

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4267822号
(P4267822)

(45) 発行日 平成21年5月27日(2009.5.27)

(24) 登録日 平成21年2月27日(2009.2.27)

(51) Int. Cl.		F 1	
C 1 2 N	1/20	(2006.01)	C 1 2 N 1/20 A
A 6 1 F	13/15	(2006.01)	A 6 1 F 13/18 B
A 6 1 F	13/472	(2006.01)	A 6 1 K 35/74 A
A 6 1 K	35/74	(2006.01)	A 6 1 L 15/00
A 6 1 L	15/00	(2006.01)	A 6 1 P 13/00

請求項の数 16 (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-534631 (P2000-534631)	(73) 特許権者	506215320
(86) (22) 出願日	平成11年3月5日(1999.3.5)		エッセーアー・ハイジーン・プロダクツ・
(65) 公表番号	特表2002-505099 (P2002-505099A)		アーベー
(43) 公表日	平成14年2月19日(2002.2.19)		スウェーデン・SE-405・03・イエ
(86) 国際出願番号	PCT/SE1999/000336		ーテポリ・(番地なし)
(87) 国際公開番号	W01999/045099	(74) 代理人	100064908
(87) 国際公開日	平成11年9月10日(1999.9.10)		弁理士 志賀 正武
審査請求日	平成18年2月20日(2006.2.20)	(74) 代理人	100089037
(31) 優先権主張番号	9800749-5		弁理士 渡邊 隆
(32) 優先日	平成10年3月6日(1998.3.6)	(74) 代理人	100108453
(33) 優先権主張国	スウェーデン(SE)		弁理士 村山 靖彦
(31) 優先権主張番号	9801951-6	(74) 代理人	100110364
(32) 優先日	平成10年6月2日(1998.6.2)		弁理士 実広 信哉
(33) 優先権主張国	スウェーデン(SE)		
微生物の受託番号	DSM 11918		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規な薬剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

Deutsche Sammlung von Mikroorganismenに寄託され、DSM 11918のアクセション番号が割り当てられたラクトバチルス・プランタルム(Lactobacillus plantarum) LB931株。

【請求項2】

Deutsche Sammlung von Mikroorganismenに寄託され、DSM 11918のアクセション番号が割り当てられた医学的に使用されるラクトバチルス・プランタルム(Lactobacillus plantarum) LB931株。

【請求項3】

Deutsche Sammlung von Mikroorganismenに寄託され、DSM 11918のアクセション番号が割り当てられたラクトバチルス・プランタルム(Lactobacillus plantarum) LB931株を、薬学的に受容可能なキャリアおよび/または希釈剤とともに含む薬学的組成物。

【請求項4】

他の乳酸細菌をも含むことを特徴とする、請求項3に記載の薬学的組成物。

【請求項5】

10^4 cfu ~ 10^{11} cfu の LB931 を含む、請求項3に記載の薬学的組成物。

【請求項6】

10⁵ cfu ~ 10⁹ cfu の LB931 を含む、請求項 5 に記載の薬学的組成物。

【請求項 7】

懸濁液、スプレー剤、ゲル、クリーム、粉剤、カプセルまたは膣挿入剤である、請求項 3 に記載の薬学的組成物。

【請求項 8】

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen に寄託され、DSM 11918 のアクセシオン番号が割り当てられたラクトバチルス・プランタルム (Lactobacillus plantarum) LB931 株を含むことを特徴とする、吸収製品。

【請求項 9】

女性用衛生製品、おむつ、生理用ナプキン、パンティガードまたは失禁ガードであることを特徴とする、請求項 8 に記載の吸収製品。

【請求項 10】

10⁴ cfu ~ 10¹¹ cfu の LB931 を含む、請求項 8 に記載の吸収製品。

【請求項 11】

10⁵ cfu ~ 10⁹ cfu の LB931 を含む、請求項 10 に記載の吸収製品。

【請求項 12】

前記の薬学的に受容可能なキャリアはスキムミルクあるいは粉末または他の形態の乳酸菌成長因子である、請求項 5 に記載の薬学的組成物。

【請求項 13】

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen に寄託され、DSM 11918 のアクセシオン番号が割り当てられたラクトバチルス・プランタルム (Lactobacillus plantarum) LB931 株の使用であって、泌尿生殖管感染症の予防および/または治療を行うための薬学的組成物を調製するための使用。

【請求項 14】

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen に寄託され、DSM 11918 のアクセシオン番号が割り当てられたラクトバチルス・プランタルム (Lactobacillus plantarum) LB931 株の使用であって、泌尿生殖管感染症の予防および/または治療に好適な吸収用品を製造するための使用。

【請求項 15】

泌尿生殖管感染症が腸内細菌のコロニー形成であることを特徴とする、請求項 13 または 14 に記載の使用。

【請求項 16】

吸収用品が、おむつ、生理用ナプキン、パンティガードまたは失禁ガードであることを特徴とする、請求項 14 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、有用な薬学的特性を有する新規なラクトバチルス (Lactobacillus) 属の細菌株に関する。本発明はまた、この細菌株を含む薬学的組成物および個人ケア製品ならびに泌尿生殖管感染症を防止するためのこの細菌株の使用に関する。

