

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3993168号

(P3993168)

(45) 発行日 平成19年10月17日(2007.10.17)

(24) 登録日 平成19年8月3日(2007.8.3)

|                                |         |         |
|--------------------------------|---------|---------|
| (51) Int. Cl.                  | F I     |         |
| <b>C 1 2 N</b> 1/20 (2006.01)  | C 1 2 N | 1/20 A  |
| <b>A 6 1 K</b> 35/74 (2006.01) | C 1 2 N | 1/20 E  |
| <b>A 6 1 K</b> 45/00 (2006.01) | A 6 1 K | 35/74 A |
| <b>A 6 1 P</b> 1/00 (2006.01)  | A 6 1 K | 45/00   |
| <b>A 6 1 P</b> 1/04 (2006.01)  | A 6 1 P | 1/00    |
| 請求項の数 16 (全 11 頁) 最終頁に続く       |         |         |

|               |                               |           |                     |
|---------------|-------------------------------|-----------|---------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2003-536411 (P2003-536411)  | (73) 特許権者 | 504142569           |
| (86) (22) 出願日 | 平成14年10月11日(2002.10.11)       |           | ユニバーシティ・オブ・レディング    |
| (65) 公表番号     | 特表2005-505298 (P2005-505298A) |           | イギリス国、レディング・アール・ジー・ |
| (43) 公表日      | 平成17年2月24日(2005.2.24)         |           | 6・6・エイ・ピー、フード・マイクロビ |
| (86) 国際出願番号   | PCT/EP2002/011428             |           | アル・サイエンス・ユニット、スクール  |
| (87) 国際公開番号   | W02003/033681                 |           | ・オブ・フード・バイオサイエンスーズ  |
| (87) 国際公開日    | 平成15年4月24日(2003.4.24)         | (74) 代理人  | 100062007           |
| 審査請求日         | 平成16年6月8日(2004.6.8)           |           | 弁理士 川口 義雄           |
| (31) 優先権主張番号  | 0124580.2                     | (74) 代理人  | 100113332           |
| (32) 優先日      | 平成13年10月12日(2001.10.12)       |           | 弁理士 一入 章夫           |
| (33) 優先権主張国   | 英国 (GB)                       | (74) 代理人  | 100114188           |
| 微生物の受託番号      | NCIMB 41114                   |           | 弁理士 小野 誠            |
|               |                               | (74) 代理人  | 100103920           |
|               |                               |           | 弁理士 大崎 勝真           |
|               |                               | 最終頁に続く    |                     |

(54) 【発明の名称】 ラクトバシルス・ペントサス株を含む組成物およびそれらの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

受託番号 NCIMB 41114 として寄託されているラクトバシルス・ペントサス (Lactobacillus pentosus) 株。

【請求項 2】

生の、弱毒化された、または死滅されたラクトバシルス・ペントサス NCIMB 41114 株および汎用の担体を含む栄養性組成物。

【請求項 3】

組成物のグラム当たり  $10^5 \sim 10^{11}$  cfu のラクトバシルス・ペントサス NCIMB 41114 株を含む、請求項 2 に記載の栄養性組成物。

【請求項 4】

1 日用量において  $10^6 \sim 10^{12}$  cfu のラクトバシルス・ペントサス NCIMB 41114 株を提供する、請求項 2 または 3 に記載の栄養性組成物。

【請求項 5】

生の、弱毒化された、または死滅されたラクトバシルス・ペントサス NCIMB 41114 株および汎用の担体を含む医薬組成物。

【請求項 6】

組成物のグラム当たり  $10^5 \sim 10^{11}$  cfu のラクトバシルス・ペントサス NCIMB 41114 株を含む、請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

10

20

1日用量において $10^6 \sim 10^{12}$  cfuのラクトバシルス・ペントサスNCIMB 41114株を提供する、請求項5または6に記載の医薬組成物。

【請求項8】

錠剤、カプセル、インプラント、坐剤、ペッサリー、粉末、溶液、ゲル、または細菌懸濁液の形態にある、請求項5から7のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項9】

ラクトバシルス・ペントサスNCIMB 41114株の医薬としての使用。

【請求項10】

カンジダ症を予防または治療するための医薬の製造におけるラクトバシルス・ペントサスNCIMB 41114株の使用。

10

【請求項11】

健常腸内フローラを促進するための、および過敏性腸症候群またはその症状を予防または治療するための医薬の製造におけるラクトバシルス・ペントサスNCIMB 41114株の使用。

