

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2008/133075

発行日 平成22年7月22日 (2010. 7. 22)

(43) 国際公開日 平成20年11月6日 (2008. 11. 6)

(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 K	2 G O 5 4
GO 1 N 33/533 (2006.01)	GO 1 N 33/533	
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 21/78 C	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 15 頁)

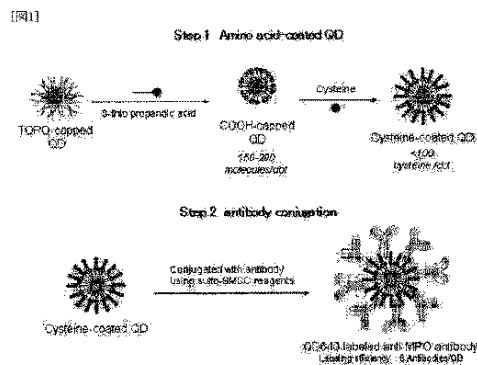
出願番号 特願2008-520458 (P2008-520458)	(71) 出願人 000002174 積水化学工業株式会社 大阪府大阪市北区西天満 2 丁目 4 番 4 号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2008/057254	(74) 代理人 100086586 弁理士 安富 康男
(22) 国際出願日 平成20年4月14日 (2008. 4. 14)	(74) 代理人 100119529 弁理士 諸田 勝保
(31) 優先権主張番号 特願2007-105264 (P2007-105264)	(72) 発明者 山本 健二 日本国東京都文京区西片 1 丁目 8 - 1 8
(32) 優先日 平成19年4月12日 (2007. 4. 12)	(72) 発明者 星野 昭芳 日本国東京都中野区弥生町 4 丁目 6 - 1 1
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 鈴木 和男 日本国千葉県いすみ市岬町椎木 6 6 3 - 2
	F ターム (参考) 2G054 AA08 AB04 CA23 CA28 EA03 GA01 GA03 GA04 GB02 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 活性化免疫細胞の検出方法

(57) 【要約】

本発明の目的は、活性化により免疫細胞の表面に表出したタンパク質を高感度に検出することができる活性化免疫細胞の検出方法を提供することである。

本発明は、量子ドットを蛍光プローブとする抗体を用いて、活性化により免疫細胞の表面に表出したタンパク質を検出する活性化免疫細胞の検出方法である。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

量子ドットを蛍光プローブとする抗体を用いて、活性化により免疫細胞の表面に表出したタンパク質を検出することを特徴とする活性化免疫細胞の検出方法。

【請求項 2】

量子ドットを蛍光プローブとする抗ミエロペルオキシターゼ抗体を用いて、活性化好中球の表面に表出したミエロペルオキシターゼを検出することを特徴とする活性化好中球の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、活性化により免疫細胞の表面に表出したタンパク質を高感度に検出することができる活性化免疫細胞の検出方法に関する。

【背景技術】

【0002】

例えば、免疫細胞の一種である好中球は、微生物等の病原体が侵入し、感染症を起こした場合、この病原体を取り込み、その細胞内に存在するミエロペルオキシターゼ (MPO) によって殺菌する機能を有する (非特許文献 1)。ところが、川崎病や急速進行性糸球体腎炎等を初めとする血管炎の患者は、発病初期から MPO に対する抗好中球細胞質自己抗体 (MPO-ANCA) を有することが知られており、これが診断基準の必要要件の一つに挙げられている (非特許文献 2)。健常者の血液や健常なマウスの血液等に含まれる好中球は不活性化状態であるが、血管炎等を発病した患者の好中球は、細胞内に存在していた MPO が細胞表面に表出した活性化状態にあるのではないかと考えられている。また、健常者の好中球であっても、白血球走化因子 (fMLP) 等で刺激を与えることで活性化

20

するものと考えられている。このような免疫細胞の活性化による特定のタンパク質の表出は、好中球のみならず、T細胞、マクロファージ、樹状細胞等の免疫細胞の多くに見られる現象であると考えられる。

【0003】

血管炎に対する治療としては、従来、ステロイド剤や抗炎症剤等による薬物治療や、 γ グロブリン療法等の免疫治療法が行われている。しかし、 γ グロブリン療法等による治療が有効で症状が緩解した場合であっても、MPO-ANCA が陽性のままであることがあった。そのため、診断と治療の有効性についての評価のためには、その病態を反映する活性化免疫細胞の検査方法が求められていた。

30

【0004】

しかしながら、活性化免疫細胞の検出を行うのは極めて困難であるのが現状であった。検査方法としては、例えば、活性化細胞上の指標タンパク質に特異的に結合する分子認識物質を蛍光体等のマーカー物質に結合した分子認識体を用いて検出する蛍光顕微鏡法等が考えられる。ところが、従来用いられていた蛍光体等のマーカー物質は、発光効率が低く感度の点で満足できるものではなかったことに加え、活性化免疫細胞に結合させようとすると光退色を起こしてしまうという問題があった。

40

【非特許文献 1】 Aratani Y, Kura F, Watanabe H, Akagawa H, Takano Y, et al. 2002. J Infect Dis 185:1833-7

【非特許文献 2】 Gross WL, Schmitt WH, Csernok E. 1993. Clin Exp Immunol 91:1-12

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、上記現状に鑑み、活性化により免疫細胞の表面に表出したタンパク質を高感度に検出することができる活性化免疫細胞の検出方法を提供することを目的とする。

50

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、量子ドットを蛍光プローブとする抗体を用いて、活性化により免疫細胞の表面に表出したタンパク質を検出する活性化免疫細胞の検出方法である。

