

(19) 日本国特許庁(JP)

**再公表特許(A1)**

(11) 国際公開番号

**W02011/007584**

発行日 平成24年12月20日 (2012.12.20)

(43) 国際公開日 **平成23年1月20日 (2011.1.20)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 35/74 (2006.01)</b>	A 6 1 K 35/74	A 4 B 0 1 8
<b>A 6 1 P 1/02 (2006.01)</b>	A 6 1 P 1/02	4 B 0 6 5
<b>A 2 3 L 1/30 (2006.01)</b>	A 2 3 L 1/30	Z 4 C 0 8 7
<b>C 1 2 N 1/20 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/20	E
<b>C 1 2 R 1/225 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/20	A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 19 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2011-522744 (P2011-522744)	(71) 出願人	504136568 国立大学法人広島大学 広島県東広島市鏡山1丁目3番2号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2010/004626	(74) 代理人	110000084 特許業務法人アルガ特許事務所
(22) 国際出願日	平成22年7月16日 (2010.7.16)	(74) 代理人	100077562 弁理士 高野 登志雄
(31) 優先権主張番号	特願2009-168122 (P2009-168122)	(74) 代理人	100096736 弁理士 中嶋 俊夫
(32) 優先日	平成21年7月16日 (2009.7.16)	(74) 代理人	100117156 弁理士 村田 正樹
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100111028 弁理士 山本 博人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 口腔内疾患の予防、改善又は治療剤

## (57) 【要約】

口腔内疾患の原因菌に対して抗菌スペクトルが広く、風味が良く嗜好性に優れた発酵物を製造可能な新規乳酸菌株及びこれを用いた口腔内疾患の予防、改善又は治療剤の提供。

ラクトバチルス・ラムノーサス K O 3 株、ラクトバチルス・カゼイ Y U 3 株及びラクトバチルス・パラカゼイ Y U 4 株から選ばれる1種以上の乳酸菌の菌体若しくは菌体培養物又はこれらの抽出物を有効成分とする口腔内疾患予防又は治療剤。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ラクトバチルス・ラムノーサス (Lactobacillus rhamnosus) K O 3 株 ( N I T E B P - 7 7 1 )、ラクトバチルス・カゼイ (Lactobacillus casei) Y U 3 株 ( N I T E B P - 7 7 2 ) 及びラクトバチルス・パラカゼイ (Lactobacillus paracasei) Y U 4 株 ( N I T E B P - 7 7 5 ) から選ばれる 1 種以上の乳酸菌の菌体若しくは菌体培養物又はこれらの抽出物を有効成分とする口腔内疾患の予防、改善又は治療剤。

## 【請求項 2】

ラクトバチルス・ラムノーサス (Lactobacillus rhamnosus) K O 3 株 ( N I T E B P - 7 7 1 )、ラクトバチルス・カゼイ (Lactobacillus casei) Y U 3 株 ( N I T E B P - 7 7 2 ) 及びラクトバチルス・パラカゼイ (Lactobacillus paracasei) Y U 4 株 ( N I T E B P - 7 7 5 ) から選ばれる 1 種以上の乳酸菌の菌体若しくは菌体培養物又はこれらの抽出物を含有する食品。

10

## 【請求項 3】

発酵乳又は発酵飲料である請求項 2 記載の食品。

## 【請求項 4】

ラクトバチルス・ラムノーサス (Lactobacillus rhamnosus) K O 3 株 ( N I T E B P - 7 7 1 )、ラクトバチルス・カゼイ (Lactobacillus casei) Y U 3 株 ( N I T E B P - 7 7 2 ) 及びラクトバチルス・パラカゼイ (Lactobacillus paracasei) Y U 4 株 ( N I T E B P - 7 7 5 ) から選ばれる 1 種以上の乳酸菌の菌体若しくは菌体培養物又はこれらの抽出物を有効成分とするう蝕菌、歯周病菌及びカンジダ菌の増殖抑制剤。

20

## 【請求項 5】

う蝕菌、歯周病菌及びカンジダ菌が、少なくとも、ストレプトコッカス・ミュータンス (Streptococcus mutans)、ストレプトコッカス・ソブリナス (Streptococcus sobrinus)、ポルフィロモナス・ジンジパリス (Porphyromonas gingivalis) 及びカンジダ・アルビカンス (Candida albicans) である請求項 4 記載のう蝕菌、歯周病菌及びカンジダ菌の増殖抑制剤。

## 【請求項 6】

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に、N I T E B P - 7 7 1 として寄託されたラクトバチルス・ラムノーサス (Lactobacillus rhamnosus) K O 3 株、N I T E B P - 7 7 2 として寄託されたラクトバチルス・カゼイ (Lactobacillus casei) Y U 3 株及び N I T E B P - 7 7 5 として寄託されたラクトバチルス・パラカゼイ (Lactobacillus paracasei) Y U 4 株。

30

## 【請求項 7】

口腔内疾患の予防、改善又は治療剤として使用される、ラクトバチルス・ラムノーサス (Lactobacillus rhamnosus) K O 3 株 ( N I T E B P - 7 7 1 )、ラクトバチルス・カゼイ (Lactobacillus casei) Y U 3 株 ( N I T E B P - 7 7 2 ) 及びラクトバチルス・パラカゼイ (Lactobacillus paracasei) Y U 4 株 ( N I T E B P - 7 7 5 ) から選ばれる 1 種以上の乳酸菌の菌体若しくは菌体培養物又はこれらの抽出物。

## 【請求項 8】

ラクトバチルス・ラムノーサス (Lactobacillus rhamnosus) K O 3 株 ( N I T E B P - 7 7 1 )、ラクトバチルス・カゼイ (Lactobacillus casei) Y U 3 株 ( N I T E B P - 7 7 2 ) 及びラクトバチルス・パラカゼイ (Lactobacillus paracasei) Y U 4 株 ( N I T E B P - 7 7 5 ) から選ばれる 1 種以上の乳酸菌の菌体若しくは菌体培養物又はこれらの抽出物を投与又は摂取することを特徴とする口腔内疾患の予防、改善又は治療方法。

40

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、う蝕又は歯周病等の口腔内疾患の予防、改善又は治療剤に関する。

50

## 【背景技術】

## 【0002】

口腔内微生物叢は、400～500種類の微生物によって構成されている。このため、口腔内にはう蝕菌、歯周病菌及びカンジダ菌等、様々な病原微生物が存在し、う蝕症、歯周疾患や舌炎、齦口瘡、口腔カンジダ症等の種々の疾患が引き起こされる。また、最近の研究では、カンジダ菌は歯周病にも関連していることが報告されている。

従って、従来より、抗菌性物質を配合した口腔用組成物に関して多くの提案がなされてきた。しかし、口腔内に抗菌剤を投与しても抗菌剤は短時間のうちに唾液や飲食物によって洗い流され、その効果は一過性のものと言わざるを得なかった。

## 【0003】

また近年、乳酸菌が大腸内に於いて各種疾病の原因菌を抑制することに鑑み、その手法を歯科疾患に対して応用する研究が行われている。例えば、ラクトバチルス・サリバリウス（特許文献1、特許文献2）、ラクトバチルス・ロイテリ（特許文献3、特許文献4）、ラクトバチ・パラカゼイ（特許文献5）、ラクトバチルス・デルブルッキー（特許文献6）、ラクトバチルス・ファーマンタム（非特許文献1）等の乳酸菌がう蝕や歯周病の予防に有効であることが報告されている。

