

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4350170号
(P4350170)

(45) 発行日 平成21年10月21日(2009.10.21)

(24) 登録日 平成21年7月31日(2009.7.31)

(51) Int.Cl.

F I

A 6 1 K 35/74 (2006.01)
 A 2 3 L 2/02 (2006.01)
 A 2 3 L 2/52 (2006.01)
 A 2 3 C 9/12 (2006.01)
 A 2 3 G 9/04 (2006.01)

A 6 1 K 35/74 A
 A 2 3 L 2/02 A
 A 2 3 L 2/00 F
 A 2 3 C 9/12
 A 2 3 G 9/04

請求項の数 17 (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平11-502253
 (86) (22) 出願日 平成10年6月2日(1998.6.2)
 (65) 公表番号 特表2002-507200(P2002-507200A)
 (43) 公表日 平成14年3月5日(2002.3.5)
 (86) 国際出願番号 PCT/SE1998/001041
 (87) 国際公開番号 WO1998/055131
 (87) 国際公開日 平成10年12月10日(1998.12.10)
 審査請求日 平成17年1月21日(2005.1.21)
 (31) 優先権主張番号 9702083-8
 (32) 優先日 平成9年6月2日(1997.6.2)
 (33) 優先権主張国 スウェーデン(SE)

微生物の受託番号 NCIMB 40564

(73) 特許権者
 エスーム、アクチボラグ
 スウェーデン国ウメオ、グリメルベージェン、
 5 イー
 (74) 代理人
 弁理士 佐藤 一雄
 (74) 代理人
 弁理士 小野寺 捷洋
 (74) 代理人
 弁理士 中村 行孝
 (74) 代理人
 弁理士 紺野 昭男
 (72) 発明者
 エバ、グラーン、ホカンソン
 スウェーデン国ウメオ、ニガタン、7 4

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ラクトバチルス・カセイ・ラムノススを含む薬学的調製物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトおよび動物における胃腸障害の予防および/または処置に必要な薬学的調製物であって、受入番号 NCIMB 40564 を有するラクトバチルス・カセイ・ラムノスス(Lactobacillus casei rhamnosus) LB21 の生存可能な微生物株を、微生物がその生存性を維持している少なくとも1つの薬学的に受容可能なキャリア媒体を含むことを特徴とする、薬学的調製物。

【請求項 2】

前記微生物株が、直ちに使用できる調製物の1mlあたり、 $10^2 \sim 10^{12}$ コロニー形成単位の量で存在することを特徴とする、請求項1に記載の薬学的調製物。

【請求項 3】

前記微生物株が、直ちに使用できる調製物の1mlあたり、 $10^6 \sim 10^{10}$ コロニー形成単位の量で存在することを特徴とする、請求項2に記載の薬学的調製物。

【請求項 4】

前記の薬学的に受容可能なキャリア媒体が、酸性化乳または発酵乳であることを特徴とする、請求項1に記載の薬学的調製物。

【請求項 5】

前記の薬学的に受容可能なキャリア媒体が、サワーミルク、ヨーグルトおよびミルク、または果汁、アイスクリーム、スープおよび果汁飲料であることを特徴とする、請求項4に記載の薬学的調製物。

10

20

【請求項 6】

調製物を動物に投与する場合、前記の薬学的に受容可能なキャリア媒体が、適切な動物飼料であることを特徴とする、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の薬学的調製物。

【請求項 7】

調製物を動物に投与する場合、前記の薬学的に受容可能なキャリア媒体が、ホエー、乾燥飼料、または濃縮された懸濁物であることを特徴とする、請求項 6 に記載の薬学的調製物。

【請求項 8】

前記微生物株が、スターター培養物として前記キャリア媒体に、および／または直ちに使用できる調製物に添加されていることを特徴とする、請求項 1 に記載の薬学的調製物。

10

【請求項 9】

前記薬学的調製物が、薬学的に受容可能なキャリア物質と一緒に、カプセル、錠剤または粉剤のような乾燥形態で存在するか、あるいは、必要に応じて凍結された、懸濁剤の形態で存在することを特徴とする、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の薬学的調製物。

【請求項 10】

前記薬学的調製物が、薬学的に受容可能なキャリア物質と一緒に、NaCl 溶液、グルコース溶液、またはスキムミルクの形態で存在することを特徴とする、請求項 9 に記載の薬学的調製物。

【請求項 11】

少なくとも 1 つの他のラクトコッカス属、ラクトバチルス属、またはビフィドバクテリウム属の微生物株もまた前記調製物に組み込まれていることを特徴とする、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の薬学的調製物。

20

【請求項 12】

ラクトコッカス・ラクチス (*Lactococcus lactis*) L1a もまた前記調製物に組み込まれていることを特徴とする、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の薬学的調製物。

【請求項 13】

抗生物質に関連する下痢、胃および上部小腸におけるヘリコバクター感染、旅行者の下痢、ストレスにより誘導される胃腸障害、細胞毒性により誘導される腸の影響、小児におけるアレルギー、便秘の予防および／または処置、および／または肝臓移植を受けた小児または胆管閉鎖症に関する手術を受けた小児における腸感染症または新生児もしくは未熟児である乳幼児における腸感染症の予防のための、請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載の薬学的調製物。

