明　細　書

発明の名称 ： 腸管バリア保護剤および腸管バリア破綻関連疾患予防剤

技術分野

[0001]　本発明は、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティスまたはビフィドバクテリウム・アドレッセンティス由来の成分を有効成分とする腸管バリア保護剤および腸管バリア破綻関連疾患予防剤に関する。

背景技術

[0002]　近年、腸内細菌が宿主の代謝異常症の病態、とりわけ肥満や糖尿病の病態形成に影響を与えることに注目が集まっている。現在では食習慣、運動不足と並んで腸内細菌が肥満の原因となっていると考えられており、肥満症患者の腸内細菌叢を変化させる、さらには腸内環境を改善することによる肥満症の新規治療法が模索されている。

[0003]　腸内細菌叢の乱れ（Ｄｙｓｂｉｏｓｉｓ）は、さまざまな要因（ストレス、加齢、アルコール、喫煙、食生活、抗生物質、身体活動量の不足など）で引き起こされるが、その結果として、腸内細菌由来の毒素であるリポポリサッカライド（ＬＰＳ）による刺激、腸管における炎症性サイトカインによる刺激、酸化ストレスによる刺激の３つの刺激により腸管バリア機能が破綻する。その破綻により、ＬＰＳや炎症性サイトカインが血中に流入して循環し、インスリン感受性を決める脂肪組織や肝臓に達し、慢性炎症やインスリン抵抗性が引き起こされることが知られている（非特許文献１、２）。

[0004]　そのため、腸管バリア機能を保護することは、肥満、糖尿病等の腸管バリアが破綻することに関連した疾患の予防もできると考えられている。

[0005]　これまで腸管バリア機能を保護するための腸内細菌の探索がされているものの、これまで報告されているのは、ビフィドバクテリウム・ビフィダム、ビフィドバクテリウム・アニマリスのサイトカイン刺激に対する腸管バリア保護作用（非特許文献３～６）、ビフィドバクテリウム・ロンガム、ビフィ

ドバクテリウム・アニマリスのＬＰＳ刺激に対する腸管バリア保護作用（非特許文献７～８）等があるものの、複数の刺激に対する腸管バリア保護作用を有する腸内細菌は報告されていなかった。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Coppe. J-P, et al., PLoS Biol. 6. 2853. 2008

非特許文献2：Winer. D. A, et al., Cell Metab. 23. 413. 2016

非特許文献3：Al-Sadi. R, et al., Int. J. Mol. Sci. 22. 8070. 2021

非特許文献4：Hsieh. C. Y, et al., Physiol Rep. 3. 3. e12327. 2015

非特許文献5：Wang. X, et al., Biomedicines. 9. 641. 2011

非特許文献6：Castro-Herrera. V. M, et al., Nutrients. 12. 1719. 2020

非特許文献7：Zhao. L, et al., J. Funct. Foods . 92. 105030. 2022

非特許文献8：Kim. J.Y, et al., Front Microbiol. 13. 817591. 2022

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、腸管バリア機能を保護するための腸内細菌であって、従来のものよりも効果が高いものを見出し、更に、その活性本体を見出すことを課題とした。

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、特定のビフィズス菌が、優れた腸管バリア機能の保護作用を有することを見出し、更に、その活性本体を見出し、本発明を完成させた。

[0009] すなわち、本発明は、以下のものである。

［１］ビフィドバクテリウム・アドレッセンティスを有効成分とすることを特徴とする腸管バリア保護剤。

［２］腸管バリア保護が、ＬＰＳ刺激、炎症性サイトカイン刺激および酸化ストレス刺激から選ばれる１以上の刺激からの腸管バリアの保護である［１］記載の腸管バリア保護剤。

［３］［１］または［２］記載の腸管バリア保護剤を含有する腸管バリア破綻関連疾患予防剤。

［４］腸管バリア破綻関連疾患が、糖尿病、肥満、炎症性腸疾患、脂肪肝、パーキンソン病、がん、過敏性腸疾患、脂質異常症、アトピー、喘息、認知症、不眠症、うつ、関節リウマチから選ばれるものである［３］記載の腸管バリア破綻関連疾患予防剤。

［５］ビフィドバクテリウム・アドレッセンティスの細胞壁多糖画分および／または細胞質内画分を有効成分とする腸管バリア保護剤。

［６］ラムノース、グルコース、ガラクトースが４～３：１：２～１の繰り返し構造であり、限外濾過膜による分画分子量が１～３万である多糖を有効成分とする腸管バリア保護剤。

［７］ウリジン二リン酸－Ｎ－アセチルムラミン酸－Ｌ－アラニン－Ｄ－グルタミン酸－Ｌ－リジンを有効成分とする腸管バリア保護剤。

［８］ラムノース、グルコース、ガラクトースが４～３：１：２～１の繰り返し構造であり、限外濾過膜による分画分子量が１～３万であることを特徴とする多糖。

［９］ビフィドバクテリウム・アドレッセンティスを溶菌処理し、次いで、これを限外濾過膜により分画分子量が１～３万の画分を得て、更に、これを以下の条件またはこれと同等の条件で行われる親水性相互作用クロマトグラフィー、

［クロマトグラフィー条件］

流速: 1.0 mL/min

移動相 A: MeCN, B: H_2O

グラジエント：0-3.3 min ：A=95, B=5, 3.3-83.3 min: A=95→0, B=5→100

カラム: YMC-triart Diol HILIC（φ4.6x250mm, 5μm）

温度: 40℃

注入量: 2～10 μL (5 mg/mL in H_2O)

溶出時間：22～35min

で採取することを特徴とするラムノース、グルコース、ガラクトースが４～３：１：２～１の繰り返し構造であり、限外濾過膜による分画分子量が１～３万である多糖の製造方法。

［１０］溶菌処理が、ムラミダーゼで処理をした後、ヌクレアーゼおよびプロテアーゼで処理するものである［９］請求項９記載の多糖の製造方法。

［１１］［５］～［７］の何れか１に記載の腸管バリア保護剤を含有する腸管バリア破綻関連疾患予防剤。

［１２］腸管バリア破綻関連疾患が、糖尿病、肥満、炎症性腸疾患、脂肪肝、パーキンソン病、がん、過敏性腸疾患、脂質異常症、アトピー、喘息、認知症、不眠症、うつ、関節リウマチから選ばれるものである［１１］記載の腸管バリア破綻関連疾患予防剤。

発明の効果

[0010] 本発明の腸管バリア保護剤は、腸内に存在するビフィドバクテリウム・アドレッセンティス、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティスの細胞壁多糖画分および／または細胞質内画分、前記画分を由来とするラムノース、グルコース、ガラクトースが４～３：１：２～１の繰り返し構造であり、限外濾過膜による分画分子量が１～３万である多糖、または、ウリジン二リン酸－Ｎ－アセチルムラミン酸－Ｌ－アラニン－Ｄ－グルタミン酸－Ｌ－リジンを有効成分とするものであるため、安全に長期間、腸管バリアを保護することができる。

[0011] また、本発明の腸管バリア保護剤は、腸管バリアを保護することができるため、腸管バリアの破綻に関連する疾患の予防剤としても有用である。

[0012] また、本発明の多糖は、ラムノース、グルコース、ガラクトースが４～３：１：２～１の繰り返し構造であり、限外濾過膜による分画分子量が１～３万であり、この多糖は、種々の用途に用いることができる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]実施例１のＬＰＳ刺激した単層膜におけるＴＥＥＲと時間の関係を示す図である。

[図2]実施例１のＬＰＳ刺激した単層膜における４８時間後のＴＥＥＲを示す図である。

[図3]実施例１の炎症性サイトカイン刺激した単層膜におけるＴＥＥＲと時間の関係を示す図である。ＴＩはＴＮＦ－α＋ＩＦＮ－γを表す。

[図4]実施例１の炎症性サイトカイン刺激した単層膜における４８時間後のＴＥＥＲを示す図である。ＴＩはＴＮＦ－α＋ＩＦＮ－γを表す。

[図5]実施例１の酸化ストレス刺激した単層膜におけるＴＥＥＲと時間の関係を示す図である。

[図6]実施例１の酸化ストレス刺激した単層膜における６時間後のＴＥＥＲを示す図である。

[図7]実施例１のタイトジャンクションタンパク質の局在への影響を示す図である（＋：YIT 13021添加、－：YIT 13021無添加）

[図8]実施例２の刺激なしの単層膜におけるＴＥＥＲと時間の関係を示す図である。

[図9]実施例２の刺激なしの単層膜における６時間後のＴＥＥＲを示す図である。

[図10]実施例３のＬＰＳ刺激した単層膜における４８時間後のＴＥＥＲを示す図である。

[図11]実施例３の炎症性サイトカイン刺激した単層膜における４８時間後のＴＥＥＲを示す図である。ＴＩはＴＮＦ－α+ＩＦＮ－γを表す。

[図12]実施例３の酸化ストレス刺激した単層膜における６時間後のＴＥＥＲを示す図である。

[図13]実施例４の刺激なしの単層膜における２４時間後のＴＥＥＲを示す図である。

[図14]実施例５（加熱死菌体）の刺激なしの単層膜における２４時間後のＴＥＥＲを示す図である。

[図15]実施例５（生菌体）の刺激なしの単層膜における２４時間後のＴＥＥＲを示す図である。

[図16]実施例６（でんぷん顆粒と組み合わせて培養した生菌体）の刺激なしの単層膜における２４時間後のＴＥＥＲを示す図である。

[図17]細胞壁多糖画分（細胞質内画分も含まれる）の無刺激下でのＴＥＥＲ値の結果を示す図である。

[図18]細胞壁多糖画分（細胞質内画分も含まれる）のサイズ排除クロマトグラフィ（Size Exclusion Chromatography, SEC）分析の結果を示す図である。