以下に本発明を詳述する。

【0007】

フルオレセインイソチオシアネート (FITC) やフェコエリトリン (PE) のような従来の有機蛍光体プローブは、活性化免疫細胞に結合させると、活性化免疫細胞から生じる活性酸素種の働きによって光退色を起こしていたものと考えられる。本発明者らは、鋭意検討の結果、蛍光プローブとして量子ドット (Quantum Dot: QD) を結合した抗体を用いれば、極めて高い発光効率で活性化により細胞表面に表出したタンパク質を高感度で検出することができることを見出し、本発明を完成するに至った。これは、量子ドットは有機蛍光体に比べて発光効率自体が高いことに加え、活性酸素種によっても変性されることなく光退色を起こさないためと考えられる。

10

【0008】

本発明の活性化免疫細胞の検出方法となる免疫細胞としては、例えば、好中球、T細胞、マクロファージ、樹状細胞等が挙げられる。また、上記免疫細胞としては、ヒト細胞の他にもマウス等の哺乳類の細胞も対象となり得る。

本願明細書において活性化免疫細胞とは、疾患により、又は、健常人であっても刺激を与えることにより、正常な状態にあっては細胞の内側に存在する特定のタンパク質が免疫細胞の表面に表出した状態をいう。

20

【0009】

例えば、好中球にあっては、血管炎等を発病した場合や白血球走化因子 (fMLP) 等で刺激を与えることにより、ミエロペルオキシターゼ (MPO) が好中球の表面に表出して活性化好中球となる。

T細胞は、T細胞レセプター刺激により Fas リガンドがT細胞の表面に表出して活性化T細胞となる。これにより Fas/Fas リガンドを介して細胞のアポトーシスを誘導するものと考えられる。

T細胞は、刺激により CD69 がT細胞の表面に表出して活性化T細胞となる。これによりリュウマチが誘導されると考えられている。

30

好中球やマクロファージは、刺激により CD69 や fMLP レセプター、TNF α レセプターが細胞の表面に表出して活性化好中球、活性化マクロファージとなる。

樹状細胞は、抗原による刺激により該抗原の部分構造を細胞の表面に提示して活性化樹状細胞となる。活性化樹状細胞はB細胞に対応する抗体産生を誘導する等、免疫系細胞の活性化を行う。

【0010】

また、例えば、好中球やマクロファージ等の免疫細胞の膜表面には7回膜貫通型G蛋白質共役型タンパク質であるケモカインレセプターが表出している。ケモカイン (chemokine) は細胞遊走活性 (chemotaxis) を有するサイトカインであり、現在までに50以上のケモカインが同定されている。ケモカインがケモカインレセプターと結合すれば特定の組織に特定の炎症細胞が集積し活性化され、やがて局所に特異的炎症が起こることが知られている。例えばマクロファージでは、ケモカインレセプターの中の一つのサブグループであるCCケモカインレセプター (例えば、CCR1 (ケモカインレセプター1) ~ CCR10 (ケモカインレセプター10) 等) が表出している。

40

骨髄で生成したときのマクロファージでは、ほとんどすべてのCCケモカインレセプターが細胞膜の表面に表出している。その後、マクロファージは肺、脳、骨、肝臓等の臓器に移動して、臓器特異的マクロファージに成熟して各々の機能を発現する。臓器特異的マクロファージにおいては、各臓器に対応した特異的なCCケモカインレセプターのみが細胞膜上に表出し、他のCCケモカインレセプターは細胞膜上から消失する。例えば、腹腔マクロファージにおいてはCCR8のみが表出しており、手術後の癒着に関係することが知

50

られている。また、骨におけるマクロファージ（破骨細胞）においてはCCR1とCCR5のみが表出しており、骨粗鬆症との関連が知られている。特異的なCCケモカインレセプターは、その各々の臓器において正常機能を維持するために極めて重要な役割を担っていると考えられる。このような特異的なCCケモカインレセプターの表出もまた、活性化の1種であると考えられる。「活性化マクロファージ」の細胞膜上に表出した特異的なCCケモカインレセプターを検出することは、マクロファージの正常な機能発現を評価するうえで極めて重要である。

【0011】

本願発明の活性化免疫細胞の検出方法では、このように活性化により免疫細胞の表面に表出したタンパク質（MPO、Fasリガンド、CD69、fMLプレセプター、TNF α レセプター、樹状細胞表面に提示された抗原の部分構造等）に特異的に結合する抗体に、
10 蛍光プローブとして量子ドットを結合したものをを用いることを特徴とする。例えば、活性化好中球の検出においては、抗ミエロペルオキシターゼ抗体（以下、抗MPO抗体ともいう）に結合した量子ドット（以下、抗MPO抗体結合量子ドットともいう）を分子認識体として用いる。

以下、抗MPO抗体結合量子ドットを用いた活性化好中球の検出を例として、本発明を更に詳しく説明する。なお、量子ドットを蛍光プローブとする抗ミエロペルオキシターゼ抗体を用いて、活性化好中球の表面に表出したミエロペルオキシターゼを検出する活性化好中球の検出方法もまた、本発明の1つである。

【0012】

本明細書において量子ドットとは、結晶からなる量子サイズ効果をもつ大きさの粒子（通常10nm以下）であって、量子サイズ効果の大きなバンドギャップにより蛍光発光（紫外～赤外領域）するナノ粒子を意味する。

上記量子ドットは、励起光照射により蛍光を発する粒子であり、本発明では、分子認識発光性微粒子のマーカ物質となる粒子である。このような量子ドットを構成する物質としては特に限定されず、例えば、I族、II族、III族、IV族、V族、VI族、VII族の化合物等が挙げられる。具体的には、例えば、CuCl、CdS、CdSe、CdTe、ZnS、ZnSe、ZnTe、MgTe、GaAs、GaP、GaSb、GaN、HgS、HgSe、HgTe、InAs、InP、InSb、InN、AlAs、AlP、AlSb、AlS、PbS、PbSe、Ge、Si等、又は、これらのアロイ材料等が
30 挙げられる。中でも、CuCl等のI-VII族化合物半導体、CdS、CdSe等のII-V族、InAs等のIII-V族化合物半導体、Si、Ge等のIV族半導体からなる半導体結晶が好適である。

