

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4381145号
(P4381145)

(45) 発行日 平成21年12月9日(2009.12.9)

(24) 登録日 平成21年10月2日(2009.10.2)

(51) Int.Cl. F I
GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 D

請求項の数 4 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2003-553255 (P2003-553255)	(73) 特許権者	591083336 株式会社ビー・エム・エル 東京都渋谷区千駄ヶ谷5丁目21番3号
(86) (22) 出願日	平成14年12月5日(2002.12.5)	(73) 特許権者	500103797 財団法人ルイ・パストゥール医学研究センター 京都府京都市左京区田中門前町103-5
(86) 国際出願番号	PCT/JP2002/012745	(74) 代理人	100103160 弁理士 志村 光春
(87) 国際公開番号	W02003/052417	(72) 発明者	小川 一行 埼玉県川越市の場1361番地1 株式会社ビー・エム・エル 総合研究所内
(87) 国際公開日	平成15年6月26日(2003.6.26)	(72) 発明者	高森 靖 埼玉県川越市の場1361番地1 株式会社ビー・エム・エル 総合研究所内 最終頁に続く
審査請求日	平成17年10月14日(2005.10.14)		
(31) 優先権主張番号	特願2001-382611 (P2001-382611)		
(32) 優先日	平成13年12月17日(2001.12.17)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

(54) 【発明の名称】 細胞外グラニューライシンの検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

血液検体における、細胞外の15Kグラニューライシンを検出して、検体提供者の免疫状態を確認する、グラニューライシンの検出方法。

【請求項2】

血液検体が、全血、血清または血漿である、請求項1記載のグラニューライシンの検出方法。

【請求項3】

15Kグラニューライシンの検出手段が、ELISA(エライザ)法、RIA(ラジオイムノアッセイ)法、免疫クロマトグラフィー法、免疫沈降法を利用した解析法、若しくは、ウェスタンブロット法を主体とした解析法である、請求項1又は2に記載のグラニューライシンの検出方法。

【請求項4】

請求項3記載の検出手段を行うための要素を含む、グラニューライシン検出用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

技術分野

本発明は、癌や感染症、臓器移植手術後等の免疫状態を確認することが可能な、特定生体成分の検出方法に関する発明である。

【0002】

背景技術

グラニューライシンは、ナチュラルキラー細胞（以下、NK細胞ともいう）や細胞傷害性Tリンパ球（以下、CTLともいう）が、標的細胞に細胞死を惹き起こすために放出する一連の殺細胞活性分子の一つである。

このグラニューライシンが、NK細胞やCTLの状態を把握するための指標になり、これにより、宿主の免疫状態を確認し得ることが見出された（特開2001-249126号公報）。

【0003】

グラニューライシンは、細胞傷害性顆粒に局在する分子量1万5千（15K）のタンパク質で、顆粒内では一部切断されて、分子量9千（9K）のタンパク質として存在している。9Kグラニューライシンには、細胞傷害活性と抗菌活性が認められている（Pena, S. V., et al., J. Immunol., 158, 2680-2688 (1997), Stenger, S., et al., Science, 282, 121-125 (1998)）。

【0004】

特開2001-249126号公報に記載された、グラニューライシンを検出指標として、免疫状態を確認する方法は、NK細胞内やCTL細胞内におけるグラニューライシンを検出することによる免疫状態の確認方法であり、細胞内のグラニューライシンを検出するのに適しているフローサイトメトリー解析を好適な検出手段としている。このため、血液検体を用いるには、細胞画分を単離し、固定後に可溶化工程を経ることが必要となる。また、対象が細胞であるため、検体の保存に困難を伴う。すなわち、この先行技術は、免疫状態を確認するのに優れた方法ではあるが、さらなる利便性の追求と、簡便化の課題が伴っていることも否めない。

【0005】

本発明が解決すべき課題は、信頼性を担保しつつ、さらに簡便な、グラニューライシンを検出することによる、免疫状態の確認手段を提供することにある。

【0006】

発明の開示

本発明者は、この課題を解決するために、生体内におけるグラニューライシンの挙動について、さらに検討を重ねた。その結果、グラニューライシンが、NK細胞やCTLのみならず、これらの細胞外においても可溶性の蛋白質として認められ、血液検体の15Kグラニューライシンを検出することにより、その血液検体の提供者の免疫状態を、従来よりも簡便に把握することが可能であることを見出し、本発明を完成した。