30

【請求項 14】

受入番号 NCIMB 40564 を有する、ヒトおよび動物における胃腸障害の防止および／または治療を行い得るラクトバチルス・カセイ・ラムノスス株。

【請求項 15】

抗生物質に関連する下痢、胃および上部小腸におけるヘリコバクター感染、旅行者の下痢、ストレスにより誘導される胃腸障害、細胞毒性により誘導される腸の影響、小児におけるアレルギー、便秘の予防および／または処置、および／または肝臓移植を受けた小児または胆管閉鎖症に関する手術を受けた小児における腸感染症または新生児もしくは未熟児である乳幼児における腸感染症の予防のための薬剤を調製するための、請求項 14 に記載のラクトバチルス・カセイ・ラムノスス株の使用。

40

【請求項 16】

生後、1 日目～8 日目の新生児の便から単離された、受入番号 NCIMB 40564 を有するラクトバチルス・カセイ・ラムノスス LB21 株を、微生物がその生存性を維持している薬学的に受容可能なキャリア媒体に加えることを特徴とする、請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載の薬学的調製物の製造方法。

【請求項 17】

ラクトバチルス・カセイ・ラムノスス LB21 株が、生後、5 日目の新生児の便から単離

50

されたものである、請求項 16 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、ヒトおよび動物における胃腸障害の予防および／またはその処置に必要な薬学的調製物に関する。

背景技術

多くの状況において広範に広がっている健康上の問題としては、様々な病原性微生物により引き起こされる下痢および他の腸管障害がある。このような問題は、抗生物質またはガンの処置で放射線による処置を受けている人々、ストレスで苦しめる人々、海外旅行者、および託児所などのデイケアセンターにおいて特にありがちである。そのように下痢を引き起こす腸内病原性細菌の例は、サルモネラ属細菌、赤痢菌属細菌、エルシニア属細菌、大腸菌、シュードモナス属細菌、クロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*) およびクロストリジウム・ソルデリ (*Clostridium sordelli*)、黄色ブドウ球菌、クレブシエラ属細菌、ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*)、およびカンピロバクター属細菌である。

微生物は、互いにその増殖を促進するか、または阻害することによって、互いに正の影響または負の影響を及ぼし合っていることが、長い間、広く知られている。このような干渉現象は、特に、ヒトの皮膚微生物叢、咽頭および腸において調べられている。その根本的な機構は完全に知られていないが、正常な微生物叢は、病原性細菌に対する防御において非常に重要であることが見出されている。細菌の侵入は、正常な微生物叢内の細菌により様々な方法で阻害される。そのような方法の 1 つは、抗生物質様の物質、いわゆるバクテリオシンの産生である。抗生物質とは対照的に、バクテリオシンは、ほとんどの場合、一定の群の細菌に対して非常に選択的な作用を有するが、微生物叢の残りには影響を及ぼさない。そのような特異的な作用を有する無害な細菌を感染で苦しんでいる患者に投与することは、その可能性について検討が行われているだけでなく、ある程度、実際に行われている。言うまでもないことではあるが、投与される細菌は、影響を及ぼし得る環境に定着し得るようにしなければならない。例えば、これは、抗生物質による処置の後、重症な下痢によって引き起こされる乱れた腸内微生物叢を有する患者にサワーミルクを与えるという考えである。しかし、腸内微生物叢においてどのような変化が生じるかは科学的に分析されておらず、そして、その効果は、たとえあったとしても、ほとんどの場合、はっきりしていない。これは、おそらくは、腸内ではコロニーが形成されなかったという事実、あるいは与えた細菌は、下痢を引き起こす細菌と干渉する可能性が全くなかったという事実のためである。鼻粘膜、皮膚および咽頭において微生物叢を無害な微生物と置き換える実験もまた行われた。この実験によって、いわゆる再コロニー化が可能であり、そして再コロニー化によって意図した効果を得ることができるということが明らかにされた。

上記のように、病原性微生物によって引き起こされる様々な障害で苦しんでいる患者に細菌を投与するために行われた実験は、ほとんどの場合、決定的な結果が得られていない。明らかに、コロニー形成および干渉を達成するためにはどのような細菌株が最も適するかという知識は十分ではない。

規定された条件下で研究することによって、最近、微生物間の相互作用を調節する機構の重要で基本的な原理を確立することが可能になり、そしてこのような相互作用を調べるための方法を開発することもまた可能になった。これにより、意味のある再現可能な方法でこの相互作用と干渉し得る可能性、従って、感染症の治療において、治療的 - 予防的にこの相互作用を利用し得る可能性が新しく開拓された。

新生児において、ビフィドバクテリウム属微生物と一緒に、最初に無菌の腸内に定着するのは、ラクトバチルス属の微生物株である、同様に、成人においては、ラクトバチルス属は、腸内における優勢な正常な微生物叢である。多くのラクトバチルス属の微生物株は、実際、潜在的な腸内の病原性細菌に対して阻害作用を有する乳酸、酢酸、および過酸化水素を産生する。それらのいくつかは、特定の微生物株に対する効果を有するが、他の物質

10

20

30

40

50

は、より広範な阻害効果を有する。

腸内微生物叢におけるラクトバチルス属の微生物株の重要性は、多くの異なる研究において明らかにされている（基本的な参考文献 1～8 を参照のこと）。例えば、特定のラクトバチルス属の微生物株は、病原性細菌のコロニー形成を防ぎ、バクテリオシンおよび他の抗菌成分を産生し、免疫系を刺激し、腫瘍および結腸ガンの危険性を低下させ、血清コレステロール含有量を減少させ、老人の胃腸管の運動性を改善し、ラクトース耐性を改善することなどが知られている。様々な研究もまた行われたが、この研究において、すべてのラクトバチルス属の微生物株が試験事項において機能していないという事実依存して、これらの効果を明らかにすることができなかった。いくつかの研究においては、不適切なラクトバチルス属微生物の調製物、例えば、粉末状態で、または非コーティングカプセルとして凍結乾燥された調製物が使用されている。

