

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2009/110614

発行日 平成23年7月14日 (2011.7.14)

(43) 国際公開日 平成21年9月11日 (2009.9.11)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48 M	2 G O 4 3
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	2 G O 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/48 P	2 G O 5 4
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/53 K	4 B O 6 3
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 33/68	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 31 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2010-501988 (P2010-501988)	(71) 出願人 504430569 小林 泰信 東京都新宿区余丁町 1 4 - 4 「ジェー・ビー・セラピューティクス株式会社内」
(21) 国際出願番号 PCT/JP2009/054340	
(22) 国際出願日 平成21年3月6日 (2009.3.6)	
(31) 優先権主張番号 特願2008-98732 (P2008-98732)	(71) 出願人 504430868 谷川 啓司 東京都新宿区余丁町 1 4 - 4 「ジェー・ビー・セラピューティクス株式会社内」
(32) 優先日 平成20年3月7日 (2008.3.7)	(74) 代理人 100064012 弁理士 浜田 治雄
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 小林 泰信 東京都新宿区余丁町 1 4 - 4 ジェー・ビー・セラピューティクス株式会社内

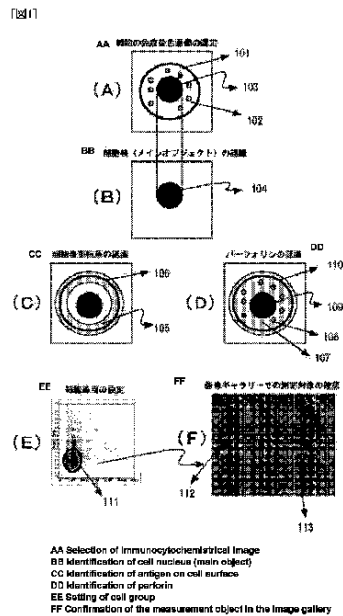
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エフェクター細胞の機能測定法及び測定用キット並びに測定システム

(57) 【要約】

本発明は、従来までのエフェクター細胞の機能測定法のような短所や課題を克服する新たな細胞機能測定法、及び当該測定のための測定キット並びに測定システムを提供することを目的とする。

本発明は、エフェクター細胞の数、性質及びその機能を、細胞の画像の解析が可能なセルベースドアッセイ装置等を用いて、同時に又は随時測定・解析することにより、従来法の組合せよりも優れた、詳細且つ信頼性の高いデータを得ることが可能となった。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも一つ以上の細胞を容器の底面に配列させ、その底面に配列する細胞を蛍光又は発光シグナルを検出できるデジタルカメラでデジタル画像を撮像し、撮像されたデジタル画像から当該細胞の細胞表面及び／又は細胞内に含有及び／又は結合している物質を起源とする蛍光及び／又は発光シグナルを計測し、そのシグナルの当該細胞内での分布や強度を測定する工程を含むことを特徴とするリンパ球の細胞機能の測定方法であって、少なくとも：

a) 前記の蛍光及び／又は発光シグナルの分布や強度の測定結果を使用して、細胞を識別するステップ；

10

を含む測定方法。

【請求項 2】

さらに、

b) 前記の蛍光及び／又は発光シグナルの分布や強度の測定結果を使用して、細胞の傷害の有無を識別するステップを含む請求項 1 記載のリンパ球の細胞機能の測定方法。

【請求項 3】

さらに、

c) 前記の蛍光及び／又は発光シグナルの分布や強度の測定結果を使用して、細胞の産生する物質を検出するステップを含む請求項 1 に記載のリンパ球の細胞機能の測定方法。

20

【請求項 4】

さらに、

c) 前記の蛍光及び／又は発光シグナルの分布や強度の測定結果を使用して、細胞の産生する物質を検出するステップ；

d) 前記の蛍光及び／又は発光シグナルの分布や強度の測定結果を使用して、その測定結果によって細胞同士の接着の有無を検出するステップ；

e) 前記の蛍光及び／又は発光シグナルの分布や強度の測定結果を使用して、その測定結果によって細胞内分子の動態を検出するステップを含む請求項 2 に記載のリンパ球の細胞機能の測定方法。

【請求項 5】

前記の細胞機能の測定が、血液、血液中の単核球分画またはリンパ球分画、またはそれらの培養物をエフェクター細胞として用いて測定されることを特徴とする請求項 1 乃至 4 いずれか一つに記載のリンパ球の細胞機能測定方法。

30

【請求項 6】

前記のリンパ球が、ナチュラルキラー細胞または細胞傷害性 T 細胞のいずれか一種またはその両細胞であることを特徴とする請求項 1 乃至 4 いずれか一つに記載のリンパ球の細胞機能測定方法。

【請求項 7】

前記の容器が、マイクロプレート、マイクロタイタープレート、シャーレ、スライドグラス、フラスコからなる群から選ばれるいずれか一種である請求項 1 乃至 4 いずれか一つに記載のリンパ球の細胞機能測定方法。

40

【請求項 8】

前記の細胞を配列させる場所が、マイクロプレート内のマイクロウェルもしくはマイクロタイタープレート内のウェルの底面であることを特徴とする請求項 1 乃至 4 いずれか一つに記載のリンパ球の細胞機能測定方法。

【請求項 9】

細胞識別および細胞の傷害、細胞の産生する物質、細胞同士の接着ならびに細胞内分子の動態の検出の各ステップのうち、少なくとも一種以上のステップが、特異抗体を用いた免疫化学的方法であることを特徴とする請求項 1 乃至 4 いずれか一つに記載のリンパ球の細胞機能測定方法。

【請求項 10】

50

前記の細胞を識別する方法が、当該細胞の細胞表面及び／又は細胞内に特徴的に存在する分子を認識する方法であることを特徴とする請求項 1 乃至 4 いずれか一つに記載のリンパ球の細胞機能測定方法。

【請求項 1 1】

前記の細胞を識別する方法が、主要組織適合性抗原クラス I 分子上に提示されているペプチド分子を特異的に認識する方法であることを特徴とする請求項 1 乃至 4 いずれか一つに記載のリンパ球の細胞機能測定方法。

【請求項 1 2】

前記の細胞の産生する物質が、サイトカイン及び／又は細胞殺傷成分であることを特徴とする請求項 1 乃至 4 いずれか一つに記載のリンパ球の細胞機能測定方法。

10

【請求項 1 3】

前記のサイトカインがインターフェロニン γ であることを特徴とする請求項 1 2 に記載のリンパ球の細胞機能測定方法。

【請求項 1 4】

前記の細胞殺傷成分がパーフォリン、グランザイム A、グランザイム B、グラニュライシンからなる群から選ばれる分子の一種または二種以上であることを特徴とする請求項 1 2 に記載のリンパ球の細胞機能測定方法。

【請求項 1 5】

前記の細胞傷害の検出が、細胞死及び／又はアポトーシスの検出であることを特徴とする請求項 1 乃至 4 いずれか一つに記載のリンパ球の細胞機能測定方法。

20

【請求項 1 6】

少なくとも請求項 1 乃至 1 4 項のいずれか 1 項に記載の方法を実施するために必要な試薬・器具を構成要素として含む細胞傷害活性測定用キット。

【請求項 1 7】

少なくとも一つ以上の細胞を容器の底面に配列させ、その底面に配列する細胞を蛍光又は発光シグナルを検出できるデジタルカメラでデジタル画像を撮像し、撮像されたデジタル画像から当該細胞の細胞表面及び／又は細胞内に含有及び／又は結合している物質を起源とする蛍光及び／又は発光シグナルを計測し、そのシグナルの当該細胞内での分布や強度を測定する機能を含むことを特徴とするリンパ球の細胞機能の測定システムであって、デジタル画像撮像手段と、撮像した画像を波長別に分光するフィルタと、分光した撮像データから輝度情報と位置情報と波長情報毎に格納するメモリと、撮像データを分析する中央演算部と、演算結果を表示する表示部を備え、

30

a) 前記の蛍光及び／又は発光シグナルの分布や強度の測定結果を使用して、細胞を識別する機能を備えるリンパ球の細胞機能の測定システム。

【請求項 1 8】

さらに、

b) 前記の蛍光及び／又は発光シグナルの分布や強度の測定結果を使用して、細胞の傷害の有無を識別する機能を備える請求項 1 7 記載のリンパ球の細胞機能の測定システム。

【請求項 1 9】

さらに、

40

c) 前記の蛍光及び／又は発光シグナルの分布や強度の測定結果を使用して、細胞の産生する物質を検出する機能を備える請求項 1 7 記載のリンパ球の細胞機能の測定システム。

【請求項 2 0】

さらに、

c) 前記の蛍光及び／又は発光シグナルの分布や強度の測定結果を使用して、細胞の産生する物質を検出する機能と；

d) 前記の蛍光及び／又は発光シグナルの分布や強度の測定結果を使用して、その測定結果によって細胞同士の接着の有無を検出する機能と；

e) 前記の蛍光及び／又は発光シグナルの分布や強度の測定結果を使用して、その測定結果によって細胞内分子の動態を検出する機能とを備える請求項 1 8 記載のリンパ球の細胞

50

機能の測定システム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この発明は、リンパ球の細胞傷害活性を中心とする細胞機能を測定する方法、及びそのための測定用キット並びに測定システムに関するものである。

【背景技術】

【0002】

我々の体には異物を認識して排除する免疫機構が備わっている。外部から侵入した病原体や、生体内で生じた癌細胞等の異常な細胞は異物として認識され、様々な免疫系のメカニズムによって生体から排除される。このような免疫機能は、血液やリンパ液の流れに乗って全身をくまなく循環する白血球によって巧妙に制御されている。

10

【0003】

白血球のうち、いわゆる細胞性免疫の効果相（エフェクター・フェーズ）で主役を担うのがリンパ球である。リンパ球のうち、ナチュラルキラー細胞（以下、NK細胞と略す場合がある）や細胞傷害性T細胞（以下キラーT細胞と略す場合がある）等の、いわゆるエフェクター細胞と呼ばれる細胞群は、例えばウイルスに感染した細胞や癌細胞等、生体内の、自分自身の細胞に生じた異常を感知し、そしてその異常細胞を殺傷することによって排除する（例えば、非特許文献1）。

【0004】

エフェクター細胞がウイルス感染細胞や癌細胞を殺傷するメカニズムは複数報告されているが、特にNK細胞とキラーT細胞の場合には、パーフォリンとグランザイム類を介した細胞傷害活性のメカニズムが重要な役割を果たしている（例えば、非特許文献1参照）。これらのエフェクター細胞は、標的細胞に接着した後に、パーフォリンやグランザイム類等を放出する。パーフォリンは標的細胞の細胞膜に孔を開け、グランザイムがその孔を通して標的細胞内に注入される。ヒトのグランザイムには少なくともA、B、H、M、Kの5種類が存在するが、この内、グランザイムBは、標的細胞内に存在するカスパーゼ3等のアポトーシス関連酵素を活性化することで標的細胞にアポトーシスを誘導し、そして最終的に標的細胞を死に到らしめるとされる。一方グランザイムAは、その詳細な作用メカニズムは不明だが、少なくともカスパーゼ非依存的な経路によって標的細胞にアポトーシスを誘導するとされる。またパーフォリンとグランザイムと同時に、脂質結合性蛋白であるグラニューライシンも細胞外に放出される。グラニューライシンの作用メカニズムやその生理的意義にはまだ不明な点も多いが、標的細胞の細胞膜に直接結合することで標的細胞に細胞死を誘導する可能性が指摘されている（例えば、非特許文献2参照）。