【0007】

すなわち、本発明は、血液検体における、細胞外の15Kグラニューライシンを検出して、検体提供者の免疫状態を確認する、グラニューライシンの検出方法（以下、本検出方法ともいう）を提供する発明である。

【0008】

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施の形態を説明する。

本検出方法の検出対象となる、血液検体における細胞外の15Kグラニューライシンは、リンパ球等のグラニューライシン産生細胞から分泌されて結果存在するものであると考えられるが、必ずしも、これに限定されるものではない。

【0009】

血液検体としては、赤血球、白血球、血小板、その他の細胞画分を凝集させて除いた血清、さらには、抗凝固剤を添加した後、細胞を除いた血漿が好適である。

また、細胞が混入した血液検体の場合、検出対象から細胞を除外することができる操作を行うのが好適である。

【0010】

本発明において、血液検体における検出の対象となるグラニューライシンは、上述のよう

10

20

30

40

50

に15Kグラニューライシンである。よって、後述するグラニューライシンに対する抗体は、少なくとも、15Kグラニューライシンに対して特異性を有する抗体であることが好適である。

【0011】

15Kグラニューライシンの検出は、上記のグラニューライシンに対する抗体を用いて、それと血液検体中の15Kグラニューライシンとの抗原抗体反応を利用する検出手段を用いて行うことが好適である。具体的には、例えば、ELISA（エライザ）法、RIA（ラジオイムノアッセイ）法、免疫クロマトグラフィー法、免疫沈降法を利用した解析法、ウエスタンプロット法を主体とした解析法等を例示することができる。これらの検出手段の中でも、その定量性と安全性、さらには、正確性故に、ELISA法を選択することが好適

10

【0012】

このような検出手段を行う前提として、少なくとも15Kグラニューライシンに特異的に結合する抗体（モノクローナル抗体および/またはポリクローナル抗体：以下、グラニューライシンに対する抗体ともいう）が必要である。

【0013】

グラニューライシンに対する抗体の製造方法は、常法に従って行うことが可能である。

グラニューライシンに対するポリクローナル抗体は、グラニューライシン分子の全部または一部を免疫抗原として、免疫した動物に由来する免疫血清から製造することができる。

【0014】

グラニューライシンに対するモノクローナル抗体は、上記のポリクローナル抗体と同様の方法で、免疫した動物の免疫細胞と動物の骨髄腫細胞とのハイブリドーマを作出し、これによりグラニューライシン分子を認識する抗体を産生するクローンを選択し、このクローンを培養することにより製造することができる。

20

【0015】

上述したポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体は遺伝子免疫によっても調製が可能である。具体的にはグラニューライシン分子の全部または一部をコードする遺伝子を発現するベクターを直接動物に免疫する事によって製造することができる。

また、免疫される動物も特に限定されるものではなく、マウス、ラット等を広く用いることができるが、モノクローナル抗体を製造する場合には、細胞融合に用いる骨髄腫細胞との適合性を考慮して選択することが望ましい。

30

【0016】

免疫は一般的方法により、例えば上記免疫抗原を免疫の対象とする動物に静脈内、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内注射等で投与することにより行うことができる。

より具体的には、上記免疫抗原を所望により通常のアジュバントと併用して、免疫の対象とする動物に2～14日毎に上記手段により数回投与し、ポリクローナル抗体製造のための免疫血清またはモノクローナル抗体製造のための免疫細胞、例えば免疫後の脾臓細胞を得ることができる。

【0017】

モノクローナル抗体を製造する場合、この免疫細胞と細胞融合する他方の親細胞としての骨髄腫細胞としては、既に公知のもの、例えばSP2/0-Ag14、P3-NS1-1-Ag4-1、MPC11-45、6.TG1.7（以上、マウス由来）；210.RCY.Ag1.2.3（ラット由来）；SKO-007、GM15006TG-A12（以上、ヒト由来）等を用いることができる。

40

【0018】

上記免疫細胞とこの骨髄腫細胞との細胞融合は、通常公知の方法、例えばケーラーとミルシュタインの方法（Kohler, G. and Milstein, C., Nature, 256, 495（1975））等に準じて行うことができる。

