

明 細 書

発明の名称： 関節機能改善用組成物

技術分野

[0001] 本発明は、関節機能を改善することができる関節機能改善用組成物に関する。本発明は、軟骨細胞の増殖を促進させる作用があり、また、滑膜細胞による炎症因子、軟骨基質分解因子、疼痛因子、神経伸長因子の産生を抑制する作用がある。本発明により、変形性膝関節症に代表される変形性関節症や関節リウマチなどの種々の関節疾患の予防や治療に有用である関節機能改善作用を有する素材を提供することができる。さらに、本発明は、該関節機能改善作用を有する素材を含有する、関節機能改善剤、関節機能改善用飲食品、関節機能改善用栄養組成物、関節機能改善用飼料又は関節機能改善用医薬品に関する。

背景技術

[0002] 近年、日本人の平均寿命は80歳を超え、およそ4人に1人は65歳以上という、超高齢社会を迎えた。これに伴って、運動器の障害の罹患率も増加の一途を辿っている。2007年に日本整形外科学会は、運動器の健康維持、増進、介護に関する国民ならびに医師の意識改革を推進するために、「ロコモティブシンドローム（運動器症候群）」という新しい言葉を提唱した。ロコモティブシンドロームは、運動器の機能不全により要介護状態および要介護リスクが高まった状態を示し、運動器には骨、関節、靱帯、脊椎、脊髄、筋肉、腱、末梢神経など、体を支え、動かす役割を有する器官が総じて含まれる。これら運動器で見られる代表的な疾患および機能障害として、骨粗鬆症やサルコペニア、変形性関節症などが挙げられる。

[0003] 我が国における変形性膝関節症の患者数は、2009年で2530万人程度と推定されており、50歳以上の2～3割が罹患しているとされ、患者数が最も多い関節疾患である。変形性関節症が発症する要因として、加齢および遺伝的要因による関節構成要素の変性、あるいは肥満、労働、スポーツに

よる関節への負荷などと考えられている。変形性関節症の発症に伴い、関節周囲を取り囲む滑膜組織に炎症が併発することで、軟骨の減少、消失を含む関節の変形が加速する。また、炎症の併発と関節の変形に伴い、多くの変形性関節症患者は疼痛を感じ、QOL（Quality of life、生活の質）が著しく低下する。

関節軟骨には血管や神経細胞がないため、一旦損傷を受けると自然に復元することは難しいとされている。そのため、変形性関節症の症状が軽度の場合、温熱療法やけん引といった理学療法、あるいは鎮痛薬や抗炎症薬を用いた緩和療法がとられる。しかし、既存のステロイドや非ステロイド系の抗炎症剤は、副腎機能障害や小腸障害のような副作用が大きな問題となっている。また、症状が重度の場合、ヒアルロン酸の関節への注入や手術による人工関節置換が実施される。しかし、日常から、変形性関節症の症状を軽減して患者のQOLを向上させるためには、その疾病の性質上、食品や食品に含まれる有効成分を日常的に安全に長期間摂取することにより、患者自身の軟骨の形状を維持し、変形を予防または修復し、あるいは消失した軟骨を再生し、また、関節周囲の炎症と疼痛を抑制することが求められる。

[0004] これまでに、クコ抽出物を含有することを特徴とする関節機能改善剤が開示されている（特許文献1）。しかしながら、乳酸菌又はビフィズス菌の菌体成分又はその培養物が、軟骨細胞又は滑膜細胞に直接作用することにより、軟骨細胞の増殖を促進させ、滑膜細胞による炎症因子、軟骨基質分解因子、疼痛因子、神経伸長因子の産生を抑制することは、これまで知られていなかった。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開第2020-94015号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明の課題は、日常的に安全に長期間摂取することが可能であり、軟骨細胞の増殖を促進させる作用があり、変形あるいは消失した軟骨を修正または再生し、疼痛を緩和する効果に優れ、関節機能改善作用を有する素材を提供することである。また、本発明の課題は、滑膜細胞による炎症因子、軟骨基質分解因子、疼痛因子、神経伸長因子の産生を抑制する作用を有する素材を提供することである。この素材は、変形性膝関節症に代表される変形性関節症や関節リウマチなどの種々の関節疾患の予防や治療に有用である。また、本発明の課題は、関節機能改善作用を有する素材を配合した関節機能改善剤、関節機能改善用飲食品、関節機能改善用栄養組成物、関節機能改善用飼料または関節機能改善用医薬品を提供することである。前記素材は、軟骨細胞の増殖を促進させる作用がある。また、前記素材は、滑膜細胞による炎症因子、軟骨基質分解因子、疼痛因子、神経伸長因子の産生を抑制する作用があるので、変形あるいは消失した軟骨を修正または再生し、疼痛を緩和する効果に優れている。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意検討を進めた結果、いくつかの乳酸菌あるいはビフィズス菌が軟骨細胞の増殖を促進させる作用、又は、滑膜細胞による炎症因子、軟骨基質分解因子、疼痛因子、神経伸長因子の産生を抑制する作用があることを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0008] すなわち、本発明は以下の構成によるものである。

(1) ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属、ラクトコッカス (*Lactococcus*) 属、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属、またはビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 属に属する菌の菌体及び／又はその培養物を有効成分として含む関節機能改善用組成物。

(2) ラクトバチルス属、ラクトコッカス属、ストレプトコッカス属、またはビフィドバクテリウム属に属する菌が、ラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバチル

ス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、ラクトコッカス・ラクチス (*Lactococcus lactis*)、ラクトコッカス・ローデンシス (*Lactococcus laudensis*)、ストレプトコッカス・オラリス (*Streptococcus oralis*)、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*)、ビフィドバクテリウム・シュードロンガム (*Bifidobacterium pseudolongum*)、ビフィドバクテリウム・サーモフィラム (*Bifidobacterium thermophilum*) から選択されるひとつ以上であることを特徴とする (1) の関節機能改善用組成物。

(3) ラクトバチルス・サリバリウス、ラクトコッカス・ラクチス、またはビフィドバクテリウム・ロンガムに属する菌が、ラクトバチルス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius*)、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチス (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*)、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリス (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*)、又はビフィドバクテリウム・ロンガム・サブスピーシーズ・インファンティス (*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) に属する菌であることを特徴とする (2) の関節機能改善用組成物。

(4) ラクトバチルス属、ラクトコッカス属、ストレプトコッカス属、またはビフィドバクテリウム属に属する菌が、ラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*) SBT2062 株 (FERM BP-11075)、ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) SBT2161 株 (NITE BP-1707)、SBT2171 株 (FERM BP-5445

)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*) SBT2687株 (NITE ABP-03331)、SBT2651株 (NITE P-03330)、ラクトバチルス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius*) SBT2670株 (FERM P-13247)、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチス (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) SBT0625株 (NITE P-03078)、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリス (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) SBT11373株 (NITE P-03246)、ラクトコッカス・ローデンシス (*Lactococcus laudensis*) SBT11178株 (NITE P-03333)、ストレプトコッカス・オラリス (*Streptococcus oralis*) SBT0320株 (NITE P-03332)、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) SBT2928株 (FERM P-10657)、ビフィドバクテリウム・ロンガム・サブスピーシーズ・インファンティス (*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) SBT2785株 (NITE P-03328)、ビフィドバクテリウム・シュードロンガム (*Bifidobacterium pseudolongum*) SBT2922株 (NITE P-02984)、ビフィドバクテリウム・サーモフィラム (*Bifidobacterium thermophilum*) SBT2992株 (NITE P-03364) から選択されるひとつ以上であることを特徴とする (1) 乃至 (3) のいずれか一項に記載の関節機能改善用組成物。

(5) (1) 乃至 (4) のいずれか一項に記載の関節機能改善用組成物を含むことを特徴とする関節機能改善剤、関節機能改善用飲食品、関節機能改善用栄養組成物、関節機能改善用飼料又は関節機能改善用医薬品。

(6) 新規乳酸菌ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*) SBT2687株。

(7) 新規乳酸菌ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*) SBT2651株。

(8) 新規乳酸菌ラクトコッカス・ローデンシス (*Lactococcus laudensis*) SBT11178株。

(9) 新規乳酸菌ストレプトコッカス・オラリス (*Streptococcus oralis*) SBT0320株。

(10) 新規ビフィズス菌ビフィドバクテリウム・ロンガム・サブスピーシーズ・インファンティス (*Bifidobacterium longum subsp. infantis*) SBT2785株。

(11) 新規ビフィズス菌ビフィドバクテリウム・サーモフィラム (*Bifidobacterium thermophilum*) SBT2992株。

(12) 関節機能改善用組成物の製造のための、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属、ラクトコッカス (*Lactococcus*) 属、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属、またはビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 属に属する菌の菌体及び／又はその培養物の使用。

(13) 関節機能改善に使用するための、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属、ラクトコッカス (*Lactococcus*) 属、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属、またはビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 属に属する菌の菌体及び／又はその培養物。

(14) 有効量のラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属、ラクトコッカス (*Lactococcus*) 属、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属、またはビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 属に属する菌の菌体及び／又はその培養物を、それを必要

としている対象に摂取させるか、又は投与することを含む、関節機能改善方法。

(15) ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属、ラクトコッカス (*Lactococcus*) 属、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属、またはビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 属に属する菌の菌体及び／又はその培養物を有効成分として含む、軟骨細胞増殖促進用、炎症因子産生抑制用、軟骨基質分解因子産生抑制用、疼痛因子産生抑制用、及び／又は神経伸長因子産生抑制用組成物。

発明の効果

[0009] 本発明の関節機能改善用組成物は、安全性が高く、軟骨細胞の増殖を促進させる作用、又は、滑膜細胞による炎症因子、軟骨基質分解因子、疼痛因子、神経伸長因子の産生を抑制する作用を介した関節機能改善作用が顕著である。該関節機能改善用組成物は、変形性膝関節症に代表される変形性関節症や関節リウマチなどの種々の関節疾患の予防や治療に有用である。また、本発明は、関節の機能を高めることができる。本発明は、軟骨細胞の増殖を促進させる作用があり、また、滑膜細胞による炎症因子、軟骨基質分解因子、疼痛因子、神経伸長因子の産生を抑制する作用がある。したがって、本発明は、変形性膝関節症に代表される変形性関節症や関節リウマチなどの種々の関節疾患の予防や治療に有用である関節機能改善用組成物を配合した関節機能改善剤、関節機能改善用飲食品、関節機能改善用栄養組成物、関節機能改善用飼料または関節機能改善用医薬品を提供するものである。

