

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4540376号
(P4540376)

(45) 発行日 平成22年9月8日(2010.9.8)

(24) 登録日 平成22年7月2日(2010.7.2)

(51) Int.Cl.	F 1	
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N	1/20 A
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P	1/00
C 1 2 N 1/00 (2006.01)	C 1 2 N	1/00 P
A 6 1 K 35/74 (2006.01)	A 6 1 K	35/74 G
C 1 2 R 1/225 (2006.01)	C 1 2 N	1/20 A

請求項の数 2 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-86790 (P2004-86790)	(73) 特許権者	302057948 有限会社アーク技研 埼玉県和光市新倉 3-9-2
(22) 出願日	平成16年3月24日(2004.3.24)	(74) 代理人	100076163 弁理士 嶋 宣之
(65) 公開番号	特開2005-269968 (P2005-269968A)	(72) 発明者	村田 公英 東京都西東京市ひばりヶ丘 1-11-26
(43) 公開日	平成17年10月6日(2005.10.6)	審査官	長井 啓子
審査請求日	平成19年3月19日(2007.3.19)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 乳酸菌生産物質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

L . アシドフィラス (Lactobacillus acidophilus)、L . プレビス (Lactobacillus brevis)、L . ジェンセニイ (Lactobacillus jensenii)、L . パラカゼイ (Lactobacillus paracasei subsp. paracasei)、L . ガセリー (Lactobacillus gasseri)、L . ブルガリクス (Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus)、L . ヘルベティカス (Lactobacillus helveticus)、L . カゼイ (Lactobacillus casei subsp. casei)、L . ラモナウサス (Lactobacillus rhamnosus)、L . デルブリツキイ (Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii)、S . サーモフィラス (Streptococcus thermophilus)、E . フェシウム (Enterococcus faecium)、L . ラクチス (Lactococcus lactis)、B . ロンガム (Bifidobacterium longum)、B . ビフィダム (Bifidobacterium bifidum)、B . アドレセンティス (Bifidobacterium adolescentis) の 16 種の乳酸菌を用いるとともに、これらのうち、E . フェシウムおよびL . ヘルベティカスを第 1 グループ、E . フェシウムおよびL . アシドフィラスを第 2 グループ、E . フェシウムおよびL . ガセリーを第 3 グループ、E . フェシウム、L . アシドフィラスおよびL . プレビスを第 4 グループ、E . フェシウム、L . アシドフィラスおよびL . プレビスを第 5 グループ

10

20

プ、E．フェシウム、L．アシドフィラス、L．プレビス、L．パラカゼイを第6グループ、B．アドレセンティス単体を第7グループ、L．デルブリッキおよびL．ガセリーを第8グループ、L．デルブリッキ単体を第9グループ、E．フェシウム、L．ジェンセニイ、L．パラカゼイおよびL．プレビスを第10グループ、L．アシドフィラス単体を第11グループ、E．フェシウムおよびL．ガセリーを第12グループ、L．パラカゼイ単体を第13グループ、L．ガセリー、E．フェシウムおよびB．ピフィダムを第14グループ、B．ロンガム、S．サーモフィラスおよびE．フェシウムを第15グループ、L．ガセリーを単体で第16グループ、L．ブルガリクスおよびS．サーモフィラスを第17グループ、L．ガセリー、L．ラクチス、L．ガセリーおよびE．フェシウムを第18グループ、L．ガセリー、S．サーモフィラスおよびL．ブルガリクスを第19グループ、L．ラクチスを単体で第20グループ、L．ガセリーおよびE．フェシウムを第21グループ、L．ラモノウサスを単体で第22グループ、L．カゼイを単体で第23グループ、B．ロンガムを単体で第24グループとし、それぞれのグループ毎に継代培養して共棲状態を維持するとともに、それら培養液のうち、第1，2グループ同士、第3，4グループ同士、第5，6グループ同士、第7，8グループ同士、第9，10グループ同士、第11，12グループ同士、第13，14グループ同士、第15，16グループ同士、第17，18グループ同士、第19，20グループ同士、第21，22グループ同士、第23，24グループ同士で1次培養し、さらに、第1，2グループと第3，4グループ、第5，6グループと第7，8グループ、第9，10グループと第11，12グループ、第13，14グループと第15，16グループ、第17，18グループと第19，20グループ、第21，22グループと第23，24グループ同士とで2次培養し、さらに、これら各2次培養液を混合して3次培養して得た乳酸菌培養液をろ過して得たる液からなる乳酸菌生産物質。

【請求項2】

3次培養した乳酸菌培養液を加熱滅菌後、冷却して脂肪分を凝固させてからろ過して得たる液からなる請求項1に記載の乳酸菌生産物質。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この発明は、乳酸菌を培養して得られる乳酸菌生産物質に関する。

【背景技術】

【0002】

乳酸菌は、腸内で腸内微生物の生育に大きな影響を与え、腸内環境を良好に保つことが知られている。この乳酸菌は人の腸内に、腸内良性菌いわゆる善玉菌として生息し、上記腸内環境を維持している。従って、この乳酸菌数が低下したり、活性が低下したりすることによって上記腸内環境が崩れる原因になる。

上記腸内環境を整えることによって、免疫力が向上し、様々な病気に罹りにくくなったり、病状が改善されたりすることが期待されている。

そこで、近年乳酸菌の生菌を腸内に補給するために、その生菌を含むヨーグルトや飲料などが販売されている。そして、これらのヨーグルトや飲料を直接体内に取り入れて、腸内の乳酸菌量を増加させるようにしている。

なお、本願出願人は、先行技術調査を行うことなく、公知の技術を基に本願発明を開発したので、本件に係る先行技術文献情報はない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

しかし、上記生菌を含むヨーグルトや飲料などの食品を摂取したとしても、その生菌が腸に到達するまでに、胃酸で分解されたり、消化されたりして、生菌のほとんどが死滅してしまう。つまり、ヨーグルトや飲料などから生菌を摂取したとしても、生きたまま腸に到達する乳酸菌はほんのわずかな量になってしまう。

従って、乳酸菌による期待通りの整腸作用が得られないことが多い。

【 0 0 0 4 】

上記のように生菌の死滅を考慮して、生菌を腸内に届けるためには、上記乳酸菌を含む食品を大量に摂取しなければならない。しかしながら、ヨーグルトなどの飲食単位（ヨーグルト一瓶）に含まれている乳酸菌の量に限りがあるので、大量の乳酸菌を一度に摂取することは、かなり難しくなる。

