

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6401712号
(P6401712)

(45) 発行日 平成30年10月10日(2018.10.10)

(24) 登録日 平成30年9月14日(2018.9.14)

(51) Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	35/20	(2006.01)	A 6 1 K 35/20
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P 31/00
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 2 3 L	33/10	(2016.01)	A 2 3 L 33/10

請求項の数 7 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2015-552518 (P2015-552518)	(73) 特許権者	515135918 再生ファーマ株式会社 大阪府守口市大久保町三丁目34番8号
(86) (22) 出願日	平成26年12月11日(2014.12.11)	(74) 代理人	100083301 弁理士 草間 攻
(86) 国際出願番号	PCT/JP2014/082888	(72) 発明者	宇部 義浩 徳島県徳島市南常三島町二丁目1番地 徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部ライフシステム部門内
(87) 国際公開番号	W02015/087981	(72) 発明者	堀 均 徳島県徳島市南常三島町二丁目1番地 徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部ライフシステム部門内
(87) 国際公開日	平成27年6月18日(2015.6.18)		
審査請求日	平成28年12月8日(2016.12.8)		
(31) 優先権主張番号	特願2013-257888 (P2013-257888)		
(32) 優先日	平成25年12月13日(2013.12.13)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ウシ初乳酵素処理物、その製造方法、組成物および飲食品

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ウシ初乳を、ウシ初乳中の総タンパク質濃度を調整するに必要な量の緩衝液の存在下に
- ガラクトシダーゼと接触させる工程を含んでなる、1回の投与用として、0.02 μg ~ 40 mg / kg の範囲のタンパク質を含むマクロファージ活性化作用を示すウシ初乳酵素処理物の製造方法。

【請求項2】

ウシ初乳を、シアリダーゼと接触させる工程をさらに含んでなる、請求項1記載の製造方法。

【請求項3】

ウシ初乳を、ウシ初乳中の総タンパク質濃度を調整するに必要な量の緩衝液の存在下に
- ガラクトシダーゼと接触させる工程を含んでなり、1回の投与用として、0.02 μg ~ 40 mg / kg の範囲のタンパク質を含むマクロファージ活性化作用を示すウシ初乳酵素処理物を含有することを特徴とする医薬組成物の製造方法。

【請求項4】

ウシ初乳を、シアリダーゼと接触させる工程をさらに含んでなる、請求項3記載の医薬組成物の製造方法。

【請求項5】

抗癌用または抗感染症用である、請求項3または4に記載の医薬組成物の製造方法。

【請求項6】

ウシ初乳を、ウシ初乳中の総タンパク質濃度を調整するに必要な量の緩衝液の存在下に
 - ガラクトシダーゼと接触させる工程を含んでなり、1回の投与用として、 $0.02 \mu\text{g} \sim 40 \text{mg} / \text{kg}$ の範囲のタンパク質を含むマクロファージ活性化作用を示すウシ初乳酵素処理物を含有することを特徴とする飲食品用組成物の製造方法。

【請求項7】

ウシ初乳を、シアリダーゼと接触させる工程をさらに含んでなる、請求項6記載の飲食品用組成物の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、癌および感染症などの疾病の治療や予防に有用な、ウシ初乳酵素処理物を含んでなる医薬組成物およびその製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

マクロファージは体内の老廃物の処理や、微生物、ウイルスなどの病原体や腫瘍細胞に対する防御機能を担っている。また、T細胞への抗原の提示とインターロイキン1の産生を介し、細胞性免疫のエフェクターとしての機能も有している。したがって、癌や感染症などの治療や予防にはマクロファージを活性化させることが重要であり、マクロファージの活性化により、癌や感染症の治療や予防を行うことが可能である。

【0003】

マクロファージを活性化する因子としては、例えばインターフェロンが挙げられ、その臨床応用も試みられている。また、ある種の多糖類が免疫賦活活性を有することが知られており、これらの一部は抗ウイルス剤や抗ガン剤としての開発が期待されるものである（特許文献1または2）。

【0004】

ヒト血清の酵素処理物（ - ガラクトシダーゼ、または、 - ガラクトシダーゼとシアリダーゼ）がマクロファージ活性化作用を有することは、特許文献3に記載がある。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特開平05 - 097695号公報

【特許文献2】特公平06 - 099314号公報

【特許文献3】国際公開第2013/038997号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、癌および感染症などの疾病の治療、予防、改善、寛解の維持などに有用な、ウシ初乳酵素処理物、その製造方法、それを含んでなる組成物および各種製品を提供しようとするものである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、鋭意検討した結果、ウシ初乳を特定の酵素、すなわち、 - ガラクトシダーゼ、または、 - ガラクトシダーゼおよびシアリダーゼと接触させ、酵素処理すると、優れたマクロファージ活性化作用を示すことを見出し、さらに検討を重ねて本発明を完成した。

