(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4059532号
(P4059532)

(45)発行日　平成20年3月12日(2008.3.12)　(24)登録日　平成19年12月28日(2007.12.28)

(51)Int.Cl.		F I	
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/18
A61K 38/16	(2006.01)	A61K	37/14
A61P 31/04	(2006.01)	A61P	31/04

請求項の数 1　(全 13 頁)

(21)出願番号　特願平6-191487
(22)出願日　平成6年8月15日(1994.8.15)
(65)公開番号　特開平8-59500
(43)公開日　平成8年3月5日(1996.3.5)
審査請求日　平成13年8月6日(2001.8.6)

前置審査

(73)特許権者　000006127
森永乳業株式会社
東京都港区芝５丁目３３番１号
(74)代理人　100093230
弁理士　西澤　利夫
(72)発明者　島村　誠一
神奈川県座間市東原５－１－８３
森永乳業株式会社栄養科学研究所内
(72)発明者　福渡　康夫
神奈川県座間市東原５－１－８３
森永乳業株式会社栄養科学研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】腸内細菌の体内移行を阻止するペプチド混合物と、このペプチド混合物を含有する組成物

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
ラクトフェリンをプロテアーゼで加水分解し、抗菌性ペプチドを除去して得られるペプチド混合物であって、次の理化学的および生物学的性質を有するペプチド混合物を有効成分として含有する腸管から臓器への腸内細菌の体内移行を阻止するための組成物、
ｂ）生体外で抗菌作用を有しないこと、
ｃ）抗原性が未分解のラクトフェリンの１／１０００から１／１０００００であること、
ｄ）高速液体クロマトグラフィーにより測定した平均分子量が３００から１３，０００ダルトンであること、
ｅ）ラクトフェリンの分解率が６％から５０％であること。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【産業上の利用分野】
この発明は、腸内細菌の体内移行（Bacterial translocation 、以下ＢＴと記載することがある）を阻止する効果を発現する物質、すなわち、ラクトフェリンの加水分解物から抗菌性ペプチド等の抗菌性分画を除去して得られるラクトフェリン加水分解物由来のペプチド混合物と、このペプチド混合物を有効成分として含有する食品、医薬品または飼料等の組成物に関するものである。さらに詳しくは、この発明は、それ自体では生体外で全く抗菌活性を示さず、ヒトおよび動物に経口的または経管的に投与することにより、腸管から臓器への腸内細の体内移行を阻止し、腸内細菌の体内移行に起因する日和見感染症、嫌気

性菌感染症、敗血症等の疾病を予防する効果を有するラクトフェリン加水分解物由来の抗菌性を有しないペプチド混合物と、このペプチド混合物を有効成分として含有する組成物に関するものである。

【０００２】

【従来の技術】

近年、抗生物質等による化学療法の発展並びに栄養面および衛生面の向上は病原性微生物の感染症を著しく減少させ、ヒトおよび動物の寿命、ヒトの重症患者および重症の動物の生存期間の延長が実現された。一方、感染に対する抵抗力の弱い未熟児、小児、老人、外科手術、火傷、リュウマチ、ガン、エイズ等の患者等、いわゆる易感染性宿主と呼ばれる人の数が増加し、日和見感染症、嫌気性菌感染症、敗血症等の罹患が深刻な問題となっている。

【０００３】

これらの感染症は、消化管内に常在する細菌が、患者の血中、病巣中に検出される［ジャーナル・オブ・インフェクシャス・ディジーズ（Journal of Infectious Diseases），第１５２巻，第９９～１０３ページ，１９８５年］ことから、腸内細菌の腸管から臓器への体内移行が原因と考えられている。また、これらの感染症に罹患する人は、消化管の機能が低下している場合が多く、主に経腸栄養または高カロリー輸液による経中心静脈栄養（total parenteral nutrition。以下ＴＰＮと記載することがある）による栄養補給が実施されるが、これらの栄養法がＢＴを一層促進することが知られている。

【０００４】

ＴＰＮでは消化管を使用しないため、消化管の機能は低下し、消化管粘膜の萎縮および粘液量の減少が見られる（輸液・栄養ジャーナル，第１５巻，第１３１１～１３１９ページ，１９９３年）。本来、消化管は粘膜および粘液によって微生物の侵入から宿主を保護しているが、ＴＰＮにおける消化管粘膜の萎縮および粘液の減少は、消化管粘膜の透過性を増大させ、消化管腔内の微生物が粘膜を通過し、リンパ系、門脈へ移行するＢＴを惹起する。ＢＴは、腸管膜リンパ節、脾臓、肝臓、腎臓等の臓器、血液、さらには全身性の感染症に波及し、易感染性宿主に感染症を誘発する［フューラー編，「プロバイオティクス・ザ・サイエンティフィック・ベーシス」(Probiotics, The Scientific Basis)，チャップマン・アンド・ホール社，ロンドン，第５５～５８ページ，１９９２年］。