上記量子ドットを構成するその他の物質としては、例えば、TiO₂等の金属酸化物、フタロシアニン、アゾ化合物等の有機化合物等も好適に用いられる。

【0013】

上記IV族半導体からなる半導体結晶としては、例えば、IV族の元素とハロゲン元素とからなるメタルハライド化合物が好ましい。

上記メタルハライド化合物としては、例えば、シリコン化合物、ゲルマニウム化合物、チタン化合物等が挙げられる。具体的には、例えば、SiCl₄、GeCl₄、TiCl₄
40、SiBr₄、GeBr₄、TiBr₄、SiI₄、GeI₄、TiI₄等が挙げられる。

上記量子ドットの原料は単独で用いてもよく、2種以上を併用してもよい。2種以上を併用した場合、これらのアロイ材料を得ることが可能となる。

【0014】

上記量子ドットの粒子構造としては特に限定されず、例えば、単一又は2種以上の材料を混合或いはアロイ化した単粒子、単粒子の表面にシェル構造を設けたコアシェル構造、シェルを多層化した多層シェル構造等が挙げられる。

【0015】

上記コアシェル構造としては、例えば、CdSをコア-CdSeをシェル、CdSeをコ
50

ア-CdSをシェル、CdSをコア-ZnSをシェル、CdSeをコア-ZnSをシェル、CdSeのナノ結晶をコア-ZnSをシェル、CdSeのナノ結晶をコア-ZnSeをシェル、Siをコア-SiO₂をシェルとするコア-シェル構造を有するもの等が挙げられる。

【0016】

上記量子ドットとしては、本発明の目的を損なわない範囲であれば、表面を化学的又は物理的に修飾されたものであってもよく、また、界面活性剤、分散安定剤又は酸化防止剤等の添加剤を加えたものであってもよい。このような量子ドットは、コロイド化学的な方法、例えば、逆ミセル法(Lianos, P. et al., Chem. Phys. Lett., 125, 299 (1986))やホットソープ法(Peng, X. et al., J. Am. Chem. Soc., 119, 7019 (1997))等によって合成することができる。

10

【0017】

上記量子ドットの粒子径としては特に限定されないが、通常、好ましい下限は0.5nm、好ましい上限は100nmである。この範囲内であると、十分な蛍光強度や水系溶媒中での分散安定性を得ることができる。より好ましい下限は1nm、より好ましい上限は50nm、更に好ましい上限は10nmである。

【0018】

上記量子ドットは、正又は負の電荷を有していることが好ましい。正又は負の電荷を有することにより、例えば、静電引力によって上記量子ドットを用いてなる分子認識発光性微粒子を、標的物質である活性化好中球に好適に結合させることができる。また、上記量子ドット同士は、静電反発することから凝集することを防止することができるとともに、活性化好中球へ結合させる際に上記量子ドット同士が重なって結合することを防止することができる。

20

【0019】

上記量子ドットに正又は負の電荷を帯電させる方法としては特に限定されず、例えば、上記量子ドットに正又は負の電荷を有する材質を用いる方法や、後述する方法で抗MPO抗体を量子ドット表面に結合する際に、量子ドット表面を処理する化合物として正又は負の電荷を有する化合物を用いる方法等が挙げられる。

【0020】

上記量子ドットは、本発明の目的を損なわない範囲であれば、界面活性剤、分散安定剤又は酸化防止剤等の添加剤を加えたものであってもよい。

30

【0021】

上記量子ドットは、励起光照射によって高輝度の蛍光(フォトルミネッセンス)を発し、微量成分の高感度測定に好適に用いることができる。上記量子ドットは、粒子径を制御することで励起光照射により励起して発する蛍光を変化させることができる。すなわち、上記量子ドットの粒子径が大きくなるほど、蛍光波長は長波長側(赤外側)にシフトし、逆に上記量子ドットの粒子径が小さくなるほど、蛍光波長は短波長側(紫外側)にシフトする。粒子径の異なる量子ドットを目的に応じて使い分けることにより、発光スペクトルを任意に調節したり設計したりすることが可能であり、より精密な測定への応用を図ることができる。

40

【0022】

本発明による活性化好中球の検出方法に用いる抗MPO抗体結合量子ドットを製造する方法としては特に限定されないが、図1の概略図に示した方法が好適である。このような製造方法によって得られた抗MPO抗体結合量子ドットは、抗原を認識する機能及びFcレセプター結合機能等を含む抗体としての機能を保持していることから、本発明の活性化免疫細胞の検出方法に好適に用いることができる。

【0023】

図1に示した抗MPO抗体結合量子ドットの製造方法は、量子ドット表面を親水化した後、システインでコートする工程(1)(Step1)を有する。

50

上記量子ドット表面を親水化する方法としては特に限定されないが、上記量子ドット表面をカルボキシル基でキャップする方法が好適である。

上記量子ドット表面をカルボキシル基でキャップする方法としては、具体的には、例えば、以下の方法が好適に用いられる。

【0024】

すなわち、上記量子ドットの原料物質を、トリ-*n*-オクチルホスフィンオキシド (TOPO) 等を含有する配位溶媒中に分散させ、上記原料物質の微粒子をTOPOでミセル化 (TOPOミセル) する。

次いで、TOPOミセルをアルゴンガス封入条件下で加熱してTOPOミセル内の原料物質の微粒子を成長させ、表面にTOPOが固定された量子ドット (TOPO固定量子ドット) を作製する (ホットソープ法)。なお、このとき作製する量子ドットの粒子径を制御することで、励起光照射により発する蛍光の波長を制御することができる。また、この状態の量子ドットは、トルエンやテトラヒドロフラン (THF) 等の有機溶媒に可溶である。

