

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2008-245576

(P2008-245576A)

(43) 公開日 平成20年10月16日(2008.10.16)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 1/20 (2006.01)	C12N 1/20 A	4B018
A61K 35/74 (2006.01)	A61K 35/74 A	4B065
C08B 37/00 (2006.01)	A61K 35/74 G	4C086
A61K 31/715 (2006.01)	C08B 37/00 P	4C087
A61P 29/00 (2006.01)	A61K 31/715	4C090
審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 22 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2007-91065 (P2007-91065)

(22) 出願日 平成19年3月30日 (2007.3.30)

(出願人による申告)平成18年度、経済産業省、地域新生コンソーシアム研究開発事業(新規乳酸菌差別化技術を利用した機能性発酵乳・健康食品素材)に関する委託契約に基づき産業再生法第30条の適用を受ける特許出願

(71) 出願人 591181894

よつ葉乳業株式会社

北海道河東郡音更町新通20丁目3番地

(71) 出願人 504300088

国立大学法人帯広畜産大学

北海道帯広市稲田町西2線11番地

(71) 出願人 506206133

ニュテックス株式会社

北海道帯広市稲田町西2線11番地 国立大学法人帯広畜産大学地域共同研究センター内

(71) 出願人 500503551

株式会社生物有機化学研究所

北海道札幌市清田区美しが丘四条9丁目2番1号

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫調節作用が期待できる乳酸菌及び菌体外多糖類

(57) 【要約】

【課題】 ヒトや動物における経口的な投与による免疫調節作用が期待できる乳酸菌と菌体外多糖類を提供すること。

【解決手段】 3位置換グルコース、6位置換ガラクトース、2位3位置換グルコースおよび非還元末端グルコースから成る4糖繰り返しを単位とする主要成分と、3位置換グルコース、6位置換ガラクトース、2位3位置換グルコースおよび非還元末端ガラクトースから成る4糖繰り返しを単位とするマイナー成分と、から構成される多糖類を産生することを特徴とする、新規な乳酸菌ラクトバチルス・ファーメントム(Lactobacillus fermentum) TDS030603株、該乳酸菌が産生する菌体外多糖類、免疫調節作用が期待できる新規な乳酸菌ラクトバチルス・ヘルペティカス TDS030903株、これらを含有する食品、免疫調節剤並びに物性改善剤を提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

3 位置換グルコース、6 位置換ガラクトース、2 位 3 位置換グルコースおよび非還元末端グルコースから成る 4 糖繰り返しを単位とする主要成分と、3 位置換グルコース、6 位置換ガラクトース、2 位 3 位置換グルコースおよび非還元末端ガラクトースから成る 4 糖繰り返しを単位とするマイナー成分と、から構成される多糖類を産生することを特徴とするラクトバチルス・ファーメンタム (*Lactobacillus fermentum*)。

【請求項 2】

ラクトバチルス・ファーメンタムが T D S 0 3 0 6 0 3 株 (N I T E A P - 3 3 8) である請求項 1 に記載のラクトバチルス・ファーメンタム。

10

【請求項 3】

3 位置換グルコース、6 位置換ガラクトース、2 位 3 位置換グルコースおよび非還元末端グルコースから成る 4 糖繰り返しを単位とする主要成分と、3 位置換グルコース、6 位置換ガラクトース、2 位 3 位置換グルコースおよび非還元末端ガラクトースから成る 4 糖繰り返しを単位とするマイナー成分と、から構成される多糖類。

【請求項 4】

請求項 1 あるいは 2 に記載のラクトバチルス・ファーメンタムの菌体を、生菌で 10^7 / g 以上、あるいは死菌体で 0 . 1 ~ 1 0 0 重量 % 含有することによって免疫調節作用が期待できる食品又は食品用素材。

20

【請求項 5】

請求項 3 に記載の多糖類を食品中に 0 . 1 ~ 1 0 0 重量 % 含有することによって免疫調節作用が期待できる食品又は食品用素材。

【請求項 6】

請求項 1 あるいは 2 に記載のラクトバチルス・ファーメンタムの菌体を有効成分として含有する免疫調節剤。

【請求項 7】

請求項 3 に記載の多糖類を有効成分として含有する免疫調節剤。

【請求項 8】

請求項 3 に記載の多糖類を有効成分として含有する物性改善剤。

30

【請求項 9】

免疫調節作用が期待できるラクトバチルス・ヘルペティカス T D S 0 3 0 9 0 3 株 (N I T E A P - 3 3 9) 。

【請求項 10】

請求項 9 に記載のラクトバチルス・ヘルペティカス T D S 0 3 0 9 0 3 株の菌体を 0 . 1 ~ 1 0 0 重量 % 含有することによって免疫調節作用が期待できる食品又は食品用素材。

【請求項 11】

請求項 9 に記載のラクトバチルス・ヘルペティカス T D S 0 3 0 9 0 3 株の菌体を有効成分として含有する免疫調節剤。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫調節作用が期待できる乳酸菌及び該乳酸菌が産生する菌体外多糖類、これらを用いた食品、これらを有効成分として含有する免疫調節剤、並びに物性改善剤に関する。

【背景技術】

【0002】

乳酸菌を摂取することが動物や人の健康に寄与すると考えられていることは、すでに広く知られたことである (例えば非特許文献 1 ~ 3 参照)。その健康に寄与する効果のひとつに免疫調節効果がある。本明細書において免疫調節効果とは、人が摂取することで免疫

50

系に影響を与え、抗炎症作用、抗アレルギー作用、腫瘍増殖抑制作用などを示す効果のことを意味している。

【0003】

現在までに、乳酸菌の免疫調節作用については非常に多くの知見が知られているが、乳酸菌がもつ免疫調節効果は、それぞれの株に効果の程度が依存しており、どのような株を選択するかが重要である。それゆえ、単にラクトバチルス・ファーメンタム、あるいはラクトバチルス・ヘルペティカスということだけでは免疫調節作用を有しているとはいえない。

【0004】

ラクトバチルス・ファーメンタムの免疫調節効果に関係する特許文献としては、特許文献1～5などがある。

特許文献1は、ラクトバチルス・ファーメンタム変異株VRI003株に関する特許であるが、本発明のファーメンタム株とはL-アラビノース、マンノース、マルトース、トレハロースの発酵性において差異があり、全く異なるものである。

特許文献2は、ラクトバチルス・ファーメンタムの高濃度乳酸菌乾燥物をカプセルに充填することを特徴とする健康食品に関するものであるが、株の特徴付けがなされておらず、本発明のファーメンタム株を開示していない。

【0005】

特許文献3は、ラクトバチルス・ファーメンタムを含む乳酸菌とサッカロミセス・セレビシエとの混合培養物に関するものであり、一種類の乳酸菌のみで免疫調節効果を発揮する本発明とは明らかに異なる。

特許文献4は、ラクトバチルス・ファーメンタムCP34株がIgE抗体量を減少させることを開示しているが、糖発酵性が相違していることから、本発明と全く異なる株であることは明らかである。

【0006】

特許文献5は、インターロイキン-12(IL-12)の産生を促進する乳酸菌に関するものであり、具体例としてラクトバチルス・ファーメンタムATCC14931を挙げている。ラクトバチルス・ファーメンタムの種々の株が様々な免疫調節作用を有していることは既に知られているが、上述のように、選択する株によってその効果は異なる。それ故、特許文献5の開示によっても本発明の発明性は否定されない。

【0007】

本発明のラクトバチルス・ファーメンタムは、菌の詳しい同定がなされており、また、菌体外多糖類を産生するという際立った特徴を有している。しかも、その多糖類の基本構造が明らかにされ、また、マウスにおいて該多糖類の免疫調節作用が明らかにされている。それゆえ、本発明のファーメンタム株は、十分に特徴付けされた独自の菌株である。

【0008】

一方、ラクトバチルス・ヘルペティカスに関しては、特許文献6～8など、免疫調節効果にかかわる公知の情報がある。

特許文献6は、複数の乳酸菌株を組み合わせることで効果を得る抗腫瘍活性剤に関するもので、一種類の菌株のみで効果が得られる本発明とは異なる。

【0009】

特許文献7は、各種乳酸菌保存株について網羅的に、それを摂取させたBALB/cマウスでのIgEの産生量を調べ、実施例として示している。ここでは、ラクトバチルス・ヘルペティカスについてはATCC15009株が例示されているが、本発明のヘルペティカス株とは明らかに異なる。また、当該実施例によると、同じ種でも株によってIgEの産生量には著しい違いがあり、このような反応が株レベルで明確に異なることがわかる。

