

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5116756号
(P5116756)

(45) 発行日 平成25年1月9日(2013.1.9)

(24) 登録日 平成24年10月26日(2012.10.26)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)		C 1 2 Q	1/02
G O 1 N 33/53 (2006.01)		G O 1 N	33/53 Y
G O 1 N 33/543 (2006.01)		G O 1 N	33/543 5 9 7
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)		C 1 2 N	5/00 2 0 2 L

請求項の数 20 (全 32 頁)

(21) 出願番号	特願2009-500664 (P2009-500664)	(73) 特許権者	506330449
(86) (22) 出願日	平成19年3月20日 (2007. 3. 20)		セントビンセント ホスピタル シドニー リミテッド
(65) 公表番号	特表2009-529894 (P2009-529894A)		オーストラリア国 エヌエスタブリュ20 10 シドニー ビクトリアストリート
(43) 公表日	平成21年8月27日 (2009. 8. 27)		セントビンセント ホスピタル アンド ユニバーシティ オブ エヌエスタブリ ュ シー/ーセンター フォー イムノロ ジー
(86) 国際出願番号	PCT/AU2007/000342	(74) 代理人	100107984
(87) 国際公開番号	W02007/106939		弁理士 廣田 雅紀
(87) 国際公開日	平成19年9月27日 (2007. 9. 27)	(72) 発明者	ケラハー アンソニー ドミニク
審査請求日	平成22年3月4日 (2010. 3. 4)		オーストラリア国 ニューサウスウェール ズ2234 バンゴール イルンバプレス 6
(31) 優先権主張番号	2006901400		最終頁に続く
(32) 優先日	平成18年3月20日 (2006. 3. 20)		
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)		

(54) 【発明の名称】 抗原特異的又はマイトジェン活性化T細胞の検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

対象における抗原特異的なCD4+T細胞及び/又はCD8+T細胞を定量的又は定性的に検出する方法であって、前記対象由来の全血試料をインビトロで抗原に曝露した後に、前記全血試料において、細胞表面マーカーCD25、並びに、細胞表面マーカーCD134及び/又はCD137の、CD4+T細胞及び/又はCD8+T細胞による共発現を定量的又は定性的に検出することを含む方法。

【請求項2】

以下のステップ：

(i) 抗原の存在下で対象由来の全血試料を培養するステップと、

(ii) 培養全血試料中のCD25、並びに、CD134及び/又はCD137の、CD4+T細胞及び/又はCD8+T細胞による共発現を定量的又は定性的に検出するステップと

を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

抗原が、ツベルクリン、C型肝炎ウイルス(HCV)コア抗原、HCV非構造タンパク質3(NS3)、サイトメガロウイルス(CMV)リンタンパク質65(pp65)、CMV溶解物、単純疱疹ウイルス(HSV)-1溶解物、HSV-2溶解物、ワクシニア溶解物、破傷風トキソイド(TT)、結核菌由来の精製タンパク質誘導物質(PPD)、連鎖球菌抗原ストレプトキナーゼ、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)-1 p24、及びHI

V - 1 G a g、E n v、P o 1 又は他の補助タンパク質由来の重複ペプチドのプールからなる群から選択される、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

対象の免疫能力を測定する方法であって、前記対象由来の全血試料をインビトロで抗原及び/又はマイトジェンに曝露した後に、前記全血試料中の細胞表面マーカー C D 2 5、並びに細胞表面マーカー C D 1 3 4 及び/又は C D 1 3 7 の、C D 4 + T 細胞及び/又は C D 8 + T 細胞による共発現を定量的又は定性的に検出することを含む方法。

【請求項 5】

以下のステップ：

(i) 抗原及び/又はマイトジェンの存在下で対象由来の全血試料を培養するステップと

10

、

(ii) 培養全血試料中の C D 2 5、並びに、C D 1 3 4 及び/又は C D 1 3 7 の、C D 4 + T 細胞及び/又は C D 8 + T 細胞による共発現を定量的又は定性的に検出するステップ

とを含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

培養するステップが、全血試料を抗原の存在下で培養することからなる、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

抗原が、ツベルクリン、C 型肝炎ウイルス (H C V) コア抗原、H C V 非構造タンパク質 3 (N S 3)、サイトメガロウイルス (C M V) 溶解物、C M V リンタンパク質 6 5 (p p 6 5)、単純疱疹ウイルス (H S V) - 1 溶解物、H S V - 2 溶解物、ワクシニア溶解物、破傷風トキソイド (T T)、結核菌由来の精製タンパク質誘導物質 (P P D)、連鎖球菌抗原ストレプトキナーゼ、ヒト免疫不全ウイルス (H I V) - 1 p 2 4、及び H I V - 1 G a g、E n v、P o 1 又は他の補助タンパク質由来の重複ペプチドのプールからなる群から選択される、請求項 6 に記載の方法。

20

【請求項 8】

培養するステップが、全血試料をマイトジェンの存在下で培養することからなる、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 9】

マイトジェンが、フィトヘムアグルチニン (P H A)、ホルボールミリスチルアセテート (P M A)、イオノマイシン、ブドウ球菌エンテロトキシン B (S E B)、毒素性ショック症候群毒素 (T S S T)、ブドウ球菌エンテロトキシン A (S E A)、コンカナバリン A (C o n A)、ヤマゴボウマイトジェン、並びに場合により C D 2 8 副刺激及び/又は抗 C D 2 モノクローナル抗体と組み合わせることもある、抗 C D 3 モノクローナル抗体からなる群から選択される、請求項 8 に記載の方法。

30

【請求項 10】

検出するステップが、培養ステップの開始から 2 4 ~ 4 8 時間以内に実施される、請求項 2 又は 5 に記載の方法。

【請求項 11】

検出するステップが、培養ステップの開始から 4 0 ~ 4 4 時間以内に実施される、請求項 10 に記載の方法。

40

【請求項 12】

全血試料がヘパリン処理全血試料である、請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

C D 2 5、並びに、C D 1 3 4 及び/又は C D 1 3 7 の、C D 4 + T 細胞及び/又は C D 8 + T 細胞による共発現を検出するステップが、C D 4 + T 細胞上の C D 2 5 及び C D 1 3 4 の共発現を定量的又は定性的に検出することからなる、請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

50

CD 25、並びに、CD 134及び/又はCD 137の、CD 4 + T細胞及び/又はCD 8 + T細胞による共発現を検出するステップが、CD 8 + T細胞上のCD 25及びCD 137の共発現を定量的又は定性的に検出することからなる、請求項1～12のいずれかに記載の方法。

【請求項15】

検出するステップが、CD 25、CD 134及びCD 137の1種に特異的に結合するモノクローナル抗体の群から選択される少なくとも1つのモノクローナル抗体の使用を含む、請求項1～14のいずれかに記載の方法。

【請求項16】

検出するステップがフローサイトメトリーの使用を含む、請求項1～15のいずれかに記載の方法。

10

【請求項17】

CD 25、並びに、CD 134及び/又はCD 137を共発現する細胞を単離するステップを更に含む、請求項1～16のいずれかに記載の方法。

【請求項18】

単離するステップが、CD 25、CD 134及びCD 137の1種に特異的に結合するモノクローナル抗体の群から選択される少なくとも1つのモノクローナル抗体の使用を含む、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

単離するステップがフローサイトメトリーの使用を含む、請求項17又は18に記載の方法。

20

【請求項20】

対象がヒトである、請求項1～19のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗原特異的CD 4 + 若しくはCD 8 + T細胞の検出法、又は対象の全般的免疫能力の測定法に関する。

【背景技術】

【0002】

30

Tリンパ球のCD 4 + 亜集団 (CD 4 + T細胞) は、病原性で細胞内の細菌 (例えば、マイコバテリア) 及び真菌 (例えば、カンジダ)、ウイルス並びに原虫などの細胞内病原体に対する生体防御において、主要な役割を演じる。特に、CD 4 + T細胞は、このような細胞内病原体による感染症に対する細胞性免疫反応の調節を補助し、実際、抗原刺激に応じたサイトカインの放出を介して他細胞からの多様な免疫反応 (例えば、Bリンパ球及び抗体反応の促進及び成熟化、マクロファージの活性化、並びにナチュラルキラー (NK) 細胞及びCD 8 + 細胞傷害性T細胞 (CTL) の活性化) を促進することにより、しばしば「ヘルパー」T細胞と称される。このような抗原刺激は、適切なクラスII主要組織適合性遺伝子複合体 (MHC) のタンパク質を発現する任意の抗原提示細胞が提示する抗原が、「初回抗原刺激を受けた」CD 4 + T細胞 (即ち、「抗原特異的CD 4 + T細胞」になるように、ある抗原に以前に曝されたことのあるCD 4 + T細胞) により認識されることによって実現される。前記の通り、刺激済みのCD 4 + T細胞が起こす免疫反応の1種又は「エフェクター機能」は、マクロファージの活性化である。活性化されたマクロファージは、食細胞活性の増加 (即ち、活性化マクロファージは病原体食菌能の増加を示す) 及び他の活性の増加を介した感染部位における病原体の殺滅に必須の役割を演じる。抗原特異的CD 4 + T細胞とマクロファージとの相互作用は、いわゆる遅延型過敏症反応 (DTH) の基礎となるが、この反応は、対象が以前に特定の抗原 (例えば、病原体又はアレルギーの抗原) に曝露又は「感作」されたことがあるか否かを判定するために、各種皮膚試験で利用されてきた。よく知られている1種のDTH皮膚試験は、対象における潜在的結核 (結核菌で発症 (Mycobacterium tuberculosis)) を調べる、又は対象が、カル

40

50

メット・ゲラン菌（BCG）結核ワクチンの接種を以前に受けたことがあるか否かを判定する検査において、ツベルクリン抗原として使用するツベルクリン反応（Mantoux試験）である。

【0003】

ツベルクリン反応、及びBioMerieux Multitestなどの他の類似の遅延型過敏症皮膚試験は、恐らくはCD4 + T細胞が媒介する抗原特異的の反応を検出するために、臨床及び診断試験室並びに研究室において広く使用されてきた。しかし、こうした試験では、実施に（即ち、読取結果を得るために）相当量の時間が確かに必要であり、結果の読取りに患者が戻って来ることが必要であり、こうした試験の適用及び読取りにおいて担当者自身に相当な変動性がある。これらの問題が相俟ってその有効な使用が制限される。例えば、ツベルクリン反応では、ツベルクリン抗原の投与からおよそ2～3日間何らかのDTH反応を観察しなければならず、そのため遠隔地に住んでいる人々の有効な検査には妥当でないか、望ましくないことになり得る。その上、皮膚試験結果の評価は、相対的に主観的なため、定量的な結果ではなく定性的な結果を生じる。

10

【0004】

DTH皮膚試験はさておき、抗原特異的CD4 + T細胞は、他の方法によって検出し、実際に測定することができる。例えば、末梢血単核細胞（PBMC）を用いて、リンパ増殖アッセイ（LPA）の名で知られる方法によって抗原特異的CD4 + T細胞を測定することができる。しかし、インビトロでのCD4 + T細胞の増殖能を利用し、新たに合成されたDNA中への³H - チミジンの取込みを培養の6～7日後に検出する方法には、診断試験室にとってその魅力を失わせる制約がいくつかある。その制約は、即ち（i）多量の放射性核種の使用、（ii）長い「応答」時間、（iii）PBMCを調製するための血液試料の長々とした処理の必要性、（iv）バッチ間で変動性があることによる、慎重に選別したヒト血清に対する依存性、（v）高度な訓練を要する培養技術の必要性、（vi）CD4 + T細胞を最初に精製した場合以外は、その反応の原因をCD4 + T細胞とすることができないという事実、並びに（vii）試験室間の規格化に問題のある、アッセイ間及びアッセイ内の実質的な変動性である。現在のところ、LPAは研究室以外ではめったに実施されない。

20

【0005】

別の例は、カルボキシフルオレッセイン二酢酸スクシンイミジル（CFSE）標識PBMCを用いるLPAのフローサイトメトリー式変法である（Lyons, AB, and CR Parish. 1994. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. J Immunol Methods 171:131）。このアッセイは、研究室で広く使用されてきており、放射活性を使用せず、反応性CD4 + T細胞の直接同定も可能にするが、LPAの他の欠点をなお免れない。加えて、このアッセイには、当該細胞数が、しばしば多量の背景染色の中にあって微少になり得るために、フローサイトメトリー分析を非常に慎重に実施しなければならないという欠点がある。

30

【0006】

更なる例は、いわゆる細胞内サイトカイン（ICC）アッセイである。このアッセイは、研究室においてかなり広く使用されようになっており、全血培養物中の抗原特異的CD4 + T細胞の直接検出を可能にする（Nomura, LE, JM Walker, and HT Maecker. 2000. Optimization of whole blood antigen-specific cytokine assays for CD4(+) T cells. Cytometry 40:60）。しかし、このアッセイは、非常に手が掛かり、全タンパク抗原を用いる6時間の培養（抗原の処理及び提示に2時間に加え、プレフェルジンAを用いて4時間）、又はペプチド及びプレフェルジンAを用いる6時間の培養のいずれかを要する。更に、試料の取得がその日の遅くになると、夜遅く処理ステップが必要になり、そうでなければ翌日まで放置されるが、それは最適ではない。その上、次いで培養後に2時間の細胞内染色ステップが必要であり、その後フローサイトメトリー分析が行われる。ICCアッセイの自動化は可能である（Sun, MA, HS Dunn, PL Orr, R de Laat, E Sinclair, SA Ghanekar, BM Bredt, JF Dunne, VC Maino, and HT Maecker. 2003. Performance of pl

40

50

ate-based cytokine flow cytometry with automated data analysis. BMC Immunol 4:9) が、一般には利用できない。また、試験室間の規格化にも問題がある。

【 0 0 0 7 】

したがって、現在利用できる方法のうち、臨床及び診断試験室並びに研究室に直ぐに適用できる抗原特異的 C D 4 + T 細胞の検出法は存在しない。更に、診断試験室での使用に適した方法に関しては、それに伴う各種の問題及び困難のためにこれまで不評であった。しかし、診断試験室で不評となっている抗原特異的 C D 4 + T 細胞の検出アッセイが、唯一種の免疫反応アッセイではない。即ち、ポリクローナルマイトジェンであるフィトヘムアグルチニン (P H A) に対する免疫系リンパ球の反応は、一般的な T 細胞免疫能力の尺度として以前に広く使用されてきた (例えば、原発性免疫不全が疑われる場合に対して (Buckley, RH 2004. Molecular defects in human severe combined immunodeficiency and approaches to immune reconstitution. Annu Rev Immunol 22:625))。しかし、このアッセイは ^3H -チミジン L P A に基づくので、細胞が 3 日目に採集されることは別として、L P A と本質的に同じ欠点を受ける。

