

(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2008-212026

(P2008-212026A)

(43) 公開日 平成20年9月18日(2008.9.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 B 0 6 4
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 B	4 C 0 8 4
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 V	

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2007-51746 (P2007-51746)	(71) 出願人	505076751 株式会社フィットイン 埼玉県鶴ヶ島市上広谷794番地62
(22) 出願日	平成19年3月1日(2007.3.1)	(71) 出願人	505374783 独立行政法人 日本原子力研究開発機構 茨城県那珂郡東海村村松4番地49
		(74) 代理人	100065215 弁理士 三枝 英二
		(74) 代理人	100076510 弁理士 掛樋 悠路
		(74) 代理人	100108084 弁理士 中野 睦子
		(72) 発明者	菅原 卓也 愛媛県松山市桑原2-9-8-144 国立大学法人愛媛大学農学部内 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫蛋白質の製造方法

(57) 【要約】

【課題】リンパ球やリンパ球ハイブリドーマ細胞を用いて、免疫グロブリンやサイトカイン等の免疫蛋白質を効率良く製造する方法を提供する。

【解決手段】放射線処理されたコラーゲン、キチンまたはキトサンの存在下でリンパ球やリンパ球ハイブリドーマ細胞を培養することによって、免疫蛋白質、特に免疫グロブリンを製造する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

放射線処理されたコラーゲン、キチンまたはキトサンの存在下で、白血球またはリンパ球ハイブリドーマを培養することを特徴とする免疫蛋白質の製造方法。

【請求項 2】

放射線処理されたコラーゲン、キチンまたはキトサンが、コラーゲン、キチンまたはキトサンを含む原料を放射線処理して得られるものである、請求項 1 に記載する免疫蛋白質の製造方法。

【請求項 3】

免疫蛋白質が免疫グロブリンであることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載する免疫蛋白質の製造方法。

【請求項 4】

免疫グロブリンが I g M 抗体であることを特徴とする、請求項 3 に記載する免疫蛋白質の製造方法。

【請求項 5】

コラーゲンがクラゲに由来するコラーゲンである、請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載する免疫蛋白質の製造方法。

【請求項 6】

白血球またはリンパ球ハイブリドーマを培養して免疫蛋白質を製造する際に使用される、放射線処理されたコラーゲン、キチンまたはキトサンを有効成分とする免疫蛋白質の産生増強剤。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は免疫蛋白質、特に免疫グロブリンを効率よく製造する方法およびそれに使用する材料に関する。

【背景技術】**【0002】**

免疫グロブリンやサイトカイン等の免疫蛋白質は、体内診断薬、治療薬等の医薬分野への応用が期待されている複合蛋白質の一つである。なかでも免疫グロブリンには、体内に入った細菌などを破壊する作用、好中球の食作用を補助する作用、および細菌が産生した毒素を中和する作用があり、さらに抗生物質の治療効果を高めて人体を感染から守る役割を果たしている。かかる免疫蛋白質の製剤（例えば免疫グロブリン製剤）は、原則として献血された健康なヒトの血液を原料として製造される。製剤は、製造過程においてウイルスなどを除去・不活性化するほか、最後にエイズや感染などの原因ウイルスの検査を行って陰性であることを確認した後に出荷されるが、ヒトの血液を原料とするため、感染が起こる可能性を完全に否定することができない。

【0003】

そこで、こうした問題を解決するために、分子生物学的手法を用いて人工的に免疫蛋白質を製造する方法が開発されている。この方法の課題として、短時間に効率よく免疫蛋白質を製造する方法を確立することが求められている。というのも、免疫蛋白質は、通常リンパ球やリンパ球から調製されるハイブリドーマ細胞（リンパ球類）から産生されるものの、その生産効率は極めて低いという問題があるからである。

【0004】

かかる問題を解消する方法として、ヒトリンパ球類にミカン果汁を添加して免疫蛋白質を製造する方法（特許文献 1）、およびコラーゲンの存在下でヒトリンパ球類を培養して免疫蛋白質を製造する方法（特許文献 2）が提案されている。しかしながら、免疫蛋白質の生産効率の点ではまだまだ改良の余地がある。

【特許文献 1】特開平 6 - 9 8 7 6 3 号公報

【特許文献 2】特開 2 0 0 6 - 2 0 4 2 4 8 号公報

10

20

30

40

50

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、白血球、またはリンパ球を用いて調製されるハイブリドーマ細胞（以下、これを「リンパ球ハイブリドーマ」ともいう）を用いて、免疫グロブリン等の免疫蛋白質を高い効率で製造する方法を提供することを目的とする。また、本発明は当該免疫蛋白質の効率的な製造において有効に使用できる免疫蛋白質の産生増強剤を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討していたところ、放射線処理したコラーゲン、キチンまたはキトサンの存在下で、免疫グロブリン等の免疫蛋白質を産生する能力を有する白血球やリンパ球ハイブリドーマを培養することにより、免疫蛋白質の産生効率が高まり、大量に免疫蛋白質を製造することができることを見出し、さらにその産生効率は、放射線処理しない未処理のコラーゲン、キチンまたはキトサンを使用した場合ならびに放射線処理に代えて酵素処理したコラーゲン、キチンまたはキトサンを使用した場合に比べて、顕著に高いことを確認した。

