



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101228262 B

(45) 授权公告日 2011.04.20

(21) 申请号 200680026573.5
 (22) 申请日 2006.07.20
 (30) 优先权数据
 211670/2005 2005.07.21 JP
 (85) PCT申请进入国家阶段日
 2008.01.21
 (86) PCT申请的申请数据
 PCT/JP2006/314369 2006.07.20
 (87) PCT申请的公布数据
 W02007/010977 JA 2007.01.25
 (73) 专利权人 株式会社益力多本社
 地址 日本东京
 (72) 发明人 野瀬淳史 野崎大辅 石川文保
 水泽进 赤星良一
 (74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127
 代理人 丁香兰 赵冬梅
 (51) Int. Cl.
 C12N 1/20 (2006.01)
 A23L 1/30 (2006.01)

A61K 35/74 (2006.01)
 A61P 1/04 (2006.01)
 A61P 31/04 (2006.01)

(56) 对比文件
 CN 1589322 A, 2005.03.02, 全文.
 张巧华. 有机化工产品及其试验方法标准汇编
 1. 中国标准出版社, 1992, 304.
 罗威, 罗立新等. 双歧杆菌发酵荔枝汁开
 发活菌保健饮品的研究. 广州食品工业科技
 20. 2004, 2027-30.

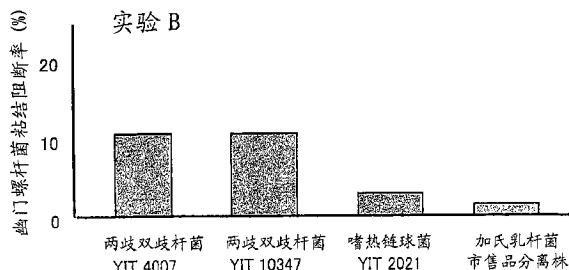
审查员 黄丽君

权利要求书 1 页 说明书 23 页 序列表 3 页
 附图 10 页

(54) 发明名称
 新型双歧杆菌属细菌及其利用

(57) 摘要

本发明涉及新型双歧杆菌属细菌及其利用。本发明的目的在于提供一种两歧双歧杆菌，该两歧双歧杆菌具有幽门螺杆菌的除菌作用，并且其即使在好氧条件下保存于发酵乳食品或饮品中，也具有较高的存活性。本发明提供具有如下性质的两歧双歧杆菌 (*Bifidobacterium bifidum*)：
 (1) 具有对幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*) 的除菌作用，(2) 在 10℃ 的好氧条件下于发酵乳食品或饮品中保存 14 天时的存活率为 10% 以上。



1. 一种两歧双歧杆菌 (*Bifidobacterium bifidum*)，其是保藏编号为 FERM BP-10613 的两歧双歧杆菌 YIT 10347。
2. 一种幽门螺杆菌感染预防治疗剂，其特征在于，该预防治疗剂含有权利要求 1 所述的两歧双歧杆菌作为有效成分。
3. 一种胃炎、胃溃疡、十二指肠溃疡的预防治疗剂，其特征在于，该预防治疗剂含有权利要求 1 所述的两歧双歧杆菌作为有效成分。
4. 一种胃不适的预防治疗剂，其特征在于，该预防治疗剂含有权利要求 1 所述的两歧双歧杆菌作为有效成分。
5. 一种胃酸过多、胃食道逆流症的预防治疗剂，其特征在于，该预防治疗剂含有权利要求 1 所述的两歧双歧杆菌作为有效成分。
6. 一种食品，其特征在于含有权利要求 1 所述的两歧双歧杆菌。
7. 如权利要求 6 所述的食物，其是发酵乳食品。
8. 如权利要求 6 或 7 所述的食物，其中，该食品进一步含有甜味剂。
9. 如权利要求 6 或 7 所述的食物，其中，该食品是装填在容器中的。
10. 如权利要求 9 所述的食物，其中，所述容器由透氧性包裹材料构成。
11. 一种饮品，其特征在于含有权利要求 1 所述的两歧双歧杆菌。
12. 如权利要求 11 所述的饮品，其是发酵乳饮品。
13. 如权利要求 11 或 12 所述的饮品，其中，该饮品进一步含有甜味剂。
14. 如权利要求 11 或 12 所述的饮品，其中，该饮品是装填在容器中的。
15. 如权利要求 14 所述的饮品，其中，所述容器由透氧性包裹材料构成。

新型双歧杆菌属细菌及其利用

技术领域

[0001] 本发明涉及新型两歧双歧杆菌 (*Bifidobacterium bifidum*) 及其利用, 所述两歧双歧杆菌具有对幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*) 的除菌作用, 并且其在发酵乳食品或发酵乳饮品中的存活性优异。

[0002] 背景技术

[0003] 已知双歧杆菌属细菌 (下文中称为“双歧菌”) 是人体肠内菌群中的主要细菌, 具有诸如改善便秘或腹泻的整肠作用、抑制血清胆固醇上升的作用、免疫活化作用等对人体健康有益的作用。因此, 对于双歧菌, 有很多市售品以各种发酵乳食品或饮品和活菌制剂等的形式销售, 现在形成了稳定的市场。特别地, 由于含有双歧菌的发酵乳食品或饮品具有优异的嗜好性, 从而适于持续地摄取双歧菌。

[0004] 随着近些年对于双歧菌有效性的研究的进展, 已表明双歧菌具有抗溃疡作用, 例如, 有报告指出短双歧杆菌 YIT 4014、短双歧杆菌 YIT 4043 和两歧双歧杆菌 YIT 4007 (FERM BP-791) 这 3 个菌株在大鼠醋酸溃疡诱导模型大鼠中发挥出抗溃疡作用 (非专利文献 1)。并且, 有报告指出, 通过给予两歧双歧杆菌 YIT 4007 的干燥粉末, 会改善胃溃疡 / 十二指肠溃疡患者的症状, 使幽门螺杆菌从胃部粘膜消失 (非专利文献 2), 由此可以期待其作为幽门螺杆菌的感染预防治疗剂以及胃炎、胃溃疡和十二指肠溃疡的预防治疗剂的应用。并且, 对于上述两歧双歧杆菌 YIT 4007, 有报告指出给予的活菌数越多, 其效果越是增加 (非专利文献 3), 为了有效发挥其药理作用, 需要使尽量多的活菌到达胃和肠管内。

[0005] 但是, 由于含有两歧双歧杆菌 YIT 4007 的双歧菌是专性厌氧菌, 不耐氧, 特别是在好氧的条件下保存时, 存在活菌数迅速减少这样的问题, 从而难以给予充分数量的双歧菌。

[0006] 为了解决这样的问题, 人们对用于改善保存时的存活性的各种成分 (例如南瓜或黄瓜等蔬菜榨汁物、丙酮酸、还原型谷胱甘肽等 (专利文献 1); 甘油、木糖醇等 (专利文献 2); 乳糖醇 (专利文献 3) 等) 的使用进行研究, 但这些成分的添加会带来制造成本上升、嗜好性降低等问题, 因而无法简单地使用。并且, 也研究了将刚制造完的含双歧菌发酵物填充进由不透氧性的包材构成的容器中, 从而完全阻断与氧的接触的方法。但是, 还尚未提供出完全的不透氧性容器, 并且也存在透氧性低的材料在成型的自由度方面欠缺的问题。进而, 使用复合材料作为透氧性低的容器时, 存在其废弃物的处理变得复杂、容器自身也昂贵等问题, 在其利用方面存在很多限制。

[0007] 因此认为, 改善双歧菌在发酵乳食品或饮品等中的存活性的根本性的解决方法在于制作出即使在好氧条件下也具有高存活性的双歧菌株, 作为这种菌株的例子, 已经报告有短双歧杆菌 YIT 10001 (FERMBP-8205) (专利文献 4)、短双歧杆菌 SBR 3212 (FERM P-11915) (专利文献 5)、两歧双歧杆菌 YIT 4002 (FERM BP-1038) (专利文献 6) 等。

[0008] 但是, 这些在好氧条件下显示高存活性的双歧菌与两歧双歧杆菌 YIT 4007 等相

比，在对幽门螺杆菌的除菌作用和抗溃疡作用方面非常弱。至今还没有制作出如此地在好氧条件下也具有高存活性、且同时具有对幽门螺杆菌的除菌作用等的菌株，使充分数量的活菌到达胃和肠管内以表现抗溃疡作用这一点是困难的。

- [0009] 专利文献 1：日本特开 2003-250528 号公报
[0010] 专利文献 2：日本特开平 11-137172 号公报
[0011] 专利文献 3：日本特许第 3261571 号
[0012] 专利文献 4：WO03/040350 号国际公开小册子
[0013] 专利文献 5：日本特许第 2922013 号
[0014] 专利文献 6：日本特公昭 61-19220 号公报
[0015] 非专利文献 1：日本糖质学会第 16 回糖质科学研讨会演讲要旨集、24-25(1994)
[0016] 非专利文献 2：薬理と治療（药理与治疗）、Vol.22、No.11、253-256 (1994)
[0017] 非专利文献 3：機能性食品と薬理栄養（功能性食品与药理营养）、Vol.2、No.3、203-213(2005)

发明内容

[0018] 因此，本发明的课题在于提供一种具有对幽门螺杆菌的除菌作用、且即使在好氧条件下保存于发酵乳食品或饮品中也具有较高的存活性的新型两歧双歧杆菌。

[0019] 本发明人为了解决上述课题进行了深入研究，结果发现，通过在特殊的条件下对具有幽门螺杆菌的除菌作用的两歧双歧杆菌进行育种改良，能够得到具有对幽门螺杆菌的除菌作用、且即使在好氧条件下保存时也具有高存活性的两歧双歧杆菌，从而完成了本发明。

[0020] 即，本发明提供具有如下性质的两歧双歧杆菌（*Bifidobacterium bifidum*）：

[0021] (1) 具有对幽门螺杆菌（*Helicobacter pylori*）的除菌作用；

[0022] (2) 在 10℃ 的好氧条件下于发酵乳食品或发酵乳饮品中保存 14 天时的存活率为 10% 以上。

[0023] 并且，本发明提供幽门螺杆菌感染的预防治疗剂；胃炎、溃疡的预防治疗剂；胃不适的预防治疗剂；胃酸过多、胃食道逆流症的预防治疗剂，这些预防治疗剂的特征在于含有上述两歧双歧杆菌作为有效成分。

[0024] 进而，本发明提供以含有上述两歧双歧杆菌为特征的食品或饮品、特别是发酵乳食品或发酵乳饮品。

[0025] 本发明的两歧双歧杆菌即使在好氧条件下保存于发酵乳食品或饮品中也具有优异的存活性，因此是两歧双歧杆菌所具有的幽门螺杆菌的除菌作用的有效性能够长期得到维持的优异的物质。

[0026] 因此，本发明的两歧双歧杆菌可以良好地用于幽门螺杆菌感染的预防治疗；胃炎、溃疡的预防治疗；胃不适的预防治疗；胃酸过多、胃食道逆流症的预防治疗。并且，本发明的两歧双歧杆菌也可以良好地用于具有上述预防治疗作用的食物或饮品、特别是发酵乳食品或饮品的制造，并且，由于上述食物或饮品不必填充于由不透氧性的包裹材料构成的容器中，容器的选择范围也较宽。

[0027] 附图说明

- [0028] 图 1 是显示使用了 BiBIF 引物的 YIT 4007 和 YIT 10347 的菌种分析结果的附图。
- [0029] 图 2 是显示 YIT 4007 和 YIT 10347 的 RAPD 谱带 (band pattern) 的附图。
- [0030] 图 3 是显示 YIT 4007 和 YIT 10347 的染色体 DNA 的脉冲电场电泳谱带的附图。
- [0031] 图 4 是显示对人体胃细胞的粘结性试验的结果的附图。
- [0032] 图 5 是显示阻断幽门螺杆菌对人体胃细胞的粘结的阻断试验的结果的附图。
- [0033] 图 6 是显示阻断幽门螺杆菌对人体胃细胞的粘结的阻断试验的结果的附图。
- [0034] 图 7 是显示 YIT 10347 对于由幽门螺杆菌感染导致的诱导自人体胃细胞的 IL-8 的抑制效果试验的结果的附图。
- [0035] 图 8 是显示 YIT 10347 对于由 TNF- α 的添加导致的诱导自人体胃细胞的 IL-8 的抑制效果试验的结果的附图。
- [0036] 图 9 是显示培养液中的 YIT 10347 对幽门螺杆菌的抑制效果试验的结果的附图 (实验 A: 单菌培养, 实验 B: 混合培养)。
- [0037] 图 10 是显示 YIT 10347 和 YIT 4007 对于由幽门螺杆菌感染导致的诱导自人体胃细胞的 IL-8 的抑制效果的比较试验的结果的附图。
- [0038] 图 11 是显示 YIT 10347 和 YIT 4007 对于由 TNF- α 的添加导致的诱导自人体胃细胞的 IL-8 的抑制效果的比较试验的结果的附图。
- [0039] 图 12 是显示将含有 YIT 10347 的乳酸菌饮料给予至人体的试验结果 (全体被测试者的胃蛋白酶原 I 值) 的附图。
- [0040] 图 13 是显示将含有 YIT 10347 的乳酸菌饮料给予至人体的试验结果 (活动性胃炎被测试者的胃蛋白酶原 I 值) 的附图。
- [0041] 图 14 是显示将含有 YIT 10347 的乳酸菌饮料给予至人体的试验结果 (萎缩性胃炎临界范围被测试者的胃蛋白酶原 II 值) 的附图。
- [0042] 图 15 是显示将含有 YIT 10347 的乳酸菌饮料给予至人体的试验结果 (全体幽门螺杆菌阳性者的呼气 $\Delta^{13}\text{CO}_2$ 的值) 的附图。
- [0043] 图 16 是显示将含有 YIT 10347 的乳酸菌饮料给予至人体的试验结果 (幽门螺杆菌阳性且有活动性胃炎的被测试者的呼气 $\Delta^{13}\text{CO}_2$ 的值) 的附图。
- [0044] 图 17 是显示将含有 YIT 10347 的乳酸菌饮料给予至人体的试验结果 (幽门螺杆菌阳性且萎缩性胃炎临界范围的被测试者的便中幽门螺杆菌抗原量) 的附图。
- [0045] 图 18 是显示将含有 YIT 10347 的乳酸菌饮料给予至人体的试验结果 (全体被测试者的胃不适的改善率) 的附图。

具体实施方式

[0046] 本发明的两歧双歧杆菌具有幽门螺杆菌的除菌作用, 并且, 在 10°C 的好氧条件下于发酵乳食品或饮品中保存 14 天时的存活率为 10% 以上。此处, 幽门螺杆菌的除菌作用是指, 利用阻断幽门螺杆菌粘结到人体胃细胞的阻断作用、对幽门螺杆菌直接的增殖抑制作用等来降低幽门螺杆菌的菌数。此处所说的阻断幽门螺杆菌粘结到人体胃细胞的阻断作用具体是指, 在 Leibovitz' s L-15 培养基上, 向源自人体胃的细胞中添加 $10^8 \sim 10^9$ CFU/ml 的本发明的两歧双歧杆菌, 于 37°C 预培养 2 小时, 向其中添加幽门螺杆菌 10^7 CFU/ml, 于 37°C 培养 90 分钟后于 4°C 放置一夜, 结果幽门螺杆菌对源自人体胃的细