【0002】

(技術的背景：下記の説明における引用はすべて参考として援用される)

泌尿生殖管領域における通常の細菌フローラは、50 を越える種々の細菌種を含む複雑な生態系によって形成されている (Hill 他、Scand. J. Urol. Nephrol. 1984; 86 (増刊): 23 ~ 29)。正常なフローラは、妊娠可能な女性の膣環境に適合したグラム陽性の桿菌であるラクトバチルス (LB) 属に属する細菌が優勢である。これらの細菌はまた、膣内における特定の環境および生態系バランスの維持にも寄与している。

【0003】

10

20

30

40

50

膣およびそれ以外の泌尿生殖管領域の多数の細菌フローラの複雑な相互作用パターンに加えて、細菌の増殖特性および付着特性に影響し得る物理的条件の変化を検討する必要がある。LVS細菌株のいくつかは、様々な機構で、潜在的な病原性細菌の増殖を阻害する。LBの代謝によって、多くの他の細菌種には好ましくない膣分泌液の低いpHに寄与する有機酸（特に、乳酸および酢酸）が生成し得る。LBはまた、潜在的に病原性の細菌および酵母の増殖を直接阻害する可溶性物質を産生する。LBはまた、グラム陰性の嫌気性桿菌および腸内細菌科などのカタラーゼ酵素を有していない細菌にとって毒性の過酸化水素を産生し得る。このような阻害特性は、種々のLB細菌株の間で大きく変化し得る（Hooton他、JAMA、1990；265：64～69）。

【0004】

天然の防御システムが弱い場合、例えば、薬物療法、劣った個人ケア、あるいは皮膚または粘膜の微生物フローラの変化に関連して、潜在的な病原性微生物は臨床的な感染症を引き起こし得る。膣の正常なフローラはLBが優勢であり、周囲のpHは4.5未満である。酵母および腸内細菌はわずかであるか、または存在していない（Redondo-Lopez他、Rev. Inf. Dis. 1987；12：856～872）。膣の細菌フローラの変化が種々の病原的条件に関連して見出され得る。再燃した尿路感染症に罹っている女性は、膣および尿管口における腸内細菌の数が増大しており、そして泌尿生殖管の細菌フローラもまた乳酸菌が激減している（Marrie他、J. Clin. Microbiol. 1976、8、67～72）。感染症の頻度が抗生物質による他の感染症の治療に関連して増大することもまた知られている（Stamey、Rev. Inf. Dis. 1987：9（増刊、2）：195～208；Reid他、Curr. Opin. Inf. Dis. 1991；4：37～41）。さらに、度重なる抗生物質治療の病歴を有する子供は尿路感染症により罹りやすいことが明らかにされている（Marild他、Ped. Inf. Dis. 1990；22：43～47）。

【0005】

細菌性膣症においては、LBの数が減少し、pHが上昇する。バクテロイデス（Bacterioides）属の細菌種、ガードネラ・バギナリス（Gardnerella vaginalis）およびモビルンクス（Mobiluncus）属もまた優勢である（Redondo-Lopez、上記）。腸内細菌の数の増大に伴う膣炎は、多くの場合、抗生物質治療に関連する明らかな問題である。ペニシリンの一般的な経口投与は、膣分泌液における物質の蓄積をもたらし（Sjoberg他、Obstet. Gynecol. 1990；75：18～21）、その後、腸内細菌および酵母のコロニー形成が生じる（Sjoberg他、Gynecol. Obstet. Invest. 1992；33：42～46）。サル（Macaca fascicularis）での研究により、アモキシシリンの膣投与によって、尿路病原性大腸菌のコロニー形成を阻害する正常な細菌フローラの能力が損なわれることが明らかにされている（Herthelius他、Infection、1988；16：263～266）。

【0006】

妊娠期間中、膣フローラの組成は胎児および子供の罹患率に影響し得る。便および膣フローラにおけるB群連鎖球菌（GBS）の存在は一般的である（妊娠した女性の30%までである）。これらの細菌は、通常、女性の健康に対する脅威にはならない。しかし、GBSは重大な感染症を新生児に生じさせることがある。この場合、細菌は、出産前または出産に関連して母親から子供に垂直的に伝わる。他の細菌もまたこのように伝染して、感染症を子供に生じさせることがある。細菌性膣症と早産との間にも強い関係が存在する（Martius他、Arch. Gynecol. Obstet. 1990；247：1～13）。この現象の背後にある機構は不明である。グラム陰性細菌種が優勢になる膣フローラの変化はホスホリパーゼA2の酵素量を増大させ、次いで、この酵素がアラキドン酸から始まるプロスタグランジン合成を開始させ得ることが明らかにされている（Bejar他、Obstet. Gynecol. 1981；57：479～482）。膣症フローラはまた大量のエンドトキシンを産生する（Sjoberg他、Obstet. Gynec

10

20

30

40

50

ol. 1991; 77: 265~266)。これにより、おそらくはインターロイキン類によって媒介される内因性のプロスタグランジン合成が誘導され得る (Romero 他、Obstet. Gynecol. 1989; 73: 31~34)。

