

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5578375号  
(P5578375)

(45) 発行日 平成26年8月27日(2014.8.27)

(24) 登録日 平成26年7月18日(2014.7.18)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 K 35/74 (2006.01)	A 6 1 K 35/74 A
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K 35/74 G
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/16
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 1/00

請求項の数 3 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2011-553864 (P2011-553864)	(73) 特許権者	501176303 日環科学株式会社 千葉県千葉市中央区汐見丘町11の1の2 11
(86) (22) 出願日	平成23年2月9日(2011.2.9)	(73) 特許権者	304021831 国立大学法人 千葉大学 千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号
(86) 国際出願番号	PCT/JP2011/052735	(73) 特許権者	504160781 国立大学法人金沢大学 石川県金沢市角間町ヌ7番地
(87) 国際公開番号	W02011/099514	(73) 特許権者	503114002 独立行政法人水産大学校 山口県下関市永田本町2-7-1
(87) 国際公開日	平成23年8月18日(2011.8.18)		
審査請求日	平成24年6月20日(2012.6.20)		
(31) 優先権主張番号	特願2010-28205 (P2010-28205)		
(32) 優先日	平成22年2月10日(2010.2.10)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
(31) 優先権主張番号	特願2010-28204 (P2010-28204)		
(32) 優先日	平成22年2月10日(2010.2.10)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
微生物の受託番号	NITE BP-1051		
微生物の受託番号	NITE BP-863		
微生物の受託番号	PTA 1773		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 好熱性微生物を用いた混合物、溶解液、及び医薬品

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

好熱性複合菌BP-1051又は*Bacillus thermoamylovorans*の近縁種で難分解性の糖質の分解能を有するBP-863を含む混合物又は溶解液であって、動物へ投与することで、動物の腸内におけるクロストリジウム属のcluster IVとsubcluster XIVaの腸内菌数を制御するとともに、該動物の粘膜免疫系遺伝子群、腸における代謝関連遺伝子群、肝臓における代謝関連遺伝子群のうち、少なくとも一つの発現を調節し、結果として粘膜免疫の賦活化、並びに内臓脂肪の蓄積軽減をもたらすことを特徴とする混合物又は溶解液。

【請求項2】

好熱性種菌PTA-1773、並びに好熱性複合菌BP-1051又は*Bacillus thermoamylovorans*の近縁種で難分解性の糖質の分解能を有するBP-863を含む混合物又は溶解液であって、動物へ投与することで、動物の腸内におけるクロストリジウム属のcluster IVとsubcluster XIVaの腸内菌数を制御するとともに、該動物の粘膜免疫系遺伝子群、腸における代謝関連遺伝子群、肝臓における代謝関連遺伝子群のうち、少なくとも一つの発現を調節し、結果として粘膜免疫の賦活化、並びに内臓脂肪の蓄積軽減をもたらすことを特徴とする混合物又は溶解液。

【請求項3】

請求項1又は2に記載の混合物又は溶解液を含有する粘膜免疫の賦活化、並びに内臓脂肪の蓄積軽減をもたらすための医薬品。

【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、ヒトを含む動物に対する粘膜免疫系の活性化、及び代謝調節が可能な好熱性微生物を含む混合物、溶解液、及び医薬品に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

微生物を用いたプロバイオティクスは、動物の腸内細菌層を改善し、下痢の予防や免疫を活性化すること等が知られている。例えば、特許文献1には、動物に対する下痢等を予防する菌体由来の殺菌処理成分が開示されている。又、特許文献2には、乳酸菌の一種であるラクトバチラス属を含む配合物が開示されている。又、特許文献3には、枯草菌の一種である*Bacillus subtilis*由来の抗菌化合物が開示されている。又、特許文献4には、酵母、ラクトバチラス、及びビフィドバクテリウムを含む共生組成物であり、胃腸管に対する定着性を有する微生物群が開示されている。更に、特許文献5には、乳酸菌の一種であるラクトバチラス属等を含む免疫増強剤が開示されている。これらの特許文献に開示されるプロバイオティクスは、何れも常温性の微生物を用いたものであり、好熱性の微生物を用いたものでない。

10

## 【0003】

又、動物への常温性の微生物の投与が免疫系や代謝調節系に与える影響、及びその作用機序について開示されている例としては、次のようなものが挙げられる。

## 【0004】

非特許文献1では、*Bacillus subtilis*がラビットの盲腸内のバクテロイデス属との共生によってCCL21遺伝子の発現を増進することが報告されている。又、非特許文献2では、動物由来の病原菌と知られているサルモネラ菌が、粘膜免疫系のセンサーであるToll-like receptor4を介して免疫系のB細胞の遊走因子であるケモカインCXCL13とCCL21との発現を抑制することが報告されている。尚、前記ケモカインCXCL13等は、非特許文献3にて生体においてリンパ節の発達に関連する役割を担っていることが開示されており、非特許文献4にて呼吸器系の免疫機能の形成に関連することが開示されている。

20

## 【0005】

又、非特許文献5では、腸管における免疫系の調節部位であるパイエル板の機能を調節する細菌としてSegmented filamentous bacteriaが開示されている。又、非特許文献6では、上記のような特殊な細菌をGerm free animal（無菌動物）に導入し、ヒトのフローラを入れる試みも実施されている。

30

## 【0006】

一方、特許文献6～8には、好熱性の微生物を用いたものが開示されている。この好熱性の微生物を用いた技術は、有機性廃棄物をリサイクルすることによって、各用途の製剤化が可能である点等の着目すべきメリットが多くある。しかしながら、前記各特許文献では、キチン質を分解する能力を有するバチルス属を畜産動物に投与した場合の糞尿由来の堆肥化の促進、臭気軽減等についての開示がなされているものの、その作用機序についての詳しい記載がない。即ち、これらの特許文献には、好熱性微生物を動物に投与した場合の生体に対する直接的な効果、特に免疫系や内分泌系に与える影響についての開示がなされていない。

40

## 【0007】

以上のように、従来の免疫系の調節に関する技術は、常温性の微生物を用いたものばかりである。特に、免疫系の制御をしながら、筋肉の増量効果を高めたり、或いは腸管のガス代謝や脂肪代謝を調節し、腸管の内容物由来の温暖化ガスの低減をしたり、体内の脂肪蓄積を抑制する効果を同時に達成することはできない。又、従来の好熱性の微生物を用いた技術は、肥料並びに飼料効果、環境改善効果を謳っている。

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

50

## 【 0 0 0 8 】

- 【特許文献1】特許2621588号公報
- 【特許文献2】特許3338446号公報
- 【特許文献3】特表2006-514019号公報
- 【特許文献4】特開2009-137962号公報
- 【特許文献5】特開2006-76961号公報
- 【特許文献6】特許3146305号公報
- 【特許文献7】特許3314302号公報
- 【特許文献8】特開2003-219864号公報
- 【非特許文献】

10

## 【 0 0 0 9 】

- 【非特許文献1】Nicholas B et al. Microbialinduction of B and T cell areas in rabbit appendix. Dev Comp Immunol.2008;32(8): 980-981
- 【非特許文献2】Asheley L st John et al.Salmonella disrupts lymph node architecture by TLR-4mediated suppressionofhomeostatic chemokines. Nature Medicine 2009; 15(11): 1259-1266
- 【非特許文献3】Serge A van de Pavert et al.ChemokineCXCL13 is essential for lymph node initiation and is induced byretinoic acid and neuronal stimulation. Nature Immunology 2009; 10(11): 1193-1200
- 【非特許文献4】Juan E Moyron-Quiroz, et al. Roleof inducible bronchus associated lymphoid tissue (iBALT) inrespiratory immunity. Nature Medicine. 2004; 10(9):927-934
- 【非特許文献5】Klaasen HLM et al. Infection and Immunity61: 303-306, 1993 etc.
- 【非特許文献6】腸内細菌学雑誌22:109-114,2008

20

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【 0 0 1 0 】

しかしながら、各特許文献、及び非特許文献に開示される技術は、動物に与える影響についての作用機序と全身の健康状態に与える影響とを双方向で検証するデータに乏しい。特に、従来の好熱性の微生物を用いた技術については、実験動物を用いた研究成果に関するものでなく、畜産動物以外の動物、特にヒトへの応用を図る為の基礎研究等についての知見が乏しい。

30

## 【 0 0 1 1 】

本発明は、上記事情に鑑みなされたものであって、普遍的なデータが蓄積している実験動物であるラット、並びにマウスを用いた研究データに基づいて、粘膜免疫系遺伝子群や、腸、肝臓における代謝関連遺伝子群の調節を可能とする好熱性微生物を用いた混合物、溶解液及び医薬品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】

## 【 0 0 1 2 】

本発明に係る混合物又は溶解液は、好熱性複合菌BP-1051又はBacillus thermoamylovoransの近縁種で難分解性の糖質の分解能を有するBP-863を含む混合物又は溶解液であって、動物へ投与することで、動物の腸内におけるクロストリジウム属のcluster IVとsubcluster XI Vaの腸内菌数を制御するとともに、該動物の粘膜免疫系遺伝子群、腸における代謝関連遺伝子群、肝臓における代謝関連遺伝子群のうち、少なくとも一つの発現を調節し、結果として粘膜免疫の賦活化、並びに内臓脂肪の蓄積軽減をもたらすことを特徴とする混合物又は溶解液である。

40

## 【 0 0 1 4 】

本発明に係る混合物又は溶解液は、好熱性種菌PTA-1773、並びに好熱性複合菌BP-1051又はBacillus thermoamylovoransの近縁種で難分解性の糖質の分解能を有するBP-863を含む混合物又は溶解液であって、動物へ投与することで、動物の腸内におけるクロストリジ

50

ウム属のcluster IVとsubcluster XIVaの腸内菌数を制御するとともに、該動物の粘膜免疫系遺伝子群、腸における代謝関連遺伝子群、肝臓における代謝関連遺伝子群のうち、少なくとも一つの発現を調節し、結果として粘膜免疫の賦活化、並びに内臓脂肪の蓄積軽減をもたらすことを特徴とする混合物又は溶解液である。