10

国際特許公開 WO 96 / 38159 (L a f o r L a b l t d) は、抗生物質に関連する下痢を処置するための薬学的組成物であって、特に、生きたラクトバチルス・ラムノスス (L a c t o b a c i l l u s r h a m n o s u s) 株を含有する組成物を開示する。

日本国特許出願第 172,949 号 (ヤクルト本社 (株)) は、特に、抗アレルギー剤における活性成分としてのラクトバチルス・ラムノススおよびラクトバチルス・カセイ (L a c t o b a c i l l u s c a s e i) を開示する。

国際特許公開 WO 93 / 01823 は、ヒトの腸内におけるコロニー形成能を有するラクトバチルス属の微生物株を単離するための方法に関する。例えば、L . c a s e i s p . r h a m n o s u s 271 株が単離され、これは、特に、発酵させた栄養物の組成物の形態で、細菌感染症の予防または処置に有用であるといわれている。議論されているこの微生物株は、成人の腸から単離された。

20

欧州特許 EP - A - 0 271 364 は、動物の腸障害の処置または予防に必要な調製物に関する。この調製物は、特に、L a c t o b a c i l l u s c a s e i s p p . r h a m n o s u s の表現型から選択される 1 つまたは複数の乳酸細菌を含む。この調製物は、複数の微生物株の非特異的な混合物であり、さらにまた、ヒトにおける使用を目的としていない。議論されているこの微生物株は、ウシおよびヒツジから単離されたようであり、従って、ヒトに対して適用することができない。さらに、実験は、ウシおよびヒツジに対して行われたただであった。

30

DT - A 1 - 2 , 421 , 066 は、乱れた腸内微生物叢を正常な状態に回復させるための調製物であって、ビフィドバクテリウム属微生物と、おそらくは、同様に L a c t o b a c i l l u s c a s e i v a r . r h a m n o s u s 株との混合物を含む調製物に関する。

異なる細菌の間の相互作用に関する本発明者らの研究において、本発明らは、特に、特定のラクトバチルス属微生物株が、抗生物質の摂取によって生じる下痢を抑えるためにどのように作用し、そしてヘリコバクターなどの病原性細菌の増殖をどのように防止するかということを研究した。実験室規模で、様々な生物学的特性を有する非常に多くのクローンが単離されたラクトバチルス属微生物の培養物を試験した。これらの 1 つであるラクトバチルス・カセイ・ラムノスス (L a c t o b a c i l l u s c a s e i r h a m n o s u s) L B 21 (下記において、さらに「LB21」として示される) は、乳児の便から単離され、そしてヒトにおける様々な種類の感染症に重要な細菌 (例えば、黄色ブドウ球菌、様々な微生物種のサルモネラ属細菌、赤痢菌属細菌、シュドモナス属細菌、クレブシエラ - 腸内細菌、カンピロバクター属細菌、クロストリジウム・ディフィシル、ヘリコバクター・ピロリなど) の大多数に対して特に著しい阻害作用を有することが明らかにされた。腸内の病原性細菌に対する、まさに LB21 の強力な阻害作用は、おそらくは、LB21 が、熱に安定な、5000 ダルトン未満の分子量を有し、そして特徴的な様式で腸内の病原性細菌に対する有害作用を有する特異的な低分子量タンパク質または特異的な低分子量ペプチドを産生しているという事実によるものである。

40

しかし、上記の刊行物はいずれも、乳児の便から単離され、そして非常に関連する微生物

50

株と比較して、胃腸障害に対する著しく改善された効果を有するラクトバチルス・カセイ・ラムノスス LB21株を記載していない。

発明の開示

本発明の目的は、先行技術による処置方法によって可能になる以上に効果的に上記の健康上の問題を軽減することである。この目的は、導入方法として言及したタイプの薬学的調製物で、さらに、添付した請求項の第1項の特徴部において規定される特徴を有する薬学的調製物によって達成される。好ましい実施形態は、添付される従属項に記載されている。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、ヒトおよび動物における胃腸障害の予防および/またはその処置に必要な薬学的調製物に関する。この調製物は、ラクトバチルス・カセイ・ラムノスス LB21株の生存形態の生きた微生物株および/または本質的に類似する機能を有する1つまたは複数のその変異体を、微生物がその生存性を維持している少なくとも1つの薬学的に受容可能なキャリア媒体に含むことを特徴とする。より詳細には、本発明は、特に、抗生物質に関連した下痢、胃におけるヘリコバクター感染、旅行者の下痢、およびストレスにより誘導される胃腸障害の予防および/または処置に必要な薬学的調製物に関する。

さらに、本発明は、ヒトおよび動物における胃腸障害の防止および/または治療を行うことができ、そして、生後、約1日目～8日目の乳児の便から単離されたラクトバチルス・カセイ・ラムノスス NCIMB 40564株に関する。

本発明の薬学的調製物は、微生物株ラクトバチルス・カセイ・ラムノスス LB21またはその変異体を、直ちに使用できる調製物の1mlあたり、 $10^2 \sim 10^{12}$ のコロニー形成単位の量で、好ましくは $10^6 \sim 10^{10}$ のコロニー形成単位の量で含有する。

