

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-515430

(P2005-515430A)

(43) 公表日 平成17年5月26日(2005.5.26)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	4 B O 6 3
GO 1 N 33/15	GO 1 N 33/15	
GO 1 N 33/50	GO 1 N 33/50	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2003-560514 (P2003-560514)	(71) 出願人	504238116
(86) (22) 出願日	平成14年12月20日 (2002.12.20)		イースタン ヴァージニア メディカル
(85) 翻訳文提出日	平成16年8月12日 (2004.8.12)		スクール
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/040797		アメリカ合衆国 バージニア州 ノーフォーク
(87) 国際公開番号	W02003/060467		ピー. オー. ボックス 1980
(87) 国際公開日	平成15年7月24日 (2003.7.24)	(74) 代理人	100102978
(31) 優先権主張番号	60/342, 432		弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成13年12月21日 (2001.12.21)	(74) 代理人	100108774
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 橋本 一憲
		(74) 代理人	100128048
			弁理士 新見 浩一
		(72) 発明者	デン ユビン
			アメリカ合衆国 バージニア州 ヨークタウン
			コリーン ドライブ 203
		Fターム (参考)	2G045 BB20 BB24 BB50 CB01 FB03
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 医用薬剤の効果を分析する方法

(57) 【要約】

医用薬剤の効果を分析する方法、より詳細にはヒトの免疫系に及ぼす医用薬剤の効果を分析するエクスピボ方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

医用薬剤を免疫応答細胞と接触させて、薬剤-細胞混合物を形成させる段階；および
プローブを用いて薬剤-細胞混合物を細胞の活性化についてアッセイする段階
を含む、免疫応答に及ぼす医用薬剤の効果を決定する方法。

【請求項 2】

薬剤-細胞混合物を細胞の活性化についてアッセイするために用いるプローブに、表現
型マーカープローブ、化学的マーカープローブ、活性化マーカープローブ、またはそれら
の組み合わせが含まれる、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

薬剤-細胞混合物を細胞の活性化についてアッセイするために用いるプローブに、細胞
表面抗原に対する抗体、分泌抗原に対する抗体、細胞内抗原に対する抗体、またはそれら
の組み合わせが含まれる、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

医用薬剤を免疫応答細胞と接触させて、薬剤-細胞混合物を形成させる段階；および
少なくとも2つの表現型マーカーの存在を確認するために、薬剤-細胞混合物をアッセイ
する段階
を含む、医用薬剤に対する細胞の反応を決定する方法。

【請求項 5】

表現型マーカーに、CD4、CD8、CD56、CD19、CD14、CD3、CD16、またはそれらの組み合
わせが含まれる、請求項4記載の方法。

【請求項 6】

薬剤-細胞混合物を化学的マーカーに対するプローブと接触させる段階、および化学的
マーカーの存在について薬剤-細胞混合物をアッセイする段階をさらに含む、請求項4記載
の方法。

【請求項 7】

植物性物質の存在下で末梢血単核細胞をインキュベートする段階；および
インキュベートした末梢血単核細胞を1組のプローブと接触させて、プローブ-細胞複合
体を形成させる段階
を含む、細胞の反応を検出する方法。

【請求項 8】

プローブ-細胞複合体を検出する段階をさらに含む、請求項7記載の方法。

【請求項 9】

インキュベートした末梢血単核細胞を、化学的マーカー、活性化マーカー、またはそれ
らの組み合わせに対するプローブと接触させて、プローブ-マーカー複合体を形成させる
段階、およびプローブ-マーカー複合体を検出する段階をさらに含む、請求項7記載の方法
。

【請求項 10】

感染性病原体の存在下で末梢血単核細胞をインキュベートする段階をさらに含む、請求
項7記載の方法。

【請求項 11】

医用薬剤にチョウセンニンジン由来物質が含まれる、請求項1および4記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

背景

ニンジン等の生薬は強壮剤として見なされており、研究によりニンジンはヒトの免疫機
能を向上させ得ることが示されている。紅参およびチョウセンニンジン（アメリカニンジ
ンとも呼ばれる）を含むニンジン由来の抽出物は、動物モデルおよびヒトにおいて抗腫瘍
効果を有することが報告されている。さらに臨床試験により、ニンジン抽出物は高齢者に

10

20

30

40

50

において呼吸器感染に対する予防効果を有することが示されている。いかにしてニンジンが免疫系を増強させ呼吸器感染と闘うのかは、現在のところ不明である。

【背景技術】

【0002】

生薬等がいかにして働くのかをより理解することにより、および健康価値のためにいかにしてこれらの生薬をスクリーニングするかを学ぶことにより、インフルエンザ等の細菌およびウイルス感染がより迅速に寛解し得る。インフルエンザ感染は、重大な公衆衛生問題である。免疫機能障害を有することが知られている高齢者にとって、インフルエンザは重篤となり得る。免疫機能を増強してインフルエンザ感染を防ぎ、かつインフルエンザからの回復を促進する可能性のある薬草療法は、切に必要とされる助けを人々に提供することができる。

