

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5913353号
(P5913353)

(45) 発行日 平成28年4月27日 (2016. 4. 27)

(24) 登録日 平成28年4月8日 (2016. 4. 8)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 35/74	(2015. 01)	A 6 1 K 35/74	Z N A G
A 6 1 P 35/00	(2006. 01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 31/19	(2006. 01)	A 6 1 K 31/19	
A 6 1 K 31/51	(2006. 01)	A 6 1 K 31/51	
A 6 1 K 38/00	(2006. 01)	A 6 1 K 37/02	

請求項の数 7 (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願2013-540910 (P2013-540910)
 (86) (22) 出願日 平成22年11月29日 (2010. 11. 29)
 (65) 公表番号 特表2014-500263 (P2014-500263A)
 (43) 公表日 平成26年1月9日 (2014. 1. 9)
 (86) 国際出願番号 PCT/MY2010/000307
 (87) 国際公開番号 WO2012/074351
 (87) 国際公開日 平成24年6月7日 (2012. 6. 7)
 審査請求日 平成25年11月21日 (2013. 11. 21)

前置審査

(73) 特許権者 505291413
 ユニバーシティー プトラ マレーシア
 マレーシア スランゴル ユービーエム
 セルダン 4 3 4 0 0
 (74) 代理人 100102842
 弁理士 葛和 清司
 (72) 発明者 フォー, ホイ リン
 マレーシア スランゴル 4 3 4 0 0、セル
 ダン、ユニバーシティー プトラ マレ
 ーシア、ファクulty オブ バイオテ
 クノロジー アンド バイオモレキュラー
 サイエンス、デパートメント オブ
 バイオプロセス テクノロジー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍細胞毒性剤およびその方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ラクトバシラス・プランタラムから生成された代謝産物および薬学的に許容される賦形剤を含み、がん細胞に対してアポトーシスを誘導し、乳がん、子宮頸がん、および肝臓がんからなる群から選択されるがんを処置するための、医薬組成物。

【請求項 2】

代謝産物の pH を生理学的 pH 7 . 2 ~ 7 . 4 に調節し、代謝産物を処置の前に 0 . 2 2 μ m 膜フィルターでろ過した、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

代謝産物が、バクテリオシンおよび/または有機酸を含む、請求項 1 または 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

医薬組成物が、さらに栄養分、ビタミン、有機酸塩またはこれらの組み合わせを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

ビタミンが、ビタミン B である、請求項 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

有機酸塩が、ギ酸、酢酸および乳酸のナトリウム塩を含む、請求項 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

哺乳動物のがん細胞に対してアポトーシスを誘導するためのキットであって、キットが、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に定義される医薬組成物を含む容器を含む、前記キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、乳酸菌などのグラム陽性菌から得られる代謝産物の抗腫瘍剤としての使用に関する。本発明は、実際にヒト細胞における腫瘍の増殖の治療および／または予防するための方法についてまた開示する。

【背景技術】

【0002】

10

発明の背景

自然界に広く存在する乳酸菌は、グルコースまたはラクトースなどの炭水化物を用いて有機酸を生成する微生物である(von Wright, 2005)。乳酸菌は、昔から、直接的または間接的に食物に用いられてきた。ヒトの腸管微生物相の研究の結果、健康な人の胃腸管における主な乳酸菌として、ラクトバシラス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバシラス・カゼイ (*Lactobacillus casei*)、ラクトバシラス・ファーメンタム (*Lactobacillus fermentum*) およびラクトバシラス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*) 等が報告されてきた。そのような乳酸菌は、胃酸および胆汁に対して耐性である (Balcazar, 2007)。

【0003】

20

現在、乳酸菌は、広く世界中で微生物剤または発酵品に不可欠な細胞調製品等として用いられてきた。発酵乳または乳酸菌の腫瘍細胞に対する細胞毒性の効果について多くの報告がある。たとえば、ラクトバシラス・カゼイの投与は、生きたラクトバシラス・カゼイの毎日の取り込みによって、腫瘍を有さない、および少なくとも2つの結腸直腸腫瘍を除去した、398人の男性および女性に結腸直腸の異型を抑制することにより、結腸直腸がんの進行を予防することができる (Ishikawa et al., 2005)。乳酸菌は、炭水化物を代謝する細菌であり、それにより乳酸を生成する。これら細菌は、嫌気性条件下で良好に増殖する通性嫌気性菌または絶対嫌気性菌に属する。

【0004】

30

乳酸菌の一般に知られている属の少数は、ストレプトコッカス (*Streptococcus*)、ラクトバシラス、リューコノストック (*Leuconostoc*)、ビフィドバクテリア (*Bifidobacteria*) およびペディオコッカス (*Pediococcus*) である。ストレプトコッカス属微生物は、腐敗細菌または病原菌を抑えるために乳を発酵することによって乳酸を生成するホモ発酵性の細菌である。ラクトバシラス属微生物は、桿状のホモまたはヘテロ発酵性の細菌であり、乳製品または野菜の発酵中に広く見られる。リューコノストック属微生物である双球菌は、ヘテロ発酵微生物であり、主に野菜の発酵に関与する。ビフィドバクテリア属微生物は、こどもの健康に有効なL(+)乳酸を生成する絶対嫌気性菌であるが、好気状態では、生存することができない (Holzapfel et al., 2001)。

【0005】

40

多くの化学組成物が抗腫瘍剤として報告されているが、これらの組成物は、腫瘍細胞を破壊するだけでなく、正常細胞もまた破壊する。代わりに、腫瘍組織を取り除く外科治療も通常行われている。しかし、この方法は、腫瘍組織を完全に取り除かないために非常に難しい。いかなる治療も副作用をもたらす、完全に最善の結果が得られていないのが現状である。たとえば、化学療法が、ネオアジュバント、アジュバントおよびサルベージ療法としてうまく用いられている (Carlson et al., 2006)。化学療法は、急速に正常細胞を分裂させる有害な副作用を伴って、癌細胞を急速に分裂させる。これは、内皮細胞毒性、免疫抑制、粘膜炎および脱毛症などの最も一般的な化学療法の副作用をもたらす (Mitchell, 2004; Mailloux et al., 2005)。さらに、従来の化学療法医薬の使用は、癌細胞に化学耐性をもたらすことがわかってきた (Zhivotovsky and Orrenius, 2009)。放射線および生物学的作用物質の同時治療法もまた用いられている (American Cancer Society, 2009)