20

30

【0005】

近年になって、このエフェクター細胞の機能を応用した免疫細胞療法が、癌の治療や予防に適用されている。その代表的なものに「LAK療法」と「活性化リンパ球移入療法」がある（例えば、非特許文献3参照）。

【0006】

この内、「LAK療法」は、体外に取り出したリンパ球をインターロイキン2等によって癌細胞殺傷能力が高まるように活性化し、その細胞を再度生体内に戻す療法である。実際にリンパ球をインターロイキン2存在下で培養すると、リンパ球中のNK細胞のパーフォリン含有量が顕著に高まることが報告されている（例えば、非特許論文4）。また「活性化リンパ球移入療法」は、体外に取り出したリンパ球中のキラーT細胞を特異的に活性化させる免疫細胞療法だが、「LAK療法」同様に、パーフォリン・グランザイム等による標的細胞殺傷能力を亢進させることが、治療効果を高める重要な要素となる。

40

【0007】

したがって、上記の免疫細胞療法を施行するにあたって、投与される治療用細胞のエフェクター細胞としての機能を、事前の検査で十分に確認しておくことが重要である。すなわち治療用細胞、それは純化された均一な細胞集団ではなく、ほとんどの場合は抗原特異

50

性の異なる多様性に富んだリンパ球の集合であるが、少なくともその細胞集団の中に、目的とするエフェクター細胞がどの程度の比率で存在しているか、加えてそのエフェクター細胞が、実際にパーフォリンやグランザイムB等の殺傷成分を発現しているかどうか、その発現量がどの程度なのか、そして当該治療用細胞が、実際に標的となる癌細胞を殺傷する細胞傷害活性を有しているか否かを確認しておくことが重要である。さらに治療前後の、患者の血液中に存在するエフェクター細胞の比率やその機能を検査すること、また治療の経過に伴うそれらの変動を随時モニタリングすることは、治療効果を的確に把握するために重要であるのみならず、将来の適切な治療方針を決定する上でも極めて重要である。

【0008】

一方、生体本来が備える免疫機能は、免疫細胞療法による癌治療の場面に限らず、予防医学的な観点からも注目されている。特にNK細胞が癌細胞を殺傷する機能はNK活性とも呼ばれ、生体の免疫機能の代表的な指標の一つとして広く認知されている。

【0009】

NK活性は、一般的には、クロミウム遊離試験と呼ばれる検査やフローサイトメトリーによる細胞傷害活性試験によって評価されるが(例えば、非特許文献5参照)、その活性は年齢や生活習慣によって変動することが報告されており(例えば、非特許文献6参照)、さらにその活性が、ある種の健康食品やサプリメントの摂取等によって亢進することも報告されている(例えば、非特許文献7参照)。すなわちNK活性は、今日では健康増進のバロメータとして、さらには生体の免疫機能に対する薬品、食品、サプリメント等の効果を確認するための手段としても重要な検査項目として位置付けられている。

【0010】

【非特許文献1】Russell JH, Ley TJ, Annu. Rev. Immunol, 20:323-370 (2002)

【非特許文献2】Lettau M, Schmidt H, Kabelitz D, Janssen O, Immunol Lett, 108: 10-19 (2007)

【非特許文献3】有賀、清水、高崎：東京女子医科大学雑誌、74：291-299 (2004)

【非特許文献4】Rukavina D, Laskarin G, Rubesa G, Strbo N, Manestar D, Glavas M, Christmas SE, Podack ER, Blood, 92: 2410-2420 (1998)

【非特許文献5】Kim GG, Donnenberg VS, Donnenberg AD, Gooding W, Whiteside TL. J Immunol Methods, 325: 51-66 (2007)

【非特許文献6】竹下・森本：臨床病理、43：1087-1094 (1995)

【非特許文献7】Nagao F, Nakayama M, Muto T, Okumura K, Biosci Biotechnol Biochem, 64: 2706-2708 (2000)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

上述のように、エフェクター細胞の機能の測定は、生体の免疫能を知る上で重要な検査項目である。そして現状では様々な手法によってエフェクター細胞の活性が評価されている。しかし以下に述べるように、個々の検査内容には様々な短所や問題点が内在している。

【0012】

NK細胞の機能は、NK活性を測定するのが一般的である。すなわち被験者の末梢血等をエフェクター細胞とし、骨髄性白血病細胞株であるK562細胞を標的細胞とし、各検査施設が独自に定めた比率でこれらの細胞を共培養し、そして一定時間後に、標的細胞で

あるK562細胞の傷害の程度を測定する。細胞傷害の測定は、クロミウム遊離試験によって評価されるのが一般的である。そしてその結果は、例えば末梢血中のリンパ球とK562細胞を10:1の比率で混合して4時間培養し、そして培養4時間後の時点で、傷害を受けたK562細胞が全体の60%であったとすると、NK活性が60%であると定義する。

【0013】

しかしこの検査は、一般にNK活性と称されるものの、実際の検査材料は、血液または単核球細胞を中心とする白血球の細胞集団である。そしてNK細胞は、これらの検体中に、通常は十数パーセント程度かそれ以下しか含まれない。また各試験での検体中のNK細胞数は一定ではない。加えて検体中に存在するNK細胞は、数だけでなく、その機能面でも均質ではないと考えられる。例えば前述の非特許論文4には、NK細胞のパーフォリン含有量が、性別や年齢によって異なっていることが記されている。

10

【0014】

すなわちクロミウム遊離試験のような、従来のNK活性評価とその測定結果は、検体中のNK細胞数やその質の違いを考慮に入れず、単に標的細胞に生じる細胞死という最終結果を表わすものに過ぎない。よってNK細胞数が多い検体は、一般に、より高いNK活性値を示す傾向があり、逆にNK細胞数が少ない検体は低いNK活性値を示す傾向がある。また複数の検体を比較してNK活性に違いが認められた場合、その違いがNK細胞数の違いによるものか、個々のNK細胞の機能に違いがあるためなのか、様々な可能性が考えられるが、上述の検査法ではその詳細を明らかにすることはできない。

20

【0015】

クロミウム遊離試験に加えて、フローサイトメトリーやRT-PCR等の別の手法を用いて、検査材料中のNK細胞の比率やパーフォリン・グランザイムBの発現量を解析することも可能である。しかしそれらの追加検査を行うには、より多くの時間と労力ならびに費用を要し、さらに検査に要する細胞量も多くなるため、例えば免疫細胞療法においては、検査に用いる細胞数が増えることで、本来の治療に用いるべき細胞数が減る、という不都合も生じることになる。

【0016】

一方、非特許文献5でも開示されているように、近年ではクロミウム遊離試験の代替法として、フローサイトメーターによる細胞傷害活性試験も開発されている。このフローサイトメーターでの試験では、複数の抗体と蛍光色素を適切に組み合わせることで、標的細胞に生じた細胞傷害の程度の測定と同時に、その検査に用いた検体中のNK細胞の比率、またそのNK細胞のグランザイムの発現頻度等を測定することも可能である。しかしそれらの複数の検査データは、例えば単位細胞あたりの細胞傷害活性を算出する等、NK活性を補正する場合には有用であるが、その一方で、いずれも個々に独立したデータであって、単にそれらのデータの集積や組合せだけでは、NK細胞と標的細胞間の相互作用の詳細や、個々の細胞に生じた細胞レベル・分子レベルでの現象の詳細を解析することは困難である。

30

【0017】

そもそもフローサイトメーターでの測定と解析において、測定時に保存され、また解析に使用されるデータは、細胞が装置内の流路を流れた時に検出された散乱光や蛍光強度等の数値データであり、それらの複数のパラメータをリストモードデータに変換したものを統計解析処理するのであって、細胞そのものを直接解析対象としているわけではない。よって解析ソフト上で様々な解析手法を駆使したとしても、解析できる現象とそのデータの精度には限度がある。例えば、前出の非特許文献5では、フローサイトメーターによって、NK細胞やT細胞と標的細胞との接着を解析する事例が開示されている。しかし散乱光や蛍光強度等の数値データとそのデータ解析手法の工夫だけで、細胞同士の接合を検出したり解析するには限界があり、顕微鏡で細胞像を直接確認して解析する場合と比べて、その解析データの信頼性が劣ることは明らかである。またフローサイトメーターでは、その機器の特性として、測定対象とした個々の細胞を測定後に回収することは困難である。

40

50

よって、仮に解析結果の信頼性に何らかの疑義が生じたとしても、もはや個々の細胞を回収して再測定することは極めて困難であり、実質的には解析結果の信頼性を後になって立証する術はない。

【0018】

一方、キラーT細胞の場合には、NK細胞と比べてその細胞数が少ないが故に、当該細胞の機能測定は極めて困難となり、生体内のある特定の細胞集団、例えば末梢血単核球中の当該細胞の頻度の測定しかできない場合も少なくない。特に、癌患者の末梢血中に検出される、ある特定の腫瘍抗原に対する特異的キラーT細胞の数は極めて微量であり、例えば、その検出頻度はキラーT細胞全体の0.1%、末梢血単核球画分中では0.01%にも満たない場合が少なくない。このような状況では、通常の採血で回収できる腫瘍抗原特異的なキラーT細胞数は極めて微量であり、上述のクロミウム遊離試験やフローサイトメーターを用いた細胞傷害活性試験等を実施するための、必要最低限度の細胞数すら確保できず、結果として、標的癌細胞に対する細胞傷害活性を直接測定することもできない場合が多い。よって現状では、ほとんどの場合、MHCテトラマー法やELISPOT法等により、末梢血のキラーT細胞中の、ある特定の抗原に応答する特異的キラーT細胞の頻度の測定を限度とする検査しか行われぬ。

10

【0019】

そしてそのMHCテトラマー法やELISPOT法による頻度測定ですら、測定対象となる細胞が微量であるが故に、データの信頼性や再現性の確保が困難である、と言わざるを得ない。例えばMHCテトラマー法は、抗原ペプチドとMHCクラスI様分子との複合体を蛍光色素等で標識し、当該分子と結合するキラーT細胞をフローサイトメーターで検出して解析する方法であり、感染症研究分野では、ウイルス抗原を特異的に認識するキラーT細胞を検出するための代表的な手法の一つとして広く用いられている。しかしフローサイトメトリーでの解析では、例えば測定対象が測定する細胞の0.01%にも満たないような微量の場合には、一般にデータの信頼性確保が困難となる。そして上述のように、データ解析の時点で仮に何らかの疑義が生じた場合、例えばあるドットプロット解析における、一つの細胞の存在を示すドットが、測定対象である細胞に由来するシグナルなのか、あるいは混入したノイズによるアーチファクトなのかということに疑問を持ったとしても、もはやその一つのドットを対象として再測定や再解析することは叶わない。

20

【0020】

一方、ELISPOT法は、特異抗原で活性化されたキラーT細胞が産生するインターフェロン γ （以下、IFN γ と略す場合がある）やグランザイムB等を検出する方法であり、MHCテトラマー法と同様に、抗原特異的キラーT細胞を検出するための代表的手法の一つとして汎用されている。しかし、低頻度の細胞解析におけるデータの信頼性確保は、MHCテトラマー法同様に困難である。加えて、測定対象は、膜に点在するスポット、すなわち細胞が産生したIFN γ やグランザイムB等を酵素抗体法等で染色して可視化したスポットであって、やはり細胞を直接測定対象としているのではない。それらの物質が検出された場所（スポット）に、かつてその物質を産生した細胞が存在していたと解釈する。従って測定後に、反応の特異性に疑義が生じたとしても、そのスポットの位置に本当にその物質を産生した細胞が存在していたのかどうかを、後になって立証する術はない。

