

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-196355

(P2014-196355A)

(43) 公開日 平成26年10月16日(2014. 10. 16)

|                                     |               |             |
|-------------------------------------|---------------|-------------|
| (51) Int.Cl.                        | F I           | テーマコード (参考) |
| <b>A 6 1 K 35/74 (2006.01)</b>      | A 6 1 K 35/74 | G 4 C 0 8 7 |
| <b>A 6 1 P 37/08 (2006.01)</b>      | A 6 1 P 37/08 |             |
| <b>A 6 1 P 17/00 (2006.01)</b>      | A 6 1 P 17/00 |             |
| <b>A 6 1 P 17/02 (2006.01)</b>      | A 6 1 P 17/02 |             |
| <b>A 6 1 P 17/04 (2006.01)</b>      | A 6 1 P 17/04 |             |
| 審査請求 有 請求項の数 10 O L (全 15 頁) 最終頁に続く |               |             |

|              |                                     |          |                             |
|--------------|-------------------------------------|----------|-----------------------------|
| (21) 出願番号    | 特願2014-145321 (P2014-145321)        | (71) 出願人 | 000006138                   |
| (22) 出願日     | 平成26年7月15日 (2014. 7. 15)            |          | 株式会社明治                      |
| (62) 分割の表示   | 特願2010-500565 (P2010-500565)<br>の分割 |          | 東京都江東区新砂1丁目2番10号            |
| 原出願日         | 平成21年2月26日 (2009. 2. 26)            | (74) 代理人 | 110000084<br>特許業務法人アルガ特許事務所 |
| (31) 優先権主張番号 | 特願2008-49714 (P2008-49714)          | (74) 代理人 | 100077562                   |
| (32) 優先日     | 平成20年2月29日 (2008. 2. 29)            |          | 弁理士 高野 登志雄                  |
| (33) 優先権主張国  | 日本国 (JP)                            | (74) 代理人 | 100096736                   |
|              |                                     |          | 弁理士 中嶋 俊夫                   |
|              |                                     | (74) 代理人 | 100117156                   |
|              |                                     |          | 弁理士 村田 正樹                   |
|              |                                     | (74) 代理人 | 100111028                   |
|              |                                     |          | 弁理士 山本 博人                   |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗アレルギー剤

(57) 【要約】

【課題】 抗アレルギー剤の提供。

【解決手段】 プロピオニバクテリウム・フロイデンライヒの発酵物を有効成分とする抗アレルギー剤。

【選択図】 なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

プロピオニバクテリウム・フロイデンライヒの発酵物を有効成分とする抗アレルギー剤。

**【請求項 2】**

更に、抗酸化剤を含む請求項 1 記載の抗アレルギー剤。

**【請求項 3】**

発酵物が、乳製品のタンパク質分解酵素処理物を含有する培地を用いてプロピオン酸菌を培養した培養液である請求項 1 又は 2 記載の抗アレルギー剤。

**【請求項 4】**

乳製品が、脱脂粉乳、ホエイ粉及びミルクプロテインから選ばれる 1 種以上のものである請求項 3 記載の抗アレルギー剤。

**【請求項 5】**

経口投与用又は経口摂取用であることを特徴とする、請求項 1～4 の何れか 1 項記載の抗アレルギー剤。

**【請求項 6】**

プロピオニバクテリウム・フロイデンライヒの発酵物を乾燥質量換算において、ヒト体重 1 kg 当り 1 日量 10～500 mg 摂取するものである請求項 5 記載の抗アレルギー剤。

**【請求項 7】**

アトピー性皮膚炎を抑制する抗アレルギー剤である請求項 1～6 のいずれかに記載の抗アレルギー剤。

**【請求項 8】**

乾皮・痂皮形成、発赤・出血、組織脱落・擦り傷、浮腫、及び掻痒行動から選ばれるアトピー性皮膚炎症状を抑制する抗アレルギー剤である請求項 1～7 のいずれかに記載の抗アレルギー剤。

**【請求項 9】**

乾皮・痂皮形成、発赤・出血、組織脱落・擦り傷、浮腫、及び掻痒行動のアトピー性皮膚炎症状を抑制する抗アレルギー剤である請求項 1～8 のいずれかに記載の抗アレルギー剤。

**【請求項 10】**

ダニに由来するアトピー性皮膚炎症状を抑制する抗アレルギー剤である請求項 1～9 のいずれかに記載の抗アレルギー剤。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、抗アレルギー剤に関する。

**【背景技術】****【0002】**

近年、食物、スギ等の特定の花粉、ハウスダスト、化学物質等による鼻炎、結膜炎、気管支喘息、アトピー性皮膚炎等のアレルギー症状が社会問題とされている。特に、住宅の高気密化と共に、施工時のホルムアルデヒド、トルエン等の揮発性有機化合物の使用、ペットの室内飼育や冷暖房の連続使用等によって、ダニ、その死骸やフン、カビ、花粉、ペットの毛等のハウスダストや揮発性有機化合物等の化学物質等が室内に長期間存在して、アレルギー症状を引き起こすことが問題とされている。

**【0003】**

通常、アレルギー症状の軽減には抗ヒスタミンやステロイド等の薬剤に頼る面が大きく、費用や副作用等の点で患者に強いられる負担は大きいため、比較的簡便に安全性の高い食品由来のものを摂取することによってアレルギー症状を軽減できることが望まれている。

例えば、柿の葉エキスでは、受け身皮膚アナフィラキシー（PCA）反応とアトピー性皮

10

20

30

40

50

膚炎モデルでの有効性が確認されている（特許文献１）。また微生物でもこのような有効性が確認された例はあるが、この微生物は遺伝子組換え大腸菌であり、十分に安全性を検証する必要がある（特許文献２）。更に、アレルギー症状を軽減できる食品や安全性の高い天然微生物等の検索が望まれる。

#### 【０００４】

ところで、プロピオン酸菌（Propionibacterium）、ラクトコッカス属（Lactococcus）乳酸菌やロイコノストック属（Leuconostoc）乳酸菌は従来より飲食品の製造に用いられており、またこれらの培養液中に１，４－ジヒドロキシ－２－ナフトエ酸（DHNA）が含まれていることが報告されている（特許文献３，非特許文献１）。

【特許文献１】特開２０００－１３９４０６号公報

【特許文献２】特開２００２－１５４９７６号公報

【特許文献３】国際公開２００３／０１６５４４号パンフレット

【非特許文献１】K.Fruichi et al., Applied and Environmental Microbiology, May 2007, p.3137-3143.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

#### 【０００５】

本発明の目的は、安全性の高い抗アレルギー剤を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

#### 【０００６】

本発明者等は、アレルギー症状の低減できる物質を検討した結果、プロピオン酸菌発酵物がダニ由来抗原によるアトピー様皮膚炎及び受け身皮膚アナフィラキシー（PCA）反応を軽減する作用を有し、当該発酵物が抗アレルギー剤として有用であることを見出した。