【0017】

本発明に係る医薬品は、前記混合物又は溶解液を含有する粘膜免疫の賦活化、並びに内臓脂肪の蓄積軽減をもたらすための医薬品である。

【発明の効果】

【0018】

本発明の混合物又は溶解液は、好熱性複合菌BP-1051又はBacillus thermoamylovoransの近縁種で難分解性の糖質の分解能を有するBP-863を含む混合物又は溶解液、或いは、好熱性種菌PTA-1773、並びに好熱性複合菌BP-1051又はBacillus thermoamylovoransの近縁種で難分解性の糖質の分解能を有するBP-863を含む混合物又は溶解液であって、動物へ投与することで、動物の腸内におけるクロストリジウム属のcluster IVとsubcluster XIVaの腸内菌数を制御するとともに、該動物の粘膜免疫系遺伝子群、腸における代謝関連遺伝子群、肝臓における代謝関連遺伝子群のうち、少なくとも一つの発現を調節し、結果として粘膜免疫の賦活化、並びに内臓脂肪の蓄積軽減をもたらすことを特徴とする混合物又は溶解液であって、動物へ投与することで、動物の腸内におけるクロストリジウム属のcluster IVとsubcluster XIVaの腸内菌数を制御するとともに、該動物の粘膜免疫系遺伝子群、腸における代謝関連遺伝子群、肝臓における代謝関連遺伝子群のうち、少なくとも一つの発現を調節し、結果として粘膜免疫の賦活化、並びに内臓脂肪の蓄積軽減をもたらすことを特徴とする混合物又は溶解液であるので、ヒトを含む動物に投与することによって、宿主の腸内フローラと共存し、粘膜免疫系遺伝子群、腸における代謝関連遺伝子群、肝臓における代謝関連遺伝子群のうち、少なくとも一つの発現を調節することが期待される。又、本混合物又は溶解液は、無菌環境下でも、ヒトを含む動物に投与することによって、粘膜免疫系遺伝子群等の発現を調節することが期待される。

【0019】

本発明の混合物又は溶解液は、好熱性微生物として好熱性複合菌BP-1051を含むことで、腸内に菌相が存在しないような無菌条件下、及び腸内に菌相が存在する通常環境下何れにおいても、動物（ヒトを含む）に投与することによって、細菌感染、ウイルス感染に対して早期に対応する自然免疫系を活性化することで粘膜免疫系遺伝子群の発現を調節し、又、腸、肝臓における代謝関連遺伝子群の発現を調節することが期待される。

尚、前記好熱性微生物とは、H. G. Schlegel著、「一般微生物学」（Thieme Verlag Stuttgart, 第5版, 173 高度好熱菌及び超高度好熱菌の欄）に記載の耐熱性の基準（最適増殖温度が40 以上）と合致するものである。

【0020】

本発明の混合物又は溶解液は、好熱性微生物として、Bacillus thermoamylovoransの近縁種で難分解性の糖質の分解能を有するBP-863、好熱性種菌PTA-1773の何れかを含むことによっても、上記同様の効果を発揮できる。

【0021】

尚、前記BP-863は、腸管のパイエル板の発達、並びに生体内のIL-18の産生を活性化すると想定される。一般にパイエル板は、免疫グロブリンの産生調節等を担っており、IL-18はインターフェロンガンマの産生を誘導することが知られている。従って、BP-863によれば、前記無菌条件下、或いは前記通常条件下何れにおいても、細菌感染、ウイルス感染に対して早期に対応できる自然免疫系の活性化に寄与することができる。

【0022】

本発明の医薬品は、上記混合物又は溶解液の何れかを有効成分として含有することによって、上記同様の効果を発揮することができる。尚、本発明の医薬品は、人を含む動物に対し、経口的、或いは経気道的な投与を行うことができる。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

## 【 0 0 2 3 】

【図 1】本発明の混合物又は溶解液の腸管内における作業機序に関する概念図。

【図 2】本発明の混合物又は溶解液のGerm freeマウスの腸管機能に与える影響を示す概念図。

【図 3】*Bacillus thermoamylovorans*の近縁種、N-11株 (NITE BP-863) のシャーレ上の培養写真。

【図 4】*Bacillus thermoamylovorans*の近縁種、N-11株 (NITE BP-863) の電子顕微鏡画像。

【図 5】高脂肪食下で飼育したマウス (飲水：水道水) のCTスキャンによる体幹部の画像。

【図 6】高脂肪食下で飼育したマウス (飲水：溶解液 1 - B を 1 . 0 % 添加した水道水) のCTスキャンによる体幹部の画像。

【図 7】好熱性の微生物を投与したGerm free マウスの肝臓におけるIL-18の含有量を示した図。

【図 8】好熱性の微生物を投与したGerm free マウスの糞中の分泌型IgAの濃度を示した図。

## 【発明を実施するための形態】

## 【 0 0 2 4 】

以下、図面を参照しつつ、本発明の実施形態を説明する。まず、本発明の混合物又は溶解液について説明する。本発明の混合物又は溶解液は、好熱性の微生物を含んだ有機物を高温発酵することで得られ、ヒトを含む動物へ投与することで、該動物の粘膜免疫系遺伝子群、腸における代謝関連遺伝子群、肝臓における代謝関連遺伝子群のうち、少なくとも一つの発現を調節するものである。

## 【 0 0 2 5 】

前記好熱性の微生物は、上記にも記載のとおり、最適増殖温度が 40 以上の微生物である。具体的には、好熱性の*Bacillus*属、*Oceanobacillus*属、*Paenibacillus*属、*Anoxybacillus*属、*Lysinibacillus*属等の微生物が挙げられる。その他、好熱性の*Methanopyrus*属、*Geogemma*属、*Pyrolobus*属、*Pyrodictium*属、*Hyperthermus*属、*Pyrococcus*属、*Pyrobaculum*属、*Thermococcus*属、*Aeropyrum*属、*Aquifex*属、*Thermotoga*属、*Thermodesulfobacterium*属、*Thermus*属、*Geobacillus*属、*Thermomyces*属、*Clostridium*属の微生物が挙げられる。又、更に具体的には、好熱性種菌PTA-1773、好熱性複合菌BP-1051、*Bacillus thermoamylovorans*の近縁種 (N-11) であるBP-863、細菌門としてFirmicutesに属する*Bacillus thermocloacae*の近縁種 (gene bank データベースにおいてno.AB298562として登録されている。)、*Bacillus thermoamylovorans*の近縁種 (同データベースにおいてno.AB298559として登録されている。)が挙げられる。

## 【 0 0 2 6 】

尚、前記好熱性種菌PTA-1773は、2000年5月1日付けでATCC(American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard Manassas, Virginia 20110-2209 U.S.A.)に国際寄託されている(受託番号:PTA-1773)。好熱性種菌PTA-1773は、キチン質分解能の高い微生物群、並びに好熱性の乳酸菌を含んでおり、具体的にはActinomycetales bacterium属、Alicyclobacillus属、Amphibacillus属、Anoxybacillus属、Atopostipes属、Brachybacterium属、Brevibacterium属、Cerasibacillus属、Clostridium属、Corynebacterium属、Curtobacterium属、Georgenia属、Gracilibacillus属、Jeotgalicoccus属、Salinibacillus属、Tissierella属、Ureibacillus属、Vagococcus属、Virgibacillus属、Weissella属等の微生物を含んでいる。又、好熱性複合菌BP-1051は、2011年1月18日付けで独立行政法人製品評価技術基盤機構の特許微生物寄託センター (NPMD) (日本国〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8)に、国際寄託されている(受託番号:NITE BP-1051)。又、*Bacillus*

10

20

30

40

50

thermoamylovoransの近縁種(N-11)であるBP-863は、2010年1月15日付けで独立行政法人製品評価技術基盤機構の特許微生物寄託センター(NPMD)(日本国 〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8)に国際寄託されている(受託番号: NITE BP-863)。

【0027】

前記有機物は、上記のような好熱性微生物を含み、高温発酵可能なものである。具体的には、上記好熱性の微生物を含んだ海産物、農産物、それらの残渣等の有機性廃棄物、木材チップ等が挙げられる。尚、前記農産物とは、とうもろこしの外皮、とうもろこしの芯(コーンコブ)、大豆かす、イチゴ、キノコ等の難分解性の糖アルコールであるアラビノース、キシリトール、キシラン等を含有する素材を含む。

10

【0028】

尚、前記有機物は、本発明の混合物又は溶解液を作製するために、50以上、90以下の温度で発酵させる。ここで、有機物の発酵温度を50より低くすることは、前記好熱性の微生物の増殖が進みにくくなり、又、常温性の微生物も増殖してしまう可能性が有るので、適切ではない。又、有機物の発酵温度を90より高くすることは、前記好熱性の微生物が死滅する可能性が有るので適切ではない。

【0029】

本発明の混合物又は溶解液は、前記発酵により得られる発酵産物より作製することができる。例えば、本発明の混合物は、前記発酵産物をそのまま、或いは飼料等に混合することで作製することができる。又、本発明の溶解液は、前記発酵産物を水で希釈することで作製することができる。その他、本発明の混合物又は溶解液は、前記好熱性の微生物を死滅させないことを条件に、任意の方法により作成することができる。

20

【0030】

以上のように作製される本発明の混合物又は溶解液は、経口的又は経気道的に動物(ヒトを含む)へ投与することにより、当該動物の粘膜免疫系遺伝子群、腸における代謝関連遺伝子群、肝臓における代謝関連遺伝子群のうち、少なくとも1つの発現を調節することができる。

【0031】

本発明の混合物又は溶解液の上記機能は、例えば、図1に記載されるようなメカニズムにより生ずることが想定される。即ち、本発明の混合物又は溶解液中に含まれる好熱性の微生物は、宿主の腸内フローラと共存する際に、粘膜免疫系及び代謝系に作用する。まず、粘膜免疫系への作用としては、腸管においてナチュラルキラー細胞(NK細胞)を活性化し、又、ケモカイン並びに関連遺伝子群の発現を促進して、リンパ組織の形成やB細胞の遊走を促進することで、抗体産生を増加させる。又、代謝系の作用としては、脂肪代謝に係る遺伝子群の発現量を調節し中性脂肪を減少させ、又、ガス代謝に係る遺伝子群の発現量を調節しメタンガス産生を抑制する。