30

40

【0021】

以上のように現状のキラーT細胞の検査は、測定対象となる細胞を十分量確保することが困難であるが故に、その細胞の細胞傷害活性を直接評価することが難しく、さらにその細胞の頻度の測定ですら、信頼性や再現性の確保が容易ではないのが現状である。

【0022】

本発明は、上述のような、従来までのエフェクター細胞の機能測定法の短所や課題を克服するための、新たな細胞機能測定法を提供すること、及び当該測定を実施するためのキット並びにその測定システムを提供することを目的とする。すなわち本発明は、エフェクター細胞の、標的細胞に対する細胞傷害活性等の機能を詳細且つ網羅的に、かつ高い精度で測定するための新たな細胞機能測定法及び当該測定を実施するためのキット並びにその

50

測定システムを提供する。

【課題を解決するための手段】

【0023】

かかる問題を解決するために鋭意検討した結果、発明者らは、エフェクター細胞の機能を評価するためには、細胞傷害活性のメカニズム全体を検査対象として、エフェクター細胞が標的細胞を死滅させる際の様々な細胞生物学的な現象を、詳細且つ網羅的に解析することが不可欠であると考えに至った。そして種々の細胞レベル、分子レベルでの現象を同時に、さらに必要に応じて随時測定しなければならないと考えた。加えて、低頻度の細胞の機能の測定に際して、そのデータの信頼性や再現性の確保のために、必要に応じて再解析することが可能な測定法でなければならないと考えた。そして最終的に、種々の細胞レベル、分子レベルでの現象を画像イメージとして取得し、それらの画像データを様々な解析手法を用いて解析する新たな細胞機能評価法を確立し、発明を完成するに至った。

10

【0024】

本発明の一態様は、例えば標準マイクロタイタープレート中でエフェクター細胞と標的細胞を任意の時間、任意の割合で混合して培養し、必要に応じて、複数の分子を蛍光標識抗体や蛍光物質等により標識し、その後、上記のプレート中の細胞の一つ一つの画像イメージの取得と解析が可能なセルベースドアッセイ装置を用いて、複数の分子の発現を同時に、また必要に応じて随時測定し、そしてそれらの測定結果を定性及び定量的に解析することを特徴とするエフェクター細胞評価法を提供するものである。

【0025】

ここで、標準マイクロタイタープレートの底は平底であることが望ましく、また、サンプルとなる細胞は、一つまたは複数のいずれでもよい。さらに、複数の細胞をサンプルとする場合は、前記平底の底面に単層で配置することが望ましい。

20

【0026】

すなわち本発明では、検体中の、目的とするエフェクター細胞の比率、細胞内にパーフォリン・グランザイムを発現するエフェクター細胞の比率、また個々のエフェクター細胞内のパーフォリン・グランザイム含有量等、従来までフローサイトメーター等を用いて測定していた項目と、個々のエフェクター細胞中のパーフォリン・グランザイム等の局在、並びにエフェクター細胞が標的細胞に遭遇することによって生じるパーフォリン・グランザイム等を含有する細胞内顆粒の細胞内動態等、従来までは蛍光顕微鏡やレーザー共焦点顕微鏡等で観察していた項目とを同時に測定する。加えて、エフェクター細胞の標的細胞への接着や、標的細胞でのアポトーシスに係る変化等の細胞生物学的な現象も、同一サンプル中で同時に測定する。これら複数のパラメータを同時に計測することで、エフェクター細胞の機能の詳細を網羅的に、かつ包括的に解析することが可能となる。

30

【0027】

具体的には、標的細胞の細胞傷害を測定して定量化する際に、当該現象が、例えばアポトーシスによるものなのかどうか、そして標的細胞へのエフェクター細胞の付着はどの程度なのか、エフェクター細胞の細胞質内に、標的細胞にアポトーシスを誘導せしめる殺傷成分、例えばグランザイムBが発現しているか、そしてそのエフェクター細胞が標的細胞を殺傷せんがために、当該細胞内のグランザイムBを含む細胞内顆粒を標的細胞との接着面に移動させているか否か、といった諸現象を同時に測定・解析する。さらに検体中に存在するエフェクター細胞の比率、グランザイムBを発現するエフェクター細胞の比率、また個々のエフェクター細胞のグランザイムB発現量も同時に測定して解析する。すなわち本発明に係る方法によれば、エフェクター細胞の量と質、そしてその機能を詳細に、また同時に、かつ多面的に解析することが可能となり、それによって当該現象の特異性と妥当性を確認することが可能となる。

40

【0028】

さらに本発明は、細胞個々の画像データを取得し、そしてその画像データを解析対象とするため、上記のような、細胞の詳細な形態学的観察や解析が可能となることに加え、データ解析時に細胞一つ一つの画像を確認することで、検体の調製や測定時に混入した異物

50

を発見したり、その異物に由来する疑陽性データを発見することが容易となる。そして当該疑陽性データを除いた真の陽性データのみで結果を再解析することが可能となる。このような疑陽性データの排除と再解析は、従来法であるクロミウム遊離試験やフローサイトメトリーによるNK活性測定、またMHCテトラマー法やELISPOT法でのキラーT細胞の頻度の測定では行うことのできない、当該発明の優れた特性の一つである。従ってキラーT細胞のような低頻度の細胞群を測定対象とする場合であっても、従来法と比べて、より信頼性の高い測定と解析を行うことが可能となる。

【0029】

あわせて本発明では、ある複数パラメータを測定して解析が終了した後であっても、必要に応じて、別のパラメータを加えて再測定し、再度データを解析し直すことが可能である。10
前述の例では、エフェクター細胞のグランザイムBの発現を測定・解析する例を提示したが、本発明では、当該測定及び解析が終了した後に、改めて当該測定対象のエフェクター細胞が、別の殺傷成分であるグランニューライシンを発現しているか否かを調べたい場合、免疫学的に交差しない適切な抗体を用い、また光学的に検出可能で、かつ他のパラメータ測定に用いた蛍光色素等と分離測定可能な波長を有する標識色素を用いることで、マイクロタイタープレート中の同一細胞のグランニューライシンを染色し、他の複数パラメータとともに、改めて測定や解析をやり直すことが可能となる。このような利便性、すなわち同一検体を用いて、ある一連の測定と解析が終了した後に、別のパラメータを加えて再測定・再解析を行うことができるという利便性は、従来法にはない、本発明の優れた特性の別の一面である。従来法であるクロミウム遊離試験やフローサイトメトリーによるNK活性測定、またMHCテトラマー法やELISPOT法でのキラーT細胞の頻度の測定では、20
このような、同一検体での、新たなパラメータを加えた再測定・再解析は不可能である。

【0030】

上述のような測定・解析を行うための装置は、具体的には特定されないが、例えばオリンパス製のRS-100のような細胞イメージ解析装置等、細胞の蛍光顕微鏡画像を全自動で取得し、さらに蛍光輝度情報や細胞形態情報などを解析して数値化することで統計的なデータを取得することができるような装置であることが望ましい。すなわち当該測定装置は、例えば測定対象が、標準平底96穴のマイクロタイタープレートのウェル底部に固着し、かつ、様々な蛍光標識を施した細胞単層であった場合、その96穴マイクロタイタープレートを保持するために適合したステージを有し、そしてそのステージを移動させる手段を有し、また例えばCCDカメラのようなデジタルカメラ、励起光を細胞に方向付ける光源、および細胞から放射された蛍光をデジタルカメラに方向付けるための手段を備え、さらにそのデジタルカメラからのデジタルデータを受信及び処理するためのコンピューターシステムを有するセルベースドアッセイ装置である。そして当該96穴マイクロタイタープレートの全領域を画像描出し、この画像を解析して、個々の細胞の表面抗原や細胞内抗原の発現量等を定量解析することが可能な装置である。30

【0031】

上述の装置は、少なくとも10倍の対物レンズ、好ましくは20倍以上、さらに好ましくは40倍以上の対物レンズを装備する高倍率蛍光光学系装置であって、細胞の内部構造を詳細に観察するための顕微鏡画像の取得が可能な装置であることが好ましい。また高感度検出のために、異なる励起波長と蛍光波長を持つ多くの蛍光分子を幅広く検出することが可能な光源と検出器を備えていることが好ましい。その際、同一検体で複数のパラメータの検出を行うためにも、複数の蛍光色素で多重染色した場合に、各々の色素ごとの蛍光強度を独立して精度よく測定するための光学的分離機能、光学フィルタ等を有していることが好ましい。そして、独立して同時に測定できる蛍光色素の数は少なくとも2種以上、望ましくは4種以上の色素を同時に用いることができる光学的測定機能を有する装置であることがさらに好ましい。40

【0032】

そして上述の装置は、例えばCCDカメラからのデジタルデータを受信して処理するためのコンピューター手段を有するものであり、具体的にはデータを画像イメージとして保存50

し、必要に応じて当該画像イメージを加工し、また定量的に解析することができるような画像解析機能を搭載しているか、または外部の画像解析装置と連動して測定データを加工・解析できる装置であることが好ましい。加えて、例えば標準96穴マイクロタイプレート等の多数のウェルを有するプレートを使用した場合でも、測定時に自動的にアライメント及びフォーカスする機能を搭載することで、多様な処理を施した、より多くの細胞の画像イメージデータを、自動で高速に取得する機能を有する装置であればさらに好ましい。

【0033】

例えば、前述の非特許文献5では、イメージングフローサイトメーター装置を用い、散乱光や蛍光データからバーチャルな細胞像をディスプレイ上で再現し、あたかも顕微鏡画像による形態学的観察を行っているような解析事例が示されている。しかしこの論文で開示されている方法は、基本的にフローサイトメトリー手法を改変した方法であって、細胞の画像データを解析対象とする当該発明とは本質的に異なっている。すなわち本発明に係る方法では、CCDカメラ等で取得した細胞の画像イメージを測定・解析対象として保存し、そしてその画像データを様々な画像処理によって数値化データとして換算して統計解析等を行う。しかし上記の論文での測定方法は、従来までのフローサイトメトリーでの解析法、すなわちある特定の流路を連続的に流れる細胞にレーザー光等の光を照射した際の、個々の細胞が発生する散乱光や蛍光の強度を発光位置情報と共にデータとして保存し、その光学的データを様々な手法で解析する方法である。従って当該非特許文献に記載の方法は、細胞を直接観察し、その画像データを直接解析対象とする本発明とは本質的に異なる方法である。加えて、前述のように、フローサイトメトリーを用いた測定法であるが故に、疑陽性データの排除と再解析ができず、また同一検体での新たなパラメータを加えた再測定・再解析も不可能であり、この点からも、本発明に係る測定法とは本質的に異なる方法であると考えられる。

【0034】

なお、撮像装置としては、CCDイメージセンサを含むCCDカメラの他にCMOSイメージセンサを用いることもでき、300nm乃至800nmの蛍光を含む光を検出して、撮影対象物から発した光をレンズなどの光学系によって撮像素子の受光平面に結像させ、その像の光による明暗を電荷の量に光電変換し、それを順次読み出して電気信号に変換する。

【0035】

すなわち発明に用いる装置は、CCDイメージセンサやCMOSイメージセンサ等のイメージを撮像して測定・解析を行うための装置デジタル画像撮像手段と、撮像した画像を波長別に分光するフィルタと、分光した撮像データから輝度情報と位置情報と波長情報毎に格納するメモリと、撮像データを波長毎の光強度としてその波長対周波数のグラフを入手して分析する中央演算部と、演算結果を表示する表示部を備えるものである。

