

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4577660号
(P4577660)

(45) 発行日 平成22年11月10日(2010.11.10)

(24) 登録日 平成22年9月3日(2010.9.3)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Y
GO 1 N 33/58 (2006.01)	GO 1 N 33/58 Z

請求項の数 15 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2006-512936 (P2006-512936)	(73) 特許権者	000000066
(86) (22) 出願日	平成17年4月15日(2005.4.15)		味の素株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2005/007306		東京都中央区京橋1丁目15番1号
(87) 国際公開番号	W02005/108979	(74) 代理人	100082005
(87) 国際公開日	平成17年11月17日(2005.11.17)		弁理士 熊倉 禎男
審査請求日	平成20年1月11日(2008.1.11)	(74) 代理人	100084009
(31) 優先権主張番号	特願2004-121616 (P2004-121616)		弁理士 小川 信夫
(32) 優先日	平成16年4月16日(2004.4.16)	(74) 代理人	100084663
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		弁理士 箱田 篤
(31) 優先権主張番号	特願2004-233513 (P2004-233513)	(74) 代理人	100093300
(32) 優先日	平成16年8月10日(2004.8.10)		弁理士 浅井 賢治
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100114007
(31) 優先権主張番号	特願2005-36312 (P2005-36312)		弁理士 平山 孝二
(32) 優先日	平成17年2月14日(2005.2.14)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 末梢血単核球の多糖結合能測定キット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

蛍光標識免疫賦活多糖を含有する検出試薬、及び前記蛍光標識免疫賦活多糖とは異なる多糖の蛍光標識体又は前記蛍光標識免疫賦活多糖と同じ多糖であって、蛍光標識されていない免疫賦活多糖を含有する標準試薬とを含むことを特徴とする末梢血単核球の多糖結合能測定キット。

【請求項2】

免疫賦活多糖が - グルカンである請求項1記載のキット。

【請求項3】

免疫賦活多糖がレンチナンである請求項1記載のキット。

【請求項4】

検出試薬と標準試薬がそれぞれ液状で、別々の容器に収容されてなる請求項1～3のいずれか1項記載のキット。

【請求項5】

溶血・固定液と組み合わせてなる請求項4記載のキット。

【請求項6】

洗浄・分析液と組み合わせてなる請求項5記載のキット。

【請求項7】

標準試薬が、検出試薬の蛍光標識免疫賦活多糖とは異なる多糖の蛍光標識体を含有する請求項1～6のいずれか1項記載のキット。

10

20

【請求項 8】

標準試薬が、検出試薬で用いる蛍光標識免疫賦活多糖と同じ多糖であって、蛍光標識されていない免疫賦活多糖を含有する請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載のキット。

【請求項 9】

標準試薬が、検出試薬の蛍光標識免疫賦活多糖とは異なる多糖の蛍光標識体を含有する第 1 の標準試薬及び検出試薬で用いる蛍光標識免疫賦活多糖と同じ多糖であって、蛍光標識されていない免疫賦活多糖を含有する第 2 の標準試薬との組み合わせである請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載のキット。

【請求項 10】

さらに採血管を含んでなる請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項記載のキット。

10

【請求項 11】

試験血液を、蛍光標識免疫賦活多糖を含有する検出試薬に接触させ、血液中の目的末梢血単核球画分を得、その蛍光強度を測定して蛍光標識免疫賦活多糖と目的末梢血単核球との結合量 (B) を求める工程、

試験血液を、検出試薬で用いるのとは異なる多糖の蛍光標識体を含有する標準試薬に接触させ、血液中の目的末梢血単核球画分を得、その蛍光強度を測定して蛍光標識体と目的末梢血単核球との結合量 (A) を求める工程、

両者の結合量の差 $B - A$ から、使用した免疫賦活多糖が試験血液を提供した哺乳動物の免疫賦活に有効であるか否かを判定する工程、

を含むことを特徴とする免疫賦活多糖の免疫賦活剤としての有効性を判定する方法。

20

【請求項 12】

試験血液を、蛍光標識免疫賦活多糖を含有する検出試薬に接触させ、血液中の目的末梢血単核球画分を得、その蛍光強度を測定して蛍光標識免疫賦活多糖と目的末梢血単核球との結合量 (B) を求める工程、

試験血液を、検出試薬で用いる蛍光標識免疫賦活多糖と同じ多糖であって蛍光標識されていない免疫賦活多糖を含有する標準試薬、及び蛍光標識免疫賦活多糖を含有する検出試薬に接触させ、血液中の目的末梢血単核球画分を得、その蛍光強度を測定して蛍光標識免疫賦活多糖と目的末梢血単核球との結合量 (A) を求める工程、

測定値 A 及び両者の結合量の差 $B - A$ から、使用した免疫賦活多糖が試験血液を提供した哺乳動物の免疫賦活に有効であるか否かを判定する工程、

を含むことを特徴とする免疫賦活多糖の免疫賦活剤としての有効性を判定する方法。

30

【請求項 13】

試験血液を、検出試薬に接触させるときの温度が、0 ~ 50 である請求項 11 又は 12 記載の方法。

【請求項 14】

免疫賦活多糖が - グルカンである請求項 11 ~ 13 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 15】

免疫賦活多糖がレンチナンである請求項 11 ~ 13 のいずれか 1 項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本発明は、どの免疫賦活多糖がどの個体に対して免疫賦活剤として有効であるか否かを簡易に測定するのに有効な多糖結合能測定キット、及び免疫賦活剤としての有効性測定方法に関するものである。

【0002】

(発明の背景技術)

レンチナンといった - グルカンなどの免疫賦活多糖は、免疫賦活剤や抗悪性腫瘍剤として効果があることが知られているが、効果の発現には個体差が大きいことも知られている(非特許文献 1)。

一方、ヒトやマウスなどの哺乳類の末梢血単核球、例えば、単球、顆粒球やリンパ球の

50

表面に免疫賦活多糖が結合することが知られている（非特許文献 2 及び 3）。そして、末梢血単核球への免疫賦活多糖の結合能には個体差やマウス系統差があることが示されており、免疫賦活多糖の効果発現と結合能は相関する可能性が大きい。