【0008】

すなわち、本発明は、

[1] ウシ初乳を、 - ガラクトシダーゼと接触させる工程を含んでなる、ウシ初乳酵素処理物の製造方法、

[2] ウシ初乳を、シアリダーゼと接触させる工程をさらに含んでなる、上記[1]記載

10

20

30

40

50

の製造方法、

[3] 上記 [1] または [2] 記載の製造方法により得られる、ウシ初乳酵素処理物、
 [4] 1 回の投与用として、 $0.02 \mu\text{g} \sim 40 \text{mg}$ 、好ましくは $0.02 \mu\text{g} \sim 20 \text{mg}$ 、
 より好ましくは $0.2 \mu\text{g} \sim 20 \text{mg}$ 、より好ましくは $2 \mu\text{g} \sim 20 \text{mg}$ 、より好ま
 しくは $20 \mu\text{g} \sim 20 \text{mg}$ 、より好ましくは $200 \mu\text{g} \sim 10 \text{mg}$ 、より好ましくは 200
 $0 \mu\text{g} \sim 2 \text{mg}$ の範囲のタンパク質を含む上記 [3] 記載のウシ初乳酵素処理物、
 [5] 上記 [3] または [4] 記載のウシ初乳酵素処理物を含んでなる医薬組成物、
 [6] 抗癌用または抗感染症用である、上記 [5] 記載の医薬組成物、
 [7] 上記 [3] または [4] 記載のウシ初乳酵素処理物を含んでなる飲食品用組成物、
 [8] 上記 [7] 記載の飲食品用組成物を含んでなる飲食品、

10

に関する。

【発明の効果】

【0009】

本発明の、ウシ初乳酵素処理物は、優れたマクロファージ活性化作用、特に腸管マクロ
 ファージの活性化作用を有するので、癌や感染症などの疾病の治療や予防に有用であり、
 抗癌剤、抗感染症剤などとして用いることができる。

【0010】

また、該ウシ初乳酵素処理物を用いれば、上記疾病の予防、改善、寛解の維持などに有
 用な医薬部外品、並びに、飲食品用組成物および飲食品を提供することができる。

【0011】

さらに、本発明に係るウシ初乳酵素処理物は、ウシ初乳を - ガラクトシダーゼ、また
 は、 - ガラクトシダーゼおよびシアリダーゼで処理することによって調製できるため、
 簡便かつ低コストであるという利点を有する。

20

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】 ギムザ染色したマクロファージの様子を示す図面代用写真である。

【図2】 各検体の、 0.5% オプソニン化SRBCを用いたマクロファージ貪食能活性に
 ついての結果を示すグラフである。

【図3】 電気泳動の結果を示す図面代用写真である。

【発明を実施するための形態】

30

【0013】

<ウシ初乳>

本発明で使用するウシ初乳とは、子牛の分娩後、母牛が10日目までに分泌する乳汁を
 いい、好ましくは7日目まで、より好ましくは5日目までに分泌する乳汁である。本発明
 において、ウシ初乳は、ホルスタイン種、黒毛和種などのウシの種類にかかわらず、いず
 れの種のものをも使用することができる。

【0014】

<酵素>

本発明で使用する - ガラクトシダーゼは、特に限定なく、周知のいずれの種類のもの
 も使用することができる。そのようなものとしては、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*)
) 由来のもの、ウシ肝臓 (bovine liver) 由来のものなどがあげられる。市販されたもの
 としては、例えば、和光純薬工業 (株) のカタログ No. 072-04141、SIGMA
 A - ALDRICH社のG1875などが挙げられる。

40

本発明において、 - ガラクトシダーゼは、単独で用いてもよく、2種以上を組み合わせ
 せて用いてもよい。

【0015】

本発明で使用するシアリダーゼは、特に限定なく、周知のいずれの種類のものも使用す
 ることができる。そのようなものとしては、例えば、ウェルシュ菌 (*Clostridium perfrin*
genes) 由来のもの、レンサ球菌 (*Streptococcus 6646K*) 由来のもの、コレラ菌 (*Vibri*
o cholerae) 由来のもの、アースロバクター・ウレアファシエンス (*Arthrobacter ureaf*

50

aciens)由来のものなどがあげられる。市販されたものとしては、例えば、SIGMA - ALDRICH社の製品番号 (Sigma Prod. Nos.) N 2 8 7 6、N 2 1 3 3、N 2 9 0 4、N 3 0 0 1、N 5 6 3 1、生化学バイオビジネス社のコード番号 (Code Number) 1 2 0 0 5 2、Bio Labs社のカタログ番号 (Catalog#) P 0 7 2 0 L、P 0 7 2 0 Sなどがあげられる。

本発明において、シアリダーゼは、単独で用いてもよく、2種以上を組み合わせ用いてもよい。

【0016】

< 酵素処理 >

本発明において、ウシ初乳と、 α -ガラクトシダーゼ若しくはシアリダーゼとの接触 (酵素処理) は、それぞれ、十分な量の酵素を用いて十分な時間接触させることにより、それ以上実質的に酵素反応が進行しない程度まで行うのが好ましい。このような目的には、酵素の種類にもよるが、例えば、 α -ガラクトシダーゼとして和光純薬工業 (株) のカタログ No. 0 7 2 - 0 4 1 4 1 を用いる場合、ウシ初乳 1 0 0 μ l に対して、酵素を 6 5 m U 使用すれば十分である。また、例えば、シアリダーゼとして SIGMA - ALDRICH 社の製品番号 (N 2 8 7 6) を用いる場合、ウシ初乳 1 0 0 μ l に対して、酵素を 6 5 m U 使用すれば十分である。この場合の酵素処理の時間としては、3時間行えば十分である。

