

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5149346号  
(P5149346)

(45) 発行日 平成25年2月20日(2013.2.20)

(24) 登録日 平成24年12月7日(2012.12.7)

(51) Int. Cl.	F I
A 2 3 K 1/00 (2006.01)	A 2 3 K 1/00 1 0 1
A 2 3 K 1/16 (2006.01)	A 2 3 K 1/16 3 0 4 B
A 2 3 K 1/18 (2006.01)	A 2 3 K 1/18 A
A 6 1 K 35/74 (2006.01)	A 6 1 K 35/74 A
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 K 35/74 D

請求項の数 2 外国語出願 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-177134 (P2010-177134)	(73) 特許権者	590002013
(22) 出願日	平成22年8月6日(2010.8.6)		ソシエテ・デ・プロデュイ・ネスレ・エス
(62) 分割の表示	特願2001-552728 (P2001-552728)		・アー
原出願日	平成12年12月28日(2000.12.28)		スイス シーエイチー1800 ヴェヴェ
(65) 公開番号	特開2011-24583 (P2011-24583A)	(74) 代理人	100088155
(43) 公開日	平成23年2月10日(2011.2.10)		弁理士 長谷川 芳樹
審査請求日	平成22年8月20日(2010.8.20)	(74) 代理人	100114270
審査番号	不服2011-22182 (P2011-22182/J1)		弁理士 黒川 朋也
審査請求日	平成23年10月13日(2011.10.13)	(74) 代理人	100128381
(31) 優先権主張番号	00200179.0		弁理士 清水 義憲
(32) 優先日	平成12年1月18日(2000.1.18)	(74) 代理人	100107456
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 池田 成人
		(74) 代理人	100140453
			弁理士 戸津 洋介

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペットのヘリコバクター種治療用ペットフード組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

犬用の胃内ヘリコバクター様細菌(G H L O)感染疾患治療剤であって、  
ラクトバチルス・ジョンソニを、1日あたりの量で $10^9$ から $10^{12}$ cfu含む、治療剤。

【請求項2】

前記ラクトバチルス・ジョンソニはラクトバチルス・ジョンソニNCC533(CNC M I - 1 2 2 5)である、請求項1に記載の治療剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はペットのヘリコバクター様細菌による感染に係る疾患の予防または治療に意図されたペットフード組成物を製造するために乳酸菌の単離菌株を使用することに関する。本発明はまたそれから調製したペットフード組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

[発明の背景]

ヒトでは、病原菌のヘリコバクター・ピロリ(Helicobacter pylori)に感染されると、胃炎の原因になったり、また潰瘍性疾患や胃癌になることは公知である。この治療方法は無数にある。乳酸菌がインビトロやインビボでヘリコバクター・ピ

ロリを阻害し得ることはE P 5 7 7 9 0 3号明細書(ネスレ)に開示した。

【0003】

犬やネコのような飼いならされた肉食動物は胃内のヘリコバクターの他の種により事実上すべて感染されている。そのほとんどはインビトロで培養できないが、形態的にはH.ヘイルマニに似ている。H.フェリスもネコの胃粘膜から単離されたが、最近2つの新しいヘリコバクター種、即ちH.ビゾゼロニとH.サロモニスが犬から単離された。しかし、これらのヘリコバクター種は形態的分析だけでは識別できないので、胃内ヘリコバクター様生物("Gastric Helicobacter like organisms"、GHLO)として分類されている。

【0004】

GHLOはペットの洞部(antrum)および/またはコーパス(corpus)にコロニーを形成するが、H.ピロリのコロニーは主にコーパスで形成される。コロニーを形成するGHLO生物は胃基底腺に深く住み、非侵襲性細菌として知られるH.ピロリと比較して、時に、胃壁細胞小管内に、および小窩や胃粘膜で見られる(ダン等、1997、「Hpは表面上皮細胞に接着性の粘膜に見られ、陰窩内にしばしば深く発見される」)。

【0005】

ネコや犬の胃がヘリコバクター種により汚染されることは、胃炎が軽度から中程度に発展する重大な危険因子と考えられる。観察される炎症は、H.ピロリに感染されたヒトに起きるものより通常は酷くない。胃潰瘍、リンパ腫および癌のようなさらに酷い病変が観察され得るが、GHLOの病原性は少しも明かにされていない。

【0006】

それにもかかわらず、ネコや犬のGHLOによる感染を低レベルにコントロールすることは多くの獣医により有益なものと認識されている。このものは医薬の治療を必要とする病気とは十分には認識されていないので、ネコや犬のGHLO感染を最小にしようとする活性成分を含有するペットフード製品が一般には必要とされる。

【発明の概要】

【0007】

したがって、本発明は乳酸菌の少なくとも1つの株および/またはその代謝産物またはインビトロで強力な抗ヘリコバクター細菌活性を示す能力について単離され選択された少なくとも1つの乳酸菌により発酵された培地を、ペットのGHLO感染に関連する疾患の予防治療用に意図された組成物の製造のために使用することに関する。

【0008】

望ましい態様において、単離された株により産生された代謝産物または該乳酸菌により発酵された培地、あるいは乳酸菌の単離された株により発酵された培養培地のサブフラクションが使用される。

【0009】

乳酸菌株はラクトバチルス・ジョンソニ(Lactobacillus johnsonii)、ラクトバチルス・ロイテリ(Lactobacillus reuterii)、ラクトバチルス・パラカゼイラクトバチルス・パラカゼイ(Lactobacillus paracasei)、ラクトバチルス・アニマリス(Lactobacillus animalis)、ラクトバチルス・ルミニス(Lactobacillus ruminis)、ラクトバチルス・アシドフィルス(Lactobacillus acidophilus)、ラクトバチルス・ラムノサス(Lactobacillus rahnosus)、ラクトバチルス・ファーメンタム(Lactobacillus fermentum)、ビフィドバクテリウム(Bifidobacterium)種、ビフィドバクテリウム・ラクティス(Bifidobacterium lactis)、ビフィドバクテリウム・アニマリス(Bifidobacterium animalis)からなる群から選択される。

【0010】

10

20

30

40

50

望ましい態様において、乳酸菌株はラクトバチルス・ジョンソニ (*Lactobacillus johnsonii*) NCC 533 (CNCM I - 1225)、ラクトバチルス・ファーマンタム (*Lactobacillus fermentum*) NCC 2581 (CNCM I - 2448)、ラクトバチルス・ファーマンタム NCC 2592 (CNCM I - 2450)、ラクトバチルス・ファーマンタム NCC 2613 (CNCM I - 2452)、ラクトバチルス・パラカゼイ (*Lactobacillus paracasei*) NCC 2461 (CNCM I - 2116)、ラクトバチルス・アニマリス (*Lactobacillus animalis*) NCC 2603 (CNCM I - 2451)、ラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rahnmosus*) NCC 2583 (CNCM I - 2449)、ラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*) NCC 2628 (CNCM I - 2453)、ビフィドバクテリウム種 NCC 2627、ビフィドバクテリウム種 NCC 2657、ビフィドバクテリウム・ラクティス (*Bifidobacterium lactis*) (ATCC 27536) からなる群から選択される。

