

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4213613号
(P4213613)

(45) 発行日 平成21年1月21日(2009.1.21)

(24) 登録日 平成20年11月7日(2008.11.7)

(51) Int.Cl.		F 1	
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 A
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q 1/02

請求項の数 4 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2004-92536 (P2004-92536)	(73) 特許権者	000003078 株式会社東芝 東京都港区芝浦一丁目1番1号
(22) 出願日	平成16年3月26日(2004.3.26)	(74) 代理人	100058479 弁理士 鈴江 武彦
(65) 公開番号	特開2005-270069 (P2005-270069A)	(74) 代理人	100091351 弁理士 河野 哲
(43) 公開日	平成17年10月6日(2005.10.6)	(74) 代理人	100088683 弁理士 中村 誠
審査請求日	平成17年2月9日(2005.2.9)	(74) 代理人	100108855 弁理士 蔵田 昌俊
		(74) 代理人	100084618 弁理士 村松 貞男
		(74) 代理人	100092196 弁理士 橋本 良郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫影響検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被検物質の免疫系に及ぼす影響を検出する免疫影響検出方法であって、
前記被検物質と免疫細胞を接触させる工程と、
前記免疫細胞に発現した、TRPV2、VR-1、配列番号1で表されるヌクレオチドによりコードされるタンパク質および配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質からなる群より選択されるパニロイド受容体ファミリーのタンパク質をコードする遺伝子から転写されたmRNAを検出する工程と、
を含むことを特徴とする免疫影響検出方法。

【請求項 2】

被検物質の免疫系に及ぼす影響を検出する免疫影響検出方法であって、
前記被検物質と免疫細胞を接触させる工程と、
前記免疫細胞に発現した、TRPV2、VR-1、配列番号1で表されるヌクレオチドによりコードされるタンパク質および配列番号2で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質からなる群より選択されるパニロイド受容体ファミリーのタンパク質を検出する工程と、
を含む免疫影響検出方法。

【請求項 3】

前記被検物質は、内分泌攪乱物質PAHであることを特徴とする請求項1又は2に記載の免疫影響検出方法。

【請求項 4】

前記被検物質は、ダイオキシンまたはダイオキシン異性体であることを特徴とする請求項1又は2に記載の免疫影響検出方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、被検物質が免疫系に及ぼす影響を検出するための方法およびキットに関する。より詳細には、ヒトバニロイド受容体タンパク質 (vanilloid receptor-like protein; TRPV-2, VRL-1) ポリペプチド、前記ペプチドをコードするポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドプライマーまたはプローブを使用して、被検物質が免疫細胞に与える毒性を検出するための方法およびキットに関する。

10

【背景技術】

【0002】

近年、内分泌攪乱物質をはじめとする化学物質が、低濃度でも生体に悪影響を惹起することが問題になっている。それらの影響の範囲は、生殖系にとどまらず、神経系や免疫系にも及んでいる。なかでも、建築物(建材)に含まれる化学物質が原因で頭痛や喘息、時には呼吸困難から死に至るほどの過剰反応を引き起こしてしまう「化学物質過敏症」(シックハウスまたはシックスクール)、環境ホルモンと呼ばれる物質による健康障害など、国内での化学物質による免疫障害の人の割合は11.6%に達している。このような現状から、化学物質の免疫系に及ぼす影響の評価方法の構築が進められている。化学物質によるアレルギー反応の惹起に関するインビトロでの評価方法については、いくつかの試験方法が

20

【0003】

Jurkat T細胞は、ヒトTリンパ球由来の培養細胞であり、容易にアポトーシスを引き起こすことが知られている。ダイオキシン(2,3,7,8-TCDD)は、インビボにおいて、胸腺退縮など免疫毒性を示す内分泌攪乱物質であることが知られている。また、2,3,7,8-TCDDは、Jurkat T細胞への暴露によってアポトーシスを引き起こすことや、生存率を低下させることが知られており(非特許文献1、5)、アレルギーなどの免疫応答に関わるHRF遺伝子の発現量が増大させることが知られている(非特許文献2)。このため、免疫毒性モデルのひとつとなっている。したがって、HRF以外にも、免疫毒性を有する内分泌攪乱物質を感作させることによって発現量が著しく増大する物質が同定できたとすれば、該物質を指標に内分泌攪乱物質の免疫毒性を検出することが可能であろう。

