発明の目的及び特徴について深く且つ具体的に理解するために、好ましい実施例を挙げて添付の図面を参照しながら、以下の

50

ように詳細に説明する。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】本発明の検出フローのブロック図である。

【図2】本発明の重度皮膚有害反応患者、耐性患者及び健康な被験者からのリンパ球細胞と起因薬物/その代謝産物又は耐性薬とをインビトロで1週間又は2週間共培養するグラニューライシンの発現レベルである。グラニューライシンはELISAにより測定され、グラニューライシンの倍数変化は得られたデータを溶媒対照群のデータで除算することによって計算される。

【図3】本発明の重度皮膚有害反応患者、耐性患者及び健康な被験者からのリンパ球細胞と起因薬物/その代謝産物又は耐性薬とをインビトロで1週間又は2週間共培養するIFN- γ の発現レベルである。IFN- γ の発現レベルはELISAにより測定され、IFN- γ の倍数変化は得られたデータを溶媒対照群のデータで除算することによって計算される。

【図4】本発明のアロプリノール(Allopurinol)により引き起こす重度皮膚有害反応患者からのリンパ球細胞と1倍又は10倍の起因薬物/その代謝産物又は耐性薬とをインビトロで1週間共培養するグラニューライシンmRNAの発現レベルである。グラニューライシンmRNAはRT-PCRにより測定され、グラニューライシンの倍数変化は得られたデータを溶媒対照群のデータで除算することによって計算される。

【発明を実施するための形態】

【0024】

図1~図4を参照し、本発明は、薬物アレルギー反応の起因薬物を同定する方法である。その方法は、ステップ1:生物サンプルからのリンパ球細胞と被疑薬又はその代謝産物とをインビトロで共培養して生成物を形成することと、ステップ2:生成物中のグラニューライシンのタンパク質、ポリペプチド又はmRNAの発現レベルを検出して対照値と比較し、グラニューライシンのタンパク質、ポリペプチド又はmRNAの発現レベルが対照値よりも1.2倍以上高かった場合、この被疑薬又はその代謝産物はリンパ球を活性化させる程度がより高いと判定して、それは薬物アレルギー反応を引き起こす可能性がある起因薬物であることとを含む。

【0025】

上述した対照値は、培養培地又は薬を溶解する溶媒を含む培養培地に培養する生物サンプルからのリンパ球中のグラニューライシンの発現レベルの値を示す。

【0026】

その中、ステップ2では、グラニューライシンの発現レベルを検出するために、特異的な捕捉抗体及び検出抗体を用いて生成物中のグラニューライシンのタンパク質又はポリペプチドに対して反応する。

【0027】

その中、ステップ2では、グラニューライシンの発現レベルを検出するために、特異的なオリゴヌクレオチドプライマー又はプローブを用いて生成物中のグラニューライシンのmRNAに対して反応する。

【0028】

その中、起因薬物は、西洋薬、漢方薬、ワクチン、及びT細胞活性化を誘導可能な抗原を含む。

【0029】

上述した同定方法は、生成物に発現されるグラニューライシンを検出することにより、薬物アレルギー反応の起因薬物を同定することである。薬物アレルギー反応は、スティーブンス・ジョンソン症候群(Stevens-Johnson syndrome, SJS)、中毒性表皮壊死症(Toxic epidermal necrolysis, TEN)、好酸球増多および全身症状を伴う薬物発疹(Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms, DRE

10

20

30

40

50

SS)、斑丘疹性発疹 (maculopapular eruptions, MPE)、重症型多形性紅斑 (erythema multiforme majus, EMM) 及び固定薬疹 (fixed drug eruption, FDE) などを含む。

【0030】

グラニューライシンのタンパク質又は核酸がリンパ球の培養培地に発現するかどうか又はそのレベルは、個体からのリンパ球サンプルと被疑薬/その代謝産物又は耐性薬とを共培養する結果を評価する。リンパ球は、末梢血液からの細胞又は生物個体から単離される体液を含み、より好ましい源は末梢血液である。グラニューライシンの発現レベルは様々な方法で検出することができ、グラニューライシン遺伝子から転写される mRNA、遺伝子から翻訳されるタンパク質の量又は遺伝子から翻訳されるタンパク質の活性を検出することを

