

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-526762

(P2012-526762A)

(43) 公表日 平成24年11月1日(2012.11.1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/74 (2006.01)	A 6 1 K 35/74 A	4 B 0 1 8
A 6 1 K 9/08 (2006.01)	A 6 1 K 9/08	4 C 0 7 6
A 6 1 P 3/02 (2006.01)	A 6 1 P 3/02	4 C 0 8 4
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	4 C 0 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 33 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2012-510264 (P2012-510264)	(71) 出願人	599132904
(86) (22) 出願日	平成22年5月11日 (2010.5.11)		ネステク ソシエテ アノニム
(85) 翻訳文提出日	平成24年1月6日 (2012.1.6)		スイス国, ブベイ, アブニュー ネスレ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2010/056414		5 5
(87) 国際公開番号	W02010/130713	(74) 代理人	100088155
(87) 国際公開日	平成22年11月18日 (2010.11.18)		弁理士 長谷川 芳樹
(31) 優先権主張番号	09159925.8	(74) 代理人	100114270
(32) 優先日	平成21年5月11日 (2009.5.11)		弁理士 黒川 朋也
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100128381
(31) 優先権主張番号	09159929.0		弁理士 清水 義憲
(32) 優先日	平成21年5月11日 (2009.5.11)	(74) 代理人	100107456
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 池田 成人
		(74) 代理人	100140453
			弁理士 戸津 洋介
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 プロバイオティクスを含有する、手術及び外傷患者のための特殊医学的栄養物

(57) 【要約】

本発明は、特殊栄養組成物の分野に関する。特に、本発明は、プロバイオティクス微生物を含む、入院患者に完全栄養を供給するための栄養組成物を提供する。このようなプロバイオティクス微生物は、例えば、生物活性のある加熱処理されたプロバイオティクス微生物などの非複製微生物でもよい。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

完全栄養を供給し、プロバイオティクス微生物を含む、手術及び/又は外傷患者に投与される組成物。

【請求項 2】

0.9 ~ 1.6 kcal/ml の範囲のカロリー密度、370 ~ 1100 mOsm/kg 水の範囲の重量オスモル濃度を有し、組成物のカロリーの約 21 ~ 23 % を占めるタンパク質源、組成物のカロリーの約 37 ~ 54 % を占める炭水化物源、組成物のカロリーの約 24 ~ 41 % を占める脂質源を含み、70 : 1 ~ 74 : 1 の範囲の NPC : N 比を有する、請求項 1 に記載の組成物。

10

【請求項 3】

1 : 1 ~ 1.5 : 1 の範囲の n6 : n3 脂肪酸比、及び/又は 26 : 74 ~ 57 : 43 の範囲の MCT : LCT 比を有する脂質源を含む、請求項 1 又は 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

約 76 ~ 86 % の遊離水を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5】

プロバイオティクス微生物が、非複製プロバイオティクス微生物を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

約 10^6 ~ 10^{12} cfu に相当する量のプロバイオティクス微生物を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 7】

非複製プロバイオティクス微生物が、加熱処理によって、好ましくは少なくとも 1 秒間の少なくとも 71.5 の高温処理によって非複製にされた、請求項 5 又は 6 に記載の組成物。

【請求項 8】

加熱処理が、約 1 ~ 120 秒間の約 71.5 ~ 150 の高温処理であり、好ましくは高温 / 短時間 (HTST) 処理又は超高温 (UHT) 処理である、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

炎症性障害の予防又は治療において使用するための、請求項 8 に記載の組成物。

30

【請求項 10】

加熱処理が、約 3 分 ~ 2 時間、約 70 ~ 150 の温度範囲で、好ましくは 5 分 ~ 40 分間、80 ~ 140 の範囲で行われる、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 11】

欠陥のある免疫防御と関連する障害の予防又は治療において使用するための、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

プロバイオティクスの少なくとも 90 %、好ましくは少なくとも 95 %、さらに好ましくは少なくとも 98 %、最も好ましくは少なくとも 99 %、理想的には少なくとも 99.9 %、最も理想的には全てが非複製である、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項 13】

プロバイオティクス微生物が、ビフィドバクテリウム属、ラクトバチルス属、プロピオニバクテリウム属、又はこれらの組合せ、例えば、ビフィドバクテリウム・ロンガム、ビフィドバクテリウム・ラクティス、ビフィドバクテリウム・アニマリス、ビフィドバクテリウム・プレーベ、ビフィドバクテリウム・インファンティス、ビフィドバクテリウム・アドレスセンティス、ラクトバチルス・アシドフィルス、ラクトバチルス・カゼイ、ラクトバチルス・パラカゼイ、ラクトバチルス・サリパリウス、ラクトバチルス・ロイテリ、ラクトバチルス・ラムノサス、ラクトバチルス・ジョンソニー、ラクトバチルス・ブラン

50

タルム、ラクトバチルス・ファーメンタム、ラクトコッカス・ラクティス、ストレプトコッカス・サーモフィルス、ラクトコッカス・ラクティス、ラクトコッカス・ジアセチラクティス、ラクトコッカス・クレモリス、ラクトバチルス・ブルガリカス、ラクトバチルス・ヘルベティカス、ラクトバチルス・デルブレッキー、エシェリキア・コリ、及び/又はこれらの混合物からなる群から選択される、請求項1～12のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項14】

プロバイオティクス微生物が、ビフィドバクテリウム・ロンガム NCC 3001、ビフィドバクテリウム・ロンガム NCC 2705、ビフィドバクテリウム・ブレーベ NCC 2950、ビフィドバクテリウム・ラクティス NCC 2818、ラクトバチルス・ジョンソニー La 1、ラクトバチルス・パラカゼイ NCC 2461、ラクトバチルス・ラムノサス NCC 4007、ラクトバチルス・ロイテリ DSM 17983、ラクトバチルス・ロイテリ ATCC 55730、ストレプトコッカス・サーモフィルス NCC 2019、ストレプトコッカス・サーモフィルス NCC 2059、ラクトバチルス・カゼイ NCC 4006、ラクトバチルス・アシドフィルス NCC 3009、ラクトバチルス・カゼイ ACA-DC 6002 (NCC 1825)、エシェリキア・コリ Nissle、ラクトバチルス・ブルガリカス NCC 15、ラクトコッカス・ラクティス NCC 2287、又はこれらの組合せからなる群から選択される、請求項1～13のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項15】

1日用量当たり約0.005mg～1000mgの非複製微生物を含有する、請求項1～14のいずれか一項に記載の組成物。

20

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、特殊栄養組成物の分野に関する。特に、本発明は、プロバイオティクス微生物を含む、入院患者に完全栄養を供給するための栄養組成物を提供する。このようなプロバイオティクス微生物は、例えば、生物活性のある加熱処理されたプロバイオティクス微生物などの非複製微生物でもよい。

【0002】

人体はその源を主に摂取食物から得ている。しかし特定の条件では、患者は、補助なしでは十分な量の食物を摂取することができないことがある。手術後及び/又はクリティカルケア状態の入院患者についても同様であり得ることが多い。このような患者は、十分な量で経口摂取を受け入れることができないことがある。

30

【0003】

それにも関わらず、十分な栄養供給は、特に手術の前又は後の患者に不可欠である。

【0004】

このような患者のために、特別な栄養組成物が開発されてきており、今日販売されている。

【0005】

典型的には、このような組成物は、患者に完全栄養を供給することを目的とする。

40

【0006】

さらに、特殊組成物は、特に手術の間の感染症の危険性を減少させ、回復期間を減少させ得る。これによって、経費が削減され、患者は病院をより早く出て、家族の元に戻ることができる。

【0007】

それでもなお、このような特殊栄養組成物の性能をさらにいっそう改善することが望ましいであろう。

【0008】

特に入院している状態では、患者の腸管内菌叢は、例えば、抗菌性調製物の消費によって相当損なわれていることがある。しかし、機能している腸管内菌叢は、摂取食物からの

50

栄養素が適切に吸収されることを確保することが必要とされる。

【0009】

さらに、入院患者の免疫系は、特に手術前又は後の、身体全体の健康状態によって、及びストレスによって損なわれていることが多い。

【0010】

最終的に、栄養組成物によってまた、副作用の危険性を伴わずに、天然であり投与するのに安全な抗炎症性化合物を実現すれば有利であろう。

【0011】

結果的に、工業規模で生産することが簡単であり、理想的にはより長い保存寿命又は上昇した温度でも活性を失わない一方で、消化管の機能を改善すること、免疫系をブーストすること、及び/又は抗炎症作用を実現することを可能とする、手術及び外傷患者に投与される栄養組成物が当技術分野で必要とされている。

10

【0012】

本発明者らは、この必要性に取り組んだ。

【0013】

したがって、現況技術を改善し、この記載された必要性に取り組むことは、本発明の目的であった。

【0014】

独立請求項の主題によって本発明の目的を達成できたことを、本発明者らは驚いたことに見出した。従属請求項は、本発明のアイデアをさらに発展させる。

20

【0015】

完全栄養を供給し、プロバイオティクス微生物を含む特殊栄養組成物が、表明した必要性を満たすことを、本発明者らは驚いたことに見出した。

【0016】

特殊栄養組成物は、プロバイオティクスを含むヨーグルト飲料の保存寿命を超える保存寿命を通常有するため、プロバイオティクスは現在、このような栄養組成物に加えられていない。これは、プロバイオティクスの生存能が長期間の保存寿命の間に確保できるかについて不確実であるためである。

【0017】

非複製プロバイオティクスでさえ、プロバイオティクスの健康上の利益をもたらすことができ、改善された利益さえも有し得ることを、本発明者らは今や示すことができた。

30

【0018】

したがって、本発明の一実施形態は、完全栄養を供給し、プロバイオティクス微生物を含む、手術及び/又は外傷患者に投与される組成物である。

【0019】

本発明の組成物は、経口的又は経管栄養法によって経腸的に投与し得る。

【0020】

合併症、例えば、感染症の危険性が減少し、GI管の構造及び機能が保存され、価格がより低いため、非経口栄養と比較して、経腸栄養が好ましいことが多い。

【0021】

経腸栄養についての典型的な適応症には、例えば、食欲不振症、タンパク質の栄養不足、肝不全、手術のための腸の前処置、腸管皮膚瘻の閉鎖、広範囲の腸切除後又は吸収不良をもたらす得る障害における小腸の順応、経口摂取ができないこと、外傷、及び/又は代謝ストレスをもたらす重篤疾患が含まれる。

40

【0022】

患者が全ての必要な栄養素を組成物から得て、さらなる食料源が必要ない場合、このような組成物は、完全栄養を実現する。

【0023】

好ましくは、組成物は、短期間又は長期間両方の経管栄養に適したバランスのとれた栄養素プロファイルを有する。組成物は、危篤状態の患者の特定の必要性を満たすように設

50

計される。

【0024】

本発明の組成物は、より速い回復のための体の免疫防御をサポートするのを助け、感染症の割合、人工呼吸器使用日及びLOSを減少させることを助ける。

【0025】

組成物は、免疫応答をサポートするアルギニン、オメガ-3脂肪酸及び核酸の特殊ブレンドを提供する。

【0026】

手術前及び手術後に、0.5~1Lの組成物を少なくとも5~7日間投与することが推奨される。

【0027】

組成物は、0.9~1.6kcal/mlの範囲のカロリー密度、370~1100mOsm/kg水の範囲の重量オスモル濃度を有し、組成物のカロリーの約21~23%を占めるタンパク質源、組成物のカロリーの約37~54%を占める炭水化物源、及び組成物のカロリーの約24~41%を占める脂質源を含み得る。

【0028】

NPC:N比は、70:1~74:1の範囲でもよい。非タンパク質キロカロリーと窒素の比(NPC:N)は、1日毎に供給される窒素のグラムを計算し(1gのN=6.25gのタンパク質)、総非タンパク質キロカロリーを窒素のグラムで割ることによって計算する。

【0029】

典型的には、80:1の範囲のNPC:N比を有する栄養サプリメントを、最も重度のストレス状態にある患者のために使用し、100:1の範囲のNPC:N比を、重度のストレス状態にある患者のために使用し、150:1の範囲のNPC:N比を、ストレス状態にない患者のために使用する。

【0030】

したがって、NPC:N比は、患者の状態によって調節し得る。

【0031】

タンパク質源として、乳からのカゼイン酸ナトリウム及びカゼイン酸カルシウム、並びにL-アルギニンの組合せを使用し得る。10~20g/Lの追加のL-アルギニンを使用し得る。

【0032】

組成物は、1~2g/Lの食事性ヌクレオチドをさらに含有し得る。

【0033】

本発明の組成物中に含有される脂質源は、1:1~1.5:1の範囲のn6:n3脂肪酸比、及び/又は26:74~57:43の範囲のMCT(中鎖トリグリセリド):LCT(長鎖トリグリセリド)比を有し得る。