発明を実施するための形態

[0010] 本発明において使用できる乳酸菌としては、関節機能改善作用を有する、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属、ラクトコッカス (*Lactococcus*) 属、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属に属する乳酸菌であればどのようなものでも用いることができ、ビフィズス菌としては、関節機能改善作用を有する、ビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 属に属するビフィズス菌であればどのような

なものでも用いることができる。

ラクトバチルス属に属する乳酸菌としては、ラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*) 等に属する乳酸菌を例示することができる。ラクトコッカス属に属する乳酸菌としては、ラクトコッカス・ラクチス (*Lactococcus lactis*)、ラクトコッカス・ローデンシス (*Lactococcus laudensis*) 等に属する乳酸菌を例示することができる。ストレプトコッカス属に属する乳酸菌としては、ストレプトコッカス・オラリス (*Streptococcus oralis*) 等に属する乳酸菌を例示することができる。ビフィドバクテリウム属に属するビフィズス菌としては、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*)、ビフィドバクテリウム・シュードロンガム (*Bifidobacterium pseudolongum*)、ビフィドバクテリウム・サーモフィラム (*Bifidobacterium thermophilum*) 等に属するビフィズス菌を例示することができる。ラクトバチルス・サリバリウスに属する乳酸菌としては、ラクトバチルス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius*) 等の乳酸菌を例示することができる。ラクトコッカス・ラクチスに属する乳酸菌としては、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチス (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*)、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリス (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) 等の乳酸菌を例示することができる。ビフィドバクテリウム・ロンガムに属するビフィズス菌としては、ビフィドバクテリウム・ロンガム・サブスピーシーズ・インファンティス (*Bifidobacterium longum* subsp. *i*

n f a n t i s) 等のビフィズス菌を例示することができる。いずれの乳酸菌またはビフィズス菌についても、例示したものに限定されるものではない。

[0011] 本発明に用いることができるラクトバチルス・アシドフィルス、ラクトバチルス・ヘルベティカス、ラクトバチルス・サリバリウス、ラクトバチルス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サリバリウス、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチス、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリス、ラクトコッカス・ローデンシス、ストレプトコッカス・オラリス、ビフィドバクテリウム・ロンガム、ビフィドバクテリウム・ロンガム・サブスピーシーズ・インファンティス、ビフィドバクテリウム・シュードロンガム、ビフィドバクテリウム・サーモフィラムは、16SリボソームRNA遺伝子配列解析等の一般的な分類方法により、分類することができる。

本発明では、特に、ラクトバチルス・アシドフィルス (*L a c t o b a c i l l u s a c i d o p h i l u s*) SBT2062株 (FERM BP-11075)、ラクトバチルス・ヘルベティカス (*L a c t o b a c i l l u s h e l v e t i c u s*) SBT2161株 (NITE BP-1707)、SBT2171株 (FERM BP-5445)、ラクトバチルス・サリバリウス (*L a c t o b a c i l l u s s a l i v a r i u s*) SBT2687株 (NITE ABP-03331)、SBT2651株 (NITE P-03330)、ラクトバチルス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サリバリウス (*L a c t o b a c i l l u s s a l i v a r i u s s u b s p. s a l i v a r i u s*) SBT2670株 (FERM P-13247)、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチス (*L a c t o c o c c u s l a c t i s s u b s p. l a c t i s*) SBT0625株 (NITE P-03078)、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリス (*L a c t o c o c c u s l a c t i s s u b s p. c r e m o r i s*) SBT11373株 (NITE P

ー03246)、ラクトコッカス・ローデンシス (*Lactococcus laudensis*) SBT11178株 (NITE P-03333)、ストレプトコッカス・オラリス (*Streptococcus oralis*) SBT0320株 (NITE P-03332)、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) SBT2928株 (FERM P-10657)、ビフィドバクテリウム・ロンガム・サブスピーシーズ・インファンティス (*Bifidobacterium longum subsp. infantis*) SBT2785株 (NITE P-03328)、ビフィドバクテリウム・シュードロンガム (*Bifidobacterium pseudolongum*) SBT2922株 (NITE P-02984)、ビフィドバクテリウム・サーモフィラム (*Bifidobacterium thermophilum*) SBT2992株 (NITE P-03364) を用いることが好ましいが、これらに限定されるものではない。

[0012] 本発明の関節機能改善用組成物では、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属、ラクトコッカス (*Lactococcus*) 属、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属、またはビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 属に属する菌の菌体、及びその培養物のうちの1つ以上を含むことができる。本発明の有効成分は、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属、ラクトコッカス (*Lactococcus*) 属、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属、またはビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 属に属する菌の各々の菌体から成るものであってもよい。本発明の有効成分は、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属、ラクトコッカス (*Lactococcus*) 属、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属、またはビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 属に属する菌の各々の培養物から成るものであってもよい。

[0013] (乳酸菌またはビフィズス菌の培養法)

本発明に用いる乳酸菌またはビフィズス菌は、乳酸菌またはビフィズス菌の培養の常法に従って培養することができる。培養培地は、乳培地又は乳成分を含む培地、これを含まない半合成培地など種々の培地を用いることができる。このような培地としては、還元脱脂乳培地などを例示することができる。得られた培養物から遠心分離などの集菌手段によって分離された菌体をそのまま本発明の有効成分として用いることができる。濃縮、乾燥、凍結乾燥などした菌体を用いることもできるし、加熱乾燥などにより死菌体にしてもよい。

[0014] 菌体として純粋に分離されたものだけでなく、培養物、懸濁物、その他の菌体含有物や、菌体を酵素や物理的手段を用いて処理した細胞質や細胞壁画分も用いることができる。培養物などの形態としては、合成培地であるMRS培地（DIFCO社製）、M17培地（DIFCO社製）、1%グルコース含有GAM培地（日水製薬社製）、還元脱脂乳培地など一般的に乳酸菌の培養に用いられる培地を用いた培養物だけでなく、チーズ、発酵乳、乳酸菌飲料などの乳製品などを例示することができるが特に限定されるものではない。さらに、得られた培養物から遠心分離、濾過操作などの方法を用いて、乳タンパク質沈殿や菌体成分を除去することによって調製した培養上清なども用いることができる。固形分が少ない上清であるため、飲食品などへの適用範囲が広がる。例えば、還元脱脂乳培養物を5,000rpm、10分間遠心分離することにより、培養上清を調製することができる。

[0015] （新規乳酸菌株または新規ビフィズス菌株）

本発明は、新規乳酸菌株または新規ビフィズス菌株に関するものである。これらの新規乳酸菌株または新規ビフィズス菌株とは、ラクトバチルス・サリバリウス SBT2687株（NITE ABP-03331）、ラクトバチルス・サリバリウス SBT2651株（NITE P-03330）、ラクトコッカス・ローデンシス SBT11178株（NITE P-03333）、ストレプトコッカス・オラリス SBT0320株（NITE P-03332）、ビフィドバクテリウム・ロンガム・サブスピーシーズ

・インファンティス SBT2785株(NITE P-03328)、ビフィドバクテリウム・サーモフィラム SBT2992株(NITE P-03364)である。以下、同乳酸菌株またはビフィズス菌株を「本発明の乳酸菌またはビフィズス菌」、「本発明の乳酸菌株またはビフィズス菌株」、または単にSBT2687株、SBT2651株、SBT11178株、SBT0320株、SBT2785株、SBT2992株と記載することがある。

これらの乳酸菌株は、2020年12月1日又は2021年1月19日に、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（郵便番号292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室）に、SBT2687株はNITE ABP-03331、SBT2651株はNITE P-03330、SBT11178株はNITE P-03333、SBT0320株はNITE P-03332、SBT2785株はNITE P-03328、SBT2992株はNITE P-03364の受託番号で寄託されている。

本発明の乳酸菌またはビフィズス菌は、上記寄託乳酸菌株またはビフィズス菌株に制限されず、これらの寄託乳酸菌株またはビフィズス菌株と実質的に同等の乳酸菌株またはビフィズス菌株であってもよい。実質的に同等の乳酸菌株またはビフィズス菌株とは、ラクトバチルス・アシドフィルス、ラクトバチルス・ヘルベティカス、ラクトバチルス・サリバリウス、ラクトバチルス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サリバリウス、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチス、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリス、ラクトコッカス・ローデンシス、ストレプトコッカス・オラリス、ビフィドバクテリウム・ロンガム、ビフィドバクテリウム・ロンガム・サブスピーシーズ・インファンティス、ビフィドバクテリウム・シュードロンガム、ビフィドバクテリウム・サーモフィラムに属する乳酸菌株またはビフィズス菌株であって、寄託乳酸菌株またはビフィズス菌株と同程度の高い関節機能改善作用を有する乳酸菌株またはビフィズス菌株を

言う。「寄託乳酸菌株またはビフィズス菌株と同程度の高い関節機能改善作用を有する乳酸菌株またはビフィズス菌株」とは、例えば、以下の手順1)～3)により測定した軟骨細胞増殖促進効果または、手順4)～7)により測定した滑膜細胞による炎症因子、軟骨基質分解因子、疼痛因子、神経伸長因子の産生抑制効果が、各々の寄託乳酸菌株またはビフィズス菌株における軟骨細胞増殖促進効果または滑膜細胞による炎症因子、軟骨基質分解因子、疼痛因子、神経伸長因子の産生抑制効果と有意差がない乳酸菌株またはビフィズス菌株を意味する。

[0016] (軟骨細胞増殖促進効果の評価方法)