10

【 0 0 0 8 】

抗凝固処理した全血試料の少量の一定分量を抗原又は P H A と 4 時間 (2 4 時間まで) インキュベートし、C D 4 + T 細胞上の早期 T 細胞活性化マーカー抗原 C D 6 9 の上方調節による活性化をフローサイトメトリーで測定する、より簡潔な全血法が提案されてきた (Perfetto, SP, TE Hickey, PJ Blair, VC Maino, KF Wagner, S Zhou, DL Mayers, D S t Louis, CH June, and JN Siegel. 1997. Measurement of CD69 induction in the assessment of immune function in asymptomatic HIV-infected individuals. Cytometry 30 :1)。応答時間が短く、細胞表面の読取りが非常に簡単なこの全血アッセイは、魅力的な手法であった。しかし、本出願人によれば、このアッセイはポリクローナル P H A 反応の測定には有用であるが、不適切なほど多数の C D 4 + T 細胞が抗原に応じて C D 6 9 を上方調節し、この読取りに特異性が欠如していることを示すので、このアッセイが抗原特異的 C D 4 + T 細胞の検出に十分には特異的でないことが判明した。更に、エクスピボでの C D 4 + T 細胞の小さいが無視できないサブセット上に C D 6 9 が存在するために、結果の分析が複雑になることが判明した。

20

【 0 0 0 9 】

抗原特異的 C D 4 + T 細胞に対する全血アッセイの使用されている別の例は、Quantiferon (登録商標) 全血刺激アッセイ (CSL Limited社製、Melbourne、VIC、オーストラリア) である。このアッセイでは、抗原刺激後に血漿を収集し、E L I S A によりその I F N - γ を分析する。しかし、多量の I F N - γ が、特にウイルス抗原に反応する C D 8 + T 細胞、並びに培養物中に存在する N K 細胞により産生されるため、標準的 L P A 同様に、その反応が C D 4 + T 細胞によることが確認されていない。現在のところ、このアッセイは結核菌に対する反応の検出だけに認可されている。しかし、このアッセイは、年少小児集団において多数の不確定な結果を示すことが認められてきた。結核菌により刺激される I F N - γ 反応の検出法であって、欧州で使用が認可されている T spot TB アッセイとして知られる第 2 のアッセイがある。このアッセイは、ELIspot プレート上に播種する前に P B M C の分離を要する ELIspot 基準法である。このアッセイは、特異性及び感度が類似しており、小児及び免疫低下者の患者において不確定結果の割合が減少するようである。

30

40

【 0 0 1 0 】

したがって、特に抗原特異的 C D 4 + T 細胞、それだけでなく抗原特異的 C D 8 + T 細胞を検出する、相対的に簡単で費用効果的な代替法に対する必要性が今なお存在している。

【 0 0 1 1 】

C F S E 標識 P B M C を用いて細胞表面マーカー抗原 C D 2 5 (インターロイキン - 2 (I L - 2) 受容体の鎖である膜貫通タンパク質) の上方調節と細胞分裂との動態を調べる間に、本出願人は、約 4 8 時間以後に開始する細胞分裂に先立って、C D 2 5 が、2

50

4時間以後に抗原又はマイトジェンに反応するCD4+T細胞上に顕著に上方調節されることを見出した。同時に、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)などのある種の副刺激細胞表面タンパク質の発現動態を調べていると、これらのタンパク質の上方調節も24時間以後に起こることが判明した。マウスモデルにおける遺伝子研究によって、CD4+T細胞上のOX40と抗原提示細胞上のOX40リガンド(OX40L)との相互作用が、初回抗原刺激後の「記憶」CD4+T細胞(即ち、即座の防御力、並びに抗原刺激に対してより迅速で有効な免疫反応を開始する能力を付与できる、いわゆる記憶細胞に成長した初回抗原刺激済みのCD4+T細胞)の生成、及びエフェクターCD4+T細胞の生存促進にとって肝要であることが示された。CD4+T細胞上のCD134発現は、抗原又はマイトジェンによるT細胞受容体の刺激から24~48時間後に最高潮となり、約120時間後に基準線に戻ることが以前に報告されていた(Croft, M 2003. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? Nat Rev Immunol 3:609)ので、本出願人は、抗原又はマイトジェンで刺激した全血培養物を用いて、CD25及びCD134が、48時間の直前(即ち、最大のCD134発現に相当するが、細胞分裂の開始前に相当した時点)に共発現するか否か、したがって抗原特異的CD4+T細胞を検出及び/又は測定する、相対的に簡単に費用効果的な方法の基礎として使用し得るか否かを調査した。抗原特異的CD4+T細胞用のこうした細胞表面マーカーは、ヘパリンナトリウムで抗凝固処理した全血試料を用いて、抗原との40~44時間のインキュベーション後にフローサイトメトリーによって容易に測定できることが判明した。したがって、この方法は、準備の簡潔性(即ち、PBMCの調製が不要)と、フローサイトメトリーの簡単な読取り(即ち、細胞の透過性及びサイトカインの検出が不要)とを併用している。更に、この方法は、驚くほど低いバックグラウンド(CD4+T細胞の<0.03%)を有することが判明済みであり、この方法の使用によって、マイコバクテリア抗原、破傷風トキソイド、サイトメガロウイルス(CMV)溶解物、ワクシニア溶解物、及びヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)の調製物中に含まれる抗原に対して、特異的なCD4+T細胞反応を容易に検出することがこれまでに可能となった。その上、この方法は、一般的な免疫能力の尺度として、PHAなどのマイトジェン及びブドウ球菌エンテロ抗原B(SEB)に対するより広範な反応の評価にも使用できることが判明した。その上更に、この方法は、固定及び透過性化のステップを回避し得る、抗原特異的又はマイトジェン活性化CD4+T細胞の細胞分取に適用を有する。

【非特許文献1】Lyons, AB, and CR Parish. 1994. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. J Immunol Methods 171:131

【非特許文献2】Nomura, LE, JM Walker, and HT Maecker. 2000. Optimization of whole blood antigen-specific cytokine assays for CD4(+) T cells. Cytometry 40:60

【非特許文献3】Sun, MA, HS Dunn, PL Orr, R de Laat, E Sinclair, SA Ghanekar, B M Bredt, JF Dunne, VC Maino, and HT Maecker. 2003. Performance of plate-based cytokine flow cytometry with automated data analysis. BMC Immunol 4:9

【非特許文献4】Buckley, RH 2004. Molecular defects in human severe combined immunodeficiency and approaches to immune reconstitution. Annu Rev Immunol 22:625

【非特許文献5】Perfetto, SP, TE Hickey, PJ Blair, VC Maino, KF Wagner, S Zhou, DL Mayers, D St Louis, CH June, and JN Siegel. 1997. Measurement of CD69 induction in the assessment of immune function in asymptomatic HIV-infected individuals. Cytometry 30:1

【非特許文献6】Croft, M 2003. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? Nat Rev Immunol 3:609

【発明の開示】

【0012】

第1の態様では、本発明は、対象における抗原特異的なCD4+T細胞及び/又はCD8+T細胞を定量的又は定性的に検出する方法であって、抗原への曝露に反応する前記対象由来の全血試料において、細胞表面マーカーCD25、並びに細胞表面マーカーCD1

10

20

30

40

50

34及び/又はCD137の発現を定量的又は定性的に検出することを含む方法を提供する。

【0013】

好ましくは、第1の態様の方法は、以下のステップ：

- (i) 抗原の存在下で対象由来の全血試料を培養するステップと、
- (ii) 培養試料中のCD25、並びに、CD134及び/又はCD137の共発現を定量的又は定性的に検出するステップとを含む。

【0014】

好ましくは、CD25並びに、CD134及び/又はCD137の発現を検出するステップは、抗原の存在下での全血試料の培養開始から約48時間以内に実施される。

10

【0015】

好ましくは、CD25並びに、CD134及び/又はCD137の発現を検出するステップは、CD4+T細胞上でのCD25及びCD134の定量的若しくは定性的な検出、又はCD8+T細胞上でのCD25及びCD137の定量的若しくは定性的な検出からなる。

【0016】

好ましくは、この方法は、抗原特異的CD4+T細胞の定量的又は定性的な検出に使用される。

【0017】

第2の態様では、本発明は、対象の免疫能力を測定する方法であって、抗原及び/又はマイトジェンへの曝露に反応する、前記対象由来の全血試料中の細胞表面マーカーCD25、並びに細胞表面マーカーCD134及び/又はCD137の発現を定量的又は定性的に検出することを含む方法を提供する。

20

【0018】

好ましくは、第2の態様の方法は、以下のステップ：

- (i) 抗原及び/又はマイトジェンの存在下で対象由来の全血試料を培養するステップと、
- (ii) 培養試料中のCD25、並びに、CD134及び/又はCD137の共発現を定量的又は定性的に検出するステップとを含む。

30

【0019】

好ましくは、CD25並びに、CD134及び/又はCD137の発現を検出するステップは、抗原及び/又はマイトジェンの存在下での全血試料の培養開始から約48時間以内に実施される。

【0020】

好ましくは、CD25並びに、CD134及び/又はCD137の発現を検出するステップは、CD4+T細胞上でのCD25及びCD134の定量的若しくは定性的な検出、又はCD8+T細胞上でのCD25及びCD137の定量的若しくは定性的な検出からなる。

40

【0021】

好ましくは、この方法は、抗原特異的又はマイトジェン活性化CD4+T細胞の定量的又は定性的な検出に使用される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0022】

本出願人は、細胞表面マーカーCD25並びに、CD134及び/又はCD137の発現の検出が、対象由来の全血培養試料中の抗原特異的なCD4+T細胞及び/又はCD8+T細胞を検出及び/又は測定する有用な手段を提供することを見出した。

【0023】

CD4+T細胞又はCD8+T細胞に関して使用される用語「抗原特異的」とは、該T

50

細胞が、対象とする特定抗原に特異的に結合及び反応することができることを意味すると理解されたい。加えて、「抗原特異的」と述べたCD4+T細胞又はCD8+T細胞は、T調節細胞(T_{REG}細胞)ではないことを理解されたい。

【0024】

第1の態様では、本発明は、対象における抗原特異的なCD4+T細胞及び/又はCD8+T細胞を定量的又は定性的に検出する方法であって、抗原への曝露に反応する前記対象由来の全血試料において、細胞表面マーカーCD25、並びに細胞表面マーカーCD134及び/又はCD137の発現を定量的又は定性的に検出することを含む方法を提供する。

【0025】

好ましくは、第1の態様の方法は、以下のステップ：

- (i) 抗原の存在下で対象由来の全血試料を培養するステップと、
- (ii) 培養試料中のCD25、並びに、CD134及び/又はCD137の共発現を定量的又は定性的に検出するステップとを含む。

【0026】

全血試料は、当業者に周知の任意の方法によって(例えば、カニューレ及び血液試料バイアルの使用によって)対象から取得することができる。適当な抗凝固剤を全血試料に添加して凝固を防止してもよい。特に適当な抗凝固剤は、任意の市販のヘパリン処理血液試料バイアルを用いることにより、都合よく使用できるヘパリンナトリウムである。酸性クエン酸デキストロース(ACD)やエチレンジアミン四酢酸(EDTA)などのカルシウムイオン(Ca²⁺)をキレート化する抗凝固剤は、カルシウム流入の阻止によりリンパ球機能を妨害する恐れがあるので、避けることが好ましい(Lewis, RS. 2001. Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. Ann Rev Immunol 19:497-521)。したがって、第1の態様の方法に使用する全血試料は、ヘパリン処理血液試料バイアル中に収集することが好ましい。

【0027】

全血試料を培養するステップは、当業者に周知の任意の方法に準じ得る。全血試料は、例えば適当な培地(例えば、Iscove改変ダルベッコ培地)及び抗原と混合し、37°Cでインキュベートし得る。その抗原は、検出しようとする抗原特異的なCD4+T細胞及び/又はCD8+T細胞に従って選択することになる。したがって、潜在的結核又はBCGによる以前のワクチン接種を検査するためには、選択される該抗原は、ツベルクリン、又はESAT-6(early secretory antigenic target)、培養液タンパク質-10(CFP-10)などの結核特異抗原でもよい。同様にC型肝炎の検査には、選択される該抗原はC型肝炎ウイルス(HCV)のコア抗原又は非構造タンパク質3(NS3)とし得るが、CMVの検査にはリンタンパク質65(pp65)又はCMV溶解物を利用し得る。HIV-1に対しては、選択される該抗原は、組換えp24、又はGag、Env、Pol若しくは他のHIV-1補助遺伝子由来の重複ペプチドのプールでもよい。

【0028】

ツベルクリン、HIV-1 p24などの精製タンパク質(天然又は組換え)は別として、該抗原は、例えば、細菌若しくはウイルス溶解物、死滅全粒ウイルス、抗原性タンパク質断片(合成抗原性ペプチドを含む)、重複ペプチドプール(Zaunders, JJ, WB Dyer, B Wang, ML Munier, M Miranda-Saksena, R Newton, J Moore, CR Mackay, DA Cooper, NK Saksena, and AD Kelleher. 2004. Identification of circulating antigen-specific CD4+ T lymphocytes with a CCR5+, cytotoxic phenotype in an HIV-1 long-term non progressor and in CMV infection. Blood 103:2238、Zaunders, JJ, ML Munier, DE Kaufmann, S Ip, P Grey, D Smith, T Ramacciotti, D Quan, R Finlayson, J Kaldor, ES Rosenberg, BD Walker, DA Cooper, and AD Kelleher. 2005. Early proliferation of CCR5+ CD38+++ antigen-specific CD4+ Th1 effector cells during primary HIV-1 infection. Blood 106:1660)又は最適化抗原性ペプチド、細菌、真菌若しくは酵母の死滅若し