【０００５】

これに対して、経腸栄養は、ＴＰＮに比して消化管粘膜の形態変化の程度が少なく、しかも糖、アミノ酸代謝、免疫機能等の栄養的または臨床的側面についても優れている（外科，第５１巻，２４～３１ページ，１９８９年）ため、栄養補給は早期にＴＰＮから経腸栄養に移行すべきことが推奨されている。

しかしながら、経腸栄養の場合でも、成分組成により消化管粘膜の構造と機能の相違が認められている（輸液・栄養ジャーナル，第１３巻，１０４３～１０４８ページ，１９９１年）。高カロリー輸液を経口投与した動物実験では、ＢＴが認められることから［ジャーナル・オブ・パーエンテラル・アンド・エンテラル・ニュートリション(Journal of Parenteral and Enteral Nutrition），第１４巻，第４４２～４４７ページ，１９９０年］、経腸栄養でも栄養成分の相違によりＢＴの誘導される可能性が指摘されている。

【０００６】

さらに、これらの栄養補給が必要な患者は、疾病の治療または感染症の予防のため、同時に放射線療法、抗生物質、抗癌剤の投与等のストレスが付加されている場合が多く、いずれも消化管粘膜の損傷、消化管内の常在細菌叢の変化等の副作用を併発し、相乗的にＢＴを惹起して、感染症を悪化させる危険性が高い。動物を用いた実験例では、通常の固形飼料、経腸栄養剤、ＴＰＮ等で飼育したマウスの腹腔内に、５－フルオロウラシル、メトトレキセート等の抗癌剤または免疫抑制剤を投与することにより、ＢＴが高頻度に発生することも知られている[カレント・ミクロバイオロジー（Current Microbiology），第８巻，第２８５～２９２ページ，１９８３年] 。また、マウスに抗生物質（ペニシリン、クリンダマイシン等）を経口投与した場合、ＢＴが高頻度に発生することも知られている[イ

ンフェクション・アンド・イミュニティー（Infection and immunity），第３３巻、第８５４～８６１ページ，１９８４年］。

【０００７】

このように液状または流動状の食品のみを摂取しているヒトおよび動物は、ＢＴが誘導されやすい状態である上に、治療に用いられる薬剤、治療方法等により、一層ＢＴが誘導されるという深刻な状況におかれているにもかかわらず、有効な治療方法はほとんど開発されていなかった。

一方、ＢＴの防止に有効な成分に関しては、若干の報告がある。グルタミンまたは核酸成分を添加した高カロリー輸液のＴＰＮが、動物試験で有効であるという報告があるが［輸液・栄養ジャーナル，第１２巻，第１２５１～１２５５ページ，１９９０年、サージェリー（Surgery)，第１０４巻，第９１７～９２３ページ，１９８８年、および第４７回日本栄養・食糧学会総会講演要旨集，第２０３ページ，１９９３年］、経口投与での効果は知られていない。

【０００８】

また、経腸栄養でのＢＴの防止に有効な成分として、消化管内の内容量を増加させる非発酵性のセルロースおよびカオリンが、動物試験で有効であるという報告があるが［ジャーナル・オブ・パーエンテラル・アンド・エンテラル・ニュートリション（Journal of Parenteral and Enteral Nutrition)，第１４巻，第４４２～４４７ページ，１９９０年、およびニュートリション（Nutrition)，第８巻，第２６６～２７１ページ，１９９２年］、これらの成分は腸内で消化されないため、低残渣性が要求される経腸栄養での使用範囲は極めて限定されている。

【０００９】

以上のように、経口的または経管的に摂取してＢＴを阻止し、感染症の予防に有効な成分およびこの成分を含有する医薬品、食品、飼料等はほとんど開発されていない。

最近、抗癌剤の５－フルオロウラシルの投与によって誘導されるマウスの内因性敗血症に、経口投与したウシラクトフェリンの有効性が報告された（第７１回日本細菌学会関東支部総会講演抄録集，第３５ページ，１９９４年）。この内因性敗血症にはＢＴが関与していると推定されるが、ラクトフェリンの抑制効果は固形飼料を摂取した場合のみ観察され、液体の経腸栄養剤を摂取した場合の効果は全く検討されていない。さらに、消化吸収性の改善、抗原性を低下させるためにラクトフェリンを蛋白質分解酵素等で処理した場合の影響については全く検討されていない。

【００１０】

ラクトフェリンは涙、唾液、末梢血、乳汁中に含まれている鉄結合性糖蛋白質であり、従来より、大腸菌、カンジダ菌、クロストリジウム菌等の有害微生物に対して抗菌作用を示すことが知られている［ジャーナル・オブ・ペディアトリクス（Journal of Pediatrics)，第９４巻，第１～９ページ，１９７９年］。ラクトフェリン由来の生理活性物質として、ラクトフェリン加水分解物を有効成分とする抗菌剤（特開平５－３２００６８号公報）、抗菌性ペプチドおよび抗菌剤（特開平５－９２９９４号公報）は、多くの食品、医薬品等への応用例が報告されている。しかしながら、ラクトフェリン加水分解物から抗菌性ペプチドを除去したペプチドおよび糖ペプチドの混合物を主成分とする分画（以下ペプチド混合物と記載する）、すなわち、それ自体では抗菌活性を示さないペプチド混合物の生理活性は全く知られておらず、その用途に関しても何ら報告されていない。

