

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5631862号
(P5631862)

(45) 発行日 平成26年11月26日(2014.11.26)

(24) 登録日 平成26年10月17日(2014.10.17)

| | | | |
|----------------|--------------|------------------|----------------------|
| (51) Int.Cl. | | F I | |
| C 1 2 N | 1/20 | (2006.01) | C 1 2 N 1/20 A |
| C 1 2 Q | 1/68 | (2006.01) | C 1 2 Q 1/68 Z N A A |
| C 1 2 P | 17/06 | (2006.01) | C 1 2 P 17/06 |
| A 2 3 L | 1/30 | (2006.01) | A 2 3 L 1/30 Z |
| A 6 1 K | 35/74 | (2006.01) | A 6 1 K 35/74 A |

請求項の数 6 (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-501510 (P2011-501510)
 (86) (22) 出願日 平成22年2月25日(2010.2.25)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2010/001272
 (87) 国際公開番号 W02010/098103
 (87) 国際公開日 平成22年9月2日(2010.9.2)
 審査請求日 平成24年8月24日(2012.8.24)
 (31) 優先権主張番号 特願2009-42867 (P2009-42867)
 (32) 優先日 平成21年2月25日(2009.2.25)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

微生物の受託番号 IPOD FERM BP-11231

(73) 特許権者 000006884
 株式会社ヤクルト本社
 東京都港区東新橋1丁目1番19号
 (74) 代理人 110000084
 特許業務法人アルガ特許事務所
 (74) 代理人 100068700
 弁理士 有賀 三幸
 (74) 代理人 100077562
 弁理士 高野 登志雄
 (74) 代理人 100096736
 弁理士 中嶋 俊夫
 (74) 代理人 100117156
 弁理士 村田 正樹
 (74) 代理人 100111028
 弁理士 山本 博人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エコール産生細菌及びその利用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

S l a c k i a s p . Y I T 1 1 8 6 1 (F E R M B P - 1 1 2 3 1)。

【請求項2】

S l a c k i a s p . Y I T 1 1 8 6 1 (F E R M B P - 1 1 2 3 1) を含有することを特徴とする飲食用又は医薬用組成物。

【請求項3】

さらにアドニトール、アラビノース、エリスリトール、ガラクトース、ラクチトール、メレチトース、トレハロース、リボース、ソルボース、キシロース、イノシトール及びソルビトールから選ばれる1以上を含有することを特徴とする請求項2記載の組成物。

10

【請求項4】

さらにダイゼインを含有することを特徴とする請求項2又は3記載の組成物。

【請求項5】

S l a c k i a s p . Y I T 1 1 8 6 1 (F E R M B P - 1 1 2 3 1) をダイゼインに作用させることを特徴とするエコールの製造方法。

【請求項6】

配列番号1又は2記載の塩基配列若しくはそれと相補的な塩基配列からなる核酸断片。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

本発明は、エコール産生細菌及びその利用に関する。

【背景技術】

【0002】

大豆食品に多く含まれるイソフラボンは、不定愁訴等の更年期障害の改善や骨粗鬆症の予防、高脂血症や動脈硬化の予防、乳がんや前立腺がんの予防等に効果がある機能性成分として知られている。近年の研究により、イソフラボンの一つであるダイゼイン(Da id z e i n)は、体内の腸内細菌によってエストロゲン作用や抗酸化作用がより強力なエコール(E q u o l)に代謝されることが明らかになり、エコールは体内で上記の作用を奏する主要な有効成分の一つとして注目されている。

【0003】

体内でのダイゼインからエコールへの産生は全てのヒトで一律に行われるのではなく、その産生能には個人差があり、30~50%のヒトがエコール産生能を有することが報告されている(非特許文献1)。そこで、エコール産生能を有する腸内細菌の探索が精力的に行われており、エコール産生能を有する微生物として、バクテロイデス・オバタス、ストレプトコッカス・インターメディアス、ストレプトコッカス・コンステラータス(特許文献1)、ラクトコッカス・ガルピエ(特許文献2)、*S l a c k i a* s p p . T M - 30株、ビフィドバクテリウム・アドレスセンチス T M - 1株、ビフィドバクテリウム・プレーベ J C M 1273(特許文献3)、プロプリオノバクテリア・フレウンデレッキ、ビフィドバクテリウム・ラクチス、ラクトバチルス・アシドフィルス、ラクトコッカス・ラクチス、エンテロコッカス・フェシウム、ラクトバチルス・カゼイ、ラクトバチルス・サリパリウス(特許文献4)、S N U - J u l o n g 732(非特許文献2)、g r a m p o s i t i v e b a c t e r i u m d o 03(非特許文献3)が報告されている。

【0004】

しかしながら、上記で報告されている微生物はいずれも基質となるダイゼインからのエコール変換能が低いため、微生物を用いたヒト体内でのエコール産生や微生物を用いたエコールの工業的生産といった用途に用いることはできなかった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】国際公開99/7392号パンフレット

【特許文献2】国際公開2005/42号パンフレット

【特許文献3】特開2006-204296号公報

【特許文献4】特表2006-504409号公報

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】P r o c S o c E x p B i o l M e d、V o l . 217、N o . 3、p 335 - 339(1998)

【非特許文献2】A p p l E n v i r o n M i c r o b i o l、V o l . 71、p 214 - 219(2005)

【非特許文献3】J B i o s c i B i o e n g、V o l . 102、p 247 - 250(2006)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

従って本発明は、エコール変換効率が高い微生物、該微生物を利用した飲食用・医薬用組成物、該微生物を利用したエコールの製造方法、及び該微生物を特異的に検出できる核酸断片を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

10

20

30

40

50

本発明者らは上記課題を解決するため鋭意検討した結果、本発明者らが先に発明したエコーン変換能を有する微生物の選択培地を用いてエコーン産生能を有するヒトの糞便を継代培養することでエコーン変換効率が非常に高い微生物を見出すことに成功し、本発明を完成した。

【0009】

すなわち、本発明は、ダイゼインからのエコーン変換能が24時間で50%以上である微生物を提供するものである。

【0010】

また、本発明は、上記のエコーン変換能を有する微生物を含有する飲食用又は医薬用組成物を提供するものである。

【0011】

また、本発明は、上記のエコーン変換能を有する微生物をダイゼインに作用させることを特徴とするエコーンの製造方法を提供するものである。

【0012】

さらに、本発明は、上記のエコーン変換能を有する微生物を特異的に検出する核酸断片を提供するものである。

【発明の効果】

【0013】

本発明の微生物はエコーン変換効率が非常に高いことから、ヒト体内でのエコーン産生を企図した飲食品や医薬品に利用することができ、エコーンが関与する不定愁訴等の更年期障害、骨粗鬆症、高脂血症、動脈硬化、乳がん、前立腺がん、月経前症候群等の様々な疾病の治療や改善、或いはその予防等の目的に利用できる。また、エコーンの工業的生産に利用した場合は、エコーンを高濃度で回収できることから、その後の分離精製等の作業が容易となり極めて効率的にエコーンを生産することが可能となる。さらに、本発明の核酸断片を用いることで糞便や消化管内容物からエコーン変換能を有する微生物を検出することができ、核酸断片を用いてエコーン変換能を有する微生物を定量化することで、各個人が元来有するエコーン産生能を簡便に調べることが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】 *Slackia* sp. YIT 11861の分子系統樹を示す図である。図中[]はアクセッションナンバーを、数値はBootstrap値を示した。

