

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5435587号
(P5435587)

(45) 発行日 平成26年3月5日(2014.3.5)

(24) 登録日 平成25年12月20日(2013.12.20)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/68	(2006.01)	GO 1 N 33/68	
GO 1 N 33/50	(2006.01)	GO 1 N 33/50	Z
GO 1 N 33/15	(2006.01)	GO 1 N 33/15	Z
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	D

請求項の数 11 (全 23 頁)

(21) 出願番号 特願2010-513071 (P2010-513071)
 (86) (22) 出願日 平成21年5月22日(2009.5.22)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2009/059453
 (87) 国際公開番号 W02009/142303
 (87) 国際公開日 平成21年11月26日(2009.11.26)
 審査請求日 平成24年3月21日(2012.3.21)
 (31) 優先権主張番号 特願2008-135966 (P2008-135966)
 (32) 優先日 平成20年5月23日(2008.5.23)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 000181147
 持田製薬株式会社
 東京都新宿区四谷1丁目7番地
 (74) 代理人 100080159
 弁理士 渡辺 望穂
 (74) 代理人 100090217
 弁理士 三和 晴子
 (72) 発明者 内藤 克紀
 東京都新宿区四谷一丁目7番地 持田製薬
 株式会社内
 審査官 廣田 健介

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 食細胞の機能評価方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記の工程を含むことを特徴とする、食細胞の機能評価方法、
 1) 食細胞と貪食物質を接触させる工程、
 2) 食細胞により産生される s C D 1 4 - S T を測定する工程、および
 3) 検体の測定値を標準値と比較し、食細胞の貪食活動の有無および/または程度を判定する工程。

【請求項2】

食細胞の機能を評価することによる食細胞の機能異常を伴う疾患の検出方法であって、
 1) 請求項1に記載の方法により、被験体由来の食細胞の機能を評価する工程、
 2) 評価した結果を正常値と比較する工程、および
 3) 被験体由来の食細胞の機能が正常値より高値または低値であるかにより疾患の有無および/または程度を判定する工程、
 を含むことを特徴とする方法。

【請求項3】

食細胞の機能を評価することによる免疫機能の評価方法であって、
 1) 請求項1に記載の方法により、被験体由来の食細胞の機能を評価する工程、
 2) 評価した結果を正常値と比較する工程、および
 3) 被験体由来の食細胞の機能が正常値より高値または低値であるかにより免疫機能の程度を判定する工程、

を含むことを特徴とする方法。

【請求項 4】

食細胞の機能を評価することによる薬剤の効果の評価方法であって、

1) 請求項 1 に記載の方法により、薬剤投与中および/または薬剤投与後の被験体由来の食細胞の機能を評価する工程、

2) 評価した結果を正常値および/または薬剤投与前の評価結果と比較する工程、および

3) 薬剤の投与による被験体由来の食細胞の機能の変化の有無および/または程度を判定する工程、

を含むことを特徴とする方法。

10

【請求項 5】

下記の工程を含むことを特徴とする、貪食機能調節物質のスクリーニング方法、

1) 食細胞と被験物質を接触させる工程、

2) 食細胞により産生される s C D 1 4 - S T を測定する工程、および

3) 食細胞の貪食能に対する被験物質の効果を評価する工程。

【請求項 6】

貪食物質の存在下で、食細胞と被験物質を接触させることを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

下記の工程を含むことを特徴とする、食細胞による貪食が関連する疾患の検出方法、

1) 被験体由来の検体(血液を除く)に含まれる s C D 1 4 - S T を測定する工程、

2) 測定した値を正常値と比較する工程、および

3) 検体中の s C D 1 4 - S T の量が正常値より高値であるか否かを判定する工程。

20

【請求項 8】

検体に貪食物質を添加後、s C D 1 4 - S T を測定することを特徴とする、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

食細胞による貪食が関連する疾患が関節リウマチであり、検体が関節液である、請求項 7 または 8 に記載の方法。

【請求項 10】

食細胞による貪食が関連する疾患が乳房炎であり、検体が乳汁である、請求項 7 または 8 に記載の方法。

30

【請求項 11】

s C D 1 4 - S T からなる食細胞の機能を評価するためのマーカー。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、食細胞の機能評価のための新規な方法、食細胞による貪食が関連する疾患の検出方法に関する。

【背景技術】

40

【0002】

食細胞とは、貪食活性をもつ細胞の総称である。生体内で貪食を主な役割としている、好中球、マクロファージ、樹状細胞のような専門食細胞 (p r o f e s s i o n a l p h a g o c y t e) と、状況に応じて貪食活性を発揮する非専門食細胞 (a m a t e u r p h a g o c y t e) に大別される。非専門食細胞には、脳のミクログリア細胞、肝臓のクッパー細胞、精巢のセルトリ細胞などが含まれる。

【0003】

白血球とは、血液に含まれる細胞成分であり、主に顆粒球 (約 6 0 %)、リンパ球 (約 2 5 %)、単球 (約 5 %) より構成される。顆粒球はさらに好中球、好酸球、好塩基球に分類されるが、数としては好中球が最も多く、白血球の約半数は好中球が占める。また、

50

単球は各組織に遊走してマクロファージとなる。白血球は多くの食細胞を含んでおり、単離が容易なため、食細胞のリソースとして好適に用いられている。

【0004】

貪食は、細菌・真菌などの微生物の進入に対して最も早期に働く重要な生体防御機構の一つである。貪食は、食細胞による異物の認識、異物のとりこみ、食胞の形成、食胞内での異物の消化、消化した物質の吸収または排出という連続的段階を経る。貪食は、細菌・真菌などの外来の異物に対してのみ起こるものではなく、炎症部位における自己組織の残滓や、老廃した自己細胞といった、自己由来の不要な物質の除去にも関連している。食細胞は、貪食した物質を細胞内で消化するのみでなく、貪食に伴い活性酸素やタンパク質分解酵素を細胞外に放出する場合もある。これにより局所での効率的な殺菌や組織消化が可能となるが、一方で、過剰な貪食反応により、自己組織が破壊されてしまう場合もある。たとえば、関節リウマチ(rheumatoid arthritis: RA)の病変部では、自己免疫複合体を過剰に貪食した細胞(RA細胞)が認められ、RA細胞から放出されるタンパク質分解酵素が組織を障害し、関節炎の進行に関与していることが知られている。

10

【0005】

食細胞の貪食機能を測定する方法としては、食細胞をラテックス粒子と接触させ、細胞内に取り込まれたラテックス粒子をサイトメトリーや顕微鏡によりカウントする方法、蛍光標識を施した貪食物質(大腸菌、ザイモザンなど)を食細胞に貪食させ、細胞内に取り込まれた量を検出する方法、生菌を貪食させた後、残った生菌の数を培養により確認する方法、貪食の際に放出される活性酸素による発光を検出する方法などが知られている。

20

【0006】

CD14分子は、単球の膜上に発現されている分化マーカーの一つとして同定された糖タンパク質であり、LPS(リポポリサッカライド)のレセプターとしての機能を有することが知られている(非特許文献1)。CD14分子には、細胞表面上に発現している膜結合型CD14(mCD14)と、可溶性CD14(sCD14)の2種類が存在する。sCD14として、約55kDa、約49kDaの分子量を有する分子種の存在が知られており、肝臓からの分泌と、単球の活性化に伴うmCD14の酵素による切断によって産生されると考えられている(非特許文献2~4)。

30

【0007】

分子量約55kDaおよび約49kDaのsCD14(以下「高分子量sCD14」という。)は、敗血症(SEPSIS)、後天性免疫不全症候群(AIDS)、急性呼吸促進症候群(ARDS)、全身性エリテマトーデス(SLE)等、多くの疾患における患者の血中で高値を示す事が報告されている。そのため、これらのsCD14は疾患特異的なマーカーではないと考えられている(非特許文献5~6)。

一方、敗血症患者において特徴的に血中濃度が上昇する、新たなsCD14の分子種として、sCD14-ST(可溶性CD14抗原サブタイプ)が存在することが報告されている。

【0008】

sCD14-STとは、sCD14のうち、非還元条件下SDS-PAGEにおいて分子量 13 ± 2 kDaに泳動されることを特徴とし、CD14のN端部を保持しているものである。高分子量sCD14と比べると、C端側が大きく欠失したアミノ酸配列を有しており、高分子量sCD14とは異なりLPS結合能を有していない。また、sCD14-STは高分子量sCD14とは異なる免疫原性を示すため、抗体を用いて両者を区別できる。sCD14-STは敗血症患者において特異的に血中濃度が上昇する(特許文献1)。また、敗血症との判別が難しい、全身性炎症反応(SIRS)を示す患者と比較しても、敗血症患者の血中で高値を示すという報告があり、sCD14-STは敗血症の特異的な診断マーカーであると考えられている(非特許文献7)。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

50

【0009】

【特許文献1】国際公開WO2005/108429号公報

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Wrightら, Science, 249:1431-1433, 1990年.

【非特許文献2】BazilおよびStrominger, Journal of Immunology, 147:1567-1574, 1991年.

【非特許文献3】Buflerら, European Journal of Immunology, 25:604-610, 1995年.

【非特許文献4】Suら, Journal of Hepatology, 31:435-442, 1999年.

【非特許文献5】Hayashiら, Infection and Immunity, 67:417-420, 1999年.

【非特許文献6】Lawnら, Clinical & Experimental Immunology, 120:483-487, 2000年.

