

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-539776

(P2008-539776A)

(43) 公表日 平成20年11月20日 (2008. 11. 20)

(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 0 0 1
A 6 1 K 35/74 (2006. 01)	A 6 1 K 35/74 A	4 B 0 2 4
A 6 1 P 1/12 (2006. 01)	A 6 1 P 1/12	4 B 0 6 5
A 6 1 P 35/00 (2006. 01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 3/06 (2006. 01)	A 6 1 P 3/06	4 C 0 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 24 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2008-511662 (P2008-511662)
 (86) (22) 出願日 平成18年3月31日 (2006. 3. 31)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年1月16日 (2008. 1. 16)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2006/061247
 (87) 国際公開番号 W02006/122850
 (87) 国際公開日 平成18年11月23日 (2006. 11. 23)
 (31) 優先権主張番号 05104071.5
 (32) 優先日 平成17年5月16日 (2005. 5. 16)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 500029925
 ユニベルシテ・ド・リエージュ
 UNIVERSITE DE LIEGE
 ベルギー国、4031 アングルール、ア
 ヴニユ・プレーエリー 4
 Avenue Pre-Ailly, 4, B
 -4031 Angleur, Belgi
 um
 (74) 代理人 100110423
 弁理士 曾我 道治
 (74) 代理人 100084010
 弁理士 古川 秀利
 (74) 代理人 100094695
 弁理士 鈴木 憲七

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 共生ビフィドバクテリア種

(57) 【要約】

ビフィドバクテリウム (Bifidobacterium) GC56 に 40% より大きな DNA 配列相同性を持つビフィドバクテリウム (Bifidobacterium) 株を含んでいる共生組成物であって、ここで、ビフィドバクテリウム (Bifidobacterium) GC56 は、コテクシオン ナショナル ドゥ キュルテュール ドゥ ミクロオルガニスム (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes、CNCM、パスツール研究所) に、2004 年 12 月 9 日に寄託されたものであり、寄託番号 CNCM 1 - 3342 を有する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM、パストゥール研究所)において2004年12月9日寄託番号CNCM1-3342をもって寄託されたビフィドバクテリウム (Bifidobacterium) GC56、またはこれの、相同体、子孫、あるいは突然変異体。

【請求項 2】

ビフィドバクテリウム (Bifidobacterium) GC56 に対する40%よりも大きいDNA配列相同性を持ち、ここでビフィドバクテリウム (Bifidobacterium) GC56 が Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM、パストゥール研究所)において2004年12月9日寄託番号CNCM1-3342をもって寄託された、ビフィドバクテリウム (Bifidobacterium) 株。

10

【請求項 3】

請求項 1 もしくは請求項 2 において定義されたとおりのビフィドバクテリウム (Bifidobacterium) 株と1種以上の許容可能な賦形剤とを含んでいる、共生組成物。

【請求項 4】

前記組成物が、食品製品である、請求項 3 において定義されたとおりの共生組成物。

20

【請求項 5】

前記食品製品が、発酵乳、植物乳、豆乳、バター、チーズ、およびヨーグルトから選択された、酪農主体の製品である、請求項 4 において定義されたとおりの共生組成物。

【請求項 6】

請求項 1 もしくは請求項 2 において定義されたとおりの、治療物質としての使用用の、特に、消化管疾患 (例えば下痢)、癌、コレステロール過剰、アレルギー、および感染の処置および/または予防における、ビフィドバクテリウム (Bifidobacterium) 株。

【請求項 7】

請求項 1 もしくは請求項 2 において定義されたとおりのビフィドバクテリウム (Bifidobacterium) 株の、前記疾患の処置および/または予防用の医薬品の調製における使用。

30

【請求項 8】

請求項 1 もしくは請求項 2 において定義されたとおりのビフィドバクテリウム (Bifidobacterium) 株を、更なる治療剤 (1種もしくは複数種)と一緒に含んでいる組み合わせ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ビフィドバクテリウム (Bifidobacterium) 属に属しているバクテリウム、該バクテリウムを含んでいる共生組成物、特に食品製品、および、消化管疾患処置におけるそれらの使用に関する。

40

【背景技術】

【0002】

ビフィドバクテリア (もしくはビフィドバクテリウム (Bifidobacterium) 属に属しているバクテリア) が、ヒトおよび動物の糞叢の最も重要な集団の1つを構成する。一般的に、これらのバクテリアが高い割合において糞叢中において存在している場合、良好な健康の指標であると考えられている。この理由により、これらは、共生バクテリアとして知られている (生きて摂取された場合、腸叢の天然のバランスを向上させる有益微生物)。既知のビフィドバクテリアの例は、B. アドレセンティス (B. adol

50

escentis)、B.アニマリズ(B. animalis)、B.ビフィドゥム(B. bifidum)、B.ブレベ(B. breve)、B.カテナラトゥム(B. catenulatum)、およびB.ロングム(B. longum)を包含し、これらのバクテリアは、有益な、技術(テクノロジー)面での、官能特性、および共生効果を持つと示されている。

【0003】

ビフィドバクテリアは、発酵乳(“生きているビフィズス菌”入りヨーグルト)における添加剤として最もよく見出されており、これゆえ、経済的に重要な商品を構成する。ミルク産業により選ばれた株は、製造プロセスに対する耐性、および、食品内での生存のような数多くの厳しい要求に見合わなければならない。フランスにおける最も汎用された種は、B. animalis 亜種ラクティス(lactis)およびB. animalis 亜種 animalis であり、これらは、動物起源からの亜種であり、決してヒトから単離されなかった。ビフィドバクテリアの重要さの観点において、食品産業の要求に最適の特性を持っている新種をこの属内で同定する大きな必要性がある。例えば、2004年、ある1グループが、Bifidobacterium プシユクレロフィルム(psychraerophilum)を豚盲腸から、同定単離した(Simpson, P.J. ら、(2004) Int J Syst Evol Microbiol 54:401~6)。以前に知られたビフィドバクテリウム(Bifidobacterium)種は、20と46~49.5との間の温度でだけ成長できていた(Biavatti, B. ら、(2000)、Annals of Microbiology 50:117~131; Dong ら、(2000) Int J Syst Evol Microbiol 50 Pt 1:119~25)が、このバクテリアは、全ての以前の種を凌駕する利点を、4~10において成長していくことにより、実証した。これは、共生組成物には有益であり、これらバクテリアが、その保蔵低温をより生き延びやすく、これゆえ、保蔵寿命を引き延ばすからである。これゆえ、更なるビフィドバクテリア種の同定を求める大きな必要性があり、これらは、独特の(ユニークな)利点を保有するだけでなく、以前に同定されたビフィドバクテリア種の有益さも保持する。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0004】

これゆえ、本発明の第1の態様によれば、Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes(CNCM、パストゥール研究所)において2004年12月9日、寄託番号CNCM1-3342をもって寄託されたビフィドバクテリウム(Bifidobacterium)GC56、またはこれの、相同体、子孫、もしくは突然変異体が提供される。

【0005】

ビフィドバクテリウム(Bifidobacterium)GC56の相同体が、Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes(CNCM、パストゥール研究所)において2004年12月9日、寄託番号CNCM1-3342をもって寄託されたビフィドバクテリウム(Bifidobacterium)GC56(本明細書において以降‘GC56’と言われる)との40%よりも大きいDNA配列相同性を持っているいずれのビフィドバクテリア株を言うとして理解されることが、認められる。好ましくは、GC56相同体が、GC56との50%よりも大きい相同性を持っているものであり、より好ましくは60%よりも大きく、最も好ましくは70%よりも大きく、特に好ましくは80%よりも大きく、または、最も特に好ましくは90%よりも大きい(あるいは、上の値のいずれかの間のいずれかの範囲)。配列の相同性が、DNA-DNA再会合実験に関して本明細書において記載されたとおりテストされ得ることも、認められる。このような実験は、16SrDNAもしくはhsp60遺伝子の特定の配列の検出を包含することがあり、これらの配列および繋がったエンドヌクレアーゼ制限部位が、GC56の検出を可能とする。他の実験が、GC56を同定

10

20

30

40

50

することもあるが、E L I S A - P C RおよびP C R - R F L Pを包含する。

【0006】

G C 5 6は、B i f i d o b a c t e r i u m クルディラクティス (c r u d i l a c t i s) と呼ばれる新種のビフィドバクテリウム (B i f i d o b a c t e r i u m) を代表する。これら用語、G C 5 6、G C 5 6群 (グループ)、B i f i d o b a c t e r i u m G C 5 6、およびB i f i d o b a c t e r i u m c r u d i l a c t i s が、互換的に使用されており、この新種のビフィドバクテリウム (B i f i d o b a c t e r i u m) を言う。

【0007】

本明細書において論じられるG C 5 6株の例は、F R 6 2 / b / 3、F R 5 9 / b / 2、およびF R 4 7 / 3を包含する。これらの株の1 6 S r D N A 遺伝子配列が、G e n B a n k において寄託されており、寄託番号：

A Y 9 5 2 4 4 9 (配列 I D N o : 3)、A Y 9 5 2 4 4 8 (配列 I D N o : 4)、およびA Y 9 5 2 4 5 0 (配列 I D N o : 2) をそれぞれ持つ。G e n B a n k において寄託されたA Y 9 5 2 4 4 8 に関する1 6 S r D N A 遺伝子配列は、本願出願日において、エラーを持つ。本発明者らは、該配列における該エラーを訂正する適用を行った。