特許文献8は、複数種の乳酸菌と酵母を共生培養して得られる発酵乳を有効成分として含有する免疫増強組成物に関するものであるが、単一菌株による本発明とは別異のものである。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 0 】

このように、種々の乳酸菌株の摂取が動物の免疫調節作用を有することは良く知られていることであるが、より優れた免疫調節作用を有する乳酸菌株の提供が求められていた。

【 0 0 1 1 】

【非特許文献 1】Tannock, G. W.(1999).Probiotics, a critical review, Horizon scientific press.(ISBN:1 898486 15 8)

【非特許文献 2】Wood, B. J. B. (1999). the lactic acid bacteria in health and disease, AN Aspen Publication

【非特許文献 3】細野明義 編、発酵乳の科学 - 乳酸菌の機能と保健効果 -、アイ・ケイコーポレーション (2 0 0 2 年)

【特許文献 1】特表 2 0 0 5 - 5 3 7 7 9 1 号公報

【特許文献 2】特開 2 0 0 5 - 1 2 4 4 3 2 号公報

【特許文献 3】特開 2 0 0 4 - 9 1 4 3 3 号公報

【特許文献 4】特開 2 0 0 4 - 2 6 7 2 9 号公報

【特許文献 5】特開平 1 0 - 1 3 9 6 7 4 号公報

【特許文献 6】特開 2 0 0 5 - 9 7 2 8 0 号公報

【特許文献 7】特開平 9 - 2 9 5 9 号公報

【特許文献 8】特開 2 0 0 6 - 7 6 9 6 1 号公報

【 発 明 の 開 示 】

【 発 明 が 解 決 し よ う と す る 課 題 】

【 0 0 1 2 】

日本においては、国民の高齢化が進行し、その結果、国民医療費の高騰が大きな問題となっている。そこで、医療に頼るのではなく、単に食品として摂取するだけで、免疫力を高め、健康維持に役立てることができれば、医療費の低減に繋がり、国民の福祉に大きく寄与すると考えられる。

よって、本発明は、食品として摂取することにより、免疫力を高め、抗炎症作用、抗アレルギー作用、抗腫瘍作用などを発揮し、体質改善を図ることができる免疫調節剤を提供することを目的とする。

【 課 題 を 解 決 す る た め の 手 段 】

【 0 0 1 3 】

本発明者らは、上記のような課題を解決するひとつの手段として、免疫力を調節すると一般に信じられている発酵乳から、食べることで、免疫力を高め、アレルギーを低減し、癌の増殖に対して抑制効果を示すなどの免疫力を調節する作用を有する乳酸菌を探索してきた。

その結果、ラクトバチルス・ファーマンタム T D S 0 3 0 6 0 3 株とその菌体外多糖類及びラクトバチルス・ヘルペティカス T D S 0 3 0 9 0 3 株に、優れた免疫調節作用が期待できることを初めて明らかにした。

これらの知見に基づいて、本発明は完成されたのである。

【 0 0 1 4 】

すなわち、請求項 1 に記載の本発明は、3 位置換グルコース、6 位置換ガラクトース、2 位 3 位置換グルコースおよび非還元末端グルコースから成る 4 糖繰り返しを単位とする主要成分と、3 位置換グルコース、6 位置換ガラクトース、2 位 3 位置換グルコースおよび非還元末端ガラクトースから成る 4 糖繰り返しを単位とするマイナー成分と、から構成される多糖類を産生することを特徴とするラクトバチルス・ファーマンタム (L a c t o b a c i l l u s f e r m e n t u m) である。

請求項 2 に記載の本発明は、ラクトバチルス・ファーマンタムが T D S 0 3 0 6 0 3 株 (N I T E A P - 3 3 8) である請求項 1 に記載のラクトバチルス・ファーマンタムである。

請求項 3 に記載の本発明は、3 位置換グルコース、6 位置換ガラクトース、2 位 3 位置換グルコースおよび非還元末端グルコースから成る 4 糖繰り返しを単位とする主要成分と

10

20

30

40

50

、3位置換グルコース、6位置換ガラクトース、2位3位置換グルコースおよび非還元末端ガラクトースから成る4糖繰り返しを単位とするマイナー成分と、から構成される多糖類である。

請求項4に記載の本発明は、請求項1あるいは2に記載のラクトバチルス・ファーマンタムの菌体を、生菌で 10^7 /g以上、あるいは死菌体で0.1~100重量%含有することによって免疫調節作用が期待できる食品又は食品用素材である。

請求項5に記載の本発明は、請求項3に記載の多糖類を食品中に0.1~100重量%含有することによって免疫調節作用が期待できる食品又は食品用素材である。

請求項6に記載の本発明は、請求項1あるいは2に記載のラクトバチルス・ファーマンタムの菌体を有効成分として含有する免疫調節剤である。

請求項7に記載の本発明は、請求項3に記載の多糖類を有効成分として含有する免疫調節剤である。

請求項8に記載の本発明は、請求項3に記載の多糖類を有効成分として含有する物性改善剤である。

請求項9に記載の本発明は、免疫調節作用が期待できるラクトバチルス・ヘルペティカスTDS030903株(NITE AP-339)である。

請求項10に記載の本発明は、請求項9に記載のラクトバチルス・ヘルペティカスTDS030903株の菌体を0.1~100重量%含有することによって免疫調節作用が期待できる食品又は食品用素材である。

請求項11に記載の本発明は、請求項9に記載のラクトバチルス・ヘルペティカスTDS030903株の菌体を有効成分として含有する免疫調節剤である。

【発明の効果】

【0015】

本発明のラクトバチルス・ファーマンタム及びラクトバチルス・ヘルペティカスを用いて製造した発酵乳等の食品を摂取することで、免疫力を高め、抗炎症効果、抗アレルギー効果、抗腫瘍効果など、体質の改善に繋がることが期待できる。

また、本発明のラクトバチルス・ファーマンタムの生産する菌体外多糖類は、食品として利用する場合には、物性を改善するという作用とともに、免疫力を調節するという2つの効果が期待できる機能性素材として利用できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の乳酸菌ラクトバチルス・ファーマンタムは、3位置換グルコース、6位置換ガラクトース、2位3位置換グルコースおよび非還元末端グルコースから成る4糖繰り返しを単位とする主要成分と、3位置換グルコース、6位置換ガラクトース、2位3位置換グルコースおよび非還元末端ガラクトースから成る4糖繰り返しを単位とするマイナー成分と、から構成される多糖類を産生することを特徴とするものである。

本発明のラクトバチルス・ファーマンタムは、上記多糖類を菌体外に産生・蓄積するものであればどのようなものでもよく、例えばラクトバチルス・ファーマンタムTDS030603株が挙げられる。

【0017】

本発明の多糖類は、3位置換グルコース、6位置換ガラクトース、2位3位置換グルコースおよび非還元末端グルコースから成る4糖繰り返しを単位とする主要成分と、3位置換グルコース、6位置換ガラクトース、2位3位置換グルコースおよび非還元末端ガラクトースから成る4糖繰り返しを単位とするマイナー成分と、から構成される新規な多糖である。主要成分とマイナー成分の好ましい構成比は、主要成分：マイナー成分=75：25~80：20である。

本発明の多糖類は上記の構造を有するものであればよく、その由来は特に限定されない。例えば、ラクトバチルス・ファーマンタム等の乳酸菌、特にラクトバチルス・ファーマンタムTDS030603株由来のものが好適に使用できる。

【0018】

本発明において初めて単離されたラクトバチルス・ファーマンタムTDS030603株（以下、単にTDS030603株と呼ぶことがある。）、及びラクトバチルス・ヘルペティカスTDS030903株（以下、単にTDS030903株と呼ぶことがある。）は、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターに寄託されており、その受託番号はそれぞれNITE AP-338、NITE AP-339である。

【0019】

TDS030603株とTDS030903株は、ともに家庭で作られている、工業的に作られていない伝統的発酵乳から分離されたものである。このような発酵乳は、工業的に作られたものと違い、様々な乳酸菌や酵母などによって発酵している。それ故、どのような乳酸菌から構成されているかを知るには、乳酸菌を分離同定する必要がある。