## 【0004】

しかしながら、う蝕菌や歯周病菌に対して抗菌力を示す乳酸菌であっても、抗菌スペクトルが狭かったり、或いは発酵能が十分でなく良好な発酵物が得られない、風味が良く嗜好性の優れた発酵物が得られないという問題もあった。

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0005】

【特許文献1】W02002/016554パンフレット

【特許文献2】W02003/082027パンフレット

【特許文献3】特開2003-299480号公報

【特許文献4】特表2008-502360号公報

【特許文献5】特開2008-37859号公報

【特許文献6】特開2008-237198号公報

## 【非特許文献】

## 【0006】

【非特許文献1】三村純代，二川浩樹，牧平清超，檜山あや，高本祐子；日本歯科技工学会誌，29巻特別号，298（2008）

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0007】

本発明は、口腔内疾患の原因菌に対して抗菌スペクトルが広く、風味が良く嗜好性に優れた発酵物を製造可能な新規乳酸菌株及びこれを用いた食品、口腔内疾患の予防、改善又は治療剤を提供することに関する。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0008】

本発明者らは、口腔内微生物について鋭意検討したところ、唾液中に存在するラクトバチルス・ラムノーサス、ラクトバチルス・カゼイ及びラクトバチルス・パラカゼイに属する特定の乳酸菌株に、う蝕菌、歯周病菌及びカンジダ菌の何れに対しても優れた抗菌力があり、しかもこれらを用いることにより嗜好性に優れた発酵物が製造できることを見出した。

## 【0009】

すなわち、本発明は以下の1)～8)に係るものである。

- 1) ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*) K O 3 株 (N I T E B P - 7 7 1)、ラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*) Y U 3 株 (N I T

10

20

30

40

50

E B P - 772) 及びラクトバチルス・パラカゼイ (Lactobacillus paracasei) Y U 4 株 (N I T E B P - 775) から選ばれる 1 種以上の乳酸菌の菌体若しくは菌体培養物又はこれらの抽出物を有効成分とする口腔内疾患の予防、改善又は治療剤。

2) ラクトバチルス・ラムノーサス (Lactobacillus rhamnosus) K O 3 株 (N I T E B P - 771)、ラクトバチルス・カゼイ (Lactobacillus casei) Y U 3 株 (N I T E B P - 772) 及びラクトバチルス・パラカゼイ (Lactobacillus paracasei) Y U 4 株 (N I T E B P - 775) から選ばれる 1 種以上の乳酸菌の菌体若しくは菌体培養物又はこれらの抽出物を含有する食品。

3) 食品が発酵乳又は発酵飲料である上記 2) の食品。

4) ラクトバチルス・ラムノーサス (Lactobacillus rhamnosus) K O 3 株 (N I T E B P - 771)、ラクトバチルス・カゼイ (Lactobacillus casei) Y U 3 株 (N I T E B P - 772) 及びラクトバチルス・パラカゼイ (Lactobacillus paracasei) Y U 4 株 (N I T E B P - 775) から選ばれる 1 種以上の乳酸菌の菌体若しくは菌体培養物又はこれらの抽出物を有効成分とするう蝕菌、歯周病菌及びカンジダ菌の増殖抑制剤。

5) う蝕菌、歯周病菌及びカンジダ菌が、少なくとも、ストレプトコッカス・ミュータンス (Streptococcus mutans)、ストレプトコッカス・ソブリナス (Streptococcus sobrinus)、ポルフィロモナス・ジンジパリス (Porphyromonas gingivalis) 及びカンジダ・アルビカンス (Candida albicans) である 4) のう蝕菌、歯周病菌及びカンジダ菌の増殖抑制剤。

6) 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に、N I T E B P - 771 として寄託されたラクトバチルス・ラムノーサス (Lactobacillus rhamnosus) K O 3 株、N I T E B P - 772 として寄託されたラクトバチルス・カゼイ (Lactobacillus casei) Y U 3 株及び N I T E B P - 775 として寄託されたラクトバチルス・パラカゼイ (Lactobacillus paracasei) Y U 4 株。

7) 口腔内疾患の予防、改善又は治療剤として使用される、ラクトバチルス・ラムノーサス (Lactobacillus rhamnosus) K O 3 株 (N I T E B P - 771)、ラクトバチルス・カゼイ (Lactobacillus casei) Y U 3 株 (N I T E B P - 772) 及びラクトバチルス・パラカゼイ (Lactobacillus paracasei) Y U 4 株 (N I T E B P - 775) から選ばれる 1 種以上の乳酸菌の菌体若しくは菌体培養物又はこれらの抽出物。

8) ラクトバチルス・ラムノーサス (Lactobacillus rhamnosus) K O 3 株 (N I T E B P - 771)、ラクトバチルス・カゼイ (Lactobacillus casei) Y U 3 株 (N I T E B P - 772) 及びラクトバチルス・パラカゼイ (Lactobacillus paracasei) Y U 4 株 (N I T E B P - 775) から選ばれる 1 種以上の乳酸菌の菌体若しくは菌体培養物又はこれらの抽出物を投与又は摂取することを特徴とする口腔内疾患の予防、改善又は治療方法。

【発明の効果】

【0010】

本発明によれば、う蝕症、歯周疾患や舌炎、驚口瘡、口腔カンジダ症等の種々の口腔内疾患の予防、改善又は治療効果を発揮する、嗜好性の高い食品、医薬品、口腔内組成物等を提供できる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図 1 a】Streptococcus mutans に対する発育阻害効果を示すグラフ。

【図 1 b】Streptococcus mutans に対する発育阻害効果を示すグラフ。

【図 2】Streptococcus sobrinus に対する発育阻害効果を示すグラフ。

【図 3 a】Porphyromonas gingivalis に対する発育阻害効果を示すグラフ。

【図 3 b】Porphyromonas gingivalis に対する発育阻害効果を示すグラフ。

【図 4 a】Candida albicans に対する発育阻害効果を示すグラフ。

【図 4 b】Candida albicans に対する発育阻害効果を示すグラフ。

【図 5】Candida albicans に対するバイオフィルム形成阻害効果を示すグラフ。

10

20

30

40

50

【図6】味についての評価結果 (Visual Analogue Scale(VAS)法) を示すグラフ。

【図7】ヨーグルトの抗菌作用を示すグラフ。(A) : *S. mutans* ingbritt株、(B) : *S. sobirinus* B13株

【図8a】ヒト口腔内におけるう蝕菌及び歯周病菌の菌数減少効果を示すグラフ。(A) : う蝕菌、(B) : *P. intermedia* (Pi)

【図8b】ヒト口腔内におけるう蝕菌及び歯周病菌の菌数減少効果を示すグラフ。(C) : *T. forsythensis* (Tf)、(D) : *F. nucleatum* (Fuso)

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明の発酵乳に用いられる乳酸菌は、ラクトバチルス・ラムノーサス、ラクトバチルス・カゼイ及びラクトバチルス・パラカゼイに属する乳酸菌株であり、具体的には、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(住所:〒292-0818 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8)に、NITE BP-771として2009年6月10日付で寄託されたラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*) KO3株、NITE BP-772として2009年6月10日付で寄託されたラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*) YU3株及びNITE BP-775として2009年6月24日付で寄託されたラクトバチルス・パラカゼイ (*Lactobacillus paracasei*) YU4株である。