より具体的には、この細胞融合は、通常公知の融合促進剤、例えばポリエチレングリコール（PEG）、センダイウイルス（HVJ）等の存在下において、融合効率を向上させ

50

るためにジメチルスルホキシド等の補助剤を必要に応じて添加した通常の培養培地中で行い、ハイブリドーマを調製する。

【 0 0 1 9 】

所望のハイブリドーマの分離は、通常の選別用培地、例えばHAT（ヒポキサンチン，アミノプテリンおよびチミジン）培地で培養することにより行うことができる。すなわち、この選別用培地において目的とするハイブリドーマ以外の細胞が死滅するのに十分な時間をかけて培養することによりハイブリドーマの分離を行うことができる。このようにして得られるハイブリドーマは、通常の限界希釈法により目的とするモノクローナル抗体の検索および単一クローン化に供することができる。

【 0 0 2 0 】

目的とするモノクローナル抗体産生株の検索は、例えばELISA法，プラーク法，スポット法，凝集反応法，オクタロニー法，RIA法、間接蛍光抗体法、等の一般的な検索法に従い行うことができる。

このようにして得られるグラニューライシンを認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培地で継代培養することが可能であり、さらに液体窒素中で長時間保存することもできる。

【 0 0 2 1 】

ハイブリドーマからのモノクローナル抗体の採取は、ハイブリドーマを常法に従って培養して、その培養上清として得る方法や、ハイブリドーマをこのハイブリドーマに適合性が認められる動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法等を用いることができる。

上述のようにして得られるポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体は、更に、塩析，ゲル濾過法，アフィニティクロマトグラフィー等の通常的手段により精製することができる。

【 0 0 2 2 】

このようにして得られるポリクローナル抗体ないしモノクローナル抗体は、グラニューライシンに特異反応性を有する抗体である。

さらに、グラニューライシンに対する抗体に、必要に応じて標識処理、すなわち、酵素標識処理、蛍光標識処理、アイソトープ標識処理等を、常法に従い行うことができる。

血液検体中のグラニューライシンを捕捉し得る抗体は、固相に固定化された固定化抗体として用いられるのが、好適な態様の一つである。

【 0 0 2 3 】

固相としては、例えば、マイクロプレート、ビーズ、アガロース等が挙げられる。固定化方法は、固相の種類に応じた抗体の固定化方法における常法に従い行うことができる。

例えば、マイクロプレートに対しては、常法に従った物理的な非特異的吸着法を行うことにより、抗体の固定化を行うことができる。また、ビーズやアガロースに対しても、常法に従って固定化を行うことができる。例えば、化学的な架橋剤を用いた固定化や、固定化された抗イムノグロブリン抗体やプロテインA等の抗体に親和性のある蛋白質を用いた固定化法等を行うことにより、抗体の固定化を行うことができる。

【 0 0 2 4 】

上記のように、グラニューライシンに対する抗体を用いて、検出手段に応じた要素を用いることによって、本検出方法を行うことができる。

検出手段がELISA法やRIA法である場合には、例えば、マイクロプレートに固定化したグラニューライシンに対する抗体に、血液検体を接触させて、15Kグラニューライシンを固定化抗体に結合させ、この固相に結合した15Kグラニューライシンを、酵素またはラジオアイソトープ標識抗体等を用いて検出することにより、本検出方法を行うことができる。

【 0 0 2 5 】

また、検出手段として、免疫沈降法を利用する場合には、例えば、ビーズやアガロース

10

20

30

40

50

に固定化した15Kグラニューライシンに対する抗体に、血液検体を接触させて、15Kグラニューライシンを固定化抗体に結合させ、この固相に結合した15Kグラニューライシンを分離して、この分離物から15Kグラニューライシンを検出することにより、本検出方法を行うことができる。この15Kグラニューライシンの検出方法としては、例えば、前記の分離物に対して電気泳動を行って、この電気泳動パターン¹⁰の転写物に、15Kグラニューライシンに対する標識抗体を作用させて、15Kグラニューライシンのバンドを検出する、ウエスタンブロット法を挙げることができる。

【0026】

また、検出手段を、ウエスタンブロット法を主体とした方法とすることも可能である。例えば、血液検体から細胞を除いた細胞除外検体を、直接、電気泳動により分離し、その転写物に、15Kグラニューライシンに対する標識抗体を作用させて、バンドを検出することにより、血液検体中の15Kグラニューライシンを検出することができる。