【0034】

大量のn-3脂肪酸は、炎症反応をモジュレートするのを助ける。バランスのとれたペプチドプロファイル及びMCT油は、吸収及びGI耐性を促進する。高いMCT:LCT比が選択され、脂肪吸収不良の可能性を減少させる。したがって、通常の患者については25:75~20:80のMCT:LCT比が理想的であり得る一方、脂質吸収不良を有する患者については50:50~60:40の範囲のMCT:LCT比を選択することが賢明であり得る。

【0035】

したがって、DHA/EPA含量は、1.5g/L~5g/Lの範囲でもよい。DHA/EPAの量の増加は、免疫応答を改善させる。したがって、損なわれた免疫系を有する患者について、少なくとも2.5g/LのDHA/EPAが好ましい。

【0036】

本発明の組成物は、繊維内容物で強化し得る。繊維内容物は10~15g/Lの範囲で

10

20

30

40

50

よく、部分的加水分解グアーガムを含み得る。

【0037】

繊維内容物は高度な治癒サポートを実現し、腸機能不全を患っている患者のために有用であろう。

【0038】

本発明の組成物は、約76～86%の遊離水を含み得る。

【0039】

遊離水は、最小限の液体の必要量を満たすのに必須である。通常患者については、概ね83～86%の遊離水含量が好ましいことがある。

【0040】

容量の制限及び/又は高いカロリー密度に対する要求を有する患者について、十分な水分補給をまだ実現する概ね69～71%の遊離水含量が好ましいことがある。

【0041】

本発明の組成物は特に、糖尿病性足部潰瘍、感染症、意図していない体重減少、容量不耐性、うっ血性心不全、クリティカルケア状態、手術、重篤疾患、乳糖不耐性、手術前及び手術後の状態、褥瘡、創傷管理、静脈うっ血性潰瘍、グルテン不耐性、代謝ストレス状態、呼吸器疾患、人工呼吸器への依存、代謝亢進、外傷、火傷及び創傷、HIV/AIDS、人工呼吸器を装着した危篤状態の患者、容量感受性、及び/又はカロリーの必要性増加の栄養管理のために有用である。

【0042】

組成物は、部分的に又は単独で非複製プロバイオティクス微生物を含み得る。

【0043】

例えば、免疫ブースト作用に関して、及び/又は抗炎症作用に関して、非複製プロバイオティクス微生物は、複製プロバイオティクス微生物より有効でさえあり得ることを、本発明者らは驚いたことに見出した。

【0044】

プロバイオティクスは「適当量で投与されたときに健康上の利益を宿主に与える生きた微生物」(FAO/WHOガイドライン)として定義されることが多いため、これは驚くべきことである。既刊文献の大部分は、生きたプロバイオティクスについて論じている。さらに、いくつかの研究は非複製細菌によって実現される健康上の利益を調査したが、例えば加熱処理によるプロバイオティクスの不活性化は、これらの健康上の利益と称されるものの損失をもたらすことをこれらの研究の大部分は示した(Rachmilewitz, D.ら、2004、Gastroenterology 126:520～528; Castagliuoloら、2005、FEMS Immunol. Med. Microbiol. 43:197～204; Gill, H. S. 及びK. J. Rutherford、2001、Br. J. Nutr. 86:285～289; Kaila, M.ら、1995、Arch. Dis. Child 72:51～53)。いくつかの研究は、死んだプロバイオティクスがいくらかの健康への影響を保持し得ることを示した(Rachmilewitz, D.ら、2004、Gastroenterology 126:520～528; Gill, H. S. 及びK. J. Rutherford、2001、Br. J. Nutr. 86:285～289)が、明らかに生きているプロバイオティクスが今までのところ当技術分野でより能力があると見なされてきた。

【0045】

本発明による組成物は、任意の有効量で、例えば、約 $10^6 \sim 10^{12}$ cfu/g乾重量に相当する量で、プロバイオティクス微生物を含み得る。

【0046】

プロバイオティクス微生物は、非複製プロバイオティクス微生物でもよい。

【0047】

「非複製」プロバイオティクス微生物には、加熱処理されたプロバイオティクス細菌が含まれる。これには、不活性化された、死んだ、生存していない、並びに/又はフラグメ

10

20

30

40

50

ント(DNA、代謝物、細胞質化合物、及び/若しくは細胞壁材料など)として存在する微生物が含まれる。

【0048】

「非複製」とは、古典的なプレーティング法によって生存細胞及び/又はコロニー形成単位を検出することができないことを意味する。このような古典的なプレーティング法は、微生物学の書籍: James Monroe Jay、Martin J. Loessner、David A. Golden、2005、Modern food microbiology、第7版、Springer Science、New York、N.Y. 790頁に要約されている。典型的には、生存細胞が存在しないことは、下記のように示すことができる。異なる濃度の細菌調製物(「非複製」試料)の播種、並びに適切な条件(少なくとも24時間の好気性及び/又は嫌気性雰囲気)下でのインキュベーション後に、寒天プレート上で目に見えるコロニーがない、又は液体増殖培地の混濁度の増加がない。

10

【0049】

プロバイオティクスは、本発明の目的のために、「宿主の健康又は満足な状態に対して有益な作用を有する微生物細胞調製物又は微生物細胞の成分」と定義される(Salmi nen S、Ouweland A、Benno Y.ら、「Probiotics: how should they be defined」Trends Food Sci. Technol. 1999: 10 107~10)。

【0050】

非複製プロバイオティクス微生物を使用する可能性は、いくつかの利点を提供する。重度の免疫不全患者において、生きたプロバイオティクスの使用は、菌血症が発生する潜在的な危険性によって例外的な場合において限定されることがある。非複製プロバイオティクスは、何の問題もなしに使用し得る。

20

【0051】

さらに、非複製プロバイオティクス微生物を提供することは、健康上の利益を保持する一方で高温の再構成を可能にする。

【0052】

本発明の組成物は、健康上の利益を少なくとも部分的に生じさせるのに十分な量の、プロバイオティクス微生物及び/又は非複製プロバイオティクス微生物を含む。これを達成するのに適当な量は、「治療有効用量」と定義される。この目的のために有効な量は、患者の体重及び身体全体の健康状態などの当業者には公知のいくつかの要因、並びに食品マトリックスの作用によって決まる。

30

【0053】

予防的用途において、本発明による組成物を、障害の影響を受けやすい又はそうでなければ障害の危険性がある消費者に、その障害が発生する危険性を少なくとも部分的に減少させるのに十分な量で投与する。このような量は、「予防有効用量」とであると定義される。ここでまた、正確な量は、患者の健康状態及び体重などのいくつかの要因、並びに食品マトリックスの作用によって決まる。

【0054】

当業者であれば、治療有効用量及び/又は予防有効用量を適切に調節することができる。

40

【0055】

一般に、本発明の組成物は、プロバイオティクス微生物及び/又は非複製プロバイオティクス微生物を治療有効用量及び/又は予防有効用量で含有する。

【0056】

典型的には、治療有効用量及び/又は予防有効用量は、1日用量当たり約0.005mg~1000mgの範囲のプロバイオティクス微生物及び/又は非複製プロバイオティクス微生物である。

【0057】

50

数値量に関して、「短時間高温」処理された非複製微生物は、組成物中に $10^4 \sim 10^{12}$ 当量 c f u / g 乾燥組成物に相当する量で存在し得る。明らかに、非複製微生物は、コロニーを形成しない。結果的に、治療有効用量及び/又は予防有効用量という用語は、 $10^4 \sim 10^{12}$ c f u / g の複製細菌から得られる非複製微生物の量と理解される。これには、不活性化された、生存していない、又は死んだ、又はフラグメント(DNA若しくは細胞壁若しくは細胞質化合物など)として存在する微生物が含まれる。すなわち、組成物が含有する微生物の量は、全ての微生物が、実際は不活性化された、又は死んだ、断片化された、又はこれらの状態の任意若しくは全ての混合物などの非複製であろうとならうとに関わりなく、生きていたかのように、微生物の量のコロニー形成能(c f u)に関して表される。

10

【0058】

好ましくは、非複製微生物は、 $10^4 \sim 10^9$ c f u / g 乾燥組成物に相当する量で、よりさらに好ましくは $10^5 \sim 10^9$ c f u / g 乾燥組成物に相当する量で存在する。

【0059】

プロバイオティクスは、当技術分野において公知の任意の方法によって非複製にし得る。

【0060】

プロバイオティクス菌株を非複製にするのに今日利用可能な技術は通常、加熱処理、照射、紫外線、又は化学薬品(ホルマリン、パラホルムアルデヒド)の使用である。

【0061】

食品産業の工業的状況において比較的容易に適用される、プロバイオティクスを非複製にする技術を使用することが好ましいであろう。

20

【0062】

プロバイオティクスを含有する今日市場にある大部分の製品は、それらの生産の間に加熱処理される。したがって、プロバイオティクスがそれらの有益な特性を保持若しくは改善し、又は消費者のために新規で有益な特性を得る一方で、生産される製品と一緒に又は少なくとも同様の方法で、プロバイオティクスを加熱処理できることは好都合であろう。

【0063】

しかし文献においては、加熱処理によるプロバイオティクス微生物の不活性化は、プロバイオティクス活性の少なくとも部分的な損失と一般に関連している。

30

【0064】

プロバイオティクス微生物を例えば、加熱処理によって非複製にすることは、プロバイオティクスの健康上の利益の損失をもたらさず、それとは反対に、既にある健康上の利益を増強させ、健康上の新たな利益さえ生じさせ得ることを、本発明者らは驚いたことに今や見出した。

【0065】

したがって、本発明の一実施形態は、非複製プロバイオティクス微生物が加熱処理によって非複製とされた組成物である。

【0066】

このような加熱処理は、少なくとも 71.5 で少なくとも1秒間行い得る。

40

【0067】

長時間加熱処理又は短期間加熱処理を行い得る。

【0068】

今日の工業規模において、通常、UHT様加熱処理などの短期間加熱処理が好ましい。この種の加熱処理は細菌負荷を減少させ、処理時間を短縮し、それによって栄養素が損なわれることを減少させる。

【0069】

高温で短時間加熱処理されたプロバイオティクス微生物が、それらの当初の特性に関わらず抗炎症性免疫プロファイルを示すことを本発明者らは初めて示す。特に、この加熱処理によって、新規な抗炎症性プロファイルが発生し、又は既にある抗炎症性プロファイル

50

が増強される。

【 0 0 7 0 】

したがって、たとえ生きた対応物が抗炎症性菌株でなくても、典型的な産業上利用可能な加熱処理に相当する特定の加熱処理パラメータを使用することによって、抗炎症性免疫プロファイルを有する非複製プロバイオティクス微生物を生じさせることは今や可能である。

【 0 0 7 1 】

したがって、例えば、加熱処理は、約 1 ~ 1 2 0 秒間の約 7 1 . 5 ~ 1 5 0 の高温処理でもよい。高温処理は、高温 / 短時間 (H T S T) 処理又は超高温 (U H T) 処理でもよい。

【 0 0 7 2 】

プロバイオティクス微生物は、約 1 ~ 1 2 0 秒の短時間、約 7 1 . 5 ~ 1 5 0 の高温処理に曝し得る。

【 0 0 7 3 】

より好ましくは、微生物は、約 1 ~ 3 0 秒の短時間、約 9 0 ~ 1 4 0 、例えば 9 0 ° ~ 1 2 0 の高温処理に曝し得る。

【 0 0 7 4 】

この高温処理によって、微生物は少なくとも部分的に非複製となる。

【 0 0 7 5 】

高温処理は通常の大気圧で行い得るが、また高圧下で行い得る。典型的な圧力範囲は、1 ~ 5 0 パール、好ましくは 1 ~ 1 0 パール、さらにより好ましくは 2 ~ 5 パールである。明らかに、熱が加えられるとき、プロバイオティクスは、液体又は固体である培地中で加熱処理されることが好ましい。したがって、加えられる理想的な圧力は、微生物がその中に供給される組成物の性質及び使用される温度によって決まる。

【 0 0 7 6 】

高温処理は、約 7 1 . 5 ~ 1 5 0 、好ましくは約 9 0 ~ 1 2 0 、さらにより好ましくは約 1 2 0 ~ 1 4 0 の温度範囲で行い得る。

【 0 0 7 7 】

高温処理は、約 1 ~ 1 2 0 秒、好ましくは、約 1 ~ 3 0 秒、さらにより好ましくは約 5 ~ 1 5 秒の短時間で行い得る。

【 0 0 7 8 】

この所与の時間枠は、プロバイオティクス微生物が所与の温度に曝される時間を意味する。微生物がその中に供給される組成物の性質及び量によって、及び使用する加熱装置の構造によって、熱を加える時間は変化し得ることに留意されたい。

