

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5879349号  
(P5879349)

(45) 発行日 平成28年3月8日(2016.3.8)

(24) 登録日 平成28年2月5日(2016.2.5)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N	1/20	(2006.01)	C 12 N	1/20	Z N A A
A 61 K	35/74	(2015.01)	A 61 K	35/74	A
A 61 P	1/02	(2006.01)	A 61 P	1/02	
A 61 P	31/04	(2006.01)	A 61 P	31/04	1 7 1
A 61 K	8/99	(2006.01)	A 61 K	8/99	

請求項の数 17 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-524449 (P2013-524449)  
 (86) (22) 出願日 平成23年8月17日 (2011.8.17)  
 (65) 公表番号 特表2013-535226 (P2013-535226A)  
 (43) 公表日 平成25年9月12日 (2013.9.12)  
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2011/064173  
 (87) 國際公開番号 WO2012/022773  
 (87) 國際公開日 平成24年2月23日 (2012.2.23)  
 審査請求日 平成26年8月14日 (2014.8.14)  
 (31) 優先権主張番号 10173286.5  
 (32) 優先日 平成22年8月18日 (2010.8.18)  
 (33) 優先権主張国 歐州特許庁 (EP)

微生物の受託番号 CECT CECT 7480  
 微生物の受託番号 CECT CECT 7481

(73) 特許権者 512197744  
 アペーバイオティックス・ソシエダッド・  
 アノニマ  
 A B - B I O T I C S S. A.  
 スペイン O 8 1 9 3 セルダニヨラ・デル・  
 バジェス、ベジャテッラ、エディフィシ・  
 エウレカ、シン・ヌメロ、パルク・デ・レ  
 セルカ・ウーアーペーーカンプス・ウーア  
 一ペー  
 (74) 代理人 100081422  
 弁理士 田中 光雄  
 (74) 代理人 100084146  
 弁理士 山崎 宏  
 (74) 代理人 100122301  
 弁理士 富田 憲史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 口腔衛生のためのプロバイオティック組成物

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

受入番号 C E C T 7 4 8 1 の下にスペイン・タイプ・カルチャー・コレクション ( C E C T ) において寄託されたラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*) 株および / またはその変異体であって、該変異体は、出発物質として寄託された株 C E C T 7 4 8 1 を使用することにより、変異誘発または再単離技術により得られ、該変異体は、出発物質として使用された寄託された株と少なくとも同程度で、口腔ストレス状態に対して生存し、口腔組織に付着し、凝集物を形成し、口腔病原体を阻害する能力を保持する変異体、および / または、

受入番号 C E C T 7 4 8 0 の下にスペイン・タイプ・カルチャー・コレクション ( C E C T ) において寄託されたラクトバチルス・ブレビス (*Lactobacillus brevis*) 株および / またはその変異体であって、該変異体は、出発物質として寄託された株 C E C T 7 4 8 0 を使用することにより、変異誘発または再単離技術により得られ、該変異体は、出発物質として使用された寄託された株と少なくとも同程度で、口腔ストレス状態に対して生存し、口腔組織に付着し、凝集物を形成し、口腔病原体を阻害する能力を保持する変異体を含む組成物。

10

## 【請求項 2】

医薬としての使用のための、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 3】

ヒトを含む動物において口腔病原体により引き起こされる口腔における障害の予防およ

20

び／または処置における使用のための、請求項 2 に記載の組成物。

**【請求項 4】**

口腔における障害が歯垢関連障害である、請求項 3 に記載の組成物。

**【請求項 5】**

歯垢関連障害が、歯肉炎、歯周炎、齲蝕または知覚過敏である、請求項 4 に記載の組成物。

**【請求項 6】**

口腔における障害が口臭である、請求項 3 に記載の組成物。

**【請求項 7】**

口腔における障害がカンジダ症である、請求項 3 に記載の組成物。 10

**【請求項 8】**

請求項 1 - 7 のいずれかに記載の組成物および少なくとも 1 つの薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物。

**【請求項 9】**

請求項 1 - 8 のいずれかに記載の組成物を含むプロバイオティック(probiotic)製品。

**【請求項 10】**

請求項 1 - 8 のいずれかに記載の組成物および少なくとも 1 つの食用成分を含む食用製品。

**【請求項 11】**

栄養補助食品である、請求項 10 に記載の食用製品、請求項 1 - 8 のいずれかに記載の組成物または請求項 9 に記載のプロバイオティック製品。 20

**【請求項 12】**

請求項 1 - 8 のいずれかに記載の組成物および少なくとも 1 つの美容上許容される賦形剤を含む美容用組成物。

**【請求項 13】**

有効量の、請求項 1 - 8 のいずれかに記載の組成物または請求項 12 に記載の美容用組成物を含む、口腔ケア製品。

**【請求項 14】**

チューリンガム、練り歯磨き、マウススプレー(mouth spray)、ロゼンジまたは口腔分散性錠剤である、請求項 13 に記載の口腔ケア製品。 30

**【請求項 15】**

受入番号 C E C T 7 4 8 1 の下にスペイン・タイプ・カルチャー・コレクション( C E C T )において寄託されたラクトバチルス・プランタラム株および／またはその変異体であって、該変異体は、出発物質として寄託された株 C E C T 7 4 8 1 を使用することにより、変異誘発または再単離技術により得られ、該変異体は、出発物質として使用された寄託された株と少なくとも同程度で、口腔ストレス状態に対して生存し、口腔組織に付着し、凝集物を形成し、口腔病原体を阻害する能力を保持する変異体。

**【請求項 16】**

受入番号 C E C T 7 4 8 0 の下にスペイン・タイプ・カルチャー・コレクション( C E C T )において寄託されたラクトバチルス・ブレビス株および／またはその変異体であって、該変異体は、出発物質として寄託された株 C E C T 7 4 8 0 を使用することにより、変異誘発または再単離技術により得られ、該変異体は、出発物質として使用された寄託された株と少なくとも同程度で、口腔ストレス状態に対して生存し、口腔組織に付着し、凝集物を形成し、口腔病原体を阻害する能力を保持する変異体。 40

**【請求項 17】**

出発物質としてラクトバチルス・プランタラム C E C T 7 4 8 1 またはラクトバチルス・ブレビス C E C T 7 4 8 0 を使用すること、および、変異誘発または再単離技術を適用することを含む、ラクトバチルス・プランタラム C E C T 7 4 8 1 またはラクトバチルス・ブレビス C E C T 7 4 8 0 の変異体を得るための方法であって、該得られた変異体は、出発物質として使用された寄託された株の、口腔ストレス状態に対して生存し、口腔組織 50

に付着し、凝集物を形成し、口腔病原体を阻害する能力を少なくとも保持する、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、医学、微生物学および栄養学の分野、特に、口腔衛生の分野において有用なプロバイオティックラクトバチルス株および組成物の新規組合せに関する。

【背景技術】

【0002】

背景技術

歯垢関連疾患、特に歯肉炎、歯周炎および齲蝕は、世界口腔疾患負担の大部分を示す。 10

【0003】

歯周疾患（歯肉炎および歯周炎）は、主として特定のグラム陰性菌の細菌感染により引き起こされ、軟結合組織の最初の破壊、次に、歯を支持する下層の歯槽骨および靭帯の破壊を引き起こす。細菌の種ポルフィロモナス・ジンジバリス(*Porphyromonas gingivalis*)は、歯周炎の発症および進行における主な病原因子として関与している。歯肉炎の一因となる他の種はまた、トレポネーマ・デンティコラ(*Treponema denticola*)、プレボテラ・デンティコラ(*Prevotella denticola*)およびフゾバクテリウム・ヌクレアタム(*Fusobacterium nucleatum*)である。世界保健機関の調査に基づくと、多数の子供は歯肉炎の兆候を有し、成人では、歯周疾患の最初の段階が高度にまん延している。例えば、欧州において、成人集団のおよそ 15 - 35 %が、該多因子疾患に罹患している。 20

【0004】

齲蝕（虫歯としても知られている）は、細菌作用が堅い歯質を傷つける疾患である。ストレプトコッカス・ミュータンス(*Streptococcus mutans*)は、歯の表面に対する多くの付着を手助けする受容体を備えた少数の特殊な生物体の1つであり、したがって、歯の表面の早期定着種であり、齲蝕の最も重要な一因である。該先駆種の増殖および代謝は、高度に石灰化した歯のエナメル質を虫歯になりやすくする口内の酸性環境を作る。

【0005】

上記に加えて、1つのさらなる口腔障害、口臭(halitosis)は、人口の大部分に影響すると考えられる。臭い息(bad breath)としても称される口臭は、硫黄含有アミノ酸の細菌分解に由来する多くの揮発性化合物により引き起こされる。関与している細菌（主に、フゾバクテリウム・ヌクレアタム、ポルフィロモナス・ジンジバリス、ポルフィロモナス・インターメディア(*Porphyromonas intermedia*)、およびトレポネーマ・デンティコラ）は、口腔の停滞域、例えば、舌の背面、歯周ポケットおよび隣接歯間領域に住む。該障害は、それを罹患している者に対して個人的および社会的に有意な影響を有し、虫歯および歯周疾患に続く、歯科医の助けを求める3番目に多い理由であると推定される。 30

【0006】

口腔細菌は、全ての堅い、および柔らかい口腔組織上に生物膜（歯垢）を形成し、口の病理学的状態において主な病原因子であると考えられる。乏しい口腔衛生維持により促進される生物膜内の細菌の蓄積により、微生物群における同種シフト(allopathic shift)しやすくなり、歯周炎および齲蝕形成の発生をもたらし、ならびに口臭に寄与する。 40

【0007】

酵母、および特に、カンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)はまた、口腔における障害の原因であり得る。高齢者は、慢性疾患、薬物療法、乏しい口腔衛生、唾液分泌の減少または免疫系の損傷によって誘発されるカンジダ感染に対して弱い。カンジダによるコロニー形成が無症候性であったとしても、多量の増殖は、通常、種々の型の粘膜病変および症状を伴う局所的カンジダ症を引き起こす。

