

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-204296
(P2006-204296A)

(43) 公開日 平成18年8月10日(2006.8.10)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N 1/20 Z N A A	4 B O 1 8
A 6 1 K 35/74 (2006.01)	A 6 1 K 35/74 A	4 B O 2 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 5
A 6 1 K 31/353 (2006.01)	A 6 1 K 31/353	4 C O 8 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C O 8 6
審査請求 未請求 請求項の数 34 O L (全 34 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2005-376653 (P2005-376653)	(71) 出願人	501145295
(22) 出願日	平成17年12月27日 (2005.12.27)		独立行政法人食品総合研究所
(31) 優先権主張番号	特願2004-377891 (P2004-377891)		茨城県つくば市観音台2丁目1番地12
(32) 優先日	平成16年12月27日 (2004.12.27)	(74) 代理人	100078282
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 山本 秀策
		(74) 代理人	100062409
			弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		(72) 発明者	田村 基
			茨城県つくば市吾妻2丁目10番4 80
			9-502
		Fターム(参考)	4B018 MD07 MD85 MD87 ME04 ME06
			ME08 ME14 MF01 MF06 MF13
			4B024 AA01 AA05 AA11 CA01 HA14
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ダイゼイン資化によるエコール生成能を改善するための腸内細菌およびその利用

(57) 【要約】

【課題】本発明は、腸内でダイゼインを資化してエコールを生産するもしくは腸内細菌叢全体のエコール生産を向上させる能力を有する腸内細菌を提供することを課題とする。

【解決手段】本発明は、ダイゼインを資化してエコールを生産する能力を有する、ヒトの腸内細菌（特に、Slackia属菌TM-30）および、腸内細菌叢全体のダイゼインを資化してエコールを生産する能力を効果的に向上させる能力を有する腸内細菌（Bifidobacterium adolescentis、Bifidobacterium breve）およびそれらの利用方法を提供する。エコール生産能を向上させるための方法であって、本発明の腸内細菌または組成物を、処置が必要とされる被験体に投与する工程を包含する方法もまた提供される。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ダイゼインを資化してエコールを生産するダイゼイン資化能を有する、ヒトの腸内細菌と菌種特異的プライマーもしくは、ヒトの腸内細菌叢のダイゼインを資化してエコールを生産する能力を向上させる腸内細菌。

【請求項 2】

前記腸内細菌は、*Slackia*属に属する、請求項 1 に記載の腸内細菌。

【請求項 3】

前記腸内細菌は、*Bifidobacterium*属に属する、請求項 1 に記載の腸内細菌。

10

【請求項 4】

前記腸内細菌は、*Bifidobacterium adolescentis*種または *Bifidobacterium breve*種に属する、請求項 3 に記載の腸内細菌。

【請求項 5】

前記腸内細菌の菌種特異的プライマーであって、配列番号 3 に示す配列の一部で選択的に検出可能であることを特徴とする、請求項 1 に記載の腸内細菌。

【請求項 6】

前記腸内細菌は、ダイゼインを基質として 24 時間後に測定したダイゼイン資化能が 10% 以上であることを特徴とする、請求項 1 に記載の腸内細菌。

【請求項 7】

前記腸内細菌は、ダイゼインを基質として 24 時間後に測定したダイゼイン資化能 10% 以上であることを特徴とする、請求項 1 に記載の腸内細菌。

20

【請求項 8】

前記腸内細菌は、ダイゼインを基質として 24 時間後に測定したダイゼイン資化能 20% 以上であることを特徴とする、請求項 1 に記載の腸内細菌。

【請求項 9】

前記腸内細菌は、ダイゼインを基質として 24 時間後に測定したダイゼイン資化能 30% 以上であることを特徴とする、請求項 1 に記載の腸内細菌。

【請求項 10】

前記腸内細菌は、エコール非生産性ヒトフローラマウスに対してエコール生産性付与効果を有することを特徴とする、請求項 1 に記載の腸内細菌。

30

【請求項 11】

前記腸内細菌は、エコール生産性ヒトフローラマウスに対して 2 倍以上のエコール生産性向上効果を有することを特徴とする、請求項 1 に記載の腸内細菌。

【請求項 12】

前記腸内細菌は、*Slackia*属である、請求項 7 または 8 に記載の腸内細菌。

【請求項 13】

前記腸内細菌は、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において、受領番号 FERM AP-20729 号 (受領日平成 17 年 12 月 2 日) の *Slackia* TM-30 株、受託番号 FERM P-20325 号 (受領番号 FERM AP-20325 号) (受領日平成 16 年 12 月 16 日) として寄託された *Bifidobacterium adolescentis* TM-1 株、もしくは理化学研究所微生物系統保存施設の保存菌株である *Bifidobacterium breve* JCM 1273 である請求項 1 に記載の腸内細菌。

40

【請求項 14】

プロバイオティクスとして使用可能な細菌であることを特徴とする、請求項 1 に記載の腸内細菌。

【請求項 15】

デンプンまたはグリコーゲンを資化する能力を有することをさらに特徴とする、請求項 1 に記載の腸内細菌。

50

【請求項16】

請求項1に記載の腸内細菌の組み合わせであって、該組み合わせに含まれる前記腸内細菌は、Slackia属に属する細菌と、Bifidobacterium属に属する細菌とを含む、組み合わせ。

【請求項17】

前記組み合わせは、Slackia TM-30株とBifidobacterium adolescentis TM-1株との組み合わせを含む、請求項16に記載の組み合わせ。

【請求項18】

エコール生産能を向上させるための、請求項1～14のいずれか1項に記載の腸内細菌または請求項15～17のいずれか1項に記載の組み合わせを含む組成物。 10

【請求項19】

食品または医薬である、請求項18に記載の組成物。

【請求項20】

さらに他の有効成分を含む、請求項18に記載の組成物。

【請求項21】

前記腸内細菌は、液体中に溶解して提供される、請求項18に記載の組成物。

【請求項22】

前記腸内細菌は、固形状で提供される、請求項18に記載の組成物。

【請求項23】

前記腸内細菌は、凍結乾燥されて提供される、請求項18に記載の組成物。 20

【請求項24】

前記腸内細菌を胃液から保護する成分をさらに含む、請求項18に記載の組成物

【請求項25】

エコール生産能を向上させるための方法であって、請求項1～14のいずれか1項に記載の腸内細菌、請求項15～17のいずれか1項に記載の組み合わせまたは請求項18～24のいずれか1項に記載の組成物を、処置が必要とされる被験体に投与する工程を包含する、方法。

【請求項26】

ダイゼインを資化してエコールを生産するダイゼイン資化能を有するもしくはエコール生産能を向上させるための細菌を生産する方法であって、該細菌を含むことが予想されるサンプルを、EG培地を用いて培養する工程を包含する、方法。 30

【請求項27】

ダイゼインを資化してエコールを生産するダイゼイン資化能を有する、ヒトの腸内細菌もしくはエコール生産能を向上させるヒトの腸内細菌を生産する方法であって、

A) ヒトの腸由来物質または糞便を含むサンプルを提供する工程；

B) 該サンプルを、EG培地を用いて、37℃で培養する工程；

C) ブレインハートインフュージョン37g、寒天1g、L-システイン塩酸0.5g、炭酸ナトリウム4gを1リットルの蒸留水に加温溶解し、酸素フリーの炭酸ガスを吹き込みながら試験管に分注し、プチルゴム栓をして、オートクレーブ滅菌処理を行って作製した反応液0.2ml中で、該サンプル中で菌濃度が約 10^9 /mlになるように懸濁し、ダイゼイン $1\mu\text{l}$ (20mg/ml)を添加した後、簡易型嫌気性培養装置アネロパックで37℃、24時間インキュベーションする工程； 40

D) 反応液中のイソフラボン類の分析を行う工程；および

E) ダイゼインまたはその誘導体を資化してエコールを生産するダイゼイン資化能を有する腸内細菌を選択し、生産する工程を包含する方法。

【請求項28】

前記サンプルは、健康人の糞便に由来するサンプルである、請求項27に記載の方法。

【請求項29】

請求項27～29に記載の方法により調製される細菌。 50

【請求項 30】

エコールを含むもしくはエコール生産性を向上させる医薬を製造するための方法であって、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の腸内細菌または請求項 15 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の組み合わせと、ダイゼインとを混合する工程、および混合された混合物を該腸内細菌が資化する条件下でインキュベートする工程を包含する、方法。

【請求項 31】

請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の腸内細菌または請求項 15 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の組み合わせと、ダイゼインとを混合する工程、および混合された混合物を該腸内細菌が資化する条件下でインキュベートする工程を包含する方法によって生産された、組成物。

10

【請求項 32】

請求項 30 に記載の方法によって得られる細菌。

【請求項 33】

エコールを含む医薬を製造するための、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の腸内細菌、請求項 30 に記載の方法によって得られる細菌または請求項 15 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の組み合わせの使用。

【請求項 34】

エコール生産性を向上させるための医薬を生産するための、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の腸内細菌、請求項 30 に記載の方法によって得られる細菌または請求項 15 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の組み合わせの使用。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ダイゼインを資化してエコールを生産するダイゼイン資化能を有する腸内細菌と菌種特異的プライマーもしくは、ヒトの腸内細菌叢のダイゼインを資化してエコールを生産する能力を向上させる腸内細菌およびその利用に関する。

【背景技術】

【0002】

特許文献 1 (国際公開 WO 99 / 07392 号) にはダイゼインを資化してエコールを生産する微生物である *Bacterioides FERM BP - 6435*、*Streptococcus FERM BP - 6436* および *Streptococcus FERM BP - 6437* を必須成分として含有するダイゼイン含有物が記載されている。

30

【0003】

しかし、これらの微生物は、いずれもプロバイオテイクスとしての使用例の少ない菌種である。プロバイオテイクスとは、消化管内の細菌叢を改善し、宿主に有益な作用をもたらす有用な微生物と、それらの増殖促進物質に関する能力をいい、最近注目されている能力である。これまでのところ、プロバイオテイクスとして使用されているのは、*Bifidobacterium* および *Lactobacillus* などしかない。

【0004】

大豆食品の心臓血管疾患予防効果 [非特許文献 1 = *J. Nutr.* 128 巻、1589 - 1592 頁 (1998)]、乳癌、前立腺癌などの特定の癌の予防効果 [非特許文献 2 = *Nutr. Cancer*、21、113 - 131 (1994)] が示唆されている。イソフラボンは、大豆に含まれる機能性成分であり、ダイゼインはイソフラボンの主要な成分の一つである。このダイゼインは、腸内細菌の作用によって抗酸化性およびエストロゲン作用の強いエコールに資化され得ることが報告されている [非特許文献 3 = *Food Chem. Toxicol.*、41 巻、631 - 636 頁 (2003)]。しかし、従来、このような特定の腸内細菌を単離してくる方法は報告されていない。

40

【0005】

ところが、最近、ボランティア試験において、イソフラボン含有大豆食品を摂取した人の血漿コレステロールおよび血漿トリグリセリド低下効果が顕著であったのは、エ

50

コール生産能が高い人であったということが報告されている [非特許文献4 = Ann. Nutr. Metab, 48巻、67 - 78頁 (2004)]。また、乳癌リスクの低さと尿中へのエコール排泄量の高さとの間に相関があるという報告 [非特許文献5 = Lancet, 350巻、990 - 994頁 (1997)] や、男性の前立腺癌は、エコール生産能が高い人では少ないことが報告されていて [非特許文献6 = Jpn. J. Clin. Oncol. 32巻、296 - 300頁 (2002)]、イソフラボンの心疾患予防効果や乳癌、前立腺癌予防には、エコールが重要な役割を担っていることが推察されている。

【0006】

非特許文献7 [Journal of Food Science 67巻、3104 - 3113頁 (2002)] および非特許文献8 [Journal of Food Science 68巻、623 - 631頁 (2002)] には、Bifidobacteriumを用いてイソフラボン類を生物変換する方法が記載されている。しかし、この文献で開示された細菌は、ヒトの糞便に添加した場合のエコール生産におよぼす効果については報告されておらず、エコール生産能向上効果については、全く言及しておらず、エコール生産能向上効果については、ないといえる。また同定した微生物のプロバイオテイクスとしての利用については何ら言及されていない。

【0007】

本発明者は、非特許文献9 ~ 11 [Nutr. Res. 22巻、705 - 513頁 (2002) ; J. Nutr. Sci. Vitaminol. 48巻、225 - 229頁 (2002) ; Microb. Ecol Health Dis 16巻、18 - 22頁 (2004)] において、エコールが動物の健康状態に与える影響を試験し、実際にエコール生産能を高めることによって、健康状態が改善したことを報告している。しかし、ヒト由来の腸内細菌であって、実際にヒトの腸内細菌叢におけるダイゼインからエコールへの資化能力を向上作用を有するものは全く報告されていない。そのような腸内細菌は、エコール生産能向上効果を有する微生物として有用であるので、当該分野において必要性が未だに存在する。

【特許文献1】国際公開WO99/07392号パンフレット

【非特許文献1】J. Nutr. 128巻、1589 - 1592頁 (1998)

【非特許文献2】Nutr Cancer, 21、113 - 131 (1994)

【非特許文献3】Food Chem. Toxicol., 41巻、631 - 636頁 (2003)

【非特許文献4】Ann. Nutr. Metab, 48巻、67 - 78頁 (2004)

【非特許文献5】Lancet, 350巻、990 - 994頁 (1997)

【非特許文献6】Jpn. J. Clin. Oncol. 32巻、296 - 300頁 (2002)

【非特許文献7】Journal of Food Science 67巻、3104 - 3113頁 (2002)

【非特許文献8】Journal of Food Science 68巻、623 - 631頁 (2002)

【非特許文献9】Nutr. Res. 22巻、705 - 513頁 (2002)

【非特許文献10】J. Nutr. Sci. Vitaminol. 48巻、225 - 229頁 (2002)

【非特許文献11】Microb. Ecol Health Dis 16巻、18 - 22頁 (2004)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

腸内細菌叢と共存下でダイゼインを資化してエコールを生産する能力を有する腸内細菌および腸内細菌叢全体のダイゼインを資化してエコールを生産する能力を効果的に向上させる能力を有する腸内細菌は、これまで全く見出されていない。従って、本発明は、腸内

10

20

30

40

50

でダイゼインを資化してエコールを生産するもしくは腸内細菌叢全体のエコール生産を向上させる能力を有する腸内細菌を提供することを課題とする。

【0009】

エコールは、たとえ大豆製品を摂取したとしても、40%～60%の人では非常に生産能力が低いことが様々な報告から明らかにされている。エコール生産能の低い人について、よりエコール生産能を高めることは、イソフラボン類が関与すると期待されている生活習慣病予防効果をより効果的に発揮させるためには、非常に重要である。

【0010】

食品によってエコール生産能の非常に低い人のエコール生産能が高くするという方法も考えられるが、エコール生産能の非常に低い人をエコール生産能が高くする食品成分については、現在のところ見出されておらず、長期間の大豆製品を摂取した人でも、エコール生産能が変わらないといった報告があり [Am. J. Clin. Nutr., 80巻, 692-699頁(2003)]、通常の食品の摂取だけでエコール生産能を高めることは困難であるのが現状である。

10

【0011】

エコール生産能の低い人をよりエコール生産能の高い人に変えるためには、プロバイオティクスとしてダイゼインまたはその誘導体(例えば、ダイジンなどの配糖体)を資化してエコールを生産するダイゼイン資化能を有する菌を摂取し、腸内細菌叢のエコール生産能がこの摂取菌の作用によって高めるといった方法が考えられ、ビフィドバクテリウム菌(Bifidobacterium)を初めとするエコール資化能を有する腸内細菌の検索が行なわれている。

20

【0012】

ところが、実際に、糞便の細菌叢に添加するだけで、ダイゼインを資化してエコールを生産能を向上させるダイゼイン資化能を有する腸内細菌および糞便細菌叢に添加するだけで、ダイゼインを資化してエコール生産能を向上させるがそれ自体はダイゼイン資化能を有さない腸内細菌は、これまで見出されていない。従って、本発明は、ダイゼインを資化してエコールを生産するダイゼイン資化能を有する腸内細菌とこの菌を検出するための特異的プライマーおよびダイゼインを資化してエコールを生産する生産性を向上させる腸内細菌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】

30

【0013】

本発明者らは、多くの腸内細菌について、ダイゼインまたはその誘導体を資化してエコールを生産するダイゼイン資化能を調べた結果、EG培地を用いることにより、効率よく、ダイゼイン資化能を有する細菌を同定することができた。そして、この菌は、実際に、腸内細菌叢のエコール生産能力を顕著に向上させた。また、この菌の菌種特異的プライマーを設計できた。さらに、ダイゼイン資化能を有さないが、腸内細菌叢のエコール生産能力を顕著に向上させる腸内細菌を見出したことによって、上記課題を解決した。

【0014】

この新規同定方法を用いて、本発明者らは、従来にはなかったエコール生産可能なSlackia属菌(例えば、Slackia属菌TM-30;独立行政法人産業技術総合研究所17年12月2日に寄託、受領番号AP-20729号ヒトの腸内細菌叢のエコール生産能を向上エコール生産可能なBifidobacterium adolescentis(例えば、Bifidobacterium adolescentis TM1株;独立行政法人産業技術総合研究所16年12月16日に寄託、受託番号FERM P-20325(受領番号FERM AP-20325)と理化学研究所微生物系統保存施設の保存菌株のBifidobacterium breve JCM 1273が存在することを見いだした。

40

【0015】

本発明の代表的なSlackia属菌とBifidobacterium adolescentisは、本発明者が、本発明において新規に開示した方法により、例えば、健

50

康人の糞便より単離したものである。従って、本発明は、この新規細菌取得方法をも包含する。

【0016】

本発明は、ダイゼインを資化してエコールを生産する能力を有する、ヒトの腸内細菌（特に、*Slackia*属菌TM-30）、腸内細菌叢全体のダイゼインを資化してエコールを生産する能力を効果的に向上させる能力を有する腸内細菌（*Bifidobacterium adolescentis*、*Bifidobacterium breve*）およびエコール生産能を向上させるための、この腸内細菌を含む組成物、およびダイゼインを資化してエコールを生産する能力を有するヒトの腸内細菌の分子生物学的手法を用いた迅速検出・定量測定方法を提供する。エコール生産能を向上させるための方法であって、本発明の腸内細菌または組成物を、処置が必要とされる被験体に投与する工程を包含する方法もまた提供される。

10

(1) ダイゼインを資化してエコールを生産するダイゼイン資化能を有する、ヒトの腸内細菌と菌種特異的プライマーもしくは、ヒトの腸内細菌叢のダイゼインを資化してエコールを生産する能力を向上させる腸内細菌。

(2) 上記腸内細菌は、*Slackia*属に属する、項目1に記載の腸内細菌。

(3) 上記腸内細菌は、*Bifidobacterium*属に属する、項目1に記載の腸内細菌。

(4) 上記腸内細菌は、*Bifidobacterium adolescentis*種または*Bifidobacterium breve*種に属する、項目3に記載の腸内細菌。

20

(5) 上記腸内細菌の菌種特異的プライマーであって、配列番号3に示す配列の一部で選択的に検出可能であることを特徴とする、項目1に記載の腸内細菌。

(6) 上記腸内細菌は、ダイゼインを基質として24時間後に測定したダイゼイン資化能が1.0%以上であることを特徴とする、項目1に記載の腸内細菌。

(7) 上記腸内細菌は、ダイゼインを基質として24時間後に測定したダイゼイン資化能10%以上であることを特徴とする、項目1に記載の腸内細菌。

(8) 上記腸内細菌は、ダイゼインを基質として24時間後に測定したダイゼイン資化能20%以上であることを特徴とする、項目1に記載の腸内細菌。

(9) 上記腸内細菌は、ダイゼインを基質として24時間後に測定したダイゼイン資化能30%以上であることを特徴とする、項目1に記載の腸内細菌。

30

(10) 上記腸内細菌は、エコール非生産性ヒトフローラマウスに対してエコール生産性付与効果を有することを特徴とする、項目1に記載の腸内細菌。

(11) 上記腸内細菌は、エコール生産性ヒトフローラマウスに対して2倍以上のエコール生産性向上効果を有することを特徴とする、項目1に記載の腸内細菌。

(12) 上記腸内細菌は、*Slackia*属である、項目7または8に記載の腸内細菌。

(13) 上記腸内細菌は、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において、受領番号FERM AP-20729号（受領日平成17年12月2日）の*Slackia* TM-30株、受託番号FERM P-20325号（受領番号FERM AP-20325号）（受領日平成16年12月16日）として寄託された*Bifidobacterium adolescentis* TM-1株、もしくは理化学研究所微生物系統保存施設の保存菌株である*Bifidobacterium breve* JCM 1273である項目1に記載の腸内細菌。

40

(14) プロバイオテイクスとして使用可能な細菌であることを特徴とする、項目1に記載の腸内細菌。

(15) デンプンまたはグリコーゲンを資化する能力を有することをさらに特徴とする、項目1に記載の腸内細菌。

(16) 項目1に記載の腸内細菌の組み合わせであって、上記組み合わせに含まれる上記腸内細菌は、*Slackia*属に属する細菌と、*Bifidobacterium*属に属する細菌とを含む、組み合わせ。

50

- (17) 上記組み合わせは、Slackia TM-30株とBifidobacterium adolescentis TM-1株との組み合わせを含む、項目16に記載の組み合わせ。
- (18) エコール生産能を向上させるための、項目1~14のいずれか1項に記載の腸内細菌または項目15~17のいずれか1項に記載の組み合わせを含む組成物。
- (19) 食品または医薬である、項目18に記載の組成物。
- (20) さらに他の有効成分を含む、項目18に記載の組成物。
- (21) 上記腸内細菌は、液体中に溶解して提供される、項目18に記載の組成物。
- (22) 上記腸内細菌は、固形状で提供される、項目18に記載の組成物。
- (23) 上記腸内細菌は、凍結乾燥されて提供される、項目18に記載の組成物。 10
- (24) 上記腸内細菌を胃液から保護する成分をさらに含む、項目18に記載の組成物
- (25) エコール生産能を向上させるための方法であって、項目1~14のいずれか1項に記載の腸内細菌、項目15~17のいずれか1項に記載の組み合わせまたは項目18~24のいずれか1項に記載の組成物を、処置が必要とされる被験体に投与する工程を包含する、方法。
- (26) ダイゼインを資化してエコールを生産するダイゼイン資化能を有するもしくはエコール生産能を向上させるための細菌を生産する方法であって、上記細菌を含むことが予想されるサンプルを、EG培地を用いて培養する工程を包含する、方法。
- (27) ダイゼインを資化してエコールを生産するダイゼイン資化能を有する、ヒトの腸内細菌もしくはエコール生産能を向上させるヒトの腸内細菌を生産する方法であって、 20
- A) ヒトの腸由来物質または糞便を含むサンプルを提供する工程；
- B) 上記サンプルを、EG培地を用いて、37℃で培養する工程；
- C) プレインハートインフュージョン37g、寒天1g、L-システイン塩酸0.5g、炭酸ナトリウム4gを1リットルの蒸留水に加温溶解し、酸素フリーの炭酸ガスを吹き込みながら試験管に分注し、プチルゴム栓をして、オートクレーブ滅菌処理を行って作製した反応液0.2ml中で、上記サンプル中で菌濃度が約 10^9 /mlになるように懸濁し、ダイゼイン $1\mu\text{l}$ (20mg/ml)を添加した後、簡易型嫌気性培養装置アネロパックで37℃、24時間インキュベーションする工程；
- D) 反応液中のイソフラボン類の分析を行う工程；および
- E) ダイゼインまたはその誘導体を資化してエコールを生産するダイゼイン資化能を有 30
- する腸内細菌を選択し、生産する工程を包含する方法。
- (28) 上記サンプルは、健康人の糞便に由来するサンプルである、項目27に記載の方法。
- (29) 項目27~29に記載の方法により調製される細菌。
- (30) エコールを含むもしくはエコール生産性を向上させる医薬を製造するための方法であって、項目1~14のいずれか1項に記載の腸内細菌または項目15~17のいずれか1項に記載の組み合わせと、ダイゼインとを混合する工程、および混合された混合物を上記腸内細菌が資化する条件下でインキュベートする工程を包含する、方法。
- (31) 項目1~14のいずれか1項に記載の腸内細菌または項目15~17のいずれか1項に記載の組み合わせと、ダイゼインとを混合する工程、および混合された混合物を上 40
- 記腸内細菌が資化する条件下でインキュベートする工程を包含する方法によって生産された、組成物。
- (32) 項目30に記載の方法によって得られる細菌。
- (33) エコールを含む医薬を製造するための、項目1~14のいずれか1項に記載の腸内細菌、項目30に記載の方法によって得られる細菌または項目15~17のいずれか1項に記載の組み合わせの使用。
- (34) エコール生産能を向上させるための医薬を生産するための、項目1~14のいずれか1項に記載の腸内細菌、項目30に記載の方法によって得られる細菌または項目15~17のいずれか1項に記載の組み合わせの使用。
- 【0017】

従って、本発明のこれらおよび他の利点は、以下の詳細な説明を読みかつ理解すれば、当業者には明白になることが理解される。

【発明の効果】

【0018】

本発明は、ダイゼインを資化してエコールを生産するダイゼイン資化能を有する細菌を同定する方法を初めて提供することによって、そのような細菌と腸内細菌叢のダイゼインを資化してエコールを生産性向上能を有する細菌の同定および生産することを初めて可能にした。本発明を利用して同定することができたダイゼインを資化してエコールを生産する本発明の *Slackia* 属菌もしくは *Bifidobacterium* 菌は、糞便腸内細菌叢に添加するとエコール生成能を顕著に向上させることが確認された。本発明の *Bifidobacterium* 菌は、イソフラボン含有食品と同時にもしくは個別に経口的に摂取することで、腸内細菌叢のダイゼインを資化してエコールを生産するダイゼイン資化能を短期間で向上させることができる。また、ダイゼインを資化してエコールを生産する本発明の *Slackia* 属菌の菌種特異的プライマーを用いることで、分子生物学的手法によるエコール生産能を有する腸内細菌の高速検出を可能とし、エコール生産性腸内細菌の検出方法に画期的な手法を提供することとなる。

10

【0019】

従って、本発明は、プロバイオティクスまたは健康食品、医薬などとして有用な腸内細菌を提供する。およびエコール生産菌の新規検出方法を提供本発明は、女性の乳癌、男性の前立腺癌などの予防医学において効果を奏する。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

以下、本発明を説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の冠詞（例えば、英語の場合は「a」、「an」、「the」など、他の言語における対応する冠詞、形容詞など）は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。

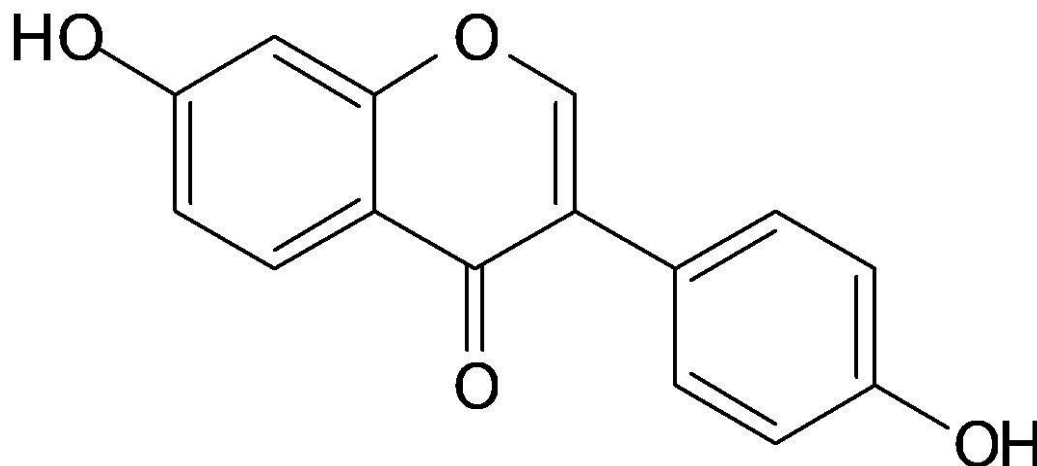
【0021】

本明細書において、ダイゼイン (daidzein) とは、4', 7-ジヒドロキシ-3-ジデヒドロイソフラボン-4-オン (4', 7-dihydroxy-2, 3-didehydroisoflavan-4-one) という一般名で表され、以下の構造

30

【0022】

【化1】



40

【0023】

という構造を有するイソフラボンである。

【0024】

本明細書においてダイゼインの誘導体とは、加水分解などによってダイゼインに変換さ

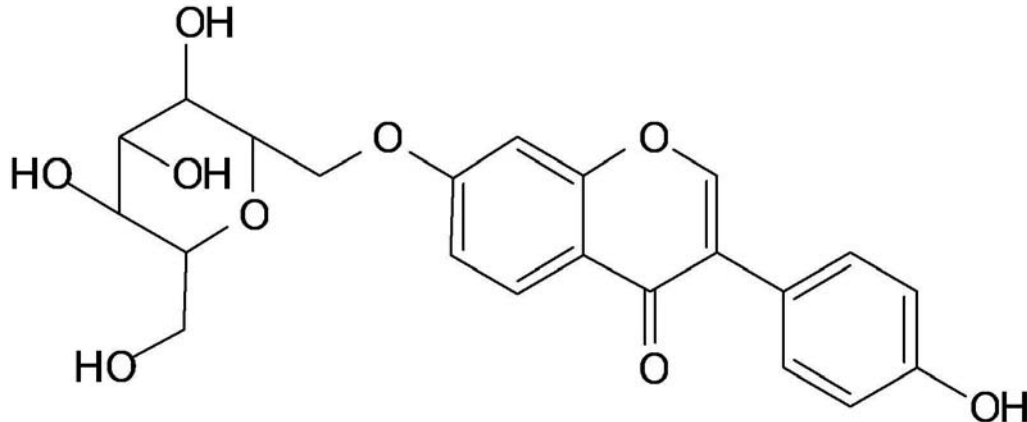
50

れ得る化合物をいう。そのような誘導体としては、例えば、配糖体を挙げることができ、代表的には、ダイジン、マロニルダイジン、アセチルダイジンなどを挙げるができる

本明細書において、ダイジン (daidzin) とは、7 - (- D - グルコピラノシルオキシ) - 4' - ヒドロキシ - 2, 3 - ジデヒドロイソフラバン - 4 - オン (7 - (- D - glucopyranosyloxy) - 4' - hydroxy - 2, 3 - dihydroisoflavan - 4 - One) という一般名で表され、以下の構造

【0025】

【化2】



10

20

【0026】

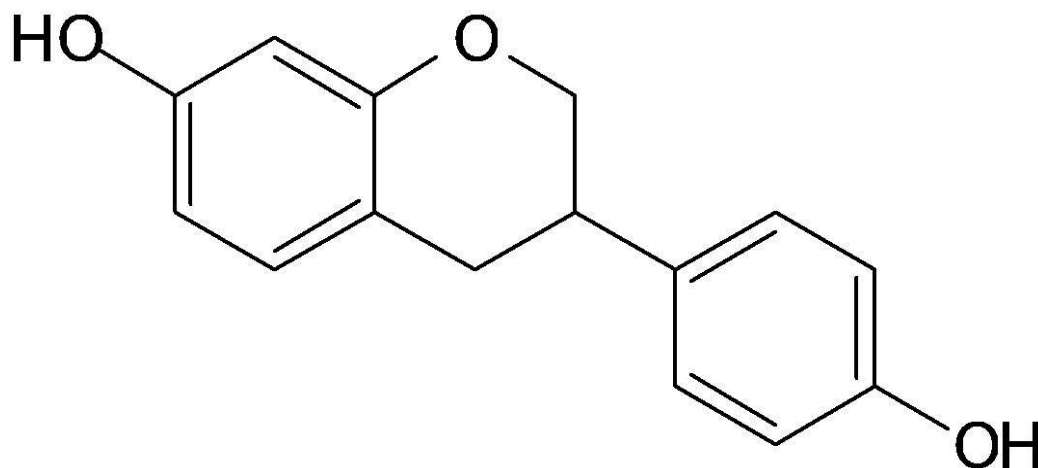
を有する。

【0027】

本明細書において、エコール (equol) とは、一般名 7 - ヒドロキシ - 3 - (4 - ヒドロキシフェニル) クロマンで表され、以下の構造

【0028】

【化3】



30

40

【0029】

という構造を有する化合物である。エコールは、抗酸化性およびエストロゲン作用の強いイソフラボンとして知られている。

【0030】

本明細書において、「ダイゼインを資化してエコールを生産するダイゼイン資化能」とは、ダイゼインまたはその誘導体 (例えば、ダイジンのような配糖体) に曝されたとき、エコールを生産する細胞の能力をいう。

【0031】

本明細書において、このような細菌のダイゼイン資化能は、以下のようにエコール濃度を測定することによって判定されその値は、ダイゼイン資化能値とも称される。

50

【0032】

In vitroでのダイゼイン資化能測定法

EG培地を用い、37℃で48時間、Slackia属菌を培養する。反応液0.2 mlで、Slackia属菌を菌濃度が約 10^9 /mlになるように懸濁し、ダイゼイン1 μ l (20 mg/ml)を添加した後、簡易型嫌気性培養装置アネロパックで37℃、24時間インキュベーションを行った。

【0033】

本明細書において用いられるEG培地は、以下のようにして調製される。

【0034】

組成：馬肉浸出液		930 mL	10
Proteose peptone No 3 (Difco)		10 g	
Yeast extract (Difco)		5 g	
Na ₂ HPO ₄		4 g	
グルコース		1.5 g	
L-シスチン(予め少量の0.1N HClで溶解して添加)		0.2 g	
消泡剤(トレスリコン10%溶液)		5 mL	
L-システイン・HCl・H ₂ O		0.5 g	
馬血液		50 mL	
pH	7.6 ~ 7.8。		

【0035】

20

製造方法：L-システイン・HCl・H₂Oと馬血液以外の成分を加熱して溶解し、pHを修正、115℃、20分滅菌後50℃に冷やし、L-システイン・HCl・H₂Oと馬血液を加え、シャーレに分注して平板とする。なお、馬肉浸出液は、培地1000 mlに対し500 gの馬肉からの浸出液を用いる。

本明細書において使用されるダイゼイン資化能測定法において用いられる反応性は、以下のようにして作製される：ブレインハートインフュージョン37 g、寒天1 g、L-システイン-塩酸0.5 g、炭酸ナトリウム4 gを1リットルの蒸留水に加温溶解し、酸素フリーの炭酸ガスを吹き込みながら試験管に分注し、プチルゴム栓をして、オートクレーブ滅菌処理を行う。

【0036】

30

本明細書のダイゼインを資化してエコールを生産する能力の測定試験における反応の終了後、反応液1に対して4倍量のメタノールと酢酸混合液(メタノール：酢酸=100：5)を加えて60秒間激しくボルテックスする。ついで、遠心分離し得られた上澄をフィルターで濾過し、濾液を電気化学検出器搭載のHPLCで分析して、イソフラボン類の分析を行う。

【0037】

本発明のヒトの腸内細菌は、Slackia属菌、もしくはBifidobacterium属に属する。Slackia属菌は、ヒトの腸内の常在菌の一種であり、以前は、Eubacterium属に分類されていた。また、Bifidobacterium属に属する細菌は、アクチノミセス科(Actinomycetaceae)の細菌の一属であり、分枝した、二分叉の棍棒状またはへら状の桿菌をいう。Bifidobacterium属に属する細菌は、母乳で養育される乳児の腸内菌叢の主要な構成菌で、これらの菌が消化管内で糖を分解して産生する乳酸や酢酸が消化に役立つとされる。

【0038】

本発明のヒトの腸内細菌の一方は、BL培地のコロニー形態からビフィズ菌である可能性が考えられた。本明細書において使用される「Bifidobacterium adolescentis」は、Bifidobacterium属に属する菌種であり、ここで使用される性質は、光岡らの糖発酵試験法(腸内菌の世界一嫌気性菌の分離と同定：叢文社、1984)に記載される方法に準じて行う。他方のSlackia属菌は、コロニー形態や顕微鏡観察からは、菌の同定となる手がかりが見出せなかったため、自動

50

細菌同定検査装置を用いたラピッドID32 Aアピ(日本バイオメリュー株式会社製)と篠田らの16SrRNA遺伝子解析による細菌の系統分類方法[非特許文献12=島津評論, 57巻, 121-132頁(2000)]を採用して同定を行なった。具体的には、以下の通りである。

【0039】

PYF培地(ペプトン-イーストエクストラクト-フィールズ(Peptide - Yeast Extract - Field)溶液ブロス;トリプティケース(BBL)10g;イーストエクストラクト(Difco)5.0g;フィールズ溶液(消化血液)40ml;塩溶液40ml;L-システイン・HCl・H₂O 0.5g;精製水920ml、pH7.2に調整)に、各種試験用の糖類(例えば、L-アラビノース;D-キシロース;D-グルコース;D-マンノース;D-フラクトース;D-ガラクトース;マルトース;シュークロース;ラクトース;トレハロース;D-ソルビトール;D-マンニトール;イノシトール;グリセリン;デンプンなど)を添加して、滅菌し、糖資化性状検査用培地とする。分離株をBLB培地(Briggs Liver Broth;トマトジュース溶液(トマトジュース(Del Monte))を等量の水に溶解し、NaOHでpHを7.0に調整し、濾紙で濾過する)400.0ml;Neopeptone(Difco)15.0g;Yeast extract(Difco)6.0g;肝臓抽出物(Liver extract)(10gの肝臓粉末を170mlの水に入れ、50~60で1時間維持し、5分間煮沸して、pHを7.2に調整し、濾過することによって調製する)75.0ml;グルコース20.0g;可溶性デンプン0.5g;NaCl 5.0g;Tween 80 1.0g;L-システイン・HCl・H₂O 0.2g;蒸留水525.0ml、PHは6.8に調整する)で37、48時間嫌氣的に培養を行った後、一白金耳をこのBLB培地に接種して再び37で24時間培養し、その0.3mlを遠心分離管に9mlずつ分注したBLB培地に摂取し、再び37 24時間培養する。次いで、菌体を遠心分離し、上清を捨て、0.1%L-システイン・HCl・H₂Oと0.1%チオグリコール酸ナトリウムを含む滅菌食塩水で原培養液の2倍の濃度に再浮遊した物を接種溶液とする。この菌液を上記糖資化性状検査用培地に添加して、嫌気培養装置にて、一週間培養を行い、培地のpHの変動から糖の資化性を決定する。

【0040】

ここで、特に、本発明のピフィスズ菌属の腸内細菌は、好ましくは、以下の条件:

- A) 好気条件での発育: -
- B) カタラーゼ: -
- C) ゼラチン液化性: -
- D) インドール産生: -
- E) 硝酸還元性: -

このほかに、本発明の好ましい腸内細菌は、以下の菌学的性質を有する。

【0041】

以下の温度で良好に生育する: 37 ~ 43

以下のpHで良好に生育する: 7.2 ~ 7.5

好気性嫌気性の別: 嫌気性

グラム陽性・陰性: グラム陽性菌

ウレアーゼ -

糖類から酸及びガスの生成の有無

エスクリン +

グリセリン -

D-キシロース +

D-マンノース +

マンニトール +。

【0042】

別の好ましい実施形態では、本発明の方法により単離される腸内細菌は、以下の糖につ

いて以下に示す酸及びガスの生成：

- A) L-アラビノース (+)
- B) エリスリトール (-)
- C) セロビオース (+)
- D) D-ラフィノース (+)
- E) D-フルクトース (+)
- F) ガラクトース (+)

を生理学的性質として有し得る。

このような性質は、*Bifidobacterium adolescentis*種が有し得るがこれに限定されない。

本発明のビフィズス細菌は、ヒトの腸内細菌叢のダイゼイン資化能を通常少なくとも38%以上向上させる能力を有し、エコール生産菌に対しては、共存させた場合に、ダイゼイン資化能を少なくとも500%以上向上させる能力を有する。従来細菌で、500%以上ものダイゼイン資化能を向上させる細菌は見つかっておらず、本発明の方法により初めて同定することができた細菌であるといえる。

本明細書において、本発明に係る腸内細菌叢のダイゼインを資化してエコールを生産する能力の向上に寄与するビフィドバクテリウム菌は、幼児、成人等の糞便から分離した多数の*Bifidobacterium*属菌株の中から分離された。この菌株の代表例は、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(〒305-8566 茨城県つくば市東1-1-1中央第6)に受領番号FERM AP-20325号(受領日平成16年12月16日; 受託番号FERM P-20325号)として寄託済みである。

【0043】

分離した*Bifidobacterium*菌株の同定は、光岡らの糖発酵試験法(腸内菌の世界-嫌気性菌の分離と同定 叢文社)に準拠して行なった。

【0044】

最も好ましい実施形態において、本発明の*Bifidobacterium adolescentis* TM-1菌株は次のような菌学的性質を有し、それにより*Bifidobacterium adolescentis*に属する菌株であると同定された：グラム陽性無芽胞桿菌。顕微鏡観察では棍棒状の桿菌で分岐したのも認められる。好気条件下での発育(-)、カタラーゼ(-)、ゼラチン液化性(-)、硫化水素産生(-)、インドール産生(-)、硝酸還元性(-)。BL寒天平板上ではEG寒天平板上の集落よりもはるかに大型で、菌体の一部が膨らみ、湾曲し、一端が細くなったものが多く、分岐したのもみられる。BS寒天培地での生育は良好である。

【0045】

1つの実施形態において、本発明の*Bifidobacterium adolescentis* TM-1菌株は、代表的には、次のような糖発酵性を有する。

【0046】

L-アラビノース(+)、D-キシロース(+)、D-フルクトース(+)、ガラクトース(+)、マルトース(+)、セロビオース(+)、ラクトース(+)、D-ラフィノース(+)、グルコース(+)、エリスリトール(-)、メリビオース(+)、トレハロース(-)、マンニトール(+)、ソルビトール(-)、マンノース(+)、ラムノース(-)。

【0047】

分離した*Slackia*属菌の同定は、自動細菌同定検査装置を用いたラピッドID32 Aアピ(日本バイオメリュー株式会社製)及び16SrRNA遺伝子解析による細菌の系統分類方法に準拠して行なった。また、グルコース発酵性試験、胆汁耐性試験についても検討を行った。

【0048】

本発明のヒトの腸内細菌の他方の*Slackia*属菌は、グラム陽性桿菌であり、好気条件下では生育しないいわゆる嫌気性菌である。EGおよびBL培地では、乳白色の微小

10

20

30

40

50

コロニーを形成する。コロニー形状は、ドーム状に隆起し、B L培地で生育した本菌の顕微鏡観察では、短桿菌から長桿菌が混在し、いわゆるピフィズス菌等でしばしば観察される多形性を示す。グルコースをわずかに発酵し、10%及び20%胆汁酸共存下では、生育しない。

【0049】

本発明のSlackia属菌TM-30菌株は、以下の生化学的性質を有する(+：陽性、-：陰性)ウレアーゼ(-)、アルギニンジヒドラーゼ(+)、-ガラクトシダーゼ(-)、-ガラクトシダーゼ(-)、-ガラクトシダーゼ-6-フォスフェート(-)、-グルコシダーゼ(-)、-グルコシダーゼ(-)、-アラビノシダーゼ(-)、-グルクロニダーゼ(-)、-N-アセチルグルコサミニダーゼ(-)、D(+)マンノース発酵(-)、ラフィノース発酵(-)、硝酸塩の還元(-)、インドール産生(-)、アルカリフォスファターゼ(-)、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(-)、ロイシルグリシ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(-)、ピログルタミン酸アリルアミダーゼ(-)、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(-)、グルタミン酸デカルボキシラーゼ(+)、-フッコシダーゼ(-)、ヒスチジンアリルアミダーゼ(-)、グルタミルグルタミン酸アリルアミダーゼ(-)、セリンアリルアミダーゼ(-)。

10

【0050】

Slackia属菌を同定するのに用いた篠田らの16SrRNA遺伝子解析による細菌の系統分類方法では、細菌のゲノムをインスタジーンマトリクス(日本バイオラッド)で抽出し、27f(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'(配列番号1))と1492r(5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3'(配列番号2))のユニバーサルプライマー組み合わせでPCRを行い、16SrDNAの増幅を行った。さらに、16SrDNAをキアゲンのスピнкаラムで精製し、六種類のシーケンスプライマーとBigDyeTerminatorVer1.1を用いてPCRを行い、アプライドバイオシステムズ社のABI310で、遺伝子解析し、Slackia属菌の16SrDNAの部分塩基配列を決定した。

20

【0051】

本明細書における「プライマー」とは、高分子合成酵素反応において、合成される高分子化合物の反応の開始に必要な物質をいう。核酸分子の合成反応では、合成されるべき高分子化合物の一部の配列に相補的な核酸分子(例えば、DNAまたはRNAなど)が用いられ得る。本明細書においてプライマーはマーカー検出手段として使用され得る。

30

【0052】

通常プライマーとして用いられる核酸分子としては、目的とする遺伝子の核酸配列と相補的な、少なくとも8の連続するヌクレオチド長の核酸配列を有するものが挙げられる。そのような核酸配列は、好ましくは、少なくとも9の連続するヌクレオチド長の、より好ましくは少なくとも10の連続するヌクレオチド長の、さらに好ましくは少なくとも11の連続するヌクレオチド長の、少なくとも12の連続するヌクレオチド長の、少なくとも13の連続するヌクレオチド長の、少なくとも14の連続するヌクレオチド長の、少なくとも15の連続するヌクレオチド長の、少なくとも16の連続するヌクレオチド長の、少なくとも17の連続するヌクレオチド長の、少なくとも18の連続するヌクレオチド長の、少なくとも19の連続するヌクレオチド長の、少なくとも20の連続するヌクレオチド長の、少なくとも25の連続するヌクレオチド長の、少なくとも30の連続するヌクレオチド長の、少なくとも40の連続するヌクレオチド長の、少なくとも50の連続するヌクレオチド長の、核酸配列であり得る。プローブとして使用される核酸配列には、上述の配列に対して、少なくとも70%相同な、より好ましくは、少なくとも80%相同な、さらに好ましくは、少なくとも90%相同な、少なくとも95%相同な核酸配列が含まれる。プライマーとして適切な配列は、合成(増幅)が意図される配列の性質によって変動し得

40

50

るが、当業者は、意図される配列に応じて適宜プライマーを設計することができる。そのようなプライマーの設計は当該分野において周知であり、手動でおこなってもよくコンピュータプログラム（例えば、LASERGENE, Primer Select, DNASTAR）を用いて行ってもよい。

【0053】

本明細書において「プローブ」とは、インビトロおよび/またはインビボなどのスクリーニングなどの生物学的実験において用いられる、検索の手段となる物質をいい、例えば、特定の塩基配列を含む核酸分子または特定のアミノ酸配列を含むペプチドなどが挙げられるがそれに限定されない。本明細書においてプローブは、マーカー検出手段としてもちいられる。

10

【0054】

通常プローブとして用いられる核酸分子としては、目的とする遺伝子の核酸配列と相同なまたは相補的な、少なくとも8の連続するヌクレオチド長の核酸配列を有するものが挙げられる。そのような核酸配列は、好ましくは、少なくとも9の連続するヌクレオチド長の、より好ましくは少なくとも10の連続するヌクレオチド長の、さらに好ましくは少なくとも11の連続するヌクレオチド長の、少なくとも12の連続するヌクレオチド長の、少なくとも13の連続するヌクレオチド長の、少なくとも14の連続するヌクレオチド長の、少なくとも15の連続するヌクレオチド長の、少なくとも20の連続するヌクレオチド長の、少なくとも25の連続するヌクレオチド長の、少なくとも30の連続するヌクレオチド長の、少なくとも40の連続するヌクレオチド長の、少なくとも50の連続するヌクレオチド長の、少なくとも核酸配列であり得る。プローブとして使用される核酸配列には、上述の配列に対して、少なくとも70%相同な、より好ましくは、少なくとも80%相同な、さらに好ましくは、少なくとも90%相同な、少なくとも95%相同な核酸配列が含まれる。

20

【0055】

本明細書において「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのヌクレオチドのポリマーをいう。この用語はまた、「オリゴヌクレオチド誘導体」または「ポリヌクレオチド誘導体」を含む。「オリゴヌクレオチド誘導体」または「ポリヌクレオチド誘導体」とは、ヌクレオチドの誘導体を含むか、またはヌクレオチド間の結合が通常とは異なるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドをいい、互換的に使用される。そのようなオリゴヌクレオチドとして具体的には、例えば、2'-O-メチル-リボヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5'ホスホロアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合とがペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン（phenoxazine-modified cytosine）で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、DNA中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体およびオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体などが例示される。他にそうではないと示されなければ、特定の核酸配列はまた、明示的に示された配列と同様に、その保存的に改変された改変体（例えば、縮重コドン置換体）および相補配列を包含することが企図される。具体的には、縮重コドン置換体は、1またはそれ以上の選択された（または、すべての）コドンの3番目の位置が混合塩基および/またはデオキシノシン残基で置換された配列を作成することにより達成され得る（Batzeraら、Nucleic Acid Res. 19:5081(1991); Ohtsukaら、J. Biol

30

40

50

. Chem. 260:2605-2608 (1985); Rossoliniら、Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)。

【0056】

本明細書において「ヌクレオチド」は、天然のものでも非天然のものでもよい。「ヌクレオチド誘導体」または「ヌクレオチドアナログ」とは、天然に存在するヌクレオチドとは異なるがもとのヌクレオチドと同様の機能を有するものをいう。そのようなヌクレオチド誘導体およびヌクレオチドアナログは、当該分野において周知である。そのようなヌクレオチド誘導体およびヌクレオチドアナログの例としては、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、メチルホスホネート、キラルメチルホスホネート、2'-O-メチルリボヌクレオチド、ペプチド型核酸(PNA)が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0057】

アミノ酸は、その一般に公知の3文字記号か、またはIUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionにより推奨される1文字記号のいずれかにより、本明細書中で言及され得る。ヌクレオチドも同様に、一般に受け入れられた1文字コードにより言及され得る。

【0058】

本明細書において「因子」(agent)としては、意図する目的を達成することができる限りどのような物質または他の要素(例えば、光、放射能、熱、電気などのエネルギー)でもあってもよい。そのような物質としては、例えば、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、核酸(例えば、cDNA、ゲノムDNAのようなDNA、mRNAのようなRNAを含む)、ポリサッカリド、オリゴサッカリド、脂質、有機低分子(例えば、ホルモン、リガンド、情報伝達物質、有機低分子、コンビナトリアルケミストリで合成された分子、医薬品として利用され得る低分子(例えば、低分子リガンドなど)など)、これらの複合分子が挙げられるがそれらに限定されない。ポリヌクレオチドに対して特異的な因子としては、代表的には、そのポリヌクレオチドの配列に対して一定の配列相同性を(例えば、70%以上の配列同一性)もって相補性を有するポリヌクレオチド、プロモーター領域に結合する転写因子のようなポリペプチドなどが挙げられるがそれらに限定されない。ポリペプチドに対して特異的な因子としては、代表的には、そのポリペプチドに対して特異的に指向された抗体またはその誘導体あるいはその類似物(例えば、単鎖抗体)、そのポリペプチドがレセプターまたはリガンドである場合の特異的なリガンドまたはレセプター、そのポリペプチドが酵素である場合、その基質などが挙げられるがそれらに限定されない。

20

30

【0059】

したがって、本明細書においてポリヌクレオチドまたはポリペプチドなどの生物学的因子に対して「特異的に相互作用する因子」とは、そのポリヌクレオチドまたはそのポリペプチドなどの生物学的因子に対する親和性が、他の無関連の(特に、同一性が30%未満の)ポリヌクレオチドまたはポリペプチドに対する親和性よりも、代表的には同等またはより高いか、好ましくは有意に(例えば、統計学的に有意に)高いものを包含する。そのような親和性は、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、結合アッセイなどによって測定することができる。本明細書において第一の物質または因子が第二の物質または因子に「特異的に相互作用する」とは、第一の物質または因子が、第二の物質または因子に対して、第二の物質または因子以外の物質または因子(特に、第二の物質または因子を含むサンプル中に存在する他の物質または因子)に対するよりも高い親和性で相互作用することをいう。物質または因子について特異的な相互作用としては、例えば、核酸におけるハイブリダイゼーション、タンパク質における抗原抗体反応、リガンド-レセプター反応、酵素-基質反応など、核酸およびタンパク質の両方が関係する場合、転写因子とその転写因子の結合部位との反応など、タンパク質-脂質相互作用、核酸-脂質相互作用などが挙げられるがそれらに限定されない。従って、物質または因子がともに核酸である場合、第一の物質または因子が第二の物質または因子に「特異的に相互作用する」ことには、第一の物質または因子が、第二の物質または因子に対して少なくとも一部に相補性を有する

40

50

ことが包含される。また例えば、物質または因子がともにタンパク質である場合、第一の物質または因子が第二の物質または因子に「特異的に相互作用する」こととしては、例えば、抗原抗体反応による相互作用、レセプター-リガンド反応による相互作用、酵素-基質相互作用などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0060】

本明細書において遺伝子の「相同性」とは、2以上の遺伝子配列の、互いに対する同一性の程度をいう。従って、ある2つの遺伝子の相同性が高いほど、それらの配列の同一性または類似性は高い。2種類の遺伝子が相同性を有するか否かは、配列の直接の比較、または核酸の場合ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーション法によって調べられ得る。2つの遺伝子配列を直接比較する場合、その遺伝子配列間でDNA配列が、代表的には少なくとも50%同一である場合、好ましくは少なくとも70%同一である場合、より好ましくは少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である場合、それらの遺伝子は相同性を有する。

10

【0061】

本明細書ではアミノ酸および塩基配列の類似性、相同性および同一性の比較は、配列解析用ツールであるBLASTを用いてデフォルトパラメータを用いて算出される。同一性の検索は例えば、NCBIのBLAST 2.2.9 (2004.5.12 発行)を用いて行うことができる。本明細書における同一性の値は通常は上記BLASTを用い、デフォルトの条件でアラインした際の値をいう。ただし、パラメータの変更により、より高い値が出る場合は、最も高い値を同一性の値とする。複数の領域で同一性が評価される場合はそのうちの最も高い値を同一性の値とする。

20

【0062】

本明細書において「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」とは、当該分野で慣用される周知の条件をいう。本発明のポリヌクレオチド中から選択されたポリヌクレオチドをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法などを用いることにより、そのようなポリヌクレオチドを得ることができる。具体的には、コロニーあるいはブランク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0MのNaCl存在下、65でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC(saline-sodium citrate)溶液(1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウムである)を用い、65条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるポリヌクレオチドを意味する。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning 2nd ed., Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press(1995)などの実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。ここで、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列からは、好ましくは、A配列のみまたはT配列のみを含む配列が除外される。従って、本発明において使用されるポリペプチドにおける任意の因子には、本発明で特に記載されたポリペプチドをコードする核酸分子に対して、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子によってコードされるポリペプチドも包含される。

30

40

【0063】

本明細書においてポリペプチド発現の「検出」または「定量」は、例えば、mRNAの測定および免疫学的測定方法を含む適切な方法を用いて達成され得る。分子生物学的測定方法としては、例えば、ノーザンブロット法、ドットブロット法またはPCR法などが例示される。免疫学的測定方法としては、例えば、方法としては、マイクロタイタープレートを用いるELISA法、RIA法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法などが例示される。また、定量方法としては、ELISA法またはRIA法などが例示される。

50

【0064】

本発明の *Slackia* 属菌 TM - 30 菌株の 16 S r DNA の部分塩基配列 (1 4 0 2 b p) を示す。

【0065】

Slackia 属菌 TM - 30 菌株の 16 S r DNA の部分塩基配列 (1 4 0 2 b p)

:

```

C A C A T G C A A G T C G A A C G A G T A A G A C G C C T T C G G G C G T G G A
T A G A G T G G C G A A C G G G T G A G T A A C A C G T G A C C A A C C T G C C
C C C T C C T C C G G G A C A A C C T C G G G A A A C C G A G G C T A A T A C C
G G A T A C T C C G G G C C C C C G C A T G G G G A G C C C G G G A A A G C C      10
C T G G C G G G A G G G G A T G G G G T C G C G G C C C A T C A G G T A G A C G
G C G G G G T A A C G G C C C A C C G T G C C T A C T A C G G G T A G C C G G G
C T G A G A G G C C G A T C G G C C A C A T T G G G A C T G A G A C A C G G C C
C A G A C T C C T A C G G G A G G C A G C A G T G G G G A A T T T T G C G C A A
T G G G G G C A A C C C T G A C G C A G C G A C G C C G C G T G C G G G A C G A
A G T C A T T C G T G A C G T A A A C C G C T T T C A G C G A G G A A G A A C C
A T G A C G G T A C T C G C A G A A G A A G C C C C G G C T A A C T A C G T G C
C A G C A G C C G C G G T A A T A C G T A G G G G G C G A G C G T T A T C C G G
A A T C A T T G G G C G T A A A G C G C G C G C A G G C G G G C T T T C A A G C
G G C G G C G T C G A A G C C G G G G G C T C A A C C C C C G G A A G C G C C C      20
C G A A C T G G A A G C C T C G G A T G C G G C A G G G G G A G G C G G A A T T
C C C G G T G T A G C G G T G A A A T G C G C A G A T A T C G G G A A G A A C A
C C G A C G G C G A A G G C A G C C T C C T G G G C C G G C A T C G A C G C T G
A G G C G C G A A A G C T G G G G G A G C G A A C A G G A T T A G A T A C C C T
G G T A G T C C C A G C C G T A A A C G A T G G A C G C T A G G T G T G G G G G
G A A C A T C C C T C C G T G C C G A A G C C A A C G C A T T A A G C G T C C C
G C C T G G G G A G T A C G G C C G C A A G G C T A A A A C T C A A A G G A A T
T G A C G G G G G C C C G C A C A A G C A G C G G A G C A T G T G G C T T A A T
T C G A A G C A A C G C G A A G A A C C T T A C C A G G G C T T G A C A T A C G
G G T G A A G C C G G G A G A G A T C C G G T G G C C G A G A G G A G C C C G T      30
A C A G G T G G T G C A T G G C T G T C G T C A G C T C G T G C C G T G A G G T
G T T G G G T T A A G T C C C G C A A C G A G C G C A A C C C C C G C C G C G T
G T T G C C A G C A T T C A G T T G G G C A C T C A C G C G G G A C T G C C G G
C G T C A A G C C G G A G G A A G G C G G G G A C G A C G T C A A G T C A T C A
T G C C C C T C A T G C C C T G G G C C G C A C A C G T G C T A C A A T G G C C
G G C A C A A C G G G T T G C C A C C C C G C G A G G G G G A G C G G A T C C C
A A A A G C C G G C C C C A G T T C G G A T C G C A G G C T G C A A C C C G C C
T G C G T G A A G C C G G A G T T G C T A G T A A T C G C G G A T C A G C A C G
C C G C G G T G A A T A C G T T C C C G G G C C T T G T A C A C A C C G C C C G
T C A C A C C A C C C G A G T C G T C T G C A C C C G A A G C C G C C G G C C G      40
A A C C C C G A A A G G G G G C G G A G G C G T C G A A G G T G T G G A G G G T
G A ( 配列番号 3 ) 。

```

【0066】

上記塩基配列を DDBJ の核酸データベースで *blastn* を利用して相同性の高い菌を検索したところ、本発明の菌株は、*Slackia exigua* (Accession no : AF101240) の 16 S r DNA 遺伝子の 1365 個のうち 1269 が一致した (92%) 。よって本菌は、*Slackia* 属に属すると考えられる。*Slackia* 属菌 TM - 30 菌株は、以下のような *In vitro* でのダイゼイン資化能を有する。

【0067】

【表 1】

【表 1】
反応液のイソフラボン類の濃度：

	反応前	反応 24 時間後
ダイゼイン	391 μ M	269 μ M
エコール	0 μ M	4.2 μ M

【0068】

ここで、反応前から反応後に減少したダイゼイン濃度に対する反応 24 時間後エコール濃度の割合をダイゼイン資化能として計算すると、本発明の一つの代表的な菌株は、1.6%以上のダイゼイン資化能を有するといえる。

10

【0069】

本明細書において「ダイゼイン資化能」は、ダイゼイン 1 μ l (20 mg/ml) を添加した後、簡易型嫌気性培養装置アネロパックで 37、24 時間インキュベーションし、反応終了後、反応液 1 に対して 4 倍量のメタノールと酢酸との混合液 (メタノール：酢酸 = 100 : 5) を加えて 60 秒間激しくボルテックスにより攪拌し、遠心分離して得られた上澄をフィルターで濾過し、濾液を電気化学的検出器搭載の HPLC (日本分光などから入手可能) で分析してイソフラボン類の分析を行って、エコール生産性の有無を確認し、エコールが生産 (すなわち、ダイゼインが資化) されていることを確認することによって確認することができる。

20

【0070】

本明細書において「ヒトフローラマウス」とは、ヒトフローラを腸内に移植したマウスを言う。ヒトのフローラに関する実験モデルとして使用される。

【0071】

本明細書において、「エコール非生産性ヒトフローラマウスに対してエコール生産性付与効果」とは、エコールを通常生産しないヒトフローラマウスに投与すると、エコールを生産する能力を付与する能力をいう。具体的には、本明細書において実施例 3 において例示されている。

30

【0072】

本明細書において、「エコール生産性ヒトフローラマウスに対してエコール生産性向上効果」とは、エコールを通常生産するヒトフローラマウスに投与すると、そのエコール生産脳が増強される能力を言う。具体的には、本明細書実施例 4 などに例示されている。

【0073】

(有用組成物)

別の局面において、本発明は、エコール生産能を向上させるための、本発明の腸内細菌を含む組成物を提供する。このような組成物は、食品、飼料、健康食品、特定医療用保険食品、医薬部外品、医薬品などとして利用することができる。特に、本発明は、ヒトの腸内細菌であることから、ヒトのプロバイオテイクスとして利用することができる。本発明の組成物には、好ましくは、さらなる有効成分を含めることができる。そのような有効成分としては、例えば、大豆オリゴ糖、フラクトオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖などのビフィズス菌増殖促進物質などを挙げることができるがそれらに限定されない。

40

【0074】

以下に本発明の医薬組成物の一般的な調製法を示す。なお、動物薬組成物、医薬部外品、水産薬組成物、食品組成物および化粧品組成物等についても公知の調製法により製造することができる。

【0075】

本発明の腸内細菌または組成物は、薬学的に受容可能なキャリアと配合し、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、粉剤、座剤等の固形製剤、またはシロップ剤、注射剤、懸濁剤、

50

溶液剤、スプレー剤等の液状製剤として経口または非経口的に投与することができる。薬学的に受容可能なキャリアとしては、上述のように、固形製剤における賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤、崩壊阻害剤、吸収促進剤、吸着剤、保湿剤、溶解補助剤、安定化剤、液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤等が挙げられる。また、必要に応じ、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤等の製剤添加物を用いることができる。また、本発明の組成物には本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチドなど以外の物質を配合することも可能である。非経口の投与経路としては、静脈内注射、筋肉内注射、経鼻、直腸、膣および経皮等が挙げられるがそれらに限定されない。腸内細菌を投与する場合は、腸に送達し得る形態であることが好ましい。

【0076】

10

好ましくは、製剤化する場合は、本発明の腸内細菌の凍結乾燥菌末に、必要に応じてデンプン、ヒドロキシプロピルセルロースなどの賦形剤も混合して成形する。

【0077】

固形製剤における賦形剤としては、例えば、グルコース、ラクトース、スクロース、D-マンニトール、結晶セルロース、デンプン、炭酸カルシウム、軽質無水ケイ酸、塩化ナトリウム、カオリンおよび尿素等が挙げられる。

【0078】

固形製剤における滑沢剤としては、例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ホウ酸末、コロイド状ケイ酸、タルクおよびポリエチレングリコール等が挙げられるがそれらに限定されない。

20

【0079】

固形製剤における結合剤としては、例えば、水、エタノール、プロパノール、白糖、D-マンニトール、結晶セルロース、デキストリン、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、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、デンプン溶液、ゼラチン溶液、ポリビニルピロリドン、リン酸カルシウム、リン酸カリウム、およびシェラック等が挙げられる。

【0080】

固形製剤における崩壊剤としては、例えば、デンプン、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、カンテン末、ラミナラン末、クロスカルメローズナトリウム、カルボキシメチルスターチナトリウム、アルギン酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類、ラウリル硫酸ナトリウム、デンプン、ステアリン酸モノグリセリド、ラクトースおよび繊維素グリコール酸カルシウム等が挙げられるがそれらに限定されない。

30

【0081】

固形製剤における崩壊阻害剤の好ましい例としては、水素添加油、白糖、ステアリン、カカオ脂および硬化油等が挙げられるがそれらに限定されない。

【0082】

固形製剤における吸収促進剤としては、例えば、第四級アンモニウム塩基類およびラウリル硫酸ナトリウム等が挙げられるがそれらに限定されない。

【0083】

40

固形製剤における吸着剤としては、例えば、デンプン、ラクトース、カオリン、ペントナイトおよびコロイド状ケイ酸等が挙げられるがそれらに限定されない。

【0084】

固形製剤における保湿剤としては、例えば、グリセリン、デンプン等が挙げられるがそれらに限定されない。

【0085】

固形製剤における溶解補助剤としては、例えば、アルギニン、グルタミン酸、アスパラギン酸等が挙げられるがそれらに限定されない。

【0086】

固形製剤における安定化剤としては、例えば、ヒト血清アルブミン、ラクトース等が挙

50

げられるがそれらに限定されない。

【0087】

固形製剤として錠剤、丸剤等を調製する際には、必要により胃溶性または腸溶性物質（白糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート等）のフィルムで被覆していてもよい。錠剤には、必要に応じ通常の剤皮を施した錠剤、例えば、糖衣錠、ゼラチン被包錠、腸溶被錠、フィルムコーティング錠あるいは二重錠、多層錠が含まれる。カプセル剤にはハードカプセルおよびソフトカプセルが含まれる。座剤の形態に成形する際には、上記に列挙した添加物以外に、例えば、高級アルコール、高級アルコールのエステル類、半合成グリセライド等を添加することができるがそれらに限定されない。

10

【0088】

液状製剤における溶剤の好ましい例としては、注射用水、アルコール、プロピレングリコール、マクロゴール、ゴマ油およびトウモロコシ油等が挙げられる。

【0089】

液状製剤における溶解補助剤の好ましい例としては、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、D-マンニトール、安息香酸ベンジル、エタノール、トリスアミノメタン、コレステロール、トリエタノールアミン、炭酸ナトリウムおよびクエン酸ナトリウム等が挙げられるがそれらに限定されない。

【0090】

液状製剤における懸濁化剤の好ましい例としては、ステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸、レシチン、塩化ベンザルコニウム、塩化ペンゼトニウム、モノステアリン酸グリセリン等の界面活性剤、例えば、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース等の親水性高分子等が挙げられるがそれらに限定されない。

20

液状製剤における等張化剤の好ましい例としては、塩化ナトリウム、グリセリン、D-マンニトール等が挙げられるがそれらに限定されない。

液状製剤における緩衝剤の好ましい例としては、リン酸塩、酢酸塩、炭酸塩およびクエン酸塩等の緩衝液等が挙げられるがそれらに限定されない。

30

液状製剤における無痛化剤の好ましい例としては、ベンジルアルコール、塩化ベンザルコニウムおよび塩酸プロカイン等が挙げられるがそれらに限定されない。

【0091】

液状製剤における防腐剤の好ましい例としては、パラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、2-フェニルエチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸等が挙げられるがそれらに限定されない。

【0092】

液状製剤における抗酸化剤の好ましい例としては、亜硫酸塩、アスコルピン酸、α-トコフェロールおよびシステイン等が挙げられるがそれらに限定されない。

【0093】

注射剤として調製する際には、液剤および懸濁剤は殺菌され、かつ血液と等張であることが好ましい。通常、これらは、細菌保留フィルター等を用いるる過、殺菌剤の配合または照射によって無菌化する。さらにこれらの処理後、凍結乾燥等の方法により固形物とし、使用直前に無菌水または無菌の注射用希釈剤（塩酸リドカイン水溶液、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、エタノールまたはこれらの混合溶液等）を添加してもよい。

40

【0094】

さらに、必要ならば、医薬組成物は、着色料、保存剤、香料、矯味矯臭剤、甘味料等、ならびに他の薬剤を含んでもよい。

【0095】

本発明の医薬は、必要に応じて生理学的に受容可能なキャリア、賦型剤または安定化剤

50

(日本薬局方第14版、その追補またはその最新版、Remington's pharmaceutical Sciences, 18th Edition, A.R. Genaro, ed., Mack Publishing Company・1990などを参照)と、所望の程度の純度を有する組成物とを混合することによって、凍結乾燥されたケーキまたは水溶液の形態で調製され保存され得る。

【0096】

細胞を凍結乾燥する方法もまた、公知である。そのような方法としては、例えば、ジメチルホルムアミドなどに細胞を入れて凍結乾燥機でアンプルが真空状態になるよう処理した後、4～25℃で保存する方法等を挙げることができる。このほかにも、液体窒素法：10%グリセロール加保存培地に濃厚菌を懸濁し、これを専用アンプルに収め、液体窒素タンク(-150～-196℃)で保管することができる。

10

【0097】

本発明の組成物の投与すべき量は、使用目的、対象疾患(種類、重篤度など)、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。本発明の処置方法を被検体(または患者)に対して施す頻度もまた、使用目的、対象疾患(種類、重篤度など)、患者の年齢、体重、性別、既往歴、および治療経過などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。頻度としては、例えば、毎日数ヶ月に1回(例えば、1週間に1回～1ヶ月に1回)の投与が挙げられる。1週間～1ヶ月に1回の投与を、経過を見ながら施すことが好ましい。

【0098】

本明細書において「患者」とは、本発明の処置が適用される生物をいい、「被検体」または「被験体」ともいわれる。患者は好ましくは、ヒトであり得る。

20

【0099】

本発明は、患者への有効量の本発明の組成物の投与による処置、阻害および予防の方法を提供する。好ましい局面において、本発明の組成物は実質的に精製されたものであり得る(例えば、その効果を制限するかまたは望ましくない副作用を生じる物質が実質的に存在しない状態が挙げられる)。

【0100】

本発明はまた、エコールを含む医薬を製造するための方法であって、本発明の腸内細菌と、ダイゼインとを混合する工程、および混合された混合物を該腸内細菌が資化する条件下でインキュベートする工程を包含する、方法を提供する。

30

【0101】

ここで、本発明のSlackia属腸内細菌は、ダイゼインをエコールに資化する能力を有することから、エコールを含む医薬を効率よく製造することが可能である。混合された混合物は、使用される腸内細菌が、ダイゼインをエコールに資化させる任意の条件下でインキュベートすることができることが理解される。

【0102】

本明細書において、ダイゼインをエコールに資化させる条件は、当業者が当該分野において公知の方法を用いて適宜決定することができる。そのような条件としては、例えば、ブレインハートインフュージョン37g、寒天1g、L-システイン-塩酸0.5g、炭酸ナトリウム4gを1リットルの蒸留水に加温溶解し、酸素フリーの炭酸ガスを吹き込みながら試験管に分注し、プチルゴム栓をして、オートクレープ滅菌処理を行って作製した反応液0.2ml中で、該サンプル中でSlackia属菌の菌濃度が約 10^9 /mlになるように懸濁し、ダイゼイン1 μ l(20mg/ml)を添加した後、簡易型嫌気性培養装置アネロパックで37℃、24時間インキュベーションすることを挙げることができるがそれらに限定されない。

40

【0103】

生成したエコールは必要に応じて精製または分離することができる。そのような精製および分離の方法は、クロマトグラフィー、バッチ、HPLC、抽出など当該分野において公知の任意の方法を用いて実施することができる。

50

【0104】

従って、本発明はまた、本発明の腸内細菌とダイゼインとを混合する工程、および混合された混合物を本発明の腸内細菌が資化する条件下でインキュベートする工程を包含する方法によって生産された、組成物を提供する。このような組成物は、エコーンなどのエストロゲン様効果を有するかまたは強いイソフラボンに富むことから、抗癌（乳癌、前立腺癌予防）作用、心疾患予防効果などを期待して投与するために用いられ得る。

【0105】

本発明はまた、別の局面において、エコーン生産能を向上させるための方法を提供する。エコーン生産能とは、ヒトなどの動物において用いられるとき、腸内でダイゼインをエコーンに変換できる能力をいう。エコーン生産能が高いと、イソフラボンの血漿コレステロールおよび血漿トリグリセリド低下効果が顕著であり、抗癌作用なども期待されることから、エコーン生産能を上げることは、健康の品質を改善する役割を果たす。

10

【0106】

この方法は、本発明の腸内細菌または本発明の組成物を、処置が必要とされる被験体に投与する工程を包含する。そのような投与は、当該分野において公知の方法を利用して実施することができる。

【0107】

本明細書中、「投与する」とは、本発明の医薬などまたはそれを含む医薬組成物を、単独で、または他の治療剤と組み合わせて処置が意図される宿主に与えることを意味する。組み合わせは、例えば、混合物として同時に、別々であるが同時にもしくは並行して；または逐次的にかのいずれかで投与され得る。これは、組み合わせられた薬剤が、治療混合物としてともに投与される提示を含み、そして組み合わせた薬剤が、別々であるが同時に（例えば、同じ個体へ別々の粘膜を通じての場合）投与される手順もまた含む。「組み合わせ」投与は、第1に与えられ、続いて第2に与えられる化合物または薬剤のうちの1つを別々に投与することをさらに含む。

20

【0108】

（本発明の腸内細菌生産法）

別の局面において、本発明は、ダイゼインを資化してエコーンを生産するダイゼイン資化能を有する、細菌および腸内細菌叢のエコーン生産能向上作用を有する細菌を生産する方法であって、該細菌を含むことが予想されるサンプルを、EG培地を用いて培養する工程を包含する、方法を提供する。

30

【0109】

好ましい実施形態では、本発明は、ダイゼインを資化してエコーンを生産する能力を有する、ヒトの腸内細菌を生産する方法であって、A) ヒトの腸由来物質または糞便を含むサンプルを提供する工程；B) 該サンプルを、EG培地を用いて、37℃で培養する工程；C) プレインハートインフュージョン37g、寒天1g、L-システイン-塩酸0.5g、炭酸ナトリウム4gを1リットルの蒸留水に加温溶解し、酸素フリーの炭酸ガスを吹き込みながら試験管に分注し、プチルゴム栓をして、オートクレーブ滅菌処理を行って作製した反応液0.2ml中で、該サンプル中で菌濃度が約 10^9 /mlになるように懸濁し、ダイゼイン $1\mu\text{l}$ （20mg/ml）を添加した後、簡易型嫌気性培養装置アネロパックで37℃、24時間インキュベーションする工程；D) 反応液中のイソフラボン類の分析を行う工程；およびE) ダイゼインを資化してエコーンを生産する能力を有する腸内細菌を選択し、生産する工程を包含する方法を提供する。

40

【0110】

理論に束縛されることを望まないが、本発明のような細菌がこれまで同定できなかったのは、嫌気性微生物の培地は、多くの種類があり、EG培地は市販されておらず、自ら調製して作製する必要があることから、EG培地ではなく他の市販の培地を用いてダイゼイン資化能を有する菌を探索することが通常であったからであると考えられる。微生物の代謝活性は、培地によって大きく変動する場合がある。本発明において、ダイゼイン資化菌の同定を可能にしたのは、ダイゼイン資化菌を探索および同定する目的としては、これま

50

で世界において全く使用されていなかったEG培地のみを用いて、しかも、好ましい実施形態においては、嫌気性反応液も、嫌気度の高い反応液を組み合わせるといった一連の新規な工夫を行ったからであると考えられる。

【0111】

本発明は、好ましくは、上記方法において、サンプルとして健康人糞便由来のものを利用することが好ましい。特に、エコー生産能の高い健康人の糞便を使用することがより好ましい。

【0112】

(使用)

本発明は、エコーを含む医薬を製造するためまたはエコー生産能を向上させるための医薬を生産するために、本発明の腸内細菌を使用することを企図する。このような腸内細菌は、上記(腸内細菌)に関する説明において記載される任意の形態を採用することができるが理解される。

【0113】

本明細書において引用された、科学文献、特許、特許出願などの参考文献は、その全体が、各々具体的に記載されたのと同じ程度に本明細書において参考として援用される。

【0114】

以上、本発明を、理解の容易のために好ましい実施形態を示して説明してきた。以下に、実施例に基づいて本発明を説明するが、上述の説明および以下の実施例は、例示の目的のみに提供され、本発明を限定する目的で提供したのではない。従って、本発明の範囲は、本明細書に具体的に記載された実施形態にも実施例にも限定されず、請求の範囲によってのみ限定される。

【実施例】

【0115】

以下に実施例を示して本発明をさらに詳しく説明するが、この発明は以下の例に限定されるものではない。以下の実施例において用いられる試薬などは、例外を除き、Sigma (St. Louis, USA)、和光純薬(大阪、日本)、LC Laboratories, Woburn, USA)などから市販されるものを用いた。

(実施例1: ダイゼイン資化能を有する腸内細菌およびダイゼイン資化能を向上させる腸内細菌の分離)

本実施例では、EG培地を用いて、細菌を分離した。EG培地は以下のようにして調製した。

本明細書において用いられるEG培地は、以下のようにして調製される。

【0116】

組成：馬肉浸出液		930 mL	
Proteose peptone No 3	(Difco)	10 g	
Yeast extract	(Difco)	5 g	
Na ₂ HPO ₄		4 g	
グルコース		1.5 g	
L-シスチン(予め少量の0.1N HClで溶解して添加)		0.2 g	40
消泡剤(トレスリコン10%溶液)		5 mL	
L-システイン・HCl・H ₂ O		0.5 g	
馬血液		50 mL	
pH		7.6 ~ 7.8	

製造方法：L-システイン・HCl・H₂Oと馬血液以外の成分を加熱して溶解し、pHを修正、115、20分滅菌後50に冷やし、L-システイン・HCl・H₂Oと馬血液を加え、シャーレに分注して平板とする。なお、馬肉浸出液は、培地1000 mLに対し500 gの馬肉からの浸出液を用いる。

【0117】

新鮮なヒト糞便を滅菌ホモジナイザーに入れ、嫌気性希釈液で10倍ずつ段階的に希釈

し、それぞれの希釈段階あたり0.05mlを滅菌ピペットを用いてEG培地に接種し、滅菌コンラージ棒で塗り広げて、37、48時間で簡易型嫌気性培養装置にて培養を行った。培養終了後、コロニーを1個ずつ白金耳で拾い上げ、別のEG培地に塗り広げて、再度37、48時間、簡易型嫌気性培養装置にて培養を行った。培養終了後、1白金耳ずつ200 μ lの嫌気性反応液(ブレインハートインフュージョン37g、寒天1g、L-システイン塩酸塩0.5g、炭酸ナトリウム4gを1リットルの蒸留水に加温溶解し、酸素フリーの炭酸ガスを吹き込みながら試験管に分注し、プチルゴム栓をして、オートクレーブ滅菌処理を行った反応液)に懸濁し、ダイゼイン1 μ l(20mg/ml)を添加した後、簡易型嫌気性培養装置アネロパックで37、24時間インキュベーションを行った。反応終了後、反応液1に対して4倍量のメタノールと酢酸との混合液(メタノール:酢酸=100:5)を加えて60秒間激しくボルテックスにより攪拌した。次いで、遠心分離して得られた上澄をフィルターで濾過し、濾液を電気化学的検出器搭載のHPLC(日本分光などから入手可能)で分析してイソフラボン類の分析を行って、エコール生産性の有無を確認した。次に、増菌するために、エコール生産性の認められる腸内細菌をEG培地に接種し、37、48時間で簡易型嫌気性培養装置にて培養を行った。培養終了後、コロニーを1個ずつ白金耳で拾い上げ上記の嫌気性反応液200 μ lに懸濁し、ダイゼイン1 μ l(20mg/ml)を添加した後、予めEG培地で増菌していたエコール生産性が無い腸内細菌を1白金耳接種して、上記と同様の方法で培養、エコールの分析を行って、エコール生産性菌のエコール生産性が向上するかどうかを検討した。

10

【0118】

20

その結果、エコール生産性が向上したことが確認された。

【0119】

(実施例2: 分離した腸内細菌の資化能)

Slackia属菌TM-30のダイゼインの*in vitro*での資化能を下記の方法で調べた。EG培地で37で48時間嫌気培養を行ったSlackia属菌を嫌気性希釈液に懸濁し、懸濁液200 μ lにダイゼイン(20mg/ml)1 μ l加えて、37、24時間インキュベーションを行った。Slackia属菌終濃度(約 10^9 /ml)。反応終了後、反応液1に対して4倍量のメタノールと酢酸混合液(メタノール:酢酸=100:5)を加えて60秒間激しくボルテックスした後、フィルターで濾過し、濾液を電気化学検出器搭載のHPLCで分析して、イソフラボン類の分析を行った。

30

【0120】

【表2】

【表2】

反応液のイソフラボン濃度:

	反応前	反応 24 時間後
ダイゼイン	391 μ M	269 μ M
エコール	0 μ M	4.2 μ M

40

【0121】

本発明の代表的な菌株は、1.6%以上のダイゼイン資化能を有すると言える。

【0122】

(実施例3: エコール非生産性ヒトフローラマウスに対するSlackia属菌の*in vitro*におけるエコール生産能向上効果)

健康なヒトの糞便を嫌気性グローブボックス(窒素:炭酸ガス:水素=85:10:5)内で嫌気性輸送液を用いてホモジネートし、この糞便希釈液をピニールアイソレータ内で飼育している無菌マウス(IQI)ICR系成熟雄マウスに経口投与し、ヒトの腸内細菌叢を有するヒトフローラマウスを作製した。このヒトフローラマウスをガンマー線滅菌AIN93M飼料で19ヶ月間飼育した後、糞便を滅菌試験管に採取し、上記希釈液で

50

糞便当たり35倍に希釈し、この希釈液0.2mLにダイゼイン(20mg/ml)1 μ l加えて、簡易型嫌気性培養装置アネロパックで37 $^{\circ}$ C、24時間インキュベーションを行い、エコール生産能を調べたところ、1匹のマウスでエコール生産能が非常に低いヒトフローラマウスを得た。そこで、このヒトフローラマウスの糞便を滅菌試験管に採取し、上記希釈液で糞便当たり35倍に希釈し、この希釈液0.2mLにダイゼイン(20mg/ml)1 μ l加えてさらに、EG培地で37 $^{\circ}$ Cで48時間嫌気培養を行った*Slackia*属菌を白金耳にて嫌気性希釈液に懸濁し、菌液20 μ lを糞便希釈液に加えた。*Slackia*属菌終濃度(10⁷/ml)。反応は、簡易型嫌気性培養装置アネロパックで37 $^{\circ}$ C、24時間インキュベーションを行った。また対照には、菌液20 μ lの代わりに嫌気性希釈液20 μ l加えたものを用いた。反応終了後、反応液1に対して4倍量のメタノールと酢酸混合液(メタノール：酢酸=100：5)を加えて60秒間激しくボルテックスした後、フィルターで濾過し、濾液を電気化学検出器搭載のHPLCで分析して、イソフラボン類の分析を行った。

10

【0123】

【表3】

【表3】

反応液のイソフラボン類濃度：

	ダイゼイン	エコール
対照	380 μ M	0 μ M
<i>Slackia</i> 属菌添加	214 μ M	3.4 μ M

20

【0124】

本発明の代表的な菌株は、エコール非生産性ヒトフローラマウスに対するエコール生産能付与効果を有すると言える。

【0125】

(実施例4：エコール生産性ヒトフローラマウスに対する*Slackia*属菌の*in vitro*におけるエコール生産能向上効果)

健康なヒトの糞便を嫌気性グローブボックス(窒素：炭酸ガス：水素=85：10：5)内で嫌気性輸送液を用いてホモジネートし、この糞便希釈液をビニールアイソレータ内で飼育している無菌マウス(IQI)ICR系成熟雄マウスに経口投与し、ヒトの腸内細菌叢を有するヒトフローラマウスを作製した。このヒトフローラマウスをガンマー線滅菌AIN93M飼料で19ヶ月間飼育した後、このヒトフローラマウスの糞便を滅菌試験管に採取し、上記希釈液で糞便当たり35倍に希釈し、この希釈液0.2mLにダイゼイン(20mg/ml)1 μ l加えて、簡易型嫌気性培養装置アネロパックで37 $^{\circ}$ C、24時間インキュベーションを行い、エコール生産能を調べたところ2匹のマウスでエコール生産能を有するヒトフローラマウスを得た。そこで、このヒトフローラマウスの糞便を滅菌試験管に採取し、上記希釈液で糞便当たり35倍に希釈し、この希釈液0.2mLにダイゼイン(20mg/ml)1 μ l加えてさらに、EG培地で37 $^{\circ}$ Cで48時間嫌気培養を行った*Slackia*属菌を白金耳にて嫌気性希釈液に懸濁し、菌液4 μ lを糞便希釈液に加えた。*Slackia*属菌終濃度(10⁷/ml)。反応は、簡易型嫌気性培養装置アネロパックで37 $^{\circ}$ C、24時間インキュベーションを行った。また対照には、菌液4 μ lの代わりに嫌気性希釈液4 μ l加えたものを用いた。反応終了後、上記と同様の方法で、イソフラボン類の分析を行った。

30

40

【0126】

【表 4】

【表 4】

反応液のイソフラボン類濃度：

	ダイゼイン	エコール
対照	345 μ M	35.2 μ M
<i>Slackia</i> 属菌添加	252 μ M	75.8 μ M

【0127】

本発明の代表的な *Slackia* 属菌株は、エコール生産性ヒトフローラマウスに対する 2.1 倍以上のエコール生産能向上効果を有すると言える。

10

【0128】

(実施例 5： エコール生産能を有する *Slackia* 属菌に対するビフィドバクテリウム菌 TM-1 菌株の *in vitro* におけるエコール生産能向上効果)

EG 培地で 37 で 48 時間嫌気培養を行った *Slackia* 属菌とビフィドバクテリウム TM-1 菌とをそれぞれ白金耳にて別々に嫌気性希釈液に懸濁し、*Slackia* 属菌 200 μ l に対してビフィドバクテリウム TM-1 菌株 10 μ l とダイゼイン (20 mg/ml) 1 μ l 加えて、37、24 時間インキュベーションを行った。また対照には、ビフィドバクテリウム菌液 10 μ l の代わりに嫌気性希釈液 10 μ l 加えたものを用いた。反応液の *Slackia* 属菌終濃度は約 10^9 / ml、ビフィドバクテリウム TM-1 菌株終濃度約 10^6 / ml であった。反応終了後、上記と同様の方法で、イソフラボン類の分析を行った。

20

【0129】

【表 5】

【表 5】

反応液のイソフラボン類濃度：

	ダイゼイン	エコール
<i>Slackia</i> 属菌のみ	269 μ M	4.2 μ M
ビフィドバクテリウム TM-1 菌株添加	222 μ M	21.7 μ M

30

【0130】

本発明のビフィドバクテリウム TM-1 菌株は、エコール生産能を有する菌に対する五倍以上のエコール生産能向上効果を有すると言える。

40

【0131】

(実施例 6： エコール生産能を有する *Slackia* 属菌に対するビフィドバクテリウム TM-1 菌株の *in vitro* におけるダイゼイン配糖体からのエコール生産能向上効果)

EG 培地で 37 で 48 時間嫌気培養を行った *Slackia* 属菌とビフィドバクテリウム TM-1 菌とをそれぞれ白金耳にて別々に嫌気性希釈液に懸濁し、次のように三種類の反応液を作製してダイゼイン配糖体の資化性を検討した。

【0132】

(1) *Slackia* 属菌 200 μ l に対してビフィドバクテリウム TM-1 菌株 10 μ l とダイジン (40 mg/ml) 1 μ l 添加 (反応液の *Slackia* 属菌終濃度

50

は約 10^9 / ml、ビフィドバクテリウム菌終濃度約 10^9 / ml)

(2) *Slackia* 属菌 200 μ l に対してダイジン (40 mg/ml) 1 μ l 添加 (反応液の *Slackia* 属菌終濃度は 1.12×10^9 / ml)

(3) ビフィドバクテリウム TM-1 菌株 200 μ l に対してダイジン (40 mg/ml) 1 μ l 添加 (反応液のビフィドバクテリウム菌終濃度は約 10^{10} / ml)

上記三種類の反応は、簡易型嫌気性培養装置アネロパックで 37、24 時間インキュベーションを行った。反応終了後、反応液 1 に対して 4 倍量のメタノールと酢酸混合液 (メタノール : 酢酸 = 100 : 5) を加えて 60 秒間激しくボルテックスした後、フィルターで濾過し、濾液を電気化学検出器搭載の HPLC で分析して、イソフラボン類の分析を行った。

10

【0133】

【表6】

【表6】

反応液のイソフラボン類濃度：

	ダイゼイン	エコール
<i>Slackia</i> 属菌+ビフィドバクテリウム TM-1 菌株	324.7 μ M	2 μ M
<i>Slackia</i> 属菌のみ	0 μ M	0 μ M
ビフィドバクテリウム TM-1 菌株のみ	337.6 μ M	0 μ M

20

【0134】

本発明の代表的な *Slackia* 属菌は、ダイゼインの配糖体からは、ダイゼインもエコールも生成できないが、本発明のビフィドバクテリウム TM-1 菌株は、ダイゼインの配糖体からグルコースを加水分解し、ダイゼインを生成することで、*Slackia* 属菌のダイゼインの配糖体からのエコール生産に寄与していると言える。

30

【0135】

(実施例7：エコール生産性ヒトフローラマウスに対するビフィドバクテリウム TM-1 菌株の *in vitro* におけるエコール生産能向上効果)

健康なヒトの糞便を嫌気性グローブボックス (窒素 : 炭酸ガス : 水素 = 85 : 10 : 5) 内で嫌気性輸送液を用いてホモジネートし、この糞便希釈液をビニールアイソレータ内で飼育している無菌マウス (IQI) ICR 系成熟雄マウスに経口投与し、ヒトの腸内細菌叢を有するヒトフローラマウスを作製した。このヒトフローラマウスをガンマー線滅菌 AIN93M 飼料で 19 ヶ月間飼育した後、このヒトフローラマウスの糞便を滅菌試験管に採取し、上記希釈液で糞便当たり 35 倍に希釈し、この希釈液 0.2 mL にダイゼイン (20 mg/ml) 1 μ l 加えて、簡易型嫌気性培養装置アネロパックで 37、24 時間インキュベーションを行い、エコール生産能を調べたところ 2 匹のマウスでエコール生産能を有するヒトフローラマウスを得た。そこで、このヒトフローラマウスの糞便を滅菌試験管に採取し、上記希釈液で糞便当たり 35 倍に希釈し、この希釈液 0.2 mL にダイゼイン (20 mg/ml) 1 μ l 加えてさらに、EG 培地で 37 で 48 時間嫌気培養を行ったビフィドバクテリウム TM-1 菌株を白金耳にて嫌気性希釈液に懸濁し、菌液 8 μ l を糞便希釈液に加えた。ビフィドバクテリウム菌終濃度 (約 10^8 / ml)。反応は、簡易型嫌気性培養装置アネロパックで 37、24 時間インキュベーションを行った。また対照には、菌液 8 μ l の代わりに嫌気性希釈液 8 μ l 加えたものを用いた。反応終了後、上記と同様の方法で、イソフラボン類の分析を行った。

40

50

【0136】

【表7】

【表7】

反応液のイソフラボン類濃度：

	ダイゼイン	エコール
対照	345 μ M	35.2 μ M
ビフィドバクテリウム TM-1 菌株添加	242 μ M	48.6 μ M

10

【0137】

本発明の代表的なビフィドバクテリウム菌株は、エコール生産性ヒトフローラマウスに対する38%以上のエコール生産能向上効果を有すると言える。

【0138】

(実施例8：エコール生産性ICR系マウスに対するビフィドバクテリウムTM-1菌株の*in vitro*におけるエコール生産能向上効果)

20

あらかじめエコール生産能があることを確認した二匹のICR系雄マウスの糞便を採取し、上記希釈液で糞便当たり25倍に希釈し、この希釈液0.2mLにダイゼイン(20mg/mL)1 μ L加えて、さらに、EG培地で37で48時間嫌気培養を行ったビフィドバクテリウムTM-1菌を白金耳にて嫌気性希釈液に懸濁し、菌液4 μ Lを糞便希釈液に加えた。ビフィドバクテリウム菌終濃度(約 10^8 /mL)。また対照には、菌液4 μ Lの代わりに嫌気性希釈液4 μ L加えたものを用いた。反応終了後、上記と同様の方法で、イソフラボン類の分析を行った。

【0139】

【表8】

【表8】

反応液のイソフラボン類濃度：

	ダイゼイン	エコール
対照	91.5 μ M	60.0 μ M
ビフィドバクテリウム TM-1 菌添加	165.6 μ M	75.3 μ M

30

【0140】

本発明の代表的なビフィドバクテリウムTM-1菌株は、エコール生産性コンベンショナルマウスに対する25%以上のエコール生産能向上効果を有すると言える。

40

【0141】

(実施例9：エコール生産能を有するヒトに対するビフィドバクテリウムTM-1菌株の*in vitro*におけるエコール生産能向上効果)

エコール生産能をあらかじめ確認した健康な男性成人でしかも、過去二ヶ月以内に抗生物質を摂取したことが無いと確認がとれているヒトの糞便を採取し、上記希釈液で糞便当たり30倍に希釈し、この希釈液0.2mLにダイゼイン(20mg/mL)1 μ L加えて、さらに、EG培地で37で48時間嫌気培養を行ったビフィドバクテリウム菌を白金耳にて嫌気性希釈液に懸濁し、菌液4 μ Lを糞便希釈液に加えた。ビフィドバクテリウ

50

ム菌菌終濃度（約 10^8 / ml）。また対照には、菌液 $4 \mu\text{l}$ の代わりに嫌気性希釈液 $4 \mu\text{l}$ 加えたものを用いた。反応終了後、上記と同様の方法で、イソフラボン類の分析を行った。

【0142】

【表9】

【表9】反応液のイソフラボン類濃度：

	ダイゼイン	エコール
対照	286 μM	59 μM
ビフィドバクテリウム TM-1 菌添加	72.2 μM	71 μM

10

【0143】

本発明の代表的なビフィドバクテリウム TM-1 菌株は、エコール生産性のヒトに対する 20% 以上のエコール生産能向上効果を有すると言える。

【0144】

（実施例 10：エコール生産能を有するヒトに対するビフィドバクテリウム プレーベ JCM 1273 菌株の *in vitro* におけるエコール生産能向上効果）

エコール生産能をあらかじめ確認した健康な男性成人でしかも、過去二ヶ月以内に抗生物質を摂取したことが無いと確認がとれているヒトの糞便を採取し、上記希釈液で糞便当たり 30 倍に希釈し、この希釈液 0.2 mL にダイゼイン（20 mg / ml） $1 \mu\text{l}$ 加えて、さらに、BL 培地で 37 で 48 時間嫌気培養を行ったビフィドバクテリウム プレーベ JCM 1273 菌を白金耳にて嫌気性希釈液に懸濁し、菌液 $4 \mu\text{l}$ を糞便希釈液に加えた。ビフィドバクテリウム プレーベ菌終濃度（約 10^7 / ml）。また対照には、菌液 $4 \mu\text{l}$ の代わりに嫌気性希釈液 $4 \mu\text{l}$ 加えたものを用いた。反応終了後、上記と同様の方法で、イソフラボン類の分析を行った。

20

【0145】

【表10】

【表10】反応液のイソフラボン類濃度：

	ダイゼイン	エコール
対照	140.0 μM	144.2 μM
ビフィドバクテリウム プレーベ菌添加	28.8 μM	171.1 μM

30

40

【0146】

ビフィドバクテリウム プレーベ JCM 1273 菌株は、エコール生産性のヒトに対する 18% 以上のエコール生産能向上効果を有すると言える。

【0147】

（実施例 11：16S rRNA 遺伝子解析にもとづく Slackia 属菌種の推定およびエコール生産性 Slackia 属菌種の検出のための菌種特異的プライマーの取得）

EG 培地で 37 で 48 時間嫌気培養を行った Slackia 属菌からインスタジーンマトリクス（バイオラッド製）で細菌のゲノム DNA を抽出した。このゲノム DNA を篠田らの 16S rRNA 遺伝子解析による細菌の系統分類方法 [非特許文献 8 = 島津評論, 57 巻, 121 - 132 頁 (2000)] を採用して Slackia 属菌種の推定を行っ

50

たところ本菌は、*Slackia exigua* (受託番号 (Accession no) : AF101240) の 16 SrDNA 遺伝子の 1365 個のうち 1269 が一致した (92%)。よって本菌は、*Slackia* 属に属すると考えられるが、種レベルでは、全くの新菌の可能性がある。そこで、本菌を特異的に検出する菌種特異的プライマーの作製を試みた。DDBJ の核酸データベースと CLUSTAL W program [Nucleic Acids Res 22 巻 4673 - 4680 頁 (1994)] を利用してエコール生産性 *Slackia* 属菌種の検出のための菌種特異的プライマーを取得した。

Slackia 属菌種の検出のための菌種特異的プライマー :

Forward SLCf 5' AAGCCTCGGATGCGGCAG3' (配列番号 4)

Reverse SLCr 5' TCTCGGCCACCGGATCT3' (配列番号 5)

生成物サイズ (bp) 383 bp

Slackiasp. TM-30 特異的プライマーによる PCR 産物 (配列) : 383 bp

AAGCCTCGGATGCGGCAGGGGAGGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCGGGAAGAACACCGACGGC
GAAGGCAGCCTCCTGGGCCGGCATCGACGCTGAGGCGCAAAGCTGGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
CAGCCGTAAACGATGGACGCTAGGTGTGGGGGAACATCCCTCCGTGCCGAAGCCAACGCATTAAGCGTCCCGCCTGGGG
AGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGAAGCA
ACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATACGGGTGAAGCCGGGAGAGATCCGGTGGCCGAGA (配列番号 3 の 5 69 位から 951 位)

(実施例 12 : 製剤例)

上記のように同定した *Bifidobacterium* TM-1 株を *Bifidobacterium* 培地 JCM カタログ培地 No19) に接種後、37、18~24 時間静置培養を行なった。培養終了後、7,000 rpm、15 分間遠心分離を行い培養液の 1/100 量の濃縮菌体を得た。次いで、各々の濃縮菌体にグルタミン酸ソーダ 5% (重量)、可溶性澱粉 5% (重量)、シヨ糖 5% (重量) および硫酸マグネシウム 7 水和物 1% (重量) を含む分散媒と同量混合し、pH 7.0 に修正後、-40 以下で凍結してから凍結乾燥を行った。得られた凍結乾燥菌末を 60 メッシュの篩で粉末化して菌株の乾燥菌末を調製する。この乾燥菌末 2 mg (菌数、 5×10^8 相当) と乳糖 (日局) 61 mg、澱粉 (日局) 116, 2 mg、結合剤としてポリビニルピロリドン K25 (日局) 20 mg、滑沢剤としてステアリン酸マグネシウム (日局) 0.8 mg を加えて均一に混合し、打錠機で圧縮成型し 1 錠当たり 200 mg の素錠を作り、さらに、ヒドロキシプロピルセルロースを用いてフィルムコーティングを施して白色のフィルムコーティングされた錠剤を製造する。

【0148】

このような錠剤は、健康食品または医薬として投与することができる。

【0149】

(実施例 13 : エコール製剤の調製)

ソヤフラボン HG (不二製油製、大豆エタノール抽出物、インフラボン含量約 40%) を 25% となるように反応液 (ブレインハートインフュージョン 37 g、寒天 1 g、L-システイン-塩酸 0.5 g、炭酸ナトリウム 4 g を 1 リットルの蒸留水に加温溶解し、酸素フリーの炭酸ガスを吹き込みながら試験管に分注し、ブチルゴム栓をして、オートクレーブ滅菌処理を行った反応液) に添加する。この反応液 9 ml に、約 $10^9 / ml$ *Slackia* 属菌 TM-30 を添加して、37、24 時間静置培養を行い、エコールを生成させた。これを凍結乾燥して粉末とする。このエコール含有粉末は、エコール製剤および他の食品と混合することで、エコール含有食品に用いることができる。

【0150】

(実施例 14 : 別の菌株の同定)

上記実施例と同様の方法で、ダイゼインを資化して 1.6% 以上エコールを生産する新

たに別の菌株を取得する。同定される菌株について、Slackiaに属する菌を同定することができる。このような菌は、ダイゼイン資化能を有するにSlackia属する菌として特定することができる。

【0151】

以上のように、本発明の好ましい実施形態を用いて本発明を例示してきたが、本発明は、この実施形態に限定して解釈されるべきものではない。本発明は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。当業者は、本発明の具体的な好ましい実施形態の記載から、本発明の記載および技術常識に基づいて等価な範囲を実施することができることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願および文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。

10

【産業上の利用可能性】

【0152】

本発明は、健康食品、食品、医薬などの産業において製造および利用することができる。従って、種々の分野において、本発明は、利用可能性を有する。

【配列表フリーテキスト】

【0153】

配列番号1：ユニバーサルプライマー-27f 5' - A G A G T T T G A T C C T G G C T C A G - 3'

配列番号2：ユニバーサルプライマー-1492r 5' - G G C T A C C T T G T T A C G A C T T - 3'

20

配列番号3：Slackia属菌TM-30菌株の16SrDNAの部分塩基配列(1402bp)：

C A C A T G C A A G T C G A A C G A G T A A G A C G C C T T C G G G C G T G G A
T A G A G T G G C G A A C G G G T G A G T A A C A C G T G A C C A A C C T G C C
C C C T C C T C C G G G A C A A C C T C G G G A A A C C G A G G C T A A T A C C
G G A T A C T C C G G G C C C C C G C A T G G G G A G C C C G G G A A A G C C
C T G G C G G G A G G G G A T G G G G T C G C G G C C C A T C A G G T A G A C G
G C G G G G T A A C G G C C C A C C G T G C C T A C T A C G G G T A G C C G G G
C T G A G A G G C C G A T C G G C C A C A T T G G G A C T G A G A C A C G G C C
C A G A C T C C T A C G G G A G G C A G C A G T G G G G A A T T T T G C G C A A
T G G G G G C A A C C C T G A C G C A G C G A C G C C G C G T G C G G G A C G A
A G T C A T T C G T G A C G T A A A C C G C T T T C A G C G A G G A A G A A C C
A T G A C G G T A C T C G C A G A A G A A G C C C C G G C T A A C T A C G T G C
C A G C A G C C G C G G T A A T A C G T A G G G G G C G A G C G T T A T C C G G
A A T C A T T G G G C G T A A A G C G C G C G C A G G C G G G C T T T C A A G C
G G C G G C G T C G A A G C C G G G G G C T C A A C C C C C G G A A G C G C C C
C G A A C T G G A A G C C T C G G A T G C G G C A G G G G G A G G C G G A A T T
C C C G G T G T A G C G G T G A A A T G C G C A G A T A T C G G G A A G A A C A
C C G A C G G C G A A G G C A G C C T C C T G G G C C G G C A T C G A C G C T G
A G G C G C G A A A G C T G G G G G A G C G A A C A G G A T T A G A T A C C C T
G G T A G T C C C A G C C G T A A A C G A T G G A C G C T A G G T G T G G G G G
G A A C A T C C C T C C G T G C C G A A G C C A A C G C A T T A A G C G T C C C
G C C T G G G G A G T A C G G C C G C A A G G C T A A A A C T C A A A G G A A T
T G A C G G G G G C C C G C A C A A G C A G C G G A G C A T G T G G C T T A A T
T C G A A G C A A C G C G A A G A A C C T T A C C A G G G C T T G A C A T A C G
G G T G A A G C C G G G A G A G A T C C G G T G G C C G A G A G G A G C C C G T
A C A G G T G G T G C A T G G C T G T C G T C A G C T C G T G C C G T G A G G T
G T T G G G T T A A G T C C C G C A A C G A G C G C A A C C C C C G C C G C G T
G T T G C C A G C A T T C A G T T G G G C A C T C A C G C G G G A C T G C C G G

30

40

50

C G T C A A G C C G G A G G A A G G C G G G G A C G A C G T C A A G T C A T C A
T G C C C C T C A T G C C C T G G G C C G C A C A C G T G C T A C A A T G G C C
G G C A C A A C G G G T T G C C A C C C C G C G A G G G G G A G C G G A T C C C
A A A A G C C G G C C C C A G T T C G G A T C G C A G G C T G C A A C C C G C C
T G C G T G A A G C C G G A G T T G C T A G T A A T C G C G G A T C A G C A C G
C C G C G G T G A A T A C G T T C C C G G G C C T T G T A C A C A C C G C C C G
T C A C A C C A C C C G A G T C G T C T G C A C C C G A A G C C G C C G G C C G
A A C C C C G A A A G G G G G C G G A G G C G T C G A A G G T G T G G A G G G T
G A

配列番号4 : S l a c k i a 属菌種の検出のための菌種特異的プライマー : F o r w a r d S L C f 5 ' A A G C C T C G G A T G C G G C A G 3 ' 10

配列番号5 : S l a c k i a 属菌種の検出のための菌種特異的プライマー : R e v e r s e S L C r 5 ' T C T C G G C C A C C G G A T C T 3 '

【配列表】

2006204296000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 13/08 (2006.01)	A 6 1 P	13/08	4 C 0 8 7
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P	15/00	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	A
A 2 3 L 1/28 (2006.01)	A 2 3 L	1/28	Z
A 2 3 L 1/30 (2006.01)	A 2 3 L	1/30	A
	C 1 2 N	1/20	E

Fターム(参考) 4B065 AA01X AA21X AC14 AC20 CA18 CA44
 4C084 AA19 MA02 MA16 MA34 MA44 MA52 NA14 ZA811 ZA812 ZB261
 ZB262
 4C086 AA01 AA02 BA08 MA02 MA04 MA16 MA34 MA44 MA52 NA14
 ZA81 ZB26
 4C087 AA02 AA03 BC55 BC59 MA02 MA16 MA34 MA44 MA52 NA14
 ZA81 ZB26