

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6285687号
(P6285687)

(45) 発行日 平成30年2月28日(2018.2.28)

(24) 登録日 平成30年2月9日(2018.2.9)

(51) Int.Cl.	F 1	
A 6 1 K 35/74 (2015.01)	A 6 1 K 35/74	A
A 6 1 P 1/02 (2006.01)	A 6 1 P 1/02	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 K 38/02 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	1 7 1
A 2 3 L 33/135 (2016.01)	A 6 1 K 38/02	
請求項の数 4 (全 9 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2013-221749 (P2013-221749)	(73) 特許権者	711002926 雪印メグミルク株式会社 北海道札幌市東区苗穂町六丁目1番1号
(22) 出願日	平成25年10月25日(2013.10.25)	(74) 代理人	110000774 特許業務法人 もえぎ特許事務所
(65) 公開番号	特開2015-83547 (P2015-83547A)	(72) 発明者	小林 敏也 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号雪 印メグミルク株式会社内
(43) 公開日	平成27年4月30日(2015.4.30)	(72) 発明者	加藤 晴彦 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号雪 印メグミルク株式会社内
審査請求日	平成28年9月14日(2016.9.14)	(72) 発明者	東 直樹 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号雪 印メグミルク株式会社内
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 口腔内疾患予防剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ラクトバチルス・ガセリ(Lactobacillus gasseri) 菌 S B T 2 0 5 5 (F E R M P - 1 5 5 3 5) を有効成分とする口腔内疾患予防剤。

【請求項2】

前記ラクトバチルス・ガセリ菌 S B T 2 0 5 5 が腸管内で定着することで、口腔内で産生した ディフェンシンにより口腔内疾患を予防することを特徴とする請求項1に記載の口腔内疾患予防剤。

【請求項3】

上記口腔内疾患が、歯周病であることを特徴とする請求項1又は2に記載の口腔内疾患予防剤。

【請求項4】

請求項1～3のいずれかに記載の口腔内疾患予防剤を含む口腔内疾患予防用飲食物、口腔内疾患予防用飼料又は口腔内疾患予防用栄養組成物。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

歯周病は、ポルフィロモナス・ジンジバリスやアグリゲイティバクター・アクチノミセテムコミタンスなどの歯周病菌により引き起こされる歯周組織に発生する炎症性疾患の総称

である。歯周組織の炎症が慢性化し、歯周病が進行すると、最終的には歯槽骨が吸収されることで歯牙の喪失を招く。また、歯周病は慢性炎症による歯周組織の破壊のみならず、動脈硬化や糖尿病などの生活習慣病の発症とも関連していることが報告されており、歯周病を予防することは、単に口腔内の健康だけでなく、生活の質を向上させるためにも重要である。

【0002】

従来、歯周病の予防および改善には、殺菌・抗菌剤を含有するうがい薬などを用いて歯周病菌を直接殺菌する方法や、歯周病菌が形成するプラークを直接取り除く外科的手法、または抗生物質の服用による薬物投与方法などの方法により行われてきた。

【0003】

また、ロイコノストック属の乳酸菌を含有する口腔疾患の予防および/または治療のために用いられる口腔用組成物が開示されている(特許文献1)。これは、口腔内のバイオフィルムを形成する主要な口腔内細菌に対して共凝集を引き起こし、また口腔内組織への付着性を有する特徴を有しながら、口腔疾患の予防や治療のために用いられる口腔用組成物であり、チューインガム、トローチ、キャンディーなどへの応用が開示されている。

【0004】

他方、抗菌ペプチドであるヒト *ディフェンシン2* は、大腸菌やう蝕原因細菌(例えば *Streptococcus mutans*)、黄色ブドウ球菌などの病原菌に対して高い抗菌作用を示すことが知られており(非特許文献2, 3)、クエン酸等の有機酸を口腔内投与後、口腔内に一定時間保持することで、唾液中の *ディフェンシン* 産生が増加することや、動物細胞に食用担子菌類の抽出物を大腸菌存在下で添加することで、ヒト *ディフェンシン2* の産生が増加すること、さらに、動物細胞をピフィズス菌で5時間刺激後、大腸菌を添加することで *ディフェンシン* の誘導が、コントロールと比較し有意に増加したことが開示されている(特許文献2, 3, 4)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特開2010-53062号公報

【特許文献2】特許4847756号公報

【特許文献3】特開2012-140336号公報

【特許文献4】特開W02007/020884

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】山口泰弘、他、医学のあゆみ、227: 987-990, 2008.

【非特許文献2】Jolly S. et al., J. Clin. Microbiol., 42: 1024~1029, 2004.