#### 【０００７】

従って、本発明は、プロピオン酸菌発酵物を有効成分とする抗アレルギー剤を提供するものである。

また、本発明は、プロピオン酸菌発酵物の、抗アレルギー剤の製造のための使用を提供するものである。

また、本発明は、プロピオン酸菌発酵物を有効量投与又は摂取するアレルギー症状の予防・改善方法を提供するものである。

【発明の効果】

#### 【０００８】

本発明は、従来から食品の製造に用いられている天然微生物による発酵物であるので、安全性が高い抗アレルギー剤として有用である。また、微生物を用いるため当該発酵物を、大量に生産することも可能である。

【図面の簡単な説明】

#### 【０００９】

【図１】蒸留水投与群[蒸留水]、プロピオン酸菌発酵物投与群[プロピオン酸菌発酵物]、培地（未発酵物）投与群[培地]及び皮膚炎非惹起群[非惹起]における試験期間中の皮膚炎症状スコアの推移を示す（平均±標準誤差で表記。\* $P<0.01$ ，\* $P<0.05$ ，Dunnettの多重比較、蒸留水投与群との比較）。

【図２】蒸留水投与群[蒸留水]、プロピオン酸菌発酵物投与群[プロピオン酸菌発酵物]、培地（未発酵物）投与群[培地]及び皮膚炎非惹起群[非惹起]におけるday14、day21及びday28の血清中総IgE濃度を示す（平均±標準誤差で表記。\* $P<0.05$ ，Dunnettの多重比較、蒸留水投与群との比較）。

【図３】蒸留水投与群[蒸留水]、プロピオン酸菌発酵物投与群[プロピオン酸菌発酵物]、培地（未発酵物）投与群[培地]及び皮膚炎非惹起群[非惹起]におけるday14、day21及びday28のSAA濃度を示す（平均±標準誤差で表記。\* $P<0.05$ ，Dunnettの多重比較、蒸留水投与群との比較）。

【図４】蒸留水投与群のPCA反応惹起部位[蒸留水]、プロピオン酸菌発酵物投与群のPCA反

10

20

30

40

50

応惹起部位[プロピオン酸菌発酵物]、培地投与群のPCA反応惹起部位[培地]、ケトチフェンフマル酸塩投与群のPCA反応惹起部位[ケトチフェンフマル酸塩]、および各群のPCA反応非惹起部位[PCA(-)]における漏出エバンスブルー量を示す。(平均±標準誤差で表記。\*\*)  $P<0.01$ , Dunnettの多重比較、蒸留水投与群のPCA反応惹起部位[蒸留水]と比較。)

【図5】試験食A：酸性飲料(プラセボ)、試験食B：プロピオン酸菌乳清発酵物含有酸性飲料(アクティブ1)、C：プロピオン酸菌乳清発酵物含有ヨーグルト飲料(アクティブ2)における角層水分量(AU)を示す(平均±標準偏差で表記。\* $P<0.05$  (paired t-test)、# $P<0.05$  (Tukey-Kramer法による3群間の多重比較検定))。

【図6】試験食A：酸性飲料(プラセボ)、試験食B：プロピオン酸菌乳清発酵物含有酸性飲料(アクティブ1)、C：プロピオン酸菌乳清発酵物含有ヨーグルト飲料(アクティブ2)におけるキメスコアを示す(平均±標準偏差で表記。\* $P<0.05$  (paired t-test)、# $P<0.05$  (Tukey-Kramer法による3群間の多重比較検定))。

【発明を実施するための形態】

#### 【0010】

本発明で用いるプロピオン酸菌は、プロピオニバクテリウム (Propionibacterium) 属、プロピオニシモナス (Propionicimonas) 属、プロピオニフェラックス (Propioniferax) 属、プロピオニマイクロビウム (Propionimicrobium) 属、プロピオニビブリオ (Propionivibrio) 属等があり、特に制限されないが、プロピオニバクテリウム属に属する菌が好ましい。プロピオニバクテリウム属の菌としては、例えば、プロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ (P.freudenreichiiまたはPropionibacterium freudenreichii)、プロピオニバクテリウム・トエニー (P.thoeniiまたはPropionibacterium thoenii)、プロピオニバクテリウム・アシディプロピオニシ (P.acidipropioniciまたはPropionibacterium acidipropionici)、プロピオニバクテリウム・ジェンセニー (P.jenseniiまたはPropionibacterium jensenii) 等のチーズ用のプロピオン酸菌；プロピオニバクテリウム・アビダム (P.avidum)、プロピオニバクテリウム・アクネス (P.acnes)、プロピオニバクテリウム・リンホフィラム (P.lymphophilum)、プロピオニバクテリウム・グラニューロサム (P.granulosam)、プロピオニバクテリウム・アラビノサム (P.arabinosum)、プロピオニバクテリウム・シクロヘキサニカム (P.cyclohexanicum)、Propionibacterium innocuum、Propionibacterium intermedium、Propionibacterium pentosaceum、Propionibacterium peterssonii、Propionibacterium propionicum、Propionibacterium zeae、等が挙げられ、好ましくはチーズ用のプロピオン酸菌である。このなかでもプロピオニバクテリウム・フロイデンライヒがより好ましく、特にプロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ (Propionibacterium freudenreichii) ET-3株 (平成13年8月9日付で、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566)) に受託番号FERM BP-8115として寄託されている。識別のための表示はET-3、ブタペスト条約に基づく寄託への移管日は平成14年7月11日である。) が好ましい。

#### 【0011】

本発明のプロピオン酸菌発酵物の製造過程にある培養工程で用いる培地の栄養源は、プロピオン酸菌の培養に用いられるものであればよく (例えば、特許文献3及び非特許文献1)、乳製品、酵母エキス、大豆エキス、トリプチケース等のペプトンや、これらを多く含有する食品を用いることができる。あるいはこれらの酵素処理物を用いてもよい。このなかでも乳製品のタンパク質分解酵素処理物を含有する培地が好ましい。当該培地は当該タンパク質分解酵素処理物を主成分とすることがより好ましく、当該タンパク質分解酵素分解物の含有量は、液体培地中、0.1~40質量%がより好ましく、1~20質量%が更に好ましい。

#### 【0012】

上記タンパク質分解酵素分解物に用いられる乳製品としては、生乳、濃縮乳、全粉乳、脱脂乳、脱脂粉乳、ミルクプロテイン (MPC(milk protein concentrate))、カゼイン、ホエイ、濃縮ホエイ、ホエイタンパク質濃縮物 (WPC)、ホエイタンパク分離物 (WP

I) 及びホエイ粉等が挙げられ、これらを単独で又は2種以上用いてもよい。このうち、脱脂乳、脱脂粉乳、ホエイ濃縮物、ホエイ粉、ミルクプロテインが好ましい。これらは市販品のものを使用してもよい。この乳製品の使用量は、液体培地中、0.1～40質量%が好ましく、1～20質量%がより好ましい。