【0027】

本検出方法により、血液検体の15Kグラニューライシンを検出することにより、検体提供者の免疫状態の確認を行うことができる。すなわち、健常人の標準的な、血液検体におけるグラニューライシン量と比べて、検体提供者の血液検体における15Kグラニューライシン量が少なければ、当該検体提供者の免疫状態が低下していることがわかる。よって、例えば、健常人の通常の検診において、本検出方法を行うことにより、免疫状態の確認を行うことが可能であり、現に罹患している何らかの疾病の存在や、疾病に罹患する危険の検出を行うことが可能である。また、例えば、癌患者や感染症の患者の血液検体における15Kグラニューライシン量を継続的にモニターすることにより、当該患者の免疫状態を把握して、治療方針を決定するための有力な要素とすることができる。また、例えば、臓器移植手術により免疫抑制剤投与の処置を受けた患者の予後の免疫状態（免疫抑制効果が低い場合の移植片に対する拒絶反応、免疫抑制効果が高すぎる場合の副作用や感染症、癌の発症）や、幹細胞等の移入療法を受けた免疫不全患者における免疫系の形成度合いも、非常に重要な問題であり、本検出方法で、このような臓器移植患者の血液検体における15Kグラニューライシン量を継続的にモニターすることにより、当該患者の免疫状態を把握して、治療方針を決定する有力な要素とすることも可能である。

【0028】

本発明は、本検出方法を行うための検出用キットを提供する。すなわち、本発明は、上記の検出手段を行うための要素を含む、グラニューライシン検出用キット（以下、本検出用キットともいう）を提供する発明でもある。

本検出用キットには、最低限、少なくとも15Kグラニューライシンに特異的に結合する抗体が要素として含まれる。

【0029】

例えば、検出手段が、ELISA法の場合には、固相に固定化した15Kグラニューライシンに対する第1抗体、および/または、この固定化第1抗体に結合した15Kグラニューライシンを検出するための第2抗体が、ELISA法の本検出用キットに要素として含まれることが好適である。また、第2抗体を検出するための検出試薬、ブロッキング液、希釈液、グラニューライシン標準品等を、ELISA法の本検出用キットの要素として含めることも好適である。

【0030】

また、検出手段が、免疫沈降法を利用した解析法において、上記の例のように、ウエスタンブロット法を検出手段として組み合わせる場合には、血液検体における15Kグラニューライシンを捕捉するための、15Kグラニューライシンに対する固定化抗体、および/または、電気泳動のバンドとして分離されるグラニューライシンを検出するための、グラニューライシンに対する標識抗体を、ウエスタンブロット法の本検出用キットの要素として含めることが好適である。また、グラニューライシンに対する標識抗体を検出するための検出試薬、ブロッキング液、希釈液、転写膜等を、ウエスタンブロット法の本検出用キットの要素として含めることも好適である。

10

20

30

40

50

【0031】

実施例

以下、本発明を実施例により、具体的に説明するが、この実施例により、本発明の技術的範囲は限定されない。

【0032】

〔製造例1〕 グラニューライシンに対するモノクローナル抗体の作製

100~200 unit/mlのIL-2の存在下で培養したヒトの末梢血リンパ球(2×10⁶細胞/mlのヒト末梢血リンパ球を、10%牛胎児血清含有RPMI1640培地で、37・5%CO₂下で10日間培養を行った)より、常法に従ってRNAを抽出し、このRNAを鋳型として、RT-PCR法(PCRプライマー1:配列番号1、PCRプライマー2:配列番号2)を行い、グラニューライシンの蛋白質全長をコードする領域を含む遺伝子部分〔J. Exp. Med., 172:1159-1163(1990):配列番号3〕を相補的DNA(cDNA)の増幅産物として合成した。このグラニューライシンの蛋白質全長をコードするcDNAを、哺乳動物用発現ベクターであるpRc/CMVまたはpcDL-SR 296に組み込み、得られた組換えベクターを生理食塩水に溶かして、マウスの皮下または皮内に免疫した。1~2週間隔で、4~5回免疫後、間接蛍光抗体法(後述の方法に準じて行った)により抗体価の上昇が認められたマウスの脾細胞を、常法に従って細胞融合した後、グラニューライシンに特異的に結合する抗体を産生するハイブリドーマを、再び間接蛍光抗体法で検索した。すなわち、上述したグラニューライシンをコードする遺伝子で形質転換して、これを発現させた細胞(COS-7)を、2%パラフォルムアルデヒドで固定後、0.5%Tween 20で、膜を可溶化し、これに、ハイブリドーマの培養上清を加えて、抗体を反応させた後、蛍光ラベルされた抗マウスIgG抗体を反応させ、蛍光を検出することにより、グラニューライシンに特異的に結合する抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングした。その結果、9個のグラニューライシンに特異的に結合する抗体を産生するハイブリドーマが得られた。得られたハイブリドーマのそれぞれの培養上清を用いて、硫酸沈澱およびプロテインGカラムによる精製を行い、グラニューライシンに対するモノクローナル抗体を、2種類調製した。以下、これをモノクローナル抗体RB1、および、モノクローナル抗体RC8ともいう。

