

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6486837号
(P6486837)

(45) 発行日 平成31年3月20日(2019.3.20)

(24) 登録日 平成31年3月1日(2019.3.1)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 N	1/20	(2006.01)	C 1 2 N 1/20 E
A 6 1 K	35/747	(2015.01)	A 6 1 K 35/747
A 6 1 P	1/14	(2006.01)	A 6 1 P 1/14
A 6 1 P	1/10	(2006.01)	A 6 1 P 1/10
A 2 3 L	33/135	(2016.01)	A 2 3 L 33/135

請求項の数 15 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-555745 (P2015-555745)	(73) 特許権者	515109115
(86) (22) 出願日	平成26年2月4日(2014.2.4)		ラドウィッグ ストッカー ホフフェイス
(65) 公表番号	特表2016-508368 (P2016-508368A)		トレイ ゲーエムペーハー
(43) 公表日	平成28年3月22日(2016.3.22)		ドイツ国 ミュンヘン 80335 クラ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/052129		イットマイヤーシュトラッセ 5
(87) 国際公開番号	W02014/122119	(74) 代理人	100113376
(87) 国際公開日	平成26年8月14日(2014.8.14)		弁理士 南条 雅裕
審査請求日	平成29年1月25日(2017.1.25)	(74) 代理人	100179394
(31) 優先権主張番号	13153996.7		弁理士 瀬田 あや子
(32) 優先日	平成25年2月5日(2013.2.5)	(74) 代理人	100185384
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 伊波 興一朗
微生物の受託番号	DSMZ DSM 23090	(74) 代理人	100137811
微生物の受託番号	DSMZ DSM 23091		弁理士 原 秀貢人
微生物の受託番号	DSMZ DSM 23200		
微生物の受託番号	DSMZ DSM 23092		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腸疾患の予防および治療のための、微生物の使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

腸疾患の予防および/または治療、および/または、腸疾患のリスク低減のための医薬を製造するための、

アセチルコリン産生微生物の使用であって、

前記微生物は、*Lactobacillus sanfranciscensis* 株、または、*Lactobacillus rossiae* 株である、
使用。

【請求項2】

腸内健康の維持および/または改善するための機能性食品または機能性飲料の製造における、アセチルコリン産生微生物の非医療的使用であって、

前記微生物は、*Lactobacillus sanfranciscensis* 株、または、*Lactobacillus rossiae* 株である、

但し、前記微生物から、DSM23090株、DSM23091株、DSM23200株、DSM23092株、DSM23093株、DSM23201株、DSM23174株、DSM23121株およびDSM26024株のいずれか1つから選択される、*Lactobacillus* 株を除く、

使用。

【請求項3】

請求項1または2に記載の使用であって、

10

20

健康な腸管内菌叢を維持および/または促進するため、および/または、消化プロセスの毒性作用を低減するため、および/または、消化器系を刺激するため、および/または、腸調節を改善するための、
使用。

【請求項 4】

請求項 1 または 3 に記載の使用であって、
前記腸疾患は、機能性腸疾患および/または腸神経系により制御される腸壁の分泌と関連する疾患である、
使用。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の使用であって、
前記腸疾患は、機能性便秘、機能性下痢および/または過敏性腸症候群 (I B S) である、
使用。

10

【請求項 6】

請求項 4 に記載の使用であって、
前記腸疾患は、便秘が主である I B S、交互の I B S、または下痢が主である I B S である、
使用。

【請求項 7】

請求項 1、3、4、5 または 6 に記載の使用であって、
前記腸疾患は炎症性腸疾患である、
使用。

20

【請求項 8】

請求項 7 に記載の使用であって、
前記腸疾患は、潰瘍性大腸炎および/またはクローン病である、
使用。

【請求項 9】

請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の使用であって、
前記微生物は、適切な培養条件下で、30 mg / kg 以上のアセチルコリンを産生する、
使用。

30

【請求項 10】

請求項 1、4、5 または 6 に記載の使用であって、
前記乳酸菌 (L a c t o b a c i l l u s) は、DSM 26024 株、DSM 23090 株、DSM 23091 株、DSM 23200 株、DSM 23092 株、DSM 23093 株、DSM 23201 株、DSM 23174 株および DSM 23121 株、またはそれらから培養される株、のいずれか 1 つから選択される、
使用。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の使用であって、
前記乳酸菌 (L a c t o b a c i l l u s) は、DSM 23090 株および DSM 23093 株、のいずれか 1 つから選択される、
使用。

40

【請求項 12】

請求項 1、3、4、5、6、7、8、9、10 または 11 に記載の使用であって、
製剤の剤形中の、
使用。

【請求項 13】

請求項 2 に記載の使用であって、

50

前記機能性食品がサワードウブレッドである、
使用。

【請求項 1 4】

請求項 1 2 または 1 3 に記載の使用であって、
好ましい腸管内菌叢を維持および/または回復するための少なくとも 1 つのさらなる細菌をさらに含む、
使用。

【請求項 1 5】

請求項 1 2 または 1 3 に記載の使用であって、
腸疾患の治療のための少なくとも 1 つのさらなる薬剤をさらに含む、
使用。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、腸疾患の予防および/または治療、および/または、腸疾患のリスク軽減、
および/または、腸内健康の改善、ならびに、健康な腸管内菌叢の促進における使用のため
の、アセチルコリン産生微生物に関する。アセチルコリン産生微生物は、製剤の剤形と
して、または、機能性食品または補助食品への添加剤として、提供され得る。また、乳酸
菌を使用してアセチルコリンを産生する方法も含まれる。さらに本発明は、腸疾患の治療
および/または予防における使用のための、微生物によって産生されるアセチルコリンに
関する。

20

【背景技術】

【0002】

数多くの患者が、下部の小腸および/または大腸と関連する胃腸障害を患っている。こ
れらの障害は、過敏性腸症候群 (IBS)、または痙攣性結腸、特発性変質性大腸炎 (i
d i o p a t h i c a l t e r a t i v e c o l i t i s)、粘液性大腸炎、コラー
ゲン形成大腸炎、クローン病、一般的な炎症性腸疾患、顕微鏡的大腸炎、抗生物質関連
の大腸炎、特発性または単なる便秘、憩室性疾患、およびエイズ腸症を含む。

30

【0003】

過敏性腸症候群は、全ての胃腸障害の中で最も一般的であり、成人の 11 ~ 14 % が患
い、消化不良を有する全患者の 50 % 超を占める (G . T r i a d a f i l o p o u l o
s e t a l . , B o w e l D y s f u n c t i o n i n f i b r o m y a l g
i a , D i g e s t i v e D i s . , S c i . 3 6 (1) : 5 9 - 6 4 [1 9 9 1] ;
W . G . T h o m p s o n , I r r i t a b l e B o w e l S y n d r o m : P a t
h o g e n e s i s a n d M a n a g e m e n t , L a n c e t , 3 4 1 : 1 5 6 9
- 1 5 7 2 [1 9 9 3])。実際に薬物療法を求めているのは IBS を有する人々のほん
の一部であると考えられる。IBS を有する患者は、異なる症状、例えば、排便、交互の
下痢および便秘、腹部の膨張、ガス、および、排泄物中の過剰粘液に主に関連する、腹痛
を示す。3 つのグループの IBS が存在する：便秘が主である IBS (C - IBS)、交
互の IBS (A - IBS)、および、下痢が主である IBS (D - IBS)。IBS は、
慢性の状態として認識され、患者の生活の質に重大な影響を有し得る。

40

【0004】

IBS に関するいくつかの可能性のある原因は、例えば、繊維質の少ない洋食、腸運動
の機能不全、腹痛感受、異常な心理または行動、または、ストレスに対する精神心理学的
応答が提唱されている。しかしながら、それらの原因のいずれも、完全には認められてい
ない (上記 W . G . T h o m p s o n [1 9 9 3])。

【0005】

IBS を患っている患者は、正常な腸活動を痛みとして感じるように思われる。例えば

50

、IBS患者は、正常よりも少量の直腸膨張で痛みを経験し、または、移動性運動群 (migrating motor complex) のフェーズIII活動を認知する閾値が正常よりも低い (W. E. Whitehead et al., Tolerance for Rectosigmoid Distention in Irritable Bowel Syndrome, *Gastroenterol.* 98:1187-92 [1990]; J. E. Kellow et al., Enhanced Perception of Physiological Intestinal Motility in the Irritable Bowel Syndrome, *Gastroenterol.* 101(6):1621-24 [1991])。

【0006】

IBS患者における腸管運動は、薬、ホルモン、食品、および精神的ストレスなどの様々な刺激に対する正常な制御応答とは異なる (D. G. Wangel and D. J. Deller, Intestinal Motility in Man, III: Mechanisms of Constipation and Diarrhea with Particular Reference to the Irritable Bowel, *Gastroenterol.* 48:69-84 [1965]; R. F. Harvey and A. E. Read, Effect of Cholecystokinin and Colon Motility and on Symptoms of Patients with Irritable Bowel Syndrome, *Lancet* i:1-3 [1973]; R. M. Valori et al., Effects on Different Types of Stress and "Prokinetic drugs" on the Control of the Fasting Motor Complex in Humans, *Gastroenterol.* 90:1890-900 [1986])。

【0007】

Evansら、および、GovathおよびFarthingは、過敏性腸症候群は乱れた胃腸運動と関連することが多いと認識した (P. R. Evans et al., Gastroparesis and Small Bowel Dysmotility in Irritable Bowel Syndrome, *Dig. Dis. Sci.* 42(10):2087-93 [1997]; D. A. Gorard and M. J. Farthing, Intestinal Motor Function in Irritable Bowel Syndrome, *Dig. Dis.* 12(2):72-84 [1994])。IBSにおける腸運動障害に向けられた治療は、セロトニンアンタゴニスト (D. P. Becker et al., Meso-azacyclic Aromatic Acid Amides And Esters as Serotonergic Agents, 米国特許第5,612,366号; M. Ohta et al., Methods for Treatment of Intestinal Diseases, 米国特許第5,547,961号)、および、コレオシトキニン (Cholecystokinin) アンタゴニスト (Y. Sato et al., Benzodiazepine derivatives, 米国特許第4,970,207号; H. Kitajima et al., Thienylazole Compound and Thienotriazolodiazepine Compound, 米国特許第5,760,032号) の使用を含む。結腸運動指数は、結腸および小腸運動障害における筋電活動を変えたが、それらはIBS特異的でないので、信頼性のある診断手法であるとは証明されていない (上記のW. G. Thomson [1993])。

【0008】

IBSの治療のためのプロバイオティクスの投与の試みがなされている。例えば、Allanらは、症状を緩和するために *Enterococcus faecium* 株の使用を開示した (W. D. Allan et al., Probiotic Containing *Enterococcus faecium* strain NCIMB 40

