

(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2001 - 215224

(P2001 - 215224A)

(43)公開日 平成13年8月10日(2001.8.10)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	K 2 G 0 4 5
			Q
			Y
// G 0 1 N 33/50		33/50	K
			Q

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 6 数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 325518(P2000 - 325518)

(22)出願日 平成12年10月25日(2000.10.25)

(31)優先権主張番号 特願平11 - 334129

(32)優先日 平成11年11月25日(1999.11.25)

(33)優先権主張国 日本(JP)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成11年10月30日

日本免疫学会発行の「日本免疫学会総会・学術集会記録第29巻」に発表

(71)出願人 000004455

日立化成工業株式会社

東京都新宿区西新宿2丁目1番1号

(72)発明者 松井 隆

茨城県日立市東町四丁目13番1号 日立化成

工業株式会社医薬品研究所内

(72)発明者 山下 耕平

茨城県日立市東町四丁目13番1号 日立化成

工業株式会社医薬品研究所内

(72)発明者 鈴木 良弘

東京都練馬区関町南3 - 26 - 2

(74)代理人 100089244

弁理士 遠山 勉 (外2名)

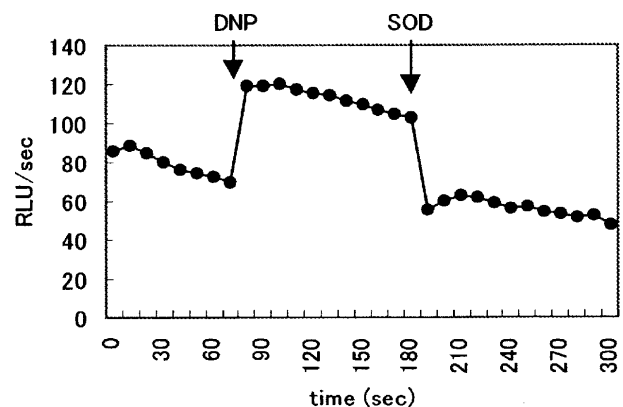
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 免疫反応のアッセイ法、免疫学的判定法及びアッセイキット

(57)【要約】

【課題】 簡便かつ迅速に免疫反応の有無及び強度を測定することができる方法、免疫学的判定法及びアッセイキットを提供する。

【解決手段】 肥満細胞、好塩基球、好酸球、好中球、T細胞、B細胞、単球又はマクロファージ等の免疫細胞が関与する免疫反応の有無の検出又は強度を、これらの免疫細胞が活性化される際に産生する活性酸素種の強度によって測定する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 免疫細胞が関与する免疫反応の有無の検出又は強度の測定のための免疫反応のアッセイ法であって、活性化した免疫細胞が産生する活性酸素種を測定することを特徴とする免疫反応のアッセイ法。

【請求項2】 免疫細胞が、肥満細胞、好塩基球、好酸球、好中球、T細胞、B細胞、単球又はマクロファージの少なくとも1つから選択される請求項1に記載の免疫反応のアッセイ法。

【請求項3】 免疫細胞が、肥満細胞、好塩基球、好酸球、T細胞又はB細胞であり、免疫細胞を抗原と反応させることにより活性化する請求項2記載の免疫反応のアッセイ法。

【請求項4】 免疫細胞が肥満細胞又は好塩基球であり、免疫細胞に前記抗原をIgE抗体を介して反応させることにより活性化する請求項3記載の免疫反応のアッセイ法。

【請求項5】 免疫細胞が抗原で感作されたT細胞である請求項3記載の免疫反応のアッセイ法。

【請求項6】 抗原がアレルゲンである請求項4記載の免疫反応のアッセイ法。

【請求項7】 抗原が感染症抗原、自己抗原又はワクチン抗原から選ばれる請求項1～3のいずれか一項に記載の免疫反応のアッセイ法。

【請求項8】 活性酸素種がスーパーオキシドアニオン、一重項酸素又はヒドロキシルラジカルから選ばれる請求項1～7のいずれか一項に記載の免疫反応のアッセイ法。

【請求項9】 被検者の皮膚又は被検試料に抗原を投与し、発生する活性酸素種を測定し、その活性酸素種の量を指標として免疫細胞による免疫反応が関与する疾患の罹患、又はワクチン抗原に対する免疫の成立を判定することを特徴とする免疫学的判定法。

