

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5277172号
(P5277172)

(45) 発行日 平成25年8月28日 (2013. 8. 28)

(24) 登録日 平成25年5月24日 (2013. 5. 24)

(51) Int. Cl.

F 1

A 6 1 K 35/74 (2006. 01)

A 6 1 K 35/74

A

A 6 1 P 1/02 (2006. 01)

A 6 1 K 35/74

B

A 6 1 K 35/74

Z

A 6 1 P 1/02

請求項の数 6 (全 70 頁)

(21) 出願番号	特願2009-541864 (P2009-541864)	(73) 特許権者	508020155
(86) (22) 出願日	平成19年12月18日 (2007. 12. 18)		ビーエーエスエフ ソシエタス・ヨーロピア
(65) 公表番号	特表2010-513350 (P2010-513350A)		A
(43) 公表日	平成22年4月30日 (2010. 4. 30)		B A S F S E
(86) 国際出願番号	PCT/EP2007/011127		ドイツ連邦共和国 ルートヴィヒスハーフェン (番地なし)
(87) 国際公開番号	W02008/074473		D-67056 Ludwigshafen, Germany
(87) 国際公開日	平成20年6月26日 (2008. 6. 26)	(74) 代理人	100091096
審査請求日	平成21年6月17日 (2009. 6. 17)		弁理士 平木 祐輔
(31) 優先権主張番号	06026301.9	(74) 代理人	100118773
(32) 優先日	平成18年12月19日 (2006. 12. 19)		弁理士 藤田 節
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100122389
微生物の受託番号	DSMZ DSM 16667		弁理士 新井 栄一
微生物の受託番号	DSMZ DSM 16668		
微生物の受託番号	DSMZ DSM 16669		
微生物の受託番号	DSMZ DSM 16670		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ミュータンス・ストレプトコッカスによって引き起こされる齧蝕を予防および／または治療するための使用および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ストレプトコッカス・ソブリヌス (*Streptococcus sobrinus*) に結合することにより前記ストレプトコッカス・ソブリヌス (*Streptococcus sobrinus*) によって引き起こされる齧蝕を治療または予防するための抗齧蝕原性組成物の調製のための、ラクトバチルス・パラカゼイおよびラクトバチルス・ラムノサスからなる群から選択されるラクトバチルス属に属する微生物またはその変異体もしくは誘導体の使用であって、
該ラクトバチルス属に属する微生物またはその変異体もしくは誘導体はミュータンス・ストレプトコッカス (*mutans Streptococci*) 群に属する細菌に特異的に結合し得ることを特徴とし、

ここで該特異的結合が、

(i) 熱処理に耐性があり、ここで前記熱処理は 95 以上の温度で少なくとも20分にわたるものであり；かつ

(ii) プロテアーゼ処理に耐性があり、ここで前記プロテアーゼ処理はプロナーゼE、プロテイナーゼK、トリプシンおよびキモトリプシンからなる群より選択されるプロテアーゼでの処理であり；かつ

(iii) カルシウム依存性であり；かつ

(iv) 4.5～8.5のpH範囲内で形成され；かつ

(v) 唾液の存在下で形成される、

ものであり、

ここで前記ラクトバチルス属に属する微生物の誘導体は、前記微生物の不活性形態または前記微生物の断片であり、前記微生物の不活性形態は前記微生物が熱不活性化または凍結乾燥されたものであり、前記断片は膜調製物から取得された膜画分であり、かつ前記不活性形態または前記断片はミュータンス・ストレプトコッカス群 (mutans Streptococci) 群に属する細菌に特異的に結合し得る能力を保持するものである、
上記使用。

【請求項 2】

特異的結合を、以下のとおり：

- (a) 前記微生物を静止期まで増殖させ；
 - (b) 前記微生物を、静止期まで増殖させたミュータンス・ストレプトコッカス群に属する細菌と混合し； 10
 - (c) ステップ(b)で得た混合物を、前記微生物とミュータンス・ストレプトコッカス群の細菌との凝集体の形成を可能とする条件下でインキュベートし；さらに
 - (d) ペレットの発生によって凝集体を検出する
- ステップでアッセイすることができる、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

前記微生物が、DSMZ受託番号DSM 16667、DSMZ受託番号DSM 16668、DSMZ受託番号DSM 16669、DSMZ受託番号DSM 16670およびDSMZ受託番号DSM 16671を有するラクトバチルス・パラカゼイからなる群から選択されるラクトバチルス・パラカゼイ (*Lactobacillus paracasei*) またはこれらの変異体もしくは誘導体であるか、あるいは、DSMZ受託番号DSM 16672 およびDSMZ受託番号DSM 16673を有するラクトバチルス・ラムノサスからなる群から選択されるラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*) またはこれらの変異体もしくは誘導体であり、ここで前記変異体もしくは誘導体が、ミュータンス・ストレプトコッカス群に属する細菌に結合する能力を保持している、請求項 1 または 2 に記載の使用。 20

【請求項 4】

前記微生物が、ストレプトコッカス・ミュータンス (*Streptococcus mutans*)、ストレプトコッカス・ソブリヌス (*Streptococcus sobrinus*)、ストレプトコッカス・クリセツス (*Streptococcus cricetus*)、ストレプトコッカス・ラッティ (*Streptococcus rattii*)、ストレプトコッカス・フェラス (*Streptococcus ferus*) およびストレプトコッカス・マカカエ (*Streptococcus macacae*) からなる群から選択される1種以上の細菌に結合し得る、請求項 1 ~ 3 のいずれか1項に記載の使用。 30

【請求項 5】

前記微生物が、

- (a) ストレプトコッカス・ミュータンス血清型c (DSMZ 20523) および/もしくは血清型e (NCTC 10923) および/もしくは血清型f (NCTC 11060)、または
 - (b) ストレプトコッカス・ソブリヌスDSM 20742、または
 - (c) ストレプトコッカス・ラッティDSM 20564、または
 - (d) ストレプトコッカス・クリセツスDSM 20562、または
 - (e) ストレプトコッカス・フェラスDSM 20646、または
 - (f) ストレプトコッカス・マカカエDSM 20714 40
- に結合することができる、請求項 4 に記載の使用。

【請求項 6】

前記抗齲蝕原性組成物が、製薬上または経口的に許容可能な担体または賦形剤をさらに含む医薬組成物である、請求項 1 ~ 5 のいずれか1項に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ミュータンス・ストレプトコッカス群 (mutans Streptococci) 群に属する細菌に特異的に結合し得ることを特徴とする乳酸菌群に属する微生物またはこれらの変異体もしくは誘導体の使用であって、ここで該特異的結合が、ストレプトコッカス・ミュータ 50

ンス(*Streptococcus mutans*)以外のミュータンス・ストレプトコッカスによって引き起こされる齲蝕の治療または予防用の抗齲蝕原性組成物の調製のために、(i)熱処理に耐性があり；および/または(ii)プロテアーゼ処理に耐性があり；および/または(iii)カルシウム依存性であり；および/または(iv)4.5~8.5のpH範囲内で形成され；および/または(v)唾液の存在下で形成される、上記使用に関する。

【0002】

好ましくは、上記の特異的結合は、以下のとおり：

- (a) 上記の微生物を静止期まで増殖させ；
 - (b) 上記の微生物を、静止期まで増殖させたミュータンス・ストレプトコッカス群に属する細菌と混合し；
 - (c) ステップ(b)で得た混合物を、上記の微生物とミュータンス・ストレプトコッカス群の細菌との凝集体の形成を可能とする条件下でインキュベートし；さらに
 - (d) ペレットの発生により凝集体を検出する
- ステップでアッセイすることができる。

【0003】

本発明の別の態様は、ストレプトコッカス・ミュータンス以外のミュータンス・ストレプトコッカスによって引き起こされる齲蝕の予防または治療方法であって、ミュータンス・ストレプトコッカス群に属する細菌に特異的に結合し得ることを特徴とする乳酸菌群に属する微生物、または該微生物の変異体、誘導体、類似体または断片を投与するステップを含んでなる、上記方法である。

【背景技術】

【0004】

ミュータンス・ストレプトコッカスは、最初の歯の萌出後に宿主に定着する(Carlsonら, *Caries Res.* 9 (1975), 333-339)。これらは歯の表面上に局在化し、プラーク中のこれらの存在量は、初期の病変中が最も高い(Duchinおよびvan Houte *Arch. Biol. Biol.* 23 (1978) 779-786)。プラーク内でのミュータンス・ストレプトコッカスの定着レベルは、スクロース消費によって増加する(Staatら, *J. Dent. Res.* 54 (1975) 872-880)。ミュータンス・ストレプトコッカスは、これらの歯への付着を促進する特定の高分子をスクロースから合成することができる(Tanzerら, *Infect. Immun.* 10 (1974) 197-203)。ミュータンス・ストレプトコッカスは、スクロースなどの単純炭水化物から酸を迅速に生産し、低pHに耐性である(Edwardsson, *Arch. Biol.* 13 (1968) 637-646)。さらに、ミュータンス・ストレプトコッカスは基本的に常に、初期の且つ確立された齲蝕病変部位の培養で回収される(Littletonら, *Arch. Oral. Biol.* 15 (1979) 461-463)。様々な実験動物(例えば、単感染させた純粋隔離群)において、ミュータンス・ストレプトコッカスが齲蝕病変を誘導および進行させている可能性が示された後、ミュータンス・ストレプトコッカスに対する関心が高まった。ミュータンス・ストレプトコッカスの病原性の発現は、炭水化物、特にスクロースの消費と強く関連している。

【0005】

乳酸菌または放射線菌のような、齲蝕の発達と関連のある他の細菌種の役割は決定されていない。これらの細菌は、齲蝕の病変中でよく見られるが、ミュータンス・ストレプトコッカスとの関連においてのみ見られる。現在の知識によれば、ミュータンス・ストレプトコッカスの存在は、齲蝕発生の必須条件である(Tanzerら, *J. Dent. Educ.* 65 (2001) 1028-1037)。ミュータンス・ストレプトコッカス群は、少なくともストレプトコッカス・ミュータンス(*S. mutans*)、ストレプトコッカス・ソブリヌス(*S. sobrinus*)、ストレプトコッカス・クリセツス(*S. cricetus*)、ストレプトコッカス・ラッティ(*S. rattii*)、ストレプトコッカス・フェラス(*S. ferus*)およびストレプトコッカス・マカカエ(*S. macacae*)を含むものとして定義されている(Loescheら, *Microbio. Rev.* 50 (4) (1986) 353-380)。ストレプトコッカス・ミュータンスが、ヒトにおいて最も豊富に存在するミュータンス・ストレプトコッカスの代表であるという事実から、大部分の微生物学的齲蝕研究ならびに抗齲蝕方法は、この特定の種に重点を置いている。

【 0 0 0 6 】

歯の表面へのストレプトコッカス・ミュータンスの最初の結合は、2つのメカニズムを介して生じる。第1のメカニズムは、ストレプトコッカス・ミュータンスの、連鎖球菌抗原I/II(SA I/II)(B、IF、P1、SR、MSL-1またはPAcの同義語によっても知られている表面タンパク質)を介したペリクル(歯の表面上の唾液タンパク質の層)への結合である。このタンパク質に対する抗体は、*in vitro*でストレプトコッカス・ミュータンスの付着を妨げることが示されている。

【 0 0 0 7 】

従って、連鎖球菌抗原I/II(SA I/II)はワクチン投与の標的である。様々な組換えの組み合わせ(コレラ毒素に結合させた、または非病原性のサルモネラ菌株の表面上に発現させた完全抗原、唾液結合領域、タンパク質)において、動物の免疫の成功が示されている。この免疫の成功は、高いIgA力価およびストレプトコッカス・ミュータンス定着の低下をもたらした(Huangら, *Infect. Immun.* 69 (2001), 2154-2161)。SA I/IIをコードするDNAワクチンを使用して同様の結果が達成されている(Fanら, *J. Dent. Res.* 81 (2002), 784-787)。抗SA I/II抗体を乳酸菌の表面に組換え発現させることによって受動免疫が達成されている。これらのラクトバチルス菌はストレプトコッカス・ミュータンスを凝集させ、これらの細菌をラットに投与すると齲蝕進行の低減をもたらした(Kruegerら, *Nature Biotechnology* 20 (2002), 702-706)。

10

【 0 0 0 8 】

WO 06/027265は、ストレプトコッカス・ミュータンスの歯への付着を抑制する目的で、ストレプトコッカス・ミュータンスに結合し得る乳酸菌を提供する。

20

【 0 0 0 9 】

連鎖球菌抗原の最も重要な結合パートナーは、唾液凝集素(スカベンジャー受容体高システインスーパーファミリーに由来する肺の糖タンパク質gp-340と類似のタンパク質)である(Prakobpholら, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 39860-39866)。

【 0 0 1 0 】

齲蝕発生における凝集素の役割は、現在までのところ完全には理解されていない。凝集素は、歯の表面に結合して存在する場合に、ストレプトコッカス・ミュータンスの付着をもたらす可能性があり、また溶解状態で存在する場合にストレプトコッカス・ミュータンスの凝集を引き起こし得る。後者は、唾液流による、凝集したストレプトコッカス・ミュータンスの口からの除去をもたらすだろう。唾液中の高い凝集素濃度は、*in vitro*ではストレプトコッカス・ミュータンスの付着の増加をもたらすが、他方*in vivo*においては、唾液中の凝集素濃度と齲蝕のリスクとの間に明らかな相関関係はない(Stenuddら, *J. Dent. Res.* 80 (2001), 2005-2010)。

30

【 0 0 1 1 】

凝集素に対するモノクローナル抗体は、*in vitro*において、唾液で覆われたヒドロキシアパタイトへのストレプトコッカス・ミュータンスの結合を完全に遮断し、凝集素依存性の凝集を妨げる(CarlenおよびOlsson, *J. Dent. Res.* 74 (1995), 1040-1047; Carlenら, *J. Dent. Res.* 77 (1998), 81-90)。Bradyら, *Infect. Immun.* 60 (1992), 1008-1017は、表面付着と凝集とは、異なる抗体によって別々に阻害し得ることを示した。このことは、これらの2つの作用には凝集素の別々のエピトープが関与していることを示唆する。

40

【 0 0 1 2 】

齲蝕の進行に関係していることが多い他の唾液タンパク質は、高プロリンタンパク質(PRP)である。しかし、齲蝕原性細菌の付着におけるこれらのタンパク質の役割については論議を呼んでいる。これらのタンパク質は、2つの遺伝子座(PRH-1およびPRH-2)によってコードされ、わずかなアミノ酸のみが異なる別個の変異体(PRP-1、PRP-2、PIF、Db(ヘテロ接合体))として生じる。

【 0 0 1 3 】

これらの変異体は、タンパク質分解切断することが可能であり、いわゆる小PRP(PRP-3、PRP-4、PIF-fおよびDb-f)を生じさせる。PRPは、共生様(commensales)アクチノミセス・ネ

50

スルンディ (*Actinomyces naeslundii*) または非ミュータンス・ストレプトコッカスの強い結合を仲介する。興味深いことに、この結合は、歯の表面への上記のタンパク質の付着後にのみ起こり、結合部位へ接触可能にするコンホメーション変化を生じさせる。ストレプトコッカス・ミュータンスは、弱くのみ結合する。PRP変異体Dbは、ストレプトコッカス・ミュータンスの有効な結合と関係している。高濃度のDbは、ストレプトコッカス・ミュータンスの高付着および齲蝕の強い進行と相関している。高い総PRP濃度のうち、PRP-Dbの低下部分は、齲蝕の低い進行と相関している(Stenuddら, J. Dent. Res. 80 (2001), 2005-2010)。ストレプトコッカス・ミュータンスがPRPに直接結合するか否かについては知られていない。

【 0 0 1 4 】

ストレプトコッカス・ミュータンスを歯の表面に付着させる第2の方法は、スクロース依存性付着による方法である。ストレプトコッカス・ミュータンスは、糖ポリマーグルカン合成し得る3種類の異なるグリコシルトランスフェラーゼ(GTF)を発現する。グルカンは、水溶性形態(1-6グリコシド結合)およびムタンと呼ばれる不溶性形態(1-3グリコシド結合)で存在する。ムタンは、口腔細菌または唾液中の酵素のいずれによっても分解することができない。ムタンは、歯のプラーク中に、ストレプトコッカス・ミュータンスのスクロース依存性付着の基礎となる粘着性のマトリックスを形成する。ムタン形成に關与する一般的な酵素であるグリコシルトランスフェラーゼGTFBおよびGTFCは、ストレプトコッカス・ミュータンスの細胞表面上に位置している。対照的に、グリコシルトランスフェラーゼGTFDは可溶性グルカン合成し、これがストレプトコッカス・ミュータンスによって分泌される。ストレプトコッカス・ミュータンスのGTF欠失変異株を用いた実験は、スクロース依存性付着には3つの酵素全ての相互作用が必要であることを示す(Ooshimaら, J. Dent. Res. 80 (2001), 1672-1677)。グリコシルトランスフェラーゼは、N末端スクロース結合部位およびC末端グルカン結合部位を有する。酵素またはグルカン結合部位に対する抗体は、ストレプトコッカス・ミュータンスのスクロース依存性付着の阻害をもたらす。抗体を用いてN末端スクロース結合部位を遮断することはできなかった(Yuら, Infect. Immun. 65 (1997), 2292-2298)。

【 0 0 1 5 】

グリコシルトランスフェラーゼの阻害およびその後のストレプトコッカス・ミュータンスの付着の低減は、一部のフラボノイド類またはテルペノイド類(US 2004/0057908)またはプロポリス抽出物(Duarteら, Biol. Pharmacol. Bull. 26 (2003), 527-531)によって達成することもできる。

【 0 0 1 6 】

S11と名付けられた乳酸菌は、in vitroにおいてこれらがムタン形成を低下させ、それによりストレプトコッカス・ミュータンスの付着を低下させることが見出されている。上記のとおり、ムタン形成はストレプトコッカス・ミュータンスが歯の表面へ付着するのに不可欠である。この結果、Chungら, (Oral Microbiol. Immunol. 19 (2004), 214-216)は、ストレプトコッカス・ミュータンスを、ムタン形成を低下させると言われている乳酸菌S11菌株と共にインキュベートしたときに、ストレプトコッカス・ミュータンス細胞が剥離していることを発見した。ムタンへのストレプトコッカス・ミュータンスの結合は、細菌結合タンパク質(グルカン結合タンパク質)を介して生じる。この結合の正確なメカニズムを明らかにしなければならない(Satoら, Infect. Immun. 65 (1997), 668-675)。

【 0 0 1 7 】

真菌であるトリコデルマ・ハルジアナム(*Trichoderma harzianum*)とペニシリウム・ブルプロゲナム(*Penicillium purpurogenum*)は、同種の -1,3-グルカナーゼを産生する(Fuglsangら, J. Biol. Chem. 275 (2000), 2009-2018)。グルカン産生およびプラーク形成に対して有効なエンテロコッカス(*Enterococcus*)、ラクトバチルス(*Lactobacillus*)およびラクトコッカス(*Lactococcus*)種の使用が記載されている(US 6,036,952)。この作用のメカニズムを解明しなければならない。

【 0 0 1 8 】

齲蝕を抑制するための他の方法は、プラーク中の低pHを中和することである。尿素とアルギニンは唾液の成分である。尿素は、齲蝕に罹患していない人と齲蝕に罹患した人との間で大きな違いはなく、3~10 mmol/Lの濃度で存在する。遊離アルギニンの濃度は、4~40 μ mol/Lの間で異なる。齲蝕に罹患していない個人は、齲蝕に罹患した人より高い、唾液中の遊離アルギニンの濃度平均を有する(van Wuyckhuysenら, J. Dent. Res. 74 (1995), 686-690)。

【0019】

ストレプトコッカス・サングイス(*Streptococcus sanguis*)およびアクチノミセス・ネスルンディのような一部のプラーク細菌は、尿素またはアルギニンを開裂し、アンモニアの形成をもたらすことができる。アルカリ性のアンモニウムはプラークのpHを上昇させ、これにより齲蝕を低減させる(Curran ら, Appl. Environ. Microbiol. 61 (1995), 4494-4496; Morou-BermudezおよびBurne, Infect. Immun. 68 (2000), 6670-6676)。従って、これらの細菌は、齲蝕の治療に用いられることが示唆される。齲蝕の治療のために提案される別の方法は、PRP-1およびPRP-3のタンパク質分解により、口腔細菌様のストレプトコッカス・サングイス(*S. sanguis*)、ストレプトコッカス・オラリス(*S. Oralis*)およびストレプトコッカス・ミティス(*S. mitis*)によるさらなるタンパク質分解後にプラーク中に高pHをもたらし得る高アルギニンペプチドを創出することである。これらのペプチドの組換え変異体を適用することにより、pHのスクロース依存性低下が抑制される(Liら, Infect. Immun. 68 (2000), 5425-5429)。さらに、スクロース摂取後に尿素含有チューインガムを使用することによってpHの降下を抑制し、その結果、例えばストレプトコッカス・ミュータンスが齲蝕にそれほど寄与し得ないようにすることができると記載されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0020】

【特許文献1】WO 06/027265

【特許文献2】US 2004/0057908

【特許文献3】US 6,036,952

【非特許文献】

【0021】

【非特許文献1】Carlsonら, Caries Res. 9 (1975), 333-339

【非特許文献2】Duchin and van Houte Arch. Biol. Biol. 23 (1978) 779-786

【非特許文献3】Staatら, J. Dent. Res. 54 (1975) 872-880

【非特許文献4】Tanzerら, Infect. Immun. 10 (1974) 197-203

【非特許文献5】Edwardsson, Arch. Biol. 13 (1968) 637-646

【非特許文献6】Littletonら, Arch. Oral. Biol. 15 (1979) 461-463

【非特許文献7】Tanzerら, J. Dent. Educ. 65 (2001) 1028-1037

【非特許文献8】Loescheら, Microbio. Rev. 50 (4) (1986) 353-380

【非特許文献9】Huangら, Infect. Immun. 69 (2001), 2154-2161

【非特許文献10】Fanら, J. Dent. Res. 81 (2002), 784-787

【非特許文献11】Kruegerら, Nature Biotechnology 20 (2002), 702-706

【非特許文献12】Prakobpholら, J. Biol. Chem. 275 (2000) 39860-39866

【非特許文献13】Stenuddら, J. Dent. Res. 80 (2001), 2005-2010

【非特許文献14】CarlenおよびOlsson, J. Dent. Res. 74 (1995), 1040-1047

【非特許文献15】Carlenら, J. Dent. Res. 77 (1998), 81-90

【非特許文献16】Bradyら, Infect. Immun. 60 (1992), 1008-1017

【非特許文献17】Stenuddら, J. Dent. Res. 80 (2001), 2005-2010

【非特許文献18】Ooshimaら, J. Dent. Res. 80 (2001), 1672-1677

【非特許文献19】Yuら, Infect. Immun. 65 (1997), 2292-2298

【非特許文献20】Duarte ら, Biol. Pharmacol. Bull. 26 (2003), 527-531

【非特許文献21】Chungら, (Oral Microbiol. Immunol. 19 (2004), 214-216)

【非特許文献 2 2】Satoら, Infect. Immun. 65 (1997), 668-675

【非特許文献 2 3】Fuglsangら, J. Biol. Chem. 275 (2000), 2009-2018

【非特許文献 2 4】van Wuyckhuysenら, J. Dent. Res. 74 (1995), 686-690

【非特許文献 2 5】Curranら, Appl. Environm. Microbiol. 61 (1995), 4494-4496

【非特許文献 2 6】Morou-BermudezおよびBurne, Infect. Immun. 68 (2000), 6670-6676

【非特許文献 2 7】Liら, Infect. Immun. 68 (2000), 5425-5429

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0022】

しかし、上記から明らかなとおり、従来技術は、ストレプトコッカス・ミュータンスに対する抗齲蝕方法に重点を置いている。ストレプトコッカス・ミュータンス以外のミュータンス・ストレプトコッキを標的とすることを可能とするであろう方法は、齲蝕発生においてこれらが果たし得る役割にも関わらず記載されていない。従って、上記の所望の基準を満たし、ストレプトコッカス・ミュータンス以外の細菌によって引き起こされる齲蝕を予防および/または治療するために有用な手段および方法が必要とされている。

【0023】

このように、本発明の根底にある技術的課題は、上記の必要性を満たすことである。この技術的課題の解決は、請求項において特徴付けられる実施形態を提供することにより達成される。

【課題を解決するための手段】

【0024】

従って、第1の態様において、本発明は、ミュータンス・ストレプトコッキ群に属する細菌に特異的に結合し得ることを特徴とする乳酸菌群に属する微生物またはその変異体もしくは誘導体の使用であって、ここで該特異的結合が、ストレプトコッカス・ミュータンス以外のミュータンス・ストレプトコッキによって引き起こされる齲蝕の治療または予防用の抗齲蝕原性組成物の調製のために、(i)熱処理に耐性があり；および/または(ii)プロテアーゼ処理に耐性があり；および/または(iii)カルシウム依存性であり；および/または(iv)4.5~8.5のpH範囲内で形成され；および/または(v)唾液の存在下で形成される、上記使用に関する。

【0025】

好ましくは、上記の特異的結合は、以下のとおり：

(a) 上記の微生物を静止期まで増殖させ；

(b) 上記の微生物を、静止期まで増殖させたミュータンス・ストレプトコッキ群に属する細菌と混合し；

(c) ステップ(b)で得た混合物を、上記の微生物とミュータンス・ストレプトコッキ群の細菌との凝集体の形成を可能とする条件下でインキュベートし；さらに

(d) ペレットの発生によって凝集体を検出する

ステップでアッセイすることができる。

【0026】

好適な実施形態において、かかるアッセイにおいて用いられるミュータンス・ストレプトコッキ群に属する細菌は、ストレプトコッカス・ミュータンスである。

【0027】

上記の特異的結合は、好ましくは、以下の実施例4に記載のとおりアッセイされる。特に実施例4(下記参照)に記載のミュータンス・ストレプトコッキのペレット化凝集アッセイのため、乳酸菌群に属する微生物は、ミュータンス・ストレプトコッキと、3:1~60:1(ミュータンス・ストレプトコッキ:乳酸菌)の容量比で混合されることが好ましい。実施例1に記載のとおり、乳酸菌とミュータンス・ストレプトコッキの両方を静止期まで増殖させる。光学密度は、600 nmの波長で光度的に測定することが好ましい。上記の比は、1:50~1:2.5のコロニー形成単位の比に対応する。好ましくは、1ml中のOD₆₀₀=1は、ミュータンス・ストレプトコッカスの3x10⁸コロニー形成単位と相関している。好ま

10

20

30

40

50

しくは、以下に記載のとおり、1ml中の $OD_{600}=1$ は、乳酸菌の 7×10^9 コロニー形成単位と相関する。好ましくは、ペレット化による凝集反応をアッセイするため、上記の細菌は15mlファルコンチューブ内で2ml容量であることが好ましい。必要であれば、これらの培養懸濁液をPBS緩衝液で希釈して上記の容量比を得ながら2mlの最終容量を維持する。好ましくは、この混合物を約15秒間ボルテックスし、その後5、10、15分以上静置し、さらに好ましくは、20分以上室温(すなわち、16 ~ 25 の任意の温度)で静置する。凝集は、懸濁液の直接濁度として視認可能であり、少なくとも20分後、凝集は、目に見えるペレットとして沈殿する凝集体によって視認可能となり(図1、左側のファルコンチューブに例示)、他方、非ミュータンス・ストレプトコッカス凝集混合物は、懸濁液中にとどまったままとなる(図1、右側のファルコンチューブに例示)。対照として、各乳酸菌およびミュータンス・ストレプトコッカス菌株の自己凝集を、ミュータンス・ストレプトコッカスまたは乳酸菌のいずれかを除くことによってアッセイすることができる。