【0008】

口腔内の微生物叢の病原性の可能性を修飾することは、これらの障害に対抗することにおける興味深い戦略である。この方向において、部分的に病原性微生物を置き換えるためのプロバイオティックのラクトバチルスの導入は、口腔感染をコントロールするための有 50

望な手段である。しかしながら、消化器疾患と比較して、口腔衛生適用のためのプロバイオティックの使用は、ほとんど研究されていない。現在、このような健康適用を組み込んだプロバイオティックを含む市販製品は、ほとんど市場に出回っていない。

#### 【0009】

これらの製品の1つは、BioGaiaからのProdentis（登録商標）である。Prodentisは、プロバイオティックのラクトバチルス・ロイテリATCC55730株を含むチューインガムであり、臨床試験において歯肉炎を低下させることが証明されている(Twetman Sら "Short-term effect of chewing gums containing probiotic Lactobacillus\_reuteri on the levels of inflammatory mediators in gingival crevicular fluid". Acta Odontol Scand, 2009, vol. 67, p. 19-24)。同じ株であるラクトバチルス・ロイテリATCC55730は、齲歎原性ストレプトコッカス・ミュータンスに対する強いアンタゴニスト活性を発揮することが報告されている(Caglar Eら "Salivary mutans streptococci and lactobacilli levels after ingestion of the probiotic bacterium Lactobacillus\_reuteri ATCC 55730 by straws or tablets". Acta Odontol Scand, 2009, vol. 64, p. 314-318)。しかしながら、他の口腔病原体に対するラクトバチルス・ロイテリATCC55730の影響についてはほとんど知られていない。さらに、ラクトバチルス・ロイテリは、口腔からではなく腸から単離されており、該株が、長期効果を有するために、生物膜を形成するか、または該環境に定着する能力を有するのか否か知られていない。ラクトバチルス種は、口腔状態を模倣する試験モデル系において、唾液被覆表面への付着能力が非常に多様であることが示されている(Stamatova Iら "In vitro evaluation of yoghurt starter lactobacilli and Lactobacillus rhamnosus GG adhesion to saliva-coated surfaces". Oral Microbiol Immunol, 2009, vol. 24, p. 218-223)。

#### 【0010】

ストレプトコッカス・サリバリウスK12は、口腔における使用のために意図された別の市販のプロバイオティックである。ストレプトコッカス・サリバリウス(S. salivarius)K12は、健康児の唾液から単離され、口臭の病因と見なされる種々の細菌種に対するインビトロでの抗菌活性を行なうことが示されている(Burton JPら "Preliminary study of the effect of probiotic Streptococcus salivarius K12 on oral malodor parameters". J Appl Microbiol, 2006, vol. 100, p. 754-764)。しかしながら、該株の有益な効果は、口臭症状の改善に限定される。

#### 【0011】

したがって、プロバイオティックは、適当なプロバイオティック株が同定されるという条件で、口腔において有益な効果を提供する可能性を有する。この試みにおいて、宿主に対する推定的な利益、また、株の安全性ならびに口腔において起こり得る副次的作用も考慮する必要がある。後者は、特定の口腔ラクトバチルスは、堅い組織、例えば、エナメル質および象牙質の分解を助ける高い酸産生の可能性によって齲歎原性と言われているため、口腔ラクトバチルスの使用を考慮する間、特別な関連をもたらす。

#### 【0012】

口腔プロバイオティックの分野における進歩にもかかわらず、口腔における広範囲の利益を有し、副次的作用を提供しない新規プロバイオティック株が必要とされることは上記から明らかである。

#### 【発明の概要】

#### 【0013】

#### 発明の概要

本発明者らは、ヒト口腔微生物叢由来の新規株を単離した。該株のラクトバチルス・プランタラムCECT7481およびラクトバチルス・ブレビスCECT7480は、それらを口腔衛生の改善における使用に適当にする種々の機能特性を示す。このような特性は、口腔病原体に対する良いアンタゴニスト特性だけでなく、口腔にコロニーを作る能力および低酸性化プロフィールもまた含む。以下に議論されているとおり、両方の株が单一の

10

20

30

40

50

組合せにおいて使用されるとき、口腔における健康上の利益が顕著であることも見いだした。

【0014】

したがって、第1の局面において、本発明は、ラクトバチルス・プランタラム C E C T 7 4 8 1 およびラクトバチルス・ブレビス C E C T 7 4 8 0 を含む組成物を提供する。

【0015】

出発物質として寄託された株を使用することにより、当業者は、慣用の変異誘発または再単離技術により、本発明の組成物を形成する株の本明細書に記載されている関連する特徴および利点を保持または増強するさらなる変異体またはそれらの誘導体を日常的に得ることができるることは、明らかである。このような変異体または誘導体は、遺伝的に修飾されているか、または天然であってよい。当業者は、該株の機能活性を決定するために使用される十分な方法を決定し得る。これらの活性を測定するために可能な方法の例は、以下の実施例において示されている。10

【0016】

したがって、「ラクトバチルス・プランタラム C E C T 7 4 8 1」は、受入番号 C E C T 7 4 8 1 の下にスペイン・タイプ・カルチャー・コレクションにおいて寄託されたラクトバチルス・プランタラム株、ならびに出発物質として寄託された株を使用する当分野で既知の技術により得られる変異体または誘導体微生物、株ラクトバチルス・プランタラム C E C T 7 4 8 1 の本明細書に記載されている関連する特徴および利点を少なくとも保持するこのような変異体または誘導体であると理解される。「ラクトバチルス・ブレビス C E C T 7 4 8 0」は、受入番号 C E C T 7 4 8 0 の下にスペイン・タイプ・カルチャー・コレクションにおいて寄託されたラクトバチルス・ブレビス株、ならびに出発物質として寄託された株を使用する当分野で既知の技術により得られる変異体または誘導体微生物、株ラクトバチルス・ブレビス C E C T 7 4 8 0 の本明細書に記載されている関連する特徴および利点を少なくとも保持するこのような変異体または誘導体であると理解される。20

【0017】

本発明の株は、プロバイオティックとして特に有用であるという利点を有する。

【0018】

「プロバイオティック」なる用語は、十分な量において投与されるとき、宿主に健康上の利益を与える微生物として当分野で認識される。プロバイオティック微生物は、毒性の欠如、生存能力、付着および有益な効果に関するいくつかの必要条件を満たすべきである。これらのプロバイオティック特徴は、同じ種の細菌の中でも株依存性である。したがって、全てのプロバイオティックの必要条件においてより良い能力を有する株を見つけることが重要である。30

【0019】

好ましくは、本発明の株は、口腔プロバイオティック、すなわち口腔衛生を増強するためのプロバイオティックとして有用である。ラクトバチルス・プランタラム C E C T 7 4 8 1 およびラクトバチルス・ブレビス C E C T 7 4 8 0 が、口腔障害、例えば、歯肉炎、歯周炎、齲蝕および口臭の発症に関する口腔の非常に多数の病原体に対する有意な阻害活性を示すが、ヒト口腔細菌叢の一般的な共生株に対する最小のアンタゴニスト作用を示すことを見いだした。さらに、これらの2つの株は、それらの間の阻害活性の欠如を示し、したがって単一の処方においてこれらの組合せ使用を可能にする。さらに、以下の実施例において見るとおり、単一の処方へのこれらの株の組合せ（すなわち本発明の組成物）は、別々に使用される個々の株の活性と比較して、口腔病原体に対するより高いアンタゴニスト活性を示すという利点を有する。したがって、本発明の株は、口腔病原体に対する共同活性を示し、組合せにおいて使用されるとき、とりわけ有用である。40

【0020】

口腔における病理学的状態に関与する微生物、例えば、ストレプトコッカス・ミュータンス (*Streptococcus mutans*)、ポルフィロモナス・ジンジバリス、トレボネーマ・デンティコラ、プレボテラ・デンティコラおよびフゾバクテリウム・ヌクレアタムをアンタゴナ50

イズすることにより、これらの株は、口腔微生物学的プロフィールをより健康的なプロフィールに変化する効果を有し、それにより口腔衛生状態の利益となる。

#### 【0021】

しかしながら、口腔病原体をアンタゴナイズする細菌株の単一の能力は、口腔におけるプロバイオティック効果を保証するために十分ではない。本発明の組成物の株は、強いアンタゴニスト活性に加えて、口腔にコロニーを作る良い能力を示すため、良い口腔プロバイオティックである。以下の実施例7において見ることができるとおり、ラクトバチルス・プランタラム C E C T 7 4 8 1 およびラクトバチルス・ブレビス C E C T 7 4 8 0 は、リゾチームおよび過酸化水素の存在下で増殖することができる。有利には、これらの株はまた、口腔組織に付着する良い能力を有する。

10

#### 【0022】

さらに、本発明の株は、凝集物を形成する高い能力を示す利点を有する。これは、該株が病原体の生物膜形成と干渉することにより歯垢を阻害または減少させることができるのであるため、重要である。凝集活性を有する乳酸菌プロバイオティック株は、互いの、または他の微生物との病理学的細菌の凝集の結果である病原体細菌による歯垢形成を阻害または減少させることができることが知られている。上記のとおり、堅い、および柔らかい口腔組織上に口腔病原体により形成される生物膜は、口の病理学的状態における重要な病原因子と考えられ、歯周炎、齲蝕形成および口臭の発生を引き起こす。本発明の株による凝集物の形成は、両方の株が組成物に組み合わせられるとき、増加され、該株が、単一の処方に組み合わせられるとき、病原体細菌を置き換えることにおいてより有効であることを意味する。

20

#### 【0023】

驚くべきことに、本発明者らはまた、株 C E C T 7 4 8 1 および C E C T 7 4 8 0 が特に低酸性化プロフィールを示すことを見いたしました。ラクトバチルス種は、多くの乳酸菌と同様に、ヒトの食物中の糖の発酵の結果としての揮発性酸の高い生産により特徴付けられる。しかしながら、これらの細菌の酸産生特性は、齲蝕の危険性を高めるため、口腔における起こり得る副次的作用となり得る。実際、多数のラクトバチルスは、齲蝕原性であると考えられている。したがって、本発明の組成物を形成するラクトバチルス株により示される酸生産の減少は、それらを口腔における健康適用のために特に適当にする。

