

(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2006-184072

(P2006-184072A)

(43) 公開日 平成18年7月13日(2006.7.13)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 K	2 GO 4 5
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z	4 B O 6 3
GO 1 N 33/15 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z	
	GO 1 N 33/53 D	
審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 14 頁)		

(21) 出願番号 特願2004-376216 (P2004-376216)
 (22) 出願日 平成16年12月27日 (2004.12.27)

(71) 出願人 592242408
 財団法人ルイ・パストゥール医学研究センター
 京都市左京区田中門前町103番地の5
 (71) 出願人 591083336
 株式会社ビー・エム・エル
 東京都渋谷区千駄ヶ谷5丁目21番3号
 (74) 代理人 100068032
 弁理士 武石 靖彦
 (74) 代理人 100080333
 弁理士 村田 紀子
 (74) 代理人 100115222
 弁理士 徳岡 修二
 (74) 代理人 100124796
 弁理士 重本 博充

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 被検物質の免疫賦活能評価方法

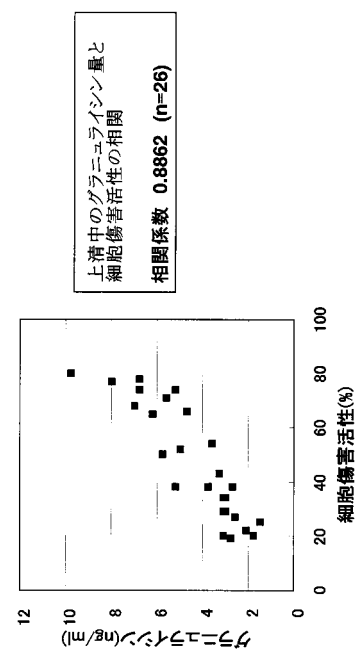
(57) 【要約】

【課題】 測定に適した生理活性物質、すなわち、インビトロで末梢血単核球 (PBMC) と被検物質とを培養したときに、培養上清から採取することができ、且つPBMCの細胞傷害活性と高い相関関係を示す生理活性物質であって、用いるPBMCによってバラツキが出にくい生理活性物質を用いて、簡便かつ信頼性の高い、被検物質の免疫賦活能評価方法を提供する。

【解決手段】 被検物質を末梢血単核球とともに培養し、培養上清のグラニューライシンを検出することを特徴とする、被検物質の免疫賦活能評価方法。

【選択図】 図 4

図 4. 乳酸菌刺激によるPBMC上清中のグラニューライシン量と細胞傷害活性の相関



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被検物質を末梢血単核球とともに培養し、培養上清のグラニューライシンを検出すること
を特徴とする、被検物質の免疫賦活能評価方法。

【請求項 2】

グラニューライシンの検出手段としてELISA法を用いる、請求項 1 に記載の評価方法。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の評価方法を用いる、免疫賦活物質のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、哺乳類に対する被検物質の免疫賦活能を評価するための簡便且つ正確な方法
に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、免疫能を増強することによって疾患を治癒、改善することに注目が集まっており
、医薬品分野のみならず健康食品等の分野においても、免疫賦活能を有する物質の発見や
物質の免疫賦活能の評価に多くの資本と労力が投下されている。従来、被検物質の免疫賦
活能の有無及び程度は、一般に細胞傷害活性をマーカーとして判定されていた。

【0003】

20

細胞傷害活性は、末梢血単核球(PBMC)と標的細胞(腫瘍細胞など)を混合培養し、cell-c
ell contactさせたときに標的細胞の何%を殺傷するかで判定していた。しかしこの方法で
は、標的細胞を無菌的に継続して継代培養する必要がある煩雑である。また、標的細胞が
傷害されるか否かに基づいて判定することから、細胞傷害活性の値は標的細胞の調子や元
気度によって左右されやすく、標的細胞の状態を定常に保たなければ値の変動が大きくな
る。また、被検者から分離して得られるPBMCの細胞傷害活性度は、保存条件や採血後の時
間などに影響されやすく、採血当日あるいは遅くとも翌日には測定することが必須である
。さらに細胞傷害活性の高い血液を用いると刺激により細胞傷害活性の値がプラトーに達
してしまい、免疫賦活能の比較がしにくくなる傾向が見られる。

【0004】

30

それ故、細胞傷害活性を測定する方法は、手間がかかるとともに、正確なデータを得る
ためには複数回の実験を行わなければ信頼性のあるデータを得ることはできないという問
題がある。このような問題は、特に多くの被検物質をスクリーニングしたい場合に大きな
障害となる。そのため、細胞傷害活性の測定に代替する方法が望まれていた。