30

【0032】

又、本発明の混合物又は代謝系中に含まれる好熱性の微生物は、直接的に粘膜免疫系へ作用することも想定される。これは、図2に示すように、本発明の混合物又は溶解液を投与したGerm free マウス(無菌マウス)において、パイエル板の発達、糞便の代謝の正常化、粘膜免疫系のマイルドな賦活化が行われることに基づく。従って、本発明の混合物又は溶解液は、腸内が無菌の環境下でも、腸内代謝を性状に近い形で調節するプロバイオティクスと言える。例えば、医療分野において絶食を必要とする術後治療への応用が期待される。

40

【0033】

又、本発明の混合物又は溶解液は、含んでいる微生物が好熱性であるため、使用直前において60程度の滅菌が可能であり、雑菌の混入を防いだ形で活用することができる。又、より簡便な培養技術によって新規機能を有するプロバイオティクス、並びにプレバイオティクスを大量に増産することも可能である。

【0034】

50

次に、本発明の医薬品について説明する。本発明の医薬品は、本発明の混合物又は溶解液を有効成分として含有していることにより、投与された動物の粘膜免疫系遺伝子群、腸における代謝関連遺伝子群、肝臓における代謝関連遺伝子群のうち、少なくとも1つの発現を調節して、効果を発揮するものである。尚、本医薬品は、経口的又は経気道的に動物（ヒトを含む）に投与することができるものである。

【0035】

又、本発明の医薬品は、必要に応じて、賦形剤、増量剤、結合剤、湿潤化剤、崩壊材、表面活性剤、滑沢剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、溶解補助剤、矯味矯臭剤、無痛化剤、安定化剤等の薬学上許容される担体又は添加剤を適宜選択して混合して実現することができる。

10

【0036】

尚、例えば、前記賦形剤としては、乳糖、白糖等の糖類、デンプン類等が挙げられる。又、崩壊材としては、セルロース誘導体、デンプン類等が挙げられる。又、結合剤としては、ゼラチン、アラビアゴム等の高分子類が挙げられる。又、滑沢剤としては、ロウ類、ステアリン酸等が挙げられる。

【0037】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものでない。又、実施例において引用された文献中の記載内容は、本明細書の記載として参照されるものとする。

【実施例1】

20

【0038】

(1-1) 溶解液1-A、1-Bの作製

溶解液1-Aは、新澤ら(Niisawa C, Oka S, Kodama H, Hirai M, Kumagai Y, Mori K, Matsumoto J, Miyamoto H, Miyamoto H (2008) *Microbial analysis of composted product of marine animal resources and isolation of antagonistic bacteria to plant pathogen from the compost. J Gen Appl Microbiol* 54: 149-158)が報告した高温発酵産物を重量比で200倍希釈し、60乃至70で6時間以上、散気処理して作製した。又、溶解液1-Bは、溶解液1-Aに含まれる好熱性微生物と、PTA-1773を共培養することにより作製されたものである。

【0039】

30

(1-2) 溶解液1-Aに含まれる微生物の解析

前記溶解液1-Aは、多種の好熱性微生物を含有しており、優先菌種として好熱性複合菌BP-1051が含まれており、それらの塩基配列(16SrDNA配列)を解析した。該解析は、溶解液1-Aに含まれている微生物を標準培地、普通寒天培地、ハートインフュージョン培地等に植菌して増殖した菌株からDNAを抽出して行った。又、この解析では、既知の方法(Lane, D.J. (1991)

16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. eds., John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England, pp. 115-175)を適用して、ユニバーサルプライマーとして27F and 1525Rを用いてPCR反応を実施した。反応溶液は、25µL

40

2×GoTaq Hot Start Colorless Master Mix (Promega Co., WI, USA)と2pmoleのプライマーを混合し、サンプルを50µLの滅菌水で溶解して作成した。PCRサイクルは、94

で15分の後、94を30秒、55を30秒、72を90秒のサイクルを35サイクル実施し、72で7分間、反応させた。更に、1.5-kbp長のPCR断片をQIAquick

PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Germany)で精製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kitを用いて、塩基配列が全自動DNA analyser system (Applied Biosystems Inc., CA,

USA)により決定された。更に、GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)のデータベース

50

等により照合検索を行った。この解析により解析された各微生物の塩基配列は、配列番号 1 ~ 8 に示すとおりである。

【 0 0 4 0 】

ここで、配列番号 1 に塩基配列を示す *Bacillus badius* の近縁種 (IP-2) は、*Bacillus badius* の標準菌株 (B NBRC15713<sup>T</sup>) と 97.3% の相同性を有するものである。又、*Bacillus badius* の近縁種 (IP-2) の特徴としては、グラム陽性、幅 2 μm、長さ 2 μm、芽胞形成、グルコース、ラクトース等の糖分解能無、カタラーゼ、オキシダーゼ陽性等が挙げられる。尚、*Bacillus badius* は、窒素代謝にかかわる遺伝子を有していることが知られている。

【 0 0 4 1 】

配列番号 2 に塩基配列を示す *Anoxybacillus kamchatkensis* の近縁種 (IP-3) は、*Anoxybacillus kamchatkensis* の標準菌株 (IAM11061<sup>T</sup>) と 99.5% の相同性を有するものである。又、*Anoxybacillus kamchatkensis* の近縁種 (IP-3) の特徴としては、グラム陽性、幅 0.4 μm、長さ 3 ~ 4 μm、芽胞形成、スターチ、グルコースの分解能有、カタラーゼ、オキシダーゼ陽性、硝酸塩を亜硝酸に還元すること等が挙げられる。尚、*Anoxybacillus kamchatkensis* は、リパーゼ活性があり、脂質の分解能が高いことが想定されるものである。

【 0 0 4 2 】

配列番号 3 に塩基配列を示す *Virgibacillus pantothenicus* の近縁種 (IP-9) は、*Virgibacillus pantothenicus* の標準菌株 (DSM14988<sup>T</sup>) と 99.5% の相同性を有するものである。又、*Virgibacillus pantothenicus* の近縁種 (IP-9) の特徴としては、グラム陰性、幅 0.5 μm、長さ 5 ~ 6 μm、大きな芽胞形成、スターチ、グルコース、タガトースの分解能有、カタラーゼ、オキシダーゼ陽性、硝酸塩を亜硝酸に還元すること等が挙げられる。尚、*Virgibacillus pantothenicus* は、塩分抵抗性をもつ成分である ectoine を有しており、この ectoine は保湿成分としても知られている。

【 0 0 4 3 】

配列番号 4 に塩基配列を示す *Bacillus fortis* の近縁種 (IP-14) は、*Bacillus fortis* の標準菌株 (LMG22079<sup>T</sup>) と 99.7% の相同性を有するものである。又、*Bacillus fortis* の近縁種 (IP-14) の特徴としては、グラム陽性、幅 0.5 μm、長さ 1 μm、芽胞形成、スターチ、グルコースの分解能無、トレハロースの分解能有、カタラーゼ、オキシダーゼ陽性、硝酸塩を亜硝酸に還元しないこと等が挙げられる。

【 0 0 4 4 】

配列番号 5 に塩基配列を示す *Lysinibacillus xylanilyticus* の近縁種 (IP-23) は、*Lysinibacillus xylanilyticus* の標準菌株 (YC6957<sup>T</sup>) と 95.0% の相同性を有するものである。又、*Lysinibacillus xylanilyticus* の近縁種 (IP-23) の特徴としては、グラム陽性、幅 0.5 μm、長さ 3 ~ 5 μm、芽胞形成、糖分解能無、ペプトン分解能有、カタラーゼ、オキシダーゼ陽性、硝酸塩を亜硝酸に還元しないこと等が挙げられる。尚、*Lysinibacillus xylanilyticus* は、難分解性のキシランの分解特性を有することが知られているが、*Lysinibacillus xylanilyticus* の近縁種 (IP-23) は、前述のように、糖分解能が皆無であり、ペプトンの利用能のみが高く、新菌種と考えられる。

【 0 0 4 5 】

配列番号 6 に塩基配列を示す *Paenibacillus timonensis* の近縁種 (IP-60) は、*Paenibacillus timonensis* の標準菌株 (CIP108005<sup>T</sup>) と 96.9% の相同性を有するものである。又、Pa

10

20

30

40

50

enibacillus

timonensisの近縁種 (IP-60) の特徴としては、グラム陽性、幅  $0.5 \mu\text{m}$ 、長さ  $3 \sim 5 \mu\text{m}$ 、芽胞形成、スターチ、キシリトール、キシラン分解能有、カタラーゼ、オキシダーゼ陰性、硝酸塩を亜硝酸に還元すること等が挙げられる。尚、Paenibacillus timonensisは、キシランの分解能が知られていないが、Paenibacillus timonensisの近縁種 (IP-60) は、上記のように、高いキシラン分解能を有しており、新菌種と想定される。又、難分解性の糖アルコールの分解能も、BP-863と同程度高い。

【0046】

配列番号7に塩基配列を示すPaenibacillus curdlanolyticusの近縁種 (IP-75) は、Paenibacillus

10

curdlanolyticusの標準菌株 (IF015724<sup>T</sup>) と  $94.6\%$  の相同性を有するものである。又、Paenibacillus

curdlanolyticusの近縁種 (IP-75) の特徴としては、グラム陽性、幅  $0.5 \mu\text{m}$ 、長さ  $3 \sim 5 \mu\text{m}$ 、芽胞形成、ラクトース分解能有、カタラーゼ、オキシダーゼ陰性、硝酸塩を亜硝酸に還元しないこと等が挙げられる。尚、Paenibacillus

curdlanolyticusは、難分解性のキシランの分解特性があることが知られている。又、Paenibacillus curdlanolyticusの近縁種 (IP-75) は、難分解性の糖アルコールの分解能もBP-863と同程度高く、新菌種と想定される。