【0007】

本発明はかかる知見に基づいて完成したものであって、下記の構成を有することを特徴とするものである。

【0008】

項1．放射線処理されたコラーゲン、キチンまたはキトサンの存在下で、白血球またはリンパ球を用いて調製されるハイブリドーマを培養することを特徴とする、免疫蛋白質の製造方法。

項2．放射線処理されたコラーゲン、キチンまたはキトサンが、コラーゲン、キチンまたはキトサンを含む原料を放射線処理して得られるものである、項1に記載する免疫蛋白質の製造方法。

項3．免疫蛋白質が免疫グロブリンであることを特徴とする、項1または2に記載する免疫蛋白質の製造方法。

項4．上記免疫グロブリンがIgM抗体であることを特徴とする、項3に記載する免疫蛋白質の製造方法。

項5．コラーゲンがクラゲに由来するコラーゲンである、項1乃至4のいずれかに記載する免疫蛋白質の製造方法。

項6．白血球またはリンパ球を用いて調製されるハイブリドーマを培養して免疫蛋白質を製造する際に使用される、放射線処理されたコラーゲン、キチンまたはキトサンを有効成分とする免疫蛋白質の産生増強剤。

【発明の効果】

【0009】

本発明の方法によれば、免疫蛋白質、特に免疫グロブリンを高い効率で製造することができる。このため、本発明の製造方法は、血液を原料としない安全性の高い免疫グロブリン製剤を工業的に製造する方法として有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

(1) 放射線処理コラーゲン、キトサンおよびキチン

放射線処理する対象のコラーゲンとしては、特に限定はなく、自然界に存在するコラーゲン、人工的に調製されたコラーゲンのいずれをも使用することができる。自然界に存在するコラーゲンとしては、例えば、植物由来、動物由来、または魚介類などの水生生物由来のものを挙げることができる。

【0011】

ここで植物、陸上動物、水生生物の種類も特に制限されない。例えば、陸上動物として

10

20

30

40

50

は牛、豚、馬、羊、兎および鼠等の陸上哺乳類；および鶏等の鳥類を挙げることができ、また水生生物としてはサケ、マス、タラ等の魚類；鯨や鯨などの海棲哺乳類；およびクラゲ等の軟体動物を挙げることができる。好ましくは水生生物に由来するコラーゲンであり、とりわけクラゲに由来するコラーゲンを好適に挙げることができる。クラゲの種類も特に制限されず、ホワイトタイプ、チャイナタイプ、セミチャイナタイプ、キャノンボールタイプ、およびボールタイプ等の公知のクラゲに由来するコラーゲンが、いずれも使用できる。

【0012】

これらのコラーゲンは商業的に入手することも可能であるが、上記植物、陸上動物または水生生物（以下、これらを総称して「動植物類」ともいう）を原料として自ら調製することもできる。

10

【0013】

例えばこれらの動植物類からコラーゲンを採取する方法としては、例えば、前記動植物類またはその動植物類から採取された骨、皮、皮膚、鱗、腱等のコラーゲンを含む部分を、必要に応じて乾燥処理、またはノおよび裁断、破碎若しくは粉碎処理し、次いで酸性水溶液を用いて抽出する方法を挙げることができる。

【0014】

抽出に使用する酸性水溶液としては、例えば、塩酸、硫酸または硝酸等の無機酸の水溶液；シュウ酸、ギ酸、クエン酸、酢酸または酪酸等の有機酸類の水溶液が挙げられる。これらの中でも取り扱い性の面から無機酸、特に塩酸の水溶液が好ましい。また、制限はされないが、前記酸性水溶液の水素イオン濃度はpH 2～4の範囲であることが好ましく、pH 2.5～3.5の範囲であれば更に好ましい。

20

【0015】

動植物類からコラーゲンを抽出する際の温度は、低温、常温または加熱（高温）のいずれでもよく、例えば0～150の範囲を用いることができる。好ましくは0～130の範囲、より好ましくは60～130の加熱条件下である。なお、コラーゲンを抽出する際の圧力は大気圧に限られず、加圧下を実施することができる。またコラーゲンを抽出する際の時間は、抽出する際の温度等の諸条件により適宜決定されるが、5分～24時間の範囲で行われることが好ましい。

【0016】

斯くして動植物類からコラーゲンを抽出した後、得られた抽出物からコラーゲン以外の成分、例えば肉、骨、皮、皮膚、鱗、腱などの動植物の残渣等を除去することによってコラーゲンを含む水溶液を得ることができる。また抽出溶媒として上記酸性水溶液を使用した場合は、さらに得られた抽出液を水に対して透析する操作を行なうことが好ましい。