【００１１】

【発明が解決しようとする課題】

以上のように、経口的または経管的に摂取してＢＴを阻止し、ＢＴに起因する感染症の予防に有効な物質、この物質を含有する医薬品、食品、飼料等の開発が待望されているにもかかわらず、前記の限定された報告を除き、そのような物質および組成物については従来何らの報告もなされていなかった。

【００１２】

この発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであり、消化管機能および感染抵

抗力の低下したヒトおよび動物が、経口的または経管的に摂取するだけで腸内細菌のＢＴを阻止し、感染症を予防する効果があり、しかも消化吸収性、低抗原性、および低残渣性に優れ、副作用のないペプチド混合物を提供することを目的としている。

【００１３】

この発明は、また、以上のペプチド混合物を含有する組成物、すなわち食品、医薬品、飼料等を提供することを目的としている。

【００１４】

【課題を解決するための手段】

この発明の発明者らは、前記の課題を解決をするため、各種タンパク質のプロテアーゼ加水分解物を調製し、ＢＴを阻止する活性をスクリーニングしたが、その中でそれ自体では生体外で全く抗菌活性を示さないペプチド混合物がＢＴを阻止する活性を有すること、すなわち、抗菌活性を示さないラクトフェリン加水分解物由来のペプチド混合物が、ヒトおよび動物が経口的または経管的に摂取することにより、ＢＴを阻止する効果を有することを発見し、この発明を完成した。

【００１５】

すなわち、この発明は、ラクトフェリンをプロテアーゼで加水分解し、抗菌性ペプチドを除去して得られるペプチド混合物であって、次の理化学的および生物学的性質を有するペプチド混合物を有効成分として含有する腸管から臓器への腸内細菌の体内移行を阻止する組成物、

ｂ）生体外で抗菌作用を有しないこと、

ｃ）抗原性が未分解のラクトフェリンの１／１０００から１／１０００００であること、

ｄ）高速液体クロマトグラフィーにより測定した平均分子量が３００から１３，０００ダルトンであること、

ｅ）ラクトフェリンの分解率が６％から５０％であること、を提供する。

【００１６】

以下、この発明について詳しく説明する。この発明のＢＴを阻止するラクトフェリン加水分解物由来のペプチド混合物は、例えば、特開平５－２３８９４８号公報に記載の方法に従って製造することができる。具体的には、ラクトフェリンのペプシン加水分解物から疎水性クロマトグラフィーによって抗菌性ペプチドを分画して精製する場合、各ペプチドはクロマトグラフ用担体に吸着した抗菌性ペプチドと、クロマトグラフ用担体に吸着しないで溶出する抗菌性ペプチド以外のペプチド混合物とに分画される。この発明のペプチド混合物は、後者の画分に存在し、ペプチドおよび糖ペプチドを主成分とするものであり、後記する試験例から明らかなように、ペプチド混合物そのものには生体外で抗菌活性が存在しない。

【００１７】

この発明のペプチド混合物は、ラクトフェリン加水分解物から抗菌性ペプチドを分離した残渣を、常法（例えば、噴霧乾燥、真空乾燥、凍結乾燥等）により乾燥した粉末、限外濾過膜によって濃縮した濃縮液またはこの濃縮液を常法により乾燥した粉末として、最も安価に製造し得るが、製造コストを無視すれば、各種プロテアーゼにより、抗菌性ペプチドを生成させることなくラクトフェリンを加水分解した分解物からも得ることができる。

【００１８】

この発明のペプチド混合物は、ラクトフェリンの加水分解工程後に、酵素を加熱失活させる工程を経るため、殺菌はこの加熱失活工程で既に達成されているが、必要があればさらに加熱殺菌することもできる。