10

【0031】

生成物において、細胞から単離される mRNA はハイブリダイゼーション又は増幅アッセイにより検出されることができ、その方法は、ノーザンブロット分析 (Northern blot analyses)、ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction) 及びプローブアレイ (probe arrays) を含むが、これらに限定されない。mRNA 含量の検出の好ましい診断方法は、単離される mRNA を核酸分子 (プローブ) と接触させ、この核酸分子は被験遺伝子の mRNA とハイブリダイズすることができる。本発明において、核酸分子のプローブは、全長遺伝子配列を有するグラニューライシン核酸、又は長さが少なくとも 7、15、30、50、100 又は

20

【0032】

生成物中のグラニューライシンの mRNA 含量はヌクレオチド増幅技術により検出されることもでき、例えば、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)、リガーゼ連鎖反応、自立複製配列システム、転写増幅システム (transcriptional amplification system)、Q レプリカーゼ (Q-Beta Replicase)、ローリングサークル複製 (rolling circle replication) 又は他の任意の方法によりヌクレオチドを増幅した後、従来技術により増幅された分子を検出する。本発明に使用される増幅プライマーは、5' 又は 3' 末端の遺伝子領域に結合することができる (プラス鎖 (plus strand) とマイナス鎖 (minus strand) 又はその反対にそれぞれに結合する) 1 対の核酸分子である。一般的には、増幅プライマーは、10~30 個のヌクレオチド分子から構成され、長さが 50~200 個のヌクレオチド領域を横方向に増幅することができる。適切な条件及び試薬を備える場合、そのプライマーはその自身のヌクレオチド配列により核酸分子を増幅させることができる。

30

【0033】

本発明の実施例において、対照群サンプルをグラニューライシンの mRNA 又はゲノム DNA の検出の増幅プライマーを有するものとハイブリダイズすることにより、対照群と試験サンプルとのグラニューライシンの mRNA 又はゲノム DNA の発現を比較することを含む。

40

【0034】

生成物 (リンパ球の培養上清液 (supernatants)) 中のグラニューライシンのタンパク質含量はさまざまな方法で検出されることができ、その方法は、グラニューライシンのタンパク質、その抗原又はその免疫原性断片に選択的に結合可能な試薬 (例えば、抗体) を用いてサンプルと結合した後、サンプル中のグラニューライシンのタンパク質含量を評価することを含む。その技術は、酵素結合免疫吸着アッセイ (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、酵素結合免疫スポットアッセイ (enzyme-linked immunospot (ELISPOT))

50

assays)、免疫沈降 (immunoprecipitations)、免疫蛍光 (immunofluorescence)、酵素免疫測定 (enzyme immunoassay, EIA)、放射免疫測定 (radioimmunoassay, RIA) 及びウエスタンブロット分析 (Western blot analysis) を含む。

【0035】

本発明の実施例において、対照群サンプルをグラニューライシンの検出の抗体を有するものと接触することにより、対照群と試験サンプルとのグラニューライシンのタンパク質の発現を比較することをさらに含む。その方法は、実験値と参考値 (例えば、培養培地/溶媒との培養するサンプル) とを比較することをさらに含む。

【0036】

本発明は、薬物アレルギー反応の起因薬物を同定する同定キットも含む。その同定キットは、試験キットと、検出キットとを備え、試験キットは、試薬と、生物サンプルからのリンパ球細胞と、被疑薬又はその代謝産物とをインビトロで共培養して生成物を形成する。検出キットを試験キットから形成される生成物と反応して、生成物中のグラニューライシンのタンパク質、ポリペプチド又はmRNAの発現レベルを検出し、グラニューライシンのタンパク質、ポリペプチド又はmRNAの発現レベルが対照値よりも1.2倍以上高かった場合、この被疑薬又はその代謝産物が起因薬物であると判定することができる。

【0037】

その中、検出キットは、生成物中のグラニューライシンmRNAの発現レベルを検出するために、グラニューライシンmRNA又はゲノムDNAに対して1対の特異的なオリゴヌクレオチドプライマー又はプローブを含む。

【0038】

その中、検出キットは、生成物中のグラニューライシンタンパク質又はポリペプチドの発現レベルを検出するために、グラニューライシンに対して特異的な捕捉抗体の1種及び検出抗体の1種を含む。