免疫賦活多糖の末梢血単核球への結合能は、抗レンチナン抗体などの免疫賦活多糖の抗体を用いる方法が知られているが、この方法では、抗レンチナン抗体は IgM なので使用しにくく、又抗レンチナン抗体は自家生産であり、力価が一定のものを恒常的に供給するのは困難であるとの問題がある。さらに、血液から白血球画分を分離し、血清存在下で反応にかけるため、操作が煩雑であるとの問題がある。

【 0 0 0 3 】

これに対して、蛍光標識免疫賦活多糖を末梢血単核球（全血）に添加培養し、その蛍光強度を測定することが行われている（非特許文献 4 及び 5）。

この方法は、抗レンチナン抗体などを用いる方法に比べて、遥かに効率的かつ高精度で標識免疫賦活多糖の末梢血単核球への結合能を測定できる方法である。しかしながら、本発明者らが調べたところ、この方法では、免疫賦活多糖に特異的な結合以外に、非特異的な結合を含んで測定しているため、たとえポジティブな結果がでたとしても、試験した個体の免疫賦活多糖に対する特異的な結合能のみを測定していることにはならず、必ずしも試験した個体の結合能と効果が相関しない可能性があることがわかった。

【 0 0 0 4 】

【非特許文献 1】Cancer Res. 44: 5132 (1984)

【非特許文献 2】50th Annual Mtg. Proc. Jpn. Cancer Assoc. p259 (1991)

【非特許文献 3】Int. J. Immunopharmac. 18: 211 (1996)

【非特許文献 4】J. Clin. Invest. Vol. 98, No. 1, July 1996, pp50-61

【非特許文献 5】J. Exp. Med. Vol. 196, No.3, August 5, 2002, pp407-412

【発明の開示】

【 0 0 0 5 】

本発明は、より予測精度の高い判定が可能な末梢血単核球の多糖結合能測定キットを提供することを目的とする。

本発明は、又、免疫賦活多糖の免疫賦活剤としての有効性を判定する、より予測精度の高い方法を提供することを目的とする。

【 0 0 0 6 】

本発明は、蛍光標識免疫賦活多糖を含有する検出試薬を用いることに加えて、蛍光標識免疫賦活多糖とは異なる多糖の蛍光標識体を含有する標準試薬、又は蛍光標識免疫賦活多糖と同じ多糖であって、蛍光標識されていない免疫賦活多糖を含有する標準試薬を用いると、より精度が高く免疫賦活多糖の免疫賦活剤としての有効性を予測でき、これによれば効果的に上記課題を解決できるとの知見に基づいてなされたものである。

すなわち、本発明は、蛍光標識免疫賦活多糖を含有する検出試薬、及び前記蛍光標識免疫賦活多糖とは異なる多糖の蛍光標識体又は前記蛍光標識免疫賦活多糖と同じ多糖であって、蛍光標識されていない免疫賦活多糖を含有する標準試薬とを含むことを特徴とする末梢血単核球の多糖結合能測定キットを提供する。

【 0 0 0 7 】

本発明は、又、試験血液を、蛍光標識免疫賦活多糖を含有する検出試薬に接触させ、血液中の目的末梢血単核球画分を得、その蛍光強度を測定して蛍光標識免疫賦活多糖と目的末梢血単核球との結合量 (B) を求める工程、

試験血液を、検出試薬で用いる蛍光標識免疫賦活多糖とは異なる多糖の蛍光標識体を含有する標準試薬に接触させ、血液中の目的末梢血単核球画分を得、その蛍光強度を測定して異なる多糖の蛍光標識体と目的末梢血単核球との結合量 (A) を求める工程、但し、検出試薬に標準試薬に含有する多糖の非標識体もしくは別の蛍光色素での標識体を共存させて接触させる場合は、この工程を省略することができる。

両者の結合量の差 $B - A$ から、使用した免疫賦活多糖が試験血液を提供した哺乳動物の免疫賦活に有効であるか否かを判定する工程、

10

20

30

40

50

を含むことを特徴とする免疫賦活多糖の免疫賦活剤としての有効性を判定する方法を提供する。

【0008】

本発明は、又、試験血液を、蛍光標識免疫賦活多糖を含有する検出試薬に接触させ、血液中の目的末梢血単核球画分を得、その蛍光強度を測定して蛍光標識免疫賦活多糖と目的末梢血単核球との結合量(B)を求める工程、

試験血液を、検出試薬で用いる蛍光標識免疫賦活多糖と同じ多糖であって蛍光標識されていない免疫賦活多糖を含有する標準試薬、及び蛍光標識免疫賦活多糖を含有する検出試薬に接触させ、血液中の目的末梢血単核球画分を得、その蛍光強度を測定して蛍光標識免疫賦活多糖と目的末梢血単核球との結合量(A)を求める工程、

測定値A及び両者の結合量の差 $B - A$ から、使用した免疫賦活多糖が試験血液を提供した哺乳動物の免疫賦活に有効であるか否かを判定する工程、

を含むことを特徴とする免疫賦活多糖の免疫賦活剤としての有効性を判定する方法を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

本発明で用いる蛍光標識免疫賦活多糖としては、多糖類のグルコース残基に -CHO、 -COOH、 -NH₂、 -NHS、 -CN、エポキシ基等の反応基を導入することができる多糖類であれば何でも使用することができる。例えば、 α -グルカン、 β -グルカン、ヘテロ多糖(好ましくはヘテログルカン)、蛋白結合グルカン等があげられ、好ましくは α -グルカンであり、より好ましくはレンチナン、ザイモザン、パヒマラン、シゾフィラン、プスチュラン、スクレログルカン及びリヘナンである。これらの多糖類について、分子量は特に限定されない。

上記多糖類に蛍光標識を導入する蛍光物質としては、分子内にNH₂-、COOH-やイミド等の反応基を有している蛍光物質(ビオチン等の蛍光標識アビジン等の二次蛍光物質で蛍光検出できる物質も含まれる)を用いることができる(例えば、新生化学実験講座3 糖質I(上)p19~、p95~(1990)東京化学同人、東京、同 糖質I(下)p605~、p743~及び同 糖質II p283~参照)。好ましくは、-NH₂(イミド含む)を持つ蛍光物質やビオチン化合物があげられる。色の規定は特に限定されないが、FACS等のflow cytometry解析で検出可能な波長であることが望ましい。好ましくは、フルオレセイン(fluorescein)系の化合物である。具体的には、Fluorescein 5-thiosemicarbazide、FITC(Fluorescein isothiocyanate)などがあげられる。

