

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4990129号  
(P4990129)

(45) 発行日 平成24年8月1日(2012.8.1)

(24) 登録日 平成24年5月11日(2012.5.11)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	P
GO 1 N 33/543	(2006.01)	GO 1 N 33/543	5 2 5 U
GO 1 N 33/569	(2006.01)	GO 1 N 33/569	L
C 1 2 Q 1/02	(2006.01)	C 1 2 Q 1/02	

請求項の数 26 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2007-509977 (P2007-509977)	(73) 特許権者	506365142
(86) (22) 出願日	平成17年4月29日 (2005.4.29)		マブテック アーバー
(65) 公表番号	特表2007-535668 (P2007-535668A)		スウェーデン王国 ネッカ ストランド
(43) 公表日	平成19年12月6日 (2007.12.6)		オーガスティンダルスバーゲン 19
(86) 国際出願番号	PCT/EP2005/004620	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開番号	W02005/106479		弁理士 清水 初志
(87) 国際公開日	平成17年11月10日 (2005.11.10)	(74) 代理人	100128048
審査請求日	平成20年4月21日 (2008.4.21)		弁理士 新見 浩一
(31) 優先権主張番号	0409775.4	(72) 発明者	ブレエッシュ-アンデルセン ステン
(32) 優先日	平成16年4月30日 (2004.4.30)		スウェーデン王国 ネッカ ストランド
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(72) 発明者	ポーリー スタファン
			スウェーデン王国 ネッカ ストランド
			オーガスティンダルスバーゲン 19

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 非ELISpotアッセイ法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サンプルにおける細胞による検体の産生を検出する方法であって、以下の段階を含む方法：

(i) 検体に結合することが可能な抗体、ならびに検体の分泌を高めることによりまたは刺激シグナルが検体の自然な分泌を抑制するのを阻害することにより検体の検出を高めることが可能な第一薬剤を提供する段階であって、該抗体および該第一薬剤が同じ支持体上に固定され、該抗体および該第一薬剤が固定化される表面はPVDfまたはニトロセルロース膜であり、該支持体は該抗体および該第一薬剤によって均一にコーティングされている段階；

(ii) 該抗体および該薬剤を細胞のサンプルに接触させる段階；ならびに

(iii) 該検体の該抗体への結合を検出し、それによってサンプルにおける細胞による検体の産生を検出する段階。

【請求項 2】

二つまたはそれ以上の抗体が、支持体上に固定される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

第一薬剤が検体の分泌を高めることが可能である、請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4】

細胞が、検体の分泌を刺激するまたは阻害することが可能な第二薬剤に接触させられている、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 5】

段階(ii)が、細胞のサンプルを、検体の分泌を刺激するまたは阻害することが可能な第二薬剤に接触させることをさらに含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 6】

第二薬剤が支持体上に固定される、請求項 5 記載の方法。

## 【請求項 7】

第一薬剤が、第二薬剤に反応した検体の分泌を増強することが可能である、請求項 4 ~ 6 のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 8】

第一薬剤が、検体の分泌を高めるために抑制シグナルを阻害することが可能である、請求項 3 または 7 記載の方法。

10

## 【請求項 9】

第一薬剤が、検体の自然な分泌を低減するために刺激シグナルを阻害することが可能である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 10】

検体の検出を高めることが可能なさらなる薬剤が、支持体上に固定される、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 11】

細胞がT細胞である、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 12】

検体がサイトカインである、請求項 11 記載の方法。

20

## 【請求項 13】

第一薬剤が以下のものである、請求項 11 または 12 記載の方法：

- (a) ポリクローナルT細胞活性化因子；
- (b) 共刺激剤に対する抗体または組換えリガンド；
- (c) サイトカイン；
- (d) IL-10またはTGF- $\beta$  である免疫刺激性シグナルを阻害することが可能である薬剤；
- (e) 細胞外マトリクスタンパク質；または
- (f) ウイルス活性化因子。

## 【請求項 14】

(a) ポリクローナルT細胞活性化因子が、CD3抗体またはPHAもしくはConAなどのレクチンである；

(b) 共刺激剤が、CD28、ICOS、もしくはCD40である；

(c) サイトカインが、IL-2、IL-15、IL-4、もしくはIL-12である；

(d) 細胞外マトリクスタンパク質がフィブロネクチンもしくはラミニンである；または

(e) ウイルス活性化因子が、T細胞においてウイルス複製を活性化するCD3抗体もしくはPHAである、

請求項 13 記載の方法。

30

## 【請求項 15】

細胞がウイルス感染細胞である、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項記載の方法。

40

## 【請求項 16】

検体がウイルス粒子またはタンパク質である、請求項 15 記載の方法。

## 【請求項 17】

ウイルスがHIV、EBV、またはCMVである、請求項 15 または 16 記載の方法。

## 【請求項 18】

検体を分泌する細胞の数を決定することをさらに含む、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 19】

検体に対して特異的な抗体、ならびに検体の分泌を高めることによりまたは刺激シグナルが検体の自然な分泌を抑制するのを阻害することにより検体を分泌する細胞の検出を高

50

めることが可能な第一薬剤を含み、該抗体および該第一薬剤が、P V D Fまたはニトロセルロース膜である同じ表面上に均一に固定される、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか一項記載の方法における使用のためのアッセイプレート。

【請求項 2 0】

第一薬剤が、

( i ) 検体の分泌を高めることが可能であるか、

( i i ) 第二薬剤に反応した検体の分泌を増強することが可能であるか、

( i i i ) 検体の分泌を高めるために抑制シグナルを阻害することが可能であるか、または

( i v ) 検体の自然な分泌を低減するために刺激シグナルを阻害することが可能である

10

請求項 1 9 記載のアッセイプレート。

【請求項 2 1】

第一薬剤が、

(a) ポリクローナルT細胞活性化因子；

(b) 共刺激剤に対する抗体または組換えリガンド；

(c) サイトカイン；

(d) IL-10またはTGF- $\beta$  である免疫刺激性シグナルを阻害することが可能である薬剤；

(e) 細胞外マトリクスタンパク質；または

(f) ウイルス活性化因子

20

である、請求項 1 9 記載のアッセイプレート。

【請求項 2 2】

(a) ポリクローナルT細胞活性化因子が、CD3抗体またはPHAもしくはConAなどのレクチンである；

(b) 共刺激剤が、CD28、ICOS、もしくはCD40である；

(c) サイトカインが、IL-2、IL-15、IL-4、もしくはIL-12である；

(d) 細胞外マトリクスタンパク質がフィブロネクチンもしくはラミニンである；または

(e) ウイルス活性化因子が、T細胞においてウイルス複製を活性化するCD3抗体もしくはPHAである、

30

請求項 2 1 記載のアッセイプレート。

【請求項 2 3】

表面上に固定される、検体の分泌を刺激するまたは阻害することが可能な第二薬剤をさらに含む、請求項 1 9 ~ 2 2 のいずれか一項記載のアッセイプレート。

【請求項 2 4】

一つまたは複数のウェルを含み、各々のウェルが、50 ~ 100ngのタンパク質結合能力を有する、請求項 1 9 ~ 2 3 のいずれか一項記載のアッセイプレート。