50

。さらに外科および放射線治療への化学療法の大きな進歩にもかかわらず、癌の死亡率は、多くの国の死亡の原因の中では、上位を占めている(WHO, 2009a)。したがって、正常な細胞には、限られた毒性でありながら、大きな効果を有する新規な化学療法を開発することが必要である。

【 0 0 0 6 】

食品が長期の健康のもとになるという期待に結びつき、長期の化学療法剤よりもむしろ、健康維持のための自然な方法を用いることへの消費者の要望は、プロバイオティクス市場が急速に拡大するという推測を支持するものである。総合的な研究から得られる結果が、食品、補助食品または医薬品のいずれかとしてプロバイオティクス製剤を市場に出すために、おそらく必要となるであろう(Mercenier et al., 2002)。バクテリオシンが乳酸菌から単離され、抗生物質に類似の方法によって種々の病原菌に対し阻害作用を有する。しかし、バクテリオシンは、その合成および作用機序、毒性および耐性のメカニズムの点から抗生物質とは区別できる。

新しい抗腫瘍化合物は、ヒトの癌の治療のために絶えず需要があり、新しい抗腫瘍化合物の製造は、さらなる研究のための抗腫瘍剤の開発の重要なものである。これらの化合物を製造するための製造プロセスに用いられる新規な培養菌株が同様に重要である。さらに微生物によって生成される代謝産物が、抗ウィルス性および抗腫瘍作用を有するとともに、重要なヒトの病原菌および菌に対する抗菌作用を示すことが見出された(Zhao et al., 2006; Wachsman et al., 1999)。

【 0 0 0 7 】

本発明の目的は、優れた抗腫瘍活性を有し、低減された副作用を有する代謝産物に基づく新規な抗腫瘍剤であり、かつ食品製造に用いられる高度に安全な細菌から製造することができる新規な抗腫瘍剤を提供することにある。さらに本発明の他の目的は、乳酸菌の抗がん効果（がん細胞増殖の阻害およびアポトーシスの誘導）を測定する方法の提供およびさらには抗がん効果を有する乳酸菌のスクリーニング方法を提供することにある。

【発明の概要】

【 0 0 0 8 】

したがって、本発明は、腫瘍の予防または治療のための乳酸菌株の使用であって、かかる菌株は、B I O T E Cカルチャーコレクション(BIOTEC Culture Collection (B C C))およびタイのB I O T E C中央研究ユニット(BIOTEC Central Research Unit of Thailand)に寄託されたラクトバシラス・プランタラム(Lactobacillus plantarum) I - U L 4、T L 1、R S 5、R G 1 4、R G 1 1およびR I 1 1(菌株は生きた形態または生きてはいないが無傷である)である使用に関する。さらに、ラクトバシラス・プランタラム I - U L 4、T L 1、R S 5、R G 1 4、R G 1 1およびR T 1 1が、哺乳動物(好ましくはヒト)における腫瘍の予防または治療のためにがんの増殖の阻害およびアポトーシスを誘導することができるバクテリオシンなどの代謝産物を生成するものである。とくに代謝産物が、抗腫瘍剤であって、代謝産物は、栄養分、ビタミン(好ましくは、ビタミンB)、有機酸塩(好ましくは、ギ酸、酢酸および乳酸のナトリウム塩)またはこれらの組み合わせで補助される。実際に特定の本発明に用いられる代謝産物の量は、完全増殖培地全体の1%(v/v)および50%(v/v)の濃度である。

【 0 0 0 9 】

これに続き、抗腫瘍剤は、完全増殖培地全体の0%(v/v)および50%(v/v)の濃度を有することにより、種々の型のヒトがん性細胞(たとえば、ヒト乳がん細胞株M C F - 7、ヒト結腸直腸がん細胞株H T - 2 9、ヒト子宮頸がん細胞株H e L a、ヒト肝臓がん細胞株H e p G 2、ヒト白血病細胞株H L - 6 0およびK - 5 6 2)の生存度を低下する手段を提供するものである。さらに、抗腫瘍剤が、1%(v/v)~50%(v/v)の濃度を有することにより、種々の型のヒトがん性細胞の増殖を阻害する手段を有する。また、本発明は、がん細胞のアポトーシスの誘導を促進しなければならない乳酸菌株について記載し、かかる菌株はB I O T E Cカルチャーコレクション(B C C)およびタイのB I O T E C中央研究ユニットに寄託されたラクトバシラス・プランタラム I - U L

4、TL1、RS5、RG14、RG11およびRI11である。したがって、本発明は、がん細胞の治療または予防の医薬の製造について記載し、かかる医薬は、ラクトバシラス・プランタラムI-UL4、TL1、RS5、RG14、RG11およびRI11株を用いて製造される。実際に抗腫瘍剤が、BIOTECカルチャーコレクション(BCC)およびタイのBIOTEC中央研究ユニットに寄託されたラクトバシラス・プランタラムI-UL4、TL1、RS5、RG14、RG11およびRI11由来の6種の代謝産物の組み合わせもまた提供する。

【0010】

しかし、本発明の他の側面では、がんの治療または予防のための組成物に関し、有効量の少なくとも1種の乳酸菌株および薬学的に許容される賦形剤を含み、該菌株が、BIOTECカルチャーコレクション(BCC)およびタイのBIOTEC中央研究ユニットに寄託されたラクトバシラス・プランタラムI-UL4、TL1、RS5、RG14、RG11およびRI11である。組成物が、バクテリオシンなどの代謝産物および有機酸(ギ酸、酢酸および乳酸のナトリウム塩を含む)を含む抗腫瘍剤を含み、さらに栄養分、ビタミン(好ましくは、ビタミンB)、有機酸塩またはこれらの組み合わせを含む。また、組成物は、さらにBIOTECカルチャーコレクション(BCC)およびタイのBIOTEC中央研究ユニットに寄託されたラクトバシラス・プランタラムI-UL4、TL1、RS5、RG14、RG11およびRI11由来の6種の代謝産物の組み合わせを含む。

