

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2024年5月10日(10.05.2024)



(10) 国際公開番号  
**WO 2024/095989 A1**

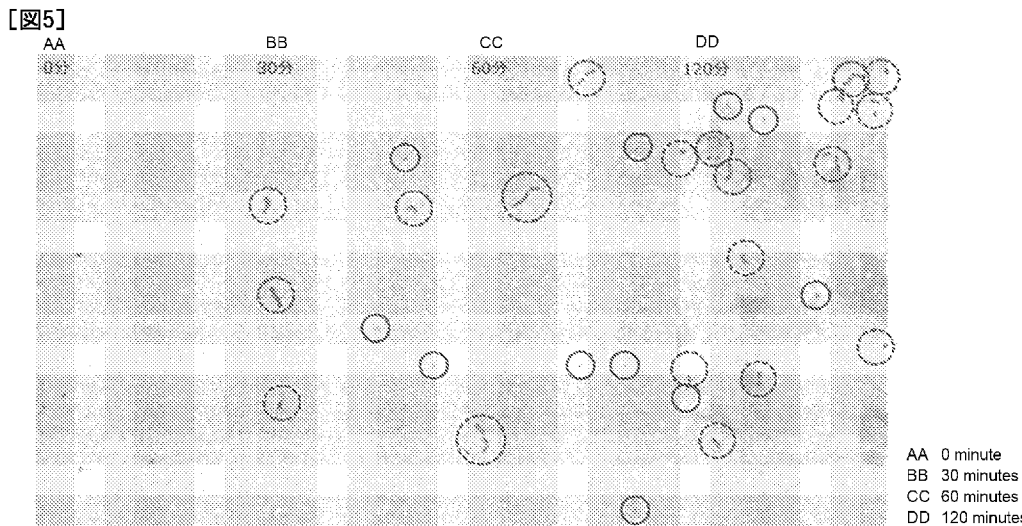
- (51) 国際特許分類:  
*C12Q 1/06* (2006.01) *C12N 1/20* (2006.01)  
*A23C 9/123* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2023/039175
- (22) 国際出願日: 2023年10月31日(31.10.2023)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2022-175383 2022年11月1日(01.11.2022) JP
- (71) 出願人: 小岩井乳業株式会社(**KOIWAI DAIRY PRODUCTS CO., LTD.**) [JP/JP]; 〒1000005 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号 Tokyo (JP). キリンホールディング

ス株式会社 (**KIRIN HOLDINGS KABUSHIKI KAISHA**) [JP/JP]; 〒1640001 東京都中野区中野四丁目10番2号 中野セントラルパークサウス Tokyo (JP).

- (72) 発明者: 植田 一馬(**UEDA, Kazuma**); 〒1640001 東京都中野区中野四丁目10番2号 小岩井乳業株式会社内 Tokyo (JP). 藤田 淳(**FUJITA, Jun**); 〒1640001 東京都中野区中野四丁目10番2号 小岩井乳業株式会社内 Tokyo (JP). 桑平 秀夫(**KUWAHIRA, Hideo**); 〒1640001 東京都中野区中野四丁目10番2号 小岩井乳業株式会社内 Tokyo (JP).

(54) **Title:** METHOD FOR MEASURING NUMBER OF CELLS OF LACTOCOCCUS LACTIS IN FERMENTATION COMPOSITION CONTAINING LACTOCOCCUS LACTIS AND STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS

(54) 発明の名称: ラクトコッカス・ラクティス及びストレプトコッカス・サーモフィラスを含む発酵組成物におけるラクトコッカス・ラクティスの菌数測定方法



(57) **Abstract:** The present invention addresses the problem of providing: a method for selectively measuring the number of cells of a bacterium capable of activating a plasmacytoid dendritic cell (e.g., a lactic acid bacterium such as a bacterium of strain JCM5805) at low cost and in a simple manner without the need for a skillful technique in a fermentation composition containing the bacterium capable of activating a plasmacytoid dendritic cell (e.g., a lactic acid bacterium such as a bacterium of strain JCM5805) and a thermophilus bacterium; a fermentation composition suitable for the method; and others. More specifically, in a preferred aspect (i.e., an aspect in which the bacterium capable of activating a plas-

(74) 代理人： 廣 田 雅 紀 (HIROTA, Masanori);  
〒1070052 東京都港区赤坂二丁目 2 番 1 9  
号アドレスビル6階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

macytoid dendritic cell is a bacterium of strain JCM5805), the present invention addresses the problem of providing: a method for selectively measuring the number of cells of a bacterium of strain JCM5805 at low cost and in a simple manner without the need for a skillful technique in a fermentation composition containing the bacterium of strain JCM5805 and a thermophilus bacterium that are similar to each other with respect to morphology such as size or shape; a fermentation composition suitable for the method; and others. The present invention relates to: a method for measuring the number of cells of a component (A) that is a bacterium capable of activating a plasmacytoid dendritic cell (e.g., *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain JCM5805) in a fermentation composition containing the component (A) and a component (B) that is a bacterium belonging to *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, the method comprising a step (1) of adding a diluent solution to the fermentation composition and a step (2) of incubating a diluted solution produced in the step (1) at 35 to 50°C; and others.

(57) 要約：本発明の課題は、プラズマサイトイド樹状細胞を活性化し得る細菌（例えば、JCM5805株菌等の乳酸菌）とサーモフィラス菌とを含む発酵組成物において、熟練した技術を必要とせず、低コストで、かつ、簡便に、プラズマサイトイド樹状細胞を活性化し得る細菌（例えば、JCM5805株菌等の乳酸菌）の菌数を選択的に測定する方法、及び、かかる方法に適した発酵組成物を提供すること等にある。本発明の好適な態様（プラズマサイトイド樹状細胞を活性化し得る細菌がJCM5805株菌である態様）である場合の課題として、より詳細には、大きさ又は形状等の形態が互いに類似しているJCM5805株菌とサーモフィラス菌とを含む発酵組成物において、熟練した技術を必要とせず、低コストで、かつ、簡便に、JCM5805株菌の菌数を選択的に測定する方法、及び、かかる方法に適した発酵組成物を提供すること等にある。本発明は、成分（A）プラズマサイトイド樹状細胞を活性化し得る細菌（例えば、ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティスJCM5805株菌）、及び、成分（B）ストレプトコッカス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サーモフィラスに属する細菌を含む発酵組成物において、前記成分（A）の菌数を測定する方法であって、工程（1）：前記発酵組成物に希釈液を添加する工程；及び、工程（2）：前記工程（1）で得られた希釈物を35～50℃でインキュベートする工程；を含む、前記方法等に関する。

## 明 細 書

発明の名称：

ラクトコッカス・ラクティス及びストレプトコッカス・サーモフィラスを含む発酵組成物におけるラクトコッカス・ラクティスの菌数測定方法

### 技術分野

[0001] 自然免疫系は主として細菌感染またはウイルス感染におけるプライマリーレスポンスを担い、中でも樹状細胞は強力かつ重要な構成細胞である。また、樹状細胞のうち、プラズマサイトイド樹状細胞（形質細胞様樹状細胞、`pDC: plasmacytoid dendritic cell`）は、ウイルスに対して増殖阻害活性を示すⅠ型インターフェロン（`type I interferon`）等の様々なインターフェロン（`IFN`）の主要な産生細胞であり、抗ウイルス生体防御において極めて重要な役割を有する（特許文献１）。

本発明は、プラズマサイトイド樹状細胞を活性化し得る細菌（好ましくは、ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティス（本明細書において「ラクトコッカス・ラクティス」とも表示する。）`JCM5805`株菌（本明細書において、「`JCM5805`株菌」とも表示する。））及びストレプトコッカス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サーモフィラス（本明細書において「ストレプトコッカス・サーモフィラス」とも表示する。）に属する細菌（以下、「サーモフィラス菌」とも表示する。）を含む発酵組成物におけるプラズマサイトイド樹状細胞を活性化し得る細菌の菌数測定方法、並びに、プラズマサイトイド樹状細胞を活性化し得る細菌及びサーモフィラス菌を含む発酵組成物等に関する。

### 背景技術

[0002] 食品には、しばしば乳酸菌等の細菌が含まれる。乳酸菌には多くの種類が存在し、その性質は様々であるが、例えば、プラズマサイトイド樹状細胞を活性化し得る細菌として、ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ

・ラクティス JCM 5805 株菌などが知られている（特許文献 1）。ここで、当該食品中に含まれる乳酸菌等の、プラズマサイトイド樹状細胞を活性化し得る細菌の細菌数を検出することは、食品における有効性及び安全性等の観点から、重要である。

[0003] 細菌数を検出する手段として、例えば、ブリード法（直接個体鏡検法）が知られている（非特許文献 1）。ブリード法とは、スライドガラスに食品を塗抹して乾燥させた後、染色液で染色された細菌の数を顕微鏡で測定する方法である。

ここで、ブリード法には、操作が単純であり、経費が少なくて済む（非特許文献 2）という利点があるものの、細菌の形態観察を伴うため、大きさ又は形状等の形態が類似した二種類以上の細菌を含む場合においては、特定の細菌の数を選択的に測定することは難しいという欠点があった。

一方で、細菌以外に、豆乳成分等の他成分を含む場合において、当該他成分と細菌を判別し、細菌数を計測する方法が報告されている（特許文献 2）。特許文献 2 に係る方法では、当該他成分を分解することにより、細菌のみをフィルタにてろ過抽出して捕集し、細菌数の測定を可能とする。

しかしながら、特許文献 2 に係る方法をもってしても、二種類以上の細菌を含む場合において、特定の細菌のみを捕集できるよう、それ以外の菌を選択的に分解又は消滅させることは難しく、二種類以上の細菌を含む場合においては、特定の細菌の数を選択的に測定することは難しいという課題が依然として存在していた。

## 先行技術文献

### 非特許文献

[0004] 非特許文献 1：日畜会報， 59（4）：376－378

非特許文献 2：日畜会報， 58（12）：1048－1053

### 特許文献

[0005] 特許文献 1：国際公開 2012／091081 パンフレット

特許文献 2：特開 2009－247331 号公報

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明の課題は、プラズマサイトイド樹状細胞を活性化し得る細菌（例えば、JCM5805株菌等の乳酸菌）とサーモフィラス菌とを含む発酵組成物において、熟練した技術を必要とせず、低コストで、かつ、簡便に、プラズマサイトイド樹状細胞を活性化し得る細菌（例えば、JCM5805株菌等の乳酸菌）の菌数を選択的に測定する方法、及び、かかる方法に適した発酵組成物を提供すること等にある。

本発明の好適な態様（プラズマサイトイド樹状細胞を活性化し得る細菌がJCM5805株菌である態様）である場合の課題として、より詳細には、大きさ又は形状等の形態が互いに類似しているJCM5805株菌とサーモフィラス菌とを含む発酵組成物において、熟練した技術を必要とせず、低コストで、かつ、簡便に、JCM5805株菌の菌数を選択的に測定する方法、及び、かかる方法に適した発酵組成物を提供すること等にある。

### 課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、本発明の課題を解決すべく、鋭意検討した結果、プラズマサイトイド樹状細胞を活性化し得る細菌（例えば、JCM5805株菌等の乳酸菌）とサーモフィラス菌とを含む発酵組成物を希釈し、得られた希釈物を35～50℃でインキュベートすることにより、プラズマサイトイド樹状細胞を活性化し得る細菌（例えば、JCM5805株菌等の乳酸菌）と、サーモフィラス菌との間の、肥大化または増殖の程度の差を利用することで、顕微鏡等を用いて両菌を視覚的に区別することが顕著に容易になること等を見だし、本発明を完成するに至った。

[0008] すなわち、本発明によれば以下の発明等が提供される。

〔1〕成分（A）プラズマサイトイド樹状細胞を活性化し得る細菌、及び、成分（B）ストレプトコッカス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サーモフィラスに属する細菌を含む発酵組成物において、

