

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-147367

(P2007-147367A)

(43) 公開日 平成19年6月14日(2007.6.14)

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	P	4 B O 6 3
<b>C 1 2 Q 1/02</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/02		

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願2005-340281 (P2005-340281)	(71) 出願人	000002174 積水化学工業株式会社 大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号
(22) 出願日	平成17年11月25日(2005.11.25)	(74) 代理人	100086597 弁理士 宮▲崎▼主税
		(74) 代理人	100095382 弁理士 目次 誠
		(72) 発明者	小林 幸司 大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学工業株式会社内
		(72) 発明者	阿部 佳子 大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学工業株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サイトカイン産生能の測定方法

(57) 【要約】

【課題】測定対象のサイトカインに対する抗体が投与された被験体から採取された血液において、該血液のサイトカインの産生能力を測定することを可能とする方法を得る。

【解決手段】測定対象のサイトカインに対する抗体を投与された被験体から採取された血液と、血液細胞から上記サイトカインの産生を誘導する材料とをインキュベーションし、上記サイトカインを産生させ、次に、測定対象のサイトカインと上記サイトカインに対する抗体とからなる免疫複合体を解離させる第1の前処理工程及び解離させた上記サイトカインを分離する第2の前処理工程とを実施し、しかる後、産生されたサイトカイン量を定量する、各工程を備える、サイトカインの産生能測定方法。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

測定対象のサイトカインに対する抗体を投与された被験体から採取された血液と、血液細胞から前記サイトカインの産生を誘導する材料とをインキュベーションし、前記サイトカインを産生させる工程と、

産生された前記サイトカイン量を定量する工程とを有するサイトカイン産生能の測定方法において、

前記サイトカインの定量工程に先立ち、測定対象の前記サイトカインと該サイトカインに対する抗体とからなる免疫複合体を解離させる第 1 の前処理工程と、第 1 の前処理工程後に、解離させたサイトカインを分離する第 2 の前処理工程とをさらに備えることを特徴とするサイトカイン産生能測定方法。

10

## 【請求項 2】

前記測定対象のサイトカインが、腫瘍壊死因子 - ( T N F - ) である請求項 1 に記載のサイトカイン測定方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、血液のサイトカイン産生能を測定する方法に関し、より詳細には、測定対象とするサイトカインに対する抗体が投与された被験体から採取された血液のサイトカイン産生能力を測定する方法に関する。

20

## 【背景技術】

## 【0002】

サイトカインは、種々の細胞から分泌され、細胞の情報伝達に関わるタンパク質の総称で、免疫/生体防御、炎症/アレルギー、発生・分化(形態形成)、造血機構、内分泌系、神経系に直接的あるいは間接的に関与し、またその破綻によって、各種疾病にも深く関係している。

## 【0003】

そのため、各種疾病の病態や治療の効果を評価するために、被験者のサイトカイン産生能力を測定することが行われている。特許文献 1、特許文献 2 及び特許文献 3 には、特定の表面粗さを有する高分子材料や特定の化学構造を有する高分子材料と血液を接触させ、腫瘍壊死因子 ( T N F - )、インターロイキン 1 ( I L - 1 ) の産生を誘導する方法が開示されている。また、特許文献 4 及び特許文献 5 では血液細胞からのサイトカイン産生能力を正確に測定するためのキットが開示されている。

30

## 【0004】

最近、種々の疾病の病態と特定のサイトカインとの関係が明らかになり、これらのサイトカインをターゲットとする治療法が始まっている。例えば、関節リウマチやクローン病の治療において、腫瘍壊死因子 ( T N F - ) をターゲットとしたインフリキシマブのような抗 T N F - 抗体製剤が世界中で広く用いられつつある。

## 【特許文献 1】特許第 3 3 5 4 6 6 9 号公報

## 【特許文献 2】特許第 3 3 5 4 6 7 0 号公報

40

## 【特許文献 3】特許第 3 5 1 9 8 3 2 号公報

## 【特許文献 4】特許第 3 3 4 2 7 9 5 号公報

## 【特許文献 5】特許第 3 2 1 1 2 5 0 号公報

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0005】

本発明の目的は、上述した測定対象のサイトカインに対する抗体を投与された被験体から採取された血液のサイトカインの産生能力を測定することにある。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0006】

