明　細　書

発明の名称 ： 乳酸菌を用いた抗体価上昇剤

技術分野

[0001] 本発明は、乳酸菌を用いた抗体価上昇剤、例えばアジュバントに関する。

背景技術

[0002] 高齢者では、風邪やインフルエンザのような呼吸器感染や、ノロウイルス感染のような胃腸感染症は死に到る可能性があることが知られている。また、近年になって、妊婦では、風疹感染により、出生する子供における先天性疾患の発症のリスクが指摘され、妊婦本人のみならず、その周囲で妊婦と共同生活する人達などにも、その感染の予防が求められている。これらの高齢者、妊婦、子供の種々の感染症の予防や治療、さらにはインフルエンザや細菌などの予防や重症化への対策としてワクチンの接種が有用である。

[0003] また、学生のような若年成人においては、通常、免疫機能が高く、ワクチンの接種などの感染症の予防への意識が低いものの、若年成人でも、精神的なストレスなどによって、免疫力が低下し、感染症に罹りやすくなることが知られており、免疫力の増強については世代を問わず求められている。しかしながら、ワクチンの接種のみでは、抗体価が十分に上がらず、効果の持続期間が短くなるなど、その効果が十分に得られないこともあり、様々なワクチンのアジュバントが研究されている。

ワクチンは、ヒトや動物を能動免疫するための抗原の総称である。弱毒化した生きた病原体を用いる生ワクチン、殺したウイルスまたは病原細菌を用いる不活化または死菌ワクチン、それらの構成成分を用いるコンポーネントワクチン、および細菌の産物である毒素の不活物のトキソイドなどがある。また、ワクチンには、正常細胞には発現せず、がん細胞にのみ特異的に発現する抗原（がん抗原）を用いたがんの治療において使用されるがんワクチンも存在する。

[0004] ヤマノイモ科ヤマノイモ属の植物の地下茎を発酵処理して得た水溶性画分

のうち、分子量が1,000以上200,000以下の画分を有効成分として含有する感染防御剤が提案されている（特許文献１）。

[0005] また、免疫力の強化を目的として、免疫原性物質と共に経鼻投与する免疫アジュバントであり、アウレオバシジウム属（Aureobasidium sp.）の微生物の培養物から得られる培養組成物を有効成分として含有する、免疫アジュバントが提案されている（特許文献２）。

[0006] さらに、食品100ｇあたり、少なくとも10^6個のLactobacillus rhamnosus GG、および天然源から単離された少なくとも0.5ｇのβ－グルカンを含む食品、およびこれをワクチンに対する免疫応答を増大させるアジュバントとしても使用することが提案されている（特許文献３）。

[0007] また、70歳以上の健常な高齢者を対象とし、インフルエンザのワクチンを接種する4週間前から毎日、Lactobacillus casei DN-114 001を含むヨーグルト飲料を経口摂取することで、プラセボの非発酵乳飲料を経口摂取した場合に比べて、ワクチン株に特異的な抗体価が有意に上昇したことが報告されている（非特許文献１）。

[0008] さらに、Lactobacillus fermentum CECT5716菌体を経口摂取することで、インフルエンザに特異的なIgAが上昇したことが報告されている（非特許文献２）。

[0009] また、Bifidobacterium animalis ssp. lactis (BB-12(R)) の菌体および L. paracasei ssp. paracasei (L. casei 431(R)) を含む酸乳飲料を経口摂取することで、インフルエンザに特異的なIgG、IgG1、IgG3が上昇したことが報告されている（非特許文献３）。

[0010] また、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1の生成する酸性多糖類、およびLactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1をスターター菌として製造する発酵乳がNK細胞活性化作用を有することが報告されている（特許文献４）。

先行技術文献

特許文献

[0011] 特許文献1：特開平０４－２３５９２１号公報

特許文献2：国際公開第２０１２／０１４９７８号

特許文献3：特表２００８－５２９５３５号公報

特許文献4：特許第５１７７７２８号公報

非特許文献

[0012] 非特許文献1：Boge T, Remigy M, Vaudaine S, Tanguy J, Bourdet-Sicard R, Van der Werf S. “A probiotic fermented dairy drink improves antibody response to influenza vaccination in the elderly in two randomised control trials” Vaccine 2009; 27: 5677-5684.

非特許文献2：Olivares M, Diaz-Ropero MP, Sierra S, Lara-Villoslada F, Fonolla J, Navas M, Rodriguez JM, Xaus J. “Oral intake of Lactobacillus fermentum CECT5716 enhances the effects of influenza vaccination” Nutrition 2007; 23: 254-260.

非特許文献3：Rizzardini et al. “Evaluation of the immune benefits of two probiotic strain Bifdobacterium animalis ssp. lactis, BB-12 and Lactobacillus paracasei ssp. paracasei, L. casei 431 in an influenza vaccination model: a randomized, double-blind, placebo-controled study” Br. J. Nutr. 107: 876-884. 2012.

非特許文献4：Minna K. Salminen, Hilpi Rautelinf, Soile Tynkkynen, Tuia Poussa, Maiia Saxelinf, Ville Valtonen, and Asko Jarvinen. “Lactobacillus Bacteremia, Clinical Significance, and Patient Outcome, with Special Focus on Probiotic L. Rhamnosus GG” Clinical Infectious Diseases 2004:38(1 January):62-69

非特許文献5：Merja Rautio, Hannele Jousimies-Somer, Heikki Kauma, Ilmo Pietarinen, Maija Saxelin, Soile Tynkkynen, and Markku Koskela. “Liver Abscess Due to a Lactobacillus rhamnosus Strain Indistinguishable from L. rhamnosus Strain GG” Clinical Infectious Diseases 1999;28:1159-60

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0013] このように種々の研究、検討がなされているが、夫々、安全かつ簡易なアジュバントとはいえず、実用性が必ずしも十分ではなかった。

特許文献１に記載の発明は、長時間の培養およびろ過などの工程を要し、その製造方法が複雑であり、抗体価への影響については知られていない。また、特許文献２に記載の発明は、ワクチン接種と共に、アウレオバシジウム属の微生物の培養液そのものを経鼻または経口投与しており、容易なアジュバントの摂取を可能とするものではない。さらに、特許文献３に記載の発明は、Lactobacillus rhamnosus GGを用い、β－グルカンによってLactobacillus rhamnosus GGの増殖率の増大を助けるものであって、Lactobacillus rhamnosus GGがワクチンのアジュバントとして有益であるとしているが、そのアジュバント効果は確認しておらず、また、発酵乳のスターター菌として使用できるプロバイオティクス菌を提供するものではない。さらに、Lactobacillus rhamnosus GGは敗血症、肝膿腫の事例が報告されている（非特許文献４、非特許文献５）。

[0014] また、非特許文献１において、インフルエンザワクチンのアジュバント効果が示されたLactobacillus casei DN-114 001を含むヨーグルト飲料もまた、その発酵には、別途Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus およびStreptococcus thermophilusを必要とするものである。さらに、非特許文献２および３において、それぞれインフルエンザワクチンのアジュバント効果が示されたLactobacillus fermentum CECT5716、B. animalis ssp. lactis (BB-12(R))、およびL. paracasei ssp. paracasei (L. casei 431(R)) が、発酵乳などのスターターとして用いることのできるか否かは不明である。