前記成分（Ａ）の菌数を測定する方法であって、

工程（１）：前記発酵組成物に希釈液を添加する工程；

工程（２）：前記工程（１）で得られた希釈物を 35～50℃のいずれかの温度でインキュベートする工程；及び

工程（３）：前記工程（２）でインキュベートした希釈物中の前記成分（Ａ）の菌数を測定する工程；

を含む、前記方法；

〔２〕成分（Ａ）ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティス JCM5805 株菌、及び、

成分（Ｂ）ストレプトコッカス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サーモフィラスに属する細菌

を含む発酵組成物において、

前記成分（Ａ）の菌数を測定する方法であって、

工程（１）：前記発酵組成物に希釈液を添加する工程；

工程（２）：前記工程（１）で得られた希釈物を 35～50℃のいずれかの温度でインキュベートする工程；及び、

工程（３）：前記工程（２）でインキュベートした希釈物中の前記成分（Ａ）の菌数を測定する工程；

を含む、前記方法；

〔３〕前記希釈液が、（i）細菌（例えば乳酸菌）が増殖可能な培地を含む水溶液、（ii）緩衝液、（iii）細菌（例えば乳酸菌）が増殖可能な培地を含む緩衝液、のいずれかである、上記〔１〕又は〔２〕に記載の方法；

〔４〕前記培地が、ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地（SCD培地）又はM17ブロス培地である、上記〔３〕に記載の方法；

〔５〕前記緩衝液が、トリス塩酸緩衝液である、上記〔３〕に記載の方法；

〔６〕前記希釈物の pH が 6～9 である、上記〔１〕～〔５〕のいずれかに記載の方法。

〔７〕前記希釈液の添加量が、前記発酵組成物 1 g あたり 4 mL 以上である

、上記〔１〕～〔６〕のいずれかに記載の方法；

〔８〕前記インキュベートの時間が、１５～７５分間である、上記〔１〕～〔７〕のいずれかに記載の方法；

〔９〕前記発酵組成物中のショ糖の含有量が６質量％以下である、上記〔１〕～〔８〕のいずれかに記載の方法；

〔１０〕前記成分（Ａ）の菌数を測定することが、前記成分（Ａ）の菌数を顕微鏡観察により測定することである、上記〔１〕～〔９〕のいずれかに記載の方法；

〔１１〕前記顕微鏡観察が、直接鏡検法による顕微鏡観察である、上記〔１０〕に記載の方法；

〔１２〕前記成分（Ａ）が、プラズマサイトイド樹状細胞を活性化し得る細菌（例えば、ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティス JCM 5805 株菌等の乳酸菌）の生菌及び／又は死菌を含む、上記〔１〕～〔１１〕のいずれかに記載の方法；

〔１３〕前記希釈液が、細菌（例えば乳酸菌）が増殖可能な培地を含有し、かつ、インキュベートが、４３℃で６０～１２０分間である場合において、前記成分（Ａ）と前記成分（Ｂ）との間の増殖率の差が  $0.5 \times 10^9$  個／（ $\text{g} \cdot \text{hour}$ ）以上である、上記〔１〕～〔１２〕のいずれかに記載の方法；

〔１４〕前記成分（Ａ）の菌数の測定が、前記成分（Ａ）と前記成分（Ｂ）との間の肥大化率及び／又は増殖率の違いを利用することによるものである、上記〔１〕～〔１３〕のいずれかに記載の方法；

〔１５〕成分（Ａ）プラズマサイトイド樹状細胞を活性化し得る細菌、及び成分（Ｂ）ストレプトコッカス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サーモフィラスに属する細菌

を含む発酵組成物であって、

工程（１）：前記発酵組成物に希釈液を添加する工程；及び、

工程（２）：前記工程（１）で得られた希釈物を３５～５０℃でインキュベ

ートする工程；

において、

インキュベートが、43℃で60～120分間である場合において、前記成分（A）と前記成分（B）との間の増殖率の差が $0.5 \times 10^9$ 個／（g・hour）以上である、

前記発酵組成物；

〔16〕成分（A）ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティス JCM5805 株菌、及び成分（B）ストレプトコッカス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サーモフィラスに属する細菌

を含む発酵組成物であって、

工程（1）：前記発酵組成物に希釈液を添加する工程；及び、

工程（2）：前記工程（1）で得られた希釈物を35～50℃でインキュベートする工程；

において、

インキュベートが、43℃で60～120分間である場合において、前記成分（A）と前記成分（B）との間の増殖率の差が $0.5 \times 10^9$ 個／（g・hour）以上である、

前記発酵組成物；

## 発明の効果

[0009] 本発明によれば、プラズマサイトイド樹状細胞を活性化し得る細菌（例えば、JCM5805株菌等の乳酸菌）とサーモフィラス菌とを含む発酵組成物において、熟練した技術を必要とせず、低コストで、かつ、簡便に、プラズマサイトイド樹状細胞を活性化し得る細菌（例えば、JCM5805株菌等の乳酸菌）の菌数を選択的に測定する方法、及び、かかる方法に適した発酵組成物等を提供することができる。

より詳細には、本発明の好適な態様（プラズマサイトイド樹状細胞を活性化し得る細菌がJCM5805株菌である態様）によれば、大きさ又は形状等の形態が互いに類似しているJCM5805株菌とサーモフィラス菌とを

含む発酵組成物において、熟練した技術を必要とせず、低コストで、かつ、簡便に、JCM5805株菌の菌数を選択的に測定する方法、及び、かかる方法に適した発酵組成物等を提供することができる。

### 図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1は、ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティス JCM5805株菌と、該株と同等の株（該株に由来する株及び該株が由来する株）との間の関係を示す図である。

[図2]図2は、直接鏡検法における16視野の取り方を表す図である。

[図3]図3は、発酵組成物をリン酸緩衝液（pH7.2）で希釈した試験例1を、直接鏡検法により観察して得られた顕微鏡画像を表す。

[図4]図4は、発酵組成物を0.1Mトリス塩酸緩衝液加SCD培地（pH8.0）で希釈した試験例2を、直接鏡検法により観察して得られた顕微鏡画像を表す。

[図5]図5は、発酵組成物をSCD培地（pH7.2）で希釈した試験例3を、直接鏡検法により観察して得られた顕微鏡画像を表す。

### 発明を実施するための形態

[0011] 本発明は、

[1]成分（A）プラズマサイトイド樹状細胞を活性化し得る細菌、及び、成分（B）ストレプトコッカス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サーモフィラスに属する細菌

を含む発酵組成物において、

前記成分（A）の菌数を測定する方法であって、

工程（1）：前記発酵組成物に希釈液を添加する工程；

工程（2）：前記工程（1）で得られた希釈物を35～50℃のいずれかの温度でインキュベートする工程；及び、

工程（3）：前記工程（2）でインキュベートした希釈物中の前記成分（A）の菌数を測定する工程；

を含む、前記方法（以下、「本発明の測定方法」とも表示する。）；

[2] 成分 (A) ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティス JCM5805 株菌、及び、  
成分 (B) ストレプトコッカス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サーモフィラスに属する細菌  
を含む発酵組成物において、  
前記成分 (A) の菌数を測定する方法であって、  
工程 (1) : 前記発酵組成物に希釈液を添加する工程 ; 及び、  
工程 (2) : 前記工程 (1) で得られた希釈物を 35 ~ 50℃ でインキュベートする工程 ;  
を含む、前記方法 (以下、「本発明の測定方法の好適な態様」とも表示する。);

[3] 成分 (A) プラズマサイトイド樹状細胞を活性化し得る細菌、及び  
成分 (B) ストレプトコッカス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サーモフィラスに属する細菌  
を含む発酵組成物であって、  
工程 (1) : 前記発酵組成物に希釈液を添加する工程 ; 及び、  
工程 (2) : 前記工程 (1) で得られた希釈物を 35 ~ 50℃ でインキュベートする工程 ;  
において、  
インキュベートが、43℃ で 60 ~ 120 分間である場合において、前記成分 (A) と前記成分 (B) との間の増殖率の差が  $0.5 \times 10^9$  個 / (g · hour) 以上である、  
前記発酵組成物 (以下、「本発明の発酵組成物」とも表示する。);

[4] 成分 (A) ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティス JCM5805 株菌、及び  
成分 (B) ストレプトコッカス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サーモフィラスに属する細菌  
を含む発酵組成物であって、

工程（１）：前記発酵組成物に希釈液を添加する工程；及び、

工程（２）：前記工程（１）で得られた希釈物を 35～50℃でインキュベートする工程；

において、インキュベートが、43℃で60～120分間である場合において、前記成分（Ａ）と前記成分（Ｂ）との間の増殖率の差が $0.5 \times 10^9$ 個／（g・hour）以上である、

前記発酵組成物（以下、「本発明の発酵組成物の好適な態様」とも表示する。）；

などの実施態様を含んでいる。

[0012] 本発明における「pDCを活性化し得る細菌」（以下、「本発明における細菌」とも表示する。）とは、特に限定されず、例えば、pDCを活性化し得る乳酸菌、酢酸菌、エシェリヒア属菌、バチルス属菌又は藍色細菌などを用いる。ここで、細菌は、「生菌体」、「死菌体」、又は、「生菌体及び死菌体の両方」のいずれであってもよいが、本発明の意義をより多く享受する観点から、「生菌体」又は「生菌体及び死菌体の両方」であることが好ましい。

[0013] 本発明における「pDCを活性化し得る細菌」は、IFNの産生を誘導し得る。IFNとしては、Type I IFN（I型インターフェロン）、Type II IFN（II型インターフェロン）またはType III IFN（III型インターフェロン）の少なくとも1以上であることが好ましい。Type I IFNはウイルス感染に有効とされるサイトカインをいい、例えば、IFN- $\alpha$ （例えば、1、2、4、5、6、7、8、10、13、14、16、17または21等のサブタイプを含む）またはIFN- $\beta$ 等が含まれる。Type II IFNにはIFN- $\gamma$ が含まれ、Type III IFNにはIFN- $\lambda$ が含まれる。本発明における「pDCを活性化し得る細菌」は、少なくともType I IFNの産生誘導性を有するものが好ましい。

[0014] 本発明における「pDCを活性化し得る細菌」が産生を誘導し得るIFN

は、Type I IFN、Type II IFNまたはType III IFNのいずれかに属するIFNであれば特に限定されないが、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ およびIFN- $\lambda$ からなる群から選択される一種以上であることが好ましく、IFNの内の少なくとも一種がIFN- $\alpha$ であることがより好ましく、IFNの内の少なくとも一種がIFN- $\alpha$ であり、かつ、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ およびIFN- $\lambda$ からなる群から選択される二種以上であることがさらに好ましく、二種以上のIFNの内の少なくとも二種がIFN- $\alpha$ およびIFN- $\beta$ であることが特に好ましい。

[0015] 細菌が、pDCを活性化し得るか否かは、細菌をpDCに供したときに、pDCが細菌を貪食するか、細菌を貪食したpDC表面に細胞突起が出現するか、又は細菌を貪食したpDCがIFN (Type I IFNおよび／またはType III IFN等) を産生するかによって、確認することができる。

[0016] pDCの貪食又はpDC表面の細胞突起の出現については、例えば、顕微鏡観察又はフローサイトメトリーなどによる観察によって確認することができ、好ましくは、蛍光色素を修飾した細菌をpDCに供したあとで、当該pDCを観察することが好ましい。

[0017] IFN (Type I IFNおよび／またはType III IFN等) の産生については、例えば、細菌をマウス等の哺乳類の骨髓細胞から誘導したpDCの共存下で培養した場合に、培養系内のIFN- $\alpha$ またはIFN- $\beta$ 等のIFN量または濃度を測定することにより確認できる。

[0018] IFN濃度は、具体的には、下記 (i) ~ (iv) の手順で測定することにより確認できる。

(i) 赤血球除去したマウス由来骨髓細胞を、下記の組成に調製したRPMI 1640培地に $1 \times 10^6$ 個/mLとなるように懸濁し、細胞懸濁液を調製する。

