

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7030716号

(P7030716)

(45)発行日 令和4年3月7日(2022.3.7)

(24)登録日 令和4年2月25日(2022.2.25)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 Q 1/04 (2006.01)

C 1 2 Q 1/04

Z N A

A 6 1 K 35/744 (2015.01)

A 6 1 K 35/744

A 6 1 K 35/747 (2015.01)

A 6 1 K 35/747

A 6 1 P 37/08 (2006.01)

A 6 1 P 37/08

C 1 2 N 1/20 (2006.01)

C 1 2 N 1/20

E

請求項の数 9 (全23頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-558668(P2018-558668)

(86)(22)出願日 平成29年5月8日(2017.5.8)

(65)公表番号 特表2019-520801(P2019-520801
A)

(43)公表日 令和1年7月25日(2019.7.25)

(86)国際出願番号 PCT/SE2017/050455

(87)国際公開番号 WO2017/196235

(87)国際公開日 平成29年11月16日(2017.11.16)

審査請求日 令和2年5月8日(2020.5.8)

(31)優先権主張番号 1650620-6

(32)優先日 平成28年5月9日(2016.5.9)

(33)優先権主張国・地域又は機関

スウェーデン(SE)

微生物の受託番号 DSMZ DSM17938

DSMZ DSM32273

最終頁に続く

(73)特許権者 500155578

バイオガイア・エイビー

B i o g a i a A B

スウェーデン・エス - 1 0 3 6 4 ストツ

クホルム・ピーオーボツクス 3 2 4 2

(74)代理人 110000855

特許業務法人浅村特許事務所

(72)発明者 ヴァーサロヴィック、ジェイムズ

アメリカ合衆国、テキサス、ベライア、

サウス サード ストリート 5 3 4

(72)発明者 モルシュタム、ボー

スウェーデン国、レールム、セーデルフ

リッツヴェーゲン 1 2

(72)発明者 ガネッシュ、バーヌ プリヤ

アメリカ合衆国、テキサス、ヒュースト

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アレルギー治療に有用な細菌株の選択

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳動物における食物アレルギーの予防、抑制及び／又は治療に使用するための乳酸菌株の選択方法であって、

ジアシルグリセロールキナーゼ (D a g K) を産生する能力に関して乳酸菌株をスクリーニングすること；並びに

哺乳動物における食物アレルギーの予防、抑制及び／又は治療に使用するための D a g K を産生する能力を有する乳酸菌株を選択すること、を含む上記方法。

【請求項 2】

乳酸菌株を選択することが、D a g K を産生する能力を有し、且つ D a g K を細胞外に放出可能である乳酸菌株を選択することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記乳酸菌株をスクリーニングすることが、D a g K を産生する能力に関してラクトバチルス・ロイテリ (L a c t o b a c i l l u s r e u t e r i) 株をスクリーニングすることを含み；及び

前記乳酸菌株を選択することが、D a g K を産生する能力を有する L . ロイテリ株を選択することを含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記乳酸菌株をスクリーニングすることが、d a g K 遺伝子を含む D a g K をコードする

遺伝子の存在に関して前記乳酸菌株をスクリーニングすることを含み；及び
前記乳酸菌株を選択することが、前記dagK遺伝子を含むDagKをコードする前記遺伝子を含む乳酸菌株を選択することを含む、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

前記乳酸菌株をスクリーニングすることが、前記乳酸菌株の細胞質ゾル中のDagKの存在及び／又は前記乳酸菌株を培養するそれぞれの培地中のDagKの存在に関して前記乳酸菌株をスクリーニングすることを含み、及び

前記乳酸菌株を選択することが、i) 乳酸菌株の細胞質ゾル中にDagKを含む乳酸菌株及び／又はii) 前記乳酸菌株を培養する培地がDagKを含む乳酸菌株を選択することを含む、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項6】

哺乳動物における、食物アレルギーの予防、抑制及び／又は治療に使用するための、___ジアシルグリセロールキナーゼ(DagK)を産生する能力を有する乳酸菌株を含む医薬であって、但し、前記乳酸菌株がラクトバチルス・ロイテリ(Lactobacillus reuteri)株ATCC PTA-6475及びL.ロイテリ(L. reuteri)株ATCC PTA-4659からなる群からは選択されない、上記医薬。

【請求項7】

前記乳酸菌株が、DagKを産生する能力を有し、且つDagKを細胞外に放出可能である乳酸菌株である、請求項6に記載の医薬。

【請求項8】

前記乳酸菌株が、DagKを産生する能力を有するラクトバチルス・ロイテリ(Lactobacillus reuteri)株である、請求項6又は7に記載の医薬。

20

【請求項9】

哺乳動物における食物アレルギーの予防、抑制及び／又は治療に使用するための、___ラクトバチルス・ロイテリ(Lactobacillus reuteri)株DSM32273を含む医薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明の実施形態は、一般的に、細菌株の選択、特に、アレルギーの予防、抑制及び／又は治療に有用な細菌株の選択、並びにその使用に関する。

30

【背景技術】

【0002】

アレルギー（アレルギー反応又はアレルギー疾患としても知られている）は、環境中のある物に対する免疫系の過敏症によって引き起こされる多くの症状である。アレルギーには、例えば、アレルギー性鼻炎（花粉症とも称される）；食物アレルギー；アトピー性皮膚炎（アトピー性湿疹とも称される）；アレルギー性喘息；及びアナフィラキシーが含まれる。症状は、一般的に、アレルギーの種類によって異なる。例えば、食物アレルギー（食品に対する異常な免疫反応である）は、軽度から重度の、かゆみ、舌の腫れ、嘔吐、下痢、息切れ、呼吸困難、又は低血圧に至る兆候及び症状を引き起こす可能性がある。これは通常、数分から数時間以内の曝露で生じる。それは、症状が重篤な場合には、アナフィラキシーとして知られている。

40

【0003】

一般的な抗原、即ち、免疫系が認識した脅威（そうでなければ、体に無害であろうが）と戦う異常に激しい免疫応答を生じる抗原には、とりわけ、花粉及び食物が含まれる。基本的な機構には、免疫グロブリンE抗体(IgE)が抗原に結合し、次に、肥満細胞又は好塩基球上の受容体に結合して、ヒスタミン等の炎症性化学物質の放出を誘発することが関わっている。

【0004】

現在のアレルギー治療には、既知の抗原を避けること及び抗ヒスタミン薬等の薬剤を使用

50

することが含まれる。抗ヒスタミン薬は、体内のヒスタミン受容体の活性に抵抗する薬剤である。抗ヒスタミン薬は、それらが作用するヒスタミン受容体に従ってサブクラスに分類される。抗ヒスタミン薬の2つの最も大きなクラスは、H1 - 抗ヒスタミン薬及びH2 - 抗ヒスタミン薬である。ヒスタミンH1受容体(H1R)を標的とする抗ヒスタミン薬は、主にアレルギー反応を治療するのに使用される。ヒスタミンH2受容体(H2R)を標的とする抗ヒスタミン薬は、胃腸系の症状を治療するのに使用される。

【0005】

幾つかのより古いタイプの抗ヒスタミン薬は、眠気や調整機能の低下等の副作用によって役に立たなくなる。また、より新しいタイプの抗ヒスタミン薬は、口渇や頭痛等の望ましくない副作用を引き起こす可能性がある。従って、アレルギーを治療及び予防する新しい方法には、更なる改善の余地がある。

10

【0006】

ヒト及び他の哺乳動物の体の様々な場所には、多くの異なる種の乳酸菌を含む、多くの異なる種の細菌が住み着いている。このような細菌は、長い間その宿主と共存し、様々な種類の相乗的な有益な効果をもたらしているが、今日では、それは、多様性を有し、現実存在している細菌株に依存していることも知られている。米国の食糧農業機構(FAO)と世界保健機構(WHO)が現在採用している定義によれば、プロバイオティクスは「適正量投与すると宿主に健康上の利益をもたらす生きた微生物」である。今日では、多くの異なる細菌、例えば、ラクトバチルス属(*Lactobacillus*)及びビフィドバクテリウム属(*Bifidobacteria*)の菌株等の乳酸産生細菌が、プロバイオティクスとして使用されている。

20

【0007】

既知の乳酸菌の一例は、ラクトバチルス・ロイテリ(*Lactobacillus reuteri*)(共生腸管ファーミキュート(*Firmicute*))であり、多様な鳥類及び哺乳動物の種の胃腸管で広く分布しているプロバイオティックである。この生物は一般的に安全と認められており(GRAS)、且つ有益な微生物と認識されており、約20年間、プロバイオティックとして世界的に使用されてきた。L・ロイテリは、腸上皮細胞、単球における炎症誘発性サイトカイン、及び異なるげっ歯類モデルにおける腸の炎症を抑制することが報告されている。

【0008】

Leeら(2004年)は、乳酸菌を、IL-2等のTh1細胞サイトカインの産生を促進しつつ、一方で、IL-4及びIL-5等のTh2細胞サイトカインの産生を抑制することを介する経口アレルギーの治療手段として使用することができることを開示している。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

アレルギーの予防、抑制及び/又は治療に有用な細菌株を選択することが、一般的な目的である。

【課題を解決するための手段】

【0010】

実施形態の態様は、哺乳動物におけるアレルギーの予防、抑制及び/又は治療に使用するための細菌株の選択方法に関する。この方法には、ジアシルグリセロールキナーゼ(DagK)を産生する能力に関して細菌株をスクリーニングすることが含まれる。該方法には更に、哺乳動物におけるアレルギーの予防、抑制及び/又は治療に使用するためのDagKを産生する能力を有する細菌株を選択することが含まれる。

40

【0011】

実施形態の別の態様は、哺乳動物におけるアレルギーの予防、抑制及び/又は治療に使用するためのDagKを産生する能力を有する細菌株であって、但し、ラクトバチルス・ロイテリ株ATCC PTA - 6475及びL・ロイテリ株ATCC PTA - 4659からなる群からは選択されない細菌株に関する。