【0005】

この問題を解決するものとして、PBMCから放出される生理活性物質を測定することによ
り、免疫賦活能を評価する方法が考えられる。この方法によれば、上清中に存在する生理
活性物質を測定すればよいため、上清を回収し凍結保存しておいて多量の検体を一括して
測定することが可能であり、また標的細胞を培養する必要がないため、上記方法と異なり
、利便性に富み簡便である。

40

【0006】

PBMCから放出される生理活性物質であって、免疫と関係するものとして、例えば、IFN-
γ、IL-12などが考えられる。

【0007】

また、特許文献 1 では、体液検体において、細胞外のグラニューライシンを検出すること
により検体提供者の免疫状態を確認する方法が開示されている。この発明は、グラニュー
ライシンが、NK細胞やCTLから細胞外に分泌されることにより細胞外においても可溶型の蛋
白質として認められること、及び重症度の異なる癌患者から採取した血漿中のグラニュー
ライシン量を測定し、健常者の血漿中のグラニューライシン量と比較した結果、重症度の低い
癌患者では、血漿中のグラニューライシン量が健常者とほとんど変わらないのに対し、重症

50

度の高い癌患者（免疫状態がより低下しているものと思われる）では、血漿中のグラニューライシン量が有意に低下していることを見出してなされたものであり、インビボのグラニューライシンの挙動に基づくものである。

【特許文献1】国際公開番号WO 03/052417号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

しかし、PBMCが放出する生理活性物質を指標として免疫賦活能を正確に見るためには、様々なことが要求される。すなわち、細胞傷害活性との相関関係が大きいことや、用いるPBMCによって大きなバラツキが出ないこと、小差の免疫賦活能も的確に評価できることなどが求められる。上記特許文献1においても、インビトロにおけるグラニューライシンの挙動は明らかにされていない。

10

【0009】

したがって、評価に適した生理活性物質、すなわち、インビトロでPBMCと被検物質とを培養したときに、上清（PBMCの細胞外）から採取することができ、且つPBMCの細胞傷害活性と高い相関関係を示す生理活性物質であって、用いるPBMCによってバラツキが出にくい生理活性物質の発見、及び該生理活性物質を用いた、簡便かつ信頼性の高い評価方法が望まれていた。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、PBMCと被検物質とを混合培養した際、培養上清中に存在するグラニューライシン量と細胞傷害活性との間に高い相関性が見られること、及び上清中のグラニューライシン量は、複数人の血液から採取したPBMCを用いて実験を行った際にも、各PBMC間でのバラツキが小さいことを見出し、本発明を完成した。

20

【0011】

すなわち、本発明は、被検物質を末梢血単核球(PBMC)とともに培養し、培養上清のグラニューライシンを検出することの特徴とする、被検物質の免疫賦活能評価方法である。

【0012】

被検物質をPBMCとともに培養すると、被検物質に免疫賦活能がある場合には、PBMCが活性化されグラニューライシンの産生が亢進される。しかし被検物質が免疫賦活能を有しない場合には、グラニューライシンの産生は亢進されない。産生されたグラニューライシンの一部は、PBMCから分泌されて培養上清に存在し、培養上清中から検出されたグラニューライシン量は細胞傷害活性と高い相関性を示す。したがって、培養上清のグラニューライシンを検出することにより、被検物質に免疫賦活能があるか否か、またその程度を評価することが可能である。

30

【0013】

この方法によれば、細胞傷害活性測定法と異なり、標的細胞（一般に腫瘍細胞であるK562が用いられる）を無菌的に継代培養する必要及び標的細胞の状態を定常に保つ必要がないため簡便である。また、細胞傷害活性の測定は、PBMCとK562とを反応させた後数時間以内（一般に約2～4時間後）に測定する必要があるため、やり直しあるいは測定検体を保存することができず、例えわずかの検体でもその日のうちに測定しなければならないが、本発明に係る方法では、上清を回収し凍結保存しておいて、後で測定することができるため、時間的な制限が少ない。特に複数の被検物質を測定する場合などは、検体を保存しておき、一括して測定すればよいため効率的である。

40

さらに、異なる個体のPBMCを用いた場合でも値が大きく変動しないため、複数回の実験を行わなくても信頼性の高いデータを得ることができ、また、被検物質の免疫賦活能を比較する際にも便利である。

【0014】

グラニューライシンの検出手段としてELISA法を用いれば、標準物質を基準にして測定す

50

るので値の変動が少なく、大量の検体を一度に処理できる。また、放射性同位元素を使用する必要がないため、放射性同位元素使用許可施設で測定しなければならないという問題や、環境あるいは測定者の健康への影響といった問題がない。さらに、測定が簡便であって、特殊で高価な測定機器を必要としない。