30

【0017】

放射線処理する対象のキチンやキトサンとしても、特に限定はなく、自然界に存在するキチンおよびキトサン、ならびに人工的に調製されたキチンやキトサンのいずれをも使用することができる。キチンは蟹や海老などの甲殻類の甲羅や甲殻または椎茸等からとれる物質であり、当該キチンのアセチル基を脱アセチル化するとキトサンになる。本発明において放射線処理する対象のキチンやキトサンは、キチンまたはキトサンの単品または各純度が高いものであってもよいが、キチンとキトサンの混合物（すなわち、キチンの脱アセチル化度が100%でないもの）であってもよい。一般に、キチンは水不溶性であり、キトサンは水溶解性であり、例えばキチンの一部を脱アセチル化した脱アセチル化度20%以上のキチンとキトサンの混合物はpH 3で50程度の水溶液に可溶である。この点を考慮してキチンの脱アセチル化度を適宜調整して用いることもできる。

40

【0018】

これらのキチンおよびキトサンはいずれも商業的に入手することも可能であるが、甲殻類や椎茸等を原料として定法に従って調製することもできる（例えば、特開平6-239902号公報など参照）。

【0019】

50

放射線を照射する対象のコラーゲン、キチンまたはキトサンの形状は、特に制限されず、粉末状、粒状または塊状の固体状；水などの溶媒に溶解または懸濁された溶液、ペースト状または懸濁液状のいずれであってもよい。好ましくは粉末または水などの溶媒に溶解または懸濁された溶液である。溶液、ペースト状または懸濁状のコラーゲン、キチンまたはキトサンを用いる場合、その濃度として、制限されないが、通常5～50重量%、好ましくは10～30重量%、より好ましくは10～20重量%の範囲を挙げることができる。

【0020】

放射線の種類には、アルファ線、ベータ線、陽子線、陽電子線、重陽子線、重イオン線、中性子線、X線、およびガンマ線などがある。上記コラーゲン等の処理に使用される放射線は特に制限されないが、好ましくは工業的に使用されているコバルト-60からのガンマ線、および加速器による電子線を挙げることができる。電子加速器としては、厚さ1mm以上の厚い試料が照射できる加速電圧1MeV以上の中エネルギーから高エネルギー電子加速器が最も好ましい。但し、照射対象物が薄いフィルム状であれば、1MeV以下の低エネルギー電子加速器であっても電子線が透過するため、好適に使用することができる。

10

【0021】

コラーゲン、キチンまたはキトサンを放射線処理する放射線の吸収線量は、本発明の効果が得られる限り特に制限されない。コラーゲン、キチンまたはキトサンの別、固体状または液状などの形状の別、濃度の違いによって好適な吸収線量は異なるが、通常1～2000kGyの範囲から適宜選択して用いることができる。好ましくは1～1000kGy、より好ましくは5～500kGyである。なお、吸収線量は、定法に従って測定することができる。具体的には、例えばフリッケ線量計で校正したCTA線量計（例えば、FTR-125、Fuji Photo Film Co. Ltd）を用いて測定することができる。

20

【0022】

液状態のコラーゲン、キチンまたはキトサンを放射線照射処理した場合、得られた処理液は、そのままの状態または適当に水に希釈した後に、スプレードライ、ドラムドライ、凍結乾燥などの慣用の方法で乾燥することができ、固体状態の放射線処理コラーゲン、キチンまたはキトサンとして得ることができる。また逆に固体状態（例えば粉末など）のコラーゲン、キチンまたはキトサンを放射線照射処理した場合、得られた固体（粉末など）は、そのままの状態で使用することもできるし、また適当な溶媒（例えば水溶液）に溶解または懸濁することによって、液状の放射線処理コラーゲン、キチンまたはキトサンとして調製することもできる。

30

【0023】

なお、放射線処理コラーゲン、キチンおよびキトサンは、コラーゲン、キチンおよびキトサンそのものを放射線で照射処理して調製されるものに限らず、前述するコラーゲン、キチンまたはキトサンを含む原料、具体的にはコラーゲンを含む動植物類やそのコラーゲン含有部位（例えば骨、皮、皮膚、鱗、腱など）、またはキチンやキトサンを含む甲殻類や植物、もしくはそれらのキチンまたはキトサンを含む部位（例えば甲羅や甲殻など）を放射線で照射処理し、次いで放射線処理コラーゲン、キチンまたはキトサンに相当する成分を抽出することによっても調製することができる。

40

【0024】

(2) 免疫蛋白質の産生増強剤

後述するように、免疫蛋白質を産生する能力を有する細胞（免疫蛋白質産生細胞）を、上記の放射線処理コラーゲン、キチンおよびキトサンの存在下で培養することによって、当該細胞における免疫蛋白質の産生量を増加させることができる。このため、放射線処理コラーゲン、キチンおよびキトサンは、免疫蛋白質産生細胞の培養に際して、免疫蛋白質の産生増強剤として用いることができる。従って、本発明は前述する放射線処理コラーゲン、キチンおよびキトサンについて、免疫蛋白質の産生増強剤としての新規用途を提供するものである。

