

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6201982号  
(P6201982)

(45) 発行日 平成29年9月27日(2017.9.27)

(24) 登録日 平成29年9月8日(2017.9.8)

(51) Int.Cl.	F I
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 A
<b>C 1 2 N 1/20 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/20 A
<b>G O 1 N 33/569 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/569 F
<b>A 6 1 K 39/02 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/02

請求項の数 24 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-507676 (P2014-507676)	(73) 特許権者 000000066 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目15番1号
(86) (22) 出願日 平成25年3月14日(2013.3.14)	(74) 代理人 100080791 弁理士 高島 一
(86) 国際出願番号 PCT/JP2013/057287	(72) 発明者 亀山 恵司 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内
(87) 国際公開番号 W02013/146319	(72) 発明者 伊藤 喜久治 東京都文京区弥生1-1-1 国立大学法人東京大学内
(87) 国際公開日 平成25年10月3日(2013.10.3)	審査官 小金井 悟
審査請求日 平成27年10月16日(2015.10.16)	
(31) 優先権主張番号 61/618,052	
(32) 優先日 平成24年3月30日(2012.3.30)	
(33) 優先権主張国 米国(US)	
(31) 優先権主張番号 特願2012-80469 (P2012-80469)	
(32) 優先日 平成24年3月30日(2012.3.30)	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	
微生物の受託番号 IPOD FERM BP-11443	
前置審査	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 糖尿病誘起細菌

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号3で表される核酸配列を含む16SリボソームRNA遺伝子を有する細菌。

【請求項2】

糖尿病を誘起する活性を有する、請求項1記載の細菌。

【請求項3】

受託番号FERM BP-11443で特定される、請求項1又は2に記載の細菌。

【請求項4】

配列番号3で表される核酸配列を含む16SリボソームRNA遺伝子を特異的に検出するプライマーセット又はプローブを含む、請求項1～3のいずれか1項に記載の細菌の検出用試薬。

【請求項5】

プライマーセットが、配列番号4～12のいずれかで表される核酸配列の相補配列の連続する部分配列にハイブリダイズするポリヌクレオチド及びこのハイブリダイゼーション部位より3'側の配列番号4～12のいずれかで表される核酸配列の連続する部分配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む、請求項4に記載の検出用試薬。

【請求項6】

プライマーセットが、配列番号1で表される核酸配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号2で表される核酸配列からなるポリヌクレオチドを含む、請求項4又は5に記載の検出用試薬。

## 【請求項 7】

プローブが、配列番号 4 ~ 12 のいずれかで表される核酸配列又はその相補配列の連続する部分配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む、請求項 4 に記載の検出用試薬。

## 【請求項 8】

プローブが、配列番号 1 で表される核酸配列からなるポリヌクレオチド又は配列番号 2 で表される核酸配列からなるポリヌクレオチドを含む、請求項 4 又は 7 に記載の検出用試薬。

## 【請求項 9】

配列番号 3 で表される核酸配列を含む 16 S リボソーム RNA 遺伝子の特異的に検出することを含み、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の細菌の検出方法。 10

## 【請求項 10】

配列番号 4 ~ 12 のいずれかで表される核酸配列の相補配列の連続する部分配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドと、このハイブリダイゼーション部位より 3' 側の配列番号 4 ~ 12 のいずれかで表される核酸配列の連続する部分配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドとをプライマーとして使用してポリメラーゼ連鎖反応を行うことを含み、請求項 9 に記載の検出方法。

## 【請求項 11】

配列番号 1 で表される核酸配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号 2 で表される核酸配列からなるポリヌクレオチドをプライマーとして使用してポリメラーゼ連鎖反応を行うことを含み、請求項 10 に記載の検出方法。 20

## 【請求項 12】

配列番号 4 ~ 12 のいずれかで表される核酸配列又はその相補配列の連続する部分配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドをプローブとして使用する、請求項 9 に記載の検出方法。

## 【請求項 13】

配列番号 1 で表される核酸配列からなるポリヌクレオチド又は配列番号 2 で表される核酸配列からなるポリヌクレオチドをプローブとして使用する、請求項 12 に記載の検出方法。

## 【請求項 14】

制限酵素 MspI を使用する T - RFLP 法により、断片長が  $282 \pm 1$  bp の制限酵素処理断片を検出することを含み、請求項 9 に記載の検出方法。 30

## 【請求項 15】

被験者の糞便中の請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の細菌を検出することを含み、糖尿病の素因の有無を試験する方法。

## 【請求項 16】

該細菌が請求項 9 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の検出方法によって検出される、請求項 15 に記載の方法。

## 【請求項 17】

配列番号 3 で表される核酸配列を含む 16 S リボソーム RNA 遺伝子の特異的に検出するプライマーセット又はプローブを含む、糖尿病の素因の有無を判定するための剤。 40

## 【請求項 18】

プライマーセットが、配列番号 4 ~ 12 のいずれかで表される核酸配列の相補配列の連続する部分配列にハイブリダイズするポリヌクレオチド及びこのハイブリダイゼーション部位より 3' 側の配列番号 4 ~ 12 のいずれかで表される核酸配列の連続する部分配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む、請求項 17 に記載の剤。

## 【請求項 19】

プライマーセットが、配列番号 1 で表される核酸配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号 2 で表される核酸配列からなるポリヌクレオチドを含む、請求項 17 又は 18 に記載の剤。 50

## 【請求項 2 0】

プローブが、配列番号 4 ~ 1 2 のいずれかで表される核酸配列又はその相補配列の連続する部分配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む、請求項 1 7 に記載の剤。

## 【請求項 2 1】

プローブが、配列番号 1 で表される核酸配列からなるポリヌクレオチド又は配列番号 2 で表される核酸配列からなるポリヌクレオチドを含む、請求項 1 7 又は 2 0 に記載の剤。

## 【請求項 2 2】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の細菌の ホルムアルデヒド処理により調製した死菌体。

## 【請求項 2 3】

請求項 2 2 に記載の 死菌体 を含有する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の細菌に対する免疫応答を誘導するための組成物。

## 【請求項 2 4】

配列番号 3 で表される核酸配列を含むポリヌクレオチド。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

本発明は、糖尿病の発症を誘起する細菌及びその用途、並びに当該細菌の検出方法等に関する。

## 【背景技術】

## 【0 0 0 2】

糖尿病は、慢性的な高血糖を主病態とする代謝障害が持続することによって、種々の合併症を引き起こす難治性の疾患である。糖尿病は成因によって、1型糖尿病、2型糖尿病、遺伝子異常による糖尿病、他の疾患・条件に伴う糖尿病、妊娠糖尿病などに分類される。1型糖尿病および2型糖尿病は、遺伝子異常ではなく遺伝子多型の一つである一塩基多型 (SNP) に、種々の環境因子が加わって発症する多因子病である。1型糖尿病は、自己免疫や膵細胞の破壊に係る複数のSNPにウイルス感染などの環境因子が加わり、膵細胞の破壊性病変でインスリンの欠乏が生じることによって起こる糖尿病である (非特許文献 1) 。一方、2型糖尿病は、インスリン分泌やインスリン感受性などのインスリン作用不足に関するSNPや肥満に関するSNPに、過食、高脂肪食、加齢、喫煙、運動不足等の環境因子が加わり、脂肪組織、骨格筋、肝臓におけるインスリンのシグナル伝達異常によって引き起こされる糖尿病である。2型糖尿病の成因において、欧米人はインスリン感受性低下が優位であるが、日本人では膵臓のインスリン分泌能低下も伴う場合が多い (非特許文献 2) 。

糖尿病が発症する原因は完全には明らかではないが、一般的に、遺伝的に糖尿病になりやすい体質 (遺伝因子) の人が、糖尿病になりやすいような生活習慣を送ること (環境因子) によって2型糖尿病になると考えられている。

## 【0 0 0 3】

糖尿病の発症に関する環境因子の一つとして、近年、腸内細菌の関与が明らかになっている。1型糖尿病においては、1型糖尿病モデルラットに抗生物質sulphamethoxazole、trimethoprim、colistineの混合水溶液を飲水摂取させることによって、糖尿病の発症が抑制されたことや (非特許文献 3) 、また、プロバイオティクス乳酸菌Lactobacillus johnsonii N6.2の1型糖尿病モデルラットへの投与によって、糖尿病の症状が緩和されることが報告されている (非特許文献 4) 。一方、2型糖尿病の発症に対する腸内細菌の関与については、更に多くの報告がある。肥満によるインスリンや炎症性サイトカインの増加が、腸管上皮細胞のタイトジャンクションに作用し細胞間隙透過性を上昇させるため、腸内のグラム陰性菌由来細胞構成成分であるLipopolysaccharide (LPS) の生体内への侵入が容易となる。門脈内に取り込まれたLPSは、肝臓へと運ばれ肝臓内の単核球であるクッパー細胞が認識し、炎症性サイトカインを放出するため、肝臓のインスリン抵抗性が引き起こされ、糖代謝や脂質代謝異常をきたす。このため、本来インスリンによって抑制されるはずの肝臓での糖新生やグリコーゲン分解が亢進し、高血糖が引き起こされる。また血中に

10

20

30

40

50

侵入したLPSもまた同様にマクロファージ等の単核球によって認識され、炎症性サイトカインの分泌を誘導し、骨格筋や脂肪組織のインスリン感受性を低下させ、糖の取り込みが抑制されるため高血糖が引き起こされることが報告されている（非特許文献5）。

【0004】

2008年にCaniらは、高脂肪食摂取マウスへのampicillin及びneomycinの飲水投与によって、空腹時血糖値、耐糖能、インスリン抵抗性、脂肪組織の炎症が改善されることを報告している（非特許文献6）。さらに、2008年にMembrezらは、ob/obマウス及び高脂肪食摂取マウスへのnorfloxacin及びampicillinの飲水投与によって、空腹時血糖値及び耐糖能が有意に改善されることを報告している（非特許文献7）。

【0005】

また、プレバイオティクスによる2型糖尿病の改善効果について、Caniらは、2007年と2009年に、オリゴ糖による腸内ビフィズス菌の増加によって2型糖尿病の病態が改善されることを報告している（非特許文献8、9）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】インスリン分泌、文光堂、2004、第43-52頁

【非特許文献2】インスリン抵抗性、文光堂、2004、第35-44頁

【非特許文献3】Diabetologia 2006, 49, 2105-2108

【非特許文献4】PLoS One 2010, 5, e10507

【非特許文献5】Pharmacol Ther 2011, 130, 202-212

【非特許文献6】Diabetes 2008, 57, 1470-1481

【非特許文献7】FASEB J 2008, 22, 2416-26

【非特許文献8】Diabetologia 2007, 50, 2374-83

【非特許文献9】Gut 2009, 58, 1091-1103

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

上記の通り、1型/2型糖尿病の病態発現に係る環境因子の一つとして腸内細菌叢が深く関わっていることは示唆されているが、何れの報告でも広域抗菌スペクトルを持つ抗生物質の使用やプレバイオティクスの使用であるため、複雑系である腸内細菌叢全体としての関与を明らかにしたに過ぎず、特定の腸内細菌に限定した関与は見出せていない。これに対し、糖尿病の病態発現の原因となる特定の腸内細菌を発見したという例はこれまでに無く、そのような腸内細菌が存在するか否かについても全く不明のままである。

また、抗生物質による糖尿病の治療効果は十分期待できるが、広域抗菌スペクトルを持つ抗生物質の使用は、ビフィズス菌や乳酸菌等の有用腸内細菌も同時に除去されることや、抗生物質耐性菌の出現リスク増大や、副作用である下痢症による患者QOLの著しい低下などが問題となっている。