【請求項12】

下痢または他の胃腸障害を予防または治療するための医薬の製造におけるラクトバシルス・ペントサスNCIMB 41114株の使用。

【請求項13】

カンジダ症を予防または治療するための栄養性配合物の製造におけるラクトバシルス・ペントサスNCIMB 41114株の使用。

20

【請求項14】

健常腸内フローラを促進するための、および過敏性腸症候群またはその症状を予防または治療するための栄養性配合物の製造におけるラクトバシルス・ペントサスNCIMB 41114株の使用。

【請求項15】

下痢または他の胃腸障害を予防または治療するための栄養性配合物の製造におけるラクトバシルス・ペントサスNCIMB 41114株の使用。

【請求項16】

糞便由来細胞培養物を殺菌レベルのテトラサイクリンの存在下において培養させ、生存可能な乳酸菌細胞を前記培養物から集めることを含む方法によって得られる、請求項1に記載のラクトバシルス・ペントサス株。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ラクトバシルス・ペントサス (*Lactobacillus pentosus*) の新規プロバイオティック株、この菌株を含む食用組成物および医薬組成物、並びに良好な健康の促進、特には、免疫系の刺激、カンジダ症の治療、消化一般の補助、および過敏性腸症候群 (IBS) の症状の緩和におけるこの菌株の医学的適用に関する。

【背景技術】

【0002】

40

健常常在腸内フローラは有益細菌、主として、ラクトバシルス (*Lactobacillus*) およびビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 属のメンバーの群を構成する。微生物のバランスは感染により、食事の変化により、抗生物質による処置を通して、およびストレスまたは生理学的外傷によって破壊され得る。このようなことが生じるとき、幾つかの有害反応が誘発され得る。下痢、便秘および腸刺激性の他の症状の発症を伴って消化パターンが変化することがある。免疫系が損なわれ、その結果として感染性疾患に対する耐性が低下することがある。病原性細菌または真菌が消化系または身体の他の部分に定着し、コロニーを形成する。

【0003】

伝統的に、例えばヨーグルトのような発酵乳製品は消化系を滑らかにすることが可能な

50

健康食品とみなされている；このような観察は、今や、乳酸菌の存在によって説明される。健康を促進することができるラクトバシルスおよびビフィドバクテリウムのような微生物は「プロバイオティクス (probiotics)」と呼ばれる。特定のプロバイオティック微生物が病原性細菌および酵母と競合することによって、腸内フローラの構成に影響を及ぼし得ることが、研究によって示されている。プロバイオティクスは、例えばミルクアレルギーの患者において、腸の透過性を低下させ、かつ局所腸内免疫応答を強化することにより、腸粘膜の治癒を促進するものであるともされている。下痢の予防および治療並びに抗生物質治療後の共生フローラの回復の強化にプロバイオティクスの使用が提唱されている。抗発癌活性もプロバイオティクスを用いる臨床試験において示されている。

【発明の開示】

10

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

市販の「生きている」乳製品の中には、消化および健全な免疫系の促進のため、特定のプロバイオティック・ラクトバシルスまたはビフィドバクテリウム種を特に多く含むことが要求されている。しかしながら、望ましいプロバイオティック効果の全ては、選択された僅かな細菌株によってのみ示される。胃腸 (GI) 管における株の生存性が、その株の体内での生物学的効果にとって重要であることも留意しなければならない。株が腸内に移動して定着するためには、理想的には、GI 管の粘膜表面に密着し、例えば、胃酸および胆汁酸への露出のような消化管の通過に対して生き残ることができなければならない。

【0005】

20

本発明は、ラクトバシルス・ペントサス (*Lactobacillus pentosus*) LPK と呼ばれるラクトバシルス属の新規プロバイオティック株に関し、これは 2001 年 8 月 28 日にブダペスト条約に従って英国 Aberdeen の NCIMB に寄託され、受託番号 NCIMB 41114 を受けている。ラクトバシルス属一般に典型的な特徴に加えて、この株はさらなる驚くべき特性を有する：カンジダ種の増殖を、プロバイオティックの使用によっては従来達成されていない程度にまで抑制することが可能である。さらに、テトラサイクリン系抗生物質はこの株の増殖に対して効果がない。この特性の独自の組合せは、身体のあらゆる領域におけるカンジダの望ましくない増殖に対し有効に利用することができる。特に、カンジダは過敏性腸症候群 (IBS) における原因因子と考えられるため、この L. ペントサスの新規株をその障害の治療または予防において用い得