<培地の組成>

- ・ 10体積% FBS
- ・ 100 U/mL ペニシリン／ストレプトマイシン

- ・ 1 mM ピルビン酸ナトリウム
- ・ 2.5 mM HEPES
- ・ 1 質量% MEM NEAA
- ・ 50  $\mu$ M  $\beta$ -メルカプトエタノール
- ・ 100 ng/mL Flt-3L

(ii) 調製した細胞懸濁液を 1 mL ずつ播種し、CO<sub>2</sub> インキュベータ内で 37°C、5 体積% CO<sub>2</sub> にて 1 週間培養して pDC を誘導する。

(iii) 誘導された pDC を含む骨髓細胞を、 $2 \times 10^5$  個/mL となるように懸濁し、200  $\mu$ L ずつ 96 ウェルプレートに播種し、PBS で 1 mg/mL の濃度となるように調整した乳酸菌懸濁液を 2  $\mu$ L ずつ添加する。

(iv) 24 時間後に培養上清を回収し、IFN- $\alpha$  測定キットを用いて ELISA 法により IFN- $\alpha$  濃度を測定する。

[0019] 本発明における「pDC を活性化し得る細菌」は、「終濃度が 10  $\mu$ g/mL の該細菌」と、「マウスの骨髓から回収して 100 ng/mL Flt-3L を含む細胞培養培地で 7 日間培養して得られる、pDC を含む、終濃度が  $2 \times 10^5$  個/mL の骨髓細胞」とを 24 時間共培養することで 30 pg/mL (好ましくは 50 pg/mL、より好ましくは 60 pg/mL、より好ましくは 70 pg/mL、80 pg/mL、90 pg/mL、100 pg/mL、150 pg/mL、さらに好ましくは 200 pg/mL、210 pg/mL、220 pg/mL、230 pg/mL、240 pg/mL、250 pg/mL、さらにより好ましくは 300 pg/mL、400 pg/mL、500 pg/mL、600 pg/mL、700 pg/mL、特に好ましくは 800 pg/mL) 以上の IFN- $\alpha$  を産生する指標で表されるものとすることができる。

[0020] 本発明の「pDC を活性化し得る細菌」における pDC 活性化としては、CD80、CD86 または MHC class II 等の活性化マーカーの発現を促進し得ることが挙げられる。

[0021] 本発明の「pDC を活性化し得る細菌」としては、「ストレプトコッカス

・サリバリウス・サブスピーシーズ・サーモフィラスに属する細菌」（サーモフィラス菌）以外の細菌であって、pDCを活性化し得る細菌である限り、特に制限されないが、乳酸菌、酢酸菌、及び、バチルス属菌からなる群から選択される1種又は2種以上の細菌が挙げられる。

[0022] 上記の「pDCを活性化し得る乳酸菌」としては、特に限定されないが、例えば、オエノコッカス (*Oenococcus*) 属菌、ビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 属菌、レンチラクトバチルス (*Lentilactobacillus*) 属菌、ワイセラ (*Weissella*) 属菌、テトラジェノコッカス (*Tetragenococcus*) 属菌、ラクトコッカス (*Lactococcus*) 属菌、ロイコノストック (*Leuconostoc*) 属菌、ペディオコッカス (*Pediococcus*) 属菌、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属菌、エンテロコッカス (*Enterococcus*) 属菌、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属菌、及び、ラクチプランチバチルス (*Lactiplantibacillus*) 属菌が挙げられ、オエノコッカス (*Oenococcus*) 属菌、ビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 属菌、レンチラクトバチルス (*Lentilactobacillus*) 属菌、ワイセラ (*Weissella*) 属菌、テトラジェノコッカス (*Tetragenococcus*) 属菌、ラクトコッカス (*Lactococcus*) 属菌、ロイコノストック (*Leuconostoc*) 属菌、ペディオコッカス (*Pediococcus*) 属菌、エンテロコッカス (*Enterococcus*) 属菌、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属菌、及び、ラクチプランチバチルス (*Lactiplantibacillus*) 属菌が好ましく挙げられる。

[0023] 上記のオエノコッカス属菌としては、例えば、オエノコッカス・オエニ (*Oenococcus oeni*) 等が挙げられる。オエノコッカス属菌の具体例としては、オエノコッカス・オエニ JCM 6125 等が挙げられる。

[0024] 上記のビフィドバクテリウム属菌としては、例えば、ビフィドバクテリウム・アニマリス・サブスピーシーズ・ラクティス (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) およびビフィドバクテリウム・ロンガム・サブスピーシーズ・インファンティス (*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) 等が挙げられる。ビフィドバクテリウム属菌の具体例としては、ビフィドバクテリウム・アニマリス・サブスピーシーズ・ラクティス JCM 10602 およびビフ

イドバクテリウム・ロンガム・サブスピーシーズ・インファンティス JCM 1222 等が挙げられる。

[0025] 上記のレンチラクトバチルス属菌としては、例えば、レンチラクトバチルス・パラケフィリ (*Lactiplantibacillus parakefiri*) 等が挙げられる。レンチラクトバチルス属菌の具体例としては、レンチラクトバチルス・パラケフィリ JCM 8573 等が挙げられる。

[0026] 上記のワイセラ属菌としては、例えば、ワイセラ・パラメセンテロイデス (*Weissella paramesenteroides*) およびワイセラ・ビリデスセンス (*Weissella viridescens*) 等が挙げられる。ワイセラ属菌の具体例としては、ワイセラ・パラメセンテロイデス JCM 9890 およびワイセラ・ビリデスセンス JCM 1174 等が挙げられる。

[0027] 上記のテトラジェノコッカス属菌としては、例えば、テトラジェノコッカス・ハロフィルス (*Tetragenococcus halophilus*) 等が挙げられる。テトラジェノコッカス属菌の具体例としては、テトラジェノコッカス・ハロフィルス NRIC 0098 等が挙げられる。

[0028] 上記のラクトコッカス属菌としては、例えば、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティス (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*)、ラクトコッカス・ガルビエアエ (*Lactococcus garvieae*)、ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・クレモリス (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*)、ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ホールドニアエ (*Lactococcus lactis* subsp. *hordniae*) およびラクトコッカス・プランタラム (*Lactococcus plantarum*) 等が挙げられる。

[0029] 上記のラクトコッカス属菌の具体例としては、ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティス JCM 5805、ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティス NBRC 12007、ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティス NRIC 1150、ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティス JCM 20101、

ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティス JCM 7638、ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティス ATCC 11454、ラクトコッカス・ガルビエアエ NBRC 100934、ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・クレモリス JCM 16167、ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・クレモリス NBRC 100676、ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ホールドニアエ JCM 1180 および ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ホールドニアエ JCM 11040 および ラクトコッカス・プランタラム JCM 11056 等が挙げられる。

[0030] 上記のロイコノストック属菌としては、例えば、ロイコノストック・カーノサム (*Leuconostoc carnosum*) および ロイコノストック・ラクティス (*Leuconostoc lactis*) 等が挙げられる。ロイコノストック属菌の具体例としては、ロイコノストック・カーノサム JCM 9695 および ロイコノストック・ラクティス NBRC 12455 等が挙げられる。

[0031] 上記のペディオコッカス属菌としては、例えば、ペディオコッカス・アシディラクティシ (*Pediococcus acidilactici*)、ペディオコッカス・ペントサセウス (*Pediococcus pentosaceus*)、ペディオコッカス・セリコーラ (*Pediococcus cellicola*)、ペディオコッカス・クラウッセニー (*Pediococcus claussenii*)、ペディオコッカス・ダムノサス (*Pediococcus damnosus*)、ペディオコッカス・エタノーリデュランス (*Pediococcus ethanolidurans*)、ペディオコッカス・イノピナタス (*Pediococcus inopinatus*)、ペディオコッカス・パルヴルス (*Pediococcus parvulus*)、ペディオコッカス・スティレシー (*Pediococcus stilesii*) 等が挙げられる。ペディオコッカス属菌の具体例としては、例えば、ペディオコッカス・アシディラクティシ JCM 8797、ペディオコッカス・アシディラクティシ K15 および ペディオコッカス・ダムノサス JCM 5886 等が挙げられる。

[0032] 上記のストレプトコッカス属菌としては、例えば、ストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*) 等が挙げられる。

- [0033] 上記のエンテロコッカス属菌としては、例えば、エンテロコッカス・アルセディニス (*Enterococcus alcedinis*) 等が挙げられる。
- [0034] 上記のラクトバチルス属菌としては、例えば、ラクトバチルス・パラカゼイ (*Lactobacillus paracasei*)、ラクトバチルス・デルブルエッキ (*Lactobacillus delbrueckii*)、ラクトバチルス・アシドフィラス (*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*)、ラクトバチルス・フルクティヴォランス (*Lactobacillus fructivorans*)、ラクトバチルス・ヒルガルディー (*Lactobacillus hilgardii*)、ラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasseri*)、ラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*) およびラクトバチルス・ブルガリクス (*Lactobacillus bulgaricus*) が挙げられる。
- [0035] ラクトバチルス属菌の具体例としては、ラクトバチルス・パラカゼイ K W 3 1 1 0、ラクトバチルス・パラカゼイ M C C 1 8 4 9、ラクトバチルス・ラムノサス G G、ラクトバチルス・ラムノサス G G、ラクトバチルス・ラムノサス C R L 1 5 0 5、ラクトバチルス・ガセリ S B T 2 0 5 5、ラクトバチルス・アシドフィルス L - 9 2、ラクトバチルス・ブルガリクス O L L 1 0 7 3 R - 1 等が挙げられる。
- [0036] 上記のラクチプランチバチルス属菌としては、例えば、ラクチプランチバチルス・プランタラム (*Lactiplantibacillus plantarum*)、ラクチプランチバチルス・ペントーサス (*Lactiplantibacillus pentosus*) 等が挙げられる。ラクチプランチバチルス属菌の具体例としては、ラクチプランチバチルス・プランタラム L - 1 3 7、ラクチプランチバチルス ペントーサス O N R I C b 0 2 4 0 等が挙げられる。なお、ラクチプランチバチルス・プランタラム、ラクチプランチバチルス・ペントーサスはそれぞれ、旧分類では、ラクトバチルス・プランタラム、ラクトバチルス・ペントーサスに分類されていたものである。
- [0037] 上記の「p D C を活性化し得る酢酸菌」としては、特に限定されないが、

例えば、グルコンアセトバクター（*Gluconacetobacter*）属菌、アセトバクター（*Acetobacter*）属菌、グルコノバクター（*Gluconobacter*）属菌などが挙げられ、好ましくはグルコンアセトバクター属菌が挙げられ、より好ましくはグルコンアセトバクター・ハンゼニイが挙げられ、さらに好ましくはグルコンアセトバクター・ハンゼニイ GK-1 が挙げられる。

[0038] 上記の「pDCを活性化し得るバチルス属菌」としては、特に限定されないが、例えば、バチルス・コアグランス（*Bacillus coagulans*）等が挙げられる。バチルス属細菌の具体例としては、例えば、バチルス・コアグランス SANK 70258 株等が挙げられる。

[0039] （JCM5805 株菌）

本発明の測定方法の好適な態様としては、「pDCを活性化し得る乳酸菌」として、ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティス JCM5805 株菌を用いる態様が挙げられる。本発明に用いる「JCM5805 株菌」としては、JCM5805 株の菌体である限り、「生菌体」、「死菌体」、又は、「生菌体及び死菌体の両方」のいずれであってもよいが、本発明の意義をより多く享受する観点から、「生菌体」又は「生菌体及び死菌体の両方」であることが好ましい。

本発明における「JCM5805 株」には、JCM5805 株と同等の菌株も、該菌株に含まれる。ここで、同等の菌株とは、JCM5805 株から由来している菌株（菌株 A）、JCM5805 株が由来する菌株（菌株 B）、又は、前述の菌株 A 若しくは菌株 B の子孫菌株をいう。同等の菌株は他の菌株保存機関に保存されている場合もある。図 1 に、JCM5805 株に由来する菌株、及び、JCM5805 株が由来する菌株を示す。図 1 に記載の JCM5805 株の同等の菌株であっても、本発明における「JCM5805 株」として用いることができる。