10

20

30

40

50

371 米国特許第5,728,380号、および、Probiotic, 米国特許第5,589,168号)。Borodyは、疾患スクリーニングされたヒトドナー由来の糞便細菌によって導入される新しい細菌群集を用いた置換および洗浄による、または、バクテリオイド(Bacterioids)および大腸菌の種を含む組成物による、腸内細菌叢の少なくとも部分的な除去によって過敏性腸症候群を治療する方法を教示した(T. J. Borody, Treatment of Gastro-Intestinal Disorders with a Fecal Composition of Bacterioids and E. coli, 米国特許第5,443,826号)。

【0009】

人々の健康および幸福が、消化管(具体的には大腸)に生息する微生物によってプラスまたはマイナスに影響され得ることは、多くの科学者たちの論争である。これらの微生物は、毒素、代謝副産物、および単鎖脂肪酸などの産生を介して、宿主の生理学的状態に影響を及ぼす。

10

【0010】

腸内細菌叢の構成および量は、疾患、生活様式、旅行および他の因子により誘導される状態またはストレスにより、影響され得る。個人の健康および幸福にプラスに影響する微生物が大腸内に生息するのを促進することが可能な場合、それは宿主の心理的幸福を改善するであろう。

【0011】

有益な微生物またはプロバイオティクスの導入は、飲料、ヨーグルト、カプセル、および、生菌が大腸に到達することを可能にする他の形態での、微生物の摂取により達成され得る。

20

【0012】

しかしながら、現在までに、十分な形で上皮層の分泌機能および腸便通の制御を行なう腸神経系(ENS)を刺激する信頼性のある方法は見つかっておらず、または、開発されていない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

したがって、本発明の課題は、上皮層の分泌機能および腸便通の制御に十分な形で介入して、それにより腸疾患の進行に作用する方法を提供することであった。

30

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明の発明者らは、鋭意研究を行なった結果、アセチルコリン産生微生物によって、腸機能を調節することができるということを見いだした。それにより、アセチルコリン産生微生物(具体的には乳酸菌)の選択および特異的な投与を介した、腸内のアセチルコリンによる、運動および分泌の標的化された二重の刺激に関する方法が提供される。この治療方法は、慢性のIBS、および、正常に機能しない腸の運動および分泌に関連する他の疾患のための公知の治療に対する有望な代替または付加である。

【図面の簡単な説明】

40

【0015】

【図1】サワードウ、サワードウブレッドおよび類似ブレッドの水抽出物中の代謝産物プロファイル。A:トリプリケートでのサワードウ(SD)、サワードウブレッド(BR)および類似ブレッド(AN)由来の水抽出物中の絶対的な代謝産物(absolute metabolite)の濃度のヒートマップ。水抽出物は、合計ドウまたはブレッド乾燥質量の5~10%を構成する。B:代謝産物の主成分分析(PCA)は、サワードウ(SD)、サワードウブレッド(BR)および類似ブレッド(AN)の間の代謝産物の濃度において有意差を示す。

【図2】サワードウ抽出物は、ムスカリン性アセチルコリン受容体(mACHR)に直接作用することにより、胃の筋肉運動を効果的に刺激する。A:アセチルコリン(ACH)

50

($2.5 \mu\text{M}$)、または、サワードウ (SD)、サワードウブレッド (BR) または類似ブレッド (AN BR) の抽出物 (0.02%) の、いずれかにより誘導される筋緊張の変化。類似ブレッドの抽出物以外では、緊張の増大が、刺激付加の際に直ちに観察された (矢印記号)。B: 示差的な治療における、筋緊張変化のメジアン ($n > 4$)。アセチルコリン (ACH)、および、サワードウ (SD)、サワードウブレッド (BR) または類似ブレッド (AN BR) の抽出物の、運動促進性作用は、mAChR 特異的アンタゴニスト (アトロピン) により、完全に無効にされる。これは、抽出物中のアセチルコリンが、mAChR に直接作用することを示す。

【図3】テトロドトキシン (TTX) は、サワードウ (SD) 由来のアセチルコリン (ACH) による筋収縮の刺激に有意な効果はない。図は、アセチルコリン ($2.5 \mu\text{M}$)、または、サワードウ (SD)、サワードウブレッド (BR) または類似ブレッド (AN BR) の 0.02% 抽出物のいずれかにより刺激される筋緊張の変化、および、TTX 事前処理の効果を示す。TTX は、サワードウ ACH により誘導される筋収縮に有意な効果を示さず、神経を仲介せずに筋肉 mAChR に直接作用することにより、刺激が誘導されることが示された。

【図4】サワードウおよびサワードウブレッドの抽出物は、腸の粘膜の漿膜または粘膜のいずれか側から適用すると、塩化物イオンの分泌を刺激する。A: 2つのチャンバーを分離する粘膜小片を具備するウッシングチャンバー (Ussing Chamber)。電極の下部セットは経上皮電圧 (V_{TE}) を測定し、側部セットは短絡電流 (I_{sc}) を測定する。分泌は、 V_{TE} を 0mV に維持するのに必要な I_{sc} の変化により見積って測定される。B: アセチルコリン (ACH)、サワードウ (SD)、サワードウブレッド (SD BR) または類似ブレッド (AN BR) の抽出物により刺激される、代表的な I_{sc} トレース。曲線下面積は、積分 ($\mu\text{A} \cdot \text{s} / \text{cm}^2$) を用いて計算し、青色は抽出物に対する応答を示し、赤ストライプは、電場刺激 (EFS) に対する応答を示す。図Cは、モルモット結腸粘膜の粘膜側 (MUC) または漿膜側 (SER) のいずれかの処理の際の、 I_{sc} の変化のメジアン ($n > 4$) 値を示す。アセチルコリン (ACH) およびサワードウ (SD) およびサワードウブレッド (SD BR) の抽出物は、粘膜のいずれか側に適用すると、分泌を明らかに刺激する一方で、類似ブレッドの抽出物は効果がない。サワードウおよびサワードウブレッド中のアセチルコリンが刺激に関与していることを示す。

【図5】アトロピンは、サワードウ (SD) およびサワードウブレッド (SD BR) 分泌物により刺激される塩化物イオンの分泌を、完全に無効にする。アトロピン事前処理 ($1 \mu\text{M}$) をした、およびしていない、モルモット結腸粘膜の、粘膜側 (A) または漿膜側 (B) のいずれかに対する、アセチルコリン (ACH) ($10 \mu\text{M}$) および抽出物 (0.1%) の適用における、経時的な短絡電流 (I_{sc}) の変化の平均 ($n > 4$) 値を示す。アトロピンは、分泌刺激を完全に無効にし、サワードウ抽出物の分泌効果における mAChR の役割を示した。

【図6】アトロピンは、粘膜ではなく漿膜に適用すると、ACH、および、サワードウ (SD)、サワードウブレッド (BR) または類似ブレッド (AN BR) の抽出物による分泌刺激を完全に無効にする。アトロピン ($1 \mu\text{M}$) で事前処理をして、およびせずに、ACH および抽出物で粘膜側を処理した後の、経時的な短絡電流 (I_{sc}) の変化の平均 ($n > 4$) 値を示す。アトロピンは、漿膜または粘膜のいずれか側に添加した。アトロピンは、粘膜側ではなく漿膜に適用した場合に分泌を完全に無効にした。

【図7】サワードウ乳酸菌の代謝プロファイル。A: 乳酸菌接種の24時間後のMRSブロス中の絶対的な代謝産物の値のヒートマップ (3回の実験の平均)。B: 代謝産物のPCAプロットは、試験したサワードウ細菌および *L. paracasei* (LC) の間の明らかな区別を示す。C: *L. paracasei* はアセチルコリンを少しも産生しないので、アセチルコリン (ACH) は、PCAプロットに見られる区別において最も強い役割を果たす。

【図8】乳酸菌を用いたインキュベーション24時間における、MRS培地中のアセチルコリン濃度。A: 0.25×10^7 細菌/mLを用いた接種24時間における、MRSブ

10

20

30

40

50

ロス中のアセチルコリン濃度。B : MRS 中 10^6 / mL の細菌数に調節した、アセチルコリン (ACH) 濃度。濃度は、LC - MS / MS を用いて、公知濃度のアセチルコリンを有する溶液の面積に対してピーク面積を比較することにより決定した。

【図9】サワードウ乳酸菌の濃縮馴化培地は、腫瘍壊死因子 (TNF) - 活性化腸上皮細胞 (IEC) によるインターフェロン誘導タンパク質 10 (IP - 10) の分泌を有意に阻害する。ELISA により測定した、Mode - k 細胞の培養培地中の IP - 10 の濃度を示す。細胞を、濃縮馴化培地 (cCM) (黒いバー) および cCM + 10 ng / mL の TNF (灰色バー) とともに、24 時間インキュベートした。L. paracasei (L. p.) は、効率的に IP - 10 を分解することが可能な Lactocepin PrtP を発現し、予想通りに、最も高い阻害活性を有する。サワードウ乳酸菌の cCM は、程度はより少ないが、IP - 10 分泌を有意に阻害する。L. sanfranciscensis DSM 23174 株および DSM 23200 株は、IP - 10 分泌の阻害において、L. paracasei の次に最も効率的である。

10

【図10】ホルムアルデヒドで固定したサワードウ乳酸菌は、TNF 活性化腸上皮細胞によるインターフェロン誘導タンパク質 (IP - 10) の分泌を、有意に阻害する。ELISA により測定した、Mode - k 細胞の培養培地中の IP - 10 の濃度を示す。20 MOI の固定化乳酸菌 (黒いバー) および 20 MOI の固定化乳酸菌 + 10 ng / mL の腫瘍壊死因子 (TNF) (灰色バー) とともに、細胞を 24 時間インキュベートした。固定化 L. paracasei (L. p.) は、固定化 L. sanfranciscensis DSM 23090 株および DSM 23092 株と同様に、TNF 活性化コントロールと比較して、TNF 活性化腸上皮細胞による IP - 10 分泌に対して、最も高い阻害活性を有する (灰色バー)。

20

【発明を実施するための形態】

【0016】

したがって、本発明の第1の態様は、腸疾患の予防および/または治療、および/または、腸疾患を発症するリスクの軽減における使用のための、アセチルコリン産生微生物である。

【0017】

本発明のさらなる態様は、腸内健康の維持および/または改善のための、特に、腸内健康の改善のための、アセチルコリン産生微生物の非医療的使用である。

30

【0018】

アセチルコリン産生微生物は生菌であり、好ましくは、腸領域で増殖可能である。

【0019】

本明細書において用いられる用語「腸領域」は、小腸および大腸を含むことを意図する。大腸は、結腸および直腸を含むことを意図し、ヒトでは、結腸、直腸および盲腸を含むことを意図する。

