

明 細 書

発明の名称：免疫賦活活性を有する酸性菌体外多糖

技術分野

[0001] 本発明は、免疫賦活活性を有する酸性菌体外多糖に関する。

背景技術

[0002] 乳酸菌をはじめとする様々な微生物が、菌体外多糖（*exopolysaccharide*；EPS）を産生し、細胞外に分泌していることが知られている。乳酸菌 *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*（ラクトバチルス・デルブルッキー・サブスピーシーズ・ブルガリクス）と *Streptococcus thermophilus*（ストレプトコッカス・サーモフィルス）を利用して乳を発酵することで製造されるヨーグルトをはじめとする発酵乳中にも、EPSが含まれている。近年、EPSは、免疫賦活機能などの様々な生理活性機能を有していることで注目を集めている。

[0003] *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*（ラクトバチルス・デルブルッキー・サブスピーシーズ・ブルガリクス）OLL1073R-1株が産生するEPSは、2つのグルコース残基と2つのガラクトース残基からなる主鎖及び1つのガラクトース残基からなる側鎖から構成される繰り返し単位（リピーティングユニット）が多数連なった繰り返し構造を有すること、その構造にリン酸基が付加した酸性多糖と、リン酸基が付加していない中性多糖が存在することが知られている（非特許文献1及び2）。さらに、OLL1073R-1株が産生するそのような酸性EPSは、免疫賦活作用を有することも知られている（非特許文献1及び2）。

[0004] 一方で、免疫賦活作用を有する新たなEPSの取得がさらに望まれている。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1: Marie-Rose Van Calsteren, et al., Carbohydrate Research, 413 (2015) 115-122

非特許文献2: 牧野聖也, Milk Science, Vol. 58, No. 2 (2009)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、免疫賦活活性を有する多糖をさらに提供することを課題とする。

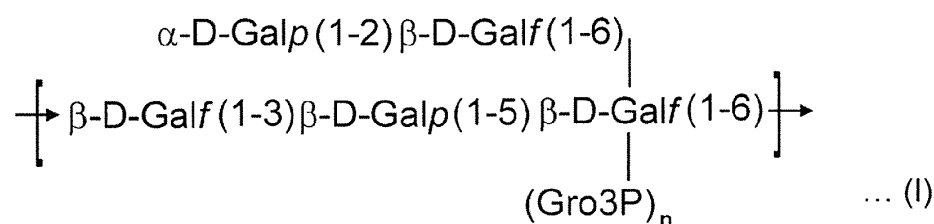
課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意検討を重ねた結果、OLL1073R-1株の培養物から、糖残基がガラクトース残基のみで構成された繰り返し単位が連なる（反復した）新たな繰り返し構造を有する、免疫賦活活性を有する菌体外多糖（EPS）を取得することに成功し、本発明を完成するに至った。

[0008] すなわち、本発明は以下の態様を包含する。

[1] 以下の式（I）で表される繰り返し単位が連なった繰り返し構造を有する酸性菌体外多糖。

[化1]



（式（I）中、nは、繰り返し単位毎に独立して0又は1の整数を表す）

[2] 単離された、上記[1]に記載の酸性菌体外多糖。

[3] ラクトバチルス・デルブルッキー・サブスピーシーズ・ブルガリク

スを含む乳酸菌培養物から単離された、上記〔１〕又は〔２〕に記載の酸性菌体外多糖。

〔４〕 ラクトバチルス・デルブルッキー・サブスピーシーズ・ブルガリクス OLL1073R-1 株（受託番号 FERM BP-10741）由来である、上記〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の酸性菌体外多糖。

〔５〕 上記〔１〕～〔４〕のいずれかに記載の酸性菌体外多糖を有効成分として含む、免疫賦活用組成物。

〔６〕 上記〔１〕～〔４〕のいずれかに記載の酸性菌体外多糖を有効成分として含む、免疫賦活用の食品又は医薬品。

〔７〕 上記〔１〕～〔４〕のいずれかに記載の酸性菌体外多糖、上記〔５〕に記載の免疫賦活用組成物、又は上記〔６〕に記載の免疫賦活用の食品又は医薬品を、対象に摂取させるか又は投与することを含む、免疫賦活方法。

〔８〕 免疫賦活用の組成物、食品若しくは医薬品の製造における、上記〔１〕～〔４〕のいずれかに記載の酸性菌体外多糖の使用。

[0009] 本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号 2022-155708 号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、免疫賦活活性を有する EPS を新たに提供することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図 1 は、実施例 1 で得た酸性 EPS について $[^1\text{H}-^{13}\text{C}]$ -HSQC 法で取得したスペクトルを示す図である。