【0039】

その中、生成物中のグラニューライシン発現レベルを捕捉抗体及び検出抗体により同定する方法は、酵素結合免疫吸着アッセイ又は酵素結合イムノスポットアッセイである。

【0040】

その中、起因薬物は、西洋薬、漢方薬、ワクチン、及びT細胞活性化を誘導可能な抗原分子を含む。

【0041】

本発明に説明した同定方法は、個体に薬物アレルギー反応を引き起こす、又は薬物アレルギー反応を引き起こす可能性のある起因薬物を同定することができ、上述した薬物アレルギー反応は、斑丘疹性発疹 (maculopapular eruptions, MPE)、固定薬疹 (fixed drug eruption, FDE)、重症型多形性紅斑 (erythema multiforme majus, EMM)、重度皮膚有害反応 (severe cutaneous adverse reactions, SCAR)、好酸球増多および全身症状を伴う薬物発疹 (Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms, DRESS)、スティーブンス・ジョンソン症候群 (Stevens-Johnson syndrome, SJS) 及び中毒性表皮壊死症 (Toxic epidermal necrolysis, TEN) を含む。

【0042】

その方法は、実験値と参考値 (例えば、培養培地/溶媒との培養するサンプル) とを比較することをさらに含む。グラニューライシンの発現結果は本明細書に説明した任意の方法、例えば、生成物に得られる核酸をオリゴヌクレオチドプライマー又はプローブと接触すること、又は生成物を抗グラニューライシン抗体と接触することにより得ることができる。

【0043】

本発明は、リンパ球と被疑薬又はその代謝産物とをインビトロで共培養して、ELIS

10

20

30

40

50

A又はELISPO Tによりそのグラニューライシンの発現レベルを検出し、又はリアルタイム定量 (real-time quantitative) PCRによりそのグラニューライシ mRNA を検出する方法を含む。その方法は、患者の全血からリンパ球を単離して、リンパ球細胞をPRMI-1640培養培地を含有する96ウェルマイクロプレート (microplates) 中、37、5%CO₂で培養するステップを含む。また、共培養する薬物又はその代謝産物及び耐性薬を培養培地で生理的な治療濃度 (physiologically therapeutic level) の1倍 (1 fold, 1X)、0.1倍 (0.1 fold, 0.1X) 及び10倍 (10 fold, 10X) に希釈して、1~2週間共培養する。

【0044】

リンパ球細胞と被疑薬/代謝産物との共培養：Ficoll-Paque (Pharmacia Fine Chemicals, USA) により密度勾配遠心分離法で全血サンプルから末梢血単核細胞を単離する。PBMC (1.0×10^6 / ウェル) を10%自己血清 (autologous serum) と、IL7 (1 ng/ml) とを含むRPMI-1640培養培地 (GIBCO Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA) を有する96ウェル培養プレートに37、5%CO₂の培養条件で1~2週間培養する。共培養の被疑薬、薬物代謝産物及び耐性薬を培養培地で生理的な治療濃度 (physiologically therapeutic level) の1倍、1/10倍又は10倍に希釈する。例えば、細胞をオキシプリノール (oxypurinol) ($10 \mu\text{g/ml}$, $100 \mu\text{g/ml}$)、又は患者が服用して薬物アレルギー反応を3ヶ月以上引き起こさない耐性薬を含む培養培地に培養する。また、陰性対照群 (negative control) は、薬物を溶かす溶媒を加えた培養培地であり、陽性対照群 (positive control) は、 $10 \mu\text{g/ml}$ のフィトヘماغルチニン (phytohemagglutinin, PHA) を加えた培養培地である。

【0045】

グラニューライシンの発現のELISA定量：培養した後、上清液を7日目及び14日目に回収して、ELISAによりグラニューライシンを測定する。簡単に言えば、培養プレート (Nunc, Roskilde, Denmark) には $50 \mu\text{g/ml}$ の抗グラニューライシモノクロナール抗体G011でコーティングして、10%FBSを含む洗浄バッファ (PBS containing 0.1% Tween-20) を加えてブロッキング (blocking) し、そして室温で以下の系列的な反応を行う：被検出の生成物を加えて2時間反応し、 $1 \mu\text{g/ml}$ のビオチン化抗グラニューライシモノクロナール抗体G052をブロッキングバッファに加えて1時間反応し、 $2 \mu\text{g/ml}$ のhorseradish peroxidase-conjugated streptavidinを洗浄バッファに加えて反応する。2つの以上の反応の間に洗浄バッファにより培養プレートを洗浄する。最後には、H₂O₂を含む基質溶液を培養プレートに加えて反応し、培養プレートを洗浄した後にテトラメチルベンジジン (tetramethylbenzidine) を加えて反応する。グラニューライシンの分析感度は 1.56 ng/ml である。また、IFN-ELISAキット (Invitrogen, Carlsbad, CA) によるサンプル中のIFN-の分析感度は 1.56 pg/ml である。