30

【0004】

一方、バニロイド受容体またはバニロイド受容体様タンパク質は、イオンチャネルファミリーに属するポリペプチドであると考えられておる。これらのタンパク質は、バニロイド化合物(カプサイシンなど)や温度刺激などの有害な刺激に対する情報を中枢神経系に伝える機能を持つ感覚ニューロンを選択的に活性化することが明らかとなっており、痛覚の発生に關与することが示されている(非特許文献3、4)。バニロイド受容体またはバニロイド受容体様タンパク質をコードするいくつかのポリヌクレオチドが同定され、クローニングされている(非特許文献3)。バニロイド受容体ポリペプチドおよび該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、開示されている(特許文献1および2)。これらの文献では、バニロイド受容体またはバニロイド受容体タンパク質は、痛覚の発生に關与しているという機能に基づいた知見を得ている。

40

【特許文献1】国際公開第99/37675号パンフレット

【特許文献2】米国特許第6,335,180号

【非特許文献1】Hossain A. et.al. J. Biol. Chem. 273 19853-19858 (1998)

【非特許文献2】Oikawa K. et.al. Biochem. Biophysica. Res. Commun. 290 984-987 (2002)

50

【非特許文献3】Caterina MJ. Et.al. Nature 389 816-824 (1997)

【非特許文献4】Caterina MJ. Etal Nature 398 436-441 (1999)

【非特許文献5】Myung-Ja Kwon et.al. Pharmacology and Toxicology 93 186-190 (2003)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、パニロイド受容体、パニロイド受容体様タンパク質およびそれらをコードするヌクレオチド、または、配列番号2で表されるポリペプチドおよび配列番号1で表されるポリヌクレオチドの発現量の増加を指標として、被検物質の免疫毒性の有無を判定することを目的とする。

10

【課題を解決するための手段】

【0006】

上記問題を解決すべく鋭意研究の結果、免疫細胞において、ダイオキシン(2,3,7,8-TCDD)刺激によってパニロイド受容体をコードするmRNAの転写量が変化するという知見を得ることに成功し、本発明を完成するに至った。

【0007】

すなわち、本発明は、被検物質の免疫系に及ぼす影響を検出する免疫影響検出方法であって、前記被検物質と免疫細胞を接触させる工程と、前記免疫細胞に発現したパニロイド受容体ファミリーのタンパク質をコードする遺伝子から転写されたmRNAを検出する工程とを含むことを特徴とする免疫影響検出方法を提供する。

20

【0008】

また、被検物質の免疫系に及ぼす影響を検出する免疫影響検出方法であって、前記被検物質と免疫細胞を接触させる工程と、前記免疫細胞に発現したパニロイド受容体ファミリーのタンパク質を検出する工程とを含む方法を提供する。

【0009】

さらに、本発明は、上記免疫影響検出方法であって、前記被検物質が、内分泌攪乱物質PAHまたはダイオキシンもしくはダイオキシン異性体である免疫影響検出方法を提供する。

【0010】

さらに、本発明は、上記免疫影響検出方法であって、前記パニロイド受容体ファミリーのタンパク質がTRPV2またはVR-1である免疫影響検出方法を提供する。

30

【0011】

さらに、本発明は、上記免疫影響検出方法であって、前記パニロイド受容体ファミリーのタンパク質が配列番号1で表されるヌクレオチドにによってコードされるタンパク質、または配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質である免疫影響検出方法を提供する。

【0012】

また、本発明は、パニロイド受容体ファミリーのタンパク質をコードするポリヌクレオチドを検出するためのプローブを支持体表面に配列してなることを特徴とする免疫影響検出用アレイを提供する。

40

【0013】

さらに、本発明は、パニロイド受容体ファミリーのタンパク質をコードするポリヌクレオチドを検出するためのプローブとパニロイド受容体ファミリーのタンパク質に対する抗体とを支持体表面に配列してなることを特徴とする免疫影響検出用μTASを提供する。

【発明の効果】

【0014】

上述のように、本発明によれば、被験物質の免疫毒性の有無を容易に検出することが可能になる。免疫細胞におけるパニロイド受容体またはパニロイド受容体様タンパク質、およびそれらをコードするヌクレオチドを検出することによって、被験物質の免疫毒性を検

50

出すことが可能になる。したがって、被験物質が、シックハウスなどのアレルギー症状の原因物質となる可能性があるかどうかの判定や、新規材料の毒性判定を行うことができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

本発明は、上述のとおり、免疫細胞において、ダイオキシン(2,3,7,8-TCDD)刺激によってパニロイド受容体をコードするmRNAの転写量が変化するという知見に基づいている。すなわち、本発明は、被検物質が、免疫系に影響を及ぼす物質である場合には、該被検物質に暴露された免疫細胞においてパニロイド受容体をコードするmRNAの転写が促進されることを利用した方法である。

