

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3765983号
(P3765983)

(45) 発行日 平成18年4月12日(2006.4.12)

(24) 登録日 平成18年2月3日(2006.2.3)

(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N 1/20	A
A 2 3 C 9/123 (2006.01)	A 2 3 C 9/123	
A 2 3 C 9/13 (2006.01)	A 2 3 C 9/13	
A 2 3 C 19/00 (2006.01)	A 2 3 C 19/00	
A 2 3 G 9/32 (2006.01)	A 2 3 G 9/02	

請求項の数 8 (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-603691 (P2000-603691)	(73) 特許権者	590002013
(86) (22) 出願日	平成12年3月2日(2000.3.2)		ソシエテ デ プロデユイ ネットスル ソ
(65) 公表番号	特表2002-537867 (P2002-537867A)		シエテ アノニム
(43) 公表日	平成14年11月12日(2002.11.12)		スイス国シーエイチー1800 プベイ,
(86) 国際出願番号	PCT/EP2000/001798		ピー. オー. ボックス 353
(87) 国際公開番号	W02000/053202	(74) 代理人	100066692
(87) 国際公開日	平成12年9月14日(2000.9.14)		弁理士 浅村 皓
審査請求日	平成16年4月16日(2004.4.16)	(74) 代理人	100072040
(31) 優先権主張番号	99104922.2		弁理士 浅村 肇
(32) 優先日	平成11年3月11日(1999.3.11)	(74) 代理人	100107504
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 安藤 克則
(31) 優先権主張番号	99104924.8	(74) 代理人	100102897
(32) 優先日	平成11年3月11日(1999.3.11)		弁理士 池田 幸弘
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		
微生物の受託番号	CNCM I-2116		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 病原菌およびロタウイルスが原因となる下痢を予防できるラクトバチルス菌株

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ラクトバチルス・パラカゼイ CNCM I - 2 1 1 6 (N C C 2 4 6 1)。

【請求項2】

ラクトバチルス・パラカゼイ CNCM I - 2 1 1 6 (N C C 2 4 6 1) を含む、摂取できる支持物質。

【請求項3】

ラクトバチルス・パラカゼイ CNCM I - 2 1 1 6 (N C C 2 4 6 1) は約 10^5 c f u / g ~ 約 10^{12} c f u / g 支持物質の量で支持物質に含まれる、請求項2に記載の摂取できる支持物質。

【請求項4】

ラクトバチルス・パラカゼイ CNCM I - 2 1 1 6 (N C C 2 4 6 1) の培養物の上澄を含む、摂取できる支持物質。

【請求項5】

前記支持物質は、乳、ヨーグルト、カード、チーズ、発酵乳、乳をベースとする発酵製品、アイスクリーム、発酵穀類をベースとする製品、乳をベースとする粉末、乳児用調製粉乳から選択した食品組成物である、請求項2又は4に記載の摂取できる支持物質。

【請求項6】

支持物質は下痢と関連する疾病の治療および/または予防に使用する、請求項2から5のいずれか1項に記載の摂取できる支持物質。

【請求項 7】

ラクトバチルス・パラカゼイ C N C M I - 2 1 1 6 (N C C 2 4 6 1) 又はその培養物の上澄を含有する、食品組成物又は医薬組成物。

【請求項 8】

乳、ヨーグルト、カード、チーズ、発酵乳、乳をベースとする発酵製品、アイスクリーム、発酵穀物をベースとする製品、乳をベースとする粉末、乳児用調製粉乳、錠剤、細菌液体サスペンション、経口用乾燥サプリメント、経口用含水サプリメント、乾燥経管栄養又は含水経管栄養から選択する、請求項 7 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明はラクトバチルス属の新規微生物に関し、これらの微生物は病原菌およびロタウイルスにより引き起こされる下痢の予防に有用である。特に本発明は摂取できる支持物質の製造のためにこの微生物の使用およびこの微生物を含む組成物に関する。

10

【0002】

主要代謝成分として乳酸を産生する微生物は古くから知られている。これらの細菌はそれぞれ乳または乳加工工場に、生きている植物や腐朽植物に、またヒトおよび動物の腸に見出すことができる。「乳酸菌」と要約されるこれらの微生物はむしろ不均質性群を表わし、例えばラクトコッカス、ラクトバチルス、ストレプトコッカス、ビフィドバクテリウム、ペディオコッカス属などを含む。

【0003】

乳酸菌は低 pH の利益を受ける食品の保存に、および腐敗菌の生育を阻害するその発酵活性中産生する発酵産物の作用に対し発酵剤として利用されてきた。このため、乳酸菌はチーズ、ヨーグルトおよび乳からの他の発酵乳製品のような各種の異なる食品の製造に使用されている。

20

【0004】

ごく最近乳酸菌は、ある種の菌株が摂取によりヒトおよび動物に有用な性質を示すことが分かったことで多大の注意を引いた。特にラクトバチルスまたはビフィドバクテリウム属の特定菌株は腸粘膜にコロニーを作り、かつヒトおよび動物の生活状態の維持に役立つことが分かった。

【0005】

この点で、ヨーロッパ特許 0 7 6 8 3 7 5 号明細書は腸フローラに移植できかつ腸細胞に付着できるビフィドバクテリウム属の特定菌株を開示する。これらのビフィズス菌は免疫調節を助け、かつ病原菌が腸細胞に付着することを競合的に排除することができ、したがって個人の健康の維持に役立つことが報告されている。

30

【0006】

最近の数年間、プロバイオチック剤として乳酸菌の潜在的使用に対し研究が集中した。プロバイオチックは、腸内の天然マイクロフローラを保持することにより個人の健康を増進する生育可能な微生物製剤であると考えられる。微生物製剤はその有効な微生物およびその作用様式が既知である場合、プロバイオチックとして通常許容できる。プロバイオチックは腸粘膜に付着し、腸管にコロニーを形成し、同様にその上に有害な微生物の付着を防止すると考えられる。これらの作用に対する決定的必要条件は、乳酸菌が適当かつ生育しうる形で腸粘膜に到達しなければならず、かつ胃腸管の上部で、特に胃で普通の低 pH の影響により破壊されないことにある。

40

【0007】

この点で、WO 9 7 / 0 0 0 7 8 号明細書はこのようなプロバイオチックとしてラクトバチルス GG (A T C C 5 3 1 0 3) と呼ばれる特定の菌株を開示する。本微生物は食品に由来する過敏症反応を予防または治療する方法において特に使用され、この方法ではペプシンおよび/またはトリプシンにより加水分解処理された食品物質を受容者に投与するものである。選択されたラクトバチルス菌株は付着性およびコロニー形成性を示し、かつプロテアーゼ酵素系を示すとして記載され、投与される食品に含有されるタン白物質は特定

50

のラクトバチルス菌株が分泌するプロテアーゼによりさらに加水分解される。この文献に記載の方法は、結局腸によりもはやアレルギー物質の実質量を示さないタン白物質を吸収することになる。