胞的粘结被阻断 5% 以上、优选 5% ~ 20%；或者，在 Leibovitz' s L-15 培养基上于 37°C 对 10^7 CFU/ml 的幽门螺杆菌和 $10^8 \sim 10^9$ CFU/ml 的本发明的两歧双歧杆菌进行 2 小时的预培养，将该预培养液添加至源自人体胃的细胞中，于 37°C 培养 90 分钟后，于 4°C 放置一夜，结果幽门螺杆菌对源自人体胃的细胞的粘结被阻断 5% 以上、优选 5% ~ 20%。并且，对幽门螺杆菌的增殖抑制作用具体是指，在布氏肉汤培养基 (brucella broth) 中添加 10^5 CFU/ml 的幽门螺杆菌和 10^7 CFU/ml 的本发明的两歧双歧杆菌，将其于 37°C 培养 48 小时后，幽门螺杆菌的活菌数减少至 10^3 CFU/ml 以下、优选为 $10 \sim 10^3$ CFU/ml。进而，所谓幽门螺杆菌的菌数的降低，具体可以举出，粘结在胃细胞、胃粘蛋白和胃组织上的幽门螺杆菌的菌数降低；口腔、鼻腔、喉、食道、胃、十二指肠、小肠、盲肠、大肠、直肠等肠管内的幽门螺杆菌的菌数降低；通过与幽门螺杆菌的共同培养（混合培养）导致幽门螺杆菌的菌数降低；在尿素呼气试验中 $\Delta^{13}\text{C}$ 值降低；血清中的幽门螺杆菌抗体价降低；粪便中的幽门螺杆菌抗原量降低；等等。此处，所谓幽门螺杆菌的菌数包括，幽门螺杆菌的活菌数 (CFU)、菌量（与抗幽门螺杆菌抗体的反应性）、基因量（能够特异性地识别幽门螺杆菌的 DNA 量、RNA 量）、对幽门螺杆菌具有特异性的病原因子的量或活性（脲酶活性、空泡毒素 VacA、CagPAI（毒力岛，pathogenecity island）、LPS-Lewis 抗原量）。并且，所谓存活率是指，相对于在好氧条件下保存所用的培养液、发酵乳食品或饮品中的在保存前的活菌数，于好氧条件下保存（10°C、14 天）后的活菌数的比例。另外，活菌数可以按照通常方法求出。例如，将在好氧条件下保存所用的培养液或者后述的发酵乳食品或饮品适当稀释，涂抹在 TOS 丙酸琼脂培养基上或混合于 TOS 丙酸琼脂培养基中，于 37°C 厌氧培养 72 小时后，测定菌落，由此可以求出活菌数。

[0047] 具体地说，以具有幽门螺杆菌的除菌作用的两歧双歧杆菌为母株，通过对其进行育种改良就可以得到本发明的两歧双歧杆菌。对可以用作母株的两歧双歧杆菌没有特别限制，只要是具有幽门螺杆菌的除菌作用的菌株即可，可以举出例如两歧双歧杆菌 YIT 4007（于昭和 56 年 2 月 4 日作为 FERM BP-791 在独立行政法人产业技术综合研究所专利生物保藏中心（茨城县筑波市东 1 丁目 1 番地 1 中央第 6）进行过国际保藏）。

[0048] 作为育种改良的方法没有特别限制，可以举出例如利用浓缩法、紫外线、亚硝基胍 (NTG)、甲基磺酸乙酯 (EMS) 等突变诱导剂的变异方法。

[0049] 以浓缩法为例对育种改良的具体例进行说明。首先，在乳培养基中培养作为母株的具有幽门螺杆菌的除菌作用的两歧双歧杆菌，获得培养液，将所得到的培养液在好氧条件下保存，从存活下来的菌中选出耐氧性高的菌。更具体地说，在乳培养基中培养两歧双歧杆菌 YIT 4007 (FERM BP-791)，获得培养液，接下来，在该培养液中添加糖浆液，制成发酵乳食品或饮品，然后将该发酵乳食品或饮品在好氧条件下保存 21 天，选出存活的菌。使用如上选出的菌，反复进行该工序，将耐氧性高的菌浓缩，其结果，能够获得在 10°C 的好氧条件下于发酵乳食品或饮品中保存 14 天时的存活率为 10% 以上、优选为 10 ~ 40% 左右的本发明的两歧双歧杆菌。作为在好氧条件下保存的一例，可以举出通气搅拌保存，即，在向保存体系中通入大气等而得到的好氧状态下，利用搅拌子或搅拌叶片持续搅拌，进行保存。

[0050] 在上述浓缩法中使用的所谓乳培养基是指以乳为主成分的培养基，作为乳，可以举出牛乳（全脂乳）及作为其加工品的脱脂乳、源自乳的肽等。对在这样乳培养基

中培养两歧双歧杆菌时的培养条件没有特别限定，可以根据两歧双歧杆菌的生长条件进行适当设定，在大约 30 ~ 40℃、优选为 33 ~ 37℃ 进行厌氧培养是优选的。并且，在两歧双歧杆菌中存在仅以乳为营养源时难以生长的菌株，在这种情况下，也可以在乳培养基中添加各种糖类、酵母提取液、肽类等促进增殖的物质。

[0051] 并且，利用上述浓缩法在好氧条件下保存培养液时，优选在培养液中添加糖浆等甜味剂、乳化剂、增稠（稳定）剂、维生素、矿物质、酸味剂、乳脂、提味剂、浸膏等任意成分，或是根据需要另外合用两歧双歧杆菌以外的微生物，按照通常方法制成发酵乳食品或饮品后进行保存。与仅保存于培养液中的情况相比，这样做更会使其环境接近最终形态的制品，能够更有效地浓缩出在最终形态的制品中具有高存活性的菌。

[0052] 添加于培养液中的任意成分之中，作为糖浆，可以举出包含葡萄糖、蔗糖、果糖、果糖葡萄糖液糖、葡萄糖果糖液糖、帕拉金糖、海藻糖、乳糖、木糖、麦芽糖、蜂蜜、糖蜜等糖类；山梨糖醇、木糖醇、赤藓醇、乳糖醇、帕拉金糖醇（パラチニット）、还原糖稀、还原麦芽糖糖稀等糖醇、阿斯巴甜、甜味蛋白（thaumatin）、三氯蔗糖、丁磺胺钾（安塞蜜）、甜菊等高甜味度甜味剂等物质。作为乳化剂，可以举出蔗糖脂肪酸酯、甘油脂肪酸酯、聚甘油脂肪酸酯、脱水山梨糖醇脂肪酸酯、卵磷脂等。作为增稠（稳定）剂，可以举出琼脂、明胶、角叉菜胶、果阿胶、黄原酸胶、果胶、刺槐豆胶、结冷胶、羧基甲基纤维素、大豆多糖类、褐藻酸丙二醇酯等。作为维生素，可以举出维生素 A、维生素 B 类、维生素 C、维生素 E 类等。作为矿物质，可以举出钙、镁、锌、铁、锰等。作为酸味剂，可以举出柠檬酸、乳酸、醋酸、苹果酸、酒石酸、葡糖酸等。作为乳脂，可以举出奶油、黄油、酸奶油等。作为提味剂，可以举出酸奶系、莓系、橙系、木梨（flower pear）系、紫苏系、柑橘系、苹果系、薄荷系、葡萄系、杏系、西洋梨（pear）、奶蛋糊、桃、甜瓜、香蕉、热带植物、药草系、红茶、咖啡系等。作为浸膏，可以举出药草浸膏、黑砂糖浸膏等。

[0053] 并且，作为两歧双歧杆菌以外的微生物，可以举出例如：短双歧杆菌（*Bifidobacterium breve*）、长双歧杆菌（*B.longum*）、婴儿双歧杆菌（*B.infantis*）、青春双歧杆菌（*B.adolescentis*）、链状双歧杆菌（*B.catenulatum*）、假小链双歧杆菌（*B.pseudocatenulatum*）、动物双歧杆菌（*B.animalis*）、乳双歧杆菌（*B.lactis*）、球双歧杆菌（*B.globosum*）等双歧杆菌属细菌；干酪乳杆菌（*Lactobacillus casei*）、嗜酸乳杆菌（*L.acidophilus*）、植物乳杆菌（*L.plantarum*）、布氏乳杆菌（*L.buchneri*）、鸡源乳杆菌（*L.gallinarum*）、嗜淀粉乳杆菌（*L.amylovorus*）、短乳杆菌（*L.brevis*）、鼠李糖乳杆菌（*L.rhamnosus*）、高加索奶乳杆菌（*L.kefir*）、类干酪乳杆菌（*L.paracasei*）、卷曲乳杆菌（*L.crispatus*）、玉米乳杆菌（*L.zaeae*）、瑞士乳杆菌（*L.helveticus*）、唾液乳杆菌（*L.salivarius*）、加氏乳杆菌（*L.gasseri*）、发酵乳杆菌（*L.fermentum*）、路氏乳杆菌（*L.reuteri*）、卷曲乳杆菌（*L.crispatus*）、德氏乳杆菌保加利亚亚种（*L.delbrueckii subsp.bulgarius*）、德氏乳杆菌德氏亚种（*L.delbrueckii subsp.delbrueckii*）、约氏乳杆菌（*L.johnsonii*）、戊糖乳杆菌（*L.pentosus*）、马里乳杆菌（*L.mali*）等乳杆菌属细菌；嗜热链球菌（*Streptococcus thermophilus*）等链球菌属细菌；乳酸乳球菌乳亚种（*Lactococcus lactis subsp.lactis*）、乳酸乳球菌乳脂亚种（*Lactococcus lactis subsp.cremoris*）等乳球菌属细菌；粪肠球菌（*Enterococcus faecalis*）、屎肠球菌（*E.faecium*）等肠球菌属细菌；枯草芽孢

杆菌 (*Bacillus subtilis*) 等芽孢杆菌属细菌；酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、德氏有孢圆酵母 (*Torulasporadelbrueckii*)、乳酒假丝酵母 (*Candida kefyri*) 等属于酵母属、有孢圆酵母属、假丝酵母属等的酵母。

[0054] 将利用上述浓缩法得到的、已确认其在好氧条件下保存后的存活率特别高的 1 个菌株作为两歧双歧杆菌 YIT 10347 (FERM BP-10613)，于平成 17 年 6 月 23 日向独立行政法人产业技术综合研究所专利生物保藏中心 (茨城县筑波市东 1 丁目 1 番地 1 中央第 6) 提出了国际保藏 (FERMBP-10613 转自平成 17 年 6 月 23 日向上述保藏机关提出保藏的 FERMP-20569)。

[0055] 该两歧双歧杆菌 YIT 10347 (下文中有时称为“YIT 10347”) 的细菌学性质与作为母株的两歧双歧杆菌 YIT 4007 (下文中有时称为“YIT 4007”) 相比，结果如下。

[0056] < 菌落性状和细菌形态 >

[0057] 将各菌株接种于添加有琼脂的 MILS 培养基 (Iwata & Morishita, Letter in Applied Microbiology, vol 9, 165-168, 1989) 中，通过 37°C 的厌氧培养，重复进行单一菌落的分离，从而观察经纯化的菌株的菌落性状和细菌形态。

[0058] 【表 1】

[0059]

	YIT 4007	YIT 10347
革兰氏染色	阳性	阳性
菌体形态	多形性杆菌	多形性杆菌
菌落颜色	白色	白色
菌落形态	光滑扁平	光滑扁平

[0060] < 基于 API 50CH 的糖发酵性状试验结果 >

[0061] 利用 API 50CH (bioMerieux Japan 制造)，按照试剂盒中附带的使用指南中所记载的方法，将培养一夜后的菌液接种于各基质中。将其在 37°C 厌氧手套箱 (グローボックス) 中培养，在培养的第 7 天，对各基质的糖发酵性状进行判定。

[0062] 【表 2】

	YIT 4007	YIT 10347
[0063] 对照	—	—
甘油	—	—
赤藓醇	—	—

D-阿拉伯糖	-	-
L-阿拉伯糖	-	-
核糖	-	-
D-木糖	-	-
L-木糖	-	-
戊五醇	-	-
β 甲基-木糖苷	-	-
半乳糖	+	+
D-葡萄糖	+	+
D-果糖	+	+
D-甘露糖	-	-
L-山梨糖	-	-
鼠李糖	-	-
半乳糖醇	-	-
肌醇	-	-
甘露醇	-	-
α 甲基-D-甘露糖	-	-
α 甲基-D-葡萄糖	-	-
N 乙酰葡萄糖胺	±	+
苦杏仁苷	-	-
熊果苷(Arbutine)	-	-
七叶苷	-	-
水杨苷	-	-
纤维二糖	-	-
麦芽糖	-	-
乳糖	±	+
蜜二糖	±	±
蔗糖	-	+
海藻糖(treharose)	-	-
菊糖	-	-
松三糖	-	-
D-棉子糖	-	-
阿米酮(amidon)	-	-
糖原	-	-
木糖醇	-	-
β 龙胆二糖	±	+
D-松二糖	-	-
L-来苏糖	-	-
D-塔格糖	-	-
D-岩藻糖	-	-
L-岩藻糖	-	-
D-阿糖醇	-	-
L-阿糖醇	-	-
葡萄糖酸盐/酯	-	-
2 酮基-葡萄糖酸盐/酯	-	-
5 酮基-葡萄糖酸盐/酯	-	-

[0064]

[0065] +：阳性；±：疑似阳性；-：阴性

[0066] 并且，本发明的两歧双歧杆菌具有幽门螺杆菌的除菌作用，特别是具有阻断幽门螺杆菌粘接到人体胃细胞的阻断作用、对幽门螺杆菌的增殖抑制作用。进而，本发明

的两歧双歧杆菌与作为其母株的一例的两歧双歧杆菌 YIT 4007 相同，具有胃粘膜的保护作用、血清胃蛋白酶原 (PG) 值的改善作用、白细胞介素 (IL)-8 的产生抑制作用。

[0067] 进而，使用了双歧杆菌属细菌、乳酸菌的发酵乳食品或饮品通常会在保存中出现酸度上升等随时间而发生的变化，由此导致味道变差，已知这种随时间而发生的变化会因蔗糖等 2 糖类的使用而变得明显，尤其是无脂肪乳固体成分（非脂乳固体成分，SNF）浓度越高，变化越显著。但是，尽管其机理尚不清楚，本发明的两歧双歧杆菌即使是在发酵乳食品或饮品中与蔗糖等 2 糖类混合的情况下，也能抑制保存中的酸度的上升，能够抑制味道的劣化。具体地说，在使用本发明的两歧双歧杆菌、于蔗糖含量为 3 质量%以上（优选为 3 ~ 6 质量%左右）、非脂乳固体成分含量为 8 质量%以上（优选为 8 ~ 12 质量%左右）的发酵乳食品或饮品中，在 20℃ 的好氧条件下保存 4 天后的酸度与保存前（刚制造完时）的酸度之差为 2 以下，优选为 1 以下。此处，酸度是指，中和 9g 试样所需的 1/10 当量氢氧化钠水溶液的量 (ml)。

[0068] 由于具有上述那样的性质的本发明的两歧双歧杆菌具有幽门螺杆菌的除菌作用等，因此可以用作幽门螺杆菌的感染预防治疗剂。并且，对于本发明的两歧双歧杆菌的除菌作用，给予的活菌数越多，其药理作用越会增大，因此优选本发明的两歧双歧杆菌在活菌状态下使用。进而，由于本发明的两歧双歧杆菌具有高耐氧性，因此可以使大量的活菌到达胃和肠管内，可以良好地用于幽门螺杆菌的感染的预防治疗；胃炎、溃疡的预防治疗；胃不适的预防治疗；胃酸过多、胃食道逆流症的预防治疗等。

[0069] 并且，由于本发明的两歧双歧杆菌具有胃粘膜的保护作用、血清胃蛋白酶原 (PG) 值的改善作用，因此其也可以用于由应激性溃疡、乙醇等引起的坏死性溃疡、活动性胃炎、前庭部显性胃炎、胃体部显性胃炎、全胃胃炎 (pangastritis)、胃腺癌、过形成性息肉、胃底腺息肉、萎缩性胃炎、胃食道逆流症（逆流性食道炎）、胃不适（包括 NUD，非溃疡性消化不良）以及与幽门螺杆菌感染密切相关的胃癌等疾病的治疗、改善、或其预防等。

