



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類 4 C07K 15/04, C12P 21/00 C12N 5/00 // A61K 37/02 (C12P 21:00, C12R 1:91)</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO 90/03397  (43) 国際公開日 1990年4月5日 (05.04.90)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP89/00960 (22) 国際出願日 1989年9月21日 (21. 09. 89)  (30) 優先権データ 特願昭 63-234722 1988年9月21日 (21. 09. 88) JP  (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 明治製菓株式会社 (MEIJI SEIKA KAISHA, LTD.) [JP/JP] 〒104 東京都中央区京橋二丁目4番16号 Tokyo, (JP)  (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 松永啓太 (MATSUNAGA, Keita) [JP/JP] 野尻宙平 (NOJIRI, Chuhei) [JP/JP] 真壁 理 (MAKABE, Osamu) [JP/JP] 長岡行蔵 (NAGAOKA, Kozo) [JP/JP] 〒222 神奈川県横浜市港北区師岡町760 明治製菓株式会社 薬品総合研究所内 Kanagawa, (JP) 厨 信一郎 (KURIYA, Shinichiro) [JP/JP] 緒方清行 (OGATA, Kiyoyuki) [JP/JP] 野村武夫 (NOMURA, Takeo) [JP/JP] 〒113 東京都文京区千駄木1-1-5 日本医科大学内 Tokyo, (JP) 浜口裕之 (HAMAGUCHI, Hiroyuki) [JP/JP] 〒184 東京都小金井市貫井北町1-22-5-102 Tokyo, (JP)</p>	<p>(74) 代理人 弁理士 八木田 茂, 外 (YAGITA, Shigeru et al.) 〒105 東京都港区西新橋1丁目1番15号 物産ビル別館 Tokyo, (JP)  (81) 指定国 AT (欧州特許), BE (欧州特許), CH (欧州特許), DE (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), IT (欧州特許), JP, LU (欧州特許), NL (欧州特許), SE (欧州特許), US. 添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54) Title: NOVEL MEGAKARYOCYTIC COLONY STIMULATING FACTOR AND PROCESS FOR ITS PREPARATION (54) 発明の名称 新規な巨核球系コロニー刺激因子とその製法  (57) Abstract  According to this invention, a novel megakaryocytic colony stimulating factor is obtained by culturing a cell strain of human pulmonary large cell cancer, for example, PC-13 cell strain or human lung cancer cell strain MC-1 separated as monoclonal cells from PC-13 cell strain, recovering a supernatant of the culture liquor, collecting from the supernatant a megakaryocytic colony stimulating factor (Meg-CSF) comprising a protein having the activity of forming a megakaryocytic colony from myeloid cells when applied to human or mouse myeloid cells in vitro and the activity of increasing the number of platelets in the peripheral vessel in vivo, and purifying the factor. The obtained colony stimulating factor is a protein having a molecular weight of 24,000 and an isoelectric point of 4.5 to 5.5, and is useful for treating a certain kind of platelet reducing diseases. This factor can be mixed with conventional various excipients to form medicinal compositions in various preparation forms.</p>		

(57) 要約

本発明においては、ヒト由来の肺大細胞癌の細胞株、例えばPC-13株又はPC-13株から単一クローン細胞として分離されたヒト肺癌細胞株MC-1株を培養し、得られた培養物から培養液上清を回収する。次いで、その培養液上清から、ヒト又はマウスの骨髄細胞に *in vitro* で作用させる時に骨髄細胞から巨核球系コロニーを形成させる活性と *in vivo* で末梢血中の血小板の数を増加させる活性とをもつ蛋白質から成る巨核球系コロニー刺激因子(Meg-CSF)を採取し、精製する。得られた巨核球系コロニー刺激因子物質は分子量24,000及び等電点4.5 ~5.5を有する蛋白質である。本発明による巨核球系コロニー刺激因子物質は、或る種の血小板減少症の治療に有用であり、また慣用の各種の賦形剤との混和により各種の剤型の医薬組成物に製剤できる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT オーストリア	ES スペイン	MG マダガスカル
AU オーストラリア	FI フィンランド	ML マリ
BB バルバドス	FR フランス	MR モーリタニア
BE ベルギー	GA ガボン	MW マラウイ
BF ブルキナ・ファソ	GB イギリス	NL オランダ
BG ブルガリア	HU ハンガリー	NO ノルウェー
BJ ベナン	IT イタリア	RO ルーマニア
BR ブラジル	JP 日本	SD スーダン
CA カナダ	KP 朝鮮民主主義人民共和国	SE スウェーデン
CF 中央アフリカ共和国	KR 大韓民国	SN セネガル
CG コンゴ	LI リヒテンシュタイン	SU ソビエト連邦
CH スイス	LK スリランカ	TD チャード
CM カメルーン	LU ルクセンブルグ	TG トーゴ
DE 西ドイツ	MC モナコ	US 米国
DK デンマーク		

## 明 細 書

## 新規な巨核球系コロニー刺激因子とその製法

技術分野

本発明は、ヒト由来の肺大細胞癌の細胞株を培養して得られた培養液上清から単離された蛋白質から成り且つヒト又はマウスの骨髄細胞に *in vitro* で作用させる時に巨核球系コロニーを形成させる活性をもつと共に、*in vivo* で脾臓中の巨核球を増殖させる活性と末梢血中の血小板を増加させる活性をもつ新規な巨核球系コロニー刺激因子、及びその製法に関する。

背景技術

血小板は、血管の破れで起る出血が自然に停まる止血過程中に起る血栓形成、及び血液凝固の促進に重要な働きを行っている。ヒトにおいて、この血小板は、骨髄幹細胞から、巨核球前駆細胞を経て分化して生成されて骨髄中に存在する巨核球より血流中に放出される。

巨核球系コロニー刺激因子 (Megakaryocyte Colony Stimulating Factor; Meg-CSF と略記される) は健康なヒト又は哺乳動物の血液内に存在しており、しかも骨髄幹細胞及び (又は) 巨核球前駆細胞に働いて、これら細胞の巨核球への分化と巨核球の増殖を促進すると言われている生理活性物質である。その Meg-CSF の活性は *in vitro* でヒト又はマウスの骨髄細胞から巨核球系コロニーを形成する活性について測定される。

現在、巨核球系コロニー刺激因子の活性は、再生不良性貧血患者尿中 (Kawakita, M. et al. 「Blood」 61, 556(1983))、無骨髄巨核球性血小板減少性紫斑病患者の血漿中 (Hoffman, R. et al. 「J. Clin. Invest.」 5 75, 1174(1985))、インゲンマメレクチン (PHA) 刺激ヒト末梢リンパ球の培養液上清中 (Messner, H. A. et al. 「J. Cell Physiol. Suppl.」 1, 45) に発現していることが認められている。しかし、巨核球系コロニー刺激因子を回収し、精製し、医薬品に製剤化しようとする場合には、前記の患者の尿及び血漿等はいずれも、生体材料であること、個体差を示すこと、ウィルス、細菌による感染の可能性があることであり、これらの理由により、均一な材料の形でかつ大量に Meg-CSF の製造用の原料として得ることは困難である。

15 他方、ヒト胎児腎細胞の培養液上清又は血小板減少症患者の血漿から単離されて SDS-PAGE で 15,000 ダルトンの分子量と 5.1 の等電点を有し、巨核球系細胞中の蛋白質合成を促進する活性をもつ巨核球促進因子 (Megakaryocyte Stimulatory Factor ; MSF) 及びその製造法が報告されている (ヨーロッパ特願公開 0 2 60918 A2 号又は特開昭 63-239298 号明細書参照)。この公知の MSF は巨核球に特異的に作用するが Meg-CSF 活性を示さない。

25 本発明は、巨核球系コロニー刺激因子 (Meg-CSF) の製造用の安定な原料源を見出だし、これより巨核球系

コロニー刺激因子を製造することを目的とする。また、本発明は、医薬品として使用できる程度の純度までに、収得したMeg-CSF物質を精製することを目的とする。

そこで、本発明者らは均一な原料として大量に入手可能である各種の動物細胞株を探索したところ、ヒト由来の肺大細胞癌細胞PC-13株（日本国、群馬県藤岡市に所在の免疫生物研究所より市販で入手）を培養して得られた培養液上清（以下、単に培養液上清という）中に巨核球系コロニー刺激因子(Meg-CSF)の活性を見出だした。本発明者らはMeg-CSF物質の単離と精製を効率良く行うため、Meg-CSFの高生産性株の選択、並びに無血清培地を用いる細胞培養法の開発を行い、この無血清培地による培養法で前記のPC-13株細胞を培養した培養液上清より、巨核球系コロニー刺激因子活性を指標として用いながらMeg-CSF物質を採取、単離及び精製することに成功した。その得られたMeg-CSFの精製品がin vivoで作用させると巨核球前駆細胞と巨核球を増殖する作用及び哺乳動物に投与すると末梢血中の血小板の数を増加する作用を有することを本発明者らは見出だした。そして、得られたMeg-CSF精製品がその物理化学的性質及び生物学的性質の測定により新規な物質であることを確認した。こうして本発明を完成した。

