

(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
2021年12月23日(23.12.2021)



(10) 国際公開番号

WO 2021/256476 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 1/38 (2006.01) A61P 31/00 (2006.01)
A61K 35/747 (2015.01) A61P 37/02 (2006.01)
A61P 1/10 (2006.01) A61P 37/08 (2006.01)
A61P 1/12 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

クルト本社内 Tokyo (JP), 清水 健介(SHIMIZU Kensuke); 〒1058660 東京都港区海岸1丁目10番30号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP), 小穴 康介(OANA Kosuke); 〒1058660 東京都港区海岸1丁目10番30号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP), 大石 憲司(OISHI Kenji); 〒1058660 東京都港区海岸1丁目10番30号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2021/022767

(22) 国際出願日: 2021年6月16日(16.06.2021)

(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 2020-104213 2020年6月17日(17.06.2020) JP

(74) 代理人: 特許業務法人 小野国際特許事務所(THE PATENT CORPORATE BODY OF ONO & CO.); 〒1030015 東京都中央区日本橋箱崎町20-5 Tokyo (JP).

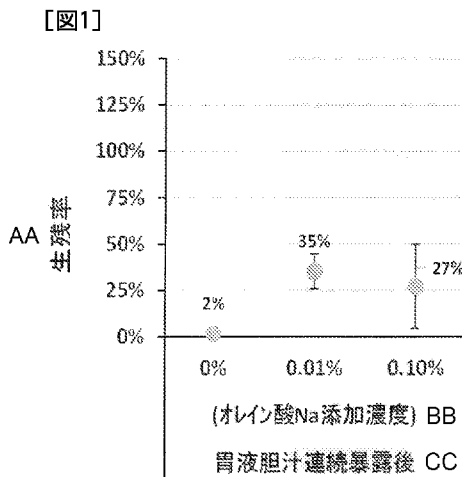
(71) 出願人: 株式会社ヤクルト本社 (KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA) [JP/JP]; 〒1058660 東京都港区海岸1丁目10番30号 Tokyo (JP).

(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, 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, IT, 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,

(72) 発明者: 牧野 博(MAKINO Hiroshi); 〒1058660 東京都港区海岸1丁目10番30号 株式会社ヤ

(54) Title: METHOD FOR IMPROVING RESISTANCE OF LACTIC ACID BACTERIA TO GASTRIC JUICES/BILE

(54) 発明の名称: 乳酸菌の胃液・胆汁耐性向上方法



(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a technique for heightening the resistance of lactic acid bacteria to gastric juices/bile, and improving the in vivo survival thereof. Provided is a method that solves said problem is characterized by cultivating lactic acid bacteria in a culture medium that contains oleic acid or a salt thereof.

(57) 要約: 本発明の課題は、乳酸菌の胃液や胆汁に対する耐性を高め、生体内での生残性を向上させる技術を提供することである。当該課題を解決した方法は、乳酸菌を、オレイン酸又はその塩を含有する培地で培養することを特徴とする。



WO 2021/256476 A1

NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, WS, 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 :

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 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))

明 細 書

発明の名称：乳酸菌の胃液・胆汁耐性向上方法

技術分野

[0001] 本発明は、乳酸菌の胃液・胆汁耐性向上方法に関し、さらに詳細には、乳酸菌自体の胃酸、胆汁酸等に対する耐性を付与ないし増強し、摂取後、生きのまま腸内に到達させ得る方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、プロバイオティクスとして、腸内細菌叢のバランスを改善し、宿主の健康に有益な作用をもたらす微生物が注目されている。このような微生物として乳酸菌やビフィズス菌が利用されており、これらを摂取することで、便秘・下痢症の改善効果、免疫機能改善による感染防御・アレルギー抑制効果、動脈硬化の予防効果など様々な生理効果を得られることが報告されている。

[0003] プロバイオティクスの定義に関しては、近年、生菌だけでなく死菌を含める考え方も提唱されている。しかし、プロバイオティクスの作用機序として、腸内細菌叢において有用な微生物が増殖し、様々な代謝産物を産生することによって、競合する有害な微生物を排除したり、増殖を抑制したりすることで、その機能がより効果的に発揮され得るといえるから、腸内において生きの状態で存在している方が有利と考えられる。このように、摂取された有用微生物は、生きのままの状態で腸内に到達することが望まれるが、腸内に到達するまでには、温度、pH、酸素など、微生物の生育を阻害する様々な因子が存在し、特に胃液や胆汁などの消化液は、胃酸や胆汁酸の他、様々な消化酵素を含み、これらの消化液に曝されると、死滅したり、生き残ったとしてもコロニー形成能（増殖能）を喪失するなど重大な傷害を受ける。

[0004] そのため、有用微生物を消化液から保護し、消化管内での生残性を向上させる技術が検討されている。例えば、微生物のhrcA遺伝子を破壊することにより、微生物自体の胃酸・胆汁酸耐性を増強する方法（特許文献1）や、乳

酸菌を腸溶性カプセル内に封入し、胃液などとの直接的な接触を回避して生残性を高める方法（特許文献2参照）などが開示されている。しかし、前者は煩雑な遺伝子工学的手法を要するものであり、後者は剤型に制約が生じるなど、これらの技術は汎用性が高いものとは言い難かった。一方、より簡便な方法として、ラクトバチルス・ラクチスを、Tween 80を過剰添加した培地で培養することにより、その胆汁耐性が向上することが報告されている（非特許文献1）。しかし、本出願人が、ラクチカゼイバチルス・パラカゼイにこの技術を適用したところ、胆汁耐性の向上は認められず、むしろ低下してしまうことが確認された。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開2005-160号公報

特許文献2：特開2014-139200号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Kimoto H, Ohmomo S, Okamoto T. Enhancement of bile tolerance in lactococci by Tween 80. *J Appl Microbiol.* (2002) 92, 41-46.

