

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017 年 10 月 12 日(12.10.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/175774 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 35/744 (2015.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01) A61P 37/04 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/014153
- (22) 国際出願日: 2017 年 4 月 4 日(04.04.2017)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2016-075323 2016 年 4 月 4 日(04.04.2016) JP
- (71) 出願人: キッコーマン株式会社 (KIKKOMAN CORPORATION) [JP/JP]; 〒2788601 千葉県野田市野田 2 5 0 番地 Chiba (JP). 国立研究開発法人国立国際医療研究センター (NATIONAL CENTER FOR GLOBAL HEALTH AND MEDICINE) [JP/JP]; 〒1628655 東京都新宿区戸山 1 丁目 2 1 番地 1 号 Tokyo (JP). 国立研究開発法人産業技術総合研

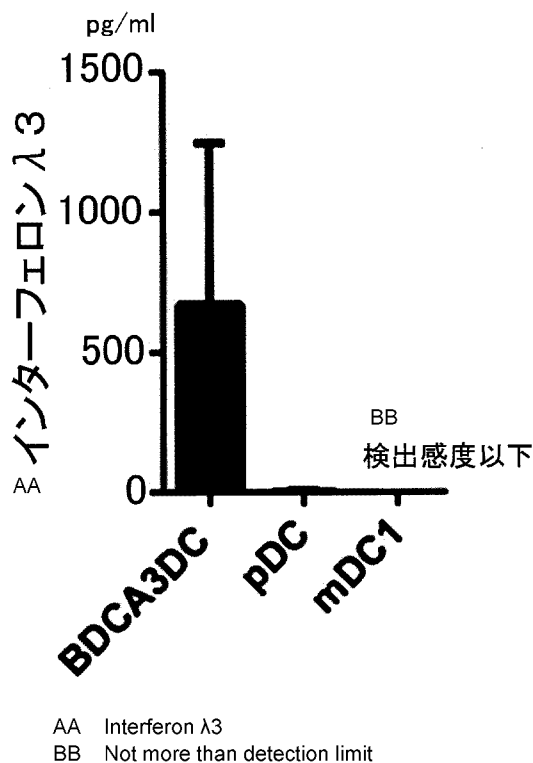
究所 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関 1 丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP).

- (72) 発明者: 由雄 祥代 (YOSHIO Sachiyo); 〒2728516 千葉県市川市国府台 1-7-1 国立研究開発法人国立国際医療センター 肝炎・免疫研究センター内 Chiba (JP). 考藤 達哉 (KANTO Tatsuya); 〒2728516 千葉県市川市国府台 1-7-1 国立研究開発法人国立国際医療センター 肝炎・免疫研究 Chiba (JP). 川島 忠臣 (KAWASHIMA Tadaomi); 〒2788601 千葉県野田市野田 2 5 0 番地 キッコーマン株式会社内 Chiba (JP). 碓 菜穂 (IKARI Naho); 〒2788601 千葉県野田市野田 2 5 0 番地 キッコーマン株式会社内 Chiba (JP). ▲辻▼ 典子 (TSUJI Noriko); 〒3058566 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人栄光特許事務所 (Eikoh Patent Firm, P.C.); 〒1050003 東京都港区西新橋一丁

[続葉有]

(54) Title: COMPOSITION FOR PROMOTING INTERFERON λ PRODUCTION AND METHOD FOR PRODUCING SAME

(54) 発明の名称: インターフェロン λ 産生促進用組成物及びその製造方法



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a composition for promoting interferon λ production, said composition comprising an active ingredient exerting an effect of promoting interferon λ production on BDCA3DCs, and a method for producing the same. The present invention relates to: (1) a composition for promoting interferon λ production, said composition comprising, as an active ingredient, cells of a lactic acid bacterium, which can be cultured under stress conditions, cell components thereof or a culture product thereof; and (2) a method for producing a composition for promoting interferon λ production, said method comprising culturing a lactic acid bacterium, which can be cultured under stress conditions, to give the cells of the lactic acid bacterium, cell components thereof or a culture product thereof.

(57) 要約: 本発明は、BDCA3DCに対してインターフェロン λ の産生促進作用を示す有効成分を含有する、インターフェロン λ 産生促進用組成物及びその製造方法を提供することを目的とする。本発明は、(1) ストレス条件下で培養が可能である乳酸菌の菌体、菌体成分又は培養物を有効成分として含有する、インターフェロン λ 産生促進用組成物、及び(2) ストレス条件下で培養が可能である乳酸菌を培養して、該乳酸菌の菌体、菌体成分又は培養物を得ることを含む、インターフェロン λ 産生促進用組成物の製造方法に関する。

WO 2017/175774 A1



目 7 番 1 3 号 虎ノ門イーストビルディング
1 0 階 Tokyo (JP).

- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 規則 13 の 2 に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示 (規則 13 の 2.4(d)(i)及び 48.2(a)(viii))

明 細 書

発明の名称：

インターフェロンλ産生促進用組成物及びその製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、インターフェロンλ産生促進用組成物及びその製造方法に関する。

背景技術

[0002] インターフェロンλはⅠⅠⅠ型インターフェロンに属する生理活性物質（サイトカイン）の１種であり、これまでに樹状細胞、肝細胞、腸管上皮細胞、肺上皮細胞などによる産生が認められている。インターフェロンλは抗ウイルス作用といった自然免疫賦活化作用を有し、抗ウイルス活性、免疫賦活化性、抗感染症活性、抗Ｂ型肝炎活性、抗Ｃ型肝炎活性、抗増殖活性、抗腫瘍活性、抗癌活性などを示し得ることから、これらの活性を有する飲食品、治療剤、予防剤、改善剤、緩和剤などに利用することが期待されている。

[0003] 具体的には、インターフェロンλはＣ型肝炎治療において治験が行われ、実際に抗ウイルス作用を示すことが確認されている。また、インターフェロンλは、ロタウイルス、ＲＳウイルス、インフルエンザウイルスなどに対しても抗ウイルス作用を示すことが確認されており、肝臓、腸管、呼吸器などの組織の免疫において重要な役割を果たしている。

[0004] さらに、インターフェロンλは、加齢に伴って生じる免疫力の低下を補うことができるものである。インターフェロンλに対する受容体は上記した細胞に限定的に局在していることから、インターフェロンλは、あらゆる細胞に受容体が発現しているインターフェロンαとは異なり、摂取者に対して、副作用を抑えて選択的な生理活性作用を付与することができる。

[0005] そこで、インターフェロンλを直接投与することのみならず、インターフェロンλの生体内での発現量を増やすこと、すなわち、インターフェロンλの産生を促進する物質を投与することにより、インターフェロンλによって

期待される生理活性を生体内で引き起こすことが可能となる。

[0006] インターフェロン λ を産生する細胞のうち、樹状細胞は、プラズマサイトイド樹状細胞（pDC）及びミエロイド樹状細胞（mDC）に大別でき、mDCはさらにCD19が陰性であるmDC1及びBDCA3が陽性であるBDCA3DCに分けることができる。

[0007] これらの樹状細胞サブセットは、それぞれ発現する細胞表面分子マーカーの種類及び程度、産生するサイトカインの種類などが相違することが知られている（例えば、非特許文献1及び2を参照）。

[0008] インターフェロン λ 産生促進物質としては、例えば、pDCを活性化して、インターフェロン λ の産生を促進する可能性があるものとして、特許文献1にラクトコッカス・ラクティス（*Lactococcus lactis*）JCM20101株及びJCM5805株が記載されている。

[0009] また、インターフェロン λ とは異なるサイトカインとして、インターフェロン γ 及びインターフェロン β の産生を促進し得る乳酸菌として、テトラジェノコッカス属乳酸菌が知られている（例えば、特許文献2及び3を参照）。

先行技術文献

特許文献

[0010] 特許文献1：国際公開第2012/091081号

特許文献2：日本国特開2006-028047号公報

特許文献3：日本国特許第5312322号公報

非特許文献

[0011] 非特許文献1：Jens Geginat et al., *Frontiers in Immunology*, October 2015, Vol.6, Article 527

非特許文献2：Bing Liu et al., *Gastroenterology Research and Practice*, Vol. 2015, Article ID 796461

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0012] 特許文献1によれば、JCM20101株及びJCM5805株のインターフェロンλの産生量は、他のインターフェロンの産生量と比べて1桁少ない。そこで、本発明者らは、JCM20101株及びJCM5805株のインターフェロンλの産生促進作用について、改めて調べることにした。その際、樹状細胞の中でも、インターフェロンλの産生量が比較的多い、BDCA3DCを用いることにした。
- [0013] そうしたところ、驚くべきことに、特許文献1に記載のJCM20101株及びJCM5805株は、BDCA3DCに対してインターフェロンλ産生促進作用をほとんど示さなかった。また、特許文献2及び3並びに非特許文献1及び2には、BDCA3DCに対してインターフェロンλ産生促進作用を示す物質についての記載はない。
- [0014] そこで、本発明が解決しようとする課題は、BDCA3DCに対してインターフェロンλの産生促進作用を示す有効成分を含有する、インターフェロンλ産生促進用組成物及びその製造方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0015] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を積み重ねた結果、ストレス条件下で培養が可能である乳酸菌の菌体、菌体成分又は培養物は、BDCA3DCに対してインターフェロンλ産生促進作用を示すことを見出した。
- [0016] 特に驚くべきことに、特許文献1に記載のJCM20101株及びJCM5805株は二本鎖RNAを含有するものでありながらもBDCA3DCに対してインターフェロンλ産生促進作用を示さないことに対して、テトラジェノコッカス・ハロフィラス (Tetragenococcus halophilus) KK221株は、BDCA3DCに対して格別に優れたインターフェロンλ産生促進作用を示すことを本発明者らは見出した。
- [0017] これらの知見を基に、本発明者らは、KK221株などのストレス条件下で培養が可能である乳酸菌の菌体、菌体成分又は培養物を有効成分として含

有する、インターフェロン λ 産生促進用組成物及びその製造方法を創作することに成功した。本発明はこれらの知見及び成功例に基づいて完成するに至った発明である。

[0018] すなわち、本発明は以下に関する。

1. ストレス条件下で培養が可能である乳酸菌の菌体、菌体成分又は培養物を有効成分として含有する、インターフェロン λ 産生促進用組成物。
2. 前記インターフェロン λ 産生促進用組成物は、B D C A 3 D Cに対するインターフェロン λ 産生促進用組成物である、前記1に記載のインターフェロン λ 産生促進用組成物。
3. 前記インターフェロン λ は、インターフェロン λ 3である、前記1又は2に記載のインターフェロン λ 産生促進用組成物。
4. 前記菌体、前記菌体成分及び前記培養物は、それぞれ核酸を含有する菌体、菌体成分及び培養物である、前記1～3のいずれか1に記載のインターフェロン λ 産生促進用組成物。
5. 前記ストレス条件下で培養が可能である乳酸菌は、菌体 1×10^{10} c f uあたり15, 000 ng / ml以上の二本鎖RNAを含有する乳酸菌及び菌体 1×10^{10} c f uあたり総核酸中の二本鎖RNAの割合が3.5%以上である乳酸菌の少なくとも一方である、前記4に記載のインターフェロン λ 産生促進用組成物。
6. 前記インターフェロン λ 産生促進用組成物が、インターフェロン λ 産生促進用腸溶組成物である、前記1～5のいずれか1に記載のインターフェロン λ 産生促進用組成物。
7. 前記1～6のいずれか1に記載のインターフェロン λ 産生促進用組成物を含有する飲食品。
8. ストレス条件下で培養が可能である乳酸菌を培養して、該乳酸菌の菌体、菌体成分又は培養物を得ることを含む、インターフェロン λ 産生促進用組成物の製造方法。
9. ストレス条件下で培養が可能である乳酸菌の菌体、菌体成分又は培養物

を使用してインターフェロンλの産生を促進する方法。

10. インターフェロンλ産生促進用組成物の製造のためのストレス条件下で培養が可能である乳酸菌の菌体、菌体成分又は培養物の使用。

11. インターフェロンλの産生を促進するためのストレス条件下で培養が可能である乳酸菌の菌体、菌体成分又は培養物の使用。

発明の効果

[0019] 本発明の組成物及び本発明の製造方法によって得られる組成物は、インターフェロンλ産生促進作用、特にBDCA3DCに対するインターフェロンλ産生促進作用を有し、さらにこれらの作用に関連して、抗ウイルス効果、免疫賦活効果、抗感染症効果、抵抗性抗B型肝炎効果、抗C型肝炎効果、抗増殖活効果、抗腫瘍効果、抗癌効果などを奏することが期待できる。

[0020] 本発明の組成物で用いられる有効成分は飲食品の添加物などの使用実績のあるものである。したがって、本発明の組成物は、安全性が高いものであり、抗ウイルス剤、免疫賦活剤、抗感染症剤、抗B型肝炎剤、抗C型肝炎剤、腸管免疫賦活剤、気道免疫賦活剤、抗腫瘍剤、抗癌剤などとして有用であり、経口的又は非経口的な形態で提供することが期待できるものである。

図面の簡単な説明

[0021] [図1]図1は、実施例に記載されている、テトラジェノコッカス・ハロフィラスKK221株によるBDCA3DCのインターフェロンλ3産生促進試験の結果を示す図である。

[図2]図2は、実施例に記載されている、テトラジェノコッカス・ハロフィラスKK221株によるBDCA3DC、pDC及びmDC1のインターフェロンλ3産生促進試験の結果を示す図である。

[図3]図3は、実施例に記載されている、テトラジェノコッカス・ハロフィラスKK221株及び該菌株をRNaseA処理した菌体による、BDCA3DCのインターフェロンλ3産生促進試験の結果を示す図である。

[図4]図4は、実施例に記載されている、テトラジェノコッカス・ハロフィラスKK221株及びPoly I:Cによる、クロロキン添加有無別のBDCA3DCのインターフェロンλ3産生促進試験の結果を示す図である。

A3DCのインターフェロン λ 3産生促進試験の結果を示す図である。

[図5]図5は、実施例に記載されている、テトラジェノコッカス・ハロフィラスKK221株による、TRIF阻害剤の添加有無別のBDCA3DCのインターフェロン λ 3産生促進試験の結果を示す図である。

[図6]図6は、実施例に記載されている、テトラジェノコッカス・ハロフィラスKK221株、ラクトコッカス・ラクティスJCM20101株及びJCM5805株による、BDCA3DCのインターフェロン λ 3産生促進試験の結果を示す図である。

[図7]図7は、実施例に記載されている、テトラジェノコッカス・ハロフィラスKK221株、ラクトコッカス・ラクティスJCM20101株及びJCM5805株による、pDCのインターフェロン α 産生促進試験の結果を示す図である。

[図8]図8Aおよび図8Bは、それぞれ、実施例に記載されている、テトラジェノコッカス・ハロフィラスKK221株及びPoly I:Cによる、BDCA3DCの各サイトカイン産生促進試験の結果を示す図である。