10

【0003】

ウイルス感染に対する免疫応答は、2つの段階に分けられる：最初の自然免疫応答および後の適応免疫応答である。自然免疫応答はウイルス感染との闘いの前線で作用するが、サイトカインおよびケモカインを分泌するためのマクロファージ（ヒトでは単球とも呼ばれる）およびナチュラルキラー（NK）細胞の活性化が関与している。これらの細胞によって分泌されるサイトカイン/ケモカインは直接的な抗ウイルス機能を有し、また適応免疫応答を活性化する機能も有する。適応免疫応答は抗原特異的で、したがってより精巧であり、かつ体液性（抗体）免疫応答と細胞性免疫応答にさらに分けることができる。細胞性免疫応答における主役には、1型CD4陽性Tヘルパー細胞（Th1）およびCD8陽性細胞障害性T細胞（CTL）が含まれ得る。Th1は部分的にCTLの増殖を助け、CTLはウイルス抗原の認識を介してウイルス感染細胞を直接死滅させることができる。

20

【発明の開示】

【0004】

概要

医用薬剤の効果を分析する方法、より詳細にはヒトの免疫系に及ぼす医用薬剤の効果を分析するエクスピボ方法を提供する。

【0005】

どのようにして医用薬剤が細胞に効果を及ぼし、かつ/または免疫系を刺激するのかは、ほとんど不明である。医用薬剤の潜在的利点を描写することを試み、医用薬剤の効果を分析する方法を本明細書に提供する。本方法は、医用薬剤を細胞と接触させ、医用薬剤に対する細胞の反応を同定することによって達成される。接触は、医用薬剤を細胞と共ににインキュベートすることによって、または当技術分野で周知の他の方法によって、達成され得る。細胞の反応は、表現型マーカーおよび/または化学的マーカーに対するプローブによって同定され得る。表現型マーカーは医用薬剤によって影響を受ける細胞の種類を決定するために用いることができ、一方化学的マーカーは細胞によって産生される分子を同定することができる。表現型マーカーおよび化学的マーカーのどちらも、広範な細胞および/または分子を同定するために多岐にわたってもよい。

30

【0006】

一つには、免疫応答に及ぼす医用薬剤の効果を決定する方法を本明細書に提供する。これは、医用薬剤を免疫応答細胞と接触させて薬剤-細胞混合物を形成させ、少なくとも1つのプローブを薬剤-細胞混合物に提供して細胞の活性化についてアッセイすることにより達成される。本明細書で用いる「免疫応答細胞」とは、細胞に結合した抗原または非結合の抗原によって直接的または間接的に活性化される任意の細胞種を指す。プローブには、細胞表面抗原、分泌抗原、および/または細胞内抗原に対する抗体を含むことができる。細胞表面抗原の例には、免疫応答細胞の表面タンパク質もしくは細胞膜タンパク質、または細胞種を同定するための当技術分野で周知の他の種類の細胞表面抗原を含むことができる。細胞内のおよび/または分泌される抗原/分子の例には、ケモカインおよび/またはサイトカイン等のポリペプチドが含まれ得る。

40

【0007】

50

医用薬剤を免疫応答細胞と接触させて薬剤-細胞混合物を形成させ、薬剤-細胞混合物において少なくとも2つの表現型マーカーについてアッセイすることにより医用薬剤に対する細胞の反応を決定する方法についても、本明細書に提供する。各表現型マーカーを使用して、特定の種類の活性化免疫応答細胞を同定する。免疫応答細胞の種類の例には、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、および単球が含まれる。さらに、化学的マーカーに対する少なくとも1つのプローブを、薬剤-細胞混合物と接触させてもよい。各化学的マーカープローブにより、一般に、免疫応答細胞によって産生される特定のタンパク質またはタンパク質のクラスが同定される。免疫応答細胞によって産生されるタンパク質の例にはサイトカインおよびケモカインが含まれるが、他の細胞タンパク質も同定され得る。そのようなタンパク質は1つの細胞種によって産生される場合もあれば、または2つ以上の種類の細胞によって産生される場合もある。

10

【0008】

様々な時間間隔で薬剤-細胞混合物をスクリーニングし、表現型マーカーおよび/または化学的マーカーを分析することにより医用薬剤の効果を同定し得る。さらに、活性化免疫応答細胞の存在について混合物をスクリーニングする以前に、細菌またはウイルス病原体を薬剤-細胞混合物に添加してもよい。所望のパラメータおよび用いるマーカーにより、1分ごとの、1時間ごとの、および/または毎日のスクリーニングを含む、特定の試験のために選択した時間間隔で、スクリーニングを行ってよい。

【0009】

活性化マーカーに対するプローブを含む他の種類のマーカーに対するプローブもまた、添加してよい。活性化マーカーは、活性化されて、一般に他の物質の存在下で特定のペプチドの転写を抑制するかまたは増強する細胞によって産生される。活性化マーカーの実例には、CD69 (T細胞および単球に対応する) およびMHCクラスII (別名HLA-DRとして知られている、B-細胞に対応する) が含まれる。活性化マーカーはまた、様々な細胞種に及ぼす医用薬剤の効果を同定する助けにもなり得る。