[0070] 另外，在被幽门螺杆菌感染的胃粘膜中会引起活动性胃炎（浅表性胃炎），其是以中性粒细胞和大量的单核细胞的浸润为特征的组织学胃炎。进而，随着这些胃炎的恶化，细胞的增殖受到抑制，细胞功能也降低，粘膜变得脆弱，变化为不出现活动性炎症症状的萎缩性胃炎。随着萎缩性胃炎的恶化，引起肠上皮化生，导致胃癌的危险性升高。另一方面，在活动性胃炎的状态下，受胃酸、胃蛋白酶等攻击因子或 NSAIDs 等药剂的影响，进而引起胃粘膜的组织损伤，从而导致胃溃疡、十二指肠溃疡等消化性溃疡。因此，具有幽门螺杆菌的除菌作用等的本发明的两歧双歧杆菌能够用作由幽门螺杆菌引起的胃炎和溃疡、特别是胃 / 十二指肠溃疡的预防治疗剂。进而，由于本发明的两歧双歧杆菌会降低与胃酸的分泌密切相关的血清胃蛋白酶原 I 值，因此能够用作胃酸过多的预防治疗剂、以抗生物物质等进行幽门螺杆菌的除菌治疗后发生的胃食道逆流症（逆流性食道炎）的预防治疗剂。

[0071] 并且，幽门螺杆菌的感染会诱发 IL-8、IL-1 β 、TNF- α 等炎症性细胞因子。IL-8 使中性粒细胞迁移至胃粘膜，成为引起局部炎症反应的原因。IL-1 β 和 TNF- α 除了诱导 IL-8 的产生外，据认为还具有降低胃酸分泌的作用，与胃粘膜萎缩有关系，胃粘膜受到对这些细胞因子的诱导能较高的幽门螺杆菌的感染而成为慢性的炎症状态，导致

胃粘膜功能受损。本发明的两歧双歧杆菌能够抑制由幽门螺杆菌的感染或 TNF- α 所诱导的 IL-8 的产生。并且,其抑制效果高于作为母株的一例的两歧双歧杆菌 YIT4007,且活菌数越多,抑制效果越强。

[0072] 将本发明的两歧双歧杆菌用作上述的幽门螺杆菌的感染预防治疗剂或用作胃炎、溃疡的预防治疗剂、胃不适的预防治疗剂以及胃酸过多、胃食道逆流症的预防治疗等的情况中,对于作为有效成分的两歧双歧杆菌的形态没有特别限制,只要是活菌的状态,既可以利用冷冻干燥后的产物,也可以利用含有细菌的培养物。

[0073] 并且,在上述幽门螺杆菌的感染预防治疗剂或胃炎、溃疡的预防治疗剂、胃不适的预防治疗剂、胃酸过多、胃食道逆流症的预防治疗剂中,可以将作为有效成分的两歧双歧杆菌与固体或液体的药用无毒性载体混合,或是通过并用以常用的药品制剂的形式给药。作为这样的制剂,可以举出例如片剂、颗粒剂、散剂、胶囊剂等固体制剂;溶液剂、悬浮剂、乳剂等液体制剂;冷冻干燥制剂等。这些制剂可以利用制剂上的通用方法来制备。作为上述药用无毒性载体,可以举出例如,葡萄糖、乳糖、蔗糖、淀粉、甘露醇、糊精、脂肪酸甘油酯、聚乙二醇、羟甲基淀粉、乙二醇、聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯、氨基酸、明胶、白蛋白、水、生理盐水等。并且,也可以根据需要适当添加稳定化剂、润湿剂、乳化剂、结合剂、等渗剂、赋形剂等常用的添加剂。作为有效成分的两歧双歧杆菌除了单剂给药外,还可以制造为用于消化性溃疡、逆流性食道炎、胃食道逆流症、功能性消化不良 (functional dyspepsia) 的胃酸分泌抑制剂与两歧双歧杆菌的合剂,并可与各有效成分同时给药,所述胃酸分泌抑制剂包括下述物质:西米替丁、雷尼替丁、法莫替丁、罗沙替丁、尼扎替丁、拉呋替丁、雷尼替丁等 H_2 -受体拮抗剂;奥美拉唑、兰索拉唑、雷贝拉唑等质子泵抑制剂;依卡倍特钠、奥诺前列素、恩前列素、米索前列醇、西曲酸酯、硫酸铝、索法酮、曲昔匹特、普劳诺托、替普瑞酮、聚普瑞锌、盐酸贝奈克酯 β 环糊精包合物、瑞巴匹特、舒必利、选择素、马来酸伊索拉定等胃粘膜保护剂等。此处所谓的胃粘膜保护剂是指具有防御因子增强作用、环氧化酶表达增强作用、前列腺素产生增强作用、粘液分泌增强作用、细胞保护作用、粘膜血流量增加作用、胃酸分泌抑制作用、重碳酸离子分泌增强作用、抗胃泌素作用、抗氧化作用、内源性选择素生成促进作用等作用的药剂或成分。进而,作为与两歧双歧杆菌同时给药的有效成分,可以使用盐酸哌吡氮平、硫酸阿托品等抗毒蕈碱剂;碳酸氢钠、氧化镁、氢氧化铝凝胶-氢氧化镁混合液、硅酸铝等抑酸剂;抗坏血酸、尿酸、白蛋白结合胆红素、 β 胡萝卜素、维生素 E、辅酶 Q、谷胱甘肽、半胱氨酸、胱氨酸、丙酮酸、植酸钙镁、植酸、木质素、皂苷、阿魏酸、 γ 氨基丁酸、 γ 谷维醇等天然材料;异黄酮、花色素苷、儿茶素、黄酮、黄酮醇、黄烷酮、查耳酮、咕吨酮、原花青素、果实多酚、茶叶多酚、可可多酚、咖啡多酚、绿茶多酚等多酚等。

[0074] 另外,作为本发明的幽门螺杆菌的感染预防治疗剂、胃炎、溃疡的预防治疗剂、胃不适的预防治疗剂、胃酸过多、胃食道逆流症的预防治疗剂的有效成分的两歧双歧杆菌至今用于食品,其安全性也得到了确认。因此,对其用于幽门螺杆菌的感染预防治疗剂、胃炎、溃疡的预防治疗剂、胃不适的预防治疗剂、胃酸过多、胃食道逆流症的预防治疗剂的情况下的给药量没有严格限制,对于优选的给药量,以活菌数计,每日为 10^5 CFU \sim 10^{13} CFU,特别优选为 10^9 CFU \sim 10^{13} CFU。

[0075] 并且, 本发明的幽门螺杆菌的感染预防治疗剂、胃炎、溃疡的预防治疗剂、胃不适的预防治疗剂、胃酸过多、胃食道逆流症的预防治疗剂不仅可以制成上述那样的制剂, 也可以混合在食品或饮品中来使用。混合在食品或饮品中的情况下, 既可以直接含有, 也可以与各种营养成分共同含有。该食品或饮品可以用作对幽门螺杆菌感染的预防或改善/治疗、胃炎、溃疡、胃不适、胃酸过多、胃食道逆流症的预防或改善/治疗有用的保健用食品或是食品材料。具体地说, 将本发明的幽门螺杆菌的感染预防治疗剂、胃炎、溃疡的预防治疗剂、胃不适的预防治疗剂、胃酸过多、胃食道逆流症的预防治疗剂混合进食品或饮品中的情况下, 既可以适当使用可用于食品或饮品的添加剂, 利用常用的方法成型为适于食用的形态(即, 颗粒状、粒状、片剂、胶囊、膏等), 也可以添加至各种食品(例如, 火腿、香肠等肉食加工食品; 鱼糕、鱼卷等水产加工食品; 面包、点心、黄油、奶粉)中来使用, 或是添加至水、果汁、牛奶、清凉饮料、茶饮料等饮料中来使用。由于本发明的两歧双歧杆菌具有高耐氧性, 因此不需要严密的厌氧状态, 从而可以适用于任意形态的食品或饮品。另外, 所述食品或饮品中包括动物的饲料。

[0076] 上述的食品或饮品中可以添加各种食品材料。可以添加例如: 葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、果糖、塔格糖、乳糖、葡萄糖果糖液糖、海藻糖、trehallose(トレハロース)、琼脂低聚糖、黑曲霉低聚糖、低聚半乳糖、低聚果糖、低聚木糖、棉子糖、水苏糖、乳果糖、麦芽三糖、低聚异麦芽糖、环糊精、蜂蜜、枫糖浆、黑砂糖、红薯糖浆等各种糖类; 肉浸膏、酵母浸膏、鱼肉浸膏、心脏浸膏、肝脏浸膏、肽等各种营养素; 藻酸、藻酸钠、岩藻依聚糖、马尾藻多糖、Fulceran(フルセラン)、海萝聚糖、紫菜聚糖、昆布糖、普鲁兰多糖、刺云实胶、魔芋葡甘聚糖、菊粉、 β -葡聚糖、几丁质、壳聚糖、聚右旋糖、透明质酸、硫酸软骨素、硫酸肝素、硫酸多糖类、神经节苷脂、硫酸脑苷酯、唾液酸、聚唾液酸、甘露聚糖、半乳聚糖、果聚糖、木聚糖、阿拉伯聚糖、阿拉伯半乳聚糖、葡糖甘露聚糖、半乳甘露聚糖、甜菜纤维、燕麦纤维、小麦纤维、大豆纤维、米糠纤维、大麦纤维、黄原胶、玉米纤维、苹果纤维、柑橘纤维、サイリウム(CYALUME)纤维、菠萝纤维、西梅纤维、香蕉纤维、醋酸菌细菌纤维素、乳酸菌菌体细胞壁、双歧杆菌属细菌菌体细胞壁、酵母菌体细胞壁、纳豆果聚糖、胶原质、纳豆聚谷氨酸等各种食物纤维或这些食物纤维的各种水解物或是它们的提取成分、小麦麸、大麦麸、米麸、野燕麦麸、燕麦麸、黑麦麸、サイリウム(一种膨胀性食物纤维, CYALUME)、米糠、玄米、菊苣、大豆渣、苹果浆、抗性淀粉、大麦麦芽、玉米种子外皮、乳酸菌菌体、双歧杆菌属细菌菌体、啤酒酵母菌体、葡萄酒酵母菌体、面包酵母菌体、葡萄酒糟、酒糟、酱油糟、啤酒糟、米曲、麦曲、豆曲、红曲、黄曲、纳豆粘质物、葡萄种子提取物、蜂蜜、蜂王浆、蜂胶、小球藻、螺旋藻、裸藻、芦荟、裙带菜、钩凝菜、岩生紫菜、江蓠、日本溪菜、石花菜、昆布、无肋马尾藻、黑海带、腔昆布、浅草紫菜、海青菜、羊栖菜、石莼、海藻等含有大量难消化性的食物纤维的各种材料或它们的提取成分等。

[0077] 并且, 上述的食品或饮品中也可以添加钙、镁、锌、铁、白云石等各种矿物质类或者这些矿物质类的各种盐类; 柠檬酸、苹果酸、酒石酸、葡糖酸、琥珀酸、富马酸、抗坏血酸、乳酸、醋酸、丙酸、丁酸、磷酸、氨基酸等各种酸类或者这些酸类的各种盐类; 谷胱甘肽、植酸钙镁、植酸、木质素、皂苷、阿魏酸、 γ -氨基丁酸、 γ -谷

维醇、查耳酮、黄烷酮、黄酮、黄酮醇、异黄酮、花青素、儿茶素、原花青素、茶叶多酚、类姜黄色素(クルクミド)、辣椒素、芝麻素酚、芝麻木质素、茶黄素、 β 二酮类、类胡萝卜素类、烯丙基硫化物、异硫氰酸酯类、萜烯类、叶绿素类、饱和脂肪酸类、n-3 多价不饱和脂肪酸类、n-6 多价不饱和脂肪酸类、共轭亚油酸类、磷脂质类、植物甾醇类、卵蛋白、乳蛋白、米蛋白、大麦蛋白、小麦蛋白、鱼肉蛋白、胶原质等各种天然物成分；维生素 A、维生素 B 类、维生素 C、维生素 D 类、维生素 E、维生素 K 类、 β 胡萝卜素、视黄酸、叶酸等各种维生素类；黑升麻、南瓜种子、石榴种子、贯叶连翘、西番莲、缬草、野葛、迷迭香、薄荷、荷兰芹、金盏花、蜜蜂花、艾蒿、红花、萝卜种子、咖啡树、五加、葫芦果实、橘科果皮、银杏叶、蕺菜、枣、枸杞子、甘草、灵芝、高丽参、瓜拉那、マクテイス树液等各种浸膏类或者它们的提取成分；绿茶、红茶、乌龙茶、甜茶、匙羹藤茶、番石榴叶等各种植物或者它们的提取成分；胡椒、山椒、姜黄、肉桂、芥末、辣椒粉、姜黄根、鼠尾草、百里香、罗勒、辣椒、肉豆蔻等各种香辛料或它们的提取成分等。

[0078] 进而，在上述的食品或饮品中还可以添加米、玄米、大麦、小麦、燕麦、黑麦、野燕麦、玉米、雁来红、稷、小米、荞麦、薏苡、稗子、高粱、葛(クズ)、木薯等各种谷物(叶、茎、种子、根、花、芽、皮、树液、果实等各部分)或者这些谷物的种子的发芽物成分或者它们的提取成分；南瓜、黄瓜、丝瓜、蕺菜、西芹、茄子、洋葱、蒜、鳄梨、小豆、白小豆、金时豆、四季豆、芸豆、豌豆、白芸豆、白豆、黑豆、青豆、毛豆、绿豆、蚕豆、大福豆、兵豆、红扁豆、紫甘薯、咸草、羽衣甘蓝、姜黄、蒲公英、土豆、红薯、芋头、魔芋、山芋、茄子、西红柿、苦瓜、青椒、芝麻、圆白菜、冬瓜、花茎甘蓝、花椰菜、生菜、生姜、牛蒡、里芋、葫芦、榕木芽、萝卜、山葵、辣椒、胡萝卜、菠菜、百合、小洋葱、紫苏、葱、韭菜、欧洲防风、大吴风草、红皮蒜、白菜、荷兰芹、罗勒、蕨菜、问荆、王紫萁、竹笋等各种蔬菜(叶、茎、种子、根、花、芽、皮、树液、果实等各部分)或者这些蔬菜的种子的发芽物或者它们的提取成分；香菇、蕈、灰树花菌、金针菇、黑木耳、荷叶蘑、真姬菇、滑菇、平菇、杏鲍菇、松茸等蘑菇类或者这些蘑菇类的提取成分；葡萄、柿子、柠檬、苹果、樱桃、李子、草莓、橙子、番石榴、香蕉、蓝莓、黑莓、蔓越橘、木莓、越橘、杨梅、南美捻、树番茄、西印度樱桃、橄榄、椰子、酸橙、台湾香檬、甜瓜、桃、杨梅、荔枝、芒果、柚子、木瓜、菠萝、梨、梅子、葡萄柚、花梨、杏、梅、日本夏橙、枇杷、桔子、石榴、毛诃子、西瓜、李子、西梅、猕猴桃等水果(叶、茎、种子、根、花、芽、皮、树液、果实等各部分)或者它们的提取成分；杏仁、腰果、花生、松籽、澳洲坚果、栗子、白果、核桃、可可、咖啡等各种坚果(叶、茎、种子、根、花、芽、皮、树液、果实等各部分)或者它们的提取成分等。

[0079] 并且，还可以进一步向上述的食品或饮品中添加酪蛋白、乳清蛋白等乳蛋白或者其水解物、乳肽、氨基酸、乳清、白脱奶、乳脂、乳脂肪球膜、乳铁蛋白、含有唾液酸的寡糖等乳成分等。

[0080] 进而，还可以向上述的食品或饮品中添加美拉德反应物、类黑精、含有抗幽门菌鸡卵抗体的鸡卵黄蛋白、可可、巧克力、咖啡、绿茶、乌龙茶、红茶、麦茶、葡萄酒、啤酒、绍兴酒、清酒、乙醇等具有抗幽门菌作用的食物材料。

