

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公開特許公報(A) (11)特許出願公開番号

特開2002 - 48791

(P2002 - 48791A)

(43)公開日 平成14年2月15日(2002.2.15)

(51) Int.Cl⁷

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

G 0 1 N 33/53

G 0 1 N 33/53

K

審査請求 未請求 請求項の数 60 L (全 5 数)

(21)出願番号 特願2000 - 230783(P2000 - 230783)

(71)出願人 000002093

住友化学工業株式会社

大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

(22)出願日 平成12年7月31日(2000.7.31)

(72)発明者 田村 敏生

東京都中野区中央1丁目46番12号

(74)代理人 100093285

弁理士 久保山 隆 (外2名)

(54)【発明の名称】免疫機能の検定方法

(57)【要約】

【課題】哺乳類動物の免疫機能の検定方法を提供すること。

【解決手段】被験哺乳類動物から分離されたCD4陽性のT細胞群においてT細胞抗原受容体鎖の発現強度が低い細胞群の細胞数の比率を測定するか、または前記細胞群においてT細胞抗原受容体FcR鎖を発現する細胞群の細胞数の比率を測定することを特徴とする哺乳類動物の免疫機能の検定方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】被験哺乳類動物から分離されたCD4陽性のT細胞群においてT細胞抗原受容体鎖の発現強度が低い細胞群の細胞数の比率を測定するか、または前記細胞群においてT細胞抗原受容体FcR鎖を発現する細胞群の細胞数の比率を測定することを特徴とする哺乳類動物の免疫機能の検定方法。

【請求項2】CD4陽性のT細胞群がNaive T細胞群である請求項1記載の検定方法。

【請求項3】CD4陽性のT細胞群が、哺乳類動物の血液または非ヒト哺乳類動物の脾臓から分離された細胞群である請求項1または2のいずれかに記載の検定方法。

【請求項4】T細胞抗原受容体鎖またはFcR鎖の発現を、該鎖に対する抗体を用いて検出する請求項1～3のいずれかに記載の検定方法。

【請求項5】非ヒト哺乳類動物に被験物質を投与し、請求項1～4のいずれかに記載の方法により該動物の免疫機能を検定する工程を含む薬剤のスクリーニング方法。

【請求項6】T細胞抗原受容体鎖に対する抗体またはFcR鎖に対する抗体を含む免疫機能の検定用キット。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【発明の属する技術分野】本発明は、免疫機能の検定方法に関する。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】免疫機能は、体外から侵入した感染源、体内の新生物である癌細胞などの自己以外の異物に対する生体の防衛機構として働いている。かかる免疫機能は、例えば老化に伴って低下することが知られており、感染症や癌は、老人の主要直接死因の中にあげられている（広川勝いく著「免疫系からみた老化」、細胞工学臨時増刊 老化の分子生物学、秀潤社、1989年発行）。感染症や癌などの自己以外の異物が原因となる疾患の治療に当っては、自己以外の異物に対してその個体が有する防衛機構、すなわち免疫機能の強弱を把握することが必要となることから、免疫機能を検定する方法の開発が強く求められていた。

【0003】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、かかる状況の下、鋭意検討した結果、免疫機能を担うCD4陽性のT細胞群において、特定のT細胞抗原受容体を発現する細胞群の細胞数の比率を測定することにより、免疫機能を検定し得ることを見出し、本発明に至った。すなわち、本発明は、

1) 被験哺乳類動物から分離されたCD4陽性のT細胞群においてT細胞抗原受容体鎖の発現強度が低い細胞群の細胞数の比率を測定するか、または前記細胞群においてT細胞抗原受容体FcR鎖を発現する細胞群の細胞数の比率を測定することを特徴とする哺乳類動物の免疫機能の検定方法（以下、本発明方法と記す。）、

2) 非ヒト哺乳類動物に被験物質を投与し、前項に記載の方法により該動物の免疫機能を検定する工程を含む薬剤のスクリーニング方法、3) T細胞抗原受容体鎖に対する抗体またはFcR鎖に対する抗体を含む免疫機能の検定用キットを提供するものである。

