明　細　書

発明の名称 ：

乳酸菌を有効成分として含む、皮膚における特定細菌の異常増殖に起因する皮膚の状態の悪化を防止又は改善するための組成物

技術分野

[0001] 本発明は、経口で摂取することによって、皮膚に感染し、皮膚の状態を悪化させる細菌の異常増殖や感染に起因する皮膚疾患を治療又は予防する効果のある乳酸菌を含む組成物である。

背景技術

[0002] ヒトは生活するうえで、多数の微生物と定常的に接触している。特に外部環境に常に接している皮膚に関しては、他の組織と比較して、より病原性微生物による感染症に罹患するリスクに曝されている。また、皮膚には特有の微生物が多種に渡って存在しており、これらの微生物は、総じて皮膚の常在細菌叢と呼ばれる。近年、皮膚の常在細菌叢のバランスと皮膚の恒常性に関する研究が盛んにおこなわれてきており、特定の細菌が異常に増殖することによって、皮膚の状態が悪化することが知られている。病原性微生物の感染が成立した場合や特定の細菌が異常増殖した時には、湿疹や肌荒れ、腫れ・水ぶくれや出血などの症状を示し、痒みや痛みが生じる。特に顔など他人からよく見える場所で感染性の肌荒れが生じると、感染者のQOL(quality of life)が著しく低下する。また、近年、特定の皮膚疾患(アトピー性皮膚炎など)においても、黄色ブドウ球菌の異常増殖と臨床症状の増悪との関連性が示唆される(非特許文献１参照)など、従来では感染症との関わりが知られていなかった皮膚疾患においても、細菌の感染や異常増殖によるリスクと皮膚疾患には大きな関連があると示唆されてきた。

[0003] 皮膚における感染症に対する治療は細菌性の感染症とウイルス性の感染症では方法が異なっているため、その診断が非常に重要な役割を占めている。細菌性の感染症の場合、主として抗生物質の投与による治療が行われるが、

抗生物質を多用することによる耐性菌の出現のリスクがある。ウイルス性の感染症の場合、抗ウイルス薬が一部のウイルス種の感染症にしか存在しないため、対症療法に留まっているものもある。

[0004] そのため、皮膚の角化細胞のバリア機能を高めて、細菌感染を防ぐというアイディアが注目を集めている。ラクトバチラス・ラムノサス、ラクトバチラス・レウテリ、ビフィドバクテリウム・ロンガムなどにはそのような効果が認められている(特許文献１を参照)。また、特定の皮膚共生生物を用いて、皮膚の細菌叢を調節し健康を促進するか、疾患を阻害することが可能であるというアイディアも注目を集めている。ラクトバチル属の乳酸菌には化膿連鎖球菌と共凝集させることで生育を阻害する効果があることが知られている(特許文献２を参照)。一過性病原性皮膚細菌と結合し、生育を阻害することで感染を抑制する乳酸菌であるラクトバスルス・デルブリュッキ(特許文献３を参照)やラクトバチルス・ブーケンライ(特許文献４を参照)などが知られている。また、ラクトバチルス・サニビリ、ラクトバチルス・サリヴァリウス、ラクトバチルス・ペントーサスにも黄色ブドウ球菌や緑膿菌、化膿性連鎖球菌に接着し、生育阻害を起こすことがわかっている(特許文献５を参照)。しかしながら、いずれも皮膚に直接的に乳酸菌を塗布することで初めて機能を発揮するものであり、常に全身にこれらの乳酸菌を塗布し続けることは現実的に不可能である。そのため、もっと簡便な方法で全身の皮膚における感染症を予防・治療できる方法が望まれてきていた。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特表2015-514127号公報

特許文献2：特許第5916846号公報

特許文献3：特許第5495559号公報

特許文献4：特許第5826241号公報

特許文献5：特表2016-508712号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Kobayashi T et al., (2015) Immunity, 42, 4, 756-766

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、乳酸菌を含有する組成物を経口摂取することによって、特定の細菌が異常増殖したときに生じる皮膚状態の悪化を防止又は改善するための食品組成物及び医薬組成物を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、乳酸菌を経口摂取することにより、特定の細菌が異常増殖したときに生じる皮膚状態の悪化を低減させることができるかについて鋭意検討を行った。

[0009] その結果、乳酸菌の経口摂取により、黄色ブドウ球菌を皮膚に塗布・感染させたときに、その菌の増殖と皮膚の状態の悪化を防ぐことを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0010] すなわち、本発明は以下のとおりである。