[0081] 上述的食品或饮品中，优选以活菌状态含有作为有效成分的两歧双歧杆菌的发酵乳、乳酸菌饮料、发酵豆乳、发酵果汁、发酵植物液等发酵乳食品或饮品。这些发酵乳食品或饮品的制造可以依照常规方法，例如对于发酵乳，在杀菌后的乳培养基中单独接种本发明的两歧双歧杆菌或将其与其他的微生物同时接种进行培养，对其进行均质化处理，得到发酵乳基体。然后添加另行制备的糖浆溶液进行混合，用匀质器等进行均质化，进而添加提味剂、食品材料，制成最终的制品。如此得到的发酵乳可以制成原味型、软型、水果提味剂型、固形、液状等任意形态的制品。

[0082] 并且，优选在上述发酵乳食品或饮品中与两歧双歧杆菌一起合用选自乳杆菌属细菌、链球菌属细菌和乳球菌属细菌中的 1 种以上的乳酸菌来制造发酵乳食品或饮品，因为这样能够获得较高的嗜好性，可以持续饮用。

[0083] 另外，本发明的两歧双歧杆菌即使在使用 2 糖类等的甜味剂、特别是蔗糖的情况下，也能够抑制保存中的酸度上升，能够抑制味道的劣化，因此可以良好地用于添加了该两歧双歧杆菌的发酵乳食品或饮品中。

[0084] 迄今为止，含有双歧菌的食品或饮品主要使用由玻璃、铝涂敷纸等不透氧性的包裹材料构成的容器以提高保存时的存活性。但是，由于本发明的两歧双歧杆菌具有高耐氧性，不需要严密的厌氧状态，因此仅将含有该两歧双歧杆菌的食品或饮品填装在容器中即可，容器的包裹材料可以是不透氧性或透氧性中的任一种，与由不透氧性的包裹材料构成的容器相比，由透氧性的包裹材料构成的容器的成本低，成型的自由度高，因此优选使用由透氧性的包裹材料构成的容器。作为这种由透氧性包裹材料构成的容器，可以举出，每个容器的透氧量为 0.05ml 以上 /24h · atm、在 25℃ 具有透氧性的容器（例如，聚苯乙烯容器（聚苯乙烯表面积为 125.6cm²，铝盖部表面积为 5cm²（铝盖部的透氧量为 0ml））：2.1ml/24h · atm、25℃；低密度聚乙烯容器（低密度聚乙烯表面积为 125.6cm²，铝盖部表面积为 5cm²（铝盖部的透氧量为 0ml））：1.4ml/24h · atm、25℃；高密度聚乙烯容器（高密度聚乙烯表面积为 125.6cm²，铝盖部表面积为 5cm²（铝盖部的透氧量为 0ml））：0.63ml/24h · atm、25℃；聚对苯二甲酸乙二醇酯容器（聚对苯二甲酸乙二醇酯表面积为 125.6cm²，低密度聚乙烯盖部表面积为 5cm²）：0.08ml/24h · atm、25℃；乙烯乙烯醇 - 低密度聚乙烯复合容器（乙烯乙烯醇表面积为 125.6cm²，低密度聚乙烯盖 (lid) 部表面积为 20.9cm²）：0.23ml/24h · atm、25℃；乙烯乙烯醇 - 高密度聚乙烯复合容器（乙烯乙烯醇表面积为 125.6cm²，高密度聚乙烯盖 (lid) 部表面积为 20.9cm²）：0.10ml/24h · atm、25℃）等（上述透氧量均是每 100ml 容量的容器的数值）。

[0085] 实施例

[0086] 下面根据实施例、试验例来进一步详细地说明本发明的内容，但本发明不受这些的任何限制。

[0087] 实施例 1

[0088] 两歧双歧杆菌 YIT 4007 的育种改良：

[0089] 以两歧双歧杆菌 YIT 4007 (FERM BP-791) 为母株，将其接种于非脂乳固体成分为 14 质量%的脱脂乳中，于 37℃ 培养直至 pH4.8，由此制备菌液。向该菌液中添加另行制备的下述菌液（混合比例 20 : 1），最后添加含有葡萄糖果糖液糖的糖浆液以使最终浓度为 3 质量%，制备发酵乳食品或饮品。所述另行制备的菌液如下制备：将嗜热链球菌

YIT 2021 接种于非脂乳固体成分为 14 质量%的脱脂乳中于 37℃培养直至 pH4.3。

[0090] 将该发酵乳食品或饮品如下保存在好氧条件下，由存活的菌中选出耐氧性高的细菌。首先，在 10L 的罐中装进 10L 上述制备的发酵乳食品或饮品，以 7L/ 分钟的比例输送空气以使溶存氧浓度为 12mg/L 以上，在以 60rpm 的速度搅拌下于 2℃保存。保存 21 天后提取存活菌，以该存活菌作母株，与上述相同地制备菌液，进而进行发酵乳食品或饮品的制备。将该发酵乳食品或饮品于 2℃进行 21 天的通气搅拌进行保存。重复三次此操作，将存活性高的菌株浓缩，将第 3 次的存活菌涂在 TOS 丙酸琼脂培养基 (Yakult 药品工业制造) 上，分离出 24 株单一的菌落。

[0091] 使用上述分离的菌株之一与作为母株的 YIT 4007，与上述相同地制备发酵乳食品或饮品。向由具有透氧性的聚苯乙烯构成的容量为 100ml 的容器 (聚苯乙烯表面积为 125.6cm²；透氧量 (每个容器) 2.1ml/24h · atm、25℃) 中装入 100ml 上述制备的发酵乳食品或饮品，于 10℃保存 (好氧条件下保存)。测定刚制造完时和保存后的菌数，对存活性进行了比较，其结果，作为显示出优于 YIT 4007 的存活性的微生物，得到了 YIT 10347。如表 3 所示，对于保存 14 天后的存活率，相对于 YIT 4007 为 2%，YIT10347 为 30%。

[0092] 【表 3】

[0093]

菌株	菌数(CFU/ml)		存活率(%)
	刚制造完	14 天后	
YIT 4007	1.1×10^9	2.0×10^7	2
YIT 10347	2.2×10^9	6.6×10^8	30

[0094] 实施例 2

[0095] 两歧双歧杆菌 YIT 10347 的性状试验：

[0096] 通过对上述两菌株的菌落性状、菌形态、糖发酵性状进行比较以及以下的实验，确认到两歧双歧杆菌 YIT 10347 是以两歧双歧杆菌 YIT 4007 为母株的育种改良菌株。

[0097] (1) 利用菌种特异的引物进行的菌种判定

[0098] 利用使用玻璃珠的氯化苄法 (Nuc.Acid.Res 21, 5279-5280 (1993)) 由 1ml 两歧双歧杆菌 YIT 10347 和 YIT 4007 的菌液中提取 DNA。以该 DNA 为模板，通过使用对两歧双歧杆菌具有特异性的引物 (FEMS Microbiol.Letts.167, 113-121 (1998)) 的 PCR 法进行了菌种的确认。其结果，在两菌株中都确认到两歧双歧杆菌所特有的扩增，从而判定两菌株为两歧双歧杆菌 (图 1)。

[0099] BiBIF-1 (序列编号 1)：

[0100] 5' -CCACATGATCGCATGTGATTG-3'

[0101] BiBIF-2 (序列编号 2)：

[0102] 5' -CCGAAGGCTTGCTCCCAA-3'

[0103] (2) 利用随机扩增多态 DNA (RAPD : Random amplified polymorphic DNA) 进行菌

株识别

[0104] 以与上述同样地提取出的 DNA 为模板, 通过使用 6 种引物 (Nuc.Acid.Res 20, 5137-5142(1992)) 的 RAPD 进行了比较。YIT 4007 和 YIT10347 在全部的引物中都显示出相同的谱带, 从而显示出两菌株为遗传学上极为接近的菌株。另外, 图 2 给出了谱带可见多种的引物 A 和 E 的谱带。

[0105] 引物 A(序列编号 3): CCGCAGCCAA

[0106] 引物 B(序列编号 4): AACGCGCAAC

[0107] 引物 C(序列编号 5): GCGGAAATAG

[0108] 引物 D(序列编号 6): GAGGACAAAG

[0109] 引物 E(序列编号 7): CGAACTAGAC

[0110] 引物 F(序列编号 8): GTAGACAAGC

[0111] (3) 利用基于限制性酶的 DNA 多态解析 (RFLP: Restriction fragment length polymorphisms) 进行菌株识别

[0112] 使用两菌株的培养菌液, 对于与低熔点琼脂糖 (LMP 琼脂糖: BIO-RAD 制造) 混和制成的琼脂糖块, 使用溶菌酶进行溶菌后, 使用蛋白分解液 (蛋白酶 K) 除去蛋白质, 用清洗用缓冲液 (20mM Tris、50mM EDTA) 进行清洗。然后, 向琼脂糖块中分别添加 60 单位的 Xba I (识别序列: T⁺CTAGA)、Hind III (识别序列: AA⁺GCTT) 和 VspI (识别序列: AT⁺TAAT) 等各限制性酶 (均为 Takara 制造), 于 4℃ 放置一夜后, 于 37℃ 反应 24 小时, 进行酶处理。酶处理结束后, 使用脉冲场电泳仪 (CHEF MAPPER: BIO-RAD 制造) 利用 1 质量% 琼脂糖凝胶 (PFC Agarose: BIO-RAD 制造) 进行脉冲电场电泳。电泳后, 以 0.5mg/L 的溴化乙锭溶液染色 30 分钟, 用蒸馏水脱色 30 分钟后, 在紫外线下拍摄照片, 通过肉眼进行 DNA 多态的解析。对于任一种限制性酶, 两菌株的 RFLP 解析结果完全一致 (图 3)。

[0113] 实施例 3

[0114] 存活性确认试验:

[0115] 分别使用两歧双歧杆菌 YIT 10347 和 YIT 4007, 如下制备发酵乳食品或饮品。即, 在非脂乳固体成分为 14 质量% 的脱脂乳上分别接种上述两歧双歧杆菌各 2 质量%, 于 37℃ 培养直至 pH4.8, 在 15MPa 均质化, 制备成菌液 A。另一方面, 在非脂乳固体成分为 14 质量% 的脱脂乳上接种 0.1 质量% 嗜热链球菌, 于 37℃ 培养直至 pH4.3, 在 15MPa 均质化, 制备成菌液 B。然后, 制备含有蔗糖的糖浆液以使混合后的最终浓度为 4 质量%。将菌液 A、菌液 B 和糖浆液以 55 : 3 : 42 的比例混合, 制备成非脂乳固体成分为 8.1 质量% 的发酵乳。

[0116] 向容量为 100ml 的不透氧性纸-铝复合容器 (表面积为 143cm²; 透氧量 (每个容器) 为 0ml/24h · atm、25℃) 和透氧性聚苯乙烯容器 (聚苯乙烯表面积为 125.6cm²; 透氧量 (每个容器) 为 2.1ml/24h · atm、25℃) 中分别装进上述制备的发酵乳各 100ml, 于 10℃ 保存 14 天。测定刚制造完时和保存后的菌数, 对两歧双歧杆菌的存活性进行了比较。另外, 纸-铝复合容器在厌氧条件下保存相当于聚苯乙烯容器在好氧条件下保存。

[0117] 其结果, YIT 4007 在透氧性聚苯乙烯容器中的存活率为 2%, YIT10347 在透氧性聚苯乙烯容器中的存活率为 34%, 保持了高于 YIT 4007 的存活性 (表 4)。

[0118] 【表 4】

[0119]

菌株	容器	菌数(CFU/ml)		存活率(%)
		刚制造完	14 天后	
YIT 4007	纸-铝复合	1.5×10^9	5.7×10^8	38
	聚苯乙烯	1.3×10^9	2.6×10^7	2
YIT 10347	纸-铝复合	1.9×10^9	1.0×10^9	53
	聚苯乙烯	2.0×10^9	6.8×10^8	34

[0120] 实施例 4

[0121] 性状变化确认试验：

[0122] 分别使用两歧双歧杆菌 YIT 10347 和 YIT 4007，如下制备发酵乳食品或饮品。即，在非脂乳固体成分为 14 质量%的脱脂乳上分别接种上述 YIT 10347 和 YIT 4007 各 2 质量%，于 37℃ 培养直至 pH4.8，在 15MPa 均质化，制备成菌液 A。另一方面，在非脂乳固体成分为 14 质量%的脱脂乳上接种 0.1 质量%的嗜热链球菌，于 37℃ 培养直至 pH4.3，在 15MPa 均质化，制备成菌液 B。然后，制备含有蔗糖（最终浓度 4.2 质量%）或葡萄糖糖果糖液糖（最终浓度 5.6 质量%）作为甜味剂的糖浆液。将菌液 A、菌液 B 和糖浆液以 55 : 3 : 42 的比例混合，制备成非脂乳固体成分为 8.1 质量%的发酵乳食品或饮品。

[0123] 将 100ml 上述制备的发酵乳食品或饮品装进与实施例 1 相同的聚苯乙烯容器中，于 20℃ 保存 4 天（好氧条件下保存）。对于刚制造完时和保存后的状态，测定了酸度和 pH，并请 10 名评审员进行了味道评价。另外，味道评价的评价标准如下所示。

[0124] 其结果，使用蔗糖作为甜味剂的情况下，与 YIT 4007 相比，YIT 10347 在 20℃ 保存 4 天后的酸度变化也较小，并且，在味道方面，酸臭、发酵臭味轻，为良好。另一方面，使用葡萄糖糖果糖液糖作为甜味剂的情况下，在 20℃ 保存 4 天后的酸度和味道变化方面，YIT 4007 与 YIT 10347 之间未见差异（表 5 和表 6）。

[0125] <味道评价标准>

[0126] （评分）（内容）

[0127] +2：味道非常好

[0128] +1：味道好

[0129] ±0：味道一般

[0130] -1：味道差

[0131] -2：味道非常差

[0132] 【表 5】

[0133]

甜味剂	菌株	酸度		pH	
		刚制造完	保存后	刚制造完	保存后
蔗糖	YIT 10347	5.5	6.2	4.89	4.88
	YIT 4007	5.6	7.7	4.81	4.66
葡萄糖果 糖液糖	YIT 10347	5.5	7.5	4.87	4.70
	YIT 4007	5.6	7.3	4.84	4.71

[0134] 【表 6】

[0135]

甜味剂	菌株	味道(平均值)		自由描述
		刚制造完	保存后	保存后
蔗糖	YIT 10347	0.88	0.28	温和, 酸臭味轻, 有乳感
	YIT 4007	0.90	-0.15	发酵臭-酸臭味重, 酸味重
葡萄糖果 糖液糖	YIT 10347	0.70	-0.03	有酸味, 爽滑
	YIT 4007	0.75	0.03	温和的酸味, 有层次, 爽滑

[0136] 实施例 5

[0137] 乳酸菌饮品的制造:

[0138] 将 70g 全脂奶粉、0.1g 乳肽溶解于 290g 水中, 于 135℃ 杀菌 3 秒钟后, 接种 2 质量% 的两歧双歧杆菌 YIT 10347, 于 37℃ 培养直至 pH4.8, 在 15MPa 均质化, 得到 360g 菌液 A。另一方面, 将 6g 脱脂奶粉溶解于 24g 水中, 于 120℃ 杀菌 3 秒钟后, 接种 0.1 质量% 的嗜热链球菌 YIT 2021, 于 37℃ 培养直至 pH4.3, 在 15MPa 均质化, 得到 30g 菌液 B。并且, 将 50g 蔗糖、5g 羧甲基纤维素、1g 结冷胶、0.1g 三氯蔗糖、0.5g DL 苹果酸、1g 香料溶解于水中, 加水使总量为 610g, 将其于 120℃ 杀菌 3 秒钟后, 得到糖浆液。混合菌液 A、菌液 B 和糖浆液, 装进容量为 100ml 的乙烯乙醇-低密度聚乙烯复合容器 (乙烯乙醇表面积为 125.6cm², 低密度聚乙烯盖 (lid) 部表面积为 20.9cm²; 透氧量 (每个容器) 为 0.23ml/24h · atm、25℃), 得到非脂乳固体成分为 5.5 质量% 的乳酸菌饮料。另外, 该乳酸菌饮料中 YIT 10347 的初始菌数为 1.3×10⁹CFU/ml。