【図2】 作製したプライマーの検出感度を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明において、エコーン変換能とは、エコーンの基質となるダイゼインを最終濃度100 μ Mとなるように添加した培地に、対象となる微生物を10⁷個/培地・mLとなるように接種し、37 $^{\circ}$ Cで一定時間保温して培地中のエコーン濃度を測定し、ダイゼインの初発濃度と比較して、次式に当てはめることにより調べることができる。

【0016】

エコーン変換能(%) = (対象とする微生物を含む培養液中のエコーン濃度) / (培養液中のダイゼインの初発濃度) \times 100

【0017】

ここで培養は、ヒト腸管内の状態を再現するために嫌気培養で行うことが好ましく、培地としてはGAM培地が好ましい。

また、エコーン濃度は、液体クロマトグラフィー、LC-MS等の常法に従って測定することができる。

本発明の「ダイゼインからのエコーン変換能が24時間で50%以上である微生物」とは上記のエコーン変換能が24時間の保温により50%以上である微生物を指す。さらに、24時間の保温で80%以上、より好ましくは100%である微生物を好適に利用することができる。また、より短時間の保温、例えば8時間の保温で50%以上である微生物

10

20

30

40

50

も好適に利用することができる。これらの一例として Slackia 属細菌を挙げることができる。

【0018】

具体的に、本発明のエコール変換能を有する微生物は、エコール変換能を有する微生物が存在する可能性のある検体を用いて、本発明者らが先に発明したエコール変換能を有する微生物の選択培地（国際公開2007/52740号パンフレット）を用いてダイゼインからのエコール変換能を確認しながら、糞便等の検体を継代培養していくことで、エコール変換能を有する微生物をスクリーニングすることができる。エコール変換能を有する微生物が存在する可能性のある検体としては、エコール産生能を有するヒト（エコールプロデューサー）の糞便や消化管内容物等が好適に用いられ、糞便は遠心洗浄処理したものを

10

【0019】

上記方法により得られたエコール変換能を有する Slackia 属細菌の一つを、Slackia sp. YIT 11861 (FERM BP-11231) として、平成21年2月3日付で、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（茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6）に寄託した。この Slackia sp. YIT 11861 の系統分類、生化学性状を次に示す。

【0020】

Slackia sp. YIT 11861 の1400bp以上の16S rRNA塩基配列を定法に従い決定し、公共DNAデータベース（DDBJ）にてFASTAプログラムを用いて相同性検索を行った。その結果、既知の Slackia 属細菌株 Slackia exigua ATCC 700122^T（アクセッションナンバー：AF101240）と本菌株の16S rRNAの相同性は92.4%であった。また、DNAデータベースより入手した他の細菌の塩基配列を多重整列後、NJ法により分子系統解析を行った結果、本菌株はコリオバクテリア科 Slackia 属に属していた。また、特許文献3に記載の Slackia spp. TM-30 および3種の人由来の未培養菌（アクセッションナンバー；EF071271, DQ797152, AY916234）と99%以上の相同性を有しており、一群のクラスターを形成していた。

20

【0021】

生化学的性状は、アルカリホスファターゼが陽性を示した点、アルギニンアリルアミダーゼ、プロリンアリルアミダーゼ、フェニルアラニンアリルアミダーゼ、ロイシンアリルアミダーゼ、チロシンアリルアミダーゼ、アラニンアリルアミダーゼ、グリシンアリルアミダーゼ、ヒスチジンアリルアミダーゼ、セリンアリルアミダーゼが陰性を示した点で S. exigua ATCC 700122^T と異なっていた。また、D-マンノース、D-ラフィノースの資化性、アルカリホスファターゼが陽性を示した点において Slackia spp. TM-30 と異なっていた。以上のことから、Slackia sp. YIT 11861 は既報の株とは異なることが判明した。

30

【0022】

本発明のエコール変換能を有する微生物を含有する飲食用又は医薬用組成物は、体内、血中、大腸内等の腸内等におけるエコール濃度上昇剤として利用でき、不定愁訴等の更年期障害、骨粗鬆症、高脂血症、動脈硬化、乳がん、前立腺がん、月経前症候群等のイソフラボンが関与する様々な疾病の治療や改善、或いはその予防等の目的に利用できる。特に、エコール産生能を有さないヒト（エコール非プロデューサー）やエコール産生能が低いヒトに使用することでイソフラボンが関与する様々な疾病を日常的に予防することができる。また、不定愁訴等の更年期障害や骨粗鬆症、発がんのリスクが高まる中年期や老年期のヒトに好適に利用することができる。

40

【0023】

ここで、本発明のエコール変換能を有する微生物の利用形態は特に制限されず、生菌又は加熱菌体（死菌体）のいずれでもよく、また凍結乾燥したものであってもよく、培養上清等の培養物、菌体処理物等を利用することもできる。なお、エコール変換能は細菌由来

50

の酵素により発揮されると考えられるので、酵素の活性を失活させない状態で利用することが望ましい。

【0024】

本発明の組成物には、アドニトール、アラビノース、エリスリトール、ガラクトース、ラクチトール、メレチトース、トレハロース、リボース、ソルボース、キシロース、イノシトール、ソルビトールを含有させてもよい。これら糖類は、エコール変換能を有する微生物を選択的に維持・増殖させたり、或いは微生物のエコール変換能を亢進する作用を有し、エコール濃度上昇作用を有するため、本発明のエコール変換能を有する微生物と併用することでより優れたエコール濃度上昇剤として利用できる。糖類は、単独で用いてもよく、又は2種類以上組み合わせ用いてもよい。これらの糖類は、D体L体のいずれを用いてもよいが、好ましくは、D体である。また、無水物、5水和物等の水和物を用いることもできる。

10

【0025】

トレハロースには、2分子のグルコースの結合様式の相違により、 α 体、 β 体及び γ 体の異性体が存在し、いずれの異性体も用いることができるが、好ましくは α 体である。イノシトールには、9種類の立体異性体(myo-イノシトール、D(+)-イノシトール、L(-)-イノシトール、muco-イノシトール、scyllo-イノシトール、cis-イノシトール、epi-イノシトール、allo-イノシトール、neo-イノシトール)が存在する。天然にはmyo-イノシトール、D(+)-イノシトール、L(-)-イノシトール、muco-イノシトール、scyllo-イノシトールが存在するが、入手し易さの観点から、myo-イノシトールを使用することが好ましい。当該イノシトールは2種以上の立体異性体を併用することができる。