【0015】

本発明に係る評価方法を用いて免疫賦活物質のスクリーニングを行えば、多数の被検物質から免疫賦活能を有する物質を、効率よく発見することができる。

【発明の効果】

【0016】

本発明に係る評価方法によれば、被検物質をPBMCとともに培養し、培養上清のグラニューライシンを測定するだけでよいため、細胞傷害活性の測定と異なり、標的細胞を培養する必要がない。また、上清を保存しておいて後で測定することが可能であるため、時間的な制約が少なく、保存しておいた検体をまとめて測定することも可能である。さらに、異なるPBMCを用いても、測定結果に大きな差が出ないため、複数回の実験を行わなくても信頼性の高いデータを得ることができ、多数の被検物質のスクリーニングに非常に有効である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

末梢血単核球(PBMC)は、一般に単球とリンパ球(ナチュラルキラー(NK)細胞、Tリンパ球、Bリンパ球)を含んでおり、末梢血をヘパリン加採血しフィコール液を用いて遠心分離すること等によって得ることができる。本発明においては、少なくともナチュラルキラー細胞(NK細胞)あるいは細胞傷害性Tリンパ球(CTL)のいずれかを含むものを指す。

【0018】

グラニューライシンはナチュラルキラー細胞(NK細胞)や細胞傷害性Tリンパ球(CTL)が標的細胞に細胞死を惹き起こすために放出する一連の殺細胞活性を有する分子のひとつであって、細胞傷害活性と抗菌活性が報告されている。

【0019】

以下、実施例により本発明を更に詳細に説明する。実施例に用いた被検物質、測定方法は以下のとおりである。グラニューライシンと比較する物質としてIFN- γ を用いた。

【0020】

被検物質として、動物性の発酵乳製品や腸管から分離した動物性乳酸菌(*Lactobacillus lactis*)を10種類、漬物から分離した植物性乳酸菌(*Lactobacillus pentosus*)3種類を使用した(以下、これら13種の乳酸菌をそれぞれA, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, Mと称する)。乳酸菌は、5 μ g/ml濃度の加熱死菌体として使用した。

【0021】

グラニューライシンの検出は、エライザ(ELISA)法を用いて行った。手順を以下に示す。

グラニューライシンサンドイッチエライザ測定法

100mM炭酸ナトリウム緩衝フィコール液を用いて液中に、5 μ g/mlに希釈したマウス抗ヒトグラニューライシンモノクローナル抗体(クローンRB1)を添加して、これを96ウエルマイクロプレートのウェルに分注して、4 $^{\circ}$ Cで一晩接触させることにより固相化を行う。この抗体固相化プレートを、洗浄液(0.1%Tween20/PBS)で洗った後、ブロッキング液(10%牛胎児血清/洗浄液)でブロックする。抗体固相化プレートを、前記洗浄液で洗った後、前記ブロッキング液で希釈した標準品(前記のモノクローナル抗体を得る際の免疫に用いたプラスミドを、COS-7細胞にトランスフェクションして、2日目の培養上清を100万unit/mlの標準品とする)またはサンプルを、それぞれ50 μ l添加して反応させ、反応後、前記洗浄液で、再度、洗浄する。次に常法によりビオチン化したビオチン化抗グラニューライシンモノクローナル抗体(クローンRC8)を反応させて、PBST(0.1%Tween20/PBS)で洗浄した

後、PBSTで希釈したHRP (Horseradish Peroxidase) 標識ストレプトアビジンを反応させる。PBSTで洗浄後、プレートに検出用のTMB酵素基質を加え、反応させた後、プレートリーダーで測定する。

【0022】

細胞傷害活性の測定は以下の方法を用いて行った。腫瘍細胞(標的細胞)として、K562を用いた。

細胞傷害活性測定法

K562標的細胞を蛍光色素DiO で標識し、これをPBMCと2時間反応させる。培養液には細胞膜不透過性核酸結合蛍光色素PIを加えておく。傷害を受けたK562標的細胞はDiO ,PIで二重染色されるのに対し、傷害を受けなかったK562標的細胞はDiOのみの単染色であるため、これを利用してフローサイトメーターで検出する。

10

【実施例1】

【0023】

「反応時間の検討」

ヒト末梢血をヘパリン加採血し、フィコールパック比重遠沈法によりPBMCを分離した。分離したPBMCは10%牛胎児血清を含むRPMI1640培地を用いて最終濃度 2×10^6 cells/mlに調整した。これに $5 \mu\text{g/ml}$ 濃度の乳酸菌Aを加え5mlリンパ球培養用チューブで培養した。培養は5%炭酸ガス、37℃の条件で行った。3時間ごとに上清を回収しグラニュライシンサンドイッチELISA測定法によって、上清中のグラニュライシン量を測定した。結果を図1に示す。