【0020】

本明細書において用いられる用語「腸疾患を発症するリスクの軽減」は、本発明のアセチルコリン産生微生物を用いて治療される個体が、治療されていない個体と比較して、外部刺激または生理学的プロセスに起因する腸疾患のより低い発症リスクを示すことを意味する。

40

【0021】

本明細書において用いられる用語「腸内健康の維持および/または改善」は、アセチルコリン産生微生物を用いた治療の際に、個体が、ヒトまたは動物の健康に有益でありかつ前記個体の消化の維持および/または改善に合理的な、異なる腸管内菌叢を示すことを意味する。さらに、腸管内菌叢の改善は、有害細菌を除外競争して (out - competing)、正常な便通を刺激することにより、腸疾患を発症する対象の耐性増大をもたらし得る。

【0022】

本明細書において用いられる用語「微生物」は、細菌および酵母を含む。細菌は、好ま

50

しくは、乳酸杆菌科、例えば、乳酸菌株、具体的には、Lactobacillus sanfranciscensis株、Lactobacillus rossiae株、Lactobacillus lactisおよびLactobacillus plantarumである(Stephenson et al., The production of acetylcholine by a strain of Lactobacillus plantarum, 【0023】)

特定の実施態様では、微生物は、Lactobacillus plantarum株ではなく、具体的には、Lactobacillus plantarum 299v株(DSM 9843)またはLactobacillus plantarum株(ATCC 10241)ではない。特定の実施態様では、微生物は、Lactobacillus rhamnosus株ではなく、具体的には、Lactobacillus rhamnosus GGではない。

10

【0024】

腸疾患は、炎症性腸疾患(IBD)、例えば、潰瘍性大腸炎、クローン病、コラーゲン形成大腸炎、リンパ性大腸炎、虚血性大腸炎、ベーチェット病、不定の大腸炎、空置大腸炎(diversion colitis)、嚢炎または顕微鏡的大腸炎および/または大腸癌および/または微生物と関連する疾患、例えば、カンジダ症、小腸細菌の過剰増殖、急性または慢性の腸感染および/または硫酸還元細菌により誘導される疾患、および/または腸憩室、および/または腸癌腫、および/または機能的腸疾患(FBD)、例えば過敏性腸症候群、および/または、腸神経系により制御される腸壁の分泌と関連する疾患を含む。

20

【0025】

用語「機能的腸疾患」(FBD)は、慢性または半慢性である胃腸疾患を指し、それは、腸の痛み、腸機能障害、および社会的混乱(social disruption)と関連する。症状の特定の組み合わせおよび有病率を、「ローマ基準(Rome criteria)」として知られる分類体系に従って定義される以下の7つのFBDサブグループで特徴付ける: 1) C1: 便秘が主である過敏性腸症候群; 2) C1: 下痢が主である過敏性腸症候群; 3) C3: 機能的便秘; 4) C4: 機能的下痢; 5) C2: 機能的腹部膨満; 6) F3a: 骨盤底の共同運動障害; 7) F3b: 内肛門括約筋機能障害。

30

【0026】

より具体的には、腸疾患は、機能的腸疾患、および/または、腸神経系により制御される腸壁の分泌と関連する疾患、具体的には、機能的便秘、機能的下痢および/または過敏性腸症候群(IBS)、例えば、具体的には、便秘が主であるIBS、交互のIBS、または下痢が主であるIBSであり得る。

【0027】

本発明のアセチルコリン産生微生物は、好ましくは、健康な腸管内菌叢の維持および/または促進、および/または消化プロセスの毒性作用の低減、および/または消化器系の刺激、および/または腸調節の改善に有用である。健康な腸管内菌叢の促進は、腸内(具体的には大腸、より具体的には結腸)の有害細菌の除外競争をもたらし、それにより、消化プロセスの毒性作用を低減し、消化器系を刺激し、腸調節を改善する。

40

【0028】

本発明のアセチルコリン産生微生物は、好ましくは、有益な方法で炎症性腸疾患(IBD)の進行を調節して、炎症促進性ケモカインIP-10の分泌の阻害によりIBD患者の症状を軽減するのに有用である。

【0029】

別の実施態様では、腸疾患は、炎症性腸疾患であり得る。当該疾患は、好ましくは潰瘍性大腸炎、クローン病、コラーゲン形成大腸炎、リンパ性大腸炎、虚血性大腸炎、ベーチェット病、不定の大腸炎、空置大腸炎および/または顕微鏡的大腸炎である。当該疾患は、より好ましくは、潰瘍性大腸炎および/またはクローン病である。

50

【0030】

本発明の微生物は、アセチルコリンを産生することが可能である。好ましくは、アセチルコリン産生微生物は、記載される適切な培養条件下で、20、25、30、35または40mg/kg以上、より好ましくは40mg/kg以上、さらにより好ましくは35mg/kg以上のアセチルコリンを産生する。乳酸菌培養に適切な任意の培養培地を、アセチルコリン産生微生物の培養に用いてよい。好ましくは、MRS-ブロス培地として用いる。好ましくは、アセチルコリン濃度は、 10^6 /mlの細菌数に調節する。

【0031】

アセチルコリン産生微生物は、好ましくは細菌である。より好ましくは、細菌は、乳酸杆菌科、例えば、乳酸菌株、具体的には、Lactobacillus sanfranciscensis株、Lactobacillus rossiae株、Lactobacillus brevis株、または、Lactobacillus plantarum株であり、それらは、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Germany)の閲覧用目録から一般に利用可能である。

【0032】

より好ましい実施態様では、乳酸菌株は、DSM26024株、DSM23090株、DSM23091株、DSM23200株、DSM23092株、DSM23093株、DSM23201株、DSM23174株およびDSM23121株のいずれか1つ、またはそれらから培養される株、より具体的には、DSM23090株またはDSM23093株、またはそれらから培養される株から選択される。これらの株は、ブダペスト条約に従って、Leibniz-Institut DSM-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Germany)に寄託されている。新規の乳酸菌株は、以下のアクセションナンバーおよび寄託日を有する：DSM23090(2012-06-21)、DSM23091(2012-06-21)、DSM23200(2012-06-21)、DSM23092(2012-06-21)、DSM23093(2012-06-21)、DSM23201(2012-06-21)、DSM26024(2012-06-04)、DSM23174(2012-06-21)、DSM23121(2012-06-21)。

【0033】

本明細書において用いられる用語「それらから培養される株」は、原株の培養により得られる子孫株を指す。

【0034】

アセチルコリン産生微生物は、好ましくは、アセチルコリン分泌微生物である。本明細書において用いられる用語「アセチルコリン分泌微生物」は、その微生物が、アセチルコリンを培養培地中に分泌することを意味する。

【0035】

本発明は、アセチルコリン産生微生物の医療的使用に関する。好ましくは、微生物は、薬学的に許容できる剤形として、または栄養の形態(例えば食品または飲料)で提供される。

【0036】

一実施態様では、アセチルコリン産生微生物は、医薬組成物で提供される。また、アセチルコリン産生微生物は、機能性食品中または機能性飲料中の添加剤としても提供される。微生物を取り込んだ医薬組成物、食品または飲料は、安全に摂取することができ、胃腸の機能障害または器質性障害または疾患、例えばIBDまたはIBSと関連する状態または症状のリスクがあるとされる対象または患っている対象に、特に推奨される。それらは、アセチルコリン産生微生物を、好ましくは、前記障害または疾患を治療または予防するのに有効量で含む。

【0037】

10

20

30

40

50

本明細書において用いられる、用語「有効量」は、所望の治療効果を達成する（例えば、IBSまたはIBDに関連する疾患、状態および症状を、治療および/または予防する）のに効果的な量を指す。

【0038】

アセチルコリン産生微生物の有効量は、好ましくは、 $10^6 \sim 10^{12}$ cfu / 剤形（コロニー形成単位 / 剤形）の範囲の用量、より好ましくは、 $10^7 \sim 0.5 \times 10^{12}$ cfu / 剤形の範囲、さらにより好ましくは、 $10^9 \sim 10^{11}$ cfu / 剤形の範囲を含む。剤形は、1日に1回または数回、例えば、2回、3回、またはそれ以上、投与してよい。

【0039】

医薬組成物は、液体または固体の形状であってよい。組成物は、少なくとも1つのアセチルコリン産生微生物またはそれらの混合物、および場合により薬学的に許容できる担体を含む。

【0040】

医薬組成物中に取り込まれる微生物などの量は、組成物の全重量に基づいて、約0.1 ~ 約100重量%、好ましくは約2 ~ 約20重量%、さらにより好ましくは約4 ~ 約10重量%に変化させてよい。

【0041】

本発明の医薬組成物は、文献で知られる通常の製剤形態、例えば錠剤、コーティング錠、カプセル、パッケージ、溶液、懸濁液、エマルジョン、坐薬、ペレット、シロップ、膣坐薬、軟膏、クリームなどに作ることができる。好ましくは、組成物は、腸溶性コーティングを含む。それらは、通常の様式で、活性成分を賦形剤および/または担体と混合し、場合により、アジュバントおよび/または分散剤を添加することにより、調製することができる。希釈剤としては水を用いるべきであり、他の有機溶媒をアジュバントの形態で用いることもできる。アジュバントは、例えば、水、非毒性の有機溶媒、例えば、パラフィン、植物油（ピーナッツ油またはゴマ油）、アルコール類（例えば、エタノール、グリセロール）、グリコール類（プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）であってよい。固形担体は、例えば、天然鉱物粉末（カオリン、タルク）、合成鉱物粉末（例えばシリケート）、糖（例えばショ糖）であってよい。乳化剤は、スルホン酸アルキルまたはスルホン酸アリアルなど、分散剤、例えばリグニン、メチルセルロース、スターチおよびポリビニルピロリジン、および、潤滑剤、例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ステアリン酸、ラウリルスルホン酸ナトリウムであってよい。

【0042】

組成物は、腸領域（例えば経口、直腸または鼻 - 十二指腸）に投与される薬学的に許容できる液体担体に場合により再構成するための、凍結乾燥され、粉碎され、および粉末化された、アセチルコリン産生微生物を含んでよい。投与は、通常の様式で、好ましくは経口 / 直腸経路で行なう。浣腸剤として、その結果、生理食塩水などに溶解して注入されてよい。粉末としては、飲用に再構成するために、好ましくは味の良い形態で提供することができる。粉末は、鼻 - 十二指腸注入により注入されるように再構成してもよい。