[１] 乳酸菌を有効成分として含む、経口摂取により、細菌の異常増殖を抑制し、又は細菌の異常増殖に起因する皮膚状態の悪化を防止又は改善するための組成物。

[２] 細菌が黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）、表皮ブドウ球菌（Staphylococcus epidermidis）、Ａ群β溶血性連鎖球菌（化膿レンサ球菌）（Streptococcus pyogenes）、緑膿菌（Pseudomonas aeruginosa）、蛍光発色性ジフテロイド（蛍光ジフテロイド）及びアクネ桿菌（Propionibacterium acnes）からなる群から選択される[１]の組成物。

[３] 細菌が黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）、表皮ブドウ球菌（Staphylococcus epidermidis）、アクネ桿菌（Propionibacterium acnes）からなる群から選択される、[２]の組成物。

[４] 前記乳酸菌が、ラクトコッカス属に属するものである、[１]～[３]のいずれかの組成物。

[５] 前記乳酸菌が、ラクトコッカス・ラクティスである、[１]～[３]のい

ずれかの組成物。

[６] 前記乳酸菌が、ラクトコッカス・ラクティスJCM5805株である、[１]～[３]のいずれかの組成物。

[７] 食品組成物である、[１]～[６]のいずれかの組成物。

[８] 医薬組成物である、[１]～[６]のいずれかの組成物。

[９] 細菌の異常増殖に起因する皮膚の状態が肌荒れ、皮膚炎である、[７]又は[８]の組成物。

[１０] 細菌の異常増殖に起因する皮膚の状態がとびひ（伝染性膿痂疹）、蜂窩織炎、丹毒、ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群、毛包炎、にきび、せつ、癰、細菌性爪囲塩、慢性膿皮症及び尋常性毛瘡からなる群から選択される[８]の組成物。

[0011] 本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2016-180851号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

発明の効果

[0012] 本発明により、乳酸菌を経口摂取することで、皮膚における特定の細菌の異常増殖を抑制し、皮膚状態の悪化を防止又は改善する効果を持つ食品組成物及び医薬組成物を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]Lactococcus lactis JCM5805の細菌感染性病変スコア抑制効果（感染２日後）を示す図である。

[図2]Lactococcus lactis JCM5805の被験部位中の生菌数抑制効果（皮膚全体での菌数結果、感染２日後）を示す図である。

[図3]皮膚（非感染部位）における抗細菌遺伝子の発現（感染２日後）を示す図である。

[図4]Lactococcus lactis JCM5805の細菌感染性病変スコア抑制効果（経時変化）を示す図である。

[図5]Lactococcus lactis JCM5805摂取時の皮膚の黄色ブドウ球菌に対する抗菌作用を示す図である。

[図6]Lactococcus lactis JCM5805摂取時の皮膚の表皮ブドウ球菌に対する抗菌作用を示す図である。

[図7]Lactococcus lactis JCM5805摂取時の皮膚のアクネ菌に対する抗菌作用を示す図である。

発明を実施するための形態

[0014] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0015] 本発明は、乳酸菌を有効成分として含む、特定の細菌の異常増殖に起因する皮膚状態の悪化を防止又は改善するための組成物である。

[0016] 細菌の異常増殖に起因する皮膚の状態の悪化は、肌荒れ、腫れ、湿疹等を含み、さらに病原性細菌の感染により悪化した皮膚の病態を含む。本発明の組成物は、病原性細菌の皮膚感染に起因する皮膚病変の重症化を軽減又は抑制し得る。

[0017] 皮膚病変には、皮膚における丘疹及びびらん、表皮における、かさぶた・表皮肥厚・膿疱・浸食/潰瘍・細胞間浮腫・細胞内浮腫や真皮及び皮下組織における、炎症細胞浸潤が含まれる。本発明の組成物は、これらの度合いを低減させる。

[0018] また、細菌の異常増殖に起因する皮膚の状態は、病原性細菌の感染により生じた皮膚疾患を含む。病原性細菌の感染により生じた皮膚疾患は、病原性細菌による皮膚感染症ともいう。皮膚疾患は、好ましくは炎症を伴う肌荒れ又は皮膚炎である。

[0019] すなわち、本発明は乳酸菌を有効成分として含む、特定の細菌の異常増殖に起因する皮膚状態の悪化を抑制又は予防するための組成物、病原性細菌による皮膚感染症を治療又は予防するための組成物でもある。