20

【0010】

植物性物質の存在下で末梢血単核細胞をインキュベートし、インキュベートした末梢血単核細胞を1組のプローブと接触させて相補的プローブ-細胞複合体を形成させることによる細胞の反応を検出する方法もまた、本明細書に提供する。各プローブは、免疫応答細胞種の特異的表現型マーカーと複合体形成し得る。次に、プローブ-細胞複合体を検出および分析することができる。プローブはまた化学的および/または活性化マーカーについて用いることが可能であり、プローブ-マーカー複合体を検出してよい。

30

【0011】

詳細な説明

医用薬剤の効果を分析する方法を開発した。医用薬剤には、天然由来の薬剤および合成によって製造された薬剤の両方が含まれ得る。天然由来医用薬剤の例には、薬草等の植物性物質が含まれる。植物性物質には、葉、根、樹皮、樹液、液果、および/もしくは抽出物、またはそれらの組み合わせが含まれ得るが、これらに限定されない。同様に、植物性物質は、粉末化、乾燥、分画、滴下してよく、またはそのままでよい。

【0012】

1つの態様においては、医用薬剤を、Th1、CTL、NK、B細胞、および単球 (別名マクロファージとして知られる) 等の免疫応答細胞を含む細胞種の混合物である末梢血単核細胞 (PBMC) と接触させる。これらの免疫応答細胞種のそれぞれは、検出可能な表面抗原等の少なくとも1つの表現型マーカーを有する。例えば、CD4、CD8、CD56、CD19、およびCD14は、それぞれTh1、CTL、NK、B細胞、および単球の表現型マーカーである。Th1およびCTL細胞はまた、抗原CD3を有する。NK細胞は、さらに抗原CD16を有する。各表面抗原 (表現型マーカー) はプローブによって同定することができ、プローブは典型的にはこれら表面抗原に対する抗体であるが、表面抗原を同定するために使用可能な任意の他のプローブであってもよい。プローブは放射性、蛍光、または色素タグで標識できるが、当技術分野で周知の他の種類の標識を使用してもよい。

40

50

【0013】

免疫応答細胞は、一般に、活性化された場合に例えばペプチドおよび/または他の因子といった種々の化学的マーカーを産生する。これらの化学的マーカーの多くは、サイトカインおよびケモカインとして周知である。サイトカインには、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、およびIL-12等のインターロイキンが含まれる。他のサイトカインにはインターフェロン- γ (ifn- γ) および腫瘍壊死因子- α (tnf- α) が含まれるが、他のサイトカインもまた免疫応答細胞から産生され得る。アッセイされ得る適したケモカイン(種々の白血球を走化性誘引する低分子量ポリペプチド)の例には、マクロファージ走化性活性化因子(MCAF)、マクロファージ炎症性タンパク質-1a(MIP-1a)、マクロファージ炎症性タンパク質-1b(MIP-1b)、RANTES、およびインターロイキン8(IL-8)が含まれる。これらの化学的マーカーもまたプローブを用いて同定することができ、プローブはこれらのペプチドおよび/または因子のそれぞれに対する抗体である場合が多いが、免疫応答細胞によって産生される特異的な分泌または細胞内のペプチドまたは因子を同定する任意のプローブであってもよい。

【0014】

細胞の反応を検出するには、生薬等の医用薬剤の存在下でPBMCをインキュベートしてよい。次に、インキュベートしたPBMCを、特定の免疫応答細胞種(例えば、Th1細胞およびB細胞)の少なくとも2つの表現型マーカーに対する1組のプローブに接触させ得る。それぞれのプローブにより、特定の表現型マーカーが特異的に同定される。表現型マーカーがインキュベートした細胞内に存在し、かつその特異的プローブに接触される場合、プローブ-マーカー複合体が形成される。次に、当業者に周知の方法およびアッセイ法により、プローブ-マーカー複合体を検出することができる。

【0015】

医用薬剤の効果についてのさらなる情報を提供するために、インキュベートしたPBMCにさらなる成分を添加してもよい。例えば、サイトカインおよびケモカインのような特異的の化学的マーカーに対するプローブを、インキュベートしたPBMCと接触させて、検出および分析され得るさらなるプローブ-マーカー複合体を形成させてもよい。また、表現型マーカーおよび/または化学的マーカーに対するプローブと組み合わせて、細菌またはウイルス病原体等の感染物質をPBMCと共にインキュベートしてもよい。結局、活性化マーカーまたは当業者に周知の他のマーカーに対するプローブを含む他の種類のプローブを用いて、インキュベートしたPBMCと接触させてよい。当技術分野において既知の他の種類の薬剤をPBMCおよび医用薬剤と共にインキュベートし、有利または不利な事象が起こるか否かを決定してもよい。