50

【 0 0 1 2 】

実施形態の更なる態様は、哺乳動物におけるアレルギーの予防、抑制及び／又は治療の方法に関する。この方法には、アレルギーに罹患しているか又はアレルギーを発症するリスクを有する哺乳動物に、D a g Kを産生する能力を有する細菌株を投与することが含まれるが、但し、該細菌株は、L . ロイテリ株 A T C C P T A - 6 4 7 5 及び L . ロイテリ株 A T C C P T A - 4 6 5 9 からなる群からは選択されない。

【 0 0 1 3 】

実施形態の追加的な態様には、哺乳動物におけるアレルギーの予防、抑制及び／又は治療に使用するための L . ロイテリ D S M 3 2 2 7 3、哺乳動物における食物アレルギーの予防、抑制及び／又は治療に使用するための L . ロイテリ A T C C P T A - 6 4 7 5、哺乳動物における食物アレルギーの予防、抑制及び／又は治療に使用するための L . ロイテリ A T C C P T A - 4 6 5 9、及び哺乳動物におけるアレルギーの予防、抑制及び／又は治療に使用するための L . ファーメンタム (L . f e r m e n t u m) A T C C 1 4 9 3 1 が含まれる。

【 0 0 1 4 】

実施形態の別の態様は、D a g Kを産生する能力を有する細菌株及び H 1 - 抗ヒスタミン薬を含む抗アレルギー組成物に関する。

【 0 0 1 5 】

更なる態様は、医薬として使用するための、及び哺乳動物におけるアレルギーの予防、抑制及び／又は治療に使用するための、上記の抗アレルギー組成物に関する。

【 0 0 1 6 】

実施形態の D a g K 産生細菌株により、H 1 R シグナル伝達経路におけるジアシルグリセロール (D A G) シグナル伝達を終結させることができる。従って、アレルギー反応において放出されるヒスタミンは、H 1 R シグナル伝達経路を介するその炎症誘発性作用の誘導を抑制するが、依然として H 2 R シグナル伝達経路を介するその抗炎症性作用の誘導は可能である。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 7 】

実施形態並びに更なるその目的及び利点は、添付の図面と併せた以下の説明を参照することによって最も良く理解できる。

【 0 0 1 8 】

【 図 1 】 図 1 は、一実施形態に従う哺乳動物におけるアレルギーの予防、抑制及び／又は治療に使用するための細菌株の選択方法を示すフローチャートである。

【 0 0 1 9 】

【 図 2 】 図 2 は、L . ロイテリ野生型 (W T) 及び h d c A 突然変異体 A T C C P T A - 6 4 7 5 及び A T C C P T A - 4 6 5 9 が D a g K を産生することを示す。ハウスキープ遺伝子 r p o B に対して正規化された相対的な m R N A 標的遺伝子の発現レベルは、各細菌の 3、6、24 及び 48 時間の培養から示される。各細菌について 3 時間の培養から得られた m R N A を、1 . 0 に設定して、相対的な m R N A の倍数における差を特定するためのキャリブレーターとして使用した。

【 0 0 2 0 】

【 図 3 】 図 3 は、L . ロイテリ D a g K のアミノ酸配列 (配列番号 1 3) を示す。L . ロイテリ D a g K のアミノ酸配列は、トリプシン切断部位 (縦線) と共に示されている。太字のアミノ酸は、このようなトリプシン処理の後に得られたペプチド配列を示す。黒いバーは、L C - M S / M S 実験で見られたペプチド配列を示す。

【 0 0 2 1 】

【 図 4 】 図 4 は、L . ロイテリ D a g K のアミノ酸配列 (配列番号 1 3) を示す。太字のアミノ酸は、得られたペプチド配列を示す。黒いバーは、L C - M S / M S 実験で見出されたペプチド配列を示す。

【 0 0 2 2 】

10

20

30

40

50

【図5】図5は、市販のDagK阻害剤(DGK inhibitor)が、マウスエンテロイドにおけるL-ロイテリ由来DagKが媒介するプロテインキナーゼC(PKC)のリン酸化を妨げることを示す。(a)は、哺乳動物のリン酸化PKC(pPKC)を標的とする、培地コントロール(LDM-4)のみと、WT Lr(LDM4中で増殖させたWT Lr)と、DagK阻害剤と、DagK阻害剤及びWT Lrとを用いて45分間処理した10週齢の無菌(GF)雄マウスのマウス回腸エンテロイドから単離したタンパク質を示すウェスタンブロット分析を示す。10 µgのタンパク質をSDSゲルの各ウェルに入れた。pPKCの合成比は、DagK阻害剤処理群のpPKCを1に設定し、ベースラインとして使用して、画像J分析によって得た。(b) pPKCタンパク質濃度(10 µg入れた)を示し、画像-JGFコントロール群を使用してデンストメトリーによって定量したn = 3の平均値を、1に設定した。 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ 、 $***P < 0.001$ 。1群あたりn = 10のマウス。ボンフェローニ補正による一元配置分散分析。

10

【0023】

詳細な説明

本実施形態は、一般的に、細菌株の選択、特に、アレルギーの予防、抑制及び/又は治療に有用な細菌株の選択、並びにその使用に関する。

【0024】

本実施形態は、従来の抗ヒスタミン薬によるアプローチと比較した場合、アレルギーの予防及び治療の分野において根本的に異なるアプローチを採用している。先行技術との明らかな相違は、本実施形態では、アレルギーの予防、抑制及び/又は治療に有益な細菌株を選択して使用することに基づいている。実施形態に従って選択され、そして使用される細菌株は、ジアシルグリセロールキナーゼ(DagK)を産生する能力を有する。

20

【0025】

DagKは、リン酸源としてアデノシン三リン酸(ATP)を利用して、ジアシルグリセロール(DAG)からホスファチジン酸(PA)への転化を触媒する酵素である。非刺激細胞では、DagKの活性は低いので、DAGをグリセロリン脂質の生合成に使用することができる。しかし、ホスホイノシチド経路の受容体が活性化されると、DagKが活性化されて、DAGからPAへの転化への動きが高められる。DAGからPAへの転化により、DAGが減少するが、そうでなければ、プロテインキナーゼC(PKC)を活性化することができる。

30

【0026】

ヒスタミンH1受容体(H1R)下流のシグナル伝達は、DagK合成によって、シグナル伝達に参与する脂質DAGを阻害することによって中断される。従って、本明細書に開示されるDagK産生乳酸細菌株は、放出されたヒスタミンによる炎症誘発作用を抑制する。これにより、順に、アレルギー反応の結果として産生されたヒスタミンによるヒスタミンH2-受容体(H2R)の活性化のみが可能になる。そのようなH2Rの活性化により、抗炎症症状が促進される。

【0027】

従って、DagKを産生する能力を有する細菌株は、H1R下流のシグナル伝達の抑制を引き起こすが、一方、アレルギー反応によって放出されたヒスタミンは、H2Rの活性化を誘導する。これらの組み合わせによって、ヒスタミンによる炎症誘発性作用を抑制し、且つ抗炎症性及び抗アレルギー症状を促進する。

40

細菌においては、酵素DagKは、遺伝子dagKによって発現される。

【0028】

図1は、哺乳動物におけるアレルギーの予防、抑制及び/又は治療に使用するための細菌株の選択方法を示すフローチャートである。この方法には、ステップS1において、DagKを産生する能力に関して細菌株をスクリーニングすることが含まれる。更に、この方法には、ステップS2において、哺乳動物におけるアレルギーの予防、抑制及び/又は治療に使用するためのDagKを産生する能力を有する細菌株を選択することが含まれる。

【0029】

50

これにより、図 1 に示す方法を用いて、哺乳動物におけるアレルギーを回避、抑制及び / 又は治療するのに有用な細菌株を同定し、且つ選択することができる。選択基準は、上記のように、アレルギー反応の結果として放出されるヒスタミンの炎症誘発性作用を抑制し、且つ放出されたヒスタミンの抗炎症作用を促進する、酵素 D a g K を産生する能力である。

【 0 0 3 0 】

一実施形態では、図 1 のステップ S 2 には、D a g K を産生する能力を有し、且つ D a g K を細胞外に放出可能である細菌株を選択することが含まれる。従って、この実施形態では、ステップ S 2 で選択された細菌株は、D a g K を産生する能力を有するのみならず、可溶性の D a g K にし、これにより、細胞外で、即ち、選択された細菌株の細胞の外でも利用可能になる。これは、細菌株が分泌することができ、或いはそうでなければ D a g K を細胞外に放出することができることを意味する。

10

【 0 0 3 1 】

一実施形態では、D a g K を産生する能力に関する細菌株のスクリーニングを、そのゲノム又はプラスミド等の発現カセットのいずれかにおいて、細菌株中の d a g K 遺伝子等のジアシルグリセロールキナーゼをコードする遺伝子の存在を検出することによって評価する。このような実施形態では、図 1 のステップ S 1 には、d a g K 遺伝子等の D a g K をコードする遺伝子の存在に関して細菌株をスクリーニングすることが含まれる。ステップ S 2 には、この実施形態では、d a g K 遺伝子等の D a g K をコードする遺伝子を含む細菌株を選択することが含まれる。

20

【 0 0 3 2 】

特定の実施形態では、細菌株には、D a g K をコードする活性遺伝子が含まれる。該遺伝子に関して活性とは、D a g K をコードする遺伝子が、細菌株中の構成的プロモーター又は細菌株中の誘導性プロモーターによって制御されること、即ち、プロモーターは、細菌株中で活性化又は誘導され得ることを意味する。

【 0 0 3 3 】

D a g K をコードする遺伝子の存在を検出するのに使用することができる様々な技術が利用可能である。非制限的且つ例示的な技術には、D a g K をコードする遺伝子の部分に相補的なプライマー又は D a g K をコードする遺伝子のプロモーターに相補的なプライマーを使用して、D a g K をコードする遺伝子、その一部分、遺伝子のプロモーター、又はその一部分に対応する増幅されたデオキシリボ核酸 (D N A) 配列の存在を増幅及び検出するポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) が含まれる。特に、定量ポリメラーゼ連鎖反応 (q P C R) を用いて、D a g K をコードする遺伝子の存在を検出することができる。他の技術には、種々の D N A 配列決定技術が含まれる。

