

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2020年6月4日(04.06.2020)



(10) 国際公開番号
WO 2020/111172 A1

- (51) 国際特許分類:
A61P 31/04 (2006.01) *A23L 33/195* (2016.01)
A61K 35/744 (2015.01) *A61K 38/16* (2006.01)
A23L 33/18 (2016.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2019/046527
- (22) 国際出願日: 2019年11月28日(28.11.2019)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
 特願 2018-223461 2018年11月29日(29.11.2018) JP
- (71) 出願人: 雪印メグミルク株式会社(MEGMILK
 SNOW BRAND CO., LTD.) [JP/JP]; 〒0650043

北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号Hokkaido (JP).

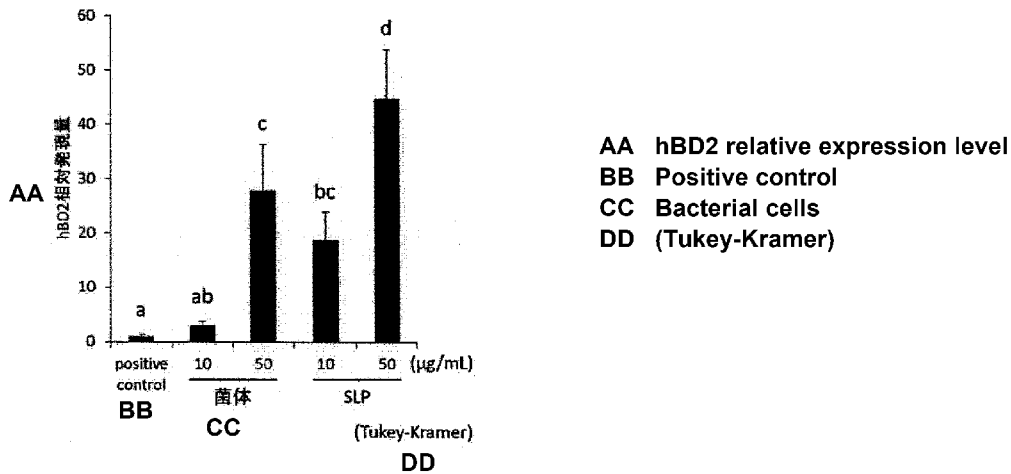
(72) 発明者: 小島 英史(KOBATAKE Eiji); 〒0650043
 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号雪印メグミルク株式会社内 Hokkaido (JP). 冠木敏秀(KABUKI Toshihide); 〒0650043 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号雪印メグミルク株式会社内 Hokkaido (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人 もえぎ特許事務所(MOEGI PATENT OFFICE); 〒1600007 東京都新宿区荒木町20番地21インテック88ビル4階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,

(54) Title: COMPOSITION FOR PROMOTING ANTIMICROBIAL PEPTIDE PRODUCTION

(54) 発明の名称: 抗菌ペプチド産生促進用組成物



(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a novel material that elevates the production of antimicrobial peptides from epithelial cells and has a preventative effect against infection. The present invention provides a composition for promoting antimicrobial peptide production, the composition having lactic acid bacteria of the genus *Lactobacillus* as an active ingredient. The present invention also provides a composition for promoting antimicrobial peptide production, the composition having a component derived from *Lactobacillus* cells as an active ingredient. Furthermore, the present invention provides a composition for promoting antimicrobial peptide production in which the bacterial-cell-derived component is one or more selected from the group consisting of S-layer proteins and S-layer protein degradation products.



WO 2020/111172 A1

CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH,
KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,
MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

添付公開書類 :

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 規則13の2に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示 (規則13の2.4(d)(i)及び48.2(a)(viii))

(57) 要約 : 本発明の課題は、上皮細胞からの抗菌ペプチド産生を上昇させ、感染予防効果を有する新規な素材を提供することである。本発明は、ラクトバチルス属の乳酸菌を有効成分とする抗菌ペプチド産生促進用組成物を提供する。また、ラクトバチルス属の菌体由来成分を有効成分とする抗菌ペプチド産生促進用組成物を提供する。さらには、前記菌体由来成分がS層タンパク質 (S-layer protein) 及びS層タンパク質 (S-layer protein) の分解物からなる群から選択される1つ以上である抗菌ペプチド産生促進用組成物を提供する。

明 細 書

発明の名称： 抗菌ペプチド産生促進用組成物

技術分野

[0001] 本発明は、抗菌ペプチド産生促進用組成物に関する。特に、ラクトバチルス属乳酸菌を含む抗菌ペプチド産生促進用組成物に関する。

背景技術

[0002] 抗菌ペプチドは生体が有する防御システムの一つであり、細菌、真菌、ウイルスなどに対して広い抗菌活性を有する。抗菌ペプチドの発現を誘導することにより、感染に対する予防、治療効果が期待できることから、これまでにいくつかの抗菌ペプチド産生を上昇させるための解決手段が開示されている。

特許文献1は、非病原性細菌を用いて皮膚細胞における β ディフェンシン産生を刺激することを課題とし、その解決手段として加熱処理したラクトバチルス・プランタルムの細胞を含む抽出物、およびその活性画分を含む組成物を開示している。

