

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4343477号
(P4343477)

(45) 発行日 平成21年10月14日(2009.10.14)

(24) 登録日 平成21年7月17日(2009.7.17)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N 1/20 A
A 2 3 K 1/16 (2006.01)	C 1 2 N 1/20 E
A 2 3 K 1/18 (2006.01)	A 2 3 K 1/16 3 0 4 B
C 1 2 R 1/23 (2006.01)	A 2 3 K 1/18 A
	C 1 2 N 1/20 A
請求項の数 1 (全 30 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2001-587107 (P2001-587107)	(73) 特許権者	590002013
(86) (22) 出願日	平成13年5月22日 (2001.5.22)		ソシエテ・デ・プロデュイ・ネスレ・エス・アー
(65) 公表番号	特表2003-534003 (P2003-534003A)		スイス シーエイチー1800 ヴェヴェー
(43) 公表日	平成15年11月18日 (2003.11.18)	(74) 代理人	100088155
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/006039		弁理士 長谷川 芳樹
(87) 国際公開番号	W02001/090311	(74) 代理人	100094318
(87) 国際公開日	平成13年11月29日 (2001.11.29)		弁理士 山田 行一
審査請求日	平成17年9月5日 (2005.9.5)	(74) 代理人	100123995
(31) 優先権主張番号	00201867.9		弁理士 野田 雅一
(32) 優先日	平成12年5月25日 (2000.5.25)	(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
(31) 優先権主張番号	01201503.8	(74) 代理人	100126653
(32) 優先日	平成13年4月25日 (2001.4.25)		弁理士 木元 克輔
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		
微生物の受託番号	CNCM I-2453		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペットフード用新規プロバイオチックス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ラクトバチルス・アシドフィラスNCC2628 (CNCM I-2453)。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は新規乳酸菌、特にそのプロバイオチックポテンシャルに対し単離し、選択した属ラクトバチルス、ビフィドバクテリウムおよびストレプトコッカス(エンテロコッカス)の微生物に関する。本発明はペットの健康を改良するためのペットフード組成物の製造におけるこれらの使用およびこれらを含む組成物にも関する。このような微生物をペットに給与することによりペットの健康を維持または改良する方法も供される。

【0002】

(発明の背景)

家畜の健康はその飼養に密接に関連する。正しい飼養をすることにより、ペットが元気に健康となる。栄養価を付与する他に、フード組成物は腸内菌相の平衡に影響を与え、胃腸障害を生じたりまたは予防することができる。従って、胃腸管および健康な動物の消化プロセスに関する知識は実際の飼養プラクティスの理解に必須である。肉食動物としての猫や犬は消化管が短いことおよび食塊が速かに流動する点で特徴がある。

【0003】

猫および犬の胃腸マイクロフロラの構成成分としてバクテロイデス種、クロストリジウム種、エンテロバクテリアセ、ビフィドバクテリウム種、ラクトバチルス種、ストレプトコッカ

ス種、スタフィロコッカス種および酵母を回収することができる。

【0004】

この内因性菌相の数および組成は、年齢により異なるがやや安定であるが、食物によっては余り修正しない。胃の酸度、胆汁、腸のぜん動、および局所免疫は、ヒトや各種他の哺乳動物の小腸における菌相の調整に重要であると考えられる因子である。

しばしば犬や猫の胃腸疾患は細菌の過度の生育ならびに病原菌により生産される腸毒素の産生と関連する。

【0005】

最近の数年間、乳酸菌のいくつかの貴重な菌株およびプロバイオチック剤としてのその使用の可能性に研究は集中した。プロバイオチクスは腸の自然のマイクロフローラを保持することにより哺乳動物の健康を増進する生菌標品であると考えられる。プロバイオチクスは腸粘膜に付着し、腸管にコロニーを形成し、それにより有害な微生物がそこに付着することを防止すると考えられる。これらの作用に対する必要条件は、固有成形生存形で腸粘膜に到達しなければならず、特に胃の優勢な低pHの作用により殺されないことにある。特に、猫および犬の消化管の生理はヒトとは異なる。例えば、胃の平均pHは犬では約3.4および猫では4.2である。

10

【0006】

米国特許5,968,569号明細書はペットフードシリアルにプロバイオチック微生物を含ませることが開示されるが、そのものも、残留利用技術も、ペットの健康に具体的に意図される菌株に関し情報を供しない。

20

従って、ペットに特に適応し、およびペットの健康に有利な高いプロバイオチック性で選択した新規菌株を供すること、およびこれらの菌株をペットフード組成物に添加することに対するニーズがある。

【0007】

(発明の概要)

本発明の第1特徴によれば、生存能力およびペットの胃腸管にコロニーを形成する能力およびペットの健康に対し有利なプロバイオチック活性を働かせる能力について選択した、乳酸菌の新規プロバイオチック微生物が供される。

プロバイオチック菌株はラクトバチルス、ビフィズス菌またはエンテロコッカスから選択できる。

30

【0008】

プロバイオチック菌株はラクトバチルス・ルーテリ、ラクトバチルス・アシドフィラス、ラクトバチルス・アニマリシ、ラクトバチルス・ルミニス、ラクトバチルス・ジョンソニイ、ラクトバチルス・カゼイ、ラクトバチルス・パラカゼイ、ラクトバチルス・ラムノサス、ラクトバチルス・ファーマンタム、およびビフィドバクテリウム種、エンテロコッカス・フェシウムおよびエンテロコッカス種から成る群から選択できる。

【0009】

好ましい態様では、プロバイオチック菌株はラクトバチルス・ルーテリ(NCC2581; CNCM I-2448)、ラクトバチルス・ルーテリ(NCC2592、CNCM I-2450)、ラクトバチルス・ラムノサス(NCC2583; CNCM I-2449)、ラクトバチルス・ルーテリ(NCC2603; CNCM I-2451)、ラクトバチルス・ルーテリ(NCC2613、CNCM I-2452)、ラクトバチルス・アシドフィラス(NCC2628; CNCM I-2453)、ビフィドバクテリウム・アドレセンチス(例えば、NCC2627)、ビフィドバクテリウム種、NCC2657またはエンテロコッカス・フェシウムSF68(CNCIMB 10415)から成る群から選択する。

40

【0010】

新規菌株は約 $1.0E+04$ ~約 $1.0E+12$ cfu/動物/日、好ましくは $1.0E+05$ ~約 $1.0E+11$ cfu/動物/日、もっとも好ましくは $1.0E+07$ ~ $1.0E+10$ cfu/動物/日の任意量で使用できる。

50

【0011】

1 特徴では本発明はペットの胃腸管の病原菌によるコロニー形成と関連する疾患の治療および/または予防するための組成物の製造に、上記菌株および/またはその培養物の上澄および/またはその代謝産物の使用に関する。特に断わらない限り、「菌株」とはその培養物の上澄および/またはその代謝産物を含む。

【0012】

別の特徴では、本発明はペットの免疫応答を調整するために意図した組成物の製造のために、上記菌株および/またはその培養物の上澄および/またはその代謝産物の使用に関する。免疫応答を「調整」とするとは、上記菌株および/またはその培養物の上澄および/またはその代謝産物がペットの健康に重要な或る免疫機能を刺激するか、または免疫疾患、例えば炎症、アレルギーなどに潜在的に包含する他の免疫機能を調整する能力を有することを意味する。これらの免疫機能の刺激または調整は上記菌株および/またはその培養物の上澄および/またはその代謝産物の各種組合せを使用することにより達成できる。

10

【0013】

本発明はさらにペットの胃腸管、皮膚および/または被膜系または免疫系の健康を維持し、または改良する方法を供し、この方法は少なくとも1つの上記単離菌株を含有するペットフード組成物をペットに給与する工程を含む。

【0014】

さらに、本発明は病原菌によるペットの胃腸管のコロニー形成と関連する疾患の治療および/または予防方法を供し、この方法は少なくとも1つの本発明による単離菌株を含有するペットフード組成物をペットに給与する工程を含む。

20

【0015】

本発明はペットに免疫応答を調整する方法も供し、この方法は少なくとも1つの本発明による単離菌株を含有するペットフード組成物をペットに給与する工程を含む。

本発明はペットの加齢効果を改善または低減する方法も供し、この方法は少なくとも1つの本発明による単離菌株を含有するペットフード組成物をペットに給与する工程を含む。

【0016】

これらの選択した微生物はペットの胃腸管に、皮膚および/または被膜 (caot) に、その免疫系に、および加齢効果に対しペットに特別の有利なインパクトを有する。

これらの菌株サルモネラ・チフィウム、エッシャーヒア・コリ、シゲラ・ダイセンテリエーまたはペットにコロニーを形成する他の病原腸細菌または蠕虫 (トキソカラ種、原虫 (クリプトスポリジウム種、ジアルジア種、ペンタトリコモナス・ホミニス、エンタモエバ・ヒストリチカ、トキソプラズマ・ゴンジイ、・・・) のような寄生虫または酵母のような腸内病原体に特別の有利なインパクトを有する。

30

【0017】

フードと組合せて、これらの微生物は特に呈味性、消化および腸の健康、免疫機能および衛生状態 (これは糞容積の低減および少なくとも犬の糞の部分脱臭に寄与する) に有利なプロバイオチック効果を示す。すなわち、本発明の第2の特徴により、ペットフード組成物はペットに高いプロバイオチック活性を有し、これを摂取するペットの胃腸管を生存させ、およびコロニーを形成できる微生物を含む。

40

【0018】

従って、本発明は上記のように単離した少なくとも1つのプロバイオチック菌株および/またはその培養物の上澄および/またはその代謝産物を、摂取しうる支持体または医薬マトリックスと関連して含有する、ペットの胃腸管の健康のために意図したペットフード組成物に関する。

また、本発明は上記のように単離した少なくとも1つの菌株および/またはその培養物の上澄および/またはその代謝産物を、摂取しうる支持体または医薬マトリックスと関連して含有する、ペットの免疫応答を調整するためのペットフード組成物に関する。

【0019】

また、本発明は上記のように単離した少なくとも1つの菌株および/またはその培養物の

50

上澄および/またはその代謝産物を、摂取しうる支持体または医薬マトリックスと関連して含有する、ペットの加齢効果を改善または低減するためのペットフード組成物に関する。

最後に、本発明は上記のように単離した少なくとも1つの菌株および/またはその培養物の上澄および/またはその代謝産物を摂取しうる支持体または医薬マトリックスと関連して含有する、ペットの皮膚および/または被膜の健康のためのペットフード組成物に関する。

【0020】

態様では、摂取しうる支持体は栄養的に均衡のとれたペットフード組成物を含む。この組成物は好ましくは単離菌株、その培養物の上澄および/またはその代謝産物を、組成物を完全食としてペットに給与する場合、予防効果を供するのに有効な十分量を含有する。

10

【0021】

(発明の詳細な記載)

以下の記載内で、略語 c f u (「コロニー形成単位」) は寒天プレート上の微生物計数により示される細菌細胞数を示す。

さらに、「NCC」はネスレ・カルチャー・コレクションを示す(ネスレ・リサーチセンター、ローザンヌ、スイス)。

【0022】

本発明の第1目的に関し、猫および犬のふんから単離した20のラクトバチルスおよび18のビフィズス菌を科学技術的および生理学的パラメータに関し選別し、選択した。

20

プロバイオチックの潜在的適用に対する最初の選別はイン・ピトロで(例1および2参照)、生育特性、異なるpHの胃の酸性度に対しおよび猫や犬に見出されそうな十二指腸に存在する胆汁塩の異なる濃度に対する許容性について行なった。

さらに、2つの異なる極低温保護媒体に凍結乾燥した細胞が良好に生存することは、促進貯蔵試験により示されるように4 および20 で明確に実証された。

【0023】

これらの菌株は短い世代期間、その定常相中の高いカウント値(1.0E+08 c f u / m l 以上)、接種後8時間および24時間の高い数値の安定性、凍結乾燥次いで貯蔵条件に対する安定性、十二指腸に見出される生理的胆汁濃度(2%胆汁)に対する耐性および4%までの胆汁の存在で生育する場合のその阻害率の低い点で特徴がある。さらにDNA