【0016】

以下の実施例は、医用薬剤の効果を分析する方法を説明するものである。これらの実施例は説明のためのものであり、本明細書で説明する本発明の範囲を限定するものではない。各実施例を考察する前に、各実施例の結果に到達するために用いた方法を十分に理解してもらうため、実験の背景を考察する。当然のことながらこれらの方法は、同じまたは類似の結果を達成するため当技術分野で周知のように変更または変化してもよく、または技術の向上に伴い改良してもまたは修正してもよい。

【0017】

チョウセンニンジン抽出物

以下の実施例のために選択した医用薬剤は、チョウセンニンジンである。チョウセンニンジン抽出物は、CVテクノロジーズ(CVT)、カナダ、エドモントンの提供による。チョウセンニンジン抽出物には3つの異なるロット、CVT 2001 008、CVT 2001 009、CVT 2001 010が存在し、対照抽出物には2つの異なるロット、CVT HT 1001-005およびCVT HT 1001-009が存在した。どの抽出物も粉末形態で提供されたものであり、PBS緩衝液に溶解した。次に、抽出物を組織培養培地、10% FBS(Summit Biotech、コロラド州)を添加したRPMI(Gibco、メリーランド州)中で最終濃度になるように希釈した。

【0018】

10

20

30

40

50

末梢血単核細胞の精製

健常人由来のヘパリン処理したPBMC（各採血20～30 ml）を、1200 RPMで10分間遠心し、軟膜層を単離した。軟膜層を回収し、フィコール勾配（Histopaque, Sigma、ミズーリ州）の上に慎重に重層した。次に、1700 RPMで30分間細胞を遠心分離した。界面からPBMCを回収し、遠心沈殿させ、実験に用いる前にRPMIで2回洗浄した。

【0019】

チョウセンニンジンによる単球の活性化の分析

AIM-V培地（Gibco、メリーランド州）200 μ l中の 5×10^5 個PBMCを、様々な用量のチョウセンニンジン抽出物と共に一晚（16時間）インキュベートした。細胞を遠心沈殿させ、表面抗原抗体CD14-APC、CD69-FITC、およびCD86-PEで染色した。FACSCalibur（Becton Dickinson、カリフォルニア州）を用いて染色した細胞をフローサイトメトリー分析に供し、データをCellQuestソフトウェア（Becton Dickinson、カリフォルニア州）により分析した。CD14陽性細胞にゲートを設定し、その活性化マーカーCD69およびCD86の発現を適切な抗体を用いて分析した。

【0020】

チョウセンニンジンによる樹状細胞（DC）の活性化の分析

樹状細胞は当業者に周知の方法によって産生したが、説明のために以下の要約した例を提供する。AIM-V 3 ml中の 1.5×10^7 個の新たに単離したPBMCを6ウェルプレートのウェルに入れ、37℃で3時間インキュベートした。非接着細胞を除去した。接着細胞を穏やかに2回洗浄し、GM-CSF（800単位/ml）およびIL-4（1000単位/ml）（Biosource、カリフォルニア州）を添加したAIM-V 5 ml中で培養した。インキュベートしてから7日後、培養物の樹状突起の豊富な形態およびMHCおよび共刺激分子の高い発現によって判断されるように、培養物は通常50%を超える樹状細胞を含んだ。樹状細胞におけるチョウセンニンジンの効果を分析するため、7日目に樹状細胞培養物由来の細胞を回収し、計数し、様々な用量のチョウセンニンジン抽出物と共に一晚インキュベートした。次に、細胞をCD86、83、およびMHC II（HLA-DRとも呼ばれる）抗体で染色した。

【0021】

FastImmuneアッセイ法

1×10^6 個のPBMCを、様々な用量のチョウセンニンジン抽出物および対照と共にインキュベートした。等量（10 HA単位/ml）のインフルエンザ A/H3N2/Calvadonia、A/H1N1/パナマ、およびB/ヤマナシを含む生インフルエンザウイルスの混合物を、必要に応じてPBMCに添加した。生インフルエンザウイルスの対照抗原として、尿膜腔液を用いた。インフルエンザを伴いまたは伴わずにPBMCを3時間活性化し、プレフェルジンA（BFA、5 μ g/ml、Sigma、ミズーリ州）を細胞に添加した。PBMCをさらに15時間インキュベートした。その後PBMCを固定し（1%パラホルムアルデヒド、Sigma、ミズーリ州）、透過処理し（透過処理緩衝液、Beckton Dickinson、カリフォルニア州）、以下のコンジュゲート抗体で染色した：CD56-PE、CD4-APC、CD8-PerCP、およびIFN-g-FITC。FACSCaliburサイトメーターおよびCellQuestソフトウェアを用いて、染色したPBMCをフローサイトメトリー分析に供した。次の分析のため、散布図でリンパ球にゲートを設定した。IFN-gについても陽性であるNK細胞（CD56陽性）を、活性化されたNK細胞として定義した。