【0046】

リアルタイム定量ポリメラーゼ連鎖反応 (Quantitative Real-Time RT-PCR)：培養したリンパ球細胞からRNA (Total RNA) を単離する。Light Cycler (Roche molecular Biochemicals) -based master SYBR Green 1 kitによりグラニューライシンのmRNA含量を測定する。その絶対コピー数はMatsushita et al. (Matsushita et al. Br J Haematol. 2001 March; 112 (4): 916-26) に説明される方法により確認する。以下には、方法に使用されるオリゴヌクレオチドである：

10

20

30

40

50

グラニューライシン (g r a n u l y s i n) :
 5 ' - T C T C T C G T C T G A G C C C - 3 ' 、
 5 ' - G C A G C A T T G G A A A C A C T - 3 ' 。

【 0 0 4 7 】

- a c t i n :
 5 ' - A C A T C C G C A A A G A C C T - 3 ' 、
 5 ' - A G G G T G T A A C G C A A C T A - 3 ' 。

【 0 0 4 8 】

統計分析：リンパ球細胞が被疑薬 / 代謝産物又は耐性薬に刺激された後、培養上清液中のグラニューライシンの倍数変化算は得たデータを溶媒対照群のデータで割ることにより得られる。群間の有意差は1サンプルt検定 (o n e s a m p l e t t e s t) 又はスチューデントのt検定 (s t u d e n t ' s t t e s t) により分析される。感度及び特異性は標準的な定義に従って計算する。すべてのP値は両側 (t w o - t a i l e d) であり、P値 < 0 . 0 5 はこの分析が統計的に有意であると考えられた。統計分析は、SPSSソフトウェアバージョン18.0 (S P S S s o f t w a r e V e r s i o n 1 8 . 0) (S P S S I n c , C h i c a g o , I L) を用いて行う。

10

【 0 0 4 9 】

グラニューライシンが薬物アレルギー反応を引き起こす起因薬物の同定に応用できるかどうかを検証するために、本実施例には、22人の、例えば、SJS、TEN、DRESS、FDE及びEMMなどを含む重度皮膚有害反応 (s e v e r e c u t a n e o u s a d v e r s e d r u g r e a c t i o n s) 患者が募集される。そのリンパ球細胞と起因薬物又は代謝産物とをインビトロで培養して1週間又は2週間刺激した後、ELISAによりサンプル中のグラニューライシン及びIFN- γ の含量を測定して、その感度を比較する。結果は、グラニューライシンの感度が77.3 ~ 81.8%に達することを示している。また、IFN- γ の感度が20%より低いである (表 1) 。これにより、本実験は、ELISAによるグラニューライシンの検出をインビトロでのグラニューライシン系薬物リンパ球刺激試験 (g r a n u l y s i n - b a s e d d r u g l y m p h o c y t e s t i m u l a t i o n t e s t) に応用することは高感度であることで、薬物アレルギー反応を引き起こす起因薬物の同定に利用できることが実証される。

20

【 0 0 5 0 】

【 表 1 】

30

	感度 (%)		
	グラニューライシン	IFN- γ	
1週間	77.3	18.2	$p=2.03 \times 10^{-4}$
2週間	81.8	13.6	$p=1.16 \times 10^{-5}$

40

【 0 0 5 1 】

表1は、22人の重度皮膚有害反応患者 (S C A R) のリンパ球細胞を薬物で1 ~ 2週間刺激して、ELISAにより放出されたグラニューライシン及びIFN- γ の感度を計算する比較結果である。

【 0 0 5 2 】

本発明では、グラニューライシンを薬物アレルギー反応の起因薬物の同定に用いる特異性をさらに確認する。本評価方法において、薬物耐性患者及び健康な被験者のリンパ球ではなく、薬物アレルギー患者のリンパ球のみが起因薬物 / 代謝産物とインビトロで培養された後、そのグラニューライシンの発現レベルが増加することを実証するため、本実施例には、11人の薬物耐性患者及び10人の健康な被験者が募集され、そのリンパ球とその耐性