30

【0024】

猫および犬の健康のために意図した菌株は2.0%までの胆汁塩の存在で少なくとも1.0E+06 c f u / m l まで生育できる。該菌株は約3.4~約4.2のpH範囲で約2時間後少なくとも1.0E+06 c f u / m l まで生育できる。

本発明による菌株はラクトバチルス・ルーテリ、ラクトバチルス・アシドフィラス、ラクトバチルス・アニマリシ、ラクトバチルス・ルミニス、ラクトバチルス・ジョンソニイ、ラクトバチルス・カゼイ、ラクトバチルス・パラカゼイ、ラクトバチルス・ラムノサス、ラクトバチルス・ファーメントム、ビフィドバクテリウム種、エンテロコッカス・フェシウム、エンテロコッカス種から成る群から選択できる。

40

【0025】

次の菌株ラクトバチルス・ルーテリNCC2581、ラクトバチルス・ラムノサスNCC2583、ラクトバチルス・ルーテリNCC2592、ラクトバチルス・ルーテリNCC2603、ラクトバチルス・ルーテリNCC2613、およびラクトバチルス・アシドフィラスNCC2628はブダペスト条約下で国立微生物カルチャーコレクション(フランス、パリ)に2000年4月19日に、それぞれ次の照合番号CNCM I-2448、CNCM I-2449、CNCM I-2450、CNCM I-2451、CNCM I-2452およびCNCM I-2453にて寄託した。これらの寄託菌の入手性に対するすべての制限はこの出願に対する優先権を請求する本出願または別の出願の最初の公開で撤回される。

50

【0026】

選択菌株の生化学的特性

- ・ラクトバチルス・ルーテリ CNCM I - 2448
- グラム陽性菌、運動性なし、孢子形成せず
- かなり短く厚い小ロッド
- ヘテロ発酵代謝を有する微好気性菌、L (+) および D (-) 乳酸の産生、
- カタラーゼ (-)、グルコースから CO₂ の産生、アルギニンの加水分解 = NH₃ 産生
- 5% および 10% NaCl で生育
- 糖：L - アラビノース、ガラクトース、D - グルコース、ラクトース、サッカロース、D - ラフィノースを発酵 10
- ・ラクトバチルス・ラムノサス CNCM I - 2449
- グラム陽性菌、運動性なし、孢子形成せず
- かなり短く厚い小ロッド
- ヘテロ発酵代謝を有する微好気性菌、L (+) 乳酸の産生
- カタラーゼ (-)
- Lb . ラムノサスに一般的なすべての糖を発酵
- ・ラクトバチルス・ルーテリ CNCM I - 2450
- グラム陽性菌、運動性なし、孢子形成せず
- かなり短く厚い小ロッド
- ヘテロ発酵代謝を有する微好気性菌、L (+) および D (-) 乳酸の産生 20
- カタラーゼ (-)、グルコースから CO₂ の産生、アルギニンの加水分解 = NH₃ の産生
- 5% および 10% 食塩で生育
- 糖：L - アラビノース、ガラクトース、D - グルコース、D - キシロース、ラクトース、サッカロース、D - ラフィノースを発酵
- ・ラクトバチルス・ルーテリ CNCM I - 2451
- グラム陽性菌、運動性なし、孢子形成せず
- かなり短く厚い小ロッド
- ヘテロ発酵代謝を有する微好気性菌、L (+) および D (-) 乳酸の産生
- カタラーゼ (-)、グルコースから CO₂ の産生、アルギニンの加水分解 = NH₃ 産生
- 5% および 10% NaCl により生育 30
- Lb . ルーテリに一般的なすべての糖を発酵
- ・ラクトバチルス・ルーテリ CNCM I - 2452
- グラム陽性菌、運動性なし、孢子形成せず
- ヘテロ発酵代謝を有する微好気性菌、L (+) および D (-) 乳酸の産生
- カタラーゼ (-)、グルコースから CO₂ の産生、アルギニンの加水分解 = NH₃ の産生
- 糖：L - アラビノース、D - グルコース、ラクトース、サッカロース、D - ラフィノースを発酵
- ・ラクトバチルス・ルーテリ CNCM I - 2453
- グラム陽性菌、運動性なし、孢子形成せず
- かなり短く厚い小ロッド 40
- ホモ発酵代謝を有する微好気性菌、L (+) および D (-) 乳酸の産生
- カタラーゼ (-)
- 糖：D - グルコース、ラクトース、サッカロース、D - ラフィノースを発酵

【0027】

猫から3つのラクトバチルス (NCC 2581、NCC 2592、NCC 2583)、犬から3つのラクトバチルス (NCC 2603、NCC 2613、NCC 2628)、猫から1つのピフィズス菌 (NCC 2627) および犬から1つのピフィズス菌 (NCC 2657) から単離した菌類を、さらにペットの潜在的プロバイオチック活性について試験した (例3および4参照)。

【0028】

別の態様では、本発明はペットの健康を改良し、または維持しうるフード組成物を製造するために、上記菌株の使用に関する。

これらは生存形、または不活性形で、カルチャーの上澄またはその画分（例えば細胞壁、ペプチドグリカン、細胞質、精製タン白、機能性代謝産物、生物活性分子）として使用できる。

これらは約 $1.0 \text{ E} + 04 \text{ c f u} / \text{ g}$ ~ 約 $1.0 \text{ E} + 11 \text{ c f u} / \text{ g}$ 、好ましくは $1.0 \text{ E} + 05 \text{ c f u} / \text{ g}$ ~ 約 $1.0 \text{ E} + 10 \text{ c f u} / \text{ g}$ 、もっとも好ましくは $1.0 \text{ E} + 06 \text{ c f u} / \text{ g}$ ~ $1.0 \text{ E} + 09 \text{ c f u} / \text{ g}$ の量で使用するのが好ましい。

【0029】

好ましい態様では、これらはペットフードの品質を改良するために補助食品として使用でき、約 $1.0 \text{ E} + 04 \text{ c f u} / \text{ g}$ ~ 約 $1.0 \text{ E} + 11 \text{ c f u} / \text{ g}$ の量で含むことができる。補助食品として、これらはカプセル化することができ、または粉末形で、含水または乾燥の主食と一緒に、または別に包装して供することができる。例として、本発明により選択した微生物、その培養物の上澄の成分または部分または選択した代謝産物を含有する粉末は粉末形、またはゲルまたは脂質または他の適当なキャリアで小袋に包装できる。これらの別々に包装したユニットは使用者の指示により主食と一緒に、または主食またはオヤツと一緒に使用する複数 - ユニット包装で供することができる。別の例では、プロバイオチック菌株は複数 - 区画包装ユニットで第2摂取成分、例えば含水または適度の水分含量のチャンキーミールまたは乾燥キブルのミール寸法バッチの柔軟な小袋形と一緒に供することができる。小袋の第1区画はプロバイオチック菌株を、第2の別の密封区画は第2摂取成分を含有する。

【0030】

これらの選択した微生物はペットにその胃腸管、その皮膚および/または被膜、その免疫系、歯科または口腔の健康、その骨および加齢効果で特に有利なインパクトを有する。これらはまたフードの呈味性、消化、免疫機能および衛生状態（糞容積の減少および犬の糞の部分脱臭）をペットで改良することも分かった。

【0031】

本発明は摂食支持体または医薬マトリックスと関連して上記特性を有する少なくとも1つのプロバイオチック菌株を含有する、ペットの健康を改良または維持するペットフード組成物にも関する。

【0032】

上記特性を有する少なくとも1つの菌株および/またはその培養物、上澄またはその画分および/またはその代謝産物は通常の食事のサプリメントとして、または栄養的に完全なペットフードの成分としてペットに与えることができる。

【0033】

本発明による栄養的に完全なペットフード組成物は粉末型、乾燥形またはウェットな冷却したまたは貯蔵安定性のペットフード製品でよい。これらのペットフードは微生物活性を望む場合、微生物の生存を確保するために注意することを条件として当業者に既知の方法により製造できる。菌株および/またはその発酵培地とは別に、これらのペットフードは任意の1つ以上の澱粉源、タン白源および脂質源を含むことができる。

【0034】

適当な澱粉源は例えば、コーン、米、小麦、大麦、カラス麦、大豆のような穀物および豆類およびこれらの混合物である。

適当なタン白源は任意の適当な動物または植物タン白源、例えば肉およびミール、家禽ミール、魚粉、濃縮大豆タン白、乳タン白、グルテンなどから選択できる。老動物では、タン白源は高品質タン白を含有するのが好ましい。

適当な脂質源は肉、動物脂肪および植物脂肪である。

【0035】

澱粉、タン白および脂質源の選択は動物の栄養要求、呈味性の考慮、および適用製品の型により主として決定される。老ペットの場合、ペットフードは若いペットのペットフード

10

20

30

40

50

より比例的に少ない脂肪を含有することが好ましい。さらに澱粉源は1つ以上の米、大麦、小麦およびコーンを含むことができる。

さらに、他の各種成分、例えば糖、塩、スパイス、調味料、ビタミン、ミネラル、フレーバ付与剤、脂肪などは必要に応じてペットフードに添加することもできる。

【0036】

乾燥ペットフードの場合、ベーキングその他の適当な方法は使用できるが、適当な方法は押出し加熱である。押出し加熱する場合、乾燥ペットフードは通例キブルの形で供される。プレバイオチック炭水化物を使用する場合、このプレバイオチックは加工前乾燥ペットフードの他の成分と混合できる。適当な方法はヨーロッパ特許出願0850569号明細書に記載される。プロバイオチック微生物を使用し、最終製品に活性を望む場合、微生物は乾燥ペットフード上に被覆し、またはフード内に充填することが最善である。適当な方法はヨーロッパ特許出願0862863号明細書に記載される。微生物の生存が必要でない場合、押出し前のミックスに望むようにその培養物の上澄または代謝産物を添加できる。

10

【0037】

ウェットフードの場合、米国特許4,781,939号および5,132,137号明細書に記載される方法は模造肉製品の製造に使用できる。チャンク型製品の他の製造方法、例えば蒸気オープン加熱も使用できる。別法では、ローフ型製品は適当な肉材料を乳化して肉エマルジョンを製造し、適当なゲル化剤を添加し、缶または他の容器に充填前肉エマルジョンを加熱することにより製造できる。乾燥ペットフードの製造の場合におけるように、選択したプロバイオチック種の生存が必須でない場合、調理または加熱前、または製造方法の任意の適当な、または有利な工程で飼料ミックスに添加できる。

20

【0038】

ペットフードのプレバイオチック量は好ましくは約20重量%未満、一層好ましくは約10重量%未満である。例えば、プレバイオチックはペットフードの約0.1~約5重量%を含むことができる。プレバイオチ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~約10重量%、一層好ましくは約1~約5重量%から成るよう含むことができる。

【0039】

ペットフードは長鎖脂肪酸のような他の活性剤を含有できる。適当な長鎖脂肪酸は - 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エン酸を含む。魚油はエイコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸の適当な源である。ルリヂサ油、黒スグリ種子油、および月見草油は - リノール酸の適当な源である。ペニバナ油、ヒマワリ油、コーン油および大豆油は適当なリノール酸源である。

30

【0040】

必要な場合、ペットフードは栄養的に完全であるようにミネラルおよびビタミンを補充する。

さらに、望む場合、菌株は例えば、糖マトリックス、脂肪マトリックスまたは多糖類マトリックスでカプセル化することができる。またヨーロッパ特許862863号明細書に記載のように被覆することもできる。