【非特許文献7】Yaegashiら, Journal of Infection and Chemotherapy 11:234-238, 2005年.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

従来の、食細胞の貪食能の測定方法は、貪食物質の事前の標識作業、貪食後に残った生菌を確認するための培養、検鏡など時間と手間がかかる操作や、サイトメーター、顕微鏡といった専門の装置が必要であり、より簡便な新たな測定方法の開発が望まれていた。貪食に伴い食細胞から放出される液性因子を測定できれば、より簡便かつ定量的な測定法となりうるが、サイトカインは貪食刺激以外の種々の免疫賦活刺激によっても産生されるので、貪食特異的なマーカーには適さない。また、活性酸素も種々の刺激により産生されること、また短時間で消滅してしまうことから、貪食特異的なマーカーには適さず、測定を即時に行わなければならないという制約があった。

【0012】

局所での貪食反応が関連している疾患(例、関節リウマチ等)において、体液等の検体中のマーカー分子を測定することにより貪食反応の程度を計測できれば、疾患の診断に役立つ。この場合、検体中の液性因子を測定することが簡便であるが、これまで、貪食特異的、かつ、測定に適した安定性を有する液性因子は知られていなかった。

【課題を解決するための手段】

【0013】

sCD14-STが敗血症患者血漿で上昇する疾患マーカーであることは公知であったが、その産生機序は明らかでなかった。かかる状況下において、本発明者は、エンドトキシン惹起ウサギ敗血症モデル動物では血中sCD14-STが上昇しないが、生菌感染によるウサギ敗血症モデル動物(CLP(盲腸漿膜剥離)モデル)では上昇することを見出した。この実験事実から、sCD14-STの産生にはエンドトキシンによる白血球の活性化のみでは不十分であり、白血球による細菌の貪食過程が重要であることを知得した。そこで、in vitroにおいて各種の白血球刺激物質とsCD14-ST産生量の関連性を詳細に調べたところ、sCD14-STは白血球に貪食活動を起こさせる物質を添加した時にのみ産生され、これは貪食を阻害する物質を添加することにより低下することを知見した。さらに発明者は、ウサギ関節炎モデル動物において、関節炎の発症に伴い関節液中のsCD14-STが上昇していることを見出した。

【0014】

したがって、sCD14-STは、貪食反応に特異的であり、かつ、測定に適した安定性を有する液性因子である。

【 0 0 1 5 】

すなわち、本発明は、食細胞の機能評価の新たな方法を提供する。

(1 - 1) 食細胞により産生される s C D 1 4 - S T を測定することを特徴とする、食細胞の機能評価方法。

(1 - 2) 食細胞の機能が、貪食能である、上記 (1 - 1) に記載の方法。

(1 - 3) 食細胞に貪食物質を接触させる工程を含むことを特徴とする、上記 (1 - 1) または (1 - 2) に記載の方法。

(1 - 4) 下記の工程を含むことを特徴とする、食細胞の機能評価方法、

1) 食細胞と貪食物質を接触させる工程、

2) 食細胞により産生される s C D 1 4 - S T を測定する工程、および

3) 測定値を標準値と比較し、食細胞の貪食活動の有無および / または程度を判定する工程。

(1 - 5) 食細胞が、好中球、顆粒球および / または白血球である、上記 (1 - 1) 乃至 (1 - 4) のいずれかに記載の方法。

(1 - 6) 食細胞が顆粒球であり、食細胞の機能が貪食能である、上記 (1 - 1) 乃至 (1 - 4) のいずれかに記載の方法。

また、本発明は、s C D 1 4 - S T を含有する食細胞の機能の評価するためのマーカーである。

【 0 0 1 6 】

また、本発明は、被験体由来の食細胞の機能の評価することによる、各種の検出・評価方法を提供する。

(2 - 1) 食細胞の機能の評価することによる食細胞の機能異常を伴う疾患の検出方法であって、

1) 上記 (1 - 1) 乃至 (1 - 6) のいずれかに記載の方法により、被験体由来の食細胞の機能の評価する工程、

2) 評価した結果を正常値と比較する工程、および

3) 被験体由来の食細胞の機能が正常値より高値または低値であるかにより疾患の有無および / または程度を判定する工程、

を含むことを特徴とする方法。

(2 - 2) 食細胞の機能の評価することによる免疫機能の評価方法であって、

1) 上記 (1 - 1) 乃至 (1 - 6) のいずれかに記載の方法により、被験体由来の食細胞の機能の評価する工程、

2) 評価した結果を正常値と比較する工程、および

3) 被験体由来の食細胞の機能が正常値より高値または低値であるかにより免疫機能の程度を判定する工程、

を含むことを特徴とする方法。

(2 - 3) 食細胞の機能の評価することによる薬剤の効果の評価方法であって、

1) 上記 (1 - 1) 乃至 (1 - 6) のいずれかに記載の方法により、薬剤投与中および / または薬剤投与後の被験体由来の食細胞の機能の評価する工程、

2) 評価した結果を正常値および / または薬剤投与前の評価結果と比較する工程、および

3) 薬剤の投与による被験体由来の食細胞の機能の変化の有無および / または程度を判定する工程、

を含むことを特徴とする方法。

(2 - 4) 移植用の食細胞の品質を評価する方法であって、

1) 上記 (1 - 1) 乃至 (1 - 6) のいずれかに記載の方法により、移植用の食細胞の機能の評価する工程、

2) 評価した結果を基準値と比較する工程、および

3) 移植用の食細胞の機能が基準値を満たしているかを判定する工程、を含むことを特徴とする方法。

10

20

30

40

50

(2-5) 食細胞が、好中球、顆粒球および/または白血球である、上記(2-1)乃至(2-4)のいずれかに記載の方法。

(2-6) 食細胞の機能が、貪食能である、上記(2-1)乃至(2-5)のいずれかに記載の方法。

(2-7) 食細胞が顆粒球であり、食細胞の機能が貪食能である、上記(2-1)乃至(2-4)のいずれかに記載の方法。

【0017】

また、本発明は、貪食機能調節物質のスクリーニング方法を提供する。

(3-1) 下記の工程を含むことを特徴とする、貪食機能調節物質のスクリーニング方法、

- 1) 食細胞と被験物質を接触させる工程、
- 2) 食細胞により産生されるsCD14-STを測定する工程、および
- 3) 食細胞の貪食能に対する被験物質の効果を評価する工程。

(3-2) 貪食物質の存在下で、食細胞と被験物質を接触させることを特徴とする上記(3-1)に記載の方法。

(3-3) 食細胞が、好中球、顆粒球および/または白血球である、上記(3-1)乃至(3-2)のいずれかに記載の方法。

【0018】

また、本発明は、食細胞による貪食が関連する疾患の検出方法を提供する。

(4-1) 下記の工程を含むことを特徴とする、食細胞による貪食が関連する疾患の検出方法、

- 1) 被験体由来の検体(血液を除く)に含まれるsCD14-STを測定する工程、
- 2) 測定した値を正常値と比較する工程、および
- 3) 検体中のsCD14-STの量が正常値より高値であるか否かを判定する工程。

(4-2) 検体に貪食物質を添加後、sCD14-STを測定することを特徴とする、上記(4-1)に記載の方法。

(4-3) 食細胞による貪食が関連する疾患が関節リウマチであり、検体が関節液である、上記(4-1)または(4-2)に記載の方法。

(4-4) 食細胞による貪食が関連する疾患が乳房炎であり、検体が乳汁である、上記(4-1)または(4-2)に記載の方法。

(4-5) 食細胞が、好中球、顆粒球および/または白血球である、上記(4-1)乃至(4-4)のいずれかに記載の方法。

【発明の効果】

【0019】

本発明によれば、貪食に伴い食細胞から放出される液性因子であるsCD14-STを測定することにより、食細胞の機能を特異的かつ簡便に測定することができる。また、該測定系を用いて貪食機能調節物質のスクリーニングを行うことができる。さらに、食細胞による貪食が関連する疾患を特異的かつ簡便に検出できる。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】実施例3に記載のsCD14-ST測定系における、組換え体ウサギsCD14-STの用量依存的な反応性を示す。横軸は組換え体sCD14-ST濃度(pg/mL)を示し、縦軸は吸光度を示す。

【図2】実施例4に記載のLPS負荷ウサギ敗血症モデルにおける、LPS投与前後の血中sCD14-STの測定結果を示す。縦軸は血中sCD14-ST濃度(pg/mL)を示す。

【図3】実施例4に記載の生菌感染によるウサギ敗血症モデルにおける、手術前後の血中sCD14-STの測定結果を示す。縦軸は血中sCD14-ST濃度(pg/mL)を示す。

【図4】実施例5に記載の、ウサギ顆粒球を各種白血球刺激剤で刺激した際のsCD14

10

20

30

40

50

- S T 産生の様子を示す。

【図 5】実施例 5 に記載の、ウサギ顆粒球を各種白血球刺激剤で刺激した際の高分子量 s C D 1 4 産生の様子を示す。

【図 6】実施例 5 に記載の、ウサギ顆粒球を貪食物質で刺激した際の s C D 1 4 - S T 産生に対する、貪食阻害剤の効果を示す。

【図 7】実施例 6 に記載の、ウサギ関節炎モデルの関節洗浄液中の s C D 1 4 - S T の測定結果を示す。

【図 8】実施例 7 に記載の、ヒト顆粒球を各種白血球刺激剤で刺激した際の s C D 1 4 - S T 産生の様子を示す。

【図 9】実施例 7 に記載の、ヒト顆粒球を貪食物質で刺激した際の s C D 1 4 - S T 産生に対する、貪食阻害剤の効果を示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 1 】

1 . s C D 1 4 - S T (可溶性 C D 1 4 抗原サブタイプ)

本発明は、食細胞が、外来微生物や異物を貪食し、消化する過程で、s C D 1 4 - S T が産生されることを見出したことに基づいている。s C D 1 4 - S T は、s C D 1 4 のうち、非還元条件下 SDS - P A G E において分子量 13 ± 2 k D a に泳動されることを特徴とし、C D 1 4 の N 端部のアミノ酸配列を保持しているものである。また、s C D 1 4 - S T は、高分子量 s C D 1 4 とは異なる免疫原性を示す。たとえば、ヒト高分子量 s C D 1 4 は、3 C 1 0 抗体 (A T C C T I B - 2 2 8) により認識されるが、ヒト s C D 1 4 - S T は 3 C 1 0 抗体に結合しない。

