

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6964191号
(P6964191)

(45) 発行日 令和3年11月10日(2021.11.10)

(24) 登録日 令和3年10月20日(2021.10.20)

(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 35/745 (2015.01)	A 6 1 K 35/745
A 6 1 K 35/747 (2015.01)	A 6 1 K 35/747
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00

請求項の数 18 (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2020-524353 (P2020-524353)
 (86) (22) 出願日 平成30年4月19日 (2018. 4. 19)
 (65) 公表番号 特表2021-501586 (P2021-501586A)
 (43) 公表日 令和3年1月21日 (2021. 1. 21)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2018/004590
 (87) 国際公開番号 W02019/088379
 (87) 国際公開日 令和1年5月9日 (2019. 5. 9)
 審査請求日 令和2年7月28日 (2020. 7. 28)
 (31) 優先権主張番号 10-2017-0145420
 (32) 優先日 平成29年11月2日 (2017. 11. 2)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 韓国 (KR)

(73) 特許権者 512139102
 ユニバーシティ-インダストリー コーオ
 ペレイション グループ オブ キョンヒ
 ユニバーシティ
 UNIVERSITY-INDUSTRY
 COOPERATION GROUP
 OF KYUNG HEE UNIVER
 SITY
 大韓民国キョンギド、ヨンイン-シ、キ
 フン-グ、トギョン-デロ、1732、キ
 ユンヒ、ユニバーシティ、グローバル、キ
 ャンパス

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規な乳酸菌およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ラクトバチルス・プランタラムNK3 (Lactobacillus plantarum NK3) KCCM12089P。

【請求項 2】

ビフィドバクテリウム・ロンガムNK49 (Bifidobacterium longum NK49) KCCM12088P。

【請求項 3】

前記ラクトバチルス・プランタラムNK3 (Lactobacillus plantarum NK3) KCCM12089Pは、配列番号1の16S rDNA塩基配列を含む、請求項1に記載のラクトバチルス・プランタラムNK3 (Lactobacillus plantarum NK3) KCCM12089P。

【請求項 4】

前記ビフィドバクテリウム・ロンガムNK49 (Bifidobacterium longum NK49) KCCM12088Pは、配列番号2の16S rDNA塩基配列を含む、請求項2に記載のビフィドバクテリウム・ロンガムNK49 (Bifidobacterium longum NK49) KCCM12088P。

【請求項 5】

ラクトバチルス・プランタラムNK3 (Lactobacillus plantarum NK3) KCCM12089P、ビフィドバクテリウム・ロンガムNK49 (B

bifidobacterium longum NK49) KCCM12088Pまたはこれらの混合物を含む炎症疾患の予防または治療用の薬学組成物。

【請求項6】

前記ラクトバチルス・プランタラムNK3 (*Lactobacillus plantarum* NK3) KCCM12089Pは、その生菌体、その死菌体、その培養物またはその破砕物である、請求項5に記載の炎症疾患の予防または治療用の薬学組成物。

【請求項7】

前記ビフィドバクテリウム・ロンガムNK49 (*Bifidobacterium longum* NK49) KCCM12088Pは、その生菌体、その死菌体、その培養物またはその破砕物である、請求項5に記載の炎症疾患の予防または治療用の薬学組成物

10

【請求項8】

前記炎症疾患は、関節炎、痛風、肝炎、喘息、肥満、角膜炎、胃炎、腸炎、腎臓炎、大腸炎、糖尿、結核、気管支炎、胸膜炎、腹膜炎、脊椎炎、膵臓炎、炎症痛、尿道炎、膀胱炎、膣炎、動脈硬化症、敗血症、火傷、皮膚炎、歯周炎および歯肉炎を含む群より選択されるいずれか一つ以上である、請求項5に記載の炎症疾患の予防または治療用の薬学組成物。

【請求項9】

前記炎症疾患は大腸炎または膣炎である、請求項5に記載の炎症疾患の予防または治療用の薬学組成物。

20

【請求項10】

ラクトバチルス・プランタラムNK3 (*Lactobacillus plantarum* NK3) KCCM12089P、ビフィドバクテリウム・ロンガムNK49 (*Bifidobacterium longum* NK49) KCCM12088Pまたはこれらの混合物を含む炎症疾患の予防または改善用の健康機能食品。

【請求項11】

前記ラクトバチルス・プランタラムNK3 (*Lactobacillus plantarum* NK3) KCCM12089Pは、その生菌体、その死菌体、その培養物またはその破砕物である、請求項10に記載の炎症疾患の予防または改善用の健康機能食品

30

【請求項12】

前記ビフィドバクテリウム・ロンガムNK49 (*Bifidobacterium longum* NK49) KCCM12088Pは、その生菌体、その死菌体、その培養物またはその破砕物である、請求項10に記載の炎症疾患の予防または改善用の健康機能食品。

【請求項13】

前記炎症疾患は、関節炎、痛風、肝炎、喘息、肥満、角膜炎、胃炎、腸炎、腎臓炎、大腸炎、糖尿、結核、気管支炎、胸膜炎、腹膜炎、脊椎炎、膵臓炎、炎症痛、尿道炎、膀胱炎、膣炎、動脈硬化症、敗血症、火傷、皮膚炎、歯周炎および歯肉炎を含む群より選択されるいずれか一つ以上である、請求項10に記載の炎症疾患の予防または改善用の健康機能食品。

40

【請求項14】

前記炎症疾患は大腸炎または膣炎である、請求項10に記載の炎症疾患の予防または改善用の健康機能食品。

【請求項15】

炎症疾患の治療のための薬剤を製造するためのラクトバチルス・プランタラムNK3 (*Lactobacillus plantarum* NK3) KCCM12089P、ビフィドバクテリウム・ロンガムNK49 (*Bifidobacterium longum* NK49) KCCM12088Pまたはこれらの混合物の使用。

【請求項16】

50

前記炎症疾患は、関節炎、痛風、肝炎、喘息、肥満、角膜炎、胃炎、腸炎、腎臓炎、大腸炎、糖尿、結核、気管支炎、胸膜炎、腹膜炎、脊椎炎、膵臓炎、炎症痛、尿道炎、膀胱炎、膣炎、動脈硬化症、敗血症、火傷、皮膚炎、歯周炎および歯肉炎を含む群より選択されるいずれか一つ以上である、請求項 1 5 に記載の使用。

【請求項 1 7】

炎症疾患の治療に用いるためのラクトバチルス・プランタラム NK 3 (*Lactobacillus plantarum* NK 3) K C C M 1 2 0 8 9 P、ビフィドバクテリウム・ロンガム NK 4 9 (*Bifidobacterium longum* NK 4 9) K C C M 1 2 0 8 8 P またはこれらの混合物を含む組成物。

【請求項 1 8】

前記炎症疾患は、関節炎、痛風、肝炎、喘息、肥満、角膜炎、胃炎、腸炎、腎臓炎、大腸炎、糖尿、結核、気管支炎、胸膜炎、腹膜炎、脊椎炎、膵臓炎、炎症痛、尿道炎、膀胱炎、膣炎、動脈硬化症、敗血症、火傷、皮膚炎、歯周炎および歯肉炎を含む群より選択されるいずれか一つ以上である、請求項 1 7 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、新規な乳酸菌であるラクトバチルス・プランタラムおよびビフィドバクテリウム・ロンガムに関し、具体的には、炎症疾患の予防および治療に有用な新規な乳酸菌を含む組成物に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

炎症は、任意の外部刺激に対して生体組織または器官に現れる一種の防御反応の一つである。正常な場合、炎症反応は、外部から感染した物質を除去し、損傷した組織を再生して機能を回復するようになる。しかし、炎症誘発サイトカインの分泌に応じた炎症反応が持続的に起こると、炎症反応が起こった部位に応じて様々な炎症疾患が発生するようになる。

【0 0 0 3】

一方、女性の炎症疾患の一つである膣炎は、膣内に正常に存在する細菌の代わりに、様々な嫌気性細菌が増殖して発生する膣内感染症であり、最近、女性の衛生用品の使用増加およびストレスの増加によりその発生が増加している。膣炎は細菌性膣炎と真菌性膣炎が大半であるが、細菌性膣炎の場合は代表的に嫌気性菌株であるガードネレラ・バギナリス (*Gardnerella vaginalis*) またはアトポビウム・バギナエ (*Atopobium vaginae*) により発生し、真菌性膣炎の場合はカンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) により主に発生する (*Sexually Transmitted Diseases* , November 2006 , vol 33 , No . 11 , 663 - 665) 。

【0 0 0 4】

一方、細菌性膣炎の場合は抗生剤を用い、真菌性膣炎の場合はアゾール系抗真菌剤を用いて症状を改善させることができるが、このような治療剤の場合、また他の菌の交代現象を引き起こして根本的な治療効果を期待し難いという問題がある。したがって、膣内の膣炎原因菌を除去すると同時に正常乳酸菌が原状回復するように炎症反応を抑制できる治療剤の開発が必要な実情であるが、十分な研究が行われていない。

【0 0 0 5】

このような背景下、本発明者らは、炎症疾患、具体的には膣炎の予防および治療剤を研究している最中、キムチおよびヒトの糞便から分離した新規な乳酸菌が、炎症反応を抑制するだけでなく、膣炎原因菌の成長を抑制すると同時に膣炎の治療効果を示し、炎症疾患、具体的には膣炎の予防および治療に有用に使用できることを確認し、本発明を完成するに至った。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】**【0006】**

