



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1842588 B

(45) 授权公告日 2010.09.29

(21) 申请号 200480022361.0

(22) 申请日 2004.07.27

(30) 优先权数据

203802/2003 2003.07.30 JP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006.02.05

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2004/010639 2004.07.27

(87) PCT申请的公布数据

W02005/012503 JA 2005.02.10

(73) 专利权人 BHPH 有限公司

地址 巴哈马拿骚

(72) 发明人 秦忠世 利森仁 丸冈俊之

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322

代理人 龙淳

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

A01N 63/02 (2006.01)

A61K 35/74 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

C12R 1/245 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1406274 A, 2003.03.26, 全文.

JP 2001333766 A, 2001.12.04, 摘要.

王雪青

马长伟

方碧春

武运

杜敏

. 以干酪乳杆菌和葡萄球菌为发酵剂生产干发酵香肠过程中的主要理化和微生物变化. 食品与发酵工业 24 6.1998, 24(6), 6-11.

Miguel Freitas, Emmanuelle Tavan, Karine Thoreux, Chantal Cayuela, Catherine Sapin and Germain Trugnan. Lactobacillus casei DN-114 001 and Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482 inhibit rotavirus infection by modulating apical glycosylation pattern of cultured human intestinal HT29-MTX cells. Gastroenterology 124 4.2003, 124(4), 475-476.

审查员 耿晓芬

权利要求书 1 页 说明书 72 页 附图 4 页

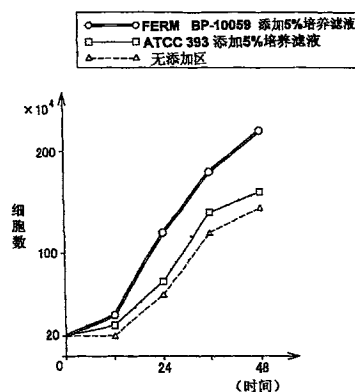
(54) 发明名称

新乳酸菌、活体活化型乳酸菌制剂以及活体传染病的预防剂与治疗剂

(57) 摘要

本发明的课题是培养作为益生菌、对活体真正有用的乳酸杆菌和在难以治疗的慢性传染病的病灶中定植・增殖、一边排除病原菌一边发挥强有力的净化能力、能够治疗传染病的乳酸杆菌。培养具有下述主要性质的干酪乳杆菌种, 解决了上述课题。1) 能够在 1 种至 4 种氨基酸中的任意 1 种作为生长所必须的氮源的存在下生长。2) 在能够生长的培养基中接种与大肠菌同样的菌数, 在 37℃ 下厌氧混合培养时, 最终菌数为大肠菌的 50% 以上。3) 用适当的培养基培养时, 最终 pH 为 4.0 以下, 并且最高酸度为 1.5% 以上。4) 对 5%

胆汁酸盐具有抵抗性。5) 产生抗生素。



1. 一种干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*) 种, 其特征在于, 其为 FERM BP-10059 并具有下述性质 (1)、(2)、(3)、(4) 和 (5) :

(1) 能够在 1 种至 4 种氨基酸中的任意 1 种作为生长所必须的氮源的存在下生长 ;

(2) 在能够生长的培养基中接种与大肠菌同样的菌数, 在 37℃ 下厌气混合培养时, 最终菌数为大肠菌的 50% 以上 ;

(3) 用适当的培养基培养时, 最终 pH 为 4.0 以下, 并且最高酸度为 1.5% 以上 ;

(4) 对 5% 的胆汁酸盐具有抵抗性 ;

(5) 产生抗生素。

2. 一种活体活化型乳酸菌制剂, 其特征在于 :

以权利要求 1 所述的干酪乳杆菌种为主要有效成分。

3. 一种对人、动物和植物的传染病的预防剂与治疗剂, 其特征在于 :

以权利要求 1 所述的干酪乳杆菌种为主要有效成分。

4. 如权利要求 3 所述的对人、动物和植物的传染病的预防剂与治疗剂, 其特征在于 :

权利要求 3 所述的对人、动物和植物的传染病的预防剂与治疗剂含有抗生素。

新乳酸菌、活体活化型乳酸菌制剂以及活体传染病的预防 剂与治疗剂

技术领域

[0001] 本发明涉及具有以往公知的细菌没有的优异特性的干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*) 种, 以该菌为主要有效成分、在恢复·维持·增进健康和改善动植物的成长和品质方面极其有效的活体活化型乳酸菌制剂以及在人、动物和植物的传染病的预防和治疗方面显示出极高的效果的乳酸菌制剂。

背景技术

[0002] 细菌侵入活体内并增殖、该活体出现病态症状称为传染病, 一旦细菌在活体内开始增殖、活体对此显示出种种反应, 就会出现发红、肿胀等各种现象。此时, 如果适当使用抗生素等药剂, 则该传染病将趋向治愈。但是, 在丧失使用抗生素的时间、使用方法不恰当、治疗过程中药剂的使用被中断、药剂不能充分地到达局部等情况下, 妨碍病原菌的消灭或者排除、治疗以不成功而告终的情况也很多。除了这些主要原因以外, 最近, 细菌方面和宿主方面都产生问题, 使情况更加复杂, 传染病长期化, 或者更加恶化并向难以治疗的疾病转化。

[0003] 20 世纪上半叶, 由于以青霉素 (penicillin) 为开端的抗生素的出现, 人类在与传染病斗争的历史中, 开始胜利在握。与以往的药剂不同, 这种显示出戏剧性的效果的药剂, 被高度评价为“魔法子弹”, 传染病似乎被征服, “传染病”这一词语也暂时成为废词。但是, 可以看到由滥用抗生素产生的耐药性细菌的出现和蔓延, 细菌也不是简单地被击败。细菌耐心地忍耐、积蓄力量, 转为反击。获得抗药性的细菌通过与被称为 R- 质体 (plasmid) 的特别的 DNA 碎片 (耐药基因) 结合, 已经成功地跨越种类而传递给其它细菌并增殖。即使说以作为现在医院内感染而成为大问题的耐甲氧西林 (methicillin-resistant) 葡萄球菌 (MRSA) 为首的耐多种药剂的耐万古霉素肠球菌 (VRE)、绿脓菌、结核菌、赤痢菌等的横行与蔓延, 将医疗界置于被击败的紧要关头也不为过。

[0004] 例如, 据说 80% 的成人患有的牙周病, 是支撑牙齿的周围组织, 即牙龈、牙骨质、牙周膜、牙槽骨等引起炎症, 逐渐溃散下去的疾病, 其原因是由喜好定居在牙周组织、尤其是牙齿和牙龈交界的牙颈部的沟中、形成斑块 (牙垢) 的细菌产生的物质, 由于该细菌产生的毒素和酶, 首先出现牙龈局部的炎症、即牙龈炎, 其演变而形成牙龈袋 (gum pocket), 在此, 斑块成长, 牙周炎发病。随着症状的恶化, 牙周袋变深、变宽, 牙根部受炎症影响而逐渐被破坏, 迟早会导致失去牙齿。具体地说, 在牙周病的初期阶段, 附着斑块的牙颈部的牙龈红肿、失去弹性, 刷牙时会出血。如果置之不理, 则斑块逐渐成长、产生牙石、使牙颈部扩张, 形成牙周袋 (periodontal pocket)。此时, 牙石成为屏障、下部的斑块变得不能刷掉, 细菌越来越增加气势, 由于其毒素导致牙周袋变得越来越变大, 炎症从牙龈向牙周膜、牙槽骨扩大, 从那儿出血、流脓、变得感觉到口臭, 同时, 周围的牙齿也相继开始感染。牙周袋中的炎症如果慢性化, 则支撑牙根的牙槽骨从表面开始溶解, 同时, 牙龈也伴随着浮肿, 不能坚固地支撑牙齿而动摇, 产生浮动的感觉和强烈的口臭, 用力咀嚼时伴随有疼痛。如果进一步恶化,

则牙槽骨几乎被溶解、牙根露出,牙的摇晃愈加严重,成为不能食用硬物的状态,最后,走向牙齿相继脱落的结果。因此,专家将该牙周病作为目前难以根治的慢性传染病的典型范例来认识。

[0005] 接下来的问题涉及药剂本身,药剂对活体来说是异物,伴随有不同程度的副作用,所以,专家指出,越是效果高的药剂,副作用越强。通常,对老年人用药的作用,被称为“效果是二分之一、副作用是二倍”。考虑到即将到来的老龄化社会时,不能不顾该事实。必须尽早认识到,现在是全社会最高声疾呼“安全性与安心感”的时代。现在,由于副作用引起的死亡事故仍有发生。抗生素也不例外,以也被称为青霉素休克 (penicillin shock) 的过敏反应为开端,白血球减少、贫血等血液毒性与其它药剂相比格外强,因此使免疫力下降,这也是官方机关认可的事实。但是,因为其有用性高,所以,在实际中,除了重病或死亡的情况以外几乎没有成为问题。

[0006] 而且,抗生素中还隐藏有一个无法直接看到的副作用。那就是会引起对也被称为重要脏器之一的肠内细菌群的损害和菌交替现象。即,对抗生素敏感性高的肠内有益菌的骤减与血液毒性相互结合,更加加速免疫功能的下降,推进传染病的慢性化,同时,也成为引起病毒性疾病和新的传染病的主要原因。实际上,被称为典型的慢性传染病的牙周病、副鼻腔炎、痔疮等的病原菌大多是耐抗生素菌,药剂对它们无效、只会积累副作用。即使是敏感性的,抗生素用得越多,变异成抗药菌的危险也越高。这些现象,对个人而言,是被暴露于由病原菌产生的持续的毒素中,受到与免疫功能下降的双重的致命障碍;对社会而言,抗药菌跨越国境,向全世界散布难以想象的毒害。

[0007] 另一方面,将目光投向欧美,从十几年前开始,不是生病以后再治疗、而是养成不生病的身体这样的想法(预防医学的重要性)已经成为主流,其有效方法之一是安全性得到来自社会的理解、借助有益细菌的力量的“益生菌 (probiotics)”,已经取得了成果。

[0008] 乳酸菌的研究开始于被称为现代微生物学之父的法国的巴斯德 (Pasteur)、俄罗斯的梅契尼科夫 (Metchinikoff) 创立了长生不老理论,之后进行了大量的临床应用,但没有获得真正意义上的实用化。这是因为流行病学调查显示的结果和实验表明的结果不吻合。但是,到最近,由于肠内细菌学的长足进步,阐明了乳酸菌担负着如下的重要任务。

[0009] (1) 免疫功能正常化作用:使对于生命维持不可欠缺的免疫功能正常化、提高。

[0010] (2) 肠内净化作用:整理肠内细菌群,抑制有害菌的繁殖,抑制肠内的异常发酵和有害菌的产生。

[0011] (3) 血液净化作用:由于肠内净化作用的延伸效果,血液也被净化。

[0012] (4) 食物营养价值的促进作用:促进维生素、氨基酸等的合成。协助从肠壁吸收营养成分。

[0013] (5) 防止有害菌感染的作用:即使外来的有害菌侵入,也将防御在肠内的增殖感染。

[0014] (6) 细胞的正常化作用:促进细胞具有的功能正常化。

[0015] 回过头来,日本也迎来了老龄化社会,抑制医疗费成为国家目标,已认识到疾病预防的重要性,全社会现在已经具有健康意识。与之相伴,以乳酸菌为原料的产品一直在增加,打着功能性酸奶 (functional yogurt) 的旗号的商品开发也变得盛行起来。但是,实际情况是,即使连续摄取这些产品,也很少能感觉到上述 (1) ~ (6) 的作用和对疾病与健康的

确实效果,况且,关于对传染病的有效性,不能以未知数来消除指望落空的感觉。

[0016] 本发明人根据这些现状,解决以往的抗生素的弊病,即耐药性细菌、药剂过敏症、副作用和关于常驻菌群的种种问题,为了响应今后社会的需要,本发明人在 2000 年 5 月提出了对传染病使用具有分离选择的特异能力的乳酸杆菌的方案,作为“新传染病对应型乳酸杆菌与以该乳酸杆菌为主要成分的乳酸菌制剂”进行了专利申请(参照特开 2001-333766 号公报)。

[0017] 该乳酸杆菌是产生不仅具有阻碍病原菌繁殖的作用、而且具有使病原菌毒性减弱的特性的“新生理活性物质(novel bioactivesubstances)”的干酪乳杆菌种,涉及以该菌为主要有效成分的能够应付急性和慢性传染病的乳酸菌制剂。其内容是,从自然界分离采集的干酪乳杆菌中,只选择产生抗菌谱广的抗生素的菌株,接着,一边用动物实验等确认该抗生素是否显示减弱病原菌毒性的性质、溶血性、S-R 变异等,一边进行筛选,将最终合格的 3 株干酪乳杆菌种、即 FERMBP-6771 株、FERM BP-6772 株、FERM BP-6773 株应用于传染病。另外,使其具有对通用的抗生素的抵抗性,以便使其能够与这些抗生素同时使用。在对急性大肠炎、急性膀胱炎、急性支气管炎等急性传染病的给药例子中,除了抗生素给药之外,通过使用本乳酸菌,与以往的抗生素单独给药相比较,可以得到(i)使抗生素的给药量减少、(ii)副作用少、症状缓和快、(iii)肠内细菌群的扰动少等较高的治疗效果,由药剂产生的弊端也被减轻。但是,对牙周炎、副鼻腔炎、支气管炎、痔疮等慢性传染病,不仅表现出效果需要时间,而且达不到完全治愈。

发明内容

[0018] 如上所述,本发明的课题是培育能够在迟迟不得治疗的慢性传染病的病灶处定植(colonize)・增殖、一边排除病原菌一边发挥强有力的净化能力的干酪乳杆菌种。

[0019] 本发明人为了解决这些课题而进行深入研究的结果是,着眼于虽然经常暴露于杂菌的污染、但是维持洁净性的阴道内净化系统,得到启发,达到目的。

[0020] 即,是以具有下述性质(1)、(2)、(3)、(4)和(5)为特征的干酪乳杆菌种,该干酪乳杆菌种优选 FERM BP-10059(FERM P-19443)。

[0021] (1)能够在 1 种至 4 种氨基酸中的任意 1 种作为生长所必须的氮源的存在下生长。

[0022] (2)在能够生长的培养基中接种与大肠菌相同的菌数,在 37℃下厌气混合培养时,最终菌数为大肠菌的 50%以上。

[0023] (3)用适当的培养基培养时,最终 pH 为 4.0 以下,并且最高酸度为 1.5%以上。

[0024] (4)对 5%的胆汁酸盐具有抵抗性。

[0025] (5)产生有抗生素。

[0026] 本发明的第二方面是一种干酪乳杆菌种,其特征在于,除了上述记载的性质之外,还具有至少 1 种以下的性质,该干酪乳杆菌种优选是 FERM BP-10059(FERM P-19443)。

[0027] (a)具有对通用的抗生素的抵抗性。

[0028] (b)具有淀粉分解能力。

[0029] (c)促进绿藻(chlorella)的生长。

[0030] (d)在 5℃~45℃范围的温度域内生长。

[0031] (e)在 pH4.0~pH10.0 范围的 pH 域内生长。

[0032] (f) 在任意的氧分压中都能够生长。

[0033] 本发明的第三方面是一种活体活化型乳酸菌制剂,其特征在於,以上述记载的干酪乳杆菌种为主要有效成分,上述干酪乳杆菌种特别优选是 FERM BP-10059 (FERM P-19443)。

[0034] 本发明的第四方面是一种对人、动物和植物的传染病的预防剂和治疗剂,其特征在於以上述记载的干酪乳杆菌种为主要有效成分,优选含有抗生素,在牙周病的治疗中,优选以杀菌消毒液将患部消毒后、涂敷于该患部,上述杀菌消毒液优选含有 500ppm ~ 1,500ppm 的 III 价铁离子、500ppm ~ 2,000ppm 的 L- 抗坏血酸以及 200ppm ~ 2,000ppm 的 1 种或 2 种以上的山梨酸、苯甲酸和对羟基苯甲酸酯作为主要成分,上述干酪乳杆菌种特别优选为 FERM BP-10059 (FERM P-19443)。

[0035] 现在是全社会比什么都更重视“安全性和安心感”的时代,健康和医疗也不例外,以欧美为中心、兴起了“益生菌”的想法。附带说一下,所谓益生菌,意思是共生物质,是指栖息在肠内、对身体发挥有益作用的细菌等微生物,利用该细菌的力量、使其在疾病预防与治疗中积极地发挥作用,主要是指乳酸菌和双叉乳杆菌 (*Lactobacillus bifidus*) 等在体内的利用。

[0036] 本发明人迅速地致力于此,开发出了由赋予其特异能力的干酪乳杆菌种构成的本发明的乳酸菌制剂。本制剂作为走在益生菌的最前端的物质,不仅在恢复、维持、增进健康方面具有极其鲜明的作用,而且,对于传染病转向慢性、即使现代医学也迟迟不得治疗的疾病,可以表现出同类的以往产品中无法看到的高效的治疗效果。另外,因为本发明的乳酸菌对抗生素具有抗性,所以,通过与抗生素并用,能够实现更快的治疗。此时,抗生素的给药量以必须的最小量就足够,可以减少药剂本来具有的各种副作用和抗药菌的蔓延等弊病。除此之外,因老龄化社会的到来而产生的成人病和因年龄增加而产生的慢性传染病的增加,和与之相伴的医疗费力的庞大化必然到来时,作为可以解决这些问题的手段,本发明的乳酸菌制剂的作用今后将变得越来越重要。

[0037] 在抗生素问世之前,对于牙周病的治疗,世界上无论何处几乎都没有恰当地应对过。牙周病病灶内的细菌,也被认为是心脏疾病等致命疾病的原因,因为强调了其危险性,所以严重的龋齿和牙周病牙被毫不客气地拔除。由于该学说,长期以来,牙科医学相比于治疗疾病,更偏向于拔牙及其清理、即安装假牙的方向。使用抗生素的同时,这一点开始一点一点地被改正,进入二十世纪八十年代,牙周病原菌的研究取得进展、已经可以相当准确地判明疾病的发展,实施除去斑块和牙石的基本的治疗,其结果是炎症得到改善,牙周袋如果变浅,则摇晃的牙被接上而不摇晃,未改善的地方,对牙龈进行开刀,这样的保留牙的治疗方针已经被确立。还判明了隐藏在牙龈里的细菌具有特别的群结构 (collective structure) 和屏障,降低了抗菌剂和杀菌剂等的药物效果,疾病的发病和进展也和患者的生活习惯、全身的疾病、遗传因子有关,牙周病的难治性再次受到关注,伴随无力之感,牙周病的基本检查与治疗在这 10 年中几乎没有进步。

[0038] 另一方面,随着长寿社会的到来,专家逐渐地阐明了牙齿与身体健康的深刻关系,牙齿不仅是单纯的咬合功能,而且对生命中枢本身起作用,社会已经认识到,为了预防痴呆、癌症、脑中风、心脏病等,治疗坏牙以引出自然治愈力、提高全身功能的治疗很重要。即,牙齿是宝贵的脏器,通过牙齿可以带来提高身心功能、防止老化、人生幸福感的提高,这种

意识已觉醒。牙的缺损和蛀牙、用于其修复的不完全的人造物的埋设,很有可能在活体中引起持续的而且累积的应激反应(stress reactions)。在副作用和药物问题受到关注的最近,不失去牙齿、对医生和对患者来说身心和经济负担都小的、安全的本发明的预防剂与治疗剂被开发出来,作为使被揶揄为善后医疗的牙周病治疗彻底改变的物质,其期待很大,一定会成为以有牙齿是正常的社会作为目标的全人类的福音。

[0039] 在牙周病的治疗中,取代以往的治疗方法中通用的消毒液和抗生素,通过并用本发明人开发的对粘膜温和、对病原菌表现出强烈的效果的杀菌消毒液(USP6296881B1)和粘膜亲和性高、显示出特异能力的本发明的乳酸菌制剂,不受牙科医师的技术能力影响,从初期阶段的牙周病到末期阶段的牙周病,只要保留可以支持牙齿的牙槽骨,就可以大体上治愈牙周病,是优异的牙周病的预防剂和治疗剂。而且,本发明的牙周病治疗剂,可以在以往的牙周病治疗方法之外给药。

[0040] 另外,即使在饲养猪、童子鸡(broiler)、青花鱼、虫类等动物时,通过投入本发明的乳酸菌制剂,可以促进动物的生长,同时,有助于提高其品质和预防疾病,还对金鱼的水霉病和溃疡病等各种疾病表现出高效的治疗效果。

[0041] 另外,即使对草莓、菠菜等蔬菜类和草本植物(herb)等植物,通过撒布本发明的乳酸菌制剂,也可以促进生长,而且可以采集到高品质的产物。而且,除了抑制发病之外,对黄瓜的白粉病、霜霉病等植物疾病的治疗也有效。

[0042] 本发明的乳酸菌制剂的问世,对使用抗生素或农药治疗传染病的以往的固定观念吹来了新风,不久一定会大大有助于今后的“益生菌”的认识和发展。

[0043] 乳酸菌从肠道、口腔等活体内到树叶、草、农作物、水果、土壤、污水,在自然界中广泛栖息,在所有存在生命活动的“场所”附近均有大量发现。所以,从连乳酸菌的存在都不知道的很久以前,就自然地用于食品加工和保存,但最近,根据科学的观点,乳酸菌的作用已经被认识到,已经作为益生菌而受到关注。

[0044] 本发明人还前进了一步,开发出了具有对活体的高亲和性和以往没有的优异的净化能力的乳酸菌。通过该菌的使用可知,不仅在疾病的预防和治疗中表现出卓越的效果,而且能够大大地有助于动物和植物的生长和品质提高。因此推测,产业上的利用领域,第一产业自不用说,而且能够在涉及广泛意义上的全部健康产业和由此派生的美容领域、食品领域等广大范围内利用,在普通人生活方面,能够在所有必需的环境下使用、应用。

附图说明

[0045] 图1是表示小鼠的皮肤被剥离后重新生长的状态的图。

[0046] 图2是表示猴子肾的V-1细胞株的增殖状态的图。

[0047] 图3是表示小鼠肥大细胞瘤细胞株P815的增殖的状态。

[0048] 图4是表示小鼠淋巴细胞CEA的增殖状态的图。

[0049] 图5是表示绿藻(chlorella)的增殖状态的图。

具体实施方式

[0050] 本发明中所谓的干酪乳杆菌种,是指经培养得到的菌体、培养液本身和除去细菌的培养滤液,所谓含有新干酪乳杆菌的制剂,是指只含有本发明的干酪乳杆菌种的制剂以

及含有本发明的干酪乳杆菌种和抗生素的制剂。

[0051] 本发明的干酪乳杆菌种的开发,是参考阴道内存在的常驻的乳酸菌进行的。即,杜德林杆菌 (*Doederlein's bacillus*) 常驻在阴道内,分解从阴道壁分泌出的糖原、产生乳酸,维持酸度、防止从外部侵入的腐败性细菌的增殖,在保持其清洁度方面担负着重要的作用。已知该菌是近似于嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 的菌,因抗生素等其生长被抑制时,酵母和其它细菌增殖、能够成为各种炎症的原因。即,以阴道内极少的营养作为粮食而定居,构筑起以能够增殖的乳酸菌为主体的感染防御体系。如果肠内细菌群成为以有益菌为主体,那么顽疾痔瘻也会自然地变好,在这一点上,该净化的体系基本上是共通的。

[0052] 根据这些见解,本发明人尽可能地收集作为整肠剂的乳酸菌制剂和市售的乳酸菌制品,系统地调查·研究的结果,只有兼备某几个条件的菌株,100%地表现出本来明显存在的或潜在地具有的能力,根本性地将动物和植物的活体活性化,表现出其成长和品质提高等的经济上的效果,发现提高对疾病的免疫力(自然治愈力),同时能够强有力地排除传染病的病原菌,从而完成了本发明。

[0053] 所谓应该保持本发明的干酪乳杆菌种的条件,首先,作为必要条件(1) 营养需求与以往公知的干酪乳杆菌种相比显著较低。即,意味着:作为生长必须的氮源,即使是1种氨基酸、2种氨基酸、3种氨基酸与4种氨基酸中的任意1种,也能够生长。(2) 在生长环境下,增殖速度快。即,意味着:在能够生长的培养基中接种与大肠菌同样的菌数、在37℃与大肠菌厌气混合培养时,最终菌数成为大肠菌的50%以上。(3) 乳酸产生能力高。即,意味着:用适当的培养基培养时,最终pH为4.0以下,并且最高酸度为1.5%以上。(4) 对胆汁酸具有高抵抗性。即,意味着对5%的胆汁酸盐具有抵抗性。(5) 产生抗生素,能够抑制其它细菌的增殖。

[0054] 更优选的是,(a) 具有对通用的抗生素的抵抗性。(b) 具有淀粉分解能力。(c) 促进绿藻的生长。(d) 生长温度域广。即,意味着:在5℃~45℃范围的温度域内生长。(e) 生长pH域广。即,意味着:在pH4.0~pH10.0范围的pH域内生长。(f) 能够生长的氧分压广。即,意味着:在任意的氧分压下都能够生长。