[0040] JCM5805 株等の本発明における細菌の菌体の調製方法は特に制限されず、JCM5805 株等の本発明における細菌の生菌体の調製方法としては、例えば、JCM5805 株等の本発明における細菌の生菌体を培養した

培地から、ろ過、遠心分離等により菌体を集菌する方法を挙げることができる。また、JCM5805株等の本発明における細菌の死菌体の調製方法としては、例えば、JCM5805株等の本発明における細菌の生菌体を培養した培地を殺菌してから、ろ過、遠心分離等により菌体を集菌する方法や、JCM5805株等の本発明における細菌の生菌体を培養した培地から、ろ過、遠心分離等により菌体を集菌してから、殺菌する方法などを挙げることができる。必要に応じてさらに乾燥処理や破砕処理を行うことができる。

なお、殺菌の手段は特に制限されず、加熱のみならず、紫外線やγ線照射など、菌を死滅させる常套手段を用いることができる。また、発酵組成物の調製時の殺菌処理にて、発酵組成物中のJCM5805株菌等の本発明における細菌を死滅させてもよい。

[0041] (サーモフィラス菌)

本発明に用いる「ストレプトコッカス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サーモフィラスに属する細菌」(サーモフィラス菌)としては、本発明の意義をより多く享受する観点から、サーモフィラス菌の「生菌体」又は「生菌体及び死菌体の両方」が挙げられ、「生菌体」が好ましく挙げられる。

[0042] サーモフィラス菌の菌体の調製方法は特に制限されず、サーモフィラス菌の生菌体の調製方法としては、例えば、サーモフィラス菌の生菌体を培養した培地から、ろ過、遠心分離等により菌体を集菌する方法を挙げることができる。

[0043] 本発明において、本発明の効果を妨げない限りは、JCM5805株菌等の本発明における細菌とサーモフィラス菌以外のその他の乳酸菌等の細菌もさらに併用してもよいが、本発明の意義をより多く享受する観点から、本発明において、JCM5805株菌等の本発明における細菌とサーモフィラス菌以外には、その他の乳酸菌等の細菌を用いないことが好ましい。

[0044] 本発明に用いる乳酸菌等の本発明における細菌や、サーモフィラス菌は、公知の寄託機関等から入手することができる。上記の乳酸菌株等の細菌株のうち、JCM菌株は、理化学研究所・バイオリソースセンター・微生物材料

開発室（茨城県つくば市高野台3丁目1番地の1）から、NBRC菌株は、独立行政法人製品評価技術基盤機構生物遺伝資源部門（千葉県木更津市かずさ鎌足2丁目5番8号）から、NRIC菌株は、東京農業大学・菌株保存室（東京都世田谷区桜丘1丁目1番1号）から、ATCC菌株は、American type culture collection（米国）から、それぞれ入手することができる。

[0045] JCM5805菌株は上記の通り理化学研究所・バイオリソースセンター・微生物材料開発室から入手することができるが、本発明では理化学研究所・バイオリソースセンター・微生物材料開発室以外の保存機関に保存された、JCM5805菌株の同一菌株を使用することができる。具体的には、JCM5805菌株の同一菌株を、独立行政法人製品評価技術基盤機構生物遺伝資源部門（千葉県木更津市かずさ鎌足2丁目5番8号）、東京農業大学・菌株保存室（東京都世田谷区桜丘1丁目1番1号）およびAmerican type culture collection（米国）等から入手することができる。また、本発明に用いる乳酸菌の生菌として、市販のスターターカルチャーを用いてもよい。

[0046]（発酵組成物）

本明細書における「発酵組成物」とは、製造工程のいずれかに、乳酸菌の生菌で乳原料を発酵させる工程を含むものを意味する。

本明細書における「発酵組成物」には、例えば、「乳及び乳製品の成分規格等に関する省令」（以下、「乳等省令」という。）で定義される「発酵乳」、「乳製品乳酸菌飲料」、「乳酸菌飲料」、「乳等を主要原料とする食品」等を包含するがこれらに限定されない。例えば、乳等省令で定義される「発酵乳」とは、生乳、牛乳、特別牛乳、生山羊乳、殺菌山羊乳、生めん羊乳、成分調整牛乳、低脂肪牛乳、無脂肪牛乳および加工乳などの乳；や、クリーム、バター、チーズ、練乳などの乳製品；や、乳等を主要原料とする食品；などの乳等を、乳酸菌または酵母で発酵させ、固形状（ハードタイプ）、糊状（ソフトタイプ）または液状（ドリンクタイプ）にしたもの、または、

これらを凍結したものをいうが、本明細書における「発酵組成物」は、このような乳等省令で定義される発酵乳に限定されない。また、本明細書における「乳等を主要原料とする食品」には、製造工程のいずれかに、乳酸菌の生菌で乳原料を発酵させる工程を含むものである限り、乳等省令に規定される「乳等を主要原料とする食品」等に限られず、「乳」及び／又は「クリーム、バター、チーズ、練乳、粉乳、発酵乳等の乳製品」を主要原料とする食品も含まれる。かかる「乳等を主要原料とする食品」として、サワークリーム等が挙げられる。

[0047] 乳等省令における発酵乳などの定義や成分規格は以下のとおりである。

乳等省令において、発酵乳とは「乳又はこれと同等以上の無脂乳固形分を含む乳等を乳酸菌又は酵母で発酵させ、糊状又は液状にしたもの又はこれらを凍結したもの」と定義されている。その成分規格は「無脂乳固形分8%以上、乳酸菌数又は酵母数（1 mL 当たり）1, 000万以上、大腸菌群陰性」とされている。

また、乳等省令において、乳製品乳酸菌飲料とは「乳等を乳酸菌又は酵母で発酵させたものを加工し、又は主要原料とした飲料（発酵乳を除く。）」と定義されている。その成分規格は「無脂乳固形分3%以上、乳酸菌数又は酵母数（1 mL 当たり）1, 000万以上、大腸菌群陰性」とされている。

また、乳等省令において、乳等を主要原料とする食品の乳酸菌飲料とは「乳等を乳酸菌又は酵母で発酵させたものを加工し、又は主要原料とした飲料（発酵乳を除く。）」と定義されている。その成分規格は「無脂乳固形分3%未満、乳酸菌数又は酵母数（1 mL 当たり）100万以上、大腸菌群陰性」とされている。

[0048] 本発明における「発酵組成物」は、任意成分として、安定剤、甘味料、食物繊維、ビタミン、ミネラル、香料等を含有していてもよい。上記の安定剤としては特に限定されず、例えば、カラギーナン、キサンタンガム等が挙げられる。また、上記の甘味料としては特に限定されず、例えば、糖類、糖アルコール類、高甘味度甘味料等が挙げられ、これらの甘味料を1種又は2種

以上組み合わせて用いることができる。

[0049] 発酵組成物が甘味料を含有する場合、甘味料の含有濃度は特に制限されないが、顕微鏡観察した際の JCM 5805 株菌等の本発明における細菌とサーモフィラス菌との識別が難しくなる場合があり、本発明の意義をより多く享受し得る観点から、甘味料（好ましくは糖、さらに好ましくはショ糖）の含有濃度は好ましくは 6 質量%以下、より好ましくは 3 質量%以下、さらに好ましくは 1 質量%以下であることが挙げられる。

[0050] 本発明における「発酵組成物」には、無脂乳固形分の濃度が例えば 1～18 重量%、好ましくは 2～16 重量%、より好ましくは 2～14 重量%、さらに好ましくは 4～12 重量%、6～10 重量%若しくは 7～9 重量%であり、及び／又は、乳脂肪分の濃度が例えば 0～8 重量%、好ましくは 0.1～7 重量%、より好ましくは 0.5～4 重量%又は 1～3 重量%であるものが好適に含まれる。

[0051] (pH)

本発明における発酵組成物の pH としては、特に制限されないが、例えば 6 以下、3.5～6 などが挙げられる。発酵組成物の pH は、公知の方法にしたがって、例えば pH メーター（製品名：pH メータ F-52、株式会社堀場製作所製）などを用いて 20℃ にて測定することができる。

[0052] (乳原料)

本明細書における「乳原料」には、典型的には、乳等省令に定義される「乳」、すなわち、生乳、牛乳、特別牛乳、生山羊乳、殺菌山羊乳、生めん羊乳、成分調整牛乳、低脂肪牛乳、無脂肪牛乳および加工乳などの乳またはこれと同等以上の無脂乳固形分（すなわち 8%以上）を含むものが挙げられるが、乳成分を含む組成物である限り特に制限されない。本明細書における「乳成分」としては、乳等省令に定義される「乳」由来の乳脂肪、及び、該「乳」由来の無脂乳固形分（例えば、該「乳」由来のタンパク質及び／又は該「乳」由来の糖）からなる群から選択される 1 種又は 2 種以上が挙げられる。

[0053] 本明細書における「乳原料」は、乳、乳製品等を用いて調製することができる。「乳原料」として、乳及び／又は乳製品を用いる場合は、より具体的には、牛乳、水牛乳、羊乳、山羊乳、馬乳、濃縮乳、脱脂乳、脱脂濃縮乳、脱脂粉乳、全脂粉乳、クリーム、バター、バターミルク、練乳、乳糖、乳タンパク質濃縮物、ホエイタンパク質濃縮物、及び、水からなる群から選択される１種又は２種以上を用いて調製することができる。

[0054] 本明細書における「乳原料」としては、乳成分の固形分の濃度が例えば１～１８重量％、好ましくは２～１６重量％、より好ましくは４～１２重量％であるものが挙げられ、及び／又は、無脂乳固形分の濃度が例えば１～１８重量％、好ましくは２～１６重量％、より好ましくは２～１４重量％、さらに好ましくは４～１２重量％、６～１０重量％若しくは７～９重量％であるものが挙げられ、及び／又は、乳脂肪分の濃度が例えば０～８重量％、好ましくは０．１～７重量％、より好ましくは０．５～４重量％又は１～３重量％であるものが挙げられる。

[0055] (希釈液を添加する工程)

本発明の測定方法における、前記発酵組成物に希釈液を添加する工程（１）としては、発酵組成物に希釈液を添加する工程である限り特に制限されない。

[0056] 本発明における「希釈液」としては、発酵組成物に添加して発酵組成物を希釈することができる液体である限り特に制限されず、水や、水溶液が挙げられ、中でも、水溶液が好ましく挙げられ、中でも、発酵組成物に添加した際に発酵組成物のカードをより溶解し易く、希釈物を顕微鏡観察した場合に視野のバックグラウンド像の色彩がより薄くなる観点から、ｐＨ６～９の水溶液がより好ましく挙げられ、中でも、ｐＨ７～９の水溶液がさらに好ましく挙げられる。

[0057] ｐＨ６～９の水溶液としては、ｐＨ６～９の水溶液である限り特に制限されず、例えば、水酸化ナトリウムやアンモニア等のアルカリ性物質を含む水溶液、有機酸などの酸性物質を含む水溶液、アルカリ性物質と酸性物質を含