10

## 【0011】

別の目的は、ペットのGHLO感染に関係する疾患の治療または予防方法に関し、乳酸菌の少なくとも1つの株および/またはその代謝産物あるいはインビトロで強力な抗ヘリコバクター細菌活性を示す能力について単離され選択された少なくとも1つの乳酸菌により発酵された培地を含有する組成物をペットに投与することを含む。

## 【0012】

20

別の目的は、乳酸菌の少なくとも1つの単離株および/またはその代謝産物あるいは上記特徴を有する少なくとも1つの乳酸菌により発酵させた培地を、摂取可能な支持体または医薬用マトリックスとともに含有するペットフード組成物を供することである。

## 【0013】

このペットフード組成物はネコや犬のGHLO感染を減少させることができ、GHLOロードとウレアーゼ活性は基底部分で少なくとも0.5評点および洞部で少なくとも0.5評点減少する。

## 【0014】

慢性胃炎におよぼす当該組成物の効果は、薄い部位のバイオプシの細胞検査により評価した。これは胃の炎症の評点で少なくとも0.5 (0から3までの評点) の平均的後退で、慢性の基底部分胃炎の後退を誘導しうる。

30

## 【0015】

他の態様では、このペットフード組成物はGHLOによる感染レベルと相関関係にある呼吸臭を有意に減少することができる。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0016】

## [発明の詳細な記載]

次の記載において、「GHLO」とは「胃内ヘリコバクター様生物」を意味する。ペットの胃粘膜にコロニーを形成することが分かっているヘリコバクター・フェリス (*Helicobacter felis*)、H.ヘイルマニ (*H. heilmannii*)、H.ビゾゼロニ (*H. bizzozeroni*)、およびH.サロモニス (*H. salomonis*) のようなヘリコバクター種はこの規定に分類される。

40

## 【0017】

さらに、ペットの胃腸管に直接影響するすべての疾患や、例えば、悪い口臭症状のような2次的疾患も、「GHLO疾患」に含める。

## 【0018】

また、「NCC」はネスレのカルチャーコレクション (ネスレ・リサーチ・センター、スイス、ローザンヌ) を意味する。

## 【0019】

本発明の最初の目的について、少なくとも1つの乳酸菌株および/またはその代謝産物

50

あるいはインビトロで強力なヘリコバクター細菌活性を示しうる乳酸菌の少なくとも1つの株により発酵された培地を、ペットのGHL0感染に関係する疾患の予防や治療を意図した組成物の製造に使うことに関する。

【0020】

これらの菌株はその技術的および生理学的パラメータ、特にその良好な生育特性、少なくとも $5 \times 10^8$  菌/ml、望ましくは $10^6$  から $10^{10}$  菌/ml、更に望ましくは $10^9$  から $10^{10}$  菌/mlおよびインビトロで強力な抗ヘリコバクター細菌活性を示す能力について、多くの乳酸菌株から選択された。

【0021】

望ましい態様において、当該乳酸菌株はラクトバチルス・ジョンソニ、ラクトバチルス・ロイテリ、ラクトバチルス・パラカゼイ、ラクトバチルス・アニマリス、ラクトバチルス・ルミニス、ラクトバチルス・アシドフィルス、ラクトバチルス・ラムノサス、ラクトバチルス・ファーメンタム、ビフィドバクテリウム種、ビフィドバクテリウム・ラクティス、ビフィドバクテリウム・アニマリスからなる群から選択することができる。

10

【0022】

該乳酸菌株はラクトバチルス・ジョンソニ NCC 533 (CNCM I - 1225)、ラクトバチルス・ファーメンタム NCC 2581 (CNCM I - 2448)、ラクトバチルス・ファーメンタム NCC 2592 (CNCM I - 2450)、ラクトバチルス・ファーメンタム NCC 2613 (CNCM I - 2452)、ラクトバチルス・パラカゼイ NCC 2461 (CNCM I - 2116)、ラクトバチルス・アニマリス NCC 2603 (CNCM I - 2451)、ラクトバチルス・ラムノサス NCC 2583 (CNCM I - 2449)、ラクトバチルス・アシドフィルス NCC 2628 (CNCM I - 2453)、ビフィドバクテリウム種 NCC 2627、ビフィドバクテリウム種 NCC 2657、ビフィドバクテリウム・ラクティス (ATCC 27536) からなる群から選択するのがよい。

20

【0023】

本発明により選択した各種菌株のうち、つぎの株はブダペスト条約により、国立微生物カルチャーコレクション(フランス、パリ、パスツール研)(CNCM)に、ラクトバチルス・ジョンソニ(NCC 533)については92年6月30日にCNCM I - 1225として、ラクトバチルス・パラカゼイ(NCC 2461)については99年1月12日にCNCM I - 2116としておよびラクトバチルス・ファーメンタム NCC 2581, NCC 2592, NCC 2613、ラクトバチルス・アニマリス NCC 2603、ラクトバチルス・ラムノサス NCC 2583、ラクトバチルス・アシドフィルス NCC 2628については00年4月19日にそれぞれ(CNCM I - 2448)、(CNCM I - 2450)、(CNCM I - 2452)、(CNCM I - 2451)、(CNCM I - 2449)、(CNCM I - 2453)として寄託された。ビフィドバクテリウム・ラクティス(ATCC 27536)の菌株はハンセンより受けた(ハンセン A/S、デンマーク、DK - 2970ホースホルム)。

30

【0024】

< 選択菌株の生化学的特性 >

40

[ラクトバチルス・ジョンソニ CNCM I - 1225]

・グラム陽性菌、非運動性、孢子なし・かなり短く、太いカン菌・ホモ発酵代謝をもつ好気性菌、L(+)およびD(-)乳酸を産生・カタラーゼ(-)、CO<sub>2</sub>の産生(-)、アルギニンの加水分解(-)

・糖類の発酵：アミグダリン(+)、アラビノース(-)、セロピオース(+)、エスクリン(+)、フラクトース(+)、ガラクトース(-)、グルコース(+)、ラクトース(+)、マルトース(+/-)、マンニトール(-)、マンノース(+)、メリピオース(-)、ラフィノース(+)、リボース(-)、サリシン(+)、シュクロース(+)、トレハロース(+)

【0025】

50

【ラクトバチルス・パラカゼイ CNCM I - 2116】  
 ・グラム陽性・カタラーゼ陰性・アルギニン由来NH<sub>3</sub>形成陰性・CO<sub>2</sub>産生陰性・L(+)乳酸産生・約0.4%までの濃度で胆汁塩の存在下で生育  
 【0026】

乳酸菌の単離株および/またはその発酵された培養培地はペットの健康を改善するため、特にペットのGHLO感染に関連する疾患の予防または治療のために意図された組成物の製造に使用することができる。

【0027】

これらのものは悪い呼吸臭のようなGHLO感染に関連する他の疾患にも使用できる。事実、ネコや犬の胃内にGHLOが存在すると、尿素から多量のアンモニアが生成されるので呼吸臭に明らかに影響を及ぼす。このアンモニアはゲップをした後に呼吸に現れる。悪臭は、スルフィド揮発性化合物の産生により胃内のGHLOの存在にも関係する。該単離株により産生された代謝産物は悪い呼吸臭を減じかつペットの呼吸を新鮮にすることが望ましい。