30

#### 【0024】

上記有益な特性に加えて、本発明の株は、悪臭化合物、例えば、揮発性硫黄化合物、吉草酸、酪酸およびプトレシンを生産しないか、またはこれらを非常に低量で生産するという利点を有する。これはまた、口腔において本発明の組成物を適用するとき適切である。

#### 【0025】

さらに、プロバイオティックとしての使用のための株に一致するとおり、本発明の組成物を形成する株は、歐州食品安全機関 (E F S A) により定義される「安全性適格推定」(Q P S) ステータスを有する細菌種に属する。さらに、本発明者らは、これらの株がヒトおよび / または獣医学的に重要な抗生物質 (アンピシリン、ゲンタマイシン、ストレプトマイシン、エリスロマイシン、テトラサイクリン、クリンダマイシンおよびクロラムフェニコール) に対する有意な耐性を示さず、したがって抗生物質耐性の病原性種への起こり得る移入の危険性を排除することを見いたしました。

40

#### 【0026】

上記を考慮して、本発明の株は、口腔プロバイオティックの分野で知られている市販の株と比較したとき、口腔プロバイオティックに関連する全てのパラメーターに対してより良いパフォーマンスを有する。以下の実施例に示されるとおり、新規株は、ストレプトコッカス・サリバリウス (Streptococcus salivarius) K 1 2 およびラクトバチルス・ロイテリ A T T C 5 5 7 3 0 およびラクトバチルス・ブレビス C D 2 よりも、口腔状態に対してより抵抗性であり、凝集物を形成するより良い能力、より高い (およびより広い) アンタゴニスト活性、より良い付着および / またはより低い酸性化プロフィールを有する。該特性のそれぞれを決定するためのプロトコールは、以下に含まれる。さらに、単一の組成物

50

への本発明の両方の株の組合せは、一般的に、関連した機能性において株の共同パフォーマンスをもたらす。したがって、両方の株を含む組成物は、口腔プロバイオティックとしての使用のために特に適当である。

#### 【0027】

ヒト宿主においていくつかの有益な効果を發揮することにおいて、本発明の第1の局面の組成物は、医薬として有用である。特に、ラクトバチルス・プランタラム C E C T 7 4 8 1 およびラクトバチルス・ブレビス C E C T 7 4 8 0 を含む組成物が投与されるとき、口腔における障害の予防および/または処置において、好ましくは、口腔における病原体により引き起こされる障害の予防および/または処置のために有用である。

#### 【0028】

理論に縛られることは望まないが、本発明の組成物を形成する株の有益な効果は、口腔の微生物学的プロフィールを改善し、より健康的な口腔細菌叢を得た結果である。これらの有益な細菌の口腔における増殖は、一般的な、および/または日和見的な病原性微生物の増殖を阻害する環境圧を誘導する。該環境圧は、プロバイオティック細菌の凝集による付着部位および栄養に対する競合、抗菌性化合物の生産ならびに病原体の置換に由来する。

10

#### 【0029】

考慮に入れるさらなる1つの項目は、プロバイオティック細菌が免疫応答を調節する能力である。プロバイオティックが免疫を調節するメカニズムは、消化器構造において広く研究されている。プロバイオティック種は、上皮細胞により分泌される炎症性および抗炎症性サイトカインのバランスを変化させる能力を示した。プロバイオティックはまた、トール様受容体制御シグナル伝達経路を介して、先天免疫を増強すること、および病原体誘導炎症を調節することにより、免疫応答を制御する。プロバイオティックによる局所免疫応答ならびに全身免疫応答の増強は、末梢粘膜表面における感染、例えば、口腔における感染を防止することにおいて、プロバイオティックのための新たな機会を提供し得る。

20

#### 【0030】

したがって、第3の局面において、本発明は、医薬としての使用のための本発明の株を含む組成物を提供する。

#### 【0031】

第4の局面において、本発明は、ヒトを含む動物における口腔病原体により引き起こされる口腔の障害の予防および/または処置における使用のための本発明の第1の局面において記載されている組成物を提供する。あるいは、該局面は、ヒトを含む動物における口腔病原体により引き起こされる口腔の障害の予防および/または処置のための医薬の製造のための本発明の第1の局面において記載されている組成物の使用として規定することができる。

30

#### 【0032】

本発明はまた、本発明の第1の局面において記載されている組成物を必要とする動物に投与することを含む、ヒトを含む動物における口腔病原体により引き起こされる口腔の障害の予防および/または処置のための方法を提供する。

#### 【0033】

40

「口腔病原体により引き起こされる口腔の障害」なる用語は、口腔病原体、例えば、細菌、ウイルスまたは酵母により引き起こされている口腔において見いだすことができるあらゆる障害または異常として、広範な意味において本明細書において使用される。このような障害は、深刻な病理学的状態ならびにささいな状態または不快症状であり得る。「口腔病原体により引き起こされる口腔の障害」の説明的な非限定的な例は、特に、齲歯、歯肉炎、歯周炎、カンジダ症、ヘルペスおよび潰瘍、ならびに口臭、着色した歯、知覚過敏である。

#### 【0034】

本発明の第4の局面の1つの態様において、組成物は、歯垢関連障害の処置および/または予防のために使用される。好ましくは、歯垢関連障害は、齲歯、知覚過敏、歯肉炎お

50

より歯周炎からなる群から選択される。

【0035】

本発明の第4の局面の別の態様において、組成物は、口臭の処置および／または予防のために使用される。

【0036】

本発明の第4の局面のさらなる態様において、組成物は、カンジダ症の処置および／または予防のために使用される。

【0037】

本発明の株を含む本発明の組成物は、食用、美容用または医薬品として処方することができる。該組成物は、本発明の株に加えて、1つ以上の他の活性剤および／または美容上許容される賦形剤（美容用組成物の場合において）、薬学的に許容される賦形剤（医薬組成物の場合において）または適切な食用成分（食用組成物の場合において）を含むことができる。本発明の特定の態様において、本発明の組成物は、1つ以上の活性剤をさらに含む。好ましくは、さらなる活性剤は、本発明の組成物を形成する株に対してアンタゴニスト性でない他のプロバイオティック細菌である。さらに好ましくは、さらなる活性剤は、口臭、カンジダ症、齲蝕、知覚過敏および／または歯周疾患を処置および／または予防するために適当である。処方に依存して、株は、精製された細菌として、細菌培養物として、細菌培養物の一部として、後処理された細菌培養物として、単独または適当な担体または成分と共に加えられ得る。プロバイオティクスも加えることができる。

10

【0038】

組成物は、固体、液体または気体であってもよく、とりわけ、粉末、錠剤、膜調製物、溶液、エアロゾル、顆粒、ロゼンジ、丸薬、懸濁液、エマルジョン、カプセル、シロップ、液体、エリキシル剤、エキス剤、チンキ剤または流エキス剤の形態、または経口投与のために特に適当である形態であってもよい。

20

【0039】

他の局面において、本発明は、本発明の組成物を薬学的に許容される賦形剤と共に含む医薬組成物を提供する。この点において、医薬品は、本発明の組成物を形成する株のバイオアベイラビリティに負に影響しない任意の適当な形態において調製され得る。組成物の特定の目的を考慮して、処方のための賦形剤および最も適当な方法の選択は、製薬技術分野の当業者の範囲内である。

30

【0040】

本明細書において使用される「薬学的に許容される」なる用語は、正しい医学的判断の範囲内で、過剰毒性、炎症、アレルギー性応答、または他の問題もしくは合併症なしで対象（ヒトまたは非ヒト動物のいずれか）の組織との接触における使用のために適当であり、妥当な利益／危険比に見合う、化合物、材料、組成物、および／または投与形態を示す。それぞれの担体、賦形剤などはまた、処方の他の成分との適合性という意味において「許容され」なければならない。適当な担体、賦形剤などは、標準的製薬テキストにおいて見いだすことができる。

【0041】

本発明の別の局面は、本発明の組成物を美容上許容される賦形剤と共に含む美容用組成物を提供する。病理学的細菌により引き起こされる口腔障害を予防および／または処することにおいて、本発明の組成物は、これらの障害により生じる症状の改善および／または予防のために有用である。このような症状は、限定はしないが、臭い息および着色した歯を含む。

40

【0042】

「美容上許容される」なる用語は、健全な医学的判断の範囲内で、特に、過度の毒性、不適合性、不安定性およびアレルギー性応答を伴うことなくヒト皮膚と接触して使用するために適当である、化合物、材料、組成物、および／または投与形態を示す。それぞれの「美容上許容される」担体、賦形剤などはまた、美容用処方の他の成分との適合性という意味において「許容され」なければならない。美容用処方のための適当な担体、賦形剤な

50

どは、標準的テキストにおいて見いだすことができる。

【0043】

本発明の株はまた、種々の食用製品、例えば、乳製品、ヨーグルト、カード、チーズ(例えば、クォーク(quark)、クリーム、プロセス、ソフトおよびハード)、発酵乳、ミルク粉末、ミルクをベースとする発酵させた製品、アイスクリーム、発酵させたシリアルをベースとする製品、ミルクをベースとする粉末、飲料、ドレッシングおよびベットフードに包含させることができる。「食用製品」なる用語は、美容用、医薬用および獣医用製品を除かず、動物により摂取され得る表示のあらゆる形態における製品の任意の型を含む、広範な意味において、本明細書において使用される。他の食用製品の例は、肉製品(例えば、レバーペースト、フランクフルトソーセージおよびサラミソーセージまたはミートスプレッド)、チョコレートスプレッド、充填物(例えば、トリュフ、クリーム)およびフロスティング、チョコレート、菓子(例えば、キャラメル、キャンディー、フォンダンまたはタフィー)、焼いた食品(ケーキ、ペストリー)、ソースおよびスープ、果汁およびコーヒー用クリームである。動物性食物用の飼料もまた、本発明の範囲内に含まれる。本発明の組成物はまた、他の食品中の成分として使用することができる。特に興味のある食用製品は機能性食品および特殊調製粉乳である。10