50

薬又は代謝産物とをインビトロで培養して1～2週間刺激した後、ELISAによりサンプル中の生物サンプルのグラニューライシン及びIFN- γ 含量を測定して、その特異性を比較する。結果は、耐性患者試験について、1週間培養した後、グラニューライシンの特異性が95.7%に達し、IFN- γ の特異性が76.2%に達し、2週間培養した後、グラニューライシンの特異性が92.9%に達し、IFN- γ の特異性が77.8%に達することを示している(表2)。健康な被験者の結果について、2週間培養した後、グラニューライシンの特異性が86.7%であり、IFN- γ の特異性が75.6%である(表2)。これにより、本実験は、ELISAによるグラニューライシンの検出をインビトロでの薬物リンパ球活性化試験(granulysin-based drug lymphocyte stimulation test)に応用することは高感度であることで、薬物アレルギー反応を引き起こす起因薬物の同定に利用できることが実証される。

10

【0053】

特異性(Specificity)(%)

【0054】

【表2】

	耐性対照群		健康な対照群	
	1週間	2週間	1週間	2週間
グラニューライシン	95.7	92.9	-	86.7
IFN- γ	76.2	77.8	-	75.6

20

【0055】

表2は、11人の薬物耐性患者及び10人の健康な被験者のリンパ球細胞を耐性薬で1～2週間刺激して、ELISAにより放出されたグラニューライシン及びIFN- γ の特異性を計算する比較結果である。

【0056】

図2～3に示すように、重度皮膚有害反応患者、耐性患者及び健康な被験者からのリンパ球細胞と起因薬物/代謝産物又は耐性薬とをインビトロで培養して1～2週間刺激した後、ELISAによりそのグラニューライシン及びIFN- γ の発現レベルを測定する。その結果は、重度皮膚有害反応患者からのリンパ球細胞を起因薬物/代謝産物で刺激した後、グラニューライシンの発現に有意差があるが、耐性患者及び健康な被験者に有意差がないことを示している(図2A及び図2B)。一部の重度皮膚有害反応患者からのリンパ球細胞が刺激された後、IFN- γ の発現レベルも増加した(図3A及び図3B)が、例は少ないため、特定のバイオマーカーとすることができない。これにより、この結果は、ELISAによるグラニューライシンの検出をインビトロでの薬物リンパ球活性化試験(granulysin-based drug lymphocyte stimulation test)に応用することにより、薬物アレルギー反応を引き起こす起因薬物を同定することが最良の方法であることが実証される。

30

40

【0057】

図4を参照し、mRNAの方面について、本実施例は3人の、アロプリノールで引き起こす重度皮膚有害反応患者が募集され、そのリンパ球を1倍又は10倍の起因薬物/代謝産物又は他の耐性薬とインビトロで1週間それぞれ共培養した後、RT-PCRによりそのグラニューライシンmRNAの発現レベルを測定する。その結果は、1倍又は10倍の起因薬物/代謝産物のいずれかが刺激された後、グラニューライシンはより好ましい感度(66.7%)及びより好ましい特異性(100%)を有することを示している。

【0058】

上述したすべての実施例によると、グラニューライシン(RT-PCR又はELISAに

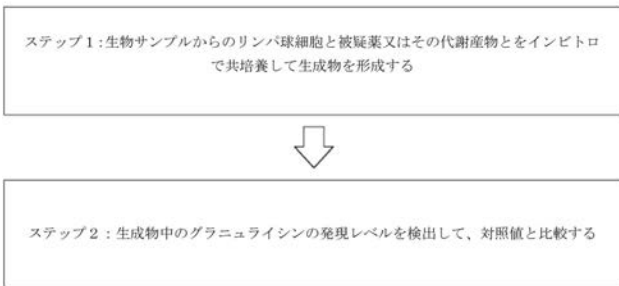
50

よるその発現の検出)をインビトロでの薬物リンパ球活性化試験 (granulysin-based drug lymphocyte stimulation test) に応用することは高感度且つ高特異性であるため、薬物アレルギー反応の起因薬物の同定に応用することができる。本発明は、インビトロでの薬物リンパ球活性化試験によるグラニューライシンmRNA及びタンパク質の発現レベルの測定方法を提供し、インビトロでの薬物リンパ球活性化試験 (granulysin-based drug lymphocyte stimulation test) に応用してグラニューライシンmRNA及びタンパク質の発現レベルを測定するキット又は試薬セットも提供し、それは、グラニューライシンmRNAを検出するためのプライマー及びプローブと、グラニューライシンを認識するための抗体とを含む。