[図19]細胞壁多糖画分（細胞質内画分も含まれる）を限外濾過膜で分画した後、その分画を1μg/mLとなるように添加した際の無刺激下でのＴＥＥＲ値の結果を示す図である。

[図20]分子量１万以下の画分の親水性相互作用クロマトグラフィー（Hydrophilic interaction chromatography, HILIC）分析した結果および分取したフラクションを示す図である。

[図21]分子量１万以下から採取した分画を1μg/mLとなるように添加した際の無刺激下でのＴＥＥＲ値の結果を示す図である。

[図22]分子量１万以下から採取した分画２の^{1}Ｈ－ＮＭＲのスペクトルを示す図である。

[図23]ウリジン二リン酸－Ｎ－アセチルムラミン酸－Ｌ－アラニン－Ｄ－グルタミン酸－Ｌ－リジンの構造を示す図である。

[図24]分子量１～３万の画分のHILIC分析した結果および分取したフラクションを示す図である。

[図25]分子量１～３万から採取した分画を1μg/mLとなるように添加した際の無刺激下でのＴＥＥＲ値の結果を示す図である。

[図26]分子量１～３万から採取した分画１および分画２の^{1}Ｈ－ＮＭＲのスペクトルを示す図である。

[図27]分画２の構成糖分析の結果を示す図である。

[図28]多糖の構造を示す図である。

発明を実施するための形態

[0014] 本発明の腸管バリア保護剤（以下、「本発明保護剤」という）のうち、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス（Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ａｄｏｌｅｓｃｅｎｔｉｓ）を有効成分とするものは本発明保護剤１という。また、本発明保護剤のうち、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティスの細胞壁多糖画分および／または細胞質内画分、ラムノース、グルコース、ガラクトースが４～３：１：２～１の繰り返し構造であり、限外濾過膜による分画分子量が１～３万である多糖、または、ウリジン二リン酸－Ｎ－アセチルムラミン酸－Ｌ－アラニン－Ｄ－グルタミン酸－Ｌ－リジンを有効成分とするものは本発明保護剤２という。

[0015] まず、本発明保護剤のうち、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティスを有効成分とする本発明保護剤１について説明する。

[0016] 本発明保護剤１に用いられるビフィドバクテリウム・アドレッセンティスは、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティスとして公知の株または常法（例えば、（１）ビフィズス菌の研究、編著：光岡知足、日本ビフィズス菌センター、（２）腸内菌検索手法と腸内構成菌、藤澤倫彦、日本細菌学雑誌２０１４、（３）ＰＭＩＤ：２８３９４９２４(ビフィドバクテリウム・アドレッセンティスをマウス便から単離しているが、ヒトに適用可能））で分離したものの何れでもよいが、例えば、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス YIT 13021、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス YIT 13609、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス YIT 12828、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス基準株（ATCC15703）、ビフィドバクテリウム・ア

ドレッセンティス YIT 13022、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス YIT 11033、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス YIT 11034、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス YIT 11040等が挙げられる。これらのビフィドバクテリウム・アドレッセンティスは１種または２種以上を組み合わせて用いることができる。

[0017] これらのビフィドバクテリウム・アドレッセンティスの中でもビフィドバクテリウム・アドレッセンティス YIT 13021、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス YIT 13609、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス YIT 12828が好ましく、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス YIT 13021がより好ましい。

[0018] 本発明保護剤１に用いられるビフィドバクテリウム・アドレッセンティスには、前記した菌株の他、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティスの性質を維持したまま、人為的に遺伝子操作等した株も含まれる。また、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティスは生菌でも死菌でも効果を発揮するが生菌が好ましい。

[0019] 上記ビフィドバクテリウム・アドレッセンティスのうち、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス YIT 13021は、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス YIT 13021（NITE BP-03808、受託日：２０２３年１月２４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微生物寄託センター（〒２９２－０８１８日本国千葉県木更津市かずさ鎌足２－５－８　１２２号室）に国際寄託されている。

[0020] ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス YIT 13609は、YIT 13609（NITE P-04064、受託日：２０２４年１月１５日）として独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター（〒２９２－０８１８千葉県木更津市かずさ鎌足２－５－８　１２２号室）に国内寄託されていたものを、２０２４年１２月９日に国際寄託への移管請求を行いYIT 13609（NITE BP-04064、受託日：２０２４年１月１５日）として、ブダペスト条約の国際寄託当局である上記特許微生物寄託センターに国際寄託されている。

[0021] ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス YIT 12828は、YIT 12828（NITE P-04065、受託日：２０２４年１月１５日）として上記特許微生物寄託センターに国内寄託されていたものを、２０２４年１２月９日に国際寄託への移管請求を行いYIT 12828（NITE BP-04065、受託日：２０２４年１月１５日）として、ブダペスト条約の国際寄託当局である上記特許微生物寄託センターに国際寄託されている。

[0022] ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス YIT 13022は、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス YIT 13022（NITE BP-03809、受託日：２０２３年１月２４日）として上記国際寄託当局に国際寄託されている。

[0023] ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス YIT 11033は、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス YIT 11033（NITE BP-03810、受託日：２０２３年１月２４日）として上記国際寄託当局に国際寄託されている。

[0024] ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス YIT 11034は、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス YIT 11034（NITE BP-03811、受託日：２０２３年１月２４日）として上記国際寄託当局に国際寄託されている。

[0025] ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス YIT 11040は、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス YIT 11040（NITE BP-03812、受託日：２０２３年１月２４日）として上記国際寄託当局に国際寄託されている。

[0026] 本発明保護剤１は、上記ビフィドバクテリウム・アドレッセンティスを有効成分とすることにより、ＬＰＳ刺激、炎症性サイトカイン刺激および酸化ストレス刺激から選ばれる１以上の刺激からの腸管バリアの保護、好ましくは前記２以上の刺激からの腸管バリアの保護、より好ましくは前記３の刺激からの腸管バリアの保護をすることができる。

[0027] ここでＬＰＳ刺激とは、腸内細菌由来の毒素であるリポポリサッカライド（ＬＰＳ）が、腸管上皮細胞に作用することをいう。

[0028] 炎症性サイトカイン刺激とは、ＴＮＦ－α、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－６等の炎症性サイトカインが、腸管上皮細胞に作用することをいう。

[0029] 酸化ストレス刺激とは、酸化ストレスにより生じた過酸化水素等の活性酸素種が腸管上皮細胞に作用することをいう。

[0030] ここで腸管バリアの保護とは、後述する実施例で示されるように、ＬＰＳ刺激、炎症性サイトカイン刺激、酸化ストレス刺激から選ばれる１以上の刺激、好ましくは前記２以上の刺激、より好ましくは前記３の刺激があっても腸管に存在するタイトジャンクションタンパク質の発現または局在が乱れたり、破綻したりしないこと、または腸管バリア強度の指標値（経上皮電気抵抗値；ＴＥＥＲ）の低下を抑制することを言う。

[0031] 本発明保護剤１の形態は特に限定されず、従来公知のビフィズス菌と同様に、発酵乳、ヨーグルト、菌末サプリメント等の飲食品、乳酸菌、ビフィズス菌製剤等の医薬品等が挙げられる。これらの中でも発酵乳等の発酵食品、乳酸菌、ビフィズス菌製剤等の医薬品が好ましい。

[0032] 本発明保護剤１は、ヒトを含む哺乳動物に投与することにより腸管バリアの保護をすることができる。この場合、本発明保護剤１にはビフィドバクテリウム・アドレッセンティスを１日あたり10^5～10^{10}ｃｆｕ程度の摂取量となる量で含有させればよい。

[0033] 本発明保護剤１は、上記した通り、腸管バリアの保護をすることができるため、腸管バリアの破綻に関連する疾患の予防剤（以下、「本発明予防剤１」という）とすることができる。なお、本発明予防剤１は、腸管バリアの乱れも保護することができるため、腸管バリアの破綻に関連する疾患には、腸管バリアの乱れに関連する疾患も含まれる。腸管バリア破綻関連疾患としては、例えば、糖尿病、肥満、炎症性腸疾患（クローン病、潰瘍性大腸炎等）、脂肪肝、パーキンソン病、がん、過敏性腸疾患、脂質異常症、アトピー、喘息、認知症、不眠症、うつ、関節リウマチ等が挙げられる。これらの腸管バリア破綻関連疾患の中でも、肥満および糖尿病が好ましい。

[0034] 本発明予防剤１は、ヒトを含む哺乳動物に投与することにより腸管バリア破綻関連疾患の予防をすることができる。この場合、本発明予防剤１にはビ

フィドバクテリウム・アドレッセンティスを１日あたり10^5～10^{10}ｃｆｕ程度の摂取量となる量で含有させればよい。

[0035] 上記した疾患が腸管バリアの破綻に関連することは以下の文献に記載されている。

＜炎症性腸疾患、肥満症、脂肪肝＞

Lee. B, et al., J Immunol Res. 2018. 2645465. 2018

＜パーキンソン病＞

Van Ijzendoorn. S. C. D, et al., J Parkinsons Dis. 9. S323. 2019

＜がん、過敏性腸疾患＞

Oshima. T, et al., J Gastroenterol. 51. 768. 2016

＜脂質異常症＞

Flaig. B, et al., Nutrients. 15. 228. 2023

＜アトピー、喘息＞

Niewiem. M, et al., Nutrients. 14. 1893. 2022

＜認知症＞

Stadlbauer. V, et al., BMC Geriatr. 20. 248. 2020

＜不眠症、うつ＞

Li. Y, et al., Front Psychiatry. 9. 669. 2018

＜関節リウマチ＞

Matei. D. E, et al., Med. 2. 864. e9. 2021

[0036] 本発明保護剤１や本発明予防剤１に用いられるビフィドバクテリウム・アドレセンティスのうち、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス YIT 13021、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス YIT 13022、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス YIT 11033、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス YIT 11034、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス YIT 11040等はでんぷん顆粒に接着して資化する性質を有している。このような性質はビフィドバクテリウム・アドレッセンティス基準株（ATCC15703）にはない。このことおよび上記性質を確かめるための試験方法等については、２０