【0007】

L Bの理論的に有望な特性により、その目的とする用途を有する市販の調製物においてL Bを使用して、膣フローラを補い強化することが考えられる。これは成功しているが、多くの場合、入手できる調製物は、述べられているよりもかなり少ない数のL Bを含有していることが多い。調製物の中には汚染されているものもある (Hughes 他、Obstet. Gynecol. 1990; 75(2): 244~248)。L Bを加えることによって泌尿生殖管領域における正常な細菌フローラを補い改善するためには、使用する細菌株を注意深く選択する必要がある。この目的に好適なL B細菌株は下記の基準を満たさなければならない：

1. そのようなL B細菌株は、腸内細菌、B群連鎖球菌、ブドウ球菌および酵母に対する増殖阻害能を有する可溶性物質を大量に産生しなければならない。
2. そのようなL B細菌株は皮膚および泌尿生殖管領域の粘膜に移動され得なければならない。
3. そのようなL B細菌株は泌尿生殖管領域の上皮細胞表面に付着することができなければならない。
4. そのようなL B細菌株は長期間にわたる貯蔵に耐えることができ、そして種々の種類の調製物においてそのような細菌株を誘導することができなければならない。
5. そのようなL B細菌株は使用時に用品または調製物においてその生存性および特性を保持することができなければならない。
6. そのようなL B細菌株はノノキシノール - 9を含有する殺精子調製物に対して感受性であってはならない。
7. そのようなL B細菌株はヒト女性の泌尿生殖管から単離されなければならない。
8. そのようなL B細菌株はヒト泌尿生殖管のL Bフローラの存在を可能にしなければならない。

従って、これらの条件を満たす細菌株が求められている。

【0008】

(発明の要旨)

上記条件を満たすL B 931と呼ばれるラクトバチルス・プランタルム (Lactobacillus plantarum) の新規な細菌株が単離された。この細菌株は、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (Braunschweig、ドイツ) に寄託され、DSM 11918のアクセション番号が割り当てられている。従って、L B 931は、泌尿生殖管感染症の治療および/または予防に使用することができる。L B 931は、薬学的組成物および個人ケア用製品 (おむつおよび生理用ナプキンなど) に都合よく含めることができる。

【0009】

(定義)

本明細書中で開示されているように、用語「L B」は、ラクトバチルス属の細菌をいう。

【0010】

本明細書中で開示されているように、用語「泌尿生殖管」は、会陰部、尿道および膣をいう。

【0011】

本明細書中で開示されているように、用語「吸収用品」は、血液または尿などの体液を吸収するのに好適な製造物に関する。そのような用品の例は、女性用衛生製品、失禁ガードおよびおむつが挙げられる。

【0012】

本明細書中で開示されているように、用語「G B S」はB群連鎖球菌をいう。

【0013】

本明細書中で開示されているように、用語「乳酸細菌」は、ラクトバチルス属およびラクトコッカス属に属する細菌などの乳酸を産生する細菌に関する。

【0014】

用語「cfu」は、コロニー形成単位を意味する。

【0015】

(発明の詳細な説明)

本発明は、LB931(DMS11918)として示されるラクトバチルス・プランタルムの新規な細菌株に関する。この細菌株は、非常に多数の病原性微生物の増殖を阻害するので、泌尿生殖器官感染症の予防および/または治療に有用である。この細菌株は耐久性であり、室温での長期間の保存において容易に生存する。従って、LB931を含有する製品は貯蔵寿命が長い。この細菌株は、ヒトの皮膚および膈上皮細胞に容易に移動し得る。LB931は、いくつかの抗生物質および殺精子化合物の治療的濃度に対して耐性である。

10

【0016】

LB931の阻害特性は調べられている。十分に阻害された細菌種の例には、大腸菌属(*Escherichia*)、クレブシエラ属(*Klebsiella*)、プロテウス属(*Proteus*)、ブドウ球菌属(*Staphylococcus*)およびB群連鎖球菌である。従って、LB931は、これらの微生物によって引き起こされる感染症の予防および/または治療に有用である。

【0017】

上記のように、本発明はまた、薬学的または生理学的に受容可能なキャリア、賦形剤および/または希釈剤とともにLB931を含む、好ましくは局所投与に好適な様々な薬学的組成物を提供する。一般に、そのようなキャリアは、用いられる投薬量および濃度で被投与者に対して非毒性でなければならない。通常、そのような組成物の調製には、治療薬剤を、緩衝剤、およびグリセリン、ポリエチレングリコールなどのゲル形成薬剤の増粘剤と組み合わせることが伴う。アスコルビン酸などの抗酸化剤、低分子量(約10残基未満)のポリペプチド、タンパク質、炭水化物(グルコース、スクロースおよびデキストリン類を含む)、および他の安定化剤および賦形剤を含めることができる。可能な薬学的組成物は、軟膏、クリーム、液体溶液、坐薬またはカプセルである。