【0043】

この目的を達成するために適応される製剤形態は、通常の賦形剤、例えばラクツロース、デキストロース、ラクトースに加えて、他の添加剤、例えばクエン酸ナトリウム、炭酸カルシウム、リン酸二水素カルシウムを、いくつかのさらなる物質、例えばスターチ、ゼラチンなどと合わせて含んでよい。液体形態の場合、適合する着色剤または風味物質を添加してよい。

【0044】

アセチルコリン産生微生物を含む組成物のさらなる構成要素は、活性剤、例えばグルタミン / グルタメートまたはそれらの前駆体、マンナン、ガラクトロン酸オリゴマー、ハーブ抽出物、例えば Regulat（登録商標）（Dr. Niedermayer Pharmaの登録商標）および Iberogast（登録商標）（Steigerwald

10

20

30

40

50

Arzneimittelwerk GmbHの登録商標)、チョークベリービール酵母、潰瘍性大腸炎の治療に有用な薬、例えばスルファサラジン、5-A S A 剤、コルチコステロイド、例えば副腎皮質ステロイド、プレドニゾン、ヒドロコルチゾン、またはブデソニド、または、痛み、下痢、感染、またはIBSに対して用いられる薬剤、例えばセロトニン-4受容体アゴニスト、例えばテガセロッドを含んでよい。組成物は、他のアジュバント、例えば、胃での細菌の不活性化を弱める制酸剤と組み合わせることができる。胃での酸分泌は、H₂アンタゴニストまたはオメプラゾールを用いて薬理的に抑制することもできる。

【0045】

本発明の組成物は、個別に連続的に、または、本明細書で上記に記載したような活性剤とともに同時に投与する、キットの形態で提供してよい。これらの活性剤は、本発明の組成物とともに標準的な製剤の剤形で、例えば、少なくとも1つの薬学的に許容できる担体と組み合わせ、好適に製剤化してよい。

10

【0046】

別の好ましい実施態様では、アセチルコリン産生微生物を含む組成物は、少なくとも1つのさらなる微生物、すなわち、非アセチルコリン産生微生物、例えば、好ましい腸管内菌叢を維持および/または回復するための細菌を含んでよい。さらなる細菌は、好ましくは、プロバイオティック細菌である。

【0047】

本発明の別の実施態様では、アセチルコリン産生微生物は、好ましくは、プロバイオティックとして、好ましくは機能性食品または機能性飲料への添加剤として、提供することができる。

20

【0048】

栄養添加剤としての微生物の量は、約0.0001~約20重量%、好ましくは約0.01~約10重量%、さらにより好ましくは約0.1~約5重量%に変化してよい。

【0049】

別の好ましい実施態様では、アセチルコリン産生微生物は、食材、好ましくは食品-または飼料製品、例えば穀類、具体的にはオート麦フレークまたはパン、飲料または乳製品、具体的にはヨーグルト、ザウアークラウトジュース、植物抽出物、例えばRegulat(登録商標)、発酵飲料またはBrottrunk(登録商標)に適用することができる。食材への適用は、好ましくは微生物を食材上に噴霧することにより、前記材料をアセチルコリン産生微生物でコーティングすることにより達成され得る。また、アセチルコリン産生微生物は、食材、例えばパン、ヨーグルト、またはチーズ、好ましくはサワードウブレッド中に、それらを注入することにより適用することもできる。

30

【0050】

本明細書において用いられる用語「機能性食品」は、その栄養上および感覚上の機能に加えて、代謝にプラスの効果があり、バランスのとれた栄養の範囲内で、健康の改善、幸福の増大および/または健康リスクの低減に貢献する食品である。機能性食品は、自然食品、または、構成要素を追加または除去することにより改変された食品であってよい。

【0051】

好ましい実施態様では、機能性食品は発酵製品であり、より好ましくは、機能性食品はサワードウまたはサワードウブレッドである。

40

【0052】

本発明のサワードウブレッドは、アセチルコリン産生株を含むだけでなく、さらに、高い含有量の他のアセチル化化合物、例えばN-アセチル-グリシン、ホモセリン、カナバニンなども含み得るという利点を有する。

【0053】

本明細書において用いられる用語「機能性飲料」は、その栄養上および感覚上の機能に加えて、代謝にプラスの効果があり、バランスのとれた栄養の範囲内で、健康の改善、幸福の増大および/または健康リスクの低減に貢献する飲料である。消費に一般的な量で、

50

正常の食習慣の範囲内で、その効果が得られる。

【0054】

機能性飲料は、さらなる構成要素、例えばハーブ類、ビタミン類、ミネラル類、アミノ酸類、またはさらなる他の食品または飲料成分（一般の栄養を超える特定の健康利益を提供する）を含んでよい。あるいは、刺激物、例えばタウリン、グルコノラクトン（glucoronolactone）、カフェイン、B-ビタミン、ガラナ、朝鮮人参、銀杏、L-カルニチン、糖類、抗酸化剤、マテ、クレアチン、オオアザミなどを含んでよい。好ましい実施態様では、本発明のアセチルコリン産生微生物により消化されるのに適切なプレバイオティックをさらに含む。

【0055】

好ましい機能性飲料は、飲用ヨーグルト、発酵穀物飲料、アルコールフリーのビール、Brottrunk（登録商標）、果汁ベースの飲料、または、植物またはハーブの抽出物を含む飲料、例えばIberogast（登録商標）である。

【0056】

また、機能性食品または機能性飲料は、好ましくは、腸疾患の治療のための、少なくとも1つのさらなる活性剤とともに投与することもできる。さらなる活性剤は、上述の薬剤群から選択することができる。

【0057】

別の実施態様では、活性剤は、好ましくは、好ましい腸管内菌叢を維持および/または回復するための、少なくとも1つのさらなる細菌であってよい。さらなる細菌は、プロバイオティック細菌の群から選択することができる。

【0058】

好ましいプロバイオティック細菌は、乳酸菌およびビフィズス菌由来の株、例えば、Lactobacillus acidophilus、Lactobacillus johnsonii、Lactobacillus casei、Lactobacillus lactis、Lactobacillus reuteri、Lactobacillus rhamnosus、および/または、Bifidobacterium lactisを含む群から選択することができる。

【0059】

場合により、組成物は、プレバイオティックを含むこともできる。本明細書において用いられる「プレバイオティック組成物」は、結腸に既に生息する限られた数の微生物種のうちの1つの増殖、活性または両方を、選択的に刺激することにより、宿主に有利に作用する、少なくとも非消化性の食品成分である。プレバイオティックは、好ましくは、非消化性オリゴ糖、例えば、フラクトオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖、ラクトロース（lactulose）、キシロオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖、大豆オリゴ糖、ゲンチオオリゴ糖、グルコオリゴ糖、フルクタン、ラクトスクロース（lactosucrose）、単鎖フラクトオリゴ糖、およびそれらの混合物である。

【0060】

また、本発明は、乳酸菌を使用してアセチルコリンを産生する方法も提供する。好ましくは、単一の乳酸菌株を用い、または、乳酸菌株または乳酸菌株の組成物の組み合わせを用いる。したがって、用いられる乳酸菌株は、具体的には、Lactobacillus sanfranciscensis株、Lactobacillus rossiae株、Lactobacillus brevis株、または、Lactobacillus plantarum株、より具体的には、DSM26024株、DSM23090株、DSM23091株、DSM23200株、DSM23092株、DSM23093株、DSM23201株、DSM23174株およびDSM23121株、またはそれらから培養される株、さらにより具体的には、DSM23090株またはDSM23093株である。

【0061】

本発明の別の態様は、上述の腸疾患の治療および/または予防における使用のための、

10

20

30

40

50

微生物によって産生されるアセチルコリンである。アセチルコリンは、好ましくは、本発明の微生物によって産生され得る。微生物は、好ましくは乳酸杆菌科、例えば、乳酸菌株、具体的には、*Lactobacillus sanfranciscensis* 株、*Lactobacillus rossiae* 株、*Lactobacillus brevis* 株、または、*Lactobacillus plantarum* 株である。腸疾患は、上述の腸疾患、例えば、炎症性腸疾患または機能性腸疾患を含む。好ましくは、疾患は、過敏性腸症候群および/または腸神経系により制御される腸壁の分泌と関連する疾患である。微生物によって産生されるアセチルコリンは、例えば食品および/または飼料製品に添加されて経口で投与され得る。添加は、本発明の微生物を用いた食品および/または飼料製品の製造の間に、食品および/または飼料製品の発酵のために行なってもよい。そのような発酵食品の製品は、サワードウブレッドであってよく、ここで、生きた微生物は、熱によるベーキングの段階中に死滅し、微生物により産生されたアセチルコリンを含むサワードウブレッドをもたらす。微生物によって産生されるアセチルコリンの含有量は、約5~1000mgアセチルコリン/kg食品または飼料製品の範囲であり、好ましくは約20~500mgアセチルコリン/kg飼料製品または食品製品の範囲、より好ましくは約40~200mgアセチルコリン/kg飼料製品または食品製品の範囲である。好ましくは、アセチルコリンの量は、推奨される1日の用量と同等とみなされる。

10

【0062】

さらに、本発明は、以下の実施例によって、より詳細に説明される。

【実施例】

20

【0063】

1) 方法および材料

1.1) サワードウおよびブレッド

サワードウ (*Vollsau*) を、乳酸菌 DSM 26024 株、DSM 23090 株、DSM 23091 株、DSM 23200 株、DSM 23092 株、DSM 23093 株、DSM 23201 株、DSM 23174 株および DSM 23121 株を含む、I 型サワードウライ麦スターターの伝統的な増殖により調製した。サワードウおよびサワードウブレッドの組成は：71%ライ麦粉、25%小麦粉、1.8%塩および2%パン粉 (pH 4.5、酸性度 9~10) である。生地を 298 で 1.5 時間焼いた。類似ブレッドは、2.5%炭酸水素ナトリウム、0.13%酢酸および1.2%乳酸でサワードウスターターを置き換えて、サワードウブレッドと同一であった。

30

【0064】

1.2) 代謝産物の分析

サワードウ、サワードウブレッドおよび類似ブレッドの水抽出物 (<10kDa)、ならびに、乳酸菌の MRS 増殖培地を、代謝産物の定量化のために、LC-MS/MS 分析に供した。分析前に、MRS 培地を、10kDa Vivaspin 500 フィルター (*Sartorius Stedim biotech, Goettingen, Germany*) を用いて濾過した。

【0065】

以下を用いてサンプルを測定した：

40

Dionex Ultra High Performance Liquid Chromatography Ultimate (登録商標) 3000 (*Dionex, Idstein, Germany*)