【0011】

さらに本発明は、哺乳動物(ヒト)のがん細胞のアポトーシスを促進するための方法および方法が、上記組成物の投与を含む方法にもまた関する。とくに、本発明は好ましくは、哺乳動物のがんの予防または治療のためのキットを提供し、キットが、上記組成物を含む容器を含むものである。また、本発明は、BIOTECカルチャーコレクション(BCC)およびタイのBIOTEC中央研究ユニットに寄託されたラクトバシラス・プランタラムI-UL4、TL1、RS5、RG14、RG11およびRI11を含む抗腫瘍のための食品について記載する。また、食品は、ラクトバシラス・プランタラムI-UL4、TL1、RS5、RG14、RG11およびRI11株由来の6代謝産物の組み合わせを含む。

本発明は、以下の詳細な記載および単に実例であり、本発明を限定するものではない、添付の図面により完全に理解される。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】図1は、乳酸菌の6菌株に由来する代謝産物のMCF-7細胞に対する抗増殖効果のグラフである。同じ列および実験のうち、アスタリスクを付した値は、処理しないコントロールに対し有意差がある、 $P < 0.05$ 。

【図2】図2は、乳酸菌の6菌株に由来する代謝産物のHT-29細胞における抗増殖効果のグラフである。同じ列および実験のうち、アスタリスクを付した値は、処理しないコントロールに対し有意差がある、 $P < 0.05$ 。

【図3】図3は、MCF-7細胞における乳酸菌代謝産物のアポトーシス誘導のグラフである。注：「初期アポトーシス」は、初期のアポトーシス性細胞を示し、「後期アポトーシス」は、後期のアポトーシス性細胞および壊死性細胞を示す。T1：処理していないコントロール、T2：処理したコントロールである(±は、標準誤差を示す)。処理グループを処理していないコントロールと比較する。同じ列および実験のうち、共通の文字を有する値は、有意差がない、 $P > 0.05$ 。

【0013】

【図4】図4は、UL4代謝産物で処理したMCF-7細胞の蛍光顕微鏡写真である。パネルA：24時間、パネルB：48時間、Cは、72時間である。乳酸菌代謝産物に曝したときの以下の形態学的変化は、アポトーシスの典型であり、aは、細胞の収縮、bは、膜ブレブ形成(membrane blebbing)、cは、アポトーシス小体形成、dは、壊死性細胞である(倍率：4000×)。

【図5】図5は、T U N E Lアッセイによる、アポトーシス性細胞におけるDNA鎖切断の検出を表す2つのパラメーターの散布図（左図）および一つのパラメーターのヒストグラム（右図）のグラフである。パネルA：72時間の処理なしコントロール；B：72時間UL4代謝産物処理。アポトーシスを起こした細胞（R4）は、散布図におけるDNA鎖切断の非常に高い発現（Y座標の指数関目盛に注意）およびヒストグラムのM2ゲートに特徴付けられる。

【図6】図6は、B I O T E Cカルチャーコレクション（B C C）およびタイのB I O T E C中央研究ユニットに寄託されたラクトバシラス・プランタラムI - U L 4、T L 1、R S 5、R G 1 4、R G 1 1およびR I 1 1株の配列表である。

【0014】

10

発明の詳細な説明

本発明は、とくにマレーシアの食品、ラクトバシラス菌種から単離された、正常細胞の細胞毒性効果を有さないがん性細胞における、乳酸菌株の代謝産物の細胞毒性効果について記載する。本発明は、またヒトがん性細胞における細胞死の誘導にも関する。とくに、本発明は、結腸および乳がん細胞の増殖の阻害に関する。さらに詳しくは、本発明は、ヒト乳がん細胞におけるアポトーシス誘導に関する。

本発明は、乳酸菌の抗腫瘍効果について容易に測定する方法、かかる方法を用いて抗腫瘍効果を有する乳酸菌をスクリーニングする方法、乳酸菌の抗炎症サイトカイン効果を容易に測定する方法およびかかる方法を用いて炎症性サイトカイン阻害作用を有する乳酸菌のスクリーニング方法について記載する。

20

【0015】

本発明の解決方法は、新規なラクトバシラス属微生物、さらには、食品源から単離したI - U L 4、T L 1、R S 5、R G 1 4、R G 1 1およびR I 1 1菌株を含むラクトバシラス・プランタラムに関する。とくにこれらの菌株が、免疫促進、抗がん活性およびこれらへの利用を有すると考えられる。がん細胞生存度の減少、がん細胞の増殖阻害およびヒトがん細胞のアポトーシス誘導によるこの優れた抗がん活性によって、本発明のI - U L 4、T L 1、R S 5、R G 1 4、R G 1 1およびR I 1 1菌株を含むラクトバシラス・プランタラムは、抗がん剤、食品添加剤、飼料添加剤、健康補助食品または栄養補助食品産における機能性食品、および医薬品などの種々の製品の製造に効果的に用いることができる。

30

【0016】

従って、I - U L 4、T L 1、R S 5、R G 1 4、R G 1 1およびR I 1 1菌株は、プロマレーシア大学バイオプロセステクノロジー学科（Department of Bioprocess Technology, Universiti Putra Malaysia）より得られた。実際に菌株は、代謝産物を生成することができる。これらの菌株からの代謝産物を得る際、代謝産物は、未使用の万能容器に移し、代謝産物のpHを、水酸化ナトリウム（NaOH）を用いて生理学的pHに調整した。さらに代謝産物をがん細胞に処理する前に0.22 μm膜シリンジフィルターを用いてろ過し、代謝産物は、使用するまで、4℃で保った。

理論に制限されることなく、プロビオティクス乳酸菌由来の代謝産物は、有意に、がん細胞の生存率を減少することができ、がん細胞の増殖を阻害し、ヒトがん細胞のアポトーシスを誘導することができると考えられる。さらなる詳細についてここでの実施例を参照する。