20

【0024】

PBMC上清中のグラニュライシン量の増加は、乳酸菌刺激後約6時間から認められた。15時間後には、乳酸菌を加えずに測定したPBMC上清中のグラニュライシン量(刺激なし)との間に明らかな差が生じ、乳酸菌Aにグラニュライシン分泌を促進する能力があることが明らかになった。上清中のグラニュライシン量は18時間でプラトーに達した。実施例1の結果から、PBMCと乳酸菌の培養時間は21時間に決定した。

【実施例2】

【0025】

「乳酸菌A～Iによるグラニュライシン産生促進能の検討」

実施例1と同様の方法でPBMCを乳酸菌と21時間培養した後、遠心分離して、PBMCを試験管下層部に沈降させ、培養上清を回収し、グラニュライシンサンドイッチELISA測定法によって、上清中のグラニュライシン量を測定した。結果を図2に示す。

30

【0026】

乳酸菌A～Iを加えた場合、対照(乳酸菌を加えなかった場合の培養上清中のグラニュライシン量)と比較して、培養上清中のグラニュライシン量はそれぞれ増加していた。実施例の結果から、乳酸菌A～Iにグラニュライシン産生亢進能があること、及びその程度が分かった。

【実施例3】

【0027】

「乳酸菌A～Iによる細胞傷害活性促進能の検討」

40

実施例2と同様に、PBMCを乳酸菌で21時間刺激した後、蛍光色素DiO で標識したK562標的細胞をPBMCと2時間反応させ、細胞傷害活性を測定した。結果を図3に示す。PBMCの細胞傷害活性は乳酸菌刺激によって増強した。この結果から、乳酸菌A～Iに細胞傷害活性を亢進する能力があることが分かった。

【0028】

「乳酸菌刺激時の上清中のグラニュライシン量と細胞傷害活性の相関」

図4にPBMC上清中のグラニュライシン量と細胞傷害活性の相関関係を示す。図に示すように、乳酸菌刺激時の上清中のグラニュライシン量と細胞傷害活性には強い相関が見られた。相関係数は0.8862であった。

【0029】

50

図 5 に、対照を 1 とした場合の上清中のグラニュライシン比（実施例 2 の結果から作成）および細胞傷害活性比（実施例 3 の結果から作成）を示す。図 5 に示すように、上清中のグラニュライシン量を測定する方法によれば、細胞傷害活性に比べて、小差の免疫賦活能も明確に把握できる。その一方で、上清中のグラニュライシン量は被検物質ごとに極端に変動しなかったため、希釈等を行う手間はかからず、測定が簡便であった。

【実施例 4】

【0030】

「PBMCのグラニュライシン産生量の個体差の検討（1）」

同じ被検物質について、3 名（各人を S.G. H.M. K.Y. と表す）の血液から分離した PBMC を用いて実験を行い、培養上清中のグラニュライシン量を比較した。結果を表 1 及び図 6 に示す。

【0031】

【表 1】

表 1. PBMC 上清中のグラニュライシン量の個体差

被験者 乳酸菌株	グラニュライシン量 (ng/ml)		
	S.G.	H.M.	K.Y.
対照	3.0	1.9	2.6
A	8.0	7.8	11.8
B	6.8	6.6	8.5
C	3.8	2.5	3.1
D	5.5	4.9	7.1
E	7.0	7.1	9.2
F	5.6	4.9	7.4
G	9.8	8.3	13.8
H	3.3	2.2	2.8
I	5.0	4.5	6.9

【0032】

PBMC 上清中のグラニュライシン量は、異なる個体から分離した PBMC を用いて測定を行った際も、個体による差が小さく、極端に高値を示す個体や、グラニュライシンがほとんど検出されない個体はなかった。また、各乳酸菌について、最大値を示す個体と最小値を示す個体とを比較した場合、最大値が最小値の 2 倍を超えることはなかった。さらに、どの

個体のPBMCを使用しても、上清中のグラニューライシン量は、G，A，E，B，F，D，I，C，Hの順に高値を示した（ただし、H.M.のみ、DとFの値が同じ）。

【実施例 5】

【0033】

「PBMCのグラニューライシン産生量の個体差の検討（2）」

PBMC上清中のグラニューライシン量の個体差をさらに検討するために、実施例 4 とは異なる被験者 4 名（各人を K.T.、K.A.、S.K.、S.Y. と表す）の血液から分離した PBMC を用いて、5 種の乳酸菌による実験を行い、培養上清中のグラニューライシン量を比較した。結果を表 2 及び図 7 に示す。

【0034】

【表 2】

10

表 2. PBMC上清中のグラニューライシン量の個体差 (ng/ml)

被験者 乳酸菌株	K.T.	K.A.	S.K.	S.Y.
対照	3.0	1.7	1.5	3.1
G	9.8	3.5	7.4	7.0
J	5.6	3.0	4.7	5.8
K	7.0	3.1	6.8	6.2
L	3.3	2.6	3.6	5.2
M	3.8	1.8	2.7	2.8

