

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5149305号  
(P5149305)

(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 1	
<b>C 1 2 N 1/20 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/20	Z N A A
<b>A 2 3 L 1/30 (2006.01)</b>	A 2 3 L 1/30	Z
<b>A 6 1 K 35/74 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/20	E
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 35/74	A
<b>A 6 1 P 19/06 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00	1 1 1
請求項の数 11 (全 14 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2009-543849 (P2009-543849)  
 (86) (22) 出願日 平成20年11月27日(2008.11.27)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2008/071559  
 (87) 国際公開番号 W02009/069704  
 (87) 国際公開日 平成21年6月4日(2009.6.4)  
 審査請求日 平成23年6月10日(2011.6.10)  
 (31) 優先権主張番号 特願2007-310892 (P2007-310892)  
 (32) 優先日 平成19年11月30日(2007.11.30)  
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

微生物の受託番号 NPMD NITE BP-462

(73) 特許権者 000006138  
 株式会社明治  
 東京都江東区新砂1丁目2番10号  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74) 代理人 100102118  
 弁理士 春名 雅夫  
 (74) 代理人 100160923  
 弁理士 山口 裕孝  
 (74) 代理人 100119507  
 弁理士 刑部 俊  
 (74) 代理人 100142929  
 弁理士 井上 隆一  
 (74) 代理人 100148699  
 弁理士 佐藤 利光

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血中尿酸値低減作用を有する乳酸菌

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

受託番号：NITE BP-462として寄託されているLactobacillus gasseri 乳酸菌 OLL2922 株。

【請求項2】

請求項1に記載の乳酸菌の生菌体および/または該乳酸菌の生菌体含有物を含む、血中尿酸値上昇抑制用の飲食品または医薬品。

【請求項3】

請求項1に記載の乳酸菌の生菌体および/または該乳酸菌の生菌体含有物を含む、高尿酸血症の予防および/または治療用の飲食品または医薬品。

【請求項4】

請求項1に記載の乳酸菌の生菌体および/または該乳酸菌の生菌体含有物を含む、プリン体の吸収を抑制するための飲食品または医薬品。

【請求項5】

飲食品の原料または中間製品を請求項1に記載の乳酸菌の生菌体および/または該乳酸菌の生菌体含有物に接触させる工程を含む、プリン体が低減化された飲食品の製造方法。

【請求項6】

血中尿酸値上昇抑制用の飲食品または医薬品を製造するための、請求項1に記載の乳酸菌の生菌体および/または該乳酸菌の生菌体含有物の使用。

【請求項7】

高尿酸血症の予防および/または治療用の飲食品または医薬品を製造するための、請求項 1 に記載の乳酸菌の生菌体および/または該乳酸菌の生菌体含有物の使用。

【請求項 8】

プリン体の吸収を抑制するための飲食品または医薬品を製造するための、請求項 1 に記載の乳酸菌の生菌体および/または該乳酸菌の生菌体含有物の使用。

【請求項 9】

対象において食品に含まれるプリン体の摂取を抑制するための、請求項 1 に記載の乳酸菌の生菌体および/または該乳酸菌の生菌体含有物。

【請求項 10】

対象において血中尿酸値上昇を抑制するための、請求項 1 に記載の乳酸菌の生菌体および/または該乳酸菌の生菌体含有物。

10

【請求項 11】

対象において高尿酸血症を治療するための、請求項 1 に記載の乳酸菌の生菌体および/または該乳酸菌の生菌体含有物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血中尿酸値低減作用を有する乳酸菌およびその利用方法に関する。また本発明は、前記乳酸菌を含む高尿酸血症の予防および/または治療用の食品または医薬品に関する。

20

【背景技術】

【0002】

高尿酸血症は、環境要因（生活習慣）や遺伝的要因により、尿酸排泄低下や尿酸産生過剰がおり、血中の尿酸が過剰になった状態である。高尿酸血症は自覚症状がない場合もあるが、痛風、腎機能障害、尿路結石、動脈硬化症といった深刻な合併症を引き起こす。高尿酸血症の代表的合併症である痛風は、激痛を伴う急性関節炎が主症状として現れる。過去には、痛風は「帝王の病気」と呼ばれており、肉や魚、アルコールなどを頻りに多く摂取する層の「ぜいたく病」であったが、近年では、食生活の変化によって年々増加傾向にある。現在の日本における痛風の患者数は30～40万人、高尿酸血症の患者数は推定600万人といわれており、高尿酸血症の予防および治療への関心が高まっている。