[0020] 異常増殖又は感染時に皮膚状態の悪化を引き起こす細菌としては、黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）、表皮ブドウ球菌（Staphylococcus epidermidis）などのブドウ球菌属に属する細菌；Ａ群β溶血性連鎖球菌（化膿レンサ球菌）（Streptococcus pyogenes）などのレンサ球菌に属する細菌；緑膿菌（Pseudomonas aeruginosa）などのシュードマナス属に属する細菌；

蛍光発色性ジフテロイド（蛍光ジフテロイド）などのコリネバクテリウム属に属する細菌；アクネ桿菌（Propionibacterium acnes）などのプロピオニバクテリウム属に属する細菌等が挙げられる。本発明の組成物は、これらの細菌の異常増殖や感染に起因する皮膚状態の悪化の抑制、治療又は予防に用いることができるが、特に好ましくは黄色ブドウ球菌に起因する皮膚状態の悪化の抑制、治療又は予防に用いることができる。ただし、黄色ブドウ球菌の異常増殖に起因する皮膚状態の悪化に対する効果については一例であり、本効果については黄色ブドウ球菌のみに限定されない。

[0021] 本発明の組成物により治療又は予防し得る皮膚疾患としては、以下の疾患が挙げられる。以下には、皮膚疾患名及び原因となる細菌を示す。但し、以下の皮膚疾患は一例であり、これらのみに限定されない。

○ とびひ（伝染性膿痂疹）

水泡型 黄色ブドウ球菌

痂皮型 A群β溶血性連鎖球菌

○ 蜂窩織炎

ブドウ球菌、又はA群β溶血性連鎖球菌

○ 丹毒

A群β溶血性連鎖球菌

○ ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群（SSSS：Staphylococcal Scalded Skin Syndrome）

黄色ブドウ球菌

○ 毛包炎（毛嚢炎）

黄色ブドウ球菌及び表皮ブドウ球菌

○ にきび（尋常性ざ瘡）

ニキビは毛包炎の１種であり、青少年の顔面に生じる。

[0022] 黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌及びアクネ桿菌

○ せつ（おでき）及び癰（よう）

せつ及び癰（よう）は毛包炎が進行したものをいう。

[0023] 黄色ブドウ球菌及び表皮ブドウ球菌

○ 細菌性爪囲塩

黄色ブドウ球菌、A群β溶血性レンサ球菌及び緑膿菌

○ 多発性汗腺膿瘍（ブドウ球菌性汗孔周囲炎）

黄色ブドウ球菌

○ 慢性膿皮症

黄色ブドウ球菌及び表皮ブドウ球菌

○ 尋常性毛瘡（かみそり負け）

黄色ブドウ球菌及び表皮ブドウ球菌

○ 紅色陰癬

蛍光ジフテロイド

また、アトピー性皮膚炎も黄色ブドウ球菌による感染が症状を悪化させることが報告されており、本発明の組成物はアトピー性皮膚炎の症状の緩和及び改善に用いることもできる。

[0024] 上記のLactococcus lactis JCM5805は、理化学研究所　バイオリソースセンター(日本国　茨城県つくば市高野台３丁目１番地の１）から入手することができる。また、Lactococcus lactis JCM5805と同等の菌株を用いることができる。ここで、同等の菌株とは、上記の菌株から由来している菌株又は上記の菌株が由来する菌株若しくはその菌株の子孫菌株をいう。同等の菌株は他の菌株保存機関に保存されている場合もある。他の菌株保存機関とは、例えばAmerican type culture collection （米国）、東京農業大学・菌株保存室（日本国　東京都世田谷区桜丘１丁目１番１号）等が挙げられるが、これらの保存機関に限定されるものではない。

[0025] 本発明の組成物は、上記の乳酸菌の培養物を含む。培養物とは、生菌体、死菌体、生菌体又は死菌体の破砕物、生菌体又は死菌体の凍結乾燥物、該凍結乾燥物の破砕物、培養液、培養液抽出物等をいい、乳酸菌の一部や乳酸菌の処理物も含む。さらに、上記乳酸菌のDNA又はRNAも乳酸菌の培養物に含まれる。

[0026] 乳酸菌の培養は、公知の培地を用いた公知の方法で行うことができる。培地としては、MRS培地、GAM培地、LM17培地など、市販の乳酸菌培養用の培地を用いることができ、適宜無機塩類、ビタミン、アミノ酸、抗生物質、血清等を添加して用いればよい。培養は、25～40℃で数時間～数日行えばよい。

