

明 細 書

発明の名称： 抗菌ペプチド誘導剤

技術分野

[0001] 本発明は、抗菌ペプチド誘導剤に関する。

背景技術

[0002] ヒトを始めとする哺乳動物は、病原性細菌及び真菌、ウイルスなどに感染されることで、これらの菌やウイルスが生体内に侵入し、増殖や定着することで、下痢、胃腸疾患、発熱などを起こし、その症状が重篤であれば、死亡に至る場合もある。このような哺乳動物の感染症は、医療の発達した現代においてもなお、撲滅することなく、例えばヒトが健康的な生活を送る上での大きな課題である。

[0003] これらの感染症は、健常成人よりもむしろ、感染防御機能を始めとする抵抗力の弱い高齢者、乳幼児、小児などに罹患しやすい。例えば、高齢者は、加齢に伴う自己の感染防御機能の低下により、健常成人では感染しないような常在細菌（例えば、鼻の粘膜などに存在する黄色ブドウ球菌など）に感染しやすい。例えば、乳幼児や小児は、免疫組織が未熟であり、自己の感染防御機能の低さにより、健常成人と比較して感染症に罹患する可能性が高いといわれている。このように抵抗力の弱い対象者が集団で過ごす施設では、個々の感染症が見られると、感染症の拡散を防止するために、その感染症を罹患した患者を物理的に隔離したり、感染症の発症した患者の滞在や訪問をした施設を閉鎖するなどの対応を強いられる。

[0004] 感染症の対処法としては、感染症の原因を特定した上で、抗菌作用のある薬物（抗菌薬）を投与する治療が一般的である。しかし、抗菌薬を患者に投与する場合は、感染症の原因となる特定の菌やウイルスだけでなく、感染症の原因とはならない元々体内に定着している、いわゆる病原性のないビフィズス菌などの腸内細菌や常在菌にも作用するため、下痢や他の病原体の感染症などの副作用が生じる可能性もある。また、同じ種類の抗菌薬を反復的に

投与したり、長期に投与することにより、感染症の原因となる病原性細菌、真菌、及びウイルス自体が当該薬物に耐性する機会を与えることにより、その感染症の治療が困難となる場合がある。

[0005] 元来、生物は、感染症の原因となる病原性細菌や真菌、ウイルスの侵入や定着を防ぐために、抗菌作用を持つ種々のペプチド（抗菌ペプチド）を当該生物自身の体内で分泌していることが知られている。抗菌ペプチドは、10～100個のアミノ酸が結合したペプチドで、ヒトを含む様々な生物から単離されている。また、抗菌ペプチドは、宿主に由来するので、前記抗菌薬の投与のような副作用がなく、耐性菌を出現させない。すなわち、体内で抗菌ペプチドの分泌を促進させることができれば、理想的な感染の防御が期待できる。

[0006] ヒト由来の抗菌ペプチドには、例えば、ディフェンシンファミリー（ α -ディフェンシン、 β -ディフェンシンなど）、カセリシジン（LL-37）、ダームシジン（dermcidin）、LEAP-1（ヘプシジン）、LEAP-2、ラクトフェリン、Regenerating Islet-derived ファミリー（に属する）ペプチド（Regペプチド）などがある。これらの抗菌ペプチドは、分子構造や分泌する臓器が異なり、抗菌作用を示す標的物質も異なる。

[0007] これらの抗菌ペプチドを人為的にヒトに発現させたり、分泌させることができれば、感染症の予防や症状の軽減を期待できる。例えば、有機酸を有効成分とするヒト β -ディフェンシンの分泌促進する技術（特許文献1）、酵母由来の不溶性画分を有効成分とする抗菌ペプチドの遺伝子を発現誘導する技術（特許文献2）、酵母由来のマンナン含有成分を有効成分とする抗菌ペプチドを発現誘導する技術（特許文献3）、ハイチュウ用濃縮ヨーグルト、甘酒の抽出物、焼酎もろみ、糠味噌濃縮物などの有効成分とする抗菌ペプチドを発現誘導する技術（特許文献4）、発芽玄米及び／又は玄米糠由来のステロール配糖体を有効成分とする α -ディフェンシン等の抗菌ペプチド分泌誘導する技術（特許文献5）、レスベラトロールを有効成分とする α -ディフェンシン等の抗菌性ペプチドを分泌誘導する技術（特許文献6）などが提

案されている。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：国際公開第2005/027893号

特許文献2：特開2003-000262号公報

特許文献3：特開2006-241023号公報

特許文献4：特開2005-270117号公報

特許文献5：特開2013-074821号公報

特許文献6：特開2013-237643号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は、ヒトの体内に存在する自己生体防衛機構を発揮できる、安全で副作用のない、抗菌ペプチドの体内分泌誘導剤を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、上記の課題に鑑み、鋭意研究を進めたところ、以下の知見を得た。すなわち、乳酸菌を摂取させることで、ディフェンシンを発現する遺伝子や、Regペプチドの遺伝子発現を誘導させることを実証し、前記の課題を解決することを見出した。また、本発明の有効成分である乳酸菌、及びその下位概念の乳酸菌を発酵させた素材は、発酵食品などで長年の食習慣もあるため、本発明の抗菌ペプチドの体内分泌誘導剤は、安全で、副作用のリスクは極めて少ない。