【0008】

従って、糖尿病の病態発現の原因となる細菌を特定できれば、その細菌に対して特異的に作用する除去方法を開発することにより、糖尿病を効果的に治療又は予防することが可能となる。以上の事情に鑑み、本発明は、糖尿病を誘起する細菌を単離及び同定し、当該細菌を利用した糖尿病の治療及び/又は予防手段を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意検討し、空腹時血糖値が400mg/dlを超える高値を示した肥満モデルマウスの糞便中の腸内細菌叢を網羅的に調べて正常マウスのものと比較することにより、特定の細菌が優勢化していることを見出した。この細菌を肥満モデルマウスの盲腸内容物から単離することに成功し、更にその16SリボソームRNA遺伝子配列に基づく系統分類解析を行なった結果、ラクノスピラ科(Lachnospiraceae

10

20

30

40

50

e) に属する新属新種であることを見出した。更に、この細菌が無菌肥満モデルマウスの腸内に定着すると、インスリン分泌能の低下及び高血糖を引き起こすことをも明らかにした。以上の知見に基づき、本発明を完成するに至った。

【 0 0 1 0 】

即ち、本発明は以下の通りである。

- [ 1 ] 糖尿病を誘起する活性を有するラクノスピラ科に属する細菌。
- [ 2 ] 長桿菌である、[ 1 ] に記載の細菌。
- [ 3 ] 線毛あるいは鞭毛様の構造を持つ、[ 1 ] 又は [ 2 ] に記載の細菌。
- [ 4 ] 運動性を有する、[ 1 ] ~ [ 3 ] のいずれかに記載の細菌。
- [ 5 ] 嫌気性である、[ 1 ] ~ [ 4 ] のいずれかに記載の細菌。 10
- [ 6 ] エタノール耐性を示す、[ 1 ] ~ [ 5 ] のいずれかに記載の細菌。
- [ 7 ] 腸内細菌である、[ 1 ] ~ [ 6 ] のいずれかに記載の細菌。
- [ 8 ] 配列番号 3 で表される核酸配列と 9 8 % 以上の相同性を有する核酸配列を含む 1 6 S リボソーム R N A 遺伝子を有する細菌。
- [ 9 ] 配列番号 3 で表される核酸配列を含む 1 6 S リボソーム R N A 遺伝子を有する細菌。
- [ 1 0 ] 糖尿病を誘起する活性を有する、[ 8 ] 又は [ 9 ] 記載の細菌。
- [ 1 1 ] 受託番号 F E R M B P - 1 1 4 4 3 で特定される、[ 1 ] ~ [ 1 0 ] のいずれかに記載の細菌。
- [ 1 2 ] 配列番号 3 で表される核酸配列と 9 8 % 以上の相同性を有する核酸配列を含む 1 6 S リボソーム R N A 遺伝子を特異的に検出するプライマーセット又はプローブを含む、[ 1 ] ~ [ 1 1 ] のいずれかに記載の細菌の検出用試薬。 20
- [ 1 3 ] 配列番号 3 で表される核酸配列を含む 1 6 S リボソーム R N A 遺伝子を特異的に検出するプライマーセット又はプローブを含む、[ 1 2 ] に記載の細菌の検出用試薬。
- [ 1 4 ] プライマーセットが、配列番号 4 ~ 1 2 のいずれかで表される核酸配列の相補配列の連続する部分配列にハイブリダイズするポリヌクレオチド及びこのハイブリダイゼーション部位より 3 ' 側の配列番号 4 ~ 1 2 のいずれかで表される核酸配列の連続する部分配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む、[ 1 2 ] 又は [ 1 3 ] に記載の検出用試薬。
- [ 1 5 ] プライマーセットが、配列番号 1 で表される核酸配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号 2 で表される核酸配列からなるポリヌクレオチドを含む、[ 1 2 ] ~ [ 1 4 ] のいずれかに記載の検出用試薬。 30
- [ 1 6 ] プローブが、配列番号 4 ~ 1 2 のいずれかで表される核酸配列又はその相補配列の連続する部分配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む、[ 1 2 ] 又は [ 1 3 ] に記載の検出用試薬。
- [ 1 7 ] プローブが、配列番号 1 で表される核酸配列からなるポリヌクレオチド又は配列番号 2 で表される核酸配列からなるポリヌクレオチドを含む、[ 1 2 ]、[ 1 3 ] 及び [ 1 6 ] のいずれかに記載の検出用試薬。
- [ 1 8 ] 配列番号 3 で表される核酸配列と 9 8 % 以上の相同性を有する核酸配列を含む 1 6 S リボソーム R N A 遺伝子を特異的に検出することを含む、[ 1 ] ~ [ 1 1 ] のいずれかに記載の細菌の検出方法。 40
- [ 1 9 ] 配列番号 3 で表される核酸配列を含む 1 6 S リボソーム R N A 遺伝子を特異的に検出することを含む、[ 1 8 ] に記載の検出方法。
- [ 2 0 ] 配列番号 4 ~ 1 2 のいずれかで表される核酸配列の相補配列の連続する部分配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドと、このハイブリダイゼーション部位より 3 ' 側の配列番号 4 ~ 1 2 のいずれかで表される核酸配列の連続する部分配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドとをプライマーとして使用してポリメラーゼ連鎖反応を行うことを含む、[ 1 8 ] 又は [ 1 9 ] に記載の検出方法。
- [ 2 1 ] 配列番号 1 で表される核酸配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号 2 で表される核酸配列からなるポリヌクレオチドをプライマーとして使用してポリメラーゼ連鎖反 50

応を行うことを含む、[ 2 0 ]に記載の検出方法。

[ 2 2 ] 配列番号 4 ~ 1 2 のいずれかで表される核酸配列又はその相補配列の連続する部分配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドをプローブとして使用する、[ 1 8 ] 又は [ 1 9 ] に記載の検出方法。

[ 2 3 ] 配列番号 1 で表される核酸配列からなるポリヌクレオチド又は配列番号 2 で表される核酸配列からなるポリヌクレオチドをプローブとして使用する、[ 2 2 ] に記載の検出方法。

[ 2 4 ] 制限酵素 MspI を使用する T - R F L P 法により、断片長が  $282 \pm 1$  bp の制限酵素処理断片を検出することを含む、[ 1 8 ] 又は [ 1 9 ] に記載の検出方法。

[ 2 5 ] 被験者の糞便中の [ 1 ] ~ [ 1 1 ] のいずれかに記載の細菌を検出することを含む、糖尿病の素因の有無の判定方法。 10

[ 2 6 ] 該細菌が [ 1 8 ] ~ [ 2 4 ] のいずれかに記載の検出方法によって検出される、[ 2 5 ] に記載の判定方法。

[ 2 7 ] 配列番号 3 で表される核酸配列と 9 8 % 以上の相同性を有する核酸配列を含む 1 6 S リボソーム R N A 遺伝子の特異的に検出するプライマーセット又はプローブを含む、糖尿病の素因の有無を判定するための剤。

[ 2 8 ] 配列番号 3 で表される核酸配列を含む 1 6 S リボソーム R N A 遺伝子の特異的に検出するプライマーセット又はプローブを含む、[ 2 7 ] に記載の剤。

[ 2 9 ] プライマーセットが、配列番号 4 ~ 1 2 のいずれかで表される核酸配列の相補配列の連続する部分配列にハイブリダイズするポリヌクレオチド及びこのハイブリダイゼーション部位より 3 ' 側の配列番号 4 ~ 1 2 のいずれかで表される核酸配列の連続する部分配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む、[ 2 7 ] 又は [ 2 8 ] に記載の剤。 20

[ 3 0 ] プライマーセットが、配列番号 1 で表される核酸配列からなるポリヌクレオチド及び配列番号 2 で表される核酸配列からなるポリヌクレオチドを含む、[ 2 7 ] ~ [ 2 9 ] のいずれかに記載の剤。

[ 3 1 ] プローブが、配列番号 4 ~ 1 2 のいずれかで表される核酸配列又はその相補配列の連続する部分配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む、[ 2 7 ] 又は [ 2 8 ] に記載の剤。

[ 3 2 ] プローブが、配列番号 1 で表される核酸配列からなるポリヌクレオチド又は配列番号 2 で表される核酸配列からなるポリヌクレオチドを含む、[ 2 7 ]、[ 2 8 ] 及び [ 3 1 ] のいずれかに記載の剤。 30

[ 3 3 ] [ 1 ] ~ [ 1 1 ] のいずれかに記載の細菌の処理物。

[ 3 4 ] [ 1 ] ~ [ 1 1 ] のいずれかに記載の細菌の死菌体、構成成分及び抽出物から選択されるいずれか 1 つ以上である、[ 3 3 ] 記載の細菌の処理物。

[ 3 5 ] [ 3 3 ] 又は [ 3 4 ] に記載の処理物を含有する、[ 1 ] ~ [ 1 1 ] のいずれかに記載の細菌に対する免疫応答を誘導するための組成物。

[ 3 6 ] 糖尿病の治療及び / 又は予防用である、[ 3 5 ] に記載の組成物。

[ 3 7 ] 配列番号 3 で表される核酸配列を含むポリヌクレオチド。

[ 3 8 ] [ 1 ] ~ [ 1 1 ] のいずれかに記載の細菌又は当該細菌に含まれる抗原性を有する構成成分を特異的に認識する抗体。 40

[ 3 9 ] [ 1 ] に記載の細菌の処理物を含有する組成物を対象に投与することを含む、[ 1 ] に記載の細菌により誘起される糖尿病の治療及び / 又は予防方法。

【発明の効果】

【 0 0 1 1 】

本発明の細菌は、糖尿病を誘起する活性を有する。従って、本発明の細菌の定着、増殖又は生理作用を抑制することは、糖尿病の治療のみならず予防のための新たな戦略となり得る。従来から、糖尿病の治療薬としては、インスリン製剤、インスリン分泌促進剤、インスリン抵抗性改善剤、グルコース吸収抑制剤などがよく知られているが、何れも対症療法的薬剤である。本発明により、糖尿病の原因となる腸内細菌の駆除が可能となるが、これは原因療法的な糖尿病の治療方法であり、これまでに類を見ない。当該腸内細菌に対し 50

て特異的に作用する本発明のワクチン組成物は、糖尿病の発症前から当該腸内細菌の定着を阻止することを可能とし、予防医学的観点から糖尿病のリスクを低減するための新たな手段となる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】ob/obマウスの空腹時血糖値の経時変化。

【図2】飼育開始時(5週齢)における腸内細菌叢。空腹時血糖値の上昇が認められたマウスの腸内細菌叢(上)。正常血糖値のマウスの腸内細菌叢(下)。

【図3】バンコマイシンによる空腹血糖値の上昇抑制効果。データは平均値±標準誤差で示した(n=6、\* : P<0.05(コントロール群との比較))。

【図4】T-RF 282±1 bpが最も多く存在した個体のバンコマイシン摂取による腸内細菌叢の変化。

【図5】分離菌株の16S rDNAを用いた近隣結合法による分子系統樹解析結果。

【図6】AJ110941菌株の走査型電子顕微鏡画像。

【図7】ノトバイオートマウスの腸内細菌叢測定結果。

【図8】AJ110941菌株定着による血糖値、血中インスリン及びグルカゴンへの影響(n=3、\* : P<0.05(コントロール群との比較))。

【図9】AJ110941菌株定着によるHOMA-IR及びHOMA- $\beta$ への影響(n=3、\* : P<0.05(コントロール群との比較))。

【図10】AJ110941菌株経口負荷によるインスリン感受性への影響(n=5、\* : P<0.05(コントロール群との比較))。

【図11】ヒトにおけるAJ110941の検出頻度。

【図12】2型糖尿病被験者におけるAJ110941保有者と非保有者の糖尿病指標の比較。

【発明を実施するための形態】

【0013】

(1. 糖尿病を誘起する活性を有する細菌)