【0022】

CTL培養物

1.5 mlの完全培地（10% FBSを添加したRPMI）中の 1.5×10^6 個のPBMCを、様々な用量のチョウセンニンジン抽出物と共に24ウェルプレートのウェルに入れた。インフルエンザAカルバドニア（Calvadonia）、Aパナマ、およびBヤマナシの死インフルエンザウイルス（1:1000に希釈したインフルエンザワクチンによる）で、PBMCを刺激した。48時間ごとに、培養物に低用量のIL-2（20 IU/ml）およびIL-7（20 ng/ml）を補充した。培養してから7～9日目に細胞を回収し、計数し、インフルエンザ特異的T細胞の頻度について分析した。

【0023】

CTL培養物由来のインフルエンザ特異的CD4陽性またはCD8陽性T細胞の定量

分析のためにCTL培養物を回収した日に、CTL培養物を調製するために用いたPBMCの元のドナーから末梢血も取得した。これらの新たに単離したPBMCに、インフルエンザウイルスを感染させた。これらの新たに単離したPBMCは、自己の抗原提示細胞を提供するためのものである。感染させたPBMCを、CTL培養物から回収した細胞とそれぞれ1:10 (PBMC:CTL)の比で混合した。対照として、非感染PBMCを用いてCTL培養物由来の細胞と混合した。細胞混合物を3時間インキュベートした後、BFAを添加した。上記と同様にして、FastImmune法によりインフルエンザ特異的T細胞を定量した。インフルエンザ特異的T細胞の頻度は、インフルエンザ感染細胞による刺激時にIFN-g陽性でもあったCD8陽性T細胞またはCD4陽性T細胞として定義した。

10

【0024】

実施例1. 単球および樹状細胞等の抗原提示細胞に及ぼすチョウセンニンジンの効果

単球またはマクロファージおよび樹状細胞を含む抗原提示細胞は、ウイルス感染した場合にウイルス抗原をプロセッシングしてT細胞に提示することによってT細胞応答を仲介する上で重要な細胞である。活性化抗原提示細胞は、MHCおよび共刺激分子の高発現から、より効果的な抗原提示細胞であることが知られている。さらに、活性化抗原提示細胞は、IL-12およびIL-10等のサイトカインを分泌し、T細胞を補充しかつT細胞の増殖を促進することができる。

【0025】

抗原提示細胞に及ぼすチョウセンニンジンの効果を判定するため、以下の2つの実験を行った。まず、PBMCを様々な用量のチョウセンニンジン抽出物と共に一晚(16時間)インキュベートし、単球(CD14陽性細胞)がチョウセンニンジンによって活性化されるか否かを判定した。活性化マーカーCD69およびCD86の二重陽性単球を、活性化単球の指標として用いた。この1つめの実験は、チョウセンニンジン抽出物の存在下で活性化単球が増殖し、単球の活性化は用量依存的であるという結果であった(図1)。

20

【0026】

第二の実験は、チョウセンニンジンがインビトロで産生した樹上細胞、プロフェッショナル抗原提示細胞に及ぼす効果を判定するためのものである。樹状細胞は、7日間のGM-CSFおよびIL-4の存在下で接着性PBMCから産生した。次に樹状細胞を回収し、様々な用量のチョウセンニンジン抽出物と共に一晚インキュベートし、MHC II、CD86、およびCD83の発現増加の可能性により活性化効果を分析した。CD86は共刺激分子(B7.2)であり、CD83は成熟樹状細胞のマーカーである。活性化樹状細胞は、CD83、CD86、およびMHC IIの発現が増加することが知られている。結果から、樹状細胞をチョウセンニンジン抽出物と共に一晚インキュベートした後に、CD83が増加することが示された(データは示さず)。

30

【0027】

実施例2. インフルエンザ感染に応答したNK細胞の刺激に対するチョウセンニンジン抽出物の効果

NK細胞はウイルス感染した細胞を直接殺すことができるため、ウイルス感染の初期段階で重要な役割を果たす。また、活性化NK細胞はIFN-gおよびIL-2等のサイトカインを分泌し得る。IFN-gは、直接的な抗ウイルス効果およびCTLの増殖を助ける能力を有する。チョウセンニンジンがNK細胞を刺激するか否かを判定するために実験を行い、PBMCを生インフルエンザウイルスと共に一晚インキュベートした場合にチョウセンニンジン抽出物がNK細胞を刺激するという結果が得られた(図2A)。チョウセンニンジンの刺激は、NK細胞によるIFN-gの分泌によって実証された。NK細胞の刺激は、チョウセンニンジン抽出物に用量依存的であった(図2B)。さらに、チョウセンニンジンはCD3陽性T細胞(Th1およびCTL細胞についてスクリーニングした)またはNKT細胞(CD3およびCD56二重陽性細胞)を活性化しなかったため、チョウセンニンジンによるNK細胞の活性化はNK細胞特異的であった。チョウセンニンジンによるNK細胞の活性化はまた病原体依存的であること、すなわちチョウセンニンジンはインフルエンザウイルスの存在下でのみNK細胞を刺激してIFN-gを分泌させることが見出された(図2A、2番目および4番目のパネル)。CVT(CVT HT 1001-005およ