む水溶液などが挙げられる。

[0058] pH 6～9の水溶液としては、好ましくはpH 6～9の緩衝液、より好ましくはpH 7～9の緩衝液が挙げられる。pH 6～9の緩衝液や、pH 7～9の緩衝液として、具体的には、トリス緩衝液（好ましくはトリス塩酸緩衝液）、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、グリシン緩衝液、クエン酸緩衝液、ヒスチジン緩衝液、アセトアミドグリシン緩衝液、ACES（N-（2-アセトアミド）-2-アミノエタンスルホン酸）緩衝液、ADA（N-（2-アセトアミド）イミノ二酢酸）緩衝液、BES（N，N-ビス（2-ヒドロキシエチル）-2-アミノエタンスルホン酸）緩衝液、ピシン（N，N-ビス（2-ヒドロキシエチル）グリシン）緩衝液、Bis-Tris（ビス（2-ヒドロキシエチル）イミノトリス（ヒドロキシメチル）メタン）緩衝液、コラミン塩酸緩衝液、EPPS（4-（2-ヒドロキシエチル）-1-ピペラジンプロパンスルホン酸）緩衝液、グリシンアミド緩衝液、HEPES（4-2-ヒドロキシエチル-1-ピペラジンエタンスルホン酸）緩衝液、HEPPSO（N-（ヒドロキシエチル）ピペラジン-N'-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸）緩衝液、MES（2-（N-モルホリノ）エタンスルホン酸）緩衝液、MOPS（3-（N-モルホリノ）プロパンスルホン酸）緩衝液、MOPSO（2-ヒドロキシ-3-モルホリノプロパンスルホン酸）緩衝液、PIPES（ピペラジン-N，N'-ビス（2-エタンスルホン酸））緩衝液、POPSO（ピペラジン-1，4-ビス（2-ヒドロキシプロパンスルホン酸））緩衝液、TAPS（N-トリス（ヒドロキシメチル）メチル-3-アミノプロパンスルホン酸）緩衝液、TAPSO（3-〔N-トリス（ヒドロキシメチル）メチルアミノ〕-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸）緩衝液、TES（N-トリス（ヒドロキシメチル）メチル-2-アミノエタンスルホン酸）緩衝液、トリシン（N-〔トリス（ヒドロキシメチル）メチル〕グリシン）緩衝液、AMP SO（N-（1，1-ジメチル-2-ヒドロキシエチル）-3-アミノ-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸）緩衝液、CABS（4-（シクロヘキシルアミノ）-1-ブタンスルホン

酸)緩衝液、CAPS (N-シクロヘキシル-3-アミノプロパンスルホン酸)緩衝液、CHES (N-シクロヘキシル-2-アミノエタンスルホン酸)緩衝液、CAPSO (N-シクロヘキシル-2-ヒドロキシル-3-アミノプロパンスルホン酸)緩衝液、及び、DIPSO (3-(N,N-ビス[2-ヒドロキシエチル]アミノ)-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸)緩衝液からなる群から選択される1種又は2種以上が挙げられ、トリス緩衝液が好ましく挙げられ、トリス塩酸緩衝液がより好ましく挙げられる。なお、緩衝液としては、サーモフィラス菌の生育を阻害しない観点から、キレート剤の含有量は6質量%以下、より好ましくは3質量%以下、さらに好ましくは1質量%以下、さらにより好ましくは0.5質量%以下であることが好ましく、キレート剤を含まない緩衝液がさらに好ましく挙げられる。キレート剤としては、特に制限されず、例えば、リン酸塩(例えば、リン酸三ナトリウム、リン酸二ナトリウム、リン酸三カリウム等の正リン酸塩；ピロリン酸四ナトリウム、ポリリン酸ナトリウム、メタリン酸ナトリウム、メタリン酸カリウム等の重合リン酸塩)、クエン酸塩(例えば、クエン酸ナトリウム、クエン酸カリウム等)、酒石酸塩(例えば、酒石酸ナトリウム、酒石酸カリウム等)、リンゴ酸塩(例えば、リンゴ酸ナトリウム、リンゴ酸カリウム等)及びエチレンジアミン四酢酸(EDTA)等が挙げられるが、EDTAであることが好ましい。

[0059] pH 6～9の水溶液や、pH 6～9の緩衝液は、市販されている水溶液や緩衝液を用いてもよいし、市販されている試薬を水に溶解して製造してもよい。

[0060] 本発明における「希釈液」は、乳酸菌等の本発明における細菌が増殖可能な培地(本明細書において、単に「培地」とも表示する。)を含んでいなくてもよいが、サーモフィラス菌の肥大化や増殖をより促進し、顕微鏡観察した際のJCM5805株菌等の本発明における細菌との識別をより容易にするなどの観点から、培地を含んでいることが好ましく、顕微鏡観察した際のJCM5805株菌等の本発明における細菌との識別をより容易にし、かつ

、視野のバックグラウンド像の色彩をより薄くする観点から、希釈液は、培地を含む、 $\text{pH} 6 \sim 9$ （好ましくは $\text{pH} 7 \sim 9$ ）の水溶液であることがより好ましく、培地を含む、 $\text{pH} 6 \sim 9$ （好ましくは $\text{pH} 7 \sim 9$ ）の緩衝液であることがさらに好ましい。

[0061] 希釈液が培地を含む場合、希釈液中の培地成分の濃度は特に制限されないが、希釈液全量に対する、培地成分の乾燥重量の割合で、例えば $0.1 \sim 15 \text{ w/v} \%$ 、好ましくは $0.5 \sim 10 \text{ w/v} \%$ 、より好ましくは $1 \sim 9 \text{ w/v} \%$ 、さらに好ましくは $2 \sim 6 \text{ w/v} \%$ が挙げられる。

[0062] 本発明における「培地」としては、適切な条件下で、その培地中で乳酸菌等の本発明における細菌（好ましくは乳酸菌）が増殖可能なものである限り特に制限されず、少なくとも、糖類などの炭素源を含むものが挙げられ、好ましくは、アミノ酸などの窒素源、及び／又は、無機塩を含むものが好ましく挙げられる。かかる培地として、具体的には、ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地（SCD培地）、M17ブロス培地が挙げられ、これらは公知のものを用いることができる。

[0063] なお、SCD培地及びM17ブロス培地としては、一例として、以下の組成が挙げられる。

<SCD培地1Lあたりの組成>

カゼイン製ペプトン 17.0g

ソイペプトン 3.0g

ブドウ糖 2.5g

リン酸二カリウム 2.5g

塩化ナトリウム 5.0g

水 残量

<M17ブロス培地950mLあたりの組成>

カゼイン製ペプトン 5.0g

ソイペプトン 5.0g

牛肉エキス 5.0g

酵母エキス 2.5g  
アスコルビン酸 0.5g  
硫酸マグネシウム 0.25g  
 $\beta$ -グリセロリン酸二ナトリウム 19.0g  
水 残量

[0064] 本発明における「希釈液」の好適な実施形態の一つとして、(i) 培地を含む水溶液（例えば、培地を含み、かつ、緩衝液ではない、水溶液）、(ii) 緩衝液、(iii) 乳酸菌等の本発明における細菌（好ましくは乳酸菌）が増殖可能な培地を含む緩衝液からなる群から選択されるものを挙げることができ、中でも、(i) 培地を含む水溶液（好ましくはそのpHは6～9、より好ましくは7～9）や、(iii) 培地を含む緩衝液（好ましくはそのpHは6～9、より好ましくは7～9）を好ましく挙げることができ、中でも、(iii) 培地を含む緩衝液（好ましくはそのpHは6～9、より好ましくは7～9）をより好ましく挙げることができる。

[0065] 本発明における「希釈液」の好適な実施形態の一つとして、乳酸菌等の本発明における細菌（好ましくは乳酸菌）が増殖可能な培地を含有し、かつ、インキュベートが、43℃で60～120分間である場合において、前記成分(A)と前記成分(B)との間の増殖率の差が $0.5 \times 10^9$ 個/(g · hour)以上となるような希釈液が挙げられる。かかる希釈液は、サーモフィラス菌の肥大化や増殖をより促進し、顕微鏡観察した際のJCM5805株菌等の本発明における細菌との識別をより容易にするなどの観点から好ましい。

[0066] 発酵組成物への希釈液の添加量としては、特に制限されず、発酵組成物1gあたり、例えば2mL以上、好ましくは4mL以上、より好ましくは7mL以上、さらに好ましくは9mL以上が挙げられる。

希釈液の添加量の上限は特に制限されず、発酵組成物1gあたり、例えば100mL以下、50mL以下が挙げられる。

[0067] (インキュベートする工程)

本発明の測定方法における、前記工程（１）で得られた希釈物を３５～５０℃でインキュベートする工程（２）としては、その希釈物を３５～５０℃でインキュベートする工程である限り特に制限されない。

[0068] 本発明における「インキュベートする」とは、希釈物を３５～５０℃の条件下に置くことを意味する。かかるインキュベートする工程において、ＪＣＭ５８０５株菌はそれほど肥大化や増殖しないのに対し、サーモフィラス菌は肥大化や増殖するため、顕微鏡を用いて両菌を視覚的に区別することが顕著に容易になる。また、本発明における細菌として、ＪＣＭ５８０５株菌以外の細菌を用いた場合、本発明における細菌と、サーモフィラス菌との間の、肥大化または増殖の程度の差を利用することで、顕微鏡等を用いて両菌を視覚的に区別することが顕著に容易になる。

[0069] インキュベートするときの温度としては、その温度帯として、好ましくは３８～５０℃、より好ましくは３８～４８℃、さらに好ましくは４０～４６℃、より好ましくは４１～４５℃、さらに好ましくは４２～４４℃、最も好ましくは４３℃が挙げられる。

[0070] インキュベートするときの雰囲気中の湿度としては、その湿度帯として、好ましくは８５～１００％、より好ましくは９０～９８％、さらに好ましくは９２～９７％が挙げられる。

[0071] インキュベートするときの雰囲気中の二酸化炭素濃度としては、その濃度帯として、好ましくは１～２０％、より好ましくは３～１５％、さらに好ましくは５～１０％が挙げられる。

[0072] インキュベートするときの雰囲気中の酸素濃度としては、その濃度帯として、好ましくは１～３０％、より好ましくは３～２５％、さらに好ましくは５～２０％が挙げられる。

[0073] インキュベートする時間としては、ＪＣＭ５８０５菌等の本発明における細菌とサーモフィラス菌とを視覚的により識別しやすくすることと、より短時間で測定することとのバランスの観点から、例えば１５～１２０分間、好ましくは１５～７５分間、より好ましくは２０～７５分間又は３０～６０分

間が挙げられる。

[0074] (菌数の測定法)

本発明の測定方法における、前記工程(2)でインキュベートした希釈物中の前記成分(A)の菌数を測定する工程(3)としては、前記工程(2)でインキュベートした希釈物中の前記成分(A)の菌数を測定する工程である限り特に制限されず、前記工程(2)でインキュベートした希釈物中の前記成分(A)の菌数を測定してもよいし、かかる希釈物をさらに希釈液で希釈してから前記成分(A)の菌数を測定してもよい。このように、工程(3)でさらに希釈液を用いる場合、その希釈液は工程(1)で用いた希釈液と同じ希釈液であってもよいし、異なる希釈液であってもよい。かかる異なる希釈液として、例えば、滅菌済みの牛乳を1~10v/v%含む滅菌水が挙げられる。

[0075] 工程(2)でインキュベートした希釈物中の成分(A)の菌数(すなわち、JCM5805株菌等の本発明における細菌の菌数)を測定する方法としては、顕微鏡観察による測定方法が好ましく挙げられ、直接鏡検法がより好ましく挙げられる。

[0076] 直接鏡検法などの、顕微鏡観察による測定方法は、公知の方法を用いることができる。直接鏡検法として具体的には、後述の実施例の10.に記載の方法を好ましく挙げることができる。

[0077] 本発明により測定される菌数は、測定精度の観点から、発酵組成物1gあたり、 $1.0 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^{11}$ であることが好ましく、 $1.0 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^{10}$ であることがより好ましく、 $5.0 \times 10^8 \sim 5.0 \times 10^9$ であることがさらに好ましい。

[0078] (本発明の発酵組成物)

本発明の発酵組成物としては、  
成分(A) プラズマサイトイド樹状細胞を活性化し得る細菌、及び  
成分(B) ストレプトコッカス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サーモフィラスに属する細菌

を含む発酵組成物であって、

工程（１）：前記発酵組成物に希釈液を添加する工程；及び、

工程（２）：前記工程（１）で得られた希釈物を 35～50℃でインキュベートする工程；

において、

インキュベートが、43℃で60～120分間である場合において、前記成分（Ａ）と前記成分（Ｂ）との間の増殖率の差が $0.5 \times 10^9$ 個／（g・hour）以上である、