【0010】

標準試薬として用いる、検出試薬で用いる蛍光標識免疫賦活多糖とは異なる多糖の蛍光標識多糖としては、検出試薬で用いる蛍光標識免疫賦活多糖とは末梢血単核球への結合様式の異なる多糖体で同一蛍光色素で蛍光標識したものであれば何でもよい。例えば α -1,3-グルカンの結合能測定の場合の標準試薬は、同一蛍光物質で蛍光標識された α -グルカン、ヘテロ多糖(好ましくはヘテログルカン)等である。分子量は、特に規定はなく単糖や二糖でもよいが、測定したい多糖体の0.01倍~100倍(好ましくは0.1~10倍、より好ましくは同程度)であるのがよい。蛍光強度は測定したい蛍光標識多糖(検出試薬)と比較してグルコース当り換算強度で0.01倍~100倍(好ましくは0.1~10倍、より好ましくは同程度)であるのがよい。

又、本発明では、標準試薬として、検出試薬で用いる蛍光標識免疫賦活多糖と同じ多糖であって、蛍光標識されていない免疫賦活多糖を用いることができる。

本発明では、検出試薬及び標準試薬とも、それぞれ液状で、別々の容器に収容されているのが好ましい。この場合、水溶液に、検出試薬又は標準試薬を1~10,000 μ g/mLの量(好ましくは、10~1,000 μ g/mL、より好ましくは100~500 μ g/mL)で、かつ適当な防腐剤(アジ化ナトリウム等)や細胞膜の流動性を抑えるための試薬(アジ化ナトリウムやサイトカラシンB等)を添加しておいてもよい。

【0011】

10

20

30

40

50

本発明のキットには、さらに、溶血・固定液、洗浄・分析液、採血管を組み合わせるのが好ましい。

採血管としては、材質は特に限定されないが、ガラス、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン製等のものであって、ヘパリン、クエン酸、EDTA等で抗凝固処理したものが好ましい。採血用量は、0.01~10mLであるのが好ましく、特に好ましくは1~5mLである。

本発明では、採血管に採血した後、採血管に、標準試薬液(A液)(検出試薬に蛍光標識免疫賦活多糖とは異なる多糖の非標識体もしくは別の蛍光色素による標識体を共存させる場合は省略することができる)もしくは検出試薬液(B液)を容量比で1/100~1/2量(好ましくは1/10~1/20)(多糖体の最終濃度としては、0.1 μ g~1,000 μ g/mL, 好ましくは1~100 μ g/mL, より好ましくは、10~50 μ g/mL)を混和して5~180分(好ましくは15~90分、より好ましくは30~60分)放置する。放置する温度は、0~50 が好ましい。

【0012】

さらに、この操作は、後述の溶血・固定液処理の後に行うこともできる。

溶血・固定液としては、赤血球を溶血させることができる水のような低張溶液であればよい。例えば塩化アンモニウム系の溶血溶液や市販溶液(FACS Lysing Solution(BD社製)等)などを用いることができる。添加量は、処理する血液溶液の1~100倍量(好ましくは2~50倍、より好ましくは10~40倍)であり、血液と混和し、0~40(好ましくは室温)で、1~60分(好ましくは5~30分、より好ましくは10~15分)放置して赤血球を溶血させ、遠心分離し上澄みを除去する。また、測定までに24時間以上を要する場合は、細胞を固定することが望ましい。その際には、例えばホルマリン系の固定剤(ホルムアルデヒド等)を添加した溶液(FIX&PERM Reagent A(Caltag社製)等)を用い上記と同様に赤血球を溶血させ遠心分離し上澄みを除去し、必要に応じて洗浄・分析液で洗浄した後、0~室温(好ましくは冷蔵保存)で放置し72時間以内(好ましくは48時間以内)に測定する。

【0013】

洗浄・分析液は、生理食塩水のような等張溶液であればよく、例えば市販のPBS(phosphate buffered saline)系の試薬等を用いることができる。必要によりBSA(bovine serum albumin)やアジ化ナトリウム、エチレングリコール等を含有しているものを用いてもよい(例えば、洗浄用緩衝液(PBS(-)+0.1%BSA+0.1%アジ化ナトリウム)等)。添加量は処理血液量の0.5~10倍量(好ましくは1~4倍量)加え混和後、遠心分離して上澄みを除去するのがよい。この操作を1~数回行い、さらに処理血液量の0.5~10倍量(好ましくは1~4倍量)加え、混和しflowcytometryにて解析する。測定までに24時間以上を要する場合は、防腐剤や細胞膜流動性防止剤(例えばアジ化ナトリウムやサイトカラシンB等)を含有させたものを用いるのが望ましい。

本発明のキットに使用する血液は、採取直後、採取後氷中・冷蔵庫等で短時間保管しておいたもの、-30以下で凍結保存しておいたもの、の何れでもよく、凍結保存しておいた血液は、使用時に通常の方法で融解して使用すればよい。

【0014】

本発明のキットは、血液単核球のみならずその他の細胞浮遊液の染色にも応用できる。種々の細胞株(癌細胞株や白血球細胞株等)の浮遊液、癌組織や種々の臓器(リンパ節(実施例)、脾臓、肺、肝臓、腸管、皮膚等)の細胞浮遊液(EDTA処理や酵素(トリプシンやコラゲナーゼ等)処理し単細胞浮遊液にしたものでもよい)の染色にも応用できる。操作は、 $1 \times 10^3 \sim 10^8$ 個/mL(好ましくは $1 \times 10^4 \sim 10^7$ 個/mL、より好ましくは $1 \times 10^5 \sim 10^6$ 個/mL)に調製した単細胞浮遊液であれば、上記と同様な操作で測定することができる。

【0015】

さらに、本発明のキットは、single color解析のみならずmulti-color解析にも応用できる。すなわち、ある細胞内外の特定の物質(例えば、表面抗原等)、細胞内物質(サイトカイン等)等に対する抗体を用いるflowcytometryと組み合わせで解析することができ