【0008】

さらに、ヨーロッパ特許0577903号明細書にはヘリオバクター・ピロリの作用と関連する潰瘍の治療または予防処置用に意図された支持物質の製造に、潰瘍の発現に認知された原因であるヘリオバクター・ピロリに取って代る能力を有するような乳酸菌の使用について言及されている。

【0009】

介在するWO99/29833号明細書には、確定した大きさの3つのプラスミドをもつ特別の菌株、LMGP17806が記載される。この菌株はサルモネラ・ティフィムリウムによる侵入から腸細胞を防止できることを記載する。

10

【0010】

乳酸菌の特定菌株が有し得る有用な性質を認識して、ヒトおよび/または動物の生活状態に有利である付加的乳酸菌菌株に対する願望が業界にある。

従って、本発明の課題はヒトおよび/または動物に有利な新しい性質を示す付加的細菌菌株を供することである。

【0011】

上記問題は新規微生物、すなわち下痢を起こす病原菌による腸のコロニー形成を予防しかつ口タウイルスによる腸上皮細胞の感染を予防しうる特性を有するラクトバチルス属に属する乳酸菌を供することにより解決された。好ましい態様によれば、このラクトバチルス菌株は宿主生物の腸粘膜に付着することができ、そしてそこに本質的にコロニーを形成することができるものである。

20

【0012】

別の好ましい態様によれば、このラクトバチルス菌株は0.4%までの胆汁酸塩の存在下で生育することができるので、容易に胃腸管を通過でき、本質的に活性のまままでとどまることができる。

【0013】

他の好ましい態様によれば、本乳酸菌はラクトバチルス・ラム、サスマまたはラクチトバチルス・パラカゼイ、好ましくはラクトバチルス・パラカゼイから選択され、一層好ましくはラクトバチルス・パラカゼイCNCM I-2116である。

30

【0014】

本発明の微生物は次の性質を有することが分った。即ち、グラム陽性、カタラーゼ陰性、NH₃形成アルギニン陰性およびCO₂産生陰性である。これらはL(+)乳酸を産生し、約0.4%までの濃度の胆汁酸塩の存在下で生育でき、かつ口タウイルスによる上皮細胞の感染を本質的に予防できる。

【0015】

新規微生物は各種摂取可能な支持物質、例えば乳、ヨーグルト、カード、発酵乳、乳をベースとする発酵製品、発酵穀類をベースとする製品、乳をベースとする粉末、乳児用調製粉乳の製造に使用でき、約10⁵cfu/g~約10¹¹cfu/gの量で支持物質に含ませることができる。本発明において、各語cfuは「コロニー形成単位」を示し、寒天プレート上の微生物数により示される細菌細胞数として規定される。

40

本発明はまた上記特性を有する少なくとも1つのラクトバチルス菌株を含有する食品または医薬組成物を供する。

【0016】

本発明の食品組成物の製造に対し、本発明による少なくとも1つのラクトバチルス菌株は適当な支持物質に約10⁵cfu/g~約10¹¹cfu/g、好ましくは約10⁶cfu/g~約10¹⁰cfu/g、一層好ましくは約10⁷cfu/g~約10⁹cfu/gの量で添加される。

【0017】

50

医薬製剤の場合、製品は錠剤、細菌液体サスペンション、乾燥経口サプリメント、含水経口サプリメント、乾燥経管栄養または含水経管栄養などの形で製造することができ、そこに添加されるラクトバチルス菌株量は 10^{12} cfu/gまでの範囲、好ましくは約 10^7 cfu/g～約 10^{11} cfu/g、一層好ましくは約 10^7 cfu/g～約 10^{10} cfu/gである。

【0018】

固体の腸における新規微生物の活性は当然用量依存である。すなわち、上記食品物質または医薬組成物を摂取することにより新規微生物の量が多い程、微生物の保護活性および/または治療活性は高い。新規微生物は人類および動物には有害でなくかつ最終的に乳児の排泄物から単離されるので、本質的に個体の腸の高割合が新規微生物によりコロニー形成

10

【0019】

図中、

図1は細菌菌株によるロタウイルス保護性を評価するために選別する細胞培養の概略図を示す。

図2は異なる生育培地のL・カゼイ菌株CNCM I-2116 (ST11と呼ぶ)の酸性化を示す。

図3は10で30日間測定したL・カゼイ菌株ST11の生存割合を示す。

図4はST11の連続希釈により細胞を培養した後骨髓由来のマウス付着細胞の1L-12およびIL-10のmRNAパターンを示す。

20

図5はIL-4産生が減少したことによるTh2分化の結果を示す。

図6は培養ST11細胞を、病原性大腸菌が上皮細胞に付着するのを防止する試験で使用された細胞培養実験結果の概略を示す。

図7はST11培養物の上澄液を、病原性大腸菌が上皮細胞に付着するのを阻止する試験で使用する細胞培養実験結果の概略を示す。

図8は培養ST11細胞を、サルモネラ・チフィリウムが上皮細胞中に侵入するのを阻止する試験で使用する、細胞培養実験結果の概略を示す。

図9はST11培養物の上澄液を、サルモネラ・チフィリウムが上皮細胞中に侵入するのを阻止する試験で使用する、細胞培養実験結果の概略を示す。

【0020】

30

本発明に導く広汎な研究中、発明者らは乳児排泄物を調査し、そこから多種の異なる細菌菌株を単離した。これらの菌株は続いてロタウイルスおよび下痢を引き起こすことが既知の病原菌による上皮細胞の感染を防止するその能力を試験した。

【0021】

ラクトバチルス、ラクトコッカス、ストレプトコッカスを含む数種の菌属の阻害活性を選別した。試験は本質的にヒトのウイルス性下痢の主要な病原体を表わす3つのロタウイルスセロタイプ(セロタイプG1、G3およびG4)および感染個体に下痢を起こす代表的病原性微生物として病原性大腸菌およびサルモネラ・チフィリウムにより行なった。

【0022】

各種乳酸菌はMRS、Hugo-JagoまたはM17培地のような適当な培地でこれらの最適生育温度に相当する約30°～40°の温度で生育させた。定常生育に到達後、細菌は遠心分離して集め、生理的食塩水に再懸濁した。異なる試験別に細菌細胞は冷凍貯蔵した(-20°)。

40

【0023】

ロタウイルス試験

各種ロタウイルスのストックを集密的細胞単層の感染により調製した。ロタウイルスは感染前に培養した。細胞は20の組織培養感染用量により感染させた。抗-ロタウイルス特性を評価するために、2つの異なるプロトコルを適用した。1つのプロトコルによれば各種細菌菌株はロタウイルスとの直接の相互作用を試験し、一方第2プロトコルでは細菌は細胞性ロタウイルス受容体と相互作用する菌株を選別した。第1プロトコルは各細菌サスベ