特許文献2は、安全で副作用のない抗菌ペプチドの誘導剤を提供することを課題とし、その解決手段として乳酸菌を有効成分として含む抗菌ペプチド誘導剤を開示している。

特許文献3は、抗菌ペプチドの分泌を誘発させる物質を提供し、細菌またはウイルスに起因する疾患に対する治療剤を提供することを課題とし、その解決手段として分岐鎖アミノ酸を有効成分として含有する抗菌ペプチド分泌誘発剤を開示している。

しかしながら、本願の提供する解決手段はいずれの文献にも開示も示唆もされていない。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特許第5224807号公報

特許文献2：WO2015/087919パンフレット

特許文献3：特開2003-95938号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 本発明の課題は、上皮細胞からの抗菌ペプチド産生を上昇させ、感染予防効果を有する新規な素材を提供することである。

課題を解決するための手段

[0005] 上記課題を解決するため、本発明には以下の構成が含まれる。

〔1〕ラクトバチルス属の菌体由来成分であるS層タンパク質（S-layer protein）及び前記S層タンパク質（S-layer protein）の分解物からなる群から選択される1つ以上を有効成分として含むことを特徴とする抗菌ペプチド産生促進用組成物。

〔2〕ラクトバチルス属の菌体由来成分であるS層タンパク質（S-layer protein）及び前記S層タンパク質（S-layer protein）の分解物を含むラクトバチルス・ヘルペティカス菌体又はその培養物を有効成分として含む抗菌ペプチド産生促進用組成物。

〔3〕前記ラクトバチルス属の乳酸菌がラクトバチルス・ヘルペティカス、ラクトバチルス・アシドフィルス、ラクトバチルス・アミロボラス又はラクトバチルス・ブフネリである〔1〕又は〔2〕に記載の抗菌ペプチド産生促進用組成物。

〔4〕抗菌ペプチドが β -ディフェンシンである〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の抗菌ペプチド産生促進用組成物。

〔5〕抗菌ペプチド産生促進が、上皮細胞における抗菌ペプチドの産生促進である〔1〕～〔4〕のいずれかに記載の抗菌ペプチド産生促進用組成物。

〔6〕〔1〕から〔5〕のいずれか1つに記載の抗菌ペプチド産生促進用組成物を含む抗菌ペプチド産生促進用飲食品。

〔7〕〔1〕から〔5〕のいずれか1つに記載の抗菌ペプチド産生促進用組成物を含む感染予防用飲食品。

発明の効果

[0006] ラクトバチルス属乳酸菌に由来するS層タンパク質 (S-layer protein、以下SLPということがある) およびその分解物、もしくはSLPを含むラクトバチルス属乳酸菌菌体およびその培養物などの抗菌ペプチド産生を誘導する素材を体内に摂取することにより、種々の感染に対する防御能の向上が期待できる。

図面の簡単な説明

- [0007] [図1]精製したSLPをSDS-PAGEにかけた結果を示す写真である。
[図2]SLP、加熱したSLP、SLP分解物をSDS-PAGEにかけた結果を示す写真である。
[図3]Caco-2細胞にラクトバチルス・ヘルペティカス乳酸菌菌体又は当該乳酸菌のSLPを添加した場合のhBD2遺伝子の発現量を示すグラフである。
[図4]Caco-2細胞にラクトバチルス・ヘルペティカスのSLP、加熱したSLP、SLP分解物を添加した場合のhBD2遺伝子の発現量を示すグラフである。
[図5]Caco-2細胞にラクトバチルス・ヘルペティカスSBT2171、ラクトバチルス・アシドフィルスJCM1132、ラクトバチルス・アミロボラスJCM1126、ラクトバチルス・ブフネリJCM1115から調製したSLPを添加した場合のhBD2遺伝子の発現量を示すグラフである。
[図6]HSC-4細胞にラクトバチルス・ヘルペティカス乳酸菌菌体又は当該乳酸菌のSLPを添加した場合のhBD2遺伝子の発現量を示すグラフである。

発明を実施するための形態

- [0008] 本発明は、新規な抗菌ペプチド産生促進用組成物を提供するものである。
本発明の抗菌ペプチド産生促進用組成物について以下に詳細に説明する。
(抗菌ペプチド産生促進用組成物)
S-layer protein (以下、単にSLPということがある)

は種々の細菌の細胞壁外層で認められ、規則的な結晶構造を呈することを特徴とするタンパク質である。SLPは細胞壁成分に非共有的に結合していることから、塩化リチウムなどのカオトロピック試薬によって菌体から抽出される。また、抽出されたSLPはカオトロピック試薬を除くことで規則的な結晶構造を再形成する。この特徴を利用し、菌体からの精製が可能となる。

乳酸菌の中ではラクトバチルス属においてS-layerを発現していることが見出されており、向井らの報告（Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria, 19(1):21-29, 2008）ではラクトバチルス・アシドフィルス（*L. acidophilus*）グループ乳酸菌をはじめとする13菌種でSLPの発現が確認もしくは推定されている。これらの乳酸菌が発現しているSLPには、等電点が9~10の塩基性タンパク質であること、N末端領域に23~30アミノ酸残基からなるシグナルペプチド配列を持つことといった共通点がある。本発明の抗菌ペプチド産生促進用組成物に用いるSLPは、ラクトバチルス属に由来し、当該作用を有するものであればどのようなものでも用いることができるが、ラクトバチルス・ヘルベティカス、ラクトバチルス・アシドフィルス、ラクトバチルス・アミロボラス又はラクトバチルス・ブフネリが好ましい。ラクトバチルス・ヘルベティカスのうちではSBT2171（FERM BP-5445）が最も好ましい。