#### 発明の開示

25 従って、本発明の第1の要旨においては、ヒト由来

の肺大細胞癌の細胞株を培養して得られた培養液上清から単離された蛋白質から成り且つin vitroでヒト又はマウスの骨髓細胞に作用させると巨核球系コロニーを形成させる活性とin vivoで末梢血中の血小板を増加させる活性とを有する巨核球系コロニー刺激因子が提供される。

更に、本発明の第2の要旨においては、ヒト由来の肺大細胞癌の細胞株を培養して得られた培養液上清から単離された蛋白質から成り且つin vitroでヒト又はマウスの骨髓細胞に作用させると巨核球系コロニーを形成させる活性とin vivoで末梢血中の血小板を増加させる活性とを有する巨核球系コロニー刺激因子であって、しかも下記の諸性質をもつことを特徴とする巨核球系コロニー刺激因子が提供される。

(a) ヒト由来の肺大細胞癌細胞PC-13株の培養液上清中から、若しくは該PC-13株から単一クローン株として分離されたヒト肺ガン細胞株MC-1株（「微工研」にブダベスト条約下で「FERM BP-2574」の寄託番号で寄託されている）の培養液上清中から本因子が単離できる。

(b) 分子量：24,000（ゲル濾過法で測定）

(c) 等電点：4.5～5.5の範囲（等電点クロマトグラフィーで測定）

(d) 活性の熱安定性：80℃で30分間本因子を加熱すると失活して、活性に熱安定性がない。

(e) 酵素に対する活性の安定性：ノイラミニダーゼで本因子を処理しても活性は安定である。

(f) サイトカイン等の活性の有無：

本因子はインターロイキン-2 (IL-2)、インターロイキン-6 (IL-6)、腫瘍壊死因子(TNF)、エリスロポエチン (EPO)の各活性を示さない。

(g) 抗原性：

インターロイキン-1  $\alpha$  抗体、インターロイキン-1  $\beta$  抗体、ヒトGM-CSF 抗体、ヒト・インターロイキン-3 抗体により本因子の活性は中和されない。またラジオイムノアッセイにより評価すると、本因子はプロラクチン、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、成長ホルモン(GH)、インシュリン、バソプレッシン(ADH)、副腎皮質ホルモン(ACTH)との間に免疫学的交差性を示さない。

(h) 可溶化剤に対する活性の安定性：

ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)又は塩酸グアニジンで本因子を処理すると、活性が部分的に失われて不安定である。また、本因子をTween 20 (すなわちポリオキシエチレン(20)ソルビトールモノラウレート)、Nonidet P40 (すなわちポリオキシエチレン(9) -p-tert-オクチルフェノール)、Triton X-100 (すなわちポリオキシエチレン(9~10) -p-tert-オクチルフェノール)等の非イオン系界面活性剤で処理しても活性は実質的に安定である。

(i) 特異的な生理活性：

本因子はヒト又はマウスの骨髄細胞に *in vitro* で働くと、巨核球系コロニーを形成させる活性を示す。また、マウスに本因子を投与すると、脾臓中の巨核球及び巨核球前駆細胞を増殖させる活性と末梢血中の血小板数を増加させる活性を示す。

本発明の第2の要旨による巨核球系コロニー刺激因子は、分子量24,000（ゲル濾過法で測定）と等電点範囲 4.5~5.5 を有し、一つの蛋白質物質をなすと認められる。

本発明の第3の要旨によると、ヒト由来の肺大細胞癌の細胞株を培養し、得られた培養物から次に巨核球系コロニー刺激因子を含む培養液上清を回収し、その培養液上清から巨核球系コロニー刺激因子を採取し、そしてそれを精製することを特徴とする巨核球系コロニー刺激因子を製造する方法が提供される。

この本発明の方法では、培養される肺大細胞癌の細胞株としては、PC-13株（日本国群馬県藤岡市にある免疫生物研究所から自由に分譲される）が使用でき、また前記のPC-13株から本発明者らによって分離されて単一クローンとされたヒト肺癌細胞株MC-1株も使用できる。ヒト肺ガン細胞株MC-1株は日本国茨城県つくば市にある通産省工業技術院微生物工業技術研究所（微工研）に1989年8月31日以来、ブダペスト条約の規定の下に寄託番号「FERM BP-2574」として寄託し



である。

本発明の方法では、ヒト由来肺大細胞癌細胞株を無血清の培地中で培養することが好ましい。

更に、本発明者らは、ヒト由来の肺大細胞癌細胞株、  
5 特に前記のPC-13株及びMC-1株の培養に最適である培地組成を見出すために研究を行った。その結果、動物細胞の培養のための培地として知られるRPMI-1640培地に数種の補助成分を補足して成る新しい無血清培地を調製し、これをRPMI-HPTS培地と命名した。この  
10 RPMI-HPTS培地の組成は、この培地の10ℓ当りに、RPMI-1640培地（固体粉末の形として）の104g、炭酸水素ナトリウムの12g、ペニシリンGの400mg、ストレプトマイシンの400mg、トランスフェリンの50mg、亜セレン酸の200μg、ビルビン酸ナトリウムの1.0  
15 mM及びN-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸（通例はHEPESと略記される緩衝剤であり、化学式はC<sub>8</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Sである）の15.0mMを含み、残余が滅菌水である培地であり、血清成分を含まないものである。

20 このRPMI-HPTS培地は、前記のPC-13株又はヒト肺ガン細胞株MC-1株を培養して本発明の巨核球系コロニー刺激因子を生産させるのに良く適することが認められた。

従って、本発明の別の要旨によると、ヒト肺癌細胞  
25 株MC-1株(FERM BP-2574の寄託番号で寄託されている

る) を、前記の組成をもつRPMI-HPTS培地中で5%のCO<sub>2</sub>を含み且つ水蒸気で飽和された空気の下に35~38℃の温度で培養し、この細胞の培養を、培養液上清中に巨核球系コロニー刺激因子が生産され蓄積されるまで続けることから成る巨核球系コロニー刺激因子の製造法が提供される。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明による巨核球系コロニー刺激因子(Meg-CSF)を得るためには、一般的には、前記のヒト由来の肺大細胞癌の細胞株、特に前記のPC-13株又はヒト肺癌細胞株MC-1株を、動物細胞の培養に通常用いられる培地中で培養し、これにより、得られた培養物の上清中にMeg-CSF物質を産生させ、蓄積させる。この方法に用いられる培地としては、例えば公知のRPMI-1640培地、ダルベッコ改変イーグル培地、Ham's F 12培地、等が単独、もしくはこれらの2種以上を混合して用いられる。当該培地中には0~10%の牛胎児血清、もしくは亜セレン酸、ピルビン酸、エタノールアミン、トランスフェリン、血清アルブミン、HEPES等を添加してもよい。培養は、培養すべき細胞を培地にたとえば $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ 細胞/mlの接種量になるように接種し、次いで細胞の増殖が可能である35~38℃の温度、好ましくは37℃で、5% CO<sub>2</sub>の存在下に水蒸気で飽和された空気中で行うことが好ましい。培養器は、動物細胞の培養用の各種フラスコ、シャーレ、ローラーボ

トル等を用いることができる。また、マイクロキャリアを用いてスピナーボトル中で細胞を培養することもできる。無血清の条件下、もしくは、低濃度血清（2%以下）の条件下で、培養を行うときは、培養器  
5 の内壁の細胞接着面をコラーゲン、ゼラチン等で処理しておくことが望ましい。培養時間は通常2～6日間程度で十分である。その後、得られた培養物から培養液上清を回収する。この培養液上清中に、本発明の  
Meg-CSF物質が産生されている。

10 PC-13株細胞は細胞の培養に当って固体面に付着しないと増殖できない種類の付着細胞であり、このPC-13株から Meg-CSF の産生能が高い単一クローン株を分離するためには付着細胞のクローン化に一般的な手法が用いられる。例えば、限界希釈法、コロニー形成  
15 法等を用いることができる。これらの方法によって得られた細胞を別々に分けて個別に培地中で  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  細胞/ml の濃度まで増殖させ、得られた夫々の培養液上清中の巨核球系コロニー刺激因子活性を *in vitro* の評価系で検索し、これにより本発明の Meg-CSF  
20 物質産生能の高いクローン株を検出し、このクローン株を単独に更に増殖させるのがよい。

培養液上清からの本発明の Meg-CSF 物質の回収と精製は、例えば、当該上清を、透析、限外濾過、塩析、  
ゲル濾過、イオン交換クロマト、等電点クロマトグラ  
25 フィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、