２３年１月３１日の国際出願（ＰＣＴ／ＪＰ２０２３／ ３０１８）に記載されている。

[0037] そのため、本発明保護剤１および本発明予防剤１に、上記性質を有するビフィドバクテリウム・アドレッセンティスを用いる場合には、これらと共に、でんぷん顆粒を含有させることが好ましい。それにより腸内で競争状態にあるユウバクテリウム・レクターレ等の腸内細菌のでんぷん顆粒への接着を抑制し、自身が接着、集住することができるため効果が高まる。ここで、上記性質をより得やすくするために、溶性でんぷん、でんぷん顆粒、デキストリン等が添加された培地でビフィドバクテリウム・アドレッセンティスを培養することが好ましい。

[0038] ここででんぷん顆粒とは、バレイショ、サツマイモ等のイモ類、コムギ、コメ、トウモロコシ等の穀類、ダイズ、アズキ等の豆類、あるいはタピオカ、バナナ等由来のでんぷんであって、製造時の乾燥工程を除いて水を含む加熱工程(煮る、蒸すなど)を経ていないか、もしくは水を含む加熱工程を経ても糊化しておらず、天然の顆粒状態を保ち、常温の水に不溶のものをいう。より具体的にでんぷん顆粒は、未調理のバレイショ、サツマイモ等のイモ類、コムギ、コメ、トウモロコシ等の穀類、ダイズ、アズキ等の豆類、あるいはタピオカ、バナナ等に由来する未調理のでんぷんであり、球形、卵型、多面体等の顆粒形状を持ち、植物種によるが、直径は典型的には１～１２０μｍである。この直径は、顕微鏡または粒子径測定機器で測定することができる。

[0039] 本発明保護剤１および本発明予防剤１に、でんぷん顆粒を含有させる場合、１日あたり０．５～１００ｇ程度の摂取量となるように含有させればよい。

[0040] 以上説明した本発明保護剤１および本発明予防剤１は、安全に長期間、腸管バリアの保護や腸管バリア破綻関連疾患を予防することができる。

[0041] また、本発明保護剤１は、腸管バリアの保護をするが、何も刺激が無い場合には腸管バリアを増強することもできる。そのため、本発明保護剤１は、

腸管バリア増強剤としても用いることができる。ここで腸管バリアの増強とは腸管バリア強度の指標値（経上皮電気抵抗値；ＴＥＥＲ）を増加させることをいう。

[0042] 次に本発明保護剤のうち、以下のビフィドバクテリウム・アドレッセンティス由来の成分の何れかを有効成分とする本発明保護剤２について説明する。なお、本発明保護剤２でいう、腸管バリアの保護とは腸管バリア強度の指標値（経上皮電気抵抗値；ＴＥＥＲ）を、何も添加しない場合と比較して、上昇させることをいう。

（１）ビフィドバクテリウム・アドレッセンティスの細胞壁多糖画分および／または細胞質内画分

（２）ラムノース、グルコース、ガラクトースが４～３：１：２～１の繰り返し構造であり、限外濾過膜による分画分子量が１～３万である多糖

（３）ウリジン二リン酸－Ｎ－アセチルムラミン酸－Ｌ－アラニン－Ｄ－グルタミン酸－Ｌ－リジン

[0043] 本発明保護剤２の有効成分である（１）ビフィドバクテリウム・アドレッセンティスの細胞壁多糖画分および／または細胞質内画分について説明する。

[0044] ビフィドバクテリウム・アドレッセンティスの細胞壁多糖画分および／または細胞質内画分は、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティスを溶菌処理して得られるものである。

[0045] 上記で用いられるビフィドバクテリウム・アドレッセンティスとしては、上記したビフィドバクテリウム・アドレッセンティスを有効成分とする本発明保護剤１で用いられるビフィドバクテリウム・アドレッセンティスを用いることができる。

[0046] 上記したビフィドバクテリウム・アドレッセンティスは溶菌処理をする前に、培養をしておくことが好ましい。培養は従来公知の条件で行えばよい。また、培養後は、常法に従って、遠心分離等で集菌やＰＢＳ等による洗浄を行ってもよい。

[0047] 上記したビフィドバクテリウム・アドレッセンティスの溶菌処理は、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティスから細胞壁多糖画分および／または細胞質内画分が得られるものであれば特に限定されず、例えば、ムラミダーゼ、ヌクレアーゼ、プロテアーゼ等の複数の酵素を適宜組み合わせて用いる公知の方法が利用できる。

[0048] このような複数の酵素を用いた方法のうち、好ましい方法としては、ムラミダーゼで処理をした後、ヌクレアーゼおよびプロテアーゼで処理する方法が挙げられる。ムラミダーゼとしては、例えば、ムタノリシン（Mutanolysin）、リゾチーム（Lysozyme）、ラビアーゼ（Labiase）などが挙げられる。ヌクレアーゼとしては、例えば、ベンゾナーゼ（Benzonase）、などが挙げられる。プロテアーゼとしては、例えば、プロナーゼ（Pronase）、トリプシン（Trypsin）などが挙げられる。

[0049] 上記の好ましい方法は次のように行われる。まず、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティスを予め常法に従って十分に培養した後、遠心分離で集菌し、ＰＢＳで洗浄しておく。このビフィドバクテリウム・アドレッセンティスの生菌１ｍｇに対してムラミダーゼを１～１００Ｕ、好ましくは４Ｕ添加し、３７～６０℃、好ましくは３７℃で、１２時間以上、好ましくは１６～２４時間反応させる。次いで必要により遠心等を行い不溶物を取り除き、上清を得て、これにヌクレアーゼを生菌１ｍｇに対して１～１００Ｕ、好ましくは１．４Ｕ添加し、３７～６０℃、好ましくは３７℃で、１２時間以上、好ましくは１６～２４時間反応させる。次いでこれにプロテアーゼを生菌１ｍｇに対して０．０００１～０．５ｍｇ、好ましくは０．００６ｍｇ添加し、３７～６０℃、好ましくは３７℃で、１２時間以上、好ましくは１６～２４時間反応させる。反応後は、透析膜等で精製を行ってもよい。透析膜の分画分子量は３，５００～１４，０００、好ましくは３，５００～８，０００である。

[0050] 上記のようにして（１）のビフィドバクテリウム・アドレッセンティスの細胞壁多糖画分および／または細胞質内画分が得られる。このビフィドバク

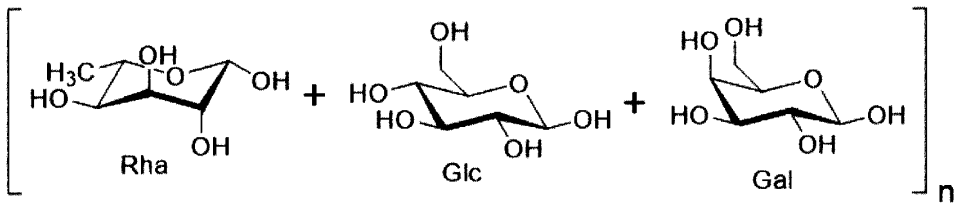
テリウム・アドレッセンティスの細胞壁多糖画分および／または細胞質内画分の物性は以下の通りである。

性状：白～淡灰茶色の固体

[0051] このビフィドバクテリウム・アドレッセンティスの細胞壁多糖画分および／または細胞質内画分は腸管バリア保護作用を有する。

[0052] 次に本発明保護剤２の有効成分である（２）ラムノース、グルコース、ガラクトースが４～３：１：２～１の繰り返し構造であり、好ましくは３：１：１あるいは４：１：２の繰り返し構造であり、限外濾過膜による分画分子量が１～３万である多糖について説明する。なお、この多糖は以下の式で表される構造を有しており、新規物質である。

[0053] [化1]



4～3：1：2～1

[0054] この多糖の物性は以下の通りである。

性状：白～淡黄色の固体

[0055] この多糖はビフィドバクテリウム・アドレッセンティスを溶菌処理し、次いで、これを限外濾過膜により分画分子量が１～３万の画分を得て、更に、これを以下の条件またはこれと同等の条件で行われる親水性相互作用クロマトグラフィー、

［クロマトグラフィー条件］

流速: 1.0 mL/min

移動相 A: MeCN, B: H_2O

グラジエント：0-3.3 min:A=95, B=5, 3.3-83.3 min: A=95→0, B=5→100

カラム: YMC-triart Diol HILIC (φ4.6x250 mm, 5 μm)

温度: 40 ℃

注入量: 2～10 μL (5 mg/mL in H_2O)

検出：charged aerosol detector (CAD)