【請求項 2 5】

請求項 2 1 ~ 2 4 のいずれか一項記載のアッセイプレートおよび検出手段を含む、キット。

【請求項 2 6】

40

免疫反応をモニターするため、インビトロでウイルス感染を検出するため、または抗ウイルス薬を同定するための、請求項 1 9 ~ 2 4 のいずれか一項記載のアッセイプレートまたは請求項 2 5 記載のキットの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

発明の分野

本発明は、細胞のサンプルによる検体の産生を検出するための方法、その方法における使用のためのアッセイプレート、およびアッセイプレートを含むキットに関する。

【背景技術】

50

## 【 0 0 0 2 】

発明の背景

酵素免疫スポットアッセイ法(enzyme-linked immunospot assay)(ELISpot)は、T細胞特異的反応の検出に対して広く使用される。ELISpotアッセイ法において、特異的サイトカインを分泌するT細胞は、そのサイトカインに対して特異的な抗体が固定されたELISpotアッセイプレートにおいてT細胞をインキュベートすることによって検出される。次いで、抗体に結合したサイトカインが、標準的な免疫学的試験法を使用して可視化され得る。サイトカイン産生が生じた、アッセイプレートの領域に局在する結合サイトカインのスポットは、活性化T細胞の存在を示す。各々のスポットは、単一の細胞によるサイトカイン産生を意味するので、アッセイプレートに存在する細胞の数が公知である場合、反応細胞の頻度が、形成されたスポットの数を数えることによって確定され得る。

10

## 【 0 0 0 3 】

ELISpotアッセイ法は、ウイルス感染細胞の検出、特異的抗体を分泌する細胞の列挙、フィブロネクチンを分泌する細胞の検出、および単球の研究などの、その他の目的に対しても使用されている。

## 【 0 0 0 4 】

ELISpotアッセイ法における陽性細胞の検出を高めるための可溶性共同因子の使用が記載されている。固定化共同因子は、T細胞を刺激するために使用されており、かつ培養培地におけるサイトカインの存在は、ELISAに基づく分析によって続いて検出されている。

## 【発明の開示】

20

## 【 0 0 0 5 】

発明の概要

本発明は、検体を分泌する細胞の検出が生物活性分子の使用によって高められる、改善されたELISpotアッセイ法を提供する。本発明のアッセイ法は、検体に対する特異的結合薬剤が生物活性分子と同じ表面上に固定される、アッセイプレートを利用する。生物活性分子は、特異的刺激に反応した検体の分泌を増強する役目をする。したがって、生物活性分子は、検体を分泌する細胞の検出を高める役目をする。この増強効果は、サンプルにおけるすべての潜在的反応細胞のより効果的な刺激に起因する、より多数の特異的スポットとして明示され得る。または、増強効果は、アッセイ法の経過の間の個々の細胞による検体のより高い産生に起因する、より明確なスポットにおいて明示され得る。例えば、細胞は、検体の産生がより早期の時間ポイントにおいて開始されるように、より効果的に刺激され得る。本発明のアッセイ法は、調査手段としても診断的手段としても有用である。

30

## 【 0 0 0 6 】

従って、本発明は以下を提供する：

-サンプルにおける細胞による検体の産生を検出する方法であって、以下の段階を含む方法：

(i) 検体に結合することが可能な抗体および検体の検出を高めることが可能な第一薬剤を提供する段階であって、前記抗体および第一薬剤が、同じ支持体上に固定される段階；

(ii) 前記抗体および前記薬剤を細胞のサンプルに接触させる段階；ならびに

(iii) 検体の前記抗体への結合を検出し、それによってサンプルにおける細胞による検体の産生を検出する段階。

40

-検体に対して特異的な抗体および検体を分泌する細胞の検出を高めることが可能な第一薬剤を含み、前記抗体および第一薬剤が、同じ表面上に固定される、本発明の方法における使用のためのアッセイプレート；

-本発明のアッセイプレートおよび検出手法を含むキット；ならびに

-インビトロでウイルス感染を診断するまたは抗ウイルス薬を同定するために、免疫反応をモニターするための、本発明のアッセイプレートまたはキットの使用。

## 【 0 0 0 7 】

発明の詳細な説明

本発明は、サンプルにおける細胞による検体の産生を検出するインビトロを提供し、そ

50

の方法は以下の段階を含む：

- (i) 検体に結合することが可能な抗体および検体の検出を高めることが可能な第一薬剤を提供する段階であって、前記抗体および第一薬剤が、同じ支持体上に固定される段階；
- (ii) 前記抗体および薬剤を細胞のサンプルに接触させる段階；ならびに
- (iii) 検体の前記抗体への結合を検出し、それによってサンプルにおける細胞による検体の産生を検出する段階。

【0008】

本発明の方法は、陽性細胞の検出を高めることが可能な薬剤が、検出のために使用される抗体と同じ支持体上に固定される、事実上ELISpotアッセイ法である。ELISpotアッセイ法における細胞の検出を高めるための薬剤の使用は、これまでに記載されている。しかしながらこれまで、そのような薬剤は、検出のために使用される抗体と同じウェルに固定されておらず、可溶性形式でアッセイ法に添加されている。

10

【0009】

同じ支持体上の検出を高めることが可能な薬剤および抗体の両方を提供することによって、要求される添加の数が低減されるので、アッセイ法はより簡単になる。これは、アッセイ法が、簡単さおよび安全性が必須である、例えば診断的応用において、大規模スクリーニングに対して使用される場合、特に重要である。