一方で、近年、その因果関係は、明らかになっていない部分が多いが、摂取した乳酸菌が死滅したとしても、様々な、体に良い作用が表れることが分かってきている。この効果は、乳酸菌の生産物質によるものと考えられる。

この発明の目的は、少量を摂取することで、乳酸菌による効果を得ることができる乳酸菌生産物質を提供することである。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 9 】

第 1 の発明は、L . アシドフィラス (Lactobacillus acidophilus) 、 L . プレビス (Lactobacillus brevis) 、 L . ジェンセニイ (Lactobacillus jensenii) 、 L . パラカゼイ (Lactobacillus paracasei subsp . paracasei) 、 L . ガセリー (Lactobacillus gasseri) 、 L . ブルガリクス (Lactobacillus delbrueckii subsp . bulgaricus) 、 L . ヘルペティカス (Lactobacillus

helveticus) 、 L . カゼイ (Lactobacillus casei subsp . casei) 、 L . ラモノウサス (Lactobacillus

rhamnosus) 、 L . デルブリッキイ (Lactobacillus delbrueckii subsp . delbrueckii) 、 S . サーモフィラス (Streptococcus

thermophilus) 、 E . フェシウム (Enterococcus faecium) 、 L . ラクチス (Lactococcus lactis) 、 B . ロンガム (Bifidobacterium

longum) 、 B . ビフィダム (Bifidobacterium bifidum) 、 B . アドレセンティス (Bifidobacterium

adolescentis) の 1 6 種の乳酸菌を用いるとともに、それら 3 属の乳酸菌から選択した 1

種または 2 種以上の乳酸菌を用いて複数のグループを形成し、それらグループ毎に継代培養して共棲状態を維持し、この継代培養されたグループ単位の乳酸菌同士をさらに共棲培

養して得た乳酸菌培養液をろ過して得たる液からなることを前提とする。

【 0 0 1 0 】

そして、上記培養時には、 E . フェシウムおよび L . ヘルペティカスを第 1 グループ、

E . フェシウムおよび L . アシドフィラスを第 2 グループ、 E . フェシウムおよび L . ガ

セリーを第 3 グループ、 E . フェシウム、 L . アシドフィラスおよび L . プレビスを第 4

グループ、 E . フェシウム、 L . アシドフィラスおよび L . プレビスを第 5 グループ、 E

. フェシウム、 L . アシドフィラス、 L . プレビス、 L . パラカゼイを第 6 グループ、 B

. アドレセンティス単体を第 7 グループ、 L . デルブリッキイおよび L . ガセリーを第 8

グループ、 L . デルブリッキイ単体を第 9 グループ、 E . フェシウム、 L . ジェンセニイ、

L . パラカゼイおよび L . プレビスを第 1 0 グループ、 L . アシドフィラス単体を第 1

1 グループ、 E . フェシウムおよび L . ガセリーを第 1 2 グループ、 L . パラカゼイ単体

を第 1 3 グループ、 L . ガセリー、 E . フェシウムおよび B . ビフィダムを第 1 4 グループ、

B . ロンガム、 S . サーモフィラスおよび E . フェシウムを第 1 5 グループ、 L . ガ

セリーを単体で第 1 6 グループ、 L . ブルガリクスおよび S . サーモフィラスを第 1 7

グループ、 L . ガセリー、 L . ラクチス、 L . ガセリーおよび E . フェシウムを第 1 8

グループ、 L . ガセリー、 S . サーモフィラスおよび L . ブルガリクスを第 1 9 グループ、 L

. ラクチスを単体で第 2 0 グループ、 L . ガセリーおよび E . フェシウムを第 2 1

グループ、 L . ラモノウサスを単体で第 2 2 グループ、 L . カゼイを単体で第 2 3

グループ、 B . ロンガムを単体で第 2 4 グループとし、それぞれのグループ毎に継代培養して共棲状態

を維持するとともに、それら培養液のうち、第 1 , 2 グループ同士、第 3 , 4 グループ同

10

20

30

40

50

士、第5, 6グループ同士、第7, 8グループ同士、第9, 10グループ同士、第11, 12グループ同士、第13, 14グループ同士、第15, 16グループ同士、第17, 18グループ同士、第19, 20グループ同士、第21, 22グループ同士、第23, 24グループ同士で1次培養し、さらに、第1, 2グループと第3, 4グループ、第5, 6グループと第7, 8グループ、第9, 10グループと第11, 12グループ、第13, 14グループと第15, 16グループ、第17, 18グループと第19, 20グループ、第21, 22グループと第23, 24グループ同士とで2次培養し、さらに、これら各2次培養液を混合して3次培養した点に特徴を有する。

【0011】

第2の発明の乳酸菌生産は、上記3次培養した乳酸菌培養液を加熱滅菌後に冷却して脂肪分を凝固させてからろ過して得たる液からなる点に特徴を有する。

10

【発明の効果】

【0012】

第1, 第2の発明によれば、16種の乳酸菌を培養して乳酸菌生産物質を得ることができ、この乳酸菌生産物質には多くの種類の代謝産物を大量に含有させることができる。

特に、3つの菌属に属する乳酸菌を組み合わせることで単一属、単一種の乳酸菌の代謝産物よりも多くの種類の代謝産物が生成される。

また、共棲状態を維持する乳酸菌のグループを生成してそのグループ同士を共棲培養しているため、多数の菌種の共棲培養を、短時間で安定的に行うことができる。その結果、多くの種類の有用な代謝産物を含有した乳酸菌生産物質を短時間で安定的に生成することができる。

20

【0013】

この乳酸菌生産物質を摂取した場合には、上記代謝産物によって、腸内良性菌が活性化し、腸内環境を良好にすることができる。つまり、乳酸菌の生菌を直接摂取することなく、乳酸菌の効果を得ることができる。

また、上記乳酸菌生産物質には大量の代謝産物が含まれているため、これを摂取するときにも、生菌を摂取するときのように、たくさんの量を摂取する必要がない。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

本願出願人は、乳酸菌の代謝産物に着目し、この乳酸菌の代謝産物が腸内環境の調整に役立つものと考えた。すなわち、上記乳酸菌の代謝産物が腸内に供給されることによって、これら代謝産物に含まれる成分が、腸内良性菌の栄養源となって、それら良性菌が活性化されるものとの仮説を立て、いろいろな実験を繰り返した。

30

【0015】

そこで、まず、多数の乳酸菌の中から、複数種の乳酸菌を共存させたグループを形成し、これらのグループ同士あるいは、単菌を組み合わせることで共棲培養し、乳酸菌生産物質を得た。なお、後で説明する1次共棲培養を行う際の単位をこの発明のグループというので、単菌もその単菌からなるグループと考えている。