以上のようにして得られたこの発明のペプチド混合物は、次のａ）～ｅ）の理化学的および生物学的性質を有する。

ａ）腸管から臓器への腸内細菌の体内移行を阻止する。

ｂ）生体外で抗菌作用を有しない。

ｃ）抗原性が未分解のラクトフェリンの１／１０００から１／１０００００である。

ｄ）高速液体クロマトグラフィーにより測定した平均分子量が３００から１３，０００ダ

ルトンである。
ｅ）ラクトフェリンの分解率が６％から５０％である。
【００１９】
その他に、さらにこの発明のペプチド混合物は、乳中に含まれるラクトフェリンをプロテアーゼで加水分解し、抗菌性ペプチドを除去して得られるペプチドを主成分とするものであるから、水溶解性、消化吸収性、低抗原性および低残渣性に優れ、かつ副作用も存在しないという優れた特徴を有している。
なお、前記理化学的および生物学的性質は、次の方法による試験によるものであり、後記の試験例および実施例における試験方法も次の方法による。
１）抗原性
ウサギ抗ラクトフェリン血清を用いたエライザ法（ELISA:Enzyme linked immunosorbent assay.東邦医学会雑誌、第３５巻、第５０９～５１６ページ、１９８９年）によって測定し、未分解のラクトフェリンに対する相対値により表示した。
２）平均分子量
常法（宇井信生等編，「タンパク質・ペプチドの高速液体クロマトグラフィー」，化学増刊第１０２号，第２４１～２５１ページ，株式会社化学同人，１９８４年）により、高速液体クロマトグラフシステム（島津製作所製。ＬＣ－７Ａ）を用いて分子量分布を測定し、得られたデータを解析プログラム（島津製作所製。ＣＲ－４Ａ）を用いて算出した重量平均分子量により表示した。
３）分解率
ケルダール法により試料の全窒素を、ホルモール滴定法により試料のホルモール態窒素を測定し、これらの値から次式により算出した数値により表示した。
【００２０】
分解率（％）＝（ホルモール態窒素／全窒素）×１００
４）生体外の抗菌性
生体外の抗菌性は、試験例１に記載の方法により行った。すなわち、１％バクトペプトン（ディフコ・ラボラトリー社製）および水からなる液体培地２ｍｌに、０～２０ｍｇ／ｍｌの濃度範囲で段階的に試料を添加し、対数増殖期のEscherichia coli 0111 （東京大学医科学研究所より分譲）を10^6／ｍｌの生菌数濃度で接種し、３７℃で１６～２０時間培養し、培養後の培養液の供試菌の発育状態を６６０ｎｍの吸光度で測定し、いずれの濃度に試料を添加した場合にも供試菌の増殖が見られる場合に抗菌性無しと判定した。
５）ＢＴ阻止効果
試験例２、３または６に記載の方法により作出されるＢＴ誘導マウスにおいて、試料を添加した飼料でマウスを飼育した場合のＢＴ発生率を測定し、ＢＴ発生率の低下が認められた場合にＢＴ阻止効果が有ると判定した。ＢＴ発生率の測定方法は次のとおりである。
【００２１】
飼育終了後のマウスを解剖し、腸間膜リンパ節を無菌的に採取し、少量の希釈液（光岡知足著、「腸内細菌の世界」、３２２ページ、叢文社、１９８０年）を添加し、テフロン製ホモジナイザーにて均質化した懸濁液を２等分し、ＢＬ寒天平板培地およびＴＳ寒天平板培地（光岡知足著、「腸内細菌の世界」、３１９ページおよび３２７ページ、叢文社、１９８０年）にそれぞれ塗布し、ＢＬ寒天平板培地は嫌気的条件下、ＴＳ寒天平板培地は好気的条件下で、３７℃で４８時間培養する。培養後の寒天培地上に細菌のコロニーが形成された場合にＢＴが発生したものと評価した。このように、腸間膜リンパ節中に細菌が検出されたマウスの匹数の、供試したマウスの匹数に対する割合をＢＴ発生率と表示した。
【００２２】
次に、この発明のペプチド混合物を有効成分として含有する組成物について説明する。
この発明の組成物は、加工乳、乳清飲料、育児用ミルク、治療用ミルク、飼料用ミルク、経腸または経管栄養剤等摂取時に液状または流動状の形態の食品、飼料、医薬品等である。経腸または経管栄養剤としては、普通流動食、ブレンダー食、濃厚流動食等の完全流動食、低蛋白流動食、低脂肪流動食、低コレステロール流動食、低ナトリウム流動食、治療

乳、成分栄養流動食等の特殊流動食であってもよい。この発明の組成物に添加するペプチド混合物は、加熱による変性がほとんどないため食品、医薬品、飼料等に添加する場合、製造工程のいずれの段階であっても可能である。

【００２３】

この発明の組成物は、少なくとも０．０１％（重量。以下特に断りのない限り同じ）、望ましくは０．１～５％のペプチド混合物を含有し、感染抵抗力、消化管機能が低下したヒトおよび動物に経口的または経管的に投与することによって、ＢＴを阻止する効果があり、ＢＴに起因するあらゆる感染症を予防することができる。

【００２４】

ヒトおよび動物に経口的または経管的に投与する場合の有効投与量は、後述する試験例２から６に示したように、ＢＴを高頻度に誘導するモデルマウスを用いて確認した。このモデルマウスは、感染抵抗力、消化管機能が低下したヒトおよび動物に近似させるため、液状または流動状の食餌だけで飼育し、場合によって抗ガン剤のメトトレキセートを投与しＢＴを誘導した。なお、ヒトおよび動物に起こるＢＴの発症部位は、臓器の中でも腸間膜リンパ節が最も早期に、また高頻度に認められる。このモデルマウスの腸間膜リンパ節でのＢＴ発生率は、食餌にこの発明のペプチド混合物を０．０１％以上添加して投与した場合に低下し、特に０．１～５％の濃度にペプチド混合物を添加した場合に顕著な効果を示した。これらの結果から、この発明のペプチド混合物が、感染抵抗力、消化管機能が低下したヒトおよび動物に発症するＢＴを抑制することは明らかである。