20

【0026】

糖類は、合成品や天然由来抽出物等の市販品を使用してもよく、また、これらの糖類を多く含む天然由来素材として使用してもよい。具体的に、アドニトールを多く含む素材としては、植物の根やリボフラビン含有素材が挙げられ、ソルボースを多く含む素材としては植物の果実などが挙げられ、メレチトースを多く含む素材としては植物の蜜や分泌液が挙げられ、トレハロースを多く含む素材としてはキノコ類が挙げられる。

【0027】

本発明の組成物にダイゼインを含有させてもよい。ダイゼインはエコールの基質となるため、本発明のエコール変換能を有する微生物や上記の糖類と併用することでさらに優れたエコール濃度上昇剤として利用できる。ダイゼインは合成品や天然由来抽出物等の市販品を使用してもよく、ダイゼインを多く含む天然由来素材やその加工品を使用してもよい。具体的に、ダイゼインを多く含む素材としては大豆、えんどう豆、葛、クローバー等が挙げられ、これらの加工品としては例えば、豆腐、豆乳、油揚げ、納豆、醤油、味噌、テンペ等が挙げられる。イソフラボン配糖体は体内の腸内細菌の働きによりアグリコン化されるため、ダイゼインは、その配糖体化合物であるダイジン、マロニルダイジン、アセチルダイジン等の形態として使用することもできる。また、ダイゼインからのエコール変換における中間代謝物であるジヒドロダイゼイン等を使用することもでき、本明細書の「ダイゼイン」にはこれらの配糖体や中間代謝物も含まれる。

30

40

【0028】

本発明のエコール変換能を有する微生物を含有する飲食用又は医薬用組成物を使用する場合の投与量に厳格な制限はなく、対象者や適用疾患等の様々な使用態様によって得られる効果が異なるため、適宜投与量を設定することが望ましい。微生物量としては生菌換算で1日当たり 10^5 個 $\sim 10^{10}$ 個の投与が好ましく、特に 10^6 個 $\sim 10^9$ 個が好ましい。また組成物における糖類の含量は0.5 ~ 50 質量%、さらに1 ~ 10 質量%、ダイゼインの含量はダイゼイン換算で5 ~ 2000 μ M、さらに100 ~ 800 μ Mとするのが好ましい。

【0029】

本発明の組成物は、経口投与又は非経口投与のいずれも使用できるが、経口投与が好ま

50

しい。投与に際しては、有効成分であるエコール変換能を有する微生物を含有する組成物を経口投与、直腸内投与、注射等の投与方法に適した固体又は液体の医薬用無毒性担体と混合して、慣用の医薬品製剤の形態で投与することができる。

【0030】

このような製剤としては、例えば、錠剤、顆粒剤、散在、カプセル剤等の固形剤、溶液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤、凍結乾燥剤等が挙げられる。これらの製剤は製剤上の常法により調製することができる。上記の医薬用無毒性担体としては、例えば、澱粉、デキストリン、脂肪酸グリセリド、ポリエチレングリコール、ヒドロキシエチルデンプン、エチレングリコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、アミノ酸、ゼラチン、アルブミン、水、生理食塩水等が挙げられる。また、必要に応じて、安定化剤、湿潤剤、乳

10

【0031】

また、本発明の飲食用組成物は、そのまま、又は種々の栄養成分を加えて、飲食品中に含有せしめればよい。本発明の飲食用組成物は、体内のエコール濃度を上昇させる目的、或いは不定愁訴等の更年期障害、骨粗鬆症、高脂血症、動脈硬化、乳がん、前立腺がん、月経前症候群等の改善、予防等に有用な保健用食品又は食品素材として利用でき、これらの飲食品又はその容器には前記の効果を有する旨の表示を付してもよい。具体的に本発明の組成物を飲食品とする場合は、飲食可能な添加剤を適宜使用し、慣用の手段を用いて食用に適した形態、例えば、顆粒状、粒状、錠剤、カプセル、ペースト等に成形してもよく、また種々の食品、例えば、ハム、ソーセージ等の食肉加工食品、かまぼこ、ちくわ等の

20

【0032】

本発明のエコール変換能を有する微生物をダイゼインに作用させることで、効率的にエコールを製造することができる。エコール変換能を有する微生物の形態は特に制限されず、生菌又は加熱菌体（死菌体）のいずれでもよく、また凍結乾燥したものであってもよく、培養上清等の培養物、菌体処理物等を利用することができるが、エコール変換能は細菌由来の酵素により発揮されると考えられるので、酵素の活性を失活させない状態で利用することが望ましい。本発明の微生物は、従来公知のエコール産生菌と比較してエコール変換能が非常に高いため、収率よく低コストでエコールを製造することができる。

30

【0033】

具体的には、培地にダイゼインを $10 \sim 1000 \mu\text{M}$ となるように添加し、本発明のエコール変換能を有する微生物を $10^6 \sim 10^{10}$ 個/培地・mLとなるように接種し、37で8時間以上、嫌気培養することで、エコールを製造することができる。この培地には、アドニトール、アラビノース、エリスリトール、ガラクトース、ラクチトール、メレチトース、トレハロース、リボース、ソルボース、キシロース、イノシトール及びソルビトールから選ばれる1以上のエコール濃度上昇作用を有する糖類を1～10質量%添加するのが好ましく、その他の窒素源等の適当な成分を加えて使用してもよいが、本発明のエコール変換能を有する微生物の増殖を阻害したり、エコール変換能を阻害する成分の使用

40

【0034】

基質となるダイゼインは合成品や天然由来抽出物等の市販品を使用してもよく、ダイゼインを多く含む天然由来素材やその加工品を使用してもよい。また、ダイゼインは、その配糖体化合物であるダイジン、マロニルダイジン、アセチルダイジン等の形態で使用する

50

こともでき、この場合はイソフラボン配糖体をアグリコン化する作用を有する公知の微生物（ピフィドバクテリウム等）や酵素（ α -グルコシダーゼ等）を本発明の微生物と併用すればよい。

【0035】

本発明のエコール変換能を有する微生物による培養以外に、微生物由来のエコール変換能を有する酵素を作用させることもできる。その使用方法に特に制限はないが、具体的には、培養物をそのまま用いる方法、培養物を遠心分離や膜処理等により濃縮して培養物濃縮液あるいはペレットとして使用する方法、静止菌体として使用する方法、乾燥菌体として使用する方法、菌体破砕物として使用する方法、粗酵素溶液として使用する方法、精製酵素溶液として使用する方法、酵素粉末として使用する方法等が挙げられる。