【 0 0 7 9 】

しかし典型的には、本発明の組成物及び / 又は微生物を、高温短時間 (H T S T) 処理、瞬間殺菌又は超高温 (U H T) 処理によって処理する。

【 0 0 8 0 】

U H T 処理は、組成物を短時間、概ね 1 ~ 1 0 秒間、乳中の細菌胞子を殺すのに必要とされる温度である 1 3 5 (2 7 5 ° F) を超える温度で加熱することによる組成物の少なくとも部分殺菌を伴う、超高温加工又は超加熱処理 (両方とも、U H T と省略) である。例えば、1 3 5 を超える温度を使用してこのように乳を加工することは、必要な保持時間 (2 ~ 5 秒まで) で細菌負荷の減少を可能にし、それによって連続流れ操作が可能となる。

【 0 0 8 1 】

2 つの主要なタイプの U H T システム (直接及び間接システム) がある。直接システムにおいて、製品を蒸気噴射又は蒸気注入によって処理し、一方では間接システムにおいて、製品を、プレート熱交換器、チューブ式熱交換器又はかき取り式熱交換器を使用して加熱処理する。U H T システムの組合せは、製品調製の工程において、任意のステップで又は複数のステップで適用し得る。

10

20

30

40

50

【0082】

H T S T 処理は、下記のように定義される（高温 / 短時間）：乳中の生存している微生物の数の 99.9999% を殺す、5 対数の減少を達成するように設計される殺菌法。これはほぼ全ての酵母、カビ及び一般の腐敗細菌を破壊するのに適当であると考えられ、一般の耐熱性の病原生物の適当な破壊をまた確実なものとする。H T S T 工程において、乳を 71.7 (161 °F) に 15 ~ 20 秒間加熱する。

【0083】

瞬間殺菌は、果汁及び野菜汁、ビール及び乳製品などの腐敗しやすい飲料の加熱殺菌の方法である。腐敗微生物を殺し、製品をより安全なものとし、それらの保存寿命を延ばすために、瞬間殺菌は容器への充填の前に行う。液体は、71.5 (160 °F) ~ 74 (165 °F) の温度に約 15 ~ 30 秒間曝される間、制御された連続流に流入する。

10

【0084】

本発明の目的のために、「短時間高温処理」という用語には、例えば、高温短時間 (H T S T) 処理、U H T 処理、及び瞬間殺菌が含まれる。

【0085】

このような加熱処理は改善された抗炎症性プロファイルを有する非複製プロバイオティクスを実現するため、本発明の組成物は、炎症性障害の予防又は治療において用い得る。

【0086】

本発明の組成物によって治療又は予防することができる炎症性障害は、特に限定されない。例えば、これらは、急性炎症（敗血症など）；火傷；及び慢性炎症（炎症性腸疾患、例えば、クローン病、潰瘍性大腸炎、嚢炎など）；壊死性腸炎；皮膚炎（U V 又は化学物質が誘発する皮膚炎、湿疹、反応性皮膚など）；過敏性腸症候群；眼炎；アレルギー、喘息；並びにこれらの組合せからなる群から選択し得る。

20

【0087】

長時間加熱処理が使用されてプロバイオティクス微生物を非複製とする場合、このような加熱処理は、約 70 ~ 150 の温度範囲で約 3 分 ~ 2 時間、好ましくは 80 ~ 140 の範囲で 5 分 ~ 40 分行い得る。

【0088】

長時間加熱処理によって非複製とされた細菌が通常、それらのプロバイオティクス特性の発揮に関して生細胞より効率的でないことを従来技術は一般に教示する一方で、加熱処理されたプロバイオティクスが、生きた対応物と比較して免疫系を刺激することにおいて優れていることを本発明者らは示すことができた。

30

【0089】

本発明はまた、少なくとも約 70 での少なくとも約 3 分間の加熱処理によって非複製とされたプロバイオティクス微生物を含む組成物に関する。

【0090】

非複製プロバイオティクスの免疫ブースト作用は、インビトロの免疫プロファイリングによって確認された。使用されたインビトロモデルは、ヒト末梢血単核球細胞 (P B M C) からのサイトカインのプロファイリングを使用し、当技術分野で免疫調節性化合物の試験のための標準モデルとしてよく受け入れられている (Schultz ら、2003、*Journal of Dairy Research* 70、165 ~ 173；Taylor ら、2006、*Clinical and Experimental Allergy*、36、1227 ~ 1235；Kekkonen ら、2008、*World Journal of Gastroenterology*、14、1192 ~ 1203)。

40

【0091】

インビトロの P B M C アッセイは、幾人かの著者 / 研究チームによって使用され、例えば、プロバイオティクスの免疫プロファイル、すなわち、プロバイオティクスの抗炎症性又は炎症誘発性の特徴によってプロバイオティクスが分類されてきた (Kekkonen ら、2008、*World Journal of Gastroenterology*、14、1192 ~ 1203)。例えば、このアッセイによって、大腸炎のマウスモデル

50

におけるプロバイオティクス候補の抗炎症作用の予測を可能にすることが示されてきた (Foligne, B.ら、2007、World J. Gastroenterol. 13: 236~243)。さらに、このアッセイは、臨床試験における読み出し情報として定期的に使用され、臨床成績と首尾一貫する結果をもたらすことが示された (Schultzら、2003、Journal of Dairy Research 70、165~173; Taylorら、2006、Clinical and Experimental Allergy、36、1227~1235)。

【0092】

アレルギー性疾患は過去数十年に亘り着実に増加してきており、WHOは、アレルギー性疾患を流行病と現在考えている。一般的に、アレルギーは、免疫系のTh1及びTh2応答の間のアンバランスに起因し、Th2メディエーターの産生への強力な偏りをもたらすと考えられている。したがって、免疫系のTh1及びTh2アームの間の適切なバランスを回復することによって、アレルギーを軽減、ダウンレギュレート又は予防することができる。これは、Th2応答を減少させ、又は少なくとも一時的に、Th1応答を増強する必要性を意味する。後者は、例えばより高いレベルのIFN- γ 、TNF- α 及びIL-12を伴うことが多い免疫ブースト反応の特徴であろう。(Kekkonenら、2008、World Journal of Gastroenterology、14、1192~1203; Viljanen M.ら、2005、Allergy、60、494~500)

10

【0093】

したがって、本発明の組成物は、欠陥のある免疫防御と関連する障害を治療又は予防することを可能とする。

20

【0094】

結果的に、本発明の組成物によって治療又は予防することができる欠陥のある免疫防御と関連している障害は、特に限定されない。

【0095】

例えば、これらの障害は、感染症、特に、細菌、ウイルス、真菌及び/又は寄生虫の感染症; 食細胞欠損; ストレス又は免疫抑制薬、化学療法又は放射線療法によって誘発されるものなどの低いレベルから重症レベルまでの免疫抑制; 新生児の免疫系などのより免疫適格性ではない免疫系の自然状態; アレルギー; 並びにこれらの組合せからなる群から選択し得る。

30

【0096】

本発明に記載する組成物はまた、ワクチン、特に経口ワクチンへの患者の反応の増強を可能とする。

【0097】

任意の量の非複製微生物が有効である。しかし、プロバイオティクスの少なくとも90%、好ましくは、少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも98%、最も好ましくは少なくとも99%、理想的には少なくとも99.9%、最も理想的には全てが非複製である場合が一般に好ましい。

【0098】

本発明の一実施形態において、全ての微生物は、非複製である。

40

【0099】

結果的に、本発明の組成物において、プロバイオティクスの少なくとも90%、好ましくは、少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも98%、最も好ましくは少なくとも99%、理想的には少なくとも99.9%、最も理想的には全ては、非複製でもよい。

【0100】

全てのプロバイオティクス微生物を、本発明の目的のために使用し得る。

【0101】

例えば、プロバイオティクス微生物は、ビフィドバクテリウム属 (bifidobacteria)、ラクトバチルス属 (lactobacilli)、プロピオニバクテリウ

50

ム属 (*propionibacteria*)、又はこれらの組合せ、例えば、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*)、ビフィドバクテリウム・ラクティス (*Bifidobacterium lactis*)、ビフィドバクテリウム・アニマリス (*Bifidobacterium animalis*)、ビフィドバクテリウム・ブレーベ (*Bifidobacterium breve*)、ビフィドバクテリウム・インファンティス (*Bifidobacterium infantis*)、ビフィドバクテリウム・アドレスセンチス (*Bifidobacterium adolescentis*)、ラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*)、ラクトバチルス・パラカゼイ (*Lactobacillus paracasei*)、ラクトバチルス・サリパリウス (*Lactobacillus salivarius*)、ラクトバチルス・ロイテリ (*Lactobacillus reuteri*)、ラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・ジョンソニー (*Lactobacillus johnsonii*)、ラクトバチルス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*)、ラクトバチルス・ファーマンタム (*Lactobacillus fermentum*)、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*)、ストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*)、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*)、ラクトコッカス・ジアセチラクティス (*Lactococcus diacetylactis*)、ラクトコッカス・クレモリス (*Lactococcus cremoris*)、ラクトバチルス・ブルガリカス (*Lactobacillus bulgaricus*)、ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*)、ラクトバチルス・デルブレッキー (*Lactobacillus delbrueckii*)、エシェリキア・コリ (*Escherichia coli*) 及び / 又はこれらの混合物からなる群から選択し得る。

【0102】

本発明による組成物は、例えば、ビフィドバクテリウム・ロンガム NCC 3001、ビフィドバクテリウム・ロンガム NCC 2705、ビフィドバクテリウム・ブレーベ NCC 2950、ビフィドバクテリウム・ラクティス NCC 2818、ラクトバチルス・ジョンソニー La1、ラクトバチルス・パラカゼイ NCC 2461、ラクトバチルス・ラムノサス NCC 4007、ラクトバチルス・ロイテリ DSM 17983、ラクトバチルス・ロイテリ ATCC 55730、ストレプトコッカス・サーモフィルス NCC 2019、ストレプトコッカス・サーモフィルス NCC 2059、ラクトバチルス・カゼイ NCC 4006、ラクトバチルス・アシドフィルス NCC 3009、ラクトバチルス・カゼイ ACA-D C 6002 (NCC 1825)、エシェリキア・コリ Nissle、ラクトバチルス・ブルガリカス NCC 15、ラクトコッカス・ラクティス NCC 2287、又はこれらの組合せからなる群から選択されるプロバイオティクス微生物を含み得る。

【0103】

全てのこれらの菌株は、ブダペスト条約により寄託されていたか、及び / 又は市販である。

【0104】

菌株を、ブダペスト条約の元で下記のように寄託した。

ビフィドバクテリウム・ロンガム NCC 3001 : ATCC BAA - 999
 ビフィドバクテリウム・ロンガム NCC 2705 : CNCM I - 2618
 ビフィドバクテリウム・ブレーベ NCC 2950 : CNCM I - 3865
 ビフィドバクテリウム・ラクティス NCC 2818 : CNCM I - 3446
 ラクトバチルス・パラカゼイ NCC 2461 : CNCM I - 2116
 ラクトバチルス・ラムノサス NCC 4007 : CGMCC 1.3724
 ストレプトコッカス・サーモフィルス NCC 2019 : CNCM I - 1422

ストレプトコッカス・サーモフィルス NCC 2059 : CNCM I - 4153
 ラクトコッカス・ラクティス NCC 2287 : CNCM I - 4154
 ラクトバチルス・カゼイ NCC 4006 : CNCM I - 1518
 ラクトバチルス・カゼイ NCC 1825 : ACA - DC 6002
 ラクトバチルス・アシドフィルス NCC 3009 : ATCC 700396
 ラクトバチルス・ブルガリカス NCC 15 : CNCM I - 1198
 ラクトバチルス・ジョンソニー La1 CNCM I - 1225
 ラクトバチルス・ロイテリ DSM 17983 DSM 17983
 ラクトバチルス・ロイテリ ATCC 55730 ATCC 55730
 エシェリキア・コリ Nissle 1917 : DSM 6601

10

【0105】

本明細書に記載されている本発明の全ての特徴を、開示されているような本発明の範囲から逸脱することなく自由に合わせることができることを、当業者であれば理解するであろう。