溶出時間：22～35 min

で採取することにより製造することができる。

[0056] 上記において用いられるビフィドバクテリウム・アドレッセンティスおよび溶菌処理については、上記と同様である。

[0057] 溶菌処理後、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティスの細胞壁多糖画分および／または細胞質内画分が得られる。これについて限外濾過膜で精製して分画分子量が１～３万の画分を得る。この際に用いる限外濾過膜としては、上記分子量のものが得られれば特に限定されないが、例えば、分画分子量１０万、分画分子量３万、分画分子量１万の限外濾過膜を組み合わせて用いることが好ましく、分画分子量３万、分画分子量１万の限外濾過膜を組み合わせて用いることがより好ましい。

[0058] 精製後、限外濾過膜による分画分子量が１～３万の画分が得られる。これについて上記した条件で親水性相互作用クロマトグラフィーを行い、ラムノース、グルコース、ガラクトースが４～３：１：２～１の繰り返し構造であり、限外濾過膜による分画分子量が１～３万である多糖を採取する。

[0059] 上記親水性相互作用クロマトグラフィーおいては、上記条件の他に、この条件を適宜変更してラムノース、グルコース、ガラクトースが４～３：１：２～１の繰り返し構造であり、限外濾過膜による分画分子量が１～３万である多糖が得られる同等の条件で行うことができる。このような同等の条件としては、当業者が上記条件を参考に、流速、移動相組成、カラム担体の種類、カラム担体の粒子径、カラムの長さ、温度、注入量および注入液の濃度を適宜変更して設定することができ、具体的には以下のものが挙げられる。

[0060] ［クロマトグラフィー条件］

流速: 0.5～1.0 mL/min

移動相 A: MeCN, B: H_2O

グラジエント： (a)～c)の何れか)

a) 0-2 min: A = 95, B = 5, 2-25 min: A = 95→0, B = 5→100、

b) 0-2 min: A = 95, B = 5, 2-50 min: A = 95→0, B = 5→100

c) 0-2 min: A = 95, B = 5, 2-100 min: A = 95→0, B = 5→100

カラム: YMC-triart Diol HILIC (φ4.6x150 mm, 5 μm)

温度: 40 ℃

注入量: 2～10 μL (5 mg/mL in H_2O)

検出：charged aerosol detector (CAD)

溶出時間：流速1.0 mL/min；a) 8～11 min、b) 13～19 min、c) 25～35 min

流速0.5 mL/min；a) 10～13 min、b) 15～21 min、c) 27～37 min

[0061] 上記のようにして（２）のラムノース、グルコース、ガラクトースが４～３：１：２～１の繰り返し構造であり、限外濾過膜による分画分子量が１～３万である多糖が得られる。この多糖が得られたかどうかは、例えば、ＮＭＲ、ＨＰＬＣ等を用いた構造解析や構成糖分析で確認することができる。具体的には、Shodex SUGER KS-804カラム（昭和電工 F6378035）を用いたSEC分析において、溶出時間８～９分付近にピークを確認することができる。より具体的には、後記する実施例に記載の方法で確認することができる。

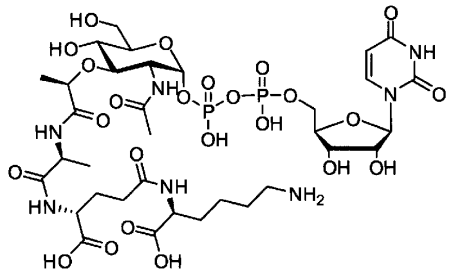
[0062] このラムノース、グルコース、ガラクトースが４～３：１：２～１の繰り返し構造であり、限外濾過膜による分画分子量が１～３万である多糖は腸管バリア保護作用を有する。

[0063] 最後に本発明保護剤２の有効成分である（３）ウリジン二リン酸－Ｎ－アセチルムラミン酸－Ｌ－アラニン－Ｄ－グルタミン酸－Ｌ－リジンについて説明する。

[0064] このウリジン二リン酸－Ｎ－アセチルムラミン酸－Ｌ－アラニン－Ｄ－グルタミン酸－Ｌ－リジン（CAS No. 143436-84-4など、）は、公知の化合物であり、細胞質内の構成成分で以下の化学式で表されるものである（Nicolas Gisch, Birte Buske, Holger Heine, Buko Lindner, Ulrich Zahringer, Synt

hesis of biotinylated muramyl tripeptides with NOD2-stimulating activity, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2011(21) 3362.）。

[0065] [化2]



[0066] このウリジン二リン酸－Ｎ－アセチルムラミン酸－Ｌ－アラニン－Ｄ－グルタミン酸－Ｌ－リジンは、市販品を利用してもよいし、上記文献に基づいて得てもよいし、後記する実施例に記載に基づいて、上記（１）ビフィドバクテリウム・アドレッセンティスの細胞壁多糖画分および／または細胞質内画分から得てもよい。

[0067] このウリジン二リン酸－Ｎ－アセチルムラミン酸－Ｌ－アラニン－Ｄ－グルタミン酸－Ｌ－リジンは腸管バリア保護作用を有する。

[0068] 本発明保護剤２は、上記（１）～（３）の何れかを有効成分とすることにより腸管バリアを保護することができる。

[0069] 本発明保護剤２の形態は、上記（１）～（３）の何れかを含有していて投与に適したものであれば特に限定されず、例えば、ヒト用の医薬品、飲食品、サプリメント等とすることができる。

[0070] 医薬品としては、上記（１）～（３）の何れかをそのままたは必要に応じ、薬学的に許容される担体と組み合わせて製剤化できる。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、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。

更に必要に応じて、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。

[0071] また、剤型も特に限定されず、液剤、粉剤、顆粒剤、カプセル剤、錠剤等が例示され、常法に従って製造することができる。本発明保護剤２中の有効成分の含有量は特に制限されず、例えば、１～１００質量％が好ましく、より好ましくは５～７０質量％であり、特に好ましくは１０～６０質量％である。

[0072] 本発明保護剤２を飲食品の形態とする場合、上記（１）～（３）の何れかをそのままままたは必要に応じ、公知の飲食品に用いられる添加物、素材等を配合し、常法に従って調製することができる。飲食品としては、例えば、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。

[0073] 本発明保護剤２をサプリメントの形態とする場合、上記（１）～（３）の何れかをそのままままたは必要に応じ、公知のサプリメントに用いられる添加物、素材等を配合し、常法に従って調製することができる。

[0074] 本発明保護剤２は、ヒトを含む哺乳動物に投与することにより腸管バリアの保護をすることができる。この場合、本発明保護剤２を一日あたり、（１）ビフィドバクテリウム・アドレッセンティスの細胞壁多糖画分および／または細胞質内画分であれば０．０００００６０～２７０ｍｇとなる量で投与すればよく、（２）ラムノース、グルコース、ガラクトースが４～３：１：２～１の繰り返し構造であり、限外濾過膜による分画分子量が１～３万である多糖であれば０．０００００３２４～１５ｍｇとなる量で投与すればよく、（３）ウリジン二リン酸－Ｎ－アセチルムラミン酸－Ｌ－アラニン－Ｄ－グルタミン酸－Ｌ－リジンであれば０．０００００４２０～１９ｍｇとなる量で投与すればよい。

[0075] 以上説明した本発明保護剤２は、上記した通り、腸管バリアの保護をすることができるため、腸管バリアの破綻に関連する疾患の予防剤（以下、「本発明予防剤２」という）とすることができる。なお、本発明予防剤２は、腸管バリアの乱れも保護することができるため、腸管バリアの破綻に関連する疾患には、腸管バリアの乱れに関連する疾患も含まれる。腸管バリア破綻関連疾患としては、例えば、糖尿病、肥満、炎症性腸疾患（クローン病、潰瘍性大腸炎等）、脂肪肝、パーキンソン病、がん、過敏性腸疾患、脂質異常症、アトピー、喘息、認知症、不眠症、うつ、関節リウマチ等が挙げられる。これらの腸管バリア破綻関連疾患の中でも、肥満および糖尿病が好ましい。

[0076] 本発明予防剤２は、ヒトを含む哺乳動物に投与することにより腸管バリア破綻関連疾患の予防をすることができる。この場合、本発明予防剤２を一日あたり、（１）ビフィドバクテリウム・アドレッセンティスの細胞壁多糖画分および／または細胞質内画分であれば０．００００６０～２７０ｍｇとなる量で投与すればよく、（２）ラムノース、グルコース、ガラクトースが４～３：１：２～１の繰り返し構造であり、限外濾過膜による分画分子量が１～３万である多糖であれば０．０００００３２４～１５ｍｇとなる量で投与すればよく、（３）ウリジン二リン酸－Ｎ－アセチルムラミン酸－Ｌ－アラニン－Ｄ－グルタミン酸－Ｌ－リジンであれば０．０００００４２０～１９ｍｇとなる量で投与すればよい。

[0077] 上記した疾患が腸管バリアの破綻に関連することは本発明予防剤１の説明で用いたのと同様の文献に記載されている。

[0078] 本発明保護剤２および本発明予防剤２は、安全に長期間、腸管バリアの保護や腸管バリア破綻関連疾患を予防することができる。

[0079] また、本発明保護剤２は、腸管バリアの保護をするが、何も刺激が無い場合には腸管バリアを増強することもできる。そのため、本発明保護剤２は、腸管バリア増強剤としても用いることができる。ここで腸管バリアの増強と

は腸管バリア強度の指標値（経上皮電気抵抗値；ＴＥＥＲ）を何も添加しない場合と比較して、上昇させることをいう。

実施例

[0080] 以下、本発明を実施例を挙げて詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に何ら限定されるものではない。なお、以下の全ての実施例において有意差検定はｔ検定で行われ、＊はｐ＜０．０５、＊＊はｐ＜０．０１、＊＊＊はｐ＜０．００１を示している。