30

【 0 0 3 4 】

別の実施形態では、D a g K を産生する能力に関して細菌株をスクリーニングすることは、細菌細胞の細胞質ゾル中における、又は細菌株が追加的に D a g K を分泌又は細胞外に放出することができる場合は、細菌株を培養している培地中における、D a g K 酵素の存在を検出することによって評価される。この実施形態では、図 1 のステップ S 1 には、細菌株の細胞質ゾル中の D a g K の存在及び / 又は細菌株を培養しているそれぞれの培地中の D a g K の存在に関して細菌株をスクリーニングすることが含まれる。ステップ S 2 には、この実施形態では、i) その細胞質ゾル中に D a g K を含む細菌株及び / 又は i i) 細菌株が培養される培地に D a g K を含む細菌株を選択するステップが含まれる。

40

【 0 0 3 5 】

細胞質ゾル及び / 又は細菌細胞の培地中の D a g K の存在を検出するのに使用することができる様々な技術が存在する。非限定的であるが例示的な技術には、例えば、酵素結合免疫吸着法 (E L I S A) ; タンデム質量分析法 (M S / M S) によって補完されるマトリクス支援レーザー脱離 / イオン化 (M A L D I) 飛行時間型 (T O F) 及びエレクトロスプレーイオン化 (E S I) T O F によるペプチド質量フィンガープリンティング等のタンパク質質量分析法; 免疫電気泳動法において、抗 D a g K 抗体を使用することが含まれる。

50

【 0 0 3 6 】

一実施形態では、図 1 の方法でスクリーニングされ、且つ選択された細菌株は、一般的に安全と認められる (G R A S) 細菌株である。従って、アレルギーを予防、抑制及び / 又は治療するために、哺乳動物に投与した場合、該細菌株は、好ましくは、いかなる疾患又は有害な症状も引き起こしてはいけない。従って、図 1 の方法に従って選択された細菌株は、好ましくは非病原性細菌株である。従って、このような G R A S 細菌株は、好ましくは、いわゆる有益な微生物である。G R A S である細菌株の特定の例は、非病原性プロバイオティック細菌等のプロバイオティック細菌である。従って、一実施形態では、図 1 のステップ S 1 には、D a g K を生産する能力に関してプロバイオティック細菌株をスクリーニングすることが含まれ、ステップ S 2 には、D a g K を産生する能力を有するプロバイオティック細菌株を選択することが含まれる。

10

【 0 0 3 7 】

一実施形態では、細菌株は乳酸菌株である。このような実施形態では、ステップ S 1 には、D a g K を産生する能力に関して乳酸菌株をスクリーニングすることが含まれる。これに対応して、ステップ S 2 には、D a g K を産生する能力を有する乳酸菌株を選択することが含まれる。

【 0 0 3 8 】

ラクトバチルス目 (l a c t o b a c i l l a l e s) とも称される乳酸菌は、一般的な代謝及び生理学的特徴を共有する、グラム陽性、低 G C 、耐酸性、一般的に非孢子形成性、非呼吸性 (n o n r e s p i r i n g) 、桿菌又は球菌のいずれかのクレードである。これらの細菌は、炭水化物発酵の主要な代謝最終産物として乳酸を産生する。乳酸菌を含む属には、ラクトバチルス属、リューコノストック属、ペディオコッカス属、ラクトコッカス属及びストレプトコッカス属が含まれる。乳酸菌は更に、アエロコッカス属、カーノバクテリウム属、エンテロコッカス属、オエノコッカス属、スポロラクトバチルス属、テトラジェノコッカス属、バゴコッカス属、及びワイセラ属等の他の属にも見出すことができる。

20

【 0 0 3 9 】

ストレプトコッカス属の中の特定の好ましい細菌種には、ストレプトコッカス・サリバリウス及びストレプトコッカス・サーモフィルス (t e r m o p h i l u s) が含まれる。

【 0 0 4 0 】

特定の実施形態では、細菌株は、S . サリバリウス株又は S . サーマモフィルス株である。この実施形態では、図 1 のステップ S 1 には、D a g K を産生する能力に関して S . サリバリウス株又は S . サーマモフィルス株をスクリーニングすることが含まれ、ステップ S 2 には、これに対応して、D a g K を産生する能力を有する S . サリバリウス株又は S . サーマモフィルス株を選択することが含まれる。

30

【 0 0 4 1 】

特定の実施形態では、ステップ S 2 には、哺乳動物における花粉アレルギーの予防、抑制及び / 又は治療に使用するための D a g K を産生する能力を有する S . サリバリウス株又は S . サーマモフィルス株を選択することが含まれる。

【 0 0 4 2 】

現在好ましい属は、ラクトバチルス属である。

40

ラクトバチルス属には、L . アセトトレランス (L . a c e t o t o l e r a n s) 、 L . アシジファリナエ (L . a c i d i f a r i n a e) 、 L . アシジピスシス (L . a c i d i p i s c i s) 、 L . アシドフィルス (L . a c i d o p h i l u s) 、 L . アジリス (L . a g i l i s) 、 L . アルギダス (L . a l g i d u s) 、 L . アリメンタリウス (L . a l i m e n t a r i u s) 、 L . アミロリティクス (L . a m y l o l y t i c u s) 、 L . アミロフィルス (L . a m y l o p h i l u s) 、 L . アミロトロピカス (L . a m y l o t r o p h i c u s) 、 L . アミロボルス (L . a m y l o v o r u s) 、 L . アニマリス (L . a n i m a l i s) 、 L . アントリ (L . a n t r i) 、 L . アポデミ (L . a p o d e m i) 、 L . アビアリエス (L . a v i a r i e s) 、 L .

50

| | |
|--|---|
| <p> ビフェルメンタンス (<i>L. bifementans</i>)、<i>L. ブレビス</i> (<i>L. brevis</i>)、<i>L. ブフネリ</i> (<i>L. buchneri</i>)、<i>L. カメリアエ</i> (<i>L. camelliae</i>)、<i>L. カゼイ</i> (<i>L. casei</i>)、<i>L. カテナフォルミス</i> (<i>L. catenaformis</i>)、<i>L. セチ</i> (<i>L. ceti</i>)、<i>L. コレオホミニス</i> (<i>L. coleohominis</i>)、<i>L. コリノイデス</i> (<i>L. collinoides</i>)、<i>L. コンポスティ</i> (<i>L. composti</i>)、<i>L. コンカブス</i> (<i>L. concavus</i>)、<i>L. コリニフォルミス</i> (<i>L. coryniformis</i>)、<i>L. クリスパタス</i> (<i>L. crispatus</i>)、<i>L. クルストルム</i> (<i>L. crustorum</i>)、<i>L. クルバタス</i> <i>L. curvatus</i>、<i>L. デルブリュキイ亜種ブルガリクス</i> (<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>)、<i>L. デルブリュキイ亜種エルブリュキイ</i> (<i>L. delbrueckii subsp. elbrueckii</i>)、<i>L. デルブリュキイ亜種ラクティス</i> (<i>L. delbrueckii subsp. lactis</i>)、<i>L. デキストリニクス</i> (<i>L. dextrinicus</i>)、<i>L. ジオリボランス</i> (<i>L. diolivorans</i>)、<i>L. エクイ</i> (<i>L. equi</i>)、<i>L. エクイゲネロシ</i> (<i>L. equigenerosi</i>)、<i>L. ファラギニス</i> (<i>L. farraginis</i>)、<i>L. ファルシミニス</i> (<i>L. farciminis</i>)、<i>L. ファーメントム</i> (<i>L. fermentum</i>)、<i>L. フォルニカリス</i> (<i>L. fornicalis</i>)、<i>L. フルクチボランス</i> (<i>L. fructivorans</i>)、<i>L. フルメンティ</i> (<i>L. frumenti</i>)、<i>L. フルエンシス</i> (<i>L. fuchuenensis</i>)、<i>L. ガリナルム</i> (<i>L. gallinarum</i>)、<i>L. ガッセリ</i> (<i>L. gasserii</i>)、<i>L. ガストリクス</i> (<i>L. gastricus</i>)、<i>L. ガネンシス</i> (<i>L. ghanensis</i>)、<i>L. グラミニス</i> (<i>L. graminis</i>)、<i>L. ハンメシイ</i> (<i>L. hammesii</i>)、<i>L. ハムステル</i> (<i>L. hamster</i>)、<i>L. ハルビネンシス</i> (<i>L. harbinensis</i>)、<i>L. ハヤキテンシス</i> (<i>L. hayakitensis</i>)、<i>L. ヘルベティクス</i> (<i>L. helveticus</i>)、<i>L. ヒルガルディイ</i> (<i>L. hilgardii</i>)、<i>L. ホモヒオチイ</i> (<i>L. homohiochii</i>)、<i>L. イネルス</i> (<i>L. iners</i>)、<i>L. イングルビエイ</i> (<i>L. ingluviei</i>)、<i>L. インテスティナリス</i> (<i>L. intestinalis</i>)、<i>L. ジェンセニイ</i> (<i>L. jensenii</i>)、<i>L. ジョンソニイ</i> (<i>L. johnsonii</i>)、<i>L. カリキセンシス</i> (<i>L. kalixensis</i>)、<i>L. ケフィラノファシエン</i> (<i>L. kefirano faciens</i>)、<i>L. ケフィリ</i> (<i>L. kefirii</i>)、<i>L. キムチ</i> (<i>L. kimchi</i>)、<i>L. キタサトニス</i> (<i>L. kitasatonis</i>)、<i>L. クンケエイ</i> (<i>L. kunkeei</i>)、<i>L. ライヒマンニイ</i> (<i>L. leichmannii</i>)、<i>L. リンドネリ</i> (<i>L. lindneri</i>)、<i>L. マレフェルメンタンス</i> (<i>L. malefermentans</i>)、<i>L. マリ</i> (<i>L. mali</i>)、<i>L. マニホチボランス</i> (<i>L. manihotivorans</i>)、<i>L. ミンデンシス</i> (<i>L. mindensis</i>)、<i>L. ムコサエ</i> (<i>L. mucosae</i>)、<i>L. ムリヌス</i> (<i>L. murinus</i>)、<i>L. ナゲリイ</i> (<i>L. nagelii</i>)、<i>L. ナムレンシス</i> (<i>L. namurensis</i>)、<i>L. ナンテンシス</i> (<i>L. nantensis</i>)、<i>L. オリゴフェルメンタンス</i> (<i>L. oligofermentans</i>)、<i>L. オリス</i> (<i>L. oris</i>)、<i>L. パニス</i> (<i>L. panis</i>)、<i>L. パンテリス</i> (<i>L. pantheris</i>)、<i>L. パラブレビス</i> (<i>L. parabrevis</i>)、<i>L. パラブフネリ</i> (<i>L. parabuchneri</i>)、<i>L. パラカゼイ</i> (<i>L. paracasei</i>)、<i>L. パラコリノイデス</i> (<i>L. paracollinoides</i>)、<i>L. パラファラギニス</i> (<i>L. parafarraginis</i>)、<i>L. パラケフィリ</i> (<i>L. parakefirii</i>)、<i>L. パラリメンタリウス</i> (<i>L. paralimentarius</i>)、<i>L. パラプランタルム</i> (<i>L. paraplantarium</i>)、<i>L. ペントーサス</i> (<i>L. pentosus</i>)、<i>L. ペロレンス</i> (<i>L. perolens</i>)、<i>L. プランタルム</i> (<i>L. plantarium</i>)、<i>L. ポンチス</i> (<i>L. pontis</i>)、<i>L. プロテクトス</i> (<i>L. protectus</i>)、<i>L. プシタシ</i> (<i>L. psittaci</i>)、<i>L. レンニニ</i> (<i>L. rennini</i>)、<i>L. ロイテリ</i> (<i>L. reuteri</i>)、<i>L. ラムノーサス</i> (<i>L. rhamnosus</i>)、<i>L. リマエ</i> (<i>L. rimae</i>)、<i>L. ロゴサエ</i> (<i>L. rogosa</i>)、<i>L. ロシアエ</i> (<i>L. rossiae</i>)、<i>L. ルミニス</i> (<i>L. ru</i> </p> | <p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p> <p>50</p> |
|--|---|

