

明 細 書

発明の名称： 乳酸菌及び免疫賦活剤

技術分野

[0001] 本発明は、ラクトバチルス属乳酸菌及び免疫賦活剤に関する。

背景技術

[0002] 免疫力は、健康の維持、向上に非常に重要な役割を果たしており、その研究が様々なところでなされている。免疫には自然免疫と獲得免疫が存在し、生体防御機能を担っている。健康志向の高まりから、これらの免疫機能を高める手段が熱望されている。かかる免疫機能を高める手段として乳酸菌を摂取する方法が知られている。乳酸菌には様々な種類のものがあるが、ヨーグルトの製造等の多種多様な食品への使用が可能なため、ラクトバチルス属の乳酸菌が産業上有用である。従って、免疫賦活活性が高いラクトバチルス属の乳酸菌の開発が熱望されている。

先行技術文献

特許文献

- [0003] 特許文献1：特許第6 1 7 0 1 9 0号公報
特許文献2：特許第6 6 5 2 3 3 1号公報
特許文献3：特許第6 7 0 5 6 2 8号公報
特許文献4：特許第6 7 9 6 2 9 9号公報
特許文献5：特許第5 9 6 8 6 5 5号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 本発明は、ラクトバチルス属乳酸菌を用いる新規免疫賦活剤であって、高い免疫賦活活性を有するものを提供することを課題とする。好ましい実施形態において、本発明は、公知の乳酸菌であるJCM5805株よりも高い免疫賦活活性を示す新規ラクトバチルス属乳酸菌及び当該ラクトバチルス属乳酸菌を用いる免疫賦活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

[0005] かかる状況の下、本発明者らは、免疫賦活の観点から多種多様な乳酸菌について検討をおこなった結果、無数に存在する乳酸菌のなかから高い免疫賦活活性を示す乳酸菌を複数見出した。しかも、ラクトバチルス属乳酸菌であるラクトバチルス・ヘルペティカスのなかに活性が高いものがあることを見出した。本発明はかかる新規の知見に基づく。従って、本発明は以下の項に示す免疫賦活剤、乳酸菌等を提供する：

項1．有効成分としてラクトバチルス・ヘルペティカスを含む免疫賦活剤であって、前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが、樹状細胞様細胞活性化、IgA産生誘導及びIL-12産生誘導の3つの機能を有する、免疫賦活剤。

[0006] 項2．前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが、ラクトバチルス・ヘルペティカスGCL1815、またはラクトバチルス・ヘルペティカスGCJ5-4Bである、項1に記載の免疫賦活剤。

[0007] 項3．前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが以下の(1)～(3)からなる群より選択される少なくとも1つの要件を満たす、項1又は2に記載の免疫賦活剤。

(1) 8×10^5 cells/mLの濃度のヒト由来末梢血単核細胞液250 μ Lを播種したウェルに 1×10^7 cells/ウェルの該乳酸菌を添加した場合に100 ng/mL以上のIgAを産生する

(2) 1. 25×10^5 cells/mLの濃度のヒト由来樹状細胞様細胞200 μ Lを播種したウェルに 4×10^6 cells/ウェルの該乳酸菌を添加した場合のCD86の発現強度が、乳酸菌を添加しないコントロールと比較して1.5倍以上である

(3) 1. 25×10^5 cells/mLの濃度のヒト由来樹状細胞様細胞200 μ Lを播種したウェルに 4×10^6 cells/ウェルの該乳酸菌を添加した場合に300 pg/mL以上のIL-12を産生する。

[0008] 項4．前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが前記(1)～(3)の3つ

の要件を満たす、項 3 に記載の免疫賦活剤。

- [0009] 項 5. 前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが有する樹状細胞様細胞活性化、IgA 産生誘導及び IL-12 産生誘導の 3 つの免疫賦活機能のうち、少なくとも 1 つの免疫賦活機能が、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) JCM5805 株よりも高い、項 1～4 のいずれか一項に記載の免疫賦活剤。
- [0010] 項 6. 前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが有する樹状細胞様細胞活性化、IgA 産生誘導及び IL-12 産生誘導の 3 つの免疫賦活機能が、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) JCM5805 株よりも高い、項 1～5 のいずれか一項に記載の免疫賦活剤。
- [0011] 項 7. 前記免疫賦活が、健康な人の免疫機能の維持である、項 1～6 のいずれか一項に記載の免疫賦活剤。
- [0012] 項 8. 項 1～7 のいずれか一項に記載の免疫賦活剤を含有する、免疫賦活用の経口組成物。
- [0013] 項 9. 飲食品用組成物である、項 8 に記載の経口組成物。
- [0014] 項 10. 項 1～7 のいずれか一項に記載の免疫賦活剤を含有する、ウイルス感染症の予防または治療剤。
- [0015] 項 11. 独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) の特許微生物寄託センター (NPMD) における受託番号が NITE BP-03804 であるラクトバチルス属に属する乳酸菌。
- [0016] 項 12. 独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) の特許微生物寄託センター (NPMD) における受託番号が NITE BP-03805 であるラクトバチルス属に属する乳酸菌。
- [0017] 項 13. 免疫賦活における使用のための乳酸菌であって、該乳酸菌が樹状細胞様細胞活性化、IgA 産生誘導及び IL-12 産生誘導の 3 つの機能を有する、ラクトバチルス・ヘルペティカスである、乳酸菌。
- [0018] 項 14. ラクトバチルス・ヘルペティカス GCL1815、またはラクトバチルス・ヘルペティカス GCJ5-4B である、項 13 に記載の使用のため

めの乳酸菌。

[0019] 項15. 前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが以下の(1)～(3)からなる群より選択される少なくとも1つの要件を満たす、項13又は14に記載の使用のための乳酸菌。

(1) 8×10^5 cells/mLの濃度のヒト由来末梢血単核細胞液250 μ Lを播種したウェルに 1×10^7 cells/ウェルの該乳酸菌を添加した場合に100 ng/mL以上のIgAを産生する

(2) 1.25×10^5 cells/mLの濃度のヒト由来樹状細胞様細胞200 μ Lを播種したウェルに 4×10^6 cells/ウェルの該乳酸菌を添加した場合のCD86の発現強度が、乳酸菌を添加しないコントロールと比較して1.5倍以上である

(3) 1.25×10^5 cells/mLの濃度のヒト由来樹状細胞様細胞200 μ Lを播種したウェルに 4×10^6 cells/ウェルの該乳酸菌を添加した場合に300 pg/mL以上のIL-12を産生する。

[0020] 項16. 前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが前記(1)～(3)の3つの要件を満たす、項15に記載の使用のための乳酸菌。

[0021] 項17. 前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが有する樹状細胞様細胞活性化、IgA産生誘導及びIL-12産生誘導の3つの免疫賦活機能のうち、少なくとも1つの免疫賦活機能が、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) JCM5805 株よりも高い、項13～16のいずれか一項に記載の使用のための乳酸菌。

[0022] 項18. 前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが有する樹状細胞様細胞活性化、IgA産生誘導及びIL-12産生誘導の3つの免疫賦活機能が、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) JCM5805 株よりも高い、項13～17のいずれか一項に記載の使用のための乳酸菌。