【0106】

本発明のさらなる利点及び特徴は、下記の実施例及び図から明らかである。

【図面の簡単な説明】

【0107】

【図1A】「短時間高温」で処理されたプロバイオティクスの抗炎症性免疫プロファイルの増強を示す。

20

【図1B】「短時間高温」で処理されたプロバイオティクスの抗炎症性免疫プロファイルの増強を示す。

【図2】「短時間高温」で処理された後、抗炎症性となった、すなわちインビトロで明白な抗炎症性免疫プロファイルを示す非抗炎症性プロバイオティクス菌株を示す。

【図3A】「短時間高温」で処理された後、インビトロで増強した又は新規な抗炎症性免疫プロファイルを示す、市販の製品中で使用されているプロバイオティクス菌株を示す。

【図3B】「短時間高温」で処理された後、インビトロで増強した又は新規な抗炎症性免疫プロファイルを示す、市販の製品中で使用されているプロバイオティクス菌株を示す。

【図4A】高温での加熱処理によって、インビトロで増強した又は新規な抗炎症性免疫プロファイルを示す、乳製品スターター菌株（すなわち、Lc1スターター菌株）を示す。

30

【図4B】高温での加熱処理によって、インビトロで増強した又は新規な抗炎症性免疫プロファイルを示す、乳製品スターター菌株（すなわち、Lc1スターター菌株）を示す。

【図5】HTST処理で処理された後に、インビトロで抗炎症性免疫プロファイルを示す、非抗炎症性プロバイオティクス菌株を示す。

【図6】生菌及び加熱処理された（140、15秒間）形態の、プロバイオティクス及び乳製品スターター菌株によって生じた、PBMCデータ上の主成分分析（IL-12p40、IFN-、TNF-、IL-10）。各点は、そのNCC番号又は名称によって同定される、生菌又は加熱処理された1つの菌株を表す。

【図7】生菌株及び加熱処理された（85、20分）菌株のIL-12p40/IL-10比を示す。全体的に、85での20分間の加熱処理は、本発明の「短時間高温」処理とは対照的に、IL-12p40/IL-10比の増加をもたらす（図1、2、3、4及び5）。

40

【図8】加熱処理された細菌で刺激されたヒトPBMCからの、インビトロのサイトカイン分泌の増強を示す。

【図9】食塩水で誘発したOVA感作マウス（陰性対照）、OVAで誘発したOVA感作マウス（陽性対照）、及びOVAで誘発し、加熱処理された又は生菌のビフィドバクテリウム・ブレーベNCC 2950で処理したOVA感作マウスにおいて観察した下痢の激しさの割合を示す。結果を、下痢の激しさ（4つの独立の実験から計算した平均±SEM）の割合として示し、100%の下痢の激しさは、陽性対照（アレルゲンによって感作及び誘発された）群において発生した症状に相当する。

50

【実施例】

【0108】

実施例 1

方法

細菌調製物：

生きたプロバイオティクスによってもたらされる宿主の免疫系に対する健康上の利益は一般に、菌株特異的であると考えられる。高レベルのIL-10及び/又は低レベルの炎症促進性サイトカインをインビトロで誘発するプロバイオティクス(PBMCアッセイ)は、インビボで強力な抗炎症性菌株であることが示されてきた(Foligne, B.ら、2007、World J. Gastroenterol. 13: 236~243)。

10

【0109】

いくつかのプロバイオティクス菌株を使用して、加熱処理されたプロバイオティクスの抗炎症特性を調査した。これらは、ビフィドバクテリウム・ロンガムNCC3001、ビフィドバクテリウム・ロンガムNCC2705、ビフィドバクテリウム・プレーベNCC2950、ビフィドバクテリウム・ラクティスNCC2818、ラクトバチルス・パラカゼインNCC2461、ラクトバチルス・ラムノサスNCC4007、ラクトバチルス・カゼインNCC4006、ラクトバチルス・アシドフィルスNCC3009、ラクトバチルス・カゼイACA-DC6002(NCC1825)、及びエシェリキア・コリNissleであった。Nestle Lc1発酵製品を生産するために商業的に使用されるいくつかの菌株を含めたいくつかのスターター培養菌株(ストレプトコッカス・サーモフィルスNCC2019、ストレプトコッカス・サーモフィルスNCC2059、ラクトバチルス・ブルガリカスNCC15及びラクトコッカス・ラクティスNCC2287)もまた試験した。

20

【0110】

細菌細胞は、5~15Lのバイオリクター中で各菌株について最適化した条件で培養した。全ての典型的な細菌増殖培地が使用可能である。このような培地は、当業者には公知である。pHを5.5に調節したとき、30%塩基溶液(NaOH又はCa(OH)₂)を連続的に加えた。適当であるとき、ヘッドスペースをCO₂でガス処理することによって嫌気性条件を維持した。エシェリキア・コリを、標準的な好気条件下で培養した。

30

【0111】

細菌細胞を、遠心分離(5,000×g、4)によって集め、概ね10⁹~10¹⁰cfu/mlの最終濃度に達するように、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)に適当な容量で再懸濁させた。調製物の一部を、-80で15%グリセロールと共に冷凍した。別の部分の細胞を、以下によって加熱処理した。

超高温：140、15秒間；間接蒸気噴射による。

高温短時間(HTST)：74、90及び120、15秒間、間接蒸気噴射による。

水浴中で長時間低温(85、20分)。

加熱処理した上で、試料を使用するまで-80で冷凍して保持した。

40

【0112】

細菌調製物のインビトロ免疫プロファイリング：

生細菌調製物及び加熱処理された細菌調製物の免疫プロファイル(すなわち、インビトロでヒト血液細胞からの特定のサイトカインの分泌を誘発する能力)を評価した。ヒト末梢血単核球細胞(PBMC)を、血液フィルターから単離した。細胞密度勾配による分離の後、単核細胞を集め、ハンクス平衡塩類溶液で2度洗浄した。次いで、細胞を、10%ウシ胎仔血清(Bioconcept, Paris, France)、1%L-グルタミン(Sigma)、1%ペニシリン/ストレプトマイシン(Sigma)及び0.1%ゲンタマイシン(Sigma)で補充したIscoveの改変ダルベッコ培地(IMDM、Sigma)に再懸濁させた。次いで、PBMC(7×10⁵細胞/ウェル)を、生細菌及び加熱処理された細菌(7×10⁶当量cfu/ウェル)と共に48ウェルプレート中

50

で36時間インキュベートした。生細菌及び加熱処理された細菌の作用を、2つの別々の実験に分割した8人の個々のドナーからのPBMC上で試験した。36時間のインキュベーション後、培養プレートを冷凍し、サイトカイン測定まで-20℃で保持した。サイトカインプロファイリングは、生細菌及びそれらの加熱処理された対応物について並行（すなわち、PBMCの同じバッチ上の同じ実験で）で行った。

【0113】

36時間のインキュベーション後の細胞培養上清中のサイトカイン（IFN- γ 、IL-12p40、TNF- α 及びIL-10）のレベルは、製造者の指示に従ってELISAによって決定した（R&D Duoset Human IL-10、BD OptEIA Human IL12p40、BD OptEIA Human TNF- α 、BD OptEIA Human IFN- γ ）。IFN- γ 、IL-12p40及びTNF- α は、炎症促進性サイトカインであり、一方では、IL-10は、強力な抗炎症メディエーターである。結果は、4人の個々のドナーの平均（pg/ml） \pm SEMとして表すが、各々4人のドナーで行う2つの個々の実験の代表である。IL-12p40/IL-10比は、各菌株についてインビボの抗炎症作用の予測値として計算する（Foligne, B.ら、2007、World J. Gastroenterol. 13: 236~243）。

10

【0114】

各菌株についてのELISA（上記を参照されたい）によって決定したサイトカインの数値（pg/ml）を、BioNumerics v5.10ソフトウェア（Applied Maths、Sint-Martens-Latem、Belgium）に移した。主成分分析（PCA、ディメンショニング技術）を、このセットのデータで行った。数値についての平均の引き算、及び数値についての分散値による割り算を、主成分分析に含めた。

20

【0115】

結果

超高温（UHT）/高温短時間（HTST）様処理によって生じた抗炎症性プロファイル調査中のプロバイオティクス菌株を、一連の加熱処理（超高温（UHT）、高温短時間（HTST）及び85℃、20分間）に曝し、それらの免疫プロファイルを、インビトロでの生細胞の免疫プロファイルと比較した。生きた微生物（プロバイオティクス及び/又は乳製品スターター培養物）は、ヒトPBMCと共にインキュベートしたとき、異なるレベルのサイトカイン産生を誘発した（図1、2、3、4及び5）。これらの微生物の加熱処理は、温度依存的態様でPBMCによって産生されたサイトカインのレベルを変更させた。「短時間高温」処理（120℃又は140℃、15秒間）は、抗炎症性免疫プロファイルを有する非複製細菌を生じさせた（図1、2、3及び4）。実際に、UHT様処理した菌株（140℃、15秒）は、さらなるIL-10産生を維持又は誘発する一方で、より少ない炎症促進性サイトカイン（TNF- α 、IFN- γ 、IL-12p40）を誘発した（生きた対応物と比較して）。このように得られたIL-12p40/IL-10比は、生細胞と比較して、任意のUHT様処理した菌株についてより低かった（図1、2、3及び4）。この観察はまた、HTST様処理によって処理された、すなわち120℃に15秒間（図1、2、3及び4）、又は74℃及び90℃に15秒間（図5）曝露された細菌について有効であった。加熱処理（UHT様又はHTST様処理）は、プロバイオティクス菌株（図1、2、3及び5）及び乳製品スターター培養物（図4）のインビトロの免疫プロファイルに対して同様の作用を有した。生きたプロバイオティクス及び加熱処理された（140℃、15秒）プロバイオティクス並びに乳製品スターター菌株によって産生されたPBMCデータ上の主成分分析によって、生菌株はx軸に沿って至る所に分布することが明らかになったが、これは菌株が非常に異なる免疫プロファイルをインビトロで示すことを例示する（低（左側）から高（右側）までの炎症促進性サイトカインの誘発物質）。加熱処理された菌株はグラフの左側上に集まり、炎症促進性サイトカインは加熱処理された菌株によってより少なく誘発されることが示される（図6）。対照的に、20分

30

40

50

間 85 で加熱処理された細菌は、生細胞よりもより多く炎症促進性サイトカインを、及びより少なく IL - 10 を誘発し、より高い IL - 12 p 40 / IL - 10 比がもたらされた (図 7)。

【 0 1 1 6 】

抗炎症性プロファイルは、UHT 様及び HTST 様処理によって増強又は生じる。

【 0 1 1 7 】

UHT 及び HTST 処理された菌株は、それらの各々の当初の免疫プロファイルに関わらず (生細胞)、抗炎症性プロファイルを示す。インビボで抗炎症性であることが公知であり、インビトロで抗炎症性プロファイルを示すプロバイオティクス菌株 (ビフィドバクテリウム・ロンガム NCC 3001、ビフィドバクテリウム・ロンガム NCC 2705、
10
ビフィドバクテリウム・ブレーベ NCC 2950、ビフィドバクテリウム・ラクティス NCC 2818) は、「短時間高温」処理後に、増強された抗炎症性プロファイルをインビトロで示すことが示された。図 1 に示すように、UHT 様処理されたビフィドバクテリウム属菌株の IL - 12 p 40 / IL - 10 比は、生きた対応物の IL - 12 p 40 / IL - 10 比より低く、したがって、UHT 様処理された試料の改善された抗炎症性プロファイルが示された。より顕著には、UHT 様及び HTST 様処理によって抗炎症性プロファイルが生じたことは、非抗炎症性の生菌株についてまた確認された。生菌のラクトバチルス・ラムノサス NCC 4007 及びラクトバチルス・パラカゼイ NCC 2461 の両方は、高い IL - 12 p 40 / IL - 10 比をインビトロで示す (図 2 及び 5)。2 つの生菌
20
株は、マウスにおいて TNBS が誘発する大腸炎に対して保護性でないことが示された。ラクトバチルス・ラムノサス NCC 4007 及びラクトバチルス・パラカゼイ NCC 2461 によって誘発された IL - 12 p 40 / IL - 10 比は、「短時間高温」処理 (UHT 又は HTST) 後に劇的に減少し、ビフィドバクテリウム属菌株で得られた IL - 12 p 40 / IL - 10 比と同じぐらい低いレベルに達した。これらの低い IL - 12 p 40 / IL - 10 比は、IL - 10 分泌についての変化なし (ラクトバチルス・ラムノサス NCC 4007) 又は劇的な誘発 (ラクトバチルス・パラカゼイ NCC 2461) と合わせて、低レベルの IL - 12 p 40 産生によるものである (図 2)。

【 0 1 1 8 】

結果として、

生きた微生物の抗炎症性プロファイルは、UHT 様及び HTST 様加熱処理によって増強させることができ (例えば、ビフィドバクテリウム・ロンガム NCC 2705、ビフィドバクテリウム・ロンガム NCC 3001、ビフィドバクテリウム・ブレーベ NCC 2950、
30
ビフィドバクテリウム・ラクティス NCC 2818)、

抗炎症性プロファイルは、非抗炎症性の生きた微生物 (例えば、ラクトバチルス・ラムノサス NCC 4007、ラクトバチルス・パラカゼイ NCC 2461、乳製品スターターであるストレプトコッカス・サーモフィルス NCC 2019) から UHT 様及び HTST 様加熱処理によって生じさせることができ、