前記発酵組成物である限り特に制限されない。

また、本発明の発酵組成物の好適な態様としては、

成分（Ａ）ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティス JCM5805 株菌、及び

成分（Ｂ）ストレプトコッカス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サーモフィラスに属する細菌

を含む発酵組成物であって、

工程（１）：前記発酵組成物に希釈液（好ましくは、乳酸菌が増殖可能な培地を含有する希釈液）を添加する工程；及び、

工程（２）：前記工程（１）で得られた希釈物を 35～50℃でインキュベートする工程；

において、

インキュベートが、43℃で60～120分間である場合において、前記成分（Ａ）と前記成分（Ｂ）との間の増殖率の差が $0.5 \times 10^9$ 個／（g・hour）以上である、

前記発酵組成物である限り特に制限されない。前述の増殖率の差の上限は特に制限されないが、例えば、 $1 \times 10^{10}$ 個／（g・hour）や、 $7 \times 10^9$ 個／（g・hour）などが挙げられる。なお、（g・hour）における「g」はグラムという単位を、「hour」は時間という単位を表す。

[0079] 本発明の発酵組成物の製造方法としては、JCM5805株菌等の本発明

における細菌及びサーモフィラス菌を用いること以外は、発酵乳などの発酵組成物の一般的な製造方法を用いることができる。発酵乳の一般的な製造方法としては、例えば、発酵乳の製造方法としては、容器に乳原料を充填してから乳酸菌で発酵させる方法（いわゆる後発酵タイプ）であってもよいし、乳原料を乳酸菌で発酵させ、生じたカードを砕いて、これを容器に充填する方法（いわゆる前発酵タイプ）などを挙げることができる。発酵時間としては、例えば1～96時間、好ましくは2～72時間、より好ましくは3～48時間が挙げられる。発酵組成物pHがどの程度以下になるまで発酵を行うかは、発酵組成物の種類や商品設計等により異なるため一概に述べることはできないが、発酵組成物が発酵乳である場合は、発酵乳のpHが例えば5以下、好ましくは4.8～4.5になるまで行うことが好ましい。発酵組成物のpHは常法により測定することができる。

[0080] 本発明における発酵組成物は、容器詰めされていなくてもよいが、容器詰めされていることが好ましい。「容器詰めされた」とは、発酵組成物が容器内に充填され密封されたことをいう。容器は、発酵乳等の製造において一般的に用いられる容器が好ましく挙げられ、例えば、プラスチック製、ガラス製及び紙製等の容器が挙げられる。

[0081] 本発明の発酵組成物中に含まれるプラズマサイトイド樹状細胞を活性化し得る細菌の菌数は、測定精度の観点から、 $1.0 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^{14}$ であることが好ましく、 $1.0 \times 10^9 \sim 1.0 \times 10^{13}$ であることがより好ましく、 $5.0 \times 10^9 \sim 5.0 \times 10^{12}$ であることがさらに好ましい。

[0082] 以下に、本発明を実施例によって詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

## 実施例

[0083] 1. 検体（JCM5805株菌及びサーモフィラス菌を含有する発酵乳）の調製

検体である発酵乳を以下の方法で調製した。

[0084] 乳原料として、牛乳（乳脂肪分3重量%以上、無脂乳固形分8重量%以上

）及びクリーム、脱脂粉乳を用意した。また、ストレプトコッカス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サーモフィラスの生菌、及び、JCM5805株菌の生菌を用意した。

[0085] 牛乳及びクリーム、脱脂粉乳を、乳脂肪分2.5%、無脂乳固形分12.0%となるように混合し、分散させて、15MPaで均質化してから、95℃で加熱殺菌した後、冷却した。この乳原料に、サーモフィラス菌の生菌、及び、JCM5805株菌の生菌を添加し、pHが4.6になるまで、36℃で発酵を行った。得られた発酵組成物を検体とした。なお、得られたこれらの検体は、「乳及び乳製品の成分規格等に関する省令」で定められる「発酵乳」に該当する。

[0086] 2. 希釈液の調製

検体の希釈に用いる希釈液を3種類調製した。

[0087] 希釈液（1）リン酸緩衝液（pH7.2）：

34.0gのリン酸二水素カリウム（無水）をイオン交換水に溶解後、1mol/Lの水酸化ナトリウム溶液を約175mL加えてpH7.2に調整し、5gのポリソルベート80（Tween80）を加えて溶解させ、イオン交換水を加えて1000mLとした。得られたリン酸緩衝液を、オートクレーブにて121℃で15分間加熱して滅菌した。

[0088] 希釈液（2）0.1Mトリス塩酸緩衝液加SCD培地（pH8.0）：

まず始めに、1Mトリス塩酸緩衝液（pH8.0）を調製した。具体的には、12.1gのトリスヒドロキシメチルアミノメタン（トリス、富士フィルム和光純薬株式会社製・特級）をイオン交換水80mLに溶かし、5Nまたは1N希塩酸（富士フィルム和光純薬株式会社製・特級）を用いてpHを8.0に調整後、イオン交換水で100mLとすることによって、1Mトリス塩酸緩衝液（pH8.0）を調製した。

[0089] 次に、30gのトリプトソイブイオン培地（栄研化学株式会社製）に、100mLの上記1Mトリス塩酸緩衝液（pH8.0）を加え、さらにイオン交換水を加えて1000mLとした。得られた0.1Mトリス塩酸緩衝液加

S C D培地を、オートクレーブにて121℃で15分間加熱して滅菌した。

[0090] 希釈液（3）S C D培地（p H 7. 2）：

30 gのトリプトソイブイオン培地（栄研化学株式会社製）にイオン交換水を加えて1000 mLとした。得られたS C D培地を、オートクレーブにて121℃で15分間加熱して滅菌した。

[0091] 3. 塗抹用希釈液の調製

牛乳（常温保存可能品）5 mLを滅菌水に溶解して100 mLとした。

[0092] 4. [試験例1] 希釈液（1）（リン酸緩衝液：p H 7. 2）による検体の希釈

上記1.の方法で製造した検体をよく攪拌したのち、1.0 gを秤量した。1.0 gの検体を、マイクロピペットで採取した9 mLのリン酸緩衝液（p H 7. 2）に攪拌及び溶解することによって検体を希釈して、希釈物を得た。すなわち、得られた希釈物は、10% w / vの濃度で検体を含むように希釈液で希釈された希釈物である。かかる希釈物を常温（約20～25℃）で30分間静置して、発酵乳の凝固物（カード）を溶解させた後、再度攪拌した。次いで、その希釈物1 mLをマイクロピペットで採取して塗抹用希釈液9 mLに攪拌及び溶解することによって、再度希釈して希釈物を得た。すなわち、得られた希釈物は、1% w / vの濃度で検体を含むように希釈液で希釈された希釈物である。この希釈物を試験例1とした。

[0093] 5. [試験例2] 希釈液（2）0.1 Mトリス塩酸緩衝液加S C D培地（p H 8. 0）による検体の希釈

上記1.の方法で製造した検体をよく攪拌したのち、1.0 gを秤量した。1.0 gの検体を、マイクロピペットで採取した9 mLの0.1 Mトリス塩酸緩衝液加S C D培地（p H 8. 0）に攪拌及び溶解することによって検体を希釈して、希釈物を得た。すなわち、得られた希釈物は、10% w / vの濃度で検体を含むように希釈液で希釈された希釈物である。かかる希釈物を、43℃に加温した恒温水槽にて、一定時間（0、30、60及び90分間）、インキュベートした後、再度攪拌した。次いで、その希釈物1 mLを

マイクロピペットで採取して塗抹用希釈液 9 mL に攪拌及び溶解することによって、再度希釈して希釈物を得た。すなわち、得られた希釈物は、1 % w / v の濃度で検体を含むように希釈液で希釈された希釈物である。この希釈物を試験例 2 とした。

なお、上記インキュベートにおいて、JCM5805 株菌はそれほど肥大化や増殖しないのに対し、サーモフィラス菌は肥大化や増殖する。

[0094] 6. [試験例 3] 希釈液 (3) SCD 培地 (pH 7. 2) による検体の希釈  
0. 1 M トリス塩酸緩衝液加 SCD 培地 (pH 8. 0) に代えて、SCD 培地 (pH 7. 2) を用いたこと以外は、試験例 2 の調製法と同じ調製法にて希釈物を得た。この希釈物を試験例 3 とした。

[0095] 7. 試験例 1 ～ 3 で用いた希釈液と、観察までのインキュベート時間のまとめ

前述の試験例 1 ～ 3 で用いた希釈液と、観察までのインキュベート時間を表 1 に記載する。

[0096] [表1]

| 試験例   | 検体希釈液                            | 観察時点              |
|-------|----------------------------------|-------------------|
| 試験例 1 | リン酸緩衝液 (pH7.2)                   | 30 分経過時点          |
| 試験例 2 | 0.1M トリス塩酸緩衝液加<br>SCD 培地 (pH8.0) | 0・30・60・120 分経過時点 |
| 試験例 3 | SCD 培地 (pH7.2)                   | 0・30・60・120 分経過時点 |

[0097] 8. 塗抹・乾燥・染色方法

マイクロピペットで各試験例を正確に 0. 01 mL 採取し、その全量を誘導板 (1 cm<sup>2</sup> の正方形がついたもの) (株式会社長嶋製作所製) に載せたスライドガラス上にゆっくりと滴下し、その試験例の滴を、塗抹針 (有柄針) を用いて 1 cm<sup>2</sup> の面積に均一に広げ、乾燥させた。そのスライドガラスを、99. 5 % エタノール (富士フィルム和光純薬株式会社製・特級) に数秒浸漬した後、乾燥させた。次に、そのスライドガラスをニューマン染色液 (シグマアルドリッチジャパン合同会社製) で数秒間染色し、余液を静かに落と

し、乾燥させた。そのスライドガラスを、水を溜めた容器に数秒間浸漬し、余分な染色液を洗い流した。この洗浄操作を、余分な染色液が滲まなくなったことを確認するまで行った後、スライドガラスを乾燥させた。なお、乾燥作業はすべて乾燥装置（恒温機又はホットプレート）を用いて、スライドガラスを40～45℃で乾燥させた。その際、スライドガラスは、乾燥装置のうち、水準器で水平を確認した場所に置いた。

[0098] 9. 顕微鏡視野面積の算出

使用した光学顕微鏡（製品名：NIKON Eclipse Ni-U、株式会社ニコン製）の視野の直径（円形視野の場合）、もしくは縦横の寸法（四角形視野の場合）を、対物マイクロメーター（株式会社渋谷光学製）を用いて計測し、顕微鏡視野面積（ $\text{mm}^2$ ）を算出した。

[0099] 10. 直接鏡検法による菌数の測定方法

光学顕微鏡を用いて、観察を行い、JCM5805株菌の菌数を測定した。双球菌は2個と測定した。JCM5805株菌は鏡検でやや色調が薄い小双球菌として確認されるため、JCM5805株菌の菌数を測定する際は、そのような菌体のみを測定した。なお、試験例2や試験例3において、一定時間以上インキュベートした場合は、後述するように、サーモフィラス菌の肥大化及び増殖が確認されたのに対し、JCM5805株菌においては肥大化及び増殖のいずれも確認されなかったため、サーモフィラス菌からJCM5805株菌を顕著に容易に識別することが可能となった。

[0100] 染色した面積（ $1\text{cm}^2 = 100\text{mm}^2$ ）の中の16視野の菌数を測定し、顕微鏡視野面積（ $\text{mm}^2$ ）と16視野の平均菌数を算出した。検体希釈倍率（10倍）、塗抹用希釈倍率（10倍）、塗抹量（0.01mL）を下記の計算式に代入し、検体中のJCM5805菌数（個/g）を算出した。

