

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

**特開2006-46977
(P2006-46977A)**

(43) 公開日 **平成18年2月16日(2006.2.16)**

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)		GO 1 N 33/53	Y	
GO 1 N 33/536 (2006.01)		GO 1 N 33/536	D	
GO 1 N 33/543 (2006.01)		GO 1 N 33/543	5 9 7	

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 16 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2004-225039 (P2004-225039)</p> <p>(22) 出願日 平成16年8月2日(2004.8.2)</p>	<p>(71) 出願人 501307136 折原 弘治 鹿児島県鹿児島市下荒田3丁目22番21号</p> <p>(74) 代理人 240000039 弁護士 弁護士法人 衛藤法律特許事務所</p> <p>(72) 発明者 折原 弘治 鹿児島県鹿児島市下荒田3丁目22-21 フォルティス八幡 402号</p>
---	--

(54) 【発明の名称】 Toll like receptors (TLRs)、CD14分子および主要組織適合分子複合体の連続的測定方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】ヒトの静脈血液の採取により、単球、マクロファージ、樹状細胞上の分子群を連続して測定でき、しかも正確な測定値を得ることができるToll like receptors (TLRs)、CD14分子および主要組織適合分子複合体の連続的測定方法を提供する。

【解決手段】液体培地であるRPMI Medium 1640 with 25mM HEPES buffer with L-glutamine (Invitrogen Corporation, California) にそのヒト自身の血漿が10%~20%となるように加え、血液から分離した単核球分画をその中で浮遊させた状態とし、8個のサンプルに分割した後、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR9、CD14、HLA-A、B、C、HLA-DRに対する蛍光標識抗体と反応させ、フローサイトメトリ分析器で各細胞膜上タンパク分子の量を測定する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒト血液細胞中の単球、マクロファージ、樹状細胞膜上のTLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR9、CD14、HLA-A、B、C、HLA-DRを連続的に定量化することを特徴とするToll like receptors (TLRs)、CD14分子および主要組織適合分子複合体の連続的測定方法。

【請求項2】

液体培地であるRPMI Medium 1640 with 25mM HEPES buffer with L-glutamine (Invitrogen Corporation, California) にそのヒト自身の血漿が10%~20%となるように加え、血液から分離した単核球分画をその中で浮遊させた状態とし、8個のサンプルに分割した後、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR9、CD14、HLA-A、B、C、HLA-DRに対する蛍光標識抗体と反応させ、フローサイトメトリー分析器で各細胞膜上タンパク分子を測定することを特徴とするToll like receptors (TLRs)、CD14分子および主要組織適合分子複合体の連続的測定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒト血漿を用いた細胞培養工学的手法によりフローサイトメトリー分析器で各細胞膜上タンパク分子を測定する医療産業分野の技術に属し、殊にToll like receptors (TLRs)、CD14分子および主要組織適合分子複合体の各測定を連続的に行い得る測定方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

従来、細胞膜上のToll like receptors (TLRs) を測定する際には、単核球分画(単球、マクロファージ、樹状細胞を含む)を無血清の液体培地であるRPMI Medium 1640 with 25mM HEPES buffer with L-glutamine (Invitrogen Corporation, California) か、他の動物の血清を添加した低血清液体培地、あるいは、リン酸緩衝液(PBS: phosphate buffer saline) にBovine Serum Albumin (BSA) を0.1%の割合で添加した溶液に浮遊させてから、TLRsに対する蛍光標識抗体と反応させ、フローサイトメトリー分析器にて蛍光強度を測定し、細胞膜上の各TLRs量の測定を行っていた(例えば、非特許文献1参照)。しかしながら、浮遊細胞と蛍光標識抗体の反応が完了するまでに室温で30分~60分程度の時間が必要であり、さらに、フローサイトメトリーにて測定する間の時間がかかるため、この方法では、ヒト血液から採取した状態をそのまま反映した細胞膜上のTLRs量は計測できない。なぜならば、時間の経過とともに細胞死(アポトーシスが主である)が進行、もしくは、細胞死が起こらなくとも細胞膜上のTLRsをはじめ各種蛋白レセプターに変化が起こってしまうためである。このことを防がなければ、実際にヒトの血管内を流れている状態のCD14陽性細胞(単球、マクロファージ、樹上細胞)膜上の正確なTLRs量とはならず(正確性の問題)、まして、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR9、CD14、HLA-A、B、C、HLA-DRとフローサイトメトリーでの測定に要する約45分から60分間という時間だけ考えても、このようなレセプター群の連続的かつ正確な解析は不可能であった。

【0003】

哺乳動物におけるTLRsは、1997年にJaneway、Medzhitovらによって発見された。その後、単球、マクロファージ、樹状細胞などの自然免疫にとって重要な細胞は、TLR1とTLR2のヘテロダイマーとなったレセプターを介してグラム陽性菌の菌体成分(ペプチドグリカン、リポタイコ酸)を認識し、CD14で捕捉されたりリポレサッカライド(LPS)をTLR4に受け渡すかたちで、CD14とTLR4がグ

10

20

30

40

50

ラム陰性菌の認識に關与することが明らかとなった。また、TLR3は、ウイルスの二本鎖RNAを認識し、TLR9は、ウイルスや細菌のDNAの認識にあたることが知られている。TLR5は、サルモネラ菌などの鞭毛を構成するタンパクであるフラジェリンを認識する。TLR7とTLR8は、ウイルスDNAを認識することが報告されている。現在まで、TLRsは、1～10まで10個知られているが、TLR10に関しては何を認識するレセプターなのか不明である。

【0004】

一方、主要適合因子複合体(MHC)は、クラス1とクラス2が存在し、クロスプリゼンテーションが起こり得るものの、おおまかなところ、MHCクラス1は、内因性抗原をCD8陽性リンパ球T細胞へ抗原提示する役割を担い、MHCクラス2は、外因性抗原をCD4陽性リンパ球T細胞へ抗原提示する役割を担う。両者とも獲得免疫に重要な因子となっている。MHCは、ヒトでは、human leukocyte antigen(HLA)と呼ばれ、クラス1は、主にHLA-A, B, Cであり、MHCクラス2は、HLA-DRがその一部を成す。

【0005】

【非特許文献1】Circulation(Published online before print December 31, 2001: Inflammatory Response After Open Heart Surgery Release of Heat-Shock Protein 70 and Signaling Through Tll-Like Receptor-4の4/15頁)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

ヒトの疾患においてウイルス感染症なのか、細菌感染症なのか、また、感染症ではなく他の疾患なのか鑑別できないことが少なからずある。また、細菌感染症であっても、その細菌を同定できないことも多い。例えば、感染性心内膜炎や敗血症(血液培養やエンドトキシン測定にたよってきたが、抗生剤投与療法中であれば、その細菌同定の可能性は低いし、たとえ抗生剤投与中でなくとも80%程度の同定率とされる。)、あるいは、サンプルが採取できない箇所における感染症では、内科的に細菌同定できる手段が、皆無という場合も存在する。

【0007】

上記のような症例において、TLRs、CD14およびHLAの測定は、細菌感染なのか、ウイルス感染なのか、または、異なる疾患に起因したものなのか、さらには、細菌感染であれば、グラム陽性菌なのか、あるいは、グラム陰性菌なのかを迅速かつ正確に診断する検査方法に成り得る。しかしながら、臨床的实施に対しては、TLRs、CD14およびHLAの量測定において、その確実なる再現性に加え、患者の血管中を流れている血液細胞そのものを反映したかたちでの正確性が当然に要求される。

【0008】

本発明は、患者の血液から分離した単核球分画(単球、マクロファージ、樹状細胞を含む)に最適な処理を施すことで、フローサイトメトリー機器を使用し、感染症の有無あるいは疾患鑑別という課題の解決に寄与しようとするものである。本発明者は、上記課題に鑑み鋭意研究の結果、感染症の起炎菌(グラム陽性菌かグラム陰性菌か)あるいは、ウイルス感染に応じて、それらを認識するとされる特定のTLRs、CD14、HLA分子の定量化に成功し、健常者のそれらに比べて増加することを見出した。これにより、身体における感染箇所の特定はできないまでも、患者が感染症に侵されているかどうかの診断を迅速かつ正確に行うことができ、医療上きわめて有用な検査方法を提供することができる。