40

50

びCVT HT 1001-009) によって提供される2つの対照チョウセンニンジン抽出物を試験するためにも、実験を行った。これらの対照抽出物は、検出可能な免疫機能をもたないことが知られている。培養物中にインフルエンザウイルスが存在した場合にでさえ、これら2つの対照抽出物によってNK細胞は活性化されなかった(図2A、3番目のパネル)。

【0028】

本実験から、チョウセンニンジンが、NKを特異的に刺激/活性化することにより、インフルエンザウイルス感染に応答して免疫系を刺激することが示された。チョウセンニンジンによるNK細胞の活性化はインフルエンザ特異的であり、チョウセンニンジン抽出物に用量依存的である。試験した全部で3つのチョウセンニンジン抽出物および2つの対照抽出物のうち、チョウセンニンジン抽出物は、これら3つの異なる抽出物による活性化の程度から見てほとんど変動なく、NK細胞に対してIFN-gを分泌させる特異的刺激効果を示した(図3を参照のこと)。さらに、2つの対照抽出物では、またはチョウセンニンジンを添加しなかった場合には、NK細胞の刺激は認められなかった。

10

【0029】

実施例3. インフルエンザ特異的CD4陽性Th1細胞、CD8陽性CTL細胞、およびNK細胞の増殖に及ぼすチョウセンニンジンの効果

上記の実施例1および2の実験は、新たに単離したPBMCの短期間(一晚)の培養物を利用したエキスピボ実験である。エキスピボ実験はいかにチョウセンニンジン抽出物が働くかという細胞機構を分析する上では好ましいが、CTLまたは他の細胞種の増殖に及ぼすチョウセンニンジン抽出物の長期効果を研究するためには用いることができない。そのような理由から、希釈したインフルエンザワクチン(死滅したインフルエンザウイルスを含む)によって刺激したPBMCのCTL培養物を、チョウセンニンジン抽出物の存在下において調製した。対照として、CVT対象抽出物またはチョウセンニンジン抽出物を添加して実験を行った。ワクチンと共にインキュベートして7~9日後、CTL培養物由来の細胞を回収し、計数し、Fast Immuneアッセイに供した。IFN-g陽性T細胞を、インフルエンザ感染抗原提示細胞(材料および方法の項を参照のこと)による再活性化後の抗原特異的T細胞として定義した。1人のドナー由来のCTL培養物において、チョウセンニンジン抽出物がよりインフルエンザ特異的なT細胞の増殖、特にCD8陽性CTL細胞を刺激したことが認められた(ドナー1、CD8+細胞、図4)。チョウセンニンジン抽出物を添加した場合、チョウセンニンジン抽出物を添加しなかった対象と比較して、CTL培養物中のNK細胞の数が有意に多かったことも認められた(図5)。さらに、結果から、チョウセンニンジンによるNK細胞の増加がチョウセンニンジン抽出物に用量依存的な様式であることが示された。対照抽出物(CVT HT 1001-005またはCVT HT 1001-009)を用いた場合、CTL培養物中のNK細胞増殖の増加は見られなかった(データは示さず)。この結果は、インフルエンザウイルスによる活性化の初期の段階において、チョウセンニンジン抽出物がNK細胞を刺激する(そしてIFN-gを分泌する)という知見(図2)と一致する。

20

30

【0030】

上記で確認された実施例によってわかるように、チョウセンニンジン抽出物は単球を直接活性化し、抽出物の存在はまたインフルエンザ感染に応答してNK細胞活性化を増強させる。チョウセンニンジン抽出物はまた、Th1 CD4陽性T細胞およびCD8陽性CTL細胞を含むインフルエンザ特異的T細胞の増殖、および全NK細胞の増殖を助ける。

40

【0031】

インフルエンザウイルスが、インフルエンザ特異的記憶T細胞からIFN-g分泌を誘導することも認められた(図2Aの3番目のパネルの右下の象限)。チョウセンニンジン抽出物は、インフルエンザ特異的T細胞であっても非インフルエンザ特異的T細胞であっても短期間培養においてT細胞に対して増強効果をもたなかった。NK細胞の活性化はインフルエンザウイルス単独でも、チョウセンニンジン抽出物の存在なしでさえも見られるが、インフルエンザウイルスによるNK細胞の活性化にはPBMCの生インフルエンザウイルスとの長期の(>16時間)インキュベーションが必要である。PBMCとウイルスを共にインキュベートして3時間後にすべてのサイトカイン分泌が停止する(BFAにより)エキスピボの条件では、チ

50

ヨウセンニンジン抽出物を添加しない限りNK細胞の活性化は見られなかった。

【 0 0 3 2 】

結局、本結果から、いかにして医用薬剤が免疫応答細胞を含む細胞に効果を及ぼすかという機構を研究するための、エキスピボ分析の可能性が実証される。これにより、医用薬剤が免疫系を刺激し得るか否かを判定するそのスクリーニング方法が提供される。このエキスピボ分析はさらにまた、特定の関心対象の病原体に应答した、薬草を含む医用薬剤の免疫効果を分析するためにも利用できる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 3 3 】

