

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-194259

(P2005-194259A)

(43) 公開日 平成17年7月21日(2005.7.21)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/715	A 6 1 K 31/715	4 C 0 8 6
A 6 1 K 35/74	A 6 1 K 35/74	4 C 0 8 7
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/12	4 C 0 9 0
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
	審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 8 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2004-203601 (P2004-203601)	(71) 出願人	000006138 明治乳業株式会社 東京都江東区新砂1丁目2番10号
(22) 出願日	平成16年7月9日(2004.7.9)	(72) 発明者	牧野 聖也 神奈川県小田原市成田540 明治乳業株式会社研究本部内
(31) 優先権主張番号	特願2003-414258 (P2003-414258)	(72) 発明者	池上 秀二 神奈川県小田原市成田540 明治乳業株式会社研究本部内
(32) 優先日	平成15年12月12日(2003.12.12)	(72) 発明者	指原 紀宏 神奈川県小田原市成田540 明治乳業株式会社研究本部内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	Fターム(参考)	4C086 AA01 AA02 EA24 MA01 MA04 NA14 ZB26 ZB33 ZC02
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 NK細胞活性化剤

(57) 【要約】

【解決手段】 乳酸菌由来リン酸化多糖類を有効成分とするNK細胞活性化剤。

【効果】 Lactobacillus bulgaricus0LL1073R-1株(FERM P-17227)から得られたリン酸化多糖類は優れたNK細胞活性化能を有していることが明らかになった。本発明のリン酸化多糖類は安全性に優れ、その上NK細胞活性化効果が高いことが確認され、優れた免疫賦活用飲食品及び/又は医薬品を提供することができる。したがって、本発明によりインフルエンザなどの感染予防、癌の予防、進行の防止などが可能となった。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

酸性多糖類を有効成分として含有することを特徴とするNK細胞活性化剤。

【請求項 2】

酸性多糖類がリン酸化多糖類である請求項 1 記載のNK細胞活性化剤。

【請求項 3】

多糖類が乳酸菌由来である請求項 1 または 2 記載のNK細胞活性化剤。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 つに記載のNK細胞活性化剤を含み、NK細胞活性化作用を有するものであることを特徴とし、NK細胞活性化のために用いられる旨の表示を付した発酵乳。 10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ナチュラルキラー（以下「NK」ともいう）細胞活性化作用を有する組成物に関するものである。

【背景技術】

【0002】

NK細胞は、名前のおりウイルス感染細胞やがん細胞をいち早く発見して殺す働きがあり、インフルエンザなどの感染症予防、癌予防の決め手として注目されている。しかしながらNK細胞の活性（破壊能力）は加齢とともに低下し、高齢になるほどガン発生率が高くなるのは、NK細胞の活性化の衰えに関連しているとされている。また、NK細胞は自律神経に影響を受けるため、ストレスを受けて交感神経が優位になるとNK細胞の活性（破壊能力）は激減する。このように、健康を維持するためには、NK細胞の活性化が不可欠である。そして、NK細胞活性化を促進する物質が探索されているが、薬剤として利用されるものがほとんどである。食品として利用可能な素材としては、多糖（レンチナン、キチン、キトサン、マイタケD-フラクシオン、ニゲロオリゴ糖等）および菌体（*Lactobacillus casei shirota*、*Bifidobacterium lactis* HN019等）が知られている（非特許文献 1 ~ 6、特許文献 1）が、必ずしも十分な活性を得ることが出来なかった。しかしながら、食品として利用されている素材由来であれば、日常生活において安全かつ簡便に摂取し、免疫力の増強が期待される。 20 30

【非特許文献 1】秋山由紀雄，羽室淳爾，蛋白質 核酸 酵素，26(3)，208-224(1981)

【非特許文献 2】Nishimura K, Nishimura S, Nishi N, Numata F, Tone Y, Tokura S, Azuma I, Vaccine, 3(5), 379-84(1985)

【非特許文献 3】Kodama N, Komuta K, Sakai N, Nanba H, Biol Pharm Bull, 25(12), 1647-50(2002)

【非特許文献 4】Murosak S, Muroyama K, Yamamoto Y, Liu T, Yoshikai Y, Int Immunopharmacol, 2(1), 151-9(2002)