- ポンプ - HPG - 3400SD

- 脱ガス装置 - SRD - 3400

- オートサンプラー - WPS - 3000TSL

- カラムオープン - TCC - 3000SD

API 4000 QTRAP、線形イオントラップ四重極質量分析計 (*AB Sciex, Darmstadt, Germany*) :

- イオン化型 - エレクトロスプレーイオン化 (ESI)

50

- 機器制御 - Analyst software (AbSciex, Darmstadt, Germany)
- 固定相: TSK Gel Amide-80 3 μ m (150 \times 2mm, Tosoh Bioscience, Stuttgart, Germany)
- 固定相温度: 40
- 移動相:

【表1】

溶離液A:	アセトニトリル/水中5mM/Lの酢酸アンモニウム(95+5)			
溶離液B:	水中5mM/Lの酢酸アンモニウム(95+5)			10
グラジエント:	0分	90%A	10%B	
	5分	90%A	10%B	
	10分	80%A	20%B	
	15分	50%A	50%B	
	18分	0%A	100%B	
	21分	0%A	100%B	
	24分	90%A	10%B	
	30分	90%A	10%B	20
流速:	200 μ l/分			

【0066】

クロマトグラムはMultiquant 2.0 (AbSciex, Darmstadt, Germany)を用いて分析し、サンプル中の濃度は標準スペクトルに従って計算した。

【0067】

1.3) 抽出

サワードウ、サワードウブレッドおよび類似ブレッドを、凍結乾燥し、粉末にすり碎いた。100gの粉末化されたブレッドまたはサワードウを、500mLの蒸留水中に可溶化し、50で3時間、常時攪拌して抽出した。懸濁液を9000rpmで20分遠心分離した。上清を回収して4に保持した。ペレットを再度500mLの蒸留水中に再懸濁し、3時間抽出を繰り返した。遠心分離後、ペレットを再度500mLの蒸留水中に再懸濁し、一晚抽出した。3回の抽出ステップ後の上清(合計容量は約1.5L)を一緒にプールし、0.2 μ m、除外閾値100kDaおよび10kDaの、Vivaflow 200カセット(Sartorius, Goettingen, Germany)を用いて、段階的に濾過した。除外閾値100kDaおよび10kDaの濾液を凍結乾燥し、インピトロ分析のために、蒸留水中で25%に再懸濁した。10gの<10kDa画分を、100gの凍結乾燥したブレッドおよびサワードウから抽出した。

【0068】

1.4) エンドトキシンの測定および除去

サワードウ、サワードウブレッドおよび類似ブレッド由来の水抽出物中の、エンドトキシン濃度の測定を、Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Chromogenic Endpoint Assay (Hycult biotech, Uden, Netherlands)を用いて決定した。アッセイは、製造業者の説明書に従って行なった。溶液からパイロジェンを結合して除去する、固定化ポリミキシンBを有する樹脂を含む、Detoxi-Gel™ Endotoxin Removing Columns (Thermo Scientific, Rockford, USA)を用いて、サワードウ、サワードウブレッドおよび類似ブレッド由来の水抽出物中の、エンドトキシン混入を除去した。エンドトキシンの除去は、製造業者の説明書に従って行な

った。

【0069】

1.5) ELISA

細胞培養上清中の、インターフェロン誘導タンパク質 (IP-10) (ミューリン/ヒト) および (ミューリン) 濃度を、適切な ELISA キット (R&D Europe, Abington, England) を用いて製造業者の説明書に従って決定した。ELISA は、Nunc MaxiSorp (登録商標) 平底96ウェルプレート (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany) を用いて行なった。手短には、96ウェルプレートを、一晚室温で、適切な捕捉抗体を用いてコーティングした。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を用いてプレートを3回洗浄し、PBS 中1%のウシ血清アルブミンでブロッキングし、細胞培養上清とともに室温で1.5時間インキュベートした。プレートを洗浄し、適切な検出抗体とともに室温で1.5時間インキュベートした。プレートを洗浄し、検出酵素とともにインキュベートした。プレートを洗浄し、基質溶液とともにインキュベートした。基質と検出酵素の反応の測光分析により、タンパク質濃度を決定した。

10

【0070】

1.6) 細菌培養

サワードウから分離した *L. rossiae* (DSM 26024) および *L. sanfranciscensis* 株 (DSM 23090、DSM 23091、DSM 23092、DSM 23093、DSM 23174、DSM 23200、DSM 23201)、*L. sanfranciscensis* 基準株 DSM 20451 (DSMZ GmbH, Braunschweig, Germany)、*L. plantarum* FUA 3038、および、*L. brevis* 3113 (カナダ・アルバータ大学の Ganzle 教授より提供)、*L. paracasei* VSL #3 (イタリア・L'Aquila の De Simone 博士より提供) を、30℃にて、Anaerogen packages (Anaerogen, Basingstoke, Oxford, UK) を用いて、嫌気的条件下で、新しく添加した0.15%のL-システインを含むMRSプロス (pH 5.4) 中で増殖させた。固定化細菌 (5%ホルムアルデヒド、4時間、4℃) を、使用前に滅菌PBSを用いて3回洗浄した。一晚 (anovernight) の培養からの細菌 (5×10^7 cfu/ml) を、DMEM (1%グルタミン、20mM HEPES) および嫌気的 (anaerobic) 培養に30℃で一晩移行させることにより、濃縮された馴化培地 (CM) を作製した。細菌および細菌上清 (CM) を、遠心分離 (4500g、10分、室温) の後に分離した。CMをpH 7.4に調節し、フィルター滅菌し (0.22 μm)、そして、100kDaの排除サイズを有するVivacellフィルターシステム (Satorius Stedim Biotech, Goettingen, Germany) を用いて濃縮した (100x)。濃縮馴化培地を、細胞培養刺激実験において、1x希釈した。上述のそれぞれの培地に1.5%の寒天を添加することにより、寒天プレートを得た。

20

30

【0071】

1.7) 運動性

Dunkin Hardley モルモット (Sulzfeld and Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln, Germany) 由来のコーパス環状筋調製物を用いて、運動性測定を行なった。LabChart 5ソフトウェア (AD Instruments, Spechbach, Germany) を用いて、浴槽 (organ bath) 中で、力変換器を用いて筋肉の収縮力を測定した。手短には、胃の筋組織を粘膜層から切断して、続いて、氷冷調製 Krebs 溶液 (pH 7.4) ($MgCl_2 \times 6H_2O$ 1.2mM、 $CaCl_2 \times 2H_2O$ 2.5mM、 NaH_2PO_4 1.2mM、 $NaCl$ 117mM、 $NaHCO_3$ 25mM、 $C_6H_{12}O_6$ 11mM、 KCl 4.7mM) を灌流した。コーパス環状筋の1.5cm²片を切り取り、37℃で、2つの電極間に、ポリアミドスレッドを用いて、両端から、20mLの実験用 Kr

40

50

e b s 溶液 (N a H C O ₃ が 2 0 m M である点を除き調製 K r e b s と同一) 中の浴槽中へ載せて、カルボゲン (9 5 % O ₂ および 5 % C O ₂) を用いて連続的に通気した。4 5 分の平衡期間後、筋肉調製物を電場刺激 (E F S) により刺激し、バイタリティを試験した。実験的処理と同様に E F S の間の収縮力の変化を力変換器により測定した。任意の処理間のタイムラプスは常に 2 0 分であった。

【 0 0 7 2 】

1 . 8) ウッシングチャンバー

腸管上皮を横切るイオンの動きを、ウッシングチャンバー技術 (E a s y m o u n t c h a m b e r s , P h y s i o l o g i c i n s t r u m e n t s , S a n D i e g o , U S A) および、L a b C h a r t 5 ソフトウェア (A D I n s t r u m e n t s , S p e c h b a c h , G e r m a n y) を用いて測定した。手短には、D u n k i n H a r d l e y モルモット (S u l z f e l d a n d H a r l a n W i n k e l m a n n G m b H , B o r c h e n , G e r m a n y) の遠位結腸片を切断し、筋肉層を除去し、粘膜 / 粘膜下組織の調製物を、記録領域 0 . 5 c m ² を有するスライダに載せた。頂端側および基底側を、5 m L の K r e b s 溶液中に別々に浸した。実験手順の間、浴槽は 3 7 ° に維持し、カルボゲン (9 5 % O ₂ および 5 % C O ₂) を用いて連続的に通気した。4 5 分の平衡期間後、組織を電気刺激して (パラメータ : 刺激強度 6 V 、持続時間 1 0 秒、周波数 1 0 H z 、単一パルス持続時間 0 . 5 m s) 、組織バイタリティを評価した。能動イオン輸送の評価のために、短絡電流 (I _{S C}) を適用することにより、組織を横切る受動イオン輸送によって形成される自然発生の経上皮電圧 (V _{T E}) を 0 m V に設定した。能動的な (a c t i v e) 塩化物イオン分泌が誘導されると、V _{T E} を 0 m V に維持するために I _{S C} の増加が必要であることが分かる。I _{S C} の変化は、アニオン分泌またはカチオン吸引により生じる電流に等しい。各実験の最初および最後に組織の経上皮抵抗性 (T E R = V _{T E} / I _{S C} × 1 0 0 0 / 2) を測定して、組織の完全性を評価した。

【 0 0 7 3 】

1 . 9) 統計分析

データを平均値 ± 標準偏差 (S D) として示す。全ての統計的計算は、処理群と、対応するコントロール群とを比較する、S t a t i s t i c a l p r o g r a m m i n g p l a t f o r m R を用いて行ない、独立 t 検定を用いて分析した。様々な処理群と、対応するコントロール群とを比較するデータを、O n e - W a y A N O V A を用いて分析し、その後、適切な多重比較の手順を行なった。データが正規分布に従わない、または不連続なデータを含む場合は、ノンパラメトリック検定 (M a n n - W h i t n e y / 順位和検定、順序に基づく (o n r a n k s) A N O V A) を用いた。p 値が 0 . 0 5 未満 (*) または 0 . 0 1 未満 (* *) である場合に、有意差とみなした。主成分分析 (P C A) をピアソン、K (O n L i n e s a n d P l a n e s o f C l o s e s t F i t t o S y s t e m s o f P o i n t s i n S p a c e , P h i l o s o p h i c a l M a g a z i n e (1 9 0 1) , 2 (1 1) , 5 5 9 - 5 7 2 、および、T h e o d o r i d i s , G . , G i k a , H . G . , W i l s o n , I . D . ; L C - M S - b a s e d m e t h o d o l o g y f o r g l o b a l m e t a b o l i t e p r o f i l i n g i n m e t a b o n o m i c s / m e t a b o l o m i c s , T r A C T r e n d s i n A n a l y t i c a l C h e m i s t r y (2 0 0 8) , 2 7 (3) , 2 5 1 - 2 6 0) で記載する。