【0004】

【発明の実施の形態】本発明において、CD4陽性のT細胞とは、CD4抗原を発現するT細胞を意味し、CD4抗原とは、国際的なCD（cluster of differentiation）分類により分類されたCD抗原の一種である。CD4陽性のT細胞（以下、CD4陽性細胞と記す。）は、免疫機能の中心的役割を担っており、その表面に存在するT細胞抗原受容体を介して病原微生物や癌細胞などの抗原と接触すると、活性化されて、サイトカインとよばれる自らおよび他の免疫系の細胞を活性化する因子を產生し、また、抗原を破壊する細胞に分化する。通常のCD4陽性細胞の多くは、2本の鎖からなるホモダイマー構造を有するT細胞抗原受容体を発現しているが、鎖とFcR鎖とからなるヘテロダイマー構造を有するT細胞抗原受容体を発現するCD4陽性細胞も若干存在する。

【0005】本発明方法において使用し得るCD4陽性細胞群は、例えば、ヒト、マウス、ラット等の哺乳類動物の血液または非ヒト哺乳類動物の脾臓等から、新生化学実験講座12 分子免疫学I、東京化学同人等に記載されているような常法に準じて調製することができる。具体的には例えば、まず、脾臓細胞の浮遊液を調製し、これを市販のナイロンウールやゲル濾過樹脂が充填されたカラムを使用して分画することにより、CD4陽性細胞群を調製することができる。CD4陽性細胞群を血液から調製する場合は、新生化学実験講座12 分子免疫学I、東京化学同人等に記載されているような常法に準じてあらかじめ溶血操作を施し、赤血球を除いておく方が望ましい。

【0006】CD4陽性細胞におけるT細胞抗原受容体鎖またはFcR鎖の発現は、例えば、これら各鎖に対する抗体を用いて検出することができる。抗体としては、市販品を使用してもよいし、その抗体を產生するハイブリドーマを細胞バンク等より入手し、これを単クローネ抗体ハイブリドーマとELISA、岩崎辰夫著、講談社サイエンティフィック等に記載されているような常法に準じて培養し、その培養上清を使用することもできる。また、かかる抗体を產生するハイブリドーマをこれと適合性のある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水を検出しに使用することもできる。さらに、前記培養上清または腹水を、常法に準じて、硫酸アンモンニウム分画、塩析、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー、プロテインAカラムクロマトグラフィー等のアフィニティーコロマトグラフィーによって分画することにより、より純度の高い抗体画分を得て、これを検出に用いることも

できる。

【0007】CD4陽性細胞において発現したT細胞抗原受容体鎖またはFcR鎖を、各鎖に対する抗体を用いて検出する方法としては、例えば、フローサイトメトリー法やELISAのような免疫測定法、ウエスタンプロット法などをあげることができ、特にフローサイトメトリー法が好適である。かかる検出法において、前記の各鎖に対する抗体を認識することができ、しかるべき蛍光物質、例えば、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、フィコエリトリン(PE)等で標識された抗体を2次抗体として使用してもよい。使用される抗体はその種類や標識に用いられた蛍光物質によって、陽性細胞群の乖離に差が見られることがある。従って、用いる抗体の種類および量、細胞数に関しては、あらかじめ適切な条件を検討することが望ましい。例えば、使用する抗体の濃度については、抗体溶液を2倍で段階希釈し、希釈した抗体で細胞を染色し、フローサイトメーターにて解析し、検出される蛍光強度の低下が認められない濃度を使用する。また、陰性対照として、抗体を添加しない細胞のサンプルを調製し、蛍光を発しない細胞群のデータを取得しておき、陽性を示す細胞群を決める際の参考にすることが望ましい。さらに、例えば、前記の各鎖に対する抗体が取得された動物と同一種であって、前記各鎖に対する抗体を産生していない動物の血清またはIgGや、前記の各鎖に対する抗体と同じサブクラスであり、かつ、CD4陽性細胞とは反応しない抗体を添加して同様の処理を行い、得られた測定サンプルを陰性対照としてもよい。細胞と抗体の反応は、常法に準じて1ml以下の容量で行う方が望ましい。測定対象であるCD4陽性細胞群と上記のような抗体を、新生化学実験講座12分子免疫学I、東京化学同人等に記載されているような常法に準じて反応させた後、抗体の結合した細胞をフローサイトメーターにより測定する場合には、縦軸に細胞と結合した抗体の蛍光強度を、縦軸に細胞数をプロットできるように設定するのが望ましい。また、測定時の細胞数は、およそ $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ 程度が望ましい。