非特許文献2：Zheng et al., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020;70:2782-2858

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 従って、本発明の課題は、乳酸菌の胃液や胆汁に対する耐性を高め、生体内での生残性を向上させる技術を提供することである。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究した結果、乳酸菌を、オレイン酸又はその塩を添加した培地で培養することにより、胃液及び胆汁に対する耐性が増強され、曝露後の生残性が向上することを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0009] すなわち、本発明は乳酸菌を、オレイン酸又はその塩を含有する培地で培養することを特徴とする乳酸菌の胃液及び／または胆汁耐性向上方法である。

[0010] また本発明は、菌体に占めるオレイン酸の割合が28～38%であるラクチカゼイバチルス・パラカゼイである。

[0011] また本発明は、菌体に占めるオレイン酸の割合が28～38%であるラクチカゼイバチルス・パラカゼイ YIT9029 (FERM BP-1366) である。

[0012] また本発明は、上記オレイン酸の割合が28～38%であるラクチカゼイバチルス・パラカゼイを含有する経口製剤である。

[0013] また本発明は、上記オレイン酸の割合が28～38%であるラクチカゼイバチルス・パラカゼイを含有する飲食品である。

発明の効果

[0014] 本発明により、乳酸菌自身の胃液や胆汁等に対する耐性を付与ないし増強することができるため、これを含有する飲食品等を摂取すると、より多くの菌体が増殖能を維持したまま生菌状態で腸内へ到達することが可能となる。そのため、乳酸菌が有する様々な生理機能において、より優れた効果を持続的に得ることができる。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]実施例1における胃液胆汁連続曝露後のラクチカゼイバチルス・パラカゼイの生残率を示すグラフである。

[図2]実施例1における胃液胆汁連続曝露後のラクチカゼイバチルス・パラカゼイ菌体の構成脂肪酸組成を示すグラフである。

[図3]比較例1における胃液胆汁連続曝露後のラクチカゼイバチルス・パラカゼイの生残率を示すグラフである。

[図4]比較例1における胃液胆汁連続曝露後のラクチカゼイバチルス・パラカゼイ菌体の構成脂肪酸組成を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0016] 本発明に用いる乳酸菌について、Zhengらの乳酸菌の再分類（非特許文献2）によると、従来ラクトバチルス（*Lactobacillus*）属に属していた乳酸菌について、その菌属が細分化され、ならびに菌種の一部において属名が変更されることになった。本明細書では再分類以降の新分類の表記で示すものとする。

また、旧分類においてラクトバチルス・カゼイ（*Lactobacillus casei*）又はラクトバチルス・パラカゼイ（*Lactobacillus paracasei*）に分類されていた乳酸菌のなかで、新たにラクチカゼイバチルス・パラカゼイ（*Lacticaseibacillus paracasei*）として分類され得るものは、本願のラクチカゼイバチルス・パラカゼイ（*Lacticaseibacillus paracasei*）に含まれるものとする。本発明に用いる乳酸菌としては特に制限されず、例えば、ラクチカゼイバチルス・パラカゼイ（*Lacticaseibacillus paracasei*）、ラクチカゼイバチルス・カゼイ（*Lacticaseibacillus casei*）等のラクチカゼイバチルス属細菌、ラクトバチルス・ガセリ（*Lactobacillus gasseri*）、ラクトバチルス・アシドフィルス（*Lactobacillus acidophilus*）、ラクトバチルス・ヘルベティカス（*Lactobacillus helveticus*）、ラクトバチルス・デルブルッキイー サブスピーシーズ、ブルガリカス（*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*）、ラクトバチルス・デルブルッキイー サブスピーシーズ、デルブルッキイー（*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*）、ラクトバチルス・ジョンソニー（*Lactobacillus johnsonii*）等のラクトバチルス属細菌、リギラクトバチルス・サリバリウス（*Ligilactobacillus salivarius*）等のリギラクトバチルス属細菌、リモシラクトバチルス・ファーマンタム（*Limosilactobacillus fermentum*）等のリモシラクトバチルス属細菌、リクオリラクトバチルス・マリ（*Liquorilactobacillus mali*）等のリクオリラクトバチルス属細菌、ストレプトコッカス・サーモフィルス（*Streptococcus thermophilus*）等のストレプトコッカス属細菌、ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ、ラクチス（*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*）、ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ、クレモリス（*Lactococcus lactis* subsp.

、*cremoris*)、ラクトコッカス・プランタラム (*Lactococcus plantarum*)、ラクトコッカス・ラフィノラクチス (*Lactococcus raffinolactis*) 等のラクトコッカス属細菌、エンテロコッカス・フェカーリス (*Enterococcus faecalis*)、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) 等のエンテロコッカス属細菌を挙げることができ、これらの乳酸菌を1種または2種以上用いることができる。なお、Zhengらの乳酸菌の再分類(非特許文献2)によると、ラクチカゼイバチルス・カゼイ (*Lacticaseibacillus casei*) は旧分類ではラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*) であり、リギラクトバチルス・サリバリウス (*Ligilactobacillus salivarius*) は旧分類ではラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*) であり、リモシラクトバチルス・ファーメントム (*Limosilactobacillus fermentum*) は旧分類ではラクトバチルス・ファーメントム (*Lactobacillus fermentum*) であり、リクオリラクトバチルス・マリ (*Liquorilactobacillus mali*) は旧分類ではラクトバチルス・マリ (*Lactobacillus mali*) である。

[0017] 上記乳酸菌の中でも胃液・胆汁耐性に優れること等からラクチカゼイバチルス・パラカゼイ (*Lacticaseibacillus paracasei*) が好ましい。ラクチカゼイバチルス・パラカゼイは、この種に分類されるものであれば特に限定されず、市販されているもの、ATCC等の寄託機関に寄託されているもの、新たに見出されたもの、あるいは、それらの変異株等を用いることができる。このようなラクチカゼイバチルス・パラカゼイとしては、例えば、ラクチカゼイバチルス・パラカゼイ YIT9029、ラクチカゼイバチルス・パラカゼイ YIT0209^T等が挙げられる。これらラクチカゼイバチルス・パラカゼイの中でも、より胃液、胆汁耐性に優れること等から、ラクチカゼイバチルス・パラカゼイ YIT9029が好ましい。ラクチカゼイバチルス・パラカゼイ YIT9029は、本出願人がラクトバチルス・カゼイ YIT9029 (FERM BP-1366、寄託日：1987年5月18日) としてブダペスト条約の国際寄託当局である独立行政法人製品評価技術基盤機構特許生物寄託センター (〒292-0818 日本国千葉県木更津市か