【0047】

又、配列番号8に塩基配列を示すBacillus rarisの近縁種 (IP-95) は、Bacillus rarisの標準菌株 (LMG22866<sup>T</sup>) と  $99.9\%$  の相同性を有するものである。又、Bacillus rarisの近縁種 (IP-95) の特徴としては、グラム陽性、幅  $1 \mu\text{m}$ 、長さ  $2 \mu\text{m}$ 、芽胞形成、スターチ、グルコース、トレハロース分解能有、カタラーゼ、オキシダーゼ陽性、硝酸塩を亜硝酸に還元すること等が挙げられる。

20

【実施例2】

【0048】

(2-1) 溶解液2の作製

溶解液2は、株式会社三六九に設置された3段式の通気性発酵槽において、溶解液1-Bに含まれる微生物群によって、海産残渣を含む有機物を70以上90以下で発酵し、その最終発酵物を水で100倍に希釈し、60以下で10時間以上の間、ばっ気条件下で溶解させることにより作製した。

30

【0049】

(2-2) 溶解液2の投与によって無菌マウスの盲腸便で優先種となる微生物の解析

溶解液2を、無菌飼育したBalb/cマウス(雄、10週齢)に0.5%の濃度で3週間投与し、その盲腸便から分離した微生物の塩基配列(16SrDNA配列)を解析した。尚、飼育にあたり、前記Balb

/cマウスは、室温  $24 \pm 1$ 、湿度  $55 \pm 5\%$  で調節された飼育室においてアイソレーター(アイ・シー・エム社製)で飼育し、飼料は放射線滅菌済みの飼料(オリエンタル酵母社製 製品名CMF)を用いた。又、塩基配列の解析は、実施例1の(1-2)で述べた方法と同様の方法により行った。この解析により解析された溶解液2に含まれる各微生物の塩基配列は、配列番号9、10に示すとおりである。

40

【0050】

前記配列番号9に塩基配列を示すBacillus thermoamylovoransの近縁種(N-11)は、前記BP-863であり、Bacillus

thermoamylovoransの標準菌株(LMG18084<sup>T</sup>)と  $99.9\%$  の相同性を有するものである。このBacillus

thermoamylovoransの近縁種(N-11)の生化学的性状は表1に示すとおりであり、又、Bacillus thermoamylovoransの近縁種(N-11)の培養写真は図3、図4に示すとおりである。

【0051】

50

【表 1】

特徴	Bacillus thermoamylovoransの近縁種(N-11)	Bacillus thermoamylovorans の標準菌株(LMG 18084 <sup>T</sup> )
コロニーおよび顕微鏡観察		
コロニーの色	クリーム	クリーム
菌の形状	桿菌	桿菌
菌の大きさ	0.5 × 2-5 μm	0.45-0.5 × 3-4 μm
グラム染色	+	+
芽胞染色	+	+
芽胞の位置	端(subterminal)	端(subterminal)
運動性	V	V (variable among the strain)
その他の生化学的特徴		
インドール産生	-	-
IPA産生	-	-
H <sub>2</sub> S産生	-	-
尿素分解	-	-
硝酸塩還元	+	+
カタラーゼ	+	+
オキシダーゼ	+	+
酸産生能試験		
グルコース	+	+
ラクトース	+	+
マルトース	+	+
ガラクトース	+	+
トレハロース	+	+
マンノース	+	+
スクロース	+	+
フルクトース	+	+
セロビオース	+	+
リボース	+	+
キシロース	+	V (variable among the strain)
ラムノース	+	-
D-アラビノース	+	-
ツラノース	+	ND
グルコン酸ナトリウム	+	-
イノシトール	+	-
キシリトール	+	-
ズルシトール	+	-
エリスリトール	+	-
ソルビトール	+	-
マニトール	+	-
乳酸	+	ND
キシラン	+	ND

## 【 0 0 5 2 】

尚、表 1 においては、Bacillus thermoamylovoransの標準菌株(LMG18084<sup>T</sup>)と比較して、Bacillus thermoamylovoransの近縁種(N-11)の生化学的性状を示している。又、Bacillus thermoamylovoransの標準菌株(LMG18084<sup>T</sup>)の生化学的性状は、Combet-Blanc, Y., Ollivier, B., Streicher, C., Patel, B.K.C., Dwivedi, P.P., Pot, B., Prensier, G., Garcia, J.L.(1995) Bacillus thermoamylovorans sp. nov., a moderately thermophilic and amylolytic bacterium. Int. J.Syst. Bacteriol. 45: 9-16、及びCoorevits, A., Logan, N., Dinsdale, A., Halket, G., Scheldeman, P., Heyndrickx, M., Schumann, P., VanLandschoot, A., De Vos, P. (2010) Bacillus thermolactis sp. nov., isolated from dairy farms, and emended description of Bacillus thermoamylovorans. Int. J. Syst. Microbiol. 56: 781-786に記載された内容に基づくものである。

## 【 0 0 5 3 】

前記*Bacillus thermoamylovorans*の近縁種 (N-11) は、表 1 に示すように、*Bacillus thermoamylovorans*の標準菌株 (LMG18084<sup>T</sup>) と比較して、難分解性の糖アルコールであるアラビノース、キシリトール等について高い分解能を有する。そのため、*Bacillus thermoamylovorans*の近縁種 (N-11) は、発酵飼料等に利用する際に、従来飼料価値の低かった難分解性の糖アルコール等を含むトウモロコシ外皮や小麦粕、大豆粕、キノコ、野菜粕等について効果的な分解能が期待される。又、*Bacillus thermoamylovorans*の近縁種 (N-11) は、難分解性の多糖類であるキシランの分解能も確認されている。又、*Bacillus thermoamylovorans*の近縁種 (N-11) は、図 4 の電子顕微鏡写真に示すように、通常の培地条件では、芽胞を形成しているものと桿菌が共存している。

10

## 【 0 0 5 4 】

前記配列番号 1 0 に塩基配列を示す*Bacillus coagulans*の近縁種 (N-16) は、*Bacillus coagulans*の標準菌株 (ATCC7050<sup>T</sup>) と 9 9 . 9 % の相同性を有するものである。この*Bacillus*

*coagulans*の近縁種 (N-16) の特徴としては、グラム陽性、幅 0 . 7  $\mu\text{m}$ 、長さ 3 ~ 5  $\mu\text{m}$ 、芽胞形成、スターチ分解能無、グルコース、トレハロース、タガトースの分解能有、カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陰性、硝酸塩を亜硝酸に還元しないこと等が挙げられる。

## 【 0 0 5 5 】

( 2 - 3 ) 溶解液 3、4、5 の作製

20

溶解液 3 は、*Bacillus thermoamylovorans*の近縁種 (N-11) (BP-863) のみを含む溶解液として作製した。又、溶解液 4 は、*Bacillus coagulans*の近縁種 (N-16) (BP-1051 に含有する単離菌) のみを含む溶解液として作製した。又、溶解液 5 は、*Bacillus thermoamylovorans*の標準菌 (LMG18084<sup>T</sup>) のみを含む溶解液として作製した。

## 【 実施例 3 】

## 【 0 0 5 6 】

( 3 - 1 ) 溶解液 1 - A に係る検証実験 [ 1 ]

Wistar ラット (雄、3 週齢) (九動社より入手) に溶解液 1 - A を投与して、該溶解液 1 - A の遺伝子群発現調節効果を検証する実験を行った。尚、本実験は、下記 3 群を準備して、比較することにより行った。

30

( 1 - A ) 群 通常飼育群 (対照群)

( 1 - B ) 群 溶解液 1 - A の飲水添加群

( 1 - C ) 群 溶解液 1 - A (但し、0 . 0 2  $\mu\text{m}$  フィルター滅菌処理済) の飲水添加群

## 【 0 0 5 7 】

尚、Wistar ラットは、( 1 - A ) ~ ( 1 - C ) 群共に 5 日間予備的に飼育したものを実験に用いた。又、Wistar ラットは、各群共に 5 匹とし、1 匹ずつ個別のゲージ (夏目製作所社製) で飼育した。又、飼料は、放射線滅菌済みの飼料 (オリエンタル酵母社製 製品名 MF) を使い、Wistar ラット 1 匹に対し 1 日あたり 2 5 g の摂取制限内で自由摂食させた。又、飲水は、( 1 - A ) 群について水道水、( 1 - B ) 群について溶解液 1 - A を 1 . 0 % 添加した水道水、( 1 - C ) 群について溶解液 1 - A を 0 . 0 2  $\mu\text{m}$  フィルターで滅菌処理したものを 1 . 0 % 添加した水道水を用い、自由摂取させた。

40

## 【 0 0 5 8 】

上記 ( 1 - A ) ~ ( 1 - C ) 群の Wistar ラットは、夫々 3 ヶ月間飼育した後、それらの腸管、肝臓、脾臓、血液等を採取し、素早く液体窒素で凍結し、その後 - 8 0 の冷蔵庫で保管した。

## 【 0 0 5 9 】

各群間における遺伝子群の発現の変動は、上記採取した小腸管を用いて解析した。具体的には、採取した小腸管からバイエル板を除いた部位において、RNA 抽出を実施した。こ

50

のRNA抽出は、100mg以下の組織にIsogen（ニッポンジーン社製）を1000 $\mu$ l添加し、液体窒素で凍らせたまま乳鉢で粉碎し、RNAeasy mini kit（Quiagen社製）を用いて行った。そして、各遺伝子群の発現量は、前記抽出したRNAをマウスの全遺伝子を搭載するマイクロアレイ（アジレント社製）にハイブリダイゼーション及び洗浄後、アレイスキャナー（アジレント社製）により各スポット蛍光値の算出及び補正を行うことで数値化した。その結果は、表2、3に示すとおりである。