[0015] また、特許文献４に記載の発明は、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1の生成する酸性多糖類、およびLactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1をスターター菌として製造する発酵乳であるが、ここで検討されている効果は、NK細胞の活性化であって、抗体価につい

ての影響は知られていない。

[0016] 上述の通り、様々なアジュバントが提案されているが、依然として、ワクチンの接種に基づく抗体価の上昇を増強することで、その効果を持続するアジュバントであって、安全であり、簡易に製造でき、世代を問わず気軽に摂取できるアジュバントは存在しない。

[0017] したがって、本発明の課題は、ワクチンなどの接種に基づく効果を持続する抗体価上昇剤、例えばアジュバントであって、安全かつ簡易で、経済的であり、世代を問わず気軽に摂取できる抗体価上昇剤、例えばアジュバントおよびその製造方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0018] 本発明者らは、上記の課題を解決するため、鋭意研究を重ねる中で、発酵乳のスターターとして用いることのできる、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1が抗体価上昇効果、例えばアジュバント効果を有することを見出し、さらに研究を進めた結果、本発明を完成するに至った。

[0019] すなわち、本発明は、以下に関する。

［１］

Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1および／またはその培養物を含有する、抗体価上昇剤。

［２］

アジュバントである、［１］に記載の抗体価上昇剤。

［３］

ワクチン用アジュバントである、［２］に記載の抗体価上昇剤。

［４］

感染症ワクチン用アジュバントである、［３］に記載の抗体価上昇剤。

［５］

感染症が、インフルエンザである、［４］に記載の抗体価上昇剤。

[0020] ［６］

培養物が、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1およ

びStreptococcus thermophilusを培養して得られる組成物である、［１］～［５］のいずれかに記載の抗体価上昇剤。

［７］

１個包装中の、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1を含む乳酸菌が9×10^{7}～10^{12}cfuである、［１］～［６］のいずれかに記載の抗体価上昇剤。

［８］

１個包装あたり、10～1000ｇまたは10～1000mlを含む、［１］～［７］のいずれかに記載の抗体価上昇剤。

［９］

［１]～[８]のいずれかに記載の抗体価上昇剤を包装してなる製品。

[0021] ［１０］

［１］～［８］のいずれかに記載の抗体価上昇剤を対象が摂取する、または対象に摂取させることを含む、抗体価を上昇させる方法（医療行為を除く）。

［１１］

一日あたり10～1000gまたは10～1000mlの抗体価上昇剤の摂取を、3週間以上継続する、［１０］に記載の方法。

［１２］

抗体価上昇剤の摂取をワクチン接種日の少なくとも１週間以上前から継続する、［１１］に記載の方法。

[0022] 本発明は、さらに以下にも関する。

［Ｉ］

Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1および／またはその培養物を含有する、アジュバント。

［ＩＩ］

アジュバントが、インフルエンザワクチン用のアジュバントである、［Ｉ］に記載のアジュバント。

［ＩＩＩ］

培養物が、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1およびStreptococcus thermophilusを用いて得られた培養物である、［Ｉ］または［ＩＩ］に記載のアジュバント。

［ＩＶ］

１個包装中の、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1を含む乳酸菌が9×10^{7}cfuである、［Ｉ］～［ＩＩＩ］のいずれかに記載のアジュバント。

［Ｖ］

１個包装あたり、10～1000ｇまたは10～1000mlである、［Ｉ］～［ＶＩ］のいずれかに記載のアジュバント。

［ＶＩ］

［Ｉ］～［Ｖ］のいずれかに記載のアジュバントを対象が摂取する、または対象に摂取させることを含む、ワクチン効果を増強する方法（医療行為を除く）。

［ＶＩＩ］

一日あたり10～1000gまたは10～1000mlの培養物の摂取を、3週間以上で継続する、［ＶＩ］に記載の方法。

[0023] ［ＶＩＩＩ］

Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1および／またはその培養物を対象が摂取する、または対象に摂取させることを含む、抗体価を上昇させる方法（医療行為を除く）。

［ＩＸ］

培養物が、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1およびStreptococcus thermophilusを用いて得られた培養物である、［ＶＩＩＩ］に記載の方法。

［Ｘ］

抗体価がインフルエンザ抗体価である、［ＶＩＩＩ］または［ＩＸ］に記

載の方法。

［ＸＩ］

一日あたり10～1000gまたは10～1000mlの培養物の摂取を、3週間以上で継続する、［ＶＩＩＩ］～［Ｘ］のいずれかに記載の方法。

発明の効果

[0024] 本発明では、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1および／またはその培養物により、医療的な疾患の予防や治療に利用することができるほか、特定保健用食品や一般的な食品として、健康の維持、増進に利用することができる。特に、抗体価を上昇させ、高く維持すること、およびワクチンの効果を増強させることができる。さらに、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1は発酵乳のスターター菌として用いることのできる菌株であるため、これを用いて、安全であり、簡易に製造でき、世代を問わず気軽に摂取できる抗体価上昇剤、例えばアジュバントを提供することができる。

図面の簡単な説明

[0025] [図1-1]インフルエンザA型H1N1の抗体価の推移を示す図である。

[図1-2]インフルエンザA型H3N2の抗体価の推移を示す図である。

[図1-3]インフルエンザB型の抗体価の推移を示す図である。

[図2-1]インフルエンザA型H1N1の抗体陽転率の推移を示す図である。

[図2-2]インフルエンザA型H3N2の抗体陽転率の推移を示す図である。

[図2-3]インフルエンザB型の抗体陽転率の推移を示す図である。

[図3-1]インフルエンザA型H1N1の抗体保有率の推移を示す図である。

[図3-2]インフルエンザA型H3N2の抗体保有率の推移を示す図である。

[図3-3]インフルエンザB型の抗体保有率の推移を示す図である。

[図4-1]マウスへの2回目の卵白アルブミン（OVA）免疫から1週間後（Day14）のOVA抗原に対するIgG1抗体価を示す図である。

[図4-2]マウスへの2回目のOVA免疫から1週間後（Day14）のOVA抗原に対するIgG2a抗体価を示す図である。

[図4-3]マウスへの2回目のOVA免疫から1週間後（Day14）のOVA抗原に対するIgG2b抗体価を示す図である。

[図5-1]マウスへの2回目のOVA免疫から2週間後（Day21）のOVA抗原に対するIgG1抗体価を示す図である。

[図5-2]マウスへの2回目のOVA免疫から2週間後（Day21）のOVA抗原に対するIgG2a抗体価を示す図である。

[図5-3]マウスへの2回目のOVA免疫から2週間後（Day21）のOVA抗原に対するIgG2b抗体価を示す図である。

[図5-4]マウスへの2回目のOVA免疫から2週間後（Day21）の総IgE抗体価を示す図である。

発明を実施するための形態

[0026] 本明細書における「Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1」は、独立行政法人 産業技術総合研究所　特許生物寄託センター（IPOD, AIST）（日本国　〒３０５－８５６６　茨城県つくば市東１丁目１番地１中央第６）に受領番号：FERM P-17227（識別のための表示：　Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1、寄託日（受領日）：平成11年2月19日）で平成11年2月22日に国内受託されており、平成18（2006）年11月29日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-10741が付与されている。