【００２５】

次に試験例を示してこの発明をさらに詳しく説明する。

（試験例１）

この試験は、この発明のペプチド混合物の抗菌活性を調べるために行った。

１％バクトペプトン（ディフコ・ラボラトリー社製）水からなる液体培地２ｍｌに、０～２０ｍｇ／ｍｌの濃度範囲で段階的にこの発明のペプチド混合物（実施例１と同一の方法により製造）を添加し、対数増殖期のEscherichia coli 0111 （東京大学医科学研究所より分譲）を10^6／ｍｌの生菌数濃度で接種し、３７℃で１６～２０時間培養した。培養後、培養液の供試菌の発育状態を６６０ｎｍの吸光度で測定した結果、ペプチド混合物をいずれの濃度に添加した場合にも供試菌の増殖抑制は認められず、このペプチド混合物に抗菌活性は存在しないことが認められた。

【００２６】

一方、対照として用いた未分解のウシラクトフェリン（森永乳業社製）は２ｍｇ／ｍｌ以上の濃度で供試菌の増殖を完全に阻止し、抗菌性ペプチド（特開平５－２３８９４８号公報の実施例１と同一の方法により製造した）は６μｇ／ｍｌ以上の濃度で供試菌の増殖を完全に阻止した。

なお、他の方法により製造したこの発明のペプチド混合物についても同様の試験を行ったが、ほぼ同様な結果が得られた。

（試験例２）

この試験は、この発明のペプチド混合物のＢＴ阻止効果を試験するために必要なＢＴ誘導マウス作出のために行った。

【００２７】

先ず、この試験に使用する液状または流動状の食品をマウスに投与した場合にＢＴを高頻度に誘導するモデルマウスを次のようにして作成した。即ち、９週齢のＳＰＦマウス（日本ＳＬＣから購入）、ＢＡＬＢ／ｃ、雌、２０匹を１０匹づつ２群に分け、糞食防止ネットを配設したケージに入れ、通常の固形飼料および水で２週間飼育した。次いで、１群のマウスに表１に示す組成の高カロリー輸液のみを無菌パックから経口的に自由摂取させ、２週間飼育した。他の１群は対照として固形飼料および水で同様に２週間飼育した。

【００２８】

【表１】

高カロリー輸液の組成
４．２５％アミノ酸（ＥＳポリタミン）
２８％ブドウ糖
３２．７ｍＥｑ／Ｌナトリウムイオン
３２ｍＥｑ／Ｌカリウムイオン
９９．７ｍＥｑ／Ｌ塩素イオン
２８ｍＥｑ／Ｌ乳酸イオン
４ｍＥｑ／Ｌ硫酸イオン
９ｍＥｑ／Ｌカルシウムイオン
６ｍＥｑ／Ｌ燐酸イオン
４ｍＥｑ／Ｌマグネシウムイオン
４ｍｌ／Ｌビタミン剤（オーツカＭＶ注）

（注）アミノ酸は武田薬品工業社販売、その他は大塚製薬社発売の経中心静脈用製剤を用いた。

【００２９】

飼育終了後のマウスを解剖し、腸間膜リンパ節を無菌的に採取し、少量の希釈液（光岡知足著、「腸内細菌の世界」、３２２ページ、叢文社、１９８０年）を添加し、テフロン製ホモジナイザーにて均質化した。この均質化した懸濁液を２等分し、ＢＬ寒天平板培地およびＴＳ寒天平板培地（光岡知足著、「腸内細菌の世界」、３１９ページおよび３２７ページ、叢文社、１９８０年）にそれぞれ塗布し、ＢＬ寒天平板培地は嫌気的条件下、ＴＳ寒天平板培地は好気的条件下で、３７℃で４８時間培養した。培養後の寒天培地上に細菌のコロニーが形成されたマウスの場合、すなわち腸間膜リンパ節中に細菌が検出されたマウスの場合を、ＢＴが発生したものと評価し、各群のＢＴ発生率を測定した。

【００３０】

その結果、固形飼料で飼育した群のＢＴ発生率は１／１０（１０匹中１匹にＢＴが発生したことを示す。以下特に断りのない限り同じ）であったのに対し、高カロリー輸液で飼育した群のＢＴ発生率は８／１０であった。従って、マウスを固形飼料で飼育した場合、ＢＴはほとんど発生しなかったが、高カロリー輸液だけで飼育することにより、ＢＴ誘導マウスが、高頻度で作出されることが認められた。

（試験例３）

この試験は、この発明のペプチド混合物のＢＴ阻止効果を試験するために必要なＢＴ誘導マウス作出の他の方法を調べるために行った。

【００３１】

４週齢のＳＰＦマウス（日本ＳＬＣから購入）、ＢＡＬＢ／ｃ、雌、２０匹を１０匹づつ２群に分けて糞食防止ネットを配設したケージに入れ、市販の牛乳のみを無菌パックから経口的に自由摂取させて２週間飼育した。飼育後のマウスを解剖し、腸間膜リンパ節を無菌的に採取し、試験例２と同様の方法によりＢＴ発生率を測定した。

