

(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2010-209015

(P2010-209015A)

(43) 公開日 平成22年9月24日 (2010.9.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 36/06 (2006.01)</b>	A 6 1 K 35/72	4 B 0 1 8
<b>A 6 1 K 35/74 (2006.01)</b>	A 6 1 K 35/74 A	4 C 0 8 7
<b>A 6 1 P 37/08 (2006.01)</b>	A 6 1 P 37/08	
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
<b>A 2 3 L 1/30 (2006.01)</b>	A 6 1 K 35/74 Z	

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-58186 (P2009-58186)  
 (22) 出願日 平成21年3月11日 (2009.3.11)

(71) 出願人 591033283  
 オハヨー乳業株式会社  
 岡山県岡山市中区神下5 6 5 番地  
 (74) 代理人 100062225  
 弁理士 秋元 輝雄  
 (72) 発明者 中村 昇二  
 岡山県岡山市芳賀5 3 2 5 - 1 オハヨー  
 乳業株式会社基礎研究室内  
 (72) 発明者 砂田 洋介  
 岡山県岡山市芳賀5 3 2 5 - 1 オハヨー  
 乳業株式会社基礎研究室内  
 Fターム(参考) 4B018 LB01 LB02 LB05 LB06 LB07  
 LB08 MD81 MD86 ME07  
 4C087 AA01 AA02 BC12 BC56 CA09  
 CA10 MA02 MA52 NA05 NA12  
 ZB13 ZC75

(54) 【発明の名称】 抗アレルギー用組成物及びそれを含有する抗アレルギー剤および抗アレルギー食品

(57) 【要約】

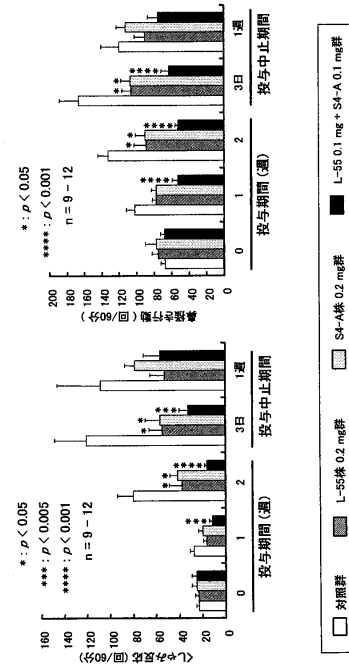
【課題】 日常的に摂取することによりI型アレルギー症状の改善が期待でき、且つ摂取中止後もその改善効果の持続が期待される抗アレルギー用組成物及びそれを含有する抗アレルギー剤および抗アレルギー食品の提供。

【解決手段】 ラクトバチルス・アシドフィルスグループ乳酸菌 L - 5 5 株の菌体を含む培養物と、酵母菌サッカロミセス・セレビシエ S 4 - A 株の菌体を含む培養物を共に有効成分として含有し、且つ含まれる L - 5 5 株の生菌数が  $5 \times 10^9$  個以上  $50 \times 10^9$  個以下であり、S 4 - A 株の生菌数が  $2 \times 10^8$  個以上  $20 \times 10^8$  個以下であることを特徴とする抗アレルギー用組成物により課題を解決できる。

【選択図】 図 1

(ロ) 鼻掻き行動

(イ) くしゃみ反応



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

ラクトバチルス・アシドフィルスグループ乳酸菌 L - 5 5 株の菌体を含む培養物と、酵母菌サッカロミセス・セレピシエ S 4 - A 株の菌体を含む培養物を共に有効成分として含有し、且つ含まれる L - 5 5 株の生菌数が  $5 \times 10^9$  個以上  $50 \times 10^9$  個以下であり、S 4 - A 株の生菌数が  $2 \times 10^8$  個以上  $20 \times 10^8$  個以下であることを特徴とする抗アレルギー用組成物。

**【請求項 2】**

ラクトバチルス・アシドフィルスグループ乳酸菌 L - 5 5 株の菌体と酵母菌サッカロミセス・セレピシエ S 4 - A 株の菌体を、共に有効成分として含有し、且つ含まれる L - 5 5 株の菌量が乾燥重量で 5 mg 以上 50 mg 以下であり、S 4 - A 株の菌量が 5 mg 以上 50 mg 以下であることを特徴とする抗アレルギー用組成物。

10

**【請求項 3】**

請求項 1 あるいは請求項 2 記載の抗アレルギー用組成物を含有することを特徴とする抗アレルギー剤。

**【請求項 4】**

請求項 1 あるいは請求項 2 記載の抗アレルギー用組成物を含有することを特徴とする抗アレルギー食品。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】**