る。この際には、例えば細胞表面の物質の解析では、採血管に標準試薬液又は検出試薬液を加えて行う操作の際に、細胞表面物質に対する抗体を共存させれば簡便に測定することができる。A液/B液に用いている蛍光標識物質とは別の蛍光標識物質で標識された抗体を用いるのがより簡便である。またビオチン等で標識した抗体を用い、洗浄後に別の蛍光標識物質で標識されたアビジン等で処理してもよい。さらには標識されていない抗体を用いる場合は、洗浄後に、その抗体に対する二次抗体（A液/B液に用いている蛍光標識物質とは別の蛍光標識物質で標識された抗体やビオチン等で標識した抗体を用い、洗浄後に別の蛍光標識物質で標識されたアビジン等で処理）で測定することも可能である。採血管に標準試薬液又は検出試薬液を加えて行う操作の際に抗体を共存させなくても、溶血操作の後に、抗体を用いて処理して測定することも可能である。

10

又、細胞内の物質を測定する場合は、溶血・固定操作を行った後、細胞膜透過用緩衝液（例えばFIX&PERM Reagent B（Caltag社製））でPermealizing処理後に抗体を用いて処理して測定することができる。

【0016】

本発明では、上述したように、試験血液を、蛍光標識免疫賦活多糖を含有する検出試薬に接触させ、血液中の目的末梢血単核球画分を得、その蛍光強度を測定して蛍光標識免疫賦活多糖と目的末梢血単核球の結合体の量（B）を求め、

試験血液を、検出試薬で用いる蛍光標識免疫賦活多糖とは異なる多糖の蛍光標識体を含有する標準試薬に接触させ、血液中の目的末梢血単核球画分を得、その蛍光強度を測定して蛍光標識体と目的末梢血単核球との結合量（A）を求め（検出試薬に蛍光標識免疫賦活多糖とは異なる多糖の非標識体もしくは別の蛍光色素による標識体を共存させる場合は省略することができる）、

20

両者の結合量の差 $B - A$ から、使用した免疫賦活多糖が試験血液を提供した哺乳動物の免疫賦活に有効であるか否かを判定することができる。ここで、結合体の量や結合量としては、結合する細胞の数（割合）とすることができる（以下同じ）。

【0017】

又、検出試薬で用いる蛍光標識免疫賦活多糖と同じ多糖であって蛍光標識されていない免疫賦活多糖を含有する標準試薬を用いる場合には、

試験血液を、蛍光標識免疫賦活多糖を含有する検出試薬に接触させ、血液中の目的末梢血単核球画分を得、その蛍光強度を測定して蛍光標識免疫賦活多糖と目的末梢血単核球との結合量（B）を求め、

30

試験血液を、検出試薬で用いるのと同じ多糖であって蛍光標識されていない免疫賦活多糖を含有する標準試薬、及び蛍光標識免疫賦活多糖を含有する検出試薬に接触させ、血液中の目的末梢血単核球画分を得、その蛍光強度を測定して蛍光標識免疫賦活多糖と目的末梢血単核球との結合量（A）を求め、

測定値A及び両者の結合量の差 $B - A$ から、使用した免疫賦活多糖が試験血液を提供した哺乳動物の免疫賦活に有効であるか否かを判定することができる。

本発明では、非特異的な多糖の結合量を除去でき、測定したい免疫賦活多糖の特異的な結合を測定することができる。さらに、上記2つの判定方法を併用することにより、非特異的な抗腫瘍多糖の結合量を除去でき、免疫賦活多糖の蛍光標識化により、細胞への結合様式が変化していないことを確認でき、使用した免疫賦活多糖の特異的な結合のみを測定でき、免疫賦活多糖の免疫賦活剤としての有効性を精度が高く予測できる。

40

【0018】

本発明により、蛍光標識免疫賦活多糖を含有する検出試薬を用いることに加えて、蛍光標識免疫賦活多糖とは異なる多糖の蛍光標識体を含有する標準試薬を用いる（非特異的な異なる多糖の結合量を測定できる）もしくは検出試薬に異なる多糖の非標識体あるいは別の蛍光色素による標識体を共存させると、前者の測定結果から非特異的な異なる多糖の結合量を除去でき、測定したい免疫賦活多糖の特異的な結合能を測定することができるため、免疫賦活多糖の免疫賦活剤としての有効性を精度が高く予測できる利点がある。

一方、蛍光標識免疫賦活多糖を含有する検出試薬を用いることに加えて、蛍光標識免疫

50

賦活多糖と同じ多糖であって、蛍光標識されていない免疫賦活多糖を含有する標準試薬を用いると、免疫賦活多糖の蛍光標識化により、細胞への結合様式が変化していないことを確認でき、測定したい免疫賦活多糖自身の結合能を正確に測定でき、免疫賦活多糖の免疫賦活剤としての有効性を精度が高く予測できる。

【0019】

よって、蛍光標識免疫賦活多糖を含有する検出試薬を用いることに加えて、蛍光標識免疫賦活多糖とは異なる多糖の蛍光標識体を含有する第1の標準試薬（検出試薬に異なる多糖の非標識体あるいは別の蛍光色素による標識体を共存させる場合は第1の標準試薬を省略することができる）及び検出試薬で用いる蛍光標識免疫賦活多糖と同じ多糖であって、蛍光標識されていない免疫賦活多糖を含有する第2の標準試薬とを用いると、一層精度よく測定したい免疫賦活多糖自身の結合能を正確に測定でき、免疫賦活多糖の免疫賦活剤としての有効性をより精度が高く予測できる。

10

又、本発明のキットは、検出試薬、標準試薬、溶血・固定液、洗浄・分析液、採血管と組み合わせることにより、迅速、簡便に蛍光強度のズレ（差）、すなわち、個々人の免疫賦活多糖に対する特異的結合能を測定することができる。