10

【0020】

なお、発酵乳から乳酸菌を分離する手法は、適切な教科書が存在し、誰でも容易に実施可能である。例えばSkinner, F. A., and Lovelock, D. W. (1979). Identification methods for microbiologists Second edition. Academic Pressなどが参考になる。

【0021】

本発明の乳酸菌の分離は、具体的には以下の通り行った。

発酵乳検体を滅菌した生理食塩水に段階希釈し、MRS寒天培地（De Man, J. D., Rogosa, M., Sharpe, M. E. (1960). J. Appl. Bact. 23, 130-135.）、M17寒天培地（Terzaghi, B. E., and Sandine, W. E. (1975). Appl. Environ. Microbiol. 29, 807-813.）

20

に0.1mlを塗抹し、炭酸ガス置換下で嫌気培養を32℃で行い、画線分離して純粋な株とした。グラム陽性、カタラーゼ陰性のものを乳酸菌と見なし、生育温度試験、グルコースからのガス産生、細菌同定用検査キットAPI-50CH（日本ビオメリユー製）を用いた糖の発酵性、及び16SrDNAの部分配列に基づいて同定した。

【0022】

TDS030603株は、グラム陽性の桿菌でヘテロ発酵型乳酸菌である。16SrDNA配列に基づく同定において、ラクトバチルス・ファーマンタムと同定された。本菌株を、乳酸菌用の培地であるMRS液体培地（MRS寒天培地と同じ組成で、寒天を配合しないもの）で常法により培養したところ、培養物は粘稠性を示し、菌体外多糖類を産生することが示された。また、墨汁染色においても、典型的な菌体外多糖類の産生が示された。

30

【0023】

なお、乳酸菌の菌体外多糖類についての知見は、例えばInternational Dairy Journal 第11巻第9号（2001年）（乳酸菌多糖類に関する特集号）などに記載されているが、乳酸菌が特徴的に多糖類を産生する場合には、例えばピペットで当該乳酸菌の培養物を吸い取った際に、粘稠な糸曳きが見られることで容易に判定できる。

【0024】

同様にTDS030903株は、16SrDNA塩基配列に基づく同定と、細菌同定用検査キットであるAPI50CH（日本ビオメリユー製）の糖発酵性にも基づく同定によって、ラクトバチルス・ヘルペティカスと同定された。

40

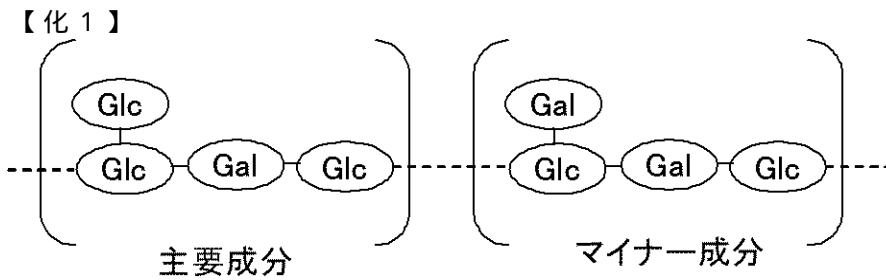
【0025】

TDS030603株が生産する菌体外多糖類を核磁気共鳴分析およびメチル化分析により解析した結果、当該多糖類は、3位置換グルコース、6位置換ガラクトース、2位3位置換グルコースおよび非還元末端グルコースから成る4糖繰り返しを単位とする主要成分と、3位置換グルコース、6位置換ガラクトース、2位3位置換グルコースおよび非還元末端ガラクトースから成る4糖繰り返しを単位とするマイナー成分との混合物であることが明らかとなった。

本発明の多糖類の構造の模式図を化1に示す。

【0026】

50



【 0 0 2 7 】

本発明の乳酸菌 2 種の洗浄菌体はそれぞれ、Colon 26 結腸癌担癌マウスを用いた経口摂取試験により、癌細胞の増殖抑制の傾向を示し、インターロイキン - 6 (I L - 6) 産生を有意に抑制したので、腫瘍増殖抑制作用、抗炎症作用が期待できる。

10

また、本発明のラクトバチルス・ファーマンタムの培養物から分離精製した多糖類、及び本発明のヘルペティカス株菌体は、それぞれマウス由来マクロファージの培養細胞においてインターロイキン - 1 2 (I L - 1 2) の産生を促進する傾向があった。さらに、オポアルブミン感作マウスにおいて、本発明のファーマンタムのホエー培養物の凍結乾燥物を経口投与することで、血清中のオポアルブミン特異的 I g E の産生を低下させる傾向にあった。以上から、本発明の乳酸菌及び多糖類はともに、ヒトにおいても I 型アレルギーを抑制することが期待できる。

【 0 0 2 8 】

20

このように、本発明のラクトバチルス・ファーマンタム菌体、その多糖類及びラクトバチルス・ヘルペティカス T D S 0 3 0 9 0 3 株菌体は、抗腫瘍作用、抗炎症作用、抗アレルギー作用などの免疫調節作用を有していることから、これらを免疫調節作用を有する食品及び食品用素材並びに抗腫瘍剤、抗炎症剤、抗アレルギー剤などの免疫調節剤の製造に利用することができる。ここで、食品としてはヨーグルト、乳酸飲料、チーズ、パン、クッキーなどが挙げられるが、特に制限はない。

また、本発明の多糖類は水に容易に溶解し、水の粘稠性を高める性質を有していることから、食品用の増粘剤などの物性改善剤の製造に利用することができる。

【 0 0 2 9 】

本発明のラクトバチルス・ファーマンタム菌体を含む食品、食品用素材及び免疫調節剤は、本発明のラクトバチルス・ファーマンタム菌体を培地において常法で培養することにより製造することができる。

30

【 0 0 3 0 】

ここで、培養に用いる培地は、本発明のラクトバチルス・ファーマンタムが生育可能な培地であればどのようなものでも利用可能であり、獣乳、脱脂乳などの乳、ホエー（乳清とも呼ばれるチーズ製造等で生じる副産物）、各種合成培地などを用いることができる。

これら培地は、微量のマンガンを含んでいることが好ましい。培地中のマンガンの濃度は硫酸マンガンの濃度として 0 . 0 0 0 0 1 ~ 1 重量%、好ましくは 0 . 0 0 1 ~ 0 . 1 重量%である。マンガンの濃度が前記の下限値未満であると、菌体外多糖類の産生量が著しく減少するため好ましくない。なお、培地中に含まれるマンガンは、どのような形態で含まれていても良い。例えば、食品添加物や食品成分のうち、マンガンを多く含有するものとして酵母エキスなどが知られている。それゆえ、培地に酵母エキスなどを加えることで、発酵が促進され、多糖類産生量を増加させることが可能となる。また、例えば硫酸マンガンの無機塩として培地に添加してもよい。

40

【 0 0 3 1 】

培養温度は、本発明のラクトバチルス・ファーマンタムが良く生育する温度、例えば 2 0 ~ 4 5 、好ましくは 2 5 ~ 4 0 とすることができる。また、培養時間は 4 ~ 4 8 時間、好ましくは 8 ~ 2 4 時間とすることができる。

【 0 0 3 2 】

また、本菌株はヘテロ発酵性のために、発酵中に微量の炭酸ガスを産するという特徴が

50

あり、密閉容器で発酵した場合には、容器内の圧力が上昇する。それゆえ、炭酸ガスの発生が製造上支障になる場合に、容器に充填する際には、炭酸ガスが透過しやすい材質の包装材料を用いた容器に充填するか、培養が十分完了した後に充填することが好ましい。

なお、本発明のラクトバチルス・ファーメンタム以外の乳酸菌を培地に添加して混合培養することにより、特徴的な発酵乳を得ることができる。ここで、組み合わせる乳酸菌としては、目的にあったものであればいずれでも良い。

【0033】

このようにして、獣乳やホエー（乳清）を発酵することにより得られた発酵物をそのまま、又は必要な後処理をして、本発明のラクトバチルス・ファーメンタム菌体を含む食品とすることができる。

また、このようにして培養した後、得られた培養物（培地）をそのまま、又は必要に応じてさらに処理することにより、本発明の食品用素材又は免疫調節剤として摂取することができる。例えば、培養終了後の培養物をそのまま濃縮したもの、これを粉末化したもの、培養終了後の培養物から遠心分離、濾過等により集菌して菌体のみとしたもの、これを凍結乾燥菌体としたもの、さらに加熱処理した菌体、菌体破砕物等も本発明の食品用素材又は免疫調節剤とすることができる。また、上記のものをさらに通常用いられる補助剤を添加して製剤化したものや、種々の食品に配合したもの等も、本発明の免疫調節剤とすることができる。