30

【0003】

高尿酸血症の予防および治療は、食事療法、運動療法、医薬品およびこれらの組み合わせで血中の尿酸値をコントロールすることによって行われる。特に、摂取カロリー制限は高尿酸血症の予防および治療方法として最も選択される方法の一つであるが、厳しいカロリー制限を継続することは必ずしも容易ではない。このような状況を改善する方法として、プリン体を分解する乳酸菌、酵母などの微生物を経口的に（例えば医薬品、飲食品として）摂取させて、腸管内で食事から摂取されたプリン体を分解し、その体内への吸収を減少させ、血清尿酸値を低減させる方法が提案されている（特許文献1、非特許文献1）。乳酸菌は古くから食品や医薬品として利用されており、人体への安全性も高いため、乳酸菌摂取は副作用の懸念の低い、高尿酸血症を予防・治療するための有効な方法となり得る。また、上述の通り、高尿酸血症の予防および治療法の第一選択は食事療法であり、尿酸値のコントロールを可能とする乳酸菌を食品として摂取できれば、極めて現実的かつ有力な新規の高尿酸血症の予防および/または治療法となり得る。しかしながら、上記文献で報告された、プリン体分解能を有する乳酸菌：Lactobacillus fermentum、Lactobacillus pentosusはガス生産能を有しており、飲食品や医薬品への応用という観点からは必ずしも適当な菌種とはいえない。

40

【0004】

なお、本出願の発明に関連する先行技術文献情報を以下に示す。

【特許文献1】W02004/112809

【非特許文献1】日本農芸化学会ホームページ 日本農芸化学会年次大会講演発表データ

50

ベース ([http://isbba.bioweb.ne.jp/jsbba\\_db/index.html](http://isbba.bioweb.ne.jp/jsbba_db/index.html)) 「日本農芸化学会 2004.03.30 一般講演、池永武、久米村恵 他：食事性高尿酸血症モデルラットの血中尿酸値に及ぼす乳酸菌の影響」

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は上記状況に鑑みてなされたものであり、本発明が解決しようとする課題は、飲食品や医薬品用途に適した、高尿酸血症の予防および/または治療の可能な乳酸菌を提供することであり、また同時に、上記乳酸菌を用いた高尿酸血症の予防および/または治療用組成物を提供することである。

10

【課題を解決するための手段】

【0006】

上記課題を解決すべく、本発明者らは鋭意努力を重ねた。まず、イノシンおよびグアノシン存在下で各種乳酸菌を培養し、上記ヌクレオシドの消費量および分解物（ヒポキサンチン、グアニン）の生産量を測定し、ヌクレオシド分解能の顕著な複数の乳酸菌を選抜した。上記選抜によってヌクレオシド分解能が高いと判断された乳酸菌を、プリン体含有飼料で飼育したラットに経口投与し、当該ラットの一般状態および血清尿酸値を測定し、乳酸菌の投与による血清尿酸値への影響を観察した。その結果、血清尿酸値の上昇を有意に抑える乳酸菌：Lactobacillus gasseri OLL2922を見出した。さらに本発明者らは、上記乳酸菌を用いてヨーグルトを調製し、上記乳酸菌がヨーグルトを含む食品の加工用として

20

【0007】

本発明は、より具体的には以下の〔1〕～〔14〕を提供するものである。

〔1〕 受託番号：NITE BP-462として寄託されているLactobacillus gasseri 乳酸菌 OLL2922株。

30

〔2〕 上記〔1〕に記載の乳酸菌、該乳酸菌含有物および/またはその処理物を含む、血中尿酸値上昇抑制用の飲食品または医薬品。

〔3〕 上記〔1〕に記載の乳酸菌、該乳酸菌含有物および/またはその処理物を含む、高尿酸血症の予防および/または治療用の飲食品または医薬品。

〔4〕 上記〔1〕に記載の乳酸菌、該乳酸菌含有物および/またはその処理物を含む、プリン体の吸収を抑制するための飲食品または医薬品。

〔5〕 上記〔1〕に記載の乳酸菌、該乳酸菌含有物および/またはその処理物を投与することを特徴とする、対象において食品に含まれるプリン体の摂取を抑制する方法。

〔6〕 上記〔1〕に記載の乳酸菌、該乳酸菌含有物および/またはその処理物を投与することを特徴とする、対象において血中尿酸値上昇を抑制する方法。

40

〔7〕 上記〔1〕に記載の乳酸菌、該乳酸菌含有物および/またはその処理物を投与することを特徴とする、対象において高尿酸血症を治療する方法。

〔8〕 飲食品の原料または中間製品を上記〔1〕に記載の乳酸菌、該乳酸菌含有物および/またはその処理物に接触させる工程を含む、プリン体が低減化された飲食品の製造方法。

〔9〕 血中尿酸値上昇抑制用の飲食品または医薬品を製造するための、上記〔1〕に記載の乳酸菌、該乳酸菌含有物および/またはその処理物の使用。

〔10〕 高尿酸血症の予防および/または治療用の飲食品または医薬品を製造するための、上記〔1〕に記載の乳酸菌、該乳酸菌含有物および/またはその処理物の使用。

〔11〕 プリン体の吸収を抑制するための飲食品または医薬品を製造するための、上記

50

〔 1 〕に記載の乳酸菌、該乳酸菌含有物および/またはその処理物の使用。

〔 1 2 〕 対象において食品に含まれるプリン体の摂取を抑制するための、上記〔 1 〕に記載の乳酸菌、該乳酸菌含有物および/またはその処理物。

〔 1 3 〕 対象において血中尿酸値上昇を抑制するための、上記〔 1 〕に記載の乳酸菌、該乳酸菌含有物および/またはその処理物。

〔 1 4 〕 対象において高尿酸血症を治療するための、上記〔 1 〕に記載の乳酸菌、該乳酸菌含有物および/またはその処理物。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 0 8 〕