[0101] <JCM5805菌数(個/g)の計算式>

JCM5805菌数（個/g）＝16視野の平均菌数×（染色した面積（ $100\text{mm}^2$ ）／顕微鏡視野面積（ $\text{mm}^2$ ））×検体希釈倍率（10）×塗抹用希釈倍率（10）／塗抹量（0.01mL）

[0102] < 1 6 視野の取り方 >

測定の起点は、塗抹面の上端・左端から各々約 2 mm 内側とし、塗抹面の偏りを平均化するために逆 S 字型を用いて満遍なく観察を行った（図 2）。

1 6 視野の測定範囲は、塗抹面の端から約 2 mm 内側で囲まれたエリア内（図 2）とした。

[0103] 1 1. 試験例 1（比較例）についての結果

試験例 1 を上記 1 0. 記載の直接鏡検法により観察して得られた顕微鏡画像を図 3 に示す。J C M 5 8 0 5 株菌及びサーモフィラス菌の両方が映っている図 3 から分かるように、J C M 5 8 0 5 株菌及びサーモフィラス菌は、大きさ及び形状等の形態が類似している。したがって、発酵組成物が J C M 5 8 0 5 株菌及びサーモフィラス菌の両方を含む場合に、リン酸緩衝液（p H 7. 2）を用いた上記 4. に記載の方法で、それぞれの乳酸菌を視覚的に識別し、一方の菌数を選択的に測定することは、難しいことが示された。また、試験例 1 は顕微鏡観察した場合の画像中のバックグラウンド像の色彩が、後述の試験例 2 や試験例 3 におけるその色彩よりも濃いことから、乳酸菌を視覚的に識別することがより難しく、観察作業における作業効率を低下させることも示された。

[0104] 1 2. 試験例 2（実施例）についての結果

試験例 2 を上記 1 0. 記載の直接鏡検法により観察して得られた顕微鏡画像を図 4 に示す。図 4 において、実線の円で囲まれた乳酸菌が J C M 5 8 0 5 株菌であり、破線の円で囲まれた乳酸菌がサーモフィラス菌である。

[0105] 図 4 から分かるように、希釈物のインキュベーション時間が長くなるにしたがって、サーモフィラス菌の肥大化及び増殖が確認されたのに対し、J C M 5 8 0 5 株菌においては肥大化及び増殖のいずれも確認されなかった。その結果、長年の経験によって熟練した者でなくとも、J C M 5 8 0 5 菌とサーモフィラス菌とを視覚的にきわめて容易に識別することができるようになり、希釈前の発酵組成物中の J C M 5 8 0 5 株菌の菌数を、直接鏡検法によって、顕著に容易に測定することができた（表 2）。

また、試験例2の顕微鏡画像（図4）におけるバックグラウンド像の色彩は、試験例1の場合（図3）や後述の試験例3の場合（図5）と比べて薄く、乳酸菌を視覚的に識別することがより容易となり、観察作業における作業効率がさらに向上した。

[0106] [表2]

| 静置時間          | 0分                | 30分               | 60分               | 120分              |
|---------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| pH            | 7.7               | 7.6               | 7.5               | 7.0               |
| JCM5805菌(個/g) | $1.5 \times 10^8$ | $1.4 \times 10^8$ | $1.5 \times 10^8$ | $1.5 \times 10^8$ |
| サーモフィラス菌(個/g) | $1.0 \times 10^8$ | $1.3 \times 10^8$ | $2.2 \times 10^8$ | $7.7 \times 10^8$ |

[0107] 13. 試験例3（実施例）についての結果

試験例3を上記10. 記載の直接鏡検法により観察して得られた顕微鏡画像を図5に示す。図5において、実線の円で囲まれた乳酸菌がJCM5805株菌であり、破線の円で囲まれた乳酸菌がサーモフィラス菌である。

[0108] 図5から分かるように、希釈物のインキュベート時間が長くなるにしたがって、サーモフィラス菌の肥大化及び増殖が確認されたのに対し、JCM5805株菌においては肥大化及び増殖のいずれも確認されなかった。その結果、長年の経験によって熟練した者でなくとも、JCM5805菌とサーモフィラス菌とを視覚的にきわめて容易に識別することができるようになり、希釈前の発酵組成物中のJCM5805株菌の菌数を、直接鏡検法によって、顕著に容易に測定することができると示された（表3）。

また、試験例3の顕微鏡画像（図5）におけるバックグラウンド像の色彩は、試験例2の場合（図4）と比べるとやや濃いものの、試験例1の場合（図3）と比べて薄く、乳酸菌を視覚的に識別することがより容易となり、観察作業における作業効率が向上した。

[0109]

[表3]

| 静置時間           | 0 分               | 30 分              | 60 分              | 120 分             |
|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| pH             | 6.4               | 6.4               | 6.1               | 4.8               |
| JCM5805 菌(個/g) | $1.3 \times 10^9$ | $1.4 \times 10^9$ | $1.3 \times 10^9$ | $1.3 \times 10^9$ |
| サーモフィラス菌(個/g)  | $1.2 \times 10^9$ | $1.0 \times 10^9$ | $2.0 \times 10^9$ | $7.4 \times 10^9$ |

### 産業上の利用可能性

[0110] 本発明によれば、プラズマサイトイド樹状細胞を活性化し得る細菌（例えば、JCM5805 株菌等の乳酸菌）とサーモフィラス菌とを含む発酵組成物において、熟練した技術を必要とせず、低コストで、かつ、簡便に、プラズマサイトイド樹状細胞を活性化し得る細菌（例えば、JCM5805 株菌等の乳酸菌）の菌数を選択的に測定する方法、及び、かかる方法に適した発酵組成物等を提供することができる。

より詳細には、本発明の好適な態様（プラズマサイトイド樹状細胞を活性化し得る細菌がJCM5805 株菌である態様）によれば、大きさ又は形状等の形態が互いに類似しているJCM5805 株菌とサーモフィラス菌とを含む発酵組成物において、熟練した技術を必要とせず、低コストで、かつ、簡便に、JCM5805 株菌の菌数を選択的に測定する方法、及び、かかる方法に適した発酵組成物を提供すること等を提供することができる。

### 請求の範囲

- [請求項1] 成分（Ａ）プラズマサイトイド樹状細胞を活性化し得る細菌、及び、成分（Ｂ）ストレプトコッカス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サーモフィラスに属する細菌を含む発酵組成物において、前記成分（Ａ）の菌数を測定する方法であって、  
工程（１）：前記発酵組成物に希釈液を添加する工程；  
工程（２）：前記工程（１）で得られた希釈物を 35～50℃のいずれかの温度でインキュベートする工程；及び  
工程（３）：前記工程（２）でインキュベートした希釈物中の前記成分（Ａ）の菌数を測定する工程；を含む、前記方法。
- [請求項2] 成分（Ａ）の細菌が、ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティス JCM 5805 株菌である、請求項 1 に記載の方法。
- [請求項3] 前記希釈液が、（i）細菌が増殖可能な培地を含む水溶液、（ii）緩衝液、（iii）細菌が増殖可能な培地を含む緩衝液、のいずれかである、請求項 1 に記載の方法。
- [請求項4] 前記培地が、ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地（SCD 培地）又は M17 ブロス培地である、請求項 3 に記載の方法。
- [請求項5] 前記緩衝液が、トリス塩酸緩衝液である、請求項 3 に記載の方法。
- [請求項6] 前記希釈物の pH が 6～9 である、請求項 1 に記載の方法。
- [請求項7] 前記希釈液の添加量が、前記発酵組成物 1 g あたり 4 mL 以上である、請求項 1 に記載の方法。
- [請求項8] 前記インキュベートの時間が、15～75 分間である、請求項 1 に記載の方法。
- [請求項9] 前記発酵組成物中のショ糖の含有量が 6 質量％以下である、請求項 1 に記載の方法。
- [請求項10] 前記成分（Ａ）の菌数を測定することが、前記成分（Ａ）の菌数を顕

微鏡観察により測定することである、請求項 1 に記載の方法。

[請求項11] 前記顕微鏡観察が、直接鏡検法による顕微鏡観察である、請求項 10 に記載の方法。

[請求項12] 前記成分 (A) が、プラズマサイトイド樹状細胞を活性化し得る細菌の生菌及び／又は死菌を含む、請求項 1 に記載の方法。

[請求項13] 前記希釈液が、細菌が増殖可能な培地を含有し、かつ、インキュベートが、43℃で60～120分間である場合において、前記成分 (A) と前記成分 (B) との間の増殖率の差が $0.5 \times 10^9$ 個／(g・hour) 以上である、請求項 1 に記載の方法。

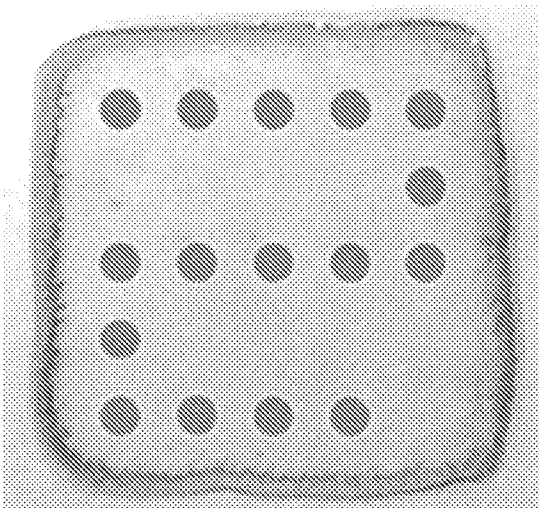
[請求項14] 前記成分 (A) の菌数の測定が、前記成分 (A) と前記成分 (B) との間の肥大化率及び／又は増殖率の違いを利用することによるものである、請求項 1 に記載の方法。

[請求項15] 成分 (A) プラズマサイトイド樹状細胞を活性化し得る細菌、及び成分 (B) ストレプトコッカス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サーモフィラスに属する細菌を含む発酵組成物であって、  
工程 (1) : 前記発酵組成物に希釈液を添加する工程；及び、  
工程 (2) : 前記工程 (1) で得られた希釈物を35～50℃でインキュベートする工程；  
において、  
インキュベートが、43℃で60～120分間である場合において、前記成分 (A) と前記成分 (B) との間の増殖率の差が $0.5 \times 10^9$ 個／(g・hour) 以上である、  
前記発酵組成物。

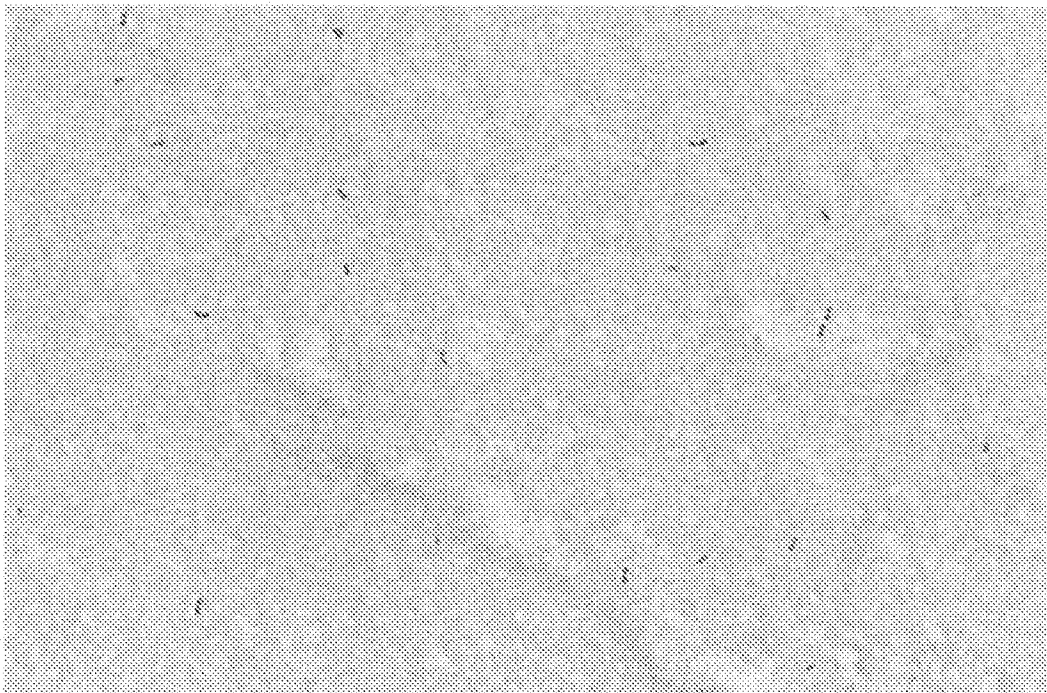
[請求項16] 成分 (A) の細菌が、ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティス JCM 5805 株菌である、請求項 15 に記載の発酵組成物。

