

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5144950号
(P5144950)

(45) 発行日 平成25年2月13日 (2013. 2. 13)

(24) 登録日 平成24年11月30日 (2012. 11. 30)

(51) Int. Cl.

F 1

GO 1 N 33/53 (2006.01)

GO 1 N 33/53

K

GO 1 N 33/53

D

請求項の数 4 (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願2007-87984 (P2007-87984)
 (22) 出願日 平成19年3月29日 (2007. 3. 29)
 (65) 公開番号 特開2008-249367 (P2008-249367A)
 (43) 公開日 平成20年10月16日 (2008. 10. 16)
 審査請求日 平成22年3月26日 (2010. 3. 26)

(73) 特許権者 303058708
 株式会社バイオマーカーサイエンス
 京都府京都市左京区田中門前町103番地
 の5
 (73) 特許権者 596156174
 吉川 敏一
 京都府宇治市菟道荒横1-51
 (74) 代理人 100100480
 弁理士 藤田 隆
 (74) 代理人 100135839
 弁理士 大南 匡史
 (72) 発明者 古倉 聡
 滋賀県大津市月輪4丁目11-9
 (72) 発明者 吉川 敏一
 京都府宇治市菟道荒横1-51
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ナチュラルキラー活性の評価方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生体から単離された末梢血単核細胞の集団におけるCD4+細胞の数とCD8+細胞の数との比を指標として、前記生体のナチュラルキラー活性を評価することを特徴とするナチュラルキラー活性の評価方法。

【請求項 2】

生体から単離された末梢血単核細胞の集団におけるCD4+・CD25+細胞の数の比率を指標として、前記生体のナチュラルキラー活性を評価することを特徴とするナチュラルキラー活性の評価方法。

【請求項 3】

CD4+細胞の数とCD8+細胞の数との比あるいはCD4+・CD25+細胞の数の比率を、予め設定された基準値と比較することにより、前記生体のナチュラルキラー活性を評価することを特徴とする請求項1又は2に記載のナチュラルキラー活性の評価方法。

【請求項 4】

前記基準値は、生体から単離された直後の末梢血単核細胞における細胞障害性試験によるナチュラルキラー活性の値との相関を示す回帰式から求めたものであることを特徴とする請求項3に記載のナチュラルキラー活性の評価方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

20

本発明はナチュラルキラー活性の評価方法に関し、さらに詳細には、精度管理が容易で生体のナチュラルキラー活性をより正確かつ簡便に評価することができるナチュラルキラー活性の評価方法に関する。

【背景技術】

【0002】

生体内にウイルスや細菌などの抗原（非自己）が侵入したり、生体内でがん細胞が発生した場合には、生体は抗原やがん細胞を排除するために多様な生体反応を引き起こす。この抗原等に対して起こる一連の生体反応が免疫応答であり、その強さ、すなわち免疫能がいわゆる抵抗力に直接関連している。すなわち、ヒトの免疫能を正確に評価することは、感染症や発ガンを予防する上での指標として極めて重要である。この免疫能については、

10

【0003】

ヒトの免疫能の評価方法としては、被検者の末梢血から得た免疫担当細胞のナチュラルキラー活性（NK活性）を指標とする方法が従来から広く採用されている。具体的には「細胞障害性試験」と呼ばれる手法で行われており、被検者から採取した末梢血を遠心分離して得た末梢血単核細胞をエフェクター細胞とし、該エフェクター細胞を標的となるがん細胞（ターゲット細胞）と接触させ、ターゲット細胞に対する細胞障害性を細胞内に取り込ませた⁵¹Cr等の遊離をもって評価するものである。

【0004】

一方で、細胞障害性試験については、精度管理の難しさと操作の煩雑さが指摘されている。すなわち測定結果のばらつきが大きく、複数の条件を設定して試験を行う必要がある。そもそも細胞障害性試験で得られたNK活性の値が被検者の免疫能を正しく反映しているのか、との指摘さえある。また、⁵¹Cr等の放射性物質を用いることが多く、専用の取扱い施設が必要となり、かつ作業者の安全性にも不安が残る。このような背景の下、ヒトの免疫能をより正確かつ簡便に評価するための技術開発が進められている。特許文献1には、殺細胞活性分子であるグランジュリン、パーフォリン、あるいはグランザイムBの免疫担当細胞における発現量を指標として、被検者の免疫状態を確認する方法が開示されている。

20

【0005】

なお臨床検査の現場において、検査体制が整っている施設では採血後ただちに細胞障害性試験を行うことができるが、そうでない施設では外部の検査機関に試験を依頼することになる。この際、採血から試験開始までに24時間以上経過していることも少なくない。

30

【特許文献1】特開2001-249126号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

前述のように、ヒトの免疫能を正確に把握するためには、多方面から評価する必要がある。そのためには、従来とは異なった方面から免疫能を評価する方法であって且つ精度管理が容易な技術が求められる。本発明の目的は、精度管理が容易で、生体のナチュラルキラー活性をより正確かつ簡便に評価することができるナチュラルキラー活性の評価方法等

40

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、従来の細胞障害性試験における精度管理の難しさの一要因として、採血から試験開始までの経過時間が影響しているのではないかと考えた。すなわち、細胞障害性試験はターゲット細胞に対する細胞障害性を直接みるものであり、エフェクター細胞の成育状態（例えば、保存状態）が試験結果に影響することが予想された。そこで、採血からの経過時間と細胞障害性試験によるNK活性の値との関係について実際に実験を行って調査した。その結果、時間の経過とともにNK活性の値が減少しており、しかもその減少の度合いが予想を上回るほど大きいものであることを確認した。検体によっては24時間