【 0 0 7 4 】

2 .) 結果

2 . 1) サワードウ、サワードウブレッドおよび類似ブレッド由来の抽出物中の、代謝産物の L C - M S / M S 分析

サワードウおよび生のサワードウ (r a w s o u r d o u g h) のサワードウブレッドの水可溶性抽出物 (< 1 0 k D a 、トリプレケート) に対する発酵の効果を比較するために、3 つの異なるバッチから調製したサワードウブレッドおよび類似ブレッドを L C -

10

20

30

40

50

MS/MS分析に供した。抽出物中の代謝産物濃度は、公知濃度の代謝産物を有する標準溶液に対する比較により決定した。

【0075】

主成分分析(PCA)は、サワードウ、サワードウブレッドおよび類似ブレッドから分離された代謝産物において、有意差を示した(図1)。生のサワードウは、有意により多量のフリーのアミノ酸を有し、内在性の小麦粉の酵素(endogenous flour enzyme)および乳酸菌プロテアーゼの、タンパク質分解活性を反映する。焼く前に、新しい未発酵の小麦粉をサワードウに添加して、類似ブレッドとサワードウブレッドとの間に、フリーのアミノ酸含有量の違いがない理由を説明する。アセチルコリンは、サワードウおよびサワードウブレッドには一貫して存在するが類似ブレッドには存在しない、代謝産物である(表1)。サワードウ細菌による発酵は、サワードウブレッドと類似ブレッドとの間の唯一の違いであり、アセチルコリンは、サワードウ中に存在する微生物により産生されることを示唆する。

10

【0076】

【表2】

表1: 乾燥ブレッド中に38.6 mg/kgの多量のアセチルコリンを含む、サワードウおよびサワードウブレッド。標準的な濃度のアセチルコリンを有する溶液の面積に対してピーク面積を比較することにより、LC-MS/MSを用いて濃度を決定した。

水抽出物	水抽出物中のACH濃度	ブレッドまたはサワードウ中のACH濃度(乾燥質量)
サワードウ, 10 kDa	1819 ± 717 μM	26.5 ± 10.4 mg/kg
サワードウブレッド, 10 kDa	2644 ± 273 μM	38.6 ± 4.03 mg/kg
類似ブレッド, 10 kDa	44.5 ± 1.0 μM	0.64 ± 0.03 mg/kg

20

【0077】

2.2) サワードウ由来のアセチルコリンは、インビトロで筋収縮を引き起こす。

アセチルコリン(ACH)は神経伝達物質であり、筋細胞上のムスカリン性(mACHR)またはニコチン性ACH受容体(nACHR)のいずれかを刺激することにより胃腸管内の運動性を活性化するのに関与する。サワードウ由来のアセチルコリンが、この活性を模倣するかどうか判定するために、モルモットの分離したコーパス筋を、サワードウ、サワードウブレッドおよび類似ブレッドの抽出物を用いて刺激し、収縮刺激を測定した。サワードウおよびサワードウ抽出物の両方とも、アセチルコリンと同様に、同等の濃度で筋収縮を誘導したが、類似ブレッド抽出物では誘導しなかった(図2)。アトロピン(mACHR特異的アンタゴニスト)を用いて、ムスカリン性またはニコチン性ACHRを活性化することにより抽出物が収縮を刺激するかどうか判定した。アトロピンを用いた筋条片の事前処理は、ACHならびにサワードウおよびサワードウブレッドの抽出物による刺激を完全に無効にし、サワードウ由来のアセチルコリンがmACHRを介して作用していることを示した。

30

【0078】

さらに、サワードウ由来のACHが、神経の活性化(その結果として筋細胞を刺激する)を介して作用するかどうかを明確にするために、筋肉調製物をテトロドトキシン(TTX)で事前処理した。TTXは、神経により生じる活動電位を阻害し、下流のシグナル伝達を無効にする。TTXの事前処理は、アセチルコリンおよび抽出物により誘導される筋収縮に有意な効果がなく、両方とも、筋細胞上のmACHRを直接活性化することを示した(図3)。運動性は、GI管の極めて重要な機能の一つである。セロトニン(5-ヒドロキシトリプタミン)受容体のアゴニストおよびアンタゴニストは、運動性(およびその結果として、IBS患者の便通)を調節するための一般的な処置選択肢である(Camilleri, M. and V. Andresen, Current and novel therapeutic options for irritable bowel

40

50

syndrome management. Dig Liver Dis, 2009. 41(12): p. 854-62)。これらの知見は、局所でのA C Hの外部適用を用いてE N S仲介の運動性を調節することも可能であることを示す。

【0079】

2.3) サワードウ由来のアセチルコリンは、管腔側由来の腸粘膜による分泌を刺激する。

腸神経により腸壁の漿膜側へ放出されるアセチルコリン(A C H)は、粘膜による塩化物イオンの分泌を刺激し、続いて、管腔中への水の受動輸送を行なう。この作用は、アセチルコリンエステラーゼによるアセチルコリンの迅速な分解のため一過的である。腸の分泌機能に対するサワードウ由来のA C Hの効果を、モルモット結腸において試験した。サワードウ、サワードウブレッド、類似ブレッドの抽出物、ならびに、(純粋な)A C Hを、モルモット遠位結腸由来の腸粘膜/粘膜下組織調製物の、管腔(粘膜)側または漿膜側のいずれかに適用した。実験はウッシングチャンパー内で行ない、短絡電流(I_{sc})の変化を測定した。このシステムでは、能動イオン輸送のみが測定されるように、調製物にわたって電気的で浸透性の流体静力学および化学的勾配のバランスを取ることににより、組織または上皮細胞層を横切るイオンの受動流動を除外する。ウッシングチャンパー中で、組織の各側付近に電極を置き、能動イオン輸送の結果として産生される、上皮にわたる自然発生の電位差(P D)の検出を可能にする(Hirota, C. L. and McKay D. M., Cholinergic regulation of epithelial ion transport in the mammalian intestine, Br. J. Pharmacol., 2006, 149(5): p. 463-79)。驚くことに、粘膜側および漿膜側からの両方とも、A C HおよびA C H含有抽出物(類似ブレッド抽出物は効果がなかった)により調製物を刺激すると、 I_{sc} の増加が見られ(図4)、サワードウおよびサワードウブレッド中のアセチルコリンは、刺激に適切であることが示された。

【0080】

組織をアトロピンで事前処理し、分泌に対する抽出物の効果を再度測定した(図5)。アトロピンは、応答を完全に無効にして、サワードウ抽出物の分泌促進効果におけるmA C H Rの役割を確証した。

【0081】

以前の研究は、基底側上の腸上皮細胞におけるA C H Rの発現の証拠を示すが、細胞層の頂端側上ではない(Hirota, C. L. and McKay D. M., Cholinergic regulation of epithelial ion transport in the mammalian intestine, Br. J. Pharmacol., 2006, 149(5): p. 463-79)。したがって、頂端側から適用されるA C Hは、細胞層を横切って、基底側上の受容体を刺激する可能性が高い。この仮説は、A C Hを頂端(すなわち粘膜または管腔側)に適用すると、アトロピンを粘膜側ではなく漿膜側に適用した場合に分泌効果が有意に阻害されるという事実により確認された(図6)。漿膜側に適用したアトロピンは、基底側上の全てのmA C H Rを阻害し、A C H活性を無効にした。しかしながら、アトロピンを粘膜側に適用すると、これは、基底側に到達する量をより少量にして、したがって、部分的にのみA C H活性を阻害する。アトロピンが上皮層を横切って、基底側のmA C H Rを阻害することができるという知見は、A C Hを漿膜に、そしてアトロピンを粘膜に適用すると、分泌が阻害されるという事実により確認された(データ示さず)。

【0082】

これらの知見は、局所でA C Hの外部適用を用いて、E N Sが仲介する液分泌を調節することもできることを示す。腸内への液分泌は、酵素消化に理想的な環境を提供し、腸管を通した排泄物の通過を促進すると仮定されるので、これは特に重要である。さらに、最近の研究は、急性で局所的に標的化された水分泌が、特定の機械的ストレスの箇所における上皮損傷に対する防護手段としての役割を果たすことを示唆する(Barrett, K

10

20

30

40

50

. E. and S. J. Keely, Chloride secretion by the intestinal epithelium: molecular basis and regulatory aspects. *Annu Rev Physiol*, 2000. 62: p. 535 - 72、および、Sidhu, M. and H. J. Cooke, Role for 5-HT and ACh in submucosal reflexes mediating colonic secretion. *Am J Physiol*, 1995. 269 (3 Pt 1): p. G346 - 51)。

【0083】

2.4) LC-MS/MS分析は、サワードウ乳酸菌の増殖培地中の、アセチルコリンの存在を明らかにした。

サワードウから単離した *L. rossiae* (DSM 26024) および *L. sanfranciscensis* の7株 (DSM 23090 ~ DSM 23201)、別のサワードウから単離した *L. brevis* 3113 および *L. plantarum* FUA 3038、および、*L. paracasei* (VSL #3) を、MRS培地中で24時間増殖させた。増殖培地を回収して濾過し、LC-MS/MSを用いて分析した。

【0084】

PCA分析は、*L. paracasei*と比較して、全てのサワードウ単離細菌の代謝産物プロファイルにおいて有意差を示す。その違いは、*L. paracasei*培地中には存在しないがサワードウ細菌増殖培地中に存在する、アセチルコリンの影響に主に起因する(図7)。24時間にわたってACHを最も多く産生するのは、*L. brevis* 3113であり、さらに、それは増殖速度が最も高い(図8A)。しかしながら、濃度を細菌数(例えば培地中、 10^6 /ml)に合わせると、*L. sanfranciscensis* DSM 23090株およびDSM 23093株が、細菌細胞あたり最も多くACHを産生する(図8B)。

