

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5992393号  
(P5992393)

(45) 発行日 平成28年9月14日(2016.9.14)

(24) 登録日 平成28年8月26日(2016.8.26)

(51) Int.Cl.		F I	
<b>C 1 2 Q</b>	<b>1/02</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/02
<b>G O 1 N</b>	<b>33/48</b>	<b>(2006.01)</b>	G O 1 N 33/48 B
<b>G O 1 N</b>	<b>33/538</b>	<b>(2006.01)</b>	G O 1 N 33/538
<b>G O 1 N</b>	<b>33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 K
<b>C O 7 K</b>	<b>16/24</b>	<b>(2006.01)</b>	C O 7 K 16/24

請求項の数 24 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-257625 (P2013-257625)	(73) 特許権者	509095835
(22) 出願日	平成25年12月13日(2013.12.13)		オックスフォード イミュノテック リミテッド
(62) 分割の表示	特願2009-530943 (P2009-530943) の分割		イギリス国 オックスフォードシャー アピンドン ミルトン パーク 91
原出願日	平成19年10月5日(2007.10.5)	(74) 代理人	100102978
(65) 公開番号	特開2014-112089 (P2014-112089A)		弁理士 清水 初志
(43) 公開日	平成26年6月19日(2014.6.19)	(74) 代理人	100119507
審査請求日	平成26年1月10日(2014.1.10)		弁理士 刑部 俊
(31) 優先権主張番号	0619853.5	(74) 代理人	100128048
(32) 優先日	平成18年10月6日(2006.10.6)		弁理士 新見 浩一
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(72) 発明者	デュラント イアン
			イギリス国 バッキンガムシャー ストーク マンデヴィル エスクデール ロード 46

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 調製方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の段階を含む、インビトロ細胞性免疫アッセイを行う方法：

- (i) 個体からの全血試料を少なくとも8時間保存する段階；
- (ii) ポジティブまたはネガティブ親和性選択段階を包含している方法により前記保存試料中に存在する顆粒球からT細胞および抗原提示細胞の集団を精製する段階；および
- (iii) 前記細胞の集団を細胞性免疫アッセイで用いて、T細胞における抗原特異的応答を測定する段階。

【請求項 2】

前記試料が少なくとも10時間保存される、請求項1記載の方法。

10

【請求項 3】

前記試料が少なくとも12時間保存される、請求項2記載の方法。

【請求項 4】

前記試料が12から36時間、12から48時間、または24から48時間保存される、請求項3記載の方法。

【請求項 5】

前記試料が2～8 で保存される、請求項1から4のいずれか一項記載の方法。

【請求項 6】

前記試料が18～25 で保存される、請求項1から4のいずれか一項記載の方法。

【請求項 7】

20

前記精製方法が顆粒球を取り除くためのネガティブ親和性選択段階を含む、請求項1から6のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8】

前記試料を抗CD66b抗体および抗グリコホリンA抗体を含む抗体調製物と接触させて、赤血球および顆粒球を凝集させる段階、ならびに遠心分離により調製物から該赤血球および顆粒球を取り除く段階を含む、請求項7記載の方法。

【請求項 9】

抗CD15リガンドを含む固体支持体と前記試料を接触させて試料からCD15+細胞を取り除くことにより、前記顆粒球が取り除かれる、請求項7記載の方法。

【請求項 10】

前記固体支持体が磁気ビーズを含み、方法が、試料を該磁気ビーズと接触させてCD15+細胞をビーズに結合させる段階、およびCD15+細胞が結合しているビーズを試料から分離する段階を含む、請求項9記載の方法。

【請求項 11】

試料中の赤血球が溶解またはろ過により取り除かれる、請求項9から10のいずれか一項記載の方法。

【請求項 12】

精製が、試料における、全細胞に対するT細胞の比率および全細胞に対する抗原提示細胞の比率の両方の増加をもたらす；かつ/または試料が、保存または精製または細胞性免疫アッセイでの使用の前のいかなる時点でも凍結されていない、請求項1から11のいずれか一項記載の方法。

【請求項 13】

T細胞の全ての種類を選択する、前記細胞に対するポジティブ親和性選択段階を含む、請求項1から6のいずれか一項記載の方法。

【請求項 14】

前記試料と、前記T細胞および抗原提示細胞の表面上に存在する細胞表面タンパク質に結合するリガンドが付着している固体支持体とを接触させ、それによってT細胞および抗原提示細胞の調製物を単離する段階を含む、請求項13記載の方法。

【請求項 15】

CD4+、CD8+、CD19+および/またはCD14+細胞を全血試料から単離するために、前記固体支持体が、1つまたは複数の抗CD4、抗CD8、抗CD19および抗CD14リガンドを含む、請求項14記載の方法。

【請求項 16】

T細胞および抗原提示細胞の前記調製物が、アッセイで用いる前に固体支持体から分離される、請求項14または15記載の方法。

【請求項 17】

T細胞および抗原提示細胞の前記調製物が、アッセイで用いるために前記固体支持体上で保持される、請求項14または15記載の方法。

【請求項 18】

前記固体支持体が磁気ビーズを含む、請求項14から17のいずれか一項記載の方法。

【請求項 19】

各前記磁気ビーズがそれに抗CD4、抗CD8および抗CD19リガンドを結合させている、請求項18記載の方法。

【請求項 20】

各磁気ビーズがそれに1つまたは複数の抗CD4、抗CD8または抗CD19リガンドを結合させており、かつ該磁気ビーズが、一緒に混合されCD4+、CD8+およびCD19+細胞に結合する固体支持体を提供する、請求項18記載の方法。

【請求項 21】

細胞性免疫アッセイがELISPOTアッセイである、請求項1から20のいずれか一項記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 2 2】

試料が-5 ~ 40 の温度で8から48時間保存される、請求項1から21のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 2 3】

以下を含む、請求項21記載の方法を行うためのキット：

- (i) マイクロタイタープレートに付着させた、サイトカイン特異的抗体、ならびに
- (ii) 固体支持体に結合させた、抗CD15、抗CD4、抗CD8、抗CD19および抗CD14リガンド/抗体からなる群より選択される1つまたは複数のリガンド/抗体、ならびに
- (iii) 細胞を保存しかつ精製する方法を行うための説明書、および/またはELISPOTアッセイを行うための説明書。

10

## 【請求項 2 4】

請求項1から20のいずれか一項記載の方法において使用するためのキットであって、

- (i) 固体支持体に結合させた、抗CD15、抗CD4、抗CD8、抗CD19および抗CD14リガンド/抗体からなる群より選択される1つまたは複数のリガンド/抗体；ならびに
  - (ii) 精製を行うための説明書
- を含む、T細胞および抗原提示細胞の集団を精製するための前記キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

## 発明の分野

20

本発明は、全血試料から細胞を保存しかつ精製するための方法に関する。特に、発明は、リンパ球および抗原提示細胞の集団がインビトロで細胞性免疫反応を測定するアッセイで用いるのに有効に安定化されかつ精製されるように、全血試料から細胞を保存しかつ精製するための方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

## 発明の背景

細胞性免疫(CMI)反応は、個体の免疫状態を定義するために一般に用いられる。通常、臨床免疫学の技術分野において、CMI反応という用語は、インビボ皮膚試験、リンパ球増殖アッセイ、および特定の抗原の存在下で末梢血単核球(PBMC)により産生されるサイトカインのインビトロ検出を包含する。本明細書において記載される発明は、1つのクラスのCMI反応、すなわち特定の抗原に対するサイトカインに基づくインビトロCMI反応を測定するよう設計されたアッセイ技術(以下「CMIアッセイ」と略す)で用いるための、単離された全血試料由来の細胞を操作し、安定化し、調製するための改良された方法に対応する。