50

経過時で50%以下まで減少している例も見られた。さらに、検体ごとの減少度合いのばらつきが大きく、外挿も困難であった。これにより、従来の細胞障害性試験によるNK活性をもって免疫能を正確に評価するためには、採血直後の新鮮な検体を用いて試験を行う必要があることが強く示唆された。

【0008】

そこで本発明者らは、採血からある程度の時間が経過した検体を用いても正確な免疫能の評価ができる技術の開発を目指し、鋭意研究を行った。その結果、末梢血単核細胞の表面抗原の違いによる亜分類に着目することにより、採血からの時間経過の影響を受けず、且つばらつきも小さい免疫能(NK活性)の評価方法を確立することに成功し、本発明を完成した。すなわち、本発明の要旨は以下のとおりである。

10

【0009】

請求項1に記載の発明は、生体から単離された末梢血単核細胞の集団におけるCD4+細胞の数とCD8+細胞の数との比を指標として、前記生体のナチュラルキラー活性を評価することを特徴とするナチュラルキラー活性の評価方法である。

【0010】

また請求項2に記載の発明は、生体から単離された末梢血単核細胞の集団におけるCD4+・CD25+細胞の数の比率を指標として、前記生体のナチュラルキラー活性を評価することを特徴とするナチュラルキラー活性の評価方法である。

【0011】

免疫担当細胞は、発現している表面抗原の種類によって亜分類されている。表面抗原の種類としては、CD3、CD4、CD8、CD14、CD19、CD25等があり、CD4を発現している細胞(CD4+細胞)はヘルパーT細胞、CD8を発現している細胞(CD8+細胞)はキラーT細胞、CD4とCD25の両方を発現している細胞(CD4+・CD25+細胞)は制御性T細胞に相当する。そして、本発明のナチュラルキラー活性の評価方法では、生体から単離された末梢血単核細胞の集団におけるCD4+細胞の数とCD8+細胞の数との比(請求項1)、あるいはCD4+・CD25+細胞の数の比率(請求項2)を指標として、生体のナチュラルキラー活性を評価する。本発明のナチュラルキラー活性の評価方法では、表面抗原の種類によって分類された特定の細胞集団の数比をもって評価するので、検体となる末梢血単核細胞が生きてさえおればよく、その成育状態の影響を受けない。そのため、末梢血単核細胞が生きている限りにおいて採血から試験開始までの経過時間の影響を受けることはなく、精度管理が容易で、外部の検査機関にて試験を行う場合でも正確にナチュラルキラー活性の評価を行うことができる。さらに、末梢血単核細胞の分類については、例えばフローサイトメトリーによって簡単に行うことができるので、操作が簡便であり、多数の検体を一度に処理することができる。またさらに、放射性物質を使う必要がないので、専用の施設も不要である。

20

30

【0012】

なお、「CD4+細胞の数とCD8+細胞の数との比」は、例えば「CD4+細胞の数/CD8+細胞の数」やその逆数「CD8+細胞の数/CD4+細胞の数」をもって表現することができる。あるいは、単に「CD4+細胞の数:CD8+細胞の数」で表現してもよい。同様に、「末梢血単核細胞の集団におけるCD4+・CD25+細胞の数の比率」は、例えば、「CD4+・CD25+細胞の数/末梢血単核細胞の全数」で表現することができる。これらは、いずれもフローサイトメトリーによって簡単に測定および算出することができる。

40

【0013】

請求項3に記載の発明は、CD4+細胞の数とCD8+細胞の数との比あるいはCD4+・CD25+細胞の数の比率を、予め設定された基準値と比較することにより、前記生体のナチュラルキラー活性を評価することを特徴とする請求項1又は2に記載のナチュラルキラー活性の評価方法である。

【0014】

本発明のナチュラルキラー活性の評価方法では、予め基準値を設定しておき、CD4+

50

細胞の数とCD8+細胞の数との比あるいはCD4+・CD25+細胞の数の比率を当該基準値と比較してナチュラルキラー活性を評価する。かかる構成により、より正確にナチュラルキラー活性の評価を行うことができる。

【0015】

請求項4に記載の発明は、前記基準値は、生体から単離された直後の末梢血単核細胞における細胞障害性試験によるナチュラルキラー活性の値との相関を示す回帰式から求めたものであることを特徴とする請求項3に記載のナチュラルキラー活性の評価方法である。

【0016】

細胞障害性試験によるナチュラルキラー活性(NK活性)測定については、試験を採血直後に行えば、その測定結果は生体の免疫状態を正確に反映していると考えられる。そして本発明のナチュラルキラー活性の評価方法では、基準値として生体から単離された直後の末梢血単核細胞における細胞障害性試験によるNK活性の値との相関を示す回帰式から求めたものを採用する。かかる構成により、さらに正確にナチュラルキラー活性の評価を行うことができる。

10

【0017】

関連の発明は、請求項1に記載のナチュラルキラー活性の評価方法に用いるためのナチュラルキラー活性評価用キットであって、CD4+細胞に特異的な抗体と、CD8+細胞に特異的な抗体とを含むことを特徴とするナチュラルキラー活性評価用キットである。

【0018】

この発明は上述のナチュラルキラー活性の評価方法に用いるためのナチュラルキラー活性評価用キットにかかるものであり、CD4+細胞に特異的な抗体とCD8+細胞に特異的な抗体とを含む。この発明のナチュラルキラー活性評価用キットによれば、生体から単離した末梢血単核細胞の集団をフローサイトメトリーに供する際にCD4+細胞ならびにCD8+細胞の分類を簡便に行うことができる。その結果、「CD4+細胞の数とCD8+細胞の数との比」をきわめて簡便に測定および算出することができる。