【0060】

【表2】

Gene	Gene Symbol	Regulation
immunoglobulin related gene	XM_213585, LOC500183, RGD1359539, Z93370, XM_345745, X60291, A2m	up
vitamin D-binding protein precursor	TC641315	up
chemokine (C-C motif) ligand	Ccl21b, Scya11, Scya28, Sdf1, LOC498335	up
chemokine (C-C motif) receptor	Cxcr4, Ccr5, Ccr6, Ccr7	up
nuclear receptor coactivator 7	XM_574285	up
granzyme B /natural killer cell protease precursor	M_224224, RGD1562700_predicted, Gzmb, RGD1562700_predicted	up

10

【0061】

【表3】

Gene	Gene Symbol	Regulation
HBV pX associated protein 8 large isoform	Hbxap_predicted	down
carbonic anhydrase	ENSRNOT00000051309	down
apolipoprotein A-V	Apoa5	down
endothelin	Edn3	down
heat shock protein 4	Hspa4	down

20

【0062】

表2は、(1-A)群に対し(1-B)群において2.0倍以上の発現量を示す上位6つの遺伝子群を示している。これらの遺伝子群の内、immunoglobulin related gene、chemokine (C-C motif) ligand、chemokine (C-C motif) receptor、granzyme B / natural killer cell protease precursorは粘膜免疫系遺伝子群であり、vitamin D-binding protein precursorは代謝関連遺伝子群である。又、表中にはないが、粘膜免疫系遺伝子群であるtumor necrosis factor receptorも、(1-A)群に対し(1-B)群において1.8倍程度の発現量であった。

30

【0063】

尚、前記immunoglobulin related geneとしては、anti-idiotypic immunoglobulin M light chain、immunoglobulin gamma2a constant region、Ig light chain、Ig gamma-1、chain C region、gamma-2a immunoglobulin heavy chain、immunoglobulin kappa chain variable regionが確認された。又、前記chemokine (C-C motif) ligandとしては、Small inducible cytokine B13 precursor (CXCL13) (B lymphocyte chemoattractant)が顕著に発現していた。Real time PCRによる定量化を行ったところ、(1-A)群に対し(1-B)群において、3.6倍(n=3)の増加傾向が認められた。

40

【0064】

50

表3は、(1-A)群に対し(1-B)群において2分の1以下の発現量を示す上位5つの遺伝子群を示している。これらの遺伝子群の内、HBV pX associated proteinはウイルス感染の制御に、carbonic anhydraseはガス代謝に、apolipoprotein A-Vは脂肪代謝に、endothelinは血圧調節に、heat shock protein 4は遺伝子発現、タンパク機能調節及び細胞内シグナル等に、夫々関与する。

【0065】

尚、(1-C)群は、(1-B)群と異なり、(1-A)群に対する遺伝子群の発現量の変動が少なかった。

【0066】

(3-2) 溶解液1-Bに係る検証実験[1]

Germ free マウスに溶解液1-Bを投与して、該溶解液1-Bの遺伝子群発現量調節効果を検証する実験を行った。尚、本実験は、下記2群を準備して、比較することにより行った。

(2-A)群 通常飼育群(対照群)

(2-B)群 溶解液1-Bの飲水添加群

【0067】

尚、Germ freeマウス(東京大学大学院農学生命科学研究科獣医公衆衛生学研究室より入手、及び当該研究室に飼育依頼)は、(2-A)、(1-B)群共に5匹とし、各群内で同じアイソレーター(アイ・シー・エム社製)で飼育した。又、飼料は、放射線滅菌済みの飼料(オリエンタル酵母社製 製品名CMF)を用い、自由摂食させた。又、飲水は、(2-A)群について紫外線及びオートクレーブにより滅菌された水、(2-B)群について紫外線及びオートクレーブにより滅菌された水に、溶解液1-Bを0.5%添加したものを、自由摂取させた。

【0068】

上記(2-A)、(2-B)群のGerm free マウスは、夫々3週間飼育した後、それらの腸管、肝臓、脾臓、血液等を採取し、素早く液体窒素で凍結し、その後-80の冷蔵庫で保管した。そして、各群間における遺伝子群の発現量の変動は、本実施例(3-1)と同様の方法を適用して解析した。

【0069】

前記解析の結果、Germ free マウスにおいては、溶解液1-Bの投与によって、表2及び表3に示すWistarラットの場合と同様に变化した遺伝子群は少ないものの、表4に示すような類似した粘膜免疫系遺伝子群であるimmunoglobulin related gene、chemokine (C-C motif) ligand、tumor necrosis factor receptorが高発現し、代謝関連遺伝子群の発現も調節されることも明らかになった。尚、この結果は、Germ free マウスへの投与期間が3週間と短いため、短期間投与の効果と想定される。

【0070】

【表4】

Gene	Mouse Gene Symbol	Regulation
immunoglobulin related gene	Igsf9, Igsf3, Semas3b	up
chemokine (C-C motif) ligand	Ccl25	up
tumor necrosis factor receptor	Tnfrsf1b	up

【0071】

(3-3) 溶解液1-Aに係る検証実験[2]

本実施例(3-1)において採取したWistarラットの肝臓に関して、(1-A)、(1-B)群間における遺伝子群の発現量の変動を解析した。本解析は、本実施例(3-1)と同様の方法を適用して行った。解析結果は、表5、6に示すとおりである。

【0072】

【表 5】

Gene	Gene Symbol	Regulation
olfactory receptor 1148 (predicted)	Olr1148	up
immunoglobulin related gene	RGD1562855_predicted, IgK	up
UDP glycosyltransferase 2 family, polypeptide B	Olr1330	up
TRAF2 binding protein	LOC310877; Ab2-389	up
alcohol dehydrogenase 6 (class V)	Adh6	up

【 0 0 7 3 】

【表 6】

10

Gene	Gene Symbol	Regulation
mesothelin	Msln	down
prolactin receptor	RATPRLR; MGC105486	down
Nocturnin (CCR4 protein homolog)	LOC310395	down
hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2	Hsd17b2	down
apelin, AGTRL1 ligand	Apel	down
ring finger protein 187 (predicted)	RGD1308636	down
SNF1-like kinase	Sik	down
stearoyl-Coenzyme A desaturase	Scd1, Scd2	down

【 0 0 7 4 】

表 5 は、(1 - A) 群に対し (1 - B) 群の肝臓において顕著に高発現する主な上位 5 つの遺伝子群を示している。これらの遺伝子群の内、immunoglobulin related gene は粘膜免疫系のものであり、alcohol dehydrogenase 6 (class V) は代謝関連系のものである。又、olfactory receptor 1148 (predicted)、UDP glycosyltransferase 2 family polypeptide B、TRAF2 binding protein はその他の生理反応にかかわるものである。又、表中にはないが、代謝関連遺伝子群である glucokinase 等も高発現していた。

20

【 0 0 7 5 】

尚、前記 immunoglobulin related gene としては、Ig kappa chain、Ig germline kappa-chain C-region gene、3' end、anti-NG F30 antibody light chain mRNA、variable and constant regions、immunoglobulin alpha heavy chain が挙げられる。

30

【 0 0 7 6 】

表 6 は、(1 - A) 群に対し (1 - B) 群の肝臓において顕著に低発現する主な上位 8 つの遺伝子群を示している。これらの遺伝子群の内、hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2 はテストステロンの増減に影響し、stearoyl-coenzyme A desaturase はトリグリセリドの減少等脂肪代謝全体に影響するものである。又、apelin は慢性肝疾患や肥満の際に増加するものである。

【 0 0 7 7 】

(3 - 4) 溶解液 1 - B に係る検証実験 [ 2 ]

本実施例 (3 - 2) において採取した Germ free マウスの肝臓に関して、(2 - A)、(2 - B) 群間における遺伝子群の発現量の変動を解析した。本解析は、本実施例 (3 - 1) と同様の方法を適用して行った。解析結果は、表 7、8 に示すとおりである。

40

【 0 0 7 8 】

【表 7】

Gene	Mouse Gene Symbol	Regulation
major facilitator superfamily domain containing 2	Mfsd2	up
procollagen, type IV, alpha 2	Col4a2	up
purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 2	P2ry2	up
ERBB receptor feedback inhibitor 1	Errf1	up
glypican 1	Gpc1	up

【0079】

【表 8】

10

Gene	Mouse Gene Symbol	Regulation
gene model 837, (NCBI), transcript variant 1 (Gm837)	Thsd7a	down
phospholipase C, beta 1	Plcb1	down
mesothelin	Msln	down
solute carrier family 17	Slc17a8	down
disrupted in renal carcinoma 2	Dirc2	down

【0080】

表 7 は、(2 - A) 群に対して、(2 - B) 群の肝臓において顕著に高発現する主な上位 5 つの遺伝子群を示している。又、表 8 は、(2 - A) 群に対して、(2 - B) 群の肝臓において顕著に低発現する主な上位 5 つの遺伝子群を示している。尚、これら結果は、Germ free マウスへの投与期間が 3 週間と短いため、短期間投与の効果と想定される。表 7、8 より、Germ free マウスの肝臓においては、本実施例 (3 - 3) における Wistar ラットの肝臓と比較して、mesothelin の発現量が顕著に減少する点について一致したものの、その他の遺伝子群についての一致が見られなかった。

20

【0081】

(3 - 5) 溶解液 1 - B に係る検証実験 [3]

Wistar ラット (雄、3 週齢) (九動社より入手) に溶解液 1 - B を投与して、該溶解液 1 - B の脂質エネルギー代謝調節効果を検証する実験を行った。尚、本実験は、下記 4 群を準備して、比較することにより行った。

(3 - A) 群 通常食飼育群 (対照群)