本発明の目的は、新規なラクトバチルス・プランタラムおよびビフィドバクテリウム・ロンガム乳酸菌を提供することにある。

【0007】

本発明の他の目的は、新規な乳酸菌を含む炎症疾患の予防または治療用の組成物を提供することにある。

【0008】

本発明のまた他の目的は、新規な乳酸菌を含む炎症疾患の予防または改善用の健康機能食品を提供することにある。

【課題を解決するための手段】**【0009】**

前記目的を達成するための一様態として、本発明は、ラクトバチルス・プランタラムNK3 (*Lactobacillus plantarum* NK3) (寄託機関：韓国微生物保存センター、寄託日：2017.08.04、受託番号：KCCM12089P) を提供する。

【0010】

本発明のラクトバチルス・プランタラムNK3は、伝統醗酵食品であるキムチから分離および同定されたラクトバチルス・プランタラムの新規な乳酸菌であることを特徴とする。

【0011】

本発明のラクトバチルス・プランタラムNK3の同定および分類のための16S rDNA塩基配列は、本明細書に添付された配列番号1の通りである。したがって、本発明のラクトバチルス・プランタラムNK3 (*Lactobacillus plantarum* NK3) は、配列番号1の16S rDNAを含むことができる。

【0012】

前記配列番号1の16S rDNA塩基配列の分析結果、公知のラクトバチルス・プランタラム菌株と99%の相同性を示しており、ラクトバチルス・プランタラムと最も高い分子系統学的類縁関係を示した。したがって、前記乳酸菌をラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*) に同定し、ラクトバチルス・プランタラムNK3に命名し、韓国微生物保存センターに2017年8月4日付で寄託した (受託番号KCCM12089P)。

【0013】

本発明のラクトバチルス・プランタラムNK3はグラム陽性菌であり、細胞の形態は桿菌である。より具体的なラクトバチルス・プランタラムNK3の生理学的特性は当該技術分野における通常の方法により分析することができ、その結果は下記表2の通りである。具体的には、ラクトバチルス・プランタラムNK3は、炭素源として、L-アラビノース、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、マンニトール、ソルビトール、D-メチル-D-マンノシド、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、セロピオース、マルトース、ラクトース、メリピオース、スクロース、トレハロース、メレジトース、ゲンチオピオース、D-ツラノースおよびグルコネートを用いることができる。

【0014】

前記目的を達成するための他の一様態として、本発明は、ビフィドバクテリウム・ロンガムNK49 (*Bifidobacterium longum* NK49) (寄託機関：韓国微生物保存センター、寄託日：2017.08.04、受託番号：KCCM12088P) を提供する。

【0015】

本発明のビフィドバクテリウム・ロンガムNK49は、ヒトの糞便から分離および同定されたビフィドバクテリウム・ロンガムの新規な乳酸菌であることを特徴とする。

10

20

30

40

50

【0016】

本発明のビフィドバクテリウム・ロンガムNK49の同定および分類のための16S rDNA塩基配列は、本明細書に添付された配列番号2の通りである。したがって、本発明のビフィドバクテリウム・ロンガムNK49 (*Bifidobacterium longum* NK49) は、配列番号2の16S rDNAを含むことができる。

【0017】

前記配列番号2の16S rDNA塩基配列の分析結果、公知のビフィドバクテリウム・ロンガム菌株と99%の相同性を示しており、ビフィドバクテリウム・ロンガムと最も高い分子系統学的類縁関係を示した。したがって、前記乳酸菌をビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) に同定し、ビフィドバクテリウム・ロンガムNK49に命名し、韓国微生物保存センターに2017年8月4日付で寄託した(受託番号KCCM12088P)。

10

【0018】

本発明のビフィドバクテリウム・ロンガムNK49はグラム陽性菌であり、細胞の形態は桿菌である。より具体的なビフィドバクテリウム・ロンガムNK49の生理学的特性は当該技術分野における通常の方法により分析することができ、その結果は下記表3の通りである。具体的には、ビフィドバクテリウム・ロンガムNK49は、炭素源として、L-アラビノース、D-リボース、D-キシロース、D-ガラクトース、D-グルコース、D-フルクトース、マンニトール、ソルビトール、-メチル-D-グルコシド、エスクリン、サリシン、マルトース、ラクトース、メリビオース、スクロース、ラフィノースおよびD-ツラノースを用いることができる。

20

【0019】

前記目的を達成するための他の一様態として、本発明は、ラクトバチルス・プランタラムNK3 (*Lactobacillus plantarum* NK3) KCCM12089P、ビフィドバクテリウム・ロンガムNK49 (*Bifidobacterium longum* NK49) KCCM12088Pまたはこれらの混合物を含む炎症疾患の予防または治療用の薬学組成物を提供する。

【0020】

本発明の「ラクトバチルス・プランタラムNK3 (*Lactobacillus plantarum* NK3)」は、前記で説明した通りである。

30

具体的には、本発明の薬学組成物に含まれるラクトバチルス・プランタラムNK3は、その生菌体、その死菌体、その培養物、その破砕物またはその抽出物であってもよいが、炎症疾患の予防または治療の効果を達成できるラクトバチルス・プランタラムNK3の形態であれば、特に制限されない。

【0021】

本発明の「ビフィドバクテリウム・ロンガムNK49 (*Bifidobacterium longum* NK49)」は、前記で説明した通りである。

具体的には、本発明の薬学組成物に含まれるビフィドバクテリウム・ロンガムNK49は、その生菌体、その死菌体、その培養物、その破砕物またはその抽出物であってもよいが、炎症疾患の予防または治療の効果を達成できるラクトバチルス・プランタラムNK3の形態であれば、特に制限されない。

40

【0022】

本発明における用語「培養物」は乳酸菌を公知の液体培地または固体培地で培養させて得たものを意味し、本発明においては新規な乳酸菌を含む概念である。

【0023】

本発明の炎症疾患は、関節炎、痛風、肝炎、喘息、肥満、角膜炎、胃炎、腸炎、腎臓炎、大腸炎、糖尿、結核、気管支炎、胸膜炎、腹膜炎、脊椎炎、膵臓炎、炎症痛、尿道炎、膀胱炎、膣炎、動脈硬化症、敗血症、火傷、皮膚炎、歯周炎および歯肉炎を含む群より選択されるいずれか一つ以上であってもよい。

【0024】

50

本発明の一実施例においては、マウスから分離したマクロファージに炎症反応誘導物質であるリポポリサッカライドと共にラクトバチルス・プランタラムNK3またはビフィドバクテリウム・ロンガムNK49の処理時に炎症反応が顕著に抑制されることを確認した(図1および2)。それにより、前記ラクトバチルス・プランタラムNK3、ビフィドバクテリウム・ロンガムNK49またはこれらの混合物を含む薬学組成物が炎症疾患の予防および治療に有用に使用できることを確認した。

具体的には、前記炎症疾患は膣炎であってもよい。

【0025】

本発明の一実施例においては、ラクトバチルス・プランタラムNK3、ビフィドバクテリウム・ロンガムNK49またはこれらの混合物が膣炎誘発細菌であるガードネレラ・バギナリスおよびアトポビウム・バギナエに対して成長抑制効果を示し、前記ガードネレラ・バギナリスの感染を抑制する効果に優れることを確認した(図3~5)。また、本発明の一実施例においては、膣炎が誘導された動物モデルにラクトバチルス・プランタラムNK3、ビフィドバクテリウム・ロンガムNK49またはこれらの混合物を投与した結果、膣炎細菌により発生した浮腫を伴った炎症および膣炎細菌数が減少し、膣の代表的な炎症指標であるミエロペルオキシダーゼの活性が減少し、膣粘膜において、TNF- α の発現が増加し、IL-10の発現が増加することを確認した(図6~10)。それにより、前記ラクトバチルス・プランタラムNK3、ビフィドバクテリウム・ロンガムNK49またはこれらの混合物を含む薬学組成物が具体的な炎症疾患である膣炎の予防および治療に有用に使用できることを確認した。

具体的には、前記炎症疾患は大腸炎であってもよい。

【0026】

本発明の一実施例においては、大腸炎が誘導された動物モデルにラクトバチルス・プランタラムNK3、ビフィドバクテリウム・ロンガムNK49またはこれらの混合物を投与した結果、大腸の長さが回復し、ミエロペルオキシダーゼの活性が減少し、炎症指標であるサイトカインの発現量および活性が抑制されることを確認した(表6)。それにより、前記ラクトバチルス・プランタラムNK3、ビフィドバクテリウム・ロンガムNK49またはこれらの混合物を含む薬学組成物が具体的な炎症疾患である大腸炎の予防および治療に有用に使用できることを確認した。

【0027】

本発明に係る薬学組成物は、哺乳動物に投与された後に活性成分の迅速、持続または徐放を提供することができるように当業界で周知の方法を利用して薬学的剤形に製造できる。剤形の製造において、本発明に係る薬学組成物は、新規な乳酸菌の活性を阻害しない範囲内で薬剤学的に許容可能な担体をさらに含むことができる。

【0028】

前記薬剤学的に許容可能な担体は、通常用いられるもの、例えば、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、キシリトール、エリトリトール、マルチトール、デンプン、アカシアゴム、アルギネート、ゼラチン、リン酸カルシウム、ケイ酸カルシウム、セルロース、メチルセルロース、微晶質セルロース、ポリビニルピロリドン、水、メチルヒドロキシベンゾエート、プロピルヒドロキシベンゾエート、タルク、ステアリン酸マグネシウムおよび鉱油などを含むが、これらに制限されるものではない。また、本発明の薬学的組成物は、充填剤、増量剤、結合剤、湿潤剤、崩壊剤、界面活性剤などの希釈剤または賦形剤、その他の薬剤学的に許容可能な添加剤を含むことができる。