【0036】

発明の別の好ましい実施態様として、本発明は、標的細胞に生じた傷害を検出する方法として、細胞死を検出する方法乃至アポトーシスを検出する方法を提供するものである。

【0037】

細胞死の検出方法は特に限定されるものではないが、例えば常法に従って、PI（プロピジウムイオダイド）や7-AAD（7-アミノアクチノマイシンD）等を用いて、生細胞と死細胞を識別する方法も用いることができる。

【0038】

一方、アポトーシスを検出する方法も特に限定されるものではないが、例えばアポトーシス初期段階で細胞に発現する特徴的な分子である活性型カスパーゼ3を測定対象として用いることができる。カスパーゼ3は、例えばエフェクター細胞から標的細胞内に注入されたグランザイムBの作用によって切断されることで、細胞質内で活性型となるが、この活性型カスパーゼ3を特異抗体を用いて免疫染色により可視化することで、アポトーシスの発現を評価する。また標的となる癌細胞が上皮系細胞の場合には、サイトケラチン18

をアポトーシスの指標とすることもできる。サイトケラチン18は、活性化されたカスパーゼ3（またはカスパーゼ7）により切断されるが、その切断されたサイトケラチン18を免疫化学的に検出することで、標的細胞に生じたアポトーシスを検出することも可能である。

【0039】

またアポトーシスの検出には、上述のような免疫化学的手法に加えて、例えば活性型カスパーゼ3に特異的に結合する蛍光標識化合物や、カスパーゼ3によって切断されることで蛍光発色するような特異的な基質等の化学物質を用いて、活性型カスパーゼ3の量や、その酵素活性を測定する方法でもよい。また蛍光標識したアネキシンVを用いて、アポトーシス初期段階で細胞表面に露出するフォスファチジルセリンを検出する方法や、細胞核をDAPI等の色素で染色することで、核の濃縮・断片化等のアポトーシス細胞に特徴的な形態学変化を指標として定量解析する方法を用いてもよい。

10

【0040】

そして本発明のある好ましい実施態様では、標的細胞そのもの、又は上述のような様々な指標によって選別された、何らかの傷害を受けた標的細胞や、アポトーシスを生じた標的細胞及び/又はアポトーシスに特徴的な分子を発現している標的細胞に、実際にエフェクター細胞が接着しているかどうかを確認する工程を含むことを特徴とするエフェクター細胞の機能測定法を提供する。エフェクター細胞と標的細胞との接着は、エフェクター細胞が標的細胞を殺傷するために不可欠な現象である。したがって経時的にこの現象を解析する工程を含むことによって、当該エフェクター細胞が、実際に標的細胞を識別して接着する能力を有する機能的な細胞であるか否かを確認することができる。

20

【0041】

エフェクター細胞の特定には様々な方法を用いることができるが、当該エフェクター細胞に特徴的な分子の検出、例えばNK細胞の場合には、NKp46やNKp30等のNK細胞の細胞表面に特徴的に発現する分子を利用して特定する方法を用いることができる。ただ検体によっては、これらの分子の発現が極端に低いために細胞の特定が困難な場合もあるので、例えばCD56陽性且つCD3陰性の細胞を選択する等、他の複数の抗原分子を組み合わせて特定してもかまわない。

【0042】

また抗原特異的なキラーT細胞を識別するためには、主要組織適合性抗原クラスI分子上に提示されているペプチド抗原を検出する方法を用いるのが好ましく、具体的には蛍光標識MHCテトラマー分子等によって検出する方法が好ましい。しかし抗原によっては、当該MHCテトラマー分子を容易に作製できない場合もあるので、CD3陽性且つCD8陽性の細胞を選別する等、他の複数の分子の発現の有無を指標に識別する方法を用いてもよい。

30

【0043】

さらに抗原特異的なキラーT細胞の識別には、特異抗原による刺激に応じて、当該抗原特異的キラーT細胞から産生される分子、あるいは特異抗原刺激に応じて発現量が変化する、当該抗原特異的キラーT細胞の細胞内の分子の発現量等を指標とすることもできる。具体的には、特異抗原の刺激による、キラーT細胞からのIFN γ 等のサイトカインの産生、または当該サイトカイン等の細胞内での蓄積、またパーフォリン、グランザイムA、グランザイムB、グラニューライシン等の細胞殺傷成分の細胞内での発現の亢進等を指標とすることができる。

40

【0044】

もし純化されたエフェクター細胞を用いることが可能であれば、上記の方法に加えて、例えばGFP等を発現させるための蛍光マーカー遺伝子、または蛍光分子そのものを直接当該細胞に取り込ませることで識別する方法、あるいは事前に特定の分子、例えば細胞分裂時にプロモデオキシウリジン等を細胞内に取り込ませ、その分子の発現の有無を指標としてエフェクター細胞を識別する方法を用いてもかまわない。

【0045】

50

一方、標的細胞は、例えば細胞のサイズの違い等、その形態学的な特徴だけでエフェクター細胞と識別可能であれば、特に蛍光分子等で標識する必要はない。しかし他細胞と識別する必要がある場合には、エフェクター細胞の標識と同様に、当該標的細胞に特徴的な分子を認識する抗体等を用いて蛍光標識すればよい。また標的細胞が上記のK562細胞のような株化細胞であれば、例えばGFP等を発現させるための蛍光マーカー遺伝子、または蛍光分子そのものを直接標的細胞に取り込ませることで標的細胞を標識して識別する方法、あるいは前述のように、例えばプロモデオキシウリジン等を細胞内に取り込ませて標識し、その分子の発現の有無を指標として標的細胞を識別する方法を用いてもかまわない。

【0046】

10

エフェクター細胞と標的細胞の接着を検出する方法は特に限定されない。例えば、画像データ中の標的細胞を一つ一つ観察し、実際にエフェクター細胞が付着する細胞の比率を計測するのが最も容易である。一方、マスキング・ツールを有する画像解析装置であれば、当該解析ツールを用いて解析を行ってもよい。その場合、例えば標的細胞の核乃至細胞膜を染色し、そして任意の標的細胞の、当該染色部位の外周に、その周囲に付着するリンパ球が含まれる程度の領域、画像上では標的細胞の細胞核乃至細胞膜の周囲の一定ピクセル外側に、細胞核乃至細胞膜の形状と相似形の領域を設定（マスク）し、その領域内にエフェクター細胞を起源とする蛍光シグナルが存在するかどうかを調べることで、エフェクター細胞が接着する標的細胞と、エフェクター細胞が接着していない標的細胞とを自動的に選別して計測することが可能となる。

20

【0047】

さらに本発明の別の好ましい実施態様では、エフェクター細胞の細胞内にある細胞殺傷成分の量と、その動態を確認する工程を含むことを特徴とするエフェクター細胞評価法を提供するものである。測定対象となるパーフォリン、グランザイムA、グランザイムB、グラニュライシンの量は、常法通りに特異抗体を用いて免疫蛍光染色を施し、その蛍光強度を測定して定量化することができる。また高倍率で解像度の高い画像を取得できれば、細胞内の顆粒数を計測して算出することもできる。

【0048】

一方、これら細胞殺傷成分のエフェクター細胞内での動態を解析する方法は特に限定されないが、上述と同様に、直接細胞の画像を観察して解析する方法及び画像解析装置による自動解析のどちらかの方法を用いることができる。すなわち、これらの殺傷成分を含む細胞内顆粒は、通常はエフェクター細胞内に比較的均一に分布しているが、エフェクター細胞と標的細胞とが接着すると、標的細胞内に注入される前段階として、細胞内細胞殺傷成分がその細胞接着面付近に集積する（例えば、前述の非特許論文2参照）。この現象を利用して、エフェクター細胞の殺傷成分の細胞内での動態を解析する。

30

【0049】

具体的には、細胞画像を直接観察し、標的細胞との接着面の周辺に細胞内顆粒を集積させているエフェクター細胞数を計測し、その比率を算出する方法があげられる。一方、画像解析機能を利用する場合には、例えばエフェクター細胞とその細胞内顆粒、及び標的細胞の核乃至細胞膜を染色した画像データを用い、上記と同じくマスキング・ツール等の解析手法を用い、当該画像データ上で、標的細胞の核の外周乃至細胞膜から等間隔ごとに拡がる任意のドーナツ型の領域を設定し、そのドーナツ型の領域内に含まれるエフェクター細胞の細胞内顆粒の数及び／又はその蛍光強度の分布を統計的に解析することで、標的細胞との接着面の周辺に細胞内顆粒を集積させているエフェクター細胞の比率を算出することができる。すなわち細胞内顆粒が細胞内に比較的均一に存在していれば、細胞内顆粒の分布は、標的細胞の細胞核乃至細胞膜からある一定のピクセルの範囲内に比較的幅広く分布する。しかし顆粒が標的細胞との接着面に集積していれば、その分布は上述の均一な場合と比べて、より核や細胞膜に近い位置に偏ることになる。この顆粒の分布の変化を統計的に解析することで、エフェクター細胞の細胞内顆粒の動態を解析することもできる。

40

【0050】

50

標的細胞の核や細胞膜を染色する方法は特に限定されないが、例えば核染色はD A P I (4', 6-ジアミノ-2-フェニルインドール)を用いることができる。また細胞膜の染色は、用いる標的細胞の種類に応じ、その細胞の細胞膜に特異的に発現している分子を染色する方法等を用いればよい。また上述の画像解析のためには、例えばエフェクター細胞との共培養の前に、P K H-26 (シグマ製)のような親油性の蛍光物質を用いて標的細胞だけを蛍光標識する方法を用いてもかまわない。

【0051】

本発明の別の態様として、上述のような、エフェクター細胞及び/又は標的細胞に生じる様々な細胞レベル、分子レベルでの変化を測定するためのキットを提供するものである。当該キットは、細胞の共培養及び/又は様々なパラメータを測定する際に用いる細胞培養容器、及び細胞や分子を識別するための特異抗体と蛍光色素等の試薬から構成される。

10

【0052】

キットの構成要素の一つである細胞培養容器は、エフェクター細胞と標的細胞の培養に、また測定時には細胞を単層に配列させる場として用いられるが、いずれも、いわゆるマイクロタイタープレートやマイクロプレートと称する容器で、一般の細胞培養に用いられ、また免疫化学的手法による抗体染色処理等に使用できるものであればよい。また必ずしも細胞の培養と測定を同一の容器で行う必要はなく、例えば一つのキットに含まれる容器が、少なくとも培養用と測定用の2種以上の異なるものであってもよい。また測定装置が許容する範囲で、マイクロタイタープレートやマイクロプレートに限らず、シャーレ、あるいはスライドグラスやフラスコ等を用いてもよい。しかし同一条件で培養した細胞群に多様な条件で染色を施して多様な解析を行うことを想定した場合には、少なくとも測定用の容器は多ウェルのマイクロタイタープレートやマイクロプレートであることが望ましい。当該マイクロタイタープレートやマイクロプレートのウェル数も特に限定されるものではないが、例えば細胞培養等で汎用される6穴、12穴、24穴、48穴、96穴マイクロタイタープレートが好ましく、特に96穴のウェルを有するマイクロタイタープレートやマイクロプレートが好ましい。

20

【0053】

上記のマイクロタイタープレートやマイクロプレートの材質は特に限定されないが、細胞の培養及び測定に際して、共に、市販の細胞培養用やE L I S A用の標準プラスチックプレート、またはガラス製のプレート等を用いることができる。これらのプレートの底面、すなわち細胞が接触する表面の材質や形状、表面の荷電状態等も特に限定されるものではない。必要に応じて、また蛍光測定の障害にならない範囲で、細胞の付着を補助するための分子、例えばコラーゲン等のタンパク質やポリDリジン等の高分子化合物、またその他の物質で表面加工したものをを用いることもできる。また前記のように、マイクロタイタープレートやマイクロプレートに限らず、シャーレ、スライドグラス、フラスコ等の別の容器を用いてもよいが、これらの容器も同様に、細胞の付着を補助するような素材や表面加工処理をしたものをを用いることができる。