その後、作製したTOPO固定量子ドットをTHFに溶解させ、そこに、例えば、トリ-*n*-オクチルホスフィンオキシド等のプロパン酸を加えて加温、還流後 (チオール変換反応)、NaOH水溶液を加え、濾過及びカラム等を用いて未反応物の精製と濃縮とを行うことで、量子ドットの表面がカルボキシル基でキャップされたカルボキシル基固定量子ドットを製造することができる。

【0025】

上記工程 (1) では、上記表面を親水化した量子ドットをシステインでコートする。

上記表面親水化量子ドットをシステインでコートする方法としては特に限定されないが、例えば、上述した方法によりカルボキシル基でキャップされた量子ドットを用いる場合、該カルボキシル基でキャップされた量子ドット溶液を、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (EDC) カップリング剤とともにシステイン溶液に加えて混合する方法が好適に用いられる。

【0026】

図1に示した抗MPO抗体結合量子ドットの製造方法は、システインでコートした量子ドットの表面に、抗ミエロペルオキシターゼ抗体 (抗MPO抗体) を結合する工程 (2) (Step 2) を有する。

上記抗MPO抗体としては特に限定されず、従来公知の手段により得られるものを用いることができる。具体的には、例えば、マウスC57BL/6株から得られたMPO欠損マウスにヒトMPOのリコンビナントで免疫し、このマウスから得た血液をDEAEカラム、CMセファロースカラムで精製したものを、70%硫酸アンモニウムで濃縮し、HPLCにてCMセファロースカラムで更に精製することにより得ることができる。

【0027】

上記システインでコートした量子ドットの表面に抗MPO抗体を結合する方法としては特に限定されないが、例えば、カラムにて遊離アミノ酸を除去した後、Sulfosuccinimidyl-trans-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (sulfos-MCC) カップリング剤等を用いて上記抗MPO抗体を量子ドット表面に結合させる方法が好適に用いられる。

【0028】

本発明で用いる抗MPO抗体結合量子ドットにおいて、上記量子ドットの表面に結合する抗MPO抗体の量としては特に限定されないが、好ましい下限は1Abs、好ましい上限は100Absである。1Abs未満であると、活性化好中球に対する結合能が低いことがあり、100Absを超えると、蛍光発光が探知できなくなることがある。より好ましい上限は10Absである。

【0029】

上記量子ドットに結合した抗MPO抗体は、例えば、四酸化オスミウムの逆染色法による透過電子顕微鏡観察により視覚的に確認することができる。また、量子ドット表面の抗M

10

20

30

40

50

P O抗体数は、例えば、ブラットフォード試薬を用いたアミノ酸含有量の測定により確認することができる。

【0030】

本発明の活性化免疫細胞の検出方法では、上記量子ドットを蛍光プローブとする抗体を用いて、活性化により免疫細胞の表面に表出したタンパク質を検出する。例えば、上記量子ドットに結合した抗M P O抗体を、血管炎等の疾患により、又は、健常人であっても刺激を与えることによりM P Oが細胞表面に表出した活性化好中球に作用させると、該細胞表面のM P Oに結合する。このようにして活性化好中球に結合させた抗M P O抗体結合量子ドットを発光させることで、活性化好中球を検出することができる。検出には顕微鏡等を用いた目視による観察の他、量子ドットの蛍光強度等を数値化して定量的に行うこともできる。具体的には例えば、蛍光ウエスタンブロット法、組織化学的分析等の従来公知の方法により行うことができる。

10

【0031】

健常者の血液や健常なマウスの血液等に含まれる免疫細胞は不活性な状態であるが、疾患により活性化される。本発明の活性化免疫細胞の検出方法によれば、このような疾患の診断や治療の有効性についての評価に極めて有効である。例えば、川崎病や急速進行性糸球体腎炎、ヴェーゲナー肉芽腫症、ビュルガー病、チャージストラウス症候群（C S S）、結節性多発性動脈炎（P N）、顕微鏡的多発性血管炎（M P A）等の血管炎等の診断や治療の有効性についての評価には、上記抗M P O抗体結合量子ドットを用いた活性化好中球の検出方法が有効である。

20

【0032】

免疫細胞の活性化は、種々の刺激物質による刺激によっても起こり得る。例えば、健常者から採集した不活性な好中球に対して白血球走化因子（f M L P）等による刺激を付与することにより活性化させることができ、その活性化の状態を上記抗M P O抗体結合量子ドットを用いた活性化好中球の検出方法により検出することも可能である。このような研究は、免疫系の異常による疾患の発症機構の解明や、これらの疾患に対する医薬の開発等に重要である。

【発明の効果】

【0033】

本発明の活性化免疫細胞の検出方法では、量子ドットを蛍光プローブとする抗体を用いることにより、活性化した免疫細胞の表面であっても光退色することなく高い発光を得ることができる。これにより、活性化免疫細胞を高感度で視覚的に検出することができる。本発明によれば、活性化により免疫細胞の表面に表出したタンパク質を高感度に検出することができる活性化免疫細胞の検出方法を提供できる。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0034】

以下に実施例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

【0035】

（実施例1）

（1）抗M P O抗体結合量子ドットの調製

（a）量子ドットの作製

アルゴン気流下、トリ-*n*-オクチルホスフィンオキシド（T O P O）7.5 gに、ステアリン酸2.9 g、*n*-テトラデシルホスホン酸620 mg、酸化カドミニウム250 mg、を加え370℃に加熱混合した。

これを270℃まで自然冷却させた後、予めトリブチルフォスフィン2.5 mLにセレン200 mgを溶解させた溶液を加え、減圧乾燥し、T O P Oで被覆されたC d S e微粒子を得た。