【0029】

本発明に係る薬学組成物の投与量は、薬剤学的に有効な量でなければならない。「薬学的に有効な量」は、医学的治療に適用可能な合理的な受惠/危険の比率で炎症疾患を予防または治療するのに十分な量を意味する。有効用量レベルは、製剤化方法、患者の状態および体重、患者の性別、年齢、疾患の程度、薬物の形態、投与経路および期間、排泄速度、反応感応性などのような要因に応じて当業者により多様に選択できる。有効量は、当業

10

20

30

40

50

者に認識されているように、処理の経路、賦形剤の使用および他の薬剤と共に使用できる可能性に応じて異なりうる。しかし、好ましい効果のために、経口投与剤の場合、一般に、成人に1日に体重1kgあたりに本発明の組成物を1日に0.0001~100mg/kgで、好ましくは0.001~100mg/kgで投与することができる。上記のように投与剤を投与する場合、本発明のラクトバチルス・プランタラムNK3、ビフィドバクテリウム・ロンガムNK49またはこれらの混合物を1日に 1×10^2 CFU/kg~ 1×10^{11} CFU/kgで投与することができる。投与は、1日に1回投与してもよく、数回に分けて投与してもよい。前記投与量は、いかなる面でも本発明の範囲を限定しようとするものではない。

【0030】

本発明の薬学組成物は、マウス、家畜、ヒトなどの哺乳動物に様々な経路を通して投与できる。具体的には、本発明の薬学組成物は、経口または非経口投与（例えば、塗布または静脈内、皮下、腹腔内注射）してもよいが、経口投与が好ましい。膣炎の予防および治療のためには膣内に投与することができる。経口投与のための固形製剤には、散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、軟質カプセル剤、丸剤などが含まれる。経口のための液状製剤には、懸濁剤、内用液剤、乳剤、シロップ剤、エアロゾルなどが該当するが、よく用いられる単純希釈剤である水、リキッドパラフィンの他に種々の賦形剤、例えば、湿潤剤、甘味剤、芳香剤、保存剤などが含まれる。非経口投与のための製剤としては、各々通常の方法により滅菌された水溶液、液剤、非水性溶剤、懸濁剤、エマルジョン、点眼剤、眼軟膏剤、シロップ、坐剤、エアロゾルなどの外用剤および滅菌注射製剤の形態に剤形化して用いることができ、好ましくは、クリーム、ゲル、パッチ、噴霧剤、軟膏剤、硬膏剤、ローション剤、リニメント剤、眼軟膏剤、点眼剤、ペースト剤またはカタプラズマ剤の薬剤学的組成物を製造して用いることができるが、これらに限定されるものではない。局所投与のための製剤は、臨床的処方に応じて無水型または水性型であってもよい。非水性溶剤、懸濁剤としては、プロピレングリコール(propylene glycol)、ポリエチレングリコール、オリーブオイルのような植物性オイル、エチルオレエートのような注射可能なエステルなどが使用できる。坐剤の基剤としてはウイテプゾール(witepsol)、マクロゴール、トゥイーン(tween)61、カカオ脂、ラウリン脂、グリセロゼラチンなどが使用できる。

【0031】

前記目的を達成するための他の一様態として、本発明は、ラクトバチルス・プランタラムNK3(Lactobacillus plantarum NK3)、ビフィドバクテリウム・ロンガムNK49(Bifidobacterium longum NK49)またはこれらの混合物を対象体に投与するステップを含む炎症疾患の予防または治療方法を提供する。

【0032】

本発明の「ラクトバチルス・プランタラムNK3(Lactobacillus plantarum NK3)」、「ビフィドバクテリウム・ロンガムNK49(Bifidobacterium longum NK49)」、「投与」および「炎症疾患」などの用語は、前記で説明した通りである。

【0033】

前記対象体は動物を言い、典型的には、本発明の新規な乳酸菌を用いた治療により有益な効果を奏することができる哺乳動物であってもよい。このような対象体の好ましい例には、ヒトのような霊長類が含まれる。また、このような対象体には、炎症疾患の症状を有するかまたはこのような症状を有する危険のある対象体は全て含まれる。

【0034】

他の一様態として、本発明は、ラクトバチルス・プランタラムNK3(Lactobacillus plantarum NK3) KCCM12089P、ビフィドバクテリウム・ロンガムNK49(Bifidobacterium longum NK49) KCCM12088Pまたはこれらの混合物を含む炎症疾患の予防または改善用の健

10

20

30

40

50

康機能食品を提供する。

【0035】

本発明の「ラクトバチルス・プランタラムNK3 (Lactobacillus plantarum NK3)」、「ビフィドバクテリウム・ロンガムNK49 (Bifidobacterium longum NK49)」、「投与」および「炎症疾患」などの用語は、前記で説明した通りである。

【0036】

前記健康機能食品は、食品の生体調節機能を強調した食品であり、物理的、生化学的、生物工学的な方法を利用して特定の目的に作用および発現するように付加価値を付与した食品である。このような健康機能食品の成分は、生体防御と身体リズムの調節、疾患の防
止および回復に関係する身体調節機能を生体に対して十分に発揮するように設計して加工し、食品として許容可能な食品補助添加剤、甘味料または機能性原料を含有することができる。

10

【0037】

本発明のラクトバチルス・プランタラムNK3またはビフィドバクテリウム・ロンガムNK49を健康機能食品（または健康機能飲料添加物）として用いる場合、前記新規な乳酸菌をそのまま添加するかまたは他の食品または食品成分と共に使用し、通常の方法に従って適切に使用できる。前記ラクトバチルス・プランタラムNK3またはビフィドバクテリウム・ロンガムNK49の混合量は、その使用目的（予防、健康または改善、治療的処
置）に応じて適宜に決定できる。

20

【0038】

前記健康機能食品は、種々の栄養剤、ビタミン、鉱物（電解質）、合成風味剤および天然風味剤などの風味剤、着色剤および増進剤（チーズ、チョコレートなど）、ペクチン酸およびその塩、有機酸、保護性コロイド増粘剤、pH調節剤、安定化剤、保存剤、グリセリン、アルコール、炭酸飲料に用いられる炭酸化剤などを含有することができる。また、本発明の健康機能食品は、果物および野菜飲料の製造のための果肉を含有することができる。このような成分は単独でまたは組み合わせて使用でき、このような添加剤の比率は組成物の全体重量当たり
に0.001～50重量部の範囲で選択されるのが一般的である。

【0039】

前記健康機能食品の種類に特に制限はない。前記ラクトバチルス・プランタラムNK3またはビフィドバクテリウム・ロンガムNK49を添加できる食品としては、ソーセージ、肉類、パン、チョコレート類、スナック類、キャンデー類、菓子類、ラーメン、ピザ、その他の麺類、ガム類、アイスクリーム類を含む酪農製品、各種スープ、飲料、お茶、ドリンク剤、アルコール飲料およびビタミン複合剤などが挙げられる。飲料に剤形化する場合、新規な乳酸菌の他に添加される液体成分としては、これらに限定されるものではないが、通常の飲料のように種々の香味剤または天然炭水化物などを追加成分として含有することができる。上述した天然炭水化物は、単糖類（例えば、ブドウ糖、果糖など）、二糖類（例えば、マルトース、スクロースなど）および多糖類（例えば、デキストリン、シクロデキストリンなどの通常の糖）、およびキシリトール、ソルビトール、エリトリトールなどの糖アルコールであつてもよい。

30

40

【0040】

他の一様態として、本発明は、炎症疾患の治療のための薬剤を製造するためのラクトバチルス・プランタラムNK3 (Lactobacillus plantarum NK3) KCCM12089P、ビフィドバクテリウム・ロンガムNK49 (Bifidobacterium longum NK49) KCCM12088Pまたはこれらの混合物の使用を提供する。

【0041】

他の一様態として、本発明は、炎症疾患の治療に用いるためのラクトバチルス・プランタラムNK3 (Lactobacillus plantarum NK3) KCCM12089P、ビフィドバクテリウム・ロンガムNK49 (Bifidobacteri

50

um longum NK49) KCCM12088Pまたはこれらの混合物を含む組成物を提供する。

【0042】

他の一様態として、本発明は、炎症疾患の治療のためのラクトバチルス・プランタラムNK3 (*Lactobacillus plantarum* NK3) KCCM12089P、ビフィドバクテリウム・ロンガムNK49 (*Bifidobacterium longum* NK49) KCCM12088Pまたはこれらの混合物の使用を提供する。

【0043】

以上、本明細書に記載された数値は、特に明示していない限り、均等範囲まで含むものと解釈しなければならない。

10

【0044】

以下では、本発明の理解を助けるために好ましい実施例を提示する。但し、下記の実施例は本発明をより容易に理解するために提供されるものに過ぎず、下記の実施例により本発明の内容が限定されるものではない。

【発明の効果】

【0045】

本発明に係る新規な乳酸菌であるラクトバチルス・プランタラムNK3、ビフィドバクテリウム・ロンガムNK49またはこれらの混合物は、炎症反応を抑制するという効果がある。したがって、本発明に係る新規な乳酸菌は、炎症疾患の予防または治療用の組成物として用いることができ、特に、大腸炎および膣炎の治療および予防に効果的である。