30

【0054】

測定に際しては、測定対象である細胞の剥離を防ぐために、細胞を測定用容器の底面に固着させる必要がある。特にリンパ球等、ほとんどのエフェクター細胞が浮遊系細胞であるために、細胞を容器の底面に固着させる操作は不可欠となる。その方法は特に限定されるものではないが、例えばマイクロタイタープレートやマイクロプレートを用いる場合には、細胞浮遊液を播種した後に、当該プレートを遠心処理して細胞を沈め、その後乾燥させることで、細胞をプレート底面に付着伸展させることができる。また蛍光測定の障害にならない範囲で、上記のような細胞の付着を補助するための表面加工処理をしたマイクロタイタープレートやマイクロプレートを用いることもできる。マイクロタイタープレートやマイクロプレート以外の容器、シャーレ、スライドグラス、フラスコ等の別の容器を用いる場合にも同様の方法で細胞を固着させることができる。

40

【0055】

一方、キットの構成要素の一つである試薬は、市販の抗体や試薬を用いることができる

50

。例えばNK細胞の識別用には、前述のようにNK p 4 6 やNK p 3 0 に対する特異抗体、又はCD 5 6 抗体とCD 3 抗体の組合せ（例えば、いずれもベックマンコールター製）、またMHCテトラマーの場合、例えばHLAタイプがA 0 2 0 1 型のHer 2 / neu 特異的なキラー細胞の識別用には、例えばPE標識Her 2 / neu (K I F G S L A F L) MHCテトラマー (M B L 製) 等の市販の試薬を用いることができる。さらに細胞内の顆粒の識別には、やはり市販のパーフォリン、グランザイムA、グランザイムB、グラニュライシン各々に対する特異抗体を用いることができるし、サイトカインの検出にも市販の特異抗体を用いることができる。また細胞内のサイトカインを検出する際には、培養液中にタンパク輸送阻害剤を加え、細胞内にサイトカインを蓄積させる手順を用いることができるが、この目的のために使用されるタンパク輸送阻害剤としては、例えばモネンシンA、プレフェルジンA等の市販の試薬を用いることができる。

10

【0056】

上述の特異抗体は、すでに蛍光色素が標識されている抗体を用いてもよいが、非標識の抗体とその抗体を特異的に認識する市販の蛍光標識二次抗体との組合せであってもよい。その際の蛍光色素は特に限定されるものではないが、少なくとも3種類の異なった分子を同時に識別するためのキットには、例えばInvitrogen: Molecular

Probes 製の蛍光色素であれば、Alexa Fluor (登録商標) 488、Alexa Fluor (登録商標) 555、Alexa Fluor (登録商標) 647の3種類の蛍光色素を標識した一次抗体乃至二次抗体を組み合わせることができる。

20

【0057】

細胞死やアポトーシスを識別するための試薬も特に限定されないが、当該キットには、例えば死細胞の識別用に、PI (プロピジウムイオダイド) や7-AAD (7-アミノアクチノマイシンD) 等を用いることができる。アポトーシスの検出には、例えばCell Technologies製のAPO LOGIX試薬のような、細胞内活性型カスパーゼに特異的に結合する蛍光標識試薬を用いてもよいし、活性型カスパーゼの作用により蛍光分子が遊離するような基質、例えばBioVisionの7-AFC結合基質等の試薬を用いてもよい。またアネキシンV検出用にImmunotech製のFITC標識アネキシンV等の蛍光標識試薬等を用いることができる。

30

【0058】

一方、免疫化学的にアポトーシスを検出する場合には、上述のように、例えば市販の活性型カスパーゼ3を特異的に認識する抗体や抗サイトケラチン18抗体を用いることができる。抗体は、すでに蛍光色素で標識されている抗体を用いてもよいが、非標識の抗体とその抗体を特異的に認識する蛍光物質が結合する市販の二次抗体との組合せであってもよい。その際の蛍光色素の種類は特に限定されるものではない。

【発明の効果】

【0059】

本発明に係る方法、また本発明に係るキットを用いることで、エフェクター細胞そのものの性質、及び同細胞が標的細胞を殺傷する際の複数の細胞レベル及び分子レベルでの現象を、同時及び／又は随時測定することが可能となる。そしてそれらの解析データを組み合わせることで、従来までの細胞傷害活性測定法単独や、その他の複数の試験検査を組み合わせた解析法と比べて、より信頼度の高い有用な検査データを提供することが可能となる。

40

【図面の簡単な説明】

【0060】

【図1】本発明の実施例1に係るエフェクター細胞の機能測定法による画像解析における測定領域の設定方法の概要図であり、(A)細胞の免疫染色画像の選定を示す概要図であり、(B)細胞核(メインオブジェクト)の認識を示す概要図であり、(C)細胞表面抗原の認識を示す概要図であり、(D)パーフォリンの認識を示す概要図であり、(E)細胞集団の設定を示す概要図であり、(F)画像ギャラリーでの測定対象の確認を示す概要

50

図である。

【図2】本発明の実施例1 PBMC中のパーフォリン陽性NK細胞の解析の一例。(A)は本発明に係るエフェクター細胞の機能測定法による解析例であるグラフで、CD56陽性CD3陰性の細胞(NK細胞)を選択し、当該細胞群のパーフォリン陽性細胞の比率を算出したもの。(B)従来法によるフローサイトメーターで、CD56陽性CD3陰性の細胞を選択し、当該細胞群のパーフォリン陽性細胞の比率を算出したものである。

【図3】本発明の実施例1に係るエフェクター細胞の機能測定法によるパーフォリン陽性NK細胞の画像解析の一例のグラフと撮像である。(A)のドットプロット中の矢印で示した任意のドット一点が、(B)での矢印で示した領域内の細胞の画像に対応する撮像である。

10

【図4】本発明の実施例2に係るエフェクター細胞の機能測定法によるNK細胞の、パーフォリン含有顆粒の解析の一例を示す撮像と解析画像である。(A)は任意に選択した1個のNK細胞(パーフォリン陽性、CD56陽性)であり、(B)は当該細胞の顆粒数解析時の顆粒検出方法の一例を示す解析画像である。

【図5】本発明の実施例3に係るエフェクター細胞の機能測定法によるPBLとK562細胞の培養混合物の画像データの一例の撮像である。矢印はK562細胞を示し、一部の細胞の細胞質に活性型カスパーゼ3の発現が認められた。△印はCD56陽性細胞(NK細胞)を示す。

【図6】本発明に係るエフェクター細胞の機能測定法によるアポトーシスを起したK562細胞に接着するNK細胞の一例の撮像である。△印はCD56陽性のNK細胞を示し、矢印は活性型カスパーゼ陽性のK562細胞を示す。

20

【図7】本発明の実施例4に係るエフェクター細胞の機能測定法によるK562細胞に接着するNK細胞の一例の撮像である。矢印で示したNK細胞のうち、NK(*)のパーフォリン顆粒は、細胞質内に比較的均一に分布しているが、他の2つのNK細胞では、K562細胞との細胞接着面へのパーフォリン顆粒の集積が認められる。

【図8】従来法による末梢血中のMAGE-3特異的キラーT細胞の解析例の概要図と撮像を示す。(A)はMHCテトラマー法の解析チャートの一例、また(B)はELISPOT法での結果の一例で、当該特異的キラーT細胞群が産生したIFN γ のスポットを示す。

【図9】本発明の実施例4に係る方法でのMAGE-3特異的キラーT細胞の解析の一例の概要図と撮像を示す。(A)のヒストグラムは細胞内IFN γ 陽性細胞の解析の一例を示す。(B)は、(A)のヒストグラムでIFN γ 陽性の範囲のすべての細胞のイメージを示す。16個の細胞イメージの内、左下のX印の部分は、実際に細胞の形態を示していないことからノイズと判断された。そして(C)は画像データ中のX印の部分に相当するイメージを示したが、誤って細胞と認識されていたのが矢印で示した部分であり、その部分が実際に非特異的な蛍光を放つノイズであることが再確認された。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0061】

以下に具体的な例を記載して発明の効果を説明する。

【実施例】

40

【0062】

[実施例1]

健常人末梢血NK細胞のパーフォリン発現量の解析

健常人末梢血30mLを採取し、常法に従って、Ficoll-Conray密度勾配遠心法によって末梢血単核球(以下PBMCと略す場合がある)を分離調製した。得られたPBMCは、AIM-V培地(Invitrogen製)に懸濁し、フラスコ(ファルコン3136)に播種して37℃で30分間培養した後に、軽いピペティングによって浮遊細胞だけを回収し、約1,500万個のリンパ球濃縮画分(以下PBLと略す場合がある)を得た。このPBLを半分に分け、一方を本発明に係る細胞イメージ解析装置での測定用の検体とし、もう一方を従来法であるフローサイトメトリー法での測定用の検体とし

50

た。

【0063】

細胞イメージ解析用の検体は、平底96穴マイクロプレート（コーニング3596）に1穴あたり10万個の細胞を播種し、次にプレートを50 x gで10分間遠心処理した後に、上清を除いて30分間風乾した。その後、細胞を4%のパラホルムアルデヒドで30分間固定した。洗浄後、細胞質内のパーフォリンをマウス抗ヒトパーフォリン・モノクローナル抗体（ANCELL製）とAlexa Fluor（登録商標）647標識抗マウスIgG抗体（Invitrogen製）で染色し、またFITC標識抗ヒトCD3抗体（ベックマンコールター製）とR-PE標識抗ヒトCD56抗体（ベックマンコールター製）を用いて、リンパ球の細胞表面抗原を標識した。その後、DAPIで細胞核を染色し、染色後に細胞イメージ解析装置（オリンパス製CELLVIEW RS100）を用い、PBL中のNK細胞（CD3陰性、CD56陽性）の比率ならびにパーフォリン陽性細胞の比率を解析した。

10

【0064】

データ解析は以下の手順で行った。画像解析における測定領域の具体的な設定方法の概要を図1に示したが、図1(A)の101は細胞表面抗原（CD3とCD56）を示し、102はパーフォリン、103は核を示すが、まずこれら染色処理を施した任意の細胞画像を複数選択した。次に、画像解析の際に細胞一つ一つを自動的に識別するために、核領域104、すなわちDAPIで染色された領域をメインオブジェクトとして認識するような領域を設定した(B)。その際、核領域の設定は、DAPI染色部分の面積の最大値と最小値および蛍光強度の閾値により設定し、また細胞密度が高く、細胞が込み合っているような場合は、ウォーターシェッドアルゴリズム手法によって核同士のくびれを認識することにより個々の細胞を認識するようにして領域を設定した。次に認識されたメインオブジェクト、すなわち個々の細胞核を中心とし、等間隔に存在するドーナツ型のエリア105と細胞すべてを網羅する領域107を作成した。ドーナツエリア作成においては、核最外線からのドーナツの最内線開始地点とドーナツ最外線である終点を自由に設定できるが、細胞の表面抗原（CD3とCD56）を測定対象とする際(C)には、エリア内に細胞膜106のすべて乃至少なくともその一部含まれる状態となる領域105のようなドーナツエリアを設定し、また細胞内のパーフォリン108を測定対象とする場合(D)には、細胞核109と細胞膜110を含む、細胞内をもれなく測定対象とするような領域107を設定した。エリアを設定した後に、各々のエリア内におけるCD3、CD56、パーフォリンの平均蛍光強度（エリア内の1ピクセルあたりの平均蛍光強度）もしくは最大蛍光強度（エリア内の1ピクセルあたりで最大の蛍光強度）により1細胞あたりのそれぞれの蛍光強度を解析した。解析にあたって、核の誤認識を排除するため、核のエリア（Area）と例えばサーキュラリティーファクター等の細胞核（メインオブジェクト）の形状の記述ファクターにより細胞集団を特定するようなリージョン111を測定対象として選択し、ノイズを排除して解析データの精度を高めた(E)。また当該機器の解析ソフトのギャラリー機能(F)を用い、上記で選択したリージョン中の細胞個々の画像を確認し、混入した異物112や複数の細胞を一つの細胞として認識しているような誤認識113等が認められた場合には、データ解析対象から除外した。