コロニー形成単位という表現は、基質上で増殖する1つまたは複数の細菌を含有するコロニーの数を意味する。

ヘリコバクター感染という表現は、ヘリコバクター属細菌が胃または小腸の上部部分に存在することが同定された胃潰瘍の症状を意味する。

旅行者の下痢という表現は、例えば、海外において、さらには、例えば、サルモネラ属細菌および大腸菌によって引き起こされる感染の場合における胃腸内の微生物叢の変化として生じる下痢を意味する。

ストレスにより誘導される胃腸障害という表現は、胃痛、下痢、ガス生成などを引き起こす胃腸内の微生物叢のアンバランスを意味する。

本発明の好ましい実施形態において、LB21のキャリアは、サワーミルク、ヨーグルト、ミルクなどの酸性化(soured)乳製品または発酵乳製品であり、あるいは果汁、アイスクリーム、スープまたは果汁飲料である。微生物株は、そのような乳製品を調製するときのスターター培養物として使用することができ、好都合な微生物株の量が増大した酸性化乳製品または発酵乳製品を得ることができる。当然なことではあるが、LB21を、調製後の乳製品に、あるいは果汁、スープまたはアイスクリームに加え、このようにして、媒体中における望ましい細菌の量を多くすることも可能である。このような実施形態は、このようにして得られる調製物は健康によく、高く評価された食品であるために非常に重要である。そのような調製物は、下痢および乳幼児に影響を及ぼすことが多い他の腸感染に対して予防的または治療的に投与することができる。さらに、そのような調製物は、抗生物質またはガンの処置において放射線による処置を受けている人々に、胃におけるヘリコバクター感染を有する人々に、そして海外旅行者に投与することができる。このような人々は、多くの場合、胃腸管に対して異常な微生物叢が生じている。

本発明の調製物はまた、経口投与を行うための乾燥形態で、例えば、カプセル、錠剤または粉剤の形態で、あるいはNaCl溶液、グルコース溶液、またはスキムミルクなどの(必要に応じて凍結される)懸濁剤の形態で存在し得る。このときに使用されるキャリア媒体は、従来のタイプのものであり、当業者には周知である。カプセルは、胃液に対して抵抗性のタイプのものである。そうすることによって、微生物は胃液から保護され、腸内でのみ放出される。同じ理由により、錠剤を、胃液に対して抵抗性の従来技術のコーティ

10

20

30

40

50

ングとともに投与することができる。粉剤は、投与する前に、水性液（例えば、水、果汁またはいくつかの乳製品）に攪拌されることが意図され得る。

従って、本発明の調製物は、抗生物質に関連する下痢に対する予防剤および／またはその処置剤として特に大きな可能性を有することが見出されている。

本発明の調製物はまた、ヒトおよび動物の胃および上部小腸におけるヘリコバクター感染の予防および／または処置のために有利に使用することができるが、いわゆる旅行者の下痢およびストレスによって誘導される胃障害に対しても使用することができる。

本発明による薬学的調製物において、1つまたは複数のラクトコッカス属またはラクトバチルス属の微生物株などのいくつかの他の乳酸細菌もまた、おそらく、組み込むことができる。しかし、好ましくは、ラクトコッカス・ラクチス（*Lactococcus lactis*）L1A株が同様に組み込まれる。

10

本発明による薬学的調製物はまた、下記の状態における小児の予防および／または処置において特に好都合であることが見出されている。

a) 集中治療を必要とする新生児および未熟児。

そのような集中治療は、ラクトバチルス属微生物およびビフィドバクテリウム属微生物による腸での正常なコロニー形成が行われていないことにより、病原性細菌が優勢になる危険性が高まるという事実において行うことができる。これはまた、感染症の危険性および抗生物質の使用を増大させる。LB21の投与は、このような乳幼児における腸内微生物叢を正常にすることができ、そして上記の好ましくない発生に対抗し得る。

b) I型糖尿病、セリアキ（*celiac*）（グルテンアレルギー）、および様々な自己免疫状態になる危険性の増大に曝された乳幼児。

20

これらの障害を引き起こす要因の1つは、おそらくは、食物、腸内細菌、ウイルス、または他の微生物に由来する抗原（身体内に天然に存在しない物質）が、身体の自身の組織に対する免疫反応を引き起こし得るような、腸での免疫調節の乱れである。LB21の投与によって、腸内の微生物叢を正常にすることができ、従って、これらの障害の発生を抑えることができる。

c) 胆管閉鎖症（肝臓の内部および／または外部において胆管の完全な喪失または部分的な喪失を伴う先天性奇形）に関する手術が行われた小児および肝臓移植が行われた小児。これらのカテゴリーの小児は、手術後の肝臓／胆管に影響を及ぼす感染症によって攻撃される危険性が大きくなる。LB21の投与は、このような感染症を通常引き起こす細菌の増殖を阻害することによって、そのような合併症の危険性を減少させることができる。

30

本発明の薬学的調製物はまた、細胞毒性の処置との関連において有用である。ガン疾患の患者は、多くの場合、腸の機能に対して好ましくない作用を有し、そして腸粘膜の構造およびその新しい増殖に対して有害な作用を有する細胞毒素で処置されている。その結果、このような処置は、しばしば、栄養物の吸収作用の低下および下痢を引き起こす。さらなる結果は、腸内細菌が、弱くなった腸粘膜を介して血管にまで広がり、重篤な感染症を引き起こし得るということである。これは、抗生物質の消費を増大させ、その結果、腸の機能をさらに悪化させる。これは、様々な腸内細菌が抗生物質に対する耐性を獲得することを意味し得る。