【非特許文献3】Midorikawa K. et al., Infect. Immun., 71: 3730~3739, 2003

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

上記した口腔内組織に付着性を有する乳酸菌含有の口腔疾患の予防および/または治療組成物では、効果を得るために一定時間口腔内に乳酸菌を留めておく必要があり、その応用は、チューインガム、トローチ、キャンディーなどに限られるものであった。

【0008】

そこで、本発明は、口腔内に留めておく必要がなく、簡便な方法で歯周病を予防することができる口腔内疾患予防剤を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は以下の構成を含むものである。

(1) ラクトバチルス属に属する乳酸菌が腸管内で定着することで、口腔内で産生した抗菌ペプチドにより口腔内疾患を予防する、前記ラクトバチルス属に属する乳酸菌を有効成

10

20

30

40

50

分とする口腔内疾患予防剤。

(2) 上記ラクトバチルス属に属する乳酸菌が、ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasseri*) 菌であることを特徴とする(1)記載の口腔内疾患予防剤。

(3) 上記ラクトバチルス属に属する乳酸菌がラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasseri*) 菌 S B T 2 0 5 5 (F E R M P - 1 5 5 3 5) であることを特徴とする(2)記載の口腔内疾患予防剤。

(4) 上記抗菌ペプチドが ディフェンシンであることを特徴とする請求項(1)~(3)記載の口腔内疾患予防剤。

(5) 上記口腔内疾患が、歯周病であることを特徴とする(1)~(4)に記載の口腔内疾患予防剤。

(6) (1)~(5)のいずれかに記載の口腔内疾患予防剤を含む口腔内疾患予防用飲食物、口腔内疾患予防用飼料又は口腔内疾患予防用栄養組成物。

【発明の効果】

【0010】

本発明によれば、乳酸菌が腸内で定着し、口腔内で ディフェンシンの産生を誘導することにより、口腔内に乳酸菌を留めることなく歯周病を予防することが可能な口腔疾患予防剤を提供することができる。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明によれば、摂取した乳酸菌が腸内に定着することで口腔内で ディフェンシンの分泌が促進され、歯周病菌を殺菌することによって口腔内疾患を予防できる。

乳酸菌としては、ラクトバチルス属に属する乳酸菌であればいずれの乳酸菌も用いることができるが、ラクトバチルス・ガセリ菌 (*Lactobacillus gasseri*) が好ましく、さらにはラクトバチルス・ガセリ菌 (*Lactobacillus gasseri*) S B T 2 0 5 5 株であることが好ましい。

【0012】

歯周病菌としては、具体的にはポルフィロモナス・ジンジバリスやアグリゲイティバクター・アクチノミセテムコミタンスなどの歯周病菌が該当する。

【0013】

本発明の口腔内疾患予防剤は、そのまま口腔内疾患予防剤として使用することが可能であるが、常法に従い、培養し培養物とし用いることもできる。さらに、これらを培養物とした後に、これを栄養剤やヨーグルト、乳飲料、ウエハース等の飲食品、栄養組成物、飼料に配合することも可能である。

【0014】

本発明の口腔内疾患予防剤は、そのまま口腔内疾患予防剤として使用することが可能であるが、常法に従い、粉末剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、ドリンク剤等に製剤化して用いることもできる。さらに、これらを製剤化した後に、これを栄養剤やヨーグルト、乳飲料、ウエハース等の飲食品、栄養組成物、飼料に配合することも可能である。

【0015】

本発明の口腔内疾患予防効果を有する飲食品、栄養組成物、飼料とは、この口腔内疾患予防剤のみを含む場合の他に、安定剤や糖類、脂質、フレーバー、ビタミン、ミネラル、フラボノイド、ポリフェノール等、他の飲食品、飼料に通常含まれる原材料等を配合することができる。

また、そのような飲食品、栄養組成物、飼料を原材料として、他の飲食品等に通常含まれる原材料等を配合して調製することも可能である。

【0016】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

【実施例1】

【0017】

10

20

30

40

50

< マウス実験的歯周炎に対する乳酸菌の抑制効果 >

生後7週齢の雌性BALB/cマウスを1群20匹からなる2試験群A、Bに分け、試験群Aには25%トレハロース水溶液に混合したラクトバチルス・ガセリ(Lactobacillus gasseri)菌SBT2055株(10^9 cfu/200 μ l)を、ゾンデを用いて3週間連日胃内に強制投与した。試験群Bには25%トレハロース溶液のみを胃内投与した。その後、2試験群それぞれのマウスに対して実験的歯周炎を惹起させるために、5%カルボキシメチルセルロース溶液で調製したポルフィロモナス・ジンジバリスATCC381株の菌液(10^9 cfu/100 μ l)を、2週間連日口腔内に強制接種した。ポルフィロモナス・ジンジバリス菌の投与中も、試験群Aには25%トレハロース水溶液に混合したガセリ(Lactobacillus gasseri)菌SBT2055株(10^9 cfu/200 μ l)の投与を続け、試験群Bには25%トレハロース溶液のみを胃内投与した。