また、SLPは菌体から精製されたものである必要はなく、SLPを含む菌体自体や培養物としても用いることができるが、精製したSLPがより好ましい。菌体自体は、生菌体でも死菌体でもよい。

抗菌ペプチドとしては、ディフェンシンファミリー（ α -ディフェンシン、 β -ディフェンシンなど）、カセリシジン（LL-37）、ダームシジン、LEAP-1（ヘプシジン）、LEAP-2、ラクトフェリン、Regペプチドなどが挙げられ、このうちでもディフェンシンファミリーが好ましく、 β -ディフェンシンがさらに好ましい。

[0009]（抗菌ペプチド産生促進用組成物の製造方法）

S L Pは以下の方法に従って乳酸菌菌体より精製する。対象とするラクトバチルス属乳酸菌をM R S液体培地などの液体培地、もしくは脱脂乳で十分に培養した後に菌体を回収し、必要に応じて洗浄を行う。菌体は、寒天培地などに生育させたコロニーから回収してもよい。得られた菌体をそのまま、もしくは凍結乾燥した後に、塩化リチウム、尿素、塩酸グアニジンなどのカオトロピック試薬溶液で懸濁、攪拌して菌体表層のS L Pを可溶化する。可溶化したS L Pを含む溶液から固形物を除いた後、透析などによってカオトロピック試薬を除き、S L Pを析出させる。析出したS L Pを回収後、必要に応じて洗浄を行い、精製S L Pとする。本発明の抗菌ペプチド産生促進用組成物に用いるS L Pは加熱しても抗菌ペプチド促進作用が維持されることから加熱されたものであってもよい。

[0010] (S L P分解物)

S L P分解物は以下の方法に従って調製する。S L Pの懸濁液に対して種々のプロテアーゼを適当な濃度で添加し、適宜反応させる。プロテアーゼの種類およびプロテアーゼ分解の程度は限定されるものではない。一例としてプロティナーゼKで分解処理する条件としては、37℃で2時間～24時間が望ましく、3時間～20時間がより好ましい。

[0011] (摂取量)

S L Pによる抗菌ペプチド産生促進作用は分解物の状態でも発揮されることから、経口的に摂取した後に胃酸による分解を受けても作用への影響は小さいものと考えられる。このことから、S L Pを食品に添加して経口的に摂取することが望ましい。摂取量については特に制限しないが、ラクトバチルス・ヘルベティカスS B T 2 1 7 1の場合、概算でS L P 1 m g / 日を継続的に摂取することで抗菌ペプチドの誘導が期待できると考えられる。

[0012] (食品、医薬品、飼料への配合)

精製したS L Pは加熱処理によって抗菌ペプチド産生促進作用を失わないことから、常法に従って食品、医薬品、飼料に配合することが可能である。

本発明の抗菌ペプチド産生促進用組成物を含む飲食品は、抗菌ペプチド産

生促進用飲食品としての利用価値があり、本飲食品を摂取することにより、上皮細胞からの抗菌ペプチド産生を促進し、様々な感染からの予防ができ、また感染した場合でも軽症に抑えられ、また早い回復が期待できる。動物用飼料に含まれる場合は、これを摂取した動物に同様の効果が期待できる。

また、本発明の抗菌ペプチド産生促進用組成物を含む医薬は、抗菌ペプチドの産生が促進されることにより治療または予防できる疾患に使うことができる。例えば、病原菌による各種の感染症などが挙げられる。

[0013] (評価方法)

抗菌ペプチド産生促進作用とは、対象における抗菌ペプチドの産生が促進される作用をいい、抗菌ペプチドを発現するための遺伝子の発現が誘導されることにより抗菌ペプチドが発現されることをいう。したがって、本明細書中、抗菌ペプチド産生促進作用と抗菌ペプチド誘導作用とは同義で用いられる。

本発明のSLPによる抗菌ペプチド誘導作用は以下に示す方法で評価する。培養細胞に対してSLPもしくはその分解物を添加し、所定の時間作用させた後に抗菌ペプチド遺伝子の発現量を測定する。評価には種々の細胞を用いることができるが、特に生体外との接触が想定される上皮細胞が好ましい。また、測定される抗菌ペプチドは限定されるものではないが、ディフェンシンファミリーが好ましく、上皮細胞から分泌される β -ディフェンシンが特に好ましい。

実施例

[0014] 以下、本発明の実施例を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0015] 本試験に用いたラクトバチルス属の菌体、SLP、SLP分解物の調製例を以下に示す。

(ラクトバチルス属乳酸菌菌体の調製例)

ラクトバチルス・ヘルベティカスSBT2171をMRS液体培地100 mLで37℃、16時間培養後、遠心分離(8,000×g、4℃、10分

間)にて菌体を回収し、生理食塩水で2回、滅菌MilliQ水で1回洗浄し、さらに凍結乾燥を実施した(凍結乾燥菌体)。

以下の試験では、凍結乾燥菌体を用いた。

[0016] (SLPの調製例)