10

【0016】

本発明の1つの態様において、パニロイド受容体ファミリーのタンパク質をコードするmRNAの検出を利用した方法について説明する。

【0017】

ここで、パニロイド受容体ファミリーのタンパク質は、本明細書において使用されるものとして、TRPV-2、VR-1、配列番号2で表されるポリペプチドなどのパニロイド受容体もしくはパニロイド受容体様タンパク質、並びにこれらの断片を含む。また、パニロイド受容体ファミリーのタンパク質をコードするヌクレオチドまたはポリヌクレオチド(たとえば、mRNAは、上記TRPV-2、VR-1、配列番号2で表されるポリペプチドなどのパニロイド受容体ファミリーのタンパク質をコードするポリヌクレオチド、および配列番号1で表されるポリヌクレオチド、並びにこれらの断片を含む。さらに、パニロイド受容体ファミリーのタンパク質は、いずれの種に由来するものであってもよいが、ヒトに由来するものが好ましい。

20

【0018】

a) 免疫細胞への被験物質の暴露

本発明の方法では、まず被検物質と免疫系の細胞(免疫細胞、免疫担当細胞とも称する)を接触させる。このような接触は、たとえば以下のように行うことができる。まず、血清を含む培地中において、免疫細胞を培養しておく。免疫細胞としては、たとえば、ヒトの白血球T細胞株化細胞などのT細胞、B細胞、マクロファージ、およびその他当業者に既知の種々の免疫細胞を使用することができる。また、培養条件は、使用する細胞に適した培地において適切な条件下で培養することが好ましい。

30

【0019】

免疫系に及ぼす影響を検出するための被検物質は、任意の物質であってよいが、たとえば、免疫系に影響を及ぼすことが明らかな被検物質として、ダイオキシン(2,3,7,8-TCDD; 2,3,7,8-tetrachloro dibenzo dioxin)およびダイオキシン異性体(たとえば1-MCDD(1-monochloro dibenzo dioxin)、1,2,3,7,8-PeCDD(1,2,3,7,8-pentachloro dibenzo dioxin))が挙げられる。また、被検物質は、純粋なものである必要はなく、たとえば任意の組成物または混合物であってよく、また精製されていない粗製物であってよい。また、被検物質は、固体、液体、および気体などのいずれの形態であってよい。

【0020】

続いて、上記免疫細胞と、被験物質を接触させる。接触は、たとえば免疫細胞を含む培養液中に被検物質を添加することによって行うことができる。添加後、免疫系の細胞を被検物質と接触させるために十分な時間インキュベートする。さらに、パニロイド受容体ファミリーのタンパク質をコードする遺伝子を転写させるために十分な時間インキュベートすることが好ましい。たとえば、1時間、3時間、6時間、24時間程度培養すればよい。このような接触のために必要な時間、並びに転写および翻訳のために必要な時間は、当業者であれば容易に見出すことができるであろう。

40

【0021】

また、本方法において、対照試料として、被検物質を添加せずに同様の実験を同時に行った免疫細胞を準備することが好ましい。たとえば、同一条件で同時に培養を行い、一方

50

には被検物質を添加し、他方を対照試料として被検物質を添加せずに培養しておく。

【0022】

b) 転写産物の分離

次いで、上記処理を行った免疫細胞において、パニロイド受容体ファミリーのタンパク質をコードする遺伝子から転写されたmRNAを検出する。mRNAを検出するためには、上記培養液から免疫細胞を回収し、RNAの単離をおこなう。RNAの単離は、当業者に既知のいずれの方法を使用して行ってもよく、たとえば、アルカリ法によって、またはグアニジンイソチオシアネートを用いた変性とセシウム溶液を用いた密度勾配超遠心によって総RNAを単離することができる。

【0023】

c) 被験物質物質の免疫細胞毒性の検出

上記b)で得られたRNAにおいて、パニロイド受容体もしくはパニロイド受容体様タンパク質をコードするmRNA、または配列番号1で表されるmRNAの転写量を検出する。転写量は、当業者に既知のいずれの方法を使用して検出してもよいが、たとえば得られたRNAからのRT-PCRによってパニロイド受容体ファミリーのタンパク質をコードするcDNAを増幅し、増幅産物を電気泳動することによって定量してもよく、またハイブリダイゼーションを利用して検出することもできる。また、パニロイド受容体ファミリーのタンパク質をコードするmRNAの検出は、その全長を検出してもよく、またはその一部のヌクレオチド断片を検出してもよい。ハイブリダイゼーションを利用して検出する場合、パニロイド受容体ファミリータンパク質をコードするポリヌクレオチドと相補的な配列を有するプローブを使用して検出することができる。このようなプローブは、当業者であれば容易に作成することができるであろう。また、このようなプローブを配置した装置を使用することによって容易に検出および定量することができる。このような装置としては、例えば、ガラス、石英、ポリマー、金属など、任意の材料からなる支持体上に複数のプローブのみを配列して固定したマイクロアレイ型デバイス、またはプローブのみならずパニロイド受容体ファミリーのタンパク質に対する抗体(免疫細胞)を前述したような支持体上に固定してなる μ TAS型デバイスを具備する装置が想定される。