10

【0036】

酵素の精製条件、精製度に特に制約はなく、一般的な精製手法を用いることができる。エコール変換能を有する微生物を培養した後、遠心分離、有機膜、無機膜等の分離手段で菌体を分離し、培養上清中に当該酵素が含まれる場合にはこれを回収し、粗酵素溶液とすることができる。また菌体内に当該酵素が含まれる場合は菌体をホモジナイザーや超音波処理により物理的に破砕する、もしくは細胞壁溶解酵素等を用いて酵素的に処理することにより、菌体内抽出液を得、粗酵素溶液とすることができる。これらの粗酵素溶液を硫酸塩析処理、透析、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等を適宜組み合わせることにより、精製度の高い精製酵素溶液としてもよい。

20

【0037】

エコール変換能を有する微生物や微生物由来のエコール変換能を有する酵素は、一般的な固定化の手法を用いて固定化したものを用いてもよい。固定化の手法としては、担体結合法、架橋法、包括法等が挙げられるが、これに制限されるものではない。担体結合法としては共有結合法、イオン結合法、物理的吸着法、架橋法としてはグルタルアルデヒド法、包括法としては格子型包括法とマイクロカプセル型包括法が例として挙げられる。より具体的には、活性炭、おがくず等へ吸着させる方法、CM-セルロース、P-セルロース、DEAEセルロース、ECTEOLA-セルロース等へ結合させる方法、グルタルアルデヒド、トリレンジイソシアナート等により架橋する方法、アクリルアミド、カラギーナン、アルギン酸、ゼラチン、酢酸セルロース等により包括させる方法が挙げられる。また、固定化した細菌あるいは酵素をバッチ式、カラム式等の一般的に利用される方法で使用することができ、これらは単回、繰り返し、あるいは連続使用することができる。

30

【0038】

上記の方法により製造したエコールは、培養上清等のエコール含有培養物をそのまま用いてもよく、カラムクロマトグラフィー、有機溶媒抽出等の常法に従って培養物からエコールを分離精製してもよい。得られた培養物をイオン交換カラムに吸着させた後、メタノールで溶出させて、エコール精製物とすることができる。

【0039】

本発明のエコール変換能を有する微生物のDNA及び/又はRNAに特異的にハイブリダイズしうる核酸断片は、本発明者らがシーケンスを行って得た *Slackia* sp. YIT 11861 の塩基配列とデータベース（DDBJ、Genbank等）とを比較・検討することにより得た。本発明の核酸断片を作成するにあたり、そのターゲットには系統分類の指標として信頼性の高い16S rRNA 遺伝子を用い、分析にはPCR法等の手段が必要になるため、RNAではなくDNAを用いた。

40

【0040】

核酸断片の設計の際には、標的とするエコール変換能を有する *Slackia* 属細菌とその近縁の菌の16S rRNA 塩基配列とでアライメントを行った。すなわち、現在の遺伝子配列を指標とした分類体系に基づいてコリオバクテリア科に属する近縁菌種（アトポビウム属、コリンセラ属など）を選択し、アライメントを行った。その結果、配列番号1又は2記載の塩基配列からなる核酸断片が得られた。目的細菌のDNA及び/又はRN

50

Aに特異的にハイブリダイズしうる核酸断片としては、かくして設計された配列のみならず、公知の技術常識にのっとれば適宜想定することができ、当該塩基配列と相補的な塩基配列からなる核酸断片、又はそれらと相同な塩基配列からなり且つ機能的に等価である核酸断片が挙げられる。ここで、それらと相同な塩基配列からなり且つ機能的に等価である核酸断片としては、例えば以下の(a)~(c)に示す核酸断片であって、目的微生物の検出や同定、定量に用いることができるものが挙げられる。

(a) 配列番号1又は2で示される塩基配列若しくはそれと相補的な塩基配列からなる核酸断片において、1又は数個、好ましくは1乃至10個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなる核酸断片。

(b) 配列番号1又は2で示される塩基配列若しくはそれと相補的な塩基配列と90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは99%以上の同一性を有する塩基配列からなる核酸断片。

(c) 配列番号1又は2で示される塩基配列若しくはそれと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列からなる核酸断片。

【0041】

なお、ここで塩基配列の同一性は、GENETYX(R)のホモロジー解析プログラムを用いることにより算出される。また、「ストリンジェントな条件」としては、例えば、50%ホルムアミド、5×SSC、5×デンハルト溶液及び250mg/mLサケ精子DNAを含む溶液に42℃で16~24時間恒温し、ハイブリダイズさせる条件が挙げられる。

【0042】

上記のように設計した核酸断片は、その塩基配列に従い、DNA合成機により人工的に合成することができる。その特異性は以下の実施例に示す、核酸断片をプライマーとして用いた場合の18株の近縁種(Atopobium fosses JCM 9981^T, Atopobium minutum JCM 1118^T, Atopobium parvulum JCM 10300^T, Atopobium rimae JCM 10299^T, Atopobium vaginae DSM 15829^T, Collinsella aerofaciens ATCC 25986^T, Collinsella intestinalis JCM 10643^T, Collinsella stercoris JCM 10641^T, Cryptobacterium curtum DSM 15641^T, Denitrobacterium detoxificans CCUG 47027^T, Eggerthella hongkongensis JCM 14552^T, Eggerthella lenta ATCC 25559^T, Eggerthella sinensis JCM 14551^T, Olsenella profusa JCM 14553^T, Olsenella uli JCM 12494^T, Slackia exigua JCM 11022^T, Slackia faecicanis JCM 14555^T, Slackia heliotrinireducens JCM 14554^T)に対するアンプリコンの有無ならびに代表的な腸内細菌種および病原菌種27株のアンプリコンの有無を指標として確認した。結果として、特異性に問題はなかった。

【0043】

本発明の核酸断片はエコー変換能を有する微生物に特異的であるので、ヒトや動物の糞便や消化管内容物から得たDNAやRNAを対象としたPCR反応、或いはFISH(Fluorescence in situ hybridization)等を行うことで、エコー変換能を有する微生物を特異的に検出、同定、定量することができる。エコー変換能を有する微生物を定量化することで、各個人が元来有するエコー産生能を簡便に調べることが可能となり、エコーが関与する不定愁訴等の更年期障害、骨粗鬆症、高脂血症、動脈硬化、乳がん、前立腺がん、月経前症候群等の様々な疾病の罹患リスクを把握することができ、エコー産生能が無いヒトや低いヒトに対して本発明の組成物を投与する等の予防策を効果的に講じることができる。また、これら疾病に罹患しているヒ

10

20

30

40

50

トでエコー産生能が無いヒトや低いヒトに対しても、本発明の組成物を投与する等して、疾病の治療や改善に役立てることができる。

【0044】

PCRあるいはRT-PCRを用いる分析方法は、例えば(1)検体中のDNA又はRNAを抽出する工程、(2)上記核酸断片の1以上を用いてPCRあるいはRT-PCRを行う工程、及び(3)工程(2)により増幅されたDNA断片を検出する工程により行うことができる。検体由来の鋳型DNA(鋳型がRNAの場合はcDNA)に本発明の核酸断片を組み合わせ、増幅反応を行うことにより、標的とするSlackia属細菌に特異的なDNA断片(PCR産物)を得ることができる。このようにして得られたDNAを電気泳動すれば、バンドの有無から標的とするSlackia属細菌を特異的に検出、同定することができる。