【非特許文献 5】Hori T, Kiyoshima J, Yasui H, Biosci Biotechnol Biochem, 67(2), 420-2(2003) 40

【非特許文献 6】Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML, Gopal PK., Am J Clin Nutr, 74(6), 833-9(2001)

【特許文献 1】特開2001-31573号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

そこで、NK細胞を活性化し、免疫力を高める食品由来の組成物が望まれている。

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明者らは、NK細胞を活性化する食品由来の組成物を検討したところ、酸性多糖類 50

にNK細胞活性化作用があることを見出して本発明を完成させた。

本発明は、具体的には、

[1] 酸性多糖類を有効成分として含有することを特徴とするNK細胞活性化剤、

[2] 酸性多糖類がリン酸化多糖類である上記[1]記載のNK細胞活性化剤、

[3] 多糖類が乳酸菌由来である上記[1]または[2]記載のNK細胞活性化剤、

[4] 上記[1]~[3]のいずれか1つに記載のNK細胞活性化剤を含み、NK細胞活性化作用を有するものであることを特徴とし、NK細胞活性化のために用いられる旨の表示を付した発酵乳、
を提供するものである。

【発明の効果】

10

【0005】

酸性多糖類からなるNK細胞活性化剤により、インフルエンザなどの感染予防、癌の予防、進行の防止などが可能となった。根本治療法のないこれらの疾患の治療または予防薬の一つを新たに提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0006】

本発明のNK細胞活性化剤は、酸性多糖類、好ましくはリン酸化多糖類を有効成分とする。リン酸化多糖類には、多糖類を産生する乳酸菌の培養物、該培養物から精製した多糖類、多糖類を化学的又は酵素的にリン酸化して得られた多糖類などが挙げられる。リン酸化多糖類中のリン含有量は0.01%以上であることが好ましく、0.1%以上であることがさら

20

に好ましい。また、本願発明でいう多糖類には、当該多糖を化学的又は酵素的に分解して得られたオリゴ糖を含む。

本発明に用いられる乳酸菌としては、多糖類を生産する乳酸菌であれば、種類を問わない。酸性多糖類は単独で、または種類の異なる2種以上を組み合わせ用いてもよい。乳酸菌としては、ラクトバチルス・ブルガリクス(*Lactobacillus bulgaricus*)、またはラクトコッカス・ラクティス・クレモリス(*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*)等が、単独でまたは組み合わせ用いられる。これらの中でも*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* KVS20株(Kitazawa H, Yamaguchi T, Miura M, Saito T, Itoh T, *J Dairy Sci*, 76, 1514-9(1993)), *Lactobacillus bulgaricus* OLL1073R-1株(FERM P-17227)が好適である。

30

【0007】

多糖類を培養物そのままを用いても構わないが、特開2000-247895号公報記載の方法で中性多糖類を除く、または、必要に応じて下記のようにして精製したものをを用いても構わない。尚、下記の工程の一部を省略、追加しても構わない。

- 1、遠心分離による培養物からの菌体の除去
- 2、エタノール沈殿によって高分子量の多糖類、タンパク質を沈殿として回収
- 3、タンパク質の除去
 - a) final 5-10%程度のトリクロロ酢酸でタンパク沈殿、遠心
 - b) boilすることによりタンパク質を熱変性、遠心
 - c) b)のあとにプロテイナーゼによるタンパク分解、あるいはDNAaseによる核酸の分解処理等も行い、透析
- 4、陰イオン交換樹脂による酸性多糖類の吸着と溶出による回収
- 5、ゲルろ過により分子量100万以上の物質として酸性多糖類を精製する。

40

この時、酸性かつ分子量が近いタンパク質が混合していた場合は、ゲルろ過の前、あるいは後に何らかのタンパク除去操作を加えることも可能である。

【0008】

酸性多糖類を製剤化して医薬品とする場合には、治療目的や投与経路等に応じて剤型を選択することができる。例えば、錠剤、丸剤、散剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤、カプセル剤、注射剤、坐剤、シロップ剤、浸剤、煎剤、チンキ剤等が挙げられる。また、製剤化のために、必要に応じて充填剤、増量剤、結合剤、保湿剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤等の希釈剤あるいは賦形剤を用いることができる。また、この医薬製剤中に着色剤、保存