【0017】

酵素処理は、任意の容器中で、これら酵素を、ウシ初乳に添加して実施することができるが、所望により、ウシ初乳中の総タンパク質濃度を調整するために、この分野で通常用いられる緩衝液を加えてもよい。そのような緩衝液としては、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水 (SPB)、リンゲル液などが挙げられる。

酵素処理の温度は、酵素が活性を示す温度であれば特に限定はないが、通常酵素が高い活性を示す 3 7 付近の温度である。

【0018】

酵素処理は、加熱 (熱処理) により、酵素を失活させることにより終了する。かかる熱処理は、酵素を失活させることができる限り特に限定されないが、例えば、6 0 付近の温度で、約 1 0 分間加熱することにより、実施することができる。

熱処理後の検体は、所望により、濃縮してもよい。当該濃縮は、市販の機器、例えば遠心濃縮器 (例えば、MILLIPORE社製の 1 0 0 0 0 M W C O Y M - 1 0) を用いて行うことができる。

【0019】

また、酵素処理は、固相に固定した酵素 (固定化酵素) を用いて行うこともできる。酵素を固相に固定させる方法は、当業者に知られており、例えば、 α -ガラクトシダーゼおよび/またはシアリダーゼを、シアンプロマイドの如きカップリング剤により、アガロースビーズに固定することができる。そのような固定化酵素としては、例えば、イモビライズド α -ガラクトシダーゼ G 3 M (M o B i T e c 社、# A 3 1 0 2)、ノイラミニダーゼアガロース *Clostridium perfringens* (ウェルシュ菌) 由来 (SIGMA - ALDRICH社製、製品番号 (Product Number): N 5 2 5 4) などが市販されている。固定化酵素を用いる利点は、酵素処理後、酵素を熱処理により失活させることなく回収することが可能なこと、および、そのような回収により夾雑物 (熱処理により失活した酵素などのタンパク質等) の存在を減じることができることである。

【0020】

< ウシ初乳酵素処理物 >

こうして得られる本発明のウシ初乳酵素処理物は、さらに、凍結乾燥して、固体ないし粉体状としてもよい。このようなウシ初乳酵素処理物は、癌や感染症などの疾病の治療、予防、改善、寛解の維持などに有用な、新規組成物である。

【0021】

10

20

30

40

50

< 医薬組成物、医薬品 >

本発明のウシ初乳酵素処理物は、そのまま、もしくは、適宜、薬学的に許容しうる補助剤（担体）を配合することにより、医薬組成物として調製することができる。このような薬学的に許容し得る補助剤としては、この分野で通常用いられるものをいずれも好適に使用することができ、具体例としては、例えば、希釈剤、安定剤、保存剤、緩衝剤、賦形剤、結合剤、防腐剤、崩壊剤、滑沢剤、矯味剤等が挙げられる。これら補助剤は、医薬組成物の剤型に応じて、適宜配合される。

【 0 0 2 2 】

本発明の医薬組成物は、適当な剤型に製剤化して、医薬品とすることができる。そのような剤型としては特に制限されず、経口製剤であっても非経口製剤であってもよい。非経口製剤としては、注射剤、輸液剤、点鼻剤、点耳剤、坐剤、経腸栄養剤などが挙げられる。例えば、注射剤としては、静脈内注射、皮下注射、皮内注射、筋肉内注射、腹腔内注射などの投与形態のものが挙げられ、このうち、筋肉内注射が好ましい。一方、経口製剤としては、散剤、顆粒剤、錠剤（舌下錠などを含む）、カプセル剤、丸剤、腸溶剤、内用液剤（懸濁剤、乳剤、シロップ剤などを含む）、吸入剤などが挙げられる。

【 0 0 2 3 】

本発明のウシ初乳酵素処理物の投与量は、投与対象の年齢、性別、体重および症状、投与方法などにより異なるが、典型的な例としては、例えば、本ウシ初乳酵素処理物に含まれるタンパク質の総量として、1回の投与あたり、体重1kgあたり、約0.02μg以上、好ましくは約0.2μg以上、より好ましくは約2μg以上、より好ましくは約20μg以上、より好ましくは約200μg以上であり、かつ、約40mg以下、好ましくは約20mg以下、より好ましくは約13mg以下、より好ましくは約10mg以下、より好ましくは2mg以下である。好ましい投与量の範囲としては、例えば、約0.02μg～約40mg、好ましくは約0.02μg～約20mg、より好ましくは約0.2μg～約20mg、より好ましくは約2μg～約20mg、より好ましくは約20μg～約20mg、より好ましくは約200μg～約10mg、より好ましくは約200μg～約2mgである。他の好ましい範囲としては、約1mg～約40mg、好ましくは約2mg～約20mg、さらに好ましくは約3mg～約13mgの範囲にあるのがよい。なお、本明細書において、タンパク質の量は、波長570nmでの吸光度により決定したタンパク質濃度をもとに、算定するものである。

【 0 0 2 4 】

本発明の医薬組成物を、上記の如き1回あたりの投与量で投与する場合の、典型的な投与間隔および投与回数としては、1～2回/日である。なお、投与量および投与間隔は、医薬組成物中に含まれるタンパク質の総量を指標として、投与されるタンパク質の総量が同等となるような範囲内で、適宜変更することができる。