10

【0028】

上記のアッセイによるラクトバチルス菌とミュータンス・ストレプトコッカスの凝集は、形成された凝集体を遠心分離(例えば500xgで30秒間)で分離することによって定量することができる。その後、上清中に残った非凝集細胞の量を測定することによって凝集量を測定することができる。この測定は、当業者に公知の任意の好適な手段によって行うことができる。好ましくは、上記の測定は、特定量(例えば1ml)の上清を除去することによって行う。その後、取り出した上清の光学密度は、当業者に公知の任意の好適な波長(例えば600nm)で測定することができる。乳酸菌を用いない対応する対照試験の値を引いた後の測定値が、凝集していない細胞の量を示す。

20

【0029】

別法として、可能性のある自己凝集の問題に対処するため、染色、好ましくは蛍光染色を用いることができる。このため、さらに好ましい実施形態において、上記の特異的結合は、以下のとおり：

- (a) 上記の微生物を静止期まで増殖させ；
 - (b) 上記の微生物を、静止期まで増殖させて好適な染色試薬(好ましくは蛍光染色試薬)を用いて染色したミュータンス・ストレプトコッキ群に属する細菌を混合し；
 - (c) ステップ(b)で得た混合物を、上記の微生物とミュータンス・ストレプトコッキ群の細菌との凝集体の形成を可能とする条件下でインキュベートし；さらに
 - (d) 染色(好ましくは蛍光染色)の検出により凝集体を検出する
- ステップでアッセイすることができる。

30

【0030】

また、好適な実施形態において、かかるアッセイで用いられるミュータンス・ストレプトコッキ群に属する細菌は、ストレプトコッカス・ミュータンスである。好ましくは、このような凝集アッセイは、以下の実施例5に記載のとおりに行うことができる。特に、実施例5に記載のミュータンス・ストレプトコッキの凝集アッセイ(下記参照)のため、実施例1に記載のとおり、乳酸菌とミュータンス・ストレプトコッキの両方を静止期まで増殖させる。光学密度は、600nmの波長で光度的に測定することが好ましい。好ましくは、1ml中の $OD_{600}=1$ は、ミュータンス・ストレプトコッカスの 3×10^8 コロニー形成単位と相関している。好ましくは、以下に記載のとおり、1ml中の $OD_{600}=1$ は、ラクトバチルス菌の 7×10^9 コロニー形成単位と相関する。その後、ミュータンス・ストレプトコッキを染色する。他の好適な実施形態では、ラクトバチルス菌は染色するが、ストレプトコッキは染色しない。染色試薬として、任意の好適な染色試薬を用いることが可能であり、好ましくは、当業者に公知の蛍光染色試薬を用いることができる。特異的または非特異的蛍光染色試薬、例えば、CFDA-SEを使用し得ることが好ましい。特に細胞は、例えば、好ましくは3200xgで5分間の遠心分離によって回収される。その後、得られたペレットは、当業者に公知の任意の好適な緩衝液中に(好ましくはPBS緩衝液中で)再懸濁することができる。緩衝液の量は、結果として得られる懸濁液が、例えば4.2/mlの OD_{600} を有するように計算し得る。その後上記の懸濁液を、好適な染色試薬(例えば、好ましくは5,6-カルボキシ

40

50

フルオレセインジアセテート、スクシンイミジルエステル(CFDA-SE)を含む、さらに好ましくは2μlのCFDA-SE溶液(Invitrogen社)を含む蛍光染色試薬)と混合してよい。その後上記の細胞は、当業者に公知の好適な時間(例えば2時間)、当業者に公知の好適な温度(例えば37℃)でインキュベートし得る。

【0031】

他のステップでは、例えば遠心分離によって染色した細胞を回収することができる。上記の遠心分離は、3200xgで5分間行うことが好ましい。その後上記の細胞は、当業者に公知の好適な緩衝液中に(例えば2mlのPBS緩衝液中に)再懸濁し得る。凝集のため、乳酸菌群に属する微生物は、ミュータンス・ストレプトコッカスと、3:1~1:3の容量比(ミュータンス・ストレプトコッカス:ラクトバチルス菌)で混合することが好ましい。さらに好ましくは、この混合物の容量比は1:1である。上記の比は、1:50~1:150のコロニー形成単位の比に対応する。染色(好ましくは蛍光)を測定することによって凝集反応をアッセイするため、ラクトバチルス菌とミュータンス・ストレプトコッカスは、当業者に公知の任意の好適な容量(好ましくは容量50μl)で用いられる。混合は、マイクロタイタープレート中で(例えば96穴マイクロタイタープレート中で)行うことが好ましい。次いで上記の混合物を、好ましくはフルスピードで12分間ボルテックスし得る。その後、この混合物を、例えば500xgで10秒間遠心分離することができる。その後上清を除去し、ペレットを当業者に公知の任意の好適な緩衝液中に(好ましくは任意の好適な容量、例えば100μlのPBS緩衝液中に)再懸濁し得る。この懸濁液の染色は、上記の混合物中で、当業者に公知の任意の好適な手段によって測定することができる。好ましくは、蛍光染色の場合、この蛍光は、蛍光リーダー中で、例えば励起波長495nmおよび発光波長525nmで検出し得る。対照として、ラクトバチルス菌のみおよび染色したミュータンス・ストレプトコッカスのみをアッセイすることができる。試験対象のミュータンス・ストレプトコッカスのみについて、任意のバックグラウンド染色、例えば蛍光を測定することが可能であり、好ましくは各ラクトバチルス菌との凝集の値から引くことができる。上記に示すとおり測定したバックグラウンド染色(例えば蛍光)を、上記のラクトバチルス菌および上記の試験対象のミュータンス・ストレプトコッカスを含むサンプル中で測定した染色(例えば蛍光)から引き、結果として得られる値が少なくとも0を超える場合、凝集作用が存在する。さらに好ましくは、上記のとおりに行われる一連の試験において、結果として得られる値が再現性良く0を超える場合、凝集作用が存在する。「一連の実験」は、少なくとも2回、好ましくは3回、さらに好ましくは4回および最も好ましくは5回の試験を意味する。

【0032】

上記の特異的結合は、マグネシウムを必要としない。この特性は、実施例に記載のとおり試験することができる。

【0033】

実施例に記載のとおり、驚くべきことに、ストレプトコッカス・ミュータンスには結合するが他のストレプトコッカス種(ストレプトコッカス・サリバリウス(*S. salivarius*)、ストレプトコッカス・オラリス(*S. oralis*)、ストレプトコッカス・ミティス(*S. mitis*)および/またはストレプトコッカス・サングイニス(*S. sanguinis*))には結合しない能力により、上記の結合アッセイによって元来同定され且つ単離されていた乳酸菌(WO 06/27265参照)が、様々な他のミュータンス・ストレプトコッカス(例えばストレプトコッカス・ソプリヌス、ストレプトコッカス・クリセツス、ストレプトコッカス・ラッティ、ストレプトコッカス・フェラスおよびストレプトコッカス・マカカエ)を凝集させる能力を示すことが見出されている。このため、ストレプトコッカス・ミュータンスとの関連で上記の結合特性(この結合は、好ましくは上記のアッセイによって評価される)を示す乳酸菌の同定は、ストレプトコッカス・ミュータンスを凝集させる能力を有するだけでなく、他のミュータンス・ストレプトコッカス(すなわち、以下にさらに記載する共通の特性を有し、齧蝕進行とも関係するストレプトコッカス種をも凝集させる能力も有する乳酸菌を提供する。このように、ミュータンス・ストレプトコッカス群に属する細菌の1種(例えばストレプトコッカス・ミュータンス)に対して上述の結合特性を示す乳酸菌は、他のミュータンス

・ストレプトコッキ群に属する細菌も凝集させることが可能であり、このため、かかる他の細菌によって引き起こされる齲蝕の予防および/または治療に使用し得ることが見出されている。従って、ミュータンス・ストレプトコッキ群に属する細菌の1種に対する乳酸菌の結合を試験する上記のアッセイは、ミュータンス・ストレプトコッキ群の他の細菌にも結合し/凝集させる乳酸菌を同定することを可能とする。このように、本発明は、ストレプトコッカス・ミュータンス以外のミュータンス・ストレプトコッキによって引き起こされる齲蝕に対処するための手段および方法の提供における重要な改善を提供する。

【0034】

上記から明らかなように、上記の特性は全て、上記の乳酸菌群に属する微生物を、齲蝕(特にストレプトコッカス・ミュータンス以外のミュータンス・ストレプトコッキによって引き起こされる齲蝕)を予防および/または治療するために適した薬剤とする。従って、上記の乳酸菌群に属する微生物は抗齲蝕原性作用を与えるため、齲蝕(特にストレプトコッカス・ミュータンス以外のミュータンス・ストレプトコッキによって引き起こされる齲蝕)を予防および/または治療するために有用な薬剤である。「齲蝕」または「歯の齲蝕」または「空洞」は、徐々に歯の死をもたらす歯の軟らかく腐食した領域に関連する慢性感染疾患のための、互換性のある用語である。この疾患は、子供および若者に起こることが多いが、どんな人にも影響を及ぼし得る。この疾患は、若い人々の歯の喪失の最も重大な原因である。齲蝕は、当技術分野で公知の方法によって診断することができる(例えば、Angmar-Mansson and ten Bosch, Adv. Dent. Res. 7 (1993), 70-79参照)。

【0035】

「ミュータンス・ストレプトコッカス」という用語は、口腔内のプラーク中に見出され、マンニトールおよびソルビトールを発酵させる、ストレプトコッカスの分類群の微生物を指す。上記の特性を有し、さらにスクロースから細胞外グルカンを生産し得る微生物であることが好ましい。好ましくは、上記の微生物は、特にヒトおよび/または動物モデルにおいて齲蝕原性である。さらに好ましくは、この用語は、上記の全ての特性を示す微生物に関する。ソルビトールおよびマンニトールの発酵は、当業者に公知の任意の好適な試験(例えばAPI 20ステップ試験(BioMerieux社、France))を用いて試験することができる。

【0036】

より好ましくは、上記の用語は、ストレプトコッカス・ミュータンス、ストレプトコッカス・ソブリヌス、ストレプトコッカス・クリセツス、ストレプトコッカス・ラッティ、ストレプトコッカス・フェラスまたはストレプトコッカス・マカカエ種に属する微生物に関する。さらに好ましくは、この用語は、ストレプトコッカス・ミュータンス血清型c(DSMZ 20523)、ストレプトコッカス・ミュータンス血清型e(NCTC 10923)、ストレプトコッカス・ミュータンス血清型f(NCTC 11060)、ストレプトコッカス・ソブリヌスDSM 20742、ストレプトコッカス・ラッティDSM 20564、ストレプトコッカス・クリセツスDSM 20562、ストレプトコッカス・フェラスDSM 20646またはストレプトコッカス・マカカエDSM 20714に属する微生物に関する。「ミュータンス・ストレプトコッキ」という用語は、上記のミュータンス・ストレプトコッカス群の微生物の少なくとも1種を指す。好ましくは、この用語は、上記のミュータンス・ストレプトコッカス群に属する微生物の任意の組み合わせおよびサブグループを指す。

【0037】

「齲蝕を予防する」という用語は、齲蝕の予防を含む。従って、齲蝕の原因物質であるミュータンス・ストレプトコッキに遭遇したことはないが、遭遇する(すなわちミュータンス・ストレプトコッキに感染する)リスクがある被験体には、該被験体が齲蝕に罹患しないという限りにおいて、例えば、本発明の使用および方法が有効である。従って、乳児または若年の動物の口腔には通常はミュータンス・ストレプトコッキがいないため、本発明の使用および方法は、齲蝕の予防のために、例えば乳児、子供または若年の動物に適用することができる。しかし、本発明に従って用いられる組成物は、乳児、子供または若年の動物への投与に限定されるものではない。

【0038】

「齲蝕を治療する」という用語は、本明細書中の以下に記載の組成物を、ミュータンス・ストレプトコッカの細胞の量を低下させる目的および/または口から(特に歯を含む口腔から)ミュータンス・ストレプトコッカを完全に枯渇させる目的で、齲蝕に罹患している被験体に投与することを含む。当然、ミュータンス・ストレプトコッカから治癒した後は、ミュータンス・ストレプトコッカに与えられた予防的抗齲蝕作用について、本発明の使用および方法が各被験体に有効であるということが予想される。

【0039】

場合により、上記の乳酸菌群に属する微生物は、その抗齲蝕原性作用に加えて、これが投与される宿主生物に有益な効果を有するプロバイオティック微生物である。「プロバイオティック」は、一般に受け入れられている定義によれば、「宿主動物の腸内の微生物バランスを改善することによりその動物に有益に作用する生菌の栄養補助食品」である。

【0040】

ミュータンス・ストレプトコッカは、口内の正常細菌叢の一部として生じる。これらは、ヒトおよび動物(特に哺乳動物)における歯の齲蝕の原因に関与している。歯のプラークは、歯肉に隣接した歯の裂溝および小窩に付着する。プラークは、最初は歯のエナメル質上に沈着して吸着された糖タンパク質で構成される。その後、口腔細菌がこの糖タンパク質と関連するようになる。食事のスクロースは、特にスクロースが、その一部がしばらくの間口内に残り得る粘着性の甘い食品の形態である場合、齲蝕生成の重大な原因である。このようにして、スクロースはミュータンス・ストレプトコッカによってさらに完全に代謝され、酸を形成する。スクロースを含有する飲料は、飲み込まれるためこのスクロースが口内にある時間は少ない。習慣的な歯のブラッシングの使用ならびに爪楊枝およびデンタルフロスの使用によって、歯のプラークを抑制することが必要である。1ppmのフッ化物を飲料水に添加すると、齲蝕の低減に極めて有効であることが証明されている。さらに、科学界において、ストレプトコッカス・ミュータンスに対するワクチンの使用の可能性が検討されている。このため、口腔中の大部分の細菌に作用する口内衛生の一般的スキームに加えて、従来技術は、ほぼ完全にストレプトコッカス・ミュータンスに対する特定の手段に集中している。しかし、乳酸菌群に属する天然の微生物(好ましくは、ストレプトコッカス・ミュータンスに結合する能力によって同定されたラクトバチルス属に属する微生物)が、ミュータンス・ストレプトコッカ株(例えばストレプトコッカス・ソブリヌス、ストレプトコッカス・クリセツス、ストレプトコッカス・ラッティ、ストレプトコッカス・フェラスまたはストレプトコッカス・マカカエ等)に結合する能力も有するという本発明の驚くべき発見により、上記の乳酸菌群に属する微生物は、ミュータンス・ストレプトコッカ(例えばストレプトコッカス・ソブリヌス、ストレプトコッカス・クリセツス、ストレプトコッカス・ラッティ、ストレプトコッカス・フェラスまたはストレプトコッカス・マカカエ等)を凝集させ且つ洗い流すことができるため、今やストレプトコッカス・ミュータンス以外のミュータンス・ストレプトコッカによって引き起こされる齲蝕を有効に予防および/または治療することが可能である。従って、本発明は、その抗齲蝕原性特性に加えてプロバイオティクスとして有用であり得る食品用生物である、簡単に投与できる細菌の使用を提供する。

【0041】

特に、乳酸菌群に属する微生物(好ましくは、ストレプトコッカス・ミュータンスには結合するがストレプトコッカス・サリバリウス、ストレプトコッカス・オラリス、ストレプトコッカス・ミティスおよびストレプトコッカス・サンガイニスには結合しない能力によって元来同定されていたラクトバチルス属に属する微生物)を分析したとき、驚くべきことに、この微生物はストレプトコッカス・ミュータンスに結合し得るだけでなく、他のミュータンス・ストレプトコッカ種(例えば、齲蝕の原因物質であるストレプトコッカス・ソブリヌス、ストレプトコッカス・クリセツス、ストレプトコッカス・ラッティ、ストレプトコッカス・フェラスまたはストレプトコッカス・マカカエ等)にも結合し得ることが見出されている。これらのミュータンス・ストレプトコッカに結合することによって

、上記の乳酸菌群(好ましくは、特に本明細書中に記載のラクトバチルス属)に属する微生物は、ミュータンス・ストレプトコッカスに結合して凝集させ、このようにして結果的には唾液の自然な流れによってミュータンス・ストレプトコッカスを洗い流すことにより、齲蝕を予防および/または治療する。それに加えて、上記の乳酸菌群に属する微生物は、本明細書中(特に以下の実施例6)に記載の、口腔中に存在するミュータンス・ストレプトコッキ群に属さない他の微生物には結合しないことが好ましい。このようにして、齲蝕の原因物質としてのミュータンス・ストレプトコッキのみが枯渇するため、口腔の微小環境は影響を受けない。知見の限りでは、ミュータンス・ストレプトコッキは、口腔への有益な効果を全く有していないため、これらの喪失が各宿主に悪影響を及ぼすことはない。

10

【0042】

ミュータンス・ストレプトコッキに対する上記の乳酸菌群(特に本明細書中に記載のラクトバチルス種)に属する微生物の特異的結合は、顕著に、熱処理に耐性且つ/またはプロテアーゼ処理に耐性である。さらに、この特異的結合はカルシウム依存性且つ/またはマグネシウム非依存性で、酸性点である4.5において安定であり、またこの特異的結合は唾液の存在下で生じ、このことが上記の微生物を、経口適用形態での、または高濃度のカルシウムを含み得る食品、飼料、もしくは飲料(例えば牛乳)の添加物としての使用に特に適したものとする。驚くべきことに、本明細書中に開示される上記の微生物の熱不活性化させたまたは凍結乾燥した類似体、誘導体もしくは断片は、依然としてミュータンス・ストレプトコッキに特異的に結合することができる。この驚くべき作用は、齲蝕を予防および/または治療するために動物(好ましくは、ヒトまたは哺乳動物)において使用するための組成物中での上記の微生物の類似体もしくは断片ならびにこれらの変異体もしくは誘導体の使用に有利である。特に上記の類似体または断片は、例えば化粧品組成物または医薬組成物、食品もしくは飼料または飲料等の任意の組成物に容易に加えることができる。さらに、かかる類似体または断片の製造は、安価で容易であり、ミュータンス・ストレプトコッキに特異的に結合する能力を喪失することなく長期間保存することができる。上記の乳酸菌群に属する微生物の他の利点は、凍結乾燥され、または噴霧乾燥もしくは乾燥された場合に、ミュータンス・ストレプトコッキに特異的に結合する能力を保持することである。この利点は、上記の微生物を、本明細書中に記載の組成物中での使用に好ましい成分とする。

20

30

【0043】

本発明の他の実施形態および利点は本明細書中の記載においてある程度説明され、さらにある程度は、本明細書中の記載から明らかであり、または本発明の実施から学ぶことができる。

【0044】

本明細書中に記載の特定の方法、プロトコル、細菌、ベクター、および試薬等は変更可能であるため、本発明がこれらに限定されるものではないことは、本発明を詳細に説明する前に理解されるべきである。本明細書において用いられる用語は、特定の実施形態を説明するためにのみ用いられ、特許請求の範囲の記載のみによって限定される本発明の範囲の限定を意図するものではないことも理解されるべきである。他に定義されない限り、本明細書中で用いられる技術用語および科学用語は、当業者に一般的に理解されている意味と同じ意味を有する。

40

【0045】

好ましくは、本明細書中で用いられる用語は、“A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)”, Leuenberger, H.G.W, Nagel, B.およびKolbl, H.編(1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerlandに記載のとおり定義される。本明細書およびそれに続く特許請求の範囲全体にわたって、文脈上他の意味に解すべき場合を除き、「含む」という単語は、記載された整数もしくはステップ、または整数もしくはステップのグループの包含を意味するが、任意の他の整数もしくはステップまたは整数もしくはステップのグループの除外を意味するものではないことが理解さ

50

れるだろう。

【0046】

この明細書の文章全体を通して、幾つかの文献が引用されている。本明細書中で引用される各文献(特許、特許出願、科学出版物、製造者の仕様書、説明書等の全てを含む)は、上記でも下記でも、参照によりその全体が本明細書に援用される。本明細書中のいかなる記載も、本発明が、先行発明による開示に先行する権利がないと認めていると解されるべきではない。

【0047】

本明細書および特許請求の範囲において用いられるとおり、文脈上明らかに他の意味を示す場合を除き、「a」、「an」および「the」の単数形は、複数の支持対象を含むことに留意しなければならない。従って、例えば、「試薬」に言及する場合は1種以上のかかる異なった試薬を含み、「方法」に言及する場合、本明細書中に記載の方法を改変またはこれと置換し得た、当業者に公知の同等のステップおよび方法への言及を含む。

【0048】

本発明の文脈において用いる場合、「乳酸菌群に属する微生物」という用語は、細菌(特にグラム陽性発酵真正細菌、さらに特に乳酸菌を含む乳桿菌(*Lactobacteriaceae*)のファミリーに属する細菌)に属する微生物を包含する。用語「誘導体」、「変異体」、「類似体」および「断片」は、本明細書中の他の箇所に記載されている。乳酸菌は、分類上の観点から、ストレプトコッカス(*Streptococcus*)、レウコノストック(*Leuconostoc*)、ペディオコッカス(*Pediococcus*)およびラクトバチルス(*Lactobacillus*)に細分化される。上記の乳酸菌群に属する微生物は、ラクトバチルス種であることが好ましい。乳酸菌群のメンバーには通常はポルフィリンおよびシクロロムがなく、電子伝達リン酸化を行わないため、基質レベルのリン酸化によってのみエネルギーを得る。すなわち、乳酸菌中では、ATPは炭水化物の発酵を通して合成される。全ての乳酸菌は嫌氣的に増殖するが、多くの嫌気性菌とは異なり、大部分の乳酸菌は酸素感受性ではないため、酸素の存在下ならびに非存在下で増殖することができる。従って、乳酸菌群に属する上記の微生物は、好ましくはラクトバチルス属に属する酸素耐性嫌気性乳酸菌であることが好ましい。

【0049】

上記の乳酸菌は、好ましくは桿菌様または球状であって、細長い桿状体から短く曲がった桿状体と様々であり、さらに好ましくは不動および/または無孢子であり、発酵代謝の主要なもしくは単一の生成物として乳酸を生成する。上記の微生物が属するラクトバチルス属は、以下の特性によって3つの主要なサブグループに分けられ、これにより上記のラクトバチルス種が3つの主要なサブグループのそれぞれに属し得ると想定される。

【0050】

(a) ホモ発酵性ラクトバチルス

(i) グルコースから、エムデン-マイヤーホフ経路を経て85%以上の量で乳酸(好ましくは乳酸のL、DまたはDLアイソマー)を生成し；

(ii) 45 の温度では増殖するが、15 の温度では増殖せず；

(iii) 長桿形であり；且つ

(iv) 細胞壁中にグリセロールテイコ酸を含む；

(b) ホモ発酵性ラクトバチルス

(i) エムデン-マイヤーホフ経路を経て乳酸(好ましくは乳酸のLまたはDLアイソマー)を生成し；

(ii) 15 の温度で増殖し、45 の温度で可変増殖を示し；

(iii) 短桿形またはコリネ型であり；且つ

(iv) 細胞壁中にリピトールおよび/またはグリセロールテイコ酸を含む；

(c) ヘテロ発酵ラクトバチルス

(i) グルコースから、ペントースリン酸経路を経て50%以上の量で乳酸(好ましくは乳酸のDLアイソマー)を生成し；

(ii) 二酸化炭素とエタノールを生成し、

10

20

30

40

50

- (iii) 15 または45 の温度で可変増殖を示し；
- (iv) 長桿形または短桿形であり；且つ
- (v) 細胞壁中にグリセロールテイコ酸を含む。

【 0 0 5 1 】

上記の特性に基づいて、上記の微生物は、乳酸菌群、特にラクトバチルス属に属するように分類することができる。従来の系統分類学を用いて、例えば、"Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" (Williams & Wilkins Co., 1984) 中の関連の記載を参照することにより、ある微生物が、ラクトバチルス属に属すると決定することができる。別法として、この微生物を、当技術分野で公知の方法により、例えば該微生物の代謝フィンガープリント(すなわち、かかる微生物が糖を代謝する能力の比較概観)により、または例えばSc hleifer ら, System. Appl. Microb., 18 (1995), 461-467もしくはLudwigら, System. A ppl. Microb., 15 (1992), 487-501に記載される他の方法によって、ラクトバチルス属に属すると分類することができる。上記の微生物は、糖の源を代謝することが可能であり、このことはラクトバチルス属に属する微生物の分野において典型的且つ公知である。しかし、好ましくは上記の微生物は、以下からなる群から選択される代謝フィンガープリントを有する：

- (i) D-ラクトースを代謝するが、L-ソルボースおよび/またはD-サッカロースおよび/またはD-イヌリンは代謝しない、
- (ii) イヌリンを代謝する、
- (iii) L-ソルボースを代謝するが、D-ラクトースおよび/またはD-サッカロースおよび/またはイヌリンは代謝しない、また
- (iv) L-ソルボース、D-ラクトースおよびイヌリンを代謝する。

【 0 0 5 2 】

好ましくは、上記の微生物は、以下からなる群から選択される代謝フィンガープリントを有する：

- (i) D-ラクトースを代謝するが、L-ソルボース、D-サッカロースおよびイヌリンは代謝しない、
- (ii) L-ソルボース、D-ラクトースおよびイヌリンを代謝するが、D-サッカロースは代謝しない、
- (iii) L-ソルボースを代謝するが、D-ラクトース、D-サッカロースおよびイヌリンは代謝しない、また
- (iv) L-ソルボース、D-ラクトース、D-サッカロースを代謝するが、イヌリンは代謝しない。

【 0 0 5 3 】

当然、上記の微生物は、上述の代謝フィンガープリントパターンにおいて言及される糖の代謝には限定されず、ラクトバチルス種によって一般に代謝される他の糖を代謝することができる。

【 0 0 5 4 】

ラクトバチルス属への上記の微生物の帰属は、当技術分野で公知の他の方法を用いることにより(例えば、決定すべき種の全タンパク質のSDS-PAGEゲル電気泳動を用いて、これらを公知の既に特徴付けられたラクトバチルス属の株と比較することによって)特徴付けることもできる。上記のように全タンパク質プロファイルを作成する技術、ならびにかかるプロファイルの数値分析は、当業者に周知である。しかしながら、これらの結果は上記のプロセスの各段階が十分に標準化されている限りにおいてのみ信頼し得る。ある微生物がラクトバチルス属に帰属することを決定するときに精度が要求される場合、欧州連合(European Union)によって組織された「ワークショップ」の期間中にベルギーのヘント大学において1994年9月12日～9月16日に発表されたとおり(細菌の分類および同定のためのフィンガープリント技術、全細胞タンパク質のSDS-PAGE)、Potらなどの著者らによって標準化された手法が通常一般に利用可能である。この技術においてSDS-PAGE電気泳動ゲルを分析するために用いられるソフトウェアは、種間の相関性の程度が、このソフトウェアによ