50

本発明は、測定対象のサイトカインに対する抗体を投与された被験体から採取された血液と、血液細胞から前記サイトカインの産生を誘導する材料とをインキュベーションし、前記サイトカインを産生させる工程と、産生された前記サイトカイン量を定量する工程とを有するサイトカイン産生能の測定方法において、前記サイトカインの定量工程に先立ち、測定対象の前記サイトカインと該サイトカインに対する抗体とからなる免疫複合体を解離させる第1の前処理工程と、第1の前処理工程後に、解離させたサイトカインを分離する第2の前処理工程とをさらに備えることを特徴とするサイトカイン産生能測定方法である。

【0007】

また、本発明のある特定の局面では、測定対象のサイトカインが腫瘍壊死因子 - ( T N F - ) である。 10

【0008】

以下、本発明の詳細を説明する。

【0009】

本願発明者らは、抗 T N F - 抗体製剤の一種であるインフリキシマブを投与された被験体から採取された血液のリポポリサッカライド ( L P S ) 刺激による T N F - 産生能を測定した際、 T N F - の産生を検出することができないことを初めて見出した。

【0010】

そこで、このような被験体から採取された血液におけるサイトカインの産生能力の測定方法を鋭意検討した結果、これは、採取された血液中のインフリキシマブが L P S 刺激により産生された T N F - と結合し、 E L I S A のような抗原抗体反応を利用した測定系において競合阻害を起こすことによることを見出した。 20

【0011】

本発明は、本願発明者により初めて見出された上記問題点を解決するためになされたものであり、インフリキシマブなどの抗 T N F - 抗体製剤を投与された被験体から採取された血液においても、 L P S 刺激による T N F - 産生能の測定を可能とする方法であり、産生された T N F - の定量工程に先立ち、インフリキシマブなどの抗 T N F - と T N F - との結合物から、 T N F - を解離させる第1の前処理工程と、解離させた T N F - を分離する第2の前処理工程とを含むことを特徴とする。

【0012】

抗 T N F - 抗体と、 T N F - との結合物から、 T N F - を解離する第1の前処理工程は、様々な方法で行うことができる。様々な方法としては、カオトロピックイオンによる処理、酸処理、高イオン強度による処理などが挙げられ、特にカオトロピックイオンによる処理は次の分離工程が容易に行えることから好適に用いられる。 30

【0013】

また、解離された T N F - を分離する第2の前処理工程についても、様々な方法により行うことができる。このような方法としては、例えば、分子量の差異を利用する方法 ( 限外ろ過、クロマトグラフィー ) が挙げられ、特に短時間で作業工程が簡単な限外ろ過膜を用いた遠心分離法が好適である。

【0014】

本発明で用いられるサイトカインの産生を誘導する材料とは、血液細胞、特に顆粒球、単球、マクロファージ、リンパ球等の白血球や血小板と反応し、これらの細胞の活性化を促し、種々の生理活性物質の産生、遊離もしくは誘導を引き起こす材料をいい、従来、前記細胞の活性化物質として知られる種々の材料が挙げられる。例えば、結核菌、コリネバクテリウム菌、溶連菌などの種々の微生物、 O K 4 3 2、合成リピド A、ピランコポリマー、精製ツベルクリン、レクチン ( フィトヘマグルチニン、コンカナバリン A、ポークウィードマイトゲン等 )、ザイモザン、リポポリサッカライド ( L P S )、スーパー抗原、 P S K ( クレスチン )、レンチナン、カルシウムイオノフォア、ホルボルエステル、免疫グロブリン固定化担体、ホルミルメチオニルロイシルフェニルアラニン ( F M L P ) などのホルミルペプチド、及び測定対象のサイトカインの産生を誘導する別のサイトカインな 40 50