【0034】

さらに、上記本発明の食品用素材又は免疫調節剤を種々の食品に配合すること、あるいは上記本発明の食品用素材又は免疫調節剤を配合して常法により食品を製造することにより、本発明のラクトバチルス・ファーメンタム菌体を含む食品を製造することができる。

本発明のラクトバチルス・ファーメンタム菌体を用いた食品、食品用素材、及び免疫調節剤に含まれるラクトバチルス・ファーメンタム菌体は、発酵乳以外に用いる場合には生菌体でも死菌体でも良い。何故なら、乳酸菌を経口摂取し、腸管まで到達すると、腸管上皮細胞上のM細胞から取り込まれた後に免疫器官であるパイエル板で処理され、免疫応答が開始される。この時にパイエル板に認識される部位は細胞壁成分(ペプチドグリカン、リポテイコ酸、表層タンパク質など)であることがこれまでの研究から明らかにされている。そのため、必ずしも生菌である必要がない。(Kitazawa, H., Ueha, S., Itoh, S., Watanabe, H., Konno, K., Kawai, Y., Saito, T., Itoh, T., Yamaguchi, T. (2001). *Int. J. Food Microbiol.* 65, 149-162. 及び Iliev, ID., Kitazawa, H., Shimosato, T., Katoh, S., Morita, H., He, F., Hosoda, M., Saito, T. (2005). *Cell Microbiol.* 7(3), 403-414.)。また、本発明に用いた経口投与による免疫学的試験では、加熱死菌体を用いて各種試験を実施している。

【0035】

なお、本発明のラクトバチルス・ファーメンタム菌体を含む食品又は食品用素材におけるラクトバチルス・ファーメンタム菌体の含有量は、生菌数では 10^7 / g 以上、重量比では 0.1 ~ 100%、好ましくは 0.1 ~ 20% である。生菌数において望ましい菌数が 10^7 / g 以上である理由は、発酵乳の日本国内の規格によって、生菌で 10^7 / g 以上と定義されているからである。死菌体においては免疫調節作用を期待しているため、マウスの経口投与試験において試験食中に 0.1% 含有させていたことにより、好ましくは 0.1% 以上としているが、菌体そのものの粉末を少量摂取しても、食品として問題がないため、上限を 100% とした。しかし、風味等を勘案すると 0.1 から 20% が望ましい。

また、本発明のラクトバチルス・ファーメンタム菌体を有効成分として含む免疫改善剤におけるラクトバチルス・ファーメンタム菌体の含有量は菌体含有量では 0.1 ~ 100%、好ましくは 0.1 ~ 20% である。

【0036】

本発明の多糖類を含む食品、食品用素材、免疫調節剤及び物性改善剤は、本発明の

ラクトバチルス・ファーメンタム菌体を培地において培養することにより製造することができる。ここで、用いる培地や培養方法は、上記したラクトバチルス・ファーメンタム菌体を含有する食品用素材及び免疫調節剤の製造方法と同様とすることができる。

【0037】

このようにして、獣乳やホエー（乳清）を発酵することにより得られた発酵物をそのまま、又は必要な後処理をして、本発明の多糖類を含有する食品とすることができる。

また、培養後に得られた培養物（培地）をそのまま、又は必要に応じてさらに処理することにより、本発明の食品用素材、免疫調節剤又は物性改善剤とすることができる。例えば、培養終了後の培養物から遠心分離、濾過等により菌体を除去したもの、及びこれを濃縮、精製等したものの等も本発明の食品用素材、免疫調節剤又は物性改善剤とすることができる。また、上記のものをさらに通常用いられる補助剤を添加して製剤化したものや、種々の食品に配合したものの等も、本発明の免疫調節剤又は物性改善剤とすることができる。

10

【0038】

さらに、上記本発明の食品用素材、免疫調節剤又は物性改善剤を種々の食品に配合すること、あるいは上記本発明の食品用素材又は免疫調節剤を配合して常法により食品を製造することにより、本発明のラクトバチルス・ファーメンタム由来の多糖類を含有する食品を製造することができる。

【0039】

なお、本発明の多糖類を含有する食品又は食品用素材における多糖類の含有量は0.1～100重量%、好ましくは0.1～20重量%である。

20

また、本発明の多糖類を有効成分として含有する免疫改善剤における多糖類の含有量は0.1～100重量%、好ましくは0.1～20重量%である。

さらに、本発明の多糖類を有効成分として含有する物性改善剤における多糖類の含有量は0.1～100重量%、好ましくは0.1～20重量%である。

【0040】

本発明のラクトバチルス・ヘルペティカスTDS030903株菌体を含有する食品、食品用素材及び免疫調節剤は、本発明のTDS030903株菌体を培地において培養することにより製造することができる。

ここで、培養に用いる培地は、本発明のTDS030903株が生育可能な培地であればどのようなものでも利用可能であり、上記のラクトバチルス・ファーメンタムと同様のものを用いることができる。また、培養方法も上記のラクトバチルス・ファーメンタムと同様とすることができるが、培養温度は20～45、好ましくは25～40とすることができる。

30

なお、本発明のラクトバチルス・ヘルペティカス以外の乳酸菌を培地に添加して混合培養することにより、特徴的な発酵乳を得ることができる。ここで、組み合わせる乳酸菌としては、目的にあったものであればいずれでも良い。

【0041】

このようにして、獣乳やホエー（乳清）を発酵することにより得られた発酵物をそのまま、又は必要な後処理をして、本発明のラクトバチルス・ヘルペティカスTDS030903株菌体を含有する食品とすることができる。

40

また、このようにして培養した後、得られた培養物（培地）をそのまま、又は必要に応じてさらに処理することにより、本発明の食品用素材又は免疫調節剤とすることができる。例えば、培養終了後の培養物から遠心分離、濾過等により集菌して菌体のみとしたもの、これを凍結乾燥菌体としたもの、さらに加熱処理した菌体、菌体破砕物等も本発明の食品用素材又は免疫調節剤とすることができる。また、上記のものをさらに通常用いられる補助剤を添加して製剤化したものや、種々の食品に配合したものの等も、本発明の免疫調節剤とすることができる。

【0042】

さらに、上記本発明の食品用素材又は免疫調節剤を種々の食品に配合すること、あるいは上記本発明の食品用素材又は免疫調節剤を配合して常法により食品を製造することによ

50

り、本発明のラクトバチルス・ヘルペティカスTDS030903株菌体を含有する食品を製造することができる。

本発明のTDS030903株菌体を用いた食品、食品用素材、及び免疫調節剤に含まれるTDS030903株菌体は、生菌体であることが好ましいが、死菌体であってもよい。死菌体であっても良い理由は、ラクトバチルス・ファーマンタムについて述べたのと同様な理由である。

【0043】

なお、本発明のTDS030903株菌体を含有する食品又は食品用素材におけるTDS030903株菌体の含有量は、生菌では $10^7/g$ 以上、重量比では0.1~100%、好ましくは0.1~20%である。

また、本発明のTDS030903株菌体を有効成分として含有する免疫改善剤におけるTDS030903株菌体の含有量は0.1~100重量%、好ましくは0.1~10重量%である。このような範囲指定の理由は、ラクトバチルス・ファーマンタムについて述べたのと同様な理由である。