【0010】

加えて、薬剤は、固定化形式で施行される場合、より効果的であり得る。例えば、T細胞上の受容体は、それらのシグナルを伝達することができるように、架橋していることにしばしば依存しており、そのような架橋は、刺激薬剤が固定されている場合に、より効果的に達成され得る。本発明の特定の態様において、検出を高めることが可能な薬剤が、検体の自然な分泌を刺激する分子に対する抗体である場合、その抗体は、抗体が溶液中に添加された場合に要求されると考えられる「中和する」能力を有する必要はない。

20

【0011】

本発明のアッセイ法において、検出を高めることが可能な固定化薬剤の存在は、ELISpotアッセイ法において標準的に観察される不完全活性化プロセスを代償する役目をする。この代償の結果として、スポットの増加した数は、本発明のアッセイ法において達成され得、故に、検体を刺激することが可能な薬剤に反応する能力を有する細胞の頻度のより正確な推定がなされ得る。

30

【0012】

細胞

一つの好ましい態様において、細胞はT細胞である。T細胞は、概して、血液サンプルにおいて被験体から採取されるが、T細胞を含むサンプルのその他の型が使用されてもよい。サンプルは、アッセイ法に直接的に添加され得る、または処理され得る。典型的には、処理は、血液からの細胞の単離および細胞培養培地または緩衝液におけるこれらの懸濁を含み得る。細胞懸濁は、試験状況に応じて、細胞の異なる濃度を含むように希釈され得る。サンプルにおける細胞の濃度は、血液中の濃度よりも高い可能性がある。

【0013】

好ましくは、アッセイ法において使用されるT細胞は、未処理または希釈サンプルの形式である。T細胞は、新鮮に単離され得(例えば、新鮮に単離される単核細胞(MC)または末梢血単核細胞(PBMC))、エキスビボで直接的に使用される、すなわち方法において使用される前に培養されない。または、T細胞は、アッセイ法における使用に先行して、インビトロで培養されていてもよい。

40

【0014】

96ウェルプレート形式アッセイ法において、概して、約 $2.5 \times 10^4$  ~ 約 $3 \times 10^5$ 細胞が、各々のウェルに添加される。特異的応答を分析するための典型的な96ウェルプレート形式アッセイ法において、約 $10^5$  ~ 約 $3 \times 10^5$ 細胞が各々のウェルに添加され得る。96ウェルプレート形式における約 $3 \times 10^5$ 細胞を超える細胞数は、次により拡散したスポットを生じ得る、多細胞層を生じ得る。より多くの細胞を調べることが望まれる場合、ウェルの数が増や

50

されるべきである、またはより大きいウェルを有するプレートが使用されるべきである。PBMCの特異的的刺激に対して、最適な細胞濃度は、約 $2 \times 10^5$  ~ 約 $3 \times 10^5$ 細胞である。例えばPHAまたは抗CD3を伴うポリクローナル刺激に対して、細胞数は、例えば約 $2.5 \times 10^4$  ~ 約 $5 \times 10^4$ 細胞/ウェルなど、かなり低い必要があり、そうでなければ、多すぎる細胞による産生が、個々に産生する細胞を見ることを不可能にすると思われるからである。豊富な陽性細胞(例えば、単離T細胞クローン)を使用する場合、より低い細胞数も好ましい。

#### 【0015】

第二の態様において、細胞は、ウイルス感染細胞であり得る。細胞は、血液細胞、例えば、リンパ球、単球、または顆粒球であり得る。その他の適した細胞は、尿、唾液、精液、または腔分泌物から単離され得る。その他の細胞の型は、ウイルスの親和性に応じて、スクリーニングもされてもよい。本発明の方法によって検出され得るウイルス感染細胞は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、エプスタイン・バー・ウイルス(EBV)、およびサイトメガロ・ウイルス(CMV)に感染された細胞を含む。

10

#### 【0016】

本発明のその他の態様において、細胞は、例えば、血液細胞などの寄生虫感染細胞、バクテリア感染細胞、インシュリン産生島細胞、樹枝状細胞、癌細胞、または神経幹細胞であり得る。

#### 【0017】

##### 検体

検体は、典型的には免疫反応性物質であり、典型的にはタンパク質である。細胞がT細胞である態様において、検体は、典型的には一つまたは複数のサイトカインである。サイトカインは、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12、もしくはIL-13などのインターロイキン、IFN- $\gamma$ 、もしくはIFN- $\beta$ などのインターフェロン、TNF- $\alpha$ などのその他のサイトカイン、パーフォリン、またはグランザイムから選択され得る。好ましくは、サイトカインはIFN- $\gamma$  またはIL-4である。典型的には、一つまたは複数のサイトカインは、T細胞が抗原またはアレルゲンなどの刺激物質に接触させられる際に、放出される。本発明の方法は、1つ、2つ、3つ、またはそれ以上の検体を、同時にまたは連続的に検出し得る。同時検出に対するサイトカインの好ましい組み合わせは、IFN- $\gamma$  とIL-2、IL-4、IL-5、およびIL-10の任意の一つを含む。

20

#### 【0018】

細胞がウイルス感染細胞である態様において、検体は、典型的にはウイルス粒子またはウイルスタンパク質である。検出され得るウイルス粒子およびタンパク質の例は、エプスタイン・バー・ウイルスならびにヒト免疫不全ウイルスI型およびII型(HIV)を含む。

30

#### 【0019】

細胞が癌細胞である場合、検体は、典型的には成長因子または成長調節タンパク質である。細胞が、寄生虫感染血液細胞などの寄生虫感染細胞である場合、検体は、典型的には寄生虫由来タンパク質である。

#### 【0020】

##### 抗体

抗体は、検体に結合すること、好ましくは特異的に結合することが可能である。抗体は、検体に特異的に結合することが可能な任意の特異的結合薬剤によって置き換えられ得る。薬剤または抗体は、特異的な物質に対して選択的または高親和性を有して結合する場合に、物質に「特異的に結合する」が、その他の物質には結合しない、実質的には結合しない、または低親和性のみを有して結合する。抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであり得る。本発明の方法における使用に対しては、モノクローナル抗体が好ましい。

40

#### 【0021】

抗体は、モノクローナルまたはポリクローナル抗体であり得る。モノクローナル抗体が好ましい。抗体は、親和性リガンドまたは抗体フラグメントであってもよく、または含んでもよく、フラグメントは検体に結合することが可能である。そのような抗体フラグメントは、一本鎖抗体と同様に、Fv、F(ab') $_2$ およびF(ab') $_2$ フラグメントを含む。