【 0 0 2 2 】

一方で、s C D 1 4 - S T を特異的に認識し、高分子量 s C D 1 4 は認識しない抗体も存在する。このような抗体は、s C D 1 4 - S T の特定部位のペプチドをエピトープとするペプチド抗体である。特定部位とは、C D 1 4 の二次構造における 3 と 4 の間の領域である (K i m r a , J o u r n a l o f B i o l o g i c a l C h e m i s t r y , 2 8 0 : 1 1 3 4 7 - 1 1 3 5 1 , 2 0 0 5 年 .) 。具体的にはヒト C D 1 4 (配列番号 1) では 3 6 ~ 7 9 番目のアミノ酸配列、ウサギ C D 1 4 (配列番号 2) では 3 8 ~ 8 1 番目のアミノ酸配列、マウス C D 1 4 (配列番号 3) では 3 6 ~ 7 9 番目のアミノ酸配列、ウシ C D 1 4 (配列番号 4) では 3 6 ~ 7 7 番目のアミノ酸配列が該当する。当該領域の中の、連続した 8 アミノ酸以上の配列からなるペプチドを、抗原として抗体を作製する。ヒト C D 1 4 の 5 3 ~ 6 8 番目の 1 6 アミノ酸からなるペプチド、ウサギ C D 1 4 の 4 0 ~ 5 9 番目の 2 0 アミノ酸からなるペプチドが好適な例である。高分子量 s C D 1 4 は、3 ~ 4 の領域 (3 - 2 - 3 - 4 を含む) においてシート構造やヘリックス構造をとっているが、s C D 1 4 - S T は高分子量 s C D 1 4 に比べて C 端側が大きく欠失した配列を有しているため、3 ~ 4 の領域において本来の立体構造を維持できず、両者は立体構造的に異なっていることが、抗体の認識性の違いを生じさせていると考えられる。

【 0 0 2 3 】

したがって、s C D 1 4 - S T は、非還元条件下 SDS - P A G E において分子量 13 ± 2 k D a に泳動されることを特徴とし、C D 1 4 の N 端部のアミノ酸配列を保持していることに加え、特定の免疫原性によって特徴づけることができる。特定の免疫原性とは、C D 1 4 の 3 ~ 4 の領域中の連続した 8 アミノ酸以上の配列からなるペプチドを抗原として作製した抗体により認識されることである。また、s C D 1 4 - S T は、生菌感染による敗血症または敗血症モデルにおいて特異的に血中濃度が上昇する因子である。たとえば、ヒト s C D 1 4 - S T は、非還元条件下 SDS - P A G E において分子量 13 ± 2 k D a に泳動され、N 末端配列に配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の 1 番目 ~ 8 番目の配列を有し、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の 5 3 番目 ~ 6 8 番目の 1 6 アミノ酸残基からなるペプチドに結合する抗体に特異的に結合することを特徴とする。さらに、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の 1 7 番目 ~ 2 6 番目からなるペプチドに結合する抗体に特異的

10

20

30

40

50

に結合すること、3C10抗体に結合しないこと、MEM-18抗体に結合しないこと、LPS結合能を有さないこと、ヒト血清から得られうること、および、敗血症患者において特異的に血中濃度が上昇する因子であること、という特徴のうち任意の一つ以上を付け加えることができる。

【0024】

sCD14-STはCD14のN端部のアミノ酸配列を保持しているため、sCD14-STを単離しN端のアミノ酸配列を解析した場合、CD14のN端部と同一のアミノ酸配列を有していることが確認できる。少なくともN端から1番目～8番目のアミノ酸配列が同一であればよい。たとえば、ヒトであれば配列番号1のアミノ酸配列の1番目～8番目の配列をN端に保有していることが確認できる。ウサギであれば配列番号2のアミノ酸配列の1番目～8番目、マウスであれば配列番号3のアミノ酸配列の1番目～8番目、ウシであれば配列番号4のアミノ酸配列の1番目～8番目をN端に保有している。

10

【0025】

2. 食細胞の機能評価方法

本発明における食細胞は、哺乳類由来の、貪食活性を持つ細胞であれば特に限定されないが、好中球が好適である。調製のしやすさから、好中球を含む試料として、白血球や顆粒球を用いてもよい。顆粒球へ分化する機能を有している単離された細胞株でもよく、例としてHL-60が挙げられる。哺乳類としては、ヒト、ウサギ、マウス、ラット、サル、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、イヌ、ネコなどが挙げられる。

【0026】

食細胞は、血液、組織液、リンパ液、関節液、乳汁、脳脊髄液、膿、唾液、涙液、粘液、鼻水、痰、尿、腹水、羊水、精液などの体液等から調製することができる。また、鼻腔、気管支、肺、皮膚、腹腔、各種臓器、関節、骨などを洗浄した後の洗浄液から調製することができる。加えて、皮膚、肺、腎、粘膜などの組織からも、食細胞を調製することができる。

20

【0027】

生体から食細胞を調製する場合は、食細胞のみを厳密に単離して用いてもよいし、食細胞を含む画分を調製して用いてもよい。たとえば、血液から調製した白血球、血液から調製した顆粒球、腹腔洗浄液から調製した顆粒球などを、本発明の方法に用いる食細胞として供することができる。

30

【0028】

食細胞の機能とは、食細胞が保有している生理的機能である。本発明では、貪食能を食細胞の活性の指標とし、食細胞の機能を評価する。食細胞は、貪食能以外にも、サイトカイン産生能や遊走能などさまざまな機能を併せ持つが、食細胞に共通な機能は貪食能である。したがって、食細胞が細胞として正常な機能を有しているか否かは、貪食能を指標とすることが好ましい。また食細胞は多くの場合、免疫細胞として生体内で免疫機能を発揮しているので、食細胞の貪食能の評価をすることは、食細胞の免疫機能を評価することに繋がる。

【0029】

すなわち、本発明の好ましい態様の一つは、好中球、顆粒球および/または白血球の貪食能の測定方法である。また、本発明の別の好ましい態様の一つは、好中球、顆粒球および/または白血球の貪食能の測定することによる、免疫機能の評価方法である。

40

【0030】

本発明の食細胞の機能評価方法は、食細胞により産生されるsCD14-STを測定することを特徴とする。sCD14-STは、食細胞の機能を評価するためのマーカーとして有用である。食細胞は、貪食活動に伴いsCD14-STを産生する。食細胞の貪食活動は、食細胞が貪食物質と接触することから始まる。貪食物質は、食細胞に貪食活動を起こさせるものであり、ここでいう貪食活動とは、少なくとも食細胞による貪食物質の取り込み(食作用)、および、取り込んだ物質の細胞内での消化の過程を含むものをいう。食細胞による取り込み・消化が行われる貪食物質の具体例としては、細菌・真菌などの菌体

50

、ザイモザン等が挙げられる。一方で、マイクロビーズ・ラテックスビーズのような、取り込まれても消化されない物質は、本発明における貪食物質に該当しない。

【0031】

sCD14-STの測定は、食細胞を含有する溶液、もしくは該溶液の上清に対して行う。ここでいう溶液とは、培地、細胞分画液、細胞アッセイ用溶液、生理食塩液、体液などである。生体から食細胞を調製する過程において、食細胞がすでに内在性の貪食物質に対して貪食活動を行っている場合、調製した食細胞含有溶液またはその上清を直接測定することで、食細胞の機能を評価できる。

【0032】

食細胞に貪食物質を接触させる場合は、食細胞を含有する溶液に貪食物質を添加すればよい。あるいは貪食物質が表面に結合された容器に、食細胞を含有する溶液を添加してもよい。貪食物質は、取り扱いの容易性の点で、ザイモザンが好ましく用いられる。

【0033】

sCD14-STの測定は、sCD14-STを検出できる系であれば特に限定されるものではないが、sCD14-STに特異的に結合する抗体を用いた免疫学的測定系により測定することが好ましい。免疫学的測定系は、好ましくは、直接吸着法、サンドイッチ法、凝集法、固相結合法または溶液反応法などから選ぶことができる。特に好ましい方法は、サンドイッチ法(サンドイッチ免疫測定法)である。

【0034】

サンドイッチ免疫測定法は、測定するタンパク質の異なる部位を認識する2種類以上の抗体を用いて、抗体-抗原-抗体複合体を形成させることにより測定する方法である。サンドイッチ免疫測定法は公知の技術を利用することができる。測定法の原理、応用及び改良法については、たとえば、石川栄治著「超高度酵素免疫測定法」、学会出版センター(1993年)、松橋直ほか編著「免疫測定法の新しい活用事例と診断試薬・治療薬開発への応用」、経営教育出版(1985年)、石川栄治ほか編「酵素免疫測定法」(第3版)、医学書院(1987年)に記載されている。

【0035】

sCD14-STに特異的に結合する抗体は、CD14の二次構造における3と4の間の領域中の、連続した8アミノ酸以上の配列からなるペプチドに結合する抗体である。このような抗体の例は、国際公開WO2005/108429号公報に記載のS68抗体、本明細書実施例1に記載のF1301-9-1抗体などが挙げられる。サンドイッチ免疫測定法を用いる場合は、更にもう一種の抗体が必要であるが、sCD14-STに結合する抗体であれば特に特異性は問わない。高分子量sCD14とsCD14-STの両方を認識する抗体を用いることもできる。このような抗体の例は、国際公開WO2005/108429号公報に記載のF1106-13-3抗体やF1031-8-3抗体、本明細書実施例2に記載のF1258-7-2抗体などが挙げられる。これらの抗体は、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよく、特に限定されない。サンドイッチ免疫測定法を用いる場合には、モノクローナル抗体が好ましい。また、該モノクローナル抗体の断片であってもよい。ここでいう抗体の断片とは、該モノクローナル抗体のFab、Fab'、またはF(ab')₂のいずれかである。

【0036】

免疫学的な測定系では、sCD14-STと抗体の複合体を形成させた後、形成された複合体を標識により検出することで、sCD14-STの存在を測定する。標識は、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、オキシダーゼ、もしくはウリカーゼ等の酵素、アクリジニウムもしくはその誘導体、エクオリンもしくはその改変体等の化学発光物質、FITC、ユウロピウム(Eu)、もしくはサマリウム(Sm)等のランタノイド等の蛍光物質、色素、金コロイド、着色ラテックス、またはアイソトープを用いればよい。化学発光物質、蛍光物質、着色標識、またはアイソトープを標識として用いる場合は、その標識に応じた測定機器により光学的に測定できる。色素、金コロイドまたは着色ラテックスを標識として用いて、イムノクロマト法またはフロースル

10

20

30

40

50

一法を利用したキットにて測定する場合は、目視により測定可能である。

【0037】

免疫学的な測定系は、キットの形態で提供することも可能である。キットはsCD14-S Tに特異的に結合する抗体を必須要素とし、その他、sCD14-S Tと抗体の複合体を形成させた後、形成された複合体を標識により検出するための構成要素を含む。たとえば、抗体を固相化させた不溶性担体（プラスチックプレート、ラテックス粒子など）、ペルオキシダーゼ等の標識酵素、金コロイド等の標識物質、テトラメチルベンジン（TMB）等の発色物質、検出感度を上げるためのビオチン-ストレプトアビジン等の特異結合物質、ブロッキング剤、希釈液、洗浄液、標準物質などを含んでよい。