【 0 0 2 5 】

本発明の医薬組成物は、マクロファージ活性化作用を有する。したがって、本発明の医薬組成物は、これら作用によって治療または予防しうる疾病の治療剤または予防剤として使用することができる。このような疾病としては、癌や感染症があげられる。

【 0 0 2 6 】

癌としては、癌腫（carcinoma）、肉腫（sarcoma）、その他の悪性腫瘍（malignant tumor）のいずれをも含むものであり、例えば、皮膚癌、気管支癌、肺癌、非小細胞肺癌、乳癌、卵巣癌、舌癌、咽頭癌、食道癌、胃癌、小腸癌、大腸癌、直腸癌、結腸癌、肝癌、膵臓癌、腎臓癌、腎細胞癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、ウィルムス腫瘍、悪性黒色腫、髄膜腫、神経芽腫、骨肉腫、カポジ肉腫、リンパ腫、白血病などが挙げられる。なお、本明細書において、用語「癌」は、これら悪性腫瘍の他、その転移をも含むものである。

【 0 0 2 7 】

また、感染症としては、例えば、ウイルス感染症、細菌感染症などが挙げられ、具体的には、HIV感染症、エイズその他、B型肝炎、C型肝炎、ヘルペス、インフルエンザ、肺

10

20

30

40

50

炎、結核、EBウイルス感染症などが挙げられる。

【0028】

本発明の医薬組成物は、他の抗癌剤や抗感染症剤とともに併用することができる。併用する場合には、当該他の薬剤の効能、効果、投与量を考慮の上、本発明の医薬組成物の投与量を適宜調節する。

【0029】

<医薬部外品>

本発明のウシ初乳酵素処理物は、上記の如き医薬品としてだけでなく、医薬部外品として調製することもできる。当該医薬部外品には、必要に応じて、上記補助剤等を配合することができる。また、医薬部外品は、溶液状、懸濁液状、シロップ状、顆粒状、クリーム状、ペースト状、ゼリー状等の種々の形態をとり得るものであり、必要に応じ、所望の形状に成形することもできる。医薬部外品として使用する場合のウシ初乳酵素処理物の使用量は、特に限定されるものではないが、上記医薬品の場合の投与量を参考にして、適宜、設定することができる。

10

【0030】

<飲食品用組成物、飲食品>

本発明のウシ初乳酵素処理物は、必要に応じて、上記補助剤や、甘味料、香辛料、調味料、防腐剤、保存料、殺菌剤、酸化防止剤などの飲食品に通常用いられる各種添加剤を適宜配合することにより飲食品用組成物とすることができ、さらには、該飲食品用組成物をさらに加工して、これを含んでなる飲食品とすることができる。該飲食品用組成物または飲食品は、溶液状、懸濁液状、シロップ状、顆粒状、クリーム状、ペースト状、ゼリー状等の種々の形態をとり得るものであり、必要に応じ、所望の形状に成形することもできる。また、該飲食品は、パン、麺、菓子、飲料、スープ、加工食品など様々な形態をとることができる。飲食品用組成物および飲食品の調製はいずれも常法にのっとり実施することができる。

20

【0031】

本発明のウシ初乳酵素処理物は、上記の如き疾病に効果を奏するものであるので、本発明の飲食品用組成物や飲食品は、このような疾病の予防、改善、寛解の維持などに効果を発揮し得る。この場合において、本発明の飲食品用組成物または飲食品におけるウシ初乳酵素処理物の使用量は、特に限定されるものではないが、上記医薬品の場合の投与量を参考にして、適宜、設定することができる。ウシ初乳酵素処理物の使用量の好ましい具体例としては、例えば、1回の飲食あたり、体重1kgあたり、約1mg～約40mg、好ましくは約2mg～約20mg、さらに好ましくは約3mg～約13mgの範囲である。

30

【0032】

かかる本発明の飲食品は、いわゆる健康食品、健康飲料、特定保健用食品、機能性食品、栄養補助食品（サプリメント）であったり、その他人以外の動物に対する飼料であり得る。

【0033】

このような本発明の医薬品、医薬部外品、および飲食品は、活性成分であるウシ初乳酵素処理物を、消化管内、好ましくは口腔内または腸管内から吸収させる形態（例えば、上述の舌下錠や腸溶剤の形態）であることが好ましい。口腔内または腸管内のマクロファージを直接活性化する効果が期待できるからである。特に、腸管関連リンパ組織（GALT: gut-associated lymphoid tissue）には、そのパイエル板に、体内最大と言われる豊富な数のマクロファージが存在することが知られている。