20

30

40

【0065】

一方、フローサイトメーター用検体は、常法に従い、PC-5標識抗ヒトCD3抗体（ベックマンコールター製）とR-PE標識抗ヒトCD56抗体（ベックマンコールター製）を用いてリンパ球の細胞表面抗原を標識し、さらにマウス抗ヒトパーフォリン・モノクローナル抗体（ANCELL製）とFITC標識抗マウスIgG抗体（ベックマンコールター製）でパーフォリンを染色し、エピックスXL（ベックマンコールター製）とExp 032解析ソフト（ベックマンコールター製）を用いて、同じくPBL中のNK細胞（CD3陰性、CD56陽性）の比率ならびにパーフォリン陽性細胞の比率を解析した。

【0066】

その結果を図2と図3に示した。本発明に係る方法でトータル5,008個のPBLを

50

解析した結果、CD56陽性CD3陰性細胞、すなわちNK細胞は952個で、その比率は19.0%であり、またこの952個のNK細胞中のパーフォリン陽性細胞数は899個で、その比率は94.4%であった(図2(A))。この結果は、従来法であるフローサイトメーターで同一サンプルを測定した場合の結果、すなわちNK細胞の比率が19.3%で、同NK細胞中のパーフォリン陽性比率は95.2%(図2(B))と同程度であり、本発明に係る方法が、たとえ複数の細胞が混在していても、従来のフローサイトメーター法と同等の精度で、特定の細胞を識別して計測することが可能であると確認された。

【0067】

さらに従来法であるフローサイトメーター法とは異なり、本発明に係る測定法では、細胞一つ一つの解析データを画像イメージとして保存しているため、ドットプロット分析でのグラフ中の一つ一つのドットが実際に細胞であるか否かを視覚的に確認することが可能であった。具体的には、図3に、CD56陽性CD3陰性の領域内の任意に選択したドット(A)に対応する画像イメージを、(B)のディスプレイ上で表示させた一例を示したが、当該ドットに対応する細胞が、実際にパーフォリン顆粒を発現するCD56陽性のNK細胞であることが確認された。すなわち仮に検体調製時や測定時に何らかの原因で異物等が混入した場合に、従来法ではそのような異物に起因するノイズと細胞を区別することが困難で、結果的に解析時に当該ノイズを排除することができなかったが、本発明に係る測定法では、グラフ上の全ドットの画像データを確認することが可能であり、仮に異物に起因するノイズを発見した場合には、そのノイズを省いて再度データ解析を行うことで、結果的に信頼性の高いデータ解析が可能となった。

【0068】

また当該機器ソフトが有するスポット検出機能を用い、NK細胞の細胞内パーフォリン陽性顆粒数を測定した。図4に、その解析の一事例を示したが、(A)に示した細胞の原画像内のパーフォリン顆粒が、スポット検出機能によって複数のスポットとして認識され、そのスポットの総数が17個であると計測された(B)。この方法を用いて、上記の検体の画像データよりPBL中のNK細胞を選択し、その細胞内パーフォリン陽性顆粒数を測定した。また同時にパーフォリンの替わりに抗ヒトグランザイムB抗体を用いてグランザイムB顆粒を染色した検体を調製し、当該細胞の細胞内グランザイムB陽性顆粒数を測定した。それらの結果を表1に示したが、NK細胞一個あたりのパーフォリン顆粒数は平均で17.2個であり、またグランザイムBの顆粒数は16.0個であった。以上の結果から、本発明に係る方法により、従来法と同様にNK細胞の比率を容易に算出でき、且つより信頼度の高いデータ解析が可能となり、加えて当該細胞群の細胞傷害活性機能に直接関与する細胞内のパーフォリンやグランザイムB等の顆粒の発現状態をより詳細に解析することが可能となった。

【0069】

【表1】

NK細胞中のパーフォリン、グランザイムB顆粒の数

	顆粒数 (個) / 細胞
パーフォリン(+)	17.2
グランザイムB(+)	16.0

【0070】

[実施例2]

健常人PBLによるK562細胞との混合培養における培養混合物解析

実施例 1 と同様の方法で、健常人末梢血より約 2, 0 0 0 万個の P B L を得た。そして予め 2 万個/ウェルの K 5 6 2 細胞 (ヒト慢性骨髄性白血病細胞株) を播種しておいた U 底 9 6 穴マイクロプレート (ファルコン 3 0 7 7) に、上記の P B L を 4 0 万個/ウェル播種して 4 時間両細胞を共培養した。培養終了後にマイクロプレートを 5 0 x g で 1 0 分間遠心処理し、直ちに 4 % パラホルムアルデヒドを加えて 3 0 分間細胞に固定処理を施した。その後、固定した細胞を半分に分け、一方を本発明に係る細胞イメージ解析装置での測定用の検体とし、もう一方を従来法であるフローサイトメトリー解析用の検体とした。

【0071】

細胞イメージ測定・解析用の検体は、平底 9 6 穴マイクロプレート (コーニング 3 5 9 6) に播き直し、当該プレートを 4 5 0 x g で 1 0 分間遠心処理した後に、上清を除いて 6 0 分間風乾した。その後、R - P E 標識抗ヒト C D 5 6 抗体 (ベックマンコールター製) と F I T C 標識抗ヒト C D 3 抗体 (ベックマンコールター製) の 2 つの抗体、または R - P E 標識抗ヒト C D 5 6 抗体 (ベックマンコールター製) 単独で N K 細胞を標識した。そして後者の R - P E 標識抗ヒト C D 5 6 抗体単独で N K 細胞を標識した検体は、パーフォリンをマウス抗ヒトパーフォリン・モノクローナル抗体 (A N C E L L 製) と A l e x a F l u o r (登録商標) 4 8 8 標識抗マウス I g G 抗体 (I n v i t r o g e n 製) を用いて染色した。そして両検体とも共存する K 5 6 2 細胞のアポトーシスの有無を調べるために、ウサギ抗ヒト活性型カスパーゼ 3 ポリクローナル抗体 (T R E V I G E N 製) と A l e x a F l u o r (登録商標) 6 4 7 標識抗ウサギ I g G 抗体 (I n v i t r o g e n 製) で染色した。その後 D A P I で細胞核を染色し、染色後に細胞イメージ解析装置 (オリンパス製 C E L A V I E W R S 1 0 0) を用い、P B L 中の N K 細胞 (C D 3 陰性、C D 5 6 陽性) の比率の解析、N K 細胞中のパーフォリン顆粒の発現、そして K 5 6 2 細胞中の活性型カスパーゼ 3 陽性細胞の比率を計測した。一方、フローサイトメーターでの測定・解析用の検体は、[実施例 1] と同様の方法で、P C - 5 標識抗 C D 3 抗体と R - P E 標識抗 C D 5 6 抗体処理を施して N K 細胞を識別し、さらにウサギ抗ヒト活性型カスパーゼ 3 ポリクローナル抗体 (T R E V I G E N 製) と F I T C 標識抗ウサギ I g G 抗体 (ベックマンコールター製) を用いて活性型カスパーゼ 3 を染色した。そして直ちにエピックス X L (ベックマンコールター製) を用いて、P B L 中の N K 細胞 (C D 3 陰性、C D 5 6 陽性) の比率と、K 5 6 2 細胞中の活性型カスパーゼ 3 陽性細胞の比率を計測した。

【0072】

その結果、P B L 中の C D 5 6 陽性かつ C D 3 陰性の N K 細胞の比率は、本発明に係る測定・解析方法で 8 . 7 %、またフローサイトメーターでの測定・解析で 8 . 6 % とほぼ同程度であった。また K 5 6 2 細胞中の活性型カスパーゼ 3 陽性細胞の比率は、本発明に係る測定・解析方法で 1 6 . 0 %、フローサイトメーターでの測定・解析方法で 1 6 . 9 % と、同じくほぼ同様の発現率であった。

【0073】

図 5 に、本発明に係る測定・解析方法において、実際に解析に用いた画像データの一例、すなわち培養 4 時間後の P B L と K 5 6 2 との培養混合物の画像の一例を示した。図に見られるように、培養混合物中には小型細胞 (リンパ球等) と大型の K 5 6 2 細胞が混在し、そして C D 5 6 分子が一部の小型細胞 (N K 細胞) の細胞膜に局限して発現している像が認められ、また活性型カスパーゼ 3 の発現が一部の大型細胞 (K 5 6 2 細胞) の細胞質に局限して認められた。すなわち本発明に係る測定・解析方法では、取得した画像データを用いた形態学的な観察も可能であり、当該数値データの妥当性を形態学的に裏付けることが可能であった。

【0074】

[実施例 3]

健常人 P B L による K 5 6 2 細胞へのアポトーシス誘導、細胞の付着並びに細胞内顆粒動態の解析

さらに図 6 に、実施例 2 で実際に解析に用いた他の画像データ例を示したが、実施例 3

では実施例2の結果を用いてCD56分子を発現するNK細胞がアポトーシスを起したK562細胞に付着している像を容易に識別することが可能であった。任意のK562細胞300個を選択し、活性型カスパーゼ3の発現とNK細胞の付着を解析した結果、47個の活性型カスパーゼ3陽性のK562細胞が確認され、その内13個の活性型カスパーゼ3陽性K562細胞にNK細胞が付着していることが確認された。また図7に示したように、K562細胞に付着する一部のNK細胞(図7のNK)の細胞内パーフォリン顆粒が、K562細胞との接着面に集積する像も確認され、細胞内に均質に顆粒が分布しているNK細胞(図7内のNK(*))と容易に識別することが可能であった。これらの画像データをを用い、NK細胞が付着する任意のK562細胞50個を選択し、それらのK562細胞に付着するNK細胞内のパーフォリン顆粒を観察した結果、当該K562細胞に付着するNK細胞数はトータルで66個あり、その内パーフォリン顆粒がK562細胞との接着面に集積しているNK細胞の総数は25個で、測定したNK細胞全体の38%であった。

10

【0075】

[実施例4]

がん患者末梢血中のMAGE-3特異的なキラーT細胞の検出

外科切除標本の免疫組織染色で腫瘍抗原のMAGEが陽性であった大腸癌患者(HLA-A2402)に、MAGE-3ペプチドを用いたペプチド樹状細胞ワクチン療法を行った。すなわち事前にMAGE-3ペプチド(IMPKAGLLI)で処理した成熟自己樹状細胞の1千万個~1億個を、一週間に一度、当該患者の鼠径部リンパ節の近傍の皮内に接種して、生体内でMAGE-3特異的なキラーT細胞の誘導を行った。5回目の樹状細胞ワクチン接種の2日後に、接種部位にMAGE-3に特異的と思われるDTH様皮膚反応が認められたため、MAGE-3特異的なキラーT細胞が誘導がされたと判断し、最後のワクチン接種の1週間後に、当該患者の末梢血を採取し、本発明に係る測定・解析法により、末梢血中のMAGE-3特異的なキラーT細胞の有無を解析した。比較例として、同末梢血を検体とし、従来法であるMHCテトラマー法およびELISPOT法を用いて、同様に末梢血中のMAGE-3特異的なキラーT細胞を解析した。