なお、Budapest Notification No. 282 (http://www.wipo.int/treaties/en/notifications/budapest/treaty_budapest_282.html)に記載される通り、独立行政法人製品評価技術基盤機構（IPOD, NITE）が独立行政法人 産業技術総合研究所　特許生物寄託センター（IPOD, AIST）より特許微生物寄託業務を承継したため、現在は、独立行政法人製品評価技術基盤機構（IPOD, NITE）（千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 120 号室）に寄託されている（受託番号FERM BP-10741）。

[0027] Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1および／またはその培養物は、抗体価を上昇させ、高く維持することができる。

本明細書において「培養物」とは、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1を培養して得られる組成物を意味し、菌体を培養した培養物それ自体、遠心分離などにより菌体を分離除去した培養物、培養物の濃縮液、培養物の希釈液、培養物から水分を除去した固形物などの、培養物を処理して得られる全ての状態のものが含まれる。なお、本明細書において「培養」はLactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1による発酵を含み、「培養物」はLactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1による発酵物、すなわちLactobacillus delbrueckii ssp.

[0028] Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1の培養は、一般的な方法に準じて行うことができる。例えば、生乳（未殺菌乳）、殺菌乳、全脂濃縮乳、全脂粉乳、脱脂乳、脱脂濃縮乳、脱脂粉乳、乳蛋白質濃縮物（MPC）、ホエイ、ホエイパウダー、脱塩ホエイ、脱塩ホエイパウダー、ホエイ蛋白質濃縮物（WPC）、ホエイ蛋白質分離物（WPI）、α－ラクトアルブミン（α－La）、β－ラクトグロブリン（β－Lg）、カゼイン、ナトリウムカゼイネート、カルシウムカゼイネート、クリーム、バター、糖類（乳糖を含む）、ミネラル、ビタミン、および／または酵母エキスを含んでいる培地に菌体を摂取し、温度35～45℃で、2～24時間、嫌気培養すればよい。典型的な培地としては、ホエイをプロテアーゼで処理したものに、酵母エキスを添加し、さらにpHを7程度に調整したものが挙げられる。

[0029] 本発明の一態様において、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1の培養温度は、30～45℃の範囲とすることが好ましい。特に、32～44℃の範囲とすることがより好ましく、34～43℃の範囲とすることがさらに好ましい。

本発明の一態様において、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1の培養時間は、1～24時間の範囲とすることが好ましい。特に、2～12時間の範囲とすることがより好ましく、3～8時間の範囲とすることがさらに好ましい。

なお、本発明の一態様において、前記培養温度と前記培養時間は、いかな

る組み合わせでもよいが、製造効率、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1の菌体数、培養物（発酵物）の酸度、風味などの観点から、好ましくは30～45℃で1～24時間、さらに好ましくは32～44℃で2～12時間、より好ましくは34～43℃で3～8時間培養（発酵）させる。

[0030] 本発明の一態様において、生産効率の観点から、培養物が、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1およびStreptococcus thermophilusを用いて得られた培養物、例えばLactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1およびStreptococcus thermophilusを培養して得られる組成物であることが好ましい。本発明において、Streptococcus thermophilusには、あらゆる菌株を用いることができるが、好ましくは、Streptococcus thermophilus OLS3059を用いることができる。

本明細書における、「Streptococcus thermophilus OLS3059」は、独立行政法人 産業技術総合研究所　特許生物寄託センター（IPOD, AIST）（日本国〒３０５－８５６６　茨城県つくば市東１丁目１番地１　中央第６）に受領番号：FERM P-15487（識別のための表示：　Streptococcus thermophilus OLS3059、寄託日（受領日）：平成8年2月29日）で平成8年2月29日付にて国内受託されており、平成18（2006）年11月29日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-10740が付与されている。

なお、Budapest Notification No. 282 (http://www.wipo.int/treaties/en/notifications/budapest/treaty_budapest_282.html)に記載される通り、独立行政法人製品評価技術基盤機構（IPOD, NITE）が独立行政法人 産業技術総合研究所　特許生物寄託センター（IPOD, AIST）より特許微生物寄託業務を承継したため、現在は、独立行政法人製品評価技術基盤機構（IPOD, NITE）（千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 120 号室）に寄託されている（受託番号FERM BP-10740）。

[0031] 本明細書において、「抗体価」とは、抗原に対して産生された抗体の量を示す指標を意味し、典型的には、赤血球凝集抑制試験（hemagglutination inhibition test ：HI法）、酵素結合免疫吸着法（enzyme-linked immunosorbe

nt assay：ELISA法）、酵素抗体法（enzyme immunoassay：EIA法）、ラテックス免疫比濁法（latex turbidimetric immunoassay：LTI法）などの方法により測定することができる。

[0032] 抗体価の例としては、インフルエンザ、麻疹、流行耳下腺炎、風疹、水痘、ジフテリア、破傷風、百日咳などのウイルスや細菌などによる感染症の病原体に対する抗体価、または前立腺がんなどのがん抗原に対する抗体価が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、ワクチンにより予防や治療が可能な疾患などの病原体に対する抗体価および、ウイルス性疾患の病原体ウイルスに対する抗体価などが挙げられ、特に好ましくは、インフルエンザ、麻疹、風疹などの、ワクチンの接種が推奨される感染症の病原体に対する抗体価が挙げられる。

[0033] 本明細書において「抗体」とは、リンパ球のうちB細胞の産生する糖タンパク分子であり、抗原を認識して結合する働きを有する分子を意味する。また、抗体は定常領域の構造の違いにより、いくつかのクラス（アイソタイプ）に分けられる。哺乳動物では、定常領域の構造の違いによりIgG、IgA、IgM、IgD、IgEの5種類のクラスの免疫グロブリンに分類され、各クラスはさらにサブクラスに分類される。なお、本明細書では、「抗体」とは、上述のクラス・サブクラスの総称を意味する。

抗体のエフェクター機能は、抗体のFc領域が担う機能であり、抗体クラスに大きく依存する。補体活性化能はIgMとIgGクラスの抗体に限られ、抗体の可変領域が結合した細胞を溶解させる機能を特にCDC（補体依存性細胞障害）と呼ぶ。また、IgG、IgE、IgAクラスの抗体のFc領域はそれぞれに特異的なFc受容体に結合し、Fc受容体をもつ細胞を活性化したり、抗体の細胞間トランスポートに働く。特に、IgGクラス抗体がT細胞、NK細胞、好中球、マクロファージ上のFc受容体を介して、これらのエフェクター細胞を活性化し，抗体の可変領域が結合した標的細胞を殺すことをADCC（抗体依存性細胞障害）と呼ぶ。

本発明の一態様において、「抗体価」はIgG抗体価である。

[0034] 本発明は、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1および／またはその培養物を摂取する、または摂取させることを含む、抗体価を上昇させる方法を提供する。ここで、抗体価を上昇させる方法には、医者による医療行為および非医療行為が含まれる。

[0035] 本明細書において、「摂取」とは、体内に取り込むことを意味し、例えば、飲食、吸入、経管栄養法などによるものが挙げられる。典型的には経口摂取、経腸摂取が挙げられるが、これらに限定されない。