10

【0028】

乳酸菌の単離株により発酵された培養培地のサブフラクションも使用できる。本発明の乳酸菌株は生存可能な形または不活化された形で使用できる。

【0029】

望ましい態様において、乳酸菌菌株はその発酵生育培地の存在下で使用される。この培地は単独でまたは食品と一緒に例えば滅菌し、押出または噴霧乾燥、冷蔵または貯蔵安定にすることができる。

20

【0030】

乳酸菌またはその対応する発酵培地を、ペットに利用できる量が約 $10^3 - 10^{14}$  cfu/日に相当するように使用できる。この量は動物の体重に左右され、犬では約 $10^9 - 10^{12}$  cfu/日、ネコでは $10^7 - 10^{11}$  cfu/日が望ましい。

【0031】

他の態様では、本発明はペットのGHLO感染に関係する疾患の治療または予防方法であって、乳酸菌の少なくとも1つの株および/または上記特徴を有する少なくとも1つの乳酸菌により発酵される培地を含有する組成物をペットに投与するものである。ペットに利用可能な量は約 $10^3 - 10^{14}$  cfu/日に相当し、犬では約 $10^9 - 10^{12}$  cfu/日、ネコでは $10^7 - 10^{11}$  cfu/日が望ましい。

30

【0032】

本発明の第2の主目的は乳酸菌の少なくとも単離された株および/またはその代謝産物あるいは発酵生育培地を含有するペットフード組成物に関し、該乳酸菌は上記の特徴を有し、組成物は摂取可能な支持体または医薬用マトリックスをともに含む。

【0033】

当該株および/またはその発酵培地はインビトロで強力な抗ヘリコバクター細菌活性を示す能力について動物の消費に適する1つ以上の乳酸菌から選択することができる。

【0034】

上記の特徴を有する少なくとも1つの菌株および/またはその発酵培地はペットの通常の食事の補給として、あるいは栄養的に完全なペットフードの成分としてペットに投与することができる。

40

【0035】

本発明にかかる栄養的に完全なペットフード組成物は粉末でも、乾燥状またはウェット状、冷蔵または貯蔵安定なペットフード製品でもよい。

ペット用の食事補給でもあるいは医薬組成物でもよい。

【0036】

栄養的に完全なペットフードは任意の適当な形でよく、例えば乾燥形、半ウェット形およびウェット形でよい。これらのペットフードは常法通り製造することができる。菌株および/またはその発酵培地の他に、これらのペットフードは1種以上の澱粉源、タンパク

50

質源および脂質源を含有してもよい。

【0037】

適当な澱粉源は例えば、コーン、コメ、小麦、大麦、オート、大豆およびそれらの混合物のような穀類やマメ科植物である。

適当なタンパク質源は肉、肉粉、家禽粉、魚粉、濃縮大豆タンパク質、乳タンパク質、グルテンなどの適当な動物又は植物タンパク質源から選択できる。老齢の動物には、高品質のタンパク質を含むタンパク質源が望ましい。

適当な脂質源には肉、動物脂肪および植物脂肪がある。

【0038】

澱粉、タンパク質及び脂質源の選択は、動物の栄養要求度、食性の問題、および製造製品の種類により主に決定される。老齢のペット用には、ペットフードは、若令のペット用のペットフードよりも比例的に脂肪含量が少ないのがよい。さらに、澱粉源は1種以上のコメ、大麦、小麦およびコーンを含んでもよい。

【0039】

さらには、各種他の成分、例えば糖、塩、スパイス、調味料、ビタミン、フレーバ付与剤、脂肪などを必要に応じてペットフードに加えることもできる。

【0040】

乾燥ペットフードでは、押し加熱方法が適しているが、焙焼その他の適当な方法も使用できる。押し加熱する場合は、乾燥ペットフードは粗挽き粉(kibble)の形で通常供される。プレバイオティックを使用する場合には、加工する前に、プレバイオティックを乾燥ペットフードの他の成分と混和してもよい。適当な方法はEP0850569号明細書に記載される。プロバイオティック微生物を使用する場合には、該微生物を乾燥ペットフードに被覆するかまたは一緒に加えるのがベストである。適当な方法はEP0862863号明細書に記載される。

【0041】

ウェットなペットフードでは、米国特許第4,781,939号明細書および5,132,137号明細書に記載の方法を使用して、肉に似た製品を得ることができる。チャンク型の製品を製造する他の方法、例えば、スチームオープン加熱も使用可能である。別法としては、適当な肉材料を乳化して肉すり身を調製し、適当なゲル化剤を加え、そして缶やその他の容器に充填する前に該すり身を加熱してローフ型の製品を製造することもできる。

【0042】

ペットフード中のプレバイオティックの量は約20重量%、特に約10重量%がよい。例えば、プレバイオティックはペットフードの約0.1%から約5重量%を含む。プレバイオティックとしてチコリを使用するペットフードでは、チコリは飼料混合物の約0.5%から約10重量%、望ましくは約1%から約5重量%を含むのがよい。

【0043】

プロバイオティック微生物を使用する場合には、ペットフードはプロバイオティック微生物をペットフードのgあたり約 $10^4$ ~約 $10^{10}$ 細胞含有するのがよく、より好ましくはペットフードのgあたり約 $10^6$ ~約 $10^8$ 細胞を含有する。ペットフードは約0.5%~約20重量%のプロバイオティック微生物の混合物を含み、好ましくは約1%~約6重量%、例えば約3%~約6重量%を含む。

【0044】

ペットフードには他の活性成分例えば、長鎖脂肪酸を含んでもよい。適当な長鎖脂肪酸には - リノール酸、 - リノール酸、リノール酸、エイコサペンタエン酸およびドコサヘキサン酸がある。魚油はエイコサペンタエン酸およびドコサヘキサン酸の適当なソースである。ルリチシャ油、黒スグリ種油およびマツヨイグサ油は - リノール酸の適当なソースである。サフラワー油、ヒマワリ油、コーン油および大豆油はリノール酸の適当なソースである。

【0045】

10

20

30

40

50

必要なら、ペットフードにミネラルやビタミンを補給して、栄養的に完全にすることができる。

さらに、必要なら、菌株を例えば糖マトリックス、脂肪マトリックスあるいは多糖類マトリックス中にカプセル化できる。

【0046】

有益な効果を得るためにペットに消費されるペットフードの量はペットの大きさ、ペットの種類およびペットの年齢により異なる。しかしながら、約 $10^3 \sim 10^{14}$  cfuの少なくとも1つの乳酸菌株および/またはその対応する発酵培地の日常量を供するペットフードの量が通常適している。犬では約 $10^9 \sim 10^{12}$  cfu/日、ネコでは $10^7 \sim 10^{11}$  cfu/日を投与するのが好ましい。

10

【0047】

本発明の組成物は特にペットのGHLOに関連する感染の予防又は治療を意図するもので、特に、例えば、ペットの胃腸管あるいは下部腸の感染の予防又は治療を意図するものである。これは例えば、ペットの健康な消化機能を維持しかつ例えば、GHLOのような病原株による再感染を予防することも意図している。したがって、この組成物はGHLOの侵入に対する抗生物学的治療のアジュバントとしても使用できる。