1) マウス由来軟骨前駆細胞株 (ATDC5) を96穴の平板細胞培養プレートに5,000 cells/wellになるように播種し、5% (v/v) ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地/ハムF-12混合培地で24時間培養する。

2) 培地を全て除いた後、ウシ胎児血清を含まないダルベッコ改変イーグル培地/ハムF-12混合培地に交換し、各種乳酸菌体破砕物またはビフィズス菌体破砕物を0.1 mg/mlの最終濃度となるよう培地に添加して、さらに48時間培養する。

3) 細胞増殖試薬を添加し5時間培養後、440 nmにおける吸光度を測定する。細胞増殖試薬としては、例えば、WST-1 (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社) を用いることができる。

(滑膜細胞による炎症因子、軟骨基質分解因子、疼痛因子、神経伸長因子の産生抑制効果)

4) ヒト滑膜由来細胞株 (SW982) を12穴の平板細胞培養プレートに100,000 cells/wellになるように播種し、10% (v/v) ウシ胎児血清を含むリーボビッツL-15培地で1週間培養する。

5) 培地を全て除いた後、ウシ胎児血清を含まないリーボビッツL-15培地に交換し、human-IL-1 β (Interleukin-1 β) を1 ng/mlの最終濃度となるよう培地に添加し、各種乳酸菌体破砕物ま

たはビフィズス菌体破碎物を 1 mg / ml の最終濃度となるよう培地に添加して、さらに 24 時間培養する。

6) 培地を全て除き、生体試料からの総 RNA 抽出用試薬を用いて、すべての RNA を抽出し、リアルタイム PCR 用の逆転写反応キットを用いて逆転写反応を行う。生体試料からの総 RNA 抽出用試薬としては、例えば、セパゾール RNA 1 SuperG 試薬（ナカライテスク社製）を用いることができる。リアルタイム PCR 用の逆転写反応キットとしては、例えば、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix（東洋紡社製）を用いることができる。

7) 得られた cDNA を用いて、Taq DNA polymerase を含む Realtime PCR 用試薬でリアルタイム PCR を行い、TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α)、MMP-13 (Matrix Metalloproteinase-13)、COX-2 (Cyclooxygenase-2)、NGF (Nerve Growth Factor) 遺伝子の発現量を定量する。Taq DNA polymerase を含む Realtime PCR 用試薬としては、例えば、T HUNDERBIRD qPCR Mix（東洋紡社製）を用いることができる。

[0017] 本発明の乳酸菌またはビフィズス菌は、前記手順 1) ~ 3) により、軟骨細胞増殖促進効果の評価を行った場合に、好ましくは、測定した細胞増殖促進効果が、乳酸菌株またはビフィズス菌株を添加していないコントロールにおける軟骨細胞増殖促進効果よりも 1.5 倍以上、さらに好ましくは 2 倍以上大きいものである。なお、前記「測定した細胞増殖促進効果」とは、前記手順 1) ~ 3) の後に測定した吸光度の値の大きさを意味する。

また、本発明の乳酸菌またはビフィズス菌は、前記手順 4) ~ 7) により、滑膜細胞による炎症因子、軟骨基質分解因子、疼痛因子、神経伸長因子の産生抑制効果の評価を行った場合に、好ましくは、測定した滑膜細胞による炎症因子、軟骨基質分解因子、疼痛因子、神経伸長因子の産生抑制効果が、

乳酸菌株またはビフィズス菌株を添加していないコントロールにおける滑膜細胞による炎症因子、軟骨基質分解因子、疼痛因子、神経伸長因子の産生抑制効果よりも1.5倍以上、さらに好ましくは2倍以上、より好ましくは3倍以上大きいものである。なお、前記「測定した滑膜細胞による炎症因子、軟骨基質分解因子、疼痛因子、神経伸長因子の産生抑制効果」とは、前記手順4)～7)の後に測定した発現量を意味する。発現量が小さいほど、滑膜細胞による炎症因子、軟骨基質分解因子、疼痛因子、神経伸長因子の産生抑制効果が大きい。例えば試験例2において、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチス SBT0625株は、対照(PBS)と比較して、炎症因子が5分の1以下であり、対照と比較して、5倍以上の炎症抑制効果を有する。

なお、上記の評価方法に限定されず、当業者に公知である軟骨細胞増殖促進効果の評価方法または滑膜細胞による炎症因子、軟骨基質分解因子、疼痛因子、神経伸長因子の産生抑制効果の評価方法を採用して、軟骨細胞増殖促進効果または滑膜細胞による炎症因子、軟骨基質分解因子、疼痛因子、神経伸長因子の産生抑制効果を評価可能である。

また、実質的に同等の乳酸菌株またはビフィズス菌株は、さらに、その16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、上記寄託乳酸菌株またはビフィズス菌株の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列と98%以上、好ましくは99%以上、より好ましくは100%の相同性を有し、且つ、好ましくは上記寄託乳酸菌株またはビフィズス菌株と同一の菌学的性質を有する。さらに、本発明の乳酸菌またはビフィズス菌は、本発明の効果が損なわれない限り、寄託乳酸菌株またはビフィズス菌株、又はそれと実質的に同等の乳酸菌株またはビフィズス菌株から、変異処理、遺伝子組み換え、自然変異株の選択等によって育種された乳酸菌株またはビフィズス菌株であってもよい。

[0018] (有効成分の摂取量)

本発明の乳酸菌あるいはビフィズス菌の菌体または培養物の摂取量は、軟骨細胞の増殖を促進させる作用、又は、滑膜細胞による炎症因子、軟骨基質

分解因子、疼痛因子、神経伸長因子の産生を抑制する作用を介した関節機能改善作用を示す量であれば特に制限はなく、製造の容易性や好ましい１日摂取量にあわせて適宜調節すればよい。本発明の投与対象は特に限定されず、ヒトに対して投与することができるが、投与対象はヒト以外の動物（例えば、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ又はウサギ等）であってもよい。投与対象がヒトである場合は、２０歳未満の未成年、成人、男女、又は６５歳以上の高齢者などに投与することができる。本発明の乳酸菌あるいはビフィズス菌の菌体または培養物の摂取量は、投与対象者の症状、年齢、及び性別などを考慮してそれぞれ個別に決定されるが、通常成人の場合、乳酸菌あるいはビフィズス菌の培養物などを１０～２００ｇ、あるいはその菌体を０．１～５，０００ｍｇ摂取できるように配合量などを調整すればよい。本発明の乳酸菌あるいはビフィズス菌の菌体または培養物は、そのまま経口摂取してもよいが、飲食品、栄養組成物、飼料および経口用医薬等へ配合する場合は、上記した摂取量となるように配合量を調整すればよい。このようにして摂取することにより、所望の効果を発揮することができる。

投与対象は、変形性膝関節症に代表される変形性関節症や関節リウマチなどの種々の関節疾患を罹患する患者でもよく、または罹患する恐れの高い対象でもよく、未だ罹患していない健康な対象であることができる。

[0019] （本発明の乳酸菌あるいはビフィズス菌の飲食品及び医薬品への使用方法について）

本発明の乳酸菌あるいはビフィズス菌の菌体または培養物は、それぞれを単独もしくは、任意の組み合わせでそのまま関節機能改善用組成物として使用してもよいが、軟骨細胞の増殖を促進させる作用、又は、滑膜細胞による炎症因子、軟骨基質分解因子、疼痛因子、神経伸長因子の産生を抑制する作用を介した関節機能改善作用を失わない範囲で必要に応じて常法に従い、粉末剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、ドリンク剤等に製剤化して用いることもできる。また、そのまま又は製剤化した後に、栄養剤や粉乳、乳飲料、乳酸菌飲料、発酵乳、清涼飲料水、チーズ、マーガリン、クリーム、プリン、ゼ

リー、ウエハース等の飲食品、栄養組成物、飼料及び医薬品に配合することも可能である。

本発明の乳酸菌あるいはビフィズス菌の菌体または培養物は、他の飲食品、飼料及び医薬に通常含まれる安定剤や糖類、脂質、フレーバー、ビタミン、ミネラル、フラボノイド、ポリフェノール等の原材料とともに使用することができる。

また、本発明の飲食品は、機能性表示食品、特定保健用食品、栄養機能食品、又は美容用食品として使用することも可能である。

[0020] 製剤化に際しては、通常使用される充填剤、増量剤、結合剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤等の希釈剤又は賦形剤を用いることができる。賦形剤としては、例えばショ糖、乳糖、デンプン、結晶性セルロース、マンニット、軽質無水珪酸、アルミン酸マグネシウム、合成珪酸アルミニウム、メタ珪酸アルミン酸マグネシウム、炭酸カルシウム、炭酸水素ナトリウム、リン酸水素カルシウム、カルボキシルメチルセルロースカルシウム等の1種又は2種以上を組み合わせる加えることができる。

[0021] 以下に実施例、試験例を示し、本発明について詳細に説明するが、本発明はこれらによって限定されるものではない。なお、本明細書において、特に説明のない限り、%は質量%を示す。

実施例

[0022] (実施例1)

ラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*) SBT2062株、ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) SBT2161株、SBT2171株、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*) SBT2687株、SBT2651株、ラクトバチルス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius subsp. salivarius*) SBT2670株、ストレプトコッカス・

オラリス (*Streptococcus oralis*) SBT0320株を、121℃、15分間の滅菌処理をした、MRS broth (DIFCO社製) にて、それぞれの菌株毎に、37℃、16時間の培養を3代以上行って賦活させた。これを同培地にそれぞれ3% (v/v) 接種し、37℃で16時間培養した後、遠心分離によりそれぞれの菌体を分離した。菌体は滅菌生理食塩水で2回、超純水で1回洗浄した後、凍結乾燥し、ラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*) SBT2062株、ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) SBT2161株、SBT2171株、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*) SBT2687株、SBT2651株、ラクトバチルス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius*) SBT2670株、ストレプトコッカス・オラリス (*Streptococcus oralis*) SBT0320株の菌体を得た (実施例品1)。このようにして得られたラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*) SBT2062株、ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) SBT2161株、SBT2171株、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*) SBT2687株、SBT2651株、ラクトバチルス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius*) SBT2670株、ストレプトコッカス・オラリス (*Streptococcus oralis*) SBT0320株の菌体は、そのまま本発明の関節機能改善作用を有する乳酸菌として使用できる。実施例品1の菌体を、イージービーズ (エーエムアール株式会社) を用いて物理的に破碎して、以下の試験に用いた。