[図2]図 2 は、実施例 1 で得た酸性 EPS について $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -NOESY 法で取得したスペクトルを示す図である。

[図3]図 3 は、実施例 1 で得た酸性 EPS の繰り返し構造を示す図である。

[図4]図 4 は、実施例 1 で得た酸性 EPS の刺激による脾臓細胞からの IFN- γ 産生誘導の結果を示すグラフである。図中の「*」は、統計学的有意差が示されたことを表す。

発明を実施するための形態

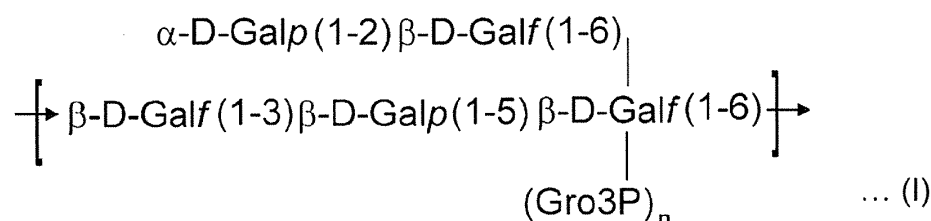
[0012] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0013] 本発明は、免疫賦活作用を有する酸性菌体外多糖（EPS）、及びその免疫賦活用途に関する。

[0014] 本発明の酸性EPSは、3つのガラクトース残基からなる主鎖と2つのガラクトース残基からなる側鎖から構成される繰り返し単位（リピーティングユニット）が連なった繰り返し構造（糖鎖）を有しており、かつ、その繰り返し構造に少なくとも1つのグリセロールリン酸基が付加されている多糖である。本発明において、「繰り返し単位が連なった」とは、繰り返し単位がタンデムに反復して配置されていることを意味する。

[0015] より具体的には、本発明の酸性EPSは、以下の式（I）で表される繰り返し単位（リピーティングユニット；図3も参照されたい）が連なった繰り返し構造を有する酸性菌体外多糖である。

[0016] [化2]

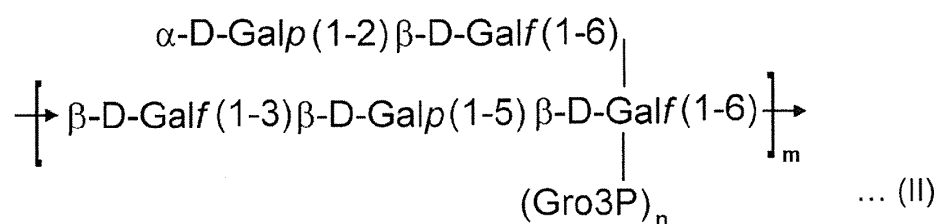


[0017] 式（I）中、nは、繰り返し単位毎に独立して0又は1の整数を表す。すなわち、本発明の酸性EPSを構成する式（I）で表される個々の繰り返し単位では、グリセロール3-リン酸基を1つ有するか又は有しないが、酸性EPS全体としてはグリセロール3-リン酸基が少なくとも1つ付加されている。

[0018] 本発明の酸性EPSは、式（I）で表される繰り返し単位が連なった、以下の式（II）で表される繰り返し構造を有する酸性菌体外多糖であり得る。

[0019]

[化3]



[0020] 式 (I I) 中、 n は、繰り返し単位毎に独立して 0 又は 1 の整数を表す。

式 (I I) 中、 m は 1 ～ 300 の整数、好ましくは 1 ～ 200 の整数を表す。

。

[0021] 式 (I) 及び (I I) 中、 $\alpha\text{-D-Galp}$ は、ピラノース型の $\alpha\text{-D}$ -ガラクトース残基を表し、 $\beta\text{-D-Galp}$ は、ピラノース型の $\beta\text{-D}$ -ガラクトース残基を表し、 $\beta\text{-D-Galf}$ は、フラノース型の $\beta\text{-D}$ -ガラクトース残基を表し、Gro3P はグリセロール 3 -リン酸基を表す。式 (I) 及び (I I) 中の (1 - 2)、(1 - 3)、(1 - 5)、及び (1 - 6) は、それぞれ、残基間の 1 - 2 結合（すなわち、1 位炭素 - 2 位炭素結合）、1 - 3 結合、1 - 5 結合、及び 1 - 6 結合を表す。

[0022] 本発明の酸性 EPS については、式 (I) で表される繰り返し単位が連なった繰り返し構造（例えば、式 (I I)）において、繰り返し単位 1 個当たり平均約 1 個（例えば、各繰り返し単位に対し 1 個 ($n = 1$) 又は 0 個であり、かつ、酸性 EPS 全体での加重平均で繰り返し単位 1 個当たり約 1 個) のグリセロール 3 -リン酸基が付加されていることが好ましいが、それに限定されない。