50

ンジョンを異るロタウイルス菌株と接触させ、ついで適当な培地で培養することを含んだ。その後、ウイルス - 細菌混合物はヒト未分化結腸腺腫細胞HT-29の細胞単層に適用し、そして培養を続けた。次にウイルス複製を試験した。第2プロトコルは先ず各細菌サスペンションをヒト未分化結腸腺腫細胞HT-29の細胞単層と一緒に培養し、次にウイルスを添加するものである。連続培養後ウイルス複製を試験した。ロタウイルスの複製は感染細胞のロタウイルスタンパクの組織 - 免疫学染色により容易に評価できる。ロタウイルスを単独接種した細胞と比較して、ロタウイルス + 指示細菌を接種した細胞カルチャーで感染細胞数が90%まで減少した場合、ロタウイルスの阻害効果は供試細菌によるものとされた。

【0024】

最初に単離した合計260種の細菌菌株のうち単に9種が本質的にロタウイルス複製を阻害することが分った。異なる細菌はラクトバチルス属亜種ラムノサスまたはパラカゼイに属することが確かめられた。ブタペスト条約により寄託され、寄託番号NCC2461 (I-2116)を受けたラクトバチルス・カゼイST11と命名された1菌株は、ロタウイルスによるヒト細胞の感染防止に非常に有効であることが分った。さらに、この特別の菌株は各種培地で酸性化を示すことから、すぐれた生育性を示す。本菌株はまた約10の低温で貯蔵中生存割合に関しすぐれた性能を示し、これにより冷蔵条件で貯蔵される食品または医薬組成物に含まれるすぐれた候補対象になる。

【0025】

抗 - 病原菌試験

抗 - 細菌性を評価するために、次のアプローチを選択した。1プロトコルによれば、本発明の培養ラクトバチルス菌株は腸細胞に下痢を起こす病原菌の付着または腸細胞中へのその侵入を防止するその能力について試験した。このため、腸細胞を病原菌および本発明の培養ラクトバチルス菌株と接触させ、付着または侵入の各割合を評価した。第2プロトコルによれば、本発明のラクトバチルス菌株の細胞培養物の上澄を病原性微生物と一緒に腸細胞に添加し、付着または侵入のそれぞれの割合を評価した。実験中、培養したラクトバチルスおよび上澄は腸細胞に付着および細胞中への侵入の双方の防止に非常に有効であることの証拠を示すことができ、これは新規微生物が分泌する代謝化合物が病原菌に関し抗 - 下痢活性に寄与しているらしいことを示している。

【0026】

上記発見の他に、本菌株は意外なことに異なる免疫メディエーターの合成にインパクトを有することで抗 - アレルギー性も示すことも分った。

【0027】

体液性免疫応答およびアレルギー反応はタイプ2フェノタイプ (Th2) を有するCD4⁺T細胞により媒介されることが一般に認められる。Th2 - 細胞は高レベルのインターロイキン4 (IL-4)、IgE (アレルギー反応に含まれる主要な抗体クラスである) の分泌に必要なサイトカインを産生することで特徴づけられる。

【0028】

Th2細胞の分化はIFN- γ 、CD4⁺T細胞の相互に排他的のTH1サブセットから生ずる特別のサイトカインにより損なわれる。このTH1細胞は順次インターロイキン12 (IL-12) により強く誘発される。これと対照的にIL-10、別のサイトカインはTH1細胞の増殖に強い抑制インパクトを有することが分ったから、免疫 - 抑制機作に役割を演ずると思われる。

【0029】

要約すれば、IL-12およびIL-10の双方はTh1サブセットの発生に影響を与えることにより、CD4⁺T細胞の発生に強い調節効果を有する。IL-12はTh1分化の誘発に対し鍵となる調整サイトカインであるから、Th2応答の発生を抑止する。従って、Th2細胞を抑止する主な道は補助細胞によるIL-12合成の刺激に見られる。

【0030】

LPSのようなグラム陰性菌のいくつかの成分はマクロファージおよび樹枝状細胞のよう

10

20

30

40

50

な付着細胞に高レベルのIL-12を誘発することは周知である。一貫して、グラム陰性菌はCD4⁺T細胞の分化をTh1フェノタイプの方向に強くかたよらせることができることが分った。

【0031】

本発明のラクトバチルス菌株の例として、微生物ST11はCD4⁺T細胞の分化の調節に含まれるサイトカインの誘導の潜在的な役割を試験した。特に、Th2分化中のCD4⁺T細胞のフェノタイプに及ぼすST11の効果が研究された。

【0032】

この点で骨髓由来のマウス付着細胞のこれら2つの調節サイトカインをコードするmRNAの合成を誘導するST11の能力は4つの他のラクトバチルス菌株および対照のグラム陰性菌(大腸菌K12)と比較した。mRNAは $10^9 \sim 10^7$ cfu/mlの範囲の細菌の連続希釈した細胞を6時間培養後、半定量的RT-PCRにより測定した。

【0033】

すべてのラクトバチルス菌株は或る程度までIL-12 mRNAの転写を誘導できるが、ST11は最強の誘導物質であることが分った。強いPCRシグナルとして最低細菌用量でさえ検出できるからである。実際に、IL-12 mRNA転写を誘導するST11の能力は大腸菌と同じくらい強かった。IL-10 mRNAの誘導はIL-12 mRNAより一般に弱く、より高い細菌用量でのみシグナルは検出できた。それでもやはりST11は他のラクトバチルスおよび大腸菌対照と比較してIL-10 mRNAの最強の誘導物質であった。

【0034】

すなわち、ST11はCD4⁺T細胞の分化に含まれる免疫-調節サイトカインの誘導に有効であると思われる。IL-12を誘導するその強い能力はTh2応答を阻害する候補であり、その測定可能なIL-10の誘導は炎症性応答を防止できる。

【0035】

上記知見の他に、ST11がTh2分化中のCD4⁺T細胞に対する阻害効果およびTh1機能に対するプラス効果を示すかどうかも測定された。十分に樹立した分化培養系が使用され、そこで前駆体CD4⁺T細胞はポリクローナル的に活性化させかつ培養培地に供された共通刺激(costimuli)の型により、Th1またはTh2分化を経るように調節させた。Th1/Th2分化は7日の最初の培養中誘発され、その後細胞は培地単独を有する第2培養で2日間再刺激され、そして特異的フェノタイプ(Th1またはTh2)の獲得は上澄で生産されたサイトカインの型(IFN- γ 対IL-4)を測定することにより評価した。

【0036】

BALB/cバックグラウンドのマウスからの前駆体CD4⁺T細胞は中性条件下(1ry培養で培地単独)で活性化後優勢なTh2フェノタイプ(2ryカルチャー上澄の高IL-4、低IFN- γ)に優先的に分化することが知られる。このフェノタイプは1ryカルチャーのIL-4にブロッキング性モノクローナル抗体を添加すると完全にTh1パターン(高IFN- γ 、低IL-4)に復帰できた。