【0008】CD4陽性細胞群においてT細胞抗原受容体鎖の発現強度が低い細胞群の細胞数の比率を測定するには、前記のようにして得られた測定データから、例えば、抗鎖抗体由来の蛍光強度の低い細胞群の細胞数の全CD4陽性細胞数に対する比率を求める。測定対象のCD4陽性細胞をあらかじめ抗CD45抗体とも反応させておくと、抗CD45抗体由来の蛍光強度が強い細胞群の細胞のデータを測定データから抽出し、抽出されたデータから、抗CD45抗体由来の蛍光強度が強い細胞群において抗鎖抗体由来の蛍光強度の低い細胞群の細胞数の比率を求めることにより、Naive T細胞群においてT細胞抗原受容体鎖の発現強度が低い細胞群の細胞数の比率を求めることができる。このようにして測定し得る「CD4陽性細胞群、好ましくはNaive T細胞群

におけるT細胞抗原受容体鎖の発現強度が低い細胞群の細胞数の比率」は、免疫機能が低下すると高くなる。また、CD4陽性細胞群においてT細胞抗原受容体FcR鎖を発現する細胞群の細胞数の比率を測定するには、前記のようにして得られる測定データから、抗FcR鎖抗体の特異的な結合が検出された細胞群の細胞数の全CD4陽性細胞数に対する比率を求める。測定対象のCD4陽性細胞をあらかじめ抗CD45抗体とも反応させておくと、抗CD45抗体由来の蛍光強度が強い細胞群の細胞のデータを測定データから抽出し、抽出されたデータから、抗CD45抗体由来の蛍光強度が強い細胞群において抗FcR鎖抗体の特異的な結合が検出された細胞群の細胞数の比率を求めることにより、Naive T細胞群においてT細胞抗原受容体FcR鎖を発現する細胞群の細胞数の比率を求めることができる。このようにして測定し得る「CD4陽性細胞群、好ましくはNaive T細胞群においてT細胞抗原受容体FcR鎖を発現する細胞群の細胞数の比率」は、免疫機能が低下すると高くなる。被験動物の免疫機能は、例えば、被験動物と同一種の動物であって基準とすることのできる個体の通常の背景値をあらかじめ入手するあるいは測定しておき、それと被験動物の測定値とを比較することにより、検定することができる。また、被験動物として非ヒト哺乳類動物を用いる場合は、例えば、しかるべき基準(対照)となる検体(例えば若齢動物のCD4陽性細胞群)のデータを併行して測定し、これと被験動物の測定値とを比較することにより、被験動物の免疫機能を検定してもよい。

【0009】本発明方法は、例えば免疫機能を調節する薬剤のスクリーニング等に利用することもできる。具体的には例えば、非ヒト哺乳類動物に被験物質を投与し、本発明方法により該動物の免疫機能を検定することにより、免疫機能を増強する効果を有する薬剤や、免疫機能を抑制する効果を有する薬剤などをスクリーニングすることができる。

【0010】

【実施例】実施例1 鎖の発現強度が低い細胞群の細胞数の比率を測定する検定

(1) 脾臓の摘出およびCD4陽性細胞の調製

若齢マウスとして、雄の6週齢のマウス(日本SLCから購入)を使用した。また、老齢マウスとして、6週齢で購入(日本SLC)した後SPF条件で飼育した26カ月齢のマウスを用いた。これらのマウスをそれぞれ頸椎脱臼により屠殺した後、脾臓を摘出して、滅菌シャーレに入れたMEM培地(JRHバイオサイエンス社製)に浸した。ピンセットを用いて脾膜を切断し、脾臓をほぐして脾臓細胞を浮遊させ、ピペットで吸っては出すの操作を数回繰り返した後、 $500 \times g$ で5分間遠心分離した。上清を除去して沈殿をMEM培地1mlに懸濁することにより、均一な細胞浮遊液を調製した。得られた細胞浮遊液を、ナイロンウール(和光純薬)をディスポーザブル注射器(10ml)につめ