30

## 【0003】

免疫系の細胞は、抗原による刺激に続いてサイトカインなどの免疫エフェクター分子を産生する能力がある。CMIアッセイは、細胞試料を抗原と共にインキュベートする段階、およびサイトカインなどの免疫エフェクター分子の存在または量を測定し、個体の選択された抗原に対して細胞性免疫反応を生ずる能力の指標を提供する段階を含む。CMIアッセイで用いる細胞はまた、リンパ球(特にT細胞)および抗原提示細胞(APC)の単離された集団を含む。APCは、終わりに近い方が各T細胞の表面上のT細胞受容体により認識され得るため、抗原のプロセッシングに関係する。抗原で誘導されたサイトカインは、アッセイ培地内に放出され、例えば、ELISA法により直接検出されるか、またはELISPOT法を用いてサイトカイン-分泌T細胞の頻度に換算して定量化され得る。

40

## 【0004】

他に酵素結合イムノスポットアッセイ(ELISPOT)と呼ばれるフィルター免疫ブランクアッセイは、当初、個体の抗体-分泌B細胞を検出し定量化するために開発された。それが開発された時に、その技術は、通常のブランクを形成する細胞アッセイに代わる迅速かつ汎用性のある代替法を提供した。最近の改良は、一秒あたりわずか100分子の特定のタンパク質しか産生しない細胞を検出できるように、ELISPOTの感度を改善している。これらの

50

アッセイは、タンパク質を分泌する細胞を直接取り巻く環境で(サイトカインなどの)特定のタンパク質性細胞産物の濃度が比較的高いことを利用する。これらの細胞産物は、高親和性抗体を用いて捕獲および検出される。ELISPOTアッセイは、Current Protocols in Immunology, Unit 6.19 pages 6.19. 1-8(非特許文献1)で概説される。

【0005】

ELISPOTアッセイは通常、6つの段階を含む：(1)精製したサイトカイン特異的抗体を膜付きマイクロタイタープレートにコーティングする段階；(2)プレートをブロッキングし、任意の他のタンパク質の非特異的な吸着を防ぐ段階；(3)サイトカインを分泌する細胞を適当な試薬と共にインキュベートする段階；(4)細胞および試薬を取り除く段階；(5)標識された二次抗サイトカイン抗体を加える段階；ならびに(6)膜上の抗体-サイトカイン複合体を検出する段階。

10

【0006】

CMIアッセイで用いるために全血試料から細胞を調製する現行の方法は、フィコール勾配を用いる末梢血単核球(PBMC)の単離を含む。これらの方法によると、CMIアッセイで有効なものとするために、リンパ球およびAPCは、可能な限り速やかに、具体的には個体からの血液試料の採集の8時間以内に血液試料から精製されなければならない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Current Protocols in Immunology, Unit 6.19 pages 6.19. 1-8

20

【発明の概要】

【0008】

本発明は、ELISPOTアッセイなどの細胞性免疫アッセイ(cell-mediated immunoassay) (CMIアッセイ)で用いるために全血試料から細胞を保存しかつ精製する方法を明らかにしている。保存前に全血試料を処理するための方法もまた明らかにされる。これらの方法は、ELISPOTアッセイなどのCMIアッセイで用いる前に、例えば48時間までなどの少なくとも6時間全血試料の保存を可能にする。

【0009】

本発明によると、全血試料から細胞を保存し精製する方法であって、該試料を細胞の精製前および/または精製後に少なくとも6時間保存する段階、ならびにポジティブまたはネガティブ親和性選択段階を包含している方法により細胞性免疫アッセイ(CMIアッセイ)で用いるためのリンパ球およびAPCの集団を精製する段階を含む方法が提供される。

30

【0010】

本発明の別の局面によると、増殖培地での希釈により全血試料を処理する段階、および少なくとも6時間処理された全血試料を保存する段階を含む、該全血試料を処理しかつ保存する方法であって、保存後に、リンパ球およびAPCの集団をCMIアッセイで用いるために得ることができる方法が提供される。保存後に、PBMCまたはリンパ球およびAPCの適切な調製物が、ELISPOTアッセイなどのCMIアッセイで用いるために、希釈された全血試料から単離され得る。

【0011】

本発明の別の局面において、ELISPOTアッセイにおいて全血に由来する単離されたT細胞のペプチド特異的サイトカイン反応を維持する方法であって、ポジティブまたはネガティブ親和性選択を用いて全血試料からT細胞およびAPCを含む細胞の集団を分離する段階を含む方法が提供される。

40

【0012】

本発明のさらなる局面において、ELISPOTアッセイで用いるのに適したリンパ球およびAPCを調製する方法であって、ろ過により赤血球を取り除く段階を含む方法が提供される。

[請求項101]

全血試料由来の細胞を保存しかつ精製する方法であって、該試料を細胞の精製前および/または精製後に少なくとも6時間保存する段階、ならびにポジティブまたはネガティブ

50

親和性選択段階を包含している方法により細胞性免疫アッセイ (cell-mediated immunoassay) (CMIアッセイ) で用いるためのリンパ球および抗原提示細胞の集団を精製する段階を含む、前記方法。

[請求項102]

前記試料が少なくとも10時間保存される、請求項101記載の方法。

[請求項103]

前記試料が少なくとも12時間保存される、請求項102記載の方法。

[請求項104]

前記試料が12から36時間、12から48時間、または24から48時間保存される、請求項103記載の方法。

[請求項105]

前記試料が2～8 で保存される、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

[請求項106]

前記試料が18～25 で保存される、請求項101から104のいずれか一項記載の方法。

[請求項107]

前記精製方法が顆粒球を取り除くためのネガティブ親和性選択段階を含む、請求項101から106のいずれか一項記載の方法。

[請求項108]

前記試料を抗CD66b抗体および抗グリコホリンA抗体を含む抗体調製物と接触させて、赤血球および顆粒球を凝集させる段階、ならびに遠心分離により調製物から該赤血球および顆粒球を取り除く段階を含む、請求項107記載の方法。

[請求項109]

前記顆粒球が、前記試料を抗CD15リガンドを含む固体支持体と接触させて試料からCD15+細胞を取り除くことにより取り除かれる、請求項107記載の方法。

[請求項110]

前記固体支持体が磁気ビーズを含む方法であって、試料を該磁気ビーズと接触させてCD15+細胞をビーズに結合させる段階、およびCD15+細胞が結合しているビーズを試料から分離する段階を含む、請求項109記載の方法。

[請求項111]

試料中の赤血球が溶解またはろ過により取り除かれる、請求項109から110のいずれか一項記載の方法。

[請求項112]

精製が、試料における、全細胞に対するT細胞の比率および全細胞に対する抗原提示細胞の比率の両方の増加をもたらす;かつ/または試料が、保存または精製またはCMIアッセイでの使用の前のいかなる時点でも凍結されていない、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

[請求項113]

前記細胞に対するポジティブ親和性選択段階を含む方法であって、任意で該親和性選択段階がT細胞の全ての種類を選択する、請求項101から106のいずれか一項記載の方法。

[請求項114]

前記試料と、前記リンパ球および抗原提示細胞の表面上に存在する細胞表面タンパク質に結合するリガンドが付着している固体支持体とを接触させ、それによってリンパ球および抗原提示細胞の調製物を単離する段階を含む、請求項113記載の方法。

[請求項115]

CD4+、CD8+、CD19+および/またはCD14+細胞を全血試料から単離するために、前記固体支持体が、1つまたは複数の抗CD4、抗CD8、抗CD19および抗CD14リガンドを含む、請求項114記載の方法。

[請求項116]

リンパ球および抗原提示細胞の前記調製物が、アッセイで用いる前に固体支持体から分離される、請求項114または115記載の方法。

10

20

30

40

50

[請求項117]

リンパ球および抗原提示細胞の前記調製物が、アッセイで用いるために前記固体支持体上で保持される、請求項114または115記載の方法。

[請求項118]