【0024】

続いて、被検物質を添加した免疫細胞と被検物質を添加していない免疫細胞におけるパニロイド受容体ファミリーのタンパク質をコードするmRNA転写量を比較する。被験物質を添加した免疫細胞から得られたmRNAの発現量が、被験物質を添加していない細胞から得られたmRNAの発現量よりも多かった場合は、被検物質によってmRNAの転写が促進されていることが考えられ、従って該被験物質は、免疫系に影響を及ぼす物質であると判定される。

【0025】

次に、本発明のもう1つの態様において、パニロイド受容体ファミリータンパク質の検出を利用した方法について説明する。

【0026】

mRNAの検出と同様に、免疫細胞への被験物質の暴露を行う。上記a)と同様の処理を行えばよい。

【0027】

d) タンパク質の分離

上記処理を行った後、免疫細胞において翻訳され、発現されたパニロイド受容体ファミリーのタンパク質を検出する。上記a)で得られた免疫細胞を含む培養液から培養した細胞を回収し、タンパク質の抽出を行う。タンパク質の抽出は、当業者に既知のいずれの方法を使用して行うこともできる。たとえば、遠心分離によって沈殿させた細胞を、ホモジナイザーまたは超音波破砕機によって破砕し、タンパク質抽出液を得る。あるいは、遠心分離によって沈殿させた細胞を変性剤、たとえばSDSもしくはメルカプトエタノールで処理することにより、または尿素を含む変性溶液で処理することにより、タンパク質抽出液を得る。

【0028】

e) 被験物質の免疫細胞毒性の検出

上記d) で得られたタンパク質抽出液において、バニロイド受容体ファミリーのタンパク質または配列番号2で表されるポリペプチドもしくはその一部を検出する。翻訳されたタンパク質の量および発現されたタンパク質の量は、当業者に既知のいずれの方法を使用して検出してもよいが、たとえばバニロイド受容体またはバニロイド受容体様タンパク質に対する抗体を使用した免疫学的方法を使用して定量することもできる。

【0029】

以下、抗体を使用した方法の概要を説明する。

【0030】

1) 抗体の作製

本方法に使用する抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれであってもよく、市販されていれば、それを使用することもできる。また、バニロイド受容体ファミリーのタンパク質または配列番号2で表されるペプチドの全長もしくは一部のペプチド断片に対する抗体を作製してもよい。

【0031】

たとえば、組換えタンパク質を使用して、当業者に既知の方法によって抗体を得ることができる。簡単には、バニロイド受容体もしくはバニロイド受容体様タンパク質をコードするヌクレオチド、または配列番号1で表されるポリヌクレオチドの全長もしくは一部のヌクレオチド断片を組み込んだ発現ベクターを作製する。組み込んだ断片の末端には、たとえばV5などのタグをつけておいてもよい。作製した発現ベクターを大腸菌などの細菌細胞または動物細胞などに形質転換し、細胞内に組換えタンパク質を発現させて、バニロイド受容体もしくはバニロイド受容体様タンパク質、または配列番号2で表されるペプチドの全長もしくは一部のペプチド断片を生産させこれらを回収する。回収は、たとえばタグによるカラム処理によって行うことができる。回収した組換えタンパク質等を、常法に従って、マウス、ラット、およびウサギなどの動物に免疫し、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を作製することができる。

【0032】

2) 発現されたタンパク質量の定量

次いで、上記d) で得られたタンパク質抽出液において、バニロイド受容体ファミリータンパク質に特異的な抗体を使用して、該タンパク質の発現量を検出する。たとえば、ELISA法またはイムノブロット法などの当業者に既知のいずれの方法によって検出することもできるが、これらに限定されない。たとえば、イムノブロット法では、上記d) で得られたタンパク質抽出液をSDS-PAGEで分離し、これらをPVDF膜などに転写して、対応するタンパク質に特異的な抗体、たとえば、上記1) のように作製した抗体を使用して検出し、さらにデンストメトリーなどによって定量することができる。