【0013】

KO3株は、ヒト唾液中から本発明者らによって初めて分離されたものであり、16S rRNAの塩基配列がラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*) strain IDCC 3201の塩基配列と1485/1485の間で100%の相同性を示し、グラム染色後の顕鏡下においてグラム陽性桿菌の様相を呈することから、ラクトバチルス・ラムノーサス (*Lactobacillus rhamnosus*) と同定された。KO3株の主な菌学的性質を以下に示す。

1) グラム陽性乳酸桿菌、2) ホモ型乳酸発酵、3) カタラーゼ陰性、4) 芽胞形成能無し、5) 好気条件下でも培養可、6) 菌体外多糖類を産生。

【0014】

YU3株は、ヒト唾液中から本発明者らによって初めて分離されたものであり、16S rRNAの塩基配列がラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*) ATCC 334の塩基配列と1485/1485の間で100%の相同性を示し、グラム染色後の顕鏡下においてグラム陽性桿菌の様相を呈することから、ラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*) と同定された。YU3株の主な菌学的性質を以下に示す。

1) グラム陽性乳酸球菌、2) ホモ型乳酸発酵、3) カタラーゼ陰性、4) 芽胞形成能無し、5) 好気条件下でも培養可、6) 菌体外多糖類を産生。

【0015】

YU4株は、ヒト唾液中から本発明者らによって初めて分離されたものであり、16S rRNAの塩基配列がラクトバチルス・パラカゼイ (*Lactobacillus paracasei*) strain DJ1 16S ribosomal RNA geneのPartial Sequenceと1477/1477 (100%)の相同性を示し、グラム染色後の顕鏡下においてグラム陽性桿菌の様相を呈することから、ラクトバチルス・パラカゼイ (*Lactobacillus paracasei*) と同定された。YU4株の主な菌学的性質を以下に示す。

1) グラム陽性乳酸球菌、2) ホモ型乳酸発酵、3) カタラーゼ陰性、4) 芽胞形成能無し、5) 好気条件下でも培養可、6) 菌体外多糖類を産生。

【0016】

本発明においては、上記乳酸菌の菌体を、乳酸菌培養の常法に従って培養し、得られた培養物から遠心分離等の集菌手段によって分離されたものをそのまま用いることのみならず、当該培養・発酵液(培養上清)、その濃縮液や、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。また、生菌体のみならず死菌体であってもよい。

【0017】

10

20

30

40

50

本発明の乳酸菌を培養する培地には、果汁培地、野菜汁培地、牛乳培地、脱脂粉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等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、脱脂乳を還元して加熱殺菌した還元脱脂乳培地、酵母エキスを添加した脱脂粉乳培地、MRS培地、GAM培地等を例示することができる。

培養方法は、静置培養又はpHを一定にした中和培養や、回分培養及び連続培養等、菌体が良好に生育する条件であれば、特に制限はない。

【0018】

本発明の乳酸菌の菌体又は菌体培養物の抽出物とは、菌体又は菌体培養物を、溶媒抽出することにより得られる各種溶剤抽出液、その希釈液、その濃縮液又はその乾燥末を意味するものである。

【0019】

本発明の抽出物を得るために用いられる抽出溶剤としては、極性溶剤、非極性溶剤のいずれをも使用することができ、これらを混合して用いることもできる。例えば、水；メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール等のアルコール類；プロピレングリコール、ブチレングリコール等の多価アルコール類；アセトン、メチルエチルケトン等のケトン類；酢酸メチル、酢酸エチル等のエステル類；テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル等の鎖状及び環状エーテル類；ポリエチレングリコール等のポリエーテル類；ヘキサン、シクロヘキサン、石油エーテル等の炭化水素類；ベンゼン、トルエン等の芳香族炭化水素類；ピリジン類等が挙げられ、このうち、酢酸エチル等のエステル類、エタノール等のアルコール類が好ましい。

【0020】

抽出条件は、使用する溶剤によっても異なるが、例えば、培養液1質量部に対して1~10質量部の溶剤を用い、0~50℃、好ましくは25~37℃の温度で、0.5時間~3時間抽出するのが好ましい。

【0021】

上記の抽出物は、そのまま用いることもできるが、当該抽出物を希釈、濃縮若しくは凍結乾燥した後、必要に応じて粉末又はペースト状に調製して用いることもできる。また、液々分配等の技術により、適宜精製して用いることもできる。

【0022】

本発明の口腔内疾患の予防、改善又は治療剤における、「口腔内疾患」としては、う蝕菌、歯周病菌及びカンジダ菌によって引き起こされる口腔内疾患をいい、例えば、う蝕症；歯肉炎、歯周炎等の歯周病、舌炎、齶口瘡、口角炎等の口腔カンジダ症等が挙げられる。

また、う蝕菌としては、ストレプトコッカス・ミュータンス (Streptococcus mutans)、ストレプトコッカス・ソブリナス (Streptococcus sobrinus)、歯周病菌としてはポルフィロモナス・ジンジパリス (Porphyromonas gingivalis)、プレボテラ・インターメディア (Prevotella intermedia)、トレポネーマ・デンティコーラ (Treponema denticola)、タンネレラ・フォーサイセンシス (Tannerella forsythensis)、アクチノバチルス・アクチノミセテムコミタンス (Actinobacillus actinomycetemcomitans)、フソバクテリウム・ヌクレアタム (Fusobacterium nucleatum) 等が挙げられ、カンジダ菌としては、カンジダ・アルビカンス (Candida albicans)、カンジダ・グラブラータ (Candida glabrata)、カンジダ・トロピカリス (Candida tropicalis) 等が挙げられる。

【0023】

後記実施例に示すように、本発明の乳酸菌は、う蝕菌であるストレプトコッカス・ミュータンス (Streptococcus mutans) 及びストレプトコッカス・ソブリナス (Streptococcus sobrinus)、歯周病菌であるポルフィロモナス・ジンジパリス (Porphyromonas gingivalis) 及びカンジダ菌であるカンジダ・アルビカンス (Candida albicans) の何れに対しても増殖抑制効果を有する。また、口腔内の歯肉縁下ブラークフォーマーとして知られる Fusobacterium nucleatum 等の Fusobacterium 属細菌の増殖を抑制する作用を有する。そして、当該乳酸菌を用いて調製された発酵乳は、風味及び食感が良く、また、既存の発酵

10

20

30

40

50

乳中の他の乳酸菌、例えば *Lactobacillus. bulgaricus* 等と共存させてもその風味を害することがないか或いはより向上させることができる。

従って、当該乳酸菌の菌体若しくは菌体培養物又はこれらの抽出物は、口腔内疾患の予防、改善又は治療剤として、或いはう蝕菌、歯周病菌及びカンジダ菌の増殖抑制剤となり得る。斯かる口腔内疾患の予防、改善又は治療剤、う蝕菌、歯周病菌及びカンジダ菌の増殖抑制剤は、それ自体で、当該口腔内の病原微生物により引き起こされる、う蝕症、歯周病、口腔カンジダ症等の口腔内疾患の予防、改善又は治療のための、或いはう蝕菌、歯周病菌及びカンジダ菌の増殖抑制のための食品、医薬品、口腔用組成物等として使用でき、或いは食品、医薬品、口腔用組成物に配合するための素材として使用可能である。また、食品は、虫歯、歯周病、その他の口腔内感染症の予防・改善等をコンセプトとし、必要に応じてその旨を表示した健康食品、サプリメント若しくは特定保健用食品等の機能性食品とすることも可能である。