[0023] 項19. 前記免疫賦活が、健康な人の免疫機能の維持である、項13～18のいずれか一項に記載の使用のための乳酸菌。

- [0024] 項20. 有効成分としてラクトバチルス・ヘルペティカスを含む、免疫賦活のための組成物であって、前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが、樹状細胞様細胞活性化、IgA産生誘導及びIL-12産生誘導の3つの機能を有する、組成物。
- [0025] 項21. 前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが、ラクトバチルス・ヘルペティカスGC L1815、またはラクトバチルス・ヘルペティカスGC J5-4Bである、項20に記載の組成物。
- [0026] 項22. 前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが以下の(1)～(3)からなる群より選択される少なくとも1つの要件を満たす、項20又は21に記載の組成物。
- (1) $8 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ の濃度のヒト由来末梢血単核細胞液250 μL を播種したウェルに $1 \times 10^7 \text{ cells}$ /ウェルの該乳酸菌を添加した場合に100 ng/mL以上のIgAを産生する
- (2) $1.25 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ の濃度のヒト由来樹状細胞様細胞200 μL を播種したウェルに $4 \times 10^6 \text{ cells}$ /ウェルの該乳酸菌を添加した場合のCD86の発現強度が、乳酸菌を添加しないコントロールと比較して1.5倍以上である
- (3) $1.25 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ の濃度のヒト由来樹状細胞様細胞200 μL を播種したウェルに $4 \times 10^6 \text{ cells}$ /ウェルの該乳酸菌を添加した場合に300 pg/mL以上のIL-12を産生する。
- [0027] 項23. 前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが前記(1)～(3)の3つの要件を満たす、項22に記載の組成物。
- [0028] 項24. 前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが有する樹状細胞様細胞活性化、IgA産生誘導及びIL-12産生誘導の3つの免疫賦活機能のうち、少なくとも1つの免疫賦活機能が、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) JCM5805 株よりも高い、項20～23のいずれか一項に記載の組成物。
- [0029] 項25. 前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが有する樹状細胞様細胞活

性化、IgA産生誘導及びIL-12産生誘導の3つの免疫賦活機能が、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) JCM5805 株よりも高い、項20～24のいずれか一項に記載の組成物。

[0030] 項26. 前記免疫賦活が、健康な人の免疫機能の維持である、項20～25のいずれか一項に記載の組成物。

項27. ラクトバチルス・ヘルペティカスである乳酸菌であって、該乳酸菌が樹状細胞様細胞活性化、IgA産生誘導及びIL-12産生誘導の3つの機能を有する、乳酸菌。

[0031] 項28. ラクトバチルス・ヘルペティカスGCL1815、またはラクトバチルス・ヘルペティカスGCJ5-4Bである、項27に記載の乳酸菌。

[0032] 項29. 前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが以下の(1)～(3)からなる群より選択される少なくとも1つの要件を満たす、項27又は28に記載の乳酸菌。

(1) 8×10^5 cells/mLの濃度のヒト由来末梢血単核細胞液250 μ Lを播種したウェルに 1×10^7 cells/ウェルの該乳酸菌を添加した場合に100 ng/mL以上のIgAを産生する

(2) 1.25×10^5 cells/mLの濃度のヒト由来樹状細胞様細胞200 μ Lを播種したウェルに 4×10^6 cells/ウェルの該乳酸菌を添加した場合のCD86の発現強度が、乳酸菌を添加しないコントロールと比較して1.5倍以上である

(3) 1.25×10^5 cells/mLの濃度のヒト由来樹状細胞様細胞200 μ Lを播種したウェルに 4×10^6 cells/ウェルの該乳酸菌を添加した場合に300 pg/mL以上のIL-12を産生する。

[0033] 項30. 前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが前記(1)～(3)の3つの要件を満たす、項29に記載の乳酸菌。

[0034] 項31. 前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが有する樹状細胞様細胞活性化、IgA産生誘導及びIL-12産生誘導の3つの免疫賦活機能のうち、少なくとも1つの免疫賦活機能が、ラクトコッカス・ラクティス (*Lac*

t o c o c c u s l a c t i s) J C M 5 8 0 5 株よりも高い、項 1 3
～ 1 6 のいずれか一項に記載の使用のための乳酸菌。

[0035] 項 3 2. 前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが有する樹状細胞様細胞活性化、I g A 産生誘導及び I L - 1 2 産生誘導の 3 つの免疫賦活機能が、ラクトコッカス・ラクティス (L a c t o c o c c u s l a c t i s) J C M 5 8 0 5 株よりも高い、項 2 7 ～ 3 1 のいずれか一項に記載の乳酸菌。

[0036] 項 3 3. 有効成分としてラクトバチルス・ヘルペティカスを含む、健康な人の免疫機能を維持するための経口組成物であって、前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが、樹状細胞様細胞活性化、I g A 産生誘導及び I L - 1 2 産生誘導の 3 つの機能を有する、経口組成物。

[0037] 項 3 4. 免疫賦活剤を製造するためのラクトバチルス・ヘルペティカスの使用であって、前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが、樹状細胞様細胞活性化、I g A 産生誘導及び I L - 1 2 産生誘導の 3 つの機能を有する、使用。

[0038] 項 3 5. それを必要とする対象にラクトバチルス・ヘルペティカスの有効量を投与することを含む、免疫賦活方法であって、前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが、樹状細胞様細胞活性化、I g A 産生誘導及び I L - 1 2 産生誘導の 3 つの機能を有する、方法。

項 3 6. それを必要とする対象にラクトバチルス・ヘルペティカスの有効量を投与することを含む、ウイルス感染症の予防または治療方法であって、前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが、樹状細胞様細胞活性化、I g A 産生誘導及び I L - 1 2 産生誘導の 3 つの機能を有する、方法。

項 3 7. 前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが、ラクトバチルス・ヘルペティカス G C L 1 8 1 5、またはラクトバチルス・ヘルペティカス G C J 5 - 4 B である、項 3 4 に記載の使用又は項 3 5 若しくは 3 6 に記載の方法。

[0039] 項 3 8. 前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが以下の (1) ～ (3) からなる群より選択される少なくとも 1 つの要件を満たす、項 3 4 に記載の使

用、項35若しくは36に記載の方法又は項37に記載の使用若しくは方法。

(1) 8×10^5 cells/mLの濃度のヒト由来末梢血単核細胞液250 μ Lを播種したウェルに 1×10^7 cells/ウェルの該乳酸菌を添加した場合に100 ng/mL以上のIgAを産生する

(2) 1.25×10^5 cells/mLの濃度のヒト由来樹状細胞様細胞200 μ Lを播種したウェルに 4×10^6 cells/ウェルの該乳酸菌を添加した場合のCD86の発現強度が、乳酸菌を添加しないコントロールと比較して1.5倍以上である

(3) 1.25×10^5 cells/mLの濃度のヒト由来樹状細胞様細胞200 μ Lを播種したウェルに 4×10^6 cells/ウェルの該乳酸菌を添加した場合に300 pg/mL以上のIL-12を産生する。

[0040] 項39. 前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが前記(1)～(3)の3つの要件を満たす、項38に記載の使用若しくは方法。

[0041] 項40. 前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが有する樹状細胞様細胞活性化、IgA産生誘導及びIL-12産生誘導の3つの免疫賦活機能のうち、少なくとも1つの免疫賦活機能が、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) JCM5805 株よりも高い、項34に記載の使用、項35若しくは36に記載の方法又は項37～39のいずれか一項に記載の使用若しくは方法。