40

【0017】

発明の実施のための最良の形態

本発明を詳述する前に、本発明は、記載の特定の態様には限定されず、当然に異なってもよいものとして理解される。本願発明の範囲が、添付のクレームによってのみ限定されるものであるため、ここで用いられる専門用語は、特定の態様についてのみ記載する目的であって、限定するものではないものとまた理解される。値の範囲が与えられているときは、かかる範囲の上限値および下限値の間に介在する各値、およびかかる記載範囲における他の記載された値または介在する値は、他に明らかな指示がなければ、下限値の10分

50

の1まで、本発明に包含される。記載の範囲において、特に除外される境界となりやすい、上限値および下限値のこれらより小さな範囲が、独立してこれらより小さな範囲に含まれてもよく、本発明の範囲にも含まれる。記載の範囲が、境界の一方または両方を含むとき、これら含まれる境界のいずれかまたは両方を除外する範囲もまた本発明に含まれる。

【0018】

他に定義されていない限り、ここで用いられるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する当業者に共通して理解されているものと同様の意味を有する。ここで記載されたものと同様またはそれと同等のいずれの方法および材料は、本発明の実務または試験にもまた用いることができるが、好ましい方法および材料をここでは記載する。ここで記載のすべての刊行物は、ここでは開示の参照として組み込まれ、刊行物が引用するものに
10 関連する方法および/または材料を記載する。ここでおよび添付のクレームで用いられる単数「a」、「an」および「the」は、明確に別の指示がない限り、複数の指示対象を含むものであることに注意すべきである。

【0019】

実施例

以下の例は、本発明の使用の範囲を例示するものであり、その範囲を限定するものではない。本発明の精神および範囲のいずれから逸脱することなく改良および変更を行うことができる。本発明を試験および実行するために以下に見出されるものと等価な他の方法または製品をたとえ用いてもよいにしても、材料および好ましい方法を述べる。本発明の背景において、乳酸菌ががんのアポトーシスをどのように助けるかを決定するために、ヒト
20 ヒト乳がん細胞株 MCF-7、ヒト結腸直腸がん細胞株 HT-29、ヒト子宮頸がん細胞株 HeLa、ヒト肝臓がん細胞株 Hep G2、ヒト白血病細胞株 HL-60およびK-562がんに対して試験された。用いられた乳酸菌株は、I - U L 4、T L 1、R S 5、R G 1 4、R G 1 1およびR I 1 1菌株を含むラクトバシラス・プランタラムからなる。さらにこれらの菌株は、抗腫瘍剤または細胞毒性剤として働く代謝産物（単数/複数）を生成する。しかし本発明において抗腫瘍剤または細胞毒性剤は、バクテリオシン、栄養分、ビタミン、有機酸塩で補助される。

【0020】

代謝産物の生成

i) ラクトバシラス種の代謝産物を未使用の万能容器に移し、代謝産物のpHをNaOHを用いて生理学的pH（7.2から7.4の間）に調節した。代謝産物をがん性細胞株および正常細胞の両方に処理する前に、0.22 μm膜シリンジフィルター（Milipore、USA）でろ過した。
30

【0021】

細胞株の入手

i) ユニバーシティブトラマレーシアの動物組織カルチャーラボラトリーが、ヒト乳がん細胞株MCF-7、ヒト結腸直腸がん細胞株HT-29、ヒト子宮頸がん細胞株 HeLa、ヒト肝臓がん細胞株 Hep G2、ヒト白血病細胞株 HL-60 およびK-562を提供した。正常腺上皮細胞モデルとしての良性正常腺上皮細胞 MCF-10A は、アメリカンタイプカルチャーコレクション（American Type Culture Collection (ATCC)）から入手した。すべてのがんおよび
40 正常細胞株は、ATCCが推奨する10%（v/v）熱不活性ウシ胎仔血清および100 U/mlペニシリン - ストレプトマイシンを有する培地に維持され、5% CO₂ 雰囲気下、37 °Cで培養した。

【0022】

ii) すべての動物実験は、ユニバーシティブトラマレーシア、獣医および動物科学学部（Faculty of Veterinary and Animal Sciences, Universiti Putra Malaysia.）のガイドラインに基づいて行われた。7～8週のメスICRマウスを頸椎脱臼によって屠殺した。解剖後に得られた脾臓および胸腺を氷冷PBSで2～3回洗い流し、続いてPBSに浸漬した金網で細分化した。細胞凝集を取り除くため、細胞懸濁液を金網を用いてろ過した。得られたすべての細胞は、遠心分離（300 × g、5分）によって氷冷PBSで2～
50

3 回洗浄した。

【 0 0 2 3 】

i i) ユニバーシティブトラマレーシア、獣医および動物科学学部から得られたガイドラインおよび承認では、健常なヒト提供者 (2 5 ~ 3 0 歳) から約 1 0 m l の血液を無菌で取り出し (静脈穿刺) 、防腐剤を有さないヘパリンチューブに移した。抗凝固処理血液を等量の p H 7 . 5 のリン酸緩衝液 (P B S) で希釈し、ゆっくりFicoll-Paque Plus上に層状にした。混合物をスウィング型ローターで 4 0 0 × g 、 4 0 分、 1 8 ~ 2 0 で遠心分離した。末梢血単核細胞 (P M B C) をFicoll - 血漿の界面から回収し、 P B S で 2 回洗浄した。マウス脾臓、胸腺およびヒト P M B C の細胞のペレットを完全増殖培地に 5×10^5 セル / m l の密度で再懸濁した。