って使用されるパラメータとアルゴリズムによって決まるため、極めて重要である。理論的詳細には立入らないが、密度計によって測定され、コンピューターによって正規化されたバンドの定量的比較は、ピアソン相関係数を用いて行うことが好ましい。このように得られた類似性マトリクスは、UPGMA(平均連結法を用いた単純ペアグループ法)アルゴリズムを用いて体系化することが可能であり、これは、最も類似しているプロファイルを一つにまとめるだけでなく、系統樹を構築することも可能とする(Kerstens, Numerical methods in the classification and identification of bacteria by electrophoresis, in Computer-assisted Bacterial Systematics, 337-368, M. Goodfellow, A. G. O'Donnell 編, John Wiley and Sons Ltd, 1985参照)。

【0055】

別法として、上記の微生物のラクトバチルス属への帰属は、いわゆるリボプリンター・RTM中のリボソームRNAに関して特徴付けることができる。さらに好ましくは、上記の種のラクトバチルス属への帰属は、この細菌の16SリボソームRNA、または16SリボソームRNAをコードするこれらの細菌のゲノムDNAのヌクレオチド配列を、現在までに知られている他の乳酸菌の属および種の16SリボソームRNAまたは16SリボソームRNAをコードするゲノムDNAのヌクレオチド配列と比較することによって示される。ある種がラクトバチルス属に帰属することを決定するための別の好適な代替法は、16S-23S rRNAスペーサー領域を標的とする種特異的PCRプライマーの使用である。別の好適な代替法は、同定された微生物がラクトバチルス属に帰属することの決定を可能とする株特異的DNAパターンが作成されることによるRAPD-PCR(Nigatuら, Antonie van Leeuwenhoek (79), 1-6, 2001中に記載)である。ある微生物がラクトバチルス属に帰属することの決定に役立つ他の技術は、制限酵素断片長多型(RFLP)(Giraffaら, Int. J. Food Microbiol. 82 (2003), 163-172)、各エレメントのフィンガープリンティング(Geversら, FEMS Microbiol. Lett. 205 (2001) 31-36)または細菌細胞の脂肪酸メチルエステル(FAME)パターンの分析(Heyrmanら, FEMS Microbiol. Lett. 181 (1991), 55-62)である。別法として、レクチンタイピングにより(Annukら, J. Med. Microbiol. 50 (2001), 1069-1074)、または細胞壁タンパク質の分析によって(Gattiら, Lett. Appl. Microbiol. 25 (1997), 345-348)によって、ラクトバチルス菌を決定することができる。

【0056】

上記の微生物は、好ましくはラクトバチルス属に属する乳酸菌、より好ましくは本明細書中に記載のラクトバチルス種である。さらに好ましくは、上記のラクトバチルスは、ラクトバチルス・パラカゼイまたはラクトバチルス・ラムノサスである。しかし、ラクトバチルス種は、これらに限定されない。上記の微生物は、好ましくは「単離され」または「精製され」ていてよい。「単離された」という用語は、その物質が、元の環境(例えば、その物質が天然物であれば、天然の環境)から取り出されていることを意味する。例えば、自然系の中の共存物質の一部または全てから分離された天然の微生物(好ましくはラクトバチルス種)は単離されている。かかる微生物は組成物の一部であってよく、この組成物がその自然環境の一部ではないという点において、依然として単離されていると考えるべきである。

【0057】

「精製された」という用語は、絶対純度を要求するものではなく、むしろこの用語は、相対的定義を意図するものである。ライブラリから得られる個々の微生物は、通常、微生物学的に均一になるまで精製されている(すなわちこれらの微生物は、当技術分野で公知の方法によって寒天プレート上に画線する場合、単一のコロニーとして増殖する)。この目的のために用いられる寒天プレートは、ラクトバチルス種選択的であることが好ましい。かかる選択寒天プレートは、当技術分野において公知である。

【0058】

より好ましくは、上記の乳酸菌群に属する微生物は、DSMZ受託番号DSM 16667(ラクトバチルス・パラカゼイ属の種パラカゼイLb-Ob-K1)、DSMZ受託番号DSM 16668(ラクトバチルス・パラカゼイ属の種パラカゼイLb-Ob-K2)、DSMZ受託番号DSM 16669(ラクトバチルス・

10

20

30

40

50

パラカゼイ属の種パラカゼイLb-Ob-K3)、DSMZ受託番号DSM 16670(ラクトバチルス・パラカゼイ属の種パラカゼイLb-Ob-K4)、DSMZ受託番号DSM 16671(ラクトバチルス・パラカゼイ属の種パラカゼイLb-Ob-K5)、DSMZ受託番号DSM 16672(ラクトバチルス・ラムノサスLb-Ob-K6)およびDSMZ受託番号DSM 16673(ラクトバチルス・ラムノサスLb-Ob-K7)を有するラクトバチルス・パラカゼイもしくはラクトバチルス・ラムノサスまたはその変異体もしくはは誘導体からなる群から選択され、ここで上記の変異体または誘導体は、ミュータンス・ストレプトコッキに特異的に結合する能力を保持する。「DSMZ受託番号を有するラクトバチルス・パラカゼイまたはラクトバチルス・ラムノサス」という用語は、2004年8月26日にDeutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH(「DSMZ」)に寄託され、以下の寄託番号DSM 16667、16668、16669、16670、16671、16672または16673を有するラクトバチルス・パラカゼイ種またはラクトバチルス・ラムノサス種に属する微生物の細胞に関連している。DSMZは、Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germanyに所在している。上記のDSMZ寄託は、特許手続き上の微生物寄託の国際承認に関するブダペスト条約の規約に従って行われた。

【0059】

上記の乳酸菌群に属する微生物の「変異体または誘導体」(好ましくは寄託されたラクトバチルス・パラカゼイまたはラクトバチルス・ラムノサス細胞の変異体もしくはは誘導体)は、好ましくは、寄託されたそれぞれの株と同じ特徴を有する。すなわち上記の変異体または誘導体は、ミュータンス・ストレプトコッキに特異的に結合する能力を保持し、好ましくは、本明細書中に記載の結合特性を有する。例えば、上記の誘導体は遺伝子操作することができる。本発明の文脈において、「遺伝子操作された」という用語は、*in vitro* および *in vivo*において、遺伝子改変が生じるように、また組換えDNA技術によって遺伝子が変化するように所望の核酸を改変するための当業者に公知の方法について最も広い意味で用いられる。従って、上記の方法は、組換え核酸のクローニング、配列決定および形質転換を含んでなることが好ましい。この目的のため、適切なベクターは、例えば、EP-B1 506 789、EP-B1 316 677、EP-B1 251 064、EP-B1 218 230、EP-B1 133 046またはWO 89/01970に記載のラクトバチルス種用の発現ベクターを含む。

【0060】

プライマー、酵素、中間構築物をクローニングするための他の宿主細胞等を用いることが可能であり、これらは当業者に公知である。好ましくは、遺伝子操作された変異体は、細菌の染色体もしくはプラスミドのいずれかに含まれる、または細菌の染色体および/またはプラスミドに含まれる組換え核酸を有する、上記の乳酸菌群に属する微生物の細胞(好ましくは寄託されたラクトバチルス種の細胞)を含む。上記の組換え核酸は、上記の乳酸菌群に属する微生物に対して外来性であることが好ましい。「外来性」という用語は、ポリヌクレオチドまたは核酸分子が、宿主細胞に関して異種であること(これは、異なるゲノム背景を有する細胞または生物に由来していることを意味する)、あるいは宿主細胞に関しては同種であるけれども上記の核酸分子の天然の対応物とは異なるゲノム環境に位置していることのいずれかであることを意味する。これは、上記の核酸分子が宿主細胞に関して同種である場合、この核酸分子が上記の宿主細胞のゲノム中の天然の位置には位置していない(特にこの核酸分子が異なる遺伝子に囲まれている)ことを意味する。この場合、上記のポリヌクレオチドは、それ自身のプロモーターの制御下にあってもよいし、異種プロモーターの制御下にあってもよい。宿主細胞中に存在する上記のベクターまたは核酸分子は、宿主細胞のゲノムに組み込まれていてもよいし、何らかの形態で染色体外に保持されていてもよい。この点において、相同組み換えによって変異体遺伝子を修復または創出するために上記の核酸分子を使用し得ることも理解されるべきである。プラスミドは、低コピー数、中コピー数または高コピー数のプラスミドであってよい。上記の遺伝子操作された変異体は、サッカロースサブユニットのムタン特異的1,3-グリコシド結合を分解することができるグルカナーゼまたはムタナーゼをコードする核酸を有し得る。真菌のグルカナーゼは、例えばFuglsangら, J. Biol. Chem. 275 (2000), 2009-2018に記載されている。遺伝子操作された変異体が、好ましくは細菌の細胞壁から分泌され、または細胞壁に結

合している抗体をコードする組換え核酸を有する細胞を含むことも考えられる。「抗体」という用語は、インタクトな抗体ならびにその抗体断片(例えば分離された軽鎖および重鎖、Fab、Fab/c、Fv、Fab'、F(ab')₂)を包含する。「抗体」という用語は、ヒト化抗体、二機能抗体、および単鎖Fvs(scFv)または抗体融合タンパク質のような抗体構築物も含む。本発明の文脈においては、「抗体」という用語が、上記の寄託された微生物の誘導体の細胞中で発現させ得る抗体構築物(例えば、特に当技術分野で公知の方法によるベクターによって形質転換させ得る抗体構築物)を含むことも想定される。特に、かかる抗体構築物が、例えば連鎖球菌抗原I/IIを特異的に認識することが考えられる。このような方法は、例えば、Kruegerら, Nat. Biotechnol. 20 (2002), 702-706またはShiroza, Biochim Biophys Acta 1626 (2003), 57-64に記載されている。

10

【0061】

発現された抗体の分泌は、好ましくは、抗体をコードする核酸を分泌シグナル配列に機能的に連結させることによって達成される。細菌の細胞壁に結合させることは、酵素ソーターゼのメカニズムを利用することによって達成することができた。すなわち、グラム陽性細菌の表面タンパク質は、保存されたLeu-Pro-X-Thr-Gly(LPXTG)モチーフの切断を含むメカニズムによって細菌の細胞壁に結合され、これはペプチドグリカン細胞壁の構築の間に生じる。従って、抗体をコードする核酸分子は、ソーターゼがタンパク質を細菌の細胞壁に結合させるために用いる上記の保存モチーフをコードする配列に融合させることができる。

【0062】

20

上記の乳酸菌群に属する微生物(好ましくは、上記の寄託されたラクトバチルス種)を、特にストレプトコッカス・ミュータンスに対して有効な抗菌物質であるリ्यूテリンをコードする核酸分子を有するように遺伝子改変することも考えられる。リ्यूテリンは、例えば、Talaricoら, Chemother. 33 (1989), 674-679に記載されている。

【0063】

上記の乳酸菌群に属する微生物の変異体(好ましくは寄託されたラクトバチルス株の変異体)は、人為的に変異されていることが好ましい。本発明によれば、「変異された」という用語は、例えば自然に、または物理的手段もしくは化学的化合物/物質/薬剤(例えばEMSもしくはENU)によって引き起こされる、遺伝物質(すなわち核酸)の永久的改変を意味する。上記の改変は、核酸/遺伝子/染色体内の1つ以上の塩基の転移またはトランスポージョン、欠失/挿入/付加のような点変異を含み、これにより核酸/遺伝子/染色体を改変し、この改変が、例えばドミナントネガティブ効果を生じさせる、異常な遺伝子発現/転写/翻訳または不活性な遺伝子産物、構成的に活性/不活性な遺伝子産物を特に引き起こし得る。好ましくは、変異は、ミュータンス・ストレプトコッキに特異的に結合する能力の向上をもたらす。このように、所望の遺伝子中に変異を有する寄託された微生物の変異細胞、または所望の遺伝子中の変異が当業者に公知の方法によって誘導されている変異細胞も好ましい。従来技術においては、変異したまたは遺伝子操作された細菌細胞を、任意の好適な方法/表現型によって選択し得るということも知られている。本発明の文脈において、ミュータンス・ストレプトコッキに特異的に結合する能力が高められている変異体を、実施例に記載の方法に従って試験することができる。しかし、「変異体」という用語は、ゲノム(すなわち細菌染色体)中に自然の自発的変異を有する、上記の乳酸菌群に属する微生物の細胞(好ましくは寄託された微生物の細胞)も包含する。「自発的変異」は自然に、すなわち人、または変異原への曝露による直接的な遺伝子操作を行うことなく生じる変異である。自発的変異体の選択は、上記の株を培養し、ミュータンス・ストレプトコッキへの結合の向上を示す変異細菌の能力によって所望の変異体を選択することにより達成することができる。自発的変異体の選択方法は、当技術分野において周知である(例えば、Sambrook, Russell "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (2001); Ausubel, "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989)参照)。例えば、かかる変異は、培養の間(例えば、DNA複製を伴う通常の細胞分裂過程の間、または乳酸菌群に

30

40

50

属する上記の微生物の変異体の継代および/または保存中)に生じ得る。

【0064】

口腔は、多数の異なる種のストレプトコッキイにとって生育場所であり、これらが同一の生育環境を共有しているということを考慮すれば、これらの多数の異なる種が多くの特徴を共通に有していることは驚くべきことではない。このように、上記の乳酸菌群に属する微生物は、ミュータンス・ストレプトコッキイに特異的に結合することが好ましい。従って、本発明の文脈における「特異的に結合する」という用語は、上記の乳酸菌群に属する微生物(好ましくはラクトバチルス属に属する微生物)が、ミュータンス・ストレプトコッカス(特にストレプトコッカス・ミュータンス)には結合するが、他の大部分の種には結合せず、好ましくはストレプトコッカス属に属する他の種(実施例6に記載される種)には結合しないことを意味する。すなわち、上記の乳酸菌群に属する微生物は、好ましくは、ストレプトコッカス・サリバリウス(好ましくは亜種サーモフィルスに属する)種、ストレプトコッカス・オラリス種、ストレプトコッカス・ミティス種および/またはストレプトコッカス・サンガイニス種に属する細菌には結合しない。さらに好ましくは、この微生物は、ストレプトコッカス・サリバリウス属の種サーモフィルス(API 50 CH(Biomerieux社, France)によって同定される)、ストレプトコッカス・オラリス(DSMZ 20066)、ストレプトコッカス・オラリス(DSMZ 20395)、ストレプトコッカス・オラリス(DSMZ 20627)、ストレプトコッカス・ミティス(DSMZ 12643)および/またはストレプトコッカス・サンガイニス(DSMZ 20567)には結合しない。さらに、上記の微生物は、好ましくは、ストレプトコッカス以外の属に属する(例えばスタフィロコッカス(*Staphylococcus*)属に属する)細菌には結合しない。さらに好ましくは、この微生物は、スタフィロコッカス・エピデルミディス(*Staphylococcus epidermidis*)種に属する細菌には結合しない。最も好ましくは、この微生物は、スタフィロコッカス・エピデルミディス(DSMZ 1798)および/またはスタフィロコッカス・エピデルミディス(DSMZ 20044)には結合しない。

【0065】

上記のとおり、驚くべきことに、ストレプトコッカス・ミュータンスには結合するが、他のストレプトコッカス種(ストレプトコッカス・サリバリウス、ストレプトコッカス・オラリス、ストレプトコッカス・ミティスおよび/またはストレプトコッカス・サンガイニス)には結合しないことについて選択される乳酸菌が、他のミュータンス・ストレプトコッキイ(すなわち、上記の共通の特性を示し、齲蝕の原因物質として疑われてもいる他のストレプトコッカス種)にも結合する能力を示すことが見出されている。このように、ストレプトコッカス・ミュータンスに対して上記の特異的結合特性を示す乳酸菌は、ストレプトコッカス・ミュータンス以外のミュータンス・ストレプトコッキイによって引き起こされる齲蝕の予防または治療に関しても用いられる能力を示す。従って、好適な実施形態において、本発明の乳酸菌は、これらがストレプトコッカス・ミュータンスに関して上記の結合特性(すなわち(i)熱処理に耐性があり;および/または(ii)プロテアーゼ処理に耐性があり;および/または(iii)カルシウム依存性であり;および/または(iv)4.5~8.5のpH範囲内で結合を形成し;および/または(v)唾液の存在下で結合を形成する)を示し、またこの結合が、ストレプトコッカス・ミュータンスがミュータンス・ストレプトコッキイ群に属する細菌として用いられる上記のアッセイにおいて試験される点において特徴付けられる。

【0066】

特異的結合の試験のため、好ましくは、上記の各々の口腔細菌は、本明細書中の上記のとおりラクトバチルス培養液と容量比3:1で混合することが好ましく、凝集は、本明細書中、および例えば実施例4または実施例5に記載のとおり(好ましくは実施例5に記載のとおり)アッセイされる。

【0067】

上記のラクトバチルス・パラカゼイ(好ましくはラクトバチルス・パラカゼイ属の種パラカゼイ)は、ストレプトコッカス属に属する上記の口腔細菌をいずれも凝集させず、本明細書中の上記のスタフィロコッカス属に属する細菌には結合しないことが示された。上記

のラクトバチルス・ラムノサス株は、ストレプトコッカス・サリバリウス属の種サーモフィルスは別として、上記のストレプトコッカス種およびスタフィロコッカスの種の全てを凝集させるわけではないことが示された。好ましくは、「特異的に結合する」という用語は、上記の乳酸菌群に属する微生物が、齲蝕原性の歯の病原菌となる能力を有するミュータンス・ストレプトコッキ株に結合することも意味する。

【0068】

上記の特異的結合反応は、口内における、上記の乳酸菌群に属する微生物による、本明細書中に記載のミュータンス・ストレプトコッカス細胞の結合および好ましくは凝集を含む。この特異的結合は、結果として、例えば唾液流によって、または本明細書中に記載のマウスリンスもしくはマウスウォッシュ等によってミュータンス・ストレプトコッカス細胞を洗い流すように導く。口は、口の粘膜(歯肉、唇、頬、口蓋および口床)、舌および歯(人工構造物も含む)によって構成される哺乳動物(好ましくはヒトまたはペットなどの動物)の口腔を定義する。好ましくは、ミュータンス・ストレプトコッキに対する上記の乳酸菌群に属する微生物の特異的結合反応は、ミュータンス・ストレプトコッカス細胞が、歯の表面または歯に付着することを防ぐ(または、理論に拘泥するものではないが、歯の表面または歯からのミュータンス・ストレプトコッカス細胞の剥離を生じさせることができるかもしれない)。結果として、上記の特異的結合反応は、ミュータンス・ストレプトコッカス細胞を口の外に洗い流し、これにより齲蝕の原因物質を減少させ、そして齲蝕を予防および/または治療する。

【0069】

上記の乳酸菌群に属する微生物は、抗原B、IF、P1、SR、MSL-1またはPACとしても知られる連鎖球菌抗原I/IIに特異的に結合し得ると考えられている。しかし、本明細書中に記載のとおり、上記の乳酸菌群に属する微生物は、ミュータンス・ストレプトコッキの任意の他のタンパク質または表面構造に結合し、これによりミュータンス・ストレプトコッキを凝集させ、これらを口腔外へと洗い流すことができる。ストレプトコッカス・ミュータンスは、上記の連鎖球菌抗原I/IIを介してペリクルに結合することが知られている。従って、上記の乳酸菌群に属する微生物が、例えば上記の連鎖球菌抗原I/IIに結合し得る場合、ストレプトコッカス・ミュータンスならびに他のミュータンス・ストレプトコッキ群に属する微生物が歯の表面に結合することは妨げられ、このようにして齲蝕の予防および/または治療に役立つ。

【0070】

ペリクルは、唾液中に見られるタンパク質および脂質(脂肪)を含む透明な、薄い被膜である。ペリクルは、歯の表面を浄化した後数秒以内に形成される。ペリクル形成は、歯のプラーク形成の第1段階である。歯のプラークは、歯の上に蓄積する軟らかい沈着物である。プラークは、1ミリグラム当たり 10^{10} 超の細菌を含む複雑な微生物コミュニティとして定義することができる。プラーク中には、400種もの数の異なる細菌種を見出し得ると推定されている。プラークは、細菌細胞に加えて少数の上皮細胞、白血球およびマクロファージを含む。これらの細胞は、細菌の産物と唾液から形成される細胞外マトリクス内に含まれる。細胞外マトリクスは、タンパク質、多糖および脂質を含む。唾液に含まれるタンパク質の1つは、一方では口からのストレプトコッカス・ミュータンスの部分的な除去をもたらしと考えられているが、しかし他方では歯の表面へのストレプトコッカス・ミュータンスの付着を促進し、これにより歯へのストレプトコッカス・ミュータンスの最初の付着を促進し、こうして齲蝕の発症を促進すると疑われている凝集素である。

【0071】

上記の乳酸菌群に属する微生物が、本明細書中の上記において定義されているミュータンス・ストレプトコッキに特異的に結合するか否かは、特に上記の微生物とミュータンス・ストレプトコッカス細胞との反応を、上記の微生物と同様にラクトバチルス属には属するが本明細書中の上記および本明細書中の下記の実施例に記載の方法を好ましく用いることによってミュータンス・ストレプトコッキに特異的に結合することはない微生物と比較することにより、簡単に試験することができる。

【 0 0 7 2 】

好ましくは、上記の乳酸菌群に属する微生物は、ストレプトコッカス・ミュータンス血清型c(DSMZ 20523)、および/または血清型e(NCTC 10923)および/または血清型f(NCTC 11060)および/またはストレプトコッカス・ソプリヌスDSM 20742および/またはストレプトコッカス・ラッティDSM 20564および/またはストレプトコッカス・クリセツスDSM 20562および/またはストレプトコッカス・フェラスDSM 20646および/またはストレプトコッカス・マカカエDSM 20714に特異的に結合することができる。

【 0 0 7 3 】

このことは、上記の乳酸菌群に属する微生物が、ストレプトコッカス・ミュータンス血清型c(DSMZ 20523)、血清型e(NCTC 10923)、血清型f(NCTC 11060)、ストレプトコッカス・ソプリヌスDSM 20742、ストレプトコッカス・ラッティDSM 20564、ストレプトコッカス・クリセツスDSM 20562、ストレプトコッカス・フェラスDSM 20646およびストレプトコッカス・マカカエDSM 20714からなる群から選択される1種以上の微生物に好ましく結合することを意味する。より好ましくは、上記の乳酸菌群に属する微生物は、上記の細菌の任意の組み合わせ、グループまたはサブグループに結合する。さらに好ましくは、上記の乳酸菌群に属する微生物は、上記の細菌の全てに結合する。本発明によれば、「血清型」は、当技術分野で公知の血清学的方法によって同定される、細菌細胞(好ましくはストレプトコッカス・ミュータンスまたはストレプトコッカス・ソプリヌス細胞)の抗原特性である。

【 0 0 7 4 】

上記のとおり、ミュータンス・ストレプトコッキィに対する上記の乳酸菌群に属する微生物の特異的結合は、熱処理に耐性である。このため、上記の乳酸菌群に属する微生物を、例えば、15 または37 を超える温度で熱処理する。より好ましくは、上記の細胞を55 超の温度で、さらに好ましくは65 超の温度で、特に好ましくは95 超の温度で、そして最も好ましくは121 でインキュベートする。冷却後、上記の乳酸菌群に属する微生物がミュータンス・ストレプトコッキィに特異的に結合する能力を、本明細書中に記載のとおり測定する。

【 0 0 7 5 】

対応する温度は、特定のラクトバチルス種によって決めることができるが、通常の実験により、例えば様々な温度で対応する細胞をインキュベートし、本明細書中の実施例に記載の方法を用いてミュータンス・ストレプトコッキィに依然として特異的に結合し得るラクトバチルス細胞の量を測定することによって、当業者が容易に決定することができる。

【 0 0 7 6 】

通常、熱処理は1分間以上の時間持続させるべきである。好ましくは、熱処理はn分間以上の時間持続させる(ここでnは2~60の範囲内の整数であり、n=20であることが特に好ましい)。しかし、原理上はインキュベーション時間には上限はない。しかし、インキュベーション時間は、4、3、2または1時間を超えないことが好ましい。最も好ましい熱処理は、飽和蒸気中で、121 の温度において2バールの気圧で20分間以上である。最も好ましい熱処理は、タンパク質のあらゆる機能および細胞のあらゆる活力を消失させ、このようにして上記の乳酸菌群に属する微生物を、これがミュータンス・ストレプトコッキィに依然として特異的に結合し得るという点で他の微生物と区別すると考えられる。従って、上記の微生物は、本発明の文脈において、任意の食品、飼料、飲料または組成物に微生物が生存していないことが望ましい場合、これらの使用において極めて有用である。

【 0 0 7 7 】

好ましくは、本明細書中の上記の熱処理に供された上記の乳酸菌群に属する微生物は、ミュータンス・ストレプトコッキィ群に属する細菌に特異的に結合する能力が高められる。「能力が高められる」という用語は、例えば、本明細書中の上記の(好ましくは実施例5に記載の)アッセイによって、5%以上、好ましくは10%以上、さらに好ましくは20%以上および最も好ましくは30%以上で測定することができる、上記の結合の増強を意味する。好適な実施形態において、熱処理に供されるとミュータンス・ストレプトコッキィ群に属す

る細菌に特異的に結合する能力が高められる上記の乳酸菌群に属する微生物は、ラクトバチルス・パラカゼイ種、さらに好ましくはラクトバチルス・パラカゼイ属の種パラカゼイおよび最も好ましくは、ラクトバチルス・パラカゼイ属の種パラカゼイLb-Ob-K5(DSM 16671)に属する。

【0078】

上記の乳酸菌群に属する微生物の特異的結合は、プロナーゼE、プロテイナーゼK、トリプシンおよびキモトリプシンからなる群から選択されるプロテアーゼを用いた処理であるプロテアーゼ処理に対するその耐性によってさらに特徴付けられる。これらのプロテイナーゼは、特異性を示さず、このため微生物の細胞表面上にあるあらゆるタンパク質を分解すると考えられているプロテアーゼである。アミノ酸残基の特定のパターンを選ぶことが知られている他のプロテアーゼは、エラスターゼ、トロンピン、アミノペプチダーゼI、カルボキシペプチダーゼ、ドストリpain(dostripain)、エンドプロテイナーゼ、パパイン、ペプシンまたはプロテアーゼである。後者のプロテアーゼは、ミュータンス・ストレプトコッキへの上記の乳酸菌群に属する微生物の特異的結合が、後者のより特異的なプロテアーゼに耐性であるか否かを試験するために用いることもできるだろう。このように、実施例に記載されるプロテアーゼ処理の後、上記の乳酸菌群に属する微生物は、ミュータンス・ストレプトコッキに依然として特異的に結合することができる。

【0079】

さらに、上記の乳酸菌群に属する微生物の特異的結合は、そのカルシウム依存性によってさらに特徴付けられる。好ましくは、上記の特異的結合は、0.05 mM ~ 500 mM、好ましくは1 mM ~ 100 mMのカルシウムイオン濃度の存在下で起こる。特に好ましくは、カルシウム濃度は2 mM ~ 30 mMである。カルシウムへの上記の特異的結合の依存性は、実施例に記載のとおり試験することができる。

【0080】

さらに、上記の乳酸菌群に属する微生物の特異的結合は、4.0 ~ 9.0、好ましくは4.0 ~ 7.0のpH範囲にわたって維持される。特に、依然として特異的結合が生じるpH値は、好ましくは4.5である。上記のpH範囲にわたって特異的結合を維持するアッセイを行うことは、実施例に示す。さらに上記の特異的結合は、マグネシウム非依存性である。従って、マグネシウムイオンまたはマグネシウム塩が存在することは必要ではなく、これは実施例に示されている。