10

20

30

40

50

くは固定全菌抗原性調製物、或いはウィルス感染細胞又は抗原パルス抗原提示細胞でもよい。該抗原は、適当な担体分子に結合してもよく、又はアジュバントと組み合わせて使用してもよい。

【0029】

好ましくは、CD25、並びに、CD134及び/又はCD137の発現を検出するステップは、培養物中に存在する実質数の細胞を分割する前に実施する。したがって、標準的な培養条件下で（例えば、空气中5%CO₂の加湿雰囲気の中で、リンパ球の培養に適した標準培地を用いて）、該検出ステップは、好ましくは、抗原存在下での全血試料の培養開始から60時間以内、より好ましくは48時間以内実施される。その上、該検出ステップは、細胞表面マーカー（即ち、CD25、CD134及び/又はCD137）の共発現を実質的に上方調節するのに十分な期間が経過した後、実施することが好ましい。したがって、標準的な培養条件下、該検出ステップは、抗原存在下での全血試料の培養開始から約24～48時間以内実施することがより好ましく、抗原存在下での全血試料の培養開始から約40～44時間以内実施することが最も好ましい。

10

【0030】

この方法は、CD25、並びに、CD134及び/又はCD137の発現の検出を含み得るが、この方法は、CD4+T細胞上でのCD25及びCD134の定量的若しくは定性的な検出、又はCD8+T細胞上でのCD25及びCD137の定量的若しくは定性的な検出からなることが好ましい。

【0031】

これに関しては、抗原特異的CD4+又はCD8+T細胞以外のCD4+又はCD8+T細胞のうち、エクスピボで細胞表面マーカーのこうした組合せを発現するものは、あるにしてもないに等しいことが判明しており、このためCD25及びCD134の共発現又はCD25及びCD137の共発現の非常に低い「バックグラウンド」に対して、該検出ステップを実施することが可能である。その結果、本発明の第1の態様の方法は、希少な抗原特異的CD4+T細胞（例えば、全CD4+T細胞の0.1%未満の頻度で培養物中に存在する）の検出に特に使用し得る。

20

【0032】

細胞表面マーカーを検出するステップは、当業者に周知の任意の方法に従って実施し得る。このような方法は、細胞表面マーカーCD25、CD134及びCD137の1種に特異的に結合する標識モノクローナル抗体の使用、並びに好ましくはフローサイトメトリーの使用を含み得る。これに関しては、適当な標識モノクローナル抗体（例えば、抗CD25及び抗CD134抗体）と結合した後、都合がよいときに（例えば、全血試料の収集及び培養の場所からフローサイトメトリー試験室へ輸送した後）、試料を適当な固定剤（例えば、リン酸緩衝塩水（PBS）中1%で使用し得るパラホルムアルデヒド）で固定することにより、その後の細胞表面マーカーの定量又は定性的決定を行い得ることは、当業者であれば理解されよう。したがって、該検出ステップを実施するための上記好ましい各時間に関しては、培養試料の「染色」（即ち、蛍光色素（複数も）で標識した適当なモノクローナル抗体による）及び「固定」は、所与の好ましい期間内に実施しさえすればよいと理解されたい。即ち、染色及び固定を、抗原存在下での全血試料の培養開始から44時間後に開始するが、細胞表面マーカーの実際の定量又は定性的決定は、後になる（例えば12～24時間後）まで行わない場合、それでもなおその場合は、抗原存在下での全血試料の培養開始から約40～44時間の最も好ましい期間内に該検出ステップを実施することになると理解されたい。

30

40

【0033】

この第1の態様の方法は、CD25、並びに、CD134及び/又はCD137を発現する細胞の単離を更に含み得る。該単離ステップは、当業者に周知の任意の方法に従い、例えば、多くのフローサイトメーターで利用できる細胞分取機能の利用によって実施し得る。

【0034】

50

本発明の第1の態様の方法は、特に、抗原特異的CD4+T細胞の定量的又は定性的検出を可能にする(即ち、この方法はCD4+T細胞の想起反応のモニターを可能にする)。したがって、この方法は、細胞内病原性の細菌(例えば、マイコバクテリア、クロストリジウム及びヘリコバクター)、真菌(例えば、カンジダ、アスペルギルス及びクリプトコッカス)、ウイルス(例えば、サイトメガロウイルス(CMV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)-1、エプスタイン・バーウイルス(EBV)、インフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、風疹ウイルス、B型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV)、単純疱疹ウイルス(HSV)-1、HSV-2、JCウイルス及びカポジ肉腫ヘルペスウイルス)並びに原虫(例えば、トキソプラズマ、ニューモシステイス、クリプトスポリジウム及びプラスモジウム)、細胞外の細菌(例えば、大腸菌(*Escherichia coli*)、連鎖球菌種、ナイセリア種、ヘモフィルス種、シュドモナス種)及びトキソイド(例えば、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド)に対する抗原特異的CD4+T細胞の検出に有用となり得る。この方法は、自己抗原(例えば、インスリン、グリアジン、アセチルコリン受容体、ミエリン塩基性タンパク質、DNA及びクロマチン)並びにアレルゲン(例えば、イェダニタンパク質又は花粉タンパク質)に対する抗原特異的CD4+T細胞の検出にも有用となり得る。好ましくは、該抗原は、ツベルクリン、HCVコア抗原、HCV NS3、CMV pp65、CMV溶解物、HSV-1溶解物、HSV-2溶解物、JCウイルス溶解物、ワクシニア溶解物、破傷風トキソイド(TT)、結核菌由来の精製タンパク質誘導物質(PPD)、連鎖球菌抗原ストレプトキナーゼ(SK)、HIV-1 p24、及びGag、Env、Pol又は他のHIV-1補助遺伝子由来の重複ペプチドのプールからなる群から選択される。

10

20

【0035】

対象は、人間又は獣医学上重要な別の動物(例えば、家畜動物、競走馬及び愛玩動物)でもよい。対象は、例えばヒト疾患のモデル又はワクチンの開発に使用するマウスやサルなどの実験動物の場合もあり、ワクチン開発では、免疫反応の様々な側面を分析することが特に興味深い。

【0036】

第2の態様では、本発明は、対象の免疫能力を測定する方法であって、抗原及び/又はマイトジェンへの曝露に反応する、前記対象由来の適当な全血試料中の細胞表面マーカーCD25、並びに細胞表面マーカーCD134及び/又はCD137の発現を定量的又は定性的に検出することを含む方法を提供する。

30

【0037】

好ましくは、第2の態様の方法は、以下のステップ:

(i) 抗原及び/又はマイトジェンの存在下で対象由来の全血試料を培養するステップと、

(ii) 培養試料中のCD25、並びに、CD134及び/又はCD137の共発現を定量的又は定性的に検出するステップと

を含む。

【0038】

第1の態様の方法と同様に、全血試料は、当業者に周知の任意の方法により対象から取得できるが、カニューレ及びヘパリン処理血液試料バイアルの使用により都合よく取得し得る。カルシウムイオン(Ca^{2+})をキレート化する抗凝血剤は、リンパ球機能を妨害する恐れがあるので、避けることがやはり好ましい。

40

【0039】

全血試料を培養するステップは、当業者に周知の任意の方法に準じ得る。したがって全血試料は、適当な培地並びに抗原及び/又はマイトジェンと混合し、37°Cでインキュベートし得る。

【0040】

好ましくは、本発明の第2の態様の方法では、全血試料を培養するステップは、マイトジェンの存在下で培養することを含む。該マイトジェンは、当業者に周知のマイトジェン

50

から選択してもよく、例えば、該マイトジェンは、PHA、ホルボールミリスチルアセテート(PMA)、イオノマイシン、SEB、毒素性ショック症候群毒素(TSST)、ブドウ球菌エンテロトキシンA(SEA)、コンカナバリンA(ConA)、ヤマゴボウマイトジェン、並びに場合によりCD28副刺激及び/又は抗CD2モノクローナル抗体と組み合わせることもある、抗CD3モノクローナル抗体からなる群から選択してもよい。

【0041】

或いは、本発明の第2の態様の方法では、全血試料を培養するステップは、抗原の存在下で培養することを含む。ツベルクリンなどの精製タンパク質(天然又は組換え)は別として、該抗原は、やはり例えば、細菌若しくはウイルス溶解物、抗原性タンパク質断片(合成抗原性ペプチドを含む)、又は重複ペプチドプールでもよい(Zaunders, JJ, WB Dyer, B Wang, ML Munier, M Miranda-Saksena, R Newton, J Moore, CR Mackay, DA Cooper, NK Saksena, and AD Kelleher. 2004. Identification of circulating antigen-specific CD4+ T lymphocytes with a CCR5+, cytotoxic phenotype in an HIV-1 long-term nonprogressor and in CMV infection. Blood 103:2238, Zaunders, JJ, ML Munier, DE Kaufmann, S Ip, P Grey, D Smith, T Ramacciotti, D Quan, R Finlayson, J Kaldor, ES Rosenberg, BD Walker, DA Cooper, and AD Kelleher. 2005. Early proliferation of CCR5+ CD38+++ antigen-specific CD4+ Th1 effector cells during primary HIV-1 infection. Blood 106:1660)。該抗原は、適当な担体分子に結合してもよく、又はアジュバントと組み合わせて使用してもよい。

【0042】

好ましくは、該抗原は、ツベルクリン、HCVコア抗原、HCV NS3、CMV pp65、CMV溶解物、HSV-1溶解物、HSV-2溶解物、ワクシニア溶解物、破傷風トキソイド(TT)、結核菌由来の精製タンパク質誘導物質(PPD)、連鎖球菌抗原ストレプトキナーゼ、HIV-1 p24、及びGag、Pol、Env又は他のHIV-1補助遺伝子由来の重複ペプチドのプールからなる群から選択される。

【0043】

好ましくは、CD25、並びに、CD134及び/又はCD137の発現を検出するステップは、培養物中に存在する実質数の細胞を分割する前に実施する。したがって、該検出ステップは、好ましくは、抗原及び/又はマイトジェン存在下での全血試料の培養開始から60時間以内、より好ましくは48時間以内実施される。その上、該検出ステップは、細胞表面マーカー(即ち、CD25、CD134及び/又はCD137)の発現を実質的に上方調節するのに十分な期間が経過した後、実施することが好ましい。したがって、該検出ステップは、抗原及び/又はマイトジェン存在下での全血試料の培養開始から約24~48時間以内実施することがより好ましく、抗原及び/又はマイトジェン存在下での全血試料の培養開始から約40~44時間以内実施することが最も好ましい。

【0044】

この方法は、CD25、並びに、CD134及び/又はCD137の共発現の検出を含み得るが、この方法は、CD4+T細胞上でのCD25及びCD134の定量的若しくは定性的な検出、又はCD8+T細胞上でのCD25及びCD137の定量的若しくは定性的な検出からなることが好ましい。

【0045】

細胞表面マーカーを検出するステップは、当業者に周知の任意の方法に従って実施し得る。好ましくは、該検出ステップはフローサイトメトリーの使用を含む。第1の態様の方法同様に、培養全血試料を適当に固定すれば、フローサイトメトリーを遅らせてもよい(例えば12~24時間)。したがって、該検出ステップが、例えば蛍光色素(複数も)で標識された適当なモノクローナル抗体(例えば、抗CD25及び抗CD134抗体)の使用、並びにフローサイトメトリーの使用を含む場合、培養全血試料は、抗原及び/又はマイトジェンとの試料の培養開始から44時間後に染色及び固定するが、細胞表面マーカーの定量又は定性的決定(例えば、フローサイトメトリーによる)は、後で行ってもよい。

したがって、該検出ステップは、それでもなお、抗原及び/又はマイトジェン存在下での全血試料の培養開始から約40～44時間の最も好ましい期間内に実施されたと理解されよう。

【0046】

この第2の態様の方法は、CD25、並びに、CD134及び/又はCD137を発現する細胞の単離を更に含む得る。該単離ステップは、当業者に周知の任意の方法に従い、例えば、多くのフローサイトメーターで利用できる細胞分取機能の利用によって実施し得る。

【0047】

対象は、人間又は獣医学若しくは実験上重要な別の動物でもよい。

10

【0048】

本発明の特質をより明確に理解するために、以下の非限定的な実施例を参照しながらその好ましい形態を今から説明する。

[実施例]

【実施例1】

【0049】

ヒト全血のCD25 / CD134 アッセイ

材料及び方法

対象

健常成人志願者を大学及び病院の人材から募集した。対象3名は、職業上の理由から地域の労働衛生安全指針に従ってワクシニアの接種を受け、他所 (Zaunders JJ, Dyer WB, Munier ML, Ip S, Liu J, Amyes E, Rawlinson W, De Rose R, Kent SJ, Sullivan JS, Cooper DA, Kelleher AD. 2006. CD127+CCR5+CD38+++ CD4+ Th1 effector cells are an early component of the primary immune response to vaccinia virus and precede development of interleukin-2+ memory CD4+ T cells. J Virol. 80(20):10151-61) に記載のように経時的試料を提供した。HIV-1 p24 (Zaunders, JJ, WB Dyer, B Wang, ML Munier, M Miranda-Saksena, R Newton, J Moore, CR Mackay, DA Cooper, NK Sakse na, and AD Kelleher. 2004. Identification of circulating antigen-specific CD4+ T lymphocytes with a CCR5+, cytotoxic phenotype in an HIV-1 long-term nonprogressor and in CMV infection. Blood 103:2238) に対する検出容易なCD4+ T細胞反応を示す、HIV陽性長期非進行者LTNP-001も検査を受けた。

20

30

【0050】

試薬

マイトジェンのフィトヘムアグルチニン (PHA; Sigma社製、St Louis, MO、米国) を最終濃度5 µg / mlで全血培養物中で使用した。ブドウ球菌エンテロトキシンB (SEB; Sigma社製) を最終濃度1 µg / mlで使用した。

【0051】

CMV溶解物は、以前に記載 (Zaunders, JJ, WB Dyer, B Wang, ML Munier, M Miranda-Saksena, R Newton, J Moore, CR Mackay, DA Cooper, NK Saksena, and AD Kelleher. 2004. Identification of circulating antigen-specific CD4+ T lymphocytes with a CCR5+, cytotoxic phenotype in an HIV-1 long-term nonprogressor and in CMV infection. Blood 103:2238) のように調製し、最終濃度1 / 250で使用した。