10

#### 【0024】

医薬品として用いる場合の形態としては経口投与の形態が好ましく、その剤型は、例えば、液剤；錠剤、顆粒剤、細粒剤、粉剤、タブレット等の固形剤；或いは当該液剤又は固形剤を封入したカプセル剤、口腔用スプレー、トローチ等の様々な形態が挙げられる。このような種々の剤型の医薬製剤やサプリメントを調製するには、本発明の菌体や培養物の作用を妨げない範囲で、他の薬学的に許容される賦形剤、結合剤、増量剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、矯味剤、香料、被膜剤、担体、希釈剤等を適宜組み合わせ用いることができる。

20

斯かる経口投与用製剤として用いる場合の該製剤中の本発明の乳酸菌の菌体若しくは菌体培養物又はこれらの抽出物の含有量は、全組成中の1質量%～50質量%、好ましくは10質量%～20質量%である。

#### 【0025】

食品として用いる場合の形態としては、果汁又は野菜汁飲料、炭酸飲料、茶系飲料、乳飲料、発酵乳、発酵果汁、発酵野菜汁、アルコール飲料、清涼飲料等の飲料や、ゼリー状食品や各種スナック類、焼き菓子、ケーキ類、チョコレート、ジャム、パン、ガム、飴、スープ類、漬物、佃煮等の各種食品の他、上述した経口投与製剤と同様の形態（錠剤、カプセル剤、シロップ等）のサプリメント等が挙げられる。

30

#### 【0026】

本発明の乳酸菌の培養物は、そのままヨーグルト、チーズ、味噌、醤油、漬物等の発酵食品となり、斯かる発酵乳やチーズを素材として使用し、虫歯や歯周病予防、改善用のパンやスナック菓子、ケーキ等にすることもできる。

#### 【0027】

本発明の乳酸菌を利用した発酵は、予めスターターを用意し、これを発酵用原料物質に接種して発酵させる方法が好ましい。ここでスターターとしては、例えば代表的には予め通常の殺菌処理を行った発酵用原料物質、例えば酵母エキスを添加した10%脱脂粉乳などに、乳酸菌を接種して培養したものを挙げる事ができる。尚、発酵用原料物質には、必要に応じて発酵促進物質、例えばグルコース、澱粉、蔗糖、乳糖、デキストリン、ソルビトール、フラクトースなどの炭素源、酵母エキス、ペプトンなどの窒素源、ビタミン類、ミネラル類などを加えることができる。

40

乳酸菌の接種量は、一般には発酵用原料物質含有液1mL中に菌体が約 $1 \times 10^6$  cell以上、好ましくは $1 \times 10^7$  cell前後含まれるものとなる量から選ばれるのが適当である。培養条件は、一般に、発酵温度20 - 42 程度、好ましくは25 - 37 程度、発酵時間5 - 72時間程度から選ばれる。斯くして得られる乳酸発酵物は、カード状形態（ヨーグルト様形態）を有しており、このものはそのまま固形食品となり得る。該カード状形態の乳酸発酵物は、これを更に均質化することにより、所望の飲料形態とすることができる。

#### 【0028】

本発明の口腔内疾患の予防、改善又は治療剤等を口腔用組成物として用いる場合の具体

50

的な形態としては、洗口剤、マウスウォッシュ、練歯磨、粉歯磨、水歯磨、口腔用軟膏剤、ゲル剤、錠剤、顆粒剤、細粒剤、グミゼリー、トローチ、タブレット、カプセル、キャンディー、チューインガム等が挙げられ、好ましくは、練歯磨、洗口剤、グミゼリー、トローチが挙げられる。

【0029】

上記医薬品や食品への本発明乳酸菌の含有量は、特に限定されないが、一日投与量等に合わせて適宜調節すれば良いが、例えば剤型が液体の場合には、乳酸菌体濃度を  $1 \times 10^6$  cells/ml ~  $1 \times 10^8$  cells/ml とすることが好ましく、固体の場合には、 $1 \times 10^7$  cells/g ~  $1 \times 10^{10}$  cells/g とすることが好ましい。

【0030】

本発明の乳酸菌を生菌として投与する場合は、成人一人当たり、 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^{10}$  cfu / 日投与することが好ましい。

以下に、実施例及び試験例を示し、本発明についてより詳細に説明する。

【実施例】

【0031】

製造例 1 乳酸菌菌体の調製

MRS培地 (Difco社) を 121 で 20 分間滅菌した後、ラクトバチルス・ラムノーサス (Lactobacillus rhamnosus) K03株 (NITE BP-771) として、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 (住所：〒292-0818 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8) に寄託 (2009年6月10日) を接種し、37 で 48時間大気下で培養し、蒸留水・超純水・緩衝液などで洗浄後、菌体を得ることができる。

【0032】

同様に、MRS培地 (Difco社) を 121 で 20 分間滅菌した後、ラクトバチルス・カゼイ (Lactobacillus casei) YU3株 (NITE BP-772) として、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 (住所：〒292-0818 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8) に寄託 (2009年6月10日) を接種し、37 で 48時間大気下で培養し、蒸留水・超純水・緩衝液などで洗浄後、菌体を得ることができる。

【0033】

また、MRS培地 (Difco社) を 121 で 20 分間滅菌した後、ラクトバチルス・パラカセイ (Lactobacillus paracasei) YU4株 (NITE BP-775) として、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 (住所：〒292-0818 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8) に寄託 (2009年6月24日) を接種し、37 で 48時間大気下で培養し、蒸留水・超純水・緩衝液などで洗浄後、菌体を得ることができる。

尚、比較として用いた、Lactobacillus Fermentum は、前記非特許文献1に記載の、ヒト口腔内から採取された Lactobacillus Fermentum SU3株を用い、上記と同様に培養し、試験に供した。

【0034】

試験例 1 う蝕菌、歯周病菌及びカンジダ菌に対する抗菌作用

試験方法

-80 で保存した各菌株を、常温で解凍し、遠沈 (3000rpm x 5min) にて回収後、滅菌蒸留水 (MQ水) で2回洗浄し OD600で0.3 (約  $1.0 \times 10^9$  cfu/ml) に調節した。各懸濁液500  $\mu$ l を15mlのMRS Broth、もしくはBrain Heart Infusion Broth (以下BHI Broth: Difco) に接種後37 で48時間静置培養を行った。その後、3000rpm、5分間 (室温) の遠沈後、上清を回収し、抗菌アッセイに用いた。

【0035】

<被験菌株>

う蝕菌 (mutans streptococci) として、Streptococcus mutans Ingbritt、Streptococcus sobrinus B13、を用いた。これらの菌の前培養には5%のYeast Extract (Difco) を添加したTryptic Soy Broth (以下TSBY: Difco) を用いて37、24時間培養を行った。その後、MQ水で2回洗浄後、OD600で0.3 (Streptococcus mutans Ingbritt;  $1.0 \times 10^8$  cfu/ml、

10

20

30

40

50



Streptococcus sobrinus B13 ;  $1.0 \times 10^8$  cfu/ml ) に調整したものを使用した。

歯周病菌としては、Porphyromonas gingivalis 381株を用い、1%ヘミンおよび0.2%ビタミンKを添加したGAM培地を用いて37℃で7日間AneroPack (MCG) を入れた嫌気ジャー (BBL, Cookeysville, USA) ( $10\% \text{CO}_2$ ) の中で前培養を行った。その後、リン酸緩衝液 (pH 7.4 ; PBS) で2回洗浄後、OD600で0.3 (約 $0.5 \times 10^7$  cfu/ml) に調整して用いた。