[図9]図9は、実施例に記載されている、テトラジェノコッカス・ハロフィラスKK221株、ラクトコッカス・ラクティスJCM20101株及びJCM5805株による、生菌数あたりの二本鎖RNAの量を測定した結果を示す図である。

[図10]図10は、実施例に記載されている、テトラジェノコッカス・ハロフィラスKK221株、ラクトコッカス・ラクティスJCM20101株及びJCM5805株による、生菌数あたりの総核酸量を測定した結果を示す図である。

[図11]図11は、実施例に記載されている、テトラジェノコッカス・ハロフィラスKK221株、ラクトコッカス・ラクティスJCM20101株及びJCM5805株による、生菌数あたりの総核酸中の二本鎖RNAの割合を算出した結果を示す図である。

[図12]図12は、実施例に記載されている、テトラジェノコッカス・ハロフ

ィラスKK221株、ラクトコッカス・ラクティスJCM20101株及びJCM5805株による、乾燥菌体あたりの二本鎖RNAの量を測定した結果を示す図である。

[図13]図13は、実施例に記載されている、テトラジェノコッカス・ハロフィラスKK221株、ラクトコッカス・ラクティスJCM20101株及びJCM5805株による、乾燥菌体あたりの総核酸量を測定した結果を示す図である。

[図14]図14は、実施例に記載されている、テトラジェノコッカス・ハロフィラスKK221株、ラクトコッカス・ラクティスJCM20101株及びJCM5805株による、乾燥菌体あたりの総核酸中の二本鎖RNAの割合を算出した結果を示す図である。

[図15]図15は、実施例に記載されている、各種乳酸菌による、生菌数あたりの二本鎖RNAの量を測定した結果を示す図である。

[図16]図16Aおよび図16Bは、実施例に記載されている、ラクトバチルス・サケイK1株を20℃、34℃又は38℃にて培養して得られた培養殺菌処理液の 1×10^{10} cfu相当液量について、生菌数あたりの二本鎖RNA量を測定した結果を示す図である。

[図17]図17Aおよび図17Bは、実施例に記載されている、ラクトバチルス・サケイK41株を23℃、29℃又は36℃にて培養して得られた培養殺菌処理液の 1×10^{10} cfu相当液量について、生菌数あたりの二本鎖RNA量を測定した結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0022] 以下、本発明の詳細について説明する。本発明のインターフェロン λ 産生促進用組成物（以下、単に本発明の組成物とよぶ。）は、インターフェロン λ 産生促進作用を有し、かつ、有効成分としてストレス条件下で培養が可能である乳酸菌の菌体、菌体成分又は培養物を少なくとも含有する。

[0023] 本明細書における「インターフェロン λ 産生促進作用」とは、例えば、インターフェロン λ 遺伝子の発現量を促進すること、インターフェロン λ タン

パク質の翻訳量を増大すること及びインターフェロン λ 産生細胞を活性化することのうち少なくともいずれか1つの作用をいう。

[0024] 本発明の組成物が有するインターフェロン λ 産生促進作用は、本発明の組成物を供することにより惹起されるインターフェロン λ 産生促進作用であれば特に限定されないが、例えば、樹状細胞に対するインターフェロン λ 産生促進作用であり、好ましくは末梢血系樹状細胞に対するインターフェロン λ 産生促進作用であり、より好ましくはBDCA3DCに対するインターフェロン λ 産生促進作用である。

[0025] 本発明の組成物によって産生促進されるインターフェロン λ は特に限定されず、インターフェロン λ 1、インターフェロン λ 2及びインターフェロン λ 3のいずれでもよいが、好ましくはインターフェロン λ 3であり、より好ましくはBDCA3DCにおいて産生されるインターフェロン λ 3である。

[0026] 本発明の組成物は、インターフェロン λ 産生促進作用を有することにより、抗ウイルス効果、免疫賦活効果、抗感染症効果、抗B型肝炎効果、抗C型肝炎効果、抗増殖活効果、抗腫瘍効果及び抗癌効果などを奏することが期待されるものであることから、抗ウイルス剤、免疫賦活剤、抗感染症剤、抗B型肝炎剤、抗C型肝炎剤、腸管免疫賦活剤、気道免疫賦活剤、抗腫瘍剤及び抗癌剤という態様を採り得る。

[0027] 本発明の組成物が奏する抗疾患効果とは、例えば、抗ウイルス効果の場合は、摂食者における現在又は将来のウイルス性疾患若しくはウイルス性疾患に罹患しているとされる状態になることを抑制、遅滞又はその状態を改善することをいう。

[0028] 本発明の組成物が奏する免疫賦活効果とは、例えば、摂食者における現在又は将来の免疫系を活性化して、種々の疾患や異常を正常な状態になるように維持又は促進することをいう。

[0029] 乳酸菌は通常知られているとおりの乳酸を生成する微生物のことを意味する。乳酸菌としては、例えば、テトラジェノコッカス属、ペディオコッカス属、ラクトバチルス属、ストレプトコッカス属、ロイコノストック属などに

属する微生物が挙げられ、増殖性及びホモ発酵型でガス発生がないという観点からテトラジェノコッカス属、ペディオコッカス属、ラクトバチルス属が特に好ましい。

[0030] 乳酸菌としては、具体的には例えば、テトラジェノコッカス・ハロフィラスKK221株、テトラジェノコッカス・ハロフィラスNBRC12172株、ペディオコッカス・ペントサセウスOS株(NITE P-354)、ペディオコッカス・ペントサセウスNRIC1915株、ペディオコッカス・ペントサセウスNRIC0099株、ペディオコッカス・ペントサセウスNRIC0122株、ラクトバチルス・プランタラムNRIC1930株、ラクトバチルス・プランタラムNRIC1067株、ラクトバチルス・デルブリュッキー・サブスピーシーズ・ブルガリカスNRIC1688株、ラクトバチルス・デルブリュッキー・サブスピーシーズ・ラクティスNRIC1683株、ラクトバチルス・ブレビスNRIC1713株、ラクトバチルス・ペントーサスNRIC0391株、ラクトバチルス・ペントーサスNRIC0396株、ラクトバチルス・ペントーサスNRIC1836株、ラクトバチルス・カゼイ・サブスピーシーズ・カゼイNRIC0644株、ラクトバチルス・パラカゼイ・サブスピーシーズ・パラカゼイNRIC1936株、ストレプトコッカス・サーモフィラスNRIC0256株、ロイコノストック・メセンテロイデス・サブスピーシーズ・メセンテロイデスNRIC1982株、ロイコノストック・シュードメセンテロイデスATCC12291株、ロイコノストック・ラクティスNRIC1582株などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0031] ストレス条件下で培養が可能である乳酸菌は、上記した乳酸菌などのうち、二本鎖RNAの含有量が大きい乳酸菌であることが好ましく、菌体 1×10^{10} cfuあたり15,000 ng/ml以上の二本鎖RNAを含有する乳酸菌及び菌体 1×10^{10} cfuあたり総核酸中の二本鎖RNAの割合が3.5%以上である乳酸菌の少なくとも一方であることがより好ましい。

[0032] 乳酸菌が生菌である場合、菌体 1×10^{10} cfuあたり15,000 ng

／m l 以上の二本鎖RNAを含有する乳酸菌及び菌体 1×10^{10} c f u あたり総核酸中の二本鎖RNAの割合が3.5%以上であることが特に好ましい。また、乳酸菌が生菌である場合、菌体 1×10^{10} c f u あたり総核酸中の二本鎖RNAの割合が3.5%以上であることが特に好ましい。

[0033] 乳酸菌の菌体 1×10^{10} c f u あたりの二本鎖RNAの含有量の上限は特に制限されないが、通常50,000 ng / m l 以下である。また、乳酸菌の菌体 1×10^{10} c f u あたり総核酸中の二本鎖RNAの割合の上限は特に制限されないが、通常20%以下である。

[0034] ストレス条件下で培養が可能である乳酸菌の具体的態様としては、例えば、テトラジェノコッカス属の乳酸菌、ペディオコッカス属の乳酸菌、ラクトバチルス属の乳酸菌などが挙げられ、好ましくはテトラジェノコッカス・ハロフィラス、ペディオコッカス・ペントサセウス、ラクトバチルス・サケイなどが挙げられるが、これらに限定されない。

[0035] ストレス条件下で培養が可能である乳酸菌としては、増殖性及びホモ発酵型でガス発生がないという観点から、ラクトバチルス・プランタラムNRIC1067株、ラクトバチルス・デルブリュッキー・サブスピーシーズ・ラクティスNRIC1683株、ラクトバチルス・ペントーサスNRIC1836株、ストレプトコッカス・サーモフィラスNRIC0256株が好ましく、ペディオコッカス・ペントサセウスNRIC0099株、ラクトバチルス・パラカゼイ・サブスピーシーズ・パラカゼイNRIC1936株、ラクトバチルス・ブレビスNRIC1713株がより好ましく、テトラジェノコッカス・ハロフィラスKK221株、ペディオコッカス・ペントサセウスOS株(NITE P-354)がさらに好ましい。

[0036] 乳酸菌を入手する方法は特に限定されないが、例えば、市販や寄託されている乳酸菌を利用する方法、醤油諸味、漬物、市販の乳酸菌飲料などの乳酸菌含有物から分離して利用する方法などが挙げられる。

[0037] 本発明の組成物において有効成分として含有される乳酸菌は、上記した乳酸菌のうち、ストレス条件下で培養が可能である乳酸菌であれば特に限定さ

れない。ここでストレス条件とは、高塩濃度、高温又は低温、貧栄養、富栄養、低pH、高pHなどの乳酸菌を通常培養する条件から外れている条件であり、好ましくは乳酸菌の倍加時間が好適な条件で培養した場合の時間よりも長くなるような条件である。

[0038] 具体的には、高塩濃度によるストレス条件下での培養とは、例えば、塩分濃度が好ましくは0.5～30% (w/v)、より好ましくは5～15% (w/v) を含む培地を使用して培養することが挙げられる。塩分濃度が0.5% (w/v) 未満又は30% (w/v) 超の培地では、乳酸菌の増殖が極端に遅くなる場合がある。

[0039] また、高温又は低温によるストレス条件下での培養とは、例えば、乳酸菌の増殖に適した至適温度±5～20℃、好ましくは至適温度±10℃にて培養することが挙げられる。具体的には、例えば、使用する乳酸菌の至適温度が30℃であれば35～45℃又は15～25℃にて培養すること、使用する乳酸菌の至適温度が35℃であれば40～50℃又は20～30℃にて培養することなどが挙げられる。

[0040] 乳酸菌は、ストレス条件下で培養することにより、ストレスがない条件下で培養する場合と比べて、例えば、二本鎖RNAなどの菌体成分をより多く産生し得る。

[0041] ストレス条件下で培養が可能である乳酸菌は、いずれか1種を単独で、又は2種以上を組み合わせて使用できる。本発明の組成物において有効成分として含有される乳酸菌は、ストレス条件下で培養した乳酸菌であっても、通常の条件下で培養した乳酸菌であっても、いずれでもよい。例えば、ストレス条件下で培養した乳酸菌の1種又は2種以上と、通常の条件下で培養した乳酸菌の1種又は2種以上とを組み合わせる本発明の組成物に含有させ得る。

[0042] 本発明の組成物における有効成分は、ストレス条件下で培養が可能である乳酸菌それ自体、すなわち、該乳酸菌の菌体に加えて、該乳酸菌の菌体成分及び該乳酸菌の培養物であり得る。乳酸菌の菌体は、例えば、乳酸菌の培養

物を遠心分離などの通常知られている固液分離手段を用いて培地を除去することにより得られる菌体が挙げられる。

[0043] 乳酸菌の菌体成分は、例えば、乳酸菌の菌体内に存在する、又は菌体外に分泌する精製又は非精製の成分が挙げられ、具体的には一本鎖RNA及び二本鎖RNA並びに一本鎖DNA及び二本鎖DNAが挙げられる。

[0044] 乳酸菌の培養物は、例えば、乳酸菌を培養して得た培養液そのものが挙げられる。本発明の組成物における有効成分としては、ストレス条件下で培養が可能である乳酸菌の菌体、菌体成分及び培養物であれば特に限定されないが、例えば、核酸を含有する菌体、菌体成分及び培養物が好ましい。核酸としては、RNAが好ましく、二本鎖RNAがより好ましい。

[0045] ストレス条件下で培養が可能である乳酸菌の菌体、菌体成分及び培養物は、それらのいずれか1種を単独で、又は2種以上を組み合わせで使用することができる。具体的には、例えば、該乳酸菌の菌体、菌体成分及び培養物からRNA、好ましくは二本鎖RNAを単離して使用してもよい。

[0046] すなわち、本発明は、ストレス条件下で培養が可能である乳酸菌の菌体、菌体成分及び培養物から単離した二本鎖RNAを有効成分として含有する、インターフェロン λ 産生促進用組成物にも関する。また、本発明は、ストレス条件下で培養が可能である乳酸菌の菌体、菌体成分及び培養物を得ること、および該乳酸菌の菌体、菌体成分及び培養物から二本鎖RNAを単離することを含む、インターフェロン λ 産生促進用組成物の製造方法にも関する。

[0047] 乳酸菌の菌体、菌体成分及び培養物からRNAを単離する方法は特に限定されないが、例えば、乳酸菌の菌体から二本鎖RNAを単離する方法としては、特許文献3に記載の方法が挙げられる。

[0048] 二本鎖RNAを含有する乳酸菌の菌体、菌体成分又は培養物を入手する方法は特に限定されない。具体的には、例えば、テトラジェノコッカス属に属する乳酸菌を食塩5～10% (w/v) を含有するMRS培地 (BD社) に接種し、又はペディオコッカス属、ラクトバチルス属、ラクトコッカス属、ストレプトコッカス属及びロイコノストック属に属する乳酸菌を通常のMR

S培地に植菌し、20～35℃にて24～72時間培養することにより、二本鎖RNAを含有する乳酸菌の菌体、菌体成分及び培養物を入手する方法が挙げられる。

[0049] 乳酸菌の菌体、菌体成分及び培養物から二本鎖RNAを単離する方法の具体例としては、例えば、以下の方法が挙げられる。

[0050] すなわち、二本鎖RNAを含有する乳酸菌の菌体、菌体成分及び培養物を90～100℃にて5～20分間の加熱殺菌処理に供して加熱殺菌処理液を得る。次いで加熱殺菌処理液を遠心分離等の固液分離手段に供して固形分を回収する。次いで固形分を洗浄して緩衝液に懸濁して懸濁液を得る。次いで懸濁液にリゾチームを添加して35～40℃にて加温してリゾチーム処理液を得る。