20

**【0001】**

本発明は、抗アレルギー作用を有するラクトバチルス・アシドフィルスグループ乳酸菌 L - 5 5 株の菌体と抗アレルギー作用を有する酵母菌サッカロミセス・セレピシエ S 4 - A 株の菌体を、共に有効成分として含有する抗アレルギー用組成物及びそれを含有する抗アレルギー剤および抗アレルギー食品に関するものであり、更に詳細には、I 型アレルギー症状の改善に優れた効果を発揮し、且つ摂取中止後もその改善効果の持続が期待される抗アレルギー用組成物及びそれを含有する抗アレルギー剤および抗アレルギー食品に関する。

**【背景技術】****【0002】**

30

近年、先進国を中心に、花粉症、食物アレルギー、アトピー性皮膚炎の一部といった免疫グロブリン E ( I g E ) 依存性の I 型アレルギー疾患の患者が年々増加している。

このような現状に対して、アレルギーに関する研究が精力的に行われ、数々のアレルギー治療薬が開発されてきているが、一般に抗アレルギー剤には、一過性の症状緩和をもたらす効果は期待できるが、投与後代謝・排泄により薬の効果が薄れ、そのために継続して薬を服用し続けなければならないという問題がある。

これは患者にとって、服用し続けることによる薬の副作用や経済面を考えると大きな負担であるといえる。そのために既存の薬に替わって、副作用の心配が無く、安価で、且つ抗アレルギー作用の持続性が期待できる、新たな治療剤が望まれている。

**【0003】**

40

このような既存の薬に替わる新たな治療剤として、最近微生物が注目されており、特に乳酸菌や酵母といったプロバイオティクスと呼ばれる微生物の経口摂取により、アレルギー症状を改善する試みが、数多くなされている。

一例として、エンテロコッカス・フェカリス ( 特許文献 1、2 参照 )、ラクトバチルス・ロイテリ ( 特許文献 3 参照 )、ラクトバチルス・アシドフィルス ( 特許文献 4 参照 )、ラクトバチルス・パラカゼイ ( 特許文献 5 参照 ) といった抗アレルギー作用を有する乳酸菌を添加した機能性食品が提案されている。また、サッカロミセス酵母の菌体、あるいは菌体構成成分を添加した抗アレルギー改善食品なるものも提案されている ( 特許文献 6 ~ 10 参照 )。

**【0004】**

50

これら乳酸菌や酵母菌は、古来より人間が発酵食品として摂取してきた経緯があり、副作用面においては何ら問題のない安全な食品といえる。

また、薬に比べて安価であることから、経済的にも充分満足できるものである。しかしながら、乳酸菌あるいは酵母菌を用いた抗アレルギー食品の場合、アレルギー改善効果が薬に比べて弱いという欠点がある。

更に抗アレルギー作用の持続性については、調べられた報告例がほとんどなく、未だに満足できる抗アレルギー食品を提供するには至っていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特開平11-199495号公報

【特許文献2】特開2000-095697号公報

【特許文献3】特開2000-095697号公報

【特許文献4】特開2004-026729号公報

【特許文献5】特開2008-245569号公報

【特許文献6】特開2004-224772号公報

【特許文献7】特開2006-187258号公報

【特許文献8】特開2007-197333号公報

【特許文献9】特開2007-217435号公報

【特許文献10】特開2008-182900号公報

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】*Biol. Pharm. Bull.* 2007; 30(11): 2163-2166, *Int Immunopharmacol.* 2008; 8(13-14): 1761-1766, 2007年第57回日本アレルギー学会秋季学術大会抄録集 アレルギー. 2007; 56(8-9): 1098)。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の第1の目的は、抗アレルギー作用を有する乳酸菌と酵母菌について、両菌体あるいは両菌体を含む培養液を混合した組成物であって、種々の形態で、その抗アレルギー作用を相乗的に増加せしめ、更に摂取を中止した後もその効果が持続して発揮される抗アレルギー用組成物を提供することである。

本発明の第2の目的は、本発明の抗アレルギー用組成物を含有する抗アレルギー剤を提供することである。

本発明の第3の目的は、本発明の抗アレルギー用組成物を含有する抗アレルギー食品を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

上記課題を解決するために、本発明者らは、創意工夫を重ねた結果、抗アレルギー作用を有するラクトバチルス・アシドフィルスグループ乳酸菌L-55株(特許寄託センター寄託番号FERM P-18652)の菌体と抗アレルギー作用を有する酵母菌サッカロミセス・セレビシエS4-A株(特許寄託センター寄託番号FERM AP-21124)の菌体を、共に有効成分として含有せしめた組成物は、それぞれ単独で含有せしめた組成物に比べて抗アレルギー作用が高まり、更に摂取を中止した後もその効果が持続することを見出し、またそれを含有する抗アレルギー剤および抗アレルギー食品が抗アレルギー作用が高く、更に摂取を中止した後もその効果が持続することを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0009】