30

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明の一側面においては、寄託番号 NCIMB 41114 を有するラクトバシルス・ペントサスの株が提供される。

【0007】

本発明の第 2 の側面においては、ラクトバシルス・ペントサス NCIMB 41114 株の識別特性の全てを有する、生物学的に純粋なラクトバシルス属株が提供される。

【0008】

本発明の第 3 の側面においては、ラクトバシルス・ペントサス NCIMB 41114 株を含む栄養性組成物または医薬組成物が提供される。

40

【0009】

本発明の第 4 の側面においては、ラクトバシルス・ペントサス NCIMB 41114 株および抗生物質を含む栄養性組成物もしくは医薬組成物またはキットが提供される。

【0010】

本発明の別の側面においては、ラクトバシルス・ペントサス NCIMB 41114 株の医薬としての使用が提供される。

【0011】

本発明のさらに別の側面においては、健常腸内フローラを促進するための、並びに細菌もしくは酵母感染；カンジダ症；下痢もしくは他の胃腸障害；過敏性腸症候群もしくはそ

50

これらの症状；および弱体化した免疫系を予防もしくは治療するための医薬もしくは栄養性配合物の製造におけるラクトバシルス・ペントサスNCIMB41114株の使用が提供される。

#### 【0012】

本発明のさらなる側面においては、乳酸菌のプロバイオティック株を単離する方法であって、糞便由来細胞株を殺菌レベルのテトラサイクリンの存在下において培養させ、その株から生存可能な乳酸菌を集めることを含む方法；並びにこの方法によって得られた乳酸菌株が提供される。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0013】

本願の主題である新規L. ペントサス株は、健康な成人から得られた糞便の培養物から単離され、テトラサイクリンの存在下で培養された。

#### 【0014】

2つの顕著かつ予期せぬ観察がこの微生物の発見および単離につながった。第一は、本発明のラクトバシルス株が、そしてその株のみが、培地中の他の乳酸菌を絶滅させる広スペクトルの抗生物質であるテトラサイクリンを含有する培地中でも生存し、かつ増殖したということである。第二は、当初からほとんどの糞便培養物中にカンジダが存在していたものの、この酵母の増殖は本発明のラクトバシルスの存在下で停止したということである。対照的に、本発明の新規株が存在しない糞便培養物においては、カンジダはテトラサイクリンによって死滅した細菌が残したニッチを支配するまでに増殖した。

#### 【0015】

本発明の新規細菌およびこの細菌を含有する組成物は、一般には、健康にとって有益であり、全ての年齢の人々が十分に許容するものである。L. ペントサスNCIMB41114は、健康人において、軽い病気、例えば、胃の不調、胃炎、胃潰瘍、軽い下痢（抗生物質関連の下痢を含む）、不規則な消化パターン、胸焼け、および他の消化性の不良から保護するのに予防的または治療的に用いることができる。健康腸内フローラの促進、免疫刺激、癌予防、骨成長の刺激およびコレステロール減少の効果も一般の人々が享受することができる。本発明の新規細菌は入院患者、養護施設内で生活する個人、免疫無防備状態の人々、抗生物質治療を受けている患者の他、乳児、例えば、新生児にとっても特に有益であり得る。例えば、本発明の細菌は、母乳を受けている乳児の腸内フローラにより類似する乳児の腸内フローラの形成に用いることもできる。

#### 【0016】

本発明の細菌は、特には医薬療法の代わりとして、またはそれと共に、特定の疾患状態を標的とするのに用いることもできる。例えば、乳児の下痢（例えば、ロタウイルスによって生じるもの）、コレラ、赤痢、並びに赤痢菌、大腸菌O157:H7、クロストリジウム・ジフィシレ（*Clostridium difficile*）およびサルモネラの感染を本発明の細菌の消費によって治療または緩和することができる。あらゆる理由（例えば、化学療法後、白血病、HIV/AIDS等）により免疫無防備状態にある人々にとって、L. ペントサスNCIMB41114の摂取は、病原性微生物の感染を予防または抑制する非常に有用な予防的および治療的処置であり得る。