10

【0045】

また、鋳型のDNA又はRNA(cDNA)を段階希釈しPCRを行えば、Slackia属細菌の定量化も可能である。PCRを用いて定量を行う際は、上記方法の他、リアルタイムPCR(Real-time PCR)を用いる方法がより好ましい。PCRにより増幅されるPCR産物量を経時的に観察し、一定のDNA量に達した時のPCRサイクル数を特定することにより、検体中のSlackia属細菌の定量が可能となる。

【0046】

増幅されるPCR産物の経時的な観察は、PCR産物をSYBR(R)Green I等のインターカレーター性蛍光色素により標識し、各PCR段階での蛍光強度を測定することにより行うことができる。インターカレーター性色素は二本鎖核酸にインカレーションすることで蛍光強度が増加する性質を有することから、標的細菌のDNA(RNAの場合はcDNA)からPCR反応により生成するPCR産物を正確に測定することができ、特にSYBR(R)Green Iが好適に用いられる。

20

【0047】

任意に設定された一定の蛍光強度(DNA量)に達した時のPCRサイクル数(以下 C_T 値とする)を特定することにより、検体中の標的細菌の定量、或いは検出・同定が可能となる。また、蛍光色素により標識したTaqManプローブやMolecular Beacon等を使用することにより行うこともできる。TaqManプローブやMolecular Beaconは、PCRにより増幅される領域の内部配列と相同性を有するオリゴヌクレオチドに蛍光色素とクエンチャーを結合させたプローブであり、PCR反応に共存させて用いる。プローブに結合した蛍光色素とクエンチャーの相互作用でPCR増幅反応に応じた蛍光を発するため、各PCR段階での蛍光強度を測定することにより増幅されるPCR産物の経時的な観察を行うことができる。

30

【0048】

検体中の標的とするSlackia属細菌の定量、或いは検出・同定は、培養法等により計測した細菌数の対数値と C_T 値の検量線により求めることができる。すなわち、標的とする細菌数の対数値を横軸に、 C_T 値を縦軸にプロットした検量線を予め作成し、PCR反応の結果得られた C_T 値を該検量線に適用して、検体中の標的とするSlackia属細菌の定量、或いは検出・同定を行う。

40

【0049】

本発明の核酸断片は、上記のPCR法においてプライマーとして用いる他、単独でもプローブとして使用でき、これらは他の公知のユニバーサルプライマー、オリゴヌクレオチド等と組み合わせて用いることもできる。

【0050】

本発明の核酸断片をプローブとして用いる分析方法としては、例えばインサイチュハイブリダイゼーション(in situ hybridization)、ドットプロットハイブリダイゼーション(dot blot hybridization)等が挙げられ、中でもインサイチュハイブリダイゼーションは検体中の核酸を抽出する工程を必要としないため迅速な手法として好ましく、蛍光物質により標識した核酸断片をプローブとし

50

て用いるFISHがより好ましい。

【0051】

FISHは、具体的には、(1)検体をホルムアルデヒド或いはホルマリンにより固定する工程、(2)固定した検体をスライドガラス又はメンブレンフィルターに塗抹する工程、(3)蛍光標識した核酸断片によりハイブリダイゼーションを行う工程、(4)ハイブリダイゼーション後の余分な核酸断片及び非特異的に結合した核酸断片を洗浄する工程、及び(5)ハイブリダイズ後の結果について蛍光顕微鏡を用いて肉眼的に観察、或いはCCDカメラ等により画像として取得する工程により行うことができる。

【0052】

検体中に標的とするSlackia属細菌が存在する場合は、用いた核酸断片とハイブリダイズし、上記ハイブリダイズ後の結果におけるシグナルが陽性となるので、これらの細菌を特異的に検出し、同定することができる。また、それを計数することにより、定量化も可能となる。

【0053】

以下、試験例及び実施例を挙げて本発明の内容をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらにより何ら制約されるものではない。

【実施例】

【0054】

試験例1 エコール変換能を有する細菌の取得

健全エコールプロデューサーの新鮮排泄便をガラスビーズ(3mm)存在下で10倍容の嫌気状態の希釈液(KH_2PO_4 0.00255%, K_2HPO_4 0.00255%, NaCl 0.006%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.00255%, CaCl_2 0.000255%, MgSO_4 0.000255%, 0.1%レサズリン溶液0.1%, 8% Na_2CO_3 溶液2.2%, L-システイン塩酸塩0.05%)に良く懸濁し、滅菌ガーゼを用いて残渣を除去した。8,000xg、10分の遠心分離を行い、沈殿を同量の同希釈液にて懸濁した。この状態で-30にて凍結保存した。使用時に解凍した糞便希釈液を8,000xg、10分の遠心分離を行い、得られた沈殿についてソルボースを糖源としたPY培地(ペプトン0.5%、トリプチケースペプトン0.5%、イーストエキス1%、ヘミン0.00005%、ビタミンK1 0.0001%、L-システイン塩酸塩0.05%、 KH_2PO_4 0.0006%、 K_2HPO_4 0.0006%、 NaCl 0.0012%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.0006%、 CaCl_2 0.00006%、 MgSO_4 0.00006%)に懸濁した。37、混合ガス($\text{N}_2:\text{H}_2:\text{CO}_2=88:7:5$)存在下で24~48時間インキュベートした。これを7代まで継代した培養物について、同培地を用いて 10^6 倍希釈液を調整した。この希釈液50 μL について、それぞれ20枚のGAM(1%glucose加)寒天平板培地に塗抹した。それらを37、72h、嫌気グローブボックス内でインキュベートしコロニーを形成させた。得られたコロニーについて、コロニー性状(表面性状、大きさ)およびグラム染色像から、26種類に分類した。それぞれの代表コロニーについて終濃度100 μM のダイゼインを含むGAM(1%glucose加)液体培地に植菌した。37、24h、混合ガス($\text{N}_2:\text{H}_2:\text{CO}_2=88:7:5$)存在下でインキュベートした培養液についてHPLCにてエコール濃度を測定した結果、高いダイゼイン-エコール変換能を有するグラム陽性桿菌を見出した。なお、HPLC条件は次の条件で行った。

【0055】

装置:LCモジュール1(Waters)

カラム:YMC-Pack CN(Y.M.C製)

検出:紫外吸光度計(測定波長280nm)