すでにラクトバチルス・アシドフィルスグループ乳酸菌L-55株および酵母菌サッカ

10

20

30

40

50

ロミセス・セレピシエ S 4 - A 株については、それぞれ単独に摂取することでアトピー性皮膚炎、花粉症、通年性鼻炎など I 型アレルギーの症状を抑制することはわかっているが（非特許文献 1 参照）、本発明者らの長年の研究により、上記 2 種の異なる微生物種を併用摂取することで、それぞれ単独摂取するよりも相乗効果的にアレルギー症状が軽減されることが判明し、その結果、両菌体を有効成分として含有する組成物を完成させることによって課題の解決が図れたのである。

【 0 0 1 0 】

すなわち、請求項 1 記載の本発明は、抗アレルギー用組成物において、ラクトバチルス・アシドフィルスグループ乳酸菌 L - 5 5 株の菌体を含む培養物と酵母菌サッカロミセス・セレピシエ S 4 - A 株の菌体を含む培養物を共に有効成分として含有し、且つ含まれる L - 5 5 株の生菌数が  $5 \times 10^9$  個以上  $50 \times 10^9$  個以下であり、S 4 - A 株の生菌数が  $2 \times 10^8$  個以上  $20 \times 10^8$  個以下であることを特徴とする。

10

【 0 0 1 1 】

請求項 2 記載の本発明は、抗アレルギー用組成物においてラクトバチルス・アシドフィルスグループ乳酸菌 L - 5 5 株の菌体と酵母菌サッカロミセス・セレピシエ S 4 - A 株の菌体を共に有効成分として含有し、且つ含まれる L - 5 5 株の菌量が 5 mg 以上 50 mg 以下であり、S 4 - A 株の菌量が 5 mg 以上 50 mg 以下であることを特徴とする。

【 0 0 1 2 】

請求項 3 記載の本発明は、抗アレルギー剤において、請求項 1 あるいは請求項 2 記載の抗アレルギー用組成物を含有することを特徴とする。

20

【 0 0 1 3 】

請求項 4 記載の本発明は、抗アレルギー食品において、請求項 1 あるいは請求項 2 記載の抗アレルギー用組成物を含有することを特徴とする。

【 発明の効果 】

【 0 0 1 4 】

本発明の請求項 1 記載の抗アレルギー用組成物は、抗アレルギー作用を有するラクトバチルス・アシドフィルスグループ乳酸菌 L - 5 5 株の菌体を含む培養物と抗アレルギー作用を有する酵母菌サッカロミセス・セレピシエ S 4 - A 株の菌体を含む培養物を共に所定量含有することを特徴とするものであり、且つ製造が容易であり、L - 5 5 株の生菌数および S 4 - A 株の生菌数を所定の範囲内として本発明の組成物を日常的に摂取することにより、I 型アレルギー症状の改善が期待でき、且つ摂取中止後もその改善効果の持続が期待されるという顕著な効果を奏す。

30

【 0 0 1 5 】

本発明の請求項 2 記載の抗アレルギー用組成物は、抗アレルギー作用を有するラクトバチルス・アシドフィルスグループ乳酸菌 L - 5 5 株の菌体と酵母菌サッカロミセス・セレピシエ S 4 - A 株の菌体を共に有効成分として所定量含有することを特徴とするものであり、且つ製造が容易であり、L - 5 5 株の菌体（死菌でもよく、死菌と生菌の混合物でもよい）の菌量および S 4 - A 株の菌体（死菌でもよく、死菌と生菌の混合物でもよい）の菌量を所定の範囲内として本発明の組成物を日常的に摂取することにより、I 型アレルギー症状の改善が期待でき、且つ摂取中止後もその改善効果の持続が期待されるという顕著な効果を奏す。

40

【 0 0 1 6 】

本発明の請求項 3 記載の抗アレルギー剤は、請求項 1 あるいは請求項 2 記載の抗アレルギー用組成物を含有することを特徴とするものであり、日常的に摂取することにより、I 型アレルギー症状の改善が期待でき、且つ摂取中止後もその改善効果の持続が期待されるという顕著な効果を奏す。

【 0 0 1 7 】

本発明の請求項 4 記載の抗アレルギー食品は、請求項 1 あるいは請求項 2 記載の抗アレルギー用組成物を含有することを特徴とするものであり、日常的に摂取することにより、I 型アレルギー症状の改善が期待でき、且つ摂取中止後もその改善効果の持続が期待され

50

るという顕著な効果を奏す。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】(イ)は、本発明の実施例において、くしゃみ反応に対するL-55株とS4-A株投与の効果を示す図であり、(ロ)は鼻掻き行動に対するL-55株とS4-A株投与の効果を示す図である。