【0044】

したがって、本発明の別の局面において、本発明の組成物を他の食用成分と共に含む食用組成物を提供する。20

【0045】

「食用成分」なる用語は、食べられることに適している、すなわち動物、限定はしないが好ましくはヒト、ウシまたはベットによる食物として使用される成分を示す。20

【0046】

しばしば、バイオティック細菌組成物、例えば本明細書に記載されているものは、栄養補助食品として考えられる。食品サプリメントまたは栄養サプリメントとしても知られている栄養補助食品は、正常食物において通常摂取されない有益な成分を提供する。主として、栄養補助食品は、食品として考えられるが、ときどき、薬物、自然健康製品または栄養補助食品として定義される。本発明という意味において、栄養補助食品はまた、栄養補助食品を含む。栄養補助食品は、「カウンターごしに」、すなわち処方箋なしで、通常販売される。30

【0047】

好みの状態において、本発明の組成物は栄養補助食品である。

【0048】

本発明の組成物が栄養補助食品であるとき、それは、それ自体を投与することができ、適当な飲用液体、例えば、水、ヨーグルト、ミルクまたは果汁と混合することができ、または固体または液体食物と混合することができる。この文脈において、栄養補助食品は、錠剤、丸薬、カプセル、ロゼンジ、顆粒、粉末、懸濁液、小袋、トローチ、スイーツ、棒状物、シロップおよび対応する投与形態の形態で、通常、投与用量の形態であり得る。好みの状態は、本発明の組成物を含む栄養補助食品は、栄養補助食品を調製する慣用のプロセスにおいて製造される、錠剤、ロゼンジ、カプセル、または粉末の形態で投与される。40

【0049】

上記から導き出すことができるとおり、本発明の組成物を含む製品は、口腔障害を予防もしくは処置することによるか、またはこれらの障害に由来する症状を改善することによって、口腔衛生適用における使用のためのものである。したがって、本発明の別の局面は、上記の組成物を、薬学的に賦形剤または美容上許容される賦形剤または他の食用成分と共に含む口腔ケア製品を提供する。

【0050】

本発明の意味において、該組成物は、通常の使用過程において、特定の治療剤の全身投与の目的のために意図的に飲み込まれず、むしろ、口腔活性の目的のために、実質的に全ての歯の表面および/または口腔組織に接触するために十分な時間、口腔内に保持される50

口腔用製品であってもよい。このような製品の非限定的な例は、練り歯磨き、歯磨き剤、歯磨き粉、局所口腔用ゲル、洗口液、義歯用製品、マウススプレー、チューインガム、デンタルフロスまたはデンタルテープである。口腔用組成物は、単一相の口腔用組成物であってよく、または2つ以上の口腔用組成物の組合せであってよい。

#### 【0051】

1つの態様において、口腔ケア製品は、チューインガム、練り歯磨き、マウススプレー、ロゼンジまたは口腔分散性錠剤である。好ましくは、口腔ケア製品は、ロゼンジまたは口腔分散性錠剤の形態である。

#### 【0052】

本発明の口腔ケア製品はまた、他の口腔に活性な剤、例えば、過酸化物、過ホウ酸塩、過炭酸塩、ペルオキシ酸塩、過硫酸塩、亜塩素酸金属、およびそれらの組合せのような漂白または酸化剤を含む歯科用ホワイトニング活性物質を含み得る。歯の色を修飾する物質もまた、本発明において有用な口腔ケア活性物質の中に考えられ得る。口腔ケア製品は、香味化合物、例えば、メントールをさらに含み得る。

10

#### 【0053】

本発明の組成物を形成する株は、好ましくは、生存可能である細胞の形態である。しかしながら、本発明の株はまた、生存可能でない細胞の形態、例えば、ラクトバチルス・ブランタラム C E C T 7 4 8 1 およびラクトバチルス・ブレビス C E C T 7 4 8 0 により生じる有益な因子を含む死菌物または組成物であり得る。これは、熱的に死滅された微生物またはpH、超音波処理、放射線もしくは圧力負荷の変化への暴露により死滅された微生物を含むことができる。生存可能でない細胞を用いると、製品の調製がより簡単であり、細胞は市販の製品に容易に組み込むことができ、保存的必要条件は生存可能である細胞よりもはるかに少ない。

20

#### 【0054】

本発明の組成物の形態において使用されるとき、株は意図される使用のために適当な任意の濃度比であることができる。例えば、株は、3:1から1:3(ラクトバチルス・ブランタラム C E C T 7 4 8 1 : ラクトバチルス・ブレビス C E C T 7 4 8 0 )に含まれる濃度比であることができる。好ましくは、濃度比は1:1である。さらに、本発明の株は、必要とされる使用に対する有効量において組成物中に含まれる。

#### 【0055】

30

本明細書において使用される「有効量」なる用語は、健全な医学的判断の範囲内で、処置される状態を良い方向に修飾できるほど十分高いが、(合理的な利益/危険比で)深刻な副次的作用を回避できるほど十分低い、組成物中のそれぞれの株に対するコロニー形成単位(cfu)の量である。該プロバイオティック微生物の有効量は、当業者により決定され、なし遂げられる特定の目的、処置される患者の年齢および健康状態、根底にある障害の重症度、および最終的な処方によって変化する。例えば、口腔衛生製品において、株は、約 $10^5$  cfu/gから約 $10^{12}$  cfu/gの量、好ましくは約 $10^7$  cfu/gから約 $10^{11}$  cfu/gの量で存在する。「コロニー形成単位」(「cfu」)なる用語は、寒天プレート上の微生物学的カウントにより示される細菌細胞の数として定義される。特定の態様において、本発明の組成物は、 $10^7 - 10^{10}$  cfu/gにて含む口腔ケア製品である。

40

#### 【0056】

栄養補助食品は、通常、 $10^5$ から $10^{12}$  cfu/gの範囲である量におけるプロバイオティック株を含む。特定の態様において、本発明の組成物は、 $10^7 - 10^{10}$  cfu/gにて含む栄養補助食品である。

#### 【0057】

本発明の株は、適当な培地中で、および適当な条件下で細菌を培養することにより生じる。株は、純粋な培養物を形成するように単独で、または他の微生物と共に混合培養物として、または種々の型の細菌を別々に培養し、次に、それらを所望の比率で混合することにより、培養することができる。培養後、細胞懸濁液は、回収され、それ自身を使用され

50

るか、または所望の手段において、例えば、濃縮またはフリーズドライにより処理され、さらに製品の調製において使用される。ときどき、プロバイオティック調製物は、保存期間を改善するために、固定化またはカプセル化処理に付される。細菌の固定化またはカプセル化のためのいくつかの技術は、当分野で知られている。特定の態様において、本発明の組成物の一部を形成する株は、被包性細菌として口腔ケア製品に組み込まれる。

【0058】

当業者に明らかなどおり、ラクトバチルス・プランタラム C E C T 7 4 8 1 およびラクトバチルス・ブレビス C E C T 7 4 8 0 は、単一の組成物において混合された場合のみでなく、それらが単独で、あるいは、同時に、連続して、または特定の期間後に別々に投与される 2 つの異なる組成物において使用される場合も有効である。さらに、当業者は、該株の 1 つを、口腔障害、特に口腔病原体により生じる障害、さらに好ましくは歯垢関連障害および / または口臭および / またはカンジダ症を予防または処置するために、口腔衛生のための他の株と共に使用されるように処方することができることを理解している。10

【0059】

結果として、本発明の 1 つのさらなる局面は、ラクトバチルス・プランタラム C E C T 7 4 8 1 を提供する。

【0060】

最後に、本発明の別の局面は、ラクトバチルス・ブレビス C E C T 7 4 8 0 を提供する。20

【0061】

本発明の株は、初めて本明細書において開示され、したがって新規である。図 1 に示されるとおり、ラクトバチルス・プランタラム C E C T 7 4 8 1 およびラクトバチルス・ブレビス C E C T 7 4 8 0 の両方の株は、密接に関連する市販のラクトバチルス株、例えば、ラクトバチルス・プランタラム 2 9 9 v、ラクトバチルス・プランタラム V S L # 3、ラクトバチルス・カゼイ V S L # 3 およびラクトバチルス・カゼイ D N 1 1 4 . 0 0 1 と、異なるパルスフィールドゲル電気泳動パターンを有する。

【0062】

当分野のいくつかの文献は、ラクトバチルス・プランタラムおよびラクトバチルス・ブレビスの株を含む組成物を記載している。しかしながら、本発明の組成物は、該組成物に対して新規である。30

【0063】

特に、K R 1 0 0 7 8 0 0 3 0 は、ラクトバチルス・ブレビスおよびラクトバチルス・プランタラムの株を含む発酵させた豆乳を記載している。記載された株は、韓国において典型的である発酵させた野菜からなる食べ物であるキムチから単離された。対照的に、本発明の株は、キムチが消費されていない南アメリカの開発地域における子供の唾液から単離された。したがって、本発明のラクトバチルス・ブレビスおよびラクトバチルス・プランタラム株は言及された韓国の株と完全に異なる起源を有し、ラクトバチルス・プランタラム C E C T 7 4 8 1 またはラクトバチルス・ブレビス C E C T 7 4 8 0 のいずれかが同じであるという意味である。

【0064】

別の韓国特許出願 K R 1 0 0 8 6 6 5 0 4 は、ラクトバチルス・プランタラム P 2 (微生物受託番号 K C T C 1 1 3 9 1 B P ) および / またはラクトバチルス・ブレビス M 2 (微生物受託番号 K C T C 1 1 3 9 0 B P ) を使用する発酵させた赤色朝鮮人参を記載している。これらの株は、朝鮮人参から単離された。再び、本発明の株は南アメリカの開発地域において消費されていない植物から単離されたため、記載された韓国の株は本発明の株と完全に異なる起源を有する。これは、ラクトバチルス・プランタラム C E C T 7 4 8 1 またはラクトバチルス・ブレビス C E C T 7 4 8 0 のいずれかが言及された韓国の株と同じであるということを不可能にさせる。40