【図 1】プリン体（イノシン）存在下で各種乳酸菌を培養したときの、各乳酸菌のプリン体分解能を示す図である。プリン体分解率が高いと認められた菌株（星印）を、モデル動物実験対象とした。

10

【図 2】プリン体（グアノシン）存在下で各種乳酸菌を培養したときの、各乳酸菌のプリン体分解能を示す図である。プリン体分解率が高いと認められた菌株（星印）を、モデル動物実験対象とした。

【図 3】各種乳酸菌のプリン体分解能を、（ヒポキサンチン量+グアニン量）/5-プロモウラシル量で評価した図である。

【図 4】プリン体分解能の高い乳酸菌（*L. fermentum*、*L. brevis*）を食事性高尿酸血症モデル動物に経口投与し、血清尿酸値を測定した結果を示す図である。第1群：陰性群、第2群：対照群、第3群：菌体投与群の結果をそれぞれ示す。

20

【図 5】*L. gasseri* OLL2922株および*L. gasseri* OLL2959株の遺伝子増幅産物の比較を示す写真である。

【 0 0 0 9 〕

〔 発明の実施の形態 〕

本発明は、プリン体分解能を有し、ガス産生能を有しない、新規の*Lactobacillus gasseri* 乳酸菌、OLL2922株に関するものである。本発明は、プリン体分解能を有し、ガス産生能を有しない*L. gasseri* 乳酸菌OLL2922株が本発明者らによって初めて見出されたことに基づくものである。

【 0 0 1 0 〕

*Lactobacillus* 属は、乳酸菌の代表的な属の一つで、80種以上の種を含む。*Lactobacillus* 属に含まれる種の例として、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *burgalicus*、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*、*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*、*Lactobacillus helveticus*、*Lactobacillus helveticus* subsp. *jugurti*、*Lactobacillus acidophilus*、*Lactobacillus crispatus*、*Lactobacillus amylovorus*、*Lactobacillus gallinarum*、*Lactobacillus gasseri*、*Lactobacillus oris*、*Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus*、*Lactobacillus johnsonii*、*Lactobacillus fermentum*、*Lactobacillus brevis* を挙げることができる。本発明の*Lactobacillus* 属乳酸菌は、プリン体分解能を有し、ガス産生能を有しない、*Lactobacillus* 属乳酸菌である限りいずれの種であってもよいが、好ましくは、*Lactobacillus gasseri*であり、より具体的には*Lactobacillus gasseri* OLL2922株（受託番号：NITE BP-462）である。

30

40

【 0 0 1 1 〕

本発明の*Lactobacillus gasseri*（以下、場合により「*L. gasseri*」と略す）乳酸菌 OLL2922株は、プリン体分解能を有し、ガス産生能を有しないという特徴を有する*L. gasseri* 乳酸菌である。本発明者らは、多数の乳酸菌についてプリン体分解能およびガス生産能の有無を検討し、*L. gasseri* OLL2922と名付けた*L. gasseri* 乳酸菌が、プリン体分解能を有し、ガス産生能を有しないことを具体的に見出した。さらに*in vivo*実験によって、*L. gasseri* OLL2922が血中の尿酸値上昇を有意に抑制することを突き止めた。

【 0 0 1 2 〕

プリン体は、核酸を構成する成分であり、プリンde novo合成、サルベージ回路、食餌中の核タンパク質等によって生体に供給され、不要なプリン体は肝臓において代謝されて

50

排出される。尿酸は、ヒト、高等霊長類、鳥類、爬虫類等におけるプリン体の最終代謝産物である。

【0013】

本明細書においてプリン体とは、プリン骨格を有する化合物である。プリン体の代表例として、プリンヌクレオチド（アデニル酸、デオキシアデニル酸、グアニル酸、デオキシグアニル酸）、プリンヌクレオシド（アデノシン、デオキシアデノシン、グアノシン、デオキシグアノシン）、プリン塩基（アデニン、グアニン）、プリン塩基を含むオリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドを挙げることができる。プリン塩基は、核酸を構成する他、ATP、GTP、cAMP、cGMP、補酵素A、FAD、NAD等の多様な生体成分を構成する。本明細書においては、プリン骨格を有する限り、このような生体成分も全てプリン体に含まれる。

10

【0014】

生体内におけるプリン体は、尿酸に代謝される。プリン体が尿酸まで至る代謝経路は広く知られている。AMPは5'-ヌクレオチダーゼによってアデノシンとなり、アデノシンはイノシンを経てヒポキサンチンとなる。GMPは、5'-ヌクレオチダーゼによってグアノシンとなった後、グアニンとなる。ヒポキサンチンはキサンチンオキシダーゼによって、またグアニンはグアニンデアミナーゼによって、いずれもキサンチンに代謝され、さらにキサンチンはキサンチンオキシダーゼによって尿酸となる。

【0015】

本発明においてプリン体分解能とは、少なくとも一つのプリン体を分解する能力をいい、分解産物がプリン骨格を有するかどうかは問わない。すなわち、あるプリン体を分解してプリン骨格を有さない化合物にする能力も、あるプリン体を分解して別のプリン体（プリン骨格を有する化合物）にする能力も、本発明におけるプリン体分解能に含まれる。