【実施例】

【0044】

次に、本発明を実施例により詳しく説明する。

なお、本発明の乳酸菌TDS030603株及びTDS030903株は、前記したように所定の微生物保存機関に寄託されており、十分に開示されている。

【0045】

(実施例1)ラクトバチルス・ファーマンタムTDS030603株とラクトバチルス・ヘルペティカスTDS030903株の同定

TDS030603株とTDS030903株の性状を調べて同定を行った。

上記乳酸菌の糖の発酵性を、それぞれ細菌同定用検査キットAPI50CH(日本ピオメリユー製)で調べた。なお、測定方法の詳細はメーカーの指示する方法に従った。

また、上記乳酸菌の基本的性状と16Sr-DNAの配列に基づく同定結果を用いて最終的な同定結果とした。その結果をそれぞれ表1と表2に示す。

【0046】

10

20

【表 1】

菌株名	TDS030603
菌形態	桿菌
グラム染色	グラム陽性
カタラーゼ	陰性
グルコースからのガス産生	ガス産生あり
発酵する糖 (API 50CHによる)	Ribose, Galactose, Glucose, Fructose, Lactose, Melibiose, Sucrose, Raffinose,
発酵しない糖 (API 50CHによる)	Glycerol, Erythritol, D-Arabinose, L-Arabinose, D-Xylose, L-Xylose, Adonitol, β -Methyl-D-Xyloside, Mannose, Sorbose, Rhamnose, Dulcitol, Inositol, Mannitol, Sorbitol, α -Methyl-D-Mannoside, α -Methyl- D-Glucoside, N-Acetyl-Glucosamine, Amygdalin, Arbutin, Esculin, Salicin, Cellobiose, Maltose, Trehalose, Inulin, Melezitose, Starch, Glycogen, Xylitol, Gentiobiose, D-Turanose, D-Lyxose, D-Tagatose, D-Fucose, L-Fucose, D-Arabitol, L-Arabitol, Gluconate, 2-Keto-Gluconate, 5-Keto-Gluconate
培養した際の粘稠性	MRS液体培地で培養した場合に粘稠性あり。 特にマンガンを微量に含む培地で強い粘稠性を示す。
16S-rDNA部分配列に基づく同定結果	Lactobacillus fermentum
寄託番号	NITE AP-338

【 0 0 4 7 】

【表 2】

菌株名	TDS030903
菌形態	桿菌
グラム染色	グラム陽性
カタラーゼ	陰性
グルコースからのガス産生	ガス産生なし
発酵する糖 (API 50CHによる)	Galactose, Glucose, Fructose, Mannose, N-Acetyl-Glucosamine, Lactose
発酵しない糖 (API 50CHによる)	Glycerol, Erythritol, D-Arabinose, L-Arabinose, Ribose , D-Xylose, L- Xylose, Adonitol, β-Methyl-D-Xyloside, Sorbse, Rhamnose, Dulcitol, Inositol, Mannitol, Sorbitol, α-Methyl-D-Mannoside, α-Methyl-D-Glucoside, Amygdalin, Arbutin, Esculin, Salicin, Cellobiose, Maltose, Melibiose, Sucrose, Trehalose, Inulin, Melezitose, Raffinose, Starch, Glycogen, Xylitol, Gentiobiose, D-Turanose, D-Lyxose, D-Tagatose, D-Fucose, L-Fucose, D-Arabitol, L-Arabitol, Gluconate, 2-Keto-Gluconate, 5-Keto-Gluconate
培養した際の粘稠性	粘稠性なし。
16S-rDNA部分配列に基づく同定結果	Lactobacillus helveticus
寄託番号	NITE AP-339

【0048】

(実施例2) ラクトバチルス・ファーマンタム TDS030603 株を用いた発酵乳の試作

ラクトバチルス・ファーマンタム TDS030603 株を使用して発酵乳を試作した実施例を示す。

新鮮なラクトバチルス・ファーマンタム TDS030603 株の培養液を単独で、あるいはストレプトコッカス・サーモフィラスの培養液と組み合わせてスターターとして用い、殺菌した牛乳にそれぞれ 1% 接種し、30 で 19.5 時間培養した。培養後、10 以下まで十分冷却して、食した。

できたばかりの発酵乳は、ファーマンタム単独のものもサーモフィラスと組み合わせたものも良好な物性と風味を有していたが、TDS030603 株がヘテロ発酵性であるため、やや泡立っていた。

【0049】

(実施例3) ラクトバチルス・ファーマンタム TDS030603 株のホエー培地での菌体外多糖類の産生条件の検討

TDS030603 株を MRS 液体培地で常法により培養し観察した結果、培養物が粘稠性を示し、多糖類を産生することが明らかであった。MRS 培地には硫酸マンガンが成分として 0.004 重量% 含まれている。この硫酸マンガン培地成分から除いて培養した結果、著しく多糖の生成が減少することが明らかとなった。また、本菌株を種菌として用いて乳を培地として上記と同様に培養した場合にも、微量のマンガンが含まれていないと多糖の生成は少なかった。

【0050】

そこで、本多糖類をホエー(乳清)で培養して生産する場合をモデルにして、酵母エキ

ス等の添加物が多糖の生産に与える影響を調べた。試験した添加物はトリプトン（BBL製）、硫酸マンガン（和光純薬製）、酵母エキス（P2G、アサヒフード&ヘルスケア製）、酵母エキス（型番LYII-P、大日本明治精糖製）、乳ペプチド（FE135、DMVジャパン製）であった。

ホエーパウダー（よつ葉乳業製）を10重量%の割合で水に還元し、121で15分間オートクレーブすると、含まれているタンパク質等が凝集物を生成した。この凝集物を遠心分離により除去し、10%除タンパクホエー液とした。これに上述の添加物を表3に示す割合で加え、121で15分間オートクレーブしたものを培地（除タンパクホエー培地）として使用した。

スターターとして使用するTDS030603株培養液は、培地由来のマンガンの影響を除くため、1%トリプトンを添加した上記の10%除タンパクホエー液を121で15分間オートクレーブして得た培地に、TDS030603株のコロニー1個分を無菌的に接種し、30で24時間培養したものをを用いた。このように調製したスターターは培地成分にマンガンを極微量にしか含まず、スターター自体に含まれるマンガンを培地に持ち込む影響を避けることができる。

【0051】

このスターターを各除タンパクホエー培地に3%添加し、30で24時間培養し、10に冷却後、その粘度を測定した。粘度は、B型粘度計でR-Lアダプタを使用し、回転数60rpmの条件で測定した。なお、培養前の培養液についても、上記と同様に粘度を測定した。粘度の単位は国際単位（SIU）である $\text{mPa}\cdot\text{s}$ （ミリPascal second）で表した。ちなみに、室温の水の粘度は約 $1\text{mPa}\cdot\text{s}$ である。

次に、培養液中に生じた多糖のおおよその量（粗多糖類の量）をエタノール沈殿により測定した。まず、培養液に等量のエタノールを加え、5で一晩放置した。遠心後沈殿を回収し、イオン交換水を加え、70において30分間攪拌しながら溶解させた。遠心後、上清を回収し、凍結乾燥したものの重量を測定した。なお、多糖類の産生量の測定は、粘度が高いものについてのみ実施した。

【0052】

結果を表3に示す。

本試験の結果、酵母エキスを5重量%といった大量に培地に添加することで、多糖類の産生が著しく促進されることが明らかになった。特に、酵母エキス（LYII-P）の添加が最も効果的であった。また、発酵促進のためのペプチド類を添加することで、酵母エキスの量を減らしても多糖生成がある程度維持されることがわかった。トリプトンや乳ペプチド単独の添加では、粘度から見て多糖の生成にはあまり促進効果がないことも示された。

以上の結果から、酵母エキスなどの安全な食品添加物を添加することで、ホエーを用いて本発明の多糖類を生産することが可能であることが示された。

【0053】

10

20

30

【表 3】

除タンパクホエーに添加した 添加物の種類と添加量 (培地中の最終濃度:重量%)	培養前の粘度 (mPa・s)	培養物の粘度 (mPa・s)	培地当りの 粗多糖類の量 (g/リットル)
トリプトン:1%、 硫酸マンガン:0.004%	1.92	5.26	1.4
トリプトン:1%	1.90	2.24	測定せず
酵母エキス(P2G):5%	2.24	5.71	3.1
酵母エキス(LYII-P):5%	2.42	7.14	4.3
トリプトン:1%、 酵母エキス(P2G):2%	2.06	4.06	測定せず
乳ペプチド(FE135):1%、 酵母エキス(P2G):2%	2.17	5.19	2.6
乳ペプチド(FE135):1%、 酵母エキス(LYII-P):2%	2.42	5.75	2.6
乳ペプチド(FE135):1%、 硫酸マンガン:0.004%	2.04	2.81	測定せず
乳ペプチド(FE135):1%	2.05	2.21	測定せず

【0054】

(実施例4) ラクトバチルス・ファーマンタムTDS030603株の培養物からの菌体外多糖類の精製

イオン交換水にホエーパウダー(よつ葉乳業製)を10重量%溶解させ、121で15分間オートクレーブしたものを、12000rpmにて20分間遠心分離を行ってタンパクを除去した。これに、1%のトリプトンと0.004%の硫酸マンガンを加え、121で15分間オートクレーブしたものを培地とした。