また、上記タンパク質分解酵素は、市販品のものを用いればよいが、プロテアーゼが好ましく、このうち中性プロテアーゼが好ましく、当該タンパク質分解酵素にはプロテアーゼの他にペプチダーゼを含んでいてもよい。使用するプロテアーゼまたはペプチダーゼは特に限定されないが、例えば、食品グレードプロテアーゼは、エンド型プロテアーゼ、エキソ型プロテアーゼ、エキソ型ペプチダーゼ／エンド型プロテアーゼ複合酵素、プロテアーゼ／ペプチダーゼ複合酵素を含む。エンド型プロテアーゼは、例えば、キモシン (EC 3.4.23.4, Maxiren, modified yeast *Kluyveromyces lactis* 由来、GIST-BROCADES N.V.)、AlcalaseR (*Bacillus licheniformis* 由来、ノボ社)、エスペラーゼ (*B. lentus* 由来、ノボ社)、NeutralseR (*B. subtilis* 由来、ノボ社)、プロタメックス (バクテリア由来、ノボ社)、PTN6.0S (ブタ膵臓トリプシン、ノボ社) など、エキソ型ペプチダーゼ／エンド型プロテアーゼ複合酵素としては、例えばフレーバーザイム (*Aspergillus oryzae* 由来、ノボ社) などが挙げられる。他に、エンド型プロテアーゼとして、例えば、トリプシン (CAS No.9002-07-7、EC 3.4.21.4、ウシ膵臓由来、Product No.T8802、SIGMA)、ペプシン (CAS No.9001-75-6、EC 3.4.4.1、ブタ胃粘膜由来、SIGMA)、キモトリプシン (ノボ社、ベーリンガー社)、プロテアーゼN「アマノ」G (*Bacillus subtilis* 由来；天野エンザイム)、ビオプラザーゼ (*Bacillus subtilis* 由来；ナガセ産業)、パパインW-40 (天野エンザイム)、エキソ型プロテアーゼとして、膵カルボキシペプチダーゼ、小腸刷子縁のアミノペプチダーゼなどが挙げられる。また、プロテアーゼ／ペプチダーゼ複合酵素としては、例えばプロテアーゼA「アマノ」G (*Aspergillus oryzae* 由来；天野エンザイム)、ウマミザイムG (ペプチダーゼ及びプロテアーゼ、*Aspergillus oryzae* 由来；天野エンザイム) を用いることができる。酵素の由来は上記の記載に限定されず、動物、植物、微生物のいずれに由来するものであってもよいが、*Aspergillus oryzae* 由来のものが好適である。これらの酵素は商品名・由来・製造元など限定的なものを意味しない。本発明の実施において、酵素は1種もしくは2種以上を組み合わせてもよい。好適な例として、プロテアーゼA「アマノ」G (*Aspergillus oryzae* 由来；天野エンザイム) を挙げることができるが、この例に限定されない。また、前述の酵素を組み合わせて用いる場合には、それぞれの酵素反応は、同時でもよく、別々に行ってもよい。この酵素の使用量は、乳製品中のタンパク質が分解できる量を用いればよいが、乳製品100質量部に対して、0.01～10質量部が好ましく、0.1～10質量部がより好ましい。

#### 【0013】

上記乳製品のタンパク質分解酵素処理物の製造方法は、乳製品にタンパク質分解酵素を添加し、加温処理して乳製品中のタンパク質の分解を行う。酵素分解開始時のpH、酵素分解時間、酵素反応温度は本発明品が得られるのであれば特に限定されない。

加温温度は、タンパク質分解酵素が活性化する温度であればよく、20～60℃が好ましく、40～60℃がより好ましく、40～50℃がさらに好ましい。

加温時間は、特に限定されないが、1～10時間が好ましく、3～8時間がより好ましい。

このときのpH (25℃) は、特に限定されないが、2～8が好ましく、5～8がより好ましい。pHを調整する緩衝剤としては、炭酸、酢酸、クエン酸、フマル酸、リンゴ酸、乳酸、グルコン酸、酒石酸等の有機酸塩、リン酸、塩酸、硫酸等の無機塩、水酸化ナトリウム等の水酸化物、アンモニア又はアンモニア水等が挙げられ、これらを単独又は2種以上組み合わせて用いてもよい。

#### 【0014】

上記乳製品のタンパク質分解酵素分解物の製造方法について以下に一例を示す。

脱脂粉乳を3～6% (w/w) 及びミルクプロテイン3～6% (w/w) の濃度になるように水で溶解又は懸濁した溶液を作製し、当該溶液にプロテアーゼを乳製品100質量

10

20

30

40

50

部に対して0.25～5質量部添加し、混合液を調製する。当該混合溶液を40～50℃、5～7時間、pH6～8で乳製品中のタンパク質の分解を行い、乳製品のプロテアーゼ処理物（タンパク質分解酵素分解物）を得ることができる。

#### 【0015】

また、ホエイ粉（10w/w%）及びプロテアーゼアマノA「アマノ」G（0.07w/w%、天野エンザイム社製）を水に溶解し、47℃（pH6.6）で2時間酵素分解を行い、その後、85℃、10分間加熱することにより酵素を失活させて乳製品のタンパク質分解酵素分解物を得ることもできるが、この例に限定されない。

#### 【0016】

本発明に用いる培地には、上記乳製品のタンパク質分解酵素処理物の他、トリブチケース、フィトン、酵母エキス、糖質等の任意成分を適宜添加してもよく、このうち少なくとも酵母エキスを添加することが好ましく、この酵母の使用量は、乳製品100質量部に対して、0.1～10質量部が好ましく、0.5～10質量部がより好ましい。

糖質としては、乳糖又はこのラクターゼ処理物、グルコース、果糖、ショ糖又は糖廃液も使用することができ、このうち乳糖が好ましい。乳清ミネラル等のミネラル類などを含有してもよい。

これら任意成分は、市販品のものを使用すればよく、またはこれらを多く含有する食品を用いてもよい。

#### 【0017】

本発明に用いる培地の例として、培地量の3%（w/w）の脱脂粉乳（明治乳業）、3.4%（w/w）のMilk Protein Concentrate（MPC：Murray Goulburn）、0.25%（w/w）のプロテアーゼ（プロテアーゼA「アマノ」G、天野エンザイム社製）を適当量のイオン交換水に溶解し、47℃で6時間、脱脂粉乳及びMPC中のタンパク質を酵素分解し、分解後に0.5%（w/w）のビール酵母エキス（P2G、アサヒフードアンドヘルスケア社製）を添加し、pHを6.8～6.9に調整した後、121℃で15分の滅菌をしたものを挙げることができる。なお、酵素分解時のpHは炭酸カリウム溶液を用いて6.6～7.0に調整する。

#### 【0018】

また、ホエイ粉（10w/w%）及びプロテアーゼアマノA「アマノ」G（0.07w/w%、天野エンザイム社製）を水に溶解し、47℃（pH6.6）で2時間酵素分解を行い、その後、85℃、10分間加熱することにより酵素を失活させ、次に、ビール酵母エキス（0.10w/w%、アサヒフードアンドヘルスケア社製）及び硫酸アンモニウム（0.27w/w%）を添加し、pHを6.7に調整後、121℃で7分間滅菌したものも挙げることができるが、この例に限定されない。