50

## 【0022】

本発明の方法は、一つまたは複数、例えば、二つ、三つ、または四つの抗体を利用し得、各々の抗体は、異なる検体に特異的に結合する。

## 【0023】

一つの態様において、本発明は、刺激薬剤に反応してサイトカインを分泌するT細胞を検出する方法を提供する。この態様において、本発明の方法における使用に適した抗体は、典型的には、一つまたは複数のサイトカイン、例えば、二つ、三つ、または四つのサイトカインだが好ましくは一つのサイトカインに特異的に結合する。好ましくは、抗体は、IFN- またはIL-4に特異的に結合する。サイトカインに対する抗体は、市販されている、または標準的な技術を使用して作成され得る。市販されている抗体は、Mabtech AB、ストックホルム、スウェーデンが提供している、以下のモノクローナル抗体を含む：IL-2に対してIL2-IおよびIL2-II、IL-4に対して82.4および12.1またはIL4-IおよびIL4-II、IL-5に対してTRFK5および5A10、IL-13に対してIL13-IおよびIL13-2、IFN- に対して1-D1Kおよび7-B6-1、IL-6に対して13A5および39C3、IL-10に対して9D7および12G8、IL-12に対してIL-12-I、IL-12-II、およびIL-12-III、TNF- に対してTNF -IおよびTNF -II、パーフォリンに対してpf-344、ならびにIFN に対してIFN -IおよびIFN -II。

10

## 【0024】

第二の態様において、本発明は、ウイルス感染細胞を検出する方法を提供する。この態様において、抗体は、典型的にはウイルス粒子またはウイルスタンパク質に結合する。好ましくは、抗体は、感染細胞によって分泌されるウイルスエンベロープまたはウイルスタンパク質に特異的に結合する。

20

## 【0025】

細胞の検出を高めることが可能な薬剤

検体を分泌する細胞の検出を高めることが可能な薬剤は、検体の分泌を高める物質であり得る。そのような薬剤は、陽性対照として有用である。それ故に、本発明のそのような方法は、検出を高める薬剤が使用されない方法と同時に実施され得る。この局面において、マイクロタイタープレートにおける一つまたは複数だがすべてではないウェルは、検体に対して特異的な抗体に加えて、検出を高めることが可能な薬剤を含み得る。本発明のこの態様において、細胞の検出を高めることが可能な薬剤は、CD3に対する抗体または植物性赤血球凝集素(PHA)もしくはコンバナバリン(concanavalin)A(ConA)などのレクチンなどのポリクローナル活性化因子であり得る。これらの活性化因子は、活性化T細胞の検出を高めることにおいて有用であり得る。

30

## 【0026】

検体を分泌する細胞の検出を高めることが可能な薬剤は、検体の分泌を刺激する薬剤に反応した検体の特異的分泌を増強するように作用し得る。それ故に、検出を高めることが可能な薬剤は、検体の分泌に対する共刺激シグナルを提供する。

## 【0027】

活性化T細胞を検出することに対する態様において、薬剤は、CD28、誘導性共刺激(ICOS)分子、またはCD40などの共刺激分子に対する抗体または組換えリガンドであり得る。免疫反応に対して重要な抗原提示および細胞間接触のプロセスは、ELISpotアッセイ法において提供される正常なインビトロ条件下において、最適に満たされない。ELISpotプレートにおける共刺激シグナルの提供は、細胞間接触において正常に提供されるシグナルの代わりになり、したがって、特異的な様式で反応細胞の数を高める。表2に示される結果は、固定化抗CD28抗体の使用が、精製ツベルクリンタンパク質(PPD)および破傷風毒素(TT)という抗原に対するT細胞の特異的反応を有意に高めることを明示する。

40

## 【0028】

刺激薬剤に反応した検体の分泌を増強する薬剤の別の例は、IL-2およびIL-15などの成長因子である。これらの成長因子は、特異的免疫反応を増強するように作用し、活性化のためのさらなるシグナルを反応T細胞に提供する。刺激シグナルを増強するために適した薬剤のその他の例は、IL-4産生細胞の刺激をさらに増強するIL-4、およびインターフェロ

50

ン- (IFN- )などのTh-1サイトカインの産生を促進するために使用され得るIL-12である。

【0029】

検体を分泌する細胞の検出を高めることが可能な薬剤は、検体の分泌を阻害するシグナルを阻害することによって作用し得る。例えば、T細胞の検出に対する態様において、薬剤は、IL-10またはTGF- などの一般的免疫抑制性分子に対する抗体であり得る。一般的免疫抑制性分子に対する抗体は、免疫抑制性分子をウェル表面に「吸着」し、それによって免疫抑制性分子を潜在的反応T細胞に、より接近しにくいものにすると思われる。

【0030】

別の代替物において、検体を分泌する細胞の検出を高めることが可能な薬剤は、検体の自然な分泌を抑制するために、刺激シグナルを阻害するように作用し得る。これは、シグナル対ノイズ比を改善することによって、特異的反応がより簡単に明らかにされるのに役立つ。例えば、グランザイムBおよびIFN- は、両方ともT細胞と同様にナチュラルキラー(NK)細胞によって産生される。薬剤は、T細胞からのグランザイムBまたはIFN- の検出を助けるために、NK細胞からのグランザイムBまたはIFN- の自然な産生を抑制し得る。このような方式で作用する適した薬剤は、刺激シグナルとして作用する分子に対する特異的な抗体を含む。

【0031】

フィブロネクチンおよびラミニンなどの細胞外マトリクスタンパク質は、刺激シグナルに反応した物質の分泌を増強することによって、検体の検出を高めることが可能な薬剤のさらなる例である。細胞外マトリクスタンパク質は、免疫細胞とケモカインなどのマトリクス依存性細胞モジュレーターとの適切な相互作用に対して必須である。それ故に、細胞外マトリクスタンパク質の包含は、刺激に対する最適な条件を提供するために要求され得る。

【0032】

本発明の方法において、検出を高めることが可能な1つ、2つ、3つ、またはそれ以上、例えば、4つまたは5つの薬剤が、支持体に結合し得る。2つまたはそれ以上のそのような薬剤が支持体に結合する場合、薬剤は、同じまたは異なるメカニズムによって作用し得、同じまたは異なる検体の検出を高め得る。例えば、細胞がT細胞である場合、2つの共刺激シグナルが、CD4およびCD8反応細胞の両方を最適に検出するために使用され得る。ここで、検出システムは、好ましくは、T細胞の別々のセットによって通常は産生されるIL-4およびIFN- などの、複数のサイトカインに基づく。