**THE UNIVERSITY OF CHICAGO**

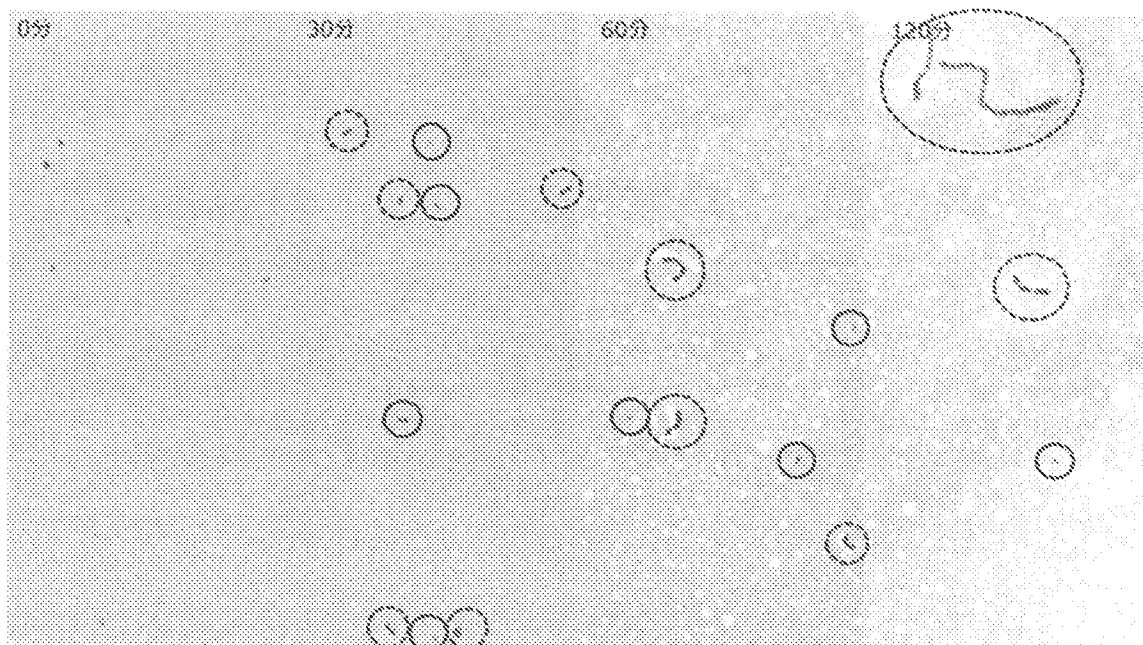
[図2]



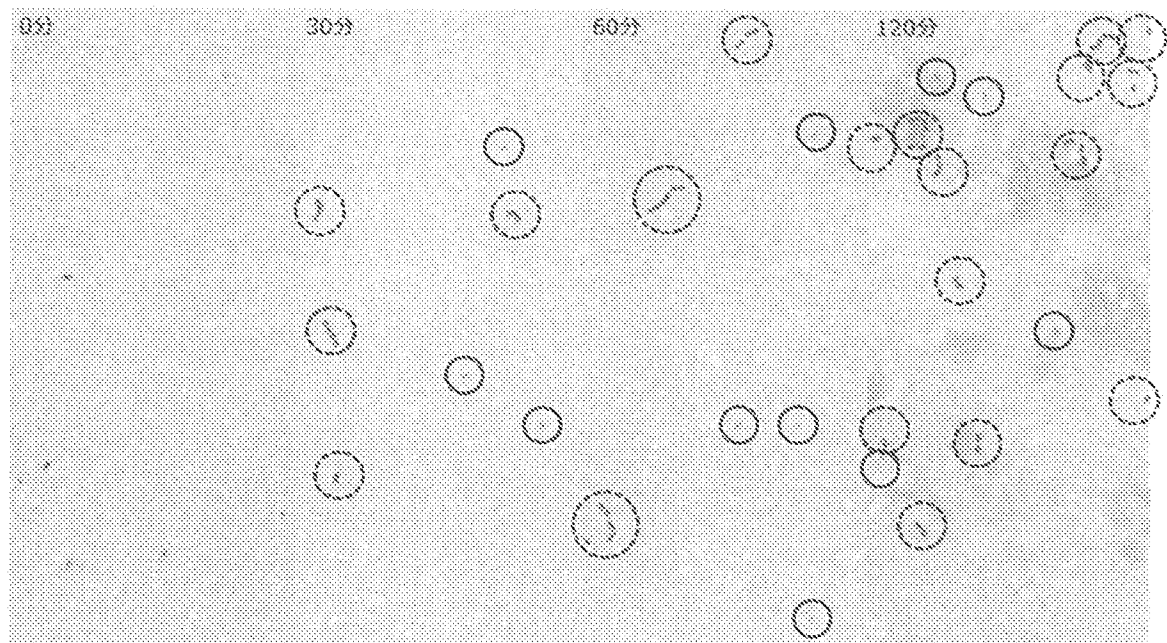
[図3]



[図4]



[図5]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/039175

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER***C12Q 1/06*(2006.01)i; *A23C 9/123*(2006.01)i; *C12N 1/20*(2006.01)i

FI: C12Q1/06; A23C9/123; C12N1/20 A

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q1/06; A23C9/123; C12N1/20

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996

Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024

Registered utility model specifications of Japan 1996-2024

Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); PubMed

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages               | Relevant to claim No. |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | JP 2022-136018 A (KOIWA NYUGYO KK) 15 September 2022 (2022-09-15)                                | 15-16                 |
| A         | examples                                                                                         | 1-14                  |
| A         | JP 2017-6097 A (SNOW BRAND MILK PROD CO LTD) 12 January 2017 (2017-01-12)                        | 1-16                  |
|           | entire text, all drawings                                                                        |                       |
| A         | CN 106906304 A (BRIGHT DAIRY & FOOD CO., LTD.) 30 June 2017 (2017-06-30)                         | 1-16                  |
|           | entire text, all drawings                                                                        |                       |
| A         | CN 101948904 A (YANTAI XIWANG TECHNOLOGY DEVELOPMENT CO., LTD.LTD.) 19 January 2011 (2011-01-19) | 1-16                  |
|           | entire text, all drawings                                                                        |                       |
| A         | JP 2017-85975 A (KIRIN CO LTD) 25 May 2017 (2017-05-25)                                          | 1-16                  |
|           | entire text, all drawings                                                                        |                       |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&amp;” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

05 January 2024

Date of mailing of the international search report

16 January 2024

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)  
3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915  
Japan

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/039175

### C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages      | Relevant to claim No. |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | JP 2016-5452 A (KIRIN CO LTD) 14 January 2016 (2016-01-14)<br>entire text, all drawings | 1-16                  |
| <hr/>     |                                                                                         |                       |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/JP2023/039175**

| Patent document<br>cited in search report |             |   | Publication date<br>(day/month/year) | Patent family member(s)                         | Publication date<br>(day/month/year) |
|-------------------------------------------|-------------|---|--------------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------|
| JP                                        | 2022-136018 | A | 15 September 2022                    | (Family: none)                                  |                                      |
| JP                                        | 2017-6097   | A | 12 January 2017                      | (Family: none)                                  |                                      |
| CN                                        | 106906304   | A | 30 June 2017                         | (Family: none)                                  |                                      |
| CN                                        | 101948904   | A | 19 January 2011                      | (Family: none)                                  |                                      |
| JP                                        | 2017-85975  | A | 25 May 2017                          | US 2018/0312799 A1<br>entire text, all drawings |                                      |
|                                           |             |   |                                      | WO 2017/082181 A1                               |                                      |
| JP                                        | 2016-5452   | A | 14 January 2016                      | US 2017/0189458 A1<br>entire text, all drawings |                                      |
|                                           |             |   |                                      | WO 2015/182735 A1                               |                                      |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                             |                |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））<br>C12Q 1/06(2006.01)i; A23C 9/123(2006.01)i; C12N 1/20(2006.01)i<br>FI: C12Q1/06; A23C9/123; C12N1/20 A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                             |                |
| B. 調査を行った分野                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                             |                |
| 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））<br>C12Q1/06; A23C9/123; C12N1/20                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                             |                |
| 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの<br>日本国実用新案公報 1922-1996年<br>日本国公開実用新案公報 1971-2024年<br>日本国実用新案登録公報 1996-2024年<br>日本国登録実用新案公報 1994-2024年                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                             |                |
| 国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）<br>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); PubMed                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                             |                |
| C. 関連すると認められる文献                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                             |                |
| 引用文献の<br>カテゴリー*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                           | 関連する<br>請求項の番号 |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | JP 2022-136018 A (小岩井乳業株式会社) 15.09.2022 (2022 - 09 - 15)                                    | 15-16          |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 実施例                                                                                         | 1-14           |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | JP 2017-6097 A (雪印メグミルク株式会社) 12.01.2017 (2017 - 01 - 12)                                    | 1-16           |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 全文, 全図                                                                                      |                |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | CN 106906304 A (BRIGHT DAIRY & FOOD CO., LTD.) 30.06.2017 (2017 - 06 - 30)                  | 1-16           |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 全文, 全図                                                                                      |                |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | CN 101948904 A (YANTAI XIWANG TECHNOLOGY DEVELOPMENT CO., LTD.) 19.01.2011 (2011 - 01 - 19) | 1-16           |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 全文, 全図                                                                                      |                |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | JP 2017-85975 A (キリン株式会社) 25.05.2017 (2017 - 05 - 25)                                       | 1-16           |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 全文, 全図                                                                                      |                |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | JP 2016-5452 A (キリン株式会社) 14.01.2016 (2016 - 01 - 14)                                        | 1-16           |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 全文, 全図                                                                                      |                |
| <input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                             |                |
| * 引用文献のカテゴリー<br>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの<br>“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献<br>“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの<br>“I” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）<br>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献<br>“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献<br>“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの<br>“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの<br>“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの<br>“&” 同一パテントファミリー文献 |                                                                                             |                |
| 国際調査を完了した日<br>05.01.2024                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 国際調査報告の発送日<br>16.01.2024                                                                    |                |
| 名称及びあて先<br>日本国特許庁(ISA/JP)<br>〒100-8915<br>日本国<br>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 権限のある職員（特許庁審査官）<br>山▲崎▼ 真奈 4N 7884<br>電話番号 03-3581-1101 内線 3488                             |                |

国際調査報告  
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2023/039175

| 引用文献 |             |   | 公表日        | パテントファミリー文献     | 公表日 |
|------|-------------|---|------------|-----------------|-----|
| JP   | 2022-136018 | A | 15.09.2022 | (ファミリーなし)       |     |
| JP   | 2017-6097   | A | 12.01.2017 | (ファミリーなし)       |     |
| CN   | 106906304   | A | 30.06.2017 | (ファミリーなし)       |     |
| CN   | 101948904   | A | 19.01.2011 | (ファミリーなし)       |     |
| JP   | 2017-85975  | A | 25.05.2017 | US 2018/0312799 | A1  |
|      |             |   |            | 全文, 全図          |     |
|      |             |   |            | W0 2017/082181  | A1  |
| JP   | 2016-5452   | A | 14.01.2016 | US 2017/0189458 | A1  |
|      |             |   |            | 全文, 全図          |     |
|      |             |   |            | W0 2015/182735  | A1  |