20

【0016】

本発明のL. gasseri乳酸菌は、公知方法によって分離することができる。例えば、ヒト等の哺乳類の糞便から菌を培養し、培養した菌の形状、生理学的特徴等からL. gasseri乳酸菌を分離し、プリン体分解能の有無を検出し、プリン体分解能を有し、かつガス生産能を有しないL. gasseri乳酸菌を選別することで単離可能である。プリン体分解能の検出およびガス生産能の検出は公知方法によって可能であり、プリン体分解能は後述する実施例1が例示できる。また、ガス産生能については、試験管に培地（ラクトバチルスの場合には通常MRS培地を使用）およびダーラム管を入れ、121、15分オートクレープし、十分に生育した培養液を10μl接種し、至適温度（菌株により30~37）で1~3日間培養した後、ダーラム管にたまるガスの有無を肉眼観察する方法などが例示できる。

30

【0017】

本発明のL. gasseri乳酸菌を培養するには、一般的に乳酸桿菌の培養に適した培地であれば良く、グルコース、ラクトース、ガラクトース、フルクトース、トレハロース、スクロース、マンノース、セロビオース等の炭素源、肉エキス、ペプトン、イーストエキス、ラクタ、カゼイン、ホエータンパク質等の窒素源、硫酸マグネシウム、硫酸鉄、硫酸マンガンの無機栄養素を含む培地を用いることができる。好適な例の一つとして、Lactobacilli MRS Broth (Difco)を挙げることができる。培養条件は、腸内乳酸菌が生育し得る条件であれば、特に制限はないが、好ましい条件としては、例えば、pH5.0 - pH8.0、温度20 - 45 であり、より好ましい条件としては、嫌気性、pH5.0 - pH7.0、温度30 - 40 である。

40

【0018】

本発明の「プリン体分解能を有し、ガス産生能を有しない、L. gasseri乳酸菌OLL2922株」は、本発明者らによって、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターに寄託された。以下に、寄託を特定する内容を記載する。

(1) 寄託機関名：独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター

(2) 連絡先：日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 郵便番号292-0818  
電話番号0438-20-5580

(3) 受託番号：NITE BP-462

50

(4) 識別のための表示：Lactobacillus gasseri OLL2922株

【0019】

Lactobacillus gasseri OLL2922株（受託番号：NITE BP-462）は、グラム陽性桿菌であり、Lactobacilli MRS Agar, Difco上でのコロニー形態は円形、淡黄色、扁平状である。生理学的特徴としては、ホモ乳酸発酵形式、45℃での発育性を有する。菌体増殖においては培養中の培地のpHは6.0~7.0に維持することが好ましい。

【0020】

本発明者らは、後述するとおり、本発明のL. gasseri乳酸菌をモデル動物に経口投与し、該乳酸菌に血中尿酸値の上昇を抑制する効果があることを確認した。したがって、本発明のL. gasseri乳酸菌は、血中尿酸値の上昇抑制のために、または高尿酸血症の予防および/または治療のために利用することができる。

10

【0021】

また、本発明のL. gasseri乳酸菌のプリン体分解能を利用して、本発明の乳酸菌が投与された対象の体内において、食品に含まれるプリン体の摂取を抑制することができる。

本発明において「対象」とは、血中尿酸値が上昇している、若しくはそのおそれのある生物体、または高尿酸血症を発症している、若しくはそのおそれのある生物体などを挙げるることができる。本発明のL. gasseri乳酸菌が投与される生物体は、特に限定されるものではないが、動物（例えば、ヒト、家畜動物種、野生動物）を含む。

【0022】

本発明のL. gasseri乳酸菌は、血中尿酸値上昇抑制用の飲食品または医薬品、高尿酸血症の予防および/または治療用の医薬品または飲食品の製造に用いることができる。

20

本発明のL. gasseri乳酸菌を用いて作る飲食品は、カテゴリーや種類に制限はなく、機能性食品、特定保健用食品、健康食品、介護用食品でも良く、また、菓子、乳酸菌飲料、チーズやヨーグルト等の乳製品、調味料等であっても良い。飲食品の形状についても制限はなく、固形、液状、流動食状、ゼリー状、タブレット状、顆粒状、カプセル状など、通常流通し得るあらゆる飲食品形状をとることができる。上記飲食品の製造は、当業者の常法によって行うことができる。上記飲食品の製造においては、乳酸菌生育を妨げない限り、糖質、タンパク質、脂質、食物繊維、ビタミン類、生体必須微量元素（硫酸マンガン、硫酸亜鉛、塩化マグネシウム、炭酸カリウム、等）、香料やその他の配合物を添加することもできる。