どを用いることができる。特に、L P Sはサイトカインの誘導活性が高く好適である。

【0015】

本発明における血液細胞から産生されるサイトカインとは、上記材料との反応によって、血液細胞から誘導、産生される物質であり、腫瘍壊死因子 ( T N F - ) I L - 1 ~ 1 8等のインターロイキン、I N F - 、I N F - 、I N F - 等のインターフェロン、G - C S F、G M - C S F、M - C S F等のコロニー刺激因子、腫瘍壊死因子 ( T N F - )、R A N T E S等が挙げられる。

【0016】

上記、種々のサイトカインの産生を誘導する材料の必要量は、通常、用いる材料ごとにその量を変化させ、指標とする生理活性物質の誘導活性を測定して、その用量反応曲線から最適量を設定される。例えば、L P Sを生理活性物質の産生を誘導する材料として用い、指標とするサイトカインとしてT N F - 用いる場合には、血液中のエンドトキシン濃度として、0 . 6 ~ 1 0 0 0 0 0 E U / m lとするのが好ましく、より好ましくは、2 0 ~ 1 0 0 0 E U / m lである。

10

【0017】

本発明では、採血する際に血液が凝固しないように、血液抗凝固剤を添加することが望ましい。血液抗凝固剤としては、ヘパリン化合物、クエン酸化合物、シュウ酸化合物などが挙げられ、ヘパリンナトリウムなどが細胞の生物学的反応を阻害しないので好ましい。上記ヘパリンナトリウムの該容器中の収容量としては、該容器に血液が収容された時に、その血液中の濃度が低くなると血液凝固の恐れがあり、高くなると細胞に不測の活性化や不活性化を起こす恐れがあるので、4 ~ 5 0 U / m l、より好ましくは8 ~ 2 0 U / m lになるように収容する。

20

【0018】

血液と上記サイトカインの産生を誘導する材料との反応温度は、生理活性物質の産生が効率的に行われ、過度の溶血を引き起こさない温度である1 5 ~ 4 2 が好ましく、より、好ましくは、3 0 ~ 4 0 である。反応時間は、上記生理活性物質の産生が効率的に行われ、過度の溶血を引き起こさない反応時間である1 ~ 4 8時間が好ましく、より、好ましくは、2 ~ 2 4時間である。

【0019】

上記、血液細胞から産生される生理活性物質の測定試薬としては、産生された上記生理活性物質の量を定量可能な試薬であれば、特に限定されないが、例えば、定量しようとする生理活性物質に対するモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体及びペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼなどの酵素及び各々の酵素の発色基質などを利用した酵素免疫測定方法が挙げられる。

30

【0020】

以下に、本発明の血液細胞から産生されたサイトカインなどの生理活性物質の血漿中濃度の定量方法の一例を例として詳しく説明する。

【0021】

まず、血液と上記生理活性物質を誘導する材料とを上記測定容器の中で反応させ、生理活性物質を誘導し、誘導後の血液を遠心して、血球成分と血漿成分を分離させる。次いで、分離された血漿を、上記生理活性物質に対するモノクローナル抗体を固定化したマイクロプレートのウェルに、ピペティングにより添加し、3 7 で約2時間反応させる。次いで、反応後の血漿液を吸引除去等の手段で廃棄し、さらに、未反応成分を除くため、T w e e n 2 0等のノニオン系の界面活性剤を含有する中性p Hの洗浄用緩衝液で上記ウェルを洗浄する。次いで、西洋わさびペルオキシダーゼを固定化した上記生理活性物質に対するポリクローナル抗体をピペティングにより添加し、3 7 で1時間反応させる。次いで、未反応の西洋わさびペルオキシダーゼ固定化抗体を除くため、上記ウェルを上記洗浄用緩衝液で洗浄した後、過酸化水素、テトラメチルベンジジンを含む基質溶液を添加し、5 ~ 1 0分間反応させる。次いで、1 M硫酸溶液を添加し、反応を停止させて、酵素反応による基質の発色を4 5 0 n mの吸光度から測定する。この測定値と既知濃度の上記生