[0027] 培養後、乳酸菌菌体を遠心分離やろ過により集菌する。死菌として用いる場合、オートクレーブ等により殺菌して用いてもよい。

[0028] 上記の乳酸菌を含む組成物を摂食することにより、皮膚における抗細菌遺伝子（抗菌性遺伝子）の発現が促進、増強され、特定の細菌の異常増殖や病原性微生物の感染に起因する皮膚状態の悪化を防止又は改善することができる。抗細菌遺伝子の発現産物であるタンパク質は細菌に結合し、細菌の細胞膜を破壊し、細菌を殺傷する。抗細菌遺伝子として、β-defensin 1 (BD-1)、β-defensin 3 (BD-3)、β-defensin 14(BD-14)、S100A8等が挙げられる。

[0029] 本発明の組成物の有効成分として用い得る乳酸菌として、経口摂取した場合にも、生体に対して皮膚感染症に対する治療又は予防効果を有する乳酸菌が好ましい。そのような乳酸菌は、胃液や腸液に対する耐性が高く、例えば、強い酸耐性を有しており、生存したまま腸管に到達し得る乳酸菌である。上記のLactococcus lactis JCM5805は経口摂取した場合にも、皮膚の感染症の治療又は予防効果を発揮し得る。

[0030] 本発明の組成物は食品組成物、すなわち飲食品を含む。該食品組成物は、肌荒れ、腫れ、湿疹等などの上記の特定の細菌の異常増殖や病原性微生物の感染に起因する皮膚の状態の悪化の防止又は改善のために用いることができる。特定の細菌の異常増殖や病原性微生物の感染に起因する皮膚状態の悪化を防止又は改善するとは、特定の細菌の皮膚における異常増殖や病原性微生物の感染を抑制し、皮膚の炎症の悪化を抑制することをいう。

[0031] 乳酸菌自体を食品組成物として用いることもできるが、乳酸菌を、飲食品に含ませて用いることもできる。対象となる飲食品の種類は、特定の微生物の異常増殖や病原性細菌の感染に起因する皮膚疾患の症状の緩和及び改善のための活性成分が阻害されないものであれば特に限定されない。例えば、乳

・乳製品；飲料；調味料；酒類；農産・林産加工食品；菓子・パン類；穀粉・麺類；水産加工品；畜産加工品；油脂・油脂加工品；調理冷凍食品；レトルト食品；インスタント食品；食品素材などが挙げられる。この中でも、ヨーグルト、チーズ等の発酵乳製品や乳酸菌飲料、あるいは清涼飲料、ノンアルコール飲料、スポーツ用飲料などの飲料類に用いることができる。発酵飲食品として用いる場合、乳酸菌を発酵飲食品に死菌として所要量添加するほか、乳酸菌スターターとして用いて発酵飲食品を製造することもできる。

[0032] また、食品組成物にはダイエタリー・サプリメント：dietary supplement、食品添加物（食品添加剤）などが含まれる。

[0033] 本発明の飲食品は、機能性表示食品、健康飲食品、特定保健用飲食品、栄養機能飲食品、健康補助飲食品等を含む。ここで、特定保健用飲食品とは、食生活において特定の保健の目的で摂取をし、その摂取により当該保健の目的が期待できる旨の表示をする飲食品をいう。また、機能性表示食品とは、事業者の責任で、科学的根拠を基に商品パッケージに機能性を表示するものとして、消費者庁に届け出られた食品をいう。

[0034] 乳酸菌を含む食品組成物は、特定の微生物の異常増殖や病原性細菌が感染した皮膚の状態を緩和し、改善するために経口摂取してもよく、また、事前に経口摂取することにより、特定の微生物が異常に増殖することや病原性細菌が皮膚に感染することを抑制することができる。また、病原性微生物が感染した場合でも病原性細菌が増殖するのを抑制することができる。すなわち、特定の微生物の異常増殖や病原性細菌の感染に起因する皮膚疾患の症状の緩和及び改善し、皮膚病変の憎悪化を抑制することができる。

[0035] さらに本発明の乳酸菌を有効成分として含む、病原性細菌の感染に起因する皮膚疾患を治療又は予防するための組成物は医薬組成物を含む。該医薬組成物は、上記の病原性細菌の感染に起因する皮膚疾患の治療又は予防に用いることができる。また、該医薬組成物は、上記の病原性細菌の感染に起因する皮膚疾患の症状の緩和及び改善、上記の病原性細菌の感染に起因する皮膚病変の憎悪化の抑制に用いることができる。

[0036] 該医薬組成物は、病原性細菌の感染に起因する皮膚疾患の治療又は予防剤、病原性細菌の感染に起因する皮膚疾患の症状の緩和及び改善剤、病原性細菌の感染に起因する皮膚病変の憎悪化の抑制剤ということもできる。