【0009】

患者の状態を正確に反映したCD14陽性細胞(単球、マクロファージ、樹状細胞)を、そのままのかたちでフローサイトメトリーでの測定へもっていけるかどうか、つまり

10

20

30

40

50

、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR9、CD14、HLA-A、B、C、HLA-DRと連続的に解析しても最初から最後まで正確な量測定が行えているのかどうか問題であった(正確性の問題)。従来の方法では、これだけの数の分子を連続的に解析するため、時間がかかりすぎ、細胞にストレスを与え、最悪の場合には、主にアポトーシスを引き起こし、その解析結果は、正確性を欠いたものであった。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明では、患者の血漿を10%~20%含む液体培地であるRPMI Medium 1640 with 25mM HEPES buffer with L-glutamine (Invitrogen Corporation, California: 以下、RPMI Mediumと略する)に分離した単核球分画を浮遊させた上で、蛍光標識抗体と室温で30~60分間反応させ、フローサイトメトリーにてTLRs、CD14、HLA分子の量を順次測定すれば、さらに測定に必要な2倍以上の時間をかけても、同一のサンプルは20%誤差範囲でもって測定できることが判明した。したがって、患者血漿を10%~20%量とした液体培地に添加するというこの条件は、アポトーシスを防ぎ、また細胞へのストレスを最小限に止め、患者本来の細胞に最も近い状態で測定を行っているものとみなせる。

10

【0011】

実際、上記方法手順に従う測定方法により、起炎菌の確定した感染症患者(本測定を行うことに同意を得た)と健康者ボランティア群との比較検討を行うことで起炎菌のグラム陽性、陰性かを迅速かつ高感度に指摘でき、正確な補助的診断を行うことに成功した(有効性)。上述した検討の結果、「患者血漿を10%~20%含む液体培地(RPMI Medium)に分離した単核球分画を浮遊させた上で、蛍光標識抗体と室温で30~60分間反応させ、フローサイトメトリーにてTLRs、CD14、HLA分子の量を順次測定する」という条件が、その他血漿添加濃度の条件に比べ最も望ましいと結論された。

20

【0012】

以下、採取した血液より分離した単核球分画を患者血漿含有RPMI Medium(10%~20%の濃度で)内に浮遊し、蛍光標識抗体と反応させ、フローサイトメトリーにてTLRs、CD14、HLA分子の量を順次測定することの正確性を検討した結果と上記結論に至る経過を記載した。

30

ヒト正常健康者(本検査測定に参加することに同意を得た血液提供者)よりヘパリンを入れた注射器で血液を30ml採取し、単核球分画(単球、マクロファージ、樹状細胞を含む)を分離し、-80で冷凍保存しておいた。その際、得られた血漿も同様に-80で冷凍保存しておいた。

【0013】

冷凍保存しておいた単核球を37で解凍し、遠心操作を行い、上清を除去した。RPMI Mediumにヒト血漿濃度が10%となるように添加し、全部で16mlとした液体内に単核球を浮遊させた。これを16本の1.5ml清潔チューブに1mlずつ分注し、すべてのチューブにFITCで蛍光標識したCD14抗体を入れ、1本目と9本目はCD14抗体のみ、2本目と10本目はPEで蛍光標識したTLR1抗体を、3本目と11本目はPEで蛍光標識したTLR2抗体を、4本目と12本目はPEで蛍光標識したTLR3抗体を、5本目と13本目はPEで蛍光標識したTLR4抗体を、6本目と14本目はPEで蛍光標識したTLR9抗体を、7本目と15本目はPEで蛍光標識したHLA-A、B、C抗体を、8本目と16本目はPEで蛍光標識したHLA-DR抗体をそれぞれに入れ、室温で30分~45分間反応させ抗原抗体反応を完了させた。

40

【0014】

フローサイトメトリーでの分析は、まず、励起させるレーザー光の波長を488nmとし、1本目のFITC蛍光標識したCD14抗体のみを入れたサンプルの解析を行った。コンピューター上で、前方散乱と側方散乱に分けたグラフ画面上で、CD14陽性細胞(単球、マクロファージ、樹状細胞)が多く集まる細胞集団を曲線ゲート(以下、Aゲート

50

と略する)で囲み、さらに、側方散乱を横軸にCD14の陽性度を表わす対数軸を縦軸にとったグラフでFITC蛍光を520nmの側方散乱光で拾い、CD14が陽性となる細胞群を四角ゲート(以下、Bゲートと略する)で囲んで、そのAとBの両ゲート内に入る細胞のみに関して分析を行うよう設定した。そして、CD14陽性細胞(単球、マクロファージ、樹状細胞)が持つ自家蛍光とCD14細胞のCD14平均蛍光強度(MFI: mean fluorescence intensity)をまず測定しておいた。

【0015】

次に、2本目のサンプル、FITC蛍光標識したCD14抗体とPEで蛍光標識したTLR1抗体の分析を行い、AとBの両ゲートに入る細胞集団の細胞膜上に存在するTLR1量を610nmの蛍光波長を拾い、TLR1のMFIの測定を行った。この値をCD14陽性細胞の自家蛍光MFIで割った値を1細胞あたりの膜表面に発現しているTLR1レセプターの量とし数値化した。同様に、2本目~8本目のサンプルを分析器にかけ、連続的にTLR2、TLR3、TLR4、TLR9、HLA-A, B, C、HLA-DRの測定数値化を行った。この測定の間には要した時間はおよそ1時間であった。続いて、同じ1本目~8本目と同じサンプルである9本目~16本目のサンプルに関して、1時間遅れで上記すべての値に関して測定を行った。

10

【0016】

また、3名の別人の正常健康者より採血し、冷凍保存しておいた単核球を37℃で解凍し、遠心操作を行い、上清を除去した。RPMI Mediumにヒト血漿濃度が、それぞれ20%、25%、5%となるように添加し、すべての血漿濃度の場合に全部で16mlとした液体内に単核球を浮遊させることで、上述の操作を行い、それぞれ1本目~8本目、さらに同じサンプルである9本目~16本目の合計16本のサンプルを準備し、フローサイトメトリー解析を行った。20%、25%、5%ヒト血漿入りの各3名の1本目~8本目のサンプルを連続して計るまで約1時間を要し、すべて一時間遅れで各3名の9本目~16本目のサンプルに関して、分析を行った。

20

【0017】

フローサイトメトリーを用いた測定方法では、細胞と各蛍光標識抗体とを反応させる必要があり、最低でも抗原抗体反応が完了するためには、30分から45分程度の時間経過が必須となる。この経過時間にフローサイトメトリーでの測定に要する時間を加えれば、患者の感染症を反映したそのままの細胞状態で、TLRs、CD14、HLA-A, B, C、HLA-DRを、順次連続的に測定することは、従来方法論に従っては、不可能である。そのため、RPMI Mediumにそのヒト自身の血漿を入れ込むことを発案した。

30

従来のRPMI Mediumに細胞群を浮遊させフローサイトメトリーで測定する方法では、細胞にストレスを与え、約1時間も経てばアポトーシスが生じてくる。このことは、フローサイトメトリーによる解析コンピューター画面上Aゲートの細胞集団が左下方へ外れていくことで表わされ、5%と25%ヒト血漿でも、抗体と反応させてから約1時間30分も経過すれば、Aゲート内の細胞の数的割合は減り、左下方への細胞集団の移動が観察されることで示された。

ここに、感染症を含むその他疾患(自己免疫疾患)の有無をこれら自然免疫、獲得免疫に關与する細胞膜上分子を利用して明らかとするためには、すべての分子にわたって連続的に測定する必要が生じる。

40

【0018】

5%と25%濃度では、1本目~8本目のサンプルを測定終了した時点(抗体処理から約2時間30分後)では、同一であるはずの9本目~16本目のサンプルの測定値に最大で±50%の変化が生じた。このことにより、抗体と反応させて後に1本目~8本目のサンプルを順次測定する間にも、細胞変性が進行しているのは確実であり、測定した値が患者の細胞状態を表わしたものは考え難いと結論された。さらに、HLA-A, B, Cは、細胞にストレスがかかれば、細胞内変性タンパクが増え、その抗原提示を行うため、細胞膜上の量は増えてくる。5%ヒト血漿濃度では、この現象が起こっており、アポトーシ

50

スが生じなくとも、測定するCD14陽性細胞にストレスがかかっていることが観察され、このような細胞膜上各種レセプターの測定量は、正確なものとはいえない。逆に、25%ヒト血漿濃度では、HLA-A, B, C量が減少することが観察された。このことは、ストレス緩和もしくはNK(ナチュラルキラー)細胞に自己細胞であることを認識させる必要性がなくなっているために起こっている現象とみなされ、このように25%高濃度血漿の場合でも、細胞膜上各種レセプターの測定量は、信頼性(正確性)を欠いたものであった。以上より、5%と25%ヒト血漿では、CD14、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR9、HLA-A, B, C、HLA-DRを順次連続して正確な測定を行うことは、不可能であった。

【0019】

しかしながら、10%~20%ヒト血漿濃度では、アポトーシスもほとんど起こることなく(Aゲートから外れる細胞数もほとんどなく)、1本目~8本目のサンプルの測定値と1時間遅れで測定した9本目~16本目のサンプルの測定値は、いずれも±20%の変化に留まった。HLA-A, B, C分子の抗体処理を行ってから約3時間以内での時間的変化もほとんど認められなかった。これらの事実より、患者の細胞状態を最も正確に表わす測定には、10%~20%ヒト血漿含有RPMI Mediumでの細胞抗体処理する方法が適切であり、その後のフローサイトメトリーによる各種細胞膜上タンパク量の測定値は、患者のもった免疫担当細胞群の状態そのものに最も近いものと判断され得る。

【発明の効果】

【0020】

本発明によれば、患者の静脈血液の採取により、単球、マクロファージ、樹状細胞上のこれら分子群(TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR9、CD14、HLA-A, B, C、HLA-DR)を連続して測定でき、しかも正確な測定値が得られる。これにより、ヒトの疾患においてウイルス感染症なのか、細菌感染症なのか、また、感染症ではなく別の疾患なのか鑑別できるようになる。また、細菌感染症と明らかに判っていても、その細菌を同定できないことも多かった。例えば、抗生剤投与療法中であれば、感染性心内膜炎や敗血症の血液培養による細菌同定率は低いが、たとえ抗生剤投与中であっても、菌体成分に反応する細胞の特性をみる本発明では、細菌のグラム陽性菌かグラム陰性菌かを判断でき、治療にとって非常に有用な情報を与えるものとなる。さらに、サンプルが採取できない箇所における炎症があったとしても、採血という簡易的方法により、感染症の有無について判断できる。

また、本発明は、患者血液から分離した単核球分画(単球、マクロファージ、樹状細胞を含む)に最適な処理を施すことで、フローサイトメトリー機器を使用し、感染症の有無あるいは疾患鑑別という課題の解決に寄与しようとするものであり、患者が感染症に侵されているかどうかの診断が、迅速かつ正確に行え、従来にはなかった医療上有用な補助的検査方法を提供するものとなる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0021】

以下、本発明の実施の形態を図面に示す測定結果に基づいて詳細に説明する。

本発明に係るフローサイトメトリーのコンピューターの画面上に設定した各グラフの一覧を列記して示した。図1から図4は、RPMI Mediumに10%ヒト血漿を添加した測定結果を示すグラフである。図5から図8はRPMI Mediumに20%ヒト血漿を添加した測定結果を示すグラフである。図9から図12はRPMI Mediumに5%ヒト血漿を添加した測定結果を示すグラフである。図13から図16はRPMI Mediumに25%ヒト血漿を添加した測定結果を示すグラフである。

【0022】

詳述すると、まず、図1(a)は、前方散乱を縦軸に側方散乱を横軸にとったグラフであり、単核球細胞群のなかでも、その細胞の大きさおよび細胞内小器官密度により、ある程度、各種細胞集団に分けることが可能となる。Aの曲線形態ゲートに囲まれた部分に多くのCD14陽性細胞が存在する。図1(b)は、AゲートにおいてCD14陽性細胞を

10

20

30

40

50

さらにBゲートに入る細胞集団として分けたもので、以下の解析は、AとBの両ゲートに入ったもののみ、つまり、単球、マクロファージ、樹状細胞について解析するようコンピュータ設定を行った結果を示す。図中、右側の図1(c)と図1(d)は、図1(a)と図1(b)を測定した後、故意に一時間程遅らせ測定した同一サンプルのグラフで、比較検討を容易にするために並列して示す。図2(a)と図2(b)は、それぞれ、FITC標識CD14抗体でとらえたCD14の平均蛍光強度(MFI: mean fluorescence intensity)とA、B両ゲートに入ったCD14陽性細胞の(単球、マクロファージ、樹状細胞)の自家蛍光を表わしたグラフである。図中、右側の図2(c)と図2(d)は、図2(a)と図2(b)を測定した後、故意に一時間程遅らせ測定した同一サンプルのグラフで、比較検討を容易にするために並列して示す。図3(a)~(e)は、PE標識TLR1, 2, 3, 4, 9でとらえた各TLRのフローサイトメトリーでの一次元解析を表わすグラフで、それらのMFI値とそれらの値を自家蛍光MFIで割った値、つまり、各TLRの細胞表面発現量を示すものである。図面右側の図3(f)~(j)は、図3(a)~(e)を測定した後、故意に一時間程遅らせ測定した同一サンプルのグラフで、比較検討を容易にするために並列して示す。図4(a)と図4(b)は、PE標識HLA-A, B, C抗体とPE標識HLA-DR抗体でとらえたHLA-A, B, CとHLA-DRのフローサイトメトリーでの一次元解析を表わすグラフで、それらのMFI値とそれらの値を自家蛍光MFIで割った値、つまり、各HLAの細胞表面発現量を示す。図中、右側の図4(c)と図4(d)は、図4(a)と図4(b)を測定した後、故意に一時間程遅らせ測定した同一サンプルのグラフで、比較検討を容易にするために並列して示す。図5から図8に示すグラフは、RPMI Mediumに20%ヒト血漿を添加したものであり、その他の条件は、図1から図4に示すグラフとそれぞれ同じものである。図9から図12に示すグラフは、RPMI Mediumに5%ヒト血漿を添加したものであり、その他の条件は、図1から図4に示すグラフとそれぞれ同じものである。図13から図16に示すグラフは、RPMI Mediumに25%ヒト血漿を添加したものであり、その他の条件は、図1から図4に示すグラフとそれぞれ同じものである。

10

20

30

40

【0023】

先ず、本検査の実施にあたり同意を得た正常健康者ボランティア(実施例で行ったのは4名)からノボ・ヘパリン(10000単位/10ml)1ml入り注射器にて30mlの静脈採血を行い、清潔操作にて最終濃度5mMのEDTA入りリン酸緩衝液(以下、PBS/EDTAと略する)を20ml添加し、室温、400gで35分間遠心した後、上部の1.5倍に希釈された血漿と下部の赤血球とに分離し、その中間に存在するパフィーコート層を採取した(慎重に希釈された上部の血漿を別の清潔容器に移し取りながら)。採取した8~10ml程のパフィーコート層をPBS/EDTAで35mlまで希釈し、15mlのLYMPHOPREP(商品名:第一化学薬品株式会社製, JAPAN)を入れた新たな50ml容器に35mlの細胞溶液を緩やかに入れ上乗せし2層に分かれるようにする。再び、400gで35分間遠心し、上清を取り除きながら中間層にできた10ml程度の単核球層を分離する。PBS/EDTAで50mlとし、300gで10分間遠心し、沈澱した細胞を吸い取らないよう慎重に上清を除き、混入している血小板を取り除く。次に、再度50mlのPBS/EDTAで攪拌し、細胞を浮遊させ、250gで10分間遠心を2度繰り返し行い、混入している血小板を取り除く操作を行った。最後に、細胞凍結保存液であるセルバンカー2(商品名: #ZCB-201、ダイアトロン, JAPAN)の1.5mlに沈澱した単核球細胞を浮遊させ、-80の冷蔵庫に保存した。最初に分離したPBS/EDTAで希釈された血漿も同じく-80の冷蔵庫に保存しておいた。

【0024】

フローサイトメトリーでのTLRs、CD14、HLA-A, B, C、HLA-DRの解析時において、-80で単核球細胞を保存液に入れ、ストックしておいたチューブを37の温浴につけ、約5分間かけて溶解させた。続いて300gの遠心を10分間行い、細胞を沈澱させ、上清を吸い取った。

50

ヒト血漿各濃度（本実施例で行ったのは、5%、10%、20%、25%の濃度）含有RPMIMedium内に沈澱細胞を浮遊させ、1.5mlチューブを8本準備しておき、均等に8サンプルに分注した（本実施例では、時間差をみるため、2倍の16本に分注した。）。速やかにすべてのサンプルにFITC標識CD14抗体を5 μ l添加していき、次いで2本目のサンプルには、PE標識TLR1抗体を5 μ l添加した。3本目のサンプルには、PE標識TLR2抗体を、4本目のサンプルには、PE標識TLR3抗体を、5本目のサンプルには、PE標識TLR4抗体を、6本目のサンプルには、PE標識TLR9抗体を、7本目のサンプルには、PE標識HLA-A, B, C抗体を、8本目のサンプルには、PE標識HLA-DR抗体を、それぞれ5 μ l添加した。そして、室温で30分～45分程度時間をおき、抗原抗体反応を進行させた。

10

【0025】

その後、フローサイトメトリー機器での分析を行ったが、その蛍光励起レーザー光の波長は、488nmとした。FITC蛍光は、520nmを中心にして拾い、光電子増倍管での電気信号変換により、蛍光強度を測定した。PE蛍光は、610nmを中心にして拾い、別の光電子増倍管での電気信号変換により、蛍光強度を測定した。

図1(a)は、前方散乱（細胞の大きさを表わす）と側方散乱（細胞内の小器官密度を表わす）から考えて、Aの曲線形態ゲート内に囲まれた細胞集団が、単球、マクロファージ、樹状細胞を多く含む集団であることが予測された。その左下方の数的割合の多い集団は、リンパ球の集団である。図1(b)では、予測通り、Aゲートに囲まれた部分は、約80%の細胞が、CD14陽性細胞でBの四角ゲート内に入ってきた。したがって、A、B

20

【0026】

図2(a)は、縦軸に細胞数をとり、積分面積値に等しいCD14細胞群の平均蛍光強度(MFI: mean fluorescence intensity)を表わしたグラフであり、その数値は積分面積値に等しい。図2(b)では、PE標識の抗体を入れていない610nm蛍光波長を拾いCD14陽性細胞群が自らもつ自家蛍光のこの波長範囲内の強さを表わした。すべての物質は、原子でできており、当然のことながら自家蛍光をもっている。細胞も例外ではない。

30

【0027】

図3(a)～(e)は、それぞれ、610nm蛍光波長を拾ってPE標識TLR1、2、3、4、9抗体処理後のMFI値を解析した結果である。ここで得られた各MFI値をCD14陽性細胞のもつ自家蛍光のMFIで割った値をもって、各TLRsの細胞膜上の発現量を数値化できる。

【0028】

図4(a)と(b)は、それぞれPE標識HLA-A, B, C抗体とHLA-DR抗体で処理した際の、610nm蛍光波長を拾ったMFI値を表わしたもので、これら数値をCD14陽性細胞のもつ自家蛍光のMFIで割れば、HLA-A, B, C、HLA-DRの量を数値化できる。

40

【0029】

図1～図4を通して、右側のグラフはすべて、左側のグラフと抗体処理時間を同じくした完全に同一のサンプルではあるが、フローサイトメトリーでの解析を故意に1時間遅延させてから行ったものである。

【実施例1】**【0030】**

炎症所見のない正常健康者で、本研究への参加に同意した者より、ノボ・ヘパリン(Aventis, USA: 10000単位/10ml)1ml入り注射器にて30mlの静脈採血を行った。清潔操作にて最終濃度5mMのEDTA入りリン酸緩衝液(phosphate buffer saline) (以下、PBS/EDTAと略する)の20ml

50

を添加し、スイングローターにセットし、ブレーキなしで20、400gで35分間遠心した。パフィーコート層の上部5mlを残し、最上部の1.5倍に希釈された血漿を慎重に別の清潔50ml円錐チューブに移し取りながら、その中間に存在するパフィーコート層をさらに別の50ml円錐チューブに採取した(下部層は、赤血球)。採取した8~10ml程のパフィーコートにPBS/EDTAを加え35mlとし、転倒混和した。新たに50ml円錐チューブに15mlのLYMPHOPREP(商品名:第一化学薬品株式会社製, JAPAN)を入れ、35mlに希釈したパフィーコート層を緩やかに入れ重層した。これをスイングローターにセットし、ブレーキなしで20、400gで35分間遠心した。上清を取り除きながら中間層にできた10ml程度の単核球層を分離し、清潔な50ml円錐チューブに移した。そして、PBS/EDTAで50mlとし、300gで10分間遠心し、沈澱した細胞を吸い取らないよう慎重に上清を取り除いた。次に、再度50mlのPBS/EDTAで攪拌し、細胞を浮遊させ、250gで10分間遠心を2度繰り返し行い、混入している血小板を取り除く操作を行った。最後に、細胞凍結保存液であるセルバンカー2(#ZCB-201、ダイアトロン, JAPAN)の1.5mlに沈澱した単核球細胞群を浮遊させ、-80の冷蔵庫に保存した。最初に分離したPBSで希釈された血漿も同じく-80の冷蔵庫に保存しておいた。

10

【0031】

-80で単核球細胞を保存液に入れ、ストックしておいたチューブとPBS/EDTAで希釈したそのヒトの血漿を37の温浴につけ、約5分間かけて溶解させた。続いて細胞の入ったストックチューブを300gの遠心に10分間かけ、細胞を沈澱させ、上清の保存液を吸い取った。

20

RPMI Medium内のヒト血漿濃度が10%になるように血漿を加え16mlの細胞懸濁液を準備した。そこに沈澱細胞を浮遊させ、1.5mlチューブの16本に等しく分注した。速やかにすべてのサンプルにFITC標識CD14抗体(ebioscience, Cat. 11-0149, USA)を5µl添加していき、次いで2本目と10本目のサンプルには、PE標識TLR1抗体(ebioscience, Cat. 12-9911, USA)を5µl添加した。3本目と11本目のサンプルには、PE標識TLR2抗体(ebioscience, Cat. 12-9922, USA)を、4本目と12本目のサンプルには、PE標識TLR3抗体(ebioscience, Cat. 12-9039, USA)を、5本目と13本目のサンプルには、PE標識TLR4抗体(ebioscience, Cat. 12-9917, USA)を、6本目と14本目のサンプルには、PE標識TLR9抗体(ebioscience, Cat. 12-9099, USA)を、7本目と15本目のサンプルには、PE標識HLA-A, B, C抗体(ebioscience, Cat. 12-9983, USA)を、8本目と16本目のサンプルには、PE標識HLA-DR抗体(ebioscience, Cat. 12-9956, USA)を、それぞれ5µl添加した。そして、室温で30分~45分程度時間をおき、抗原抗体反応を進行させた。

30

【0032】

その後、フローサイトメトリ機器(Epics Elite, Beckman Coulter, USA)での分析を行ったが、その蛍光励起レーザー光の波長は、488nmとし、FITC蛍光は、520nmを中心にして拾い、光電子増倍管での電気信号変換により、蛍光強度を測定した。PE蛍光は、610nmを中心にして拾い、別の光電子増倍管での電気信号変換により、蛍光強度の測定を行った。

40

図1(a)は、前方散乱(細胞の大きさを表わす)と側方散乱(細胞内の小器官密度を表わす)から考えて、Aの曲線形態ゲート内に囲まれた細胞集団が、単球、マクロファージ、樹状細胞を多く含んだ集団であることが、それら細胞形態より予測された。その左下方の数的割合の多い集団は、T、Bリンパ球の集団であることも確かめた。図1(b)では、予測通り、Aゲートに囲まれた部分の約80%の細胞が、CD14陽性細胞であり、Bの四角ゲート内に入ってきた。したがって、A、B両ゲート内に入った細胞群のみの分析を行うようコンピューターを設定し、単球、マクロファージ、樹状細胞のみの分析を行

50

った (CD14 陽性細胞は、単球、マクロファージ、樹状細胞のみであるから)。

【0033】

図2(a)は、縦軸に細胞数を取り、その積分面積値を表わすCD14細胞群の平均蛍光強度(MFI: mean fluorescence intensity)をコンピューターグラフ上に描かせ数値化した(PE蛍光のみの一次元解析)。図2(b)では、PE標識の抗体を入れていない610nm蛍光波長を拾い、CD14陽性細胞群が自らもつ自家蛍光のこの波長範囲内の強さをコンピューターグラフ上に表わした(すべての物質は、原子でできており、当然のことながら自家蛍光をもっているため、細胞も例外ではない)。

【0034】

図3(a)~(e)の結果は、PE標識TLR1、2、3、4、9抗体処理後、2本目から6本目のサンプルを連続的に解析していき、610nm蛍光波長を拾ったAとBの両ゲートに入った細胞のみの一次元解析であり、それぞれのMFI値を示した。ここで得られた各MFI値をCD14陽性細胞のもつ自家蛍光のMFIで割った値をもって、各TLRsの細胞膜上の発現量として数値化した。

10

【0035】

図4(a)と(b)は、それぞれPE標識HLA-A, B, C抗体とHLA-DR抗体で処理した際の、610nm蛍光波長を拾ったMFI値を表わしたもので、これら数値をCD14陽性細胞のもつ自家蛍光のMFIで割り、HLA-A, B, C, HLA-DRの量として数値化した。

20

【0036】

続いて、図1乃至図4を通して、図中、右側のグラフはすべて、左側のグラフと抗体処理時間を同じくした完全に同一のサンプルの測定結果ではあるものの、フローサイトメトリーでの解析を故意に1時間遅らせてから連続的に実施例1と同様にして計測したものである。

【実施例2】

【0037】

別の正常健康者で、この本研究への参加に同意した者より、ノボ・ヘパリン(Aventis, USA: 10000単位/10ml)1ml入り注射器にて30mlの静脈採血を行った。以下、上記と同様の操作手順に従って行った。ただし、(0019)においては、単核球分画沈澱細胞を懸濁するRPMI Medium内のヒト血漿濃度に関して、この場合20%になるように血漿を加え、全体を16mlの細胞懸濁液とし、同様に16本のサンプルを準備した。そして、フローサイトメトリーでの1~8本目の測定値と故意に1時間遅らせてから連続的に解析した同一のサンプル群である9~16本目の測定値とを比較した。

30

【実施例3】

【0038】

3人目の正常健康者で、この本研究への参加に同意し、血液を提供して頂ける方より、ノボ・ヘパリン(Aventis, USA: 10000単位/10ml)1ml入り注射器にて30mlの静脈採血を行った。以下、上記と同様の操作手順に従って行った。ただし、単核球分画沈澱細胞を懸濁するRPMI Medium内のヒト血漿濃度に関して、この場合5%になるように血漿を加え、全体を16mlの細胞懸濁液とし、同様に16本のサンプルを準備した。そして、フローサイトメトリーでの1~8本目の測定値と故意に1時間遅くしてから連続的に解析した同一のサンプル群である9~16本目の測定値とを比較した。

40

【実施例4】

【0039】

4人目の正常健康者で、本研究への参加に同意した者より、ノボ・ヘパリン(Aventis, USA: 10000単位/10ml)1ml入り注射器にて30mlの静脈採血を行った。以下、上記と同様の操作手順に従って行った。ただし、単核球分画沈澱細胞を

50

懸濁するRPMI Medium内のヒト血漿濃度に関して、この場合25%になるように血漿を加え、全体を16mlの細胞液とし、同様に16本のサンプルを準備した。そして、フローサイトメトリーで1~8本目の測定値と故意に1時間遅らせてから連続的に解析した同一のサンプル群である9~16本目の測定値とを比較した。

【0040】

本実験系での実施例1から実施例4までの結果のまとめと結論を以下に記載する。

16本のサンプルを準備し、フローサイトメトリーでの1~8本目の解析と故意に1時間遅らせてから連続的に解析した同一のサンプル群である9~16本目を測定値と比較検討した結果より、まず、沈澱細胞群(単核球分画)を懸濁するRPMI Medium内のヒト血漿濃度に関して、5%の場合には、前方散乱を縦軸に側方散乱を横軸にとって描いたグラフ上の単球、マクロファージ、樹状細胞が多く集まったAゲート内の細胞が、時間経過とともに左下方へと外れていき(アポトーシスを表わす)、フローサイトメーターで解析を行った最初のサンプルでは、全体の6.9%がゲート内に入っていたはずが、約1時間後には、4.8%にまで減少した。さらに、CD14のMFI値にも変化が生じた。同一サンプルであるにもかかわらず、TLR3においては、1時間経過後に+46%もの差異を生じ、TLR9においては、-67%の差異が生じた。その他TLR1で+23%の違いがでた。以上のことより、避けられない抗原抗体反応の時間経過内に、1サンプル~9サンプルにおいても、そのヒトの血液中の細胞状態をそのまま反映したものになっていない可能性が大きく、正確性を欠くことが判る。

【0041】

次に、沈澱細胞群(単核球分画)を懸濁するRPMI Medium内のヒト血漿濃度に関して、25%の場合にも、Aゲート内の細胞が、時間経過とともに左下方へと外れていき、全体の6.4%あった細胞群が4.9%に減少した。HLA-A,B,C分子発現に-28%の差異を生じ、TLR2で、-41%もの差異が出た。また、TLR9では、+35%の違いが生じ、ヒト血漿濃度を高濃度にしても、アポトーシスは避けられず、これらレセプター群の連続的測定において、そのヒトの血液中の細胞状態をそのまま反映したものになっていない可能性は大きい。

【0042】

一方、RPMI Medium内のヒト血漿濃度を10%と20%にした場合、10%では、Aゲート内細胞数割合が、6.2%から4.7%へと減少するにもかかわらず(20%では、Aゲート内細胞数割合が、3.5%から3.8%と減少することはなかったが)、すべての測定結果が、±20%以内におさまり、特に、HLA-A,B,C分子発現量に時間的变化が起こっていないということは、細胞へのストレスの少なさを意味したものである。

したがって、フローサイトメトリーによって、これらレセプター群を連続的に測定することにおいて、抗原抗体反応時間、解析時間を合わせた時間経過があるとしても、そのヒトの血液中の細胞状態をそのまま反映したものに近い状態になっている可能性が大きいのは、RPMI Medium内のヒト血漿濃度を10%~20%にし、単核球分画を混濁させ、測定を行った場合であると判断できる。

【図面の簡単な説明】

【0043】

【図1】10%ヒト血漿を添加したRPMI Medium条件下において、前方散乱及び側方散乱を測定した結果とCD14陽性細胞集団を示すグラフである。

【図2】10%ヒト血漿を添加したRPMI Medium条件下において、CD14蛍光強度を測定した結果とそれらの細胞集団を示すグラフである。

【図3】10%ヒト血漿を添加したRPMI Medium条件下において、各TLRの細胞表面発現量を測定した結果を示すグラフである。

【図4】10%ヒト血漿を添加したRPMI Medium条件下において、各HLAの細胞表面発現量を測定した結果を示すグラフである。

【図5】20%ヒト血漿を添加したRPMI Medium条件下において、前方散乱及

10

20

30

40

50

び側方散乱を測定した結果と、CD14陽性細胞を示すグラフである。

【図6】20%ヒト血漿を添加したRPMI Medium条件下において、CD14蛍光強度を測定した結果とそれら細胞集団の自家蛍光を示すグラフである。

【図7】20%ヒト血漿を添加したRPMI Medium条件下において、各TLRの細胞表面発現量を測定した結果を示すグラフである。

【図8】20%ヒト血漿を添加したRPMI Medium条件下において、各HLAの細胞表面発現量を測定した結果を示すグラフである。

【図9】5%ヒト血漿を添加したRPMI Medium条件下において、前方散乱及び側方散乱を測定した結果とCD14陽性細胞集団を示すグラフである。

【図10】5%ヒト血漿を添加したRPMI Medium条件下において、CD14蛍光強度を測定した結果とそれら細胞集団の自家蛍光を示すグラフである。 10

【図11】5%ヒト血漿を添加したRPMI Medium条件下において、各TLRの細胞表面発現量を測定した結果を示すグラフである。

【図12】5%ヒト血漿を添加したRPMI Medium条件下において、各HLAの細胞表面発現量を測定した結果を示すグラフである。

【図13】25%ヒト血漿を添加したRPMI Medium条件下において、前方散乱及び側方散乱を測定した結果とCD14陽性細胞集団を示すグラフである。

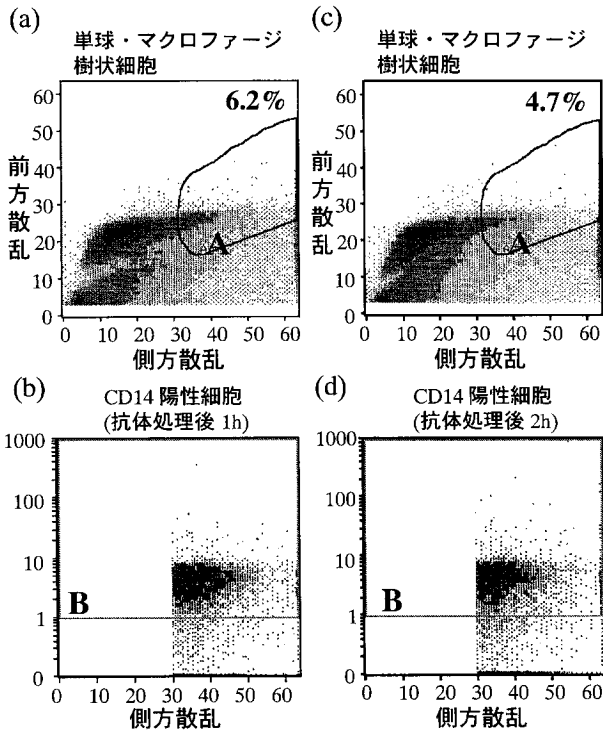
【図14】25%ヒト血漿を添加したRPMI Medium条件下において、CD14蛍光強度を測定した結果とそれら細胞集団の自家蛍光を示すグラフである。

【図15】25%ヒト血漿を添加したRPMI Medium条件下において、各TLR 20

の細胞表面発現量を測定した結果を示すグラフである。
【図16】25%ヒト血漿を添加したRPMI Medium条件下において、各HLAの細胞表面発現量を測定した結果を示すグラフである。

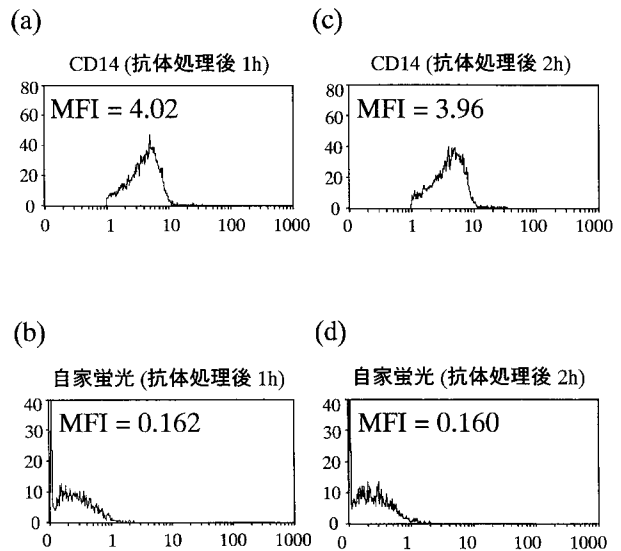
【図1】

血清濃度 10%



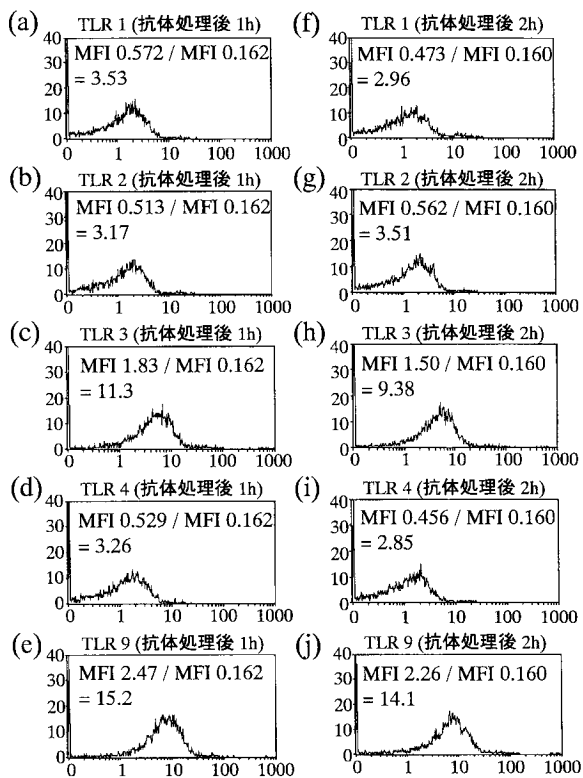
【図2】

血清濃度 10%



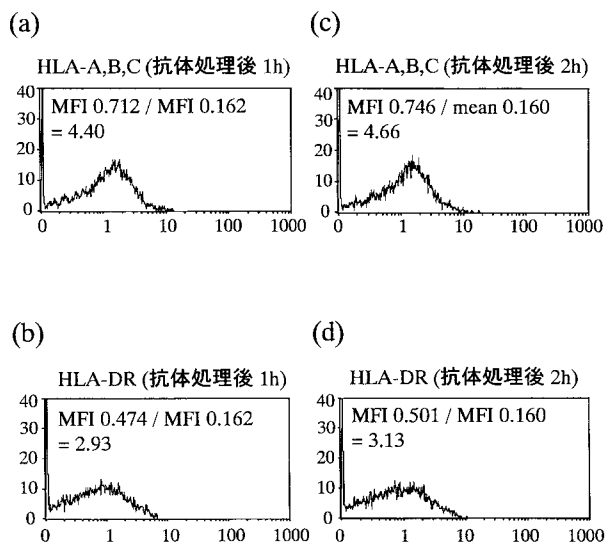
【 図 3 】

血清濃度 10%



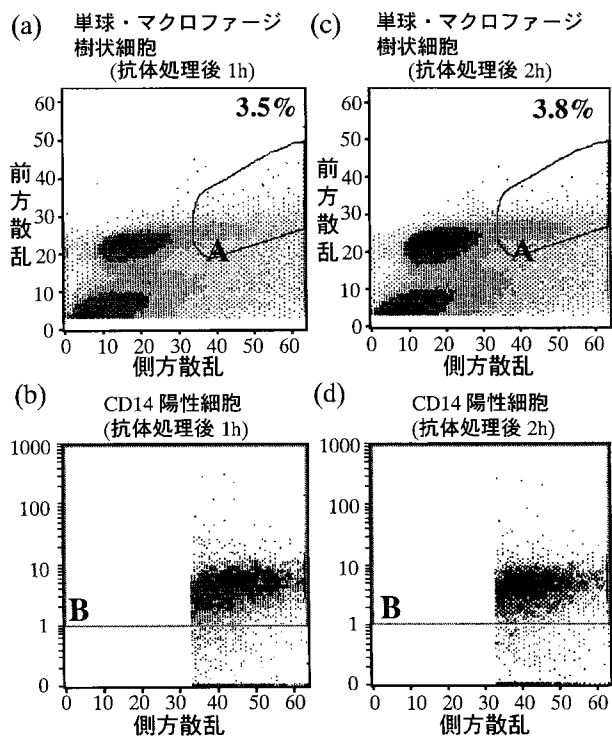
【 図 4 】

血清濃度 10%



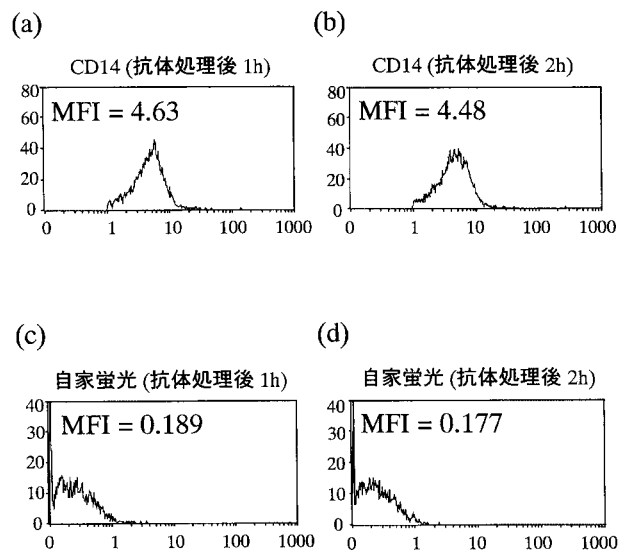
【 図 5 】

血清濃度 20%



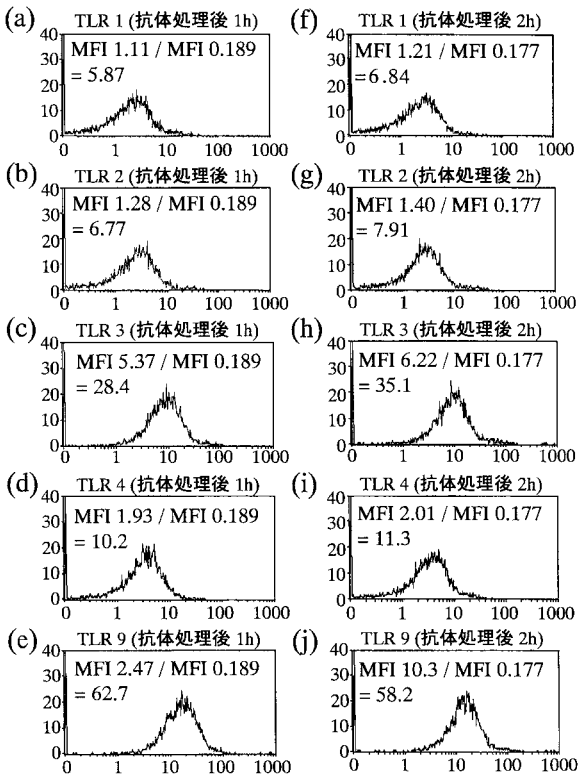
【 図 6 】

血清濃度 20%



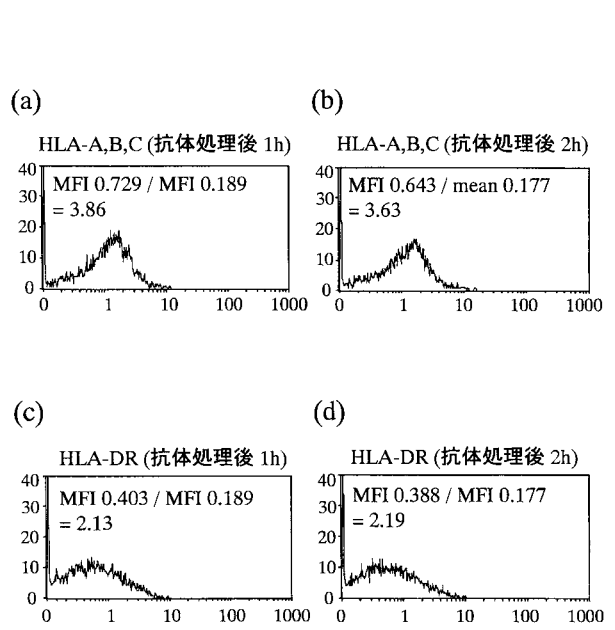
【 図 7 】

血清濃度 20%



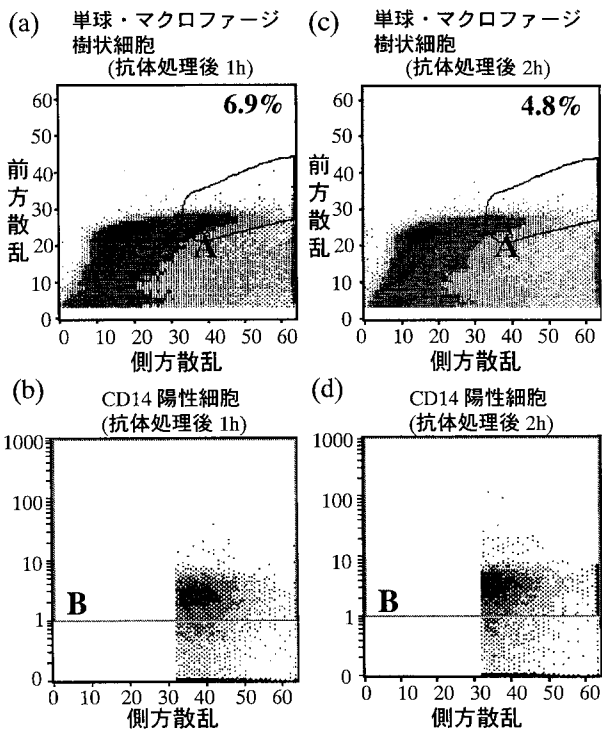
【 図 8 】

血清濃度 20%



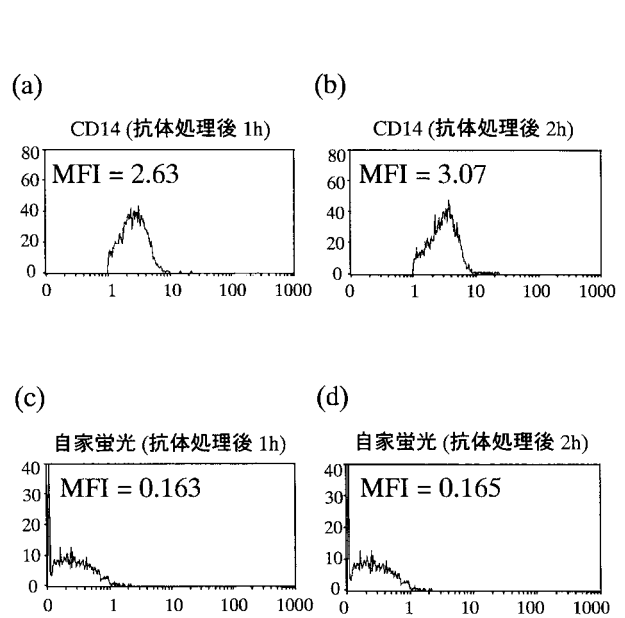
【 図 9 】

血清濃度 5%



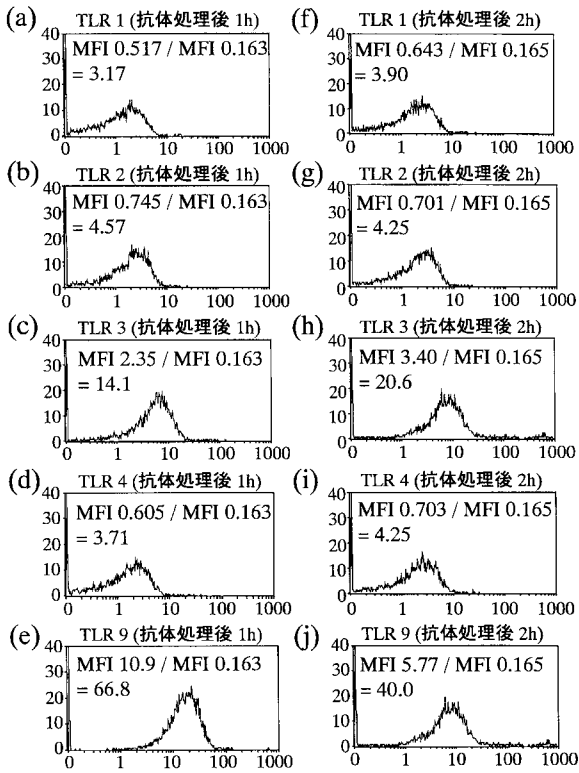
【 図 10 】

血清濃度 5%



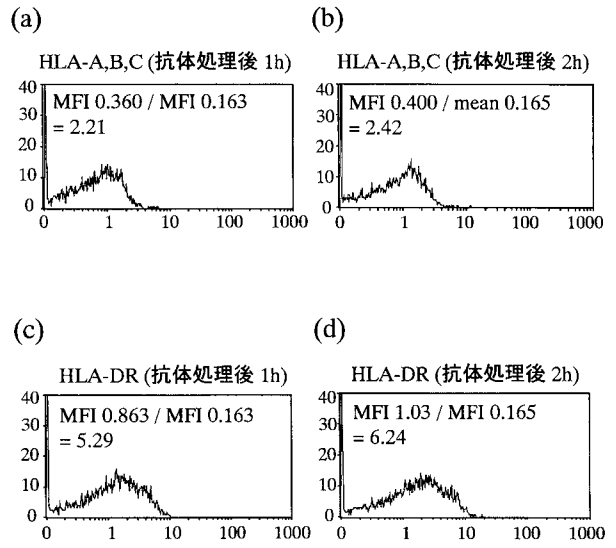
【 図 1 1 】

血清濃度 5%



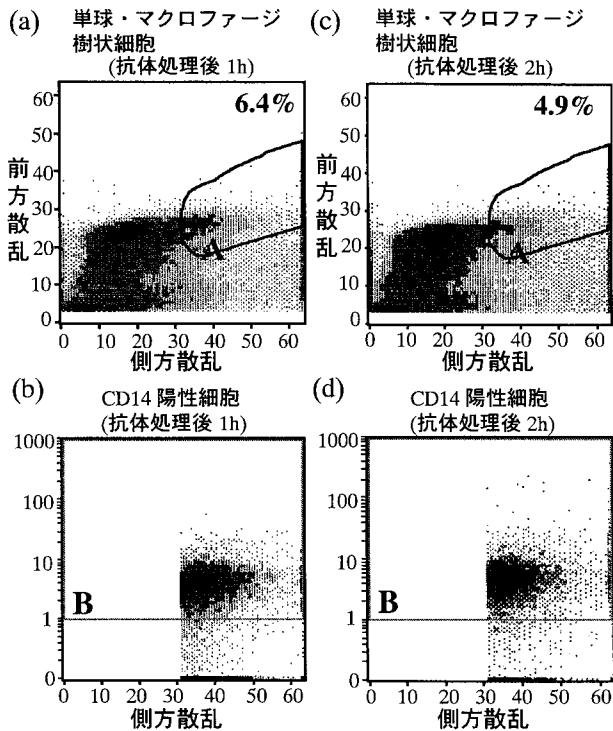
【 図 1 2 】

血清濃度 5%



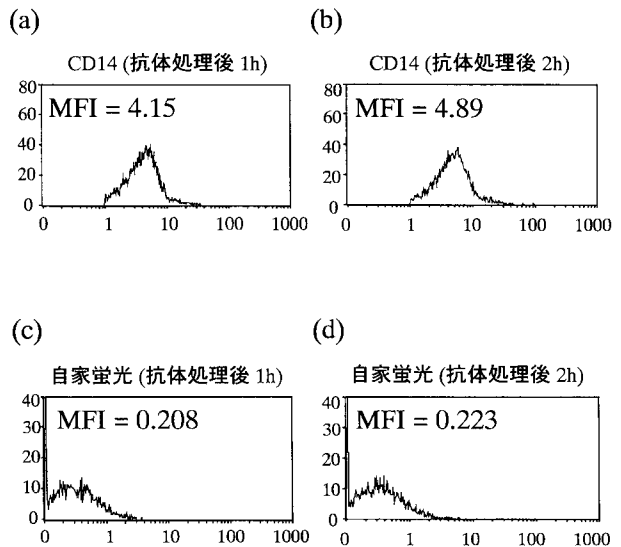
【 図 1 3 】

血清濃度 25%



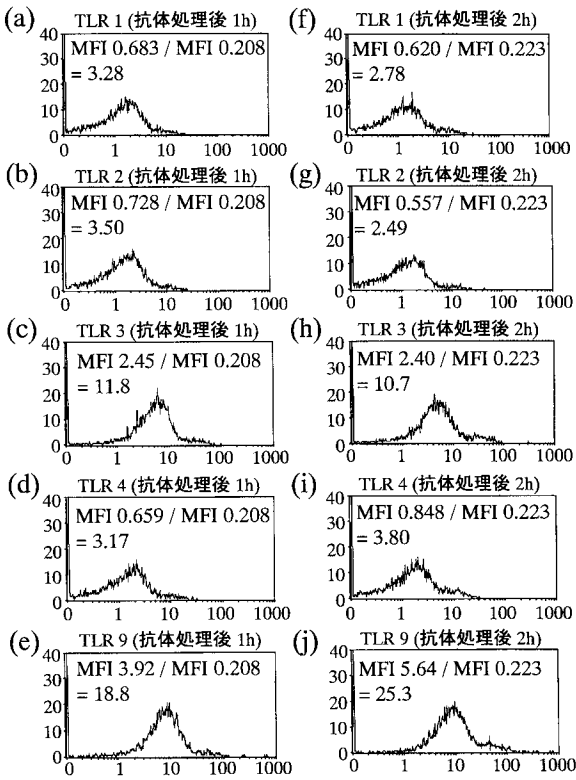
【 図 1 4 】

血清濃度 25%



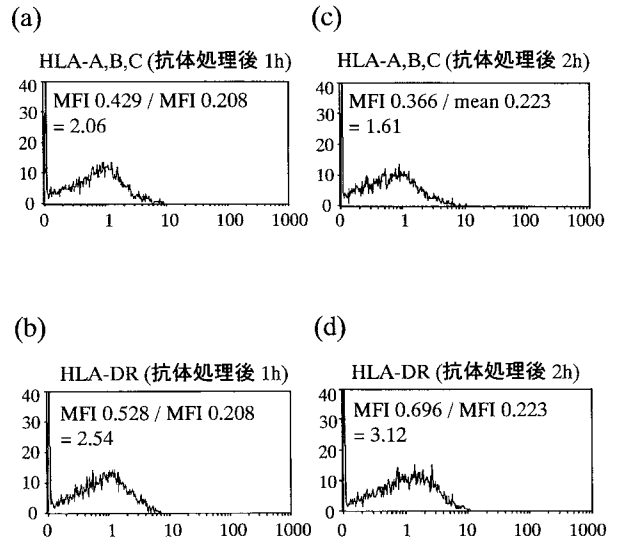
【 图 1 5 】

血清濃度 25%



【 图 1 6 】

血清濃度 25%



专利名称(译)	Tolllikereceptors (TLRs) , CD14分子和主要组织相容性复合物的连续测量方法		
公开(公告)号	JP2006046977A	公开(公告)日	2006-02-16
申请号	JP2004225039	申请日	2004-08-02
[标]申请(专利权)人(译)	折原浩二		
申请(专利权)人(译)	折原浩二		
[标]发明人	折原弘治		
发明人	折原 弘治		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/536 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/53.Y G01N33/536.D G01N33/543.597		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

Toll样受体 (TLR) , CD14分子以及能够通过收集人静脉血并获得准确的测量值来连续测量单核细胞 , 巨噬细胞和树突状细胞上的一组分子的分子。提供了一种连续测量主要组织相容性复合物的方法。解决方案：将人血浆添加到带有25mM HEPES缓冲液和L-谷氨酰胺 (加利福尼亚州 Invitrogen公司 , 加利福尼亚州) 的液体培养基RPMI Medium1640中 , 使人血浆浓度达到10%至20% , 并添加从血液中分离的单核细胞级分。漂浮在其中 , 分成8个样品 , 然后与针对TLR1 , TLR2 , TLR3 , TLR4 , TLR9 , CD14 , HLA-A , B , C , HLA-DR的荧光标记抗体发生反应。细胞计数仪分析每个细胞膜上蛋白质分子的数量。 [选择图]无