[0042] 項41. 前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが有する樹状細胞様細胞活性化、IgA産生誘導及びIL-12産生誘導の3つの免疫賦活機能が、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) JCM5805 株よりも高い、項34に記載の使用、項35若しくは36に記載の方法又は項37～40のいずれか一項に記載の使用若しくは方法。

[0043] 項42. 前記免疫賦活が、健康な人の免疫機能の維持である、項34に記載の使用、項35に記載の方法又は項37～41のいずれか一項に記載の使用若しくは方法。

- [0044] 項 4 3. 前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが経口投与される、項 3 5～4 2 のいずれか一項に記載の方法。
- [0045] 項 4 4. 前記免疫賦活剤が経口組成物である、項 3 4～4 2 のいずれか一項に記載の使用。
- [0046] 項 4 5. 前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが飲食品として投与される、項 3 5～4 3 のいずれか一項に記載の方法。
- [0047] 項 4 6. 前記免疫賦活剤が飲食品用組成物である、項 3 4～4 2 及び 4 4 のいずれか一項に記載の使用。
- [0048] 項 4 7. 前記免疫賦活剤がウイルス感染症の予防または治療剤である、項 3 4～4 2、4 4 及び 4 6 のいずれか一項に記載の使用。

発明の効果

- [0049] 本発明によれば、ラクトバチルス属乳酸菌を用いる新規免疫賦活剤であって、高い免疫賦活を有するものを提供することができる。

図面の簡単な説明

- [0050] [図1]調製例 1 および調製例 2 のIgA産生能を評価した結果を示す。図中の略称は以下の通り：je1:Lactobacillus jensenii 1、fe6:Limosilactobacillus fermentum 6、fe20:Limosilactobacillus fermentum 20、cr2:Lactobacillus crispatus 2、pe5:Lactiplantibacillus pentosus 5、la23:Lactococcus lactis 23、la24:Lactococcus lactis 24、he11:Lactobacillus helveticus GCJ5-4B(受託番号N I T E B P - O 3 8 0 5)、he12:Lactobacillus helveticus GCL1815(受託番号N I T E B P - O 3 8 0 4)、ga8:Lactobacillus gasseri 8、la44:Lactococcus lactis 44、pe6:Lactiplantibacillus pentosus 6、cr11:Lactobacillus crispatus 11、la15:Lactococcus lactis 15
- [図2]調製例 1 および調製例 2 の樹状細胞様細胞活性化を評価した結果を示す。
- [図3]調製例 1 および調製例 2 のNK細胞活性化を評価した結果を示す。

発明を実施するための形態

[0051] 免疫賦活剤

本発明は有効成分としてラクトバチルス・ヘルペティカスを含む免疫賦活剤であって、前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが、樹状細胞様細胞活性化、IgA産生誘導及びIL-12産生誘導の3つの機能を有する、免疫賦活剤を提供する。

[0052] ラクトバチルス・ヘルペティカスとしては、ラクトバチルス・ヘルペティカスGCL1815（「ラクトバチルス・ヘルペティカスGCD8-9D」と表記するものも含まれる。以下同じ。）、ラクトバチルス・ヘルペティカスGCJ5-4B等が挙げられ、ラクトバチルス・ヘルペティカスGCL1815、ラクトバチルス・ヘルペティカスGCJ5-4B等が好ましい。好ましい実施形態において、ラクトバチルス・ヘルペティカスとしては、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（日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室（郵便番号292-0818））に2023年1月20日に寄託されている、受託番号がNITE BP-03804又はNITE BP-03805である株等が挙げられる。

[0053] 本発明において、免疫賦活剤の有効成分であるラクトバチルス・ヘルペティカスは、樹状細胞様細胞活性化、IgA産生誘導及びIL-12産生誘導の3つ全ての機能を有する。

具体的には、免疫賦活剤の有効成分であるラクトバチルス・ヘルペティカスは、まず、樹状細胞様細胞活性化を有する。樹状細胞は免疫機能において大きな役割を果たしている。より具体的には、例えば、樹状細胞はマクロファージやNK細胞などとともに自然免疫において重要な役割を担っており、体内に細菌やウイルスなどの異物が侵入した場合、まずそれらを排除する働きを示す。また、樹状細胞は侵入した異物の情報をT細胞やB細胞へ抗原提示などにより伝達し、異物に対して特異的に作用する抗体産生の促進や細胞障害性T細胞を活性化するなど獲得免疫においても重要な役割を果たしている。

[0054] このように樹状細胞は自然免疫および獲得免疫の両方に関わる細胞であり、免疫全体に大きな影響を及ぼしている。樹状細胞には様々な種類が存在す

るが、大きく分けて形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cell: pDC) と従来型樹状細胞 (conventional dendritic cell: cDC) に分類される。pDC はウイルスに対する増殖阻害活性を示し、NK細胞の活性化にも寄与する I 型インターフェロンの主要な産生細胞であるが抗原提示能は弱い。一方、cDC はNK細胞を活性化する IL-12 を産生するのに加え、強い抗原提示能を有することから、獲得免疫の誘導にも重要な役割を果たしている。獲得免疫の一種である IgA は、他の免疫グロブリンと異なり特異性が低く、多くの種類の細菌・ウイルスに作用するため幅広い感染症の予防に寄与すると考えられており、自然免疫と獲得免疫をともに活性化する cDC は感染症予防の中心的な役割を担う細胞の 1 つである。本発明において、「樹状細胞様細胞」は、生体から採取した樹状細胞及び単球、iPS細胞、ES細胞等の幹細胞から誘導した cDC の機能を有した細胞を総称したものである。樹状細胞様細胞の活性化の程度を測定することにより、生体内での樹状細胞に対する乳酸菌の影響を評価することができる。

[0055] 具体的には、乳酸菌による樹状細胞様細胞活性化は、例えば、 $1.25 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ の濃度のヒト由来樹状細胞様細胞 $200 \mu\text{L}$ を播種したウェルに $4 \times 10^6 \text{ cells}$ /ウェルの乳酸菌を添加し、CD86 の発現強度を測定することにより評価することができる。より具体的には、上記測定は、本願実施例に記載の方法に従い行うことができる。本発明においては、ラクトバチルス・ヘルベティカスのうち、上記方法により測定した場合の CD86 の発現強度が、乳酸菌を添加しないコントロールと比較して（[本発明の有効成分の乳酸菌添加群における CD86 の発現強度] / [コントロールにおける CD86 の発現強度] の比率で）、例えば、105%以上、好ましくは130%以上、より好ましくは145%以上、さらに好ましくは150%以上、なおさらに好ましくは180%以上、特に好ましくは200%以上であるようなものが好ましい。上記測定に使用する樹状細胞様細胞は限定されないが、典型的には、本願実施例で使用されている未成熟樹状細胞 (M

ylc細胞)を分化誘導させた不死化樹状細胞等を用いることができる。

[0056] また、乳酸菌によるIgA産生誘導は、例えば、 8×10^5 cells/mLの濃度のヒト由来末梢血単核細胞液250 μ Lを播種したウェルに 1×10^7 cells/ウェルの該乳酸菌を添加し、産生されるIgAを測定することにより評価することができる。より具体的には、上記測定は、本願実施例に記載の方法に従い行うことができる。本発明においては、ラクトバチルス・ヘルペティカスのうち、上記方法により測定した場合に100 ng/mL以上、より好ましくは150 ng/mL以上のIgAが検出されるようなものが好ましい。また、本発明においては、ラクトバチルス・ヘルペティカスのうち、上記方法により測定した場合のIgA産生量が、乳酸菌を添加しないコントロールと比較して（[本発明の有効成分の乳酸菌添加群におけるIgA産生量（ng/mL）] / [コントロールにおけるIgA産生量（ng/mL）]の比率で）、例えば、105%以上、好ましくは110%以上、好ましくは120%以上、好ましくは140%以上、好ましくは170%以上であるようなものが好ましい。