【0008】

G C 5 6は、" L ' e t o i l l e d u V e r c o r s " のチーズ作りの間に同定され、これは、伝統的で手作りのプロセスである。G C 5 6は、チーズ生産プロセスの間中 存在しており (つまり、生乳からその熟成の終わりまで)、統計的に有意の増加を、該プロセス間に伴う。これらのバクテリアは、天然微生物集団に属し、これは、末端製品の官能特性の開発に参画する。

【0009】

G C 5 6は、食品生産プロセスから単離された最初のビフィドバクテリア種であるとの鍵 (キー) である利点を持ち、一方、以前のビフィドバクテリアは、ヒトもしくは動物の消化管から抽出されており、これゆえ、G C 5 6は、他のビフィドバクテリアよりも、製造プロセス中に統合するによりたやすく、食品および発酵製品における安定化にもよりたやすい。

【0010】

G C 5 6は、好冷であり、1 0 ~ 1 2 程度の低温、" L ' e t o i l l e d u V e r c o r s " プロセスの熟成温度において成長できるとも見出されており、一方、他の殆どが、2 0 よりも高温を必要とする。G C 5 6は、L ' e t o i l l e d u V e r c o r s のプロセス (ミルク4、2日の型からの除去まで2 2 に温め、次いで、8日の熟成から2 8日まで1 2 において維持した) の低温により選択された、ミルク垂優占種集団を構成すると考えられている。低温での成長の鍵である利点は、G C 5 6バクテリアが、他の殆どの共生バクテリア組成物よりも、低い保管温度をより生き延び易いことであり、これゆえ、その保蔵寿命を引き延ばす。

【0011】

G C 5 6の更なる利点は、空気 (エア) 寛容であることであり、一方、他の殆どが、複製し生き延びるのに厳しい嫌気条件を必要とする。

【0012】

B i f i d o b a c t e r i u m G C 5 6の更なる利点は、これらが、良好な発酵乳 (単独もしくは混合物で)、末端製品における良好な乳酸耐性 (10^6 c f u / g よりも多い)、十分な成長速度、良好な、胃酸、胆汁、および消化管酵素耐性を与え、ならびに、成長因子 (イースト抽出物、加水分解蛋白、ビタミン、および他の元素) を求める必要性がより低いことである。

【0013】

本発明の第2の態様として、本明細書において前に定義されたB i f i d o b a c t e r i u m G C 5 6と、1種以上の許容可能な賦形剤とを含んでいる共生組成物が与えら

10

20

30

40

50

れている。

【 0 0 1 4 】

許容可能な賦形剤が、当業者に、共生組成物調製品についてよく知られていると認められていると思われる。

このような許容可能な賦形剤の例は：

蔗糖（スクロース）、異性化糖、葡萄糖（グルコース）、果糖（フルクトース）、パラチノース、トレハロース、乳糖（ラクトース）、およびキシロースのような糖；ソルビトール、キシリトール、エリトリトール（エリスリトール）、ラクチトール、パラチノール、還元餅状澱粉シロップ、および還元餅状麦芽糖（マルトース）シロップのような糖アルコール；スクロース脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、およびレシチンのような乳化剤；カラギーナン、キサンタンゴム、グアーゴム、ペクチン、およびローカストビーンゴムの増粘剤（安定化剤）；クエン酸、乳酸、およびリンゴ酸のような酸性化剤；レモン果汁（ジュース）、オレンジ果汁、およびベリー果汁のような果汁；ビタミン A、ビタミン B、ビタミン C、ビタミン D、およびビタミン E のようなビタミン；ならびに、カルシウム、鉄、マンガン、および亜鉛のようなミネラルを包含する。

10

【 0 0 1 5 】

本発明の組成物は、添加混合していった調製されてよく、適切には常温および大気圧において、通常では口腔投与用に適合される。このような組成物は、錠剤（タブレット）、カプセル、口腔用液体調製品、従来の食品製品、粉末、顆粒、ロゼンジ、再形成可能な粉末、もしくは懸濁の形であってよい。

20

【 0 0 1 6 】

口腔投与用錠剤（タブレット）およびカプセルは、単位（ユニット）用量の形であってよく、結合剤、充填剤（フィラー）、錠剤用潤滑剤、崩壊剤、および許容可能な湿潤剤のような 1 種以上の従来の賦形剤を含有してよい。これら錠剤は、医薬の実際においてよく知られた方法に従い、コーティングされてよい。

【 0 0 1 7 】

口腔用液体調製品は、例えば、水性もしくは油性懸濁、溶液、エマルション、シロップ、またはエリキシルの形であってよく、あるいは、水もしくは他の適切なビヒクルを用いる使用前再構成用乾燥製品の形であってよい。このような液体調製品は、懸濁剤、乳化剤、非水性ビヒクル（食用油を包含してよい）、保存料、もし望まれれば、従来の香料および着色料のような従来の添加剤を含有してよい。

30

【 0 0 1 8 】

1 つの好ましい実施形態において、本発明の組成物は、従来の食品製品、より好ましくは、酪農主体の製品（例えば、発酵乳、植物乳、豆乳、バター、チーズ、もしくはヨーグルト）または果汁として処方される。本組成物は好ましくは、大人および小人ヒトおよび動物用食品もしくは飲料として処方される。代替りの好ましい実施形態において、本組成物は、凍結乾燥されたかもしくは噴霧乾燥された粉末として処方される。

【 0 0 1 9 】

共生効果を呈している（つまり、腸叢バランスを維持している）と同時に、ビフィドバクテリアは一般的に、消化管疾患（例えば下痢）、癌、コレステロール過剰、アレルギー、および感染のような種々の疾患の処置および / または予防において、潜在的に有用であるとも信じられている。

40

【 0 0 2 0 】

これゆえ、本発明の更なる態様として、治療物質としての、特に上の疾患の処置および / または予防における使用用ビフィドバクテリウム（*Bifidobacterium*）G C 5 6 が与えられている。

【 0 0 2 1 】

本発明は更に、*Bifidobacterium* G C 5 6 の、上の疾患の処置および / または予防用医薬品調製における使用を提供する。

50

【 0 0 2 2 】

本発明は更に、上の疾患の、ヒトもしくは動物の被験体における処置および／または予防方法を提供し、該被験体に、治療有効量の *Bifidobacterium* GC56 を投与していくことを含む。

【 0 0 2 3 】

Bifidobacterium GC56 が、他の治療剤と組み合わせて使用されてよく、例えば、消化管疾患（例えば下痢）、癌、コレステロール過剰、アレルギー、および感染の処置および／または予防において有用であると知られた他の医薬品である。

【 0 0 2 4 】

これゆえ、本発明の更なる態様として、ビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) GC56 を更なる治療剤（１種もしくは複数種）と共に含んでいる組み合わせが与えられている。

10

【 0 0 2 5 】

上に言及された組み合わせは簡便に、共生組成物、これゆえ、上で定義されたとおりの組み合わせを１種以上の賦形剤と共に含んでいる共生組成物の形で使用に与えられてよく、本発明の更なる態様を含む。このような組み合わせの個々の成分が、連続してもしくは同時に、別々のもしくは組み合わせられた共生組成物において投与されてよい。

【 0 0 2 6 】

好ましい実施形態において、*Bifidobacterium* GC56 が、他のビフィドバクテリアもしくは：

20

ラクトバチルス アキドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバチルス ガッセーリ (*Lactobacillus gasseri*)、ラクトバチルス プランタルム (*Lactobacillus plantarum*)、ラクトバチルス ブクネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ラクトバチルス カゼイ (*Lactobacillus casei*)、ラクトバチルス ジョンソニイ (*Lactobacillus johnsonii*)、ラクトバチルス ガリナルム (*Lactobacillus gallinarum*)、ラクトバチルス (アミロボルス (*Lactobacillus amylovorus*)、ラクトバチルス ブレビス (*Lactobacillus brevis*)、ラクトバチルス ラミノス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス ケフィル (*Lactobacillus kefir*)、ラクトバチルス パラカゼイ (*Lactobacillus paracasei*)、ラクトバチルス クリスパトゥス (*Lactobacillus crispatus*)、ラクトバチルス デルブルウェキイ (*Lactobacillus delbrueckii*) 亜種 *delbrueckii*、*Lactobacillus delbrueckii* 亜種 *ブルガリク* (*bulgaricus*)、ラクトバチルス ヘルウェティクス (*Lactobacillus helveticus*)、ラクトバチルス ゼエ (*Lactobacillus zeae*)、およびラクトバチルス サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*) のような *Lactobacillus* 属に属しているバクテリア；ストレプトコッカス テルモフィルス (サーモフィルス) (*Streptococcus thermophilus*) のような *Streptococcus* 属に属しているバクテリア；ラクトコッカス ラクティス (*Lactococcus lactis*) 亜種 *クレモリス* (*cremoris*) および *Lactococcus lactis* 亜種 *lactis* のような *Lactococcus* 属に属しているバクテリア；バチルス スブティリス (*Bacillus subtilis*) のような *Bacillus* 属に属しているバクテリア；ならびに、サッカロミセス ケレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、トルラスポラ デルブルウェキイ (*Torulaspora delbrueckii*)、およびカンディダ ケフィル (*Candida kefir*) のような、*Saccharomyces*、*Torulaspora*、および *Candida* 属に属しているイースト