【0033】

タンパク質およびポリペプチドの検出には、上記1) で得られた抗体などのモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を配置した装置を使用することによって容易に検出および定量することができる。このような装置としては、上記抗体類のみが固定されたマイクロアレイ型デバイス、または抗体類のみならず免疫細胞も含む μ TAS型デバイスを具備する装置が想定される。

【0034】

続いて、被検物質を添加した免疫細胞と被検物質を添加していない免疫細胞におけるバニロイド受容体ファミリーのタンパク質の量を比較する。被験物質を添加した免疫細胞から得られたタンパク質の発現量が、被験物質を添加していない細胞から得られたタンパク質の発現量よりも多かった場合は、被検物質によってタンパク質の翻訳が促進されていることが考えられ、従って該被験物質は、免疫系に影響を及ぼす物質であると判定される。

【0035】

さらに、本発明のもう1つの態様において、上記方法を実施するためのキットが提供される。

10

20

30

40

50

【0036】

本キットは、上記パニロイド受容体ファミリーのタンパク質をコードするポリヌクレオチドを検出するためのプローブを含むことを特徴とする。また、該プローブは、プローブのみを含むマイクロアレイ型デバイス、またはプローブのみならず免疫細胞も含む μ TAS型デバイスとして提供されてもよい。さらに、キットには、パニロイド受容体ファミリーのタンパク質をコードするポリヌクレオチドを増幅するためのプライマーおよび適切なバッファーなどが含まれていてもよい。

【0037】

本発明のキットを使用すれば、上記被検物質の免疫系に及ぼす影響を検出する方法を容易に実施することが可能となる。

10

【実施例1】

【0038】

<ダイオキシンの免疫影響の検出>

(1) Jurkat T細胞の培養

Jurkat T細胞は、10%牛胎児血清(FCS)を含むRPMI 1640にて、通常の培養操作によって培養をおこなった。継代は2日ごとに行い、5%CO₂雰囲気下において37℃で培養を行った

(2) ダイオキシン暴露

Jurkat T細胞を遠心にて回収し懸濁後、 5×10^5 細胞相当分を1.5mlの10% FCS-RPMI 1640培地に希釈した。1.5mlの10% FCS-RPMI 1640培地に、DMSOに溶解した2,3,7,8 - TCDDを20 nMの最終濃度になるように添加し、激しくボルテックスで攪拌する。この溶液をJurkat T細胞の希釈液とあわせて軽く混合し、全量を6穴マイクロタイタープレートにまいた。対象試料として、2,3,7,8 - TCDDを含まないDMSOのみを添加して、同様の操作をおこなった。

20

【0039】

(3) RNAの抽出

(2)にてダイオキシンを暴露した細胞を24時間培養したのち、1800rpmの遠心にて回収して、それぞれの細胞からRNAを抽出した。RNAの抽出には、RN easy (QIAGEN社製)をもちいて行った。すなわち、回収した細胞全量にメルカプトエタノールを含むRLT液350 μ lを加え、激しくボルテックスを掛けた。その後、18ゲージのニードルを5回通過させることによって、ホモジナイズした。ホモジネートに350 μ lの70%エタノールを加え、全量をRN easy mini columnに移した。10000rpmで15秒遠心後、ろ過液を除去し、700 μ lのRW 1液でカラムの洗浄を行った。続いて500 μ lのRPE液で2度洗浄を行った。洗浄液を遠心にて完全に除去した後、40 μ lのRN aseフリー水で10000rpmの遠心によって溶出した。この溶出液をRNA溶液とした。

30

【0040】

(4) TRPV2の検出

RT-PCR法を使用して、(3)で得られたRNAに対して、TRPV2 RNAの検出をおこなった。まず、(3)で得られたRNAに対して、Super scriptII (Invitrogen社製)を使用して逆転写反応を行った。すなわち、以下のように試薬を調製し、65℃において5分間の加熱変性後、氷上に1分間放置した

40

【表1】

RNA 溶液(5ng/ml)	1 μ l
ランダムヘキサマー (50ng/ml)	1 μ l
10mM dNTP 混合物	1 μ l
DEPC-水	7 μ l

【0041】

さらに、以下の試薬を混合し、25℃で2分間インキュベートした。

50

【表 2】

10xRT バッファー	2 μ l
25mM MgCl ₂	4 μ l
0.1M DTT	2 μ l
RNase OUT (RNase 阻害剤)	1 μ l

【 0 0 4 2 】

さらに、逆転写酵素 (Super script II) を1 μ l (50 unit) 添加して、以下のプログラムで反応を行った。

10

【表 3】

25°C	10 分
42°C	50 分
70°C	15 分

【 0 0 4 3 】

この溶液をcDNA溶液とし、以下のPCR反応に用いた。

【 0 0 4 4 】

PCR反応は、EX-Taq (宝酒造製) を使用して行った。すなわち、以下のように試薬を調製し、サーマルサイクラーでPCR反応を行った。

20

【表 4】

CDNA 溶液	0.5 μ l
10x バッファー	2 μ l
10mM dNTP 混合物	1.6 μ l
プライマー (F, R)	各 0.2 μ l
水	15.4 μ l
EX-Taq	0.1 μ l