#### 【0019】

本発明において生乳、濃縮乳、全粉乳、脱脂乳、脱脂粉乳、ミルクプロテイン（MPC（milk protein concentrate））、カゼイン、濃縮ホエイ及びホエイ粉等、乳タンパクに由来するものを栄養源に用いたプロピオン酸菌発酵物を、以降プロピオン酸菌乳タンパク質発酵物という。さらに、ホエイ、WPCまたはWPI等、ホエイに由来するものを栄養源に用いたプロピオン酸菌発酵物を、以降、プロピオン酸菌乳清発酵物という。

#### 【0020】

本発明の培養方法は、公知の各種好氣的又は嫌氣的培養方法を用いることができるが、液体培地による好気又は嫌気培養法が大量生産の点から好ましい。

また、プロピオン酸菌発酵物の生産効率を高める点から、嫌氣的条件下における前培養で予めプロピオン酸菌の菌体数を増加させた後に、嫌氣的又は好氣的条件下における本培養を行うことが好ましい。

プロピオン酸菌は嫌氣性である点から嫌氣的培養法を用いることがより好ましく、嫌氣的培養法を用いた後引き続き好氣的培養法を用いることが更に好ましい。

#### 【0021】

嫌氣的培養法における培養中の培養温度は20～40℃が好ましく、30～40℃がよ

10

20

30

40

50

り好ましい。また、このときの培地 pH は中性～微酸性、具体的には 5.0～8.0 に調整することが好ましく、6.0～7.0 がより好ましく、さらに好ましくは 6.2～6.8 である。当該培養期間は 1～12 日間が好ましく、5～12 日間がより好ましい。

また、好氣的培養法における培養中の培養温度は 20～40℃ が好ましく、30～40℃ がより好ましい。また、このときの培地 pH は中性～微酸性、具体的には 5.0～8.0 に調整することが好ましく、6.0～7.0 がより好ましく、さらに好ましくは 6.2～6.8 である。当該培養期間は 1～10 日間が好ましく、3～7 日間がより好ましい。

#### 【0022】

本発明の有効成分であるプロピオン酸菌発酵物は、上記培地を用いて上記培養方法によりプロピオン酸菌を培養し、得られたものであり、プロピオン酸菌及び培養物の両方を含む。

得られたプロピオン酸菌発酵物をそのまま使用してもよいが、適宜濃縮や希釈、乾燥等を行ってもよい。

このとき、抗酸化剤を添加することにより、生成された DHNA が 2-アミノ-3-カルボキシ-1,4-ナフトキノン (2-amino-3-carboxy-1,4-naphthoquinone (ACNQ)) に変化することを防ぐことができる。

ここで、抗酸化剤としては、アスコルビン酸若しくはその塩、アスコルビン酸エステル、エリソルビン酸等が用いられるが、アスコルビン酸又はその塩が特に好ましい。当該塩としては、ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属塩；カルシウム、マグネシウム等のアルカリ土類金属塩；アンモニア塩等が挙げられる。

抗酸化剤の含有量は、プロピオン酸菌発酵物中に 0.001～10 質量%、更に 0.01～5 質量%、特に 0.04～3 質量% が好ましい。

なお、当該発酵物中のプロピオン酸菌は、生菌、死滅菌又はその粉碎物の何れでもよい。

このとき、当該発酵物 1 mL 中にプロピオン酸菌が  $1 \sim 9 \times 10^{10}$  cfu 含まれていることが好ましく、 $2 \sim 6 \times 10^{10}$  cfu 含まれていることがより好ましい。又は、当該発酵物 1 mL 中に乾燥質量換算でプロピオン酸菌が 50～500 mg 含まれていることが好ましく、100～300 mg 含まれていることがより好ましい。

#### 【0023】

本発明のプロピオン酸菌発酵物の製造法について以下に一例を示す。

前培養したプロピオン酸菌含有培養液を培養液 (1～3 L) に接種後、本培養を行う。

30～40℃ の培養中、培養液を窒素ガス 0.1～1 L/min でスパーキングし、攪拌速度 50～200 rpm で 140～160 時間嫌氣的培養を行う。このとき、プロピオン酸菌接種後 1～2 日培養した後、任意の培地組成成分である糖質を 0.5～2.0 mL/h で連続的に添加してもよい。

更に、上記嫌氣的培養に引き続き好氣的培養を行うことが好ましく、このとき、窒素ガスを酸素ガスに代えて同様に通気し、110～130 時間好氣的培養を行う。

このようにしてプロピオン酸菌を培養してプロピオン酸菌の培養液を得、更に当該培養液中に抗酸化剤を添加し、プロピオン酸菌発酵物として使用することができる。

#### 【0024】

また、本発明の有効成分であるプロピオン酸菌発酵物は、国際公開第 03/016544 号パンフレット等に記載の公知の製造法に準じて製造することもできる。本明細書において、「プロピオン酸菌発酵物」には、プロピオン酸菌による発酵によって得られた培養物自体、培養物に抗酸化剤を添加したもの、及びそれらの処理物、例えば、培養物をろ過もしくは除菌して得られた培養濾液や培養上清液、その培養濾液等をエバポレーター等により濃縮した濃縮物、ペースト化物、希釈物又は (凍結) 乾燥物が含まれる。

#### 【0025】

更に、上記のように得られたプロピオン酸菌発酵物は、プロピオン酸菌発酵物の不純物を除去する又は有効成分を濃縮するため、活性炭やイオン交換樹脂等の吸着クロマトグラフィー等を用いて精製してもよい。また、プロピオン酸菌発酵物を、溶媒で希釈した可溶

10

20

30

40

50

画分または不溶画分とすることもできる。溶媒としては、水や通常用いられる溶媒、例えば、アルコール類、炭化水素類、有機酸、有機塩基、無機酸、無機塩基、超臨界流体等を単独あるいは複数を組み合わせて用いることができる。

#### 【0026】

本発明のプロピオン酸菌発酵物は、後記試験例1に示すように、ダニや化学物質に起因するアレルギー症状等を軽減することができるので、鼻炎、結膜炎、気管支喘息又はアトピー性皮膚炎を抑制する抗アレルギー剤として使用することができる。アトピー性皮膚炎は、免疫が介在する皮膚の炎症であって、慢性のかゆみを伴う皮膚の表層性の炎症のことをいう。アトピー性皮膚炎には、IgEが介在する型（外因型）もIgEが介在しない型（内因型）も存在する。アトピー性皮膚炎の環境要因としては、食物（牛乳、卵、小麦、ピーナツ、魚等）、空気中のアレルゲン（ダニ、カビ、フケ等）などがある。また、アトピー性皮膚炎の発症には、遺伝的要因も示唆される（福島雅典 総監修、メルクマニュアル 第18版 日本語版、日経BP社発行、pp. 999（2006））。