[0011] さらに、本発明の抗菌ペプチドの体内分泌誘導剤を摂取させることにより、当該抗菌ペプチドが体内で誘導され、各種の感染防御に起因する免疫力の維持・向上やアンチエイジング、健康な寿命の延長などが期待できる。中でも、日和見細菌による感染症、病原細菌、真菌による感染症、ピロリ菌への感染症、バクテリアトランスロケーション、腸粘膜の炎症の持続、腸内フロ

ーラのバランスの変化（腸内フローラのバランスの破綻など）、及びこれらの炎症から誘導される疾病、クローン病、潰瘍性大腸炎などの炎症性大腸炎、制御性T細胞の分化を誘導して過剰な炎症やアレルギー症状などを予防及び／又は治療が期待できる。また、免疫機能が未熟な乳幼児や小児、免疫力が低下している高齢者、及び各種疾患を有する患者の感染リスクを減少させ、炎症を抑制させ、アレルギーや慢性疾患などを予防や軽減されることが期待できる。

[0012] 前述するように、乳酸菌には、ディフェンシンまたはRegペプチドもしくはその両方の抗菌ペプチドの遺伝子発現を誘導させる作用がある。従って、本発明は、乳酸菌または乳酸菌によって発酵させた素材もしくはその両方を有効成分とし、抗菌ペプチドの遺伝子発現を誘導させることを特徴とする抗菌ペプチド誘導剤またはその誘導用組成物もしくはその両方を提供する。更に、乳酸菌の抗菌ペプチド誘導剤の製造のための使用を提供する。加えて、本発明は、乳酸菌の抗菌ペプチド誘導用組成物の製造のための使用を提供する。

[0013] すなわち、本発明は、次の通りとなる。

（１）乳酸菌または乳酸菌によって発酵させた素材もしくはその両方を有効成分とし、抗菌ペプチドの遺伝子発現を誘導させることを特徴とする抗菌ペプチド誘導剤。

（２）抗菌ペプチドがディフェンシンまたはRegenerating Islet-derivedファミリーペプチド（Regペプチド）もしくはその両方であることを特徴とする（１）に記載の抗菌ペプチド誘導剤。

（３）乳酸菌が、ラクトバチルス属乳酸菌またはストレプトコッカス属乳酸菌もしくはその両方であることを特徴とする（１）または（２）に記載の抗菌ペプチド誘導剤。

（４）請求項１乃至３のいずれに記載の抗菌ペプチド誘導剤を含有する、抗菌ペプチド誘導用組成物。

（５）乳酸菌が、ラクトバチルス属乳酸菌から選ばれる１種又は２種類以上

の菌株と、ストレプトコッカス属乳酸菌から選ばれる１種又は２種類以上の菌株との組み合わせである、（４）に記載の抗菌ペプチド誘導用組成物。

（６）誘導用組成物の単位包装当たり、乳酸菌が１億個以上含有することを特徴とする（４）に記載の抗菌ペプチド誘導用組成物。

（７）前記乳酸菌が生菌であることを特徴とする（１）～（６）に記載のいずれか１つの抗菌ペプチド誘導用組成物。

（８）（４）乃至（７）に記載の抗菌ペプチド誘導用組成物が、抗菌ペプチドの遺伝子発現を誘導させる、感染予防作用を有する食品・医薬品組成物。

（９）前記食品・医薬品組成物が、経口摂取、経腸摂取で誘導される（８）に記載の感染予防作用を有する食品・医薬品組成物。

（１０）抗菌ペプチドの遺伝子発現を誘導させる有効成分としての乳酸菌または乳酸菌によって発酵させた素材もしくはその両方の、抗菌ペプチド誘導剤の製造のための使用。

（１１） 抗菌ペプチドの遺伝子発現を誘導させる有効成分としての乳酸菌または乳酸菌によって発酵させた素材もしくはその両方の、抗菌ペプチド誘導剤を含有する抗菌ペプチド誘導用組成物の製造のための使用。

（１２） 抗菌ペプチドの遺伝子発現を誘導させる有効成分としての乳酸菌または乳酸菌によって発酵させた素材もしくはその両方の、抗菌ペプチド誘導剤を含有する感染予防作用を有する食品・医薬品組成物の製造のための使用。

発明の効果

[0014] 本発明は、ヒトの体内に存在する自己生体防衛機構を発揮できる、安全で副作用のない、抗菌ペプチドの体内分泌誘導剤を提供することができる。

発明を実施するための形態

[0015] 以下では、本発明を詳細に説明するが、本発明は、個々の形態には限定されない。

[0016] 本発明の乳酸菌とは、分類学的に乳酸菌と認定されたものの全てを総称し、もしくはビフィズス菌などのその類縁の細菌の全てを総称し、菌種や菌株

などにおける制限はない。また、乳酸菌はその由来により、植物由来、及び動物由来と分類されることもあるが、本発明の乳酸菌は植物由来も動物由来もどちらも使用することができる。中でも、ラクトバチルス属乳酸菌から選ばれる1種又は2種以上の菌株、ストレプトコッカス属乳酸菌から選ばれる1種又は2種以上の菌株との組み合わせが、ヨーグルトなどの発酵乳により食習慣で実績があるために好ましい。また、ラクトバチルス属乳酸菌がブルガリア菌、又はラクトバチルス・ブルガリカスと称される、ラクトバチルス・デルブリュッキー・サブスピーシーズ・ブルガリカス (*Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*)、及びストレプトコッカス属乳酸菌がサーモフィラス菌、又はストレプトコッカス・サーモフィラスと称される、ストレプトコッカス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サーモフィラス (*Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*) であることがより好ましい。