【0033】

〔製造例2〕 グラニューライシンに対するポリクローナル抗体の作製

グラニューライシンの部分アミノ酸配列(29アミノ酸)(J. Exp. Med., 165:601-614(1987), J. Exp. Med., 172:1159-1163(1990)): Arg Thr Gly Arg Ser Arg Trp Arg Asp Val Cys Arg Asn Phe Met Arg Arg Tyr Gln Ser Arg Val Thr Gln Gly Leu Val Ala Gly(N5-1:配列番号4)の傘貝ヘモシアニンとの結合体で、ウサギを常法に従って免疫し、抗血清を得た。得られた抗血清について、硫酸沈澱およびプロテインGカラムによる精製を行い、さらに上記の合成ペプチド(N5-1)を結合したカラムによるアフィニティークロマトグラフィーによる精製を行い、グラニューライシンに対するポリクローナル抗体(抗N5-1抗体)を調製した。

【0034】

〔試験例〕 免疫沈降法とウエスタンブロット法を用いたヒト血漿中のグラニューライシンの検出

抗グラニューライシンモノクローナル抗体RC8を、抗マウスIgG結合磁気ビーズ(Dynabeads: DYNAL社製)に結合させて、この固定化ビーズを、検体提供者(健康人1名)から血液を採取して得た血液検体である、ヒト血漿(3ml)中に添加して、穏やかに転倒混和を、4下で4時間行って、血漿中のグラニューライシンを担体の抗グラニューライシンモノクローナル抗体に対して結合させた後、血漿を除き、担体を洗浄液(0.1%Tween 20/PBS)で洗った。この担体を、SDSサンプルバッファー中に懸濁して煮沸した後、SDS-PAGEにより、蛋白質を分離した。電気泳動を行ったSDS-PAGEのゲルから、蛋白質をナイロン膜に転写した後、ブロッキング液(1%ス

10

20

30

40

50

キムミルクノ洗浄液)で膜をブロックした後、この膜に対して、ウサギ由来抗グラニューライシンポリクローナル抗体(抗N5-1抗体)を反応させた。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識した抗ウサギIgG抗体(ZYMED Laboratories社製)を反応させ、洗浄後、酵素基質(Chemiluminescence reagent: NEN Life Science products社製)を用いた化学発光法によりグラニューライシンのバンドを検出した。陽性コントロールとして、培養したヒトリンパ球の細胞溶解液を用いた。

【0035】

第1図に、その結果を示す。第1図は、上記の方法により得られた、グラニューライシンの存在を示すパターンを示している〔(a)は、ヒト血漿における結果を示し、(b)は、陽性コントロールにおける結果を示している。各パターンの右側は、分子量マーカである〕。

10

第1図から、培養ヒトリンパ球の細胞溶解液からは、9Kと15Kのグラニューライシンが検出され、ヒトの血漿からは、15Kグラニューライシンが検出されたことがわかる。この結果から、培養ヒトリンパ球の細胞溶解液には、9Kと15Kのグラニューライシンが存在するが、ヒト血漿中には、15Kグラニューライシンのみが存在していることが明らかとなった。

また、この結果により、血液検体における15Kグラニューライシンを、グラニューライシンに対する抗体を検出手段として用いたウエスタンブロット法で検出可能であることが明らかとなった。