minis)、*L. サエリムネリ* (*L. saerimneri*)、*L. サケイ* (*L. sakei*)、*L. サリバリウス* (*L. salivarius*)、*L. サンフランシスセンシス* (*L. sanfranciscensis*)、*L. サトスメンシス* (*L. satsumensis*)、*L. セカリフィルス* (*L. secaliphilus*)、*L. シャルペアエ* (*L. sharpeae*)、*L. シリギニス* (*L. siliginis*)、*L. スピチエリ* (*L. spicheri*)、*L. スエビクス* (*L. suebicus*)、*L. タイランドンシス* (*L. thailandensis*)、*L. ウルツネンシス* (*L. ultunensis*)、*L. バシノステルクス* (*L. vaccinostercus*)、*L. バギナリス* (*L. vaginalis*)、*L. ベルスモルデンシス* (*L. versmoldensis*)、*L. ビニ* (*L. vini*)、*L. ビツリヌス* (*L. vitulinus*)、*L. ゼアエ* (*L. zeae*)、及び *L. ザイマエ* (*L. zymae*) を含む幾つかの種が含まれる。一実施形態では、細菌株は、GRAS 状態を有する乳酸菌株であり、非病原性であり、上記のラクトバチルス属の種の群から選択される。

10

【0043】

特定の実施形態では、細菌株は、*L. ロイテリ* 株である。この実施形態では、図1のステップS1には、DagKを産生する能力に関して*L. ロイテリ* 株をスクリーニングすることが含まれ、ステップS2には、これに対応して、DagKを産生する能力を有する*L. ロイテリ* 株を選択することが含まれる。

【0044】

特定の実施形態では、ステップS2には、哺乳動物における食物アレルギーの予防、抑制及び/又は治療に使用するためのDagKを産生する能力を有する*L. ロイテリ* 株を選択することが含まれる。

20

【0045】

別の特定の実施形態では、細菌株は、*L. ファーメントム* 株である。この実施形態では、図1のステップS1には、DagKを産生する能力に関して*L. ファーメントム* 株をスクリーニングすることが含まれ、ステップS2には、これに対応して、DagKを産生する能力を有する*L. ファーメントム* 株を選択することが含まれる。

【0046】

特定の実施形態では、ステップS2には、哺乳動物における花粉アレルギーの予防、抑制及び/又は治療に使用するためのDagKを産生する能力を有する*L. ファーメントム* 株を選択することが含まれる。

30

【0047】

一実施形態では、細菌の凍結乾燥 (freeze-drying 又は lyophilizing) 前に、既にDagKを発現している予め活性化している細菌株とするために、細菌株をDAGの存在下で増殖させる。従って、この実施形態では、該方法は、更に、DAGの存在下で細菌株を培養することを含む。

【0048】

実施形態の別の態様は、哺乳動物におけるアレルギーの予防、抑制及び/又は治療に使用するためのDagKを産生する能力を有する細菌株であって、但し、*L. ロイテリ* 株 ATCC PTA-6475 及び *L. ロイテリ* 株 ATCC PTA-4659 からなる群からは選択されない細菌株に関する。

40

【0049】

一実施形態では、アレルギーは、食物アレルギー及び花粉アレルギーからなる群から選択される。特定の実施形態では、アレルギーは、食物アレルギーであり、好ましくは、ピーナッツアレルギー、乳 (乳糖又は乳タンパク質) アレルギー、卵アレルギー、木の実アレルギー、魚アレルギー、貝アレルギー、大豆アレルギー、及び小麦 (グルテン) アレルギーからなる群から選択される食物アレルギーである。

【0050】

花粉アレルギーの非限定的な例には、マツ (*Pinus*)、カバノキ (*Betula*)、ハンノキ (*Alnus*)、ヒマラヤスギ (*cedar*)、ハシバミ (*Corylus*)、

50

ホーンビーム (*Carpinus*)、セイヨウトチノキ (*Aesculus*)、ヤナギ (*Salix*)、ポプラ (*Populus*)、プラタナス (*Platanus*)、シナノキ / ライム (*Tilia*)、オリーブ (*Olea*)、スギ (*Cryptomeria japonica*)、ヒノキ (*Chamaecyparis obtusa*)、ライグラス (*Lolium sp.*)、チモシー (*Phleum pratense*)、ブタクサ (*Ambrosia*)、プランテン (*Plantago*)、イラクサ / ヒカゲミズ (*Urticaceae*)、オウシュウヨモギ (*Artemisia Vulgaris*)、アカザ (*Chenopodium*)、及びスイバ / ドック (*Rumex*) からの花粉に対抗するアレルギーが含まれる。

【0051】

10

実施形態の *DagK* 産生細菌株は、哺乳動物におけるアレルギーを治療するのに使用することができる。本明細書で使用する治療は、哺乳動物に、実施形態の細菌株を投与した後、哺乳動物から、症状が 100% なくなることを必ずしも意味しない。更に、治療には、哺乳動物におけるアレルギーの症状を軽減することが包含される。従って、実施形態の細菌株は、哺乳動物におけるアレルギーを抑制する、或いは阻止するのに使用することができる。

【0052】

更に、又は選択的に、実施形態の細菌株は、哺乳動物がアレルギーを発症するリスクを予防、即ち、回避、又は少なくとも軽減させるのに使用することができる。哺乳動物は、例えば、アレルギーへの遺伝子的又は遺伝的素因等の、アレルギーへの素因を持っている可能性がある。従って、実施形態の細菌株を、このような哺乳動物に、アレルギーに罹患しているか、又はアレルギー反応を発症する哺乳動物のリスクを回避するか、又は少なくとも軽減するのに投与することができる。

20

【0053】

特定の実施形態では、実施形態の細菌株を投与することができる哺乳動物は、好ましくはヒトである。実施形態の細菌株は更に、獣医学的用途に使用、即ち非ヒト哺乳動物に投与することができる。このような非ヒト哺乳動物の非限定的な例には、イヌ、ネコ、ウマ及びウシが含まれる。

【0054】

一実施形態では、細菌株は、*DagK* を産生する能力があり、かつ、*DagK* を分泌する等、細胞外に放出する能力がある細菌株である。

30

【0055】

一実施形態では、細菌株は、*DagK* を産生する能力がある乳酸菌株である。特定の実施形態では、乳酸菌株は、ラクトバチルス属、リューコノストック属、ペディオコッカス属、ラクトコッカス属、ストレプトコッカス属、アエロコッカス属、カーノバクテリウム属、エンテロコッカス属、オエノコッカス属、スポロラクトバチルス属、テトラジェノコッカス属、バゴコッカス属、及びワイセラ属からなる群から選択される *DagK* を産生する能力を有する乳酸菌株である。一実施形態では、*DagK* を産生する能力を有する乳酸菌株は、ラクトバチルス、リューコノストック、ペディオコッカス、ラクトコッカス及びストレプトコッカスからなる群から選択される。

40

【0056】

一実施形態では、細菌株は、*DagK* を産生する能力を有する *L* . ロイテリ株である。特定の実施形態では、*DagK* を産生する能力を有する *L* . ロイテリ株は、哺乳動物における食物アレルギーの予防、抑制及び / 又は治療に使用される。

【0057】

別の実施形態では、細菌株は *DagK* を産生する能力を有する *L* . ファーメンタム株である。特定の実施形態では、*DagK* を産生する能力を有する *L* . ファーメンタム株は、哺乳動物における花粉アレルギーの予防、抑制及び / 又は治療に使用される。

【0058】

更に別の実施形態では、細菌株は、*DagK* を産生する能力を有する *S* . サリバリウス株

50

又はS・サーモフィルス(ter m o p h i l u s)株である。特定の実施形態では、D a g Kを産生する能力を有するS・サリバリウス株又はS・サーモフィルス(ter m o p h i l u s)株は、哺乳動物における花粉アレルギーの予防、抑制及び/又は治療に使用される。