30

【 0 0 4 5 】

プライマーには、以下の配列のものを用いた。

【表 5】

F	CTCTGCACATCGCCATTGAG
R	CCAGCTTCAGAGGCGTGAGAT

【 0 0 4 6 】

アニール温度は、49 で行った。

【 0 0 4 7 】

PCR産物を3.0% Nuseive3:1アガロース/TBE電気泳動によって分離し、バイオラッド社製のフルオロイメジャーによって検出した。その結果、図1のような結果が得られた。図中、y軸は任意単位を示し、x軸は添加した被検物質を示す。この結果は、ダイオキシンの影響を検出することを示す。

40

【実施例 2】

【 0 0 4 8 】

<ダイオキシンの免疫影響の検出2>

(1) Jurkat T細胞の培養

Jurkat T細胞は、10%牛胎児血清を含むRPMI 1640にて、通常の培養操作によって培養をおこなった。継代は2日ごとに行い、5%CO₂雰囲気下において37 で培養を行った。

【 0 0 4 9 】

50

(2)ダイオキシン暴露

Jurkat T細胞を遠心にて回収し懸濁後、 5×10^5 細胞相当分を1.5mlの10% FCS-RPMI 1640培地に希釈した。1.5mlの10%FCS-RPMI 1640培地に、DMSOに溶解した2,3,7,8 - TCDDを20nMの最終濃度になるように添加し、激しくボルテックスで攪拌した。この溶液をJurkat T細胞の希釈液とあわせて軽く混合し、全量を6穴マイクロタイタープレートにまいた。対象試料として、2,3,7,8 - TCDDを含まないDMSOのみを添加して、同様の操作をおこなった。

【0050】

(3)RNAの抽出

(2)にてダイオキシンを暴露した細胞を24時間培養したのち、1800rpmの遠心にて回収して、それぞれの細胞からRNAを抽出した。RNAの抽出には、RN easy (QIAGEN社製)をもちいて行った。すなわち、回収した細胞全量にメルカプトエタノールを含むRLT液350 μ lを加え、激しくボルテックスを掛けた。その後、18ゲージのニードルを5回通過させることによって、ホモジナイズした。ホモジネートに350 μ lの70%エタノールを加え、全量をRN easy mini columnに移した。10000rpmで15秒遠心後、ろ過液を除去し、700 μ lのRW1液でカラムの洗浄を行った。続いて500 μ lのRPE液で2度洗浄を行った。洗浄液を遠心にて完全に除去した後、40 μ lのRN aseフリー水で10000rpmの遠心によって溶出した。この溶出液をRNA溶液とした。

【0051】

(4)VR-1の検出

RT-PCR法を使用して、(3)で得られたRNAに対して、VR-1 RNAの検出をおこなった。まず、(3)で得られたRNAに対して、Super scriptII (Invitrogen社製)を使用して逆転写反応を行った。すなわち、以下のように試薬を調製し、65 $^{\circ}$ Cにおいて5分間の加熱変性後、氷上に1分間放置した

【表6】

RNA 溶液 (5ng/ml)	1 μ l
ランダムヘキサマー (50ng/ml)	1 μ l
10mM dNTP 混合物	1 μ l
DEPC-水	7 μ l

【0052】

さらに、以下の試薬を混合し、25 $^{\circ}$ Cで2分間インキュベートした。

【表7】

10xRT バッファー	2 μ l
25mM MgCl ₂	4 μ l
0.1M DTT	2 μ l
RNase OUT (RNase 阻害剤)	1 μ l

【0053】

さらに、逆転写酵素 (Super script II) を1 μ l (50 unit) 添加して、以下のプログラムで反応を行った。

【表8】

25 $^{\circ}$ C	10分
42 $^{\circ}$ C	50分
70 $^{\circ}$ C	15分

10

20

30

40

50

【 0 0 5 4 】

この溶液をcDNA溶液とし、以下のPCR反応に用いた。

【 0 0 5 5 】

PCR反応は、EX-Taq（宝酒造製）を使用して行った。すなわち、以下のように試薬を調製し、サーマルサイクラーでPCR反応を行った。

【表 9】

CDNA 溶液	0.5 μ l
10x バッファー	2 μ l
10mM dNTP 混合物	1.6 μ l
プライマー (F, R)	各 0.2 μ l
水	15.4 μ l
EX-Taq	0.1 μ l