【0065】

国際特許出願 W O 2 0 0 5 / 0 8 2 1 5 7 および W O 0 2 / 3 9 8 2 5 はまた、ラクト

10

20

30

40

50

バチルス・プランタラムおよびラクトバチルス・プレビス株の組合せを記載している。WO 2005/082157の組成物に記載されているラクトバチルス・プレビスLBR01株は、台湾におけるマスター・ド・ピクルスから単離された。WO 02/39825の組成物に記載されているラクトバチルス・プレビスC21は、モンゴルの豆腐から単離された。上記のとおり、これらのラクトバチルス・プレビス株の完全に異なる起源にしたがって、それらが本発明の株と同じであることは不可能である。そのうえ、記載されているラクトバチルス・プレビスLBR01およびラクトバチルス・プレビスC21株は、一般に利用できないようである。

#### 【0066】

さらに、WO 2006/080035は、ラクトバチルス・プレビスCD2および不特定のラクトバチルス・プランタラム株を、ラクトバチルス・サリバリウス(*L. salivarius*)株と共に含む婦人科組成物を記載している。しかしながら、株ラクトバチルス・プレビスCD2は、ラクトバチルス・プレビスCECT7480と異なっている。表4において示されるとおり、株ラクトバチルス・プランタラムCECT7481とラクトバチルス・プレビスCD2を混合したとき、アンタゴニスト効果は、凝集物を形成するする能力について観察される。対照的に、ラクトバチルス・プランタラムCECTとラクトバチルス・プレビスCECT7480との組合せは、凝集物を形成するより良い能力をもたらす。さらに、本発明のラクトバチルス・プレビス株は、市販のラクトバチルス・プレビスCD2と比較して有意に低い酸性化プロフィールを有することが証明されている(表5参照)。したがって、ラクトバチルス・プレビスCECT7480は、ラクトバチルス・プレビスCD2と異なるだけでなく、口腔衛生適用に対してより適当である。要するに、異なる効果を有する一方で、本発明の組合せは、WO 2006/080035に記載されているものと異なっている。

#### 【0067】

最後に、WO 02/018542は、チェダー・チーズにおいて頻繁に見られるラクトバチルス株が、ラクトバチルス・プレビスおよびラクトバチルス・プランタラム株を含むことを記載しており、特許出願FR 2448865(10頁、11-17行)は、ラクトバチルス・プレビスを加えることができるラクトバチルス・プランタラムを含む組成物を記載している。しかしながら、これらの文献は、特定のラクトバチルス・プレビス株および特定のラクトバチルス・プランタラム株を含む組成物を記載していない。したがって、特定のラクトバチルス・プレビス株、すなわちラクトバチルス・プレビスCECT7480、および特定のラクトバチルス・プランタラム株、すなわち、ラクトバチルス・プランタラムCECT7481を含む本発明の組成物は、新規である。

#### 【0068】

明細書および特許請求の範囲中、「含む」なる用語およびその派生語は、他の技術的特徴、付加物、成分または工程を排除することを意図しない。本発明のさらなる目的、利点および特徴は、明細書の試験に基づいて当業者に明らかとなるか、または本発明の実施により知ることができる。さらに、本発明は、本明細書に記載されている特定の、および好みの態様の全ての起こり得る組合せを含む。実施例および図面は、説明の手段として提供され、本発明の限定を意図しない。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0069】

【図1】1、ラクトバチルス・プランタラムCECT7481(F2096)；2、ラクトバチルス・プランタラム299V；3、ラクトバチルス・プランタラムVSL#3；4、ラクトバチルス・プレビスCECT7480(I3141)；5、ラクトバチルス・カゼイVSL#3；6、ラクトバチルス・カゼイDN114.001のSfi-I(A、B)およびSma-I(C、D)制限ゲノムDNAのパルスフィールド電気泳動パターン。Mは分子マークを表す。

#### 【実施例】

#### 【0070】

10

20

30

40

50

## 実施例

以下の部は、本発明の株の特性および口腔衛生適用に関する特定のプロバイオティック特徴を記載する。

### 【0071】

#### 1. 微生物の単離

新規株 F 2096 および I 3141 は、熱帯の南アメリカの開発地域の 0 - 5 歳の子供由来の唾液から単離された。唾液を PBS バッファー (pH 7.4) に溶解させ、アリコートし、10 µg / ml のバンコマイシン (SIGMA) を補った MRS (Man Rogosa Sharp, Sigma-Aldrich Chem, Spain) 寒天上で置いた。株を 37 °C で微好気的条件 (5% CO<sub>2</sub>) 下で培養した。増殖させた後、単離された株を、15% のスキムミルク粉末を有する PBS 0.1 X 中で凍結乾燥により保存した。  
10

### 【0072】

株 F 2096 および I 3141 は、それぞれラクトバチルス・プランタラムおよびラクトバチルス・ブレビスとして同定された (以下の 2 の部参照)。両方の株は、スペイン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託された (Universitat de Valisncia, Campus de Burjassot, Edif. de Investigacion, 46100 Burjassot, Valisncia, Spain)。ラクトバチルス・プランタラム (株 F 2096) は、21.01.2009 にて寄託され、受入番号 7481 と与えられた。ラクトバチルス・ブレビス (株 I 3141) は、18.02.2009 にて寄託され、受入番号 7480 と与えられた。両方の寄託された株は、生存可能であり、寄託に関連する全ての特徴を維持している。  
20

### 【0073】

以下において使用されるとおり、株 F 2096 は、ラクトバチルス・プランタラム CECT 7481 に、株 I 3141 は、ラクトバチルス・ブレビス CECT 7480 に対応する。

### 【0074】

ペディオコッカス・アシディラクティシ (pediococcus acidilactici) F 2019 (本明細書において以下ペディオコッカス・アシディラクティシ (P. acidilactici) と称する)、ラクトバチルス・パラカゼイ I 3152 (本明細書において以下ラクトバチルス・パラカゼイ (L. paracasei) と称する) およびペディオコッカス・ペントサセウス (Pediococcus pentosaceus) I 54 (本明細書において以下ペディオコッカス・ペントサセウス (P. pentosaceus) と称する) は、上記説明のとおりヒト唾液から単離された。ストレプトコッカス・サリバリウス K 12 は、TBS (トリプシン分解ダイズ培養液) 中の市販の BLIS K 12 (登録商標) から単離され、37 °C で好気状態下で培養した。ラクトバチルス・ロイテリ ATCC 55730 株は、市販の Reuteri Drops (登録商標) から、ラクトバチルス・プランタラム 299v は Poviva (登録商標) から、ラクトバチルス・ブレビス CD 2 は Inersan (登録商標) から、ラクトバチルス・プランタラム VSL #3 およびラクトバチルス・カゼイ VSL #3 は VSL #3 (登録商標) から、ラクトバチルス・カゼイ DN 114.001 は Actimel (登録商標) から単離された。後者の株の全ては MRS 上で単離し、37 °C で 5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。潜在的に病原性の株ポルフィロモナス・ジンジバリス CIP 103683、フゾバクテリウム・ヌクレアタム CIP 104988、トレボネーマ・デンティコラ CIP 103917 およびプレボテラ・デンティコラ CIP 104478T は、パスツール研究所から得、提供者の指示にしたがって培養した。臨床的起源のストレプトコッカス・ミュータンスは、37 °C で 5% CO<sub>2</sub> 下でブレインハート (Brain Heart) 寒天上で培養した。株の同定は、シーケンシングにより行った。  
30  
40

### 【0075】

#### 2. 株の分類学的特性

##### 2. 1. 属および種の遺伝的同定

###### A) 方法

本発明の株を、37 °C で 5% CO<sub>2</sub> を含む雰囲気下で MRS 培地 (pH 6.4) 上で

50

一晩培養した。さらに、細菌を回収し、洗浄し、前溶解バッファー（480 μlのEDTA 50 mM pH 8.0；120 μlのリゾチーム 10 mg/ml）に再懸濁し、さらに37℃で60分インキュベートした。DNAを、Wizard Genomic DNA精製キット（Promega）を使用して抽出した。14000 gで2分間、前処理された細菌を遠心分離し、上清を除去した後、Promegaのプロトコールを続けた。簡潔には、細菌を核溶解溶液に再懸濁し、80℃で5分間インキュベートし、次に室温に冷やした。細胞溶解物をRNase溶液中で37℃で60分間インキュベートし、タンパク質にタンパク質沈殿溶液を加え、高速で回転させることにより、沈殿させた。サンプルを冷やし、15000 gで3分間遠心した。DNAを含む上清をきれいな1.5 ml微量遠心チューブに移し、反転により600 μlのイソプロパノールと混合した。DNAを15000 gで2分間遠心分離により回収し、注意深く上清を捨てた。DNAサンプルを、穏やかにチューブを数回反転させることにより、600 μlの70%エタノールで洗浄した。エタノールを、15000 gで2分間遠心分離後に、吸引により除去した。最後に、DNAペレットは、65℃で1時間インキュベートすることにより、100 μlのRehydration溶液に再懸濁した。サンプルを2-8℃で貯蔵した。

## 【0076】

16S rRNAを、16Sのほぼ全配列のフラグメント（1000個以上のヌクレオチド）を生産するユニバーサルプライマーEub27fおよびEub1492rを使用して、PCRにより増幅した（表1）。次に、上記説明のとおりに得られたDNAを、キットQuiagene（Quiagene）を使用して洗浄した。

## 【0077】

4連続シーケンシング反応を、表1において示されるプライマーを使用するBigDyeキットv.3.1を使用して、Genetic Analyzer 3130（Applied Biosystems）においてそれぞれのサンプルに対して行った。データ回収およびクロマトグラムを、DNA Sequence Analysis v.5.2ソフトウェア（Applied Biosystems）を使用して作り、Chromas（Technelysium Pty Ltd.）およびBioEdit（Ibis Biosciences）での視覚分析により確認した。