【0037】

Th2阻害に対しST11の潜在的な役割を調査するために、BALB/cマウスからの精製前駆体CD4⁺T細胞は1ry培養中補助細胞として骨髓付着細胞の存在下で活性化させた。これらの細胞は培地単独で、または1mg/ml LPS、または 10^8 cfu/ml ST11、または 10^8 cfu/mlの別のラクトバチルスの存在で共同培養した。この後細胞を洗浄し、CD4⁺T細胞はもう一度精製し、そして培地単独で2ry培養で再刺激させた。分化CD4⁺T細胞により生成されたサイトカインは2日後測定した。予期されたように、培地単独の存在下で分化した細胞は優勢なTh2フェノタイプを示した。1ry培養にST11を添加すると、IL-4の生産が8倍の減少となるように、Th2分化の結果を調節した。この阻害はLPSの存在下で分化した細胞から誘導された培養で観察されたものと同様の大きさのものであった。対照的に、他のラクトバチルス菌

10

20

30

40

50

株はIL-4量に測定可能なインパクトを有しなかった。興味あることに、IFN-r量は1ry培養でST11の添加により増加しなかった。

【0038】

要約すると、ST11はTh2分化を経るCD4⁺T細胞によるIL-4産生を特異的に損なったが、IFN-r分泌を有意に増加しなかった。ST11がIFN-r生産を増加しない事実はIL-10を誘導するその能力によるが、その結果抗-Th2活性にも拘らず低炎症性インパクトを保持できる。

結果として、ST11はすぐれた抗-Th2プロファイルを有するラクトバチルス菌株であり、このプロファイルにより抗-アレルギー、プロバイオチック活性を有する細菌としてその用途のすぐれた候補たらしめていることが分った。

10

【0039】

本発明は例としてここに記載する。

培地および溶液

MRS (ディフコ)、

Hugo-Jago (トリプトン ディフコ 30g/l、酵母抽出物 ディフコ 10g/l、ラクトース ディフコ 5g/l、KH₂PO₄ 5g/l、牛肉抽出物 ディフコ 2g/l、寒天 ディフコ 2g/l)、

M17 (ディフコ)、

M199 (セロメッド)、

リングル液 (オキシド)、

20

PBS (NaCl 8g/l, KCl 0.2g/l, Na₂HPO₄ 1.15g/l, KH₂PO₄ 0.2g/l)、

トリプトース ホスフェート プロス (フロー) トリプシン-EDTA 溶液 (セロメッド)。

ヒトロタウイルス Wa (G1 セロタイプ) およびシミアン ロタウイルス SA-11 (G3 セロタイプ) は、P.A. オフィット、フィラデルフィア小児病院、米国から得た。DS-IXRRV リアソルタント ウイルスはA. カピキアン、NIH ベセスダ、米国から得た。セロタイプ4ヒト ロタウイルス ホチはP. バックマン、ミュンヘン大学、ドイツから得た。大腸菌 DAEC C1845 はワシントン大学、シアトルから得、かつ大腸菌 JPN 15 はメリーランド大 (米国) のワクチン開発センターから得た。

30

【0040】

例1

乳児排泄物から乳酸菌の単離

新しい排泄物を生後15~27日の健康な乳児16人のおしめから集めた。1gの新しい排泄物は実験室に輸送するため嫌気条件下に置き、微生物分析は試料収集後2時間内にリングル液に連続希釈し、選択培地に置くことにより行なった。MRS寒天+抗生物質 (ホスフォマイシン 80μg/ml、スルファメトキサゾール 93μg/ml、トリメトプライム 5μg/ml) は37、48時間培養し、乳酸菌を単離するために使用した。

40

【0041】

例2

抗-ロタウイルス活性に対し細胞培養の菌株の試験

ラクトバチルス、ラクトコッカス、ストレプトコッカス属を含む数種の乳酸菌を選択し、細胞培養阻害試験で抗-ロタウイルス活性を示したものに対し試験した。ラクトコッカス属では2つの亜種 (Lc. ラクチス亜種ラクチスおよびクレモリス) から成る単一種 (Lc. ラクチス) により表わした。合計30菌株を試験した。ストレプトコッカス属では45菌株で1種 (S. サーモフィラス) を表わした。ロイコノストックおよびプロピオニバ

50

クテリウム属では単一種（6菌株）を表わしたが、エンテロコッカスおよびスタフィロコッカス属では各2種で合計17菌株を表わした。

全体で260個の菌株についてロタウイルス阻害活性を試験した。

第1プロトコル

30 μ lの細菌サスペンション（平均 3×10^6 細菌を含有）は10%トリプトース ホスフェート ブロス（フロー）および5%トリプシン - EDTA溶液（セロメッド）（HT-29細胞の場合1:4に希釈）および補充M199培地では100 μ lウイルスを補充した70 μ l M199培地と混合した。ウイルス - 細菌混合物は4 で1時間および37 で1時間培養した。96の穴を有する微量定量プレートの集密的細胞単層として生育するヒト未分化結腸腺腫細胞HT-29の細胞はリン酸塩緩衝生理的食塩水（PBS、pH7.2）で3回洗浄した。ウイルス - 細菌混合物は細胞に適用し、微量定量プレートはCO₂インキュベータ（ヘレウス）で18時間培養した。ウイルスの複製は下記のように試験した。

10

第2プロトコル

30 μ lの細菌サスペンション（前記）は10% トリプトース ホスフェート ブロス（フロー）および5% トリプシン - EDTA溶液（セロメッド）（HT-29細胞の場合1:4に希釈）を補充した70 μ l M199培地と混合し、そして微量定量プレートの細胞に直接適用した。37 で1時間培養後、補充したM199培地の100 μ lのウイルスを微量定量プレートの細胞に添加した。培養はCO₂インキュベータ（ヘレウス）で18時間継続した。ウイルスの複製は下記のように試験した。

20

ロタウイルス複製は下記のように感染細胞のロタウイルス タン白の組織 - 免疫染色により評価した。

感染1日後、細胞培養培地は微量定量プレートから捨て、細胞は無水エタノールで10分固定した。エタノールは捨て、プレートは3回PBS緩衝液で洗浄した。次にウサギに産生し（ローザンヌのISREC大学から得た）、PBSに1:2000に希釈した50 μ lの抗 - ロタウイルス血清（主としてVP6 タン白に向けられる）を各穴に添加し、穴の乾燥を防止するためにカバースリップをかぶせて37 で1時間培養した。抗血清はその後捨て、プレートはPBSにより3回洗浄した。山羊に産生しかつペルオキシダーゼに結合した（GAR - IgG - PO、ノルディック）50 μ lの抗 - ウサギ免疫グロブリンG（IgG）抗血清はPBSに1:500に希釈して各穴に添加し、そしてプレートは37 で1時間培養した。血清は捨て、プレートはもう一度PBSにより3回洗浄した。次に100 μ lの次の基質混合物を各穴に添加した：10 mlの0.05 Mトリス - 塩酸塩（pH7.8）、1 mlのH₂O₂（30%容、H₂Oに1:600に希釈、メルク）および200 μ lの3 - アミノ - 9 - エチルカルバゾール（-80 で200 μ l試料で貯蔵した0.1 g / 10 ml エタノール、A - 5754、シグマ）。プレートは室温で少なくとも30分インキュベートした。基質は捨て、穴は200 μ lのH₂Oを満たして反応を停止させた。感染細胞病巣は倒立顕微鏡（ダイアパート、レイツ）により計数した。