[0051] 次いでリゾチーム処理液にSDS及びProteinase Kを添加して35～40℃にて加温してプロテナーゼ処理液を得る。次いでプロテナーゼ処理液をフェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール処理に供し、遠心分離等の固液分離手段により上清として粗核酸抽出液を得る。粗核酸抽出液には、DNA、一本鎖RNA、二本鎖RNAなどを含有する核酸混合物である。

[0052] 次いで、粗核酸抽出液を、セルロースカラムクロマトグラフィーに供することによって、精製された二本鎖RNAを得ることができる。セルロースカラムクロマトグラフィー及びその後の高度な精製手段は、特許文献3の記載に準じて実施することができる。

[0053] 乳酸菌の菌体、菌体成分及び培養物は、長期にわたりヒトに摂取されてきた実績のある天然物やその由来物であって安全性が高いことから、本発明の組成物は、実用性が高く、そのまま、又は加工することにより、経口的又は非経口的な形態で種々の用途に適用可能である。

[0054] 本発明の組成物は、用途に応じて、例えば、他の成分と混合して使用することができる。このように、本発明の組成物は、ストレス条件下で培養が可能である乳酸菌の菌体、菌体成分又は培養物の他に、本発明の目的を達成し

得る限り、種々のものを配合できる。

[0055] 本発明の組成物には、例えば、糖質甘味料、安定化剤、乳化剤、澱粉、澱粉加工物、澱粉分解物、食塩、着香料、着色料、酸味料、風味原料、栄養素、果汁、卵などの動植物性食材、賦形剤、増量剤、結合剤、増粘剤、香油などの通常の食品加工に使用される添加物をさらに含有することができる。添加物の使用量は、本発明の課題の解決を妨げない限り特に限定されず、適宜設定され得る。

[0056] 本発明の組成物は、通常用いられる形態であれば特に限定されず、例えば、固形状、液状、ゲル状、懸濁液状、クリーム状、シート状、スティック状、粉状、粒状、顆粒状、錠状、棒状、板状、ブロック状、ペースト状、カプセル状、カプレット状などの各形態を採り得る。

[0057] 本発明の組成物は、例えば、経口用組成物である場合に、乳酸菌の菌体、菌体成分及び培養物並びにこれらから単離した二本鎖RNAを、食道及び胃を経由して小腸へ送達し得るものとして、腸溶性組成物とすることが好ましい。腸溶性組成物は、胃酸では溶けずに小腸において溶解する形態の組成物であれば特に限定されず、例えば、耐酸性マイクロカプセルやリポソームの形態の組成物などが挙げられる。

[0058] 本発明の組成物に含有されるストレス条件下で培養が可能である乳酸菌の菌体、菌体成分又は培養物の含有量は、インターフェロン λ 産生促進作用が認められる量であれば特に限定されないが、経口用組成物としては、例えば、組成物全体に対して、好ましくは0.0001質量%以上、より好ましくは0.001質量%以上であり、上限は特に制限されないが通常50質量%以下である。非経口用組成物としては、例えば、組成物全体に対して、好ましくは0.00001質量%以上、より好ましくは0.0001質量%以上であり、上限は特に制限されないが、通常10質量%以下である。

[0059] 本発明の組成物の摂取量は特に限定されず、摂取者の症状や体格に合わせて適宜設定すればよいが、例えば、ストレス条件下で培養が可能である乳酸菌を有効成分とする組成物の摂取量は通常1～1000mg/体重60kg

／日である。

[0060] 本発明の組成物は、それ自体単独で、又は飲食品、医薬品などに添加して使用することができる。すなわち、本発明の別の態様は、本発明のインターフェロン λ 産生促進用組成物を含有する飲食品であり、例えば、機能性飲食品、特定保健用飲食品、栄養機能飲食品、保健機能飲食品、特別用途飲食品、栄養補助飲食品、健康補助飲食品、サプリメント、美容飲食品、化粧品、医薬品、医薬部外品、動物飼料などやこれらの製品を製造するための原料が挙げられる。

[0061] 本発明の製造方法は、ストレス条件下で培養が可能である乳酸菌を培養して、該乳酸菌の菌体、菌体成分又は培養物を得ることを少なくとも含む。有効成分であるインターフェロン λ 産生促進作用を示す成分が得られる限り、乳酸菌の培養条件、有効成分である菌体、菌体成分又は培養物の採取方法は特に限定されない。

[0062] 本発明の製造方法の一態様として、例えば、高塩濃度又は通常の塩濃度のMRS培地に乳酸菌を植菌し、該乳酸菌の至適温度 $\pm 5 \sim 20^{\circ}\text{C}$ にて12～72時間培養することにより培養物を得る。次いで得られた培養物から培地を限外ろ過膜や遠心濃縮機などの通常知られている固液分離手段によって培地を除去して菌体を回収する。次いで得られた菌体を水や食塩水などで洗浄することにより、乳酸菌の菌体を得ることを含む方法が挙げられる。

[0063] このようにして得られた菌体、該菌体を水や食塩水などに懸濁した菌体懸濁液、該菌体を乾燥処理に供して得られる乾燥粉末などは、本発明の組成物の有効成分として使用可能である。乾燥処理の方法は特に限定されず、例えば、自然乾燥、風乾、噴霧乾燥、凍結乾燥などが挙げられる。

[0064] 本発明の製造方法では、本発明の目的を達成し得る限り、上記した工程の前段若しくは後段又は工程中に、種々の工程や操作を加入することができる。

[0065] 以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではなく、本発明の課題を解決し得る限り、本発明は

種々の態様をとることができる。

実施例

[0066] [例1. テトラジェノコッカス属乳酸菌のインターフェロン λ 産生促進試験]

テトラジェノコッカス属に属する乳酸菌を使用し、インターフェロン λ 産生促進試験を実施した。

[0067] 1. 乳酸菌懸濁液の調製

乳酸菌としてテトラジェノコッカス・ハロフィラスKK221株 (Tetragenococcus halophilus Th221、以下、KK221株とよぶ。)を使用した。本出願人は、KK221株を下記の条件で寄託した。

(1) 寄託機関名：独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許生物寄託センター

(2) 連絡先：〒305-8566 茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6

(現：千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 120号室)

電話番号0438-20-5580

(3) 受託番号：FERM BP-10987

(4) 識別のための表示：Tetragenococcus halophilus Th221

(5) 原寄託日：2007年6月25日

(6) ブダペスト条約に基づく寄託への移管日：2008年7月16日

[0068] まず、食塩10% (w/v) を含有したMRS培地に、KK221株を 1×10^7 個/mlとなるように接種して乳酸菌原液を調製した。この乳酸菌原液を、30℃にて48~72時間静置培養した後、95℃にて10分間の煮沸殺菌処理を行うことにより、培養殺菌処理液を調製した。培養殺菌処理液を遠心分離して得た菌体を、生理食塩水にて洗浄した後、生理食塩水に 1×10^9 個/mlとなるように懸濁し、乳酸菌懸濁液を調製した。

[0069] 2. インターフェロンλ 産生促進試験

調製した乳酸菌懸濁液のインターフェロンλ の産生促進活性を、非ウイルス感染健常者の末梢血より採取及び調製した樹状細胞を用いて以下のとおりに評価した。

[0070] (1) 末梢血由来樹状細胞の採取及び調製

非ウイルス感染健常者の末梢血 200 ml から低密度勾配遠心法により単核球として、磁気細胞分離システム (Milteny 社)、セルソーター (BD 社) を用いて樹状細胞 (Dendritic cell; DC) を単離した。なお、樹状細胞は、BDCA4 陽性である plasmacytoid DC (pDC); BDCA1 が陽性であり、かつ、CD19 が陰性である myeloid cell type 1 (mDC1); 及び、BDCA3 が陽性である myeloid cell type 2 (BDCA3 DC) の 3 種の表現型サブセットで単離した。

[0071] 単離した各 DC の細胞数を測定し、 5×10^4 個/ml となるように 25 mM D-グルコース、25 mM HEPES 及び $1 \mu\text{M}$ ピルビン酸ナトリウム含有 IMDM 培地 (GIBCO 社) を用いて細胞原液を調製した。24 ウェル組織培養プレートに 1 ウェルあたり $200 \mu\text{l}$ の細胞原液を播種した。さらに、各ウェルに上記成分を含有する IMDM 培地又は乳酸菌懸濁液を、それぞれ 1 ウェルあたり $0 \mu\text{l}$ 、 $0.1 \mu\text{l}$ 、 $1 \mu\text{l}$ 、 $10 \mu\text{l}$ 及び $100 \mu\text{l}$ を加え (乳酸菌数/DC 数 = 0、10、100、1,000 及び 10,000)、 37°C にて 5% 炭酸ガス培養器内で培養し、共培養開始後 24 時間の培養上清を回収した。

[0072] (2) インターフェロンλ 産生促進活性の測定

回収した培養上清を用いて、インターフェロンλ 3 を化学発光酵素免疫測定法により、スギヤマらの文献 [Sugiyama M et al. Hepatol Res. 42 (11): 1089-1099, 2012] に記載の方法に準じて測定した。

[0073] DC として BDCA3 DC を用いた場合のインターフェロンλ 3 の測定結

果を図1に示す。図1に示すように、共培養開始後24時間目において、KK221株がBDCA3DCによるインターフェロン λ 3産生を濃度依存的に促進したことが確認された。

[0074] 乳酸菌数/DC数を100に設定し、かつ、DCとしてBDCA3CD、pDC及びmDC1を用いた場合のインターフェロン λ 3の測定結果を図2に示す。図2に示すように、共培養の開始後24時間目において、KK221株がBDCA3DC（BDCA3陽性樹状細胞）及びpDC（BDCA4陽性樹状細胞）のインターフェロン λ 3産生を促進したことが確認された。

[0075] 図1及び図2の結果より、KK221株が、ヒト樹状細胞におけるインターフェロン λ 3産生促進作用を有することが確認できた。

[0076] [例2. テトラジェノコッカス属乳酸菌から単離したRNAのインターフェロン λ 産生促進試験]

1. RNase A処理

KK221株を10mM Tris-HCl (pH8.0) を用いて 5×10^9 個/mlとなるように懸濁し、 $10 \mu\text{g/ml}$ となるように牛脾臓由来RNase A (Sigma社) をさらに添加して、RNase A含有菌懸濁液を調製した。

[0077] このRNase A含有菌懸濁液を、37℃にて2時間インキュベートすることによる酵素処理に供して、酵素処理液を得た。本酵素処理において、NaCl非存在下では1本鎖RNA及び2本鎖RNAの両方が分解される。

[0078] 得られた酵素処理液を遠心分離することにより回収した菌体を、10mM Tris-HCl (pH8.0) で2回洗浄した後に、生理食塩水に 1×10^9 個/mlとなるように懸濁し、RNA分解乳酸菌懸濁液を調製した。

[0079] 2. インターフェロン λ 産生促進活性の測定

RNA分解乳酸菌懸濁液又は例1で調製した未処理乳酸菌混濁液と、例1で調製したBDCA3DCとを一定の割合で混合し（BDCA3DC数：乳酸菌数=1：100）、これらの共培養を行った。共培養後の上清を培養開始24時間後に回収し、例1と同様にして化学発光酵素免疫測定法により、

上清中のインターフェロン λ 濃度を測定した。結果を図3に示す。

[0080] 図3に示すように、RNA分解乳酸菌懸濁液及び未処理乳酸菌混濁液のいずれを用いてもBDCA3DCのインターフェロン λ 産生を促進することが確認された。しかし、RNA分解乳酸菌懸濁液において、インターフェロン λ 産生促進活性が低下することが確認された。この結果から、ストレス条件下で培養が可能である乳酸菌内のRNAが樹状細胞を活性化してインターフェロン λ の産生を促進していることがわかった。BDCA3DCはトル様受容体(TLR)3の発現が非常に高いという特徴がある。この受容体は二本鎖RNAを認識することが知られており、菌体内の二本鎖RNAの含量、もしくは総核酸中の二本鎖RNAの割合が高いほどインターフェロン λ の産生促進が強いことが考えられる。

[0081] [例3. TLR3経路阻害剤を使用したインターフェロン λ 産生促進試験]

乳酸菌の構成成分を認識すると想定されるBDCA3DCにおけるToll様受容体(TLR)に着目し、エンドソームへの取り込みを阻害し、細胞質内に存在するTLR3への会合を阻害するクロロキン、もしくは2本鎖RNAを認識するTLR3を介するシグナル伝達のアダプター分子であるTRIFの阻害剤(製品名「TRIF/TICAM1 Peptide」; NOVUS社)を用いて、インターフェロン λ 産生促進活性を評価した。

[0082] TLR3リガンドとして化合物Poly I:C(製品名「Poly I:C」; InvivoGen社)を用いた。樹状細胞の調製、乳酸菌懸濁液の調製及びインターフェロン λ 産生促進活性の測定は例1及び例2と同様の方法で行った。なお、乳酸菌懸濁液については、例1で調製した未処理乳酸菌懸濁液を用いた。共培養開始後24時間目の上清中のインターフェロン λ 濃度を測定した。

[0083] 乳酸菌懸濁液及びPoly I:Cの添加別に、クロロキンの添加の有無によるインターフェロン λ 産生促進活性を測定した結果を図4に示す。図4に示すように、乳酸菌懸濁液及びPoly I:Cのいずれを添加した場合でも、クロロキン10 μ Mを添加することによりインターフェロン λ 産生促進活性

が低下することが確認された。

[0084] 乳酸菌懸濁液を添加し、さらにT R I F阻害剤を $0\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 及び $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加したことによるインターフェロン λ 産生促進活性を測定した結果を図5に示す。T R I F阻害剤添加により、T R I F阻害剤の濃度依存的にインターフェロン λ 産生促進活性が低下したことが確認された。

[0085] 図4及び図5の結果より、ストレス条件下で培養が可能である乳酸菌によるB D C A 3陽性樹状細胞におけるインターフェロン λ 産生促進活性は、T R I Fが関与するシグナル、つまりT L R 3からのシグナルに関係がある可能性が示唆された。

[0086] [例4. 種々の乳酸菌を使用したインターフェロン産生促進試験]

K K 2 2 1株に加えて、インターフェロン λ 産生を誘導することが知られるラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) に属するJ C M 2 0 1 0 1株及びJ C M 5 8 0 5株(特許文献1)を使用し、インターフェロン λ 産生促進試験を実施した。

[0087] J C M 2 0 1 0 1株及びJ C M 5 8 0 5株は、食塩を含有しないM R S培地に 1×10^7 個/ ml となるように接種して乳酸菌原液を調製した。この乳酸菌原液を、 30°C にて24時間静置培養した後、 95°C にて10分間の煮沸殺菌処理を行うことにより、培養殺菌処理液を調製した。培養殺菌処理液を遠心分離して得た菌体を、生理食塩水にて洗浄した後、生理食塩水に 1×10^9 個/ ml となるように懸濁し、乳酸菌懸濁液を調製した。