ラクトバチルス・ヘルベティカスSBT2171をMRS液体培地100 mLで37℃、16時間培養後、遠心分離(8,000×g、4℃、10分間)にて菌体を回収し、滅菌MilliQ水で1回洗浄した。得られた菌体はcOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche)を添加した1M LiCl溶液10mLで懸濁し、室温で30分間攪拌した。攪拌後の懸濁液を遠心分離(10,000×g、4℃、20分間)し、上清を回収した。沈殿はcOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche)を添加した5M LiCl

溶液10mLで再懸濁し、室温で再度30分間攪拌した。攪拌後の懸濁液は遠心分離(10,000×g、4℃、20分間)し、上清を回収した。回収した上清をまとめ、0.2μmフィルターを通した後にSlide-A-Lyzer G2 10K (Pierce)で滅菌MilliQ水に対して透析することでSLPを析出させた。透析後の溶液を遠心分離(12,000×g、4℃、20分間)し、析出したSLPを回収した。回収したSLPは滅菌MilliQ水1mLで洗浄後、1M LiCl溶液500μLに懸濁し、適宜攪拌しながら氷上で15分間保持した。遠心分離によってLiCl溶液を除き、再度滅菌MilliQ水1mLで洗浄、滅菌MilliQ水に再懸濁して凍結乾燥したものを精製SLPとした。

精製後のSLPは、SDS-PAGE法によって目的サイズの43kDa付近にバンドが認められることを確認した(図1)。また、得られたSLPは3mgであった。

[0017] (SLP分解物の調製例)

5mg/mLとなるようにPBSで懸濁したSLPに、proteina

seK (from *Tritirachium album*, P6556 : Sigma) (10mg/mL) を終濃度 100 μ g/mL となるように添加し、37°C で一晩反応させた。反応後の SLP を 96°C で 10 分間加熱して proteinase K を不活化し、SLP 分解物とした。比較のため、PBS で懸濁した SLP、PBS で懸濁して 96°C で 10 分間加熱した SLP、proteinase K で分解した SLP について SDS-PAGE 法でバンドの確認を行った (図 2)。加熱した SLP は SLP と同様の 43 kDa 付近のほか、37 kDa 付近、5 kDa 付近にもバンドが見られた。また、SLP 分解物は 5 kDa 以上の明確なバンドは見られなかった。

[0018] 〔試験例 1〕 抗菌ペプチド誘導活性の評価 (1) 菌体との比較

1. 試験方法

継代培養した Caco-2 細胞 (ヒト腸管上皮細胞) を 2.0×10^5 cells/well となるよう 12 well プレートに播種し、5% CO₂ インキュベーターにて 37°C で一晩培養した。培養には、DMEM-high glucose (D5796 : Sigma) に FBS (final conc. 10%) (Lot. 11D264 : Sigma)、NEAA (final conc. 1x) (M7145 : Sigma)、Penicillin-Streptomycin (final conc. 100U-100 μ g/mL) (15140-122 : Life technologies) を添加して使用した。培養後、細胞が 70~80% コンフルエントに達していることを確認するとともに、培地を除き FBS および抗生物質を添加していない培地 (DMEM-high glucose + 1x NEAA) に交換、37°C でさらに 24 時間培養した。培養後の 12 well プレートから培地を除き、ラクトバチルス・ヘルペティカス SBT 2171 菌体もしくはラクトバチルス・ヘルペティカス SBT 2171 から精製した SLP を 10 もしくは 50 μ g/mL 含む培地を添加、6 時間培養した。培養後の 12 well プレートから培地を除き、PBS で洗浄した後、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて細胞からトータル RNA を抽出した。

抽出したトータルRNAは、NanoDrop2000 (Thermo Fisher Scientific) で濃度を測定した。

抽出したトータルRNA溶液から、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (東洋紡) を用いてcDNAを合成した。逆転写反応には、TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice(登録商標) Gradient (タカラバイオ) を使用した。得られた逆転写反応液をtemplate cDNAとしてリアルタイムPCRに供した。

リアルタイムPCRにはTaqMan(登録商標) Fast Advanced Master Mix (Life Technologies、Cat #4444556) およびTaqMan Gene Expression Assay (hBD2:Hs00175474_m1、GAPDH:Hs03929097_g1) (Life Technologies) を使用した。反応には384ウェルプレート (Life Technologies、Cat #4309849) を用い、ViiA™7 (Life Technologies) を使用した。ポジティブコントロール (positive control) としてLPSを10 μ g/mLの濃度で添加し、各水準の遺伝子発現は $\Delta\Delta C_t$ 法によってポジティブコントロールに対する相対発現量として評価した。試験はn=3で実施し、増幅が認められなかったサンプルを含む水準は非検出 (n. d. : not detected) とした。