40

【0052】

インビトロアッセイ用のワクシニア抗原は、HeLa細胞中でのNYCBH株の増殖後、他所 (Zaunders JJ, Dyer WB, MunierML, Ip S, Liu J, Amyes E, Rawlinson W, De Rose R, Kent SJ, Sullivan JS, Cooper DA, Kelleher AD. 2006. CD127+CCR5+CD38+++ CD4+ Th1 effector cells are an early component of the primary immune response to vaccinia virus and precede development of interleukin-2+ memory CD4+ T cells. J Virol. 80(20):10151-61) に記載のように調製した。感染性細胞内成熟ウィルスの全粒ウィルス溶解物は、感染細胞を多数回凍結・融解した後、700g、10分の遠心分離により

50

細胞屑を除去することによって調製した。ウイルス抗原は、56、30分の熱不活性化で更に処理し、感染力価を 10^6 倍減少させた（データは示していない）。ワクシニア溶解物は、最終濃度 $1/250$ で使用した。未感染HeLa細胞の対照溶解物も並行して調製し、同じ最終濃度で使用した。

【0053】

結核菌(MTB)由来のPPDとして調製したマイコバクテリア抗原は、Staten Serum Institute社(デンマーク)から入手した。PPDは最終濃度 $5\mu\text{g/ml}$ で使用した。

【0054】

破傷風トキソイド(TT)は、Commonwealth Serum Laboratories社(CSL Limited, Melbourne, VIC、オーストラリア)から入手した。TTは、この製造業者の指示に従って最終濃度 2LfU/ml で使用した。

【0055】

HIV-1 p24 (Protein Sciences社製、Meriden, CT、米国)は、以前に記載(Zaunders, JJ, WB Dyer, B Wang, ML Munier, M Miranda-Saksena, R Newton, J Moore, CR Mackay, DA Cooper, NK Saksena, and AD Kelleher. 2004. Identification of circulating antigen-specific CD4+ T lymphocytes with a CCR5+, cytotoxic phenotype in an HIV-1 long-term nonprogressor and in CMV infection. Blood 103:2238)のように濃度 $5\mu\text{g/ml}$ で使用した。

【0056】

CD3-PerCP-Cy5.5、CD4-PE-Cy7、CD8-APC-Cy7、CD25-APC、CD134-PE及びCD134-FITCの複合モノクローナル抗体は、Becton-Dickinson社(San Jose, CA、米国)から入手した。

【0057】

リンパ増殖アッセイ(LPA)

末梢血単核細胞(PBMC)は、以前に記載(Zaunders, JJ, WB Dyer, B Wang, ML Munier, M Miranda-Saksena, R Newton, J Moore, CR Mackay, DA Cooper, NK Saksena, and AD Kelleher. 2004. Identification of circulating antigen-specific CD4+ T lymphocytes with a CCR5+, cytotoxic phenotype in an HIV-1 long-term nonprogressor and in CMV infection. Blood 103:2238)のようにFicoll-Hypaque密度勾配遠心により分離した。PBMC 1×10^5 個を、10%ヒト血清(Cambrex社製、East Rutherford, NJ、米国)を含有するRPMI 1640(JRH社製、Melbourne, VIC、オーストラリア)中6日間、96ウェル丸底プレート中の1ウェルにつきインキュベートした。添加物を含まない(対照)、又は異なる抗原若しくはマイトジェンを含む培養物を四重に用意した。 ^3H -チミジン(Amersham社製、Buckinghamshire、英国) $0.5\mu\text{Ci}$ を1ウェルにつき添加し、更に18時間インキュベートした後、細胞を採集し(Canberra Packard社)、TopCountシンチレーションカウンター(Packard Instrument社製、Meriden, CT、米国)上で計数した。各抗原又はマイトジェンに対する反復計数の平均値を対照培養物に対する平均値で割り、刺激指数(SI)を求めた。対照ウェルにおけるcpmは、 $124 \sim 428\text{cpm}$ の範囲にあった。

【0058】

CD4+T細胞のCFSE増殖アッセイは、以前に記載(Zaunders, JJ, WB Dyer, B Wang, ML Munier, M Miranda-Saksena, R Newton, J Moore, CR Mackay, DA Cooper, NK Saksena, and AD Kelleher. 2004. Identification of circulating antigen-specific CD4+ T lymphocytes with a CCR5+, cytotoxic phenotype in an HIV-1 long-term nonprogressor and in CMV infection. Blood 103:2238)のように実施した。

【0059】

細胞内サイトカイン(ICC)アッセイ

6色フローサイトメトリーを使用する、以前に公表済みの方法(Nomura, LE, JM Walker, and HT Maecker. 2000. Optimization of whole blood antigen-specific cytokine assays for CD4(+) T cells. Cytometry 40:60)に基づいた全血細胞内サイトカイン(ICC)

10

20

30

40

50

CC) アッセイを用いて、他所 (Zaunders, JJ, WB Dyer, B Wang, ML Munier, M Miranda-Saksena, R Newton, J Moore, CR Mackay, DA Cooper, NK Saksena, and AD Kelleher.

2004. Identification of circulating antigen-specific CD4+ T lymphocytes with a CCR5+, cytotoxic phenotype in an HIV-1 long-term nonprogressor and in CMV infection. Blood 103:2238、Zaunders JJ, Dyer WB, Munier ML, IpS, Liu J, Amyes E, Rawlinson W, De Rose R, Kent SJ, Sullivan JS, Cooper DA, Kelleher AD. 2006. CD127+CCR5+CD38+++ CD4+ Th1 effector cells are an early component of the primary immune response to vaccinia virus and precede development of interleukin-2+ memory CD4+ T cells. J Virol. 80(20):10151-61) に記載のようにワクシニア特異的 CD4+ T 細胞を測定した。手短に言うと、ヘパリン Na 抗凝固処理全血を、無添加物 (対照)、SEB、又はワクシニア若しくは対照溶解物の存在下、共刺激性抗体 CD28 及び CD49d と共に 37、2 時間インキュベートした後、10 µg/ml のプレフェルジン A (Sigma-Aldrich 社製) と共に更に 4 時間インキュベートした。このインキュベーション終了時に、EDTA (Sigma 社製) を室温 (RT) で 15 分間、最終濃度 2 µM で培養物に添加した。サイトカインの細胞内染色は、以前に記載 (Zaunders, JJ, WB Dyer, B Wang, ML Munier, M Miranda-Saksena, R Newton, J Moore, CR Mackay, DA Cooper, NK Saksena, and AD Kelleher. 2004. Identification of circulating antigen-specific CD4+ T lymphocytes with a CCR5+, cytotoxic phenotype in an HIV-1 long-term nonprogressor and in CMV infection. Blood 103:2238) のように実施した。手短に言うと、これらの培養物からの 100 µl を、次いで FACS 溶解溶液 1 ml と RT で 10 分間インキュベートし、PBA 2 ml で 1 回洗浄した。次いで、ペレットを FACS 透過作用溶液 0.5 ml と RT で 10 分間インキュベートし、PBA 2 ml で 1 回洗浄した。次いで、細胞を mAb と暗所中、RT で 30 分間インキュベートした後、0.5% ウシ血清アルブミン及び 0.1% アジ化ナトリウムを含有するリン酸緩衝塩水 (PBS) (PBA) 2 ml で 1 回洗浄し、0.5% パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝塩水 (PF/PBS) 中に再懸濁した。
【0060】

解析のために、30000 イベントを以前に記載 (Zaunders, JJ, ML Munier, DE Kaufmann, S Ip, P Grey, D Smith, T Ramacciotti, D Quan, R Finlayson, J Kaldor, ES Rosenberg, BD Walker, DA Cooper, and AD Kelleher. 2005. Early proliferation of CCR5+ CD38+++ antigen-specific CD4+ Th1 effector cells during primary HIV-1 infection. Blood 106:1660) のように収集した。T リンパ球は、側方散乱光に対し先ず CD3-PerCP-Cy5.5 にゲート設定し、次いで CD4-PE-Cy7 陽性 / CD8-APC-Cy7 陰性細胞にゲート設定し、CD69-APC+IFN- γ -FITC+ 細胞を解析した。この方法は、HIV 陰性対照 16 例の解析から、バックグランド結果と標準偏差の 3 倍との和に基づいて、CD4+ T 細胞の陽性結果 0.08% の検証済みカットオフ値を有する (Munier 等、未公表結果)。

【0061】

全血の CD25 / CD134 アッセイ

ヘパリン Na 抗凝固処理全血 0.25 ml を、滅菌した 5 ml のポリスチレン製ネジ蓋瓶 (Biolabs 社製、Melbourne, VIC、オーストラリア) 中で Iscove 改変ダルベッコ培地 (IMDM; JRH 社製) 0.25 ml と混合した。抗原及びマイトジェンを指定した濃度で添加し、蓋を緩く付けた状態で、培養物を空气中 5% CO₂ の加湿雰囲気中で 37、40 時間インキュベートした。陰性対照培養物は、抗原の非存在下で全血及び IMDM の混合液だけを含んでいた。陽性対照培養物は、PHA、SEB のいずれかを含有していた。こうした陽性及び陰性の対照培養物は、あらゆる実験に含められた。

【0062】

フローサイトメトリー

全血培養物のフローサイトメトリーは、固定後にデュアルレーザー LSR II フローサイトメーター (Becton-Dickinson 社製) 上で FACS Diva v4.1 ソフトウェアを用いて実施した。T リンパ球は、側方散乱光ゲートに対し先ず CD3-PerCP-Cy

10

20

30

40

50

5.5を用いて同定し、次いでCD3 + CD4 - PE - Cy7 + T細胞にゲート設定した。また、CD8 - APC - Cy7染色を用いてCD4 + ゲートからCD8 + T細胞を除外した。次いで、CD25 - APC及びCD134 - PEで染色するために、CD3 + CD4 + CD8 - 細胞を解析した。一部の実験では、示した通りCD25 - APC及びCD134 - FITCを使用した。モノクローナル抗体は、すべてBecton-Dickinson社から入手した。最低50000イベントを解析した。補償は、個々の蛍光色素で染色したリンパ球を用いて調べ、次いでCD3 - PerCP - Cy5.5、CD4 - PE - Cy7、CD8 - APC - Cy7、CD56 - APC、CD19 - PE及びCD14 - FITC (Becton-Dickinson社製) で同時に染色した細胞で確認した。更なる対照には、APC、PE又はFITC抗体を含んでいない個々のチューブが含まれていた(データは示していない)。

10

【0063】

結果

陰性対照並びにマイトジェン及び抗原に対する反応

対照培養物(+0)におけるCD4 + T細胞上でのCD25及びCD134のバックグラウンド共発現が、図1に示してある。31回の個別実験で得られた結果から、バックグラウンド平均値は0.0062%であり、標準偏差は0.0082%であった。したがって、陽性結果のカットオフ値は、平均値 + 3 × 標準偏差、即ち0.0062% + 3 × 0.0082% = 0.03%と計算された。

【0064】

ポリクローナルマイトジェンSEBに対する反応を示す代表的ヒストグラムも図1に示されており、このマイトジェンに反応するCD4 + T細胞の非常に高い比率を証明している。

20

【0065】

健常成人対照において、CMV溶解物、TT及びPPDの各抗原を想起するための反応を示す代表的ヒストグラムも図1に示されている。

【0066】

CD25及びCD134の共発現の動態

全血培養物におけるCD25 + CD134 + CD4 + T細胞の発現の動態は、対象2名について図2に示されている。その結果から、抗原特異的CD4 + T細胞の反応は44時間で最適に検出されることが示されている。この時点は、CFSE LPAで検出した場合(データは示していない)、CD4 + T細胞がインビトロで増殖を開始し得る時間より前である。したがって、44時間にCD25 + CD134 + と測定されたCD4 + T細胞は、元の全血試料中に存在する個数を反映しているようである。

30

【0067】

こうした実験におけるSEBに対する反応は、24時間の短時間でピークに達したが、大きさ類似の第2のピークが44時間後に認められた(図2)。したがって、マイトジェンに対する抗原特異的反応、ポリクローナル反応の両方を44時間の同一時点に測定することができる。

【0068】

全血アッセイのLPA及びCFSE標準増殖アッセイとの比較

40

CMV、TT、PPD及びHIV p24を含む各種抗原に対する想起反応が異なる対象4名について、全血アッセイを2種の増殖アッセイと比較して調べた。フローサイトメトリーの代表的ヒストグラムを図3に示すが、これは、全血アッセイがCD4 + T細胞増殖のCFSEアッセイと合致することを実証している。対照の健常成人対象3名及びHIV + 長期非進行者(Zaunders, JJ, WB Dyer, B Wang, ML Munier, M Miranda-Saksena, R Newton, J Moore, CR Mackay, DA Cooper, NK Saksena, and AD Kelleher. 2004. Identification of circulating antigen-specific CD4+ T lymphocytes with a CCR5+, cytotoxic phenotype in an HIV-1 long-term nonprogressor and in CMV infection. Blood 103:2238) 1名に対する結果が、表1に要約されている。全血アッセイの特異性は、対照の健常成人対象3名中2名が、全アッセイを通じてCMVに対する反応で陰性ある一方、

50

対照の第3の健常成人対象が全アッセイを通じて陽性であったという観察により、実証される。一般に、全血アッセイの結果が高いほど、増殖の結果も高かったが、2種の増殖アッセイ間ですら、アッセイ間に有意の変動性があるらしいことは確かであった。