30

40

50

のような他の共生バクテリアと組み合わせられる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0027】

本発明の好ましい実施形態が今、添付の図面に言及しながら、例としてだけ記載される。

【0028】

ビフィドバクテリウム (Bifidobacterium) G C 5 6 の単離

G C 5 6 が、産業における生乳チーズ加工品 " L ' e t o i l e d u V e r c o r s " (フランス) から、単離された。培養方法 (D e l c e n s e r i e ら、(2005) J M i c r o b i o l M e t h o d s 61: 55 - 67) が、特に分子レベルでの方法が、これらのバクテリアの、その産物の産物鎖、および、その末端産物組成のチェックを通しての検出を可能とした。95株が、31/31の研究されたチーズ " L ' E t o i l e d u V e r c o r s " から、異なる生産段階において単離され、内3/7のチーズは商品生乳チーズからであり、これら以外は " L ' E t o i l e d u V e r c o r s " からであり、生乳サンプル中であった。B i f i d o b a c t e r i u m G C 5 6 株 F R 6 2 / b / 3 (= C U E T M 0 4 / 3) が、C o l l e c t i o n N a t i o n a l e d e C u l t u r e s d e M i c r o - o r g a n i s m e s (C N C M、パストゥール研究所) において、2004年12月9日、寄託番号 C N C M 1 - 3 3 4 2 と共に寄託されており、その配列が、G e n b a n k 上、寄託番号 A Y 9 5 2 4 4 9 と共に寄託されている。

【0029】

P C R によるビフィドバクテリウム (Bifidobacterium) G C 5 6 の検出

1. DNA 標的の調製

DNA 抽出 (W i z a r d (登録商標) ゲノムDNA精製キット、P r o m e g a から) :

1 m l の肉汁が、2 分間 13,000 g において遠心された。このペレットが、480 μ l の E D T A、60 μ l の リゾチーム、および 120 μ l の細胞溶解溶液に懸濁され、45 分間 37 においてインキュベートされた。遠心後、600 μ l の核溶解溶液が、該ペレットに加えられ、次いで、5 分間 80 においてインキュベートした。冷やされたら、200 μ l の蛋白溶解溶液が加えられ、その後、ボルテックスミキサーに付した。この結果得られてくる懸濁が次いで 5 分間、氷上でインキュベートされ、5 分間 13,000 g において遠心された。上清が、600 μ l のイソプロパノールを含有しているきれいなチューブ (管) に移され、該管が次いで、遠心された。上清がデカンテーションされ、600 μ l の 70 % エタノールが加えられ、該管が遠心された。エタノールがアスピレーションされ、ペレットが 10 分間風乾された。仕上げに、該 DNA ペレットが再度、100 μ l の再水和溶液中において、終夜 4 において水和された。

【0030】

2. P C R プロトコル

G C 5 6 が、複合微生物集団内において、h s p 6 0 遺伝子主体の 2 種類の P C R 方法論を使用して、検出され得る。

【0031】

(a) 種特異的プライマーを使用し得る P C R

4 μ l の DNA (50 ~ 100 ng)、0.2 μ l (400 pmol/l) の上流プライマー (5' - A T T T C C G C A G C C A A G G A C G T - 3' (配列 ID 番号: 44) ; 表 1) および 0.2 μ l (400 pmol/l) の下流プライマー (5' - T C C A G A G C T T C G G C G A T C T T C - 3' (配列 ID 番号: 45) ; 表 1)、0.2 mol/l の d N T P、0.2 μ l (IU) の T a q ポリメラーゼ酵素、2 μ l の酵素用バッファー、1.6 μ l の M g C l₂、ならびに、11.0 μ l の超純水が混合され、合計体積 20 μ l に達した。

【0032】

10

20

30

40

50

本熱サイクラーは、以降とおり、プログラムされた。

1 回の 10 分のサイクルを 95 において

次いで、95 30 秒、64 . 2 (アニール化温度) 30 秒、および 72 30 秒から構成された 30 回のサイクル

72 5 分により終了

【0033】

20 μ l の各 PCR 産物が、2 μ l の着色剤に加えられ、2 % アガロース寒天ゲルのウェルに移された。そのサイズの評価が、Smart Ladder (登録商標) を使用して、調製された。該寒天は、TAE IX 緩衝液に浸され、移動条件は、60 分 120 V 400 mA であった。移動後、その寒天が 10 分間、臭化エチジウム中においてインキュベートされ、10 分間、水洗された。増幅生成物が、紫外線透過発光下に観察された。hspo' O gene 配列が、その位置を Smart Ladder (登録商標) と関連させていくことにより、同定された。ブランクのコントロールのウェルも調製され、各 PCR における混入を評価した。

10

【0034】

(b) 種特異的プローブを使用してのリアルタイム PCR

ビフィドバクテリウム (Bifidobacterium) 属 (表 1) に特異的な 1 対の変性プライマーが、hspo' O gene に関する PCR 用に使用された。1 プローブが、4 株の GC56 グループ (FR51/h/1、FR47/3b、FR59/b/2、FR54/e/1) の DNA 配列後、GC56 グループ (表 1) の hspo' O 配列から選ばれた。これらビフィドバクテリアの配列が、European Bioinformatics Institute からのプログラム ClustalW を使用して、並べられた。これら並びが、GC56 グループに特異的な配列を明らかとした。

20

【0035】

これらの配列から、これらプライマー、および、Applied Biosystems (Applied Biosystems、Foster city、USA) により提供されたプローブ設計 (デザイン) ガイドラインを使用して、プローブが誘導された。特異性をチェックするために、選択されたプローブが、利用可能な全 hspo' O gene 配列に比較され、BLAST データベース検索プログラムを使用した。GC56 プローブが、FAM (レポーター色素) および DQ を用いて標識 (ラベル) された。

30

【0036】

【表 1】

表 1：ビフィドバクテリア増幅およびGC56グループ同定に使用されたプライマーおよびプローブ。

標的微生物	プライマー ／プローブ	標的化 遺伝子	配列 (5'-3')	アンプリコン の大きさ	参考文献
<i>Bifidobacterium</i> <i>spp.</i>	前向き プライマー	<i>hsp60</i> 遺伝子	GTSCAYGARGGYC TSAAGAA (配列 ID No: 46)	217 bp	Delcenserie et al. (2004)
	逆向き プライマー		CGTAAGGGGCATG ATGATCT (配列 ID No: 47)		
GC56 グループ	前向き プライマー 逆向き プライマー	<i>hsp60</i> 遺伝子	5'- ATTTCGCGAGCCA AGGACGT-3' (配列 ID No: 44) 5'- TCCAGAGCTTCGG CGATCTTC-3' (配列 ID No: 45)	105 bp	本研究
GC56 グループ	プローブ	<i>hsp60</i> 遺伝子	FAM- ATTTCGCGAGCCA AGGACGTTGA-DQ (配列 ID No: 43)		本研究

【0037】

これらアッセイの感受性および特異性

本プローブの特異性をチェックするために、PCRが、13種の異なるビフィドバクテリア (*Bifidobacterium*) 種に属している55株、ならびに、GC56グループに属している9種のビフィドバクテリア (*Bifidobacterium*) 株に関して実施された。GC56プローブを用いて観察された結果は、特異性98% (1種の *B. adolescentis* 株 (5031e) だけ、陽性であった) および感受性100% (テストされたGC56グループからの9株が、陽性であった) を明らかにした。

【0038】

リアルタイムPCR条件

増幅反応混合物は、10～50 ngのDNA、12.5 μlのqPCR master mix (Eurogentec、Seraing、Belgium)、960 nMの各プライマー、50～150 nMのフッ素系プローブ、および、5 mMのMgCl₂を、合計容積25 μlに含有した。各マイクロウェルプレートにおいて、1ウェルが鋳型を持たないコントロールとして使用されたが、該DNAサンプル以外の全試薬を含有した。該増幅は、50 2分間、95 10分間、次いで、40サイクルの2温度PCR (95 30秒間および60 90秒間) であり、検出は、ABI Prism 7000 配列検出システム (Applied Biosystems、Foster city、USA) 上で実施された。これらサンプルに関するPCRの結果が、Rn (相対感度) 蛍光シグ

ナルとして表現された。

【0039】

Ct値が、500よりも高い相対蛍光値に関して25よりも低かった場合、サンプルは陽性と思なされた。

【0040】

多重PCR、リアルタイムPCRのような他の種々のこれらの方法が、ハイブリダイゼーション手法、ドットプロットハイブリダイゼーション、*in situ* 蛍光ハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーション、拘束フラグメント長多型解析のような他の手法同様、使用され得た。

【0041】

ビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) GC56の特徴化

(a) 温度

暫定的な研究において、株FR62/b/3、GC56が、10mlの全乳クリーム、粉乳を有する全乳クリーム（乾燥状態において15%蛋白に到達するよう）、半脱脂粉乳、粉乳を有する半脱脂粉乳、および甘味濃縮乳（Nestle（登録商標））中において、インキュベートされた。UHT乳およびNestle（登録商標）粉乳が、使用された。接種された乳サンプルが、嫌氣的な瓶中において、30および37において、72時間インキュベートされ、バクテリアが次いで、カウントされた。成育速度が、37におけるよりも、30においてより良好であると思出されたので、30が、更なる研究用に選ばれた。

【0042】

(b) 成育

*Bifidobacteria*が、BHI（倍の濃度）肉汁において、30 3日間、嫌氣的条件下に継代培養された。肉汁中初期濃度は、 10^7 cfu/mlであった。該肉汁は、ペプトン - 生理食塩水中に10から10まで希釈された。100μlの肉汁、ならびに、希釈物 - 2、- 4、- 6、および - 8が回収され、10mlの全乳クリーム、もしくは、粉乳を有する全乳クリームに懸濁された（乾燥状態において15%蛋白に到達するよう）。これら乳は、嫌氣的瓶中において、6、12、24、および48時間、30においてインキュベートされた。