[0057] そして、乳酸菌によるIL-12産生誘導は、例えば、 1.25×10^5 cells/mLの濃度のヒト由来樹状細胞様細胞200 μ Lを播種したウェルに 4×10^6 cells/ウェルの該乳酸菌を添加し、産生されるIL-12を測定することにより評価することができる。より具体的には、上記測定は、本願実施例に記載の方法に従い行うことができる。本発明においては、ラクトバチルス・ヘルペティカスのうち、上記方法により測定した場合に好ましくは300 pg/mL以上、より好ましくは600 pg/mL以上、より好ましくは900 pg/mL以上のIL-12が検出されるようなものが好ましい。

[0058] また、本発明においては、ラクトバチルス・ヘルペティカスのうち、上記方法により測定した場合のIL-12産生量が、乳酸菌を添加しないコントロールと比較して（[本発明の有効成分の乳酸菌添加群におけるIL-12産生（pg/mL）] / [コントロールにおけるIL-12産生（pg/mL）]の比率で）、例えば、105%以上、好ましくは110%以上、好ましくは120%以上、好ましくは140%以上、好ましくは170%以上であるようなものが好ましい。

L)] の比率で)、例えば、好ましくは110%以上、より好ましくは180%以上、さらに好ましくは290%以上、なおさらに好ましくは500%以上、特に好ましくは1000%以上であるようなものが好ましい。

[0059] さらに好ましい実施形態においては、ラクトバチルス・ヘルペティカスとして、樹状細胞様細胞活性化、IgA産生誘導及びIL-12産生誘導からなる群より選択される少なくとも1つ（好ましくは少なくとも2つ、より好ましくは3つ全て）の免疫賦活機能が、ラクトコッカス・ラクティス（*Lactococcus lactis*）JCM5805 株よりも高いものを用いることが好ましい。当該実施形態における樹状細胞様細胞活性化、IgA産生誘導及びIL-12産生誘導の測定方法は上記と同様である。本発明の免疫賦活剤の有効成分であるラクトバチルス・ヘルペティカスに代えてJCM5805 株乳酸菌を用いる以外、上記と同様の操作を行うことにより、JCM5805 株乳酸菌の上記機能を測定することができる。

[0060] 本発明において、上記ラクトバチルス・ヘルペティカスとしては、死菌体（加熱死菌体等）を用いても、生菌を用いてもよい。本発明において、上記ラクトバチルス・ヘルペティカスは、1種単独で又は2種以上を組み合わせで用いることができる。

[0061] 本発明において上記乳酸菌は、免疫賦活剤の有効成分として用いられる。「免疫賦活」用途としては、上記樹状細胞様細胞活性化、IgA産生誘導、IL-12産生誘導等の用途が挙げられる。また、本発明において用語「免疫賦活」には、免疫機能が低下した人の当該免疫機能を向上させることだけでなく、健康な人の免疫機能の維持も包含される。

[0062] 本発明においては、本発明の有効成分であるラクトバチルス・ヘルペティカスそのものを免疫賦活剤として用いても、当該乳酸菌末と、薬学的に許容される、もしくは食品に添加され得る各種担体（例えば、等張化剤、キレート剤、安定化剤、pH調節剤、防腐剤、抗酸化剤、溶解補助剤、粘稠化剤、賦形剤、結合剤等）とを組み合わせた組成物として用いてもよい。当該実施形態において、免疫賦活剤組成物中のラクトバチルス・ヘルペティカスの含

有量は限定されないが、例えば、50質量%以上、60質量%以上、70質量%以上、80質量%以上、90質量%以上、95質量%以上、99質量%以上等の範囲で適宜設定できる。免疫賦活剤に用いるラクトバチルス・ヘルペティカス菌末中のラクトバチルス・ヘルペティカスの菌数は限定されないが、例えば、1億～100兆個/g、好ましくは100億～10兆個/g、より好ましくは500億～1兆個/g、さらに好ましくは1000億個/g以上、特に好ましくは3000億個/g以上の範囲で適宜設定できる。

[0063] 等張化剤としては、例えば、グルコース、トレハロース、ラクトース、フルクトース、マンニトール、キシリトール、ソルビトール等の糖類、グリセリン、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等の多価アルコール類、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム等の無機塩類等が挙げられる。これらの等張化剤は、1種単独で、又は2種以上を組み合わせ用いることができる。

[0064] キレート剤としては、例えば、エデト酸二ナトリウム、エデト酸カルシウム二ナトリウム、エデト酸三ナトリウム、エデト酸四ナトリウム、エデト酸カルシウム等のエデト酸塩類、エチレンジアミン四酢酸塩、ニトリロ三酢酸又はその塩、ヘキサメタリン酸ソーダ、クエン酸等が挙げられる。これらのキレート剤は、1種単独で、又は2種以上を組み合わせ用いることができる。

[0065] 安定化剤としては、例えば、亜硫酸水素ナトリウム等が挙げられる。

[0066] pH調節剤としては、例えば、塩酸、炭酸、酢酸、クエン酸等の酸が挙げられ、さらに水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等のアルカリ金属水酸化物、炭酸ナトリウム等のアルカリ金属炭酸塩又は炭酸水素塩、酢酸ナトリウム等のアルカリ金属酢酸塩、クエン酸ナトリウム等のアルカリ金属クエン酸塩、トロメタモール等の塩基等が挙げられる。これらのpH調節剤は、1種単独で、又は2種以上を組み合わせ用いることができる。

[0067] 防腐剤としては、例えば、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸プロピル

、パラオキシ安息香酸ブチル等のパラオキシ安息香酸エステル、グルコン酸クロルヘキシジン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、塩化セチルピリジニウム等の第4級アンモニウム塩、アルキルポリアミノエチルグリシン、クロロブタノール、ポリクォード、ポリヘキサメチレンビグアニド、クロルヘキシジン等が挙げられる。これらの防腐剤は、1種単独で、又は2種以上を組み合わせて用いることができる。

[0068] 抗酸化剤としては、例えば、亜硫酸水素ナトリウム、乾燥亜硫酸ナトリウム、ピロ亜硫酸ナトリウム、濃縮混合トコフェロール等が挙げられる。これらの抗酸化剤は、1種単独で、又は2種以上を組み合わせて用いることができる。

[0069] 溶解補助剤としては、例えば、安息香酸ナトリウム、グリセリン、D-ソルビトール、ブドウ糖、プロピレングリコール、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、マクロゴール、D-マンニトール等が挙げられる。これらの溶解補助剤は、1種単独で、又は2種以上を組み合わせて用いることができる。