20

【0036】

〔実施例〕ELISA法による免疫状態の確認

健常者35名、癌患者16名の血液から血漿を採取し、血液検体として使用した。

<ELISA用スタンダードの調製>

グラニューライシンのELISA用スタンダードは、下記の要領で調製した。すなわち、前記のモノクローナル抗体を得る際の免疫に用いたプラスミドを、COS-7細胞にトランスフェクションして、2日目の培養上清(血清不含のDMEM培地)から、グラニューライシンを、ヘパリンセファロースに吸着させて濃縮した後、Superdex 75を用いたゲル濾過法を行うことにより精製した。このサンプルをスタンダードとして、その一部を、SDS存在下で電気泳動した後、ゲルをCBBで染色して、検出されたバンドから、デンストメーターを使って、サンプル中のグラニューライシンの含有量を見積もった。

30

【0037】

<ELISA法>

ELISA法は、下記のようにして行った。

100mM炭酸ナトリウム緩衝液中に、5 μ g/mlに希釈した抗グラニューライシンモノクローナル抗体RB1を添加して、これを96ウエルマイクロプレートのウエルに分注して、4で一晚接触させることにより、固相化を行った。この抗体固定化プレートを、洗浄液(0.1%Tween20/PBS)で洗った後、ブロッキング液(10%牛胎児血清ノ洗浄液)でブロックした。抗体固定化プレートを、前記洗浄液で洗浄後、前記ブロッキング液で希釈した、上記のスタンダードまたは上記のサンプル(上記のブロッキング液で6倍希釈したものを)、それぞれ50 μ l添加して反応させ、反応後、前記洗浄液で、再度洗浄した。次に、マウス血清を1%含む、前記ブロッキング液で希釈した、常法によりモノクローナル抗体RC8をビオチン化して得た、ビオチン化抗グラニューライシンモノクローナル抗体RC8を反応させて、TBST(0.1%Tween20/Tris-buffered saline)で洗浄した後、TBSTで希釈した、アルカリホスファターゼ標識ストレプトアビジンを反応させた。TBSTで洗浄後、プレートに検出用の酵素基質(ELISA Amplification System: GIBCO社製)を加え、反応させた後、プレートリーダーで測定した。

40

【0038】

50

その結果を、第2図と第3図に示す。第2図は、スタンダードにより得られたELISAの標準希釈曲線を示している（横軸にグラニューライシンの濃度を、縦軸にELISA法で得られた吸光度を示している）。

【0040】

第3図（横軸に検体提供者のタイプを、縦軸に血漿中のグラニューライシンの濃度を示している）は、健常者35名、癌患者16名（うち、パフォーマンスステータス0～1が12名、2～3が4名：パフォーマンスステータスは患者の日常生活の活動度を表すもので、一般に値が高い程疾患による重症度が高く、従って免疫状態が低下しているものと思われる）の血漿を用いた、ELISA法により、グラニューライシンを検出した結果を示している。この結果、パフォーマンスステータス0～1の癌患者では、血漿中のグラニューライシン濃度が、健常人とほとんど変わらないのに対し、パフォーマンスステータス2～3の癌患者では、健常人に比べ有意に低下していた。

10

これにより、本検出方法により、癌患者の血漿等の血液検体のグラニューライシンを検出することにより、検体提供者の免疫状態を、簡便かつ的確に確認することが可能であることが示された。

【0041】

産業上の利用可能性

本発明により、検体提供者の免疫状態を、簡便かつ的確に確認することが可能な手段が提供される。

【配列表】

20

SEQUENCE LISTING

<110> BML, INC.
Louis Pasteur Center for Medical Research

<120> Method of Detecting Granulysin

<130> PBM68/PCT 10

<140>
<141>

<150> JP P2001-382611
<151> 2001-12-17

<160> 4 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 1 30
catctcagcg gctgccccac catg 24

<210> 2
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo sapiens 40

<400> 2
tgtatacctt ctacaggtcc cctctga 27

<210> 3

<211> 745

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (129)..(563)