40

【0041】

新規プロバイオチック菌株はペットフードが好ましくは約 1.0×10^4 ~ 約 1.0×10^{10} のプロバイオチック微生物細胞/g/ペットフード、一層好ましくは約 1.0×10^6 ~ 約 1.0×10^8 プロバイオチック微生物細胞/g/ペットフードを含有するように使用することが好ましい。好ましくは約0.02~約6重量%、もっとも好ましくは約1~約6重量%を含有する。

【0042】

有利な効果を得るためにペットが消費するペットフード量はペットの大きさ、ペットの型、およびペットの年齢による。しかし、少なくとも1つの乳酸菌菌株の約 1.0×10^3 ~ 1.0×10^{14} cfuの1日量を供するペットフード量および/または等量の発酵培地

50

は通例適する。好ましくは犬の場合約 $1.0 \times 10^9 \sim 1.0 \times 10^{11}$ cfu / 日または猫の場合 $1.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^{10}$ cfu / 日が与えられる。

【0043】

本発明組成物は高いプロバイオチック活性を有し、および/またはペットの健康な消化機能の改良および/または維持に、および胃腸管、皮膚および/または被膜、および/または免疫系、ペットの健康を改良し、維持するために特に有効であることが分かる。この組成物は猫および犬の加齢効果に有利なインパクトも有する。

【0044】

本発明はここに記載する特定態様により範囲を限定されるものではない。例は図の簡単な記載が先行する。

10

図 1

マイトジエンまたはホルボルエステルにより刺激した犬の末梢血液単核細胞 (PMBC) のリンパ球増殖。L・アシドフィラス NCC 2628 を含み (黒色バー) または含まない (白色バー) 4 週給与した成犬からの PMBC を図に示す用量 ($\mu\text{g/ml}$) の異なるマイトジエンにより刺激した。マイトジエンは PHA (フィトヘマグルチン)、ConA (コンカナバリン A)、PWM (ポークウィードマイトジエン) であり、およびホルボルエステルは PMA / イオノ (ホルボルミリスチレートアセテートおよびイオノマイシン) である。 $^* = P < 0.05$ 、スチューデント t 試験。

図 2

異なるプロバイオチック菌株により刺激した犬の白血球が生産したシトカイン。通常の成犬からの白血球はペットから単離後 18 時間の異なるラクトバチルス菌株により刺激した。対照培養は培地のみ (負の対照) またはヒトのラクトバチルス単離物 ST11 (正の対照) を含有した。シトカインの同定は RT-PCR により行なった。その定量はエチジウムブロミド - 歪のアガロースゲルを走査し、NIH イメージソフトウエアを使用して各バンドの相対的ピクセルを測定することにより行なった。結果は任意ユニットで 2 つの別個の試験の平均値として表わす。

20

(A) IL-12、(B) IL-10、(C) IFN、(D) TGF。

【0045】

例

例 1 菌株および培養条件

30

多数の菌株 (ネスレ・カルチャー・コレクション = NCC から) は猫および犬に使用するためその潜在的プロバイオチックを選別した。特に、生育可能性、次に貯蔵するための凍結乾燥に対する耐性、胃の酸度および猫や犬の胃腸管に見出される胆汁塩の各種濃度に対する耐性は猫および犬の糞から単離した 20 のラクトバチルスおよび 18 のビフィズス菌に対し評価し、表 1 に示す。

表 1 試験のために選択した細菌のコードおよび特性

ラクトバチルス:

NCC- コード	CNCM- コード	コード	動物種 起源	摂取食物 の型	アルギニン からの NH ₃	乳 酸	API50CH による同定
2578	--	LB1-1	猫	混 合	-	L	L. アニマリス/ルミニス
2581	I-2448	LB1-2	猫	混 合	+	D/L	L. ルーテリ
2583	I-2449	LK1-1	猫	混 合	-	D/L	L. ラムノサス
2586	--	LK1-2	猫	混 合	+	D/L	L. ルーテリ
2590	--	LH2-1	猫	乾 燥	-	D/L	L. アシドフィラス
2592	I-2450	LR1-1	猫	混 合	+	D/L	L. ルーテリ
2594	--	LS1-1	猫	混 合	-	L	L. アニマリス/ルミニス
2597	--	LA2-5	犬	含 水	-	L	L. アニマリス
2600	--	LC2-5	犬	含 水	-	D/L	L. ファーメンタム/ルーテリ
2603	I-2451	LE2-5	犬	含 水	-	L	L. ルーテリ
2606	--	LF2-6	犬	乾 燥	+	D/L	L. ルーテリ
2609	--	LH2-6	犬	乾 燥	+	D/L	L. ルーテリ
2613	I-2452	LH2-7	犬	乾 燥	+	D/L	L. ルーテリ
2616	--	L1-1-1	犬	乾 混 合	+	D/L	L. ルーテリ/ファーメンタム
2619	--	L1-1-2	犬	混 合	-	D/L	L. アシドフィラス
2621	--	L3-1-2	犬	混 合	-	L	L. アニマリス/ルミニス
2625	--	L7-1-3	犬	混 合	-	L	L. アニマリス/ルミニス
2628	I-2453	LA1-5	犬	混 合	-	D/L	L. アシドフィラス
2632	--	LA1-6	犬	混 合	+	D/L	L. ルーテリ/ファーメンタム
2636	--	LB1-5	犬	混 合	-	L	L. アニマリス/ルミニス

10

20

ビフィズス菌:

NCC コード	コード	動物種 起源	摂取食事 の型	種
2623	CO2-5	猫	乾 燥	ビフィドバクテリウム
2627	CG2-5	猫	乾 燥	Bif. アドレセンチス
2630	CH2-5	猫	乾 燥	Bif. アドレセンチス
2633	CE3-1	猫	乾 燥	Bif. アドレセンチス
2635	CC1-5	猫	混 合	Bif. ロンガム/スイス
2637	CE4-1	猫	乾 燥	Bif. アドレセンチス
2640	CB3-5	猫	乾 燥	Bif. アドレセンチス
2643	CJ2-6	猫	乾 燥	Bif. アドレセンチス
2647	D5-3-5	犬	含 水	Bif. アドレセンチス
2651	D8-3-6	犬	乾 燥	Bif. アニマリス/ラクティス
2654	D9-3-7	犬	乾 燥	Bif. アニマリス/ラクティス
2657	D6-3-6	犬	乾 燥	ビフィドバクテリウム
2660	D7-3-5	犬	乾 燥	ビフィドバクテリウム
2663	DB3-1	犬	乾 燥	ビフィドバクテリウム
2667	DC3-1	犬	乾 燥	ビフィドバクテリウム
2671	DA1-3	犬	混 合	Bif. アニマリス/ラクティス
2674	DA3-1	犬	乾 燥	ビフィドバクテリウム
2677	DD3-1	犬	乾 燥	Bif. アドレセンチス

30

40

20のラクトバチルスおよび18のビフィズス菌のすべては、表1に示すように異なる食物を続けた猫および犬から単離した。最初の同定は形態学的および生理学的特徴により測定した。API-50CHおよびRapid-1D32Aシステム

(BioMérieux)

をそれぞれラクトバチルスおよびビフィズス菌に対し使用した。純粋な菌株は凍結し、-80でネスレ・カルチャー・コレクション(NCC)に寄託した。

50

すべての細菌は検定に対しプロス - 培地に培養した。各再活性化した菌株からの試料は 1 ml - 極低温保護培地 (40%グリセロール + 60%LL) に -80 で貯蔵した。カルチャーは1週1回10ml - 生育培地および37 で嫌気培養した1%接種物をベースに継代培養して維持した。

ラクトバチルスはMRSで18時間生育させた。ビフィズス菌はMRS + 0.05% (W/V) L - システイン塩酸塩 (MRS - C) で32時間、またはBH1 + 0.05% L - システイン塩酸塩 (BH1 - C) で48時間のいずれかで5%接種で出発して生育した。すべてのカルチャーは異なる転移間で+4 で貯蔵した。嫌気生活は一般に水素 - 炭素二酸化物嫌気系 (Gas Pak, Becton Dickinson, USA) を使用して得られた。ビフィズス菌はその貯蔵期間中常にこれらのジャーに保存した。

10

【0046】

例2 菌株の選択

このイン・ビトロ選別は生存細胞の工業的適用、抑制または有害な胃腸条件に対する生育能およびそのゲノムの多様性に対する生産特徴に基づいた。これらの非特性菌株の菌株多様性又はゲノム類似性はRAPDおよびリボタイプを使って考慮した。

材料および方法

・細菌の生育

多くの細胞を急速に生産しうる菌株を同定しなければならない。その細菌生育サイクルは短かい誘導期、短かい世代時間、最高の計数および永い定常期により特徴がある。従って、菌株はもっとも重要な特徴に相当する3つの可変因子、すなわちその誘導期の長さ、その世代時間 (時間で)、およびその最高細胞計数値を考慮して比較した。

20

ラクトバチルスの場合

37 で予備培養した200ml MRSプロスは1%の新しい継代培養で接種した。1mlの試料は接種後8時間で毎時間ごとに集めた。最終試料は24時間後に採取した。1mlの各試料は計数のためTSに10倍連続希釈した。カルチャーはMRS寒天 (流しこみ - プレーティング技術) に、嫌氣的に、37 で48時間生育した。30 ~ 350のコロニー数を有するすべてのプレートはコロニー形成単位 (cfu) / カルチャーmlとして記録し、従って計数に対し考慮した。

(MRS - C) 中のビフィズス菌

予備試験で、すべての菌株はMRS - CおよびTRYGプロスの生育を24時間計数した。結果はcfu/mlで表わした。生育カーブはMRS - Cに生育する場合0、4、12、24、32および48時間後、ラクトバチルスに対し記載されるプロトコルにより細胞数を測定して確定した。継代培養培地および生育培地の脱ガス最高化の影響を測定するために、この検定を実施した。

30

- ・継代培養から、BH1 - Cに4 で48時間貯蔵し、次いでMRS - Cに接種し、
- ・継代培養から、BH1 - Cに4 で48時間貯蔵し、十分に脱ガスしたMRS - Cに接種し (培地を2回オートクレーブ処理し、直接嫌気性ジャーに貯蔵する最高化した酸素除去)、

- ・新しい継代培養からMRSに、次いで試験前十分に脱気し、嫌気条件下で貯蔵したMRS - Cに接種する。

40

表2 細菌生育に対する試験培地

ラクトバチルスの場合			
基質	組成	pH	参照
MRS	MRS糖を含まず (Difco) グルコース 蒸留水	35 g.l ⁻¹ 20 g.l ⁻¹ 1,000 ml	6.5 デマンら (1960)
ビフィズス菌の場合			
基質	組成	pH	参照
MRS-C	MRS糖を含まず (Difco) グルコース L-システインHCl (Fluka) 蒸留水	35 g.l ⁻¹ 20 g.l ⁻¹ 0.5 g.l ⁻¹ 1,000 ml	6.0 パシエルおよび ナイフェル (1996)
TPYG (トリプチカーゼ ペプトン 酵母 エキス)	トリプチカーゼ (BBL) ペプトン (Difco) 酵母エキス (Difco) グルコース (Merck) L-システインHCl (Fluka) 蒸留水	50 g.l ⁻¹ 5 g.l ⁻¹ 20 g.l ⁻¹ 4 g.l ⁻¹ 1 g.l ⁻¹ 1,000 ml	7.0

10

20

固体培地はDifco Bacto寒天(15g/l)の添加により得た。培地は121で15分オートクレーブ処理した。ビフィズス菌用液体培地は嫌気条件下で貯蔵し、または使用前脱気した。

【0047】

胃のpHおよび胆汁に対する耐性

摂取する場合、微生物は動物の胃腸管で有利な活性を示しうる胃および十二指腸状態を残存せねばならない。胃のpHおよび胆汁塩は細菌菌相を調整する責任を有する主要成分である。従って、酸度および胆汁に対する菌株の耐性を試験しなければならない。

猫および犬の消化管の生理はヒトとは異なる。平均pHは犬および猫でそれぞれpH3.4および4.2である。再構成したペットの胆汁は試験用に推奨された(表4)。小腸における胆汁濃度は食物を摂取する場合0.5~2%の範囲で変動する。