(3 - B) 群 通常食 + 溶解液 1 - B の飲水添加群

(3 - C) 群 高脂肪食飼育群

(3 - D) 群 高脂肪食 + 溶解液 1 - B の飲水添加群

30

【0082】

尚、Wistar ラットは、(3 - A) ~ (3 - D) 群共に 5 日間予備的に飼育したものを実験に用いた。又、Wistar ラットは、各群共に 5 匹とし、1 匹ずつ個別のゲージ (夏目製作所社製) で飼育した。又、飼料について、(3 - A)、(3 - B) 群には放射線滅菌済みの飼料 (オリエンタル酵母社製 商品名 MF) を、(3 - C)、(3 - D) 群には放射線滅菌済みの飼料 (オリエンタル酵母社製 商品名 MF) にラードを 20% 含有されるように添加した飼料 (ケーピーティーオリエンタル社において作成) を、夫々 Wistar ラット 1 匹に対し 1 日あたり 25 g の摂取制限内で自由摂食させた。又、飲水について、(3 - A)、(3 - C) 群には水道水、(3 - B)、(3 - D) 群には溶解液 1 - B を 1.0% 添加した水道水を、夫々自由摂取させた。

40

【0083】

上記 (3 - A) ~ (3 - D) 群の Wistar ラットは、夫々 3 ヶ月間飼育した後、それらの血液等を採取すると共に、体重を測定した。尚、体重の統計処理は、ANOVA (分散分析) により行い、その結果は表 9 に示すとおりである。尚、表中の NS とは有意差が無いことを示す。

【0084】

【表 9】

通常食	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	有意差(LF-T vs LF-C)	有意差(LF-C vs HF-C)
飲水日数	(3-A)群(LF-C)		(3-B)群(LF-T)			
実験前	88.6	0.5	89.4	4.9	NS	NS
実験後3ヶ月	485.2	35.3	486.6	49.7	NS	NS

高脂肪食	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	有意差(HF-T vs HF-C)	有意差(LF-T vs HF-T)
飲水日数	(3-C)群(HF-C)		(3-D)群(HF-T)			
実験前	88.6	3.4	88.0	2.9	NS	NS
実験後3ヶ月	456.8	35.7	516.4	31.7	p<0.05	NS

10

## 【0085】

表9より明らかであるように、共に通常食を摂食させた(3-A)群と(3-B)群との間では、Wistarラットの体重に有意差がなかった。しかしながら、共に高脂肪食を摂食させた(3-C)群と(3-D)群との間では、Wistarラットの体重に有意差があった。即ち、高脂肪食+溶解液1-Bの飲水添加群である(3-D)群のWistarラットは、高脂肪食飼育群である(3-C)群のWistarラットと比較して有意に体重が増加した。

## 【0086】

尚、(3-C)群と(3-D)群との間では、Wistarラットの血液分析の結果に有意差が認められなかった。又、(3-D)群のWistarラットには、解剖学的な所見において顕著な脂肪沈着は認められなかった。又、肝臓の免疫組織染色によっても、脂肪滴は少なくなっていた。

20

## 【0087】

(3-6) 溶解液1-Bに係る検証実験[4]

Balb/cマウス(雄、3週齢)(九動社より入手)に溶解液1-Bを投与して、該溶解液1-Bの脂質エネルギー代謝調節効果を検証する実験を行った。尚、本実験は、下記4群を準備して、比較することにより行った。

(4-A)群 通常食飼育群(対照群)

(4-B)群 通常食+溶解液1-Bの飲水添加群

(4-C)群 高脂肪食飼育群

(4-D)群 高脂肪食+溶解液1-Bの飲水添加群

30

## 【0088】

尚、Balb/cマウスは、各群4匹又は6匹とし、4匹の場合は1つのゲージ(夏目製作所社製)、6匹の場合は2つのゲージ(夏目製作所社製)に分けて飼育した。又、飼料について、(4-A)、(4-B)群には放射線滅菌済みの飼料(オリエンタル酵母社製商品名MF)を、(4-C)、(4-D)群には放射線滅菌済みの飼料(オリエンタル酵母社製商品名MF)にラードを20%含有されるように添加した飼料(ケービーティーオリエンタル社において作成)を用い、夫々自由摂食させた。又、飲水について、(4-A)、(4-C)群には水道水、(4-B)、(4-D)群には溶解液1-Bを1.0%添加した水道水を、夫々自由摂取させた。そして、(4-A)~(4-D)群のBalb/cマウスは、夫々3ヶ月間飼育した後、CTスキャンにより体脂肪率を測定すると共に、体重も測定した。

40

## 【0089】

(4-C)、(4-D)群のBalb/cマウスの体幹部のCTスキャン像は、図5、6に夫々示すとおりであり、Balb/cマウスの体内で、図5、6における外周囲に近い部分、及び図6における中央上部の黒っぽい灰色に見える部分が脂肪である。これより、(4-D)群のBalb/cマウスは、(4-C)群のBalb/cマウスと比較して、体重が増加傾向にあるにもかかわらず、体脂肪が少ないことが明らかであり、実際、体脂肪率が20%程度低かった。尚、Balb

50

/ cマウスの大腿部においても同様の傾向が示されている。この傾向は、体脂肪の蓄積が低く、筋肉が付きやすいことを示唆している。

【0090】

(3-7) 溶解液1-Bに係る検証実験 [5]

Wistarラット(雄、3週齢)(九動社より入手)に溶解液1-Bを投与して、腸内における腸内在来菌であるクロストリジウムであるClostridium clusters IV、及びClostridium subcluster XIVaの変化を測定する実験を行った。尚、本実験は、下記2群を準備して、比較することにより行った。

(5-A)群 通常食飼育群(対照群)

(5-B)群 通常食+溶解液1-Bの飲水添加群

10

【0091】

尚、Wistarラットは、(5-A)、(5-B)群共に5日間予備的に飼育したものをを用いた。又、Wistarラットは、各群共に5匹とし、1匹ずつ個別のゲージ(夏目製作所社製)で飼育した。又、飼料は、放射線滅菌済みの飼料(オリエンタル酵母社製 製品名MF)を用い、Wistarラット1匹に対し1日あたり25gの摂食制限内で自由摂食させた。又、飲水について、(5-A)群には水道水、(5-B)群には溶解液1-Bを1.0%添加した水道水を、夫々自由摂取させた。

【0092】

上記(5-A)、(5-B)群のWistarラットは、夫々3ヶ月飼育した。そして、そららの糞中のlostridium clusters IV、及びClostridium subcluster XIVaの変化を、T-RFLP(Terminal Restriction Frament Length Polymorphism Analysis)によって確認した。その結果は、表10に示すとおりである。

20

【0093】

【表10】

	(5-A)群	(5-B)群
Clostridium cluster IV	3.38	7.17
Clostridium subcluster XIVa	9.50	14.04

30

【0094】

これより、(5-A)群に対し(5-B)群では、Clostridium cluster IV、及びClostridium subcluster XIVa共に増加することが明らかとなった。

【0095】

(3-8) 溶解液1-A、1-Bに係る検証実験から得られる知見

本実施例(3-1)~(3-7)に記載した各実験の結果を検討することで、以下のような知見が得られた。

【0096】

40

本実施例(3-1)、(3-3)に係る実験結果より、溶解液1-A中に含まれている微生物による免疫系の賦活化や腸管機能の正常化する傾向が挙げられる。例えば、抗IgM抗体は、抗原の代わりにナイーブB細胞の活性に寄与することが知られている(Mora et al. Generation of Gut-Homing Ig A- secreting B cells by intestinal dendritic cells. Science 2006; 314: 1157-1160)。又、同様に抗NGF抗体の産生が推察される。抗NGF抗体は、腸における傍細胞透過性の異常な増加を低減化することが知られている(Barreau, et al. Pathways involved in gut mucosal barrier dysfunction induced in adult rats by maternal deprivation: corticotrophin-releasing factor and nerve growth factor interplay. J Physiol. 2007; 580(1): 347-356)。

50

## 【0097】

次に、本実施例(3-1)に係る実験結果より、溶解液1-A中に含まれる微生物によって、vitamin

D-binding protein precursorの発現量が増加しているが、このvitamin D-binding protein precursorは、マイクロファージの活性化に寄与することが知られており、抗ガン機能も示唆されている(Kisker

et al., Vitamin D binding protein-Macrophage activating factor (DBP-maf) inhibits

angiogenesis and tumor growth in mice. Neoplasia 2003; 5(1):32-40)。又、HBV pX associated proteinの発現量が減少しているが、このHBV pX associated protein (HBV pX遺伝子)は、p53誘導型の細胞死を促進することが知られている。

10

## 【0098】

又、carbonic anhydraseの発現量が低下しているが、このcarbonic anhydraseは代謝調節系であり、炭酸イオン量を調節することが知られている。糞中の炭酸イオンは、腸内フローラから発生するメタンガスのソースであるため、carbonic

anhydraseの発現量が減少することで、メタンガスの産生が腸内で減っていることが期待される。これは、別途行った実験において、高温発酵飼料(溶解液1-Aと同様の微生物

が含まれている発酵産物を含む飼料)を投与すると、糞の発酵時の悪臭が少なくなることと矛盾しない。尚、通常、畜糞は堆肥化の際に嫌気発酵になる傾向があり、糞中のメタン

ガスと硫化水素からメチルメルカプタンを生成しうる。よって、糞中にあらかじめメタンが少なければ、前記メチルメルカプタンの生成量が少なくなることになる。尚、メタンガスは二酸化炭素の20倍の温暖化係数も有するため、腸内からの調節が可能であれば意義深い。

20

## 【0099】

又、apolipoprotein A-Vの発現量が低下しているが、このapolipoprotein

A-Vは、発現量が低下することで中性脂肪値の低下に寄与することが知られている。尚、本実施例(3-1)において採取した肝臓等を解析したところ、血清中のトリグリセリドに減少傾向があり、肝臓におけるトリグリセリドの沈着が軽減することも免疫組織化学染色により確認されている。

## 【0100】

又、滅菌処理を行っている(1-C)群において、(1-B)群と異なり(1-A)群に対する遺伝子群の発現量の変動がみられないに基づき、遺伝子群の発現量の調節効果を発揮させるためには、好熱性の微生物の存在が重要であることが示唆されている。

30

## 【0101】

次に、本実施例(3-3)に係る実験結果より、溶解液1-A中に含まれる微生物群によって、alcohol dehydrogenase 6 (class V)の発現量が増加しているが、このalcohol dehydrogenase 6 (class V)は脂肪代謝との関連性が期待されるものである。又、mesothelinの発現量が低下しているが、このmesothelinは発ガン関連遺伝子群であり、発現量の低下は好ましいことであると推察される。