30

ごく少数の細菌菌株がロタウイルスと相互作用した。初めに選択した260個の細菌細胞のうち単に9個のみが少なくとも1つのプロトコルのロタウイルス複製を阻害した。ラクトバチルス・パラカゼイNC C 2461（ST11）はセロタイプ1ロタウイルス、セロタイプ3ロタウイルスSA11およびセロタイプ4ロタウイルスホチに対し非常に高い活性を示した。

40

【0042】

例3

Caco-2細胞の培養

（病原性）細菌阻害試験では、細胞系Caco-2を腸のモデルとして使用した。この細胞系は例えば、ポーラリゼーション、腸酵素の発現、特別構造のポリペプチドの生産のような腸細胞に対し特有の特徴を提示する。

この細胞は3つの異なる支持体、すなわち生育および増殖用にプラスチック皿で（25 cm²、コーニング）、付着試験では脱脂および滅菌した6個の穴を有するガラスプレート（

50

22 × 22 mm、コーニング) および阻害試験では24個の穴を有するガラスプレート(コーニング)で生育させた。

培養2日後に培地(DMEM)を毎日変えた。使用前培地は100 U/ml ペニシリン/ストレプトマイシン、1 μg/ml アンホテリンおよび56 °で30分不活性化した20% FCSを補充した。培養は90%空気と10% CO₂を含む大気で37 °で行なった。細胞は6日毎に分離した。細胞は0.25%トリプシンおよび3 mM EDTAを含むpH 7.2のPBSで処理して穴の壁から分離した。トリプシンの効果を中和するために、等容積のFCSを生成細胞サスペンションに添加し、混合物は遠心分離し(1000 rpmで10分)、ペレットは再び培養物に入れた。約3.5 × 10⁵細胞を新しい培養びんに移し、集密的細胞単層を得るまで培養した。

10

【0043】

例4

細菌の培養

ST11:

細菌菌株は15%グリセロールを含有するMRS培地に-20 °で貯蔵した。菌株はMRSに嫌気条件下で育成し、阻害試験に使用する前24時間の間隔で新しい培地に2回移した。この試験では、2 × 10⁹ cfu/mlの濃度を使用した。

上澄は20,000 rpmで1時間遠心分離して集め、得た上澄はその後細菌の存在を点検した。

大腸菌:

2つの大腸菌菌株、大腸菌DAEC C1845(拡散付着大腸菌)および大腸菌JPN15(EPEC、エンテロ・パソジェニック大腸菌)を使用した。

解凍後、最初の継代培養はCFA-ミュラーヒントン寒天培地で行ない、これは細菌による付着率を表現するのに適する。

各実験前に細菌細胞は37 °で培養し、新しい培地への移送は各24時間後に2回行なう。JPN15はアンピシリン耐性遺伝子を有するので、この抗生物質は生育中の選択に使用した。

サルモネラ:

サルモネラ・チフィウム菌株SL1344を実験に使用し、これはLB培地に使用前生育した。

【0044】

例5

大腸菌の阻害試験

新しい培地に第2継代培養後、病原菌菌株はLB培地で10 μCi/mlのC¹⁴-アセテートを使用して放射性同位元素により標識した。この培地で菌株の培養は37 °で18時間行なった。

その後細菌サスペンションは遠心分離(1041g、15分)して、残留するC¹⁴-アセテートを含む上澄を除いた。ペレットを懸濁し、PBSで洗浄し、ついで細胞を1%無菌マンノースml当たり約10⁸細胞の濃度で懸濁させた。マンノースは特別な付着を示さないことが分っている。

40

異なる病原菌株(大腸菌)をCaco-2細胞(37 °、10% CO₂、90%空気)の単層と3時間接触させた。同じ実験は上澄(20,000 rpmで40分遠心分離して得た)を使用して行なった。

対照として病原菌はST11または培養上澄のそれぞれを同時添加せずにCaco-2単層と接触させた。

3時間の培養後、培地を変え、単層はPBSで3回洗浄した。各洗浄工程は本質的にすべての非特異的付着を除くためにPBS溶液の20×攪拌を含んだ。細胞はその後1mlの炭酸ナトリウムを添加しそして37 °で40分培養して溶解した。均質化後、試料(250ml)は5mlのシンチレーション流体(ヒオニック-フルオル パッカー)で稀釈し、計数した(パッカー2000)。病原性細胞のCaco-2細胞への付着率%は1

50

00% (付着、又は例6の侵入)にセットした対照に対し計算した。

【0045】

例6

サルモネラに対する阻害試験

サルモネラは表皮細胞に侵入しかつそこで増殖する細菌である。ST11の阻害活性を測定するために、サルモネラ・チフィウム菌株SL1344を上記のように¹⁴C-アセテート含有培地で培養し、例5記載の実験を行なった。

培養後、Caco-2細胞はPBSで洗浄してすべての非付着細胞を除いた。その後ゲンタマイシン(20 µg/ml)を含有する培地を添加し、培養は37°Cで1時間継続した。ゲンタマイシンはすべての菌体外微生物が殺されるように腸細胞に入りこまない抗生物質であり、一方腸細胞に既に侵入したサルモネラは生き残る。PBSにより2回細胞を洗浄後、細胞は無菌蒸留水を添加して溶解し、放射能は例4に記載のように測定した。例5および6の結果は図6~9に示す。培養ST11細胞および培養上澄は下痢を起こす病原性微生物による腸細胞への付着および細胞中への侵入防止に非常に有効であった。

【0046】

例7

ST11の性質

ST11は人工胃液中で培養した。人工胃液はペプシン(3g/l)を無菌生理的食塩水(0.5% w/v)に懸濁し、pHをそれぞれ2.0および3に濃HClにより調整して製造した。ST11は上記培地で量を変えて生育させ、微生物の耐性を測定した。結果は表1に要約する。

表1

pH	cfu/ml, T0	cfu, T1分	Cfu, T15	cfu, T30	cfu, T60
2.0	2.0×10^9	1.8×10^9	1.2×10^9	3.7×10^8	7.0×10^7
3.0	2.0×10^9	1.9×10^9	1.7×10^9	1.7×10^9	8.4×10^8

ST11は乳酸菌の属で開示した方法により規定された次の性質を有する(Ed. B. J. B. Wood and W. H. Holzappel, Blackie A&P)。

- グラム陽性
- カタラーゼ陰性
- NH₃生成アルギニン陰性
- CO₂産生陰性
- L(+)乳酸の産生
- 約0.4%までの濃度の胆汁酸塩の存在で生育。

【0047】

例8

各種条件下のST11の生育

ST11はシュクロース(0, 0.5, 1または2%)または大豆ペプトン(0.5%)またはグルコース(0.5%)を補充したトマトをベースとする培地(蒸留水に水和した4%トマト粉末)に異なる期間37°Cで培養した。結果は図2に示す。

ST11はさらに米粉(3%)、小麦粉(2%)およびシュクロース(3%)から成る培地に2.5%の量で添加し、4.4のpHに達するまで37°Cで培養した。冷却後、製品はビタミンCを添加または添加せずに包装し、10°Cで貯蔵した。