20

【0018】

本発明はまた、LB931を含む吸収用品に関する。そのような用品は、着用者の皮膚と密着していることを目的とする浸透性の外側シート、使用時に着用者から遠位に置かれていることを目的とする好ましくは液体不浸透性の裏打ちシート、および前記の外側シートと裏打ちシートとの間に配置された吸収構造体を含むことができる。場合により、さらなるシートを、例えば詰め物または類似する材料の形態で、前記の外側シートと吸収構造体との間に置くことができる。拮抗作用性を示す微生物を、吸収用品の種々の部分に配置することができる。例えば、外側シート内に、吸収用品の吸収構造体内に、吸収用品の層の2つの間に、吸収用品における緩やかな挿入製造物に、あるいは特定の他の方法で配置することができる。

30

【0019】

本発明は、添付した図面を参照して記載される。

図1は、凍結乾燥したLB931の室温(+22)および+6における安定性を示すグラフである。

図2は、吸収用品に含有されたLB931の安定性を示すグラフである。

図3および図4は、LB931を含むパンティライナーを使用した後での少女の尿管口および会陰部皮膚に移動したLB931の数を明らかにしている。

40

【0020】

次に、本発明を、下記の実施例を参照して説明する。

実施例1：ラクトバチルス・プランタルムLB931株の単離および分類

細菌サンプルを健康な女性から採取した。これらのサンプルから細菌株を単離し、それら

50

の細菌株を腸内細菌のその増殖阻害能についてスクリーニングした（データは示さず）。健康な妊婦から単離された最も良い細菌株は、試験キットAPI 50 CH（APIシステムズ、Bio Merieux、フランス）によりラクトバチルス・プランタルムと分類され、LB 931と命名された。この細菌株は、BCCM/LMG（ベルギー）でのSDS-pageによるDNA分析によって、ラクトバチルス・プランタルム - ペントサス - パラプランタルム（*Lactobacillus plantarum - pentosus - paraplantarum*）であるとさらに型分類された。

【0021】

実施例2：細菌株LB 931の阻害能

この実験の目的は、他の細菌の増殖を阻害する細菌株LB 931の能力をさらに明らかにすることであった。LB 931を、MRSプロス（Merck、ドイツ）において37の温度および5%CO₂のもとで一晩増殖させた。10⁸個の細菌を含有する1mlを25mlの溶融した2%寒天MRSプロスに加えた。混合物をペトリ皿に注ぎ、固化させて、上記のように24時間インキュベーションした。M17寒天（Merck、ドイツ）の別の25mlを第1層の上部に注ぎ、平板を室温で4時間置いた。LB 931を含まない同様の寒天平板もまた作製して、コントロール平板として使用した。

【0022】

指標細菌を、別に、TY培地（Holm他、APMIS、1967、69、264）において37で空気中で培養した。培養物を25区画のBertaniトレイに移した。各区画には0.25ml（10⁶細菌/ml）が含まれた。この各トレイから、細菌を、Steerのスチールピンレプリケーター（Steers他、J. Antibiot. Chemother. 1979、9、307）を使用して、ラクトバチルス含有する寒天平板に移してスタンプした。平板を37で一晩インキュベーションした。平板を観察して、a) 指標細菌が増殖しているかどうか；b) 指標細菌の増殖が阻害されているかどうか；またはc) 指標細菌の増殖が生じていないかどうかを明らかにした。

【0023】

妨害試験の結果を表Iに示す。

【表1】

表 I

指標細菌種	阻害	
	%	阻害数/総数
コアグラージェ陰性ブドウ球菌	90	9/10
B群連鎖球菌	100	19/19
ラクトバチルス sp.	7	1/14
クレブシエラ sp.	100	50/50
大腸菌	100	50/50
プロテウス sp.	100	50/50

【0024】

これらの結果は、ラクトバチルス・プランタルムLB 931が非常に多数の細菌株の増殖を阻害しているか、または妨げていること、および他のラクトバチルスの細菌株はほとん

ど影響を受けていないことを示している。

【 0 0 2 5 】

実施例 3：種々の調製物における L B 9 3 1 の生存能

a) 等量部のスキムミルクおよび 0.9% NaCl の懸濁物に溶解した L B 9 3 1。L B 9 3 1 を、0.9% NaCl を含有するスキムミルクに溶解した。次いで、溶解した細菌を種々の温度でインキュベーションした。細菌数を、細胞を計数することによって連続的に追跡した。結果を下記の表 II に示す。

【 0 0 2 6 】

【表 2】

10

表 II

温度 (°C)	細菌数 (CFU)			
	0 日目	2 日目	5 日目	3 2 日目
4	7.8×10^{10}			2.2×10^{10}
20	1.8×10^{10}		2.2×10^{10}	
27	1.8×10^{10}	1.2×10^{10}	3.3×10^9	
37	1.8×10^{10}	5.8×10^9	1.0×10^5	

20

【 0 0 2 7 】

これらの結果は、L B 9 3 1 が、+ 4 で、1ヶ月の期間にわたって、スキムミルクおよび NaCl の混合物で安定であることを示している。

【 0 0 2 8 】

b) L B 9 3 1 のスキムミルク調製物を標準的な方法に従って凍結乾燥した。得られた粉末を室温および + 6 でペトリ皿において保存した。細菌数を 7 日後および 2 5 日後にそれぞれ測定した。結果を下記の表 III に示す。