50

【 0 0 2 5 】

免疫蛋白質の産生増強剤は、前述する放射線処理コラーゲン、キチンまたはキトサンそのものであってもよいし、また放射線処理コラーゲン、キチンまたはキトサンを有効成分とし、これら以外に、他の免疫蛋白質産生増強剤、適当な溶媒または免疫蛋白質産生細胞の培養に必要な添加剤（例えばウシ血清等の血清、インスリン、トランスフェリン、エタノールアミン、亜セレン酸ナトリウム等）などを含むものであってもよい。また、ここで有効成分として用いる放射線処理コラーゲン、キチンおよびキトサンは、コラーゲン、キチンおよびキトサンそのものを放射線で照射処理して調製されるものに限らず、（１）で説明するコラーゲン、キチンまたはキトサンを含む原料、具体的にはコラーゲンを含む動物植物類やそのコラーゲン含有部位（例えば骨、皮、皮膚、鱗、腱など）、またはキチンやキトサンを含む甲殻類や植物もしくはそれらのキチンまたはキトサンを含む部位（例えば甲羅や甲殻など）を放射線で照射処理し、次いで放射線処理コラーゲン、キチンまたはキトサンに相当する成分を抽出することによっても調製されたものであってもよい。

10

【 0 0 2 6 】

なお、ここで対象とする免疫蛋白質ならびに当該免疫蛋白質を産生する能力を有する細胞については、下記（３）において詳述する。

【 0 0 2 7 】

（３）免疫蛋白質の製造方法

本発明が提供する免疫蛋白質の製造方法は、前述する放射線処理コラーゲン、キトサン若しくはキチン、すなわち前述する免疫蛋白質の産生増強剤の存在下で、免疫蛋白質を産生する能力を有する細胞を培養することによって実施することができる。

20

【 0 0 2 8 】

本発明が対象とする免疫蛋白質としては、IgA抗体、IgD抗体、IgE抗体、IgG抗体およびIgM抗体などの免疫グロブリン；インターロイキン（IL-1～18など）、インターフェロン（IFN- α 、 β 、 γ など）、腫瘍壊死因子（TNF、TNF α など）、コロニー刺激因子（G-CSF、M-CSF、EPO、SCFなど）、成長因子（EGF、FGF、IGF、NGF、PDGF、TGFなど）などのサイトカイン（リンフォカイン、モノカイン）を挙げることができる。好ましくは免疫グロブリンであり、より好ましくは免疫グロブリンのなかでもIgM抗体である。

【 0 0 2 9 】

免疫蛋白質を産生する能力を有する細胞としては、上記免疫蛋白質、好ましくは免疫グロブリンを産生する能力を有する細胞であれば特に制限されない。通常、リンパ球（B細胞、T細胞、NK細胞）およびマクロファージなどの白血球を挙げることができる。好ましくはリンパ球、特にB細胞である。また、免疫蛋白質を産生する能力を有する限り、上記リンパ球（特にB細胞）と自立増殖能を有する多発性骨髄腫やリンパ腫などのミエローマ細胞との融合細胞（これを本発明では「リンパ球ハイブリドーマ」という）であってもよい。かかるハイブリドーマの調製は、センダイウイルスを用いた細胞融合法、ポリエチレングリコール法、または電気パルスによる電気融合など、慣用方法に従って行うことができる。好ましいリンパ球ハイブリドーマとして、ヒト骨髄腫細胞株とリンパ球（B細胞）とを細胞融合させたヒト型ハイブリドーマHB4C5細胞を挙げることができる。これらの白血球およびリンパ球ハイブリドーマの由来は特に制限されないが、ヒト由来の免疫蛋白質を製造する観点から、好ましくはヒト由来である。

30

40

【 0 0 3 0 】

なお、本発明の免疫蛋白質の製造に使用する白血球またはリンパ球ハイブリドーマは、単一種類のものに限らず、２種以上を組み合わせることもできる。

【 0 0 3 1 】

免疫蛋白質の製造は、これらの白血球またはリンパ球ハイブリドーマを、前述する放射線処理コラーゲン、キチンまたはキトサンの存在下で培養することによって行うことができる。すなわち、放射線処理コラーゲン、キチンまたはキトサンを含有する培地中で、上記白血球またはリンパ球ハイブリドーマを培養することによって行うことができる。

【 0 0 3 2 】

50

ここで白血球またはリンパ球ハイブリドーマの培養に使用する培地としては、放射線処理コラーゲン、キチンまたはキトサンを含有すること以外は、白血球またはリンパ球ハイブリドーマの培養に通常使用される培地を広く用いることができる。例えば、EagleのMEM培地、McCoyの5Aまたは7A培地、HamのF10またはF12培地、199培地等、またはこれらの改良型の培地等を挙げることができる。かかる培地は一般に基本合成培地等として商業的に入手することが可能である。