[0017] 本発明の乳酸菌において、生菌、または死菌の状態のいずれにおいても使用することができる。また、本発明の乳酸菌の形態は、凍結や凍結乾燥をしたものであっても使用することができる。さらに、本発明の乳酸菌は、乳酸菌の菌体のみ、乳酸菌の菌体に菌体以外の成分（例えば、凍結保護剤や凍結乾燥保護剤など）が含まれた形態であってもよく、医薬品の素材や飲食品の素材などとして使用実績のある澱粉や水などの各種媒体に分散されている状態であってもよい。

[0018] 本発明の抗菌ペプチドの誘導剤とは、ヒトを始めとする哺乳動物に摂取させることにより、体内で遺伝子などが誘導され、当該遺伝子に由来する抗菌ペプチドを産生させることができる剤をいう。なお、ここでいう、摂取とは、ヒトの体内に入るものであれば投与経路に限定はなく、例えば、経口投与、経管投与、経腸投与など、公知の投与方法の全てが該当する。このとき、典型的には、消化管を経由する経口摂取、経腸摂取が挙げられるが、経口摂取が好ましく、飲食による摂取がより好ましい。

- [0019] 本発明の抗菌ペプチドとは、体内に由来しない外部の細菌を滅菌、殺菌、静菌させて、感染を防御する作用のあるペプチドのことをいう。抗菌ペプチドとして、ディフェンシンファミリー（ α -ディフェンシン、 β -ディフェンシンなど）、カセリシジン（LL-37）、ダームシジン（dermcidin）、LEAP-1（ヘプシジン）、LEAP-2、ラクトフェリン、Regペプチドなどを例示できる。抗菌ペプチドは該当するペプチドそのものであってもよく、特定箇所を加水分解して活性化する、いわゆる前駆体の形態であってもよい。
- [0020] 本発明の誘導とは、抗菌ペプチドを発現するための遺伝子の発現が生体内で増加し、それに伴って、抗菌ペプチドを発現させることをいう。当該遺伝子には特に制限はないが、好ましい遺伝子として、Reg I、Reg II、Reg III α 、Reg III β 、Reg III γ 、およびディフェンシンを発現する遺伝子などを例示できる。
- [0021] 本発明の別の態様として、ディフェンシンファミリー及び／又はRegペプチドに起因する各種疾病の予防及び／又は治療剤である。各種疾病とは、日和見細菌による感染症、病原細菌、真菌、ウィルスによる感染症、ピロリ菌への感染症、バクテリアトランスロケーション、腸粘膜の炎症の持続、腸内フローラのバランスの変化（腸内フローラのバランスの破綻など）、及びこれらの炎症から誘導される疾病、クローン病、潰瘍性大腸炎などの炎症性大腸炎、制御性T細胞の分化を誘導して過剰な炎症やアレルギー症状など、本発明の出願日及び／又は優先日を基準とする日の前後に関係なく、ディフェンシンファミリー及び／又はRegペプチドに起因する疾病、症状、症候群、並びにこれらを示唆するもの全てを称する。
- [0022] 本発明の乳酸菌で発酵させた素材とは、医薬品の素材、飲食品の素材などでヒトを始めとする哺乳動物が摂取してきた習慣のある素材を乳酸菌で発酵させたものであれば、特に制限はない。中でも、乳、大豆、小豆、穀類、野菜類、肉類、魚類、及びこれらの混合物を乳酸菌で発酵させた素材を例示できる。

[0023] 乳を乳酸菌で発酵させた素材の一例として、乳脂肪分 3.0 重量%、無脂乳固形分 9.5 重量%となるよう、原料乳と乳製品と原料水を調合し、必要に応じて乳脂肪球を調節するための均質化処理を行い、65℃30分間保持に相当する殺菌条件で加熱殺菌し、40～45℃で冷却した後に、ラクトバチルス属乳酸菌として、ラクトバチルス・デルブリュッキー・サブスピーシーズ・ブルガリカスとストレプトコッカス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サーモフィラスとの混合スターターを添加し、40～45℃で2～12時間発酵させ、0.6～1.2重量%の乳酸酸度となるよう調整したものを例示することができる。このときに、ラクトバチルス・デルブリュッキー・サブスピーシーズ・ブルガリカスとストレプトコッカス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サーモフィラスの菌株に制限はなく、当該2菌種以外の乳酸菌（例えば、ラクトバチルス属、ビフィドバクテリウム属、ラクトコッカス属、ロイコノストック属など）の添加、その他の発酵や健康に有用な微生物や素材や添加物の添加は任意である。なお、ここでいう原料乳とは、牛、山羊、羊、水牛などから搾乳した生乳又は原乳と称されるもの、及び当該生乳又は原乳と同組成の還元乳に限定されず、乳脂肪分及び／又は無脂乳固形分（乳タンパク質、乳糖、灰分）を加えたり（強化したり）、例えば乳脂肪分を除去して低脂肪乳や無脂肪乳とすること、乳糖不耐症の傾向の有するヒト向けに脱乳糖乳や乳糖分解乳とすることも可能である。さらには、ナトリウムなどのミネラルの摂取を制限されている患者向け、及び／又は摂取時の塩味を緩和させることを目的に、脱塩乳とすること、又はカルシウムなどのミネラルの摂取を推奨されている患者向けを目的にカルシウム強化乳とすることも可能である。