[0037] 該医薬組成物の形態は特に限定されない。例えば、粉末、顆粒、錠剤、シロップなどが挙げられる。本発明の医薬組成物は、好ましくは経口で投与する。該医薬組成物は、賦形剤、崩壊剤、結合剤、滑沢剤、着色剤等を含んでいても良い。賦形剤としてはブドウ糖、乳糖、コーンスターチ、ソルビット等が、崩壊剤としてはデンプン、アルギン酸ナトリウム、ゼラチン末、炭酸カルシウム、クエン酸カルシウム、デキストリン等が、結合剤としてはジメチルセルロース、ポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、メチルセルロース、エチルセルロース、アラビアゴム、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン等が、滑沢剤としてはタルク、ステアリン酸マグネシウム、ポリエチレングリコール、硬化植物油等がそれぞれ挙げられる。

[0038] 投与量は、投与する患者の年齢、体重、性別、疾患の相違、症状の程度により適宜決定することができ、１日１回又は数回に分けて投与すればよく、１回菌数にして1×10^{9}～1×10^{12}細胞に相当する量の培養物を投与すればよい。あるいは、乳酸菌菌体の乾燥重量換算で１回1～1000mg、好ましくは20～300mgを投与すればよい。

[0039] 本発明は、経口摂取により、細菌の異常増殖を抑制し、又は細菌の異常増殖に起因する皮膚状態の悪化を防止又は改善するための乳酸菌を包含する。

[0040] また、本発明は、乳酸菌を投与することを含む、細菌の異常増殖を抑制する方法、又は細菌の異常増殖に起因する皮膚状態の悪化を防止又は改善する方法を包含する。

[0041] さらに、本発明は、細菌の異常増殖を抑制する方法、又は細菌の異常増殖に起因する皮膚状態の悪化を防止又は改善するための医薬組成物を製造するための、乳酸菌の使用を包含する。

実施例

[0042] 本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

[0043] ［実施例１］ 黄色ブドウ球菌液の調製

本発明に使用した黄色ブドウ球菌は以下に示すような方法で調製した。

＜実験方法＞

Staphylococcus aureus MX2株を米国の生物資源バンクであるAmerican Type Culture Collection（ATCC）より入手した。試験の都度、試験管に普通ブイヨン培地（栄研社製）を10 mL入れ、凍結菌液を融解し、100 μLを接種した後、恒温振盪培養機（タイテック社製）で37℃、振盪培養した。培養後の菌懸濁液を遠心機にて遠心分離（1000 rpm、5分）し、上清を取り除いた。沈殿している菌に生理食塩液2 mLを加え攪拌し、接種菌原液とした。

[0044] 接種菌原液を生理食塩液で希釈して、目視によりMcFarland比濁法を用いて濁度が1になるように調製した。McFarland 1に調製した菌液の一部を採取し、生理食塩液で100倍希釈し、接種菌液とした。

[0045] 接種菌液中の菌数測定に関して、接種菌液の一部を採取して、生理食塩液で10^3、10^4倍希釈し、普通寒天培地に塗抹後、37℃設定の恒温器（MTR-251、三洋電機株式会社）で2日間培養した。培養後、コロニー数をペン型コロニーカウンターで計測し、接種菌液1 mL中に含まれる生菌数を算出し、菌濃度（cfu/mL）の確認をした。

＜結果＞

実施例２に使用した黄色ブドウ球菌濃度は3.4 x 10^6cfu/mL、実施例３に使用した黄色ブドウ球菌濃度は3.0 x 10^6 cfu/mLであった。

[0046] ［実施例２］ Lactococcus lactis JCM5805の黄色ブドウ球菌皮膚感染に対する防御作用の解析

Lactococcus lactis JCM5805を経口摂取させたマウスの皮膚に黄色ブドウ球菌を接種し、病変度評価、黄色ブドウ球菌の生菌数測定、病理組織学的検査、抗細菌性遺伝子発現を実施し、細菌感染に対する防御効果を評価した。