10

【 0 0 2 4 】

がん細胞生存度、増殖およびアポトーシス誘導の測定

Mosmann (1983) による M T T アッセイを用いて局所的に単離したラクトバシラス菌種の 6 つの菌株由来の代謝産物の細胞生存度に対する効果を評価した。細胞を平底 9 6 ウェルプレート上に 1×10^4 セル / ウェルの密度で 2 4 時間プレートし、[コントロールセル、 0 % (v / v) の代謝産物] または代謝産物の 2 倍希釈濃度 [5 0 % (v / v) から 0 . 5 % (v / v)] の存在下で処理した。2 4 時間、 4 8 時間および 7 2 時間の培養後、それぞれ M T T 溶液 (P B S 5 m g / m l) 2 0 μ l をそれぞれのウェルに添加し、暗い中、 3 7 、 5 % C O ₂ 雰囲気下で 4 時間培養した。得られたホルマザンの結晶を 1 0 0 μ l D M S O に溶解した。参照波長、 6 3 0 n m での 5 7 0 n m の吸収 (A) を μ Quant ELIZAリーダー (Biotek EL340, USA) を用いて計測した。細胞生存度の比率は、(A サンプル - A フラック) / (A コントロール - A フラック) × 1 0 0 % として計算した。すべての実験は、それぞれの実験に対しを 3 つの試料を用いて独立した 3 回の実験を行い、 5 0 % 阻害の濃度 (I C ₅₀) 値を測定した。

20

【 0 0 2 5 】

【表 1】

表 1. 72 時間培養後の種々のがん細胞株および正常細胞におけるラクトバシラス菌種の 6 つの菌株由来の代謝産物の 50% 阻害濃度 (IC_{50} 値)

ラクトバシラス種由来の代謝産物の IC_{50} 値							
細胞の種類	UL4	TL1	RS5	RG14	RG11	RI11	
がん細胞株							
MCF-7 cells		10	13	21	20	16	16
HeLa		20	18	24	20	N.D.	18
Hep G2		22	22	27	22	N.D.	N.D.
HT-29		N.D.	N.D.	28	22	N.D.	N.D.
K-562		10	5	5	5	5	5
HL-60		5	5	9	10	1	1
正常細胞							
MCF-10A		26	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ヒト PBMC		N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
マウス 脾臓		N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
マウス 胸腺		N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

注: IC_{50} 値は、処理細胞の細胞生存度の 50% 阻害をもたらす代謝産物の% (v/v)、N.D. は、50% (v/v) の濃度まで IC_{50} 値が検出されない。

【0026】

i i i) 96 ウェルプレートに 5×10^3 セル/ウェルの密度で細胞を播種する。培地を 24 時間後に吸引し、それぞれ 24 時間、48 時間および 72 時間の試験を行う、被験抽出物を含む新しい培地で置換した。さらなる手順は、メーカーからの手順に従った。放射性 [3H] チミジン取り込みアッセイに代わる方法として BrdU ELISA システムを用いるため、 $10 \mu M$ 濃度の最終濃度にした後、BrdU によって 2 ~ 24 時間、再培養した。培地をそれぞれのウェルから吸引した。固定/変性溶液を、細胞が固定、透過および DNA が変性される、組み込まれた BrdU への抗体が結合を抗体が結合することができるように添加した。抗-BrdU 抗体をすべてのウェルに添加し、1 時間、組み込まれた BrdU に結合するために 1 時間培養した。その後、結合していない抗体を洗い流し、検出器に結合しない、西洋ワサビペルオキシダーゼ接合ヤギ抗マウス抗体を添加した。停止液をそれぞれのウェルに添加し、分光光度計 (Biotek EL340, USA) を用いて $450 nm$ (参照波長 $540 nm$) で

【0027】

i v) アポトーシスを起こした細胞の特質の一つは、ホスファチジルセリン (PS) の外面化である。原理的には、PI は傷害が起きた細胞膜を有する細胞の細胞 DNA を PI が染色する一方で、アネキシン V が細胞表面ホスファチジルセリンを検出する。これによって、初期にアポトーシスを起こした細胞 (アネキシン V^+/PI^-) および後期にアポトーシスを起こした細胞および壊死性細胞 (アネキシン V^+/PI^+) から生存能力のある細胞 (アネキシン V^-/PI^-) の識別が可能となる。本研究では、細胞死の状態は、BD バイオサイエンス アネキシン V - FITC アポトーシス検出キット (BD Biosciences Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit.) を用いて試験した。MCF-7 細胞を 6 - ウェル組織培養プレートへ 2

、 5×10^5 セル/ウェルの密度で播種し、一晚付着させ、24、48 および 72 時間処理した。処理の終わりに、分離し、トリプシン処理した細胞を沈殿させ、結合バッファ中で再懸濁した。その後、細胞をアネキシン V - F I T C および P I で暗い中で 15 分、染色し、最終容量が $500 \mu\text{l}$ の結合バッファで希釈し、フローサイトメトリー分析を行った。1 試料につき、計 10,000 の事象が得られた (Vermes et al., 1995)。データの取得および分析は、FACS-Calibur フローサイトメーター (BD Biosciences, USA) で行った。結果は、少なくとも 3 つの別々の実験の平均 \pm 標準誤差で表される。

【0028】

v) MCF-7細胞を 6 ウェルプレートで U L 4 代謝産物で処理し、5% C O₂ 雰囲気下で 37、24、48 および 72 時間培養した。24、48 時間のそれぞれの培養後、培地中に分離した細胞を回収し、トリプシン処理した付着細胞へ戻した。細胞を P B S で洗浄し、その後、細胞 1 m L 中に 1 : 1 の比の A O ($100 \mu\text{g/mL}$) および P I ($100 \mu\text{g/mL}$)、 $10 \mu\text{l}$ で培養し、 $200 \times g$ で 5 分再び遠心分離した。上澄みを吸引し、残留上澄み $50 \mu\text{l}$ とした。ペレットを再懸濁し、細胞懸濁液 $10 \mu\text{l}$ をスライドガラスに滴下し、カバーガラスで覆った。30 分以内にスライドを蛍光顕微鏡 (Nikon FC-35DX, Japan) で励起フィルターおよび 450 - 490 のバリアフィルターおよび 520 nm のロングパスフィルターの組み合わせで観察した。生存能力のある細胞 (緑の無傷細胞)、アポトーシス性細胞 (凝縮または断片化した核を有する緑の収縮細胞)、および後期アポトーシス性細胞および壊死性細胞 (赤い細胞) の割合が、統計的に有意なデータで > 200 細胞から測定された。