50

剤、香料、風味剤、甘味剤等や他の医薬品を医薬製剤中に含有させてもよい。

【0009】

酸性多糖類を含む食品の形態としては、ヨーグルトの様な発酵乳、飲料等を挙げることができ、健康食品、特定保健用食品、栄養補助食品もしくはNK細胞活性化作用を表示した食品等として使用できる。酸性多糖類と食品衛生上許容できる配合物、例えば、安定化剤、保存料、着色料、香料、ビタミン等の配合物を上記リン酸化多糖類に適宜添加し、混合し、定法により、錠剤、粒状、顆粒状、粉末状、カプセル状、液状、ゼリー状、クリーム状、飲料等の食品とすることが出来る。

このような形態の、NK細胞活性化補助食品を摂取することにより、NK細胞活性化が図られるため、本発明で得られる食品は、インフルエンザなどの感染予防、癌の予防、進行の防止などに寄与することが可能である。

10

【0010】

以下、本発明を説明するが、本発明がこの実施例に限定されないことはいうまでもない。

【実施例1】

【0011】

乳酸菌由来多糖の製造

1、乳酸菌の培養

10%乳清をプロテアーゼで55℃、8時間処理した後酵母エキスを0.5%添加、pH7.0に調製したものに*Lactobacillus bulgaricus* OLL1073R-1株 (FERM P-17227) を接種し、37℃、24時間の静置培養を行った。

20

2、多糖の精製

10-20Lの培養液より菌体を遠心分離 (22800 x g, 4℃, 20min) した後、エタノール沈殿 (60-70% (v/v)) を2回行った。沈殿物はMilliQ水に溶解し、トリクロロ酢酸 (final 10%) によるタンパク変性、遠心分離 (22800 x g, 4℃, 20min) による不溶物の除去を行った。

MilliQ水に対する透析、凍結乾燥を行った後、0.02M Tris-HCl (pH8.6) に溶解し、陰イオン交換樹脂であるDEAE-Sephacryl (Amersham Biosciences) を用いて中性多糖と酸性多糖の分離を行った (図1)。中性多糖はPass画分として回収し、酸性多糖はNaClを用いて0.5Mイオン強度勾配による溶出で回収した。

回収された酸性多糖はSephacryl S-400HR (Amersham Biosciences) を用いてゲルろ過を行い、分子量による分離を行った。本多糖は分子量 1×10^6 Da以上の画分と分子量がより小さい画分に分離され、分子量 1×10^6 Da以上の画分について分取した (図2)。

30

分取した多糖はMilliQ水に対して透析後、凍結乾燥し、酸性多糖精製品を得た。

なお、多糖はグルコースを標準物質としてフェノール・硫酸法を用いて検出・定量した。

また、文献記載 (Uemura J, *Milchwissenschaft*, 53(8), 443-6(1998)) の方法で当該多糖を分析したところ、リン酸化多糖を含有していることが確認された。

【実施例2】

【0012】

多糖のNK活性

40

1、多糖のマウスへの経口投与試験

マウスBALB/c (雄、8週齢、SLC社) 30匹を1群10匹で3群に分け、以下の投与物を3週間、ゾンデにより強制経口投与を行った。

1) 蒸留水投与群 : 0.5ml/body/day

2) 実施例1で得た酸性多糖投与群 : 5mg/kg/day

3) 実施例1で得た酸性多糖投与群 : 30mg/kg/day

多糖は各濃度で蒸留水に溶解し、0.5ml/body/dayで投与を行った。

2、NK活性測定

3週間の投与終了後、個々のマウスよりそれぞれ脾臓を取り出し、細胞をRPMI1640 (10% FCS) に懸濁することにより脾臓細胞懸濁液 (1×10^7 cells/ml) を調製した。

50

この脾臓細胞をエフェクター細胞、YAC-1細胞をターゲット細胞としてNK活性をfluorescence activated cell sorter(以下FACSとする)を用いて測定した。ターゲット細胞であるYAC-1は3,3'-di-octadecyloxacarbocyanine perchlorate(以下Dioとする)により蛍光染色した後、脾臓細胞とともに96穴マイクロプレート(丸底)を用いて37℃、5%CO₂条件下で4時間培養を行った。培養終了前にPropidium Iodide(以下PIとする)を培養液に加え、死細胞を染色した。培養終了後、Johannの論文を参考にFACSを用いてDio、PIともに染色された細胞を死滅したYAC-1細胞として検出した(Johann S, Blumel G, Lipp M, Forster R, J Immunol Methods, 185(2), 209-16(1995))。なお、エフェクター細胞とターゲット細胞の比率は40:1とした。