前記固体支持体が磁気ビーズを含む、請求項114から117のいずれか一項記載の方法。

[請求項119]

各前記磁気ビーズがそれに抗CD4、抗CD8および抗CD19リガンドを結合させている、請求項118記載の方法。

[請求項120]

各磁気ビーズがそれに1つまたは複数の抗CD4、抗CD8または抗CD19を結合させており、かつ該磁気ビーズがCD4+、CD8+およびCD19+細胞に結合している固体支持体を提供するように一緒に混合される、請求項118記載の方法。

10

[請求項121]

全血試料を増殖培地で希釈する段階、および処理された全血試料を少なくとも6時間保存する段階を含む、該全血試料を処理しかつ保存する方法であって、保存後に、リンパ球および抗原提示細胞の集団を、細胞性免疫アッセイ(CMIアッセイ)で用いるために得ることができる、前記方法。

[請求項122]

細胞性免疫アッセイで用いるために、保存後に前記全血試料からリンパ球および抗原提示細胞の調製物を精製する段階をさらに含む、請求項121記載の方法。

20

[請求項123]

前記全血試料が細胞増殖培地により1:1の比率で希釈される、請求項121または122記載の方法。

[請求項124]

前記細胞増殖培地 AIM-Vである、請求項121、122または123記載の方法。

[請求項125]

請求項101から120または122のいずれか一項記載の方法に従って全血試料を保存する段階ならびにリンパ球および抗原提示細胞の集団を精製する段階、ならびにリンパ球および抗原提示細胞の調製物をELISPOTアッセイで用いる段階を含む、ELISPOTアッセイを行う方法。

30

[請求項126]

ELISPOTアッセイにおいて全血に由来する単離したT細胞のペプチド特異的サイトカイン反応を維持する方法であって、ポジティブまたはネガティブ親和性選択を用いて全血試料からT細胞および抗原提示細胞を含む細胞の集団を単離する段階を含む、前記方法。

[請求項127]

- T細胞および抗原提示細胞の集団が、請求項107から126のいずれか一項で定義される方法により全血から単離される;かつ/または

- 前記試料が、親和性選択前に少なくとも10時間、少なくとも12時間、もしくは12から36時間、12から48時間もしくは24から48時間保存される;かつ/または

- 前記試料が、親和性選択前に2~8 しくは18~25 で保存される、  
請求項126記載の方法。

40

[請求項128]

ELISPOTアッセイで用いるのに適したリンパ球および抗原提示細胞を調製する方法であって、ろ過により赤血球を取り除く段階、任意で、赤血球はフィルターに通過させながら前記全血試料をフィルターに通し、続いてリンパ球および抗原提示細胞をフィルターから集める段階を含む、前記方法。

[請求項129]

前記フィルターを逆洗して(back flush)、前記リンパ球および抗原提示細胞を回収する、請求項128記載の方法。

[請求項130]

50

ヒト由来の試料に対して行われる方法であって、任意で該試料が疾患を診断するためのCMIアッセイで用いられる、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

[請求項131]

以下を含む、請求項125の方法を行うためのキット:

- (i) 任意でマイクロタイタープレートに付着させた、サイトカイン特異的抗体、ならびに
- (ii) 任意で固体支持体に結合させた、請求項109および115のいずれか一項で定義される1つまたは複数のリガンド/抗体、ならびに
- (iii) 任意で、細胞を保存しかつ精製する方法を行うための説明書、および/またはELISPOTアッセイを行うための説明書。

10

[請求項132]

以下を含む、請求項101から120、126および127のいずれか一項記載のリンパ球および抗原提示細胞の集団を精製するためのキット:

- (i) 任意で固体支持体に結合させた、請求項109および115のいずれか一項で定義される1つまたは複数のリガンド/抗体;ならびに
- (ii) 任意で、精製を行うための説明書。

**【発明を実施するための形態】**

**【0013】**

**発明の詳細な説明**

本発明は、ELISPOTアッセイなどのCMIアッセイで用いるために全血試料から細胞を保存しかつ精製する方法を提供する。本発明はまた、細胞増殖培地での希釈により全血試料を処理し、処理された全血試料を保存する方法を提供する。この方法は、血液試料から単離されたリンパ球およびAPCのペプチド特異的サイトカイン反応をELISPOTアッセイなどのCMIアッセイで用いるのに十分であるように、好ましくは診断方法で有用であるようにすることができる。

20

**【0014】**

本発明によると、細胞性免疫アッセイ(CMIアッセイ)は、特定の抗原に対するサイトカインによる細胞性免疫反応を測定するためのインビトロアッセイを指す。そのようなアッセイは、個体から得られた試料を用い、この試料は免疫系の細胞を含む。免疫系の細胞は、抗原による刺激に続いて、サイトカインなどの免疫エフェクター分子を産生することができる。そのようなアッセイは、試料を抗原と共にインキュベートする段階、およびサイトカインなどの免疫エフェクター分子の存在または量を測定し、選択された抗原に対して細胞性免疫反応を生じる個体の能力の指標を提供する段階を含む。本発明によると、CMIアッセイは、好ましくはELISPOTアッセイである。ELISPOTアッセイなどのCMIアッセイで用いるための細胞は、T細胞およびAPCの集団などのリンパ球およびAPCの単離された集団を含む。

30

**【0015】**

本方法にしたがって調製されるリンパ球およびAPCならびに特にT細胞およびAPCの単離された調製物は、診断で用いるためのELISPOTアッセイなどのCMIアッセイで用いられ得る調製物を提供する。そのような調製物は、診断を可能にするのに十分な反応を生じる。そのような反応は、背景より50%高いものとして定義してもよい。あるいは、そのような反応は、新鮮に単離された全血試料を用いて得られうる最大反応の少なくとも50%であるとして定義されうる。

40

**【0016】**

例えば、通常のアッセイでは、ELISPOTアッセイにおいて1ウェルあたり $2.5 \times 10^5$ の生存能力のあるPBMCが用いられる可能性がある。結核に対するELISPOTアッセイでは通常、陰性対照は5スポットより少ない。この場合、陽性または反応性の試料は、陰性対照より6またはそれより多いスポットを有する。陰性対照が6またはそれより多いスポットを有する場合、反応性試料は陰性対照スポット数の2倍より多く含んでいるかどうかで示される。

**【0017】**

50

1つの態様において、本発明の方法は、保存の前または後に、ポジティブ親和性選択段階またはネガティブ親和性選択段階を用いて全血試料から細胞を精製する。ポジティブ親和性選択段階は、対象の細胞を固体支持体に結合させ、よって非結合細胞から結合細胞を分離するために用いられる。精製された結合細胞は保持され、非結合細胞は捨てられる。

【0018】

別の方法では、ELISPOTアッセイなどのCMIアッセイで用いるための細胞調製物において必要とされないまたは望ましくない細胞を取り除くために、ネガティブ親和性選択段階が用いられる。したがって、固体支持体に結合した細胞が捨てられ、精製された非結合細胞が回収され保持される。

【0019】

この方法は、(T細胞などの)リンパ球およびAPC両方の精製をもたらす。精製は、リンパ球およびAPC両方のポジティブまたはネガティブ親和性選択を含んでもよく、その場合通常、これらの細胞の種類両方の試料において濃縮される、すなわち、発明の方法を行った結果として細胞の総数に対するT細胞の比率および細胞の総数に対するAPC比率が試料中で増加する。