10

【0018】

両試験群共に試験開始後3週間後で且つポルフィロモナス・ジンジバリス菌の口腔接種前、及びポルフィロモナス・ジンジバリス菌の口腔接種した後の、1、7、15、30日後にそれぞれマウス口腔粘膜組織を採取し、組織中の - ディフェンシン特異的mRNAの発現量を測定した。結果を図1に示す。

【0019】

図1の横軸に測定の時点を、又縦軸に - ディフェンシンの特異的なmRNA発現量を表した。ポルフィロモナス・ジンジバリス菌の口腔接種した後の、1、7、15、30日後をそれぞれDay1、Day7、Day15、Day30とする。また、ポルフィロモナス・ジンジバリス菌の口腔接種する14日前をDay-14とする。図1に示すように、試験群Aでは、ポルフィロモナス・ジンジバリス菌の口腔接種後、1日後から15日目まで口腔内における - ディフェンシンの遺伝子発現量が増加していることから、ラクトバチルス・ガセリ(Lactobacillus gasseri)菌SBT2055株の投与により - ディフェンシン産生が顕著に亢進したことが分かる。

20

【0020】

両試験群共にポルフィロモナス・ジンジバリス菌の口腔接種後30日目にマウスを炭酸ガスにて安楽死させ、頭蓋骨を2気圧下で10分間加熱後、3%次亜塩素酸ナトリウム溶液に浸漬して軟組織を除去し、1%メチレンブルー溶液で歯槽骨を染色乾燥させた試料をデジタルHDマイクロスコープにて測定した。結果を図2に示す。また、上顎臼歯部のセメントエナメル境から歯槽骨頂までの距離を7カ所測定し、測定値を平均し個体当たりの歯槽骨吸収量とした。結果を図3に示す。

30

【0021】

図2はデジタルHDマイクロスコープの写真であり、上は試験群Aを下は試験群Bを示す。試験群Aが試験群Bと比較し、染色部が少ないことから、ラクトバチルス・ガセリ(Lactobacillus gasseri)菌SBT2055株の投与により、ポルフィロモナス・ジンジバリス菌感染による炎症及び歯槽骨吸収が顕著に抑制されたことが分かる。

【0022】

図3の縦軸に平均歯槽骨吸収量を表した。左側が試験群Aで右側が試験群Bである。試験群Aが試験群Bと比較し平均骨吸収量が低い事から、ラクトバチルス・ガセリ(Lactobacillus gasseri)菌SBT2055株の投与により、ポルフィロモナス・ジンジバリス菌感染による炎症及び歯槽骨吸収が顕著に抑制されたことが分かる。

40

【実施例2】

【0023】

(ラクトバチルス ガセリ培養物粉末の調製)

還元脱脂乳培地(13重量%脱脂粉乳、0.5重量%酵母エキス含有)を95℃で30分間殺菌した後、ラクトバチルス ガセリ(Lactobacillus gasseri) SBT2055 (FERM P-15535)を接種し、37℃で16時間培養し、得られた培養物を凍結乾燥してラクトバチルス ガセリ(Lactobacillus gasseri) SBT2055 (FERM P-15535)の培養物粉末を得た。これは、そのまま本発明の口腔内疾患予防剤として使用し得る。

50

【実施例 3】

【0024】

(錠剤の製造)

ラクトバチルス ガセリ (*Lactobacillus gasseri*) SBT2055 (FERM P-15535) の液体培養物を、4、7,000rpmで15分間遠心分離した後、滅菌水による洗浄と遠心分離を3回繰り返して行い、洗浄菌体を得た。この洗浄菌体を凍結乾燥処理して菌体粉末を得た。この菌体粉末1部に脱脂粉乳4部を混合し、この混合粉末を打錠機により1gずつ常法により打錠して、本発明のラクトバチルス ガセリ (*Lactobacillus gasseri*) SBT2055 (FERM P-15535) の菌体200mgを含む錠剤を調製した。

【実施例 4】

【0025】

(発酵乳の製造)