20

【0076】

具体的には、採取した末梢血より、前記と同様の方法でPBMCを調製し、一部のPBMCは直ちに凍結保存し、また一部のPBMCは、磁気マイクロビーズ(ミルテニーバイオテック社製)によってCD14陽性細胞もしくはCD8陽性細胞を分取して凍結保存し、その後必要に応じてそれらを解凍して用いた。

30

【0077】

本発明に係る測定・解析は以下の手順で行った。まず凍結保存しておいたCD14陽性細胞を解凍し、その後、常法に従ってGM-CSFとIL-4存在下で5日間培養し、さらにTNF α を加えて2日間培養することで成熟樹状細胞を誘導した。この成熟樹状細胞を1mLあたり10 μ gの合成MAGE-3ペプチド(IMPKAGLLI)を含むAIM-V培地(Invitrogen製)中で2時間培養したものを抗原提示細胞として用いた。その後、この抗原提示細胞(2万個)と別途解凍しておいたPBMC(20万個)とを最終濃度で10%のヒトAB血清を含むAIM-V培地(Invitrogen製)に懸濁した後に、U底の96穴マイクロプレートに播種し、37 $^{\circ}$ Cで20時間培養した。その後、最終濃度で2 μ MとなるようにモネンシンA(Sigma製)を加えてさらに4時間、合計で24時間培養を続けた。培養終了後、50xgで10分間遠心処理した後に4%パラホルムアルデヒドで細胞を30分間固定し、そして固定細胞を洗浄した後に、その細胞をすべて平底の96穴マイクロプレートに播種した。細胞を播種したマイクロプレートは直ちに450xgで10分間遠心処理し、60分間風乾して細胞をプレートに固着させた。その後、細胞内IFN γ をマウス抗ヒトIFN γ 抗体(BDファーマインジェン製)、Alexa Fluor(登録商標)647標識抗マウスIgG抗体(Invitrogen製)を用いて染色し、またFITC標識抗ヒトCD3抗体(バックマンコールター製)とR-PE標識抗ヒトCD8抗体(バックマンコールター製)を用いてキラーT

40

50

細胞を標識し、また細胞核をDAPIで染色した。染色後に細胞イメージ解析装置（オリンパス製CELAVIEW RS100）を用い、CD3、CD8陽性キラーT細胞中のIFN γ 産生細胞の比率を解析した。

【0078】

一方、MHCテトラマー法では、解凍したPBMCを材料とし、FITC標識HLA-A2402用のMAGE-3ペプチドMHCテトラマー（Proimmune製）ならびにPC-5標識抗ヒトCD3抗体（ベックマンコールター製）とPE-標識抗ヒトCD8抗体（ベックマンコールター製）を用いて常法通りにPBMCを蛍光標識し、直ちにエピックスXL（ベックマンコールター製）を用いて、当該PBMC中のMAGE-3特異的キラーT細胞の比率を測定・解析した。ELISPOT法は、IFN γ ELISPOT SET（BD製）とAEC SUBSTRATE SET（BD製）を用い、当該キットに記載された手順に従って抗原刺激によってキラーT細胞から産生されたIFN γ のスポットを検出し計測した。具体的には、予め分取・保存してあったCD8陽性細胞（10万個）と、上記と同様の手順で作製したMAGE-3標識成熟樹状細胞（1万個）を抗原提示細胞として24時間共培養したものを検体とし、検出されたIFN γ のスポット数を計測した。

【0079】

各々の試験法で計測した末梢血中のMAGE-3特異的なキラーT細胞の比率を表2にまとめた。いずれの測定法でも、MAGE-3特異的キラーT細胞の比率は同程度であり、キラーT細胞（CD8+T細胞）の1%以下と低値であった。しかしデータ解析過程において、当該発明に係る方法では、従来法と比べてより詳細なデータ解析が可能であった。

【0080】

【表2】

表2 MAGE-3特異的キラーT細胞頻度

	本発明に係る 方法	従来法	
		MHCテトラマー	ELISPOT
陽性細胞	15	124	254
CD8+T細胞	3,520	27,971	50,000
(%)	0.43	0.44	0.51

【0081】

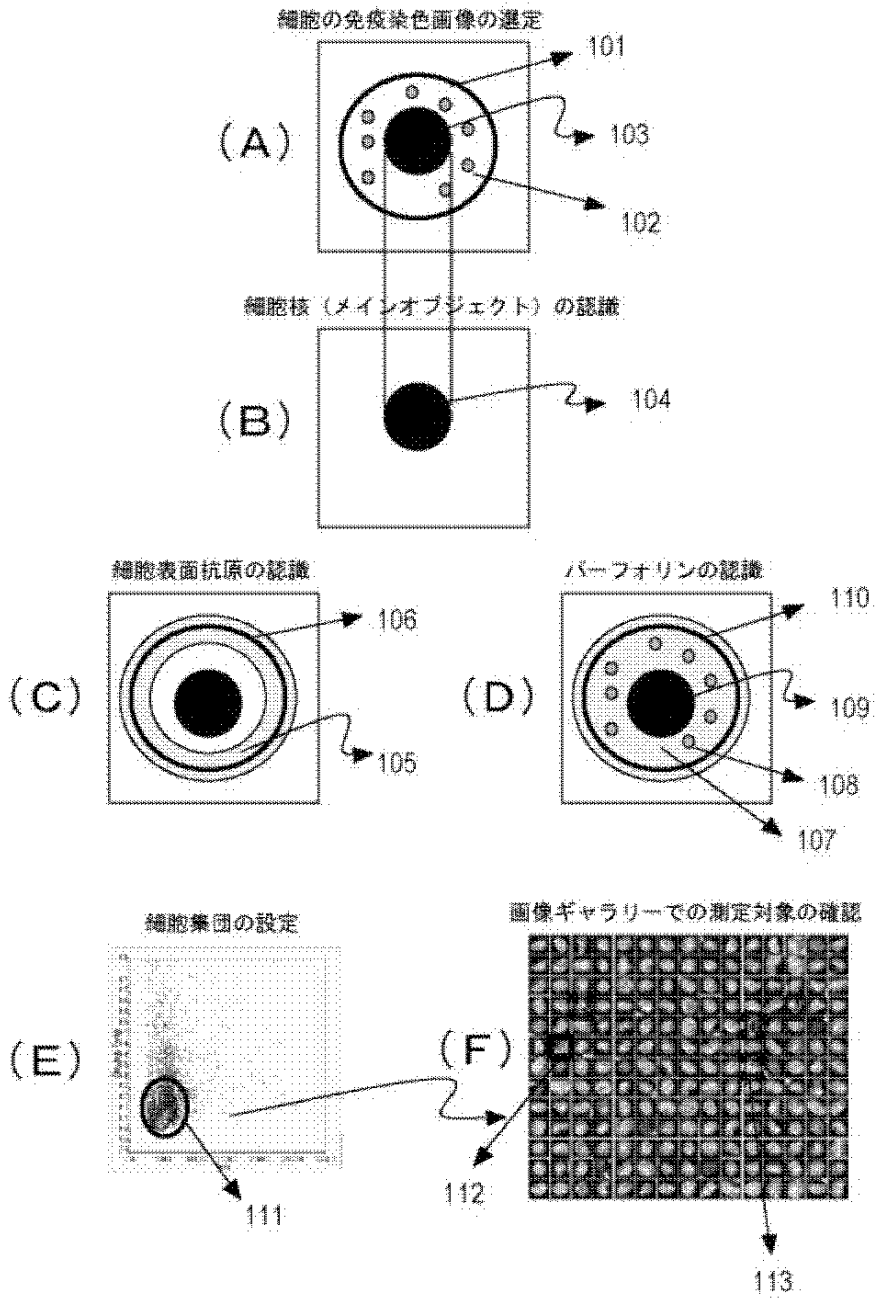
図8に、従来法であるMHCテトラマー法（A）とELISPOT法（B）のデータの一例を示したが、いずれの方法でも細胞とノイズ（非特異的な陽性シグナル）との識別は不可能で、例えばMHCテトラマー法（A）でのドットプロットから、あるいはELISPOT法（B）でのスポット画像のいずれからも疑陽性データの有無を確認することはできなかったが、一方、本発明に係る測定法では、画像データの確認からノイズの検出は容易であった。図9に本発明に係る測定法でのデータ解析例を示したが、（A）のヒストグラム上でIFN γ 陽性細胞の範囲に16個の細胞が検出されたが、個々の細胞の画像（B）を確認すると、1つが細胞ではなくノイズによる擬陽性データと判断された。実際に当該ノイズ部分の周辺の画像（C）を再確認すると、非特異的蛍光を放つ異物が細胞として誤認識されていることが判明した。従ってトータル3,520個のキラーT細胞中の15個（0.43%）の細胞がIFN γ を産生する特異的キラー細胞であると判断された。以上のように、本法では疑陽性データを除くことが可能であり、たとえ測定対象となる細胞頻度が極めて低い場合であっても、従来法と比べてより信頼性の高いデータの解析が可能であると考えられた。

【発明の産業上の利用分野】

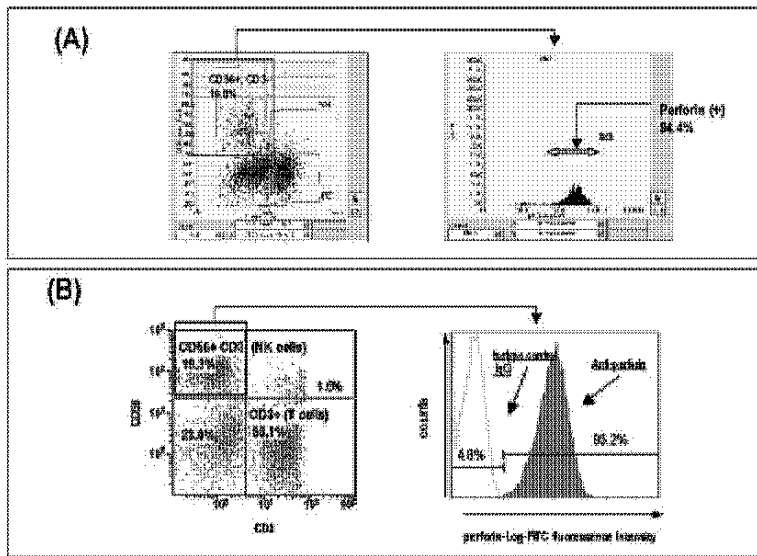
【0082】

本発明は、NK細胞や抗原特異的キラーT細胞の機能の詳細を測定するための新たな細胞機能測定法と当該測定のためのキット並びに測定システムを提供するものである。本発明に係る方法で、また本発明に係るキット並びに測定システムを用いて細胞機能を測定して解析することで、例えば癌免疫細胞療法においては、患者一例一例のエフェクター細胞の機能を詳細にモニタリングすることが可能となる。また従来はNK活性では解析できなかった、被験者の免疫応答の詳細をより簡便に、かつ多面的に測定することも可能となり、結果的として健康増進や疾病予防といった観点からは、より詳細で的確な情報を被験者に提供することが可能となる。また免疫機能を調節する食品や薬物等の有効性を確認する際にも、極めて有用なアッセイツールとなる。