細胞毒素による処置に関連してLB21を与えることによって、腸粘膜の機能および構造に対する好ましくない作用を減少させることができ、従って、腸内の細菌によって引き起こされる重篤な感染症の危険性を減少させることができる。

40

さらに、本発明による薬学的調製物は、小児のアレルギー（例えば、アトピー性湿疹）の防止に有用であり、そして、特に老人における便秘の防止および処置に有用である。

本発明の薬学的調製物が動物の処置を目的とする場合、キャリアは、ホエー、乾燥飼料、または濃縮された懸濁物の形態などの好適な飼料である。

微生物は、凍結乾燥された状態で、好ましくは、スキムミルク中で、乾燥した暗所に保存できる。しかし、約-70の温度でも凍結される。

本発明の調製物の必要な用量は、患者の年齢および状態、ならびに病気の困難さの種類および程度のような要因に依存して調節することができる。このような背景に対する適切な

50

用量を決定することは当業者がなし得る範囲内である。本発明のさらなる利点は、非常に過大な用量の薬学的投与であっても、患者に対する危険性をほとんど意味しないということである。

本発明の微生物

上記の微生物株ラクトバチルス・カセイ・ラムノス LB21は、約100株のラクトバチルス属微生物の1つとして、約5日目の健康な新生児の便から単離され、次いで、本発明の目的のために最も効果的な微生物株であるとして選択された。LB21が、生後の第1日目～第8日目などの第1週の新生児、好ましくは生後約5日目の新生児から単離されたことは非常に重要である。LB21は、FasolaおよびBioRadの方法によるパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)を使用することによって、他のラクトバチルス・カセイ・ラムノス株と区別される。LB21は、以前には単離も定義もなされておらず、従って、以前には全く知られていなかったラクトバチルス・カセイ・ラムノス株である。これは、上記の健康上の問題および病気-健康の状態において、特に好ましい作用を有することが見出された。

10

下記の表に、いくつかの病原体に対する阻害作用に関して、LB21を、新生児の便から単離された他のラクトバチルス属の微生物株と比較した初期段階の選択における試験結果を示す。

競合結果

病原体	LB6	LB8	LB14	LB18	LB21	LB27	LB32
大腸菌	4/5	1/5	0/5	2/5	5/5	0/5	1/5
クレブシエラ	2/5	2/5	1/5	2/5	5/5	1/5	3/5
腸球菌	0/5	0/5	0/5	1/5	3/5	0/5	1/5
GBS	2/5	0/5	0/5	2/5	5/5	0/5	2/5

20

上記のように、LB21株は、本発明の調製物における活性成分として含まれ、1993年6月11日にThe National Collection of Industrial and Marine Bacteria (NCIMB) (23 St. Macher Drive, Aberdeen AB2 1RV、英国)に寄託された。その受入番号は、NCIMB 40564である。この微生物株は、Lactobacillus casei rhamnosus L2005の識別名として寄託されたが、この微生物株の通常の呼称は、後日、Lactobacillus casei rhamnosus LB21に変更されたことに注意しなければならない。この微生物株は、API 50CHシステム(API-System, Labalmles Grottes, 38390 Montalieu, Vercieu)に従ってタイプ化または分類が行われる。これは、下記のタイプ化表から明らかである。

30

API 50CL

37、CO₂血液寒天

	化合物	コード	2 4 時間	4 8 時間	
0	チェック	—	—	—	
1	グリセロール	—	—	—	
2	エリトリトール	—	—	—	
3	D-アラビノース	—	—	—	
4	L-アラビノース	—	—	—	10
5	リボース	+	+	+	
6	D-キシロース	—	—	—	
7	L-キシロース	—	—	—	
8	アドニトール	—	—	—	
9	β -メチルキシロシド	—	—	—	20
10	ガラクトース	+	+	+	
11	D-グルコース	+	+	+	
12	D-フルクトース	+	+	+	
13	D-マンノース	+	+	+	
14	L-ソルボース	—	—	—	30
15	ラムノース	G	G	G	
16	ダルシトール	+	G	+	
17	イノシトール	—	—	—	
18	マンニトール	+	+	+	
19	ソルビトール	+	G	+	40
20	α -メチル-D-マンノシド	—	—	—	
21	α -メチル-D-グルコシド	—	—	—	
22	N-アセチルグルコースアミン	+	+	+	
23	アミグダリン	G	—	G	

2 4	アルブチン	+	—	+	
2 5	エスクリン	+	+	+	
2 6	サリシン	+	+	+	
2 7	セロビオース	+	—	+	
2 8	マルトース	—	—	—	
2 9	ラクトース	+	+	+	10
3 0	メリビオース	—	—	—	
3 1	サッカロース	—	—	—	
3 2	トレハロース	+	+	+	
3 3	イヌリン	—	—	—	
3 4	メラジトース	+	—	+	20
3 5	D-ラフィノース	—	—	—	
3 6	アミドン	—	—	—	
3 7	グリコーゲン	—	—	—	
3 8	キシリトール	—	—	—	
3 9	β -ゲンチオビオース	G	—	G	30
4 0	D-ツラノース	—	—	—	
4 1	D-リキソース	—	—	—	
4 2	D-タガトース	+	+	+	
4 3	D-フコース	—	—	—	
4 4	L-フコース	—	—	—	40
4 5	D-アラビトール	—	—	—	
4 6	L-アラビトール	—	—	—	
4 7	グルコン酸	G	G	G	