20

【0019】

関連の発明は、さらにCD4+・CD25+細胞に特異的な抗体を含むことを特徴とする上記のナチュラルキラー活性評価用キットである。

【0020】

かかる構成により、「末梢血単核細胞の集団におけるCD4+・CD25+細胞の数の比率」をもきわめて簡便に測定および算出することができるナチュラルキラー活性評価用キットが提供される。

30

【0021】

関連の発明は、請求項2に記載のナチュラルキラー活性の評価方法に用いるためのナチュラルキラー活性評価用キットであって、CD4+・CD25+細胞に特異的な抗体を含むことを特徴とするナチュラルキラー活性評価用キットである。

【0022】

この発明は上述のナチュラルキラー活性の評価方法に用いるためのナチュラルキラー活性評価用キットにかかるものであり、CD4+・CD25+細胞に特異的な抗体とを含む。この発明のナチュラルキラー活性評価用キットによれば、生体から単離した末梢血単核細胞の集団をフローサイトメトリーに供する際にCD4+・CD25+細胞の分類を簡便に行うことができる。その結果、「末梢血単核細胞の集団におけるCD4+・CD25+細胞の数の比率」をきわめて簡便に測定および算出することができる。

40

【0023】

関連の発明は、さらにCD4+細胞に特異的な抗体とCD8+細胞に特異的な抗体とを含むことを特徴とする上記のナチュラルキラー活性評価用キットである。

【0024】

かかる構成により、「CD4+細胞の数とCD8+細胞の数との比」をもきわめて簡便に測定および算出することができるナチュラルキラー活性評価用キットが提供される。

【発明の効果】

50

【 0 0 2 5 】

本発明のナチュラルキラー活性の評価方法によれば、末梢血単核細胞が生きている限りにおいて採血から試験開始までの経過時間の影響を受けることはなく、精度管理が容易で、外部の検査機関にて試験を行う場合でも正確にナチュラルキラー活性の評価を行うことができる。さらに、末梢血単核細胞の分類については、フローサイトメトリーによって簡単に行うことができるので、操作が簡便であり、多数の検体を一度に処理することができる。またさらに、放射性物質を使う必要がないので、専用の施設も不要である。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 2 6 】

本発明のナチュラルキラー活性の評価方法の1つの様相は、生体から単離された末梢血単核細胞の集団におけるCD4+細胞の数とCD8+細胞の数との比を指標として、前記生体のナチュラルキラー活性を評価するナチュラルキラー活性の評価方法である。また、本発明のナチュラルキラー活性の評価方法の他の様相は、生体から単離された末梢血単核細胞の集団におけるCD4+・CD25+細胞の数の比率を指標として、前記生体のナチュラルキラー活性を評価するナチュラルキラー活性の評価方法である。

【 0 0 2 7 】

本発明のナチュラルキラー活性の評価方法では、生体から単離された末梢血単核細胞(PBMC)を検体とする。PBMCの単離方法としては、公知の方法をそのまま用いることができ、例えば、ヘパリン採血した全血を比重遠心分離に供することにより、単離することができる。採血からPBMCを単離するまでの時間については、PBMCが生存状態で保持できる条件下で血液が保存されていれば特に制限はなく、採血直後にPBMCを単離することは必須でない。むしろ作業性を考慮すると、採血した血液を適切な条件下で一旦保存し、その後にPBMCを単離することが好ましい。血液の保存方法としては、臨床検査の分野で採用されている方法がそのまま適用でき、例えば、ヘパリン共存下で室温保存または冷蔵保存することができる。

【 0 0 2 8 】

本発明のナチュラルキラー活性の評価方法では、単離されたPBMCの集団における「CD4+細胞の数とCD8+細胞の数との比」あるいは「CD4+・CD25+細胞の数の比率」といったパラメータを指標とする。これらのパラメータについては、例えば、単離したPBMCをフローサイトメトリーに供することにより、容易に得ることができる。この際、PBMCの各表面抗原に特異的な抗体とPBMCの集団とを接触させることにより、PBMCを表面抗原の種類に従って分類する。すなわち、CD4+細胞に特異的な抗体とCD8+細胞に特異的な抗体とを用いることにより、CD4+細胞の数の比率(%)とCD8+細胞の数の比率(%)を測定することができ、「単離されたPBMCの集団におけるCD4+細胞の数とCD8+細胞の数との比」を得ることができる。また、CD4+・CD25+細胞に特異的な抗体を用いることにより、「単離されたPBMCの集団におけるCD4+・CD25+細胞の数の比率(%)」を測定することができる。なお、これらの抗体についてはすでに取得されており、市販もされている。ケーラーとミルシュタインの方法等の公知技術で自家調製してもよい。

【 0 0 2 9 】

好ましい実施形態では、上記した「CD4+細胞の数とCD8+細胞の数との比」あるいは「CD4+・CD25+細胞の数の比率」を、予め設定された基準値と比較することにより、生体のナチュラルキラー活性(NK活性)を評価する。すなわち、生体から単離された直後のPBMC、換言すれば、採血直後のPBMCを検体とする場合には、細胞障害性試験によるNK活性をもって生体の免疫能を正確に評価することができる。そこで、正確な免疫能を反映しているNK活性との相関性を有する基準値を採用することにより、本発明によるNK活性の評価をきわめて正確に行うことができる。当該基準値は、採血直後のPBMCを用いて細胞障害性試験によるNK活性と各パラメータ(CD4+細胞の数とCD8+細胞の数との比、並びに、CD4+・CD25+細胞の数の比率)の測定を行い、当該NK活性と各パラメータとの相関データから選択すればよい。例えば、細胞障害