20

30

【0035】

実施例 4 と同様、実施例 5 においても、PBMC上清中のグラニューライシンは、極端に高値を示す個体や、ほとんど検出されない個体は見られず、個体による差が小さかった。また、各乳酸菌について、最大値を示す個体と最小値を示す個体とを比較した場合、最大値が最小値の 3 倍を超えることはなかった。さらに、どの個体の PBMC を使用しても、上清中のグラニューライシン量は、G，K，J の順に高値を示した。L，M については、1 名のみが M，L の順で高値を示し、他の 3 名は L、M の順で高値を示した。

【0036】

実施例 4 及び実施例 5 から、PBMC上清中のグラニューライシン量は個体間のバラツキが小さく、複数の検体を用いて実験を繰り返さなくても、信頼性の高いデータを得ることができることが分かった。

40

【0037】

以上の実施例の結果から、PBMCを被検物質とともに培養した際の、PBMC上清中のグラニューライシン量と PBMC の細胞傷害活性との間には高い相関関係があることが明らかになり、細胞傷害活性の測定に代えて、上清中のグラニューライシン量を測定して被検物質の免疫賦活能を評価できることが分かった。また、PBMC上清中のグラニューライシン量の測定は簡便であること、及び用いる PBMC による個体差が小さいことが明らかになり、本発明にかかる方法が、被検物質の免疫賦活能を評価する方法として非常に適していること、特に、多数の被検物質から免疫賦活能を有する物質をスクリーニングする方法として非常に適してい

50

ることが分かった。

【0038】

「比較例1」

乳酸菌刺激時におけるPBMC上清中のIFN- γ 量の測定

実施例1と同様の方法でPBMCを乳酸菌で21時間刺激した後、PBMC培養上清を回収し、市販のELISAキットを用いてELISA測定法によって上清中のIFN- γ 量を測定した。結果を表3及び図8に示す。

【0039】

【表3】

表3. 乳酸菌刺激によるPBMC上清中のIFN- γ 量(pg/ml)

10

菌株	IFN- γ (pg/ml)
対照	0
A	2601
B	4620
C	0
D	1262
E	1717
F	582
G	3455
H	0
I	0

20

30

【0040】

PBMC上清中のIFN- γ 量は、被検物質によって大きな違いが認められた。すなわち、全く検出できないか高値を示すかのどちらかであり、値の差が大きいため、希釈して測定を行う必要があった。

40

【0041】

「比較例2」

乳酸菌刺激時の上清中のIFN- γ 量と細胞傷害活性の相関

図9にPBMC上清中のIFN- γ 量と細胞傷害活性の相関関係を示す。乳酸菌刺激時の上清中のIFN- γ 量と細胞傷害活性との相関は低く、相関係数は0.5009であった。

【0042】

「比較例3」

50

PBMCのIFN- γ 産生量の個体差の検討

同じ被検物質について、5名（各人を、K.A. k.a. H.M. K.Y. S.K.と表す）の血液から分離したPBMCを用いて実験を行い、PBMC上清中のIFN- γ 量を比較した。結果を表4及び図10に示す。

【0043】

【表4】

表4. PBMC上清中のIFN- γ 量の個体差 (pg/ml)

被験者	乳酸菌株		
	A	B	C
K.A.	629	476	5
k.a.	76	57	0
H.M.	690	1940	62
K.Y.	918	257	10
S.K.	5	20	0

10

20

30

40

50

【0044】

PBMC上清中のIFN- γ 量は個体差がおおきく、極端に高値を示す個体（K.A.、H.M.、K.Y.）と、ほとんど検出されない個体（k.a.、S.K.）とがあり、値に大きなバラツキが見られた。また、IFN- γ 応答性が高い個体間（あるいは低い個体間）で比較した場合であっても、測定値が7倍以上異なることがあり、最高値を示す乳酸菌の種類も個体によって異なった。

【0045】

比較例1～3の結果から、PBMCを被検物質とともに培養した際の、PBMC上清中のIFN- γ 量とPBMCの細胞傷害活性との間には明確な相関関係が見られず、細胞傷害活性の測定に代えて上清中のIFN- γ 量を測定する方法は用いることはできないこと、また、PBMC上清中のIFN- γ 量は、用いるPBMCによって測定結果が大きく異なり、被検物質の免疫賦活能の評価には適していないことが分かった。

【0046】

「結論」

実施例の結果から、細胞傷害活性測定法に代えて、上清中のグラニューライシンを検出することによって、被検物質の免疫賦活能を評価できることが分かった。また、本発明にか

かる方法では、K562を培養する必要がなく、さらに上清を凍結保存しておいて後日測定することができるため、細胞傷害活性の測定と比べて非常に測定が簡単であり、利便性が高かった。