[0024] 本発明の抗菌ペプチド誘導剤は、乳酸菌が含まれていればその菌数には制限はないが、単位包装当たり乳酸菌が1億個以上存在することが好ましく、5億個以上存在することがより好ましく、10億個以上存在することが更に好ましい。乳酸菌の菌数は多ければ多いほど本発明の効果は期待できるが、乳酸菌一般の増殖を考慮して、上限は10兆個である。また、例えば、ラク

トバチルス属乳酸菌とストレプトコッカス属乳酸菌が含まれている場合には、ラクトバチルス属乳酸菌0.1億個以上でストレプトコッカス属乳酸菌が1億個以上であることが好ましく、ラクトバチルス属乳酸菌が0.5億個以上でストレプトコッカス属乳酸菌が5億個以上であることがより好ましく、ラクトバチルス属乳酸菌が1億個以上でストレプトコッカス属乳酸菌が10億個以上であることがさらに好ましく、ラクトバチルス属乳酸菌が5億個以上でストレプトコッカス属乳酸菌が50億個以上であることが最も好ましい。ラクトバチルス属乳酸菌とストレプトコッカス属乳酸菌の菌数は多いほど本発明の効果は期待できるが、乳酸菌一般の増殖を考慮して、上限はラクトバチルス・ブルガリカス1兆個、ストレプトコッカス・サーモフィラス10兆個である。さらに、例えば、ラクトバチルス・デルブリュッキー・サブスピーシーズ・ブルガリカスとストレプトコッカス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サーモフィラスが含まれている場合には、ラクトバチルス・デルブリュッキー・サブスピーシーズ・ブルガリカスが0.1億個以上でストレプトコッカス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サーモフィラスが1億個以上であることが好ましく、ラクトバチルス・デルブリュッキー・サブスピーシーズ・ブルガリカスが0.5億個以上でストレプトコッカス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サーモフィラスが5億個以上であることがより好ましく、ラクトバチルス・デルブリュッキー・サブスピーシーズ・ブルガリカスが1億個以上でストレプトコッカス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サーモフィラスが10億個以上であることがさらに好ましく、ラクトバチルス・デルブリュッキー・サブスピーシーズ・ブルガリカスが5億個以上でストレプトコッカス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サーモフィラスが50億個以上であることが最も好ましい。ラクトバチルス・デルブリュッキー・サブスピーシーズ・ブルガリカスとストレプトコッカス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サーモフィラスの菌数は多いほど本発明の効果は期待できるが、乳酸菌一般の増殖を考慮して、上限はラクトバチルス・デルブリュッキー・サブスピーシーズ・ブルガリカス1兆個、スト

レプトコッカス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サーモフィラス 10 兆個である。

[0025] 本発明の抗菌ペプチド誘導剤は、単位包装あたりの重量に制限はないが、抗菌ペプチド誘導剤が 1 g あたり、乳酸菌が 1 億個以上存在する時には、10～500 g が好ましく、25～250 g がより好ましく、50～200 g がさらに好ましく、75～150 g が最も好ましい。また、本発明の単位包装とは、袋、箱、容器あたりのみならず、それらに含まれる一回あたりの単位包装形態であってもよいし、一日あたりの単位包装形態であってもよい。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。

[0026] 本発明の一態様において、乳酸菌及び/又はその培養物、ならびにこれらを含む抗菌ペプチド誘導剤の摂取は、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、抗菌ペプチド誘導、分泌促進効果を高めるために望ましい。

[0027] 乳酸菌及び/又はその培養物は、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。十分に有効な抗菌ペプチド誘導の効果が得られる観点から、8週間程度までの継続を目安とすることもできる。

[0028] 本発明の乳は、乳、乳製品、乳タンパク質の少なくとも一種以上が含まれる。例えば、牛乳、羊、ヤギ等の獣乳や、その加工品、殺菌乳、脱脂乳、全脂粉乳、部分脱脂乳、脱脂粉乳、全脂濃縮乳、脱脂濃縮乳、クリーム、バター、バターミルク、ホエイ、ホエイタンパク質濃縮物（WPC）、ホエイタンパク質単離物（WPI）、 α -ラクトアルブミン（ α -La）、 β -ラクトグロブリン（ β -Lg）、 α -カゼイン、 β -カゼイン、 κ -カゼイン、非たんぱく態窒素などが挙げられる。

[0029] 本発明の乳酸菌は、医薬品または飲食品として使用することもできる。本発明の乳酸菌を含む医薬品または飲食品は、抗菌ペプチド発現促進効果を有する点で有用であり、特に、微生物感染予防または感染治療用の医薬品また

は飲食品として使用できる。本発明の乳酸菌を医薬品または飲食品として使用する場合には、単独の菌株を使用してもよく、または2以上の菌株を組み合わせて使用してもよい。

[0030] 本発明の乳酸菌を前記医薬品または飲食品に使用するにあたり、その状態は問わない。例えば、本発明の乳酸菌は、生菌、死菌、または処理物であっても上記医薬品または飲食品に使用できる。例えば、本発明の乳酸菌の培養物、その濃縮物、ペースト状に加工したペースト化物、噴霧乾燥物、凍結乾燥物、真空乾燥物、ドラム乾燥物、媒体に分散させた液状物、希釈剤で希釈した希釈物、乾燥物をミルなどで破砕した破砕物などを前記医薬品または飲食品に用いることができる。