【0038】

食細胞を含有する溶液、もしくは該溶液の上清中のsCD14-S Tを定性的および/または定量的に測定する。測定した結果を、標準値と比較し、sCD14-S Tの存在の有無および/または量を判断する。sCD14-S Tの存在の有無および/または量から、食細胞の貪食活動の有無および/または程度を判定する。標準値は、測定する目的により適宜定めうるが、たとえば、食細胞を含有しない溶液、貪食物質を接触させる前の溶液、またはそれらの溶液の上清の測定値を、陰性標準値とする。検体の測定値が、陰性標準値より高いかどうかを判定し、食細胞の貪食能を評価する。また、標準値として、sCD14-S Tの標準物質の測定値から求めた検量線を用いることもできる。検体の測定値を、検量線と比較し、検体中のsCD14-S Tを定量することで、食細胞の貪食能を評価する。アッセイに供した食細胞の数および/または単位時間あたりのsCD14-S T産生量の標準値を指標とし、検体中の食細胞の機能の高低、活性化の度合い等を実行することができる。sCD14-S Tの標準物質は、血液から精製したsCD14-S T、食細胞の貪食刺激により産生されたsCD14-S Tを精製したもの、組換え体sCD14-S T、ペプチド合成したsCD14-S Tなどを用いる。sCD14-S Tの精製法、組換え体の製造法は、国際公開WO2005/108429号公報に記載されている。

【0039】

3. 被験体由来の食細胞の機能を実行することによる、各種の検出・評価方法

前記の「2. 食細胞の機能評価方法」の項に説明した方法を用いて、被験体由来の食細胞の機能を実行することにより、以下の検出・評価が可能となる。

A) 被験体が食細胞の機能異常を伴う疾患に罹患しているかどうか、疾患の進行度、および/または疾患の重傷度を検出・評価できる。

B) 被験体の免疫機能の低下、亢進などの変化もしくは異常の有無および/または程度を実行・評価できる。

C) 薬剤投与中および/または薬剤投与後の被験体由来の食細胞の機能を実行することで、薬剤の効果を検出・評価できる。

D) 食細胞を再生医療に用いるにあたって、細胞の品質評価の指標とすることができる。

【0040】

食細胞の機能異常を伴う疾患の検出・評価を行う場合は、少なくとも、前記の「2. 食細胞の機能評価方法」の項に説明した方法を用いて、被験体由来の食細胞の機能を実行する工程を含めばよく、評価した結果を正常値と比較する工程、および被験体由来の食細胞の機能が正常値より高値または低値であるかにより疾患の有無および/または程度を判定する工程を更に含むことができる。

【0041】

ここで、正常値とは、予め疾患に罹患していない被験体、すなわち正常な被験体由来の食細胞の機能を実行した結果を求めておき、その測定結果の平均値もしくは範囲をとる等により標準化した値を用いることができる。検体の測定値と正常値を比較するにあたっては、そのまま高低を比較するのみでもよいが、正常被験体の平均値 $\pm 2SD$ または $\pm 3SD$ をカットオフ値として、カットオフ値より検体の測定値が高いもしくは低い場合、食細胞の機能異常があると判断できる。また測定値の大きさ・小ささの程度により疾患の進行

10

20

30

40

50

度、および/または疾患の重症度を評価することもできる。

【0042】

食細胞の機能異常を伴う疾患としては、たとえば尿毒症、血清オプソニン活性低下、補体欠損症、先天性貧食能不全症、慢性肉芽腫、ミエロペルオキシダーゼ欠損症、白血病、悪性リンパ腫、細菌性心内膜炎、糖尿病、肝硬変などが挙げられる。たとえば慢性肉芽腫は、好中球の活性酸素の産生に欠陥を有し、そのために重篤な細菌や真菌感染を繰り返す先天性の食細胞機能異常症である。慢性肉芽腫患者由来の好中球は、食作用（異物取り込み）は有するが、消化機能を有さない。したがって、ラテックスビーズ取り込みによる検査では異常を検出できないが、sCD14-ST産生を指標とした貧食能評価であれば、食細胞機能異常を検出することが可能である。

10

【0043】

免疫機能の評価方法を行う場合は、前述の食細胞の機能異常を伴う疾患の検出・評価を行う場合に準ずる。食細胞の機能、特に貧食は、生体の免疫応答において最も早期に働く重要な生体防御機構であり、食細胞の機能異常はすなわち免疫機能の異常へとつながる。食細胞の機能異常を免疫機能と読み替えて適用すればよい。

【0044】

薬剤の効果の検出・評価を行う場合は、少なくとも、薬剤投与中および/または薬剤投与後の被験体由来の食細胞について、前記の「2.食細胞の機能評価方法」の項に説明した方法を用いて、食細胞の機能の評価する工程を含めばよく、評価した結果を正常値および/または薬剤投与前の評価結果と比較する工程、および薬剤の投与による被験体由来の食細胞の機能の変化の有無および/または程度を判定する工程を更に含むことができる。ここでいう正常値とは、正常な被験体由来の食細胞の機能を測定した結果のことであり、上述に説明したとおりである。

20

【0045】

免疫抑制剤、免疫賦活剤、抗がん剤などを投与した場合に、薬剤投与中および/または薬剤投与後の食細胞の機能の変化を検出することにより、薬剤が有効に作用しているか、あるいは薬剤による副作用がどの程度発生しているかを確認することができ、薬剤選択や投与量に対する有用な指針を得ることが可能となる。また、食細胞の機能の変化の程度、すなわちsCD14-ST産生量の変化の大きさ・小ささを指標に、薬剤の効果の程度を評価することもできる。たとえば、G-CSFを投与する前後で、末梢血中の好中球の貧食能を比較し、G-CSF投与により正常な機能の好中球がどの程度増加したかを評価することができる。

30

【0046】

食細胞を再生医療に用いるにあたって、細胞の品質評価を行う場合は、用いる食細胞の貧食能をsCD14-ST産生を指標に測定することにより、細胞として正常な機能を有しているか、および/または、細胞の活性を評価することができる。ここでいう再生医療とは、自己由来の白血球などを体外で培養・処理した後、本人へ戻す自家細胞移植、および、正常人ドナー由来の白血球などを患者へ移植する他家細胞移植などが挙げられる。移植用の細胞を調製した後、その細胞が一定の品質を保有しているかを検査するために、「2.食細胞の機能評価方法」の項に説明した方法を用いることができる。調製した細胞の機能を基準値と比較し、基準値を満たしていれば、使用可能な品質であると判断する。基準値は、再生医療の目的に応じて適宜設定できるが、通常は、正常な食細胞の貧食能と比較すればよい。基準値より低い場合は、調製の過程で食細胞の機能または細胞の活性が失われたため、移植に適した品質でないと判断できる。

40

【0047】

4. 貧食機能調節物質のスクリーニング方法

前記の「2.食細胞の機能評価方法」の項に説明した方法を用いて、貧食機能調節物質のスクリーニングを行うことができる。すなわち、本発明は、下記の工程を含むことを特徴とする、貧食機能調節物質のスクリーニング方法を提供する。

1) 食細胞と被験物質を接触させる工程、

50

2) 食細胞により産生される s C D 1 4 - S T を測定する工程、および

3) 食細胞の貪食能に対する被験物質の効果を評価する工程。

なお、1) 食細胞と被験物質を接触させる工程に際して、貪食物質の存在下で、食細胞と被験物質を接触させてもよい。

【 0 0 4 8 】

貪食機能調節物質とは、食細胞の貪食活動を促進もしくは抑制する物質のことである。たとえば、既知の貪食機能抑制物質である、ワートマニン (W o r t o m a n i n) や サイトカラシン D (C y t o c h a l a s i n D) を被験物質として食細胞に接触させ、食細胞により産生される s C D 1 4 - S T を測定すると、被験物質の添加により s C D 1 4 - S T の産生量は減少し、貪食抑制効果が確認できる。これと同様にして、貪食機能調節活性を調べたい物質を被験物質として食細胞に接触させ、s C D 1 4 - S T の産生量を指標に貪食能に対する効果を評価することができる。

10

【 0 0 4 9 】

5. 貪食が関連する疾患の検出方法

本発明は、また、食細胞による貪食が関連する疾患の検出方法を提供する。該検出方法は、被験体由来の検体に含まれる s C D 1 4 - S T を測定し、その測定した値を正常値と比較し、該検体中の s C D 1 4 - S T の量が正常値より高値であるか否かを判定して、被験体が食細胞による貪食が関連する疾患に罹患しているかどうか、疾患の進行度、および/または疾患の重傷度を検出できる。

【 0 0 5 0 】

20

被験体としては、哺乳類であれば特に限定されるものではないが、ヒト、サル、ラット、マウス、ウサギ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、イヌ、またはネコなどの哺乳類を対象とできる。

【 0 0 5 1 】

食細胞による貪食が関連する疾患とは、患部において食細胞による貪食活動が生じている疾患のことである。特に、局所における自己免疫反応や感染に伴う貪食が生じている疾患である。たとえば、自己免疫疾患、関節リウマチ、乳房炎、痛風、糸球体腎炎、潰瘍性大腸炎、地中海熱、中耳炎、鼻炎、肺炎、結核、膀胱炎、羊水感染症、または膿精液症等の局所的な疾患が例として挙げられる。ただし、本発明においては、全身性の感染を伴う疾患、敗血症は除く。

30

【 0 0 5 2 】

検体としては、組織液、リンパ液、関節液、乳汁、脳脊髄液、膿、唾液、涙液、粘液、鼻水、痰、尿、腹水、羊水、精液などの体液、また、鼻腔、気管支、肺、皮膚、腹腔、各種臓器、関節、骨などを洗浄した後の洗浄液を用いる。ただし、本発明においては、血液は除く。