【0033】

またかかる培地には、ウシ血清等の血清を添加することも特に制限されない。また、その他、インスリン、トランスフェリン、エタノールアミン、亜セレン酸ナトリウム等の各種添加剤を適宜添加することもできる。

10

【0034】

培地に配合する放射線処理コラーゲン、キチンまたはキトサンの量は、制限されないが、例えば、培養する白血球またはリンパ球ハイブリドーマの量が培地1mLあたり $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ cellsである場合を一例にすると、蛋白質濃度に換算して培地1mLあたり0.1~10,000 μg の範囲を挙げることができる。好ましくは10~5,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、より好ましくは10~1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲である。

【0035】

なお、本発明の製造方法は、白血球またはリンパ球ハイブリドーマの培養に使用する培地に、放射線処理コラーゲン、キチンまたはキトサンが、好ましくは上記割合で配合されていればよいため、培地への配合に使用する放射線処理コラーゲン、キチンまたはキトサンの純度は問わない。よって、培地への配合に使用する放射線処理コラーゲン、キチンまたはキトサンは、放射線処理したコラーゲンを含む動植物類の抽出物またはその粗精製物、または放射線処理したキチンまたはキトサンを含む甲殻類や植物の抽出物またはその粗精製物であってもよい。

20

【0036】

白血球またはリンパ球ハイブリドーマを培養する際の温度は、免疫蛋白質を産生できる温度であれば、特に制限されないが、通常30~45の範囲を用いることができる。好ましくは35~42の範囲、より好ましくは36~38の範囲である。また湿度も特に制限されない。通常相対湿度が80~100%の範囲、好ましくは90~100%の範囲、より好ましくは95~100%の範囲を挙げることができる。

30

【0037】

また、白血球またはリンパ球ハイブリドーマを培養する際には、通常、炭酸ガスを1~10体積%程度の割合で含む空気の雰囲気下で培養が行われる。好ましい炭酸ガスの濃度としては3~8体積%の範囲を挙げることができる。

【0038】

培養時間は、前記免疫蛋白質の製造効率に応じて適宜決定されるが、通常は5時間~2週間の範囲である。

【0039】

斯くして放射線処理コラーゲン、キチンまたはキトサンの存在下で前記白血球またはリンパ球ハイブリドーマを培養することにより、培地中に免疫蛋白質を効率よく産生して蓄積させることができる。

40

【0040】

次いで、培地から定法に従って固液分離して免疫蛋白質を単離し、必要に応じてアフィニティクロマトグラフィー等の液体クロマトグラフ法等を用いて精製することにより、所望の免疫蛋白質を取得することができる。

【0041】

斯くして得られる免疫蛋白質、好ましくは前述する免疫グロブリンやサイトカイン(リンフォカイン、モノカイン)、より好ましくは免疫グロブリンは、例えば、免疫疾患治療薬、免疫機能検査薬の有効成分として広く用いることができる。

【実施例】

50

【0042】

以下、本発明を実施例により詳細に説明する。但し、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0043】

参考例1 クラゲからのコラーゲン抽出操作

根口クラゲ類（根口クラゲ目ピゼンクラゲ科）の可食部（上傘部）を細かく刻み、水素イオン濃度をpH3に調整した希塩酸水溶液を用いて、温度4℃にて一晚攪拌した。その後、121℃にて20分間の条件にてコラーゲンの抽出を実施した。得られた抽出液を10mMリン酸緩衝液（pH7.4）に対して透析（「セルロース透析膜」（分画分子量14,000）使用）を行い、透析後の抽出液をポアサイズ0.45μmのフィルターにより濾過してコラーゲンを含む水溶液（蛋白濃度約20mg/ml）を得た。以下、このコラーゲンを含む水溶液を「クラゲコラーゲン水溶液」と呼ぶ。

10

【0044】

参考例2 ウシアキレス腱からのコラーゲン抽出操作

参考例1で使用したクラゲに代えてウシアキレス腱を用いる以外は全く同様の操作を行い、コラーゲンを含む水溶液（蛋白質濃度：約20mg/ml）を得た。以下、このコラーゲンを含む水溶液を「ウシアキレス腱コラーゲン水溶液」と呼ぶ。

【0045】

実施例1および2 コラーゲン水溶液の放射線照射処理

参考例1で得られたクラゲコラーゲン水溶液および参考例2で得られたウシアキレス腱コラーゲン水溶液をそれぞれポリエチレン製の容器に入れ、これらに室温中で、吸収線量が10、20、50、200kGyになるようにコバルト-60からのγ線を照射した。

20

【0046】

実施例3および4 キチンおよびキトサン（粉末）の放射線照射処理

キチン（分子量約600,000、株式会社三晶から入手）およびキトサン（分子量約100,000、株式会社三晶社から入手）の粉末を、それぞれポリエチレン製の容器に入れ、これらに室温中で、吸収線量が30、660、1000、1340kGyになるようにコバルト-60からのγ線を照射した。放射線処理したキチン20mgおよびキトサン20mgをそれぞれ1Nの酢酸水溶液10mlに溶解し、その後、水酸化ナトリウム水溶液でpHを6に調整して、キチンまたはキトサンを含む水溶液に調製した。