【0048】

例9

マウス付着細胞のST11による1L-12および1L10-mRNAの合成の誘導
8週令の特別の病原体を含まないC57BL/6マウスの大腿骨および脛骨から骨髓を単離し、10%牛胎児血清、1mM L-グルタミン、12mMヘペス、0.05mM 2-メルカプトエタノール、100U/mlペニシリンおよび100μg/mlストレプトマイシン(すべての試薬はギブコから)を含有するRPMI培地(ギブコ)に 2×10^6 細胞/mlの濃度で、37°Cで12時間、5%CO₂大気で培養した。非付着細胞は温かい培地で3回連続洗浄して捨て、残る付着細胞を集め、 10^6 細胞/mlの濃度で6時間細菌の存在または不存在下で培養した。6時間はLPSの応答でマウス付着細胞によるサイトカインmRNA合成の最適時点を表わすことは予め測定した。細菌は $10^9 \sim 10^7$ cfu/mlの範囲の異なる濃度で添加した。細胞を生育し、上記のように貯蔵した。

6時間の培養期間の最後に、細胞は遠心分離により単離し、TRIzol試薬キット(gibcoBRL, Cat. No. 15596-018)を使用し、メーカーの指示に従って溶解した。総RNAはイソプロパノール沈澱により単離し、200mMトリスpH8.3、25mM KCl、1μg/mlオリゴd(T)₁₅(ベーリンガーマンハイム)、1mM DDT(ベーリンガーマンハイム)、4mMの各dNTP(ベーリンガーマンハイム)および40U/ml Rnasin(プロメガ)を含有する40-μl反応容量で200U逆転写酵素(スーパースクリプトII, BRL)を使用して42°Cで90分cDNAに逆転写した。PCRプライマーおよび条件は既にコプフラが記載したものを使用した(ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン、1996年9月1日、184(3)、1127-36)。cDNA量はハウスキーピング遺伝子(β-2-ミクログロブリン)に特異的プライマーを使用して試料内で標準化した。PCR生成物は2%アガロースゲル上で分離し、バンドはUV下で分析した。

図4に示すように、ST11はもっとも強い1L-12および1L-10mRNAの誘導を示し、これは積極的なコントロール(腸菌)で観察されたレベルに匹敵できるものであった。最低細菌濃度(10^7 cfu/ml)で最大の差が見られた。

【0049】

例10

ST11による1L-4合成の抑制

CD4⁺T細胞はミルテニ・バイオテック(Cat. No. 492-01)からMiniMACSキットを使用して特定病原体未感染のBALB/cマウスの脾臓から精製した。CD4⁺T細胞は10%牛胎児血清、1mM L-グルタミン、12mMヘペス、0.05mM 2-メルカプトエタノール、100U/mlペニシリンおよび100μg/mlストレプトマイシンを含有するRPMI培地に 2×10^5 細胞/mlの濃度で培養し、プレート-結合モノクローナル抗体と架橋結合することにより1週中活性化し、CD₃(クローン2C11)およびCD28(クローン37.51、双方の抗体はファーミンゲンから)を得た。この1ry培養中、CD4⁺T細胞は補助細胞として骨髓付着細胞(上記のように単離)と、および 10^8 cfu/ml ST11、または 10^8 cfu/ml Lal、または1mg/ml LPSと、または培地のみで同時培養した。この後、この細胞は洗浄し、CD4⁺T細胞はMiniMACSキット技術を使用してもう一度精製し、ついで培地のみを含有する2ry培養で再刺激した。分化CD4⁺T細胞により産生されたサイトカインは2日後サンドイッチELISA(エンドーゲンおよびファーミンゲンからのキット)を使用して上澄で測定した。

結果は図5に示す。培地のみで分化した細胞は高レベルの1L-4を特徴とする優勢なTh2フェノタイプを示した。1ry培養物にST11を添加することにより、1L-4産生が8倍減少したように、Th2分化の結果を強く調節した。この阻害はLPSの存在で分化した細胞から誘導された培養物に認められるものと同様の大きさのものであった。これと対照的に、他のラクトバチルス菌株は1L-4レベルについて測定可能なインパクトを有しなかった。興味あることに、IFN-γ量は1ry培養物にST11を添加することにより増加しなかった。

上記から分かるように、本発明の菌株は微生物の有用な性質を利用して食品および/また

10

20

30

40

50

は医薬品キャリアの製造に十分に準備できる。

【 0 0 5 0 】

例 1 1

ST11 菌株はガテマラ市郊外のコミュニティでこの地域の大部分の子供が経験する兩期の急性下痢疾病の媒介および体験に影響を与えるその能力に関し臨床試験を行なった。35～70ヶ月令の合計203人の子供が研究に登録し、29日の供与期間にわたって 10^{10} の生菌(ST11)の目標用量を受け、または何も(偽薬)受けなかった。試料および偽薬の双方をそれぞれ選択した子供は栄養不十分のため年令に対する体重および年令に対する身長で典型的不足があった。

学令前の子供の供与試験の開始前、安全評価は試験管内および生体内研究に基づいて行なった。試験管内研究では食品適用に使用する他のラクトバチルスと同様の抗生物質耐性パターンを示したが、生体アミンの形成、ムチンの分解および胆汁酸塩の脱結合の可能性はない。42人の成人ボランティアを含む偽薬-調整臨床研究では、ST11は十分に許容され、そして鼓腸、1日の便通の回数および便の固さのような監視される可能性のある発現のうち悪影響を全く誘導せず、血清の急性期タン白量は潜在的炎症反応に関し何らの懸念も起こさなかった。

試料および偽薬はネスレの製品技術センターで小袋に包装し、ガテマラに冷凍して船積みした。各10gの小袋はチョコレートフレーバ付与ビヒクルおよび0.2gのST11(10^{10} cfu)、または偽薬の場合、0.2gの粉乳から成っていた。チョコレートフレーバ付与ビヒクルはココア粉末、糖、大豆レシチン、バニラおよびシナモンから成るものであった。小袋は使用前2時間まで4～6℃で貯蔵した。使用前、小袋はネスレが供する、細菌汚染の全くない100mlの水に溶解しなければならなかった。

適用されたプロトコルによれば、下痢は24時間中に3回以上の液体または未固形排泄の発生として規定された。下痢症状は下痢の証拠(24時間中に3回の下痢排泄)を提示した場合として規定された。その合計期間(時間で)は最初の3回の指標便通時から最初の有形便通の出現まで、または24時間排便のない期間までが計算された。「新しい」症状を有する子供では、前期症状の終るまで48時間経過しなければならなかった。そうでなければ、同じ症状の継続が考えられ、その場合全体の期間が評価に使用される。29日の観察期間中1回以上の実証された下痢の症状を経験するのは子供の場合であった。下痢症状の強さは産生した軟便の総回数を基準とした。症状のきびしさの要素は便通に血液、粘液または膿汁の存在、同時に伴う発熱および嘔吐を包含する。24時間に7回の便通の烈しさ、または診療所、健康センター、または病院で健康専門職による介在が必要の場合も症状をきびしいものとして分類する。