【図2】本発明の実施例において、血清総IgE濃度に対するL-55株とS4-A株投与の効果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0019】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明に使用される抗アレルギー作用を有するラクトバチルス・アシドフィルスグループ乳酸菌L-55株は、本発明者らがヒトの糞便より分離したヒト腸内生息性の乳酸菌であり、ヨーグルト製造にも用いられることから、安全性には何ら問題の無い乳酸菌である。

【0020】

L-55株は、市販の乳酸菌用合成培地、例えばMRS培地で培養できるほか、野菜汁、果物汁、豆乳、獣乳、脱脂乳などを原料として培養でき、適宜、大豆ペプチド、酵母エキスまたは乳蛋白の加水分解物など市販の生育促進物質を添加することで、より菌濃度の高い培養液が調製できる。

そして、これらのL-55株培養液は、そのまま原料として使用できるのはもちろんであるが、培養液から遠心分離法や膜濃縮法などの濃縮処理を施して得られる菌体塊を使用することもできる。

なお、菌体塊は凍結乾燥を施した後、菌体粉末として用いることもできる。培養例を挙げると、L-55株を0.1%濃度の酵母エキスを含む10%還元脱脂乳培地に接種して、37℃で16時間培養することによって、生菌数が約 $5 \times 10^8$ コロニー数/mlのL-55株培養液が得られる。

【0021】

一方、本発明に使用される抗アレルギー作用を有する酵母菌サッカロミセス・セレピシエS4-A株は、本発明者らが中華人民共和国・内蒙古自治区において昔から伝統的製法で作られている馬乳酒から分離した酵母菌であるが、自然界あるいはさまざまな発酵食品の中からも分離されるので、抗アレルギー作用を有する菌株であれば特に限定されるものではない。

本菌株は、試料を適宜希釈した後、その希釈液をポテトデキストロース寒天培地上に塗沫することによって分離できる。そしてこのようにして得られる酵母菌サッカロミセス・セレピシエは、古来よりパンや酒作りに用いられており、食経験が豊富な微生物であることから、安全性には何ら問題がない。

【0022】

S4-A株は、市販の酵母菌用培地、例えばポテトデキストロース培地で培養できるほか、酵母エキス1~2%及びぶどう糖1~5%から成る培地であれば安価に培養できる。

また本菌株は、野菜汁、果物汁、豆乳、獣乳、脱脂乳などを原料としても培養でき、その場合、適宜、大豆ペプチド、酵母エキスまたは乳蛋白の加水分解物など市販の生育促進物質ならびにサッカロミセス・セレピシエの資化できる糖、例えばグルコース、ガラクトース或いはスクロースなどを1~5%の範囲で任意に添加すればよい。

【0023】

このようにして得られるS4-A株培養液はそのまま原料に使用できるが、L-55株と同様、培養液から遠心分離法や膜濃縮法などの濃縮処理を施して得られる菌体塊を使用することもできる。

なお、菌体塊は凍結乾燥を施したのち、菌体粉末として用いることもできる。

培養例を挙げると、サッカロミセス・セレピシエS4-A株を酵母エキス2%及びぶど

10

20

30

40

50

う糖5%から成る液体培地に接種し、37で24時間通気培養することで、生菌数がおよそ $1 \times 10^7$ コロニー数/mlの培養液が得られる。

【0024】

本発明は、ラクトバチルス・アシドフィルスグループ乳酸菌L-55株の菌体と酵母菌サッカロミセス・セレビスエS4-A株の菌体を共に有効成分として含有せしめることを特徴とする抗アレルギー用組成物であり、両菌体を含有せしめることでI型アレルギー症状の改善に優れた効果を発揮し、且つ摂取中止後もその改善効果の持続が期待される。

したがって、どちらか一方の菌体だけを含んだ組成物では望みどおりの抗アレルギー効果は発揮されない。

【0025】

そのため、上記のようにして調製された乳酸菌と酵母菌の両培養液（あるいは菌体塊や菌体粉末）は、混合することで目的とする効果が発揮される組成物が完成する。

具体的には本発明における混合物の場合、1日にヒト体重1kgあたり、それぞれの菌体が共に乾燥重量（菌体そのものの乾燥重量）で5mg以上摂取できるよう混合することが必要である。

【0026】

しかしながら、両菌体の混合量が多くなると菌体由来の渋みや塩味が強くなり、食品として味覚的な問題が生じるので、両菌体の混合量はそれぞれ50mgを上限とすることが望ましい。