【0085】

2.5) サワードウ乳酸菌は、TNF活性化腸上皮細胞によるケモカインIP-10の分泌を阻害する。

Lactocepin PrtP (*L. paracasei* (VSL #3)で発現されるセリンプロテアーゼ)は、炎症促進性ケモカインインターフェロン誘導タンパク質10 (IP-10)を選択的に分解する。*PrtP*が本発明の乳酸菌中にも存在するかどうか調べるために、サワードウ8株:*L. sanfranciscensis* (DSM 23090、DSM 23091、DSM 23092、DSM 23093、DSM 23174、DSM 23200、DSM 23201) および *L. rossiae* (DSM 26024)、ならびに、陽性コントロールとして *L. paracasei* から、全ての細菌DNAを分離した。*Lactocepin PrtP* 特異的なプライマーを用いてDNAを増幅し、アガロースゲル上で可視化した。サワードウから単離した乳酸菌中には、検出可能な量の *lactocepin PrtP* 遺伝子は存在しなかった。サワードウ乳酸菌8株および *L. paracasei* を、無刺激およびTNF活性化Mode-K細胞による、炎症促進性ケモカインIP-10の分泌に対するそれらの効果に関して試験した。興味深いことに、*Lactocepin PrtP* 遺伝子は検出されなかったという事実にもかかわらず、馴化培地(図9)および固定化乳酸菌(図10)の両方とも、IP-10阻害活性を示した。このことは、サワードウ乳酸菌により産生される、炎症促進性ケモカインIP-10の分泌を阻害するのに適切な分泌型および細胞表面結合型の両方の因子が存在することを示唆する。この結果は、IBD患者において再度押し寄せる腸炎症にIP-10が関与しているので、IBDの潜在的な治療およびそれらの症状の軽減の基礎を提供する。

10

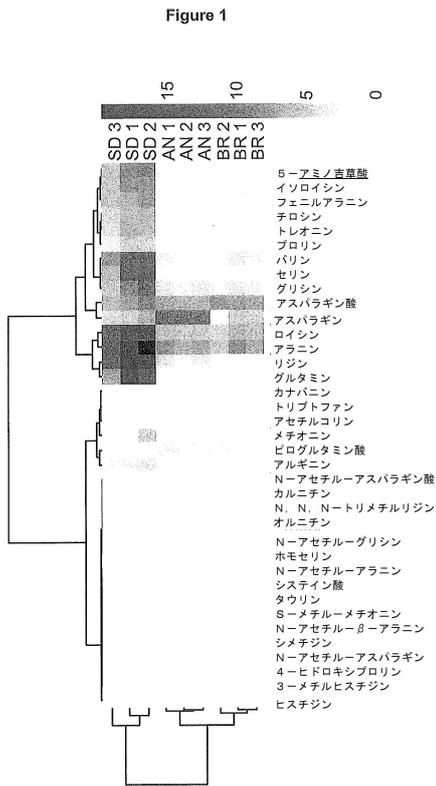
20

30

40

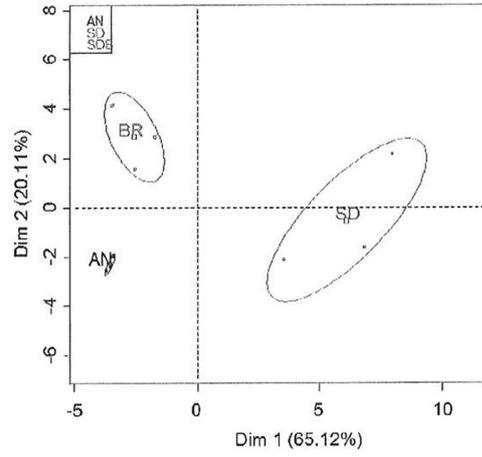
【 図 1 A 】

A



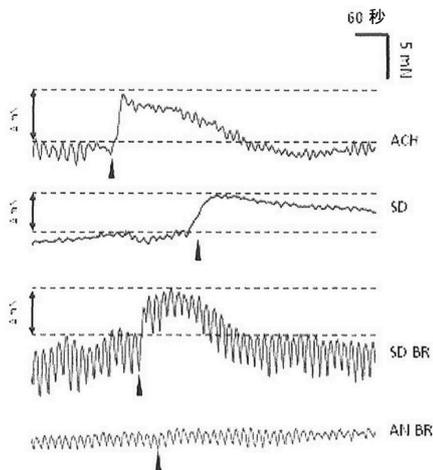
【 図 1 B 】

B



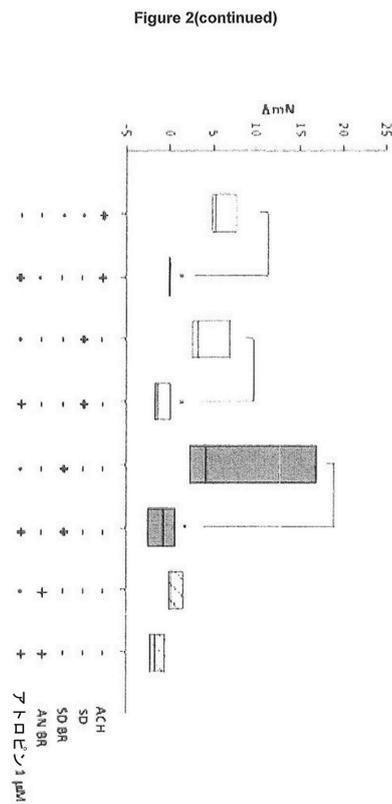
【 図 2 A 】

A



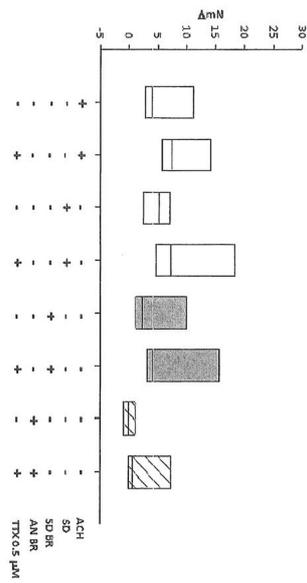
【 図 2 B 】

B



【 図 3 】

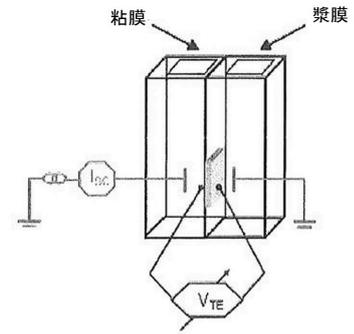
Figure 3



【 図 4 A 】

Figure 4

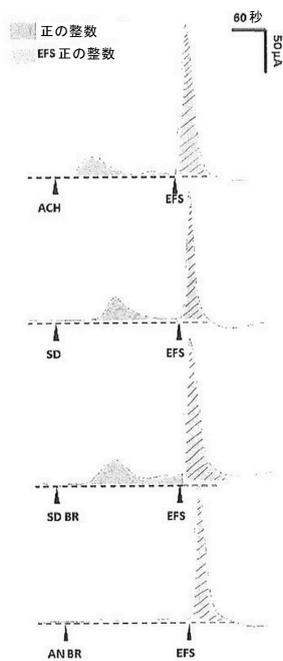
A



【 図 4 B 】

Figure 4(continued)

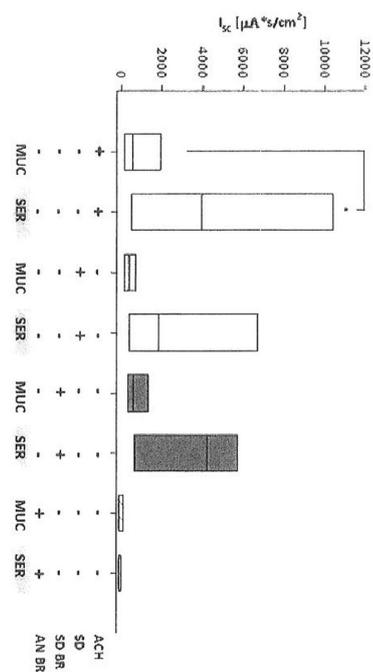
B



【 図 4 C 】

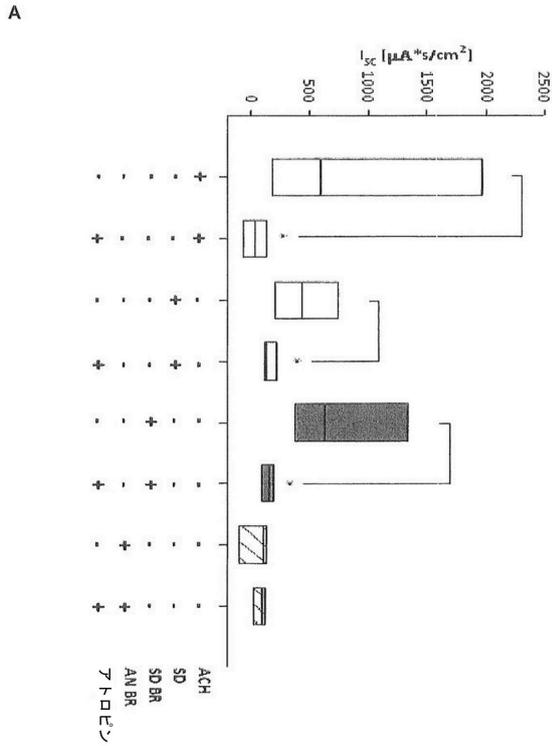
Figure 4 (continued)

C



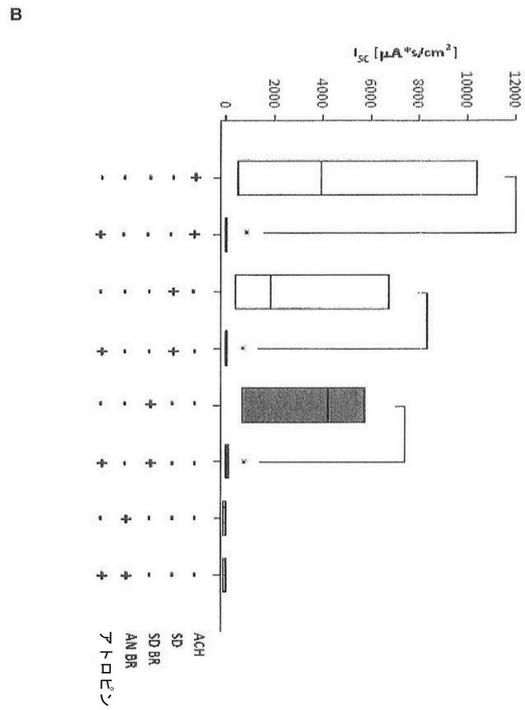
【 5 A 】

Figure 5



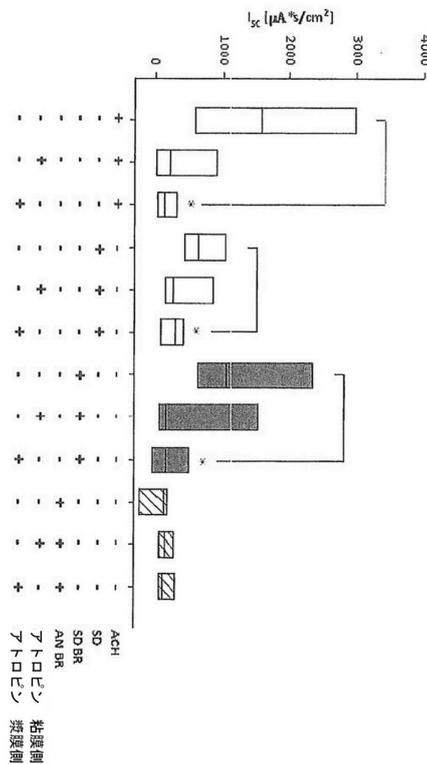
【 5 B 】

Figure 5 (continued)