【 0 0 2 9 】

【表 3】

30

表 III

温度 (°C)	細菌数 (CFU)		
	0 日目	7 日目	2 5 日目
6	4.2×10^8	2.2×10^8	1.2×10^8
22	4.2×10^8	1.9×10^8	1.4×10^8

40

【 0 0 3 0 】

凍結乾燥粉末中における細菌数もまた、4週間毎に 6 8 週まで追跡した。これらの結果を図 1 に示す。L B 9 3 1 が室温および + 6 の両方で 2 2 週間にわたって安定であることが図から明らかである。1年後、+ 6 では、 10^5 c f u / m g を越える L B 9 3 1 が

50

生存している。

【0031】

c) pH 6.6の合成尿におけるLB931の生存能を調べた。合成尿は、一価および二価のカチオンおよびアニオンならびに尿素を含有し、GeigyのScientific Tables (第2巻、第8版、1981、53頁)における記載に従って調製した。滅菌した合成尿に微生物用の栄養培地を加えた。栄養培地は、Hook培地およびFSA培地の組成データに従って調製した。1mlの合成尿に 10^3 個のLB931細菌を加え、サンプルを32で18時間インキュベーションした。インキュベーション後、サンプル中の細菌数は $> 10^5 / ml$ であった。LB931は合成尿中で生存し、増殖することができる。

10

【0032】

d) 吸収用品(パンティライナー)でのLB931の生存能を調べた。LB931の懸濁液($150 \mu l$)を吸収用品に加えて、その後、この用品を密閉した包装で9ヶ月まで保存した。結果を図2に示す。非常に多くの細菌が7ヶ月間生存していた。

【0033】

e) 最後に、LB931を増殖および保存の期間中のその特性について調べた。LB931をMRSプロスで培養し、新しい継代物を3日毎に3ヶ月間にわたって作製した。その後、LB931の開始サンプルおよび最後の継代物を、API試験、PGFE、および妨害試験で比較した。この2つのサンプルはすべての試験において同一であった。このことは、LB931は、増殖培地での貯蔵および数代の継代の後で非常に安定であることを示している。

20

【0034】

実施例4：女性における会陰部皮膚および尿管口へのLB931の移動

パンティライナーを使用したときに会陰部へのLB931の移動を調べるために下記の試験を行った。すべての被験者は年齢が12才~60才の女性であり、試験を必要に応じて月経期の間で行った。試験製品を、液体浸透性の外側シート、液体不浸透性の背面層、およびその間にある $100 g / m^2 \sim 200 g / m^2$ の化学セルロースパルプの吸収層を含む従来のパンティライナーから製造した。試験製品の吸収面に、LB931細菌の懸濁液を製品あたり 10^9 コロニー形成単位の量で噴霧した。

【0035】

13人の被験者の会陰部におけるLB931の存在を明らかにするために、いわゆる綿棒試験を行った。細菌を、滅菌塩化ナトリウム溶液に浸漬した綿チップを含む滅菌スティックを所定の皮膚領域をこすることによって採取した。会陰部皮膚および尿管口におけるLB931および他のLBの存在が明らかにされた。ブランクサンプルを求めるために、被験者をこのようにして調べた。この場合、被験者は、朝、5時間、パンティライナーを着用した。パンティライナーを脱ぎ、そして加えた乳酸細菌および天然の乳酸細菌の存在を、それぞれ、パンティライナーを脱いだ直後、再度測定した。このサンプルはサンプル1と呼ばれた。さらに4時間後~5時間後、さらなるサンプルを採取し、サンプル2とした。乳酸細菌のタイプを、LB931についてはバンコマイシンを含むロゴサ寒天を使用し、他のLBについては嫌氣的にインキュベーションしたロゴサ寒天平板を使用して同定した。さらなる同定をAPI (BioMerieux、フランス)およびPFGE (パルスフィールド電気泳動)によって行った。これらの結果を表IVに示す。LB931は、LB931を噴霧したパンティライナーを使用した後のすべての女性において会陰部皮膚または尿管口で見出すことができる。

30

40

【0036】

【表4】

表 IV

被験者 番号	尿管口	サンプル1		サンプル2	
		尿管口	会陰部皮膚	尿管口	会陰部皮膚
1	2×10 ² 0	4×10 ⁴ 0	0	0	
2	6×10 ¹ 0	7×10 ² 0	0	2×10 ² 0	
3	1×10 ³ 0	1×10 ² 0	1×10 ¹ 0	5×10 ¹ 0	
4	1×10 ² +	3×10 ² +	3×10 ¹ +	1×10 ³ +	
5	2×10 ³ +	3×10 ³ 0	2×10 ¹ +	1×10 ¹ +	
6	1×10 ² +	2×10 ² +	1×10 ¹ +	7×10 ¹ +	
7	2×10 ³ +	8×10 ³ +	1×10 ² +	7×10 ¹ +	
8	2×10 ¹ 0	4×10 ³ 0	0	8×10 ¹ 0	
9	9×10 ¹ +	2×10 ² +	0	8×10 ¹ +	
10	3×10 ³ 0	2×10 ⁴ 0	7×10 ² 0	4×10 ³ 0	
11	2×10 ² +	6×10 ² +	3×10 ² +	2×10 ² +	
12	7×10 ¹ 0	9×10 ² 0	0	1×10 ¹ 0	
13	5×10 ³ 0	7×10 ³ 0	7×10 ³ 0	7×10 ¹ 0	
LB931 陽性の数		13	13	8	12