【 0 0 5 3 】

s C D 1 4 - S T の測定方法は、前述の 2 . 食細胞の機能評価方法に記載の方法に準ずる。

正常値としては、予め疾患に罹患していない被験体、すなわち正常な被験体由来の検体を測定した結果を求めておき、その測定結果の平均値もしくは範囲をとる等により標準化した値を用いることができる。正常な被験体由来の検体の測定値が、測定系のバックグラウンドの値とほぼ同等になるような場合は、測定系におけるバックグラウンドの値の平均値もしくは範囲を設定する等により標準化した値を用いてもよい。測定系におけるバックグラウンドの値とは、検体ではなくバッファやアッセイ溶液などを測定系に添加した場合の測定値である。検体の測定値と正常値を比較するにあたっては、そのまま高低を比較することができるが、正常被験体の平均値 + 2 S D または + 3 S D をカットオフ値として、カットオフ値より検体の測定値が高い場合、陽性と判断することもできる。また、測定値が大きいほど、疾患の進行度、および/または疾患の重傷度が高いと判断することができる。

40

【 0 0 5 4 】

50

検体中には、食細胞が含まれていても含まれていなくてもよい。検体中の s C D 1 4 - S T を直接測定して、生体内での貪食の程度、すなわち疾患の有無および/または程度を評価できる。これは、生体内において食細胞が貪食活動を行った結果産生された s C D 1 4 - S T が検体中に存在することが理由の一つである。たとえば、関節炎モデル動物において、関節液または関節洗浄液中の s C D 1 4 - S T を測定することで、関節での炎症を伴う疾患、具体的には、関節リウマチ、変形性関節症、肩関節周囲炎などの診断ができる。これは、関節液または関節洗浄液中の s C D 1 4 - S T 濃度上昇が検出可能であることが理由の一つである。

【 0 0 5 5 】

一方、検体とする体液や組織洗浄液中の食細胞の有無および/または量を検出して疾患の有無および/または程度を評価することも可能である。この場合、検体に貪食物質を添加し、産生された s C D 1 4 - S T を測定すればよい。たとえば、乳汁に貪食物質を添加し、産生された s C D 1 4 - S T を測定して、乳房炎の診断をすることができる。特にウシ乳房炎の検出に有用である。

【 0 0 5 6 】

以上、好適な実施の形態を挙げて説明したが、本発明は、上記実施の形態に限定されるものではなく、本発明の要旨を逸脱しない範囲内で、当該発明の属する技術の分野における通常の知識を有する者によって各種変更及び修正が可能であることは言うまでもない。

【実施例】

【 0 0 5 7 】

(実施例 1) 合成ペプチドを抗原とした F 1 3 0 1 - 9 - 1 抗体の作製

1 - (1) 抗原とするペプチドの調製

配列番号 5 に記載の配列 (ウサギ C D 1 4 アミノ酸配列の 4 0 位から 5 9 位の配列に該当) からなるペプチドを、N 末端で S H 基を介してキャリア蛋白質と結合させるため、N 末端にシステインを挿入してペプチド合成機 A B I 4 3 3 A (アプライドバイオシステムズ) を用いて合成した。定法により精製し、精製ペプチドとして 2 ~ 3 m g を得た。

【 0 0 5 8 】

1 - (2) 合成ペプチドを用いたペプチドキャリアタンパクの調製

1 - (1) で調製したペプチドを蒸留水で 1 0 m g / m L に溶解し、1 0 m g / m L の I m j e c t M a l e i m i d e A c t i v a t e d K e y h o l e L i m p e t H e m o c y a n i n (K L H) (P I E R C E) と等量混合し室温で 2 時間反応することで、ペプチドとキャリア蛋白質を結合した (以下、配列番号 5 のペプチド - K L H と記す)。また 1 - (1) で調製したペプチドを蒸留水で 1 0 m g / m L に溶解し、1 0 m g / m L の I m j e c t M a l e i m i d e A c t i v a t e d B o v i n e S e r u m A l b u m i n (B S A) (P I E R C E) と等量混合し室温で 2 時間反応することで、ペプチドとキャリア蛋白質を結合した (配列番号 5 のペプチド - B S A と記す)。

【 0 0 5 9 】

1 - (3) 合成ペプチドを抗原としたハイブリドーマクローン作製

1 - (1) で調製したペプチドに対するモノクローナル抗体を作製するため、配列番号 5 のペプチド - K L H を用いてラットを免疫した。すなわち、配列番号 5 のペプチド - K L H 各 1 0 0 μ g を 1 0 0 μ L の生理食塩水で希釈した後、1 0 0 μ L のフロインド完全アジュバント (D I F C O) と等量混合した。これを W i s t a r r a t (日本エスエルシー) メス 8 週令のフットパッド内に各 1 0 0 μ L ずつ投与した。1 1 日後、配列番号 5 のペプチド - K L H 1 0 0 μ g を 2 0 0 μ L の生理食塩水で希釈し、再度フットパッドに投与した。さらに 3 日後、腸骨リンパ節よりリンパ球を分離し、得られたリンパ球を S p 2 / O - A g 1 4 (A T C C C R L - 1 5 8 1) と混合した後、ポリエチレングリコールを用いて安東民衛・千葉丈 / 著「単クローン抗体実験操作入門」(講談社)に記載の方法にしたがって細胞融合を行った。H A T 培地によりハイブリドーマを選択し、1 週間後、目的の抗体を産生しているハイブリドーマを E L I S A 法にて選定した。すなわち

10

20

30

40

50

、0.076 Mリン酸緩衝液 (pH 7.4) (以下D-PBSと記載)で配列番号5のペプチド-BSAを10 μg/mLに希釈し、イムノプレート (Maxisorb、Nunc)に50 μL/ウエルで添加した。4 で一晩反応後、イオン交換水で5回洗浄した。2% Stabligurdを含むD-PBS (pH 7.4)を各ウエルに100 μL添加してブロッキングした。次にハイブリドーマの培養上清を各ウエルに添加して37 で1時間反応させた後、0.05% Tween 20を含む生理食塩水で3回洗浄した。ペルオキシダーゼ標識抗ラットイムノグロブリン抗体 (DAKO)を10%ウサギ血清を含むD-PBS (pH 7.4)で1000倍に希釈し、各ウエルに50 μL添加した。37 で1時間反応後、同様に3回洗浄した。TMB溶液 (BioFX)を各ウエルに添加し、室温で10分間反応後、0.5 M硫酸溶液で反応を停止した。プレート分光光度計 (NJ-2100、日本インターメッド)で450 nmの吸光度を測定した。吸光度の上昇が認められたウエルの細胞を選択し、限界希釈法によりクローニングを行った。11日後、同様にスクリーニングを行い、配列番号5のペプチドと反応する抗体を産生するクローン F1301-9-1を得た。

10

【0060】

1-(4)ハイブリドーマ培養上清からの抗体精製

1-(3)で得たクローンF1301-9-1をSFM培地 (GIBCO)にて3 Lスケールで培養した。この培養上清を0.45 μmのフィルターに供して細胞を取り除いた後に、Protein Gカラムに供した。次いで、吸着画分を酸溶出し、直ちに1/10倍量の1 M Tris-HCl (pH 8.0)を添加する事により中和した。溶出液を限外膜にて生理食塩水にバッファー交換し、精製抗体とした。

20

【0061】

(実施例2)合成ペプチドを抗原としたF1258-7-2抗体の作製

2-(1)抗原とするペプチドの調製

配列番号6に記載の配列 (ウサギCD14アミノ酸配列の1位から30位の配列に該当)からなるペプチドを、N末端でSH基を介してキャリア蛋白質と結合するため、N末端にシステインを挿入してペプチド合成機ABI433A (アプライドバイオシステムズ)を用いて合成した。定法により精製し、精製ペプチドとして2~3 mgを得た。

【0062】

2-(2)合成ペプチドを用いたペプチドキャリアタンパクの調製

1-(2)記載の方法に準じて、配列番号6のペプチド-KLHおよび配列番号6のペプチド-BSAを調製した。

30

【0063】

2-(3)合成ペプチドを抗原としたハイブリドーマクローンの作製

1-(3)記載の方法に準じて、2-(2)で調製した配列番号6のペプチドに対するモノクローナル抗体を産生するクローンF1258-7-2を得た。

2-(4)ハイブリドーマ培養上清からの抗体精製

1-(4)記載の方法に準じて、2-(3)で調製した配列番号6のペプチドに対するハイブリドーマクローンの培養上清からモノクローナル抗体精製した。

40

【0064】

(実施例3)ウサギsCD14-ST測定系の作製

ウサギsCD14-STを特異的に検出可能な系を作製するため、実施例1-(4)、2-(4)に記載の抗体を用いてサンドイッチELISA系を作製した。

【0065】

3-(1)F1258-7-2のFab'-HRPの作製

F1258-7-2抗体のF(ab')₂を作製するために、実施例2-(4)で得た精製F1258-7-2抗体をPepsinで処理した。すなわち、精製F1258-7-2抗体を2 M尿素を含む100 mM酢酸バッファー (pH 4.4)にバッファー交換した後、Pepsin (Boehringer)を抗体:酵素=30:1(重量比)となるように添加し、37 で6時間反応した。反応終了時には1 Mトリス塩酸緩衝液 (pH 8

50

. 0) を添加して、pH を中性付近に戻した。次に F (a b ') 2 の精製を行った。すなわち、Fc 部位と P e p s i n を取り除く目的で、P e p s i n 処理した抗体を P r o s e p G (M i l l i p o r e) に供し、吸着画分を酸溶出した。さらにこの吸着画分を S u p e r d e x 2 0 0 (A m e r s h a m) に供することで未切断の抗体を取り除き、F 1 2 5 8 - 7 - 2 の F (a b ') 2 を得た。精製した F (a b ') 2 は S D S - P A G E に供して純度を確認し、ウシ血清 I g G を標準品とした P r o t e i n A s s a y D y e R e a g e n t (バイオラッド) を用いてタンパク定量した。続いて得られた F 1 2 5 8 - 7 - 2 F (a b ') 2 抗体を P e r o x i d a s e L a b e l i n g K i t S H (同仁化学) を用いて部分還元し、ヒンジ部分に存在するシステイン残基を P e r o x i d a s e 標識することにより F 1 2 5 8 - 7 - 2 F a b ' - H R P を作製した。