【0048】

本発明組成物のGHLOに及ぼす影響はバイオプシ部位(例2参照)の組織検査により評価した。部位あたりGHLOの数が細菌ゼロの場合、評点は「0」で、細菌が5未満の場合は、評点「1」、5から20の場合、評点は「2」、20以上の場合は、評点は「3」である。このペットフード組成物は犬ネコのGHLO感染を減少させることができ、基底部中のGHLOロード(load)とウレアーゼ活性は少なくとも0.5の評点減ぜられ、かつ洞部では少なくとも0.5の評点減ぜられた。

20

【0049】

慢性胃炎の本組成物の効果はまたバイオプシ薄層部位の細胞検査により評価した。慢性胃炎の組織学的分類はつぎの通りである。

- ・評点0：表面繊維形成、0好中球、0-10リンパ球およびプラズマ細胞、凝集体なし、正常上皮細胞、
- ・軽度の慢性胃炎 - 評点1：慢性表面胃炎、10-15表面間隙性組織を含むリンパ球またはプラズマ細胞、凝集体<2、正常な上皮細胞、
- ・中度の慢性胃炎 - 評点2：慢性間隙性胃炎、10-50またはそれ以上の粘膜が全体に厚いリンパ球またはプラズマ細胞、凝集体>3、正常上皮細胞、
- ・重篤な慢性胃炎 - 評点3：萎縮性胃炎、10-50またはそれ以上リンパ球またはプラズマ細胞、凝集体>3、腺性上皮細胞変化

30

【0050】

この組成物は胃の炎症の評点で少なくとも0.5の平均的後退で、慢性基底部胃炎の後退を導くことができる。

【0051】

この組成物は呼吸臭を有意に減少させることもわかった。したがって、ペットの悪い呼吸臭のようなGHLO感染に関係する2次的疾患を治療または予防するものである。

40

さらに、本発明の組成物は犬の寿命を改善することもできる。

【0052】

次の例は説明を目的とするものであり、本願の主題を限定するものではない。すべての百分率は特に断らない限り、重量により表す。

【実施例】

【0053】

<例1 菌株の選択>

本発明の菌株を選択するために、増殖可能なGHLO( $10^7$ 菌)はDMEM中該菌株の生育上澄(BS)の連続希釈物の存在下で5%CO<sub>2</sub>のもと37℃で1-2時間培養することができる。培養後、GHLO-B S混合物を12,000gで3分間遠心分離し、

50

ついでペレットを1mlの0.9%NaClで洗い、急速ウレアーゼテスト(Jatrox登録商標-H.p.テスト、Procter & Gamble Pharmaceuticals GmbH, Weiterstadt, ドイツ)500μlに再懸濁させる。ウレアーゼ活性に比例する比色変化は、550nmの光学密度の比色分析によって測定される。

菌の生存可能性は、10%の馬の血清(イノテック)、および1%のIsovitale X(Baltimore Biological Laboratories, Baltimore, MD)を補給した血清プレート(GC寒天、Gibco BRL、ペイズリー、スコットランド)上にGHLOの連続希釈物を平板培養してLSによる培養後に評価し、そしてコロニ-形成単位(CFU)をカウントする。

10

【0054】

<例2>

犬のヘリコバクター種感染に及ぼすラクトバチルスの発酵培地による補給効果を実験する。

【0055】

[材料と方法]

<動物>

フランス、リヨンの獣医学校の倫理委員会はこの研究を認証した。GHLOを自然に胃内感染させた9匹の雄のビーグル犬をこの研究に使った。動物は体重10-14kg、年齢3-4歳の範囲である。犬を各犬舎に収容し、衛生と飼育条件を同一にした(リヨンの獣医学校)。犬舎は毎日清掃し、消毒した。

20

犬は定期的に午前8時に給餌し、実験中飲料水にはコンスタントに接近させた。全実験中、特定の飼料(VITALITY登録商標、フリスキー社、フランス)を与えた。

【0056】

<実験デザイン>

処理前の、GHLOの胃内感染は、GHLOの同定(組織細菌学)、胃内ウレアーゼ活性(Jatrox登録商標試験)および胃の基底部および/または洞部バイオプシの慢性胃炎(組織病理学)の存在を評価して9匹のビーグル犬で確認した。GHLO感染のすべての犬は13日間処理に供した。これらの試験プラス<sup>13</sup>C-尿素呼吸試験によるGHLOの胃内感染の検出は3度(処理前[D<sub>0</sub>]、処理終了時[D<sub>13</sub>]および処理終了後30日[D<sub>43</sub>])繰返した。

30

【0057】

<処理>

処理は、13日の期間中L.ジョンソニNCC533により発酵させた酸性乳標品を毎日消費させるものである。この酸性乳標品は特定の飼料(240g「VITALITY/犬」)を与える前に完全に食べさせる必要があった。

【0058】

<評価試験>

・[臨床試験]:全実験中、犬は該獣医学校の二人の獣医師により観察した。臨床知見は報告書の形で記録した。

40

【0059】

・[胃のバイオプシ]:麻酔下(ケタミン、IMALGENE登録商標、5mg/kg-IM(静注))、胃の内視鏡検査を行った。犬は24時間断食させた。内視鏡はビデオガストロスコープ、オリンパス登録商標GIFK/XV10で行った。各評価の日に、12個のバイオプシを胃の基底部と洞部から取った。GHLOのウレアーゼ活性を測定するために、2つの基底部および洞部バイオプシを直ぐに使用した。4つの基底部と洞部バイオプシは組織細菌学および組織病理学のために使用する前に「ブーイン(bouin)」溶液に保持させた。

【0060】

・[GHLOの同定(組織細菌学)]:GHLOの同定は、バイオプシ部位の組織検査に

50

より行った。組織部位はギームサ型染色液で染色し、顕微鏡（×1000）で評価した。G H L Oの半定量的評価は胃内の局在と細胞外のコンタミの深さを考慮して行う。部位当たりのG H L Oの数が無菌の場合、評点「0」、5未満の場合、評点「1」、5～20の場合、評点「2」、および20を越える場合、評点「3」である。各基底部および洞部バイオプシについては、2つの部位を試験し、評価し、結果は2つの評価の平均値であった（エム・ディー・ウィラード、16頭のドイツシェパード犬の天然に増殖する小腸のバクテリア過剰繁殖の特徴、J . A . m . V e t . M e d . A s s o c . , 1 9 9 4 , 2 0 4 , 1 2 0 1 - 1 2 0 6 ）。

#### 【0061】

・ [ 胃内ウレアーゼ活性 ] ( J a t r o x 登録商標 - H . P . テスト、P r o c t e r & G a m b l e、ドイツ) : 本試験の原理は、試験媒体の尿素をG H L Oに存在するウレアーゼにより分解させる。尿素の分解に係るpH値の上昇は、指示薬(フェノールレッド)が黄色からピンク/赤に変色することにより分かる。バイオプシは試料採取後直ぐに試験した。指示薬にバイオプシを加えた後、J a t r o x 登録商標試験はUV検出器で比色計により180分間で読んだ。比色計は対照650nmで550nmにセットした。基底部および洞部バイオプシのウレアーゼ活性は2つの光学的測定の前平均であった。