【実施例】

40

【0016】

以下に、この発明の乳酸菌生産物質を生成する方法を説明する。

この実施形態における乳酸菌生産物質を生成するために、ラクトバチルス(Lactobacillus)菌属に属する乳酸菌、ビフィドバクテリウム(Bifidobacterium)菌属に属する乳酸菌、ストレプトコッカス(Streptococcus)菌属に属する乳酸菌のいずれかに属する複数の乳酸菌を用いた。

【0017】

そして、上記ラクトバチルス(Lactobacillus)菌属に属する乳酸菌として、L.アシドフィラス(Lactobacillus acidophilus)、L.ブレビス(Lactobacillus brevis)、L.ジェンセニイ(Lactobacillus jensenii)、L.パラカゼイ(Lactobacillus paraca

50

sei subsp. paracasei)、L. ガセリー (*Lactobacillus gasseri*)、L. ブルガリクス (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus)、L. ヘルペティカス (*Lactobacillus helveticus*)、L. カゼイ (*Lactobacillus casei* subsp. casei)、L. ラモナウサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、L. デルブリッキイ (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. delbrueckii)、L. ラクチス (*Lactococcus lactis*) を 1 種または 2 種以上用いた。

【 0 0 1 8 】

上記ビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 菌属に属する乳酸菌として、B. ロンガム (*Bifidobacterium longum*)、B. ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)、B. アドレセンティス (*Bifidobacterium adolescentis*) を 1 種または 2 種以上用いた。

10

【 0 0 1 9 】

また、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 菌属に属する乳酸菌として、S. サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*)、E. フェシウム (*Enterococcus faecium*)、L. ラクチス (*Lactococcus lactis*) の 1 種または 2 種以上を用いた。

【 0 0 2 0 】

そして、以上の乳酸菌を次のようにして培養した。

まず、複数の乳酸菌を、24 のグループに分け、それらをグループ毎に継代培養したが、そのグループ分けは次の通りである。すなわち、図 1 に示すように、第 1 グループは E. フェシウムおよび L. ヘルペティカスで構成し、第 2 グループは、E. フェシウムおよび L. アシドフィラスで構成している。第 3 グループは E. フェシウムおよび L. ガセリーで構成し、第 4 グループは、E. フェシウム、L. アシドフィラスおよび L. プレビスで構成している。

20

【 0 0 2 1 】

第 5 グループは、E. フェシウム、L. アシドフィラスおよび L. プレビスで構成し、第 6 グループは、E. フェシウム、L. アシドフィラス、L. プレビス、L. パラカゼイで構成し、第 7 グループは、B. アドレセンティス単体で構成している。

【 0 0 2 2 】

第 8 グループは、L. デルブリッキイおよび L. ガセリーで構成し、第 9 グループは L. デルブリッキイ単体で構成し、第 10 グループは、E. フェシウム、L. ジェンセニイ、L. パラカゼイおよび L. プレビスで構成し、第 11 グループは、L. アシドフィラス単体で構成している。

30

【 0 0 2 3 】

第 12 グループは、E. フェシウムおよび L. ガセリーで構成し、第 13 グループは、L. パラカゼイ単体で構成し、第 14 グループは、L. ガセリー、E. フェシウムおよび B. ビフィダムで構成し、第 15 グループは、B. ロンガム、S. サーモフィラスおよび E. フェシウムで構成している。第 16 グループは、L. ガセリー単体で構成し、第 17 グループは、L. ブルガリクスおよび S. サーモフィラスで構成している。

【 0 0 2 4 】

第 18 グループは、L. ガセリー、L. ラクチス、L. ガセリーおよび E. フェシウムで構成し、第 19 グループは、L. ガセリー、S. サーモフィラスおよび L. ブルガリクスで構成し、第 20 グループは、L. ラクチス単体で構成し、第 21 グループは、L. ガセリーおよび E. フェシウムで構成し、第 22 グループは、L. ラモナウサス単体で構成し、第 23 グループは、L. カゼイ単体で構成し、第 24 グループは、B. ロンガム単体で構成している。

40

【 0 0 2 5 】

それらのグループ毎に継代培養するとともに、それら培養液のうち、第 1, 2 グループ同士、第 3, 4 グループ同士、第 5, 6 グループ同士、第 7, 8 グループ同士、第 9, 10 グループ同士、第 11, 12 グループ同士、第 13, 14 グループ同士、第 15, 16 グループ同士、第 17, 18 グループ同士、第 19, 20 グループ同士、第 21, 22 グループ同士、第 23, 24 グループ同士で 1 次培養した。

50

【 0 0 2 6 】

さらに、上記第 1, 2 グループと第 3, 4 グループ、第 5, 6 グループと第 7, 8 グループ、第 9, 10 グループと第 11, 12 グループ、第 13, 14 グループと第 15, 16 グループ、第 17, 18 グループと第 19, 20 グループ、第 21, 22 グループと第 23, 24 グループ同士とで 2 次培養し、さらに、これら各 2 次培養液を混合して 3 次培養した。

そして、上記のようにして得た 3 次培養液を、加熱して乳酸菌を滅菌し、それをろ過して、ろ液を得た。

【 0 0 2 7 】

なお、上記各グループの乳酸菌は次のようにして継代培養したものである。すなわち、各グループのそれぞれの乳酸菌は、それらを継代培養した場合にも、共棲状態を維持できるであろうことを予測しながら集合させたものである。

複数の乳酸菌が共棲状態を維持するとは、複数の種類の乳酸菌が同時に存在し、それぞれが生きていける共棲状態が存在することである。特に、一方が、他方に影響を及ぼしたり、一方だけが生き残ったりする状態ではない。

【 0 0 2 8 】

上記各乳酸菌グループは、様々な菌の組み合わせの中から、共存可能な組み合わせを選択することによって形成した。

また、上記 24 のグループを構成する乳酸菌の中には、同時に複数のグループに属する菌種も有る。これは、3 次までの共棲培養の過程で共棲状態が維持されることを考慮して菌種を組み合わせためである。また、同一種の乳酸菌でも、株が異なるものも含まれている。

【 0 0 2 9 】

そして、各乳酸菌グループの培養培地は、日水製薬株式会社製の G A M 半流動高層培地、B L 寒天培地あるいは変法 G A M 寒天培地からなる 3 種類の培地を、乳酸菌に応じて使い分けるとともに、これらの培地において、32 で 12 時間培養した。その後、37 で 12 時間培養し、さらに 40 で 24 時間培養した。グループ化した乳酸菌を上記のようにして継代培養するとともに、その培養液を 5 で冷蔵保存しておいた。