30

猫および犬に見出される極限pH値により、pH2.6における10分後、pH3.4(犬から単離した菌株)またはpH4.2(猫から単離した菌株)の2時間後の生存数は1.0E+06cfu/ml以下であってはならない。

・胃のpHに対する耐性

すべてのラクトバチルスはMRSプロスに1%で接種し、37で一晩嫌氣的に生育させた。ビフィズス菌はBH1-Cに5%接種し、37で48時間嫌気条件下で生育した。カルチャーは2ml反応管(エッペンドルフ)に分配し、3,500xg/10分/20で遠心分離した。細胞はリンゲル液で3回洗浄した。胃の酸性条件に対する耐性は塩酸(メルク)により調整したpH値2.6、3.4および4.2を有する3つの模擬胃液でイン・ピトロで試験した。使い捨て濾過製品(ナルゲン)をすべての濾過-滅菌に使用した。各細菌サスペンションの生存は1.5mlの0.5%NaCl溶液を補足した一連の5ml模擬胃液(各種pH)に1mlを添加して研究した。

40

試料は37に培養し、生存微生物数を次により算定した。

・pH2.6胃液で0、1、5、10分

・pH3.4(犬から単離した菌株に対し)または4.2(猫から単離した菌株に対し)のいずれかのpHを胃液が有する場合0、1、30、60、120、180分。

試料はリン酸塩緩衝液(pH7.0)に希釈し、MRS-C寒天上に注加して計数した。

表3 模擬胃液

50

基質名	組成	PH
胃液	0.3% w/v 豚ペプシン (シグマ) 0.5% w/v NaCl HCl (メルク): pH調整用	2.1, 3.4 or 4.2

・胆汁塩に対する耐性

各種濃度の再構成ペット胆汁の存在で18時間生育させたラクトバチルス生存数の進展を測定した。

2つの生存数はその \log_{10} の偏差が0.25以上である場合有意に異ると考えられた。各菌株は2つの変数により特徴化された、

- ・対照と有意差が見出されなかった場合、試験した最高胆汁塩濃度
- ・生育培地の胆汁濃度が増加する場合、生存能力の減少割合。

胆汁濃度が1%段階で上昇する場合、その生存数が \log_{10} より大きい損失に特徴がある菌株は胆汁に敏感であると考えられた。0および2%胆汁の存在で生育する細胞間に $1 \log_{10}$ 以上、および胆汁の付加的%(2%以上)につき $1 \log_{10}$ 以上の減少は許容しうると考えられた。さらに、2%までの胆汁塩の存在で生育する場合、 1.0×10^6 cfu/ml以上を産生しうる菌株のみが、胃腸管に効果を産出するために選択されるべきである。

猫および犬から再構成したペット胆汁は表4に示すように調製し、使用前に濾過滅菌した。最初の試験では、ラクトバチルスはMRSプロスに37で24時間嫌氣的に生育し、追加の18時間、新しいMRSプロスプラス0, 0.1, 0.3, 0.5, 1, 2, 4%滅菌再構成ペット胆汁に移した。試料は計数のためTSに10倍連続希釈した。希釈液 1.0×10^{-3} および 1.0×10^{-5} はWASP(「ウイットリオートマチックスパイラルプレーター」、ドン・ウイットリ・サイエンティフィック社、英国)を使用してMRS寒天に注入して平板とした。乾燥する場合、プレートはさかさにし、37で48時間嫌気ジャー内で培養した。

フロックら(1972)は対照管生長と比較して試験で少なくとも $2 \log$ 減少した場合抑制は有意であると規定した。これに基づいて、最初の検定で胆汁濃度に敏感であるすべてのラクトバチルスおよび4%胆汁に耐性の2つのラクトバチルスは0, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4%胆汁の存在で同様に試験した。第2試験は反復能力を目的とし、生存菌数が濃度の増加につれて劇的に減少するかどうかを調べた。

他方、これらの菌株は18時間中胆汁に耐性であることを指摘した。生育カーブは誘導期および生育割合が影響を受けるか否かを決定するために胆汁塩の存在で試験した。検定は早期の生育測定に対し記載されたプロトコルにより、1%再構成ペット胆汁を補足したMRSプロスに生育するラクトバチルスにより行なわれた。

ビフィズス菌はMRS-Cプロスと0, 1, 2, 3および4%再構成ペット胆汁を使用して継代培養し、32時間/37/嫌氣的に生育させた。同じ計数方法は 1.0×10^{-3} , 1.0×10^{-4} および 1.0×10^{-5} の希釈液でラクトバチルスに対するように行なった。

表4 再構成ペット胆汁

化合物	$\mu\text{mol/ml}$	mg/ml	% 合計
タウロデオキシコレート (シグマ)	14.00	7.00	18.0
タウロコレート (シグマ)	59.00	30.40	74.0
胆汁酸塩 (フルカ)	0.14	0.06	0.2
タウラケノデオキシコレート (シグマ)	6.90	3.45	8.0

・ラクトバチルス菌株の凍結乾燥およびその後の貯蔵に対する生存

生存の進展を評価した。1.0E+05 cfu/mlより劣る生存菌数は低すぎると考えられた。

各菌株の場合、新しいサブカルチャーを3%で200ml MRSプロスに接種した。カルチャーは37で16時間生育した。未通気条件(閉鎖容器)は本質的に嫌気性であるとみなした。生存菌数は上記混釈平板法を使用して計数した。

カルチャーは3,500xg/+7/20分で遠心分離して(RC3Cソルバル・インスツルメント・セントリフュージ)収穫し、10mlの2つの異なる極低温保護媒体に再懸濁させた。各菌株は2つの異なる極低温保護剤に再懸濁した。濃厚細菌サスペンションは計数し(混釈平板法)、びん(0.5ml/アンプル)に分配した。試料は液体窒素で-196で凍結し、18時間真空乾燥した。凍結乾燥後、窒素は凍結乾燥機空気アドミクタンズバルブを通して導入し、すべてのアンプルは密封した。すべての小びんは+4および+20で6ヶ月貯蔵した。生存細胞数/アンプル(各細菌およびサスペンション媒体)は毎月測定した。

【0049】

結果

猫および犬に対し可能性を有するプロバイオチックの選択の枠内で、その生育可能性、凍結乾燥し、その後の貯蔵に対する耐性、猫および犬の胃腸管に見出される胃のpHおよび胆汁濃度に対する耐性に基づいて20のラクトバチルスおよび18のビフィズス菌のこのイン・ビトロ選別の結果は表5に示す。

20のラクトバチルスは現在の研究でこれらが満たす基準に関し分類した。4つの菌株はその生育特性、胃のpHに対する耐性、胆汁耐性およびその凍結乾燥後の貯蔵中の生存に関し良好な結果を示した。4つの菌株はL.ルーテリNCC2581(CNCM I-2448)、L.ルーテリNCC2592(CNCM I-2450)、L.ルーテリNCC2603(CNCM I-2451)およびL.ルーテリNCC2613(CNCM I-2452)であった。次の特徴をまとめた。

- ・世代時間はMRSに生育する場合1時間未満であった。
- ・誘導期は短かった(2時間未満)。
- ・細菌数は生育サイクルの定常期中高く(1.0E+08 cfu/ml)、接種後8および24時間安定であった。
- ・菌株は凍結乾燥および4および20でその後6ヶ月の貯蔵を通して安定であった。
- ・猫および犬の胃腸管に見られそうな極限胆汁濃度に耐性であった(2%)。
- ・培地に4%までの胆汁の存在で有害な抑制はなかった。
- ・菌株はpH2.6に少なくとも10分耐性のあることを示し、1.0E+08 cfu/mlより高い量で残存した。
- ・菌株は少なくとも2時間胃の平均pHに耐性であった。

従って猫から単離した2つのラクトバチルス(L.ルーテリNCC2581およびL.ルーテリNCC2592)および犬から単離した2つ(L.ルーテリNCC2603およびL.ルーテリNCC2613)はプロバイオチック活性の可能性に対する研究に選択された。菌株NCC2581、NCC2592、NCC2603およびNCC2613はAPI50CH同定によりL.ルーテリと同定された。しかし、リポタイピングはNCC2581およびNCC2592が非常に近いパターンを有すること、およびNCC2603およびNCC2613は、こうしてありそうな密接な関係を示すことを現わした。菌株NCC2581は非常に良好な生育特性を有し、NCC2603はNCC2613以上に良好な胆汁耐性を有した。

猫の糞から単離した8つのビフィズス菌に関する結果はその生育特性、その胃のpHおよびその胆汁感受性の機能の選択が出来た。菌株NCC2623は望む特性を1つも有せず、従ってそれ以上の研究に推せんされなかった。他方、菌株NCC2627はすべての基準を満たした、すなわち

- ・世代期間はMRS-Cに生育する場合1時間未満であった。

- ・誘導期はラクトバチルスと同様に短かった。
- ・計数は高く、生育サイクルの定常期中安定であった。
- ・菌株は猫および犬の胃腸管に見られがちな極限胆汁濃度に耐性であった(2%)。
- ・培地の4%までの胆汁の存在で有意な抑制はなかった。
- ・菌株はpH2.6に少なくとも10分耐性を示し、 1.0×10^6 cfu/ml以上の高量で残留した。
- ・菌株は少なくとも2時間胃の平均pHに対し安定であった。

菌株NCC2627はNCC2623およびNCC2635より一層強い耐性があったが、これらの3つの菌株はリボタイピングにより密接なパターンを有し、従ってありうる密接な関係を示す(2つの制限酵素による消化、EcoRIおよびEcoRV)。

10

犬から単離した10のビフィズス菌はリボタイピングにより特徴化される場合2つの異なるパターンのみを示した。従って、胆汁耐性検定は4つの菌株(各グループから2つ)、すなわちNCC2657、NCC2660、NCC2671およびNCC2677によってのみ行なった。これらの4菌株はすべての胆汁の最高濃度に対し耐性であることがイン・ビトロ(2%胆汁)で見出すことができ、菌株NCC2660およびNCC2657は4%胆汁の最高値処理する場合生存数は減少しなかった。結果として、犬の糞から単離したすべてのビフィズス菌は高濃度の胆汁にむしろ耐性である。

生育特性に関し、これらの10の細菌はそれにより2つの群に分割できる、すなわち、

- ・胆汁に耐性で良好な生育特性を有する菌株、NCC2657、NCC2651、NCC2663およびNCC2667。
- ・胆汁に耐性であり、工業的生産の最高化に必要な生育特性を有する菌株、NCC2660、NCC2671、NCC2677、NCC2647、NCC2654およびNCC2674。

20

猫および犬の消化中見出された極限の胃pHに対する耐性に関する完全な結果により、一層良い菌株の測定はそれ以上の研究で選択できるであろう。菌株NCC2651のみはpH耐性に対する選択基準を満たさなかった。

表5 要約

NCC コード	コード	生育基準	胃液に対する耐性	胆汁に対する耐性	凍結乾燥後の安定性
2578	LB1-1	+	+	-	-
2581	LB1-2	+	+	+	+
2583	LK1-1	+	+	+	-
2586	LK1-2	-	+	-	-
2590	LH2-1	+	+	+	-
2592	LR1-1	+	+	+	+
2594	LS1-1	-	+	-	-
2597	LA2-5	-	+	+	+
2600	LC2-5	-	-	+	-
2603	LE2-5	+	+	+	+
2606	LF2-6	-	+	+	-
2609	LH2-6	+	+	+	-
2613	LH2-7	+	+	+	+
2616	L1-1-1	-	+	+	-
2619	L1-1-2	-	+	+	-
2621	L3-1-2	+	+	-	+
2625	L7-1-3	+	+	-	+
2628	LA1-5	+	+	+	-
2632	LA1-6	-	+	+	-
2636	LB1-5	-	+	+	+