これに、同じ培地でTDS030603株を30で1日培養した前培養液を5%添加し、25において24時間培養した。培養液3Lに、冷却した同量のエタノールを加えて一晩5で放置し、遠心して沈殿をイオン交換水で回収した。さらに、イオン交換水で1Lにメスアップし、水酸化ナトリウムで中和し透析を行ったものを、イオン交換水で3Lにメスアップし、攪拌しながら70で30分間溶解させた。これを遠心し、上清を回収して凍結乾燥した。これを粗精製多糖として以下の試験に用いた。この粗精製多糖は、常温で容易に水に溶解できた。

30

【0055】

(実施例5) ラクトバチルス・ファーマンタムTDS030603株の生産する菌体外多糖類の粘度

実施例4で得た粗精製多糖を、蒸留水に0.0、0.1、0.5、1.0、1.5、2.0重量%の各濃度で溶解させ10に冷却し、東機産業(株)製80LB型粘度計を用いて粘度を測定した。測定条件は、R-Lアダプタを使用し、回転数12rpmにおいて60秒後の粘度を測定した。測定結果は表4に示す。

40

また、同じ粘度計を用いて、回転数60、30、12rpmで測定を行った。測定結果は表5に示す。

その結果、粘度測定時の回転数が高いほど低い粘度を示すシュドプラスチック(擬塑性)粘性を示した。このことから、TDS030603株の産生する本発明の菌体外多糖類は、水の粘稠性を高めることがわかる。また、測定データから、粘度は添加量に応じて上昇することがわかる。それ故、効果の範囲は0%超の添加であればそれに呼応して粘度の上昇が見られる。物性改善剤としては、特に多糖類の添加量の範囲を指定することなく、利用できる。しかし、添加量0.1%以上で顕著な粘度の増加が見られ、実用的には20%未満程度が物性改善に望ましい。

50

【 0 0 5 6 】

【表 4】

多糖添加量(%)	0.0	0.1	0.5	1.0	1.5	2.0
粘度(mPa.s)	1.25	1.70	5.05	12.65	22.60	39.65

【 0 0 5 7 】

【表 5】

	多糖添加量(%)	粘度(mPa.s)	
		0.5	1.0
回転数	60rpm	4.10	7.84
	30rpm	4.52	9.48
	12rpm	5.05	12.65

【 0 0 5 8 】

(実施例 6) ラクトバチルス・ファーマンタム T D S 0 3 0 6 0 3 株の生産する菌体外多糖類の構造

(I) ¹H - NMR

実施例 4 で調製した粗精製多糖を、50 mM トリス - 塩酸緩衝液 (pH 8 . 7) 200 ml に溶解したものを、同緩衝液で平衡化した DEAE - Sephadex A - 50 アニオン交換樹脂 200 ml と混合し、攪拌しながら室温に 1 時間置いた。次いで、ブフナー漏斗でろ過して樹脂を除いた溶液を、水道水で 4 8 時間、2 L の蒸留水で 2 4 時間透析し、凍結乾燥することにより精製多糖を得た。

20

【 0 0 5 9 】

次に、多糖のアノマープロトン (糖の 1 位水素) の個数を推定するために、核磁気共鳴 (NMR) 装置を用いてプロトンの 1 次元 NMR スペクトル (¹H - NMR スペクトル) を測定した。

まず、上記において精製された多糖を重水に溶解し、凍結乾燥した。この操作を 3 度繰り返した後に得られた凍結乾燥物 (約 0 . 5 mg) の全量を重水 200 μ L に溶解し、マイクロ NMR チューブに入れ、Bruker 社製 NMR 装置 Advance - 600 NMR にて、温度 70 ° の条件下で ¹H - NMR スペクトルの測定を行った。その結果得られた ¹H - NMR スペクトルを図 1 に示す。

30

この結果、アノマープロトンのシグナルが 4 個存在し、結合に由来するピークが 2 個、結合に由来するピークが 2 個観測された。すなわち、当該多糖は 4 糖繰り返し単位で、結合と結合が 2 個ずつであると考えられる。

【 0 0 6 0 】

(I I) メチル化分析

次に、本発明の多糖の構成糖残基間のグリコシド結合の様式をメチル化分析によって解析した。メチル化分析方法は、Hakomori, S. (1964). J. Biochem. (Tokyo), 55(2), 205 208. の記載に従った。

40

【 0 0 6 1 】

まず、(I) で得た精製多糖の部分メチル化アルジトールアセテートを、Stellner, K., Saito, H., and Hakomori, S. (1973). Arch. Biochem. Biophys. 155, 464 472. に記載の方法で調製した。

【 0 0 6 2 】

次に、そのガスクロマトグラフ重量分析 (GC - MS) を常法に従って行い、その結果から、「生化学データブック」(東京化学同人)に基づいて、構成糖残基間のグリコシド結合の様式を帰属した。

GC - MS には Hewlett Packard 社製ガスクロマトグラフ HP 5890

50

/重量分析計HP5972MSDを用い、カラムはAgilent Technologies社製DB-17を用いた。温度条件は(1)150 (1min)、(2)150-200 (昇温速度15 /min)、(3)200 であった。

【0063】

その結果、ガスクロマトグラフィーのピークパターンを図2に、各ピークの重量分析パターンから帰属した部分メチル化アルジトールアセテートのモル比を表6に、それぞれ示す。図2中のピークA-Eは糖由来のピークであり、表6のピーク名に対応している。ピークXは調製過程で混入した不純物のピークである。

なお、グルコースとガラクトースの判別については、既知試料の同条件下でのピークの保持時間と、下記(IV)における酸分解による構成糖分析の結果をもとに行った。

10

図2及び表6の結果から、本発明の多糖は、1残基の非還元末端(図2のピークA)と1残基の分岐点(ピークE)を持つ4糖繰り返しであるが、他に非還元末端由来のマイナーピーク(ピークB)が存在しており、非還元末端をグルコースとする主要成分と非還元末端をガラクトースとするマイナー成分の混合物であることが推察された。

【0064】

【表6】

ピーク	部分メチル化アルジトールアセテート	モル比
A	2,3,4,6-Me ₄ -Glc	1.00
B	2,3,4,6-Me ₄ -Gal	0.25
C	2,4,6-Me ₃ -Glc	0.88
D	2,3,4-Me ₃ -Gal	1.01
E	4,6-Me ₂ -Glc	0.88

表6中で、Meはmethyl、Galはgalactose、Glcはglucoseを意味する。

【0065】

(III) 構成糖の分析

本発明の多糖の単糖組成を分析するために、酸加水分解によって多糖のグリコシド結合を切断し、単糖にした上で、高速液体クロマトグラフィーによって分離定量を行った。

30

すなわち、まず、(I)で得た精製多糖1.5mgを1.5mLねじ栓付試験チューブに入れ、そこに蒸留水を0.6mL加え、多糖を懸濁させた。次いで、この多糖懸濁液に3.3Mトリフルオロ酢酸(TFA)水溶液を0.9mL加えて、100に設定したアルミブロック恒温槽を用いて3時間保温し、加水分解反応を行った。反応終了後、試験チューブを凍結し、遠心エバポレーターで凍結乾燥させた。さらに、凍結乾燥物を蒸留水に溶解して糖分析用サンプルとした。

【0066】

構成糖の分析には、日本ダイオネクス社製のイオン交換クロマトグラフィーシステム(DX-500)を使用した。測定は、分離カラム:CarboPac PA1、溶離液:5mM NaOH、流速:1mL/min、検出器:パルスドアンペロメトリ検出器の条件で行った。

40

【0067】

その結果、ラムノース(Rha)、ガラクトース(Gal)、グルコース(Glc)、マンノース(Man)を含む標準糖標品のクロマトグラムを図3(a)に、当該多糖の酸分解物のクロマトグラムを図3(b)に、それぞれ示す。

この2つのクロマトグラムの比較より、本発明の多糖を構成している単糖は、GalとGlcであることが示された。また、ピークの面積比から計算した構成糖の存在比は、Gal:Glc=1:2.4-2.6であった。