10

【 0 0 5 6 】

プライマーには、以下の配列のものを用いた。

【表 10】

F	ACCAGCTGGGCATCGTGAAG
R	AGAGCATGTCGTGGCGATTAG

20

【 0 0 5 7 】

アニール温度は、49 で行った。

【 0 0 5 8 】

PCR産物を3.0% Nuseive3:1アガロース/TBE電気泳動によって分離し、パイオラッド社製のフルオロイメージャーによって検出した。その結果、図2のような結果が得られた。図は、それぞれ左：DMSO添加コントロール、右：20nM TCDD添加試料を示す。図中、y軸は任意単位を示す。この結果は、ダイオキシンの影響を検出することを示す。

【実施例 3】

【 0 0 5 9 】

<ダイオキシン異性体の免疫影響の検出>

30

(1)Jurkat T細胞の培養

Jurkat T細胞は、10%牛胎児血清を含むRPMI 1640にて、通常の培養操作によって培養をおこなった。継代は2日ごとに行い、5%CO₂雰囲気下において37 で培養を行った

(2)ダイオキシン暴露

Jurkat T細胞を遠心にて回収し懸濁後、5x10⁵細胞相当分を1.5mlの10%FCS-RPMI1640培地に希釈した。1.5mlの10% FCS-RPMI 1640培地に、DMSOに溶解した1-MCDD、2,3,7,8 - TCDD、12378-PeCDDを20nMの最終濃度になるように添加し、激しくボルテックスで攪拌した。この溶液をJurkat細胞の希釈液とあわせて軽く混合し、全量を6穴マイクロタイタープレートにまいた。対象試料として、2,3,7,8 - TCDDを含まないDMSOのみを添加して、同様の操作をおこなった。

40

【 0 0 6 0 】

(3) RNAの抽出

(2)にてダイオキシンを暴露した細胞を24時間培養したのち、1800rpmの遠心にて回収して、それぞれの細胞からRNAを抽出した。RNAの抽出には、RN easy (QIAGEN社製)をもちいて行った。すなわち、回収した細胞全量にメルカプトエタノールを含むRLT液350 μ lを加え、激しくボルテックスを掛けた。その後、18ゲージのニードルを5回通過させることによって、ホモジナイズした。ホモジネートに350 μ lの70%エタノールを加え、全量をRN easy mini columnに移した。10000rpmで15秒遠心後、ろ過液を除去し、700 μ lのRW1液でカラムの洗浄を行った。続いて500 μ lのRPE液で2度洗浄を行った。洗浄液を遠心にて完全に除去した後、40 μ lのRN aseフリー水で10000rpmの遠心によって溶出した。この

50

溶出液をRNA溶液とした。

【 0 0 6 1 】

(4) TRPV2の検出

RT-PCR法を使用して、(3)で得られたRNAに対して、TRPV2 RNAの検出をおこなった。まず、(3)で得られたRNAに対して、Super script II (Invitrogen社製)を使用して逆転写反応を行った。すなわち、以下のように試薬を調製し、65 °Cにおいて5分間の加熱変性後、氷上に1分間放置した

【表 1 1】

RNA 溶液 (5ng/ml)	1 μ l
ランダムヘキサマー (50ng/ml)	1 μ l
10mM dNTP 混合物	1 μ l
DEPC-水	7 μ l

10

【 0 0 6 2 】

さらに、以下の試薬を混合し、25 °Cで2分間インキュベートした。

【表 1 2】

10xRT バッファー	2 μ l
25mM MgCl ₂	4 μ l
0.1M DTT	2 μ l
RNase OUT (RNase 阻害剤)	1 μ l

20

【 0 0 6 3 】

さらに、逆転写酵素 (Super script II) を1 μ l (50 unit) 添加して、以下のプログラムで反応を行った。

【表 1 3】

25°C	10 分
42°C	50 分
70°C	15 分

30

【 0 0 6 4 】

この溶液をcDNA溶液とし、以下のPCR反応に用いた。

【 0 0 6 5 】

PCR反応は、EX-Taq (宝酒造製) を使用して行った。すなわち、以下のように試薬を調製し、サーマルサイクラーでPCR反応を行った。

【表 1 4】

CDNA 溶液	0.5 μ l
10x バッファー	2 μ l
10mM dNTP 混合物	1.6 μ l
プライマー (F, R)	Each 0.2 μ l
水	15.4 μ l
EX-Taq	0.1 μ l