[0055] 因此,本发明人对先前申请专利的干酪乳杆菌种 FERM BP-6971、FERM BP-6972 以及 FERM BP-6973(以下称为“原始的干酪乳杆菌种”)进行驯化培养,为赋予其上述的各条性质而倾注力量的结果,由 FERM BP-6971 株成功地制成适合于本发明的菌株,以下说明其经过。

[0056] 适应环境、而且在与病原菌的生长竞争中取胜,如果自身不充分地增殖,无论如何也不能达到对活体的影响力。因此,产生抑制其它细菌生长的抗生素是必要条件,但是,首先细菌的基本能力、即生长增殖能力强是必不可少的。一般地,乳酸菌属营养要求高,例如作为增菌用而广泛公知的 MRS 培养基的组成,1L 中含有肉汁(meat extract)10g、酵母提取物 5g、蛋白胨 10g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g、 $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5g、乙酸钠 5g、柠檬酸二铵 2g、 KH_2PO_4 2g、葡萄糖 20g。本发明的干酪乳杆菌种也不例外,但因为是从自然界分离的干酪乳杆菌,所以,原来的营养要求是中等程度,在适当浓度的“氨基酸类+维生素类+可以利用的糖+无机盐类”下能够繁殖,例如可以举出“(S-W 培养基)+(水解)酪蛋白氨基酸(casamino acid)1g+维生素 0.1g”的培养基。附带说一下,在 1L 的 S-W 培养基中含有 KH_2PO_4 1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.7g、

NaCl 1g、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 4g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03g、葡萄糖 5g。以该组成制作平板培养基，涂敷分散在灭菌的生理食盐水中的原始的干酪乳杆菌种，在 37℃ 下进行 48～72 小时的厌氧培养。出现的菌落内，选择最大的菌落、进行钩菌，以与上述同样的程序再次进行培养，选择生长起来的菌落、进行钩菌，通过反复进行这样的操作，捕捉在该培养基组成中生长增殖快的菌株。接着，将该培养基的营养浓度变为原来的 1/2、以同样的操作选择生长良好的菌株，再依次用将营养浓度降低至 1/4、1/8、1/16 的培养基来捕捉生长的菌落，由此，可以采集在极低的营养下而且在该环境下增殖力快的菌株。

[0057] 另外，含有原始的干酪乳杆菌种的以往公知的干酪乳杆菌，作为其生长中的氮源，要求有多种氨基酸，但本发明的干酪乳杆菌种，作为氮源，在任意 1 种氨基酸或 2 种乃至 4 种氨基酸的任意情况下都能够生长。例如，可以列举“无机盐类 + 糖 + 维生素类 + (L(+)-精氨酸盐酸盐 + L-谷氨酸)”。与干酪乳杆菌同样地在自然界中任何地方都栖息，对我们来说也就存在于身边，使其与已知的作为环境污染的指示菌的大肠菌共存时，本发明的干酪乳杆菌种在初期乃至中期的增殖程度和其速度不逊色于大肠菌，最终菌数之比，相对于大肠菌 1 为 0.5 以上。此外，菌数比为 0.3 以下时，即使该菌株具有怎样出色的能力，对活体的影响力也小。

[0058] 接着，为了在与其它细菌的生长竞争中取胜，使环境中的 pH 下降以抑制其它细菌的生长也是重要的性质。即，应该是培养乳酸产生能力强的菌株。特别地，在消化系统中，产生的乳酸防止活体免受外来的各种病原菌的侵入和增殖，其次是使肠的蠕动亢进、促进肠道内的废物的排泄并抑制腐败产物的生成。实验的结果表明，最终 pH 成为 4.0 以下以及最高酸度成为 1.5% 以上，在提高其乳酸菌的能力方面是重要条件之一。附带说一下，大多数以往公知的干酪乳杆菌，最终 pH 不到 4.2 以下、最高酸度小于 1.5%。此外，用于提高乳酸产生能力的培养方法的一个例子是，在向先前记载的 1L 中含有肉汁 10g、酵母提取物 5g、蛋白胨 10g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g、 $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5g、乙酸钠 5g、柠檬酸二铵 2g、 KH_2PO_4 2g、葡萄糖 20g 的培养基中添加 3g CaCO_3 形成的不透明的培养基中，在 37℃ 下厌氧培养 48～72 小时，使之结成菌落，选择其菌落周围的透明环较宽的菌落，通过反复进行上述操作，培养出乳酸产生能力高的菌株。这是利用因产生的乳酸而导致不透明的碳酸钙与乳酸结合、转化为透明的乳酸钙。

[0059] 消化道以 1 根管与外界直接连接，在严酷的环境下栖息的自然界的细菌，不能在营养丰富、而且环境稳定的肠内定植・增殖的理由之一，是因为与胆囊分泌的胆汁酸的存在有着很深的关系。因此，多数肠内细菌分离选择的培养基，为了抑制其它细菌的生长，添加胆汁酸作为组成成分。根据本发明人的见解，胆汁酸、例如去氧胆酸钠(sodiumdeoxycholate) 的浓度达到 0.1% 时，肠内细菌生长、而不是肠内栖息的细菌大多不生长。另一方面，原始的干酪乳杆菌种在胆汁酸浓度直到 0.2% 都能够生长，但是由于下述理由，得出在活体中的活动性需要在胆汁酸浓度 0.5% 下生长的结论。因此，培养了具有对胆汁酸的抵抗性的菌株，但这利用通常的方法实施。即，采用下述方法：从向乳酸菌的选择培养基 LBS 或增殖培养基 MRS 那样的高营养培养基中添加 0.2% 胆汁酸开始，每次生长中慢慢地将胆汁酸浓度提高到 0.5%。而且确认，一旦成为抵抗株，不论培养基的种类，能够原样地保持抵抗性，与此同时，本次实验的结果新判明，胆汁酸抵抗性与粘膜亲和性具有相关性。即，如果胆汁抵抗性增加，换言之，如果对胆汁酸的亲和性增加，则意味着在肠道以外的

粘膜,例如口腔、鼻粘膜、阴道等中定植性也提高。

[0060] 另外,为了阻碍其它细菌的生存,产生抗生素是非常必要的。原始的干酪乳杆菌种产生抗菌谱广的抗生素,而且该抗生素不仅阻碍其它细菌的生长,而且已报导有使病原菌的毒性减弱的作用,本发明的干酪乳杆菌种可以原样地维持继承该能力。而且,本发明的干酪乳杆菌种,要求具有对通用的抗生素的抵抗性,但是因为原始的干酪乳杆菌种具有对抗生素的抵抗性,所以,本发明的干酪乳杆菌种原样地维持继承该能力。

[0061] 为了在活体内外定植并生存增殖,最好可以将自然界中到处都丰富存在的淀粉作为能源利用。但是,大多数干酪乳杆菌都没有淀粉分解能力,即使有也微弱。原始的干酪乳杆菌种也不例外,没有淀粉分解能力,但通过驯化培养,可以在对葡萄糖和乳糖的分解能力不变的条件下、赋予其较高的淀粉分解能力,从而可以得到本发明的干酪乳杆菌种。用于提高该淀粉分解能力的培养方法的一个例子是,向 1L 中含有肉汁 1g、酵母提取物 1g、蛋白胨 3g、NaCl 1g、 K_2HPO_4 0.5g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g、 $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.05g、乙酸钠 1g、柠檬酸二铵 0.5g、12ml 0.2% BTB, pH7.4 的中~低营养的培养基中,添加葡萄糖 4.5g、淀粉 0.5g(糖类中淀粉的比例为 10%),在 37℃ 下厌气培养 48 小时。接着也以同样的培养基组成反复地进行传代,如果可以确认即使分解了一点点的淀粉,那么接着使淀粉的比例增大为 20%。这样,一边反复进行传代培养、一边将糖类中的淀粉比例提高到 100%,进行培养以使与葡萄糖的情况同样地能够迅速地分解。此外,在任意的培养基中,如果糖类被分解产生酸,则 pH 下降,培养基的颜色从蓝色变为黄色。葡萄糖为 100% 时,添加淀粉的培养基,黄色的深度甚至不变,耐心地传代是非常重要的。幸运的是,因为多数慢性传染病的病原菌不能分解淀粉以获得能量,所以,将这种能力赋予干酪乳杆菌种,作为传染病的对策是特别有效的手段。

[0062] 绿藻在这个地球上渡过了十几亿年,是进行光合作用、反复进行细胞分裂、繁殖子孙以生存下去的具有强大生命力的单细胞植物,应被置于现在多种多样的植物的祖先的位置。即,绿藻可以说是地球上生命的原形、起源也不过分。因此,如果乳酸菌促进绿藻的生长增殖,那么,意味着该乳酸菌的产生物质使生物的细胞活化并具有修复作用,因此在作为细胞集合体的活体中有效地发挥作用是不言自明的道理。几十年前就已知绿藻的代谢产物促进乳酸菌的增殖,但相反的,即乳酸菌的代谢产物刺激绿藻的增殖的报导还没有听到。因此,作为用于提高促进该绿藻生长的能力的培养方法的一个例子,将 1L 中含有蛋白胨 5g、肉汁 2g、葡萄糖 5g、酵母提取物 5g、 KNO_3 2g、 K_2HPO_4 2g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1g、NaCl 0.1g、 $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.01g、 $ZnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.05g、 $CaCO_3$ 3g、琼脂 15g, pH 为 6.8 的培养基在 120℃ 下高压灭菌 15 分钟,灭菌后冷却到 50℃ 左右后,适量添加纯粹培养的绿藻,均匀地混合,注入培养皿(Petri dish)中。在带有照明的孵卵器中、在 28℃ 下先行培养 48~72 小时,此后,将分散在灭菌生理食盐水中的原始的干酪乳杆菌种涂敷在该培养基上,在照明下在 28℃~32℃ 下继续进行好气和厌气(含有几% CO_2) 培养。每 24 小时观察一次,观察增殖的干酪乳杆菌种的菌落周围的绿藻与其它部分比较是否密集地增殖。对即使只看到一点点该倾向的菌落反复进行钓菌,可以制作出促进绿藻培养的本发明的干酪乳杆菌种。

[0063] 另外,能够生长的氧分压、温度域、pH 域等广也是为了适应严酷的环境并在生存竞争中胜出的优选条件,如果明确地选定培养基,就能够以通常的方法驯化培养。

[0064] 将以往公知的干酪乳杆菌、原始的干酪乳杆菌种和本发明的干酪乳杆菌种的不同

点示于表 1。根据表 1 可知,通过选择和驯化培养而筛选 (screening) 出的本发明的干酪乳杆菌种,因为兼有公知的干酪乳杆菌和原始的干酪乳杆菌种所没有的特异性,所以,在活体上使用本发明的干酪乳杆菌种时,不仅能够感觉到与食品专柜和健康食品专柜中地方狭窄地摆放的多种多样的乳酸菌制品中无论如何感觉不到的鲜明强烈的效果,而且在恢复、维持、增进健康方面极其鲜明地起作用,使用于动植物可产生品质提高等经济效果,而且即使对于传染病也能够表现出确实的有效性。根据这些,可以说本发明的乳酸菌制剂是活体活化型乳酸菌制剂或对动物和植物的传染病的预防剂与治疗剂。

[0065] 表 1 各种干酪乳杆菌的性质的比较

[0066]

	以往公知的干酪乳杆菌	原始的干酪乳杆菌种	本发明的干酪乳杆菌种
营养要求	中~高营养	中营养	低营养
氨基酸的要求	需要多种氨基酸	需要多种氨基酸	1~4 种氨基酸就足够
在普通琼脂培养基中的生长	- ~ ±	+	++
增殖速度	慢	中等程度	快
乳酸产生能力 最终 pH 酸度	+ 4.2 < 1.2% >	++ 4.2 < 1.2% >	+++ 4.0 > 1.5% <
胆汁酸抵抗力 (粘膜定植性)	0.1% 左右 (低)	0.2% (中)	0.5% (高)
抗产生能力 (毒性减弱型)	- ~ ± (-)	+ (+)	+ (+)
对已知抗生素的抗性	-	+	+
淀粉分解性	-	-	++
对绿藻增殖	不参与	不参与	促进生长
能够生长的氧的范围	微好气~厌气 在好气性环境下生长差	微好气~厌气 在好气性环境下生长差	好气~厌气 在所有环境下生长良好
生长温度域	15 ~ 43℃	15 ~ 43℃	5 ~ 45℃
生长 pH 域	5.0 ~ 7.5	4.5 ~ 9.5	4.0 ~ 10.0
肠内定植能力	- ~ ±	++	+++
整肠作用	- ~ ±	+	++
对病原菌	生长抑制力微弱	生长抑制力强	生长抑制力非常强

[0067] 作为牙周病元凶的斑块,据说是约 400 种细菌的集合体,其中牙周病原性最高的是 *Poryphyromonas gingivalis*、*Prevotella intermedia* 和 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, 此外, *Walinella recta*、*Bacteroides forsythus*、*Eikenella corrodens*、*Fusobacterium* 属、*Treponema* 属等也有参与。难以治疗牙周病的最大原因在于牙周病的特异性。原因是,牙齿直接连接于活体内部,若炎症反应变得严重,则身体根本不想治疗牙周病,在牙与牙龈的交界线形成深沟,破坏牙的支持组织,就象蜥蜴切断尾巴以保住性命那样,起到要牺牲牙齿以保护身体的作用。换言之,破坏支持牙齿的组织不是外部之敌,而是防止身体免受外部之敌的炎症本身。受细菌毒素和酶的污染、被这些物质渗透的牙根部对身体来说不能识别自己,起到将周边组织一起作为致病因子 (causal factor) 除去的作用。即,要治疗的反应反而使牙周病恶化。因此,患有牙周病的牙齿如果全部脱落,则疾病结束,轻松地就治愈了。

[0068] 作为其它的主要原因,可以列举 (1) 口腔内对于细菌的生长、繁殖是环境好的场所,总是保持清洁是极其困难的,特别是牙周病原性强的细菌会产生具有粘合性的葡聚糖、果聚糖等不溶性多糖类,对牙和牙龈的粘附性强,而且该物质起着保护牙周病原菌的屏障的作用; (2) 因为产生的毒素和酶潜伏并侵入牙周组织,所以,不怎么有自觉症状地发展,该症状出现,有牙齿周围的污染、炎症反应、牙龈的萎缩、老化等各种因素,并不是一个样子,一旦形成牙龈袋则不易闭合,与上述 (1) 的情况相互结合而导致反复发生; (3) 与细菌学专家合作,使用恰当的药物适用于治疗的牙科大夫少; (4) 医生和患者在根本上都有最

坏的情况拔牙就可以的简单的想法；(5) 牙周病不仅是局部的问题，大多也涉及全身疾病，例如糖尿病等内分泌疾病、遗传疾病、应激反应 (stress)、骨质疏松症、循环系统疾病等，只用对症疗法应付无法根治等。牙周病在初期阶段如果不开始治疗就不能完全治疗的原因就是因为存在着这样多的障碍因素。

[0069] 可是，现在的一般的初期治疗，主体是除去作为牙周病的温床的斑块和牙石的刮牙术和根面平整术 (scaling and root planning) 这样的治疗。牙龈上方的牙齿表面附着的龈上牙石，能够比较容易地除去，但牙龈中的牙齿表面（牙根部）附着的龈下牙石，致密而坚硬，呈黑绿色，附着力强，只用刷牙不容易除去细菌及其毒素。因此，最近采用以超声波和激光高效率地破坏、以特殊的药液使之溶解的方法。此后，将消毒液或抗生素注入牙周袋中并定植，直到炎症部位得到改善。但是，在炎症部位达到深部、用上述的治疗方法没有好转时，通过外科手术将炎症部位或损坏部位切除。此后，缝合牙龈，放入人工构件而形成。另外，作为最新技术，已经采用了进行按照 GTR 法（引导组织再生法）的外科手术或术部辅助、涂敷被称为 Emdogain 的一种蛋白、再现类似牙齿产生过程的环境、期待促使牙周组织再生的方法，但不能说对恶化的全部牙周病都有效，其适应受到局限。总之，现在的牙周病治疗的基础，是以抑制牙龈的炎症、阻止牙周病的恶化、使失去的牙周组织再生、改善其外观、而且维持新获得的治疗组织为目的，但如上述那样促进牙周病的全身的危险因素也有，在现阶段，遗憾的是实际情况是没有被视为最好的有效治疗方法，很多牙科医生认为不使之再进一步恶化、能够维持现状就可以了。

[0070] 本发明中所说的杀菌消毒液（以下称为“本杀菌消毒液”），是含有 500ppm ~ 1,500ppm 的 III 价铁离子、500ppm ~ 2,000ppm 的 L- 抗坏血酸以及 200ppm ~ 2,000ppm 的 1 种或 2 种以上的山梨酸、苯甲酸和对羟基苯甲酸酯作为主要成分的杀菌消毒液，已经取得美国专利 (USP6296881B1)，其成分在日本作为食品添加剂得到认可。现在，医疗机构广泛使用的消毒液，是醇类、酚类、卤化物、季铵盐、双胍类药剂、醛类等，没有满足杀菌性优异、安全而且低毒性、可维护性优异并且廉价等全部条件的消毒液。例如，商品名称为“洗必泰 (hibitane)”的双胍类药剂低毒性而且高效，作为世界上畅销的优异消毒液而闻名已有几十年，但对真菌的效果弱，对结核菌和芽胞无效。另外，在一部分普通细菌中也出现了抗药菌，并伴随有院内感染的原因。因此，为了弥补以往的缺点而开发的“本杀菌消毒液”，能够在仅仅 10 秒的短时间内对几乎所有细菌和真菌进行杀菌，也可以在 1 分钟 ~ 120 分钟使芽胞灭绝。尽管显示出这么高的杀菌能力，但是，如下所示，其毒性比现在的任何消毒液都低。

[0071] (1) 对皮肤的影响：每日 2 次、在 6 个月的小鼠的后蹄 (Foot Pad) 上涂敷，没有发现任何异常。

[0072] (2) 由经口给药产生的影响：以 1ml/ 只对小鼠进行给药，完全没有看到毒性。此外，该量换算成人就相当 1.8L。估计的 LD_{50} 是 10ml/ 只小鼠，换算成人相当于 18L。

[0073] (3) 由腹腔内给药产生的影响： LD_{50} 约为 1ml/ 只小鼠。

[0074] (4) 对培养细胞（动物）的影响：使用浓度的 10^3 倍的稀释，完全没有发现对细胞增殖的阻碍。这是洗必泰的毒性的约 1/10。

[0075] (5) 对人体的影响：

[0076] a) 手指的消毒：即使经历 7 年时间的长期地连日使用，也没有发现异常。但是，存在轻微的皮肤粗糙。

[0077] b) 含漱:7年时间,早晚2次含漱时使用,粘膜中没有发现任何异常,而且也没有表现出副作用和毒性。另外,此期间一次也没有蛀牙,也没有看过牙科医生。

[0078] 接下来,显示关于与牙周病相关而实施的“本杀菌消毒液”的各种试验结果。

[0079] 此外,关于“本杀菌消毒液”,分别制备氯化铁六水合物的 Fe^{3+} 浓度 3,000ppm 的水溶液、L-抗坏血酸的浓度 3,000ppm 的水溶液和山梨酸钾的浓度 1,500ppm 的水溶液,将这些水溶液等量混合、制造出“本杀菌消毒液”。

[0080] (试验例 1)

[0081] 配制供试菌的悬浊液 (1×10^9 细胞 /ml-生理食盐水),将 2 重量%的“本杀菌消毒液”滴加到该菌液中。经过一段时间,1 白金耳钩菌,接种到各增菌培养基,在最适环境下培养,以菌有无增殖来观察杀菌效果。另外,供给试验的杀菌消毒液设定为常用的浓度。其结果,将接触 10 秒~60 秒时的效果与接触 1 分钟~120 分钟时的效果示于表 2。根据表 2 可知,“本杀菌消毒液”在 10 秒左右将活动型的几乎所有菌种杀死。牙周病原性强的 *P. gingivalis*、*P. intermedia*、*A. actinomycetemcomitans* 也不例外。但是,在芽胞形成菌的芽胞的杀菌中,根据其形成的阶段需要 1 分钟~120 分钟。根据统计,以医疗从业者为首,人进行洗手和漱口的时间为 10 秒~15 秒,从这一点也可以说“本杀菌消毒液”表现出优异的效果。此外,在作为医院和牙科医院中通用的消毒液的双胍类药剂洗必泰、3%过氧化氢水和利凡诺 (acrinol) 中,也实施同样的试验,显示出杀菌效果需要 30 秒~60 秒,如上所述,洗必泰对抗酸菌和芽胞无效,3%过氧化氢水对芽胞也无效、在抗酸菌的杀菌中需要 1 分钟以上。利凡诺也是类似于 3%过氧化氢水的效果。

[0082] 表 2 杀菌消毒液的杀菌效果

[0083]

		杀菌效果 (菌有无生长)							
		接触时间							
		秒				分钟			
		10	20	30	60	1	30	60	120
革兰氏阳性菌	<i>S. aureus</i> (黄色葡萄球菌)	-	-	-	-	.			
	<i>S. aureus</i> (MRSA)	-	-	-	-				
	<i>S. pyogenes</i> (A组β型溶血性链球菌)	-	-	-	-				
	<i>S. pneumoniae</i> (肺炎球菌)	-	-	-	-				
	<i>E. faecalis</i> (肠球菌)	+	+	-	-				
	<i>C. diphtheriae</i> (白喉棒状杆菌)	-	-	-	-				
	<i>L. monocytogenes</i> (李斯特氏菌)	-	-	-	-				
革兰氏阴性菌	<i>N. gonorrhoeae</i> (淋球菌)	-	-	-	-				
	<i>E. coli</i> O-157 (大肠杆菌O-157)	-	-	-	-				
	<i>S. enteritidis</i> (沙门氏菌)	-	-	-	-				
	<i>S. flexneri</i> (赤痢菌)	-	-	-	-				
	<i>V. parahaemolyticus</i> (肠炎弧菌)	-	-	-	-				
	<i>Ps. aeruginosa</i> (绿脓菌)	+	-	-	-				
	<i>S. marcescens</i> (沙雷氏菌)	-	-	-	-				
	<i>K. pneumoniae</i> (肺炎杆菌)	-	-	-	-				
	<i>L. pneumophila</i> (嗜肺军团菌)	-	-	-	-				
	<i>P. gingivalis</i> , <i>A. actinomycetem.</i> (牙周病原菌)	-	-	-	-				
抗酸菌	<i>P. intermedia</i> (牙周病原菌)	-	-	-	-				
	<i>M. tuberculosis</i> (人型结核菌)	+	+	-	-				
	<i>M. kansasii</i> (非定型I组)	+	+	-	-				
芽胞形成菌	<i>M. abium</i> (非定型III组)	+	+	-	-				
	<i>B. subtilis</i> (枯草菌) 营养型 芽胞	-	-	-	-	+	~	-	
	<i>B. natto</i> 纳豆菌) 营养型 芽胞	+	+	+	-	+	~	-	
	<i>C. perfringens</i> (魏氏梭菌) 营养型 芽胞	+	+	+	-	+	~	-	
真菌	<i>C. tetani</i> (破伤风菌) 营养型 芽胞	+	+	+	-	+	~	-	
	<i>C. albicans</i> (白色念珠菌)	+	-	-	-				
	<i>T. interdigitale</i> (趾间发癣菌)	-	-	-	-				
	<i>A. fumigatus</i> (曲霉菌)	-	-	-	-				
	<i>C. neoformans</i> (隐球菌)	-	-	-	-				

[0084] (试验例 2)

[0085] 因为已知通常消毒液中因混入有机物、特别是蛋白质,其效果下降,所以,对在与有机物共存下的杀菌效果进行研究。首先,在“本杀菌消毒液”中分别添加 1ppm、50ppm 和 100ppm 量的脱脂乳和酵母提取物,同时,向这些水溶液中滴加 2 重量%的作为供试菌的 MRSA 或大肠菌 O-157 的 1×10^9 细胞/ml-生理食盐水。供试菌与“本杀菌消毒液”的接触时间为 10 秒~5 分钟,经过一段时间,采集 $10 \mu\text{l}$ 与供试菌的混合液,分别在适当的培养基中接种,在 37°C 下培养,根据菌有无生长来评价杀菌效果。其结果如表 3 所示,在有机物的共存下,有机物的浓度是 1ppm 时,没有发现其影响,但有机物浓度超过 50ppm 时,虽然受到其影响,但其程度轻微。另外,对上述 2 种以外的菌种也进行了同样的试验,但其效果显示出类似的趋势。进一步对牙科医院等通用的消毒液也进行同样的试验,在洗必泰中超过 50ppm 时,接触 1 分钟细菌没有死,根据有机物的种类和量的不同,即使接触 5 分钟也活着。使用 3% 过氧化氢水和利凡诺时也显示出与使用洗必泰时非常类似的趋势。

[0086] 表 3 有机物存在下的杀菌效果

[0087]

	杀菌效果 (菌有无生长)						
	接触时间						
	10	20	30	60 秒	2 分	3 分	5 分
S. aureus (MRSA)							
脱脂乳							
1 ppm	-	-	-	-	-	-	-
50 ppm	+	+	-	-	-	-	-
100 ppm	+	+	-	-	-	-	-
酵母提取物							
1 ppm	-	-	-	-	-	-	-
50 ppm	+	-	-	-	-	-	-
100 ppm	+	+	-	-	-	-	-
E. coli O-157							
脱脂乳							
1 ppm	-	-	-	-	-	-	-
50 ppm	+	+	-	-	-	-	-
100 ppm	+	+	-	-	-	-	-
酵母提取物							
1 ppm	-	-	-	-	-	-	-
50 ppm	+	-	-	-	-	-	-
100 ppm	+	+	+	-	-	-	-