[0139] 将该乳酸菌饮品于 10℃ 保存 14 天后, YIT 10347 的存活率为 14%, 味道也良好。并且, 于 20℃ 保存 4 天后, 酸度变化为 0.6, 也较小, 未见味道劣化。

[0140] 实施例 6

[0141] 发酵乳的制造:

[0142] 将 80g 脱脂奶粉溶解于 470g 水中, 于 135℃ 杀菌 3 秒钟后, 接种 2 质量% 的两歧双歧杆菌 YIT 10347, 于 37℃ 培养直至 pH4.8, 在 15MPa 均质化, 得到 550g 菌液 A。另一方面, 将 5g 脱脂奶粉溶解于 25g 水中, 于 120℃ 杀菌 3 秒钟后, 接种 0.1 质量% 的嗜热链球菌 YIT 2021, 于 37℃ 培养直至 pH4.3, 在 15MPa 均质化, 得到 30g 菌液 B。并且,

将 60g 葡萄糖果糖液糖、5g 羧甲基纤维素溶解于水中，添加 1g 香料，进而添加水，使总量为 420g，将其在 120℃ 杀菌 3 秒钟，得到糖浆液。混合菌液 A、菌液 B 和糖浆液，填充进与实施例 1 相同的聚苯乙烯容器，得到非脂乳固体成分为 8.1 质量% 的发酵乳。另外，该发酵乳中的 YIT 10347 的初始菌数为 2.6×10^9 CFU/ml。

[0143] 将该乳酸菌于 10℃ 保存 14 天后，YIT 10347 的存活率为 35%，味道也良好。并且，于 20℃ 保存 4 天后，酸度变化为 0.7，也较小，未见味道劣化。

[0144] 试验例 1

[0145] 对人体胃细胞的粘结性试验：

[0146] 将两歧双歧杆菌 YIT 10347 或 YIT 4007 接种于 GAM 肉汤培养基（日水制药制造），于 37℃ 厌氧培养 20 小时。将该培养液以 3,000rpm 的速度离心 10 分钟，沉淀出菌体，以磷酸缓冲液生理盐水（PBS）清洗 2 次后，使用 RPMI 1640（Gibco 制：无胎牛血清（FBS）、无抗生素）进行悬浮，由此制备菌株的悬浮液。并且，对于作为阴性对照使用的嗜热链球菌 YIT2021（FERM BP-7537），将其接种于 MRS 培养基（Difco 制造），同样地进行培养、悬浮，制备菌株的悬浮液。进而，对于作为阳性对照使用的加氏乳杆菌（市售品分离株），由市售的酸奶（明治 Probio 酸奶 LG21：明治乳业制造）分离出，将其接种在 MILS 培养基（Iwata & Morishita, Letter in Applied Microbiology, vol 9, 165-168, 1989）中，同样地进行培养、悬浮，制备菌株的悬浮液。另外，据报道，该加氏乳杆菌具有对人体胃细胞的粘结性和幽门螺杆菌的除菌作用。

[0147] 使用添加有 15 容量% FBS 的 eagle's MEM 培养基（无抗生素），在设定为 37℃ 的二氧化碳温育器中，在 24 孔胶原蛋白包被培养板（住友 Bakelite 制造）上培养源自人体胃的细胞株（GCIY 株：由理化学研究所生物资源中心获得）直至半汇合。每孔中的 GCIY 株细胞数为平均 6.53×10^4 个/孔。用上述 RPMI 1640 清洗各孔后，添加上述制备的各菌株的悬浮液，保温 90 分钟，进一步用上述 RPMI 1640 清洗 2 次，除去未粘结菌。将处理后的 GCIY 株细胞悬浮在 0.25W/V% 胰蛋白酶-1mM EDTA 溶液中，用 0.1W/V% 酵母浸膏溶液适当稀释，涂抹在对应各菌株选择的培养基（两歧双歧杆菌：TOS 丙酸琼脂培养基（Yakult 药品工业株式会社制造）；嗜热链球菌、加氏乳杆菌：添加有琼脂的 MRS 培养基（Difco 制造））上，由生成的菌落数计算出对 GCIY 株的粘结菌数（图 4）。

[0148] 对于两歧双歧杆菌 YIT 10347 和 YIT 4007 对 GCIY 株的粘结性，与作为阴性对照的嗜热链球菌 YIT 2021 相比，粘结菌数为 10 倍，大致一致，判断两菌株的粘结性为同等程度。并且，两菌株比作为阳性对照的加氏乳杆菌市售品分离株的粘结菌数稍多。

[0149] 试验例 2

[0150] 阻断幽门螺杆菌粘结人体胃细胞的阻断试验：

[0151] < 实验 A：双歧菌和源自人体胃的细胞株 GCIY 株的预培养体系 >

[0152] 使用添加有 15 容量% FBS 的 Leibovitz's L-15 培养基，在设定为 37℃ 的二氧化碳温育器中，在 96 孔胶原蛋白包被培养板上遮光培养源自人体胃的细胞株（GCIY 株）2~5 天直至半汇合。将与试验例 1 同样培养的各试验菌株悬浮在磷酸缓冲液（PBS）中（最终浓度为 $10^8 \sim 10^9$ CFU/ml），添加在各孔中，于 37℃ 预保温 2 小时。另一方面，用添加有 20mM 的 HEPES 的 Leibovitz's L-15 培养基（未添加 FBS）清洗 1 次，在添加有 10 容量% 牛血清的布氏肉汤培养基（Becton Dickinson 制造）上于 37℃ 在微好氧培养

(5%氧、10%二氧化碳、85%氮)条件下培养幽门螺杆菌 40 小时。将所得到的幽门螺杆菌溶液(最终浓度 10^7 CFU/ml)添进各孔,于 37℃保温 90 分钟后,用 PBS 清洗,进而添加 8W/V%多聚甲醛溶液,于 4℃放置一夜。再以 PBS 清洗 2 次后,添加含有 1W/V%过氧化氢的甲醇溶液,于室温静置 10 分钟,清洗后,添加 100 μ l 的经 PBS(该 PBS 中添加有 0.25W/V% BSA(牛血清白蛋白))稀释了 200 倍的抗幽门螺杆菌抗体(Anti H.p.(鼠 IgG1); Cat.#2007; SYN BIO 制造),于 37℃保温 2 小时。然后进行清洗,添加 100 μ l 的经 PBS(该 PBS 添加有 0.25W/V%牛血清白蛋白(BSA))稀释了 1,000 倍的抗小鼠 IgG 抗体(过氧化物酶偶联, Cappel 制造),于 37℃保温 1 小时,清洗后用 ABTS 显色试剂使其显色,用 1W/V%十二烷基硫酸钠(SDS)终止反应,测定 405nm 下的吸光值。利用下式求出幽门螺杆菌对 GCIY 株的粘附抑制率(%) (图 5)。

[0153] 抑制率(%) = $(1-A/B) \times 100$

[0154] A: 添加各试验菌株悬浮液时的吸光度

[0155] B: 未添加各试验菌株悬浮液时的吸光度

[0156] 结果可知,通过预先使 YIT 10347 和 YIT 4007 作用于 GCIY 株,阻断了之后添加的幽门螺杆菌的粘附。特别地, YIT 10347 的阻断活性较强,是作为阴性对照的嗜热链球菌 YIT 2021 的约 6 倍,并且其阻断活性也强于作为阳性对照的加氏乳杆菌(市售品分离株)。这些结果说明,与作为母株的 YIT 4007 相同, YIT 10347 具有对幽门螺杆菌的感染预防作用 and 对抗再感染的预防作用。

[0157] < 实验 B: 双歧菌和幽门螺杆菌的预培养系 >

[0158] 将与实验 A 同样制备出的幽门螺杆菌溶液(10^7 CFU/ml)和各试验菌株的 PBS 悬浮液(最终浓度 $10^8 \sim 10^9$ CFU/ml)在添加有 20mM 的 HEPES 的 Leibovitz' s L-15 培养基(未添加 FBS)中于 37℃预培养 2 小时。并且,与实验 A 同样地对源自人体胃的细胞株 GCIY 株进行培养直至半汇合,用上述 Leibovitz' s L-15 培养基清洗 1 次后,在孔中添加上述预培养液,于 37℃保温 90 分钟后,用 PBS 清洗,添加 8W/V%多聚甲醛溶液,于 4℃放置一夜。之后的操作与实验 A 同样地进行,求出幽门螺杆菌对 GCIY 株的粘附抑制率(%) (图 6)。

[0159] 结果可知,通过预先使 YIT 10347 和 YIT 4007 与幽门螺杆菌共存,阻断了幽门螺杆菌对 GCIY 株的粘附。这说明, YIT 10347 和 YIT 4007 直接作用于幽门螺杆菌,抑制了其感染力。并且, YIT 10347 的阻断活性较强,是作为阴性对照的嗜热链球菌 YIT 2021 的约 3 倍,作为阳性对照的加氏乳杆菌市售品分离株与作为阴性对照的 YIT 2021 显示出同等程度的抑制率。这些结果说明,与作为母株的 YIT 4007 相同, YIT 10347 具有抗幽门螺杆菌作用,即,具有抑制幽门螺杆菌感染状态下的幽门螺杆菌的活性和作用的作用。

[0160] 试验例 3

[0161] 两歧双歧杆菌 YIT 10347 对于由幽门螺杆菌感染而导致的诱导自人体胃细胞的 IL-8 的抑制效果试验:

[0162] 将两歧双歧杆菌 YIT 10347 接种于 MILS 培养基,于 37℃进行 20 小时的厌氧培养。以 5,000rpm 的速度对培养液进行 5 分钟离心,收集菌体,用添加有 15 容量% FBS 的 eagle' s MEM 培养基(无抗生素)清洗 3 次后,在添加有少量 15 容量% FBS 的 eagle' s

MEM 培养基（无抗生素）中悬浮。另一方面，使用添加有 15 容量% FBS 的 eagle' s MEM 培养基（无抗生素），在 37℃ 的二氧化碳温育器中，在 96 孔的胶原蛋白包被微孔培养板上培养源自人体胃的细胞株（GCIY 株）直至汇合（ $1 \sim 2 \times 10^5$ 个/cm²）。除去孔中的培养基，更换新的培养基后，在 GCIY 细胞上添加之前的 YIT 10347 的悬浮液以使最终浓度为 10^7 CFU/ml 或 10^8 CFU/ml，进一步培养 6 小时（前培养）。并且，以仅用培养基的前培养产物作为对照。除去孔中的培养基，用 PBS 对孔清洗 3 次除去 YIT 10347 后，与新的培养基一起添加幽门螺杆菌以使最终浓度为 10^7 CFU/ml，或者不进行添加而培养 GCIY 细胞 24 小时。培养完毕后，由孔中采集培养上清液，利用 ELISA 法测定培养上清液中的 IL-8 的量（图 7）。

[0163] 结果如图 7 所示，在添加 YIT 10347 进行了前培养的细胞中，在其后的幽门螺杆菌感染中所诱导的 IL-8 量低于仅用培养基进行了前培养的对照组。并且，对于 IL-8 量的降低率，添加 10^7 CFU/ml 进行了前培养的产物中为 17%，添加 10^8 CFU/ml 的产物中为 38%。这些说明，YIT 10347 具有抑制由幽门螺杆菌感染导致的诱导自胃上皮细胞的白细胞转移因子 IL-8 的产生的作用，会改善由幽门螺杆菌感染导致的胃的炎症。并且说明，活菌数越多，其抑制效果越强。

[0164] 试验例 4

[0165] 两歧双歧杆菌 YIT 10347 对于由 TNF- α 的添加而导致的诱导自人体胃细胞的 IL-8 的抑制效果试验：

[0166] 将两歧双歧杆菌 YIT 10347 接种于 MILS 培养基，于 37℃ 进行 20 小时的厌氧培养。以 5,000rpm 的速度对培养液进行 5 分钟离心，收集菌体，用添加有 15 容量% FBS 的 eagle' s MEM 培养基（无抗生素）清洗 3 次后，在添加有少量 15 容量% FBS 的 eagle' s MEM 培养基（无抗生素）中悬浮。另一方面，使用添加有 15 容量% FBS 的 eagle' s MEM 培养基（无抗生素），在 37℃ 的二氧化碳温育器中，在 96 孔的胶原蛋白包被微孔培养板上培养源自人体胃的细胞株（GCIY 株）直至汇合（ $1 \sim 2 \times 10^5$ 个/cm²）。除去孔中的培养基，更换新的培养基后，在 GCIY 细胞上添加之前的 YIT 10347 的悬浮液以使最终浓度为 10^7 CFU/ml 或 10^8 CFU/ml，进一步培养 6 小时（前培养）。并且，以仅用培养基的前培养产物作为对照。除去孔中的培养基，用 PBS 对孔清洗 3 次除去 YIT 10347 后，与新的培养基一起添加 TNF- α 以使最终浓度为 10ng/ml，培养 GCIY 细胞 24 小时。培养完毕后，由孔中采集培养上清液，利用 ELISA 法测定培养上清液中的 IL-8 的量（图 8）。

[0167] 结果如图 8 所示，对于添加 YIT 10347 对 GCIY 细胞进行前培养的产物来说，在其后的 TNF- α 处理所诱导的 IL-8 量低于仅用培养基进行了前培养的对照组。对于 IL-8 量的降低率，添加 10^7 CFU/ml 进行了前培养的产物中为 36%，添加 10^8 CFU/ml 进行了前培养的产物中为 40%。这些说明，YIT 10347 具有抑制由作为炎症反应的介质的 TNF- α 所诱导的白细胞转移因子 IL-8 的产生的作用。即，这些结果说明 YIT 10347 可能会改善与 TNF- α 相关的各种炎症。

[0168] 试验例 5

[0169] 培养液中的两歧双歧杆菌 YIT 10347 对幽门螺杆菌的抑制效果试验：

[0170] 在用盐酸调整为 pH5.8 的添加有 10 容量% 牛血清的布氏肉汤培养基中接种 1×10^5 CFU/ml 的幽门螺杆菌和 1×10^7 CFU/ml 的两歧双歧杆菌 YIT 10347，在 37℃ 的微

好氧条件下振荡培养。从该混合培养的培养液中经时采集一部分，涂布在螺杆菌琼脂培养基（日本制药制造）和 TOS 丙酸琼脂培养基（Yakult 药品工业制造）的平板上。前者在 37℃、微好氧、5 天的条件下培养，后者在 37℃、厌氧、3 天的条件下培养，培育出菌落，测定两菌的活菌数。并且，作为对照，对仅接种幽门螺杆菌的培养物经时地测定活菌数（图 9）。

[0171] 结果如图 9 所示，单独使用幽门螺杆菌的对照中，在 48 小时后，幽门螺杆菌增殖至 1×10^7 CFU/ml，而与 YIT 10347 共存的情况下，幽门螺杆菌的活菌数随着培养时间而降低，48 小时后减少至 1×10^3 CFU/ml 以下。并且，此时 YIT 10347 的活菌数增加至接种时的 10 倍以上。这些结果说明，在共存有 YIT 10347 的活菌的条件下，幽门螺杆菌的增殖受到 YIT 10347 的抑制。即，在人体摄入活菌状态的 YIT 10347 的情况下，也可以认为会抑制胃内幽门螺杆菌的增殖。