[0047] 本実施例において、病変評点は、皮膚病変度、皮膚病変スコアということ

もある。

＜実験方法＞

BALB/Cマウス（日本エスエルシー社より購入。5週齢メス）1群16匹ずつに分け、標準食摂取群（AIN-93G食・オリエンタル酵母工業社製）とLactococcus lactis JCM5805混餌投与群（Lactococcus lactis JCM5805摂取群）の2群を設定した。乳酸菌の投与量は1日1匹あたり1 mgに設定した。乳酸菌の投与開始時を0日として、14日目に塩酸ケタミン麻酔（筋肉内投与，2.0 mL / kg 、塩酸ケタミン注射液；動物用ケタラール（登録商標）50注射液；バイエル薬品株式会社）下でマウスの背部を電気カミソリで剃毛後、除毛クリーム（epilat（登録商標）、クラシエホームプロダクツ株式会社）を剃毛部位に塗り、約2 cm四方の被験部位を設定した。被験部位を布粘着テープで3回ストリッピングした。投与15日目に塩酸ケタミン麻酔下で、再度被験部位を布粘着テープで3回ストリッピングした後、マイクロピペットを用いて被験部位へ黄色ブドウ球菌の接種菌液を個体あたり0.1 mL （3.4×10^5 cfu/head）滴下した。

[0048] 黄色ブドウ球菌液接種2日後にあたる17日目に被験部位の病変度評価を行った。１頭ごとに、被験部位の丘疹及びびらんそれぞれについて、0：無症状、1：軽度、2：中程度、3：重度の4段階で評価した。丘疹及びびらんの各評点を合計した数値を病変評点とした。

[0049] また、17日目にマウスを解剖し、被験部位全体と耳を採取した。被験部位サンプルは、各群8匹分を皮膚中の生菌数測定に、残りの8匹を病理組織学的検査標本用として使用した。耳サンプルは、すべての個体のサンプルを定量PCRによる抗細菌性遺伝子発現解析用とした。

[0050] 生菌数測定は、被験部位の皮膚サンプルを細片化した後、2 mLの生理食塩液中で撹拌機を用い、ホモジネートし、皮膚組織液とした。皮膚組織液の一部を採取し、生理食塩液で最適な濃度に希釈した皮膚組織希釈液を作製した。皮膚組織希釈液100 μLを、コンラージ棒を用いてスタフィロコッカス寒天培地（栄研社製）上に塗抹し、37℃で2日間培養し、被験部位全体に含まれるコロニー数（cfu / head）を算出した。

[0051] 病理組織学的検査は、被験部位の皮膚サンプルを、常法に従いパラフィン包埋後、HE (Hematoxylin-Eosin)染色組織標本を作製し、病理組織学的検査を行った。検査項目として、表皮における、かさぶた・表皮肥厚・膿疱・浸食/潰瘍・細胞間浮腫・細胞内浮腫の度合いをそれぞれ検査した。また、真皮、皮下組織における、炎症細胞浸潤の度合いを検査した。それぞれの検査項目の程度は、0：無症状、1：軽度、2：中程度、3：重度の4段階で評価した。

[0052] 耳サンプルは、マルチビーズショッカーを用いて細片化した後、TRIzol（ライフテクノロジーズ社製）に懸濁後、遠心分離を行った。水層を取り、イソプロパノール沈殿を行った後、RNase Free Waterに懸濁することで、total RNAを抽出した。さらに、RNeasy Mini Kit (QIAGEN社製) を用いて、RNAを精製した。iScript cDNA Synthesis Kit (BIO-RAD社製) を用いてtotal RNA 200ngからcDNAを合成し、これを鋳型にして、S100A8遺伝子、β-defensin 1遺伝子、β-defensin 3遺伝子、β-defensin 14遺伝子（リファレンスとしてGAPDH遺伝子）の発現量について、Real-time PCR解析を行った。Real-time PCR解析は、SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa社製) を用い、プライマー配列を表1に示した配列のものを使用した。サーマルサイクラーはRoche のLightCycler（登録商標） 480IIを用いた。95℃で10秒間保持後、95℃で10秒間、50℃で5秒間、72℃で10秒間の反応を50サイクル行った。

[0053] [表1]

	Forward	Reverse
Gapdh	AACGACCCCTTCATTGAC（配列番号１）	TCCACGACATACTCAGCAC（配列番号２）
S100A8	GGAAATCACCATGCCCTCTA（配列番号３）	GCTGTCTTTGTGAGATGCCA（配列番号４）
β-defensin 1	CCAGATGGAGCCAGGTGTTG（配列番号５）	AGCTGGAGCGGAGACAGAATCC（配列番号６）
β-defensin 3	GCATTGGCAACACTCGTCAGA（配列番号７）	CGGGATCTTGGTCTTCTCTA（配列番号８）
β-defensin 14	TCTTGTTCTTGGTGCCTGCT（配列番号９）	CGACCGCTATTAGAACATCGAC（配列番号１０）

[0054] 皮膚病変評点、黄色ブドウ球菌の生菌数については、Mann-WhitneyのU検定

を用い、耳における抗菌性遺伝子発現はStudentのt検定を用いて、Lactococcus lactis JCM5805摂取群と標準食摂取群の有意差検定を実施した。