なお、第 24 グループの B . ロンガムは、森永乳業株式会社製の菌株である森永 B B 5 3 6 を用いた。

【 0 0 3 0 】

このようにして乳酸菌のグループを継代培養するとともに、グループ毎に同定をしたが、その同定試験は社団法人日本食品分析センターに依頼した。そして、その同定試験の概要は、各グループの検体を寒天平板培地に直接接種・培養し、優勢に生育した形状の異なる集落を釣菌してグループ毎に乳酸菌を分離し、この分離菌について形態観察、生理的性状試験および菌体内 DNA の GC 含有量の測定を行い、次の文献を参考に同定したものである。

【 0 0 3 1 】

1 . Sneath, P . H . A ., Mair, N . S ., Sharpe, M . E . and Holt, J . G . : “ Bergey ’ s Manual of Systematic Bacteriology ” Vol . 2, (1986) Williams & Wilkins .

2 . Holt, J . G ., Krieg, N . R ., Sneath, P . H . A ., Staley, J . T . and Williams, S . T . : “ Bergey ’ s Manual of Determinative Bacteriology ” Ninth Edition (1994) Williams & Wilkins .

3 . 光岡知足 : “ 腸内菌の世界 ”, (1984) 叢文社 .

4 . 辨野義巳 : 微生物 6, 3-14 (1990) .

5 . 厚生省生活衛生局監修 : “ 食品衛生検査指針 - 微生物編 - ” (1990) 日本食品衛生協会 .

6 . Schleifer, K . H . and Kilpper-Balz, R . : Int. J. Syst. Bacteriol., 34, 31-34 (1984) .

【 0 0 3 2 】

10

20

30

40

50

上記同定の結果、図1に示すように、上記森永乳業株式会社製のB・ロンガム(BB536)以外に34種類の菌株が特定されるとともに、それらが各グループ内で共棲状態を維持していることが確認された。

上記のようにして継代培養した各グループの培養液を1次共棲培養したが、図1においては、(1)~(12)までが、1次共棲培養に当たる。そして、この1次共棲培養では、日水製薬株式会社製のGAM半流動高層培地、BL寒天培地あるいは変法GAM寒天培地からなる3種類の培地を、1次共棲培養用培地として使用するとともに、これら1次共棲培養用培地を、乳酸菌に応じて使い分けた。

【0033】

そして、上記3種類のいずれかの1次共棲培養用培地に対して、グループ化した乳酸菌を添加して1次培養を行ったが、例えば、上記のようにグループ化した乳酸菌の培地が、流動性が高い培地の場合であって、しかも、乳酸菌にピフィズス菌を含んでいる場合には、1次共棲培養用培地に対して10%の乳酸菌を添加した。ピフィズス菌を含んでいないグループの場合には、同じく1次共棲培養用培地に対して3%の乳酸菌を添加した。

【0034】

また、グループ化した乳酸菌の培地が、固形性の高い培地の場合には、白金耳でつり上げた1回の量を1次共棲培養用培地に添加した。

そして、これらの培地において、37℃でpH4.6になるまで約6~12時間培養した。

【0035】

2次共棲培養では、培地として豆乳と脱脂乳とを4:1の割合で混合し、この混合液に、ブドウ糖0.5%(w/w)、酵母エキス0.4%(w/w)および既生成分である3次共棲培養液を1%(w/w)添加した。そして、この培地を37℃でpH4.55になるまで約6~10時間培養を行った。なお、この2次共棲培養において、その培地や添加要素は、どの菌についても全て同じにした。

【0036】

3次共棲培養は、豆乳と脱脂乳を8:1の割合で混合し、この混合液にブドウ糖0.5%(w/w)、酵母エキス0.4%(w/w)および既生成分である3次共棲培養液を1%(w/w)添加した。このようにした培地を用いて、最初に32℃で24時間培養し、次に40℃で48時間培養し、さらに37℃で24時間培養した。

【0037】

上記のようにして3次共棲培養した混合培養液を、高圧蒸気滅菌法を用いて乳酸菌を滅菌した。つまり、120℃程度に加熱した滅菌装置内で、上記3次共棲培養液を65℃に保って40分間加熱し、3次共棲培養液中の乳酸菌を滅菌した。そして、この滅菌した最終培養液を15℃まで冷却して、脂肪分等の不要物を凝固させた。このように脂肪分を凝固させたのは、その脂肪分をろ過によって除去しやすくするためである。このように脂肪分を除去すれば、ろ過したときのろ液が懸濁するのを防ぐことができる。また、脂肪分が酸化することによって、ろ液の中に酸化物が増加することも防止できる。

【0038】

上記のように冷却した最終培養液は、それに12%の無水エタノールを添加して、高速ホモジナイザーで破碎したが、このように最終培養液を破碎することによって、この後で実行するろ過が短時間にできることになる。また、上記無水エタノールの添加によって、上記乳酸菌の菌体内の成分を抽出することができる。

【0039】

そして、上記滅菌した最終培養液を、3μmのろ紙を用いて自然ろ過した後、それに10kgのウイトをかけてさらに搾るとともに、この搾った液を0.1~0.2μmの中空系膜でろ過して不純物を取り除きろ液を得た。

なお、上記ろ液は、その生成プロセスで、上記したように滅菌のために加熱されるが、このように加熱処理をすることによって、乳酸菌中に含まれている成分を熱抽出させることができる。また、熱によって滅菌されるので、上記乳酸菌生産物質を用いた製品内で生

10

20

30

40

50

菌が活動して、品質を変化させることがない。

【0040】

上記のように3次共棲培養を終えた最終培養液から、ろ過によって脂肪分や死菌を除去したものが、この発明の乳酸菌生産物質となる。

なお、上記のようにして生成した乳酸菌生産物質の分析結果を表1、表2および表3に示す。

【表1】

分析試験項目	結果	検出限界	注	分析方法
リン	28.1mg/100g			バドモリブデン酸吸光度法
鉄	検出せず	0.1mg/100g		原子吸光光度法
カルシウム	78.2mg/100g			過マンガン酸カリウム容量法
ナトリウム	14.5mg/100g			原子吸光光度法
カリウム	268mg/100g			原子吸光光度法
マグネシウム	34.0mg/100g			原子吸光光度法
サイアミン (ビタミンB1)	0.08mg/100g		1	高速液体クロマトグラフィー法
ビタミンB6	60 μ g/100g		2	微生物定量法
葉酸	3 μ g/100g		3	微生物定量法
ビオチン	2.2 μ g/100g		4	微生物定量法
イノシトール	26mg/100g		2	微生物定量法