【請求項10】 免疫細胞による免疫反応が関与する疾患の罹患、又はワクチン抗原に対する免疫の成立を判定するためのアッセイキットであって、前記免疫細胞による免疫反応に対応する抗原と、活性酸素種を検出するための試薬とを含むアッセイキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は免疫反応のアッセイ法、アレルギー、感染症または自己免疫疾患の罹患、又はワクチン抗原に対する免疫の成立を判定するための免疫学的判定法及びアッセイキットに関する。本発明の方法及びアッセイキットは、診断薬及び臨床検査等の分野において有用である。

【0002】

【従来の技術】免疫反応は、生体の防御機構として重要な役割を担っているが、過剰な、あるいは異常な免疫反応は、アレルギーや自己免疫疾患などの原因ともなる。

これらの免疫疾患の診断において、原因抗原の同定が重要である。抗原の同定は、抗原に対する抗体の検出によって行われることが多い。しかしながら、例えばT細胞による細胞免疫反応のように、抗体が関与しない免疫反応もあり、抗体の検出では診断できない場合もある。

【0003】アレルギーは、I型～IV型の4つのタイプに分類される。I型(即時型)アレルギーは、肥満細胞(マストセル)、好塩基球などのエフェクター細胞の活性化と、それによるヒスタミン等の化学伝達物質の放出により引き起こされる。エフェクター細胞は、それらの細胞上に発現しているIgEレセプターに抗原(アレルゲン)特異的IgE抗体が結合し、このIgE分子間に抗原がブリッジ状に結合することによって活性化される。このような機序により、I型アレルギーの診断はアレルゲン特異的IgE抗体の検出によって行われている。しかしながら、ときに高いIgE抗体価を持ちながら臨床症状が軽い例や、IgE抗体価が低いにもかかわらず重い臨床症状を示す例が認められる。

【0004】II型アレルギーは、生体自身の細胞や組織に結合した抗体が補体系を活性化することにより標的細胞に障害を与えるものであり、III型アレルギーは、生体内で生じた抗原-抗体複合体が組織細胞に沈着し、補体系を活性化させるために惹起されるものであって、いずれも抗原に結合した抗体(主にIgG、IgM)が関与している。

【0005】一方、IV型アレルギーは、抗原により感作されたT細胞と抗原との反応によりサイトカインが放出され、それによってマクロファージが活性化されて炎症反応が引き起こされるものであり、抗体は関与しない。

【0006】上記のタイプのうち、I型～III型アレルギーはいずれも抗原特異的な抗体が関与しているため、その診断に抗体の検出が有効である。しかし、IV型アレルギーは抗体が関与していないため、原因抗原の検出が困難であり、現在のところ精度の良いイン・ビトロ検査法は知られていない。また、イン・ビボ法では、負荷誘発試験が有効であるが、症状の重い例では危険を伴う。特に、薬剤アレルギーや金属アレルギー等は、II型、III型又はIV型アレルギーの機序による場合も多く、診断が困難である。

【0007】また、感染症の診断においては、感染抗原に対する抗体の検出が行われることが多い。しかしながら、検出可能な量の抗体が産生されるまでには、感染から数週間程度の期間を要するため、感染初期の診断は困難である。

【0008】感染症の予防として行われるワクチン接種の効果判定には、感染抗原に対する抗体の検出が行われる。しかしながら、感作T細胞による免疫反応のように、抗体を介さない免疫反応も存在するため、抗体量が必ずしも感染原に対する免疫反応の強さを反映するとはいえない。

【0009】ところで、最近、細胞内酸化還元(レドックス)環境が細胞のシグナル伝達に影響を与えること、及び、T細胞のアポトーシスシグナルの過程において活性酸素種が産生され、シグナル伝達のメディエータとして働くことがわかってきた(鈴木、生化学、69(3)、p187-191、1997)。しかしながら、活性化された免疫細胞が産生する活性酸素種を、免疫反応の有無又は強度の指標とし得ることは知られていない。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題の一つは、簡便かつ迅速に免疫反応の有無及び強度を測定することができる方法を提供することである。また、本発明の他の課題は、抗体の関与の有無に拘わらず、免疫反応の有無及び強度を測定することができる方法を提供することである。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者は、活性酸素種産生抑制剤により、エフェクター細胞のヒスタミン遊離が抑制されること、及び、エフェクター細胞の免疫反応によって活性酸素種が産生されることを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち本発明は、以下のとおりである。