30

40

現在の結果に関し、猫から単離した1つのビフィズス菌株および犬から単離した3つのビ

50

フィズス菌株（それぞれNCC2627、NCC2657、NCC2663およびNCC2667）は選択できる。

表6 希釈培地

基質	組成		pH
リン酸塩緩衝液	K ₂ PO ₄ KH ₂ PO ₄ 蒸留水	72 g.l ⁻¹ 48 g.l ⁻¹ 1,000 ml	7.0
リンゲル液	NaCl 蒸留水	9 g.l ⁻¹ 1,000 ml	7.0
TS(トリプトン食塩水)	NaCl トリプトン 蒸留水	8.5 g.l ⁻¹ 1 g.l ⁻¹ 1,000 ml	7.0

9 ml 一部分を管に分配し、121 で15分オートクレーブ処理をした。

最後に、38菌株のうち8菌株、すなわち猫から単離した3つのラクトバチルス(NCC2581、NCC2592、NCC2583)、犬から単離した3つのラクトバチルス(NCC2603、NCC2613、NCC2628)、猫からの1つのピフィズス菌(NCC2627)および犬からの1つのピフィズス菌(NCC2657)をさらに研究用に選択した。

これらの菌株は短い世代時間、定常期中の高数(1.0E+08cfu/ml以上)および接種後8および24時間の高度の安定性、凍結乾燥その後の貯蔵条件に対する安定性、十二指腸に見出される極限胆汁濃度に対する耐性(2%胆汁)、および4%までの胆汁の存在で生育する場合のその低抑制により特徴化される。さらに、DNA分析からの結果は調査の多様性を表わす細菌の選択に考慮した。

【0050】

例3 猫におけるコロニー形成の効力

L.ルーテリNCC2581、L.ルーテリNCC2592、L.ラムノサスNCC2583およびピフィドバクテリウム種NCC2627は猫の胃腸管を通過して生き残るその能力を評価するために給与試験で試験した。

出来るだけ等数の16匹の雄および雌猫はグランドメニューボエフ(boeuf)に3日間適応させた。給与プロトコルは「フリスキーズ・グランド・メニュー」による7日であり、「フリスキーズ・グランド・メニュー」による7日の試験は上記菌株、すなわちL.ルーテリNCC2581(食物A)、L.ルーテリNCC2592(フードB)、L.ラムノサスNCC2583(フードC)およびピフィドバクテリウム種NCC2627(フードD)の1つを含有する。フードの割当ては次の通りであった：

猫 n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
期間1	A	D	C	B	D	A	A	C	B	A	B	C	B	D	C	D
期間2	B	A	D	A	C	C	D	A	C	B	C	D	D	A	B	B

この菌株は十分量でかつ安定な凍結乾燥形で調製し、試験動物の胃腸管で菌株・生存に関しこれらの異なる8つの細菌を適用した。すべての菌株は動物に対するフードマトリックスと調製菌株を混合し十分容積のキャリアを添加するために4gのトレハロースと混合した。細菌菌株は個々のプラスチック管で生産し(1.0E+09cfu/ml)、毎日フードの部分に添加して全体の細菌が確実に喰べられるようにした。

新しい糞試料は細菌叢数を分析するために取得し、基準線と比較した(細菌添加せず)。

糞は7日および8日(基準線)
 14日および15日
 21日および22日(基準線)
 28日および29日
 に収集した。

無菌直腸プローブを使用して少なくとも0.1gの糞試料を得た。この試料は正確に秤量し、0.1gを10%グリセロールを含有する10mlの生理溶液(リンゲル)と混合する。次にこの溶液は1mlの極低温管に移し、液体窒素で凍結した。すべての試料は分析まで-80で貯蔵する。

ラクトバチルス、バクテロイデス、エンテロバクテリエシエ、エンテロコッカス、ビフィズス菌およびクロストリジウム・パーフリンゲンスの内生菌数を計数した。細菌は選択または半-選択培地で検出した。100倍連続希釈は0.5%システインを含有するリンゲル溶液で-2から-8の範囲の希釈により行なった。各種選択培地のペトリ皿に接種し、培養した(下表参照)。

細菌	培地	温度 (°C)	時間 (h)	環境
エンテロバクテリエシエ	Drigalski (サノフィ Diagnostics Pasteur, France)	37	24	好気
ビフィズス菌 ラクトバチルス	Eugon Tomato *	37	48	嫌気
	MRS (Difco, 米国)+ 抗生物質 **	37	48	嫌気
C1. パーフリンゲンス バクテロイデス	NN 寒天 ***	37	48	嫌気
	Schaedler Neo-Vanco (バイオメリックス、 マルシーレトイル、 フランス)	37	48	嫌気

* ワズワースアネロピック・バクテリオロジー・マニュアル、V. ステル、D. シトロ
ンおよびS. ファインゴールド3版

** ホスホマイシン(79.5mg/l)+スルフアメトキサゾール(0.93mg/l)+
トリメソプライム(5mg/l)

*** ロウベリおよびリリー、1995からのNN寒天

結果

細菌数はlogベース10として表わし、表7に示す。

表7 猫の糞の細菌数(平均±Stdev、n=8)

	NCC 2581		NCC 2592		NCC 2583		NCC 2627	
	前	中	前	中	前	中	前	中
ラクトバチルス	6.38 ±2.25	7.63 ±1.23	6.12 ±2.45	7.62 ±1.58	5.31 ±2.04	7.47 ±1.23	6.69 ±1.44	7.65 ±1.45
ビフィズス菌	7.17 ±1.82	7.64 ±0.42	7.57 ±1.68	6.31 ±2.26	6.43 ±2.25	6.80 ±2.19	8.04 ±1.03	6.07 ±2.32
エンテロ バクテリエシエ	4.25 ±1.71	4.27 ±1.20	4.37 ±1.35	4.58 ±1.45	5.09 ±1.50	4.40 ±0.63	4.59 ±1.42	3.64 ±0.64
バクテロイデス	6.05 ±1.38	5.54 ±0.49	5.94 ±0.99	6.15 ±1.43	6.19 ±0.97	5.52 ±0.46	6.00 ±1.11	5.48 ±0.50
C. パー プリンゲンス	4.09 ±1.22	3.84 ±1.00	3.61 ±0.57	3.30 ±0.00	4.16 ±1.64	3.34 ±0.11	3.84 ±0.89	3.57 ±0.56

処理中、引用するプロバイオチック細菌の摂取によるラクトバチルスの糞中の数の増加を観察する。選択プロバイオチックの使用と関連する腸の生態系に損傷のないことを反映するエンテロバクテリエシエ数の劇的増加のないことを観察する。

【 0 0 5 1 】

例 4 犬におけるコロニー形成の効力

L. ルーテリ NCC 2603、L. ルーテリ NCC 2613、アシドフィラス NCC 2628 および ビフィドバクテリウム種 NCC 2657 は犬の胃腸管を通過して生き残るその能力を評価するために飼養試験で試験した。

4 ~ 7 才の 10 匹の犬、5 匹の雄および 5 匹の雌はこの特別の試験を行なった。飼養プロトコルは「フリスキーズ バイタリティ」w/o チコリによる 5 日の適応期間および「フリスキーズ バイタリティ」w/o チコリによる 5 日の試験期間、および「フリスキーズ バイタリティ」w/o チコリ + 細菌、すなわち L. ルーテリ NCC 2603 (フード E)、L. ルーテリ NCC 2613 (フード F)、L. アシドフィラス NCC 2628 (フード G) および ビフィドバクテリウム種 NCC 2657 (フード H) による 3 日の適応および 5 日の試験から成るものであった。このフードの割当ては次の通りであった。

犬 n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
期間 1	E	E	E	E	E	F	F	F	F	F
期間 2	G	G	G	G	G	H	H	H	H	H

この菌株は十分量で、かつ安定な凍結乾燥形で調製して試験動物の胃腸管で生き残る菌株に関しこれらの 8 つの異なる細菌を適用した。すべての菌株は動物用のフードマトリックスと調製菌株を混合するため十分容積のキャリアを添加するように 4 g のトレハロースと混合した。細菌菌株は個々のプラスチック管に調製し (5.0 E + 0.9 c f u / m l)、毎日フードの部分に添加して全体の細菌が確実に食べられるようにした。

新しい糞試料は菌叢 (bacterial population number) を分析するために収得し、基準線と比較した (細菌添加せず)。

糞は 7 日および 8 日 (基準線)

14 日および 15 日

21 日および 22 日 (基準線)

28 日および 29 日

に収集した。

無菌直腸プローブを使用して少なくとも 0.1 g の糞試料を得た。この試料は正確に秤量

し、0.1gを10%グルセロールを含有する10mlの生理溶液(リンゲル)と混合する。次にこの溶液は1mlの極低温管に移し、液体窒素で凍結した。次にすべての試料は分析まで-80で貯蔵する。この細菌は例3記載と同一の培地で計数した。

結果 10gベース10として表わした細菌数を表8に示す。

表8 犬の糞の細菌数(平均±Stdev、n=5)

	NCC 2603		NCC 2613		NCC 2628		NCC 2657	
	前	中	前	中	前	中	前	中
ラクトバチルス	5.25 ±1.34	3.92 ±1.05	4.00 ±1.56	3.40 ±0.21	7.93 ±1.75	8.30 ±0.99	6.47 ±1.27	7.00 ±1.35
ビフィズス菌	7.32 ±2.06	4.48 ±2.64	6.09 ±2.10	4.55 ±2.79	7.70 ±2.57	7.20 ±1.88	5.72 ±2.51	6.78 ±2.39
エンテロ バクテリエシエ	4.10 ±0.89	4.62 ±0.61	3.62 ±0.72	4.39 ±0.94	4.58 ±1.54	4.04 ±0.76	4.51 ±1.51	4.85 ±1.45
バクテロイデス	7.82 ±0.53	6.70 ±1.25	6.92 ±1.37	6.69 ±1.19	7.88 ±1.13	7.53 ±0.61	7.92 ±0.63	7.66 ±0.86
C.パー フリゲンズ	3.70 ±0.89	3.84 ±0.87	3.50 ±0.45	3.30 ±0	3.70 ±0.62	3.30 ±0	3.93 ±1.25	3.70 ±0.89

処理中、菌株L.アシドフィラスNCC2628の場合を除いて選択したプロバイオチック細菌の摂取により、糞のラクトバチルス数に主要な変化は認められない。試験条件下でC.パーフリゲンズに対する抑制効果はC.パーフリゲンズの基本量が非常に低いので有意ではなかった。選択したプロバイオチックの使用と関連する腸の生態系の動揺のないことを反映してエンテロバクテリエシエ数に劇的増加のないことを認める。

【0052】

例5 ジアルジア・インテスチナリスの生存可能性に及ぼすラクトバチルスおよびその代謝産物の効果

猫および犬から単離したラクトバチルス菌株の培養濾液上澄の効果を研究した。

材料および方法

細菌菌株および培養：属ラクトバチルスに属する微生物はネスレ・カルチャー・コレクションからのものであった。細菌はKTYI培地に生育させた。ラクトバチルス代謝産物を含有する上澄はpH6に中和し、濾過滅菌した。

対照は1つの細菌カルチャー以上の同じpHにMTYI培地を乳酸により酸性化することにより行なった。その後pHは0.1N NaOHによりpH6に調製した。研究下の菌株の起源および上澄のpHおよび対照は表9に示す。

表9

菌株	起源	上澄のpH	対照のpH
L.ルーテリ NCC2581	Cat	6.63	6.63
L.ラムノサス NCC2583	Cat	6.50	5.97
L.ルーテリ NCC2592	Cat	6.04	5.98
L.ルーテリ NCC2603	Dog	6.04	5.99
L.ルーテリ NCC2613	Dog	6.07	5.95
L.アシドフィラス NCC2628	Dog	6.01	5.93