疎水性クロマトグラフィー、レクチンカラム、逆相クロマトグラフィー等を適宜組み合わせることによって行われる。より具体的には、例えば、下記のような5

5 段階よりなる方法によって Meg-CSF 物質の回収と精製を行うのが都合がよい

1. ヒドロキシアパタイトカラム・クロマトグラフィー

培養液上清をヒドロキシアパタイト(HA)カラムを通過させることにより活性物質をHAカラムに吸着させ、  
10 さらに吸着された活性物質を溶出により回収する。溶出はpH 7~8、0.2~0.5 M程度のリン酸ナトリウム、もしくは、リン酸カルシウム水溶液で行うことが望ましく、蛋白質が吸収する波長280nmの紫外線(UV)の吸光度をモニターしながら行う。この波長のUV吸収のある  
15 溶出液画分をまとめ、活性画分として採取する。

2. ConA結合担体カラム・クロマトグラフィー

上記溶出された活性画分を、そのままConA(コンカナバリンA)結合担体カラム例えばConA結合アガロースのカラムを通過させ、吸着されないで通過した画分  
20 を回収する。こうして回収された画分のうちで、上と同様に、UV 280nmでの吸光度をモニターし、このUV吸収のある活性画分をまとめ、ConA非結合画分と称する。

3. イオン交換クロマトグラフィー

上記のConA非結合画分を、透析、限外濾過等の手段  
25 を用いて塩濃度を下げ、次にイオン交換体に通して活

性物質を吸着させ、吸着された物質をイオン交換体から脱着、溶出させることにより活性画分として回収する。イオン交換体としては、陰イオン交換体、具体的には、DEAE-トヨパール（東ソー社製）、DEAE-セファロース（ファルマシア社製）、Q-セファロース（ファルマシア社製）、Mono-Q（ファルマシア社製）などがあげられる。イオン交換体への活性物質の吸着はpH 7～9、0.01～0.05 M程度の塩濃度で行い、また溶出はpH 7～9、0.1～1 M程度の塩濃度勾配溶出法で行うことが望ましい。

#### 4. ゲル濾過

前段階のイオン交換クロマトグラフィーで得られた活性画分を、限外濾過、凍結乾燥等によって一旦濃縮、又はそのまま、ゲル濾過担体のカラム中に通過させて展開させ、その活性画分を溶出により回収する。ゲル濾過担体としては、分画できる分子量の範囲が1～50万程度のもの、具体的には、ウルトロゲル（LKB社製）、セファデックス（ファルマシア社製）、セファクリル（ファルマシア社製）、トヨパール（東ソー社製）、バイオゲル（バイオラッド社製）、TSK gel G2000 SW（東ソー社製）などが用いられる。ゲル濾過法中の平衡と展開は、pH 7～8、0.05～0.3 M程度の塩濃度の条件を用いて行うことが望ましい。

#### 5. ヒドロキシアパタイト・クロマトグラフィー

25 前のゲル濾過段階で得られた活性画分を、ヒドロキ

シアパタイト(HA)カラムに吸着させ、吸着画分を回収する。吸着はpH 7～9、0.01～0.05 M程度のリン酸ナトリウム、もしくは、リン酸カルシウム、溶出はpH 7～9、0.01～0.5 M程度のリン酸ナトリウム、もしくは、リン酸カルシウムで濃度勾配法で行うことが望ましい。

上記の各段階における本発明のMeg-CSF物質の検出はin vitroの巨核球系コロニー刺激因子活性を指標として行うことができる。

10 なお、上記の5段階よりなる回収及び精製法は本発明物質の採取の一例を示したにすぎず、勿論、他の方法によって回収及び精製をしてもよい。

本発明の巨核球系コロニー刺激因子(Meg-CSF)物質はin vitroでヒト及びマウスの骨髄細胞から巨核球系コロニーを形成する過程を促進し、またin vivoで巨核球前駆細胞、及び、巨核球の増殖並びに血小板の増加を促進するものである。この巨核球系コロニー刺激因子物質は、骨髄巨核球前駆細胞からの巨核球系細胞への分化並びに巨核球系細胞の増殖の研究用試薬として、また医薬品としても使用される。本発明の巨核球系コロニー刺激因子は、ある種の血小板減少症、すなわち、抗癌剤投与後の血小板減少症、放射線治療後の血小板減少症、巨核球系コロニー刺激因子欠損性による血小板減少症、再生不良性貧血の血小板減少症、骨髄移植後の血小板減少症の治療に有効に用いることが

できる。また巨核芽球性白血病細胞を巨核球へと分化させることにより、白血病の治療にも用いられる。さらに血小板輸血の代替、補助剤としても利用できる。本発明の Meg-CSF 物質は腹腔内、静脈内又は皮下内に投与することができ、慣用の各種の賦形剤と混和することにより各種の剤型の医薬組成物に製剤にして投与できる。

また、本発明者らは、前述したように、ヒト由来の肺大細胞癌細胞株 PC-13 株から、Meg-CSF 生産能が高い単一クローン細胞であるヒト肺癌細胞株 MC-1 株を分離することに成功し、さらにこの MC-1 株の培養液上清から Meg-CSF 物質を採取することにも成功した。従って、本発明の更に別の要旨によると、ヒト由来の肺大細胞癌の細胞株から、巨核球系コロニー刺激因子の高い生産能をもつ単一のクローンとして分離されたヒト肺癌細胞株が提供される。

#### 図面の簡単な説明

第一図は、本発明による Meg-CSF 物質の製造例を例証する実施例 4 において、先の段階で部分的精製された Meg-CSF 物質を、イオン交換体 Mono Q (ファルマシア社製) を用いたイオン交換クロマトグラフィーにより精製する段階で溶出画分が示す Meg-CSF 活性と 280nm の波長の紫外線 (UV) の吸光度が溶出画分の滞留時間につれて変動する様子を表わすクロマトグラムを示す。

第二図は、上記の実施例 4 でのイオン交換クロマト  
グラフィー精製段階で部分的精製された Meg-CSF 物  
質を、ゲル濾過剤として TSK ゲル G2000 SW (東ソ  
社製) を用いるゲル濾過段階で精製する際に、溶出画  
5 分が示す Meg-CSF 活性と 280nm の波長の紫外線 (UV)  
の吸光度が溶出画分の滞留時間につれて変動する様子  
を表わすクロマトグラムを示す。

第三図は、上記の実施例 4 でのゲル濾過による精製  
段階で精製された Meg-CSF 物質を、吸着剤としてヒ  
10 ドロキシアパタイトカラム (関東化学社製) で更に精  
製する際に、溶出画分の Meg-CSF 活性と 280nm の波  
長の紫外線 (UV) の吸光度が溶出画分の溶出順序に応じ  
て変動する様子を表わすクロマトグラムを示す。

次に、本発明を実施例について説明するが、本発明  
15 はこれに限定されるものでない。

#### 実施例 1

本発明によりヒト由来肺大細胞癌細胞株を培養して  
得た培養液上清中に存在する巨核球系コロニー刺激因  
子活性を下記の 2 つの方法で検討した。

#### 20 (1) ヒト血漿凝塊法

ウシ血漿 20  $\mu$  l、ヒト AB 型血漿 40  $\mu$  l、ウシ血清ア  
ルブミン 4 mg、2-メルカプトエタノール 10  $\mu$  M、ヒ  
ト骨髓単核球  $2 \times 10^5$  個、およびアッセイすべきサン  
プル 40  $\mu$  l を含むイスコフ改変ダルベッコ培地 (Is-  
25 cove's modified Dulbecco's medium; IMDM と略記さ



れる)360  $\mu$  l に塩化カルシウム水溶液(2.6  $\mu$  g/ml)40  $\mu$  l を加えて、直ちにその混合物を、35mm の培養皿中央に置いて凝塊にさせる。この凝塊の周囲に 0.6 ml の IMDM を入れた。アッセイすべきサンプルは、ヒト由来

5 肺大細胞癌細胞株 PC-13 株細胞の培養液上清と、PC-13 株細胞の培養に用いた RPMI-1640 培地 (ブランクコントロールとして) と、また、ポジティブコントロールとして、ヒト Meg-CSF 活性を持つことが知られる、インゲンマメレクチンで刺激したヒト末梢リンパ球培

10 養液上清 (PHA-LCM) とであった。これを 37°C で 5% CO<sub>2</sub> を含む空気の存在下で 12 日間培養した。培養物中に形成された巨核球コロニーを抗ヒト第 VIII 因子抗体 (DAKO 社製) で同定しながら、ヒト Meg-CSF 活性を測定した。