[0070] 粘稠化剤としては、例えば、ポリエチレングリコール、メチルセルロース、エチルセルロース、カルメロースナトリウム、キサントガム、コンドロイチン硫酸ナトリウム、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール等が挙げられる。これらの粘稠化剤は、1種単独で、又は2種以上を組み合わせて用いることができる。

[0071] 賦形剤としては、例えば、乳糖、コーンスターチ、L-システイン、トレハロース、マルチトール、ソルビトール等が挙げられる。これらの賦形剤は、1種単独で、又は2種以上を組み合わせて用いることができる。

[0072] 結合剤としては、例えば、結晶セルロース、デンプン、ショ糖、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン、アラビアゴム末、ポリビニルピロリドン、プルラン、デキストリン、シクロデキストリン、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロー

ス、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール等が挙げられる。これらの結合剤は、1種単独で、又は2種以上を組み合わせて用いることができる。

[0073] また、上記組成物は、上記ラクトバチルス・ヘルペティカス以外に、免疫賦活機能を有することが知られている物質をさらに含んでいてもよい。免疫賦活機能を有することが知られている物質としては、例えば、ビタミンC、ビタミンA、亜鉛等が挙げられる。これらの物質は、1種単独で、又は2種以上を組み合わせて用いることができる。

[0074] 本発明の免疫賦活剤を対象（好ましくはヒト等の哺乳動物）が摂取することにより、免疫賦活効果がもたらされる。本発明の免疫賦活剤の摂取量は限定されないが、有効成分であるラクトバチルス・ヘルペティカスの1日摂取量として、例えば、1000万個～10兆個、好ましくは1億～1兆個、より好ましくは10億個～1000億個、さらに好ましくは50億～300億個、特に好ましくは100億～200億個の範囲で適宜設定できる。ラクトバチルス・ヘルペティカスの重量基準での本発明の免疫賦活剤の摂取量も限定されないが、有効成分であるラクトバチルス・ヘルペティカスの1日摂取量として、例えば、1mg～10g、好ましくは10mg～1000mg、より好ましくは40mg～300mg、さらに好ましくは200mg以上の範囲で適宜設定できる。

[0075] 経口組成物

別の実施形態において、本発明は、前記免疫賦活剤を含有する経口組成物を提供する。従って、本発明は、前記ラクトバチルス・ヘルペティカスを含有する経口組成物を提供する。経口組成物としては、飲食品組成物、医薬組成物等が包含される。本発明において飲食品組成物には、保健機能食品（栄養機能食品、特定保健用食品、機能性表示食品）等も包含される。

[0076] 飲食品組成物としては、野菜汁飲料、果汁飲料、野菜汁・果汁混合飲料、発酵乳飲料、アーモンド含有飲料等の飲料；アイスクリーム類、氷菓、アーモンド含有食品、ビスケット類（クリームサンドビスケット等）、チョコレ

ート類（準チョコレート等を含む）、発酵乳食品（ヨーグルト、チーズ）等の食品等が挙げられる。アイスクリーム類としては、ラクトアイス（発酵乳入りラクトアイス等）等が好ましい。クリームサンドビスケットとしては、クリームに前記ラクトバチルス・ヘルペティカスを配合したものが好ましい。準チョコレートとしては、コーン含有準チョコレート等が挙げられる。本発明において、これらの飲食品のうち、乳製品、乳製品を含む飲食品等が好ましい。乳製品としては、発酵乳、アイスクリーム類、乳飲料等が挙げられる。乳製品を含む飲食品としては、クリームサンドビスケット、ミルクチョコレート等が挙げられる。氷菓としては、乳入り氷菓（発酵乳入り氷菓等を含む）等が好ましい。本発明における飲食品組成物には、サプリメント等も包含される。サプリメントとしては、スポーツサプリメント（アミノ酸含有スポーツサプリメント等）が好ましい。アミノ酸含有スポーツサプリメントとしては、例えば、グルタミン含有スポーツサプリメント等が挙げられる。

[0077] 経口組成物の実施形態における有効成分のラクトバチルス・ヘルペティカスの詳細、その摂取量等は免疫賦活剤の説明において前述したのと同様である。当該実施形態において、経口組成物中におけるラクトバチルス・ヘルペティカス含有量は特に限定されないが、例えば、0.00001～99質量%、好ましくは0.0001～50質量%、より好ましくは0.001～10質量%、さらに好ましくは0.01～1質量%、特に好ましくは0.1質量%以上の範囲で適宜設定できる。本発明における経口組成物は、免疫賦活用途に用いることができる。

[0078] ウイルス感染症の予防または治療剤

本発明の有効成分である特定のラクトバチルス・ヘルペティカスを投与することにより免疫賦活効果をもたらすことができる。そのため、本発明がもたらす免疫賦活効果によりウイルス感染症の予防または治療効果を期待できる。従って、本発明は、前記免疫賦活剤を含有する、ウイルス感染症の予防または治療剤を提供する。また、本発明は、先述したラクトバチルス・ヘルペティカスを含有する、ウイルス感染症の予防または治療剤を提供する。対

象となるウイルスとしては、限定されないが、例えば、インフルエンザウイルス、コロナウイルス、アデノウイルス、RSウイルス、ヒトメタニューモウイルス、ライノウイルス等が挙げられる。ウイルス感染症の予防または治療剤の実施形態における有効成分のラクトバチルス・ヘルペティカスの詳細、その摂取量等は免疫賦活剤及び経口組成物の説明において前述したのと同様である。

[0079] ラクトバチルス・ヘルペティカス

本発明によれば、前述したラクトバチルス・ヘルペティカスに起因して、免疫賦活効果、ウイルス感染症の予防または治療効果をもたらすことができる。また、前述したラクトバチルス・ヘルペティカスは新規のものである。従って、本発明、前述したラクトバチルス・ヘルペティカス自体も提供する。本実施形態におけるラクトバチルス・ヘルペティカスの使用方法等は、免疫賦活剤、経口組成物及びウイルス感染症の予防または治療剤の説明において前述したのと同様である。

実施例

[0080] 乳酸菌死菌末の作成

調製例 1

自社保有乳酸菌株をMRS培地（Merck Millipore社製）を用いて30℃もしくは37℃で48時間、静置培養した。培養後、8,000×Gで10分間遠心分離することで集菌し、エンドトキシンフリーの生理食塩水（以下、生理食塩水）で3回洗浄した後、121℃で15分間オートクレーブすることにより殺菌した。その後、菌体を凍結乾燥し、10 mg/mLになるように生理食塩水で濃度を調整することで乳酸菌懸濁液を得た。

[0081] 調製例 2

調製例 1 の方法と同様にして、ラクトコッカス・ラクティス（*Lactococcus lactis*）JCM5805株（以下、JCM5805株）の加熱死菌体を調製した。その後、菌体を凍結乾燥し、10 mg/mLになるように生理食塩水で濃度を調整することで乳酸菌懸濁液を得た。なお、「JCM」の菌株は理化学研究所から分譲された

菌株であることを示す。

[0082] IgA産生誘導能によるスクリーニング

末梢血単核細胞用培地（以下、PBMC培地）の調製

非働化済みのウシ胎児血清（Thermo Fisher Scientific社製）（以下、FBS）を10質量%、MEMビタミン溶液（Thermo Fisher Scientific社製）を1質量%、MEM非必須アミノ酸溶液（Thermo Fisher Scientific社製）を1質量%、ペニシリン・ストレプトマイシン溶液（富士フイルム和光純薬工業社製）を1質量%、ピルビン酸ナトリウム溶液（Thermo Fisher Scientific社製）を1質量%、2-メルカプトエタノール（Thermo Fisher Scientific社製）を0.1質量%となるように、それぞれRPMI 1640（Thermo Fisher Scientific社製）に加えPBMC培地を調製した。