【0081】

上記の特異的結合のさらに他の特徴は、この結合が唾液の存在下で生じることである。唾液は、唾液腺によって合成される外因性分泌物である。唾液は、約99%の水は別として、多様な有機化合物および無機化合物を含む複雑な液体である。唾液の生理学的成分は、特に酵素(例えば、アミラーゼ、カルボアンヒドラーゼ、リゾチーム、ペルオキシダーゼ)またはタンパク質(例えば、ムチン、ラクトフェリン、高プロリンタンパク質、シスタチン、ヒスタチンもしくはスタセリンまたは可溶性IgA)である。このように、唾液中には種々の潜在的な干渉物質が含まれているにも関わらず、上記の乳酸菌群に属する微生物の特異的結合は妨げられず、または阻害されなかった。上記の特異的結合を唾液の存在下で試験するため、好ましくは実施例6に記載のストレプトコッカス種および/または実施例6のスタフィロコッカス種を含む唾液を用いることが好ましい。しかし、上記のラクトバチルス・ラムノサス種を、ミュータンス・ストレプトコッキへの特異的結合について唾液の存在下で試験する場合には、ストレプトコッカス・サリバリウス属の種サーモフィルスは取り除くことが好ましい。上記の特異的結合は、本明細書中に記載のとおりアッセイされる。

【0082】

上記の乳酸菌群に属する微生物は、特定のプロテアーゼを含み且つ炭水化物含有食品を摂取した後に低pH値となる唾液が特に存在する口(口腔および歯を含む)に様々な形態で主に投与されるため、この微生物の上述の特徴は、該微生物を、齲蝕を予防および/または治療するための強力且つ有効な薬剤とする。

【0083】

さらに、熱に対する耐性は、食品を製造する間、上記の乳酸菌群に属する微生物を食品添加物として添加する際に、有益な効果を有する。つまり、食品は加熱殺菌、加熱処理、低音殺菌等されることが多く、これは微生物の生存能力に悪影響を及ぼす。

【0084】

本発明の別の態様において、上記の乳酸菌群に属する微生物の誘導体は、記載の用途に用いられる。「上記の乳酸菌群に属する微生物の誘導体」という用語は、熱不活性化させまたは凍結乾燥させた上記の乳酸菌群に属する微生物の不活性化形態または類似体もしくは断片を意味し、ここで上記の不活性化形態、類似体または断片は、ミュータンス・ストレプトコッキに特異的に結合する能力を保持する。本発明によれば、「上記の乳酸菌群に属する微生物の不活性化形態または類似体」という用語は、ラクトバチルス属に属する微生物に特異的なプレート上でもはや単一のコロニーを形成することができない、上記の乳酸菌群に属する微生物の(好ましくは本明細書中に開示されるラクトバチルス種の)死細胞または不活性化細胞を包含する。上記の死細胞または不活性化細胞は、インタクトな細胞膜または破壊された細胞膜のいずれかを有し得る。上記の乳酸菌群に属する微生物の細胞を死滅させまたは不活性化させるための方法は、当技術分野において公知である。El-Nezamiら, J. Food Prot. 61 (1998), 466-468は、UV照射によってラクトバチルス種を不活性化させる方法について記載している。好ましくは、上記の乳酸菌群に属する微生物の細胞は、実施例に記載のとおり熱不活性化または凍結乾燥される。上記の細胞の凍結乾燥は、これらの細胞がミュータンス・ストレプトコッキに特異的に結合する能力を保持しながら、容易に保存しまた扱うことができるという利点を有する。さらに、凍結乾燥させた細胞は、当技術分野において公知の条件下で適切な液体媒体または固体媒体に適用すると、再び増殖させることができる。凍結乾燥は、当技術分野で公知の方法によって行われる。好ましくは、凍結乾燥は、室温(すなわち、16 ~ 25 の任意の温度)で2時間以上行われる。さらに、上記の乳酸菌群に属する微生物の凍結乾燥させた細胞は、本明細書中の以下の実施例7または8に示すとおり、ミュータンス・ストレプトコッキに依然として特異的に結合するように4 の温度で少なくとも4週間安定している。熱不活性化は、上記の乳酸菌群に属する微生物の細胞を170 の温度で2時間以上インキュベートすることによって達成し得る。さらに、熱不活性化は、好ましくは上記の細胞を、気圧2バールの飽和蒸気の存在下で、121 の温度で20分以上オートクレーブすることによって達成される。別法として、上記の乳酸菌群に属する微生物の細胞の熱不活性化は、この細胞を-20 で4週間、3週間、2週間、1週間、12時間、6時間、2時間または1時間以上凍結することにより達成される。上記の乳酸菌群に属する微生物の類似体の細胞は、その少なくとも70%、75%もしくは80%、さらに好ましくは85%、90%もしくは95%、また特に好ましくは少なくとも97%、98%、99%、またさらに特に好ましくは99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%もしくは99.9%、そして最も特に好ましくは100%が死滅または不活性化されているが、これらの細胞がミュータンス・ストレプトコッキに特異的に結合する能力を依然として有していることが好ましい。上記の乳酸菌群に属する微生物の不活性化形態、類似体または断片が、実際に死滅または不活性化されているか否かは、当技術分野で公知の方法により(例えば生死判別試験によって)試験することができる。

【0085】

「上記の乳酸菌群に属する微生物の不活性化形態または類似体」という用語は、上記の乳酸菌群に属する微生物(好ましくは、本明細書中に開示されるラクトバチルス種)の溶解物、断片または抽出物も包含し、ここで上記の溶解物、断片または抽出物は、ミュータンス・ストレプトコッキ群に属する細菌に特異的に結合し得ることが好ましい。この結合能力は、本明細書中に記載のとおり、特に実施例に記載のとおり試験することができる。本明細書中の上記の、本発明の態様(i)による微生物の溶解物、断片または抽出物が、ミュータンス・ストレプトコッキ群に属する細菌に特異的に結合することができない場合、その後当業者は、例えば、結合を阻害している物質を除去するために、上記の溶解物、断片または抽出物を、本明細書中の以下に例示されるとおり当技術分野で公知の方

法によってさらに精製することができる。その後、当業者は、上記の溶解物、断片または抽出物がミュータンス・ストレプトコッキ群に属する細菌に特異的に結合するか否かについて、これらを再び試験することができる。

【0086】

本発明によれば、「溶解物」という用語は、上記の乳酸菌群に属する微生物の破壊された細胞の水性媒体中の溶液または懸濁液を意味する。しかしこの用語は、あらゆる点で限定的に解釈すべきではない。この細胞溶解物は、例えばDNA、RNA、タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質等のような高分子、および/またはアミノ酸、糖、脂質酸等のような微小分子、またはその断片を含む。さらに、上記の溶解物は細胞残屑を含み、これは平滑構造または粒状構造であってよい。好ましくは、上記の溶解物は、細胞壁もしくは細胞膜またはその両方、あるいは細胞壁もしくは細胞膜またはその両方の一部もしくは断片を含む。微生物の細胞溶解物の調製方法は、当技術分野において公知であり、例えば、フレンチプレス、ガラスビーズまたは鉄ビーズを用いた細胞破碎、または酵素的細胞溶解等を用いる方法がある。さらに、細胞の溶解は、細胞を開き/破壊するための当技術分野で公知の様々な方法に関連している。細胞を溶解する方法は重要ではなく、上記の乳酸菌群に属する微生物の細胞の溶解を達成し得る任意の方法を用いてよい。当業者は適切な方法を選択することが可能であり、例えば、細胞の開放/破壊は、酵素的、化学的または物理的に行うことができる。酵素および酵素カクテルの非限定的な例は、プロテイナーゼK、リパーゼまたはグリコシダーゼのようなプロテアーゼであり；化学薬品の非限定的な例は、ドデシル硫酸ナトリウム、酸または塩基のようなイオノフォア、洗浄剤であり；また物理的手段の非限定的な例は、フレンチプレスのような高圧、浸透圧、熱または冷氣のような温度である。さらに、タンパク質分解酵素、酸、塩基等以外の酵素の適切な組み合わせを用いる方法を利用することもできる。例えば、上記の乳酸菌群に属する微生物の細胞は、凍結および解凍することにより、さらに好ましくは-70 未満の温度で凍結し且つ30 超の温度で解凍することにより溶解され、特に凍結は-75 未満の温度で行うのが好ましく、また解凍は35 超の温度で行うのが好ましく、さらに最も好ましくは凍結温度が-80 未満であり、解凍温度が37 超である。上記の凍結/解凍を、1回以上、より好ましくは2回以上、さらに好ましくは3回以上、特に好ましくは4回以上、また最も好ましくは5回以上繰り返すことも好ましい。

【0087】

従って、当業者は、上記の一般的説明を参照し、必要に応じてこれらの方法を改変または変化させることにより、所望の溶解物を調製することができる。

【0088】

好ましくは、上記の溶解物用に使用する水性媒体は、水、生理食塩水、または緩衝溶液である。細菌細胞溶解物の利点は、必要とされる技術的施設が少ないため、これを簡単に製造し且つ経済的に保存し得ることである。

【0089】

好ましくは、「抽出物」という用語は、上記の乳酸菌群に属する微生物の細胞内成分、例えばタンパク質、DNA、RNA、ペプチド、炭水化物、脂質等などの高分子および/もしくはアミノ酸、糖、脂質酸等などの微小分子、または任意の他の有機化合物もしくは分子、あるいは上記の高分子および/もしくは微小分子の組み合わせまたはその任意の断片を意味し、ここで上記の抽出物は、ミュータンス・ストレプトコッキ群に属する細菌に特異的に結合する能力を保持する。この特異的結合は、本明細書中に記載のとおり、また特に実施例に記載のとおり試験することができる。好ましくは、上記の抽出物は、細胞壁もしくは細胞膜またはその両方、あるいは細胞壁もしくは細胞膜またはその両方の一部もしくは断片を含む。さらに好ましくは、「抽出物」という用語は、無細胞培地中の任意の上記の細胞内成分を指す。

【0090】

他の好適な実施形態において、抽出物は、本明細書中の上記のとおり、細胞を開き/破壊するための当技術分野で公知の様々な方法に従って細胞を溶解させることにより、および

/あるいは当業者に公知の任意の適切な液体、培地または緩衝液中の上記の乳酸菌群に属する微生物の培養液の遠心分離処理の上清として、またはかかる培養液もしくは任意の他の好適な細胞懸濁液の溶解物の遠心分離処理の上清として得ることができる。さらに好ましくは、上記の抽出物は、精製された溶解物もしくは細胞培養液の上清またはこれらの任意の画分もしくはサブポーションであってよく、ここで上記の精製された溶解物もしくは細胞培養液の上清またはこれらの任意の画分もしくはサブポーションは、ミュータンス・ストレプトコッキ群に属する細菌に特異的に結合する能力を保持する。この結合は、本明細書中に記載のとおり、また特に実施例に記載のとおり試験することができる。溶解物、培養上清または抽出物の分画および精製のための好適な方法は当業者に公知であり、例えば、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、およびカラム法もしくはバッチ法において他のクロマトグラフィー材料を用いるクロマトグラフィー、他の分画法、例えばろ過法(例えば限外ろ過、透析、遠心分離におけるサイズ排除を用いた透析および濃縮、密度勾配もしくはステップマトリクスにおける遠心分離)、沈殿(例えばアフィニティー沈殿、塩溶または塩析(硫酸アンモニウム沈殿)、アルコール沈殿)または任意の他の好適なタンパク質化学的、分子生物学的、生化学的、免疫学的、化学的もしくは物理的方法を含む。

10

【0091】

本発明によれば、溶解物は、上記の溶解物に由来する分子の画分の調製物でもある。これらの画分は、上記の溶解物の成分を分離するための当業者に公知の方法、例えばクロマトグラフィー(例えば、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、およびカラム法もしくはバッチ法において他のクロマトグラフィー材料を用いるクロマトグラフィーなど)、他の分画法、例えばろ過法(例えば限外ろ過、透析、遠心分離におけるサイズ排除を用いた透析および濃縮、密度勾配もしくはステップマトリクスにおける遠心分離)、沈殿(例えばアフィニティー沈殿、塩溶または塩析(硫酸アンモニウム沈殿)、アルコール沈殿)または任意の他のタンパク質化学的、分子生物学的、生化学的、免疫学的、化学的もしくは物理的方法によって得ることができる。好適な実施形態において、他の画分より免疫原性の高い画分が好ましい。当業者は好適な方法を選択し、上記の一般的説明および本明細書中の実施例における具体的説明を参照し、また必要に応じてこれらの方法を適切に改変または変化させることによって、この画分の免疫原性能力を決定することができる。

20

30

【0092】

従って、「上記の乳酸菌群に属する微生物の不活性化形態または類似体」という用語は、本明細書中の上記の本発明の微生物(好ましくは本明細書中に開示されるラクトバチルス種)のろ過物も包含し、このろ過物は、好ましくはミュータンス・ストレプトコッキ群に属する細菌に特異的に結合する能力を保持する。この結合は、本明細書中に記載のとおり、また特に実施例に記載のとおり試験することができる。本明細書中の上記の乳酸菌群に属する微生物のろ過物がミュータンス・ストレプトコッキ群に属する細菌に特異的に結合することができない場合、当業者は、例えば、結合を阻害している物質を除去するために、上記のろ過物を、本明細書中の以下に例示される当技術分野で公知の方法によってさらに精製することができる。その後当業者は、上記のろ過物がミュータンス・ストレプトコッキ群に属する細菌に特異的に結合するか否かについて、これを再び試験することができる。

40

【0093】

「ろ過物」という用語は、当業者に公知の任意の適切な液体、培地または緩衝液中の上記の乳酸菌群に属する微生物の培養液の遠心分離処理の上清として得られた、本明細書中の上記の本発明の微生物の無細胞溶液または懸濁液を意味する。しかしこの用語は、あらゆる点で限定的に解釈すべきではない。このろ過物は、例えばDNA、RNA、タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質等などの高分子、および/またはアミノ酸、糖、脂質酸等などの微小分子、またはその断片を含む。微生物のろ過物の調製方法は、当技術分野において公

50

知である。さらに、「ろ過物」は、当技術分野で公知の様々な方法に関連している。正確な方法は重要ではなく、上記の本発明の微生物の細胞のろ過を達成し得る任意の方法を用いることができる。

【0094】

「上記の乳酸菌群に属する微生物の断片」は、上記の乳酸菌群に属する微生物の細胞の任意の部分を包含する。好ましくは、上記の断片は、膜調製によって得られる膜の断片である。ラクトバチルス属に属する微生物の膜調製物は、当技術分野で公知の方法によって、例えばRollanら, *Int. J. Food Microbiol.* 70 (2001), 303-307、Matsuguchiら, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10 (2003), 259-266またはStentzら, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000), 4272-4278またはVarmanenら, *J. Bacteriology* 182 (2000), 146-154に記載の方法を用いることによって得ることができる。別法として、全細胞調製物も想定される。好ましくは、上記の乳酸菌群に属する微生物の誘導体または断片は、本明細書中に詳細に記載される、ミュータンス・ストレプトコッキに特異的に結合する能力を保持する。

【0095】

1つの態様において、本発明は、ストレプトコッカス・ミュータンス以外のミュータンス・ストレプトコッキによって引き起こされる齲蝕の治療または予防用の抗齲蝕原性組成物(好ましくは医薬組成物もしくは化粧品組成物)の調製のための、上記の乳酸菌群に属する微生物またはその誘導体もしくは変異体もしくは類似体もしくは断片の使用に関する。好ましくは、上記の組成物は、ミュータンス・ストレプトコッキに特異的に結合し得る乳酸菌群に属する微生物、またはこの微生物の変異体、誘導体、類似体もしくは断片を含む。さらに好ましくは、この微生物は、本明細書中の上記の寄託された微生物またはその変異体もしくは誘導体、またはこの微生物の類似体もしくは断片である。他の好適な実施形態において、上記の組成物は、上記の微生物を、1mg当たり $10^2 \sim 10^{12}$ 個の細胞、好ましくは $10^3 \sim 10^8$ 個の細胞の量で固体形態の該組成物中に含む。液体形態の組成物の場合、この微生物の量は、1ml当たり $10^2 \sim 10^{13}$ 個の細胞である。しかし、特定の組成物については、本明細書中に記載のとおり微生物の量は異なり得る。本発明の好ましい抗齲蝕原性組成物は、ラクトースを1% (w/w) ~ 6% (w/w) の範囲内では含まない。この組成物が1% (w/w) 以下のラクトースを含むこと、例えばこの組成物が、1%未満、好ましくは0.9% (w/w)、0.8% (w/w) 未満のラクトース等を含むこと、またはこの組成物が6%、7%、8%等 (w/w) を上回るラクトースを含むことも好ましい。あるいは、この組成物がラクトースを含まないことも好ましい。

【0096】

他の態様において、このような抗齲蝕原性組成物は、ミュータンス・ストレプトコッキに特異的に結合し得る乳酸菌群に属する微生物またはこの微生物の変異体、誘導体、類似体もしくは断片を、化粧品上、経口的に、または製薬上許容可能な担体または賦形剤と共に製剤化するステップを含むことにより製造することができる。好ましくは、この微生物は、本明細書中の上記の寄託された微生物またはその変異体、誘導体、類似体もしくは断片である。本発明に従って用いられる好ましい抗齲蝕原性組成物は、ラクトースを1% (w/w) ~ 6% (w/w) の範囲内では含まない。この組成物が1% (w/w) 以下のラクトースを含むこと、例えばこの組成物が、1%未満、好ましくは0.9% (w/w)、0.8% (w/w) 未満のラクトース等を含むこと、またはこの抗齲蝕原性組成物が6%、7%、8%等 (w/w) を上回るラクトースを含むことも好ましい。あるいは、この抗齲蝕原性組成物がラクトースを含まないことも好ましい。

【0097】

本発明に従って用いられる「組成物」という用語は、上記の微生物または変異体もしくは誘導体、好ましくは上記の寄託された微生物またはこの微生物の類似体もしくは断片の1つ以上を含む組成物に関する。本発明に従って用いられる、本明細書中の下記に記載の組成物は、上記の成分を任意の組合せで含むことが想定されている。この組成物は、場合により、齲蝕を予防および/または治療するために好適な1種以上の他の成分を含み得る。従って、上記の組成物は、場合により、後述の他の成分の任意の組み合わせを含み得る。

「齲蝕を予防および/または治療するために好適な成分」という用語は、ミュータンス・ストレプトコッカスの、歯の表面への結合、ペリクルへの結合のいずれかを阻害する、および/またはミュータンス・ストレプトコッカスを不活性化させる化合物もしくは組成物および/またはこれらの組み合わせを包含する。さらに好ましくは、上記の用語は、以下に記載される、ミュータンス・ストレプトコッカスの歯の表面への付着を阻害し、ミュータンス・ストレプトコッカスのグリコシルトランスフェラーゼ活性を阻害し、ミュータンス・ストレプトコッカスを阻害もしくは不活性化させ、ミュータンス・ストレプトコッカスの凝集素依存性結合を阻害しおよび/またはミュータンス・ストレプトコッカスのサッカロース依存性結合を阻害し得る化合物もしくは組成物および/またはこれらの組み合わせを包含する。

10

【0098】

特にこの組成物は、場合によりミュータンス・ストレプトコッカスの歯の表面への付着を阻害する化合物をさらに含むことが想定される。従って、かかる化合物は、ストレプトコッカス・ミュータンスのコンピテンスシグナルペプチド(CSP)の阻害剤であることが想定される。上記の阻害剤は、CA 2,302,861中に、天然の受容体(ヒスチジニキナーゼ受容体)への上記のCSPの結合を競合的に阻害する、またはCSPに対する抗体である、CSPの誘導体または断片として記載されている。上記の阻害剤は、歯の表面上の歯のプラークのバイオフィルム環境の発達を妨げ、これによりミュータンス・ストレプトコッカスの結合を妨げる。別法として、本発明に従って用いられる組成物は、場合により、歯の齲蝕の治療および/または予防において有用なストレプトコッカス・ミュータンスI/II抗原のポリペプチド断片をさらに含み得る。かかるポリペプチド断片は、US 6,500,433に記載されている。すなわち、上記のポリペプチド断片は、天然のストレプトコッカス・ミュータンス抗原I/IIと競合して凝集素に結合することによって哺乳動物の歯の表面に付着する能力を有し、これにより歯へのストレプトコッカス・ミュータンスの付着を予防しまたは低下させることができる。US 6,500,433に記載のペプチドの一部は、歯の表面モデル(ポリスチレンマイクロタイタープレートのウェルまたはヒドロキシアパタイトビーズに吸着させたヒト全唾液)へのストレプトコッカス・ミュータンスの付着を阻害することが示されている。このように、US 6,500,433は、これらのペプチドが1つ以上の付着部位を含み、天然のSA I/IIと競合的に哺乳動物の歯に付着すると記載している。本発明に従って用いられる組成物の別の任意成分は、WO 00/66616に記載される、ストレプトコッカス・ミュータンスに由来する線毛関連付着タンパク質であるSmaAまたはその断片である。このSmaAタンパク質は、唾液ペリクルへの細菌の付着(52kdの唾液タンパク質であるアミラーゼへの結合を介すると考えられる)を媒介する、ストレプトコッカス・ミュータンスの線毛に由来する付着タンパク質である。成熟SmaAタンパク質は、還元性ポリアクリルアミドゲル上で測定したときに約65キログルトン(kd)の分子量を有し、アミラーゼに結合する能力を示し、またストレプトコッカス・ミュータンスの主要な免疫優勢線毛タンパク質である。従って、SmaAは、歯の表面の付着部位についてミュータンス・ストレプトコッカスと競合すると考えられている。

20

30

【0099】

上記のとおり、場合により、ミュータンス・ストレプトコッカスのグリコシルトランスフェラーゼ活性を阻害する化合物を、本発明に従って用いられる組成物中にさらに含めることが想定される。例えば、US 2004/0057908は、上記のグリコシルトランスフェラーゼの活性を阻害するテルペノイド類およびフラボノイド類の混合物について記載する。Duartera, Biol. Pharm. Bull. 26 (2003), 527-531は、新種のプロポリス、および該プロポリスの、グリコシルトランスフェラーゼに関する、またストレプトコッカス・ミュータンスの増殖および付着に関する化学画分について記載している。従って、上記の新種のプロポリスおよびその化学画分を、本発明に従って用いられる組成物の任意の他の成分とすることが意図される。Kooら, J. Antimicrob. Chemother. 52 (2003), 782-789は、アピゲニンとtt-ファルネソールが、ストレプトコッカス・ミュータンスのバイオフィルム蓄積および多糖産生を阻害すると記載している。このため、場合により、アピゲニンとtt-フ

40

50

アルネソールを本発明に従って用いられる組成物中に含めることが意図される。Devulapalleら, Carbohydr. Res. 339 (2004), 1029-1034には、炭水化物脂肪酸エステルがグリコシルトランスフェラーゼ活性に作用することが記載されていることから、場合により、上記の炭水化物脂肪酸エステルを本発明に従って用いられる組成物中に含めることが意図される。

【0100】

ストレプトコッカス・ミュータンスの直接阻害は、例えば、WO 2004/000222に記載されている。すなわち、遺伝子改変された、ストレプトコッカス・ミュータンスに特異的なバクテリオファージを、ストレプトコッカス・ミュータンスによって引き起こされる細菌の齲蝕を治療するために用いる。WO 2004/017988は、細菌の齲蝕を治療するために用いられる、生物学的に活性なプロテアーゼおよび1種以上の生物学的に活性なグリコシダーゼの組成物について記載している。Imazatoら, Biomaterials 24 (2003), 3605-3609は、メタクリルオイロキシドデシルピリジニウムプロミド(MDPB)が、ストレプトコッカス・ミュータンスの増殖を阻害するために有用であると記載している。従って、上記の化合物を、場合により、本発明に従って用いられる組成物中にさらに含ませ得ることが想定される。

10

【0101】

ストレプトコッカス・ミュータンスの凝集素依存性結合またはサッカロース依存性結合を阻害する、Mitomaら, J. Biol. Chem. 276 (2001), 18060-18065に記載される牛乳のラクトフェリンまたはNostroら, Lett. Appl. Microbiol. 38 (2004), 423-427に記載されるヘリクリスム・イタリクム(Helichrysum italicum)の抽出物を、場合により、本発明に従って用いられる組成物中にさらに含めることが意図される。

20

【0102】

さらに、本発明に従って用いられる組成物は、場合により、例えばDE 2152620もしくはFuglsang (2000), loc. cit.に記載されるムタナーゼ(1,3-グルカナーゼ)、または、例えばUS 6,342,385; US 5,932,469; US 5,872,001もしくはUS 5,833,958に記載されるストレプトコッカス・ミュータンスに対する抗生物質をさらに含み得る。さらに、本発明に従って用いられる組成物は、場合により、齲蝕を予防および/または治療するために好適な1種以上の上記の任意の成分を含み得ることに留意する。このように、上記の組成物は、少なくとも2種、3種、4種、5種等の、すなわち「n」種の(「n」は、2より大きな限定されない整数である)任意成分を含み得る。上記の任意成分は、任意の可能な組み合わせで組み合わせることができる。

30

【0103】

この組成物は、固体、液体もしくは気体の形態であってよく、特に、粉剤、錠剤、フィルム製剤、溶液剤、エアロゾル、粒剤、丸剤、懸濁剤、乳剤、カプセル剤、シロップ剤、液剤、エリキシル剤、エキス剤、チンキ剤もしくは流エキス剤の形態または経口投与に特に好適な形態であってよい。

【0104】

経口投与に好適な液体製剤、例えばシロップ剤は、水、通常の糖類(例えばスクロース、ソルビトールおよびフルクトース)、グリコール類(例えばポリエチレングリコールおよびプロピレングリコール)、油類(例えばゴマ油、オリーブ油およびダイズ油)、防腐剤(例えばp-ヒドロキシ安息香酸エステル)、保存料(例えばp-ヒドロキシ安息香酸誘導体、例えばp-ヒドロキシ安息香酸メチルおよび安息香酸ナトリウム)、ならびに他の材料(例えばストロベリーフレーバーまたはペパーミントなどの香料)を用いて調製することができる。

40

【0105】

さらに、経口投与に好適な製剤、例えば錠剤、粉剤および粒剤は、通常の糖類(例えばスクロース、グルコース、マンニトール、およびソルビトール)、デンプン(例えばジャガイモ、小麦およびトウモロコシ)、無機材料(例えば炭酸カルシウム、硫酸カルシウム、炭酸水素ナトリウム、および塩化ナトリウム)、植物粉末(例えば結晶セルロース、甘草末および竜胆草末)、賦形剤(例えばパインデックス(pinedex))、崩壊剤(例えばデンプン、寒天、ゼラチン粉末、結晶セルロース、カルメロースナトリウム、カルメロースカルシウム、

50

炭酸カルシウム、炭酸水素ナトリウムおよびアルギン酸ナトリウム)、滑沢剤(例えばステアリン酸マグネシウム、タルク、水素化植物油、マクロゴール、およびシリコン油)、結合剤(例えばポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、カルメロース、ゼラチン、およびデンプン糊液)、界面活性剤(例えば脂肪酸エステル)、ならびに可塑剤(例えばグリセリン)を用いて製造することができる。フィルム製剤は、当技術分野で公知の方法によって調製することができる。フィルムの調製の例は、本明細書中の実施例27に示す。