【0012】(1)免疫細胞が関与する免疫反応の有無の検出又は強度の測定のための免疫反応のアッセイ法であって、活性化した免疫細胞が産生する活性酸素種を測定することを特徴とする免疫反応のアッセイ法。

(2)免疫細胞が、肥満細胞、好塩基球、好酸球、好中球、T細胞、B細胞、単球又はマクロファージの少なくとも1つから選択される(1)の免疫反応のアッセイ法。

(3)免疫細胞が、肥満細胞、好塩基球、好酸球、T細胞又はB細胞であり、免疫細胞を抗原と反応させることにより活性化する(2)の免疫反応のアッセイ法。

(4)免疫細胞が肥満細胞又は好塩基球であり、免疫細胞に前記抗原をIgE抗体を介して反応させることにより活性化する(3)の免疫反応のアッセイ法。

(5)免疫細胞が抗原で感作されたT細胞である(3)の免疫反応のアッセイ法。

【0013】(6)抗原がアレルゲンである(4)の免疫反応のアッセイ法。

(7)抗原が感染症抗原、自己抗原又はワクチン抗原から選ばれる前記(1)~(3)のいずれかの免疫反応のアッセイ法。

(8)活性酸素種がスーパーオキシドアニオン、一重項酸素又はヒドロキシルラジカルから選ばれる(1)~

(7)のいずれかの免疫反応のアッセイ法。

(9)被検者の皮膚又は被検試料に抗原を投与し、発生する活性酸素種を測定し、その活性酸素種の量を指標として免疫細胞による免疫反応が関与する疾患の罹患、又はワクチン抗原に対する免疫の成立を判定することを特

徴とする免疫学的判定法。

(10)免疫細胞による免疫反応が関与する疾患の罹患、又はワクチン抗原に対する免疫の成立を判定するためのアッセイキットであって、前記免疫細胞による免疫反応に対応する抗原と、活性酸素種を検出するための試薬とを含むアッセイキット。

【0014】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明のアッセイ法は、免疫細胞が関与する免疫反応の有無の検出又は強度の測定のための方法であって、活性化した免疫細胞が産生する活性酸素種を測定することを含む。

【0015】前記免疫細胞としては、免疫反応に関与する細胞であれば特に制限されず、具体的には肥満細胞、好塩基球、好酸球、好中球、T細胞、B細胞、単球及びマクロファージが挙げられる。本発明において免疫反応とは、免疫細胞が抗原と直接又は間接的に相互作用することによって惹起される反応をいう。

【0016】本発明の方法は、免疫細胞が関与する免疫反応の研究において有用なツールとなり得る。また、臨床的診断の手段として、免疫細胞による免疫反応が関与する疾患、又はワクチン抗原に対する免疫の成立の判定等に利用され得る。具体的には、例えば、被検者の皮膚又は血球に抗原を投与し、発生する活性酸素種を測定し、その活性酸素種の量を指標として、免疫反応が関与する疾患の罹患、又はワクチン抗原に対する免疫の成立を判定することができる。

【0017】前記免疫反応が関与する疾患としては、喘息、じん麻疹、アレルギー性鼻炎、花粉症、薬剤アレルギー、金属アレルギー等のアレルギー；全身性エリトマトーデス、慢性関節リウマチ、同種移植片拒絶、自己免疫性溶血性貧血、橋本病、パセドウ病等の自己免疫疾患；糸球体腎炎、脊髄炎、脳炎等の、細菌、真菌又はウイルスの感染による感染症等が挙げられる。

【0018】また、ワクチンとしては、種痘、狂犬病、ジフテリア、百日咳、黄熱病、コレラ、結核BCG、ポリオ、日本脳炎、インフルエンザ、麻疹、風疹、ムンプス、A型肝炎、B型肝炎、水痘、肺炎球菌など、従来使用されているワクチンに加えて、サイトメガロウイルス、単純ヘルペス、RSウイルス、ロタウイルス、成人T細胞白血病、AIDS(後天性免疫不全症候群)、マラリア、腎症候熱、髄膜炎、C型肝炎等、開発中又は将来開発される疾患に対するワクチンが含まれる。