得られたC d S e微粒子に、T O P Oを15 g加え加熱し、引き続き270℃でトリオクチルホスフィン10 mLにZ n（S₂C N E t₂）1.1 gを溶解した溶液を加え、表面

40

50

にTOPPOが固定されたCdSeのナノ結晶をコア-ZnSをシェルとする量子ドット（平均粒子径7 nm、約642 nmの赤色蛍光発色）を作製した。

【0036】

作製した表面にTOPPOが固定された量子ドット50 mgを、4 mLフラスコ中でテトラヒドロフラン（THF）1 mLに溶解させ、3-メルカプトプロパン酸（シグマアルドリッチ社製）25 μ L加えた85°C、24時間反応させた。

その後、混濁液を集めて最大速度の遠心分離機にかけて堆積物を得た。得られた堆積物をアセトン洗浄してTOPPOを除去し、水酸化ナトリウム水溶液に溶解させて最大速度の遠心分離機にかけて不溶性残渣を除去し、溶解性量子ドットを含有する浮遊物を捕集した。得られた溶液をセファデックスカラム（Amersham Biosciences、MicroSpin G-25 Column）で洗浄し、限外濾過膜（Microcon YM-3: Millipore社製）を用いて濃縮し、減圧蒸留にて粉末化した。

10

【0037】

(b) 抗MPO抗体の調製

マウスMPOのcDNAを導入した大腸菌から製造した組み換えマウスMPOにより免疫付与することで、多クローン性反組み換えマウスMPO抗体（anti-rmMPO Ab）を調製した。なお、このanti-rmMPO Abは、マウス及びヒトのMPO分子に対して交差反応できるものであった。

【0038】

(c) α MPO-QDの調製

100 μ Mの量子ドット溶液を、同体積の100 mMのシステイン溶液に、100 mMの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩（EDC）カップリング剤（Pierce Biotechnology社製）共存のもとで、4°C、1時間混合した。Nap-5カラム（Amersham Biosciences社製）を用いて遊離アミノ酸を除去した後、sulfo-SMCCカップリング剤（Pierce Biotechnology社製）を用いて、量子ドットに1 mgの抗体を二次的に結合させ、4°Cで2時間超音波分離させた。生成物をsuperdex 200 column（Amersham biosciences社製）で精製し、限外濾過膜（NMWL 100 kDa, Centriprep, Millipore社製）を用いて濃縮し、量子ドット表面に抗MPO抗体が結合した分子認識発光性微粒子（ α MPO-QD）を製造した。その後、0.1 μ m薄膜フィルタ（Millipore社製）で濾過した。

20

得られた α MPO-QDを四酸化オスミウムによる逆染色して透過型電子顕微鏡で観察した。結果を図2に示す。図2(a)は、 α MPOを結合する前の量子ドットのみの観察結果であり、図2(b)は、 α MPO-QDの観察結果を示す電子顕微鏡写真である。図2(b)より、製造した α MPO-QDは、QDの表面に紐状物質が観察されており、QDの表明に α MPOが結合していることが確認された。

30

また、ウシ血清アルブミンの検量線のあるブラッドフォード試薬（Bio-Rad Laboratories社製）で測定した量子ドット表面の抗体は、1の量子ドット当たり約8.5 Absであった。

(d) コントロールIgG-QDの調製

anti-rmMPO Abに代えて、アイトタイプラビットIgGを用いた以外は、同様の方法により、分子認識発光性微粒子（IgG-QD）を調製し、これを α MPO-QDに対するコントロールとした。

40

【0039】

(2) 活性化好中球の検出

マウス（C57BL/6及び成熟（13週、オス）SCG/Kj）の腹腔内に8%カゼイン/PBS注射をし、3時間経過後腹腔からマウス好中球を採集した。

MPO-ANCA関連の急速進行性糸球体腎炎患者、及び、健常者からヒト好中球を採集した。ヒト好中球は、ヘパリン化した抹消血をLYMPHOPREP（Axis-Shield社製）を用いて顆粒球を分離させ、得られた顆粒球を1.5%デキスクラン（20

50

0 kDa) 溶液に懸濁させ、残留赤血球を l y s i s b u f f e r (0.75% NH₄Cl 含有 20 mM の T r i s - H C l (pH 7.6)) で除去して抽出した。

【0040】

採集したマウス好中球及びヒト好中球を 37℃ のハンクス液 (H B S S) で 10 分間前培養し、前加熱した 12 μm 厚のシリコン製ゴムウェルプレートで覆われたカバースリップ (松浪ガラス社製) 上に 10 分間載置した。好中球を炎症性サイトカインによる刺激後、すぐに冷却した 1% パラホルムアルデヒド/PBS で凝固させ、必要に応じて 0.1% T r i t o n - X にて透明化した。その後、1% ウシ血清アルブミン (シグマアルドリッチ社製、C a t # A 6 0 0 3 : 血清 M P O 分子を含まない) で 30 分間ブロックした後、α M P O - Q D 又は I g G - Q D を作用させた。

10

【0041】

活性化好中球の検出は、ウエスタンブロッティング法により、ロングパス (>610 nm) フィルタユニットを備えた蛍光顕微鏡 I X - 8 1 (オリンパス社製) で、冷却 CCD カメラ D P - 7 0 (オリンパス社製) を用いて行った。

図 3 に、結果を示した。図 3 中、「F M」は、分子認識発光性微粒子を蛍光性分子量サイズ (85 kDa) のマーカーに結合させた結果を示し、「M s」は、分子認識発光性微粒子を組み換えマウス M P O (73 kDa) に結合させた結果を示し、「H u」は、分子認識発光性微粒子をヒト M P O (59 kDa) に結合させた結果を示す。