20

【図面の簡単な説明】

【0046】

【図1】新規な乳酸菌であるラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*) NK3およびビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) NK49のマクロファージに対するNF-kBの活性 (p-p65/p65) 抑制能を示すグラフである。

【図2】新規な乳酸菌であるラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*) NK3およびビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) NK49のマクロファージに対するTNF- α の発現量抑制能を示すグラフである。

30

【図3】新規な乳酸菌であるラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*) NK3およびビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) NK49のガードネレラ・バギナリス (*Gardnerella vaginalis*) に対する抗菌効果を示すグラフである。

【図4】新規な乳酸菌であるラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*) NK3およびビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) NK49のアトポビウム・バギナエ (*Atopobium vaginae*) に対する抗菌効果を示すグラフである。

【図5】新規な乳酸菌であるラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*) NK3およびビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) NK49のガードネレラ・バギナリス (*Gardnerella vaginalis*) に対する感染抑制能を示すグラフである。G: ガードネレラ・バギナリスのみを処理した群; GL5、GL6、GL7: ガードネレラ・バギナリスを処理し、ラクトバチルス・プランタラムを各々 1×10^6 CFU/mL、 1×10^7 CFU/mL、 1×10^8 CFU/mL 処理した群; GB5、GB6、GB7: ガードネレラ・バギナリスを処理し、ビフィドバクテリウム・ロンガムを各々 1×10^6 CFU/mL、 1×10^7 CFU/mL、 1×10^8 CFU/mL 処理した群。

40

【図6】新規な乳酸菌であるラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*) NK3、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidoba*

50

cterium longum) NK49およびこれらの混合物の膣と子宮の炎症抑制効果を確認した図である。N：正常群；GC：ガードネレラ・バギナリスのみを感染させた群；oGL、oGB、oGM：ガードネレラ・バギナリスを感染させた実験動物に各々ラクトバチルス・プランタラム、ビフィドバクテリウム・ロンガムまたはこれらの混合物を経口で投与した群；vGL、vGB、vGM：ガードネレラ・バギナリスを感染させた実験動物に各々ラクトバチルス・プランタラム、ビフィドバクテリウム・ロンガムまたはこれらの混合物を膣内に投与した群。以下同一。

【図7】新規な乳酸菌であるラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*) NK3、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) NK49およびこれらの混合物の感染したガードネレラ・バギナリス (*Gardnerella vaginalis*) に対する抑制能を示すグラフである。

10

【図8】新規な乳酸菌であるラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*) NK3、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) NK49およびこれらの混合物のミエロペルオキシダーゼ活性抑制能を示すグラフである。

【図9】新規な乳酸菌であるラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*) NK3、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) NK49およびこれらの混合物のTNF- α の発現抑制能を示すグラフである。

20

【図10】新規な乳酸菌であるラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*) NK3、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) NK49およびこれらの混合物のIL-10の発現増加能を示すグラフである。

【図11】新規な乳酸菌であるラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*) NK3、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) NK49およびこれらの混合物の膣内乳酸菌 (*Lactobacilli*) の回復効果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0047】

30

以下、本発明の理解を助けるために好ましい実施例を提示する。但し、下記の実施例は本発明をより容易に理解するために提供されるものに過ぎず、これらにより本発明の内容が限定されるものではない。

【0048】

実施例1：乳酸菌の分離および同定

【0049】

(1) ヒトの糞便から乳酸菌の分離

ヒトの糞便をGAM液体培地 (GAM broth; Nissui Pharmaceutical, Japan) に入れて懸濁した。その後、上澄みを取ってBL寒天培地 (BL agar medium; Nissui Pharmaceutical, Japan) に移植し、37℃で約48時間嫌氣的に培養した後、コロニー (colony) を形成した菌株を分離した。

40

【0050】

(2) キムチから乳酸菌の分離

白菜キムチ、大根キムチまたはネギギムチを各々破碎し、破碎上澄みを取ってMRS寒天培地 (MRS agar medium; Difco, USA) に移植し、37℃で約48時間嫌氣的に培養した後、コロニー (colony) を形成した菌株を分離した。

【0051】

(3) 分離した乳酸菌の同定

ヒトの糞便またはキムチから分離した菌株の生理学的特性および16S rDNA配列

50

を分析して菌株の種を確定し、菌株名を付与した。付与された乳酸菌の菌株名は下記表1の通りである。具体的には、キムチから分離した乳酸菌は、5種のラクトバチルス・プラントラム (*Lactobacillus plantarum*) (表1の管理番号1~5)、5種のラクトバチルス・ブレビス (*Lactobacillus brevis*) (表1の管理番号6~10)、5種のラクトバチルス・サケイ (*Lactobacillus sakei*) (表1の管理番号11~15)、および5種のラクトバチルス・カルバタス (*Lactobacillus curvatus*) (表1の管理番号16~20)であった。ヒトの糞便から分離した乳酸菌は、5種のラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) (表1の管理番号21~25)、5種のラクトバチルス・プラントラム (*Lactobacillus plantarum*) (表1の管理番号26~30)、5種のラクトバチルス・ロイテリ (*Lactobacillus reuteri*) (表1の管理番号31~35)、4種のラクトバチルス・ジョンソニー (*Lactobacillus johnsonii*) (表1の管理番号36~39)、3種のラクトバチルス・ムコサエ (*Lactobacillus mucosae*) (表1の管理番号40~42)、3種のビフィドバクテリウム・アドレセンティス (*Bifidobacterium adolescentis*) (表1の管理番号43~45)、および5種のビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) (表1の管理番号46~50)であった。

【表 1】

管理番号	菌株名	管理番号	菌株名
1	Lactobacillus plantarum NK1	26	Lactobacillus plantarum NK26
2	Lactobacillus plantarum NK2	27	Lactobacillus plantarum NK27
3	Lactobacillus plantarum NK3	28	Lactobacillus plantarum NK28
4	Lactobacillus plantarum NK4	29	Lactobacillus plantarum NK29
5	Lactobacillus plantarum NK5	30	Lactobacillus plantarum NK30
6	Lactobacillus brevis NK6	31	Lactobacillus reuteri NK31
7	Lactobacillus brevis NK7	32	Lactobacillus reuteri NK32
8	Lactobacillus brevis NK8	33	Lactobacillus reuteri NK33
9	Lactobacillus brevis NK9	34	Lactobacillus reuteri NK34
10	Lactobacillus brevis NK10	35	Lactobacillus reuteri NK35
11	Lactobacillus sakei NK11	36	Lactobacillus johnsonii NK36
12	Lactobacillus sakei NK12	37	Lactobacillus johnsonii NK37
13	Lactobacillus sakei NK13	38	Lactobacillus johnsonii NK38
14	Lactobacillus sakei NK14	39	Lactobacillus johnsonii NK39
15	Lactobacillus sakei NK15	40	Lactobacillus mucosae NK40
16	Lactobacillus curvatus NK16	41	Lactobacillus mucosae NK41
17	Lactobacillus curvatus NK17	42	Lactobacillus mucosae NK42
18	Lactobacillus curvatus NK18	43	Bifidobacterium adolescentis NK43
19	Lactobacillus curvatus NK19	44	Bifidobacterium adolescentis NK44
20	Lactobacillus curvatus NK20	45	Bifidobacterium adolescentis NK45
21	Lactobacillus rhamnosus NK21	46	Bifidobacterium longum NK46
22	Lactobacillus rhamnosus NK22	47	Bifidobacterium longum NK47
23	Lactobacillus rhamnosus NK23	48	Bifidobacterium longum NK48
24	Lactobacillus rhamnosus NK24	49	Bifidobacterium longum NK49
25	Lactobacillus rhamnosus NK25	50	Bifidobacterium longum NK50

10

20

30

【 0 0 5 2 】

(4) 新規な乳酸菌ラクトバチルス・プランタラム (Lactobacillus plantarum) NK3 の生理学的特性

前記表 1 に記載された菌株のうちラクトバチルス・プランタラム (Lactobacillus plantarum) NK3 (受託番号 KCCM12089P) は、グラム陽性桿菌であることが確認された。また、ラクトバチルス・プランタラム (Lactobacillus plantarum) NK3 の 16S rDNA は、配列番号 1 の塩基配列を有することが明らかになった。ラクトバチルス・プランタラム (Lactobacillus plantarum) NK3 の 16S rDNA 塩基配列を BLAST 検索と比較した結果、同一な 16S rDNA 塩基配列を有するラクトバチルス・プランタラム (Lactobacillus plantarum) 菌株は検索されず、公知のラクトバチルス・プランタラム (Lactobacillus plantarum) 菌株の 16S rDNA 配列と 99% の相同性を示すことを確認した。

40

【 0 0 5 3 】

ラクトバチルス・プランタラム (Lactobacillus plantarum) NK3 の生理学的特性中の炭素源利用性を API 50 CHL キットを用いて糖発酵試験で分析した。その結果は下記表 2 の通りである。下記表 2 において、「+」は炭素源利