#### 【0017】

L. ペントサスLPKはテトラサイクリン系抗生物質に対して耐性であるため、この微生物を消費または適用するプロバイオティック的な利点（probiotic benefit）は抗生物質での治療の間も利用可能であり続ける。

#### 【0018】

このラクトバシルス属菌種の他の公知のラクトバシルスを上回る主な利点は、この株が酵母の過剰増殖、特には、カンジダ感染を治療することができることである。カンジダ感染は、通常は、養護施設内で生活する個人、免疫無防備状態の患者、例えば、HIV陽性もしくはAIDS患者、放射線療法、化学療法および骨髄移植を受けている患者、カンジダに対する露出が増加している入院患者、新生児、避妊ピルを使用中の女性、並びに抗生

10

20

30

40

50

物質治療法を受けているいかなる人をも含む特定の範疇の感染しやすい人々が遭遇する。カンジダ症は、カンジダ・パラプシロシス (*Candida parapsilosis*)、カンジダ・トロピカリス (*Candida tropicalis*)、またはトルロプシス・グラブラタ (*Torulopsis glabrata*) によって生じ得るが、通常は、カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) によって生じる。

#### 【0019】

カンジダ・アルビカンスは、口（鵞口瘡）、尿路、膣（膣鵞口瘡もしくは膣炎）、食道、腸管および皮膚（例えば、おむつかぶれ）に感染し、刺激、炎症および他の症状を導く。これらの感染は、一般には、一連の抗真菌剤の使用によって治癒される。IBSにおけるカンジダ過剰増殖の役割も推定されている。IBSに対する現在の治療は、主として、その障害の基礎をなす原因ではなく、症状の緩和を指向する医薬製剤である。プロバイオティック細菌の特定の株が抗カンジダ活性を有することが報告されているが、その活性の見かけのレベルは、胃腸科専門医の間で潜在的な治療的処置として多大な関心に値するには充分高いものではない。カンジダの成長を抑制するL. ペントサスLPK、すなわち、NCIMB 41114株の著しい活性のため、本発明はカンジダ感染の治療および予防における飛躍的なアプローチである。

10

#### 【0020】

したがって、本発明の一側面においては、有効量のラクトバシルス・ペントサスNCIMB 41114株の投与を：細菌もしくは酵母感染；カンジダ症、特には、尿路感染、例えば、泌尿器感染、鵞口瘡；下痢もしくは他の胃腸障害；過敏性腸症候群もしくはそれらの症状；および弱体化免疫系のいずれかを、予防または治療する方法において用いることができる。本発明の新規細菌は健常腸内フローラを促進する方法において用いることもできる。

20

#### 【0021】

本発明の一態様においては、細菌もしくは酵母感染、例えば、カンジダ感染、泌尿器感染、鵞口瘡、過敏性腸症候群（IBS）もしくはその症状、下痢もしくは他の胃腸障害を治療または予防する方法であって、そのような治療を必要とする被験者に有効量の、生の、弱毒化した、または死滅したラクトバシルス・ペントサスNCIMB 41114株を含有する組成物を投与することを含む方法が提供される。

30

#### 【0022】

本発明の別の側面においては、健常腸内フローラを促進するための、および免疫系を刺激するための方法であって、そのような治療を必要とする被験者に有効量の、生の、弱毒化した、または死滅したラクトバシルス・ペントサスNCIMB 41114株を含有する組成物を投与することを含む方法が提供される。

#### 【0023】

L. ペントサスNCIMB 41114を含有する栄養性組成物または医薬組成物は経腸的に、例えば、経口、非経口で、または皮膚もしくは粘膜との物理的接触によって投与することができる。本発明の栄養性組成物または医薬組成物は、例えばチューブまたはカテーテルにより、腸内に直接投与することができる。

40

#### 【0024】

本発明のL. ペントサス株は大規模に培養することができ、かつ凍結乾燥 (lyophilized)、凍結乾燥 (freeze-dried) または水和形態で治療的に用いることができる。本発明の新規細菌は薬学的に許容可能な担体物質または栄養性基質と共に投与することもできる。

#### 【0025】

医薬調製品の場合、製品は錠剤、カプセル、インプラント、坐剤、ベッサリー、例えば、膣ベッサリー、粉末、溶液、ゲル、細菌懸濁液等の形態で提供することができる。徐放形態が特に望ましいものであり得る。本発明の一態様においては、新規L. ペントサス株を、抗生物質の危険性および副作用を緩和するため、抗菌性抗生物質（例えば、テトラサ