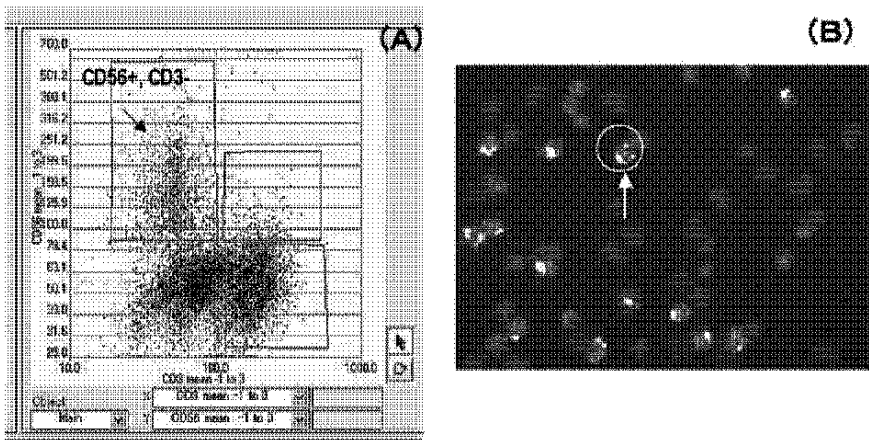
【図1】



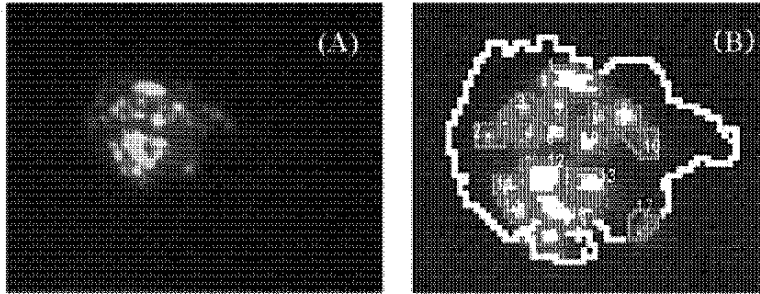
【図 2】



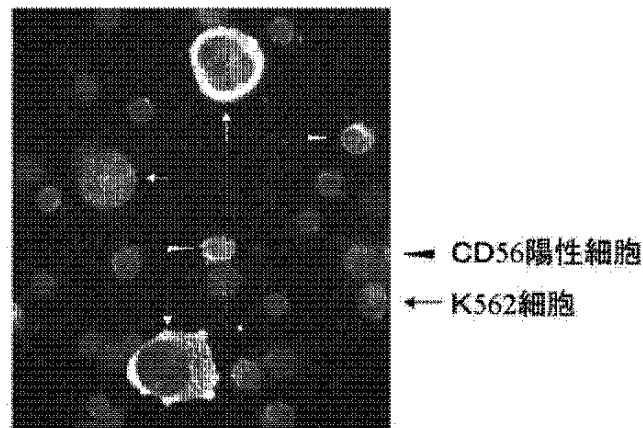
【図 3】



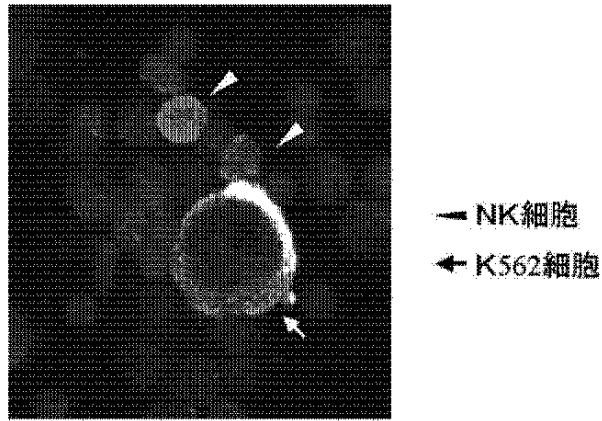
【図 4】



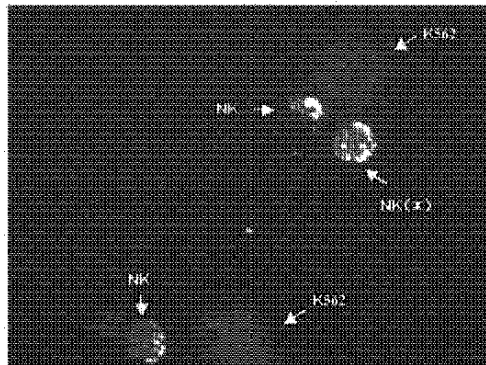
【図 5】



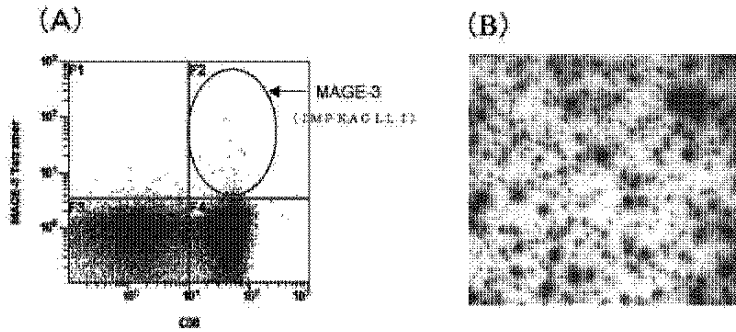
【図 6】



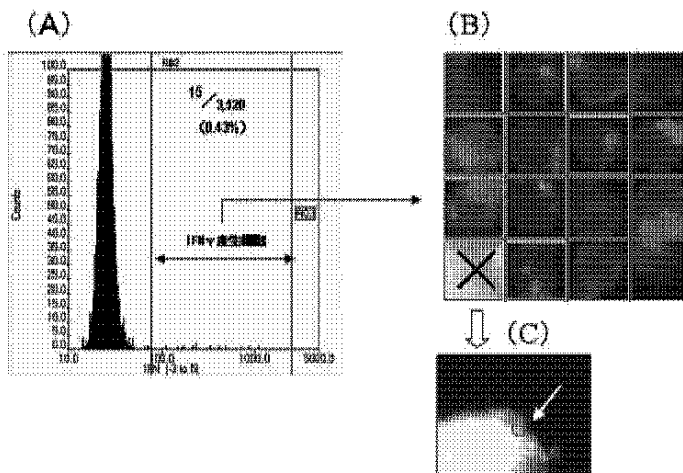
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2009/054340
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q1/02(2006.01)i, G01N21/78(2006.01)i, G01N33/573(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) C12Q1/02, G01N21/78, G01N33/573		
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) MEDLINE/CAplus/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	Shun'ichi MIYAZAKI et al., "Men'eki Saibo Kino Kaimei no Seirigakuteki Approach -Human Natural Killer Saibo no Hyoteki Saibo Shogai Kiko no Kaiseki-", Journal of Tokyo Women's Medical University, 1997, Vol.67, No.6, pages 372 to 380	1-7,10,12, 14,15/1-20
X/Y	MUNN, L. L. et al., Kinetics of adhesion molecule expression and spatial organization using targeted sampling fluorometry, BioTechniques, 1995, Vol.19, pp.622-631	1,3,4,7-10/ 1-20
A	Toshimi SUDO et al., "Hi Tokuiteki Men'eki Saibo Chiryo ni Okeru Koka Saibo no Kaiseki", Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy, 2003, Vol.30, No.11, pages 1817 to 1820	1-20
<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	"T"
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X"
"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"
"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	
Date of the actual completion of the international search 23 March, 2009 (23.03.09)		Date of mailing of the international search report 31 March, 2009 (31.03.09)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/054340

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2007-97411 A (University of Toyama), 19 April, 2007 (19.04.07), & WO 2007/040117 A	1-20
P,X	Yasunobu KOBAYASHI et al., "Saibo Image Kaiseki Sochi o Mochiita NK Saibo Kino no Kaiseki", Biotherapy, 05 November, 2008 (05.11.08), Vol.22, No.Supplement1, page 84	1-20

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 9 / 0 5 4 3 4 0	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12Q1/02(2006.01)i, G01N21/78(2006.01)i, G01N33/573(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12Q1/02, G01N21/78, G01N33/573			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) MEDLINE/CaPlus/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X/ Y	宮崎 俊一 他, 免疫細胞機能解明の生理学的アプローチ - ヒトナチュラルキラー細胞の標的細胞傷害機構の解析 -, 東京女子医科大学雑誌, 1997, Vol. 67, No. 6, pp. 372-380	1-7, 10, 12, 14, 15/ 1-20	
X/ Y	MUNN, L. L. et al., Kinetics of adhesion molecule expression and spatial organization using targeted sampling fluorometry, BioTechniques, 1995, Vol. 19, pp. 622-631	1, 3, 4, 7- 10/ 1-20	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日に後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 23.03.2009		国際調査報告の発送日 31.03.2009	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 佐々木 大輔	4B 3962
		電話番号 03-3581-1101	内線 3448

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2009/054340

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	須藤 俊美 他, 非特異的免疫細胞治療における効果細胞の解析, 癌と化学療法, 2003, Vol. 30, No. 11, pp. 1817-1820	1-20
A	JP 2007-97411 A (国立大学法人富山大学) 2007. 04. 19 & WO 2007/040117 A	1-20
P, X	小林 泰信 他, 細胞イメージ解析装置を用いたNK細胞機能の解析, Biotherapy, 2008. 11. 05, Vol. 22, No. Supplement1, p. 84	1-20

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 21/78 (2006.01)	G 0 1 N 21/64	E
	G 0 1 N 21/78	C

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,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,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,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,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,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,KN,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,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 谷川 啓司

東京都新宿区余丁町14-4 ジェー・ビー・セラピューティクス株式会社内

Fターム(参考) 2G043 AA03 BA16 EA01 FA02
 2G045 BB20 CA17 CA20 CA25 DA20 DA36 FB07 FB12 FB13 GC15
 JA01
 2G054 AA08 CA21 CE02 EA03 FA19 JA01 JA05
 4B063 QA01 QA05 QQ08 QQ79 QR48 QR66 QS33 QX02

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	效应细胞功能，测量试剂盒和测量系统的测量方法		
公开(公告)号	JPWO2009110614A1	公开(公告)日	2011-07-14
申请号	JP2010501988	申请日	2009-03-06
[标]申请(专利权)人(译)	小林 泰信 谷川敬二		
申请(专利权)人(译)	小林 泰信 谷川敬二		
[标]发明人	小林泰信 谷川啓司		
发明人	小林 泰信 谷川 啓司		
IPC分类号	G01N33/48 C12Q1/02 G01N33/53 G01N33/68 G01N21/64 G01N21/78		
CPC分类号	G01N33/5091		
FI分类号	G01N33/48.M C12Q1/02 G01N33/48.P G01N33/53.K G01N33/68 G01N21/64.E G01N21/78.C		
F-TERM分类号	2G043/AA03 2G043/BA16 2G043/EA01 2G043/FA02 2G045/BB20 2G045/CA17 2G045/CA20 2G045/CA25 2G045/DA20 2G045/DA36 2G045/FB07 2G045/FB12 2G045/FB13 2G045/GC15 2G045/JA01 2G054/AA08 2G054/CA21 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/FA19 2G054/JA01 2G054/JA05 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR66 4B063/QS33 4B063/QX02		
优先权	2008098732 2008-03-07 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

发明内容本发明的目的是提供一种克服了传统效应细胞功能测量方法的各种缺点和问题的新的细胞功能测量方法，以及用于该测量的测量套件和测量系统。工业实用性本发明优于常规方法的结合之处在于，使用能够分析细胞图像的基于细胞的测定装置等同时或在任何时间，测量和分析效应细胞的数量，性质和功能。从而可以获得详细而高度可靠的数据。