その際に混合する割合は特に限定されるものではなく、それぞれの菌体が乾燥重量で5mg以上50mg以下の範囲、好ましくは6mg以上45mg以下の範囲、特に好ましくは7mg以上40mg以下の範囲であれば、両菌の配合量割合は任意に設定できる。

【0027】

これを生菌数で示すと、L-55株は $5 \times 10^9$ 個以上 $50 \times 10^9$ 個以下、好ましくは $6 \times 10^9$ 個以上 $45 \times 10^9$ 個以下、特に好ましくは $7 \times 10^9$ 個以上 $40 \times 10^9$ 個以下、S4-A株は $2 \times 10^8$ 個以上 $20 \times 10^8$ 個以下、好ましくは $3 \times 10^8$ 個以上 $18 \times 10^8$ 個以下、特に好ましくは $4 \times 10^8$ 個以上 $16 \times 10^8$ 個以下含まれる混合物であることが必要である。

そしてそれぞれの培養液を混合する場合は、あらかじめ培養液の生菌数を常法に従って測定したうえで、任意の菌数割合になるよう培養液を混合すればよい。

L-55株およびS4-A株の生菌数が前記下限値未満では目的とする効果が発揮されない恐れがあり、前記上限値を超えると渋みや塩味が強くなり、食品として味覚的な問題が生じる恐れがある。

また、本発明の混合物には、有効成分である菌体以外に他の食原料も配合することができる。

【0028】

また本発明の組成物はラクトバチルス・アシドフィルスグループ乳酸菌L-55株と酵母菌サッカロミセス・セレビスエS4-A株を、共培養することによっても得られ、その場合に使用できる培養原料としては、野菜汁、果物汁、豆乳、獣乳、脱脂乳などが挙げられる。

【0029】

更にラクトバチルス・アシドフィルスグループ乳酸菌L-55株と酵母菌サッカロミセス・セレビスエS4-A株については、死菌体でも抗アレルギー効果が認められることから、両菌株を含む培養物あるいは菌体そのものは、通常実施される条件にて殺菌処理を施したものでよい。

【0030】

（本発明の抗アレルギー用組成物の利用）

本発明により製造された乳酸菌L-55株と酵母菌S4-A株の菌体を共に含有する抗アレルギー用組成物は、アトピー性皮膚炎、食物アレルギー、花粉症、アレルギー性鼻炎などI型アレルギー症状の改善に効果を発揮し、しかも摂取を中止した後も効果の持続性

10

20

30

40

50

が保たれる。

したがって、当該組成物は賦形剤、結合剤、希釈剤などと混合し、加工することで、抗アレルギー剤として用いることができる。

具体的な製剤形態としては、タブレット状、カプセル状、顆粒状、粉末状、懸濁液状、液状が挙げられる。

#### 【0031】

また、本発明により製造された乳酸菌 L - 5 5 株と酵母菌 S 4 - A 株の菌体を共に含有する抗アレルギー用組成物は、飲食品に配合することで抗アレルギー効果を有する飲食品として用いることも可能である。

かかる飲食品としての具体例としては、アイスクリーム、プリン、クッキー、クラッカー、チョコレート、キャンディー、ゼリーなどのデザート・菓子類、チーズ、ヨーグルトなどの乳製品類、うどん、そば、ラーメンなどの麺類、かまぼこ、ハム、ソーセージ、ハンバーグなどの魚肉畜肉製品、果汁、野菜汁、清涼飲料、牛乳、コーヒー、茶、スポーツ飲料、ミネラルウォーター、栄養ドリンクなどの各種飲料類が挙げられるが、これらは特に制限されることはない。

なお、これらの飲食品の製造に際しては、通常飲食品の配合設計に用いられる糖類、香料、果汁、食品添加物など、いずれの添加物も使用することができる。

#### 【0032】

(本発明の抗アレルギー用組成物の配合)

本発明により製造された乳酸菌 L - 5 5 株と酵母菌 S 4 - A 株の菌体を共に含有する抗アレルギー用組成物を、抗アレルギー剤、健康食品剤あるいは飲食品に配合して用いる際には、一日あたり摂取される抗アレルギー剤、健康食品剤、あるいは飲食品の量に合わせて含有させる乳酸菌 L - 5 5 株および酵母菌 S 4 - A 株の菌体量もしくは菌体数が決定され、有効成分である L - 5 5 株および S 4 - A 株の菌体が共に有効量含有するように当該組成物を添加・配合させなければならない。

#### 【0033】

具体的には、本発明における有効成分である L - 5 5 株と S 4 - A 株の菌体は、成人の場合、1日に体重 1 k g あたりそれぞれ 5 m g 以上摂取できるよう混合することが必要であるが、両菌体の混合量が多くなると菌体由来の渋みや塩味が強くなり、味覚面で食品としての品質を損なうので、混合する両菌量はそれぞれ 5 0 m g を上限とすることが必要である。