カラム温度:40

移動相:0.1%蟻酸溶液/アセトニトリル/メタノール(87:3:10)混液

流量:2.5mL/min

10

20

30

40

50

サンプル注入量：10 μl

【0056】

試験例2 エコール変換能を有する細菌の分子系統解析、生化学性状試験

試験例1で単離した細菌ゲノムを鋳型として、プライマー27f(配列番号3)および1552r(配列番号4)を用いて、16S ribosomal RNA(16S rRNA)を標的にPCRを行い、約1500bpの増幅産物を得た。それを鋳型として、シーケンシングPCRを行った。シーケンシングPCRには、BigDye(R) Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems)を用い、製品マニュアルに準じた方法で行った。シーケンサーには、AB 3130ジェネティックアナライザ(Applied Biosystems)を用いた。16S rRNA配列の分子系統解析および相同性解析には、Clustal X v1.83、TreeView v1.6.6およびGENETIX(R) Ver.7(株式会社ゼネティックス)を用いた。その結果、本菌株はコリオバクテリア科に属することが明らかとなった(図1)。Slackia exigua ATCC 700122^Tが系統的に最も近縁な既存の菌種であったが、相同性は低値を示した(92.4%)。特許文献3記載のSlackia spp. TM-30とは99%以上の相同性を有しており、データベース上に登録されている未培養菌株と併せて一群のクラスターを形成していた。このことから本菌株とSlackia spp. TM-30は同種である可能性が示された。

本菌株および16S rRNA配列解析より既存種で最も系統的に近いS. exigua ATCC 700122^Tについて、ラピッドID 32A(シスメックス・ピオメリユ株式会社)を用いて生化学性状を調べた。供試菌の培養には、GAM(1% glucose加)寒天培地を用い、37℃にて24時間、嫌気条件下で培養した。なお、同定キット1つにつき2枚分のGAM(1% glucose加)寒天培地を用いた。キットへの供試菌液の調整、反応そして判定は、キット附属のマニュアルに従った。その結果を表1に示した。エコール変換能を有する細菌は、ラピッドID 32Aにおいて、S. exigua ATCC 700122^Tとは大きく異なる性状を示した。また、エコール変換能を有する細菌は、ラピッドID 32AでD-マンノース、D-ラフィノースの資化性、アルカリホスファターゼが陽性を示した点において特許文献3に記載のSlackia spp. TM-30の生化学性状と異なっていた。したがって、既報の株とは異なる事が明らかとなった。以上の分子生物学的および生化学性状試験結果より本菌株は、Slackia属に含まれる新規な株と考えられ、Slackia属細菌YIT 11861(Slackia spp. YIT 11861)と命名した。

【0057】

【表1】

ラピッドID 32Aによる生化学性状の比較

| | ウレアーゼ | アルギニンジヒドロラーゼ | α-ガラクトシダーゼ | β-ガラクトシダーゼ | β-ガラクトシダーゼ-6-フォスフェート | α-グルコシダーゼ | β-グルコシダーゼ | α-アラビノシダーゼ | β-グルクロニダーゼ | N-アセチル-β-グルコサミニダーゼ | D-マンノース | D-ラフィノース | グルタミン酸チカルホキシラーゼ | α-フコシダーゼ | 硝酸還元 | インドール | アルカリホスファターゼ | アルギニンアリアミダーゼ | プロリンアリアミダーゼ | ロイシルグリニンアリアミダーゼ | フェニルアラニンアリアミダーゼ | ロイシン アリアミダーゼ | ピログルタミン酸アリアミダーゼ | チロシンアリアミダーゼ | アラニンアリアミダーゼ | グリシンアリアミダーゼ | ヒスチジンアリアミダーゼ | グルタミン酸アリアミダーゼ | セリンアリアミダーゼ | |
|------------------------------------------------|-------|--------------|------------|------------|----------------------|-----------|-----------|------------|------------|--------------------|---------|----------|-----------------|----------|------|-------|-------------|--------------|-------------|-----------------|-----------------|--------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|--------------|---------------|------------|---|
| <i>Slackia</i> sp. YIT 11861 | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Slackia exigua</i> ATCC 700122 ^T | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | + | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | - | + |
| <i>Slackia</i> spp. TM-30* | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

10

20

*特許文献3より転載

【0058】

試験例3 *Slackia* sp. YIT 11861のダイゼイン-エコール変換活性 *Slackia* sp. YIT 11861についてダイゼイン-エコール変換活性を調べた。ダイゼイン濃度を100、400 μMとしたGAM培地に、10⁷個/培地・mLとなるように本菌を接種し、37℃で保温した。経時的に培養液中のエコール濃度をHPLCにて測定し、ダイゼイン-エコール変換活性を測定した。

結果を表2に記載した。併せて、特許あるいは論文で公表されている菌株の活性を調査し比較した。その結果、*Slackia* sp. YIT 11861は、100 μMのダイゼインを8時間のインキュベートで95%、24時間で100%、400 μMのダイゼインを24時間で94%、96時間では100%エコールに変換した。一方、gram positive bacterium do-03株(非特許文献3)では193 μMのダイゼインを48時間で33%(初発菌体濃度:未記載、最終菌体濃度:OD₆₆₀ = 0.277、これより10⁶~10⁸個/mL・培地と推定される)、TM-30株では、391 μMのダイゼインを24時間でわずか1%程度(初発菌体濃度:未記載、最終菌体濃度:10⁹個/培地・mL)、また*L. gariviae* 92-90株ではわずか42 μMのダイゼインを100%エコールに変換するのに72時間を要し、24時間でのエコール変換は0%であった(初発菌体濃度:10⁷個/培地・mL)。以上のことから、*Slackia* sp. YIT 11861のダイゼイン-エコール変換活性は、既存の菌株に比べ非常に高い活性を有していることが明らかとなった。

30

40

【0059】

【表2】

Slackia sp. YIT 11861のダイゼイン-エコール変換活性および既報株との比較

| Strain | Condition of reaction | | | Concentration of isoflavone (μM) | | | Daidzein to equol conversion rate (%) | Reference |
|------------------------------------------|------------------------------|----------|------------------------------------------|-----------------------------------------------|-------|------|---------------------------------------|------------|
| | Temp. ($^{\circ}\text{C}$) | Time (h) | Initial daidzein conc. (μM) | Daidzein | Equol | DHD* | | |
| <i>Slackia</i> sp. YIT 11861 | 37 | 6 | 100 | 49.7 | 44.4 | 1.8 | 44 | This study |
| | 37 | 8 | 100 | 0.9 | 95 | 5.5 | 95 | |
| | 37 | 24 | 100 | 0.8 | 107 | 1.1 | 100 | |
| | 37 | 24 | 400 | 1.2 | 376 | 31.5 | 94 | |
| | 37 | 96 | 400 | 2.1 | 417 | 0.0 | 100 | |
| gram positive bacterium do-03 | 37 | 48 | 193 | 62.3 | 64 | 45.3 | 33 | 非特許文献3 |
| | 37 | 96 | 193 | ND** | 139 | ND | 72 | |
| <i>Slackia</i> spp. TM-30 | 37 | 24 | 391 | 269 | 4.2 | ND | 1 | 特許文献3 |
| <i>Lactococcus gariviae</i> strain 92-90 | 37 | 24 | 42 | 42 | 0 | 0 | 0 | 特許文献2 |
| | 37 | 96 | 42 | 0 | 42 | 0 | 100 | |