[0023] 本発明の酸性 EPS は、好ましくは、上記の繰り返し構造を基本骨格として有する。本発明において、「繰り返し構造を基本骨格として有する」とは、酸性 EPS の全長又はほぼ全長（酸性 EPS の主鎖を構成する糖残基の合計個数の 80% 以上、好ましくは 90% 以上、より好ましくは 95% 又は 98% 以上）が、式 (I) で表される繰り返し単位が連なった繰り返し構造で構成されていることを意味する。一実施形態では、本発明の酸性 EPS は、

上記の繰り返し構造のみからなるものであってもよい。

[0024] 本発明の酸性EPSは、乳酸菌をはじめとする微生物（典型的には、細菌）に由来するものであり得る。本発明の酸性EPSは、乳酸菌をはじめとする微生物（典型的には、細菌）により産生されて細胞外に分泌されるものであり得る。

[0025] 一実施形態では、本発明の酸性EPSは、微生物培養物から取得されたものであってよく、乳酸菌培養物から取得されたものであってよく、例えば、乳酸菌培養物から回収又は精製されたものであってよい。一実施形態では、本発明の酸性EPSは、単離されたものであってよく、例えば、乳酸菌培養物から単離されたものであってよい。本発明の酸性EPSに関して「単離された」とは、本発明の酸性EPSの純度が80質量%以上、好ましくは90質量%以上、さらに好ましくは98質量%以上であることを意味する。

[0026] 乳酸菌の例としては、以下に限定されないが、例えば、*Lactobacillus*（ラクトバチルス）属菌、*Streptococcus*（ストレプトコッカス）属菌、*Lactococcus*（ラクトコッカス）属菌、*Leuconostoc*（ロイコノストック）属菌、*Enterococcus*（エンテロコッカス）属菌、及び*Pediococcus*（ペディオコッカス）属菌などが挙げられる。乳酸菌の例としては、以下に限定されないが、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*（ラクトバチルス・デルブルッキー・サブスピーシーズ・ブルガリクス）、*Lactobacillus casei*（ラクトバチルス・カゼイ）、*Lactobacillus gasseri*（ラクトバチルス・ガセリ）、*Lactobacillus fermentum*（ラクトバチルス・ファーメンタム）、*Lactobacillus helveticus*（ラクトバチルス・ヘルベティクス）、*Lactobacillus acidophilus*（ラクトバチルス・アシドフィルス）、*Lactobacillus plantarum*（ラクトバチルス・プランタラム）、*Lactobacillus rhamnosus*（ラクトバチ

ルス・ラムノーサス)、*Lactobacillus pentosus* (ラクトバチルス・ペントーサス)、*Lactobacillus paracasei* (ラクトバチルス・パラカゼイ)、*Lactobacillus kefiranofaciens* (ラクトバチルス・ケフィラノファシエンス)、*Lactobacillus sake* (ラクトバチルス・サケ)、*Streptococcus thermophilus* (ストレプトコッカス・サーモフィルス)、*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティス)、*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・クレモリス)、*Leuconostoc mesenteroides* (ロイコノストック・メセンテロイデス)、*Enterococcus faecalis* (エンテロコッカス・フェカーリス)、及び *Pediococcus pentosaceus* (ペディオコッカス・ペントサセウス) などが挙げられる。

[0027] 本発明の酸性EPSを産生するために使用される、より好ましい乳酸菌の例としては、ラクトバチルス・デルブルッキー・サブスピーシーズ・ブルガリクスが挙げられ、特に好ましい乳酸菌の例としては、ラクトバチルス・デルブルッキー・サブスピーシーズ・ブルガリクス OLL1073R-1株が挙げられる。

[0028] ラクトバチルス・デルブルッキー・サブスピーシーズ・ブルガリクス (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) OLL1073R-1株は、1999年2月22日付け(原寄託日)で独立行政法人 製品評価技術基盤機構 特許生物寄託センター (NITE-IPOD [旧: 独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター]) (〒292-0818 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 120号室) に、受託番号FERM BP-10741の下でブダペスト条約に基づき国際寄託されている。なお本寄託株は2006年1月29日に、国内寄託(原寄託)からブダペスト条約に基づく国際寄託に

移管された。ラクトバチルス・デルブルッキー・サブスピーシーズ・ブルガリクス OLL1073R-1 株の現在の寄託者は株式会社明治である。株式会社明治は、明治ホールディングス株式会社に対し本願において OLL1073R-1 株に言及する権限を与えている。