【００３２】

その結果、ＢＴ発生率は１５／２０で、牛乳だけで飼育することによってもＢＴ誘導マウスを高頻度で作成可能であることが認められた。

（試験例４）

この試験は、この発明のペプチド混合物のＢＴ阻止効果を調べるために行った。　実施例１と同一の方法により製造したこの発明のペプチド混合物を０、０．０１、０．１、１および３％の各濃度で、試験例２と同一の高カロリー輸液に添加し、試験例２と同一の方法により試験し、ＢＴ発生率を比較した。なお、試験した高カロリー輸液中のアミノ酸とペプチド混合物の合計濃度は、すべて４．２５％に調整した。また、マウスは９週齢のＳＰＦマウス（日本ＳＬＣから購入）、ＢＡＬＢ／ｃ、雌を、各群２０匹、合計１００匹用いた。この試験の結果は表２に示すとおりである。

【００３３】
表２の結果からこの発明のペプチド混合物は、０．０１％以上の添加濃度でＢＴの発生を顕著に阻止することが認められた。一方、対照として牛乳カゼイン酵素分解物（森永乳業社製）を高カロリー輸液に３％の濃度で添加し、同様に試験したが、ＢＴ発生率は１６／２０でありＢＴ阻止効果は認められなかった。　なお、他の方法により製造したこの発明のペプチド混合物を用いて同様の試験を行ったが、ほぼ同じようなＢＴ阻止効果が得られた。
【００３４】
【表２】

	ペプチド混合物の添加濃度（%）				
	0	0．01	0．1	1．0	3．0
BT発生率	15/20	8/20	4/20	1/20	1/20

【００３５】
（試験例５）
この試験は、この発明のペプチド混合物のＢＴ阻止効果を調べるために行った。
実施例１と同一の方法により製造したこの発明のペプチド混合物を０、０．０１、０．１、１および５％の各濃度で市販の牛乳に添加し、試験例３と同一の方法により試験を行ってＢＴ発生率を比較した。使用したマウスは、４週齢のＳＰＦマウス（日本ＳＬＣから購入）、ＢＡＬＢ／ｃ、雌を、各群１０匹、合計５０匹用いた。
【００３６】
この試験の結果は、表３に示すとおりである。表３の結果から、ペプチド混合物は０．０１％以上の添加濃度でＢＴの発生を顕著に阻止することが認められた。一方、対照として牛乳カゼイン酵素分解物（森永乳業社製）を牛乳に５％濃度で添加し、同様に試験したが、ＢＴ発生率は８／１０でありＢＴ阻止効果は認められなかった。
【００３７】
なお、他の方法により製造したこの発明のペプチド混合物を用いて同様の試験を行ったが、ほぼ同じようなＢＴ阻止効果が得られた。
【００３８】
【表３】

	ペプチド混合物の添加濃度（%）				
	0	0．01	0．1	1．0	5．0
BT発生率	8/10	4/10	2/10	1/10	0/10

【００３９】
（試験例６）
この試験は、マウスに薬剤を投与してＢＴを高頻度に誘導した場合のペプチド混合物のＢＴ阻止効果について調べるために行った。
市販の経腸栄養剤エンシュアー（日本ダイナボット社発売）、およびこの栄養剤にこの発明のペプチド混合物（実施例１と同一の方法により製造）を０．５％添加した栄養剤の２種類を飼料とし、８週齢のＳＰＦマウス（日本ＳＬＣから購入）、ＢＡＬＢ／ｃ、雌に３週間自由摂取させた。マウスは各飼料に１群１０匹ずつ、２群合計２０匹を用いた。各飼

料で１週間飼育した２群のマウスに対し、生理食塩水に溶解したメトトレキセート（シグマ社製）をマウスの体重１ｋｇ当たり５０ｍｇ、１００ｍｇの割合でマウスの腹腔内にそれぞれ単回投与した。投与後２週間、各飼料で飼育した後、マウスを解剖し、腸間膜リンパ節を無菌的に採取し試験例２と同一の方法によりＢＴ発生率を測定した。この試験の結果は表４に示すとおりである。

【００４０】

表４の結果から、この発明のペプチド混合物は、薬剤で誘導されるＢＴの発生を顕著に阻止することが認められた。

なお、他の製造方法により得られたこの発明のペプチド類についても同様の試験を行ったが、ほぼ同じようなＢＴ阻止効果が得られた。

【００４１】

【表４】

ペプチド混合物添加量	メトトレキセート投与量（mg/kg）	
	５０	１００
０．５％	２／１０	２／１０
無添加	７／１０	９／１０

【００４２】

（試験例７）

この試験は、ペプチド混合物の急性毒性を調べるために行った。

１）使用動物

６週齢のＣＤ（ＳＤ）系のラット（日本ＳＬＣから購入）の両性を用い、雄および雌を無作為にそれぞれ３群ずつ計６群（１群５匹）に分けて使用した。

２）試験方法

実施例１と同一の方法で製造したペプチド混合物を体重１ｋｇ当り１０００および２０００ｍｇの割合で注射用水（大塚製薬社製）に１０％の濃度で溶解し、体重１００ｇ当たり１ｍｌおよび２ｍｌの割合で金属製玉付き針を用いて単回強制経口投与し、２週間観察して急性毒性を試験した。なお、対照として雄および雌の各１群に、注射用水を体重１００ｇ当たり２ｍｌの割合で同様に経口投与した。