ラクトバチルス ガセリ (*Lactobacillus gasseri*) SBT2055 (FERM P-15535) を MRS 液体培地 (商品名 *Lactobacilli* MRS Broth, Difco社製品) にて培養した。対数増殖期にある各培養液を、0.3重量%の酵母エキスを添加した10重量%還元脱脂乳 (115、20分滅菌済) に1重量%接種し、マザーカルチャーを作成した。これに10重量%の還元脱脂乳を添加して、100にて10分間加熱したヨーグルトミックスに、2.5重量%添加して調製した。37で発酵を行い、乳酸酸度0.85に到達した時点で冷却し、発酵を終了させ、本発明の口腔内疾患予防用発酵乳を得た。

【実施例 5】

【0026】

(散剤の製造)

ラクトバチルス ガセリ (*Lactobacillus gasseri*) SBT2055 (FERM P-15535) を MRS 液体培地 (商品名 *Lactobacilli* MRS Broth, Difco社) 5Lに接種後、37、18時間静置培養を行った。培養終了後、7,000rpmで15分間遠心分離を行い、培養液の1/50量の濃縮菌体を得た。次いで、この濃縮菌体を、脱脂粉乳10重量%、グルタミン酸ソーダ1重量%を含む分散媒と同量混合し、pH7に調整後、凍結乾燥を行った。得られた凍結乾燥物を60メッシュのふるいで整粒化し、凍結乾燥菌末を製造した。第13改正日本薬局方解説書製剤総則「散剤」の規定に準拠し、この凍結乾燥菌末1gにラクトース (日局) 400g、バレイショデンプン (日局) 600gを加えて均一に混合し、本発明の口腔内疾患予防用散剤を得た。

【実施例 6】

【0027】

(スティック状健康食品の製造)

実施例1で得られたラクトバチルス ガセリ (*Lactobacillus gasseri*) SBT2055 (FERM P-15535) の培養物粉末30gに、ビタミンCとクエン酸の等量混合物40g、グラニュー糖100g、コーンスターチと乳糖の等量混合物60gを加えて混合した。混合物をスティック状袋に詰め、本発明の口腔内疾患予防用スティック状健康食品を製造した。

【実施例 7】

【0028】

(ナチュラルチーズの製造)

脂肪率を調整した原料乳を75で15秒間のプレート加熱殺菌を行った後、30まで冷却し、0.01重量%塩化カルシウムを添加した。次に、これらの原料乳に市販の乳酸菌スターター (クリスチャン・ハンセン社製) 0.7重量%及びラクトバチルス ガセリ (*Lactobacillus gasseri*) SBT2055 (FERM P-15535) 1重量%を添加し、レンネット0.003重量%を添加して乳を凝固させた後、カッティングしてpHが6.2~6.1となるまで攪拌し、ホエーを排出し、カード粒を得た。さらに、このカード粒を型詰めして圧搾し、さらに加塩して、本発明の口腔内疾患予防用ナチュラルチーズを製造した。

【実施例 8】

【0029】

10

20

30

40

50

(カプセル剤の製造)

表 1 に示した配合により原料を混合し、造粒した後、カプセルに充填して、本発明の口腔内疾患予防用カプセル剤を製造した。

【 0 0 3 0 】

【表 1】

SBT2055 (FERM P-15535)		
培養物粉末 (実施例 1)	20.0 (重量%)	10
ラクトース	24.5	
可溶性デンプン	55.0	
ステアリン酸マグネシウム	0.5	

【実施例 9】

【 0 0 3 1 】

20

(飲料の製造)

表 2 に示した配合により原料を混合し、容器に充填した後、加熱殺菌して、本発明の口腔内疾患予防用飲料を製造した。

【 0 0 3 2 】

【表 2】

SBT2055 (FERM P-15535)		
培養物粉末 (実施例 2)	2.5 (重量%)	30
砂糖	7.5	
クエン酸	0.6	
リンゴ果汁	10.0	
水	79.4	

【図面の簡単な説明】

40

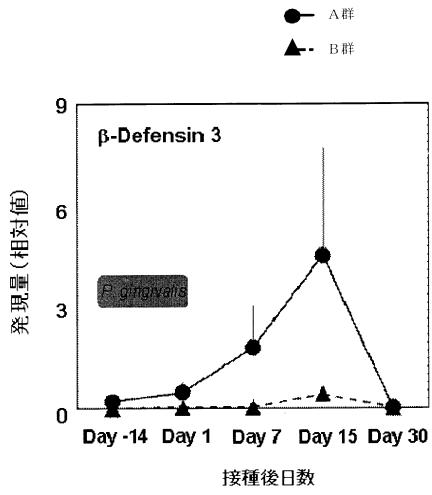
【 0 0 3 3 】

【図 1】ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasseri*) 菌 S B T 2 0 5 5 株の投与の有無における、 α -ディフェンシン遺伝子発現量を示した図である。