- [0029] 一実施形態では、本発明の酸性EPSは、上記の乳酸菌を1種類又は2種類以上含む乳酸菌培養物から取得することができる。乳酸菌培養物は、乳酸菌を使用して製造したヨーグルトなどの発酵乳であってもよいし、乳酸菌を培地（乳含有培地など）で培養することにより得られるものであってもよいが、それらに限定されない。本発明において乳酸菌培養物の調製に使用され得る「乳」は、哺乳動物（例えば、ウシ、ヤギ、ヒツジなど）の乳であることが好ましい。
- [0030] 一実施形態では、乳酸菌培養物は、乳酸菌としてラクトバチルス属菌を含むものであってよく、例えば、ラクトバチルス・デルブルッキー・サブスピーシーズ・ブルガリクスを含むものであってよい。
- [0031] 一実施形態では、乳酸菌培養物は、乳酸菌として、ラクトバチルス属菌とストレプトコッカス属菌を組み合わせる含むものであってよく、好ましい実施形態では、乳酸菌培養物は、ラクトバチルス・デルブルッキー・サブスピーシーズ・ブルガリクスと、ストレプトコッカス・サーモフィルスを含むものであってよい。
- [0032] 一実施形態では、本発明の酸性EPSは、乳酸菌由来、例えばラクトバチルス属菌及び／又はストレプトコッカス属菌などの上記乳酸菌由来であってよく、ラクトバチルス・デルブルッキー・サブスピーシーズ・ブルガリクス由来であることが好ましく、ラクトバチルス・デルブルッキー・サブスピーシーズ・ブルガリクス OLL1073R-1 株由来であることがより好ましい。
- [0033] 本発明の酸性EPSを乳酸菌によって産生させるために用いる培養条件は、例えば、後述の実施例と同様の培養条件であってよいが、それに限定されない。そのような培養条件は、例えば、脱脂乳培地などの乳含有培地で35

～39℃（典型的には、37℃）で12～24時間（例えば、18時間）の培養を含むものであり得る。

[0034] 本発明の酸性EPSの乳酸菌培養物からの取得には、公知の多糖単離精製技術を用いることができる。例えば、トリクロロ酢酸処理などにより、乳酸菌培養物中のEPSをタンパク質や乳酸菌から分離して回収し、透析した後、陰イオン交換クロマトグラフィーなどの分画技術を用いて酸性EPS画分を分離することができる。さらに、分離した酸性EPS画分中の残存タンパク質をタンパク質加水分解酵素などを用いて除去し、さらに精製することにより、本発明の酸性EPSを取得することができる。しかし、本発明の酸性EPSの単離精製方法は、その方法に限定されるものではない。

[0035] あるいは本発明の酸性EPSは、糖鎖化学合成法を用いて化学合成してもよい。化学合成した本発明の酸性EPSも、本発明における「単離された」酸性EPSの範囲に包含され得る。

[0036] 本発明の酸性EPSは、免疫賦活活性（免疫賦活作用）を有する。免疫賦活活性を有する本発明の酸性EPSは、好ましくは、インターフェロン（IFN）- γ の産生を促進することができる。IFN- γ は、主にT細胞やナチュラルキラー（NK）細胞などの免疫細胞により産生され、抗ウイルス活性、免疫調節活性、抗腫瘍活性に寄与し、またマクロファージの強力な活性因子として機能することが知られている。

[0037] 本発明の酸性EPSの免疫賦活活性は、IFN- γ の産生量を指標として評価することができる。本発明の酸性EPSの免疫賦活活性は、例えば、後述の実施例3と同じ試験方法を用いて評価することができる。具体的には、まず、マウス脾臓細胞を、牛胎児血清（例えば、10%（v/v）牛胎児血清）を含む哺乳動物細胞培養用培地（例えば、RPMI 1640培地）に懸濁した後、適切な細胞密度（例えば、 5×10^5 細胞/ウェル）でプレート等に播種すればよい。播種した細胞に、酸性EPSを、所定の濃度（例えば、終濃度25～200 $\mu\text{g/mL}$ ）で添加し、37℃、5% CO_2 下で一定時間（例えば、72時間）培養した後、培地から上清を回収し、回

収した上清中に含まれる I F N- γ 量を、抗 I F N- γ 抗体を用いた E L I S A 法（酵素結合免疫吸着法）によって定量すればよい。対照として、マウス脾臓細胞を、酸性 E P S を添加せずに同様に培養し、上清中の I F N- γ 量を定量し、酸性 E P S を添加した培養系で前述のように定量した I F N- γ 量と比較する。酸性 E P S を添加しない対照と比較して、酸性 E P S を添加した場合に上清中の I F N- γ 量が統計学的に有意に増加した場合、又は、酸性 E P S の添加量の増加に伴い濃度依存的に上清中の I F N- γ 量が増加した場合には、本発明の酸性 E P S が免疫賦活活性を有すると判断することができる。また、酸性 E P S を添加しない対照と比較した、酸性 E P S を添加した場合の上清中の I F N- γ 量の増加量に基づき、本発明の酸性 E P S が有する免疫賦活活性の強度（レベル）を評価することができる。