【0059】

実施形態の更に別の態様は、哺乳動物におけるアレルギーの予防、抑制及び/又は治療のための医薬の製造に、D a g Kを産生する能力を有する細菌株であって、但し、L・ロイテリ株ATCC PTA - 6475及びL・ロイテリ株ATCC PTA - 4659からなる群からは選択されない細菌株の使用に関する。

【0060】

実施形態の更なる態様は、哺乳動物におけるアレルギーの予防、抑制及び/又は治療の方法に関する。該方法には、D a g Kを産生する能力を有する細菌株であるが、但し、L・ロイテリ株ATCC PTA - 6475及びL・ロイテリ株ATCC PTA - 4659からなる群からは選択されない細菌株を、アレルギーに罹患しているか、又はアレルギー反応を発症するリスクを有する哺乳動物に投与することが含まれる。

【0061】

細菌株の投与及び配合の適切な方式は、D a g Kの局所的な産生が望まれる部位に応じて選択される。投与の好ましい方式は経口である。投与の他の方式には、鼻の、眼内の、皮膚、直腸、鼻、目、膣若しくは歯肉への局所的な投与、又は静脈、皮下若しくは筋肉注射の局所的な或いは他の形式が含まれる。

【0062】

実施形態の細菌株の経口投与は、哺乳動物における食物アレルギーを予防、抑制及び/又は治療するのに特に好ましい場合がある。このような場合、細菌株は、投与方式により、腸上皮の近くにあつて、これにより、細菌株がD a g Kを産生し、脂質シグナル伝達を改変して、免疫バイオマーカーに変化を引き起こし、炎症又はアレルギー応答に局所的な影響を与える。

【0063】

実施形態の細菌株の経鼻投与は、哺乳動物における花粉アレルギーを予防、抑制及び/又は治療するのに特に好ましい場合がある。このような場合、細菌株は、投与方式により呼吸器上皮の近くにあつて、これにより、細菌株がD a g Kを産生し、脂質シグナル伝達を改変して、免疫バイオマーカーの変化を引き起こし、炎症応答又はアレルギー応答に局所的な影響を与える。

【0064】

本明細書で定義される菌株の適切な投与量は、治療されるアレルギー、投与方式及び関連する配合に応じて容易に選択することができる。例えば、投与量及び投与計画は、本発明に従って対象者に投与される細菌が、所望の治療効果、予防効果又は健康上の利益をもたらすことができるように選択される。従って、好ましくは、投与量は、治療される哺乳動物及びアレルギーの種類に適した治療上又は予防上、有効な投与量である。例えば、1日の投与量としては、細菌の合計CFUで、10⁴から10¹⁰、例えば10⁵から10⁹、又は10⁶から10⁸、又は10⁸から10¹⁰を使用することができる。好ましい1日の投与量として、合計CFUで、約10⁸、例えば10⁷から10⁹又は10⁸から10⁹である。

【0065】

アレルギーは、一般的に、炎症誘発性症状を伴うヒスタミン放出の増加と相関する。従って、実施形態のD a g K産生細菌株は、アレルギー反応の間に放出されるヒスタミンによって引き起こされる炎症を、より自然な方法で抑制する優れた治療的アプローチであり得る。これは、D a g Kを産生する能力を有する実施形態の細菌株が、抗ヒスタミン薬によって引き起こされる副作用を回避できることを意味する。

【0066】

予防的又は治療的な抗アレルギー作用は、実施形態の細菌株のみによって、即ち、単一の

10

20

30

40

50

抗アレルギー活性剤として得られる。しかしながら、実施形態の菌株は、抗ヒスタミン薬等の他の抗アレルギー薬と併用することにより、該菌株及び少なくとも１種の抗ヒスタミン薬を、任意選択的に薬学的に許容可能な担体、希釈剤、賦形剤又は溶媒と共に含む組成物を形成することができる。更に、併用による治療は、実施形態の細菌株及び少なくとも１種の抗ヒスタミン薬を、アレルギーに罹患しているか又はアレルギーに罹患するリスクを有する哺乳動物に、別々に投与することによっても行なうことができる。

【００６７】

D a g K 産生細菌株を、少なくとも１種の抗ヒスタミン薬と併用する、併用による治療の利点は、少なくとも１種の抗ヒスタミン薬を単独で投与するのに比べて、該少なくとも１つの抗ヒスタミン薬の必要投与量を少なくできることである。これによって、このような抗ヒスタミン薬の投与量を減少させることによって、少なくとも１種の抗ヒスタミン薬を投与する場合に関連する副作用を回避するか、又は少なくとも最小限に抑えることができ、一方では、なお、十分な抗アレルギー作用を得ることができる。

10

【００６８】

従って、一実施形態では、組成物中の該少なくとも１種の抗ヒスタミン薬の量は、単一の抗アレルギー剤（複数可）として少なくとも１種の抗ヒスタミン薬を含む、即ち、実施形態の細菌株を欠いている組成物中の少なくとも１種の抗ヒスタミン薬の量と比較して、好ましくは、重量等で９０％未満である。種々の実施形態では、組成物中の少なくとも１種の抗ヒスタミン薬の量は、単一の抗アレルギー剤（複数可）として少なくとも１種の抗ヒスタミン薬を含む、即ち、実施形態の細菌株を欠いている組成物中の少なくとも１種の抗ヒスタミン薬の量と比較して、好ましくは、重量等で８０％未満、７０％未満、６０％未満、５０％未満、４０％未満、３０％未満、２０％未満、又は１０％未満である。

20

【００６９】

併用による治療で、D a g K 産生細菌株と共に使用することができる抗ヒスタミン薬の、非限定的であるが、例示的な例には、H 1 R アнтаゴニスト及び／又はH 1 R インバースアゴニスト等のH 1 - 抗ヒスタミン薬が含まれる。

【００７０】

H 1 R アнтаゴニストの例示的な例には、アクリバスチン、アゼラスチン、ピラスチン、プロモジフェンヒドラミン、プロムフェニラミン、ブクリジン、カルピノキサミン、セチリジン（例えば、Z Y R L E X（登録商標）、V I A L E R G（登録商標）、A C U R A（登録商標）の名称で販売されている）、クロロジフェンヒドラミン、クロルフェナミン、クロルプロマジン、クレマスチン、シクリジン、シプロヘブタジン、デクスプロムフェニラミン、デクスクロルフェニラミン、ジメンヒドリナート、ジメチンデン、ジフェンヒドラミン、ドキシラミン、エバスチン（例えば、K E S T I N E（登録商標）の名称で販売されている）、エンブラミン、フェキソフェナジン（例えば、A L L E G R A（登録商標）、A L T I F E X（登録商標）の名称で販売されている）、ヒドロキシジン、ロラタジン（例えばC L A R I T Y N（登録商標）の名称で販売されている）、メクリジン、ミルタザピン、オロパタジン、オルフェナドリン、フェニンダミン、フェニラミン、フェニルトロキサミン、プロメタジン、クエチアピン、ルパタジン、トリペレナミン、及びトリプロリジンが含まれる。

30

40

【００７１】

H 1 R インバースアゴニストの例示的な例には、セチリジン、レボセチリジン、デスロラタジン（例えば、F L Y N I S E（登録商標）の名称で販売されている）及びピリラミンが含まれる。

【００７２】

従って、実施形態の態様は、D a g K を産生する能力を有する細菌株及びH 1 - 抗ヒスタミン薬を含む抗アレルギー組成物に関する。

【００７３】

一実施形態では、H 1 - 抗ヒスタミン薬は、セチリジン、エバスチン、フェキソフェナジン、ロラタジン及びデスロラタジンからなる群から選択される。

50

【0074】

一実施形態では、細菌株は、L．ロイテリ株ATCC PTA-6475及びL．ロイテリ株ATCC PTA-4659からなる群からは選択されない。

【0075】

実施形態の更なる態様は、医薬として使用するための、且つ哺乳動物におけるアレルギーの予防、抑制及び／又は治療に使用するための抗アレルギー組成物に関する。

【0076】

併用による治療において本明細書で定義した菌株の適切な投与量は、治療されるアレルギー、投与方式、関連する配合及び併用による治療に使用される少なくとも1種の抗ヒスタミン薬に応じて、容易に選択することができる。例えば、投与量及び投与計画は、本発明に従って対象者に投与される細菌及び抗ヒスタミン薬（複数可）が、所望の治療効果、予防効果又は健康上の利益をもたらすことができるように選択される。従って、好ましくは、投与量は、治療される哺乳動物及びアレルギーの種類に適した治療上又は予防上、有効な投与量である。上記の細菌の1日の投与量は、併用による治療に使用することができる。更に、細菌は、少なくとも1種の抗ヒスタミン薬と併用されるので、併用による治療では、それより少ない1日の投与量を使用することも可能である。

【0077】

更に、細菌株は、ピーナッツアレルギー等の食物アレルギーの治療のための経口免疫療法におけるアジュバントとしても使用することができる。

【0078】

本明細書中に示した実験データから、L．ロイテリDSM32273（2016年3月8日に、ブダペスト条約下で、DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH（Inhoffenstrasse 7B、D-38124 ブラウンシュヴァイク、ドイツ）に寄託された）、L．ロイテリATCC PTA-6475（2004年12月21日に、ブダペスト条約下で、American Type Culture Collection（10801 University Blvd, Manassas, VA 20110-2209、米国）に寄託された）、及びL．ロイテリATCC PTA-4659（2002年9月11日に、ブダペスト条約下で、American Type Culture Collection（10801 University Blvd, Manassas, VA 20110-2209、米国）に寄託された）は、DagKを産生する能力を有するL．ロイテリ株であることが示される。従って、これらのL．ロイテリ株は、本明細書に開示した哺乳動物におけるアレルギーの予防、抑制及び／又は治療に使用することができる。特定の実施形態では、アレルギーは食物アレルギーである。

【0079】

従って、実施形態の態様は、哺乳動物におけるアレルギーの予防、抑制及び／又は治療に使用するためのL．ロイテリ株DSM 32273に関する。特定の実施形態では、アレルギーは食物アレルギーである。

【0080】

実施形態の他の態様は、哺乳動物における食物アレルギーの予防、抑制及び／又は治療に使用するためのL．ロイテリ株ATCC PTA-6475及び／又はL．ロイテリ株ATCC PTA-4659に関する。