【0037】

実施例5：少女における会陰部皮膚および尿管口へのLB931の移動

3才～12才の13人の少女が試験に含まれた。会陰部皮膚および尿管口からの細菌サンプルを、綿棒を最初にMRSプロスに浸し、次いでスティックで皮膚表面または上皮表面を穏やかにこすることによって得た。最後に、綿棒を、MRSプロスを含有するサンプル管に浸した。サンプルを下記の計画に従って得た：

サンプル0：ブランクサンプルを、LB931細菌を含む試験に入る前の夕方に得た。1日目の夕方、パンティライナーを着用した。

サンプル1：2日目の朝。新しいパンティライナーを1日中着用する。

サンプル2：サンプルを、任意に行われる入浴の前、および新しいパンティライナーを着用する前の夕方に採取した：2日目の夕方。

10

20

30

40

50

サンプル3：サンプル1の場合と同じ手順。3日目の朝。
 サンプル4：サンプル2の場合と同じ手順。3日目の夕方。
 サンプル5：サンプル1の場合と同じ手順。4日目の朝。
 サンプル6：サンプルを、任意に行われる入浴の前の夕方に採取する。夜間はパンティライナーを着用しない：4日目の夕方。
 サンプル7：サンプルを5日目の朝に採取する。日中はパンティライナーを着用しない。
 サンプル8：最後のサンプルを5日目の夕方に採取する。

【0038】

結果を図3（尿管口）および図4（会陰部皮膚）に示す。結果は、LB931は吸収剤用品から移動し得ることを示している。

10

【0039】

実施例6：抗生物質および殺精子剤物質に対する感受性

ラクトバチルス・プランタルムLB931のMIC値を、E試験（Brown他、J. Antimicrob. Chemother.、1991；27：185～190）を使用して測定した。結果を下記の表Vに示す：

【0040】

表V

抗生物質	MIC (μg/ml)
アンピシリン	0.19
セフトキシム	0.094
セフロキシム	0.38
ゲンタマイシン	0.25
イミペネム	0.016
メトロニダゾール	> 32
エリスロマイシン	0.25
バンコマイシン	> 256
ピペラシン/タゾバクタム	2
テトラサイクリン	2
トリメトプリム	0.016
ベンジルペニシリン	0.5

20

30

【0041】

抗生物質に対する感受性もまた、SIRシステムを使用して測定した。下記の表VIにおいて、Sは感受性を意味し、Rは耐性を示す。

表VI

抗生物質	ゾーン (mm)	判定
セフトロキシム	24	S
クリンダマイシン	35	S
トリ/スルファメトアゾール	43	S
セフトジジム	35	S
アミカシン	30	S
アズトレオナム	0	R
メシリナム	0	R
ナリジキシン酸	0	R
ネチリマイシン	0	R
ニトロファンチン	36	S
ノルフロキサシン	0	R
トブラマイシン	32	S
メシリナム/アンピシリン	41	S
セフィピロム	47	S
オキサシリン	0	R

40

50

セファロチン 22 S

【0042】

LB931は、尿管感染症について通常処方されるいくつかの抗生物質に対して感受性である。しかし、LB931はまた、例えば、ナリジキシン酸およびノルフロキサシンに対して耐性である。LB931はまたバンコマイシンに対して耐性である。

【0043】

MIC試験を殺精子剤のテルギトールについても行った。LB931を、MRS寒天で、5%CO₂のもと、37で48時間増殖させた。細菌を3mlのMRSプロスに接種し、前記と同じ条件で10時間インキュベーションした。1.5%の培養物を3mlのMRSプロスに再接種し、同じ条件下で18時間インキュベーションした。NP-9テルギトール(Sigma、米国)(ロット:47F0002)を37(粘度を低下させた)の温度のMRSプロスで希釈して、40%の貯蔵溶液にした。この貯蔵溶液を使用して、下記濃度の3mlの溶液を調製した:0%、5%、10%、20%、30%および40%。10μlの細菌培養物を各溶液に加えた。ブランク溶液を混合し、MRS寒天平板に加えた。平板を、5%CO₂のもと、37で48時間増殖させて、細胞密度を測定した。残りの溶液は、混合することなく、5%CO₂のもと、37で18時間インキュベーションした。30%および40%のNP-9を含有する溶液を37のMRSプロス(粘度を低下させた)で希釈した。すべての溶液を激しく混合し、滅菌0.9%NaClで希釈して、MRS寒天平板に加えた。平板を、5%CO₂のもと、37で48時間インキュベーションして、cfu/mlを求めた。

10

20

【0044】

結果を下記の表VIIに示す:

表VII

LB931の接種量は1.0 x 10⁷ cfuであった。

テルギトールNP-9	cfu/ml	LB931
0%	2.6 x 10 ⁹	
1%	2.5 x 10 ⁹	
5%	2.5 x 10 ⁹	
10%	1.6 x 10 ⁹	
20%	1.4 x 10 ⁹	
30%	1.0 x 10 ⁹	
40%	6.9 x 10 ⁷	

