

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4719326号
(P4719326)

(45) 発行日 平成23年7月6日(2011.7.6)

(24) 登録日 平成23年4月8日(2011.4.8)

(51) Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 35/18	(2006.01)	A 6 1 K 35/18	
A 6 1 K 35/14	(2006.01)	A 6 1 K 35/14	C
A 6 1 P 31/04	(2006.01)	A 6 1 P 31/04	
G O 1 N 33/48	(2006.01)	G O 1 N 33/48	B

請求項の数 2 (全 5 頁)

<p>(21) 出願番号 特願平8-215552</p> <p>(22) 出願日 平成8年8月15日(1996.8.15)</p> <p>(65) 公開番号 特開平10-59854</p> <p>(43) 公開日 平成10年3月3日(1998.3.3)</p> <p>審査請求日 平成15年2月6日(2003.2.6)</p> <p>審判番号 不服2008-8977(P2008-8977/J1)</p> <p>審判請求日 平成20年4月10日(2008.4.10)</p>	<p>(73) 特許権者 596120566 松元 司 東京都大田区大森中2-1-20 エステ シオン大森803</p> <p>(74) 代理人 100068700 弁理士 有賀 三幸</p> <p>(74) 代理人 100077562 弁理士 高野 登志雄</p> <p>(74) 代理人 100096736 弁理士 中嶋 俊夫</p> <p>(74) 代理人 100101317 弁理士 的場 ひろみ</p> <p>(72) 発明者 松元 司 東京都大田区大森中2-1-20 エステ シオン大森803</p> <p style="text-align: right;">最終頁に続く</p>
---	---

(54) 【発明の名称】 赤血球の分画法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

血液をデキストランの5～10w/v%生理食塩水溶液と混合して60～75分静置することにより血液を3層に分離せしめ、赤血球及び白血球を含有する上層を採取し、上層を遠心分離して、沈澱した血球成分を取得し、これを低張液で30秒程度処理した後高張液を加えることを特徴とする抗菌性赤血球含有画分の製造法。

【請求項2】

血液をデキストランの5～10w/v%生理食塩水溶液と混合して60～75分静置することにより血液を3層に分離せしめ、赤血球及び少量の白血球を含有する中間層を採取することを特徴とする細菌増殖抑制性を有する、赤血球含有画分の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は血液中の赤血球をそれぞれ機能の異なる画分に分離する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来、血球成分のうち赤血球については、酵素及び二酸化炭素の急速かつ大量運搬という役割については知られているが、その他の機能についてはほとんど知られていない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、血液中の血球の大部分を占める赤血球の新たな機能を見出すこと、及びその研究のための材料として利用可能な赤血球の機能による分画方法を提供することを目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】

そこで本発明者は血液中の赤血球をいくつかに分画するべく種々検討した結果、血液にデキストランを加えて一定時間放置すると血液が3層に分離し、当該3層に含まれる赤血球は細菌に対してそれぞれ異なる作用をすることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0005】

すなわち、本発明は、血液をデキストランの5～10w/v%水溶液又は生理食塩水溶液と混合して60～75分静置することにより血液を3層に分離せしめ、赤血球及び白血球を含有する上層、赤血球及び少量の白血球を含有する中間層並びに赤血球を含有する下層をそれぞれ採取し、上層については低張液で短時間処理した後高張液を加えることを特徴とする血液を3種の赤血球含有画分に分画する方法を提供するものである。

10

【0006】

また、本発明は、血液をデキストランの5～10w/v%水溶液又は生理食塩水溶液と混合して60～75分静置することにより血液を3層に分離せしめ、赤血球及び白血球を含有する上層を採取し、低張液で短時間処理した後高張液を加えることを特徴とする抗菌性赤血球含有画分の製造法を提供するものである。

【0007】

20

また、本発明は、血液をデキストランの5～10w/v%水溶液又は生理食塩水溶液と混合して60～75分静置することにより血液を3層に分離せしめ、赤血球及び少量の白血球を含有する中間層を採取することを特徴とする細菌増殖抑制性赤血球含有画分の製造法を提供するものである。

【0008】

【発明の実施の形態】

本発明は、血液中の赤血球をそれぞれ異なる機能を有する3種の画分に分画するものであり、まず、本発明においては血液(全血)をデキストラン水溶液と混合する。ここで用いられるデキストラン水溶液としては、デキストランの5～10w/v%水溶液又は生理食塩水溶液が好ましく、デキストランの5～10w/v%生理食塩水溶液がより好ましく、デキストランの5～8w/v%生理食塩水溶液が特に好ましい。また、血液に対するデキストラン水溶液の添加量は、血液の1～2倍量、特に1.5倍量が好ましい。血液とデキストラン水溶液の混液は、よく攪拌した後60～75分間静置すると、3層に分離する(上層、中間層及び下層)。