その際に混合する割合は特に限定されるものではなく、それぞれの菌体が乾燥重量で 5 m g 以上 5 0 m g 以下の範囲であれば、両菌の配合量割合は任意に設定できる。

#### 【0034】

これを生菌数で示すと、L - 5 5 株は  $5 \times 10^9$  個以上  $50 \times 10^9$  個以下、S 4 - A 株は  $2 \times 10^8$  個以上  $20 \times 10^8$  個以下含まれる混合物であることが望ましい。

そしてそれぞれの培養液を混合する場合は、あらかじめ培養液の生菌数を常法に従って測定したうえで、任意の菌数割合になるよう培養液を混合すればよい。

#### 【実施例】

#### 【0035】

次に実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明する。

#### 【0036】

(実施例 1)

試験方法：アレルギー抑制効果

(L - 5 5 株菌体の調製) M R S 寒天培地上で増殖したラクトバチルス・アシドフィルスグループ乳酸菌 L - 5 5 株のコロニーを、M R S 液体培地 1 0 0 m l に接種し、3 7 °C で 2 4 時間静置培養した。続いてこの培養液を同じく M R S 液体培地 1 0 リットルに移し、3 7 °C で 4 8 時間静置培養した。

培養終了後、遠心分離によって菌体を集め、さらに蒸留水で 2 回洗浄した。得られた菌体塊は 1 0 0 °C で 1 0 分間殺菌処理を施し、その後凍結乾燥処理することで粉末化し、試

10

20

30

40

50

験菌体としてマウス投与試験に供した。

【0037】

(S4 - A株菌体の調製)

ポテトデキストロース寒天培地上で増殖したサッカロミセス・セレピシエS4 - A株のコロニーを、バクトトリプトン1.0%、酵母エキス0.5%、麦芽エキス0.3%、ぶどう糖5.0%から成る液体培地100mlに接種し、30℃で24時間振とう培養した。

続いてこの培養液を同じ成分組成の液体培地10リットルに移し、30℃で24時間通気攪拌培養した。培養終了後、遠心分離によって菌体を集め、さらに蒸留水で2回洗浄した。

得られた菌体塊は100℃で10分間殺菌処理を施し、その後、凍結乾燥処理することで粉末化し、試験菌体としてマウス投与試験に供した。

【0038】

(動物種)

BALB/cマウス 雌性 6週齢 48匹

実験には、BALB/cマウス(雌性6週齢)を用いた。動物は室温 $24 \pm 2$ ℃、湿度 $55 \pm 15$ %に保たれた動物室で、おがくずを敷いたプラスチックケージの中で飼育した。マウスには飼育期間中、飼料および水は自由に摂取させた。

【0039】

(区分け)

各群のマウスには、固型飼料(オリエンタル酵母工業(株))及び水を自由摂取させた。

(1) 対照群: 蒸留水0.3ml/匹/日を14日間強制経口投与した群(12匹)

(2) L-55株単独投与群: L-55株菌体0.2mg/匹/日を14日間強制経口投与した群(12匹)

(3) S4-A株単独投与群: S4-A株菌体0.2mg/匹/日を14日間強制経口投与した群(12匹)

(4) 併用投与群: L-55株菌体0.1mg + S4-A株菌体0.1mg/匹/日を14日間強制経口投与した群(12匹)

【0040】

(試験菌体の投与方法及び投与期間)

L-55株およびS4-A株の粉末菌体は蒸留水で懸濁した後、経口ゾンデでマウスに強制投与した。

L-55株単独投与群にはL-55株菌体を0.2mg(0.2mg/匹)、S4-A株単独投与群にはS4-A株菌体0.2mg(0.2mg/匹)、併用投与群にはL-55株菌体とS4-A株菌体をそれぞれ0.1mgずつ、合計0.2mg(0.2mg/匹)を0.3mLの蒸留水に懸濁して投与した。

【0041】

投与期間は、初回感作25日目以降、試験菌体を投与直前に蒸留水に懸濁して1日1回、2週間、連続経口投与した。また対照群には、0.3mLの蒸留水を投与した。

【0042】

(マウス鼻アレルギーモデルの作製)

卵白アルブミン(OVA)0.1mg、水酸化アルミニウムゲル1mgおよび百日咳毒素300ngを生理食塩液0.2mLに溶解して、マウスに腹腔内注射し、初回感作とした。初回感作5日後に、追加感作としてOVA50μgを生理食塩液0.1mLに溶解し、マウスの背部皮下に注射した。

さらに初回感作18日目以降、局所感作として1日1回4週間OVA50mg/mLの溶液を1μLずつマイクロピペットで両側鼻腔に点鼻投与した。

【0043】

(抗原誘発鼻炎症状の測定)