[0083] ヒト末梢血単核細胞（PBMC）の準備

凍結された正常ドナー由来のヒト末梢血単核細胞（Astarte Biologics社製）（以下、PBMC）を37℃のウォーターバスで速やかに融解し、10%FBS含有RPMI1640培地10 mLが入った50 mL容遠沈管に添加したあと、ゆっくりと転倒混和した。200×Gで5分間遠心分離しPBMCを沈殿させ、上清をアスピレーターで取り除き、ペレット化したPBMCにPBMC培地を10 mL添加し再懸濁させることでPBMC懸濁液を得た。

[0084] PBMCの播種、乳酸菌添加、培養

1.5 mL容マイクロチューブに PBMC懸濁液を20 μ Lとアクリジオンオレンジ（Logos Biosystems社製）を2 μ L加えよく混合した。その後、セルカウンター（Logos Biosystems社製、L20001）を用いて細胞濃度を算出した。PBMC懸濁液をPBMC培地にて細胞濃度が 8×10^5 cells/mLになるように希釈し、96ウェルプレート（TPP社製）に250 μ Lずつ播種した。さらに調製例1の乳酸菌懸濁液をそれぞれ50 μ g/mLとなるように96ウェルプレートのウェルに添加した。またコントロールとして、乳酸菌を添加していないウェルも用意した。37℃、5%CO₂条件のCO₂インキュベーターで120時間、静置培養した。

[0085] IgA測定

120時間PBMCを培養した96ウェルプレートを取り出し、培養液を8連マイクロチューブに250 μ L分取した。200×Gで10分間遠心分離することでPBMCを沈殿させ、新しい8連マイクロチューブに培養上清を220 μ L分取した。さらに1,500×Gで10分間遠心分離し、その培養上清をELISA法によるIgA定量に供した。IgA定量はAbcam社製のHuman IgA ELISA Kitを用いて行い、キット内の取扱説明書（Protocol Booklet）に従ってIgA濃度の測定を行った。実験の再現性を確認するために、PBMCの播種からIgA測定までの操作を2回行った。

[0086] 試験結果

乳酸菌を添加せずにPBMCを培養した培養液（コントロール）に対して、調製例1で調製した乳酸菌を添加してPBMCを培養した培養液中のIgA濃度が2倍以上になった乳酸菌を選抜した。

上記条件でスクリーニングを行った結果、70種の乳酸菌をIgA産生誘導能を有する乳酸菌として選抜した。一覧を表1に示す。なお IgA産生率は以下の式にて算出した。IgA産生率＝PBMC培養液中のIgA濃度（乳酸菌添加）／PBMC培養液中のIgA濃度（乳酸菌非添加）

[0087]

[表1]

乳酸菌名	IgA 産生率 (2 回の平 均値)	乳酸菌名	IgA 産生率 (2 回の平 均値)
Lactobacillus jensenii 1 ※	2.81	Lactobacillus gasseri 3	2.17
Lactobacillus helveticus GCL1815※	2.80	Lactobacillus helveticus 6	2.17
Lactobacillus acidophilus 2	2.70	Lacticaseibacillus casei 2	2.16
Lactobacillus helveticus 5	2.63	Lacticaseibacillus casei 26	2.16
Lactococcus lactis 44※	2.61	Lactobacillus helveticus 1	2.16
Lactococcus lactis 5	2.57	Lactobacillus gasseri 8 ※	2.15
Lactobacillus helveticus GCJ5-4B※	2.56	Lactococcus lactis 13	2.14
Lactilactobacillus sakei 6	2.50	Lactococcus lactis 20	2.13
Lactococcus lactis 15※	2.49	Lactococcus lactis 36	2.13
Lactiplantibacillus pentosus 6※	2.48	Lactococcus lactis 6	2.11
Lactococcus lactis 45	2.46	Lactococcus lactis 1	2.11
Lactobacillus helveticus 2	2.44	Lactococcus lactis 23※	2.11
Lactobacillus helveticus 7	2.40	Lactobacillus gasseri 7	2.10
Lacticaseibacillus casei 15	2.39	Limosilactobacillus reuteri 4	2.10
Levilactobacillus brevis 3	2.36	Lactiplantibacillus pentosus 5※	2.10
Lactiplantibacillus plantarum 18	2.35	Lactiplantibacillus pentosus 1	2.09
Limosilactobacillus fermentum 12	2.35	Lacticaseibacillus casei 5	2.09
Lactobacillus gasseri 10	2.35	Lacticaseibacillus casei 21	2.08
Lacticaseibacillus casei 16	2.34	Lacticaseibacillus casei 19	2.08
Levilactobacillus brevis 10	2.34	Levilactobacillus brevis 5	2.07
Lactococcus lactis 22	2.33	Lacticaseibacillus casei 24	2.07
Limosilactobacillus fermentum 6※	2.32	Lactococcus lactis 34	2.07

Lacticaseibacillus casei 17	2.29	Limosilactobacillus fermentum 20※	2.07
Levilactobacillus brevis 8	2.27	Latilactobacillus sakei 9	2.06
Lactobacillus helveticus 19	2.25	Levilactobacillus brevis 7	2.04
Lactococcus lactis 24※	2.25	Lactococcus lactis 21	2.03
Levilactobacillus brevis 9	2.24	Latilactobacillus sakei 3	2.03
Levilactobacillus brevis 6	2.23	Lactobacillus crispatus 11※	2.03
Lactobacillus gasseri 40	2.21	Lactobacillus crispatus 2※	2.02
Lacticaseibacillus casei 18	2.20	Lactobacillus helveticus 14	2.02
Lactococcus lactis 43	2.20	Lactococcus lactis 14	2.01
Lactobacillus gasseri 30	2.20	Limosilactobacillus fermentum 3	2.01
Lactobacillus gasseri 20	2.19	Lactococcus lactis 42	2.01
Lactococcus lactis 19	2.19	Lactobacillus helveticus 10	2.01
Lactobacillus helveticus 3	2.17	Lactococcus lactis 10	2.00

このうち、異なる菌種、培養のしやすさ等の観点から14種類の乳酸菌を選抜し、以降の試験に供した。なお選抜した乳酸菌には表1内に※を記した。

[0088] IgA産生誘導の評価

ヒト末梢血からの末梢血単核細胞の単離

健常成人12名の協力により血液を20 mL採取し、抗凝固剤（ヘパリンナトリウム）入りの採血管にそれぞれ回収した。まずLymphoprep（登録商標）Tube（AXS社製）を400×Gで1分間遠心することで、使用前にLymphoprep（登録商標）Tube内のLymphoprep（登録商標）を下に落とした。次に、50 mL容遠沈管内で血液と生理食塩水を1:1で混合した後、Lymphoprep（登録商標）Tubeに20-30 mL移し、室温にて800×Gで20分間遠心分離した。遠心分離することで形成した層から、パスツールピペットを用いて末梢血単核細胞の層の溶液を新しい50 mL容遠沈管に採取した。末梢血単核細胞を採取した50 mL容遠沈管に生理食塩水を20 mL添加し、250×Gで10分間遠心分離することで末梢血単核細胞をペレット化した。上清をアスピレーターで取り除き、ペレット化した末梢血単核細胞にPBMC培地を1 mL添加し懸濁させることで末梢血単核細胞液