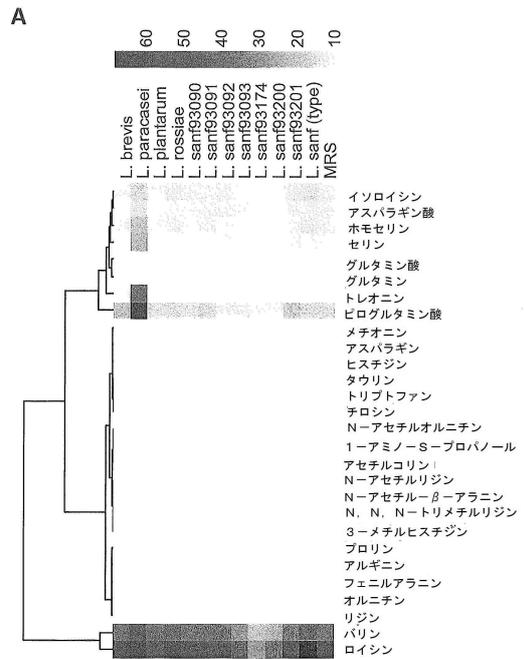
【 6 】

Figure 6



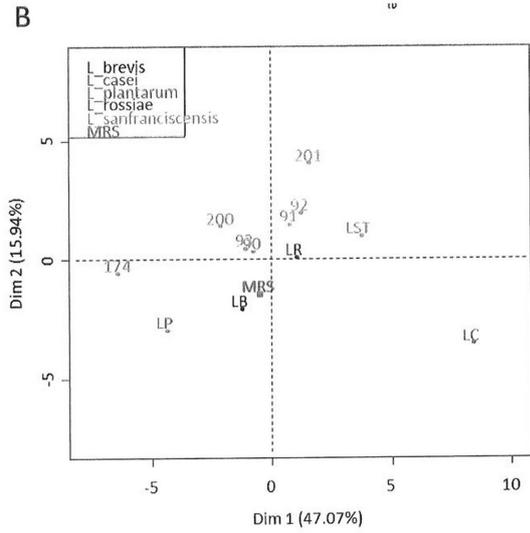
【 7 A 】

Figure 7



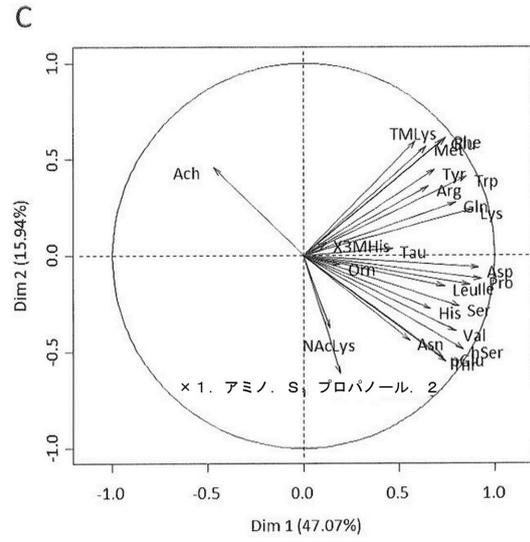
【 7 B 】

Figure 7 (continued)



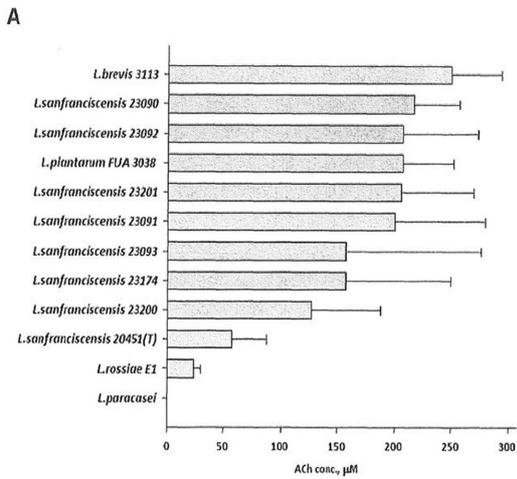
【 7 C 】

Figure 7 (continued)



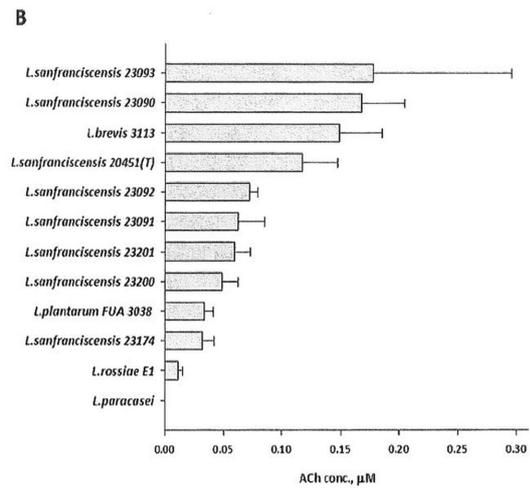
【 8 A 】

Figure 8



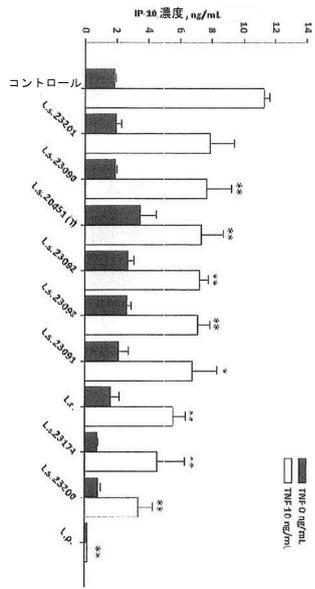
【 8 B 】

Figure 8 (continued)



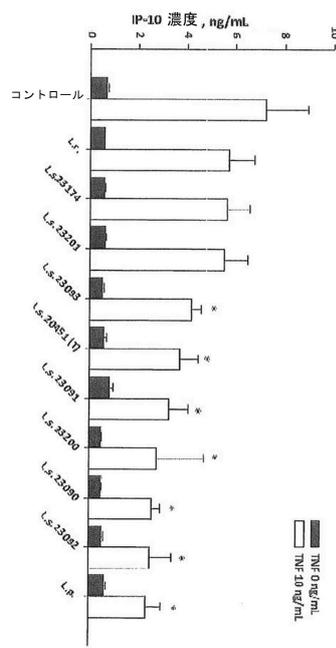
【 図 9 】

Figure 9



【 図 10 】

Figure 10



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 2 1 D 8/04 (2006.01)		A 2 1 D 8/04
A 6 1 K 45/00 (2006.01)		A 6 1 K 45/00
A 6 1 K 31/221 (2006.01)		A 6 1 K 31/221
C 1 2 P 13/00 (2006.01)		C 1 2 P 13/00

微生物の受託番号 DSMZ DSM 23093
 微生物の受託番号 DSMZ DSM 23201
 微生物の受託番号 DSMZ DSM 23174
 微生物の受託番号 DSMZ DSM 23121
 微生物の受託番号 DSMZ DSM 26024

前置審査

- (72)発明者 メイヤー ユルゲン
 ドイツ国 ミュンヘン 8 0 3 3 5 クライットマイヤーシュトラッセ 5 ラドウィッグ スト
 ッカー ホフフェイステレイ ゲーエムベーハー内
- (72)発明者 ハラー ダーク
 ドイツ国 フライジング 8 5 3 5 0 グレゴール メンデル シュトラッセ 2 テクニーシェ
 ユニベルシテート ミュンヘン内
- (72)発明者 チェンチャク アナ
 ドイツ国 フライジング ヴァイエンシュテファン 8 5 3 5 0 グレゴール メンデル シュト
 ラッセ 2 テクニーシェ ユニベルシテート ミュンヘン内
- (72)発明者 ホフマン トーマス
 ドイツ国 フライジング ヴァイエンシュテファン 8 5 3 5 0 リーゼ マイトナー シュトラ
 ッセ 3 4 テクニーシェ ユニベルシテート ミュンヘン内
- (72)発明者 ダンケル アンドレアス
 ドイツ国 フライジング ヴァイエンシュテファン 8 5 3 5 0 リーゼ マイトナー シュトラ
 ッセ 3 4 テクニーシェ ユニベルシテート ミュンヘン内
- (72)発明者 シェーマン マイケル
 ドイツ国 フライジング ヴァイエンシュテファン 8 5 3 5 0 リーゼル ベックマン シュト
 ラッセ 4 テクニーシェ ユニベルシテート ミュンヘン内
- (72)発明者 クルーガー ダグマー
 ドイツ国 フライジング ヴァイエンシュテファン 8 5 3 5 0 リーゼル ベックマン シュト
 ラッセ 4 テクニーシェ ユニベルシテート ミュンヘン内

審査官 鈴木 崇之

- (56)参考文献 特表2009-543576(JP,A)
 特表2016-502402(JP,A)
 BIOPSYCHOSOCIAL MEDICINE, 2012年, Vol. 6, No. 1, pp. 1/8-8/8
 Appl. Environ. Microbiol., 2009年, Vol. 75, No. 4, pp. 1099-1109
 MICROBIAL CELL FACTORIES, 2011年, Vol. 10, No. SUPPL.1, S6(pp. 1-11)
 INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY, 2007年, Vol. 114, No. 1, pp. 69-82
 J. Appl. Microbiol., 2007年, Vol. 103, pp. 821-835
 J. Gen. Microbiol., 1947年, Vol. 1, No. 3, pp. 279-298
 Appl. Environ. Microbiol., 1977年, Vol. 34, No. 2, pp. 237-239
 BIOESSAYS, 2011年, Vol. 33, No. 8, pp. 574-581

WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY , 2 0 1 2 年 , Vol. 18, No. 30 , pp. 4012-4018
Am. J. Physiol. , 1 9 6 9 年 , Vol. 216, No. 2 , pp. 343-347
Br. J. Pharmacol. , 2 0 0 6 年 , Vol. 149 , pp. 463-479
Int. Med. J. , 2 0 0 9 年 , Vol. 39, No. 2 , pp. 103-109

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 1 / 2 0 - 1 / 2 1

C 1 2 P 1 3 / 0 0

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

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

P u b M e d