10

20

30

40

50



くしゃみ反応および鼻掻き行動（鼻炎症状）の測定1時間前に、試験食を投与した。測定開始前に、マウスを環境に慣らすため、観察用ケージ（32×22×10cm）内に10分間置き馴化させた。OVA溶液（50mg/mL）を1μLずつ両側鼻腔に点鼻投与した直後より、マウスは観察用ケージに1匹ずつ入れ、誘発されるくしゃみ反応および鼻掻き行動の回数を60分間測定した。

鼻炎症状の測定は、試験菌体投与期間には1週毎に初回感作25, 32, 39日後に行い、試験菌体投与中止期間には、初回感作42日後（中止3日目）および46日後（中止1週目）に行った。

#### 【0044】

（血清総IgE濃度の測定）

血液は、感作25, 32, 39, 42, 46日目に尾静脈より採取し、4, 755×gで10分間遠心分離して血清を得た。血清は使用するまで-20℃で保存した。

血清総IgE濃度は、mouse IgE enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）quantitation kit（Bethyl Laboratories Inc.）を用いて測定した。

#### 【0045】

試験結果：アレルギー抑制効果

（鼻炎症状の緩和）

抗原誘発鼻炎症状の測定結果を図1（イ）、図1（ロ）に示した。図1から明らかなように、L-55株とS4-A株のそれぞれ単独投与群では、投与2週目で対照群に比べ、鼻炎症状（くしゃみ反応と鼻掻き行動）が有意に抑制された。

一方L-55株とS4-A株の併用投与群では、投与1週目以降、対照群に比べ鼻炎症状が有意に抑制された。なお、図1中の\*は有意水準0.05未満（ $p < 0.05$ ）、\*\*\*は有意水準0.005未満（ $p < 0.005$ ）、\*\*\*\*は有意水準0.001未満（ $p < 0.001$ ）であることを示している。

#### 【0046】

これらの結果から、L-55株とS4-A株を同時に摂取したときの方が、各菌体をそれぞれ単独で摂取したときよりも、鼻炎症状がより早く、そして強く緩和されることが明らかとなった。

さらに、試験菌体投与2週間後より1週間、試験菌体の投与を中止したところ、両菌体を同時に摂取したマウスでは、摂取を中止した3日後でも、鼻炎症状がより強く抑えられていた。

#### 【0047】

血清総IgE濃度の測定結果は図2に示した。

図2から明らかなように、L-55株あるいはS4-A株の単独投与群と両菌体の併用投与群では、共に投与1週目以降、対照群に比べ血清総IgE濃度が有意に低値を示したが、L-55株とS4-A株を同時に摂取したときの方が、血清総IgE濃度がより強く抑えられていた。

なお、図2中の\*は有意水準0.05未満（ $p < 0.05$ ）、\*\*は有意水準0.01未満（ $p < 0.01$ ）、\*\*\*は有意水準0.005未満（ $p < 0.005$ ）であることを示している。さらに、試験菌体投与2週間後より1週間、試験菌体の投与を中止したところ、両菌体を同時に摂取したマウスでは、摂取を中止した3日後でも、血清総IgE濃度がより強く抑えられていた。

#### 【0048】

上記の結果より、L-55株とS4-A株の菌体は血清IgE濃度の減少を介して、アレルギー性鼻炎の症状を緩和することが示唆された。

マウスの体重は約20gであり、マウス1匹あたりの有効摂取量は、L-55株およびS4-A株の菌体が0.1mgずつであることから、ヒト成人では、両菌体を同時に1日に体重1kgあたりそれぞれ5mg以上摂取することにより、各菌体を単独で摂取したときよりも、より早くそして強く鼻炎症状が緩和されることになる。

10

20

30

40

50

さらに、摂取を中止した後でも、両菌体による抗アレルギー効果は一過性ではなく、数日間は持続することも期待できる。

【0049】

(実施例2)

次にL-55株とS4-A株の菌体を共に含む組成物の製造方法について、その一例を記載するが、本発明は本発明の主旨を逸脱しない限り、実施例に限定されるものではない。

【0050】

(L-55株菌体の調製)

L-55株のコロニーを、2%ペプトン、1%酵母エキス、2%ブドウ糖、0.05%アスコルビン酸Na、0.1%ツイン80、0.5%酢酸Na、0.2%リン酸二カリウムからなる液体培地100mlに接種し、37℃で48時間静置培養した。

続いて、この培養液を上記と同じ組成の液体培地10リットルに移し、37℃で48時間静置培養した。培養終了後、遠心分離操作によって菌体を集め、さらに蒸留水で菌体を2回洗浄した。得られた菌体は100mlの蒸留水で再懸濁し、その後121℃、10分間の殺菌処理を施したのち、凍結乾燥処理することによって粉末化した。