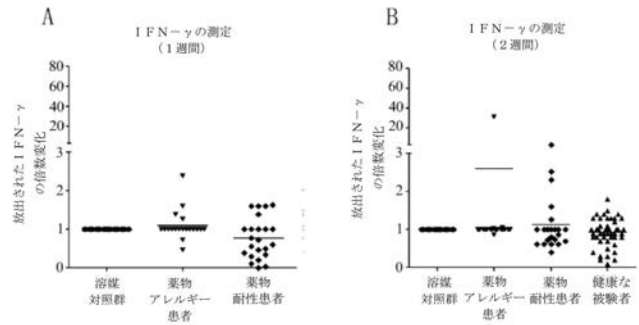
【0059】

以上、本発明の好ましい実施例について本発明の技術的特徴を具体的に説明したが、本発明の趣旨及び原則を逸脱することなく変更及び修正が可能であることが当業者には自明であり、その変更及び修正がいずれも以下の本発明の特許請求の範囲に属して含まれるべきである。

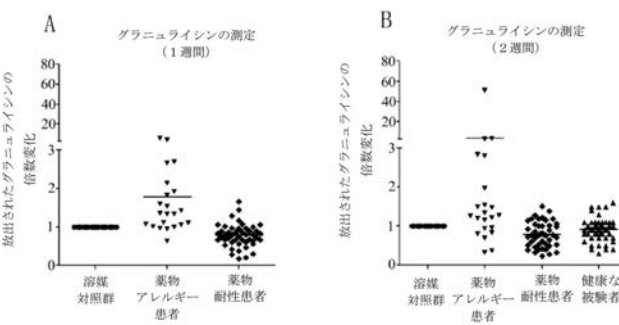
【図1】



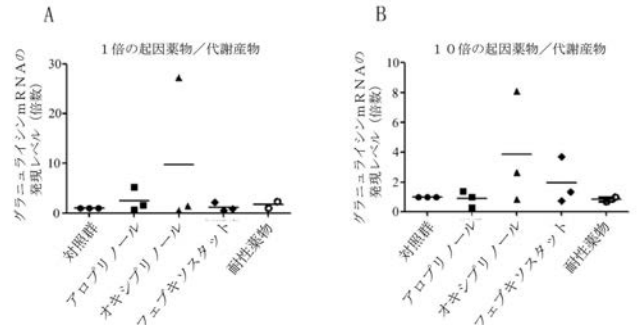
【図3】



【図2】



【図4】



【配列表】

2018537665000001.app

【 国际调查报告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2015/093319
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
G01N 33/53 (2006.01) i; C12Q 1/68 (2006.01) i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
G01N; C12Q		
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)		
DWPI, SIPOABS, CPRSABS, CPEA, TWABS, CNABS, JPABS, MOABS, HKABS, CNMED, TWMED, KRABS, AUABS, DEABS, RUABS, SGABS, ILABS, FRABS, LEXIS, CNKI, WANFANG, ISI web of Knowledge: severe cutaneous drug allergy reactions, stevens-johnson, irritability, allergy, allergies, allergic, acroesthesia, acrosthesia, oversensitive, sensitivity, sensitive, hypersusceptibility, anaphylaxis, anaphylactic, taraxy, sensitization, drug allergy, allergic to drug, drug hypersensitivity, drug allergies, drug anaphylaxis, severe cutaneous adverse reactions, stevens-johnson syndrome, SJS, toxic epidermal necrolysis, TEN, drug eruption, drug rash, epispsis, medicinal rash, granulysin, lymphocyte		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2010286375 A (UNIV HOKKAIDO), 24 December 2010 (24.12.2010), see abstract, claims 1-7, and description, paragraph [0029]	1-13
X	PAN, Yuefei et al., "Expression of Granulysin in Patients with Different Types of Drug Eruption", CHINESE JOURNAL OF DERMATOLOGY, vol.46, no.5, 31 May 2013 (31.05.2013), pages 362-364, see abstract, page 364, left-hand column	1-13
X	PAN, Yuefei; "The Expression and Significance of Cytotoxic Proteins in Stevens-Johnson Syndrome and Toxic Epidermal Necrolysis", MEDICINE & PUBLIC HEALTH, CHINA DOCTORAL DISSERTATIONS FULL-TEXT DATABASE, no.02, 15 February 2014 (15.02.2014), page B075-10, see page 41, section 3.2	1-13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 24 July 2016 (24.07.2016)	Date of mailing of the international search report 08 August 2016 (08.08.2016)	
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer XING, Ying Telephone No.: (86-10) 62411044	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2015/093319