[0023] (実施例2)

ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチス (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) SBT0625株、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリス (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) SBT11373株、ラクトコッカス・ローデンシス (*Lactococcus laudensis*) SBT11178株を、121℃、15分間の滅菌処理をしたM17培地 (DIFCO社製) に、最終濃度0.5%になるように、121℃、15分間の滅菌処理をしたラクトース溶液を添加した培地にて、それぞれの菌株毎に、30℃、16時間から24時間の培養を3代以上行って賦活させた。これを同培地にそれぞれ3% (v/v) 接種し、30℃で16時間から24時間培養した後、遠心分離によりそれぞれの菌体を分離した。菌体は滅菌生理食塩水で2回、超純水で1回洗浄した後、凍結乾燥し、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチス (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) SBT0625株、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリス (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) SBT11373株、ラクトコッカス・ローデンシス (*Lactococcus laudensis*) SBT11178株の菌体を得た (実施例品2)。このようにして得られたラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチス (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) SBT0625株、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリス (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) SBT11373株、ラクトコッカス・ローデンシス (*Lactococcus laudensis*) SBT11178株の菌体は、そのまま本発明の関節機能改善作用を有する乳酸菌として使用できる。実施例品2の菌体を、イージービーズ (エーエムアール株式会社) を用いて物理的に破碎して、以下の試験に用いた。

[0024] (実施例3)

ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) SBT2928株、ビフィドバクテリウム・ロンガム・サブスピーシーズ・インファンティス (*Bifidobacterium longum subsp. infantis*) SBT2785株、ビフィドバクテリウム・シュードロンガム (*Bifidobacterium pseudolongum*) SBT2922株、ビフィドバクテリウム・サーモフィラム (*Bifidobacterium thermophilum*) SBT2992株を、115℃、15分間の滅菌処理をしたGAM培地(日水製薬社製)に、最終濃度1%になるように、115℃、15分間の滅菌処理をしたグルコース溶液を添加した培地にて、それぞれの菌株毎に、37℃、16時間から21時間の培養を3代以上行って賦活させた。これを同培地にそれぞれ3%(v/v)接種し、37℃で16時間から21時間培養した後、遠心分離によりそれぞれの菌体を分離した。菌体は滅菌生理食塩水で2回、超純水で1回洗浄した後、凍結乾燥し、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) SBT2928株、ビフィドバクテリウム・ロンガム・サブスピーシーズ・インファンティス (*Bifidobacterium longum subsp. infantis*) SBT2785株、ビフィドバクテリウム・シュードロンガム (*Bifidobacterium pseudolongum*) SBT2922株、ビフィドバクテリウム・サーモフィラム (*Bifidobacterium thermophilum*) SBT2992株の菌体を得た(実施例品3)。このようにして得られたビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) SBT2928株、ビフィドバクテリウム・ロンガム・サブスピーシーズ・インファンティス (*Bifidobacterium longum subsp. infantis*) SBT2785株、ビフィドバクテリウム・シュードロンガム (*Bifidobacterium pseudolongum*) SBT2922株、ビフィドバクテリウム・サーモフィラム (*Bifidobacterium*

thermophilum) SBT2992株の菌体は、そのまま本発明の関節機能改善作用を有するビフィズス菌として使用できる。実施例品3の菌体を、イージービーズ（エーエムアール株式会社）を用いて物理的に破碎して、以下の試験に用いた。

[0025]（比較例1）

雪印メグミルク株式会社保有のワイセラ・コンフューサ（*Weissella confusa*）No. 1株を、121℃、15分間の滅菌処理をした、MRS broth（DIFCO社製）にて、37℃、16時間の培養を3代以上行って賦活させた。これを同培地にそれぞれ3%（v/v）接種し、37℃で16時間培養した後、遠心分離によりそれぞれの菌体を分離した。菌体は滅菌生理食塩水で2回、超純水で1回洗浄した後、凍結乾燥し、ワイセラ・コンフューサ（*Weissella confusa*）No. 1株の菌体を得た（比較例品1）。比較例品1の菌体を、イージービーズ（エーエムアール株式会社）を用いて物理的に破碎して、以下の試験に用いた。

[0026]（比較例2）

雪印メグミルク株式会社保有のペディオコッカス・ペントサセウス（*Pediococcus pentosaceus*）No. 1株を、121℃、15分間の滅菌処理をした、MRS broth（DIFCO社製）にて、37℃、16時間の培養を3代以上行って賦活させた。これを同培地にそれぞれ3%（v/v）接種し、37℃で16時間培養した後、遠心分離によりそれぞれの菌体を分離した。菌体は滅菌生理食塩水で2回、超純水で1回洗浄した後、凍結乾燥し、ペディオコッカス・ペントサセウス（*Pediococcus pentosaceus*）No. 1株の菌体を得た（比較例品2）。比較例品2の菌体を、イージービーズ（エーエムアール株式会社）を用いて物理的に破碎して、以下の試験に用いた。

[0027]（比較例3）

雪印メグミルク株式会社保有のロイコノストック・メセンテロイデス（*Leuconostoc mesenteroides*）No. 1株を、12

1℃、15分間の滅菌処理をした、MRS broth (DIFCO社製)にて、25℃、24時間の培養を3代以上行って賦活させた。これを同培地にそれぞれ3% (v/v) 接種し、25℃で24時間培養した後、遠心分離によりそれぞれの菌体を分離した。菌体は滅菌生理食塩水で2回、超純水で1回洗浄した後、凍結乾燥しロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) No. 1株の菌体を得た (比較例品3)。比較例品3の菌体を、イージービーズ (エーエムアール株式会社) を用いて物理的に破砕して、以下の試験に用いた。

[0028] (試験例1)

実施例品3のビフィドバクテリウム・サーモフィラム (*Bifidobacterium thermophilum*) SBT2992株の菌体破砕物の軟骨細胞増殖促進効果を調べた。また、比較のために、比較例品1のワイセラ・コンフューサ (*Weissella confusa*) No. 1株の菌体破砕物の軟骨細胞増殖促進効果を調べた。

マウス由来軟骨前駆細胞株 (ATDC5) を96穴の平板細胞培養プレートに5,000 cells/wellになるように播種し、5% (v/v) ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地/ハムF-12混合培地で、37℃、5% CO₂環境下にて24時間培養した。その後、培地を全て除き、ウシ胎児血清を含まないダルベッコ改変イーグル培地/ハムF-12培地で洗浄、培地交換し、実施例品3のビフィドバクテリウム・サーモフィラム (*Bifidobacterium thermophilum*) SBT2992株と比較例品1のワイセラ・コンフューサ (*Weissella confusa*) No. 1株の菌体破砕物を、それぞれ0.1 mg/mlの最終濃度となるよう培地に添加して、48時間培養した。その後、培地を全量除去し、細胞増殖試薬WST-1 (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社) を培地中に10分の1量含むように添加した後、5時間培養し、プレートリーダーを用いて440 nmの吸光度を測定した。WST-1は生細胞の代謝活性によってフォルマザン色素に還元されるため、フォルマザン色素量

は代謝活性を有する細胞数に比例する。そこで、フォルマザン色素量を反映する吸光度の値を軟骨細胞増殖促進効果の指標とした。

[0029] [表1]

菌株名	吸光度 (440nm)
対照 (PBS)	0.626 ± 0.021
<i>Weissella confusa</i> No. 1株	0.632 ± 0.038
<i>Bifidobacterium thermophilum</i> SBT2992株	1.269 ± 0.029 ※

数値は、平均値±標準偏差 (n=4) を示す。

※は対照 (PBS) と比較して有意差があることを示す ($p < 0.05$)

[0030] その結果、ビフィドバクテリウム・サーモフィラム (*Bifidobacterium thermophilum*) SBT2992株の菌体破砕物を添加した場合は、対照 (PBS) に比べ、軟骨前駆細胞の細胞数が有意に増加した。したがって、本発明のビフィドバクテリウム・サーモフィラム (*Bifidobacterium thermophilum*) SBT2992株の菌体破砕物には軟骨細胞の増殖促進効果があることがわかった。一方、比較例品1のワイセラ・コンフューサ (*Weissella confusa*) No. 1株の菌体破砕物は、軟骨細胞の増殖促進効果を示さなかった。

[0031] (試験例2)

実施例品1のラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*) SBT2062株、ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) SBT2161株、SBT2171株、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*) SBT2687株、SBT2651株、ラクトバチルス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius* subsp.

salivarius) SBT2670株、ストレプトコッカス・オラリス (Streptococcus oralis) SBT0320株、実施例品2のラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチス (Lactococcus lactis subsp. lactis) SBT0625株、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリス (Lactococcus lactis subsp. cremoris) SBT11373株、ラクトコッカス・ローデンシス (Lactococcus laudensis) SBT11178株、実施例品3のビフィドバクテリウム・ロンガム (Bifidobacterium longum) SBT2928株、ビフィドバクテリウム・サーモフィラム (Bifidobacterium thermophilum) SBT2992株の菌体破砕物の、滑膜細胞による炎症因子の産生を抑制する効果を調べた。また、比較のために、比較例品2のペディオコッカス・ペントサセウス (Pediococcus pentosaceus) No. 1株の菌体破砕物の、滑膜細胞による炎症因子の産生を抑制する効果を調べた。