40

50

理活性物質を用いて作成した検量線から、上記生理活性物質の産生誘導量を測定する。

【発明の効果】

【0022】

本発明に係るサイトカイン産生能測定方法では、測定対象のサイトカインに対する抗体を投与された被験体から採取された血液と、血液細胞から上記細胞の産生を誘導する材料とをインキュベーションし、サイトカインを産生させた後、第1、第2の前処理工程が行われ、測定対象のサイトカインが、測定対象のサイトカインとサイトカインに対する上記抗体とからの免疫複合体から解離され、かつ分離されている。従って、産生されたサイトカインを確実にかつ高精度に定量することが可能となる。

【0023】

よって、本発明によれば、抗TNF- $\alpha$ の抗体製剤のようなサイトカインに対する抗体が治療目的で投与されている被験体から採取された血液においても、正確に該血液のサイトカイン産生能を測定することができ、被験者の疾病の状態や治療効果を正確に評価することが可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0024】

以下、本発明の具体的な実施例及び比較例を挙げることにより本発明を明らかにする。なお、本発明は実施例に限定されるものではない。

【0025】

(比較例1)

(1) インフリキシマブの調製

インフリキシマブ(田辺製薬:レミケード点滴静注用100、Lot.01L102A)のバイアル(100mg)に25Gの注射針を用いて、日局注射用水(大塚製薬:Lot.1C99)10mlを添加し、バイアルを回転させながら緩やかに溶解し、10mg/ml液を調製した。LPSフリーの器具と日局生理食塩液(大塚製薬:Lot.3F81)を用いて、10mg/mlインフリキシマブ液を生理食塩水で段階希釈して、インフリキシマブの希釈系列を調製した。

【0026】

(2) 採血との血液の分注

健常人の肘静脈からヘパリンナトリウムを含有するシリンジを用いて、通常の方法で血液を採取した。血液1mlあたりのヘパリンナトリウム濃度は10~15IUとした。採取した血液をエンドトキシムフリーの器具を用いて、1.9mlずつチューブに分注した。

【0027】

(3) インフリキシマブの血液への添加とプレインキュベーション

血液に分注したチューブに(2)で調製したインフリキシマブ希釈液及び生理食塩水を0.1mlずつ添加し、37℃で1時間緩やかに振とうした。

【0028】

(4) インフリキシマブ添加血液でのTNF- $\alpha$ 産生能の測定

10ngのLPSをあらかじめ添加したチューブに(3)で得たインフリキシマブ添加血液に分注し、各チューブを37℃の恒温器に入れ、緩やかに4時間振とうしてTNF- $\alpha$ 産生反応を行った。反応後、4℃、1600×gで遠心し各々チューブの血漿を150 $\mu$ lずつ凍結保存チューブに分注して、-70℃以下に保存した。凍結保存後のTNF- $\alpha$ 産生血漿を室温で融解し、血漿中のTNF- $\alpha$ 濃度をTNF- $\alpha$ 測定EIA試薬(積水化学工業株式会社製)で定量した。

【0029】

(実施例1)

Microcon YM-100(分画分子量100,000、Millipore社)を1.5mlのエピンドルフチューブにセットした。比較例1の(4)において凍結保存したTNF- $\alpha$ 産生血漿を室温で融解し、その100 $\mu$ lを上記のMicrocon