【0081】

L．ロイテリ株DSM32273、ATCC PTA-6475及びATCC PTA-4659は、別々に使用することができ、或いは、少なくとも2種のL．ロイテリ株、例えば、L．ロイテリDSM32273及びATCC PTA-6475、L．ロイテリDSM32273及びATCC PTA-4659、L．ロイテリATCC PTA-4659及びATCC PTA-6475、又はL．ロイテリDSM32273、ATCC PTA-6475及びATCC PTA-4659の組成物として使用することができる。

【0082】

一実施形態では、*L. ファーメンタム* ATCC 14931 は、*DagK* を産生する能力を有する *L. ファーメンタム* 株である。従って、*L. ファーメンタム* ATCC 14931 は、本明細書に開示する哺乳動物におけるアレルギーの予防、抑制及び/又は治療に使用することができる。特定の実施形態では、アレルギーは花粉アレルギーである。

【0083】

L. ファーメンタム 株 ATCC 14931 は、別々に、或いは上掲の *DagK* 産生 *L. ロイテリ* 株のうちの少なくとも1種の組成物として使用することができる。従って、このような組成物は、*L. ファーメンタム* ATCC 14931 及び *L. ロイテリ* DSM 32273、*L. ファーメンタム* ATCC 14931 及び *L. ロイテリ* ATCC PTA-6475、*L. ファーメンタム* ATCC 14931 及び *L. ロイテリ* ATCC PTA-4659、*L. ファーメンタム* ATCC 14931、*L. ロイテリ* DSM 32273 及び ATCC PTA-6475、*L. ファーメンタム* ATCC 14931、*L. ロイテリ* DSM 32273 及び ATCC PTA-4659、*L. ファーメンタム* ATCC 14931、*L. ロイテリ* ATCC PTA-4659 及び ATCC PTA-6475、又は *L. ファーメンタム* ATCC 14931、*L. ロイテリ* DSM 32273、ATCC PTA-6475 及び ATCC PTA-4659 を含むことができる。

【0084】

特定の実施形態では、図1の方法には、*DagK* を産生する能力に関して、*L. ロイテリ* DSM 32273、ATCC PTA-4659 及び ATCC PTA-6475 及び *L. ファーメンタム* ATCC 14931 以外の細菌株をスクリーニングすることが含まれる。更に、この方法には、哺乳動物におけるアレルギーを予防、抑制及び/又は治療するのに使用するための、*DagK* を産生する能力を有する、*L. ロイテリ* DSM 32273、ATCC PTA-4659 及び ATCC PTA-6475、及び *L. ファーメンタム* ATCC 14931 以外の細菌株を選択することが含まれる。

【実施例】

【0085】

例1

qRT-PCRによる*dagK* mRNA遺伝子発現の定量

野生型(WT)ラクトバチルス・ロイテリ ATCC PTA-6475、*L. ロイテリ* ATCC PTA-6475の*hdca*突然変異体(2012年に、Thomasらによって、前に記載されている)、WT *L. ロイテリ* ATCC PTA-4659 及び WT *L. ロイテリ* DSM 17938(2006年1月30日にブダペスト条約下で、DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH(Mascheroder Weg 1b、D-38124 Braunschweig、ドイツ)に寄託された)を、MRS培地中で一晩37℃にて増殖させ、気相としてのN₂/CO₂(80/20; v/v)の厳密な無酸素条件下で培養した。100µlの新鮮な培養液を、10mlの乳酸菌限定培地4(LDM4)中でインキュベートした。培養液を、ミニバイオリアクター中で、37℃にて厳密な無酸素条件下に維持した。サンプルを3時間、6時間、24時間及び48時間にて収集した。細菌ペレットを、6000×gで10分間、4℃にて培養液を処理することによって得た。後に、ペレットをRNaseで処理した。細菌細胞からのmRNAを、Trizol分離キットによって抽出した。各群からの500ngのmRNAを使用して、mRNAをcDNAに転化した。処理したcDNAを、1:2に希釈し、qRT-PCRを実行するために使用した。Stratagene Mx3000p(Agilent Technologies GmbH、米国)qRT-PCRを、増幅及び蛍光データ収集に使用した。マスターミックスは、12.5µlのPower SYBR Green 2000(ABI systems、米国)、0.5µlの各プライマー(DAGK-Lr-F: GCGTGAGTCCATAACCGTCT(配列番号:9)及びDAGK-Lr-R: ATGGCTGCTGAAATTCCTGT(配列番号:10)、10µM)、1µlの試料からなり、水で調整して、最終的な体積を1ウェル当たり25µlにした。PCR増幅

の後、プライマーの特異性を、融解曲線を検査し、アガロースゲル電気泳動（１％）によって、アンプリコンのサイズを決定することによって調べた。相対的なmRNA標的遺伝子発現レベル（比＝ $\frac{[(E_{target}) dC P_{target} (control - sample)]}{[(E_{ref.}) dC P_{ref.} (control - sample)]}$ ）を、ハウスキーピング遺伝子rpoBに対して正規化し、基準として使用した。続いて、各細菌の３時間の培養から得られたmRNAを、１．０に設定し、キャリブレーターとして使用して、L．ロイテリATCC PTA-6475、ATCC PTA-4659及びDSM17938の６時間、２４時間及び４８時間のような異なる時点での同じ細菌株における相対的なmRNAの倍数における差を特定した。

【００８６】

10

図２は、dagK遺伝子発現実験の結果を示す。この図は、L．ロイテリATCC PTA-4659と共に、WT及びhdca突然変異体L．ロイテリATCC PTA-6475の両方によるdagK発現の増加を示す。しかしながら、L．ロイテリDSM17938には、dagK発現がなく、即ち、DagKを産生する能力がなかった。興味深いことに、dagK mRNA発現は、細菌の伸長期の間に非常に高く発現した。反復実験から、６時間と同様の発現を示したので、１２時間のインキュベーション時点を選択した。

【００８７】

例２

細菌培養上清中のDagKタンパク質を検出するためのLC-MS/MS

文献によると、DagKは、グラム陽性菌に可溶性のアイソフォームを有すると考えられている。本発明者らは、DagKがL．ロイテリATCC PTA-6475から放出され、それが宿主の腸上皮脂質シグナル伝達と相互作用し、アレルギー反応に起因して放出されたヒスタミンの炎症誘発性作用を抑制し、更に、抗炎症挙動を促進すると仮定した。本発明者らは、L．ロイテリATCC PTA-6475のdagK遺伝子を突然変異させ（突然変異体は、Pijkeren及びBritton（２０１２年）に記載されているように、RecT媒介一本鎖組み換えによって作成され、オリゴ（oligos）標的dagKを使用してdagK遺伝子を突然変異させるように適合させた）、DagK突然変異体L．ロイテリATCC PTA-6475を本発明者らの無菌（GF）マウスにコロニー形成させたが、本発明者らが、野生型L．ロイテリATCC PTA-6475をコロニー形成させた無菌マウスにて観察したようなIL-6及びIL-1の抑制は見られなかった。基礎的な炎症誘発性サイトカインレベルは顕著に抑制された。アレルギー反応に起因して放出されるヒスタミンは、H1R及びH2Rを活性化することができる。しかしながら、H1R下流のシグナル伝達は、L．ロイテリにおけるDagK合成によって、シグナル伝達に関わる脂質DAGを阻害することによって中断され、それによって、ヒスタミンによる炎症誘発性作用が抑制される。これにより、H2R活性化のみが可能になり、該H2R活性化は、抗炎症性症状を促進することが知られている。

20

30

【００８８】

dagKが宿主免疫応答に何らかのポジティブな効果を示すためには、宿主-DAG脂質が発現されなければならない。DAGが活性化されるためには、H1Rシグナル伝達が活性化されなければならない。このことが、本発明者らが、L．ロイテリのdagKに突然変異を起こし、マウスにコロニー形成させた場合に、炎症誘発性サイトカイン抑制が見られなかったことの理由である。このことは、PKC及びPKAの活性化によって、追加的に確認された。

40

【００８９】

DagKアイソフォームがL．ロイテリから分泌されているか否かを更に示すために、本発明者らは、細菌細胞培養実験を行った。100μlのMRS中で、37℃にて無酸素条件下で、一晚増殖させたL．ロイテリATCC PTA-6475を、DAGの存在下及び非存在下の、10mlのLDM4培地に加え、37℃にて１２時間、無酸素条件下で放置した。細菌細胞を、4℃で１０分間、6000×gの遠心分離によって除去した。１：１の比のプロテイナーゼ及びプロテインキナーゼ阻害剤を上清に添加した。上清を、0．

50

22 μ mのフィルターによって濾過して、残存する微量の細菌を除去した。D a g Kは10から13 k D aのタンパク質であるので、バックグラウンドを低減させる必要がある。従って、上清を50 k D aの濾液で処理した。フロースルーを3 k D aの濾液に加え、5000 \times gで30分間回転させた。トリプシン分解後、上相の濃縮物を使用して、L C - M S / M Sを実行した。図3は、L . ロイテリ A T C C P T A - 6 4 7 5からのD a g Kタンパク質のアミノ酸配列を、トリプシン分解或いは切断部位 (T r y p s) と共に示す。図4は、D A Gが細胞培地に存在する場合のL . ロイテリ A T C C P T A - 6 4 7 5からのD a g Kタンパク質のアミノ酸配列を示す。

【0090】

L C - M S / M S実験の結果を、表1及び表2並びに図3及び図4に示す。L . ロイテリ D a g Kタンパク質と一致する配列が、上清中に見出された。従って、L . ロイテリ A T C C P T A - 6 4 7 5は、D a g Kタンパク質を産生し且つ分泌する能力があった。興味深いことに、L . ロイテリは、細胞培地中にD A Gが存在する場合に、それが存在しない場合と比較して、より高いレベルのD a g Kを分泌した。しかしながら、本発明者らは、D A Gの存在下及び非存在下でも、D a g Kの濃度は異なるが、D a g Kを検出することができる。培地コントロールは陰性のままだった。