10

#### 【0027】

また、後記試験例3で示すように、本発明のプロピオン酸菌発酵物は、角層水分量や肌のきめスコアが上昇するので乾燥した肌の状態の改善剤、すなわち肌荒れ予防・改善剤としても有用である。そして、アトピー性皮膚炎の治療方法の1つとして、乾燥した皮膚に対する保湿等を行い、肌の状態を改善する方法があることから、当該肌荒れ予防・改善剤はアトピー性皮膚炎の治療に有用であるので、抗アレルギー剤としても使用することができる。ここで、「肌荒れ」とは、角層水分量が減少して皮膚表面が乾燥することや肌のきめが粗くなることを云う。

20

また、本発明のプロピオン酸菌発酵物は、各種製剤としても使用することができるが、抗アレルギー剤や肌荒れ予防・改善剤等を製造するために使用することも可能である。

#### 【0028】

当該抗アレルギー剤等は、飲食品又は医薬品の何れの形態でも利用することができる。例えば、医薬として直接投与することにより、或いは特定保健用食品等の特別用食品、栄養機能食品やサプリメントとして直接経口摂取することにより、又は各種食品（牛乳、発酵乳、ヨーグルト、チーズ、パン、ビスケット、クラッカー、ピッツァクラスト、調製粉乳、流動食、病者用食品、栄養食品、冷凍食品、加工食品その他の市販食品その他）に添加してこれを摂取することにより利用することができる。また、経管栄養、経腸栄養など他の形態で摂取してもよい。

30

#### 【0029】

本発明のプロピオン酸菌発酵物を含有する食品には、水、タンパク質、糖質、脂質、ビタミン類、ミネラル類、有機酸、有機塩基、果汁、フレーバー類等を主成分として使用することができる。

タンパク質としては、例えば全脂粉乳、脱脂粉乳、部分脱脂粉乳、カゼイン、ホエイ粉、ホエイタンパク質、ホエイタンパク質濃縮物、ホエイタンパク質分離物、 $\alpha$ -カゼイン、 $\beta$ -カゼイン、 $\kappa$ -カゼイン、 $\beta$ -ラクトグロブリン、 $\alpha$ -ラクトアルブミン、ラクトフェリン、大豆タンパク質、鶏卵タンパク質、肉タンパク質等の動植物性タンパク質、これらの分解物；バター、乳清ミネラル、クリーム、ホエイ、非タンパク態窒素、シアル酸、リン脂質、乳糖等の各種乳由来成分などが挙げられる。カゼインホスホペプチド、アルギニン、リジン等のペプチドやアミノ酸を含んでもよい。

40

糖質としては、例えば、糖類、加工澱粉（テキストリンのほか、可溶性澱粉、ブリティッシュスターチ、酸化澱粉、澱粉エステル、澱粉エーテル等）、食物繊維などが挙げられる。脂質としては、例えば、ラード、魚油等、これらの分別油、水素添加油、エステル交換油等の動物性油脂；パーム油、サフラワー油、コーン油、ナタネ油、ヤシ油、これらの分別油、水素添加油、エステル交換油等の植物性油脂などが挙げられる。

ビタミン類としては、例えば、ビタミンA、カロチン類、ビタミンB群、ビタミンC、ビタミンD群、ビタミンE、ビタミンK群、ビタミンP、ビタミンQ、ナイアシン、ニコチン酸、パントテン酸、ビオチン、イノシトール、コリン、葉酸などが挙げられ、ミネラ

50

ル類としては、例えば、カルシウム、カリウム、マグネシウム、ナトリウム、銅、鉄、マンガン、亜鉛、セレンなどが挙げられる。有機酸としては、例えば、リンゴ酸、クエン酸、乳酸、酒石酸、エリソルビン酸などが挙げられる。これらの成分は、2種以上を組み合わせ使用することができ、合成品及び／又はこれらを多く含む食品を用いてもよい。食品の形態としては、固体でも液体でもかまわない。またゲル状などであってもよい。

#### 【0030】

また、本発明のプロピオン酸菌発酵物を医薬品として使用する場合には、種々の形態で投与することができる。例えば、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等による経口投与を挙げることができるが、注射剤や液剤等の製剤に加工して、経管、経腸など他の投与形態で投与してもよい。これらの各種製剤は、常法に従って、主剤に賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、矯味・矯臭剤、溶解補助剤、懸濁剤、コーティング剤等の通常使用しうる既知の補助剤を用いて製剤化することができる。さらに適当量のビタミン、ミネラル、有機酸、糖類、アミノ酸、ペプチド類などを添加してもよい。

10

#### 【0031】

当該プロピオン酸菌発酵物を使用する場合、プロピオン酸菌発酵物を乾燥質量換算において、ヒト体重1kg当り1日量10～500mg摂取することが好ましく、より好ましくは、50～200mgである。また、菌体数換算において、ヒト体重1kg当り1日量 $10^8 \sim 10^{12}$ cfu摂取することが好ましく、より好ましくは、 $10^9 \sim 10^{11}$ cfuである。また、従来知られる抗アレルギー作用や肌荒れ予防・改善作用を有する医薬品や食品と併用して用いてもよい。

20

#### 【実施例】

#### 【0032】

製造例1：プロピオン酸菌発酵物の製造方法

##### 1. 材料

##### <菌株>

*Propionibacterium freudenreichii* ET-3株(FERM BP-8115株)

##### <前培養培地>

培地量の10%(w/w)のホエイ粉(明治乳業)及び0.07%(w/w)のプロテアーゼ(プロテアーゼA「アマノ」G: *Aspergillus oryzae* 由来: 天野エンザイム)を適当量のイオン交換水に溶解し、47℃で3時間、ホエイ粉中のタンパク質を酵素分解し、分解後に0.1%(w/w)の酵母エキス(P2G: アサヒフードアンドヘルスケア)を添加し、pHを6.8～6.9に調整した後、121℃で15分の滅菌をした。なお、酵素分解時のpHは炭酸カリウム溶液を用いて6.6～7.0に調整した。

30

##### <本培養培地>

培地量の3%(w/w)の脱脂粉乳(明治乳業)、3.4%(w/w)のMilk Protein Concentrate(MPC: Murray Goulburn)、0.25%のプロテアーゼ(プロテアーゼA「アマノ」G)を適当量のイオン交換水に溶解し、47℃で6時間、脱脂粉乳及びMPC中のタンパク質を酵素分解し、分解後に0.5%の酵母エキス(P2G)を添加し、pHを6.8～6.9に調整した後、121℃で15分の滅菌をした。なお、酵素分解時のpHは炭酸カリウム溶液を用いて6.6～7.0に調整した。

#### 【0033】

40

##### 2. 製造法

##### <前培養>

前培養培地100mLにET-3株の凍結菌(−80℃保存)を1mL接種し、37℃で48時間、嫌気下での静置培養を実施し、この培養液を本培養のスターターとした。

##### <本培養>

本培養培地2000mLに前培養液を20mL接種して本培養を開始した。培養温度を33℃、pHは炭酸カリウム水溶液で6.5に調整した。通気は窒素を0.4L/minでスパーキングし、攪拌速度は150rpmとした。培養開始72時間後から1.5Mの乳糖溶液(121℃、15分で滅菌済み)を0.90mL/hで192時間に渡って流加し、流加終了後に通気を窒素から酸素へと切り替え好気培養にし、好気培養を120時間継続して培養を終了し、プロピオン酸菌を含む培養液を得た。