また、比較例の結果から、インビトロでPBMCと被検物質とを培養したときに培養上清から採取することができる生理活性物質のうちで、グラニューライシンが免疫賦活能の評価に特に適していることが分かった。

【産業上の利用可能性】

【0047】

本発明にかかる方法は、免疫賦活能を利用する薬剤（例えば、癌や感染症の治療薬）のスクリーニングなどに用いることが可能である。

10

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図1】 PBMC上清中のグラニューライシン量の経時的变化を示す折れ線グラフ。

【図2】 各種乳酸菌と培養した際の、PBMC上清中のグラニューライシン量を示す棒グラフ。

【図3】 各種乳酸菌と培養した際の、PBMCの細胞傷害活性を示す棒グラフ。

【図4】 PBMC上清中のグラニューライシン量と細胞傷害活性の相関関係を示す図表。

【図5】 対照を1としたときの、PBMC上清中のグラニューライシン比（左）と細胞傷害活性比（右）を示す棒グラフ。

【図6】 各個体（S.G.、H.M.、K.Y.）のPBMC上清中のグラニューライシン量を示す棒グラフ

20

。【図7】 各個体（K.T.、K.A.、S.K.、S.Y.）のPBMC上清中のグラニューライシン量を示す棒グラフ。

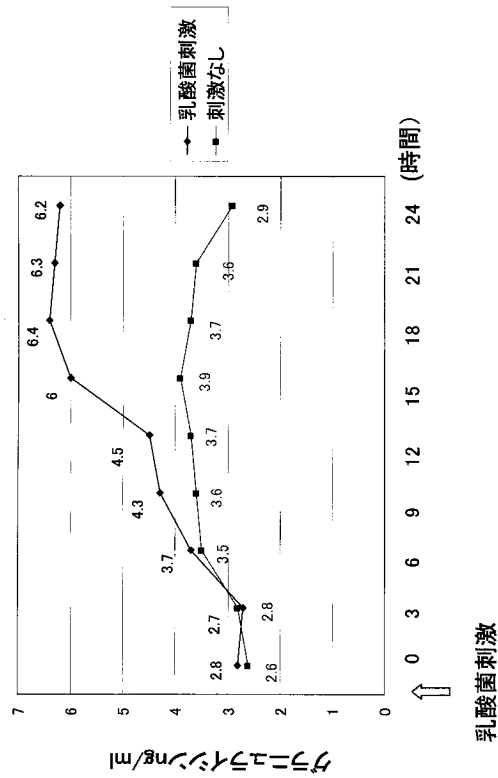
【図8】 各種乳酸菌と培養した際の、PBMC上清中のIFN- γ 量を示す棒グラフ。

【図9】 PBMC上清中のIFN- γ 量と細胞傷害活性の相関関係を示す図表。

【図10】 各個体（K.A.、k.a.、H.M.、K.Y.、S.K.）のPBMC上清中のIFN- γ 量を示す棒グラフ。

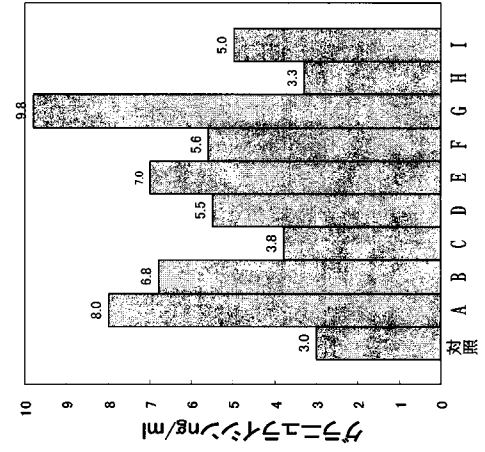
【図 1】

図 1. P BMC上清中のグラニュライシン量の時間的变化



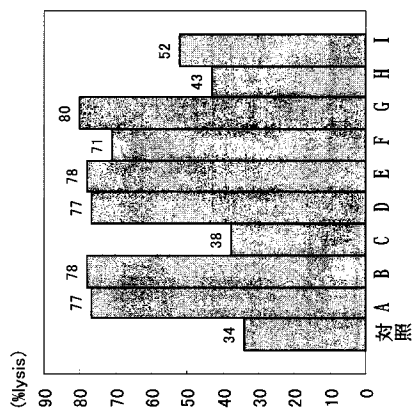
【図 2】

図 2. 乳酸菌刺激によるP BMC上清中のグラニュライシン量 (ng/ml)