３）試験結果

この試験の結果は、表５に示すとおりである。表５から明らかなように、このペプチド混合物を１０００ｍｇ／ｋｇ体重および２０００ｍｇ／ｋｇ体重の割合で投与した群に死亡例は認められなかった。従って、このペプチド混合物のＬＤ$_{50}$は、２０００ｍｇ／ｋｇ体重以上であり、毒性は極めて低いことが判明した。

【００４３】

なお、他の製造方法により得られたこの発明のペプチド混合物についても同様の試験を行ったが、ほぼ同じような結果が得られた。

【００４４】

【表５】

	投与量 (mg/kg体重)	投与濃度 (%)	投与容量 (ml/100g体重)	死亡例数 (死亡例数/全投与数)	LD_{50} (mg/kg体重)
雄	0	0	2	0／5	
	1000	10	1	0／5	
	2000	10	2	0／5	2000以上
雌	0	0	2	0／5	
	1000	10	1	0／5	
	2000	10	2	0／5	2000以上

【００４５】
次に実施例を示してこの発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、この発明は以下の実施例に限定されるものではない。
【００４６】
【実施例】
実施例１
牛乳から分離した市販のラクトフェリン（森永乳業社製）１ｋｇを精製水９リットルに溶解し、１規定の塩酸を添加してｐＨを３．０に調整した。市販の豚ペプシン（１：１００００。和光純薬工業社製）３０ｇを添加して均一に混合し、３７℃に４時間保持し、８５℃で１０分間加熱して酵素を失活させた。次いで１規定水酸化ナトリウムを添加してｐＨを７．０に調整し、不溶物を濾過して除去し、ラクトフェリン分解物溶液を得た。このラクトフェリン分解物溶液を凍結乾燥し、ラクトフェリン分解物の粉末約９６０ｇを得た。
【００４７】
このラクトフェリン分解物の分解率を前記と同様の方法により測定した結果、１１．３％であった。
前記粉末８００ｇを精製水２０リットルに溶解し、ブチルトヨパール（商標。東ソー社製）６５０Ｍを充填し、予め精製水で平衡化したカラム（直径３６ｃｍ×高さ１５ｃｍ）に流速０．２リットル／分で通液し、流出液の２８０ｎｍにおける吸光度が０．０１以下になるまで０．６リットル／分の流速で精製水を通液して洗浄した。得られたブチルトヨパールに未吸着の流出画分、約６０リットルを逆浸透膜（旭化成社製）により濃縮し、更に凍結乾燥し、ペプチド混合物の粉末約７２０ｇを得た。
【００４８】
得られたペプチド混合物について、前記と同様の方法により試験した結果、抗菌活性はなく、抗原性は未分解のラクトフェリンの１００００分の１に低減しており、分解率は１２％であり、平均分子量は約３２００ダルトンであった。
実施例２
牛乳１００リットルを７０℃に加温し、１５０ｋｇ／ｃｍ^2 の圧力で均質化し、９０℃で１０分間殺菌し、殺菌した牛乳４９．５リットルに実施例１と同一の方法で調製したペプチド混合物の粉末０．５ｋｇを添加して均一に溶解し、最終濃度１％のこの発明のペプチド混合物を含有する乳飲料約５０ｋｇを調製した。
【００４９】
この乳飲料および市販の牛乳を無菌パックに分注し、試験例５と同様に４週齢のＳＰＦマウス（日本ＳＬＣから購入）、ＢＡＬＢ／ｃ、雌各10匹に２週間自由摂取させた。飼育後のマウスを解剖し、腸間膜リンパ節を無菌的に採取し、試験例２と同様の方法でＢＴ発生率を測定した。その結果、ＢＴ発生率は市販の牛乳を投与した場合に８／１０であったのに対し、実施例１に記載のペプチド混合物を添加して調製した乳飲料を投与した場合には１／１０であり、ＢＴの発生は顕著に抑制された。
実施例３

牛乳から分離した市販のラクトフェリン（森永乳業社製）４ｋｇを精製水３６リットルに溶解し、市販の豚トリプシン（シグマ社製）１２０ｇを添加して均一に混合し、３７℃に４時間保持し、８５℃で１０分間加熱して酵素を失活させ、不溶物を濾過して除去し、凍結乾燥し、ラクトフェリン分解物の粉末約４ｋｇを得た。

【００５０】

このラクトフェリン分解物の分解率を前記と同様の方法により測定した結果、７．８％であった。

【００５１】

前記粉末８００ｇを精製水２０リットルに溶解し、ブチルトヨパール（商標。東ソー社製）６５０Ｍを充填し、予め精製水で平衡化したカラム（直径３６ｃｍ×高さ１５ｃｍ）に流速０．２リットル／分で通液した。次いで流出液の２８０ｎｍにおける吸光度が０．０１以下になるまで０．６リットル／分の流速で精製水を通液して洗浄した。この様にして得られたブチルトヨパールに未吸着の流出画分、約６５リットルを逆浸透膜（旭化成社製）により濃縮し、更に凍結乾燥し、ペプチド混合物の粉末約７６０ｇを得た。これら一連の分画操作を４回繰り返し、合計約３ｋｇのペプチド混合物の粉末を得た。