50

イクリン) 治療過程に対する付加的な治療として投与する。この目的のため、抗生物質および細菌は単一投与形態で併せて処方することができる。その代わりに、細菌および抗生物質(1種類もしくは複数)を、別々に、同時に、または連続的に用いるためのキット形態で提供することができる。別の選択肢は、フルコナゾール、イトラコナゾールおよびクロトリマゾールを含む、カンジダ症の治療に通常用いられる抗菌剤と、L. ペントサス NCIMB 41114 とを同時投与することである。これらの2つの成分は同時に作用して真菌の増殖に対抗し、かつ単一投与形態で、または別々、同時、もしくは連続投与のためのキットとして利用可能なものとすることができる。

#### 【0026】

L. ペントサス NCIMB 41114 を栄養学的な形式で投与しようとする場合、あらゆる食品または飲料製品、特に、冷蔵、凍結または長期保存日常製品、例えば、ミルク、ミルクベースの粉末、ヨーグルト、ケフィア、アイスクリーム、ミルクセーキ、チーズ、クリーム、凝乳、発酵ミルク、およびミルクベースの発酵製品に添加することができるが、ダイズ製品、発酵穀類ベース製品、フード・スプレッド、焼いた食品、完全な栄養製品、チューブ供給用配合物、および乳児用調製乳に添加することもできる。動物、例えば、ウマおよびペット動物に供給するのに適する食用配合飼料に細菌を供給することも可能である。

10

#### 【0027】

多くの場合、本発明の細菌株は発酵可能な基質、例えばミルク、またはデンプン含有基質、例えば穀類粥(cereal gruel)、で培養し、次いでその発酵した製品を栄養性組成物、例えば、食品または飲料中で用いることが好ましい。

20

#### 【0028】

栄養性組成物、例えば、食品または飲料配合物において、その製品は、脂肪、タンパク質、炭水化物、繊維、ミネラルおよびビタミンから選択される1種類以上の栄養成分をL. ペントサス LPK 菌に加えて含むことができる。消化の調整における繊維の重要性に鑑み、幾つかの種類の繊維を本発明の栄養性または医薬製品に含有することが好ましい。「プレバイオティック(prebiotic)」成分と呼ばれる食物繊維物質が提供されるとき、プロバイオティック細菌の増殖が促進されることが公知である。これは、GI管のコロニー形成を促進し、かつプロバイオティックの消費が終了した後であっても培養物の活性を維持する上で有利である。したがって、本発明の好ましい態様においては、本発明のプロバイオティック株をプレバイオティック物質と共に、単一の一般投与形態で、または同時、別々もしくは連続投与のためのパーツのキットとして投与する。

30

#### 【0029】

L. ペントサスの新規株はそれ自体で健康の利益をもたらすが、この細菌を、プロバイオティック特性を有することが公知である他のあらゆる細菌と同時投与する可能性もある。

#### 【0030】

この株は、好ましくは、食品または医薬品担体1gあたりに、約 $10^5$ ～約 $10^{11}$  cfu、好ましくは約 $10^6$ ～約 $10^{10}$  cfu、最も好ましくは約 $10^7$ ～約 $10^9$  cfuの量で添加する。細菌株は生菌の形態で投与することが好ましいが、消費前に細菌を弱毒化するか、または死滅させることができる。

40

#### 【0031】

通常は、少なくとも $10^4$  cfu/日の本発明の株の投与が臨床的に有効である。より好ましい1日用量は $10^6$ ～ $10^{12}$  cfu/日の範囲である。最も好ましいものは $10^7$ ～ $10^{10}$  cfu/日である。

#### 【実施例1】

#### 【0032】

L. ペントサス株 LPK (NCIMB 41114) の単離

(i) 連続培養系: 3つのケモスタットを並行して準備した; 各々を窒素ガスの下、37°C、pH 6.5 および $0.066\text{ h}^{-1}$ の希釈速度で維持した。これらの条件は、ヒト