【表1】

表1. L. ロイテリATCC PTA-6475からの上清のトリプシン処理のLC-MS/MS結果

| ペプチド | -10lgP | 質量 | 長さ | ppm | m/z | RT | 走査 | #Spec |
|------|--------|----------|----|-------|----------|-------|------|-------|
| A | 18.31 | 833.3813 | 6 | -6.4 | 417.6953 | 58.33 | 139 | 3 |
| B | 14.72 | 971.5287 | 11 | -62.2 | 486.7414 | 63.33 | 432 | 1 |
| C | 9.09 | 884.4352 | 7 | 35 | 443.2404 | 72.68 | 1088 | 1 |
| D | 8.83 | 1487.774 | 13 | -64.8 | 744.8461 | 52.15 | 42 | 1 |
| E | 7.94 | 996.4447 | 7 | 30.9 | 499.245 | 64.98 | 549 | 1 |
| F | 5.73 | 2710.64 | 27 | -79.9 | 678.6131 | 86.5 | 1394 | 1 |

表1のペプチドA - F :

A E E R N M R 配列番号 1
 B D V A A G G V L I S A 配列番号 2
 C D K H Q T E K 配列番号 3
 D N M R Y H L L A A C L A I 配列番号 4
 E E E R N M R Y 配列番号 5
 F K A K D V A A G G V L I S A I F S V L V G L I I F I P 配列番号 6

【表2】

表2. DAGが細胞培地中に存在する場合のL. ロイテリATCC PTA-6475からの上清のトリプシン処理のLC-MS/MS結果

| ペプチド | -10lgP | 質量 | 長さ | ppm | m/z | RT | 走査 | #Spec |
|------|--------|-----------|----|------|-----------|-------|-------|-------|
| G | 23,58 | 700,3755 | 8 | 1,7 | 701,384 | 24,55 | 15840 | 1 |
| H | 15,34 | 4515,4473 | 39 | -1,3 | 1129,8677 | 30,12 | 18496 | 1 |

表2のペプチドG - H :

G D V A A G G V L 配列番号 7

H N M R Y H L L A A C L A I I M S I L L H I S A M E W L W I L L A I F V V F T S
配列番号 8

【 0 0 9 1 】

例 3

D a g K を産生する能力を有する菌株の同定

細菌を、MRS プレート上で 16 時間 37 にて嫌気性雰囲気中で培養する。細菌のコロニーを滅菌プラスチックループを用いて集め、100 μl の滅菌水（PCR 品質）中に懸濁する。或いは、DNA を、細菌培養物から任意の適切な方法を使用して調製することができる。例えば例 1 を参照されたい。

【 0 0 9 2 】

d a g K 遺伝子の存在は、PCR、例えば、PuReTaq Ready To Go PCR ピーズ（GE HealthCare）並びに各 0.4 mM のプライマー対 d a g K __L r F（TGGACTCACGCGATAAACATCA、配列番号 11）及び d a g K __L r R（ACAATCAAATCTGTAAACAGCTTCG、配列番号 12）を使用することによって調べられる。細菌懸濁液又は DNA 調製物（0.5 μl）を、PCR 混合物に添加し、PCR 反応を、95 で 5 分間；30 ×（95 で 30 秒；58 で 30 秒；72 で 30 秒）；72 で 10 分のプログラムを実行することによって行った。PCR 生成物を、標準的なアガロースゲル電気泳動を使用して、分離し且つ可視化し、そして、該配列を、PCR に使用したフォワードプライマー（d a g K __L r F）を使用して標準的なサンガー配列決定により決定する。

【 0 0 9 3 】

例 4

D a g K を産生する能力を有するラクトバチルス・ロイテリ DSM 32273 の分析

ラクトバチルス・ロイテリ DSM 32273 細菌を、一晚、MRS プロス中で 37 にて増殖させた。細菌懸濁液を、3500 rpm で 5 分間、遠心分離し、1 μl のペレットを、100 μl の PBS に懸濁させた。

【 0 0 9 4 】

L・ロイテリ DSM 32273 における d a g K 遺伝子の PCR 分析を、例 3 に記載したように行った。

【 0 0 9 5 】

その結果から、L・ロイテリ DSM 32273 は、ヒスチジンデカルボキシラーゼをコードする遺伝子及び d a g K 遺伝子に対して陽性であることが示された（表 3 参照）。細菌株 L・ロイテリ ATCC PTA-6475 及び DSM 17938 をコントロールとして含ませた。

【表 3】

表 3. 試験した細菌の種、菌株及び宿主の起源を示す PCR 分析の結果

| 種 | 菌株 | 宿主の起源 | dagK 遺伝子の存在 |
|--------|---------------|-------|-------------|
| L.ロイテリ | ATCC PTA-6475 | ヒト | + |
| | DSM 17938 | ヒト | - |
| | DSM 32273 | ヒト | + |

【 0 0 9 6 】

例 5

花粉アレルギーに使用するためのプロバイオティック製品の製造

この例では、花粉アレルギーに使用するためのプロバイオティック製品を製造する。L・ファーマンタム ATCC 14931 の菌株を、公開されているゲノム配列から分析される D a g K を産生するその能力に基づいて選択する。L・ファーマンタム株を、業界でラク

トバチルスを増殖させるための標準的な方法を使用して、増殖し、凍結乾燥する。この製品は、良好な安定性及び貯蔵寿命のために作製された油基配合物である。製造プロセスの独特な特徴は、オイルを真空下に置いて、オイル中の水分の大部分を除去することによって、オイルを乾燥させ、配合物の安定性を高めるステップである。本明細書中の本発明で使用される油は、純粋な食用植物油、好ましくはヒマワリ油及び中鎖トリグリセリドである。

【0097】

成分の混合。

1. 中鎖トリグリセリド、例えば、Akomed R (Karlskron AB、スウェーデンのカーズルハムン) 及びひまわり油、例えば、Akosum (Karlskron AB、スウェーデンのカーズルハムン) を、二酸化ケイ素 (Cab-o-sil M5 P、M5 P、Cabot) と共に、Bolz 混合機/タンク (Alfred BOLZ Apparatebau GmbH、ドイツのヴァンゲン・イム・アルゴイ) 中で混合する。

10

【0098】

2. 均質化する。サインポンプ及び分散機 (dispax) (Sine Pump、コロラド州のアーバダ) を Bolz 混合機に接続し、混合物を均質化する。

【0099】

3. 真空乾燥する。混合物を Bolz タンク内で 10 ミリバールの真空下で 12 時間乾燥させる。

20

【0100】

4. ラクトバチルス・ファーマンタムを添加する。約 20 kg の乾燥油混合物を、50 リットルのステンレス鋼容器に移す。L. ファーマンタム粉末、好ましくは凍結乾燥されたもの (使用する L. ファーマンタムの量は、該油中で求められる量に応じて変化するであろう、しかし、一例では、1 g 当たり 10¹¹ CFU を有する 0.2 kg の培養物を添加するであろう。) を添加する。これを、均質になるまで、ゆっくりと混合する。

【0101】

5. 混合する。L. ファーマンタムを含むプレミックスを、Bolz 混合機に戻す。

【0102】

6. 排出する。懸濁液を、200 リットルのガラス容器に排出し、窒素で覆う。

30

【0103】

懸濁液は、花粉アレルギーの予防又は治療のためにヒトへの経鼻投与に使用されるスプレーボトルに充填されるまで、容器内で保管される。

【0104】

例 6

食品アレルギーに使用するためのプロバイオティック製品の製造

この例では、ラクトバチルス・ロイテリ DSM 32273 を、ヒトの食物アレルギーの予防、抑制及び/又は治療に使用するために錠剤にその菌株を添加するために、Dag K を産生するその能力に基づいて選択する。L. ロイテリ株を、業界で、ラクトバチルスを増殖させるための標準的な方法を使用して、増殖させ、凍結乾燥する。

40

【0105】

以下のステップでは、グルコースカプセル化を含む、選択された細菌株を含有する錠剤の製造プロセスの例を説明する。当該技術分野で知られている賦形剤、充填剤、着香剤、カプセル化物、潤滑剤、固化防止剤、甘味料及び錠剤製品の他の成分を、製品の有効性に影響を与えることなく使用することができることが理解される。

【0106】

1. 融解させる。容器内の SOFTISAN (商標) 154 (SASOL GMBH、ドイツの Bad Homburg) を融解させ、それを 70 に加熱して、結晶構造を完全に破壊する。次に、それを 52 から 55 (硬化点 (hardening point) のすぐ上) に冷却する。

50

【0107】

2. 造粒する。ラクトバチルス・ロイテリ凍結乾燥粉末をDiosna高せん断混合機 / 造粒機、又は同等物に移す。融解させたSOFTEISAN(商標)154を、該L・ロイテリ粉末に約1分間、ゆっくりと添加する。添加中にチョッパーを使用する。

【0108】

3. 湿式ふるい分けをする。造粒直後に、該顆粒を、Tornadoミルを使用することによって、1mmのふるい網に通す。ふるい分けた顆粒を乾燥剤パウチと共に、アルパウチ(PVC被覆アルミニウム箔から作製されたもの)に詰め、ヒートシーラーで封止して袋を形成し、混合まで、冷蔵保存する。顆粒化したバッチは、2つの錠剤バッチに分割される。

10

【0109】

4. 当技術分野で知られている標準的なマイクロカプセル化法を使用してカプセル化したカプセル化D-グルコース(G8270、>99.5%グルコース、Sigma)を添加する。糖の量は、乾燥L・ロイテリの添加粉末の全CFUに依存し、標準レベルは、全菌株10⁸CFU当たり糖1グラムとすることができるが、更に、この糖の量は、下は0.1グラム又は0.01グラムまで、上は10グラムから更に100グラムまで変化させることができる。

【0110】

5. 混合する。混合機内の全ての成分を均質なブレンド物になるまで混合する。

【0111】

6. 圧縮する。最終的なブレンド物をロータリー錠剤プレスホッパーに移し、Killianコンプレッサーにて総重量765mgで錠剤を圧縮する。

20

【0112】

7. 大量包装する。錠剤を、分子ふるいの乾燥パウチと共に、アル-バッグに詰める。該アル-パウチを、プラスチックバケツに入れ、最終的な包装前の少なくとも1週間、冷所で保管する。SOFTEISAN(商標)(水添パーム油)を使用して、ラクトバチルス細胞を油脂中にカプセル化し、環境から保護することができる。