30

【0047】

実験例1

リンバ球ハイブリドーマとしてヒト型ハイブリドーマHB4C5細胞を用い、これを実施例1で調製した放射線処理クラゲコラーゲン（吸収線量：10kGy）の存在下で培養した。また比較対照として、上記放射線照射処理クラゲコラーゲンに代えて参考例1で調製したクラゲコラーゲン（放射線非照射）の存在下で、またコントロールとしてコラーゲン非存在下で、同様にヒト型ハイブリドーマHB4C5を培養した。

【0048】

具体的には、 5×10^4 cells/mlのヒト型ハイブリドーマHB4C5細胞を、蛋白質濃度が0.1~1,000μg/mlの割合でコラーゲン水溶液を含む基本合成培地ERDF（インスリン10μg/ml、トランスフェリン20μg/ml、エタノールアミン20μM、亜セレン酸ナトリウム25nMを含む）中で、37℃、炭酸ガス体積5% - 空気95体積%の雰囲気下、湿度100%の条件下にて、6時間培養した。培養後、培地中に生成した免疫グロブリン（IgM抗体）の量を、抗ヒトIgMおよびペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgMを用いた酵素抗体法（ELISA法）によって測定した。

40

【0049】

その結果を表1に示す。

【0050】

【表 1】

	タンパク質量 ($\mu\text{g/ml}$)	IgM 産生量 (ng/ml)	活性
コントロール	0	4.8 \pm 0.52	1.0
非照射	492.9	25.1 \pm 0.00	5.2
	130.2	18.4 \pm 0.97	3.8
	32.5	9.1 \pm 0.92	1.9
	8.1	7.8 \pm 0.44	1.6
	2.0	6.5 \pm 0.29	1.4
	0.5	4.4 \pm 0.48	0.9
10kGy 照射	737.7	22.2 \pm 1.58	4.6
	193.6	23.8 \pm 1.07	4.9
	48.4	24.4 \pm 2.49	5.0
	12.1	16.0 \pm 0.81	3.3
	3.0	6.5 \pm 1.14	1.3
	0.8	5.2 \pm 0.27	1.1
	0.2	4.4 \pm 0.54	0.9

タンパク質あ
たりの活性
(比活性)が
約10倍上昇

10

20

なお、表中「活性」は、コントロール(無添加)区での免疫グロブリン(IgM 抗体)産生量
に対する、各試験区(非照射区、10kGy 照射区)における当該産生量の相対的比を意味する。

【0051】

表 1 に示すように、放射線処理コラーゲンの存在下でヒト型ハイブリドーマ HB 4 C 5 細胞を培養することによって、放射線処理しないコラーゲンの存在下で培養する場合(非照射)に比して、添加蛋白質あたりの免疫グロブリン(IgM)の産生量、すなわち比活性が約 10 倍上昇していることが明らかになった(言い換えれば、1/10量の放射線処理コラーゲンで、放射線非照射コラーゲンと同じIgM産生量を得ることができる)。

【0052】

なお、結果は示さないが、放射線処理コラーゲンとして、透析処理によって低分子画分(分子量約 14,000 以下)を除去したものを使用した場合も、上記の結果と同様に免疫グロブリン(IgM)が高い産生量で得られた。このことから、放射線処理コラーゲンの活性成分(免疫蛋白質産生増強成分)は分子量約 14,000 以上であることがうかがわれる。

【0053】

実験例 2

根口クラゲ類(根口クラゲ目ピゼンクラゲ科)の可食部(上傘部)を、そのまま放射線で照射処理した。具体的には、クラゲ(上傘部)を適当なサイズに切断した後、ポリエチレン・ナイロン製の袋に入れ、脱気処理し、次いで吸収線量が 30 kGy または 660 kGy となるように、放射線として線を、室温中で照射した。

【0054】

次いで、得られた放射線照射処理クラゲの組織を細かく刻み、これを水素イオン濃度を pH 3 に調整した希塩酸水溶液に浸漬して温度 4 にて一晚攪拌した。その後、121 にて 20 分間加温してコラーゲンを抽出した。得られた抽出液を 10 mM リン酸緩衝液(pH 7.4)に対して透析を行い(「セルロース透析膜」(分画分子量 14,000)使用)、透析後の抽出液をポアサイズ 0.45 μm のフィルターにより濾過してコラーゲンを含む水溶液(蛋白質濃度: 約 10 mg/ml)を得た。

【0055】

リンパ球ハイブリドーマとしてヒト型ハイブリドーマ HB 4 C 5 細胞を用い、これを上

30

40

50

記で調製した放射線照射処理クラゲのコラーゲン抽出液の存在下で培養した。また比較対照として、放射線照射処理したクラゲのコラーゲンに代えて、参考例1で調製したクラゲコラーゲン（放射線非照射）の存在下で、またコントロールとしてコラーゲン非存在下で、同様にヒト型ハイブリドーマHB4C5細胞を培養した。