【0043】

各インキュベート時刻において、pHが測定され、バクテリアが螺旋接種を用いてカウントされた。

【0044】

結果は、より良好な成育を、補完乳において示した。バクテリア濃度は、初期接種 10^5 、 10^3 、および 10^1 cfu/mlを用いると、 10^{10} cfu/mlに48時間後上昇したが、初期接種 10^{-1} cfu/mlを用いると、 10^9 であった。pH値は、4.6~5.3に、全ての補完乳において、傾いた。

【0045】

全乳クリームにおいて、 10^9 cfu/mlだけが、初期速度 10^5 cfu/mlから生産され、 10^6 が、 10^3 cfu/mlから生産された。pH低下は、5.7~6.4に到達した。

【0046】

この暫定的な研究の狙いは、必要とされる初期濃度を知ること、および、発酵過程の伸展を研究することであった。

【0047】

次いで、接種株FR62/b/3（乳主体培地から $9.5 \log$ cfu/ml）が、30において24時間、乳主体培地（0.3%ペプトン - カゼイン、0.5%イースト抽出物、および8%脱脂粉乳）含有20L発酵槽において、培養された。50mlの8サンプルが、以降の時刻において、回収された。

接種時刻、および、2、4、6、8、10、12、および24時間のインキュベート

10

20

30

40

50

後

螺旋状に接種していったのが、各サンプルに関し、真っ直ぐとされた。pHが自動的に、発酵槽中において、追跡された。

【0048】

これら結果は、 $8.4 \log \text{cfu/ml}$ (接種時刻) から 9.2 までの成育を6時間後示し、この速度は、24時間まで維持された。

【0049】

Lactobacillus acidophilus 株を用いて接種した場合、FR62/b/3株が、 $8.1 \log \text{cfu/ml}$ (接種時刻) から 9.2 まで、10時間後成育し、我々は、速度 $8.9 \log \text{cfu/ml}$ を24時間後観察したが、pHは、単独であった場合よりも低下した(下のセクション(c)参照)。

10

【0050】

GC56は、TPY肉汁において(bain-marieにおいて)も、最高温度 41.5 まで、および、最低温度 7 で増殖可能であり、成長のための至適温度は、 39 である。TPYにおいて、成長のための最小初期pHは、 4.7 である。GC56は、TPY寒天上でも、好気条件下に、 37 および 39 において、増殖可能である。

【0051】

TPY寒天上のGC56のコロニーは、 39 嫌氣的条件下に、クリーム色で、円く、全体の縁が凸である。これらは、直径 1mm にまで届く。これらは、好氣的条件下では、抑えられた直径 (1mm 未満) に届く。

20

【0052】

(c) pH

乳培地のpHは当初、 6.6 であった。

発酵槽中において単独で培養された場合、GC56の株FR62/b/3がpHの低下を生み出し、 5.9 から(播種時間において)、6時間後 5.0 に、12時間後 4.2 に、24時間後 3.9 に低下した。

【0053】

更に培地を酸性化させるアシドフィルス菌(*Lactobacillus acidophilus*)株存在下に、pH値が 5.9 から、6時間後 4.4 に、12時間後 3.8 に、24時間後 3.5 に下がった。これら2種のバクテリア計数は、24時間後 $8 \log \text{cfu/mL}$ に増加した。

30

【0054】

(d) 生存率

発酵槽中におけるインキュベート後、冷蔵条件(好氣的条件、温度 $4 \sim 8$)における生存率が、研究された。

【0055】

初期速度 $9.2 \log \text{cfu/mL}$ から、GC56の株FR62/b/3は、18日後 $8.5 \log \text{cfu/mL}$ に、29日後 $7.3 \log \text{cfu/mL}$ に届いた。文献によれば、製品における 10^6 もしくは 10^7cfu/mL もしくは $/\text{g}$ より大きい速度の共生が必要とされ、陽性の効果の観察を可能とする。

40

【0056】

(e) 生化学分析

GC56グループは、数量解析により、よく系統的に個別化されている(ウェイトを加味しなかった平均連関およびHartiganクラスター化法に基づいた分類)。ビフィドバクテリウム(*Bifidobacterium*)属のもう1種別の種に属している型も対照株も、該グループに参加しない。

【0057】

生乳において、および、生乳チーズにおいて、最も頻繁に単離される種であるGC56グループおよび種 *B. pseudolongum* を差別化する生化学的特徴が、下の表2において提示されており、ある特定の特徴に関する陽性の%を示す。

50

【 0 0 5 8 】

【 表 2 】

特徴	GC56グループ (138 株)	<i>B. pseudolongum</i> (98 株)
発酵:		
リボース	96	43
α -メチル-D-グルコシド	66	10
エスクリン	99	51
スターチ	0	94
グリコーゲン	0	90
酵素テスト:		
β -グルコシダーゼ	93	47
グリシンアリールアミダーゼ	86	47

10

【 0 0 5 9 】

ビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) *crudilactis* の単離新株を、最も近い系統種である *B. psychraerophilum* から差別化する表現型の特徴が、表 3 において提示されている。表 3 におけるデータは、*B. crudilactis* の単離された異なる 141 種に基づいている。これらの結果は、単離されたこれら 141 種、FR62/b/3T (*B. crudilactis* のある 1 株)、および *B. psychraerophilum* LMG 21775 T において観察された陽性応答の % として与えられている。

20

【 0 0 6 0 】

【表 3】

特徴	<i>B. crudilactis</i> (141 株)	<i>B. crudilactis</i> FR62/b/3 ^T (LMG P-22559 ^T)	<i>B. psychraerophilum</i> LMG 21775 ^T (Simpson <i>et al.</i> , 2004)
酸性化：			
L-アラビノース	1	-	+
アミグダリン	13	-	+
アルブチン	1	-	+
サリシン	2	-	+
ラクトース	100	+	-
メレジトース	1	-	+
酵素テスト：			
α -アラビノシダーゼ	1	-	+
最大成長温度 *	-	41.5 °C (6 日)	42°C
最小成長温度 †	-	7 °C (6 週)	4°C
最小成長 pH		4.7	4.5
DNA G+C 含量 (mol%)	55.2 (9 株) (SD=0.83)	56.4 (4 実験) (SD=0.60)	59.2 (HPLC, Simpson <i>et al.</i> , 2004 <i>Int J Syst Evol Microbiol</i> 54, 401-6) 55.7 (T _m †)

B. crudilactis 全株 (該株の 98%) が、ガラクトース、グルコース、フルクトース、マルトース、ラクトース、メリビオース、スクロース、ラフィノース、および D - トウラノースを発酵させる。いずれも (該株の 2%)、グリセロール、エリスリトール、D - アラビノース、L - アラビノース、L - キシロース、アドニトール、-メチルキシロシド、L - ソルボース、ラムノース、ドウルシトール、イノシトール、マンニトール、ソルビトール、-メチル - D - グルコシド、N - アセチルグルコサミン、アルブチン、トレハロース、イヌリン、メレジトース、澱粉 (スターチ)、グリコーゲン、キシリトール、D - リキソース、D - タガトース、D - フコース、L - フコース、D - アラビトール、L - アラビトール、グルコネート、2 - ケト - グルコネート、5 - ケト - グルコネートを発酵させない。全株 (該株の 98%) が、-ガラクトシダーゼ、-ガラクトシダーゼ、-グルコシダーゼ、アルギニンアリアルアミダーゼ、プロリンアリアルアミダーゼ、フェニルアラニンアリアルアミダーゼ、ロイシンアリアルアミダーゼ、およびヒスチジンアリアルアミダーゼに関して陽性であった。全て (該株の 2%)、ウレアーゼ、インドール産生、硝酸塩還元、アルギニンジヒドロラーゼ、-ガラクトシダーゼ - 6 - ホスフェート、-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、グルタミン酸脱炭酸酵素、-フコシダーゼ、ピログルタミン酸アリアルアミダーゼ、グルタミルアリアルアミダーゼに関して陰性であった。

10

【0062】

(f) G + C 含量

GC56 の FR62 / b / 3 株の平均 GC 含量 (Tm 方法) は 56% であり、このグループのうち 9 株が 55.2% である (SD = 0.83)。

20

【0063】

(g) DNA - DNA ハイブリダイゼーション

DNA - DNA 再会合レベルが、全ビフィドバクテリウム (Bifidobacterium) 種およびアエリスカルドヴィア・アエリフィラ (Aeriscardovia aeriphila) のタイプの株を用いると、4 ~ 36% であったが、結果が下の表 4 において示され、ビフィドバクテリウム (Bifidobacterium) GC56 グループ (13 実験) 内では、76 ~ 100% であった。B. psychraerophilum と GC56 対照群株 (FR62 / b / 3) との間での DNA - DNA 相同性は、31% (2 回測定) に等しく、GC56 群が、そのような種に属さないことを確認している (バクテリア種の定義の閾値 70% 以上; Goebel および Stackebrandt、(1994)、Appl Environ Microbiol、60: 1614 ~ 1621; Rossetto - Mora および Amann (2001)、FEMS Microbiol Rev、25: 39 ~ 67)。