50

結腸の末端領域において典型的に見出される条件に類似するように設定された。これらのケモスタットに、：酵母エキスを2 (g/蒸留水1 l; 以下同じ)、ペプトン水を2、NaClを0.1、 $K_2HPO_4$ を0.04、 $KH_2PO_4$ を0.04、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ を0.01、 $CaCl_2 \cdot H_2O$ を0.01、 $NaHCO_3$ を2、Tween 80を2、ヘミンを0.05、ビタミンK1を0.01、システイン・HClを0.5、胆汁塩を0.5、グルコースを0.4、デンプンを3、ペクチンを2およびアラビノガラクトンを1含有する増殖調節培地を供給した。この培地を121℃で30分間オートクレーブ処理し、まだ熱いうちに、窒素ガスの下に置いた。培地を冷却した後、1 g/lの濾過滅菌テトラサイクリンまたは1 g/lの濾過滅菌ナイスチン (nystatin) を培地用リザーバに無菌的に添加した。抗生物質が添加されないコントロール用対照ケモスタットも稼働させた。

10

#### 【0033】

(i i) 接種：新鮮な排泄された糞便試料を健常ボランティア (n=6) から得、0.1 mol/l リン酸バッファ (pH 7) を用いて10% (w/v) スラリーを嫌氣的に調製した (26)。これらのボランティアは胃腸障害の前歴がなく、かつ研究前の少なくとも3ヶ月間抗生物質の摂取をしなかった。それぞれの300 ml ケモスタット容器の半分を培地および150 ml のスラリーを添加して満たした。次に、この系を24時間放置して平衡化した後、培地の汲み上げを開始した。この実験を6名の異なる糞便提供者で各々3回ずつ反復した。

#### 【0034】

20

(i i i) 微生物培養技術：接種に用いた糞便スラリーの各々から試料を採取し、各ケモスタットからも発酵系が定常状態に達したとき (164時間後) に1 ml 試料を取り出した。次に、これらを予め1/2に薄めたペプトン水で連続的に希釈した (6倍)。各希釈液を、腸内細菌の優勢群を選択するように下記の通りに設計された (嫌気条件下、10%  $CO_2$ 、10%  $H_2$ 、80%  $CO_2$ 、大気圧、37℃) 寒天培地上に3回ずつ塗布した：嫌気性菌全体に対してはWilkins Chalgren (Oxoid)、ラクトバシルスに対してはRogosa (Oxoid)、ビフィドバクテリウムに対してはBereens、バクテロイデスに対してはKVLB、クロストリジウムに対してはReinforced Clostridia寒天 (Oxoid) + ノボボシン8 mg/l およびコロスチン8 mg/l、並びにグラム陽性球菌に対してはAzide寒天 (Oxoid)。次に、各々の希釈を、全好気性菌を選択するためにNutrient Agar (Oxoid) 上に、酵母のためにSabouraud デキストロース寒天+クロラムフェニコールおよびシクロヘキサミド上に、並びに大腸菌のためにMacConkey寒天No. 3 (Oxoid) 上に好氣的に塗布し、37℃で培養した。培養24時間から48時間後に好気性コロニーを計測し、培養48時間から72時間後に嫌気性プレートに計測した。異なる形態型を有するコロニーを株の同定を行うためにプレートから採取して、グラム染色、顕微鏡検査および表現型 (生化学的な) の特徴付けを行った。

30

#### 【0035】

結果：用いられた6つの接種物中の優勢腸内微生物の数は、コントロール用のケモスタットにおいては、安定状態条件の後にも維持された。これは、用いられた培養培地が連続培養実験におけるそのような集団の維持に効果的であったことを確証した。したがって、抗生物質の存在の結果生じる特徴のいかなる相違も、確実に実験の差異ではなく、これらの添加のためであった。試験した6つのボランティア糞便試料のうちの4つにおいて酵母が検出された。

40

#### 【0036】

テトラサイクリンの効果は、コントロールと比較して、試験した全ての細菌の集団を顕著に減少させ、それによりその活性の広スペクトルを確証するものであった。興味深い観察の1つは、テトラサイクリンの効果が、コントロールのケモスタットのレベルとの比較で、発酵系において酵母を増加させたことであった。これは、テトラサイクリンの使用および酵母の過剰増殖に関連する危険性についての臨床的な意味を有する。実際、ここで用