本発明は、糖尿病を誘起する活性を有する腸内細菌に関する。糖尿病とは、1型糖尿病または2型糖尿病のいずれをも含む。

【0014】

糖尿病を誘起する活性は、インスリン抵抗性の誘起または、インスリン分泌能低下の誘起のいずれかの活性の有無を以って判定することができる。インスリン抵抗性の誘起の活性、インスリン分泌能低下の誘起の活性は、それらの活性が判定できる方法であれば特に限定されるものではないが、例えば以下の方法で判定すればよい。

【0015】

インスリン分泌能低下の誘起活性を判定する方法では、まず5週齢の雄性C57BL/6JHamSlc ob/obの無菌マウスを、無菌条件下で8週齢まで馴化する。飼育終了までの全ての期間において、マウスは無菌条件を維持可能なアイソレーター内で飼育し、水と一般飼料(例、CRF-1(オリエンタル酵母社製))を自由摂食させる。その後、コントロール(無菌)群、E.coli及び被験腸内細菌共定着群(共定着群)に群分けする。共定着群には、E.coliの培養菌体(約 $10^7$  cells)及び被験腸内細菌の培養菌体(約 $10^7$  cells)をそれぞれ経口により接種しノトバイオート化する。コントロール群には、菌体の懸濁液に用いる培地のみを投与する。

各群のマウスを更に6週間飼育した後、4時間絶食させ、血糖値、血中インスリン濃度、血中グルカゴン濃度の測定を行う。共定着群の血糖値及び血中グルカゴン濃度が、コントロール群と比較して、統計学上有意に高く、且つ共定着群の血中インスリン濃度の平均値が、コントロール群と比較して、統計学上有意に低い場合、被験腸内細菌が糖尿病を誘起する活性を有すると判定することができる。

【0016】

インスリン抵抗性の誘起活性を判定する方法では、4週齢から12週齢まで60 kcal%ラードの高脂肪食(リサーチダイエット社製)による肥満を誘発したC57BL/6Jマウス(日本チ

10

20

30

40

50

ヤールス・リバー)を使用する。マウスを2群に分け、コントロール群、被験腸内細菌投与群とする。被験腸内細菌投与群には、被験腸内細菌菌体(投与量が約 $10^6$  cells/350  $\mu$ l/mouseとなるように用時調製する)を、1日1回、4週間経口投与により負荷する。コントロール群には、菌体の懸濁液に用いる培地のみを投与する。マウスの飼育はSPF条件下で行い、水と60 kcal%ラードの高脂肪食を自由摂食させる。

菌体投与開始から4週後に、インスリン負荷試験(インスリン1 U/kg、i.p.)を行い、インスリン抵抗性への影響を調べる。インスリン投与後15分~45分における血糖値の低下が、コントロール群と比較して、被験腸内細菌投与群において統計学上有意に抑制された場合、被験腸内細菌が糖尿病を誘起する活性を有すると判定することができる。

【0017】

本発明の細菌は、上記インスリン抵抗性誘起活性を判定する方法又はインスリン分泌低下誘起活性を判定する方法の少なくとも一方、好ましくは両方で糖尿病を誘起する活性を有すると判定される。

【0018】

本発明の細菌は、グラム陽性細菌門(Firmicutes)クロストリジウム綱(Clostridia)クロストリジウム目(Clostridiales)ラクノスピラ科(Lachnospiraceae)に属する。分離源から単離された細菌がラクノスピラ科に属するか否かは、例えば、16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列データと既知種の配列データとを比較し系統解析を行って決定することができる。系統解析及び系統樹の作成方法は、例えば以下の手順に従って行なう。

【0019】

まず細菌から鋳型となるゲノムDNAを抽出する。細菌からDNAを抽出する方法は公知であり、いずれの方法を使用してもよい。一般的には、細胞をリゾチームなどの細胞壁分解酵素で処理する方法、ガラスビーズによる物理的破壊方法、凍結融解を繰り返す処理方法などが使用される。また市販のDNA抽出用の試薬も使用することができる。ゲノムDNAは必ずしもインタクトな状態で抽出されなくてもよい。従って、試料のコンタミネーションの可能性が低く、操作が簡単で、迅速に行なうことのできる方法を適宜選択することができる。

【0020】

次にポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により16SリボソームRNAをコードする標的DNAを増幅する。PCRにおいて使用されるプライマーの配列は、少なくともラクノスピラ科に属する全ての既知細菌の16SリボソームRNAをコードする標的DNAが増幅されるよう適宜設計することができるが、通常、生物種を超えて保存された配列からなるプライマー(ユニバーサルプライマー)が使用される。またPCRの条件は特に限定されず、通常用いられる範囲内で適宜選択することができる。市販のPCR用試薬を使用して、添付の説明書に従って反応を行うことができる。

【0021】

PCRで増幅されたDNA断片は、必要に応じてスピンカラムなどを用いて精製されたのち、その塩基配列が決定される。塩基配列の決定は定法に従って行なうことができる。

【0022】

決定された塩基配列は、適当な遺伝子配列データベース及び相同性検索プログラムを用いて、既知の細菌16SリボソームDNA配列とのホモロジー検索を行うことにより、最も高い相同性を示す既知配列を抽出することができる。例えば、日本DNAデータバンク(DDBJ)のホームページを通じて、BLASTやFASTAが利用できる。プログラムとしてblastnやfastaを選択し、決定された塩基配列をクエリーとし、検索対象データベースとして16S rRNA(Prokaryotes)を選択して検索を実施すれば、高い相同性を示す既知配列が抽出され出力される。細菌の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列のデータセットを含む限り、いかなる他の遺伝子配列データベースも利用することができる。また、上記以外の自体公知の相同性検索プログラムを用いることもできる。

【0023】

10

20

30

40

50

相同性検索の結果、単離された細菌の16SリボソームRNA遺伝子の配列が、ラクノスピラ科に属さない細菌の既知配列よりもラクノスピラ科に属する細菌の既知配列とより高い相同性を示す場合、当該細菌をラクノスピラ科に属する細菌として同定することができる。

【0024】

或いは、増幅したDNAの塩基配列に基づき分子進化系統樹を推定し、単離された細菌の分類学的位置を特定することもできる。分子進化系統樹解析ソフトはインターネット等でも公開されており、それらを利用することができる(CLUSTRAL W等)。系統樹解析の結果、単離された細菌がラクノスピラ科に属する細菌と同じクラスターにある場合、当該細菌をラクノスピラ科に属する細菌として同定することができる。

10

【0025】

本発明の細菌は、どのような方法で得てもよいが、糖尿病を患う哺乳動物の糞便から採取する方法、当該哺乳動物の腸管から直接採取する方法、口腔内、腔、皮膚などから採取する方法などにより単離することができる。本発明の細菌は、糖尿病を患う哺乳動物の腸内細菌叢において優勢となる傾向があるため、当該哺乳動物の糞便、腸管内容物などから容易に単離することができる。従って、本発明の細菌は、好ましくは腸内細菌である。

【0026】

本発明の細菌の培養は、当該分野において通常使用される自体公知の方法により行なうことができる。単離された細菌について、上記方法により、糖尿病を誘起する活性を有するか否か、及び/又はラクノスピラ科に属するか否かを更に確認することができる。

20

【0027】

本発明の細菌は、通常の培養条件下(例えば、37℃、嫌氣的など)では、通常、長さ約10μm、幅約1μmの長桿菌である。本発明の細菌は、細胞周囲に多くの線毛あるいは鞭毛様の構造を持ち、運動性を有する。ここでいう運動性とは、集落を形成せず菌体を接種した場所から培地の全体に広がって発育する能力であって、細胞の移動のための運動を行なう能力を指す。細胞の移動運動には、遊走運動、滑走運動、アメーバ運動、浮上運動、原形質流動などがあるが、いずれかに限定されない。運動性の評価には、顕微鏡による直接観察、寒天平板培養による観察、半流動高層培地による観察などがあるが、何れを用いてもよい。

【0028】

本発明の細菌は嫌気性である。本発明の細菌は、EG寒天培地等の腸内細菌培養用の培地を用いて嫌気条件下(酸素濃度1ppm以下)で培養することができる。

30

【0029】

更に本発明の細菌は、糞便中または盲腸および腸内内容物中に存在する場合は、有機溶媒(好ましくはエタノール)に耐性を示し、純粋培養により耐性が失われるという特徴を有する。従って本発明の細菌は、有機溶媒耐性(好ましくはエタノール耐性)である。ここでいう有機溶媒耐性(好ましくはエタノール耐性)とは、細菌を含む糞便または盲腸および腸内内容物をエタノールやクロロフォルム等の有機溶媒(好ましくはエタノール)に2時間浸した後、当該細菌が、芽胞形成の有無に関らず、然るべき培地で再度増殖する能力を有することを指す。本発明のAJ110941は、エタノールまたはクロロホルムに懸濁し2時間放置したマウス盲腸内容物より分離培養された細菌であり、マウス腸内に存在した状態では、これらの有機溶媒によって死滅することは無い。しかしながら、一旦、純粋培養を経験した菌体は、これらの有機溶媒の処理の後、同様の条件で培養しても増殖が認められない。

40

【0030】

一態様において、本発明の細菌は、配列番号3で表される核酸配列と98%以上の相同性を有する核酸配列を含む16SリボソームRNA遺伝子、好ましくは配列番号3で表される核酸配列を含む16SリボソームRNA遺伝子を有する。ここで配列番号3は、後述するラクノスピラ科に属する本発明の細菌の1つ(AJ110941株)の16SリボソームRNA遺伝子の配列を示す。核酸配列間の相同性は、上記の相同性検索プログラムB

50

LASTを使用して計算される。一般に、細菌については、属レベルでの同定には95%以上、種レベルでの同定には98%以上の16SリボソームRNA遺伝子配列の相同性が必要とされる (Science 2005, 307, 1915-1920)。細菌がAJ110941株と同じ種に属する場合、AJ110941株と同様に、糖尿病を誘起する活性を有する可能性が高いといえる。

#### 【0031】

細菌が上記16SリボソームRNA遺伝子を有することは、上述の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列の解析方法を用いて確認することができる。あるいは、下記に詳述する本発明の検出用試薬及び検出方法に従って、該遺伝子を特異的に検出し得るプライマー又はプローブを用いて、自体公知の方法 (PCR、サザンブロッティング、DNAアレイ等) により調べることが出来る。

10

#### 【0032】

本発明者らが単離した、本発明の細菌の一例の菌株 (AJ110941) は、受託番号FERM BP-11443として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1-1-1 中央第6) にブダペスト条約に基づき国際寄託されている (受託日: 平成23年11月30日)。AJ110941株は、糖尿病モデルマウス (BKS.Cg m +/+ Lepr<sup>db</sup> / J (db/db) マウス) の盲腸内容物から分離されたものである。AJ110941株の分離には、嫌気化したEG液体培地 (「プロバイオティクス・プレバイオティクス・バイオジェニックス」、日本ビフィズス菌センター、2006年) 及びEG寒天培地を使用し、培養は嫌気的に行なった。

20

#### 【0033】

本発明の細菌は、糖尿病の一因として糖尿病の予防及び/又は治療の標的となり得るため、糖尿病の予防及び/又は治療剤のスクリーニングに有用である。また後述の本発明のワクチン組成物の製造における原料とすることができるため有用である。