[0031] さらに本発明の飲食品は、保健機能食品や病者用食品にも適用することができる。保健機能食品制度は、内外の動向、従来からの特定保健用食品制度との整合性を踏まえて、通常の食品のみならず錠剤、カプセル等の形状をした食品を対象として設けられたもので、特定保健用食品（個別許可型）と栄養機能食品（規格基準型）の2種類の類型からなる。本発明の乳酸菌を、特定保健用食品等の特別用途食品や栄養機能食品として、ヒト等の動物に投与することにより各種の感染に対する予防が可能となる。

[0032] 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氣的（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。

[0033] 本発明の一態様として、本発明に係る抗菌ペプチドの発現増強、抗菌ペプチドの分泌促進、感染症の予防・軽減の方法を用いた、包装してなる製品は、例えば抗菌ペプチドの発現増強の方法を用いた飲食品である場合、抗菌ペプチドを増強させるためとの用途が表示された飲食品、例えば「抗菌ペプチド増強用」と表示された抗菌ペプチドの発現増強の効果を有する飲食品、「抗菌ペプチド増強用」と表示された乳酸菌を含有する飲食品、あるいは「感染症予防用」と表示された乳酸菌を含有する飲食品などとするのが好ましい。

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「抗菌ペプチド増強用」あるいは「感染症予防用」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、エネルギー代謝活性化の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、抗菌ペプチドの増強や感染症予防効果など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。

[0034] 本発明の乳酸菌を飲食品として使用する場合、飲食品の種類は特に限定されない。例えば、各種飲食品（牛乳、加工乳、清涼飲料、発酵乳、ヨーグルト、チーズ、その他の乳製品、パン、ビスケット、クラッカー、ピッツァクラスト、調製粉乳、流動食、病者用食品、乳幼児用粉乳等食品、妊産婦・授乳婦用粉乳等食品、栄養食品等）に加工することができる。このような飲食品の製造にあたっては、本発明の乳酸菌やその処理物をそのまま使用したり、他の飲食品ないし食品成分と混合したりなど、通常の商品組成物における製法にしたがうことができる。また、飲食品の形状についても特に限定されず、通常用いられる飲食品の形状であれば特に問わない。例えば、固体状（粉末、顆粒状を含む）、ペースト状、液状、懸濁状などのいずれの形状でもよく、またこれらに限定されない。このとき、乳飲料、発酵乳、清涼飲料、ゼリー飲料、タブレット、粉末食品がより好ましく、ヨーグルトはさらに好

ましい。

[0035] 本発明の乳酸菌を含有する飲食物には、水、タンパク質、糖質、脂質、ビタミン類、ミネラル類、有機酸、有機塩基、果汁、フレーバー、機能性成分、食品添加物等、通常の食品に含まれる成分であればいずれであっても含めることができる。上記飲食物の製造において、タンパク質源として、例えば全脂粉乳、脱脂粉乳、部分脱脂粉乳、カゼイン、ホエイ粉、ホエイタンパク質、ホエイタンパク質濃縮物、ホエイタンパク質分離物、 α -カゼイン、 β -カゼイン、 κ -カゼイン、 β -ラクトグロブリン、 α -ラクトアルブミン、ラクトフェリン、大豆タンパク質、鶏卵タンパク質、肉タンパク質等の動物性タンパク質、これら加水分解物等の、食品製造に通常使用されるタンパク質またはタンパク質含有原材料を使用することができる。糖類の供給源の例としては、加工澱粉（テキストリンのほか、可溶性澱粉、ブリティッシュスターチ、酸化澱粉、澱粉エステル、澱粉エーテル等）、食物繊維などが挙げられる。脂質源としては、例えば、ラード、魚油等、これらの分別油、水素添加油、エステル交換油等の動物性油脂；パーム油、サフラワー油、コーン油、ナタネ油、ヤシ油、これらの分別油、水素添加油、エステル交換油等の植物性油脂などが挙げられる。ビタミン類としては、例えば、ビタミンA、カロテン類、ビタミンB群、ビタミンC、ビタミンD群、ビタミンE、ビタミンK群、ビタミンP、ビタミンQ、ナイアシン、ニコチン酸、パントテン酸、ビオチン、イノシトール、コリン、葉酸などが挙げられ、ミネラル類としては、例えば、カルシウム、カリウム、マグネシウム、ナトリウム、銅、鉄、マンガン、亜鉛、セレンなどが挙げられる。有機酸としては、例えば、リンゴ酸、クエン酸、乳酸、酒石酸などが挙げられる。機能性成分として、例えばオリゴ糖、グルコサミン、コラーゲン、セラミド、ローヤルゼリー、ポリフェノールなどが挙げられる。食品添加物として、例えば乳化剤、安定剤、増粘剤、ゲル化剤、甘味剤、酸味料、保存料、抗酸化剤、pH調整剤、着色剤などが挙げられる。バター、乳性ミネラル、クリーム、ホエイ、非タンパク態窒素、シアル酸、リン脂質、乳糖等の各種乳由来成分などは本

発明の乳酸菌を含有する飲食品の製造に好適に用いることのできる成分の例である。

これらの成分は、2種以上を組み合わせ使用することができる。また上記原材料は、天然物、天然物加工品、合成品及び／又はこれらを多く含む食品のいずれを用いてもよい。

[0036] 本発明の乳酸菌は、感染予防または治療用医薬品とすることができる。上記医薬品を製造する場合、本発明のビフィズス菌または乳酸菌は、生菌、または殺菌後、破砕あるいは未粉砕した処理物として使用することができる。また、使用する菌は単独でも、複数種であってもよい。

[0037] 上記医薬品中における本発明の乳酸菌の量は、その目的、用途（予防剤、治療剤等）に応じて任意に定めることができる。含量の一例として、全体量に対して0.001～100%（w/w）、特に0.1～100%を示すことができるが、本発明はこれに限定されない。

[0038] 本発明の乳酸菌を有効成分とする医薬品の投与量は、投与経路、ヒトを含む投与対象動物の年齢、体重、症状など、種々の要因を考慮して、適宜設定することができる。適当な投与量の一例として、有効成分として1～1000mg/kg/dayを挙げることができるが、本発明はこれに限定されない。例えば、長期間に亘って予防目的で摂取する場合には、上記範囲よりも少量であってもよい。また本有効成分は安全性の問題が見当たらないため、上記範囲よりも多量に使用してもさしつかえないと考えられる。

[0039] 上記医薬品の剤型は、本発明の乳酸菌を腸内に到達させるため、経口投与が可能な剤型が好ましい。本発明による医薬品の好ましい剤型の例としては、例えば錠剤、被覆錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、液剤、シロップ剤、トローチ剤等をあげることができる。これらの各種製剤は、常法に従って主薬である本発明の菌体および／または処理物に、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、矯味矯臭剤、溶解補助剤、懸濁剤、コーティング剤などの、医薬の製剤技術分野において通常使用しうる補助剤を用いて製剤化することができる。

- [0040] 本発明の抗菌ペプチドの誘導剤を医薬品として使用する場合には、例えば、経口投与の場合、乳酸菌もしくは、乳酸菌を発酵した素材をそのまま投与（摂取）することができるが、例えば医薬品の一般的な製法に従い、錠剤、顆粒剤、粉末剤、カプセル剤、散剤とするとして使用することができる。
- [0041] 本発明の抗菌ペプチドの誘導剤は、消化管全ての部位で効果が期待でき、消化管とはすなわち、口腔、咽頭、食道、胃、十二指腸、小腸、大腸、盲腸、肛門までの一連を例示することができる。ここで、代表的な消化管の名称を例示しているが、例えば、結腸（小腸下部）、回腸、空腸（小腸上部）、上腹部消化管、下腹部消化管、大腸上位部、大腸下位部など、公知及び／又は技術常識の範疇の名称の消化管であれば、本発明の抗菌ペプチドの誘導剤の摂取（投与）に同様の効果が期待できる。
- [0042] 本発明の抗菌ペプチドの誘導剤は、ヒトを始めとする哺乳動物の全てに対して効果があるため、当該抗菌ペプチドの誘導剤を摂取させる（投与する）各種疾患の治療及び／又は予防方法としても応用することができる。ここでいう、哺乳動物とは、ヒト、ウシ、ブタ、ヒツジ、イルカ、クジラ、トラ、ライオン、チーター、カバ、キリン、ラクダ、アルパカ、イヌ、ネコ、サル、キツネ、タヌキ、クマ、リス、オットセイ、アシカ、パンダ、イノシシ、シカ、ウマ、オラウータン、カンガルーなど、公知の家畜、愛玩動物、鑑賞動物、野生動物などで哺乳類と分類されるものの全てが該当する。また、哺乳動物以外においても、消化管を有する動物、例えば、昆虫、爬虫類、鳥類、魚類、両生類、軟体動物など、に対する本発明の抗菌ペプチドの誘導剤の投与及び／又は摂取方法に応用することも可能である。また、ここでいう各種疾患とは、抗菌ペプチドを誘導することにより、治療及び／又は予防ができる疾患であれば、制限はなく、例えば、日和見細菌による感染症、病原細菌、真菌による感染症、ピロリ菌への感染症、バクテリアトランスロケーション、腸粘膜の炎症の持続、腸内フローラのバランスの変化（腸内フローラのバランスの破綻など）、及びこれらの炎症から誘導される疾病、クローン病、潰瘍性大腸炎などの炎症性大腸炎、制御性T細胞の分化を誘導して過剰

な炎症やアレルギー症状である。

実施例

[0043] 以下では、実施例を挙げて、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は、これにより限定されない。

[0044] (試験例 1)

(実験動物)

老齢マウスの抗菌ペプチド誘導に対する乳酸菌の摂取の影響を調べた。老齢マウス作製群として 8 ヶ月齢の ICR 雄性マウス (日本エスエルシー株式会社) を入荷し、1 週間で馴化させた。このとき、ファイティングとストレス防止のため紙製の隠れ家をゲージに入れた。馴化後に、尾静脈から採血して、遠心分離によって血漿を採取し、感染で増加する代表的なサイトカインとして、血漿 IL-1 β 濃度、血漿 IL-6 濃度および血漿 TNF α 濃度を ELISA 法で測定した。体重と前記の各サイトカイン濃度が等しくなるように 2 群に分けた (2 群で $n=39$ とした)。若齢マウスを対照群として、3 ヶ月齢の ICR 雄性マウスを用いた。

[0045] (乳を発酵させた素材)

乳脂肪分 3.0 重量%、無脂乳固形分 9.5 重量%となるよう、原料乳と乳製品と原料水を調合し、70℃前後に加温した後に、15 MPa の圧力で均質化処理を行い、乳脂肪球径を一定の大きさにし、95℃2 分間保持することで加熱殺菌した。殺菌後、40~45℃で冷却した後に、市販の「明治ブルガリアヨーグルト」より単離したラクトバチルス・ブルガリカスとストレプトコッカス・サーモフィラスの混合スターターを添加し、40~45℃で 4 時間発酵させ、0.9 重量%の乳酸酸度となるよう調整し、10℃以下に冷却したものを、乳を乳酸菌により発酵させた素材とし、これを試験試料とした。試験試料 1 g 中のラクトバチルス・デルブリュッキー・サブスピーシーズ・ブルガリカスは 1 億個、ストレプトコッカス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サーモフィラスは 10 億個存在していた。

[0046] (実験動物への投与方法)

当該試験試料のマウスへの投与は、基本飼料であるA I N-9 3 M（カゼイン14重量%、レーシスチン0.18重量%、コーンスターチ46.5692重量%、 α 化コーンスターチ15.5重量%、シュクロース10重量%、大豆油4重量%、セルロースパウダー5重量%、A I N-9 3 Mミネラル混合物3.5重量%、A I N-9 3 ビタミン混合物1重量%、重酒石酸コリン0.25重量%、第三ブチルヒドロキノン0.0008重量%）に当該試験試料と水を加えて練り込み、団子状にして投与した。当該試験試料入りの飼料を老齢マウス作製群の1群に投与し、この群を便宜的に試験試料老齢マウス作製群（試験試料投与群）と称した。また、当該試験試料なしの基本飼料を老齢マウス作製群の1群に投与し、基本飼料老齢マウス作製群（陰性群）と称した。さらに、当該試験試料なしの基本飼料を若齢マウス対照群に投与し、基本飼料若齢マウス対照群（基本飼料若齢群）と称した。投与期間は試験試料投与群、及び陰性群で20ヵ月間、基本飼料若齢群で2ヵ月間とした。そして、各飼料の投与量は20g/kg体重/日とした。投与期間中は体重と摂餌量を定期的に測定し、さらに2ヵ月ごとに150 μ Lの採血を行い、血漿を採取した。投与期間の終了後、開腹して空腸、回腸、結腸を採取し、それらの組織の一部をRNA抽出用の組織用試料である10倍容のRNA later試薬（Ambion社）に4℃で一夜処理した後-80℃で保存した。それ以外の組織は液体窒素中で急速凍結した後-80℃で保存した。

[0047] （DNAマイクロアレイ解析）

前記で得られた各群の組織からRNAを抽出した。その抽出は、RNeasyキット（Qiagen社）を使用した。同一群のマウス由来のトータルRNAをそれぞれ同量ずつ混合し、DNAマイクロアレイ解析用試料を調製した。具体的な調製方法は、アフィメトリクス社の推奨する試薬を用いた。それぞれのトータルRNA試料は、3' IVT' Expressionキットを用いて、T7プロモーター配列を含むプライマーによりcDNAを合成後、それを鋳型としてT7RNAポリメラーゼでcRNAを合成すると同時

にビオチンで標識した。ビオチン標識したcRNAはMouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix社) に対してハイブリダイゼーションさせた。ハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーション用オープン (GeneChip™Hybridization Oven 630、Affymetrix社) を使用して45℃で16時間行った。さらに自動洗浄・染色装置 (GeneChip™Fluidics Station 450、Affymetrix社) を用いてアレイを洗浄し、その後streptavidin-biotin complexによりアレイ上に結合した一本鎖cRNAを蛍光標識した。なお、自動洗浄・染色装置の制御は機器制御ソフトウェア (Affymetrix™GeneChip™Command Console™Software Ver. 2 (以降、AGCCと記す)、Affymetrix社) を使用した。

[0048] 蛍光標識操作後のアレイは、レーザースキャナー (GeneChip™Scanner 30007G、Affymetrix社) を用いてスキャンして画像データを得た。尚レーザースキャナーによる画像データの取り込みはAGCCソフトウェアにより行なった。採取された画像データは解析ソフトウェア (Expression Console™ver. 1.1、Affymetrix社) を用いて標準化を行い、さらにGeneSpring GX解析ソフトウェア (GeneSpring GX ver. 11, Agilent Technologies社) あるいはGCOS (Affymetrix社) を用いて各群間の遺伝子発現量に関する比較解析を行った。得られた試験試料投与群と陰性群の遺伝子発現量は、基本飼料若齢群の各遺伝子発現量を1.0とした場合の遺伝子発現量の相対値を算出した。

[0049] 各群の空腸および結腸の試料をDNAマイクロアレイ解析して、加齢あるいは試験試料の投与で影響を受ける抗菌ペプチド遺伝子を抽出した。

[0050] 空腸において、抗菌ペプチドの1種であるRegペプチドファミリーに属するRegIII α 遺伝子、RegIII γ 遺伝子の発現量は、陰性群で低下し、抗菌ペプチドの1種であるディフェンシンファミリーに属するディフェンシ

ンrs遺伝子、ディフェンシンrs7遺伝子は、陰性群で顕著に低下した。これらの4種の遺伝子発現量は、試験試料投与群においては、陰性群と比較して2倍以上高く、基本飼料若齢群の値に近づいた。また、空腸において、RegII遺伝子の発現量では、陰性群は、基本飼料若齢群と比較して高値であったが、試験試料投与群ではさらに高い傾向が見られた（表1）。

[0051] 回腸において、抗菌ペプチドの1種であるディフェンシンファミリーに属するディフェンシン β Iの発現量は、陰性群で低下した。この遺伝子発現量は、試験試料投与群においては、陰性群、及び基本飼料若齢群よりも増加する傾向が見られた（表2）。

[0052] 結腸において、抗菌ペプチドの1種であるRegペプチドファミリーに属するRegI遺伝子とRegIII γ の相対発現量は、陰性群でその低下が顕著であった。これらの2種の遺伝子の相対発現量は、試験試料投与群においては、陰性群と比較して高い傾向が見られた（表3）。これらのことから、小腸（消化管）のRegIIを除いて抗菌ペプチドの遺伝子発現は老化で低下した。当該乳酸菌の試料を摂取することで、老化による抗菌ペプチドの遺伝子発現の低下が抑制されたといえる。

[0053] [表1]

空腸における抗菌ペプチド遺伝子の発現量

遺伝子	試験試料投与群	陰性群
Reg II	27.9	2.83
Reg III α	0.2	0.1
Reg III γ	0.8	0.35
ディフェンシン-rs	0.4	0.07
ディフェンシン-rs7	0.3	0.01

[0054] [表2]

回腸における抗菌ペプチド遺伝子の発現量

遺伝子	試験試料投与群	陰性群
ディフェンシン β I	1.87	0.87

[0055] [表3]

結腸における抗菌ペプチド遺伝子の発現量

遺伝子	試験試料投与群	陰性群
Reg I	1	0.47
Reg III γ	0.5	0.03

[0056] (試験例2)

(定量PCR解析)

リアルタイムRT-PCR用転写キットTakara Prime Script RT Master Mix (タカラバイオ社)を用いて、前記で得られた組織から抽出された各群のRNA試料からcDNAを合成した。合成されたcDNAを鋳型としてリアルタイムPCR試薬SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (タカラバイオ社)を用いてサーマルサイクラーThermal Cycler Dice Real Time System (タカラバイオ社)により定量的PCR反応および検出を行った。また、今回はReg III β 及びReg III γ の発現量の定量を目的として、これらの遺伝子の発現量をハウスキーピング遺伝子のActbを内在性コントロールとして用いる相対的な定量により、相対発現量として算出した。なお、統計処理方法はMann-Whitney U-test、あるいはG-testを用いた。p値が0.05未満であった場合を有意差があると判定した。

前記の試験試料投与群、陰性群、基本飼料若齢群のReg III β 及びReg III γ の相対発現量を比較した。陰性群では基本飼料若齢群のReg III β 及びReg III γ の相対発現量は有意に低かった。これに対して試験試料投与群と基本飼料若齢群とでは差がなく、同等のReg III β 及びReg III γ の相対発現量であった。

産業上の利用可能性

[0057] 本発明は、ヒトに備わっている自己生体防衛機構を発揮する、安全で副作用のない、抗菌ペプチドの体内分泌誘導剤を提供することができる。さらに

、本発明の抗菌ペプチドの体内分泌誘導剤を摂取することにより、当該抗菌ペプチドが体内で誘導されることにより、各種の感染防御に起因する免疫力の向上やアンチエイジング、健康寿命の延長などが期待できる。

請求の範囲

- [請求項1] 乳酸菌または乳酸菌によって発酵させた素材もしくはその両方を有効成分とし、抗菌ペプチドの遺伝子発現を誘導させることを特徴とする抗菌ペプチド誘導剤。
- [請求項2] 抗菌ペプチドがディフェンシンまたはRegenerating Islet-derived ファミリーペプチド（R e g ペプチド）もしくはその両方であることを特徴とする請求項1に記載の抗菌ペプチド誘導剤。
- [請求項3] 乳酸菌が、ラクトバチルス属乳酸菌またはストレプトコッカス属乳酸菌もしくはその両方であることを特徴とする請求項1または2に記載の抗菌ペプチド誘導剤。
- [請求項4] 請求項1乃至3のいずれに記載の抗菌ペプチド誘導剤を含有する、抗菌ペプチド誘導用組成物。
- [請求項5] 乳酸菌が、ラクトバチルス属乳酸菌から選ばれる1種又は2種類以上の菌株と、ストレプトコッカス属乳酸菌から選ばれる1種又は2種類以上の菌株との組み合わせである、請求項4に記載の抗菌ペプチド誘導用組成物。
- [請求項6] 誘導用組成物の単位包装当たり、乳酸菌が1億個以上含有することを特徴とする請求項4に記載の抗菌ペプチド誘導用組成物。
- [請求項7] 前記乳酸菌が生菌であることを特徴とする請求項1～6に記載のいずれか1つの抗菌ペプチド誘導用組成物。
- [請求項8] 請求項4乃至7に記載の抗菌ペプチド誘導用組成物が、抗菌ペプチドの遺伝子発現を誘導させる、感染予防作用を有する食品・医薬品組成物。
- [請求項9] 前記食品・医薬品組成物が、経口摂取、経腸摂取で誘導される請求項8に記載の感染予防作用を有する食品・医薬品組成物。
- [請求項10] 抗菌ペプチドの遺伝子発現を誘導させる有効成分としての乳酸菌または乳酸菌によって発酵させた素材もしくはその両方の、抗菌ペプチド誘導剤の製造のための使用。

- [請求項11] 抗菌ペプチドの遺伝子発現を誘導させる有効成分としての乳酸菌または乳酸菌によって発酵させた素材もしくはその両方の、抗菌ペプチド誘導剤を含有する抗菌ペプチド誘導用組成物の製造のための使用。
- [請求項12] 抗菌ペプチドの遺伝子発現を誘導させる有効成分としての乳酸菌または乳酸菌によって発酵させた素材もしくはその両方の、抗菌ペプチド誘導剤を含有する感染予防作用を有する食品・医薬品組成物の製造のための使用。