[0172] 试验例 6

[0173] 两歧双歧杆菌 YIT 10347 和 YIT 4007 对于由幽门螺杆菌感染而导致的诱导自人体胃细胞的 IL-8 的抑制效果比较试验：

[0174] 将两歧双歧杆菌 YIT 10347 或 YIT 4007 接种于 MILS 培养基，于 37℃ 进行 20 小时的厌氧培养。以 5,000rpm 的速度对培养液进行 5 分钟离心，收集菌体，用添加有 15 容量% FBS 的 eagle' s MEM 培养基（无抗生素）清洗 3 次后，在添加有少量 15 容量% FBS 的 eagle' s MEM 培养基（无抗生素）中悬浮。另一方面，使用添加有 15 容量% FBS 的 eagle' s MEM 培养基（无抗生素），在 37℃ 的二氧化碳温育器中，在 96 孔的胶原蛋白包被微孔培养板上培养源自人体胃的细胞株（GCIY 株）直至汇合（ $1 \sim 2 \times 10^5$ 个/cm²）。除去孔中的培养基，更换新的培养基后，在 GCIY 细胞上添加之前的 YIT10347 或 YIT 4007 的悬浮液以使最终浓度为 10^6 CFU/ml，进一步培养 6 小时（前培养）。并且，以仅用培养基的前培养产物作为对照。除去孔中的培养基，用 PBS 对孔清洗 3 次除去两歧双歧杆菌的菌体后，与新的培养基一起添加幽门螺杆菌以使最终浓度为 10^7 CFU/ml，或者不进行添加而培养 GCIY 细胞 24 小时。培养完毕后，由孔中采集培养上清液，利用 ELISA 法测定培养上清液中的 IL-8 的量（图 10）。

[0175] 结果如图 10 所示，在添加 YIT 4007 或 YIT 10347 进行了前培养的细胞中，在其后的幽门螺杆菌感染中所诱导的 IL-8 量低于仅用培养基进行了前培养的对照组。对于 IL-8 量的降低率，添加 YIT 4007 进行了前培养的产物中为 7%，而添加 YIT 10347 进行了前培养的产物中的降低率较大，为 28%。这些说明，YIT 10347 以及 YIT 4007 具有抑制由幽门螺杆菌感染导致的诱导自胃上皮细胞的白细胞转移因子 IL-8 的产生的作用，对于其抑制效果，YIT 10347 强于 YIT 4007。

[0176] 试验例 7

[0177] 两歧双歧杆菌 YIT 10347 和 YIT 4007 对于由 TNF- α 的添加而导致的诱导自人体胃细胞的 IL-8 的抑制效果比较试验：

[0178] 将两歧双歧杆菌 YIT 10347 或 YIT 4007 接种于 MILS 培养基，于 37℃ 进行 20 小时的厌氧培养。以 5,000rpm 的速度对培养液进行 5 分钟离心，收集菌体，用添加有 15 容量% FBS 的 eagle' s MEM 培养基（无抗生素）清洗 3 次后，在添加有少量 15 容量% FBS 的 eagle' s MEM 培养基（无抗生素）中悬浮。另一方面，使用添加有 15 容量% FBS 的

eagle' s MEM 培养基（无抗生素），在 37℃ 的二氧化碳温育器中，在 96 孔的胶原蛋白包被微孔培养板上培养源自人体胃的细胞株（GCIY 株）直至汇合（ $1 \sim 2 \times 10^5$ 个/cm²）。除去孔中的培养基，更换新的培养基后，在 GCIY 细胞上添加之前的 YIT10347 或 YIT 4007 的悬浮液以使最终浓度为 10^6 CFU/ml，进一步培养 6 小时（前培养）。并且，以仅用培养基的前培养产物作为对照。除去孔中的培养基，用 PBS 对孔清洗 3 次除去两歧双歧杆菌的菌体后，与新的培养基一起添加 TNF- α 以使最终浓度为 10ng/ml，培养 GCIY 细胞 24 小时。培养完毕后，由孔中采集培养上清液，利用 ELISA 法测定培养上清液中的 IL-8 的量（图 11）。

[0179] 结果如图 11 所示，对于添加 YIT 10347 或 YIT 4007 对 GCIY 细胞进行前培养的产物来说，在其后的 TNF- α 处理所诱导的 IL-8 量低于仅用培养基进行了前培养的对照组。对于 IL-8 量的降低率，添加 YIT 4007 进行了前培养的产物中为 1%，而添加 YIT 10347 进行了前培养的产物中为 15%。这些说明，YIT 10347 以及 YIT 4007 具有抑制由作为炎症反应的介质的 TNF- α 所诱导的白细胞转移因子 IL-8 的产生的作用，对于其抑制效果，YIT 10347 强于 YIT 4007。

[0180] 试验例 8

[0181] 含有两歧双歧杆菌 YIT 10347 的乳酸菌饮料的人体给予试验：

[0182] 以 79 名担忧胃的状况的健康成人作为对象，对以下的对象者进行了双盲随机安慰剂对照 2 组平行组间比较试验。预先取得了这些对象者的知情同意。

[0183] <对象者>

[0184] (1) 担忧胃的状况的健康成人（孕妇除外）

[0185] (2) 尿素呼气试验值（UBIT 给药 20 分钟后的 $\Delta^{13}\text{CO}_2$ 值，UBIT（ユービット）：大塚制药株式会社制的 ¹³C 尿素制剂，依照检查操作指南进行了试验）为 5% 以上或胃蛋白酶原 I/II 比小于 6.5 的人

[0186] (3) 没有摄入可能会影响胃症状的药品和食品的人

[0187] (4) 没有牛奶过敏或乳糖不耐症的人

[0188] (5) 没有慢性疾病的人

[0189] 试验如下进行：一日一次在起床后空腹摄入 1 个（100mL/个）被测试食品（实施例 5 制造的含有两歧双歧杆菌 YIT 10347 的乳酸菌饮料）或安慰剂食品（未经发酵乳），摄入 12 周，摄入结束后观察期为 8 周。在摄入前、摄入 4 周后、摄入 8 周后、摄入 12 周后、摄入结束 8 周后（试验开始第 20 周），由医生询问自觉症状的变化，同时对以下项目进行测定。

[0190] <测定项目>

[0191] (1) 基于尿素呼气试验的呼气 $\Delta^{13}\text{CO}_2$ 值

[0192] (2) 血清胃蛋白酶原值

[0193] (3) 便中的幽门螺杆菌的抗原量

[0194] 上述 (1) ~ (3) 的测定由株式会社 BML 实施。

[0195] 对于全体被测试者、幽门螺杆菌阳性者、基于吉原等的分组（利用胃蛋白酶原值推测胃粘膜的状态，出处：吉原等，Medical Practice、21 卷、77-81、2004 年）的活动性胃炎阶层和萎缩性胃炎临界范围阶层进行了上述试验结果的解析，进行了基于各测

定值的组间比较 (Mann-Whitney 检测)、对于偏离基线的变化量的前后比较 (Wilcoxon 检测)、自觉症状的改善比例的比较。

[0196] (试验结果)

[0197] 1. 对胃的状态的影响 (胃酸分泌、胃粘膜炎症)

[0198] 在全体被测试者或活动性胃炎阶层的被测试者中, 被测试食品组的胃蛋白酶原 I 值明显低于安慰剂组 (图 12 和图 13)。由于胃蛋白酶原 I 值与胃酸分泌有关, 这些结果说明, 含有 YIT 10347 的乳酸菌饮料具有抑制胃酸增加的效果, 进而具有抑制由于幽门螺杆菌的攻击等导致的炎症反应反复不断的活动性胃炎的胃酸增加的效果, 具有对胃酸过多、逆流性食道炎的预防治疗效果。

[0199] 并且, 在萎缩性胃炎临界阶层的被测试者中, 被测试食品组的胃蛋白酶原 II 值明显低于安慰剂组 (图 14)。由于胃蛋白酶原 II 值反映胃粘膜的炎症, 这些结果说明, 含有 YIT 10347 的乳酸菌饮料具有缓和包括萎缩性胃炎在内的胃粘膜的炎症的效果。另外, 被测试食品中含有的嗜热链球菌被确认为不影响胃蛋白酶原值, 因此可以认为在被测试食品中观察到的效果是由两歧双歧杆菌 YIT 10347 带来的。

[0200] 2. 对幽门螺杆菌的影响 (生物活性 / 菌数、菌体量)

[0201] 在全体幽门螺杆菌阳性者或幽门螺杆菌阳性且为活动性胃炎阶层的被测试者中, 被测试食品组的呼气 $\Delta^{13}\text{CO}_2$ 值低于基线, 变化量也低于安慰剂组 (图 15、图 16)。由于呼气 $\Delta^{13}\text{CO}_2$ 值反映幽门螺杆菌在胃内生长和活动所必须的脲酶活性, 这些结果说明, 含有 YIT 10347 的乳酸菌饮料具有通过阻断幽门螺杆菌的脲酶活性 (降低氮量) 所表现出的抗幽门螺杆菌作用 (降低幽门螺杆菌的菌数, 阻断由幽门螺杆菌生成的氨, 缓和、预防、治疗由幽门螺杆菌导致的胃粘膜损伤, 改善由幽门螺杆菌导致的炎症反应, 等)。并且, 在幽门螺杆菌阳性且萎缩性胃炎临界范围阶层的被测试者中, 被测试食品组的便中幽门螺杆菌抗原量低于基线 (图 17)。由于便中幽门螺杆菌抗原量反映幽门螺杆菌的菌体量, 这些结果说明, 含有 YIT 10347 的乳酸菌饮料具有降低幽门螺杆菌菌数的效果。另外, 被测试食品中含有的嗜热链球菌被确认为不影响幽门螺杆菌, 因此可以认为在被测试食品中观察到的效果是由 YIT 10347 带来的。

[0202] 3. 对胃症状的影响

[0203] 对于通过对全体被测试者的问诊得出的自觉症状的变化, 被测试食品组的胃不适 (胃痛、胃积食、胃重、恶心、不舒服、胃灼热、上腹部痛、打嗝) 的改善率高于安慰剂组 (图 18)。其明细为, 对于胃痛, 在被测试食品组, 改善 9 名, 未改善 1 名 (改善率 90%), 在安慰剂组, 改善 4 名, 未改善 2 名 (改善率 67%); 对于胃积食, 在被测试食品组, 改善 4 名, 未改善 1 名 (改善率 80%), 在安慰剂组, 改善 1 名, 未改善 2 名 (改善率 33%); 对于其他症状 (胃重、恶心、不舒服、胃灼热、上腹部痛、打嗝), 在被测试食品组, 改善 3 名, 未改善 0 名 (改善率 100%), 在安慰剂组, 改善 5 名, 未改善 3 名 (改善率 63%)。这些结果表明, 含有 YIT 10347 的乳酸菌饮料具有有效改善胃不适的效果。另外, 由于被测试食品中含有的嗜热链球菌被确认为不影响胃症状, 因此可以认为在被测试食品中观察到的效果是由 YIT 10347 所带来的。

[0204] 工业实用性

[0205] 本发明的两歧双歧杆菌具有对幽门螺杆菌的除菌作用, 并且即使在好氧条件下

保存于发酵乳食品或饮品中也具有优异的存活性。因此，上述除菌作用和存活性能够长期得到维持，能够使大量的活菌到达胃和肠管内，从而能够用作幽门螺杆菌的感染预防治疗剂；胃炎、溃疡的预防治疗剂；胃不适的预防治疗剂；胃酸过多、胃食道逆流症的预防治疗剂。并且，能够良好地用于具有这些作用的食物或饮品、特别是发酵乳食品或饮品的制造中。进而，由于能够抑制使用了蔗糖的发酵乳食品或饮品在保存中的酸度上升，抑制味道的劣化，因此能够良好地用于含有甜味剂的发酵乳食品或饮品中。