次に本発明を実施例により詳細に説明する。

【実施例】

【0020】

実施例1

Fluorescein標識レンチナン作製法

20

レンチナン原末（味の素社製）を乳鉢で練りながら蒸留水に分散させ、120℃、20分のオートクレーブにより溶解したものを溶液として用いた。

レンチナン原末溶液4mg/mlと、4mMのメタ過ヨウ素酸ナトリウムを等体積混合し、4℃で一昼夜攪拌した（酸化開裂反応により、反応基 -CHO を導入した）。次いで、エチレングリコールを全体積の60分の1量加えてメタ過ヨウ素酸の不活化を行い、4℃で一昼夜蒸留水にて透析した。回収液にFluorescein 5-thiosemicarbazide（Molecular Probes社製）200µg/mlを、最初のレンチナン原末溶液の2分の1体積加え、NaOH溶液によりpH=9.5に調製、遮光下にて4℃で一昼夜攪拌し、レンチナンを蛍光標識した。反応後、5mg/mlのSodium borohydrideを最初のレンチナン原末溶液の12.5分の1体積加え、遮光下にて4℃で一昼夜攪拌した（シッフ塩基の還元、アルデヒドのアルコール化）。最後に、HClによりpH=7.0に調製し蒸留水にて遮光下、4℃で一昼夜以上透析した。透析後、液を回収しアジ化ナトリウムを最終濃度0.02%で添加、遮光下での冷蔵保存とした。

30

【0021】

全血を用いた結合能測定法

ヘパリン入りシリンジを用い、エーテル麻酔下にてICRマウス（日本クレア（株）より購入、5～8週齢、雌）より心採血を行った。氷冷下、Falcon2054チューブにヘパリン処理血液を90µl/本で分注し、Fluorescein標識レンチナンは10µl/本で添加した。30分以上経過後、マウス単球の表面抗原F4/80に対するPE（phycoerythrin）標識抗体（PE標識抗マウスF4/80抗体；Serotec社製）を3µl/本で添加、さらに30分以上経過後、FACS Lysing Solution（溶血・固定液BD社製；蒸留水にて10倍希釈）を3ml/本添加し、室温で10分放置し溶血した。4℃、1500rpm、5分の遠心分離後、洗浄用緩衝液（PBS(-)+0.1%BSA+0.1%アジ化ナトリウム）1ml（洗浄・分析液）で洗浄し、洗浄用緩衝液0.5mlに懸濁、メッシュを通した後FACS Caliburによる2カラー（Fluorescein/PE）解析を行った。

40

データ解析は、FSC/SSCで単球画分（MC）、顆粒球画分（GC）、リンパ球画分（LC）に分け、Fluorescein/PEに展開、単球画分では、PE陽性細胞中のFluorescein陽性細胞の割合を、顆粒球画分、リンパ球画分では各画分におけるFluorescein陽性細胞の割合を解析した（結果を、例えば、図1のFLの項に示す）。

Fluorescein標識レンチナンの対象（標準試薬1）として、FITC標識デキストラン（分子量200万；シグマ）を用い、同様の解析を行った（結果を、例えば、図1のFDの項に示す）。

50

【 0 0 2 2 】

レンチナンによる結合阻害試験

結合能測定の際、全血をチューブに分注する前に、氷冷下にてレンチナン原末溶液（標準試薬 2）2mg/mlのPBS(-)による10倍希釈液を25 μ l/本で入れておき、全血を65 μ l/本添加、その後Fluorescein標識レンチナンを10 μ l/本で添加した（阻害用レンチナンの最終濃度は50 μ g/ml）。その後の操作は結合能測定法（前項）と同様に行った（結果を、例えば、図1のFL+L50の項に示す）。

凍結保存した血液を用いた試験

Lewisラット（日本チャールスリバー（株）より購入、9～10週齢、雄）よりヘパリン入りシリンジを用いて採取し、-30℃の冷凍庫で凍結保存した血液を用いて結合阻害試験を行った。

10

【 0 0 2 3 】

実験結果用量依存性

Fluorescein標識レンチナンを最終濃度5、10、20、40 μ g/ml（FL5、FL10、FL20、FL40）でICRマウス全血と1時間反応させ、Fluorescein標識レンチナン結合細胞をFACSにて解析した結果を図1～3に示す。単球画分では、Fluorescein標識レンチナンの濃度依存的な結合が認められ、40 μ g/mlでは、単球の約40%がFluorescein標識レンチナンと結合した（図1）。顆粒球画分においても濃度依存的な結合が認められ、Fluorescein標識レンチナン40 μ g/mlで顆粒球の約20%が結合した（図2）。リンパ球画分においても濃度依存的な結合が認められたが、Fluorescein標識レンチナン40 μ g/mlでも結合細胞の割合は1%未満であった（図3）。

20

【 0 0 2 4 】

レンチナンによる結合阻害試験

Fluorescein標識レンチナンを最終濃度5、10、20、40 μ g/mlでICRマウス全血と1時間反応させるよりも先にレンチナン原末溶液50 μ g/mlを共存させた場合（FL5+L50、FL10+L50、FL20+L50、FL40+L50）には、Fluorescein標識レンチナンの結合が阻害された（図1～3）。

FITC標識デキストランとの比較

FITC標識デキストランを最終濃度5、10、20、40 μ g/ml（FD5、FD10、FD20、FD40）でICRマウス全血と1時間反応させ、FITC標識デキストラン結合細胞をFACSにて解析した結果、単球画分では、20 μ g/ml以下では結合が認められなかったが、40 μ g/mlでは約5%に結合が認められた（図1）。顆粒球画分においても、20 μ g/ml以下では結合が認められなかったが、40 μ g/mlでは約10%に結合が認められた（図2）。リンパ球画分での結合は1%未満であった（図3）。

30

凍結保存した血液を用いた試験

Fluorescein標識レンチナンを最終濃度150 μ g/ml（FL150）で凍結融解後のラット全血と1時間反応させ、Fluorescein標識レンチナン結合細胞をFACSにて解析した結果、凍結融解しない血液と同程度の結合が認められた（図4）。

【 0 0 2 5 】

まとめ

例えば、図1に示されるように、単球（MC）に対するFluorescein標識レンチナン（FL）の結合量（B）からFITC標識デキストラン結合の結合量（A1）を引いた結合量が大きいので、レンチナンが有意にマウス単球に結合すること、及びこのことからレンチナンが当該マウスに対して免疫賦活剤として有効であることが推定される。