ヒト滑膜由来細胞株 (SW982) を12穴の平板細胞培養プレートに100,000 cells/wellになるように播種し、10% (v/v) ウシ胎児血清を含むリーボビッツL-15培地にて37℃、5%CO₂環境下にて1週間培養した。その後、培地を全て除き、ウシ胎児血清を含まないリーボビッツL-15培地で洗浄、培地交換した。human-IL-1 β (Interleukin-1 β) を1 ng/mlの最終濃度となるように培地に添加し、本発明の菌体破砕物を1 mg/mlの最終濃度となるよう培地に添加して、さらに24時間培養した。その後、培養後の細胞からセパゾール RNA 1 SuperG 試薬 (ナカライテスク社製) を用いて、すべてのRNAを抽出した。逆転写反応はReverTra Ace qPCR RT Master Mix (東洋紡社製) を用いた。得られたcDNAを使用して、THUNDERBIRD qPCR Mix (東洋紡社製) でリアルタイムPCRを行い、炎症因子であるTNF- α (Tumor N

ecrosis Factor- α) の遺伝子発現量を定量した。なお、遺伝子発現量を評価するための内部標準として、GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 遺伝子の発現量を使用し、解析にあたって、TNF- α には配列表配列番号 1、2 のプライマーを、GAPDHには配列表配列番号 3、4 のプライマーを用いた。

[0032] [表2]

配列番号		塩基配列 (5' = 3')
1	フォワード	GAG GCC AAG CCC TGG TAT G
2	リバーズ	CGG GCC GAT TGA TCT CAG C
3	フォワード	CTG GGC TAC ACT GAG CAC C
4	リバーズ	AAG TGG TCG TTG AGG GCA ATG

[0033] [表3]

菌株名	相対TNF- α 遺伝子発現量
対照 (PBS)	100.0 $\pm$ 11.5
<i>Pediococcus pentosaceus</i> No. 1株	91.6 $\pm$ 20.7
<i>Lactobacillus acidophilus</i> SBT2062株	45.2 $\pm$ 2.6 ※
<i>Lactobacillus helveticus</i> SBT2161株	32.1 $\pm$ 2.3 ※
<i>Lactobacillus helveticus</i> SBT2171株	40.4 $\pm$ 1.2 ※
<i>Lactobacillus salivarius</i> SBT2687株	6.3 $\pm$ 2.9 ※
<i>Lactobacillus salivarius</i> SBT2651株	10.4 $\pm$ 9.9 ※
<i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> SBT2670株	15.4 $\pm$ 17.5 ※
<i>Streptococcus oralis</i> SBT0320株	25.5 $\pm$ 1.2 ※
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> SBT0625株	18.7 $\pm$ 10.6 ※
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> SBT11373株	22.6 $\pm$ 0.8 ※
<i>Lactococcus laudensis</i> SBT11178株	17.9 $\pm$ 1.3 ※
<i>Bifidobacterium longum</i> SBT2928株	28.5 $\pm$ 11.5 ※
<i>Bifidobacterium thermophilum</i> SBT2992株	21.7 $\pm$ 0.6 ※

数値は、平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=3) を示す。

※は対照 (PBS) と比較して有意差があることを示す (p<0.05)

[0034] その結果、ラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*) SBT2062株、ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) SBT2

161株、SBT2171株、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*) SBT2687株、SBT2651株、ラクトバチルス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius*) SBT2670株、ストレプトコッカス・オラリス (*Streptococcus oralis*) SBT0320株、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチス (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) SBT0625株、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリス (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) SBT11373株、ラクトコッカス・ローデンシス (*Lactococcus laudensis*) SBT11178株、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) SBT2928株、ビフィドバクテリウム・サーモフィラム (*Bifidobacterium thermophilum*) SBT2992株の菌体破砕物を添加した場合は、いずれも対照 (PBS) に比べ、滑膜細胞におけるTNF- α 遺伝子の発現を有意に抑制した。したがって、本発明のラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*) SBT2062株、ラクトバチルス・ヘルペティカス (*Lactobacillus helveticus*) SBT2161株、SBT2171株、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*) SBT2687株、SBT2651株、ラクトバチルス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius*) SBT2670株、ストレプトコッカス・オラリス (*Streptococcus oralis*) SBT0320株、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチス (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) SBT0625株、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリ

ス (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) SBT11373株、ラクトコッカス・ローデンシス (*Lactococcus laudensis*) SBT11178株、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) SBT2928株、ビフィドバクテリウム・サーモフィラム (*Bifidobacterium thermophilum*) SBT2992株の菌体破砕物には、滑膜細胞による炎症因子の産生を抑制する効果があることがわかった。一方、比較例品2のペディオコッカス・ペントサセウス (*Pediococcus pentosaceus*) No. 1株の菌体破砕物は、滑膜細胞による炎症因子の産生を抑制する効果を示さなかった。

[0035] (試験例3)

実施例品1のラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*) SBT2062株、ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) SBT2161株、SBT2171株、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*) SBT2687株、SBT2651株、ラクトバチルス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius*) SBT2670株、ストレプトコッカス・オラリス (*Streptococcus oralis*) SBT0320株、実施例品2のラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチス (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) SBT0625株、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリス (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) SBT11373株、ラクトコッカス・ローデンシス (*Lactococcus laudensis*) SBT11178株、実施例品3のビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) SBT2928株、ビフィドバクテリウム・ロンガム・サブスピーシーズ・

インファンティス (*Bifidobacterium longum subsp. infantis*) SBT2785株、ビフィドバクテリウム・シュードロンガム (*Bifidobacterium pseudolongum*) SBT2922株の菌体破砕物の、滑膜細胞による軟骨基質分解因子の産生を抑制する効果を調べた。また、比較のために、比較例品3のロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) No. 1株の菌体破砕物の、滑膜細胞による軟骨基質分解因子の産生を抑制する効果を調べた。

ヒト滑膜由来細胞株 (SW982) を12穴の平板細胞培養プレートに100,000 cells/wellになるように播種し、10% (v/v) ウシ胎児血清を含むリーボビッツL-15培地にて37℃、5%CO₂環境下にて1週間培養した。その後、培地を全て除き、ウシ胎児血清を含まないリーボビッツL-15培地で洗浄、培地交換した。human-IL-1β (*Interleukin-1β*) を1 ng/mlの最終濃度となるように培地に添加し、本発明の菌体破砕物を1 mg/mlの最終濃度となるよう培地に添加して、さらに24時間培養した。その後、培養後の細胞からセパゾール RNA 1 SuperG 試薬 (ナカライテスク社製) を用いて、すべてのRNAを抽出した。逆転写反応はReverTraAce qPCR RT Master Mix (東洋紡社製) を用いた。得られたcDNAを使用して、THUNDERBIRD qPCR Mix (東洋紡社製) でリアルタイムPCRを行い、軟骨基質分解因子であるMMP-13 (*Matrix Metalloproteinase-13*) の遺伝子発現量を定量した。なお、遺伝子発現量を評価するための内部標準として、GAPDH (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) 遺伝子の発現量を使用し、解析にあたって、MMP-13には配列表配列番号5, 6のプライマーを、GAPDHには配列表配列番号3, 4のプライマーを用いた。

[0036]

[表4]

配列番号		塩基配列 (5' → 3')							
5	フォワード	TCC	TGA	TGT	GGG	TGA	ATA	CAA	TG
6	リバース	GCC	ATC	GTG	AAG	TCT	GGT	AAA	AT
3	フォワード	CTG	GGC	TAC	ACT	GAG	CAC	C	
4	リバース	AAG	TGG	TCG	TTG	AGG	GCA	ATG	

[0037] [表5]

菌株名	相対MMP-13遺伝子発現量
対照 (PBS)	100.0 ± 41.5
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> No. 1株	83.7 ± 26.2
<i>Lactobacillus acidophilus</i> SBT2062株	32.7 ± 14.0 ※
<i>Lactobacillus helveticus</i> SBT2161株	43.6 ± 13.0 ※
<i>Lactobacillus helveticus</i> SBT2171株	42.3 ± 11.4 ※
<i>Lactobacillus salivarius</i> SBT2687株	11.0 ± 2.6 ※
<i>Lactobacillus salivarius</i> SBT2651株	22.0 ± 4.0 ※
<i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> SBT2670株	15.1 ± 14.1 ※
<i>Streptococcus oralis</i> SBT0320株	24.3 ± 11.5 ※
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> SBT0625株	40.6 ± 13.9 ※
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> SBT11373株	24.3 ± 5.6 ※
<i>Lactococcus laudensis</i> SBT11178株	13.8 ± 3.9 ※
<i>Bifidobacterium longum</i> SBT2928株	30.6 ± 8.9 ※
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> SBT2785株	36.7 ± 6.8 ※
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> SBT2922株	22.7 ± 15.2 ※

数値は、平均値±標準偏差 (n=3) を示す。

※は対照 (PBS) と比較して有意差があることを示す (p<0.05)

[0038] その結果、ラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*) SBT2062株、ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) SBT2161株、SBT2171株、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*) SBT2687株、SBT2651株、ラクトバチルス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius*) SBT2670株、ストレプトコッカス・オラリス (

Streptococcus oralis) SBT0320株、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチス (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) SBT0625株、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリス (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) SBT11373株、ラクトコッカス・ローデンシス (*Lactococcus laudensis*) SBT11178株、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) SBT2928株、ビフィドバクテリウム・ロンガム・サブスピーシーズ・インファンティス (*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) SBT2785株、ビフィドバクテリウム・シュードロンガム (*Bifidobacterium pseudolongum*) SBT2922株の菌体破砕物を添加した場合は、いずれも対照 (PBS) に比べ、滑膜細胞におけるMMP-13遺伝子の発現を有意に抑制した。したがって、本発明のラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*) SBT2062株、ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) SBT2161株、SBT2171株、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*) SBT2687株、SBT2651株、ラクトバチルス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius*) SBT2670株、ストレプトコッカス・オラリス (*Streptococcus oralis*) SBT0320株、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチス (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) SBT0625株、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリス (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) SBT11373株、ラクトコッカス・ローデンシス (*Lactococcus laudensis*) SB

T11178株、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) SBT2928株、ビフィドバクテリウム・ロンガム・サブスピーシーズ・インファンティス (*Bifidobacterium longum subsp. infantis*) SBT2785株、ビフィドバクテリウム・シュードロンガム (*Bifidobacterium pseudolongum*) SBT2922株の菌体破砕物には、滑膜細胞による軟骨基質分解因子の産生を抑制する効果があることがわかった。一方、比較例品3のロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) No. 1株の菌体破砕物は、滑膜細胞による軟骨基質分解因子の産生を抑制する効果を示さなかった。