[0088] (试验例 3)

[0089] 在烹调后的食物腐败过程中,将“本杀菌消毒液”喷雾在食物上时,对是否可以阻止腐败的进行以及其杀菌效果是怎样的程度进行研究。通常,不会在烹调后的食物中加消毒液,但食物残渣进入牙周袋内,其大多成为细菌的营养源,另外,因为“本杀菌消毒液”以作为食品添加剂被认可的化合物作为成分,所以,掌握其效果很重要。作为试样,将刚烹调后的“饭”、“豆腐”、“菠菜拌芝麻的凉菜”和“肉和蔬菜的炒菜”分别粉碎、均匀化,使用放置在 28℃ 下的物质。将各试样放置 5 小时后,采集一部分用于活菌数的测定,用各消毒液对剩余试样进行充分地喷雾。测定喷雾后 1 小时、2 小时和 24 小时后的活菌数。此外,只喷水作为对照。另外,将各试样放置 24 小时后,采集一部分用于活菌数的测定,用各消毒液对剩余试样进行充分地喷雾。与将试样放置 5 小时的情况同样地,测定喷雾后 1 小时、2 小时和 24 小时后的活菌数。此外,只喷水作为对照。将试样各采集 5g,用常用方法稀释,按照稀释倒平板法 (poured plate method) 实施活菌数的测定。

[0090] 腐败的过程因烹调的方法、食物的材料和环境而当然有所不同。本试验的情况,关于“饭”,刚烹调后的活菌数是 2×10^6 细胞/g-试样、5 小时后是 1×10^3 细胞/g-试样、24 小时后是 5×10^5 细胞/g-试样、48 小时后增加到 7×10^6 细胞/g-试样。另外,关于“豆腐”,起初的活菌数是 2×10^4 细胞/g-试样、5 小时后是 8×10^5 细胞/g-试样、24 小时后增加到 9×10^7 细胞/g-试样、48 小时后增加到 1×10^9 细胞/g-试样,腐败进一步发展。在“菠菜拌芝麻的凉菜”中,刚烹调后的活菌数是 2×10^3 细胞/g-试样、5 小时后是 5×10^4 细胞/g-试样、24 小时后增加到 3×10^7 细胞/g-试样、48 小时后增加到 2×10^8 细胞/g-试样。在“肉和蔬菜的炒菜”中,刚烹调后的活菌数是 5×10^3 细胞/g-试样、5 小时后是 2×10^3 细胞/g-试样、24 小时后成为 2×10^8 细胞/g-试样、此时稍微发出腐败气味。48 小时后腐败更进一步发展,活菌数增加到 3×10^9 细胞/g-试样。

[0091] 将试验结果示于表 4。在烹调 5 小时后的菌没怎么增殖时候,喷雾消毒液时,其之

后,虽然因烹调食物的种类不同而稍微有点差别,活菌数也减少到 $1/100 \sim 1/200$ 。而且,1 小时后减少到 $1/1000 \sim 1/5000$,2 小时后成为 10 细胞 /g- 试样以下,菌死绝。剩余的活菌,即使经过 24 小时也没有增殖。此外,对肉类等高蛋白质的食物,即使在喷雾消毒液 2 小时后,也有 7×10^2 细胞 /-g 试样的菌数 (约 1%) 存活。可以明白,在烹调后经过 24 小时的时候,活菌数为 $10^7 \sim 10^8$ 的数量级,但刚喷雾消毒液后,活菌数减少到 $1/1000 \sim 1/10,000$ 、1 小时后减少到 $1/10,000 \sim 1/500,000$ 、2 小时后减少到 $1/300,000 \sim 1/2000,000$ 。此外,此时的活菌数是约 10^2 细胞 /g- 试样。24 小时后与 2 小时后相比,活菌数稍有增加,但本发明人认为,这与其说是剩余活菌增殖,倒不如说是从空中落下的菌产生的。因此,虽然没有达到完全灭绝,但即使说几乎杀灭也不夸张。即,可以说具有抑制食物中的腐败菌生长的能力和杀菌效果。

[0092] “本杀菌消毒液”之外,对牙科医院通用的消毒液也实施同样的试验,将其结果示于表 4。在喷雾洗必泰时,尽管刚喷雾后活菌数的减少率比“本杀菌消毒液”差、显示出很相似的趋势,但经过一定时间后,效果变弱,菌再次开始繁殖。即,虽然在某种程度上抑制食品中的腐败菌生长,但没有真正意义上的杀菌效果。另外,以 3% 过氧化氢水刚喷雾后,很多菌残存,如果经过 24 小时,则陷入腐败就在眼前的状态。

[0093] 表 4 因消毒液导致的烹调食品中的活菌数的消长

[0094]

料理（食物）			水	本杀菌消毒液	洗必泰液	3%过氧化氢水
饭	刚烹调后	2×10				
	5 小时后	1×10^3 （喷雾）				
		刚喷完后	1×10^3	8×10	1×10^2	2×10^2
		1 小时后	2.2×10^3	5×10	5×10	1×10^2
		2 小时后	7×10^3	0	2×10	1.8×10^2
		24 小时后	6×10^6	0	5×10	5×10^4
	24 小时后	5×10^5 （喷雾）				
		刚喷完后	5.5×10^5	8×10^3	1×10^4	4×10^4
		1 小时后	1.2×10^6	5×10^2	7×10^2	9×10^3
		2 小时后	2×10^6	1×10^2	5×10^2	2×10^4
		24 小时后	1×10^8	1×10^2	4×10^3	8×10^5
	48 小时后	7×10^6				
豆腐	刚烹调后	2×10^4				
	5 小时后	8×10^5 （喷雾）				
		刚喷完后	1×10^6	3×10^3	8×10^2	5×10^4
		1 小时后	3×10^6	1×10^2	5×10	2×10^3
		2 小时后	5×10^6	5	4×10	3×10^4
		24 小时后	1×10^8	8	2×10^2	6×10^6
	24 小时后	9×10^7 （喷雾）				
		刚喷完后	9×10^7	6×10^4	5×10^4	7×10^5
		1 小时后	1.2×10^8	4×10^2	5×10^2	3×10^4
		2 小时后	2×10^8	3×10	2×10^2	5×10^4
		24 小时后	2×10^9	1×10^2	3×10^3	1×10^8
	48 小时后	1×10^9				
菠菜拌芝麻的凉菜	刚烹调后	2×10^3				
	5 小时后	5×10^4 （喷雾）				
		刚喷完后	5×10^4	2×10^2	2×10^2	1×10^3
		1 小时后	9×10^4	5×10	4×10	4×10^2
		2 小时后	1.5×10^5	0	3×10	5×10^2
		24 小时后	5×10^7	7×10	6×10^2	1×10^5
	24 小时后	3×10^7 （喷雾）				
		刚喷完后	3×10^7	5×10^3	3×10^4	4×10^4
		1 小时后	4×10^7	8×10	2×10^2	5×10^3
		2 小时后	6×10^7	2×10	1×10^2	5×10^3
		24 小时后	4×10^8	1×10^2	8×10^3	7×10^6
	48 小时后	2×10^8				
蔬菜和肉的炒菜	刚烹调后	5×10				
	5 小时后	2×10^3 （喷雾）				
		刚喷完后	2.5×10^3	1×10^2	2×10^2	5×10^2
		1 小时后	6×10^3	5×10	5×10	2×10^2
		2 小时后	1×10^4	2×10	3×10	4×10^2
		24 小时后	3×10^8	7×10^2	5×10^3	5×10^6
	24 小时后	2×10^8 （喷雾）				
		刚喷完后	2×10^8	1×10^5	7×10^4	6×10^6
		1 小时后	4×10^8	4×10^2	5×10^2	5×10^4
		2 小时后	6×10^8	1×10^2	2×10^2	1×10^5
		24 小时后	4×10^9	2×10^3	5×10^4	4×10^8
	48 小时后	4×10^9				

[0095] 就试验例 1～试验例 3 中的“本杀菌消毒液”的各数据而言,应该能够期待对牙周袋中潜伏的牙周病原菌有较高的杀菌效果。与此相对,牙科通用的消毒液在牙周病原菌没有任何屏障时,恰如其分地有效,但是,如果形成有斑块、有牙石或者存在有机物或食物残渣等营养物质,则意味着效果极端地下降。

[0096] 依据以上的试验结果,接下来,以在实际中也可以称为牙周病元凶的斑块作为试

验材料,试验各杀菌消毒液的效力。

[0097] (试验例 4)

[0098] 采集龈上牙石附着的斑块,把将其直接做成厚 $200\mu\text{m}$ 的切片和将粒子大小粉碎为 $10\mu\text{m}$ 的微粉,浸渍到 1ml 的“本杀菌消毒液”中,按照常用方法测定经过一段时间后含有的活菌数。其结果如表 5 所示,在 20mg 斑块的切片中含有的 4×10^9 细胞的活菌数,浸渍 1 分钟后、其 $3/4$ 灭绝,5 分钟后成为 $1/5,000$,10 分钟后全部菌灭绝。另外,做成粉末状的斑块,其活菌数在 3 分钟以内全部灭绝。即,证实了“本杀菌消毒液”突破屏蔽,浸透到斑块内部,对其中的细菌显示出杀菌作用。此外,使用牙科领域通用的洗必泰液(洗必泰凝胶)、3%过氧化氢水和利凡诺时,斑块表面的菌在 3 分钟以内几乎全部灭绝,但栖息在内部的菌经受 60 分钟的浸渍后仍有半数存活。即,意味着不能使作为细菌集合体的斑块受到决定性的损坏。另外,对龈下牙石附着的斑块(致密、坚固)也进行同样的试验,对片状斑块约 15 分钟、对粉末状斑块约 3 分钟以内,全部细菌灭绝。与此相对,使用洗必泰液等时,如上所述,内部的菌经受 60 分钟的浸渍后仍原样地继续生存。

[0099] 表 5 因本杀菌消毒液处理导致的斑块中的活菌数的变化

[0100]

	20mg 斑块中的活菌数						
	处理前的菌数	1 分钟后	3 分钟后	5 分钟后	10 分钟后	15 分钟后	30 分钟后
片状斑块	4×10^9	1×10^9	5×10^7	8×10^5	0	0	0
微粉末状斑块	4×10^9	2×10^8	0	0	0	0	0

[0101] 接下来,再假设在牙石附着斑块中附着或混入有机物的情况,将斑块 20mg 和酵母提取物 20mg 混合,按照上述方法进行试验。其结果如表 6 所示,几乎不受有机物的影响,片状斑块浸渍 5 分钟后杀灭到约 $1/2,000$,浸渍 10 分钟全部细菌灭绝。另外,微粉末状斑块浸渍 3 分钟后,全部细菌灭绝。与此相对,使用通用的消毒剂时,在有机物的存在下,斑表面的消毒需要 10 分钟,内部的细菌大半存活。即,在治疗中,只要没有不遗漏地除去斑块,即使暂时看着变好了,也会如实地表现出反复复发。

[0102] 表 6 因本杀菌消毒液处理导致的斑块和有机物中的活菌数的变化

[0103]

	20mg 斑块和 20mg 酵母提取物中的活菌数						
	处理前的菌数	1 分钟后	3 分钟后	5 分钟后	10 分钟后	15 分钟后	30 分钟后
片状斑块	3.5×10^9	1.5×10^9	1×10^8	2×10^6	0	0	0
微粉末状斑块	3.5×10^9	4×10^8	0	0	0	0	0

[0104] 根据上述试验例 1~试验例 4 所示的各种试验可以明确,“本杀菌消毒液”对在各种环境下生存的活动的细菌给予毁灭性的破坏。可以说已证明,栖息在牙周袋内、在难以除去的斑块中潜伏的牙周病菌也不例外,通过在其部位注入“本杀菌消毒液”,虽然因斑块的生长过程及其种类不同而稍有差异,但是在瞬时~10 分钟左右均灭绝。另外,关于“本杀菌消毒液”的作用,应该特别写出的在于,如上所述在动物实验和人体实验中证实的那样,不仅对细胞、组织几乎没有破坏,而且促进组织的再生。

[0105] (试验例 5)

[0106] 将小鼠的一部分皮肤剥离约 1cm^2 ,使脱脂棉中含有常用浓度的各种杀菌消毒液,在其痕迹上早晚涂敷 2 次。此外,涂敷水作为对照。其结果如表 7 所示,对照的小鼠,在伤

口再生薄皮需要 5 日、皮肤恢复到原来厚度需要 12 日、毛长齐需要 35 日,而涂敷“本杀菌消毒液”时,伤口闭合需要 4 日、恢复到原来厚度需要 10 日、然后仅需要 30 日毛即可长齐。这与使用碘酒是类似的效果,意味着“本杀菌消毒液”和碘酒促进组织的再生。与此相反,涂敷牙科通用的洗必泰凝胶、3%过氧化氢水、利凡诺,结上一层薄皮需要 5 日、恢复到原来的厚度需要 12 ~ 15 日、毛长齐需要约 40 日。即,这些消毒液作为毒物起作用,显示出抑制组织的再生。

[0107] 表 7 因各种杀菌消毒液而导致的皮肤损伤的恢复

[0108]

	恢复状况		
	全面地结出一层薄皮	皮肤几乎成为原来的厚度	完全恢复(毛长齐)
本杀菌消毒液	4 日	10 日	30 日
洗必泰凝胶	5 日	12 日	38 日
3%过氧化氢水	5 日	15 日	40 日
利凡诺	5 日	15 日	40 日
碘酒	4 日	10 日	32 日
水	5 日	12 日	35 日

[0109] (试验例 6)

[0110] 将“本杀菌消毒液”的稀释液添加到培养基中时,如表 8 所示,本发明中使用的乳酸杆菌群,其生长受到刺激。众所周知的是,通过添加乙酸,可促进乳酸菌生长,但是,尽管将显示杀菌作用的杀菌消毒液进行稀释,但仍具有生长促进作用,可以说是令人吃惊的。但是,如表 9 所示,对以牙周病原菌为首的病原菌则没有这样的作用。即,意味着:如果在牙周袋中注入“本杀菌消毒液”后,轻轻地水洗,如后所述,充满表现出特异能力的本发明的新干酪乳杆菌种(以下称为“新乳酸菌”),则“新乳酸菌”的生长受到刺激,将增大对牙周病的治疗效果。此外,通用的消毒液,即使改变浓度添加到培养基中,菌的生长也被抑制,但一点儿也没有刺激生长。另外,在牙齿表面吸附有“本杀菌消毒液”的主要成分 Fe^{3+} ,这将成为屏障、防止牙周病原菌的再附着。另外,为了显示收敛作用,使作为牙周病原菌的营养源的牙周沟液的分泌暂时减少,对于潜伏在内部的牙周病原菌,通过部分断绝其营养源将抑制其生长繁殖。

[0111] 表 8 本杀菌消毒液对乳酸杆菌的生长的影响

[0112]

	培养基中含有的本杀菌消毒液的常用浓度的稀释						
	1/10	1/30	1/50	1/100	1/200	1/300	1/500
“新乳酸菌” (<i>L. casei</i>)	—	±	+	++	+	+	±
其它的 <i>L. casei</i>	—	—	±	+	+	±	±
<i>L. acidophilus</i>	—	—	±	+	+	±	±
<i>L. pluntarum</i>	—	—	+	+	+	±	±
<i>L. burgaricus</i>	—	—	±	+	+	±	±
<i>L. salivarius</i>	—	—	+	+	+	±	±
<i>L. fermentum</i>	—	—	±	+	+	±	±

[0113] —:抑制生长

[0114] ±:不抑制也不促进生长

[0115] +:促进生长

[0116] 表 9 本杀菌消毒液对病原菌的生长的影响

[0117]

	培养基中含有的本杀菌消毒液的常用浓度的稀释						
	1/10	1/30	1/50	1/100	1/200	1/300	1/500
<i>P. gingivalis</i>	—	—	±	±	±	±	±
<i>P. intermedia</i>	—	—	±	±	±	±	±
<i>A. actinomycetem</i>	—	—	±	±	±	±	±
<i>S. aureus</i>	—	—	±	±	±	±	±
<i>S. pyogenes</i>	—	—	±	±	±	±	±
<i>E. coli</i> O-157	—	—	±	±	±	±	±
<i>S. enteritidis</i>	—	—	±	±	±	±	±
<i>Ps. aeruginosa</i>	—	—	±	±	±	±	±
<i>V. parahaemoliticus</i>	—	—	±	±	±	±	±

[0118] —:抑制生长

[0119] ±:不抑制也不促进生长

[0120] +:促进生长

[0121] 实施例

[0122] 接下来,基于实施例,具体地说明本发明,但本发明的主旨不局限于这些实施例。此外,通过改变制造工序、使用公知的增量剂或赋型剂,当然可以得到任意的菌数。另外,各制剂的剂型,可以与适当的赋型剂一起适当采用粉末状、颗粒状、胶囊剂等通常的剂型。

[0123] (制造例 1)

[0124] 在 10L 每 1L 中含有蛋白胨 10g、肉汁 5g、酵母提取物 5g、乳糖 10g、 K_2HPO_4 2g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g、NaCl 1g、柠檬酸二铵 2g、乙酸钠 5g、 $CaCO_3$ 3g、 $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.3g、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03g、L-半胱氨酸 1g 的 pH 7.2 的培养基中,接种本发明的干酪乳杆菌种 (FERMBP-10059, FERM P-19443),在 37℃ 下厌氧培养 72 小时。培养结束后,将培养液由滤纸过滤,由此除去 $CaCO_3$,冷藏保存 3L 滤液,离心分离剩余的液体、得到上清液和菌块 8.4g。接着,以 420ml 生理食盐水洗净、反复 2 次离心分离。将得到的清洁菌块投入到由 70g 脱脂乳、20g 可溶性淀粉、0.5g 谷氨酸钠、1000ml 精制水构成的溶液中、搅拌、按照常用方法进行真空冷冻干燥,得到菌制剂 101g。测定该菌制剂的菌数时,为 2.5×10^{10} 细胞/g。这里得到的制剂是 101g 冷冻干燥菌体(包括保护剂)、3000ml 培养液、6700ml 培养滤液(除菌液)。

[0125] (制造例 2)

[0126] 在 10L 每 1L 中含有 3g(水解)酪蛋白氨基酸、2g 酵母提取物、50ml 西红柿汁、2g 葡萄糖、1g NaCl、1g KH_2PO_4 、0.7g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、1g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 、0.5ml Tween80、0.5g 可溶性淀粉的 pH 6.8 的培养基中,接种本发明的干酪乳杆菌种 (FERM BP-10059, FERM P-19443),在 30℃ 下、兼性厌氧培养 96 小时。培养结束后,冷藏保存 3L 培养液,离心分离剩余的 7L、得到上清液和菌块 5.6g。接着,用 280ml 生理食盐水洗净、再次离心分离。将得到的清洁菌块中的 2.6g 在 10.4g 马铃薯淀粉中充分混合、冷藏保存。将剩余的 3g 清洁菌块投入到由 15g 脱脂乳、15g 可溶性淀粉、5g 海藻糖、0.2g 半胱氨酸、500ml 精制水构成的溶液、搅拌、按照常用方法进行真空冷冻干燥,得到 39g 菌制剂。测定该菌制剂的菌数时,为 2×10^{10} 细胞/g。这里得到的制剂是 39g 冷冻干燥菌体(包括保护剂)、13g 湿润菌体(包括保护剂)、3000ml 培养液、6700ml 培养滤液(除菌液)。

[0127] (制造例 3)

[0128] 在 5L 每 1L 中含有 100g 脱脂乳、1g 海藻糖的 pH 调整为 6.8 的培养基中,接种本发明的干酪乳杆菌种 (FERM BP-10059, FERMP-19443),在 37℃ 下、兼性厌氧培养 72 小时。接着,向该培养液(酸乳酪)中添加 75g 海藻糖,充分搅拌,按照常用方法进行真空冷冻干燥,得到 590g 菌制剂。测定该菌制剂的菌数时,为 5×10^9 细胞/g。这里得到的制剂是含有菌体和脱脂乳发酵产物的制剂。

[0129] (制造例 4)

[0130] 本发明的新乳酸菌 (FERM BP-10059, FERM P-19443) 制剂,在 10L 每 1L 中含有 5g 蛋白胨、3g 肉汁、2g 酵母提取物、1g CGF、5g 淀粉、1g 乳糖、2g 柠檬酸二铵、3g 乙酸钠、0.2g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.03g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1g L-半胱氨酸的 pH 7.2 的培养基中,接种耐抗生素的本发明的新乳酸菌 (FERM BP-10059, FERM P-19443),在 37℃ 下厌氧培养 3 日。培养结束后,对培养液进行滤纸过滤、除去 CaCO_3 ,然后离心分离,将得到的 7.8g 菌体分散在 370ml 生理食盐水中,再反复 2 次进行离心分离。将得到的清洁菌块分散在 450ml 预先灭菌过的 5% 淀粉溶液中,按照常用方法、进行真空冷冻干燥,得到 30g 新乳酸菌制剂。该菌制剂的活菌含量为 1×10^{11} 细胞/g。

[0131] (制造例 5)

[0132] 将制造例 4 中制造的清洁菌体混入到 15.7ml 橄榄油中,制造油制剂。该菌制剂的活菌含量为 2×10^{11} 细胞/g。在 10g 亲水软膏中混合 10g 该油制剂,制造乳酸菌乳酪(cream)。接着,在该乳酸菌乳酪中混合 400mg 羟氨苄青霉素(amoxicillin)(AMPC)、100mg 红霉素(EM)、100mg 弗氏霉素(fradiomycin)(FRM)和 100mg 头孢克罗(cefaclor)(CCL)作为抗生素,制造含有抗生素的乳酸菌乳酪。

[0133] (实施例 1)

[0134] 通过大肠菌 0-157 与原始的干酪乳杆菌种 (FERM BP-6971) 的混合培养以及大肠菌 0-157 与本发明的干酪乳杆菌种 (FERMBP-10059, FERM P-19443) 的混合培养,对在大肠菌 0-157 和干酪乳杆菌的共存下、因干酪乳杆菌产生的毒性减弱型抗生素的影响力而导致的大肠菌 0-157 的 S-R 变异的速度及其比例进行跟踪调查。培养基组成为 1L 中添加 5g 肉汁、1g 酵母提取物、5g 蛋白胨、2g NaCl 、1g CaCO_3 以及 2g 葡萄糖或 2g 淀粉,将 pH 调整为 7.2。在 37℃ 下进行厌氧培养,每 72 小时进行传代培养,每次都在平板培养基上稀释涂布,观察出现的菌落,测量 S 型(原型)和变异的 R 型(毒性减弱型),比较调查其比例。将其结果示于表 10 和表 11。使用葡萄糖作为糖时,从表 10 可知,大肠菌 0-157 在与原始的干酪乳杆菌种 (FERMBP-6971) 的共存下,由传代产生的菌数变动较大。从传代第 5 代左右开始,出现 R 型(30%),随着以后反复传代, R 型的比例增大,在第 18 代全部菌转变为 R 型。以后,即使继续传代, S 型再也不能复活了。与此相对,大肠菌 0-157 在与本发明的干酪乳杆菌种 (FERMBP-10059, FERM P-19443) 的共存下,在 3 代的传代中就已经出现 5% 的 R 型、在 5 代中为 50%、在 12 代的传代中全部大肠菌转变为 R 型。即表明,与原始的干酪乳杆菌种相比,大肠菌 0-157 受到本发明的干酪乳杆菌种的影响更显著。其理由据推测是因为两种干酪乳杆菌的增殖力不同产生。

[0135]

表10 使用葡萄糖作为糖时的大肠菌O-157与原始的干酪乳杆菌种和本发明的干酪乳杆菌种的混合培养的结果

	原始的干酪 乳杆菌种	大肠菌O-157			本发 明的干酪 乳杆菌种	大肠菌O-157		
		S型	R型	R型的比例		S型	R型	R型的比例
1代	1.2×10 ⁹	4.0×10 ⁹	0	0%	1.4×10 ⁹	3.2×10 ⁹	0	0%
3代	1.2×10 ⁹	3.5×10 ⁹	0	0%	1.7×10 ⁹	2.8×10 ⁹	1.5×10 ⁹	5%
5代	1.5×10 ⁹	2.5×10 ⁹	1.0×10 ⁹	30%	2.0×10 ⁹	1.0×10 ⁹	1.0×10 ⁹	50%
7代	1.4×10 ⁹	1.1×10 ⁹	1.1×10 ⁹	50%	2.0×10 ⁹	5.0×10 ⁸	1.5×10 ⁹	75%
10代	1.0×10 ⁹	1.4×10 ⁹	1.6×10 ⁹	55%	1.8×10 ⁹	1.0×10 ⁸	1.2×10 ⁹	90%
12代	1.2×10 ⁹	9.0×10 ⁸	2.1×10 ⁹	70%	1.5×10 ⁹	0	1.2×10 ⁹	100%
15代	1.5×10 ⁹	3.5×10 ⁸	2.1×10 ⁹	85%	2.0×10 ⁹	0	8.0×10 ⁸	100%
18代	1.3×10 ⁹	0	1.5×10 ⁹	100%	2.0×10 ⁹	0	8.0×10 ⁸	100%
20代	1.4×10 ⁹	0	1.7×10 ⁹	100%	1.8×10 ⁹	0	1.0×10 ⁸	100%