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Chung, W.H. et al., "Oxypurinol-Specific T Cells Possess Preferential TCR Clonotypes and Express Granulysin in Allopurinol-Induced Severe Cutaneous Adverse Reactions", <i>JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY</i> , vol.135, no.9, 06 May 2015 (06.05.2015), pages 2237-2248	1-13
A	Chung, W.H. et al., "Granulysin is a Key Mediator for Disseminated Keratinocyte Death in Stevens-Johnson Syndrome and Toxic Epidermal Necrolysis", <i>NATURE MEDICINE</i> , vol.14, no.12, 31 December 2008 (31.12.2008), pages 1343-1350	1-13
A	WO 2014106235 A1 (DEV CENTER BIOTECHNOLOGY et al.), 03 July 2014 (03.07.2014), see the whole document	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2015/093319

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 2010286375 A	24 December 2010	None	
WO 2014106235 A1	03 July 2014	EP 2938632 A1	04 November 2015
		TW 201439116 A	16 October 2014
		US 2014186352 A1	03 July 2014
		AU 2013370009 A1	23 July 2015
		CN 105026425 A	04 November 2015
		JP 2016503817 A	08 February 2016

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2015/093319

A. 主题的分类 G01N 33/53(2006.01)i; C12Q 1/68(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类	
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) G01N; C12Q 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献	
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) DWPI, SIPOABS, CPRSABS, CPEA, TWABS, CNABS, JPABS, MOABS, HKABS, CNMED, TWMED, KRABS, AUABS, DEABS, RUABS, SGABS, ILABS, FRABS, LEXIS, CNKI, 万方, ISI web of Knowledge: 过敏, 致敏, 药物过敏, 皮肤严重不良反应, 严重皮肤药物过敏反应, 史蒂芬斯-强森症候群, 史蒂芬强森症候群, 史蒂文生, 史蒂文强生症候群, 史蒂文斯-约翰逊综合征, 斯-约二氏综合征, 中毒性表皮坏死溶解症, 中毒性表皮坏死溶解症, 毒性表皮坏死溶解症, 毒性表皮坏死溶解症, 毒性表皮溶解症, 药疹, 药物疹, 颗粒溶解素, 粒溶素, 颗粒裂解肽, 淋巴细胞, 淋巴细胞, irritability, allergy, allergies, allergic, acroaesthesia, acrosthesia, oversensitive, sensitivity, sensitive, hypersusceptibility, anaphylaxis, anaphylactic, taraxy, sensitization, drug allergy, allergic to drug, drug hypersensitivity, drug allergies, drug anaphylaxis, severe cutaneous adverse reactions, stevens-johnson syndrome, SJS, toxic epidermal necrolysis, TEN, drug eruption, drug rash, episypsis, medicinal rash, granulysin, lymphocyte	
C. 相关文件	
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落 相关的权利要求
X	JP 2010286375 A (UNIV HOKKAIDO) 2010年 12月 24日 (2010-12-24) 参见摘要, 权利要求1-7, 说明书第[0029]段 1-13
X	潘月飞等. "颗粒溶素在不同类型药疹患者中的表达" 中华皮肤科杂志, 第46卷, 第5期, 2013年 5月 31日 (2013-05-31), 第362-364页 参见摘要, 第364页左栏 1-13
X	潘月飞. "Stevens-Johnson综合征与中毒性表皮坏死溶解症中细胞毒蛋白的表达及意义" 中国优秀硕士学位论文全文数据库: 医药卫生科技辑, 第02期, 2014年 2月 15日 (2014-02-15), 第E075-10页 参见第41页第3.2节 1-13
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。	
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件	
国际检索实际完成的日期 2016年 7月 24日	国际检索报告邮寄日期 2016年 8月 8日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	授权官员 幸颖 电话号码 (86-10)62411044

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2015/093319

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	Chung, W.H. 等. "Oxypurinol-Specific T Cells Possess Preferential TCR Clonotypes and Express Granulysin in Allopurinol-Induced Severe Cutaneous Adverse Reactions" Journal of Investigative Dermatology, 第135卷, 第9期, 2015年 5月 6日 (2015 - 05 - 06), 第2237-2248页	1-13
A	Chung, W.H. 等. "Granulysin is a key mediator for disseminated keratinocyte death in Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis" NATURE MEDICINE, 第14卷, 第12期, 2008年 12月 31日 (2008 - 12 - 31), 第1343-1350页	1-13
A	WO 2014106235 A1 (DEV CENTER BIOTECHNOLOGY等) 2014年 7月 3日 (2014 - 07 - 03) 参见全文	1-13