抗炎症性プロファイルはまた、プロバイオティクスのエシェリキア・コリ菌株を含めた市販の製品から単離した菌株について示された (図 3 A 及び B)。

【 0 1 1 9 】

UHT / HTST 様処理の影響は、全ての試験したプロバイオティクス及び乳製品スターター、例えば、ラクトバチルス属、ビフィドバクテリウム属及びストレプトコッカス属について同様であった。

【 0 1 2 0 】

UHT / HTST 様処理を、異なるインビトロの免疫プロファイルを示すいくつかのラクトバチルス属、ビフィドバクテリウム属及びストレプトコッカス属に適用した。全ての菌株は、UHT / HTST 様処理後に、生きた対応物より低い炎症促進性サイトカインを誘発した (図 1、2、3、4、5 及び 6) が、これはこのように得られた非複製細菌の免疫特性に対する UHT / HTST 様処理の作用が、全てのプロバイオティクス、特にラクトバチルス属及びビフィドバクテリウム属及び特定のエシェリキア・コリ菌株、及び全て
40
50

の乳製品スターター培養物、特にストレプトコッカス属、ラクトコッカス属及びラクトバチルス属に一般化することができることを示す。

【0121】

実施例2

方法

細菌調製物：

5種のプロバイオティクス菌株を使用して、非複製プロバイオティクスの免疫ブースト特性を調査した。3種のビフィドバクテリウム属（ビフィドバクテリウム・ロンガムNCC3001、ビフィドバクテリウム・ラクティスNCC2818、ビフィドバクテリウム・プレーベNCC2950）及び2種のラクトバチルス属（ラクトバチルス・パラカゼイNCC2461、ラクトバチルス・ラムノサスNCC4007）。

10

【0122】

バッチ発酵において細菌細胞を、pH制御なしで、MRS上で37にて16~18時間増殖させた。細菌細胞を遠心分離（5,000×g、4）し、リン酸緩衝生理食塩水に再懸濁させ、その後概ね1.0E10cfu/mlの最終濃度に達するように食塩水に希釈した。ビフィドバクテリウム・ロンガムNCC3001、ビフィドバクテリウム・ラクティスNCC2818、ラクトバチルス・パラカゼイNCC2461、ラクトバチルス・ラムノサスNCC4007を、水浴中にて85で20分間加熱処理した。ビフィドバクテリウム・プレーベNCC2950を、水浴中にて90で30分間加熱処理した。加熱処理された細菌の懸濁液を分取し、使用するまで-80で冷凍保存した。生細菌は、使用するまで-80でPBS-グリセロール15%中に保存した。

20

【0123】

細菌調製物のインビトロの免疫プロファイリング

生細菌調製物及び加熱処理された細菌調製物の免疫プロファイル（すなわち、インビトロで、ヒト血液細胞から特定のサイトカインの分泌を誘発する能力）を評価した。ヒト末梢血単核球細胞（PBMC）を、血液フィルターから単離した。細胞密度勾配による分離後に、単核細胞を集め、ハンクス平衡塩類溶液で2度洗浄した。次いで、細胞を、10%ウシ胎仔血清（Biocconcept, Paris, France）、1%L-グルタミン（Sigma）、1%ペニシリン/ストレプトマイシン（Sigma）及び0.1%ゲンタマイシン（Sigma）を補充したIscoveの改変ダルベッコ培地（IMDM、Sigma）に再懸濁させた。次いで、PBMC（ 7×10^5 の細胞/ウェル）を、生細菌及び加熱処理された細菌（ 7×10^6 当量cfu/ウェル）と共に48ウェルプレート中で36時間インキュベートした。生細菌及び加熱処理された細菌の作用を、2つの別々の実験に分割した、8人の個々のドナーからのPBMC上で試験した。36時間のインキュベーション後、培養プレートを冷凍し、サイトカイン測定まで-20で保持した。サイトカインプロファイリングを、生細菌及びそれらの加熱処理された対応物について並行で行った（すなわち、PBMCの同じバッチでの同じ実験において）。

30

【0124】

36時間のインキュベーション後の細胞培養上清中のサイトカイン（IFN-、IL-12p40、TNF-及びIL-10）のレベルを、製造者の指示に従ってELISA（R&D DuoSet Human IL-10、BD OptEIA Human IL12p40、BD OptEIA Human TNF、BD OptEIA Human IFN-）によって決定した。IFN-、IL-12p40及びTNF-は、炎症促進性サイトカインであり、一方IL-10は、強力な抗炎症メディエーターである。結果を、4人の個々のドナーの平均（pg/ml）+/-SEMとして表すが、各々4人のドナーで行う2つの個々の実験の代表である。

40

【0125】

アレルギー性下痢症の予防における、生菌のビフィドバクテリウム・プレーベNCC2950及び加熱処理されたビフィドバクテリウム・プレーベNCC2950のインビボ作用
アレルギー性下痢症のマウスモデルを使用して、ビフィドバクテリウム・プレーベNCC

50

C 2 9 5 0 の T h 1 促進作用を試験した (B r a n d t E . B ら、 J C I 2 0 0 3 ; 1 1 2 (1 1) : 1 6 6 6 ~ 1 6 6 7) 。感作 (1 4 日の間隔で、オボアルブミン (O V A) 及び硫酸アルミニウムカリウムの 2 回の腹腔内注射 ; 0 日目及び 1 4 日目) 後に、雄性 B a l b / c マウスを、6 回 (2 7 日目、2 9 日目、3 2 日目、3 4 日目、3 6 日目、3 9 日目) O V A で経口的に誘発し、一過的臨床症状 (下痢症) 及び免疫パラメーターの変化 (総 I g E、O V A 特異的 I g E、マウス肥満細胞プロテアーゼ 1、すなわち、M M C P - 1 の血漿濃度) がもたらされた。生菌のビフィドバクテリウム・ブレーベ N C C 2 9 5 0 又は 9 0 で 3 0 分間加熱処理されたビフィドバクテリウム・ブレーベ N C C 2 9 5 0 を、O V A 感作の 4 日前に (- 3 日目、- 2 日目、- 1 日目、0 日目及び 1 1 日目、1 2 日目、1 3 日目及び 1 4 日目)、並びに誘発期間の間に (2 3 ~ 3 9 日目)、胃管栄養法によって投与した。概ね 10^9 コロニー形成単位 (c f u) 又は当量 c f u / マウスの 1 日当たり細菌量を使用した。

【 0 1 2 6 】

結果

加熱処理後の「炎症誘発性」サイトカインの分泌の誘発

加熱処理された菌種がヒト末梢血単核球細胞 (P B M C) によるサイトカイン分泌を刺激する能力をインビトロで評価した。加熱処理された細菌による P B M C の刺激による 4 つのサイトカインに基づいた免疫プロファイルを、同じインビトロアッセイにおいて生細菌細胞によって誘発される免疫プロファイルと比較した。

【 0 1 2 7 】

加熱処理された調製物をプレーティングし、生菌数が存在しないことについて評価した。加熱処理された細菌調製物は、プレーティング後にコロニーを産生しなかった。

【 0 1 2 8 】

生きたプロバイオティクスは、ヒト P B M C と共にインキュベートされるときに、異なるレベル及び菌株依存レベルのサイトカイン産生を誘発した (図 8) 。プロバイオティクスの加熱処理は、生きた対応物と比較すると、P B M C によって産生されるサイトカインのレベルを変更した。加熱処理された細菌は、生きた対応物よりも炎症促進性サイトカイン (T N F - α 、I F N - γ 、I L - 1 2 p 4 0) をより誘発した。対照的に、加熱処理された細菌は、生細胞と比較して同様又はより低い量の I L - 1 0 を誘発した (図 8) 。加熱処理された細菌が生きた対応物よりも免疫系をより刺激することができ、したがって弱体化した免疫防御をよりブーストできることをこれらのデータは示す。すなわち、インビトロデータは、加熱処理後の菌種の増強された免疫ブースト作用を例示する。

【 0 1 2 9 】

(生細胞と比較した) 加熱処理されたビフィドバクテリウム・ブレーベ N C C 2 9 5 0 の、免疫系に対する増強された作用を例示するために、生菌のビフィドバクテリウム・ブレーベ N C C 2 9 5 0 (菌株 A) 及び加熱処理されたビフィドバクテリウム・ブレーベ N C C 2 9 5 0 (菌株 A) の両方を、アレルギー性下痢症の動物モデルにおいて試験した。

【 0 1 3 0 】

陽性対照群と比較して、下痢の激しさは、加熱処理されたビフィドバクテリウム・ブレーベ N C C 2 9 5 0 による処理後に有意に及び一貫して減少 (4 1 . 1 % \pm 4 . 8) し、一方では下痢の激しさは、生菌のビフィドバクテリウム・ブレーベ N C C 2 9 5 0 による処理後に 2 0 \pm 2 8 . 3 % のみ低下した。加熱処理されたビフィドバクテリウム・ブレーベ N C C 2 9 5 0 が、その生きた対応物よりアレルギー性下痢に対して増強された保護作用を示すことをこれらの結果は示す (図 9) 。

【 0 1 3 1 】

結果として、プロバイオティクスが免疫防御を増強する能力は、加熱処理の後に改善することが示された。

【 0 1 3 2 】

実施例 3 ~ 5

例えば、下記の 3 つの配合物を調製し得る。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 3 】

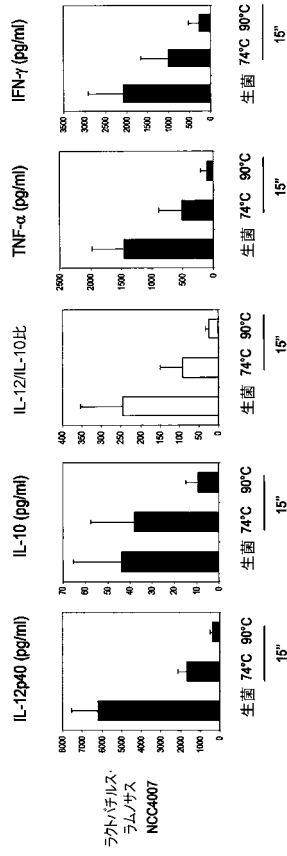
【 表 1 】

	配合物A	配合物B	配合物C
kcal/mL	1.0	1.5	1.4
カロリー分配 (kcalの%)	タンパク質: 22% 炭水化物: 53% 脂肪: 25%	タンパク質: 22% 炭水化物: 38% 脂肪: 40%	タンパク質: 22% 炭水化物: 53% 脂肪: 25%
タンパク質源	カゼイン酸ナトリウム及びカゼイン酸カルシウム(乳) L-アルギニン	カゼイン酸ナトリウム及びカゼイン酸カルシウム(乳) L-アルギニン	カゼイン酸ナトリウム及びカゼイン酸カルシウム(乳) L-アルギニン
NPC:N比	71:1	71:1	73:1
MCT:LCT比	27:73	56:44	27:73
n6:n3比	1.4:1	1.4:1	1.2:1
重量オスモル濃度 (mOsm/kg水)	375	550	930-1000
遊離水	85%	78%	77%
EPA/DHA	1.7 g/L	2.6 g/L	1.1 g/237 mL
追加のL-アルギニン	12.5 g/L	18.7 g/L	4.2 g/237 mL
食事性ヌクレオチド	1.2 g/L	1.8 g/L	430 mg/237 mL
繊維含量(部分的加水分解グアーガム):			3.3 g/237 mL
プロバイオティクス	10 ⁹ cfu、ラクトバチルス・ジョンソニーLa1	10 ⁹ cfu、加熱処理した(75°C、20分)ビフィドバクテリウム・ロンガムNCC3001	10 ⁹ cfu、UHT処理されたラクトバチルス・ジョンソニーLa1