[0136] 使用淀粉作为糖时,从表 11 可知,大肠菌 O-157 的增殖力也下降,但原始的干酪乳杆菌种以后的增殖变差,最终的菌数不足 5×10^8 细胞。由于这样的影响力下降,大肠菌 O-157 向 R 型的转变也延迟,在 7 代的传代中为 10% 的出现率、在 20 代的传代中为 50% 的

出现率。即使再继续传代,也不会超过 70%。另一方面,本发明的干酪乳杆菌种的增殖力,不逊色于使用葡萄糖的情况,大肠菌 0-157 的增殖力每一传代就下降,R 型的出现在 3 代为 15%,仅仅 7 代就成为 100%。

[0137]

表 11 使用淀粉作为糖时的大肠菌 O-157 与原始的干酪乳杆菌种和本发明的干酪乳杆菌种的混合培养的结果

	原始的干酪乳杆菌种	大肠菌 O-157			本发明的干酪乳杆菌种	大肠菌 O-157		
		S 型	R 型	R 型的比例		S 型	R 型	R 型的比例
1 代	5.0×10^8	2.0×10^9	0	0%	1.5×10^9	2.0×10^9	0	0%
3 代	4.0×10^8	2.5×10^9	0	0%	1.4×10^9	1.7×10^9	3.0×10^8	15%
5 代	3.5×10^8	2.2×10^9	0	0%	1.8×10^9	4.0×10^8	1.0×10^9	70%
7 代	3.5×10^8	1.8×10^9	2.0×10^8	10%	2.0×10^9	0	1.2×10^9	100%
10 代	3.0×10^8	1.7×10^9	3.0×10^8	15%	1.7×10^9	0	1.0×10^9	100%
12 代	2.0×10^8	1.5×10^9	5.0×10^8	25%	1.5×10^9	0	8.0×10^8	100%
15 代	2.0×10^8	1.5×10^9	6.0×10^8	30%	1.8×10^9	0	8.0×10^8	100%
18 代	2.0×10^8	1.2×10^9	8.0×10^8	40%	1.7×10^9	0	6.0×10^8	100%
20 代	1.5×10^8	8.0×10^8	8.0×10^8	50%	1.8×10^9	0	5.0×10^8	100%

[0138] 除了大肠菌 O-157 以外,对肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enteritidis*) 和弗氏志贺菌 (*Shigella flexneri*) 也实施同样的试验,与大肠菌 O-157 时同样,与原始的干酪乳杆菌

种相比,因本发明的干酪乳杆菌种导致的向 R 型的变异极其迅速,如表 12 所示。此外,将变异为 R 型的病原菌的菌株以 S 型菌株的致死量对小鼠进行口服和腹腔给药时,死亡率为 0,毛色、种类和行为与没有给药的小鼠没有任何变化,确认病原性几乎失活。

[0139] 表 12 混合培养时 R 型病原菌的出现比例

[0140]

传代数	肠炎沙门氏菌		弗氏志贺菌	
	与原始的干酪乳杆菌种的混合培养	与本发明的干酪乳杆菌种的混合培养	与原始的干酪乳杆菌种的混合培养	与本发明的干酪乳杆菌种的混合培养
5 代	20 %	40 %	5 %	15 %
10 代	40 %	80 %	25 %	50 %
15 代	55 %	90 %	35 %	70 %
20 代	70 %	95 %	50 %	80 %
25 代	75 %	100 %	50 %	100 %
30 代	80 %	100 %	55 %	100 %
35 代	80 %	100 %	70 %	100 %
40 代	90 %	100 %	75 %	100 %
45 代	95 %	100 %	80 %	100 %
50 代	90 %	100 %	75 %	100 %
60 代	95 %	100 %	80 %	100 %
70 代	100 %	100 %	85 %	100 %
80 代	100 %	100 %	90 %	100 %
90 代	100 %	100 %	100 %	100 %
100 代	100 %	100 %	90 %	100 %
110 代	100 %	100 %	100 %	100 %
120 代	100 %	100 %	100 %	100 %

[0141] (实施例 2)

[0142] 通过每日服用由原始的干酪乳杆菌种构成的制造例 1 中制造的冷冻干燥菌体 2g (5×10^8 细胞 /g), 作为肠内细菌群中的有益菌已知的双歧杆菌 (Bifidobacterium) 和乳酸杆菌 (Lactobacillus) 增加, 相反地, 作为有害菌已知的梭菌 (Clostridium) 和韦荣氏球菌 (Veillonella) 减少, 这已经试验完成, 这次, 对 10 名健康人服用本发明的干酪乳杆菌种的效果, 历时 3 个月进行测定、比较。其结果如表 13 所示, 服用原始的干酪乳杆菌种 (FERM BP-6971) 时, 3 个月后, 双歧杆菌增加约 90%、干酪乳杆菌增加 150%, 相反地, 梭菌减少 50%、韦荣氏球菌减少 25%。与此相对, 服用本发明的干酪乳杆菌种 (FERM BP-10059、FERM P-19443) 时, 3 个月后, 双歧杆菌增加 133%、干酪乳杆菌增加 300%, 与此相对, 梭菌减少 96%、韦荣氏球菌减少 98.4%。即, 可以确认, 对构成肠内细菌群有益菌、有害菌带来的作用, 本发明的干酪乳杆菌种优异得多。特别是使有害菌锐减的能力优秀。

[0143]

表13 健康人的肠内细菌群的变化

	原始的干酪乳杆菌种				本发明的干酪乳杆菌种			
	服用前	服用后菌的消长			服用前	服用后菌的消长		
		1个月	2个月	3个月		1个月	2个月	3个月
有益菌								
双歧杆菌	1.1×10^{10}	1.3×10^{10}	1.9×10^{10}	2.0×10^{10}	1.2×10^{10}	1.8×10^{10}	2.5×10^{10}	2.8×10^{10}
乳酸杆菌	2.0×10^7	2.5×10^7	3.2×10^7	5.0×10^7	2.5×10^7	5.0×10^7	8.0×10^7	1.0×10^8
有害菌								
梭菌	1.0×10^3	8.0×10^3	7.0×10^3	5.0×10^3	1.2×10^3	5.0×10^3	1.0×10^3	3.0×10^3
韦荣氏球菌	7.0×10^3	6.0×10^3	5.0×10^3	4.5×10^3	6.0×10^3	1.0×10^3	2.0×10^3	1.0×10^3

[0144] (实施例 3)

[0145] 接下来,将上述干酪乳杆菌的制造例 1 中制造的冷冻干燥菌体 2g 给药至 10 名病弱者,历时 3 个月进行测定、比较。将其结果示于表 14。根据表 13 与表 14 可知,给药前的肠内细菌群,健康人与病弱者相比,有益菌多约 2 倍、相反地有害菌只不过是其 1/3。这一点如实地表明,肠内细菌群的现状反映了目前的健康状况。在实验对象中进行问卷调查时,收

到参加本试验的全部健康人自我感觉更加健康、病弱者对健康具有信心的报告。具体地说，有(1) 疲劳感减少，(2) 脸色变好，(3) 通便异常得到改善，(4) 肌肉恢复力量、变得好看，(5) 肥胖得到改善，(6) 高血压恢复正常值，(7) 特应性(atopy) 得到相当地改善等，该比例中，服用本发明的干酪乳杆菌种的人异常地多。

[0146]

表14 病弱者的肠内细菌群的变化

	原始的干酪乳杆菌种				本发明的干酪乳杆菌种			
	服用前	服用后菌的消长			服用前	服用后菌的消长		
		1个月	2个月	3个月		1个月	2个月	3个月
有益菌								
双歧杆菌	5.0×10^9	5.2×10^9	6.0×10^9	6.5×10^9	4.0×10^9	6.0×10^9	8.0×10^9	1.0×10^{10}
乳酸杆菌	1.0×10^7	1.2×10^7	1.5×10^7	2.5×10^7	1.0×10^7	1.5×10^7	2.0×10^7	4.0×10^7
有害菌								
梭菌	7.0×10^5	6.0×10^5	6.0×10^5	4.0×10^5	5.0×10^5	8.0×10^5	2.0×10^6	8.0×10^5
韦氏球菌	2.0×10^6	1.7×10^6	1.5×10^6	1.3×10^6	2.5×10^6	1.0×10^6	5.0×10^5	2.5×10^5

[0147] (实施例 4)

[0148] 准备 3 个 W600mm×D200mm×H150mm 的培植器皿 (planter), 将在通常的旱田的土中混入 100g 熟透的堆肥和 12g 化肥 (日本合同肥料株式会社生产的 Green Map, N:8%、P:5%、K:5%) 的混合物加入各培植器皿中, 撒布 10g 苦土石灰 (株式会社 NAC 生产, 在消石灰中混合 5~7% 氧化镁的土壤改良剂)。接着, 制成 5~8mm 深度的沟, 手工播种水萝卜的种子。第 5 天发芽, 在其次日, 将制造例 2 中记载的培养基中培养原始的干酪乳杆菌种 (FERM BP-6971) 的离心菌块 2g 投入到 200ml 水中, 充分搅拌后, 在对照区中撒布。另外, 将制造例 2 中记载的培养基中培养本发明的干酪乳杆菌种 (FERM BP-10059、FERM P-19443) 的离心菌块 2g 投入到 200ml 水中, 充分搅拌后, 在试验区中撒布。此外, 在无添加区中只撒布水。在长出叶子的第 10 日, 进行疏苗以达到 5cm 间隔, 在每个培植器皿中剩下 30 棵水萝卜。在对照区和试验区中, 分别撒布上述离心菌块的悬浊液和 150ml 稀释至 500 倍的液体肥料, 在无添加区中只撒布 150ml 稀释至 500 倍的液体肥料。此后, 撒适当的水使其不干燥, 在第 28 天收割。其效果如表 15 所示, 试验区由于撒布本发明的干酪乳杆菌种, 不仅比无添加区的水萝卜、即使与撒布原始的干酪乳杆菌种的对照区培育出的水萝卜相比, 也可以收获重量、色泽、香气、肉质、味道、嚼头等各品质均优异的水萝卜。

[0149]

表 15 水萝卜的生长结果

分区	生长经过	重量 (平均 g/个)	品质			
			色泽	香气	肉质	味道
无添加区	培育的 30 棵中有 2 棵中途衰弱, 重量只有 5g。	8.1g	鲜红色	+	产生少许“微孔”。而且也有裂纹。	一般
对照区	叶子很茂密。不收获地原样放置时、产生“微孔 (pore)”。	7.2g	鲜红色	+~++	致密的肉质。	稍甜
试验区	叶子很繁茂, 色泽青翠。即使不收获地原样放置, 也不产生“微孔”。	11.8g	深红色	++	非常致密的肉质, 有嚼头。	很强

[0150] (实施例 5)

[0151] 对于豆苗的水耕栽培 (hydroponic cultivation), 设置与实施例 4 同样的试验区

实施生长试验。在聚乙烯制造的 W100×D100×H180mm 的箱子底部敷设海绵,充分浸渍在水中,在一面播种豆苗的种子。温度设定为 22℃,用黑布覆盖 5 天、隔断光线,此后撤除布,在自然光下生长。对照区中,将原始的干酪乳杆菌种 (FERM BP-6971) 的冷冻干燥菌体 1g 投入到 100ml 水中,充分搅拌后、在第 3 天和第 5 天通过喷雾撒布。另外,在试验区中,将制造例 1 中制造的本发明的干酪乳杆菌种 (FERM BP-10059、FERM P-19443) 的冷冻干燥菌体 1g 投入到 100ml 水中,充分搅拌后、在第 3 天和第 5 天通过喷雾撒布。此外,在无添加区中只撒布水。生长结果如表 16 所示,通过撒布本发明的干酪乳杆菌种,可以收获无添加区和对照区中没有的优质的豆苗。

[0152] 表 16 豆苗的生长结果

[0153]

分区	生长经过	品质
无添加区	平均高度 15.2cm 外侧的茎高、内侧的茎较低	嚼头 (texture) :一般 绿和黄绿是稍微不鲜明的颜色。 不完全的辛辣。
对照区	平均高度 16.1cm 外侧的茎高、内侧的茎较低	嚼头 :一般~优良 绿和黄绿的区分鲜明。 辛辣显著。
试验区	平均高度 16.8cm 大体整齐地变高、茎稍粗、变得结实	嚼头 :优良 色泽、绿、黄绿、白的区分非常鲜明。辛辣 中也存在柔和的甜味。

[0154] 根据实施例 1 ~ 5 可知,一面保持原始的干酪乳杆菌种的特质,一面通过驯化培养而被赋予各种性质的本发明的干酪乳杆菌种,确认对活体给予不可估量的生命力,被证实与原始的干酪乳杆菌种是根本不同的菌株。

[0155] (实施例 6)

[0156] *P. gingivalis* 和 *P. ntermedia* 的毒性,由从动物实验的结果判明 :通过观察血液平板上的黑色菌落的色调和臭气以及在平板上的附着性的强弱,可以推测产生毒素的质与量,另外,在 *A. actinomycetemcomitans* 中,通过观察其溶血性强度和附着性,能够推测产生毒素的质与量。因此,通过将上述主要的牙周病原菌与“新乳酸菌”共生培养,调查牙周病病原菌表现怎样的动向、反应。培养基采用日水制药生产的改良 GAM 肉汤,在 37℃ 下进行厌气培养,每 72 小时进行传代培养,每次按照常用方法在血液平板培养基上稀释涂布,跟踪观察其菌数和出现菌落的情形的经过。将其结果示于表 17、表 18 和表 19。根据表 17 可知, *P. gingivalis* 的菌数每次传代逐渐减少,在第 25 代最终消失。此期间的毒性变化,从第 5 代逐渐变弱,第 15 代仅有少许,第 20 代几乎全部失活。确认即使在小鼠的牙周局部使之感染该菌,也不发生牙龈炎。另外,根据表 18 可知, *P. intermedia* 的菌数随着传代次数而逐渐减少,在第 15 代消失。与之相伴,病原性也逐渐减弱,在第 12 代其病原性也消失。另外,根据表 19 可知, *A. actinomycetemcomitans* 的菌数也是每次传代都减少,但不会象 *P. gingivalis* 和 *P. intermedia* 那样迅速地减少。但是,一旦超过某一界线就会迅速减少,在第 18 代消灭。根据小鼠的试验,病原性在 12 代时完全失活。此外,对其它参与牙周病的细菌,例如 *F. nucleatum*、*B. forsythus*、*L. buccalis*、*E. corrodens* 和口腔内多的 *Streptococcus* 属,也进行同样的共生培养试验,任一种菌都比不过本发明的乳酸菌的增殖能力和生理活性物质,可知其菌数和毒性每次传代都急剧减少减少。

[0157]

表 17 P.gingivalis 与 FERM BP-10059 株的共生培养的结果

传代次数	FERM BP-10059	P.gingivalis					病原性的变化
		菌数		菌落的状态			
		比例	色调	气味	附着性		
1	1.8×10 ⁹	2.2×10 ⁹	55%	黑色、有光泽	强烈的腐败气味	坚固的附着性	强
3	1.5×10 ⁹	1.5×10 ⁹	50%	黑色、有光泽	强烈的腐败气味	坚固的附着性	中等程度～强
5	1.8×10 ⁹	5×10 ⁸	22%	黑褐色	中等程度的腐败气味	中等程度的附着性	中等程度
10	2×10 ⁹	2×10 ⁸	10%	茶色	弱的腐败气味	弱附着性	弱
15	2.5×10 ⁹	5×10 ⁷	2%	灰色	微弱的腐败气味	容易剥落	微弱
20	3×10 ⁹	1×10 ⁶	0.3%	白灰色	没有气味	无附着力	几乎没有
25	3×10 ⁹	0	0%				

[0158]

表 18 P.intermedia 与 FERM BP-10059 株的共生培养的结果

传代次数	FERM BP-10059	P.intermedia					病原性的变化
		菌数		菌落的状态			
		比例	色调	气味	附着性		
1	2.1×10^9	2×10^9	48%	黑色	腐败气味	强附着性	强
3	2.3×10^9	1×10^9	30%	黑色	腐败气味	中等程度的附着性	中等程度
5	2.5×10^9	2×10^8	7.4%	中心部分褐色	弱的腐败气味	弱附着性	中~弱
10	2.8×10^9	5×10^7	1.8%	褐色	微弱的腐败气味	几乎没有附着性	微弱
12	3×10^9	1×10^7	0.3%	灰白色	没有气味	没有	几乎没有
15	3×10^9	0	0%				

[0159]

表 19 A.actinomycetemcomitans 与 FERM BP-10059 株的共生培养的结果

传代次数	FERM BP-10059	A. actinomycetemcomitans					病原性的变化
		菌数		菌落的状态			
			比例	溶血性	气味	附着性	
1	2×10^9	2.3×10^9	53%	强（广范围）	腐败气味	强附着性	强
3	2.5×10^9	1.2×10^9	32%	强（广范围）	腐败气味	强附着性	强
5	2.5×10^9	8×10^8	24%	中等程度	中等程度的腐败气味	中等程度的附着性	中
10	2.5×10^9	2×10^8	7.4%	弱（窄范围）	弱的腐败气味	弱附着性	弱
12	2.8×10^9	1×10^8	3.4%	弱（窄范围）	弱的腐败气味	弱附着性	失活
15	3×10^9	3×10^7	1%	没有	微弱的腐败气味	几乎没有附着性	失活
18	3×10^9	0	0%				

- [0160] (实施例 7)
- [0161] 将“新乳酸菌”(FERM BP-10059、FERM P-19443) 在直径 90mm 的平板中央、

在 37℃ 下厌氧划线培养 72 小时后,使各牙周病原菌划线培养至其边界时,由于 FERM BP-10059 株 (FERM P-19443) 产生的类似抗生素的活性物质的影响,在 FERM BP-10059 株 (FERMP-19443) 的生长部位的附近,牙周病原菌的生长被阻止。接着,在生长被阻止时,对生长的牙周病原菌菌,在新的 FERM BP-10059 株 (FERM P-19443) 的生长平板上反复进行划线培养时,观察生长范围如何变化。本实施例没有如实施例 5 那样将 FERM BP-10059 株 (FERMP-19443) 与牙周病原菌混合。此外,平板采用改良 GAM 培养基。其结果如表 20 所示,由 FERM BP-10059 株 (FERM P-19443) 产生的阻止范围 (range of arrest),直到很多代以后仍大体维持在初代的状态,但如果超过某一点、则阻止范围迅速扩大,在第 13 ~ 15 代,病原菌将从培养皿上被驱逐出去、消失。另外,毒性也随着逐渐减弱、最终达到失活。

[0162] 表 20 新乳酸菌 (FERM BP-10059 株) 对牙周病原菌的影响

[0163]

牙周病原菌	因传代次数产生的阻止范围的变化 (mm)							
	1 代	3 代	5 代	7 代	9 代	11 代	13 代	15 代
<i>P.gingivalis</i>	15	20	22	22	26	32	43>	
<i>P.intermedia</i>	18	25	24	25	29	35	43>	
<i>A.actinomycetem</i>	12	10	13	18	30	35	40	43>
<i>F.nucleatum</i>	20	20	20	25	28	38	43>	
<i>B.forsythus</i>	16	18	23	22	27	35	39	43>

[0164] 43 > :虽然划线培养,但不生长

[0165] 使用已有的抗生素进行感受性试验时,每次传代其阻止范围无例外地变窄,最终获得抗药性。即,出现抗生素抵抗株,其病原菌的毒性没有变化或者多数变强。正如众所周知的,以 MRSA 为首的 VRE、耐多药结核菌、绿脓菌等的出现与蔓延成为世界性的大问题。根据上述实施例 6 和 7 可确认,无论牙周病原菌与 FERM BP-10059 株 (FERMP-19443) 是否直接接触,由于其极大的影响而没有出现抵抗株,生长增殖能力逐渐地被抑制,毒性也为完全失活。

[0166] (实施例 8)

[0167] 为了测定“新乳酸菌”(FERM BP-10059、FERM P-19443) 在牙周袋内的定植性,将悬浮在生理食盐水中的菌液 ($2 \times 10^{10}/\text{ml}$) 注射到具有同等深度的牙周袋内,从次日开始向袋内注射灭菌生理食盐水,放置 5 分钟后,再吸引采集注入的食盐水,每天观察 FERM BP-10059 株 (FERM P-19443) 的消长,持续 1 周。作为对照,将具有粘膜定植性的 *L. acidophilus* 和产生粘液、附着性高的 *B. natto* 分别独立地注入相同菌数,也观察其过程。其结果如表 21 所示,即使注入 $2 \times 10^{10}/\text{ml}$ FERMBP-10059 株 (FERM P-19443),其多数也会流出 (90% ~ 95%),但可以确认,剩下的菌定植 1 周左右,袋越深定植率越高。即意味着,FERMBP-10059 株 (FERM P-19443) 能够利用以牙龈沟液为主的营养源生长,牙周病越发展,其可以越活跃。与此相对,*L. acidophilus* 第 4 日以后、*B. natto* 第 3 日以后就确认不存在。即,可知这些菌不能在牙周袋内定植增殖。

[0168]

表21 牙周袋内的注入菌的消长

牙周袋的深度 (mm)	注入1小时后	注入菌的消长 (菌数/ml)						
		1天后	2天后	3天后	4天后	5天后	6天后	7天后
FERM BP-10059								
10mm	1×10^3	3×10^3	1×10^3	3×10^7	1×10^7	2×10^6	2×10^4	0
15mm	1×10^3	5×10^3	1.5×10^3	8×10^7	3×10^7	4×10^6	3×10^5	3×10^4
20mm	2×10^3	8×10^3	2×10^3	1×10^8	7×10^7	1×10^7	5×10^5	5×10^4
L. acidophilus								
15mm	1×10^3	1×10^3	5×10^3	5×10^3	0	0	0	0
B. natto								
10mm	5×10^3	5×10^7	3×10^4	0	0	0	0	0

[0169] (实施例 9)

[0170] 观察将“新乳酸菌”(FERM BP-10059、FERM P-19443)向牙周袋内连日注射投入时与隔日注射投入时的菌数的消长。其结果如表 22 所示,可以判明,连日注入菌时,袋内的菌数逐渐增加,袋越深、定植增殖越优异,另一方面,隔日注射投入与连日注入相比,菌的定植

增殖稍差,但就整体而言,逐渐增加。即,得到启示,隔日注射投入菌就足够了。

[0171]

表22 牙周袋内的FERM BP-10059株的消长

牙周袋的深度 (mm)	FERM BP-10059株的消长 (菌数/ml)						
	1天后	2天后	3天后	4天后	5天后	6天后	7天后
连日给药							
10mm	3.5×10^8	5×10^8	5×10^8	7×10^8	8×10^8	8×10^8	1×10^9
15mm	5×10^8	8×10^8	1×10^9	1.2×10^9	1.5×10^9	1.8×10^9	2×10^9
20mm	8.5×10^8	1.2×10^9	1.8×10^9	2.5×10^9	3.2×10^9	4×10^9	5×10^9
隔日给药							
10mm	3×10^8	1×10^8	4×10^8	1.5×10^8	6×10^8	2×10^8	6.5×10^8
15mm	5×10^8	1×10^8	6.5×10^8	2×10^8	8×10^8	2.5×10^8	1.2×10^9
20mm	8×10^8	2×10^8	1×10^9	3×10^8	2×10^9	8×10^8	2.8×10^9

[0172] “新乳酸菌”(FERM BP-10059、FERM P-19443)不仅对各种急性和慢性传染病有卓越的效果,而且对作为促进牙周病的主要原因的糖尿病等全身性的身体慢性疾病也显示出

其改善效果。即,通过投入本发明的新乳酸菌,可以提高活体的自然治愈力,其作为生命力被复原。所谓生命力即是活体的成长促进能力和组织修复能力。

[0173] (实施例 10)

[0174] 将 45 尾表现出水霉病的初期症状的平均身长 4.2cm 的金鱼(日本金鱼)分成无添加区、对照区和试验区的 3 组,将各组的饲养水温设定为 15℃、20℃和 25℃,合计使用 9 个水槽观察了 2 个月。在各水槽中,在 5L 水中放入 5 尾金鱼饲养。在对照区中,隔日投入原始的干酪乳杆菌种(FERM BP-6971)的冷冻干燥菌体 1g(5×10^6 细胞/ml 水槽水)。在试验区中,隔日投入制造例 1 中制造的本发明的干酪乳杆菌种(FERM BP-10059、FERM P-19443)的冷冻干燥菌体 1g(5×10^6 细胞/ml 水槽水)。在无添加区中,不进行任何处理地饲养金鱼。将饲养的结果示于表 23。从表 23 可知,在无添加区中,不管水温是多少,不到 1 个月,金鱼全部死亡,其平均生存天数是 18 天。另一方面,在投入原始的乳酸杆菌的对照区中,在水温为 25℃的水槽中,不到 1 个月,金鱼全部死亡,其平均生存天数是 23 天,但在设定为 15℃和 25℃的水槽中,因为水霉菌的繁殖缓慢,所以金鱼的死亡也在前面延缓,15℃中 1 个月死亡 2 尾、2 个月后再死亡 2 尾,死亡率是 80%。另外,20℃中 1 个月死亡 2 尾、2 个月后再全部死亡,死亡率是 100%。与此相对,投入本发明的干酪乳杆菌种时,在 20℃的水温中饲养的金鱼,第 45 天死亡 1 尾,在 25℃水温中饲养的金鱼在第 25 天死亡 1 尾、第 50 天死亡 1 尾,除此以外,全部很健康,身体表面附着的水霉菌也减少到几乎不明显。成长也显示出健康金鱼的不变的成长率。这表明尽管在 15℃的低温,但在低温下驯化的本发明的干酪乳杆菌种有效地发挥了作用。