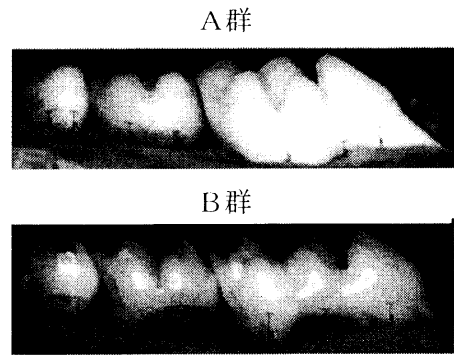
【図 2】ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasseri*) 菌 S B T 2 0 5 5 株の投与の有無における、歯槽骨の染色の様子を示した図である。

【図 3】ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasseri*) 菌 S B T 2 0 5 5 株の投与の有無における、歯槽骨吸収量を示した図である。

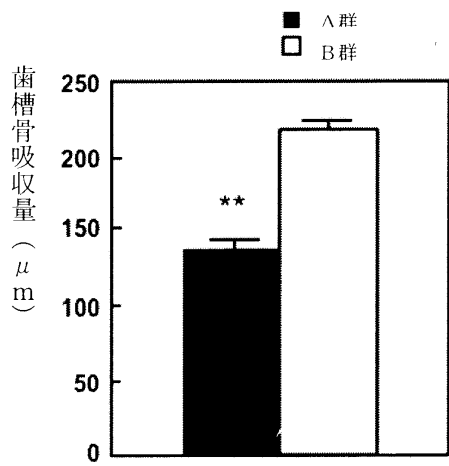
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



** $p < 0.05$ vs B群

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 A 2 3 K 20/10 (2016.01) A 2 3 L 33/135
 A 2 3 K 20/10

特許法第30条第2項適用 (1)電気通信回線を通じて講演予稿集の掲載 掲載日 平成25年7月5日 掲載アドレス <http://www.socmucimm.org/images/ICMI2013/abstract%20supplement%20-%20chronological%207-3-2013.pdf> 集會名 16th International Congress of Mucosal Immunology 公開者 The Society for Mucosal Immunology (2)ポスターセッションによる公開 集會名 16th International Congress of Mucosal Immunology 公開日 平成25年7月18日 公開者 The Society for Mucosal Immunology (3)電気通信回線を通じて学会発表プログラム公開 掲載日 平成25年9月30日 掲載アドレス http://www.jafi.jp/information/9th_gt_program.html 集會名 日本食品免疫学会第9回学術大会 公開者 日本食品免疫学会 (4)講演要旨の配布 集會名 日本食品免疫学会第9回学術大会 配布日 平成25年10月17日 配布場所 伊藤謝恩ホール(東京都文京区本郷7丁目3-1) 配布者 日本食品免疫学会 (5)ポスターセッションによる公開 集會名 日本食品免疫学会第9回学術大会 公開日 平成25年10月17日 公開者 日本食品免疫学会 (6)講演要旨の配布 集會名 日本食品免疫学会第9回学術大会 配布日 平成25年10月10日 配布場所 北農クラブ 札幌市中央区北4条西1丁目1共済ビル3F 北海道経済クラブ 北海道札幌市中央区北1条西2丁目(札幌商工会議所内) 大阪商工記者会 大阪市中央区本町橋2番5号 マイドームおおさか5階 東商クラブ 千代田区丸の内3-2-2東商ビル内 農政クラブ 千代田区霞が関1-2-1農林水産省3F 農林記者会 東京都千代田区霞ヶ関1-2-1 農林水産省3F 農協記者クラブ 東京都千代田区大手町1-3-1 JAビル26F 配布者 雪印メグミルク株式会社 (7)講演要旨のFAXによる送信 集會名 日本食品免疫学会第9回学術大会 送信日 平成25年10月10日 送信場所 雪印メグミルク株式会社本社

微生物の受託番号 IPOD FERM P-15535
 微生物の受託番号 IPOD FERM BP-10953

前置審査

(72)発明者 落合 智子
 東京都千代田区九段南四丁目8番24号学校法人日本大学内
 (72)発明者 小林 良喜
 東京都千代田区九段南四丁目8番24号学校法人日本大学内

審査官 六笠 紀子

(56)参考文献 国際公開第2013/021957(WO, A1)
 特開2012-025699(JP, A)
 特開2006-006130(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 5 / 0 0 - 3 5 / 7 6 8
 A 6 1 K 3 8 / 0 0 - 3 8 / 5 8
 W P I
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