50

用性が陽性の場合を示し、「-」は炭素源利用性が陰性の場合を示す。

【表 2】

炭素源	NK3	炭素源	NK3
対照群	-	エスクリン	+
グリセロール	-	サリシン	+
エリトリトール	-	セロビオース	+
D-アラビノース	-	マルトース	+
L-アラビノース	+	ラクトース	+
D-リボース	+	メリビオース	+
D-キシロース	-	スクロース	+
L-キシロース	-	トレハロース	+
D-アドニトール	-	イヌリン	-
メチル-D-キシロピラノシド	-	メレジトース	+
D-ガラクトース	+	ラフィノース	-
D-グルコース	+	デンプン (S t a r c h)	-
D-フルクトース	+	グリコーゲン	-
D-マンノース	+	キシリトール	-
L-ソルボース	-	ゲンチオビオース	+
ラムノース	-	D-ツラノース	+
ズルシトール	-	D-リキソース	-
イノシトール	-	D-タガトース	-
マンニトール	+	D-フコース	-
ソルビトール	+	L-フコース	-
α -メチル-D-マンノシド	±	D-アラビトール	-
α -メチル-D-グルコシド	-	L-アラビトール	-
N-アセチル-グルコサミン	+	グルコネート	±
アミグダリン	+	2-ケト-グルコネート	-
アルブチン	+	5-ケト-グルコネート	-

【 0 0 5 4 】

(5) 新規な乳酸菌 *Bifidobacterium longum* NK 4 9 の生理学的特性

前記表 1 に記載された菌株のうち *Bifidobacterium longum* NK 4 9 (受託番号 K C C M 1 2 0 8 8 P) は、グラム陽性桿菌であることが確認された。また、*Bifidobacterium longum* NK 4 9 の 1 6 S r D N A は、配列番号 2 の塩基配列を有することが明らかになった。*Bifidobacterium longum* NK 4 9 の 1 6 S r D N A 塩基配列を B L A S T 検索と比較した結果、同一な 1 6 S r D N A 塩基配列を有する *Bifidobacterium longum* 菌株は検索されず、公知の *Bifidobacterium longum* 菌株の 1 6 S r D N A 配列と 9 9 % の相同性を示すことを確認した。

【 0 0 5 5 】

Bifidobacterium longum NK 4 9 の生理学的特性中の炭素源利用性を A P I 5 0 C H L キットを用いて糖発酵

試験で分析した。その結果は下記表3の通りである。下記表3において、「+」は炭素源利用性が陽性的の場合を示し、「-」は炭素源利用性が陰性的の場合を示す。

【表3】

炭素源	NK 49	炭素源	NK 49
対照群	-	エスクリン	+
グリセロール	-	サリシン	+
エリトリトール	-	セロビオース	-
D-アラビノース	-	マルトース	+
L-アラビノース	+	ラクトース	+
D-リボース	+	メリビオース	+
D-キシロース	±	スクロース	+
L-キシロース	-	トレハロース	-
D-アドニトール	-	イヌリン	-
メチル-BD-キシロピラノシト	-	メレジトース	-
D-ガラクトース	+	ラフィノース	+
D-グルコース	+	デンプン (Starch)	-
D-フルクトース	+	グリコーゲン	-
D-マンノース	-	キシリトール	-
L-ソルボース	-	ゲンチオビオース	-
ラムノース	-	D-ツラノース	±
ズルシトール	-	D-リキソース	-
イノシトール	-	D-タガトース	-
マンニトール	+	D-フコース	-
ソルビトール	+	L-フコース	-
α-メチル-D-マンノシド	-	D-アラビトール	-
α-メチル-D-グルコシド	±	L-アラビトール	-
N-アセチル-グルコサミン	-	グルコネート	-
アミグダリン	-	2-ケト-グルコネート	-
アルブチン	-	5-ケト-グルコネート	-

【0056】

実施例2：分離した乳酸菌の活性比較

【0057】

(1) 抗酸化活性 (in vitro)

DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) を 0.2 mM 濃度になるようにエタノールに溶かして DPPH 溶液を製造した。前記 DPPH 溶液 0.1 mL に乳酸菌の懸濁液 (1×10^6 CFU/mL) またはビタミンC 溶液 (1 g/mL) を入れて 20 分間 37 で培養した。培養液を 3000 rpm で 5 分間遠心分離して上澄みを得た。その後、517 nm で上澄みの吸光度を測定して、分離した乳酸菌の抗酸化活性を計算した。各乳酸菌別の抗酸化活性は下記表4の通りである。

【0058】

(2) マクロファージでの炎症指標の測定

C57BL/6 マウス (male、6 週齢、20 ~ 23 g) の腹腔に滅菌された 4% チオグリコレート (thioglycolate) 2 mL を投与した。96 時間の経過後にマウスを麻酔し、マウスの腹腔に RPMI 1640 培地 8 mL を投与した。5 ~ 10 分後にマウスの腹腔内の RPMI 培地 (マクロファージ) を抜き取り、1000 g で 10 分

10

20

30

40

50

間遠心分離し、さらにRPMI 1640培地で2回洗浄した。前記マクロファージを各ウェル当たり 0.5×10^6 の数で24-ウェルプレートに敷き、分離した乳酸菌（最終処理濃度： 1×10^4 CFU/mL、以下同一）と炎症反応誘導物質であるリポポリサッカライド（lipopolysaccharide、LPS）を2時間または24時間処理した後に上澄みおよび細胞を得た。得られた細胞をRIPAバッファ（Gibco社）に入れて均質化した。24時間処理した培養上澄みにおいてTNF- α 、IL-10などのサイトカイン発現量を、2時間処理して得られた細胞からp65（NF- κ B）、p-p65（phosphor-NF- κ B）および β -actinの発現量を免疫ブロット法（immunoblotting）により測定した。各乳酸菌別の炎症指標の発現レベルは下記表4の通りである。

10

【0059】

（表4の活性測定時の基準：+++、>90%、非常に強い；++、>60-90%、強い；+、>20-60%、弱い；-、<20%、効果が微小、表5も同一）

【表4】

管理番号	菌株名	抗酸化活性	TNF- α 抑制能	IL-10 発現増加	NF-kB抑制能
1	Lactobacillus plantarum NK1	+	+	+	+
2	Lactobacillus plantarum NK2	+	++	+	+
3	Lactobacillus plantarum NK3	+++	+++	+++	+++
4	Lactobacillus plantarum NK4	+	+	+	++
5	Lactobacillus plantarum NK5	++	++	++	++
6	Lactobacillus brevis NK6	+	+	+	+
7	Lactobacillus brevis NK7	+	+	+	+
8	Lactobacillus brevis NK8	+	+	+	+
9	Lactobacillus brevis NK9	+	+	+	+
10	Lactobacillus brevis NK10	-	+	+	+
11	Lactobacillus sakei NK11	+	+	+	+
12	Lactobacillus sakei NK12	-	++	+	+
13	Lactobacillus sakei NK13	-	++	++	+
14	Lactobacillus sakei NK14	-	+	+	+
15	Lactobacillus sakei NK15	+	+	+	+
16	Lactobacillus curvatus NK16	+	+	+	+
17	Lactobacillus curvatus NK17	+	+	+	+
18	Lactobacillus curvatus NK18	+	+	+	+
19	Lactobacillus curvatus NK19	+	+	+	+
20	Lactobacillus curvatus NK20	+	+	+	+
21	Lactobacillus rhamnosus NK21	+	+	+	+
22	Lactobacillus rhamnosus NK22	+	+	+	+
23	Lactobacillus rhamnosus NK23	+	+	+	+
24	Lactobacillus rhamnosus NK24	++	+	+	+
25	Lactobacillus rhamnosus NK25	++	++	++	++
26	Lactobacillus plantarum NK26	+	+	+	+
27	Lactobacillus plantarum NK27	+	+	+	+
28	Lactobacillus plantarum NK28	+	+	+	+
29	Lactobacillus plantarum NK29	+	+	+	+
30	Lactobacillus plantarum NK30	+	+	+	+
31	Lactobacillus reuteri NK31	+	+	+	+
32	Lactobacillus reuteri NK32	++	++	++	++
33	Lactobacillus reuteri NK33	+++	++	++	++
34	Lactobacillus reuteri NK34	+	+	+	+
35	Lactobacillus reuteri NK35	+	+	+	+
36	Lactobacillus johnsonii NK36	++	++	++	+

10

20

30

40

37	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NK37	++	++	++	++
38	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NK38	+	+	+	+
39	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NK39	+	+	+	+
40	<i>Lactobacillus mucosae</i> NK40	++	++	++	++
41	<i>Lactobacillus mucosae</i> NK41	++	++	+++	+++
42	<i>Lactobacillus mucosae</i> NK42	+	+	+	+
43	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> NK43	+	+	+	+
44	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> NK44	++	++	++	++
45	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> NK45	+	+	+	+
46	<i>Bifidobacterium longum</i> NK46	+++	++	+++	+++
47	<i>Bifidobacterium longum</i> NK47	++	++	++	++
48	<i>Bifidobacterium longum</i> NK48	+	+	+	+
49	<i>Bifidobacterium longum</i> NK49	+++	+++	+++	+++
50	<i>Bifidobacterium longum</i> NK50	+	+	+	+

10

【 0 0 6 0 】

(3) C a c o 2 細胞の Z O - 1 タンパク質の発現効果

大腸癌細胞である C a c o 2 細胞を韓国細胞株バンクから分譲して R P M I 1 6 4 0 培地で 4 8 時間培養した後、C a c o 2 細胞をウェルあたりに 2×10^6 の量になるように 1 2 - ウェルプレートに分株した。各ウェルに L P S 1 μ g を単独で処理するか、または L P S 1 μ g と乳酸菌 1×10^4 C F U を共に処理した後、2 4 時間培養した。その後、各ウェルから培養された細胞を集め、免疫ブロット法 (i m m u n o b l o t t i n g) により密着結合タンパク質 (t i g h t j u n c t i o n p r o t e i n) である Z O - 1 の発現量を測定した。各乳酸菌別の Z O - 1 の発現量は下記表 5 の通りである。