30

【0023】

本発明のL. gasseri乳酸菌、該乳酸菌含有物および/またはその処理物は、上記の通り乳製品・発酵乳を含む一般飲食品に加工できる他、ヨーグルトやチーズ等の乳製品・発酵乳の製造用スターターとして利用することも可能である。本発明に用いられる乳酸菌処理物としては、例えば、培養物、濃縮物、ペースト化物、噴霧乾燥物、凍結乾燥物、真空乾燥物、ドラム乾燥物、液状物、希釈物、破砕物等が挙げられる。また、乳酸菌としては生菌体、湿潤菌体、乾燥菌体等が適宜使用可能である。スターターとする場合は、本発明のL. gasseri乳酸菌の生息・増殖に支障がない限り、また、乳製品製造に支障がない限り、他の微生物が混合されていても良い。例えば、ヨーグルト用乳酸菌として主要な菌種であるLactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus、Streptococcus thermophilus、Lactobacillus acidophilus等と混合しても良く、その他、一般にヨーグルト用やチーズ用として用いられる菌種と混合してスターターとすることができる。上記スターターによる乳製品、発酵乳の製造は、常法に従って行うことができる。例えば、加温・混合・均質化・殺菌処理後に冷却した乳または乳製品に、上記スターターを混合し、発酵・冷却することにより、プレーンヨーグルトを製造することができる。

40

【0024】

本発明のL. gasseri乳酸菌、該乳酸菌含有物および/またはその処理物は、生理学的に許容される担体、賦形剤、あるいは希釈剤等と混合し、医薬組成物として経口、あるいは非経口的に投与することができるが、好ましい投与方法は、経口投与である。経口投与製剤としては、周知の各種剤型とすることができ、例えば、顆粒剤、散剤、錠剤、丸剤、カ

50

プセル剤、液剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤、トローチ剤等の剤型とすることができる。また、当業者に周知の方法で腸溶性製剤とすることにより、胃酸の効果を受けることなく、本発明の*L. gasseri* 乳酸菌をより効率的に腸まで運ぶことも可能である。

【0025】

本発明の*L. gasseri* 乳酸菌を用いて製造された医薬品および飲食品は、飲食品中の同菌の作用によって、血中尿酸値上昇抑制効果や高尿酸値血症の予防および/または治療効果を発揮するものと期待できる。さらに、上記医薬品および飲食品は、投与される対象の体内において、食品に含まれるプリン体の摂取を抑制する効果を発揮するものと期待できる。

【0026】

さらに、本発明の*L. gasseri* 乳酸菌のプリン体分解能を利用して、プリン体量が低減化された飲食品を製造することも可能である。本発明のプリン体量が低減化された飲食品の製造方法は、本発明の*L. gasseri* 乳酸菌を、プリン体を含有する飲食品の原料または中間製品に接触させる工程を含む。この工程により、該原料または中間製品に含まれるプリン体の量を効率よく低減させることが可能となる。上記工程は、本発明の*L. gasseri* 乳酸菌が生存可能、または*L. gasseri* 乳酸菌により該原料または中間製品の発酵が可能な条件で行なわれることが好ましい。本発明の製造方法は、上記工程のほか、粉碎工程、混合工程、乾燥工程、殺菌および充填工程など、目的とする飲食品の通常の製造工程を含むことができる。本発明の方法によって製造される飲食品は、そのカテゴリーや種類に制限はなく、例えば機能性食品、特定保健用食品、健康食品、介護用食品でも良く、さらに一般の食品、例えば嗜好品に分類される食品であってもよいが、プリン体摂取量の制限が必要な疾患または症状の患者あるいは、上記疾患または症状予備群の日常的または補助的飲食品として特に有用である。本発明の方法は、プリン体接種の制限が必要な、または希望する対象が、従来プリン体量が多いとされる食品を安全に接種することを可能にする。

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

【実施例】

【0027】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。尚、実施例中、菌株名にJCMと記載された菌株は独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンターの微生物材料開発室から入手した基準株、菌株名にATCCと記載された菌株は、American Type Culture Collectionから入手した基準株、菌株名にMEPと記載された菌株は明治乳業株式会社保有菌株である。

【0028】

〔実施例1〕 乳酸菌の尿酸低減作用に関する *in vitro* の実験方法

各種乳酸菌について、プリン体分解能の有無を以下の方法によって検討した。

各種の乳酸菌(菌体)をDifco Lactobacilli MRS Broth (BD製)培地を用いて、酸素吸着剤「アネロパック」(三菱ガス(株)製)と共に密閉容器に入れ、温度37℃にて一晚嫌気培養した。培養後の菌体懸濁液を回転数3000rpm、温度4℃にて10分間遠心分離して菌体を沈殿回収(集菌)した。

【0029】

この菌体から $1 \times 10^9$  CFU/mLの菌体懸濁液を0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液で調製した。

各種の菌体懸濁液を調製した後に、イノシンとグアノシンをそれぞれが1.25mMになるように各種の菌体懸濁液に加えた。これらの菌体懸濁液を37℃の恒温槽へ入れ、水平回転数140rpmにて30分間あるいは1時間振とう培養した。

【0030】

振とう培養後の菌体懸濁液(反応液)について、ヌクレオシドの消費量と、ヌクレオシドの分解物である塩基(ヒポキサンチンとグアニン)の生成量を、5-プロモウラシルを内部標準としてHPLCにて測定した。移動相Aの780 μLに、反応液200 μL、内部標準として5-