＜結果＞

図１に示すように、Lactococcus lactis JCM5805摂取群は標準食摂取群に比して、黄色ブドウ球菌の皮膚感染に起因する皮膚病変度が有意に低値を示すことが判明した。すなわち、Lactococcus lactis JCM5805には黄色ブドウ球菌皮膚感染による皮膚病変の重症化に対する軽減作用があることが示された。

[0055] 図２に示すように、Lactococcus lactis JCM5805摂取群は標準食摂取群に比して、被験部位中に含まれる黄色ブドウ球菌の菌数が有意に低値を示すことが判明した。すなわち、Lactococcus lactis JCM5805には皮膚において、黄色ブドウ球菌の増殖を抑制する作用があることが示された。

[0056] 表２に示すように、Lactococcus lactis JCM5805摂取群は標準食摂取群に比して、表皮における、かさぶた・表皮肥厚・膿疱・細胞間浮腫・細胞内浮腫など、真皮や皮下における炎症細胞浸潤などすべての症状において、スコアの平均値が低値を示した。すなわち、Lactococcus lactis JCM5805には黄色ブドウ球菌皮膚感染による皮膚病変の重症化を抑制する作用があることが示された。

[0057]

[表2]

	症状	標準食摂取群のスコア平均値	JCM5805 群のスコア平均値
表皮	かさぶた	1.75	1
	表皮肥厚	2.5	1.875
	膿疱	0.5	0
	浸食/潰瘍	0.25	0
	細胞間浮腫	0.625	0.125
	細胞内浮腫	0.5	0
真皮	炎症細胞浸潤	1.375	1
皮下	炎症細胞浸潤	0.875	0.375

[0058] 図３に示すように、Lactococcus lactis JCM5805摂取群は標準食摂取群に比して、黄色ブドウ球菌を感染させていない部位である耳における、抗細菌遺伝子であるβ-defensin 3遺伝子、β-defensin 14遺伝子発現が有意に高値であった。またS100A8遺伝子、β-defensin 1遺伝子の発現の高い傾向が認められた。すなわち、Lactococcus lactis JCM5805には皮膚における抗細菌遺伝子の発現を増強させる作用があることが示された。

[0059] 以上の結果から、Lactococcus lactis JCM5805を摂取することによって、皮膚の抗菌性遺伝子の発現が増強され、黄色ブドウ球菌の皮膚感染時における菌の増殖を抑制していること、その結果として、感染に付随して生じる各種皮膚病変の重症化を顕著に抑制していることが推察された。

[0060] ［実施例３］ Lactococcus lactis JCM5805の黄色ブドウ球菌による皮膚病変の重症化抑制作用

実施例２で示したLactococcus lactis JCM5805を経口摂取させたマウスの皮膚に黄色ブドウ球菌を接種し、感染に起因する皮膚病変度を経時的に測定することにより、細菌感染に対する防御効果を病変が寛解するまでの期間評

価した。

＜実験方法＞

BALB/Cマウス（日本エスエルシー社より購入。5週齢メス）1群3匹ずつに分け、標準食摂取群（AIN-93G食）とLactococcus lactis JCM5805混餌投与群（Lactococcus lactis JCM5805摂取群）の2群を設定した。乳酸菌の投与量、投与方法、黄色ブドウ球菌の接種は実施例２と同様の方法で行い、黄色ブドウ球菌接種0日目から6日目まで皮膚の病変度を評価した。

[0061] 本実施例において、皮膚病変評点は、病変度スコア値、病変評点ということもある。

[0062] 黄色ブドウ球菌液接種後、被験部位の丘疹及びびらんそれぞれについて、0：無症状、1：軽度、2：中程度、3：重度の4段階で１頭ごとに評価した。各評点を合計した数値を病変評点とした。

＜結果＞

図４に黄色ブドウ球菌感染後の皮膚病変評点を示した。Lactococcus lactis JCM5805摂取群はコントロール群に比して、すべての時点で病変評点が低値を示すことが判明した。

[0063] 以上のことから、Lactococcus lactis JCM5805には黄色ブドウ球菌皮膚感染によって誘発される皮膚病変の重症化を抑制する作用があることが示された。

[0064] [実施例4]

Lactococcus lactis JCM5805摂取時の皮膚の黄色ブドウ球菌に対する抗菌作用

Lactococcus lactis JCM5805を経口摂取させたマウスの皮膚の抽出液を用い、黄色ブドウ球菌に対する抗菌作用を、標準食を摂取したマウスと比較した。