【００５２】

得られたペプチド混合物について、前記と同様の方法により試験した結果、抗菌活性はなく、抗原性は未分解のラクトフェリンの１０００分の１に低減しており、分解率は７．９％であり、平均分子量は約１３，０００ダルトンであった。

実施例４

ホエー蛋白酵素分解物（森永乳業社製）１１．８ｋｇ、デキストリン（昭和産業社製）３６ｋｇ、および少量の水溶性ビタミンとミネラルを水２００ｋｇに溶解し、水相をタンク内に調製した。一方、大豆サラダ油（太陽油脂社製）３ｋｇ、パーム油（太陽油脂社製）８．５ｋｇおよびサフラワー油（太陽油脂社製）２．５ｋｇ、レシチン（味の素社製）０．２ｋｇ、脂肪酸モノグリセリド（花王社製）０．２ｋｇおよび少量の脂溶性ビタミンを混合溶解し、油相を調製した。タンク内の水相に油相を添加し、攪拌して混合し、７０℃に加温し、ホモゲナイザーにより１５０ｋｇ／ｃｍ^2 の圧力で均質化し、９０℃で１０分間殺菌し、濃縮し、噴霧乾燥し、中間製品粉末約６０ｋｇを得た。

【００５３】

この中間製品粉末５０ｋｇに蔗糖（ホクレン製）６．７ｋｇ、実施例３と同一の方法により製造したペプチド混合物の粉末３ｋｇ、およびアミノ酸混合粉末（味の素社製）０．３ｋｇを添加し均一に混合し、粉末状の経腸栄養剤Ａ約６０ｋｇを得た。

これとは別に中間製品粉末５ｋｇに蔗糖（ホクレン製）０．６７ｋｇ、ホエー蛋白酵素分解物（森永乳業社製）０．３ｋｇ、およびアミノ酸混合粉末（味の素社製）０．０３ｋｇを添加し均一に混合し、粉末状の経腸栄養剤Ｂ約６ｋｇを得た。

【００５４】

この２種類の経腸栄養剤粉末を水で１５％の濃度にそれぞれ溶解し、実施例３に記載のペプチド混合物を０．７５％（以下、経腸栄養剤Ａと記載する）および０％（以下、経腸栄養剤Ｂと記載する）含有する経腸栄養剤を調製した。この２種類の経腸栄養剤を無菌パックに分注し、試験例６と同様に８週齢のＳＰＦマウス（ＳＬＣ）、ＢＡＬＢ／ｃ、雌各１０匹に３週間自由摂取させた。飼育１週間目に、生理食塩水に溶解したメトトレキセートをマウスの体重１ｋｇ当たり１００ｍｇの割合で、マウスの腹腔内にそれぞれ単回投与した。投与後２週間、各飼料で飼育した後、マウスを解剖し、腸間膜リンパ節を無菌的に採取し、ＢＴ発生率を測定した。その結果、ＢＴ発生率は実施例３に記載のペプチド混合物を含まない経腸栄養剤Ｂを投与したマウスの場合に９／１０であったのに対し、この発明のペプチド混合物を含む経腸栄養剤Ａを投与した場合には１／１０であり、ＢＴの発生は顕著に抑制されていた。

【００５５】

【発明の効果】

以上詳しく説明したとおり、この発明によって、ラクトフェリン加水分解物由来の抗菌性

のないペプチド混合物と、このペプチド混合物を有効成分として含有する組成物が提供され、これらによって次のとおりの効果が奏せられる。
１）ヒトおよび動物の腸管から臓器への腸内細菌の体内移行を阻止し、日和見感染症、嫌気性菌感染症、敗血症等の疾病を予防する効果を有する。
２）未熟児、新生児、幼児、老人、慢性消化器疾患患者、術後患者等の消化機能、感染抵抗力の低下したヒトの経口的または経管的栄養組成物の成分として副作用が少ない状態で用いられる。
３）腸内細菌の体内移行に起因する感染症の治療において、薬剤投与量の減少を可能にする。
４）抗生物質、抗癌剤等のヒトおよび動物の腸管に障害を及ぼす副作用を緩和する効果を有する。

フロントページの続き

(72)発明者　寺口　進
神奈川県座間市東原５－１－８３　森永乳業株式会社栄養科学研究所内
(72)発明者　新　光一郎
神奈川県座間市東原５－１－８３　森永乳業株式会社栄養科学研究所内
(72)発明者　桑田　英文
神奈川県座間市東原５－１－８３　森永乳業株式会社栄養科学研究所内

審査官　小堀　麻子

(56)参考文献　特開平０５－２３８９４８（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
A61K　38/00-38/58
A61P　1/00-43/00
CA(STN)
BIOSIS(STN)
MEDLINE(STN)
REGISTRY(STN)