【0056】

具体的には、 5×10^4 cells/mlのヒト型ハイブリドーマHB4C5を、蛋白質濃度が0.1~5,000 $\mu\text{g/ml}$ の割合で放射線処理クラゲのコラーゲン抽出液を含む基本合成培地ERDF（インスリン10 $\mu\text{g/ml}$ 、トランスフェリン20 $\mu\text{g/ml}$ 、エタノールアミン20 μM 、亜セレン酸ナトリウム25 nMを含む）中で、37℃、炭酸ガス体積5% - 空気95体積%の雰囲気下、湿度100%の条件下にて、6時間培養した。培養後、培地中に生成した免疫グロブリン（IgM抗体）の量を、抗ヒトIgMおよびペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgMを用いた酵素抗体法（ELISA法）によって測定した。

10

【0057】

その結果を表2に示す。

【0058】

【表2】

	タンパク質量 ($\mu\text{g/ml}$)	IgM 産生量 (ng/ml)	活性
コントロール	0	8.7 ± 1.11	1.0
非照射	1098.4	39.3 ± 3.14	4.5
	274.6	37.2 ± 2.56	4.3
	68.6	25.5 ± 3.74	2.9
	17.2	14.8 ± 2.12	1.7
	4.3	10.3 ± 0.59	1.2
	1.1	8.6 ± 0.24	1.0
	0.3	7.2 ± 0.24	0.8
	30kGy 照射	2778.6	35.7 ± 1.91
694.6		32.3 ± 2.17	3.7
145.3		31.2 ± 1.83	3.6
36.3		25.9 ± 1.85	3.0
9.1		12.0 ± 1.00	1.4
2.3		9.1 ± 0.65	1.0
0.6		7.6 ± 1.67	0.9
0.1		6.8 ± 0.54	0.8
660kGy 照射	1284.2	33.9 ± 2.09	3.9
	321.0	31.1 ± 0.55	3.6
	80.3	40.0 ± 3.74	4.6
	20.1	30.4 ± 1.58	3.5
	5.0	11.2 ± 0.54	1.3
	1.3	9.1 ± 1.03	1.0
	0.3	7.7 ± 0.36	0.9

←

タンパク質あたりの活性(比活性)が10倍以上上昇

←

20

30

40

なお、表中「活性」は、コントロール(無添加)区での免疫グロブリン(IgM抗体)産生量に対する、各試験区(非照射区、30kGy照射区、660kGy照射区)における当該産生量の相対的比を意味する。

【0059】

表2に示すように、放射線処理したクラゲから調製したコラーゲンの存在下でヒト型八

50

イブリドーマHB4C5細胞を培養することによって、放射線照射処理しないクラゲコラーゲンの存在下で培養する場合に比して、添加蛋白質あたりの免疫グロブリン(IgM)の産生量、すなわち比活性が10倍以上上昇していることが明らかになった(言い換えれば、1/10より少ない量の放射線処理コラーゲんで、放射線非照射コラーゲンと同じIgM産生量を得ることができる)。

【0060】

実験例3

リンパ球ハイブリドーマとしてヒト型ハイブリドーマHB4C5細胞を用い、これを実施例4で調製した30kGy放射線処理キトサンの存在下で培養した。また比較対照として、放射線処理したキトサンに代えて放射線処理しないキトサンの存在下で、またコントロールとしてキトサン非存在下で、同様にヒト型ハイブリドーマHB4C5細胞を培養した。

10

【0061】

具体的には、 5×10^4 cells/mlのヒト型ハイブリドーマHB4C5細胞を、培養容量に対する添加量が0.1~50%となる割合で放射線処理キトサン水溶液を含む基本合成培地ERDF(インスリン10µg/ml、トランスフェリン20µg/ml、エタノールアミン20µM、亜セレン酸ナトリウム25nMを含む)中で、37℃、炭酸ガス体積5% - 空気95体積%の雰囲気下、湿度100%の条件下にて、6時間培養した。培養後、培地中に生成した免疫グロブリン(IgM抗体)の量を、抗ヒトIgMおよびペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgMを用いた酵素抗体法(ELISA法)によって測定した。

20

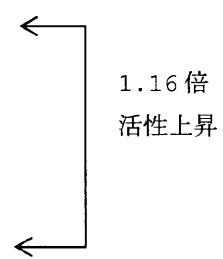
【0062】

その結果を表3に示す。

【0063】

【表3】

	添加量 (%)	IgM 産生量 (ng/ml)	活性
コントロール	0	11.0 ± 0.87	1.0
非照射キトサン	50	9.0 ± 0.70	0.8
	10	21.2 ± 0.63	1.9
	2	19.6 ± 2.90	1.8
	0.4	13.3 ± 1.23	1.2
	0.08	11.6 ± 0.68	1.1
30kGy 照射	50	10.8 ± 0.96	1.0
	10	24.4 ± 2.78	2.2
	2	18.7 ± 0.89	1.7
	0.4	16.4 ± 1.60	1.5
	0.08	14.6 ± 0.78	1.3