【0068】

以上の(I)~(III)の分析結果から、本発明の多糖は主要成分とマイナー成分の

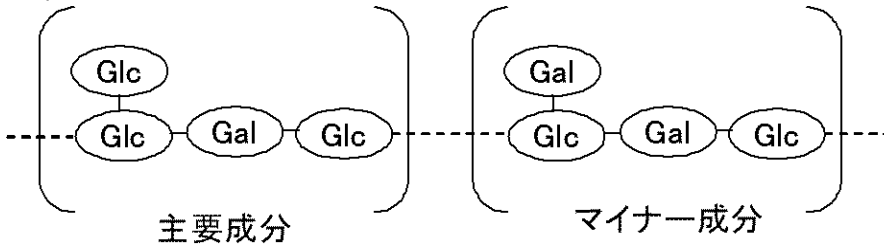
50

混合物であることが分かった。また、主要成分は3位置換Glc、6位置換Gal、2位3位置換Glcおよび非還元末端Glcから成る4糖繰り返し単位であり、マイナー成分は3位置換Glc、6位置換Gal、2位3位置換Glcおよび非還元末端Galから成る4糖繰り返し単位であると推測された。さらに、主要成分及びマイナー成分の4糖繰り返し単位には、2つのグリコシド結合ならびにグリコシド結合が含まれていることが分かった。

本発明の菌体外多糖類の最終的な構造の模式図を化2に示した。

【0069】

【化2】



主要成分：マイナー成分の比率 = 75 : 25 ~ 80 : 20

【0070】

(実施例7) ラクトバチルス・ファーマンタムTDS030603株及びラクトバチルス・ヘルペティカスTDS030903株の結腸癌担癌マウスに対する経口投与の効果

20

(1) 材料と方法

7週齢のBALB/cマウス、メス(SFC)を使用し、一群10匹で試験した。Colon26結腸癌細胞株を皮下に移植した結腸癌担癌マウスに対して、TDS030603株の凍結乾燥菌体を200µg/マウス/日の割合で、またTDS030903株の凍結乾燥菌体を1800µg/マウス/日の割合で、移植翌日より一日1回、14日間連続経口投与した。それぞれ、15日目に解剖を行い、脾臓、胸腺、肝臓および腫瘍部の重量、並びに、血漿中のサイトカインであるIL-6及びTNF-αを測定した。

【0071】

(2) 試験対象物の調製並びに投与方法

TDS030603株及びTDS030903株は、それぞれMRS液体培地で培養し、培地mlあたりの菌数を測定した。培養物を遠心分離後、適当量の水に再懸濁し、遠心、再懸濁を2回くりかえした。その後、80℃で10分間加熱し殺菌した。このようにして得られた洗浄菌体を凍結乾燥し、重量を測定した。凍結乾燥物gあたりの殺菌前の菌数を算出し、それぞれ凍結前の菌数として約10⁸CFU/日投与に相当する量となるように投与した。具体的には、約TDS030603株の凍結乾燥菌体を4mg秤量し、4ml滅菌蒸留水で溶解した。また、TDS030903株の凍結乾燥菌体は36mgを秤量し、4mlの滅菌蒸留水に溶解した。その溶液をそれぞれ200µL/マウスになるように投与した。

30

【0072】

(3) Colon26担癌マウスの作製

in vitroにおいて継代しているColon26結腸癌細胞株を用いた。0.1%トリプシン0.02%を培養液に加えて細胞を剥離した後に、1600rpm、4分5分間遠心分離した。培養液を捨て、沈殿した細胞をピペティングしてほぐし、滅菌生理食塩水を5ml加えて混和させ、細胞数測定用に採取した。

40

採取した細胞浮遊液は、細胞浮遊液50µL、4%トリパンブルー950µLの割合で混合した後、ヘモサイトメーターを用いて顕微鏡下にて細胞数ならびにセルバイアビリティを計測した。

一方、残りの細胞浮遊液は、再度遠心分離した後、上清を捨て、沈殿した細胞をピペティングしてほぐし、滅菌生理食塩水を用いて細胞数1×10⁶個/mlになるように再浮遊させた。細胞数5×10⁵個/100µLをマウス背側頸部皮下に注射筒を用いて移

50

植し、Colon 26 担癌マウスを作製した。

【0073】

(4) 解剖および重量測定

解剖前日からの絶食は行わない。解剖当日はネブタール(40 mg/kg)麻酔下において開腹し、腹大静脈よりヘパリン加採血を行った。脾臓、胸腺、肝臓および腫瘍部を摘出し、重量を測定した。採血した血液は、4℃、5000 rpmで20分間遠心分離して血漿を採血し、サイトカイン測定まで-80℃で保存した。採血した血漿は4℃において解凍し、市販のELISAキット(BIOSOURCE社製)を用いてTNF- α 及びIL-6の濃度を測定した。測定方法はキットの説明書の記載に従った。

試験結果は平均値 \pm 標準偏差で表し、データについては一元配置分散分析を行った後、フィッシャーのPLSD法により、各群間の有意差検定を行った。

【0074】

(5) 結果

結果を表7に示す。

TDS030603株投与群では、腫瘍細胞重量は対照群に比べ減少傾向であったが、対照群と有意差はなかった。炎症性サイトカインであるTNF- α 濃度は対照群に比べて低い値を示したが、有意差はなかった。同じく炎症性サイトカインであるIL-6の濃度は、5%の危険率で対照群に比べて有意な差があった。それ故、TDS030603株菌体は、腫瘍の増殖を抑制する傾向があり、炎症性サイトカインであるIL-6の産生を抑制する物質であると確認された。

一方、TDS030903株投与群では、腫瘍重量の増加を抑制する傾向があったが対照群と有意な差はなかった。またTNF- α については、5%の危険率で対照群に比して有意に産生を抑制した。IL-6については、対照群に比して1%の危険率で有意に産生を抑制した。それ故、TDS030903株菌体は、腫瘍の増殖を抑制する傾向があり、炎症性サイトカインであるTNF- α ならびにIL-6の産生を抑制する物質であると確認された。

【0075】

以上から、TDS030603株菌体とTDS030903株菌体の摂取によって、担癌というストレス下で、腫瘍増殖を抑制せしめるとともに、有意にIL-6(TDS030903株に関してはTNF- α も)の産生を抑制するので、TDS030603株とTDS030903株は抗炎症作用を有することが期待される。

【0076】

【表7】

	対照群 (n=10)	TDS030603株群 (n=10)	TDS030903株群 (n=10)
腫瘍細胞重量	0.795 \pm 0.126	0.611 \pm 0.078	0.676 \pm 0.105
TNF- α (pg/ml)	2.68 \pm 0.88	0.83 \pm 0.76	0.29 \pm 0.13 ^a
IL-6 (pg/ml)	1.88 \pm 0.35	1.04 \pm 0.11 ^a	1.00 \pm 0.08 ^{aa}

a : p < 0.05 (対照群に比べて危険率5%で有意に差)

aa : p < 0.01 (対照群に比べて危険率1%で有意に差)

【0077】

(実施例8) ホエーで生産したラクトバチルス・ファーマンタムTDS030603株の精製菌体外多糖類とラクトバチルス・ヘルベティカスTDS030903株菌体の抗アレルギー試験

<材料及び方法>

マウス由来マクロファージJ774.1細胞(理研cell bank)を用いた。J774.1細胞の培養は、培地[RPMI1640培地(GIBCO社製)+10%FBS+50U/mlペニシリン+50 μ g/mlストレプトマイシン液(GIBCO社製)]

10

20

30

50

+ 5×10^{-5} M 2 -メルカプトエタノール] を用いて定法に従って行った。

被検体として、TDS030603株の培養物から分離した十分に精製した多糖類凍結乾燥物(実施例6(I)で分析用に調製した精製多糖)及びTDS030903株菌体凍結乾燥物(実施例7に用いたものと同じ)を用いた。対照として、ラクトバチルス・ラムノーサス(Lactobacillus rhamnosus) ATCC53103株及びラクトバチルス・ヘルベティカス(Lactobacillus helveticus) JCM1120株の凍結乾燥菌体を用いた。これらの凍結乾燥菌体の調製は実施例7に用いた方法に準じた。

【0078】

24wellプレート(Nunc製)に、 7.74×10^5 細胞を 5.0×10^5 cells/ml培地で添加し、そこへサンプルを10µg/ml添加後(多糖は100µg/mlについても実施)、37℃、CO₂5%で24時間培養した。この培養試験はすべて2連で行った。

その後、上清を回収し、ELISA kit(ENDOGEN社製)を用いてIL-12産生量を測定した。この試験は2連で2回実施し、合計4連の結果を平均してIL-12の濃度とした。