10

#### 【0062】

・ [  $^{13}\text{C}$  - 尿素呼吸試験 ] : U B T 試験は内視鏡検査のため麻酔した後、2時間で行った。したがって、麻酔はU B Tの結果に影響を及ぼさなかった。U B Tは麻酔せずに断食犬に行った。最初に、犬には試験食を食べさせ、それは、毎日の摂取量の半分、即ち120g V I T A L I T Y 登録商標 / 犬である。2回目で、犬に7.5mgの $^{13}\text{C}$  - 尿素 / 犬(マス・トレース、ウォバーン、米国)を経口投与した。試験食の前(T B)について $^{13}\text{C}$  - 尿素の投与から40分後(T 4 0)に、 $^{13}\text{C O}_2$  尿素ブリーズアウト試料を得た。その後、犬に毎日の食事量の半分を与えた。 $^{13}\text{C O}_2$  尿素ブリーズアウト試料をガスアイソトープ比質量分析計(フィニガンM A T、ドイツ、ブレーメン)で分析した。研究室間の結果を標準化するために、 $^{13}\text{C}$  対照の国際標準(ビエナ・ピー・ディー・ベルムナイト即ちV P D S)のアナログを使用した。 $^{13}\text{C O}_2$ の原子比過剰はベースラインの試料(試験食および $^{13}\text{C}$ 投与前[T B]の試料)と40分後[T 4 0]に得た試料×1000(44, 45)間の原子率 $^{13}\text{C O}_2$ の差(デルタ値、 )として規定した。結果は過剰 $^{13}\text{C O}_2$ (%)として表した。

20

30

#### 【0063】

・ [ 組織病理学(細胞学) ] : c y t r o B T 試験により行った組織病理学はバイオプシ薄層部位を細胞検査して行った。インプレッション部位をヘマトキシリン - フォロキシリン - サフロン(H P S)で染色し、顕微鏡で観察した。胃バイオプシの組織的診断の基準は、400倍で見た3つの領域の平均および200倍の試料中の数であるリンパ球集合体の量である各細胞型の数に依存する。慢性胃炎の組織学的分類はつぎの通りである。

・ 評点0 : 表面繊維形成、0好中球、0 - 10リンパ球とプラズマ細胞、集合体なし、正常上皮細胞

・ 軽度の慢性胃炎 - 評点1 : 表面慢性胃炎、10 - 15表面間隙性組織を含むリンパ球またはプラズマ細胞、集合体< 2、正常上皮細胞

40

・ 中度な慢性胃炎 - 評点2 : 間隙性慢性胃炎、10 - 50リンパ球または粘膜の全厚さを含むプラズマ細胞、集合体> 3、正常上皮細胞

・ 重篤な慢性胃炎 - 評点3 : 萎縮性胃炎、10 - 50それ以上のリンパ球またはプラズマ細胞、集合体> 3、腺性上皮細胞変化(萎縮)

( R e f . ( 参照 ) : ピー・レコインダー、エム・シュバリエ、アール・ジラードおよびエフ・ダウリン、犬の小腸のバクテリアの異常発育および炎症性腸病。スピラマイシン - メトロニダゾール併用の医療効果の評価、R e v u e M e d . V e t . 1 9 9 8 , 1 4 9 , 8 4 3 - 8 5 2 ) 。

#### 【0064】

< 統計的分析 >

50

診断試験の各結果は、別々のバイオプシから2つの測定値の平均である。結果分布の正常性または異常性はウィルク - シャピロ法により試験した。

処理および処理後の効果は、ウィルコキソンのランク付け試験 (WSRT) および / または対 t - 試験を使って評価した。すべての統計的計算はソフトウェアプログラム (Statistix 登録商標、エクセル マイクロソフト 登録商標) で行った。P 値 < 0.05 は有意とみなされた。

【0065】

<結果>

胃内GHLOロードの運動性：結果は表1および2に示す。

【0066】

【表1】

表 1：基底部の組織細菌学

	基底部/コープス (評点)					
	D <sub>0</sub>	D <sub>14</sub>	D <sub>43</sub>	D <sub>14</sub> -D <sub>0</sub>	D <sub>43</sub> -D <sub>14</sub>	D <sub>43</sub> -D <sub>0</sub>
B01	3	1	2	-2	1	-1
B02	3	2	3	-1	1	0
B04	2	1	0	-1	-1	-2
B05	3	2	1	-1	-1	-2
B06	3	0	3	-3	3	0
B07	3	1	2	-2	1	-1
B08	3	3	2	0	-1	-1
B09	3	1	1	-2	0	-2
B10	3	1	3	-2	2	0
中央値	3	1	2	-2	1	-1
Nbr. < 0	-	-	-	8	3	6
Nbr. = 0	-	-	-	1	1	3
Nbr. > 0	-	-	-	0	5	0
n	9	9	9	9	9	9
平均値	2.9	1.3	1.9	-1.6	0.6	-1
+ SEM	0.11	0.29	0.35	0.29	0.47	0.29

	D <sub>14</sub> /D <sub>0</sub>	D <sub>43</sub> /D <sub>14</sub>	D <sub>43</sub> /D <sub>0</sub>
WSRT	0.0143	0.3270	0.0360

【0067】

10

20

30

【表 2】

表 2：洞部の組織細菌学

	洞部 (評点)					
	D <sub>0</sub>	D <sub>14</sub>	D <sub>43</sub>	D <sub>14</sub> -D <sub>0</sub>	D <sub>43</sub> -D <sub>14</sub>	D <sub>43</sub> -D <sub>0</sub>
B01	1	1	2	0	1	1
B02	1	1	2	0	1	1
B04	2	1	0	-1	-1	-2
B05	2	1	2	-1	1	0
B06	2	1	1	-1	0	-1
B07	1	0	1	-1	1	0
B08	1	1	1	0	0	0
B09	2	0	2	-2	2	0
B10	2	1	1	-1	0	-1
中央値	2	1	1	-1	1	0
Nbr. < 0	-	-	-	6	1	3
Nbr. = 0	-	-	-	3	3	4
Nbr. > 0	-	-	-	0	5	2
n	9	9	9	9	9	9
平均値	1.6	0.8	1.3	-0.8	0.6	-0.2
+ SEM	0.18	0.15	0.24	0.22	0.29	0.32

10

20

	D <sub>14</sub> /D <sub>0</sub>	D <sub>43</sub> /D <sub>14</sub>	D <sub>43</sub> /D <sub>0</sub>
WSRT	0.0360	0.1422	0.5896

## 【0068】

処理（〔D<sub>0</sub>〕から〔D<sub>14</sub>〕）段階の終わりに、GHLOの中央値細菌ロードは有意に基底部（P = 0.0143）で「3」から「1」の評点に、かつ洞部（P = 0.0360）では「2」から「1」に低下した。

処理開始と研究（〔D<sub>0</sub>〕から〔D<sub>43</sub>〕）の終了の間で、GHLOによる中央値細菌ロードは基底部バイオプシ（P < 0.0360）で「3」から「2」の評点に有意に減少した。洞部バイオプシでは、有意な差はなかった。