15 その結果、PC-13 株細胞の培養液上清は、PHA-LCM と同様に、ヒト Meg-CSF 活性を持つことを確認した。

#### 第一表

サンプル	ヒト Meg-CSF 活性 (CFU/ml)
RPMI-1640 培地	0.5
20 PC-13 株培養液上清	43
PHA-LCM	125

#### (2) マウスフィブリン凝塊法

ウシ胎児血清 80  $\mu$  l、ウシフィブリノーゲン (Sigma 社製) 0.2 mg、ウシトロンピン (Sigma 社製) 0.2 単位、

25 BDF<sub>1</sub> オスマウス骨髄細胞  $2 \times 10^5$  個、およびアッセイ

すべきサンプル40  $\mu$  l を含むIMDM 400  $\mu$  l の混合物を混合後にすばやく35mmの培養皿中央に置き、その混合物を凝塊にさせる。その周囲に0.6mlのイスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)をいれた。アッセイすべきサンプルは、ヒト由来肺大細胞癌細胞株PC-13株細胞の培養液上清と、PC-13株細胞の培養に用いたRPMI-1640培地(ブランクコントロールとして)と、また、ポジティブコントロールとして、マウスMeg-CSF活性を持つことが知られる、マウス骨髄単球性白血病細胞培養液上清(WEHI-CM)とであった。これを37°Cで、5% CO<sub>2</sub>を含む空気の存在下で6日間培養した。形成された巨核球コロニーをアセチルコリンエステラーゼ染色で同定しながら、マウスMeg-CSF活性を測定した。

その結果、PC-13株細胞培養液上清は、WEHI-CMと同様に、マウスMeg-CSF活性を持つことを確認した。

#### 第二表

サンプル	マウスMeg-CSF 活性 (CFU/ml)
RPMI-1640培地	1 $\pm$ 1
PC-13株培養液上清	36 $\pm$ 4
WEHI-CM	49 $\pm$ 9

#### 実施例 2

対数増殖期のPC-13株細胞を、牛胎児血清10%を含むRPMI-1640培地中に、2細胞/mlの濃度に調整して懸濁した後、その細胞懸濁液を96穴マイクロプレートに0.1 ml/一穴ずつ分注し、37°Cで5% CO<sub>2</sub>の存在下

に培養した。

こうして各穴の中で培養して得られた単一クローン細胞、計57株を別々に分け取り、増殖させ、増殖された57株の細胞を夫々に、牛胎児血清5%を含むRPMI-5 1640培地の20mlアリコート中に $1 \times 10^5$ 細胞/mlの濃度で接種し、37℃、5% CO<sub>2</sub>の存在下で4日間培養を行った。

これらの培養液上清を、1/20濃度のダルベッコPBSにて透析し、凍結乾燥した。Meg-CSF物質を含む粗10 粉末を1mlの蒸留水に溶解し、夫々の溶液のマウスMeg-CSF力価をマウスフィブリン凝塊法にて評価した。その結果、PC-13株(270 CFU/mlの力価を示す)と比べて巨核球系コロニー刺激因子活性産生能が高い単一クローン株(470 CFU/mlの力価を示す)を得て、15 これをヒト肺癌細胞株MC-1株と称した。

このヒト肺癌細胞株MC-1株は「微生物工業技術研究所」にFERM BP-2574の寄託番号で寄託されている。

### 実施例3

ヒト由来肺大細胞癌細胞であるヒト肺癌細胞株MC-20 1株細胞を下記の第四表の組成をもつ無血清培地(即ち、前記のRPMI-HPTS培地)中に、 $1 \times 10^5$ 細胞/mlの濃度で、37℃、5% CO<sub>2</sub>の存在下で4日間培養した。その後、培養物から100mlの培養液上清を回収した。培養液上清は、1/20濃度のダルベッコPBSにて透析25 し、凍結乾燥した。Meg-CSF物質を含む得られた粉

末を 5 ml の蒸留水に溶解した。得られた水溶液のマウス Meg-CSF 活性をマウスフィブリン凝塊法にて評価した。コントロールは、MC-1 株細胞の接種を省略した以外は RPMI-HPTS 培地を前と同様の処理に付したものを 5 のを用いた。

その結果、無血清培地においても、MC-1 株細胞が Meg-CSF 物質を産生することが明らかになった。

第三表

	サンプル	マウス Meg-CSF 活性 (CFU/ml)
10	MC-1 株培養液上清	640 ± 70
	RPMI-HPTS 培地	17 ± 10

第四表

RPMI-HPTS 培地の組成 (10 ℓ 当り)

	・ RPMI-1640 培地	
15	(粉末の形として、日水製薬社製)	104 g
	・ 炭酸水素ナトリウム (ナカライ社製)	12 g
	・ ペニシリン G (明治製菓社製)	400 mg
	・ ストレプトマイシン (明治製菓社製)	400 mg
	・ トランスフェリン (Boelinger 社製)	50 mg
20	・ 亜セレン酸 (ナカライ社製)	200 μg
	・ ビルビン酸ナトリウム (Sigma 社製)	1.0 mM
	・ HEPES (ナカライ社製)	15.0 mM

実施例 4

本例は、Meg-CSF 高産性能株であるヒト肺癌細胞株 MC-1 株を培養し、その培養液上清より Meg-CSF

物質を回収し精製するのに好適な方法を例示する。

#### 1. 培養

実施例 4 で得られた MC-1 株 (FERM BP-2574) を、  
牛胎児血清 5 % を含む RPMI-1640 培地 (日水製薬社製)  
5 にて、 $1 \times 10^9$  個の細胞が得られるまで、シャーレ中、  
37°C、5 % CO<sub>2</sub> の存在下に水蒸気を飽和された空気下  
で増殖させた。これら MC-1 株細胞を、ダルベッコ PBS  
にて洗浄後、トリプシン-EDTA 溶液 (GIBCO 社製) を作  
用させ、2 ~ 5 分後、トリプシンインヒビター (Sigma  
10 社製) にて、酵素反応を停止した。ピペッティングに  
て培養器壁から剥離、回収した細胞は、ダルベッコ PBS  
にて洗浄後、使用する無血清培地に浮遊させ、細胞数  
をカウント後、接種細胞として使用した。

Meg-CSF 生産の為に使用される無血清培地は、  
15 RPMI-1640 培地を基本培地として含む前記の RPMI-HPTS  
培地である。

培養容器には、組織培養用角シャーレ (25 × 25 cm,  
Nunc 社製) で、その内壁面をコラーゲン (CELL MATRIX  
-1P; IWAKI 社製) で処理したものをを用いた。MC-1 株  
20 細胞は、あらかじめ、シャーレに 125 ml の RPMI-HPTS  
培地を入れてから 37°C、5 % CO<sub>2</sub> の存在下で水蒸気飽  
和空気中でインキュベートしたシャーレ 100 枚に、  
1 × 10<sup>7</sup> 細胞 / シャーレの割合で接種した。これらの  
シャーレ中の細胞を、37°C、5 % CO<sub>2</sub> の存在下で水蒸  
25 気飽和空気中で培養した。この培養中は 3 ~ 4 日間隔

で8回、培地交換を行い、計100リットルの細胞培養液上清を回収した。

## 2. 培養液上清からの活性物質の回収

培養液上清は、濾過後、その濾液をカラム1本当りに25リットルずつ、10mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 6.8) で平衡化したヒドロキシアパタイトカラム ( $\phi 90 \times 60$ mm、生化学工業社製) に80ml/min. の流速で通過させ、活性物質をヒドロキシアパタイトに吸着させた。2000mlの10mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 6.8) で流速80ml/min. にてカラムを洗浄後、0.5 Mリン酸カリウム緩衝液 (pH 6.8) で流速10ml/min. で溶出を行った。

溶出液は10mlの分画として集め、夫々の分画の紫外線(280nm)の吸光度を測定してモニターを行い、UV吸収のある分画を活性分画として回収した。この活性分画中の蛋白質の合計量は2280mgであった。

## 3. ConA-アガロースカラムクロマトグラフィー

前段階で回収された活性画分の1.8リットルを、10mM塩化ナトリウム-10mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) に対して透析を行い、2.0リットルの透析液を得た。この溶液を半量(1.0リットル)ずつに分けて、10mM塩化ナトリウム-10mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) にて平衡化したConA-アガロースカラム ( $\phi 42 \times 77$ mm、生化学工業社製) に流速3.5 ml/min. で通過させてカラムからの通過液を集めた。この通過液中の蛋白質の合計量は1590mgであった。

#### 4. イオン交換クロマトグラフィー

ConA-アガロースカラム通過画分を、225 ml ずつに分けて、10mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) に対して透析を行った。透析液を、同緩衝液にて平衡化したイオン交換体 Mono Q HR10/10カラム ( $\phi 10 \times 100$ mm、ファルマシア社製) に 4 ml/min. の流速にて流し、活性物質を Mono Q 物質に吸着させた。同緩衝液でカラムを洗浄した後、10mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) + 0 ~ 500mM 塩化ナトリウムで濃度勾配法で 4 ml/min. の流速にて溶出した。溶出液を 10 ml ずつの分画で集め、各分画の紫外線 (280nm) の吸光度とマウス Meg-CSF 活性を測定して、UV吸光度と Meg-CSF 活性の変動を各分画の滞留時間について表わした曲線を添付図面の第一図に示した。UV吸光度の変動は破線の曲線で、活性の変動は実線の曲線で表わす。以下、第二図、第三図でも同様である。約 150mM の塩濃度で溶出した活性画分を回収した。この活性画分中の蛋白質の合計量は 78mg であった。