【0079】

<結果>

結果を表8に示す。データは4連の平均値を示している。ATCC53103株については、さらに2回の試験を行い8連の平均値を示している。

リポ多糖(LPS、Sigma社製)をポジティブコントロールとし、ATCC53103株、JCM1120株の凍結乾燥菌体を一般の乳酸菌として対照に用いた。なお、ATCC53103株は一般にプロバイオティクスであるLGG菌として知られ、アトピー性皮膚炎に関する報告(例えば、Isolauri, E., Arvola, T., Sutas, Y., Moilanen, E., Salminen, S., (2000). Clin. Exp. Allergy, 30(11), 1604-1620.参照)があることから対照とした。

【0080】

表8の結果から、TDS030603株由来の菌体外多糖類は、LGG菌(ATCC53103株)などと同等レベルにIL-12の産生を促進しているが、この検体は菌体成分を含まないことを考慮すると極めて新規性が高い。また、この多糖は濃度依存的にIL-12の産生を促進していることがわかる。ただし、本試験ではTDS030603株菌体のみ効果については試験していない。

一方、TDS030903株菌体においては、他の菌株に比べて相対的により強くIL-12の産生を促進している。IL-12はサイトカインであるインターフェロン- γ の強力な誘導因子であり、産生が増強されるとTh1を優位な状態へ傾け、抗アレルギー効果が期待できる。

【0081】

【表8】

	培養上澄液中のIL-12濃度(µg/ml)
LPS	9338.9±110.03
ATCC53103菌体(10µg)	159.73±48.66
TDS030603多糖(10µg)	150.69±30.03
TDS030603多糖(100µg)	631.94±58.051
TDS030903菌体(10µg)	1907.96±125.18

【0082】

(実施例9)動物試験(抗アレルギー効果試験)

ラクトバチルス・ファーマンタムTDS030603株及びラクトバチルス・ヘルベティカスTDS030903株の抗アレルギー効果について、オボアルブミン(OVA)感

10

20

30

50

作マウスを用いた経口投与の試験を行った。TDS030603株は菌体外多糖類を産生するので、菌体のみを分離して投与するのではなく、菌体外多糖類を含む培養物全体での抗アレルギー効果を評価した。TDS030903株は、実施例8と同様に菌体乾燥物について評価した。

【0083】

<材料及び方法>

8週齢のBALB/cマウスを用い、一群10匹で試験した。

対照群の餌はCE-2(クレア社製)を用いた。試験群は、CE-2にTDS030603株培養物(ホエー培地での培養物の凍結乾燥物)5%、又はTDS030903株菌体(凍結乾燥菌体)0.1%を含有するように混合し、いずれも自由摂取させた。ここで、TDS030603株培養物の混合量をTDS030903株菌体に比べて多く設定したのは、被検体(TDS030603株培養物)中に占める菌体成分よりも培地成分由来のものが多いことを考慮したためである。水は水道水を自由摂取させた。環境温度25

10

、湿度55%、照明は8時~20時の12時間照明とした。予備飼育期間は1週間とした。

マウスに対する免疫は20 μ gオボアルブミン(OVA)+20mg水酸化アルミニウムゲルの腹腔内投与を0日目、14日目の2回実施した。21日目に解剖し、腹部大動脈から全採血し、血清を採取した。

血清中のOVA特異的IgE量の測定は、DSマウスIgE ELISA(OVA)(大日本住友製薬(株)製)を用いて、製造者のプロトコールに従って行った。

20

【0084】

<結果>

各群の血清中OVA特異的IgE量を表9に示す。ばらつきが大きいので比較は難しいが、コントロール(対照)に比べて試験食摂取群で平均値の減少が見られた。それ故、TDS030603株のホエー培養物とTDS030903株菌体は、ともにこのような条件下でIgEを低減する効果が期待できると予想された。すなわち、これらの乳酸菌培養物あるいは菌体の摂取で、抗アレルギー効果が十分に期待できることが分かった。

【0085】

【表9】

被検体	血清中OVA-特異的IgE濃度[ng/ml]
対照	466.73 \pm 252.08
TDS030603株培養物	338.73 \pm 141.22
TDS030903株菌体	361.79 \pm 115.21

【図面の簡単な説明】

【0086】

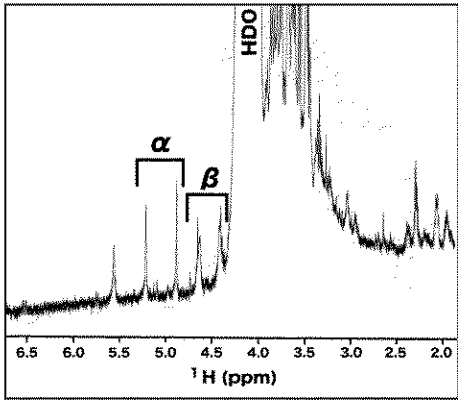
【図1】本発明の多糖類の¹H-NMRスペクトルを示す図である。

【図2】本発明の多糖類から調製した部分アルジトールアセテートのガスクロマトグラフィーのピークパターンを示す図である。

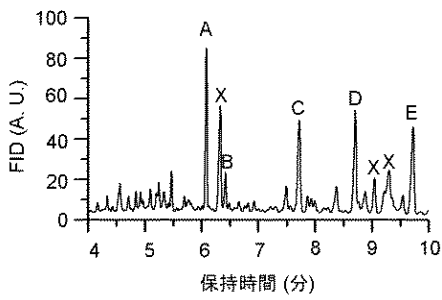
40

【図3】本発明の多糖類の酸加水分解物の液体クロマトグラフィーのピークパターンを示す図である。(a)は標準糖標品の、(b)は本発明の多糖類の酸加水分解物のピークパターンをそれぞれ示す。

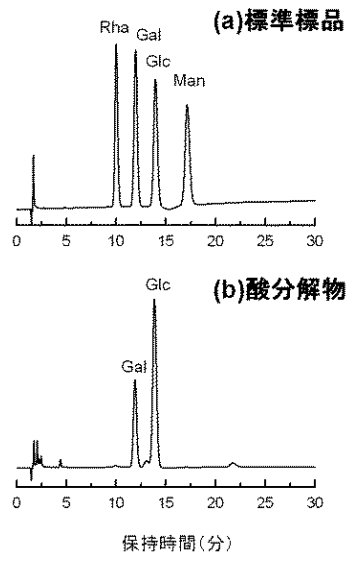
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P	37/08	
A 2 3 L 1/30 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
	A 2 3 L	1/30	Z
	C 1 2 N	1/20	E

(74)代理人 100086221

弁理士 矢野 裕也

(72)発明者 浦島 匡

北海道帯広市稲田町西2線11番地 帯広畜産大学内

(72)発明者 内田 健治

北海道北広島市輪厚465番地1号 よつ葉乳業株式会社中央研究所内

(72)発明者 橋田 修吉

北海道札幌市清田区美しが丘4条9丁目2-1 株式会社生物有機化学研究所内

(72)発明者 荒井 威吉

新潟県新潟市浦山4丁目5番14号 スカイマンション青嵐502号

(72)発明者 橋本 修一

北海道帯広市稲田町西2線11番地 帯広畜産大学地域共同研究センター内 ニュテックス株式会社内

(72)発明者 外村 幹雄

北海道札幌市清田区美しが丘4条9丁目2-1 株式会社生物有機化学研究所内

(72)発明者 関 敏之

北海道札幌市清田区美しが丘4条9丁目2-1 株式会社生物有機化学研究所内

(72)発明者 岩本 真奈

北海道北広島市輪厚465番地1号 よつ葉乳業株式会社中央研究所内

(72)発明者 元島 英雅

北海道北広島市輪厚465番地1号 よつ葉乳業株式会社中央研究所内

F ターム(参考) 4B018 MD27 MD86 ME14

4B065 AA30X CA22 CA42 CA44

4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA20 GA17 MA01 MA04 MA52 NA14

ZB07 ZB11 ZB13 ZB26

4C087 AA01 AA02 BC56 CA09 CA14 MA52 NA14 ZB07 ZB11 ZB13

ZB26

4C090 AA01 AA04 AA08 AA09 BA91 BB12 BB13 BB27 BB29 BB32

BB33 BB34 BB35 BB38 BC24 BD03 BD08 BD41 CA42 DA02

DA23 DA27