30

【0064】

DNA - DNA 再会合レベルが、De Ley らにより記述された復元速度からの分光学的方法を使用して求められ (J. Biochem. (1970) 12、133 ~ 142)、僅かにハイブリダイゼーション温度を修飾した (Gavini ら、Ecology in Health and Disease (2001) 13、40 ~ 45)。これら決定は、67.3 (株 FR62 / b / 3 の G + C 含量に従い、Tm - 25) において実施され、温度コントローラー (Peltier system, Varian) 付きの分光計 Cary 100 (Varian) を使用した。

40

【0065】

【表 4】

種	FR 6 2 / b / 3 との DNA 相同性 (%)
<i>B. crudilactis</i> FR47/3, FR55/d/2, FR59/b/2, FR98/a/11	100
<i>B. crudilactis</i> FR50/f/4	94
<i>B. crudilactis</i> Brie/9	91
<i>B. crudilactis</i> PicV/10	86
<i>B. crudilactis</i> FR35/5	85
<i>B. crudilactis</i> Reb/13	83
<i>B. adolescentis</i>	31
<i>B. angulatum</i>	36
<i>B. animalis</i>	31
<i>B. asteroides</i>	24
<i>B. bifidum</i>	21
<i>B. boum</i>	21
<i>B. breve</i>	21
<i>B. catenulatum</i>	34
<i>B. choerinum</i>	23
<i>B. coryneforme</i>	29
<i>B. cuniculi</i>	23
<i>B. dentium</i>	17
<i>B. gallicum</i>	19
<i>B. gallinarum</i>	6
<i>B. indicum</i>	21
<i>B. longum</i>	29
<i>B. magnum</i>	20
<i>B. merycicum</i>	16
<i>B. minimum</i>	22
<i>B. pseudocatenulatum</i>	26
<i>B. pseudolonum</i> 亜種 <i>globosum</i>	16
<i>B. pseudolonum</i> 亜種 <i>pseudolongum</i>	28
<i>B. psychraerophilum</i>	31
<i>B. pullorum</i>	21
<i>B. ruminantium</i>	15
<i>B. saeculare</i>	5
<i>B. scardovii</i>	35
<i>B. subtile</i>	13
<i>B. suis</i>	32
<i>B. thermacidophilum</i> 亜種 <i>thermacidophilum</i>	21
<i>B. thermacidophilum</i> 亜種 <i>porcinum</i>	26
<i>B. thermophilum</i>	4
<i>Aeriscardovia aeriphila</i>	28

表4は、FR62/b/3 (GC56グループ)からのDNAの、*B. crudilactis*および*Aeriscardovia aeriphila*の株を包含して、ビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 属のタイプの株からのDNAとのDNA-DNA再会合を示す。

【0067】

B. crudilactis FR62/b/3 (GC56)、*B. crudilactis* FR55/d/2、FR59/b/2、FR98/a/11、*B. crudilactis* FR50/f/4、*B. crudilactis* Brie/9、*B. crudilactis* PicV/10、*B. crudilactis* FR35/5、および*B. crudilactis* Reb/13は全て、*B. crudilactis*株であり、*B. crudilactis* FR62/b/3と80%より多いDNA相同性を持つ。

10

【0068】

(h) 16SrRNA配列化

16SrDNA (約1400bp)の配列化が、GC56グループの3種の代表的な株 (FR/62/b/3、FR/47/b/3、FR/59/b/2株)上で実現されており、Genbank上で利用できる他の近いビフィドバクテリア (*Bifidobacterium*) 配列と比較された (図1)。このグループが、FR/62/b/3、FR/59/b/2、およびFR/47/b/3株を考慮すると、好冷細菌 (*B. psychraerophilum*)と99.8%の類似 (3つの違い)を表示したように見えた。

20

【0069】

3種のGC56株の16SrDNA配列が、好冷細菌 (*B. psychraerophilum*)を用いて、実施された。特異的な制限酵素領域 (エリア)が、AIIUIおよびTaqIを使用して、同定された (図2)。制限断片長の多型が使用でき、このグループをサンプル中において検出もしくは同定した。好冷細菌 (*B. psychraerophilum*)との違いは、観察されなかった。しかしながら、好冷細菌 (*B. psychraerophilum*)をこれらの種類のサンプル中において見出す低い可能性がある。

【0070】

(i) hspo' O遺伝子一部配列化

図3は、GC56群 (グループ) (FR47/3、FR51/h/1、FR54/e/1、59/b/2)の幾つかの株のhspo' O遺伝子配列を、Genbank (PubMed-BLAST)上で見出された近いと同定された配列と共に示す。これらGC56グループ株間で違いは観察されなかった一方で、他のビフィドバクテリア種との違いが観察された。これらの違いは、リアルタイムPCR用に選ばれた特異的なPCRプライマーおよび特異的なプローブに使用された (表1)。

30

【0071】

(j) 外観

GC56細胞は、グラム陽性であり、孢子非形成桿菌であり、不規則に形作られた桿体である。FR62/b/3株の形態が、図4において示されている。

【図面の簡単な説明】

40

【0072】

【図1】*Bifidobacterium*の16SrDNAの配列 (1419ヌクレオチド)の系統樹を示し、FR62/b/3株 (Genbank寄託番号AY952449)、FR47/3株 (Genbank寄託番号AY952450)、FR59/b/2株 (Genbank寄託番号AY952448)を包含している。FR62/b/3、FR47/3、およびFR59/b/2は全て、*Bifidobacterium crudilactis*株である。これら配列が、ClustalXを用いて整列された。該系統樹は、*Actinomyces bovis*を根とし、近接アルゴリズムを使用しながら構築された。ブートストラップの (自己完結した) 値は、1000本の木から計算されたが、各節において与えられている。括弧中の数は、GenBank寄託番号に対応する。

50

【図2-1】GC56 FR62/b/3、Fr47/3、およびFr59/b/2株の16SrDNAの、*B. psychraerophilum*との、配列の整列を示す。これら配列が、European Bioinformatics InstituteからのプログラムClustalWを使用しながら整列された。配列1（配列ID番号：1）は、*B. psychraerophilum*（AY174108）であり、配列2（配列ID番号：2）は、GC56FR47/3（AY952450）であり、配列3（配列ID番号：3）は、GC56FR62/b/3（AY952449）であり、配列4（配列ID番号：4）は、GC56FR59/b/2（AY952448）である。配列Cが、コンセンサス配列である。該コンセンサス配列において、以降の象徴が使用されている。

10

もし主要な特徴が、当該配列において、20%の表示を持つ場合。
 : もし主要な特徴が、当該配列において、40%の表示を持つ場合。
 + もし主要な特徴が、当該配列において、60%の表示を持つ場合。
 * もし主要な特徴が、当該配列において、80%の表示を持つ場合。特徴自体 もしこれが、全配列において、存在している場合。16SrDNA上流（5'-aatagctcctggaaacgggt-3'（配列ID番号：5））～16SrDNA下流（5'-cgtaaggggcatgatgattct-3'（配列ID番号：6））の制限マップは、A I u I : A G C T切断位置5、100、411、696、902（下線部）およびT a q I : T C G A切断位置132、796（イタリック）を包含する。

【図2-2】GC56 FR62/b/3、Fr47/3、およびFr59/b/2株の16SrDNAの、*B. psychraerophilum*との、配列の整列を示す。これら配列が、European Bioinformatics InstituteからのプログラムClustalWを使用しながら整列された。配列1（配列ID番号：1）は、*B. psychraerophilum*（AY174108）であり、配列2（配列ID番号：2）は、GC56FR47/3（AY952450）であり、配列3（配列ID番号：3）は、GC56FR62/b/3（AY952449）であり、配列4（配列ID番号：4）は、GC56FR59/b/2（AY952448）である。配列Cが、コンセンサス配列である。該コンセンサス配列において、以降の象徴が使用されている。

20

もし主要な特徴が、当該配列において、20%の表示を持つ場合。
 : もし主要な特徴が、当該配列において、40%の表示を持つ場合。
 + もし主要な特徴が、当該配列において、60%の表示を持つ場合。
 * もし主要な特徴が、当該配列において、80%の表示を持つ場合。特徴自体 もしこれが、全配列において、存在している場合。16SrDNA上流（5'-aatagctcctggaaacgggt-3'（配列ID番号：5））～16SrDNA下流（5'-cgtaaggggcatgatgattct-3'（配列ID番号：6））の制限マップは、A I u I : A G C T切断位置5、100、411、696、902（下線部）およびT a q I : T C G A切断位置132、796（イタリック）を包含する。

30

【図2-3】GC56 FR62/b/3、Fr47/3、およびFr59/b/2株の16SrDNAの、*B. psychraerophilum*との、配列の整列を示す。これら配列が、European Bioinformatics InstituteからのプログラムClustalWを使用しながら整列された。配列1（配列ID番号：1）は、*B. psychraerophilum*（AY174108）であり、配列2（配列ID番号：2）は、GC56FR47/3（AY952450）であり、配列3（配列ID番号：3）は、GC56FR62/b/3（AY952449）であり、配列4（配列ID番号：4）は、GC56FR59/b/2（AY952448）である。配列Cが、コンセンサス配列である。該コンセンサス配列において、以降の象徴が使用されている。

40

もし主要な特徴が、当該配列において、20%の表示を持つ場合。
 : もし主要な特徴が、当該配列において、40%の表示を持つ場合。
 + もし主要な特徴が、当該配列において、60%の表示を持つ場合。