10

20

30

40

50

YM-100のカップに分注した。次に、3MKIを100 $\mu$ l混和し30分室温にて静置後、4、10、000 $\times$ gで30分遠心した。Microcon YM-3(分画分子量3,000、Millipore社)を別の1.5mlのエピペンドルフチューブにセットして、遠心後の低分子量分画液を100 $\mu$ lピペティングにて吸い取り、Microcon YM-3のカップに分注した。その後、PBS(ダルベッコのリン酸緩衝液、大日本製薬製)400 $\mu$ lを分注混和して、4、10、000 $\times$ gで30分遠心した。別の1.5mlのエピペンドルフチューブに上記遠心後のMicrocon YM-3のカップをセットして、カップ内のMicrocon YM-3高分子量分画液に480 $\mu$ lのPBSを分注混和して、もう一度4、10、000 $\times$ gで30分遠心した。遠心後のMicrocon YM-3のカップ内のMicrocon YM-3高分子量分画液を全量ピペティングにて吸い取り、PBSで希釈して最終100 $\mu$ lとした。この液中のTNF-濃度をTNF-測定EIA試薬(積水化学工業株式会社製)で測定した。測定濃度に3MKIによる希釈倍数を乗じて、インフリキシマブ添加血漿とTNF-産生血漿の混和液のTNF-濃度を求めた。

10

20

## 【0030】

上記、比較例1及び実施例1の結果を表1にまとめた。比較例1の結果から、インフリキシマブを血液に添加しない場合には、LPS刺激によって、TNF-濃度9.80ng/mlの産生が検出できた。しかし、インフリキシマブを血液に添加した場合には、TNF-産生は全く検出できず、インフリキシマブが血液中に0.001mg/ml以上存在すると、LPS刺激によるTNF-産生能の測定が不可能になることが判明した。一方、実施例1の結果から明らかのように、EIA法でTNF-を定量する前に、KIによって、インフリキシマブとTNF-の免疫複合体を解離させ、次に限外ろ過によって、インフリキシマブとTNF-を分離する処理を行うことによって、LPS刺激によるTNF-産生能の測定が可能になることが明らかになった。

## 【0031】

【表1】

インフリキシマブ濃度 (mg/ml)	TNF- $\alpha$ 濃度(ng/ml)			
	比較例 1		実施例 1	
	LPS 無刺激	LPS 刺激	LPS 無刺激	LPS 刺激
0.000	0.00	9.80	0.00	9.80
0.001	0.00	0.00	0.00	10.00
0.005	0.00	0.00	0.00	9.25
0.020	0.00	0.00	0.00	9.50
0.100	0.00	0.00	0.00	10.12
0.500	0.00	0.00	0.00	9.42

30

---

フロントページの続き

(72)発明者 栗山 澄

大阪府三島郡島本町百山2 - 1 積水化学工業株式会社内

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA05 QA18 QQ03 QQ08 QQ79 QR48 QR50 QR69 QR77  
QS12 QS24 QS33 QS36 QX01

专利名称(译)	测量细胞因子生产力的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2007147367A</a>	公开(公告)日	2007-06-14
申请号	JP2005340281	申请日	2005-11-25
[标]申请(专利权)人(译)	积水化学工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	积水化学工业株式会社		
[标]发明人	小林幸司 阿部佳子 栗山澄		
发明人	小林 幸司 阿部 佳子 栗山 澄		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/02		
FI分类号	G01N33/53.P C12Q1/02		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR50 4B063/QR69 4B063/QR77 4B063/QS12 4B063/QS24 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QX01		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种测量血液的细胞因子产生能力的方法，涉及从作为测量对象的细胞因子抗体给予的受试者收集的血液。解决方案：在这种细胞因子产生能力的测量方法中，从作为测量对象的抗细胞因子抗体的受试者收集的血液和从血细胞产生细胞因子的物质被孵育，从而产生细胞因子，然后第一个解离包含作为测量对象的细胞因子和抗细胞因子的抗体的免疫复合物的预处理步骤，并进行分离解离的细胞因子的第二个预处理步骤。该方法具有确定此后要执行的产生的细胞因子量的每个步骤。Z

インフリキシマブ濃度 (mg/ml)	TNF- $\alpha$ 濃度 (ng/ml)			
	比較例 1		実施例 1	
	LPS 無刺激	LPS 刺激	LPS 無刺激	LPS 刺激
0.000	0.00	9.80	0.00	9.80
0.001	0.00	0.00	0.00	10.00
0.005	0.00	0.00	0.00	9.25
0.020	0.00	0.00	0.00	9.50
0.100	0.00	0.00	0.00	10.12
0.500	0.00	0.00	0.00	9.42