【0069】

ワクシニア接種後のワクチン反応の進展

全血アッセイで検出した、ワクチン未接種対象の接種後のワクシニアに対する反応の展開を示す代表的ヒストグラムが、図4Aに示されている。異なるワクチン未接種対象3名に対するワクシニア特異的全血アッセイの経時的結果を図4Bに要約してあるが、この結果は、接種後の応答性の展開パターンがワクチン接種者全員とも類似していることを示す。図4Cは、すべての経時的全血試料にわたる、ICCアッセイ結果(他所(Zaunders J J, Dyer WB, Munier ML, Ip S, Liu J, Amyes E, Rawlinson W, De Rose R, Kent SJ, Sullivan JS, Cooper DA, Kelleher AD. 2006. CD127+CCR5+CD38+++ CD4+ Th1 effector cells are an early component of the primary immune response to vaccinia virus and precede development of interleukin-2+ memory CD4+ T cells. *J Virol.* 80(20):10151-61)で詳細に報告されている)に対するワクシニア特異的全血アッセイ結果の相関性を示す。この両アッセイ間には非常に強い相関性があり、回帰線の切片がゼロに非常に近い。しかし、全血アッセイは、8倍多くの抗原特異細胞を検出するようであった。抗原特異的CD4+T細胞のより多いこの数は、細胞免疫表現型検査により特定された推定上の抗原特異的CD4+T細胞の数(Zaunders JJ, Dyer WB, Munier ML, Ip S, Liu J, Amyes E, Rawlinson W, De Rose R, Kent SJ, Sullivan JS, Cooper DA, Kelleher AD. 2006. CD127+CCR5+CD38+++ CD4+ Th1 effector cells are an early component of the primary immune response to vaccinia virus and precede development of interleukin-2+ memory CD4+ T cells. *J Virol.* 80(20):10151-61)にはるかに近似している。これは、HIV-1一次感染及びCMV一次感染の間のICC結果が、免疫表現型検査による推定上の抗原特異的CD4+T細胞のおよそ10分の1であったという以前の知見(Zaunders, JJ, ML Munier, DE Kaufmann, S Ip, P Grey, D Smith, T Ramacciotti, D Quan, R Finlayson, J Kaldor, ES Rosenberg, BD Walker, DA Cooper, and AD Kelleher. 2005. Early proliferation of CCR5+ CD38+++ antigen-specific CD4+ Th1 effector cells during primary HIV-1 infection. *Blood* 106:1660)と合致している。

【0070】

10

20

30

【表 1】

表 1 : 全血 CD 4 + CD 2 5 + CD 1 3 4 + アッセイ、CD 4 + 増殖の C F S E アッセイ、及びリンパ増殖アッセイ (L P A) の合致

対象	抗原	CD4中の CD25+CD134+%	CD4のCFSE増殖%	LPA刺激指数
C001	0	0.0	0.7	1.0
	CMV	0.0	1.0	0.9
	TT	1.4	33.4	45.4
C002	0	0.0	1.0	1.0
	CMV	0.1	30.6	10.3
	TT	3.4	13.1	25.1
C003	0	0.0	2.6	1.0
	CMV	0.0	2.9	1.0
	TT	2.7	51.5	139
	PPD	2.6	16.3	42.7
HIV+ LTNP-001	0	0.0	4.0	1.0
	HIV p24	5.9	50	75

10

20

30

【 0 0 7 1 】

考察

該結果は、抗原特異的 CD 4 + T 細胞の全血 CD 2 5 / CD 1 3 4 アッセイが極めて低いバックグラウンドを有し、これが、この 2 種の細胞表面マーカーに対する抗体によるこの 2 種の分子の独特な同時検出により実現されることを実証している。相当な比率の循環 CD 4 + T 細胞が比較的 low レベルの CD 2 5 を発現しており、非常に low レベルの CD 1 3 4 を発現する細胞もしばしば少数存在することは、よく知られている (データは示していない) 。しかし、エキスピボで両抗原を発現する CD 4 + T 細胞は、実質上存在しない。したがって、この非常に低いバックグラウンドに対して、希少な抗原特異的 CD 4 + T 細胞を検出することが可能である。

40

【 0 0 7 2 】

該結果は、CD 2 5 + CD 1 3 4 + CD 4 + T 細胞が、このような培養物中に 2 4 ~ 4 0 時間で容易に検出できることを示している。例示したアッセイは、以前の全血 CD 6 9 アッセイのいくつかの利点を有しており、即ち (i) ヘパリンナトリウム抗凝血処理全血の少量へ抗原又はマイトジェンを単に添加することが、準備に要するすべてである、(ii) 細胞は、プールしたヒト血清の人工的状況ではなく、自家血漿中でインキュベートされる、(iii) 固定及び透過性を必要とせずに、細胞表面染色だけで済む、(iv) 試料調製の時間及びフローサイトメトリー分析の複雑度は、最小限である。しかし、CD 2 5

50

+ C D 1 3 4 + アッセイは、追加の利点、即ち (v) 抗体の組合せで C D 2 5 及び C D 1 3 4 を同時に検出することにより、対照培養物中のバックグランド染色は常に極めて低いこと、並びに (vi) 細胞表面上に C D 2 5 及び C D 1 3 4 を同時に共発現する細胞だけを計数することにより、非常に高い特異性レベルが得られることを有している。

【 0 0 7 3 】

例示したアッセイを用いて、本出願人は、ウイルス抗原（即ち、C M V 及び H I V - 1）、細菌抗原（即ち、P P D 及び T T）並びにポリクローナルマイトジェン（即ち、P H A 及び S E B）を含め、多様な範囲の抗原に反応を示す対象間の識別をすることができた。すべての事例において、その反応は、現在の「基本標準」アッセイである、³ H - チミジン、C F S E のいずれかを用いる L P A と高度な相関性を示した。別の一連の実験では、全血 C D 2 5 / C D 1 3 4 アッセイは I C C アッセイとも高度な相関性を示した。

10

【 0 0 7 4 】

反対に、全血 C D 2 5 / C D 1 3 4 アッセイは、マイトジェンの P H A 及び S E B に対する非常に広い反応を容易に検出するため、T リンパ球機能の簡潔な一般アッセイとして使用するのに適している。

【 実施例 2 】

【 0 0 7 5 】

マカークの全血 C D 2 5 / C D 1 3 4 アッセイ

材料及び方法

対象

20

この実施例ではマカーク 3 1 匹を使用した。異なる 3 群、具体的には非ワクチン接種対照群（動物 1 1 匹）、H I V - 1 G a g タンパク質を発現する構築体をワクチン接種した 1 群（動物 1 0 匹）、並びに H I V - 1 G a g、E n v 及び P o l 各タンパク質、更に他の H I V - 1 補助遺伝子を発現する構築体をワクチン接種した 1 群（動物 1 0 匹）を調査した。

【 0 0 7 6 】

構築体

H I V - 1 G a g タンパク質、並びに H I V - 1 G a g、E n v 及び P o l 各タンパク質、更に他の H I V - 1 補助遺伝子を発現する各構築体は、既に記載されている（De Rose R, Batten CJ, Smith MZ, Fernandez CS, Peut V, Thomson S, Ramshaw IA, Coupar BE, Boyle DB, Venturi V, Davenport MP, Kent SJ. 2007. Comparative efficacy of subtype AE simian-human immunodeficiency virus priming and boosting vaccines in pigtail macaques. J Virol. 81:292-300）。

30

【 0 0 7 7 】

試薬

H I V - 1 G a g 由来のペプチド 1 2 2 種の重複ペプチドプール（Zaunders, JJ, ML Munier, DE Kaufmann, S Ip, P Grey, D Smith, T Ramacciotti, D Quan, R Finlayson, J Kaldor, ES Rosenberg, BD Walker, DA Cooper, and AD Kelleher. 2005. Early proliferation of CCR5+ CD38+++ antigen-specific CD4+ Th1 effector cells during primary HIV-1 infection. Blood 106:1660）を、各ペプチドの最終濃度 2 μ g / m l で全血培養物中で使用した。

40

【 0 0 7 8 】

ヒト分子に対して特異性を有し、サル分子と交差反応する以下のマウスモノクローナル抗体：抗 C D 3 及び抗 C D 4（PharMingen社製、San Diego、C A、米国）、抗 C D 2 5（BD Biosciences社製、San Jose、C A、米国）、並びに抗 C D 1 3 4（BD Biosciences社製、San Jose、C A、米国）を使用した。

【 0 0 7 9 】

細胞内サイトカイン（I C C）アッセイ

マカークでの使用に対して最適化した、実施例 1 に記載のアッセイ同様の全血 I C C を使用して、該動物から得た新鮮末梢血試料中の I F N - 反応を分析した。

50

【 0 0 8 0 】

全血 C D 2 5 / C D 1 3 4 アッセイ

新鮮なヘパリンナトリウム抗凝血処理全血において、抗原として H I V - 1 G a g 由来の重複ペプチドのプールを用いて、実施例 1 に記載のように C D 2 5 / C D 1 3 4 アッセイを実施した。C D 3、C D 4、C D 2 5 及び C D 1 3 4 の発現について、培養済み試料を上記のモノクローナル抗体を用いて評価した。

【 0 0 8 1 】

結果及び考察

予定通りのワクチン接種を受けたマカークザル由来の C D 3 + C D 4 + T 細胞における H I V - 1 G a g に対する反応を、全血 C D 2 5 / C D 1 3 4 アッセイにより測定し、標準 I C C アッセイにより測定した I F N - 反応と比較した。図 5 に示した結果の比較から、明瞭な正の相関性が示され、したがって人間以外の対象、特に非ヒト霊長類に対する全血 C D 2 5 / C D 1 3 4 アッセイの適正が実証された。

10

【 実施例 3 】

【 0 0 8 2 】

抗原特異的 C D 8 + T 細胞を検出するための全血 C D 2 5 / C D 1 3 7 アッセイ

材料及び方法

対象

対象は、実施例 1 に記載のように募集したが、或いは抗原特異的 C D 8 + T 細胞のレベル又は C D 8 + T 細胞媒介免疫能力が注目される任意の対象を含め得る。例えば、注目し得る対象には、抗原に対してワクチン接種を受けたことがある、又は感染性病原体に曝露されたことのある対象、並びに免疫性又は疾患の進行が抗原特異的 C D 8 + T 細胞のレベルに関係している、疾患又は病状に罹っている対象が含まれる（例えば、病原体に感染した細胞又は屑の一掃に C D 8 + 細胞傷害性 T 細胞 (C T L) を必要とする疾患であって、H I V - 1、B 型及び C 型肝炎、鳥インフルエンザを含む A 型及び B 型インフルエンザ、重症急性呼吸器症候群 (S A R S) ウィルス、単純疱疹ウィルス (H S V) I 型及び II 型、エプスタイン・バーウィルス (E B V)、並びに一連の他のウィルス、更にマラリアなどの感染症を起こす非ウィルス病原体を含めた、ウィルス及び他の細胞内病原体が起こす感染症などの疾患；C D 8 + T 細胞が病原に重要な役割を演じているようである、抗レトロウイルス薬のアバカビルが誘発するような過敏性反応；更に、ウィルス病原体に対するワクチンへの反応、特に、DNA ワクチン、又は C D 8 + T 細胞反応を誘発することを意図した各種のプライムブースト系で、単独、組合せのいずれかで使用されるポックスウィルス系若しくはアデノウィルス系ワクチンが誘発する反応）。

20

30

【 0 0 8 3 】

試薬

使用し得る抗原及びマイトジェンは、実施例 1 に記載の通りである。しかし、当業者に周知の抗原又はマイトジェンの任意の個数を使用してもよい。例えば、抗原及びマイトジェンは、合成した最適化ペプチド又は重複ペプチドセット、E B V で形質転換及び不死化された感染自家 B 細胞系などのウィルス感染標的細胞、注目する M H C - 1 分子によるトランスフェクション、ペプチドセットのパルス、注目する抗原を発現するワクシニア構築体などのウィルスによる感染のいずれかを受けた細胞系を含み得る。この実験で使用した抗原及びマイトジェンは、P H A、H I V - 1 G a g、並びに C M V、E B V 及びインフルエンザウィルス由来の最適化した抗原性ペプチドのプールであった。

40

【 0 0 8 4 】

モノクローナル抗体は、実施例 1 及び実施例 2 に記載のように使用した。しかし、抗 C D 1 3 4 抗体の代わりに抗 C D 1 3 7 - P E (B D Biosciences 社製、San Jose、C A、米国) を使用した。

【 0 0 8 5 】

全血 C D 2 5 / C D 1 3 7 アッセイ

全血 C D 2 5 / C D 1 3 7 アッセイは、本質的に実施例 1 に記載のように実行した。培

50

養済み試料は、CD3、CD8、CD25及びCD137の発現についてモノクローナル抗体及びフローサイトメトリーを使用して評価した。

【0086】

フローサイトメトリー

全血培養物のフローサイトメトリーは、実施例1同様に、デュアルレーザーLSRIIフローサイトメーター(Becton-Dickinson社製)上でFACS Diva v4.1ソフトウェアを用いて実施した。Tリンパ球は、側方散乱光ゲートに対し先ずCD3-PerCP-Cy5.5を用いて同定し、次いでCD3+CD8-APC-Cy7+T細胞にゲート設定した。また、CD4-AlexaFluor700(Becton-Dickinson社製)による染色を用いてCD8+T細胞ゲートからCD4+T細胞を除外した。次いで、CD25-APC及びCD137-PEを結合するために、CD3+CD8+CD4-細胞を解析した。

10

【0087】

結果及び考察

健常対象又はHIV感染対象のCD3+CD8+T細胞における、PHA、HIV-1 Gag、並びにCMV、EBV及びインフルエンザウイルス由来の最適化した抗原性ペプチドのプールに対する反応を全血CD25/CD137アッセイで測定した。図6に示す結果では、健常成人対象C002は、四量体、ICC及びElispot分析(当業者に周知の技法を用いて実施、データは示していない)で示されたように、CMVに対する明確なCD8+T細胞反応を有し、全血CD25/CD137アッセイにおいて明瞭な陽性結果を生じた。反対に、HIV感染対象S009は、CMV反応を示さなかった(CMVに対するCD4+T細胞反応が該対象に欠如していたことと合致、データは示していない)が、HIV Gagペプチドには明瞭な陽性反応を有したため、抗原特異的CD8+T細胞を試験し、検出するための全血CD25/CD137アッセイが適正であることを実証した。こうした結果は、マウスの遺伝学研究においてCD8+T記憶細胞の生成及び生存にCD137が関与しているとの報告(Whitmire, JK and Ahmed, R. 2000. Costimulation in antiviral immunity: differential requirements for CD4(+) and CD8(+) T cell responses. Current Opinion in Immunology 12(4): 448-55)と合致している。