[0038] 本発明はまた、本発明の酸性 E P S を含む組成物、及び本発明の酸性 E P S を含む食品又は医薬品も提供する。本発明の酸性 E P S を含む、組成物、食品又は医薬品は、免疫賦活活性を有することが好ましく、免疫賦活用であることが好ましい。好ましい実施形態では、本発明の酸性 E P S は、免疫賦活用組成物、及び免疫賦活用の食品又は医薬品に、有効成分（免疫賦活活性をもたらすための有効成分）として含まれ得る。本発明の酸性 E P S は、免疫賦活用組成物、及び免疫賦活用の食品又は医薬品中に、免疫賦活のための唯一の有効成分として含まれていてもよいし、及び／又は唯一の E P S として含まれていてもよい。本発明において本発明の酸性 E P S を「有効成分として含む」とは、本発明の酸性 E P S を含む組成物、食品又は医薬品を対象に適用する際に、本発明の酸性 E P S が、免疫賦活活性を発揮するのに十分な量（有効量）及び形態で、組成物、食品又は医薬品に含まれることを意味する。本発明の酸性 E P S を含む、組成物、食品又は医薬品は、例えば、本発明の酸性 E P S を、適用（摂取又は投与）1 回当たり $10\ \mu\text{g} \sim 50\text{mg}$ / kg 体重となる量で含むことができるが、この範囲に限定されない。

[0039] 一実施形態では、本発明の酸性 E P S を含む、組成物、食品又は医薬品は、中性 E P S（例えば、O L L 1 0 7 3 R-1 株をはじめとするラクトバチ

ルス・デルブルッキー・サブスピーシーズ・ブルガリクスなどの乳酸菌由来のもの）を含まないものであり得る。一実施形態では、本発明の酸性EPSを含む、組成物、食品又は医薬品は、2つのグルコース残基と2つのガラクトース残基からなる主鎖及び1つのガラクトース残基からなる側鎖から構成される繰り返し単位が連なった繰り返し構造を有し、かつその構造にリン酸基が付加した酸性EPS（例えば、OLL1073R-1株をはじめとするラクトバチルス・デルブルッキー・サブスピーシーズ・ブルガリクスなどの乳酸菌由来のもの）を含まないものであり得る。

[0040] 本発明の組成物、食品又は医薬品は、本発明の酸性EPSに加えて、食品加工上許容される添加剤（食品添加物）又は製薬上許容される添加剤（医薬品添加剤）を含んでもよい。そのような添加剤としては、例えば担体、賦形剤、結合剤、滑沢剤、崩壊剤、湿潤剤、安定剤、緩衝剤、矯味剤、保存剤、着色剤等が挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態では、本発明の酸性EPSを含む組成物（例えば、免疫賦活用組成物）は、食品組成物又は医薬組成物であってよいが、これらに限定されない。本発明の組成物、食品又は医薬品は、他の薬理成分及び／又は機能性成分をさらに含んでもよい。

[0041] 本発明において「食品」とは、飲料であってもよいしその他の食品であってもよいが、好ましくは加工食品である。飲料としては、以下に限定するものではないが、乳酸菌飲料、乳飲料（コーヒー牛乳、フルーツ牛乳等）、茶系飲料（緑茶、紅茶及び烏龍茶等）、果物・野菜系飲料（オレンジ、りんご、ぶどう等の果汁、トマト、ニンジン等の野菜汁を含む飲料）、アルコール性飲料（ビール、発泡酒、ワイン等）、炭酸飲料、清涼飲料、水ベースの飲料等の飲料が挙げられる。飲料以外の食品としては、以下に限定するものではないが、ヨーグルトなどの発酵乳、菓子、ジャム、総菜、インスタント食品、調味料等の加工食品が挙げられる。各種の食品の製造法等については、食品製造に関する既存の参考書を参考にすることができる。