【0106】

通常の経口投与の場合、上記の微生物または類似体もしくは断片の用量は、細胞数または質量に関して上記のとおり、例えば、1人の被験体毎に1日当たり、または1日分を何回かに分けて、(乾燥重量で)1 μ g~50g、1 μ g~10g、1 μ g~5mg、1 μ g~1mgもしくは任意の他の重量であり得るだろう。非ヒト動物に投与する場合、上記の用量は、動物の年齢および種、またその症状の性質または重症度によってさらに変化する。具体的に限定するものではないが、動物用の用量は、1日1回または1日分を何回かに分けて、体重1kg当たり0.1mg~10g、好ましくは、体重1kg当たり1mg~1gである。しかし、これらの用量および投与回数は、個々の症状によって異なる。

【0107】

好ましくは、本発明に従って用いられる抗齲蝕原性組成物は、化粧品上許容可能な担体または賦形剤をさらに含む化粧品組成物である。さらに好ましくは、上記の化粧品組成物は、ミュータンス・ストレプトコッカに対して活性を有する歯磨剤、チューインガム、トローチ剤、マウスウォッシュ、マウスリンス、デンタルフロスまたはデンタルテープである。本発明に従って用いられる好ましい化粧品組成物は、ラクトースを1% (w/w) ~ 6% (w/w) の範囲内では含まない。この化粧品組成物が1% (w/w) 以下のラクトースを含むこと、例えばこの組成物が、1%未満、好ましくは0.9% (w/w)、0.8% (w/w) 未満のラクトース等を含むこと、またはこの化粧品組成物が6%、7%、8%等 (w/w) を上回るラクトースを含むことも好ましい。あるいは、この化粧品組成物がラクトースを含まないことも好ましい。

【0108】

本発明に従って用いられる化粧品組成物は、上記の微生物、その変異体、誘導体、類似体または断片を、本発明の組成物およびさらに化粧品上または経口的に許容可能な担体に関連して含む。好ましくは、本発明に従って用いられる組成物に関して記載のとおり、微生物、その変異体、誘導体、類似体または断片は、本明細書中の上記の微生物、変異体、誘導体、類似体または断片である。好ましくは、本発明に従って用いられる化粧品組成物は、経口適用で用いられる。従って、この化粧品組成物は、練り歯磨き、歯磨剤、歯磨き粉、局所経口ゲル、マウスリンス、義歯製品、マウスブレー、トローチ剤、経口錠剤、チューインガム、デンタルフロスまたはデンタルテープの形態であってよい。

【0109】

本明細書中で用いられる「経口的にまたは化粧品上許容可能な担体」という用語は、本発明の組成物を安全且つ有効な方法で口腔に適用するために使用し得る好適なビヒクルを意味する。このようなビヒクルとしては、フッ化物イオン源、付加的抗歯石剤、緩衝液、他の研磨剤、過酸化物質源、アルカリ金属重炭酸塩、増粘物質、保湿剤、水、界面活性剤、二酸化チタン、香料系、甘味料、キシリトール、着色料およびこれらの混合物などの物質を挙げることができる。本明細書中で用いられる「安全且つ有効な量」という用語は、口腔の組織および構造を損なうことなく歯を浄化し、またステイン/ブランク/歯肉炎/歯石を減少させるのに十分な量を意味する。

【0110】

本明細書中に記載される本発明の組成物のpHは、好ましくは約3.0~約9.0にわたり、好ましいpHは約5.5~約9.0であり、また最も好ましいpHは7.0~約8.5もしくは9.0である。

【0111】

上記の化粧品組成物は、通常の使用においては、特定の治療薬の全身投与を目的として嚥下されることを意図するものではなく、むしろ口内活性を目的として、実質的に全ての歯

10

20

30

40

50

の表面および/または口内組織に接触させるために十分な時間口腔内に保持される製品である。この口腔組成物は、単相の口腔組成物または2種以上の口腔組成物の組み合わせであってよい。

【0112】

本明細書中で用いられる「歯磨剤」という用語は、他に特定されない限り、ペースト剤、ゲル剤、または液体製剤を意味する。上記の歯磨剤組成物は、ゲルがペーストを囲んでいる深い縞模様、表面縞模様、多層構造またはこれらの任意の組み合わせなどの任意の所望の形態であってよい。この歯磨剤組成物をディスペンサーの物理的に分離された区画に收容し、同時に投与することができる。歯磨剤組成物は、例えば、EP-B1 0 617 608に記載されている。

10

【0113】

好ましい歯磨剤組成物は、実施例21~24に記載されている。上記の成分に加えて、本発明の歯磨剤組成物は様々な任意の歯磨剤成分を含むことが可能であり、その一部を以下に記載する。任意成分としては、例えば、限定するものではないが、粘着剤、泡立剤、香料、甘味料、付加的抗プラーク剤、付加的研磨剤、および着色料が挙げられる。これらのおよび他の任意成分は、例えば、US 5,004,597 ; US 4,885,155 ; US 3,959,458 ; およびUS 3,937,807中にさらに記載されている。

【0114】

例えば、上記の練り歯磨きは、界面活性剤、キレート剤、フッ化物源、歯ホワイトニング活性剤および歯色改善物質、増粘剤、保湿剤、香料および甘味料、アルカリ金属重炭酸塩、様々な担体ならびに/または他の活性剤を含み得る。

20

【0115】

本発明に従って用いられる好ましい任意薬剤の1つは界面活性剤であり、好ましくは、サルコシン酸塩界面活性剤、イセチオン酸塩界面活性剤およびタウリン酸塩界面活性剤からなる群から選択される界面活性剤である。本明細書において用いるのに好ましいのは、これらの界面活性剤のアルカリ金属塩またはアンモニウム塩である。本明細書において最も好ましいのは、以下のナトリウム塩およびカリウム塩である：ラウロイルサルコシン酸塩、ミリストイルサルコシン酸塩、パルミトイルサルコシン酸塩、ステアロイルサルコシン酸塩およびオレイルサルコシン酸塩。

【0116】

別の好ましい任意薬剤は、酒石酸およびその製薬上許容可能な塩、クエン酸およびアルカリ金属クエン酸塩ならびにこれらの混合物などのキレート剤である。キレート剤は、細菌の細胞壁に見られるカルシウムを錯体化することができる。キレート剤は、カルシウム橋からカルシウムを除去することによってプラークを破壊することも可能であり、これによってこのバイオマスをインタクトに保つのに役立つ。

30

【0117】

付加的な水溶性フッ化物化合物を、25 において、歯磨剤および他の口腔組成物に、あるフッ化物イオン濃度を付与するのに十分な量でこれらに含め、ならびに/または上記の付加的な水溶性フッ化物化合物を約0.0025~約5.0重量%、好ましくは約0.005~約2.0重量%で用いる場合には、付加的な抗齲蝕効果を提供するのに十分な量で含めるのが一般的である。本発明の組成物における可溶性フッ化物源として、様々なフッ化物イオン生成物質を用いることができる。好適なフッ化物イオン生成物質の例は、US 3,535,421およびUS 3,678,154に見出される。代表的なフッ化物イオン源として、フッ化スズ、フッ化ナトリウム、フッ化カリウム、モノフルオロリン酸ナトリウムおよび多数の他のフッ化物イオン源が挙げられる。フッ化スズおよびフッ化ナトリウムならびにこれらの混合物が特に好ましい。

40

【0118】

本発明に従って用いられるオーラルケア組成物は、漂白剤または酸化剤(例えば過酸化水素、過ホウ酸塩、過炭酸塩、ペルオキシ酸、過硫酸塩、金属亜塩素酸塩、およびこれらの組み合わせ)などの歯ホワイトニング活性剤も含み得る。好適な過酸化化合物としては、過酸化水素、過酸化尿素、過酸化カルシウム、およびこれらの混合物が挙げられる。好ま

50

しい過炭酸塩は、過炭酸ナトリウムである。他の好適なホワイトニング剤としては、過硫酸カリウム、過硫酸アンモニウム、過硫酸ナトリウムおよび過硫酸リチウムならびに過ホウ酸塩一水和物および四水和物、ならびにピロリン酸ナトリウム過酸化水和物が挙げられる。好適な金属亜塩素酸塩としては、亜塩素酸カルシウム、亜塩素酸バリウム、亜塩素酸マグネシウム、亜塩素酸リチウム、亜塩素酸ナトリウム、および亜塩素酸カリウムが挙げられる。好ましい亜塩素酸は、亜塩素酸ナトリウムである。付加的なホワイトニング活性剤は、次亜塩素酸塩および二酸化塩素であってよい。

【0119】

歯ホワイトニング剤としての漂白剤に加えて、本発明において有用なオーラルケア活性剤の中から歯色改善物質を考慮に入れることができる。これらの物質は、消費者を満足させるために歯色を改善するのに適している。これらの物質は、歯の表面に適用された場合に、光の吸収および/または反射に関して歯の表面を改善する粒子を含む。このような粒子は、かかる粒子を含むフィルムが歯の表面または歯に適用される場合、外見の利点を提供する。

10

【0120】

練り歯磨きまたはゲルの調製においては、組成物の望ましい稠度を提供し、使用の際に望ましい活性放出特性を提供し、保存安定性を提供し、また組成物の安定性を提供する等のために、多少の増粘物質を加えることが必要である。好ましい増粘剤は、カルボキシビニルポリマー、カラギーナン、ヒドロキシエチルセルロース、ラボナイトおよびセルロースエーテルの水溶性塩(例えば、ナトリウムカルボキシメチルセルロースおよびナトリウムカルボキシメチルヒドロキシエチルセルロース)である。カラヤガム、キサンタンガム、アラビアガム、およびトラガカントガムなどの天然ガムも使用し得る。増粘剤の一部としてコロイド状ケイ酸マグネシウムアルミニウムまたは微粉シリカを使用して、質感をさらに改善することができる。

20

【0121】

本発明の組成物の局所、経口担体の別の任意成分は、保湿剤である。保湿剤は、空気に曝されたときに練り歯磨き組成物の硬化を防ぐ役割を果たして組成物に口腔湿潤感を付与し、また特定の保湿剤は、練り歯磨き組成物に望ましい香りの甘さを与える。保湿剤は、純粋な保湿剤として、通常、本明細書中の組成物の重量の約0%~約70%、好ましくは約5%~約25%を占める。本発明の組成物中で用いるための好適な保湿剤としては、食用多価アルコール、例えばグリセリン、ソルビトール、キシリトール、ブチレングリコール、ポリエチレングリコール、およびプロピレングリコール(特にソルビトールおよびグリセリン)が挙げられる。

30

【0122】

本発明の組成物に、香料および甘味料を添加してもよい。好適な香料としては、冬緑油、ペパーミント油、スเปアミント油、丁子芽油、メントール、アネトール、サリチル酸メチル、ユーカリプトール、カシア、1-メンチルアセテート、セージ、オイゲノール、パセリ油、オキサノン、 α -イリソン、マジョラム、レモン、オレンジ、プロペニルグエトール、シナモン、バニリン、チモール、リナルール、CGAとして公知のシンナムアルデヒドグリセロールアセタール、およびこれらの混合物が挙げられる。香料は、通常、本発明の組成物中で、この組成物の重量の約0.001%~約5%のレベルで用いられる。

40

【0123】

使用し得る甘味料としては、スクロース、グルコース、サッカリン、デキストロース、レブロース、本明細書中の上記のラクトース、マンニトール、ソルビトール、フルクトース、マルトース、キシリトール、サッカリン塩、タウマチン、アスパルテーム、D-トリプトファン、ジヒドロカルコン、アセサルフェームおよびシクラミン酸塩(特にシクラミン酸ナトリウムおよびサッカリンナトリウム)ならびにこれらの混合物が挙げられる。組成物は、好ましくは、該組成物の重量の約0.1%~約10%、好ましくは約0.1%~約1%のこれらの薬剤を含む。

【0124】

50

本発明は、アルカリ金属重炭酸塩も含み得る。アルカリ金属重炭酸塩は水溶性であり、安定化されない限り水溶液系中で二酸化炭素を放出しやすい。ベーキングソーダとしても知られる重炭酸ナトリウムは、好ましいアルカリ金属重炭酸塩である。本発明の組成物は、約0.5%～約30%、好ましくは約0.5%～約15%、および最も好ましくは約0.5%～約5%のアルカリ金属重炭酸塩を含み得る。

【0125】

市販の好適な口腔組成物の調製において用いられる水は、好ましくは低イオン含量であって、且つ有機不純物を含まないものでなければならない。水は、通常、本明細書中の水性練り歯磨き組成物の重量の約10%～約50%、また好ましくは約20%～約40%を占める。これらの量の水は、添加される自由水、およびソルビトールなどの他の材料と共に導入される自由水を包含する。本発明の組成物には、二酸化チタンも加えることができる。二酸化チタンは白色の粉であり、本発明の組成物に不透明性を加える。二酸化チタンは、通常、本発明の歯磨剤組成物の重量の約0.25%～約5%を占める。

10

【0126】

本発明の組成物のpHは、好ましくは、緩衝液の使用を通して調整される。本明細書中で用いられる緩衝液は、本発明の組成物のpHを約4.5～約9.5の範囲に調整するために使用し得る薬剤を指す。緩衝液としては、リン酸一ナトリウム、リン酸三ナトリウム、水酸化ナトリウム、炭酸ナトリウム、ナトリウム酸ピロリン酸塩、クエン酸、およびクエン酸ナトリウムが挙げられる。緩衝液は、本発明の組成物の重量の約0.5%～約10%のレベルで投与することができる。歯磨剤組成物のpHは、歯磨剤の3:1水性スラリー(例えば、1部の練り歯磨きに対して3部の水)から測定される。

20

【0127】

本発明の組成物中で使用し得る他の任意薬剤としては、アルキル-およびアルコキシ-ジメチコンコポリオール(例えば、C12～C20アルキルジメチコンコポリオールおよびこれらの混合物)から選択されるジメチコンコポリオールが挙げられる。極めて好ましいのは、Abil EM90の商標名で市販されているセチルジメチコンコポリオールである。ジメチコンコポリオールは、通常、重量で約0.01%～約25%、好ましくは、約0.1%～約5%、さらに好ましくは、約0.5%～約1.5%のレベルで含まれる。このジメチコンコポリオールは、ポジティブな歯の感触の利益の提供に役立つ。他の有用な担体としては、US 5,213,790; US 5,145,666; US 5,281,410; US 4,849,213およびUS 4,528,180に開示されるような二相歯磨剤が挙げられる。

30

【0128】

本発明の化粧品組成物は、抗菌剤などの他の活性剤も含み得る。このような薬剤に包含されるのは、ハロゲン化ジフェニルエーテル、フェノールおよびその同族体を含むフェノール化合物、モノおよびポリ-アルキルならびに芳香族ハロフェノール、レソルシノールおよびその誘導体、ビスフェノール化合物およびハロゲン化サリチルアニリド、安息香酸エステル、およびハロゲン化カルバニリドなどの非水溶性の非カチオン性抗菌剤である。水溶性抗菌剤としては、特に、第4級アンモニウム塩およびビス-ピクアニド塩が挙げられる。トリクロサン-リン酸は、付加的な水溶性抗菌剤である。第4級アンモニウム剤としては、第4級窒素上の置換基の1個または2個が炭素原子約8個～約20個、典型的には約10個～約18個の炭素鎖長(典型的にはアルキル基)を有するが、残りの置換基(典型的にはアルキル基またはベンジル基)は、炭素原子約1個～約7個などのより少ない数の炭素原子(典型的にはメチル基またはエチル基)を有する第4級アンモニウム剤が挙げられる。ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド、テトラデシルピリジニウムクロリド、ドミフェンブロミド、N-テトラデシル-4-エチルピリジニウムクロリド、ドデシルジメチル(2-フェノキシエチル)アンモニウムブロミド、ベンジルジメチルスチアイルアンモニウムクロリド、セチルピリジニウムクロリド、四級化5-アミノ-1,3-ビス(2-エチル-ヘキシル)-5-メチルヘキサヒドロピリミジン、ベンザルコニウムクロリド、ベンゼトニウムクロリドおよびメチルベンゼトニウムクロリドは、典型的な第4級アンモニウム抗菌剤の例である。他の化合物は、US 4,206,215中に開示されるビス[4-(R-アミノ)-1-ピリジニウム]アルカンである。

40

50

ビスグリシン酸銅、グリシン酸銅、クエン酸亜鉛、および乳酸亜鉛などの他の抗菌剤も挙げられる。酵素は、本発明の組成物中で使用し得る別の種類の活性剤である。有用な酵素としては、プロテアーゼ、溶解酵素、プラークマトリクス阻害剤およびオキシダーゼのカテゴリに属する酵素が挙げられる。プロテアーゼとしては、パパイン、ペプシン、トリプシン、フィチン、ブロメリンが挙げられ；細胞壁溶解酵素としてはリゾチームが挙げられ；プラークマトリクス阻害剤としては、デキストラン、ムタナーゼが挙げられ；またオキシダーゼとしては、グルコースオキシダーゼ、ラクテートオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、尿酸オキシダーゼ、ペルオキシダーゼ(西洋わさびペルオキシダーゼ、ミエロペルオキシダーゼ、ラクトペルオキシダーゼ、クロロペルオキシダーゼを含む)が挙げられる。これらのオキシダーゼは、抗菌特性に加えてホワイトニング/浄化活性も有する。このような薬剤は、US 2,946,725およびUS 4,051,234に開示されている。他の抗菌剤としては、クロルヘキシジン、トリクロサン、トリクロサナーリン酸、および香油(例えばチモール)が挙げられる。トリクロサンおよびこの種類の他の薬剤は、US 5,015,466およびUS 4,894,220に開示されている。抗プラークの利点を提供するこれらの薬剤は、本発明の歯磨剤組成物の重量の約0.01%～約5.0%のレベルで存在し得る。

【0129】

本明細書中で定義される「チューインガム」という用語は、咀嚼に適しており、当業者に公知の任意の好適な量の(好ましくは、本発明の組成物の重量の2%以上の量の)エラストマーを含む菓子組成物を意味する。好適なトローチ剤およびチューインガム成分は、例えば、US 4,083,955；US 6,770,264またはUS 6,270,781中に開示されている。好ましいトローチ剤は、実施例19および20に記載されているトローチ剤である。好ましいチューインガム組成物は、実施例25に記載されている。

【0130】

本発明に従って用いられる組成物は、好ましくは、1種類のエラストマー、または数種類の異なるエラストマーの混合物を含む。エラストマー材料は、当技術分野において一般的に知られているが、具体例としては、スチレン-ブタジエンゴム(SBR)；合成ガム；ポリイソブチレンおよびイソブチレン-イソプレノコポリマー；天然ガム；チクル；天然ゴム；ジェルトン；パラタ；グッタペルカ；レチカスピ；ソルバ；およびこれらの混合物が挙げられる。本発明に従って用いられる組成物は、好ましくは、重量で約2%～約30%、さらに好ましくは約5%～約25%のエラストマーを含む。エラストマーの総レベルが約2%未満である場合、ベース組成物は弾力性、咀嚼質感、および粘着性に欠けるが、他方、約30%超のレベルでは、この製剤は硬く、ゴム状であり、咀嚼には堅いままであるため、上記のレベルは、チューインガムの所望の最終的な質感によって決まる。エラストマー溶媒はエラストマー成分の軟化を助けるので、これらが本発明に従って用いられる組成物に含まれることも好ましい。本明細書中で用いられるのエラストマー溶媒の好ましい例としては、部分的に水素化されたウッドロジンのペンタエリスリトールエステル、ウッドロジンのペンタエリスリトールエステル、部分的に二量体化されたロジンのグリセロールエステル、重合ロジンのグリセロールエステル、トールオイルのグリセロールエステル、ウッドロジンまたはガムロジン、部分的に水素化されたロジンのグリセロールエステル、部分的に水素化されたロジンのメチルエステル、およびこれらの混合物が挙げられる。本発明に従って用いられる組成物は、好ましくは、重量で約2%～約50%、さらに好ましくは約10%～約35%のエラストマー溶媒を含む。

【0131】

本発明に従って用いるためのトローチ剤は、例えば二糖が、場合により任意の適切な錠剤化助剤(例えばステアリン酸マグネシウムのような滑沢剤など)と組み合わせられて圧縮可能な固体担体上に分散されて錠剤へと圧縮される圧縮錠剤の形成について、当技術分野において認められた技術によって調製することができる。かかる錠剤化製剤の固体担体成分は、冷水可溶性デンプンまたは単糖などの唾液可溶性固体であってよく、このため本発明のトローチ剤は、口内に保持されるとここで容易に溶解して該トローチ剤に含まれている二糖酸を唾液溶液中に放出し、この二糖酸は口腔/咽頭粘膜と接触して吸収される。上記

の製剤のpHは、約4～約8.5の範囲にわたり得る。

【0132】

本発明に従って用いられるトローチ剤は、他の当技術分野において認められた固体単一用量製剤化技術を利用して調製することもできる。

【0133】

本発明に従って用いられるマウスウォッシュまたはマウスリンスは、好ましくは、以下のとおりであってよい：

A	ハッカ油(<i>Oilum menthae</i>)	1.2部
	アルニカチンキ(<i>Tinctura Arnicae</i>)	3.0部
	ミルラチンキ(<i>Tinctura Myrrhae</i>)	3.0部
	Tween	5.0部
B	酒精90%	50.0部
C	安息香酸ナトリウム	0.2部
	甘味料(例えばアスパルテーム)	0.02部

10

蒸留水を添加して100部とする。

【0134】

Aを十分に混合し、Bを攪拌下で添加し、その後Cを添加する。結果として得られる透明な液体を、調製後48時間以内にろ過する。別の好ましいマウスウォッシュは、実施例26に記載されている。

【0135】

20

剤形(液体または固体)に関わらず、本発明の1つの好ましい実施形態において、本発明の剤形は、上記の乳酸菌群に属する微生物の、微生物または類似体もしくは断片と患者の口腔との接触を促進するため、患者の口の中に一定期間保持される。

【0136】

本明細書中で用いられる「デンタルフロス」および「デンタルテープ」という用語は、歯間および歯肉縁下表面に蓄積された腐敗している食品材料を取り除いて除去し、且つ口腔中に蓄積された細菌、プラークおよび/または歯石を取り除いて除去するための器具を指す。上記のデンタルフロスまたはデンタルテープは、本明細書中の上記の本発明による微生物に加えて、洗浄剤、研磨剤、歯石抑制成分、増白剤、界面活性剤および/またはフッ化物、抗菌剤、化学療法剤もしくは抗生物質のような活性成分をさらに含み得る。他の付加的な薬剤は、抗プラーク剤、香料および着色料である。本発明のデンタルフロスまたはデンタルテープは、当業者に公知の任意の好適な形態、例えばUS 3,664,915、US 3,953,566、US 3,962,153、US 4,096,227、US 4,187,390、US 4,256,806、US 4,385,093、US 4,478,665、US 4,776,358、US 5,033,488、US 5,209,251、US 5,220,932、US 5,518,012、US 5,718,251、US 5,765,576もしくはUS 5,911,228に記載されているPTFE(テフロン(登録商標))デンタルフロスの形態、例えばUS 3,800,812、US 4,974,615、US 5,760,117、US 5,433,226、US 5,479,952、US 5,503,842、US 5,755,243、US 5,884,639、US 6,003,525もしくはUS 6,027,592に記載されているモノフィラメント歯間部デバイスの形態、またはバイオ成分テープの形態などであってよい。好ましくは、本発明のデンタルフロスまたはデンタルテープは、US 20050226820に記載されている弾性被覆モノフィラメントの形態、または、例えばUS 20020144704に記載されている配向熱可塑性樹脂ベースのデンタルテープの形態であってよい。

30

40

【0137】

本明細書中の上記の抗齲蝕原性化粧品組成物は、ヒトへの経口投与の範囲内ならびに動物への経口投与の範囲内で、好ましくは非ヒト哺乳動物用、さらに好ましくはペット用を使用することができる。本発明の抗齲蝕原性化粧品組成物が動物への経口投与の範囲内で使用される場合、この組成物は、かかる投与に好適な、当業者に公知の他の成分を含み得る。

【0138】

別の態様において、本発明は、ストレプトコッカス・ミュータンス以外のミュータンス

50

・ストレプトコッキによって引き起こされる齲蝕の治療または予防用の医薬組成物の調製のための、本明細書中の上記のミュータンス・ストレプトコッキ群に属する細菌に特異的に結合し得る乳酸菌群に属する微生物の使用に関する。

【0139】

好ましくは、かかる医薬組成物は、上記のとおり、微生物またはその誘導体もしくは変異体または類似体もしくは断片を含む。さらに好ましくは、医薬組成物は、製薬上許容可能な担体または賦形剤をさらに含む。

【0140】

医薬組成物は、本発明に従って用いられる組成物に関連して記載される上記の乳酸菌群に属する微生物または該微生物の誘導体、変異体または類似体もしくは断片の治療上有効量を含み、様々な形態(例えば、固体、液体、粉末、水性、凍結乾燥形態)に製剤化することができる。

【0141】

本発明の医薬組成物は、本明細書中に記載のとおり、製薬上許容可能な担体と共に患者に投与し得る。具体的な実施形態において、「製薬上許容可能な」という用語は、動物、またさらに特にヒトにおける使用が、監督官庁または他の一般的に認められている薬局方によって承認されていることを意味する。本発明に従って用いられる好ましい医薬組成物は、ラクトースを1% (w/w) ~ 6% (w/w) の範囲では含まない。この医薬組成物が1% (w/w) 以下のラクトースを含むこと、例えばこの医薬組成物が、1% 未満、好ましくは0.9% (w/w)、0.8% (w/w) 未満のラクトース等を含むこと、またはこの医薬組成物が6%、7%、8% 等 (w/w) を上回るラクトースを含むことも好ましい。あるいは、この医薬組成物がラクトースを含まないことも好ましい。

【0142】

「担体」という用語は、本発明の治療剤と共に投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビヒクルを指す。かかる担体は製薬上許容可能である。すなわち、用いられる用量および濃度ではレシピエントに無毒である。この担体は、等張性、低張性または弱高張性であり、スクロース溶液によって提供されるような比較的低いイオン強度を有するのが好ましい。かかる医薬担体は、水および、石油、動物、植物または合成由来の油を含む油(例えば落花生油、ダイズ油、鉱物油、ゴマ油等)などの滅菌液体であってよい。生理食塩水溶液ならびに水性のデキストロース溶液およびグリセロール溶液も、液体担体として、特に注射剤用に用いることができる。好適な医薬賦形剤としては、デンプン、グルコース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョコレート、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、ナトリウムイオン、乾燥脱脂乳、グリセロール、プロピレングリコール、水、エタノール等が挙げられる。この賦形剤は、本明細書中の上記のラクトースを含むことが可能であり、最も好ましくは、該賦形剤はラクトースを含まない。この組成物は、所望であれば、少量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝液も含み得る。これらの組成物は、溶液剤、懸濁剤、乳剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、粉剤、持続放出製剤等の形態を採り得る。口腔製剤は、標準的な担体、例えば医薬等級のマニトール、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム等を含み得る。好適な医薬担体の例は、E.W. Martin著の"Remington's Pharmaceutical Sciences"に記載されている。脱脂乳、脱脂乳粉、乳非含有製品またはラクトース非含有製品も用いることができる。上記の脱脂乳粉は、通常はリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に懸濁し、オートクレーブまたは過してタンパク質性の生存汚染菌を根絶し、その後フリーズドライ、加熱乾燥、真空乾燥、または凍結乾燥させる。医薬担体としての役割を果たし得る物質の幾つかの他の例は、例えば、糖(例えばグルコースおよびスクロース); デンプン(例えばトウモロコシデンプンおよびジャガイモデンプン); セルロースおよびその誘導体(例えばナトリウムカルボキシメチルセルロース、エチルセルロースおよび酢酸セルロース); 粉末トラガカント; 麦芽; ゼラチン; タルク; ステアリン酸; ステアリン酸マグネシウム; 硫酸カルシウム; 炭酸カルシウム; 植物油(例えば落花生油、綿実油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油およびカカオ油); ポリオール(例