40

【実施例】

【0034】

実施例にもとづいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらだけに限定されるものではない。

【0035】

1. ウシ初乳酵素処理物の調製（1）

50

固体のウシ初乳 (Now Foodsの「Colostrum Powder」) 1 mgを、1 mlの1×PBSで溶解し、その初乳液100 µlに、ガラクトシダーゼ (和光純薬工業 (株) 製、カタログNo. 072-04141, 10 mU/µl) 6.5 µl、シアリダーゼ (SIGMA-ALDRICH社製, N2876, 10 mU/µl) 6.5 µl、および100 mM SPB (15.601 gのNaH₂PO₄・2H₂Oおよび35.814 gのNa₂HPO₄・12H₂Oを、500 mlの蒸留水に溶解して、200 mM SPB (pH 7.0) を調製し、これを希釈して、100 mM SPBとした。) 87 µlを加え、37 °Cで3時間インキュベートした。インキュベート後、100 mM SPBをさらに200 µl加え、60 °Cで10分間、熱処理した。熱処理後、マイクロコン (10000 MWCO YM-10、MILLIPORE社) で濃縮し、タンパク質濃度を、波長570 nmでの吸光度測定により決定したところ (BSA (bovine serum albumin、SIGMA, A4503) について作成した検量線を使用)、1.08 µg/µlであった (検体1)。

10

【0036】

かかる検体1を、100 mM SPBを用いて希釈し、タンパク質濃度がそれぞれ、1 ng/10 µl (検体1-1)、10 ng/10 µl (検体1-2)、100 ng/10 µl (検体1-3) である各検体を調製した。

【0037】

一方、酵素処理する前の初乳について、タンパク質濃度を同様に決定したところ、14.41 µg/µlであった (比較検体1)。該比較検体1を、100 mM SPBを用いて希釈し、タンパク質濃度がそれぞれ、1 ng/10 µl (比較検体1-1)、10 ng/10 µl (比較検体1-2)、100 ng/10 µl (比較検体1-3) である各検体を調製した。

20

【0038】

2. マクロファージ貪食能活性 (1)

マウス (8週齢、ICR系雌性、日本エスエルシー (株)) を頸椎脱臼し、腹部の外皮を剥ぎ、内臓を傷つけないようにして、腹腔にリン酸緩衝生理食塩水 (PBS: 0.01 Mのリン酸ナトリウム、0.9%のNaClおよび5単位/mlのヘパリンを含有する) を10 mlを注入した。腹部を1分程度タッピングした後、腹腔液を回収し、腹膜細胞を収集した。回収した腹腔液を遠心 (1500 rpm, 4 °C, 15分) した後、上清を破棄しRPMI培地を加え、ピペッティングした。Burker-Turk型血球計算盤で細胞数を計測し、 1.0×10^6 cells/mlになるように、さらにRPMI培地を加えて調整した。なお、RPMI培地は以下の操作にて調製した。すなわち、クリーンベンチ内で、粉末培地 (GIBCO社製、カタログ番号: 856846) を精製水900 mlに溶解した後、さらに2 gのNaHCO₃を溶解した。混合物を、1 N HClでpH 7.2に調整した後、精製水を用いて全量を1000 mlとした。こうして得た溶液をフィルター (MILLIPORE、SLGVJ13SL) にて濾過したものをRPMI培地とし、使用時まで、4 °Cで保管した。

30

【0039】

滅菌したカバーガラス (MATSUNAMI, micro cover glass, No. 1) をウェル毎に3枚ずつ入れた24穴プレート (TPP, 92024) に、上記で得たマクロファージ溶液を、500 µl/well (5.0×10^5 cells/well) 分注し、各ウェルにさらにRPMI培地500 µl/wellを加え、全体として1 ml/wellになるようにした。かかるプレートを、37 °Cで、1時間インキュベーションした後、各ウェル内の液を破棄し、RPMI培地1 mlで、各ウェルを2回洗浄した。洗浄後、さらにRPMI培地1 mlを各ウェルに加え、37 °Cで、15時間インキュベートした。

40

【0040】

インキュベート後、各ウェルに、上記で調製した検体1-1~1-3、および、比較検体1-1~1-3を、それぞれ10 µl加えた。37 °Cで、3時間インキュベートして、

50

マクロファージを刺激した。インキュベート後、各ウェルの溶液部分を破棄し、0.5% オプソニン化SRBC（ヒツジ赤血球，（株）日本生物材料センター）1mlを加え、37℃で、90分間インキュベートし、マクロファージに貪食させた。貪食後、順次1/5×PBS，1×PBS，1×PBSを用いて、カバーガラスを洗浄し、約30分間風乾した。風乾後、各カバーガラスを、メタノール（関東化学（株），25183-2B）に1分程度浸し、メタノール固定した。該固定後、再び約30分間風乾し、PBSで20倍希釈したギムザ液（SIGMA，A1327）で、1時間染色した。染色後、水道水でカバーガラスの裏側から洗浄し、一晚風乾した。

【0041】

風乾後、スライドガラス（MATSUNAMI，micro slide glass，S2215）にカバーガラスを裏返して貼り付けた。光学顕微鏡（Nikon ECLIPSE E200）にてカバーガラス1枚につき9点写真を撮り、観察される全マクロファージ数、貪食されたSRBC数、貪食したマクロファージ数をカウントし、9点分の計測値を合計し、計測された全マクロファージのうちSRBCを貪食したマクロファージの割合に、1つのマクロファージの平均貪食数を掛けたものを摂食指数（ingestion index）として算出した。なお、参考までに、図1に、「貪食しているマクロファージ」および「貪食されているSRBC」の様子を表す、ギムザ染色後の写真を示す。ギムザ染色によってマクロファージは紫色の球体として、SRBCは透明の球体として観察されている。マクロファージに接触しているSRBCを貪食されたSRBC、SRBCに接触しているマクロファージを貪食したマクロファージとして、摂食指数を算出した。