寄生虫：ジアルジア・インテスチナリスWB(ATCC30597)はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ロックビル、米国)で購入した。栄養型孢子虫は11につき次のものを含有するケイスター修正TR1-S-33培地に生育した、すなわち、カゼイン消化物(Difco)20g、酵母エキス(BBL)、10g、デキストロース

(メルク)、10 g、牛胆汁(Difco)、0.75 g、NaCl(メルク)、2 g、L-システインHCl(シグマ)、2 g、アスコルビン酸ナトリウム(フルカ)、0.2 g、K₂HPO₄(メルク)、0.6 g、クエン第2鉄アンモニウム(シグマ)、22.8 mg、成牛血清(シグマ)、100 ml、ペニシリン/ストレプトマイシン(ギブコ、1000 IU/ml)、15 ml。pHは濾過滅菌前(0.22 μm孔寸法)NaOH 5 Nにより6.9に調整した。

寄生虫は40 mlのカルチャー培地を満たしたポリスチレン組織培養フラスコ(LUX、マイルズラボラトリーズ、インク、ネーパービル1L60540)で培養した。継代培養は寄生虫の付着しない上澄を廃棄し、5 mlの氷冷却カルチャー培地を添加し、氷浴で10分培養して付着する栄養型孢子虫を引き離し、0.2 mlの形成サスペンションを新鮮培地に接種して行なった。培養は37℃で暗所で行なった。

増殖検定: 200 μlの栄養型孢子虫サスペンション(1.4 × 10⁵ 寄生虫/ml)は100 μlの上澄または対照と混合し、1 μCiの³Hチミジンを添加した。試料は37℃で24時間、96-穴を有する組織培養プレート(ヌンクブランド製品)で培養した。次に、寄生虫は収穫し、チミジン添加を評価した。

結果

チミジン添加は表10に示す。犬から単離した菌株NCC 2628はWB菌株の強い増殖抑制を生じた(91%)。研究した他の菌株は栄養型孢子虫の生育を抑制しなかった。

菌株	ジアルジアインテスチナリスの増殖、CPM中
L. ルーテリ NCC 2581	1720
対照	2000
L. ラムノサス NCC 2583	2500
対照	1720
L. ルーテリ NCC 2592	1800
対照	1970
L. ルーテリ NCC 2603	2100
対照	1900
L. ルーテリ NCC 2613	2510
対照	1950
L. アシドフィラス NCC 2628	150
対照	1610
MTYI	1870

表10 ジアルジアインテスチナリス菌株の増殖に及ぼすカルチャー濾过上澄の効果

この試験においてL. アシドフィラスNCC 2628の生育中生成する機能性代謝産物はジアルジア・インテスチナリスの生育に対し非常に強い抑制効果を有することが実証できた。

【0053】

例6~8 本発明によるラクトバチルス菌株の腸病原菌に対する抑制効果

小腸病原菌に対し強い拮抗性を有する菌株と同定するために、共生培養試験を犬の小腸条件(pH、胆汁組成物および濃度、ムチン、パンクレアチン)を模擬するモデル系で行なった。模擬犬の小腸液は再構成犬胆汁(0.345 g/l タウロケノデオキシコレート、シグマ、ドイツ; 0.7 g/l タウロデオキシコレート、シグマ、ドイツ; 3.04 g/l タウロコレート、シグマ、ドイツ; 0.006 g/l コレート、フルカ、スイス)、豚ムチン(1.9 g/l、シグマ、ドイツ)、豚パンクレアチン(2.42 g/l、シグマ、ドイツ)および電解質溶液(5 g/l NaCl、0.6 g/l KCl、0

25 g/l CaCl₂、すべてメルク、ドイツ)を含有した。液のpHは0.1N NaOHによりpH 6.5 ± 0.5に調整した。

菌株および培養条件

小腸病原体

4つの可能性のある病原菌株、すなわちS.チフィリウムSL1344、E.コリETEC 08:H9およびE.コリ0149:K88(病原性犬単離物)およびSh.ダイセントリエー(ヒト起源パウイズ大、ホスピタルセンターCHUVローザンヌ、スイス)の臨床単離物を選択した。ルリアベルタニブロス(ディフコ、米国)で増殖したS.チフィリウムSL1344を除いて、すべてのエンテロバクテリアシエはブレンハートインフュージョンブロス(ディフィコ、米国)で37で振温下で(240rpm)生育させた。

10

乳酸菌

L.アシドフィラスNCC2628(CNCMI-2453)、L.ラムノサスNCC2583(CNCMI-2449)、L.ルーテリNCC2581(CNCMI-2448)、L.ルーテリNCC2592(CNCMI-2450)を含む犬および猫起源の広範囲のラクトバチルスはネスレ・カルチャー・コレクション(NCC、ネステック、スイス)から選択し、生存、生理活性および上記小腸病原体に対する抑制効果に対し犬の小腸モデルで選別した。ラクトバチルスはマンロゴサシャープブロス(ディフコ、米国)で37で嫌氣的に(アンエアロカルト、オキシド、英国)培養した。

20

生存細胞数の測定

試料は無菌リン酸塩緩衝液(NaH₂PO₄、pH7、0.2M)で希釈し、寒天プレート、すなわちラクトバチルスに対しMRS寒天(ディフィコ、米国)、S.チフィリウムおよびSh.ダイセントリエーに対しサルモネラ-シゲラ寒天(オキシド、英国)およびE.コリに対しソルビトールマックユンキー寒天(オキシド、英国)に10倍希釈物を表面プレーティングした。寒天培養はラクトバチルスに対し嫌氣的に37で48時間、およびエンテロバクテリアシエに対し37で24時間培養した。共生培養試験では、MRS寒天上のエンテロバクテリアシエの生長はポリミキシン(オキシド、英国)の添加により抑制された。

乳酸菌(LAB)および病原体間の共生培養試験

可能性のあるプロバイオチックLABおよび病原菌菌株による共生培養試験は37でカルチャーの代謝活性を有利にするため異なる炭素源(糖、ペットフード)で強化した犬の模擬小腸液20ml(ファルコン管)で行なった。LABは10E+08cfu/mlで、病原体は10E+02cfu/ml、10E+04cfu/ml、および10E+06cfu/mlで接種した。試料は8時間まで指示する異なる時間に採取し、生存細胞数は各培地に10倍希釈物を表面にプレーティングして測定した。

30

共生培養試験はデキストロース(5g/l)および異なる濃度の市販品として入手できる押し乾燥ペットフード(5、25または100g/l、フリスキーズALPOコンプリート、米国)により強化した犬の模擬小腸液を含む各種条件下で行なった。後者は均質化し(ストマッセルLABブレンダー)および電解質溶液に懸濁した。すべての試験は二重反復試験で行なった。

40

【0054】

例6

4つのラクトバチルスおよび4つの可能性のある病原菌株E.コリETEC 08:H9、E.コリ0149:K88、S.チフィリウムSL1344およびSh.ダイセントリエーは5g/lのデキストロース(ディフコ)を強化した犬の模擬十二指腸液で行なった。ラクトバチルスは10E+08cfu/mlで、グラム陰性インジケータ菌株は10E+02cfu/mlで接種した。結果は表11に示す。

表11 デキストロースを強化した犬の模擬小腸液にLABおよび病原可能性菌の共生培養

病原体	<i>E. コリ</i> ETEC O8:H9	<i>E. コリ</i> O149:K 88	<i>S.</i> チフィムリウム SL1344	<i>Sh.</i> ダイセンテリエー
プロバイオチック				
<i>L. アシドフィラス</i> NCC2628 (CNCM I-2453)	+++	+++	+++	+++
<i>L. ラムノサス</i> NCC2583 (CNCM I-2449)	+++	+++	+++	+++
<i>L. ルーテリ</i> NCC2581 (CNCM I-2448)	抑制せず	++	抑制せず	+++
<i>L. ルーテリ</i> NCC2592 (I- 2450)	抑制せず	++	抑制せず	+

10

+ 生育抑制

++ 生育の抑制および部分不活性化

+++ 生育の抑制および完全な不活性化

20

4つのすべての試験したラクトバチルスは抗菌性を実証したが、*L. アシドフィラス* NCC2628 (CNCM I-2453) および *L. ラムノサス* NCC2583 (CNCM I-2449) のみはすべての試験病原体に対し高い活性を実証した。双方の菌株は生育を抑制できるのみでなく、また試験系に含有される病原体を完全に不活性化することができた(残存生存細胞なし)。

【0055】

例7

市販品として入手できる押出し乾燥ペットフードで強化した(5, 25または100g/l、フリスキーズ ALPO コンプリート、米国)犬の模擬十二指腸液で共生培養をラクトバチルス[(*L. アシドフィラス* NCC2628 (CNCM I-2453)、*L. ラムノサス* NCC2583 (CNCM I-2449)]および *S. チフィムリウム* 間で行なった。ラクトバチルスは 1.0×10^8 cfu/ml で、グラム陰性インジケータ菌株は 1.0×10^2 cfu/ml で接種した。結果は表12に示す。

30

表12 乾燥ペットフードを強化した犬の模擬小腸液でLABおよび病原菌の可能性のある菌間の共生培養

病原体	ペットフードによる強化	<i>S. チフィムリウム</i> SL1344
プロバイオチック		
<i>L. アシドフィラス</i> NCC2628 (CNCM I-2453)	5 g/l	+++
	25 g/l	+++
	100 g/l	+++
<i>L. ラムノサス</i> NCC2583 (CNCM I-2449)	5 g/l	抑制せず
	25 g/l	+
	100 g/l	++

40

+ 生育の抑制

50

- ++ 生育の抑制および部分不活性化
- +++ 生育の抑制および完全な不活性化

結果は特にL.アシドフィラスNCC2628(CNCMI-2453)に生育を抑制し、および模擬小腸液とペットフードの混合物におけるような非常に実際的条件下で完全に小腸病原体を不活性化さえする高い可能性を実証した。L.アシドフィラスNCC2628の抗菌活性は微生物に対し発酵性糖源として働く市販ペットフードの低量強化でさえ非常に高かった。L.アシドフィラスNCC2628に対しなされたこの観察と対照的にL.ラムノサスNCC2583(CNCMI-2449)の有効性は抗菌活性の増加が試験系に添加されるペットフード量の増加につれて観察されるようにペットフードの強化量によるものであった。

10

【0056】

例8

L.アシドフィラスNCC2628(CNCMI-2453)およびS.チフィムリウムSL1344の異なる接種量による共生培養はデキストロース(5g/l、ディフコ)を強化した犬の模擬十二指腸液で行なった。L.アシドフィラスNCC2628(CNCMI-2453)は 1.0×10^8 cfu/mlで、S.チフィムリウムSL1344は 1.0×10^2 cfu/ml、 1.0×10^4 cfu/mlおよび 1.0×10^6 cfu/mlで接種した。結果は表13に示す。

表13 L.アシドフィラスNCC2628(CNCMI-2453)と異なる接種量のS.チフィムリウムSL1344の共生培養

20

病原体	病原体の接種量	S.チフィムリウム SL1344
プロバイオチック		
L.アシドフィラスNCC2628 (CNCMI-2453)	$10E+02$ cfu/ml	+++
	$10E+04$ cfu/ml	+++
	$10E+06$ cfu/ml	+++

- + 生育の抑制
- ++ 生育の抑制および部分不活性化
- +++ 生育の抑制および完全な不活性化

30

L.アシドフィラスNCC2628(CNCMI-2453)の抗菌活性は十分に高く、S.チフィムリウムSL1344の初めの高い濃度でさえ完全に不活性化した。

【0057】

例9 犬のイン・ピボ免疫刺激

ペット-単離のプロバイオチックの菌株に対する免疫刺激可能性はL.アシドフィラスNCC2628菌株を使用して臨床試験で試験した。

方法

異なるマイトジエンによる刺激による犬の末梢血液単核細胞(PBMC)

40

4~7才の20匹の犬でこの試験を行なった。飼養プロトコルは「フリスキーズ バイタリティ」w/oチコリによる1週の適応および「フリスキーズ バイタリティ」w/oチコリ+アシドフィラスNCC2628細菌による4週の試験から成るものであった。