10

20

30

40

50

性試験による20%のNK活性に相当する各パラメータの値を基準値として採用すればよい。なお、細胞障害性試験によるNK活性と各パラメータとは負の相関を示すので、20%の当該NK活性に相当する基準値を仮にAとすると、「細胞障害性試験によるNK活性20%以上」の状態であれば各パラメータはA以下の値を示す。

【0030】

上記基準値については、多数の被検者から収集した値を元に設定すれば、ユニバーサルな値となり、集団検診等の際に有用である。一方、被検者ごとに固有の基準値を設定してもよく、この際には、当該被検者の免疫能をモニタリングするのに有用である。

【0031】

本発明に使用できるナチュラルキラー活性評価用キットの1つの様相は、CD4+細胞に特異的な抗体とCD8+細胞に特異的な抗体とを含むものである。また、本発明に使用できるナチュラルキラー活性評価用キットの他の様相は、CD4+・CD25+細胞に特異的な抗体を含むものである。当該抗体はポリクローナル抗体とモノクローナル抗体のいずれでもよいが、より特異性の高いモノクローナル抗体が好ましい。これらの抗体の形状については特に限定はなく、溶液状でもよいし凍結乾燥品でもよい。また、抗体以外の試薬類、例えば、PBMC単離用の試薬(Ficoll-paque液など)、各種の緩衝液、遠心用チューブ等をさらに含むものでもよい。なお、CD4+細胞に特異的な抗体、CD8+細胞に特異的な抗体、およびCD4+・CD25+細胞に特異的な抗体、の計3種の抗体を含むキットであれば、「CD4+細胞の数とCD8+細胞の数との比」と「CD4+・CD25+細胞の数の比率」の両パラメータの測定に対応可能であり、特に好ましい。

【0032】

以下に、実施例をもって本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【実施例】

【0033】

1. 細胞障害性試験によるNK活性測定の基礎的検討

(1) エフェクター細胞の調製

文書により同意を得た健常人ボランティア8名から、安静時静脈血35mLをヘパリン入り採血管にて無菌的に採取し、5mLずつ6本に分注した。そのまま室温にて静置し、0時間後(採血直後)、2時間後、5時間後、8時間後、11時間後、および24時間後に比重遠心分離に供し、末梢血単核細胞(PBMC)を回収した。PBMCの回収は以下の手順によった。

【0034】

まず、各時間経過後(0~24時間)に1,500Gで5分間遠心した後、バフィーコート部分を別の遠心管に回収し、RPMI1640で希釈した。パスツールピペットにてFicoll-paque液(ファルマシア社)を3~4mL重層し、20、400Gで15分間遠心し(アクセル・ブレーキなし)、Ficoll-paque液層の上に分離したPBMC層をチューブに回収した。回収したPBMCをPBS(-)で希釈し、4、450Gで6分間遠心した。上清除去後、10%仔ウシ血清(FCS)含有RPMI1640に浮遊させ、4、400Gで5分間遠心した。上清除去後、10%FCS含有RPMI1640に再浮遊させ、 4×10^6 個/mLの細胞濃度になるようにPBMCを浮遊させた(エフェクター細胞浮遊液)。

【0035】

(2) ターゲット細胞の調製

119gのHEPES、54.4gのNaCl、3.73gのKCl、4.07gのMgCl₂・6H₂Oを800mLの精製水に溶解後、1N NaOHでpH7.4に調整し、精製水にて全量1,000mLとした。この溶液をフィルター滅菌し、バッファA(50mM HEPES、93mM NaCl、5mM KCl、2mM MgCl₂、pH7.4)を調製した。また、119gのHEPES、54.4gのNaCl、3.73gのKCl、4.07gのMgCl₂・6H₂O、2.94gのCaCl₂・2H₂O、18.0

gのグルコースを800mLの精製水に溶解後、1N NaOHでpH7.4に調整し、精製水にて全量1,000mLとした。この溶液をフィルター滅菌し、バッファーB(50mM HEPES、93mM NaCl、5mM KCl、2mM MgCl₂、2mM CaCl₂、10mMグルコース、pH7.4)を調製した。

【0036】

393mgのDTPA(Titriplex V)を10mLの1N NaOHに溶解し、100mM DTPA溶液を調製した。次に、1.52mLの原子吸光用Eu溶液(1,000μg/mL)、7.98mLのバッファーA、及び0.5mLの100mM DTPA溶液を混和し、HCl又はNaOHにてpHを7.4に調整してEu-DTPA溶液を調製した。一方、5.0mgのデキストラン硫酸(ファルマシア社)を1.0mLのバッファーAに溶解し、デキストラン硫酸溶液を調製した。そして、25~27μLのEu-DTPA溶液と100μLのデキストラン硫酸溶液を混和し、バッファーAにて全量を1mLとしてラベリングバッファーを調製した。

10

【0037】

T-75フラスコにて継代培養されたK-562細胞浮遊液を15mL容チューブに移し、4℃、400Gで5分間遠心した。上清除去後、3.0mLのバッファーAを加えて再浮遊させ、1.5mL容マイクロチューブ2本に分けて4℃、2,300Gで30秒間遠心した。上清除去後、バッファーAを用いて1.5mL容マイクロチューブ1本にまとめ、4℃、2,300Gで30秒間遠心した。上清除去後、1.0mLのラベリングバッファーで再浮遊させ、15mL容チューブに移し、氷中で20分間インキュベートした。この間、5分ごとに穏やかに撹拌した。

20

【0038】

インキュベート終了後、4℃に冷却したバッファーBを3.0mL加え、氷中で5分間インキュベートした。1.5mL容マイクロチューブ3本に分けて、4℃、2,300Gで30秒間遠心した。上清除去後、バッファーBを用いて1本にまとめ、4℃、2,300Gで30秒間遠心した。再度、バッファーBにて4℃、2,300Gで30秒間洗浄遠心した。さらに、10%FCS含有RPMI1640を用いて4℃、2,300Gで30秒間洗浄遠心を2回行い、再浮遊させて氷中で30分間静置した。さらに、10%FCS含有RPMI1640を用いて同様に洗浄遠心を2回行った後、 5×10^4 個/mLの細胞濃度となるように浮遊させた(ターゲット細胞浮遊液)。