【0042】

次に、H B S S 中のヒト好中球 (2×10^6 c e l l s / m L) を 37℃ でプレインキュベートしたカバースリップ上に接着し、0.1% T r i t o n - X にて透明化して好中球中の M P O の観察を行った。結果を図 4 に示した。図 4 に示したように、α M P O - Q D によって、M P O 分子が好中球内部に顆粒状に存在していることが明確に視覚化された。一方、I g G - Q D では、好中球をほとんど検出できなかった。

20

【0043】

(比較例 1)

QD に代えてフェコエリトリン (P E) を用いた以外は、実施例 1 と同様にして P E を蛍光プローブとする分子認識発光性微粒子 (α M P O - P E) を調製した。

得られた α M P O - P E を用いた以外は実施例 1 と同様にして、H B S S 中のヒト好中球 (2×10^6 c e l l s / m L) を 37℃ でプレインキュベートしたカバースリップ上に接着し、0.1% T r i t o n - X にて透明化して好中球中の M P O の観察を行った。結果を図 5 に示した。図 5 より、α M P O - P E を用いた場合には、好中球をほとんど検出できないことがわかった。

30

【0044】

(実施例 2)

実施例 1 で製造した α M P O - Q D を結合したヒト好中球について、該ヒト好中球に刺激を与える f M L P の濃度を変え、好中球表面の M P O 分子量の変化を評価した。

結果を図 6 に示した。図 6 より、好中球表面への M P O の表出は、f M L P の濃度が 10^{-8} M レベルから観察され、f M L P 濃度の上昇に伴い増加することが確認された。

【0045】

(実施例 3)

健常者から採取した好中球と急速進行性糸球体腎炎患者から採取した好中球とについて、それぞれ実施例 1 で製造した α M P O - Q D で染色したものを蛍光顕微鏡観察した。結果を図 7 に示した。図 7 中、左列は、健常者から採取した好中球の蛍光顕微鏡写真であり、右列は、急速進行性糸球体腎炎患者から採取した好中球の蛍光顕微鏡写真である。また、上段は、健常者と急速進行性糸球体腎炎患者の好中球に α M P O - Q D を結合した結果を示し、第二段目は、細菌菌体タンパク質ペプチドである f M L P で刺激した後に染色した結果を示し、第三段目は、界面活性剤で好中球の細胞膜に穴を開けた後染色をした結果を示し、第四段目は、F M L P での刺激と界面活性剤での細胞膜による穴開けとを併用した好中球の細胞膜を示す。

40

50

上段の結果より、患者の好中球は量子ドットによる蛍光が観察された。また、第三段目の結果より、健常者及び患者の両方で蛍光が見られたことから、健常者のMPOは、好中球の細胞内に存在し、患者のMPOは、好中球の表面に存在していることが示唆された。また、第二段目の結果より、健常者及び患者の両方に蛍光が見られたことより、好中球のMPOは、fMLPで刺激されると、健常者の場合であっても好中球の表面に移動することが明らかとなった。

【0046】

(実施例4)

マウス及びヒト好中球の表面のMPO転位を確認するため、ナイーブC57BL/6マウス(control)、好中球細胞質抗体(ANCA)による血管炎を発症したマウス、及び、成熟(13週、オス)したSCG/Kjマウスの腹腔好中球を用意し、fMLPの刺激前、及び、刺激後に、実施例1で製造した α MPO-QDを作用させた。蛍光顕微鏡による観察結果を図8に示した。

10

【0047】

(実施例5)

炎症性サイトカインによる刺激後のヒト好中球のMPO表面転位を調べた。すなわち、ヒト好中球(2×10^5 cells/mL)を、 $1 \mu\text{M}$ のfMLP、 1 mg/mL のCAWS、 20 ng/mL のTNF- α 、 20 ng/mL のIL-1 β 、及び、 20 ng/mL のIL-8でそれぞれ10分間刺激した後、実施例1で製造した α MPO-QDを作用させた。蛍光顕微鏡による観察結果を図9に示した。

20

【0048】

(実施例6)

実施例1で製造した α MPO-QD 1 mg を注射した成熟(13週、オス)SCG/Kjマウスから脾臓、肺、肝臓及び腎臓を取り出し、 $4 \mu\text{m}$ の厚さにスライスして蛍光顕微鏡により観察した。結果を図10に示した。なお図10中のバーは、 $250 \mu\text{m}$ を示すスケールである。

更に、腎臓のスライスを拡大して蛍光顕微鏡観察した。比較のため、コントロールIgG-QDを注射したマウスの腎臓のスライスを蛍光顕微鏡観察した。結果を図11に示した。なお、図11中のバーは、 $50 \mu\text{m}$ を示すスケールである。