本発明の一態様において、経口摂取、特に、飲食による摂取が好ましい。

本明細書において、「対象」とは、本発明の抗体価上昇剤、例えばアジュバントを適用する対象を意味し、例えば、ヒトを含む哺乳動物が挙げられ、好ましくは、ヒトである。

[0036] 本明細書において、「摂取させる」とは、視覚的および／または聴覚的に特定の目的、効果を謳って、直接的または間接的に対象に摂取させることをいい、例えば、製造業者が販売業者もしくは消費者に対し、または販売業者が消費者に対し、特定の目的、効果を謳って、対象に摂取させることを提案、示唆、指示する行為が挙げられる。

[0037] さらに、本発明は、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1および／またはその培養物を含有する抗体価上昇剤を提供する。

本明細書において「抗体価上昇剤」とは、抗体の産生を誘導し、抗体価を上昇させ、高く維持する物質およびそれを含む組成物を意味する。

本発明において、抗体価上昇剤は、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1それ自体、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1の培養物それ自体、およびこれらを含む組成物を包含する。

[0038] 本発明において、抗体価上昇剤は、摂取に適している限りは、あらゆる形態をとることができる。例えば、医薬品、医薬部外品、保健機能食品、特定保健用食品、栄養機能食品、一般食品、健康補助食品、健康食品、サプリメント、経腸栄養剤、口腔化粧品、飼料などが挙げられるが、これらに限定されない。

本発明の一態様において、抗体価上昇剤は、嗜好性の観点から、発酵乳それ自体の形態とすることもできる。

本発明の好ましい態様において、抗体価上昇剤は、製造効率の観点から、プレーンヨーグルト、ハードヨーグルト、ソフトヨーグルト、ドリンクヨーグルトなどのヨーグルトである。

本発明の一態様において、保存性などの観点から、顆粒、錠剤、タブレット、カプセルなどの形態とすることができる。

[0039] 本発明の一態様において、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1および／またはその培養物が液状である場合には、１日あたり5～1000ml、より好ましくは50～500ml、さらに好ましくは100～200ml摂取することが、摂取の容易性および抗体価上昇効果の観点から望ましい。

本発明の一態様において、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1および／またはその培養物が固形または半固形状である場合には、１日あたり、5～1000ｇ、より好ましくは50～500ｇ、さらに好ましくは100～200ｇ摂取することが、摂取の容易性および抗体価上昇効果の観点から望ましい。

本発明の一態様において、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1および／またはその培養物が乾燥体である場合には、１日あたり、0.1～50g、より好ましくは0.5～10g、さらに好ましくは1～5g摂取することが、摂取の容易性および抗体価上昇効果の観点から望ましい。

[0040] 本発明の一態様において、１回の摂取に適切な量を１個包装の形態とすることにより、安定した抗体価上昇効果を奏することのできる抗体価上昇剤を提供することができる。

本発明の一態様において、抗体価上昇剤は、上述の1日の摂取に適切な量で１個包装とすることができる。

したがって、本発明の一態様において、抗体価上昇剤は、上述の量のLactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1および／またはその培養物を含んだ抗体価上昇剤とすることができる。

本発明は、抗体価上昇剤を包装してなる製品も提供する。かかる包装製品は、１回の摂取に適切な数量を個包装した製品、複数の日数、例えば1週間分の摂取に適切な数量をまとめて包装した製品、または複数の個包装を含む製品などとすることができる。

[0041] 本発明の一態様において、抗体価上昇剤は、１個包装に、9×10^{7}cfu以上、好ましくは9×10^{8}cfu以上、さらに好ましくは9×10^{9}cfu以上のLactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1を含む乳酸菌を含む。

または、本発明の一態様において、抗体価上昇剤は、１個包装に、9×10^{7}～10^{12}cfu、好ましくは9×10^{8}～10^{12}cfu、さらに好ましくは9×10^{9}～10^{11}cfuのLactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1を含む乳酸菌を含む。

[0042] 本明細書において、「個包装」はあらゆる形態を包含し、例えば、蓋付きの容器、キャップ付きのボトル、個袋、パウチ、チューブ、ブリスターパック、アンプルなどの一般的な包装形態を含む。また、カプセル、オブラートなどの可食性フィルムなどの包装ごと摂取可能な包装形態をも含む。

本明細書において、「包装」は、上述の様な、あらゆる包装形態によって包装することを含む。

本発明の一態様において、各個包装、または複数の個包装を含む包装に、当該製品の用途、効能、機能、有効成分の種類、機能性成分の種類、摂取方法などの説明を記載すること、および／または、記載物、例えば説明書、添付文書などを加えたパッケージとすること、および／または、別途パンフレットなどの記載物を掲示することなどにより、その用途を明確とすることができる。

[0043] 本発明の一態様において、本発明の抗体価上昇剤に、その用途、効能、機能、有効成分の種類、機能性成分の種類、摂取方法などの説明を表示することが好ましい。「表示」は、医薬品、医薬部外品、保健機能食品、特定保健用食品、栄養機能食品、一般食品、健康補助食品、健康食品、サプリメント、経腸栄養剤、口腔化粧品、および飼料それぞれにおいて適した表示とする

ことができる。

本願明細書において「表示」は、需要者に対して上記説明を知らしめるための全ての表示が含まれ、上記表示内容を想起・類推させうるような表示であれば、表示の目的、表示の内容、表示する対象物・媒体などの如何に拘わらず、あらゆる全ての表示を含む。例えば、製品の包装・容器に上記説明を表示すること、製品に関する広告、価格表もしくは取引書類に上記説明を表示して展示もしくは頒布すること、またはこれらを内容とする情報を電磁気的（インターネットなど）方法により提供することが挙げられる。

[0044] 本発明の一態様において、抗体価上昇剤を包装してなる製品は、例えば抗体価上昇剤が飲食品である場合、抗体価を上昇させるためとの用途が表示された飲食品、例えば「抗体価上昇用」と表示された抗体価上昇効果を有する飲食品、「抗体価上昇用」と表示されたLactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1を含有する飲食品、あるいは「免疫力改善用」と表示されたLactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1を含有する飲食品などとすることが好ましい。

なお、以上のような表示を行うために使用する文言は、例えば「抗体価上昇用」あるいは「免疫力改善用」という文言のみに限られるわけではなく、それ以外の文言であっても、抗体価上昇効果を表す文言であれば、本発明の範囲に包含されることはいうまでもない。そのような文言としては、例えば、需要者に対して、抗体価上昇効果を認識させるような種々の用途に基づく表示も可能である。

[0045] 一方、表示される内容としては、行政などによって認可された表示（例えば、行政が定める各種制度に基づいて認可を受け、そのような認可に基づいた態様で行う表示）であることが好ましく、そのような表示内容を、包装、容器、カタログ、パンフレット、ＰＯＰなどの販売現場における宣伝材、その他の書類などへ付することが好ましい。