【図 1】 CD14+単球におけるチョウセンニンジン抽出物の用量依存的な活性化。

10

【図 2 A】 インフルエンザウイルスの存在下における、チョウセンニンジン抽出物によるNK細胞の特異的活性化。

【図 2 B】 チョウセンニンジン抽出物によるNK細胞の用量依存的活性化。

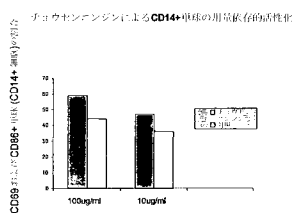
【図 3】 NK細胞がIFN-gを分泌する活性化における、様々なチョウセンニンジン抽出物の比較。

【図 4】 Th1 CD4陽性T細胞およびCD8陽性CTLの増殖に及ぼすチョウセンニンジン抽出物の効果。

【図 5】 死インフルエンザウイルスによって刺激されたCLT培養物における、NK細胞の増殖に及ぼすチョウセンニンジン抽出物 (CVT 2001 009) の効果。

【 図 1 】

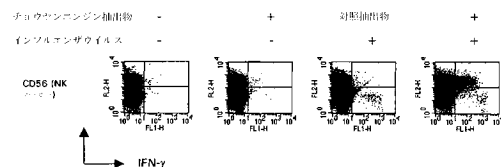
CD14+単球におけるチョウセンニンジン抽出物の用量依存的な活性化 新たに単離したPBMCを、10もしくは100 ug/mlのチョウセンニンジン抽出物 (CVT 2001-009) と、またはチョウセンニンジン抽出物を添加しない場合には対照と共に、一晩(16時間)培養した。細胞をCD14 (APC)、CD69 (PE)、およびCD86 (PerCP) (Becton Dickinson, カリフォルニア州) で染色した後、フローサイトメトリー分析に供した。単球(マクロファージ)としてCD14+細胞にゲートを設定し、そのCD69およびCD86の発現を分析した。CD69およびCD86二重陽性単球の割合を示した。



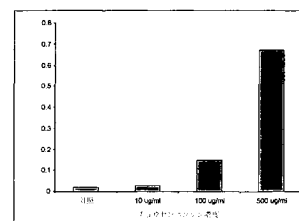
【 図 2 】

AおよびB. IFN-gの細胞内染色分析およびNK細胞マーカーCD56による、チョウセンニンジン抽出物によるNK細胞の活性化 健康人由来の新たに単離したPBMCを、対照抽出物 (対照 HT 1001-005) を含む様々な用量のチョウセンニンジン抽出物 (CVT 2001-009) を作製するまたは作製せず、生インフルエンザウイルス (全部で30 HAU/ml) と共にインキュベートした。16時間インキュベートした後、細胞を固定し、透過処理し、以下の抗体で染色した: INF-g (FITC), CD56 (PE), CD3 (PerCP), またはCD19 (APC)。以下のドットプロット分析のために、前方対向方散面図からリンパ球 (右側、T、B、およびNK細胞を含む) を識別した: CD56 発現対INF-g 発現。右側の象限に現れるリンパ球の% (CD56およびINF-g二重陽性) を、活性化NK細胞として定義した (A)。さらに、チョウセンニンジン抽出物、CVT 2001-009によるNK細胞活性化の用量依存的な様式を、Bにプロットした。同様の結果は2つの別の実験で認められ、3人の別の健康人由来のPBMCで確認された。

A. インフルエンザウイルスの存在下における、チョウセンニンジン抽出物によるNK細胞の特異的活性化

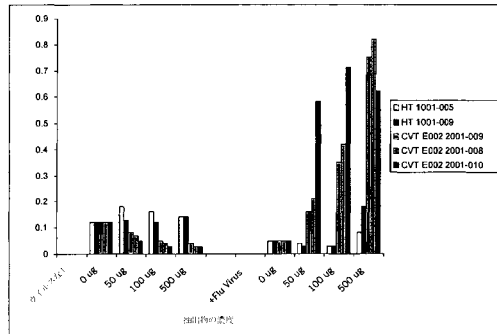


B. チョウセンニンジン抽出物によるNK細胞の用量依存的活性化



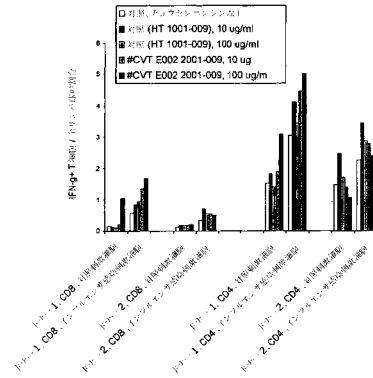
【図 3】

NK細胞を活性化させてIFN-gを分泌させる際の、様々なチョウセンニンジン抽出物の比較。この実験で様々なチョウセンニンジン抽出物を比較する以外は、本実験は図2の説明文に記載したのと同様に行った。第1群の棒グラフ（左側）はインフルエンザウイルスの存在下でのPBMCの処理であり、第2群（右側）はウイルスの存在下でのチョウセンニンジン抽出物によってNK細胞が活性化されないことが示された。



