

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4064515号  
(P4064515)

(45) 発行日 平成20年3月19日(2008.3.19)

(24) 登録日 平成20年1月11日(2008.1.11)

(51) Int.Cl.	F 1
<b>A 6 1 K 35/74 (2006.01)</b>	A 6 1 K 35/74 A
<b>A 6 1 K 31/7016 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/7016
<b>A 6 1 P 37/04 (2006.01)</b>	A 6 1 P 37/04
<b>A 6 1 P 31/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/00
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00

請求項の数 1 (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願平10-48763	(73) 特許権者 306019030 ハウスウェルネスフーズ株式会社 兵庫県伊丹市鑄物師3丁目20番地
(22) 出願日 平成10年2月13日(1998.2.13)	(74) 代理人 100071973 弁理士 谷 良隆
(65) 公開番号 特開平11-228425	(72) 発明者 室▲崎▼ 伸二 奈良県奈良市芝辻町三丁目6番27-208号
(43) 公開日 平成11年8月24日(1999.8.24)	(72) 発明者 山本 佳弘 兵庫県伊丹市荻野8丁目21番地の2 ハイスマインド203号
審査請求日 平成15年2月7日(2003.2.7)	(72) 発明者 井口 武明 兵庫県神戸市須磨区離宮前町1丁目5-25
微生物の受託番号 FERM BP-08607	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 IL-12 産生誘導組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ラクトバチルス・プランタラムL-137株(FERM P-15317)の菌体とニゲロースを有効成分として含むIL-12産生誘導組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ラクトバチルス(Lactobacillus)属に属する菌またはその処理物とたとえば、ニゲロースまたはニゲロオリゴ糖類などの3-O-D-グルコピラノシル-D-グルコースを構成単位として含有する糖類を有効成分として含むインターロイキン12(以下、IL-12と略記する。)産生誘導組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】

IL-12は、ナチュラルキラー細胞刺激因子、細胞障害性リンパ球成熟因子などとも呼ばれ、B細胞、単球、マクロファージから産生される分子量約70,000の糖蛋白質である。その生物活性としては、静止期のT細胞およびナチュラルキラー(NK)細胞からのインターフェロン産生の誘導、NK細胞活性の亢進、リンホカイン活性化キラー(LAK)細胞活性の誘導、静止期T細胞のレクチン刺激による細胞増殖能の亢進、ナイーブT細胞からT<sub>H</sub>-1細胞への分化の促進などが知られており、生体の免疫系に深く関与している物質である。

また、アレルギーや自己免疫疾患の発症機序の1つに、 $T_H - 1$ の活性が $T_H - 2$ の活性に比して低下した場合があると考えられており、ナイーブT細胞からの $T_H - 1$ 細胞への分化促進、 $T_H - 1$ 細胞の活性化を促進する作用を有するIL - 12は、アレルギーや自己免疫疾患の発症を抑制する効果があると期待されている。

一方、従来から、3 - O - - D - グルコピラノシル - D - グルコースを構成単位として含む糖類がいくつか知られている。例えば、3 - O - - D - グルコピラノシル - D - グルコースを構成単位として含む多糖として、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) の菌系中に含有されるニゲラン、そのニゲランの部分酸加水分解等によって得られる - D - グルコピラノース (1 3) - - D - グルコピラノース (1 4) - - D - グルコピラノース (1 3) - D - グルコース (以下、ニゲラントラサッカライドと称する) をはじめとする様々な3 - O - - D - グルコピラノシル - D - グルコースを構成単位として含有するオリゴ糖、さらには、上記のニゲランの加水分解によっても得ることが可能であり、また、蜂蜜、麹汁、ビール等にも含有される、ニゲロースと称される3 - O - - D - グルコピラノシル - D - グルコース (図解糖質便覧、70頁) などである。

#### 【0003】

本発明者らは、これら3 - O - - D - グルコピラノシル - D - グルコースを構成単位として含有する糖類が、抗原受容体を介する刺激により活性化されたTリンパ球およびBリンパ球の活性をさらに上昇させ、また、菌体成分またはレクチンを認識する受容体を介する刺激により、抗原非特異的に活性化されたTリンパ球およびBリンパ球の活性をさらに