#### 【0034】

また、本発明は、配列番号3で表される核酸配列を含むポリヌクレオチドも提供する。配列番号3は、ラクノスピラ科に属する本発明の細菌の1つ (AJ110941株) の16SリボソームRNA遺伝子の配列を示す。

#### 【0035】

該ポリヌクレオチドは、DNAであってもRNAであってもよく、あるいはDNA/RNAキメラであってもよい。また、該ポリヌクレオチドは二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNA又はDNA:RNAのハイブリッドでもよい。

30

#### 【0036】

本発明のポリヌクレオチドは、公知の配列情報や本明細書の配列表に記載された配列情報を利用することにより適当なプライマーを設計し、本発明の細菌であるAJ110941株の全DNA等を鋳型として用い、PCRによって直接増幅することができる。或いは、配列情報に基づいて、ポリヌクレオチド合成装置により合成してもよい。

#### 【0037】

本発明のポリヌクレオチドは、好ましくは単離又は精製されている。「単離又は精製」とは、天然に存在する状態から目的とする成分以外の成分を除去する操作が施されていることを意味する。単離又は精製された本発明のポリヌクレオチドの純度 (全ポリヌクレオチド重量に対する、本発明のポリヌクレオチドの重量の割合) は、通常50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上 (例えば実質的に100%) である。

40

#### 【0038】

本発明のポリヌクレオチドは、本発明の細菌の検出における陽性対照として使用でき、有用である。

#### 【0039】

(2. 本発明の細菌の検出用試薬)

50

本発明は、上記本発明の細菌の検出用試薬を提供する。

【0040】

本発明の検出用試薬は、本発明の細菌の16SリボソームRNA遺伝子の配列を検出することにより、試料中の本発明の細菌の存在を検出するものである。本発明の検出用試薬は、配列番号3で表される配列と98%以上の相同性を有する核酸配列を含む16SリボソームRNA遺伝子、好ましくは配列番号3で表される核酸配列を含む16SリボソームRNA遺伝子の特異的に検出し得るプライマー又はプローブを含む。

【0041】

上記プライマーは、上記16SリボソームRNA遺伝子の一部又は全部の領域を特異的にPCR増幅し得るように設計されたものであればいかなるものであってもよい。ここで「特異的に」とは、プライマーが、配列番号3で表される核酸配列と98%以上の相同性を有する核酸配列を含む16SリボソームRNA遺伝子、好ましくは配列番号3で表される核酸配列を含む16SリボソームRNA遺伝子の一部又は全部の領域をPCR増幅するが、ラクノスピラ科以外の細菌の16SリボソームRNA遺伝子をPCR増幅しないことを意味する。

10

【0042】

上記プライマーとしては、例えば、配列番号3で表される核酸配列と98%以上の相同性を有する核酸配列（好ましくは、配列番号3で表される核酸配列）の相補配列の連続する部分配列にハイブリダイズする、約15～約50塩基、好ましくは約18～約30塩基の核酸配列を含むポリヌクレオチドと、このハイブリダイゼーション部位より3'側の上記核酸配列の連続する部分配列にハイブリダイズする、約15～約50塩基、好ましくは約18～約30塩基の核酸配列を含むポリヌクレオチドとの組み合わせであり、それらによって増幅される核酸の断片長が約50～約1,000塩基、好ましくは約50～約500塩基である、一对のポリヌクレオチドが挙げられる。

20

【0043】

プライマーは、好ましくは、配列番号3で表される核酸配列と98%以上の相同性を有する核酸配列（好ましくは、配列番号3で表される核酸配列）又はその相補配列の連続する15～50塩基（好ましくは18～30塩基）の部分配列を含む。

【0044】

特異性の観点から、好適なプライマーとしては、配列番号4～12のいずれかで表される核酸配列の相補配列の連続する部分配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドと、配列番号3を基準として、このハイブリダイゼーション部位より3'側の配列番号4～12のいずれかで表される核酸配列の連続する部分配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドとの組み合わせが挙げられる。より好適には、配列番号4～12のいずれかで表される核酸配列の連続する15～50塩基（好ましくは18～30塩基）の部分配列を含むポリヌクレオチドと、このポリヌクレオチドの配列番号3で表される核酸配列からなるポリヌクレオチドへのハイブリダイゼーション部位より3'側の配列番号4～12のいずれかで表される核酸配列の相補配列の15～50塩基（好ましくは18～30塩基）の連続する部分配列を含むポリヌクレオチドとの組み合わせが挙げられる。

30

【0045】

好適なプライマーの具体例として、下記配列番号1で表される核酸配列からなるポリヌクレオチドと、下記配列番号2で表される核酸配列からなるポリヌクレオチドとの組み合わせを挙げることができる。

40

161-183F：5'-CGCACAGCTTCGCATGAAGTGGT-3'（配列番号1）

438-458R：5'-ACCGTCTGGCGACCCAAAGGT-3'（配列番号2）

【0046】

PCRにおける温度設定、反応時間及びサイクル数は、使用するテンプレートDNAの量、プライマーの種類等に応じて適宜設定することができる。PCRにおけるアニーリングの温度は、プライマーのGCコンテンツに基づき適宜設定することができる。例えば、細菌のゲノムDNAを鋳型として、配列番号1で表される核酸配列からなるポリヌクレオ

50

チド及び配列番号2で表される核酸配列からなるポリヌクレオチドをプライマーとして使用して、94 30秒、60 30秒、72 30秒を30サイクル行う条件で反応を行うことができる。

【0047】

上記プローブは、配列番号3で表される核酸配列と98%以上の相同性を有する核酸配列（好ましくは、配列番号3で表される核酸配列）に含まれる、約15塩基以上、好ましくは約18～約500塩基、より好ましくは約18～約200塩基、いっそう好ましくは約18～約50塩基の連続した核酸配列又はその相補配列にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドである。

【0048】

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）第2版（J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989）に記載の方法などに従って行なうことができる。ストリンジェントな条件としては、例えば、6×SSC（sodium chloride/sodium citrate）中45でのハイブリダイゼーション反応の後、0.2×SSC/0.1% SDS中65での一回以上の洗浄などが挙げられる。当業者は、ハイブリダイゼーション溶液の塩濃度、ハイブリダイゼーション反応の温度、プローブ濃度、プローブの長さ、ミスマッチの数、ハイブリダイゼーション反応の時間、洗浄液の塩濃度、洗浄の温度等を適宜変更することにより、所望のストリンジェンシーに容易に調節することができる。

【0049】

好ましくは、プローブは、配列番号3で表される核酸配列と98%以上の相同性を有する核酸配列（好ましくは、配列番号3で表される核酸配列）に含まれる、約15塩基以上、好ましくは約18～約500塩基、より好ましくは約18～約200塩基、いっそう好ましくは約18～約50塩基の連続した核酸配列又はその相補配列を含むポリヌクレオチドである。

【0050】

プローブの長さは、通常約15塩基以上、好ましくは約18～約500塩基、より好ましくは約18～約200塩基、更に好ましくは約18～約50塩基である。

【0051】

特異性の観点から、好適なプローブとしては、配列番号4～12のいずれかで表される核酸配列又はその相補配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドが挙げられる。より好適には、配列番号4～12のいずれかで表される核酸配列又はその相補配列の連続する15～50塩基の部分配列を含むポリヌクレオチドが挙げられる。

【0052】

好適なプローブの具体例として、配列番号1又は配列番号2で表される核酸配列からなるポリヌクレオチドが挙げられる。

【0053】

プライマー又はプローブは、特異的検出に支障を生じない範囲で付加的配列（検出対象のポリヌクレオチドと相補的でない核酸配列）を含んでいてもよい。

【0054】

前記プライマー又はプローブとして使用されるポリヌクレオチドは、デオキシリボ核酸（DNA）でもリボ核酸（RNA）でもよい。リボ核酸の場合、ヌクレオチド配列におけるチミジン残基（T）は、適宜ウリジン残基（U）と読み替えられる。また任意の位置のTをUに変えて合成したウリジン残基を含むDNAであってもよい。同様に任意の位置のUをTに変えて合成したチミジン残基を含むRNAであってもよい。また、ハイブリダイゼーションの特異性を低下させない限り、ポリヌクレオチド中に欠失、挿入又は置換などの点突然変異や、修飾ヌクレオチドが存在してもよい。

【0055】

また、プライマー又はプローブは、適当な標識剤、例えば、放射性同位元素（例：<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>32</sup>P、<sup>33</sup>P、<sup>35</sup>S等）、酵素（例： $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素等

10

20

30

40

50

)、蛍光物質(例:フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネート等)、発光物質(例:ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニン等)、ビオチンなどで標識されていてもよい。

【0056】

前記プライマー又はプローブとして使用されるポリヌクレオチドは、例えば汎用のDNA合成装置を用いて化学的に合成することができる。ポリヌクレオチドは、当該技術分野においてよく知られる他の方法のいずれかを用いて合成してもよい。

【0057】

本発明の検出用試薬は、更に他の成分として核酸合成酵素(DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、逆転写酵素など)、その他の酵素、酵素に応じた基質(dNTP、rNTPなど)などを含んでもよい。また標識検出物質や緩衝液なども含んでもよい。

10

【0058】

本発明の検出用試薬を使用すれば、試料中の糖尿病の病原菌の有無を短時間で容易に判定することができるため、糖尿病の素因の診断に有用である。

【0059】

(3. 本発明の細菌の検出方法)

更に本発明は、配列番号3で表される配列と98%以上の相同性を有する核酸配列を含む16SリボソームRNA遺伝子、好ましくは配列番号3で表される核酸配列を含む16SリボソームRNA遺伝子を検出することを含む、本発明の細菌の検出方法を提供する。

【0060】

本明細書において、「本発明の細菌の検出」は、本発明の細菌の菌体の有無を判定することのみならずその存在量を定量することをも包含する。

20

【0061】

本発明の細菌の検出にあたっては、試料から全DNAを回収する。該試料の種類としては、例えば被験者(健康者、糖尿病患者又は糖尿病に罹患していることが疑われる個体)の糞便又は腸管内容物、単離/培養された細菌などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。試料からDNAを単離/精製する方法は当該技術分野において公知であり、例えば、フェノール・クロロホルムによる抽出、市販のDNA抽出試薬を用いる抽出、又は市販のカラムキットによる精製などにより行うことができる。

【0062】

試料から回収されたDNAは、適切な緩衝液、例えばTE(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)等に溶解され、本発明の検出方法に供される。

30

【0063】

一態様において、本発明の検出方法は、上記本発明の検出用試薬に含まれるプライマーを用いて、試料から回収されたDNAを鋳型としてPCRを行なうことを含む。得られたPCR産物は、電気泳動(例えば、アガロースゲル電気泳動、ポリアクリルアミドゲル電気泳動等)により分離される。電気泳動後、ゲルがエチジウムブロマイド溶液等の自体公知の染色液により染色され、トランスイルミネーター等を用いてPCR産物が検出される。そして、特異的PCR産物の有無や量を指標として、試料中の本発明の細菌の存在の有無や存在量が判定される。

40

【0064】

本発明の検出方法において用いられるPCRは、定量的PCRであってもよい。定量的PCRは、公知の方法により行なうことができるが、2つの解析方法が知られている。1つ目は、PCR反応で反応生成物がある程度の量までは指数関数的に増加し、その後プラトーに達するという特徴を利用し、指数関数的増加期に反応生成物量を解析し、初期鋳型量を算出する方法である。2つ目は、反応生成物をリアルタイムでモニタリングすることにより、反応生成物量がある一定の値(threshold)を超えるPCRサイクル数(Ct)を決定する方法である。いずれの解析方法も、既知濃度のDNA量を変化させPCRを行ない、各サイクル数における反応生成物を解析し、そのカイネティクスから定量性のあるPCRサイクル数範囲を決定することが必要である。その結果をふまえて、未知