[0039] (試験例4)

実施例品1のラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*) SBT2687株、実施例品3のビフィドバクテリウム・ロンガム・サブスピーシーズ・インファンティス (*Bifidobacterium longum subsp. infantis*) SBT2785株、ビフィドバクテリウム・シュードロンガム (*Bifidobacterium pseudolongum*) SBT2922株の菌体破砕物の、滑膜細胞による疼痛因子の産生を抑制する効果を調べた。また、比較のために、比較例品1のワイセラ・コンフューサ (*Weissella confusa*) No. 1株の菌体破砕物の、滑膜細胞による疼痛因子の産生を抑制する効果を調べた。

ヒト滑膜由来細胞株 (SW982) を12穴の平板細胞培養プレートに100,000 cells/wellになるように播種し、10% (v/v) ウシ胎児血清を含むリーボビッツL-15培地にて37℃、5%CO₂環境下にて1週間培養した。その後、培地を全て除き、ウシ胎児血清を含まないリーボビッツL-15培地で洗浄、培地交換した。human-IL-1β (Interleukin-1β) を1 ng/mlの最終濃度となるように培地に添加し、本発明の菌体破砕物を1 mg/mlの最終濃度となるよう培地

に添加して、さらに24時間培養した。その後、培養後の細胞からセパゾール RNA 1 SuperG 試薬（ナカライテスク社製）を用いて、すべてのRNAを抽出した。逆転写反応はReverTra Ace qPCR RT Master Mix（東洋紡社製）を用いた。得られたcDNAを使用して、THUNDERBIRD qPCR Mix（東洋紡社製）でリアルタイムPCRを行い、疼痛因子であるCOX-2（Cyclooxygenase-2）の遺伝子発現量を定量した。なお、遺伝子発現量を評価するための内部標準として、GAPDH（Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase）遺伝子の発現量を使用し、解析にあたって、COX-2には配列表配列番号7、8のプライマーを、GAPDHには配列表配列番号3、4のプライマーを用いた。

[0040] [表6]

配列番号		塩基配列 (5' = 3')
7	フォワード	ATG CTG ACT ATG GCT ACA AAA GC
8	リバース	TCG GGC AAT CAT CAG GCA C
3	フォワード	CTG GGC TAC ACT GAG CAC C
4	リバース	AAG TGG TCG TTG AGG GCA ATG

[0041] [表7]

菌株名	相対COX-2遺伝子発現量
対照 (PBS)	100.0 ± 20.0 ※
<i>Weissella confusa</i> No. 1株	118.0 ± 31.8 ※
<i>Lactobacillus salivarius</i> SBT2687株	28.6 ± 24.0 ※
<i>Bifidobacterium longum subsp. infantis</i> SBT2785株	35.7 ± 15.8 ※
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> SBT2922株	48.7 ± 9.3 ※

数値は、平均値±標準偏差 (n=3) を示す。

※は対照 (PBS) と比較して有意差があることを示す (p<0.05)

[0042] その結果、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus*

salivarius) SBT2687株、*ビフィドバクテリウム・ロンガム・サブスピーシーズ・インファンティス* (*Bifidobacterium longum subsp. infantis*) SBT2785株、*ビフィドバクテリウム・シュードロンガム* (*Bifidobacterium pseudolongum*) SBT2922株の菌体破砕物を添加した場合は、いずれも対照 (PBS) に比べ、滑膜細胞におけるCOX-2遺伝子の発現を有意に抑制した。したがって、本発明のラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*) SBT2687株、*ビフィドバクテリウム・ロンガム・サブスピーシーズ・インファンティス* (*Bifidobacterium longum subsp. infantis*) SBT2785株、*ビフィドバクテリウム・シュードロンガム* (*Bifidobacterium pseudolongum*) SBT2922株の菌体破砕物には、滑膜細胞による疼痛因子の産生を抑制する効果があることがわかった。一方、比較例品1のワイセラ・コンフューサ (*Weissella confusa*) No. 1株の菌体破砕物は、滑膜細胞による疼痛因子の産生を抑制する効果を示さなかった。

[0043] (試験例5)

実施例品1のラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*) SBT2687株、SBT2651株、実施例品3の*ビフィドバクテリウム・ロンガム・サブスピーシーズ・インファンティス* (*Bifidobacterium longum subsp. infantis*) SBT2785株、*ビフィドバクテリウム・シュードロンガム* (*Bifidobacterium pseudolongum*) SBT2922株の菌体破砕物の、滑膜細胞による神経伸長因子の産生を抑制する効果を調べた。また、比較のために、比較例品2のペディオコッカス・ペントサセウス (*Pediococcus pentosaceus*) No. 1株の菌体破砕物の、滑膜細胞による神経伸長因子の産生を抑制する効果を調べた。

ヒト滑膜由来細胞株（SW982）を12穴の平板細胞培養プレートに100,000 cells/wellになるように播種し、10%（v/v）ウシ胎児血清を含むリーボビッツL-15培地にて37℃、5%CO₂環境下にて1週間培養した。その後、培地を全て除き、ウシ胎児血清を含まないリーボビッツL-15培地で洗浄、培地交換した。human-IL-1β（Interleukin-1β）を1 ng/mlの最終濃度となるように培地に添加し、本発明の菌体破砕物を1 mg/mlの最終濃度となるよう培地に添加して、さらに24時間培養した。その後、培養後の細胞からセパゾール RNA 1 SuperG 試薬（ナカライテスク社製）を用いて、すべてのRNAを抽出した。逆転写反応はReverTra Ace qPCR RT Master Mix（東洋紡社製）を用いた。得られたcDNAを使用して、THUNDERBIRD qPCR Mix（東洋紡社製）でリアルタイムPCRを行い、神経伸長因子であるNGF（Nerve Growth Factor）の遺伝子発現量を定量した。なお、遺伝子発現量を評価するための内部標準として、GAPDH（Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase）遺伝子の発現量を使用し、解析にはNGFにあたって、配列表配列番号9、10のプライマーを、GAPDHには配列表配列番号3、4のプライマーを用いた。

[0044] [表8]

配列番号		塩基配列（5' = 3'）
9	フォワード	GGC AGA CCC GCA ACA TTA CT
10	リバーズ	CAC CAC CGA CCT CGA AGT C
3	フォワード	CTG GGC TAC ACT GAG CAC C
4	リバーズ	AAG TGG TCG TTG AGG GCA ATG

[0045]

[表9]

菌株名	相対NGF遺伝子発現量			
対照 (PBS)	100.0	±	13.4	※
<i>Pediococcus pentosaceus</i> No. 1株	94.3	±	24.1	※
<i>Lactobacillus salivarius</i> SBT2687株	23.6	±	3.4	※
<i>Lactobacillus salivarius</i> SBT2651株	38.1	±	10.2	※
<i>Bifidobacterium longum subsp. infantis</i> SBT2785株	17.8	±	4.6	※
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> SBT2922株	44.8	±	12.7	※

数値は、平均値±標準偏差 (n=3) を示す。

※は対照 (PBS) と比較して有意差があることを示す (p<0.05)

[0046] その結果、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*) SBT2687株、SBT2651株、ビフィドバクテリウム・ロンガム・サブスピーシーズ・インファンティス (*Bifidobacterium longum subsp. infantis*) SBT2785株、ビフィドバクテリウム・シュードロンガム (*Bifidobacterium pseudolongum*) SBT2922株の菌体破砕物を添加した場合は、いずれも対照 (PBS) に比べ、滑膜細胞におけるNGF遺伝子の発現を有意に抑制した。したがって、本発明のラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*) SBT2687株、SBT2651株、ビフィドバクテリウム・ロンガム・サブスピーシーズ・インファンティス (*Bifidobacterium longum subsp. infantis*) SBT2785株、ビフィドバクテリウム・シュードロンガム (*Bifidobacterium pseudolongum*) SBT2922株の菌体破砕物には、滑膜細胞による神経伸長因子の産生を抑制する効果があることがわかった。一方、比較例品2のペディオコッカス・ペントサセウス (*Pediococcus pentosaceus*) No. 1株菌体破砕物は、滑膜細胞による神経伸長因子の産生を抑制する効果を示さなかった。

[0047] (実施例4)

(関節機能改善用カプセル剤の調製)

表 10 に示す配合で原材料を混合後、常法により造粒し、カプセルに充填して、本発明の関節機能改善用カプセル剤を製造した。

[0048] [表10]

	重量 (%)
SBT2062株 (実施例品1)	0.1
ラクトース	41.4
可溶性デンプン	58.0
ステアリン酸マグネシウム	0.5

[0049] (実施例5)

(関節機能改善用錠剤の調製)

表 11 に示す配合で原材料を混合後、常法により 1 g に成型、打錠して本発明の関節機能改善用錠剤を製造した。

[0050] [表11]

	重量 (%)
含水結晶ブドウ糖	93.49
SBT2161株 (実施例品1)	0.01
ミネラル混合	5.00
シュガーエステル	1.00
香料	0.50

[0051] (実施例6)

(関節機能改善用液状栄養組成物の調製)

SBT2171株の菌体 (実施例品1) 25 g を 4975 g の脱イオン水に溶解し、40℃まで加熱後、TKホモミクサー (TK ROBO MICS; 特殊機化工業社製) にて、6,000 rpm で 10 分間攪拌混合して 25 g / 5 kg の SBT2171株の菌体溶液を得た。この SBT2171株溶液 5.0 kg に、カゼイン 5.0 kg、大豆タンパク質 5.0 kg、魚油 1.0 kg、シソ油 3.0 kg、デキストリン 17.0 kg、ミネラル混合物 6.0 kg、ビタミン混合物 1.95 kg、乳化剤 2.0 kg、安定剤 4.0 kg、香料 0.05 kg を配合し、200 ml のレトルトパウチに充填