50

培養終了後、プロピオン酸菌によって生成されたDHNAがACNQに変化することを防ぐため発酵物中にアスコルビン酸を共存させるように、培養液1,000mL当たり、アスコルビン酸ナトリウム5gを添加し、プロピオン酸菌発酵物を得た。

上記発酵物の製造法は、古市らの方法(Furuichi et al, Enhancement of 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid production by *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 fed-batch culture. Appl Environ Microbiol. 2007;73(10):3137-43.) に準じて行った。

上記操作後のプロピオン酸菌発酵物0.5mL中に、プロピオン酸菌は $2.43 \times 10^{10}$ cfu含まれていた。

上記操作後、下記HPLC分析により、培養液に含まれる物質として、1,4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸(1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid (DHNA))が認められ、培養液1L当たり0.34mM(68mg/L)であったが、2-アミノ-3-カルボキシー-1,4-ナフトキノン(2-amino-3-carboxy-1,4-naphthoquinone (ACNQ))はほとんど認められなかった。

#### 【0034】

##### <HPLC分析>

カラム: Capcell pak C18 SG120、充填剤粒径 $5 \mu\text{m}$ 、内径4.6mm、長さ250mm(資生堂社)

溶離液: アセトニトリル: メタノール: 水: 酢酸 = 250: 100: 900: 0.6 (5% アンモニア水でpH5.6に調整)

流速:  $1\text{mL}/\text{min}$

注入量:  $10 \mu\text{L}$

検出器: UV270nm

##### <HPLCサンプル調製法>

培養液1mLにアセトンと酢酸エチルを各々2.5mL添加して混合後、2000xgで5分間遠心分離し、その上清液をメンブランフィルターでろ過した。

#### 【0035】

試験例1: アトピー性皮膚炎の抑制試験(アトピー性皮膚炎の動物実験モデル)

##### (1) 概略

NC/Ngaマウス雌、4週齢(日本エスエルシー社)を購入し、次の4群に分けた。すなわち、皮膚炎惹起群(蒸留水投与群( $n=7$ )[蒸留水]、比較例として液体培地(以下、培地とも称す)投与群( $n=7$ )[培地]およびプロピオン酸菌発酵物(液体)投与群( $n=7$ )[プロピオン酸菌発酵物])ならびに皮膚炎非惹起群( $n=7$ )[非惹起]に群分け後、各種試料を試験期間中(day-7からday27)に亘って連日経口投与(1日につき $0.5\text{mL}/\text{mouse}$ )した。

各種試料において、プロピオン酸菌発酵物は上記製造例1にて得られたもの(DHNA 68mg/L、およびプロピオン酸菌  $4.86 \times 10^{10}$ cfu/mlを含有する)を用い、液体培地は上記製造例1にて製造したプロピオン酸菌を接種していない殺菌済みの本培養培地を用いた。

経口投与開始後7日目(day0)より皮膚炎惹起群に対し後述の方法にて皮膚炎を惹起し、症状の推移をスコア化した。また、皮膚炎惹起開始後14、21、28日(day14、21、28)に血清を採取し、血清アミロイドA (serum amyloid A: SAA) 及びIgE濃度をELISA法により測定した。SAA濃度については、Bio Source社のELISA kitを用いて測定した。測定は、付属の取扱説明書に従った。IgE濃度の測定については、Pharmingen社製の抗体を用いてPharmingen社推奨のプロトコルを一部改変して測定した。

#### 【0036】

##### (2) ダニ破碎物液の調製

ヤケヒョウヒダニの全虫体(Mite-Dp、エル・エス・エル社製)を無水エーテルで脱脂後、蒸留水を添加して超音波破碎した。ついで水溶性画分を遠心分離し、凍結乾燥後、蒸留水を用い、タンパク質濃度が $4.5\text{mg}/\text{ml}$ (BSA換算、BioRAD社のDC protein assayで測定)に調製して使用した。

#### 【0037】

##### (3) 皮膚炎の惹起

海野らの方法を改変した(海野哲史 他、アレルギー50: 1152-1162、2001)。皮膚炎惹起

部位（頭部、耳介部及び頸部）をバリカンで剃毛後、4% SDS水溶液を全マウスの皮膚炎惹起部位にはけで20回塗布した（塗布量は約60  $\mu$ Lに相当）。SDS水溶液の乾燥後、皮膚炎惹起群にはダニ破碎物液を、皮膚炎非惹起群には蒸留水を各々20回同様にして塗布した。上記操作を1日1セット毎日繰り返すことにより皮膚炎を惹起した。

#### 【0038】

##### （4）IgE の測定

96ウェルプレートに1次抗体用の抗IgE抗体(Pharmingen社製)を2  $\mu$ g/mLで添加し、37°C 1時間静置した。0.05%Tween20/PBS（PBS-Tween）で洗浄後、1%BSA/PBSを添加し、室温で30分間静置した。PBS-Tweenで洗浄後、血清サンプル及び標準曲線作成用のIgE（Pharmingen社製）を添加し、室温で30分間静置した。PBS-Tweenで洗浄後、2次抗体用のビオチン-抗IgE抗体(Pharmingen社製)を0.5  $\mu$ g/mLで添加し、室温で1時間静置した。PBS-Tweenで洗浄後、ストレプトアビジン-HRP(Pharmingen社製)を添加し、室温で30分間静置した。PBS-Tweenで洗浄後、TMB+Substrate Chromogen(DAKO社製)を添加して発色反応を開始した。発色反応後、1N硫酸を添加し、450nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、血清中のIgE濃度を算出した。

#### 【0039】

##### （5）結果

図1に、皮膚炎症状スコアの推移を示す。スコア化は、1) 乾皮・痂皮形成、2) 発赤・出血、3) 組織脱落・擦り傷、4) 浮腫、5) 掻痒行動の5項目について、0（無症状）、1（軽度）、2（中程度）、3（重度）の4段階で評価し、各マウスにおける各スコアの合計を算出した。その結果、症状スコアについて、プロピオン酸菌発酵物投与群では、蒸留水投与群と比較して有意に低値で推移することがわかった（図1）。一方、培地投与群でも低値で推移したが、プロピオン酸菌発酵物投与群と比較すると高値だった。

血清中総IgEについて、Day14において、プロピオン酸菌発酵物投与群では、蒸留水投与群と比較してIgE濃度が有意に低いことがわかった（図2）。一方、培地投与群では、蒸留水投与群と比較して低かったが、有意差は認められなかった。

SAAについて、Day14において、プロピオン酸菌発酵物（上記製造例1のもの）投与群では、蒸留水投与群と比較して有意に低いことがわかった（図3）。一方、培地投与群では蒸留水投与群より低かったが、有意差は認められなかった。逆に、Day21においては、プロピオン酸菌発酵物投与群では、蒸留水投与群より低かったが有意差が認められなかった一方、培地投与群では蒸留水投与群より有意に低かった。Day28においては、プロピオン酸菌発酵物投与群と培地投与群の両者とも、蒸留水投与群より有意に低かった。