また、例えば、医薬品、医薬部外品、保健機能食品、特定保健用食品、栄養機能食品、一般食品、健康補助食品、健康食品、サプリメント、経腸栄養

剤、口腔化粧品、および飼料などとしての表示を例示することができる。特に、各国の制度において認可される機能性等に関する表示、例えば、日本における消費者庁によって認可される表示、例えば、特定保健用食品制度、これに類似する制度にて認可される表示を例示できる。特定保健用食品としての表示、条件付き特定保健用食品としての表示、身体の構造や機能に影響を与える旨の表示、疾病リスク低減表示などを例示することができ、詳細にいえば、健康増進法に定められた特定保健用食品としての表示（特に保健の用途の表示）、およびこれに類する表示が、典型的な例として列挙することが可能である。

[0046] 本発明の一態様において、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1および／またはその培養物、ならびにこれらを含む抗体価上昇剤の摂取は、3週間以上、好ましくは5週間以上、より好ましくは8週間以上で継続することが、抗体価上昇効果を高めるために望ましい。

[0047] Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1および／またはその培養物は、安全に摂取できるため、摂取期間の上限は特に制限されず、永久的に継続することが可能である。十分に有効な抗体価上昇効果が得られる観点から、12週間程度までを目安とすることもできる。

[0048] 本発明の一態様において、抗体価上昇剤は、アジュバントである。

本明細書において「アジュバント」とは、典型的には、免疫アジュバントを意味し、免疫誘導に際し、抗原の投与による抗体産生能を高める成分またはそれを含む組成物である。

本発明において、「アジュバント」は、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1それ自体、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1の培養物それ自体、およびこれらを含む組成物を包含する。

[0049] 本発明において、アジュバントはあらゆる形態をとることができ、例えば、医薬品、医薬部外品、保健機能食品、特定保健用食品、栄養機能食品、一般食品、健康補助食品、健康食品、サプリメント、経腸栄養剤、口腔化粧品、飼料などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0050] 本発明の一態様において、アジュバントは、嗜好性の観点から、発酵乳それ自体の形態とすることができる。

本発明の好ましい態様において、アジュバントは、製造効率の観点から、プレーンヨーグルト、ハードヨーグルト、ソフトヨーグルト、ドリンクヨーグルトなどのヨーグルトである。

本発明の一態様において、保存性などの観点から、錠剤、タブレット、カプセルなどの形態とすることができる。

[0051] 本発明の抗体価上昇剤、例えばアジュバントを摂取すること、または摂取させることにより、ワクチン効果を増強することができる。

本明細書において、「ワクチン」とは、感染症の予防および治療に用いる医薬組成物を意味する。また、当該ワクチンには、がん抗原も含まれ、がんの治療においてがんワクチンとして使用されるワクチンも含む。ワクチンは、1または2以上の、病原性を消失または弱めた病原体、がん抗原および任意に、1または2以上の、一般的なアジュバント、キャリアなどの添加剤を含んでもよい。

[0052] ワクチンの具体例として、インフルエンザワクチン、麻疹ワクチン、流行耳下腺炎ワクチン、風疹ワクチン、MRワクチン、MMRワクチン、水痘ワクチン、MMRVワクチン、ジフテリアワクチン、破傷風ワクチン、百日咳ワクチン、DTPワクチン、不活性化ポリオウイルスワクチン、B型肝炎ウイルスワクチン、髄膜炎菌結合体ワクチン、RSウイルスワクチン、ヒトパピローマウイルスワクチン、がんワクチンなどが挙げられるが、これらに限定されない。

[0053] 本明細書において、「ワクチン効果の増強」とは、ワクチン株に特異的な抗体価が上昇することを意味する。

本明細書において、「ワクチン効果を増強する方法」とは、医師による医療行為、および非医療行為の両方を含む。

[0054] 本発明の抗体価上昇剤、例えばアジュバントは、ワクチンとの混合物の形態とすることも、ワクチンとは別の個別の形態とすることもできる。本発明の一態様において、長期的な摂取が可能となること、様々な種類および形態

のワクチンと組み合わせることが可能となることなどの利点が存在することから、ワクチンとは別の個別の形態とすることが好ましい。

[0055] 本発明の抗体価上昇剤、例えばアジュバントは、ワクチン接種と同時に摂取することも、ワクチン接種の前後に摂取することもできる。

本発明の一態様において、抗体価上昇効果、例えばアジュバント効果を高めるために、抗体価上昇剤、例えばアジュバントを、ワクチン接種の前および／または後に、4週間以上、好ましくは6週間以上、さらに好ましくは8週間以上で摂取することが好ましい。

[0056] 本発明の一態様において、抗体価上昇効果、例えばアジュバント効果を高めるために、抗体価上昇剤、例えばアジュバントを、ワクチン接種日の1週間以上前から、好ましくは2週間以上前から、より好ましくは3週間以上前から摂取する。

本発明の一態様において、抗体価上昇効果、例えばアジュバント効果を高めるために、抗体価上昇剤、例えばアジュバントを、ワクチン接種日から、1週間以上、好ましくは3週間以上、より好ましくは5週間以上で継続して摂取する。

[0057] 本発明の一態様において、抗体価上昇剤、例えばアジュバントが液状である場合には、１日あたり、10～1000ml、より好ましくは50～500ml、さらに好ましくは100～200mlの抗体価上昇剤、例えばアジュバントを摂取することが、摂取の容易性および抗体価上昇効果、例えばアジュバント効果の観点から望ましい。

本発明の一態様において、抗体価上昇剤、例えばアジュバントが固形または半固形状である場合には、１日あたり、10～1000g、より好ましくは50～500g、さらに好ましくは100～200gの抗体価上昇剤、例えばアジュバントを摂取することが、摂取の容易性および抗体価上昇効果、例えばアジュバント効果の観点から望ましい。

本発明に一態様において、抗体価上昇剤、例えばアジュバントが乾燥体である場合には、１日あたり、0.1～50g、より好ましくは0.5～10g、さらに好

ましくは1～5gの抗体価上昇剤、例えばアジュバントを摂取することが、摂取の容易性および抗体価上昇効果、例えばアジュバント効果の観点から望ましい。

[0058] 本発明の一態様において、抗体価上昇剤、例えばアジュバントは、1回の摂取に適切な量を1個包装の形態とすることにより、より正確に本発明の効果を奏することのできる抗体価上昇剤、例えばアジュバントを提供することができる。

したがって、本発明の一態様において、抗体価上昇剤、例えばアジュバントは、上述の1日の摂取に適切な量で１個包装とすることができる。

[0059] 本発明の一態様において、抗体価上昇剤、例えばアジュバントは、１個包装に、9×10^{7}cfu以上、好ましくは9×10^{8}cfu以上、さらに好ましくは9×10^{9}cfu以上のLactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1を含む乳酸菌を含む。

または、本発明の一態様において、抗体価上昇剤、例えばアジュバントは、１個包装に、9×10^{7}～10^{12}cfu、好ましくは9×10^{8}～10^{12}cfu、さらに好ましくは9×10^{9}～10^{11}cfuのLactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1を含む乳酸菌を含む。

[0060] 本発明において、抗体価上昇剤、例えばアジュバントの摂取は、ワクチン接種の前後を問わず、3週間以上、好ましくは5週間以上、より好ましくは8週間以上で継続することが、抗体価上昇効果、例えばアジュバント効果を高めるために望ましい。