## 【0102】

又、Nocturninの発現量が減少しているが、このNocturninの発現量が減少すると脂肪量が減少する傾向にあることが知られている。本実施例(3-1)において採取した肝臓を解析したところ、中性脂肪の沈着が減少しており、このNocturninの発現量の減少と矛盾しない結果が得られている。又、hydroxysteroid

(17-beta) dehydrogenase2の発現量が減少している。このhydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase2の減少については、ステロイド代謝系に影響を与えていることが期待される。

40

## 【0103】

次に、Germ free マウスに係る本実施例(3-2)、(3-4)の実験結果は、溶解液1-B中に含まれる微生物が直接的に効果を発揮することを示唆するものである。Wistar

50

ラットに係る本実施例(3-1)、(3-3)の実験結果により、粘膜免疫系の遺伝子群及び代謝系の遺伝子群の発現調節効果は、宿主側の土着腸内フローラとの協調によって得られるものであると考えられるが、前記直接的な効果は、これと全く異なるものであると推察される。

#### 【0104】

次に、本実施例(3-5)、(3-6)に係る実験結果は、溶解液1-B中に含まれる微生物が、腸内の脂質エネルギーの代謝を調節している可能性を示すものである。実際、別途行った実験において、高温発酵飼料(溶解液1-Bと同様の微生物が含まれている)を投与すると、腸内のエネルギー源である有機酸の組成が変化することも明らかとなっている。

10

#### 【0105】

次に、本実施例(3-7)に係る実験結果は、溶解液1-Bに含まれる微生物が、常在菌である無害なクロストリジウムである*Clostridium clusters IV and XIVa* (*Clostridium leptum* and *coccoides* groups)を増加させることを示すものである。これより、溶解液1-Bに含まれる微生物は、投与された動物の腸内細菌相の変化を誘導することが明らかになった。又、本実施例(3-5)及び(3-6)に係る実験結果と組み合わせて考察することにより、このクロストリジウムの増加によって、Toll-like receptor 5 (TLR5)等を刺激して脂肪代謝を調節し、図6に示すCTスキャン画像に表れるように、高脂肪食条件下においても、内臓脂肪を蓄積させないという仕組みの存在が推察される。

20

#### 【0106】

尚、腸管の免疫系のレセプターである前記TLR5は、べん毛を有するクロストリジウム等のレセプターであり、自然免疫系の調節のみならず、メタボリックシンドロームの調節をしていると考えられる。又、TLR5の遺伝子を欠損したマウスがメタボリックシンドロームになり、そのマウス由来の腸内細菌相をGerm freeマウスに経口投与すると、当該Germ freeマウスもメタボリックシンドロームになったという報告がなされている(Matam Vijay-Kumar, et al. Metabolic Syndrome and Altered Gut Microbiota in Mice Lacking Toll-Like Receptor 5. Science 2010; 328:

30

228-231)。この事実は、クロストリジウムの刺激が、TLR5を介して与えられないと、メタボリックシンドロームになることを意味しており、腸内の在来菌であるクロストリジウムの存在意義を問うものとなっている。

#### 【0107】

又、前記クロストリジウムは、腸管の免疫系の制御、特に、transcription factor for head box P3 (Foxp3)を発現するCD4陽性の制御性T細胞(Treg細胞)の発現を誘導し、炎症性腸炎やアレルギー反応を起こしにくいことが報告されている(Koji Atarashi, et al. Induction of Colonic Regulatory T Cells by Indigenous Clostridium Species. 学術誌サイエンス電子版(H22.12.24発表), Science 2011; 311: 337-341)。又、人間の潰瘍性大腸炎の患者ではこの細胞が減少しているとの報告もある。尚、前記制御性T細胞は、免疫系の過剰反応を制御するT細胞の一種で、自己免疫疾患の調節に関しても重要な役割を担うと考えられている。

40

#### 【実施例4】

#### 【0108】

(4-1) 溶解液1-Bに係る検証実験[6]

無菌飼育したBalb/cマウスに、溶解液1-Bを投与して、それによる腸管内パイエル板の発達等を検証する実験を行った。尚、本実験は、通常飼育群(対照群)と、溶解液1-Bの飲水添加群の2群を準備して、比較することにより行った。

#### 【0109】

50

尚、無菌飼育したBalb / cマウス（東京大学大学院農学生命科学研究科獣医公衆衛生学研究室より入手、及び当該研究室に飼育依頼）は、両群共に5匹とし、各群内で同じアイソレーター（アイ・シー・エム社製）で飼育した。又、飼料は、放射線滅菌済みの飼料（オリエンタル酵母社製 製品名CMF）を用い、自由摂食させた。又、飲水は、対照群について紫外線及びオートクレーブにより滅菌された水、溶解液1 - Bの飲水添加群について紫外線及びオートクレーブにより滅菌された水に、溶解液1 - Bを0.5%添加したものをを用い、自由摂取させた。

【0110】

両群の無菌飼育したBalb / cマウスは、夫々3週間飼育した。そして、当該飼育後の両群の無菌飼育したBalb

/ cマウスを比較したところ、対照群と比較して溶解液1 - Bの飲水添加群の糞便が正常化する傾向が見られた。又、対照群と比較して溶解液1 - Bの飲水添加群の腸管内のバイエル板が発達することが確認された。更に、溶解液1 - Bの飲水添加群は、大腸糞中の分泌型IgAの濃度が対照群の1.5倍程度に増加する傾向が確認され、腸管の強度も対照群より増しており、性状に近い糞便の状態であった。

【0111】

（4 - 2） 溶解液1 - Bに係る検証実験 [7]

Germ free マウスに、溶解液1 - Bを投与して、それによる肝臓のIL-18含有量の変化を検証する実験を行った。尚、本実験は、通常飼育群（対照群）と、溶解液1 - Bの飲水添加群の2群を準備して、比較することにより行った。

【0112】

尚、Germ free マウス（東京大学大学院農学生命科学研究科獣医公衆衛生学研究室より入手、及び当該研究室に飼育依頼）は、両群ともに5匹とし、各群内で同じアイソレーター（アイ・シー・エム社製）で飼育した。又、飼料は、放射線滅菌済みの飼料（オリエンタル酵母社製 製品名CMF）を用い、自由摂食させた。又、飲水は、対照群について紫外線及びオートクレーブにより滅菌された水、溶解液1 - Bの飲水添加群について紫外線及びオートクレーブにより滅菌された水に、溶解液1 - Bを0.5%添加したものをを用い、自由摂取させた。

【0113】

両群のGerm free マウスは、夫々3週間飼育した。そして、当該飼育後の両群のGerm free マウスの肝臓について解析したところ、対照群と比較して溶解液1 - Bの飲水添加群の肝臓のIL-18含有量が、図7に示すように増加することが認められた。

【0114】

（4 - 3） 溶解液2、3、4、5に係る検証実験

Balb / cマウス（雄、3週齢）（九動社より入手）に、溶解液2、3、4、5を投与して、それらによる腸管及び脾臓における分泌型IgAの濃度変化を検証する実験を行った。尚、本実験は、下記5群を準備して、比較することにより行った。

（6 - A）群 通常飼育群（対照群）

（6 - B）群 溶解液2の飲水添加群

（6 - C）群 溶解液3の飲水添加群

（6 - D）群 溶解液4の飲水添加群

（6 - E）群 溶解液5の飲水添加群

【0115】

尚、Balb / cマウスは、各群4匹又は6匹とし、4匹の場合は1つのゲージ（夏目製作所社製）、6匹の場合は2つのゲージ（夏目製作所社製）に分けて飼育した。又、飼料は、放射線滅菌済みの飼料（オリエンタル酵母社製 商品名MF）を用い、自由摂食させた。又、飲水は、（6 - A）群について水道水、（6 - B）群について溶解液2を1.0%添加した水道水、（6 - C）群について溶解液3を1.0%添加した水道水、（6 - D）群について溶解液4を1.0%添加した水道水、（6 - E）群について溶解液5を1.0%添加した水道水を用い、夫々自由摂取させた。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 1 6 】

上記(6-A)～(6-E)群のBalb / cマウスは、夫々3ヶ月間飼育した後、腸管及び脾臓の分泌型IgAの濃度を糞中の分泌型IgAの濃度を測定することにより解析した。小腸のデータを図8に示す。解析の結果、対照群である(6-A)群に対して、溶解液2、3、4を夫々投与した(6-B)、(6-C)、(6-D)群は、顕著に分泌型IgAの濃度が増加した。又、(6-A)群に対する溶解液5を投与した(6-E)群の分泌型IgAの濃度の増加量は、(6-B)、(6-C)、(6-D)群と比べて小さいことが分かった。このような傾向は、脾臓でも確認された。

## 【 0 1 1 7 】

(4-4) 溶解液1-B、2、3、4、5に係る検証実験から得られる知見 10

本実施例(4-1)～(4-3)に記載した各実験の結果を検討することで、以下のようない知見が得られた。

## 【 0 1 1 8 】

無菌飼育したBalb / cマウス及びGerm free マウスに係る本実施例(4-1)、(4-2)の実験結果は、溶解液1-B中に含まれる微生物が、直接的に粘膜免疫系の遺伝子群の発現調節効果を有することを示唆するものである。これは、一般的に、パイエル板が免疫グロブリンの産生調節等、IL-18がインターフェロンガンマの産生を誘導することが知られているが、*Bacillus thermoamylovorans*の近縁種(N-11)等溶解液1-B中に含まれる微生物が、腸管のパイエル板の発達、及び生体内のIL-18の産生を活性化する、実験結果より想定されるからである。 20