20

【0088】

したがって、本発明の方法は、抗原への曝露に反応する全血試料中のCD25及びCD137の発現を定量的又は定性的に測定することにより、抗原特異的CD8+T細胞を検出するために使用することができる。したがって、この方法は、注目する抗原に対する特異的なCD8+T細胞反応の検出に有用であり、そうした抗原は、CMV、EBV、他の疱疹ウイルス、HIV及び他のレトロウイルス(ヒトT細胞白血球ウイルス(HTLV)1型及び2型、サル免疫不全ウイルス(SIV)、HIV-SIV組換えウイルス(SHIV))、ワクシニアウイルス、天然若しくは組換えワクシニア、又は注目する抗原を発現する改変ワクシニアベクター、及び他の組換えポックスウイルス(例えば、鶏痘及びアピポックスウイルス)、インフルエンザウイルス、肝炎ウイルス特にB型及びC型、パルボウイルス、JCウイルス、並びに一連のマウスウイルスなどのウイルス抗原に由来する、重複ペプチドセット又は最適化ペプチド中に含まれている抗原などである。

30

【0089】

その上、この方法は、一般的な免疫能力の尺度として、PHA(図6に示す通り)などのマイトジェン、SEB並びに抗CD3及び抗CD28に対するより広範な反応の評価にも使用できる。

40

【実施例4】

【0090】

マウス脾臓細胞のCD25/CD134アッセイ

材料及び方法

マウスの免疫

C57BL/6マウス4匹の皮下に、フロイントの完全アジュバント(Sigma社製、St. Louis, MO、米国)中に乳化したメチル化ウシ血清アルブミン(mBSA; Sigma社製

50

、St. Louis、MO、米国) 0.4 mg を接種した。7日後に、マウスの右足蹠に m B S A 200 μ g を注射し、対照として左足蹠に P B S を注射した。24 ~ 48 時間後に、足蹠を調べ、最大腫脹を測定した。対照マウスには m B S A を接種しなかった。8日目にマウスを犠牲にした。

【0091】

細胞培養

これらのマウスの脾臓をミンチにして70 μ m 滅菌メッシュを通し、単個細胞浮遊液 (1 ~ 2 \times 10⁶ 細胞/ml) を10%ウシ胎児血清を含有するRPMI 1640中、5 μ g/mlのメチルB S A存在下又は非存在下で44時間培養した。追加の培養物中では、陽性対照としてマイトジェンのフィトヘムアグルチニン (P H A ; Sigma社製、St. Louis、MO、米国) を最終濃度5 μ g/mlで使用した。

10

【0092】

モノクローナル抗体及びフローサイトメトリー

マウス細胞表面抗原に対して特異性を有する以下のモノクローナル抗体：抗C D 3 - Pacific Blue、抗C D 4 Alexa Fluor 700、抗C D 2 5 - A P C 及び抗C D 1 3 4 - P E (PharMingen社製、San Diego、CA、米国) を使用した。

【0093】

細胞は染色し、実施例1に記載のようにL S R IIフローサイトメーターで分析した。

【0094】

結果及び考察

免疫されたマウスでは、メチルB S Aを皮内投与してから24 ~ 48時間後の足蹠腫脹によって、マウスがインビボでメチルB S Aに反応したことが確認された (Jiang等、未公表；データは示していない)。1日後に、これらのマウスを犠牲にし、脾臓を取り出した。

20

【0095】

P H Aと共にインビトロで脾臓を44時間培養した後、C D 2 5 + C D 1 3 4 +であるC D 4 + T細胞の平均比率は、全マウスに対して66%であった。メチルB S Aと共に培養した免疫マウス由来の脾臓細胞については、C D 2 5 + C D 1 3 4 +であるC D 4 + T細胞の平均比率は1.81%であった。非免疫対照マウス由来の脾臓細胞については、C D 2 5 + C D 1 3 4 +であるC D 4 + T細胞の平均比率は0.04%であった。

30

【0096】

こうした結果は、C D 2 5 / C D 1 3 4 アッセイが、マウスにおける抗原特異的C D 4 + T細胞の検出にも使用できることを実証している。

【0097】

要約すると、例示したC D 2 5 / C D 1 3 4 及びC D 2 5 / C D 1 3 7 の全血アッセイは、培養準備の簡潔性 (即ち、P B M C の調製が不要)、分析用調製の簡潔性 (細胞表面抗原だけ)、フローサイトメトリー分析の簡潔性 (臨床試験室で現在使用している圧倒的多数のフローサイトメーターで操作できる4色分析)、非常に広範囲の反応に対する適用性 (希少な抗原特異細胞からマイトジェンに対するポリクローナル反応まで) を含め、現行法に対していくつかの利点を有しており、特に小児集団において利点となる少ない血液量を利用し得る。更に、こうしたアッセイは、アッセイを現場から離れて準備できるように固定後の試料を輸送するが、専門施設で行うフローサイトメトリーにより検出することを可能にし得る。

40

【0098】

C D 2 5 / C D 1 3 4 及びC D 2 5 / C D 1 3 7 アッセイは、以下の事項を含む各種の用途に適している。

1. マイトジェン (例えばP H A) に対する反応の測定による一般的免疫不全の判定。
2. 適切な抗原調製品が利用できる、細菌、真菌、ウイルス、原虫などの病原体 (例えば、普通の微生物体及び環境微生物) に対する反応のモニタリング。
3. H I V - 1 感染による進行免疫不全の対象における、このような病原体 (例えばC

50

MV)による感染に対する反応の喪失のモニタリング。

4. ワクチン反応(例えば、ワクシニア、TT、BCG(MTB)、HIV-1、並びに麻疹、ムンプス及び風疹(MMR))のモニタリング。

5. 詳細な表現型検査をするための抗原特異的CD4+T細胞の同定(例えば、Th1対Th2などの分化マーカー、リンパ節ホーミング対腸又は皮膚ホーミングなどの転送マーカー、サイトカイン受容体、及びケモカイン受容体)。

6. 44時間培養した後の固定していない抗原特異的なCD4+T細胞又はCD8+T細胞の細胞分取(例えば、定量的な単一細胞の培養、抗原特異細胞の精製集団に関する機能アッセイ、遺伝子プロファイル作成を目的とした、各種の抗原提示細胞集団の活性化要件及び細胞活性化/増殖に対する差次的効果の評価、並びにT細胞受容体の分析を可能にする)。現在のところ、細胞分取をするための抗原特異的CD4+T細胞のフローサイトメトリーによる同定には、細胞を固定し、透過性にするICCアッセイが普通は必要であるため、インビトロでの更なる増殖が妨げられる。対照的に、本発明に従って分取される細胞は、インビトロの操作に、又はマウス、マカーク、及び恐らくはヒトにおける再注入などのインビボの操作にでさえ使用できよう。この細胞は、遺伝子プロファイル作成を目的とした、RNA種の単離にも使用できよう。

7. 粗製混合物からの潜在的抗原の簡単な選別。

8. 核抗原などの十分に特性決定済みの自己抗原、及びアレルゲン(例えば、イェグニタンパク質又は花粉タンパク質)に対する反応のモニタリング。

9. 血液量が限られている小児科及び他の状況。

10. 獣医学的に重要な動物(例えば、家畜動物、競走馬及び愛玩動物)、或いは実験動物(例えば、ヒト疾患のモデルとして、又はワクチンの開発において、若しくは免疫反応の多様な側面を分析することが特に興味深い場合、刺激法、抑制法を問わない他種の免疫療法の開発において使用するマウス又はサル)における、抗原特異的又はマイトジェン活性化CD4+T細胞又はCD8+T細胞の検出。

【0099】

本明細書を通じて、単語「comprise」又は「comprises」や「comprising」などの変形は、明言した要素、整数若しくはステップ、又は一群の要素、整数若しくはステップの包含を暗示するが、他の任意の要素、整数若しくはステップ、又は一群の要素、整数若しくはステップの除外を暗示していないことは理解されよう。

【0100】

本明細書に記載したすべての刊行物は、参照により本明細書に組み込まれる。本明細書に挙げた文書、法令、材料、装置、物品などに関するいずれの考察も、本発明に前後関係を提供するだけのためである。こうした事物のいずれか又はすべてが、従来技術の基礎の一部をなす、又は本願の各請求項の優先日以前にオーストラリア若しくは他国に存在していたような、本発明に関わる分野における一般常識であったことを認めたものと判断されてはならない。

【0101】

広義に言えば、本発明の趣旨又は範囲から逸脱せずに、具体的な実施形態に示すように夥しい変形及び/又は改変を本発明になし得ることは、当業者であれば理解されよう。したがって、本実施形態は、あらゆる点で例示的であり、限定的なものではないと見なされたい。

【図面の簡単な説明】

【0102】

【図1】対照培養(+0)中でのCD25+CD134+CD4+T細胞の染色と、SEB、CMV、破傷風トキソイド(TT)、及び結核菌由来の精製タンパク分画(PPD)に各々反応するCD25+CD134+CD4+T細胞の染色との比較を示す、代表的な対照の健常成人対象1名から得たヒストグラムである。CD25+CD134+CD4+T細胞の比率(%)が、各ヒストグラムに対して示されている。

【図2】対照の健常成人対象2名(S001及びS002)に対して、TT(S001、

10

20

30

40

50

左軸)、CMV(S002、左軸)、並びにSEB(S001及びS002、右軸)に各々反応するCD25+CD134+CD4+T細胞を4~52時間の異なるインキュベーション時間で染色した結果を示す図である。

【図3】0、CMV、TT及びPPDに対する反応における、CD25+CD134+CD4+T細胞の染色(40時間のインキュベーション後)と、増殖CD4+T細胞の7日目での染色(CFSE蛍光の減少を示すと定義される)との比較を示す、対照の健常成人対象1名(表1のC003)から得たヒストグラムである。CD25+CD134+CD4+T細胞の比率(%)が各ヒストグラムに対して示され(左図)、CFSE減少CD4+T細胞の比率(%)も示されている(右図)。

【0103】

10

[図4]ワクシニア接種に反応するCD25+CD134+CD4+T細胞の外観を示すデータである。

【図4A】対象VS001に対する、接種後の異なる日において対照(左図)、ワクシニア溶解物(右図)のいずれかに反応する全血培養物中でのCD25+CD134+CD4+T細胞の染色に関する代表的なヒストグラム。CD25+CD134+CD4+T細胞の比率(%)が、各ヒストグラムに対して示されている。

【図4B】ワクシニア溶解物接種後の対象3名に対する、該溶解物に反応するCD25+CD134+CD4+T細胞の染色結果。

【図4C】ワクシニア溶解物接種後の対象3名の該溶解物に対する反応における、IFN- γ に対する細胞内サイトカインアッセイと比較した、CD25+CD134+CD4+T細胞の染色の相関性。

20

【図5】ワクチン未接種、HIV-1群特異抗原(Gag)タンパク質を発現する構築体を用いたワクチン接種、HIV-1 Gag、外膜タンパク質(Env)及びポリメラーゼポリプロテイン(Pol)タンパク質と他のHIV-1補助遺伝子とを発現する構築体によるワクチン接種のいずれかを施したマカークサル全血のHIV-1 Gag抗原ペプチドプールに対する反応における、IFN- γ に対する細胞内サイトカインアッセイと比較した、CD25+CD134+CD4+T細胞の染色の相関性を示す図である。

【図6】対照培養(+0)中でのCD25+CD137+CD8+T細胞の染色と、PHA(+PHA); HIV-1 Gag抗原由来の重複ペプチドのプール(+HIV Gag); 並びにCMV、EBV及びインフルエンザ由来の最適化抗原ペプチドのプール(+CEF)に各々反応する、CD25+CD137+CD8+T細胞の染色との比較を示す、代表的な対照の健常成人対象(C002)及び代表的なHIV+対象(S009)から各々得たヒストグラムである。CD25+CD137+CD8+T細胞の比率(%)が、各ヒストグラムに対して示されている。

30

【0104】

(参考文献)

1. Lyons, AB, and CR Parish. 1994. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* 171:131.

2. Nomura, LE, JM Walker, and HT Maecker. 2000. Optimization of whole blood antigen-specific cytokine assays for CD4(+) T cells. *Cytometry* 40:60.

40

3. Suni, MA, HS Dunn, PL Orr, R de Laat, E Sinclair, SA Ghanekar, BM Bredt, JF Dunne, VC Maino, and HT Maecker. 2003. Performance of plate-based cytokine flow cytometry with automated data analysis. *BMC Immunol* 4:9.

4. Buckley, RH 2004. Molecular defects in human severe combined immunodeficiency and approaches to immune reconstitution. *Annu Rev Immunol* 22:625.

5. Perfetto, SP, TE Hickey, PJ Blair, VC Maino, KF Wagner, S Zhou, DL Mayers, D St Louis, CH June, and JN Siegel. 1997. Measurement of CD69 induction in the assessment of immune function in asymptomatic HIV-infected individuals. *Cytometry* 30:1.

6. Croft, M 2003. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective

50

T-cell immunity? *Nat Rev Immunol* 13:609.

7. Zaunders, JJ, WB Dyer, B Wang, ML Munier, M Miranda-Saksena, R Newton, J Moore, CR Mackay, DA Cooper, NK Saksena, and AD Kelleher. 2004. Identification of circulating antigen-specific CD4+ T lymphocytes with a CCR5+, cytotoxic phenotype in an HIV-1 long-term nonprogressor and in CMV infection. *Blood* 103:2238.

8. Zaunders, JJ, ML Munier, DE Kaufmann, S Ip, P Grey, D Smith, T Ramacciotti, D Quan, R Finlayson, J Kaldor, ES Rosenberg, BD Walker, DA Cooper, and AD Kelleher. 2005. Early proliferation of CCR5+ CD38+++ antigen-specific CD4+ Th1 effector cells during primary HIV-1 infection. *Blood* 106:1660.