#### 5. ゲル濾過

Mono Qカラムから回収した活性画分の 100 ml を、5 mM硫酸ナトリウム - 5 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) に対して透析し、透析液を凍結乾燥した。得られた Meg-CSF 物質を含む部分精製された粉末を蒸留水 5 ml に加え溶解し、得られた溶液から不溶画分を遠心にて除去した後、100mM 硫酸ナトリウム - 100mM リン

酸ナトリウム緩衝液 (pH7.2) にて平衡化した TSK gel G2000 SW カラム ( $\phi 21.5 \times 600$  mm、東ソー社製) + TSK guard カラム SW ( $\phi 21.5 \times 75$  mm、東ソー社製) に 1 ml ずつ添加し、同緩衝液にて、流速 5 ml/min. で展開した。カラムから出た流出液を 5 ml ずつ分画し、各分画の紫外線 (280 nm) の吸光度とマウス Meg-CSF 活性を測定した。この UV 吸光度と Meg-CSF 活性の変動を各分画の滞留時間について表わした曲線を添付図面の第二図に示した。滞留時間が約 30~32 分間のところに溶出した活性画分を回収した。この活性画分中の蛋白質の合計量は 5.1 mg であった。

#### 6. ヒドロキシアパタイトカラム・クロマトグラフィー

ゲル濾過カラムから回収された活性画分の 50 ml を、蒸留水 50 ml にて希釈した後、その希釈溶液を 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.2) にて平衡化したヒドロキシアパタイトカラム ( $\phi 8 \times 100$  mm、関東化学社製) に流速 1 ml/min. で通過させて、活性物質をヒドロキシアパタイト (HA) に吸着させた。次いでカラムを 50 mM~300 mM のリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.2) で濃度勾配法で流速 1 ml/min. にて溶出した。溶出液を 5 ml ずつ分画し、各分画の紫外線 (280 nm) の吸光度とマウス Meg-CSF 活性を測定して、その測定結果を添付図面の第三図に曲線で表わした。約 240 mM のリン酸濃度のところに溶出した活性画分 (分画番号 6~10) を回



収した。この活性画分に含まれる蛋白質含量は0.24mgであった。活性画分を150mM 塩化ナトリウム-10mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.2) に対して透析を行い、最終品としてMeg-CSF物質を水溶性物質として得た。

5

第五表

回収と精製の 各段階	Meg-CSF 活性 (CFU/ml)	蛋白質 (mg)
上清からのHAによる回収の活性画分	$4.4 \times 10^6$	2280
10 ConA-アガロース Mono Q クロマト	$7.4 \times 10^6$	1590
ゲル濾過	$4.8 \times 10^6$	78
HAクロマト	$2.5 \times 10^5$	5.1
	$1.6 \times 10^5$	0.24

## 実施例 5

15 実施例 4 の第 5 段階で最終品として得られた本発明の巨核球系コロニー刺激因子物質の特性を次の通り調べた。

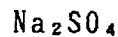
## 1. 分子量

20 高速液体クロマトグラフィーによるゲル濾過法を用いて、下記条件にて上記の Meg-CSF 物質 (以下、本物質という) の分子量を測定したところ、分子量約 24,000 であると認めた。

カラム: TSK gel G2000 SW

( $\phi 21.5 \times 600$ mm、東ソー社製)

25 溶媒: 100mM リン酸ナトリウム (pH7.2) + 100mM



流 速 : 5.0 ml / 分

分子量の算定は、分子量既知の標準蛋白としての牛血清アルブミン (分子量67,000)、オボアルブミン

5 (同 43,000)、カーボニックアンヒドラーゼ (同 29,000)、リボヌクレアーゼ A (同13,700) との比較により行った。

## 2. 等電点

等電点クロマトグラフィーを用いて下記条件で等電  
10 点を測定したところ、本物質は、 $pI = 4.5 \sim 5.5$  の等電点を有していた。

カラム : モノ P (ファルマシア社製)

開始溶媒 : 25mM ビストリス・イミノ二酢酸緩衝液 (pH7.1)

15 展開溶媒 : 10% ポリバッファー74・イミノ二酢酸緩衝液 (pH4.0)

流 速 : 0.5 ml / 分

## 3. 熱安定性

本物質をダルベッコPBS(日水製薬社製) 中で、25℃、  
20 56℃、80℃にて、30分間保持した後、その残存のマウス Meg-CSF 活性を測定した。その結果、80℃では本物質が不安定であった。

第六表

	温度	25℃	56℃	80℃
25	残存活性 (%)	100	88	2

## 4. 酵素に対する安定性

本物質を0.1M 酢酸ナトリウム水溶液 (pH5.0) 中で、不溶性ノイラミニダーゼ(シグマ社製)0.5単位で、37℃、5時間処理し、その残存したマウス Meg-CSF 活性を調べた。本物質は該酵素に対して安定であった。

## 第七表

酵 素	残存活性 (%)
無添加	100
ノイラミニダーゼ	100

## 10 5. サイトカイン等の活性

本物質が既知のサイトカイン類、すなわちIL-2、IL-6、TNF、EPOの各活性を有するかどうか検討した。各活性の測定法は以下の通りである。

## [IL-2]

15 マウスIL-2依存性細胞、CTLL-2株を培養し、その細胞を本物質あるいは標準IL-2と共に一晩培養後、<sup>3</sup>Hチミジンのパルスラベルを行った。標準物質との比較でIL-2の力価を算出した。

## [IL-6]

20 B細胞由来、SKW6-C1株を培養し、その細胞を本物質あるいは標準IL-6と共に4日間培養した。IgM産生誘導をELISAによって測定し、標準物質との比較でIL-6の力価を算出した。

## [TNF]

25 マウス繊維芽細胞、L929株を単層培養し、その細胞

を本物質あるいは標準TNF と共に一晩培養後、 $[^3\text{H}]$ チミジンのパルスラベルを行った。L 929 株細胞に生じた細胞傷害性を標準物質との比較で測定した。

[EPO]

- 5 マウス胎児肝細胞を、本物質あるいは標準EPO の存在下、20時間培養後、培地を交換し $[^{54}\text{Fe}]$ クエン酸鉄のパルスラベルを行った。標準物質との比較で EPO の力価を算出した。

#### 第八表

10	<u>活 性</u>	<u>力価の測定値</u>
	IL-2	検出限界以下
	IL-6	"
	TNF	"
	EPO	"

#### 15 6. 抗原性

本物質が既知のサイトカインおよびホルモンと免疫学的に反応する性質を有するかを検討した。

- まず、抗ヒトIL-1抗体による本物質の中和実験を行った。抗体として、ヒトIL-1 $\alpha$ 、ヒトIL-1 $\beta$ に  
 20 対するウサギポリクローナル抗体（ゼンザイム社製）を用い、中和反応液中における中和抗体価は、200 NU/mlになるように調整した。その結果、本物質は抗ヒトIL-1 $\alpha$ 、同 $\beta$ 抗体によって処理しても、そのMeg-CSF 活性は低下せず、本物質は免疫学的に前記の抗体  
 25 と反応しないことが判った。

また同様に、抗ヒトGM-CSF抗体、抗ヒトIL-3抗体による本物質の中和実験を行った。抗体としてヒトGM-CSF、及び、ヒトIL-3に対するウサギポリクローナル抗体（ゼンザイム社製）を用いた。その結果、本物質は抗ヒトGM-CSF抗体、抗ヒトIL-3抗体によって処理しても、活性は低下せず、前記の抗体と免疫学的に反応しないことが判った。

更に、本物質をラジオ・イムノ・アッセイ法にて調べたところ、本物質がプロラクチン、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、成長ホルモン（GH）、インシュリン、バソプレッシン（ADH）、副腎皮質ホルモン（ACTH）の活性を示すとは検出されず、本物質は免疫学的にこれらのホルモン類と異なる物質であることが判った。

#### 7. 可溶化剤に対する安定性

本物質が蛋白質可溶化剤で処理した時に安定性であるかを検討した。即ち、本物質をダルベッコPBS中に入れて各種可溶化剤の存在下で、4℃で24時間インキュベートした。インキュベートされた溶液から透析により可溶化剤を除去した後、その残存したマウスMeg-CSF活性を調べた。その結果、本物質は、2% SDS水溶液又は3M塩酸グアニジン水溶液で処理すると、部分的に失活されて不安定であった。また、水に溶した0.02% Tween 20、0.01% NP40 又は0.01% Triton X 100等の非イオン系界面活性剤で処理した時は安定であった。この安定試験の結果を次表に示す。

第九表

	<u>可溶化剤</u>	<u>残存活性 (CFU/ml)</u>
	control	175 ± 10
	塩酸グアニジン	50 ± 17
5	SDS	46 ± 13
	Tween 20	150 ± 17
	NP-40	158 ± 17
	Triton X 100	180 ± 12

## 実施例 6

- 10 本発明による Meg-CSF 物質の Meg-CSF 活性が、骨髓細胞中に含まれる T 細胞、または、単球系の細胞を介して発現されるものかどうかを検討するため、T 細胞又は貧食細胞を除去した骨髓細胞に本発明の Meg-CSF 物質を作用させ、発現された Meg-CSF 活性をマウス
- 15 フィブリン凝塊法で測定した。

1. T 細胞を除去された骨髓細胞に対する Meg-CSF 物質の活性

- BDF<sub>1</sub> マウス大腿骨骨髓細胞を細胞毒性テスト用培地 (Cedarlane Lab. 製) 中に  $1 \times 10^7$  / ml の濃度で浮遊
- 20 させ、抗 Thy-1,2 モノクローナル抗体溶液 (Cedarlane Lab. 製) を添加し、その混合物を 4 °C、60 分間静置した。その後、その混合物から遠心により上清を除去した後、分離された細胞に低細胞毒性ウサギ補体の溶液 (Cedarlane Lab. 製) を加え、37 °C、60 分間、インキュ
- 25 ュベートしたのち、リンホライト-M (Cedarlane Lab.