序列表

<110> 株式会社益力多本社

<120> 新型双歧杆菌属细菌及其利用

<130>PF-060014-WO

<150>JP2005-211670

<151>2005-07-21

<160>8

<170>PatentIn version 3.1

<210>1

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>BiBIF-1

<400>1

ccacatgac gcatgtgatt g 21

<210>2

<211>19

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>BiBIF-2

<400>2

ccgaaggctt gctccaaa 19

<210>3

<211>10

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 A

<400>3

ccgcagccaa 10

<210>4

<211>10

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 B

<400>4

aacgcgcaac 10

<210>5

<211>10

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 C

<400>5

gcggaaatag 10

<210>6

<211>10

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 D

<400>6

gaggacaaag 10

<210>7

<211>10

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 E

<400>7

cgaactagac 10

<210>8

<211>10

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 F

<400>8

gtagacaagc 10



图 1

图 2

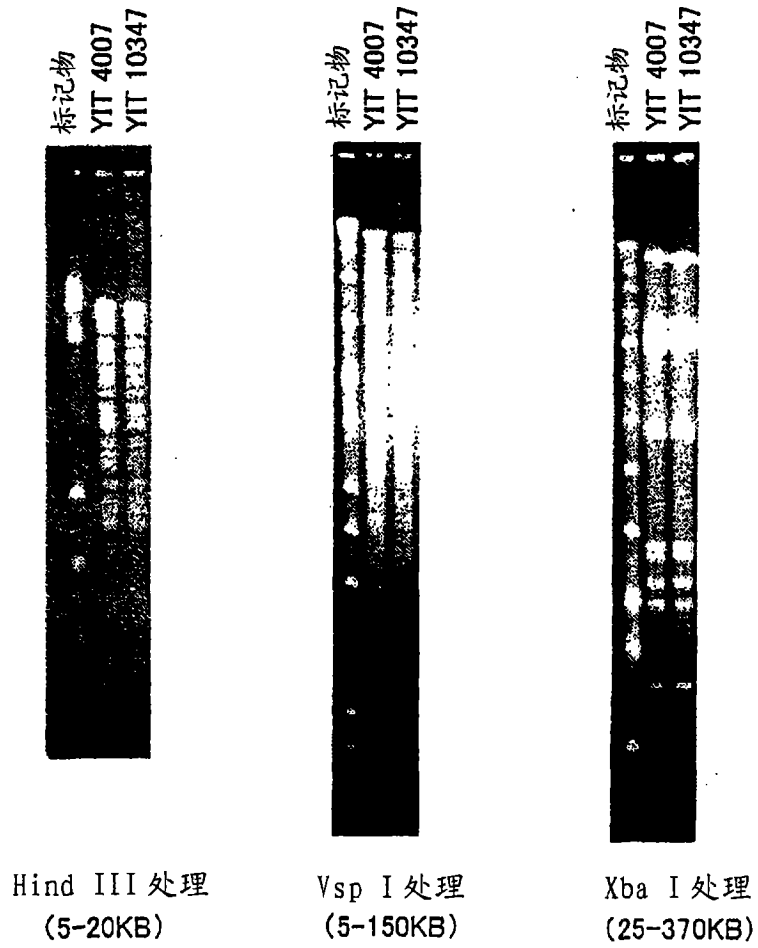


图 3

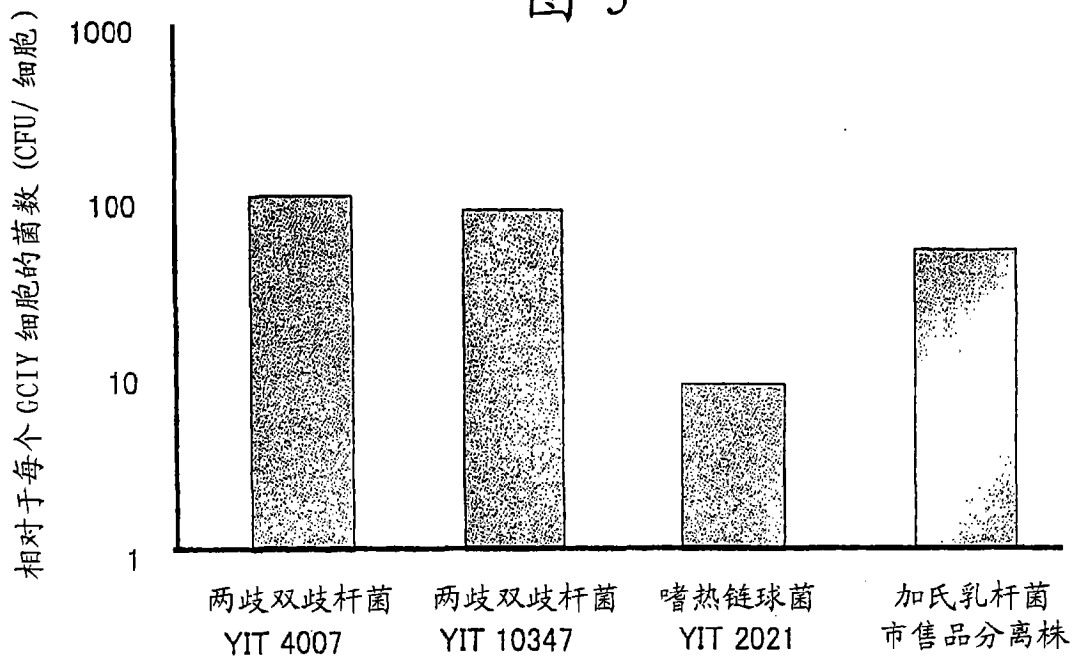


图 4

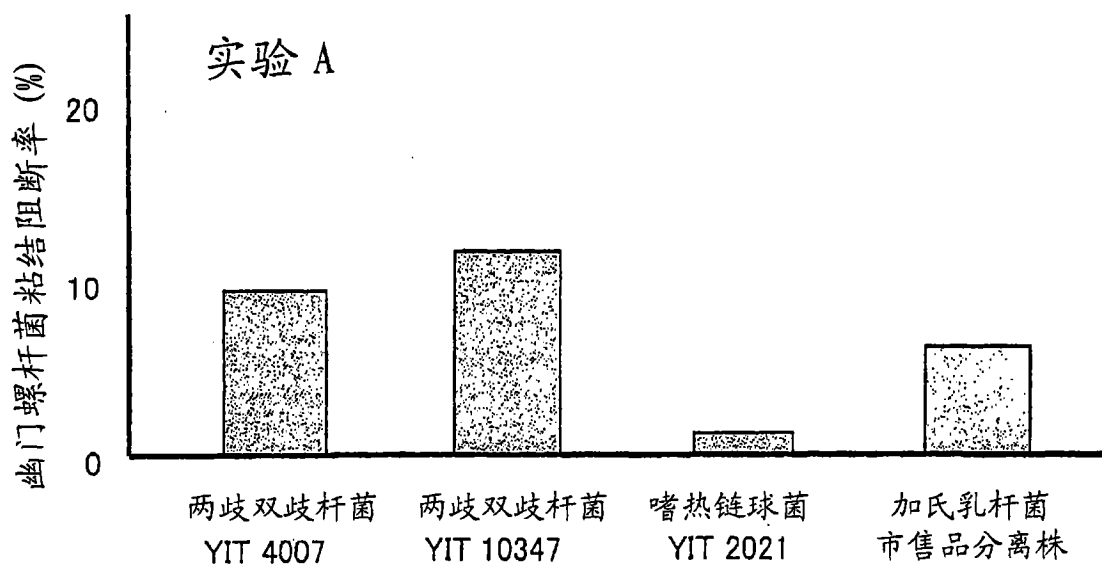


图 5

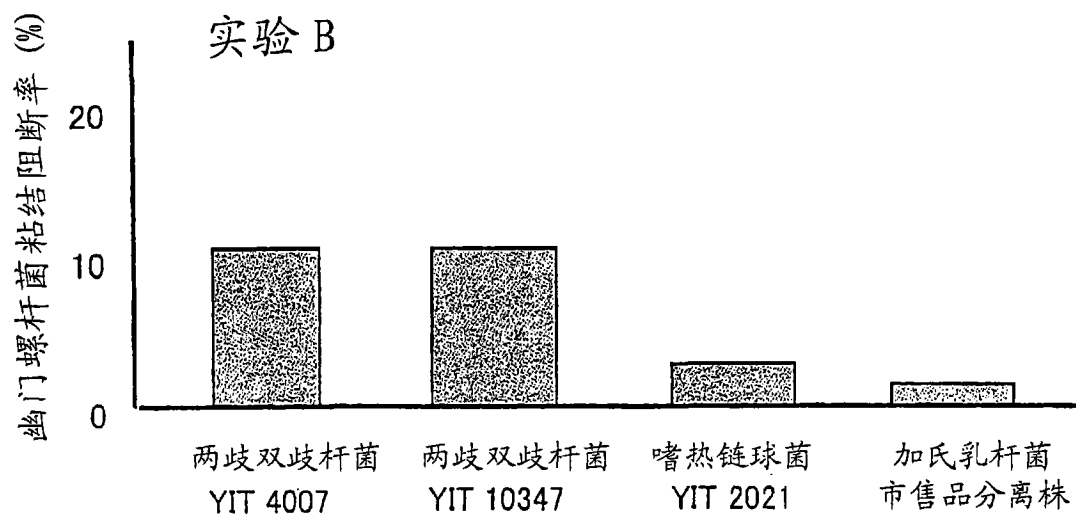


图 6

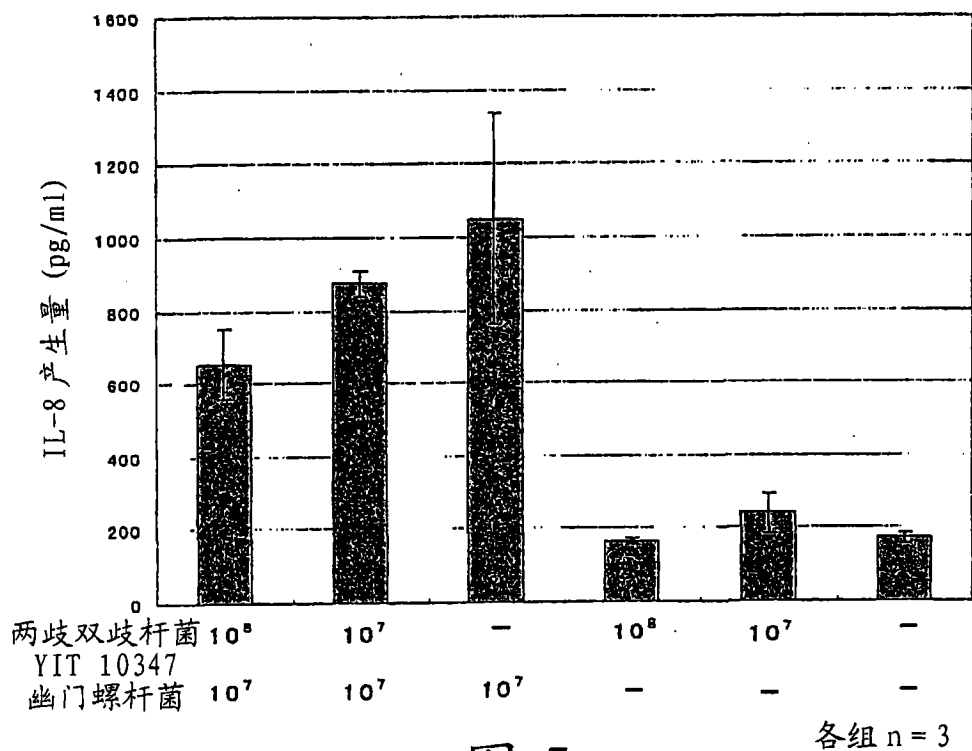


图 7

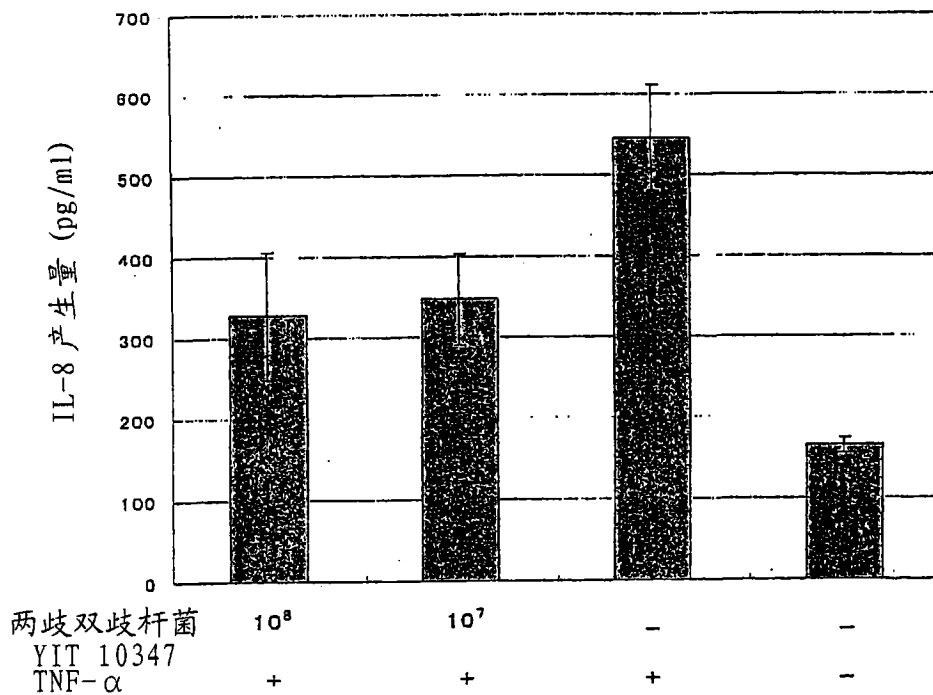
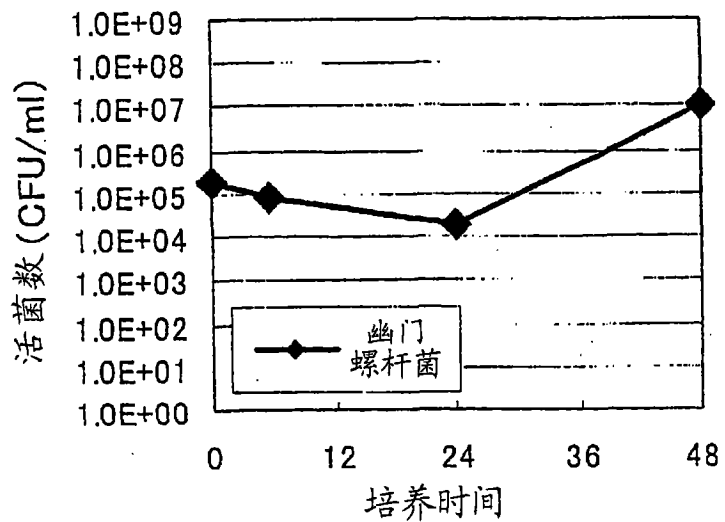