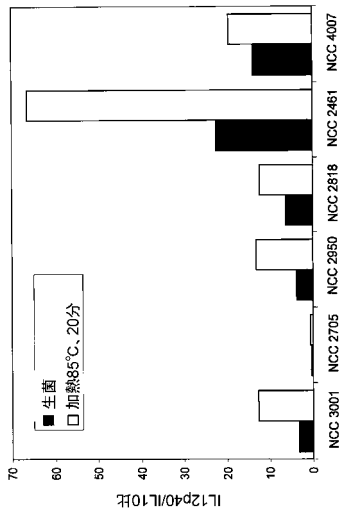
10

20

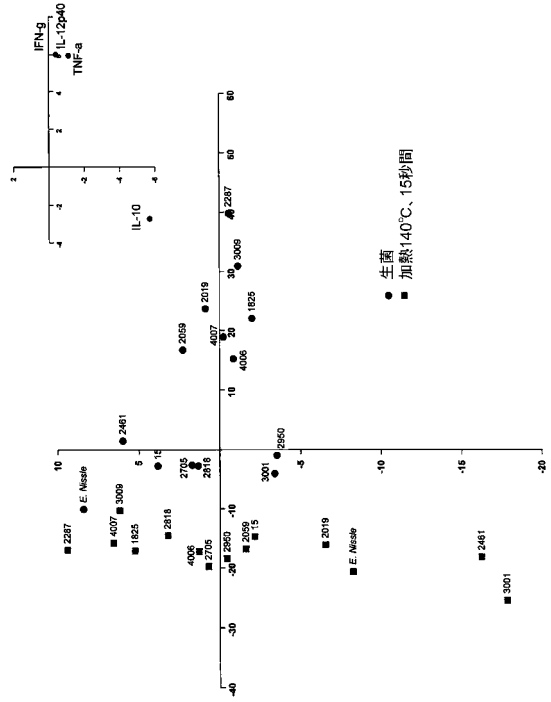
【 図 5 】



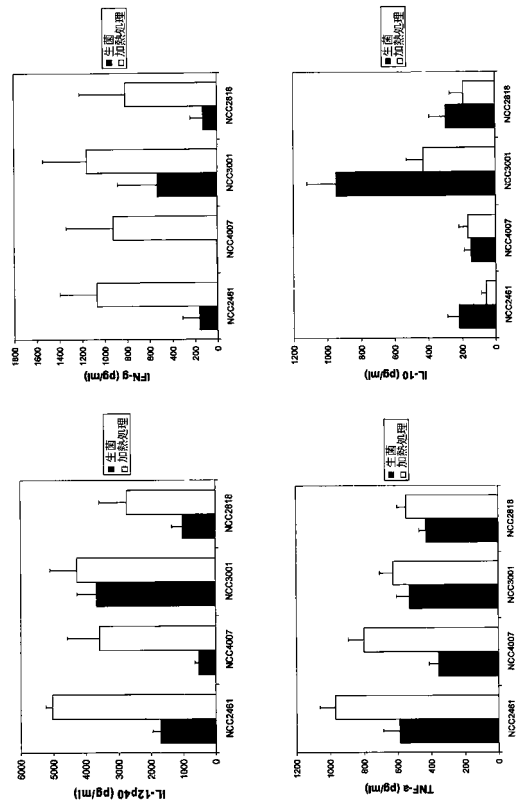
【 図 7 】



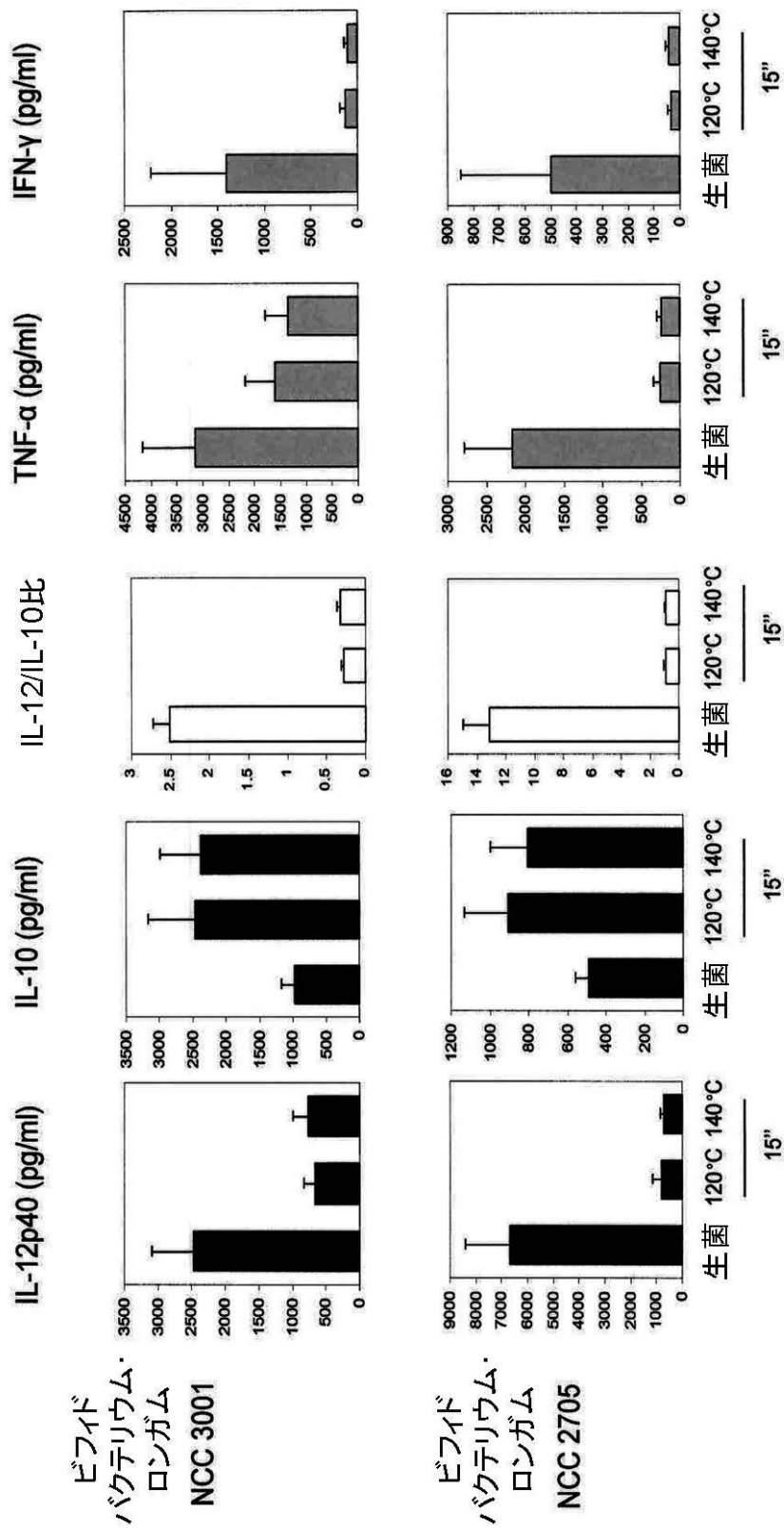
【 図 6 】



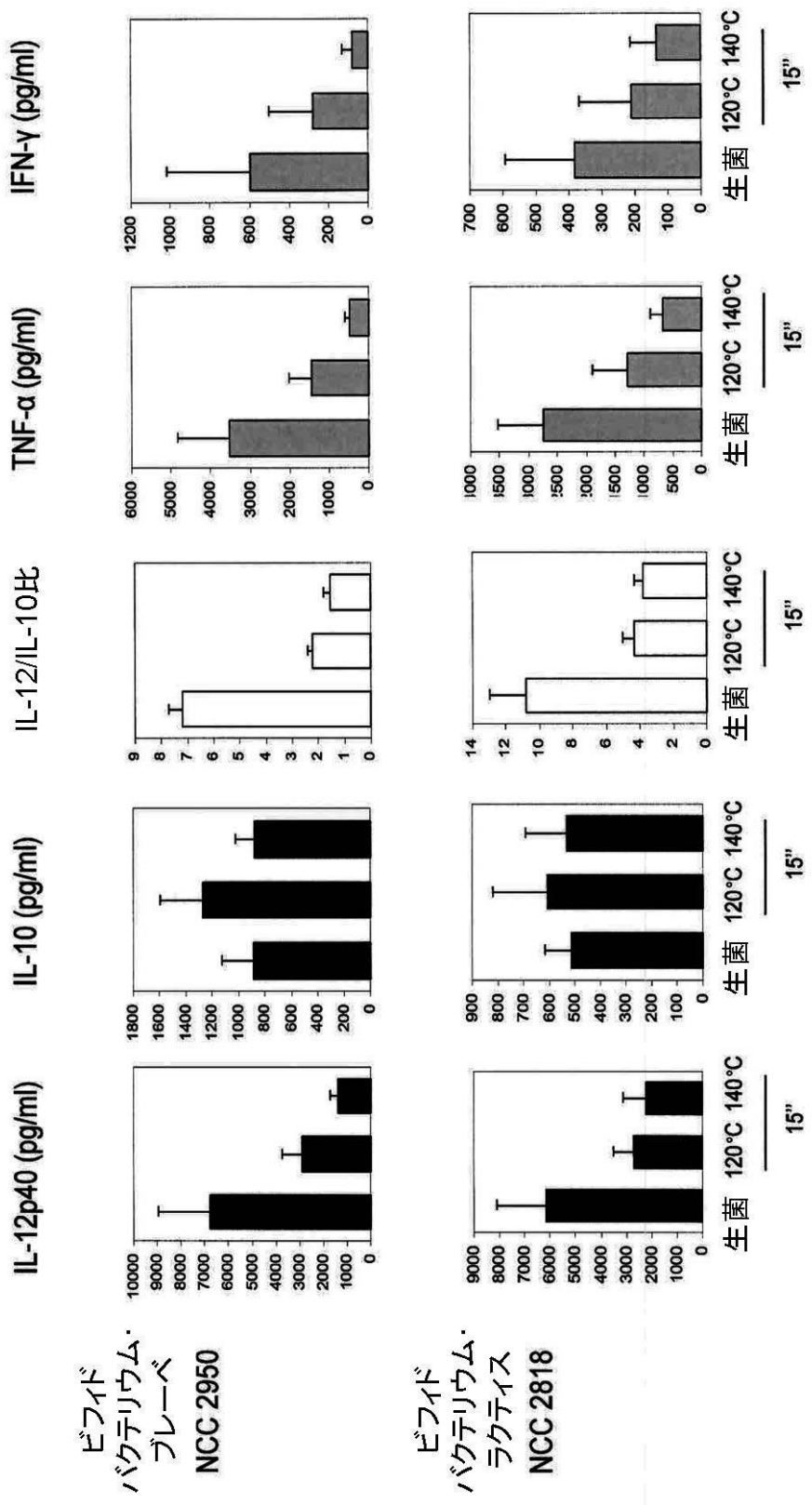
【 図 8 】



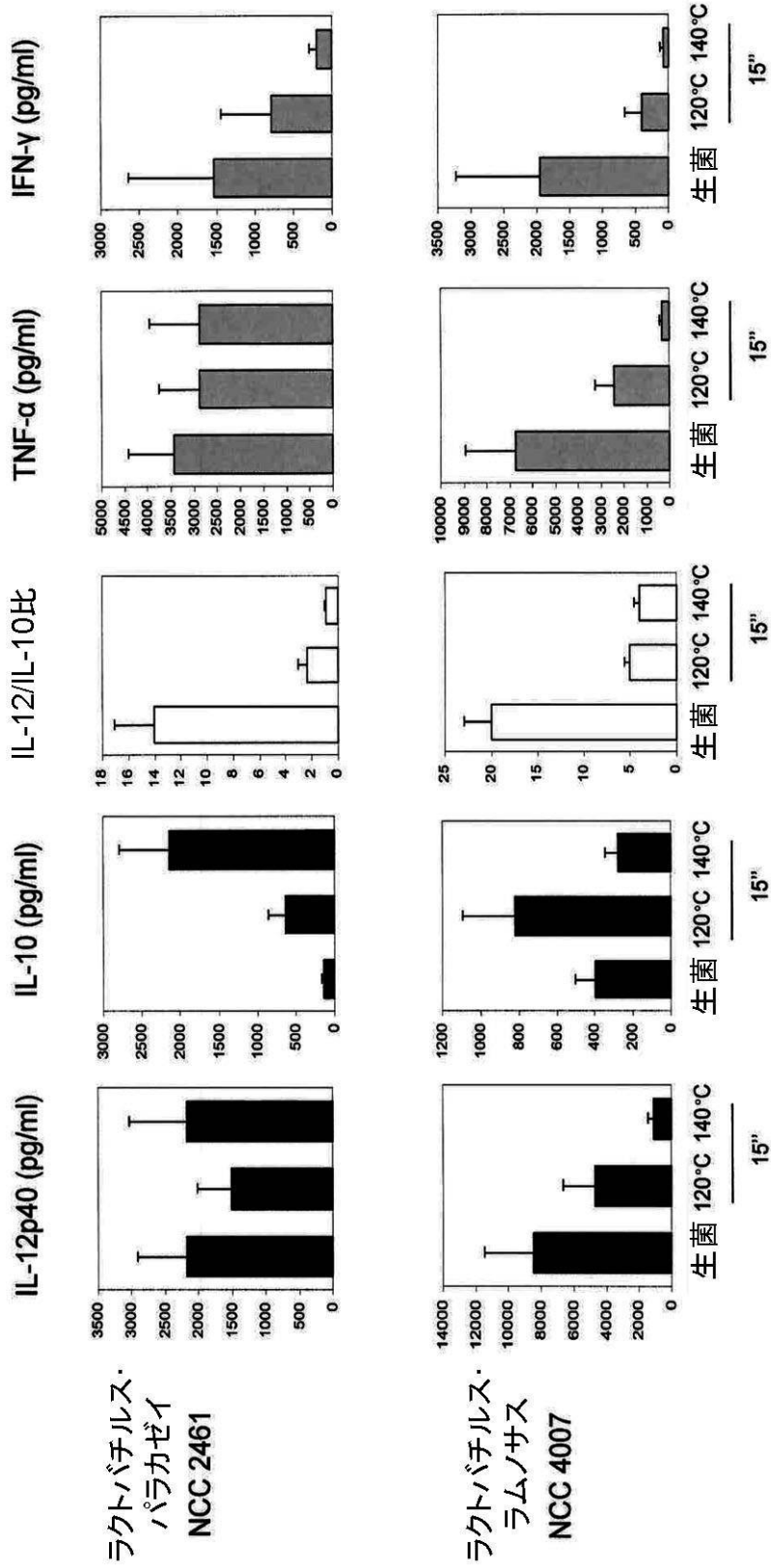
【 図 1 A 】



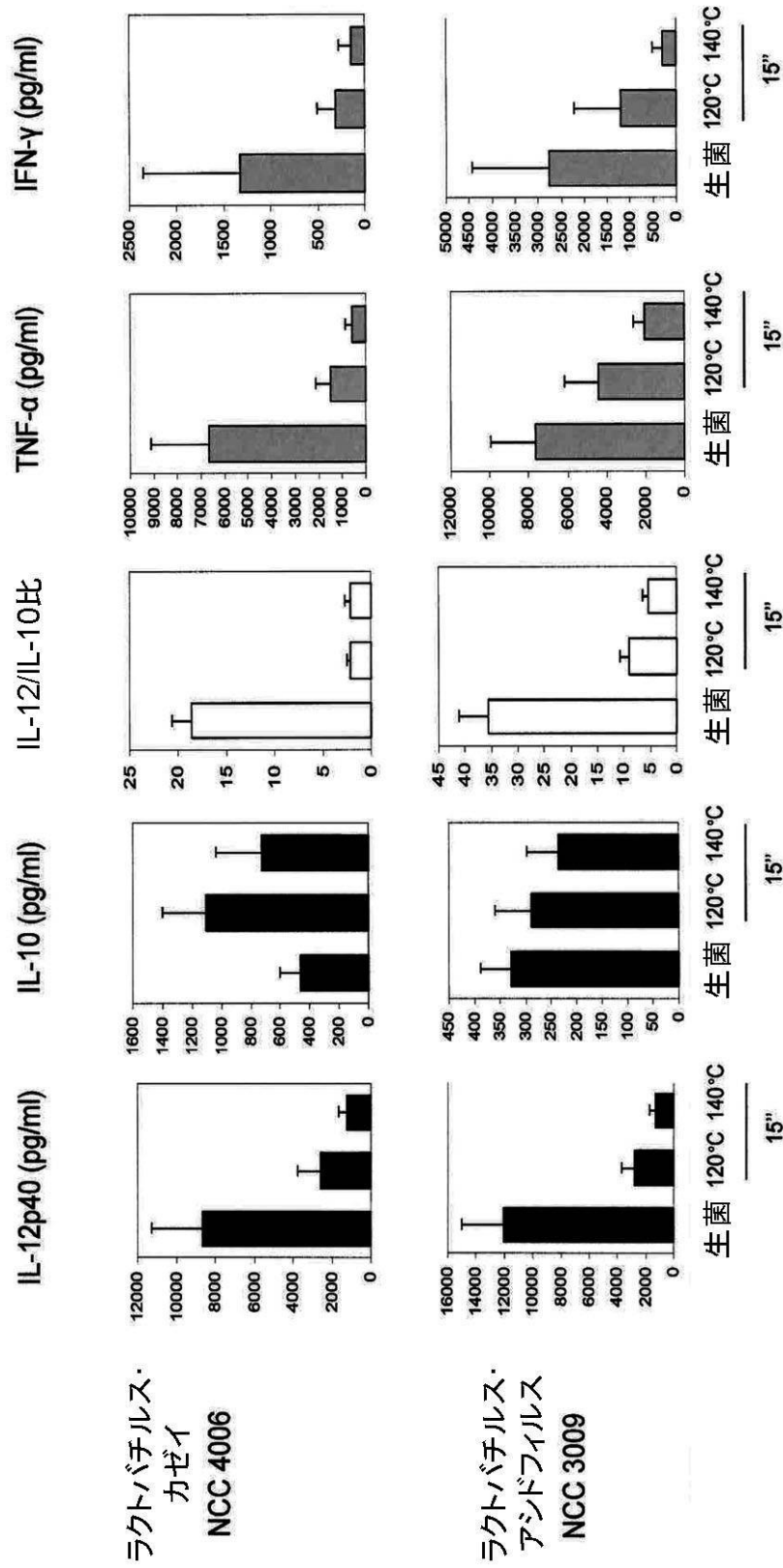
【 図 1 B 】



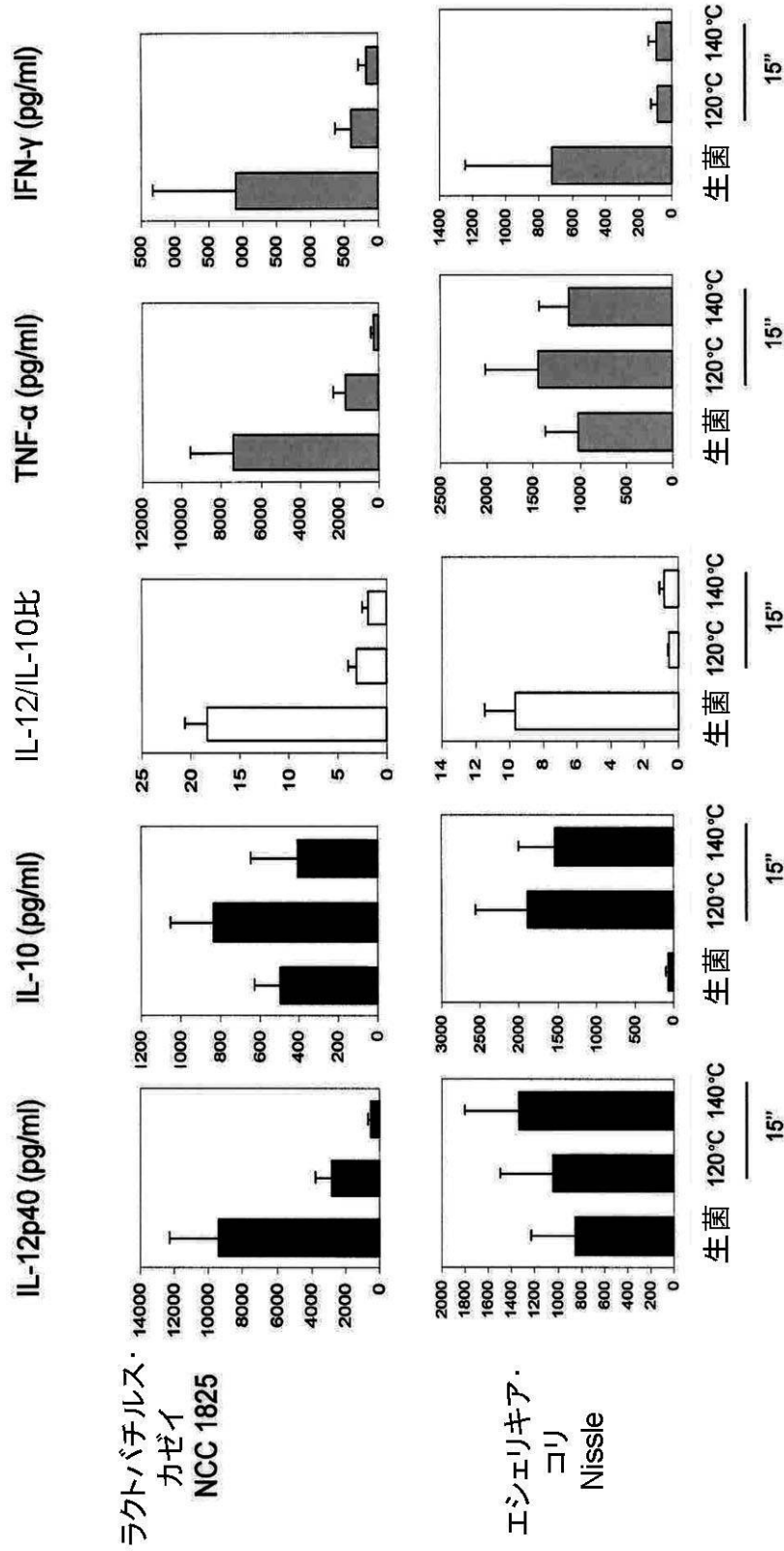
【 図 2 】



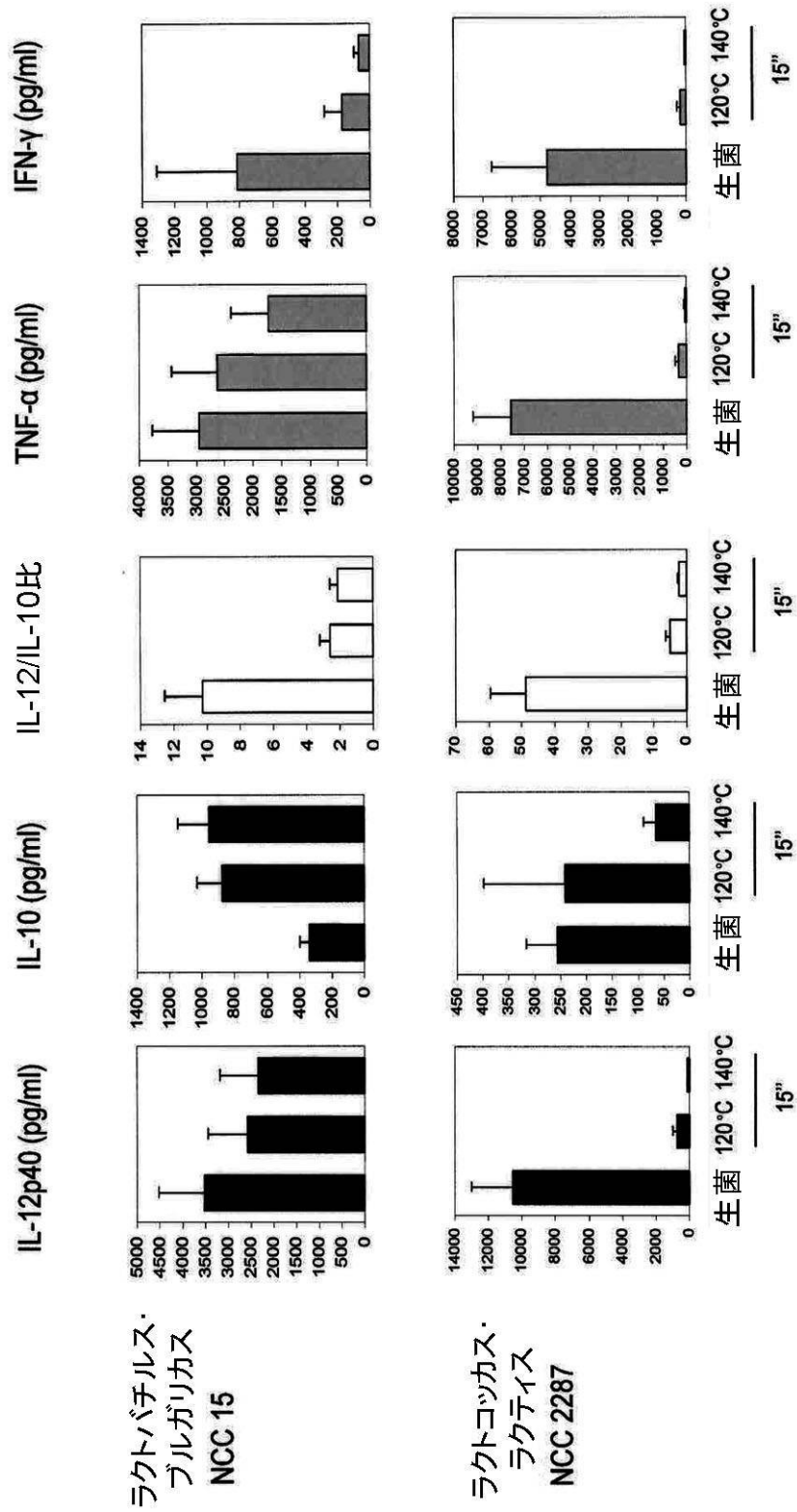
【 図 3 A 】



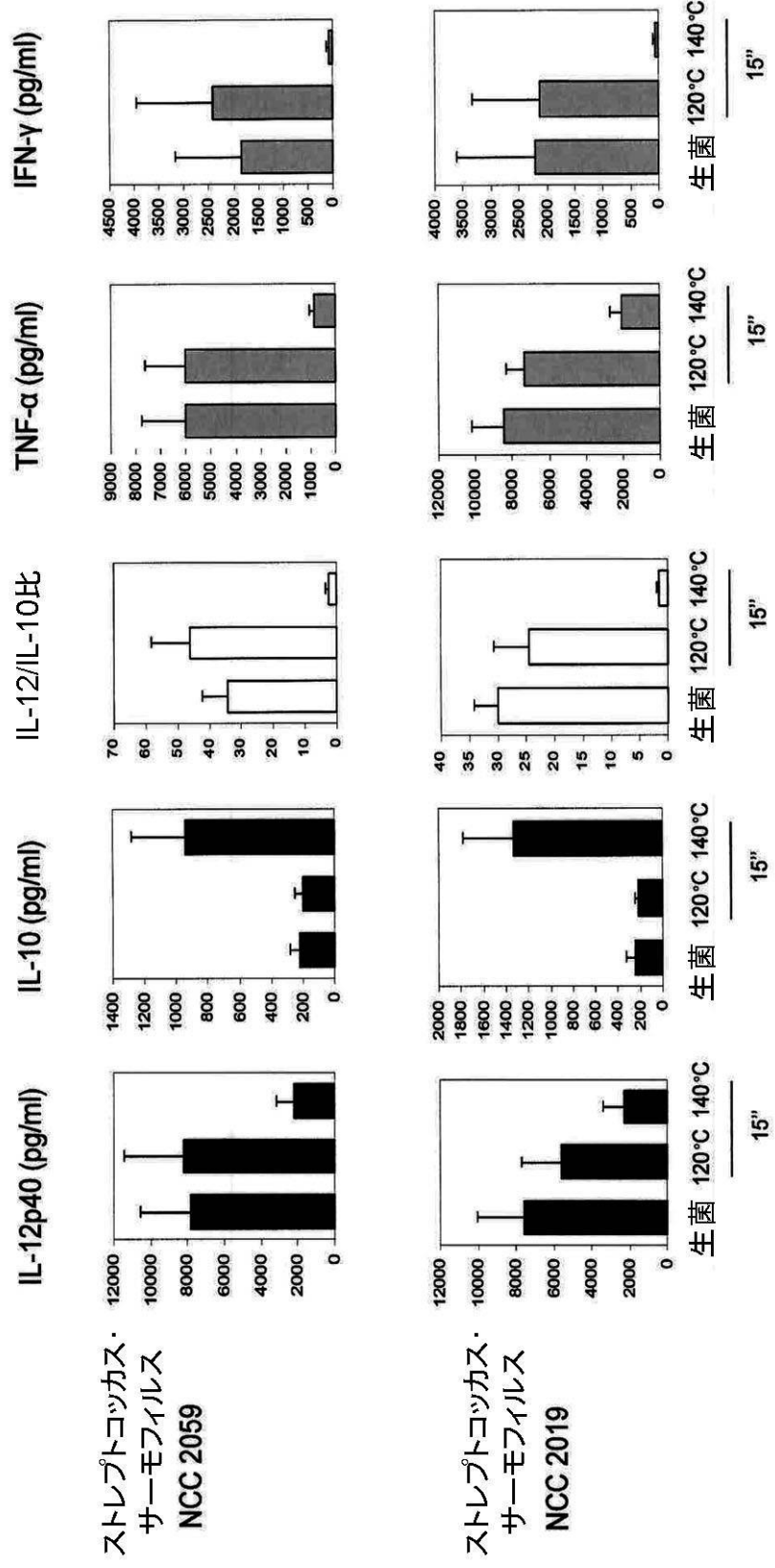
【 図 3 B 】



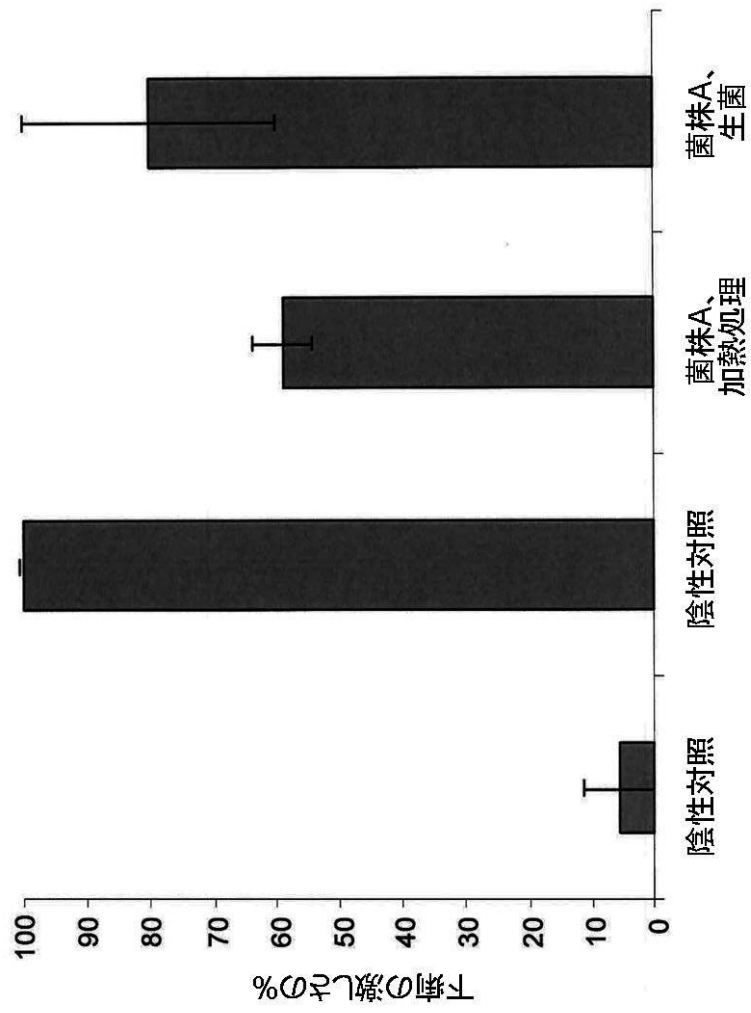
【 図 4 A 】



【 図 4 B 】



【 図 9 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2010/056414

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. A61K35/74 A61P37/04 A23L1/29 ADD.		
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) A61K A61L		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, COMPENDEX, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/069156 A2 (UNIV CALIFORNIA [US]; RAZ EYAL [US]; RACHMILEWITZ DANIEL [IL]) 19 August 2004 (2004-08-19)	1,4-13, 15
Y	paragraphs [0042], [0047], [0053], [0054], [0109], [0112]; claims 1,2,8,25	2,3
X	WO 2007/039596 A1 (NESTEC SA [CH]; GARCIA-RODENAS CLARA LUCIA [CH]; BERGONZELLI GABRIELA) 12 April 2007 (2007-04-12)	1,4-13, 15
Y	pages 3-4; claims 1-5; example 1 page 5, paragraphs 1,4-5 page 6, paragraph 2	2,3
X	WO 02/28402 A (NESTLE SA [CH]; BAUR MARKUS [DE]; BRETON LIONEL [FR]; COUZY FRANCOIS []) 11 April 2002 (2002-04-11) pages 6-7; claim 8	1,4-13, 15
	----- -/--	
<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 :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"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
"E" earlier document but published on or after the international filing date		"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
"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)		"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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"S" document member of the same patent family
"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 9 September 2010		Date of mailing of the international search report 17/09/2010