30

【0045】

これらの結果は、LB931が40%までのテルギトールNP-9において十分生存し得ることを示している。

【0046】

実施例7: 膾上皮細胞へのLB931の付着

a) LB931懸濁物の調製

LB931をMRS寒天で増殖させた(5%CO₂、37、48時間)。培養物を3mlのプロスに接種した(5%CO₂、37、8時間)。得られた培養物の2%を10mlのMRSプロスに再接種した(5%CO₂、37、18時間)。得られた培養物を20およびシングアウト・ローターにおいて2000rpm(820xg)で8分間遠心分離した。得られた細胞ペレットを5mlの乳酸緩衝液(10mM乳酸、pH4.5、0.15MのNaCl)で洗浄した。細菌を乳酸緩衝液で希釈して、OD₅₀₀を約1.0(約10⁸ cfu/ml)にする。

40

【0047】

b) 膾上皮細胞の調製:

膾上皮細胞を、滅菌綿棒スティックを使用して集め、そして細菌を、4mlの乳酸緩衝液またはPBSを含む小さなチューブに移した。チューブを混合して、綿スティックを取り出した。チューブを、Jouan社のCR-12型シングアウト・ローターにおいて、

50

700rpmおよび20で8分間遠心分離した(約100xg)。得られたペレットを3mlの乳酸緩衝液またはPBSで洗浄した。細胞を血球計で計数して、濃度を、乳酸緩衝液またはPBSを使用して10⁵~10⁶細胞/mlに調節した。25μlの細胞を、洗浄手順を管理するために顕微鏡スライドに広げた(下記参照)。

【0048】

c) 付着試験

0.5mlのLB931懸濁物および0.5mlの細胞懸濁物を1.5mlのエッペンドルフチューブで軽く混合した。コントロールサンプルを、0.5mlの細胞懸濁物および0.5mlの緩衝液を混合することによって調製した。チューブを20および2000rpm(約720xg)で遠心分離し、その後、37で1時間インキュベーションした。インキュベーション後、チューブを20および700rpm(約90xg)で8分間遠心分離した。ペレットを1mlの乳酸緩衝液またはPBSで洗浄した。最後に、ペレットを400μl~500μlの乳酸緩衝液またはPBSで懸濁した。

10

【0049】

d) 分析

懸濁したペレットの25μlを顕微鏡スライド上で風乾し、その後、固定およびグラム染色を行った。各サンプルから、50個の上皮細胞を分析する。細胞に付着したLB931の数を計数して、結果を5群(0~10、11~30、31~50、51~100、>100細菌/細胞)に分ける。

20

【0050】

結果を下記の表VIIIに示す：

【表5】

表 VIII

被験者数：5

サンプリング時期：月経期間前 (bm) ; 排卵期 (Ov)

上皮細胞	付着LB931/上皮細胞				
	0~10	11~30	31~50	51~100	>100
サンプル					
(bm) LB931と インキュベーション、 pH4.5	17.2*	24.8	14.4	15.6	28.0
(bm) コントロール細胞と インキュベーション、 pH4.5	99.6	0.4			
(Ov) LB931と インキュベーション、 pH4.5	8.4	22.8	19.2	20.0	29.6
(Ov) コントロール細胞と インキュベーション、 pH4.5	98.4	1.6			

30

40

* 数字は百分率で示されている。

【0051】

50

これらの結果により、LB931細菌は、細胞のサンプリング時期とは無関係に、臍上皮細胞に十分に付着することが明らかに示されている。

【図面の簡単な説明】

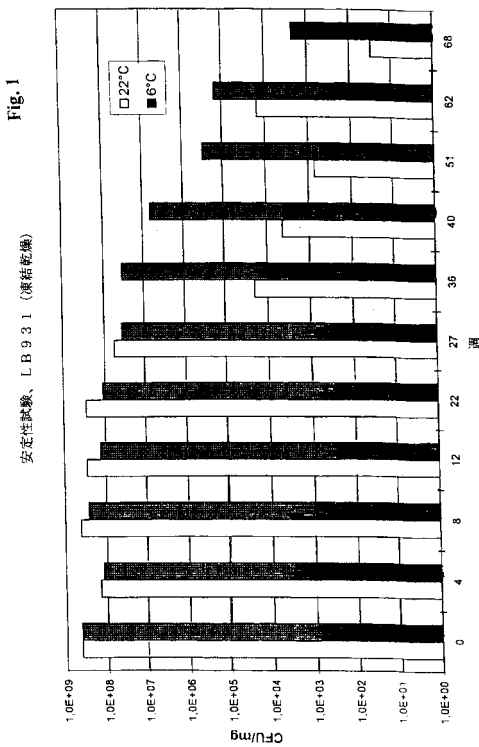
【図1】 凍結乾燥したLB931の室温(+22℃)および+6℃における安定性を示すグラフである。