注1. サイアミン塩酸塩として。

注2. 使用菌株 : *Saccharomyces cerevisiae* (S. uvarum) ATCC 9080

注3. 使用菌株 : *Lactobacillus rhamnosus* (L. casei) ATCC 7469

注4. 使用菌株 : *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014

【0041】

【表 2】

分析試験項目	結果	注	
アミノ酸	アルギニン	14mg/100g	
	リジン	36mg/100g	
	ヒスチジン	16mg/100g	
	フェニルアラニン	12mg/100g	
	チロシン	8mg/100g	
	ロイシン	16mg/100g	
	イソロイシン	13mg/100g	
	メチオニン	3mg/100g	1
	バリン	19mg/100g	
	アラニン	29mg/100g	
	グリシン	23mg/100g	
	プロリン	27mg/100g	
	グルタミン酸	57mg/100g	
	セリン	17mg/100g	
	スレオニン	20mg/100g	
	アスパラギン酸	54mg/100g	
	トリプトファン	4mg/100g	
	シスチン	6mg/100g	1

10

20

30

注 1. 過ギ酸酸化処理後、塩酸加水分解し測定した。

【 0 0 4 2 】

【表 3】

生理活性物質
プトレッシン
スペルミン
スペルミジン
ホスファチジルセリン
γ-アミノ酪酸
クレアチン

10

【0043】

表1、表2に示すように、この乳酸菌生産物質には、非常に多くの乳酸菌の代謝産物が含まれている。

また、表2にはアミノ酸の分析結果を示しているが、この表2から明らかなように、この発明の乳酸菌生産物質には、多くのアミノ酸が含まれている。

20

これらは、微生物の栄養因子である。

さらに、この乳酸菌生産物質からは、表3に示すような生理活性物質も検出されている。

【0044】

上記表1～3で示したように、上記乳酸菌生産物質に多くの種類の栄養因子や、生理活性物質が含まれているのは、多種の乳酸菌を用いた結果であると考えられる。1種の乳酸菌からも、種々の代謝産物が生産されるが、乳酸菌の種類が多くなれば、その種類も増えることが考えられるし、共棲培養を行うことによって、菌の増殖も促進されるので、上記栄養因子や生理活性物質の量も多くなることが考えられる。

30

従って、生の乳酸菌を摂取する場合と比べて、少量の上記乳酸菌生産物質を摂取すれば、多くの上記栄養因子および生理活性物質を体内に取り込むことができる。その結果、腸内では、腸内良性菌が活性化し、その量も増えて、腸内環境が改善されることが期待できる。

【0045】

特に、この発明の乳酸菌生産物質は、複数種の乳酸菌をグループにしてグループ同士で共棲培養を行っているので、最終的に、非常に多くの種類の乳酸菌から生成される代謝産物を含有する乳酸菌生産物質を得ることができる。

特に、共棲状態を維持し易い菌を複数組み合わせることでグループを作っているため、多数の菌種の中から、共棲培養に適した2種ずつを組み合わせることで共棲培養を繰り返していく場合と比べて、少ない回数で、最終培養にたどり着くことができるというメリットも有る。

40

【0046】

(実験例1)

上記のようにして得た乳酸菌生産物質を次の条件の下で100人に経口摂取させた。すなわち、各人に、7mlずつ、朝、昼、夜の食間空腹時に、8週間継続的に摂取させた。その結果、表4に示すように、体のしびれ、便秘、腹部膨満、頭痛などの自覚感覚に対して、効果ありと答えた人が86%と、ほとんどの人に自覚感覚の好転が見られた。

【表 4】

	%	有効率%
顕著な効果あり	24	86
効果あり	62	
効果なし	14	14

10

【0047】

このように自覚感覚に好転が見られたのは、菌の生存に関わりなく、上記乳酸菌生産物質内の多くの代謝産物が腸内に供給され、それが腸内良性菌の栄養源となって、腸内良性菌が活性化されたためと考えられる。

なお、上記実験例 1 は、北京中日友好医院中医内科に依頼したものである。

【0048】

(実験例 2)

実験例 2 においては、50 人の糖尿病患者に対して、実験例 1 と同様の乳酸菌生産物質を次の条件下で経口摂取させた。すなわち、各人に、7 ml ずつ、朝、昼、夜の食間空腹時に、16 週間継続的に経口摂取させた。その結果、血糖値の顕著な低下が見られたが、その実験結果を示したのが表 5 である。なお、この表 5 は、上記 50 人の平均値を示したものである。実験結果は、「参照値 ± 標準値」で表示した。

20

【0049】

【表 5】

	飲用前	16 週間飲用後	飲用完了から 1 ヶ月後
静脈血糖値 (GLU)	204.32 ± 79.66	147.02 ± 51.00	145.86 ± 32.16
糖化ヘモグロビン 値 (HbA1c)	9.18 ± 2.41	7.44 ± 1.05	7.36 ± 0.96

30

【0050】

上記表 5 に示したように、乳酸菌生産物質を経口摂取させることによって、静脈血糖値 (GLU) および糖化ヘモグロビン値 (HbA1c) とともに明らかに低下したことが分かる。従って、上記乳酸菌生産物質は、静脈血糖値 (GLU) および糖化ヘモグロビン値 (HbA1c) に対して著しい効果作用が有るといえる。

また、乳酸菌生産物質の摂取を止めてから 1 ヶ月後でも、これが再び上昇することがなく、さらに下がった人もいた。

【0051】

上記のような乳酸菌生産物質は、腸内環境を良好に保つとともに、腸内環境が整うことによって、腸内の栄養の吸収効率が上昇して、体内の恒常性を維持するものと考えられる。

40

なお、上記実験例 2 は、北京中日友好医院中医内科に依頼したものである。

【0052】

(実験例 3)

実験例 3 は、100 人の糖尿病患者に対して、上記実験例 2 と同様の条件で、この発明の乳酸菌生産物質を経口摂取させ、経口摂取前後の静脈血糖値 (GLU) および糖化ヘモグロビン値 (HbA1c) を、測定した。その結果を図 2、図 3 のグラフに示す。そして、図 2 は、静脈血糖値 (GLU) を示したグラフであり、図 3 は糖化ヘモグロビン値 (HbA1c) を示