ずさ鎌足2-5-8 120号室)に国際寄託している。なお、ラクチカゼイバチルス・パラカゼイ YIT9029は、以前の分類ではラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*) とされていたが、ラクトバチルス属の再分類により、ラクチカゼイバチルス・パラカゼイに分類された。

[0018] 上記乳酸菌を培養する培地は特に制限されるものではなく、牛乳、山羊乳、馬乳、羊乳等の生乳や、脱脂粉乳、全粉乳、生クリーム等の乳製品等からなる獣乳培地のほか、各種合成培地を挙げることができる。培地には、通常の乳酸菌培地に使用される成分を添加してもよく、このような成分として、例えば、ビタミンA、ビタミンB類、ビタミンC、ビタミンE等のビタミン類や、各種ペプチド、アミノ酸類、カルシウム、マグネシウム等の塩類が挙げられる。合成培地としては、液体培地及び固体培地のいずれでもよいが、窒素源及び炭素源を含有するものが好ましい。窒素源としては、肉エキス、ペプトン、グルテン、カゼイン、酵母エキス、アミノ酸等を、また、炭素源としては、グルコース、キシロース、フルクトース、イノシトール、マルトース、水アメ、麴汁、デンプン、バカス、フスマ、糖蜜、グリセリン等を用いることができる。また、無機質として、硫酸アンモニウム、リン酸カリウム、塩化マグネシウム、食塩、鉄、マンガン、モリブデン等を添加することができ、さらにビタミン等を添加することができる。好適な合成培地としては、MRS培地、LBS培地、Rogosa培地、WYP培地、GYP培地等が挙げられる。

[0019] 本発明においては、上記培地に、オレイン酸又はその塩を添加することにより、培養後の乳酸菌の胃液・胆汁耐性を向上させることができる。オレイン酸の塩としては、オレイン酸ナトリウム、オレイン酸カリウム等が挙げられ、これらの1種または2種を用いることができる。これらのうち、胃液・胆汁耐性向上効果等の観点から、オレイン酸ナトリウムが好ましい。

[0020] オレイン酸又はその塩の培地中の濃度は、胃液・胆汁耐性向上効果の観点から、0.001~0.3質量% (以下、特に断らない限り「%」は質量%を意味する) であることが好ましく、0.005~0.2%であることがよ

り好ましい。オレイン酸又はその塩を培地に添加する時期は特に制限されないが、乳酸菌を培養する前に添加しておくことが好ましい。

[0021] 培養条件は特に制限されるものではないが、例えば、培養温度は通常20～50℃、好ましくは25～40℃、より好ましくは35～38℃である。培養時間は通常6～62時間であり、好ましくは12～48時間であり、より好ましくは15～30時間である。培地のpHは通常3～8、好ましくは4～7であり、より好ましくは6～7である。培養はインキュベーター中で行ってもよく、また、培養の際は通気振とうしてもよい。

[0022] 上記のようにして培養した乳酸菌菌体の構成脂肪酸に占めるオレイン酸の割合は、乳酸菌の種等にもよるが、例えば、ラクチカゼイバチルス・パラカゼイの場合、構成脂肪酸に占めるオレイン酸の割合は28～38%であることが好ましく、34～36%であることがより好ましい。菌体の構成脂肪酸に占めるオレイン酸の割合は、実施例に記載の脂肪酸組成分析によって測定される値である。

[0023] 上記のようにして培養した乳酸菌を、経口製剤や飲食品等に添加する形態は特に制限されるものではなく、例えば、獣乳培地等の上記各種培地で培養して得られる培養物をそのまま添加する方法、培養液から乳酸菌を遠心分離、膜分離等で集菌した集菌物を添加する方法、培養液を乾燥させた培養液乾燥物または集菌物を乾燥させた乾燥菌体を添加する方法等が挙げられる。乳酸菌の集菌方法や培養液または集菌物の乾燥法としては、公知の方法を用いることができる。また必要に応じ、集菌物を遠心洗浄等により洗浄してもよい。

[0024] 培養した乳酸菌は、そのままあるいは薬学的に許容される担体を組み合わせて製剤化して経口製剤とすることができる。薬学的に許容される担体としては、例えば、グルコース、乳糖、ショ糖、澱粉、マンニトール、デキストリン、脂肪酸グリセリド、ポリエチレングリコール、ヒドロキシエチルデンプン、エチレングリコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、アミノ酸、ゼラチン、アルブミン、水、生理食塩水等が挙げられる。また

、必要に応じて、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、結合剤、等張化剤、賦形剤等の慣用の添加剤を適宜添加することもできる。またその剤型としては、経口製剤であれば特に限定されるものではなく、例えば、液剤、粉剤、顆粒剤、カプセル剤、錠剤、タブレット等が挙げられ、これらは常法に従って調製される。

[0025] 本発明の経口製剤における乳酸菌の含有量は特に限定されるものではないが、例えば剤型が液体の場合には、乳酸菌の生菌数は 10^6 cfu/mL \sim 10^8 cfu/mLであることが好ましく、固体の場合には 10^7 cfu/g \sim 10^{10} cfu/gであることが好ましい。投与量も特に限定されるものではないが、生菌数として、好ましくは1日当たり 10^3 cfu以上、より好ましくは 10^6 cfu以上である。