<400> 3

10

gtatctgtgg taaaccagcgt gacacggggg agatgacata caaaaagggc aggacctgag 60

aaagattaag ctgcaggctc cctgcccata aaacaggggtg tgaaaggcat ctgagcggct 120

gccccacc atg gct acc tgg gcc ctc ctg ctc ctt gca gcc atg ctc ctg 170

Met Ala Thr Trp Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Met Leu Leu

1

5

10

ggc aac cca ggt ctg gtc ttc tct cgt ctg agc cct gag tac tac gac 218

Gly Asn Pro Gly Leu Val Phe Ser Arg Leu Ser Pro Glu Tyr Tyr Asp

15

20

25

30

20

ctg gca aga gcc cac ctg cgt gat gag gag aaa tcc tgc ccg tgc ctg 266

Leu Ala Arg Ala His Leu Arg Asp Glu Glu Lys Ser Cys Pro Cys Leu

35

40

45

gcc cag gag ggc ccc cag ggt gac ctg ttg acc aaa aca cag gag ctg 314

Ala Gln Glu Gly Pro Gln Gly Asp Leu Leu Thr Lys Thr Gln Glu Leu

50

55

60

30

ggc cgt gac tac agg acc tgt ctg acg ata gtc caa aaa ctg aag aag 362

Gly Arg Asp Tyr Arg Thr Cys Leu Thr Ile Val Gln Lys Leu Lys Lys

65

70

75

atg gtg gat aag ccc acc cag aga agt gtt tcc aat gct gcg acc cgg 410

Met Val Asp Lys Pro Thr Gln Arg Ser Val Ser Asn Ala Ala Thr Arg

80

85

90

40

gtg tgt agg acg ggg agg tca cga tgg cgc gac gtc tgc aga aat ttc 458

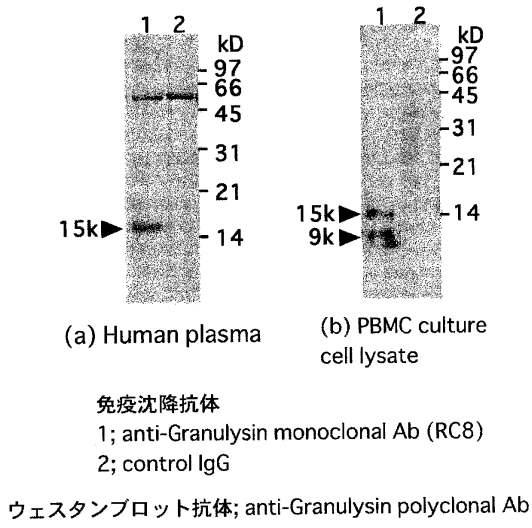
Val	Cys	Arg	Thr	Gly	Arg	Ser	Arg	Trp	Arg	Asp	Val	Cys	Arg	Asn	Phe		
95					100					105					110		
atg agg agg tat cag tct aga gtt acc cag ggc ctc gtg gcc gga gaa 506																	
Met	Arg	Arg	Tyr	Gln	Ser	Arg	Val	Thr	Gln	Gly	Leu	Val	Ala	Gly	Glu		
				115					120					125			
act gcc cag cag atc tgt gag gac ctc agg ttg tgt ata cct ict aca 554																	
Thr	Ala	Gln	Gln	Ile	Cys	Glu	Asp	Leu	Arg	Leu	Cys	Ile	Pro	Ser	Thr		10
			130					135					140				
ggt ccc ctc tgagccctct caccitgtcc tgtggaagaa gcacaggctc 603																	
Gly	Pro	Leu															
			145														
ctgtcctcag atcccgggaa cctcagcaac ctctgcccgc tectcgttc ctgatccag 663																	
aatccactct ccagtctccc tccctgact ccctctgctg tctcccctc tcacgagaat 723 20																	
aaagtgtaa gcaagaaaa aa 745																	
<p><210> 4</p> <p><211> 29</p> <p><212> PRT</p> <p><213> Homo sapiens</p>																	
<p><400> 5 30</p> <p>Arg Thr Gly Arg Ser Arg Trp Arg Asp Val Cys Arg Asn Phe Met Arg</p> <p>1 5 10 15</p> <p>Arg Tyr Gln Ser Arg Val Thr Gln Gly Leu Val Ala Gly</p> <p>20 25</p>																	

【図面の簡単な説明】

第1図は、ウェスタンブロット法によるグラニューライシンの検出を示す図面であり、第2図は、グラニューライシンに対する抗体を用いたELISAの標準曲線を示す図面であり、第3図は、健常人と癌患者に対して、ELISA法により血漿中のグラニューライシンレベルについての検討を行い、検体提供者全員の結果を総合して検討した図面である。 40