その結果、酸性多糖30mg/kg/day投与群の脾臓細胞NK活性はコントロールである水投与群に比べ有意に高かった(P<0.01)。また、酸性多糖5mg/kg/day投与群においてもコントロールに比べ高い傾向(P<0.1)が見られた(図3)。

10

【実施例3】

【0013】

多糖産生乳酸菌を利用した発酵乳の作製

NK活性上昇作用を有する酸性多糖体を産生する*L. bulgaricus* OLL1073R-1を用いて発酵乳を作製した。生乳、脱脂粉乳、砂糖を使用し、SNF9.7%、FAT3.05%、砂糖3.0%に調製した溶液(以下発酵乳Mix)に*L. bulgaricus* OLL1073R-1、*S. thermophilus* OLS3059(FERM P-15487)をスターター菌として加え、43℃で発酵を行った。酸度0.7で発酵を終了し、4℃で1日保存することで最終酸度0.78となった。また、対照発酵乳として*L. bulgaricus* OLL1256及び*S. thermophilus* OLS3295をスターター菌として用いた発酵乳についても作製した。

20

【実施例4】

【0014】

多糖産生乳酸菌を利用した発酵乳のNK活性

1、多糖産生乳酸菌を利用した発酵乳のマウスへの経口投与試験

マウスBALB/c(雄、11週齢、SLC社)32匹を1群8匹で4群に分け、以下の投与物を4週間、ゾンデにより強制経口投与を行った。

- | | | |
|--|----------------|----|
| 1) 蒸留水投与群 | 1.0ml/body/day | |
| 2) <i>L. bulgaricus</i> OLL1073R-1発酵乳(実施例3)投与群 | 200mg/body/day | 30 |
| 3) 対照発酵乳(実施例3)投与群 | 200mg/body/day | |
| 4) 発酵乳Mix(実施例3)投与群 | 200mg/body/day | |

発酵乳、発酵乳Mixは凍結乾燥物を用い、投与時に200mg/mlで蒸留水に懸濁した。

2、NK活性測定

4週間の投与終了後、個々のマウスよりそれぞれ脾臓を取り出し、細胞をRPMI1640(10% FCS)に懸濁することにより脾臓細胞懸濁液(1×10^7 cells/ml)を調製した。

この脾臓細胞をエフェクター細胞、YAC-1細胞をターゲット細胞としてNK活性をfluorescence activated cell sorter(以下FACSとする)を用いて測定した。ターゲット細胞であるYAC-1は3,3'-di-octadecyloxacarbocyanine perchlorate(以下Dioとする)により蛍光染色した後、脾臓細胞とともに96穴マイクロプレート(丸底)を用いて37℃、5%CO₂条件下で4時間培養を行った。培養終了前にPropidium Iodide(以下PIとする)を培養液に加え、死細胞を染色した。培養終了後、Johannの論文を参考にFACSを用いてDio、PIともに染色された細胞を死滅したYAC-1細胞として検出した(Johann S, Blumel G, Lipp M, Forster R, J Immunol Methods, 185(2), 209-16(1995))。なお、エフェクター細胞とターゲット細胞の比率は40:1とした。

40

その結果、発酵乳投与では多糖体産生菌である*L. bulgaricus* OLL1073R-1を使用した発酵乳投与群においてNK活性がコントロールである蒸留水投与群に比べ有意に高く(p<0.05)、発酵乳Mixと対照発酵乳に対しては高い傾向(p<0.1)が見られた(図4)。

。

【産業上の利用可能性】

50

【 0 0 1 5 】

本発明によれば、NK細胞活性化効果が高いので、免疫賦活剤として有用であるだけでなく、免疫賦活用飲食品としても利用することができる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 6 】