【0113】

上記のように、実施形態の製品は、錠剤以外の形態であってもよく、当該技術分野で知られている基本的な製品を調製する標準的な方法が、選択されたL・ロイテリ培養物を含む本発明の製品を調製するのに有益に使用される。

30

【0114】

例7

哺乳動物の腸上皮DAG及びpPKCシグナル伝達を調べるためのマウスのエンテロイド実験

マウスのエンテロイド(腸上皮層のみを含む)は、10週齢の無菌(GF)BALB/cマウス由来であった。エンテロイドは、増殖して、単層を形成し、LDM4培地(コントロール)、野生型L・ロイテリPTA-6475馴化培地(50から3kDaカットオフ)、ジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)阻害剤(2μM)のみ又はDGK阻害剤(2μM)及び野生型L・ロイテリPTA-6475馴化培地(CM; 50から3kDaカットオフ)でインキュベートした。DGK阻害剤(R59-022; 6-[2-(4-(4-フルオロフェニル)フェニルメチレン)-1-ピペリジニル)エチル]-7-メチル-5H-チアゾロ-[3,2-a]ピリミジン-5-オン)を、哺乳動物のDGKの活性化を止めるために、エンテロイドに馴化培地を添加する2時間前に添加し、2時間後、エンテロイドを洗浄し、それぞれ阻害剤を含むか又は含まない、馴化培地又はLDM4培地のみで処理した。45分間のインキュベーション後に、タンパク質を集め、ウェスタンブロットを行った。

40

【0115】

得られたDGK阻害剤で処理したエンテロイドは、野生型L・ロイテリPTA-6475馴化培地の存在下でPKCリン酸化を高め、一方、野生型L・ロイテリPTA-6475

50

馴化培地の存在下でD G K阻害剤を欠いたエンテロイドからは、P K Cリン酸化が増加した証拠は得られなかった。図5 a及び図5 bを参照されたい。

【0116】

上記の実施形態は、本発明の幾つかの例示的な例として理解されるべきである。当業者であれば、本発明の範囲から逸脱することなく、様々な改変、組み合わせ、及び変更を実施形態に加えることができることを理解するであろう。特に、異なる実施形態における異なる部分的な解決策を、技術的に可能な場合に他の構成に組み合わせることができる。しかしながら、本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によって規定される。

【0117】

参考文献

Thomasら。(2012年)。プロバイオティックラクトバチルス・ロイテリ由来のヒスタミンは、PKA及びERKシグナル伝達の調節を介してTNFを抑制する。(Histamine derived from probiotic Lactobacillus reuteri suppresses TNF via modulation of PKA and ERK signaling.) PLoS One 7(2): e31951。

【0118】

van PijkerenとBritton。(2012年)。乳酸菌における高効率組み換え。(High efficiency recombineering in lactic acid bacteria.) Nucleic Acids Research 40(10): e76。

【0119】

Leeら。(2004年)。種々の乳酸菌の食事摂取により、抗原刺激マウスの脾臓細胞における2型ヘルパーT細胞産生が抑制される。(Dietary intake of various lactic acid bacteria suppresses type 2 helper T cell production in antigen-primed mice splenocyte.) J. Microbiol. Biotechnol. 14(1): 167-170。

【配列表フリーテキスト】

【0120】

配列番号9: <223> dag K遺伝子のフォワードqRT-PCRプライマー

配列番号10: <223> dag K遺伝子のリバースqRT-PCRプライマー

配列番号11: <223> dag K遺伝子のフォワードPCRプライマー

配列番号12: <223> dag K遺伝子のリバースPCRプライマー

10

20

30

40

50

【図面】
【図 1】

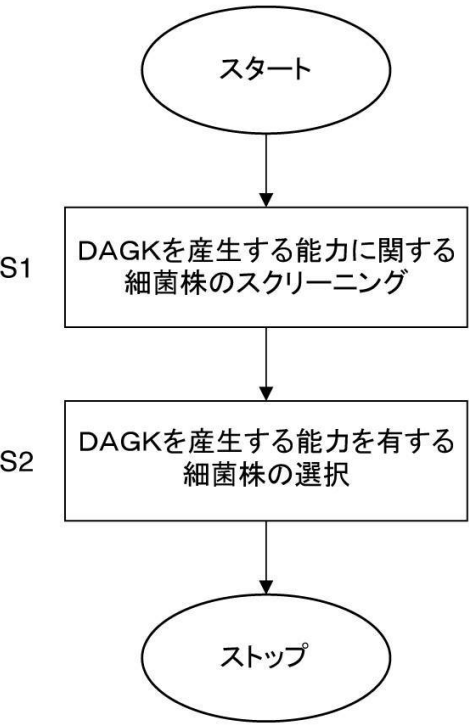


図 1

【図 2】

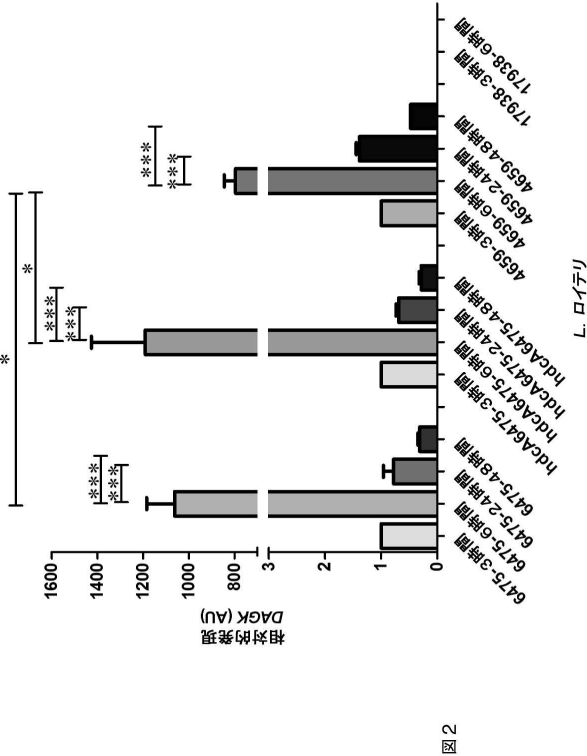


図 2

【図 3】

MDSQKHQTE KWHHLQAMR HATDGIQYV REERNARYEL LAAGLAIMS ALIQISAMEW LWLLAIEVV FTGEFINTVT EAVTDLIVDH
HYELNVKAK DVAAAGVGLIS AIFSVLVGLI IFIPRLALI R

Fig. 3

【図 4】

1 MDSRKHQTE ENHHLIQMRC HATDGIQYV REERNARYEL LAAGLAIMS ALIQISAMEW LWLLAIEVV FTGEFINTVT
S1 EAVTDLIVDH HYELNVKAK DVAAAGVGLIS AIFSVLVGLI IFIPRLALI R

Fig. 4

10

20

30

40

50

【 図 5 a 】

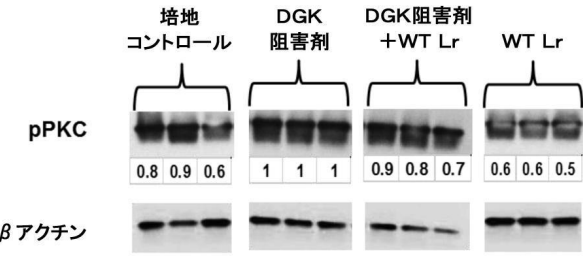


図 5a

【 図 5 b 】

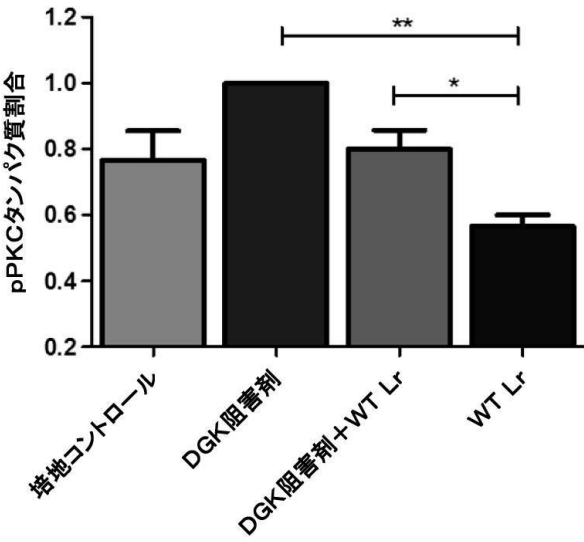


図 5b

【 配列表 】

0007030716000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 15/54 (2006.01)

F I

C 1 2 N 15/54

ATCC PTA-6475

ATCC PTA-4659

ン、ケンブリッジ ストリート 8 4 5 0、アパートメント ナンバー 1 2 0 1

審査官 西 賢二

(56)参考文献

特表 2 0 1 4 - 5 2 0 5 5 9 (J P , A)

特開 2 0 0 8 - 1 2 7 3 6 5 (J P , A)

特表 2 0 0 8 - 5 1 9 7 9 4 (J P , A)

特開 2 0 1 5 - 0 1 9 7 7 0 (J P , A)

特開 2 0 1 1 - 2 5 4 7 7 3 (J P , A)

Ganesh, B. P. et al , hdcA+ L. reuteri 6475 inhibits H1R downstream signaling via dagK and causes immunosuppression of intestinal epithelium in gnotobiotic mice , FASEB J., [online] , 2016年04月01日 , Vol. 30, Issue S1 , p. 1018.1 , https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fasebj.30.1_supplement.1018.1 , Internet, [retrieved on 2021.6.14]

Zhong, X. et al. , Diacylglycerol Kinase Deficiency Increases the Peanut Allergic Response in Mice , J. Allergy Clin. Immunol. , 2008年 , Vol. 121, Issue 2, Supplement 1 , p. S97; 376

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0

C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8

A 6 1 K 3 5 / 0 0 - 3 5 / 7 6 8

A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 1 / 8 0

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)