10

【 0 0 6 6 】

3 - (2) ウサギ s C D 1 4 - S T サンドイッチ E L I S A 系の作製

固相抗体として実施例 1 - (4) で得た F 1 3 0 1 - 9 - 1 抗体を、標識抗体として実施例 3 - (1) で作製した F 1 2 5 8 - 7 - 2 F a b ' - H R P 抗体を使用する 2 ステップサンドイッチ E L I S A 系を作製した。すなわち F 1 3 0 1 - 9 - 1 抗体を D - P B S (p H 7 . 4) で 1 0 μ g / m L に希釈し、イムノプレート (M a x i s o r b 、 N u n c) の各ウエルに 5 0 μ L 添加した。4 で一晚反応した後、イオン交換水で 5 回洗浄した。5 % S t a b i l G u a r d (S u r M o d i c s) と 0 . 1 % T w e e n 2 0 を含む D - P B S (p H 7 . 4) を各ウエルに 2 0 0 μ L 添加しブロッキングした。次に 5 % の正常ウサギ血清 (ウサギ C D 1 4 アフィニティー抗体カラムを用いて可溶性 C D 1 4 抗原を除去した血清) 、 1 % B S A 、 0 . 1 % T w e e n 2 0 を含む 1 5 0 m M リン酸バッファー (p H 6 . 0) を希釈液として検体を希釈調製し、ウエル当たり 5 0 μ L 添加し、2 5 で 3 時間反応した。反応終了後、0 . 0 5 % T w e e n 2 0 を含む生理食塩水で 5 回洗浄した。4 % ラット血清、0 . 0 5 % T w e e n 2 0 を含む 7 5 m M リン酸バッファー (p H 6 . 4) で F 1 2 5 8 - 7 - 2 F a b ' - H R P を希釈し、各ウエルに 5 0 μ L 添加した。2 5 で 2 時間反応した後、同様に 5 回洗浄した。テトラメチルベンジジン溶液 (T M B 、 B i o F X) を各ウエルに添加し、室温で 1 5 分間反応した。0 . 5 M 硫酸溶液で反応を停止し、プレート分光光度計 (N J - 2 1 0 0 、日本インターメッド) で 4 5 0 n m の吸光度を測定した。

20

30

標準物質としては、組換え体ウサギ s C D 1 4 - S T を用いた。組換え体ウサギ s C D 1 4 - S T の作製は、国際公開 W O 2 0 0 5 / 1 0 8 4 2 9 号公報に記載の方法に準じて行った。すなわち、ウサギ C D 1 4 の 6 6 番目のアミノ酸配列の後にトロンピン切断サイトを導入したプラスミドを作製し、C O S 細胞を用いて培養上清中に一過性に発現させた。培養上清中の s C D 1 4 を精製した後、トロンピンで切断し、ゲル濾過クロマトグラフィーにて組換え体ウサギ s C D 1 4 - S T を精製した。

作製したサンドイッチ E L I S A 系は、図 1 に示すように組換え体 s C D 1 4 - S T を用量依存的に検出した。

【 0 0 6 7 】

(実施例 4) ウサギ動物モデルでの s C D 1 4 - S T の産生検討

4 - (1) L P S 負荷ウサギ敗血症モデルの作製

L P S 負荷ウサギ敗血症モデルは、ニュージーランドホワイト種 (1 . 8 - 2 . 6 k g 、北山ラベス) に L P S (S a l m o e l l a M i n n e s o t a R e 5 9 5 、シグマ) を 1 0 μ g / k g の用量で耳静脈内投与することにより作製した。L P S 投与前および投与 1 . 5 時間後に耳介動脈より採血 (クエン酸加血) した。

40

【 0 0 6 8 】

4 - (2) ウサギ生菌感染モデル (C L P モデル) の作製

ウサギ C L P (c e c a l l i g a t i o n a n d p u n c t u r e) モデルは、ニュージーランドホワイト種 (1 . 8 - 2 . 6 k g 、北山ラベス) に外科的手術を行い作製した。すなわち、一晚絶食した動物をドミツール (塩酸メドミジン、明治製菓) の

50

0.35 mg/kg および動物用ケタラール（ケタミン、三共）の5 mg/kg を耳静脈内投与して全身麻酔した。腹部を切開して盲腸を腹腔外に出した後、回盲部の下流を縫合糸で絞やくし、眼科バサミにより約2 cmの幅で2箇所切開した。盲腸をピンセットで押し穿刺孔から盲腸内容物が出ることを確認した後に盲腸を腹腔内に戻し、腹膜および皮膚を縫合糸で閉じた。閉腹後、生理食塩水を50 mL/kg で皮下投与し。また、アンチセダン（塩酸アチパメゾール、明治製菓）を0.35 mg/kg で耳静脈内投与して手術終了とした。CLPモデル作製の手術前および手術2時間後に耳介動脈より採血（クエン酸加血）した。

【0069】

4 - (3) ウサギ敗血症モデルにおける血中sCD14-S Tの測定

10

実施例4 - (1) と4 - (2) で採取した血液から遠心にて血漿を調製し、実施例3 - (2) 記載の方法に準じてsCD14-S Tを測定した。結果を図2および図3に示す。LPS負荷敗血症モデルでは血中sCD14-S Tの上昇が認められなかった（図2）。一方、生菌感染による敗血症モデルにおいては血中sCD14-S Tの上昇が見られた（図3）。また、生菌感染による敗血症モデルにおける血中sCD14-S Tの上昇は、手術（感染）後2時間で検出可能であり、IL-6やd-dimerなどの他のマーカーに比べ、感染の早期に検出が可能なマーカーであることが確認された。これらのことから、sCD14-S T産生はエンドトキシンによる白血球の活性化のみでは不十分であり、感染に対する最も早い免疫応答である白血球による細菌の貪食活動が必要であると考えられた。

20

【0070】

（実施例5）ウサギ腹腔滲出顆粒球を用いた貪食実験

5 - (1) ウサギ腹腔滲出顆粒球の採取

グリコーゲンを生理食塩水で0.1%となるように溶解した。これをニュージーランド白色ウサギ（北山ラベス）オス1.64 - 1.92 kgの腹腔内に150 mL投与した。投与16時間後に過剰麻酔にてウサギを安楽殺した後に、生理食塩水にて腹腔内を洗浄して顆粒球を採取した。

【0071】

5 - (2) 各種刺激剤によるsCD14-S Tの産生

顆粒球に各種白血球刺激剤を添加してsCD14-S Tの産生量を評価した。すなわち実施例5 - (1) で採取したウサギ腹腔滲出顆粒球を2%正常ウサギ血清、2 mM Glutamin、10 mM HEPESを含むHBSSバッファー（GIBCO 14025）（以下、細胞アッセイバッファーと記す。）中に細胞濃度 1×10^7 Cells/mLとなるように懸濁し、96穴培養プレート（Nunc lon Surface、Nunc）の各ウェルに100 μ L添加した。次いで各種刺激剤を細胞アッセイバッファーにて目的濃度の3倍に調製し、各ウェルに50 μ L添加した。37 °Cで2時間インキュベーションした後に遠心にて上清を採取し、実施例3 - (2) の測定系でsCD14-S Tを測定した。結果を図4に示す。白血球による貪食・消化が起こる刺激剤（大腸菌菌体またはザイモザン）ではsCD14-S Tの上昇が認められた。一方、LPS、PMA（phorbol myristate acetate）、fMLP（formyl methionyl leucyl phenylalanine）等の貪食が起こらない刺激剤ではsCD14-S Tの上昇は認められなかった。また、貪食はおこるが消化はされないマイクロビーズでもsCD14-S Tの上昇は認められなかった。さらに、高分子量sCD14測定用のキット（R&D）を用いて高分子量sCD14の産生を測定したところ、図5に示す様に、LPSやPMAによる刺激で高分子量sCD14の産生上昇が認められた。この事は、sCD14-S Tと高分子量sCD14は産生機序が異なることを示している。

30

40

【0072】

5 - (3) 各種阻害剤のsCD14-S T産生に対する作用

実施例5 - (2) においてウサギsCD14-S Tの産生に顆粒球の貪食活動が関わっ

50

ていることが示唆された。そこで各種貪食阻害剤を用いて s C D 1 4 - S T の産生と貪食の関係を検討した。すなわち、実施例 5 - (1) で採取したウサギ腹腔滲出顆粒球を細胞アッセイバッファー中に細胞濃度 1×10^7 Cells / mL となるように懸濁し、48 穴培養プレート (48 Well Cell Culture cluster、Corning) の各ウェルに $200 \mu\text{L}$ 添加した。次いで各種阻害剤を細胞アッセイバッファーにて目的濃度の 3 倍に調製したものを各ウェルに $100 \mu\text{L}$ 添加した。37 で 30 分間反応した後に大腸菌を顆粒球の 20 倍量となるように添加した (大腸菌は 1 コロニー形成ユニットを 1 個として添加する)。37 で 2 時間インキュベーションした後、遠心にて上清を採取し、実施例 3 - (2) の測定系を用いて s C D 1 4 - S T を測定した。結果を図 6 に示す。貪食におけるメンブレントラフィックを阻害する P I 3 キナーゼ阻害剤 W o r t o m a n i n と、細胞骨格を変性させることにより貪食を阻害するアクチンの脱重合剤 C y t o c h a l a s i n D によりウサギ s C D 1 4 - S T の産生が阻害された。

【 0 0 7 3 】

(実施例 6) ウサギ関節炎モデルの関節液中の s C D 1 4 - S T の測定

6 - (1) メチル化 B S A の調製

B S A (S I G M A) 1 g を 4 % P a r a f o r m a l d e h y d e を含む D - P B S (p H 7 . 4) 1 0 0 m L に溶解し、アルカリを用いて p H を 8 . 5 に調整した後、室温で 1 時間反応した。次いで水素化ホウ素ナトリウムを 8 0 m g 添加し、4 で 2 時間還元反応した後、限外膜を用いて D - P B S (p H 7 . 4) にバッファー交換した。