【0033】

ウイルス感染細胞を検出することに対する本発明の態様において、そのような細胞の検出を高めることが可能な薬剤は、好ましくは、ウイルス複製を活性化することが可能な薬剤である。例えばHIVなどの場合、ウイルス複製の活性化因子は、抗CD3またはPHAなどのポリクロール活性化因子であり得、両方ともT細胞におけるウイルス複製を活性化する。

【0034】

検体の産生を刺激することが可能な薬剤

本発明の方法は、典型的には、特異的刺激シグナルに反応して検体を産生する細胞を検出するために使用される。従って、試験される細胞は、細胞を支持体上で抗体および検出を高めることが可能な薬剤に接触させることに先行して、例えば検体の分泌などの、産生を刺激することが可能な薬剤に接触させられ得る。代わりにまたは付加的に、細胞は、検出を高めることが可能な固定化薬剤および固定化抗体と同時に、検体の産生を刺激することが可能な薬剤に接触させられ得る。好ましくは、試験される細胞は、検出を高めることが可能な薬剤および抗体と同時に、産生を刺激することが可能な薬剤に接触させられる。細胞がT細胞である場合、産生を刺激することが可能な薬剤が、アッセイウェルに添加される、すなわち、T細胞が、産生を刺激することが可能な薬剤、検出を高めることが可能な薬剤、および抗体と同時に接触させられることが、特に好ましい。検体の産生を刺激す

10

20

30

40

50

ることが可能な薬剤は、溶液中に存在し得る、または支持体上に固定され得る。

【0035】

方法が活性化T細胞を検出するためのものである態様において、分泌を刺激することが可能な薬剤は、典型的には抗原である。抗原は、ウイルスまたはバクテリアなどの病原体に由来し得る。抗原は、自己免疫性神経疾患(ミエリン)または糖尿病(グルタミン酸脱炭酸酵素(GAD))などの、自己免疫性疾患に関連し得る。抗原は、腫瘍抗原またはアレルゲンであり得る。分泌を刺激することが可能な薬剤は、単離された粗抗原混合物、または組換え技術によって産生されたタンパク質および/もしくは製造されたペプチドを含み得る。

【0036】

検体の分泌を阻害することが可能な薬剤

本発明の方法は、自然にまたは刺激シグナルに反応して、検体を分泌する細胞を検出するために使用され得る。本発明の方法は、検体の分泌を阻害する薬剤を同定するために使用されてもよい。そのような薬剤は、物質の自然な分泌を阻害し得る、または特異的刺激に対する物質の分泌を阻害し得る。

【0037】

例えば、ウイルス感染細胞を検出することに対する本発明の態様において、方法は、抗ウイルス薬を同定するために使用され得る。薬物スクリーニングのそのような方法において、本発明の方法は、試験される薬剤の存在下および非存在下で実施され得、試験薬剤の存在下におけるウイルスタンパク質または粒子を分泌する細胞の数における任意の減少は、その薬剤が抗ウイルス薬として有用であり得ることを示す。

【0038】

T細胞を検出することに対する本発明の態様において、方法は、例えば、抗原特異的システムにおいて、免疫調節性薬剤を同定するために使用され得る。免疫調節性薬剤は、抑制性または増強性であり得る。スクリーニングのそのような方法において、本発明の方法は、試験薬剤の存在下および非存在下で実施され得、試験薬剤の存在下におけるサイトカインを分泌する細胞の数における任意の増加または減少は、その薬剤が免疫調節性活性を有することを示す。

【0039】

細胞は、細胞を抗体および検出を高めることが可能な薬剤に接触させることに先行して、試験薬剤とともにインキュベートされ得る。または、試験薬剤は、細胞が抗体および検出を高めることが可能な薬剤に接触させられるのと同時に、細胞に接触させられ得る。

【0040】

適したアッセイ法形式

細胞および細胞の該検体の分泌を刺激することが可能な薬剤および試験薬剤は、分泌の刺激に適した任意の条件下で接触させられ得る。条件は、検体が固定化抗体と直接的に相互作用するのに適していてもよい。概して、細胞は、液体サンプル中に存在すると思われる。刺激薬剤または試験薬剤は、抗体および検出を高めることが可能な薬剤が固定される表面に固定され得る。次いで、細胞は、刺激薬剤または試験薬剤、抗体および検出を高めることが可能な薬剤に、同時に接触させられ得る。

【0041】

アッセイ法は、任意の適した量において実施され得る。細胞サンプルの典型的な量は、約10 $\mu$ l~約1ml、例えば、約25 $\mu$ l~約250 $\mu$ l、約30 $\mu$ l~約200 $\mu$ l、約40 $\mu$ l~約150 $\mu$ l、または約50 $\mu$ l~約100 $\mu$ lの範囲である。典型的には、細胞が抗体および検出を高める薬剤とともにインキュベートされる時間の長さは、約4~50時間、例えば、約6~48時間、約8~45時間、約12~36時間、または約16~32時間、好ましくは約6~16時間、例えば、一晚である。

【0042】

細胞は、任意の適した温度で、抗体および検出を高めることが可能な薬剤とともにインキュベートされ得る。適した温度は、細胞が由来するヒトまたは動物の正常な体温と同じ範囲である。典型的には、インキュベーションは、約35 と約39 の間の温度、好ましく

10

20

30

40

50

は約36 ~ 約38 、より好ましくは37 で実施される。

【0043】

抗体/検体複合体の検出

固定化抗体と細胞から放出される検体との間に形成される複合体は、任意の適した手法によって検出され得る。抗体への結合の後、検体は、検体を分泌した細胞の近傍に残ると思われる。したがって、検体/抗体複合体の「スポット」は、支持体上に形成され、各々のスポットは物質を分泌する細胞を意味する。スポットを定量化すること、および典型的には対照と比較することは、検体を分泌する細胞が検出されるのを可能にする。抗体が固定される表面は、検出に先行して非結合検体を除去するために、例えばPBS中で、概して洗浄される。

10

【0044】

典型的には、抗体/検体複合体は、複合体に結合すると思われる二次抗体を使用して検出され得る。二次抗体は、典型的には、一次抗体とは異なる抗体である。典型的には、二次抗体は、一次抗体に結合する部位とは異なる部位で、検体に結合する。二次抗体は、検体と固体支持体上に固定された一次抗体との間で形成される複合体に結合し得る。