[0042] 本発明の食品は、機能性食品であってもそれ以外の食品であってもよい。

本発明において「機能性食品」は、生体に対して一定の機能性を有する食品を意味し、例えば、日本における特定保健用食品（条件付きトクホ〔特定保健用食品〕を含む）及び栄養機能食品を含む保健機能食品、機能性表示食品、特別用途食品、栄養補助食品、健康補助食品、サプリメント（例えば、錠剤、被覆錠、糖衣錠、カプセル及び液剤などの各種剤形のもの）及び美容食品（例えばダイエット食品）などのいわゆる健康食品全般を包含する。本発明の機能性食品はまた、コーデックス（F A O／W H O 合同食品規格委員会）の食品規格に基づく健康強調表示（H e a l t h c l a i m）が適用される健康食品を包含する。

[0043] 本発明の機能性食品は、病者用食品、妊産婦・授乳婦用粉乳、乳児用調製粉乳、高齢者用食品、介護用食品等の特別用途食品であってもよい。

[0044] 本発明の機能性食品は、錠剤、顆粒剤、散剤、丸剤、カプセル剤等の固形製剤、液剤、懸濁剤、シロップ剤等の液体製剤、又はジェル剤やペースト剤等であってもよいし、通常の食品形状（例えば、飲料、ヨーグルト、菓子等）であってもよい。

[0045] 本発明の食品は、本発明の酸性E P Sに加えて、任意の食品成分を含んでもよく、特に限定されない。本発明の食品は、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、フレーバー類等を含んでもよい。タンパク質としては、例えば、全脂粉乳、脱脂粉乳、部分脱脂粉乳、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植物性タンパク質、これら加水分解物、バター、乳清ミネラル、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等が挙げられる。糖質としては、一般の糖類、加工澱粉（デキストリン、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）、食物繊維等が挙げられる。脂質としては、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、サフラワール油、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等が挙げられる。ビタミン類としては、例えば、ビタミンA、カロチン類、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、葉酸等が挙げられ、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、乳清ミネラル等が挙げられる。有機酸としては、例えば、リンゴ酸、クエン酸、乳酸、酒石酸等が挙げられる。これらの成分は、単独でも2種以上を組み合わせても用いることができ、合成品及び／又はこれらを多く含む食材を原料として用いてもよい。本発明の食品は、常法により製造することができ、例えば、食品製造の任意の工程で、他の食品成分に本発明の酸性EPS又は本発明の酸性EPSを含む原料を添加することにより製造してもよい。

[0046] 本発明の医薬品は、錠剤、顆粒剤、散剤、丸剤、カプセル剤等の固形製剤、ジェル剤、又は、液剤、懸濁剤、シロップ剤等の液体製剤等の任意の剤形であってよい。本発明の医薬品は、経口投与用の医薬品であることが好ましいが、それに限定されない。

[0047] 本発明の組成物、食品又は医薬品は、本発明の酸性EPSの免疫賦活活性（免疫賦活作用）に基づいて、免疫賦活効果をもたらすことができる。例えば、本発明の組成物、食品又は医薬品は、インターフェロン（IFN）- γ の産生を促進することができる。本発明の組成物、食品又は医薬品は、摂取又は投与した対象において免疫応答を促進（刺激）することができる。

[0048] 本発明は、本発明の酸性EPS、又はそれを含む本発明の組成物、食品若しくは医薬品を対象に摂取させるか又は投与することを含む、対象において免疫賦活効果をもたらす方法（免疫賦活方法）も提供する。

[0049] 本発明の酸性EPS、又はそれを含む本発明の組成物、食品若しくは医薬品を摂取又は投与する対象は、ヒトなどの霊長類、家畜、愛玩動物、実験（試験）動物等を含む哺乳動物であることが好ましく、ヒトがより好ましい。そのような対象は、以下に限定するものではないが、免疫賦活を必要とする

対象又は免疫賦活が望まれる対象であってよく、例えば、妊産婦、乳幼児、高齢者、病者、病後者、虚弱者、免疫力が低下している対象、アスリート、感染症等の疾患への罹患を予防する必要がある対象（例えば、医療従事者、介護従事者、受験生等）などが挙げられる。

[0050] 本発明の酸性E P S、又はそれを含む本発明の組成物、食品若しくは医薬品の対象への摂取又は投与は、経口的な摂取又は投与であることが好ましいが、鼻腔経管、口腔食道経管、胃ろう、腸ろう等の経管法による摂取又は投与であってもよい。但し本発明における対象への投与経路はそれらに限定されるわけではない。

[0051] 本発明の酸性E P S、又はそれを含む本発明の組成物、食品若しくは医薬品の摂取又は投与量は、免疫賦活に有効な量であればよく、対象の生物種、年齢、体重、投与経路、投与回数等を考慮して、当業者の裁量によって広範囲に変更することができる。一実施形態では、その摂取又は投与量は、対象の体重に基づき、適用（摂取又は投与）1回当たり本発明の酸性E P S 10 μ g ~ 50 mg / kg 体重となる量であり得るが、この範囲に限定されない。