[0175] 表 23 对金鱼的水霉病的治疗效果

[0176]

水温	分区	1 个月后	2 个月后	死亡率
15℃	无添加区	5 尾死亡		100%
	对照区	2 尾死亡	2 尾死亡	80%
	试验区	全部存活、平均身长 4.4cm	全部存活、平均身长 4.5cm	0%
20℃	无添加区	5 尾死亡		100%
	对照区	2 尾死亡	3 尾死亡	100%
	试验区	全部存活、平均身长 4.4cm	1 尾死亡	20%
25℃	无添加区	5 尾死亡		100%
	对照区	5 尾死亡		100%
	试验区	1 尾死亡、平均身长 4.5cm	1 尾死亡	40%

[0177] (实施例 11)

[0178] 以各 5 尾患有气单胞菌(aeromonas)从伤口侵入、使周围的肌肉溶解、重病时内脏露出的通称为“溃疡病”的金鱼(日本金鱼)作为对象,在与实施例 10 同样地设定的水槽中实施饲养试验。金鱼的溃疡病的症状有从轻度的到中等程度的各种程度的,但平衡好地放入各水槽中饲养 2 个月。将其结果示于表 24。从表 24 可知,无添加区的金鱼,无论水温是多少,症状都恶化,2 个月以内露出内脏、全部死亡。另一方面,在添加原始的干酪乳杆菌种(FERM BP-6971)的对照区中,轻度症状的金鱼在水温较低时维持原状,在水温较高时症状缓慢地恶化,结果在 2 个月后有 60 ~ 80%的高百分率死亡。与此相对,在添加本发明的

干酪乳杆菌种 (FERM BP-10059、FERM P-19443) 的试验区中, 轻度症状时, 不论水温为多少, 几乎全部治愈。中等程度症状时, 伤口也逐渐痊愈, 即使经过 2 个月, 也没有金鱼死亡。

[0179] 表 24 对金鱼的溃疡病的治疗效果

[0180]

水温	分区	1 个月后	2 个月后	死亡率
15℃	无添加区	轻度症状的金鱼的伤口也逐渐扩大, 3 尾死亡。	轻度症状的金鱼的伤口也逐渐扩大、剩余的 2 尾也死亡。	100%
	对照区	轻度症状的金鱼维持原状、中等程度症状的金鱼仅仅伤口扩大。	轻度症状的金鱼维持原状、中等程度症状的金鱼全部死亡。	60%
	试验区	轻度症状的金鱼 1 个月后伤口几乎闭合, 中等程度症状的金鱼或维持原状或伤口稍微闭合。	轻度症状的金鱼完全恢复到健康状态, 中等程度症状的金鱼的伤口变得不明显。	0%
20℃	无添加区	显示与 15℃ 时很相似的过程, 轻度症状的金鱼死亡 1 尾、中等程度症状的金鱼死亡 2 尾。	显示与 15℃ 时很相似的过程, 剩余的 2 尾也死亡。	100%
	对照区	轻度症状的金鱼维持原状, 中等程度症状的金鱼伤口稍微扩大。	轻度症状的 1 尾金鱼伤口迅速扩大而死亡, 中等程度症状的金鱼也有 2 尾死亡。	60%
	试验区	显示与 15℃ 时同样的过程	显示与 15℃ 时同样的过程	0%
25℃	无添加区	轻度症状的金鱼的伤口也迅速扩大, 全部死亡。		100%
	对照区	轻度症状的金鱼的伤口扩大, 中等程度症状的金鱼的伤口逐渐地扩大。	轻度症状的金鱼的伤口迅速扩大、2 尾死亡, 中等程度症状的金鱼也有 2 尾死亡。	80%
	试验区	轻度症状的金鱼维持原状, 中等程度症状的金鱼伤口逐渐变小。	轻度症状的金鱼的伤口不太明显, 中等程度症状的金鱼除 1 尾外、伤口变得相当小。	0%

[0181] (实施例 12)

[0182] 将小鼠的皮肤的一部分剥离约 1cm², 此后, 早晚 2 次在无添加区局部涂敷水, 在菌添加区局部涂敷 *L. casei* 的标准株 ATCC 393 和“新乳酸菌”(FERM BP-10059、FERM P-19443) 的离心分离菌体, 观察其经过。观察结果如图 1 所示, 涂敷 FERM BP-10059 株 (FERMP-19443) 时, 伤口整个表面结出一层薄皮的天数仅为 3 天、恢复到原来的皮肤为 8 天、毛完全长齐只不过仅为 22 天。与此相对, 涂敷 ATCC393 时, 分别需要 4 天、10 天、28 天, 涂敷水时, 分别需要 5 天、12 天、35 天。在该试验中, “新乳酸菌”(FERM BP-10059、FERMP-19443) 在其组织修复能力方面也表现出了优异的能力。

[0183] (实施例 13)

[0184] 为了观察对于动物细胞和植物细胞的细胞增殖性, 在 1L 中含有 3g 蛋白胨、2g 胰蛋白胨 (tryptone)、3g 肉汁、1g CGF、1g 酵母提取物、3g 淀粉、1g 海藻糖、1.5g KH₂PO₄、0.7g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1g NaCl 、1g 柠檬酸二铵、1g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、2g 乙酸钠、2g CaCO_3 、0.2g $\text{MnSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ 、0.03g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.01g ZnSO_4 、0.2g L-半胱氨酸、1g 牛磺酸 (taurin)、pH 为 7.2 的培养基中,植入 *L. casei* 的标准株 ATCC 393 和“新乳酸菌”(FERM BP-10059、FERM P-19443),在厌氧性条件下、在 37℃ 下培养 72 小时,在日本制药生产的动物细胞培养用的 GIT 培养基中添加 5% 量的该离心分离的上清液的培养液与不添加的培养液中,分别混入 2×10^5 细胞/ml 猴肾 (V-1 细胞株) 和小鼠肥大细胞瘤细胞株 P815 以及鼠淋巴细胞 CEA,测量 48 小时后的活细胞数。将其结果示于图 2、图 3 和图 4。从各图可判明,动物细胞在其细胞培养液中添加 5% 量的乳酸菌培养滤液时,其增殖性增加,添加标准株 ATCC 393 的增加 10 ~ 15%,添加 FERM BP-10059 株 (FERM P-19443) 的增加 40 ~ 50%。这表明乳酸菌的生成物质 (生理活性物质) 促进刺激动物细胞的增殖 (分裂),还暗示淋巴球的增殖对免疫系统的强化有贡献。另外,如图 5 所示,在作为植物细胞的绿藻的同样的试验中,确认增殖率虽然比不上动物细胞,但也有提高。

[0185] 牙周病原菌的病原因子有多种,有关定植的因子、蛋白分解酶和毒素、或在毒性方面发挥作用的物质、代谢产物等直接或间接地给牙周组织带来损害。具体地说,有内毒素 (LPSI)、胶原酶、类胰蛋白酶 (trypsin-like enzymes)、纤维芽细胞抑制酶等破坏酶、白血球破坏酶 (白细胞毒素)、溶血毒、硫化氢和脂肪酸等细胞毒素,以及依靠长纤毛向粘膜上皮、红血球、其它细菌的附着性等。特别地,内毒素的作用涉及破骨细胞的活化 (牙槽骨的吸收促进)、纤维芽细胞的伤害、免疫病理学反应的促进 (过度地刺激免疫系统细胞而引起组织障碍)、施瓦茨曼 (Schwartzman) 反应 (牙周组织的循环障碍) 等多方面。“新乳酸菌”(FERM BP-10059、FERM P-19443) 对牙周病原菌,阻止其增殖,另外,不仅在病原性减弱方面发挥作用,而且可以将牙周病原菌产生的若干毒素转化分解而无毒化。

[0186] (实施例 14)

[0187] 将由改良 GAM 肉汤、在 37℃ 下厌氧培养 120 小时的牙周病原菌进行离心分离以集菌,使之在生理食盐水中浮游、离心清洗 3 次。接着,使其在 5 倍量的水中均匀浮游,冷却到 0℃,加入等量的冰冷的 0.5N 三氯乙酸水溶液,在 0℃ 放置 3 小时。接着,通过离心分离除去菌体残渣,在上清液中加入 2 体积当量的冷乙醇,离心分离沉淀物。用少量的乙醇、接着用乙醚清洗沉淀物,得到白色粉末的内毒素。使 5mg 该毒素浸透圆盘、干燥,制作感受性圆盘 (sensitivity disk)。接着,在 1L 中含有 2.5g 酵母提取物、5g 蛋白胨、1g 葡萄糖、0.1g L-半胱氨酸、1g 聚山梨醇酯 80、0.06g BCP 的 BCP 平板培养基中,将先前制作的感受性圆盘放置在涂布了 *L. casei* 标准株 ATCC 393 和“新乳酸菌”(FERM BP-10059、FERM P-19443) 的培养基的中央,在厌氧条件下、在 37℃ 下培养 48 小时。其结果,尽管距离 ATCC 393 株周边 12mm 生长被阻止,但 FERM BP-10059 株 (FERM P-19443) 在圆盘周边部位旺盛地生长。即,表明 FERM BP-10059 株 (FERM P-19443) 将该内毒素作为类维生素的增殖因子摄入菌体。另外,“新乳酸菌”(FERMBP-10059、FERM P-19443) 具有积极地使脂肪酸和硫化氢等有气味的硫化物减少的能力,通过添加这些物质可刺激增殖。

[0188] (实施例 15)

[0189] 将急性传染病中、病原菌相同而且呈现类似症状的急性大肠炎、急性膀胱炎和结膜炎的患者各 15 名分别按照每组 5 名分成 3 组。各组的治疗方法, A 组只将抗生素以 1000mg/ 日给药 5 日, B 组将抗生素以 500mg/ 日给药 5 日、同时将由制造例 1 的方法制造的

对该抗生素有抗性的本发明的干酪乳杆菌种 (FERM BP-10059、FERM P-19443) 的冷冻干燥菌体以 2g/日 (5×10^{10} 细胞/日) 给药 10 日, C 组起初只将抗生素以 1000mg/日给药、在急性症状缓和时中止给药 (通常是 2~3 日左右)、与 B 组同样地将冷冻干燥菌体以 2g/日给药 7 日。将 10 日内各组的治疗效果平均化并示于表 25。从表 25 可知, 作为急性传染病的处理方法, 通过在以往的抗生素给药以外、并用本发明的乳酸菌制剂, 或者通过在抗生素给药后服用本发明的乳酸菌制剂, 与以往的只使用抗生素的治疗相比较, 包含出现抗药菌等各种问题在内, 其优点显著, 包括 (a) 可以将抗生素的给药量减少为 1/2, (b) 症状的减轻、缓和、消失大幅度地缩短, 几乎感觉不到副作用, 患者的负担可以大幅度地减轻, (c) 几乎没有肠内细菌群的紊乱和菌交替现象等。这样, 在急性传染病时, 效果与由后述的对照例 1 的原始的干酪乳杆菌种产生的治疗效果 (病原菌和症状稍有不同) 类似。

[0190] 表 25 本发明的干酪乳杆菌种对急性传染病的治疗效果

[0191]

病名	主要的病原菌	使用抗生素	治疗方法	各 5 名患者的症状的经过和治疗效果	肠内细菌群的紊乱 ¹⁾
急性大肠炎	病原性大肠菌	头孢克洛 CCL	A	腹泻、腹痛等症状的改善需要 3 日。病原菌在 4 日几乎检测不出, 完全恢复需要 6.5 日。	++
			B	腹泻、腹痛等症状的改善需要 2.5 日。病原菌在 4 日检测不出, 此时, 从食欲、粪便的状态来判断, 认为完全恢复。	±
			C	抗生素给药 2 日, 此后只进行本乳酸菌制剂的给药。在第 5 日达到状态消失和完全恢复。	—
急性膀胱炎	肺炎杆菌	二甲胺四环素 MINO	A	微烧、排尿痛、尿频等症状的缓和需要 5 日。尿的浑浊持续 7 日。病原菌在给药 4 日后检测不出, 排尿痛和残尿感暂时残留, 完全恢复需要 10 日。	++
			B	在抗生素给药第 3 日检测不出病原菌, 第 7 日排尿痛和残尿感消失。	±
			C	抗生素给药 4 日、检测不出引起炎症的菌, 此后只进行本乳酸菌制剂的给药。排尿痛和残尿感在第 7 日消失。	—
流行性结膜炎	黄色葡萄球菌	氧氟沙星 OFLX	A	进行加入抗生素的点眼药的给药。眼睛充血、疲劳、视力弱等症状的消失需要 7 日。另外, 病原菌的消失需要 4.5 日。此外, 完全恢复需要约 2 周。	—
			B	采用滴加加入抗生素的点眼药后、以悬浮有乳酸菌的水溶液清洗眼睛的方法。病原菌的消失与 A 同样, 需要 4.5 日, 在 5.5 日症状消失, 仅 1 周就完全恢复。	—
			C	从病原菌的检测来看, 治疗效果介于上述 A 组与 B 组之间。完全恢复需要 10 日。	—

[0192] 1) ++: 肠内细菌总数急剧减少, 另外, 形成肠内细菌群的各菌属的竞争性平衡 (competitive balance) 暂时大大地瓦解。

[0193] +: 肠内细菌数有相当多的减少, 另外, 形成肠内细菌群的各菌属的竞争性平衡暂

时稍微瓦解。

[0194] ±:稍微有变化,没有大的影响。

[0195] -:没有特别的变化。

[0196] (对照例 1)

[0197] 与实施例 15 相同地,将急性传染病中、病原菌相同而且呈现类似症状的急性大肠炎、急性膀胱炎和急性支气管炎的患者各 15 名分别按照每组 5 名分成 3 组。各组的治疗方法,A 组只将抗生素以 1000mg/ 日给药 5 日,B 组将抗生素以 500mg/ 日给药 5 日、同时将以制造例 1 的方法制造的对该抗生素有抗性的原始的干酪乳杆菌种中的 FERMBP-6972 的冷冻干燥菌体以 2g/ 日 (5×10^9 细胞/ 日) 给药 10 日,C 组起初只将抗生素以 1000mg/ 日给药、在急性症状缓和时中止给药(通常为 2~3 日左右)、与 B 组同样地将冷冻干燥菌体以 2g/ 日给药 7 日。将 10 日内各组的治疗效果平均化并示于表 26。此外,本对照例 1 相当于特开 2001-333766 号公报的试验例 1(表 6)。

[0198] 表 26 原始的干酪乳杆菌种对急性传染病的治疗效果

[0199]

病名	主要的病原菌	使用抗生素	治疗方法	各 5 名患者的症状的经过和治疗效果	肠内细菌群的紊乱 ¹⁾
急性大肠炎	弯曲杆菌	红霉素 E M	A	发烧、腹泻、腹痛等症状的改善需要 2.5 日,病原菌在约 3.5 日几乎消失。恢复需要 7 日,在 1 例中,此时还继续软便的状态。	++
			B	上述症状的改善需要 3 日,病原菌的消失需要 5 日,此时,可以判断为恢复。	±
			C	显示与 A 同样的经过,根据包括患者的脸色、动作、粪便状态、食欲等的综合判断,恢复状态最好。	-
急性膀胱炎	病原性大肠菌	头孢氨苄 C E X	A	给药 3 日检测不出病原菌,微烧、排尿痛、尿频等症状的消失需要 6 日。但是,排尿痛暂时残留,完全恢复需要约 10 日。	++
			B	与 A 同样,给药 3 日检测不出病原菌,包括排尿痛的症状的消失需要 5 日。	±
			C	经历与 B 类似的经过,排尿痛的消失需要 6.5 日。	-
急性支气管炎	肺炎球菌	头孢克洛 C C L	A	病原菌在治疗期间没有达到完全消失,发烧、咳嗽、喉痛等感冒综合症在 5 日大体痊愈。但是,完全恢复需要约 10 日。	++
			B	与 A 同样,病原菌没有完全消失,但检测出的菌量最少。感冒综合症在 4、5 日大体痊愈。完全恢复需要 7 日。	±
			C	病原菌的检出量和治疗效果都在 A 与 B 之间。	-

[0200] 1) ++:肠内细菌总数急剧减少,另外,形成肠内细菌群的各菌属的竞争性平衡暂时大大地瓦解。

[0201] +:肠内细菌数有相当多的减少,另外,形成肠内细菌群的各菌属的竞争性平衡暂时稍微瓦解。

[0202] 土 :稍微有变化,没有大的影响。

[0203] - :没有特别的变化。

[0204] 关于牙周病的发生机理,以往有各种理论,但作为汇总的理论是因牙垢(斑块)的蓄积而引起的慢性炎症性疾病。牙垢是多种细菌的集合体,其产生的毒素在牙龈中引起炎症,如果其发展下去,就会逐渐地扩充作为牙床和牙的间隙的牙周袋,伴随口臭,最终破坏牙根膜和牙槽骨等牙齿的支持组织。周围的牙齿也相继感染,如果置之不理,那么全部牙齿将会脱落,80%的成人不同程度地患有该牙周病,现在也被认为是难以根治的典型模型。作为主要的引起症状的细菌,有 *Porphyromonas gingivalis*、*Actinobacillus actinomycetemcomitans*、*Prevotella intermedia*、*Prevotella intermedia* 等,但不象引起食物中毒的细菌那样产生毒素,所以,多数情况是没有自觉症状地发展,察觉到时,进行治疗为时已晚。另外,口腔内是经常被细菌污染的地方,对其繁殖是好环境,因此,很遗憾,除了多次反复复发以外,很少能举出确实能够治疗牙周病的牙科医师。该病灶建立在深处,脓总是潮湿地流出样子与痔瘻的症状非常相似,出乎意料地,在消化器官的入口和出口都产生难以根治的传染病,暗示着存在某些因果关系。该牙周病的预防和治疗方法的基础是,(1)通过刷牙尽可能地将牙垢和作为其残骸的牙石除去,最近,已采用利用超声波和激光高效率地破坏・除去,或用特殊的药液使之溶解的方法(除去细菌的巢穴)。(2)此后,直到炎症部位得到改善,将消毒液、抗生素或消炎酶制剂注入到牙周袋中,服用、抑制炎症、以求改善。(3)病灶到达深部、只用上述(1)和(2)的治疗没有好转时,通过外科手术切除炎症部分或损坏部分。(4)此后,缝合牙龈,放入人工构件而形成。最新的,也已尝试了注入以产生釉质(enamel-forming)的蛋白质为主要成分的药、促进牙周组织的再生。(5)任何治疗都困难时,就拔牙整形。总而言之,目的在于抑制牙床的炎症、阻止牙周病的发展、使失去的牙周组织再生以改善审美性以及维持新获得的治愈组织。

[0205] (实施例 16)

[0206] 将 20 名牙周病患者以 5 名 1 组分成 A~D 的 4 组,尽可能地除去全部患者的斑块和牙石(刮牙术・根面平整术操作)后,采用将抗生素软膏或用少量的水炼成凝胶状的本发明的冷冻干燥菌体填充到牙周袋中的方法。在 A 组中,只进行抗生素的给药或根据症状同时使用消炎酶制剂。在 B 组中,使用抗生素,并且同时使用将制造例 1 中制造的耐抗生素的冷冻干燥菌体和制造例 3 中制造的耐抗生素的菌制剂等量混合而成的制剂。在 C 组中,初期阶段进行抗生素或消炎酶制剂的给药,此后,使用上述菌制剂。D 组从治疗最初开始,完全不使用抗生素,只进行菌制剂的给药。另外,在治疗的时候,分离主要的病原菌,进行药剂感受性试验,根据其结果使用各自最适合的抗生素。将其结果示于表 27 和表 28。从表 27 和表 28 可知,只进行抗生素和消炎酶制剂的给药,即使对几乎不能指望有效果的牙周病,通过单独使用本发明的乳酸菌制剂或同时使用抗生素等,不用过半个月、病原菌就被逐出,继续 1~2 个月,即使有个人差别,口臭的消失、牙龈的状态、牙周袋内的状态、牙的摇晃状态等也得到改善,表现出了以往的治疗中无论如何也没有看到的有效性。这样,在牙周病时,与由下述所示的对照例 2 的原始的干酪乳杆菌株产生的治疗效果相比,更加向好的方向发展,应该大书特书的是,在牙周袋的牙龈的隆起和收敛中,可以看到显著作用。

[0207]

表27 本发明的干酪乳杆菌种对牙周病的治疗效果

治疗 方法	患者		牙周病的 程度	主要的病原菌	抗生素 (缩写)	给药时间	治疗经过和效果
	姓名	年龄 性别					
A	W.S.	48 ♀	浅部 3 5	Ps.gingivalis C. rectus	二甲胺 四环素 MINO		给药2周, 但几乎没有改善。但是, 肿胀稍有改善, 其它症状的发展停止。维持原状。
	K.K.	72 ♂	中部 2 4 5 6	Ps.gingivalis F. nucleatum	二甲胺 四环素 MINO		给药2周, 但完全没有改善。口臭、肿胀依旧。但是, 发现脓的量有一点点减少。
	M.T.	62 ♂	深部 5 6	Ps.gingivalis B. forsythus	头孢克罗 CCL		给药3周, 但几乎没有改善。口臭严重。牙龈的色调是红黑色, 肿胀的状态依旧继续。排脓、出血量几乎没有改善。
	A.I.	58 ♀	浅部 2 3	Ps.gingivalis	头孢克罗 CCL	30日	从给药第3日左右起, 一点点地改善, 口臭在第3日消失, 在第15日, 牙龈的色调、肿胀都有相当的好转。在第30日左右, 牙周袋相当地闭合, 继续下去可以期望完全治好。
B	H.T.	52 ♂	中部 4 5	Sta.aureus Fuso.nucleat um	二甲胺 四环素 MINO	30日	从给药第7日左右起, 症状开始好转, 排脓和出血也大致停止。牙周袋稍微缩小, 但不充分。但是, 牙周紧密, 已经能够充分地咀嚼硬的食物。
	M.H.	64 ♂	深部 3 5	Ps.gingivalis A.actinomy- cetemcomi- tuns	二甲胺 四环素 MINO	30日	从给药第5日左右起, 病原菌消灭, 从第7日左右起, 症状好转, 第10日, 排脓和出血停止, 同时口臭也好转。从第15日起, 肿胀逐渐消退, 色调变好, 牙周袋内稍微隆起, 牙龈牢固地变紧密。通过继续治疗, 可以期待不拔牙就能治好。

[0208]

表28 本发明的干酪乳杆菌种对牙周病的治疗效果

治疗 方法	患者		牙周病的 程度	主要的原因菌	抗生素 (缩写)	给药时间	治疗经过和效果
	姓名	年龄 性别					
C	O.M.	60 ♀	浅部 3 5	B. forsythus Ps. intermedia	羟氨苄 青霉素 AMPC 给药5日	30日	抗生素给药期间几乎没有变化, 但乳酸菌给药后迅速好转, 第10日, 牙龈的色调恢复, 肿胀大体上消失。
	S.K.	49 ♀	中部 2 3 4	Ps. gingivalis	头孢克洛 CCL 给药5日	30日	抗生素给药期间已显示出一点点地好转的趋势, 但乳酸菌给药后, 其恢复加快, 第10日, 口臭、排脓、出血都停止。第30日, 牙周袋 变成一半左右的容积。
	M.K.	63 ♂	深部 5 6	Ps. gingivalis Str. pyogenes	四环素 TC 给药7日	30日	抗生素给药期间几乎感觉不到变化。乳酸菌给药后显示出逐渐好转 的趋势, 第15日肿胀开始逐渐消退, 第30日, 牙齿不再摇晃、牙龈 恢复弹性、色调变得非常好。牙周袋稍微变浅、可以期待治愈。
	O.Y.	72 ♀	浅部 5	A. actinomy- cetemcomi- tuns		60日	从给药第7日左右起, 开始显示出一点点地改善的趋势。引起炎症 的菌在第15日消失。在第60日, 牙周袋仅残存少许, 但通过继续 本发明的乳酸菌制剂的给药, 可以期待完全治愈。
D	K.Y.	52 ♂	中部 5 6	Ps. gingivalis Sta. aureus		60日	从给药第10日左右起开始好转, 第15日口臭消失、病原菌已看不到。 第30日牙龈的色调变好、变紧密。牙周袋稍微变浅, 通过继续给药, 可以期待治愈。
	N.K.	66 ♀	深部 3 3 6 5 6	Ps. gingivalis C. rectus		60日	从给药第15日左右起, 症状开始缓和, 病原菌在第21日检测不出、 排脓和出血停止, 已经可以食用硬的食物。第60日, 牙周袋内的 肉稍稍隆起、其容积变成大约一半。牙龈的色调恢复、牙齿不再 摇晃, 通过继续治疗, 可以充分期待不拔牙即治愈。