50

いられた接種物の1つにおいては、最初は酵母が検出されなかったが、テトラサイクリン・ケモスタットで富化した。

#### 【0037】

予想どおり、ナイスタチン・ケモスタットにおいては酵母が阻害された。しかしながら、特定の細菌属も影響を受けた。主として、これには、胃腸の健康に重要であるものとみられる一般的なプロバイオティック微生物であるラクトバシルスの減少が含まれた。常在プロバイオティック水準の維持のためには、ナイスタチンの使用は歓迎されないことが明瞭に示される。

#### 【0038】

テトラサイクリン・ケモスタット試験の間、稼働したもののうちの1つが予想に反した結果を生じた。実験の開始時には酵母が存在したが、観察された一般的な傾向とは対照的に、さらに増殖することはなかった。それに代わって、グラム陽性桿菌が優勢を占め、他のタイプの細胞型は検出されなかった。したがって、遺伝子型研究を行ってこの微生物を特定した。

10

#### 【0039】

(iv) 16S rRNA単離および増幅：InstaGene Matrix (Bio-rad、Hemel Hempstead、Hertfordshire、UK)を製造者の指示に従って用いて、このラクトバシルスから全DNAを抽出した。次に、16S rRNA遺伝子を、PCRにより、遺伝子の3'および5'末端に近い保存プライマーを用いて増幅した。増幅した断片は大腸菌16S rRNA遺伝子の~30から~1500位に相当した。50 µlの最終容積中、この反応混合液は増幅プライマー、予備混合デオキシヌクレオシド三リン酸、MgCl<sub>2</sub>、テンプレート、およびTaq DNAポリメラーゼを含んでおり、Taq DNAポリメラーゼはプレサイクリング段階後に添加され、それにより反応混合液は96℃に4分間加熱され、かつ0℃で保持された。PCR増幅条件は、95℃で1分、55℃で1分、および72℃で1.5分を30サイクルであった。最終サイクルの後、72℃で10分間反応を延長し、次いで10℃で保持した。エチジウムブロマイド(0.5 µg/ml)を含有する1×TAE(40 mMトリス-酢酸塩、1 mM EDTA)中での1% (w/v) アガロースゲルによる電気泳動によって増幅産生物を可視化した。正確なサイズの産生物(プライマーpA-pHについて1500塩基対)に対応するバンドを示す反応生成物を、QIAquick PCR精製キット(QIAGEN、Crawley、West Sussex、UK)を製造者の指示に従って用いて精製した。

20

30

#### 【0040】

(v) rRNA配列決定：PCR産生物を配列決定するため、rRNAの5'末端近位の約1500ヌクレオチドを、dRhodamine terminator cycle sequencing kit (PE Applied Biosystems, Inc.、Foster City、California、USA)およびモデル377オートマチックDNAシーケンサー(PE Applied Biosystems, Inc.、Foster City、California、USA)を用いて標的とした。生成された配列を、FASTAプログラムおよびRibosomal Database Project (RDP)を用いてGenBank/EMBLデータベースにおいて利用可能な16S rRNA遺伝子配列と比較し、他の細菌種との同一性パーセンテージスコアを生成した。

40

#### 【0041】

結果：この遺伝子の1600塩基のうちの約1500を配列決定し、その微生物がラクトバシルス・ペントサスおよび系統発生的に類似するラクトバシルス・プランタラム(Lactobacillus plantarum)に密接に関連することが示された。

#### 【0042】

続いて、L. ペントサスLPKをブダペスト条約に従って、2001年8月28日に英国AberdeenのNCIMBに寄託し、受託番号NCIMB41114を受けた。

50

## 【実施例 2】

## 【0043】

単離されたラクトバシルスとカンジダ・アルビカンスとの相互作用

実験 1：カンジダ・アルビカンスおよびケモスタットから単離したラクトバシルスを、それぞれ、Sabouraud Dextrose ブロス (Oxoid) および MRS ブロス (Oxoid) において一晩増殖させた。次に、各々の 1 ml を、以下の培地成分を収容する 750 ml バッチ発酵槽に接種した：酵母エキスを 2 (g/蒸留水 1 l；以下同じ)、ペプトン水を 2、NaCl を 0.1、 $K_2HPO_4$  を 0.04、 $KH_2PO_4$  を 0.04、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  を 0.01、 $CaCl_2 \cdot H_2O$  を 0.01、 $NaHCO_3$  を 2、Tween 80 を 2、システイン・HCl を 0.5 およびグルコース 1.0。10  
培地を 121℃で 30 分間オートクレープ処理し、まだ熱いうちに窒素ガスの下に置いた。混合培養発酵を 37℃および pH 6.5 で嫌氣的に維持した。定時の試料を 48 時間にわたって採取し、顕微鏡で細胞数を計測した。培養物の同一性は、表現型および生化学的形質により確認した。発酵の最後に 1 ml を発酵槽から取り出し、連続的に希釈して MRS および Sabouraud Dextrose 寒天に塗布し、嫌氣的に 48 時間培養した。