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bochelen, Damien

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/056414

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2006/251634 A1 (KANG HO-JIN [KR] ET AL) 9 November 2006 (2006-11-09)	1,4-13, 15
Y	paragraphs [0022] - [0023]; claims 1,6 -----	2,3
X	EP 1 227 152 A1 (NESTLE SA [CH]) 31 July 2002 (2002-07-31)	1,4-15
	paragraph [0067]; claims 35,39 -----	
Y	WO 2008/001086 A1 (SHS INTERNAT LTD [GB]; LANGFORD JANE ELIZABETH [GB]; SULLIVAN IAN [GB]) 3 January 2008 (2008-01-03)	2,3
	pages 3-5; claims 1-5,15 -----	
Y	WO 94/02166 A1 (ABBOTT LAB [US]) 3 February 1994 (1994-02-03)	2,3
	claims 1,3; table 10 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2010/056414

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 2004069156	A2	19-08-2004	AU 2003303894 A1	30-08-2004
WO 2007039596	A1	12-04-2007	AT 451845 T	15-01-2010
			AU 2006298720 A1	12-04-2007
			CA 2624921 A1	12-04-2007
			CN 101299934 A	05-11-2008
			EP 1940248 A1	09-07-2008
			ES 2334943 T3	17-03-2010
			PT 1940248 E	26-01-2010
			US 2008254012 A1	16-10-2008
			ZA 200803769 A	29-07-2009
WO 0228402	A	11-04-2002	AR 033580 A1	26-12-2003
			AU 2058702 A	15-04-2002
			AU 2002220587 B2	29-06-2006
			BR 0114400 A	26-08-2003
			CA 2424607 A1	11-04-2002
			CN 1468105 A	14-01-2004
			JP 4510376 B2	21-07-2010
			JP 2004510740 T	08-04-2004
			MX PA03002957 A	30-06-2005
			US 2004013706 A1	22-01-2004
			US 2010080782 A1	01-04-2010
US 2006251634	A1	09-11-2006	AU 2006244703 A1	16-11-2006
			CN 101184497 A	21-05-2008
			EP 1877071 A1	16-01-2008
			JP 2008540406 T	20-11-2008
			WO 2006121384 A1	16-11-2006
EP 1227152	A1	31-07-2002	AT 342986 T	15-11-2006
			AU 2002247668 A1	12-08-2002
			AU 2002249151 A1	12-08-2002
			AU 2002302360 A1	03-10-2002
			CA 2435664 A1	26-09-2002
			CA 2436049 A1	08-08-2002
			CN 1518598 A	04-08-2004
			CN 1500146 A	26-05-2004
			CN 101671640 A	17-03-2010
			DE 60215461 T2	03-05-2007
			DK 1358332 T3	08-01-2007
			WO 02060931 A2	08-08-2002
			WO 02060932 A2	08-08-2002
			WO 02074798 A2	26-09-2002