又、図1に示される単球（MC）に対するFluorescein標識レンチナン（FL）の結合量（B）から、未標識レンチナン及びFluorescein標識レンチナン[FL+L50]に対する結合量（A2）を引いた結合量が大きいので、レンチナンが特異的にマウス単球に結合すること、Fluorescein標識レンチナンの結合様式と未標識レンチナンの結合様式が同じであることが確認できる。

40

50

【 0 0 2 6 】

実施例 2

ヒト血液を用いた結合能測定法

ヘパリン採血管に採血したヒト血液を250 μ l/本で分注し、一方には、実施例 1 で用いたのと同じFluorescein標識レンチナンを100 μ g/mlになるよう添加した。37 $^{\circ}$ Cで45分培養後、ヒトCD14に対するPE標識抗体(CALTAG社製)を添加、さらに37 $^{\circ}$ Cで30分培養後、0.83%塩化アンモニウム溶液(0.1%炭酸水素ナトリウム、0.0037%EDTA \cdot 4Naを含む)を10ml/本で添加し、溶血した。室温、1500rpm、5分の遠心分離後、洗浄用緩衝液(PBS(-) + 0.2%BSA + 0.1%アジ化ナトリウム)で洗浄し、洗浄用緩衝液0.5mlに懸濁、メッシュを通した後FACS Caliburによる2カラー(Fluorescein/PE)解析を行った。

10

データ解析は、FSC/SSCで単球画分、顆粒球画分、リンパ球画分に分け、Fluorescein/PEに展開、単球画分では、PE陽性細胞中のFluorescein陽性細胞の割合を、顆粒球画分、リンパ球画分では各画分におけるFluorescein陽性細胞の割合を解析した。

Fluorescein標識レンチナンの対照(標準試薬 1)として、FITC標識デキストラン(分子量200万;シグマ)を用い、同様の解析を行った。Fluorescein標識レンチナン結合細胞の割合からFITC標識デキストラン結合細胞の割合を引いた値を、レンチナン結合陽性細胞の割合とした(図 5 及び図 6 に示した。又図 7 においてFLとして示した)。

また、採血翌日まで室温保存あるいは冷蔵保存した血液、さらに別日に採血した血液についても検討を行った。

【 0 0 2 7 】

20

レンチナンによる結合阻害試験

ヒト血液にレンチナン原末溶液(標準試薬 2)を100 μ g/mlの濃度で添加、37 $^{\circ}$ C、15分培養後、Fluorescein標識レンチナンを10 μ g/mlの濃度で添加、37 $^{\circ}$ Cでさらに30分培養した。その後、ヒトCD14に対するPE標識抗体(CALTAG社製)を添加、さらに37 $^{\circ}$ Cで30分培養後、FACS Lysing Solution(溶血・固定液BD社製;蒸留水にて10倍希釈)を2ml/本添加し、室温で10分放置し溶血した。その後の操作、解析は結合能測定法(前項)と同様に行った(図 7 においてLNT + FLで示した)。Fluorescein標識レンチナンの対象(標準試薬 1)として、Fluorescein標識デキストランを用い、同様の解析を行った。

実験結果ヒト血液を用いた結合能測定法

30

図 5、図 6 に 2 例(例 1、例 2)の結果を示す。単球、顆粒球、リンパ球のいずれも個人差が認められ、強弱はいずれの画分も同様であった(図 5)。1日室温あるいは冷蔵保存した血液および別日に採血した血液で検討した結果を示す。冷蔵、室温いずれの保存条件においても採血当日の結果と同等であった。また、別日に採血した場合も同等の結果であった(図 6)。

レンチナンによる結合阻害試験

図 7 に 2 例(例 3、例 4)の結果を示す。Fluorescein標識レンチナンを最終濃度10 μ g/mlで血液と反応させるよりも先にレンチナン原末溶液100 μ g/mlを共存させた場合には、Fluorescein標識レンチナンの結合が阻害された。

【 0 0 2 8 】

40

まとめ

例えば、図 5 及び図 7 に示されるように、単球(MC)に対するFluorescein標識レンチナン(FL)の結合量(B)からFITC標識デキストランの結合量(A1)を引いた結合量(図に示されている)が大きいので、レンチナンが例 1、例 2、例 3 及び例 4 のヒトの単球に結合すること、また結合量の強弱から例 2 及び例 3 のヒトに対してレンチナンが免疫賦活剤としてより有効であることが推定される。

又、図 7 に示されるように、単球(MC)に対するFluorescein標識レンチナン(FL)の結合量(B)から、未標識レンチナン及びFluorescein標識レンチナン[LNT + FL]に対する結合量(A2)を引いた結合量が大きいので、レンチナンが特異的に例 3 及び例 4 のヒトの単球に結合すること、また結合量の強弱から例 3 のヒトに対してレンチナン

50

が免疫賦活剤としてより有効であることが推定される。

さらに、図6に示されるように、1日室温、冷蔵保存した血液および別日に採血した場合いずれにおいても同等の結果が得られたことから、本発明キットを用いれば多糖結合能を安定して測定することが可能であり、被験者固有の多糖結合能をより正確に測定することが可能である。

【0029】

実施例3

マウスの系統差に関する検討

ヘパリン入りシリンジを用い、エーテル麻酔下にてICRマウス(日本クレア(株)より購入、4~6週齢、雌)、BALB/cマウス(日本チャールスリバー(株)より購入、11~13週齢、雌)、C57BL/6マウス(日本クレア(株)より購入、10~11週齢、雄)、C3H/HeNマウス、C3H/HeJマウス(日本クレア(株)より購入、6~8週齢、雌)より心採血を行った。各マウスについて3例ずつ行った。氷冷下、Falcon2054チューブにヘパリン処理血液を90 μ l/本で分注し、Fluorescein標識レンチナンは10 μ l/本で添加した。30分以上経過後、マウス単球の表面抗原F4/80に対するPE標識抗体(PE標識抗マウスF4/80抗体; Sero tec社製)を3 μ l/本で添加、さらに30分以上経過後、FACS Lysing Solution(溶血・固定液BD社製; 蒸留水にて10倍希釈)を3ml/本添加し、室温で10分放置し溶血した。4、1500rpm、5分の遠心分離後、洗浄用緩衝液(PBS(-)+0.1%BSA+0.1%アジ化ナトリウム)1ml(洗浄・分析液)で洗浄し、洗浄用緩衝液0.5mlに懸濁、メッシュを通した後FACS Caliburによる2カラー(Fluorescein/PE)解析を行った。