【0042】

各検体について、それぞれのカバーガラスごとに、2ないし3の摂食指数を算出し、その平均値を求めた。コントロールとして、検体若しくは比較検体の代わりにRPMI培地を用いて、上記と同様の操作を行った。なお、2つの摂食指数を求めたのは比較検体1-1および同1-2であり、残りについては3つの摂食指数を算出した。

【0043】

結果を表1（オプソニン化SRBCを用いた、マウス腹腔マクロファージ貪食能活性）および図2に示す。

【0044】

【表1】

表 1

	試験に供したタンパク質量 (ng)	摂食指数 (平均値)
コントロール	0	18.99
比較検体1-1	1	17.12
比較検体1-2	10	17.96
比較検体1-3	100	19.45
検体1-1	1	21.60
検体1-2	10	23.46
検体1-3	100	24.54

【0045】

3. 腸管マクロファージの貪食能活性
(各サンプルの調製)

【0046】

LPSサンプルは、LPS (Lipopolysaccharide, from *Escherichia coli*) (SIGMA社製、L2755)を100mM PBS (pH = 7.0)で100 μ g/mlに希釈して調製した。該LPSサンプルは、文献 (Seminars Immunopathology, 31(2), 178-84, 2009)に記載のとおり腸管マクロファージを活性化するものである。

【0047】

血清サンプルは、未処理ヒト血清を100mM PBS (pH = 7.0)で100 μ g/mlに希釈して調製した。

【0048】

ヒト血清酵素処理物サンプルは、特許文献3 (国際公開第2013/038997号)の方法に従って、ヒト血清を上記ウシ初乳についての方法と同様の方法で処理して得たヒト血清酵素処理物を、100mM PBS (pH = 7.0)で100 μ g/mlに希釈して調製した。

10

【0049】

初乳サンプルは、未処理ウシ初乳を100mM PBS (pH = 7.0)で100 μ g/mlに希釈して調製した。

【0050】

ウシ初乳酵素処理物サンプルは、ウシ初乳酵素処理物を100mM PBS (pH = 7.0)で100 μ g/mlに希釈して調製した。

【0051】

20

(培地の調製)

RPMI培地17mlに、コラゲナーゼD (collagenase D) (Roche, 1108858001) 2mlとディーエヌエースI (DNase I) (Roche, 11284932001) 1mlを溶かし、37 に温め、コラゲナーゼ培地 (collagenase medium)を調製した。

【0052】

(食能活性の測定)

C57BL/6雌マウス(7週齢)に20mg/mlの抱水クロラル (sigma, A2374) 400 μ lを腹腔投与し、麻酔をかけた。マウスの右腹部を切り裂き、腸を露出させ各サンプル(1mg/kg)を投与した後、腹部を閉じた。投与1時間後、再度腹部を切り裂いて腸を露出させ、非標識OVAプロテイン (SIGMA, A5503-1G) およびAF488標識OVAプロテイン (life technologies, O34781)を投与し、腹部を閉じた。投与1時間後、マウスを頸椎脱臼させ、腸を取り出した。取り出した腸を傷つけないようにして脂肪およびパイエル板を除去し、PBSで洗浄した。腸を2cm程度に切断して、37 に温めたFACS緩衝液 (リン酸緩衝生理食塩水 (PBS: 0.01Mのリン酸ナトリウム、0.9%のNaClおよび5単位/mlのヘパリンを含有する) 41.98mlに、FBS (非動化済み) (GIBCO社製、10437) 5mlと、EDTA (ナカライテスク社製、15111-45、500mM) 1mlと、HEPES (MP社製、1688449、1M) 1mlと、ピルビン酸ナトリウム (GIMCO社製、11360-070、100mM) 500 μ lと、硫酸ポリネキシンB (GIMCO社製、21850-029、25mg/ml) 20 μ lと、ペニシリン・ストレプトマイシン (GIMCO社製、15140-122、10,000U/ml) 500 μ l) 50mlに入れ、37 のインキュベーター中にて、スターラーで、20分間攪拌した(250rpm程度)。

30

40

【0053】

攪拌後、腸を取り出し、PBS 30mlで3回洗浄した。10%FBS・RPMI培地を入れた直径10cmの皿に、腸を移した。コラゲナーゼ培地4mlを入れ、腸を切断した。コラゲナーゼ培地11mlを追加し、静置した。浮いてきた泡や脂肪をアスピレーターで除去した。バイアル中の組織片をフラスコに移し、コラゲナーゼ培地5mlでバイアルを洗浄し、洗浄液をフラスコに移した。フラスコを、37 のインキュベーターに入れ