10

20

30

40

50

プロモウラシル (1.6 mg/mL) 20  $\mu$ Lを加えて混合した。この混合液をフィルター (孔径 0.45  $\mu$ m) で濾過した後に、透過液50  $\mu$ LをHPLCに注入した。HPLCの具体的な操作条件は以下の通りである。

【0031】

HPLC : Waters alliance 2690  
 カラム : CAPCELL PAK C<sub>18</sub> SG120、粒子径 5  $\mu$ m、カラムサイズ 4.6 × 250 mm (資生堂)

移動相 : A : 25mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.1% メタノール)  
 B : 25mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.1% メタノール) / メタノール (75 : 25)  
 グラジエントA/B (min) : 100 / 0 (0) - 100 / 0 (10) -  
 20 / 80 (20) - 20 / 80 (25) - 100 / 0 (26) - 100 / 0 (40)

検出器 : フォトダイオードアレイ (Waters 996) 検出波長 254nm

流速 : 1 mL/min

カラム温度 : 常温

10

【0032】

結果を図1～3に示す。各化合物の定量は、HPLCチャートのピーク面積値に基づき行った。更に図1及び図2の分解率は下式に従い算出した。

分解率 = 100 - (イノシンあるいはグアノシン量 / ブランクにおけるイノシンあるいはグアノシン量) × 100

また、図3の算出方法は以下の通りである。

(ヒポキサンチン量+グアニン量) / 5-プロモウラシル量

図1～3の結果から、ヌクレオシド分解能の顕著であると判断される乳酸菌を選抜した。

20

【0033】

〔実施例2〕 乳酸菌の尿酸低減作用に関する *in vivo*の実験方法

先行文献 (非特許文献1) に記載された方法に従い、食事性高尿酸血症モデル動物を製作し、該動物の血清尿酸値に及ぼす微生物 (乳酸菌) の影響を検討した。上記方法は具体的には、オキシニン酸カリウムを2.5重量%とRNAを1.0重量%で含む混餌を調製して、ラットに摂取させ、摂取後からの血中尿酸値を陰性群や対照群と比較する方法である。本方法のモデル動物は、尿酸生成の阻害薬であるアロプリノールを経口投与した際に、該モデル動物の血中尿酸値が有意に抑制されることが明らかとなっている (食品機能研究ニューズ (第14号)、2005年3月9日発行、(株)メルシャン クリントック環境検査センター、[http://www.m-cleantec.com/gizyutu/news\\_0503.html](http://www.m-cleantec.com/gizyutu/news_0503.html))。このことは、高尿酸血症に対する食品の有効性を評価する系として上記方法が有用であることを示している。

30

【0034】

〔2-1 材料および実験手順〕

〔微生物〕

上記 *in vitro*試験でヌクレオシド分解能が高いと判断された、*L. gaserri* OLL2922株を使用した。各種の乳酸菌から *in vitro*試験と同様にして菌体懸濁液を調製した。菌体懸濁液を  $1 \times 10^9$  CFU / 10mL / kgでラットへ経口投与した。

【0035】

〔実験動物〕

ラット (Wister SPF、雄、7週齢) を使用した。飼育 (馴化と試験) には、ラット用プラスチックケージを使用し、1ケージ当たり1匹のラットを収容した。明暗サイクルは明期を午前7時～午後7時 (12時間) とした。

40

【0036】

〔予備飼育 (馴化) と群分け〕

実験動物は搬入した後に1週間の予備飼育 (馴化) を行った。馴化中には、餌 (飼料) としてAIN-93G (オリエンタル酵母工業(株))、飲水として水道水を自由摂取させた。予備飼育したラット (入荷7日後、8週齢、Day0) を午前中に非絶食下で尾静脈より採血した。この血液を室温で30分以上放置した後に、回転数10000 rpmにて10分間遠心分離して血

50

清を分取し、血清中の尿酸値をリンタングステン酸法にて測定した。

#### 【0037】

群分けは各群の血清中の尿酸値が同等になるように行った。試験には、1群当たり5匹のラットを使用し、陰性群（第1群）、対照群（第2群）、菌体投与群（第3群）の合計3群を設定した。群名、餌、投与物（投与用量）、匹数などを以下に示す。

- ・ 陰性群（第1群）：「AIN-93G」給餌、「生理食塩水」投与（10mL/kg）、5匹
- ・ 対照群（第2群）：「オキシニン酸カリウムを2.5重量%、RNAを1.0重量%で混合したAIN-93G」給餌、「生理食塩水」投与（10mL/kg）、5匹
- ・ 菌体投与群（第3群）：「オキシニン酸カリウムを2.5重量%、RNAを1.0重量%で混合したAIN-93G」給餌、5匹。「L. gasserii OLL2922株の懸濁液（ $1 \times 10^8$  CFU/mL）」投与（10mL/kg）。