50

* もし主要な特徴が、当該配列において、 80%の表示を持つ場合。 特徴自体 もしこれが、全配列において、存在している場合。16SrDNA上流(5' - a a t a g c t c c t g g a a a c g g g t - 3' (配列ID番号: 5)) ~ 16SrDNA下流(5' - c g t a a g g g g c a t g a t g a t c t - 3' (配列ID番号: 6))の制限マップは、A I u I : A G C T切断位置5、100、411、696、902(下線部)およびT a q I : T C G A切断位置132、796(イタリック)を包含する。

【図2-4】GC56 FR62/b/3、Fr47/3、およびFr59/b/2株の16SrDNAの、B. psychraerophilumとの、配列の整列を示す。これら配列が、European Bioinformatics InstituteからのプログラムClustalWを使用しながら整列された。配列1(配列ID番号: 1)は、B. psychraerophilum (AY174108)であり、配列2(配列ID番号: 2)は、GC56FR47/3 (AY952450)であり、配列3(配列ID番号: 3)は、GC56FR62/b/3 (AY952449)であり、配列4(配列ID番号: 4)は、GC56FR59/b/2 (AY952448)である。配列Cが、コンセンサス配列である。該コンセンサス配列において、以降の象徴が使用されている。

もし主要な特徴が、当該配列において、 20%の表示を持つ場合。

: もし主要な特徴が、当該配列において、 40%の表示を持つ場合。

+ もし主要な特徴が、当該配列において、 60%の表示を持つ場合。

* もし主要な特徴が、当該配列において、 80%の表示を持つ場合。 特徴自体 もしこれが、全配列において、存在している場合。16SrDNA上流(5' - a a t a g c t c c t g g a a a c g g g t - 3' (配列ID番号: 5)) ~ 16SrDNA下流(5' - c g t a a g g g g c a t g a t g a t c t - 3' (配列ID番号: 6))の制限マップは、A I u I : A G C T切断位置5、100、411、696、902(下線部)およびT a q I : T C G A切断位置132、796(イタリック)を包含する。

【図2-5】GC56 FR62/b/3、Fr47/3、およびFr59/b/2株の16SrDNAの、B. psychraerophilumとの、配列の整列を示す。これら配列が、European Bioinformatics InstituteからのプログラムClustalWを使用しながら整列された。配列1(配列ID番号: 1)は、B. psychraerophilum (AY174108)であり、配列2(配列ID番号: 2)は、GC56FR47/3 (AY952450)であり、配列3(配列ID番号: 3)は、GC56FR62/b/3 (AY952449)であり、配列4(配列ID番号: 4)は、GC56FR59/b/2 (AY952448)である。配列Cが、コンセンサス配列である。該コンセンサス配列において、以降の象徴が使用されている。

もし主要な特徴が、当該配列において、 20%の表示を持つ場合。

: もし主要な特徴が、当該配列において、 40%の表示を持つ場合。

+ もし主要な特徴が、当該配列において、 60%の表示を持つ場合。

* もし主要な特徴が、当該配列において、 80%の表示を持つ場合。 特徴自体 もしこれが、全配列において、存在している場合。16SrDNA上流(5' - a a t a g c t c c t g g a a a c g g g t - 3' (配列ID番号: 5)) ~ 16SrDNA下流(5' - c g t a a g g g g c a t g a t g a t c t - 3' (配列ID番号: 6))の制限マップは、A I u I : A G C T切断位置5、100、411、696、902(下線部)およびT a q I : T C G A切断位置132、796(イタリック)を包含する。

【図3】GC56グループの幾つかの株のhsp60遺伝子配列の整列を、近く同定された配列と共に示す。より具体的には、図3は、GC56グループの4種(FR47/3、FR51/h/1、FR54/e/1、59/b/2)のhsp60遺伝子の一部配列の整列を、Genbank (PubMed - BLAST)上で見出された近く同定された配列、つまり: B. pseudocatenuatum (AY004274)、B. a

10

20

30

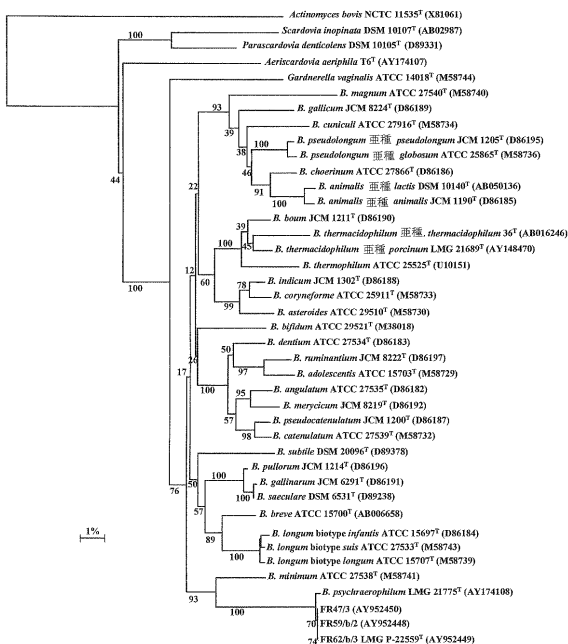
40

50

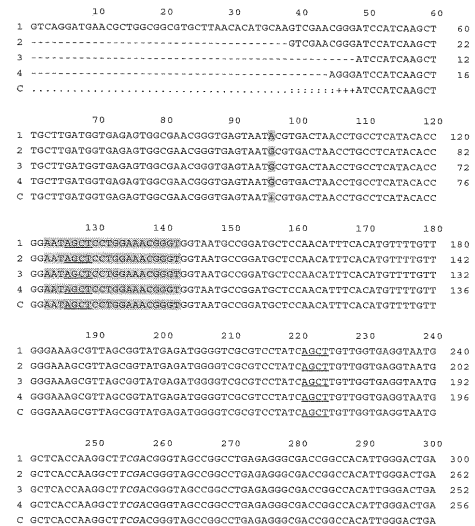
dolescentis (AF210319)、B. ruminantium (AF240571)、B. merycicum (AY004277)、B. angulatum (AF240568) と共に示す。FAM-ATTTCCGCGCAGCCAAAGGACGTTGA-DQ (配列ID番号: 43) が、hsp60 遺伝子を標的化するのに使用されたプローブであり、GC56 グループ特異的である。5' - ATTTCCGCGCAGCCAAAGGACGT - 3' (配列ID番号: 44) および 5' TCCAGAGCTTTCGGCGCATCTTC - 3' (配列ID番号: 45) が、GC56 グループに特異的な前向きおよび逆向きのプライマーであり、hspo' O 遺伝子を標的化するのに使用された。

【図4】GC56の形態学的外観を示す。

【図1】



【図2 - 1】



【図 2 - 2】

```

310      320      330      340      350      360
1  GATACGGCCAGAGCTCTTACCGGAGGACAGAGTGGGGAATTGCAACAATGGGCGAAAGC 360
2  GATACGGCCAGAGCTCTTACCGGAGGACAGAGTGGGGAATTGCAACAATGGGCGAAAGC 322
3  GATACGGCCAGAGCTCTTACCGGAGGACAGAGTGGGGAATTGCAACAATGGGCGAAAGC 312
4  GATACGGCCAGAGCTCTTACCGGAGGACAGAGTGGGGAATTGCAACAATGGGCGAAAGC 316
C  GATACGGCCAGAGCTCTTACCGGAGGACAGAGTGGGGAATTGCAACAATGGGCGAAAGC

370      380      390      400      410      420
1  CTGATGCAGCGACCGCGCTGCGGGATGAAGGCTTCGGGTTGTAAACCGCTTTTAATTG 420
2  CTGATGCAGCGACCGCGCTGCGGGATGAAGGCTTCGGGTTGTAAACCGCTTTTAATTG 382
3  CTGATGCAGCGACCGCGCTGCGGGATGAAGGCTTCGGGTTGTAAACCGCTTTTAATTG 372
4  CTGATGCAGCGACCGCGCTGCGGGATGAAGGCTTCGGGTTGTAAACCGCTTTTAATTG 376
C  CTGATGCAGCGACCGCGCTGCGGGATGAAGGCTTCGGGTTGTAAACCGCTTTTAATTG

430      440      450      460      470      480
1  GGAGCAAGCGAGAGTGAAGTGTACCTTTTGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGC 480
2  GGAGCAAGCGAGAGTGAAGTGTACCTTTTGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGC 442
3  GGAGCAAGCGAGAGTGAAGTGTACCTTTTGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGC 432
4  GGAGCAAGCGAGAGTGAAGTGTACCTTTTGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGC 436
C  GGAGCAAGCGAGAGTGAAGTGTACCTTTTGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGC

490      500      510      520      530      540
1  CCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGCTTATCCGGATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGG 540
2  CCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGCTTATCCGGATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGG 502
3  CCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGCTTATCCGGATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGG 492
4  CCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGCTTATCCGGATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGG 496
C  CCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGCTTATCCGGATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGG

550      560      570      580      590      600
1  CGGTTGTACCGCTCGTGTGAAAGTCCATCGCTTAAACGGTGATCTGCGCGGGTACGG 600
2  CGGTTGTACCGCTCGTGTGAAAGTCCATCGCTTAAACGGTGATCTGCGCGGGTACGG 562
3  CGGTTGTACCGCTCGTGTGAAAGTCCATCGCTTAAACGGTGATCTGCGCGGGTACGG 552
4  CGGTTGTACCGCTCGTGTGAAAGTCCATCGCTTAAACGGTGATCTGCGCGGGTACGG 556
C  CGGTTGTACCGCTCGTGTGAAAGTCCATCGCTTAAACGGTGATCTGCGCGGGTACGG
```