[0209] (对照例2)

[0210] 将8名牙周病患者按照1组2名分成A~D的4组, 在A组中, 只进行抗生素的给药或根据症状、同时使用消炎酶制剂, 在B组中, 进行抗生素给药、并且同时使用将以制造例1的方法制造的原始的干酪乳杆菌种的冷冻干燥菌体和以制造例3的方法制造的菌制剂

(同时具有抗生素抗性)等量混合而成的制剂。在C组中,初期阶段进行抗生素或消炎酶制剂的给药,此后,使用上述菌制剂。在D组中,从治疗最初开始,完全不使用抗生素,只进行菌制剂的给药。另外,本对照例相当于特开 2001-333766 号公报的试验例 2 的牙周病患者(相当于牙槽脓肿和牙龈炎的患者),将其结果示于表 29(相当于特开 2001-333766 号公报的表 7 ~ 10 的一部分)。

[0211]

表29 原始的干酪乳杆菌种对牙周病的治疗效果

治疗 方法	患者		病名	主要的病原菌	抗生素 (缩写)	给药时间	治疗经过和效果
	年龄	性别					
A	4 5	♂	牙槽脓肿 7	Sta. aureus Str. pyogenes	头孢克罗 CCL		给药20日, 几乎没有好转。完全看不到改善的征兆。
	2 7	♀	牙龈炎 5 5	Bac. fragiris Sta. aureus	头孢克罗 CCL		从给药第7日起, 症状一点点地好转, 但口臭、肿胀依旧, 第21日, 症状缓和, 但需要更有效的处方。
B	2 2	♀	牙槽脓肿 8	Sta. aureus Str. pyogenes	头孢克罗 CCL	4 5 日	从给药第7日起, 症状一点点地好转, 第30日, 口臭大致消失, 牙床的色调变好。第45日, 难以认为完全治愈, 但症状好转, 通过继续给药, 可以期待完全治愈。
	6 2	♂	牙槽脓肿 7 5 6	Fuso.faciforme Sta. aureus	头孢克罗 CCL	4 5 日	从给药第10日起, 症状开始好转, 一天天地变好, 第45日, 口臭减弱, 牙床的色调有相当大的改善, 虽然难以认为完全治愈, 但症状好转, 通过继续给药, 可以期待完全治愈。
C	7 2	♀	牙槽脓肿 6 5 4	Bacte.melami- nogenicus Str. pyogenes	羟氨卡 青霉素 AMPC	4 5 日	从给药第4日起, 症状一点点地好转, 第45日, 口臭消失、牙床的色调变好。通过继续给药, 可以期待完全治愈。
	2 8	♀	牙槽脓肿 7	Bacte. fragiris Sta. aureus	四环素 TC	6 0 日	从给药第5日起, 症状一点点地好转, 第60日, 口臭消失、牙床的色调有相当的恢复, 通过继续给药, 可以期待完全治愈。
D	4 4	♀	牙槽脓肿 4	Sta. aureus		6 0 日	从给药第10日起, 症状一点点地好转, 第60日, 口臭消失、牙床的色调恢复, 通过继续给药, 可以期待完全治愈。
	2 0	♂	牙槽脓肿 4 5	Fuso.faciforme Str. pyogenes		6 0 日	从给药第10日起, 症状开始好转, 第30日, 检测不出病原菌。第60日, 完全治愈。

[0212] (实施例 17)

[0213] 对作为慢性传染病的慢性副鼻腔炎、慢性支气管炎和褥疮实施了治疗试验。在 A 组中, 只进行抗生素的给药或根据症状、也同时使用消炎酶制剂。对慢性副鼻腔炎, 主要用以抗生素制剂制成的悬浊水溶液洗净鼻腔; 对于褥疮, 擦净后, 将抗生素制剂涂敷在患部。

将其治疗效果示于表 30。在 B 组中,使用抗生素,并且同时使用将制造例 1 中制造的冷冻干燥菌体 (FERM BP-10059、FERM P-19443) 和制造例 3 中制造的乳酸菌制剂 (FERM BP-10059、FERM P-19443) 等量混合而成的制剂 (同时具有抗生素抗性)。乳酸菌制剂的基本的给药方法,在慢性副鼻腔炎时,使每 1L 温水中悬浮 2g 冷冻干燥菌体、进行鼻腔洗净。是褥疮时,将冷冻干燥菌体涂敷或撒布在褥疮部位。将其治疗效果示于表 31。在 C 组中,初期阶段进行抗生素的给药或进行抗生素和消炎酶制剂的给药,此后使用上述乳酸菌制剂。将其治疗效果示于表 32。在 D 组中,从治疗最初开始,完全不使用抗生素,只进行乳酸菌制剂的给药。将其治疗效果示于表 33。另外,每次治疗时,分离慢性传染病的主要病原菌,进行药剂感受性试验,根据其结果,使用各自最适合的抗生素。从表 30 ~ 表 33 可知,将本发明的乳酸菌制剂用于抗生素难以治疗的慢性传染病,取得了很高的治疗效果。特别地,抗生素与对其具有抗性的本发明的乳酸菌制剂同时使用,表现出更加有效。与下述所示的原始的干酪乳杆菌种产生的治疗效果相比,更加良好地发展。

[0214]

表 30 本发明的干酪乳杆菌种对慢性传染病的治疗效果

患者 年龄	性别	病名	主要的病原菌	抗生素	使用 药剂	治疗经过和效果
28	♂	慢性副鼻窦 腔炎	Str.pneumoniae	羟氨苄青霉素 AMPC		刚将鼻洗净后, 状态变得良好, 但结果忽好忽坏。给药 10 日后, 症状几乎没有改善, 病原菌依旧被检测出。
44	♀	慢性副鼻窦 腔炎	Str.pneumoniae	四环素 TC		给药 15 日, 完全没有看到改善的征兆。
52	♀	慢性支气管 管炎	Sta.aureus	羟氨苄青霉素 AMPC		从给药第 5 日左右起, 感冒综合症稍有好转, 但咳嗽和咽喉痛不变, 给药 2 周后, 总体的症状缓和, 但需要更有效的处方。病原菌变少但仍可检出。
38	♂	慢性支气管 管炎	Bacte. caturahalis	甲磺酸妥苏沙星 (Tosufloxacin tosilate) TFLX		同上。
77	♀	褥疮(浅)	Kleb. pneumoniae	氧氟沙星 OFLX		涂敷 2 周, 患部面积变为一半左右, 但没有达到皮肤的再生, 给药 1 个月, 薄皮勉强再生。
74	♂	褥疮(深)	Ps.aeruginosa	氧氟沙星 OFLX		涂敷 2 周, 开始看到稍有好的征兆, 但此后忽好忽坏, 没怎么改善, 总是分泌脓和浆液。

A

表 31 由抗生素和本发明的干酪乳杆菌种产生的对慢性传染病的治疗效果

治 疗 方 法	患 者		病 名	主要的病原菌	抗 生 素	使用药剂	治疗经过和效果
	年 龄	性 别					
B	25	♀	慢性副鼻窦 腔炎	Str.pneumoniae	甲红霉素 CAM	本发明的乳 酸菌制剂	从给药第 5 日左右起, 开始好转, 第 15 日, 病原菌消灭。第 30 日, 自觉 症状几乎没有, 通过病理观察、X 射线检查确认几乎痊愈。
	37	♂	慢性副鼻窦 腔炎	Str.pneumoniae Str.pyogenes	甲红霉素 CAM	本发明的乳 酸菌制剂	从给药第 3 日左右起, 迅速地好转, 第 15 日, 未检测出病原菌, 第 30 日, 根据病理观察、X 射线检查和自觉症状都确认痊愈。
	48	♀	慢性支气 管炎	Str.pneumoniae	氧氟沙星 OFLX	本发明的乳 酸菌制剂	从给药第 5 日左右起, 症状开始好转, 给药 30 日后, 咳嗽稍有残留, 但其 它的感冒综合症大体上消失。第 7 日未检测出病原菌。
	55	♂	慢性支气 管炎	K. pneumoniae	甲磺酸妥苏 沙星 TFLEX	本发明的乳 酸菌制剂	同上。
	69	♂	褥疮 (浅)	P.vulgaris	二甲胺四环 素 MINO	本发明的乳 酸菌制剂	涂敷 1 周, 患部面积减半; 涂敷 2 周, 薄皮再生, 分泌物消失, 好转。
	81	♀	褥疮 (深)	Str.pyogenes	羟氨苄青霉 素 AMPC	本发明的乳 酸菌制剂	涂敷 1 周, 出现肉芽; 涂敷 2 周, 更加隆起; 3 周, 患部面积减半; 第 4 周全部薄皮再生。

[0216]

表 32 本发明的干酪乳杆菌对慢性传染病的治疗效果

治 疗 方 法	患 者		病 名	主要的病原菌	抗 生 素	使用药剂	治疗经过和效果
	年 龄	性 别					
C	33	♀	慢性副鼻窦 腔炎	Str.pneumoniae	甲红霉素 CAM	本发明的 乳酸菌制 剂	抗生素的给药中（1周）症状几乎没有变化，但从开始本制剂的给药后，迅速好转，第30日，自觉症状几乎没有，通过检查确认治愈。
	47	♀	慢性副鼻窦 腔炎	Sta.aureus Str.pneumoniae	甲红霉素 CAM	本发明的 乳酸菌制 剂	同上。
	59	♂	慢性支气管 管炎	Str.pyogenes Kleb.pneumoniae	氧氟沙星 OFLX	本发明的 乳酸菌制 剂	抗生素的给药中（5日）没有表现出什么效果，但由于本制剂的给药而开始好转；第15日，感冒综合症好转，第30日，几乎消失。第12日，没有检测出病原菌。
	40	♂	慢性支气管 管炎	Str.pneumoniae	氧氟沙星 OFLX	本发明的 乳酸菌制 剂	因抗生素的给药，症状稍微好转。此后，进行本制剂的给药，迅速好转，第30日，完全治愈。病原菌在第10日消失。
	65	♂	褥疮（浅）	Enterococcus	四环素 TC	本发明的 乳酸菌制 剂	抗生素涂敷1周，患部面积大致减半。此后，由于涂敷本制剂、分泌物逐渐减少，1周后薄皮再生。
	68	♀	褥疮（深）	Str.pyogenes	二甲胺四 环素 MINO	本发明的 乳酸菌制 剂	因涂敷2周抗生素，肉稍微隆起，但患部面积不变，由于涂敷本制剂，1周时患部减半、分泌物也逐渐减少，第4周患部大致闭合，整体长出薄皮。

[0217]

表 33 本发明的干酪乳杆菌对慢性传染病的治疗效果

患者	年龄	性别	病名	主要的病原菌	抗生素	使用药剂	治疗经过和效果
D	22	♂	慢性副鼻腔炎	Sta.aureus		本发明的乳酸菌制剂	从给药后大约第 5 日起, 开始逐渐好转, 第 30 日未检测出病原菌, 第 50 日, 根据病理观察和 X 射线检查都确认大体上完全治愈。
	42	♂	慢性副鼻腔炎	Str.pneumoniae		本发明的乳酸菌制剂	同上。
	65	♀	慢性支气管炎	Kleb. pneumoniae		本发明的乳酸菌制剂	从给药第 5 日左右起, 症状好转, 第 50 日, 症状大体上消失, 确认恢复。
	56	♂	慢性支气管炎	Str.pneumoniae Str.agalactiae		本发明的乳酸菌制剂	同上。
	73	♂	褥疮 (浅)	Ps.aeruginosa		本发明的乳酸菌制剂	涂敷 2 周, 患部面积大致减半。此后, 由于涂敷本制剂, 分泌物逐渐减少, 3 周后, 薄皮再生。
	78	♀	褥疮 (深)	Enterococcus Sta.aureus		本发明的乳酸菌制剂	涂敷 1 周, 产生少许肉芽, 此后, 肉迅速地隆起, 第 4 周, 形成薄皮。没有疤痕、非常美。

[0218] (对照例 3)

[0219] 将 8 名慢性副鼻腔炎患者与 8 名慢性支气管炎患者以 1 组各 2 名分成 A ~ D 的 4

组,在A组中,只进行抗生素的给药或根据症状、同时使用消炎酶剂。在B组中,使用抗生素,并且同时使用将以制造例1的方法制造的原始的干酪乳杆菌种的冷冻干燥菌体和以制造例3的方法制造的乳酸菌制剂等量混合而成的制剂。在C组中,初期阶段进行抗生素的给药或进行抗生素与消炎酶剂的给药,此后,使用上述乳酸菌制剂。在D组中,从治疗最初开始,完全不使用抗生素,只进行乳酸菌制剂的给药。另外,本对照例相当于特开2001-333766号公报的试验例2的慢性副鼻腔炎和慢性支气管炎,将其结果示于表34和表35(相当于特开2001-333766号公报的表7~10的一部分)。

[0220]

表 34 原始的干酪乳杆菌对慢性传染病的治疗效果

治疗 方法	患者		病名	主要的病原菌	抗生素	给药 时间	治疗经过和效果
	年龄	性别					
A	18	♀	慢性副 鼻腔炎	Str.pneumoniae	氨苄青霉素 ABPC		从给药第 10 日起, 自觉症状不变, 但在病理观察和 X 射线检查中稍微好转。第 20 日, 发现状态开始恶化。
	20	♂	慢性副 鼻腔炎	Str.pneumoniae Sta.aureus	甲红霉素 CAM		给药 20 日, 几乎没有好转, 完全没有看到改善的征兆。
	62	♂	慢性支 气管炎	Sta.aureus Kleb. pneumoniae	氧氟沙星 OFLX		从给药第 5 日起, 感冒综合症有相当的好转, 但咽喉还痛, 也还咳嗽。第 21 日, 症状缓和, 但需要更有效的处方。
	50	♀	慢性支 气管炎	Sta.aureus Str.pneumoniae	氧氟沙星 OFLX		同上。
B	18	♀	慢性副 鼻腔炎	Str.pneumoniae	甲红霉素 CAM	45 日	从给药第 7 日起, 症状迅速好转, 第 30 日, 未检测出病原菌。第 45 日, 根据病理观察、X 射线检查和自觉症状都确认治愈。
	35	♂	慢性副 鼻腔炎	Str.pneumoniae Str.pyogenes	甲红霉素 CAM	45 日	从给药第 4 日起, 症状迅速好转, 第 45 日, 根据病理观察和 X 射线检查, 大体上治愈, 但自觉症状还存在。通过继续给药, 可以期待完全治愈。
	45	♀	慢性支 气管炎	Bran.catarhalis Sta.aureus	氧氟沙星 OFLX	45 日	从给药第 7 日起, 症状一点点地好转, 第 45 日, 咽喉还痛, 但其它的感冒综合症好转, 通过继续给药, 可以期待完全治愈。
	72	♀	慢性支 气管炎	Str.pneumoniae	氧氟沙星 OFLX	45 日	从给药第 7 日起, 症状开始好转, 第 45 日, 确认完全治愈。

[0221]

表 35 原始的干酪乳杆菌种对慢性传染病的治疗效果

治疗 方法	患者		病名	主要的病原菌	抗生素	给药 时间	治疗经过和效果
	年龄	性别					
C	33	♀	慢性副 鼻腔炎	Str.pneumoniae	甲红霉素 CAM	60 日	从给药第 5 日起, 症状一点点地好转, 第 40 日, 未检测出病原菌。 第 60 日, 根据病理观察和 X 射线检查, 有相当的好转, 自觉症状减轻。通过继续给药, 可以期待完全治愈。
	45	♂	慢性副 鼻腔炎	Str.pneumoniae Sta.aureus	甲红霉素 CAM	60 日	从给药第 3 日起, 症状开始减轻、逐日地好转, 第 60 日, 根据病理观察和 X 射线检查, 症状减轻, 自觉症状消失。通过继续给药, 可以期待完全治愈。
	47	♂	慢性支 气管炎	Str.pneumoniae	氧氟沙星 OFLX	60 日	从给药第 5 日起, 症状一点点地好转, 第 60 日, 除咳嗽以外的感冒综合症状消失。通过继续给药, 可以期待完全治愈。
	52	♀	慢性支 气管炎	Bran.catarrhalis	氧氟沙星 OFLX	60 日	从给药第 7 日起, 症状一点点地好转, 第 60 日, 除咳嗽以外的感冒综合症状消失。通过继续给药, 可以期待完全治愈。
	39	♂	慢性副 鼻腔炎	Str.pneumoniae		60 日	从给药第 5 日起, 症状一点点地好转, 第 60 日, 根据病理观察和 X 射线检查, 症状减轻, 自觉症状几乎没有。通过继续给药, 可以期待完全治愈。
D	48	♂	慢性副 鼻腔炎	Str.pneumoniae		60 日	从给药第 10 日起, 症状迅速好转, 第 60 日完全治愈。
	62	♀	慢性支 气管炎	Sta.aureus Kleb.pneumoniae		60 日	从给药第 7 日起, 症状开始好转, 第 60 日, 症状几乎消失、恢复。通过继续给药, 可以期待完全治愈。
	68	♀	慢性支 气管炎	Str.pneumoniae		60 日	同上。

[0222] (实施例 18)

[0223] 对于患有不是传染病的, 例如便秘症、腹泻症、糖尿病和不是传染病的疾病, 例如

慢性疲劳综合症、异位性皮炎 (Atopic dermatitis)、低血压症、神经症、高血压症等慢性疾病的患者,将在 100g 乳糖中混合 20g 以制造例 2 的方法制造的冷冻干燥菌体制剂 (FERM BP-6971) 而制成的物质以 1 日 2g 进行给药。此时,菌的给药量是 2g/ 日、 1×10^{10} 细胞 /g。进行本发明的乳酸菌制剂 (FERM BP-10059、FERM P-19443) 的给药的治疗试验,分别对 10 名呈现相同或类似症状的患者进行 2 个月的给药,将当时的平均改善状态示于表 36。即使进行本发明的乳酸菌制剂的给药,也有约 15% 的患者症状完全没有改善,但没有患者症状恶化。对表 36 中记载的慢性疾病以外的疾病,例如动脉硬化症、痛风、肥胖症、慢性肝炎等多种慢性病,也表现出不同程度的有效。从表 36 可明确,如果使本发明的乳酸菌制剂的作用不受妨碍、100% 地表现出来,那么,活体的自然治愈力增大,激活生命力。例如,如果肠内通过经口给药而被净化,那么血液必定被净化,激素、酶、抗体、免疫物质等活体必须物质被输送到全身各处,新陈代谢变得顺利,全身功能好转,意味着可以实现与疾病无缘的生活。的确可以说经过一个世纪、终于实现了梅契尼科夫倡导的长生不老理论。

[0224] 表 36 慢性疾病的发展状况

[0225]

慢性疾病	因本发明的乳酸菌制剂的给药而导致的症状的发展	
	第 2 个月的效果 ¹⁾	发展状况
便秘症	○~◎	从给药第 3 日左右起,症状开始好转,一天天地变好,第 15 日大体上消失,良好的状态持续。
腹泻症	◎	从给药第 2 日起,腹泻好转,第 10 日大体上解除。此后,状态进一步变好,第 1 个月时极好地得到改善。
糖尿病	○	平均 185mg/dl 的血糖值在给药 1 个月后成为 150、2 个月后成为 140mg/dl。
不是传染病的疾病	△~○	从给药 1 个月左右开始逐渐变好,其后也逐渐好转,第 2 月就不是问题了。
慢性疲劳综合症	◎	从给药第 7 日左右起,疲劳感逐渐减弱,经过 1 个月时大体上消失。
异位性皮炎	△~○	感到痛苦多年的遗传性过敏症也从第 15 日左右起逐渐得到改善,第 2 个月好转很多。
低血压症	◎	从给药第 6 日左右 (55~95mmHg) 开始上升,1 个月后成为 (60~100 mmHg), 2 个月后成为 (65~110 mmHg) 的正常范围。
神经症	△	从给药第 1 个月左右起,不安、强迫、恐怖、癔病等症状开始缓和、减轻。第 2 个月,这些精神障碍就不用怎么担心了。
高血压症	△~○	从给药第 15 日左右起,血压 (最高血压 175 mmHg) 开始下降,1 个月后变为 150 mmHg,得到改善。另外,同时使用降压剂,进一步得到改善。

[0226] 1) 治疗效果

[0227] ◎: 极其改善、恢复健康或几乎恢复。

[0228] ○: 难以认为恢复到完全健康的状态,但状态好转,通过继续进行本制剂的给药,预计将完全治愈。

[0229] △: 稍微向逐渐好转的方向发展,但需要某些更有效的处方。

[0230] ▲: 症状暂时好转,但不久就回到原来的状态。

[0231] 如实施例 16 所示,在牙周病的治疗中,进行本乳酸菌的适当给药,显示出良好的效果,但由于牙周病的发展状态,遗憾的是这不能说是完全治愈。因此,本发明人进行深入研究的结果,已明确,在前处理中充分运用本杀菌消毒液的优点、能够得到更高的有效性,所以,按以下顺序表明其效果。

[0232] (实施例 19)

[0233] 用“本杀菌消毒液”对 5 名浅部牙周病 (shallow periodontal disease) 患者的患部实施消毒后,实施将制造例 4 中制造的“新乳酸菌制剂”注入患部的处理。将其结果示于表 37。

[0234]

表37 由“本杀菌消毒液”的消毒和本发明的“新乳酸菌制剂”的组合对浅部牙周病的治疗效果
(使用“新乳酸菌制剂”作为乳酸菌制剂)

姓名	患者		部位	主要的病原菌	治疗经过和效果
	年龄	性别			
T.K.	58	♂	3 5	P. gingivalis B. forsythus	从给药第3日左右起, 逐渐好转; 第7日, 牙龈的肿胀和色调都有相当的好转; 第20日, 牙龈几乎闭合; 第30日, 达到大致完全治愈的状态。
K.M.	54	♀	4	P. gingivalis F. nucleatum	给药第2日, 口臭消失; 第5日, 病原菌消失。第7日, 牙龈肿胀消失; 第15日, 牙周袋大体上闭合; 第30日, 达到根治的状态。
T.M.	48	♂	2 6	P. gingivalis	给药次日肿胀消退; 第3日, 牙龈的色调、弹性恢复。第10日, 牙周袋内的牙龈隆起、闭合。第25日, 达到大体上根治的状态。
S.Y.	70	♂	5	P. intermedia S. aureus	从给药第5日左右起, 逐渐好转、口臭减轻。第10日, 牙龈开始出现弹性; 第21日, 牙周袋稍微闭合; 第30日, 达到大体上闭合的状态。
H.K.	36	♀	3 3	A. actino S. aureus	给药第3日, 病原菌消失; 第7日, 牙周袋变得相当浅; 第15日, 大体上闭合。牙龈的状态恢复, 第25日达到大体上完全治愈的状态。

[0235] (实施例 20)

[0236] 用“本杀菌消毒液”对 5 名浅部牙周病患者的患部实施消毒后, 实施将制造例 5 中制造的“含有抗生素的新乳酸菌制剂”注入患部的处理。将其结果示于表 38。

[0237]

表38 由“本杀菌消毒液”的消毒和本发明的“新乳酸菌制剂”的组合对浅部牙周病的治疗效果
(使用“含有抗生素的新乳酸菌制剂”作为乳酸菌制剂)

患者		性别	部位	主要的病原菌	治疗经过和效果
姓名	年龄				
O. N.	39	♂	6 7	P. gingivalis C. rectus	给药第2日, 肿胀消退、口臭消失。第3日, 未发现病原菌; 第7日, 牙龈的色调、弹性恢复。第10日, 牙周袋变浅; 第15日, 几乎闭合。
S. N.	56	♀	4 5	A. actino	从给药第3日左右起, 逐渐好转; 第5日, 牙龈的状态大体上恢复。牙周袋稍微变浅, 第12日大体上闭合, 第20日, 达到大体上完全治愈的状态。
H. M.	65	♀	4 3	A. actino S. aureus	从给药第5日左右起好转。从第10日左右迅速好转, 牙龈的弹性、色调、肿胀大体上消失。牙周袋内的牙龈隆起, 第18日大体上闭合。
I. T.	67	♂	6	P. intermedia A. actino	给药次日, 病原菌、口臭消失; 轻微的肿胀在第3日消失。第15日, 牙周袋内的牙龈隆起; 第25日, 大体上闭合, 完全恢复。
M. M.	62	♂	5 6	P. gingivalis B. forsythus	从给药第3日左右起, 迅速好转; 第5日, 牙龈的色调、弹性恢复原状。牙周袋变得更浅, 第20日闭合、根治。

[0238] (对照例 4)

[0239] 作为对照例,对 5 名浅部牙周病患者实施基于“本杀菌消毒液”的处理、基于制造例 4 制造的“新乳酸菌制剂”的处理、基于制造例 5 制造的“含有抗生素的新乳酸菌制剂”的处理和以往的治疗方法。将其结果示于表 39。

[0240] 表 39 以往的治疗方法对浅部牙周病的治疗效果

[0241]