30

## 【0069】

<胃内ウレアーゼ活性（Jatrox<sup>登録商標</sup>試験）>：結果は表3および4に示す。

【表 3】

表 3 : 胃内ウレアーゼ活性 (Jatrox<sup>®</sup> 試験) 基底部

	基底部/コープス (光学密度)					
	D <sub>0</sub>	D <sub>14</sub>	D <sub>43</sub>	D <sub>14</sub> -D <sub>0</sub>	D <sub>43</sub> -D <sub>14</sub>	D <sub>43</sub> -D <sub>0</sub>
B01	0.43	0.34	0.43	-0.09	0.09	0.01
B02	0.42	0.39	0.44	-0.04	0.05	0.01
B04	0.54	0.00	0.44	-0.53	0.44	-0.10
B05	0.47	0.31	0.49	-0.16	0.18	0.02
B06	0.44	0.42	0.43	-0.02	0.01	-0.01
B07	0.52	0.40	0.41	-0.11	0.01	-0.11
B08	0.68	0.31	0.40	-0.37	0.09	-0.28
B09	0.45	0.35	0.38	-0.10	0.02	-0.08
B10	0.44	0.32	0.43	-0.13	0.01	-0.01
中央値	0.46	0.34	0.43	-0.12	0.09	-0.01
Nbr. < 0	-	-	-	9	0	6
Nbr. = 0	-	-	-	0	0	0
Nbr. > 0	-	-	-	0	9	3
n	9	9	9	9	9	9
平均値	0.49	0.32	0.43	-0.17	0.11	-0.06
+ SEM	0.03	0.04	0.01	0.06	0.04	0.03

10

20

	D <sub>14</sub> /D <sub>0</sub>	D <sub>43</sub> /D <sub>14</sub>	D <sub>43</sub> /D <sub>0</sub>
対 t - 試験	0.0155	0.0381	0.0921

【 0 0 7 0 】

【表 4】

表 4 : 胃内ウレアーゼ活性 (Jatrox<sup>®</sup> 試験) 洞部

	洞部 (光学密度)					
	D <sub>0</sub>	D <sub>14</sub>	D <sub>43</sub>	D <sub>14</sub> -D <sub>0</sub>	D <sub>43</sub> -D <sub>14</sub>	D <sub>43</sub> -D <sub>0</sub>
B01	0.31	0.00	0.00	-0.31	0.00	-0.31
B02	0.33	0.05	0.00	-0.28	-0.05	-0.33
B04	0.41	0.00	0.00	-0.41	0.00	-0.41
B05	0.46	0.00	0.00	-0.46	0.00	-0.46
B06	0.28	0.00	0.00	-0.28	0.00	-0.28
B07	0.00	0.00	0.00	-0.02	0.00	0.00
B08	0.00	0.07	0.00	0.07	-0.07	0.00
B09	0.05	0.00	0.00	-0.05	0.00	-0.05
B10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
中央値	0.28	0.00	0.00	-0.28	0.00	-0.28
Nbr. < 0	-	-	-	6	2	6
Nbr. = 0	-	-	-	2	7	3
Nbr. > 0	-	-	-	1	0	0
n	9	9	9	9	9	9
平均値	0.20	0.01	0.00	-0.19	-0.01	-0.20
+ SEM	0.06	0.01	0.00	0.07	0.01	0.06

10

20

	D <sub>14</sub> /D <sub>0</sub>	D <sub>43</sub> /D <sub>14</sub>	D <sub>43</sub> /D <sub>0</sub>
対 t - 試験	0.0197	0.1756	0.0123

## 【0071】

処理 ( [ D<sub>0</sub> ] から [ D<sub>14</sub> ] ) 段階の終わりで、ウレアーゼ活性の平均は基底部 ( P = 0 . 0 1 5 5 ) で 3 5 %、および洞部 ( P = 0 . 0 1 9 7 ) で 9 3 % 有意に減少した。

## 【0072】

処理 ( [ D<sub>14</sub> ] から [ D<sub>43</sub> ] ) の終了 2 9 日後に、平均ウレアーゼ活性は基底部バ  
イオプシ ( P = 0 . 0 3 8 1 ) で 3 5 % 有意に減少したが、処理の開始時より依然として  
低かった。洞部のウレアーゼ活性は修正されず、ゼロのままだった。

30

## 【0073】

< 全般のウレアーゼ活性 ( <sup>13</sup>C - 尿素呼吸試験 ) > :

結果は表 5 に示す。

## 【0074】

## 【表 5】

表 5 : 全体のウレアーゼ活性 ( $^{13}\text{C}$ -尿素呼吸試験)

	D <sub>0</sub>	D <sub>14</sub>	D <sub>43</sub>	D <sub>14</sub> -D <sub>0</sub>	D <sub>43</sub> -D <sub>14</sub>	D <sub>43</sub> -D <sub>0</sub>
B01	34	6	55	-28	49	21
B02	18	26	21	8	-5	3
B04	165	24	50	-141	26	-116
B05	15	7	6	-8	-1	-9
B06	18	20	19	2	-1	1
B07	12	13	22	1	9	10
B08	47	17	15	-30	-2	-32
B09	20	10	9	-10	-1	-11
B10	32	9	13	-23	4	-19
中央値	20	13	20	-10	-1	-9
Nbr. < 0	-	-	-	6	5	5
Nbr. = 0	-	-	-	0	0	0
Nbr. > 0	-	-	-	3	4	4
n	9	9	9	9	9	9
平均値	40	14	23	-26	9	-17
+ SEM	16	3	6	15	6	13

10

20

	D <sub>14</sub> /D <sub>0</sub>	D <sub>43</sub> /D <sub>14</sub>	D <sub>43</sub> /D <sub>0</sub>
WSRT	0.0494	0.4772	0.3433

## 【0075】

処理（〔D<sub>0</sub>〕から〔D<sub>14</sub>〕）の開始と終了の間で、35%の $^{13}\text{C}\text{O}_2$ -ブリーズアウトの中央値 $^{13}\text{C}$ -エンリッチメントは有意に減少した（ $P = 0.049$ ）。

処理終了後の29日間（〔D<sub>14</sub>〕から〔D<sub>43</sub>〕）終了時に、 $^{13}\text{C}\text{O}_2$ -ブリーズアウトの $^{13}\text{C}$ -エンリッチメントは有意には変わらなかった。

## 【0076】

<慢性胃炎（ $^{13}\text{C}$ -尿素呼吸試験）> :

結果は表6および7に示す。

30

【表 6】

表 6 : 基底部の組織病理学

	基底部/コープス (評点)					
	インクルージョン	D <sub>14</sub>	D <sub>43</sub>	D <sub>14</sub> - Incl.	D <sub>43</sub> - D <sub>14</sub>	D <sub>43</sub> - Incl.
B01	2	1	0	-1	-1	-2
B02	1	0	0	-1	0	-1
B04	2	0	0	-2	0	-2
B05	1	1	1	0	0	0
B06	1	0	1	-1	1	0
B07	1	0	0	-1	0	-1
B08	1	0	0	-1	0	-1
B09	1	0	0	-1	0	-1
B10	2	0	0	-2	0	-2
中央値	1	0	0	-1	0	-1
Nbr. < 0	-	-	-	8	1	7
Nbr. = 0	-	-	-	1	7	2
Nbr. > 0	-	-	-	0	1	0
n	9	9	9	9	9	9
平均値	1.3	0.2	0.2	-1.1	0.0	-1.1
+ SEM	0.17	0.15	0.15	0.20	0.17	0.26