[0088] J C M 2 0 1 0 1株及びJ C M 5 8 0 5株を用いて調製した乳酸菌懸濁液と、例1でK K 2 2 1株を用いて調製した乳酸菌懸濁液とについて、例1と同様に樹状細胞を調製して、乳酸菌数/D C数 $=100$ になるような条件下で、各乳酸菌によるインターフェロン λ 産生促進活性の測定を実施した。結果を図6に示す。

[0089] 図6に示すように、驚くべきことに、特許文献1ではJ C M 2 0 1 0 1株及びJ C M 5 8 0 5株がインターフェロン λ の産生を促進するという記載が

あったものの、これらの菌株を用いた乳酸菌懸濁液ではBDCA3DCに対してインターフェロン λ 産生誘導作用が見られなかった。

[0090] インターフェロン λ の発現はインターフェロン α によって誘導されることが報告されていることから（例えば、J. Viral, 2006, Vol. 80, No. 19, pp. 4501-4509を参照）、特許文献1に記載されているJCM20101株及びJCM5805株のインターフェロン λ の産生誘導は、JCM20101株及びJCM5805株によるインターフェロン α 産生誘導の結果として生じたものと推察される。

[0091] なお、同様にして、KK221株、JCM20101株及びJCM5805株を用いて調製した乳酸菌懸濁液とpDCとを、乳酸菌数/DC数=100になるように調製して共培養することにより、各乳酸菌によるインターフェロン α 産生促進活性の測定を実施した。インターフェロン α は、回収した培養上清を用いて、インターフェロン α のCBA (cytometric beads assay; BD社)を用いて、測定した。結果を図7に示す。

[0092] 図7に示すように、特許文献1が示すとおり、JCM20101株及びJCM5805株は、pDCに対してインターフェロン α 産生促進活性があることが示された。また、図2に示す結果より、pDCについてもインターフェロン λ 産生促進活性がみられることから、特許文献1に記載されているJCM20101株及びJCM5805株によるインターフェロン λ 産生促進作用は、pDCに対する作用であることが示唆される。

[0093] [例5. KK221株によるサイトカイン産生促進試験]

例1に準じて、KK221株を用いて調製した乳酸菌懸濁液又はPoly I CとBDCA3DCとを、乳酸菌数/DC数=100になるように調製して共培養することにより、各種サイトカイン産生促進活性の測定を実施した。

[0094] なお、TNF α 、IL-10、IL-1 β 、IL-6及びIL-12p70は、それぞれCBA (cytometric beads assay

；BD社）を用いて測定した。結果を図8Aおよび図8Bに示す。

[0095] 図8Aおよび図8Bに示すように、Poly I Cはインターフェロンス（IL28B）に加えて、TNF α 、インターフェロンス α 及びIL-6などを非特異的に産生促進していることに対して、KK221株はインターフェロンスに対して特異的に産生促進していることが確認できた。

[0096] Poly I Cによって産生誘導されるTNF α は典型的な炎症性サイトカインであり、TNF α により生体内では炎症反応が起こる。それに対して、KK221株は、炎症反応を起こすことなく、インターフェロンスを特異的に産生促進できることから、インターフェロンスによって期待される生理作用を誘起するものとして非常に有用であることが確認された。

[0097] [例6. 各種乳酸菌の生菌数あたりの二本鎖RNAの量及び割合の評価]

KK221株、JCM20101株及びJCM5805株の生菌数あたりの二本鎖RNA（以下dsRNAとも略す）量、総核酸量及び総核酸中の二本鎖RNAの割合（dsRNA量／総核酸量 $\times$ 100）を以下のとおりに測定した。

[0098] 食塩10%（w／v）を含有したMRS培地に、KK221株を 1×10^7 個／mlとなるように接種して乳酸菌原液を調製した。この乳酸菌原液を、30℃にて48時間静置培養して、KK221株培養液を得た。

[0099] また、食塩を含有しないMRS培地に、JCM20101株及びJCM5805株をそれぞれ 1×10^7 個／mlとなるように接種して乳酸菌原液を調製した。この乳酸菌原液を、30℃にて24時間静置培養して、JCM20101株培養液及びJCM5805株培養液を得た。

[0100] KK221株培養液の一部を採取し段階希釈して、食塩5%（w／v）を含有したMRS寒天培地を用いて培養することによりコロニー数をカウントした。また、JCM201021株培養液及びJCM5805株培養液の一部を採取し段階希釈して、食塩を含有しないMRS寒天培地を用いて培養することによりコロニー数をカウントした。

[0101] KK221株培養液、JCM20101株培養液及びJCM5805株培

養液のその余の部分について、95℃にて15分間の煮沸殺菌処理を行うことにより、各培養殺菌処理液を調製した。カウントしたコロニー数に基づいて、各培養殺菌処理液の 1×10^{10} cfu相当液量を採取した。

[0102] 採取した各液量を8500×gで15分間遠心分離し固形分を回収した。次いで固形分をSTE緩衝液で洗浄してSTE緩衝液に懸濁して懸濁液を得た。次いで懸濁液にSTE緩衝液に懸濁したリゾチーム（Sigma-Aldrich社）溶液（終濃度5mg/mL）を添加して37℃にて30分間加温してリゾチーム処理液を得た。次いでリゾチーム処理液に10%SDS（和光純薬工業）及びProteinase K（タカラバイオ社）を添加して37℃にて1時間加温してプロテナーゼ処理液を得た。

[0103] 次いでプロテナーゼ処理液をフェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール（和光純薬工業）で処理し、8500×gで15分間遠心分離し上清として粗核酸抽出液を得た。粗核酸抽出液に含まれる総核酸量を超微量分光光度計（製品名「ナノドロップ」、Thermo Fisher Scientific社）を用いて測定した。粗核酸抽出液から、ELISA法で二本鎖RNAを定量した。

[0104] 採取した各液量からRNAを抽出し、総核酸量を超微量分光光度計（製品名「ナノドロップ」、Thermo Fisher Scientific社）を用いて測定した。抽出したRNAから、さらに二本鎖RNAを抽出し、ELISA法で定量した。

[0105] 測定して得られた二本鎖RNA量、総核酸量及び総核酸中の二本鎖RNAの割合をそれぞれ図9～11に示す。検定は、KK221株とJCM20101株又はJCM5805株との間における2群間比較（対応のないt検定）により行った。有意水準は、危険率5%（図中の「*」）又は1%（「**」）とした。

[0106] 図9～11に示すように、KK221株の二本鎖RNA量はJCM20101株及びJCM5805株の二本鎖RNA量に対して大きかった。特に、KK221株の総核酸中の二本鎖RNAの割合は、JCM20101株及び

JCM5805株のその割合に対して、統計的に有意に大きかった。この結果から、ストレス条件下で培養が可能である乳酸菌内の二本鎖RNAが樹状細胞を活性化してインターフェロン λ の産生を促進しており、二本鎖RNA量が多いほど、又は総核酸中の二本鎖RNAの割合が高いほどインターフェロン λ 産生促進作用が向上すると考えられる。

[0107] また、図9および図11それぞれに示すように、生菌数あたりの二本鎖RNA量が12184~13819 ng/mLより多い量である、又は生菌数あたりの総核酸中の二本鎖RNAの割合が2.6454~3.1530%より多い量である乳酸菌は、BDCA3DCに対してインターフェロン λ 産生促進作用を有する乳酸菌であることがわかった。

[0108] [例7. 各種乳酸菌の乾燥菌体量あたりの二本鎖RNAの量及び割合の評価]

KK221株、JCM20101株及びJCM5805株の乾燥菌体量あたりのdsRNA量、総核酸量及び総核酸中の二本鎖RNAの割合を以下のとおりに測定した。

[0109] 食塩10% (w/v) を含有したMRS培地に、KK221株を 1×10^7 個/mLとなるように接種して乳酸菌原液を調製した。この乳酸菌原液を、30℃にて48時間静置培養して、KK221株培養液を得た。

[0110] また、食塩を含有しないMRS培地に、JCM20101株及びJCM5805株をそれぞれ 1×10^7 個/mLとなるように接種して乳酸菌原液を調製した。この乳酸菌原液を、30℃にて24時間静置培養して、JCM20101株培養液及びJCM5805株培養液を得た。

[0111] KK221株培養液、JCM20101株培養液及びJCM5805株培養液を、95℃にて15分間の煮沸殺菌処理に供することにより、各培養殺菌処理液を調製した。各培養殺菌処理液を遠心分離して得た菌体を、生理食塩水にて洗浄した後、再度遠心分離して得た3菌体を凍結乾燥させた。

[0112] 採取した凍結乾燥粉末5 mgを用いて、例6と同様にして、RNA抽出、総核酸量測定、二本鎖RNA抽出及び二本鎖RNA量測定を実施した。各凍

結乾燥粉末 5 m g 中の二本鎖 R N A 量、総核酸量及び総核酸中の二本鎖 R N A の割合をそれぞれ図 1 2 ～ 1 4 に示す。

[0113] 図 1 2 ～ 1 4 に示すように、K K 2 2 1 株の総核酸中の二本鎖 R N A の割合は、J C M 2 0 1 0 1 株及び J C M 5 8 0 5 株のその割合に対して、統計的に有意に大きかった。この結果から、ストレス条件下で培養が可能である乳酸菌内の二本鎖 R N A が樹状細胞を活性化してインターフェロン λ の産生を促進しており、総核酸中の二本鎖 R N A の割合が高いほどインターフェロン λ 産生促進作用が向上すると考えられる。

[0114] また、図 1 4 に示すように、乾燥菌体量あたりの総核酸中の二本鎖 R N A の割合が 3. 1 6 7 3 ～ 3. 5 8 9 8 % より多い量である乳酸菌は、B D C A 3 D C に対してインターフェロン λ 産生促進作用を有する乳酸菌であることがわかった。

[0115] [例 8. 各種乳酸菌の生菌数あたりの二本鎖 R N A 量の評価]

培養殺菌処理液の 5×10^9 c f u 相当液量を用いた以外は、例 6 と同様に、各種乳酸菌の生菌数あたりの二本鎖 R N A 量を測定した。

[0116] 使用した乳酸菌は、テトラジェノコッカス・ハロフィラス (T e t r a g e n o c o c c u s h a l o p h i l u s) K K 2 2 1 株、K 1 1 2 1 株及び K 1 1 4 2 株；ラクトバチルス・サケイ (L a c t o b a c i l l u s s a k e i) K 1 株、K 4 1 株及び K 1 1 8 5 株；ラクトバチルス・サリバリウス (L a c t o b a c i l l u s s a l i v a r i u s) K 5 9 8 株、K 1 1 8 2 株及び K 1 1 8 3 株；並びに、ラクトコッカス・ラクティス (L a c t o c o c c u s l a c t i s) K 4 3 6 株、K 5 5 0 株及び K 1 1 1 8 株を用いた。

[0117] これらの乳酸菌のうち、K 1 1 8 5 株及び K 1 1 1 8 株は、独立行政法人製品評価技術基盤機構特許生物寄託センター (N I T E - I P O D) に寄託されており、受託番号はそれぞれ N B R C 1 5 8 9 3 及び N B R C 1 0 0 9 3 3 である。

[0118] また、K 1 1 8 2 株及び K 1 1 8 3 株は、A T C C (A m e r i c a n

Type Culture Collection) より分譲を受けたものであり、ATCC番号はそれぞれ13419及び25975である。

[0119] K1121株、K1142株、K1株、K41株、K598株、K436株、K550株はキッコーマン株式会社において発酵食品等から分離した乳酸菌である。

[0120] その余の乳酸菌は、本願出願人により分離及び単離された菌株である。また、ポジティブ・コントロールとして、SoyLactic（登録商標；キッコーマン社）を使用した。ポジティブ・コントロールの二本鎖RNA測定値を100とした場合の、各乳酸菌の二本鎖RNA測定値の測定結果を図15に示す。

[0121] 図15に示すように、テトラジェノコッカス・ハロフィラスの3株及びラクトバチルス・サケイの3株の二本鎖RNA量は多かったのに対し、ラクトバチルス・サリバリウスの3株及びラクトコッカス・ラクティスの2株は二本鎖RNA量が少なかった。

[0122] 上述したように、ストレス条件下で培養が可能である乳酸菌体内の二本鎖RNAがTLR3を介して樹状細胞を活性化してインターフェロン λ の産生を促進しており、二本鎖RNA量が多いほどインターフェロン λ 産生促進作用が向上すると考えられる。したがって、これらの結果より、テトラジェノコッカス・ハロフィラスの3株及びラクトバチルス・サケイの3株は、BDCA3DCに対するインターフェロン λ 産生促進作用を有する可能性が示唆された。

[0123] また、ラクトバチルス・サケイK1株及びK41株について、各温度で培養して得られた培養殺菌処理液の 1×10^{10} cfu相当液量を用いて、生菌数あたりの二本鎖RNA量を測定した結果を図16A及び図16B並びに図17A及び図17Bにそれぞれ示す。

[0124] 図16A及び図16B並びに図17A及び図17Bに示すように、ラクトバチルス・サケイの2株の二本鎖RNA量は、至適温度よりも高温（38℃若しくは36℃）下又は低温（20℃若しくは23℃）下で培養した場合に

、二本鎖RNA量が多くなることを確認した。

[0125] これらの結果より、ストレス条件下で培養した乳酸菌は、二本鎖RNA量が多くなることから、BDCA3DCに対するインターフェロン λ 産生促進作用を有する可能性が示唆された。

[0126] 本発明を特定の態様を用いて詳細に説明したが、本発明の意図と範囲を離れることなく様々な変更および変形が可能であることは、当業者にとって明らかである。なお、本出願は、2016年4月4日付けで出願された日本特許出願（特願2016-075323号）に基づいており、その全体が引用により援用される。

産業上の利用可能性

[0127] 本発明の組成物及び本発明の製造方法によって得られる組成物は、経口的及び非経口的のいずれの態様においても適用可能な有効成分を含むものであり、インターフェロン λ 産生促進作用を通じて、抗ウイルス活性、免疫賦活活性、抗感染症活性、抗B型肝炎活性、抗C型肝炎活性、抗増殖活性、抗腫瘍活性、抗癌活性を期待する摂取者にとって有用なものであり、このような摂取者の健康及び福祉に資する飲食品、医薬品、医薬部外品、化粧品、サプリメントなどとして利用可能なものである。