	5 名患者平均的治疗经过和效果
单独使用“本杀菌消毒液”	病原菌在第 3 日消失,但牙龈的肿胀、色调、弹性有少许恢复。牙周袋变浅,但没有完全闭合。继续了 2 个月,但没有根治。
单独使用“新乳酸菌制剂”	给药数日后逐渐好转、口臭消失。第 15 日,牙龈的色调、肿胀、弹性恢复得相当好。第 30 日,牙周袋大体上闭合;第 60 日,达到大体上治愈的状态。
以往的治疗方法	开始治疗后第 15 日,肿胀减退,但肿胀和弹性仍不充分。第 30 日,牙周袋稍微变浅,即使继续治疗也不闭合。但牙龈的色调与弹性能够恢复。
单独使用“含有抗生素的新乳酸菌制剂”	给药数日后逐渐好转,第 10 日,牙龈的色调、弹性、肿胀基本上恢复。第 21 日,牙龈袋变浅;第 30 日,牙龈更加隆起;第 45 日,达到大体上闭合的状态。

[0242] 牙周病被局限于浅部时,在以往的治疗方法中,牙龈的色调、肿胀、弹性经过 2 ~ 3 周的治疗即恢复,牙周袋也稍微变浅,但决没有闭合。与此相对,将基于“本杀菌消毒液”的消毒和本发明的“新乳酸菌制剂”组合时,从治疗开始就迅速好转,肿胀也迅速消退,经过 2 周左右,牙龈的色调、弹性都几乎恢复,牙周袋也逐渐变浅,1 个月左右完全闭合、痊愈。

[0243] (实施例 21)

[0244] 用“本杀菌消毒液”对 5 名中等程度的牙周病(intermediateperiodontal disease) 患者的患部实施消毒后,实施将制造例 4 中制造的“新乳酸菌制剂”注入患部的处理。将其结果示于表 40。

[0245]

表40 由“本杀菌消毒液”的消毒和本发明的“新乳酸菌制剂”的组合对中等程度的牙周病的治疗效果
(使用“新乳酸菌制剂”作为乳酸菌制剂)

患者		部位	主要的病原菌	治疗经过和效果
姓名	年龄 性别			
K. Y.	5 0 ♀	2 6	P. intermedia Str. pyogenes	从给药第5日左右起, 显示出了好转的趋势。口臭和病原菌消失, 第15日, 牙龈肿胀消失, 色调、弹性复原。牙周袋逐渐变浅, 第45日大体上闭合。第60日彻底治好。
O. K.	7 5 ♀	2 2	P. gingivalis Fusobacterium	从给药第10日左右起, 逐渐好转, 口臭消失。第20日, 牙龈的肿胀、弹性、色调都好转很多。袋内的牙龈一点一点地隆起; 第60日, 变得相当浅; 第90日, 大体上闭合。
Y. T.	6 8 ♂	4 5	P. gingivalis B. forsythus	给药第5日, 肿胀停止, 口臭、病原菌消失。第10日, 牙龈的色调、弹性大体上好转, 牙周袋稍微变浅。第20日, 牙龈绷紧; 第35日, 大体上闭合。
W. S.	6 0 ♂	2 4	P. gingivalis	从给药第7日起, 迅速好转, 牙龈绷紧, 肿胀、出血、口臭都消失。牙周袋稍微变浅, 第21日, 大体上闭合, 达到治愈的状态。
T. T.	4 4 ♂	3 3	A. actino P. intermedia	从给药第5日左右起, 逐渐好转, 第10日, 牙龈开始出现弹性, 第15日, 色调成为粉红色, 牙周袋逐渐变浅, 第42日大体上闭合。

[0246] (实施例 22)

[0247] 用“本杀菌消毒液”对 5 名中等程度的牙周病患者的患部实施消毒后, 实施将制造例 5 中制造的“含有抗生素的新乳酸菌制剂”注入患部的处理。将其结果示于表 41。

[0248]

表41 由“本杀菌消毒液”的消毒和本发明的“新乳酸菌制剂”的组合对中等程度牙周病的治疗效果
(使用“含有抗生素的新乳酸菌制剂”作为乳酸菌制剂)

患者		性别	部位	主要的病原菌	治疗经过和效果
姓名	年龄				
U. M.	36	♂	<u>2</u> <u>3</u> <u>5</u>	P. gingivalis S. aureus	从给药第3日左右起, 显示好转的趋势, 口臭、病原菌、肿胀都消失。第12日, 牙龈的色调、弹性恢复原状。出血、排脓在第5日停止。从第15日左右起, 牙周袋逐渐变浅, 第35日, 大体上闭合。
E. J.	55	♀	<u>5</u>	P. intermedia A. actinomyces	从给药第7日左右起, 迅速好转, 口臭、出血、排脓消失。第14日, 牙龈的色调、弹性、肿胀都恢复, 牙周袋内的牙龈隆起, 第40日, 完全闭合。
K. I.	65	♀	<u>3</u> <u>2</u>	Fusobacterium E. corrodens	从给药次日开始好转, 第3日, 口臭、出血、排脓都消失, 第7日, 牙龈的状态大体上恢复。牙周袋逐渐变浅, 第35日, 达到大体上闭合的状态。
S. S.	72	♀	<u>4</u> <u>5</u>	W. recta B. forsythus	从给药第5日左右起, 迅速好转; 第10日, 牙龈的状态大体上痊愈。但是, 牙周袋的牙龈的隆起还未令人感到满意。完全闭合需要48日。
H. M.	59	♂	<u>6</u> <u>5</u>	P. gingivalis	给药第3日, 口臭、病原菌都消失。排脓、出血在第7日停止。从第15日左右起, 牙龈的状态逐渐好转, 第28日大体上痊愈。牙周袋最终没有完全地闭合, 但大体上已接近痊愈的状态。

[0249] (对照例 5)

[0250] 作为对照例, 对 5 名中等程度的牙周病患者实施基于“本杀菌消毒液”的处理、基于制造例 4 制造的“新乳酸菌制剂”的处理、基于制造例 5 制造的“含有抗生素的新乳酸菌制剂”的处理和以往的治疗方法。将其结果示于表 42。

[0251] 表 42 以往的治疗方法对中等程度的牙周病的治疗效果

[0252]

	5 名患者平均的治疗经过和效果
单独使用“本杀菌消毒液”	病原菌在第 3 日消失,排脓、出血在第 5 日消失,牙龈的肿胀、色调、弹性的恢复虽然缓慢,但恢复的基调不变。牙周袋一点点地变浅,但没有闭合。
单独使用“新乳酸菌制剂”	病原菌在第 3 日消失,口臭、排脓、出血都从第 5 日左右起大体上消退,与之相伴,牙龈的色调、肿胀、弹性逐渐恢复。牙周袋逐渐变浅,在给药的第 3 个月大体上闭合,但没有完全闭合。
以往的治疗方法	治疗开始后第 15 日,肿胀消退,但色调、弹性没有恢复,几乎没有变化。牙周袋的深度稍微变浅,但没怎么变化。竭尽全力仅维持现状。
单独使用“含有抗生素的新乳酸菌制剂”	从给药第 10 日左右起,开始好转,第 15 日,口臭、病原菌消失。在第 30 日,牙龈的色调恢复,与之相伴,弹性变好。牙龈袋稍微变浅,但即使继续治疗也没有完全闭合。

[0253] 牙周病是中等程度时,在以往的治疗方法中,肿胀消退,但色调、弹性恢复还不充分,牙周袋稍微变浅便变窄,但没有大的变化。相对于此,将基于“本杀菌消毒液”的消毒和本发明的“新乳酸菌制剂”组合时,与浅部牙周病时相比,向治愈发展的速度较慢,但确实有好转,2 ~ 3 个月内达到大体上痊愈。

[0254] (实施例 23)

[0255] 用“本杀菌消毒液”对 5 名深部牙周病 (deep periodontal disease) 患者的患部实施消毒后,实施将制造例 4 中制造的“新乳酸菌制剂”注入患部的处理。将其结果示于表 43。

[0256]

表43 由“本杀菌消毒液”的消毒和本发明的“新乳酸菌制剂”的组合对深部牙周病的治疗效果
(使用“新乳酸菌制剂”作为乳酸菌制剂)

患者			部位	主要的病原菌	治疗经过和效果
姓名	年龄	性别			
W. I.	54	♀	<u>6</u> <u>2</u>	P. gingivalis E. corrodens	给药第3日,口臭、病原菌消失。从第7日左右起,出血、排脓好转。 从第15日左右起,牙龈的状态变好,肿胀、弹性都显示出恢复的基调。 牙周袋内的牙龈逐渐地隆起、变浅。
M. N.	64	♂	<u>5</u> <u>6</u>	P. intermedia	从给药第5日起,迅速恢复;第10日,出血、排脓消失。牙龈的状态好转, 第30日恢复弹性,袋内的牙龈开始隆起,第45日牙周袋变浅,第60日大体 上闭合。
N. M.	70	♀	<u>3</u> <u>4</u>	A. actino P. intermedia	从给药第7日起,逐渐好转;第15日,口臭、出血、排脓消失。牙龈的状态, 从30日左右起,色调、肿胀、弹性都开始迅速好转。牙周袋开始一点点地 变浅,继续下去可以期待完全治疗。
O. S.	42	♂	<u>2</u> <u>5</u>	P. gingivalis	从给药第5日左右起,逐渐地恢复;第7日,出血、排脓、肿胀消失。 牙龈的状态也开始好转,第20日,色调、弹性都恢复原状。牙周袋 逐渐变浅,第60日,成为大体上闭合的状态。
S. I.	48	♂	<u>6</u> <u>3</u>	P. gingivalis B. forsythus	给药后第3日,口臭、病原菌消失。第7日,肿胀消退。出血、排脓停止, 第15日,牙龈的色调、弹性大体上恢复到原来的状态。袋内的牙龈一点 点地隆起,第45日变浅,第65日,成为大体上闭合的状态。

[0257] (实施例 24)

[0258] 用“本杀菌消毒液”对 5 名深部牙周病患者的患部实施消毒后,实施将制造例 5 中制造的“含有抗生素的新乳酸菌制剂”注入患部的处理。将其结果示于表 44。

[0259]

表44 由“本杀菌消毒液”的消毒和本发明的“新乳酸菌制剂”的组合对深部牙周病的治疗效果
(使用“含有抗生素的新乳酸菌制剂”作为乳酸菌制剂)

患者姓名	患者		部位	主要的病原菌	治疗经过和效果
	年龄	性别			
U. M.	77	♂	3 4 5	P. intermedia P. gingivalis	给药第3日, 病原菌消失。第5日, 出血、肿胀消失。从第12日前后起, 牙龈的状态好转, 弹性恢复。牙周袋的深度逐渐变浅, 第50日大体上闭合。
T. K.	80	♀	4 5 6	P. gingivalis S. aureus S. pyogenes	给药第3日, 口臭、病原菌都消失。第7日, 出血、肿胀消失, 肿胀好转。从第15日左右起, 牙龈的弹性好转、色调恢复。袋内的牙龈稍微隆起, 牙周袋变浅, 但没有闭合。
A. S.	65	♀	2 4	P. gingivalis Fusobacterium	从给药第4日起恢复。第7日, 出血、肿胀都消失。从第15日左右起, 牙龈的状态(色调、弹性)恢复相当好。袋的深度也逐渐变浅, 第60日大体上闭合。
S. A.	47	♂	6 3	A. actino Fusobacterium	给药第3日, 口臭、病原菌都消失。第5日, 肿胀也好转; 第15日, 牙龈的色调、弹性也大体上恢复。牙周袋迅速变浅, 第30日达到几mm, 第50日达到大体上闭合的状态。
T. T.	50	♂	5 5	P. intermedia B. forsythus	给药第3日, 口臭、病原菌都消失。第5日, 出血、肿胀都消失。第15日, 牙龈的色调、弹性都好转, 第30日完全恢复。袋的深度逐渐变浅, 第60日大体上完全闭合。

[0260] (对照例6)

[0261] 作为对照例,对5名深部牙周病患者实施基于“本杀菌消毒液”的处理、基于制造例4中制造的“新乳酸菌制剂”的处理、基于制造例5中制造的“含有抗生素的新乳酸菌制剂”的处理和以往的治疗方法。将其结果示于表45。

[0262] 表45 以往的治疗方法对深度牙周病的治疗效果

[0263]

	5 名患者平均的治疗经过和效果
单独使用“本杀菌消毒液”	病原菌和口臭数日后消失,牙龈的肿胀、色调、弹性一点点地变好,但感觉并不充分。袋的深度没怎么变化,但感觉变浅了。
单独使用“新乳酸菌制剂”	给药第 5~7 日,病原菌消失;从第 7 日左右起,症状开始好转;第 10 日,出血、排脓好转。从第 15 日左右起,肿胀逐渐开始消退、绷紧。色调变好,袋内的牙龈稍微隆起,袋变浅,但没有完全恢复。
以往的治疗方法	几乎没有好转,竭尽全力仅维持现状。但是,牙龈的肿胀和弹性稍微恢复。口臭好转。
单独使用“含有抗生素的新乳酸菌制剂”	给药第 5 日,病原菌消失。与之相伴,症状开始好转,出血、排脓消失。从第 15 日左右起,牙龈的状态好转,第 25 日,大体上恢复。牙周袋的深度逐渐变浅,但没有消失。

[0264] 炎症到达深部时,用以往的治疗方法,肿胀、色调、弹性等牙龈的状态稍微恢复,但牙周袋的状态几乎不变,竭尽全力仅维持现状。与此相对,将基于“本杀菌消毒液”的消毒和本发明的“新乳酸菌制剂”组合时,尽管有个人差异,但从治疗开始的第 2 周左右起,牙龈的状态趋向改善,2 个月内大体上恢复到健康的状态。牙周袋虽然每次改变非常少,但平稳地变浅变窄,3 个月内达到几 mm。有的患者维持在该状态,也有的患者重复多天、大体上完全闭合而达到治愈。

[0265] (实施例 25)

[0266] 用“本杀菌消毒液”对 5 名末期症状的牙周病患者的患部实施消毒后,实施将制造例 4 中制造的“新乳酸菌制剂”注入患部的处理。将其结果示于表 46。

[0267]

表46 由“本杀菌消毒液”的消毒和本发明的“新乳酸菌制剂”的组合对末期症状的牙周病的治疗效果
(使用“新乳酸菌制剂”作为乳酸菌制剂)

姓名	患者		部位	主要的病原菌	治疗经过和效果
	年龄	性别			
H.M.	64	♂	3 4	P. gingivalis A. actino	给药第4日, 病原菌、口臭都消失, 出血、排脓在第7日消失。从第15日起, 牙龈的状态得到改善, 牙齿的摇晃稍微好转。第60日, 牙龈组织开始显示逐渐再生的倾向, 牙周袋稍微变浅。牙龈的外观变好, 第120日, 牙齿的摇晃消失, 牙龈的状态大体上恢复。第180日, 牙周袋大体上闭合, 达到痊愈的状态。
K.N.	67	♀	4 6 2	P. gingivalis Fusobacterium	显示出与上述大致相同的经过, 大体上治愈。
N.T.	72	♀	2 3 4	P. gingivalis P. intermedia	给药第5日, 病原菌、口臭都消失, 但出血、排脓持续到第10日。第30日, 牙龈稍微有所改善, 但牙齿的摇晃和牙周袋的深度没有变化。持续90日的治疗, 看到稍稍改善, 但最终拔牙。
N.M.	59	♂	6	P. gingivalis	给药第3日, 口臭、病原菌都消失。第5日, 出血停止。排脓在第7日停止。从第15日左右起, 牙龈的色调、弹性都有恢复的趋势。从第25日左右起, 牙齿的摇晃稍微好转; 第60日, 不再摇晃。27mm的牙周袋稍微变浅。第90日, 达到15mm。第120日, 牙龈的状态恢复原状, 牙周袋成为12mm, 第180日, 成为4mm, 达到大体上根治的状态。牙槽骨也有相当的再生。
K.K.	63	♂	5 6	P. gingivalis B. forsythns E. corrodens	进程比上述稍微延迟, 但显示出大致相同的进程, 9个月内根治。

[0268] (实施例 26)

[0269] 用“本杀菌消毒液”对 5 名末期症状的牙周病患者的患部实施消毒后, 实施将制造例 5 中制造的“含有抗生素的新乳酸菌制剂”注入患部的处理。将其结果示于表 47。

[0270]

表47 由“本杀菌消毒液”的消毒和本发明的“新乳酸菌制剂”的组合对末期症状的牙周病的治疗效果
(使用“含有抗生素的新乳酸菌制剂”作为乳酸菌制剂)

患者		性别	部位	主要的病原菌	治疗经过和效果
姓名	年龄				
Y. M.	7 7	♂	[2] [3]	A. actino Fusobacterium	给药第3日, 病原菌、口臭都消失。第5日, 出血、排脓也消失。第10日, 牙龈的状态得到改善, 牙龈是稍微好转。第30日, 牙槽骨有一些再生, 牙龈几乎消失。牙周袋逐渐变浅, 第60日, 达到10mm。第120日, 牙龈的状态恢复, 袋的深度成为5mm, 继续治疗, 可以期待根治。
W. T.	5 8	♀	[3] [4] [5]	P. gingivalis W. recta	显示与上述大致同样的趋势。
V. M.	6 9	♂	[5] [5]	P. gingivalis W. recta	给药第4日, 病原菌、口臭都消灭。出血、排脓在第7日消失。从第12日左右起, 牙龈的色调、弹性、肿胀都得到改善, 第30日, 大体上恢复。牙周袋的大小逐渐变窄, 第80日达到10mm以下。牙齿摇晃在第60日好转, 已经能够食用硬的食物。第150日, 大致痊愈。
E. M.	6 4	♀	[3] [5]	A. actino W. recta	尽管进度稍慢, 但经历与上述大致相同的经过。
H. T.	5 0	♀	[6] [5]	P. gingivalis A. actino P. intermedia	给药第5日, 病原菌消失; 第20日, 牙龈的色调、弹性等稍微得到改善, 但牙槽骨的状态没怎么变化, 牙齿的摇晃稍微好转, 但最终拔牙。

[0271] (对照例 7)

[0272] 作为对照例, 采用现有的最先进的治疗方法, 即使用引人注目的 Emdogain 的被称为“引导组织再生法”的方法, 对 5 名末期症状的牙周病患者进行治疗。将其结果示于表 48。

[0273] 表 48 引导组织再生法对末期症状的牙周病的治疗效果

[0274]

	5 名患者平均的治疗经过和效果
引导组织再生法	试验了新方式的方法,没有改善效果,只能拔牙。

[0275] 牙周病处于末期状态时,用以往的治疗方法,不论如何都有为时已晚的感觉,结果不得不拔牙。可以不拔牙、利用外科手术来保养牙齿,但是,由于该病会反复再发,结果,在大多情况下,只不过是拔牙延迟了。与此相对,将基于“本杀菌消毒液”的消毒和本发明的“新乳酸菌制剂”组合时,迅速地驱逐病原菌、而且除去致病因子,以后可以期待两者相结合的组织再生的效果,70 ~ 80%的情况不必拔牙,即使没有根治也能够保留牙齿。

[0276] (实施例 27)

[0277] 将雌雄各 10 头的平均体重 18kg 的 2 个月大的兰德瑞斯 (Landrace) 种猪崽划分为 3 个区。饲养环境是单间的无窗猪舍,用换气扇进行换气。饲料用猪崽用标准饲料(日本农产工业株式会社生产)饲养。不断地供给饲料、将饲料设定为在饲料箱(feed bin)中总有残留的状态,给水通过给水器自动给水。以将各自的湿润菌体添加调整 1×10^6 细胞/g- 饲料的方式,在对照区的饲料中供给原始的干酪乳杆菌种(FERMBP-6971),在试验区中供给制造例 3 中制造的本发明的干酪乳杆菌种(FERM BP-10059、FERM P-19443),还设置不供给乳酸菌的无添加区。在上述的饲养条件下饲养 1 个月的结果,如表 49 所示,添加本发明的干酪乳杆菌种的试验区的猪崽,与无添加区相比,毛的光泽好、平均重 4.8kg,可以看到明显的促进生长的效果。完全看不到猪崽经常患有的痢疾等症状,试验以来也没有疾病,可以顺利地饲养。还确认粪的臭气也下降。另外,添加原始的干酪乳杆菌种的对照区也取得了良好的效果,但与试验区相比则逊色得多。另外,在由专家进行的肉质检查中,试验区的猪瘦肉特别多、有弹性,获得质量非常好的判定。

[0278] 表 49 猪崽的饲养试验结果

[0279]

	无添加区	对照区	试验区
开始时的平均体重	18.2kg	18.0kg	17.8kg
1 周后的平均体重	21.2kg	21.0kg	21.4kg
2 周后的平均体重	25.5kg	26.1kg	26.9kg
3 周后的平均体重	31.3kg	32.5kg	34.0kg
4 周后的平均体重	38.8kg	40.2kg	43.2kg
平均体重增加	20.6kg	22.2kg	25.4kg
饲料摄取量	42.2kg	43.8kg	43.7kg
饲料要求率	2.05	1.97	1.72

[0280] (实施例 28)

[0281] 将雌雄各 30 只烤焙用嫩鸡(broiler)专用品种(ArborAcre)的雏鸡(平均体重 43g)预备饲养 3 日后,以雌雄同数的方式分为 3 个区,将各区的平均体重设定为 50g,确认在体重上没有偏差。对其进行 4 周烤焙催肥前期用标准饲料(协同饲料株式会社生产、Golden G)的给料。饲养环境是立体鸡舍饲养(保温饲养 $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$)直到 4 周大小。以 2×10^7 细胞/g- 饲料的方式分别在对照区的标准饲料中添加原始的干酪乳杆菌种(FERM BP-6971)的冷冻干燥菌体,在试验区中添加制造例 3 中制造的本发明的干酪乳杆菌种(FERM BP-10059、FERMP-19443)的冷冻干燥菌体,还设置有不添加乳酸菌的无添加区。饲养设定为由给水器自动给水,不断地供给饲料、将饲料维持在总是有残留的状态。将结果

示于表 50,从表 50 可知,4 周饲养的结果,与无添加区相比,对照区体重增加约 15%、试验区增加约 27%。另外确认,在饲养期间,在试验区没有发生疾病,看不到痢疾等症状,粪的臭气也减轻。由此也可知,基于本发明的干酪乳杆菌种的乳酸菌制剂比基于原始的干酪乳杆菌种的乳酸菌制剂显示出格外好的效果。

[0282] 表 50 烤焙用嫩鸡的饲养试验结果

[0283]

	无添加区	对照区	试验区
开始时的平均体重	50.5g	50.0g	49.5g
1 周后的平均体重	162g	173g	180g
2 周后的平均体重	380g	405g	425g
3 周后的平均体重	696g	735g	779g
4 周后的平均体重	985g	1142g	1238g
饲料摄取量	1710g	1850g	1880g
饲料要求率	1.8	1.7	1.6

[0284] (实施例 29)

[0285] 使用 4 个养殖有 100 尾平均鱼体重约 65g 的青花鱼幼鱼的小网眼养鱼笼,其中 3 个养鱼笼作为试验区、1 个养鱼笼作为无添加区。供给将市售的黄尾鱼 (yellowtail) 用配合饵料 (日清饲料株式会社生产的 Itomate) 和沙丁鱼肉末以 1 : 1 混合而成的潮湿的小球 (moist pellet) 作为饵料。在试验区 1 中,将制造例 2 中制造的本发明的干酪乳杆菌种 (FERM BP-10059、FERM P-19443) 的干燥菌体以 1×10^9 细胞 /g- 饵料的方式混合后立即进行给药。在试验区 2 中,同样地供给以 0.02ml/g- 饵料的方式添加制造例 2 中制造的本发明的干酪乳杆菌种 (FERM BP-10059、FERM P-19443) 的培养滤液而形成的物质。在试验区 3 中,同样地供给以 0.02ml/g- 饵料的方式添加制造例 2 中制造的本发明的干酪乳杆菌种 (FERM BP-10059、FERM P-19443) 的培养滤液而形成的物质。另外,试验期间的水温是 20℃~22℃。将其结果示于表 51。从表 51 可知,与无添加区相比,试验区的青花鱼成长好、试验期间中的死亡数也少。其中,供给本发明的干酪乳杆菌种的培养液的试验区 2 的结果最好。

[0286] 表 51 使用本发明的乳酸菌制剂的青花鱼饲养试验结果

[0287]

	无添加区	试验区 1	试验区 2	试验区 3
开始时平均体重	65g	64g	65g	66g
结束时平均体重	240g	280g	290g	255g
平均增加体重	175g	216g	225g	189g
总饲料摄取量	275kg	275kg	275kg	275kg
成长率	270%	338%	346%	286%
死亡尾数	7	1	1	2

[0288] (对照例 8)

[0289] 使用原始的干酪乳杆菌种 (FERM BP-6971) 实施与实施例 29 同样的试验,将其结果示于表 52。从表 52 可知,与本发明的干酪乳杆菌种相比时,是相当差的结果。

[0290] 表 52 使用原始的干酪乳杆菌种的乳酸菌制剂的青花鱼的饲养试验结果

[0291]

	试验区 1	试验区 2	试验区 3
开始时平均体重	65g	64g	67g
结束时平均体重	265g	275g	250g
平均增加体重	200g	211g	183g
总饲料摄取量	275kg	275kg	275kg
成长率	307%	330%	273%
死亡尾数	1	2	2

[0292] (实施例 30)