【0020】

発明の1つの局面によると、全血試料は、ポジティブまたはネガティブ親和性選択段階を含む方法により細胞を全血試料から精製する段階の前におよび/または後に保存される。例えば、全血試料は、選択された細胞集団の単離の前に保存されてもよい。少なくとも6時間、少なくとも8時間、10、12、18、24、36または48時間まで保存の後に、全血試料は、処理され(すなわち親和性選択に供され)、その後ELISPOTアッセイなどのCMIアッセイで用いられ得る選択された細胞集団が単離される。別の方法では、全血試料は、得られたすぐ後に、例えば選択された細胞集団を単離するために得られた後1時間以内、6時間まで、または8時間までに処理され(すなわち親和性選択に供され)、選択された細胞集団が単離される。そのような細胞集団は次に、ELISPOTアッセイなどのCMIアッセイに用いる前に保存される。

【0021】

好ましくは、全血試料は、-5 から40、通常2 から8 または18 から25 で保存される。特に好ましい態様において、全血試料は、約18 もしくは20、または18 から25、または20 から25 などの室温で保存される。

【0022】

1つの態様において、試料は、本明細書において言及されるいかなる方法のいかなる段階においても凍結されない。1つの態様において、試料は、個体から採取される段階と(発明の方法により)保存されかつ精製される段階の間で凍結されず；かつ/または試料は、保存されかつ精製される段階とCMIアッセイで用いられる段階の間で凍結されない。

【0023】

本発明の1つの局面において、精製方法は、ELISPOTアッセイで用いるリンパ球およびAPCの調製物を得るために、全血試料から顆粒球および任意で赤血球を取り除くためのネガティブ親和性選択段階を含む。

【0024】

したがって、本発明の1つの局面によると、一段階で顆粒球および赤血球の両方を全血試料から取り除く方法が提供される。この方法によると、全血試料は、抗CD66b抗体および抗グリコホリンA抗体を含む抗体調製物と接触する。抗体は、赤血球および顆粒球を凝集するよう機能する。凝集させた赤血球および顆粒球は、例えば遠心分離により、試料から取り除かれ得る。試料はまた、遠心分離の前にフィコール勾配に供されてもよい。

【0025】

発明の別の局面において、ネガティブ親和性選択は、顆粒球の表面上に存在する細胞表面タンパク質に結合し、ELISPOTアッセイで用いられるリンパ球およびAPCの表面上に存在する細胞表面タンパク質には結合しないリガンドが結合している固体支持体の使用を含む。例えば、試料由来のCD 15+細胞に結合する抗CD15リガンドおよび/または試料由来のCD

10

20

30

40

50

66b+細胞を取り除くための抗CD66bを含む固体支持体が提供されうる。

【0026】

本発明のこの局面によると、全血試料、または赤血球を取り除くよう処理されている血液試料は、顆粒球の結合を許容する条件下で、抗CD15リガンドまたは抗CD66bリガンドを含む固体支持体と接触する。顆粒球が取り除かれているリンパ球またはAPCの調製物は、例えば試料を固体支持体と接触させてから固体支持体に結合しない任意の物質を集めることにより、直接得ることが可能である。

【0027】

別の方法において、顆粒球または他の望ましくない細胞が結合している固体支持体が、試料の残りから分離され得る。例えば、固体支持体は、磁気ビーズなどのビーズを含みうる。ひとたびビーズが固体支持体への顆粒球の結合を許容する条件下で試料と結合すれば、ビーズは、顆粒球が取り除かれれているリンパ球およびAPCの調製物を残すよう試料から分離されうる。好ましい態様において、固体支持体は、例えば磁場の適用により試料の残りから分離され得る磁気ビーズを含む。

10

【0028】

顆粒球の表面上の細胞表面マーカーに結合する能力を有する他のリガンド、特に抗体が、ネガティブ親和性選択で用いられる可能性がある。例えば、以下の抗体もまた、この方法により顆粒球を取り除くために用いられる可能性がある：抗CD16bおよび/または抗CD88。

【0029】

好ましくは、本発明のこの局面によると、赤血球もまた全血試料から取り除かれる。これは、CD15+発現細胞または顆粒球の除去の前に、後に、または同時に行われ得る。

20

【0030】

赤血球は、任意の適切な方法により試料から取り除かれ得る。例えば、試料中の赤血球は赤血球の溶解により取り除いてもよい(Simon et al., Immunol. Commun. 1983, Vol. 12, pp. 301-314)。

【0031】

発明の1つの局面によると、赤血球は、ろ過により取り除かれる。発明のこの局面によると、赤血球を取り除くためのろ過を含む、ELISPOTアッセイなどのCMIアッセイで用いるためのリンパ球およびAPCの調製のための方法が提供される。そのような方法は、それ自体で、または抗CD15+リガンドによって顆粒球を取り除くネガティブ親和性選択など1つもしくは複数の発明の方法と共に、用いられ得る。

30

【0032】

本出願のろ過方法は、フィルターに全血試料を適用する段階を含む。フィルターは、リンパ球およびAPCがフィルタ上に保持される一方で、赤血球はフィルタを通過するように、選択される。この方法によると、フィルター上にリンパ球およびAPCを有するフィルターが、ELISPOTアッセイなどのCMIアッセイで直接用いられ得る。あるいは、リンパ球およびAPCは、例えばフィルタを洗浄するまたはフィルタを逆洗してから(back flush)、回収されるリンパ球およびAPCを集めることにより、集められうる。

【0033】

本発明の別の局面によると、リンパ球およびAPCの調製物は、ポジティブ親和性段階を含む方法により全血試料から精製され、任意で親和性選択段階は全ての種類のT細胞(例えば、CD4もしくはCD8であるかに関係なく、または認識するエピトープに関係なく)を選択する。

40

【0034】

1つの局面において、全血試料は、リンパ球およびAPCの表面上に存在する細胞表面タンパク質に結合するリガンドが付着している固体支持体と接触する。リガンドは抗体であってもよい。

【0035】

本発明の好ましい局面において、そのようはリガンドは、抗CD4、抗CD8、抗CD19、抗CD

50

45、抗CD45RCおよび抗CD14リガンドから選択される。例えば、固体支持体は、全血試料中のCD4+、CD8+、CD14+およびCD19+細胞またはCD4+、CD8+およびCD19+細胞などのサブセットに結合するよう提供され得る。そのような細胞の単離は、ELISPOTアッセイで用いるのに適しているリンパ球およびAPCの調製物を提供する。そのような調製物は、CD4+およびCD8+Tリンパ球、B細胞および単球の混合物を包含する。1つの態様において、抗CD4および/または抗CD8リガンドは、精製段階において用いられず、好ましくは抗CD4抗体および/または抗CD8抗体が、精製段階において用いられない。

【0036】

好ましい態様において、固体支持体上のリガンドは、顆粒球などの最終調製物中に望ましくない細胞が固体支持体上に保持されないように選択される。例えば、リガンドは、リンパ球およびAPCに特異的であり、かつ顆粒球に結合しないように選択される。固体支持体は、ほぼ同じ割合の抗CD4、抗CD8および抗CD19リガンドまたは他の適切なリガンドと共に提供され得る。あるいは、個々のリガンドの比率は、例えば全血中に存在する各細胞の割合を反映させるよう選択され得る。別の方法では、CD4リガンド:CD8リガンド:CD19リガンドなどのリガンドの比率は、ELISPOTアッセイで用いるのに特に適している比率など望ましい比率でリンパ球およびAPCに結合し単離するよう選択され得る。

10

【0037】

選択したタンパク質に結合するために、リガンドが結合している固体支持体を用いる親和性選択の方法は、当技術分野において周知である。一般に、全血試料は、関連する細胞表面タンパク質を介する細胞のリガンドへの結合を許容する条件下で、対象のリガンドを含む固体支持体に接触する。固体支持体は、非結合物質から結合した細胞を分離するために、試料の残りから分離され得る。洗浄する段階は、例えば固体支持体から非結合物質をすすぐために含まれる可能性がある。