【0051】

(S4-A株菌体の調製)

ポテトデキストロス寒天培地上で増殖したサッカロミセス・セレビスエS4-A株のコロニーを、酵母エキス1%、ぶどう糖5%から成る液体培地100mlに接種し、30℃で24時間振とう培養した。

続いてこの培養液を上記と同じ組成の液体培地10リットルに移し、30℃で24時間通気攪拌培養した。培養終了後、遠心分離によって菌体を集め、さらに蒸留水で菌体を2回洗浄した。

得られた菌体は100mlの蒸留水で再懸濁し、その後121℃、10分間の殺菌処理を施したのち、凍結乾燥処理することによって粉末化した。

【0052】

(乳酸菌と酵母菌の混合組成物の作製)

得られたL-55株の乾燥菌体10gとS4-A株の乾燥菌体10gをきれいな容器に測り取り、よく混ぜ合わせて目的の混合組成物を得た。

【0053】

(実施例3)

次に、実施例2で得られたL-55株の菌体とS4-A株の菌体を共に含む組成物を使った抗アレルギー剤の製造方法について、その実施例を記載する。ソルビトール

85g

賦形剤 10g

実施例2で調製した菌体粉末 5g

合計 100g

上記の混合物を、常法に従い打錠機にて硬度80N(ニュートン)の錠剤(250mg/1錠)に加工した。

【0054】

(実施例4)

次に、実施例2で得られたL-55株の菌体とS4-A株の菌体を共に含む組成物を使った抗アレルギー用果汁飲料の製造方法について、その実施例を記載する。

液糖(果糖55%) 1300g

濃縮パイン果汁(Bx60) 120g

クエン酸(無水) 30g

パイン香料 10g

実施例2で調製した菌体粉末 1g

水 8539g

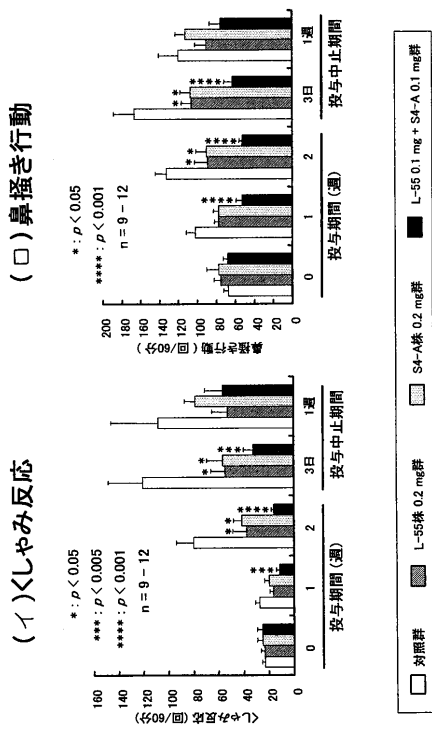
上記の混合物を、常法に従いHTST殺菌後、容器に充填(100g/1本)した。

【産業上の利用可能性】

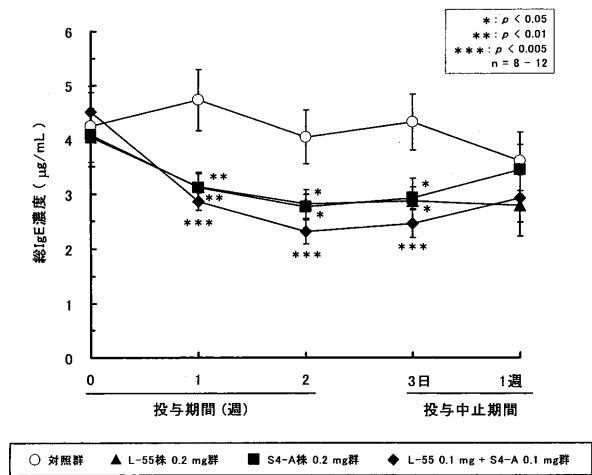
【0055】

本発明の抗アレルギー用組成物は、製造が容易であり、L-55株の菌体およびS4-A株の菌体を含有量を所定の範囲内とすることにより、日常的に摂取すると、I型アレルギー症状の改善が期待でき、且つ摂取中止後もその改善効果の持続が期待されるという顕著な効果を奏し、また本発明の抗アレルギー用組成物を含有する抗アレルギー剤および抗アレルギー食品は日常的に摂取することにより、I型アレルギー症状の改善が期待でき、且つ摂取中止後もその改善効果の持続が期待されるという顕著な効果を奏するので、産業上の利用価値は甚だ大きい。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

A 2 3 L 1/30

Z

テーマコード(参考)