データ解析は、FSC/SSCで単球画分、顆粒球画分、リンパ球画分に分け、Fluorescein/PEに展開、単球画分のPE陽性細胞中におけるFluorescein陽性細胞の割合を解析した。

Fluorescein標識レンチナンの対象(標準試薬1)として、FITC標識デキストラン(分子量200万; シグマ)を用い、同様の解析を行った。

【0030】

実験結果

マウスの系統差に関する検討

図8にF4/80陽性単球におけるFluorescein陽性細胞の割合についての平均値を示す。Fluorescein標識レンチナン20 μ g/mlで反応させた場合、BALB/cで割合が高いほかは、いずれの系統も同等であった(図8A)。Fluorescein標識レンチナン5 μ g/mlで反応させた場合は、割合の高い順にBALB/c ICR > C57BL/6 C3H/HeN C3H/HeJという結果であった(図8B)。また、FITC標識デキストラン20 μ g/mlを反応した場合、結合はほとんど認められなかった(図8C)。

まとめ

例えば、図8Bに示されるように、BALB/c、ICRは結合量が多く、C3Hでは結合量が低いことから、レンチナンの免疫賦活剤としての有効性もBALB/c、ICRでは強く、C3Hでは弱いことが推定される。

これに対して、S180マウス肉腫細胞を異なる系統のマウスに皮下移植し、レンチナンの抗腫瘍効果を検討した結果がある(非特許文献1及び6)。これによれば、ICR、BALB/cのS180皮下移植モデルに対するレンチナンの抗腫瘍効果は強く、C57BL/6を用いた場合の抗腫瘍効果は中程度であり、C3Hを用いた場合の抗腫瘍効果は弱く、Fluorescein標識レンチナンの結合量の強弱と同様の傾向であった。

このことから、測定したい免疫賦活多糖の特異的な結合を測定することにより、免疫賦活多糖の免疫賦活剤としての有効性を予測できるものと考えられる(Int. J. Immunotherapy 5(4): 145 (1989))。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】単球画分でのFluorescein標識レンチナン結合試験結果、FITC標識デキストラン結合試験結果、及びFluorescein標識レンチナンに未標識レンチナンを共存させた場合の結合試験結果を示す。

【図2】顆粒球画分でのFluorescein標識レンチナン結合試験結果、FITC標識デキストラン結合試験結果、及びFluorescein標識レンチナンに未標識レンチナンを共存させた場合の結合試験結果を示す。

【図3】リンパ球画分でのFluorescein標識レンチナン結合試験結果、FITC標識デキストラン結合試験結果、及びFluorescein標識レンチナンに未標識レンチナンを共存させた場合の結合試験結果を示す。

【図4】非凍結融解血液及び凍結融解血液の単球画分でのFluorescein標識レンチナン結合試験結果を示す。

【図5】CD14陽性単球画分、顆粒球画分、リンパ球画分でのFluorescein標識レンチナン結合試験結果を示す。

【図6】冷蔵あるいは室温保存した採血翌日の血液、さらに別日に採血した血液を用いた場合の単球画分でのFluorescein標識レンチナン結合試験結果を示す。

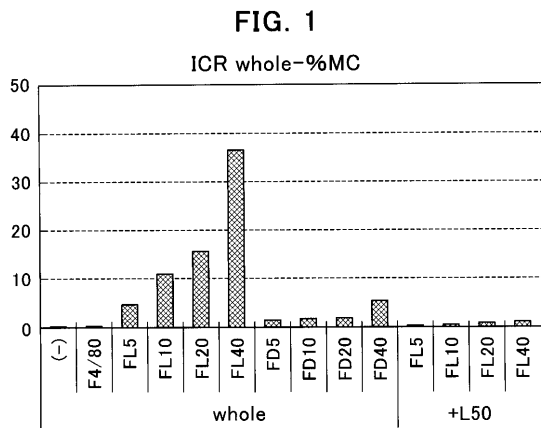
【図7】単球画分でのFluorescein標識レンチナンに未標識レンチナンを共存させた場合の結合阻害試験結果を示す。

【図8】F4/80陽性単球画分でのFluorescein標識レンチナン結合試験結果、FITC標識デキストラン結合試験結果を示す。図中、AはFluorescein標識レンチナン 20 µg/mlの場合、BはFluorescein標識レンチナン 5 µg/mlの場合、CはFITC標識デキストラン 20 µg/mlである。* : p<0.05、*** : p<0.001 (2群間での比較 : Student's T test) 図中、FLはFluorescein標識レンチナン、FDはFITC標識デキストラン、LNTは未標識レンチナン、+LはFluorescein標識レンチナンに未標識レンチナンを共存させた場合を示し、数値は濃度(単位 : マイクログラム/ミリリットル)である。