上昇させることを見出し、3 - O - - D - グルコピラノシル - D - グルコースを構成単位として含む糖類を有効成分として含有する免疫賦活剤の発明を完成し、既に特許出願をした (特開平9 - 52834号)。

その後本発明者らは、乳酸菌の1種であるラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*) L - 137株の菌体がTリンパ球共刺激作用を示すこと、また該菌体が抗原受容体を介する刺激により活性化されたTリンパ球の活性をさらに上昇させ、抗原受容体以外の経路により抗原非特異的に活性化されたTリンパ球の活性をも上昇させることを突き止めた。これらTリンパ球の活性化に伴い、Tリンパ球のインターフェロン - の産生が増強される一方、Bリンパ球への抗原受容体を介する刺激および抗原受容体以外の経路による活性化は抑制される事実も判明した。これとは別に該菌体がマクロファージのIL - 12の産生を選択的に促進する作用を有していることも判明した。

#### 【0004】

すなわち、ラクトバチルス・プランタラム L - 137菌体は、抗原受容体を介するTリンパ球の活性化を上昇させることにより、生体内で常時起こっている微生物および腫瘍細胞に対する排除反応を高め、特にインターフェロン - の産生を増強することから、ウイルスや腫瘍に対する防御能を高める。しかし、単独ではリンパ球はほとんど活性化しないことから、生体にとって好ましくない免疫応答を誘導せず、また、Bリンパ球の抗原受容体を介する活性化や抗原非特異的な活性化を抑制することにより、免疫賦活に伴い予測されるBリンパ球のポリクロナールな活性化により誘導される自己免疫疾患等は増悪させない。

またラクトバチルス・プランタラム L - 137菌体は、腫瘍細胞障害性を有するナチュラルキラー細胞を活性化するサイトカインであるIL - 12のマクロファージからの産生を高める結果、腫瘍に対する防御能を特に高めるとともに、後天性免疫不全症候群 (AIDS) の発症予防にも有用である。しかし腫瘍壊死因子 の産生は軽度にしかならないため、通常のマクロファージの活性化剤により上昇する腫瘍壊死因子 により引き起こされる、発熱、体重減少などの副作用を誘導しない。

これらの知見を基に、本発明者らは、ラクトバチルス属に属する菌またはその処理物を含む免疫賦活剤の発明を成し遂げ、既に特願平8 - 289333号として特許出願した。

#### 【0005】

【発明が解決しようとする課題】

10

20

30

40

50

前述のとおり、本発明者らはラクトバチルス属に属する菌体にIL-12産生誘導促進効果の存することを見出したが、その効果は該菌単独では必ずしも十分なものではなく、より早く、より強力にその効果を発揮させる手段が他にないものと鋭意研究を重ねてきた。

#### 【0006】

##### 【課題を解決するための手段】

そして、本発明者らはラクトバチルス属に属する菌体と併用することにより相乗効果を発揮させるような物質がないか種々検討を行ったところ、3-O-β-D-グルコピラノシル-D-グルコースを構成単位とする糖類、特にニゲロースが顕著な相乗効果を示すことを知見し、その知見に基づいて更に研究を重ねて本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、ラクトバチルス・プラントラムL-137株(FERM P-15317)の菌体とニゲロースを有効成分として含むIL-12産生誘導組成物である。

10

#### 【0007】

##### 【発明の実施の形態】

本発明に用いられる菌は、ラクトバチルス属に属し、B細胞、単球、マクロファージのIL-12の産生を誘導、促進する作用を有するものであればどのような菌でもよい。

菌のマクロファージのIL-12産生促進作用は、たとえばマウス腹腔マクロファージを組織培養プレートで培養し、ラクトバチルス属に属する菌を添加し、一定期間培養して培地中のIL-12濃度をエンザイムイムノアッセイで測定することにより容易に判定することができる。

20

本発明に用いられるラクトバチルス属に属する菌の代表的なものとしてラクトバチルス・プラントラムL-137を挙げることができるが、この菌は工業技術院生命工学工業技術研究所に平成7年1月30日に受託番号FERM P-15317、微工研菌寄第15317号として寄託されており、その菌学的性質は特開平9-163977号に詳しく記載されている。さらにこの菌については、Journal of Fermentation and Bioengineering, Vol. 73, No.3, 193-197(1992)及びVol. 80, No.2, 124-130(1995)にも報告されている。

本発明に用いられるラクトバチルス属に属する菌は、天然培地、合成培地、半合成培地などの培地に培養することにより大量に得ることができる。

#### 【0008】

培地としては、窒素源および炭素源を含有するものが用いられる。窒素源としては、たとえば、肉エキス、ペプトン、グルテン、カゼイン、酵母エキス、アミノ酸等であり、炭素源としては、たとえば、グルコース、キシロース、フラクトース、イノシトール、水アメ、麹汁、澱粉、バカス、フスマ、糖蜜、グリセリン等が用いられる。

30

このほか、無機質として、たとえば硫酸アンモニウム、リン酸カリウム、塩化マグネシウム、食塩、鉄、マンガン、モリブデン更に各種ビタミン類その他を添加することができる。

培養温度は25~40℃、好ましくは27~35℃であり、培養時間は12~48時間程度であり、通気振盪してもよい。

培地のpHは3~6、好ましくは4~6である。培養終了後菌体を採取し蒸留水を加え、遠心分離などの手段により上清を除き、必要によりその操作を繰り返し、遠心分離や濾過等により菌体を採取する。

40

採取された菌体は生菌のまま、またはたとえば加熱、紫外線照射、ホルマリン処理などにより不活性化して投与に適した剤型にすることもできる。分離された生菌体、死菌体はさらに摩砕や破碎処理をし、得られた処理物を必要により加熱滅菌、無菌濾過し、濾液を凍結乾燥して製品とすることもできる。

菌体の処理物にはたとえば、上記摩砕物、破碎物、それらからの抽出液、凍結乾燥品が含まれる。

また、本発明に用いられる乳酸菌の一種、ラクトバチルス・プラントラムL-137株は、元々発酵食品であるブロングイスダから分離されたものであり、食品、たとえば果菜

50

類、穀類から選択された少なくとも1種または、果菜類や穀類を発酵可能な形態に処理したもの、たとえば切断物、粉碎物、摩砕物、搾汁、搾汁濃縮物を本発明において用いられる菌により発酵させた菌を含む発酵物をそのまま用いることができる。

【0009】

本発明に用いられる他の有効成分は、3-O-β-D-グルコピラノシル-D-グルコースを構成単位として含有する糖類であり、その具体例としては、前記したニゲロース、ニゲランテトラサッカライド、ニゲロトリオースなどのニゲロオリゴ糖が挙げられ、これらは単独または2種以上を併用して用いてもよい。

本発明の組成物における菌体またはその処理物と糖類の使用比率は重量比で1:1~400、好ましくは1:5~100である。本発明の組成物は、必要に応じて、さらに種々の添加剤、例えば、医薬の担体、賦形剤、ビタミン、アミノ酸、ミネラル、食物繊維、他の糖類、甘味料、香料、牛乳、脱脂粉乳などの乳成分を加えてもよい。

このようにして得られた本発明の組成物は、免疫力を高めまたは調節する食品や医薬剤としても利用可能である。用いる食品あるいは、食品成分、医薬担体または賦形剤は特に限定するものではなく、当該組成物の具体的用途に応じて当業者が適宜選択できる。また本発明の組成物の形態も特に限定するものではなく、具体的用途に応じて種々の固体や液体の形態とすることができる。本発明の組成物は、医薬として用いる場合、錠剤、粉剤、顆粒剤、カプセル剤、液剤などの経口投与、あるいは注射剤などの非経口投与が考えられるが、経口投与の場合、本発明の菌体またはその処理物を1mg~5g、好ましくは4mg~4gおよび本発明の糖類を4mg~40g、好ましくは10mg~10g含む製剤を、また注射剤の場合は、菌体またはその処理物を0.1mg~1g、好ましくは0.5mg~500mg、糖類を2mg~20g、好ましくは10mg~10g含む注射液を、成人1日当たり1~数回に分けて投与することにより、副作用を伴うことなく所期の目的を達することができる。

本発明の組成物を食品として用いる場合、調味料、畜肉加工品、水産加工品、農産加工品、スナック菓子、調味食品、調味済食品、デザート類、乳油製品、菓子、スナック菓子等の形態で提供することも可能である。

本発明のIL-12産生誘導組成物は、たとえば、ウイルス、バクテリア等の微生物による感染症や各種悪性腫瘍などの予防・治療や免疫力調整に有効である。

【0010】

【実施例】

以下に参考例、実施例および試験例をあげて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はそれらによって限定されるものではない。

参考例1

ラクトバチルス・プランタラムL-137乾燥菌体の製造方法

乳酸菌培養培地であるGYP培地のグルコースの代わりにスターチを加えた培地200mlにラクトバチルス・プランタラムL-137をスターターとして1重量%接種し、32°Cで24時間前培養を行った。ついで、6LのGYP培地に前述の培養液をスターターとして1重量%接種し、32°Cにて24時間静地培養した。培養後、5000rpmで35分間遠心分離し、上清を除き、菌体を集めた。さらに、集めた菌体ペーストを生理食塩水に良く分散し、5000rpmで35分遠心分離したのち、上清を除き菌体を集めた。これを3回繰り返し、蒸留水に分散し、70°Cで10分間殺菌した。これを凍結乾燥し、乾燥菌体を7.07g得た。

【0011】

**実施例 1****清涼飲料水****処方**

ニゲロース	20.0 g	
ラクトバチルス・プランタラム L-137 乾燥菌体	1.0 g	
レモン果汁	9.4 g	
グラニュー糖	15.4 g	10
果糖ブドウ糖液糖	74.0 g	
精製ハチミツ	22.2 g	
ビタミンC	5.0 g	
クエン酸	1.5 g	
レモンフレーバー	1.6 g	

---

純水を加えて合計	1000.0 g	
----------	----------	--

**調製法**

水を除く上記各成分に純水 500 g を加えて攪拌し、10 分間超音波処理をして懸濁溶解させ、さらに水を加えて全量を 1000 g にした後、65 で 10 分間殺菌して清涼飲料水を得た。

【0012】

**実施例 2****顆粒剤****処方**

ニゲロース	60.0 g	30
ラクトバチルス・プランタラム L-137 乾燥菌体	3.0 g	
乳糖	148.0 g	
結晶セルロース	15.0 g	
ブドウ糖	71.0 g	

**調製法**

上記各成分の粉末を各配合量均一に混合し、造粒破碎後乾燥して顆粒剤を得た。

【0013】

**実施例 3****錠剤の処方ならびに調製法**

実施例 2 で得られた顆粒剤 99 g にステアリン酸カルシウム 1 g を混合し、打錠機で圧縮整形して 900 mg の錠剤を得た。得られた錠剤は 1 錠当たり、ニゲロースを約 180 mg、ラクトバチルス・プランタラム L-137 菌体を約 9 mg 含有する。

**実施例 4****注射剤の処方ならびに調製法**

ニゲロース 50 g、ラクトバチルス・プランタラム L-137 乾燥菌体 0.2 g を精製水 1000 ml に懸濁させ、超音波処理した後、凍結乾燥した。この凍結乾燥物を 500 本のバイアル瓶に分注して注射剤を得た。この注射剤 1 バイアルには凍結乾燥物 100.4 mg が含まれており、2 ml の生理食塩水に容易に懸濁溶解した。

50

## 【 0 0 1 4 】

## 実施例 5

## カプセル剤

## 処方

ニゲロース	250.0 g	
ラクトバチルス・プランタラム L - 1 3 7 乾燥菌体	30.0 g	
コーンスターチ	30.0 g	10
ステアリン酸マグネシウム	10.0 g	

## 調製法

上記各成分の配合量を均一に混合し、ゼラチンカプセルに充填した。カプセル 1 個当たり、ニゲロースを 2 5 0 m g、ラクトバチルス・プランタラム L - 1 3 7 菌体を 3 0 m g 含有する。

## 【 0 0 1 5 】

## 試験例 1

マウス腹腔マクロファージの I L - 1 2 産生誘導に対するラクトバチルス・プランタラム L - 1 3 7 乾燥死菌体とニゲロースの相乗効果

マウス ( C 5 7 B L / 6、雌、1 6 週齢 ) の腹腔内に無菌的に R P M I 1 6 4 0 培地を注入し、腹部をよく揉んだ後、注入した R P M I 1 6 4 0 培地を回収し腹腔細胞浮遊液を得た。腹腔細胞浮遊液の細胞数とそれに含まれるマクロファージの割合を自動血球計測装置で測定した後、マクロファージとして  $1 \times 10^6 / \text{ml}$  の細胞数に R P M I 1 6 4 0 培地で調製し、9 6 穴組織培養プレートに 1 穴当たり 1 0 0  $\mu\text{l}$  を播種した。3 7 の 5 % 炭酸ガス培養器内に 2 時間放置し、腹腔マクロファージを各穴に付着させ、2 時間後に R P M I 1 6 4 0 培地で洗浄後、R P M I 1 6 4 0 培地を 1 穴当たり 1 0 0  $\mu\text{l}$  加えた。

これに R P M I 1 6 4 0 培地 ( 対照 ) あるいはラクトバチルス・プランタラム L - 1 3 7 乾燥死菌体を 0 . 4 あるいは 4  $\mu\text{g} / \text{ml}$  の濃度で R P M I 1 6 4 0 培地に溶解した液をそれぞれ 1 穴当たり 5 0  $\mu\text{l}$  加えた。さらに、R P M I 1 6 4 0 培地 ( 対照 ) あるいはニゲロースを 1 2 8、6 4 0 あるいは 3 2 0 0  $\mu\text{g} / \text{ml}$  の濃度で R P M I 1 6 4 0 培地に溶解した液を 1 穴当たり 5 0  $\mu\text{l}$  加え、3 7 の 5 % 炭酸ガス培養器内で 1 5 時間培養し、培養後の培養上清の I L - 1 2 をエンザイムイムノアッセイで測定した。

## 【 0 0 1 6 】

エンザイムイムノアッセイは、ラット抗マウス I L - 1 2 I g G 2 a 抗体 ( Genzyme 社製 ) をホウ酸緩衝液で 6  $\mu\text{g} / \text{ml}$  に調製した溶液を、9 6 穴組織培養プレート 1 穴当たり 1 0 0  $\mu\text{l}$  加え 3 7 で 1 日間放置しラット抗マウス I L - 1 2 I g G 2 a 抗体を各穴に付着させたプレートを用いて行った。培養上清を 1 穴当たり 5 0  $\mu\text{l}$  加え室温で 9 0 分間放置し、培養上清の I L - 1 2 をプレートに付着したラット抗マウス I L - 1 2 I g G 2 a 抗体と結合させた。洗浄後ラット抗マウス I L - 1 2 I g G 2 a 抗体 ( Genzyme 社製 ) を加え、プレートに結合させた I L - 1 2 に結合させた。洗浄後ペルオキシダーゼで標識した抗ラット I g G 1 抗体を加え、プレートに結合させたラット抗マウス I L - 1 2 I g G 1 抗体に結合させた。洗浄後、過酸化水素 0 . 0 0 6 % とオルトフェニレンジアミン 0 . 1 % を含有するリン酸緩衝液を 1 穴当たり 1 0 0  $\mu\text{l}$  加え、室温で 2 0 分間反応させ、反応を 1 . 5 N 硫酸で停止し、マイクロプレートリーダーで吸光度 4 9 2 n m を測定し、リコンビナントマウス I L - 1 2 で作成した標準曲線から、培養上清中の I L - 1 2 の濃度を求めた。〔表 1 〕にその結果を示す。

## 【 0 0 1 7 】

## 【 表 1 】

10

20

30

40

50

培養上清中のIL-12濃度 (ng/ml)

		ニゲロース			
		0	32	160	800
添加量 ( $\mu\text{g/ml}$ )	ラクトバチルス・	0	0.18	0.12	0.12
	プランタラム L-137	0.1	0.48	1.09	1.15
	乾燥死菌体	1.0	0.90	1.39	1.63

10

〔表1〕から明らかなごとくラクトバチルス・プランタラムL-137乾燥死菌体は単独でもマクロファージからのIL-12の産生を誘導したが、ニゲロース単独ではその作用はなかった。しかし、ラクトバチルス・プランタラムL-137乾燥死菌体にニゲロースを添加すると、IL-12の産生がラクトバチルス・プランタラムL-137乾燥死菌体単独にくらべ大幅に上昇し、IL-12産生誘導におけるラクトバチルス・プランタラムL-137乾燥死菌体とニゲロースの相乗効果が検証された。

【0018】

## 試験例2

20

血中IL-12の上昇に対するラクトバチルス・プランタラムL-137乾燥死菌体とニゲロースの相乗効果

21週齢、雌性のDBA/2マウス(1群5匹)に連続して4日間毎日、(1)生理食塩水0.45ml、(2)ニゲロースを100mg/mlの濃度に生理食塩水で調製した溶液0.3ml、(3)ラクトバチルス・プランタラムL-137乾燥死菌体を1mg/mlの濃度に生理食塩水で調製した溶液0.15ml、および(4)ニゲロースを100mg/mlの濃度に生理食塩水で調製した溶液0.3mlとラクトバチルス・プランタラムL-137乾燥死菌体を1mg/mlの濃度に生理食塩水で調製した溶液0.15mlをそれぞれ腹腔内投与した。4日目の投与の4時間後にマウスの眼底静脈から採血し、血漿を分離し、IL-12をエンザイムイムノアッセイで測定した。結果を〔表2〕に示す。

30

【0019】

【表2】

血漿中のIL-12濃度 (ng/ml)

対 照	ニゲロース	L-137	ニゲロース + L-137
0.50±0.40	0.74±0.47	1.46±0.60*	3.43±0.34**

各値は例数5の平均値±標準偏差で示した。

40

\* : 危険率5%以下で対照群と有意差

\*\* : 危険率1%以下で対照群と有意差

〔表2〕から明らかなごとく、ニゲロース単独使用では有意な血漿IL-12の上昇は認められなかったが、ラクトバチルス・プランタラムL-137乾燥死菌体単独使用では有意な血漿IL-12の上昇がみられ、ラクトバチルス・プランタラムL-137乾燥死菌体とニゲロースを併用すると、血漿IL-12が顕著に上昇し、血中IL-12上昇におけるラクトバチルス・プランタラムL-137乾燥死菌体とニゲロースの相乗効果が検証された。

50

## 【 0 0 2 0 】

## 【 発 明 の 効 果 】

本発明においては、単独投与では有意な I L - 1 2 産生誘導活性を示さない 3 - O - -  
D - グルコピラノシル - D - グルコースを構成単位として含有する糖類を、ラクトバチル  
ス属に属する菌体またはその処理物と併用して投与することにより、I L - 1 2 産生誘導  
活性に対する顕著な相乗効果が奏される。

---

フロントページの続き

(72)発明者 室山 幸太郎

兵庫県伊丹市鋳物師2丁目69番地 メゾン・ド・オーク303号

審査官 上條 のぶよ

(56)参考文献 特開平09-163977(JP,A)

特開平09-052834(JP,A)

日本免疫学会総会・学術集会記録, 1997年 9月29日, 第27巻, p.126, 1F7

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 35/00-76

A61K 31/00-33/44

BIOSIS(STN)

CA(STN)

EMBASE(STN)

JMEDPlus(JDream2)

JST7580(JDream2)

JSTPlus(JDream2)