し、レトルト殺菌機（第1種圧力容器、TYPE：RCS-4CRTGN、日阪製作所製）で121℃、20分間殺菌して、本発明の関節機能改善用液状栄養組成物50kgを製造した。なお、本発明の関節機能改善用液状栄養組成物200gには、SBT2171株の菌体が100mg含まれていた。

[0052]（実施例7）

（関節機能改善用飲料の調製）

実施例品1のSBT2687株の菌体0.5gを699.5gの脱イオン水に溶解した後、40℃まで加熱後、ウルトラディスペンサー（ULTRA-TURRAX T-25；IKAジャパン社製）にて、9,500rpmで20分間攪拌混合した。マルチトール100g、酸味料2g、還元水20g、香料2g、脱イオン水176gを添加した後、100mlのガラス瓶に充填し、95℃、15秒間殺菌後、密栓し、本発明の関節機能改善用飲料10本（100ml入り）を調製した。なお、本発明の関節機能改善用飲料100gには、SBT2687株の菌体が50mg含まれていた。

[0053]（実施例8）

（イヌ用関節機能改善用飼料の調製）

実施例品1のSBT2651株の菌体2gを3,998gの脱イオン水に溶解し、40℃まで加熱後、TKホモミクサー（MARK II 160型；特殊機化工業社製）にて、3,600rpmで20分間攪拌混合して2g/4kgのSBT2651株の菌体溶液を得た。このSBT2651株の菌体溶液2kgに大豆粕1kg、脱脂粉乳1kg、大豆油0.4kg、コーン油0.2kg、パーム油2.3kg、トウモロコシ澱粉1kg、小麦粉0.9kg、ふすま0.2kg、ビタミン混合物0.5kg、セルロース0.3kg、ミネラル混合物0.2kgを配合し、120℃、4分間加熱殺菌して、本発明の関節機能改善用飼料10kgを製造した。なお、本発明の関節機能改善用飼料100gには、SBT2651株の菌体が10mg含まれていた。

[0054] (実施例 9)

(関節機能改善用粉乳の調製)

実施例品 1 の S B T 2 6 7 0 株の菌体 2 g、脱脂粉乳 9. 9 9 8 k g、脱イオン水 9 0 k g を混合し、4 0℃まで加熱後、TK ホモミクサー (TK ROBO MICS ; 特殊機化工業社製) にて、6, 0 0 0 r p m で 1 0 分間攪拌混合した。この溶液を噴霧乾燥して本発明の関節機能改善用粉乳 1 0 k g を製造した。なお、本発明の関節機能改善用粉乳 1 0 g には S B T 2 6 7 0 株の菌体が 2 m g 含まれていた。

[0055] (実施例 1 0)

(関節機能改善用乳飲料の調製)

実施例品 2 の S B T 0 6 2 5 株の菌体 1 g、牛乳 9. 9 9 9 k g を混合し、4 0℃まで加熱後、TK ホモミクサー (TK ROBO MICS ; 特殊機化工業社製) にて、6, 0 0 0 r p m で 1 0 分間攪拌混合した。1 3 0℃で 2 秒間、加熱殺菌した後、1 0℃以下まで冷却して本発明の関節機能改善用乳飲料 1 0 k g を製造した。なお、本発明の関節機能改善用乳飲料 2 0 0 g には S B T 0 6 2 5 株の菌体が 2 0 m g 含まれていた。

[0056] (実施例 1 1)

(関節機能改善用発酵乳の調製)

実施例品 2 の S B T 1 1 3 7 3 株の菌体 0. 1 g、脱脂粉乳 1 7 0 0 g、グルコース 3 0 0 g、脱イオン水 7 6 9 9. 9 g を混合し、9 5℃で 2 時間保持することで加熱殺菌した。これを 3 7℃まで冷却し、乳酸菌スターター (*S t r e p t o c o c c u s t h e r m o p h i l u s*) を 3 0 0 g 植菌し、攪拌混合後、3 7℃に保持したインキュベーター内で pH 4. 0 まで発酵させた。p H 4. 0 到達後 1 0℃以下まで冷却し、本発明の関節機能改善用発酵乳 1 0 k g を製造した。なお、本発明の関節機能改善用発酵乳 2 0 0 g には、S B T 1 1 3 7 3 株の菌体が 2 m g 含まれていた。

[0057] (実施例 1 2)

(関節機能改善用乳酸菌飲料の調製)

脱脂粉乳 1700 g、グルコース 300 g、脱イオン水 7700 g を混合し、95℃で2時間保持することで加熱殺菌した。これを37℃まで冷却し、乳酸菌スターター (L b . c a s e i) を300 g 植菌し、攪拌混合後、37℃に保持したインキュベーター内でpH4.0まで発酵させた。pH4.0到達後、攪拌しながら10℃以下まで冷却し、発酵ベースを得た。また、実施例品2のSBT11178株の菌体4 g、上白糖1800 g、酸味料20 g、香料10 g、脱イオン水8166 gを混合し、90℃で10分間殺菌後10℃以下まで冷却し、糖液を得た。前述の発酵ベース2000 gと糖液8000 gを混和し、均質機で組織を滑らかにし、200 ml 入り紙容器50本に分注後、アルミ蓋で密封し、本発明の関節機能改善用乳酸菌飲料10 kg を製造した。なお、本発明の関節機能改善用乳酸菌飲料200 ml には、SBT11178株の菌体が64 mg 含まれていた。

[0058] (実施例13)

(関節機能改善用清涼飲料水の調製)

実施例品1のSBT0320株の菌体3 g、50%乳酸0.75 kg、エリスリトール5.7 kg、香料1 kg、脱イオン水42.547 kgを混合し、40℃まで加熱後、TKホモミクサー (TK ROBO MICS ; 特殊機化工業社製) にて、6,000 rpmで10分間攪拌混合した。この溶液を90℃で10分間殺菌後10℃以下まで冷却することで、本発明の関節機能改善用清涼飲料水50 kg を製造した。なお、本発明の関節機能改善用清涼飲料水200 ml には、SBT0320株の菌体が12 mg 含まれていた。

[0059] (実施例14)

(関節機能改善用チーズの調製)

ゴーダチーズ9.5 kg、チェダーチーズ9.5 kg、実施例品3のSBT2928株の菌体4 g、クエン酸ナトリウム200 g、脱イオン水796 gを混合し、85℃で乳化した。乳化後にチーズをカルトンに充填して2昼夜、5℃で冷却して、本発明の関節機能改善用チーズ20 kg を製造した。

なお、本発明の関節機能改善用チーズ100gには、SBT2928株の菌体が20mg含まれていた。

[0060] (実施例15)

(関節機能改善用マーガリンの調製)

大豆硬化油2kg、大豆白絞油4kg、パーム油2.5kg、グリセリン脂肪酸エステル50gを混合して油層を調製した。次に、実施例品3のSBT2785株の菌体20g、乳酸10g、脱イオン水1420gを混合し、油層へ添加して油中水型乳化物を得た、この乳化物をマーガリン製造機で冷却、固化および練圧して、本発明の関節機能改善用マーガリン10kgを製造した。なお本発明の関節機能改善用マーガリン10gには、SBT2785株の菌体が20mg含まれていた。

[0061] (実施例16)

(関節機能改善用クリームの調製)

ナタネ硬化油4.5kg、レシチン40g、モノグリセリン脂肪酸エステル10g、ソルビタン脂肪酸エステル10gを混合し、油相を調製した。次に、実施例品3のSBT2922株の菌体40g、脱脂粉乳400g、カゼインナトリウム10g、シュガーエステル20g、リン酸塩10g、キサンタンガム5g、脱イオン水4.955kgを混合して、水相を調製した。水相を65℃に加温し、70℃に加温した油相を少量ずつ攪拌しながら添加し、TKホモミクサー(TK ROBO MICS; 特殊機化工業社製)にて、6,000rpmで10分間攪拌混合した。これを均質機で均質処理して本発明の関節機能改善用クリーム10kgを製造した。なお、本発明の関節機能改善用クリーム10gには、SBT2922株の菌体が40mg含まれていた。

[0062] (実施例17)

(関節機能改善用プリンの調製)

はちみつ2000g、実施例品3のSBT2992株の菌体4g、脱脂粉乳800g、マスカルポーネ300g、液状水700g、グラニュー糖50

0 g、生クリーム250 g、バター200 g、加糖卵黄400 g、ゼラチン40 g、寒天15 g、ローカストビーンガム120 g、脱イオン水4671 gを混合して、プリンミックスとした。このプリンミックスをTKホモミクサー（TK ROBO MICS；特殊機化工業社製）にて、6,000 rpmで10分間攪拌混合し、60℃に加熱して溶解した後、100 gずつ容器へ充填して冷却することで、本発明の関節機能改善用プリン100個を製造した。なお、本発明の関節機能改善用プリン100 gには、SBT2992株の菌体が40 mg含まれていた。

[0063]（実施例18）

（関節機能改善用ゼリーの調製）

実施例品1のSBT2687株の菌体4.4 g、果糖2000 g、グラニュー糖1500 g、水500 g、寒天100 g、香料10 g、脱イオン水5885.6 gを混合し、TKホモミクサー（TK ROBO MICS；特殊機化工業社製）にて、6,000 rpmで10分間攪拌混合し、50℃に加熱して溶解した後、100 gずつ容器へ充填して冷却することで、本発明の関節機能改善用ゼリー100個を製造した。なお、本発明の関節機能改善用ゼリー100 gには、SBT2687株の菌体が44 mg含まれていた。

[0064]（実施例19）

（関節機能改善用ウエハースの調製）

実施例品1のSBT2651株の菌体9.2 g、小麦粉8.5 kg、コーンスターチ1.21 kg、パーム油0.22 kg、膨張剤0.05 kgを混合した後、脱イオン水を適量加えてバッターを調製した後、ウエハース焼成機で焼成して、本発明の関節機能改善用ウエハース10 kgを製造した。なお、本発明の関節機能改善用ウエハース50 gには、SBT2651株の菌体が46 mg含まれていた。