【0029】

v i) U L 4 代謝産物で処理した細胞は、24、48 および 72 時間の培養後、採取した。分離しトリプシン処理した細胞を沈殿させ、氷冷 80% エタノール液滴で一滴ずつ固着し、分析まで (最小で 2 時間) 4 で培養した。その後、細胞を再沈殿し、PBS-BSA-Az-EDT A 緩衝液で 2 回洗浄した。細胞を D N A 断片を溶出するためにパルスボルテックス (pulse-vortexed) した。D N A 分析のために細胞を 0.1% (v/v) Triton X-100、10 m M E D T A、 $50 \mu\text{g/mL}$ R N a s e A および $2 \mu\text{g/mL}$ P I からなる P B S 緩衝液で染色した。P I が、光感受性のためこの工程は、暗所で行った。その後、細胞を 4 で 30 分培養し、動物組織カルチャーラボラトリー、分子生物学科、バイオテクノロジーおよび生体分子学部、ユニバーシティプトラマレーシア (Animal Tissue Culture Laboratory, Department of Molecular Biology, Faculty of Biotechnology and Biomolecular Sciences, University Putra Malaysia) の FACS-Calibur フローサイトメーター (BD Biosciences, USA) で 24 時間以内に読み込んだ。試料ごとに 1 万の事象が取得された。算出前にダブルット (Doublets) および細胞破片は、D N A ドットプロットビューでゲートオフ (gated off) した。細胞サイクル分布を CELLQuest Pro ソフトウェア (BD Biosciences, USA) を用いて算出した。実験は、各々の実験で 3 つの試料で少なくとも 3 回繰り返した。

【0030】

【表 2】

表 2 UL4 代謝産物の MCF-7 の細胞周期時期分布上の効果

	処理していないコントロール (%)	UL4 代謝産物 (%)	
24 時間			
Sub- G ₀ /G ₁	0.5 ± 0.3	1.7 ± 1.6	10
G ₀ /G ₁	59.1 ± 3.1	64.5 ± 6.7	
S	21.4 ± 4.2	16.4 ± 3.6	
M	19.3 ± 1.6	17.6 ± 3.3	
48 時間			
Sub- G ₀ /G ₁	0.5 ± 0.2	14.3* ± 5.6	20
G ₀ /G ₁	80.1 ± 6.2	62.7 ± 2.1	
S	9.4 ± 3.7	13.7 ± 2.7	
M	10.1 ± 2.6	9.7 ± 1.1	
72 時間			
Sub- G ₀ /G ₁	0.5 ± 0.1	9.5* ± 4.7	30
G ₀ /G ₁	89.9 ± 1.4	70.2 ± 3.4	
S	3.3 ± 0.4	9.9 ± 1.1	
M	6.2 ± 1.5	10.1 ± 1.2	

注：バーの前のデータは細胞の割合の平均を示す。エラーバーは、標準誤差を示す。アステリスクを有する同じ列の同じ実験の値は、有意差がある (P>0.05)。

【0031】

(vi) DNA ラベリングは、BD バイオサイエンス APO-DIRECT キットを用いて行った。細胞を 6 - ウェル組織培養プレートへ 2×10^5 セル/ウェルで播種した。24 時間後、培地を所望の濃度で、試験する被験抽出物を含む新しい培地で置き換えた。さらなる手順は、メーカーの指示に従って行った。培養後分離し、トリプシン処理した細胞を沈殿させ、 $1 - 2 \times 10^6$ セル/mL の濃度で、1% (w/v) パラホルムアルデヒドの PBS (pH 7.4) で再懸濁した。細胞懸濁液を 30 - 60 分氷上に置いた。その後、固着した細胞を 5 分間 $300 \times g$ で遠心分離で回収し、上澄みを取り除いた。細胞ペレットを 5 mL の PBS で 2 回洗浄し、緩やかに渦を巻く管内で残留 PBS で再懸濁した。続いて細胞をエタノールで 70% (v/v) の氷冷エタノールで再懸濁し、氷上に最低 30 分放置し、-20℃で保存した。適切な保存期間 (1 - 7 日) 後、細胞懸濁液を $300 \times g$ で 5 分遠心分離し、70% v/v エタノールを吸引した。細胞を 1 mL の洗浄緩衝液で 2 回洗浄し、細胞ペレットを 50 μ l の DNA ラベリング溶液で再懸濁した。

【0032】

60 分の培養後、細胞を 1 mL のリンス緩衝液で洗い流し、 $300 \times g$ で、5 分遠心分

10

20

30

40

50

離することで沈殿させた。細胞ペレットは、0.5 mLのPI/RNase染色緩衝液で染色した。細胞を室温で30分、暗い中で培養し、3時間以内に、CELLQuest Proソフトウェアを用いたFACS-Caliburフローサイトメトリによって分析した。試料ごとに1万の事象が取得され、ダブレットおよび細胞破片は、DNAドットプロットビューで算出前にゲートオフした。

結果は、平均±標準誤差で表され、一般線形モデル (General Linear Model) によって分析した。統計的分析をMinitab統計のソフトウェア (Minitab Statistical Software) を用いて $P < 0.05$ の相違で行った。