20

【表 5】

管理番号	菌株名	ZO-1 発現増加
1	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK1	+
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK2	+
3	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK3	++
4	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK4	+
5	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK5	++
6	<i>Lactobacillus brevis</i> NK6	+
7	<i>Lactobacillus brevis</i> NK7	+
8	<i>Lactobacillus brevis</i> NK8	+
9	<i>Lactobacillus brevis</i> NK9	+
10	<i>Lactobacillus brevis</i> NK10	-
11	<i>Lactobacillus sakei</i> NK11	+
12	<i>Lactobacillus sakei</i> NK12	-
13	<i>Lactobacillus sakei</i> NK13	+
14	<i>Lactobacillus sakei</i> NK14	+
15	<i>Lactobacillus sakei</i> NK15	+
16	<i>Lactobacillus curvatus</i> NK16	+
17	<i>Lactobacillus curvatus</i> NK17	+
18	<i>Lactobacillus curvatus</i> NK18	+
19	<i>Lactobacillus curvatus</i> NK19	+
20	<i>Lactobacillus curvatus</i> NK20	+
21	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NK21	+
22	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NK22	+
23	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NK23	+
24	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NK24	++
25	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NK25	+
26	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK26	+
27	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK27	+
28	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK28	+
29	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK29	+
30	<i>Lactobacillus plantarum</i> NK30	+
31	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK31	+
32	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK32	++
33	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK33	++
34	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK34	+
35	<i>Lactobacillus reuteri</i> NK35	+
36	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NK36	+
37	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NK37	++

10

20

30

40

38	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NK38	+
39	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NK39	+
40	<i>Lactobacillus mucosae</i> NK40	++
41	<i>Lactobacillus mucosae</i> NK41	++
42	<i>Lactobacillus mucosae</i> NK42	+
43	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> NK43	+
44	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> NK44	++
45	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> NK45	+
46	<i>Bifidobacterium longum</i> NK46	++
47	<i>Bifidobacterium longum</i> NK47	+
48	<i>Bifidobacterium longum</i> NK48	+
49	<i>Bifidobacterium longum</i> NK49	+
50	<i>Bifidobacterium longum</i> NK50	+

10

【 0 0 6 1 】

(5) 実験結果

分離した乳酸菌の活性を評価した結果、分離した乳酸菌のうち新規な乳酸菌であるラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*) NK3 およびビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) NK49 が密着結合タンパク質であるZO-1の発現量を増加させつつ、抗酸化活性および炎症反応の抑制効果に優れることを確認した(表4および表5)。

20

【 0 0 6 2 】

実施例3：マクロファージに対する炎症反応抑制能の測定

【 0 0 6 3 】

前記実施例2において抗酸化活性および炎症反応の抑制効果に優れる新規な乳酸菌であるラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*) NK3 およびビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) NK49 に対し、投与濃度に応じた炎症反応の抑制効果を確認した。

30

【 0 0 6 4 】

具体的には、C57BL/6マウス(雄、20~23g)の腹腔に滅菌された4%チオグリコレート(*thioglycolate*) 2mLを投与した。96時間の経過後にマウスを麻酔し、マウスの腹腔にRPMI 1640培地8mLを投与した。5~10分後にマウス腹腔内のRPMI培地(マクロファージ)を抜き取り、1000gで10分間遠心分離し、さらにRPMI 1640培地で2回洗浄した。24-ウェルプレートにおいて5時間培養して付着した細胞をマクロファージとして用いた。前記マクロファージを各ウェル当たり 0.5×10^6 の数で敷き、 10^3 、 10^4 および 10^5 CFU/mLの新規な乳酸菌であるラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*) NK3 およびビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) NK49 と炎症反応誘導物質であるリポポリサッカライド(*lipopolysaccharide*、LPS)を90分間または24時間処理した後に上澄みおよび細胞を得た。得られた細胞をRIPAバッファ(Gibco社)に入れて均質化した。90分間処理して得られた細胞からp65(NF-kB)、p-p65(phosphor-NF-kB)および-actinの発現量を免疫ブロット法(*immunoblotting*)により測定した。24時間処理した後に得られた培養上澄みでは、TNF- α のサイトカインの発現量をELISA kit(Ebioscience、San Diego、CA、USA)を用いて測定した。

40

その結果、ラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*) NK3 またはビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacteri*

50

um longum) NK49を処理した全ての群において、NF-kBの活性が抑制され、TNF- α の発現量が抑制されることを確認した(図1および図2)。

【0065】

実施例4：膣炎原因菌に対する抗菌力

【0066】

(1) 乳酸菌の抗菌試験

GAM培地に、分離した新規な乳酸菌であるラクトバチルス・プランタラム(Lactobacillus plantarum) NK3およびビフィドバクテリウム・ロンガム(Bifidobacterium longum) NK49 (1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 CFU/mL)と共にガードネレラ・バギナリス(Gardnerella vaginalis) またはアトポビウム・バギナエ(Atopobium vaginae) (1×10^6 CFU/mL)を移植した。37℃、嫌氣的条件でBHI brothに酵母抽出物(yeast extract) (1%)、マルトース(maltose) (0.1%)、グルコース(glucose) (0.1%)および馬血清(horse serum) (10%)を添加したBHIS培地において24時間培養して抗菌力を測定した。

10

【0067】

その結果、ラクトバチルス・プランタラム(Lactobacillus plantarum) NK3およびビフィドバクテリウム・ロンガム(Bifidobacterium longum) NK49のいずれもガードネレラ・バギナリス(Gardnerella vaginalis) およびアトポビウム・バギナエ(Atopobium vaginae) に対して95%以上の成長抑制効果を示すことを確認した(図3および図4)。

20

【0068】

(2) 乳酸菌の感染抑制能

【0069】

ヒト子宮頸癌細胞株であるHeLa細胞を37℃、5% CO₂および95%空気条件でRPMI 1640培地(10%熱不活性化ウシ胎児血清(heat-inactivated fetal calf serum)含有)において培養しつつ、分離した乳酸菌であるラクトバチルス・プランタラム(Lactobacillus plantarum) NK3およびビフィドバクテリウム・ロンガム(Bifidobacterium longum) NK49 (1×10^4 、 1×10^6 CFU/mL)のみ、または前記乳酸菌(1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 CFU/mL)と共にガードネレラ・バギナリス(Gardnerella vaginalis) (1×10^5 CFU/mL)を移植して24時間後に、HeLa細胞に付着した細菌数をqPCRにより測定した。

30

【0070】

その結果、ラクトバチルス・プランタラム(Lactobacillus plantarum) NK3またはビフィドバクテリウム・ロンガム(Bifidobacterium longum) NK49を共に移植したHeLa細胞においては、付着したガードネレラ・バギナリス(Gardnerella vaginalis)数が顕著に減少することを確認した(図5)。

40

【0071】

上記の実験結果から、新規な乳酸菌は、膣炎誘発細菌の成長抑制効果を示すだけでなく、細菌の感染を抑制させる効果も奏することが分かった。

【0072】

実施例5：動物モデルでの乳酸菌の膣炎治療効果

【0073】

(1) 膣炎動物モデルの作製および乳酸菌の投与

C57BL/6マウス(雌、19~22g、6週齢)を1群当たり6匹ずつ用いて実験を行った。前記マウスに17 β -estradiol 17-benzoate (Sigm

50

a社、MO、米国) 0.125 mgをオリーブオイルに溶かして皮下注射した。3日後、ガードネレラ・バギナリス (*Gardnerella vaginalis*) (1×10^8 CFU/mouse)をマウスの膣内に移植した。移植して8日目から14日間、毎日1回ずつ 1×10^9 CFU/mouseの分離した新規な乳酸菌であるラクトバチルス・プラントラム (*Lactobacillus plantarum*) NK3、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) NK49またはこれらの1:1の混合物を経口または膣内に直接投与した。乳酸菌を投与して7日目(移植して14日目)に最後に投与し、24時間後に動物モデルを犠牲死させて実験を行った。

【0074】

10

(2) 膣内炎症の発生有無の確認

上記のようにガードネレラ・バギナリス (*Gardnerella vaginalis*)をマウスの膣に移植した結果、膣と子宮に浮腫を伴った炎症が発生した。しかし、新規な乳酸菌であるラクトバチルス・プラントラム (*Lactobacillus plantarum*) NK3、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) NK49またはこれらの混合物を経口または膣内に投与した結果、膣と子宮の外観上の炎症が有意に減少することを確認した(図6)。

【0075】

(3) 乳酸菌およびガードネレラ・バギナリス菌株の定量

新規な乳酸菌を上記のように投与してから24時間および48時間に、滅菌された生理食塩水0.5 mlで膣内を洗い出した。洗い出した膣洗浄液をQiagen DNA purification kitを用いて分離した後、PCRにより乳酸菌およびガードネレラ・バギナリス (*Gardnerella vaginalis*) 菌株を定量した。

20

【0076】

その結果、ラクトバチルス・プラントラム (*Lactobacillus plantarum*) NK3、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) NK49またはこれらの混合物を経口または膣内に投与した群においては、感染したガードネレラ・バギナリスの菌数が99%以上減少することを確認した(図7)。

【0077】

30

(4) ミエロペルオキシダーゼ活性の測定

50 mMリン酸緩衝液 (phosphate buffer、pH6.0) 1 mlに上記のように洗い出した膣洗浄液を加えて超音波処理した。溶かして凍らせる過程を3回実施した後に遠心分離した。上層液100 μ LにO-ジアニシジン (o-dianisidine、0.129 mg/mL) 398 μ Lを加えた。H₂O₂の最終濃度を0.0005%に合わせた後、25 および492 nm条件で経時的 (time course) にミエロペルオキシダーゼ (myeloperoxidase、MPO) の活性を測定した。

【0078】

その結果、ガードネレラ・バギナリス (*Gardnerella vaginalis*) で感染させた群の場合は、膣の代表的な炎症指標であるミエロペルオキシダーゼの活性が有意に増加した。しかし、ラクトバチルス・プラントラム (*Lactobacillus plantarum*) NK3、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) NK49またはこれらの混合物を経口または膣内に投与した群においては、ミエロペルオキシダーゼの活性が顕著に減少することを確認した(図8)。

40

【0079】

(5) 膣粘膜における転写因子およびサイトカインの分析

前記犠牲死させた動物モデルの大腸または膣粘膜組織に lysis buffer (20 mM HEPES、1.5 mM MgCl₂、0.4 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mM dithiothreitol、0.5 mM phenyl methyl

50

sulfonyl fluoride、20 µg/mLトリプシン阻害剤、1% nonidet p-40、20%グリセロール)を入れて均質化(homogenize)した。Bradford assayによりタンパク質を定量して、タンパク質50 µg/µLが含まれるように検体を製造した。前記検体に電気泳動サンプルバッファ(Laemmli sample buffer 950 µL + Me 50 µL)10 µg/µLを加えた後、100 で3分間変性(denaturation)させ、電気泳動(150 V、30 mA)を行った。電気泳動したゲルを30 Vにおいて2時間メンブレンにトランスファー(transfer)した。前記メンブレンを5% skim milk/PBS-T(0.05% tween 20/PBS)に15 mL入れ、1時間揺すった。1次抗体10 µg/µLに1% skim milk/PBS-T 10 mLを入れて12時間反応させた後、PBS-T溶液で5分間3回洗浄した。そして、各サイトカインおよび転写因子に対する2次抗体10 µg/µLに1% skim milk/PBS-T 20 mLを入れて1時間揺すって反応させた。PBS-T溶液で5分間3回洗浄した後、最後にECL溶液で発光させた。

10

【0080】

その結果、ガードネレラ・バギナリス(*Gardnerella vaginalis*)で感染させた群の場合は、膣組織における、TNF- の発現が増加し、IL-10の発現が減少した。しかし、ラクトバチルス・プランタラム(*Lactobacillus plantarum*)NK3、ビフィドバクテリウム・ロンガム(*Bifidobacterium longum*)NK49またはこれらの混合物を経口または膣内に投与した群においては、TNF- の発現が抑制され、IL-10の発現が増加することを確認した(図9および図10)。

20

【0081】

(6) 膣内乳酸菌の増加

マウスの膣を滅菌された生理食塩水0.5 mLで膣内を2回洗い出した。洗い出した膣洗浄液を集めて遠心分離(10,000 g、10分間)し、沈殿物をbacterial genomic DNA extraction kit(QIAGEN DNeasy Feces kit; Qiagen, Hilden, Germany)を用いてDNAを抽出した。抽出されたDNA 10 ngをQiagen thermal cyclerにおいて下記のプライマーを入れ、SYBER premixを入れて、DNA polymerase activation(95、30秒間)、denaturation(95、5秒間)およびamplification(63、30秒間)を38回繰り返してPCRを行った。

30

【0082】

乳酸菌(*Lactobacilli*) forward(5'-3') CTC AA
A ACT AAA CAA AGT TTC(配列番号3);

乳酸菌(*Lactobacilli*) reverse(5'-3') CTT GT
A CAC ACC GCC CGT(配列番号4);

Control 16S rDNA forward(5'-3') AGA GTT
TGA TCC TGG CTC AG(配列番号5);および

Control 16S rDNA reverse(5'-3') AAG GAG
GTG WTC CAR CC(配列番号6)。

40

【0083】

その結果、ガードネレラ・バギナリスにより感染した場合、乳酸菌(*Lactobacilli*)が顕著に減少する反面、ラクトバチルス・プランタラム(*Lactobacillus plantarum*)NK3、ビフィドバクテリウム・ロンガム(*Bifidobacterium longum*)NK49またはこれらの混合物を経口または膣内に投与時、前記乳酸菌が増加することを確認した(図11)。これは、ガードネレラ・バギナリスにより膣炎が誘導されて減少した乳酸菌が、前記乳酸菌の投与により回復して、膣内酸性条件を回復したことを意味する。

50

【0084】

前記実験結果から、新規な乳酸菌は、膣炎の予防および治療に効果があることを確認した。

【0085】

実施例5：動物モデルでの乳酸菌の大腸炎の治療効果

【0086】

(1) 大腸炎動物モデルの作製および乳酸菌の投与

【0087】

C57BL/6マウス(雄、21~23g、6週齢)を1群当たり6匹ずつ用いて1週間実験室に適応させた後に実験を行った。1群を正常群にし、残りの群のマウスは2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸(2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid、TNBS)で大腸炎を誘発した。具体的には、実験動物をエーテルで麻酔した後、50%エタノールに混合したTNBS溶液を先の丸い1mL容量の注射器を用いて肛門を通して大腸内に0.1mLずつ投与し、垂直に持ち上げて30秒間保持して炎症を誘発した。一方、正常群には生理食塩水0.1mLを経口投与した。投与して翌日から、毎日1回ずつ3日間新規な乳酸菌であるラクトパチルス・プランタラム(Lactobacillus plantarum)NK3、ビフィドバクテリウム・ロンガム(Bifidobacterium longum)NK49またはこれらの1:1の混合物を生理食塩水に懸濁して 1×10^9 CFUの量で経口投与した。乳酸菌の投与が終了した翌日に実験動物を犠牲死させた後、大腸部位のうち盲腸から肛門の直前部位までの大腸を摘出して長さを測定した。その後、これより、下記の各種指標を確認した。一方、正常群の実験動物には、新規な乳酸菌の代わりに、乳酸菌懸濁液である1%デキストロース溶液を経口投与した。また、陽性対照群の実験動物には、新規な乳酸菌の代わりに、大腸炎治療薬物であるスルファサラジン(sulfasalazine)を50mg/kgの量で経口投与した。

【0088】

(2) ミエロペルオキシダーゼ活性の測定

大腸組織100mgに0.5%ヘキサデシルトリメチルアンモニウム臭化物(hexadecyl trimethyl ammonium bromide)含有10mMリン酸カルシウム緩衝液(potassium phosphate buffer、pH 7.0)200 μ Lを入れ、均質化(homogenization)した。4および10,000gの条件で10分間遠心分離して上澄みを得た。上澄み50 μ Lを0.95mLの反応液(1.6mMテトラメチルベンジジン(tetramethyl benzidine)と0.1mM H₂O₂含有)に入れ、37℃で反応させつつ、650nmで経時的に吸光度を測定した。前記ミエロペルオキシダーゼ活性は、反応物として生じたH₂O₂ 1 μ mol/mLを1ユニットに計算した。

【0089】

(3) 炎症指標の測定

ウェスタンブロット法を利用して、p-p65、p65、COX-2および β -actinのような炎症反応指標物質を測定した。具体的には、前記ミエロペルオキシダーゼ(Myeloperoxidase、MPO)活性測定実験と同様の方法により得られた上澄み50 μ gを取り、免疫ブロット法を行った。また、サイトカイン(IL-17、TNF- α)の発現量は、ELISA kitを用いて測定した。

【0090】

(4) 実験結果

前記で行った実験結果は下記表6の通りである。

10

20

30

40

【表 6】

実験群	体重変化 g	大腸長さ cm	MPO 活性 μ U/mg	TNF- α pg/mg	IL-17 pg/mg	NF-kB 活性 p-p65/p65	COX-2 活性
正常群	0.9	6.5	0.21	35	17	0.12	0.23
誘導群	-1.9	4.4	1.86	265	89	0.32	0.52
LP NK3	-0.9	5.2	1.12	89	45	0.23	0.35
BL NK49	-0.7	5.4	0.87	95	38	0.22	0.36
混合物	-0.7	5.5	0.82	88	35	0.19	0.29
陽性対照群	-1.0	5.1	1.26	105	47	0.25	0.42

10

【0091】

具体的には、ラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*) NK3、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) NK49 またはこれらの混合物を投与した群での体重変化が大きくなり毒性がないことを確認した。また、大腸炎の誘導時に大腸の長さが短くなったが、乳酸菌を投与した群においては、大腸長さの回復効果を奏することを確認した。さらに、乳酸菌を投与した群においては、大腸炎の誘導により増加したミエロペルオキシダーゼ活性が減少し、TNF- α および IL-17 のサイトカインの発現量が抑制され、NF-kB の活性および COX-2 の活性が抑制されることを確認した。

20

それにより、新規な乳酸菌は、毒性を示さず、且つ、大腸炎の予防および治療に効果があることを確認した。

【0092】

< 乳酸菌の受託情報 >

本発明の発明者らは、ラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*) NK3 を 2017 年 8 月 4 日に公認寄託機関である韓国微生物保存センター (アドレス: 大韓民国、ソウル西大門区弘済内 2 街ギル 45 ユリムビル) に特許寄託して KCCM12089P の受託番号を与えられた。