48	2-セトグルコン酸	—	—	—
49	5-セトグルコン酸	—	—	—

G=緑色

+=黄色への完全な変化

—=最初の青がかった赤藤 (blue-lilac) 色

亜種のラクトバチルス・カセイ・ラムノスス (LB21) の場合と同様に、様々なラクトバチルス属微生物株の間には大きな違いが存在することをここで強調することは重要である。本発明による薬学的調製物における LB21 は、ラクトバチルス・カセイ・ラムノスス株として明確に同定された。しかし、これは、議論しているこの微生物株が、国際特許公開 WO93/01823 などの文献に記載されている他のラクトバチルス・カセイ・ラムノスス株と同一であるか、または類似しているということを決して意味していない。これらの亜種は、例えば、酸素環境下で、そして様々な温度で増殖が異なる。これにより、同一の微生物株でないことは明らかであり、個々の亜種の詳細な特徴 (上記参照) は、亜種が、当業者によって認識される異なる特性を有することを示す。例えば、大きな違いは、LB21 は新生児の便から単離されたが、国際特許公開 WO93/01823 の微生物株 271 は成人の腸から単離されたということである。

しかし、本発明による薬学的調製物はまた、本質的に類似する機能、すなわち、上記の胃腸障害の防止および/または治療を行い得る能力を有するラクトバチルス・カセイ・ラムノスス LB21 の変異種 (例えば、突然変異体) を含む。

実験例

胃腸管の通過

ヒトおよび動物の小腸および大腸で作用し得るために、本発明の調製物における LB21 などの乳酸細菌の共生微生物株に関する必要条件は、胃の酸性環境を生存して通過しなければならないことである。ラクトバチルス・カセイ・ラムノスス LB21 が生存して胃を通過して、健康な志願者の便に見出され得ることを明らかにするための研究を行った。さらに、本発明者らは、実験の被験者が LB21 の経口摂取を中断した後の便において、この微生物株がどのくらいの期間にわたって見出されるかを調べた。

実験 A において、25 名の健康な志願者から得られた便のサンプルを無菌プラスチックチューブに入れた。サンプルは、培養を開始するまでは冷所 (最高温度、4) に保存した。培養する前に、サンプルを 0.9 % 塩溶液に 1 : 10 の比で混合した。次いで、10 μ l のサンプルを、128 μ / ml バンコマイシンを含むロゴサ (Rogosa) 平板で培養した。平板を、CO₂ 環境下、37 でインキュベーションし、48 時間後に観測した。実験 B への参加に関する限界を、便 1 g について、バンコマイシン耐性乳酸菌が最大でも 4 $\times$ 10⁴ コロニー形成単位であるように設定した。

実験 B において、参加した 25 名の上記被験者のうち 13 名は、腸において、相対的にバンコマイシン感受性乳酸菌の微生物叢を有していた。被験者は、実験の最終日まで、実験開始の 2 週間前から乳酸菌を含有する食物を取らないように指示された。各被験者は、食事と一緒に、1 日あたり、10¹¹ コロニー形成単位の生きた LB21 を有する 10 ml の塩溶液を 5 日間にわたって摂取した。これらの被験者から、乳酸菌摂取の前日 (0 日目のサンプル)、次いで、LB21 摂取の 4 日目から、処置が完了したときまで、およびその後の 12 日間について便のサンプルを得た。サンプルのサンプリングおよび培養は、実験 A と同じ方法に従って行った。ラクトバチルス・カセイ・ラムノスス LB21 の同定は、グラム染色および API 分類 (CHL 培地) によって行った。

被験者 No. 8 は、実験期間中、ペニシリンを服用していたことに注意しなければならな

10

20

30

40

50

い。従って、この被験者は、L B 2 1 を、残りの被験者群と同じときに開始して 1 0 日間にわたって摂取した。

実験 B は、L B 2 1 の摂取を止めた 1 2 日後で中断した。実験を 1 2 日で中断したが、L B 2 1 は、1 3 名の被験者のうち 4 名の便において依然として見出され得る。残る 9 名の被験者においては、L B 2 1 は、平均して、摂取を止めた 5 日後の便から単離することができる。ペニシリンを服用している被験者 N o . 8 においては、L B 2 1 は、ペニシリンの全処置期間中の便および摂取を止めた 2 日後の便に見出された。便のサンプルにおいて、L B 2 1 は、便 1 g あたり、 $1 \times 10^3 \sim 5 \times 10^5$ コロニー形成単位の程度で見出された。

被験者	L B 2 1 が便に存在する処置中断後の日数	
1	3	
2	6	
3	3	
4	1 2	
5	1 2	20
6	3	
7	5	
8	2	
9	7	
1 0	1 2	30
1 1	3	
1 2	7	
1 3	1 2	

まとめると、ラクトバチルス・カセイ・ラムノス L B 2 1 株は、生存して胃を通過し、そしてすべての被験者の便において、さらには、ペニシリン処置を受けている被験者の便において見出され得ることを実証することができる。1 3 名の被験者のうちの 4 名は、L B 2 1 の経口摂取を中断した 1 2 日後の便において L B 2 1 が依然として存在していた。残る 9 名の被験者は、平均して、L B 2 1 の摂取を中断した 5 日後において L B 2 1 が依然として存在していた。1 3 名の被験者群の全体に関する平均日数は 6 日であった。

ラクトバチルス・カセイ・ラムノス L B 2 1 の阻害作用

上記の乳酸細菌 L B 2 1 を、大多数の腸内の病原性細菌に対するその阻害作用について調べた。十分な阻害作用を有することが見出された。L B 2 1 が大腸菌 O - 1 5 7、クロストリジウム・ディフィシリ、およびヘリコバクター・ピロリをも阻害し得るかどうかを調べるための実験もまた行った。