[0019] 2. 試験結果

評価の結果、SBT2171菌体およびSLP共にhBD2遺伝子の発現上昇が認められた(図3)。SBT2171菌体では添加濃度10 μ g/mLでポジティブコントロールの約3倍、添加濃度50 μ g/mLで約28倍のhBD2遺伝子発現が認められた。一方、SLPでは添加濃度10 μ g/mLで約19倍、50 μ g/mLで約45倍の遺伝子発現が認められた。この結果より、SBT2171から精製したSLPは、SBT2171菌体よりも強い抗菌ペプチド誘導作用を有すると考えられた。図中、a、b、c、

dの記号はそれぞれ異なる記号間で有意な差 ($P < 0.05$) があることを示す (以下、図4～6において同じ)。

[0020] 〔試験例2〕抗菌ペプチド誘導活性の評価 (2) SLP分解物の評価

1. 試験方法

上記「試験例1 (1) 菌体との比較」と同様にCaco-2細胞を播種、培地交換した後、ラクトバチルス・ヘルペティカスSBT2171のSLPをそのまま、96℃10分間加熱したもの、もしくはproteinase K処理によって分解したものをそれぞれ50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度となるよう添加し、6時間培養した。その後、上記の通りトータルRNA抽出、cDNA合成、リアルタイムPCRによるhBD2遺伝子発現解析を行った。

[0021] 2. 試験結果

評価の結果、何も処理していないSLPだけでなく、加熱処理したSLPおよびproteinase Kで分解処理したSLPでもポジティブコントロールと比較して顕著に高いhBD2遺伝子発現が認められた (図4)。この結果より、精製したSLPは分解物の状態でも抗菌ペプチド誘導作用を有すると考えられた。

[0022] 〔試験例3〕抗菌ペプチド誘導活性の評価 (3) 菌株比較

1. 試験方法

上記「試験例1 (1) 菌体との比較」と同様にCaco-2細胞を播種、培地交換した後、ラクトバチルス・ヘルペティカスSBT2171、ラクトバチルス・アシドフィルスJCM1132、ラクトバチルス・アミロボラスJCM1126、ラクトバチルス・ブネリJCM1115からそれぞれ精製したSLPを10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度となるよう添加、6時間培養した。その後、上記の通りトータルRNA抽出、cDNA合成、リアルタイムPCRによるhBD2遺伝子発現解析を行った。なお、SLP無添加の場合をネガティブコントロール (negative control) としてポジティブコントロールに対する相対発現量として評価した。

[0023] 2. 試験結果

評価の結果、いずれの菌株から精製したSLPでもネガティブコントロールと比較して高いhBD2遺伝子発現が認められ、また、ポジティブコントロールと同等あるいはそれ以上のhBD2遺伝子発現が認められた(図5)。この結果より、精製したSLPによる抗菌ペプチド誘導作用はラクトバチルス属に広く共通するものと考えられた。

乳酸菌が産生するSLPの分子量は菌種間で大きな開きがあり、さらにその遺伝子構造は同一菌種内においても多様性に富むことが示されていたところ、本発明のSLPによる抗菌ペプチド誘導作用がラクトバチルス属に広く見出されたことは意外なものであった。

[0024] [試験例4] 抗菌ペプチド誘導活性の評価(4) 口腔上皮細胞での評価

1. 試験方法

継代培養したHSC-4細胞(ヒト舌上皮細胞)を 1.0×10^5 cells/wellとなるよう24wellプレートに播種し、5%CO₂インキュベーターにて37℃で一晩培養した。培養には、DMEM-high glucose(D5796:Sigma)にFBS(final conc. 10%)(Lot. 42F4160K:Gibco)、Penicillin-Streptomycin(final conc. 100U-100μg/mL)(15140-122:Life technologies)を添加して使用した。培養後、細胞が70~80%コンフルエントに達していることを確認するとともに、培地を除きFBSおよび抗生物質を添加していない培地(DMEM-high glucose)に交換、37℃でさらに24時間培養した。培養後の24wellプレートから培地を除き、ラクトバチルス・ヘルペティカスSBT2171菌体もしくはラクトバチルス・ヘルペティカスSBT2171から精製したSLPを10もしくは50μg/mL含む培地を添加、6時間培養した。その後、上記の通りトータルRNA抽出、cDNA合成、リアルタイムPCRによるhBD2遺伝子発現解析を行った。

[0025] 2. 試験結果

評価の結果、Caco-2細胞の場合と同様に菌体、SLP共にhBD2遺伝子発現の上昇が認められた。また、菌体と比較してSLP添加によって高いhBD2遺伝子発現が認められた(図6)。この結果はCaco-2細胞の場合と同様であり、SLPは菌体よりも強い抗菌ペプチド誘導作用を有すると考えられた。

[0026] (食品への配合例)

ラクトバチルス・ヘルベティカスSBT2171から精製したSLP10mgに、脱脂粉乳30g、ビタミンCとクエン酸の等量混合物40g、グラニュー糖100g、コーンスターチと乳糖の等量混合物60gを加えて混合した。混合物をスティック状袋に詰め、本発明の抗菌ペプチド産生促進用スティック状健康食品を製造した。

[0027] (飼料への配合例)

ラクトバチルス・ヘルベティカス SBT2171から精製したSLP2gを3998gの脱イオン水に懸濁し、40℃まで加熱後、TKホモミクサー(MARK 11160型;特殊機化工業社製)にて、3,600rpmで20分間攪拌混合して2g/4kgのSLP溶液を得た。このSLP溶液2kgに大豆粕1kg、脱脂粉乳1kg、大豆油0.4kg、コーン油0.2kg、パーム油2.3kg、トウモロコシ澱粉1kg、小麦粉0.9kg、ふすま0.2kg、ビタミン混合物0.5kg、セルロース0.3kg、ミネラル混合物0.2kgを配合し、120℃、4分間加熱殺菌して、本発明の抗菌ペプチド産生促進用飼料10kgを製造した。