【 0 0 7 4 】

6 - (2) E L I S A による免疫反応確認

抗原に対する免疫反応の確認を E L I S A 法にて行った。すなわちメチル化 B S A を D - P B S (p H 7 . 4) で $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ に希釈し、イムノプレート (M a x i s o r p 、 N u n c) に $50 \mu\text{L} / \text{ウェル}$ で添加した。37 で 1 時間反応後、イオン交換水で 5 回洗浄し、5 % S t a b i l G u a r d (S u r M o d i c s) を含む D - P B S (p H 7 . 4) を各ウェルに $100 \mu\text{L}$ 添加してブロッキングした。次に実施例 6 - (3) の試験に供した各ウサギの血液サンプル (血清) を、1 % S t a b i l G u a r d (S u r M o d i c s) を含む D - P B S (p H 7 . 4) にて希釈し、各 W e l l に $100 \mu\text{L}$ 添加した。室温で 1 時間反応させた後、0 . 0 5 % T e e n 2 0 を含む生理食塩水で 5 回洗浄した。次にペルオキシダーゼ標識抗ウサギイムノグロブリン抗体 (D A K O 、 P 4 4 8) を 5 % ヤギ血清含有 D - P B S で 1 0 0 0 倍に希釈し各ウェルに $50 \mu\text{L}$ 添加した。室温で 1 時間反応後、同様に 5 回洗浄し T M B 溶液 (B i o F X) を各ウェルに添加した。室温で 1 0 分間反応後、0 . 5 M 硫酸溶液で反応を停止し、プレート分光光度計 (マルチスキャン J X 、 大日本製薬) で 450nm の吸光度を測定した。

【 0 0 7 5 】

6 - (3) ウサギ関節炎モデルにおける s C D 1 4 - S T の測定

実施例 6 - (1) で調製したメチル化 B S A $500 \mu\text{L}$ (5mg) とフロインド完全アジュバント (D I F C O) $500 \mu\text{L}$ を混合し、これをニュージーランド白色ウサギ (北山ラベス) オス 1 0 - 1 1 週齢の背部皮下、後肢足底部、大腿部筋肉内に投与した (以下、抗原感作群と記す)。また、同時に同じ数のウサギに対してメチル化 B S A を加えていない溶媒投与した (以下、溶媒対照群と記す)。2 週間後、抗原感作群に対してメチル化 B S A $500 \mu\text{L}$ (5mg) と不完全フロインドアジュバント (D I F C O) $500 \mu\text{L}$ を混合し、再感作した。なお、溶媒対照群に対してはメチル化 B S A を加えていない溶媒を同じように投与した。さらに 1 週間後ウサギ耳動脈より採血し、実施例 6 - (2) の E L I S A 法にて血中抗体価を測定して、抗原感作群において感作が成立していることを確認した。次いでメチル化 B S A を D - P B S (p H 7 . 4) にて $5 \text{mg} / \text{mL}$ に調製し、 1mL を抗原感作群の膝関節腔内に投与して関節炎を惹起した。また同時に溶媒対照群に対しては D - P B S (p H 7 . 4) を膝関節腔内に 1mL 投与した。惹起 4 日後と 1 0 日後に両群の膝関節腔内洗浄液を採取して s C D 1 4 - S T の測定、塗沫による血球画分の分析を行った。また同時に耳動脈より採血 (クエン酸加血) し血中の s C D 1 4 - S T

10

20

30

40

50

を測定した。塗沫検体において、抗原感作群には多くの顆粒球の集積が認められた。また、膝関節腔内洗浄液を実施例 3 - (2) に記載の s C D 1 4 - S T 測定系に供したところ、図 7 に示す様に抗原感作群では、抗原感作後 4 日後および 1 0 日後において s C D 1 4 - S T の上昇が認められた。なお、1 0 日後においても高値を示していたことは、関節炎に伴う自己組織への過剰な免疫反応による貪食活動により s C D 1 4 - S T が産生されたことを示している。一方、両群において血中 s C D 1 4 - S T の上昇は認められなかった。

【 0 0 7 6 】

(実施例 7) ヒト由来食細胞の貪食活動に伴う s C D 1 4 - S T 産生

7 - (1) ヒト末梢血顆粒球の調製

正常人より採取した末梢血より、比重 $d = 1.077$ と $d = 1.119$ の二層を使った比重遠心法にて顆粒球画分を調製した。

【 0 0 7 7 】

7 - (2) 顆粒球の貪食活動による s C D 1 4 - S T の産生

顆粒球に各種白血球刺激剤を添加して s C D 1 4 - S T の産生量を評価した。すなわち実施例 7 - (1) で採取したヒト末梢血顆粒球を 1 0 % 正常ヒト血清、2 m M G l u t a m i n、1 0 m M H E P E S、1 0 n g / m l G - C S F を含む R P M I 1 6 4 0 培地 (S I G M A R 8 7 5 8) 中に細胞濃度 0.5×10^7 C e l l s / m L となるように懸濁した。これを 9 6 穴培養プレート (N u n c l o n S u r f a c e、N u n c) の各ウェルに 1 0 0 μ L で添加し、5 % 二酸化炭素存在下で 3 7 $^{\circ}$ C で一晩インキュベーションした。次いで各種刺激剤を 1 0 % 正常ヒト血清、2 m M G l u t a m i n、1 0 m M H E P E S を含む H B S S バッファーにて 1 . 5 倍濃度に調製し、各ウェルに 2 0 0 μ L で添加した。3 7 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベーションした後に、遠心にて上清を採取し、ヒト s C D 1 4 - S T を測定した。ヒト s C D 1 4 - S T の測定には、国際公開 W O 2 0 0 5 / 1 0 8 4 2 9 号公報の実施例 7 - (3) に記載の測定キットを用いた。すなわち、ヒト s C D 1 4 - S T を特異的に認識する、ヒト C D 1 4 の 5 3 ~ 6 8 番目のアミノ酸配列からなるペプチドに結合する抗体 (S 6 8 抗体) を含むサンドイッチ測定キットである。サンドイッチ測定系とするため、もう一種の抗体として、ヒト C D 1 4 の 1 7 ~ 2 6 番目のアミノ酸配列からなるペプチドに結合する抗体 (F 1 1 0 6 - 1 3 - 3) をペルオキシダーゼ標識したものを使用した。図 8 に示す様に、実施例 5 と同様に貪食刺激剤 (大腸菌菌体またはザイモザン) で s C D 1 4 - S T の上昇が認められたが L P S やマイクロビーズでは認められなかった。

【 0 0 7 8 】

7 - (3) 貪食阻害剤の s C D 1 4 - S T 産生に対する作用

ヒト顆粒球による s C D 1 4 - S T の産生に対する貪食阻害剤の作用を検討した。すなわち実施例 7 - (2) と同様にヒト末梢血顆粒球を 9 6 穴培養プレートで一晩インキュベーションした。次いで各種貪食阻害剤を 1 0 % 正常ヒト血清、2 m M G l u t a m i n、1 0 m M H E P E S を含む H B S S バッファーにて 3 倍濃度に調製し、各ウェルに 1 0 0 μ L で添加した。3 7 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベーションした後、大腸菌を顆粒球の 3 0 倍量となるように添加した (大腸菌は 1 コロニー形成ユニットを 1 個として添加する) 。3 7 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベーションした後に遠心にて上清を採取し、国際公開 W O 2 0 0 5 / 1 0 8 4 2 9 号公報の実施例 7 - (3) に記載の測定キットを用いてヒト s C D 1 4 - S T を測定した。その結果、図 9 に示す。実施例 5 - (3) と同様に W o r t o m a n i n、C y t o c h a l a s i n D は s C D 1 4 - S T の産生を阻害した。

【 0 0 7 9 】

7 - (4) H L - 6 0 細胞を用いた貪食実験

H L - 6 0 細胞を D M S O 存在下で培養し顆粒球へと分化させ、実施例 7 - (2) と同様の実験に供した。実施例 7 - (2) と同様にザイモザンまたは大腸菌添加で s C D 1 4 - S T の産生が認められた。