下痢の症状が監視系によって診断される場合、下痢便通は症状に対し可能な病因病原体を確認するため顕微鏡試験および培養を行なうため収集した。試験品は試料が赤痢である場合、ロタウイルス抗原、(*giardia*, and *E. histolytica*)に対し、およびシゲラ、サルモネラ、アエロモナス、プレシオモナス・シゲロイデス、大腸菌、あるいはV.コレラに対し診断された。

試験期間中、製品試料は投与期間中に含まれる微生物の生存性を試験するため集めた。微生物は全試験中小袋中で生存可能な状態のままであり、試験の終了時にも小袋は水により再構成すると 10^{10} の生存可能な微生物を含むことが分かった。

プロビオチック微生物を含有する試料は対照群(偽薬)と比較して下痢の発生を約30%だけ減少できたことが試験により分かった。尚、また対照群は試料または偽薬のそれぞれを受けない通常の人以上に下痢発生数の減少を既に示した。この後者の発見は付加的の貴重な栄養と汚染のない水を受ける子供基準で一部説明できる。しかし、試験は現場で行われたので、ST11は生体内の下痢の発生を疑いなく低減できることを明らかに誘導できる。

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 ロタウイルスに対し保護性を示す細菌菌株の細胞培養概略図である。

【 図 2 】 異なる培地におけるL.カゼイ ST11菌株の酸性化を示す。

10

20

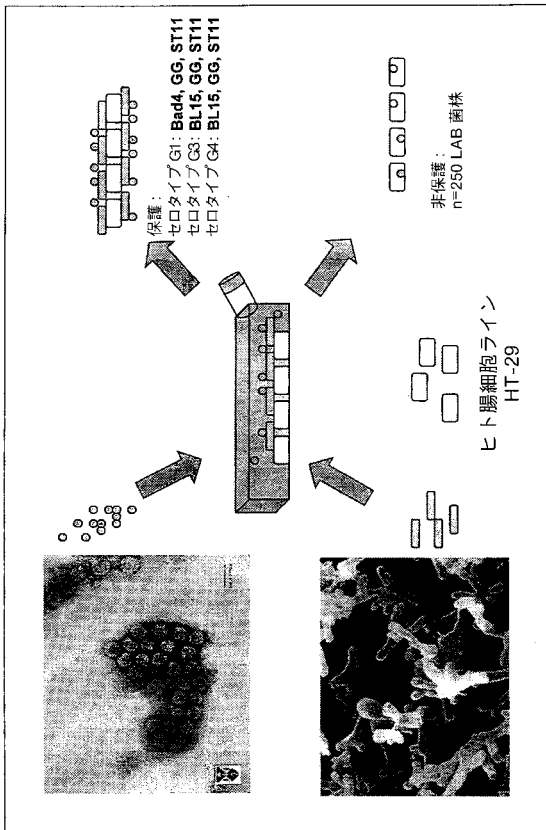
30

40

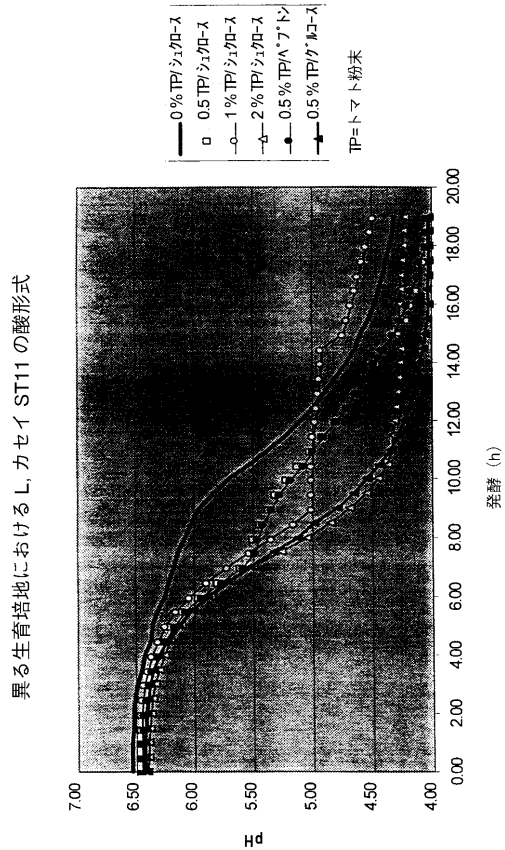
50

- 【図3】 10、30日間のL.カゼイ ST11菌株の生存割合を示す。
- 【図4】 骨髄由来のマウス付着細胞の1L-12および1L-10のmRNAパターンを示す。
- 【図5】 1L-4産生の減少によるTh2分化を示す。
- 【図6】 ST11細胞による大腸菌の上皮細胞への付着阻害を示す。
- 【図7】 ST11カルチャー上澄による大腸菌の上皮細胞への付着阻害を示す。
- 【図8】 ST11細胞によるサルモネラ・チフィウムの上皮細胞への侵入防止を示す。
- 【図9】 ST11カルチャー上澄によるサルモネラ・チフィウムの上皮細胞への侵入防止を示す。