【図1】

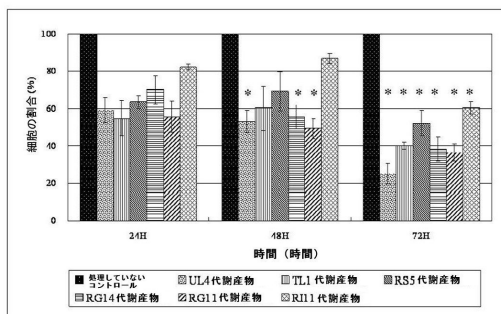


図1：乳酸菌の6菌株に由来する代謝産物のMCF-7細胞に対する抗増殖効果

【図3】

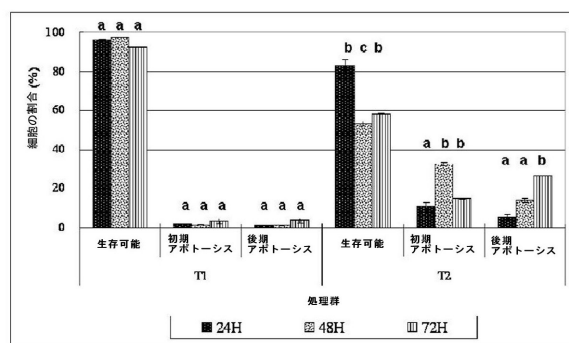


図3：MCF-7細胞における乳酸菌代謝産物のアポトーシスの誘導

【図2】

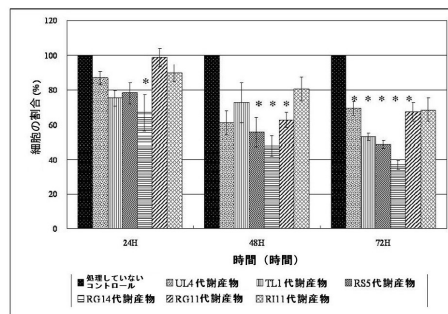


図2：乳酸菌の6菌株に由来する代謝産物のHT-29細胞に対する抗増殖効果

【 図 4 】

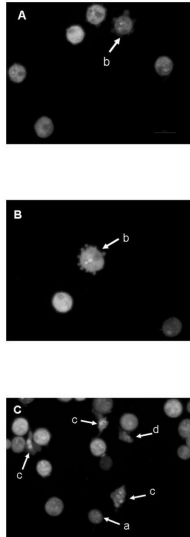


図 4：UL4代謝産物で処理したMCF-7細胞の蛍光顕微鏡写真

パネルA：24時間、パネルB：48時間、Cは、72時間である。乳酸菌代謝産物に曝したときの以下の形態学的変化は、アポトーシスの典型であり↑aは、細胞の収縮、↑bは、膜ブレブ形成、↑cは、アポトーシス小体形成、↑dは、壊死性細胞である（倍率：4000×）

【 図 5 】

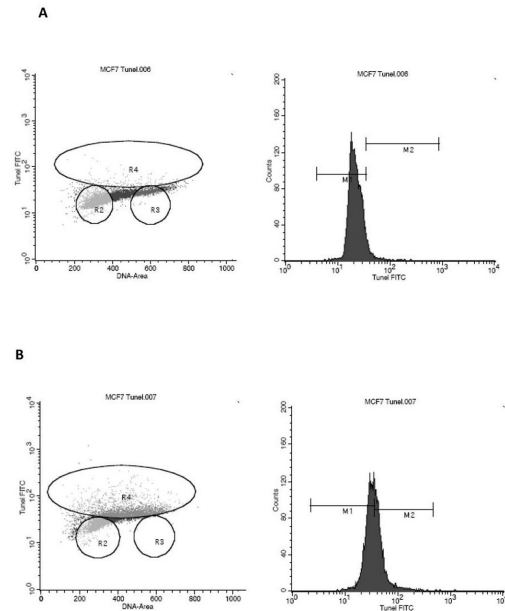


図5：TUNELアッセイによるアポトーシス性細胞におけるDNA鎖切断の検出を表す2つのパラメーターの散布図（左図）および一つのパラメーターのヒストグラム（右図）のグラフA：72時間の処理なしコントロール；B：72時間UL4代謝産物処理。アポトーシスを起こした細胞（R4）は、散布図におけるDNA鎖切断の非常に高い頻度（Y座標の指数関目盛に注意）およびヒストグラムのM2ゲートに特徴付けられる。

【 図 6 - 1 】

図 6：ラクトバシラス・プランタラムの配列表

ラクトバシラス・プランタラム株 RG14

```

acgaactctg gtattgattg gtgctgcat catgatttac atttgagtga gttggcgaact    60
ggtgagtaac acgtgggaaa cctgccaga agcgggggat aacacctgga aacagatgct    120
aataccgcat aacaacttgg accgatggt ccgagcttga aagatggctt cggctatcac    180
ttttgatgg tcccgcgcg tattagctag atgtgggggt aacggctcac catggcaatg    240
atacgtagcc gaactgagag ggtaatcggc cacattggga ctgagacacg gccaaaactc    300
ctacgggagg cagcagtagg gaatcttcca caatggacga aagtctgatg gagcaacgcc    360
gcgtgagtga agaagggttt cggctcgtaa aactctgttg ttaaagaaga acatatctga    420
gagtaactgt tcaggtattg acggtattta accagaaagc caccgctaac tacgtgccag    480
cagccgcggt aatacgtagg tggcaagcgt tgtccggatt tattggcggt aaagcgagcg    540
caggcggttt ttaagtctg at                                         562

```

【 図 6 - 2 】

ラクトバシラス・プランタラム株 RI-11

```

acgaactctg tattgattgg tgctgcatc atgatttaca ttgagtga tggcgaactg    60
gtgagtaaca cgtgggaaac ctgccagaa gcgggggata acacctggaa acagatgcta    120
ataccgcata acaacttga cgcgatggtc cgagcttga agatggcttc ggctatcact    180
tttgatggt cccggcggt attagctaga tggggggta acggctcacc atggcaatga    240
tacgtagccg acctgagagg gtaatcgcc acattgggac tgagacacgg cccaaactcc    300
tacgggagcg agcagtagg aatctccac aatggacga agtctgatgg agcaacgccg    360
cgtgagtga gaagggttc ggctcgtaaa actctgtgt taaagaaga catatctgag    420
agtaactgtt caggtattga cgtatttaa ccagaaagcc acggctaact acgtgccagc    480
agcccggtta atacgtaggt ggcaagcgtt gtcggattt attggcgcta aagcgagcgc    540
aggcggtttt ttaagtctga t                                         561