[0026] 一方、本発明の飲食品は、上記のようにして培養した乳酸菌に、公知の食品添加物及び／又は食品素材を配合し、常法に従って調製することができる。その形態は特に限定されず、例えば、液状、錠剤、カプセル、ペースト、顆粒等とすることができる。飲食品としては、発酵乳飲食品、発酵豆乳、発酵果汁、発酵野菜汁等の発酵飲食品、パン、ビスケット、ホットケーキ、麺、錠菓等のデンプンを主体とする食品、ガム、キャンディー、和菓子等の菓子類、ハム、ソーセージ等の畜肉食品、ちくわ、かまぼこ等の魚肉食品、魚介類食品、ドレッシング、醤油、ジャム、ふりかけ等の調味料、茶、ジュース、清涼飲料、酒類等の飲料等が挙げられる。

[0027] 上記発酵乳飲食品は常法に従って製造することができる。例えば、牛乳、山羊乳などの生乳、脱脂粉乳、全脂粉乳、生クリーム等の乳製品からなる獣乳培地に、乳酸菌を接種して培養し、これを均質化処理して発酵乳ベースを得て、この発酵乳ベースにシロップ溶液を添加・混合し、更にフレーバーや食品素材を添加して最終製品とすることができる。

[0028] これらの発酵乳飲食品には、必要に応じて、各種食品素材、例えば、各種糖質、増粘剤、乳化剤、各種ビタミン剤等の任意成分を配合することができる。これらの食品素材として具体的なものは、ショ糖、グルコース、フルク

トース、パラチノース、トレハロース、ラクトース、キシロース、麦芽糖等の糖質、ソルビトール、キシリトール、エリスリトール、ラクチトール、パラチニット、還元水飴、還元麦芽糖水飴等の糖アルコール、アスパルテーム、ソーマチン、スクラロース、アセスルファムK、ステビア等の高甘味度甘味料、寒天、ゼラチン、カラギーナン、グァーガム、キサンタンガム、ペクチン、ローカストビーンガム、ジェランガム、カルボキシメチルセルロース、大豆多糖類、アルギン酸プロピレングリコール等の各種増粘（安定）剤、シヨ糖脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、ポリグリセリン脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、レシチン等の乳化剤、クリーム、バター、サワークリームなどの乳脂肪、クエン酸、乳酸、酢酸、リンゴ酸、酒石酸、グルコン酸等の酸味料、ビタミンA、ビタミンB類、ビタミンC、ビタミンE類等の各種ビタミン類、カルシウム、マグネシウム、亜鉛、鉄、マンガン等のミネラル分、ヨーグルト系、ベリー系、オレンジ系、花梨系、シソ系、シトラス系、アップル系、ミント系、グレープ系、アプリコット系、ペア、カスタードクリーム、ピーチ、メロン、バナナ、トロピカル系、ハーブ系、紅茶、コーヒー系等のフレーバー類を挙げることができる。

[0029] 本発明の飲食品における乳酸菌の含有量は特に限定されるものではないが、例えば飲食品が液体の場合には、乳酸菌の生菌数は 10^6 cfu/mL \sim 10^8 cfu/mLであることが好ましく、固体の場合には 10^7 cfu/g \sim 10^{10} cfu/gであることが好ましい。投与量も特に限定されるものではないが、生菌数として、好ましくは1日当たり 10^3 cfu以上、より好ましくは 10^6 cfu以上である。

[0030] 本発明の経口製剤または飲食品に含まれる乳酸菌は、胃酸や胆汁酸などの酸に対する耐性が高いことから、胃液や胆汁などの消化液に対し高い耐性を有する。そのため、上記乳酸菌は経口摂取された後、消化液に曝されても多くの菌体が生菌のまま消化管内を通過し、腸内に到達し得るものであり、例えば、オレイン酸又はその塩無添加の培地で培養した菌体と比較して、胃液胆汁連続曝露後の生残率が好ましくは5倍以上、より好ましくは20倍以上

のものである。本発明において、胃液胆汁連続曝露後の乳酸菌の生残率とは、実施例に記載の方法によって求められる値をいう。このように本発明の経口製剤または飲食品は、乳酸菌消化管内高生残性または腸内高到達性のものである。また乳酸菌は、胃液や胆汁に暴露されると、死滅には至らなくてもコロニー形成能を失う場合があるが、本発明の経口製剤または飲食品に含まれる乳酸菌は、コロニー形成能を維持したまま生菌状態で腸内に到達し得るものであるため、より高い生理効果を持続して得ることが可能となる。

[0031] 本発明の飲食品には、乳酸菌の消化管内高生残性または腸内高到達性に関する効果ないし機能を明示的又は暗示的に表示することができる。このような表示としては、特に限定されないが、「生きたまま腸に届く能力が高い」、「腸内で増殖する能力が高い」、あるいはこれらと同視できる表示などが挙げられる。このような表示は、本発明の飲食品の態様に応じて、飲食品自体に付してもよいし、これらの容器又は包装に付してもよい。

実施例

[0032] 以下、本発明を、実施例等を挙げて詳細に説明するが、本発明はこれら実施例等に何ら限定されるものではない。

[0033] 実施例 1

(ラクチカゼイバチルス・パラカゼイの培養)

凍結保存されたラクチカゼイバチルス・パラカゼイ YIT9029をMRS液体培地に1% (v/v) 接種して37℃で好氣的に24時間培養した(前培養)。次に、無添加あるいは0.01%、0.1%のオレイン酸ナトリウム(東京化成工業)を含むMRS液体培地に、前培養液を1% (v/v) 接種して37℃で好氣的に24時間培養し(本培養)、培養菌液とした。

(人工胃液胆汁連続曝露)

上記培養菌液を遠心分離(7,000 × g、8分、4℃)した。上清を除去した後に、ペレットを15 mlの滅菌生理食塩水(大塚製薬)に再懸濁した(遠心洗浄操作)。この遠心洗浄操作を計2回実施した。再度、ペレットを15 mlの滅菌生理食塩水に懸濁して一部をサンプリングした。つ