30

【0039】

(3) NK活性の測定

ターゲット細胞浮遊液を96ウェルプレートに100μLずつ分注した。その上に、上記(1)で調製したエフェクター細胞浮遊液を「エフェクター細胞：ターゲット細胞」が「40：1」または「20：1」の比率となるように分注した。そのままプレートを5%CO₂、37℃の条件下で4時間静置した。4時間経過後、プレートのまま室温、350Gで5分間遠心した。遠心後の上清20μLを測定用プレートに移し、増強試薬100μLを分注して、放出されたEu³⁺の量(1/10量)をラベルカウンターにて測定した(測定値A)。別途、エフェクター細胞浮遊液の代わりに100μLの1%トリトンX-100溶液を添加したウェル(Total、測定値B)と、100μLの10%FCS含有RPMI1640を添加したウェル(Back、測定値C)も設定し、同時測定した。Totalはターゲット細胞を全て人工的に破壊した場合のEu³⁺放出値、Backはターゲット細胞からの自然Eu³⁺放出値を測定するためのものである。

40

【0040】

以下の式(I)によりNK活性(%)を算出した。

$$\{(A - C) / (B - C)\} \times 100 \quad (I)$$

【0041】

(4) 結果

第1表ならびに図1に結果を示す。第1表と図1において、a~hはそれぞれ同一被検者由来の検体を示している。第1表において、各数値はNK活性の測定値(%)、かつこ

50

内の数値は0時間を100とした場合の相対値である。図1は、NK活性と経過時間との関係を表すグラフである。すなわち、いずれの検体の場合も、採血後からPBMCの分離までに要した時間が長いほどNK活性の値が減少していた。また、その減少度合いは検体によってばらつきが大きかった。例えば、24時間経過後に50%以下まで減少した検体（検体f, g）がある一方で、75%程度に留まった検体（検体e）もあり、外挿によって採血直後（0時間経過後）のNK活性を推定することは困難であった。

以上より、細胞障害性試験によるNK活性は、採血後からPBMCの分離までに要した時間が長いほど減少し、採血直後に測定しないと生体の正しい免疫能を反映しないことが示された。

【0042】

10

【表1】

第1表

検体	採血後の経過時間(時間)					
	0	2	5	8	11	24
a	44.7	42.4	39.1	37.8	37.5	25.5
	100	94.9	87.5	84.6	83.9	57.0
b	43.6	39.3	36.0	30.9	31.1	26.9
	100	90.1	82.6	70.9	71.3	61.7
c	40.8	36.7	34.9	30.1	31.8	24.0
	100	90.0	85.5	73.8	77.9	58.8
d	33.4	29.7	29.0	23.5	26.0	22.5
	100	88.9	86.8	70.4	77.8	67.4
e	22.6	22.4	22.1	19.0	20.7	17.1
	100	99.1	97.8	84.1	91.6	75.7
f	36.0	29.8	29.6	26.4	25.4	17.0
	100	82.8	82.2	73.3	70.6	47.2
g	37.1	27.7	27.6	25.3	25.9	16.3
	100	74.7	74.4	68.2	69.8	43.9
h	63.5	61.0	59.2	54.5	46.5	37.7
	100	96.1	93.2	85.8	73.2	59.4

20

30

【0043】

40

2. フローサイトメトリーによる免疫担当細胞の亜分類

文書により同意を得た健常人ボランティア30名を被検者とし、上記1と同様の手順で採血直後（0時間経過後）のNK活性を測定した。この細胞障害性試験によるNK活性測定値は採血直後のPBMCを用いて測定したものであるから、被検者の免疫能を正確に反映していると考えられた。

【0044】

一方、採血直後（0時間経過後）におけるPBMCを、8種の表面抗原にそれぞれ特異的なモノクローナル抗体で染め分け、フローサイトメトリーに供して全PBMC数に対する各細胞の数の比率（%）を測定した。表面抗原8種の内訳は、T細胞（CD3+）、ヘルパーT細胞（CD4+）、キラーT細胞（CD8+）、単球（CD14+）、B細胞（

50

CD19+)、NK細胞(CD16+・CD56+)、NKT細胞(CD3+・CD16+・CD56+)、および制御性T細胞(CD4+・CD25+)とし、CD4+細胞の数のCD8+細胞の数に対する比(CD4+/CD8+)を加えた9項目について検討した。結果を第2表に示す。