## 【0078】

属同定は、Ribosomal Database Projectツールを使用して行った（Wang Qら “Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy”，Appl Environ Microbiol, 2007, vol. 73, p. 5261-5267）。種同定は、BLASTNの手段によるRefSeq データベース（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>）、およびRibosomal Database Project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data”，Nucl. Acids Res., 2007, vol. 35, p. 169-172）の両方から、既知の生物体の16S配列での得られた配列の比較により行った。

表1. 16S遺伝子を増幅し、シーケンシングするために使用されるプライマー

## 【表1】

工程	プライマー	方向	5'→3' 配列
増幅	Eub27f	フォワード	GAGTTTGATCCTGGCTCAG(配列番号:1)
	Eub1492r	リバース	TACGGYTACCTTGTACGACTT(配列番号:2)
シーケンシング	27f	フォワード	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG(配列番号:3)
	357f	フォワード	CGCCCGCCGCCGCCCCGGCCGC (配列番号:4)
	907r	リバース	CCGTCAATTCTTGTGAGTT(配列番号:5)
	1492r	リバース	GGTTACCTTGTACGACTT(配列番号:6)

## 【0079】

10

20

30

40

50

## B ) 結果

R D P (Ribosomal Database Project) ツールによって、株 F 2 0 9 6 がラクトバチルス・プランタラム種に属し、株 I 3 1 4 1 がラクトバチルス・プランタラム種に属すると同定された。

### 【 0 0 8 0 】

#### 2 . 2 . 株の遺伝子型決定

##### A ) 方法

特性評価は、ゲノム消化およびパルスフィールドゲル電気泳動により行った。F 2 0 9 6 および I 3 1 4 1 株を、以前に記載されたプロトコール (Rodas AMら “Polyphasic study of wine Lactobacillus strains: taxonomic implications”, Int J Syst Evol Microbiol, 2005, vol. 55, p. 197-207) に付した。市販の株、ラクトバチルス・プランタラム 2 9 9 V、ラクトバチルス・プランタラム V S L # 3、ラクトバチルス・カゼイ V S L # 3 およびラクトバチルス・カゼイ D N 1 1 4 . 0 0 1 はまた、コントロール株としてアッセイに含んだ。全ての株を M R S 寒天プレート上で増殖させ、37 度 5 % C O<sub>2</sub> 下で 18 時間インキュベートした。細胞を回収し、8 m l の P E T (10 mM Tris pH 7.6、1 M NaCl) 中で 3 回洗浄し、次に、6 0 0 0 r p m で 10 分間遠心した。ペレットを 7 0 0 μl の溶解バッファー (6 mM Tris、1 M NaCl、0.1 M EDTA、0.5% SLS、0.2% デオキシコール酸; 1 mg / m l リゾチーム; 40 U / m l ムタノリシン; 20 (g / m l RNase) に再懸濁した。同等の容量の 1.6% 低融点アガロース (FMC BioProducts, Rockland, ME, USA) を再懸濁された細胞に加え、4 度 1 時間で凝固させた。挿入物を 2 m l 溶解バッファー II (0.5 M EDTA pH 9.2、1% N-ラウロイルサルコシンおよび 1 mg / m l プロナーゼ) に移し、50 度 48 時間インキュベートした。次に、挿入物を室温で TE バッファー (10 mM Tris、1 mM EDTA pH 8.0) で洗浄した。全 DNA 消化を S f i - I および S m a - I 制限酵素 (Roche Diagnostics) により行った。

### 【 0 0 8 1 】

パルスフィールド電気泳動を、C H E F D R I I I 装置 (BioRad Laboratories) を使用して行った。挿入物を 1% アガロースゲル (SeaKem ME agarose, FMC BioProducts, ME, USA) に負荷した。表 2 は、それぞれの酵素に対する電気泳動状態を記載している。DNA 分子量マーカーは、L a m b d a l a d d e r P F G M a r k e r および Low Range P F G M a r k e r (New England Biolabs) であった。電気泳動後、G e l D o c S y s t e m (BioRad) を使用して、ゲルを臭化工チジウムおよび UV で染色した。

表 2 . F 2 0 9 6 および I 3 1 4 1 株由来の S f i - I および S m a - I 制限ゲノム DNA に対する電気泳動状態

### 【 表 2 】

酵素	ブロック	最初のパルス(秒)	最後のパルス(秒)	時間(時)
S f i - I	1	2	10	10
	2	15	25	6
S m a - I	1	0.5	5	16

### 【 0 0 8 2 】

##### B ) 結果

図 1 に示されるとおり、F 2 0 9 6 株に対するパルスフィールド電気泳動 S f i - I および S m a - I 制限パターンは、市販のラクトバチルス・プランタラム 2 9 9 V および ラクトバチルス・プランタラム V S L # 3 株のものと異なり、I 3 1 4 1 に対する制限パターンは、非常に関連した市販のラクトバチルス・カゼイ 株のものと異なる。したがって、F 2 0 9 6 および I 3 1 4 1 株が新規株であると結論づけることができる。

### 【 0 0 8 3 】

10

20

30

40

50

### 3. 病原体をアンタゴナイズする能力

#### A) 方法

株 F 2 0 9 6 および I 3 1 4 1 がアンタゴニスト活性を示すか否かを評価するために、Campbell プロトコールを、Oxoid 培地中に細菌性病原体で播種された寒天プレートを使用して行った。試験において使用される病原体は、ヒトの口腔において一般的に存在するものの中から選択された（表 1 参照）。簡潔には、F 2 0 9 6 、 I 3 1 4 1 およびペディオコッカス・アシディラクティシイ、ヒトの唾液から単離された別の株を、それぞれ上記特定の状態下で一晩培養した。インキュベーション後、培養物を  $10^8$  c.f.u./ml に標準化し、以下の混合培養物を調製した：F 2 0 9 6 + I 3 1 4 1 、 F 2 0 9 6 + ペディオコッカス・アシディラクティシイ、および I 3 1 4 1 + ペディオコッカス・アシディラクティシイ。該混合培養物は、等量のそれぞれのこれらの構成株および単一株の培養物として同じ全細菌濃度、すなわち  $10^8$  c.f.u./ml を含んだ。固定された容量のそれぞれの単一株の培養物および混合培養物を一様に播種し、適当な温度で 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターでコンフルエンスにまで増殖させた。次に、コンフルエンス寒天プレートの一様なサイズのシリンドラー部を、病原体プレート上にローン トゥ ローン (loan-to-loan) で置き、37° で一晩インキュベートした。

#### 【0084】

次の日、阻害部を、平らな物差しの上に寒天プレートを置くことにより測定した。株のアンタゴニスト特性を、阻害部直径 (IZD) からシリンドラー直径 (CD) を引き、この差を 2 で割ること、以下の式 GIA = (IZD - CD) / 2 により計算される、増殖阻害活性 (GIA) として測定した。本発明の株の阻害能力を、市販の口腔プロバイオティック株ストレプトコッカス・サリバリウス K 1 2 およびラクトバチルス・ロイテリ A T C C 5 5 7 3 0 のものと比較した。

#### 【0085】

#### B) 結果

株 F 2 0 9 6 および I 3 1 4 1 の増殖阻害活性は、表 3 において示される。結果は、トリプリケート実験の平均である。

表 3. 口腔病原体に対する増殖阻害活性

#### 【表 3】

	ポルフィ ロモナス	フツバク ヌクレア	トルボネ (T.den ivalis)	プロレボ ンチコラ (F.nuc leatum)	ストレプ トコッカス ・ミュータ ンシテイコ ・ス	F2096	I3141
F2096	1	4	4.5	NI	2	-	NI
I3141	NI	7	1	0.5	2	NI	-
F2096+I3141	1.5	9	4.5	1	4	-	-
F2096+ペ <sup>デ</sup> イコッカス・アシ ・テ <sup>デ</sup> イラクティシイ	0.5	1	4	NI	1	-	-
I3141+ペ <sup>デ</sup> イコッカス・アシ ・テ <sup>デ</sup> イラクティシイ	NI	5	0.5	NI	NI	-	-
ストレプトコッカス・サリバリウス	NI	NI	1	0.5	1	-	-
ラクトバチルス・ロイテリ	NI	0.5	NI	0.75	1	-	-

NI、阻害なし

#### 【0086】

該結果により分かるとおり、P 2 0 9 6 および I 3 1 4 1 の両方は、口腔病原体に対する広範な阻害パターンを有する。これは、予備試験がポルフィロモナス・ジンジバリスに

に対するアンタゴニスト活性がまれである（結果は示されていない）ことを示したため、ボルフィロモナス・ジンジバリスととりわけ関連している。さらに、混合培養物中の F 2 0 9 6 および I 3 1 4 1 の組合せが、単一の培養物として別々に使用される個々の株の活性と比較して、口腔病原体に対するより高いアンタゴニスト活性を示すことに注目すべきである。混合培養物中のそれぞれの株の濃度が単一の培養物中の濃度の半分であり、したがって、組合せのアンタゴニスト効果が、これらの株に対する個々の効果の合計よりも高いことに注意すること。この相乗効果は、それぞれの株が口腔の別の生息動物であるペディオコッカス・アシディラクティシと混合されるとき、起こらない。したがって、本発明の株は、口腔病原体に対する相乗活性を示し、単一の処方物において使用されるとき、とりわけ有用である。

10

#### 【0087】

市販のプロバイオティックストレプトコッカス・サリバリウス K 1 2 およびラクトバチルス・ロイテリ A T C C 5 5 7 3 0 と比較した場合、本発明の株は、有意に高いアンタゴニスト能力を有する。最後に、F 2 0 9 6 および I 3 1 4 1 は、互いに、またはヒトの口腔細菌叢の一般的な共生株に対して、最小のアンタゴニスト作用を示した。