また、カンジダとしては、Candida albicans MYA274、を用い、Sabouraud Dextrose Broth (Difco) を用いて37℃で24時間前培養し、MQ水で2回洗浄後OD600で0.3 (Candida albicans MYA274 ;  $1.0 \times 10^7$  cells/ml) に調整したものを用いた。

【0036】

< 抗菌アッセイ >

24穴プレートにう蝕菌に対してはTSBY、歯周病菌に対しては1%ヘミンおよび0.2%ビタミンKを添加したGAM培地またはBHI培地、カンジダに対してはSabouraud Brothを1ml、各上清1ml、OD600で0.3に調整した乳酸菌の菌懸濁液を50 $\mu$ l接種し、37℃で24時間後、濁度を測定した。コントロールとしてはTSBY、または Sabouraud Brothを1mlに、乳酸菌の前培養に用いた培地と同様の培地、すなわちMRS BrothまたはBHI Brothを1ml添加し、OD600で0.3に調整した菌懸濁液を50 $\mu$ l接種したものを用いた。また、各上清、およびコントロールにつき同様の試料を各々4つずつ作製し、平均値 $\pm$ SDを算出した。

【0037】

結果を、図1a及び1b、図2、図3a及び3b、図4a及び4bに示す。

YU3株、YU4株及びK03株は、Streptococcus mutans、Streptococcus sobrinus、Porphyromonas gingivalis、Candida albicansの何れに対しても、高い増殖抑制効果を示した。また、その抗菌力は、公知のLactobacillus Fermentum SU3株よりも優れていた。

【0038】

試験例2 バイオフィルム阻害作用

Nikawaら1996年の方法 (Nikawa, H., Nishimura, H. Yamamoto, T., Hamada, T. & Samaranayake, L.P.: The role of saliva and serum in Candida albicans biofilm formation on denture acrylic surfaces. *Microbial Ecol Health & Dis* 9, 35-48, 1996.) により、Candida albicansによるバイオフィルムアッセイを行った。義歯床用レジン (バイオレジン、松風、京都) を用い、メーカー指示の混液比にて通法通りに、50 $\times$ 50 $\times$ 0.2mmのレジン試料を重合した。これをレジンカッターにより10 $\times$ 10 $\times$ 0.2mmに切断し、バイオフィルムアッセイに用いた。

【0039】

24穴プレート底面にレジン板を置き、ヒト血清 (Type, Sigma co. human male AB plasma) を500 $\mu$ l添加し、37℃で1時間インキュベートした。その後ヒト血清を除去した。OD600で0.3に調整したCandida albicans MYA274菌株の懸濁液50 $\mu$ lを試料表面に接種し、37℃で2時間静置し、定着を促進させた。その後MRS培養上清1mlとSabouraud Brothを1ml添加し、37℃で72時間培養を行った。試料表面に形成されたバイオフィルムを壊さないようにレジン試料を静かに取り出し、400mlのMQ水で5秒間洗浄し、余剰の菌の除去を行った。レジン試料に形成されたバイオフィルム量はATPを抽出後、ルミノメーター (AB2200 ルミネッセンサー-PSN、ATTO、東京) にてATPの定量により検討を行った。なお、コントロールには乳酸菌培養上清の代わりに同量のMRS Brothを添加したものを用いた。また、各上清、およびコントロールにつき同様の試料を各々4つずつ作製し、平均値 $\pm$ SDを算出した。

【0040】

結果を図5に示す。

YU3株、YU4株及びK03株は、Candida albicans のバイオフィルム形成を強く抑制した。

【0041】

実施例1 発酵乳の製造 (1)

ラクトバチルス・ラムノーサス (Lactobacillus rhamnosus) K03株 (NITE BP-771) をMRS培地にて37℃で18時間培養し、前培養液とした。MQ水にて2回洗浄後、遠心分離し

10

20

30

40

50

て菌を回収した。市販の牛乳に「ダノンヨーグルト」(ダノンジャパン株式会社; ピフィズス菌使用)を加えたものに、洗浄した前記のK03株菌と、牛乳100mLに対して0.1~10%になるようにラクトースを添加して37℃で24時間培養し、発酵乳を得た。

なお、「ダノンヨーグルト」(ピフィズス菌使用)を少量添加し、通常の培養を行った場合に、ピフィズス菌が偏性嫌気性菌であるためヨーグルトに使用されているスターターだけが増殖すると考えられる。

#### 【0042】

##### 試験例3 発酵乳の評価(1)

被験者127名を対象に、味についてのアンケートをVisual Analogue Scale (VAS)法にて実施した。10センチの線の左端にとても美味しい、右端にとてもまずい、中央に普通と記入したスケールバーに、ヨーグルトを食べた後に記入して貰い、左端からの距離を測定して平均をとることにより、定量化した。結果を図6に示す。

また、同時に自由な意見を記載して貰った集計では、「美味しかった」、「まろやか」とであると記載した人を合わせると72%であり、本発明の発酵乳は、何れも良好な味を有していることが確認された。

#### 【0043】

##### 実施例2 発酵乳の製造(2)

乳を含む原材料を均一に混合し、加熱・殺菌する。これを冷却し、スターターとして*S. thermophilus*を用いて、*L. bulgaricus*と*L. rhamnosus* K03株を用いて、37~40℃で発酵させヨーグルト(L8020)を製造した。また、スターターとして*S. thermophilus*を用いて、*L. bulgaricus*のみによりプラセボヨーグルトを製造した。

#### 【0044】

##### 試験例4 発酵乳の評価(2)

実施例2で調製したL8020ヨーグルトを用いて、う蝕菌に対する抗菌試験を行った。

う蝕菌として、前述した*S. mutans* ingbritt株と*S. sobirinus* B13株を用いた。各菌株をTSBYにて前培養後、滅菌蒸留水にて3回洗浄し、 $1 \times 10^8$ cfu/mlに調整した。24穴プレートに1.5mLのTSBYを分注後、各ウェルに100μLの菌液を接種した。

各ヨーグルトを入れたインターセル内を24穴プレートに入れ、24時間培養後の菌量を比較した。

24時間後の菌量はATP量として測定を行った。なお同一のサンプルを4つずつ作成し、平均値±SDを求めた。結果を図7に示す。

図7(A),(B)では、グラフの縦軸にATP量(pmol/well)を示すが、Ingbritt株に対しても、B-13株に対しても、プラセボではやや増加する傾向を認めしたが、K03を添加したL8020ヨーグルトの状態でも有意な抑制効果が認められた。

#### 【0045】

##### 試験例5 発酵乳の評価(3)

実施例2で調製したL8020ヨーグルトを用いて、ヒト試験を行った。

19~25歳の被験者40名を乱数表によって2つのグループに分けた。グループ1はプラセボヨーグルト、グループ2はL8020ヨーグルトを、毎日昼食時に1つ、2週間食べ続けた。

口腔内のう蝕菌及び歯周病菌の保菌数の算定は、BMLのキットを用い唾液を採集後、う蝕菌については培養法、歯周病菌については*P. intermedia* (Pi)、*T. forsythensis* (Tf)、*F. nucleatum* (Fuso)の4菌種についてPCR-インベーター法またはインベーター法を用いて定量を行った。