以上より、本発明に係わるプロピオン酸菌発酵物は、アトピー性皮膚炎の発症抑制に効果が高いことがわかった。

#### 【0040】

試験例2：受け身皮膚アナフィラキシー反応（passive cutaneous anaphylaxis:PCA反応）の抑制試験（急性アレルギー反応の動物実験モデル）

##### （1）概要

SDラット、雄、7週齢を予備飼育後、体重に差がないように次の4群に分けた。例数は7又は8である。1群：蒸留水投与群、2群：プロピオン酸菌発酵物投与群、3群：培地投与群、4群：ケトチフェンフマル酸塩（PCA反応の抑制試薬、和光純薬社製）投与群。各ラットの背部をバリカンで剃毛後、ここにPCA反応惹起部位およびPCA反応非惹起部位を設けた。前記PCA反応惹起部位に抗DNP-IgE抗体液（25ng/site、ICN社製）、前記PCA反応非惹起部位に生理食塩水を各々皮内投与した。

各群に用いる各種試料は、試験例1と同様なものを用いた。

IgE抗体または生理食塩水の投与24時間後に、各群に抗原としてDNPの結合したBSA（DNP-BSA:2,4-dinitrophenylated Bovine Serum Albumin）（1mg/rat、エル・エス・エル社製）をエバンスブルー（5mg/rat、和光純薬社製）と共に静脈投与し、PCA反応を惹起した。プロピオン酸菌発酵物、培地又は蒸留水は、PCA反応惹起の1, 3, 5時間前に各々10mL/kg（固形分換算で1.7g/kg）で経口投与し、また、ケトチフェンフマル酸塩はPCA反応惹起の

1時間前に10mg/kgで経口投与した（3,5時間前は蒸留水を投与した）。PCA反応惹起30分後にラットから背部皮膚を得て1N水酸化カリウムで処理後、アセトンと0.6Nリン酸混液でエバンスブルーを抽出し、620nmにおける吸光度から皮膚に漏出したエバンスブルー量を算出した。

#### 【0041】

##### （2）結果

図4に、エバンスブルー漏出量を示す。プロピオン酸菌発酵物投与群のPCA反応惹起部位[プロピオン酸菌発酵物]では、蒸留水投与群のPCA反応惹起部位[蒸留水]と比較して有意に低下することがわかった（図4）。一方、培地投与群のPCA反応惹起部位[培地]でも低下したが、有意差は認められなかった。

以上より、本発明に係わるプロピオン酸菌発酵物は、PCA反応の抑制に効果が高いことがわかった。

#### 【0042】

##### 製造例2：プロピオン酸菌乳清発酵物の製造方法

##### 1. 材料

###### <菌株>

*Propionibacterium freudenreichii* ET-3株(FERM BP-8115株)

###### <前培養培地および本培養培地>

製造例1の<前培養培地>の調製方法と同様にして、前培養培地および本培養培地を調製した。

##### 2. 製造方法

###### <前培養>

前培養培地100mLにET-3株の凍結菌（-80℃保存）を1mL接種し、37℃で48時間、嫌気下での静置培養を実施し、この培養液を本培養のスターターとした。

###### <本培養>

本培養培地に前培養液を2%接種して本培養を開始した。窒素雰囲気下で培養温度33～37℃、66～96時間継続して培養し、プロピオン酸菌を含む培養液（プロピオン酸菌乳清発酵物）を得た。試験例3の試験食調製においては、この培養液自体をプロピオン酸菌乳清発酵物として用いた。

#### 【0043】

##### 試験例3：乾燥肌のヒトを対象とする臨床試験

##### （1）試験の概要

###### <試験対象>

乾燥皮膚を有する20～39歳の女性を被験者に、二重盲検プラセボコントロール試験を実施した。試験開始前に、医師が観察した皮膚所見（乾燥、鱗屑、丘疹、面疱、膿疱）に基づいて、偏りがないように、被験者を3群に群分けした。なお、本試験は、ヘルシンキ宣言（2000年エジンバラ総会で修正）を遵守し、倫理的配慮のもとに実施した。

###### <試験食>

以下の3種類（試験食A～C）を設けた。上記製造例2にて得られたプロピオン酸菌乳清発酵物を使用した。

試験食A：酸性飲料（プラセボ）[n=30]

水に各種成分（ペクチン、乳酸、ヨーグルトフレーバー、ビタミンC、アスパルテーム）を添加したもの。

乳成分および乳酸菌を含有しない。

試験食B：プロピオン酸菌乳清発酵物含有酸性飲料（アクティブ1）[n=28]

上記酸性飲料に前記プロピオン酸菌乳清発酵物を1v/v%添加したもの。

プロピオン酸菌乳清発酵物に由来しない乳成分および乳酸菌を含有しない。

試験食C：プロピオン酸菌乳清発酵物含有ヨーグルト飲料（アクティブ2）[n=28]

市販のヨーグルトを60v/v%とし、水、上記酸性飲料（プラセボ）に添加したのと同濃度の各種成分、スクロースおよび前記プロピオン酸菌乳清発酵物を1v/v%添加したも

10

20

30

40

50

の。

なお、試験食 B および試験食 C の 120 ml に含まれる DHNA 含量は  $13.2 \mu\text{g}$  である。

#### 【0044】

＜試験食の摂取期間および摂取方法＞

試験食の摂取開始日～4週間後までの試験食摂取期間、試験食を1日120 ml 経口摂取する。試験食摂取期間は、試験食以外の乳酸菌を含む食品（ヨーグルト、発酵乳等）およびオリゴ糖を含む食品の摂取、新たなサプリメント摂取の開始、新たな美容目的の治療薬摂取や外用薬使用の開始、美容目的の施術（ケミカルピーリング等）を禁止した。

#### 【0045】

（3）検査項目

試験食の摂取開始日における試験食摂取前、および試験食摂取開始から4週間後に、以下の検査を実施した。

角層水分量：水分計 コルネオメーター CM825（Courage+Khazaka electronic mbH（Germany）社製）を用い、被験者の顔面肌の角層水分量を静電容量値として2回ずつ測定し、平均値を算出した。

肌のきめ：肌画像解析装置ロボスキナライザー RSA-100（インフォワード社製）を用いて、被験者の顔面肌のきめをスコア化した。

本発明においてこのスコア値をキメスコアといい、キメスコアが高いほど、肌のきめが整っている状態であることを示す。

さらに、試験食の摂取前後の測定値については群内の比較検定（paired t-test）、および試験食の摂取前後の測定値の変化量については3群間の多重比較検定（Tukey-Kramer法）にて有意差検定を行った。