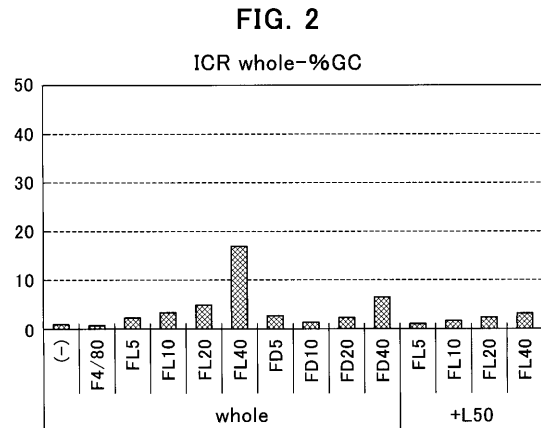
10

20

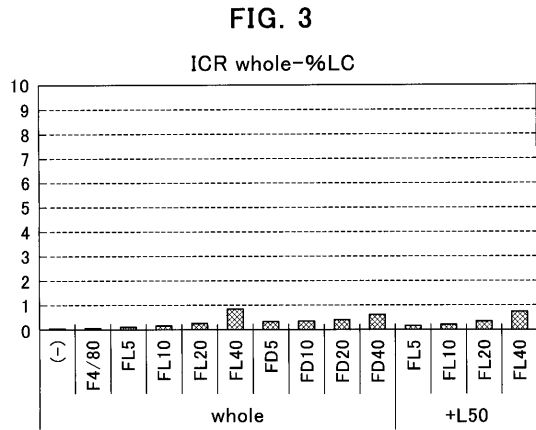
【図1】



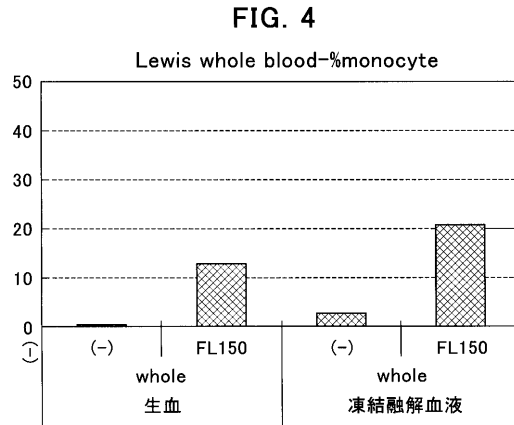
【図2】



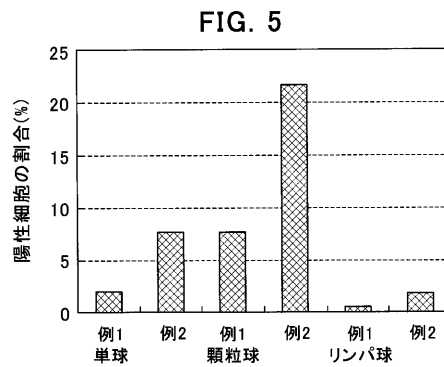
【 図 3 】



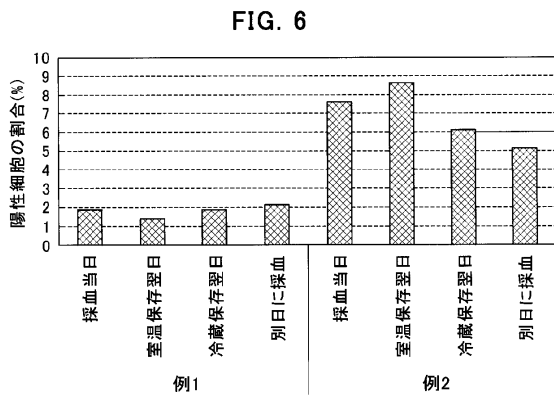
【 図 4 】



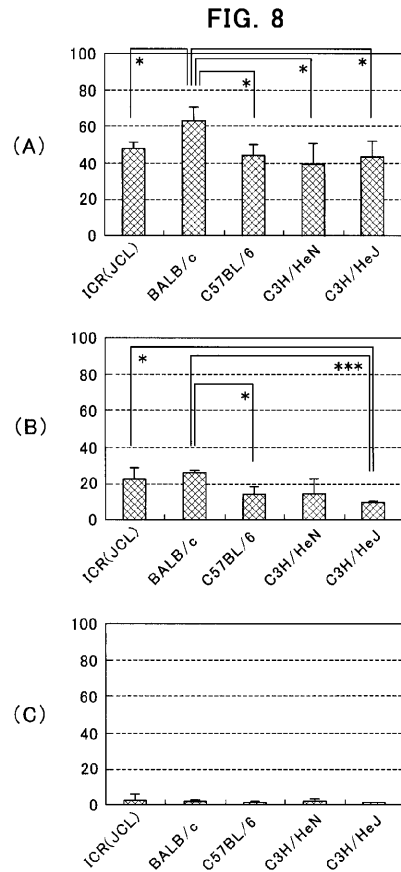
【 図 5 】



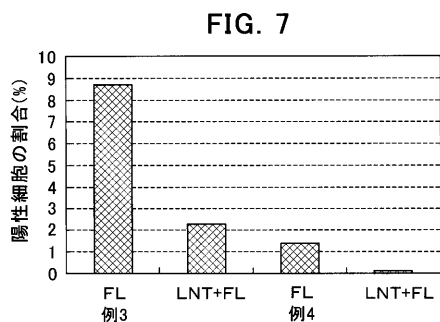
【 図 6 】



【 図 8 】



【 図 7 】



フロントページの続き

- (72)発明者 須賀 哲也
東京都中央区京橋1丁目15番1号 味の素株式会社内
- (72)発明者 須賀 泰世
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内
- (72)発明者 村田 正弘
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内

審査官 三木 隆

- (56)参考文献 特開平04-346791(JP,A)
特開平04-024555(JP,A)
FASEB Journal, 2003年, Vol.17, No.7, Page.C128-73.26
Molecular Immunology, 2003年, Vol.40, No.2-4, Page.195-196-51

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/53
G01N 33/58
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	用于外周血单核细胞的多糖结合能力测量试剂盒		
公开(公告)号	JP4577660B2	公开(公告)日	2010-11-10
申请号	JP2006512936	申请日	2005-04-15
[标]申请(专利权)人(译)	味之素株式会社		
申请(专利权)人(译)	味之素株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	味之素株式会社		
[标]发明人	須賀哲也 須賀泰世 村田正弘		
发明人	須賀 哲也 須賀 泰世 村田 正弘		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/58 C12Q1/02 G01N21/78 G01N33/15 G01N33/49 G01N33/50 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/56972 G01N2400/10 Y10S435/975		
FI分类号	G01N33/53.Y G01N33/58.Z		
代理人(译)	小川伸男		
审查员(译)	三木隆		
优先权	2004121616 2004-04-16 JP 2004233513 2004-08-10 JP 2005036312 2005-02-14 JP		
其他公开文献	JPWO2005108979A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供的用于测定外周血单核细胞结合多糖的能力的试剂盒包括含有荧光标记的免疫刺激性多糖的检测试剂;和参比试剂,其包含与荧光标记的免疫刺激多糖中使用的多糖不同的多糖的荧光标记物质,和/或未用任何荧光物质标记并且其多糖部分与包含在其中的多糖部分相同的免疫刺激多糖。荧光标记的免疫刺激多糖。使用该试剂盒可以以更高的估计精度估计外周血单核细胞的多糖结合能力。