2 株の大腸菌 O - 1 5 7 (一方は $t o x^-$ であり、他方は $t o x^+$ である) を患者から単離した。抗生物質に関連した下痢で苦しんでいる患者から得られた 5 株のクロストリジウム・ディフィシリ、および臨床材料 (生検試料) から得られた 3 株のヘリコバクター・ピロ

10

20

30

40

50

リもまた試験した。干渉試験の実施において、試験する細菌に調節した寒天層方法を使用した。この方法は、ラクトバチルス属微生物株が、MRSプロス(Merck)において、37℃で、5%CO₂で一晩培養されることを意味する。次いで、各微生物株をMRS寒天(25ml寒天)の中に別々に入れて固めた。寒天平板を、上記の条件で24時間インキュベーションした。新しい寒天層(M17寒天(Merck)、25ml)または血液寒天(BHI+ウマ血液)を第1層に重層し、次いで第2層を4時間固化させる。次いで、試験細菌を、TY培地(Holm, SEおよびFalsen, E、APMIS 1967; 69、264)において37℃で別々に培養した。細菌をベルタニ溝(Bertanitrrough)に通した(0.25ml、10⁶細菌/ml)。この細菌を、新しいベルタニ溝において、NaClで1:10に希釈した。次いで、これらの溝から、試験株(25/溝)をSteersのスチールピンレプリケーターによって寒天平板に塗布した。平板のインキュベーションを、大腸菌については37℃で、クロストリジウム・ディフィシルについては37℃で嫌氣的に、そしてヘリコバクター・ピロリについては37℃で微好氣的環境下で行った。(Steers E他、J. Antibiot. Chemoter. 179; 9、307)。確認のためには、LBを含まない平板を使用した。LB21株は、試験したすべての細菌を阻害した。

最終結果により、LB21株は、これらの腸内病原体に対する十分に優れた阻害作用を有することが明らかにされた。このような作用は、下記の表から明らかである。

ラクトバチルス属微生物LB21の阻害作用

試験細菌	数	阻害数	阻害%
大腸菌	48	48	100
腸球菌	41	34	83
B群連鎖球菌	100	100	100
A群連鎖球菌	5	5	100
クレブシエラ	36	36	100
プロテウス・ミラビリス	16	16	100
サルモネラ属細菌	15	15	100
赤痢菌属細菌	15	15	100
シュードモナス・エルギノーザ	15	15	100
エルシニア属細菌	10	10	100
スタフィロコッカス・サピロ	6	4	67
ラクトバチルス属細菌	11	0	0
ヘリコバクター・ピロリ	3	3	100
大腸菌O-157	2	2	100
クロストリジウム・ディフィシル	5	5	100

試験を、ブロスの場合と同様に、寒天層方法に従って行った。試験を繰り返し、そしていくつもの異なる pH 値で行った。

抗生物質に関連した下痢を阻害するラクトバチルス・カセイ・ラムノス LB 21 の能力

31名の健康な被験者がこの実験に参加した(16名の男性および15名の女性)。次いで、被験者を、性別により、次いで、無作為に試験群およびコントロール群に分けた。試験群には16名の被験者が含まれ、コントロール群には15名の被験者が含まれた。試験群の平均年齢は24.6才であった(19才~31才の範囲)。コントロール群の平均年齢は24.4才であった(20才~33才の範囲)。コントロール群の2名の被験者は、妊娠および抗生物質の摂取によって生じた問題のために実験の途中で離脱した。従って、脱落は6.5%に達した。最後の便の試験に関して、コントロール群においてさらにもう1名の被験者が、スポーツ外傷のために離脱した。被験者の中には喫煙者またはかぎタバコ使用者はおらず、そして被験者は誰も、実験直前の6ヶ月間は抗生物質を服用していなかった。カペペニン

10

(Kåvepenin)

以外の薬物治療は、実験期間中には行われなかった。被験者は、ペニシリン摂取を開始する2週間前、および実験期間中に何らかの発酵製品を摂取することは禁じられた。実験は、二重盲検偽薬管理試験として行われ、

Umeå大学医学部 (Umeå)

の研究倫理委員会によって承認された。

20

試験群ならびにコントロール群は、500mgのカペペネニン

(Kåvepenin)

(フェノキシメチルペニシリンカリウム、Astra Läkemedel、Södertälje)

をカプセルで経口的に1日に2回10日間にわたって服用した。

試験群には、LB 21

(Essum、Umeå)

を 10^{11} cfu (コロニー形成単位) / ml で含む凍結スキムミルクを与えた。コントロール群には、偽薬としてスキムミルクを与えた。試験群の被験者は、LB 21を含む5mlの凍結スキムミルクまたは偽薬を1日に2回摂取した。摂取をペニシリンと同時に開始し、15日間続けた。

30

便のサンプルを、0日目においてカペピニン

(Kåvepinin)

の摂取前、カペペニンおよびLB 21または偽薬の摂取期間間、カペペニン処置が完了した後においてLB 21 / 偽薬の摂取期間間の10日目および15日目に採取した。サンプルを冷所(+4 ~ 8)で保存し、その後、実験室に送り、実験室において、分析するまで-20で凍結して保存した。すべてのサンプルは、サンプリングの24時間以内に凍結した。

40

被験者は、カペペニン摂取の1週間前から、処置が完了した後の5日目まで、1日あたりの排便回数および一定の形態での便の硬さを記録した。胃痛および他の主観的な症状もまた記録した。