[0052] 本発明の酸性E P S、又はそれを含む本発明の組成物、食品若しくは医薬品の摂取又は投与は、単回（1回）のみ行ってもよいし、複数回行ってもよい。本発明の酸性E P S、又はそれを含む本発明の組成物、食品若しくは医薬品は、対象に継続的に摂取又は投与してもよく、毎日摂取又は投与してもよいし、例えば、一週間当たり1日、2日、3日、4日、5日、又は6日の頻度で摂取又は投与してもよい。継続的に摂取又は投与する場合、少なくとも3日、好ましくは1週間以上、より好ましくは2週間以上、さらに好ましくは4週間以上、例えば3ヶ月以上にわたって、対象に摂取させるか又は投与することが好ましい。

[0053] 本発明はまた、免疫賦活（免疫応答促進）に使用するための本発明の酸性E P S にも関する。本発明はまた、免疫賦活（免疫応答促進）のための本発明の酸性E P S の使用にも関する。さらに、本発明は、免疫賦活（免疫応答

促進) 用の組成物、食品若しくは医薬品の製造における、本発明の酸性EPSの使用にも関する。

実施例

[0054] 以下、実施例を用いて本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

[0055] [実施例1] 酸性EPSの産生及び精製

乳酸菌 *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (ラクトバチルス・デルブルッキー・サブスピーシーズ・ブルガリクス) OLL1073R-1株(受託番号FERM BP-10741)を、10%(wt/vol)脱脂乳培地において37℃で18時間培養した。得られた培養物に終濃度10質量%となるようにトリクロロ酢酸を加え、生じた変性タンパク質と乳酸菌を沈殿させた後、遠心分離した(12,000×g、20分)。得られた上清を回収し、3倍量の冷エタノールを加え、4℃で一晩静置した。得られた沈殿を遠心分離(12,000×g、20分)により回収し、透析膜(MWCO[分画分子量]6,000~8,000)を用いて蒸留水で透析した。これにより、粗EPS(菌体外多糖)を得た。

[0056] 得られた粗EPSから、酸性EPSを分画した。分画には、陰イオン交換担体であるDEAE-セファロース^(R)(ジエチルアミノエチル-セファロース^(R)) Fast Flowを使用し、0.02M Tris-HClバッファー(pH8.6)下で0~0.5M NaClによる濃度勾配抽出法を用いた。得られた酸性EPSを1mM MgCl₂含有0.05M Tris-HClバッファー(pH8.0)に溶解し、2mg/mL DNaseと2mg/mL RNaseで37℃で6時間処理した。その後、終濃度0.1mg/mLでプロテイナーゼK溶液を添加して37℃で16時間処理することによりタンパク質を分解し、さらに90℃で10分間加熱することにより酵素を失活させた。得られた反応液に対し、上記と同様に3倍量の冷エタノールを加えて4℃で一晩静置し、得られた沈殿を遠心分離(12,000×

g、20分)により回収し、上記透析膜を用いて蒸留水で透析する操作を繰り返すことにより酸性EPSを精製し、酸性EPS溶液を調製した。

[0057] [実施例2] 酸性EPSの構造解析

精製した酸性EPSについて、2次元NMRにより構造解析を行った。解析に用いた2次元NMRは、シグナル間の相関を明らかにして複雑な化合物の構造解析を可能にする核磁気共鳴(NMR)分光法であり、具体的には、 $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -COSY法(^1H , ^1H -correlation spectroscopy)、TOCSY法(total correlation spectroscopy)、 $[^1\text{H}-^{13}\text{C}]$ -高分解能2次元NMR法($[^1\text{H}-^{13}\text{C}]$ -heteronuclear multiple quantum correlation: $[^1\text{H}-^{13}\text{C}]$ -HSQC)、及び $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -NOESY法($[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -nuclear overhauser enhancement spectroscopy)である。

[0058] まず $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -COSY法を用いて酸性EPSの構造を推定したが、これは、各プロトンのシグナルが同じ炭素原子に結合する2つの置換基(ジェミナル位)や隣接した炭素原子に結合した2つの置換基(ビシナル位)等の影響を受け、ほとんどの各アノマータイプの糖による ^1H ケミカルシフトに帰属するためである。さらに、オリゴ糖や多糖はシグナルが複雑に重なり合うため、シグナルから特定のスピンの系に属するプロトン全ての相関ピークを抽出できるTOCSY法を用いて $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -COSY法によるデータを補強した。一方、水素原子と炭素原子のように2つの異なる種類の核間の相関を検出することが可能な $[^1\text{H}-^{13}\text{C}]$ -HSQC法を用いて、どの水素原子が直接どの炭素原子に結合しているかを解析した。さらに、空間的に近接したプロトン間のシグナルを観察する $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -NOESY法を用いて、どのシグナルが互いに近位にあるプロトン由来のものを決定した。