[0293] 进行作为鸟饲料和鱼饵特别有用的条纹蚯蚓 (red worm) 的养殖实验。准备 4 个 W600mm×D400mm×H150mm 的木箱, 用 1kg 腐叶土中混合 0.5g 生的面包酵母的物质将各木箱填充至 80%, 接着, 在各箱中各投入 100 条平均体长 10mm、平均体重 40mg 的幼蚯蚓。在设定为室温 25℃ 的室内饲养, 白天以 10 勒克斯照射电灯、夜间关灯。在试验区 1 撒布制造例 2 中制造的本发明的干酪乳杆菌种 (FERM BP-10059、FERM P-19443) 的湿润菌体 0.01g, 在试验区 2 撒布 200ml 的用水将制造例 2 中制造的本发明的干酪乳杆菌种 (FERM BP-10059、FERMP-19443) 的培养液稀释到 100 倍的稀释液, 在试验区 3 撒布 200ml 的制造例 2 中制造的本发明的干酪乳杆菌种 (FERM BP-10059、FERMP-19443) 的培养滤液。该操作每 10 日进行 1 次, 无添加区只撒布水。每个饲养箱每 2 日撒布适量的水, 以使土壤不干燥。每周投入 1 次干酵母和绿藻作为饲料, 饲养开始时各 1g, 每过 1 周各增量 20%。将 3 个月后的饲养结果示于表 53。从表 53 可知, 与无添加区相比, 试验区 1 和试验区 2 中成品率都良好、体重也增加 20% 左右。试验区 3 的结果介于它们之间。

[0294] 表 53 条纹蚯蚓的养殖试验结果

[0295]

	无添加区	试验区 1	试验区 2	试验区 3
开始时平均体长	27mm	32mm	33mm	30mm
开始时平均体重	170mg	210mg	230mg	200mg
比无添加区增加的体重	-	增加 18.5 %	增加 22.0 %	增加 11.0 %
成品率	77 %	98 %	95 %	80 %

[0296] 除了上述显示的蚯蚓以外,还实施了甲虫的幼虫、蚕的幼虫等的饲养试验,它们在

试验区内生长快而且长得大。与此相伴,蚕茧和成虫都变大。另外,使用原始的干酪乳杆菌种实施上述各种实验时,也取得了良好的结果,但如果与本发明的干酪乳杆菌种相比,则其成长率、成品率平均低 5 ~ 10%。

[0297] (实施例 31)

[0298] 使用黄瓜实施了关于作为温室栽培中最常见问题的白粉病和霜霉病的预防及治疗的试验。在白粉病中,线状菌从叶和茎的表面侵入,起初形成白的小斑点,症状发展时,叶子的一面成为涂满白粉的状态,逐渐变为灰色。叶子的生长停止,是黄瓜时,只能收获又细又小又硬的果实。另外,在霜霉病中,最初在叶的背面出现灰白色的霉状的病斑,接着在叶的表面产生象被污染的不规则的纹,并逐渐变大。最后,叶子成为黄褐色的发粘的状态、腐烂而无法期待收获。

[0299] 完全隔开黄瓜温室栽培中的一段,将按照制造例 1 中制造的本发明的干酪乳杆菌种 (FERMBP-10059、FERM P-19443) 的冷冻干燥菌体 1g 与 1L 水的比例混合的液体 (2×10^7 细胞 /ml) 在开花前的叶和茎上充分地撒布。1 周后,撒布足以发病的量的白粉病菌 (*Sphaerathecafuliginea*) 和霜霉病菌 (*Pseudoperonospora cubensis*) 的孢子,但是,黄瓜不患病、反而开花,并可以不断地收获比通常尺寸较大、优良的黄瓜。另外,在不撒布本发明的乳酸菌制剂的情况下、撒布病原菌孢子的黄瓜,都染上两种病中的一种。另外,撒布了由原始的干酪乳杆菌种 (FERM BP-6971) 得到的冷冻干燥菌体的黄瓜,部分发生疾病,患病的黄瓜不能收获。其比例占全体的 10% ~ 20%。

[0300] 上述患病的黄瓜的最初阶段,通过喷雾充分撒布将 5g 制造例 1 中制造的本发明的干酪乳杆菌种 (FERM BP-10059、FERM P-19443) 的冷冻干燥菌体悬浮在 1L 水中的菌液 (1×10^8 细胞 /ml), 1 周后再次撒布同样的量时,病斑逐渐消失,像通常一样开花,结出优良的果实。另外,同样地撒布原始的干酪乳杆菌种 (FERM BP-6971) 时,约 50% 比例的疾病治愈,剩余的 50% 的疾病原样地发展,其结果是无法收获。

[0301] 对上述黄瓜以外的作物,例如土豆、辣椒、南瓜等也同样地进行实验,都证实了撒布本发明的干酪乳杆菌种的冷冻干燥菌体是有效的。例如,即使将 3% 甲基硫菌灵 (thiophanatemethyl) (日本曹达株式会社生产的 Topsin-M) 和喹啉啉 (quinoxaline) (株式会社八洲化学生产的 Morestan) 等农药的撒布减少为通常的 1/2 ~ 1/3, 此后,适当进行本发明的乳酸菌制剂的给药,也可以得到好结果。

[0302] (实施例 32)

[0303] 准备 4 个 W600mm×D400mm×H150mm 的培植器皿 (planter), 分别在下层土中掺入 20g 化肥 (株式会社 NAC 生产、化成 38 号、N:8%、P:5%、K:5%) 和 5g 可溶性磷肥, 另外,用在通常旱田的土壤中混合 30% 的比例的腐叶土的 10L 混合土壤中混合 10g 苦土石灰 (株式会社 NAC 生产、在消石灰中混合 5 ~ 7% 氧化镁的土壤改良剂) 的混合土壤加入到 80% 左右的高度。在 10 月中旬,在各培植器皿中分别各植入 6 株 A11so 种的草莓苗,从 2 周后到 12 月中旬左右,每周施加液肥的同时,使制造例 1 中制造的本发明的干酪乳杆菌种 (FERMBP-10059、FERM P-19443) 的冷冻干燥菌体悬浮在水中 (1×10^7 细胞 /ml), 通过喷雾将其充分撒布在试验区 1 的培植器皿中的全部草莓苗上。在试验区 2 中,撒布用水将制造例 1 中制造的本发明的干酪乳杆菌种 (FERM BP-10059、FERM P-19443) 的培养液稀释至 200 倍的稀释液。在试验区 3 中,撒布用水将制造例 1 中制造的本发明的干酪乳杆菌种 (FERM

BP-10059、FERM P-19443) 的培养滤液稀释至 200 倍的稀释液。在无添加区的培植器皿中, 只撒布水。次年 3 月, 蓇葖形成时, 再次每周撒布液肥与上述乳酸菌制剂。开花后 1 个月~2 个月期间, 红的成熟的果实逐渐收获。将其结果示于表 54。从表 54 可知, 撒布本发明的乳酸菌制剂的试验区 1 与试验区 2 的草莓, 不仅生长快, 而且每 1 株可以收获 200g 的草莓。而且, 在香味、色泽、味道、大小等品质中, 无论哪一项都确认为一级品。与此相对, 无添加区的草莓与试验区的一级品相比, 收获量少、品质也逊色, 是被称为一般品的草莓。

[0304] 表 54 草莓的生长试验结果

[0305]

		无添加区	试验区 1	试验区 2	试验区 3
开花后的收获时期		35~60 日	30~50 日	30~50 日	35~55 日
每 1 株的收获量		155g	185g	200g	175g
品质	大小	中	大	大	中~大
	香味	+	+++	+++	++
	颜色	黄~深红色	深红色	深红色	深红色
	光泽	+	++	++	+~++
	味道	糖度稍微欠缺、水分稍多	糖度高、酸味也适度良好、非常美味	同左	糖度高、但酸味稍微欠缺

[0306] (实施例 33)

[0307] 准备 8 个 W600mm×D400mm×H150mm 的培植器皿, 在通常的旱田土壤中混合 30% 腐叶土, 将 8g 苦土石灰 (在消石灰中混合 5~7% 氧化镁的土壤改良剂) 混入 10L 该混合物中, 为鸭儿芹 (honestwort) 使用, 1 周后, 在 3 个培植器皿的下层土中施用 20g 化肥 (株式会社 NAC 生产、化成 38 号、N:8%、P:5%、K:5%)。另一方面, 将 20g 苦土石灰与 20g 化肥 (株式会社 NAC 生产、化成 38 号、N:8%、P:5%、K:5%) 充分混合, 放进 3 个培植器皿中, 为菠菜使用。接着, 在 9 月下旬在各个培植器皿中播种。鸭儿芹、菠菜都发芽时, 进行疏苗以使叶子不互相重叠, 主叶伸展时, 1 周施 1 次液肥, 撒水进行到土不干燥的程度。另外, 与液肥施肥的同时, 在试验区 1 中, 使制造例 2 中制造的本发明的干酪乳杆菌种 (FERM BP-10059、FERM P-19443) 的冷冻干燥菌体在水中悬浮 (1×10^7 细胞/ml), 通过喷雾撒布在整体上。在试验区 2 中, 同样地喷撒用水将制造例 2 中制造的本发明的干酪乳杆菌种 (FERM BP-10059、FERM P-19443) 的培养液稀释到 300 倍的稀释液。在试验区 3 中, 喷撒用水将制造例 2 中制造的本发明的干酪乳杆菌种 (FERM BP-10059、FERM P-19443) 的培养滤液稀释至 300 倍的稀释液。无添加区只喷撒水。将关于鸭儿芹的结果示于表 55。从表 55 可知, 喷撒本发明的乳酸菌制剂的试验区 1 和试验区 2 的鸭儿芹, 生长快, 叶子宽、厚而且柔软, 香味良好、市售的水耕栽培的鸭儿芹无法与之相比。另外, 以上述为标准, 试验区 3 也收获了品质良好的鸭儿芹。

[0308] 表 55 鸭儿芹的生长试验结果

[0309]

		无添加区	试验区 1	试验区 2	试验区 3
收获状况		从播种到收获(高度 15cm 以上)需要 35 日。每 1 棵的重量与试验区 1 的鸭儿芹相比是 80%左右。若收获时间迟则硬。	到收获需要 30 日。即使收获时间稍微迟一些,品质也没有问题。	到收获需要 28 日。即使收获时间稍微迟一些,品质也没有问题。	到收获需要 32 日。收获时间迟就稍微地变硬。
品质	香味	+	++	+++	++
	其它	叶子的宽度、厚度都一般	叶子宽、尽管厚但是柔软,茎也柔软,叶子的颜色深。	同左	叶子是一般宽度,但叶、茎都柔软

[0310] 将关于菠菜的结果示于表 56。从表 56 可知,试验区的菠菜与无添加区的菠菜相比,根红色深、更稳固,叶大而厚、有光泽,散发出独特的甜味,培育成为深绿色的高品质的菠菜。在无添加区,一部分出现斑点病(叶子上出现褐色病斑,病斑上长出黑褐色的霉菌而枯萎),但试验区完全没有。另外,除上述以外,在卷心菜、芜荑(parsley)、芹菜(celery)等蔬菜类,葡萄、桔子等水果,蘑菇等担子菌类,石柑(pothos)等观赏植物,康乃馨等花中,也实施了比较实验,在所有情况下,相比于无添加区,都可以提前收获高品质的作物。而且,几乎不患病。

[0311] 表 56 菠菜的生长试验结果

[0312]

	无添加区	试验区 1	试验区 2	试验区 3
收获 状况	从播种到收获(出现 5~6 片主 叶时)需要 50 日。	从播种到收获需要 40 日。	同左	从播种到收获需要 45 日。
品质	特有的甜味感觉稍弱	叶子宽、厚、色泽好,具有特有的甜味	同左	同左

[0313] (实施例 34)

[0314] 购入薄荷苗(具有 6 片叶子),在旱田土壤中混入 50%腐叶土,与上述实施例 15 和实施例 16 同样地设置试验区 1、试验区 2、试验区 3 和无添加区,通过喷雾每周撒布 1 次本发明的乳酸菌制剂(FERMBP-10059、FERM P-19443)。此外,每月施 1 次液肥。其结果,相比于无添加区,试验区 1、试验区 2 和试验区 3 的薄荷,叶子长得密、具有独特甜味的芳香很强烈。对上述以外的草本植物,例如黄春菊、鼠尾草、薰衣草、柠檬香蜂草(lemon balm)等也实施了实验,与薄荷同样,可以感觉到每种草本植物特有的芳香。此外,使用特开 2001-333766 中使用的原始的干酪乳杆菌种(FERM BP-6971)同样地实施对上述的蔬菜和草本植物的实验,显示出优异的结果,但是,如果根据其收获量、品质、芳香、发病等综合判断,无论如何也达不到由撒布本发明的干酪乳杆菌种(FERM BP-10059、FERM P-19443)产生的结果。

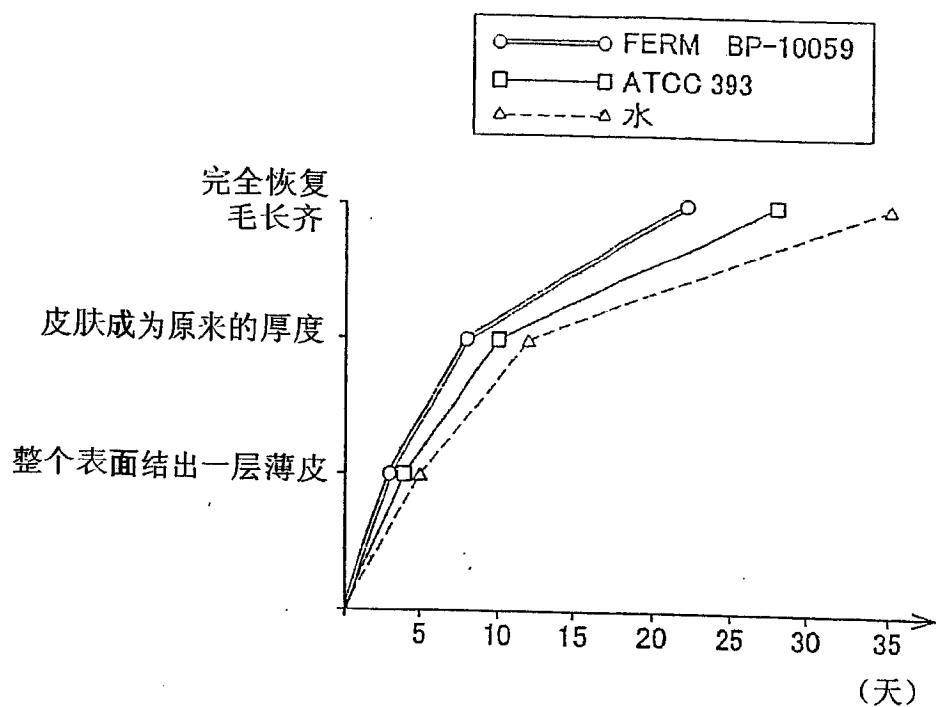


图1

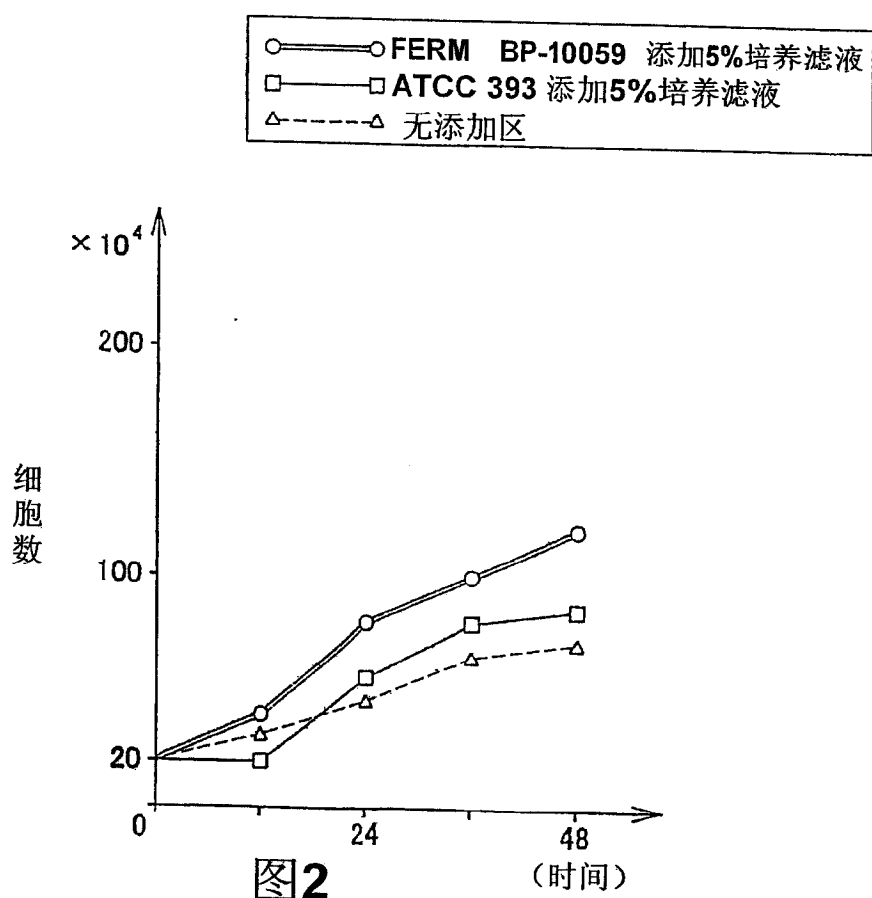


图2

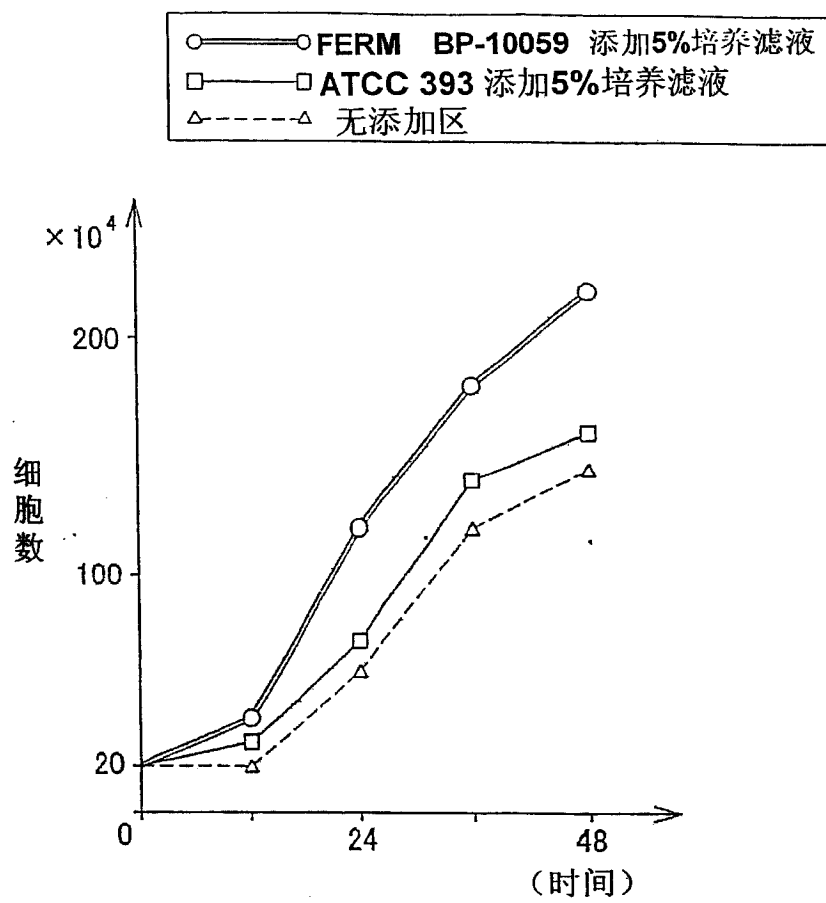


图 3

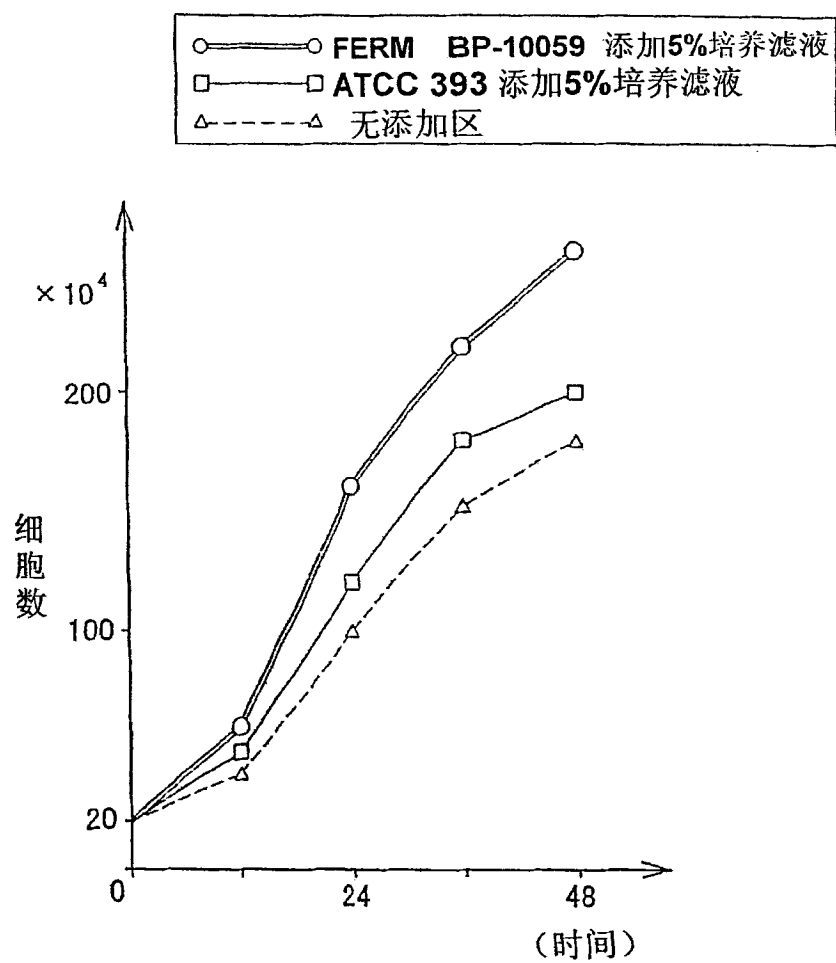


图 4

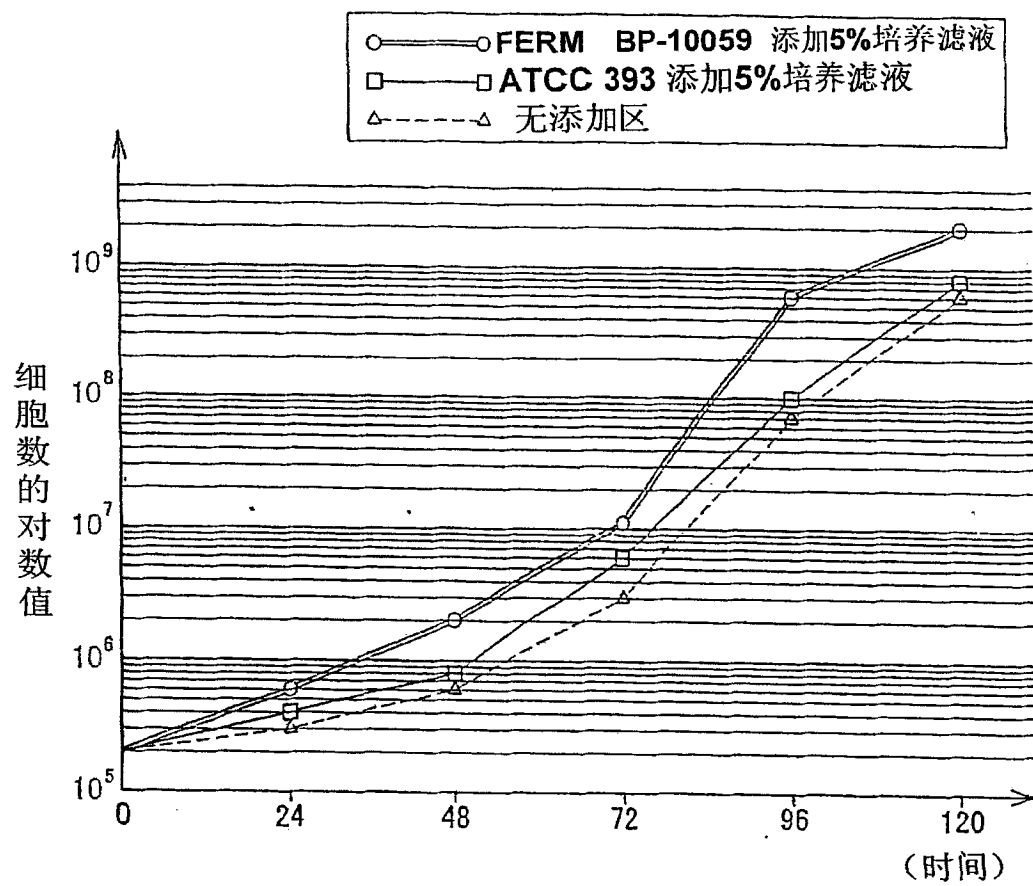


图 5