[0028] (医薬品への配合例)

ラクトバチルス・ヘルベティカスSBT2171の液体培養物を、4℃、7,000rpmで15分間遠心分離した後、滅菌水による洗浄と遠心分離を3回繰り返して行い、洗浄菌体を得た。この洗浄菌体を凍結乾燥処理して菌体粉末を得た。この菌体粉末1部に脱脂粉乳4部を混合し、この混合粉末を打錠機により1gずつ常法により打錠して、本発明の抗菌ペプチド産生促進用錠剤を調製した。

産業上の利用可能性

[0029] ラクトバチルス属乳酸菌に由来するSLPおよびSLP分解物、もしくはSLPを含むラクトバチルス属乳酸菌菌体およびその培養物などの抗菌ペプチド産生を誘導する素材を体内に摂取することにより、種々の感染に対する防御能の向上が期待できる。

[0030]

0-1	様式 PCT/RO/134 この寄託された微生物又はその他の生物材料に関する表示 (PCT規則13の2)は、右記によって作成された。	JPO-PAS i370
0-2	国際出願番号	
0-3	出願人又は代理人の書類記号	SNOW-244

1	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
1-1	段落番号	0008
1-3	寄託の表示	
1-3-1	寄託機関の名称	IPOD 独)製品評価技術基盤機構 特許生物寄託センター (NITE-IPOD)
1-3-2	寄託機関のあて名	日本国 〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 120号室
1-3-3	寄託の日付	1996年 03月 06日 (06.03.1996)
1-3-4	受託番号	IPOD FERM BP-5445
1-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国

受理官庁記入欄

0-4	この用紙は国際出願とともに受理した (はい/いいえ)	✓
0-4-1	権限のある職員	奥谷 賢一

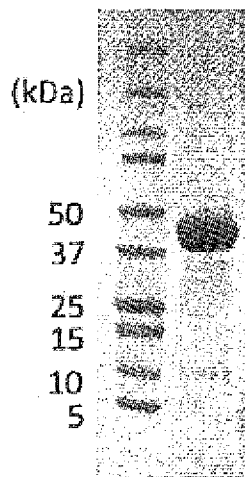
国際事務局記入欄

0-5	この用紙が国際事務局に受理された日	
0-5-1	権限のある職員	

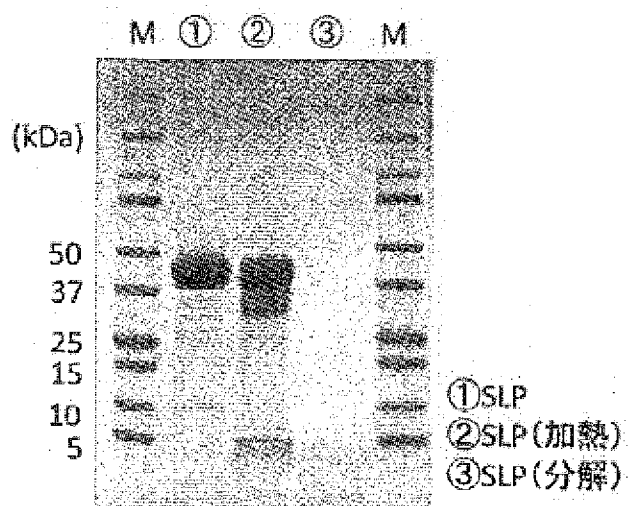
請求の範囲

- [請求項1] ラクトバチルス属の菌体由来成分であるS層タンパク質 (S-layer protein) 及び前記S層タンパク質 (S-layer protein) の分解物からなる群から選択される1つ以上を有効成分として含むことを特徴とする抗菌ペプチド産生促進用組成物。
- [請求項2] ラクトバチルス属の菌体由来成分であるS層タンパク質 (S-layer protein) 及び前記S層タンパク質 (S-layer protein) の分解物を含むラクトバチルス・ヘルペティカス菌体又はその培養物を有効成分として含む抗菌ペプチド産生促進用組成物。
- [請求項3] 前記ラクトバチルス属の乳酸菌がラクトバチルス・ヘルペティカス、ラクトバチルス・アシドフィルス、ラクトバチルス・アミロボラス又はラクトバチルス・ブフネリである請求項1又は2に記載の抗菌ペプチド産生促進用組成物。
- [請求項4] 抗菌ペプチドが β -ディフェンシンである請求項1～3のいずれかに記載の抗菌ペプチド産生促進用組成物。
- [請求項5] 上皮細胞における抗菌ペプチドの産生促進である請求項1～4のいずれかに記載の抗菌ペプチド産生促進用組成物。
- [請求項6] 請求項1から請求項5のいずれか1つに記載の抗菌ペプチド産生促進用組成物を含む抗菌ペプチド産生促進用飲食品。
- [請求項7] 請求項1から請求項5のいずれか1つに記載の抗菌ペプチド産生促進用組成物を含む感染予防用飲食品。