[0061] 本発明の抗体価上昇剤、例えばアジュバントは、ワクチンの接種の有無にかかわらず、安全に摂取できるため、摂取期間の上限は特に制限されず、永久的に継続することが可能である。十分に有効な抗体価上昇効果、例えばアジュバント効果が得られる観点から、12週間程度までを目安とすることもできる。

[0062] 本願発明の一態様において、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1またはその培養物を含有する、飲食品、発酵食品、発酵飲料など

が挙げられる。発酵食品、発酵飲料の例としては、例えば、ヨーグルト、チーズ、キムチ、ピクルス、ザワークラウト、ラッシー、ドリンクヨーグルトなどの乳酸発酵飲食品が挙げられる。

[0063] 本発明の一態様において、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1の培養物は、嗜好性の観点から発酵乳それ自体であることが好ましい。

本発明の一態様において、生産効率および嗜好性の観点から、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1およびStreptococcus thermophilusを用いて得られた発酵乳、例えば、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1およびStreptococcus thermophilusをスターターとして用いた発酵により得られた発酵乳を、培養物として選択することが好ましい。

[0064] 本明細書において「発酵乳」とは、乳を発酵させたものをいい、乳及び乳製品の成分規格等に関する省令（乳等省令）で定義される「発酵乳」、「乳酸菌飲料」、「乳飲料」、「ナチュラルチーズ」などを包含する。例えば、発酵乳は、乳等省令で定義される「発酵乳」、すなわち、生乳、牛乳、特別牛乳、生山羊乳、殺菌山羊乳、生めん羊乳、成分調整牛乳、低脂肪牛乳、無脂肪牛乳および加工乳などの乳またはこれと同等以上の無脂乳固形分を含む乳などを、乳酸菌または酵母で発酵させ、固形状（ハードタイプ）、糊状（ソフトタイプ）または液状（ドリンクタイプ）にしたもの、または、これらを凍結したものをいう。

[0065] 発酵乳の典型例としては、ヨーグルトが挙げられる。国連食料農業機構(FAO)／世界保健機構(WHO)の定義した、国際規格にも「ヨーグルトと称される製品は、Streptococcus thermophilus、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricusの両方の菌の乳酸発酵作用により、乳及び脱脂粉乳などの乳製品から作られるもので、最終製品中には前述の2つの菌が多量に生存しているもの」と規定される。本明細書において、「ヨーグルト」とは、前記のFAO/WHOの定義するヨーグルトを包含するものである。

[0066] 本発明の一態様においては、発酵乳が、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricusをスターター菌として用いて製造する発酵乳、特に、プレーンヨーグルト、ハードヨーグルト（セットタイプヨーグルト）、ソフトヨーグルト、ドリンクヨーグルトなどのヨーグルトであることが好適である。

[0067] 本発明に一態様において、生産効率および嗜好性の観点から、発酵乳が、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1およびStreptococcus thermophilusをスターター菌として製造した発酵乳であることが好ましい。

[0068] 以下、本発明を実施例に基づいて、さらに詳細に説明するが、本発明は、これらの実施例に限定されるものではなく、本発明の技術的な思想を逸脱しない範囲で種々の変更が可能である。

実施例

[0069] ［製造例１］Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1の培養物およびプラセボの製造

乳製品、砂糖、原料水を含む混合物Aに、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1およびStreptococcus thermophilus OLS3059をスターターとして添加して43℃で、4時間発酵させ、これに、ぶどう糖果糖液糖、砂糖、ペクチン、香料、ステビア、および原料水を含む混合物Bを添加し、ドリンクタイプのヨーグルト（以下「ヨーグルトR-1のドリンクタイプ」と称する）を製造した。

上述の混合物Aおよび混合物Bと同一の原料を同一の配合比で混合し、これに、乳酸を添加し、酸乳飲料（以下「プラセボ飲料」）を製造した。

ヨーグルトR-1のドリンクタイプおよびプラセボ飲料、それぞれをキャップ付きペットボトルに、112mlで充填した。

[0070] ［実施例１］

＜摂取計画＞

男子大学生の40名（平均年齢：19.4歳（18～25歳））を対象にして、無作為化二重盲検プラセボコントロール試験を実施した。

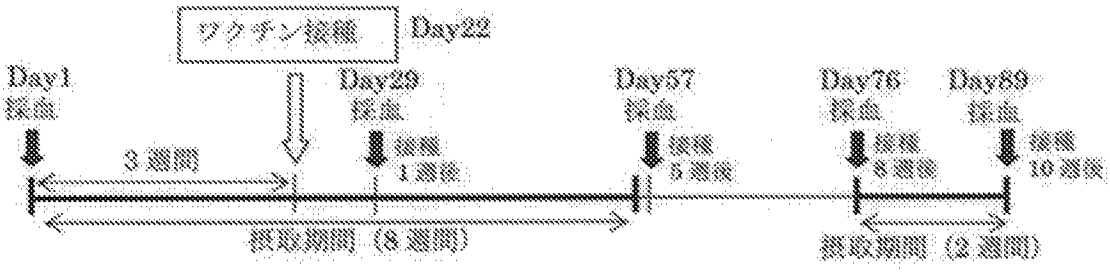
被験者を2群に分け、一方のグループには、製造例１において製造した、ヨーグルトR-1のドリンクタイプを１本（112 ml）/day（R-1摂取群）で、他方のグループには、製造例１において製造した、プラセボ飲料を１本（112 ml）/day（プラセボ群）で摂取させた。これらの摂取期間は、冬季休暇前の8週間および冬季休暇後の2週間であった。試験の開始から3週間後に、インフルエンザワクチン（A型H1N1、A型H3N2、B型の3種の混合）を接種した。

[0071] ＜評価項目＞

ヨーグルトR-1のドリンクタイプやプラセボ飲料の摂取開始日（Day1）、インフルエンザワクチンの接種から1週間後（Day29）、インフルエンザワクチンの接種から5週間後（Day57）、インフルエンザワクチンの接種から約8週間後（Day76）、インフルエンザワクチンの接種から約10週間後（Day89、ヨーグルトR-1のドリンクタイプやプラセボ飲料の摂取終了日）に採血を行い、インフルエンザ特異的抗体価をHI法で測定した。

これらのスケジュールを下記表１に示す。

[0072] [表1]



[0073] その結果として、インフルエンザワクチン（A型H1N1、A型H3N2、B型の3種の混合）の接種から約8週間後に、R-1摂取群では、プラセボ群に比べ、インフルエンザA型H3N2の抗体価が有意に高い数値を示した（図1-2）。

このとき、R-1摂取群では、プラセボ群に比べ、インフルエンザA型H1N1の抗体価が全体的に低い数値を示した（図1-1）。

なお、R-1摂取群では、プラセボ群に比べ、インフルエンザB型の抗体価が高い数値を示した（図1-3）。

[0074] ここで、「抗体価」とは、次の意味である。

＜抗体価＞

ウイルスに感染すると血清中に抗体を産生するが、ウイルスなどの抗原に対して産生された抗体の量を示す指標である。

例えば、インフルエンザウイルスは動物の赤血球を互いに凝集させる性質を持っている。血液中に抗体が存在していると、ウイルスの抗原と抗体で抗原抗体反応が起こり、赤血球凝集能が抑制される。この性質を利用して、血液中の抗ウイルス抗体量を測定する方法が赤血球凝集抑制試験であり、麻疹、風疹のウイルスなどの「抗体価」の測定に用いられる。