30

【0009】

上層をピペット等により分取し、低張液で短時間処理した後高張液を加えることにより、抗菌活性を示す赤血球を含有する画分が得られる。より詳細には、上層を遠心分離等に行うことにより血球成分を取得する。次いで、当該血球成分に低張液を加えて短時間後に高張液を加えて、等張液とする。ここで、低張液としては、例えばサポニン水溶液が好ましく、高張液としては低張液を等張にできるものであれば制限されない。血球成分を低張液中におく時間は30秒程度が好ましい。低張液処理時間が短すぎると、得られる赤血球の抗菌性が発現せず、長すぎると溶血が進行しすぎ、赤血球が少なくなってしまう。

40

【0010】

中間層及び下層は、それぞれピペット等で採取すればよい。

【0011】

かくして得られた、3種の赤血球画分は、それぞれRPMI-1640、MEM、BME、HAMF12、MCDB104、MCDB153などの液体培地中に添加して、細菌に対する作用の観察、その他各種の研究に利用することができる。前記低張液処理された上層に細菌を接種して観察したところ、当該上層中には白血球も含まれているが白血球は何ら細菌に対して作用せず、赤血球が細菌に対して攻撃し、抗菌作用を示すことが判明した。

50

また、中間層に細菌を接種して観察したところ、細菌の増殖が有意に抑制された。一方、下層についても同様の試験をしたが、この層には細菌に対する作用は認められなかった。

【0012】

【実施例】

次に実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれに何ら限定されるものではない。

【0013】

実施例

健常人の新鮮血10mlにデキストラン溶液〔デキストラン70（東京化成製）7.0gを100ml生理食塩水に溶解した液〕15mlを加え、ピペットでよく攪拌した後、60～75分間静置した。血液は、上層、中間層、下層の3層に分離した。

10

【0014】

上層を遠心分離して、沈澱した血球成分（赤血球及び白血球）を取得した。これに低張液（RLB，原宿クリニック製）30mlを加え、30秒後高張液（BELMAR，原宿クリニック製）10mlを加えた。これを遠心分離に付し、血球成分を採取し、RPMI-1640 3mlを加えた（サンプルA）。

【0015】

中間層をピペットで4滴とり、これにRPMI-1640 3mlを加えた（サンプルB）。

【0016】

下層をピペットで1滴とり、これにRPMI-1640 3mlを加えた（サンプルC）。

20

【0017】

試験例

サンプルA、B及びCに緑膿菌をそれぞれ少量接種し、室温で5～6時間放置し、次いで37℃で5%CO₂条件下にインキュベートした。その後、顕微鏡下にサンプルA、B及びCの細菌に対する作用を観察した。

【0018】

サンプルA中には、赤血球の他に白血球が存在することが顕微鏡下でも確認された。また、赤血球は、図1に示すように、種々の形態に変化することが観察された。インキュベート約6時間後、サンプルA中の白血球は細菌に対して何ら積極的に作用せず、これに対し赤血球又は変形赤血球が細菌に対して攻撃するような動きを見せ、細菌を動かなくさせる様子が観察された。

30

【0019】

サンプルB中にも赤血球の他に白血球が少量存在することが顕微鏡下で確認された。また、赤血球の形態変化も観察された。インキュベート約6時間後、サンプルB中の細菌数は、コントロール（RPMI-1640中の細菌数）に比べて有意に減少していた。

【0020】

サンプルC中には、赤血球のみが存在することが顕微鏡下で確認された。また、赤血球の形態変化も観察された。サンプルC中の細菌数は、コントロールと同等であった。

【0021】

【発明の効果】

本発明によれば、赤血球を主成分とし、機能の異なる3種の血液画分に分離することができる。これらの3種の画分は、抗菌性試験、その他の臨床検査等に応用可能である。

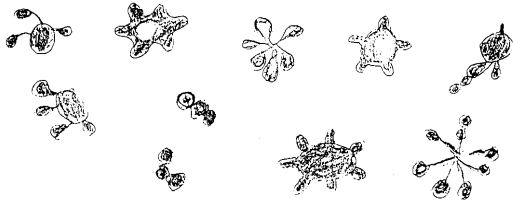
40

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明により得られた画分中の赤血球の形態変化を示す図である。

【図 1】

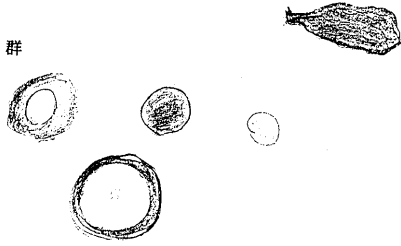
(1) 群



(2) 群



(3) 群



フロントページの続き

合議体

審判長 山口 由木

審判官 伊藤 幸司

審判官 川上 美秀

- (56)参考文献 国際公開第94/25135(WO,A1)
特開昭57-54860(JP,A)
特開昭58-90513(JP,A)
米国特許第4,765,899(US,A)
米国特許第4,224,942(US,A)
特表平7-501328(JP,A)
Enzyme,1977年,Vol.22, No.3,p.176-182
久留米医学会雑誌,1982年,Vol.5, No.5,p.345-359
Microbiol.Immunol.,1991年,Vol.35, No.8,p.615-622

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

A61K35/00-76

G01N33/48

A61M1/02