[0059] $[^1\text{H}-^{13}\text{C}]$ -HSQC法で取得したスペクトルを図1に、 $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -NOESY法で取得したスペクトルを図2に示す。

[0060] 2次元NMR構造解析の結果、得られた酸性EPSは、主に、ガラクトー

ス残基（3つのフラノース型ガラクトース残基と2つのピラノース型ガラクトース残基）からなる繰り返し単位が連なった繰り返し構造を有していることが示された。さらに、この繰り返し構造には繰り返し単位の多くで繰り返し単位毎に1つのグリセロールリン酸基が結合し、細菌細胞壁へのアンカーを形成していることも示された。

[0061] さらに、グリコシル結合分析のため、得られた酸性EPSをペルメチル化し、脱重合し、アセチル化処理し、得られたメチル化アルジトールアセテートをガスクロマトグラフィー質量分析法（GC-MS）で分析することにより、当該酸性EPSの繰り返し構造を図3のとおり決定した。図3中、A、B、C、D、E/Fは、図1及び2のスペクトルに示された、それぞれの糖残基を指し示すために便宜上付与している記号である。図3に示す構造において、Galpはピラノース型ガラクトース残基、Galfはフラノース型ガラクトース残基、Gro3pはグリセロール3-リン酸基を表す。

[0062] [実施例3] 酸性EPSの免疫賦活活性評価

マウス脾臓細胞を、10%（v/v）牛胎児血清を含むRPMI 1640培地に懸濁した後、 5×10^5 細胞/ウェルの密度で96ウェルプレートに播種した。播種した細胞に、実施例1で精製し実施例2で構造を決定した酸性EPSの溶液を、EPSの終濃度 $25 \mu\text{g/mL}$ 、 $50 \mu\text{g/mL}$ 、 $100 \mu\text{g/mL}$ 、又は $200 \mu\text{g/mL}$ で添加し、 37°C 、5% CO_2 下で72時間培養した（酸性EPS刺激群）。また対照として、マウス脾臓細胞を、酸性EPSを添加せずに同様に培養した（無刺激群）。培養後、上清を回収し、培地中に産生されたインターフェロン γ （IFN- γ ）量をELISA法で定量した。

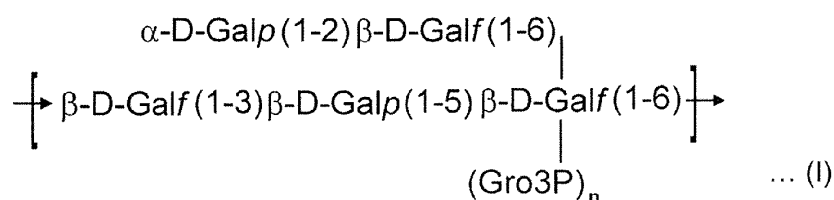
[0063] その結果、酸性EPSの添加濃度依存的な量で、脾臓細胞におけるIFN- γ 産生が誘導された（図4）。このことから、得られた酸性EPSが免疫細胞を活性化できることが示された。

[0064] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

請求の範囲

[請求項1] 以下の式（I）で表される繰り返し単位が連なった繰り返し構造を有する酸性菌体外多糖。

[化1]



（式（I）中、nは、繰り返し単位毎に独立して0又は1の整数を表す）

[請求項2] 単離された、請求項1に記載の酸性菌体外多糖。

[請求項3] ラクトバチルス・デルブルッキー・サブスピーシーズ・ブルガリクスを含む乳酸菌培養物から単離された、請求項1又は2に記載の酸性菌体外多糖。

[請求項4] ラクトバチルス・デルブルッキー・サブスピーシーズ・ブルガリクス OLL1073R-1株（受託番号FERM BP-10741）由来である、請求項1に記載の酸性菌体外多糖。

[請求項5] 請求項1に記載の酸性菌体外多糖を有効成分として含む、免疫賦活用組成物。

[請求項6] 請求項1に記載の酸性菌体外多糖を有効成分として含む、免疫賦活用の食品又は医薬品。

[請求項7] 請求項1に記載の酸性菌体外多糖、請求項5に記載の免疫賦活用組成物、又は請求項6に記載の免疫賦活用の食品又は医薬品を、対象に摂取させるか又は投与することを含む、免疫賦活方法。

[請求項8] 免疫賦活用の組成物、食品若しくは医薬品の製造における、請求項1に記載の酸性菌体外多糖の使用。