【図1】

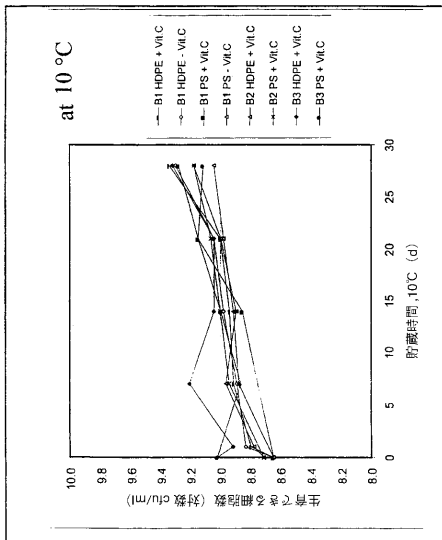


【図2】



【 図 3 】

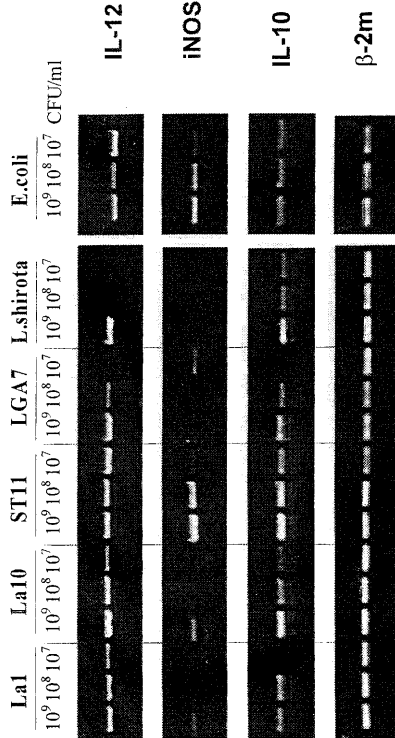
殺菌飲料中の生存



HDPE: 高密度ポリエチレン PS: ポリスチレン VitC: ビタミンC

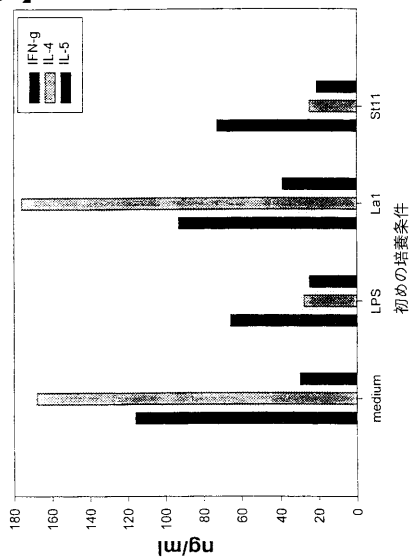
【 図 4 】

マウスマクロファージのLABによる
サイトカイン mRNA の誘導



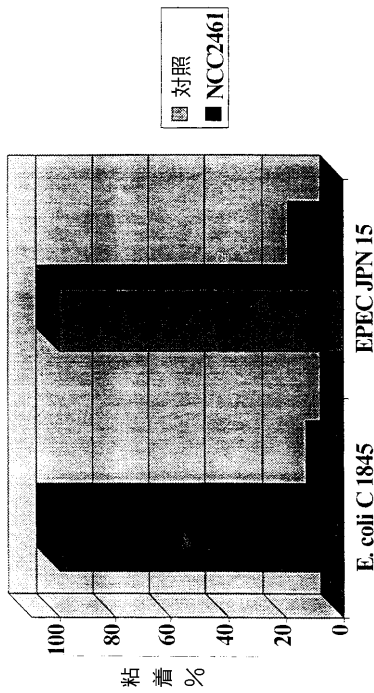
【 図 5 】

IVD 980916 内のサイトカインの遊離
(ELISA 981103 & 980925)



【 図 6 】

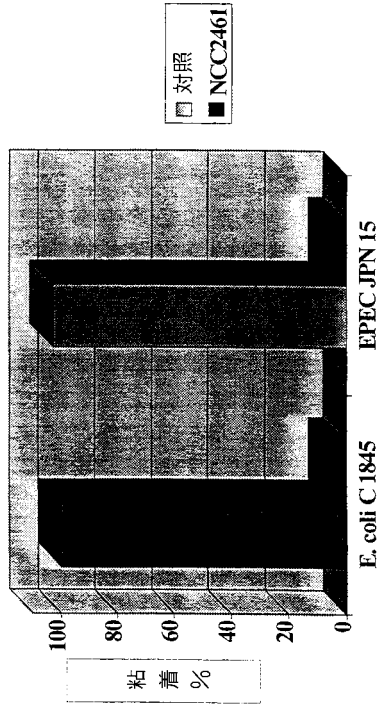
細菌カルチャー NCC2461 と接触中
腸内有毒 E.coli の粘着抑制



【 図 7 】

NCC2461 の上澄と接触中腸内有毒

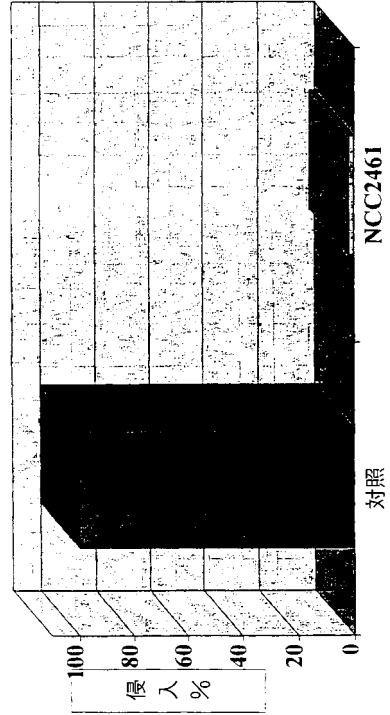
E.coli の粘着抑制



【 図 8 】

細菌カルチャー NCC2461 と接触中

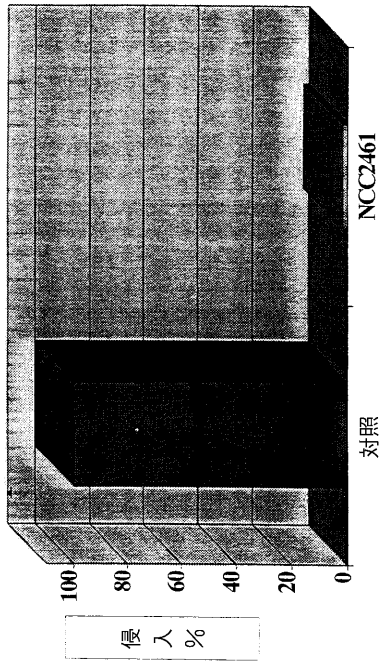
サルモネラ侵入抑制



【 図 9 】

NCC2461 の上澄と接触中

サルモネラチアフィルムリウムの侵入抑制



フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
A 2 3 G	9/44	(2006.01)	A 2 3 L 1/105
A 2 3 G	9/52	(2006.01)	A 2 3 L 1/30 Z
A 2 3 L	1/105	(2006.01)	A 6 1 K 35/74 A
A 2 3 L	1/30	(2006.01)	A 6 1 P 1/12
A 6 1 K	35/74	(2006.01)	A 6 1 P 31/14
A 6 1 P	1/12	(2006.01)	C 1 2 N 1/20 A
A 6 1 P	31/14	(2006.01)	C 1 2 R 1:225
C 1 2 R	1/225	(2006.01)	

- (72)発明者 ルニエロ、ロベルト
スイス国 ル モン - ペルラン、シュマン ポディーユ、2 4
- (72)発明者 ブルーソウ、ハラルド
スイス国 ラ ツール ド ペイルズ、シュマン ド ラ ショメニイ 1 3
- (72)発明者 ロシャ、フローレンス
スイス国 モントルー、カルチェ デ ティユール 6
- (72)発明者 フォン デル ヴァイト、ティエリイ
スイス国 ポデックス、ルート ド ラ ボルディネット 1 0
- (72)発明者 ブルム - スペリゼン、ステファニイ
スイス国 ローザンヌ、アブニュ デ ムスキーヌ 1 3
- (72)発明者 ネーゼ、ジャン - リシャル
スイス国 サビニユイ、サンチェ ド クールタライエ 6
- (72)発明者 セルバン、アラン
フランス国 シャトネイ - マラブレイ、ユーエフアール ド エスシー、ピーエイチ、パリ
エックスアイ、ファキュルテ ド ファルマシイ (デブ.ミクロブ.ノイムノル.)

審査官 田村 明照

- (56)参考文献 特開平08-268899(JP,A)
特表平10-500577(JP,A)
欧州特許出願公開第00861905(EP,A1)
国際公開第98/006411(WO,A1)
国際公開第97/046104(WO,A1)
FEMS Microbiology Letters, Vol.167, pp.185-189 (1998)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 1/20
BIOSIS/WPI(DIALOG)