【図 2 - 4】

```

910      920      930      940      950      960
1  GAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTAGGCTTGACATGTTTCGG 960
2  GAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTAGGCTTGACATGTTTCGG 922
3  GAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTAGGCTTGACATGTTTCGG 912
4  GAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTAGGCTTGACATGTTTCGG 916
C  GAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTAGGCTTGACATGTTTCGG

970      980      990      1000      1010      1020
1  ACAGCCCCAGAGATGGGGTCTCCCTTCGGGGCCGATTCACAGGTGGTGATGGTGGTCTGT 1020
2  ACAGCCCCAGAGATGGGGTCTCCCTTCGGGGCCGATTCACAGGTGGTGATGGTGGTCTGT 982
3  ACAGCCCCAGAGATGGGGTCTCCCTTCGGGGCCGATTCACAGGTGGTGATGGTGGTCTGT 972
4  ACAGCCCCAGAGATGGGGTCTCCCTTCGGGGCCGATTCACAGGTGGTGATGGTGGTCTGT 976
C  ACAGCCCCAGAGATGGGGTCTCCCTTCGGGGCCGATTCACAGGTGGTGATGGTGGTCTGT

1030      1040      1050      1060      1070      1080
1  CAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTCGCCTGTGT 1080
2  CAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTCGCCTGTGT 1042
3  CAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTCGCCTGTGT 1032
4  CAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTCGCCTGTGT 1036
C  CAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTCGCCTGTGT

1090      1100      1110      1120      1130      1140
1  TGCCAGCACGTATGTTGGGAACCTCACAAGGGACCGCGGGGTTAACTCGAGGGAAGGTG 1140
2  TGCCAGCACGTATGTTGGGAACCTCACAAGGGACCGCGGGGTTAACTCGAGGGAAGGTG 1102
3  TGCCAGCACGTATGTTGGGAACCTCACAAGGGACCGCGGGGTTAACTCGAGGGAAGGTG 1092
4  TGCCAGCACGTATGTTGGGAACCTCACAAGGGACCGCGGGGTTAACTCGAGGGAAGGTG 1096
C  TGCCAGCACGTATGTTGGGAACCTCACAAGGGACCGCGGGGTTAACTCGAGGGAAGGTG

1150      1160      1170      1180      1190      1200
1  GGGATGACGTCAGATCATGATGCGCTTAAGTCTAGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCC 1200
2  GGGATGACGTCAGATCATGATGCGCTTAAGTCTAGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCC 1162
3  GGGATGACGTCAGATCATGATGCGCTTAAGTCTAGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCC 1152
4  GGGATGACGTCAGATCATGATGCGCTTAAGTCTAGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCC 1156
C  GGGATGACGTCAGATCATGATGCGCTTAAGTCTAGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCC
```

【図 2 - 3】

```

610      620      630      640      650      660
1  GCAGGCTAGAGTGCAGTGAAGGAGATTGGAAATCCCGGTGTAAACGTTGAAATGTGTAGAT 660
2  GCAGGCTAGAGTGCAGTGAAGGAGATTGGAAATCCCGGTGTAAACGTTGAAATGTGTAGAT 622
3  GCAGGCTAGAGTGCAGTGAAGGAGATTGGAAATCCCGGTGTAAACGTTGAAATGTGTAGAT 612
4  GCAGGCTAGAGTGCAGTGAAGGAGATTGGAAATCCCGGTGTAAACGTTGAAATGTGTAGAT 616
C  GCAGGCTAGAGTGCAGTGAAGGAGATTGGAAATCCCGGTGTAAACGTTGAAATGTGTAGAT

670      680      690      700      710      720
1  ATCCGGGAAGAACACCAATGGCGAAGCGAGATCTCTGGGCTGTTACTGACGCTGAGGAGCG 720
2  ATCCGGGAAGAACACCAATGGCGAAGCGAGATCTCTGGGCTGTTACTGACGCTGAGGAGCG 682
3  ATCCGGGAAGAACACCAATGGCGAAGCGAGATCTCTGGGCTGTTACTGACGCTGAGGAGCG 672
4  ATCCGGGAAGAACACCAATGGCGAAGCGAGATCTCTGGGCTGTTACTGACGCTGAGGAGCG 676
C  ATCCGGGAAGAACACCAATGGCGAAGCGAGATCTCTGGGCTGTTACTGACGCTGAGGAGCG

730      740      750      760      770      780
1  AAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGGTGGATG 780
2  AAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGGTGGATG 742
3  AAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGGTGGATG 732
4  AAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGGTGGATG 736
C  AAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGGTGGATG

790      800      810      820      830      840
1  CTGGATGTGGGGCCCTTCCACGGGCTCCGTGTGCGAGCTAACCGGTTAAGCATCCCGCT 840
2  CTGGATGTGGGGCCCTTCCACGGGCTCCGTGTGCGAGCTAACCGGTTAAGCATCCCGCT 802
3  CTGGATGTGGGGCCCTTCCACGGGCTCCGTGTGCGAGCTAACCGGTTAAGCATCCCGCT 792
4  CTGGATGTGGGGCCCTTCCACGGGCTCCGTGTGCGAGCTAACCGGTTAAGCATCCCGCT 796
C  CTGGATGTGGG+CCCTTCCACGGG+TCCGTGTGCGAGCTAACCGGTTAAGCATCCCGCT

850      860      870      880      890      900
1  GGGGAGTACGGCCCGCAAGCTTAAACTCAAAGAAATTGACGGGGGCCCGCAAGCGGCG 900
2  GGGGAGTACGGCCCGCAAGCTTAAACTCAAAGAAATTGACGGGGGCCCGCAAGCGGCG 862
3  GGGGAGTACGGCCCGCAAGCTTAAACTCAAAGAAATTGACGGGGGCCCGCAAGCGGCG 852
4  GGGGAGTACGGCCCGCAAGCTTAAACTCAAAGAAATTGACGGGGGCCCGCAAGCGGCG 856
C  GGGGAGTACGGCCCGCAAGCTTAAACTCAAAGAAATTGACGGGGGCCCGCAAGCGGCG
```

【図 2 - 5】

```

1210      1220      1230      1240      1250      1260
1  GGTACAAAGAGATGCGACATGGCGACATGAAGCGAATCTCTTAAACCGGTTCTAGTTTC 1260
2  GGTACAAAGAGATGCGACATGGCGACATGAAGCGAATCTCTTAAACCGGTTCTAGTTTC 1222
3  GGTACAAAGAGATGCGACATGGCGACATGAAGCGAATCTCTTAAACCGGTTCTAGTTTC 1212
4  GGTACAAAGAGATGCGACATGGCGACATGAAGCGAATCTCTTAAACCGGTTCTAGTTTC 1216
C  GGTACAAAGAGATGCGACATGGCGACATGAAGCGAATCTCTTAAACCGGTTCTAGTTTC

1270      1280      1290      1300      1310      1320
1  GATTGGAGCCTTGCAACTCGGCTCCATGAAGGCGGAGTCCGTAGTAATCGGGAATCAGCAA 1320
2  GATTGGAGCCTTGCAACTCGGCTCCATGAAGGCGGAGTCCGTAGTAATCGGGAATCAGCAA 1282
3  GATTGGAGCCTTGCAACTCGGCTCCATGAAGGCGGAGTCCGTAGTAATCGGGAATCAGCAA 1272
4  GATTGGAGCCTTGCAACTCGGCTCCATGAAGGCGGAGTCCGTAGTAATCGGGAATCAGCAA 1276
C  GATTGGAGCCTTGCAACTCGGCTCCATGAAGGCGGAGTCCGTAGTAATCGGGAATCAGCAA

1330      1340      1350      1360      1370      1380
1  CGTCCGGGTGAATCGGCTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCGTCAAGTCATGAAGTGGG 1380
2  CGTCCGGGTGAATCGGCTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCGTCAAGTCATGAAGTGGG 1342
3  CGTCCGGGTGAATCGGCTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCGTCAAGTCATGAAGTGGG 1332
4  CGTCCGGGTGAATCGGCTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCGTCAAGTCATGAAGTGGG 1336
C  CGTCCGGGTGAATCGGCTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCGTCAAGTCATGAAGTGGG

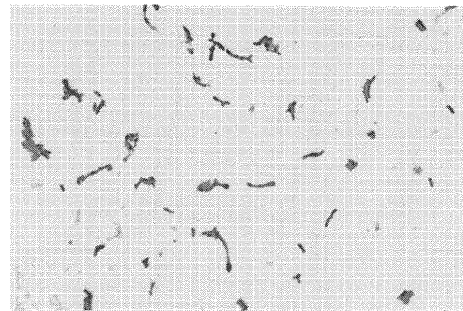
1390      1400      1410      1420
1  TAGCACCCGAAGCGGCTGGCTTAACCTTTTGGAGGGAGCCGTCTAAGG 1428
2  TAGCACCCGAAGCGGCTGGCTTAACCTTTTGGAGGGAGCCGTCTAAGG 1372
3  TAGCACCCGAAGCGGCTGGCTTAACCTTTTGGAGGGAGCCGTCTAAGG 1356
4  TAGCACCCGAAGCGGCTGGCTTAACCTTTTGGAGGGAGCCGTCTAAGG 1384
C  TAGCACCCGAAGCGGCTGGCTTAACCTTTTGGAGGGAGCCGTCTAAGG
```