50

の試料中の目的遺伝子の存在量を概算する。それにより試料中の本発明の細菌の存在量を定量することができ、目的遺伝子が被験試料中に1コピーでも含まれると概算された場合、本発明の細菌が存在すると判定することができる。

**【0065】**

一態様において、本発明の検出方法は、上記本発明の検出用試薬に含まれるプローブを、試料中の全DNA又は全RNAに接触させる工程を含む。接触の条件は、プローブが16SリボソームRNA遺伝子又はその遺伝子産物とハイブリダイズして核酸複合体を形成するよう適宜設定される。そして当該複合体は、本発明の細菌の存在を指示するものとして検出される。

**【0066】**

プローブを利用する本発明の検出方法は、種々の公知のハイブリダイゼーション技術（例えば、蛍光in situハイブリダイゼーション法（fluorescence in situ hybridization（以下FISHと略す））など）により実施することができる。FISH法においては、プローブは細菌の細胞質内に侵入し、そこに存在する16SリボソームRNA遺伝子内の相補的な配列に適切なハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする。この際に、プローブを放射性同位元素、蛍光物質（例えば、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、TAMRA、Cy3、Cy5など）、化学発光物質などで標識することで、特異的なハイブリダイゼーションの現象を適当な手法（例えば、オートラジオグラフィ、蛍光顕微鏡、フローサイトメトリーなど）によってモニタリングすることができる。例えば、プローブが放射性同位元素で標識されている場合にはオートラジオグラフィ等の方法によってアッセイを実施し、蛍光物質で標識されている場合には蛍光顕微鏡等でアッセイを実施し、化学発光物質で標識されている場合には感光フィルムを用いた解析やCCDカメラを用いたデジタル解析を実施することができる。それにより試料中の本発明の細菌の検出を行なうことができる。

**【0067】**

一態様において、本発明の検出方法は、制限酵素MspIを使用するT-RFLP（Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism）法により、断片長が $282 \pm 1$ bpの制限酵素処理断片を検出することを含む。

T-RFLP法は、例えば以下に行なうことができる。試料中の微生物群集から全DNAを抽出し、リボソームRNA遺伝子上の全細菌に共通な配列、8-27F：5'-AGAGT TTGATCCTGGCTCAG-3'（配列番号13）および1510-1492R：5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'（配列番号14）をプライマーとして使用してPCRを行う。プライマー8-27Fを6-carboxyfluorescein（6-FAM）などの蛍光物質で標識しておくことで、得られるPCR産物の末端が標識される。PCR産物を制限酵素MspIで切断した後、DNAシーケンサー（Applied Biosystems製3130xl Genetic Analyzer）などのキャピラリー電気泳動装置を用いて、サイズスタンダードGS1200LIZ、3130POP-7ポリマー、36cm Capillary Array（何れもApplied Biosystems社製）の条件で電気泳動し、蛍光標識された末端を含む断片を検出する。この条件では、配列番号3で表される核酸配列は、 $282 \pm 1$ bp（理論値： $287$ bp + GC）の末端制限酵素処理断片を生じる。従って、断片長が $282 \pm 1$ bpの制限酵素処理断片が検出されることを指標に、配列番号3で表される核酸配列を含む16SリボソームRNA遺伝子を有する本発明の細菌を検出することができる。

**【0068】**

本発明の検出方法を使用すれば、試料中の糖尿病の病原菌の有無を短時間で容易に判定することができるため、糖尿病の素因の診断に有用である。

**【0069】****（4．糖尿病の素因の有無の判定方法）**

後述の実施例において示されるように、2型糖尿病被験者の糞便中から本発明の細菌が高頻度（31名中7名）で検出されている。また糖尿病を発症していない肥満被験者でも本発明の細菌が検出されたが（32名中1名）、健常被験者では検出されなかった（31名中0名）。本発明の細菌が糖尿病を誘起する活性を有することを考慮すれば、被験者の

10

20

30

40

50

腸内に本発明の細菌が存在することは、当該被験者が、既に糖尿病を発症しているか否かにかかわらず、糖尿病を発症しやすい素質（糖尿病の素因）を有していることを示す。従って、被験者の糞便中の本発明の細菌を検出することにより、糖尿病の素因の有無を判定することができる。即ち、本発明は、被験者の糞便中の本発明の細菌を検出することを含む、糖尿病の素因の有無の判定方法を提供する。

【0070】

本発明の細菌は、被験者の糞便を試料として、上記3に記載の検出方法により検出することができる。被験者の糞便中に本発明の細菌が検出された場合、該被験者が糖尿病の素因を有し、糖尿病を発症するリスクが相対的に高いと判定することができる。逆に本発明の細菌が検出されなかった場合、該被験者が糖尿病を発症するリスクが相対的に低いと判定することもできる。

10

【0071】

また、本発明は、糖尿病の素因の有無を判定するための剤を提供する。本発明の剤は、被験者の糞便中の本発明の細菌の存在を検出することにより、糖尿病の素因の有無を判定するものである。従って本発明の剤は、好ましくは上記2に記載の検出用試薬を含み、より好ましくは配列番号1で表される核酸配列からなるポリヌクレオチド及び下記配列番号2で表される核酸配列からなるポリヌクレオチドのプライマーセットを含む。本発明の剤を用いることにより、上述の方法により容易に糖尿病の素因の有無を判定することができる。

【0072】

20

(5. 本発明の細菌の処理物及び該処理物を含有する組成物)

本発明は更に、上記本発明の細菌の処理物を提供する。

【0073】

本発明の細菌の処理物は、上記本発明の細菌が不可逆的に増殖能力を失うように物理学的又は化学的に処理して得られるものであって、本発明の細菌に対する獲得免疫を惹起させることが可能なものであれば、特に限定されない。本発明の細菌の処理物は、好ましくは本発明の細菌の死菌体、構成成分及び抽出物から選択されるいずれか1つ以上である。

【0074】

細菌の死菌体は、定法に従って生菌体を物理学的及び/又は化学的に処理して滅菌することにより調製することができる。物理学的処理方法としては、例えば、加熱処理（オートクレーブ処理、低温殺菌、高温殺菌など）、乾燥処理（加熱乾燥、凍結乾燥など）、電磁波処理（紫外線殺菌、ガンマ線殺菌など）、磨砕・破砕処理（ガラスビーズ処理、フレンチプレス処理、超音波処理など）など、又はこれらの組み合わせなどが挙げられる。化学的処理方法としては、例えば、化学薬品処理（ホルムアルデヒド処理、界面活性剤処理、酸処理、アルカリ処理）、酵素処理（プロテアーゼ処理、糖化酵素処理など）など、又はこれらの組み合わせが挙げられる。例えば、加熱処理を行なう場合、本発明の細菌の生菌体を、80から120程度の温度で、数秒から30分間程度処理することで死菌体を調製することができる。

30

【0075】

細菌の構成成分は、定法に従って生菌体又は死菌体からその構成成分の一部を単離することにより調製することができる。本発明の細菌の構成成分は、本発明の細菌に対する獲得免疫を惹起させることが可能である限り特に限定されないが、例えば、菌体を細胞壁溶解酵素で処理して細胞壁部分を取り去ったプロトプラスト、菌体の細胞壁溶解酵素可溶成分、菌体の磨砕・破砕物を公知の方法で分画して得られる各画分など、並びにこれらを更に精製して得られるタンパク質、核酸、糖質、脂質などが挙げられる。これらの処理は、当該技術分野において周知技術である。また本発明の細菌の菌体内に存在するタンパク質又はその一部を、遺伝子工学的手法又は化学的手法により合成したポリペプチド、ポリペプチド又はタンパク質も、本発明の細菌の構成成分とすることができる。

40

【0076】

本発明の細菌の抽出物としては、生菌体又は死菌体から、種々の公知の抽出方法により

50

得られる抽出物が挙げられる。抽出方法としては、例えば各種溶媒抽出、超臨界流体抽出などが挙げられる。

【0077】

上記処理の結果、本発明の細菌の処理物が抗原性を失ったり、本発明の細菌に対する獲得免疫を惹起しなくなったりすることもあり得る。そのため、処理後に抗原性その他の性質を調べることが好ましい。

【0078】

本発明の細菌の処理物は、対象に投与すると本発明の細菌に対する免疫応答を誘導するので、本発明の細菌を認識する抗体を製造するための抗原等として有用である。

【0079】

本発明は更に、上記本発明の細菌の処理物を含有する、本発明の細菌に対する免疫応答を誘導するための組成物を提供する。本発明の組成物は、抗原として本発明の細菌の処理物を含有するため、本発明の細菌に対する免疫応答を誘導することが可能である。本発明の細菌の処理物の免疫応答誘導量を、哺乳動物に投与することにより、当該哺乳動物に対して本発明の細菌に対する免疫応答を誘導することができる。

【0080】

哺乳動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモットなどのげっ歯類及びウサギなどの実験動物、イヌ及びネコなどのペット、ウシ、ブタ、ヤギ、ウマ及びヒツジなどの家畜、ヒト、サル、オランウータン及びチンパンジーなどの霊長類などが挙げられる。哺乳動物は、好ましくはげっ歯類（マウス等）又は霊長類（ヒト等）である。

【0081】

本発明の組成物は、剤形に応じて、任意の担体、例えば医薬上許容され得る担体を含むことができる。医薬上許容され得る担体としては、例えば、ショ糖、デンプン、マンニト、ソルビット、乳糖、グルコース、セルロース、タルク、リン酸カルシウム、炭酸カルシウム等の賦形剤、セルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリプロピルピロリドン、ゼラチン、アラビアゴム、ポリエチレングリコール、ショ糖、デンプン等の結合剤、デンプン、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルスターチ、ナトリウム-グリコール-スターチ、炭酸水素ナトリウム、リン酸カルシウム、クエン酸カルシウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、エアロジル、タルク、ラウリル硫酸ナトリウム等の滑剤、リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、炭酸緩衝液、クエン酸緩衝液、トリス緩衝液、グルタミン酸、イプシロンアミノカプロン酸等の緩衝液、塩化ナトリウム、塩化カリウム、グリセリン、マンニトール、ソルビトール、ホウ酸、ブドウ糖、プロピレングリコール等の等張化剤、塩酸、水酸化ナトリウム、リン酸、酢酸等のpH調整剤、グリセリン、プロピレングリコール、マクロゴール、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油等の可溶（化）剤、メチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースなどの水溶性セルロース誘導体、コンドロイチン硫酸ナトリウム、ヒアルロン酸ナトリウム、カルボキシビニルポリマー、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、マクロゴール等の増粘剤、クエン酸、メントール、グリシルリシン・アンモニウム塩、グリシン、オレンジ粉等の芳香剤、安息香酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、メチルパラベン、プロピルパラベン等の保存剤、クエン酸、クエン酸ナトリウム、酢酸、亜硫酸水素ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、エデト酸ナトリウム、アスコルピン酸、ジブチルヒドロキシルエン等の安定（化）剤、安息香酸、パラオキシ安息香酸エステル類、デヒドロ酢酸ナトリウム、ベンジルアルコール、クロロブタノール、フェノール、クレゾール、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム等の防腐剤、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ステアリン酸アルミニウム等の懸濁剤、界面活性剤等の分散剤、水、生理食塩水、オレンジジュース等の希釈剤、カカオ脂、ポリエチレングリコール、白灯油等のベースワックス、ホルマリン等の不活化剤等が挙げられるが、それらに限定されるものではない。