【0045】

概して、二次抗体は、直接的または間接的に検出され得る標識で標識される。直接的に検出可能な標識を含む特異的結合薬剤は、フルオロセイン、テキサスレッド、ローダミン、またはオレゴングリーンなどの、蛍光標識を含み得る。固定化一次抗体/物質複合体への二次蛍光標識抗体の結合は、顕微鏡検査によって検出され得る。例えば、蛍光または二焦点顕微鏡を使用して、検出され得る。

20

【0046】

好ましくは、二次抗体は、間接的に検出され得る標識に結合している。間接的に検出され得る標識は、実体顕微鏡などの、従来の低倍率、例えば、10倍倍率、20倍倍率、または50倍倍率の顕微鏡下で検出され得る沈殿非蛍光基質に作用する酵素を含み得る。好ましくは、沈殿非蛍光顕微鏡は、自動ELISpotリーダーを使用して検出される。自動ELISpotリーダーは、典型的には、スポットの分析に適合したビデオカメラおよび画像解析ソフトウェアに基づく。または、スポットは、拡大鏡を使用して目測で検出され得る。好ましい酵素は、アルカリホスファターゼおよびホースラディッシュペルオキシダーゼを含む。

30

【0047】

間接的に検出可能な標識を含む二次抗体は、検出可能な標識によって直接的または間接的に標識される三次抗体によって検出され得る。三次抗体は、典型的には二次抗体上の標識に結合し得る。例えば、二次抗体は、好ましくはビオチン部分を含み得、ストレプトアビジン部分および検出可能な薬剤として典型的にはアルカリホスファターゼまたはホースラディッシュペルオキシダーゼを含む三次薬剤による検出を可能にする。

【0048】

二次抗体は、一次抗体および細胞が採取される被験体の両方とは異なる種に由来する抗体であり得る。次いで、三次結合薬剤は、二次抗体が由来する種に由来するタンパク質を特異的に認識する抗体であり得る。

【0049】

すべての検出段階において、二次およびそれに続く薬剤の非特異的結合を最小にするための薬剤を含むことが望ましい。例えば、非特異的結合をブロックするために、ウシ血清アルブミン(BSA)またはウシ胎仔血清(FCS)が使用され得る。

40

【0050】

刺激薬剤に反応して細胞から放出される物質は、その薬剤の非存在下で、細胞から自然に放出される可能性もある。それ故に、より多くの細胞が刺激薬剤に反応して物質を放出しているのかどうかを決定するために、一つまたは複数の陰性対照アッセイ法を実施する必要があり得る。例えば、アッセイ法は、刺激薬剤の非存在下で実施され得、かつ刺激薬剤の非存在下で検出されるスポットの数が、刺激薬剤の存在下で検出されるスポットの数(陽性細胞)から減算され得る。

50

## 【 0 0 5 1 】

アッセイプレート

本発明は、細胞によって産生され得る検体に対して特異的な抗体および検体を分泌する細胞の検出を高めることが可能な第一薬剤を含み、前記抗体および第一薬剤が同じ表面上に固定される、本発明の方法における使用のためのアッセイプレートも提供する。

## 【 0 0 5 2 】

抗体および第一薬剤は、支持体全体にわたって均一に存在し得る、すなわち、抗体および第一薬剤の両方は、同じ領域に存在し得る。

## 【 0 0 5 3 】

または、抗体および第一薬剤は、アッセイプレート上の別個の位置に局在し得る。故に、本発明の一つの態様において、抗体は、支持体の一部のみ、すなわち、支持体の表面の分画にコーティングされ、一次薬剤は、支持体上に均一に、すなわち、抗体でコーティングされた支持体の部分および抗体でコーティングされていない支持体の部分上に、または抗体でコーティングされていない支持体の部分のみに、コーティングされる。この態様において、抗体でコーティングされる支持体の分画は、総表面領域の約1/200～約1/2、例えば、総表面領域の約1/100～約1/3、約1/50～約1/4、約1/20～約1/8、または約1/10～約1/9を含み得る。

10

## 【 0 0 5 4 】

この態様において、陽性アッセイ法は、抗体でコーティングされた部位におけるスポットの産生を生じると思われる。これらのスポットは、標準のELISpotにおいて見られる細胞インプリントよりも大きく、そして目視検査によって容易に記録され得る。例えば、スポットの強度に関する情報を提供し、したがって、サイトカインがどれだけ産生されるのかに関する半定量的な情報を与えるために、画像解析機が使用されてもよい。これは、陰性対照ウェルにおいて検体の自然な産生が生じる状況において、陽性反応を同定することを可能にする。サイトカインが限定された領域で捕獲されかつ検出されるという事実は、アッセイ法を高感度にする。例えば、ELISpotアッセイ法において10のスポットまたはそれ以下を産生すると考えられる、個々のペプチドに対するT細胞の反応を検出することが可能である。

20

## 【 0 0 5 5 】

この態様において、ウェルの底面上の別個の位置に、2またはそれ以上、例えば3、4、5、6、7、8、9、または10の抗体を固定することによって、単一のウェルにおいて一つまたは複数の検体を同時に検出することが可能である。抗体および薬剤は、典型的には、細胞のサンプルが固体表面上の抗体および薬剤の各々に同時に接触し得るように、固体表面上に設置される。

30

## 【 0 0 5 6 】

別個の位置は、典型的にはスポットを含む。スポットは、約1nm～約200 $\mu$ m、例えば、約1 $\mu$ m～約100 $\mu$ mまたは約10 $\mu$ m～約50 $\mu$ mの典型的な直径を有する。固定化結合タンパク質の2～50、3～40、4～30、5～20、6～15、7～12、8、9、または10のスポットが、固体表面上に存在し得る。

## 【 0 0 5 7 】

スポットは、スポットが互いに分離されるならば、表面上の任意の適した配列に配置され得る。スポットは、典型的には、第一、第二、またはさらなる検体が結合したスポットの同定を助けるために、一つまたは複数の直線に配置される。例えば、スポットは、グリッドとして配置され得る。グリッドにおいて、第一抗体は、一つの行または列に存在し得る、かつ第二抗体または薬剤は、第二の行または列に存在し得る。一つまたは複数のさらなる抗体または薬剤は、グリッドにおいて付加的な行または列を形成し得る、付加的なスポットに存在し得る。または、スポットは、固体表面上で円形配列を形成し得る。