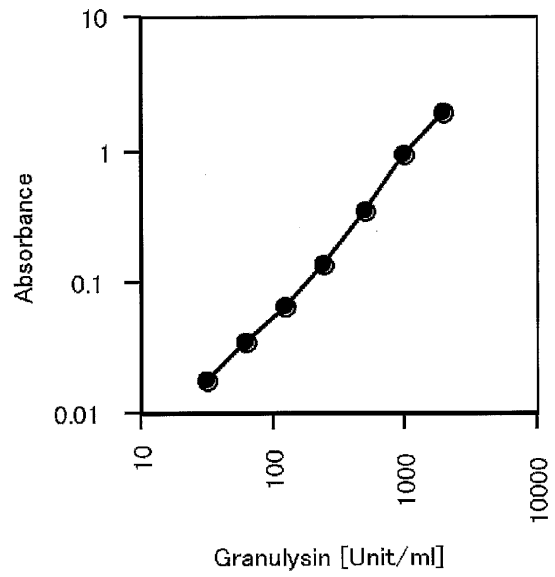
【 図 1 】

第 1 図



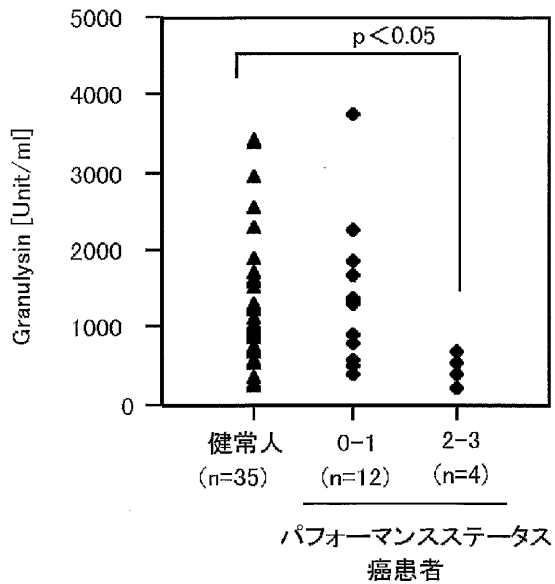
【 図 2 】

第 2 図



【 図 3 】

第 3 図



フロントページの続き

(72)発明者 鈴木 久皇

埼玉県川越市の場 1 3 6 1 番地 1 株式会社ビー・エム・エル 総合研究所内

(72)発明者 永田 欽也

埼玉県川越市の場 1 3 6 1 番地 1 株式会社ビー・エム・エル 総合研究所内

(72)発明者 岸 惇子

京都府京都市左京区田中門前町 1 0 3 番地の 5 財団法人ルイ・パストゥール医学研究センター内

審査官 海野 佳子

(56)参考文献 特開 2 0 0 1 - 2 4 9 1 2 6 (J P , A)

KISHI, A, JOURNAL OF INTERFERON & CYTOKINE RESEARCH, 2 0 0 1 年 1 0 月, V21 SUPPLIMENT
1, PS109-S110

STENGER, S., SCIENCE, 1 9 9 8 年 1 0 月, V282, P121-125

OCHOA, M. T., NATURE MEDICINE, 2 0 0 1 年 2 月 1 日, V7 N2, P174-179

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

G01N 33/53

G01N 33/68

专利名称(译)	检测细胞外颗粒溶素的方法		
公开(公告)号	JP4381145B2	公开(公告)日	2009-12-09
申请号	JP2003553255	申请日	2002-12-05
[标]申请(专利权)人(译)	BM萨尔瓦多 基金会路易斯·巴斯德医学研究中心		
申请(专利权)人(译)	BML有限公司 基金会路易斯·巴斯德医学研究中心		
当前申请(专利权)人(译)	BML有限公司 基金会路易斯·巴斯德医学研究中心		
[标]发明人	小川一行 高森靖 鈴木久皇 永田欽也 岸惇子		
发明人	小川 一行 高森 靖 鈴木 久皇 永田 欽也 岸 惇子		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N33/6863 G01N33/6872		
FI分类号	G01N33/53.D		
代理人(译)	志村光晴		
优先权	2001382611 2001-12-17 JP		
其他公开文献	JPWO2003052417A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

细胞杀伤活性的分子颗粒溶不自然杀伤细胞或仅在细胞毒性T淋巴细胞中发现存在于体液中。基于这一发现，本发明已经完成，体液分析物，通过检测细胞外颗粒溶素，证实试样供体的免疫状态，用于检测颗粒溶的方法。通过该方法，可以容易且可靠地确认标本提供者的免疫状态。

第 2 图