10

#### 【0038】

〔本飼育（試験）〕

群分けした後の翌日より試験期間とし、「AIN-93G」飼料（陰性群）と「AIN-93G+オキシニン酸カリウム+RNA」飼料（対照群、菌体投与群）をそれぞれ給餌器によりラットに8日間自由摂取させた。本飼料の給餌開始日をDay1とし、以後では日付と共にDayを起算した。「AIN-93G+オキシニン酸カリウム+RNA」飼料は、オキシニン酸カリウム（100g、ALDRICH）を2.5重量%とRNA（500g、MP Biomedicals, Inc.）を1.0重量%で含んでいる。菌体投与群の実験動物には、前記の菌体懸濁液を $1 \times 10^9$  CFU/10mL/kgで強制経口投与した。陰性群と対照群には、菌体懸濁液ではなく、生理食塩水を10mL/kgで強制経口投与した。

20

#### 【0039】

〔測定と検査等〕

- ・ 一般状態の観察と体重の測定

全例（全群）においてDay1からDay8の連日、投与時に一般状態を観察し、Day0、Day1、Day5、Day8の午前9～10時に定時で体重を測定した。

- ・ 摂餌量と摂水量の測定

全例（全群）においてDay1（セット値）、Day5（残値、セット値）、Day8（残値）の午前9～10時に定時で摂餌量と摂水量を測定した。

- ・ 採血と生化学的検査

30

全例（全群）においてDay0（午前中）、Day2（投与1時間後）、Day5（投与1時間後）、Day8（投与前）に尾静脈より採血した。採取した血液は、回転数10000 rpmにて10分間遠心分離して血清を分取し、血清中の尿酸値をリンタングステン酸法にて測定した。前記した通り、Day0では当日に血清中尿酸値を測定し、群分けに使用した。

- ・ 剖検と生化学的検査

全例（全群）においてDay8に尾静脈より採血した後に、菌体懸濁液を経口投与した。投与1時間後にネンプター麻酔（ペントバルビタール40mg/kg）状態にて、腹大動脈より全採血して致死させた。採取した血液は、回転数3000 rpmにて15分間遠心分離して血清を分取し、血清中のクレアチニン、尿酸、尿素窒素を測定した。

- ・ 臓器重量の測定

40

ラットの腎臓を摘出し、湿重量を測定した。

#### 【0040】

〔統計処理〕

結果は平均値±標準偏差で示し、対照群と菌体投与各群を比較した。数値化した検査値の分散比はF検定を行い、等分散の場合にはStudent's t-検定を、不等分散の場合にはAspin-Welch t-検定を行った。統計処理には、エクセル統計 2004 の統計解析を使用し、最低有意水準を両側5%とした。

一般状態の結果を表1に、血清尿酸値の推移を図4に示す。

各種乳酸菌投与による血清中の尿酸値の低下について、図4に示すように、L.gasserii OLL2922投与群において、有意差が認められた。一般状態は、いずれの群においても、腎

50

機能（クレアチニン値、血清中尿素窒素、腎重量）に問題がなく、体重・摂餌量・摂水量もいずれの群も問題はなかった。

【 0 0 4 1 】

【表 1】

	第1群	第2群	第3群
試験期間中の体重増加量 (g)	38.1 ± 5.8	27.6 ± 4.1	30.0 ± 2.1
試験期間中の摂餌量 (g)	116.8 ± 6.4	97.8 ± 8.1	97.1 ± 3.4
試験期間中の摂水量 (g)	103.0 ± 15.6	195.2 ± 13.6	197.4 ± 6.5
腎絶対重量 (8日目) (g)	0.93 ± 0.04	1.06 ± 0.17	0.96 ± 0.09

10

【 0 0 4 2 】

〔実施例 3〕 発酵乳の製造例

プレーンヨーグルトを *L. gasseri* OLL2922、*L. bulgaricus* JCM1002<sup>T</sup>、*S. thermophilus* ATCC19258により調製した。まず、脱脂粉乳10%培地を用いて、*L. gasseri* OLL2922、*L. bulgaricus* JCM1002<sup>T</sup>、*S. thermophilus* ATCC19258のバルクスターターを調製した。次に、ヨーグルトミックス（無脂乳固形分（SNF）：9.5%、脂肪分（FAT）：3.0%）を95、5分間で加熱処理した。この加熱処理後のヨーグルトミックスに、*L. bulgaricus* JCM1002<sup>T</sup>と、*S. thermophilus* ATCC19258のスターターを各1%、*L. gasseri* OLL2922のスターターを5%で接種し、43、4時間で発酵して、プレーンヨーグルトを得た。このプレーンヨーグルトを冷蔵庫（5）で冷却してから、風味と物性を確認した。このとき、風味と物性はいずれも良好であった。

20

【 0 0 4 3 】

〔比較例 1〕 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 法による菌株の識別

RAPD法により *L. gasseri* OLL2922株および *L. gasseri* OLL2959株 (NITE P-224)の識別を行った。ランダムプライマー-RAPD5 (5'-GTCAACGAAG-3'、配列番号：1)を用いて、922株および2959株から抽出したDNAを鋳型にして以下の条件でPCRを行い、得られた増幅産物を電気泳動したときのパターンを比較した。

30

【 0 0 4 4 】

PCR反応液 (25 μl) の組成

dH<sub>2</sub>O 18.7 μl

10×Ex Taq buffer 2.5 μl

dNTP Mix (2.5mM) 2.0 μl

Ex Taq 0.4 μl

DNA 1.0 μl

Primer (100pmol/μl) 0.4 μl

PCR条件

4 cycles (94、5min, 36、5min, 72、5min)