【0045】

【表2】

第2表

検体No.	細胞障害性試験		フローサイトメトリーによるPBMCの分画									
	NK活性(%)		CD3+ (%)	CD4+ (%)	CD8+ (%)	CD4+/CD8+	CD14+ (%)	CD19+ (%)	末梢血 リンパ球中 のNKT細胞 (%)	末梢血 リンパ球中 のNK細胞 (%)	エフェクター 細胞中の NK細胞 (%)	CD4+ CD25+ (%)
	40:1	20:1										
1	19.2	9.8	47.05	30.08	17.88	1.68	13.25	11.74	3.63	22.55	16.26	12.60
2	17.2	9.9	56.96	40.30	18.01	2.24	12.21	12.58	2.91	20.14	15.77	17.29
3	18.5	9.9	51.62	31.39	17.63	1.78	10.68	12.59	2.84	22.58	16.12	13.06
4	33.3	14.2	65.55	39.86	29.63	1.35	7.97	8.73	3.07	24.78	19.92	19.97
5	24.3	10.2	65.76	42.25	16.72	2.53	7.18	6.15	2.88	20.50	17.99	23.23
6	31.4	15.9	49.81	31.95	31.39	1.02	27.22	7.21	4.18	35.22	22.49	16.81
7	36.9	17.8	66.13	38.39	23.72	1.62	5.83	5.39	2.36	24.41	20.66	19.07
8	24.6	11.0	63.38	37.00	20.98	1.76	11.51	7.42	2.44	23.00	19.87	18.25
9	36.7	19.7	54.77	32.68	30.43	1.07	12.11	5.91	2.73	32.81	27.15	15.90
10	11.8	4.0	81.07	54.86	17.18	3.19	4.73	7.42	1.69	7.16	6.36	24.27
11	7.8	4.0	79.00	54.59	15.66	3.49	8.60	10.26	1.41	6.80	5.86	27.94
12	10.4	4.3	75.83	55.53	21.63	2.57	21.99	7.76	1.52	8.40	6.10	27.27
13	19.0	6.3	75.39	51.50	25.35	2.03	6.91	5.82	1.76	14.36	12.47	20.45
14	13.1	4.6	79.55	54.41	24.99	2.18	14.21	7.71	1.69	10.29	8.48	24.05
15	16.7	6.1	76.24	51.69	27.31	1.89	17.68	8.85	1.54	11.94	9.52	20.67
16	27.4	11.1	84.95	60.57	24.40	2.48	4.13	5.46	1.06	8.66	8.34	21.61
17	16.4	6.7	82.83	56.42	26.82	2.10	5.91	8.93	1.04	8.19	7.56	22.58
18	31.3	17.2	66.83	47.35	29.90	1.58	12.29	6.40	1.69	24.53	19.73	16.77
19	23.0	11.9	55.27	36.13	27.62	1.31	11.22	16.71	2.76	23.37	18.84	14.22
20	12.0	5.6	67.87	48.02	14.40	3.33	8.39	6.70	1.45	11.17	9.16	19.85
21	23.8	12.6	75.70	50.66	28.91	1.75	7.09	12.38	0.83	11.82	10.33	18.49
22	28.1	11.7	70.21	42.71	27.83	1.53	10.10	5.97	1.98	18.35	15.52	22.78
23	23.3	8.9	64.21	41.10	17.77	2.31	5.44	4.15	1.57	24.51	21.22	21.60
24	31.0	13.7	60.88	36.57	27.60	1.33	13.41	6.33	1.94	24.95	21.26	19.05
25	28.0	15.4	60.95	28.01	33.89	0.83	8.83	7.96	1.39	25.24	22.34	11.99
26	24.3	10.8	76.75	32.80	24.69	1.33	5.47	5.75	1.16	16.06	14.69	13.59
27	16.4	5.3	59.27	25.33	25.27	1.00	14.54	10.95	1.56	16.53	13.12	19.82
28	7.1	3.0	69.15	50.59	16.62	3.04	8.43	10.45	1.83	11.03	9.36	29.59
29	9.2	2.8	70.44	44.12	12.84	3.44	4.49	4.61	2.19	17.61	14.24	25.43
30	12.2	6.1	59.42	44.74	18.91	2.37	13.63	7.72	3.21	23.05	17.09	26.00

10

20

30

40

50

【 0 0 4 6 】

第2表に示す結果を元に、縦軸に細胞障害性試験によるNK活性（40：1）、横軸に各項目の値をプロットしたグラフ（全9種）を作成した。その結果、CD4+ / CD8+と、CD4+・CD25+細胞の数の全PBMC数に対する比率（%）（以下、単に「CD4+・CD25+」と略記する。）の2項目が、前記NK活性に対して高い負の相関を示した。図2は、細胞障害性試験によるNK活性とCD4+ / CD8+との関係を示すグラフである。CD4+ / CD8+については、回帰式「 $Y = 40.506 - 9.415X$ 」、相関係数「0.800」が得られた。図3は、細胞障害性試験によるNK活性とCD4+・CD25+との関係を示すグラフである。CD4+・CD25+については、回帰式「 $Y = 49.795 - 1.36X$ 」、相関係数「0.718」が得られた。

10

以上より、採血直後において、細胞障害性試験によるNK活性とCD4+ / CD8+とは高い相関性を示し、細胞障害性試験に代わってCD4+ / CD8+を測定することで、NK活性の評価を行えることが示された。同様に、採血直後において、細胞障害性試験によるNK活性とCD4+・CD25+とは高い相関性を示し、細胞障害性試験に代わってCD4+・CD25+を測定することで、NK活性の評価を行えることが示された。

【 0 0 4 7 】

なお得られた回帰式によれば、細胞障害性試験によるNK活性20%（ $Y = 20$ ）に対応するCD4+ / CD8の値（ X ）は2.178、CD4+・CD25+の値（ X ）は21.91%となる。したがって、通常、細胞障害性試験によるNK活性の値が20%以上であるときに免疫能が正常と評価している場合には、CD4+ / CD8の値が2.178以下、あるいはCD4+・CD25+の値が21.91%以下という基準で同様の評価を行うことができる。

20

【 0 0 4 8 】

CD4+ / CD8+とCD4+・CD25+との関係についても検討した。図4は、CD4+ / CD8+とCD4+・CD25+との関係を示すグラフである。CD4+ / CD8+とCD4+・CD25+とは高い正の相関を示した（相関係数0.815）。

【 0 0 4 9 】

3. 同一個体における各パラメータの検討

文書により同意を得た健常人ボランティア2名を被検者とし、温熱ストレスをかける直前、並びに、かけた直後、3時間後、6時間後、12時間後、24時間後に採血し、直ちに上記1と同様の手順でPBMCを採取した。温熱ストレスとして、遠赤外線全身加温装置を用い、60分間全身加温を負荷した。この負荷により、被検者2名の直腸温度は39まで上昇した。