【図2】 吸収用品に含有されたLB931の安定性を示すグラフである。

【図3】 LB931を含むパンティライナーを使用した後での少女の尿管口に移動したLB931の数を示すグラフである。

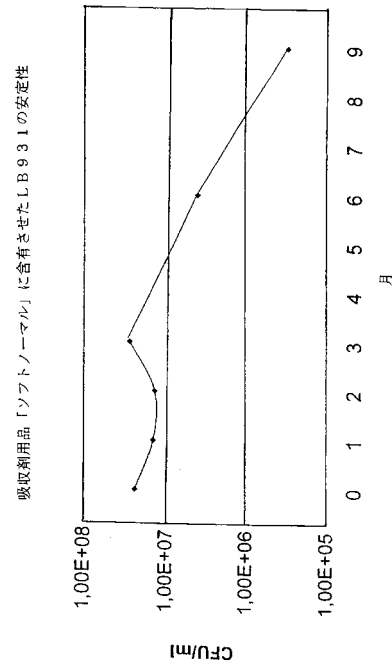
【図4】 LB931を含むパンティライナーを使用した後での少女の会陰部皮膚に移動したLB931の数を示すグラフである。

【図1】



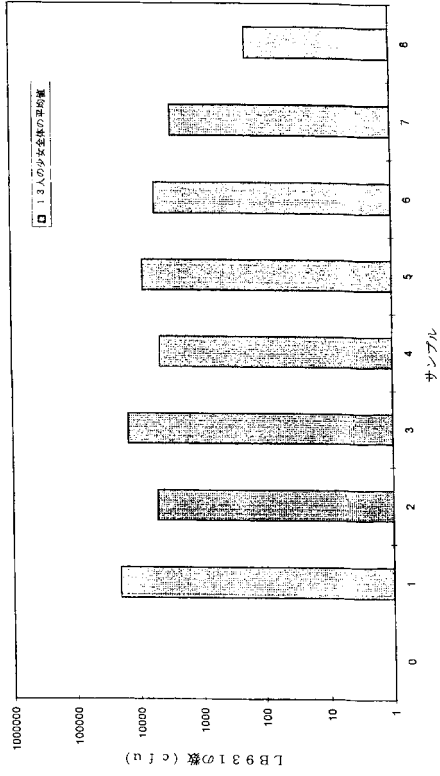
【図2】

Fig. 2



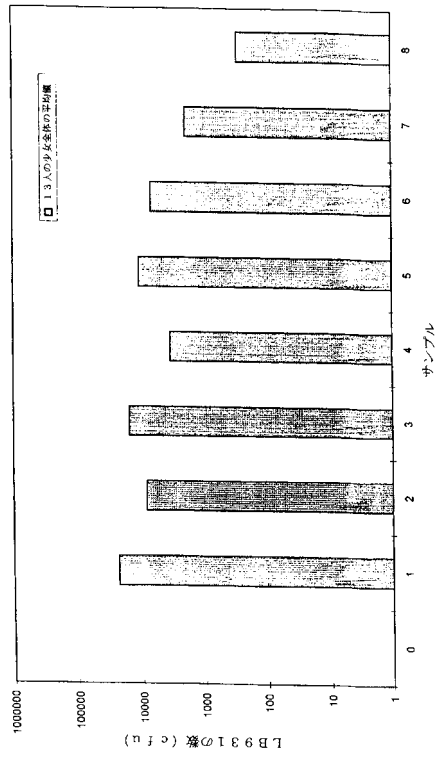
【 図 3 】

昼間/夜間の期間中のLB931の平均値 (尿道)



【 図 4 】

昼間/夜間の期間中のLB931の平均値 (会陰部)



フロントページの続き

- (51) Int.Cl. F I
A 6 1 P 13/00 (2006.01) C 1 2 N 1/20 A
 C 1 2 R 1/25 (2006.01) C 1 2 R 1:25
- (72)発明者 ホーカンソン, エヴァ, グラン
 スウェーデン, エス - 9 0 3 3 1 ウメオー, ニイガタン 7 4
- (72)発明者 ホルスグレン - ブルスク, ウラ
 スウェーデン, エス - 4 3 5 4 3 ピクスボ, プロモンヴェーゲン 3 5
- (72)発明者 アンデルソン, ロルフ
 スウェーデン, エス - 4 3 5 3 1 メールンリユーケ, ヴァルモヴェーゲン 1 1
- (72)発明者 ホルム, ステイグ, イー.
 スウェーデン, エス - 9 0 7 3 8 ウメオー, ノラ ギモネースヴェーゲン 2 5
- (72)発明者 ホーカンソン, ステラン
 スウェーデン, エス - 9 0 3 3 1 ウメオー, ニイガタン 7 4

審査官 中村 正展

- (56)参考文献 米国特許第 0 5 7 0 5 1 6 0 (U S , A)
 国際公開第 9 7 / 0 2 9 7 6 2 (W O , A 1)
 国際公開第 8 4 / 0 0 4 6 7 5 (W O , A 1)
 国際公開第 9 3 / 0 0 9 7 9 3 (W O , A 1)
 米国特許第 0 5 1 7 6 9 1 1 (U S , A)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C12N 1/20
 A61K 35/74
 A61L 15/00-15/36
 A61F 13/15-13/20
 A61F 13/47-13/472
 A61P 13/00