10

20

	D <sub>14</sub> - Incl.	D <sub>43</sub> - D <sub>14</sub>	D <sub>43</sub> - Incl.
WSRT	0.0143	0.7500	0.0225

【 0 0 7 7 】

【表 7】

表 7 : 洞部の組織病理学

	洞部 (評点)					
	インクルージョン	D <sub>14</sub>	D <sub>43</sub>	D <sub>14</sub> - Incl.	D <sub>43</sub> - D <sub>14</sub>	D <sub>43</sub> - Incl.
B01	1	2	0	1	-2	-1
B02	1	0	2	-1	2	1
B04	0	0	0	0	0	0
B05	0	1	1	1	0	1
B06	1	0	1	-1	1	0
B07	1	0	1	-1	1	0
B08	1	1	1	0	0	0
B09	1	0	0	-1	0	-1
B10	1	1	0	0	-1	-1
中央値	1	0	1	0	0	0
Nbr. < 0	-	-	-	4	2	3
Nbr. = 0	-	-	-	3	4	4
Nbr. > 0	-	-	-	2	3	2
n	9	9	9	9	9	9
平均値	0.8	0.6	0.7	-0.2	0.1	-0.1
+ SEM	0.15	0.24	0.24	0.28	0.39	0.26

30

40

	D <sub>14</sub> - Incl.	D <sub>43</sub> - D <sub>14</sub>	D <sub>43</sub> - Incl.
WSRD	0.5294	0.8336	0.7874

【 0 0 7 8 】

50

処理（〔インクルージョン〕から〔D<sub>14</sub>〕）の段階の終わりに、慢性胃炎の中央値は基底部（P = 0 . 0 1 4 3）で「1」から「0」の評点に有意に低下した。この減少は、研究の終了まで維持された。中央値評点の有意な修正は洞部バイオプシに示されなかった。

【 0 0 7 9 】

< 結論 >

【表 8】

	処理 (〔D <sub>14</sub> 〕／〔D <sub>0</sub> 〕) 特定飼料 + <i>L. ジョンソニ</i> NCC 533 発酵乳標品		処理後 (〔D <sub>43</sub> 〕／〔D <sub>14</sub> 〕) 特定飼料	
	基底部	洞部	基底部	洞部
GHLOs <sup>(2)-a</sup>	(-)*	(-)*	ns	ns
ウレアーゼ活性 <sup>(1)-b</sup>	(-)*	(-)*	(+)*	ns
ウレアーゼ活性 <sup>(2)-c</sup>	( - )*		ns	

10

20

	(〔D <sub>14</sub> 〕／インクルージョン)		(〔D <sub>43</sub> 〕／〔D <sub>14</sub> 〕)	
慢性胃炎 (2)-d	(-)*	ns	ns	ns

<sup>(1)</sup>対 t - 試験；<sup>(2)</sup>ウイルコキソン評点試験 - (-)(+)負又は正バリエーション -

• P < 0.05 - \*組織細菌学、<sup>b</sup>Jatrox<sup>®</sup> 試験 - <sup>c</sup><sup>13</sup>C- 尿素呼吸試験 - <sup>d</sup> 組織病理学

【 0 0 8 0 】

慢性胃炎の胃内 GHLO 感染の犬では、*L. ジョンソニ* NCC 533 により発酵させた酸性乳標品を消費することにより、つぎの結果を得ることができた。

30

即ち、

- ・ 基底部および洞部で、処理中、GHLO ロードおよびウレアーゼ活性の有意な減少ならびに慢性胃炎の後退、
- ・ 基底部では、処理終了後に維持された慢性胃炎の有意な後退、
- ・ 副作用なし。

【 0 0 8 1 】

< 例 3 : 各種ラクトバチルス菌株の培養上澄に存在する抗ヘリコバクター性 >

単離株 : NCC 533、NCC 2583 および NCC 2628 のラクトバチルス菌の生育培養上澄のインビトロ抗 - GHLO 性をウレアーゼ活性の阻害により評価した。

40

【 0 0 8 2 】

*H. ピゾゼロニ* および *H. サロモニス* はコロンビア寒天 - 5 % ヒツジ血液で生育した。*H. フェリス* は 3 g / L 酵母エキスと 10 % ヒツジ血液を含有するブレンハートインフュージョン (BHI) で生育した。すべてのヘリコバクター種は微好気性雰囲気 (85 % N<sub>2</sub> / 10 % CO<sub>2</sub> / 5 % O<sub>2</sub>) にて 37 - 48 時間維持された。2 . 5 g / L 酵母エキスを補給した BHI プロスに集菌した。菌数は 600 nm の光学密度 (1 OD 600 = 10<sup>8</sup> 菌 / ml) を測定して評価した。

【 0 0 8 3 】

適当な培地中の純粋のまたは予備希釈した培養上澄は、最終的に DMEM 培地に 1 : 2 に希釈した。pH を 4 . 2 に調整した後、試料を 0 . 2 μ M で濾過して滅菌した。1 × 1

50

0<sup>7</sup> H.ピロリの均等物を、異なる試料500μlを含有する試験管に加え、さらに該管を細胞培養器(5%CO<sub>2</sub>)にて37で1時間維持させた。遠心分離により集菌した。菌ペレットを0.9%NaClで一度洗いそして250μlのウレアーゼ試験試薬(Jatrox登録商標-H.p.テスト、Procter & Gamble Pharmaceutical)に再懸濁させた。更に37で1時間培養した後、ウレアーゼ活性に比例する、比色定量変化を550nmの光学密度(OD)の比色計で測定した。

【0084】

<発酵上澄標品>

NCC 2583およびNCC 2628のネスレ・カルチャー・コレクションから得たラクトバチルスをMRS-パスツール培地で生育させた。E.フェシウム SF68およびS.ブーラジ SB20はそれぞれHJL培地とYPF培地に生育させた。37で48時間後、菌をペレット化し、発酵上澄を回収し、そして更に使うまで-20で凍結保存した。

10

【0085】

<結果>

E.フェシウム SF68(Bioferment)とS.ブーラジSB20(Levucell)のラクトバチルス株、NCC 2583およびNCC 2628のストックを適当な培地にて平行して生育させた。各種発酵上澄を、ウレアーゼ試験を使って、H.ビゾゼロニ、H.サロミニスおよびH.フェリスに対する阻害能力について試験した。アッセイではNCC 533生育培養上澄をポジティブコントロールとして使用し、培地単独をネガティブコントロールとして使用した。

20

【0086】

表8は2つの別々の実験結果を示す。<L.アシドフィルスNCC 2628>の発酵上澄は、H.ビゾゼロニ、H.サロミニスおよびH.フェリスのウレアーゼ活性を全体的に阻害した。<L.ラムノサス NCC 2583>の発酵上澄はH.ビゾゼロニとH.サロミニスのウレアーゼ活性を部分的に阻害したが、H.フェリスのウレアーゼ活性は阻害しなかった。