を得た。

[0089] 末梢血単核細胞の播種、乳酸菌添加、培養

PBMC培地90 μL と末梢血単核細胞液10 μL とを1.5 mL容マイクロチューブに測り取りよく混合した後、新しい1.5 mL容マイクロチューブに20 μL を分取し2 μL のアクリジオンオレンジ (Logos Biosystems社製) を加えよく混合した。その後、セルカウンター (Logos Biosystems社製、L20001) を用いて細胞濃度を算出した。末梢血単核細胞液をPBMC培地にて 8×10^5 cells/mLの濃度になるように希釈し、96ウェルプレート (TPP社製) に250 μL ずつ播種した。さらに調製例1の乳酸菌懸濁液、調製例2の乳酸菌懸濁液をそれぞれ 1×10^7 cells/ウェル、ポジティブコントロールとしてリポポリサッカライド (富士フイルム和光純薬工業社製) (以下、LPS) を終濃度10 ng/mLとなるように96ウェルプレートのウェルに添加した。またコントロールとして、乳酸菌を添加していないウェルも用意した。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件の CO_2 インキュベーターで120時間、静置培養した。

[0090] IgA測定

120時間末梢血単核細胞を培養した96ウェルプレートを取り出し、培養液を8連マイクロチューブに250 μL 分取した。200 $\times$ Gで10分間遠心分離することで末梢血単核細胞を沈殿させ、新しい8連マイクロチューブに培養上清を220 μL 分取した。さらに1,500 $\times$ Gで10分間遠心分離し、その培養上清をELISA法によるIgA定量に供した。IgA定量はAbcam社製のHuman IgA ELISA Kitを用いて行い、キット内の取扱説明書 (Protocol Booklet) に従ってIgA濃度の測定を行った。

[0091] 樹状細胞様細胞活性化の評価

分化培地の調製

Mylc専用培地B (マイキャン・テクノロジーズ株式会社製) とMylc専用培地サプリメントB (マイキャン・テクノロジーズ株式会社製) とを200 : 1の比率で混合させ分化培地を得た。

[0092] 乳酸菌懸濁液 (1 mg/mL) の調製

調製例1および調製例2で得た乳酸菌懸濁液を、生理食塩水を用いて10倍希釈することで乳酸菌懸濁液（1 mg/mL）を得た。乳酸菌懸濁液（1 mg/mL）については、ブリード法にて菌数濃度を測定し、 4×10^7 cells/mLになるように分化培地で希釈した。

[0093] 樹状細胞の播種、乳酸菌添加、培養

マイキャン・テクノロジーズ株式会社から購入し3日間分化誘導させた不死化樹状細胞aMylc-2-A分化細胞（以下、樹状細胞）を回収した。次に、 $300 \times G$ で5分間遠心分離し樹状細胞を沈殿させ、上清をアスピレーターで取り除き、ペレット化した樹状細胞に分化培地を2 mL添加した。セルカOUNTERを用いて細胞濃度を算出した後、樹状細胞を分化培地にて 2.5×10^5 cells/mLの濃度になるように希釈し、Nunclon Sphera 96ウェル丸底プレート（Thermo Fisher Scientific社製）に100 μ Lずつ播種した。さらに乳酸菌懸濁液（ 4×10^7 cells/mL）をウェルにそれぞれ100 μ L、ポジティブコントロールとしてLPSを終濃度1 ng/mLとなるようにウェルに100 μ L添加した。またコントロールとして、乳酸菌を添加していないウェルも用意した。37 $^{\circ}C$ 、5%CO₂条件のCO₂インキュベーターで24時間、静置培養した。

[0094] 樹状細胞および培養上清の回収

24時間樹状細胞を培養した96ウェルプレートを取り出し、培養液を8連マイクロチューブに200 μ L分取した。 $500 \times G$ で10分間遠心分離することで樹状細胞を沈殿させ、新しい8連マイクロチューブに培養上清を140 μ L分取した。8連マイクロチューブに残った培養上清をアスピレーターで除去し、樹状細胞の沈殿物を得た。

[0095] 細胞表面マーカー（CD86）測定用試薬の調製

1. FcRブロッキング溶液

eBioscience（登録商標）Flow Cytometry Staining Buffer（Invitrogen社製）（以下、染色バッファー）と、Fc Receptor binding inhibitor（eBioscience社製）とを19：1の比率で混合させることでFcRブロッキング溶液を得た。

[0096] 2. 抗体溶液

染色バッファーと、PE anti-human CD86 Antibodyとを49：1の比率で混合させることで抗体溶液を得た。

[0097] 細胞表面マーカー（CD86）の測定

樹状細胞の沈殿物に染色バッファー200 μL を加え懸濁した。500×Gで5分間遠心分離し、上清をアスピレーターで取り除き、FcRブロッキング溶液20 μL を加え懸濁させた後、氷上で20分間静置させた。さらに、抗体溶液を20 μL 加え懸濁させた後、氷上で30分間静置させた。静置後、染色バッファーを160 μL 加え細胞を懸濁させ、500×Gで5分間遠心分離し、上清をアスピレーターで取り除いた。次に、染色バッファーを200 μL 加え細胞を懸濁させ、500×Gで5分間遠心分離し、上清をアスピレーターで取り除いた。染色バッファー200 μL を加え細胞を再懸濁させた溶液について、フローサイトメーター（ソニー株式会社製、SA3800）を用いて（レーザー波長：488 nm）細胞表面マーカー（CD86）の発現強度を測定した。

[0098] NK細胞活性化の評価

前述の「樹状細胞および培養上清の回収」に記載の方法で得た培養上清を用いて、NK細胞活性化を評価するためにIL-12測定を行った。IL-12測定はAbcam社製の Human IL-12 p70 ELISA Kit 用いて行い、キット内の取扱説明書（Protocol Booklet）に従ってIL-12濃度の測定を行った。

[0099] IgA産生誘導の評価

調製例1および調製例2のIgA産生能を評価した結果を図1に示す。図1に示すように、乳酸菌を添加していない場合（コントロール）と比較して、調製例1の乳酸菌を添加し培養することで、cr2、la44、cr11、la15を除き有意に末梢血単核細胞のIgA産生誘導能が上昇した。また調製例2のJCM5805株を添加した場合と比較しても、調製例1の乳酸菌を添加し培養することで、cr2、la44、cr11、la15を除き有意に末梢血単核細胞のIgA産生誘導能が上昇した。ヒトを含めた動物において、これらの乳酸菌を摂取することにより、IgA産生が亢進し、ウイルスや細菌の生体への侵入を防ぐことで、感染防御能を高めることが期待できる。