50

したグラフである。

なお、上記100人の糖尿病患者は、I型糖尿病（インシュリン依存型糖尿病）患者5人と、II型糖尿病（インシュリン非依存型糖尿病）患者95人であった。

【0053】

図2，図3のグラフから、上記乳酸菌生産物質を経口摂取することによって、静脈血糖値（GLU）および糖化ヘモグロビン値（HbA1c）が明らかに低下することが分かる。従って、上記乳酸菌生産物質は、静脈血糖値（GLU）および糖化ヘモグロビン値（HbA1c）に対して著しい効果作用が有るといえる。

上記糖化ヘモグロビン値（HbA1c）は、長期の血糖状態を表す指標であり、この値が改善されるということは、糖尿病の治療分野において非常に画期的なことである。

なお、上記実験例3は、北京中日友好医院中医内科に依頼したものである。

【0054】

（実験例4）

実験例4においては、50人の消化系腫瘍患者に対して、実験例1と同様の乳酸菌生産物質を次の条件の下で経口摂取させた。すなわち、各人に、一日一回7mlを経口摂取させた。摂取期間は40日を1クールとした。その結果、食欲増加の自覚症状が23例有り、全体の46%を占めた。また、精神疲労が好転したという自覚症状が24例有り、全体の48%を占めた。

【0055】

さらに、足、腰の虚脱感が改善した例は24例であり、全体の48%を占めた。体重増加は22例で、全体の44%を占めた。また、生活の質（QOL）が向上したと観察された例は26例で全体の52%を占めた。口の渇き改善例が17例であり全体の34%を占めた。

これらの結果は、乳酸菌生産物質が肝臓、脾臓に対しても有益であることを示していると考えられる。

また、血液検査の結果を表6に示している。

【0056】

【表6】

項目	単位	例数	治療前	治療後	差
Hb	g/L	50	111.10	125.02	13.88-2.41
WBC	10 ⁹ /L	50	5.42	5.79	0.37-0.09
BPC	10 ⁹ /L	50	170.2	194.0	23.8-2.1
GLU	mg/dl	50	82.74	78.80	3.94-0.91
GPT	U/L	50	34.06	31.56	2.50-0.41
BUN	mg/dl	50	16.67	16.41	0.26-0.04
Cr	mg/dl	50	1.06	0.88	0.18-0.02
NK細胞	%	47	8.41	10.65	2.16-0.40
CD3	%	50	65.45	69.61	4.16-1.22
CD4/CD8	—	50	1.36	1.67	0.31-0.08

【0057】

表6に示したように、血色素（Hb）の上昇、NK細胞活性の上昇、T細胞亜群CD3の上昇、CD4/CD8値の上昇が確認された。いずれの上昇率も著しいものであった。

さらに、白血球（WBC）、血小板（BPC）の値も一定の上昇が確認できた。また、血糖値にも改善の傾向があった。

なお、表 6 中の BUN (尿素窒素)、Cr (クアチン) は、いずれも腎機能の指標であり、その値が大きすぎると問題となる指標である。

この実験例 4 は、北京中西医结合学会南陽腫瘍医、癌研究基金会興腫瘍医院、北京中日友好医院中医腫瘍科に依頼したものである。

【0058】

(実験例 5)

実験例 5 においては、30 人の慢性腎炎患者に対して、実験例 1 と同様の乳酸菌生産物質を次の条件の下で経口摂取させた。すなわち、各人に、一回 7ml ずつ、朝、昼、晩の食事の前に経口摂取させた。実験期間は 2 ヶ月とした。この結果を表 7 および表 8 に示した。

【0059】

【表 7】

病状	服用前 (人)	服用後 (人)
腫れ	20	5
高血圧	9	2
腰痛	27	12
脱力感	25	10
夜尿	7	4

【0060】

【表 8】

	服用前	服用後
尿蛋白定量 (g)	2.265±1.742	1.015±1.329

【0061】

上記表 7 は、腫れ、高血圧、腰痛、脱力感、夜尿の各症状について、その症状が現れている人の人数を示したものである。この表 7 から明らかのように、上記乳酸菌生産物質の摂取によって上記各症状が表れている人の人数が減っている。すなわち、症状の改善が見られた。また、上記表 8 は尿蛋白定量を参照値 ± 標準差で表示している。この表 8 のように、明らかに尿蛋白定量が低減された。

なお、上記実験例 5 は、北京中日友好医院、河北省玉田具医院、北京慧忠医院、北京中医薬開発協会問診部に依頼したものである。

【0062】

(実験例 6)

実験例 6 においては、ストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病ラットに対して、実験例 1 と同様の乳酸菌生産物質を次の条件の下で経口投与した。まず、ラット 15 匹にストレプトゾトシンを 1ml/kg となるようにクエン酸緩衝液で溶解した後、尾静脈より投与し、ラットの血糖値が 180 mg/dl 以上であることを確認した。そして、これを 5 匹ずつ 3 つのグループに分け、これらをグループ 1 ~ 3 とした。

【0063】

上記グループ 1 には蒸留水 4ml を、グループ 2 には乳酸菌生産物質 2ml + 蒸留水 2ml を、グループ 3 には乳酸菌生産物質を 4ml を経口投与した。経口投与は 1 日 1 回 28 日間行った。そして、これらのラットの血漿中グルコース濃度を測定した。測定結果は、平均値および標準誤差で示した。

【0064】

10

20

30

40

50

上記実験例 6 の結果、グループ 1 では試験期間を通して、200mg/dl 以上という高い値を維持した。これに対して、乳酸菌生産物質を投与したグループ 2 では投与前の 274.4 ± 17.4 に比べ、投与 1 週目には 30% 以上低下し 178.2 ± 27.6 となり、2 週目以降は、 159.3 ± 9.8 とグループ 1 に対して優位な差が見られた。

また、乳酸菌生産物質を投与したグループ 3 では、投与 1 週目では 153.8 ± 7.6 で、グループ 1 と比較して優位な差が見られた。2 週目では 160.1 ± 5.5 とその効果が持続された。さらに、3 週目では 95.2 ± 2.2 、試験最終日には 103.2 ± 11.1 であった。これは、ストレプトゾトシン処理していない健常のラットとほぼ同じ値であった。

以上のことから、乳酸菌生産物質は明らかに高血糖を正常値に改善することが分かった。

10

【0065】

また、上記試験の後、各グループの肝臓と十二指腸とをホルマリン固定して、組織切片を作成し、組織学的評価を行った。

その結果、グループ 1 ではランゲルハンス島細胞の脱顆粒すなわち、顆粒の減少が見られ、細胞の空洞化などが確認された。また細胞数はストレプトゾトシン処理しないラットでは 19 以上であったが、このグループ 1 では 7.0 ± 2.0 であり、細胞数の減少も確認された。