産業上の利用可能性

[0065] 本発明によれば長期摂取が可能で、安全性が高く、軟骨細胞の増殖を促進させる作用、又は、滑膜細胞による炎症因子、軟骨基質分解因子、疼痛因子

、神経伸長因子の産生を抑制する作用を介した関節機能改善作用が顕著な関節機能改善用組成物を提供することが可能である。したがって、本発明の摂取により変形性膝関節症に代表される変形性関節症や関節リウマチなどの種々の関節疾患の予防や治療が可能である。

受託番号

[0066] [寄託生物材料への言及]

(1) ラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*) SBT2062株

イ 当該生物材料を寄託した寄託機関の名称及び住所

独立行政法人 製品評価技術基盤機構特許生物寄託センター

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)

ロ イの寄託機関に生物材料を寄託した日付

1989年5月18日

ハ イの寄託機関が寄託について付した受託番号

FERM BP-11075

(2) ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) SBT2161株

イ 当該生物材料を寄託した寄託機関の名称及び住所

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)

ロ イの寄託機関に生物材料を寄託した日付

2013年9月18日

ハ イの寄託機関が寄託について付した受託番号

NITE BP-1707

(3) ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) SBT2171株

イ 当該生物材料を寄託した寄託機関の名称及び住所

独立行政法人 製品評価技術基盤機構特許生物寄託センター

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）

ロ イの寄託機関に生物材料を寄託した日付

1994年6月22日（原寄託日）

1996年3月6日（原寄託によりブタペスト条約に基づく寄託への移管日）

ハ イの寄託機関が寄託について付した受託番号

FERM BP-5445

（4）ラクトバチルス・サリバリウス（*Lactobacillus salivarius*）SBT2687株

イ 当該生物材料を寄託した寄託機関の名称及び住所

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）

ロ イの寄託機関に生物材料を寄託した日付

2020年12月1日

2021年12月22日（原寄託によりブタペスト条約に基づく寄託への移管日）

ハ イの寄託機関が寄託について付した受託番号

NITE ABP-03331

（5）ラクトバチルス・サリバリウス（*Lactobacillus salivarius*）SBT2651株

イ 当該生物材料を寄託した寄託機関の名称及び住所

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）

ロ イの寄託機関に生物材料を寄託した日付

2020年12月1日

ハ イの寄託機関が寄託について付した受託番号

NITE P-03330

(6) ラクトバチルス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius*) SBT2670株

イ 当該生物材料を寄託した寄託機関の名称及び住所

独立行政法人 製品評価技術基盤機構特許生物寄託センター

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)

ロ イの寄託機関に生物材料を寄託した日付

1992年11月6日

ハ イの寄託機関が寄託について付した受託番号

FERM P-13247

(7) ストレプトコッカス・オラリス (*Streptococcus oralis*) SBT0320株

イ 当該生物材料を寄託した寄託機関の名称及び住所

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)

ロ イの寄託機関に生物材料を寄託した日付

2020年12月1日

ハ イの寄託機関が寄託について付した受託番号

NITE P-03332

(8) ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチス (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) SBT0625株

イ 当該生物材料を寄託した寄託機関の名称及び住所

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）

ロ イの寄託機関に生物材料を寄託した日付

2019年11月25日

ハ イの寄託機関が寄託について付した受託番号

NITE P-03078

(9) ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリス (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) SBT11373株

イ 当該生物材料を寄託した寄託機関の名称及び住所

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）

ロ イの寄託機関に生物材料を寄託した日付

2020年7月14日

ハ イの寄託機関が寄託について付した受託番号

NITE P-03246

(10) ラクトコッカス・ローデンシス (*Lactococcus laudensis*) SBT11178株

イ 当該生物材料を寄託した寄託機関の名称及び住所

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）

ロ イの寄託機関に生物材料を寄託した日付

2020年12月1日

ハ イの寄託機関が寄託について付した受託番号

N I T E P-03333

(11) ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) SBT2928株

イ 当該生物材料を寄託した寄託機関の名称及び住所

独立行政法人 製品評価技術基盤機構特許生物寄託センター

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)

ロ イの寄託機関に生物材料を寄託した日付

1989年4月13日

ハ イの寄託機関が寄託について付した受託番号

F E R M P-10657

(12) ビフィドバクテリウム・ロンガム・サブスピーシーズ・インファンティス (*Bifidobacterium longum subsp. infantis*) SBT

2785株

イ 当該生物材料を寄託した寄託機関の名称及び住所

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)

ロ イの寄託機関に生物材料を寄託した日付

2020年12月1日

ハ イの寄託機関が寄託について付した受託番号

N I T E P-03328

(13) ビフィドバクテリウム・シュードロンガム (*Bifidobacterium pseudolongum*) SBT2922株

イ 当該生物材料を寄託した寄託機関の名称及び住所

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）

ロ イの寄託機関に生物材料を寄託した日付

２０１９年６月２６日

ハ イの寄託機関が寄託について付した受託番号

N I T E P－０２９８４

（１４）ビフィドバクテリウム・サーモフィラム（*B i f i d o b a c t e r i u m t h e r m o p h i l u m*）SBT2992株

イ 当該生物材料を寄託した寄託機関の名称及び住所

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）

ロ イの寄託機関に生物材料を寄託した日付

２０２１年１月１９日

ハ イの寄託機関が寄託について付した受託番号

N I T E P－０３３６４

請求の範囲

- [請求項1] ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属、ラクトコッカス (*Lactococcus*) 属、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属、またはビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 属に属する菌の菌体及び／又はその培養物を有効成分として含む関節機能改善用組成物。
- [請求項2] ラクトバチルス属、ラクトコッカス属、ストレプトコッカス属、またはビフィドバクテリウム属に属する菌が、ラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、ラクトコッカス・ラクチス (*Lactococcus lactis*)、ラクトコッカス・ローデンシス (*Lactococcus laudensis*)、ストレプトコッカス・オラリス (*Streptococcus oralis*)、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*)、ビフィドバクテリウム・シュードロンガム (*Bifidobacterium pseudolongum*)、ビフィドバクテリウム・サーモフィラム (*Bifidobacterium thermophilum*) から選択されるひとつ以上であることを特徴とする請求項1の関節機能改善用組成物。
- [請求項3] ラクトバチルス・サリバリウス、ラクトコッカス・ラクチス、またはビフィドバクテリウム・ロンガムに属する菌が、ラクトバチルス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius*)、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチス (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*)、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリス (

Lactococcus lactis subsp. *cremoris*)、又はビフィドバクテリウム・ロンガム・サブスピーシーズ・インファンティス (*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) に属する菌であることを特徴とする請求項2の関節機能改善用組成物。

[請求項4] ラクトバチルス属、ラクトコッカス属、ストレプトコッカス属、またはビフィドバクテリウム属に属する菌が、ラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*) SBT2062株 (FERM BP-11075)、ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) SBT2161株 (NITE BP-1707)、SBT2171株 (FERM BP-5445)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*) SBT2687株 (NITE ABP-03331)、SBT2651株 (NITE P-03330)、ラクトバチルス・サリバリウス・サブスピーシーズ・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius*) SBT2670株 (FERM P-13247)、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・ラクチス (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) SBT0625株 (NITE P-03078)、ラクトコッカス・ラクチス・サブスピーシーズ・クレモリス (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) SBT11373株 (NITE P-03246)、ラクトコッカス・ローデンシス (*Lactococcus laudensis*) SBT11178株 (NITE P-03333)、ストレプトコッカス・オラリス (*Streptococcus oralis*) SBT0320株 (NITE P-03332)、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium lon*

gum) SBT2928株 (FERM P-10657)、ビフィドバクテリウム・ロンガム・サブスピーシーズ・インファンティス (*Bifidobacterium longum subsp. infantis*) SBT2785株 (NITE P-03328)、ビフィドバクテリウム・シュードロンガム (*Bifidobacterium pseudolongum*) SBT2922株 (NITE P-02984)、ビフィドバクテリウム・サーモフィラム (*Bifidobacterium thermophilum*) SBT2992株 (NITE P-03329) から選択されるひとつ以上であることを特徴とする請求項1乃至3のいずれか一項に記載の関節機能改善用組成物。

- [請求項5] 請求項1乃至4のいずれか一項に記載の関節機能改善用組成物を含むことを特徴とする関節機能改善剤、関節機能改善用飲食品、関節機能改善用栄養組成物、関節機能改善用飼料又は関節機能改善用医薬品。
- [請求項6] 新規乳酸菌ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*) SBT2687株。
- [請求項7] 新規乳酸菌ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*) SBT2651株。
- [請求項8] ラクトコッカス・ローデンシス (*Lactococcus laudensis*) SBT11178株。
- [請求項9] 新規乳酸菌ストレプトコッカス・オラリス (*Streptococcus oralis*) SBT0320株。
- [請求項10] 新規ビフィズス菌ビフィドバクテリウム・ロンガム・サブスピーシーズ・インファンティス (*Bifidobacterium longum subsp. infantis*) SBT2785株。
- [請求項11] 新規ビフィズス菌ビフィドバクテリウム・サーモフィラム (*Bifidobacterium thermophilum*) SBT2992株。

- [請求項12] 関節機能改善用組成物の製造のための、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属、ラクトコッカス (*Lactococcus*) 属、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属、またはビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 属に属する菌の菌体及び／又はその培養物の使用。
- [請求項13] 関節機能改善に使用するための、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属、ラクトコッカス (*Lactococcus*) 属、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属、またはビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 属に属する菌の菌体及び／又はその培養物。
- [請求項14] 有効量のラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属、ラクトコッカス (*Lactococcus*) 属、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属、またはビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 属に属する菌の菌体及び／又はその培養物を、それを必要としている対象に摂取させるか、又は投与することを含む、関節機能改善方法。
- [請求項15] ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属、ラクトコッカス (*Lactococcus*) 属、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属、またはビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 属に属する菌の菌体及び／又はその培養物を有効成分として含む、軟骨細胞増殖促進用、炎症因子産生抑制用、軟骨基質分解因子産生抑制用、疼痛因子産生抑制用、及び／又は神経伸長因子産生抑制用組成物。