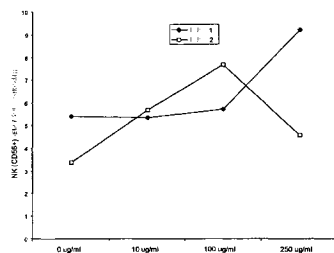
【図 4】

Th1 CD4+ T細胞およびCD8+ CTLの増殖に及ぼすチョウセンニンジン抽出物の効果。二人の健康人ドナーから単離したPBMCを、様々な濃度のチョウセンニンジン抽出物を添加して、死インフルエンザウイルス(1:1000 X 希釈したインフルエンザワクチン)で7~9日間刺激した。その後細胞を回収し、計数し、生インフルエンザウイルスに感染した1/10量の新たに単離した自己PBMCと混合した。混合した細胞を3時間インキュベートした後、プレフルジンA(BFA)を添加してサイトカインの細胞外への分泌を停止した。BFAの存在下で、細胞をさらに13時間インキュベートし続けた。細胞を固定し、透過処理し、CD56 (PE), CD8 (PerCP) およびCD4 (APC)と共に、IFN-g (FITC)の細胞内サイトカイン染色に供した。IFN-gの発現を分析するため、CD4+またはCD8+ T細胞にゲートを設定した。それに応じて、IFN-gについても陽性であるT細胞 (CD4またはCD8) の割合をプロットした。



【図 5】

死インフルエンザウイルスによって刺激されたCLT培養物における、NK細胞の増殖に及ぼすチョウセンニンジン抽出物 (CVT 2001 009) の効果。図4の説明文において記載したように、インフルエンザウイルス刺激したCLT培養物を調製した。CLT培養の終わりに、細胞をCD56で染色した。NK細胞としてCD56+細胞の割合を計数し、それに応じてプロットした。結果から、チョウセンニンジン抽出物 (CVT 2001-009) に用量依存的な刺激効果の傾向が示される。対照抽出物 (CVT HT 1001 005 または 009) を用いた場合、NK細胞増殖の増加は見られなかった (データは示さず)。



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/40797

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER												
IPC(7) : G01N 33/533												
US CL : 435/7.2, 7.21, 29, 40.5, 40.51, 288.3, 288.4; 436/546, 172, 63												
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC												
B. FIELDS SEARCHED												
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/7.2, 7.21, 29, 40.5, 40.51, 288.3, 288.4; 436/546, 172, 63												
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched												
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE, SCISEARCH, EMBASE, BIOSIS												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
X,E	US 6,620,591 B1 (DUNLAY et al.) 16 September 2003 (16.09.2003), see entire document.	1-10										
Y,E		11										
Y	Database Medline on STN, ACCESSION NUMBER 91036695. KIM, J.Y. et al. "Panax Ginseng as a potential immunomodulator: studies in mice". Immunopharmacology and Immunotoxicology. 1990, Vol. 12, No. 2, pages 257-276, Abstract.	11										
Y	Database Medline on STN, ACCESSION NUMBER 2001563978. HU, S. et al. "Effect of Subcutaneous injection of ginseng in cows with subclinical Staphylococcus aureus mastitis". J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. September 2001, Vol. 48, No. 7, pages 519-528, Abstract.	11										
A	KIM et al. Ginsenoside-Rs3, a New Diol-Type Ginseng Saponin, Selectively Elevates Protein Levels of p53 and p21 WAF1 Leading to Induction of Apoptosis in SK-HEP-1 Cells. Anticancer Research. 1999, Vol. 19, pages 487-492, see entire document.	1-11										
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.												
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"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)</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"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)	"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	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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											
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone											
"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)	"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											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family											
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search 15 December 2003 (15.12.2003)		Date of mailing of the international search report 09 FEB 2004										
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Gallene R. Gabel Telephone No. (703) 305-0169										

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ, GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE, ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,M Z,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA05 QA20 QQ08 QR41 QR48 QR55 QR69 QR77 QR79
QS12 QS24 QS28 QS36 QX02

专利名称(译)	分析医学药物效果的方法		
公开(公告)号	JP2005515430A	公开(公告)日	2005-05-26
申请号	JP2003560514	申请日	2002-12-20
[标]申请(专利权)人(译)	东弗吉尼亚医学院		
申请(专利权)人(译)	东弗吉尼亚医学院		
[标]发明人	デンユピン		
发明人	デン ユピン		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/567 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/5047 G01N2333/705		
FI分类号	G01N33/53.Y C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z		
F-TERM分类号	2G045/BB20 2G045/BB24 2G045/BB50 2G045/CB01 2G045/FB03 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA20 4B063/QQ08 4B063/QR41 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR69 4B063/QR77 4B063/QR79 4B063/QS12 4B063/QS24 4B063/QS28 4B063/QS36 4B063/QX02		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	60/342432 2001-12-21 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了分析医药效果的方法，更具体地，提供了分析医药对人体免疫系统的影响的离体方法。

A. インフルエンザウイルスの存在下における、チョウセンニンジン抽出物によるNK細胞の特異的活性化