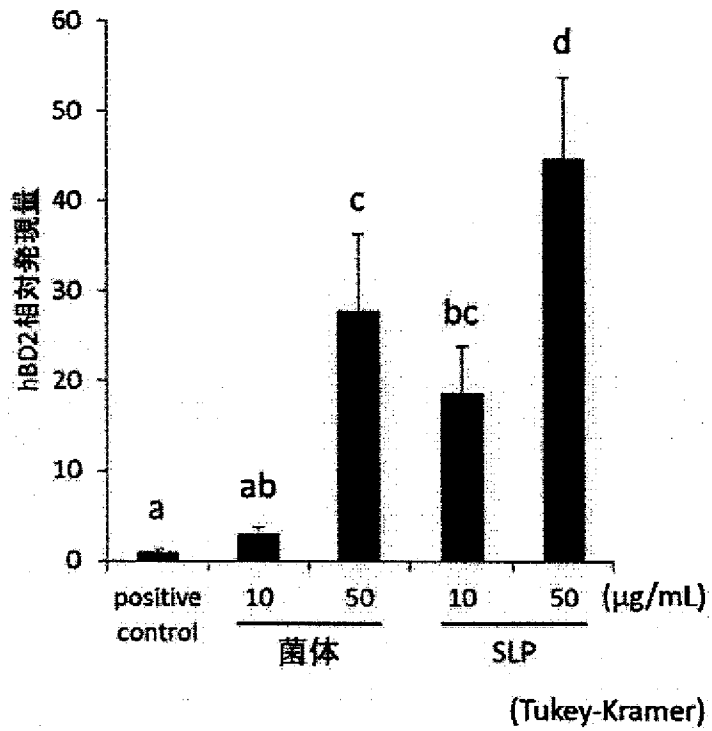
[図1]



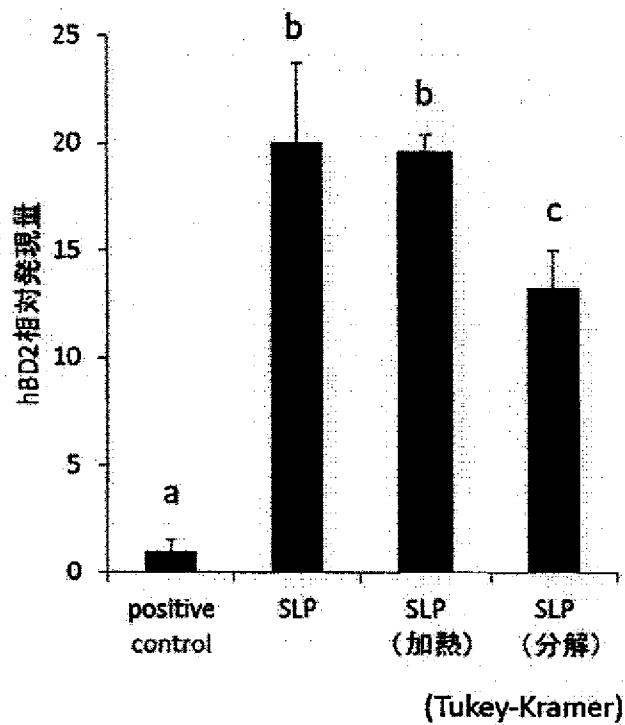
[図2]



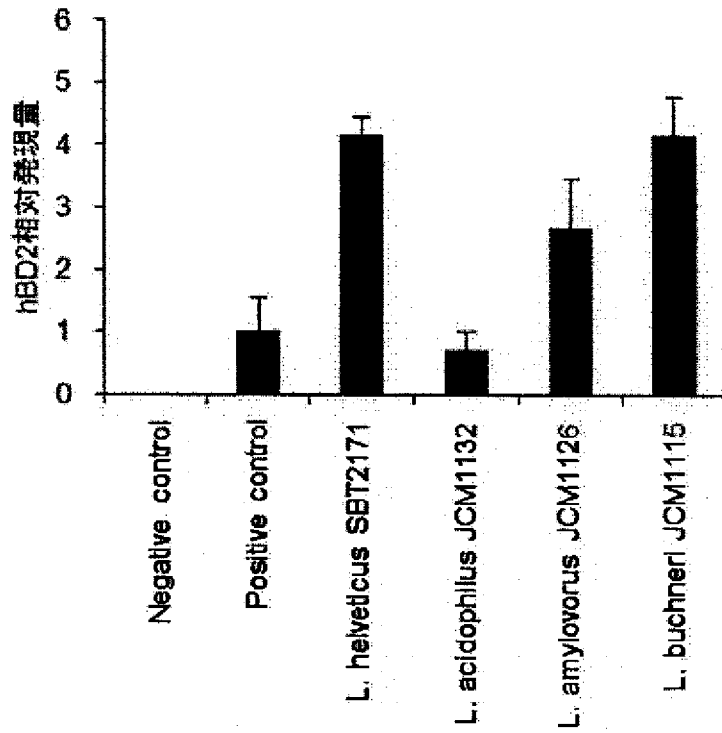
[图3]