＜実験方法＞

BALB/Cマウス（日本チャールズリバー社より購入。7週齢メス）1群8匹ずつに分け、標準食摂取群（AIN-93G食）とLactococcus lactis JCM 5805混餌投

与群(Lactococcus lactis JCM5805摂取群)の2群を設定した。乳酸菌の投与量は1日1匹あたり1 mgに設定した。乳酸菌の投与開始時を0日として、14日目に解剖し、背面皮膚を採取した。

[0065] 背面皮膚を多検体細胞粉砕機マルチビーズショッカー（登録商標、安井器械社製）で破砕後、RIPA buffer（Thermo Fisher Scientific社製）を添加し、常温で5分攪拌したあと、10,000 x g、5分の条件で遠心分離し、上清を回収することで皮膚抽出液を得た。皮膚抽出液中のタンパク濃度はBCAタンパク質定量キット(Thermo Fisher社製)を用いて測定した。

[0066] （１）皮膚抽出液の黄色ブドウ球菌に対する抗菌性を評価した。普通ブイヨン培地で培養したStaphylococcus aureus MW2株を1×10^7 CFU相当分取し、懸濁液を5 mM MOPSバッファー(pH6.8)（同仁化学社製）に置換した。菌液に上記マウス皮膚抽出物を5 μg/mLとなるように添加し、37℃で4時間培養した。4時間培養後、菌液を適度に（培地で100倍又は1000倍に）希釈し、スパイラルプレーター(IUL Instrument社製)を用いて、普通ブイヨン寒天培地上に播種した。37℃、24時間培養したあと、自動コロニーカウンターaCOLyte(Symbiosis社製)を用いて、コロニー数を計測し、菌数を測定した。

[0067] （２）皮膚抽出液の表皮ブドウ球菌に対する抗菌性を評価した。普通ブイヨン培地で培養したStaphylococcus epidermidis JCM12993株を1×10^7 CFU相当分取し、懸濁液を5 mM MOPSバッファー(pH6.8)に置換した。菌液に上記マウス皮膚抽出物を5 μg/mLとなるように添加し、37℃で4時間培養した。4時間培養後、菌液を適度に（培地で100倍又は1000倍に）希釈し、スパイラルプレーターを用いて、普通ブイヨン寒天培地上に播種した。37℃、24時間培養したあと、aCOLyteを用いて、コロニー数を計測し、菌数を測定した。

[0068] （３）皮膚抽出液のアクネ菌に対する抗菌性を評価した。ブレインハートインヒュージョン培地（栄研社製）で培養したPropionibacterium acnes JCM 6425株を1×10^6 CFU相当分取し、懸濁液を5 mM MOPSバッファー(pH6.8)に置換した。菌液に上記マウス皮膚抽出物を5 μg/mLとなるように添加し、37℃で4時間培養した。4時間培養後、菌液を適度に（培地で100倍又は1000倍に）希

釈し、スパイラルプレーターを用いて、ブレインハートインヒュージョン寒天培地上に播種した。37℃、24時間培養したあと、aCOLyteを用いて、コロニー数を計測し、菌数を測定した。

[0069] 菌数測定の結果はStudentの t検定を用いて、Lactococcus lactis JCM5805群と標準食群の有意差検定を実施した。

＜結果＞

図５に示すように、Lactococcus lactis JCM5805摂取群は標準食摂取群に比して、Staphylococcus aureus MW2株に対して、菌数が顕著に少なくなっており、抗菌性が高まっていることが示された。

[0070] 図６に示すように、Lactococcus lactis JCM5805摂取群は標準食摂取群に比して、Staphylococcus epidermidis JCM12993株に対して、菌数が顕著に少なくなっており、抗菌性が高まっていることが示された。

[0071] 図７に示すように、Lactococcus lactis JCM5805摂取群は標準食摂取群に比して、Propionibacterium acnes JCM6425株に対して、菌数が顕著に少なくなっており、抗菌性が高まっていることが示された。

[0072] 以上の結果から、Lactococcus lactis JCM5805を摂取することによって、皮膚の抗菌性遺伝子の発現が増強され、黄色ブドウ球菌のみならず、皮膚に恒常的に存在し、異常増殖を起こすと皮膚状態の悪化を示す代表的な細菌に対する抗菌作用が増強していることが明らかとなった。

[0073] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

産業上の利用可能性

[0074] 本発明の特定細菌の感染に起因する皮膚状態の悪化を防止又は改善し得る乳酸菌は医薬、機能性食品、特定保健用飲食品の有効成分として用いることができる。