づけて7, 000 × g、8分、4℃の条件で遠心分離し、上清をすべて除去した後に、ペレットを150 mlの下記表1に示す組成の人工胃液（pH 3.0に調整）に懸濁し、37℃で2時間インキュベートした。胃液曝露後、菌液の一部をサンプリングした。

[0034] [表1]

試薬名	重さ (g)
プロテオースペプトン No. 3 (BD 社製)	1.0
胃ムチン (Wako 社製)	0.3
NaCl (マナック社製)	1.0
NaHCO ₃ (Wako 社製)	0.6
KH ₂ PO ₄ (Wako 社製)	0.2

[0035] 胃液曝露後、1M NaHCO₃で菌液のpHを4.4に調整し、最終濃度が0.10%になるように人工胆汁であるoxgall (BD社製)を添加し、37℃で10分間曝露した(胆汁曝露)。胆汁曝露後に菌液の一部をサンプリングした。胃液曝露前、胃液曝露後および胃液胆汁連続曝露後にサンプリングした菌液を適宜PBSで希釈後、MRS平板培地に50 μlずつ塗抹した。37℃で好氣的に3日間培養してコロニーを計数し、菌液中の生菌数(log₁₀ cfu/ml)を測定した。胃液曝露前の生菌数(cfu/ml)を100%として、胃液曝露後及び胃液胆汁連続曝露後のラクチカゼイバチルス・パラカゼイの生残率を算出した。なお、本試験は再現性を確認するため、試験日を変えて同じ試験を3回実施した。胃液胆汁連続曝露後の結果を図1に示す。

[0036] 図1より、オレイン酸ナトリウムを添加した培地で培養することで、ラクチカゼイバチルス・パラカゼイの胃液及び胆汁に対する耐性が高まることが認められた。胃液胆汁連続曝露後において、オレイン酸ナトリウム無添加では生残率が大幅に低下したのに対し、オレイン酸ナトリウムを培地中に添加することで、曝露後の生残率が顕著に向上することが示された。

[0037] (菌体脂肪酸組成分析)

各菌液について、菌体脂肪酸組成分析システム“Sherlock Microbial Identification System”(MID

社製、ガスクロマトグラフィー)に基づき、菌体の構成脂肪酸組成を分析した。結果を図2に示す。

[0038] 図2より、オレイン酸ナトリウム添加培地で培養した菌体は、菌体中のオレイン酸の割合が上昇していることが確認された。

[0039] 比較例1

培地中にオレイン酸ナトリウムを0.01%または0.1%添加することに代えて、Tween80を0.1%、1%または5%添加した以外は実施例1と同様にして、胃液曝露後及び胃液胆汁連続曝露後の生残率及び脂肪酸組成分析を行った。胃液胆汁連続曝露後の結果を図3及び4に示す。

[0040] Tween80を0.1%添加した場合、胃液曝露後の生残率は87%であり、オレイン酸ナトリウムを0.1%添加した場合(生残率115%)と比較して生残率は低かった。また、図3及び4から明らかなように、Tween80を0.1%添加した場合、オレイン酸ナトリウムを0.1%添加した場合と比較して胃液胆汁連続曝露後の生残率は低かった。そして、Tween80の濃度を1%、5%と上昇させるのに伴い、ラクチカゼイバチルス・パラカゼイの生残率は低下し、菌体中のオレイン酸含量は減少した。

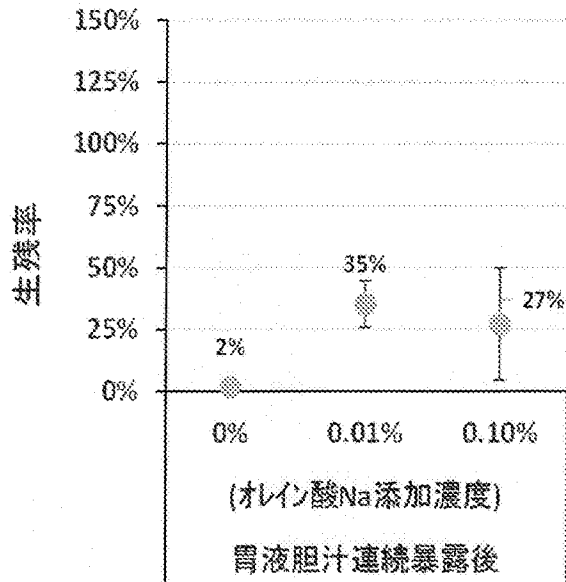
産業上の利用可能性

[0041] 本発明は、乳酸菌自身の胃液や胆汁等に対する耐性を高め、生きた状態で腸内に到達させてその機能を発揮させることができるため、乳酸菌を含有する保健機能食品等の製法として有用である。