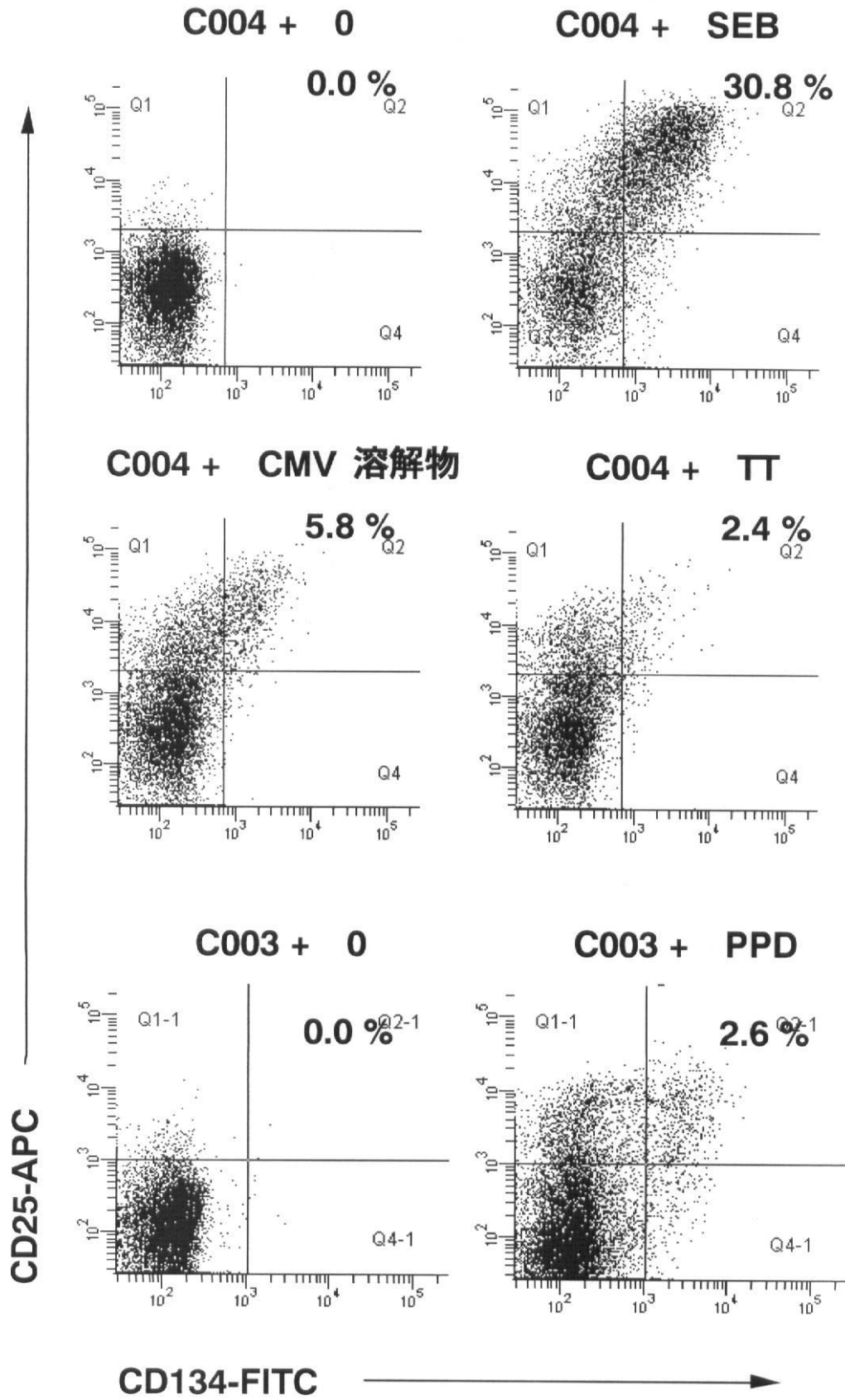
9. Lewis, RS. 2001. Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Ann Rev Immunol* 19:497-521. 10

10. Zaunders JJ, Dyer WB, Munier ML, Ip S, Liu J, Amyes E, Rawlinson W, De Rose R, Kent SJ, Sullivan JS, Cooper DA, Kelleher AD. 2006. CD127+CCR5+CD38+++ CD4+ Th1 effector cells are an early component of the primary immune response to vaccinia virus and precede development of interleukin-2+ memory CD4+ T cells. *J Virol*. 80(20):10151-61.

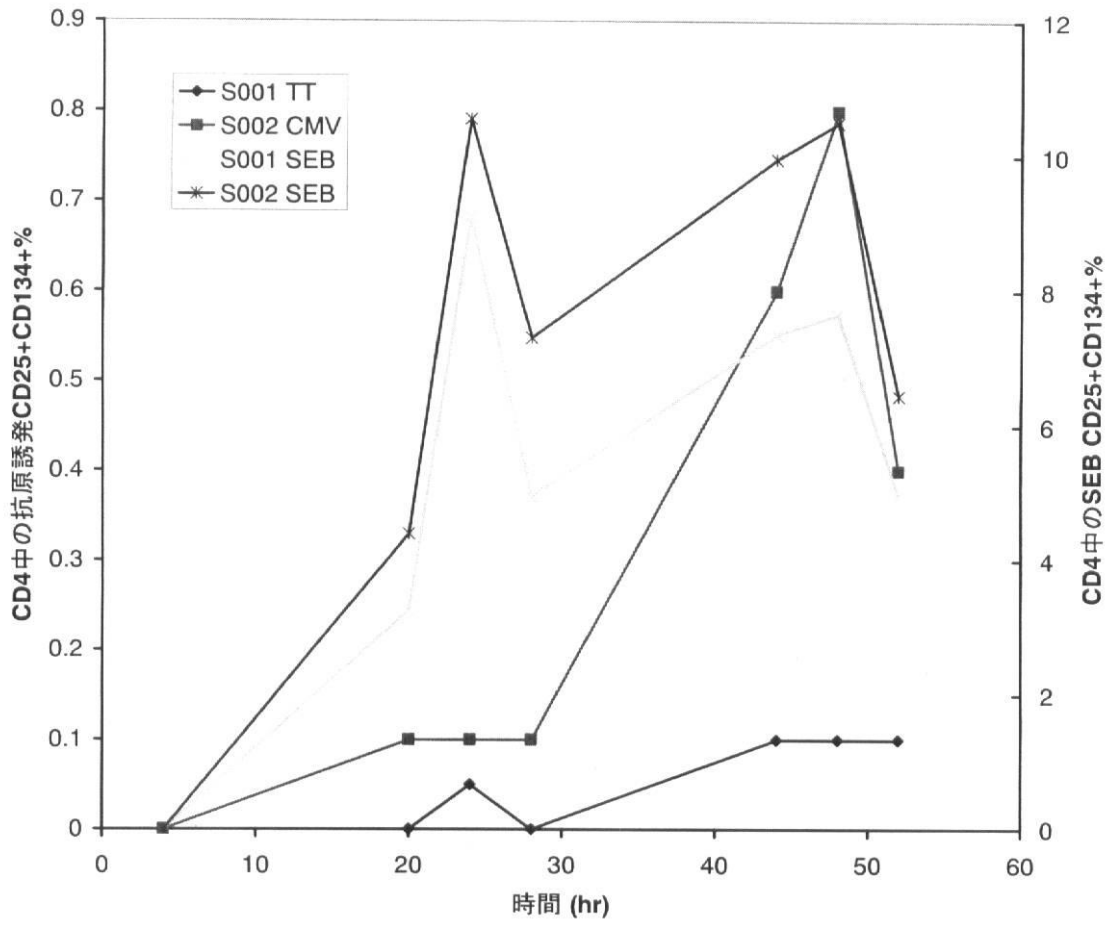
11. Whitmire, JK and Ahmed, R. 2000. Costimulation in antiviral immunity: differential requirements for CD4(+) and CD8(+) T cell responses. *Current Opinion in Immunology* 12(4): 448-55.

12. De Rose R, Batten CJ, Smith MZ, Fernandez CS, Peut V, Thomson S, Ramshaw IA, Coupar BE, Boyle DB, Venturi V, Davenport MP, Kent SJ. 2007. Comparative efficacy of subtype AE simian-human immunodeficiency virus priming and boosting vaccines in pigtail macaques. *J Virol*. 81:292-300. 20