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2015/093319

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
JP	2010286375	A	2010年 12月 24日	无			
WO	2014106235	A1	2014年 7月 3日	EP	2938632	A1	2015年 11月 4日
				TW	201439116	A	2014年 10月 16日
				US	2014186352	A1	2014年 7月 3日
				AU	2013370009	A1	2015年 7月 23日
				CN	105026425	A	2015年 11月 4日
				JP	2016503817	A	2016年 2月 8日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
 C 1 2 N 15/12 (2006.01) C 1 2 Q 1/6851 Z
 C 1 2 N 15/12

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

特許法第30条第2項適用申請有り 2015年6月4日、Journal of Investigative Dermatologyのウェブサイト(<http://www.nature.com/jid/journal/v135/n9/full/jid2015165a.html>([http://www.jidonline.org/article/S0022-202X\(15\)39014-X/pdf](http://www.jidonline.org/article/S0022-202X(15)39014-X/pdf)))にて電気通信回線(インターネット)を通じて発表

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

1. TWEEN

(72) 発明者 チュン, ウェン - フン
 台湾, タオユエン シティ, ゲイシャン ディストリクト, チャンジェン イフシンクン, ナン
 バー 204, 3エフ

(72) 発明者 フン, シェン - イウ
 台湾, タオユエン シティ, ゲイシャン ディストリクト, チャンジェン イフシンクン, ナン
 バー 204, 3エフ

F ターム(参考) 2G045 AA40 BA13 BB20 CA17 CA25 DA14 DA36 FB02 FB03
 4B063 QA01 QA13 QA18 QQ03 QQ08 QQ53 QR08 QR32 QR51 QR58
 QR62 QS10 QS14 QS25 QS39 QX02

专利名称(译)	用于鉴定药物过敏反应引起的方法和试剂盒		
公开(公告)号	JP2018537665A	公开(公告)日	2018-12-20
申请号	JP2018522116	申请日	2015-10-30
[标]申请(专利权)人(译)	钱·瓜安纪念医院磷寇 长庚医疗财团法人林口长庚纪念医院		
申请(专利权)人(译)	张·夸汪纪念医院，磷光		
[标]发明人	チュンウェンファン ファンシェンイウ		
发明人	チュン,ウエン-ファン ファン,シェン-イウ		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 C12Q1/02 C12Q1/686 C12Q1/6851 C12N15/12		
FI分类号	G01N33/68.ZNA G01N33/53.D G01N33/53.M C12Q1/02 C12Q1/686.Z C12Q1/6851.Z C12N15/12		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BB20 2G045/CA17 2G045/CA25 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR51 4B063/QR58 4B063/QR62 4B063/QS10 4B063/QS14 4B063/QS25 4B063/QS39 4B063/QX02		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

用于鉴定引起药物过敏反应的药物的方法和鉴定试剂盒，其包括体外将来自生物样品的淋巴细胞与可疑药物或其代谢产物共培养以形成产物，检测颗粒溶素蛋白，多肽或mRNA的表达水平并将其与对照值进行比较，可以确认可疑药物或其代谢产物激活淋巴细胞的程度。，有可能确定引起药物过敏反应的病原体。致病药物包括西药，中草药，疫苗和能够诱导T细胞活化的抗原分子，因此，本发明是一种简单易行的技术，它快速，经济，高度敏感，它具有诸如高特异性的优点。[选型图]图1

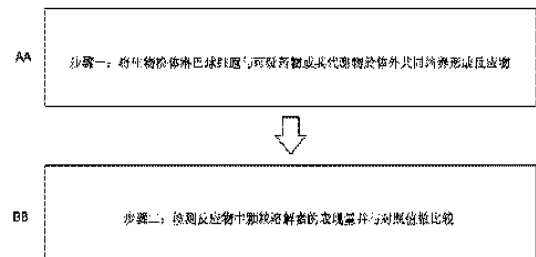


图1

AA STEP ONE: BIOLOGICAL SAMPLE LYMPHOCYTES AND A SUSPICIOUS DRUG OR THE METABOLITES THEREOF ARE CO-CULTURED IN VITRO TO FORM REACTANTS
BB STEP TWO: THE EXPRESSION LEVEL OF THE GRANULYSIN IN THE REACTANTS IS DETECTED AND COMPARED WITH THE CONTROL VALUES