サンプリングした便は、重量を測定し、滅菌水で1:10の比で希釈した。pHを、混合物の中央部において試験紙(Merck、pH 5~10)で測定した。滅菌水によって希釈した後、LB 21を、128 µgのバンコマイシンを含むロゴサ平板で培養した。サンプルを、CO₂環境下、37で48時間インキュベーションした。

すべての乳酸菌を、滅菌水による希釈後、ロゴサ平板で培養した。サンプルは、嫌気的なインキュベーションを37で48時間行った。次いで、サンプルを-20で保存した。

50

クロストリジウム・ディフィシリの毒素に関する試験を、A r o n s s o n 他に従って行った。

排便の頻度、便の硬さ、胃痛、および他の主観的な症状を記録し、そして平均値、中央値および範囲を計算した。

統計学的な計算を、S P S S f o r W i n d o w s を用いて行った。結果を、平均値および中央値として表した。乳酸菌の値は、対数化 (l o g 10) し、その後、統計学的計算を行った。中央値、および最大値と最小値との範囲を、排便回数、便の硬さ、およびpH値に基づいて計算した。群間の統計学比較を、正常範囲が見出され得ないか、または信頼性がない場合に、M a n n - W h i t n e y U 検定を用いて行った (排便回数、便の硬さ、乳酸菌、pH) 。 0 . 0 5 未満のpHを、統計学的に有意と見なした。

10

結果

L B 2 1 を摂取した被験者は、フェノキシメチルペニシリンを摂取している間、偽薬群と比較して、排便/下痢はかなり少なくなった：すなわち、それぞれ、0 . 2 4 および 0 . 9 8 ($p < 0 . 0 5$) 。さらに、排便の頻度および胃痛の発生は、ペニシリンの摂取前の状況と比較して、偽薬群におけるペニシリン処置期間中、相当の程度にまで増大した。L B 2 1 を与えた群において、便中のラクトバチルス・カセイ・ラムノススの量もまた、かなり増大した。しかし、2つの群において、排便の頻度、または便のサンプル中における乳酸菌の総数には、大きな違いはなかった。さらに、2つの群のいずれにおいても、クロストリジウム・ディフィシリの毒素は認められなかった。

20

参考文献：

- 1 . S a n d i n e , W . E . 、 1 9 7 9 、 胃腸管における乳酸菌の役割、J . F o o d P r o t e c t . 4 2 、 2 5 9 ~ 2 6 2 。
- 2 . F u l l e r , R . 、 1 9 8 6 、 共生学、J . A p p l . B a c t e r i o l . S y m p . S u p p l . 1 S ~ 7 S 。
- 3 . G i l l i l a n d , S . E . 、 N e l s o n , C . R . および M a x w e l l , C . 、 1 9 8 5 、 L a c t o b a c i l l u s a c i d o p h i l u s によるコレステロールの吸収、A p p l . E n v i r o n . M i c r o b i o l . 3 3 、 1 5 ~ 1 8 。
- 4 . G o l d i n , B . R . および G o r b a c h , S . L . 、 1 9 8 0 、 ラットにおける 1 , 2 - ジメチルヒドラジン二塩酸塩によって誘導された腸ガンに対する L a c t o b a c i l l u s a c i d o p h i l u s 食物強化物の効果、J . N a t l . C a n c e r I n s t . 6 4 、 2 6 3 ~ 2 7 1 。
- 5 . G o l d i n , B . R . および G o r b a c h , S . L . 、 1 9 8 7 、 乳酸菌 G G : 胃腸管における生存、接着および抗菌活性に関して好ましい特性を有する新しい微生物株、F E M S M i c r o b i o l . R e v . 4 6 、 7 2 頁。
- 6 . L e s s a r d , M . および B r i s s o n , G . J . 、 1 9 8 7 、 乳離れしたブタにおける成長免疫応答および便の酵素活性に対する乳酸菌発酵産物の効果、C a n . J . A n i m . S c i . 6 2 、 5 0 9 ~ 5 1 6 。
- 7 . S i i t o n e n , S . 、 V a p a a t a l o , H . 、 S a l m i n e n , S . 、 G o l d i n , A . 、 S a x e l i n , M . 、 W i k b e r g , R . および K i r k k o l a , A - L . 、 1 9 9 0 、 抗生物質に関連する下痢の防止に対する乳酸菌 G G ヨーグルトの効果、A n n u a l M e d . 2 2 、 5 7 ~ 5 9 。
- 8 . F e r n a n d e s , C . 、 S h a h a n i , K . 、 A m e r , M . 、 1 9 8 7 、 食事性乳酸菌および乳酸菌発酵乳製品の治療的役割、F E M S m i c r o b i o l . R e v . 4 6 : 3 4 3 ~ 3 5 6 。

30

40

 フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 2 3 K	1/16	(2006.01)	A 2 3 K 1/16 3 0 4 B
A 6 1 P	1/00	(2006.01)	A 6 1 P 1/00
C 1 2 N	1/20	(2006.01)	C 1 2 N 1/20 A
C 1 2 R	1/245	(2006.01)	C 1 2 N 1/20 A
			C 1 2 R 1:245

(72)発明者 ステラン、ホカンソン
スエーデン国ウメオ、ニガタン、74

審査官 佐久 敬

(56)参考文献 特表平06-501624(JP,A)
欧州特許出願公開第00271364(EP,A1)
西独国特許出願公開第02421066(DE,A)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)
A61K 35/74
C12N 1/20
CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)