40

【 0 0 6 6 】

プライマーには、以下の配列のものを用いた。

【表 15】

F	CTCTGCACATCGCCATTGAG
R	CCAGCTTCAGAGGCGTGAGAT

【0067】

アニール温度は、49 で行った。

【0068】

PCR産物を3.0% Nuseive3:1アガロース/TBE電気泳動によって分離し、バイオラッド社製のフルオロイメージャーによって検出した。その結果、図3のような結果が得られた。図中、y軸は任意単位を示し、x軸は添加した被検物質を示す。この結果は、ダイオキシンの影響を検出することを示す。

10

【図面の簡単な説明】

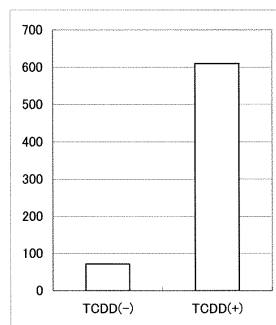
【0069】

【図1】本発明の一態様に係る方法を使用して、ダイオキシンを検出した結果を示すグラフ。

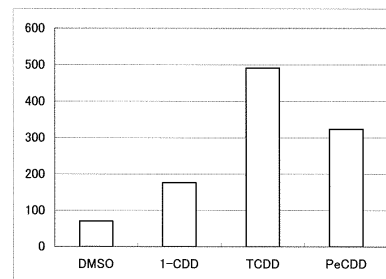
【図2】本発明の一態様に係る方法を使用して、ダイオキシンを検出した結果を示すグラフ。

【図3】本発明の一態様に係る方法を使用して、ダイオキシン異性体を検出した結果を示すグラフ。

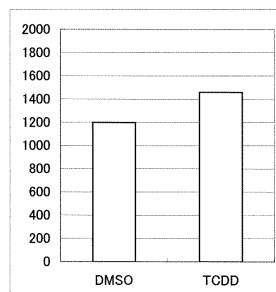
【図1】



【図3】



【図2】



【配列表】

0004213613000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 石原 美津子

神奈川県川崎市幸区小向東芝町1番地 株式会社東芝研究開発センター内

審査官 石丸 聡

(56)参考文献 Toxicol. Lett., vol. 129, pp. 1-11 (2002)

J. Biol. Chem., vol. 277, pp. 47175-47183 (2002)

臨床免疫・アレルギー科, 2006年, 第46巻, 第188 - 192頁

Int. J. Environ. Res. Public Health, vol. 1, pp. 3-11 (Mar. 2004)

J. Biol. Chem., vol. 279, pp. 25204-25210 (Jun. 2004)

Pharmacol. Toxicol., vol. 93, pp. 186-190 (2003)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/68

C12N 15/09

C12Q 1/02

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CAplus(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	免疫效果检测方法		
公开(公告)号	JP4213613B2	公开(公告)日	2009-01-21
申请号	JP2004092536	申请日	2004-03-26
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社东芝		
申请(专利权)人(译)	东芝公司		
当前申请(专利权)人(译)	东芝公司		
[标]发明人	石原美津子		
发明人	石原 美津子		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 C12Q1/02 G01N33/53 C12M1/00 C12M1/34 G01N33/15 G01N37/00		
FI分类号	C12Q1/68.A C12N15/00.A C12Q1/02 C12M1/00.A C12M1/34.Z C12N15/00.F C12N15/09.200 G01N33/15.ZZN.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N37/00.101		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/AA19 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/GA18 4B024/HA08 4B024/HA12 4B024/HA14 4B024/HA19 4B029/AA07 4B029/AA21 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/FA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA20 4B063/QQ20 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR07 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR69 4B063/QR77 4B063/QR82 4B063/QS12 4B063/QS24 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01		
代理人(译)	河野 哲 中村 诚		
审查员(译)	石丸 聪		
其他公开文献	JP2005270069A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及，在免疫细胞中，其目的在于提供一种方法和检测装置用于通过内分泌干扰物所表达的量是一个指标多肽和核苷酸的变化，来检测被检物质的免疫毒性到。解决方案：用于检测分析物的免疫系统的影响，包括用免疫细胞试验物质接触的步骤的免疫效果检测方法，在免疫细胞中表达的香草素受体家族蛋白并检测从待编码基因转录的mRNA。此外，用于检测测试物质的免疫系统的影响，检测与免疫细胞的测试物质接触的步骤的免疫效果检测方法中，在免疫细胞中表达的香草素受体家族蛋白和免疫影响检测步骤。点域1

RNA 溶液(5ng/ml)	1 μl
ランダムヘキサマー (50ng/ml)	1 μl
10mM dNTP 混合物	1 μl
DEPC-水	7 μl