40

## 【 0 0 5 8 】

抗体および抗体が結合する検体を分泌する細胞の検出を高めることが可能な薬剤は、固体支持体上に固定される。任意の適した固体支持体が使用され得る。抗体が接着する表面

50

は、ウェルの表面、好ましくはウェルの底面であり得る。典型的には、ウェルは、マイクロタイタープレートなどの、ウェルを有するプレートに存在する。次いで、別々のアッセイ法は、プレートの別々のウェルで実施され得る。好ましくは、マイクロタイタープレートは、96ウェルELISpotプレートである。好ましくは、抗体および細胞の検出を高めることが可能な薬剤が固定される表面は、ウェルの底面である。好ましくは、表面は、ポリビニリデンフルオライド(PVDF)膜またはニトロセルロース膜である。PVDFおよびニトロセルロース膜と同等のタンパク質結合能力を有するその他の膜が使用されてもよい。典型的には、表面は、約60、約70、約80、または約90  $\mu\text{g}/\text{ウェル}$ などの、96ウェルELISpotプレートのウェルあたり約50 ~ 約100  $\mu\text{g}$ のタンパク質結合能力を有する。96ウェルELISpotプレートの表面領域は、0.32 $\text{cm}^2$ である。タンパク質結合能力は、典型的には、約180  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、約200  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、約250  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、または約300  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ などの、約150  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  ~ 約315  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ である。

10

#### 【0059】

抗体は、抗体が支持体に結合するのに適した条件下で、支持体と抗体を接触させ、かつ非結合抗体を除去するために洗浄することによって、支持体に結合し得る。同様に、検体を分泌する細胞の検出を高めることが可能な薬剤は、薬剤が支持体に結合するのに適した条件下で支持体と薬剤を接触させ、かつ非結合薬剤を除去するために洗浄することによって、支持体に結合し得る。

#### 【0060】

#### キット

20

本発明は、本発明の方法を実施するためのキットも提供し、キットは、本発明に従うアッセイプレートおよび検体の抗体へ結合を検出する手法を含む。

#### 【0061】

キットは、物質/抗体複合体を検出する手法も含み得る。物質に結合した抗体は、抗体が検出のために直接的または間接的に標識される場合、直接的に検出され得る。または、検出のために直接的または間接的に標識された二次抗体は、スポットの決定を可能にするために、物質/抗体複合体に結合することを可能にされ得る。上に論じたように、二次抗体は、物質に対して特異的であり得るが、一次抗体とは異なる物質上の部位に結合し得る。

#### 【0062】

30

キットは、細胞のための培地、検出段階において使用される検出薬剤または洗浄緩衝液を付加的に含み得る。

#### 【0063】

キットは、陽性または陰性対照などの対照を含んでもよい。方法は、検出を高めることが可能な薬剤の非存在下で、検出システムが試験されることを可能にするために、陽性対照として作用し得る。

#### 【0064】

キットは、血液サンプルなどの、被験体から細胞を含むサンプルを採取する手法を含んでもよい。キットは、血液サンプルから単核細胞またはT細胞を分離する手法を含み得る。

40

#### 【0065】

#### 使用

本発明の方法は、診断的応用と同様に調査状況において使用され得る。本発明の方法は、ELISpotアッセイ法の任意の公知の応用において使用され得る。本発明の方法は、特異的免疫反応を調べる調査、例えば、ワクチン研究において、特に使用され得る。本発明の方法は、様々な感染症、アレルゲン、腫瘍抗原、または自己免疫標的へのT細胞の反応を検出することを目的とする診断的アッセイ法において使用され得る。

#### 【0066】

本発明の方法は、改善されたELISpotアッセイ法を提供する。本発明の方法に従って実施されるアッセイ法は、公知のELISpotアッセイ法よりもより感度が高い。陽性細胞の検

50

出を高めることが可能な薬剤の増強効果は、(サンプルにおけるすべての潜在的反応細胞のより効果的な刺激に起因する)より多数の特異的スポットとして、または(個々の細胞による検体のより高い産生に起因する)より明確なスポットにおいて明示され得る。

【0067】

本発明の方法は、薬物スクリーニングにおいて、例えば、抗ウイルス薬および免疫調節性薬剤を同定することにおいて、特別な実用性を有する。

【0068】

本発明の方法は、様々な単離細胞の反応を検出するために使用されてもよい。例えば、移植のために単離されるインシュリン産生島は、インシュリン産生およびストレス反応に対してモニターされ得、免疫治療のために単離される樹枝状細胞は、反応性および成熟マーカーに対してモニターされ得、ならびに脳卒中治療のために単離される神経幹細胞は、ストレスタンパク質および神経化学走化性因子に対してモニターされ得るだろう。

【0069】

## 実施例

### 方法

#### プレートの調製

PVDF膜プレート(例えば、Millipore、アメリカ合衆国が提供しているELIIP10SSP)は、150  $\mu$ lの70%エタノールを添加することによって前活性化される。およそ2分間のインキュベーションの後、プレートは滅菌水で洗浄される(200  $\mu$ l/ウェルを5回)。

【0070】

抗サイトカインモノクローナル抗体(例えば、抗IL-4モノクローナル抗体、IL4-1、Mabtech AB、スウェーデン、30  $\mu$ g/ml)および共刺激抗体(例えば、抗CD-28)の溶液は、滅菌PBSにそれらを希釈することによって調製される。抗CD28に対して、適した濃度は、1~5  $\mu$ g/mlであり得るが、これは異なる抗体に対して変化し得、滴定によって決定されるべきである。50  $\mu$ l/ウェルの抗サイトカインモノクローナル抗体は、50  $\mu$ l/ウェルの共刺激抗体または50  $\mu$ l/ウェルのPBSのみまたは同濃度の無関係なモノクローナル抗体の添加の後に、添加される。(二つの最後のウェルは対照としての役目をする)プレートは、アルミホイルに包まれ得、冷蔵庫に一晩で保存され得る。

【0071】

プレートは、任意の非結合試薬を除去するために5~6回200  $\mu$ lの滅菌PBSで洗浄される。200  $\mu$ l培地/ウェル(10%FCS、10 mMヘペス、100 U/ml ペニシリン-ストレプトマイシン、および2 mMグルタミンを追加されたRPMI 1640培地)が添加され、かつ混合物は少なくとも1時間インキュベートされる。