【図 3】

		配列 ID no	
AY004274	CGTCACGCGCGGCTCAACCCGATCGCTTGGGTGCTGGTATCGAGAAGG	112	7
FR47/3	CGTCGTTGCGGGGCTCAACCCGATCGCTTCTGTCGCGGATCGAGAAGG	65	8
FR54/e/1	CGTCGTTGCGGGGCTCAACCCGATCGCTTCTGTCGCGGATCGAGAAGG	70	9
AF210319	CGTCACGCGCGGCTCAACCCGATCGCTTCTGTCGCGGATCGAGAAGG	550	10
AF240571	CGTCACGCGCGGCTCAACCCGATCGCTTCTGTCGCGGATCGAGAAGG	112	11
AY004277	CGTCGTCGCGGCTCAACCCGATCGCTTCTGTCGCGGATCGAGAAGG	112	12
AF240568	CGTCGTCGCGGCTCAACCCGATCGCTTCTGTCGCGGATCGAGAAGG	113	13
FR51/h/1	---CGTTGTCGCTTATGCC--ATCGCTCTTCTGTCGCGGATCGAGAAGG	45	14
FR59/b/2	-----GCG--ATCGCTCTTCTGTCGCGGATCGAGAAGG	31	15
* * * * *			
AY004274	CTTCGGAAGCCATCGTCAAGGAGCTTATGCGAGCTGCCAAGGACGTTGAG	162	16
FR47/3	CGTCAGAGCCCATCGTCAAGGAGCTGATTTCCGAGCCCAAGGACGTTGAG	115	17
FR54/e/1	CGTCAGAGCCCATCGTCAAGGAGCTGATTTCCGAGCCCAAGGACGTTGAG	120	18
AF210319	CGCCGAGCCCATCGTCAAGGAGCTGATTTCCGAGCCCAAGGACGTTGAG	600	19
AF240571	CTTCGAGCCCATCGTCAAGGAGCTGATTTCCGAGCCCAAGGACGTTGAG	162	20
AY004277	CGACCGAAGTCATCGTCAAGGAGCTGATTTCCGAGCCCAAGGACGTTGAG	162	21
AF240568	CGCCGAGCCCATCGTCAAGGAGCTGATTTCCGAGCCCAAGGACGTTGAG	163	22
FR51/h/1	C-TCAGAGCCCATCGTCAAGGAGCTGATTTCCGAGCCCAAGGACGTTGAG	94	23
FR59/b/2	CGTCAGAGCCCATCGTCAAGGAGCTGATTTCCGAGCCCAAGGACGTTGAG	81	24
* * * * *			
AY004274	ACCAAGGATCAGATCGCCGCTACCGAAGCTTTCGCGCCCGGATCCGGA	212	25
FR47/3	ACCAAGGATCAGATCGCCGCGGAGCGCAAGCTTTCGCGCCCGGATCCGGA	165	26
FR54/e/1	ACCAAGGATCAGATCGCCGCGGAGCGCAAGCTTTCGCGCCCGGATCCGGA	170	27
AF210319	ACCAAGGATCAGATCGCTGCGCACCGCAAGCTTTCGCGCCCGGATCCGGA	650	28
AF240571	ACCAAGGATCAGATCGCTGCGCACCGCAAGCTTTCGCGCCCGGATCCGGA	212	29
AY004277	ACCAAGGATCAGATCGCTGCGCACCTGTCAGATTCGCGCCCGGATCCGGA	212	30
AF240568	ACCAAGGATCAGATCGCTGCGCACCGCAAGCTTTCGCGCCCGGATCCGGA	213	31
FR51/h/1	ACCAAGGATCAGATCGCCGCGAGGCAAGCTTTCGCGCCCGGATCCGGA	144	32
FR59/b/2	ACCAAGGATCAGATCGCCGCGAGGCAAGCTTTCGCGCCCGGATCCGGA	131	33

AY004274	AGTCGGCGGAGAGATCGCCGAGCTCTTGACAAAGTTGGCCAGGACGGCG	262	34
FR47/3	GGTTGGCGGAGAGATCGCCGAGCTCTTGACAAAGTTGGCCAGGACGGCG--	193	35
FR54/e/1	GGTTGGCGGAGAGATCGCCGAGCTCTTGACAAAGTTGGCCAGGACGGGT-	176	36
AF210319	AGTCGGCGGAGAGATCGCCGAGCTCTTGACAAAGTTGGCCAGGATGGCG	700	37
AF240571	AGTCGGCGGAGAGATCGCCGAGCTCTTGACAAAGTTGGCCAGGACGGTG	262	38
AY004277	GGTTGGCGGAGAGATCGCCGAGCTCTTGACAAAGTTGGCCAGGACGGCG	262	39
AF240568	GGTTGGCGGAGAGATCGCCGAGCTCTTGACAAAGTTGGCCAGGACGGCG	263	40
FR51/h/1	GGTTGGCGGAGAGATCGCCGAGCTCTTGACAAAGTTGGCCAGGACGGCG--	192	41
FR59/b/2	GGTTGGCGGAGAGATCGCCGAGCTCTTGACAAAGTTGGCCAGGACGGGT-	180	42

【図 4】



【配列表】

[2008539776000001.xml](#)

【手続補正書】

【提出日】平成20年1月17日(2008.1.17)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM、パストゥール研究所)において2004年12月9日寄託番号CNCM1-3342をもって寄託されたビフィドバクテリウム(*Bifidobacterium*) GC56。

【請求項2】

ビフィドバクテリウム(*Bifidobacterium*) GC56に対する40%よりも大きいDNA配列相同性を持ち、ここでビフィドバクテリウム(*Bifidobacterium*) GC56がCollection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM、パストゥール研究所)において2004年12月9日寄託番号CNCM1-3342をもって寄託された、ビフィドバクテリウム(*Bifidobacterium*)株。

【請求項3】

請求項1もしくは請求項2において定義されたとおりのビフィドバクテリウム(*Bifidobacterium*)株と1種以上の許容可能な賦形剤とを含んでいる、共生組成

物。

【請求項 4】

前記組成物が、食品製品である、請求項 3 において定義されたとおりの共生組成物。

【請求項 5】

前記食品製品が、発酵乳、植物乳、豆乳、バター、チーズ、およびヨーグルトから選択された、酪農主体の製品である、請求項 4 において定義されたとおりの共生組成物。

【請求項 6】

請求項 1 もしくは請求項 2 において定義されたとおりの、治療物質としての使用用の、ビフィドバクテリウム (Bifidobacterium) 株。

【請求項 7】

消化管疾患、下痢、癌、コレステロール過剰、アレルギー、および感染の処置および / または予防における使用用の、請求項 1 もしくは請求項 2 において定義されたとおりの、ビフィドバクテリウム (Bifidobacterium) 株。

【請求項 8】

請求項 1 もしくは請求項 2 において定義されたとおりのビフィドバクテリウム (Bifidobacterium) 株の、消化管疾患、下痢、癌、コレステロール過剰、アレルギー、および感染の処置および / または予防用の医薬品の調製における使用。

【請求項 9】

請求項 1 もしくは請求項 2 において定義されたとおりのビフィドバクテリウム (Bifidobacterium) 株を、更なる治療剤 (1 種もしくは複数種) と一緒に含んでいる組み合わせ。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/061247

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE EMBL 22 January 2003 (2003-01-22), SIMPSON, P.J. ET AL.: "Bifidobacterium psychraerophilum 16S ribosomal RNA gene, partial sequence" XP002396819 retrieved from EBI Database accession no. AY174108 *There is 99,8% identity in 1372 nt overlap (total 1372 nt) of AY174108 with SEQ ID NO: 2 of the present application * abstract -& SIMPSON P J ET AL: "Genomic diversity and relatedness of bifidobacteria isolated from a porcine cecum." JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 185, no. 8, April 2003 (2003-04), pages 2571-2581, XP002396829 ISSN: 0021-9193</p>	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 August 2006

Date of mailing of the international search report

13/09/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hillenbrand, G

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 37/08 (2006.01)		A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)		A 6 1 P 31/00	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)		A 6 1 K 45/00	
A 2 3 C 9/12 (2006.01)		A 2 3 C 9/12	
A 2 3 C 15/00 (2006.01)		A 2 3 C 15/00	
A 2 3 C 19/00 (2006.01)		A 2 3 C 19/00	
A 2 3 C 11/10 (2006.01)		A 2 3 C 11/10	
A 2 3 C 9/127 (2006.01)		A 2 3 C 9/127	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N 1/20	E
		C 1 2 N 15/00	A

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

(74)代理人 100111648

弁理士 梶並 順

(74)代理人 100122437

弁理士 大宅 一宏

(72)発明者 ドーブ、ジョルジュ

ベルギー国、4 8 0 1 スタンバール、リュ・ドゥ・カラミンヌ 1 4

(72)発明者 デルサンスリ、ヴェロニク

カナダ国、オンタリオ州・エル5エヌ・3ティー6、ミシソーガ、モンテヴィデオ・ロード 6 5
0 0、アパートメント 4 0 5

(72)発明者 ガヴィニ、フランソワーズ

フランス国、5 9 3 7 0 モンス・アン・バルール、リュ・アルベール・シュエイツェール 2

Fターム(参考) 4B001 AC50 BC99 EC99

4B024 AA11 CA01 CA11 HA11

4B065 AA21X AC03 AC05 BA22 CA24 CA42

4C084 AA19 MA02 MA52 NA05 ZA661 ZA731 ZB131 ZB261 ZB321 ZC331

ZC751

4C087 AA01 AA02 BC59 CA09 CA12 MA02 MA52 NA03 NA05 ZA66

ZA73 ZB13 ZB26 ZB32 ZC33 ZC75