DHD*: dihydrodaidzein, ND**: Not described

10

【0060】

試験例4 *Slackia* sp. YIT 11861に特異的な核酸断片の設計

Slackia sp. YIT 11861に特異的な配列をもとにプライマーの設計を行った。公共データベース(DDBJ/GENEBANK/EMBL)よりコリオバクテリア科の16S rRNA配列を入手し、得られた配列をもとにClustal X v1.83を用い近縁種のrRNA配列と併せて整列を行い、特異的な領域についてプライマーeq430-F/eq665-Rを設計した(配列番号1及び2)。*Slackia* sp. YIT 11861菌体(2×10^8 個/mL)から抽出したRNAを、 2×10^6 から 2×10^{-1} 個/mL相当となるように10倍段階希釈をした。この希釈RNAを1反応あたり5 μl を鋳型として、定量的RT-PCRを行った。定量的RT-PCRにはOne Step RT-PCR kit(QIAGEN)を用いた。反応液は50 $^{\circ}\text{C}$ で30分間逆転写反応を行い、その後逆転写酵素を失活させるため95 $^{\circ}\text{C}$ で15分間加熱した。続いて、94 $^{\circ}\text{C}$ 20秒、60 $^{\circ}\text{C}$ 20秒、72 $^{\circ}\text{C}$ 50秒を1サイクルとして45サイクル行った。その結果、本プライマーによるPCR増幅は、1反応あたり 10^{-3} から 10^3 個の範囲で菌数と相関を示した。糞便1gあたりに換算すると 10^3 個の菌体を定量可能であることが明らかとなった(図2)。

20

30

プライマーの特異性の検討には、表3に記載の代表的な腸内細菌、感染症起因菌およびコリオバクテリア科に属する近縁種を対象とした。DAPI染色法によりあらかじめ菌数を測定しておいた各菌株の純培養菌液よりRNAを抽出し、 2×10^8 個/mL相当となるようにRNA濃度を調整した。一反応に対して、RNAを 1×10^5 個/mL相当供試し、上述の条件により定量的RT-PCRを行った。上述のプライマーについて、代表的な腸内細菌、感染症起因菌およびコリオバクテリア科に属する近縁種を対象として、その反応性を検討した。その結果を表3に記載した。表3において、+ : CT値 ≥ 40 , - : CT値 < 40 を示す。

40

本プライマーは、*Slackia* sp. YIT 11861に対してのみ高い特異性を有していた。一方、他の対象菌株に対する交差反応は一切確認されなかった。また、RNAサンプルの代わりにNuclease-free waterを加えた反応における非特異的産物の増幅は認められなかった。

【0061】

【表 3】

使用菌株およびプライマーの特異性

| Taxon | Strain | Primer | | |
|--------------------------------------|-------------------------|--------|---------|----|
| | | eq430F | /eq665R | |
| <i>Slackia</i> sp. YIT11861 | YIT 11861 | | + | |
| <i>Atopobium fossor</i> | JCM 9981 ^T | | - | |
| <i>Atopobium minutum</i> | JCM 1118 ^T | | - | |
| <i>Atopobium parvulum</i> | JCM 10300 ^T | | - | |
| <i>Atopobium rimae</i> | JCM 10299 ^T | | - | |
| <i>Atopobium vaginae</i> | DSM 15829 ^T | | - | 10 |
| <i>Collinsella aerofaciens</i> | ATCC 25986 ^T | | - | |
| <i>Collinsella intestinalis</i> | JCM 10643 ^T | | - | |
| <i>Collinsella stercoris</i> | JCM 10641 ^T | | - | |
| <i>Cryptobacterium curtum</i> | DSM 15641 ^T | | - | |
| <i>Denitrobacterium detoxificans</i> | CCUG 47027 ^T | | - | |
| <i>Eggerthella hongkongensis</i> | JCM 14552 ^T | | - | |
| <i>Eggerthella lenta</i> | ATCC 25559 ^T | | - | |
| <i>Eggerthella sinensis</i> | JCM 14551 ^T | | - | |
| <i>Olsenella profusa</i> | JCM 14553 ^T | | - | |
| <i>Olsenella uli</i> | JCM 12494 ^T | | - | |
| <i>Slackia exigua</i> | JCM 11022 ^T | | - | |
| <i>Slackia faecicanis</i> | JCM 14555 ^T | | - | 20 |
| <i>Slackia heliotrinireducens</i> | JCM 14554 ^T | | - | |
| <i>Bifidobacterium adolescentis</i> | ATCC 15703 ^T | | - | |
| <i>Bacteroides fragilis</i> | DSM 2151 ^T | | - | |
| <i>Clostridium perfringens</i> | JCM 1290 ^T | | - | |
| <i>Prevotella melaninogenica</i> | ATCC 25845 ^T | | - | |
| <i>Veillonella parvula</i> | ATCC 10790 ^T | | - | |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> | ATCC 4356 ^T | | - | |
| <i>Escherichia coli</i> | ATCC 11775 ^T | | - | |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | ATCC 19433 ^T | | - | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC 12600 ^T | | - | |
| <i>Streptococcus mutans</i> | IFO 13955 ^T | | - | |
| <i>Campylobacter jejuni</i> | ATCC 33560 ^T | | - | 30 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC 10145 ^T | | - | |
| <i>Bifidobacterium longum</i> | ATCC 15707 ^T | | - | |
| <i>Bacteroides vulgatus</i> | JCM 5826 ^T | | - | |
| <i>Ruminococcus productus</i> | ATCC 27340 ^T | | - | |
| <i>Ruminococcus obeum</i> | ATCC 29174 ^T | | - | |
| <i>Clostridium orbiscindens</i> | DSM 6740 ^T | | - | |
| <i>Lactobacillus casei</i> | ATCC 334 ^T | | - | |
| <i>Citrobacter freundii</i> | ATCC 13316 ^T | | - | |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | ATCC 13047 ^T | | - | |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | ATCC 13883 ^T | | - | |
| <i>Enterococcus faecium</i> | ATCC 19434 ^T | | - | |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | ATCC 14990 ^T | | - | 40 |
| <i>Streptococcus salivarius</i> | ATCC 7073 ^T | | - | |
| <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> | ATCC 14987 ^T | | - | |
| <i>Bacillus cereus</i> | ATCC 12826 ^T | | - | |
| <i>Pseudomonas putida</i> | JCM 5963 ^T | | - | |

【 0 0 6 2 】

試験例 5 ヒトにおける解析

配列番号 1 及び 2 のプライマーを用いて、40名の健常成人ボランティアの糞便 RNA を対象に定量的 RT-PCR を行った。新鮮なボランティアの糞便 20 mg より、AGPC 法により全 RNA を抽出した。この全 RNA を適宜希釈し、定量的 RT-PCR を行っ