社) 4 mlに重層し、500 xgにて、20分間遠心した。単核球画分を回収し、その単核球細胞をIMDM(Sigma社製)にて2回洗浄後、細胞濃度を  $7.5 \times 10^6$  に調整してIMDMに浮遊させ、この細胞懸濁液に、アッセイすべき

5 本発明の実施例4で得られた Meg-CSF 物質の最終品の水溶液をサンプルとして種々の容量で添加し、そしてインキュベートした。前記したマウスフィブリン凝塊法にて、本発明の Meg-CSF 物質のマウス Meg-CSF 活性の評価を行った。その結果を次表に示す。T細胞

10 を除去した骨髄細胞を用いこれに作用させても、本発明の Meg-CSF 物質は、濃度依存性の Meg-CSF 活性を示した。

第十表

	サンプル量 ( $\mu$ l)	Meg-CSF 活性(CFU)
15	1	2.7 $\pm$ 1.5
	5	16.7 $\pm$ 2.1
	10	30.3 $\pm$ 1.5
	20	38.0 $\pm$ 1.4

## 2. 貧食細胞を除去された骨髄細胞に対する Meg-CSF 物質の活性

20

BDF<sub>1</sub> マウス大腿骨骨髄細胞を20%牛胎児血清(GIBCO社製)を含むIMDM(Sigma社製)中に入れて  $5 \times 10^6$  細胞/mlの細胞濃度に調整した。この細胞懸濁液に1/9容量のカルボニル鉄溶液(40 mg/ml、ナカライテスク

25 社製)、または、IMDM(Sigma社製)を添加し、37℃、

45分間、インキュベートした。各々のインキュベートされた培養液を、リンホライト-M(Cedarlane Lab.製) 4 mlに重層し、500 xgにて、20分間遠心した。単核球画分を回収し、その単核球細胞をIMDM(Sigma社製)にて2回洗浄後、細胞濃度を $1 \times 10^7$ に調整してIMDM中に浮遊させ、細胞懸濁液に本発明のMeg-CSF物質を加え、発現されたMeg-CSF活性を前記したマウスフィブリン凝塊法にて測定した。こうして本発明のMeg-CSF物質の活性を評価した。

10 その結果を次表に示す。貧食細胞を除去した骨髓細胞を用いてこれに作用させても、本発明のMeg-CSF物質は、貧食細胞を除去されていないコントロールとしての骨髓細胞を用いた場合と同様なMeg-CSF活性を示した。

第十一表

15	<u>供試の骨髓細胞</u>	<u>Meg-CSF 活性 (CFU)</u>
	貧食細胞除去区	30.0 ± 4.6
	コントロール区	28.3 ± 4.2

## 実施例 7

20 実施例 4 で最終品として得た本発明のMeg-CSF物質のin vivoに於ける巨核球系細胞に対する効果を調べた。

## 1. マウス巨核球前駆細胞に対する効果

25 ① 本Meg-CSF物質を160CFU/0.20mlの濃度で含むPBS(phosphate buffered saline)を、BDF<sub>1</sub>マウス(オス、8週齢)の腹腔内に単回投与した。投与後の経過



時間が0, 24, 48, 72, 96 時間後に、マウスを屠殺した。取出した大腿骨骨髓、及び脾臓中の巨核球前駆細胞(CFU-Meg)の数を直ちに測定した。巨核球前駆細胞の測定は、大腿骨の骨髓細胞については2 mlのIMDM中に、脾細胞については4 mlのIMDM中に浮遊させて行った。各々の細胞懸濁液を5%、ボークウィードマイトージェン刺激脾細胞の培養液上清(PWM-SCM)を5%加えたマウスフィブリン凝塊法にて培養した。PWM-SCMによって成熟したアセチルコリンエステラーゼ染色陽性細胞の数をカウントした。脾臓、又は大腿骨骨髓中に含まれる巨核球前駆細胞(CFU-Meg)の数を算出して次表に示した。

第十二表

投与後の			
15	経過時間	CFU-Meg/脾	CFU-Meg/大腿骨骨髓
	0 hr.	4560 ± 1410 (100%)	6440 ± 1067 (100%)
	24 hr.	5254 ± 1399 (115%)	6909 ± 1020 (107%)
	48 hr.	8711 ± 1117 (191%)	6400 ± 557 (99%)
	72 hr.	7523 ± 2006 (165%)	6875 ± 311 (107%)
20	96 hr.	6525 ± 881 (143%)	— — — —

② また、上と同様な方法で、マウスに本Meg-CSF物質を投与してから48hr. 後にマウスを屠殺し、取出した脾臓における巨核球前駆細胞(CFU-Meg)の数を算出し、本物質のCFU-Meg 増殖活性の投与量依存性を調べた。その結果を次表に示す。

第十三表

	<u>Meg-CSF 物質投与量</u>	<u>CFU-Meg/脾</u>
	無処理	4560 ± 1410 (100%)
	40 CFU	5944 ± 1635 (130%)
5	80 CFU	7245 ± 2010 (159%)
	160 CFU	8711 ± 1117 (191%)

## 2. マウス脾臓中の巨核球に対する効果

本 Meg-CSF 物質を160CFU/0.20 mlの濃度で含むPBSを、BDF<sub>1</sub>マウス（オス、8週齢）の腹腔内に単回投与した。投与後の経過時間が0, 24, 48, 72時間後にマウスを屠殺した。取り出した脾臓中の巨核球数を直ちに測定した。この際、脾臓は10%ホルマリンにて固定後、パラフィン包埋し、断面積が最大となるように切片を調製し、HE染色（ヘマトキシリン・エオジン染色）を行った後、顕微鏡下で染色された巨核球の数をカウントし、赤脾髄単位面積当たりの巨核球の数を算出した。その結果を次表に示す。

第十四表

	<u>投与後の経過時間</u>	<u>巨核球数/赤脾髄 1 mm<sup>3</sup></u>	<u>有意差</u>
20	0 hr.	13 ± 1.8 (100%)	
	24 hr.	15 ± 1.8 (115%)	p < 0.03
	48 hr.	20 ± 3.5 (150%)	p < 0.01
	72 hr.	18 ± 1.3 (140%)	p < 0.005

## 3. マウス末梢血中の血小板に対する効果

25 本 Meg-CSF 物質を160CFU/0.20 mlの濃度で含むPBS

を、BDF<sub>1</sub>マウス（オス、10週齢、一群6匹）の腹腔内に単回投与した。投与後の経過時間が0時間、48時間、96時間後に、末梢血中の血小板数が有意に上昇したことが観察された。試験結果を次表に示す。

5

第十五表

<u>投与後の時間</u>	<u>血小板数 (<math>\times 10^4 / \mu l</math>)</u>
0 hr.	116 $\pm$ 14 (100%)
48 hr.	123 $\pm$ 10 (106%)
96 hr.	140 $\pm$ 13 (121%)

10

産業上の利用可能性

以上のように、本発明によれば、ヒト由来の肺大細胞癌細胞株を培養し、その培養液上清から前述の生理活性を有する巨核球系コロニー刺激因子(Meg-CSF)物質を単離できる。従って、本発明はある種の血小板減少症の治療に有用である Meg-CSF 物質を医薬として提供できる。

15

## 請求の範囲

1. ヒト由来の肺大細胞癌の細胞株を培養して得られた培養液上清から単離された蛋白質から成り且つ  
in vitroでヒト又はマウスの骨髓細胞に作用させると  
5 巨核球系コロニーを形成させる活性とin vivoで末梢  
血中の血小板を増加させる活性とを有する巨核球系コ  
ロニー刺激因子。

2. ヒト由来の肺大細胞癌の細胞株を培養して得られた培養液上清から単離された蛋白質から成り且つ  
10 in vitroでヒト又はマウスの骨髓細胞に作用させると  
巨核球系コロニーを形成させる活性とin vivoで末梢  
血中の血小板を増加させる活性とを有する巨核球系コ  
ロニー刺激因子であって、しかも下記の諸性質をもつ  
こと、即ち