30

【 0 0 5 0 】

採取したPBMCを直ちに上記1と同様手順の細胞障害性試験と上記2と同様手順のフローサイトメトリーに供し、NK活性（40：1）、CD4+ / CD8+、及びCD4+・CD25+を測定した。得られた測定値を元に、細胞障害性試験によるNK活性とCD4+ / CD8+との相関性、並びに、細胞障害性試験によるNK活性とCD4+・CD25+との相関性を検討した。結果を図5と図6に示す。図5（a）は一方の被検者における細胞障害性試験によるNK活性とCD4+ / CD8+との関係を示すグラフ、図5（b）は一方の被検者における細胞障害性試験によるNK活性とCD4+・CD25+との関係を示すグラフである。図6（a）は他方の被検者における細胞障害性試験によるNK活性とCD4+ / CD8+との関係を示すグラフ、図6（b）は他方の被検者における細胞障害性試験によるNK活性とCD4+・CD25+との関係を示すグラフである。図5、6に示すように、CD4+ / CD8+とCD4+・CD25+はいずれも細胞障害性試験によるNK活性と強い負の相関を示した。特に、CD4+ / CD8+についてはいずれの個体でも相関係数が0.97以上であり、CD4+ / CD8+と細胞障害性試験によるNK活性とはほぼ同一視できることが示された。

40

以上より、同一個体においてCD4+ / CD8+あるいはCD4+・CD25+の変動を調べることにより、免疫能の変動を正確に把握できることが示された。

50

【 0 0 5 1 】

なお、図 5 (a) のグラフから回帰式「 $Y = 28.284 - 4.983 X$ 」、図 5 (b) のグラフから「 $Y = 32.924 - 0.974 X$ 」が得られた。これらの式から細胞障害性試験による NK 活性 20 % ($Y = 20$) に相当する各パラメータ値 (X) を計算すると、 $CD4+ / CD8+$ は 1.662、 $CD4+ \cdot CD25+$ は 13.27 となる。これらのパラメータ値は、図 5 の被検者に固有の基準値となり得る。同様に、図 6 (a) のグラフから回帰式「 $Y = 71.199 - 27.264 X$ 」、図 6 (b) のグラフから「 $Y = 55.521 - 1.779 X$ 」が得られた。これらの式から細胞障害性試験による NK 活性 20 % ($Y = 20$) に相当する各パラメータ値 (X) を計算すると、 $CD4+ / CD8+$ は 1.878、 $CD4+ \cdot CD25+$ は 19.97 となる。これらのパラメータ値は、図 6 の被検者に固有の基準値となり得る。

10

【図面の簡単な説明】

【 0 0 5 2 】

【図 1】細胞障害性試験による NK 活性と経過時間との関係を表すグラフである。

【図 2】細胞障害性試験による NK 活性と $CD4+ / CD8+$ との関係を示すグラフである。

【図 3】細胞障害性試験による NK 活性と $CD4+ \cdot CD25+$ との関係を示すグラフである。

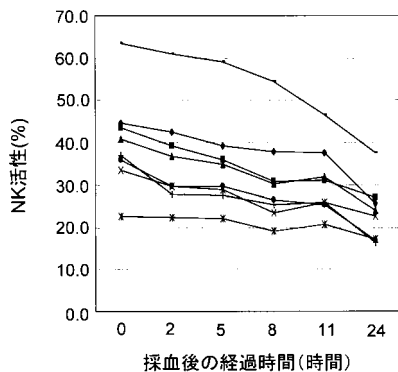
【図 4】 $CD4+ / CD8+$ と $CD4+ \cdot CD25+$ との関係を示すグラフである。

【図 5】(a) は一方の被検者における細胞障害性試験による NK 活性と $CD4+ / CD8+$ との関係を示すグラフ、(b) は一方の被検者における細胞障害性試験による NK 活性と $CD4+ \cdot CD25+$ との関係を示すグラフである。

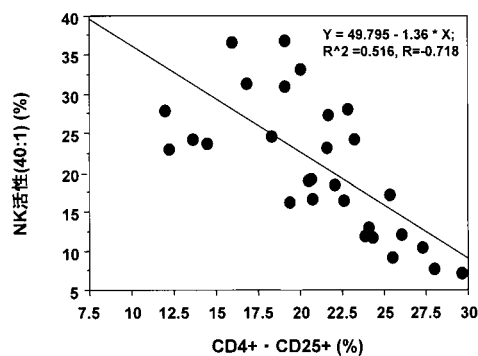
20

【図 6】(a) は他方の被検者における細胞障害性試験による NK 活性と $CD4+ / CD8+$ との関係を示すグラフ、(b) は他方の被検者における細胞障害性試験による NK 活性と $CD4+ \cdot CD25+$ との関係を示すグラフである。