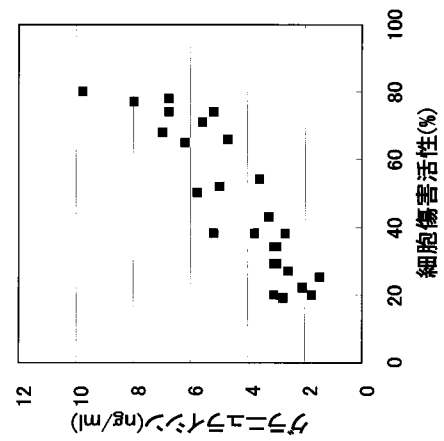
【図 3】

図 3. 乳酸菌刺激による細胞傷害活性 (%)



【図 4】

図 4. 乳酸菌刺激によるP BMC上清中のグラニュライシン量と細胞傷害活性の相関

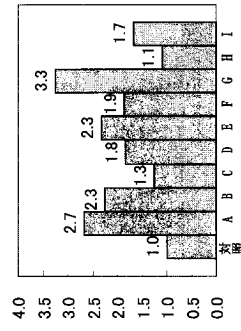
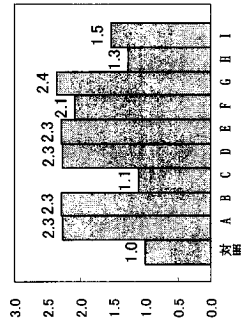


【図 5】

細胞傷害活性比

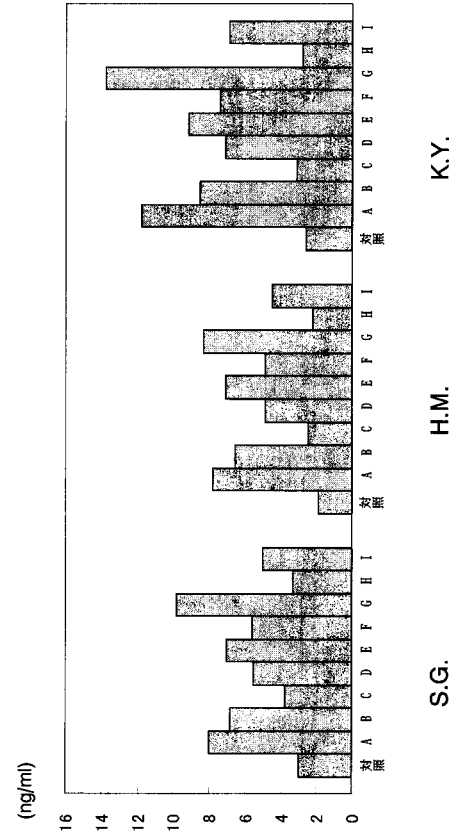
グラニューライシン比

図5



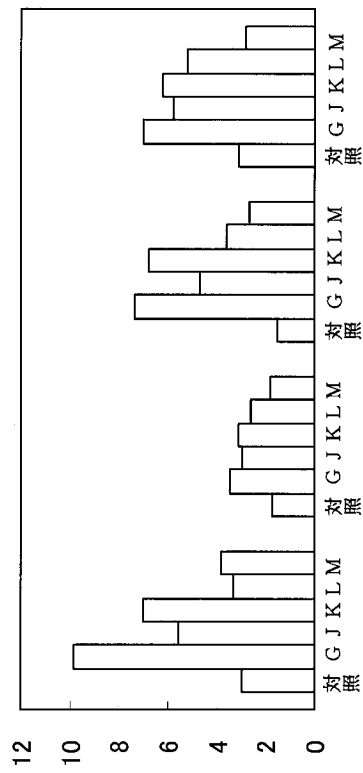
【図 6】

図 6. PBMC上清中のグラニューライシンの個体差 (ng/ml)

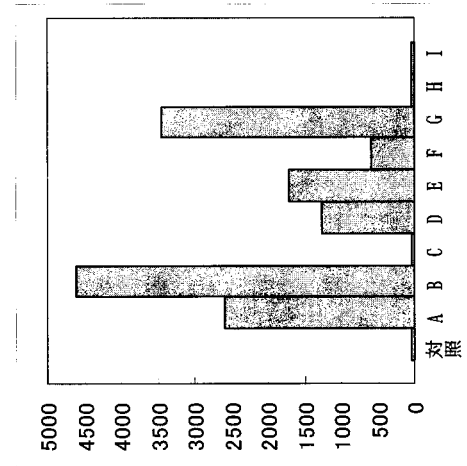


【図 7】

図7. PBMC上清中のグラニューライシンの個体差 (ng/ml)