唾液採取は、試食開始の3日前にガムチューイング法により5分間の刺激唾液を氷上で採取し、上記の各菌についての口腔内保菌数を算出し、上記試験の前値とした。

2週間の試食後に、同様にガムチューイング法により刺激唾液を約5mL氷上で採取し、上記の各菌についての口腔内保菌数を算出し、上記試験の効果の判定を行った結果を図8に示す。

#### 【0046】

10

20

30

40

50

図8(A)からわかるようにう蝕菌の口腔内保菌数の前値を100とした場合、プラセボヨーグルトによって60%程度まで減少した。一方、L8020ヨーグルトでは15%程度まで有意な減少を認めた。この結果よりL8020ヨーグルトを2週間摂取することによってう蝕菌の口腔内保菌を有意にかつ効果的に減少させることが明らかとなった。

図(B)からわかるように、Pi菌の口腔内保菌数の前値を100とした場合、プラセボヨーグルトによって180%程度まで増加した。一方、L8020ヨーグルトでは約50%程度まで有意な減少を認めた。この結果よりL8020ヨーグルトを2週間摂取することによってPi菌の口腔内保菌を有意にかつ効果的に減少させることが明らかとなった。

図(C)からわかるように、Tf菌の口腔内保菌数の前値を100とした場合、プラセボヨーグルトによって105%程度まで増加した。一方、L8020ヨーグルトでは約60%程度まで有意な減少を認めた。この結果よりL8020ヨーグルトを2週間摂取することによってTf菌の口腔内保菌を有意にかつ効果的に減少させることが明らかとなった。

図8(D)からわかるようにFuso菌の口腔内保菌数の前値を100とした場合、プラセボヨーグルトによって160%程度まで増加した。一方、L8020ヨーグルトでは約60%程度まで有意な減少を認めた。この結果よりL8020ヨーグルトを2週間摂取することによってTf菌の口腔内保菌を有意にかつ効果的に減少させることが明らかとなった。

なお、Pg菌については、保菌者数が少なく、有意な変化を認めなかった。

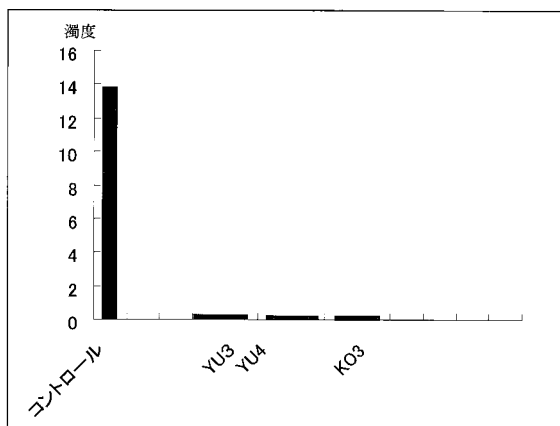
【0047】

以上の結果より、L8020ヨーグルトには、う蝕菌、歯周病菌の中のPi菌、Tf菌、歯肉縁下プラークフォーマーとして知られるFusobacterium属細菌を有意に減少させ、通常のヨーグルトと比較して、う蝕及び歯周病関連細菌に対して非常に高い効果があることが明らかとなった。