また、本発明の発明者らは、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) NK49 を 2017 年 8 月 4 日に公認寄託機関である韓国微生物保存センター (アドレス: 大韓民国、ソウル西大門区弘済内 2 街ギル 45 ユリムビル) に特許寄託して KCCM12088P の受託番号を与えられた。

30

【表7】

訳文

特許出願のためのブダペスト国際条約下の微生物受託証明

国際様式

受信: キムドンヒョン
 大韓民国、ソウル
 東大門区
 キョンフィデロ26
 (郵便番号 02447)

国際寄託機関によって
 規則7.1に基づいて発行された
 原寄託の受託証

10

I. 微生物の表示	
寄託者が付与した特定表示： <i>Bifidobacterium longum</i> NK49	国際寄託機関が付与した受託番号： KCCM12088P
II. 科学的性質および/または分類学上の位置	
Iで特定された微生物は <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input type="checkbox"/> 分類学上の位置で記載した (適用される部分に表示する)	
III. 受託	
本国際寄託機関は、Iで特定される微生物を2017年8月4日に受託した(最初の寄託日) ¹ 。	
IV. 国際寄託機関	
名称: 韓国微生物保存センター アドレス: 大韓民国、ソウル 西大門区弘済内2街ギル45 コリムビル (郵便番号 120-861)	国際寄託機関を代表する権限を 有する者の署名： 署名日: 2017. 8. 4.

20

30

¹ ルール 6.4 (d) が適用される場合、上記の日付は国際寄託機関の資格が取得された日付である。

【表 8】

訳文

特許出願のためのブダペスト国際条約下の微生物受託証明

国際様式

受信: キムドンヒョン 大韓民国、ソウル 東大門区 キョンフィデロ 2 6 (郵便番号 02447)	国際寄託機関によって 規則7.1に基づいて発行された 原寄託の受託証
--	--

10

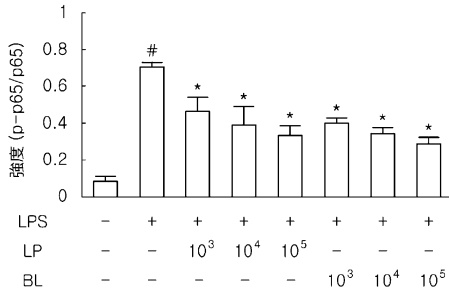
I. 微生物の表示	
寄託者が付与した特定表示: <i>Lactobacillus plantarum</i> NK3	国際寄託機関が付与した受託番号: KCCM12089P
II. 科学的性質および/または分類学上の位置	
Iで特定された微生物は <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input type="checkbox"/> 分類学上の位置に記載した (適用される部分に表示する)	
III. 受託	
本国際寄託機関は、Iで特定される微生物を2017年8月4日に受託した(最初の寄託日) ¹ 。	
IV. 国際寄託機関	
名称: 韓国微生物保存センター アドレス: 大韓民国、ソウル 西大門区弘済内 2 街ギル 4 5 ユリムビル (郵便番号 120-861)	国際寄託機関を代表する権限を 有する者の署名: 署名日: 2017. 8. 4.

20

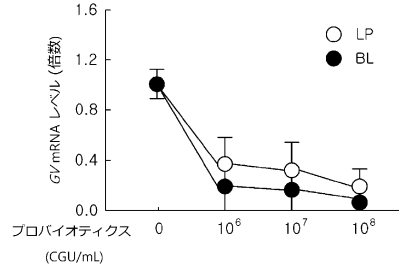
¹ ルール 6.4 (d) が適用される場合、上記の日付は国際寄託機関の資格が取得された日付である。

30

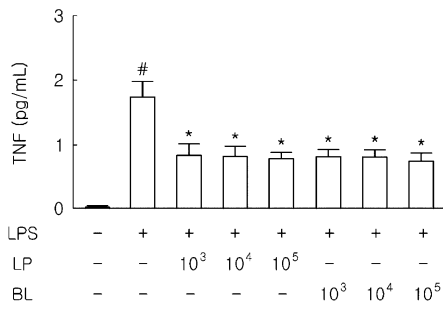
【図1】



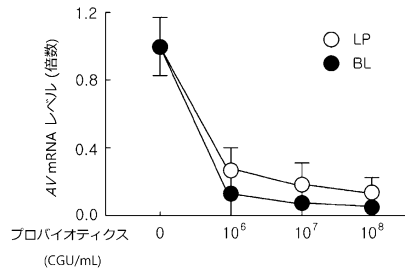
【図3】



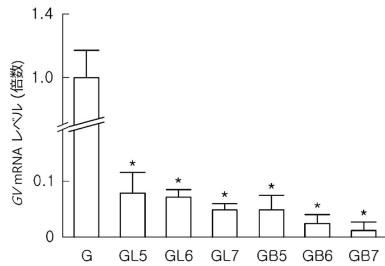
【図2】



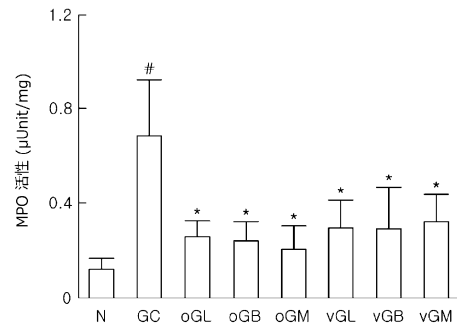
【図4】



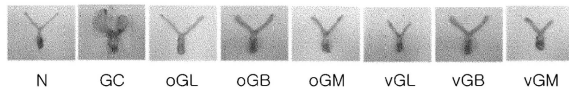
【図5】



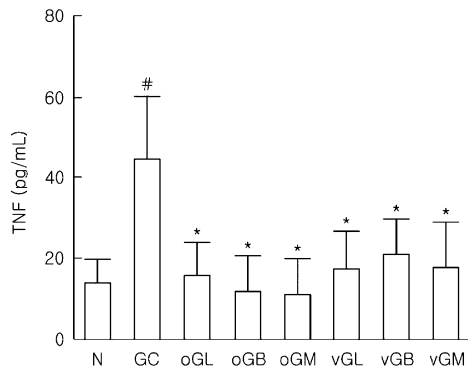
【図8】



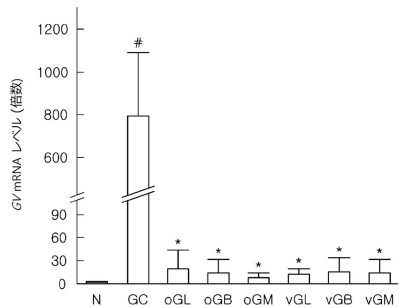
【図6】



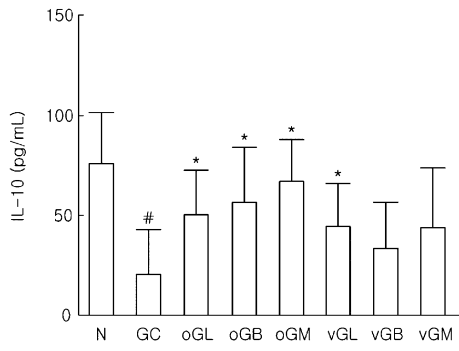
【図9】



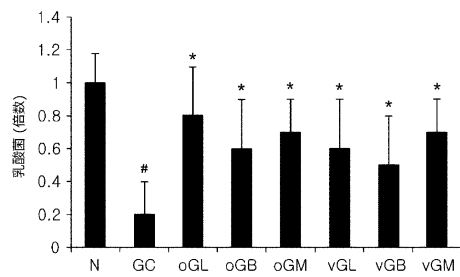
【図7】



【 図 1 0 】



【 図 1 1 】



【 配列表 】

0006964191000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P 15/02	(2006.01)	A 6 1 P 15/02
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00
C 1 2 R 1/01	(2006.01)	C 1 2 R 1:01
C 1 2 R 1/25	(2006.01)	C 1 2 R 1:25

特許法第30条第2項適用 (1)2017年10月19日、韓国薬学会発行の2017年秋季韓国薬学会国際学会の要旨集において発表(2)2017年10月20日に開催された2017年秋季韓国薬学会国際学会において発表

微生物の受託番号 KCCM KCCM12088P

微生物の受託番号 KCCM KCCM12089P

(73)特許権者 512318752

ナヴィファーム カンパニー リミテッド

大韓民国、キョンギ - ド 16209、スウォン - シ、チョンアン - ク、448ボン - ギル、チョンアン - 口、5

(74)代理人 110001807

特許業務法人磯野国際特許商標事務所

(72)発明者 キム、ドンヒュン

大韓民国 02823 ソウル、ソンプク - ク、ソンジヤム - 口、92 - 24

(72)発明者 ハン、ミュンジョ

大韓民国 02823 ソウル、ソンプク - ク、ソンジヤム - 口、92 - 24

審査官 山本 晋也

(56)参考文献 韓国登録特許第10 - 1750468 (KR, B1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 / 2 0

A 2 3 L 3 3 / 1 3 5

A 6 1 K 3 5 / 7 4 5

A 6 1 K 3 5 / 7 4 7

A 6 1 P 1 / 0 0

A 6 1 P 1 5 / 0 2

A 6 1 P 2 9 / 0 0

C 1 2 R 1 / 0 1

C 1 2 R 1 / 2 5

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

PubMed