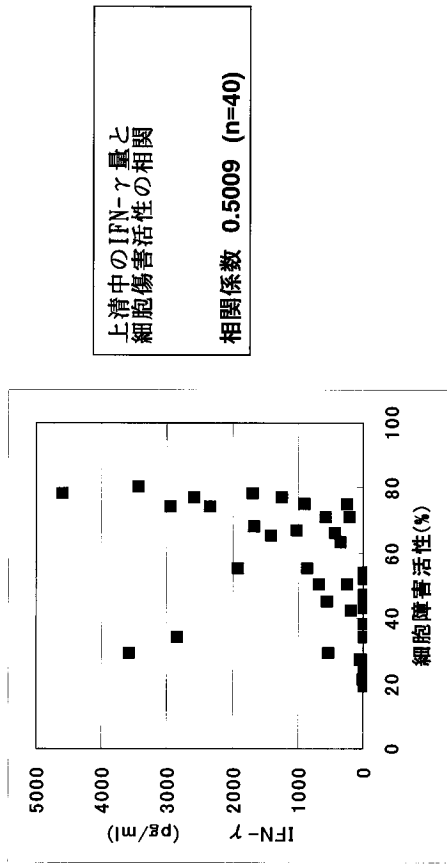


【図 8】

図 8. 乳酸菌刺激によるPBMC上清中のIFN- γ 量 (pg/ml)

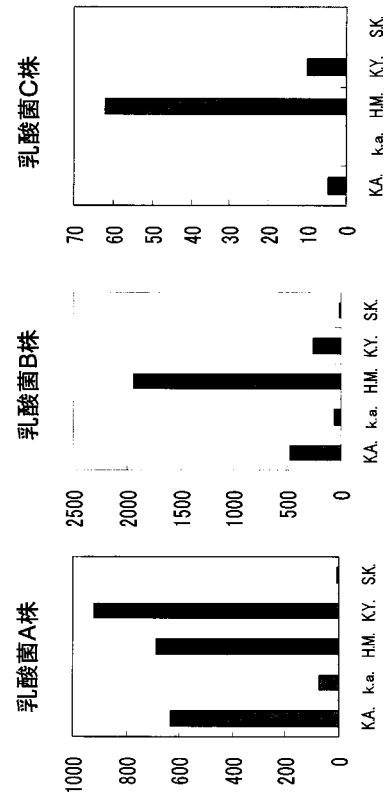
【図 9】

図 9．乳酸菌刺激によるPBMC上清中のIFN- γ 量と細胞傷害活性の相関



【図 10】

図 10．PBMC上清中のIFN- γ 量の個体差 (pg/ml)



フロントページの続き

(74)代理人 100125586

弁理士 大角 菜穂子

(72)発明者 岸 惇子

京都府京都市左京区田中門前町103番地の5 財団法人ルイ・パストゥール医学研究センター内

(72)発明者 赤谷 薫

京都府京都市左京区田中門前町103番地の5 財団法人ルイ・パストゥール医学研究センター内

(72)発明者 岸田 綱太郎

京都府京都市左京区田中門前町103番地の5 財団法人ルイ・パストゥール医学研究センター内

(72)発明者 小川 一行

埼玉県川越市市場1361番地1 株式会社ビー・エム・エル総合研究所内

(72)発明者 永田 欽也

埼玉県川越市市場1361番地1 株式会社ビー・エム・エル総合研究所内

Fターム(参考) 2G045 AA40 BB20 CA11 DA36 FB03

4B063 QA01 QQ08 QQ79 QQ91 QR48 QR50 QR54 QR56 QR77 QR82

QS28 QS33 QS35 QS36 QS39 QX01

专利名称(译)	评价受试物质的免疫增强活性的方法		
公开(公告)号	JP2006184072A	公开(公告)日	2006-07-13
申请号	JP2004376216	申请日	2004-12-27
[标]申请(专利权)人(译)	基金会路易斯·巴斯德医学研究中心 BM萨尔瓦多		
申请(专利权)人(译)	基金会路易斯·巴斯德医学研究中心 BML有限公司		
[标]发明人	岸 惇子 赤谷 薫 岸田 綱太郎 小川 一行 永田 欽也		
发明人	岸 惇子 赤谷 薫 岸田 綱太郎 小川 一行 永田 欽也		
IPC分类号	G01N33/50 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/50.K G01N33/50.Z C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/53.D		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB20 2G045/CA11 2G045/DA36 2G045/FB03 4B063/QA01 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QQ91 4B063/QR48 4B063/QR50 4B063/QR54 4B063/QR56 4B063/QR77 4B063/QR82 4B063/QS28 4B063/QS33 4B063/QS35 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX01		
代理人(译)	竹石 彦 徳冈 修治		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供适合于测量的生理活性物质，即在体外培养外周血单核细胞（PBMC）和测试物质时可从培养上清液中收集，并具有PBMC的细胞毒活性，并提供了一种简单且高度可靠的方法，用于使用生理活性物质评估测试物质的免疫增强活性，所述生理活性物质难以根据所用的PBMC而变化。 解决方案：评估测试物质的免疫增强活性的方法，其包括将测试物质与外周血单核细胞一起培养并检测培养上清液中的颗粒溶素。 点域4