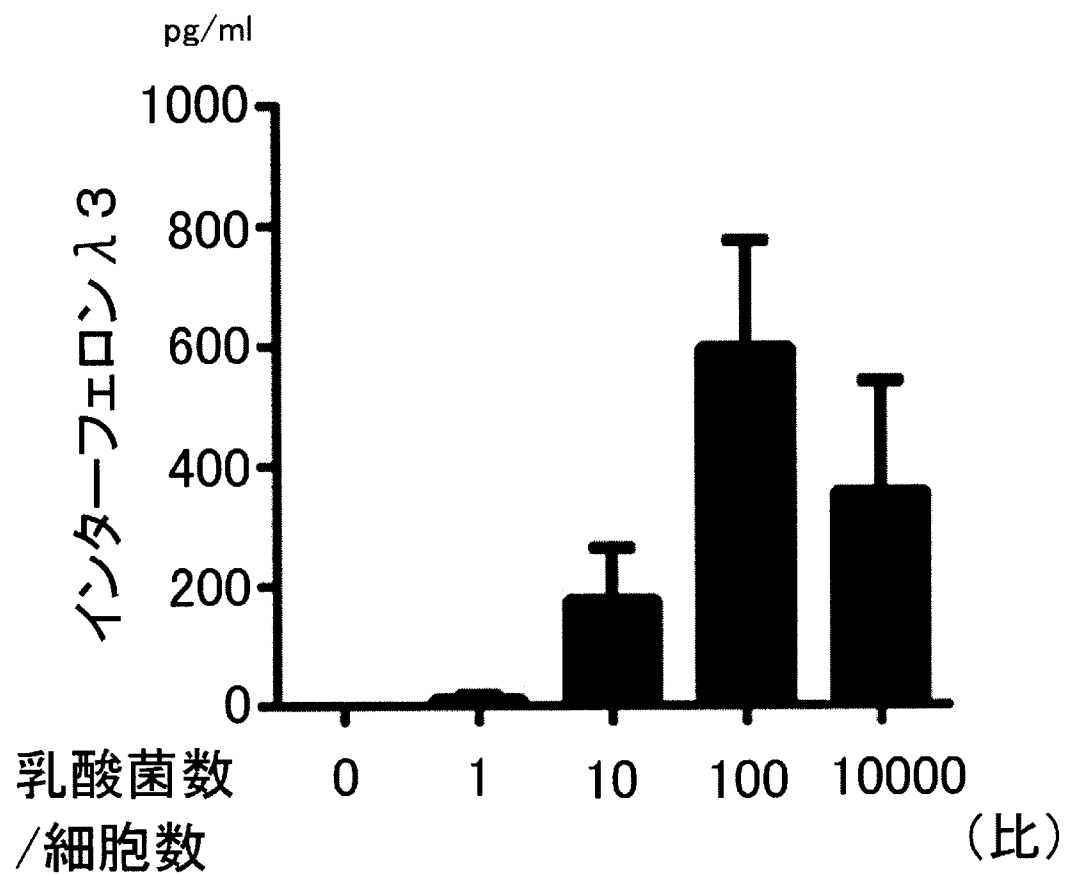
請求の範囲

- [請求項1] ストレス条件下で培養が可能である乳酸菌の菌体、菌体成分又は培養物を有効成分として含有する、インターフェロン λ 産生促進用組成物。
- [請求項2] 前記インターフェロン λ 産生促進用組成物は、B D C A 3 D Cに対するインターフェロン λ 産生促進用組成物である、請求項1に記載のインターフェロン λ 産生促進用組成物。
- [請求項3] 前記インターフェロン λ は、インターフェロン λ 3である、請求項1又は2に記載のインターフェロン λ 産生促進用組成物。
- [請求項4] 前記菌体、前記菌体成分及び前記培養物は、それぞれ核酸を含有する菌体、菌体成分及び培養物である、請求項1～3のいずれか1項に記載のインターフェロン λ 産生促進用組成物。
- [請求項5] 前記ストレス条件下で培養が可能である乳酸菌は、菌体 1×10^{10} c f uあたり15, 000 ng/ml以上の二本鎖RNAを含有する乳酸菌及び菌体 1×10^{10} c f uあたり総核酸中の二本鎖RNAの割合が3.5%以上である乳酸菌の少なくとも一方である、請求項4に記載のインターフェロン λ 産生促進用組成物。
- [請求項6] 前記インターフェロン λ 産生促進用組成物が、インターフェロン λ 産生促進用腸溶組成物である、請求項1～5のいずれか1項に記載のインターフェロン λ 産生促進用組成物。
- [請求項7] 請求項1～6のいずれか1項に記載のインターフェロン λ 産生促進用組成物を含有する飲食品。
- [請求項8] ストレス条件下で培養が可能である乳酸菌を培養して、該乳酸菌の菌体、菌体成分又は培養物を得ることを含む、インターフェロン λ 産生促進用組成物の製造方法。
- [請求項9] ストレス条件下で培養が可能である乳酸菌の菌体、菌体成分又は培養物を使用してインターフェロン λ の産生を促進する方法。
- [請求項10] インターフェロン λ 産生促進用組成物の製造のためのストレス条件

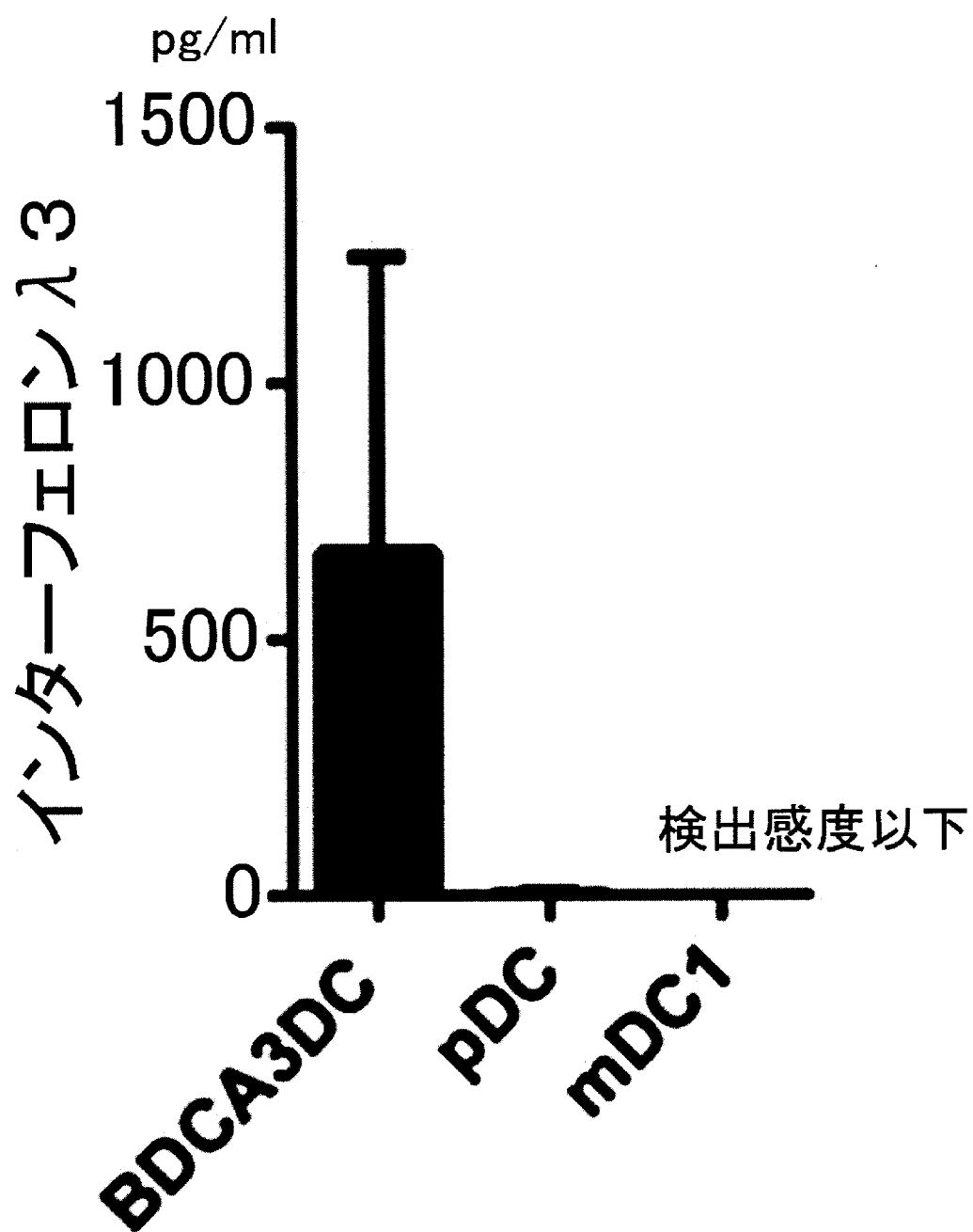
下で培養が可能である乳酸菌の菌体、菌体成分又は培養物の使用。

[請求項11] インターフェロンλの産生を促進するためのストレス条件下で培養が可能である乳酸菌の菌体、菌体成分又は培養物の使用。

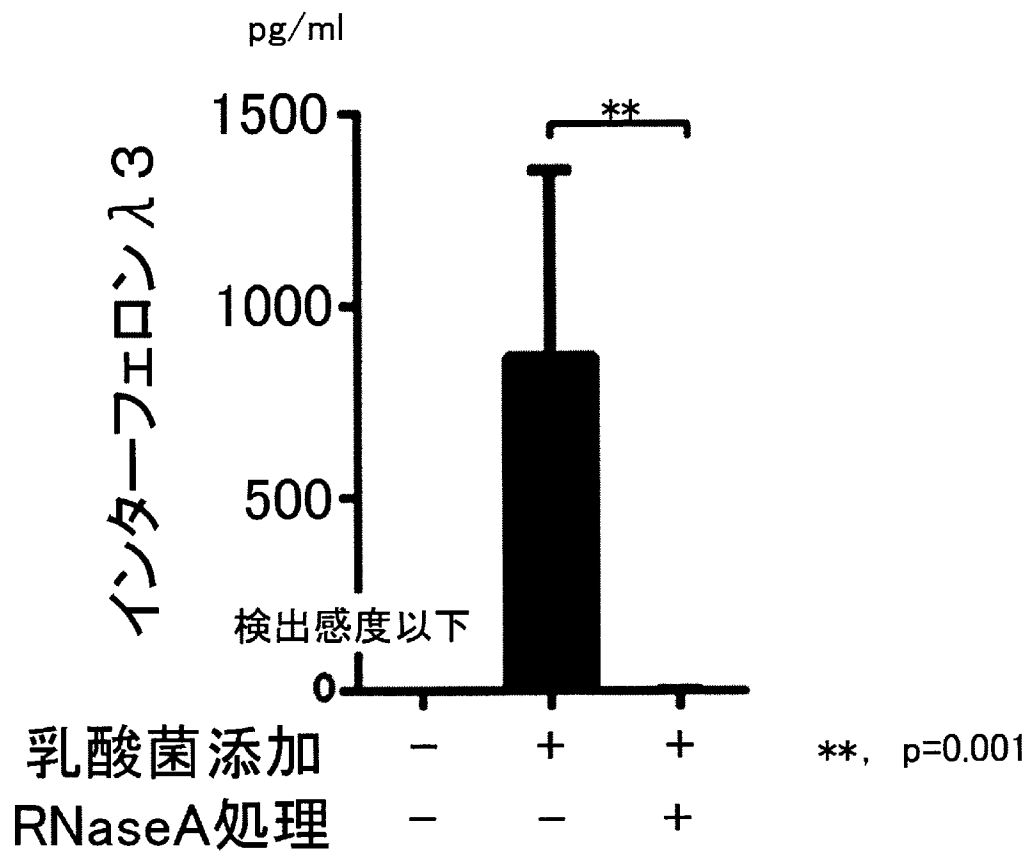
[図1]



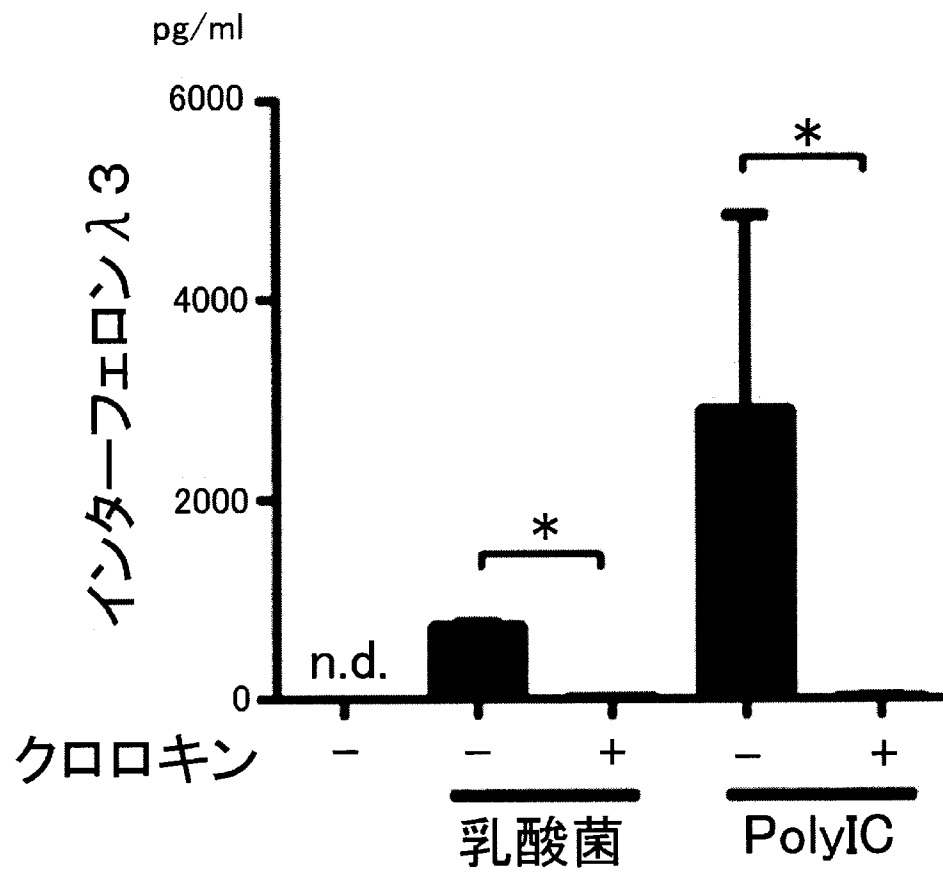
[図2]