#### 【0046】

（4）結果

結果を図5および図6に示す。角層水分量、キメスコアの測定値はいずれも、試験食 A：酸性飲料（プラセボ）の摂取前後で有意な差は認められなかった。それに対し、試験食 B：プロピオン酸菌乳清発酵物含有酸性飲料（アクティブ1）、C：プロピオン酸菌乳清発酵物含有ヨーグルト飲料（アクティブ2）の摂取後では、角層水分量、キメスコアの測定値上昇が有意に観察された。また、試験食の摂取前後の測定値の変化量に関しても、角層水分量、キメスコアのいずれにおいても、試験食 A 摂取群に対し、試験食 B、試験食 C の摂取群は有意に大きかった。

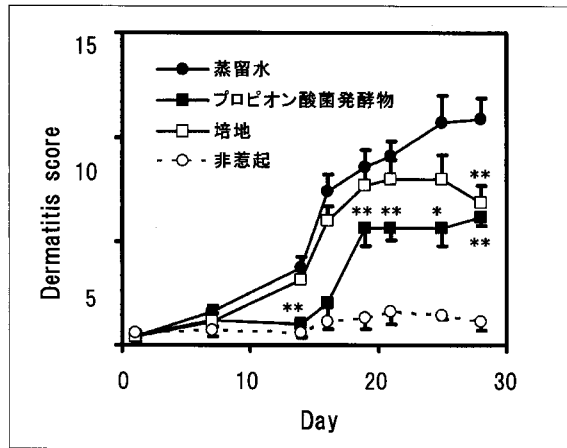
以上の結果から、本発明のプロピオン酸菌発酵物は、乾燥した肌の状態を改善する効果を有することがわかった。また、本発明のプロピオン酸菌発酵物にヨーグルトを併用しても同様の効果が得られることもわかった。

10

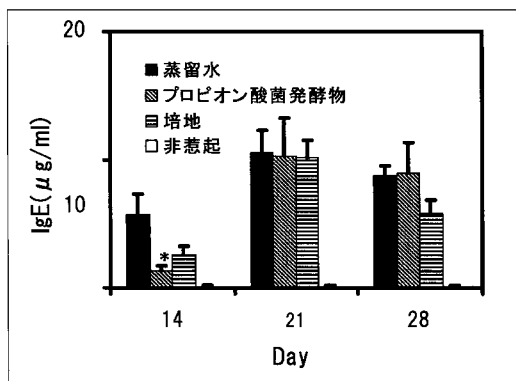
20

30

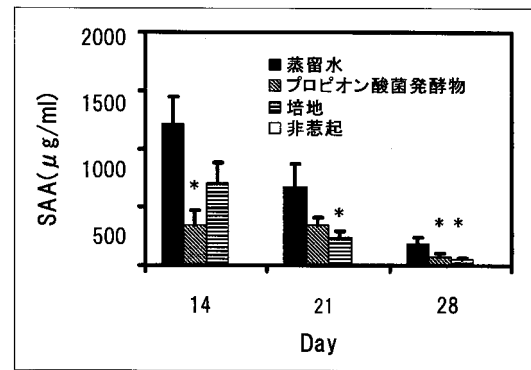
【図 1】



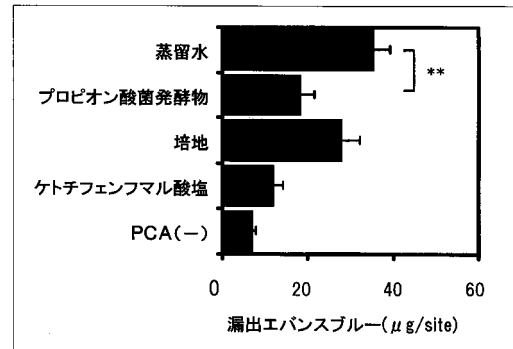
【図 2】



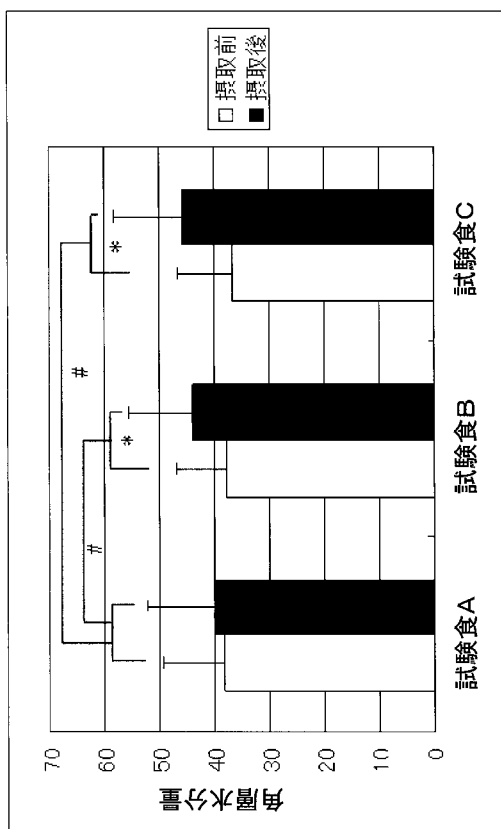
【図 3】



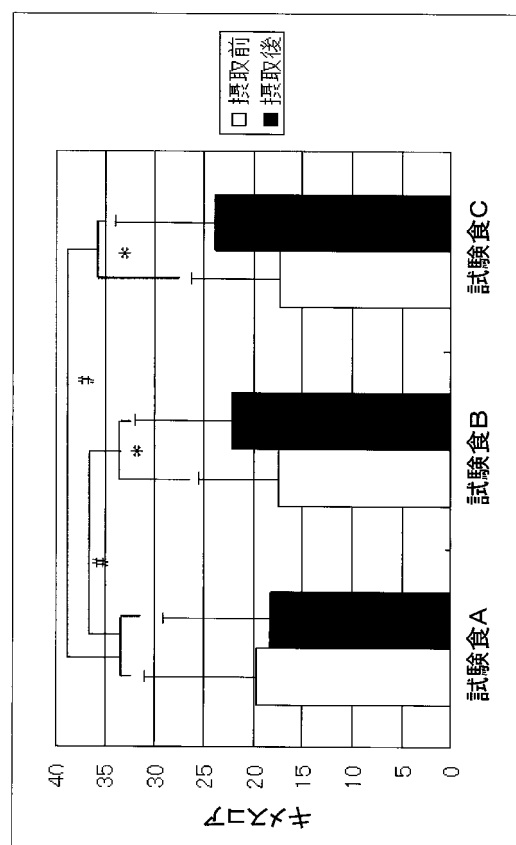
【図 4】



【図 5】



【図 6】



---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード (参考)  
A 6 1 P 7/10 (2006.01) A 6 1 P 7/10

(72)発明者 狩野 宏  
神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社研究本部内  
(72)発明者 池上 秀二  
神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社研究本部内  
(72)発明者 古市 圭介  
神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社研究本部内  
(72)発明者 伊藤 裕之  
神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社研究本部内  
(72)発明者 折居 直樹  
神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社研究本部内  
F ターム (参考) 4C087 AA01 AA02 BC74 CA10 MA52 NA14 ZA89 ZB13 ZC21