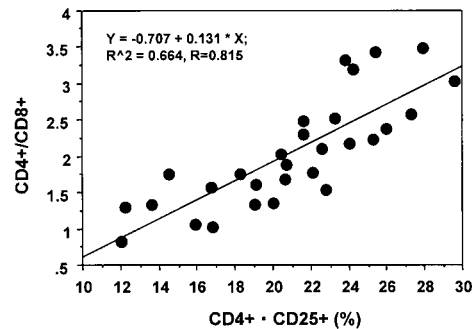
【図 1】



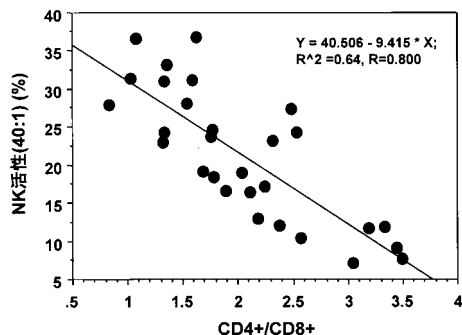
【図 3】



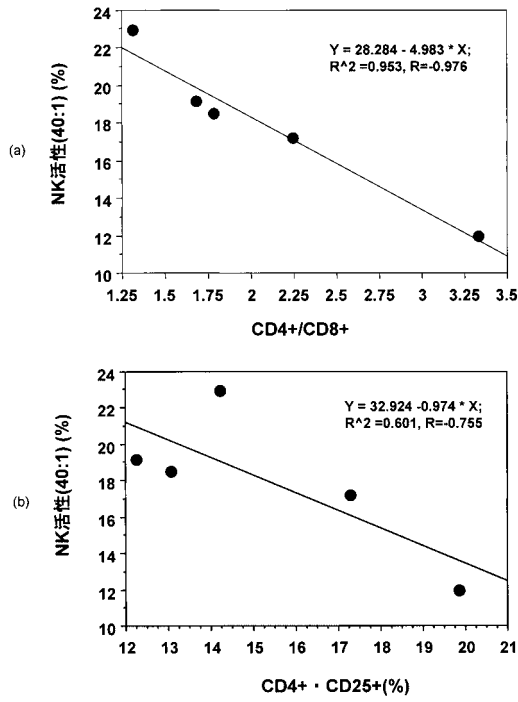
【図 4】



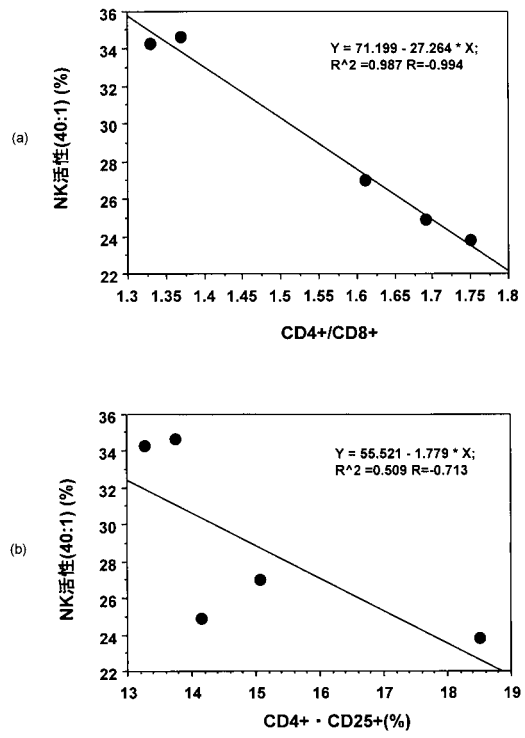
【図 2】



【図 5】



【図 6】



フロントページの続き

審査官 赤坂 祐樹

(56)参考文献 特開平01-121755(JP,A)
国際公開第2007/014420(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)
G01N 33/48-33/53

专利名称(译)	自然杀手活动的评价方法		
公开(公告)号	JP5144950B2	公开(公告)日	2013-02-13
申请号	JP2007087984	申请日	2007-03-29
[标]申请(专利权)人(译)	バイオマーカーサイエンス 吉川俊		
申请(专利权)人(译)	株式会社バイオマーカーサイエンス 吉川俊		
当前申请(专利权)人(译)	株式会社バイオマーカーサイエンス 吉川俊		
[标]发明人	古倉 聡 吉川 敏一		
发明人	古倉 聡 吉川 敏一		
IPC分类号	G01N33/53		
FI分类号	G01N33/53.K G01N33/53.D		
代理人(译)	藤田 隆 忠Daiminami		
其他公开文献	JP2008249367A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供免疫能力等的评估方法，能够容易地管理准确性，并准确和简单地评估活体的免疫能力。解决方案：通过使用从活体分离的一组外周单核血细胞中CD4 + 细胞数和CD8 + 细胞数之间的比率作为指标来评估活体的免疫能力。另外，通过使用从活体分离的外周单核血细胞组中CD4 + CD25 + 细胞数的比率作为指标来评价活体的免疫能力。优选地，采用刚刚从活体分离后与外周单核血细胞中的自然杀伤活性相关的值作为参考值。还提供了用于评估免疫能力的试剂盒，其包括对CD4 + 细胞特异的抗体和对CD8 + 细胞特异的抗体，以及用于评估免疫能力的试剂盒，包括对CD4 + CD25 + 细胞特异的抗体。Ž

検体	採血後の経過時間(時間)					
	0	2	5	8	11	24
a	44.7	42.4	39.1	37.8	37.5	25.5
	100	94.9	87.5	84.6	83.9	57.0
b	43.6	39.3	36.0	30.9	31.1	26.9
	100	90.1	82.6	70.9	71.3	61.7
c	40.8	36.7	34.9	30.1	31.8	24.0
	100	90.0	85.5	73.8	77.9	58.8
d	33.4	29.7	29.0	23.5	26.0	22.5
	100	88.9	86.8	70.4	77.8	67.4
e	22.6	22.4	22.1	19.0	20.7	17.1
	100	99.1	97.8	84.1	91.6	75.7
f	36.0	29.8	29.6	26.4	25.4	17.0
	100	82.8	82.2	73.3	70.6	47.2
g	37.1	27.7	27.6	25.3	25.9	16.3
	100	74.7	74.4	68.2	69.8	43.9
h	63.5	61.0	59.2	54.5	46.5	37.7
	100	96.1	93.2	85.8	73.2	59.4