#### 【0088】

##### 4. 凝集物の形成

###### A) 方法

凝集物を形成する能力を、凝集物および沈殿物の形成による、一晩培養物の 6 2 0 n m での光学濃度の減少をモニタリングすることにより評価した。凝集能力パーセント（% A C）値を、以下の式： $% A C = (1 - (OD_{t_f} / OD_{t_0})) / 100$ （式中、 $OD_{t_f}$  および  $OD_{t_0}$  はそれぞれ最後および最初の光学濃度である）を使用して得た。最初の O D は、全ての培養物が等量の c f u / m l を含むことができるよう、調節した。混合された培養物は、5 0 % のそれぞれの株を含む所望の全 c f u / m l を得るように、適当な量の単一の株を混合することにより調製された。

20

#### 【0089】

###### B) 結果

凝集物を形成する能力は、該株が、病原体生物膜形成に干渉することにより歯垢を阻害または減少させることができると、口腔衛生適用でのプロバイオティック株に重要である。

30

#### 【0090】

新規株およびそれらの組合せまたはペディオコッカス・アシディラクティシもしくはラクトバチルス・ブレビス C D 2との組合せに対する平均凝集能力値は、コントロール株と比較されて表 4 に示される。これらの結果は、新規単離物が、市販のコントロール ストレプトコッカス・サリバリウス K 1 2 およびラクトバチルス・ロイテリ A T T C 5 5 7 3 0 の両方よりも、有意に高い非常に良い凝集活性を示したことを明確に証明する。さらに、本発明の株による凝集物形成が、両方の株が混合培養物において混合されるとき増加され、該株が、単一の組成物に混合されるとき、病原体細菌の置換においてさらに有効であることを意味する。しかしながら、この協力は、本発明の株が、良い凝集能力を有する他の株、例えば、ペディオコッカス・アシディラクティシおよびラクトバチルス・ブレビス C D 2 と別々に混合されたとき、存在しない。さらに、本発明の株とラクトバチルス・ブレビス C D 2とを混合するとき、アンタゴニスト効果が観察され、本発明の株が、ラクトバチルス・ブレビス C D 2と混合されたとき、病原体細菌の置換においてあまり有効でないことを意味する。

40

表 4 . 凝集能力（%）

【表4】

株	凝集能力(%)
F2096	56.00
I3141	22.73
F2096 + I3141	64.73
F2096 + ペテオコカス・アシテイラケイシイ	55.50
I3141 + ペテオコカス・アシテイラケイシイ	23.30
ラクトバチルス・ブレビス CD2	24.70
F2096 + ラクトバチルス・ブレビス CD2	36.31
I3141 + ラクトバチルス・ブレビス CD2	28.50
ストレプトコカス・サリバリウス	16.67
ラクトバチルス・ロイテリ	0.00

## 【0091】

## 5. 酸の生産

## A) 方法

ヒト食物に存在する種々の糖を補った培養培地において増殖させるとの、新規株が酸を生産する能力を評価した。該株を、以下の培地内で 5% CO<sub>2</sub> 下で 37 度 18 時間増殖した：MRS および 4% グルコース、4% フルクトース、4% ラクトースまたは 4% スクロースを補った最小培地。最小培地は、2 g / L ペプトン水、2 g / L 酵母抽出物、0.1 g / L NaCl、0.04 g / L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.04 g / L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.01 g / L MgSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O、0.01 g / L CaCl<sub>2</sub> \* 6H<sub>2</sub>O、2 g / L NaHCO<sub>3</sub>、0.05 g / L ヘルミナ(hemina)（少数の 1 mol / L NaOH 滴に溶解させた）、0.5 g / L システイン HCl、0.5 g / L 胆汁塩、2 g / L Tween 80、および 10 μl ビタミン K1 (Sigma - Aldrich Chem. Spain から全ての成分を得た) を含んだ。培養物を HCl で pH 7 に調節した。pH および生存細胞の数 (cfu / ml) を、インキュベーション時間の最後に測定した。それぞれの培養培地に対する酸価の生産は、以下の式：PA 値 = pH \* log (cfu / ml) により得た。

## 【0092】

## B) 結果

上記式にしたがって、低い値は、高い酸産生性の株に対応する。高い酸生産は、齶歯形成を促進するため、口腔プロバイオティックに対する望ましくない副次的作用である。種々の糖において増殖される F2096 および I3141 ならびにいくつかのプロバイオティックコントロール株に対する酸生産値は、市販の株に対して得られた値と共に、表5に示すことができる。MM は最小培地を表す。

表5. 酸の生産

【表5】

株	MRS	MM+Gluc	MM+Fruc	MM+Lac	MM+Sac	40
F2096	32.7	30.34	28.56	31.45	31.67	
I3141	42.04	48.28	45.24	58.24	59.12	
ラクトバチルス・ブレビス CD2	26.45	31.24	24.24	21.45	24.20	
ストレプトコカス・サリバリウス	41.37	29.69	31.31	28.03	29.85	
ラクトバチルス・ロイテリ	36.75	49.19	45.67	34.01	57.39	
ラクトバチルス・バガゼイ	27.38	19.53	8.21	5.98	20.52	
ペテオコカス・ペントサセウス	24.7	11.34	13.23	12.56	17.45	
ペテオコカス・アシテイラケイシイ	22.6	15.61	11.10	16.45	22.14	

## 【0093】

これらの結果は、種々の糖における株F2096およびI3141の増殖が、口腔から単離されている他の細菌株、すなわち、ラクトバチルス・パラカゼイ、ペディオコッカス・ペントサセウスおよびペディオコッカス・アシディラクティシと比較して、有意に乏しい酸生産をもたらすことを証明する。本発明の株はまた、市販の口腔プロバイオティックのストレプトコッカス・サリバリウスK12よりも少ない酸生産である。さらに、株I3141は、特に低い酸生産であることが知られており、抗齲歯原性プロバイオティックとして売買されているラクトバチルス・ロイテリATTC55730と比較したとき、より低い酸性化プロフィールを有する。本発明I3141のラクトバチルス・ブレビス株が、市販のラクトバチルス・ブレビスCD2と比較して、有意に低い酸性化プロフィールを有することも注目すべきである。したがって、株F2096およびI3141は低酸性化プロフィールを有し、したがって口腔衛生適用に対して適当である。10

## 【0094】

## 6. 悪臭揮発性化合物の生産

## A) 方法

新規株による悪臭揮発性化合物の生産を、ヒトの食物に類似している培養培地において培養したとき、感覚評価の手段により決定した。簡潔には、株を、5% CO<sub>2</sub>下で37度48時間、グルコース(0.5% w/v)、フルクトース(0.5% w/v)、酵母抽出物(1% w/v)、肉抽出物(1% w/v)、真核細胞(200 細胞/m<sup>1</sup>)およびペクチン(0.5% w/v)を含む培地において培養した。株は、1が臭気がなく、5が非常に不快な臭気である1から5の悪臭値の生産をもたらす。20

## 【0095】

## B) 結果

悪臭化合物の生産は、口腔プロバイオティックに対して非常に望ましくない。しかしながら、本発明の株は、ヒトの食物に類似している培養培地において培養されている間、一切不快な臭気を生産しなかった。

表6. 不快な臭気の生産

【表6】

株	悪臭値
F2096	2
I3141	2
ストレプトコッカス・サリバリウス	2
ラクトバチルス・ロイテリ	3

30

## 【0096】

## 7. 口腔状態に対する生存

## A) 方法

口腔における株の生存は、それらを口腔ストレス状態に置くことにより試験した。5\*10<sup>7</sup> cfuのそれぞれの細菌株を、F2096、I3141およびラクトバチルス・ロイテリATTC55730の場合、200 μlのMRS培地の、またはストレプトコッカス・サリバリウスK12の場合、トリプシン分解ダイズ培養液(TSB, Oxoid)の96ウェル培養プレートに播種した。培養物に、生理学的濃度のリゾチーム(Sigma-Aldrich Chem, Spain)または過酸化水素(Sigma-Aldrich Chem, Spain)を補った。プレートを、5% CO<sub>2</sub>下で37度6時間インキュベートした。細菌増殖を、620 nmで光学濃度を測定することにより定量した。細菌増殖値を、補足なしの標準MRS培地中で同じ株によりなし遂げられる増殖と比較することにより得た。40

## 【0097】

## B) 結果

全生存パーセント値(%SV)を以下のとおりに計算した：%SV = [(OD<sub>tf</sub> - O

50

$D_{t_0}$  (補足あり) / ( $OD_{tf} - OD_{t_0}$  (補足なし)) ] \* 100 (式中、ODは光学濃度であり、 $t_f$ および $t_0$ はそれぞれ最後および最初の時間である)。以下の値は、トリプリケート結果の平均である:

表7. 口腔状態に対する生存

【表7】

株	MRS/TSB リゾチーム $2 \times 10^5$ U/ml	MRS/TSB $H_2O_2$ 1mM	MRS/TSB $H_2O_2$ 2,5mM	10
F2096	44.41	98.78	62.60	
I3141	0.58	42.06	84.28	
ストレプトコッカス・サリバリウス	0.50	18.89	28.78	
ラクトバチルス・ロイテリ	-17.46	31.32	-8.03	

【0098】

新規株 F 2 0 9 6 および I 3 1 4 1 は、市販の株ストレプトコッカス・サリバリウス K 1 2 およびラクトバチルス・ロイテリ ATCC 55730 よりも口腔ストレスに対して良い耐性を示した。

【0099】

8. 口腔組織に付着する能力

A) 方法

腸のブタの舌、Caco-2細胞（歯肉を刺激するため）およびヒドロキシアパタイト（HA）ビーズ（歯を刺激するため）へのF 2 0 9 6、I 3 1 4 1 および市販のコントロール株のインビトロでの付着アッセイを行った。それぞれの株を  $10 \mu l / ml$  の [3H]チミジン ( $1.0 \mu Ci / ml$ 、Amersham Biosciences, UK) で一晩インキュベートした。調製物を遠心し、ペレットを  $10^8 cfu / ml$  の濃度に PBS バッファーで再懸濁した。微生物に取り込まれたトリチウムシグナルは、シンチレーションリーダー (Wallac 1410) において最初のトリチウムシグナルおよび上清シグナルから計算した。この数（バイオマスに取り込まれたシグナル）と培養物中の微生物の数の比は、cpm/cfu (シグナル/細菌) をもたらす。