【0072】

#### 細胞調製

新鮮に調製されたまたは凍結されたPBMC(末梢血単核細胞)が、アッセイ法に使用され得る(PBMCは標準的なプロトコールに従って調製される)。凍結細胞が使用される場合、それらは、小さな氷の結晶がチューブ内に残るまで、37  $^{\circ}$ Cウォーターバス中で解凍される。約0.5 mlの培地がクライオチューブに添加され、細胞は穏やかに懸濁され、14 mlチューブに移される。培地は、12~14 mlの量が獲得されるまで、ゆっくりと細胞に添加される。10分間900 rpmでの遠心の後、上清はピペットで除去される。細胞は培地に懸濁され(計数のためにサンプルが抽出される)、2回目の遠心をされる。上清は除去され、細胞は適当な量の培地に懸濁される。

【0073】

#### アッセイ法のセットアップ

細胞は、共刺激抗体の存在下または非存在下で、特異的抗原(例えば、PPDおよびTT、Statens Serum Institute, デンマーク;両方とも培地に希釈され、典型的には10  $\mu$ g/mlの濃度で使用される)への反応に対して試験される。PHA(Orion Diagnostics、2  $\mu$ g/ml)などのポリクローナル活性化因子が、細胞およびアッセイ法の機能性をチェックするために、陽性対照として通常は含まれる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 4 】

プレートは空であり、細胞および適当な刺激は、ウェルに移される(培地単独は、自然に産生する細胞に対する対照として使用される)。特異的刺激に対して、200,000細胞/ウェルの細胞濃度が、典型的には使用されるが、より低い濃度(例えば、30,000細胞/ウェル)が、ポリクローナル活性化因子(例えば、PHAまたは抗CD3)とともにウェル内で使用され得る。プレートは、一晩または2日間のどちらか(分析されるサイトカインに依存し得る)で、5% CO<sub>2</sub>とともに37 インキュベーター内で、インキュベートされる。

## 【 0 0 7 5 】

発色

細胞は捨てられ、プレートはPBSで洗浄される(200 μl/ウェルを5回)。0.5% FCSとともにPBS中に1 μg/mlに希釈された100 μl/ウェルのビオチン化抗サイトカイン(例えば、抗IL-4モノクローナル抗体、IL4-II-ビオチン、Mabtech)が添加され、約2時間インキュベートされる。次いで、プレートは、PBSで再度洗浄され(200 μl/ウェルを5回)、0.5% FCSとともにPBS中に1:1000に希釈された100 μl/ウェルのストレプトアビジン-ALP(Mabtech)が添加され、1時間インキュベートされる。プレートはPBSで洗浄され(200 μl/ウェルを5回)、0.45 μm膜を介して濾過されたBCIP/NBT-Plus基質(Moss Inc.)とともに発色させられる。明確なスポットが観察される際に、発色は、水道水で広範囲に洗浄することによって止められる。プレートは、乾燥のために放置され、結果を見るために、低倍率実体顕微鏡(例えば、Nikon、日本; 40倍)またはELISpotリーダー(例えば、AID、ドイツ)が使用される。

## 【 0 0 7 6 】

表1:

固定化抗CD3抗体または膜に固定されたもしくは溶液に添加されたPHAによる刺激の後の、IFN- $\gamma$  産生ヒトPBMCのELISpot分析。使用された細胞数は30,000/ウェルであり、刺激の時間は18時間であった。

## 【 0 0 7 7 】

【表 1】

	スポットの数 (IFN- $\gamma$ 産生細胞)
添加物なし	4 $\pm$ 3
膜結合抗CD3	414 $\pm$ 8
可溶性PHA	582 $\pm$ 63
膜結合PHA	619 $\pm$ 68

## 【 0 0 7 8 】

表2:

膜結合抗CD28の存在下または非存在下における、二つの抗原PPDおよびTTによるヒトPBMCの特異的刺激。ELISpotは、200,000細胞/ウェルで実行され、40時間のインキュベーションの後に、IL-4およびIL-13産生細胞に対して分析された。結果は、3回の平均値を表す。

## 【 0 0 7 9 】

【表 2】

IL-4産生細胞	添加物なし	抗CD28
培地	3	4
PPD	21	83
TT	30	92
IL-13産生細胞	添加物なし	抗CD28
培地	0	3
PPD	118	240
TT	19	137

---

フロントページの続き

審査官 三木 隆

(56)参考文献 特表平05-504192(JP,A)

JENNES,W. et al., Enhanced ELISPOT detection of antigen-specific T cell responses from cryopreserved specimens with addition of both IL-7 and IL-15-the Amplispot assay. , J .Immunol.Methods , 2002年, Vol.270, No.1, p.99-108

OKAMOTO,Y. et al., Development of a dual color enzyme-linked immunospot assay for simultaneous detection of murine T helper type 1- and T helper type 2-cells. , Immunopharmacology , 1998年, Vol.39, No.2, p.107-116

OTT,P.A. et al., CD28 costimulation enhances the sensitivity of the ELISPOT assay for detection of antigen-specific memory effector CD4 and CD8 cell populations in human diseases , J.Immunol.Methods , 2004年, Vol.285, No.2, p.223-235

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/53

C12Q 1/02

G01N 33/543

G01N 33/569

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	非ELISpot测定		
公开(公告)号	<a href="#">JP4990129B2</a>	公开(公告)日	2012-08-01
申请号	JP2007509977	申请日	2005-04-29
[标]申请(专利权)人(译)	基于阿单抗技术		
申请(专利权)人(译)	安倍晋三Mabtech		
当前申请(专利权)人(译)	安倍晋三Mabtech		
[标]发明人	ブレエッシュアンデルセンステン ポーリースタファン		
发明人	ブレエッシュ-アンデルセン ステン ポーリー スタファン		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/569 C12Q1/02 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/54306 G01N33/56983 G01N33/6863		
FI分类号	G01N33/53.P G01N33/543.525.U G01N33/569.L C12Q1/02		
代理人(译)	清水初衷		
审查员(译)	三木隆		
优先权	2004009775 2004-04-30 GB		
其他公开文献	JP2007535668A5 JP2007535668A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

一种检测样品中细胞产生分析物的方法，该方法包括以下步骤：(i)能够结合分析物的抗体和能够增强分析物检测的第一种试剂提供固定在相同支持物上的抗体和第一药剂；(ii)使抗体和药剂与细胞样品接触；和(iii)将分析物与抗体结合。检测，从而检测样品中细胞产生的分析物。

	スポットの数 (IFN- $\gamma$ 産生細胞)
添加物なし	4 $\pm$ 3
膜結合抗CD3	414 $\pm$ 8
可溶性PHA	582 $\pm$ 63
膜結合PHA	619 $\pm$ 68