[0081] 実　施　例　１

腸管バリア保護作用：

試験菌株として、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス YIT 13021（NITE BP-03808）（以下、「YIT 13021」という）を用いた。対照菌株としては、ビフィドバクテリウム・ブレーベ基準株（ATCC15700）（以下、「YIT 4014」という）を用いた。これらの菌株は、ｍＧＡＭ培地に１％グルコースを追加して培養し、ＬＰＳ刺激、炎症性サイトカイン刺激または酸化ストレス刺激に対する腸管バリア保護作用について、刺激を与えていないものをコントロールとして試験した。また、YIT 13021のタイトジャンクションタンパク質の局在への影響も試験した。

[0082] （１）ＬＰＳ刺激

１．１　細胞

凍結保存済みのヒト結腸上皮細胞株Ｔ８４を使用した。Ｔ８４は、１０％ＦＢＳ、１００ μｇ/ｍＬストレプトマイシンを含んだＤＭＥＭ/Ｆ－１２培地（１０％ ＦＢＳ／Ｆ－１２）を用いて、５％ CO_2、３７℃で継代培養を行った。

[0083] １．２　単層膜の作製

Ｔ８４単層膜は２４ウェルセルカルチャーインサートプレート（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を用いて作製した。培養ディッシュにて８０％コンフルエントのＴ８４を回収し、６０，０００ ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌとなるように４００ μＬの１０％ ＦＢＳ/Ｆ－１２にてウェルのＡｐｉｃａｌ側に播種し、Ｂａ

ｓａｌ側には８００μＬの１０％ ＦＢＳ／Ｆ－１２を添加し、５％ CO_2、３７℃で培養を行った。２～３日ごとにＡｐｉｃａｌ側に４００μＬ、Ｂａｓａｌ側には８００μＬの培地で培地交換を行った。Ｔ８４は培養を１０日間行うことで単層膜を作製した。

[0084] １．３　ＬＰＳ刺激した単層膜に対する保護作用の評価

ＬＰＳは、大腸菌Ｏ５５由来のＬＰＳ（ＷＡＫＯ，＃１２８－０５１７１）を用い、１０％ ＦＢＳ/Ｆ－１２に溶かして試験濃度である１０ ｎｇ/ｍＬに調製した。ＬＰＳによる刺激は、作製した単層膜のＡｐｉｃａｌおよびＢａｓａｌの両側にＬＰＳ含有培地を加えることで行った。YIT 13021またはYIT 4014の加熱死菌体を公知の方法で調製し、これを１００ μｇ/ｍＬ（約２．４×10^8 ｃｅｌｌｓ／ｍＬ）の濃度になるように単層膜のＡｐｉｃａｌ側のみに添加し、刺激による単層膜へのダメージに対する保護作用は、Ｍｉｌｌｉｃｅｌｌ ＭＲＳ－２（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）により測定した実測抵抗値（Ω）をセルカルチャーインサートプレートの培養面積（cm^2）で割った値である経上皮電気抵抗（ＴＥＥＲ）値（Ω/cm^2）により評価した。刺激開始から各経過時間後の単層膜のＴＥＥＲ値を、刺激開始直後である０時間時のＴＥＥＲ値で割ることにより、バリアの破綻を刺激開始時からの変化率（％）として算出した。

[0085] １．４　結果

YIT 13021またはYIT 4014の腸管バリア機能への影響を検討するため、Ｔ８４をセルカルチャーインサートプレートに播種し、１０日間培養して単層膜を作製した。その単層膜にＬＰＳおよび菌株の加熱死菌体をそれぞれ添加し、４８時間後まで２４時間ごとにＴＥＥＲ値を測定した（図１）。その結果、添加から４８時間後において、YIT 13021を添加した単層膜においてＴＥＥＲ値の低下が認められず、ＬＰＳ刺激によるＴＥＥＲ値の低下が有意に抑制され、YIT 4014についてはＬＰＳ刺激のみと同じであった（図２）。

[0086] （２）炎症性サイトカイン刺激

２．１　細胞

上記（１）ＬＰＳ刺激の１．１と同様の細胞を用いた。

[0087] ２．２　単層膜の作製

上記（１）ＬＰＳ刺激の１．２と同様にして単層膜を作製した。

[0088] ２．３　炎症性サイトカイン刺激した単層膜に対する保護作用の評価

炎症性サイトカインは、ＴＮＦ－α（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ，＃２１０－ＴＡ－００５）およびＩＦＮ－γ（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ，＃２８５－ＩＦ－１００）を用い、両サイトカインは等量で１０％ ＦＢＳ/Ｆ－１２に溶かして試験濃度である１ ｎｇ/ｍＬに調製した。ＴＮＦ－αおよびＩＦＮ－γによる刺激は、作製した単層膜のＢａｓａｌ側のみにサイトカイン含有培地を加えることで行った。刺激開始から各経過時間後の単層膜のＴＥＥＲ値の測定や変化率（％）の算出は上記（１）ＬＰＳ刺激の１．３と同様にして行った。

[0089] ２．４　結果

Ｔ８４の単層膜に炎症性サイトカインであるＴＮＦ－αおよびＩＦＮ－γを加え、同時にYIT 13021またはYIT 4014をそれぞれ添加することで、炎症性サイトカインによるバリアの破綻に対するそれらの保護作用を評価した。２４、４８時間後のＴＥＥＲ値を評価した（図３）。ＴＩはＴＮＦ－α+ＩＦＮ－γを表す。その結果、炎症性サイトカイン刺激のみ、YIT 4014を添加した単層膜は２４時間後ではあまり変化が認められなかったが４８時間後にはＴＥＥＲ値が５０％程にまで低下した。一方で、YIT 13021を添加した単層膜では、２４時間後にＴＥＥＲ値がＣｔｒｌと比べて２０％程上昇した。４８時間後での刺激による低下も７０％程にとどまり、炎症性サイトカイン刺激によるＴＥＥＲ値の低下が有意に抑制された（図４）。

[0090] （３）酸化ストレス刺激

３．１　細胞

上記（１）ＬＰＳ刺激の１．１と同様の細胞を用いた。

[0091] ３．２　単層膜の作製

上記（１）ＬＰＳ刺激の１．２と同様にして単層膜を作製した。

[0092] ３．３　酸化ストレス刺激した単層膜に対する保護作用の評価

酸化ストレスには、H_2O_2（三菱，＃Ｋ－８２３０）を用い、１０％ ＦＢＳ/Ｆ－１２に希釈して試験濃度である１５００ μＭに調製した。H_2O_2による刺激は、作製した単層膜のＡｐｉｃａｌおよびＢａｓａｌの両側にH_2O_2含有培地を加えることで行った。刺激開始から各経過時間後の単層膜のＴＥＲ値の測定や変化率（％）の算出は上記（１）ＬＰＳ刺激の１．３と同様にして行った。

[0093] ３．４　結果

Ｔ８４の単層膜にH_2O_2を加え、同時にYIT 13021またはYIT 4014をそれぞれ添加することで、酸化ストレスによるバリアの破綻に対するそれらの保護作用を評価した。添加６時間後まで１時間ごとにＴＥＥＲ値を測定した（図５）。その結果、YIT 4014ではH_2O_2刺激に対する保護作用は見られなかったが、YIT 13021を添加した単層膜ではH_2O_2刺激のみの場合と比較して有意にＴＥＥＲ値の低下が抑制され、H_2O_2刺激に対する保護作用が認められた（図６）。

[0094] （４）タイトジャンクションタンパク質の局在への影響

４．１　細胞

上記（１）ＬＰＳ刺激の１．１と同様の細胞を用いた。

[0095] ４．２　単層膜の作製

上記（１）ＬＰＳ刺激の１．２と同様にして単層膜を作製した。

[0096] ４．３　単層膜の免疫染色

単層膜をＰＢＳにて２回洗浄後、２４ウェルセルカルチャーインサートプレートに１０％ 中性緩衝ホルマリン液を加え、固定化を１５分間行った。２回の洗浄操作後、０．２５％ Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００/ＰＢＳによる透過処理を５分間行った。さらに２回の洗浄操作、３７℃にて１０％ ＢＳＡ/ＰＢＳによるブロッキングを６０分間行った。これを除去した後、ＰＢＳに１００倍希釈したＡｎｔｉ－ＺＯ－１抗体（Ａｂｃａｍ，＃ａｂ２１６８８０）を添加し、４℃にて一晩インキュベートした。洗浄操作を2回行い、ＰＢＳに

て５００倍に希釈した抗ラビット Ａｌｅｘａ ５４６抗体（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ， ＃Ａ１１０１０）を添加し、３７℃、暗所にて６０分間インキュベートした。最後に洗浄操作を3回行い、セルカルチャーインサートプレートのメンブレンを切り取ってスライドガラスに乗せ、封入剤であるＶＥＣＴＡＳＨＩＥＬＤ ｗｉｔｈ ＤＡＰＩ（ＶＥＣＴＯＲ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＩＥＳ）を一滴乗せてカバーガラスを被せて観察用のスライドガラスを作製した。細胞はオールインワン蛍光顕微鏡ＢＺ－Ｘ７００（Ｋｅｙｅｎｃｅ）を用いて観察した。