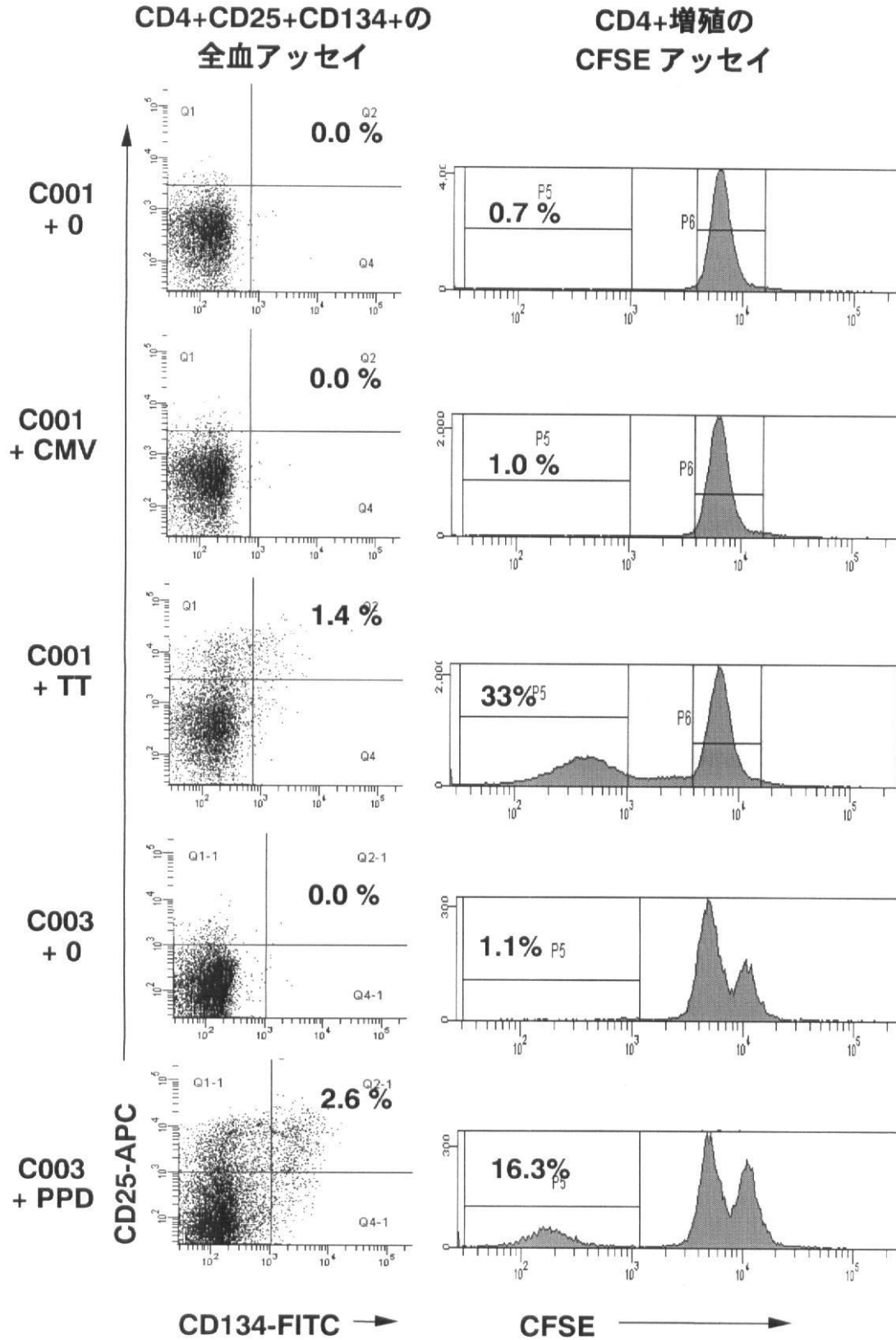
【 図 1 】



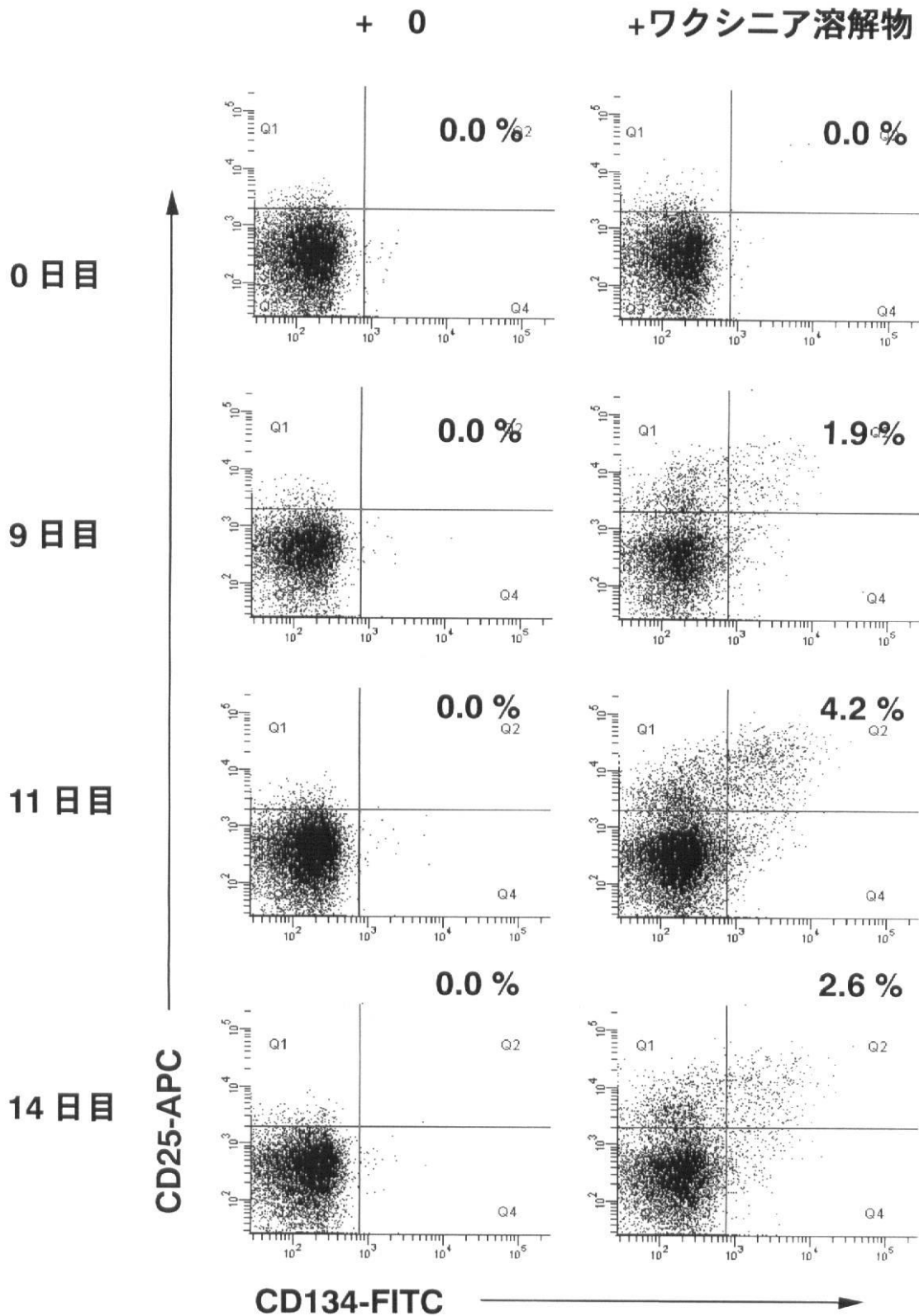
【 図 2 】



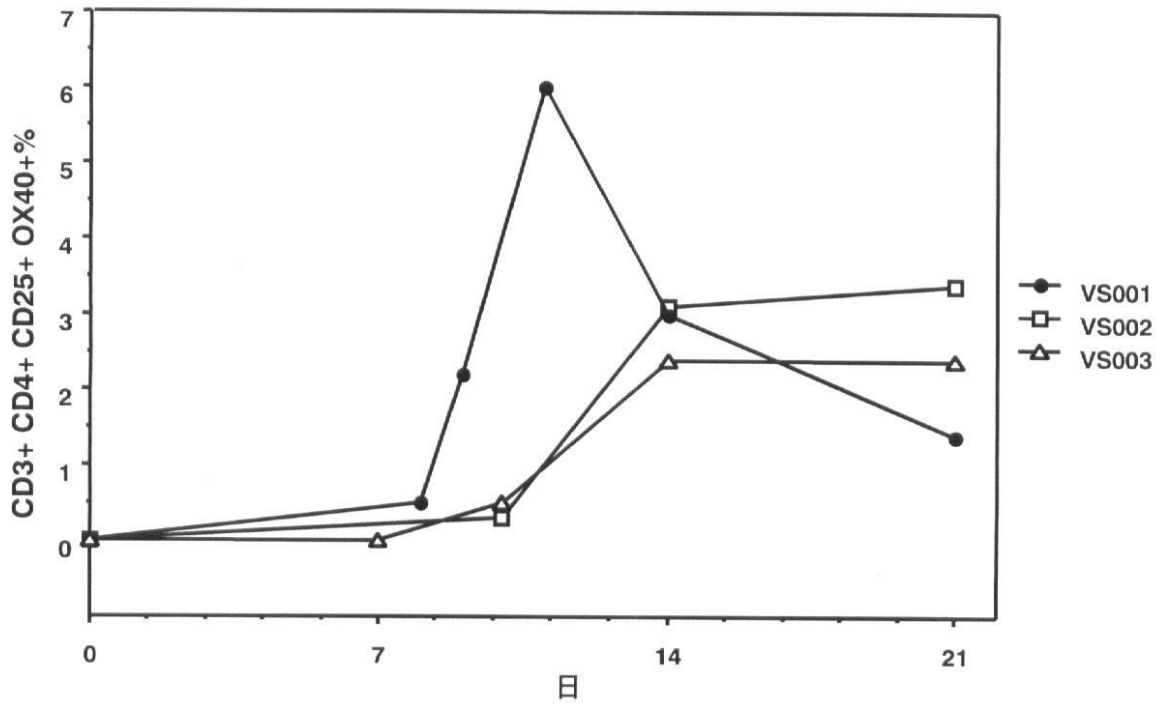
【 図 3 】



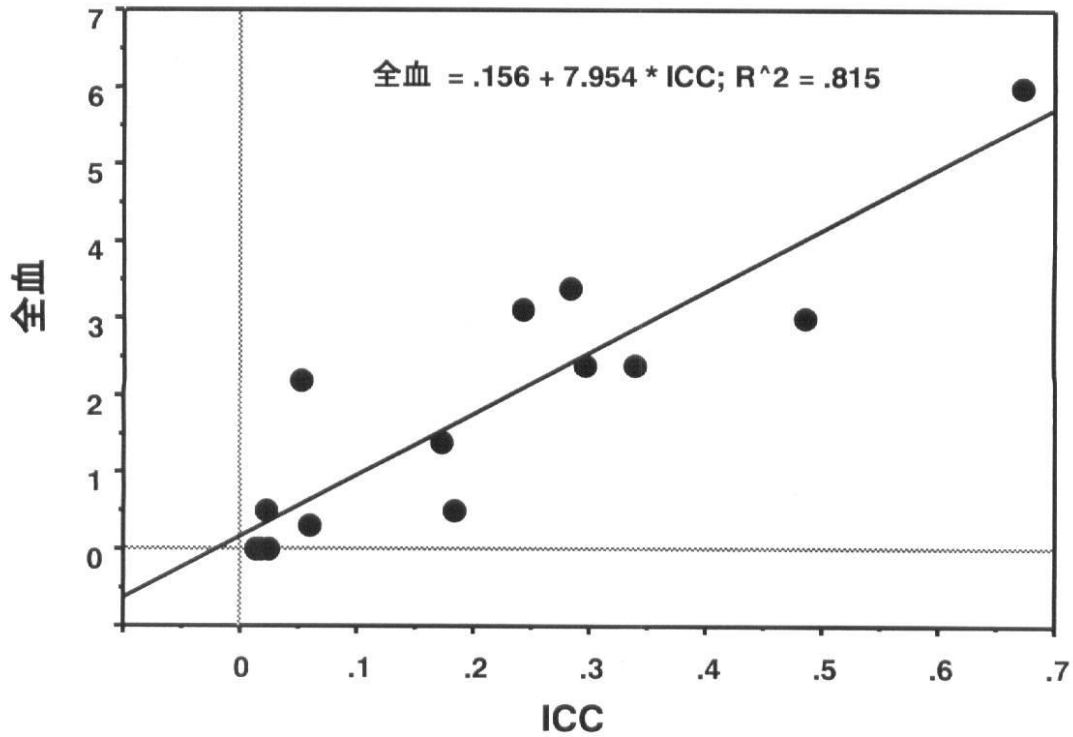
【図4A】



【 図 4 B 】

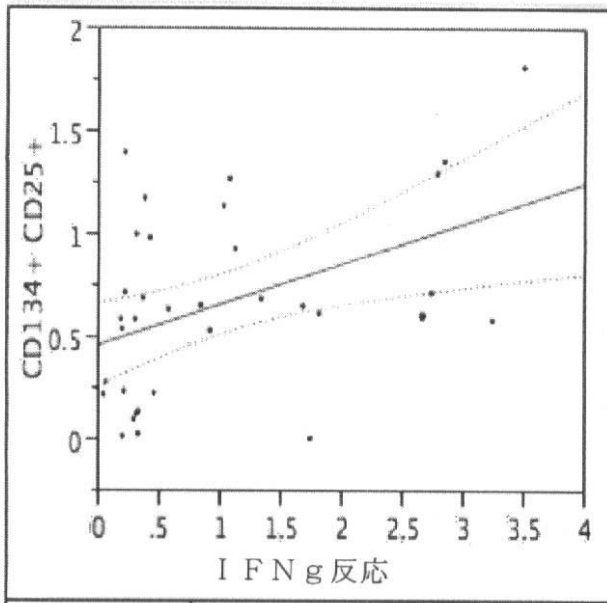


【 図 4 C 】



【図5】

IFN γ 反応によるCD134+CD25+の二変量適合



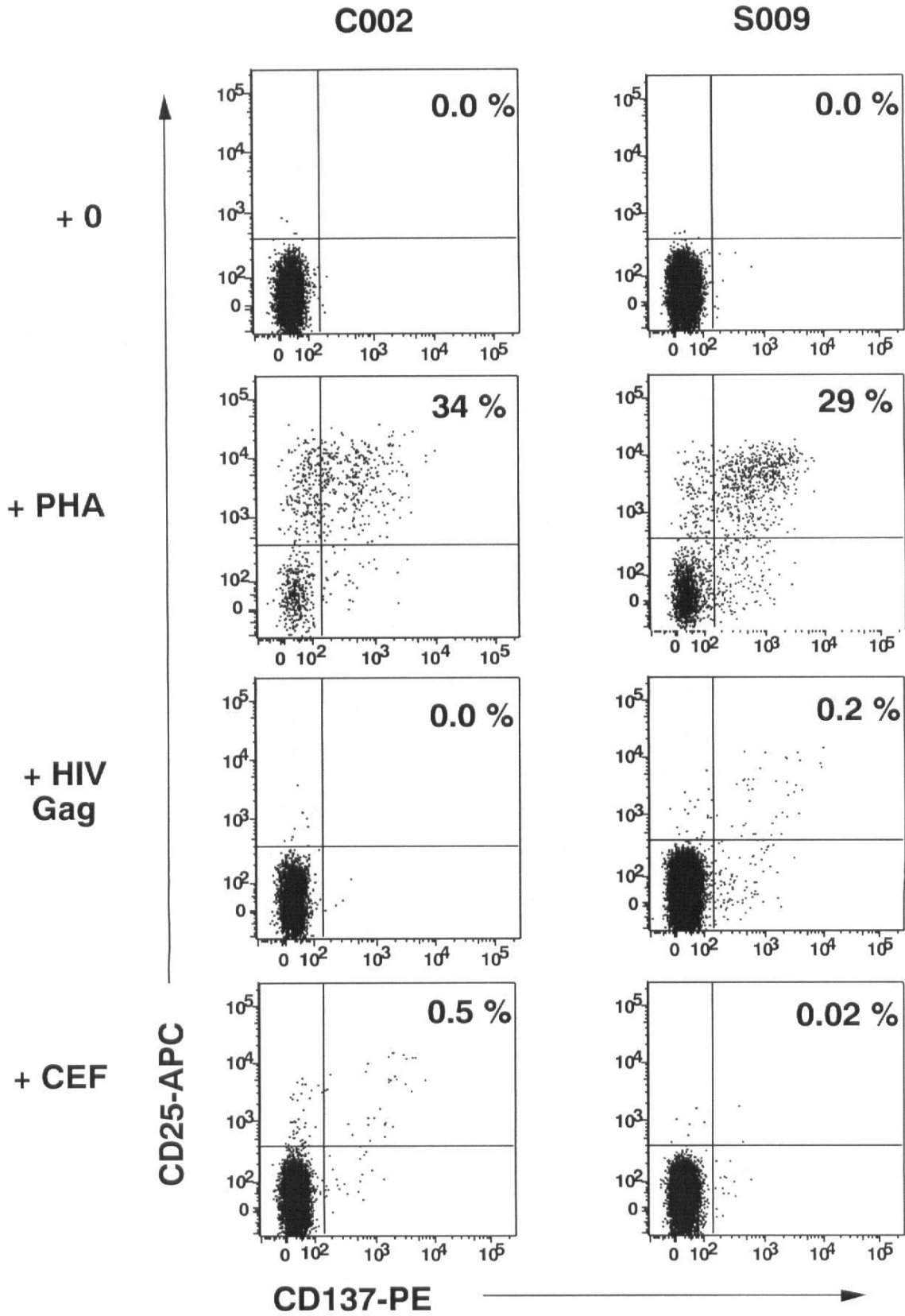
線形適合

$$CD134+CD25+ = 0.453 + 0.197 \text{ IFN}\gamma \text{ 反応}$$

$$R^2 = 0.20$$

$$P = 0.008$$

【 図 6 】



フロントページの続き

(72)発明者 ゾンダース ジョン ジェイムス
オーストラリア国 ニューサウスウェールズ 2 0 3 2 キングスフォード ショーアベニュー 4 3

審査官 福澤 洋光

(56)参考文献 British Journal of Haematology , 2 0 0 4 年 , Vol.126 , p.697-703
Arthritis and Rheumatism , 2 0 0 4 年 , Vol.50, No.9 , p.2775-2785
Journal of Immunological Methods , 2 0 0 1 年 , Vol.253 , p.95-112
Transplantation , 2 0 0 0 年 , Vol.70, No.7 , p.1038-1049
Blood , 2 0 0 5 年 , Vol.106, No.6 , p.2002-2010
Diabetes , 2 0 0 6 年 1 月 , Vol.55 , p.50-60
Transplantation Proceedings , 2 0 0 5 年 , Vol.37 , p.57-61

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N1/00-15/90

C12Q1/00-1/68

C07K1/00-19/00

CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)

JSTPlus(JDreamII)

PubMed

专利名称(译)	检测抗原特异性或丝裂原活化T细胞的方法		
公开(公告)号	JP5116756B2	公开(公告)日	2013-01-09
申请号	JP2009500664	申请日	2007-03-20
申请(专利权)人(译)	圣瓶美分医院悉尼有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	圣瓶美分医院悉尼有限公司		
[标]发明人	ケラハーアンソニー ドミニク ゾンダーズ ジョン ジェイムス		
发明人	ケラハー アンソニー ドミニク ゾンダーズ ジョン ジェイムス		
IPC分类号	C12Q1/02 G01N33/53 G01N33/543 C12N5/0783		
CPC分类号	G01N33/56972 G01N2333/70514 G01N2333/70517 G01N2333/70578 G01N2333/70596 G01N2333/715		
FI分类号	C12Q1/02 G01N33/53.Y G01N33/543.597 C12N5/00.202.L		
审查员(译)	福泽弘光		
优先权	2006901400 2006-03-20 AU		
其他公开文献	JP2009529894A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明包括在受试者中定量或定性检测抗原特异性CD4 + T细胞和/或CD8 + T细胞的方法，所述方法包括定量或定性检测细胞表面标志物CD25和一种或多种细胞表面的表达。标记CD134和CD137在来自所述受试者的合适的含淋巴细胞的样品中响应于暴露于抗原。还公开了确定受试者免疫活性的方法和分离抗原特异性CD4 +和/或CD8 + T细胞的方法。

F S Eアッセイ、及びリンパ増殖アッセイ (L P A) の合致

対象	抗原	CD4中の CD25+CD134+%	CD4のCFSE増殖%	LPA刺激指数
C001	0	0.0	0.7	1.0
	CMV	0.0	1.0	0.9
	TT	1.4	33.4	45.4
C002	0	0.0	1.0	1.0
	CMV	0.1	30.6	10.3
	TT	3.4	13.1	25.1
C003	0	0.0	2.6	1.0
	CMV	0.0	2.9	1.0
	TT	2.7	51.5	139
	PPD	2.6	16.3	42.7
HIV+ LTNP-001	0	0.0	4.0	1.0
	HIV p24	5.9	50	75