20

【0038】

本発明の好ましい局面において、固体支持体は磁気ビーズを含む。そのような磁気ビーズは、例えば磁場の適用により試料から容易に分離され得る。固体支持体が磁気ビーズまたは他の種類のビーズの形で提供される場合、各ビーズは抗CD4リガンドなどの単一のリガンドがその上に存在する可能性がある。抗CD4、抗CD8、抗CD14または抗CD19などの各リガンドを個別に保有するビーズは、CD4+、CD8+、CD14+およびCD19+細胞などの所望の細胞に結合する固体支持体を作製するために一緒に組み合わせられる。別の方法では、各磁気ビーズは、抗CD4および抗CD8リガンドの両方、または抗CD4および抗CD19リガンドまたは全てのリガンドの組み合わせなど、1つより多いリガンドと共に提供される。特に好ましい態様において、抗CD4:抗CD8:抗CD19などのリガンドの比率は、ELISPOTアッセイで用いる最終調製物で所望のリンパ球およびAPCの比率に相関するよう選択される。磁気ビーズの量はまた、選択した数の細胞を単離するために、ELISPOTアッセイで用いる調製物のその後の処理を容易にするように選択され得る。

30

【0039】

選択された細胞の調製物、および特に固体支持体結合するリンパ球およびAPCは、直接アッセイで用いられ得る。特に、関連する細胞に結合するリガンドを有する磁気ビーズは、ELISPOTアッセイなどのCMIアッセイで用いられ得る。好ましくは、ビーズに結合した細胞を有するビーズは、アッセイで用いる前に洗浄される。別の方法では、選択された細胞が全血試料の残りから単離されれば、固体支持体に結合した細胞は、アッセイで用いるために固体支持体から分離され得る。

40

【0040】

本発明の別の局面において、全血試料は、ELISPOTアッセイなどのCMIアッセイで用いられる前に、細胞増殖培地での希釈により処理され保存される。希釈された全血試料は、収集後少なくとも6時間、例えば個体から収集後少なくとも8時間、好ましくは収集後10、12、18、24、36または48時間まで保存され得る。

【0041】

本発明のこの局面によると、全血試料は、保存前に安定化または処理される。例えば、

50

方法は、全血試料または前記保存された全血試料から得られるT細胞およびAPCの単離された調製物が、試料の収集後48時間までにELISPOTアッセイで用いられる場合、生存反応が維持されるよう、全血試料を細胞増殖培地で希釈する段階を含む。

【0042】

本発明によると、全血試料は、任意の適当な比率で細胞増殖培地により希釈され得る。好ましい態様において、全血試料と細胞増殖培地の比率は1:1である。あるいは、全血試料と細胞増殖培地の比率は、10:1、20:1または30:1まで、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1であり得る。あるいは、全血試料と細胞増殖培地の比率は、1:15、1:20または1:30まで、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9または1:10であり得る。

【0043】

1つの態様によると、希釈培地は、全血試料に加えらるが、振とうまたは機械的な混合に供されない。全血試料は好ましくは、標準的なヘパリン処置されたチューブ内に保存される。好ましくは、全血試料は暗黒中で保存される。

【0044】

発明で用いる細胞増殖培地は、任意の適切な細胞増殖培地であり得る。例えば、培地は、AIM-V (Invitrogen Paisley UK)、またはRPMI 1640(商標) (Sigma Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA)などの市販されている培地であり得る。好ましい態様において、細胞増殖培地は、AIM-Vなどの無血清培地である。

【0045】

発明の1つの局面によると、前記の処理された全血試料は、保存後にCMIアッセイで用いるために用いられる、または調製される。通常、PBMC、またはTリンパ球およびAPCの調製物は、CMIアッセイで用いるために保存後に前記の処理された全血試料から精製される。任意の適切な方法が、ELISPOTアッセイなどのCMIアッセイで用いるための単離された細胞の調製物を得るために用いられ得る。通常、PBMCは、例えばフィコール勾配を用いて、単離され得る。より好ましくは、赤血球および顆粒球が、親和性選択段階を含む方法により、例えばリンパ球およびAPCの調製物を単離するために処理された全血試料から取り除かれる。

【0046】

希釈による処理はまた、CMIアッセイで用いる前に調製物の保存に先だってリンパ球およびAPCの単離された調製物を処理するために、発明の別の局面においても用いられる可能性がある。

【0047】

発明のさらなる局面において、全血はまた、希釈の有無にかかわらず、数時間、好ましくは少なくとも6時間、または12時間まで、または12~48時間保存される可能性がある。そのようは保存は、2~8 で、または室温である可能性がある。保存に続いて、リンパ球およびAPCの調製物は、上記のような親和性選択により調製されてもよく、任意で、調製物中のT細胞のペプチド特異的反応がCMIアッセイで測定されうる。このように、CMIアッセイに組み込まれるT細胞のインビトロ活性が、安定化され、維持される。したがって、このアプローチは、血液試料が単離段階の前に数時間保存される場合、例えば標準的なフィコール勾配を用いて全血試料から単離されるリンパ球およびAPCの調製物中に観察される、インビトロでのT細胞活性の著しい減少を減少させる、または未然に防ぐ。

【0048】

本発明はまた、標準的なヘパリン処置されたチューブおよび細胞増殖培地を含む、全血試料を保存するためのキットを提供する。発明はまた、本明細書において開示されるような方法により保存および精製された細胞にELISPOTアッセイを行うためのキットも提供し、キットは以下を含む：

(i) 任意でマイクロタイタープレートに付着させた、サイトカイン特異的抗体、ならびに

(ii) 任意で固体支持体に結合させた、親和性選択で用いられ得る本明細書において言及される1つまたは複数のリガンド、ならびに

10

20

30

40

50

(iii) 任意で、ELISPOTアッセイおよび/または細胞を保存しかつ精製する方法を行うための説明書。

【0049】

さらに、発明はまた、発明にしたがってリンパ球およびAPCの集団を精製するためのキットを提供し、キットは任意で固体支持体に結合させた、本明細書において記述されている1つまたは複数のリガンドを含む。キットはまた、発明による方法を行うための説明書を含んでもよい。

【0050】

発明の他の態様において、全血試料は、試料を保存することなくELISPOTアッセイなどのCMIアッセイで用いるT細胞およびAPCの集団を単離するために、ポジティブまたはネガティブ親和性選択段階を用いて処理される。さらなる態様において、ポジティブまたはネガティブ親和性選択法は、ELISPOTアッセイなどのCMIアッセイで用いるための細胞の調製物を単離するために用いられ、そのような細胞は希釈により処理されかつ保存されている全血試料に由来する。

10

【0051】

上記態様はいずれも、ELISPOTにより診断が可能である疾患を有することが疑われるヒトなどのヒトに由来する試料に対して実施されうる。

【0052】

発明は、以下の実施例を参照することによりさらに詳しく以下に記載される。

【実施例】

20

【0053】

実施例1 - 培養培地での希釈による処理

静脈穿刺後直ちに、合計78ドナーそれぞれの、10 mlリチウムヘパリンバキュテナ(BD Biosciences, Oxford, UK)1本分の全血をT-SPOT.TBアッセイキット(Oxford Immunotec, Abingdon, UK)を用いて6ヶ月間にわたって処理した。キットに添付の製造者の説明書に従って方法を実施した。この方法は以下を含む：(a) 末梢血単核球(PBMC)の調製のための標準的なフィコール法 - Sample Collection and Preparation, Procedure 2の "alternative blood collection methods"およびNote 2.参照；(b) 生細胞をトリパンブルー色素排除法を用いて計数した(Freshney, R. (1987) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, p.117, Alan R. Liss, Inc., New York)；(c) 細胞をGIBCO AIM-V (Invitrogen, Paisley, UK)で希釈し100  $\mu$ lあたり250,000細胞とした；(d) 250,000個(100  $\mu$ l)のフィコール抽出細胞を抗ガンマインターフェロンで予めコーティングされた各マイクロタイタープレートウェルに以下のうち1つと共に加えた：フィットヘマグルチニン(PHA)陽性対照、またはM. tuberculosis由来の特定の試験抗原(パネルA、パネルB)、またはT-SPOT.TBキットで抗原が提供されないサイトメガロウイルス/エプスタイン・バーウイルス/インフルエンザウイルス由来の特定の試験抗原(CEF; Mabtech, Sweden)；(e) プレートを16から20時間(37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>)インキュベートし、アルカリフォスファターゼ結合二次抗体を添加する前にリン酸緩衝食塩水(PBS)で4回洗い、1時間2~8  $^{\circ}$ Cでインキュベートした；(f) ウェルを4回洗浄し、次に5-ブロモ-4-クロロ-3'-インドイルホスフェート/ニトロブルーテトラゾリウム(BCIP/NBT)を加え、7分間インキュベートした。スポットが発生した後に、反応を蒸留水を用いて停止した；(g) 37  $^{\circ}$ Cで4時間乾燥させた後、各ウェルでスポットを形成した細胞(SFC)の数を記録し、解析した。