15 (a) ヒト由来の肺大細胞癌細胞PC-13株の培養液上  
清中から、若しくは該PC-13株から単一クローン株と  
して分離されたヒト肺癌細胞株MC-1株（「微工研」  
にブダベスト条約下で「FERM BP-2574」の寄託番号で  
寄託されている）の培養液上清中から本因子が単離で  
20 きる。

(b) 分子量：24,000（ゲル濾過法で測定）

(c) 等電点：4.5～5.5の範囲（等電点クロマトグラフィーで測定）

(d) 活性の熱安定性：80℃で30分間本因子を加熱す  
25 ると失活して、活性に熱安定性がない。

(e) 酵素に対する活性の安定性：ノイラミニダーゼで本因子を処理しても活性は安定である。

(f) サイトカイン等の活性の有無：

本因子はインターロイキン-2 (IL-2)、インターロイキン-6 (IL-6)、腫瘍壊死因子(TNF)、エリスロポエチン(EPO) の各活性を示さない。

(g) 抗原性：

インターロイキン-1  $\alpha$  抗体、インターロイキン-1  $\beta$  抗体、ヒトGM-CSF 抗体、ヒト・インターロイキン-3 抗体により本因子の活性は中和されない。またラジオイムノアッセイにより評価すると、本因子はプロラクチン、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、成長ホルモン(GH)、インシュリン、バソプレッシン(ADH)、副腎皮質ホルモン(ACTH)との間に免疫学的交差性を示さない。

(h) 可溶化剤に対する活性安定性：

ドデシル硫酸ナトリウム(SDS) 又は塩酸グアニジンで本因子を処理すると、活性が部分的に失われて不安定である。しかし、本因子を非イオン系界面活性剤で処理しても活性は実質的に安定である。

(i) 特異的な生理活性：

本因子はヒト又はマウスの骨髄細胞に *in vitro* で働くと、巨核球系コロニーを形成させる活性を示す。また、マウスに本因子を投与すると、脾臓中の巨核球及び、巨核球前駆細胞を増殖させる活性と末梢血中の血

小板を増加させる活性とを示すことを特徴とする巨核球系コロニー刺激因子。

3. ヒト由来の肺大細胞癌の細胞株を培養し、得られた培養物から次に巨核球系コロニー刺激因子を含む  
5 培養液上清を回収し、その培養液上清から巨核球系コロニー刺激因子を採取し、そしてそれを精製することを特徴とする巨核球系コロニー刺激因子を製造する方法。

4. ヒト由来の肺大細胞癌の細胞株を、血清を含ま  
10 ない培地、すなわち無血清培地で培養する請求の範囲第3項に記載の方法。

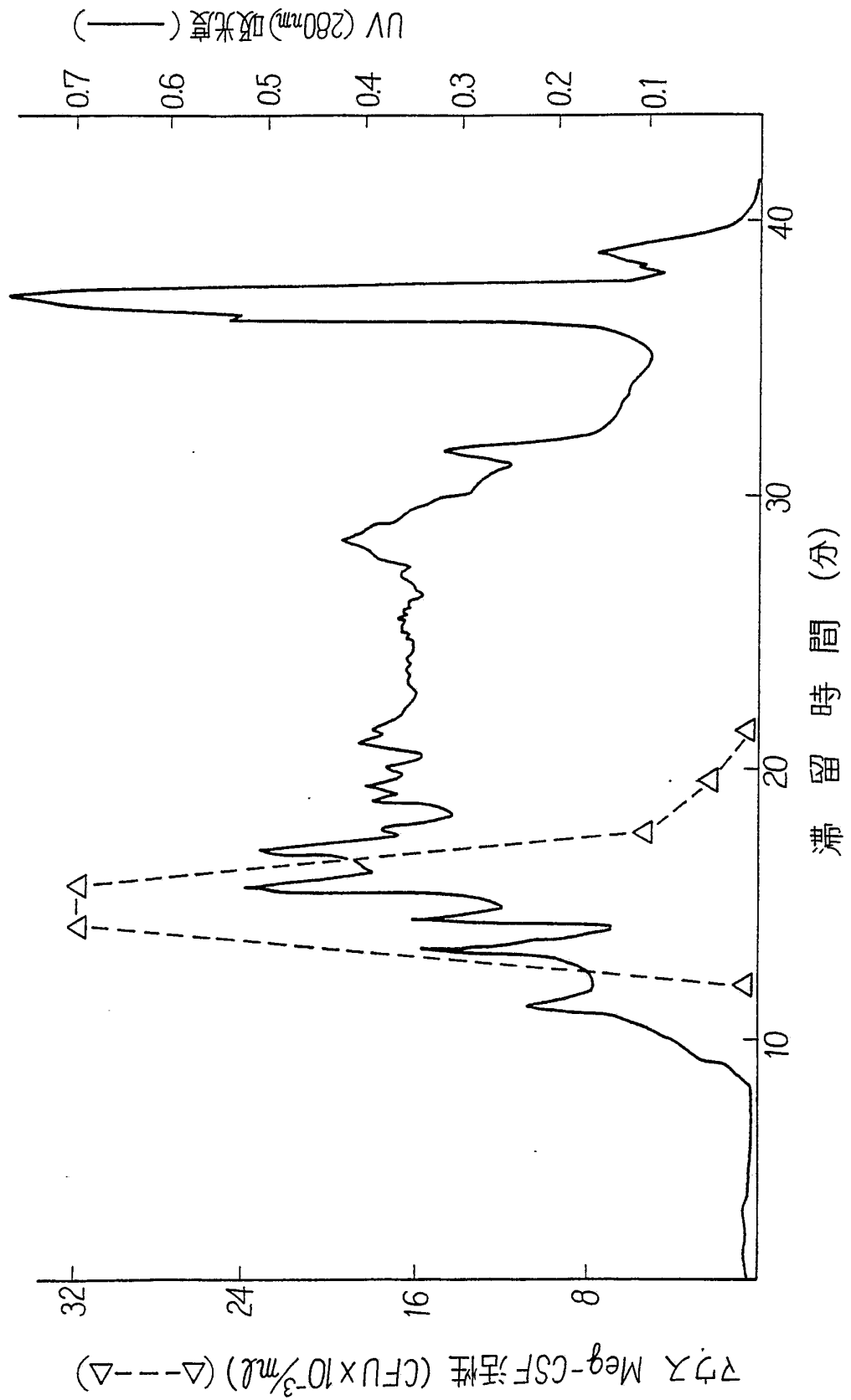
5. ヒト肺癌細胞株MC-1株(FERM BP-2574の寄託番号で寄託されている)を、培地の10ℓ当りにRPMI-1640培地(粉末形として)の104g、炭酸水素ナトリウムの12g、ペニシリンGの400mg、ストレプトマイシンの400mg、トランスフェリンの50mg、亜セレン酸の  
15 200μg、ピルビン酸ナトリウムの1.0mM及びHEPESの15.0mMを含み、残余が滅菌水である無血清培地(すなわちRPMI-HPTS培地)中で5%のCO<sub>2</sub>を含み且つ水  
20 蒸気で飽和された空気の下に35~38℃の温度、好ましくは37℃で培養し、この細胞の培養を、培養液上清中に巨核球系コロニー刺激因子が生産され蓄積されるまで続けることから成る巨核球系コロニー刺激因子の製造法。