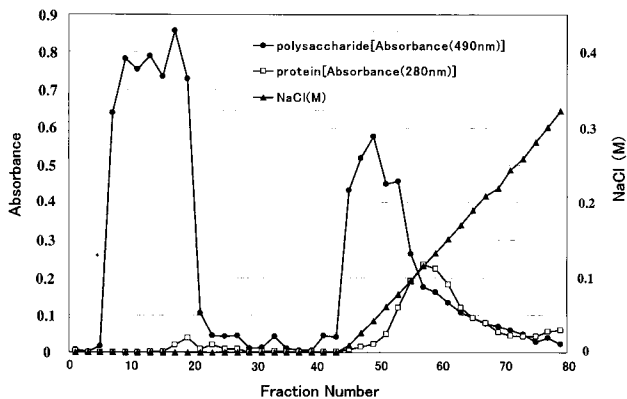
【 図 1 】 陰イオン交換樹脂 DEAE sepharoseによる中性多糖と酸性多糖の分離を示す図である。

【 図 2 】 酸性多糖のSephacryl S-400HRを用いたゲルろ過による分離を示す図である。

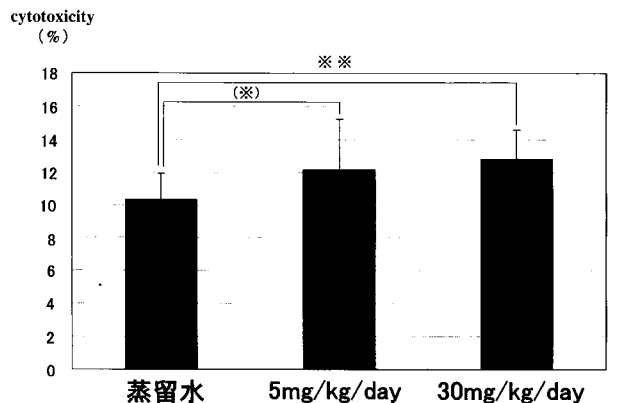
【 図 3 】 酸性多糖を3週間経口投与したマウスにおける脾臓細胞のNK活性を示す図である。(検定方法: Student's t-test)

【 図 4 】 多糖産生乳酸菌を利用した発酵乳を4週間経口投与したマウスにおける脾臓細胞のNK活性を示す図である。(検定方法: Student's t-test)

【 図 1 】

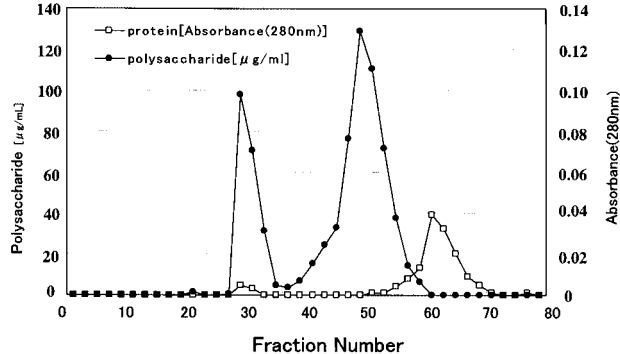


【 図 3 】



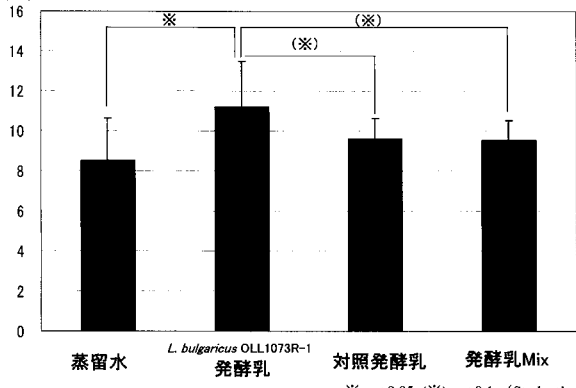
※※ p < 0.01, (※) p < 0.1 (Student's t-test)

【 図 2 】



【 図 4 】

cytotoxicity (%)



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

// C 0 8 B 37/00

F I

C 0 8 B 37/00

Z

テーマコード(参考)

Fターム(参考) 4C087 AA01 AA02 BC56 CA14 CA43 NA14 ZB26 ZB33 ZC02
4C090 AA04 BA97 BB64 BC19 DA23