10

20

30

40

50

例えばプロピレングリコール、グリセリン、ソルビトール、マンニトール、およびポリエチレングリコール)；寒天；アルギン酸；発熱物質非含有水；等張性生理食塩水；クランベリー抽出物およびリン酸緩衝溶液；脱脂乳粉；ならびに医薬製剤中で用いられる他の非毒性適合物質(例えばビタミンC、エストロゲンおよびエキナセア)である。湿潤剤および滑沢剤(例えばラウリル硫酸ナトリウム)、ならびに着色料、香料、滑沢剤、賦形剤、錠剤化剤、安定化剤、抗酸化剤および保存料も含めることができる。

【0143】

好ましくは、本発明の口腔製剤は、本明細書中に記載のラクトースを含み、最も好ましくはラクトースを含まない。当技術分野において周知の、経口投与に好適な様々な担体および/または賦形剤を、本発明の目的のために使用することができる。上記の非齲蝕原性組成物は、所望であれば、様々な公知の添加物(例えば、保存料、硬化剤、滑沢剤、乳化剤、安定化剤、エッセンス等など)をさらに含み得る。かかる組成物は、治療上有効量の上記の化合物を、好ましくは精製された形態で、患者に適切に投与するためにこの形態を提供するように、好適な量の担体と共に含む。この製剤は、投与方法に適していなければならない。

10

【0144】

通常、上記の成分は、別々にまたは単一用量形態に混合して、例えば密閉容器(例えば、活性剤の量を示すアンプルまたはサチュート)に入れた凍結乾燥させた粉末または無水濃縮物として提供される。本発明の組成物を点滴で投与する場合、滅菌された医薬等級の水または生理食塩水を含有する点滴ボトルを用いて投与することができる。

20

【0145】

本発明の医薬組成物は、中性形態または塩形態として製剤化することができる。製薬上許容可能な塩としては、アニオン(塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸等に由来するアニオンなど)を用いて形成される塩、およびカチオン(例えばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン等に由来するカチオンなど)を用いて形成される塩が挙げられる。

【0146】

場合により、*in vitro*アッセイを用いて最適用量範囲の同定を支援することができる。本発明の製剤において用いられる正確な用量は、投与経路、および疾患または障害の重篤度に依存し、また医師の判断および各患者の環境に従って決定されなければならない。有効量は、*in vitro*試験系または動物モデル試験系から得られた用量反応曲線から推定することができる。好ましくは、本発明の医薬組成物は、直接またはアジュバントと組み合わせて投与される。アジュバントは、クロロキノン、プロトン性極性化合物(例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、グリセロール、エタノール(EtOH)、1-メチル-L-2-ピロリドンまたはこれらの誘導体)、または非プロトン性極性化合物(例えばジメチルスルホキシド(DMSO)、ジエチルスルホキシド、ジ-n-プロピルスルホキシド、ジメチルスルホン、スルホラン、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、テトラメチル尿素、アセトニトリルまたはこれらの誘導体)からなる群から選択することができる。これらの化合物は、pH制限に留意した条件で加えられる。本発明に従って用いられる組成物は、脊椎動物に投与し得る。本明細書中で用いられる「脊椎動物」は、当業者に一般的に理解されているのと同じ意味を有することを意図する。特に、「脊椎動物」は哺乳動物、さらに特にヒトを包含する。

30

40

【0147】

「投与された」という用語は、治療上有効量の上記の組成物の投与を意味する。「治療上有効量」という表現は、投与が目的とする効果(この効果は抗齲蝕原性であることが好ましい)を生成する用量を意味する。正確な用量は治療目的に依存し、当業者が公知技術を用いて確定することができる。当技術分野において知られているとおり、また上記のとおり、全身送達か局所送達か、年齢、体重、全般的な健康状態、性別、食事、投与時間、薬剤相互作用および症状の重篤度による調整が必要であり、これは当業者が通例の実験を用

50

いて確定することができる。

【0148】

本発明の方法は、ヒトの治療および獣医学的用途の両方に適用することができる。所望の治療活性を有する本明細書中に記載の化合物は、本明細書中に記載のとおり、生理学的に許容可能な担体中で患者に投与し得る。本発明の化合物は、その導入方法によって、下記のとおり様々な方法で製剤化することができる。本発明の製剤中の治療上活性な化合物の濃度は、約0.1～100wt %で変化し得る。上記の薬剤は、単独で、または他の治療と組み合わせで投与することができる。

【0149】

本発明の医薬組成物の投与は、上記のとおり様々な方法で行うことが可能であり、例えば、限定するものではないが、経口投与、皮下投与、静脈内投与、動脈内投与、節内投与、髄内投与、髄腔内投与、脳室内投与、鼻腔内投与、気管支内投与、経皮投与、結節内投与、直腸内投与、腹腔内投与、筋肉内投与、肺内投与、経膈投与、経直腸投与、または眼内投与が挙げられる。

【0150】

上記の投与は、経口投与または頬投与であることが好ましい。担当の医師および臨床学的因子が、用量レジメンを決定する。医療分野において周知のとおり、任意の一人の患者用の用量は、多くの因子(例えば、患者の大きさ、体表面積、年齢、投与される特定の化合物、性別、投与時間および投与経路、全般的な健康状態、および同時に投与される他の薬剤)によって決まる。

【0151】

典型的な用量は、例えば、0.001～1000 μg の範囲内であり得るが、特に上記の因子を考慮すると、この例示的な範囲を下回るまたは上回る用量が想定される。

【0152】

上記の用量は、好ましくは、1週間に1回与えられるが、治療の進行中、この用量はさらに長い時間間隔で与えてよく、また必要であれば、さらに短い時間間隔で(例えば毎日)与えてよい。好適な場合、本明細書中に記載の方法および当業者に公知の他の方法を用いて上記の免疫応答をモニタリングして、例えば時間、量および/または組成について用量を最適化する。経過は、定期評価によってモニタリングすることができる。本発明の医薬組成物は、局所的または全身的に投与し得る。この医薬組成物を、同時治療法において、すなわち他の医薬または薬(例えば、本明細書中に記載される齲蝕の予防、治療または改善のための他の薬)との同時投与において用いることも想定される。

【0153】

別の好ましい実施形態において、本発明は、ストレプトコッカス・ミュータンス以外のミュータンス・ストレプトコッキによって引き起こされる齲蝕の治療または予防用の抗齲蝕原性組成物の調製のために、本明細書中の上記のミュータンス・ストレプトコッキ群に属する細菌に特異的に結合し得る乳酸菌群に属する微生物の使用であって、該抗齲蝕原性組成物が食品または飼料である、上記使用に関する。好ましくは、食品または飼料の形態の抗齲蝕原性組成物は、本明細書中の上記の微生物、その変異体、誘導体、類似体もしくは断片を含み、経口的に許容可能な担体もしくは賦形剤をさらに含む食品または飼料組成物である。さらに好ましくは、上記の微生物、その変異体、誘導体、類似体または断片は、本明細書中の上記の寄託された微生物、またはその変異体、誘導体もしくは断片である。

【0154】

「食品」または「飼料」は、本明細書中に記載の、哺乳動物、例えばヒトまたは動物(例えばペット)用の任意の美味なおよび/または飲用の物を含む。食品および飼料は、本明細書中の他の箇所に記載されている。「経口的に許容可能な担体」は本明細書中に上記されており、無毒で、食品および/または飼料等級であることが好ましい。さらにこの用語は、本発明に従って用いられる医薬組成物に関して言及される担体も包含する。本発明に従って用いられる好ましい食品または飼料組成物は、ラクトースを1% (w/w)～6% (w/w)の範

囲では含まない。この食品または飼料組成物が1% (w/w) 以下のラクトースを含むこと、例えばこの組成物が、1%未満、好ましくは0.9% (w/w)、0.8% (w/w) 未満のラクトース等を含むこと、またはこの食品または飼料組成物が6%、7%、8%等 (w/w) を上回るラクトースを含むことも好ましい。あるいは、この食品または飼料組成物がラクトースを含まないことも好ましい。

【0155】

本発明によれば、「食品」という用語は、食用および飲用の食品および飲料を全て包含する。従って、本発明の微生物、その誘導体、類似体または断片は食品または飲料に含めることができる。これらは、例えば、ガム、スプレー、飲料、キャンディー、特殊調製粉乳、アイスクリーム、冷菓、スイートサラダドレッシング、牛乳調製品、チーズ、クワルク(quark)、無ラクトースヨーグルト、酸乳、コーヒークリームまたはホイップクリーム等である。

10

【0156】

乳ベースの製品は、本発明の枠組み内であると考えられる。しかし乳は、例えばウシ、ヤギ、ヒツジ、バッファロー、シマウマ、ウマ、ロバまたはラクダ等の動物由来の乳を意味すると理解される。この乳は、天然の状態、再構成乳、脱脂乳、または細菌の生育または発酵乳の次の処理に必要な、例えば脂肪、酵母抽出物のタンパク質、ペプトンおよび/または界面活性剤などの化合物を補充した乳でよい。乳という用語は、一般に植物乳と呼ばれるもの、すなわち処理された植物材料の抽出物、またそうでなければ、抽出物が溶液中またはコロイド状態濁液中に酸発酵および/または熱による化学作用によって凝固し得るタンパク質を含む、マメ科植物(ダイズ、ヒヨコマメ、レンズマメ等)または油糧種子(セイヨウアブラナ、ダイズ、ゴマ、ワタ等)などにも適用される。最終的には、乳という単語は、動物乳と植物乳の混合物も意味する。

20

【0157】

本発明の微生物またはその誘導体または類似体もしくは断片をヨーグルトおよび類似の内容物を有するものに加える場合、本発明の微生物を、約 $10^5 \sim 10^7$ 細胞/mlの濃度で加えれば十分である。この場合、飲料自体の品質に重大な副次的悪影響を及ぼすことなく、ミュータンス・ストレプトコッキの齧蝕原性菌株によって誘導された歯の齧蝕を完全に予防または抑制することができる。

【0158】

このような食品、飲料または飼料は、該食品、飲料または飼料の生のまたは調理済みの材料に活性成分を加えるステップを含んでなる、食品および飲料または飼料の製造の一般的な方法によって製造することができる。本発明による食品、飲料または飼料は、食品、飲料または飼料に対して一般的に用いられている方法と同じ方法で成形し、また造粒し得る。上記の成形および粒状化の方法としては、造粒法(例えば、流動層造粒、攪拌造粒、押出造粒、転動造粒、気流造粒、圧縮成形造粒、解砕造粒、噴霧造粒、および噴射造粒)、コーティング法(例えば、パンコーティング、流動層コーティング、および乾燥コーティング)、パフ乾燥、過剰蒸気法、泡沫法、膨張法(例えばマイクロ波インキュベーション法)、ならびに押出造粒機および押出機を用いた押出法が挙げられる。

30

【0159】

本発明において用いられる食品、飲料または飼料は、本発明の微生物、その誘導体または類似体もしくは断片を活性成分として含む任意の食品、飲料または飼料を包含する。上記の食品、飲料または飼料中の活性成分は、ミュータンス・ストレプトコッキに特異的に結合するその活性を発揮し得る限り、いずれかの濃度に具体的に限定されない。上記の活性成分の濃度は、好ましくは、かかる活性成分を含む食品、飲料もしくは飼料の、または本明細書中に記載の細胞数について、0.001~100重量%、さらに好ましくは0.01~100重量%および最も好ましくは0.1~100重量%である。

40

【0160】

上記の活性成分を加える具体的な食品または飲料としては、例えば、ジュース、清涼飲料水、スープ、茶、乳酸飲料、乳製品(例えば発酵乳、アイスクリーム、バター、チーズ、

50

加工乳および脱脂乳)、肉製品(例えばハム、ソーセージおよびハンバーガー)、魚肉ケーキ製品、卵製品(例えば調味したエッグロール(egg roll)および卵豆腐)、菓子類(例えばクッキー、ゼリー、スナック類およびチューインガム)、パン類、麺類、漬物類、燻製品、干物および調味料類が挙げられる。これらの食品または飲料の形態としては、例えば、粉末食品、シート様食品、瓶詰め食品、缶詰食品、レトルト食品、カプセル食品、錠剤食品および流動食品が挙げられる。

【0161】

ミュータンス・ストレプトコッキに特異的に結合する活性を有する、乳児が摂取する食品または飲料は、好ましくは乳児用栄養組成物である。かかる乳児用栄養組成物としては、乳児用に調製された調製乳、タンパク質分解乳、特殊栄養調製乳または幼児用に調製された離乳食および食品が挙げられる。乳児用栄養組成物の形態としては、具体的に限定するものではないが、乾燥させて微粉化した粉ミルクおよび離乳食が挙げられ、また幼児が摂取するアイスクリーム、発酵乳、およびゼリーなどの一般的な食品も挙げられる。

10

【0162】

本発明による乳児用栄養組成物は、主にタンパク質、脂質、糖、ビタミンおよび/またはミネラルで構成される。この栄養組成物において、上記の活性成分はこれらの成分と混合される。

【0163】

上記のタンパク質として、乳タンパク質(例えば脱脂乳、カゼイン、乳清、乳清タンパク質濃縮物および乳清タンパク質単離物)ならびにこれらの分画物(例えば s-カゼイン、
-カゼイン、
-ラクトアルブミンおよび
-ラクトアルブミン)が挙げられる。さらに、卵タンパク質(例えば卵黄タンパク質、卵白タンパク質、およびオボアルブミン)、またはダイズタンパク質(例えば脱脂ダイズタンパク質、分離ダイズタンパク質、および濃縮物ダイズタンパク質)を用いることができる。これら以外に、小麦グルテン、魚肉タンパク質、牛肉タンパク質およびコラーゲンなどのタンパク質も十分に使用し得る。さらに、これらのタンパク質の分画物、これらのタンパク質の酸処理もしくは酵素処理から得られたペプチド、または遊離アミノ酸も十分に使用することができる。この遊離アミノ酸は、窒素源としての役割を果たすことが可能であり、特定の生理学的作用を与えるために付加的に用いることができる。このような遊離アミノ酸として、例えば、タウリン、アルギニン、システイン、シスチンおよびグルタミンが挙げられる。上記の脂質として、動物の脂肪
および油(例えば乳脂肪、ラード(豚脂)、牛脂および魚油)、植物油(例えばダイズ油、菜
種油、トウモロコシ油、ココナッツ油、ヤシ油、ヤシ核油、ペニバナ油、エゴマ油、アマ
ニ油、月見草油、中鎖脂肪酸トリグリセリド、および綿実油)、細菌が生成した脂肪およ
び油、ならびにこれらの分画油、これらの水素化油、およびこれらのエステル交換油が挙
げられる。混合すべき脂質の量は、用途によって異なる。

20

30

【0164】

上記の糖として、例えば、1種以上のデンプン、可溶性多糖、デキストリン、単糖(例えばスクロース、本明細書中に記載のラクトース、マルトース、グルコース、およびフルクトース)ならびに他のオリゴ糖が挙げられる。かかる糖の総量は、上記の栄養組成物中の総固体に対して40~80重量%であることが好ましい。さらに、アスパルテムなどの人工
甘味料を十分に使用することができる。人工甘味料の量は、上記の栄養組成物中の総固体
当たり0.05~1.0重量%が適当である。

40

【0165】

上記のビタミンとして、限定するものではないが、必須成分としてのリコピンが挙げられ、さらに、乳児に投与し得る限り、例えばビタミンA、ビタミンB群、ビタミンC、D、およびEならびにビタミンK群、葉酸、パントテン酸、ニコチンアミド、カルニチン、コリン、イノシトールおよびピオチンなどのビタミンが挙げられる。かかるビタミンは、上記の乳児用栄養組成物中の総固体当たり、重量で10mg~5gが好ましい。

【0166】

さらに、上記のミネラルとして、カルシウム、マグネシウム、カリウム、ナトリウム、鉄

50

、銅、亜鉛、リン、塩素、マンガン、セレンウムおよびヨードが挙げられる。かかるミネラルは、上記の乳児用栄養組成物中の総固体当たり、重量で1mg～5gが好ましい

上記の成分以外に、本発明に従って用いられる乳児用栄養組成物には、栄養組成物中に配合することが望ましい任意の成分(例えば、食物繊維、ヌクレオチド、核酸、香料、および着色料)を配合し得る。

【0167】

本発明に従って用いられる食品または飲料は、ストレプトコッカス・ミュータンス以外のミュータンス・ストレプトコッキによって引き起こされる齲蝕を予防および/または治療するための健康食品もしくは飲料または機能性食品もしくは飲料として使用することができる。

10

【0168】

本発明による食品または飲料を摂取する場合、摂取すべき量は具体的に限定されない。摂取すべき量は、活性成分の総量に基づいて、通常、1日当たり0.1～50g、好ましくは0.5g～20gである。上記の食品または飲料は、この量で、1日～5年間、好ましくは2週間～1年の期間継続的に摂取される。本発明においては、上記の食品または飲料を摂取する個人の、症状の重篤度、その年齢および体重等に依存して、摂取量を適切な範囲に調整することができる。

【0169】

本発明に従って用いられる飼料は、上記の活性成分を含む任意の飼料であってよい。飼料としては、例えば、イヌ、ネコ、およびラット用のペット飼料、ウシおよびブタ用の家畜飼料、ニワトリおよびシチメンチョウ用のニワトリ飼料、ならびにタイおよびブリ用の魚養殖飼料が挙げられる。

20

【0170】

上記の飼料は、本明細書中の上記の活性成分を、未加工の飼料原料(例えば、穀類、糠、油糧種子のミール、動物由来の未加工の飼料原料、他の未加工の飼料原料など)および精製品中に適切に配合することによって製造することができる。

【0171】

上記の穀類としては、例えば、ヒエ、小麦、大麦、オート麦、ライ麦、玄米、ソバ、アワ、高粱、ケナフ(Deccan grass)、トウモロコシおよびダイズが挙げられる。

【0172】

上記の糠としては、例えば、米糠、脱脂米糠、糠、低級小麦粉、小麦胚芽、大麦糠スクリーニングペレット、トウモロコシ糠、およびトウモロコシ胚芽が挙げられる。

30

【0173】

上記の油糧種子のミールとしては、例えば、ダイズミール、ダイズ粉末、アマニミール、綿実ミール、落花生ミール、ペニバナミール、ココナッツミール、ヤシミール、ゴマミール、ヒマワリミール、菜種ミール、カボック種子ミールおよびマスタードミールが挙げられる。

【0174】

上記の動物由来の未加工の飼料原料としては、例えば、魚粉、輸入ミール、ホールミール、および沿岸ミール、フィッシュソルブル、肉粉、肉骨粉、血粉、分解毛、骨粉、食肉処理副産物、フェザーミール、蚕蛹、脱脂乳、カゼイン、乾燥乳清およびオキアミが挙げられる。

40

【0175】

他の未加工の飼料原料としては、例えば、植物茎葉類(例えばアルファルファ、ハイキューブ、アルファルファ葉ミール、およびニセアカシア葉粉)、トウモロコシ加工産業の副産物(例えばトウモロコシグルテンミール、トウモロコシグルテン飼料およびトウモロコシ浸出液、デンプン、糖、酵母)、発酵産業の副産物(例えばビール残渣、麦芽根、酒残渣および醤油残渣)、ならびに農業副産物(例えば柑橘類加工残渣、豆腐残渣、コーヒー残渣、およびココア残渣、キャッサバ、空豆、グアーミール、海藻、スピルリナおよびクロレラ)が挙げられる。

50

【0176】

上記の精製品としては、例えば、カゼインおよびアルブミンなどのタンパク質、アミノ酸、デンプン、セルロース、スクロースおよびグルコースなどの糖類、ミネラルならびにビタミンが挙げられる。

【0177】

本発明による飼料を動物に与える場合、摂取させる飼料の量は具体的に限定されないが、活性成分の量に基づいて、好ましくは、例えば、1日当たり体重1kg当たり0.1mg～50gであり、好ましくは、1日当たり体重1kg当たり0.5mg～20gである。この飼料は、この量で、1日～5年間、好ましくは2週間～1年の期間継続的に摂取される。この場合も先と同様に、上記の飼料等を摂取する動物の、種、年齢および体重に依存して、摂取量を適切な範囲に調整することができる。

10

【0178】

他の実施形態において、本発明は、ストレプトコッカス・ミュータンス以外のミュータンス・ストレプトコッキによって引き起こされる齲蝕の治療または予防用の抗齲蝕原性組成物の調製のために、本明細書中の上記のミュータンス・ストレプトコッキ群に属する細菌に特異的に結合し得る乳酸菌群に属する微生物の使用であって、ここで該抗齲蝕原性組成物が、食品、飲料および飼料用の添加物である、上記使用に関する。好ましくは、上記の食品、飲料および飼料用の添加物は、本明細書中の上記の微生物またはその誘導体もしくは変異体もしくは類似体もしくは断片の存在によって、特に、ストレプトコッカス・ミュータンス以外のミュータンス・ストレプトコッキによって引き起こされる齲蝕を

20

予防および/または治療するためにミュータンス・ストレプトコッキに特異的に結合し得る。上記の微生物、その変異体、誘導体、類似体または断片は、本明細書中の上記の寄託された微生物、またはその変異体、誘導体もしくは断片であることが好ましい。上記の食品または飲料用の添加物は、乳児用栄養組成物用の添加物を包含する。

【0179】

本発明の食品用添加物は、食品、飲料または飼料用の添加物を製造するための一般的な方法によって製造することができる。必要であれば、食品、飲料または飼料において一般的に用いられる添加物、例えば、食品添加物ハンドブック(日本食品添加物協会; 1997年1月6日発行)中に記載される添加物(甘味料、着色料、保存料、増粘剤および安定化剤、抗酸化剤、発色剤、漂白剤、防腐剤、ガムベース、苦味料、酵素、増白剤、酸性化剤、調味料

30

【0180】

上記の添加物は、以下の添加物を包含する。

【0181】

上記の甘味料としては、アスパルテーム、甘草、ステビア、キシロースおよびラカンカ(羅漢果)が挙げられる。上記の着色料としては、カロテノイドおよびターメリックオレオレジン、フラボノイド、カラメル色素、スピルリナ色素、クロロフィル、紫イモ色素、紫ヤム色素、ペリラ色素、およびブルーベリー色素が挙げられる。

40

【0182】

上記の保存料としては、例えば、亜硫酸ナトリウム、安息香酸塩、ベンゾイン抽出物、ソルビン酸塩、およびプロピオン酸塩が挙げられる。上記の増粘剤および安定化剤としては、例えば、アラビアガムおよびキサントガム、アルギン酸塩、キチン、キトサン、アロエ抽出物、グアーガム、ヒドロキシプロピルセルロース、カゼインナトリウム、トウモロコシデンプン、カルボキシメチルセルロース、ゼラチン、寒天、デキストリン、メチルセルロース、ポリビニルアルコール、マイクロファイバースセルロース、微結晶セルロース、海藻セルロース、ポリアクリル酸ナトリウム、ポリリン酸ナトリウム、カラギーナンまたは酵母細胞壁などのガム類が挙げられる。

50

【 0 1 8 3 】

上記の抗酸化剤としては、例えば、ビタミンC群、エチレンジアミン四酢酸ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸カルシウム、エリソルビン酸、オリザノール、カテキン、クエルセチン、クローブ抽出物、酵素処理ルチン、リンゴ抽出物、ゴマ種子抽出物、ジブチルヒドロキシトルエン、ウイキョウ抽出物、西洋わさび抽出物、芹抽出物、茶抽出物、トコフェロール、菜種抽出物、コーヒー豆抽出物、ヒマワリ種子抽出物、フェルラ酸、ブチルヒドロキシアニソール、ブルーベリー葉抽出物、プロポリス抽出物、コショウ抽出物、ホウセンカ抽出物、没食子酸、ユーカリ抽出物、およびローズマリー抽出物が挙げられる。

【 0 1 8 4 】

上記の発色剤としては、例えば、亜硝酸ナトリウムが挙げられる。上記の漂白剤としては、例えば、亜硫酸ナトリウムが挙げられる。

10

【 0 1 8 5 】

上記の防腐剤としては、例えば、o-フェニルフェノールが挙げられる。上記のガムベースとしては、例えば、アセチルリシノール酸メチル、漆蠟、エステルガム、エレミ樹脂、エノキグサ蠟、カウリガム、カルナウバ蠟、グリセリン脂肪酸エステル、鯨蠟、コパイバルサム、コーパル樹脂、ゴム、米糠蠟、サトウキビ蠟、シェラック、ジェルトン、スクロース脂肪酸エステル、脱重合天然ゴム、パラフィン蠟、モミバルサム、プロピレングリコール脂肪酸エステル、粉末パルプ、もみ殻粉末、ホホバ油、ポリイソブチレン、ポリブテン、微結晶蠟、マスチックガム、蜂蠟およびリン酸カルシウムが挙げられる。

20

【 0 1 8 6 】

上記の苦味料としては、例えば、イソアルファー苦味酸、カフェイン、カワラタケ(*Coriolus versicolor*)抽出物、キナ抽出物、オウバク抽出物、リンドウ根抽出物、香辛料抽出物、酵素修飾ナリンギン、ジャマイカカシヤ抽出物、テオブロミン、ナリンギン、カシヤ抽出物、ニガヨモギ抽出物、エンメイソウ抽出物、オリーブ茶、ダイダイ(*Citrus aurantium*)抽出物、ホップ抽出物およびヨモギ抽出物が挙げられる。

【 0 1 8 7 】

上記の酵素としては、例えば、アミラーゼ、トリプシンまたはレンネットが挙げられる。

【 0 1 8 8 】

上記の増白剤としては、例えば、漆蠟および和蠟が挙げられる。上記の酸性化剤としては、例えば、アジピン酸、イタカニア(itacania)酸、クエン酸、コハク酸、酢酸ナトリウム、酒石酸、二酸化炭素、乳酸、フィチン酸、フマル酸、リンゴ酸およびリン酸が挙げられる。上記の調味料としては、例えば、アミノ酸(例えばアスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミン、アラニン、イソロイシン、グリシン、セリン、シスチン、チロシン、ロイシンおよびプラリン(praline))、核酸(例えばイノシン酸ナトリウム、ウリジンナトリウム、グアニル酸ナトリウム、シチジル酸ナトリウム、リボヌクレオチドカルシウムおよびリボヌクレオチドナトリウム)、有機酸(例えばクエン酸およびコハク酸、塩化カリウム、塩水湖水低塩化ナトリウム液、粗塩化カリウム、乳清塩、リン酸三カリウム、リン酸水素二カリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、リン酸三ナトリウムおよびクロレラ抽出物)が挙げられる。