30

40

【0054】

各ドナー由来の残った血液を、AIM-Vで1:1に希釈し、室温(18~25  $^{\circ}$ C)で暗中で一晚24時間保存した。

【0055】

2日目に、PBMCの調製のための標準的なフィコール法を含むT-SPOT.TBアッセイを保存された血液について行った。次に、T-SPOT.TBアッセイをポジティブ対照(PHA)および(抗原を欠いている)陰性対照(nil control)を用いて行い、SFC数を決定した。陰性対照を試験抗原ウェルSFC数から差し引いた。抗原ウェルのいずれかが6またはそれより多いスポット

50

を含み、陰性対照が0個のスポットを含む場合、試料をその非試験抗原に対して「反応性がある」と見なした。下記の表は、新鮮な血液と希釈し保存された血液との間の関連性を示す。反応性および非反応性の結果は、(AIM-Vで1:1希釈の後)室温(RT)で一晩血液を保存する前および後の両方の各ドナー血液試料に関するパネルAウェル、パネルBウェルおよびCEFウェルを用いて示される。ドナーの総数に対するパーセンテージもまた示される。CEFの抗原は、AIM Vで溶解され、アッセイ中に5 µg/mlのレベルで存在した。

パネルAの抗原		
	新鮮な血液	
希釈/保存血液	反応性あり	反応性なし
反応性あり	3 (3.8%)	1 (1.3%)
反応性なし	2 (2.6%)	72 (92.3%)

96.2%の臨床上一致

パネルBの抗原		
	新鮮な血液	
希釈/保存血液	反応性あり	反応性なし
反応性あり	5 (6.7%)	0 (0%)
反応性なし	3 (4%)	67 (89.3%)

96%の臨床上一致

CEFの抗原		
	新鮮な血液	
希釈/保存血液	反応性あり	反応性なし
反応性あり	28 (77.8%)	0 (0%)
反応性なし	5 (13.9%)	3 (8.3%)

#### 【0056】

結果は、(陰性対照より6スポット多い場合に反応性を示すと仮定して) 86.1%の臨床上一致を示した。

#### 【0057】

したがって、血液試料への培地の添加により、24時間保存後のPBMC中で陽性SFC反応が測定可能となり、収集後すぐに処理された血液を測定した場合に見られるのと同様の反応であった(結果は示さず)。培地を添加することなく、集められ24時間保存された血液は、測定可能なCMI反応の有意な減少を示した(結果は示さず)。

#### 【0058】

#### 実施例2 - ポジティブ親和性選択

一日目に、静脈穿刺の2時間以内に、9ドナーそれぞれに由来する10 mlリチウムヘパリンバキュティナ2本分の全血を、1本は暗室RT (18~25 )で、もう1本は冷蔵庫内(2~8 )で保存した。

#### 【0059】

各ドナーに対する静脈穿刺後0~2時間(新鮮)または24時間(保存)のいずれかの各時点で、3 mlの全血を洗浄バッファー(PBS/0.1% BSA/ 2mM EDTA)で1:1に希釈し、80 µlの特定の磁気Dynabeadのカクテル、すなわち均等な割合で混合されている111.45 (CD4)、111.47 (CD8)、111.49 (CD14)、および111.43 (CD19) (Invitrogen)と混合した。これらの「ビーズ」は、特定の分化(CD)マーカー:T細胞サブセットに対するCD4およびCD8、CD14(単球)およびCD19(B細胞およびAPC)の存在に基づいて細胞を陽性を選択する。試料をRTで12分間混合し、試料チューブを磁性粒子収集装置(magnetic particle concentrator) (MPC: Invitrogen, Paisley, UK)内に2分間置くことにより、ビーズを分離した。上清を廃棄し、ビーズをPBSで2回洗浄し、次に再びMPCで分離した。次にビーズを1 ml AIM-V中で再懸濁し、細胞をトリパンブルー色素排除法を用いて計数した。100 µlあたり250,000細胞となるように細胞をAIM-Vで希釈した。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 6 0 】

並行して、各ドナーについて静脈穿刺後0～2時間(新鮮)または24時間(保存)のいずれかの時点で、実施例1に示されているような標準的なフィコール法を用いて、5 mlの全血を速やかに処理した。

## 【 0 0 6 1 】

次に、全ての処理された試料を、いずれもT-SPOT.TBキットで提供されない、抗原CEF (5 µg / ml)、またはPPD (1 µg / ml)、またはPPD/CEF (それぞれ1 µg/mlおよび5 µg/ml)をアッセイウェル中に用いる、T.SPOT.TBアッセイキット(実施例1参照)を用いてアッセイした；PPD (製品コード RT23)をStatens Serum Institut (Copenhagen, Denmark)から入手した；CEFについては実施例1を参照のこと。PPDおよびCEFをそれぞれ、CD4+およびCD8+T細胞を同定するために用いた。

## 【 0 0 6 2 】

全てのドナーの結果の平均を包含している以下の表は、CD4、CD8、CD14 & CD19を結合した磁気ビーズを用いて新鮮なまたは保存された血液から選択された細胞についてELISPOTにより測定されたSFC数を、フィコールのみを使用した場合と比較して表示する。RTで24時間保存したビーズを用いて選択した血液は、「新鮮なビーズ」試料に匹敵する結果を生じ、および「フィコールのみの」試料をRTで保存した場合、ならびに「フィコールのみ」および「ビーズ」の両方を4 で保存した場合よりもよい結果を生じた。

抗原	新鮮		保存 (24時間)			
	フィコール	ビーズ	フィコール (4°C)	フィコール (22°C)	ビーズ (4°C)	ビーズ (22°C)
PPD	100	78	15	41	53	70
CEF	100	194	13	45	111	149
PPD/CEF	100	136	14	43	82	109
PPD		71.40	18.21	35.06	67.34	49.67
CEF		109.20	18.51	37.24	87.54	109.40
PPD/CEF		81.80	1.52	2.85	40.89	56.25

結果を、フィコールのみで処理された「新鮮な」試料がELISPOTアッセイで100%のSFC数を産生すると仮定して正規化した。上部3列はSFC数の平均値を示し、下部3列は標準偏差を示す。