これに対し、乳酸菌生産物質を投与したグループ 2, 3 では容量依存的に細胞数減少の抑制が認められた。このときの細胞数は、 10.3 ± 2.3 であった。

また、グループ 2 では細胞の顆粒減少および細胞の空洞化が見られたが、グループ 1 に比べて少数であった。

20

【0066】

以上の結果から、乳酸菌生産物質は血糖値を濃度依存的に優位に低下させ、正常値に改善させるが、その機序としては 1 つの作用機序ではなく、複数の作用機序が存在する。それは、組織学的にランゲルハンス島細胞の変性を改善させたがこれだけでは血糖値をほぼ正常値に回復させるには不十分と思われるからである。つまり、乳酸菌生産物質の投与によって、糖代謝に何らかの作用をもたらし、結果的に血糖値を正常値に改善させたものと考えられる。

なお、上記実験例 6 は、株式会社薬物安全性試験センターに依頼したものである。

【0067】

30

(実験例 7)

実験例 7 では、この発明の乳酸菌生産物質を、糖尿病患者に与え、臨床観察をする実験を行った。

観察対象は、病院で、糖尿病と確実に診断された 60 名の患者で、32 歳から 78 歳の患者で、罹病期間は、それぞれ、20 例は 1 ~ 5 年、20 例は 6 ~ 10 年、20 例は 10 年以上である。

これら 60 名の患者を 30 名ずつ 2 グループに分け、一方のグループには、乳酸菌生産物質を 10 ml ずつ、毎日 2 回、他方のグループには玉泉丸 15 g を毎日 2 回、経口摂取させた。これを 3 ヶ月間続け、治療前後の効果を比較した。その結果を表 9 に示す。なお、各患者には、上記乳酸菌生産物質または玉泉丸以外を投与する以外にも、降圧剤の投与など、個々の患者の必要に応じた治療を同時に行っている。上記玉泉丸とは、糖尿病の症状を改善するための漢方薬である。

40

また、以下の表中、乳酸菌生産物質のグループを実験組、玉泉丸のグループを対照組と表している。

【0068】

【表 9】

効果 組別	例数	効果顕著	効果あり	効果なし	総有効率
実験組	30	9	17	4	86.7%
対照組	30	3	17	10	66.6%

10

表 9 に示すように、上記乳酸菌生産物質、玉泉丸ともに改善が見られた。

特に、乳酸菌生産物質を摂取したグループでは、有効率が 86.7% と非常に高く、玉泉丸のグループの有効率 66.6% に比べても優位であった。

【0069】

なお、表 9 に示す「効果顕著」とは、空腹時の静脈血糖値 (GUL) が、1 ~ 2 (mmol/l) 下がり、かつ、糖化ヘモグロビン値 (HbA1C) が、1% ~ 2% 下がった状態である。つまり、上記各生物化学指数が明らかに改善した状態である。

また、「効果あり」とは、空腹時の血糖値が下がった値が 1 (mmol/l) 未満か、糖化ヘモグロビン値が 1% 未満だけ下がり、生物化学指数での改善は明確ではないが、自覚症状では改善した状態である。

20

一方、「効果なし」とは、生物化学指数と自覚症状ともに改善がなかった場合である。

つまり、上記表 9 から、この発明の乳酸菌生産物質は、糖尿病患者に対して玉泉丸よりも効果が有ることが証明された。

【0070】

また、治療前後において、上記血糖値および糖化ヘモグロビン値以外の指数も測定したので、それらの測定結果を表 10 に示す。

【表 10】

		服用前	服用後	正常値
GLU (mg/dl)	実験組	179.88±27.73	146.82±28.56	80-120
	対照組	170.81±25.97	151.82±24.21	
HbA1C%	実験組	9.56±1.50	8.19±1.51	5.6-7.5
	対照組	9.20±1.23	8.36±1.39	
TG (mmol/l)	実験組	1.82±1.91	1.48±1.40	0.56-1.7
	対照組	1.62±0.78	1.63±0.78	
CHO (mmol/l)	実験組	4.76±0.95	4.61±1.16	2.86-5.98
	対照組	4.93±0.77	5.40±1.26	
GPT (u/l)	実験組	39.26±5.81	40.53±9.76	10-60
	対照組	39.20±4.64	42.66±10.90	
GOT (u/l)	実験組	36.86±7.01	35.16±10.73	10-60
	対照組	37.90±9.35	41.76±10.32	
BUN (mmol/l)	実験組	6.37±1.05	6.00±1.45	3.2-7.1
	対照組	6.58±0.92	6.69±1.47	
Cr (μ mol/l)	実験組	75.86±18.01	79.36±15.15	男 53-106 女 44-97
	対照組	74.39±19.09	79.60±12.43	
体重 (kg)	実験組	66.2±11.15	65.23±11.19	
	対照組	65.66±11.63	65.36±11.76	
収縮期血圧 (mmHg)	実験組	141.93±11.62	135.40±9.15	120-140
	対照組	138.00±10.87	132.50±8.78	
拡張期血圧 (mmHg)	実験組	93.83±6.78	89.00±5.31	60-90
	対照組	91.83±7.71	87.33±5.68	

【0071】

上記表10から、以下のことが分かった。

血糖値と糖化ヘモグロビン値については、両グループとも、治療前後に顕著な差を示している。つまり、上記表9の結果と同じであるが、乳酸菌生産物質、玉泉丸ともに、糖尿病に対する治療効果が有る。

また、乳酸菌生産物質を摂取したグループは、中性脂肪(TG)、コレステロール(CHO)が下がっているが、玉泉丸を摂取したグループは、これらの値が下がっていない。両者の差は、顕著な差とはいえないが、糖尿病の合併症として、中性脂肪やコレステロールが高い高脂血症を併発している患者には、上記乳酸菌の摂取が有効である可能性が有る。

【0072】

さらに、血圧については、両グループとも、治療後に下がっているが、両グループとも、血圧降下剤を用いた患者が含まれているので、その影響と考えられる。

その他、乳酸菌生産物質は、体重を減少させる効果が有るのに対して、玉泉丸はその効果がない。

【0073】

また、この発明の乳酸菌生産物質を摂取したグループと、玉泉丸を摂取したグループ別に、個々の患者の、血糖値の低下数値を対比した結果を表11に示し、糖化ヘモグロビン値の低下数値の対比結果を表12に示す。