			ES 2274019 T3	16-05-2007
			JP 4249483 B2	02-04-2009
EP 1227152	A1		JP 2004531229 T	14-10-2004
			JP 2004531245 T	14-10-2004
			PT 1358332 E	31-01-2007
			US 2004115773 A1	17-06-2004
			US 2004126870 A1	01-07-2004
WO 2008001086	A1	03-01-2008	CN 101478891 A	08-07-2009
			EP 2034854 A1	18-03-2009
			US 2009238893 A1	24-09-2009
WO 9402166	A1	03-02-1994	AU 666246 B2	01-02-1996

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2010/056414

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		CA 2140760 A1	03-02-1994
		EP 0656782 A1	14-06-1995
		JP 7507327 T	10-08-1995
		US 5308832 A	03-05-1994

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	
A 6 1 K 47/42 (2006.01)	A 6 1 K 47/42	
A 6 1 K 47/26 (2006.01)	A 6 1 K 47/26	
A 6 1 K 47/44 (2006.01)	A 6 1 K 47/44	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 31/70 (2006.01)	A 6 1 K 37/22	
A 2 3 L 1/30 (2006.01)	A 6 1 K 31/70	
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 2 3 L 1/30	Z
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 9/04 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	
A 6 1 P 1/14 (2006.01)	A 6 1 P 9/04	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/14	
	A 6 1 P 11/00	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, T M), EP(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, S E, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, I L, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ , OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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

(72)発明者 メルセネール, アニック
 スイス, シーエイチ 1 0 3 0 ビュシニー, シュマン ドウ ロント 1 0
 (72)発明者 ニュートン, ソフィー
 スイス, シーエイチ 1 0 0 5 ローザンヌ, アヴェニュー ドウ アヴァン ポスト 3
 (72)発明者 ブライオールト, グエノリー
 スイス, シーエイチ 1 0 0 5 ローザンヌ, アヴェニュー ドウ ベチュージー 1 5

Fターム(参考) 4B018 MD14 MD20 MD33 MD85 ME14 MF04
 4C076 AA12 BB01 DD66 EE41 EE51 FF11
 4C084 AA02 AA03 BA44 BA46 MA02 MA17 MA52 NA14 ZA361 ZA591
 ZA661 ZA891 ZB091 ZB111 ZB311 ZC211
 4C086 AA01 AA02 EA01 MA03 MA04 MA17 MA52 NA14 ZA36 ZA59
 ZA66 ZA89 ZB09 ZB11 ZB31 ZC21
 4C087 AA01 AA02 AA03 BC34 BC56 BC59 BC61 BC74 CA09 MA01
 MA17 NA14 ZA36 ZA59 ZA66 ZA89 ZB09 ZB11 ZB31 ZC21