## 【 0 1 1 9 】

次に、Balb / cマウスに係る本実施例(4-3)の実験結果は、溶解液2中に含まれる微生物が、宿主側の土着腸内フローラとの協調によって、粘膜免疫系遺伝子群の発現調節効果を発揮することを示唆するものである。そこで、上記説明した免疫系の制御細胞であるTreg細胞で発現するFoxp3の大腸組織における発現レベルを、real time PCRによって調べたところ、BP-863の単独投与群である(6-C)群で、通常飼育群(対照群)である(6-A)群、並びに標準菌株投与群である(6-E)群よりも1.4倍程度の発現量が確認された。本結果から、好熱性BP-863の投与によって、免疫系の制御細胞であるTreg細胞が集積し、アレルギーの発症予防等の免疫制御機構が働いている可能性が有ると推察される。 30

## 【 0 1 2 0 】

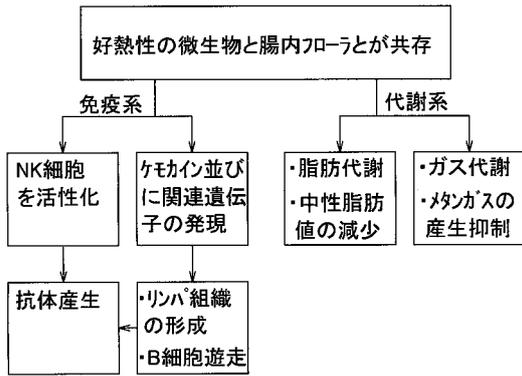
又、溶解液2中に含まれる微生物である*Bacillus thermoamylovorans*の近縁種(N-11)(BP-863)、及び、*Bacillus coagulans*の近縁種(N-16)は、*Bacillus thermoamylovorans*の標準菌(LMG18084<sup>T</sup>)と異なり、単離菌として投与した場合であっても、図8に示すように、粘膜免疫系の遺伝子群の発現調節効果を発揮する。更に、実施例3の(3-5)、(3-6)の検証試験結果等より、*Bacillus thermoamylovorans*の近縁種(N-11)を添加した群では、飼料効率が向上し、同時に飼育したカロリー数として10%以上高い高脂肪食飼育のマウスと同等以上の体重となり、体重増加率が改善している。これは、*Bacillus thermoamylovorans*の近縁種(N-11)が、飼料中の難分解性の糖を分解し、利用効率を高めることにより生じていると想定される。 40

## 【 産業上の利用可能性 】

## 【 0 1 2 1 】

本発明の混合物、溶解液、及び医薬品は、動物に投与することにより、その粘膜免疫系遺伝子群や、腸、肝臓における代謝関連遺伝子群の調節をすることができる混合物、溶解液、及び医薬品として利用することができる。

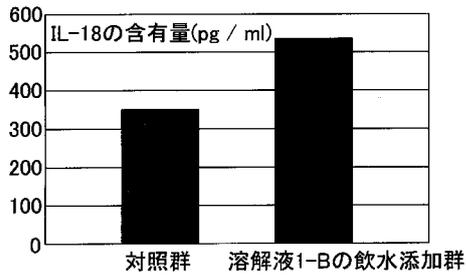
【 図 1 】



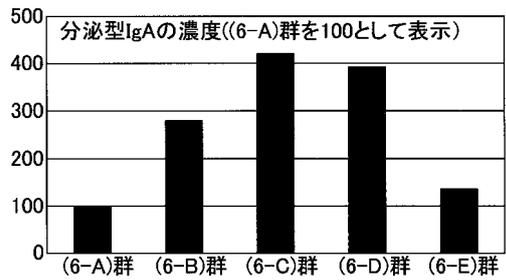
【 図 2 】



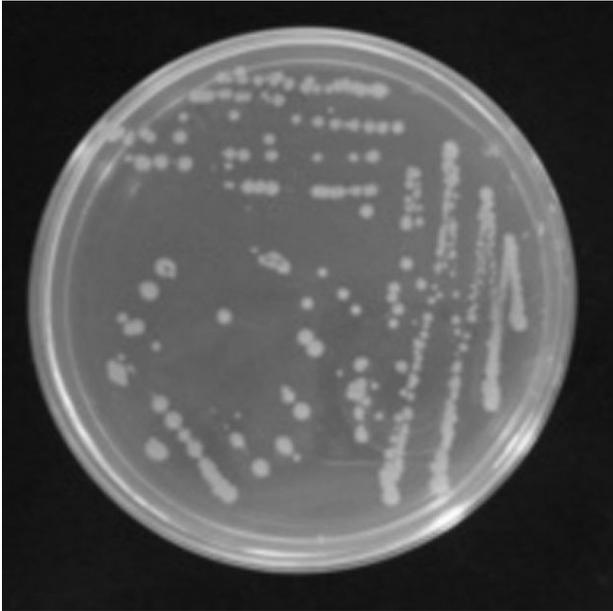
【 図 7 】



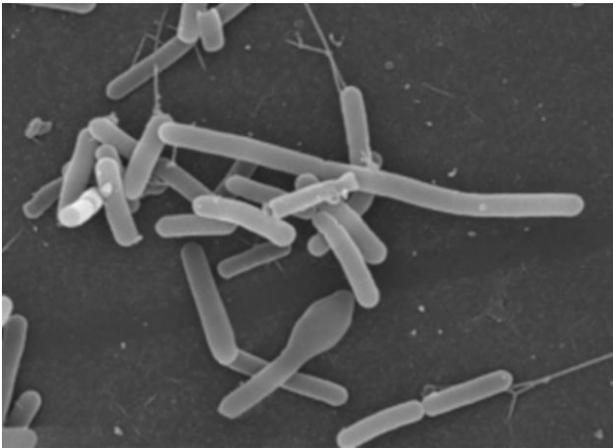
【 図 8 】



【 図 3 】



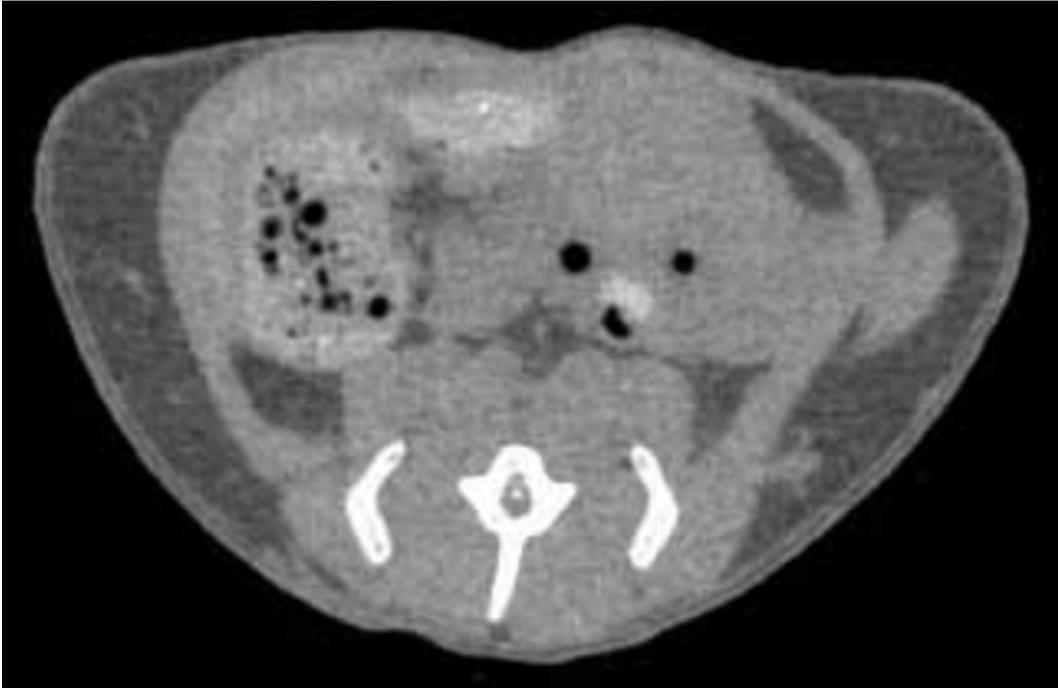
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【 配列表 】

0005578375000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P	3/00 (2006.01)	A 6 1 P	37/02
A 6 1 P	3/06 (2006.01)	A 6 1 P	3/00
C 1 2 N	1/20 (2006.01)	A 6 1 P	3/06
		C 1 2 N	1/20 Z N A E
		C 1 2 N	1/20 F

(73)特許権者 597149951

株式会社三六九

大分県杵築市大字岩谷706番地の27

(73)特許権者 598092993

京葉プラントエンジニアリング株式会社

千葉県市川市市川南2丁目8番8号

(74)代理人 100080182

弁理士 渡辺 三彦

(72)発明者 宮本 浩邦

千葉県千葉市中央区汐見丘町11の1の211 日環科学株式会社内

(72)発明者 児玉 浩明

千葉県松戸市松戸648 国立大学法人千葉大学大学院園芸学研究科内

(72)発明者 西内 巧

石川県金沢市角間町又7番地 国立大学法人金沢大学内

(72)発明者 松下 映夫

山口県下関市永田本町2-7-1 独立行政法人水産大学校内

(72)発明者 宮本 久

大分県杵築市大字岩谷706番地の27 株式会社三六九内

(72)発明者 堀内 三吉

千葉県柏市南増尾7-8-1

(72)発明者 瀬田 真奈未

千葉県松戸市松戸648 国立大学法人千葉大学大学院園芸学研究科内

(72)発明者 森 建一

千葉県千葉市中央区汐見丘町11の1の211 日環科学株式会社内

(72)発明者 服部 正平

千葉県柏市柏の葉5-1-5 国立大学法人東京大学大学院新領域創成科学研究科内

(72)発明者 小川 和男

千葉県市川市市川南2-8-8 京葉プラントエンジニアリング株式会社内

審査官 六笠 紀子

(56)参考文献 特開2003-219864(JP,A)

特開2009-100728(JP,A)

J.Gen.Appl.Microbiol., 2008年, Vol.54, No.3, p.149-58

宮本浩邦 他, 好熱菌発酵産物の経口投与がラットの腸内の細菌相と血液成分に与える影響, 生化学, 2008年, Abstracts No.1P-1278

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 35/00 - 35/76

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

W P I