图 8

实验 A



实验 B

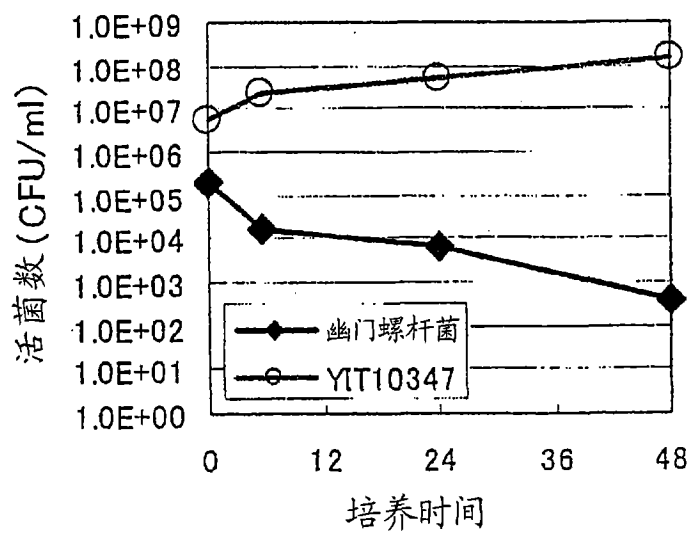


图 9

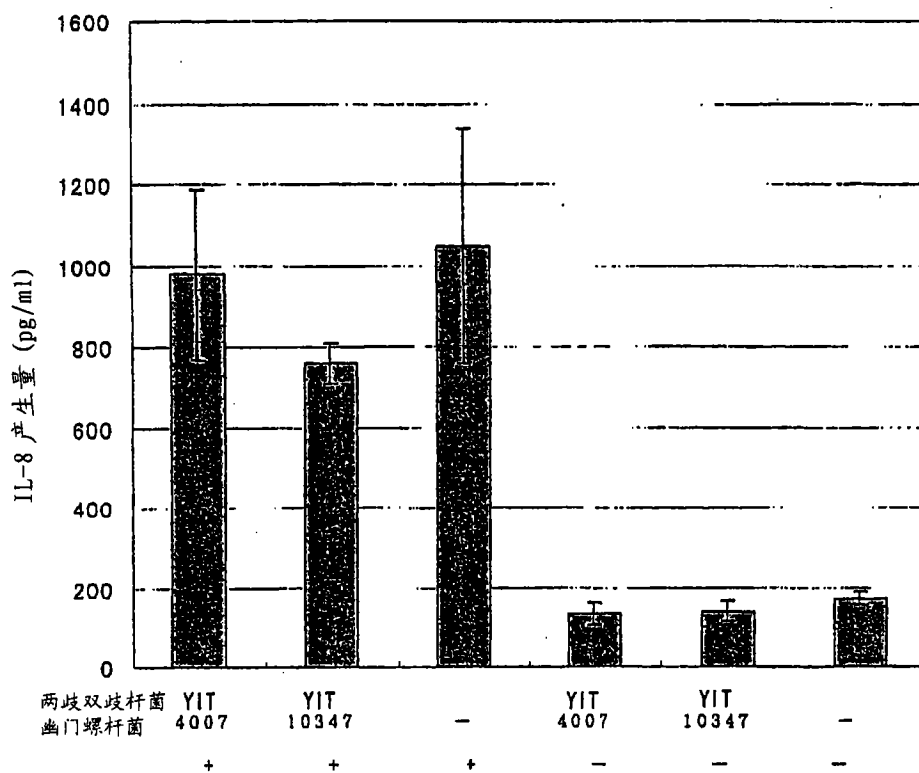


图 10

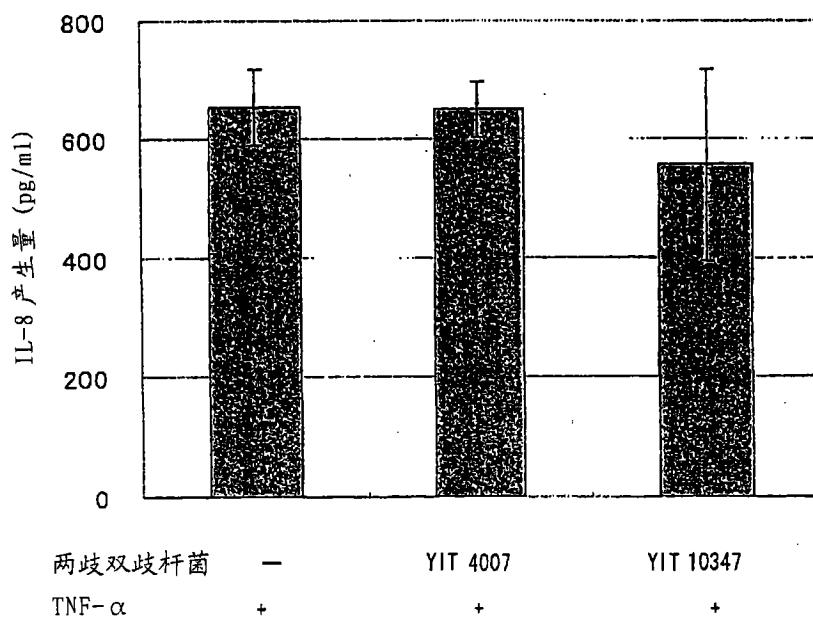


图 11

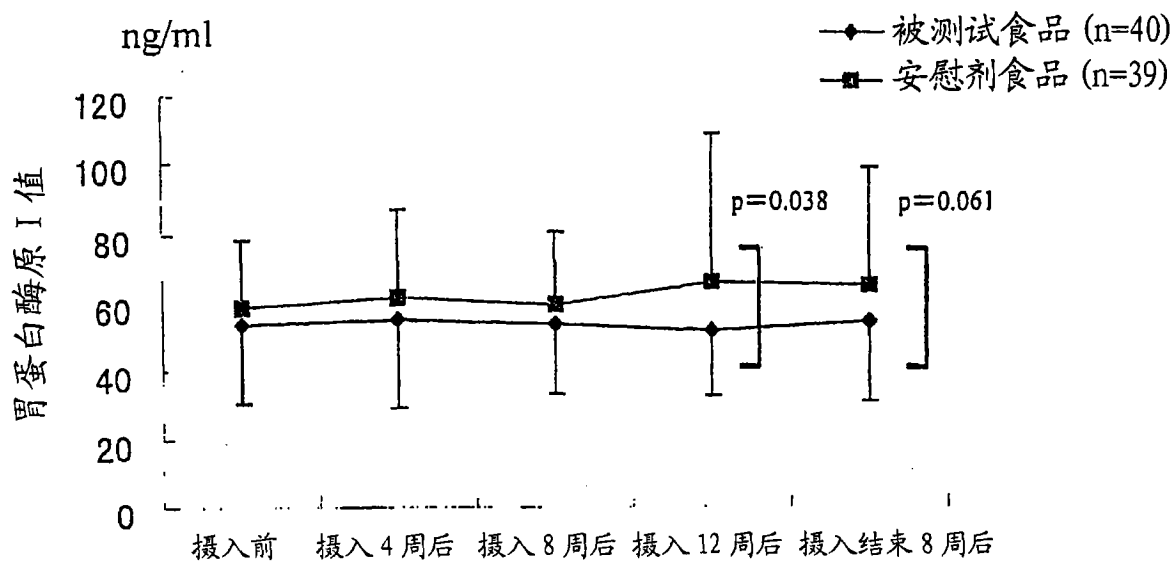


图 12

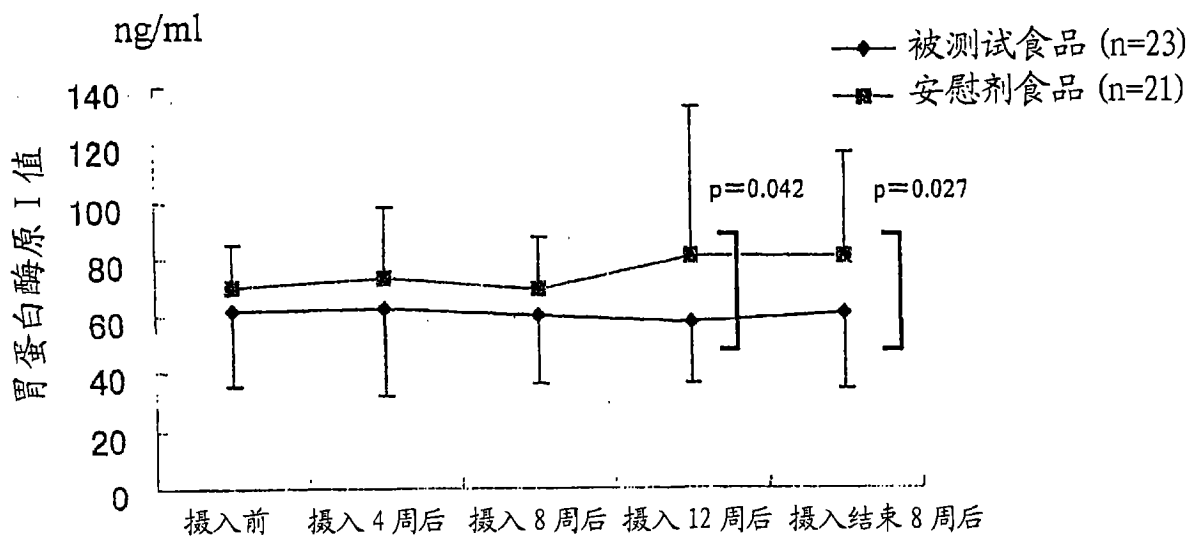


图 13

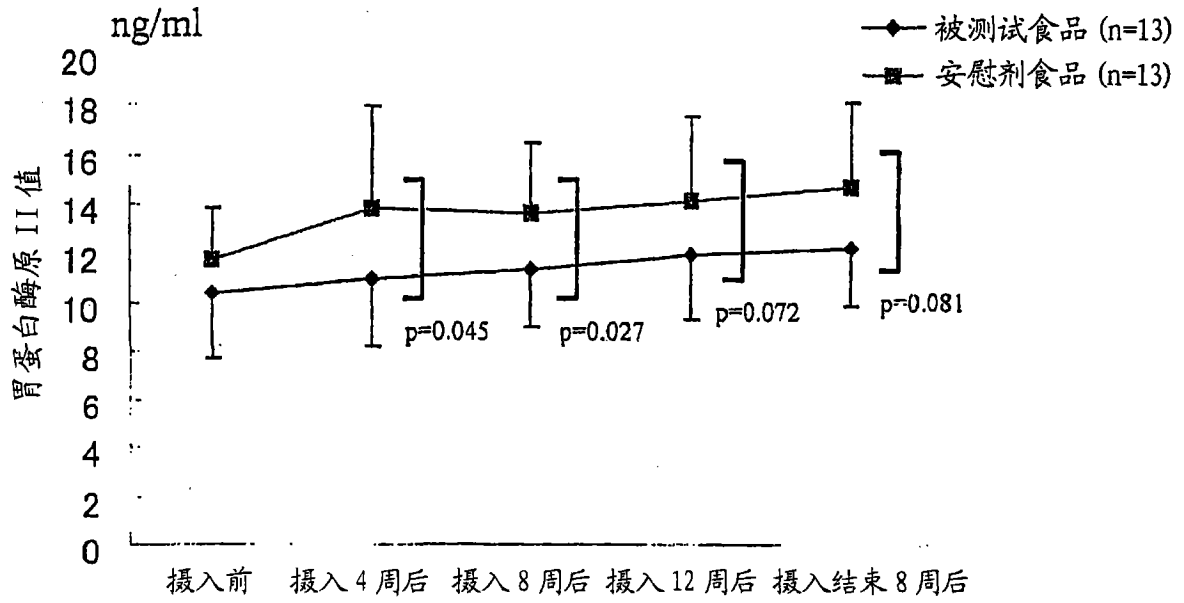


图 14

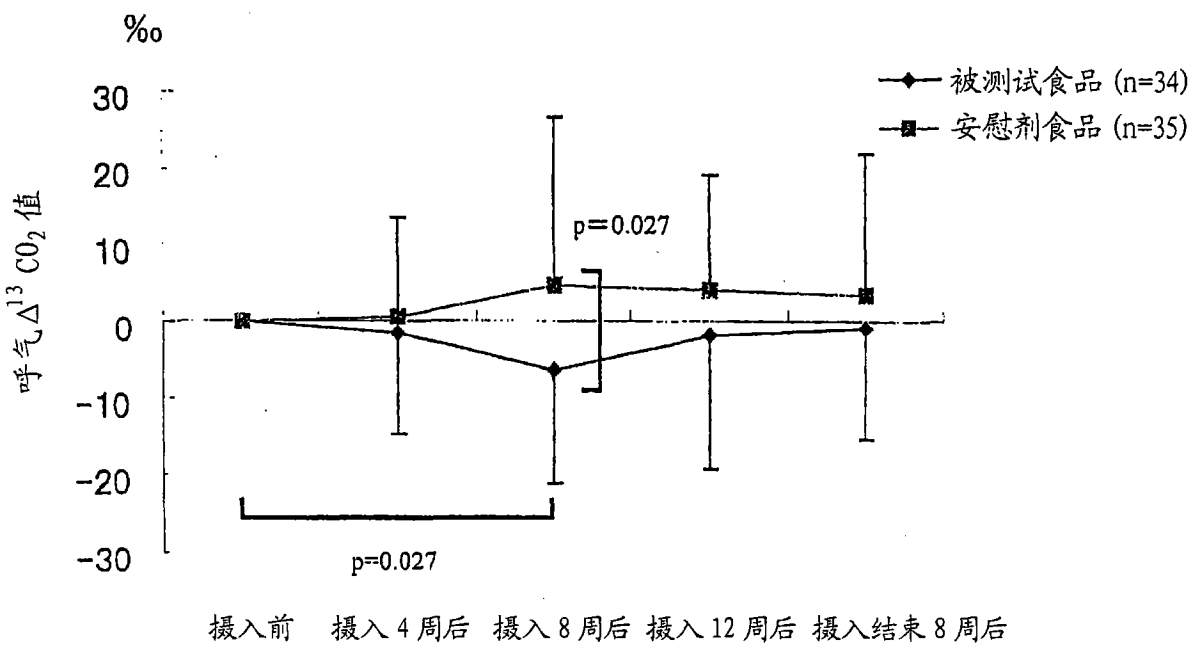


图 15

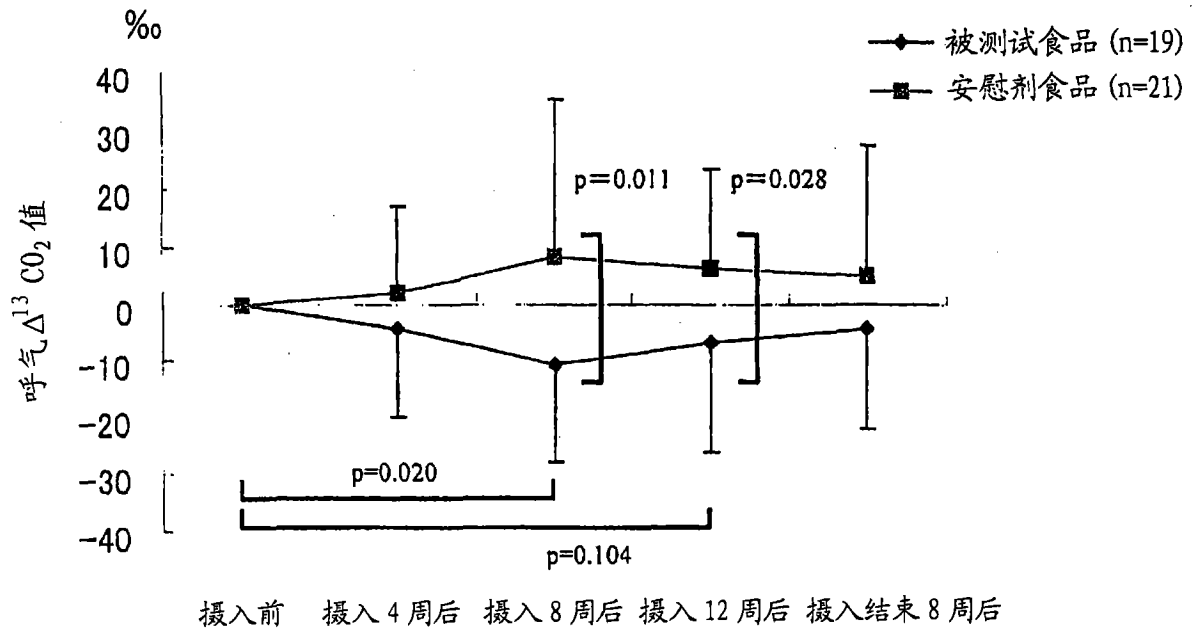


图 16

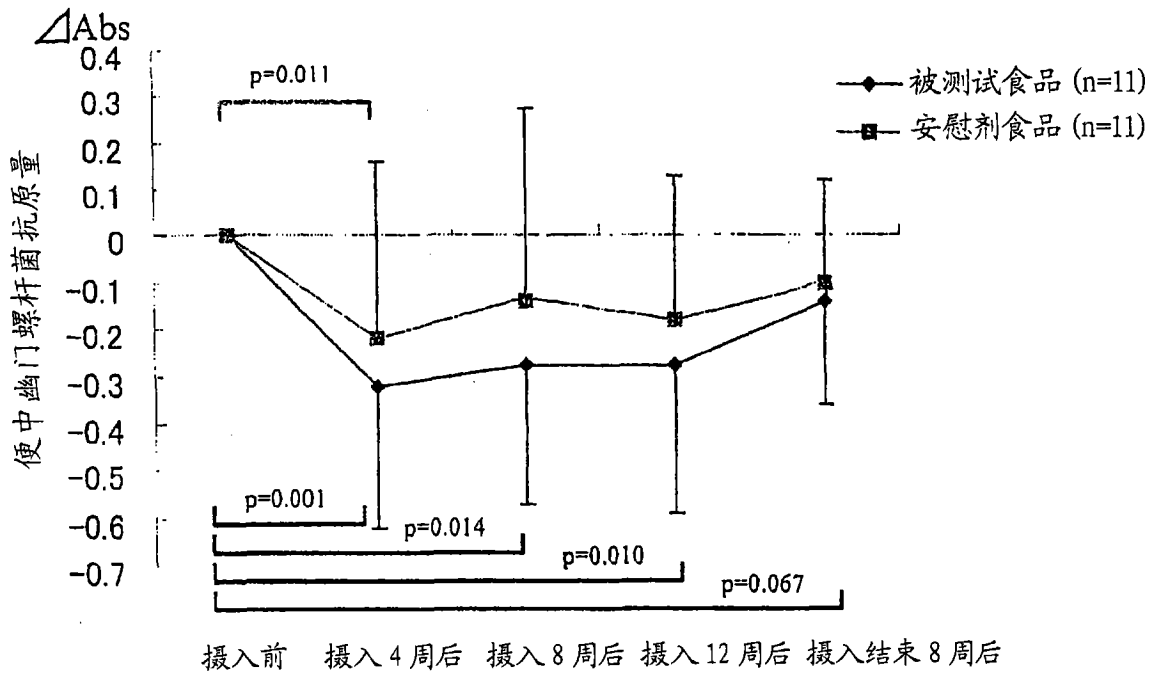


图 17

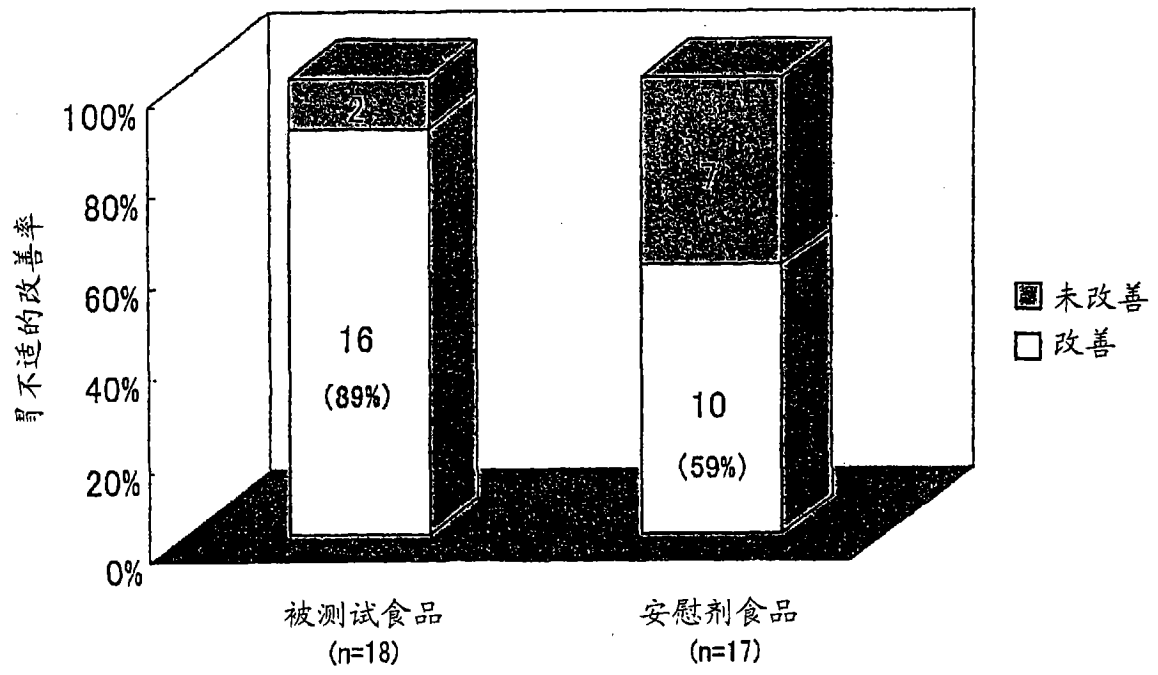


图 18