## 【 0 0 6 3 】

## 実施例3 - ネガティブ親和性選択

静脈穿刺後直ちに、10 ml リチウムヘパリンバキュテイナ2本分の全血を4ドナーそれぞれから1ヶ月間にわたって集めた。

## 【 0 0 6 4 】

各ドナー由来の1つの試料について、MACSi 抗CD15 磁気ビーズ(Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany)を用いて、ネガティブ選択段階を行った。均一分散を確実にするために、ビーズを使用前に徹底的に再懸濁した。400 µlのビーズを15 mlコニカルチューブ中の4 mlの全血に加えた。チューブをRTでMACSiMix (Miltenyi Biotech)チューブローターを用いて中速(8 rpm)で15分間インキュベートした。チューブをMACSiMagセパレーター(Miltenyi Biotech)内に設置し、ビーズをチューブ壁に2分間付着させた。チューブを磁石内に保持しながら、上清をピペットを用いて取り除き、新しいチューブ内で保持した。上清を含むチューブを再びMACSiMagセパレーター内に設置し、残っているビーズをチューブ壁に2分間付着させた。チューブを磁石内に保持しながら、上清を50 mlコニカルチューブに移した。16mlの新たに調製した1×赤血球(RBC)溶解バッファー(10×溶解バッファー：1.55M NH<sub>4</sub>Cl、100mM KHCO<sub>3</sub>、10mM EDTAの希釈により調製される)を加え、チューブを室温で5分間インキュベートした。試料を300×gで10分間遠心した。ペレット状の細胞を2回溶解バッファー(5 ml)で洗い、各回300×gで5分間遠心した。細胞を1回RPMIで洗い、ELISPOTアッセイで用いるために1 mlのAIM-Vで希釈した。

【0065】

この方法と並行して、各ドナー由来の2番目の試料を用いて、5 mlの全血を実施例1に示されているような標準的なフィコール法により処理した。

【0066】

次に精製されたPBMC試料を、ドナー1、2および4の試料に対して抗原としてCEF (5 µg/ml)を用い、およびドナー3の試料に対してパネルAおよびパネルB抗原(33 µg/ml)を用いて、実施例1に概説されているように、T.SPOT.TBアッセイでアッセイした。

【0067】

MACSi抗CD15磁気ビーズによるネガティブ選択アプローチを用いて調製されたPBMCによって得られたSFC数(下記の表に示される)は、フィコール勾配を用いて調製されたPBMCのSFC数と高い同等性を示した。この抗体に基づくPBMC単離の方法は、T-SPOT.TBアッセイにおいて技術的に実施可能でありかつ高度に再現性のある結果となることが判明した。

	ドナー 1		ドナー 2		ドナー 3		ドナー 4	
	フィコール	MACSi	フィコール	MACSi	フィコール	MACSi	フィコール	MACSi
CEF	240	239	100	111	-	0	0	0
	248	235	98	124	+	>100	>100	0
パネル A						41	31	+
						45	42	
						44	38	
パネル B						179	99	CEF
						157	106	
						151	83	
平均値	244	237	99	117.5				平均値
標準偏差	5.66	2.83	1.41	9.19				
								-
								0
								0
								+
								116
								100
								CEF
								192.3
								214.3
								標準偏差
								-
								0
								0
								+
								0
								0
								CEF
								15.70
								25.50

N.B. ドナー3および4について、(-)ウェルは抗原なしを示し；(+)ウェルはPHA (5 µg/ml)ありを示す。

【0068】

実施例4 - ネガティブ親和性選択

2つの異なる実験を、それぞれ15または11ドナーいずれかのグループ由来のプールされた全血を用いて行った。

【0069】

各実験について：(a) 一日目、静脈穿刺後直ちに、各ドナープール由来の10ml リチウムヘパリンバキュテイナ1本分の全血を、標準的なフィコール法(実施例1参照)に従って処理した。生存PBMCをトリパンブルー色素排出法を用いて計数した。100 µlあたり250,000細胞となるように、細胞を細胞培養培地(AIM-V)で希釈し；(b) 残った血液を暗中で、希釈せず、冷蔵庫中2~8 またはRT (18~25 )のいずれかで24時間保存し；(c) 2日目、保存した血液試料をPBMC調製のための標準的なフィコール法に従って処理し、生存細胞を上記(この実施例の第1パラグラフを参照)のように計数し、希釈した。

【0070】

各実験で処理された対応する試料において、各ドナーに対して1日目(新鮮)および2日目(保存)の両方で、4.5 mlの全血を15 ml遠心分離管に加え、次に抗CD66b抗体および抗グリコホリンA抗体を含むテトラマー複合体を用いてRBCを顆粒球に結合させるために225 µlのRosetteSep (StemCell, Vancouver, BC, Canada)を各管に加えた。試料を緩やかに混合し、20分間RTでインキュベートした。次に試料をRPMIで1:1に希釈し、標準的なフィコール法(実施例1参照)によりPBMCを顆粒球を欠失した細胞から単離し、このようにしてRBCおよび顆粒球をリンパ球およびAPCから分離させた。次に後者の細胞を洗い、キットに添付の製造者の説明書に従って処理した - 実施例1参照。

## 【 0 0 7 1 】

結果を以下に示す。実施された2つの異なる実験において、一方は抗原としてCEF (5  $\mu$ g/ml)を用い、もう一方はアッセイでPPD (1  $\mu$ g/ml)を用いた。上の表：4 およびRTでのフィコールおよびRosetteSep処理に対するCEFで誘発されるSFC数(15のドナーの平均値)。下の表：4 およびRTでの保存の後のフィコールおよびRosetteSep処理に対するPPDで誘発されるSFC数(11のドナーの平均値)。結果は、4 で保存され、次にPBMCのフィコール精製後に抗顆粒球抗体処理に供された試料が、標準の「新鮮な」試料と同等であり、さらに試料が抗顆粒球抗体処理の前に室温で保存される場合より高いSFC数をもたらすことを示す。

CEF	新鮮なフィコール	フィコール,4°C	RosetteSep, 4°C	フィコール, RT	RosetteSep, RT
平均値	80	54	78	39	60
合計値	4870	3252	4759	2388	3681
新鮮なフィコールとの差 (%)		-33.2	-2.3	-51	-24.4

n = 15 のドナー, 61 の複製物

PPD	新鮮なフィコール	フィコール,4°C	RosetteSep, 4°C	フィコール, RT	RosetteSep, RT
平均値	22.6	9.4	21.4	8	17.4
合計値	722	301	685	256	558
新鮮なフィコールとの差 (%)		-58.31	-5.12	-64.54	-22.71

n = 11 のドナー, 32 の複製物

## 【 0 0 7 2 】

## 実施例5 - る過

逆洗白血球フィルタ膜(PALL Medical)を用いることの実施可能性およびさらにそのような膜上に捕獲される細胞の安定性を、静脈穿刺後T0およびT24時間で調べた。捕獲された細胞を1ドナーについては冷蔵庫内(2~8 )でおよび2番目のドナーについてはRT (18~25 )で、膜上で保存した。この膜分離法を標準的なフィコールPBMC分離法の側面に沿って各時点および温度で行った。

## 【 0 0 7 3 】

保存が必要とされる膜は、段階1~3 (下記参照)、次にそれらに供される適切な保存条件および期間に従った。次に膜ホルダーデバイスを保存場所から取り出し、適切な時点で段階4~7 (下記参照)に供した。フィコール対照保存試料を標準的なフィコール分離法による処理が必要とされるまで暗中RTで保持し、AIMV細胞培養培地で1:1に希釈した。膜処置を以下に記載する。

## 【 0 0 7 4 】

段階1~3は以下で構成される：トランスファーシリンジを用いて、廃棄ビンの中に膜を通してろ過される、10 mlのWASH BUFFER 1。10 mlの全血試料を50 mlのWASH BUFFER 1と一緒にまず混合し、次にトランスファーシリンジを用いて廃棄ビンの中にLK4膜を通してろ過した。50 mlの冷却したWASH BUFFER 1をトランスファーシリンジを用いてLK4膜を通して廃棄ビンの中に入ろ過した。