```

【図 6 - 3】

ラクトバシラス・プランタラム株 RS5

acgaactctg gtattgattg gtgcttgcac catgatttac atttgagtga gtggcgaact 60
 ggtgagtaac acgtgggaaa cctgccaga agcgggggat aacacctgga aacagatgct 120
 aataccgcat aacaacttgg accgcatggt cggagcttga aagatggctt cggctatcac 180
 ttttgatgg tccgcggcg tattagctag atgggggggt aacggctcac catggcaatg 240
 atacgtagcc gaactgagag ggtaatcggc cacattggga ctgagacacg gcccaaaactc 300
 ctacgggagg cagcagtagg gaattctcca caatggacga aagtctgatg gagcaacgcc 360
 gcgtgagtga agaaggggtt cggctcgtaa aactctgttg ttaaagaaga acatatctga 420
 gagtaactgt tcaggatttg acggtattta accagaaagc caggcctaac tacgtgccag 480
 cagcccggtt aatacgtagg tggcaagcgt tgtccggatt tattggcggt aaagcgagcg 540
 caggcggtt tttaagtctg at 562

【図 6 - 4】

ラクトバシラス・プランタラム株 RG11

acgaactctg gtattgattg gtgcttgcac catgatttac atttgagtga gtggcgaact 60
 ggtgagtaac acgtgggaaa cctgccaga agcgggggat aacacctgga aacagatgct 120
 aataccgcat aacaacttgg accgcatggt cggagcttga aagatggctt cggctatcac 180
 ttttgatgg tccgcggcg tattagctag atgggggggt aacggctcac catggcaatg 240
 atacgtagcc gaactgagag ggtaatcggc cacattggga ctgagacacg gcccaaaactc 300
 ctacgggagg cagcagtagg gaattctcca caatggacga aagtctgatg gagcaacgcc 360
 gcgtgagtga agaaggggtt cggctcgtaa aactctgttg ttaaagaaga acatatctga 420
 gagtaactgt tcaggatttg acggtattta accagaaagc caggcctaac tacgtgccag 480
 cagcccggtt aatacgtagg tggcaagcgt tgtccggatt tattggcggt aaagcgagcg 540
 caggcggtt tttaagtctg at 562

【図 6 - 5】

ラクトバシラス・プランタラム株 UL4

acgaactctg gtattgattg gtgcttgcac catgatttac atttgagtga gtggcgaact 60
 ggtgagtaac acgtgggaaa cctgccaga agcgggggat aacacctgga aacagatgct 120
 aataccgcat aacaacttgg accgcatggt cggagcttga aagatggctt cggctatcac 180
 ttttgatgg tccgcggcg tattagctag atgggggggt aacggctcac catggcaatg 240
 atacgtagcc gaactgagag ggtaatcggc cacattggga ctgagacacg gcccaaaactc 300
 ctacgggagg cagcagtagg gaattctcca caatggacga aagtctgatg gagcaacgcc 360
 gcgtgagtga agaaggggtt cggctcgtaa aactctgttg ttaaagaaga acatatctga 420
 gagtaactgt tcaggatttg acggtattta accagaaagc caggcctaac tacgtgccag 480
 cagcccggtt aatacgtagg tggcaagcgt tgtccggatt tattggcggt aaagcgagcg 540
 caggcggtt tttaagtctg at 563

【図 6 - 6】

ラクトバシラス・プランタラム株 TL1

acgaactctg gtattgattg gtgcttgcac catgatttac atttgagtga gtggcgaact 60
 ggtgagtaac acgtgggaaa cctgccaga agcgggggat aacacctgga aacagatgct 120
 aataccgcat aacaacttgg accgcatggt cggagcttga aagatggctt cggctatcac 180
 ttttgatgg tccgcggcg tattagctag atgggggggt aacggctcac catggcaatg 240
 atacgtagcc gaactgagag ggtaatcggc cacattggga ctgagacacg gcccaaaactc 300
 ctacgggagg cagcagtagg gaattctcca caatggacga aagtctgatg gagcaacgcc 360
 gcgtgagtga agaaggggtt cggctcgtaa aactctgttg ttaaagaaga acatatctga 420
 gagtaactgt tcaggatttg acggtattta accagaaagc caggcctaac tacgtgccag 480
 cagcccggtt aatacgtagg tggcaagcgt tgtccggatt tattggcggt aaagcgagcg 540
 caggcggtt tttaagtctg at 562

【配列表】

0005913353000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 ロー, テック チュエン
マレーシア スランゴル 43400、セルダン、ユニバーシティー プトラ マレーシア、ファ
культиー オブ アグリカルチャー、デパートメント オブ アニマルサイエんしーず
- (72)発明者 チュア, リー オン
マレーシア スランゴル 43400、セルダン、ユニバーシティー プトラ マレーシア、ファ
культиー オブ バイオテクノロジー アンド バイオモレキュラーサイエんしーず、デパー
トメント オブ バイオプロセス テクノロジー
- (72)発明者 アリシン, ナルジャハン バヌ
マレーシア スランゴル 43400、セルダン、ユニバーシティー プトラ マレーシア、ファ
культиー オブ バイオテクノロジー アンド バイオモレキュラーサイエんしーず
- (72)発明者 アブドゥル. ラヒム, ラハ
マレーシア スランゴル 43400、セルダン、ユニバーシティー プトラ マレーシア、ファ
культиー オブ バイオテクノロジー アンド バイオモレキュラーサイエんしーず、デパー
トメント オブ セル アンド モレキュラー バイオロジー

審査官 上條 のぶよ

- (56)参考文献 国際公開第2010/117255 (WO, A1)
国際公開第2009/093447 (WO, A1)
国際公開第2010/064373 (WO, A1)
International Journal of Probiotics & Prebiotics, 2010年 2月, Vol.5, No.1, p. 37-43
Trop Anim Health Prod, 2011年, Vol.43, p.69-75
Food Technology and Biotechnology, 2010年10月 1日, Vol.48, No.4, p.476-483
Pakistan Journal of Nutrition, 2003年, Vol.2, No.5, p.283-288
Food Sic Biotechnol, 2003年, Vol.12, No.4, p.403-408
生物工学, 2004年, Vol.82, p.430-431
Cancer Immunol Immunother, 2000年 5月22日, Vol.49, No.3, p.157-164
Journal of Microbiology and Biotechnology, 2002年, Vol.12, No.6, p.998-1001

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 35/00 - 76
A23L 31/00
A61K 31/19
A61K 31/51
A61K 38/00
A61P 35/00
C12N 1/20
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)