た。反応は、試験例4に記載の方法に従った。あらかじめ菌数がわかっている Slackia sp. YIT 11861より抽出したRNAの反応性を指標として、サンプル中の Slackia sp. YIT 11861の菌数を算出した。その結果、Slackia sp. YIT 11861は、40名中16名(40%)より 6.4 ± 2.4 (Log_{10} 個/g・糞便)の菌数で検出された。

【0063】

実施例1 エコールの製造

10Lのダイゼイン含有ソルボース-PY培地(ダイゼイン0.025%、ソルボース1%、ペプトン0.5%、トリプチケースペプトン0.5%、イーストエキス1%、ヘミン0.00005%、ビタミンK1 0.0001%、L-システイン塩酸塩0.05%、 KH_2PO_4 0.0006%、 K_2HPO_4 0.0006%、 NaCl 0.0012%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.0006%、 CaCl_2 0.00006%、 MgSO_4 0.00006%)に、 10^8 個/培地・mLの Slackia sp. YIT 11861を添加し、37、96h、混合ガス($\text{N}_2:\text{H}_2:\text{CO}_2=88:7:5$)存在下でインキュベートした。培養液を遠心分離(8000xg、15分間)し、その上清に等量のジエチルエーテルを添加した。良く攪拌後、遠心分離(1000xg、2分間)により2層に分離し、ジエチルエーテル層のみを分取した。ジエチルエーテル層を40、窒素気流下にて乾固させ、2.4gのエコールを得た。

10

【0064】

実施例2 錠剤の製造

下記表4の処方で各種成分を混合して造粒・乾燥・整粒した後に、打錠して錠剤を製造した。

20

【0065】

【表4】

| (処方) | (mg) |
|----------------------------|------|
| 本発明の細菌菌体の乾燥物 ¹⁾ | 10 |
| 微結晶セルロース | 100 |
| トレハロース | 15 |
| ステアリン酸マグネシウム | 0.5 |
| メチルセルロース | 12 |
| ダイゼイン | 25 |

30

【0066】

1) Slackia sp. YIT 11861の生菌体を凍結乾燥して製造した(生菌体 10^{10} 個/gを含む)。

【0067】

実施例3 清涼飲料の製造

下記表5処方により、常法に従って各成分を配合し、均質化して清涼飲料を得た。得られた清涼飲料は褐色瓶に充填後、アルミキャップにて封印し、加熱処理を施した。

40

【0068】

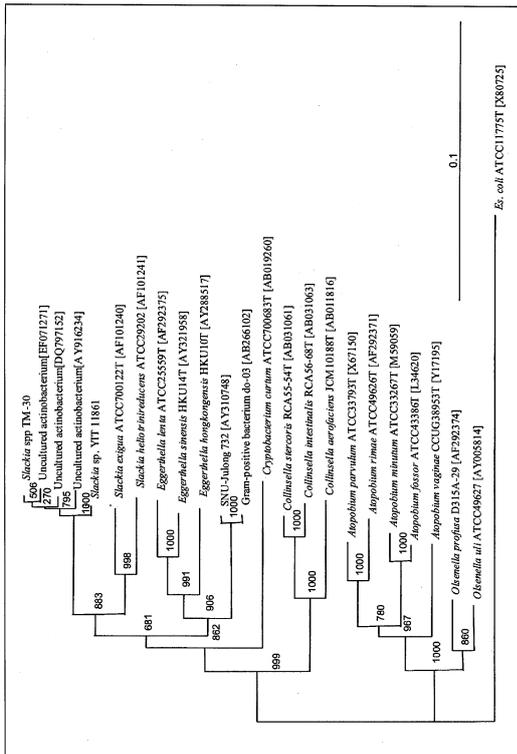
【表 5】

| (処方) | (g) |
|----------------------------|------|
| 本発明の細菌菌体の乾燥物 ¹⁾ | 0.5 |
| 香料 | 0.8 |
| クエン酸 | 0.2 |
| エリスリトール | 2.5 |
| ラクチトール | 2.5 |
| 水 | 93.5 |

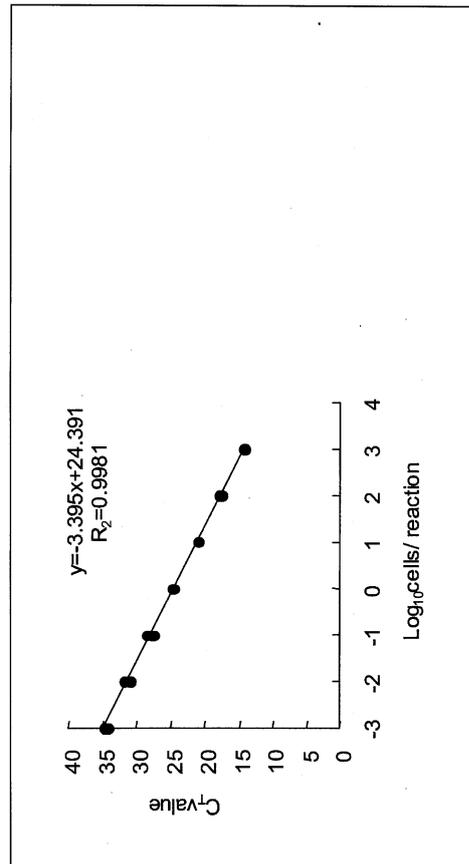
【0069】

1) *Slackia* sp. YIT 11861 の生菌体を凍結乾燥して製造した (生菌体 10^{10} 個/g を含む)。

【図 1】



【図 2】



【配列表】

0005631862000001.app

フロントページの続き

| | | | |
|---------------------------|--|-----------------|---|
| (51)Int.Cl. | | F I | |
| A 6 1 K 31/7048 (2006.01) | | A 6 1 K 31/7048 | |
| A 6 1 K 47/10 (2006.01) | | A 6 1 K 47/10 | |
| A 6 1 K 47/20 (2006.01) | | A 6 1 K 47/20 | |
| A 6 1 K 47/26 (2006.01) | | A 6 1 K 47/26 | |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | | C 1 2 N 15/00 | A |
| C 1 2 R 1/01 (2006.01) | | C 1 2 P 17/06 | |
| | | C 1 2 R 1:01 | |

- (72)発明者 辻 浩和
東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社内
- (72)発明者 野本 康二
東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社内
- (72)発明者 森山 薫
東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社内
- (72)発明者 赤座 英之
東京都新宿区西新宿3-15-5-105

審査官 渡邊 潤也

- (56)参考文献 赤座英之, 前立腺がん予防と腸内細菌, ヘルシスト, 2008年, No.192, pp.2-7

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 / 2 0
C 1 2 N 1 5 / 0 0
C 1 2 Q 1 / 6 8
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 I)
B I O S I S / M E D L I N E / W P I D S / W P I X (S T N)