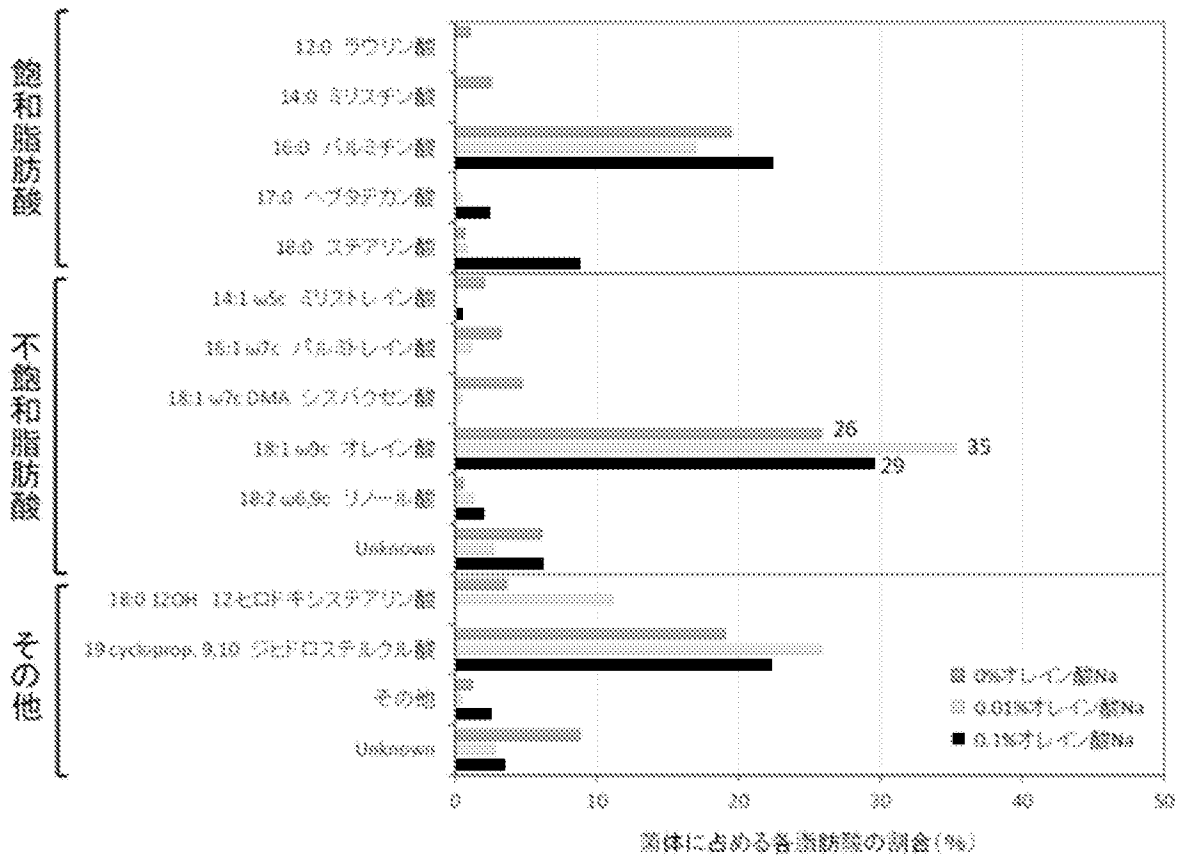
請求の範囲

- [請求項1] 乳酸菌を、オレイン酸又はその塩を含有する培地で培養することを特徴とする乳酸菌の胃液及び／または胆汁耐性向上方法。
- [請求項2] 乳酸菌がラクチカゼイバチルス・パラカゼイ (*Lactocaseibacillus paracasei*) である請求項1記載の胃液及び／または胆汁耐性向上方法。
- [請求項3] 前記ラクチカゼイバチルス・パラカゼイが、ラクチカゼイバチルス・パラカゼイ Y I T 9 0 2 9 (F E R M B P - 1 3 6 6) である請求項2に記載の胃液及び／または胆汁耐性向上方法。
- [請求項4] オレイン酸の塩が、オレイン酸ナトリウム及びオレイン酸カリウムよりなる群から選ばれる1種または2種である請求項1～3のいずれかの項記載の胃液及び／または胆汁耐性向上方法。
- [請求項5] 培地中のオレイン酸又はその塩の含有量が、0.005～0.2質量%である請求項1～4のいずれかの項記載の胃液及び／または胆汁耐性向上方法。
- [請求項6] 菌体の構成脂肪酸に占めるオレイン酸の割合が28～38%であるラクチカゼイバチルス・パラカゼイ。
- [請求項7] 菌体の構成脂肪酸に占めるオレイン酸の割合が28～38%であるラクチカゼイバチルス・パラカゼイ Y I T 9 0 2 9 (F E R M B P - 1 3 6 6) 。
- [請求項8] 請求項6に記載のラクチカゼイバチルス・パラカゼイを1種又は2種以上含有する経口製剤。
- [請求項9] 請求項7に記載のラクチカゼイバチルス・パラカゼイ Y I T 9 0 2 9 (F E R M B P - 1 3 6 6) を含有する経口製剤。
- [請求項10] 請求項6に記載のラクチカゼイバチルス・パラカゼイを1種又は2種以上含有する飲食品。
- [請求項11] 請求項7に記載のラクチカゼイバチルス・パラカゼイ Y I T 9 0 2 9 (F E R M B P - 1 3 6 6) を含有する飲食品。

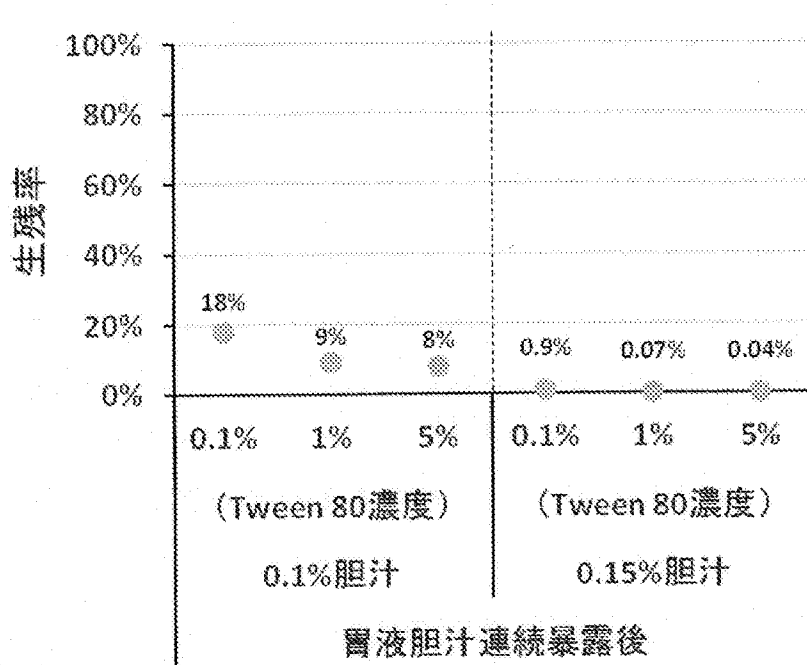
[図1]



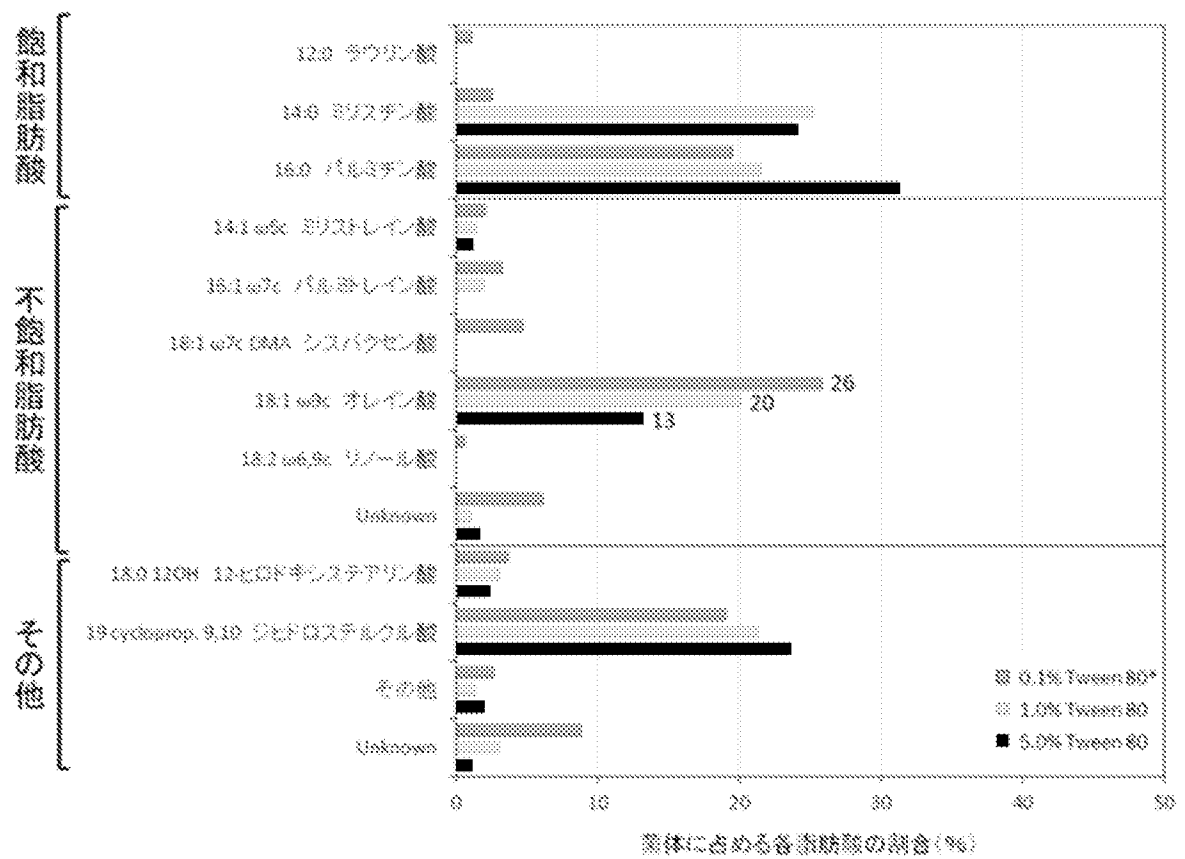
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/022767

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 C12N 1/38(2006.01)i; A61K 35/747(2015.01)i; A61P 1/10(2006.01)i; A61P 1/12(2006.01)i; A61P 9/10(2006.01)i; A61P 31/00(2006.01)i; A61P 37/02(2006.01)i; A61P 37/08(2006.01)i; C12N 1/20(2006.01)i
 FI: C12N1/38; C12N1/20 A; A61P1/12; A61P1/10; A61P37/02; A61P31/00; A61P37/08; A61P9/10 101; A61K35/747
 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)
 C12N; A61K; A61P

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	1971-2021
Registered utility model specifications of Japan	1996-2021
Published registered utility model applications of Japan	1994-2021

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (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 2008-520202 A (TINE BA) 19 June 2008 (2008-06-19) paragraphs [0001]-[0008], [0013], examples	1
Y	paragraphs [0001]-[0008], [0013], examples	2-11
X	CORCORAN, B. M. et al., "Growth of probiotic lactobacilli in the presence of oleic acid enhances subsequent survival in gastric juice", Microbiology, 2007, vol. 153, pp. 291-299, abstract, introduction, page 294, right column, line 11 to page 295, right column, line 21, table 2	1
Y	abstract, introduction, page 294, right column, line 11 to page 295, right column, line 21, table 2	2-11
Y	JP 2016-174589 A (YAKULT HONSHA CO., LTD.) 06 October 2016 (2016-10-06) paragraphs [0011], [0028]-[0032]	2-11

Further documents are listed in the continuation of Box C. 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 23 August 2021 (23.08.2021)	Date of mailing of the international search report 07 September 2021 (07.09.2021)
--	--

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/JP2021/022767

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2001-45968 A (YAKULT HONSHA CO., LTD.) 20 February 2001 (2001-02-20) examples 1, 3	2-11
Y	JP 2003-219861 A (YAKULT HONSHA CO., LTD.) 05 August 2003 (2003-08-05) paragraphs [0006], [0014]-[0021]	4-11
Y	WO 2006/126476 A1 (YAKULT HONSHA CO., LTD.) 30 November 2006 (2006-11-30) paragraphs [0036]- [0037]	4-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2021/022767

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 2008-520202 A	19 Jun. 2008	WO 2006/052148 A1 page 1, line 3 to page 2, line 36, page 3, lines 35-39, page 5, line 13 to page 6, the last line	
JP 2016-174589 A	06 Oct. 2016	US 2008/0187625 A1 US 2018/0077947 A1 paragraphs [0014], [0047]-[0051] WO 2016/152828 A1 KR 10-2017-0129189 A EP 3275316 A1 CN 107979977 A	
JP 2001-45968 A	20 Feb. 2001	US 2005/0255193 A1 examples 9, 11 WO 2001/010233 A1 KR 10-2001-0029649 A EP 1201132 A1 CN 1377231 A	
JP 2003-219861 A	05 Aug. 2003	(Family: none)	
WO 2006/126476 A1	30 Nov. 2006	US 2008/0292751 A1 paragraphs [0045]- [0046] EP 1884566 A1 KR 10-2008-0018879 A CN 101184837 A	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>C12N 1/38(2006.01)i; A61K 35/747(2015.01)i; A61P 1/10(2006.01)i; A61P 1/12(2006.01)i; A61P 9/10(2006.01)i; A61P 31/00(2006.01)i; A61P 37/02(2006.01)i; A61P 37/08(2006.01)i; C12N 1/20(2006.01)i FI: C12N1/38; C12N1/20 A; A61P1/12; A61P1/10; A61P37/02; A61P31/00; A61P37/08; A61P9/10 101; A61K35/747</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））</p> <p>C12N; A61K; A61P</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>1971-2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2021年</td> </tr> </table> <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）</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)</p>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2021年	日本国実用新案登録公報	1996-2021年	日本国登録実用新案公報	1994-2021年													
日本国実用新案公報	1922-1996年																						
日本国公開実用新案公報	1971-2021年																						
日本国実用新案登録公報	1996-2021年																						
日本国登録実用新案公報	1994-2021年																						
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>JP 2008-520202 A (ティネ ビー エー) 19.06.2008 (2008-06-19) 段落 [0001] - [0008]、[0013]、実施例</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>段落 [0001] - [0008]、[0013]、実施例</td> <td>2-11</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CORCORAN B. M. et al., Growth of probiotic lactobacilli in the presence of oleic acid enhances subsequent survival in gastric juice, Microbiology, 2007, Vol. 153, p. 291-299 Abstract、Introduction、第294頁右側欄第11行-第295頁右側欄第21行、Table 2</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>Abstract、Introduction、第294頁右側欄第11行-第295頁右側欄第21行、Table 2</td> <td>2-11</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>JP 2016-174589 A (株式会社ヤクルト本社) 06.10.2016 (2016-10-06) 段落 [0011]、[0028] - [0032]</td> <td>2-11</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>JP 2001-45968 A (株式会社ヤクルト本社) 20.02.2001 (2001-02-20) 実施例1及び3</td> <td>2-11</td> </tr> </tbody> </table> <p><input checked="" 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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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）</p> <p>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” 同一パテントファミリー文献</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 2008-520202 A (ティネ ビー エー) 19.06.2008 (2008-06-19) 段落 [0001] - [0008]、[0013]、実施例	1	Y	段落 [0001] - [0008]、[0013]、実施例	2-11	X	CORCORAN B. M. et al., Growth of probiotic lactobacilli in the presence of oleic acid enhances subsequent survival in gastric juice, Microbiology, 2007, Vol. 153, p. 291-299 Abstract、Introduction、第294頁右側欄第11行-第295頁右側欄第21行、Table 2	1	Y	Abstract、Introduction、第294頁右側欄第11行-第295頁右側欄第21行、Table 2	2-11	Y	JP 2016-174589 A (株式会社ヤクルト本社) 06.10.2016 (2016-10-06) 段落 [0011]、[0028] - [0032]	2-11	Y	JP 2001-45968 A (株式会社ヤクルト本社) 20.02.2001 (2001-02-20) 実施例1及び3	2-11
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 2008-520202 A (ティネ ビー エー) 19.06.2008 (2008-06-19) 段落 [0001] - [0008]、[0013]、実施例	1																					
Y	段落 [0001] - [0008]、[0013]、実施例	2-11																					
X	CORCORAN B. M. et al., Growth of probiotic lactobacilli in the presence of oleic acid enhances subsequent survival in gastric juice, Microbiology, 2007, Vol. 153, p. 291-299 Abstract、Introduction、第294頁右側欄第11行-第295頁右側欄第21行、Table 2	1																					
Y	Abstract、Introduction、第294頁右側欄第11行-第295頁右側欄第21行、Table 2	2-11																					
Y	JP 2016-174589 A (株式会社ヤクルト本社) 06.10.2016 (2016-10-06) 段落 [0011]、[0028] - [0032]	2-11																					
Y	JP 2001-45968 A (株式会社ヤクルト本社) 20.02.2001 (2001-02-20) 実施例1及び3	2-11																					
<p>国際調査を完了した日</p> <p>23.08.2021</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>07.09.2021</p>																						
<p>名称及びあて先</p> <p>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</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>山本 晋也 4N 3341</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3488</p>																						

C. 関連すると認められる文献		
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
Y	JP 2003-219861 A (株式会社ヤクルト本社) 05.08.2003 (2003 - 08 - 05) 段落 [0006]、[0014] - [0021]	4-11
Y	WO 2006/126476 A1 (株式会社ヤクルト本社) 30.11.2006 (2006 - 11 - 30) 段落 [0036] - [0037]	4-11

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/JP2021/022767

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2008-520202 A	19.06.2008	WO 2006/052148 A1 第1頁第3行-第2頁第3 6行、第3頁第35行-第 39行、第5頁第13行- 第6頁最終行	
		US 2008/0187625 A1	
JP 2016-174589 A	06.10.2016	US 2018/0077947 A1 [0014], [0047]-[0051] WO 2016/152828 A1 KR 10-2017-0129189 A EP 3275316 A1 CN 107979977 A	
JP 2001-45968 A	20.02.2001	US 2005/0255193 A1 Examples 9, 11 WO 2001/010233 A1 KR 10-2001-0029649 A EP 1201132 A1 CN 1377231 A	
JP 2003-219861 A	05.08.2003	(ファミリーなし)	
WO 2006/126476 A1	30.11.2006	US 2008/0292751 A1 [0045]-[0046] EP 1884566 A1 KR 10-2008-0018879 A CN 101184837 A	