[0097] ４．４ 結果

上記（１）～（３）と同様に単層膜に対して各刺激を行い、炎症性サイトカインおよびＬＰＳ刺激は４８時間、酸化ストレス刺激は６時間後に、タイトジャンクションを構成するタンパク質であるＺＯ－１を免疫染色して各単層膜を観察したもの（図７中－のもの）、あるいは、ＺＯ－１を免疫染色したものに、上記（１）～（３）と同様にして各刺激するのと同時にYIT 13021を添加した後、単層膜を観察したもの（図７中＋のもの）でYIT 13021のバリア機能の保護作用を評価した（図７）。ＬＰＳ刺激、炎症性サイトカイン刺激、酸化ストレス刺激に対するYIT 13021の保護作用を評価した結果、刺激のみではＺＯ－１の網目状の局在の一部が途切れており、細胞膜だけでなく細胞質にもＺＯ－１の存在が認められ、タイトジャンクションが乱れていることが確認できた。その一方、YIT 13021を刺激と同時に添加した単層膜では、ＺＯ－１の網目状の局在の途切れ、および細胞質における存在量が減っており、YIT 13021によりタイトジャンクションの乱れが抑えられていることが分かった。この結果から、タイトジャンクションタンパク質の局在の観点からも腸管バリアの保護作用が確認できた。

[0098] 実 施 例 ２

腸管バリア増強作用：

試験菌株として、YIT 13021およびYIT 4014を用いた。これらの腸管バリア機能への影響を検討するため、実施例１と同様に調製したＴ８４をセル

カルチャーインサートプレートに播種し、１０日間培養して単層膜を作製した。その単層膜のＡｐｉｃａｌ側にYIT 13021またはYIT 4014の加熱死菌体をそれぞれ添加し（刺激なし）、６時間後まで1時間ごとにＴＥＥＲ値を測定した（図８）。その結果、YIT 13021を添加した６時間後の単層膜において無処置のＣｔｒｌと比べ有意なＴＥＥＲ値の上昇がみられた（図９）。一方、YIT 4014を添加した単層膜においては無処置のＣｔｒｌと同程度であった。

[0099] この結果から、YIT 13021は腸管バリアの増強作用を有することが分かった。

[0100] 実　施　例　３

腸管バリア保護作用：

YIT 13021以外のビフィドバクテリウム・アドレッセンティスにもYIT 13021と同様の腸管バリア保護作用を試験した。ビフィドバクテリウム・アドレッセンティスとしては、YIT 13609（NITE BP-04064）、YIT 12828（NITE BP-04065）を用いた。

[0101] （１）ＬＰＳ刺激

実施例１の（１）ＬＰＳ刺激と同様にして単層膜のＡｐｉｃａｌ側にそれぞれの菌株の加熱死菌体を添加し、４８時間後にＴＥＥＲ値を測定した。その結果、添加から４８時間後において、YIT 13609、YIT 12828はYIT 13021と同等のＬＰＳ刺激に対する腸管バリア保護作用があることが分かった（図１０）。

[0102] （２）炎症性サイトカイン刺激

実施例１の（２）炎症性サイトカイン刺激と同様にして単層膜のＡｐｉｃａｌ側にそれぞれの菌株の加熱死菌体を添加し、４８時間後にＴＥＥＲ値を測定した。その結果、添加から４８時間後において、YIT 13609、YIT 12828はYIT 13021と同等の炎症性サイトカイン刺激に対する腸管バリア保護作用があることが分かった（図１１）。

[0103] （３）酸化ストレス刺激

実施例１の（３）酸化ストレス刺激と同様にして単層膜のＡｐｉｃａｌ側にそれぞれの菌株の加熱死菌体を添加し、６時間後にＴＥＥＲ値を測定した。その結果、添加から６時間後において、YIT 13609、YIT 12828はYIT 13021と同等の酸化ストレス刺激に対する腸管バリア保護作用があることが分かった（図１２）。

[0104] 実　施　例　４

腸管バリア増強作用：

試験菌株として、YIT 13021、YIT 13609およびYIT 12828を用いた。これらの腸管バリア機能への影響を検討するため、実施例１と同様に調製したＴ８４をセルカルチャーインサートプレートに播種し、１０日間培養して単層膜を作製した。その単層膜のＡｐｉｃａｌ側にYIT 13021、YIT 13609またはYIT 12828の加熱死菌体をそれぞれ添加し、２４時間後にＴＥＥＲ値を測定した。その結果、YIT 13609、YIT 12828はYIT 13021と同等の腸管バリアの増強作用を有することが分かった（図１３）。

[0105] 実　施　例　５

腸管バリア増強作用：

YIT 13021の生菌の腸管バリア機能への影響を検討するため、実施例１と同様に調製したＴ８４をセルカルチャーインサートプレートに播種し、１０日間培養して単層膜を作製した。その単層膜のＡｐｉｃａｌ側にYIT 13021の生菌または加熱死菌体を各濃度で添加し、２４時間後にＴＥＥＲ値を測定して比較した。その結果、加熱死菌体は、１０ μｇ/ｍＬの添加濃度から有意なＴＥＥＲ値の上昇が認められ（図１４）、生菌では1 μｇ/ｍＬの添加濃度から有意なＴＥＥＲ値の上昇が確認され、生菌の方が低濃度域からバリア増強作用を発揮することが分かった（図１５）。

[0106] 実　施　例　６

腸管バリア増強作用：

YIT 13021は、でんぷん顆粒に接着して資化する特徴を有しており、培養時におけるでんぷん顆粒の有無は菌体の性質に影響を及ぼす可能性がある。

そこで、ｍＧＡＭ培地中の炭素源をグルコースからでんぷん顆粒へと変更して培養したYIT 13021の生菌の腸管バリア機能への影響を検討した。実施例１と同様に調製したＴ８４をセルカルチャーインサートプレートに播種し、１０日間培養して単層膜を作製した。その単層膜のＡｐｉｃａｌ側にでんぷん顆粒存在下で培養したYIT 13021の生菌を各濃度で添加し、２４時間後にＴＥＲ値を測定して比較した。その結果、でんぷん顆粒存在下で培養したYIT 13021の生菌では０．１ μｇ/ｍＬの添加濃度から有意なＴＥＥＲ値の上昇が確認され、グルコースを炭素源として培養したYIT 13021の生菌（図１５）よりも、でんぷん顆粒と組み合わせて培養した生菌の方が低濃度域からバリア増強作用を発揮することが分かった（図１６）。

[0107] 実　施　例　７

ビフィドバクテリウム・アドレッセンティスの細胞壁多糖画分の腸管バリア保護作用：

ビフィドバクテリウム・アドレッセンティスに属する菌株を培養した後、溶菌処理をして細胞壁多糖画分を取得し、分析をした。

[0108] （１）菌株

菌株としてビフィドバクテリウム・アドレッセンティス YIT 13021 (NITE BP-03808)（以下、「YIT 13021」という）を用いた。

[0109] （２）培養

YIT 13021菌株を1% 溶性でんぷん（富士フィルム和光純薬 191-03985）を添加した変法GAM培地（以下「1% Starch mGAM」という）で、嫌気条件下、37℃で培養を行った。

[0110] （３）溶菌処理

2 mM $MgCl_2$含有5 mM Tris-maleate buffer (pH 6.8) の調製

Tris-maleate (Sigma 93328-25G) 1.91 g (8.05 mmol) を超純水800 mLに溶解し、0.1 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液（関東化学 37851-08）でpH 6.8に調製した。この液に超純水を加え、1.6 Lとし、0.2 μmフィルタ（Thermo 567-0020）でろ過滅菌した。ろ液270 mLに、塩化マグネシウム六水和物（関

東化学 25009-30）109.78 mg（0.540 mmol）を加え、2 mM $MgCl_2$含有5 mM Tris-maleate buffer（pH 6.8）を調製した。

[0111] 1% Starch mGAM培地から培養した生菌400 mg（乾燥菌体量）を、2 mM $MgCl_2$含有5 mM Tris-maleate buffer（pH 6.8）に13.9 mg/mLとなるように懸濁し、菌体1 mgに対してムラミダーゼとしてMutanolysinを4 U加え、37℃で振とうしながら24時間反応させた。

[0112] 残りの反応液を24℃、12,000 ×gで45分遠心し、不溶物を沈殿させ、上清を回収した。上清にヌクレアーゼとしてBenzonaseを菌体1 mgに対して1.4 U加え、37℃ で24時間反応させた。続いて、プロテアーゼとしてPronaseを菌体1 mgに対して0.006 mg加え、37℃ で振とうしながら24時間反応させた。分画分子量3,500の透析膜を用いて純水中、室温下、72時間透析を行った後、凍結乾燥することで細胞壁多糖画分（42.5 mg）を得た。

[0113] この細胞壁多糖画分の無刺激下でのＴＥＥＲ値を以下の方法に基づいて測定した。その結果を図１７に示した。この結果から細胞壁多糖画分に腸管バリアの保護作用があることが分かった。

[0114] ＜無刺激下のＴＥＥＲ値測定＞

T84単層膜は24ウェルセルカルチャーインサートプレート（Millipore）を用いて作製した。培養ディッシュにて80%コンフルエントのT84細胞を回収し、60,000 cells/wellとなるように400μLの10% FBS/F-12にてウェルのApical側に播種し、Basal側には800μLの10% FBS/F-12を添加し、5% CO_2、37℃で培養を行った。2～3日ごとにApical側に400μL、Basal側には800μLの培地で培地交換を行った。T84は培養を10日間行うことで単層膜を作製した。

[0115] 作製した単層膜のApicalに被験物質を各濃度で添加し、24時間後にMillicell MRS-2（Millipore）にて測定した実測抵抗値（Ω）をセルカルチャーインサートプレートの培養面積（cm^2）で割った値である経上皮電気抵抗（TEER）値（$Ω/cm^2$）により、バリアの増強作用を評価した。刺激開始から各経過時間後の単層膜のTEER値を、刺激開始直後である0時間時のTEER値で割ることにより、バリアの破綻を刺激開始時からの変化率（%）として算出した。

[0116] 実　施　例　８

分画分子量１万以下の画分の腸管バリア保護作用：

実施例７で得られた腸管バリアの保護作用のある細胞壁多糖画分を超純水で5 mg/mLになるように溶解し、以下の条件でSECを測定した。この結果を図１８に示した。

[0117] ＜サイズ排除クロマトグラフィ（Size Exclusion Chromatography, SEC）測定＞

カラム：Shodex SUGER KS-804（φ8.0 mm × 300 mm）

移動相：50 mM NaCl aq.