L.アシドフィラスNCC2628は試験動物の胃腸管に生存する菌株について十分量および安定な凍結乾燥形で調製した。細菌は調製細菌と動物用フードマトリックスとの混合に十分容積のキャリアを添加するために4gのトレハロースと混合した。細菌は個々のプラスチック管に調製し(5.0×10^9 cfu/日)、毎日フードの部分に添加して全体の菌が確実に喰べられるようにした。

血液は4週のプロバイオチック投与後犬から収集した。血液はVacutainer(登録商標)カラム(ベクトン ディッキンソン、マウンテン ビュー、CA)を通して分

50

画した。P B M C は製造者の推せんにより回収された。

細胞はT細胞（コンカナバリンA（c o n A））、フィトヘマグルチニン（P H A）、B細胞（ポクウィード マイトジエン（P W M））、およびすべての細胞（ホルボール-ミリステート-アセテート/イオノマイシン（P M A /イオノ）の強い増殖を誘起する異なるマイトジエンまたはホルボルエステルにより刺激した。10⁵細胞/穴は96-穴の平底カルチャープレート（ヌンク）の10%牛胎児血清および抗生物質を補充した200μlのR P M I - 1 6 4 0 培養培地の最終容量にマイトジエンまたはホルボルエステル（それぞれの用量は図1に示す）と一緒に培養した。

細胞は37℃で48時間加湿5%CO₂環境に維持した。細胞はさらに18時間1μCiの[³H]チミジン（アマーシャム・ファーマシア・バイオテック、スイス）によりパルス-標識した。次に細胞はニトロセルロースフィルター（パッカード）上で収穫し、結合[³H]チミジンはシンチレーションカウンターにより測定した（Top Count、パッカード、スイス）。細胞増殖は三重反復試験から平均として計算した（計数/分（c.p.m）（±SD）。

10

結果

図1：対照群と比較してL・アシドフィラスNCC2628を給与した犬の群ですべてのマイトジエンにตอบสนองして細胞増殖が明確に増加した。この増加はホルボルエステルPMA+イオノマイシンで刺激したカルチャーで有意であった。このデータはプロバイオチック給与犬からのリンパ球はイン・ビトロで活性化すると一層反応性であることを示し、プロバイオチック給与犬の免疫系が刺激されたことを示唆する。

20

【0058】

例10 ペット-単離ラクトバチルス菌株による免疫機能のイン・ビトロモジュレーション

上記異なるペット-単離ラクトバチルス菌株のイン・ビトロ選別はその免疫モジュレーションの可能性を測定するために行なった。このため前-炎症シトカイン（IL-12、IFN）および/または抗-炎症シトカイン（IL10、TGF-β）を誘起するその能力を測定した。（アナンド・エイ・シー、アジア、シー・エム、1999、トロップ・ガストロエンテロール、20（3）、97~106；スペルベルグ・ビー、エドワード・ジェイ・イー、Jr 2001、Clix Infect Dis., 32（1）、76~102）。これは強い抗-病原性または抗-がん免疫機能および、アレルギーおよび炎症（炎症性腸疾患）のような犬の腸病原体に対する拮抗機能に対し可能性のある候補菌株を選択することを目的とする。付加的培養は培地単独（負の対照）、エンテロコッカス・フェシウム菌株SF68（NCIMB10415、セルピオス-ファーマ、スイス）およびヒトのラクトバチルス単離物ST11（NCC2461、CNCM I-2116）（正の対照）により行なった。

30

方法

犬の白血球の異なるプロバイオチック菌株により誘起されるシトカインプロファイル通常の成犬からの血液は室温で5分ACK溶解緩衝液（150mMのNH₄Cl、1mMのKHCO₃および0.1mMのNa₂EDTA、水中、pH=7.4）により処理した。白血球は2回RPMI培地（抗生物質含まず）で洗浄し、組織培養プレートの24-穴に2.10⁶細胞/mlで播種した。10⁶CFUを含有する1mlの細菌サスペンション（下記）を各穴に添加した。

40

対照処理では、培地のみを白血球に添加した。試料は37℃および5%CO₂で18時間培養した。その後、白血球は集め、PBSで洗浄し、遠心分離した。細胞ペレットは500μlのトリゾール試薬（ギブコBRL）により溶解した。RNAは細胞溶解物からヌクレオスピンRNAキット（マチェレイ-ナゲル）を使用して抽出した。犬のシトカイン増幅用RT-PCRはAB遺伝子キット（メルク）を使用して行なった。参照の手引き（Microsynthがすべて作成）は下記する。エチジウムブロミド-着色アガロースゲルに現れたPCR-バンドの濃度計分析はNIHイメージソフトウェアを使用して行なった。すべてのバンドは各試料により得た各-アクチンPCR-製品バンドにより標準化し

50

(内部対照)、結果は各シトカインPCR-製品バンドのピクセル密度を反映する任意単位として表わす(図2)。

-細胞の調製:ラクトバチルス各種菌株をこれらが同じ濃度に達するまでMRS培地で約8時間生育させた。細菌は抗生物質を含まないRPMI培地に 10^6 cfu/mlの最終濃度に希釈した。

-シトカイン-RT-PCRsに対し使用した手引き

シトカイン	参照
IL-12p40	Büttner M., et al. 1998. Cytokine;10(4):241-248.
IFN γ	Büttner M., et al. 1998. Cytokine;10(4):241-248.
TGF β 1	Gröne A., et al. 1998. Vet. Immunol. Immunopathol.;65:11-27.
IL-10	Pinelli E., et al., 1999, Vet. Immunol. Immunopathol.;69:121-126.

10

結果

図2:データはラクトバチルスが誘起したシトカインプロファイルは菌株依存性であること示す。例えば、菌株NCC2628は高量のIL-10およびTGF-を誘起し、アレルギーおよび炎症腸疾病のような炎症疾病の免疫調整にこの特別の菌株に対する可能性を強調する。対照的に、菌株NCC2583は強量のIFN およびIL-12を誘起し、これはこの菌株を抗-病原活性および抗-がん活性に対し良い候補者にする。

20

【0059】

例11

3つの乾燥ペットフードを研究に使用する。これらは「A」、「B」および「C」とする。ペットフード「A」は栄養的に完全な乾燥ペットフードで、ブランド名ALPOとして入手できる(ALPOはスイス、ネスレ社の登録商標である)。

ペットフードBはペットフードAと同様に栄養的に完全な乾燥ペットフードであるが、小袋から供給される選択されたプロバイオチック微生物の粉末混合物が補充される。混合物は実質的に等量のL.アシドフィラスNCC2628およびピフィドバクテリウム種NCC2657を含む。各食事毎にフード上に撒布する。供給用量は約 1.0×10^8 cfu/日である。

30

ペットフードCは栄養的に完全な乾燥ペットフードで、実質的にペットフードAと同一であるが、これは1.2重量%のエンテロココッカス・フェシウムSF68(NCIMB10415)の乾燥したカルチャー上澄を含有する。

30匹の犬を研究に使用する。犬はペットフードAを使用して8週間予備給飼される。次に犬は各10匹の犬の3群、A、B、Cとし、8週間相当する名称のフードを給与される。

犬は水を自由に飲むことができ、1日に1回給与される。被膜のふけのひろまりを30人の評価パネルが開始時と次に7週後に測定する。

犬はパネルが評価前手入れし、パネルメンバーは評価中特徴を比較しない。

この評価で犬は各個のパネリストに20の異なる組合せ(pairing)で提示する。パネリストは、提示した対のどちらの犬が(1)ふけが少ない、(2)被膜の艶の高さおよび(3)被膜の臭いの少なさを点数表で示すことを求められた。

40

すべての犬の全般的被膜状態は通常健康な犬に予期できるものと同様に目で見て、および触って良好である。しかし、フードCを給与した犬は対照フードAを給与したものよりふけが著しく少なかった。フードBを給与した犬は著しく艶のある被膜を有し、Aのものより被膜の臭いが著しく少ないことを示す。これらの特徴はB群の犬と比較する場合統計的に有意的に異ならないことが分かった。

【0060】

例12

飼料混合物は約5.8重量%のコーン、約6重量%のコーングルテン、約2.3重量%の肉お

50

よびミール、塩、ビタミンおよびミネラルの残りの形成量から製造する。
 飼料混合物は予備コンディショナーに供給し、加湿する。この混合物に次のラクトバチルス菌株、ラクトバチルス・ラムノサスNCC2583(CNCMI-2449)、ラクトバチルス・アシドフィラスNCC2628(CNCMI-2453)およびエンテロコッカス・フェシウムSF68(NCIMB10415)の混合物を含有する粉末を添加する。粉末は実質的に均一に混合物中に分散する。次に加湿飼料ミックスはエクストルーダ-クッカーに供給し、糊化させる。エクストルーダ-クッカーを出る糊化マトリックスはダイを経て押出される。押出し物は犬の給飼に適する片に切断し、約110で約20分乾燥し、冷却してペレットを形成する。押出し物の片は添加菌株の細菌活性をチェックする。何も検知されない。

10

【0061】

例13

24匹の犬をこの研究に使用する。これらは若い犬および老令犬を含み、後者は8~12才である。選択した老令犬は年令に相応した関節炎症の外部徴候を示し、時々運動に若干の困難を来しているようである。或る動きは痛いらしい。これらの徴候は老令犬にしばしば認められ、関節炎状態に関するものと信じられる。

3つの乾燥ペットフードを研究に使用し、A、BおよびCとする。ペットフードAは栄養的に完全な乾燥ペットフードである(ALPOビーフィディナー)。これは対照フードである。

選択したすべての24匹の犬はペットフードAを使用して8週間予備飼養する。次に犬は3群、A、BおよびC各8匹に分け、同じ割合の若い犬および老令犬を含む。次に各群は8週間次の各フードを給与する。

20

群	ペットフード
A	A
B	B
C	C

ペットフードBは栄養的に完全な乾燥ペットフードで、実質的にペットフードAと同一であるが、その重量の2%を形成するコーティングを有し、該コーティングはエンテロコッカス・フェシウムSF68(NCIMB10415)の微生物を含む。各犬に対する毎日のフード給与量は1.0E+09cfu/日の用量であるように個々の体重により計算される。

30

フードCは上記例12で製造した押出しキブルを含む。各犬に対する毎日のフード給与量は微生物用量が1.0E+11cfu/日であるように個々の体重により計算する。犬は水を自由に飲むことができ、1日に1回給与される。活性計器を各犬の首輪に取り付け、毎日測定値を採取する。犬は犬舎スタッフにより活性を目でも評価する。

すべての犬の状態は通常健康の犬に予期できるものと同様に目で見て、触って良好である。しかし、ペットフードBおよびCを受ける群の犬はフードAによるその対応犬より一層著しく活性である。計器の読みはこれらの観察を支持する。

40

さらに、BおよびC群の老令犬は試験期間フードBおよびCを給与した後、局部関節炎症の外部徴候が少なくなるようである。さらに、犬は物理的運動による苦痛の程度が下がることを経験し、以前より一層自由に運動するようである。フードBおよびCは或る加令徴候について安心を与え、老令ペットの運動性を改良するようであると結論できる。

【0062】

例14 乾燥キャットフード

飼料混合物は58重量%のコーン、約6重量%のコーングルテン、約23重量%のチキンミール、塩、ビタミンおよびミネラルから形成する。

飼料混合物は予備コンディショナーに送り、加湿する。次に加湿飼料はエクストルーダ-

50

クッカーに送り、糊化させる。エクストルーダを出る糊化マトリックスはダイを通して押出す。押し出し物は猫の給与に適する断片に切断し、約 110 で約 20 分乾燥し、冷却してペレットを形成する。この時点で、凍結乾燥粉末の 1 つ以上の次のラクトバチルス種の菌株、ラクトバチルス・アシドフィラス NCC 2628 (CNCM I - 2453) またはエンテロコッカス・フェシウム SF68 (NCIMB 10415) をペレットに適用するために供する。猫に対する相当する飼料摂取量は約 $1.0 \text{ E} + 07 \sim 1.0 \text{ E} + 9 \text{ cfu} / \text{日}$ であるように十分な粉末がこうして供される。いくらかの粉末はペレットの最初のマスに混合し、袋詰めする。粉末の第 2 量は計量し、脂質キャリアと混合し、次にペレットの第 2 マスに噴霧する。ペレットはコーティングが 50 - 60 で数分間十分に乾燥させた後袋詰めする。