30

【 0 1 8 9 】

上記の強化剤としては、例えば、亜鉛塩、ビタミンC群、様々なアミノ酸、5-アデニル酸、塩化鉄、ヘスペリジン、様々な焼成カルシウム、様々な非焼成カルシウム、ジベンゾイルチアミン、水酸化カルシウム、炭酸カルシウム、チアミン塩酸塩、ドナリエラ(Dunallia)、カロテン、トコフェロール、ニコチン酸、ニンジンカロテン、ヤシ油カロテン、パントテン酸カルシウム、ビタミンA、ヒドロキシプロリン、ピロリン酸二水素カルシウム、ピロリン酸第一鉄、ピロリン酸第二鉄、フェリチン、ヘム鉄、メナキノン、葉酸およびリボフラビンが挙げられる。

40

【 0 1 9 0 】

上記の製造用薬剤としては、例えば、アセトンおよびイオン交換樹脂などの加工助剤が挙げられる。上記の香料としては、例えば、バニラエッセンスおよび香辛料抽出物(例えば

50

、唐辛子抽出物など)が挙げられる。

【0191】

これらの様々な添加物は、本発明による投与方法を考慮に入れて、本発明の活性成分に加えることができる。

【0192】

本発明に従って用いられる抗齲蝕原性組成物は、一定量の上記の乳酸菌群に属する微生物またはその誘導体もしくは変異体またはその類似体もしくは断片を含む。上記の微生物、その変異体、誘導体、類似体または断片は、本明細書中の上記の寄託された微生物、またはその変異体、誘導体もしくは断片であることが好ましい。この組成物、特に抗齲蝕原性組成物が、上記の乳酸菌群に属する微生物を、プロバイオティック微生物の形態で含むことも想定される。すなわち、上記の乳酸菌群に属するプロバイオティック微生物は、プロバイオティック作用に加えて、ストレプトコッカス・ミュータンス以外のミュータンス・ストレプトコッキによって引き起こされる齲蝕を治療および/または予防するために有用である。上記のプロバイオティック微生物の量は、健全な医学的判断の範囲内で、(適切な利益/リスク比において)治療すべき症状(好ましくは齲蝕)を著しく良好に改善するために十分に高いが、重大な副作用を回避するのに十分に低い。上記のプロバイオティック微生物の有効量は、達成すべき特定の目標、治療対象の患者の年齢および身体状態、原因となっている疾患の重篤度、治療期間、併用される療法および使用される特定の微生物の性質によって異なるだろう。このため、上記のプロバイオティック微生物の有効量は、ミュータンス・ストレプトコッキへの所望の特異的結合を提供する最小限の量となるだろう。例えば、リン酸緩衝生理食塩水溶液の0.05 ml 溶液、または0.05 mlの寒天の懸濁液中に溶解した生存もしくは非生存の全細胞としての 1×10^9 個の細菌、あるいは細胞壁断片の乾燥相当量の存在は、約0.05ml ~ 約20mlの量で投与する場合に有効である。

【0193】

実用面での明らかな利点は、本発明のプロバイオティック生物を、経口経路などの従来の方法で投与し得ることである。投与経路によっては、上記のプロバイオティック生物を含む活性成分を、この生物を不活性化させ得る酵素、酸および他の自然条件の作用から該生物を保護する材料でコーティングすることが必要となる可能性がある。プロバイオティック生物を非経口投与以外で投与するためには、不活性化を防ぐ材料でこれらの生物をコーティングし、またはこのような材料と共に投与しなければならない。例えばプロバイオティック生物は、酵素阻害剤と共に、またはリボソーム中に入れて同時投与することができる。酵素阻害剤としては、腓臓トリプシン阻害剤、ジイソプロピルフルオロリン酸(DFP)およびトラジロールが挙げられる。リボソームとしては、水中油中水型P40エマルジョン、ならびに通常のリボソーム、およびラクトバチルス菌またはこれらの副産物を泌尿生殖器表面に輸送する特別に設計されたリボソームが挙げられる。分散液も、例えばグリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびこれらの混合物、ならびに油中に調製することができる。通常、分散液は、様々な滅菌されたプロバイオティック生物を、塩基性分散媒体および、上記に列挙した成分のうちの必要とされる他の成分とを含む滅菌ビヒクル中に組み込むことによって調製される。滅菌注射溶液の調製用の滅菌粉剤の場合、好ましい調製法は真空乾燥技術およびフリーズドライ技術であり、これらの技術は、活性成分と任意の付加的な所望の成分の粉末を、これらの予め滅菌ろ過された溶液から生成する。さらなる好ましい調製方法としては、限定するものではないが、凍結乾燥および加熱乾燥が挙げられる。

【0194】

抗齲蝕原性組成物は、本明細書中に記載の許容可能な医薬担体を含み、これに対してまたはこの上に上記の乳酸菌群に属する微生物の細胞をフレッシュな形態、濃縮形態または乾燥形態で添加する、経口投与または頬投与を意図した製品も包含する。当然、本明細書中に開示される上記の微生物の誘導体もしくは類似体もしくは断片、または上記の微生物、その誘導体および/もしくは類似体および/もしくは断片の任意の組み合わせも加えてよい。これらの製品は、当業者に公知の摂取可能な懸濁剤、ゲル剤、ディフューザー(diffuse

10

20

30

40

50

r)、カプセル剤、硬ゼラチンカプセル剤、シロップ剤、または任意の他の生薬形態の形で提供し得る。

【0195】

本発明のプロバイオティック生物を上記のとおり好適に保護する場合、本発明の活性化化合物は、例えば、不活性希釈剤と共に、または同化可能な食用担体と共に経口投与し得るか、硬殻もしくは軟殻ゼラチンカプセル中に封入し得るか、または胃を通過するように設計された(すなわち腸溶コーティングされた)錠剤中に圧縮し得るか、または食事の食品に直接組み込み得る。経口治療投与のため、本発明のプロバイオティック生物は、賦形剤に組み込んで、摂取可能な錠剤、頬錠剤、トローチ剤、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁剤、シロップ剤、ウエハース剤等の形態で使うことができる。本発明による組成物または製剤は、経口用量単位形態が、例えば、1ml当たり約 1×10^9 個の生存または非生存の例えばラクトバチルス菌を含むように調製される。本発明のプロバイオティック生物は、好都合且つ有効な投与のために、有効量で、好適な製薬上許容可能なまたは食品的に許容可能な担体と共に、上記に開示される用量単位形態で配合される。1単位用量形態は、例えば、主要な活性化化合物を、1ml当たり、約 10^9 個の生存または非生存の例えばラクトバチルス菌の量で含み得る。プロバイオティクスなどの補助成分を含む組成物の場合、その用量は、上記の成分の通常の用量および投与法を参照することによって決定される。

【0196】

他の実施形態において、本発明は、ストレプトコッカス・ミュータンス以外のミュータンス・ストレプトコッキによって引き起こされる齲蝕の予防または治療方法に関する。好ましくは、上記の予防または治療は、本明細書中の上記のミュータンス・ストレプトコッキ群に属する細菌に特異的に結合し得ることを特徴とする乳酸菌群に属する微生物、またはこの微生物の変異体、誘導体、類似体もしくは断片を被験体に投与するステップを含む。より好ましくは、この微生物は本明細書中の上記の微生物であり、さらに好ましくは、この微生物は、本明細書中の上記のDSMZに寄託されたラクトバチルス菌である。上記の乳酸菌群に属する微生物の類似体または断片は、本明細書中の上記の任意の類似体または断片であってよい。

【0197】

好ましくは、治療対象の被験体は動物である。より好ましくはこの動物は哺乳動物であり、さらに好ましくはこの哺乳動物はペット哺乳動物である。好適な実施形態において、このペットはイヌ、ネコ、ハムスター、サル、ラットまたはマウスである。別の好適な実施形態において、上記の動物は、ウシ、ウマ、ブタ、ロバ、ヒツジまたはヤギである。別の好ましい実施形態において、上記の哺乳動物はヒトである。

【0198】

好ましくは、ミュータンス・ストレプトコッカスは、ストレプトコッカス・ミュータンス、ストレプトコッカス・ソブリヌス、ストレプトコッカス・クリセツス、ストレプトコッカス・ラッティ、ストレプトコッカス・フェラスまたはストレプトコッカス・マカカエの種に属する微生物である。さらに好ましくは、ミュータンス・ストレプトコッカスは、ストレプトコッカス・ミュータンス血清型c(DSMZ 20523)、ストレプトコッカス・ミュータンス血清型e(NCTC 10923)、ストレプトコッカス・ミュータンス血清型f(NCTC 11060)、ストレプトコッカス・ソブリヌスDSM 20742、ストレプトコッカス・ラッティDSM 20564、ストレプトコッカス・クリセツスDSM 20562、ストレプトコッカス・フェラスDSM 20646またはストレプトコッカス・マカカエDSM 20714に属する微生物に関連する。

【0199】

本発明の治療または予防対象の齲蝕は、ストレプトコッカス・ミュータンス以外のミュータンス・ストレプトコッキによって引き起こされ、好ましくは、上記の齲蝕は、ストレプトコッカス・ソブリヌス、ストレプトコッカス・クリセツス、ストレプトコッカス・ラッティ、ストレプトコッカス・フェラスおよびストレプトコッカス・マカカエからなる群から選択される1種以上の細菌によって引き起こされる。

【0200】

本発明の治療または予防方法に関連する、上記の乳酸菌群に属する微生物の投与は、当業者に公知の任意の好適な形態で行うことができる。好ましくは、上記の投与は、例えば場合により本明細書中の上記の医薬担体もしくは化粧品担体または賦形剤を含み得る、本明細書中の上記の組成物の使用および適用を包含する。この投与の用量および時間的経過は、当業者に公知の任意の適切な情報に従って確立することができる。好ましくは、上記の用量および時間的経過は、本明細書中の上記のとおりに確立し得る。

【0201】

本発明は、図1～図3によって以下に記載のとおりに示される：

【図面の簡単な説明】

【0202】

【図1】図1は、ラクトバチルス種によるストレプトコッカス・ミュータンスの凝集を示す。特にこの図は、ラクトバチルス菌がストレプトコッカス・ミュータンスと凝集している混合物(左のチューブ)を、ラクトバチルス菌がストレプトコッカス・ミュータンスと凝集していない混合物(右のチューブ)と比較して示す。この実験は実施例4に記載のとおりに行い、チューブは20分間静置して凝集体を安定化させた。

【図2】図2は、図1に示すラクトバチルス菌とストレプトコッカス・ミュータンスとの凝集体(左チューブ)の顕微鏡写真を示す。この写真は、位相差顕微鏡を用いて1000倍の倍率で撮影した。

【図3】図3は、ラクトバチルス菌による様々なミュータンス・ストレプトコッキの凝集を示す。このアッセイは、実施例5に記載のとおりに行った。簡単に言えば、蛍光染色を用いてミュータンス・ストレプトコッキを染色した。ラクトバチルス菌によってストレプトコッキを凝集させた後、結果として得られたペレットを遠心分離で分離した。これらのペレットの蛍光の量を、凝集したミュータンス・ストレプトコッキの量の尺度とした。

【0203】

本発明およびその多くの利点は、以下の実施例からより良く理解されるだろう。これらの実施例は、例示の目的のためにのみ提供されるものであり、いかなる点においても本発明の範囲を限定するよう意図するものではない。

【実施例】

【0204】

実施例1：保存および増殖

菌株の保存および増殖は、通常の手順に従って行うことができる。例えば、菌株は凍結ストックとして-80℃で保存し得る。1mlの培養液をMRS培地中で静止期(OD600/mL 4～8)まで増殖させ、500μlの滅菌50%グリセリン溶液と混合して凍結することができる。ミュータンス・ストレプトコッキの培養液は、TSY培地中で静止期(OD600/mL 1～2)まで増殖させ、上記のとおりに処理することができる。

【0205】

ミュータンス・ストレプトコッキ(ストレプトコッカス・ミュータンス、ストレプトコッカス・ソブリヌス、ストレプトコッカス・ラッティ、ストレプトコッカス・クリセツス、ストレプトコッカス・フェラス、またはストレプトコッカス・マカカエ)の培養ならびにラクトバチルス菌の培養は、密閉したファルコンチューブ内において5mlで、37℃で一晩振盪させずに行うことができる。

【0206】

特に、本出願において使用した菌株は、凍結ストックとして-80℃で保存した。MRSブロス中で静止期(OD600/mL 4～8)まで増殖させた1mlの培養液を、500μlの滅菌50%グリセリン溶液と混合して凍結した。

【0207】

特に、ミュータンス・ストレプトコッキの培養液は、TSYブロス中で静止期(OD600/mL 1～2)まで増殖させ、上記のとおりに処理した。

【0208】

ミュータンス・ストレプトコッカス(ストレプトコッカス・ミュータンス(DSM 20523、血清型c; NCTC 10923、血清型e; NCTC 11060、血清型f)、ストレプトコッカス・ソプリヌス DSM 20742、ストレプトコッカス・ラッティ DSM 20564、ストレプトコッカス・クリセツス DSM 20562、ストレプトコッカス・フェラス DSM 20646 またはストレプトコッカス・マカカエ DSM 20714)の培養およびラクトバチルス菌の培養は、密閉したファルコンチューブ内において5mlで、37℃で一晩振盪させずに行った。実施例5に記載の蛍光アッセイには、ストレプトコッカス・ミュータンス DSM 20523を使用した。

【0209】

凝集アッセイ用には、本発明のラクトバチルス菌をMRS培地中で増殖させた。5mlのMRS培地に10μlの上記のストックを植菌し、好気条件下で37℃で3日間インキュベートした。600nm(OD₆₀₀)におけるこの培養液の光学密度を測定した。その後この培養液を、PBS緩衝液を用いてOD₆₀₀が2になるまで希釈した。ミュータンス・ストレプトコッカスは、7mlのTSY培地中で増殖させた。7mlのTSY培地に10μlの上記のストックを植菌し、嫌気性条件下で37℃でインキュベートした。

【0210】

実施例2：菌株の分類学的分類

菌株の分類学的分類は、これらの炭水化物発酵パターンに従って行った。これは、API 50 CH(bioMérieux社、France)システムを用いて決定し、APILAB PLUSソフトウェアバージョン3.3.3(bioMérieux, France)を用いて分析した。

【0211】

実施例3：細胞染色

ラクトバチルス菌とミュータンス・ストレプトコッカスを実施例1に記載のとおり増殖させた後、蛍光染色を用いてミュータンス・ストレプトコッカスを染色した。このため培養液のOD₆₀₀を測定した。培養物は、3200xgで5分間の遠心分離によって回収した。そのペレットをPBS緩衝液中に再懸濁した。緩衝液の量は、結果として得られる懸濁液が、製造者の使用説明書に従って調製した2μlのCFDA-SE溶液(Invitrogen社、USA)と混合したこの懸濁液の4.2 mlのOD₆₀₀を有するように計算した。細胞染色は、この混合物を37℃で2時間インキュベートすることによって行った。染色した細胞は、3200xgで5分間の遠心分離で回収した。この細胞は、その後2mlのPBS緩衝液中に再懸濁した。

【0212】

実施例4：ミュータンス・ストレプトコッカスのペレット凝集アッセイ

このアッセイでは、ラクトバチルス菌とミュータンス・ストレプトコッカスとの混合は、容量比3:1~60:1(ミュータンス・ストレプトコッカス：ラクトバチルス菌)で行った。この容量比は、コロニー形成単位の比で1:50~1:2,5に相当する。

【0213】

1mlで、波長600nmにおいて測定した光学密度が、ミュータンス・ストレプトコッカスについては3 x 10⁸コロニー形成単位を意味し、ラクトバチルス菌については7 x 10⁹コロニー形成単位を意味することが好ましい。混合は、15mlファルコンチューブ内で2mL量で行った。最終容量を2mlに維持しながら、培養懸濁液をPBS緩衝液で希釈して上記の容量比を得た。この混合物を15秒間ボルテックスした。凝集は、上記の懸濁液の直接濁度として視認できる。上記のチューブを20分間静置し、この期間後、凝集体が視認可能なペレットとして沈殿する一方、非凝集混合物は懸濁液中にとどまった。形成された凝集体は、500xgで30秒間の遠心分離によって分離した。その後、上清中に残った非凝集細胞の量を測定することによって凝集量を定量した。同様に、1mlの上清を注意深く取り出して光学密度を測定した。この光学密度を600nmで測定した。ラクトバチルス菌を用いない各対照実験を引いた後の値は、凝集していない細胞の量を示す。

【0214】

対照として、ラクトバチルス菌株またはミュータンス・ストレプトコッカス菌株のみをチューブに加えた試験を行うことによって、各ラクトバチルス菌株および各ミュータンス・ストレプトコッカス菌株の自己凝集を常に調べた。ラクトバチルス菌によるストレプトコ

ツカス・ミュータンスの凝集は、図1(左側のチューブ)および図2に示す。

【 0 2 1 5 】

本明細書中の上記のラクトバチルス菌株、特にDSMZに寄託された菌株は、自己凝集挙動を示すことなく、全てのストレプトコッカス・ミュータンス血清型の凝集を示した。

【 0 2 1 6 】

培地：

MRSプロス：

MRS混合(Difco社, USA) 55 g/L

pH： 6.5

TSYプロス：

TSY混合(Difco社, USA) 30 g/L

酵母エキス(Deutsche Hefewerke社, Germany) 3 g/L

緩衝液：

PBS緩衝液：

Na₂HPO₄・2H₂O 1.5 g/L

KH₂PO₄ 0.2 g/L

NaCl 8.8 g/L

pHはHClで調整した。

【 0 2 1 7 】

実施例5：ミュータンス・ストレプトコッキの蛍光凝集アッセイ

このアッセイでは、各ラクトバチルス菌と、染色した各ミュータンス・ストレプトコッカスとの懸濁液を以下のとおりに混合した：

ストレプトコッカス・ミュータンスDSM 20523とLb-OB-K1(DSM 16667)、ストレプトコッカス・ミュータンスDSM 20523とLb-OB-K2(DSM 16668)、ストレプトコッカス・ミュータンスDSM 20523とLb-OB-K3(DSM 16669)、ストレプトコッカス・ミュータンスDSM 20523とLb-OB-K4(DSM 16670)、ストレプトコッカス・ミュータンスDSM 20523とLb-OB-K5(DSM 16671)、ストレプトコッカス・ミュータンスDSM 20523とLb-OB-K6(DSM 16672)、ストレプトコッカス・ミュータンスDSM 20523とLb-OB-K7(DSM 16673)；

ストレプトコッカス・ソブリヌスDSM 20742とLb-OB-K1(DSM 16667)、ストレプトコッカス・ソブリヌスDSM 20742とLb-OB-K2(DSM 16668)、ストレプトコッカス・ソブリヌスDSM 20742とLb-OB-K3(DSM 16669)、ストレプトコッカス・ソブリヌスDSM 20742とLb-OB-K4(DSM 16670)、ストレプトコッカス・ソブリヌスDSM 20742とLb-OB-K5(DSM 16671)、ストレプトコッカス・ソブリヌスDSM 20742とLb-OB-K6(DSM 16672)、ストレプトコッカス・ソブリヌスDSM 20742とLb-OB-K7(DSM 16673)；

ストレプトコッカス・クリセツスDSM 20562とLb-OB-K1(DSM 16667)、ストレプトコッカス・クリセツスDSM 20562とLb-OB-K2(DSM 16668)、ストレプトコッカス・クリセツスDSM 20562とLb-OB-K3(DSM 16669)、ストレプトコッカス・クリセツスDSM 20562とLb-OB-K4(DSM 16670)、ストレプトコッカス・クリセツスDSM 20562とLb-OB-K5(DSM 16671)、ストレプトコッカス・クリセツスDSM 20562とLb-OB-K6(DSM 16672)、ストレプトコッカス・クリセツスDSM 20562とLb-OB-K7(DSM 16673)；

ストレプトコッカス・ラッティDSM 20564とLb-OB-K1(DSM 16667)、ストレプトコッカス・ラッティDSM 20564とLb-OB-K2(DSM 16668)、ストレプトコッカス・ラッティDSM 20564とLb-OB-K3(DSM 16669)、ストレプトコッカス・ラッティDSM 20564とLb-OB-K4(DSM 16670)、ストレプトコッカス・ラッティDSM 20564とLb-OB-K5(DSM 16671)、ストレプトコッカス・ラッティDSM 20564とLb-OB-K6(DSM 16672)、ストレプトコッカス・ラッティDSM 20564とLb-OB-K7(DSM 16673)；

ストレプトコッカス・フェラスDSM 20646とLb-OB-K1(DSM 16667)、ストレプトコッカス・フェラスDSM 20646とLb-OB-K2(DSM 16668)、ストレプトコッカス・フェラスDSM 20646とLb-OB-K3(DSM 16669)、ストレプトコッカス・フェラスDSM 20646とLb-OB-K4(DSM 16670)、ストレプトコッカス・フェラスDSM 20646とLb-OB-K5(DSM 16671)、ストレプトコッカス・

10

20

30

40

50

フェラスDSM 20646とLb-OB-K6(DSM 16672)、ストレプトコッカス・フェラスDSM 20646とLb-OB-K7(DSM 16673)；

ストレプトコッカス・マカカエDSM 20724とLb-OB-K1(DSM 16667)、ストレプトコッカス・マカカエDSM 20724とLb-OB-K2(DSM 16668)、ストレプトコッカス・マカカエDSM 20724とLb-OB-K3(DSM 16669)、ストレプトコッカス・マカカエDSM 20724とLb-OB-K4(DSM 16670)、ストレプトコッカス・マカカエDSM 20724とLb-OB-K5(DSM 16671)、ストレプトコッカス・マカカエDSM 20724とLb-OB-K6(DSM 16672)およびストレプトコッカス・マカカエDSM 20724とLb-OB-K7(DSM 16673)。50 μ lのラクトバチルス菌懸濁液を、96穴マイクロタイタープレート中の50 μ lの染色したミュータンス・ストレプトコッキィに加えた。このプレートをフルスピードで12分間ボルテックスした。その後、上記のプレートを500xgで10秒間遠心分離した。上清は注意深く除去して捨てた。ペレットは、100 μ lのPBS緩衝液中に再懸濁した。

10

【0218】

マイクロタイタープレート蛍光リーダー中で、励起波長495nm、発光波長525nmで懸濁液の蛍光を測定した。

【0219】

対照として、ラクトバチルス菌のみならびに染色したミュータンス・ストレプトコッキィのみを、上記のとおり処理して測定した。各ミュータンス・ストレプトコッキィのみについて測定したバックグラウンド蛍光を、各ラクトバチルス菌との凝集について測定した値から引いた。全ての測定は3重測定で行った。上記のミュータンス・ストレプトコッキィは、試験した全てのラクトバチルス菌によって凝集された(図3参照)。

20

【0220】

培地：

MRSプロス：

MRS混合(Difco社，USA) 55 g/L

pH： 6.5

TSYプロス：

TSY混合(Difco社，USA) 30 g/L

酵母エキス(Deutsche Hefewerke社，Germany) 3 g/L

緩衝液：

PBS緩衝液：

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g/L

KH_2PO_4 0.2 g/L

NaCl 8.8 g/L

pHはHClで調整した。

30

【0221】

実施例6：口腔細菌叢の代表的なメンバーに対する凝集の特異性

上記のラクトバチルス菌培養液を、実施例1に記載のとおり増殖させた。

【0222】

上記の口腔細菌、すなわち：ストレプトコッカス・サリバリウス亜種サーモフィルス(Ornithobacterium parvum社によって単離され、製造者の使用説明書に従ってAPI 50 CH(BioMérieux社，France)によって同定した)；ストレプトコッカス・オラリス(DSMZ 20066)；ストレプトコッカス・オラリス(DSMZ 20395)；ストレプトコッカス・オラリス(DSMZ 20627)；ストレプトコッカス・エピデルミディス(DSMZ 1798)；ストレプトコッカス・エピデルミディス(DSMZ 20044)；ストレプトコッカス・ミティス(DSMZ 12643)；ストレプトコッカス・サンガイニス(DSMZ 20567)を、密閉した15mlファルコンチューブ内の5mLのBHI培地中で、37で一晩増殖させた。上記の口腔細菌を、それぞれラクトバチルス菌培養液と容量比3：1で好ましく混合し、実施例4のとおり凝集をアッセイした。凝集/非凝集の各試験について、試験結果を速やかに測定するため、上記の細菌のうち1種のみを使用することが好ましい。

40

50

【0223】

対照として、ラクトバチルス菌または口腔細菌叢の菌株のみを上記のチューブに加える試験を行うことによって、各口腔細菌ならびに試験したラクトバチルス菌株の自己凝集を常に調べた。

【0224】

ラクトバチルス・パラカゼイ属の種パラカゼイ菌株Lb-OB-K1(DSM 16667)、Lb-OB-K2(DSM 16668)、Lb-OB-K3(DSM 16669)、Lb-OB-K4(DSM 16670)、Lb-OB-K5(DSM 16671)は、上記の口腔細菌を凝集させなかった。ラクトバチルス・ラムノサス(*L. rhamnosus*)菌株Lb-OB-K6(DSM 16672)およびLb-OB-K7(DSM 16673)は、ストレプトコッカス・サリバリウス亜種サーモフィルスを凝集させた。

10

【0225】

BHIブロス：

BHI混合(Difco社, USA) 37 g/L

pH: 7.2

実施例7：ラクトバチルス菌の凝集能の温度耐性

上記の細菌を、実施例1に記載のとおり増殖させた。

【0226】

増殖させたラクトバチルス菌培養液を、飽和蒸気中で、121℃、2バールで20分間インキュベート(オートクレーブ)した。オートクレーブした培養液を室温まで冷却した後、上記のラクトバチルス菌を、増殖させたストレプトコッカス・ミュータンス培養液と容量比1:3で混合し、対照実験を含めて実施例4に記載のとおり凝集をアッセイした。凝集については、実施例6に概説したとおり、口腔細菌を用いたアッセイも行った。ラクトバチルス菌の凝集挙動は、試験対象のストレプトコッカス・ミュータンス血清型または上記の口腔細菌に対するオートクレーブ処理によっては変化しないことが見出された。

20

【0227】

実施例8：熱不活性化させたラクトバチルス菌による凝集

上記のラクトバチルス菌を実施例1に記載のとおり増殖させた。上記のミュータンス・ストレプトコッキイを実施例1および3に記載のとおり増殖させて染色した。増殖させたラクトバチルス菌培養液を、実施例1に記載のとおり、OD₆₀₀が2になるまで調整した。1 mlの上記の懸濁液を、121℃、2バールで20分間インキュベート(オートクレーブ)した。オートクレーブした培養液を室温まで冷却した後、対照実験を含めて実施例5に記載のとおり凝集を測定した。熱不活性化させたラクトバチルス菌は、依然として全てのミュータンス・ストレプトコッキイを凝集させた。

30

【0228】

実施例9：pH値に対する凝集の依存性

上記の細菌を、実施例1に記載のとおり増殖させた。0.5 mlのラクトバチルス菌と、1.5 mlのストレプトコッカス・ミュータンスを3200×gで10分間の遠心分離によって回収し、上清を捨てた。上記の細胞を、様々なpH値に調整した様々なPBS緩衝液中に、これらの元の容量(それぞれ0.5mlおよび1.5ml)で再懸濁した。これらの緩衝液のpH値は、値7.0から3.0まで0.5pH単位ずつ調整した。培養液を、凝集挙動アッセイに用いる各pH値の緩衝液中に再懸濁した。

40

【0229】

その後、上記のラクトバチルス菌を、ストレプトコッカス・ミュータンス培養液と容量比1:3で好ましく混合し、対照実験を含めて実施例4に記載のとおり凝集をアッセイした。ラクトバチルス菌によるストレプトコッカス・ミュータンスの視認可能な凝集は、4.5より低いpH値では起こらなかった。