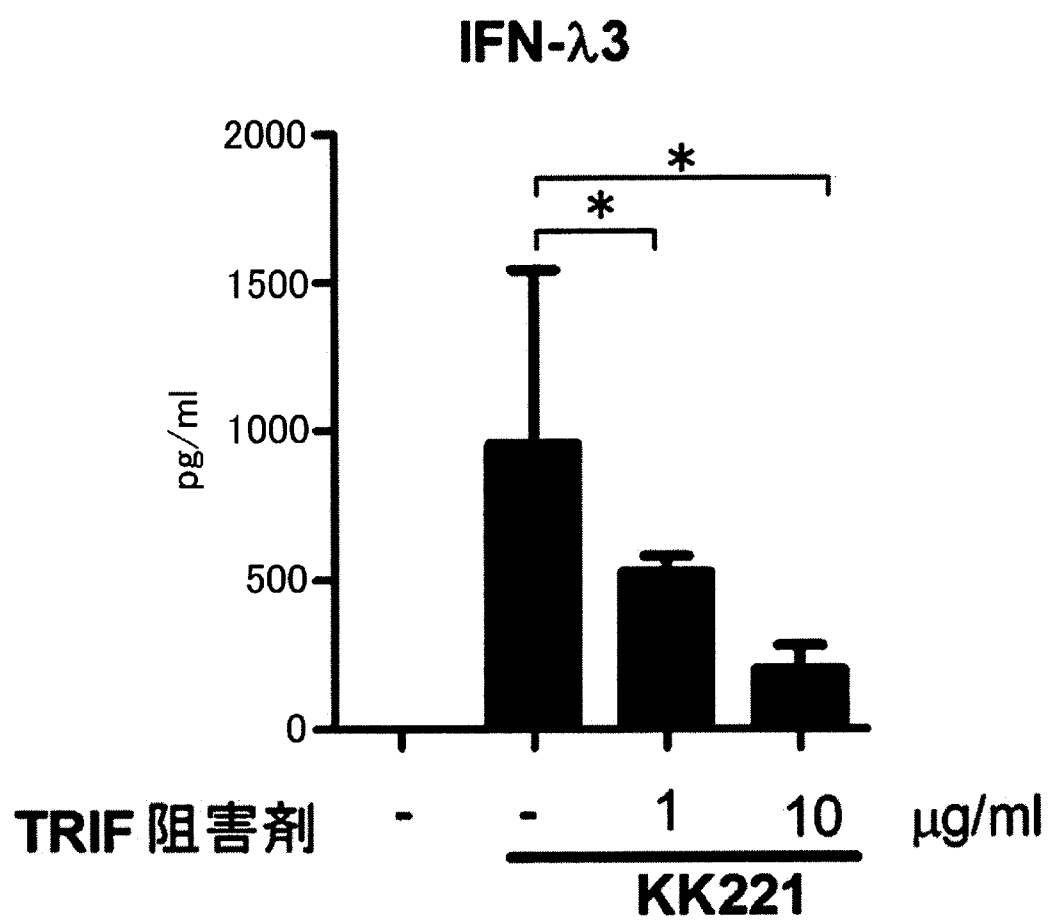
[図3]



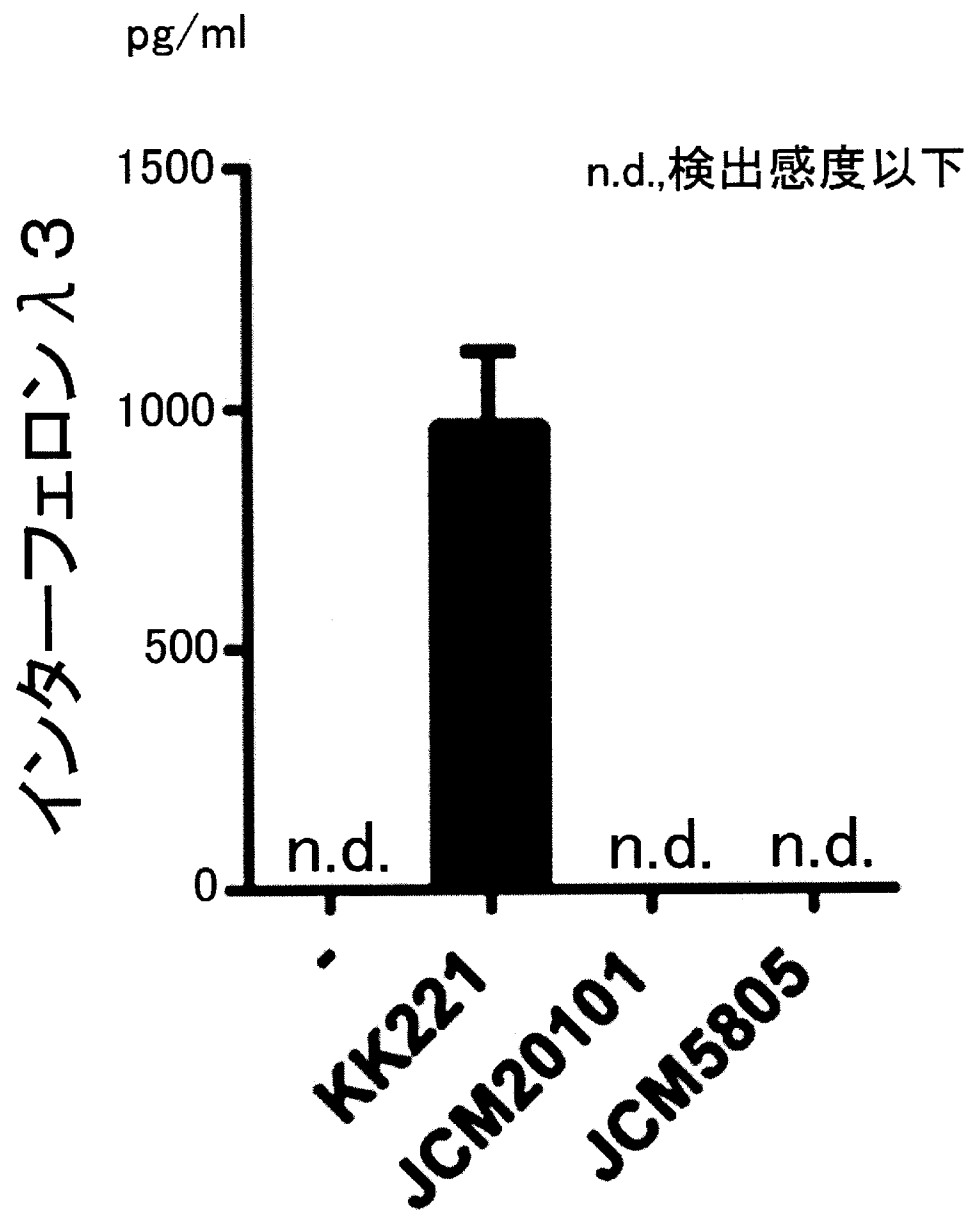
[図4]



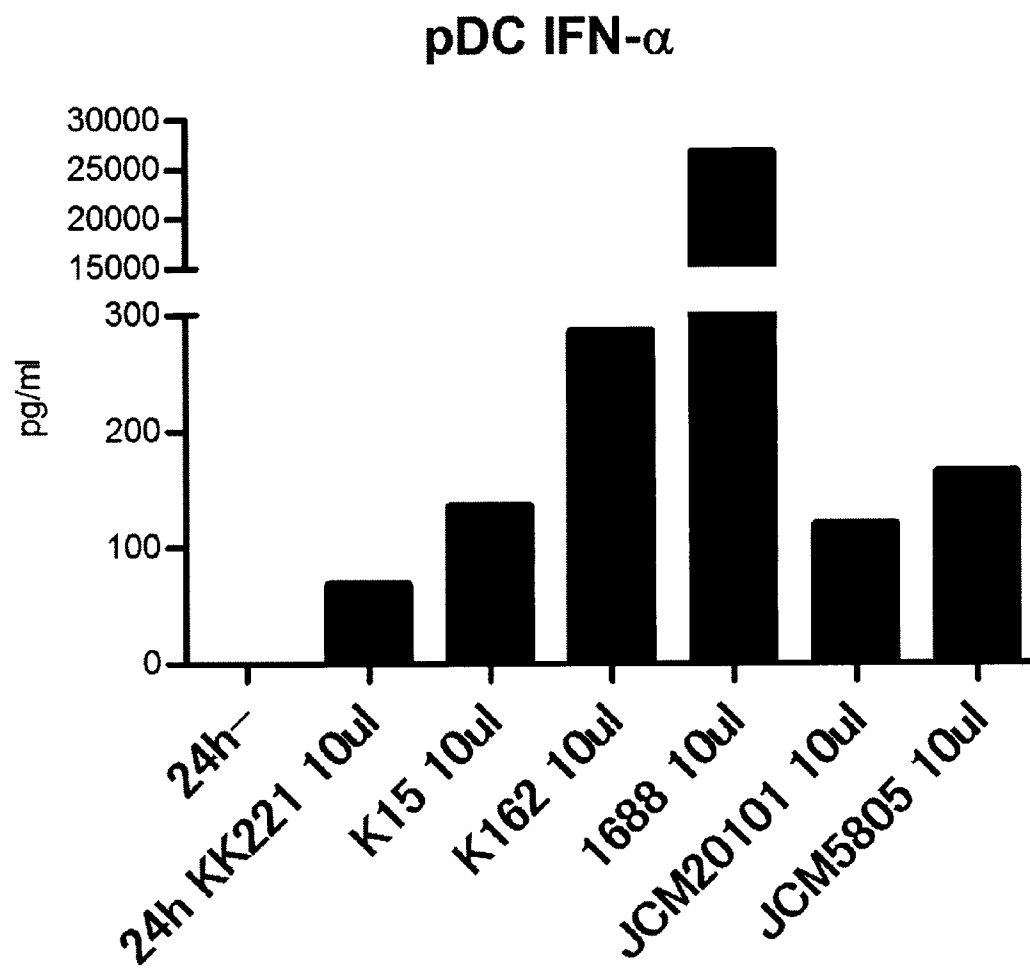
[図5]



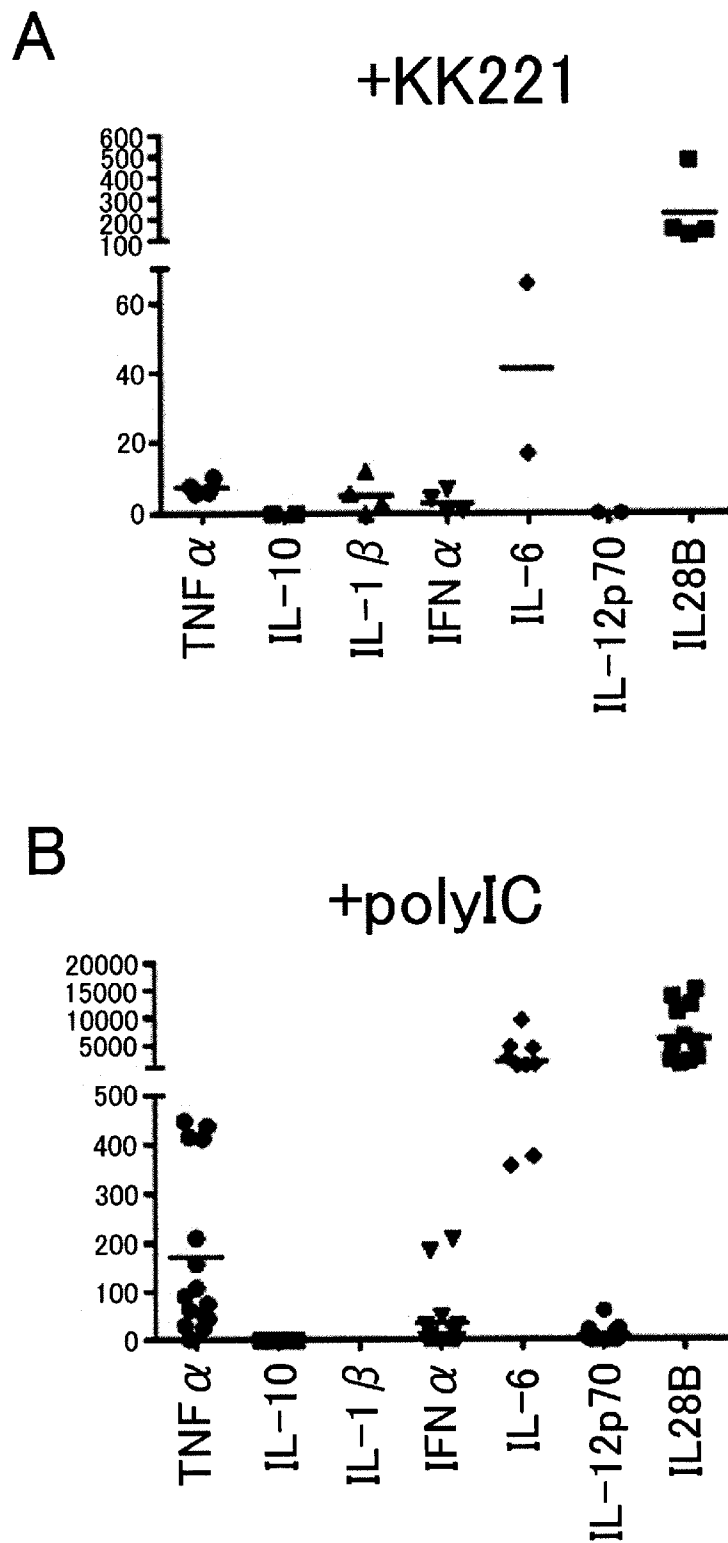
[図6]



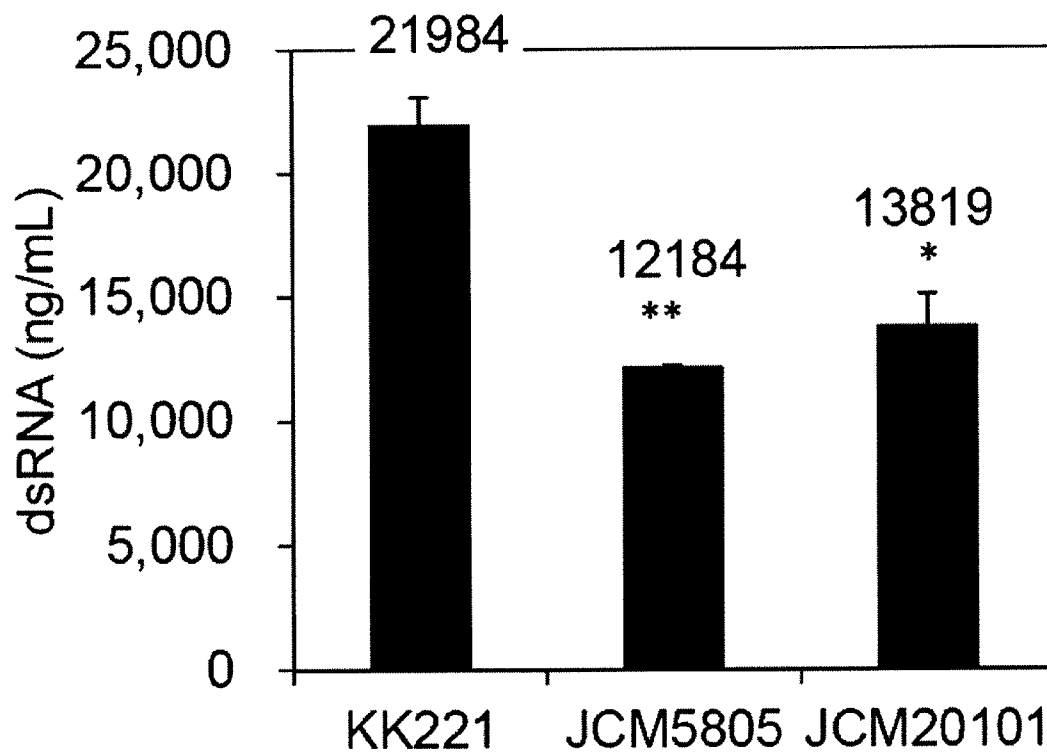
[図7]