流速：1.0 mL/min

温度: 80℃

検出: refractive index detector (RI)

[0118] SECにより細胞壁多糖画分には分子量が１万、３万、１０万、４０万以上のものが含まれることが分かった。次にこれを分画分子量１０万の限外濾過膜（ミリポア、UFC910008）、分画分子量３万の限外濾過膜（ミリポア、UFC903008）、分画分子量１万の限外濾過膜（ミリポア、UFC901008）を用いて、分子量１０万以上、１０～３万、３～１万、１万以下のものに分画した。これらについて無刺激下でのＴＥＥＲ値を以下の方法に基づいて測定した。その結果を図１９に示した。

[0119] ＜無刺激下でのＴＥＥＲ値測定＞

上記実施例７の無刺激下でのTEER値測定と同様の測定を行った。

[0120] この結果から、分画分子量３万以下の画分（１～３万の画分および１万以下の画分）に活性があることが分かった。次に分子量１万以下の画分について親水性液体相互作用クロマトグラフィー（HILIC）分析を行った（図２０）。また、通液は２４回（計１．２ｍｇ）行い、各回、図２０中の１～４のフラクションを分取した（１（１６～２０．５分）：０．４５ｍｇ、２（２０．５～２２分）：０．２５ｍｇ、３（２２～２５分）：０．４０ｍｇ、４（５１～５６分）：０．２９ｍｇ）。

[0121] ＜HILIC分析＞

流速: 1.0 mL/min

移動相 A: MeCN, B: H_2O

グラジエント：0-3.3 min:A=95, B=5, 3.3-83.3 min: A=95→0, B=5→100

カラム: YMC-triart Diol HILIC (Φ4.6x250 mm, 5 μm)

温度: 40 ℃

注入量: 10 μL (5 mg/mL in H_2O)

[0122] 上記で得られた１～４の画分について、上記と同様にしてＴＥＥＲ値測定を行った。その結果を図２１に示した。分画２のみに腸管バリアの保護作用の増強が認められた。この分画２について^{1}Ｈ－ＮＭＲ（700 MHz in D_2O at 25℃）を用いて構造解析を行った。その結果を図２２に示した。

[0123] ＜^{1}Ｈ－ＮＭＲ構造解析＞

分画２を重水（関東化学 32070-1A）に溶解し、25℃で^{1}H-NMR（700 MHz）を測定した。

[0124] ^{1}Ｈ－ＮＭＲの結果から、分画２は■にシグナルを有することから、細胞壁前駆物質のウリジン二リン酸－Ｎ－アセチルムラミン酸－Ｌ－アラニン－Ｄ－グルタミン酸－Ｌ－リジンであることが分かった（文献値（表１）：Nicolas Gisch, et al., Bioorganic Med. Chem. Lett. 21. 3362. 2011）。構造を図２３に示した。また、ウリジン二リン酸－Ｎ－アセチルムラミン酸－Ｌ－アラニン－Ｄ－グルタミン酸－Ｌ－リジンの分子量は１００８であるが、分画２を質量分析したところ［Ｍ＋１］が１００８．８であった（図示せず）。分画２は細胞壁前駆物質を含んでいることから、これまで測定をしていた細胞壁多糖画分には細胞質内画分も含まれていることが分かった。

[0125] （ウリジン二リン酸－Ｎ－アセチルムラミン酸－Ｌ－アラニン－Ｄ－グルタミン酸－Ｌ－リジンのシグナル）

[0126] [表1]

Position	UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu-L-Lys 文献値)	UDP-MurNAc-L-Ala 誘導体
H-6_{U}	7.96 (d, J = 8.3 Hz, 1H)	7.93 (d, J = 7.8 Hz, 1H)
H-1_{Rib}	5.98 (d, J = 4.4 Hz, 1H)	5.98-5.98 (m, 1H)
H-5_{U}	5.97 (d, J = 8.2 Hz, 1H)	5.95 (d, J = 7.8 Hz, 1H)
H-1_{MurNA}	5.47 (dd, J = 7.0, 3.0 Hz, 1H)	5.46-5.45 (m, 1H)
H-2_{Rib}	4.39-4.35 (m, 1H)	4.35-4.12 (m, 10H)
H-3_{Rib}	4.38-4.34 (m, 1H)	
H-2_{iGlu}	4.32-4.28 (m, 1H)	
H-2_{Lys}	4.31-4.26 (m, 1H)	
CH_{Ala}	4.29 (q, J = 7.3 Hz, 1H)	
H-4_{Rib}	4.30-4.26 (m, 1H)	
C$H$$CH_{3MurNAc}$	4.27-4.21 (m, 1H)	
H-$5a_{Rib}$	4.26-4.21 (m, 1H)	
H-$5b_{Rib}$	4.21-4.16 (m, 1H)	
H-2_{MurNAc}	4.12 (ddd, J = 10.3, 2.8, 2.7 Hz, 1H)	
H-5_{MurNAc}	3.97-3.93 (m, 1H)	3.97-3.63 (m, 5H)
H-$6a_{MurNAc}$	3.88 (dd, J = 12.4, 1.9 Hz, 1H)	
H-$6b_{MurNAc}$	3.83 (dd, J = 12.3, 4.0 Hz, 1H)	
H-3_{MurNAc}	3.79 (dd, J = 9.7, 9.3 Hz, 1H)	
H-4_{MurNAc}	3.64 (dd, J = 9.7, 9.7 Hz, 1H)	
H-6_{Lys}	3.00 (t, J = 7.4 Hz, 2H)	2.99-2.98 (m, 2H)
H-4_{iGlu}	2.36 (t, J = 7.5 Hz, 2H)	2.30-2.28 (m, 2H)
H-$3a_{iGlu}$	2.22-2.15 (m, 1H)	2.15-2.14 (m, 1H)
$COCH_{3MurNAc}$	2.01 (s, 3H)	2.00 (s, 3H)
H-$3b_{iGlu}$	2.04-1.95 (m, 1H)	1.90-1.89 (m, 1H)
H-$3a_{Lys}$	1.92-1.84 (m, 1H)	1.82-1.77 (m, 2H)
H-$3b_{Lys}$	1.79-1.72 (m, 1H)	
H-5_{Lys}	1.73-1.64 (m, 2H)	1.69-1.65 (m, 2H)
H-4_{Lys}	1.47-1.41 (m, 2H)	1.44-1.41 (m, 2H)
CH_{3Ala}	1.43 (d, J = 7.2 Hz, 3H)	1.43 (d, J = 6.5 Hz, 3H)
CHC$H_{3MurNAc}$	1.39 (d, J = 6.7 Hz, 3H)	1.39 (d, J = 6.5 Hz, 3H)

[0127] 実　施　例　９

分画分子量１～３万の画分の腸管バリア保護作用：

実施例８で得られた分画分子量１～３万の画分についてHILIC分析を行った（図２４）。また、通液は４８回（計２．４ｍｇ）行い、各回、図２４中の１～４のフラクションを分取した（１（２２～３０分）：１．１９ｍｇ、２（３０～３５分）：１．２６ｍｇ、３（３５～４２．５分）：１．０１ｍｇ、４（５１．５～５７．５分）：０．７９ｍｇ）。

[0128] ＜HILIC分析＞

流速: 1.0 mL/min

移動相 A: MeCN, B: H_2O, 0-3.3 min: A=95, B=5, 3.3-83.3 min: A=95→0, B=5→100

カラム: YMC-triart Diol HILIC (φ4.6x250 mm, 5 μm)

温度: 40 ℃

注入量:10 μL (5 mg/mL in H_2O)

[0129] 上記で得られた１～４の画分について、上記と同様にしてＴＥＥＲ値測定を行った。その結果を図２５に示した。分画１および分画２に腸管バリアの保護作用の増強が認められた。この分画１および分画２について上記と同様にして^{1}Ｈ－ＮＭＲ（700MHz in D_2O at 25℃）を用いて構造解析を行った。その結果を図２６に示した。

[0130] この結果によれば、分画１と分画２はNMRが類似していたことから、同一物質であることが示唆された。また、5 ppm付近の●は８糖、1 ppm付近の●はラムノース由来のシグナルであった。次に、分画２の構成糖分析を行った。

[0131] ＜構成糖分析＞

構成糖分析は1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) 誘導化による定量を行った。検量線作成のための標準品にはL-Arabinose (Ara) 、6-deoxtalose (6dT) 、L-Fucose (Fuc) 、D-Galactosamine (GalN) 、D-Galactose (Gal) 、D-Galacturonic acid (GalA) 、D-Glucosamine (GlcN) 、D-Glucose (Glc) 、D-Glucuronic acid (GlcA) 、D-Mannose (Man) 、Muramic acid (MurA) 、L-Rhamnose (Rha) 、D-Ribose (Rib) 、D-Xylose (Xyl) を使用した。GlcN, Man, Rib, 6-Deoxy Tal, GlcA, GlcおよびXylの各糖の水溶液を混合し標準品混合液1として、0.0625、0.25、1および4 mMの濃度の溶液を調製した。同様に、MurA, GalN, Rha, GalA, Gal, AraおよびFuc各の糖の水溶液を混合し標準品混合液2として、0.0625、0.25、1および4 mMの濃度の溶液を調製した。内部標準には0.0625 mM D-Talose (Tal) を使用した。分画2を超純水で5 mg/mLになるように溶解して分析サンプルとした。