【0087】

任意のヘリコバクター種は<L.ジョンソニ NCC 533>培養上澄との培養により、それらのウレアーゼ活性は完全に阻害された。3つのヘリコバクター種とE.フェシウムSF68の生育培養上澄、S.ブーラジSB20の生育培養上澄とを培養した場合、ウレアーゼ活性の阻害は観察されなかった。

30

【0088】

【表 9】

表 8 : GHLOウレアーゼ活性に及ぼす各種発酵上澄の影響

試料	菌種	初期 pH	ウレアーゼ活性 (OD <sub>550 nm</sub> )		
			H. ピゾゼロニ	H. フェリス	H. サロモニス
MRS- ハースツール	-	6.6	0.5	0.5	0.5
YPD	-	6.4	0.5	0.6	0.5
CNCM I-1225	L. ジョンソニ	3.9	0.0	0.0	0.0
CNCM I-2583	L. ラムナス	4.1	0.3	0.2	0.5
CNCM I-2628	L. アシドフィルス	4.1	0.0	0.0	0.0
SF68	E. フェシウム	5.1	0.5	0.5	0.5
SB20	S. プーラジ	4.2	0.5	0.5	0.6

3つのラクトバチルス、E. フェシウム、S. プーラジはそれらの適当な培地で48時間培養した。発酵培養上澄の1/2希釈を $2 \times 10^7$ 菌/mlとともに培養した。1時間培養後、H. ピゾゼロニ、H. フェリスおよびH. サロモニスのウレアーゼ活性を比色計により評価した。完全阻害  $OD_{550nm} = 0$ ; 阻害なし  $OD_{550nm} = 0.5$ 。

【0089】

&lt;例4 乾燥ドッグフード&gt;

飼料混合物は約58重量%のコーン、約5.5重量%のコーングルテン、約22重量%のチキンミール、2.5重量%の乾燥チコリ、ラクトバチルス・ジョンソニ NCC 533 (CNCM-I 1225) およびラクトバチルス・パラカゼイ (CNCM-I 2116) の株による、犬用の対応する量が約 $10^9 - 10^{12}$  cfu/日となっている発酵乳、および残りは塩、ビタミンおよびミネラルから構成される。

【0090】

飼料混合物を予備コンディショナーに入れ、加湿する。ついでこの加湿飼料をエクストルーダ加熱機に供給し、ゼラチン化する。エクストルーダにのこるゼラチン化マトリックスをダイに通し、押出す。押し出し物を犬に供するのに適当な断片に切断し、約110で約20分間乾燥し、冷却してペレットを得る。

【0091】

この乾燥ドッグフードはペットの健康を改善し、特にペットのGHLO感染に関連する疾患を予防することができる。

【0092】

&lt;例5&gt;

20匹の雄のビーグル犬を使って試験を行った。この犬はGHLOで自然に胃内感染させた。最初に、すべての犬に、GHLOの撲滅に古典的な治療として、2つの異なる抗生物質(スピラマイシン (Spiramycin) とメトロニダゾール (Metronidazole)) とオメプラゾール (Omeprazole) のような抗分泌剤とを含む抗生物質を、1週間与えた。

【0093】

処理7日後、半分の犬はGHLO陰性であり、即ち、ヘリコバクター菌は組織細菌学的にも検出されず、胃内ウレアーゼ活性もなく、 $^{13}C$ -尿素呼吸試験値は40分でベース

ラインより5%未満の増加率であった。

【0094】

処理後、半分の犬には対照飼料として、市販の乾燥ドッグフードである、フリスキー (Friskees) のメニューエネルギー製品 (Menu Energy product) を与えた。10匹の残りの犬には、犬用の量が約  $10^9 - 10^{12}$  cfu/日となる、ラクトバチルス・ジョンソニ NCC 533 (CNCM-I 1225) およびラクトバチルス・パラカゼイ (CNCM-I 2116) 株による乾燥発酵乳のペレットを含有すること以外は、フリスキーのメニューエネルギー製品に想到する試験飼料を与えた。

【0095】

<sup>13</sup>C-尿素呼吸試験と組織細菌学によるヘリコバクターの検出を、これらの2つの異なる飼料を与えた6週間後に再度行った。結果によれば、通常のフリスキーメニューエネルギー製品を与えた犬の20%は6週間で陽性になった。試験飼料を与えたすべての犬は6週間後に陰性になった。

10

この組成物はGHLOの再侵入防止用の抗生物学的治療のアジュバントとして有効である。

【0096】

<例6 缶詰ペットフード>

73%の家禽屠体、豚の肺および牛の肝臓(粉碎)、16%の小麦粉、2%の色素および9%のラクトバチルス・ジョンソニ NCC 533 (CNCM-I 1225) およびビフィドバクテリウム・ラクティス (ATCC 27536) 株による発酵乳、ビタミンおよび無機塩からなる混合物を調製する。この混合物を12 で乳化し、プリンに押し出し、ついでこれを90 の温度で加熱する。30 に冷却し、塊に切断する。この塊45%を、ソース55% (98%の水、1%の色素および1%のグアーガムから調製した) と混合する。スズめっきの缶に充填し、125 で40分滅菌した。

20

このウェットな組成物はペットのGHLO感染に関係する疾患を予防または治療するのに使われる。

【0097】

<例7 悪い呼吸臭への影響>

胃にGHLOを有する10匹の犬を例2と同じ飼料で2週間飼育した。呼吸臭はハリトメータによって治療の開始と終わりに各犬で測定した。

30

この実験では、L.ジョンソニ NCC 533 で発酵させた酸性乳調製物を含有する組成物で犬を飼育すると、呼吸臭は有意に減少した。

さらに、ヘリコバクターによる感染レベルと呼吸臭の間に明かな相関関係があった。

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
 A 6 1 P 31/04 (2006.01) A 6 1 K 35/74 G  
 A 6 1 P 1/04  
 A 6 1 P 31/04 1 7 1

(74)代理人 100139000

弁理士 城戸 博兒

(74)代理人 100152191

弁理士 池田 正人

(72)発明者 バレブル、オリヴィエ

スイス国 ローザンヌ、ルート デ コジョンネ 1 6 ベー

(72)発明者 コルテシー テウラ、イレヌ

スイス国 エパリンジェ、シェマン デュ ポルニー、3 4 セー

(72)発明者 エンスレン、マルク、イブ、アドルフ

スイス国 ローザンヌ、シェマン デ ラ ゴテッタ、3

## 合議体

審判長 内藤 伸一

審判官 中村 浩

審判官 前田 佳与子

(56)参考文献 特開平06-098782(JP,A)

国際公開第99/064023(WO,A1)

国際公開第98/055131(WO,A1)

特開平10-191916(JP,A)

COCONNIER,M.H. et al, Antagonistic activity  
 against Helicobacter infection in vitro and  
 in vivo by the human Lactobacillus, Appl En  
 viron Microbiol, 1998年, Vol.64, No.11, p.4573 -  
 4580

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 35/00-35/76

WPI, JDreamII, CAPLUS(STN), MEDLINE(STN), E  
 MBASE(STN), BIOSIS(STN)