【0230】

実施例10：pH値に対する凝集の依存性

上記のラクトバチルス菌を実施例1に記載のとおり増殖させた。ミュータンス・ストレプトコッキイを実施例1および3に記載のとおり増殖させて染色した。その後、異なる

50

pH値で凝集をアッセイした。この目的のため、ラクトバチルス菌ならびにストレプトコッキを、各pHに調整した酢酸緩衝液中に再懸濁した。試験したpH値は4.0、4.5および5.0であった。上記の凝集を、実施例5に記載のとおりアッセイした。ミュータンス・ストレプトコッキの凝集は、4.5より低いpH値では起こらなかった。

【0231】

実施例11：凍結乾燥に対する凝集挙動の感受性

上記の細菌を、実施例1に記載のとおり増殖させた。

【0232】

1mlのラクトバチルス菌培養液の複数のアリコート、3200⁺gで10分間の遠心分離によって回収した。上清は捨て、ペレットは室温において真空下で2時間凍結乾燥させた。結果として得られた、試験した各ラクトバチルス菌株の乾燥ペレットを、それぞれ室温および4℃で、1日、1週間、2週間、3週間および4週間保存した。保存期間後、凍結乾燥させたペレットを1mlのPBS緩衝液(pH7.0)中に再懸濁した。再懸濁したラクトバチルス菌を、新たに増殖させたストレプトコッカス・ミュータンス培養液と容量比1:3で混合し、対照実験を含めて実施例4に記載のとおり凝集をアッセイした。

【0233】

ストレプトコッカス・ミュータンスに対する上記のラクトバチルス菌の凝集挙動は、凍結乾燥または保存処理によっては変化しなかった。

【0234】

実施例12：凍結乾燥に対する凝集挙動の感受性

上記のラクトバチルス菌を実施例1に記載のとおり増殖させた。ミュータンス・ストレプトコッキを実施例1および3に記載のとおり増殖させて染色した。増殖させたラクトバチルス菌培養液を、実施例1に記載のとおり、OD₆₀₀が2になるまで調整した。1mlの上記の懸濁液を、室温において真空下で2時間凍結乾燥させた。その後、凍結乾燥させたペレットを、1mlのPBS緩衝液中に再懸濁した。凝集は、対照実験を含めて実施例5に記載のとおり測定した。

【0235】

ミュータンス・ストレプトコッキに対する上記のラクトバチルス菌の凝集挙動は、凍結乾燥によっては変化しなかった。

【0236】

実施例13：プロテアーゼ耐性試験

上記の細菌を、実施例1に記載のとおり増殖させた。

【0237】

使用したプロテアーゼは、プロナーゼE、プロテイナーゼK、トリプシン、キモトリプシン(全てSigma社, Germanyから入手)であった。1mlのラクトバチルス菌の複数のアリコートを、3200⁺gで10分間の遠心分離で細胞を回収し、そのペレットを1mlのPBS緩衝液(pH7.0)中に再懸濁することによってPBS緩衝液中で洗浄した。その後、この細胞を再度上記のとおり回収し、各プロテアーゼを2.5mg/mLの最終濃度で含むPBS緩衝液(pH 7.0)中に再懸濁した。この懸濁液を37℃で1時間インキュベートした。その後、上記のとおり細胞を洗浄し、PBS緩衝液(pH7.0)中に再懸濁した。

【0238】

凝集は、対照実験を含めて実施例3に記載のとおりアッセイした。

【0239】

ストレプトコッカス・ミュータンスに対する上記のラクトバチルス菌の凝集挙動は、上記のプロテアーゼのいずれかをを用いた処理によっては変化しなかった。

【0240】

実施例14：ラクトバチルス菌の凝集挙動のプロテアーゼ感受性

上記のラクトバチルス菌を実施例1に記載のとおり増殖させた。ミュータンス・ストレプトコッキを実施例1および3に記載のとおり増殖させて染色した。使用したプロテアーゼは、プロナーゼE、プロテイナーゼK、トリプシン、キモトリプシン(全てSigma社,

10

20

30

40

50

Germanyから入手)であった。1mlのラクトバチルス菌の複数のアリコート、3200⁺gで10分間の遠心分離で細胞を回収し、そのペレットを1mlのPBS緩衝液(pH7.0)中に再懸濁することによってPBS緩衝液中で洗浄した。その後、この細胞を再度上記のとおり回収し、各プロテアーゼを2.5mg/mLの最終濃度で含むPBS緩衝液(pH 7.0)中に再懸濁した。この懸濁液を37℃で1時間インキュベートした。その後、上記のとおり細胞を洗浄し、PBS緩衝液(pH7.0)中に再懸濁した。凝集は、対照実験を含めて実施例5に記載のとおりアッセイした。ミュータンス・ストレプトコッカスに対する上記のラクトバチルス菌の凝集挙動は、上記のプロテアーゼのいずれかをを用いた処理によっては変化しなかった。

【0241】

実施例15：凝集挙動のイオン依存性

上記の細菌を、実施例1に記載のとおり増殖させた。

【0242】

1mlのラクトバチルス菌の複数のアリコート、上記のとおり1mlの200mM EDTA溶液中で2回洗浄した。その後この細胞を回収し、1mlのPBS緩衝液(pH7.0)中に再懸濁した。

【0243】

実施例4に記載のとおり凝集をアッセイし、凝集能の完全な喪失が観察された。200mM EDTA溶液中で2回洗浄した後、1mlの2mMカルシウム溶液中にラクトバチルス菌を再懸濁すると、ストレプトコッカス・ミュータンスを凝集させる能力が回復した。EDTAで洗浄した細胞を100mM以下のマグネシウム溶液中に再懸濁しても、ストレプトコッカス・ミュータンスを凝集させる能力は回復しなかった。

【0244】

実施例16：凝集挙動のイオン依存性

上記のラクトバチルス菌を実施例1に記載のとおり増殖させた。ミュータンス・ストレプトコッカスを実施例1および3に記載のとおり増殖させて染色した。1mlのラクトバチルス菌の複数のアリコート、上記のとおり1mlの200mM EDTA溶液中で2回洗浄した。その後この細胞を回収し、1mlのPBS緩衝液(pH7.0)中に再懸濁した。

【0245】

実施例5に記載のとおり凝集をアッセイし、凝集能の完全な喪失が観察された。200mM EDTA溶液中で2回洗浄した後、1mlの2mMカルシウム溶液中にラクトバチルス菌を再懸濁すると、ストレプトコッカス・ミュータンスを凝集させる能力が回復した。EDTAで洗浄した細胞を100mM以下のマグネシウム溶液中に再懸濁しても、ミュータンス・ストレプトコッカスを凝集させる能力は回復しなかった。

【0246】

実施例17：唾液存在下の凝集試験

上記の細菌を、実施例1に記載のとおり増殖させた。

【0247】

2mlのストレプトコッカス・ミュータンス培養液の複数アリコートを上記のとおり回収し、2mlの唾液中に再懸濁した。この唾液は2人のボランティアによって提供され、得られた後速やかに使用した。

【0248】

実施例4に記載のとおり凝集をアッセイした。

【0249】

ストレプトコッカス・ミュータンスに対する上記のラクトバチルス菌の凝集挙動は、唾液の存在下で変化しなかった。

【0250】

実施例18：唾液存在下のミュータンス・ストレプトコッカスの凝集

ボランティアから、新たな唾液をサンプリングした。唾液流は、無糖チューインガムを噛むことによって生じさせた。ボランティアらは、各サンプリング時に15mlの唾液を採取した。新たに採取した唾液は、上記のアッセイ法のため、PBS緩衝液を用いて1:2で希釈した。ラクトバチルス菌とミュータンス・ストレプトコッカスは、実施例1に記載のと

10

20

30

40

50

おりに培養した。ミュータンス・ストレプトコッキは、染色処理後、染色した細胞をPBS緩衝液の代わりに唾液中に再懸濁したことを除いては、実施例3に記載のとおり染色した。凝集は、対照実験を含めて実施例5に記載のとおり測定した。唾液の存在は凝集を抑制しなかった。

【0251】

実施例19：トローチ剤組成物(I)

本発明のトローチ剤組成物は、好ましくはDE-C2 36 45 147の第8頁の実施例4に記載のとおり調製され、ここで、上記の実施例4に記載の成分に加えて、上記の乳酸菌群に属する微生物が、本発明のトローチ剤1mg当たり $10^2 \sim 10^{12}$ 個、好ましくは $10^3 \sim 10^8$ 個の細胞の量で加えられる。

10

【0252】

実施例20：トローチ剤組成物(II)

本発明のトローチ剤組成物は、好ましくはDE-C2 36 45 147の第8頁の実施例5に記載のとおり調製され、ここで、上記の実施例5に記載の成分に加えて、上記の乳酸菌群に属する微生物が、本発明のトローチ剤1mg当たり $10^2 \sim 10^{12}$ 個、好ましくは $10^3 \sim 10^8$ 個の細胞の量で加えられる。

【0253】

実施例21：歯磨剤組成物

本発明の歯磨剤組成物は、好ましくはDE-C2 36 45 147の第8頁の実施例3に記載のとおり調製され、ここで、上記の実施例3記載の成分に加えて、上記の乳酸菌群に属する微生物が、本発明の歯磨剤1mg当たり $10^2 \sim 10^{12}$ 個、好ましくは $10^3 \sim 10^8$ 個の細胞の量で加えられる。

20

【0254】

実施例22：チョークを基剤とする歯磨剤組成物

本発明のチョークを基剤とする歯磨剤組成物は、好ましくは、教科書“Kosmetik”, W. Umbach(編), 第2版, Thieme Verlag, 1995の第205頁の第7.1.4.4章“Rezepturbeispiel”に記載のとおり調製され、ここで、第205頁の上記の章に記載の成分に加えて、上記の乳酸菌群に属する微生物が、本発明のチョーク(胡粉)を基剤とする歯磨剤1mg当たり $10^2 \sim 10^{12}$ 個、好ましくは $10^3 \sim 10^8$ 個の細胞の量で加えられる。

【0255】

実施例23：ケイ酸/フッ化ナトリウムに基づくゲル歯磨剤

本発明のケイ酸/フッ化ナトリウム歯磨剤組成物に基づくゲル歯磨剤は、好ましくは、教科書“Kosmetik”, W. Umbach(編), 第2版, Thieme Verlag, 1995の第205頁の第7.1.4.4章“Rezepturbeispiel”に記載のとおり調製され、ここで、第205頁の上記の章に記載の成分に加えて、上記の乳酸菌群に属する微生物が、本発明のケイ酸/フッ化ナトリウムに基づくゲル歯磨剤1mg当たり $10^2 \sim 10^{12}$ 個、好ましくは $10^3 \sim 10^8$ 個の細胞の量で加えられる。

30

【0256】

実施例24：歯石に対する歯磨剤組成物

本発明の歯石に対する歯磨剤組成物は、好ましくは、教科書“Kosmetik”, W. Umbach(編), 第2版, Thieme Verlag, 1995の第206頁の第7.1.4.4章“Rezepturbeispiel”に記載のとおり調製され、ここで、第206頁の上記の章に記載の成分に加えて、上記の乳酸菌群に属する微生物が、本発明の歯石に対する歯磨剤1mg当たり $10^2 \sim 10^{12}$ 個、好ましくは $10^3 \sim 10^8$ 個の細胞の量で加えられる。

40

【0257】

実施例25：チューインガム組成物

本発明のチューインガム組成物は、好ましくは、DE-C2 36 45 147の第9頁の実施例6に記載のとおり調製され、ここで、上記の実施例6に記載の成分に加えて、上記の乳酸菌群に属する微生物が、本発明のチューインガム1mg当たり $10^2 \sim 10^{12}$ 個、好ましくは $10^3 \sim 10^8$ 個の細胞の量で加えられる。

50

【 0 2 5 8 】

実施例26：濃縮マウスウォッシュ組成物

本発明の濃縮マウスウォッシュ組成物は、好ましくは、教科書“Kosmetik”，W. Umbach(編)，第2版，Thieme Verlag，1995の第206頁の第7.1.4.4章“Rezepturbeispiel”に記載のとおり調製され、ここで、第206頁の上記の章に記載の成分に加えて、上記の乳酸菌群に属する微生物が、本発明の濃縮マウスウォッシュ組成物1ml当たり $10^2 \sim 10^{13}$ 個の細胞の量で加えられる。

【 0 2 5 9 】

実施例27：フィルム製剤フィルムの調製：

10

1. 水相

水を60℃まで加熱する。

【 0 2 6 0 】

アスパルテーム(甘味料)を攪拌下に加える。

【 0 2 6 1 】

アスパルテームを完全に溶解させる。

【 0 2 6 2 】

例えば、Kollicoat IR(ポリビニルアルコール-ポリエチレングリコール)もしくはPVP(ポリビニルピロリドン)または天然高分子(例えばアルギン酸塩)のような高分子水溶性フィルム形成剤を、これらが溶解するまで攪拌下に加える。

20

【 0 2 6 3 】

10分後、残りの泡を除去する。

【 0 2 6 4 】

上記の混合物を冷却した後、上記の乳酸菌群に属する微生物を、最終的なアロマフィルム1枚当たり $10^2 \sim 10^{12}$ 個、好ましくは $10^3 \sim 10^8$ 個の細胞の量で加える；別法として、上記の乳酸菌群に属する微生物の変異体もしくは誘導体、または上記の乳酸菌群に属する微生物の類似体もしくは断片を加えることができる。

【 0 2 6 5 】

2. 油性相

メントールをペパーミント油に溶解させる。

30

【 0 2 6 6 】

ポリソルベート80を、ペパーミント油-メントール混合物に攪拌下に加える。

【 0 2 6 7 】

その後、この混合物をプロピレングリコールに攪拌下に加える。

【 0 2 6 8 】

任意の着色料(例えば色素、レーキ)を加えてよい。

【 0 2 6 9 】

3.

攪拌下で、油性相を水相にゆっくりと混ぜる。

【 0 2 7 0 】

40

4.

裁断装置を用いて、薄いフィルムを機械的に生成する。

【 0 2 7 1 】

サンプル製剤：

	製剤 I		製剤 II	
	重量[g]	フィルム中の組成[%]	重量[g]	フィルム中の組成[%]
第 I 相				
アスパルテーム	0.7	1.4	0.7	1.8
Kollicoat IR	35.0	68.5	25.0	65.8
アスコルビン酸	—	—	1.0	2.6
チェリー			6.0	15.8
フレーバー				
脱塩水	85.0	—	80.0	
第 II 相				
メントール	1.4	2.7	—	
ペパーミント油	5.6	11.0	—	
ポリソルベート 80	0.7	1.4	—	
プロピレングリコール	7.0	13.7	5.0	13.2
グリーンレーキ	0.7	1.4	—	
アゾルビンレーキ	—	—	0.3	0.8
合計	136.1	100.0	118.0	100.0
固形成分含有量	51.1		38.0	

10

20

30

40

本発明の他の実施形態および用途は、本明細書を考慮し、本明細書に開示される本発明を実施することにより当業者には明らかであろう。本明細書中に引用される全ての参考文献は、いかなる理由にせよ、全ての刊行物、全ての米国および外国の特許ならびに全ての米国および外国の特許出願を含め、参照により具体的且つ完全に援用されるものとする。本明細書および実施例は、単に例示的なものに過ぎず、以下の特許請求の範囲によって示される本発明の真の範囲および精神と共に考慮されることを意図している。

【 0 2 7 2 】

file re. **WO 2008/074473**
in 2966 PCT S3**PCT/EP2007/011127**

**INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL**

(PCT Rule 13 bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page <u>20, lines 19-33 and page 21, lines 1-5</u>		10
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT		
Further deposits are identified on an additional sheet <input type="checkbox"/>		
Name of depositary institution DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GMBH		
Address of depositary institution (including postal code and country) Mascheroder Weg 1 b 38124 Braunschweig DE		
Date of deposit 26.08.2004	Accession Number DSM 16667	20
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable)		
This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/>		
Applicant makes use of the rights under Rule 32 EPC.		
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)		
		30
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)		
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")		
		40
For receiving Office use only <input checked="" type="checkbox"/> This sheet was received with the international application Authorized officer Fransz-Van der Hoeven	For International Bureau use only <input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on: Authorized officer	

WO 2008/074473 2008.08.07

PCT/EP2007/011127

**INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL**

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page <u>20</u> , lines <u>19-33</u> and page <u>21</u> , lines <u>1-5</u> .		10
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input type="checkbox"/>		
Name of depositary institution DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GMBH		20
Address of depositary institution (including postal code and country) Mascheroder Weg 1 b 38124 Braunschweig DE		
Date of deposit <div style="text-align: right;">26.08.2004</div>	Accession Number <div style="text-align: right;">DSM 16668</div>	30
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/>		
Applicant makes use of the rights under Rule 32 EPC.		40
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)		
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)		
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")		
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> For receiving Office use only <input checked="" type="checkbox"/> This sheet was received with the international application Authorized officer <div style="text-align: center;">Fransz-Van der Hoeven</div> </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> For International Bureau use only <input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on: Authorized officer </div>	

WO 2008/074473

PCT/EP2007/011127

**INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL**

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page <u>20</u> , lines <u>19-33</u> and page <u>21</u> , lines <u>1-5</u> .	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
Name of depositary institution DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GMBH	
Address of depositary institution (including postal code and country) Mascheroder Weg 1 b 38124 Braunschweig DE	
Date of deposit <div style="text-align: right;">26.08.2004</div>	Accession Number <div style="text-align: right;">DSM 16669</div>
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
Applicant makes use of the rights under Rule 32 EPC.	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	

<p align="center">For receiving Office use only</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <input checked="checked" type="checkbox"/> This sheet was received with the international application </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-top: 10px;"> Authorized officer Fransz-Van der Hoeven </div>	<p align="center">For International Bureau use only</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on: </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-top: 10px;"> Authorized officer </div>
--	--

WO 2008/074473

PCT/EP2007/011127

**INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL**

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page <u>20, lines 19-33 and page 21, lines 1-5</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
Name of depositary institution DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GMBH	
Address of depositary institution (including postal code and country) Mascheroder Weg 1 b 38124 Braunschweig DE	
Date of deposit 26.08.2004	Accession Number DSM 16670
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
Applicant makes use of the rights under Rule 32 EPC.	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	

<p align="center">For receiving Office use only</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This sheet was received with the international application</p> <hr/> <p>Authorized officer Franz-Van der Hoeven</p>	<p align="center">For International Bureau use only</p> <p><input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:</p> <hr/> <p>Authorized officer</p>
--	--

WO 2008/074473

PCT/EP2007/011127

**INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL**

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page <u>20, lines 19-33 and page 21, lines 1-5</u> .		
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT		
Further deposits are identified on an additional sheet <input type="checkbox"/>		
Name of depositary institution DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GMBH		
Address of depositary institution (including postal code and country) Mascheroder Weg 1 b 38124 Braunschweig DE		
Date of deposit 26.08.2004	Accession Number DSM 16671	
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable)		
This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/>		
Applicant makes use of the rights under Rule 32 EPC.		
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)		
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)		
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")		
For receiving Office use only		
<input checked="" type="checkbox"/> This sheet was received with the international application		
Authorized officer Fransz-Van der Hoeven		
For International Bureau use only		
<input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:		
Authorized officer		

WO 2008/074473

PCT/EP2007/011127

**INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL**

(PCT Rule 13bis)


A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page <u>20</u> , lines <u>19-33</u> and page <u>21</u> , lines <u>1-5</u> .		10
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input type="checkbox"/>		
Name of depositary institution DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GMBH		
Address of depositary institution (including postal code and country) Mascheroder Weg 1 b 38124 Braunschweig DE		
Date of deposit <div style="text-align: right;">26.08.2004</div>	Accession Number <div style="text-align: right;">DSM 16672</div>	20
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/>		
Applicant makes use of the rights under Rule 32 EPC.		
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)		30
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)		40
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> For receiving Office use only <input checked="" type="checkbox"/> This sheet was received with the international application <hr/> Authorized officer <div style="text-align: center;">Fransz-Van der Hoeven</div> </div> <div style="width: 45%;"> For International Bureau use only <input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on: <hr/> Authorized officer </div> </div>		

Applicant's file reference	WO 2008/074473 M2966 PCT S3	international application no.	PCT/EP2007/011127
----------------------------	--------------------------------	-------------------------------	-------------------


**INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL**

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page <u>20, lines 19-33 and page 21, lines 1-5</u> .		10
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT		
Further deposits are identified on an additional sheet <input type="checkbox"/>		
Name of depositary institution DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GMBH		
Address of depositary institution (including postal code and country) Mascheroder Weg 1 b 38124 Braunschweig DE		
Date of deposit 26.08.2004	Accession Number DSM 16673	20
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable)		
This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/>		
Applicant makes use of the rights under Rule 32 EPC.		
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)		30
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)		
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")		40
For receiving Office use only	For International Bureau use only	
<input checked="" type="checkbox"/> This sheet was received with the international application	<input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:	
Authorized officer Fransz-Van der Hoeven	Authorized officer	

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: Lb-Ob-K1	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 16667
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: () a scientific description (x) a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2004-08-26 (Date of the original deposit) ¹ .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 2004-08-30

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: Lb-Ob-K2	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 16668
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: () a scientific description (x) a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2004-08-26 (Date of the original deposit) ¹ .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 2004-08-30

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: Lb-Ob-K3	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 16669
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
<p>The microorganism identified under I. above was accompanied by:</p> <p>() a scientific description</p> <p>(x) a proposed taxonomic designation</p> <p>(Mark with a cross where applicable).</p>	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
<p>This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2004-08-26 (Date of the original deposit).</p>	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
<p>The microorganism identified under I. above was received by this International Depositary Authority on (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).</p>	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
<p>Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig</p>	<p>Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):</p> <p><i>V. Wetz</i></p> <p>Date: 2004-08-30</p>

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

Form DSMZ-BP/4 (sole page) 12/2001


I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: Lb-Ob-K4	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 16670
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
<p>The microorganism identified under I. above was accompanied by:</p> <p>() a scientific description</p> <p>(<input checked="" type="checkbox"/>) a proposed taxonomic designation</p> <p>(Mark with a cross where applicable).</p>	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
<p>This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2004-08-26 (Date of the original deposit)¹.</p>	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
<p>The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).</p>	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
<p>Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig</p>	<p>Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):</p> <p><i>V. Wils</i></p> <p>Date: 2004-08-30</p>

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.


10

20

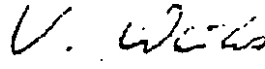
30

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: Lb-Ob-K5	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 16671
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: () a scientific description (x) a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2004-08-26 (Date of the original deposit) ¹ .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depository Authority on (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s):  Date: 2004-08-30

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depository authority was acquired.

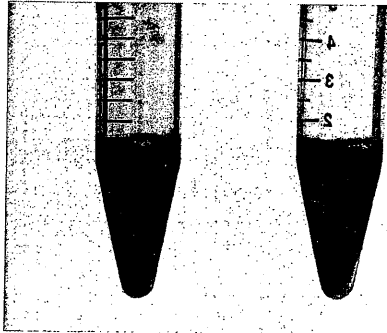
I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: Lb-Ob-K6	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 16672
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: () a scientific description (x) a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2004-08-26 (Date of the original deposit) ¹ .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 2004-08-30

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

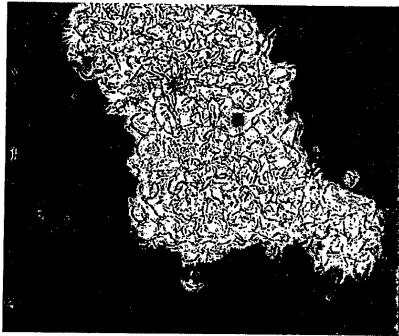
I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: Lb-Ob-K7	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 16673
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: () a scientific description (x) a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2004-08-26 (Date of the original deposit) ¹ .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 2004-08-30

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

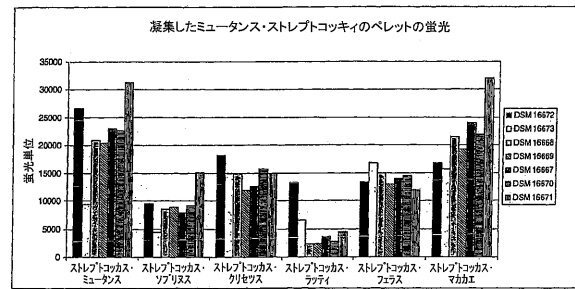
【図 1】



【図 2】



【図 3】



フロントページの続き

微生物の受託番号 DSMZ DSM 16671
 微生物の受託番号 DSMZ DSM 16672
 微生物の受託番号 DSMZ DSM 16673
 微生物の受託番号 DSMZ DSM 20523
 微生物の受託番号 NCTC 10923
 微生物の受託番号 NCTC 11060
 微生物の受託番号 DSMZ DSM 20742
 微生物の受託番号 DSMZ DSM 20564
 微生物の受託番号 DSMZ DSM 20562
 微生物の受託番号 DSMZ DSM 20646
 微生物の受託番号 DSMZ DSM 20714

前置審査

(74)代理人 100111741
 弁理士 田中 夏夫
 (72)発明者 ラインドル, アンドレアス
 ドイツ連邦共和国 6 8 1 9 9 マンハイム, ブルンヒルデシュトラッセ 2 4
 (72)発明者 ラング, クリスティーネ
 ドイツ連邦共和国 1 0 6 2 5 ベルリン, ゲーテシュトラッセ 5 9
 (72)発明者 ベットナー, メヴェス
 ドイツ連邦共和国 1 0 4 0 7 ベルリン, ヨーン - シェール - シュトラッセ 2 0 アー
 (72)発明者 フェーン, マルクス
 ドイツ連邦共和国 8 4 4 5 3 アルトミュールドルフ, シュボルトプラッツシュトラッセ 1 4

審査官 平林 由利子

(56)参考文献 特開2008-037859(JP, A)
 国際公開第06/027265(WO, A1)
 米国特許出願公開第2004/0101495(US, A1)
 WHATMORE, A.M. et al, Re-evaluation of the taxonomic position of *Streptococcus ferus*, Int J Syst Evol Microbiol, 2002, Vol.52, p.1783-7
 LOESCHE, W.J., Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay, Microbiol Rev, 1986, Vol.50, No.4, p.353-80
 吉村剛他, 小児歯科学雑誌, 2006 April, vol.44, no.2, p.213
 斎藤英一他, J Oral Biosci, 2004, vol.46, no.5, p.484
 等々力玲子他, J Oral Biosci, 2004, vol.46, no.5, p.475
 田頭素行他, 日本細菌学雑誌, 2002, vol.57, no.1, p.195
 池田祐子他, 歯科材料・器械, 2001, vol.20, no.3, p.184-8
 細田尚恵他, 日本栄養・食糧学会総会講演要旨集, 2001, vol.55, p.84
 下條学他, 日本農芸化学会誌, 1996, vol.70, no.7, p.787-92
 SAEKI, Y et al, Bull Tokyo Dent Coll, 1996, vol.37, no.2, p.77-92
 伊東哲明, 日大口腔科学, 1991, vol.17, p.115-26
 MURATA, Y et al, Antimicrob Agents Chemother, 1989, vol.33, no.9, p.1636-8

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 5 / 0 0 - 3 5 / 7 6
 A 2 3 L 1 / 2 7 - 1 / 3 0 8

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)