【0082】

本発明の組成物は、製薬上許容可能な、有効成分と相溶性であるアジュバントを更に含

10

20

30

40

50

有することが好ましい。アジュバントは、一般には、宿主の免疫応答を非特異的に増強する物質であり、多数の種々のアジュバントが当該技術分野で公知である。アジュバントの例としては以下のものが挙げられるが、これらに限定されない：水酸化アルミニウム、N - アセチル - ムラミル - L - トレオニル - D - イソグルタミン ( t h r - M D P )、N - アセチル - ノルムラミル - L - アラニル - D - イソグルタミン ( n o r - M D P )、N - アセチルムラミル - L - アラニル - D - イソグルタミニル - L - アラニン - 2 - ( 1 ' - 2 ' - ジバルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ヒドロキシホスホリルオキシ ) - エチルアミン ( M T P - P E )、Q u i l l A ( 登録商標 )、リゾレシチン、サポニン誘導体、プルロニックポリオール、モンタニド I S A - 5 0 ( S e p p i c , P a r i s , F r a n c e )、B a y o l ( 登録商標 ) 及び M a r k o l ( 登録商標 )。

10

## 【 0 0 8 3 】

本発明の組成物は、常法により製造することができる。本発明の細菌の処理物は、本発明の組成物中に 0 . 0 0 1 ~ 9 9 . 9 9 9 重量 % 含有されていればよい。

## 【 0 0 8 4 】

本発明の組成物は、様々な経路により投与することができる。投与経路としては、例えば、皮内、皮下、舌下、鼻腔内、筋肉内、腹腔内、及び経口経路等が挙げられるが、これらに限定されない。特に、腸管の粘膜免疫を誘導する方法が有効であり、腸溶性カプセルへの封入や化学的修飾による保護によって、小腸パイエル板に作用させることが望ましい。

## 【 0 0 8 5 】

本発明の組成物の投与量は、用途、対象の年齢、性別、体重、薬物への忍容性等を考慮して決められるが、通常 0 . 0 0 1 m g ~ 1 , 0 0 0 m g を 1 回又は 2 回以上投与することができる。好ましくは複数回の投与であり、この場合、2 ~ 4 週間の間隔をあけて投与することが好ましい。

20

## 【 0 0 8 6 】

本発明の組成物は、糖尿病を誘起する活性を有する本発明の細菌に対して特異的な免疫応答を増強するため、その他の有用腸内細菌を腸内から除去することなく本発明の細菌を除去することができる。従って、本発明の組成物は、ワクチンとして、本発明の細菌により誘起される糖尿病の予防及び / 又は治療のために有用である。この場合、本発明の組成物の投与対象は、本発明の細菌により誘起される糖尿病に罹患しているか又は罹患するおそれのある哺乳動物 ( 例、ヒト ) である。例えば、本発明の細菌を保菌していない哺乳動物 ( 例、ヒト ) に対して、本発明の細菌の免疫応答誘導量を、哺乳動物に投与することにより、当該哺乳動物において、本発明の細菌に対する免疫応答が誘導され、本発明の細菌に対する獲得免疫が成立する。本発明の細菌に対する獲得免疫が成立した哺乳動物の体内に、本発明の細菌が侵入したとしても、獲得免疫が作動して、本発明の細菌が免疫学的に除去される。従って、本発明の細菌に起因する糖尿病の発症を予防することができる。或いは、本発明の細菌を保菌しているが、糖尿病は未だ発病していない哺乳動物 ( 例、ヒト ) に対して、本発明の細菌の免疫応答誘導量を、哺乳動物に投与することにより、当該哺乳動物において、本発明の細菌に対する免疫応答が誘導され、本発明の細菌に対する獲得免疫が成立する。その結果、体内における本発明の細菌が免疫学的に除去され、本発明の細菌に起因する糖尿病の発症を予防することができる。更には、本発明の細菌を保菌しており、糖尿病を発病した哺乳動物 ( 例、ヒト ) に対して、本発明の細菌の免疫応答誘導量を、哺乳動物に投与することにより、当該哺乳動物において、本発明の細菌に対する免疫応答が誘導され、本発明の細菌に対する獲得免疫が成立する。その結果、体内における本発明の細菌が免疫学的に除去され、本発明の細菌に起因する糖尿病が治療される。

30

40

## 【 0 0 8 7 】

また、本発明の組成物は、本発明の細菌に対する抗体 ( モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体等 ) を製造する際の、免疫原としても有用である。

## 【 0 0 8 8 】

更に本発明は、本発明の細菌又は当該細菌に含まれる抗原性を有する構成成分を特異的

50

に認識する抗体（以下、本発明の抗体とも称する）を提供する。本発明の細菌を特異的に認識する抗体とは、本発明の細菌の細胞表層に存在する表面抗原を特異的に認識し結合する抗体をいう。表面抗原としては、例えば、細胞壁に存在する多糖、ペプチドグリカン若しくはタンパク質、又は線毛若しくは鞭毛のタンパク質が挙げられる。また本発明の細菌に含まれる抗原性を有する構成成分を特異的に認識する抗体とは、表面抗原に限らず、本発明の細菌の構成成分を特異的に認識し結合する抗体をいう。本発明の細菌の構成成分は、上記本発明の細菌の処理物について記載した通りであるが、例えば、本発明の細菌のゲノム上にコードされているタンパク質（細胞内タンパク質及び分泌タンパク質を含む）等が含まれる。

#### 【0089】

本発明の抗体は、上記本発明の細菌の処理物又は本発明の組成物を免疫原として用い、既存の一般的な製造方法によって製造することができる。本明細書において、抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体（mAb）等の天然型抗体、遺伝子組換え技術を用いて製造され得るキメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体や一本鎖抗体、およびこれらの結合性断片が含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、抗体はポリクローナル抗体、モノクローナル抗体又はこれらの結合性断片である。結合性断片とは、特異的結合活性を有する前述の抗体の一部分の領域を意味し、具体的には例えばF(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fab、Fv、sFv、dsFv、sdAb等が挙げられる（Exp. Opin. Ther. Patents, Vol.6, No.5, p.441-456, 1996）。抗体のクラスは、特に限定されず、IgG、IgM、IgA、IgDあるいはIgE等のいずれのアイソタイプを有する抗体をも包含する。好ましくは、IgG又はIgMであり、精製の容易性等を考慮するとより好ましくはIgGである。

#### 【0090】

本発明の抗体を用いることで、免疫学的手法により本発明の細菌の検出、定量等を行なうことができる。免疫学的手法としては、フローサイトメトリー解析、放射性同位元素免疫測定法（RIA法）、ELISA法（Methods in Enzymol. 70: 419-439 (1980)）、ウェスタンブロッティング、免疫組織染色等を挙げることができるが、これらに限定されない。

#### 【0091】

本明細書中で挙げられた特許及び特許出願明細書を含む全ての刊行物に記載された内容は、本明細書での引用により、その全てが明示されたと同程度に本明細書に組み込まれるものである。

#### 【0092】

以下、実施例を示して本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下に示す実施例によって何ら限定されるものではない。

#### 【実施例】

#### 【0093】

##### [実施例1] 肥満モデルマウスの血糖値と腸内細菌叢解析

B6.V Lep<sup>ob</sup>/J (ob/ob) マウスは、食欲抑制ホルモンの一種であるレプチンの遺伝子欠損マウスであるため、過食による肥満を呈するが、空腹時血糖値が400 mg/dlを超える高値を呈する個体は稀である。

そこで、肥満モデルマウスの血糖値と腸内細菌叢の関連性を調べるために、日本チャールス・リバー社より、5週齢の雄性ob/obマウスを6匹購入し、6週間の飼育を行い、その間の空腹時血糖値（16時間絶食）及び飼育開始時（5週齢）の糞便中腸内細菌叢の測定を行った。飼育期間中は、明暗12時間サイクルのSPF条件下で、1匹/ケージで飼育し、水とCRF-1（オリエンタル酵母社製）を自由摂食させた。血糖値の測定には富士ドライケムシステムFDC7000Vを用いた。排泄された糞便は、99%エタノールを入れた容器に直接受け止め、使用まで-30℃で保存した。糞便からのDNA抽出にはFastDNA SPIN Kit for Soil（MP biomedical社製）を用いた。糞便中腸内細菌叢の測定は、Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism（T-RFLP）法（Micorbiol. Immunol., 47:133-142, 2003）を用いて、Genetic Analyzer 3130xl及びDNA Size Standard 1200LIZ（Applied Biosystems社）を使用した。PCR産物の制限酵素処理には、MspI（Takara社製）を用いた。

10

20

30

40

50

図1に示したように、飼育した6匹中1匹の空腹時血糖値が上昇し、飼育開始から6週間(11週齢の時点)で400mg/dlを超えた。この個体の腸内細菌叢を調べてみると、図2に示した通り、制限酵素処理断片長(T-RF)が $282 \pm 1$  bpである特定の腸内細菌が、飼育開始の時点(5週齢)で優勢化していたことが分かった。

#### 【0094】

[実施例2] 糖尿病モデルマウスの抗生物質処理による空腹時血糖値上昇抑制効果

BKS.Cg m +/+ Lepr<sup>db</sup>/J (db/db) マウスは、食欲抑制ホルモンの一種であるレプチンの受容体遺伝子欠損マウスであるため、ob/obマウスと同様に過食による肥満を呈すが、その後、ほとんどの個体で空腹時血糖値が400 mg/dlを超える様な糖尿病を発症する。

そこで、難吸収性抗生物質が糖尿病モデルマウスの空腹時血糖値に与える影響を調べるために、日本チャールス・リバー社より、5週齢の雄性db/dbマウスを12匹購入し、コントロール群(水摂取)6匹とバンコマイシン摂取群(1 mg/ml バンコマイシン含有水摂取)6匹に分け、実施例1と同様の方法で8週間飼育し、空腹時血糖値及び糞便中腸内細菌叢の測定を行った。バンコマイシンは、グリコペプチド系抗菌薬であり、グラム陽性菌に対して広い抗菌スペクトルを持ち、消化管内で分解されにくく生体内へほとんど吸収されることが無いため、経口で摂取した場合は、腸内細菌に対してのみ作用するという特徴をもつ抗生物質である。

図3に示したように、バンコマイシン摂取群の空腹時血糖値はコントロール群に対して、有意に低値となり、難消化性抗生物質によって空腹時血糖値の上昇が抑制されることが明らかとなった。また、バンコマイシン摂取によって、T-RF  $282 \pm 1$  bpを持つ腸内細菌は検出限界以下となった。

#### 【0095】

[実施例3] T-RF  $282 \pm 1$  bpの腸内細菌の分離・同定

日本チャールス・リバー社より、5週齢の雄性db/dbマウスを10匹購入し、T-RFLP法による糞便中腸内細菌叢の測定により、T-RF  $282 \pm 1$  bpの存在量が特に多い1個体を選定した。選定されたマウスの盲腸の内容物約50 mgを採材し、1 mlの99%エタノールに懸濁し2時間処理した後、嫌気化したPBSで希釈して、EG寒天培地(Lab Anim 19: 111-118, 1985)に塗布し、37℃で7日間、嫌気的に培養した。出現したコロニーを60個分離し、それぞれのコロニーをT-RFLP法による測定を行い、T-RF  $282 \pm 1$  bpを持つコロニーを特定し株化した。