25 6. 培養液上清から巨核球系コロニー刺激因子を、

蛋白質の単離のための公知の要領で回収する工程と、回収した該因子物質を蛋白質の精製のための公知の要領で精製する工程を更に含む請求の範囲第5項に記載の方法。

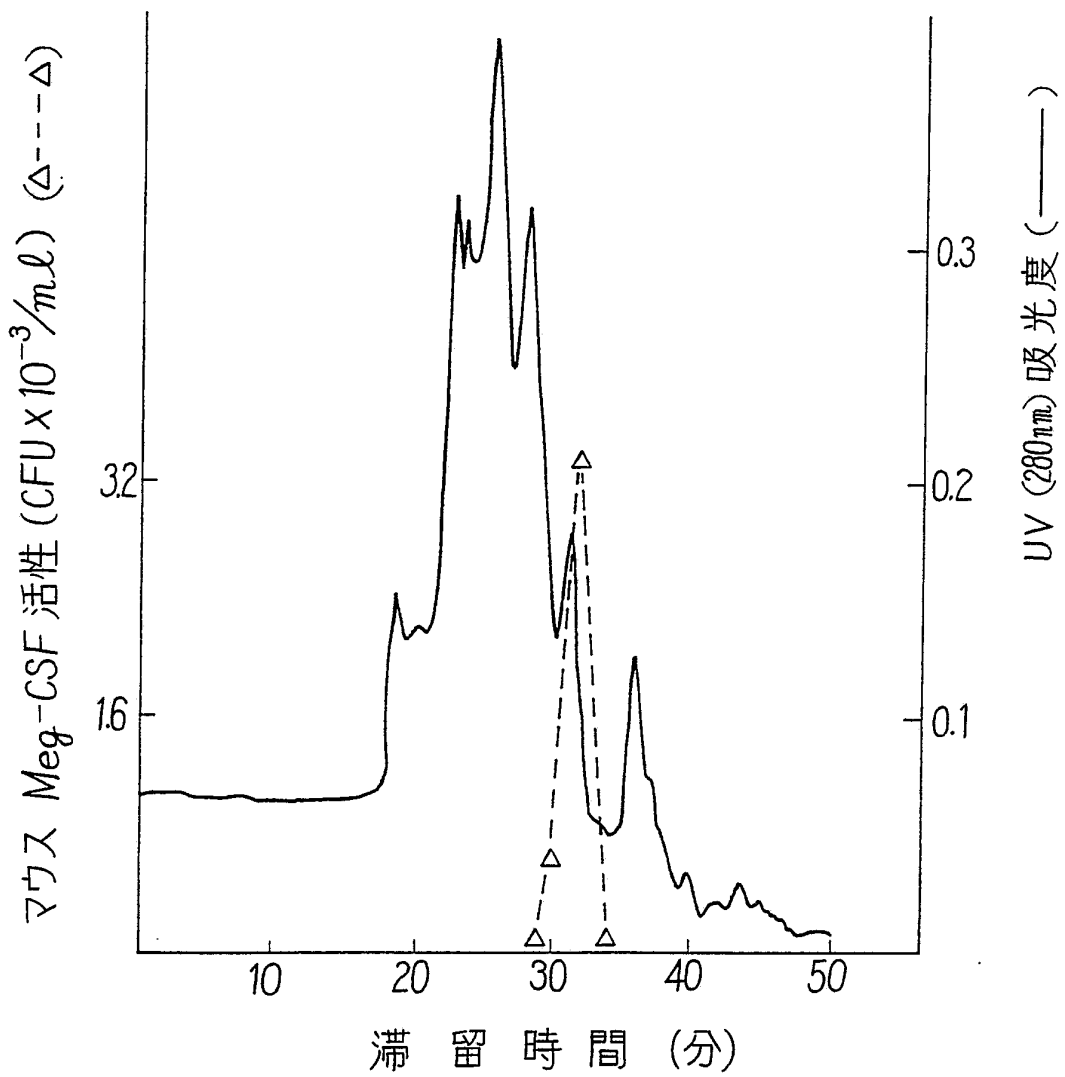
- 5 7. ヒト由来の肺大細胞癌の細胞株から、巨核球系コロニー刺激因子の高い生産能をもつ単一のクローンとして分離されたヒト肺癌細胞株。

第 1 図

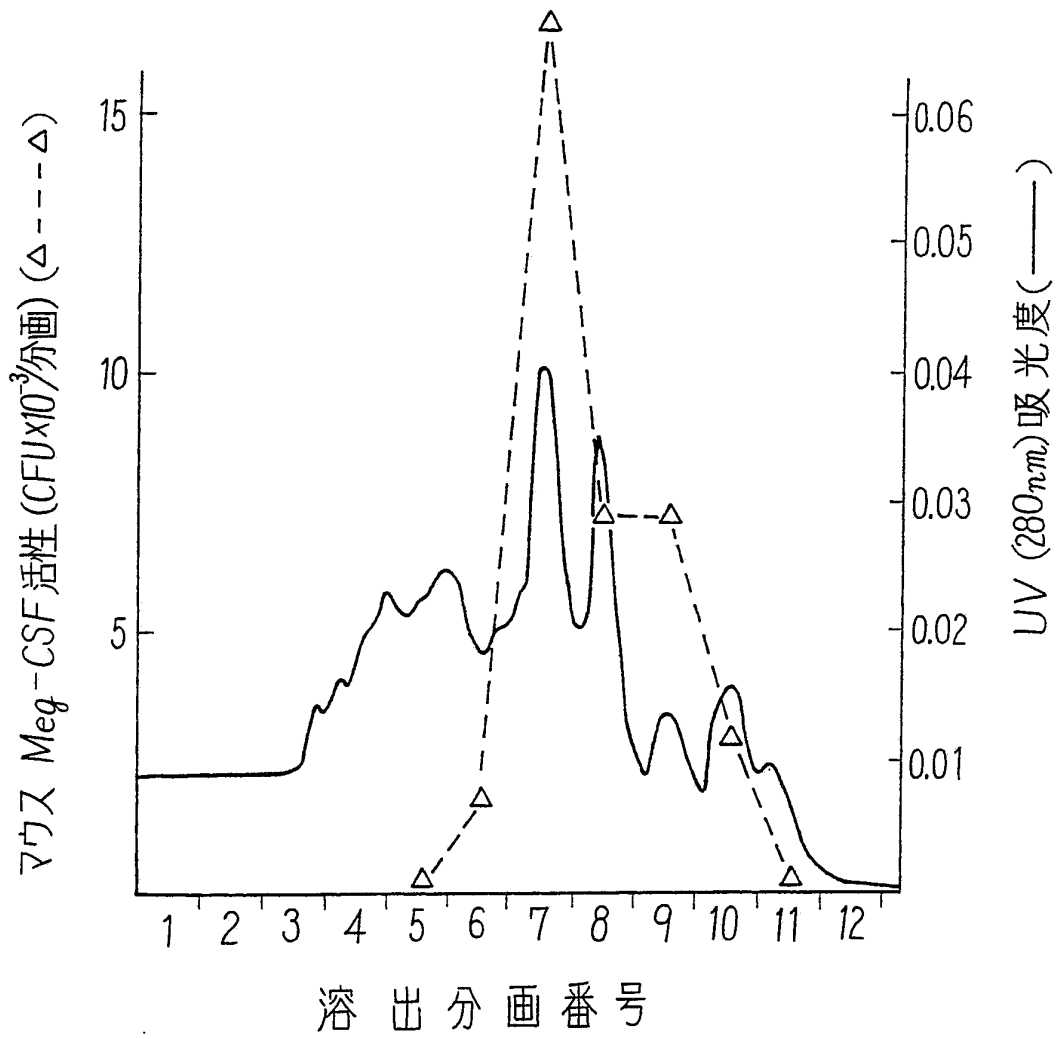




第 2 図



### 第 3 図



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/JP89/00960

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (if several classification symbols apply, indicate all) <sup>6</sup>				
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC				
Int. Cl <sup>4</sup>	C07K15/04, C12P21/00, C12N5/00// A61K37/02, (C12P21/00, C12R1:91)			
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>				
Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>				
Classification System	Classification Symbols			
IPC	C07K15/04, C12P21/00, 21/02, C12N5/00			
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup>				
Biological Abstracts Data Base (BIOSIS)				
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <sup>9</sup>				
Category *	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>		
A	Journal of Clinical Investigation, Vol. 75, No. 4, (1985), R. Hoffman et al. "Purification and partial characterization of a megakaryocyte colony-stimulating factor from human plasma" p. 1174-1182	1 - 6		
A	Journal of Immunology, Vol. 137, No. 8, (1986), D. Geissler et al. "The influence of T lymphocyte subsets and humoral factors on colony formation by human bone marrow and blood megakaryocyte progenitor cells in-vitro" p. 2508-2513	1 - 6		
<p><sup>*</sup> Special categories of cited documents: <sup>10</sup></p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;"> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </td> <td style="width: 50%; border: none;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </td> </tr> </table>			<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>			
<b>IV. CERTIFICATION</b>				
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report			
December 12, 1989 (12. 12. 89)	December 25, 1989 (25. 12. 89)			
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer			
Japanese Patent Office				

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. <sup>4</sup> C07K15/04, C12P21/00, C12N5/00// A61K37/02, (C12P21/00, C12R1:91)		
II. 国際調査を行った分野		
調査を行った最小限資料		
分類体系	分類記号	
IPC	C07K15/04, C12P21/00, 21/02, C12N5/00	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
Biological Abstracts Data Base (BIOSIS)		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の カテゴリー※	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
A	Journal of Clinical Investigation, 第75巻, 第4号, (1985), R. Hoffman et al. "Purification and partial characterization of a megakaryocyte colony-stimulating factor from human plasma" p. 1174-1182	1-6
A	Journal of Immunology, 第137巻, 第8号, (1986), D. Geissler et al. "The influence of T lymphocyte subsets and humoral factors on colony formation by human bone marrow and blood megakaryocyte progenitor cells in-vitro" p. 2508-2513	1-6
<p>※引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  「&amp;」 同一パテントファミリーの文献</p>		
IV. 認 証		
国際調査を完了した日 12. 12. 89	国際調査報告の発送日 25.12.89	
国際調査機関 日本国特許庁 (ISA/JP)	権限のある職員 特許庁審査官 内 田 俊 生	4 B 8 2 1 4