具体的には、血清を所定の希釈倍数で希釈し、一定量のウイルスを加えて反応させる。そこへ赤血球浮遊液を加え、赤血球の凝集が抑制される希釈倍数を観察する。赤血球の凝集が完全に抑制された最終の希釈倍数をHI「抗体価」とする。

[0075] 一方、インフルエンザワクチン（A型H1N1、A型H3N2、B型の3種の混合）の接種から約5週間後に、R-1摂取群では、プラセボ群に比べ、インフルエンザA型H1N1とA型H3N2の抗体陽転率が有意に高い数値を示した（図2-1、図2-2）。

また、インフルエンザA型H3N2の抗体陽転率は、R-1摂取群では、インフルエンザワクチンの接種から約8週間後に、ワクチンの有効性の国際的な基準（欧州医薬品庁の基準）とされる40%を上回ったのに対し、プラセボ群では、インフルエンザワクチンの接種後にも、40%を上回らなかった（図2-2）。

インフルエンザB型の抗体陽転率は、R-1摂取群では、インフルエンザワクチンの接種後に常に、40%を上回ったのに対し、プラセボ群では、インフルエンザワクチンの接種から約8週間後に、40%を下回った（図2-3）。

図2-1～図2-3中の40%を示す破線は、ワクチンの有効性の国際的な基準（欧州医薬品庁の基準）である。

[0076] ここで、「抗体陽転率」とは、次の意味である。

＜抗体陽転率＞

HI「抗体価」がワクチンの接種前に10未満であって、ワクチンの接種後に40以上、または、HI「抗体価」がワクチンの接種前に10以上であって、ワクチ

ンの接種後に4倍以上に上昇した被験者の割合である。

[0077] インフルエンザA型H1N1とA型H3N2の抗体保有率は、R-1摂取群、プラセボ群ともに、インフルエンザワクチンの接種前から、ワクチンの有効性の国際的な基準（欧州医薬品庁の基準）とされる70%を上回っていた（図3-1、図3-2）。

インフルエンザB型の抗体保有率は、R-1摂取群では、ワクチンの接種から1週間後と、約5週間後に、インフルエンザワクチンの有効性の基準とされる70%を上回ったのに対し、プラセボ群では、インフルエンザワクチンの接種後にも、70%を上回らなかった（図3-3）。

図3-1～図3-3中の70%を示す破線は、ワクチンの有効性の国際的な基準（欧州医薬品庁の基準）である。

[0078] ここで、「抗体保有率」は、次の意味である。

＜抗体保有率＞

HI「抗体価」が40倍以上の人の割合である。

[0079] インフルエンザA型H3N2、B型は、新規ワクチン株であることから、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1および／またはその培養物の摂取は、新規のインフルエンザワクチンに対して、より高い抗体価上昇効果、例えば、アジュバント効果を発揮する可能性が示唆された。

[0080] 以上の結果から、通常の免疫機能が高い学生のような若年成人においても、本発明の、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1および／またはその培養物を摂取することにより、抗体価が上昇することが理解される。

若年成人において、抗体価を上昇させることができることから、高齢者、妊婦、子供などを含む、広い世代において、抗体価の上昇をもたらすことが推察された。

[0081] ［実施例２］

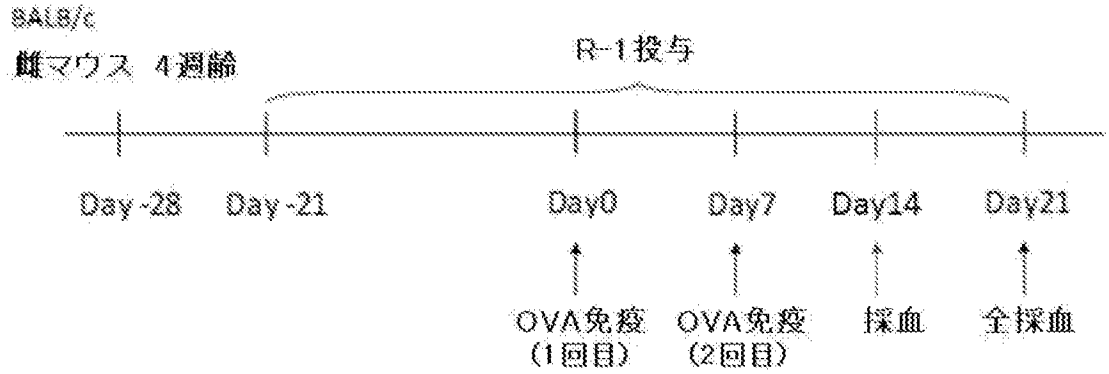
＜動物実験計画＞

4週齢のBALB/c雌マウス（日本チャールズ・リバー社）を7日間、MF固形飼

料（オリエンタル酵母社）、UV殺菌水を自由摂取させ、通常飼育して馴化させた。平均体重、バラつきが同等程度になるように、8匹、10匹に分け、試験終了まで、1群（未発酵乳摂取群（プラセボ群））は、未発酵乳（牛乳、脱脂粉乳、砂糖、甘味料）、2群（ヨーグルトR-1摂取群（R-1摂取群））は、ヨーグルトR-1（未発酵乳にヨーグルトR-1のスターターを添加して発酵させたヨーグルト）を、それぞれ0.4 ml/body、1回/日で胃ゾンデを用いて経口投与した。これらの3週間の投与後（day0）に、1群（未発酵乳摂取群）、2群（ヨーグルトR-1摂取群）ともに、10 mg/body（250μl生理食塩水溶液）のモデル抗原として、卵白アルブミン（OVA）を腹腔内投与した。そして、1週間を空けて(day7)、再度免疫し、2回目の免疫から1週間後（day14）に、部分的な採血を行い、さらに2週間後（day21）に、イソフルラン麻酔下で腋下動脈から全採血を行った。これらの採取した血液を遠心分離して、血漿を調製し、血漿中のOVA特異的抗体価をELISA法により測定した。前記抗体価を1群（未発酵乳摂取群）と2群（ヨーグルトトR-1摂取群）を比較した。なお、統計処理には、t検定を用いた。

これらのスケジュールを下記表２に示す。

[0082] [表2]



[0083] ＜ELISA測定＞

ELISA測定には、市販のELISAキットであるBETHYL Labolatories社のMouse IgG1 ELISA Quantitation Set（カタログ番号E90-105）、Mouse IgG2a ELISA Quantitation Set（カタログ番号E90-107）、Mouse IgG2b ELISA Quantitat

ion Set（カタログ番号E90-109）、Mouse IgE ELISA Quantitation Set（カタログ番号E90-115）を用いた。このとき、最初に、ELISAプレートをOVAでコーティングする点を除き、基本的に、前記のELISAキットのプロトコールおよび一般的なELISA法に準じた。サンプルプレートには、F96 CERT. MAXISORP NUNC-IMMUNO PLATE（NUNC社、カタログ番号439454)を用いた。IgE抗体価を測定する場合には、前記ELISAキットのプロトコールに準じた。

[0084] コーティングバッファー（0.05M Carbonate-Bicarbonate, pH 9.6）に溶解した100μg/mlのOVAを、サンプルプレートに100μl/wellで添加した（IgEのELISA測定の場合のみ、前記のELISAキットに付属のコーティング抗体溶液をサンプルプレートに100μl/wellで添加した）。なお、コーティングバッファーには、前記ELISAキットの説明書に記載のものを調製した。サンプルプレートを4℃に終夜で静置した。洗浄バッファー（1x TBS、0.05% Tween-20）を用いて、4回で洗浄した後に、ブロッキング溶液（1% BSA、1x TBS）を200μl/wellで添加し、室温に30分間で静置した。洗浄バッファーを用いて、4回で洗浄した後に、スタンダード・サンプルを100μl/wellで添加し、室温に1時間で静置した。洗浄バッファーを用いて、4回で洗浄した後に、二次抗体溶液を100μl/wellで添加し、サンプルプレートを室温に1時間で静置した。洗浄バッファーを用いて、4回で洗浄した後に、基質溶液（BD OptEIA(R)TMB Substrate Reagent Set（BD Bioscience社、カタログ番号555214））を100μl/wellで添加し、遮光して室温に15分間で静置した。反応停止液（0.18M H_2SO_4）を100μl/wellで添加し、吸光度（OD）を450 nmに設定して、それぞれのサンプルを測定した。なお、1x TBSは10x TBS（500 mM Tris, 1.4 M NaCl, pH 8.0）を希釈して調製した。ブロッキング溶液は、サンプルの希釈および二次抗体溶液にも用いた。以上のELISA測定の結果を図4-1～4-3および図5-1～5-4に示す。

[0085] ＜抗体価の算出＞

血漿中の抗体価は、事前に調製したOVA特異的抗体を高含有する標準血漿を、段階希釈して検量線を作成して算出した。その際、標準血漿中のIgG1抗体

価を10^7 arbitrary units(AU)/ml、IgG2a抗体価を10^6 AU/mlと定めて算出した。

[0086] ＜標準血漿の調製＞

標準血漿の調製は、以下の手順で行った。5匹の4週齢のBALB/c雌マウス（日本チャールズ・リバー社）を7日間、MF固形飼料（オリエンタル酵母社）、UV殺菌水を自由摂取させて通常飼育し馴化させた。馴化後（day0）に100μg/body（250μl完全フロイントアジュバントエマルジョン）のOVAを腹腔内投与した。1回目の免疫から2週間後（day14）に100μg/body（250μl不完全フロイントアジュバントエマルジョン）のOVAを腹腔内投与した。2回目の免疫から2週間後（day28）にイソフルラン麻酔下で腋下動脈から全採血を行った。これらの採取した血液を遠心分離して、血漿を調製し、血漿中のOVA特異的なIgG1抗体価およびIgG2a抗体価をELISA法により測定した。測定結果から、OVA特異的抗体価の高い血漿を標準血漿とした。

[0087] OVA免疫から1週間後（Day14）において、OVA抗原に対するIgG1およびIgG2b抗体価は、プラセボ群とR-1摂取群で有意な差は示されなかったが、平均値は高い傾向がみられた（図4-1および図4-3）。OVA抗原に対するIgG2a抗体価は、プラセボ群に比べて、R-1摂取群で顕著に高いことが示された（図4-2）。

また、OVA免疫から2週間後（Day21）において、OVA抗原に対するIgG1抗体価は、プラセボ群とR-1摂取群で有意な差は示されなかったが、この抗体価の平均値は、プラセボ群に比べて、R-1摂取群で高い傾向が見られた（図5-1）。OVA抗原に対するIgG2a抗体価は、プラセボ群に比べて、R-1摂取群で顕著に高く（図5-2）、OVA抗原に対するIgG2b抗体価は、プラセボ群に比べて、R-1摂取群で顕著に高いことが示された（図5-3）。

さらに、OVA免疫から1週間後（Day14）および2週間後（Day21）における各抗体価を比較すると、IgG1、IgG2aおよびIgG2bの抗体価は、R-1摂取群において高く維持され、特にIgG2aおよびIgG2bの抗体価は、R-1摂取群において顕著に高く維持した。したがって、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1および／またはその培養物を摂取することによって、抗体産生が

高く維持されることが示された。

なお、OVA免疫から2週間後（Day21）において、総IgE抗体価は、プラセボ群とR-1摂取群で有意な差は見られなかった（図5-4）。この結果から、R-1の摂取により、IgE抗体価の上昇をもたらさないことが推認された。

[0088] 以上の結果から、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1および／またはその培養物を摂取することにより、IgGの抗体産生、特にIgG2aおよびIgG2bの抗体産生が顕著に誘導されることが示された。さらに、これらの抗体産生を高く維持することが示された。

[0089] Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1および／またはその培養物の摂取によって、補体活性化能およびT細胞、NK細胞、好中球、マクロファージなどのエフェクター細胞の活性化能を有するIgG2aおよびIgG2bの抗体産生が上昇し、CDC活性およびADCC活性が増強することが推認された。したがって、当該培養物の摂取によって、感染症の全般的な予防や重症化の予防に繋がることが期待される。さらに、当該培養物の摂取によって、マウスにおける種々の抗体産生が上昇したことから、ヒトにおいても種々の抗体産生が上昇し、感染症の全般的な予防や重症化の予防に繋がる可能性が推認された。

以上の結果を総合すると、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1および／またはその培養物は、抗原特異的な免疫応答を誘導可能であり、安全かつ簡易な抗体価上昇剤、例えばアジュバントになり得るものと期待される。

請求の範囲

[請求項1] Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1および／またはその培養物を含有する、抗体価上昇剤。

[請求項2] アジュバントである、請求項１に記載の抗体価上昇剤。

[請求項3] ワクチン用アジュバントである、請求項２に記載の抗体価上昇剤。

[請求項4] 感染症ワクチン用アジュバントである、請求項３に記載の抗体価上昇剤。

[請求項5] 感染症が、インフルエンザである、請求項４に記載の抗体価上昇剤。

[請求項6] 培養物が、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1およびStreptococcus thermophilusを培養して得られる組成物である、請求項１～５のいずれか一項に記載の抗体価上昇剤。

[請求項7] １個包装中の、Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1を含む乳酸菌が9×10^{7}～10^{12}cfuである、請求項１～６のいずれか一項に記載の抗体価上昇剤。

[請求項8] １個包装あたり、10～1000ｇまたは10～1000mlを含む、請求項１～７のいずれか一項に記載の抗体価上昇剤。

[請求項9] 請求項１～８のいずれか一項に記載の抗体価上昇剤を包装してなる製品。

[請求項10] 請求項１～８のいずれか一項に記載の抗体価上昇剤を対象が摂取する、または対象に摂取させることを含む、抗体価を上昇させる方法（医療行為を除く）。

[請求項11] 一日あたり10～1000gまたは10～1000mlの抗体価上昇剤の摂取を、3週間以上継続する、請求項１０に記載の方法。

[請求項12] 抗体価上昇剤の摂取をワクチン接種日の少なくとも１週間以上前から継続する、請求項１１に記載の方法。