この菌株の16SリボソームRNA遺伝子(16S rDNA)のヌクレオチド配列は、配列番号3に示す通りである。

この配列を基に、日本DNAデータバンク(<http://www.ddbj.nig.ac.jp>)及びRibosomal Database Project(<http://rdp.cme.msu.edu/>)のデータベースを参照し、細菌種の系統分類解析を行った結果、グラム陽性細菌門(Firmicutes)クロストリジウム綱(Clostridia)クロストリジウム目(Clostridiales)ラクノスピラ科(Lachnospiraceae)に属する細菌であることが明らかとなった(図5)。しかしながら、最も近縁のAnaerostipes caccae L1-92<sup>T</sup>株でも16S rDNA配列の相同性は90%であった(表1)。尚、相同性の算出には、NCBI BLASTを用いた。

#### 【0096】

【表1】

Accession No.	Type Strain	相同性
AJ270487	<i>Anaerostipes caccae</i> L1-92 <sup>T</sup>	90%
AJ505973	<i>Marvinbryantia formatexigens</i> I-52 <sup>T</sup>	90%
AF445239	<i>Hespellia porcina</i> PPC80 <sup>T</sup>	89%
AF445264	<i>Hespellia stercorisuis</i> PPC18 <sup>T</sup>	89%
AF445285	<i>Robinsoniella peoriensis</i> PPC31 <sup>T</sup>	89%
AJ132842	<i>Dorea longicatena</i> III-35 <sup>T</sup>	89%
DQ377947	<i>Moryella indoligenes</i> AIP220.04 <sup>T</sup>	89%
EF031542	<i>Coprococcus comes</i> ATCC27758 <sup>T</sup>	89%
AB038359	<i>Coprococcus catus</i> VPI-C6-61 <sup>T</sup>	88%
AF298663	<i>Lachnobacterium bovis</i> ATCC BAA-151 <sup>T</sup>	88%
AJ270473	<i>Roseburia inulinivorans</i> A2-194 <sup>T</sup>	88%
AJ270482	<i>Roseburia hominis</i> A2-183 <sup>T</sup>	88%
AJ272036	<i>Parasporobacterium paucivorans</i> SYR1 <sup>T</sup>	88%
AJ312385	<i>Roseburia intestinalis</i> L1-82 <sup>T</sup>	88%
AY305310	<i>Roseburia faecis</i> M72/1 <sup>T</sup>	88%
AY323228	<i>Oribacterium sinus</i> AIP354.02 <sup>T</sup>	88%
EF031543	<i>Coprococcus eutactus</i> ATCC27759 <sup>T</sup>	88%
X95893	<i>Pseudobutyrvibrio ruminis</i> DSM9787 <sup>T</sup>	88%
AF116854	<i>Sporobacterium olearium</i> DSM12504 <sup>T</sup>	87%
AF202264	<i>Syntrophococcus sucromutans</i> S195 <sup>T</sup>	87%
AF399956	<i>Shuttleworthia satelles</i> D143K-13 <sup>T</sup>	87%
AJ428548	<i>Pseudobutyrvibrio xylanivorans</i> Mz5 <sup>T</sup>	87%
AJ428553	<i>Butyrvibrio hungatei</i> JK615 <sup>T</sup>	87%
L34619	<i>Dorea formicigenerans</i> <sup>T</sup>	87%
U37378	<i>Butyrvibrio proteoclasticus</i> B316 <sup>T</sup>	87%
U41172	<i>Butyrvibrio fibrisolvens</i> ATCC19171 <sup>T</sup>	87%
M59083	<i>Acetitomaculum ruminis</i> 139B <sup>T</sup>	86%
X87151	<i>Catonella morbi</i> ATCC51271 <sup>T</sup>	86%
CP000246	<i>Clostridium perfringens</i> ATCC13124 <sup>T</sup>	84%

10

20

30

## 【0097】

一般的に、属レベルでの同定には95%以上、種レベルでの同定には98%以上の相同性が必要であることが知られているため (Science 2005, 307, 1915-1920)、AJ110941は学術名が付与されていない新属新種であることが明らかとなった。この培養菌株の走査型電子顕微鏡観察の結果、図6に示した通り、長さ約10 μm、幅約1 μmの長桿菌で、細胞周囲に多くの線毛あるいは鞭毛を持つ細菌であることが分かった (以下、この腸内細菌をAJ110941と称す)。

## 【0098】

## [実施例4] AJ110941の運動性確認試験

AJ110941菌体を1 μl容のループを用いて、1ループ分量を掻き取り、EG寒天培地上の中央に直径約1cmの均一な円板状に塗布し、7日間、37 °Cの嫌気条件下において培養を行った。その結果、培養開始3日目より菌体の生育範囲が円板状に広がり始め、5日目で約5cm、7日目で約9cmに生育範囲が拡大した。この様に生育範囲の顕著な拡大が認められた。また、寒天濃度0.15%に調製した半流動高層EG培地に、AJ110941菌体を穿刺により接種し、嫌氣的に37 °Cで7日間培養した。その結果、半流動高層EG培地の全体的な白濁が認められた。これらのことから、AJ110941は運動性を有すると判断した。

40

## 【0099】

## [実施例5] AJ110941検出のための特異的DNAプライマーの作成

実施例3で示した16S rDNA配列を基にAJ110941検出のための特異的DNAプライマーを設計した。

50

161-183F : 5' -CGCACAGCTTCGCATGAAGTGGT-3' (配列番号 1 )

438-458R : 5' -ACCGTCTGGCGACCCAAAGGT-3' (配列番号 2 )

このプライマーセットの特異性を評価するために、種々の代表的な腸内細菌由来DNAをテンプレートとしたPCRを実施した。PCRは、Ex taq (タカラバイオ) を用いて、94 30秒、60 30秒、72 30秒を30サイクル行い、PCR産物の検出を行った。その結果、表 2 に示す通り、AJ110941においてのみ、約300 bpのPCRが検出された。このことから、設計したプライマーの特異性を確認することができた。

【 0 1 0 0 】

【表 2】

菌株	PCR 結果 (+/-)
AJ110941	+
<i>Bacteroides distasonis</i> JCM5825	-
<i>Bacteroides fragilis</i> JCM11019	-
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> JCM5827	-
<i>Bacteroides vulgatus</i> JCM5826	-
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> JCM1275	-
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> JCM7042	-
<i>Bifidobacterium bifidum</i> JCM1254	-
<i>Bifidobacterium bifidum</i> JCM1255	-
<i>Bifidobacterium breve</i> JCM1192	-
<i>Bifidobacterium breve</i> JCM7017	-
<i>Bifidobacterium catenulatum</i> JCM1194	-
<i>Bifidobacterium dentium</i> JCM1195	-
<i>Bifidobacterium dentium</i> JCM7135	-
<i>Bifidobacterium infantis</i> JCM1222	-
<i>Bifidobacterium longum</i> JCM1217	-
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> JCM1200	-
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> JCM7040	-
<i>Blautia producta</i> JCM1471	-
<i>Clostridium bifermentans</i> JCM1386	-
<i>Clostridium butyricum</i> JCM1391	-
<i>Clostridium paraputrificum</i> JCM1293	-
<i>Clostridium perfringens</i> JCM1290	-
<i>Clostridium ramosum</i> JCM1298	-
<i>Collinsella aerofaciens</i> JCM10188	-
<i>Collinsella intestinalis</i> JCM10643	-
<i>Collinsella stercoris</i> JCM10641	-
<i>Eggerthella lenta</i> JCM9979	-
<i>Enterococcus faecalis</i> JCM5803	-
<i>Enterococcus faecium</i> JCM5804	-
<i>Escherichia coli</i> JCM1649	-
<i>Eubacterium limosum</i> JCM6421	-
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> ATCC 27766	-
<i>Fusobacterium varium</i> JCM3722	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i> JCM1132	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i> JCM1229	-
<i>Lactobacillus casei</i> JCM1134	-
<i>Lactobacillus gasserii</i> JCM1131	-
<i>Lactobacillus salivarius</i> JCM1231	-
<i>Mitsuokella multiacida</i> JCM2054	-
<i>Porphyromonas gingivaris</i> JCM12257	-
<i>Prevotella melaninogenica</i> JCM6325	-

【 0 1 0 1 】

[ 実施例 6 ] AJ110941 定着ノトバイオトob/obマウスのフェノタイプ解析

実施例 3 で分離した腸内細菌AJ110941が肥満モデルマウスの血糖値の上昇に関与することを検証するために、他の腸内細菌の影響を排除した無菌肥満モデルマウスに定着させ、血糖値への影響を調べた。

10

20

30

40

50

三協ラボサービス社より、5週齢の雄性C57BL/6JHamSlc ob/obの無菌マウスを購入し、無菌条件下で8週齢まで馴化した。その後、コントロール（無菌）群3匹、E.coli定着群3匹、E.coli及びAJ110941共定着群（共定着群）3匹に群分けし、E.coli及びAJ110941の培養菌体をそれぞれ経口により接種しノトバイオト化した後、さらに6週間飼育した。6週間後、4時間絶食の後、糞便中腸内細菌叢、血糖値、インスリン、グルカゴンの測定を行った。腸内細菌叢及び血糖値の測定は実施例1と同様に行った。インスリンの測定はインスリンELISAキット（森永生科学研究所製）、グルカゴンの測定には、グルカゴンELISAキットワコー（和光純薬工業製）を使用した。

AJ110941の生育には、高度な嫌気性が必要なため、通性嫌気性菌であるE.coliと共定着させることによって、AJ110941の無菌マウスへの定着が可能であった。マウスの入荷から飼育終了までの全ての期間において、マウスは無菌条件を維持可能なアイソレーター内で、3匹/ケージで飼育し、水とCRF-1（オリエンタル酵母社製）を自由摂食させた。

先ず、飼育終了時の糞便中腸内細菌叢の測定し接種した細菌の定着を確認したところ、コントロール群は無菌状態が保たれており、E.coli定着群からはE.coliのみ、共定着群からはE.coliとAJ110941のみが検出され（図7）、目的とするノトバイオトマウスが作出されたことを確認した。そして、血液成分の測定を行ったところ、共定着群において、顕著な血糖値の上昇、血中グルカゴン濃度の上昇、血中インスリン濃度の低下が認められた（図8）。更に、血糖値及びインスリンの結果から、インスリン抵抗性指数（HOMA IR）及び膵細胞機能指数（HOMA $\beta$ ）を求めたところ、HOMA IRに群間差は認められなかったが、HOMA $\beta$ は、共定着群において顕著な低下が示された（図9）。

従って、他の腸内細菌の影響を極力排除した条件下においては、AJ110941の定着は、膵細胞の機能低下、即ちインスリン分泌能の低下を引き起こし、その結果として高血糖を引き起こすことが明らかとなった。

#### 【0102】

[実施例7] 食餌性肥満モデルマウスへのAJ110941生菌体の経口投与によるインスリン抵抗性への影響

4週齢から12週齢まで60 kcal%ラードの高脂肪食（リサーチダイエツト社製）による肥満を誘発したC57BL/6J（日本チャールス・リバー）を3群に分け、それぞれ、コントロール群、E.coli投与群、AJ110941投与群とした。それぞれの群には、E.coli及びAJ110941菌体を投与量が約 $10^6$  cells/350  $\mu$ l/mouseとなるように用時調製し、1日1回、4週間の経口投与負荷を行った。マウスの飼育はSPF条件下で、1匹/ケージで飼育し、水と60 kcal%ラードの高脂肪食を自由摂食させた。AJ110941菌体はEG寒天培地を用いて嫌気培養（酸素濃度1 ppm以下）を行い、嫌気チャンパー内で、コロニーをループで採取しEG液体培地に懸濁させ、各個体当たりの菌体投与量が約 $10^6$  cells/350  $\mu$ lとなるように経口投与用のシリンジに封入し、密閉容器内で投与直前まで嫌気状態を維持した。E.coliは、EG寒天培地を用いて好気培養を行い、EG液体培地に懸濁させ、各個体当たりの菌体投与量が約 $10^6$  cells/350  $\mu$ lを経口投与した。尚、コントロール群には、菌体の懸濁液に用いたEG液体培地のみを投与した。菌体投与開始から4週後に、インスリン負荷試験（インスリン1 U/kg、i.p.）を行い、AJ110941のインスリン抵抗性への影響を調べた。