[0100] 樹状細胞様細胞活性化の評価

調製例 1 および調製例 2 の樹状細胞様細胞活性化を評価した結果を図 2 に示す。なお樹状細胞様細胞活性化の評価は、細胞表面マーカー (CD86) の発現強度を測定することにより評価した。図 2 に示すように、乳酸菌を添加していない場合 (コントロール) と比較して、調製例 1 の乳酸菌を添加し培養することで、pe6を除き有意に樹状細胞が活性化した。また調製例 2 のJCM5805株を添加する場合と比較しても、調製例 1 の乳酸菌を添加し培養することで、je1、fe20、pe5、la23、la24、la44、pe6、la15を除き有意に樹状細胞が活性化した。ヒトを含めた動物において、これらの乳酸菌を摂取することにより、樹状細胞が活性化することで、免疫全体を賦活化することが期待できる。

[0101] NK細胞活性化の評価

調製例 1 および調製例 2 のNK細胞活性化を評価した結果を図 3 に示す。なおNK細胞活性化の評価は、IL-12濃度を測定することにより評価した。図 3 に示すように、乳酸菌を添加していない場合 (コントロール) と比較して、調製例 1 の乳酸菌を添加し培養することで、la44を除き有意にNK細胞が活性化した。特にhe11及びhe12は顕著にNK細胞を活性化した。また調製例 2 のJCM5805株を添加する場合と比較しても、調製例 1 の乳酸菌を添加し培養することで、有意にNK細胞が活性化した。ヒトを含めた動物において、これらの乳酸菌を摂取することにより、NK細胞が活性化することで、細菌やウイルスに感染した細胞を攻撃し感染拡大を防ぐ作用が亢進し、感染防御能を高めることが期待できる。

[0102] 上記各試験に示されるように、he11及びhe12は、樹状細胞様細胞活性化、IgA 産生誘導及びIL-12 産生誘導の 3つの機能を全て示した。具体的には、he11及びhe12は、以下の (1) ~ (3) の機能を全て示した：

(1) 8×10^5 cells/mL の濃度のヒト由来末梢血単核細胞液 250 μ L を播種したウェルに 1×10^7 cells/ウェルの該乳酸菌を添加した場合に 100 ng/mL 以上の IgA を産生する

(2) 1.25×10^5 cells/mL の濃度のヒト由来樹状細胞様細胞 200 μ L を播種したウェルに 4×10^6 cells/ウェルの該乳酸菌を添加した場合の CD86 の発現強度が、乳酸菌を添加しないコントロールと比較して 1.5 倍以上である

(3) 1.25×10^5 cells/mL の濃度のヒト由来樹状細胞様細胞 200 μ L を播種したウェルに 4×10^6 cells/ウェルの該乳酸菌を添加した場合に 300 pg/mL 以上の IL-12 を産生する。

さらに、he11 及び he12 は、樹状細胞様細胞活性化、IgA 産生誘導及び IL-12 産生誘導の 3 つの免疫賦活機能の全ての免疫賦活機能が、JCM 5805 株よりも高かった。

[0103] 処方例 1

表 2 に示す材料を使用して乳酸菌死菌末を含むアイスクリームを得た。具体的には、まず、ボウルに卵黄と砂糖を入れよく混合した。別途、鍋に生クリーム、牛乳、および乳酸菌死菌末を入れて火にかけて、鍋の周りがふつふつと沸いてきたら火から下し、卵黄と砂糖を混合したボウルに少しずつ混合しながら加えた。得られた混合物を金属製の容器に入れて粗熱を取り、蓋をして -20°C で冷却した。3 時間後に全体をかき混ぜ、その後は 30 分おきに 4 回全体をかき混ぜることにより、乳酸菌死菌末を含むアイスクリームを得た。

[0104] [表2]

牛乳	57 g
卵黄	29 g
砂糖	13 g
調製例 1 の乳酸菌死菌末	1 g
合計	100g

[0105] 処方例 2

表 3 に示す材料を使用して乳酸菌死菌末を含むヨーグルトを得た。

[0106] [表3]

ヨーグルト (BifiX ヨーグルト プレーン 砂糖 不使用：江崎グリコ株式会社)	99 g
調製例 1 の乳酸菌死菌末	1 g
合計	100g

[0107] 処方例 3

表 4 に示す材料を使用して乳酸菌死菌末を含むチョコレートを得た。具体的には、チョコレートを50℃程度のお湯で湯煎して融かした後に、乳酸菌死菌末を添加してよく混合し、型に入れて成形し、室温で静置して固化させることにより乳酸菌死菌末を含むチョコレートを得た。

[0108] [表4]

チョコレート	99 g
調製例 1 の乳酸菌死菌末	1 g
合計	100g

請求の範囲

- [請求項1] 有効成分としてラクトバチルス・ヘルペティカスを含む免疫賦活剤であって、前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが、樹状細胞様細胞活性化、IgA産生誘導及びIL-12産生誘導の3つの機能を有する、免疫賦活剤。
- [請求項2] 前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが、ラクトバチルス・ヘルペティカスGCL1815、またはラクトバチルス・ヘルペティカスGCJ5-4Bである、請求項1に記載の免疫賦活剤。
- [請求項3] 前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが以下の(1)～(3)からなる群より選択される少なくとも1つの要件を満たす、請求項1又は2に記載の免疫賦活剤。
- (1) 8×10^5 cells/mLの濃度のヒト由来末梢血単核細胞液250 μ Lを播種したウェルに 1×10^7 cells/ウェルの該乳酸菌を添加した場合に100 ng/mL以上のIgAを産生する
- (2) 1.25×10^5 cells/mLの濃度のヒト由来樹状細胞様細胞200 μ Lを播種したウェルに 4×10^6 cells/ウェルの該乳酸菌を添加した場合のCD86の発現強度が、乳酸菌を添加しないコントロールと比較して1.5倍以上である
- (3) 1.25×10^5 cells/mLの濃度のヒト由来樹状細胞様細胞200 μ Lを播種したウェルに 4×10^6 cells/ウェルの該乳酸菌を添加した場合に300 pg/mL以上のIL-12を産生する。
- [請求項4] 前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが前記(1)～(3)の3つの要件を満たす、請求項3に記載の免疫賦活剤。
- [請求項5] 前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが有する樹状細胞様細胞活性化、IgA産生誘導及びIL-12産生誘導の3つの免疫賦活機能のうち、少なくとも1つの免疫賦活機能が、ラクトコッカス・ラクティス(Lactococcus lactis) JCM5805 株より

- も高い、請求項 1 又は 2 に記載の免疫賦活剤。
- [請求項6] 前記ラクトバチルス・ヘルペティカスが有する樹状細胞様細胞活性化、IgA 産生誘導及び IL-12 産生誘導の 3 つの免疫賦活機能が、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) JCM5805 株よりも高い、請求項 1 又は 2 に記載の免疫賦活剤。
- [請求項7] 前記免疫賦活が、健康な人の免疫機能の維持である、請求項 1 又は 2 に記載の免疫賦活剤。
- [請求項8] 請求項 1 又は 2 に記載の免疫賦活剤を含有する、免疫賦活用の経口組成物。
- [請求項9] 飲食品用組成物である、請求項 8 に記載の経口組成物。
- [請求項10] 請求項 1 又は 2 に記載の免疫賦活剤を含有する、ウイルス感染症の予防または治療剤。
- [請求項11] 独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) の特許微生物寄託センター (NPMD) における受託番号が NITE BP-03804 であるラクトバチルス属に属する乳酸菌。
- [請求項12] 独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) の特許微生物寄託センター (NPMD) における受託番号が NITE BP-03805 であるラクトバチルス属に属する乳酸菌。