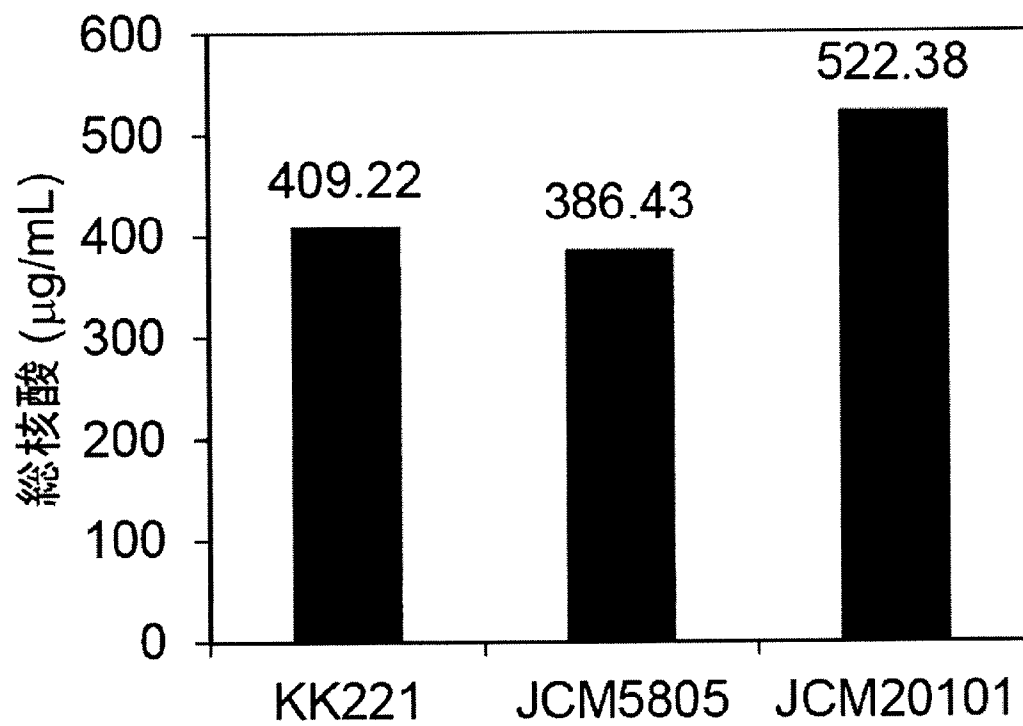
[図8]



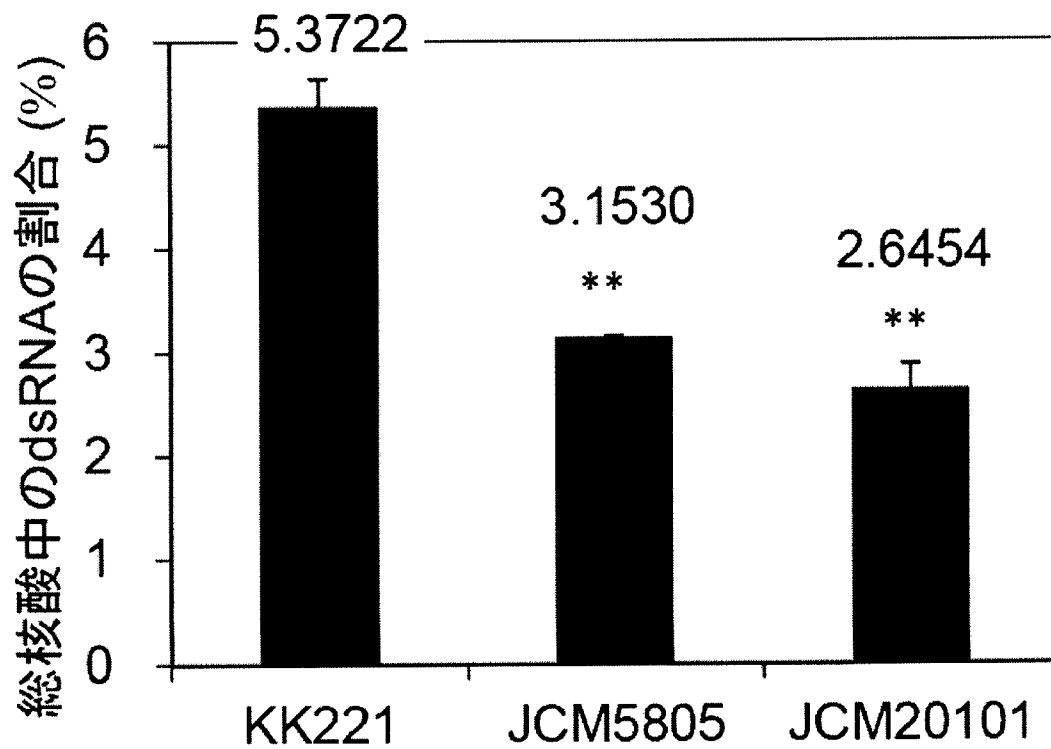
[図9]



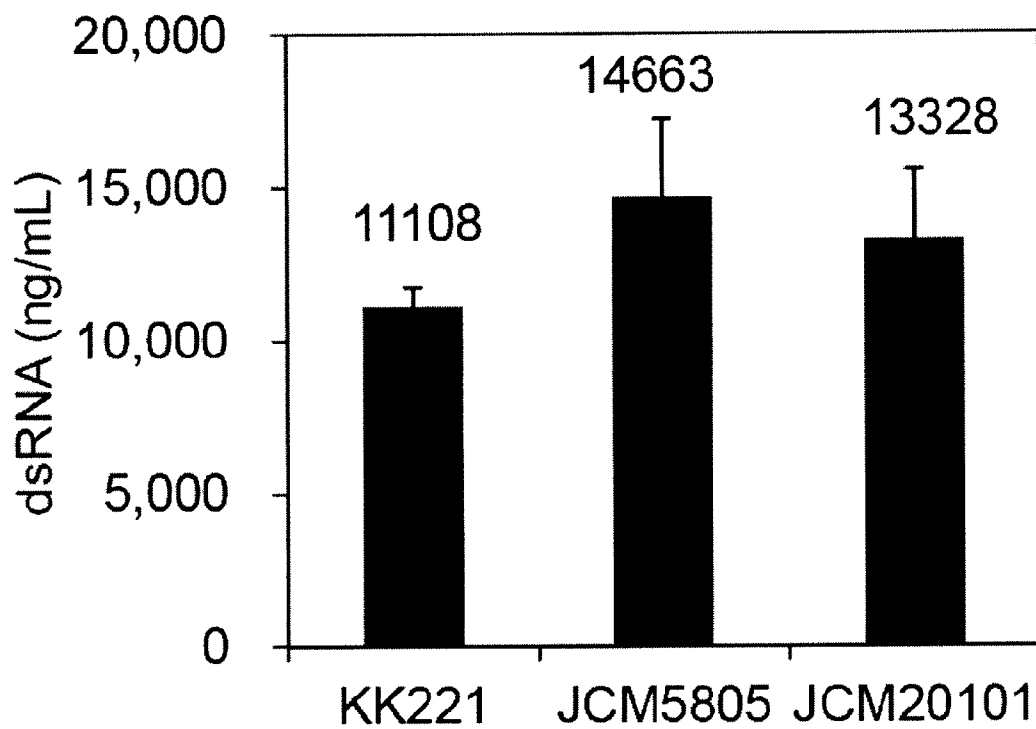
[図10]



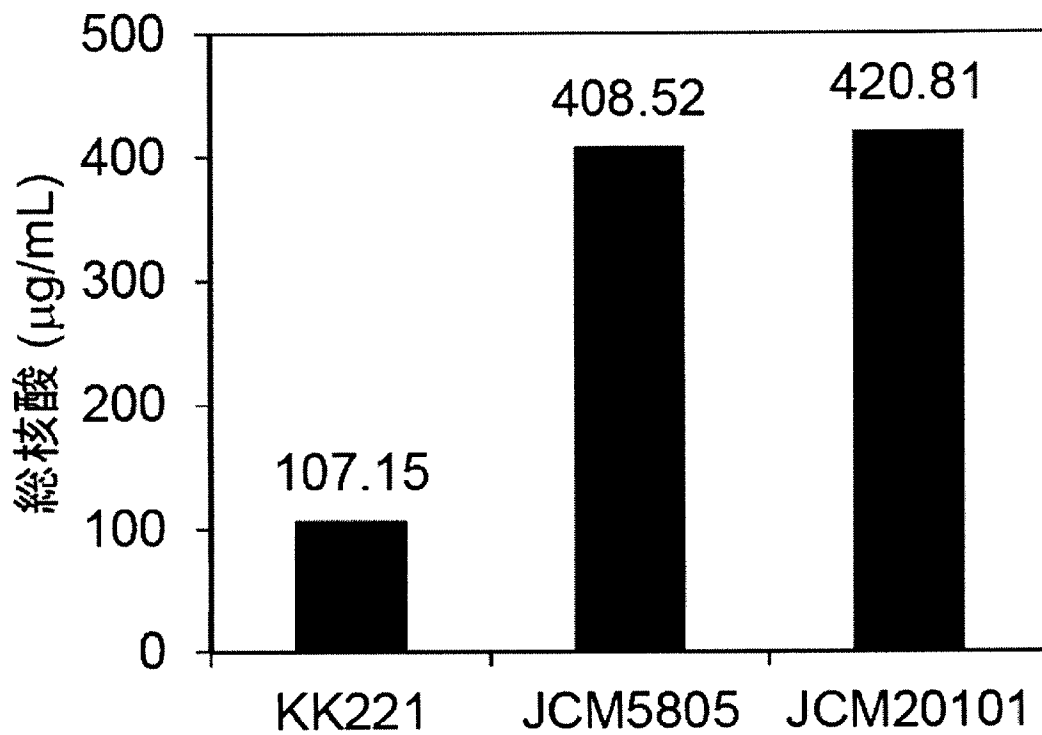
[図11]



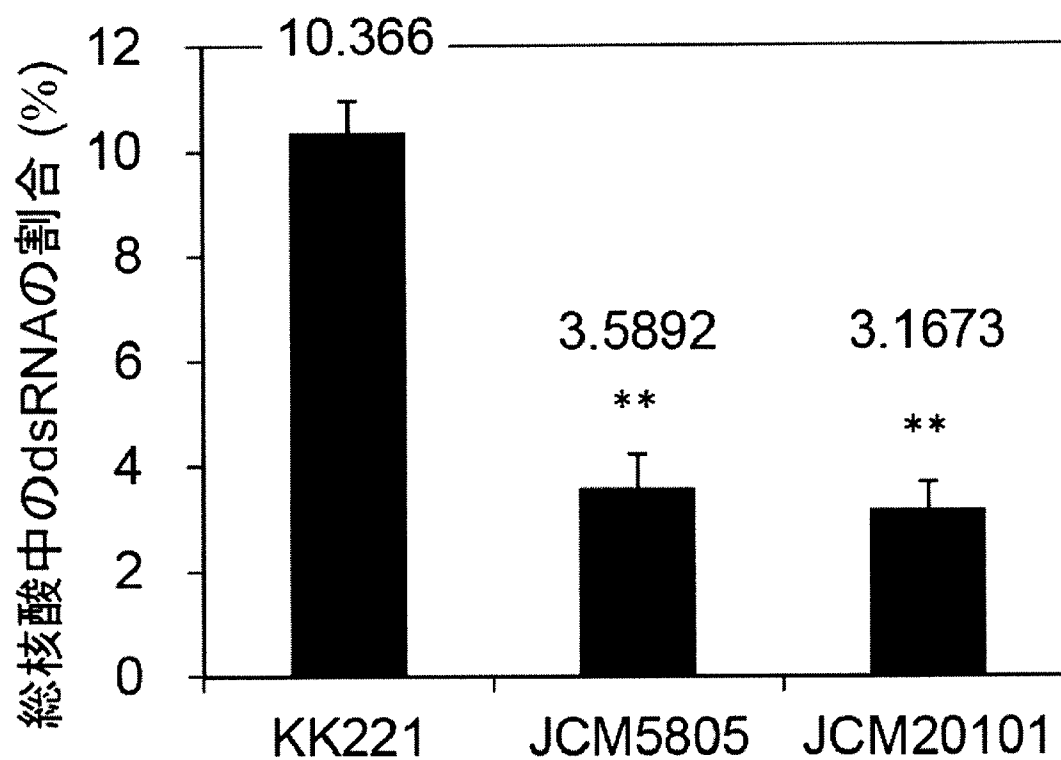
[図12]