て作製されたナイロンウールカラムに通した。すなわち、10%FCSを含むMEM培地をナイロンウールカラムに満たし、カラムの流れを止めた後、細胞浮遊液を添加し、カラムの流れを再開させた。細胞浮遊液が全てナイロンウールカラムに浸透した後カラムの流れを止め、さらに10%FCSを含むMEM培地を1~2ml加え、37℃で45分間静置した。その後カラムの流れを再開し、滴下する細胞浮遊液を10ml採取した。SephadexG-10粒子（ファルマシア）に精製水を加え、混和して静置し、粒子が大部分沈んだ時点での浮遊している粒子と水を除いた。この操作を上清が濁らなくなるまで続けて粒子を膨潤させた。膨潤した SephadexG-10粒子と同量のPBSを加えてオートクレーブ滅菌した。さらに、粒子をディスポーザブル注射器（10ml）につめてカラムを作成し、10%FCSを含むMEM培地を通した。上記ナイロンウールカラムから回収された細胞浮遊液を添加し、該液が全てカラムに浸透した後、さらに10%FCSを含むMEM培地を1から2ml添加し、最初に滴下されてくる細胞浮遊液を10ml採取した。採取された細胞を、MEM培地で洗浄した。洗浄された細胞に、ハイブリドーマ53.6.7（Pharmingen）から調製された抗CD8抗体、ハイブリドーマM1/69（Pharmingen）から調製された抗Heat Stable Antigen、ハイブリドーマM5/114（Pharmingen）から調製された抗MHC classII抗体、およびハイブリドーマ2.4G2（Pharmingen）から調製された抗FcR抗体を加え、4℃で15分間静置した後、MEM培地で2回洗浄した。洗浄された細胞に、抗ラットIgGマイクロビーズ（Miltenyi Biotec）を加え、4℃で15分間静置した後、1%FCSを含むPBS緩衝液で2回洗浄した。次いで、MACS（Miltenyi Biotec）にてマイクロビーズが結合した細胞を除去し、残った細胞を回収した。回収された細胞中のCD4陽性細胞の割合は90%以上であった。

【0011】(2) 抗体染色の前処理

回収された前記の細胞（ 1.0×10^6 個）を、PBS緩衝液で2回洗浄し、3%パラホルムアルデヒドを含むPBS緩衝液で室温下7分間静置した。さらに等量のFCSを加え37℃で20分間保温し、1%FCSを含むPBS緩衝液で2回洗浄し、さらに300μg/mlのマウスIgG（ICN）を加え4℃で10分間で静置した。

【0012】(3) Naive T細胞の検出を目的とした抗体染色

ハイブリドーマ23.G2（Pharmingen）の培養上清を2倍に希釈し、これを抗CD45RB抗体として、前記の前処理された細胞に加えて4℃で15分間静置し、次いで、ビオチン*

*で標識された抗ラットIgG抗体（Pharmingen）を2μg/mlとなるように加え、4℃で15分間静置した。さらに、PE標識されたストレプトアビシン（GIBCOBRL）を最終的に30倍希釈されるように加えて、4℃で15分間静置した後、細胞を、1%FCSを含むPBS緩衝液で2回洗浄した。

【0013】(4) 抗鎖抗体による染色

続いて、洗浄された前記細胞を、0.5%TritonX-100を含むPBS緩衝液に浮遊させて室温10分間静置した後、1%FCSを含むPBS緩衝液で2回洗浄し、マウスIgG（ICN）を300μg/mlとなるように加え4℃で10分間で静置した。次いで、抗鎖ハムスターIgGを最終濃度が1μg/mlとなるように添加して、4℃で15分間静置した。得られた細胞を、1%FCSを含むPBS緩衝液で2回洗浄し、2次抗体として、FITC標識された抗ハムスターIgG抗体（Caltag Laboratories）を加えて、4℃で15分間静置した。得られた細胞を、1%FCSを含むPBS緩衝液で2回洗浄し、測定サンプルとした。尚、抗鎖抗体に替えて、Normal hamster IgG（Pharmingen、PM11150D）を添加して同様の処理を行い、得られた測定サンプルを陰性対照とした。

【0014】(5) フローサイトメーターによる蛍光測定

FACScan（Becton Dickinson）を使用し、解析ソフトはLysis II software（Becton Dickinson）を用いて蛍光を測定した。横軸に抗鎖抗体由来の蛍光強度、縦軸に細胞数を設定して測定データを展開したところ、2つのピークを有する曲線が得られた。陰性対照の細胞の測定結果を参考にして、曲線の谷の部分にピークの境界を設定し、抗鎖抗体由来の蛍光強度の低い側のピークに含まれる細胞（以下、抗鎖抗体由来の蛍光強度の低い細胞群と記す。）の数を求めた。CD4陽性細胞群における抗鎖抗体由来の蛍光強度の低い細胞群の細胞数の比率を求める場合には、全CD4陽性細胞数に対する、抗鎖抗体由来の蛍光強度の低い細胞群の細胞数の比率を求めた。また、Naive T細胞における抗鎖抗体由来の蛍光強度の低い細胞群の細胞数の比率を求める場合には、抗CD45RB抗体由来の蛍光強度が強い細胞群をnaive T細胞としてそのデータを抽出し、抽出されたデータから、全Naive T細胞数に対する、抗鎖抗体由来の蛍光強度の低い細胞群の細胞数の比率を求めた（N=6）。結果を表40示す。