【0100】

付着測定は、ELISAプレート中の  $1.05 \times 0.5 cm$  - フラグメントのブタの舌または前インキュベートされた Caco-2 細胞または  $50 mg$  の HA ビーズ ( $80 \mu m$  の直径) のいずれかへの、 $3.3 ml$  の放射標識された  $10^8 cfu$  のそれぞれの株の添加により行った。45分後、上清を注意深く除去した。HAビーズ（付着された細菌と共に）を遠心分離により回収した。付着している細菌と共に舌または Caco-2 細胞を、ELISAウェルから廃棄した。最後に、回収した細菌を溶解し、特定の放射能 (cpm/cfu) を計算した。

【0101】

全てのアッセイをトリプリケートにおいて行い、結果を  $1 cm^2$ あたりの付着した細菌の数として示した。ストレプトコッカス・サリバリウスが多数の試験された特性（上記結果参照）に対して良い結果を示したため、該株を付着アッセイのためのコントロール株として使用した。

B) 結果

表8. 口腔組織への付着

10

20

30

40

【表8】

株	舌(cfu/cm <sup>2</sup> )	Caco-2(cfu/cm <sup>2</sup> )	HAt <sup>+</sup> -ズ(cfu/cm <sup>2</sup> )
F2096	8.84E+06	1.00E+06	2.30E+06
I3141	2.70E+06	3.78E+04	5.51E+05
ストレプトコッカス・サリバリウス	1.72E+06	8.83E+04	2.34E+05

## 【0102】

これらの結果は、株F2096およびI3141が、口腔プロバイオティック株のストレプトコッカス・サリバリウスK12と比較したとき、口腔組織への全体的な良い付着能力を有することを証明する。口腔組織へ付着するする能力は、病原体に対する付着部位を競合し、口腔における耐久性を助けるとき、これらの細菌に競合的利点を与えるため、プロバイオティックとして使用される株のための関連する特徴である。結果として、口腔組織への良い付着を示す株は、口腔からの病原体の置換に寄与し、より健康的な口腔細菌叢を促進する。

## 【0103】

9. 抗生物質感受性

## A) 方法

株F2096およびI3141に対する抗生物質感受性を、歐州食品安全機関(EFS)による技術的ガイドラインにしたがって試験した(“Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance”. The EFSA Journal, 2008, vol. 732, p. 1-15)。株に対する培養条件は以下のとおりであった：37℃で5%CO<sub>2</sub>下でEFS推奨抗生物質濃度を含むMRS寒天プレートの表面上の増殖。

## 【0104】

## B) 結果

抗生物質含有培地上での株の増殖は、表9に示される。EFSにより推奨されるアッセイのそれぞれの抗生物質の濃度は、mg/mlにおいて与えられる。抗生物質濃度に対して示されていない値は、ラクトバチルス・ブレビス種に対するEFSにより記載されており、したがって、ラクトバチルス・ブレビス株I3141における抗生物質耐性は、この種が属するグループの偏性ヘテロ型発酵性のラクトバチルスに対して推奨される濃度を使用してアッセイした。

## 【0105】

結果は、F2096およびI2141が抗生物質耐性を有しないことを示す。したがって、それらはヒトの消費のために適当である。

表9. 株F2096およびI3141の抗生物質耐性

【表9】

	ラクトバチルス・プランタム に対するEFSA濃度	F2096の増殖	偏性ヘテロ型発酵性 のラクトバチルに対 するEFSA濃度	I3141の増殖
アソビ・シリン	2	なし	2	なし
ゲンタマイシン	16	なし	16	なし
カママイシン	64	なし	16	なし
ストレプトマイシン	n.r.	なし	64	なし
エリスロマイシン	1	なし	1	なし
クリングマイシン	1	なし	1	なし
キヌブリスチン/ダルボブリ	4	なし	4	なし
ズキン				
テトラサイクリン	32	なし	8	なし
クロラムフェニコール	8	なし	4	なし

n . r .、EFSAにより推奨されていない

【0106】

書誌参照

【表10】

Twetman S, et al. "Short-term effect of chewing gums containing probiotic Lactobacillus reuteri on the levels of inflammatory mediators in gingival crevicular fluid". Acta Odontol Scand, 2009, vol. 67, p. 19–24. 20

Caglar E, et al. "Salivary mutans streptococci and lactobacilli levels after ingestion of the probiotic bacterium Lactobacillus\_reuteri ATCC 55730 by straws or tablets". Acta Odontol Scand, 2009, vol. 64, p. 314–318.

Stamatova I, et al. "In vitro evaluation of yoghurt starter lactobacilli and Lactobacillus rhamnosus GG adhesion to saliva-coated surfaces". Oral Microbiol Immunol, 2009, vol. 24, p. 218–223. 30

Burton JP, et al. "Preliminary study of the effect of probiotic Streptococcus salivarius K12 on oral malodor parameters". J Appl Microbiol, 2006, vol. 100, p. 754–764.

Wang Q, et al., "Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy", Appl Environ Microbiol, 2007, vol. 73, p. 5261–5267.

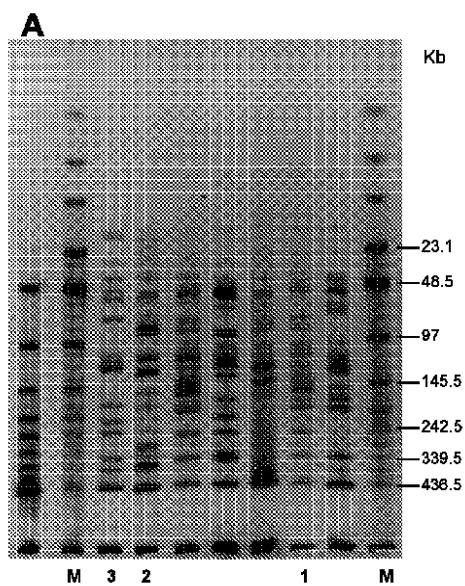
Ribosomal Database Project: <http://rdp.cme.msu.edu/>

J.R. Cole et al., "The Ribosomal Database Project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data", Nucl. Acids Res., 2007, vol. 35, p. 169–172. 40

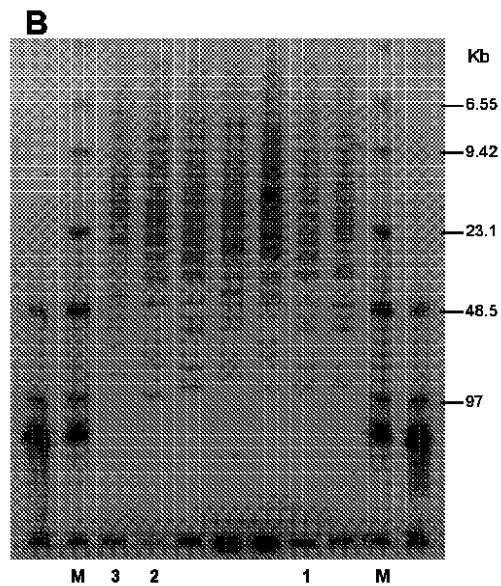
Rodas AM, et al. "Polyphasic study of wine Lactobacillus strains: taxonomic implications", Int J Syst Evol Microbiol, 2005, vol. 55, p. 197–207.

"Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance". The EFSA Journal, 2008, vol. 732, p. 1–15.

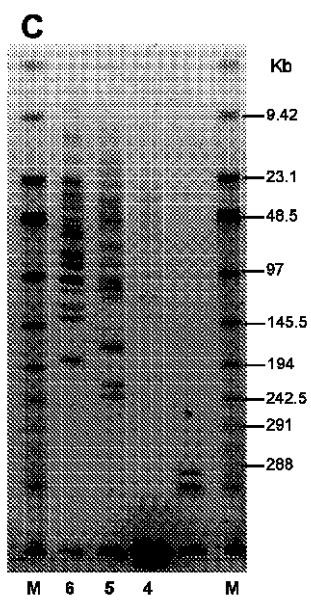
【図 1 A】



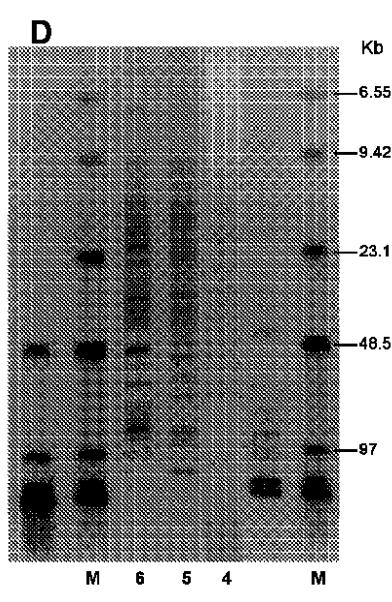
【図 1 B】



【図 1 C】



【図 1 D】



【配列表】

0005879349000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 Q	11/00	(2006.01)
A 6 1 K	9/68	(2006.01)
A 6 1 K	9/20	(2006.01)
A 6 1 K	9/12	(2006.01)
A 6 1 K	9/06	(2006.01)
A 2 3 L	33/10	(2016.01)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)
A 6 1 Q	11/00	
A 6 1 K	9/68	
A 6 1 K	9/20	
A 6 1 K	9/12	
A 6 1 K	9/06	
C 1 2 N	1/20	E
A 2 3 L	1/30	Z
C 1 2 N	15/00	A

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 ジョルディ・クネエ・カステリャーナ

スペイン、エ-08193ベラテラ、カンプス・ウアベ、エディフィシ・エウレカ

審査官 伊達 利奈

(56)参考文献 国際公開第2005/082157 (WO, A1)

特表2008-525098 (JP, A)

特表2004-507265 (JP, A)

国際公開第02/039825 (WO, A1)

Molecular and Cellular Probes, 2009, Vol.23, pp.259-263

Journal of Clinical Periodontology, 2009, Vol.36, pp.506-513

Research in Microbiology, 2003, Vol.154, pp.669-675

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 / 0 0 - 1 / 3 8

P u b M e d