30

【産業上の利用可能性】

【0049】

本発明によれば、活性化により免疫細胞の表面に表出したタンパク質を高感度に検出することができる活性化免疫細胞の検出方法を提供できる。

【図面の簡単な説明】

【0050】

【図1】抗MPO抗体結合量子ドットの製造方法の概略図である。

【図2】実施例1における α MPO結合前のQDと、 α MPO-QDの電子顕微鏡写真である。

【図3】実施例1におけるウエスタンブロッティング法による量子ドットの発光状態を示す電子顕微鏡写真である。

40

【図4】実施例1において α MPO-QD、IgG-QDをヒト好中球に結合させた電子顕微鏡写真である。

【図5】比較例1において α MPO-PEをヒト好中球に結合させた電子顕微鏡写真である。

【図6】実施例2の結果を示す電子顕微鏡写真である。

【図7】実施例3の結果を示す電子顕微鏡写真である。

【図8】実施例4の結果を示す電子顕微鏡写真である。

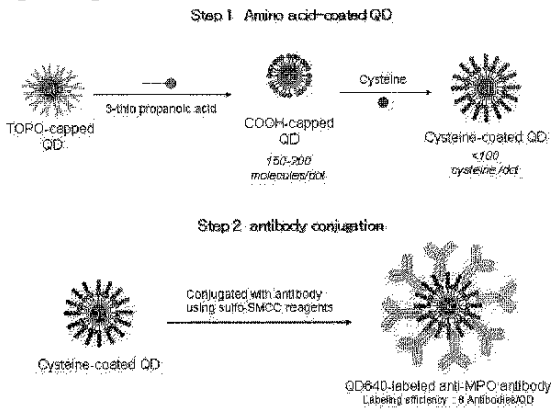
【図9】実施例5の結果を示す電子顕微鏡写真である。

【図10】実施例6の脾臓、肺、肝臓及び腎臓の電子顕微鏡写真である。

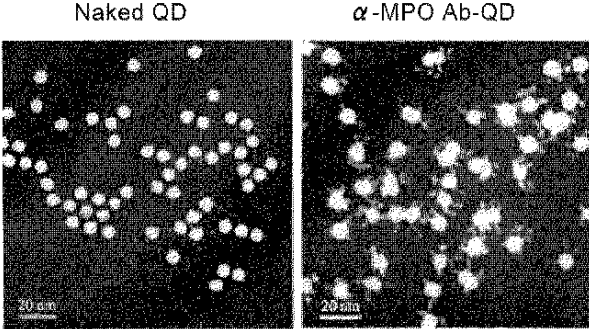
【図11】実施例6の腎臓スライスを拡大した電子顕微鏡写真である。

50

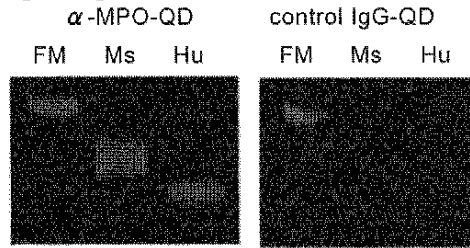
【図 1】



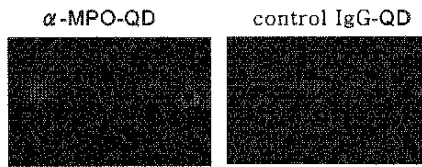
【図 2】



【図 3】



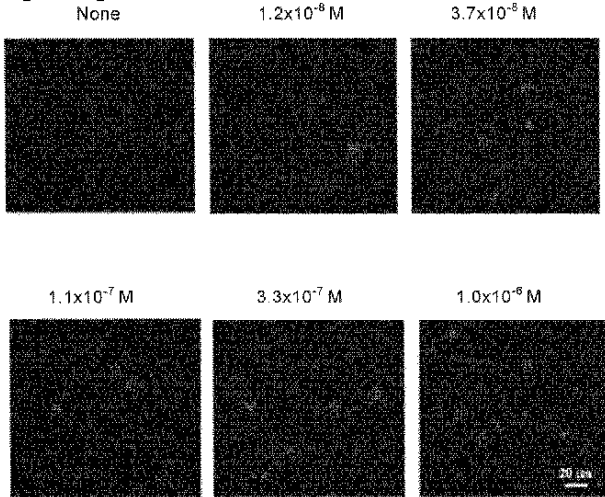
【図 4】



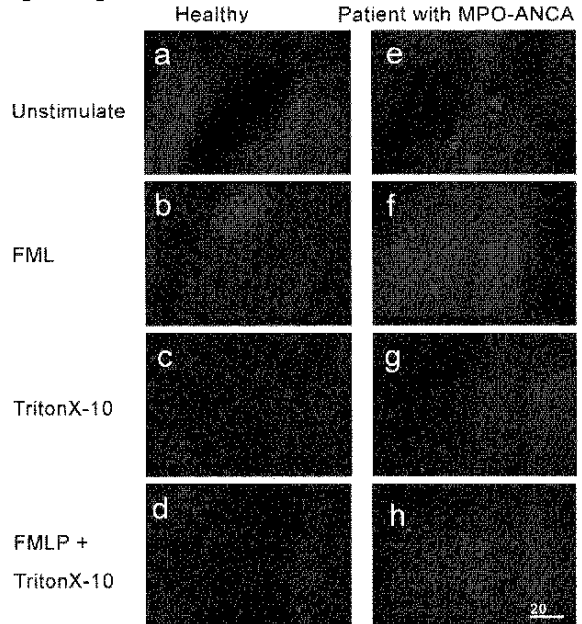
【図 5】

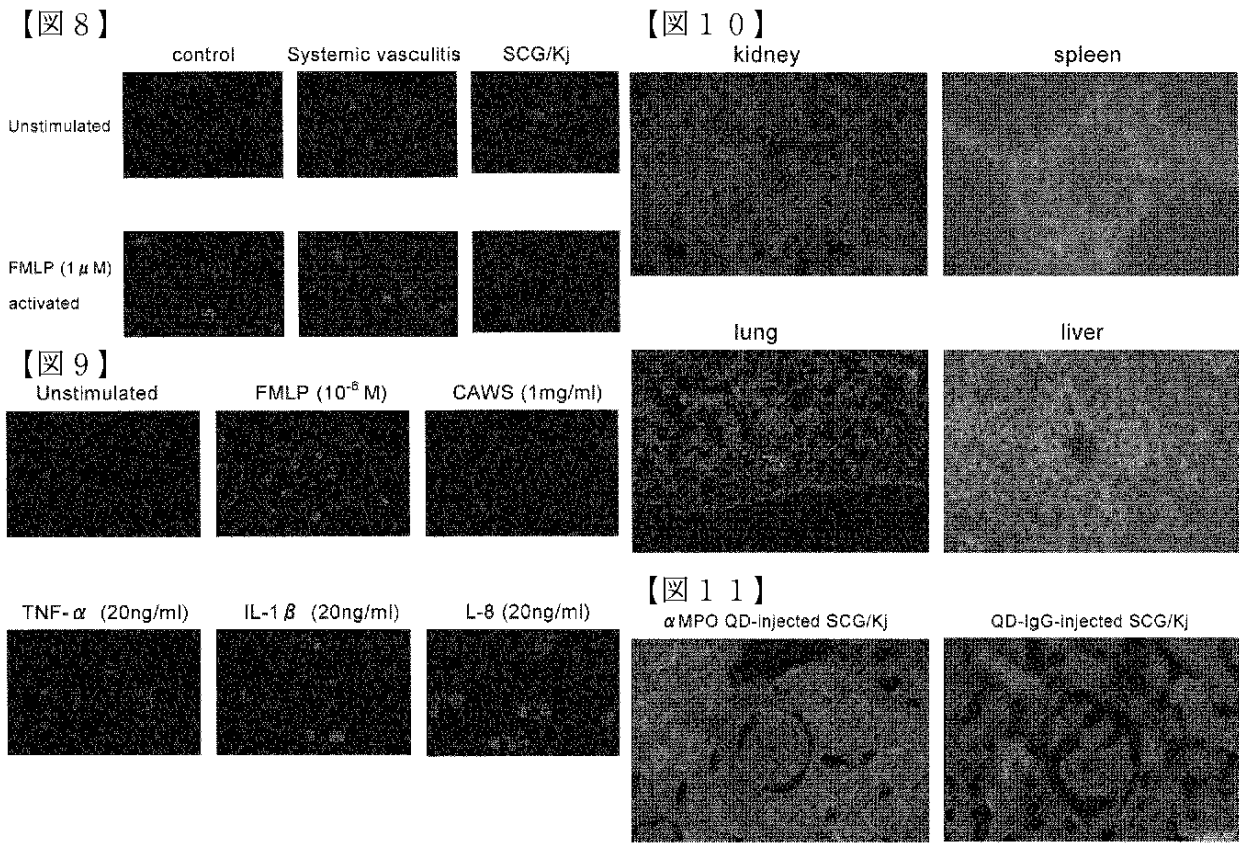


【図 6】



【図 7】





【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2008/057254
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/53(2006.01)i, C12Q1/04(2006.01)i, G01N33/536(2006.01)i, G01N33/573(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N33/53, C12Q1/04, G01N33/536, G01N33/573 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2008 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2008 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2008 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Akiyoshi HOSHINO et al., "Ryoshi Dot (QD) Hyoshiki Ko-mouse MPO Kotai o Mochiita Kekkan'en Hassho ni Kakawaru Kasseika Kochukyu MPO Bunshi no Keiko ni yoru Kenshutsu", 16th Japanese Society for Host Defense Research Gakujutsu Sokai Koen Shorokushu, page 86, (2005)	1-2
X	Akiyoshi HOSHINO et al., "Ryoshi Dot Keiko o Mochiita Kochukyu Karyunai Saiboshitsunai Sakkin Koso (myeloperoxidase; MPO) no Kenshutsu", Clinical testing, Vol.50, No.12, special extra issue, pages 1409 to 1415, (2006)	1-2