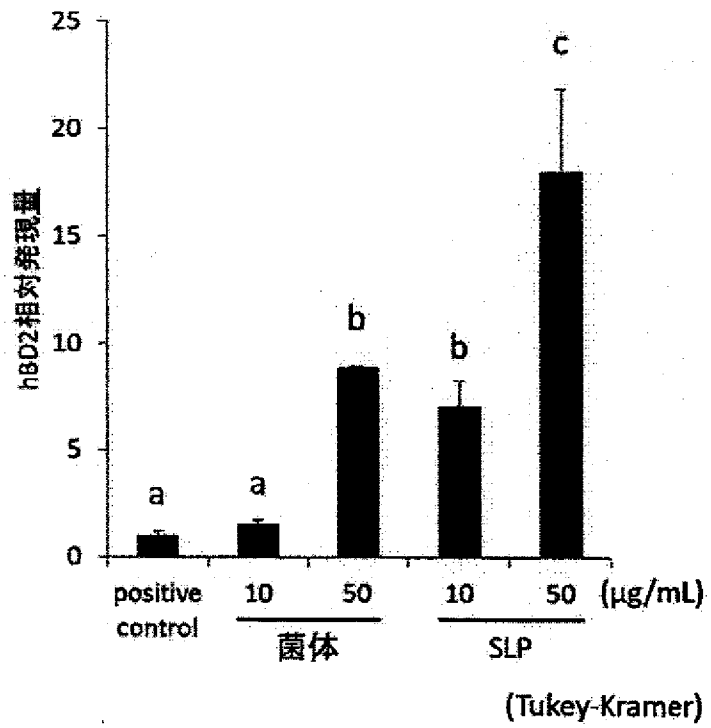
[图4]



[圖5]



[圖6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/046527

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
A61P 31/04(2006.01)i; A61K 35/744(2015.01)n; A23L 33/18(2016.01)i; A23L 33/195(2016.01)i; A61K 38/16(2006.01)i FI: A61K38/16; A61P31/04; A23L33/18; A23L33/195; A61K35/744 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61P31/04; A61K35/744; A23L33/18; A23L33/195; A61K38/16		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Published examined utility model applications of Japan	1922-1996	
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2020	
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020	
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPlus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2015-83547 A (MEGMILK SNOW BRAND CO., LTD.) 30.04.2015 (2015-04-30) claims, paragraph [0010]	1-7
X	JP 2015-151385 A (FUKUOKA UNIVERSITY et al.) 24.08.2015 (2015-08-24) claims	1-7
X	PRADO ACOSTA, M. et al., "S-layer proteins from Lactobacillus sp. inhibit bacterial infection by blockage of DC-SIGN cell receptor", Int. J. Biol. Macromol., November 2016, vol. 92, pp. 998-1005 abstract	7
X	MARTINEZ, M. G. et al., "S-layer proteins of Lactobacillus acidophilus inhibits JUNV infection", Biochem. Biophys. Res. Commun., 15 June 2012, vol. 422, no. 4, pp. 590-595 abstract	7
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 24 January 2020 (24.01.2020)	Date of mailing of the international search report 03 March 2020 (03.03.2020)	
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/046527

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	KOBATAKE, E. et al., "S-Layer Protein of Lactobacillus helveticus SBT2171 Promotes Human β -Defensin 2 Expression via TLR2-JNK Signaling", Front. Microbiol., 18 October 2019, vol. 10, article 2414, pp. 1-12 abstract	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2019/046527

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 2015-83547 A	30 Apr. 2015	(Family: none)	
JP 2015-151385 A	24 Aug. 2015	(Family: none)	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A61P 31/04(2006.01)i; A61K 35/744(2015.01)n; A23L 33/18(2016.01)i; A23L 33/195(2016.01)i; A61K 38/16(2006.01)i FI: A61K38/16; A61P31/04; A23L33/18; A23L33/195; A61K35/744</p>										
<p>B. 調査を行った分野</p>										
<p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） A61P31/04; A61K35/744; A23L33/18; A23L33/195; A61K38/16</p>										
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2020年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2020年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2020年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2020年
日本国実用新案公報	1922 - 1996年									
日本国公開実用新案公報	1971 - 2020年									
日本国実用新案登録公報	1996 - 2020年									
日本国登録実用新案公報	1994 - 2020年									
<p>国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)</p>										
<p>C. 関連すると認められる文献</p>										
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号								
X	JP 2015-83547 A (雪印メグミルク株式会社) 30.04.2015 (2015 - 04 - 30) 特許請求の範囲、段落 [0010]	1-7								
X	JP 2015-151385 A (学校法人福岡大学、外1名) 24.08.2015 (2015 - 08 - 24) 特許請求の範囲	1-7								
X	PRADO ACOSTA M. et al., S-layer proteins from Lactobacillus sp. inhibit bacterial infection by blockage of DC-SIGN cell receptor, Int. J. Biol. Macromol., 2016.11, Vol.92, p.998-1005 要約	7								
X	MARTINEZ M.G. et al., S-layer proteins of Lactobacillus acidophilus inhibits JUNV infection, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2012.06.15, Vol.422, No.4, p.590-595 要約	7								
P, X	KOBATAKE E. et al., S-Layer Protein of Lactobacillus helveticus SBT2171 Promotes Human β -Defensin 2 Expression via TLR2-JNK Signaling, Front. Microbiol., 2019.10.18, Vol.10, Article.2414, p.1-12 要約	1-7								
<p><input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>										
<p>* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献</p>										
国際調査を完了した日	24.01.2020	国際調査報告の発送日 03.03.2020								
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 小金井 悟 4N 3961 電話番号 03-3581-1101 内線 3488									

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2019/046527

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2015-83547 A	30.04.2015	(ファミリーなし)	
JP 2015-151385 A	24.08.2015	(ファミリーなし)	