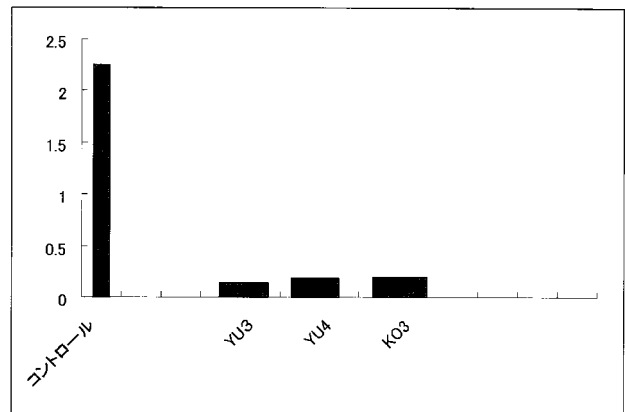
10

20

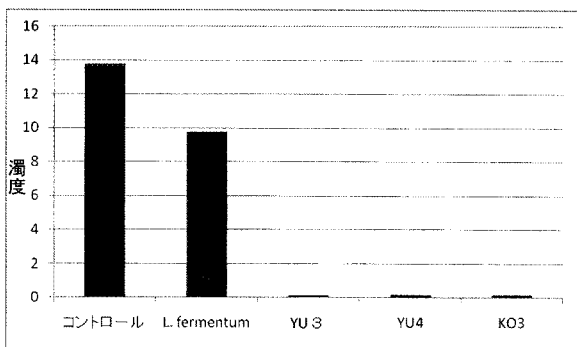
【図1a】



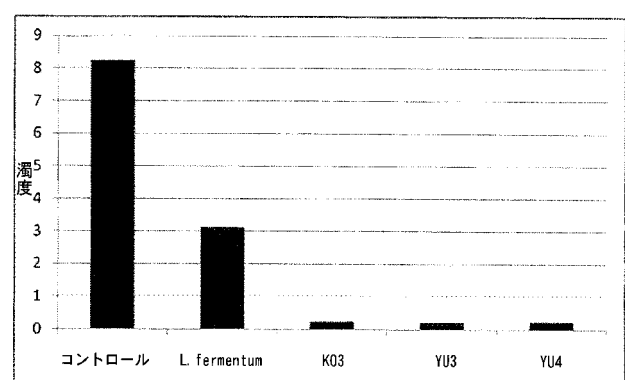
【図2】



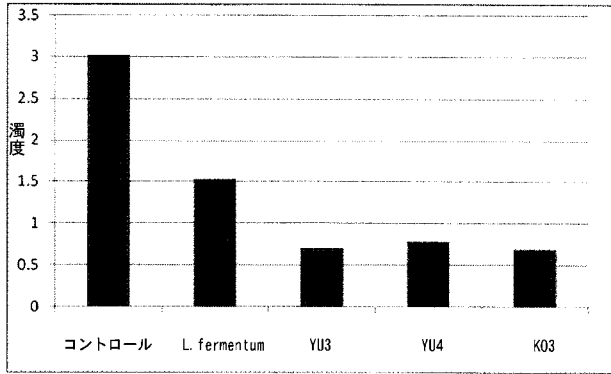
【図1b】



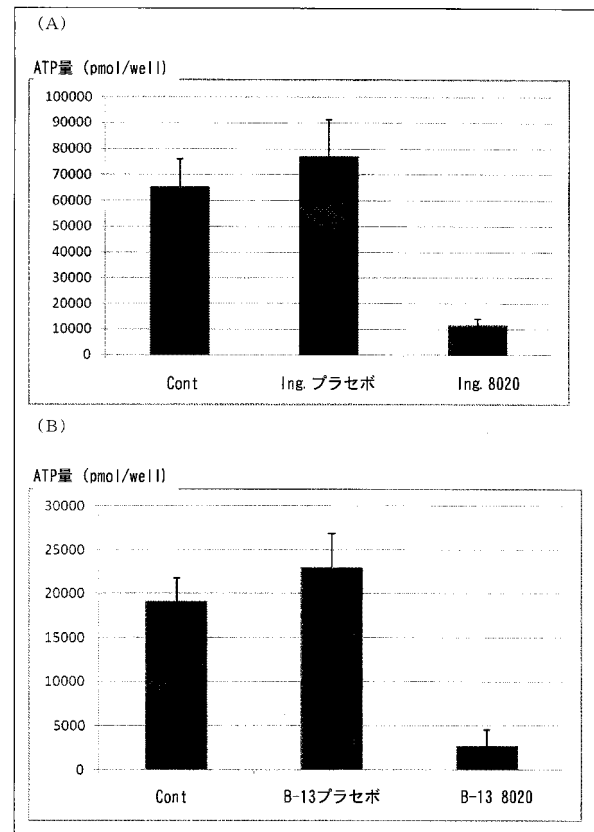
【図3b】



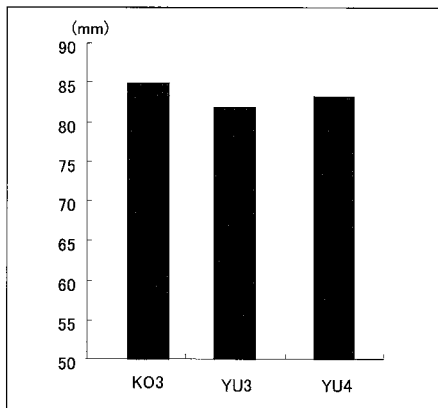
【 図 4 b 】



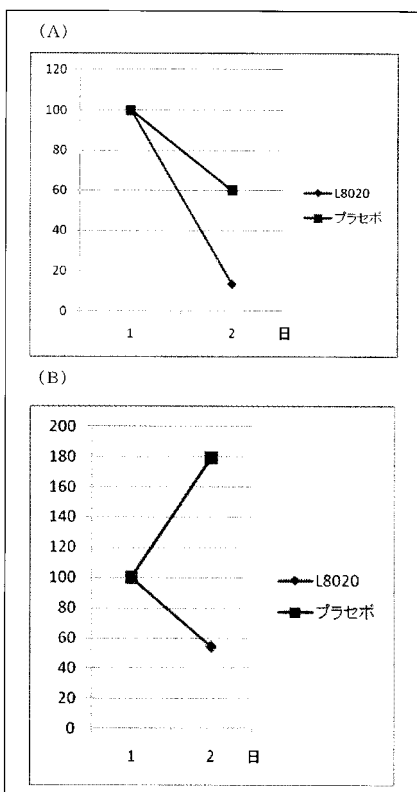
【 図 7 】



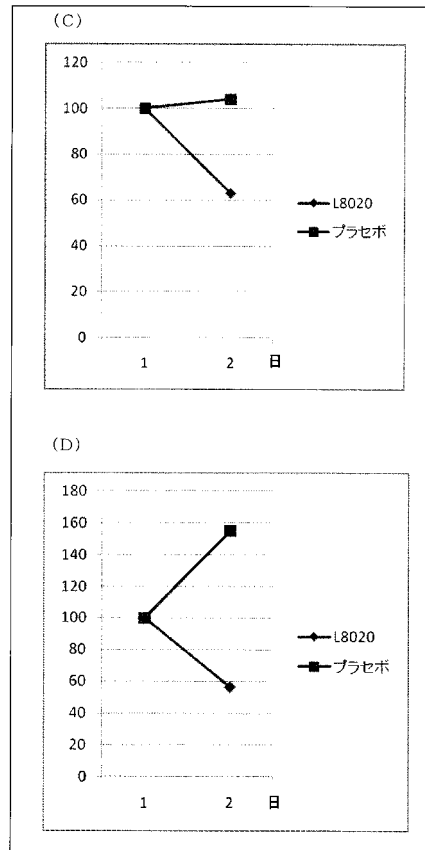
【 図 6 】



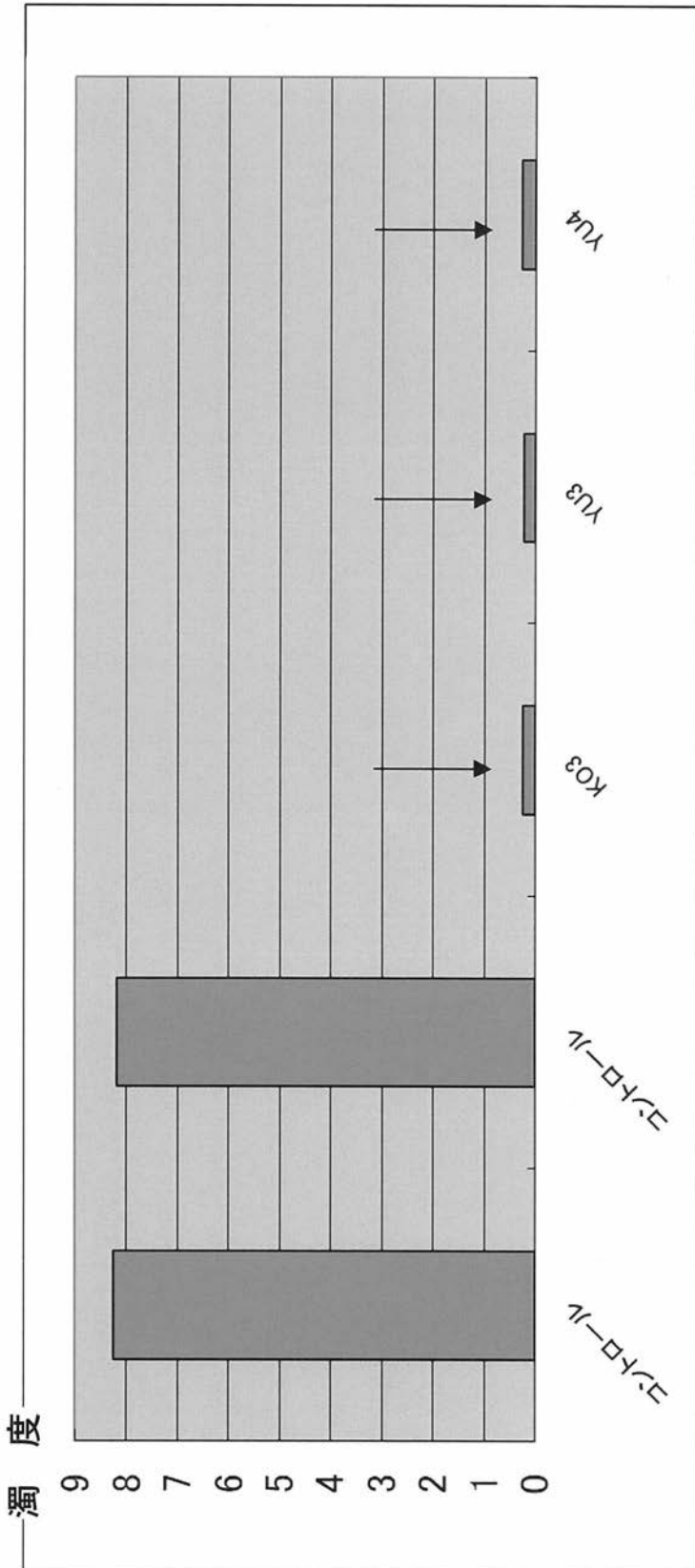
【 図 8 a 】



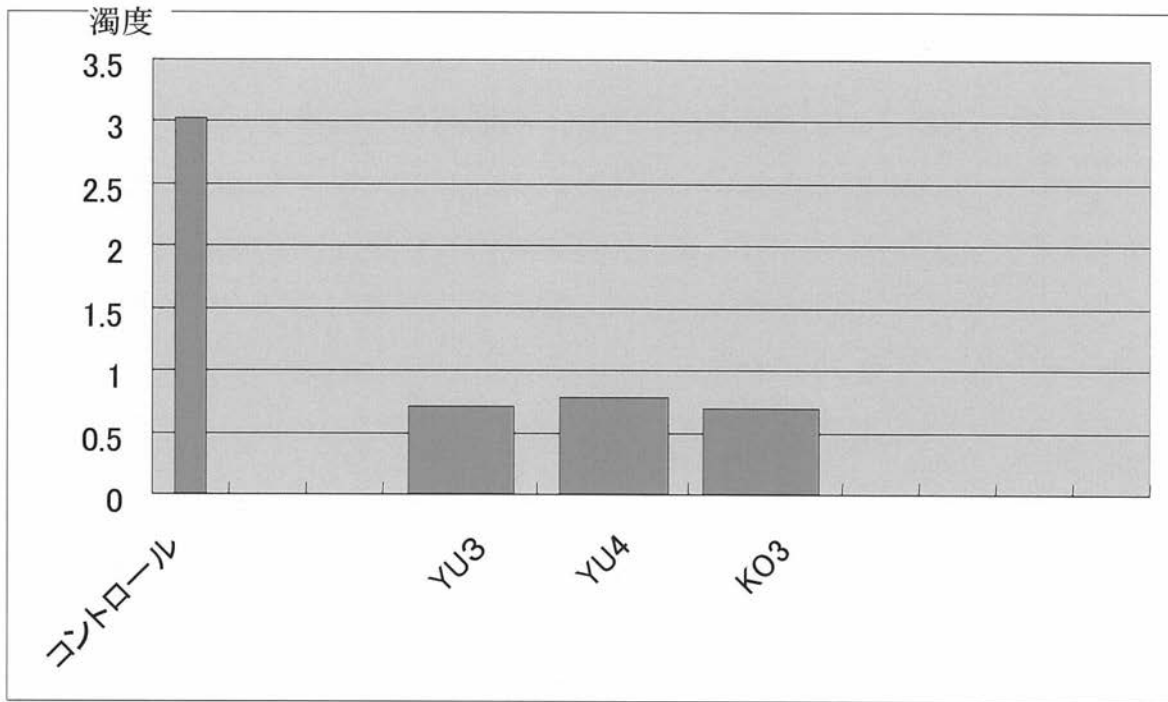
【 図 8 b 】



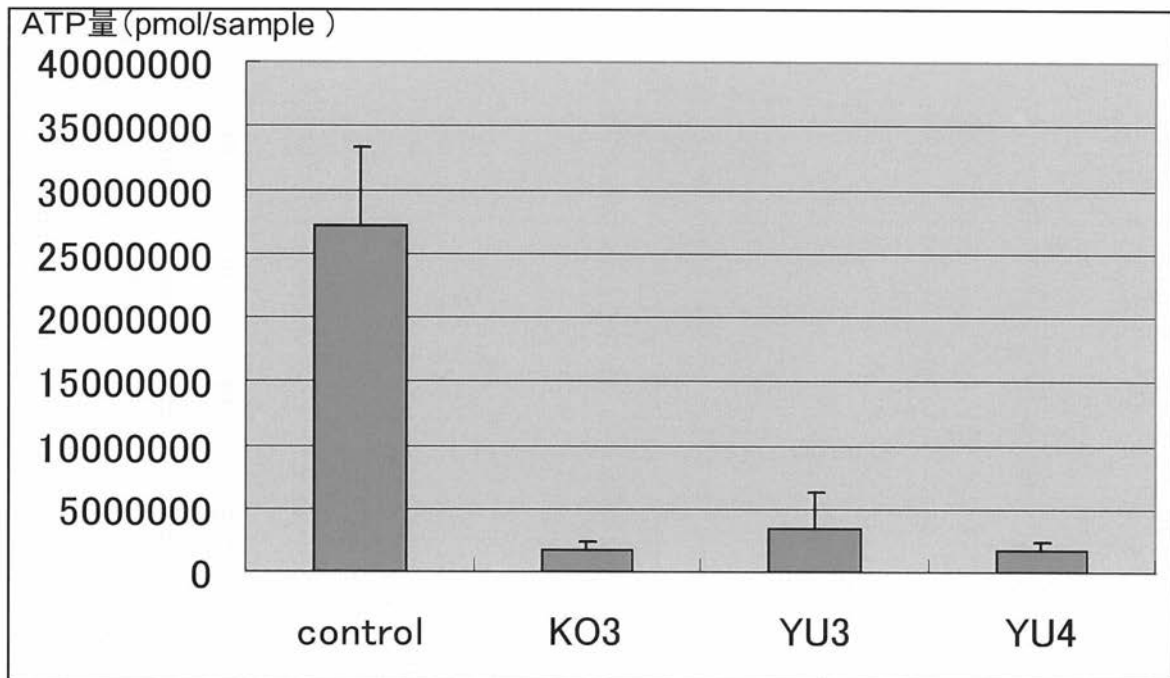
【図 3 a】



【 図 4 a 】



【 図 5 】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2010/004626
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> A61K35/74(2006.01)i, A61P1/02(2006.01)i  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K35/74, A61P1/02  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2010 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), J-DREAM II (JST)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Aya HIYAMA et al., "Koku Yurai Nyusankinkabu ni yoru mutans strepococci Oyobi Candida no Soshi Sayo", Hiroshima Daigaku Shigaku Zasshi, 2009.06, vol.41, no.1, pages 93 to 94	1-7
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 August, 2010 (30.08.10)		Date of mailing of the international search report 07 September, 2010 (07.09.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2010/004626

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 8  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
The invention set forth in the above claim involves a method for treatment of the human body by therapy, and therefore, the invention can not be recognized to be an industrially applicable invention.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.