【0019】疾患の罹患又はワクチン抗原に対する免疫の成立の判定に用いる被検試料としては、免疫細胞を含む組織、例えば血液、病理組織等が挙げられる。血液は、ヘパリンやEDTA(エチレンジアミン四酢酸ナトリウム)などの抗凝固剤を添加することが望ましい。さらに好ましくは、赤球血球を取り除くとよい。赤球の除去には、血液細胞分離用の密度勾配溶液を用いるとよ

い。また、血液細胞分離用の密度勾配溶液を用いて目的の免疫細胞を分離してもよい。血液細胞分離用の密度勾配溶液は、市販のものを用いればよく、例えばオプティブレップ(ライフテックオリエンタル社)が挙げられる。血液細胞を分離する場合は、得られた細胞をPBS(リン酸緩衝生理塩溶液)等の緩衝生理塩溶液、細胞培養用培地、又は被検者の血清等に懸濁する。病理組織を用いる場合は、これを細切し、PBS等の緩衝生理塩溶液、細胞培養用培地、又は被検者の血清等に懸濁する。

【0020】被検対象が、I型アレルギーの場合には、上記のようにして調製した被検試料に対応する抗原(アレルゲン)を加えると、該抗原に特異的なIgEが免疫細胞上のFcレセプターに結合しており、これに前記抗原が結合する。そして前記免疫細胞が活性化されて免疫反応が惹起され、活性酸素種が産生される。したがって、この活性酸素種を検出することにより、免疫反応を検出することができる。また、活性酸素種の量を測定することにより、免疫反応の強度を測定することができる。一方、試料に加えた抗原が疾患に対応していない場合には、免疫反応が惹起されないため、活性酸素種は産生されない。

【0021】被検対象が、IV型アレルギーのように感作T細胞が関与する場合には、被検試料に抗原を加えると、抗原が抗原提示細胞に取り込まれ、抗原提示細胞上の主要組織適合性抗原複合体(MHC)を介して、抗原感作T細胞に抗原を提示することで免疫反応が惹起され、活性酸素が産生される。この場合には、試料にはT細胞とともに抗原提示細胞となるB細胞や単球が含まれることが必要である。

【0022】また、II型、III型アレルギーの場合には、被検試料にアレルゲンを加えると、アレルゲンと該アレルゲン特異抗体が結合し、このアレルゲン-抗体複合体を認識した免疫細胞が活性化することによって免疫反応が惹起され、活性酸素種が産生される。

【0023】他の疾患の罹患の判定、又はワクチン抗原に対する免疫の成立の判定の場合も、上記のいずれかと同様であり、抗原として感染症抗原、自己抗原又はワクチン抗原を用いる。

【0024】前記活性酸素種としては、スーパーオキシドアニオン、一重項酸素又はヒドロキシルラジカルが挙げられる。活性酸素種を測定する方法としては、例えば、活性酸素種の酸化により発光する性質のある物質(活性酸素増感剤、例えばルミノール、ルシフェリン、ルシゲニン等)を添加し、この活性酸素増感剤の発光強度を測定する方法が挙げられる。発光強度の測定方法は、一般に市販されているルミノメーターを用いればよく、例えばLumat LB 9507(BERTHOLD社)が挙げられる。

【0025】上記のようにして、抗原の添加等によって免疫反応を惹起したときに測定される発光強度を、免疫

反応を惹起しないときの発光強度と比較することによって、免疫反応の有無又は強度を測定することができる。

【0026】また本発明の方法は、被検者の皮膚を用いて、イン・ビトロで行うこともできる。例えば、活性酸素増感剤と抗原をろ紙、スポンジ等にしみ込ませ、これを被検者の皮膚に貼付する。1~10分後これを剥がし、PBS等の緩衝液に入れてすばやく抽出し、この抽出液の発光強度をルミノメーターで測定する。抗原を添加しない条件で同様の実験を行い発光強度を測定する。また、ろ紙、スポンジ等を皮膚より剥がした後、X線フィルムと接触させ、該X線フィルムを発光で感光させることで、発光強度を測ることもできる。抗原添加の有無での発光強度差により、該抗原による免疫細胞の活性化の有無及び強さを判断することができる。

【0027】本発明の方法を実施するために必要な試薬を、キットとして提供することもできる。そのようなキットは、例えば、免疫細胞による免疫反応に対応する抗原と、活性酸素種を検出するための試薬を含む。

【0028】【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

【0029】<1>RBL-2H3細胞のヒスタミン遊離に対する活性酸素種産生阻害剤の効果

ラット好塩基球由来の細胞株RBL-2H3を、1 μ g/mLの抗ジニトロフェニル(DNP)IgE抗体(シグマ社製)を含む10%FCS-DMEM(10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル最少培地)に、2 \times 10⁵個/mLの濃度に懸濁した。24穴培養プレートにそれぞれ1穴あたり1mL添加し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂で一晩培養した。培地を除去し、細胞をPBSで洗浄し、各種濃度の活性酸素種産生抑制剤であるジフェニルヨードニウム(DPI、BioMol社)を含む20mM HEPES-DMEM(20mM HEPESを含むDMEM培地)を1穴あたり180 μ L添加した。37 $^{\circ}$ C、5%CO₂で30分培養後、10 μ g/mLのDNP-BSA(DNP結合ウシ血清アルブミン(Calbiochem-Novabiochem社から入手)を含む20mM HEPES-DMEMを、1穴あたり20 μ L添加した。さらに、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂で30分培養後、培養上清を回収し、ヒスタミン量を市販のELISAキット(ICN社製)にて測定した。

【0030】非刺激条件下でのヒスタミン遊離量を自然遊離量(N)とし、細胞を1穴あたり200 μ Lの0.05%Triton X-100を加えて溶解して得た細胞溶解液のヒスタミン量を細胞含有総ヒスタミン量(T)とし、抗原(DNP)による刺激条件下でのヒスタミン量を(S)として、総ヒスタミンに対する検体のヒスタミン遊離の割合(%)を次式により算出した。結果を表1に示す。

【0031】

【数1】

$$\text{ヒスタミン遊離 (\%)} = \left(\frac{S - N}{T - N} \right) \times 100$$

【0032】

表1

【表

DPI (μM)	ヒスタミン遊離 (%)
0	52.4
25	29.0
50	20.1
100	9.2
200	9.2

【0033】上記の結果から、活性酸素種産生抑制剤DPIにより、RBL-2H3細胞のヒスタミン遊離が抑制されたことがわかる。

【0034】<2>RBL-2H3細胞のIgE抗体と抗原刺激による活性酸素種の産生RBL-2H3細胞を、10cm培養シャーレ(コーニング社)で80%コンフルエント状態まで培養した。さらに、抗DNP IgE抗体を1μg/mLになるように添加し、37、5%CO₂で一晩培養した。培地を除去し、細胞を0.5mMEDTAPBSで洗浄後、細胞剥離用Trypsin-EDTA溶液(ライフテック オリエンタル社)をシャーレー一枚あたり3mL添加した。37で5分培養して細胞をシャーレから剥離した後、FCSを0.5mL添加してトリプシンの反応を停止させ、細胞をプラスチック遠沈管に回収した。

【0035】前記細胞をPBSで洗浄し、ハンクス液(HBSS、ライフテック オリエンタル社)に10⁷個/mLの濃度に懸濁した。プラスチック試験管(75×12mm、SARSTEDT社)に細胞懸濁液を0.1mLとり、10mMルミノール(シグマ社)を0.1mL、50U/mL西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP、シグマ社)を25μL添加した。試験管をルミノメータ(Lumat LB9507、BERTHOLD社)にセットして発光を検出し、続いて10μg/mL DNP-BSAを25μL添加して、発光を検出した。さらに50U/mLスーパーオキシドディスムターゼ(SOD、シグマ社)を25μL添加し、発光を検出した。結果を図1に示す。

*【0036】図1に示す通り、抗原(DNP)の添加により発光が増加し、SODの添加によって発光が消失したことから、RBL-2H3細胞がIgE抗体と抗原の刺激によって活性酸素種を産生したことは明らかである。

【0037】<3>アレルギー患者末梢血白血球のアレルゲン刺激による活性酸素種の産生ダニアレルギー患者の肘静脈よりヘパリン含有真空採血管(VECTAINER、Becton Dickinson社)を用いて末梢血を採取した。室温にて30分静置後、血液の25%量の5%デキストランを加え攪拌した。室温にて90分静置後、上層の白血球画分を分取し、これを400×g、15分遠心分離した。上清を捨て、沈殿の細胞に当初の血液の50%量のハンクス液(HBSS、ライフテック オリエンタル社)を加え懸濁した。プラスチック試験管(75×12mm、SARSTEDT社)に細胞懸濁液を50μLとり、5mMルシゲニン(シグマ社)を50μL、ハンクス液(HBSS、ライフテック オリエンタル社)を100μL添加した。試験管をルミノメータ(Lumat LB9507、BERTHOLD社)にセットして発光を検出し、続いてダニ抗原(Dermatophagoides pteronyssinus由来、GREER社)タンパク質濃度5μg/mLを50μL添加して、発光を検出した。結果を図2に示す。図2に示す通りアレルゲンの添加によってアレルギー患者末梢血白血球から活性酸素種が産生されることがわかる。

【0038】

【発明の効果】本発明の方法又はキットを用いることにより、免疫反応を簡便かつ迅速に測定することができる。また、本発明により、簡便かつ迅速に、免疫細胞による免疫反応が関与する疾患の罹患、又はワクチン抗原に対する免疫の成立を判定することができる。

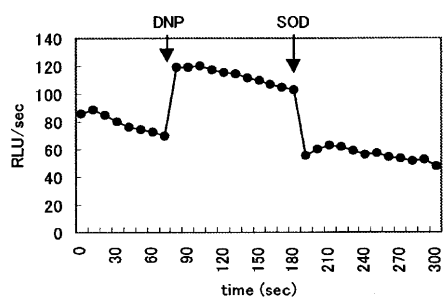
【図面の簡単な説明】

【図1】 RBL-2H3細胞の活性化による活性酸素種の産生を示す図。横軸は時間を、縦軸は発光強度(RLU:Relative Light Unit、1RLU=10フォトン)を示す。

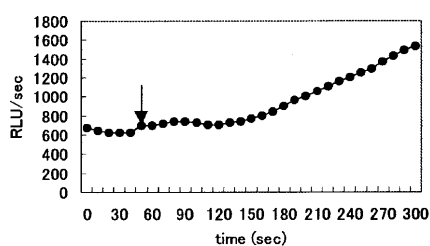
【図2】 アレルギー患者白血球のアレルゲン刺激による活性酸素種の産生を示す図である。横軸は時間を、縦軸は発光強度を示す。

*

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷
G 0 1 N 33/84

識別記号

F I
G 0 1 N 33/84

テ-マコ-ド (参考)
Z

(72) 発明者 小野 魁
東京都小平市学園西町 3 - 1 - 26

F タ-ム (参考) 2G045 AA25 CA12 CA15 CA16 CA17
CA18 CA19 CA20 CB09 DB30
FB03 FB14 GC15

专利名称(译)	免疫反应的测定方法，免疫学测定方法和测定试剂盒		
公开(公告)号	JP2001215224A	公开(公告)日	2001-08-10
申请号	JP2000325518	申请日	2000-10-25
[标]申请(专利权)人(译)	日立化成工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	日立化成工业株式会社		
[标]发明人	松井隆 山下耕平 鈴木良弘 小野魁		
发明人	松井隆 山下耕平 鈴木良弘 小野魁		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/50 G01N33/84		
FI分类号	G01N33/53.K G01N33/53.Q G01N33/53.Y G01N33/50.K G01N33/50.Q G01N33/84.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA12 2G045/CA15 2G045/CA16 2G045/CA17 2G045/CA18 2G045/CA19 2G045/CA20 2G045/CB09 2G045/DB30 2G045/FB03 2G045/FB14 2G045/GC15		
优先权	1999334129 1999-11-25 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种能够简单快速地测量免疫反应的存在与否及其强度的方法，免疫学测定方法和测定试剂盒。 解决方案：通过检测这些免疫细胞的强度，可以检测出是否存在涉及免疫细胞的免疫反应，例如肥大细胞，嗜碱性粒细胞，嗜酸性粒细胞，嗜中性粒细胞，T细胞，B细胞，单核细胞或巨噬细胞。 通过活化时产生的活性氧的强度来测量。