【 0 0 8 0 】

10

20

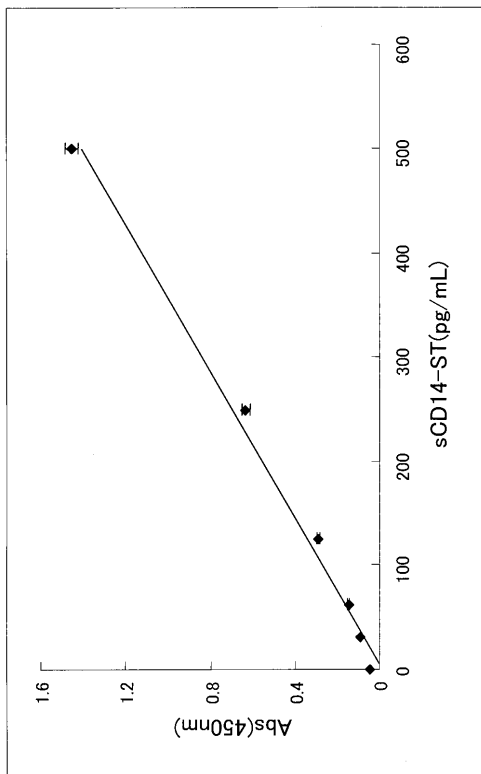
30

40

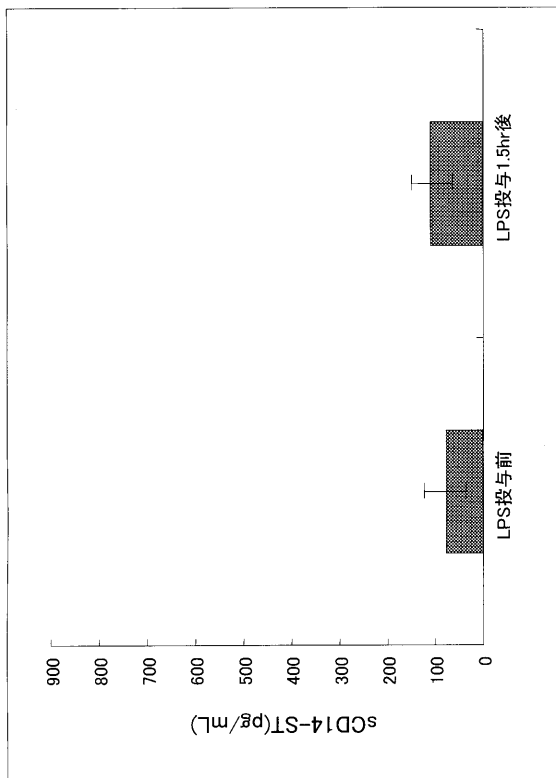
50

なお、上述の実施例は本発明の好適な実施の一例ではあるが、その範囲を限定するものではなく、本発明の要旨を逸脱しない範囲において種々変形実施可能である。

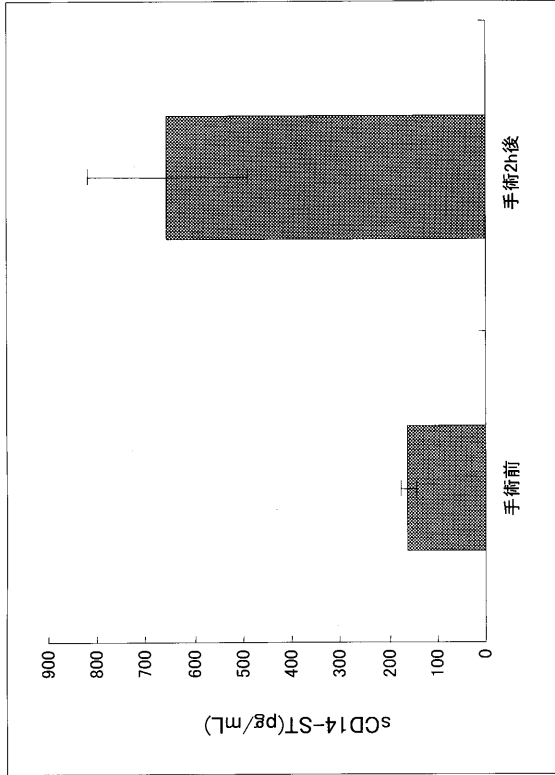
【図1】



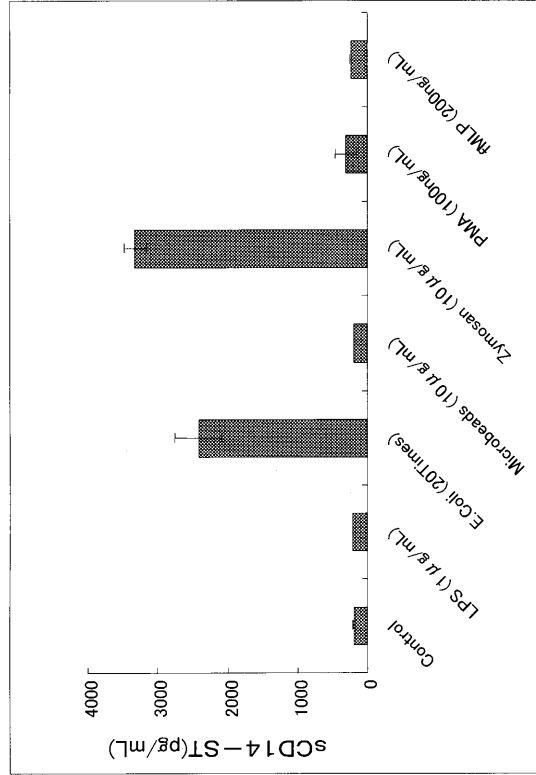
【図2】



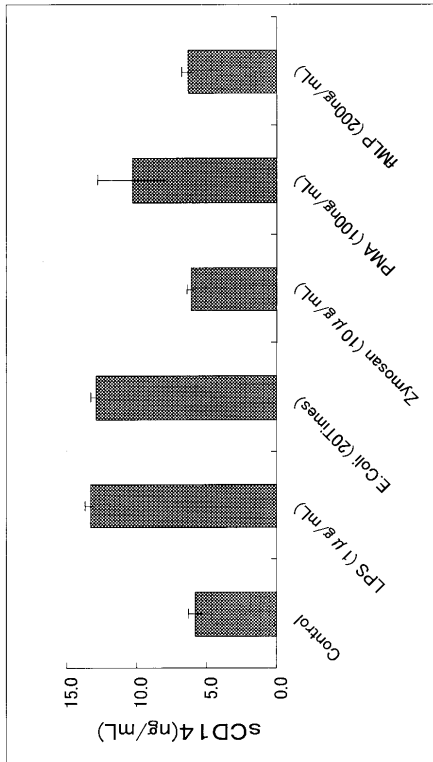
【 図 3 】



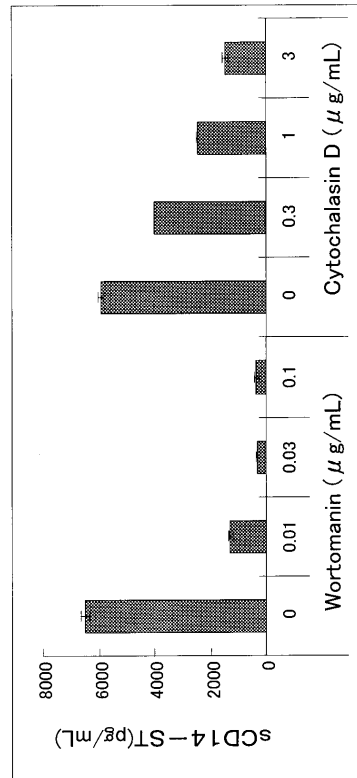
【 図 4 】



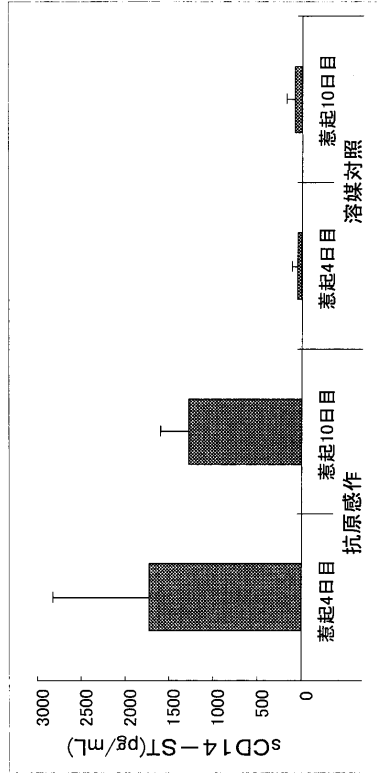
【 図 5 】



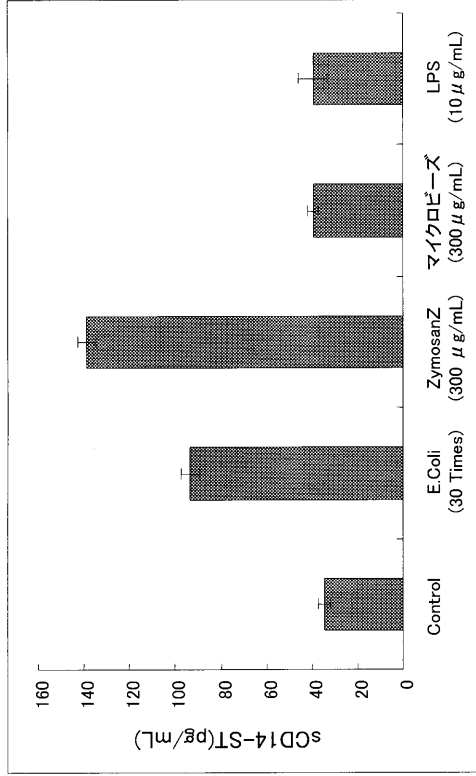
【 図 9 】



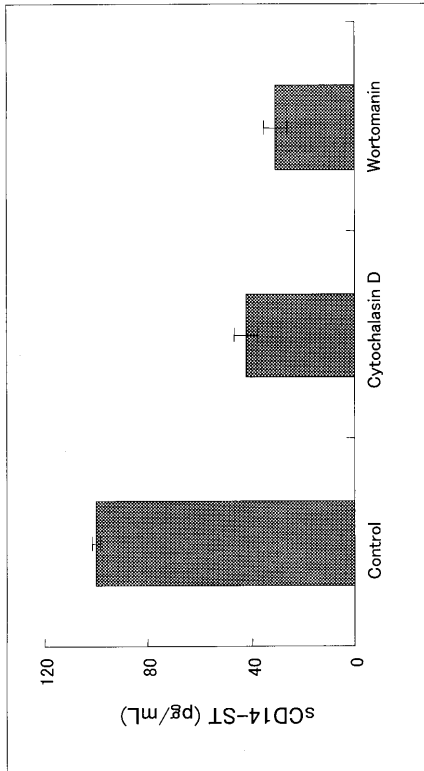
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 6 】



【配列表】

0005435587000001.app

フロントページの続き

(56)参考文献 国際公開第2005/108429(WO, A1)

遠藤重厚 他, 新しい敗血症の診断マ-カ-である可溶性CD14 サブタイプの有用性について, エンドトキシン血症救命治療研究会誌, 2005年, Vol.9, No.1, 46-50

A. CAUWELS et al., The origin and function of soluble CD14 in experimental bacterial meningitis, J. Immunol., 1999年, Vol.162, No.8, 4762-4772

X. TANG et al., Increased activation-induced cell death in peripheral lymphocytes of rheumatoid arthritis patients: the mechanism of action, Immunology, 2004年, Vol.112, No.3, 496-505

J.-W. LEE et al., Elevated Milk Soluble CD14 in Bovine Mammary Glands Challenged with Escherichia coli Lipopolysaccharide, J. Dairy Sci., 2003年, Vol.86, No.7, 2382-2389

N. Hiki et al., Release of Endotoxin-binding Proteins during Major Elective Surgery: Role of Soluble CD14 in Phagocytic Activation, World Journal of Surgery, 2000年, Vol. 24, Issue 5, 499-506

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98

G01N 33/15

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDreamIII)

专利名称(译)	吞噬细胞的功能评价方法		
公开(公告)号	JP5435587B2	公开(公告)日	2014-03-05
申请号	JP2010513071	申请日	2009-05-22
申请(专利权)人(译)	持田制薬株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	持田制薬株式会社		
[标]发明人	内藤克紀		
发明人	内藤 克紀		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/50 G01N33/15 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/56972 C07K14/70596 C07K16/2896 G01N33/5047 G01N33/5091 G01N2333/70596 G01N2800/00		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N33/53.D		
优先权	2008135966 2008-05-23 JP		
其他公开文献	JPWO2009142303A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了一种评估吞噬细胞功能的新方便的方法。该方法测定sCD14-ST，其是在吞噬细胞的吞噬作用中特异性产生的体液因子，并且其足够稳定以用于测定。还提供了一种用于检测与吞噬细胞的吞噬作用相关的疾病的方法。

【 図 1 】