10

【0063】

例 15 ペットフードおよびサプリメントの缶詰

混合物は 73% の家禽屠体、豚の肺および牛の肝臓（細碎）、16% の小麦粉、2% の着色料、ビタミンおよび無機塩から製造した。この混合物は 12 で乳化し、プリン状に押し出し、次に 90 の温度で加熱する。30 に冷却し、チャンクに切断する。これらの 45% のチャンクは 98% 水、1% の着色料および 1% のグァーガムから製造したソース 55% と混合する。錫缶に充填し、125、40 分滅菌する。供飼前ペットフードと混合するプロバイオチックサプリメントとして、次のラクトバチルス種、ラクトバチルス・ラムノサス NCC 2583 (CNCM I - 2449)、ラクトバチルス・アシドフィラス NCC 2628 (CNCM I - 2453) またはエンテロコッカス・フェシウム SF68 (NCIMB 10415) の菌株を有する小袋形の付加的包装が供される。ペットに対する相当量は猫または犬により、および体重のような物理的因子により約 $106 - 10^{12} \text{ cfu} / \text{日}$ である。これは給与指示と一緒に、缶に除去できるように貼付した補助として供給される。

20

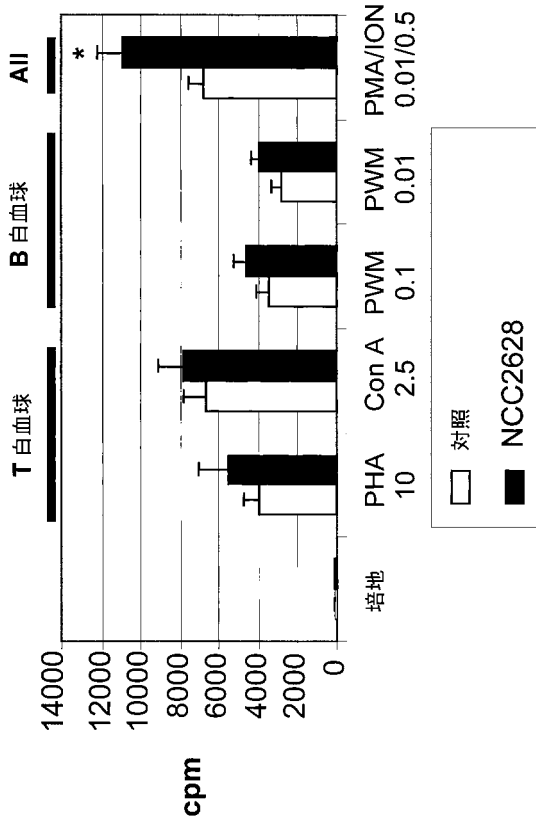
【図面の簡単な説明】

【図 1】 マイトジエンまたはホルボールエステルで刺激した犬の末梢血液単核細胞のリンパ球増殖を示す。

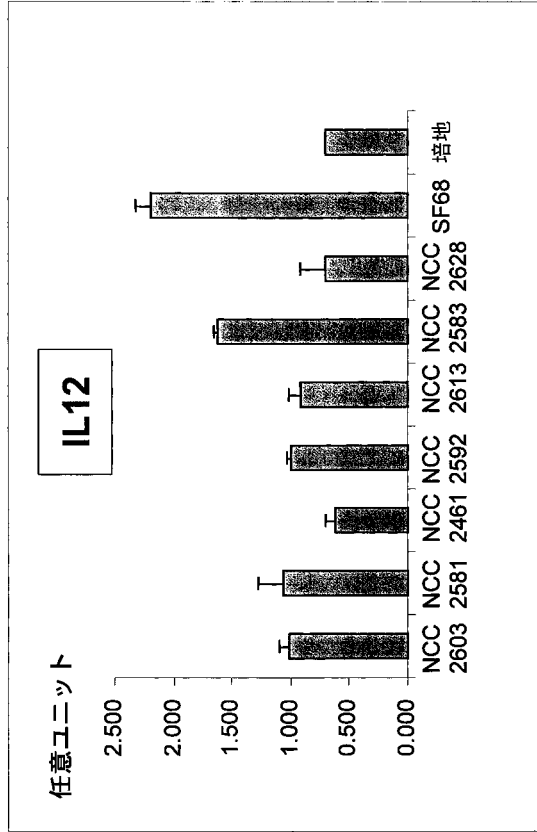
【図 2】 異なるバイオチック菌株で刺激した犬の白血球が生産したシトカインを任意ユニット IL - 12 (A)、IL - 10 (B)、IFN (C) および TGF (D) により示す。

30

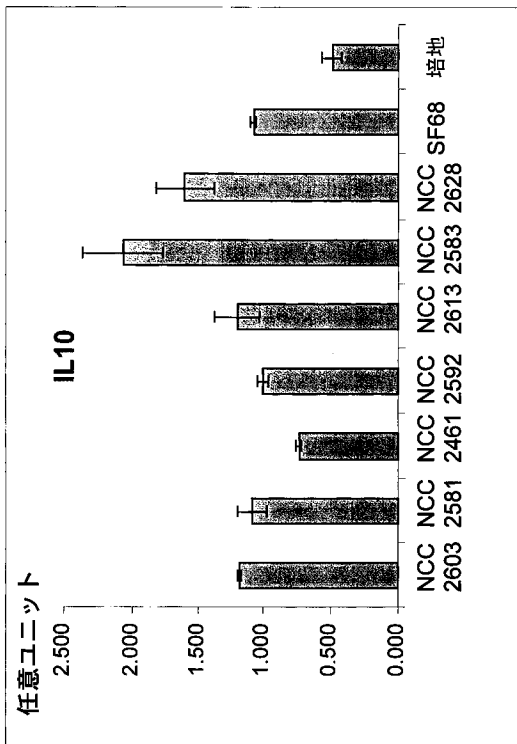
【 図 1 】



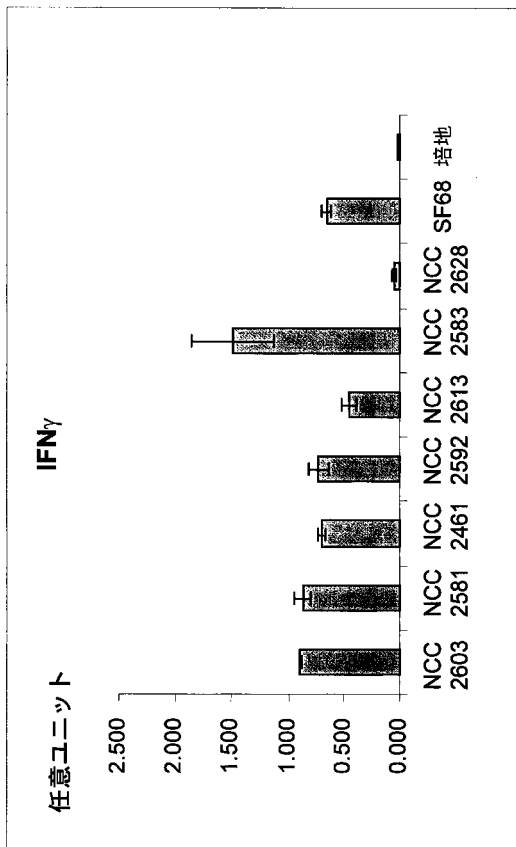
【 図 2 A 】



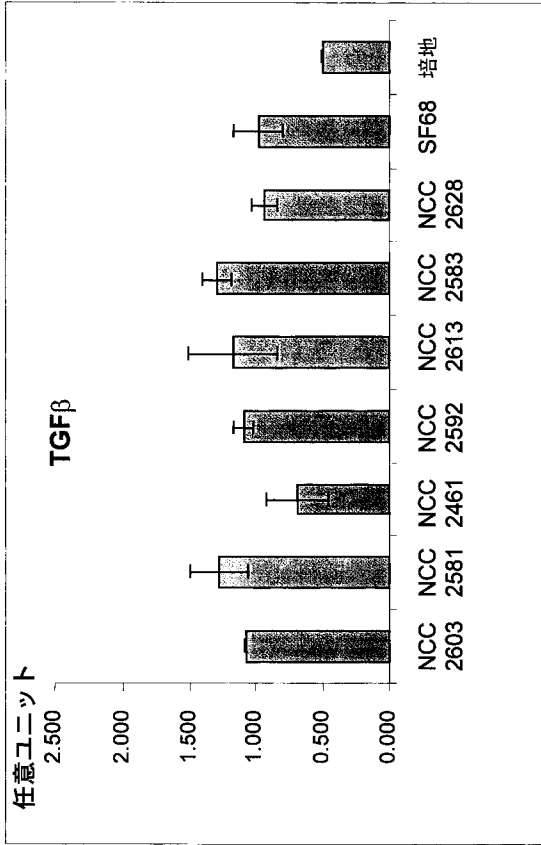
【 図 2 B 】



【 図 2 C 】



【図 2 D】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 R 1:23

前置審査

- (72)発明者 ツィンク、ラルフ
スイス国 ル モン ペルラン、シェマン デ ラ メゾン ジャン 3 6
- (72)発明者 レニエロ、ロベルト
フランス国 モイオウ、リュ シャルル デュブレイク 2 8
- (72)発明者 ロシャ、フロランス
スイス国 モントルー、カルティエ デ ティユール 6
- (72)発明者 カヴァディーニ、クリストフ
スイス国 ル モン ペルラン、シェマン デ ポーディーユ 2 6
- (72)発明者 フォン デル ヴェイト、ティエリー
スイス国 ローザンヌ、シェマン デ ベルビュ 2 5
- (72)発明者 シフリン、エデュアルド
スイス国 クリシエ、シェマン デ リアン - モン 1 7
- (72)発明者 ベニヤコーブ、ジャリル
スイス国 ローザンヌ、シェマン デ ラ グランゲット 9 2
- (72)発明者 ルソー、ヴィルジニー
フランス国 トゥールーズ、ルート デ ナルボン、2 3 5、 ミコノス ドゥジエーム - ア
パルトマン アー 2 0
- (72)発明者 ペレス、パブロ
アルゼンチン国 ラ プラタ、 デアゴナール 8 0 エヌオー 8 9 5 2 オービー

審査官 中村 正展

- (56)参考文献 特開平 0 7 - 1 9 4 3 1 7 (J P , A)
特開 2 0 0 0 - 1 2 5 7 7 8 (J P , A)
特開平 1 0 - 1 9 1 9 1 6 (J P , A)
国際公開第 9 9 / 0 1 7 7 8 8 (W O , A 1)
米国特許第 0 5 9 2 2 3 7 5 (U S , A)
J. Vet. Med. Sci. , 1 9 9 6 年 , vol. 58 , 591-593
J. Microbiol. Methods , 1 9 9 9 年 , vol. 36 , 181-192
Lett. Appl. Microbiol. , 1 9 9 8 年 , vol. 27 , 183-185
Int J. Food. Microbiol. , 1 9 9 8 年 , vol. 40 , 93-104
J. Dairy Sci. , 1 9 9 9 年 , vol. 82 , 23-31
Meat Sci. , 2 0 0 0 年 4 月 , vol. 55 , 297-300

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 1/00-1/38
A23K 1/16
A23K 1/18
C12R 1/23
JSTPlus(JDreamII)
PubMed
MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
CA/CONFSCI/SCISEARCH(STN)

WPIDS(STN)