30

40

なお、表中「活性」は、コントロール(無添加)区での免疫グロブリン(IgM抗体)産生量に対する、各試験区(非照射区、30kGy照射区)における当該産生量の相対的比を意味する。

【0064】

表3に示すように、放射線処理キトサンの存在下でヒト型ハイブリドーマHB4C5細胞を培養することによって、放射線処理しないキトサンの存在下で培養する場合に比して、免疫グロブリン(IgM)の産生量が1.16倍上昇していることが明らかになった。

【0065】

実験例4

リンパ球ハイブリドーマとしてヒト型ハイブリドーマHB4C5細胞を用い、これを実

50

施例 3 で調製した 30 kGy 放射線処理キチンの存在下で培養した。また比較対照として、放射線処理したキチンに代えて放射線処理しないキチンの存在下で、またコントロールとしてキチン非存在下で、同様にヒト型ハイブリドーマ HB 4 C 5 細胞を培養した。

【 0 0 6 6 】

具体的には、 5×10^4 cells/ml のヒト型ハイブリドーマ HB 4 C 5 細胞を、培養容量に対する添加量が 0.1 ~ 50 % となる割合で放射線処理キチン水溶液を含む基本合成培地 ERDF (インスリン $10 \mu\text{g/ml}$ 、トランスフェリン $20 \mu\text{g/ml}$ 、エタノールアミン $20 \mu\text{M}$ 、亜セレン酸ナトリウム 25nM を含む) 中で、37 °C、炭酸ガス体積 5 % - 空気 95 体積 % の雰囲気下、湿度 100 % の条件下にて、6 時間培養した。培養後、培地中に生成した免疫グロブリン (IgM 抗体) の量を、抗ヒト IgM およびペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgM を用いた酵素抗体法 (ELISA 法) によって測定した。

10

【 0 0 6 7 】

その結果を表 4 に示す。

【 0 0 6 8 】

【 表 4 】

	添加量 (%)	IgM 産生量 (ng/ml)	活性
コントロール	0	10.3 ± 1.18	1.0
非照射キチン	50	4.4 ± 0.47	0.4
	10	7.8 ± 0.51	0.7
	2	8.5 ± 0.87	0.8
	0.4	7.8 ± 0.67	0.8
	0.08	8.0 ± 0.66	0.8
30kGy 照射	50	10.0 ± 0.55	1.0
	10	11.3 ± 0.29	1.1
	2	12.8 ± 0.22	1.2
	0.4	10.1 ± 0.39	1.0
	0.08	9.6 ± 0.34	0.9



1.2倍
活性上昇

20

30

なお、表中「活性」は、コントロール(無添加)区での免疫グロブリン(IgM 抗体)産生量に対する、各試験区(非照射区、30kGy 照射区)における当該産生量の相対的比を意味する。

【 0 0 6 9 】

表 4 に示すように、放射線処理していないキチンにはヒト型ハイブリドーマ HB 4 C 5 細胞の IgM 産生を促進する効果はなかったものの、放射線処理キチンの存在下でヒト型ハイブリドーマ HB 4 C 5 細胞を培養することによって、コントロール培地で培養する場合に比して、免疫グロブリン (IgM) の産生量が 1.2 倍上昇していることが明らかになった。

40

フロントページの続き

- (72)発明者 長澤 尚胤
群馬県高崎市綿貫町1 2 3 3 独立行政法人 日本原子力研究開発機構高崎量子応用研究所内
- (72)発明者 廣木 章博
群馬県高崎市綿貫町1 2 3 3 独立行政法人 日本原子力研究開発機構高崎量子応用研究所内
- (72)発明者 八木 敏明
群馬県高崎市綿貫町1 2 3 3 独立行政法人 日本原子力研究開発機構高崎量子応用研究所内
- (72)発明者 吉井 文男
群馬県高崎市綿貫町1 2 3 3 独立行政法人 日本原子力研究開発機構高崎量子応用研究所内
- (72)発明者 玉田 正男
群馬県高崎市綿貫町1 2 3 3 独立行政法人 日本原子力研究開発機構高崎量子応用研究所内
- (72)発明者 武田 啓二
埼玉県鶴ヶ島市上広谷7 9 4 - 6 2 株式会社フィットイン内
- (72)発明者 飯島 猛斗
埼玉県鶴ヶ島市上広谷7 9 4 - 6 2 株式会社フィットイン内
- (72)発明者 辻田 純二
埼玉県鶴ヶ島市上広谷7 9 4 - 6 2 株式会社フィットイン内
- Fターム(参考) 4B064 AG27 CA20 CC24 CD19 CD20 DA01
4B065 AA94X AB06 BB02 BB12 BB18 BB19 BC03 BC07 CA25 CA44
4C084 AA06 CA18 DC50 NA14 ZB07
4C085 AA33 CC03 DD23 DD24 DD61 EE01