## 【 0 0 7 5 】

段階4~7は以下で構成される：(時点に応じて)直ちにまたは24時間後に反転される、フィルター膜。50 mlの冷却したREMOVING BUFFER 1をバックフラッシュシリンジを用いて、膜を逆に通して50 mlファルコンチューブの中へろ過した。細胞懸濁液を2000 rpmで5分間RTで回転させ、次に10 mlのAIMVで再懸濁した。細胞懸濁液を再び2000 rpmで5分間RTで回転させ、次に1 mlのAIMV培地で再懸濁し、標準的なフィコール分離法に従って計数した。(WASH BUFFER 1: 20mM HEPESおよび1%[w/v]デキストランT40で緩衝化した500 ml AIMV培地) (REMOVING BUFFER 1: 20 mM HEPESおよび0.1%[w/v]デキストランT40で緩衝化した500 ml AIMV培地)。

## 【 0 0 7 6 】

次にT-SPOT.TBアッセイを実施例1およびさらにキット毎に添付されている製造者のガイドラインに示されているように行った。

【 0 0 7 7 】

以下の表は、この研究のために行われたT-SPOT.TB試験からの結果の概要を記述する。膜実験の時間および温度に関するCEFスポット数の比較を示す。これは、同日に行われた関連するフィコール対照に対する膜性能およびさらにT0でのそれらの関連性の点で行われた。

	日付	ドナー	方法	温度	CEF数 (平均, n=4)	フィコール対照に 対するパーセンテージ	T0でのフィコール 対照に対する パーセンテージ
T0	04/05/2006	0002	フィコール	(RT)	45.5	~	~
			LK4	2-8oC	11	24.2	~
		0008	フィコール	(RT)	44.4	~	~
			LK4	RT	21.25	47.9	~
T24	05/04/2006	0002	フィコール	(RT)	47.5	~	104.4
			LK4	2-8oC	10.5	22.1	23.1
		0008	フィコール	(RT)	33.75	~	76.0
			LK4	RT	4.75	14.1	10.7

10

【 0 0 7 8 】

上記表から、2~8 および18~25 (RT)でT0およびT24両方で保存された、新鮮な全血と共に用いた膜は、ELISPOTアッセイで用いるのに十分なCEFシグナルを生じるPBMCを提供していることがわかった。逆洗フィルター膜を用いてELISPOTアッセイで反応を誘発する能力を有するPBMCを収集するという概念は、このケースにおいて証明されている。

20

【 0 0 7 9 】

実施例6 - ネガティブ親和性選択前の保存時間

2つの異なる実験を各15のドナー由来の全血の試料を用いて行った。

【 0 0 8 0 】

各実験について：(a) 一日目に、静脈穿刺後直ちに、各ドナー由来の10ml リチウムヘパリンパキュティナ1本分の全血を、PBMC調製のための標準的なフィコール法に従って、処理した(「新鮮な」試料)；(b) 各ドナー由来の残りの血液を暗中で、希釈せずに、2~8 び冷蔵庫中で様々な時間(16から72時間)保存した(保存試料)；(c) 二日目に、保存試料をRosetteSep (StemCell, Vancouver, BC, Canada)と共に実施例4に記載されているようにインキュベートし、次にPBMC調製のための標準的なフィコール法に従って処理した。次にPBMCの計数および希釈を行い、2つの異なった実験の実施において一方は抗原としてCEF (5 µg/ml)を用い、もう一方はアッセイでCEF/PPD (それぞれ5 µg/mlおよび1 µg/ml)用いる以外は実施例4に従って、試料を処理した。

30

【 0 0 8 1 】

下記で示される結果は、それぞれ処理された試料に対する3度の独立したELISPOTアッセイの結果の平均値の合計に基づく、個々のドナー試料がCEFの抗原(n=10)またはCEFの抗原およびPPD抗原の両方(n=5)のいずれかを用いる様々な処理条件に供された後の全ての個別のドナー試料で記録された累積SFC数を表す。

【 0 0 8 2 】

データは、16から24時間2~8 で保存された試料がフィコールで処理される前の抗顆粒球抗体によってその後「安定化」され得る一方で、同じ精製条件を伴う場合より長い保存時間がELISPOTアッセイにおけるSFC数の段階的な減少を生じさせることを示す。

40

抗原	新鮮な フィコール	RosetteSep, 2~8°Cで保存				
		16 hrs	20 hrs	24 hrs	48 hrs	72 hrs
CEF	940	900	846	892	661	354
CEF / PPD	481	502	476	584	324	108

50

**【 0 0 8 3 】**

同様の結果は、フィコールで「安定化」および処理される前に室温で48時間まで試料を保存する場合にも得られる。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
C 0 7 K 16/28 (2006.01) C 0 7 K 16/28

(72)発明者 デイ トニ  
イギリス国 オックスフォードシャー オックスフォード キッドリントン ウィルソン ウェイ  
3 0

(72)発明者 オキーフ アイスリング  
イギリス国 オックスフォードシャー ドレイトン ヒリアト フィールズ 4

(72)発明者 バンプトン マキシ  
イギリス国 オックスフォードシャー アピンドン ウットン サンドレイ ロード 2 2

審査官 上條 肇

(56)参考文献 米国特許出願公開第2 0 0 3 / 0 1 8 5 8 1 7 ( U S , A 1 )  
Eur J Clin Microbiol Infect Dis , 2 0 0 5 年 , Vol.24, Issue 8 , p.529-536  
Journal of Clinical Laboratory Analysis , 2 0 0 2 年 , Vol.16, Issue 1 , p.30-36

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)  
C 1 2 Q 1 / 0 2  
C 0 7 K 1 6 / 2 4  
C 0 7 K 1 6 / 2 8  
G 0 1 N 3 3 / 4 8  
G 0 1 N 3 3 / 5 3  
G 0 1 N 3 3 / 5 3 8  
C 1 2 N 5 / 0 0 - 5 / 1 0  
MEDLINE / BIOSIS ( STN )  
PubMed

专利名称(译)	调制方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP5992393B2</a>	公开(公告)日	2016-09-14
申请号	JP2013257625	申请日	2013-12-13
[标]申请(专利权)人(译)	牛津免疫科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	牛津Imyunotekku有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	牛津Imyunotekku有限公司		
[标]发明人	デュラントイアン デイトニ オキーフアイスリング バンプトンマキシシ		
发明人	デュラント イアン デイトニ オキーフ アイスリング バンプトン マキシシ		
IPC分类号	C12Q1/02 G01N33/48 G01N33/538 G01N33/53 C07K16/24 C07K16/28		
CPC分类号	C12N5/0087 A01N1/0205 A01N1/0231 G01N33/505 G01N33/56972 G01N33/6863		
FI分类号	C12Q1/02 G01N33/48.B G01N33/538 G01N33/53.K C07K16/24 C07K16/28 C12N5/00.202.K C12N5/00.202.L C12N5/0781 C12N5/0783		
F-TERM分类号	2G045/AA01 2G045/BA13 2G045/BB03 2G045/BB05 2G045/BB12 2G045/BB20 2G045/BB31 2G045/BB39 2G045/CA17 2G045/CA18 2G045/CA25 2G045/DA36 2G045/FA03 4B063/QA18 4B063/QA20 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS07 4B063/QS15 4B063/QS33 4B063/QX01 4B065/AA90X 4B065/AC20 4B065/BA25 4B065/BD12 4B065/BD14 4B065/CA46 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/EA60		
代理人(译)	清水初衷		
审查员(译)	肇峰		
优先权	2006019853 2006-10-06 GB		
其他公开文献	JP2014112089A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

一种对受试者进行免疫评估的方法，包括从受试者收集全血样品，在收集后保持样品至少6小时，从保持的样品中纯化包含淋巴细胞和抗原呈递细胞的细胞群。通过结合阳性或阴性亲和选择步骤的方法，并在细胞介导的免疫测定（CMI测定）中使用纯化的细胞。

CEFの抗原		
	新鮮な血液	
希釈/保存血液	反応性あり	反応性なし
反応性あり	28 (77.8%)	0 (0%)
反応性なし	5 (13.9%)	3 (8.3%)