30 cycles (94、1min, 36、1min, 72、2min)

40

【 0 0 4 5 】

その結果、*L. gasseri* OLL2922株および *L. gasseri* OLL2959株の増幅産物は異なるパターンを有することが明らかとなった（図5）。

【産業上の利用可能性】

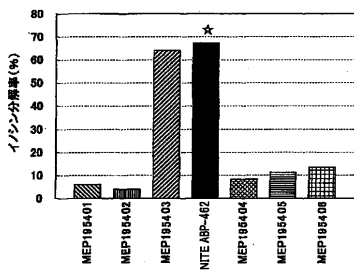
【 0 0 4 6 】

本発明によって、血中尿酸値を低減可能な乳酸菌が提供された。本発明の乳酸菌を経口摂取することにより、血中尿酸値を低減することができるため、本発明の乳酸菌は痛風や高尿酸血症の予防および/または治療用の食品または医薬品として利用できる。特に、本発明の乳酸菌は、食品製造上、ガス産生による問題がないことが確認されている点で、実

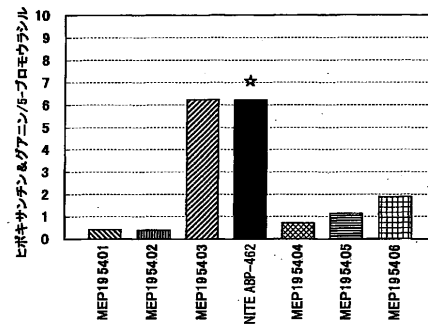
50

用化に適しているといえる。さらに、本発明の乳酸菌を利用すれば、プリン体量を低減させた加工食品の製造も可能になると考えられる。このように、本発明の乳酸菌は、食品および医薬品産業上、極めて有用性が高いといえる。

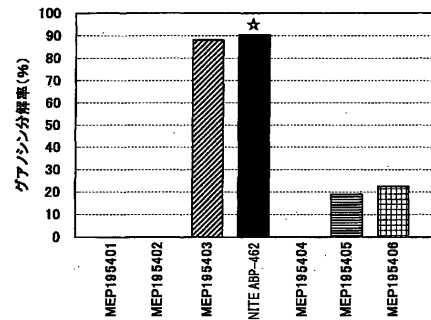
【図1】



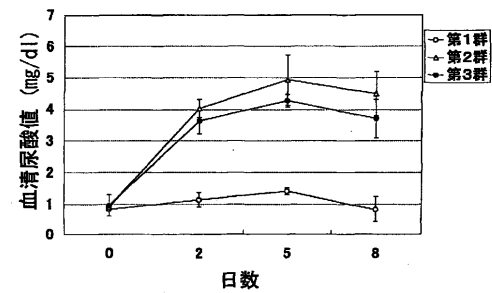
【図3】



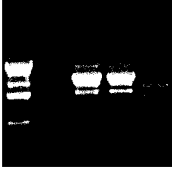
【図2】



【図4】



【図 5】



2922株 2959株

【配列表】

0005149305000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
 C 1 2 N 15/09 (2006.01) A 6 1 P 19/06  
 C 1 2 N 15/00 A

(74)代理人 100128048  
 弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506  
 弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845  
 弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340  
 弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072  
 弁理士 川本 和弥

(72)発明者 坪井 洋  
 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 金子 紀子  
 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 佐藤 秋菜  
 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 糸 晃智  
 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 木村 勝紀  
 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

審査官 太田 雄三

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 0 4 / 1 1 2 8 0 9 ( W O , A 1 )  
 国際公開第 2 0 0 6 / 0 6 7 9 4 0 ( W O , A 1 )  
 特開 2 0 0 8 - 0 0 5 8 3 4 ( J P , A )  
 池永武ら, 食事性高尿酸血症モデルラットの血中尿酸値に及ぼす乳酸菌の影響, 日本農芸化学会  
 大会講演要旨集, 2 0 0 4 年 3 月 5 日, Vol. 2004, p. 197, 3A15a07  
 小川順ら, プリンヌクレオシド代謝に影響を及ぼす乳酸菌の探索, 日本農芸化学会大会講演要旨  
 集, 2 0 0 4 年 3 月 5 日, Vol. 2004, p. 197, 3A15a06  
 池永武ら, 高いプリンヌクレオシド代謝能を有する乳酸菌の食事性高尿酸血症モデルラットの血  
 中尿酸値に及ぼす影響, 日本栄養・食糧学会総会講演要旨集, 2 0 0 4 年 4 月 1 日, Vol. 58  
 th, p. 318, 3I-4p  
 小川順ら, 高尿酸血症に有効な乳酸菌におけるプリン体代謝の解析, 日本農芸化学会大会講演要  
 旨集, 2 0 0 5 年 3 月 5 日, Vol. 2005, p. 244, 30F257a

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C12N 1/20  
 A23L 1/30  
 A61K 35/74  
 C12N 15/09  
 CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)  
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)  
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

PubMed  
CiNii