50

、内容物を、1時間攪拌した。攪拌後、フラスコに、0.5 M EDTA (pH = 8.0、PBSで作製) 400 μ l 加え、さらに5分間攪拌した。攪拌後、セルストレーナー (FALCON、352360) を乗せたチューブに上清を移した。一方、組織片に、37 に温めた FACS 緩衝液 10 ml を加え、懸濁した。懸濁液全体をセルストレーナーに通し、上に残ったデブリス (debris) を絞り切った。濾過液を、20、1800 rpm で、10分間遠心分離にかけた。遠心後、上清を取り除き、細胞を分散させた。細胞を40% パーコール (percoll) 10 ml で懸濁し、懸濁液をチューブに移し、キャピラリーを用いて75% パーコール 5 ml を下部に入れ、20、2000 rpm で、チューブを20分間遠心分離にかけた。遠心後、チューブの上部から40% パーコールをアスピレーターで7 ml 程度除去した。除去後、6 ml 程度を、FACS 緩衝液 5 ml の入ったチューブに加え、更に FACS 緩衝液を全量が14 ml になるよう加え、20、1800 rpm で、チューブを10分間遠心分離にかけた。遠心後、上清を除き、FACS 緩衝液 2 ml を入れて懸濁し、1 ml を別のチューブに移した。チューブを、20、1500 rpm で、3分間遠心分離にかけた。

【0054】

遠心後、上清を除去し、FACS 緩衝液 2 ml を加えたのち、さらにパシフィック (PacificTM) 抗マウス F4/80 抗体 (anti-mouse F4/80 Antibody) (Biolegend, 123124)、PE/cy7 抗マウス/ヒト CD11b 抗体 (PE/cy7 anti-mouse/human CD11b Antibody) (Biolegend, 101216)、CD16/32 抗体 (CD16/32 Antibody) (BD, 553141) を加え、4 で反応させた。15分後、上清を除去し、洗浄用バッファー (wash buffer) 2 ml を加え、20、1500 rpm で、3分間遠心分離した。遠心後、1 μ g/ml の7-アミノアクチノマイシン D (sigma, A9400) 溶液 200 μ l を加え、フローサイトメリーで、腸管マクロファージの貪食活性を測定した。

【0055】

(結果)

結果は表2のとおりである。初乳酵素処理物は、血清酵素処理物に比べ、腸管における卵白アルブミン (OVA) 陽性マクロファージの貪食能活性を、より増加させた。

【0056】

【表2】

表 2

サンプル	LPS	血清	血清酵素処理物	初乳	初乳酵素処理物
投与量 (mg/kg)	1	1	1	1	1
OVA 陽性マクロファージ (%)	26.9	2.6	7.2	4.5	25.5

【0057】

4. 初乳酵素処理物と血清酵素処理物における活性タンパク質 (HPA 陽性) の分子量 (検体の調製)

マーカー1は、Novex (登録商標) Sharp Pre-stained Protein Standard (InvitrogenTM, 745065) を用いた。

【0058】

血清は、未処理ヒト血清を100 mM PBS (pH = 7.0) で1 mg/ml に希釈して用いた。

【0059】

血清酵素処理物は、上記と同様にして得たヒト血清酵素処理物を100 mM PBS (pH = 7.0) で1 mg/ml に希釈して用いた。

【0060】

マーカー2はWIDE-VIEW Prestained Protein Size Marker III (Wako社製、230-02461)を用いた。

【0061】

初乳は、未処理ウシ初乳を100mM PBS (pH=7.0)で1mg/mlに希釈して用いた。

【0062】

初乳酵素処理物は、ウシ初乳酵素処理物を100mM PBS (pH=7.0)で1mg/mlに希釈して用いた。

【0063】

上記各検体を蒸留水で1 μ g/ μ lに調製し、各検体5 μ lと、Sample buffer (950 μ lのLaemmli Sample Buffer (BIO-RAD社製、161-0737)に50 μ lの2-メルカプトエタノール (SIGMA社製、A2029)を加える)5 μ lを混合し、100 で10分間熱処理し、泳動用サンプルを得た。

【0064】

泳動ゲル (XV PANTERA GEL, DRC, NXV-381D20) を泳動槽 (ERICA-MP, DRC, XVE-0MPC) にセットし、泳動バッファー (高速SDS-PAGE 泳動バッファー (DRC社製、NXV-BUFPTG) を1000mlの蒸留水で溶解して調製) で泳動槽内を満たした。セットしたゲルの各wellに各泳動用サンプルをアプライし、300Vで泳動した。各泳動サンプルのアプライ量は、レーン1が10 μ l、レーン2と3が1 μ l、レーン4、5、6が5 μ lであった。泳動終了後、ゲル上部を切り捨て、転写装置 (MINICA-MP, DRC, XVE-0MPB) にセットした。メタノール (関東化学 (株)、25183-2B) に1分間浸したPVDF膜 (BIO-RAD, 162-0177) をゲル上に乗せ、47Vで、1時間転写を行った。

【0065】

転写後、膜をTBS-T (8.0gのNaCl、0.2gのKCLおよび3.0gのH₂NC(CH₂OH)₃を、1000mlの蒸留水で溶解してpH7.4に調整し、これに1mlのポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート (WAKO社製、167-11515) を加えて調製) で10分間、3回洗浄した。膜をブロッキング液 (100mgのBSA (bovine serum albumin, SIGMA, A4503) を10mlのTBS-Tで溶解して調製) に浸し、1時間室温で振盪した。膜をTBS-Tで10分間、3回洗浄し、一次抗体HPA (10 μ lのHPAレクチン (Lectin from Helix Pomatia biotin conjugate, lyophilized powder, SIGMA社製、L6512) 1mgを1mlの100mM SPB (pH7.0) で溶解) を10mlのTBS-Tで希釈して調製) に浸し、1時間室温で振盪した。膜をTBS-Tで10分間、3回洗浄し、二次抗体ストレプトアビジン (2 μ lのストレプトアビジン (GE healthcare社製、RPN-1231) を10mlのTBS-Tで希釈して調製) に浸し、1時間室温で振盪した。膜をTBS-Tで10分間、3回洗浄した。