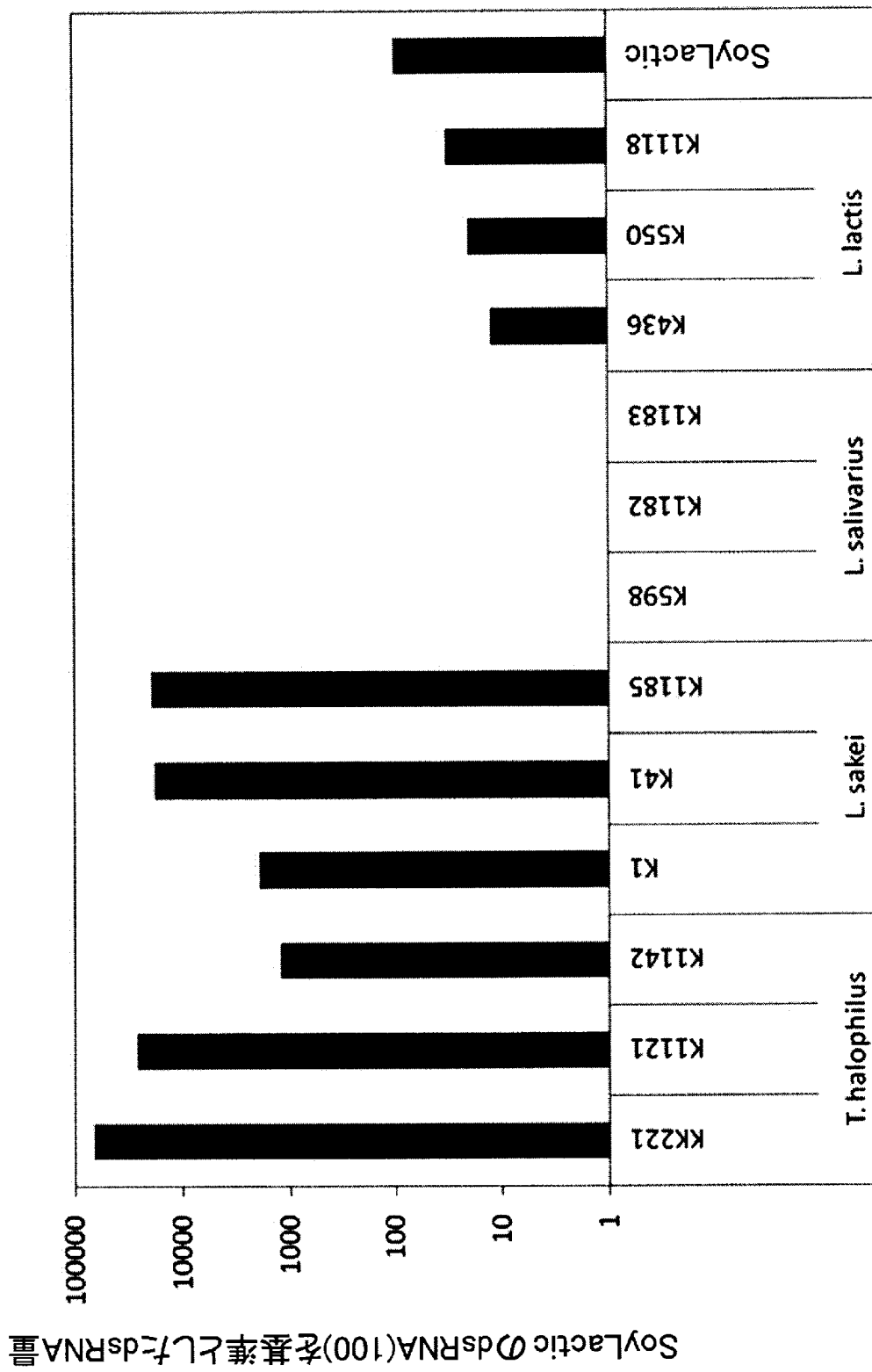
[図13]



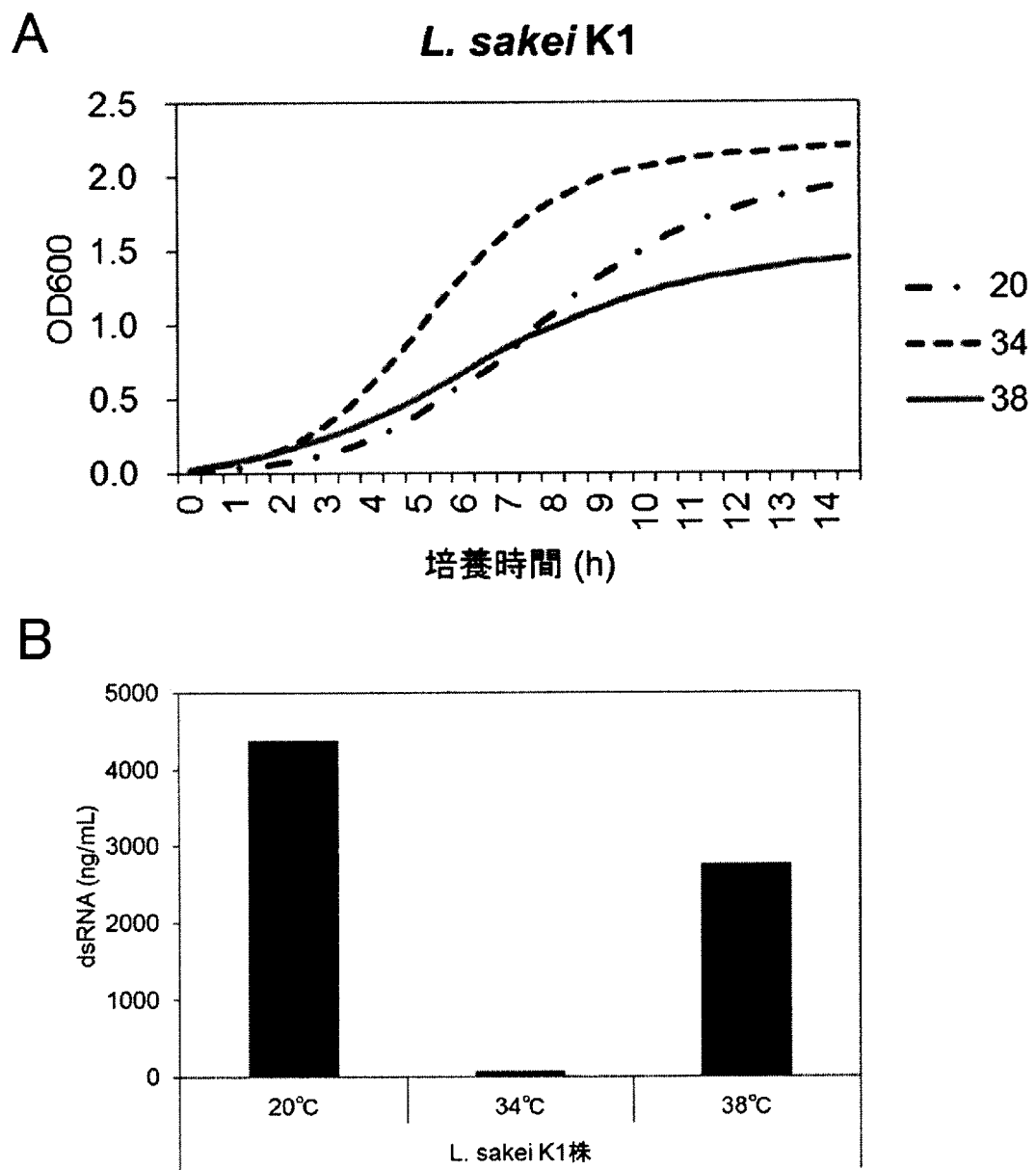
[図14]



[図15]

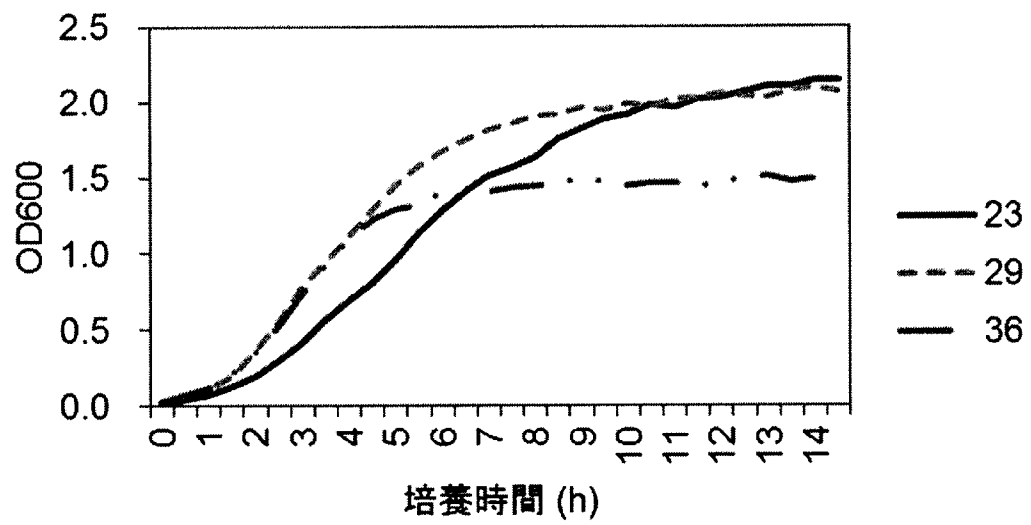


[図16]

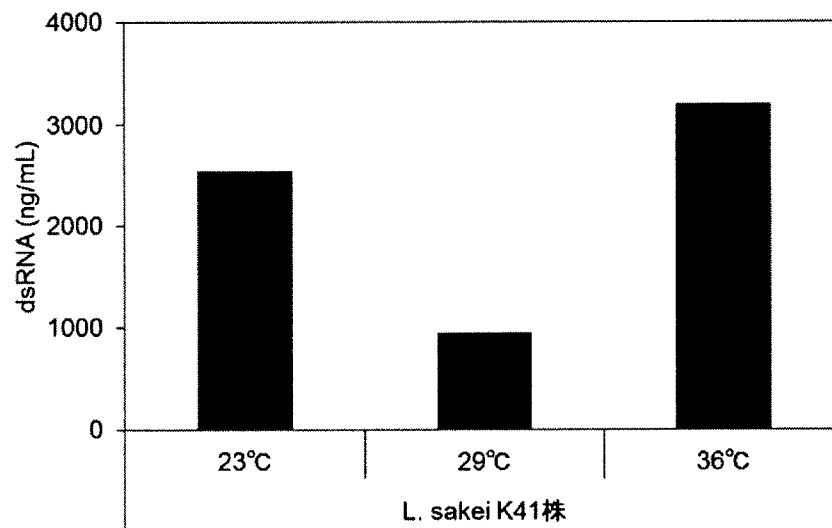


[図17]

A

L. sakei K41

B



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/014153

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K35/744(2015.01)i, A61P1/16(2006.01)i, A61P31/04(2006.01)i, A61P31/12(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P37/04(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

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)

A61K35/744, A61P1/16, A61P31/04, A61P31/12, A61P35/00, A61P37/04, A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII),
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2009/005124 A1 (Kikkoman Corp.), 08 January 2009 (08.01.2009), paragraphs [0009], [0010], [0019], [0020] & JP 5099649 B2 & US 2011/0159552 A1 paragraphs [0034], [0035], [0094], [0096] & EP 2169057 A1 & CA 2694354 A & CN 101796187 A	1-5, 7, 8, 10 1-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"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)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"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
"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
"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
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
07 June 2017 (07.06.17)

Date of mailing of the international search report
27 June 2017 (27.06.17)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/014153

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2012/091081 A1 (Kirin Holdings Co., Ltd.), 05 July 2012 (05.07.2012), claim 5; paragraphs [0001], [0029], [0035], [0037] & JP 2016-73314 A & JP 5950827 B2 & US 2013/0302380 A1 claim 5; paragraphs [0001], [0084], [0090], [0092] & US 2014/0234379 A1 & US 2017/0106028 A1 & EP 2659898 A1 & AU 2011350554 A & NZ 613335 A & AU 2015268629 A	1-11
Y	LAUTERBACH, H. et al, Mouse CD8 α ⁺ DCs and human BDCA3 ⁺ DCs are major producers of IFN- λ in response to poly IC., Journal of Experimental Medicine, 2010, 207(12), p.2703-2717, abstract	1-11
Y	YOSHIO, S. et al, Human Blood Dendritic Cell Antigen 3 (BDCA3) ⁺ Dendritic Cells Are a Potent Producer of Interferon- λ in Response to Hepatitis C Virus., Hepatology, 2013, 57(5), p.1705-1715, abstract	3-7
Y	Sachiyo YOSHIO et al., "C-gata Mansei Kan'en Kanja ni Okeru IFN λ Kosansei Jujo Saibo Subset (BDCA3+DC) no Igi", Acta Hepatologica Japonica, 2012, 53 (no.Supplement 1), page A340, OWS-282, column of [Seiseki]	3-7
A	JP 2013-514062 A (Bavarian Nordic A/S), 25 April 2013 (25.04.2013), & JP 2016-121157 A & US 2012/0258082 A1 & WO 2011/072871 A1 & WO 2012/065755 A1 & EP 2513311 A1 & AU 2010333322 A & CA 2783510 A & NZ 599677 A	1-11
A	JIANG, M. et al, Innate Immune Responses in Human Monocyte-Derived Dendritic Cells Are Highly Dependent on the Size and the 5' Phosphorylation of RNA Molecules., Journal of Immunology, 2011, 187(4), p.1713-1721	1-11
A	Tadaomi KAWASHIMA et al., "Lactic acid bacteria induces IFN-beta secretion by dendritic cells through toll-like receptors in endosomes", Proceedings of the Japanese Society for Immunology, 2009, 39, page 181, 3-B-W45-7-O/P	1-11

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K35/744(2015.01)i, A61P1/16(2006.01)i, A61P31/04(2006.01)i, A61P31/12(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P37/04(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K35/744, A61P1/16, A61P31/04, A61P31/12, A61P35/00, A61P37/04, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	WO 2009/005124 A1 (キッコーマン株式会社) 2009.01.08, 段落 0009, 0010, 0019, 0020 & JP 5099649 B2 & US 2011/0159552 A1, [0034], [0035], [0094], [0096] & EP 2169057 A1 & CA 2694354 A & CN 101796187 A	1-5, 7, 8, 10 1-11
Y	WO 2012/091081 A1 (麒麟ホールディングス株式会社) 2012.07.05, 特許請求の範囲請求項 5, 段落 0001, 0029, 0035, 0037 & JP 2016-73314 A & JP 5950827 B2 & US 2013/0302380 A1, claim5, [0001], [0084], [0090], [0092] & US 2014/0234379 A1	1-11

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.06.2017

国際調査報告の発送日

27.06.2017

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

六笠 紀子

4U

9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3439

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
	& US 2017/0106028 A1 & EP 2659898 A1 & AU 2011350554 A & NZ 613335 A & AU 2015268629 A	
Y	LAUTERBACH, H. et al, Mouse CD8 α^+ DCs and human BDCA3 $^+$ DCs are major producers of IFN- λ in response to poly IC., Journal of Experimental Medicine, 2010, 207(12), p.2703-2717, 要約	1-11
Y	YOSHIO, S. et al, Human Blood Dendritic Cell Antigen 3 (BDCA3) $^+$ Dendritic Cells Are a Potent Producer of Interferon- λ in Response to Hepatitis C Virus., Hepatology, 2013, 57(5), p.1705-1715, 要約	3-7
Y	由雄祥代他, C型慢性肝炎患者における IFN λ 高産生樹状細胞サブセット (BDCA3+DC) の意義, 肝臓, 2012, 53(No. Supplement 1), p. A340, OWS-282, [成績]欄	3-7
A	JP 2013-514062 A (バヴァリアン・ノルディック・アクティーゼルスカブ) 2013.04.25, & JP 2016-121157 A & US 2012/0258082 A1 & WO 2011/072871 A1 & WO 2012/065755 A1 & EP 2513311 A1 & AU 2010333322 A & CA 2783510 A & NZ 599677 A	1-11
A	JIANG, M. et al, Innate Immune Responses in Human Monocyte-Derived Dendritic Cells Are Highly Dependent on the Size and the 5' Phosphorylation of RNA Molecules., Journal of Immunology, 2011, 187(4), p.1713-1721	1-11
A	川島忠臣他, 乳酸菌は樹状細胞エンドソーム内 TLR を介して IFN - β を誘導する, 日本免疫学会総会・学術集会記録, 2009, 39, p.181, 3-B-W45-7-0/P	1-11