## 【0044】

実験 2：カンジダ・アルビカンスおよび単離したラクトバシルスを、それぞれ、Sabouraud Dextrose および MRS ブロスにおいて一晩増殖させた。6 つの MRS 寒天 (2% w/v) プレートに等しい深さまで注ぎ、嫌氣的に還元した。次に、単離したラクトバシルス培養物を各々のプレート上に画線した。7 ml の Sabouraud Dextrose 寒天 (0.7% w/v) を 50℃で維持し、50 μl の C. アルビカンス培養物を接種した。その後、これを、ラクトバシルス培養物を画線したプレート上に均一に注いだ。これらのプレートを 37℃で 48 時間嫌氣的に培養し、阻害帯域について検査した。両実験を 6 回繰り返した。

(他に記述しない限り、全ての化学薬品は Sigma Chemical Co. から購入した。)

## 【0045】

実験 1 において、このラクトバシルス属の新規株は良好に増殖し、カンジダの成長を阻害してそれを接種レベルに抑制した (図 1)。実験 2 においては、カンジダが増殖することができない大きな阻害帯域がラクトバシルスのコロニー上に存在した (データは示さない)。抗微生物性作用に対するこの株の耐性およびカンジダ属の菌種に対するその強力な拮抗作用は、IBS のような疾患を治療する間の腸機能の維持の可能性にとって適切である。

## 【0046】

これらの実験に基づき、この微生物を鷲口瘡および IBS のような酵母の関連する疾患の通常の治療の補助または代替として適用できることが予測される。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0047】

【図 1】図 1 は、混合培養におけるカンジダ・アルビカンス (■) および L. ペントサス NCIMB 41114 (◆) の増殖、並びにこれと同じ条件下および培地での単独培養におけるカンジダ・アルビカンス (▲) の増殖を示す。

10

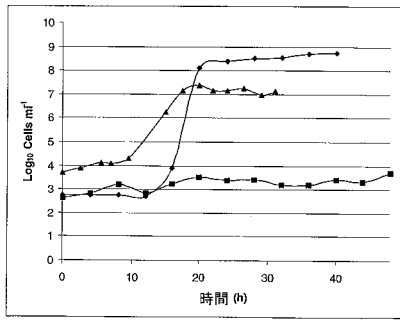
20

30

40

【図 1】

Fig. 1



---

フロントページの続き

|                                |  |               |
|--------------------------------|--|---------------|
| (51)Int.Cl.                    |  | F I           |
| <b>A 6 1 P 1/12 (2006.01)</b>  |  | A 6 1 P 1/04  |
| <b>A 6 1 P 3/02 (2006.01)</b>  |  | A 6 1 P 1/12  |
| <b>A 6 1 P 31/04 (2006.01)</b> |  | A 6 1 P 3/02  |
| <b>A 6 1 P 31/10 (2006.01)</b> |  | A 6 1 P 31/04 |
|                                |  | A 6 1 P 31/10 |

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(72)発明者 ウィン, アンソニー・ジー

イギリス国、バークシャー・アール・ジー・1・6・エイ・ゼット、レディング、ウーズレー・ストリート・41

(72)発明者 ギブソン, グレン・アール

イギリス国、バークシャー・アール・ジー・2・9・ディー・ダブリュ、レディング、シンファイールド、オートランズ・ロード・32

(72)発明者 ブロストフ, ジョナサン

イギリス国、ロンドン・エヌ・ダブリュ・3・5・エヌ・ビー、フィッツジョンズ・アベニュー・34

審査官 田中 公子

(56)参考文献 J.Appl.Microbiol., (1999) 87, p726-734

J.Food Prot., (1998) 61, 12, p1636-1643

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

BIOSIS/WPI(DIALOG)

MEDLINE(STN)

PubMed

JSTPlus(JDream2)

C12N 1/20

A61K 35/74