【0066】

プラスチック容器内で膜とECL液 (1mlの検出試薬1 (ECL Western Blotting Detection Reagents, GE healthcare社製、RPN2106V1) に1mlの検出試薬2 (ECL Western Blotting Detection Reagents, GE healthcare社製、RPN2106V2) を加えて調製) を1分間反応させ、Lumicube (リポニクス (株)、5003) により撮影した。撮影後、膜をTBS-Tで10分間、3回洗浄し、CBB染色液 (PAGE Blue 83, コスモバイオ (株)、423406) に10分間浸し、タンパク質のバンドを観察した (図3)。該結果から、血清酵素処理物にお

10

20

30

40

50

る活性タンパク質（H P A 陽性）の分子量は 7 0、5 5、5 1、1 7 k D a と同定されたのに対し、初乳酵素処理物における活性タンパク質（H P A 陽性）の分子量は 2 4 5、8 2 k D a と同定された。

【 0 0 6 7 】

5 . ウシ初乳酵素処理物の調製（ 2 ）

シアリダーゼを使用しなかったこと以外は、ウシ初乳酵素処理物の調製（ 1 ）と同様に処理して、タンパク質濃度がそれぞれ、1 0 n g / 1 0 μ l （検体 2 - 1 ）、1 0 0 n g / 1 0 μ l （検体 2 - 2 ）である各検体を調製した。ポジティブコントロールとして、L P S が 1 μ g / 1 0 μ l の検体を調製した。

【 0 0 6 8 】

6 . マクロファージ貪食能活性（ 2 ）

上記検体を用いて、マクロファージ貪食能活性（ 1 ）と同様にして、摂食指数を求めた。結果を表 3 （オプソニン化 S R B C を用いた、マウス腹腔マクロファージ貪食能活性）に示す。

【 0 0 6 9 】

【表 3】

表 3

	試験に供したタンパク質量 (ng)	摂食指数 (平均値)
コントロール	0	16.17
ポジティブコントロール (LPS)	1000	21.24
検体2-1	10	26.52
検体2-2	100	22.31

【産業上の利用可能性】

【 0 0 7 0 】

本発明によれば、癌および感染症などの疾病の治療、予防、改善、寛解の維持などに有用な、ウシ初乳酵素処理物およびその製造方法を提供することができる。

【符号の説明】

【 0 0 7 1 】

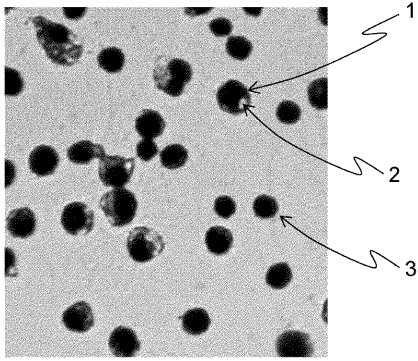
- 1 貪食しているマクロファージ
- 2 貪食されている S R B C
- 3 マクロファージ

10

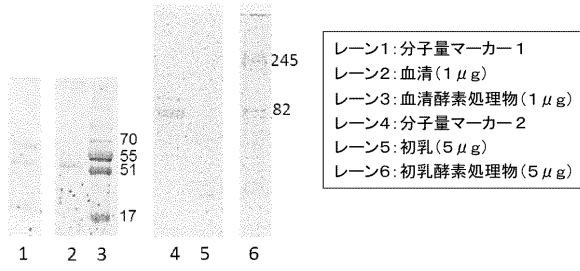
20

30

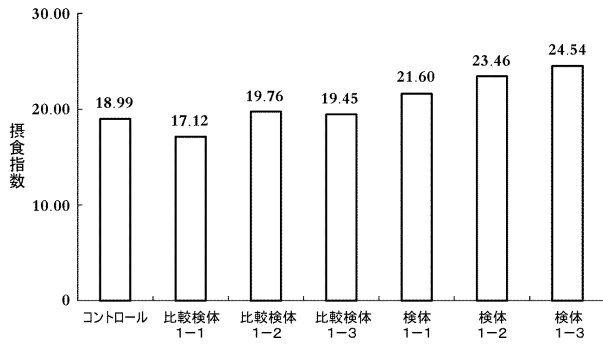
【図1】



【図3】



【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 乾 利夫

大阪府守口市金田町六丁目14番17号 乾がん免疫クリニック内

(72)発明者 久保 健太郎

大阪府守口市大久保町三丁目34番8号 ネイチャー21ビル3階 再生未来クリニック大阪内

審査官 佐々木 大輔

(56)参考文献 特表2005-508892(JP, A)

国際公開第2012/029954(WO, A1)

国際公開第2013/038997(WO, A1)

米国特許第06426109(US, B1)

日本薬学会年会要旨集, 2006.03.06, Vol.126th, No.3, p.51

Milk Science, 2013.08.08, Vol.62, No.2, pp.41-42

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 35/00 - 35/768

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)