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 June, 2008 (30.06.08)		Date of mailing of the international search report 08 July, 2008 (08.07.08)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 8 / 0 5 7 2 5 4									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/53(2006.01)i, C12Q1/04(2006.01)i, G01N33/536(2006.01)i, G01N33/573(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/53, C12Q1/04, G01N33/536, G01N33/573											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2008年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2008年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2008年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2008年	日本国実用新案登録公報	1996-2008年	日本国登録実用新案公報	1994-2008年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2008年										
日本国実用新案登録公報	1996-2008年										
日本国登録実用新案公報	1994-2008年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号									
X	星野昭芳ほか, “量子ドット (QD) 標識抗マウスMPO抗体を用いた血管炎発症に関わる活性化好中球MPO分子の蛍光による検出”, 第16回日本生体防御学会学術総会講演抄録集, P. 86, (2005)	1-2									
X	星野昭芳ほか, “量子ドット蛍光を用いた好中球顆粒内細胞質内殺菌酵素 (myeloperoxidase; MPO) の検出”, 臨床検査, Vol. 50, no. 12, 増刊号, pp. 1409-1415, (2006)	1-2									
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。									
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日に後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 30.06.2008		国際調査報告の発送日 08.07.2008									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 竹中 靖典	2 J 9 5 0 7								
		電話番号 03-3581-1101	内線 3252								

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(注) この公表は、国際事務局（W I P O）により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願（日本語実用新案登録出願）の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項（実用新案法第48条の13第2項）により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	检测活化的免疫细胞的方法		
公开(公告)号	JPWO2008133075A1	公开(公告)日	2010-07-22
申请号	JP2008520458	申请日	2008-04-14
[标]申请(专利权)人(译)	积水化学工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	积水化学工业株式会社		
[标]发明人	山本健二 星野昭芳 鈴木和男		
发明人	山本 健二 星野 昭芳 鈴木 和男		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/533 G01N21/78		
CPC分类号	G01N33/56972 B82Y15/00 G01N33/588		
FI分类号	G01N33/53.K G01N33/533 G01N21/78.C		
F-TERM分类号	2G054/AA08 2G054/AB04 2G054/CA23 2G054/CA28 2G054/EA03 2G054/GA01 2G054/GA03 2G054/GA04 2G054/GB02		
代理人(译)	诸田 胜保		
优先权	2007105264 2007-04-12 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了一种检测活化的免疫细胞的方法，该方法能够以高灵敏度检测免疫细胞活化后出现在免疫细胞表面的蛋白质。具体公开了一种检测活化的免疫细胞的方法，该方法包括通过使用利用量子点作为荧光探针的抗体来检测在免疫细胞活化后出现在免疫细胞表面上的蛋白质。