【0015】

【表1】

	鎖の発現強度が低い CD4陽性細胞の比率	
	総 CD4陽性細胞における比率 (%)	総 Naive T細胞における比率 (%)
老齢	27.2 ± 2.8	40.8 ± 8.9
若齢	14.7 ± 1.8	12.8 ± 2.0

【0016】実施例2 FcR鎖を発現する細胞群の細胞数50の比率を測定する検定

(1) 抗FcR抗体による染色

CD4陽性細胞の調製からNaive T細胞の検出を目的とした抗体染色までは、実施例1(1)～(3)と同様に行つた。洗浄された細胞を、0.5%TritonX-100を含むPBS緩衝液に浮遊させて室温10分間静置した後、1%FCSを含むPBS緩衝液で2回洗浄し、マウスIgG(ICN)を300μg/mlとなるように加え4で10分間で静置した。続いて、抗FcRラビットIgG(UBI)を2μg/mlになるように加えて4で15分間静置した。得られた細胞を、1%FCSを含むPBS緩衝液で2回洗浄した後、2次抗体として、FITC標識された抗ラビットIgG抗体(Sigma)を加えて、4で15分間静置した。得られた細胞を、1%FCSを含むPBS緩衝液で2回洗浄し、測定サンプルとした。尚、抗FcR抗体に替えて、免疫をしていないウサギの血清から精製されたIgGを添加して同様の処理を行い、得られた測定サンプルを陰性対照とした。

【0017】(2) フローサイトメーターによる蛍光測定

*実施例1(5)と同様に蛍光測定を行つた。横軸に抗FcR抗体由来の蛍光強度、縦軸に細胞数を設定して測定データを展開したところ、2つのピークを有する曲線が得られた。陰性対照の細胞の測定結果を参考にして、曲線の谷の部分にピークの境界を設定し、抗FcR抗体添加サンプルにおいてのみ検出されるピークに含まれる細胞(以下、抗FcR抗体陽性細胞群と記す。)の数を求めた。CD4陽性細胞における抗FcR抗体陽性細胞群の細胞数の比率を求める場合には、全細胞数に対する、抗FcR抗体陽性細胞群の細胞数の比率を求めた。また、Naive T細胞における抗FcR抗体陽性細胞群の細胞数の比率を求める場合には、抗CD45RB抗体由来の蛍光強度が強い細胞群をnaive T細胞としてデータを抽出し、抽出されたデータから、全Naive T細胞数に対する、抗FcR抗体陽性細胞群の細胞数の比率を求めた(N=6)。結果を表2示す。

【0018】

【表2】

	FcεR _γ 鎖を発現する CD4 陽性細胞の比率	
	全 CD4 陽性細胞における比率 (%)	全 Naive T 細胞における比率 (%)
老齢	8.7 ± 2.6	19.1 ± 7.2
若齢	5.7 ± 0.5	7.0 ± 0.4

【0019】

検定方法等が提供可能となる。

【発明の効果】本発明により、哺乳類動物の免疫機能の

专利名称(译)	测定免疫功能的方法		
公开(公告)号	JP2002048791A	公开(公告)日	2002-02-15
申请号	JP2000230783	申请日	2000-07-31
[标]申请(专利权)人(译)	住友化学有限公司		
申请(专利权)人(译)	住友化学工业株式会社		
[标]发明人	田村敏生		
发明人	田村 敏生		
IPC分类号	G01N33/53		
FI分类号	G01N33/53.K		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供哺乳动物免疫功能的认证方法。解决方案：这种哺乳动物免疫功能的认证方法的特征在于测量CD4阳性T细胞组中具有低T细胞抗原受体和zeta链表现强度的细胞组中细胞数的比例。从待测哺乳动物中分离，或通过测量细胞组中表现出T细胞抗原受体FcR链的细胞群中细胞数的比例。

総の発現強度が低い CD4陽性細胞の比率		
	総 CD4陽性細胞における比率 (%)	総 Naive T 細胞における比率 (%)
老齢	27.2 ± 2.8	40.8 ± 8.9
若齢	14.7 ± 1.8	12.8 ± 2.0