[0132] 超純水400 μLと8Mトリフルオロ酢酸水溶液 500 μLを各ねじ口試験管に添加し、分析サンプルまたは各濃度の標準品混合液1、2を100 μLを加え、フタをして撹拌した後、100℃で 2時間酸分解した。冷却後、遠心エバポレーターにて乾固した。400 μLの超純水を加え攪拌後、100 μLを新たなねじ口試験管に取り、内部標準100 μL、0.6 M 水酸化ナトリウム水溶液 100 μL、0.5 M PMPメタノール溶液 200 μLを加え、フタをして撹拌した後、70℃で30分間反応させた。冷却後、0.1 M 塩酸水溶液1 mLを加えて酸性とした。クロロホルム約1 mLで3回洗浄した。

[0133] クロロホルム洗浄後の水層を0.45 μmフィルタ（ミリポア UFC30HVNB）でろ過し、以下の条件でHPLC分析を行い、ピーク面積から各糖のモル数を各糖の標準品の検量線から算出した。4～6分析毎にカラム洗浄を行った。

[0134] （HPLC分析）

カラム温度: 40 ℃

カラム: Waters CORTECS UPLC T3（φ2.1 mm × 100 mm, 1.6 μm ）

流速: 0.3 mL/min

移動相: 10 mM トリエチルアミン（TEA）-ギ酸（FA） (pH4.7)/MeCN=75/25

測定時間: 8 min

検出: UV 245 nm

[0135] （カラム洗浄）

カラム温度: 40 ℃

流速: 0.3 mL/min

移動相: A H_2O, B MeCN

グラジエント: 0-3 min : A=75, B=25, 3-6 min : A=75→5, B=25→95, 6-9 min : A=5, B=95, 9-12 min : A=5→75, B=95→25%, 12-15 min : A=75, B=25

検出: UV 245 nm

[0136] 構成糖分析の結果から、分画２にはラムノース（Ｒｈａ）、グルコース（Ｇｌｃ）およびガラクトース（Ｇａｌ）が含まれており、比率はＲｈ

ａ：Ｇｌｃ：Ｇａｌ＝３．７：１．０：１．５であることが分かった（図２７）。繰り返し構造の糖数は、^{1}Ｈ－ＮＭＲの結果から、８糖と考えていたが、糖の比率が４：１：２あるいは３：１：１と考えられるため、５～７糖と考えた。以上のことから、限外濾過膜による分画分子量１～３万の画分から単離された活性本体の化学構造は、ラムノースが主糖で他にグルコースとガラクトースを含む５～７糖の繰り返し構造で、ラムノース、グルコース、ガラクトースが４～３：１：２～１の繰り返し構造であることが分かった（図２８）。

産業上の利用可能性

[0137] 本発明の腸管バリア保護剤は、腸管バリアの保護や、腸管バリアの破綻に関連する疾患の予防剤に利用できる。

規則 26,
02.04.2025

[138]

0-1	様式 PCT/RO/134 この寄託された微生物又はその他の生物材料に関する表示 (PCT規則13の2)は、	
0-1-1	右記によって作成された。	JPO-PAS i530
0-2	国際出願番号	
0-3	出願人又は代理人の書類記号	PF-240021-WO

1	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
1-1	段落番号	0019
1-3	寄託の表示	
1-3-1	寄託機関の名称	NPMD (独)製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター(NPMD)
1-3-2	寄託機関のあて名	日本国 〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室
1-3-3	寄託の日付	2023年 01月 24日 (24.01.2023)
1-3-4	受託番号	NPMD NITE BP-03808
1-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国
2	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
2-1	段落番号	0020
2-3	寄託の表示	
2-3-1	寄託機関の名称	NPMD (独)製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター(NPMD)
2-3-2	寄託機関のあて名	日本国 〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室
2-3-3	寄託の日付	2024年 01月 15日 (15.01.2024)
2-3-4	受託番号	NPMD NITE BP-04064
2-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国
3	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
3-1	段落番号	0021
3-3	寄託の表示	
3-3-1	寄託機関の名称	NPMD (独)製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター(NPMD)
3-3-2	寄託機関のあて名	日本国 〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室
3-3-3	寄託の日付	2024年 01月 15日 (15.01.2024)
3-3-4	受託番号	NPMD NITE BP-04065
3-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国

4	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
4-1	段落番号	0022
4-3	寄託の表示	
4-3-1	寄託機関の名称	NPMD (独)製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター(NPMD)
4-3-2	寄託機関のあて名	日本国 〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室
4-3-3	寄託の日付	2023年 01月 24日 (24.01.2023)
4-3-4	受託番号	NPMD NITE BP-03809
4-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国
5	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
5-1	段落番号	0023
5-3	寄託の表示	
5-3-1	寄託機関の名称	NPMD (独)製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター(NPMD)
5-3-2	寄託機関のあて名	日本国 〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室
5-3-3	寄託の日付	2023年 01月 24日 (24.01.2023)
5-3-4	受託番号	NPMD NITE BP-03810
5-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国
6	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
6-1	段落番号	0024
6-3	寄託の表示	
6-3-1	寄託機関の名称	NPMD (独)製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター(NPMD)
6-3-2	寄託機関のあて名	日本国 〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室
6-3-3	寄託の日付	2023年 01月 24日 (24.01.2023)
6-3-4	受託番号	NPMD NITE BP-03811
6-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国

7	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
7-1	段落番号	0025
7-3	寄託の表示	
7-3-1	寄託機関の名称	NPMD (独)製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター(NPMD)
7-3-2	寄託機関のあて名	日本国 〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室
7-3-3	寄託の日付	2023年 01月 24日 (24.01.2023)
7-3-4	受託番号	NPMD NITE BP-03812
7-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国

受理官庁記入欄

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

国際事務局記入欄

0-5	この用紙が国際事務局に受理された日	
0-5-1	権限のある職員	

請求の範囲

[請求項1] ビフィドバクテリウム・アドレッセンティスを有効成分とすることを特徴とする腸管バリア保護剤。

[請求項2] 腸管バリア保護が、ＬＰＳ刺激、炎症性サイトカイン刺激および酸化ストレス刺激から選ばれる１以上の刺激からの腸管バリアの保護である請求項１記載の腸管バリア保護剤。

[請求項3] 請求項１または２記載の腸管バリア保護剤を含有する腸管バリア破綻関連疾患予防剤。

[請求項4] 腸管バリア破綻関連疾患が、糖尿病、肥満、炎症性腸疾患、脂肪肝、パーキンソン病、がん、過敏性腸疾患、脂質異常症、アトピー、喘息、認知症、不眠症、うつ、関節リウマチから選ばれるものである請求項３記載の腸管バリア破綻関連疾患予防剤。

[請求項5] ビフィドバクテリウム・アドレッセンティスの細胞壁多糖画分および／または細胞質内画分を有効成分とする腸管バリア保護剤。

[請求項6] ラムノース、グルコース、ガラクトースが４～３：１：２～１の繰り返し構造であり、限外濾過膜による分画分子量が１～３万である多糖を有効成分とする腸管バリア保護剤。

[請求項7] ウリジン二リン酸－Ｎ－アセチルムラミン酸－Ｌ－アラニン－Ｄ－グルタミン酸－Ｌ－リジンを有効成分とする腸管バリア保護剤。

[請求項8] ラムノース、グルコース、ガラクトースが４～３：１：２～１の繰り返し構造であり、限外濾過膜による分画分子量が１～３万であることを特徴とする多糖。

[請求項9] ビフィドバクテリウム・アドレッセンティスを溶菌処理し、次いで、これを限外濾過膜により分画分子量が１～３万の画分を得て、更に、これを以下の条件またはこれと同等の条件で行われる親水性相互作用クロマトグラフィー、

［クロマトグラフィー条件］

流速：1.0 mL/min

移動相 A: MeCN, B: H_2O

グラジエント：0-3.3 min ：A=95, B=5, 3.3-83.3 min: A=95→0, B=5→100

カラム: YMC-triart Diol HILIC (φ4.6x250 mm, 5 μm)

温度: 40 ℃

注入量: 2～10 μL (5 mg/mL in H_2O)

溶出時間：22～35 min

で採取することを特徴とするラムノース、グルコース、ガラクトースが４～３：１：２～１の繰り返し構造であり、限外濾過膜による分画分子量が１～３万である多糖の製造方法。

[請求項10] 溶菌処理が、ムラミダーゼで処理をした後、ヌクレアーゼおよびプロテアーゼで処理するものである請求項９記載の多糖の製造方法。

[請求項11] 請求項５～７の何れか１に記載の腸管バリア保護剤を含有する腸管バリア破綻関連疾患予防剤。

[請求項12] 腸管バリア破綻関連疾患が、糖尿病、肥満、炎症性腸疾患、脂肪肝、パーキンソン病、がん、過敏性腸疾患、脂質異常症、アトピー、喘息、認知症、不眠症、うつ、関節リウマチから選ばれるものである請求項１１記載の腸管バリア破綻関連疾患予防剤。