【0074】

【表 1 1】

組別	血糖低下数値		
	例数	平均値	標準差
実験組	30	1.836	1.079
対照組	30	1.290	0.644

上記表 1 1 に示すように、実験組、対照組ともに、血糖値が下がっているが、実験組の方が、より低下数値が大きく、その効果には差が有ることが分かる。

【0075】

【表 1 2】

組別	糖化ヘモグロビン 低下数値		
	例数	平均値	標準差
実験組	30	1.406	0.968
対照組	30	0.853	0.651

上記表 1 2 に示すように、実験組は対照組に比べて、糖化ヘモグロビン値を下げる効果が大きいことが分かる。

【0076】

さらに、上記表 9 に示した治療前後の効果について発病年数との相関を調べた結果を表 1 3 に示す。上記発病年数とは、糖尿病を発病してからの年数である。

【表 1 3】

組別	発病年数	効果		
		効果顕著	効果あり	効果なし
実験組	1-5年	2	6	2
	6-10年	4	6	0
	10年以上	3	5	2
対照組	1-5年	2	7	1
	6-10年	1	6	3
	10年以上	0	4	6

この表 1 3 から、実験組では、発病年数による効果の現れ方には、特に差がないことが分かった。これに対し、実験組では、発病年数によって効果に差が有り、発病年数が長くなると顕著な効果が現れにくくなることが分かった。

この結果から、上記乳酸菌生産物質は、発病年数が長く、玉泉丸では明らかな効果が現れないような糖尿病患者に対しても有効であることが分かった。

なお、この実験例7は、中日友好医院および北京中医薬大学に依頼したものである。

【図面の簡単な説明】

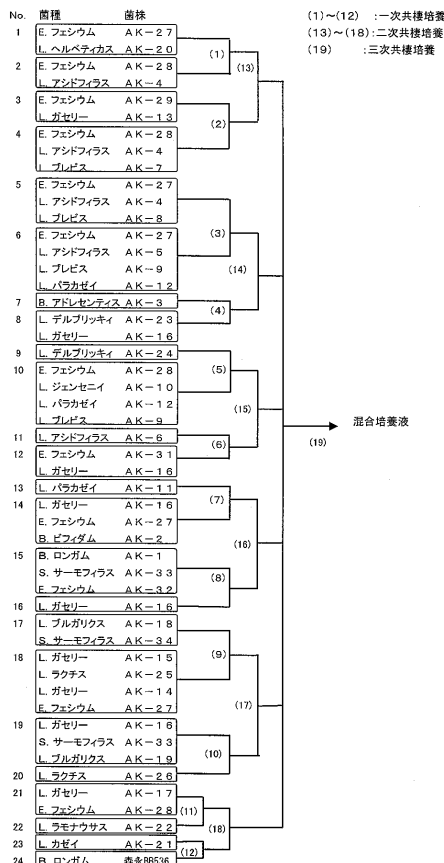
【0077】

【図1】この発明の乳酸菌生産物質を生成するための共棲培養の順序を示した図である。

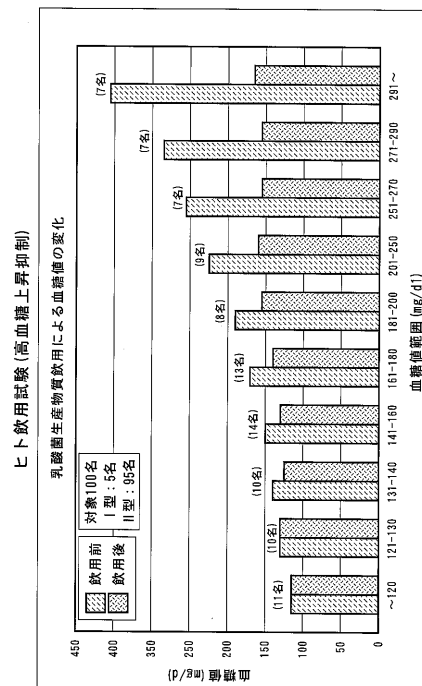
【図2】実験例3の実験結果における静脈血糖値の変化を示したグラフである。

【図3】実験例3の実験結果における糖化ヘモグロビン値(HbA1c)の変化を示したグラフである。

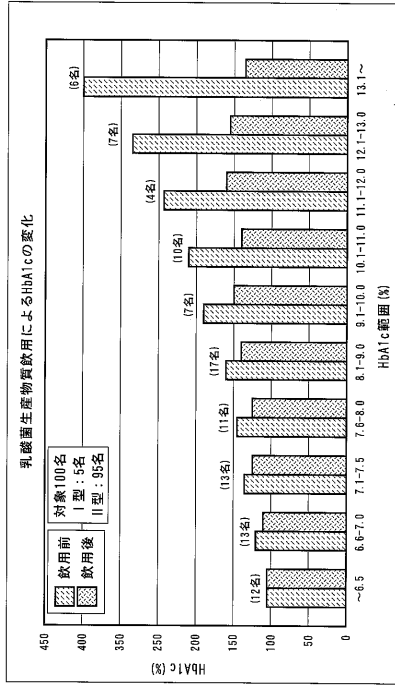
【図1】



【図2】



【 図 3 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	
C 1 2 R 1/46 (2006.01)	C 1 2 R 1:225	
C 1 2 R 1/01 (2006.01)	C 1 2 N 1/20	A
C 1 2 R 1/23 (2006.01)	C 1 2 R 1:46	
C 1 2 R 1/24 (2006.01)	C 1 2 N 1/20	A
C 1 2 R 1/245 (2006.01)	C 1 2 R 1:01	
	C 1 2 N 1/20	A
	C 1 2 R 1:23	
	C 1 2 N 1/20	A
	C 1 2 R 1:24	
	C 1 2 N 1/20	A
	C 1 2 R 1:245	
	C 1 2 N 1/00	P
	C 1 2 R 1:245	
	C 1 2 N 1/00	P
	C 1 2 R 1:24	
	C 1 2 N 1/00	P
	C 1 2 R 1:23	
	C 1 2 N 1/00	P
	C 1 2 R 1:01	
	C 1 2 N 1/00	P
	C 1 2 R 1:46	
	C 1 2 N 1/00	P
	C 1 2 R 1:225	

- (56)参考文献 特開平07 - 203954 (JP, A)
 特開平03 - 047035 (JP, A)
 特開平10 - 201416 (JP, A)
 特開平07 - 265064 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 / 2 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I)