その結果、コントロール群及びE.coli投与群では、インスリン投与後の血糖値が速やかに低下したが、AJ110941投与群では、有意にその低下が抑制された（図10）。

従って、SPF条件下でAJ110941生菌体を経口で負荷することによって、インスリン感受性が低下し、インスリン抵抗性を惹起することが明らかとなった。

#### 【0103】

[実施例8] AJ110941のヒトでの存在と糖尿病との関係解析

健常被験者31名（BMI 23、空腹時血糖<100 mg/dl、HbA1c<5.8%）、肥満被験者32名（BMI 25、空腹時血糖<100 mg/dl、HbA1c<5.8%）、2型糖尿病被験者31名（BMI 25、空腹時血糖 126 mg/dl、HbA1c 6.1%）から糞便を回収し、実施例4に記載のプライマーセットを用いて、AJ110941のヒトでの存在と糖尿病の指標との関係を調べた。

被験者の糞便サンプルは、GTC溶液（4M guanidium thiocyanate、40 mM EDTA、100 mM T

10

20

30

40

50

ris-HCl (pH 9.0))に懸濁し、FastDNA SPIN kit for soil (MP-biomedicals社製)を用いてDNAの抽出・精製を行い、これをPCRに供した。PCR条件は実施例4と同様である。その結果、AJ110941特異的プライマーによるPCRの検出件数は、健常被験者群からは0名、肥満被験者群からは1名(3.1%)、2型糖尿病被験者群からは7名(22.5%)であり、2型糖尿病被験者群の検出頻度が最も高い値となった(図11)。また、2型糖尿病被験者群を7名のPCRポジティブ(+)被験者群と、24名のPCRネガティブ(-)被験者に分け、糖尿病の指標である空腹時の血糖値、血中インスリン、血中HbA1cを比較したところ、何れの指標においてもPCR(+)群において高い傾向を示した(図12)。従って、ヒトにおいてもAJ110941菌が存在し、糖尿病の増悪因子として作用する可能性が示された。

【産業上の利用可能性】

10

【0104】

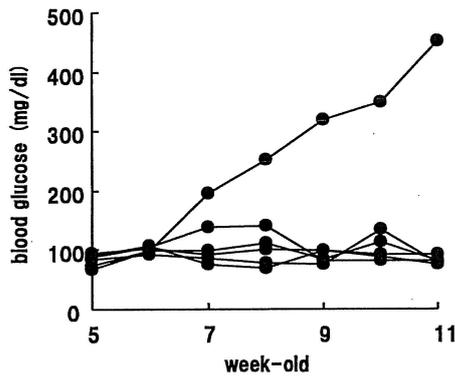
本発明の糖尿病の発症を誘起する細菌は、糖尿病予防及び治療の分野において新たな薬剤標的となり得る。これにより、糖尿病の予防及び治療を目的とする抗生剤あるいはワクチン等の医薬品の研究開発や、プレバイオティクス及びプロバイオティクス等の食品の研究開発が可能となる。更には、糞便中の腸内細菌検査によって、糖尿病発症のリスクを確認することができる。

【0105】

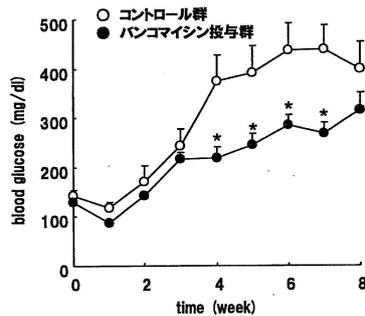
本出願は、日本で出願された特願2012-080469(出願日:2012年3月30日)及び米国仮特許出願第61/618,052号(出願日:2012年3月30日)を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

20

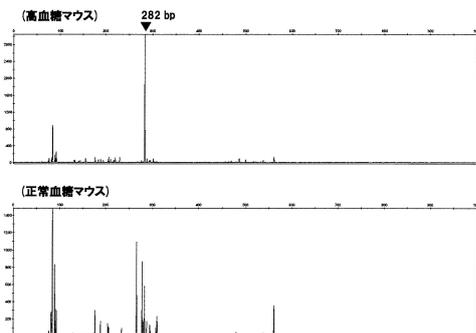
【図1】



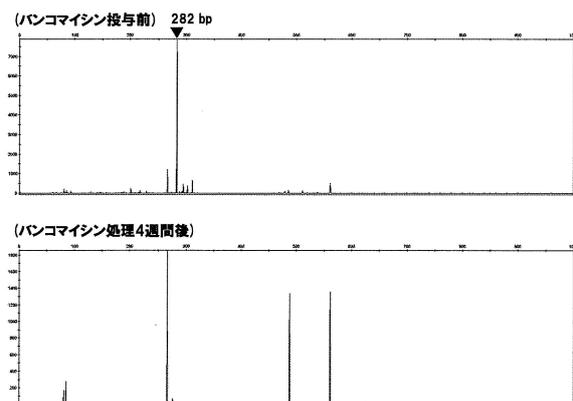
【図3】



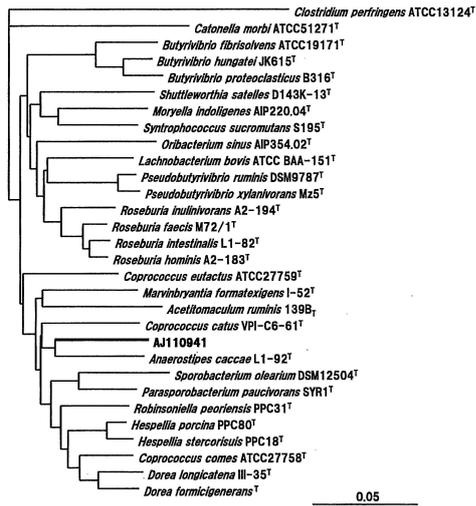
【図2】



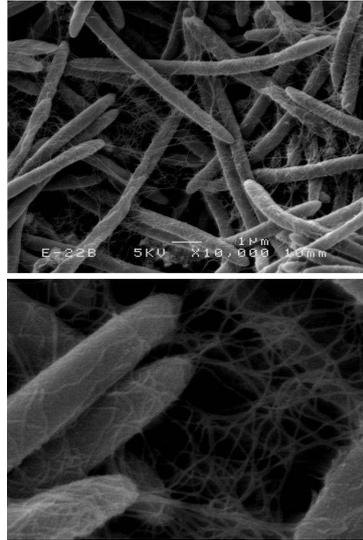
【図4】



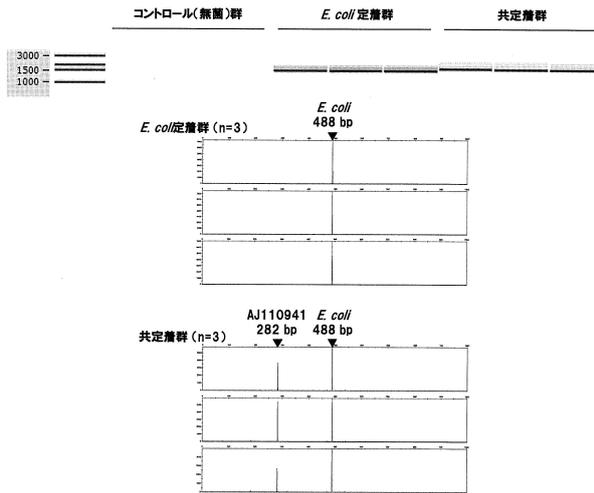
【 図 5 】



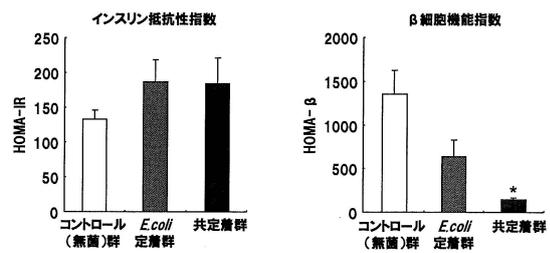
【 図 6 】



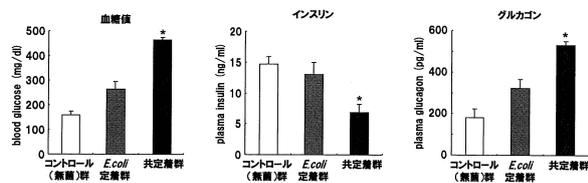
【 図 7 】



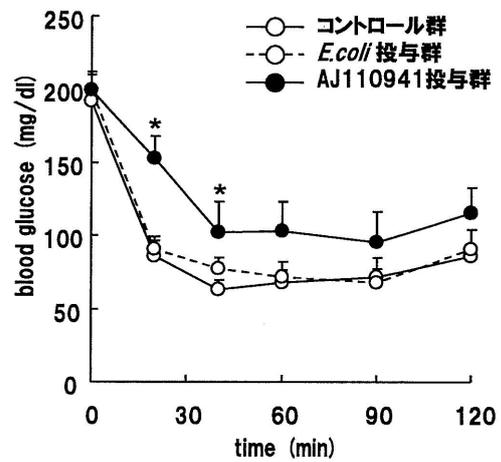
【 図 9 】



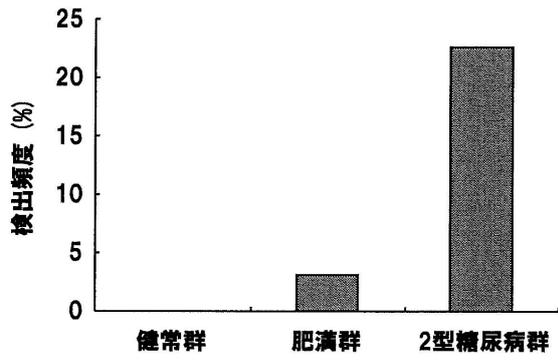
【 図 8 】



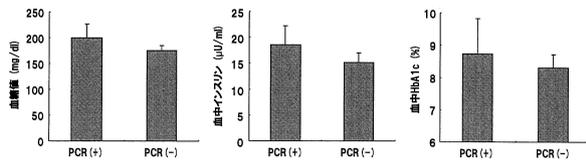
【 図 10 】



【図11】



【図12】



【配列表】

0006201982000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 K	35/74	(2015.01)	A 6 1 K	35/74	A
			A 6 1 K	35/74	B
			A 6 1 K	35/74	D

(56)参考文献 米国特許出願公開第2011/0280840 (US, A1)

国際公開第2012/024638 (WO, A2)

STECHEER B., et al., DEFINITION: Uncultured bacterium clone 16saw23-2g06.p1k 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accession No.EF605067, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EF605067>>, 2007年11月9日

WEN L., et al., DEFINITION: Uncultured bacterium clone H79S1\_71b07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accession No.EU453312, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EU453312>>, 2008年10月17日

WEN L., et al., Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes, Nature, 2008年10月23日, Vol.455, No.7216, pp.1109-1113

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C12N 1/00 - 7/08

C12Q 1/00 - 3/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq