

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6594911号
(P6594911)

(45) 発行日 令和1年10月23日(2019.10.23)

(24) 登録日 令和1年10月4日(2019.10.4)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N 1/20 Z N A A
A 2 3 L 33/135 (2016.01)	A 2 3 L 33/135
A 6 1 K 35/747 (2015.01)	A 6 1 K 35/747
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04

請求項の数 9 (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願2016-573417 (P2016-573417)	(73) 特許権者 501481492 株式会社ゲノム創薬研究所 東京都文京区本郷三丁目4番5号
(86) (22) 出願日 平成28年2月4日(2016.2.4)	
(86) 国際出願番号 PCT/JP2016/053378	(73) 特許権者 507102517 株式会社アンテナ 福岡県福岡市中央区薬院3丁目3番5号ラ ピスビル6F
(87) 国際公開番号 W02016/125861	
(87) 国際公開日 平成28年8月11日(2016.8.11)	(73) 特許権者 504137912 国立大学法人 東京大学 東京都文京区本郷七丁目3番1号
審査請求日 平成30年3月26日(2018.3.26)	
(31) 優先権主張番号 特願2015-22567 (P2015-22567)	(74) 代理人 100125748 弁理士 高橋 徳明
(32) 優先日 平成27年2月6日(2015.2.6)	(74) 代理人 100177161 弁理士 日比 敦士
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国(JP)	
微生物の受託番号 NPMD NITE BP-02005	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 乳酸菌、該乳酸菌由来の自然免疫活性化剤、感染症予防治療剤及び飲食品

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

独立行政法人製品評価技術基盤機構(NITE)の特許微生物寄託センター(NPMD)における受託番号がNITE BP-02005であるラクトバチルス(Lactobacillus)属に属する乳酸菌。

【請求項2】

配列表の配列番号1で示される16SrDNA領域の塩基配列を有する請求項1に記載の乳酸菌。

【請求項3】

請求項1又は請求項2に記載の乳酸菌、該乳酸菌の死菌又は該乳酸菌の処理物を有効成分とする自然免疫活性化剤であって、

上記乳酸菌の処理物は、乳酸菌の、培養物、濃縮物、ペースト化物、乾燥物、液状化物、希釈物、破砕物、殺菌加工物、及び、培養物からの抽出物よりなる群から選ばれらる少なくとも一つの処理物であることを特徴とする自然免疫活性化剤。

【請求項4】

請求項1又は請求項2に記載の乳酸菌のペプチドグリカンを含むことを特徴とする感染症予防治療剤。

【請求項5】

請求項3に記載の自然免疫活性化剤を有効成分として含有することを特徴とする感染症予防治療剤。

【請求項 6】

請求項 1 又は請求項 2 に記載の乳酸菌を含有する飲食品。

【請求項 7】

請求項 3 に記載の自然免疫活性化剤を含有する飲食品。

【請求項 8】

請求項 4 又は請求項 5 に記載の感染症予防治療剤を含有する飲食品。

【請求項 9】

請求項 1 又は請求項 2 に記載の乳酸菌を用いて醗酵する工程を用いて製造され、独立行政法人製品評価技術基盤機構 (N I T E) の特許微生物寄託センター (N P M D) における受託番号が N I T E B P - 0 2 0 0 5 であるラクトバチルス (Lactobacillus) 属に属する乳酸菌を含有する飲食品。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規乳酸菌、該新規乳酸菌の生菌、死菌若しくは処理物を有効成分とする自然免疫活性化剤、該新規乳酸菌のペプチドグリカンを含む有効成分とする感染症予防治療剤、及び、それらを含有する飲食品に関する。

【背景技術】

【0002】

乳酸菌は古くから醗酵食品に利用され、飲食品、医薬品、プロバイオティクス等の生産に利用されている。乳酸菌は、グラム陽性、カタラーゼ陰性、内生孢子を形成しない、運動性がない等という特徴がある。

20

【0003】

Lactobacillus paraplantarum (*L. paraplantarum*) は、*Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) に類縁の乳酸菌であり、*L. paraplantarum*、*L. plantarum* は、共に非病原性のグラム陽性の乳酸菌で、ヘテロ乳酸醗酵を行うことが知られている (非特許文献 6)。

また、一部の種や亜種では全ゲノムが解読されているほか (非特許文献 1、2)、最近では組換え *L. plantarum* が、動物の腸表皮を通じた特異的抗原の提示に利用され、経口摂取できる生きた感染症予防剤として注目されている (非特許文献 3、4)。

30

【0004】

一方、自然免疫反応では、樹状細胞やマクロファージといった免疫細胞が、細菌やウイルスに由来する自然免疫活性化物質に反応してサイトカインを産生し、その後の免疫反応が起こることが知られている。自然免疫機構は、生物が共通に有する感染防御機構であり、一般には非特異的であるために、反応が素早く、また多くの感染源に対して有効に機能することが特徴である。

【0005】

これまでに、本発明者らにより、自然免疫機構しかないカイコにおいて、自然免疫活性化反応を簡便に測定できる評価方法 (スクリーニング方法) が開発されている (特許文献 1、非特許文献 5)。更に、該方法でヒト等の脊椎動物に対して自然免疫活性化作用を有する自然免疫活性化剤の評価 (スクリーニング方法) ができることが確かめられている (特許文献 1 等)。

40

また、カイコが微生物感染症に対する抵抗性評価のモデル動物として有用であることは、本発明者らにより確かめられている (特許文献 2、3 等)。

【0006】

免疫機構の異常は、様々な疾患を引き起こす原因となる。従って、このような免疫機構を所望に調節することが可能な、優れた自然免疫活性化剤や感染症予防治療剤が望まれている。また、乳酸菌由来物又は上記剤を含有する飲食品や、上記性能に優れた乳酸菌を利用した飲食品の開発も望まれている。

【先行技術文献】

50

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】国際公開WO2008/126905号

【特許文献2】特開2007-327964号公報

【特許文献3】特開2012-006917号公報

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Kleerebezem M, Boekhorst J, van Kranenburg R, Molenaar D, Kuipers OP, Leer R, Turchini R, Peters SA, Sandbrink HM, Fiers MW, Stiekema W, Lankhorst RM, Bron PA, Hoffer SM, Groot MN, Kerkhoven R, de Vries M, Ursing B, de Vos W M, Siezen RJ. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Feb 18;100(4):1990-5

10

【非特許文献2】Siezen RJ, Francke C, Renckens B, Boekhorst J, Wels M, Kleerebezem M, van Hijum SA. Complete resequencing and reannotation of the *Lactobacillus plantarum* WCFS1 genome. J Bacteriol. 2012 Jan;194(1):195-6.

【非特許文献3】Granette C, Muller-Alouf H, Goudercourt D, Geoffroy MC, Turneer M, Mercenier A. Mucosal immune responses and protection against tetanus toxin after intranasal immunization with recombinant *Lactobacillus plantarum*. Infect Immun. 2001 Mar;69(3):1547-53.

【非特許文献4】Seegers JF. Lactobacilli as live vaccine delivery vectors: progress and prospects. Trends Biotechnol. 2002 Dec;20(12):508-15.

20

【非特許文献5】Ishii K, Hamamoto H, Kamimura M, Sekimizu K. Activation of the silkworm cytokine by bacterial and fungal cell wall components via a reactive oxygen species-triggered mechanism. J Biol Chem. 2008 Jan 25;283(4):2185-91.

【非特許文献6】Curk MC, Hubert JC, Bringel F. *Lactobacillus paraplantarum* sp. nov., a new species related to *Lactobacillus plantarum*. Int J Syst Bacteriol. 1996 Apr;46(2):595-8.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

30

本発明の課題は、高い自然免疫活性化能を有する新規な乳酸菌を提供することであり、更に、該乳酸菌又は該乳酸菌の死菌若しくは処理物を有効成分とする自然免疫活性化剤や、該乳酸菌又は該乳酸菌に由来する自然免疫活性化剤を含有する飲食品を提供することにある。

また、新規な乳酸菌に由来する物質を有効成分とする感染症予防治療剤や飲食品を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者は、上記の課題を解決すべく鋭意検討を重ねた結果、特定の（亜種の）乳酸菌株に、一般に自然免疫活性化能があると言われている種々のものや、ラクトバチルス属等に属する他の乳酸菌としてこれまでに知られている乳酸菌より高い自然免疫活性化能があることを見出した。

40

【0011】

更に、上記の自然免疫活性化能を有する乳酸菌は、その性状の分析や16S rDNAの塩基配列等の解析結果、ラクトバチルス（*Lactobacillus*）属に属する新規乳酸菌株（以下、「#11-1」と略記する場合がある）であることも判明した。

【0012】

また、該乳酸菌のペプチドグリカン画分を食したカイコは、獲得免疫機構を有していないにもかかわらず、意外にも緑膿菌感染後の生存時間が延長し、緑膿菌感染に対する抵抗性が付与されることを見出して本発明を完成するに至った。

50

【 0 0 1 3 】

すなわち、本発明は、独立行政法人製品評価技術基盤機構（N I T E）の特許微生物寄託センター（N P M D）における受託番号がN I T E B P - 0 2 0 0 5であるラクトバチルス（Lactobacillus）属に属する乳酸菌を提供するものである。

更に、上記乳酸菌の単離又は精製された乳酸菌を提供するものである。

【 0 0 1 4 】

また、本発明は、上記の乳酸菌又はその自然的若しくは人工的に変異した乳酸菌であって、自然免疫活性化能を有する乳酸菌を提供するものである。

また、本発明は、配列表の配列番号1で示される16SrDNA領域の塩基配列を有する上記の乳酸菌を提供するものである。

更に、上記乳酸菌の単離又は精製された乳酸菌を提供するものである。

【 0 0 1 5 】

また、本発明は、前記の乳酸菌、該乳酸菌の死菌、又は、該乳酸菌の処理物を有効成分とする自然免疫活性化剤であって、

上記乳酸菌の処理物は、乳酸菌の培養物；濃縮物；ペースト化物；噴霧乾燥物、凍結乾燥物、真空乾燥物、ドラム乾燥物等の乾燥物；液状化物；希釈物；破碎物；殺菌加工物；及び；該培養物からの抽出物よりなる群から選ばれる少なくとも1つの処理物であることを特徴とする自然免疫活性化剤を提供するものである。

【 0 0 1 6 】

また、本発明は、前記の乳酸菌のペプチドグリカンを含むことを特徴とする感染症予防治療剤を提供するものである。

また、本発明は、上記の自然免疫活性化剤を有効成分として含有することを特徴とする感染症予防治療剤を提供するものである。

また、本発明は、前記の乳酸菌のペプチドグリカンを含むことを特徴とする感染症予防治療剤を提供するものである。

【 0 0 1 7 】

また、本発明は、前記の乳酸菌、前記の自然免疫活性化剤又は前記の感染症予防治療剤を含有する飲食品を提供するものである。

【 0 0 1 8 】

また、本発明は、前記の乳酸菌を用いて醗酵する工程を用いて製造された飲食品を提供するものであり、上記飲食品が醗酵乳である飲食品を提供するものである。

【 発明の効果 】

【 0 0 1 9 】

本発明によれば、極めて高い自然免疫活性化能を有する新規の乳酸菌を提供することができる。

更には、該新規な乳酸菌、該乳酸菌の死菌、又は、該乳酸菌の処理物を有効成分とする極めて高い自然免疫活性化能を有する新規の自然免疫活性化剤を提供し、該乳酸菌又は該自然免疫活性化剤を含有する（に由来する）自然免疫活性化能に優れた飲食品を提供することができる。

【 0 0 2 0 】

更に、本発明によれば、該新規な乳酸菌のペプチドグリカンを含むことができ、該感染症予防治療剤は、経口投与で細菌等による感染症を予防することができる。従って、該感染症予防治療剤を含有する飲食品は感染症予防に効果的である。

【 0 0 2 1 】

本発明の新規の乳酸菌や新規の自然免疫活性化剤を見出したスクリーニング方法は、自然免疫活性化物質に反応してカイコ標本の筋収縮が起こることを利用するもので、LPSによる擬陽性の自然免疫活性化能の検出が抑えられており、また、カイコ個体を用いた測定なので、サンプルのADME（absorption, distribution, metabolism, and excretion）や、PK（pharmacokinetics）を加味した測定結果が得られ、また、毒性のある化合物

10

20

30

40

50

を除くことができる。

従って、本発明の自然免疫活性化剤、感染症予防治療剤及び飲食品は、上記テストを通過したものであるという優れた効果がある。

【0022】

本発明の乳酸菌は、一般飲食品、健康食品、薬剤、醗酵飲食品、プロバイオティクスの生産等に利用できるばかりでなく、自然免疫活性化による病気の予防・治療への利用がなされる。醗酵飲食品としては、醗酵乳、乳酸菌飲料、ヨーグルト、漬物、漬物製造用乳酸菌スターター等としての用途に特に好適である。また、酸に強いので、胃で分解されず小腸にまで届くという特徴もある。

【図面の簡単な説明】

10

【0023】

【図1】本発明の乳酸菌ラクトバチルス・パラプランタラム # 11 - 1 の 16S rDNA と近縁のラクトバチルス・パラプランタラム DSM10667 の 16S rDNA (NR - 025447.1) の BLAST を用いた相同性解析の結果を示す図である。

【図2】図1の続きの図である。

【図3】乳酸菌ラクトバチルス・プランタラム PGN のペプチドグリカン画分を食したカイコと食さないカイコの、緑膿菌感染後の生存期間を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0024】

以下、本発明について説明するが、本発明は、以下の具体的態様に限定されるものではなく、技術的思想の範囲内で任意に変形することができる。

20

【0025】

<乳酸菌>

本発明は、独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) の特許微生物寄託センター (NPMD) における受託番号が NITE BP - 02005 であるラクトバチルス (Lactobacillus) 属に属する乳酸菌である。

【0026】

以下、このラクトバチルス (Lactobacillus) 属に属する新規乳酸菌株 (# 11 - 1) について詳述する。

形態：本発明の # 11 - 1 は、ぬか漬けを分離源として初めて分離された。

30

【0027】

培地における生育状況：

(1) GAM 及び MRS 寒天培地上では白色のコロニーを形成する。拡散性の色素は認められない。

(2) 炭酸カルシウム入り MRS 寒天培地上では乳酸の生成に伴う透明帯の形成が認められる。

【0028】

生理学的性質：本発明の # 11 - 1 の生理学的、化学分類学的性質は以下の通りである。

。

(1) 酸素に対する態度：嫌氣的

40

(2) カタラーゼ： -

(3) アルカリフォスファターゼ： -

(4) エステラーゼ： -

(5) エステラーゼリパーゼ： -

(6) リパーゼ： -

(7) ロイシンアリルアミダーゼ： +

(8) パリンアリルアミダーゼ： +

(9) シスチンアリルアミダーゼ： -

(10) トリプシン： -

(11) - キモトリプシン： -

50

(1 2) 酸性フォスファターゼ : +	
(1 3) ナフトール - A S - B I - フォスフォヒドロラーゼ : +	
(1 4) - ガラクトシダーゼ : -	
(1 5) - ガラクトシダーゼ : -	
(1 6) - グルクロニダーゼ : -	
(1 7) - グルコシダーゼ : -	
(1 8) - グルコシダーゼ : -	
(1 9) N - アセチル - - グルコサミニダーゼ : -	
(2 0) - マンノシダーゼ : -	
(2 1) - フコシダーゼ : -	10
【 0 0 2 9 】	
(2 2) 下記の糖類等からの酸及びガスの生成能	
グリセロール (G l y c e r o l) : -	
エリトリール (E r y t h r i t o l) : -	
D - アラビノース (D - A r a b i n o s e) : -	
L - アラビノース (D - A r a b i n o s e) : -	
D - リボース (D - R i b o s e) : ±	
D - キシロース (D - X y l o s e) : -	
L - キシロース (L - X y l o s e) : -	
D - アドニトール (D - A d o n i t o l) : -	20
メチル - - D - キシロピラノサイド (m e t h y l - - D - x y l o p y r a n o s i d e) : -	
D - ガラクトース (D - G a l a c t o s e) : +	
D - グルコース (D - G l u c o s e) : +	
D - フルクトース (D - F r u c t o s e) : +	
D - マンノース (D - M a n n o s e) : +	
L - ソルボース (D - S o r b o s e) : -	
L - ラムノース (L - R h a m n o s e) : -	
ズルシトール (D u l c i t o l) : -	
イノシトール (I n o s i t o l) : -	30
D - マンニトール (D - M a n n i t o l) : +	
D - ソルビトール (D - S o r b i t o l) : -	
メチル - - D - マンノピラノサイド (m e t h y l - - D - m a n n o p y r a n o s i d e) : -	
メチル - - D - グルコピラノサイド (m e t h y l - - D - g l u c o p y r a n o s i d e) : +	
N - アセチルグルコサミン (N - A c e t y l g l u c o s a m i n e) : +	
アミグダリン (A m y g d a l i n) : ±	
アルブチン (A r b u t i n) : +	
エスクリン (E s c u l i n) : +	40
サリシン (S a l i c i n) : +	
D - セロビオース (D - C e l l o b i o s e) : +	
D - マルトース (D - M a l t o s e) : +	
D - ラクトース (D - L a c t o s e) : -	
D - メリビオース (D - M e l i b i o s e) : -	
D - スクロース (D - S u c r o s e) : +	
D - トレハロース (D - T r e h a l o s e) : +	
インスリン (I n s u l i n) : -	
D - メレジトース (D - M e l e z i t o s e) : -	
D - ラフィノース (D - R a f f i n o s e) : -	50

スターチ (Starch) : -
 グリコーゲン (Glycogen) : -
 キシリトール (Xylitol) : -
 ゲンチオビオース (Gentiobiose) : +
 D - ツラノース (D - Turanose) : -
 D - リキソース (D - Lyxose) : -
 D - タガトース (D - Tagatose) : -
 D - フコース (D - Fucose) : -
 L - フコース (L - Fucose) : -
 D - アラビトール (D - Arabitol) : -
 L - アラビトール (L - Arabitol) : -
 グルコネート (Glucuronate) : ±
 2 - ケト - グルコネート (2 - Keto - glucuronate) : -
 5 - ケト - グルコネート (5 - Keto - glucuronate) : -

【0030】

分子生物学的解析結果：分子生物学的な系統分類の指標として用いられている 16 S rDNA に関する # 11 - 1 の解析結果は以下の通りである。

すなわち、# 11 - 1 のゲノム DNA から、PCR により、16 S rDNA 領域の塩基配列を増幅し、シーケンサーによる解析を行った結果、16 S rDNA のほぼ全長に当たる塩基配列が見出された。

この塩基配列を NCBI の BLAST 解析で相同性検索を行ったところ、# 11 - 1 の 16 S rDNA 領域の塩基配列は、ラクトバチルス属である *Lactobacillus paraplantarum* DSM 10667 株の塩基配列 (登録番号：NR_025447.1) と相同率 98% を示したので、# 11 - 1 は、*L. plantarum paraplantarum* 種に属するものである。

しかしながら、完全には一致していないので、本発明の # 11 - 1 は、上記の株とは異なる乳酸菌株 (亜種) である。

【0031】

前記の # 11 - 1 の生理学的・化学分類学的性質を、パーゼス・マニュアル・オブ・システムティックバクテリオロジー (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol.3 1989) による分類及びその他の文献の記載内容に照らし合わせ、更に、上記 16 S rDNA 解析の結果を考慮して判断した結果、本発明の # 11 - 1 は、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属に属する新規の微生物である。

ラクトバチルス属に属する既知の株等と比べて、最も高い自然免疫活性化能を示すこと等を含め総合的に検討した結果、# 11 - 1 は単離された新規な微生物株であると判断した。

【0032】

11 - 1 は、千葉県木更津市かずさ鎌足 2 - 5 - 8 122 号室、独立行政法人製品評価技術基盤機構 (Natural Institute of Technology and Evaluation; 以下、「NITE」と略記する) の特許微生物寄託センター (NPMD) に国内寄託され、受託番号：NITE P - 02005 (寄託日：2015年2月5日) として受託された微生物である。

11 - 1 は、その後、千葉県木更津市かずさ鎌足 2 - 5 - 8 122 号室、独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) の特許微生物寄託センター (NPMD) に、原寄託申請書を提出して、国内寄託 (原寄託日：2015年2月5日) から、ブタペスト条約に基づく寄託への移管申請を行い (移管日 (国際寄託日)：2016年1月28日)、生存が証明され、ブタペスト条約に基づく寄託 (国際寄託) への移管申請が受領された結果、受託番号「NITE BP - 02005」を受けているものである。

【0033】

細菌の一般的な性状として、その菌株としての性質は変異し易いため、# 11 - 1 は、先に示した生理学的性状の範囲内に留まらない可能性も有している。また、かかる「変異

10

20

30

40

50

」には、自然的な変異と人工的な変異の両方を含むことは言うまでもない。

【0034】

以下に、#11-1の培養方法について記載する。#11-1の培養方法は、ラクトバチルス属の微生物に対して行われる一般的な培養方法に準じて行えばよい。

培養は嫌気条件下で行うことが好ましい。培地中の炭素源としては、例えば、D-リボース、D-ガラクトース、D-グルコース、D-フルクトース、D-マンノース、D-マンニトール、N-アセチルグルコサミン、アミグダリン、アルブチン、エスクリン、サリシン、D-セロピオース、D-マルトース、シュクロース、D-トレハロース、ゲンチオピオース、糖蜜、水飴、油脂類等の有機炭素化合物が用いられ、窒素源としては、肉エキス、カゼイン、ペプトン、酵母エキス、乾燥酵母、胚芽、大豆粉、尿素、アミノ酸、アンモニウム塩等の有機・無機窒素化合物を用いることができる。

また、塩類は、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、リン酸塩、鉄塩、銅塩、亜鉛塩、コバルト塩等の無機塩類を必要に応じて適宜添加する。更に、ピオチン、ビタミンB1、シスチン、オレイン酸メチル、ラード油等の生育促進物質を添加することが、目的物の産生量を増加させる点で好ましい。

また、シリコン油、界面活性剤等の消泡剤を添加してもよい。調製済みの培地としては、例えば、MRS培地、GAM培地等を用いることが好ましい。

【0035】

培養条件は、先に記したようにラクトバチルス属の微生物に対して行われる一般的な培養条件に準じて行えばよい。液体培養法であれば静置培養が望ましい。小規模であれば蓋付きガラス瓶による静置培養法を用いてもよい。

培養温度は、25～37間に保つことが好ましく、32～37で行うことがより好ましい。培養pHは7付近で行うことが好ましい。培養期間は、用いた培地組成、培養温度等により変動するファクターであるが、#11-1の場合、好ましくは12～72時間、より好ましくは24～48時間で十分な量の目的物を確保することができる。

培養して得られたコロニーをピックアップし、再度培地上でシングルコロニー形成を行うことも好ましい。

【0036】

<自然免疫活性化剤>

本発明の新規乳酸菌「#11-1」は、該乳酸菌自身として、また、該乳酸菌の自然的若しくは人工的に変異した乳酸菌として、自然免疫活性化能を有する。

すなわち、本発明は、受託番号がNITE BP-02005であるラクトバチルス(Lactobacillus)属に属する乳酸菌又はその自然的若しくは人工的に変異した乳酸菌であって、自然免疫活性化能を有する乳酸菌である。

自然免疫活性化能の測定は、実施例に具体的に記載した方法、すなわち、Ishii K., Hamamoto H., Kamimura M., Sekimizu K., J.Biol.Chem. Jan.25;283(4):2185-91(2008)にも詳述されている、カイコの緩行性筋収縮により測定された。

【0037】

「#11-1又はその自然的若しくは人工的に変異した乳酸菌」、「該乳酸菌の死菌」、「該乳酸菌の処理物」は、何れも自然免疫活性化能を有する。

ここで、「乳酸菌の処理物」としては、乳酸菌の、培養物、濃縮物、ペースト化物、乾燥物、液状化物、希釈物、破碎物、殺菌加工物、及び、培養物からの抽出物よりなる群から選ばれる少なくとも1つの処理物が挙げられる。ここで、「乾燥物」としては、噴霧乾燥物、凍結乾燥物、真空乾燥物、ドラム乾燥物等が挙げられる。

本発明の別の態様は、「前記した本発明の乳酸菌(#11-1又はその自然的若しくは人工的に変異した乳酸菌)、該乳酸菌の死菌又は該乳酸菌の処理物を有効成分とする自然免疫活性化剤であって、上記乳酸菌の処理物は、乳酸菌の、培養物、濃縮物、ペースト化物、乾燥物、液状化物、希釈物、破碎物、殺菌加工物、及び、培養物からの抽出物よりなる群から選ばれる少なくとも1つの処理物であることを特徴とする自然免疫活性化剤」である。

10

20

30

40

50

【0038】

本発明の自然免疫活性化剤は、前記の本発明の乳酸菌、該乳酸菌の死菌又は該乳酸菌の処理物を種々の状態で含むことができる。例えば、懸濁液、乳酸菌体、培養上清液、培地成分を含む状態等が挙げられる。

乳酸菌としては、生菌体、湿潤菌、乾燥菌等が適宜使用可能である。また、殺菌、すなわち、加熱殺菌処理、放射線殺菌処理、破碎処理等を施した死菌であってもよい。

【0039】

本発明の自然免疫活性化剤中の有効成分である、乳酸菌、該乳酸菌の死菌、該乳酸菌の処理物の、自然免疫活性化剤全体に対する含有量は、特に制限がなく、目的に応じて適宜選択することができるが、自然免疫活性化剤全体を100質量部としたときに、「乳酸菌、該乳酸菌の死菌、該乳酸菌の処理物の合計量」として、0.001～100質量部で含有されることが好ましく、より好ましくは0.01～99質量部、特に好ましくは0.1～95質量部、更に好ましくは1～90質量部で含有される。

10

【0040】

また、前記有効成分は、何れか1種を単独で使用してもよいし、2種以上を併用してもよい。2種以上を併用する場合の、前記自然免疫活性化剤中の各々の有効成分の含有比については、特に制限はなく目的に応じて適宜選択することができる。

【0041】

本発明の自然免疫活性化剤は、前記乳酸菌、前記乳酸菌の死菌又は前記乳酸菌の処理物を有効成分として含有するが、それら有効成分に加えて、「その他の成分」を含有することができる。

20

前記自然免疫活性化剤における、上記「その他の成分」としては、特に制限はなく、本発明の効果を損なわない範囲内で、目的に応じて適宜選択することができるが、例えば、薬学的に許容され得る担体等が挙げられる。

かかる担体としては、特に制限はなく、例えば、後述する剤型等に応じて適宜選択される。また、自然免疫活性化剤中の「その他の成分」の含有量としても、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

【0042】

<感染症予防治療剤>

前記した本発明の乳酸菌、該乳酸菌の死菌、該乳酸菌の処理物は、自然免疫活性化能を有すると共に又は有するが故に感染症予防治療剤として有用であり、特に、経口投与用の感染症予防治療剤として有用である。

30

本発明者は、本発明の乳酸菌のペプチドグリカンの経口投与が、緑膿菌に感染したカイコに対し延命効果を奏することを確認した。なお、細菌等に感染したカイコの抵抗性が、ヒト等の哺乳類における抵抗性と相関があることは既に確かめられている（例えば、特許文献2、3等）。

【0043】

具体的には、ラクトバチルス・プランタラム乳酸菌のペプチドグリカンが、カイコの緑膿菌感染に対して抵抗性を付与することが確かめられた。

カイコには獲得免疫機構がなく抗原に対して抗体を産生し得ない。従って、経口投与されたラクトバチルス・プランタラムのペプチドグリカンが、腸内等でカイコの自然免疫機構を活性化し、その結果、感染制御に対して効果を奏したためと考えられる。

40

【0044】

マウス等の獲得免疫機構を有する動物に対しては、細菌のペプチドグリカンを経口投与すると免疫力が付与されることは知られている。

しかし、本発明においては、獲得免疫機構を有さず自然免疫機構しか有さないカイコにおいて、乳酸菌のペプチドグリカンが緑膿菌感染に対して抵抗性を付与した。ペプチドグリカンがカイコの自然免疫機構を活性化し感染に抵抗したと考えられ、このことは、同様に自然免疫機構を有する哺乳類等の動物に対して、本発明の乳酸菌、該乳酸菌の死菌又は該乳酸菌の処理物を含有する自然免疫活性化剤に、感染症予防治療剤としての効果がある

50

ことを示している。

【0045】

ラクトバチルス・プランタラム、ラクトバチルス・パラプランタラム等のラクトバチルス属の乳酸菌のペプチドグリカンを含む有効成分として含有する剤は、ヒト等の哺乳類に対しても感染症予防治療剤として有用である。

従って、本発明の他の態様は、前記の自然免疫活性化剤を有効成分として含有することを特徴とする感染症予防治療剤であり、更には、前記の乳酸菌のペプチドグリカンを含む有効成分として含有することを特徴とする感染症予防治療剤である。

【0046】

<医薬品；飲食品；健康食品等>

本発明の乳酸菌や該乳酸菌に由来する本発明の自然免疫活性化剤は、医薬品、医薬部外品、一般飲食品、健康食品、粉ミルク等の規格を有する飲食品等に配合することが可能であり、それらの形態によらず様々な医薬品、飲食品等に应用できる。

中でも、前記した本発明の乳酸菌を用いて醗酵する工程を用いて製造された飲食品、更にその中でも醗酵乳は、乳酸菌の通常の効果や、本発明に特有の前記効果を発揮し易いため好ましい。

【0047】

本発明の自然免疫活性化剤や感染症予防治療剤の剤型としては、特に制限はなく、例えば、後述するような所望の投与方法に応じて適宜選択することができる。

具体的には、例えば、経口固形剤（錠剤、被覆錠剤、顆粒剤、散剤、ハードカプセル剤、ソフトカプセル剤等）、経口液剤（内服液剤、シロップ剤、エリキシル剤等）、注射剤（溶剤、懸濁剤等）、軟膏剤、貼付剤、ゲル剤、クリーム剤、外用散剤、スプレー剤、吸入散布剤等が挙げられる。

【0048】

前記経口固形剤としては、例えば、前記有効成分に、賦形剤、更には必要に応じて結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、矯味・矯臭剤等の添加剤を加え、常法により製造することができる。

【0049】

該賦形剤としては、例えば、乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、デンプン、炭酸カルシウム、カオリン、微結晶セルロース、珪酸等が挙げられる。

前記結合剤としては、例えば、水、エタノール、プロパノール、単シロップ、ブドウ糖液、デンプン液、ゼラチン液、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルスターチ、メチルセルロース、エチルセルロース、シェラック、リン酸カルシウム、ポリビニルピロリドン等が挙げられる。

該崩壊剤としては、例えば、乾燥デンプン、アルギン酸ナトリウム、カンテン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリド、乳糖等が挙げられる。

該滑沢剤としては、例えば、精製タルク、ステアリン酸塩、ホウ砂、ポリエチレングリコール等が挙げられる。

該着色剤としては、例えば、酸化チタン、酸化鉄等が挙げられる。

前記矯味・矯臭剤としては、例えば、白糖、橙皮、クエン酸、酒石酸等が挙げられる。

【0050】

前記経口液剤としては、例えば、前記有効成分に、矯味・矯臭剤、緩衝剤、安定化剤等の添加剤を加え、常法により製造することができる。

【0051】

該矯味・矯臭剤としては、例えば、白糖、橙皮、クエン酸、酒石酸等が挙げられる。前記緩衝剤としては、例えば、クエン酸ナトリウム等が挙げられる。前記安定化剤としては、例えば、トラガント、アラビアゴム、ゼラチン等が挙げられる。

【0052】

前記注射剤としては、例えば、前記有効成分に、pH調節剤、緩衝剤、安定化剤、等張

10

20

30

40

50

化剤、局所麻酔剤等を添加し、常法により皮下用、筋肉内用、静脈内用等の注射剤を製造することができる。

該pH調節剤及び該緩衝剤としては、例えば、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、リン酸ナトリウム等が挙げられる。前記安定化剤としては、例えば、ピロ亜硫酸ナトリウム、EDTA、チオグリコール酸、チオ乳酸等が挙げられる。前記等張化剤としては、例えば、塩化ナトリウム、ブドウ糖等が挙げられる。前記局所麻酔剤としては、例えば、塩酸プロカイン、塩酸リドカイン等が挙げられる。

【0053】

前記軟膏剤としては、例えば、前記有効成分に、公知の基剤、安定剤、湿潤剤、保存剤等を配合し、常法により混合し、製造することができる。

該基剤としては、例えば、流動パラフィン、白色ワセリン、サラシミツロウ、オクチルドデシルアルコール、パラフィン等が挙げられる。前記保存剤としては、例えば、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸プロピル等が挙げられる。

【0054】

前記貼付剤としては、例えば、公知の支持体に前記軟膏剤としてのクリーム剤、ゲル剤、ペースト剤等を、常法により塗布し、製造することができる。前記支持体としては、例えば、綿、スフ、化学繊維からなる織布、不織布、軟質塩化ビニル、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリウレタン等のフィルム、発泡体シート等が挙げられる。

【0055】

本発明の自然免疫活性化剤や感染症予防治療剤は、例えば、自然免疫機構の活性化を必要とする個体、細菌等に対してあたかも獲得免疫を得ようとする個体等に好適に使用できる。

具体的には、例えば、健康維持や疲労回復を必要とする個体；癌や生活習慣病の予防や治療を必要とする個体；細菌、真菌、ウイルス等に感染した個体；等に投与することにより使用することができる。

【0056】

本発明の自然免疫活性化剤や感染症予防治療剤の投与対象動物としては、特に制限はないが、例えば、ヒト；マウス、ラット等の実験動物；サル；ウマ；ウシ、ブタ、ヤギ、ニワトリ等の家畜；ネコ、イヌ等のペット；等が挙げられる。

【0057】

また、前記自然免疫活性化剤の投与方法としては、特に制限はなく、例えば、前記した剤型等に応じ、適宜選択することができ、経口投与、腹腔内投与、血液中への注射、腸内への注入等が挙げられる。中でも、経口投与が、簡便で前記効果を発揮する点から好ましい。

【0058】

前記自然免疫活性化剤又は前記感染症予防治療剤の投与量としては、特に制限はなく、投与対象である個体の年齢、体重、所望の効果の程度等に応じて適宜選択することができるが、例えば、成人への1日の投与量は、有効成分の量として、1mg～30gが好ましく、10mg～10gがより好ましく、100mg～3gが特に好ましい。

また、投与時期としても、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、予防的に投与されてもよいし、治療的に投与されてもよい。

【0059】

本発明の前記乳酸菌、該乳酸菌の死菌若しくは処理物、自然免疫活性化剤、又は、感染症予防治療剤を含有する飲食品（以下、「本発明の飲食品」と略記する場合がある）中の、乳酸菌、自然免疫活性化剤又は感染症予防治療剤の含有量は、特に制限がなく、目的や飲食品の態様（種類）に応じて、適宜選択することができるが、飲食品全体を100質量部としたときに、上記の合計量で、0.001～100質量部で含有することが好ましく、より好ましくは0.01～100質量部、特に好ましくは0.1～100質量部の含量である。

10

20

30

40

50

【0060】

また、上記の何れか1種を単独で使用してもよいし、2種以上を併用してもよい。2種以上を併用する場合の、前記飲食品中の各々の物質の含有量比には、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

【0061】

本発明の飲食品は、自然免疫活性化能及び/又は感染症予防治療能を有する。

本発明の飲食品は、前記した本発明の自然免疫活性化剤や感染症予防治療剤に加えて、更に、「その他の成分」を含有することができる。

【0062】

上記「その他の成分」としては、特に制限はなく、本発明の効果を損なわない範囲内で目的に応じて適宜選択することができる。例えば、各種食品原料等が挙げられる。また、「その他の成分」の含有量は、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

10

【0063】

本発明の乳酸菌は、一般飲食品、健康食品、薬剤、醗酵飲食品、プロバイオティクスの生産等に利用できる。醗酵飲食品としては、醗酵乳、乳酸菌飲料、ヨーグルト、漬物、漬物製造用乳酸菌スターター等としての用途に特に好適である。

【0064】

前記食品の種類としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。例えば、ゼリー、キャンディー、チョコレート、ビスケット、グミ等の菓子類；緑茶、紅茶、コーヒー、清涼飲料等の嗜好飲料；醗酵乳、ヨーグルト、アイスクリーム、ラクトアイス等の乳製品；野菜飲料、果実飲料、ジャム類等の野菜・果実加工品；スープ等の液体食品；パン類、麺類等の穀物加工品；各種調味料；等が挙げられる。中でも、ヨーグルト、醗酵乳等の乳製品が好ましい。

20

これらの食品の製造方法としては、特に制限はなく、例えば、通常の各種食品の製造方法に応じて、適宜製造することができる。

【0065】

また、前記食品は、例えば、錠剤、顆粒剤、カプセル剤等の経口固形剤や、内服液剤、シロップ剤等の経口液剤として製造されたものであってもよい。前記経口固形剤、経口液剤の製造方法は、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。例えば、前記した薬剤の経口固形剤、経口液剤の製造方法にならい、製造することができる。

30

【0066】

本発明の飲食品は、自然免疫機構の活性化や感染症に対して抵抗力を付けること等を目的とした、機能性食品、健康食品等として、特に有用である。

本発明の乳酸菌、該死菌若しくは処理物等を飲食品の製造に使用する場合、製造方法は当業者に周知の方法によって行うことができる。当業者であれば、本発明の乳酸菌の(死)菌体又は処理物を他の成分と混合する工程、成形工程、殺菌工程、醗酵工程、焼成工程、乾燥工程、冷却工程、造粒工程、包装工程等を適宜組み合わせ、目的の飲食品を作ることが可能である。

【0067】

また、本発明の乳酸菌を各種醗酵乳の製造に使用する場合、当業者に周知の方法を用いて製造することができる。例えば、本発明の乳酸菌を醗酵乳に死菌として所要量添加する工程を用いて製造された飲食品や、乳酸菌スターターとして本発明の乳酸菌を用いて醗酵する工程を用いて製造された飲食品が挙げられる。

40

乳酸菌スターターとして本発明の乳酸菌を用いて醗酵を行う場合、本発明の乳酸菌の培養条件と同様の条件等で行うことができる。

【実施例】

【0068】

以下、実施例及び検討例に基づき本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例等の具体的範囲に限定されるものではない。

【0069】

50

< 材料 >

<< 培地及び培養条件 >>

GAM培地、MRS寒天培地は、それぞれ、Nissui社、BD (Becton Dickinson) 社より入手し、必要な場合には、炭酸カルシウム (CaCO_3) を添加した。

嫌気培養には、AnaeroPak (登録商標) (Mitsubishi gas chemicals社製) を用いた。

【0070】

<< 乳酸菌の分離 >>

醗酵食品としてぬか漬けを用いた。生理食塩水 (0.9質量%の NaCl) 中で懸濁した液をMRS培地に塗り広げ、37℃で2日間嫌気培養した。

コロニーをピックアップし、 CaCO_3 -MRS培地上でのシングルコロニー形成を行った。

【0071】

その中から、後記の方法で自然免疫活性化能を測定し、自然免疫活性化能に優れた乳酸菌株 (#11-1) を得た。乳酸菌株 (#11-1) を単離した。

CaCO_3 -MRS培地上での白いコロニー形成と、透明帯の形成とによって乳酸醗酵を確認し、#11-1が乳酸菌であることを確認した。また、コロニーをグラム染色し、#11-1のグラム陽性を確認した。

【0072】

<< 乳酸菌の同定 >>

PCR酵素KOD FX Neo (Toyobo), primers 9F, 1541Rを用いたコロニーPCRによって、16S rDNA断片を得た。

BigDye (登録商標) Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, ABI PRISM (登録商標) 3100 Genetic Analyzerを利用したDirect sequencingによって配列を決定した。

配列情報は、NCBI BLASTN 2.2.27+ (8) を用いて16S ribosomal RNA sequences database (Bacteria and Archaea, 7,545 sequences) から解析した。

【0073】

#11-1の16S rDNA領域の塩基配列を、配列表の配列番号1に示した。

【0074】

16S rDNAの塩基配列を決定し、BLAST解析により相同性を検索した結果、図1と図2に示すような乳酸菌と相同性の高いものであることが明らかとなった。

この塩基配列は、図1と図2に示したように、*L. paraplantarum* DSM 10667株 (塩基配列: NR_025447.1) に近縁ではあるが、完全には一致しないので、新規の「*L. paraplantarum*」であることが分かった。

【0075】

<< 寄託 >>

実施例において使用する本発明の「#11-1」は、上述の如く、ぬか漬けから分離されたものであり、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属に属する乳酸菌 #11-1として、特許法施行規則に基づく寄託機関として、また、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約に基づく国際寄託当局として認められている、独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター (NPMD) (千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室) に寄託されている (受託番号: NITE P-02005、寄託日2015年2月5日)。

11-1は、その後、千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室、独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) の特許微生物寄託センター (NPMD) に、原寄託申請書を提出して、国内寄託 (原寄託日: 2015年2月5日) から、ブダペスト条約に基づく寄託への移管申請を行い (移管日 (国際寄託日): 2016年1月28日)、生存が証明され、ブダペスト条約に基づく寄託 (国際寄託) への移管申請が受領された結果、受託番号「NITE BP-02005」を受けているものである。

【0076】

実施例1

10

20

30

40

50

< 自然免疫活性化能の測定 >

M R S 培地で一晚培養したラクトバチルス・パラプランタラム # 1 1 - 1 (*L. paraplantarum* # 1 1 - 1) 株を、1 2 1 、 2 0 分で滅菌処理後、5 0 μ L を 5 齢カイコの断頭筋肉標本に注射し、緩行性筋収縮により自然免疫活性化能を測定した。

【 0 0 7 7 】

緩行性筋収縮による自然免疫活性化能の測定は、Ishii K. , Hamamoto H. , Kamimura M. , Sekimizu K. , *J. Biol. Chem.* Jan. 25; 283(4): 2185-91 (2008) に記載の方法に従って行った。

すなわち、5 齢カイコの断頭筋肉標本に、測定物質の濃度を複数段階に振った試料 0 . 0 5 m L をそれぞれ血液内投与し、収縮した長さが最大となったとき (約 1 0 分後) に体長をそれぞれ測定した。

注射前の体長から注射後の体長を引き算し、その値を注射前の体長で割り算した値を「C 値 (Contraction Value) 」とし、C 値 = 0 . 1 5 を 1 U (unit (ユニット)) と定義した。

【 0 0 7 8 】

0 . 9 % 生理食塩液で試料を 1 / 1 、 1 / 4 、 1 / 1 6 、 1 / 6 4 、 1 / 2 5 6 に系列段階希釈した液でそれぞれ C 値を測定し、横軸を測定物質の濃度、縦軸を C 値としてプロットしたグラフから、1 U (C 値 = 0 . 1 5) を与える「測定物質のカイコへの投与質量 (m g) 」を求め、単位質量 (m g) 当たり何 U (ユニット) を示すかを求めて、測定物質の自然免疫活性化能の大きさを評価した。

また、生理食塩液 0 . 0 5 m L をネガティブコントロール (C 値 0 . 0 5 以下を許容) 、空気 0 . 2 m L をポジティブコントロール (C 値が 0 . 2 ~ 0 . 4 内に収まる場合を許容) として同時に測定した。

【 0 0 7 9 】

比較例 1 ~ 3

実施例 1 において、ラクトバチルス・パラプランタラム # 1 1 - 1 (*L. paraplantarum* # 1 1 - 1) 株に代えて、表 1 に示したグラム陽性細菌、# 4、# 1 1 - 2 及び A を用いた以外は、実施例 1 と同様に、カイコの筋収縮により自然免疫活性化能を測定した。

【 0 0 8 0 】

実施例 1 及び比較例 1 ~ 3 の由来・性状を以下の表 1 に示す。また、参考として、近縁の株の名称と「測定菌株と該株との相同性測定結果」を併せて表 1 に示す。

自然免疫活性化能の測定結果を以下の表 2 に示す。

【 0 0 8 1 】

【表 1】

No.	測定菌株	由来	グラム染色	参考 (測定菌株と近縁の株名と、該測定菌株と該近縁の株との相同性)	
				上段: 近縁の株 下段: 登録番号	相同性 (%)
実施例 1	#11-1	ぬか漬	グラム陽性桿菌	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 NR_075041.1	99
比較例 1	#4	ぬか漬	グラム陽性桿菌	<i>Lactobacillus sakei</i> 23K NR_075042.1	99
比較例 2	#11-2	ぬか漬	グラム陽性球菌	<i>Pediococcus ethanolidurans</i> Z-9 NR_043291.1	98
比較例 3	A	キムチ	グラム陽性球菌	<i>Leuconostoc citreum</i> KM20 NR_074694.1	100

【 0 0 8 2 】

【表 2】

No.	菌株	グラム染色	自然免疫活性化能 (U/mg)
実施例1	#11-1	グラム陽性桿菌	165±35 (n=2)
比較例1	#4	グラム陽性桿菌	6.7
比較例2	#11-2	グラム陽性球菌	2.7
比較例3	A	グラム陽性球菌	43

10

【 0 0 8 3 】

本発明の乳酸菌の自然免疫活性化能を測定したところ、表 2 に示すように、実施例 1 の *L. paraplantarum* # 1 1 - 1 は、165 U/mg と、極めて自然免疫活性化能が高いものであった。

また、表 2 における、実施例 1 及び比較例 1、2 の「自然免疫活性化能 (U/mg)」の測定結果の比較からも分かる通り、ぬか漬けから得られた別株と比較しても、本発明の *L. paraplantarum* # 1 1 - 1 が極めて高い自然免疫活性化能を示すことが分かった。

また、所謂「植物性乳酸菌」として知られている *Leuconostoc citreum* KM 2 0 の自然免疫活性化能は 43 U/mg であり、本発明の *L. paraplantarum* # 1 1 - 1 よりも低いものであった (比較例 3)。

20

【 0 0 8 4 】

比較例 4

実施例 1 において、ラクトバチルス・パラプランタラム # 1 1 - 1 (*L. paraplantarum* # 1 1 - 1) 株に代えて、ラクトバチルス・ブルガリクス O L L 1 0 7 3 株を用いた以外は、実施例 1 と同様に、カイコの筋収縮により自然免疫活性化能を測定した。

【 0 0 8 5 】

比較例 5

実施例 1 において、ラクトバチルス・パラプランタラム # 1 1 - 1 (*L. paraplantarum* # 1 1 - 1) 株に代えて、ラクトバチルス・カゼイ Y I T 9 0 2 9 株を用いた以外は、実施例 1 と同様に、カイコの筋収縮により自然免疫活性化能を測定した。

30

【 0 0 8 6 】

比較例 6

実施例 1 において、ラクトバチルス・パラプランタラム # 1 1 - 1 (*L. paraplantarum* # 1 1 - 1) 株に代えて、ラクトコッカス・ラクティス J C M 5 8 0 5 株を用いた以外は、実施例 1 と同様に、カイコの筋収縮により自然免疫活性化能を測定した。

【 0 0 8 7 】

比較例 4 ~ 6 の結果を表 3 に示す。

【 0 0 8 8 】

【表 3】

No.	菌株	自然免疫活性化能 (U/mg)
比較例4	ラクトバチルス・ブルガリクス	24
比較例5	ラクトバチルス・カゼイ	5.6
比較例6	ラクトコッカス・ラクティス	17

40

【 0 0 8 9 】

比較例 4 ~ 6 の乳酸菌は、実際に市販の醗酵乳の製造に用いられている乳酸菌である。

表 3 に示されるように、実施例 1 の本発明の乳酸菌 # 1 1 - 1 は、比較例 4 ~ 6 の乳酸菌に比べても、より高い自然免疫活性化能を有することが分かった。

50

【0090】

本発明のラクトバチルス・パラプランタラム # 11 - 1 の滅菌処理物を測定物質としたとき、自然免疫活性化能が極めて高いことから、本発明の乳酸菌、本発明の乳酸菌の死菌、又は、本発明の乳酸菌の処理物（培養物；濃縮物；ペースト化物；噴霧乾燥物、凍結乾燥物、真空乾燥物、ドラム乾燥物等の乾燥物；液状化物；希釈物；破碎物；殺菌加工物；培養物からの抽出物；等）は、自然免疫活性化剤として優れているものである。

【0091】

また、ラクトバチルス・パラプランタラムは、属、種として既に醗酵食品としての安全性が確認されている。

本発明のラクトバチルス・パラプランタラム # 11 - 1 を用いて、乳を醗酵させて得られる飲食品は、自然免疫活性化能を有する。

10

【0092】

実施例 2

< 細菌感染に対する効果実験 >

独立行政法人理化学研究所より入手した、ラクトバチルス・プランタラムに属する「*Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* JCM 1057」（以下、図 3 でも「*L. plantarum* PGN」と略記する）から、常法に従いペプチドグリカン画分を調製し、それをカイコの人工餌に、2.7 質量% 混ぜて、2 日間与え続けた。注射前に総量で、0.041 g 与えたことになる。

その後、以下のように、緑膿菌感染に対するラクトバチルス・プランタラム乳酸菌のペプチドグリカンの効果を調べた。

20

【0093】

緑膿菌（PAO1）を 30℃ にて終夜培養した。その菌液を生理食塩水で 1000 倍に希釈し、その希釈液 50 μL をカイコの体液中に注射した。

注射の後は、カイコへのペプチドグリカンの食餌を中止して、27℃ で飼育し、経時的に生存数（生存割合）を計測した。

【0094】

図 3 に示すように、ラクトバチルス・プランタラムのペプチドグリカン画分を食したカイコは、食さないカイコに比べ、緑膿菌感染後の生存時間が延長することが判明した。

ラクトバチルス・プランタラムのペプチドグリカン画分によって、カイコの緑膿菌感染に対する抵抗性が付与されたことが分かった。

30

この結果は、経口投与されたラクトバチルス・プランタラムのペプチドグリカンが、腸内でカイコの自然免疫を活性化し、その結果、感染制御に対して効果を示したためと考えられる。

【0095】

乳酸菌ラクトバチルス・プランタラムのペプチドグリカンを有効成分として含有する剤は、ヒト等の哺乳類に対しても感染症予防治療剤として有用であることが分かった。

また、ラクトバチルス・プランタラムは、既に醗酵食品としての安全性が確認されている。従って、乳酸菌ラクトバチルス・プランタラムのペプチドグリカンを有効成分として含有する感染症予防治療剤は、ヒト等の哺乳類の飲食品として有用である。

40

【0096】

実施例 3

< 自然免疫活性化剤及び感染症予防治療剤の製造 >

<< 錠剤 >>

培養した # 11 - 1 を、121℃、20 分で滅菌処理後、濃縮した。該濃縮させた # 11 - 1 の培養液 20.0 mg、ラクトース 40 mg、デンプン 20 mg、及び、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース 5 mg を均一に混合した後、ヒドロキシプロピルメチルセルロース 8 質量% 水溶液を結合剤として湿式造粒法で打錠用顆粒を製造した。これに、滑沢性を与えるのに必要なステアリン酸マグネシウムを 0.5 mg ~ 1 mg 加えてから打錠機を用いて打錠し錠剤とした。

50

【0097】

<<液剤>>

上記濃縮させた#11-1の培養液10.0mgを、2質量%の2-ヒドロキシプロピル-β-サイクロデキストリン水溶液10mLに溶解し注射用液剤とした。

【産業上の利用可能性】

【0098】

本発明の新規乳酸菌や該処理物は、高い自然免疫活性化能を有し、更には、感染症予防治療効果もある。よって、本発明の乳酸菌を利用した、自然免疫を活性化させる自然免疫活性化剤や感染症予防治療剤を含有する薬剤や飲食品を提供することができ、医薬品業界、食品業界等で広く利用可能である。

【0099】

本願は、2015年2月6日に出願した日本の特許出願である特願2015-022567に基づくものであり、その出願の全ての内容はここに引用し、本発明の明細書の開示として取り込まれるものである。

【受託番号】

【0100】

NITE BP-02005

【配列表フリーテキスト】

【0101】

配列番号1は、ラクトバチルス(Lactobacillus)属に属する未知の菌株の、16S rDNAのほぼ全長にあたる塩基配列である。

10

20

【図1】

Lactobacillus paraplantarum strain DSM 10687 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
 Sequence ID: ref|NR_025447.1| Length: 1502 Number of Matches: 1
 Range 1: 31 to 1497

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
2590 bits(1402)	0.0()	1452/1475(98%)	9/1475(0%)	Plus/Plus	

Features:

Query 7 TGC AAGTCGAAGCACTCTGGTAAATGATGAAAGTGCTTCACTCGATGATTAACAT 66
 Sbjct 31 TGC AAGTCGAAGCACTCTGGTAAATGATGAAAGTGCTTCACTCGATGATTAACAT 82

Query 67 TTGAGTGAAGTGGCAACTGGTGAATGAAACCTGGGAAACCTGCCAGAACTGGGGATAA 126
 Sbjct 83 TTGAGTGAAGTGGCAACTGGTGAATGAAACCTGGGAAACCTGCCAGAACTGGGGATAA 142

Query 127 CACCTGGAAACAGATGCTAAATACCCATAAACAACCTGGACCCATGCTCCGAACTTGA 186
 Sbjct 143 CACCTGGAAACAGATGCTAAATACCCATAAACAACCTGGACCCATGCTCCGAACTTGA 202

Query 187 GATGGCTTCGGTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCTATTAGCTAGATGGTGAAGTAA 246
 Sbjct 203 GATGGCTTCGGTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCTATTAGCTAGATGGTGAAGTAA 262

Query 247 CGGCTACCAATGGCAATGATACATGCGCCCTGAGAGGGTAACTCGCCACATTTGGACT 306
 Sbjct 263 CGGCTACCAATGGCAATGATACATGCGCCCTGAGAGGGTAACTCGCCACATTTGGACT 322

Query 307 GAGACACGCCCAACTCTACGGGAGGACAGTGGGAACTTTCACAAATGGACGAAA 366
 Sbjct 323 GAGACACGCCCAACTCTACGGGAGGACAGTGGGAACTTTCACAAATGGACGAAA 382

Query 367 GTCTGATGGAGCAACCGCCGCTGAGTGAAGAGGGTTCGGCTCTCAAACTCTGTGTTT 426
 Sbjct 383 GTCTGATGGAGCAACCGCCGCTGAGTGAAGAGGGTTCGGCTCTCAAACTCTGTGTTT 442

Query 427 AAAGAAGAAATATCTGAGAGTAACTGTTCCAGGTATTGACGGTATTTAACAGAAAGCCA 486
 Sbjct 443 AAAGAAGAAATATCTGAGAGTAACTGTTCCAGGTATTGACGGTATTTAACAGAAAGCCA 502

Query 487 CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAAATACGTAGTGGCAAGGTTATCCGGATTTA 546
 Sbjct 503 CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAAATACGTAGTGGCAAGGTTATCCGGATTTA 562

Query 547 TTGGGCTAAAGCGAGCCAGCGGGTTTTAAAGTCTGATGTGAAGGCTTCCGGCTCAAC 606
 Sbjct 563 TTGGGCTAAAGCGAGCCAGCGGGTTTTAAAGTCTGATGTGAAGGCTTCCGGCTCAAC 622

Query 607 CGAAGAAGTGCATCGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAAGGACAGTGGAACTCCGATG 666
 Sbjct 623 CGAAGAAGTGCATCGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAAGGACAGTGGAACTCCGATG 682

Query 667 TGTAGCGGTGAATGCTGTAGATATATGGAAGAACCACTGCGGGAAGCGCGCTGTCTGG 726
 Sbjct 683 TGTAGCGGTGAATGCTGTAGATATATGGAAGAACCACTGCGGGAAGCGCGCTGTCTGG 742

Query 727 CTCTAAGTCAAGCTGAGGCTCGAAAGTATGGTAAACAGATGATGATGATGATGATGAT 786
 Sbjct 743 CTCTAAGTCAAGCTGAGGCTCGAAAGTATGGTAAACAGATGATGATGATGATGATGAT 802

Query 787 TCCATACCGTAAAGCACTGAATGCTAAGTCTTGGAGGGTTTCGGCCCTCAAGTCTGAGC 846
 Sbjct 803 TCCATACCGTAAAGCACTGAATGCTAAGTCTTGGAGGGTTTCGGCCCTCAAGTCTGAGC 862

Query 847 TAACCCATTAAGCATTTCGGCTGGGAGTACGGCCCAAGGCTCAAACTCAAGGAATTG 906
 Sbjct 863 TAACCCATTAAGCATTTCGGCTGGGAGTACGGCCCAAGGCTCAAACTCAAGGAATTG 922

Query 907 ACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGTTTAATTCGAAGCTACCGGAAGAACTT 966
 Sbjct 923 ACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGTTTAATTCGAAGCTACCGGAAGAACTT 982

Query 967 ACCAGGCTTTCAGACTACTGCAAACTTAAAGATTAAGAGATTAGACTTCCCTTCGGGACAT 1026
 Sbjct 983 ACCAGGCTTTCAGACTACTGCAAACTTAAAGATTAAGAGATTAGACTTCCCTTCGGGACAT 1042

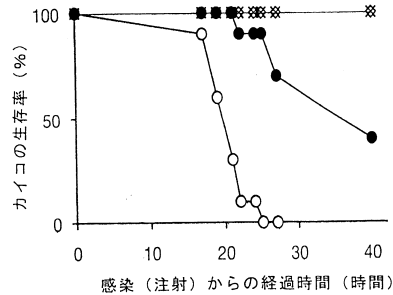
Query 1027 TACAGGTGGTGCATGGTGTGCTCAGCTGCTGCTGATGATGATGATGATGATGATGATG 1086
 Sbjct 1043 TACAGGTGGTGCATGGTGTGCTCAGCTGCTGCTGATGATGATGATGATGATGATGATG 1102

Query 1087 CGAGCGCAACCTTATTATTAGTTCAGCATTAAAGTTGGCACTCTAGTGAGACTGGCC 1146

【図2】

Sbjct	1183	CGAGCGCAACCTTATTATTAGTTCAGCATTAAAGTTGGCACTCTGGTGAAGCTGGCC	1162
Query	1147	GTGCAAAACCGGAGGAGGTGGGATGAGCTAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGCC	1206
Sbjct	1163	GTGCAAAACCGGAGGAGGTGGGATGAGCTAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGCC	1222
Query	1207	TACACAGCTGCTCAAAATGGATGGTACAACGAGTTCGAACTCGGACAGTAAGCTAACT	1266
Sbjct	1223	TACACAGCTGCTCAAAATGGATGGTACAACGAGTTCGAACTCGGACAGTAAGCTAACT	1282
Query	1267	CCTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGTCGGAACTG	1326
Sbjct	1283	CCTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGTCGGAACTG	1342
Query	1327	CTAATAATCCCGGATCAGCATGCCCGGGTAAATAGCTCCCGGCGTTGTACACCGCC	1386
Sbjct	1343	CTAATAATCCCGGATCAGCATGCCCGGGTAAATAGCTCCCGGCGTTGTACACCGCC	1402
Query	1387	CCTCACACCATGAGAGTTTGAACCCCAAGTCCGGTGGGTAACTTCGGGG-ACCAGC	1445
Sbjct	1403	CCTCACACCATGAGAGTTTGAACCCCAAGTCCGGTGGGTAACTTCGGGG-ACCAGC	1462
Query	1446	CGGCTAAGTGGGACAGATGATTAGGCGAAGTTCG	1486
Sbjct	1463	CGGCTAAGTGGGACAGATGATTAGGCGAAGTTCG	1497

【図3】



- 通常食餌+緑膿菌非感染(注射せず)
- *— ラクトバチルス・プラタルム PGN のペプトグリカン食餌+緑膿菌非感染(注射せず)
- 通常食餌+緑膿菌感染(注射)
- ラクトバチルス・プラタルム PGN のペプトグリカン食餌+緑膿菌感染(注射)

【配列表】

0006594911000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100191972

弁理士 宮坂 友梨

(72)発明者 関水 和久

東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

審査官 鈴木 崇之

(56)参考文献 国際公開第2011/115114(WO, A1)

特開2009-112232(JP, A)

国際公開第2012/063345(WO, A1)

国際公開第2012/173163(WO, A1)

国際公開第2012/108347(WO, A1)

特表2012-533319(JP, A)

西田智, 自然免疫を活性化する乳酸菌による感染症予防, 第62回日本感染症学会東日本地方会
学術集会、第60回日本化学療法学会東日本支部総会 合同学会プログラ, 2013年10月
7日, p.76, S8-4

MAKINO S., et al., Immunomodulatory Effects of Polysaccharides Produced by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OL, *J. Dairy Sci.*, 2006年, Vol. 89, pp. 2873-2881

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/20

A23L 33/135

A61K 35/747

A61P 37/04

A61P 31/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

PubMed

DWPI(Derwent Innovation)