国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2010/004626									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K35/74(2006.01)i, A61P1/02(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K35/74, A61P1/02											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2010年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2010年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2010年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2010年	日本国実用新案登録公報	1996-2010年	日本国登録実用新案公報	1994-2010年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2010年										
日本国実用新案登録公報	1996-2010年										
日本国登録実用新案公報	1994-2010年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), J-DREAM II(JST)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X	檜山あや他, 口腔由来乳酸菌株による mutans streptococci および Candida の阻止作用, 広島大学歯学雑誌, 2009.06, Vol.41 No.1, pp.93-94	1-7									
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。									
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 30.08.2010		国際調査報告の発送日 07.09.2010									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 田村 直寛	4C 4041								
		電話番号 03-3581-1101	内線 3452								

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 0 / 0 0 4 6 2 6

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求項 8 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、上記請求項に係る発明は、人を治療するための方法を包含するものであるから産業上利用することができる発明に該当しない。
2.  請求項 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求項 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2009年7月)

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 R 1/245 (2006.01)	C 1 2 N 1/20	E
	C 1 2 R 1:225	
	C 1 2 N 1/20	E
	C 1 2 R 1:245	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 二川 浩樹

広島県広島市南区霞一丁目2番3号 国立大学法人広島大学大学院医歯薬学総合研究科内

Fターム(参考) 4B018 LB07 LB08 LB10 MD86 ME09 ME14 MF01 MF13

4B065 AA30 AC20 CA41 CA44

4C087 AA01 AA02 BC56 BC57 BC61 CA09 CA10 NA14 ZA67 ZB32

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。