

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7649782号
(P7649782)

(45)発行日 令和7年3月21日(2025.3.21)

(24)登録日 令和7年3月12日(2025.3.12)

(51)国際特許分類		F I		
C 1 2 N	1/20 (2006.01)	C 1 2 N	1/20	A
C 1 2 N	1/00 (2006.01)	C 1 2 N	1/00	A
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	
A 6 1 K	35/747(2015.01)	A 6 1 K	35/747	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	
請求項の数 16 (全48頁) 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願2022-526090(P2022-526090)	(73)特許権者	312014878	
(86)(22)出願日	令和2年11月6日(2020.11.6)		バイオガイア エイビー	
(65)公表番号	特表2023-501358(P2023-501358 A)		スウェーデン王国 1 1 2 2 7 ストックホルム、クングスプロプラン 3	
(43)公表日	令和5年1月18日(2023.1.18)	(74)代理人	110000855	
(86)国際出願番号	PCT/SE2020/051075		弁理士法人浅村特許事務所	
(87)国際公開番号	WO2021/091474	(72)発明者	グラッセ、エステル	
(87)国際公開日	令和3年5月14日(2021.5.14)		フランス共和国、レザシャル、ルシエーニュ 1 2	
審査請求日	令和5年9月19日(2023.9.19)	(72)発明者	カーン、ムハマド	
(31)優先権主張番号	1951292-0		スウェーデン王国、メンダール、ランメバルスガタン 3 2	
(32)優先日	令和1年11月8日(2019.11.8)	(72)発明者	メールスタム、ボー	
(33)優先権主張国・地域又は機関	スウェーデン(SE)		スウェーデン王国、レラム、セーデルフリクツベージェン 1 2	
微生物の受託番号	DSMZ DSM 33509			
	DSMZ DSM 33632			
最終頁に続く		最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 セロトニン産生細菌

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

セロトニン欠乏症に関連する疾患の治療において使用するための細菌株を選択する方法であって、

好気性条件下で、L.ロイテリ(reuteri)細菌株およびL.ムコサエ(mucosae)細菌株からなる群から選択されるラクトバチルス細菌株の細菌を、トリプトファンを含む培地で培養すること(S1)；

前記培地またはその試料中の前記ラクトバチルス細菌株の前記細菌によって産生された任意のセロトニンを検出すること(S2)；

前記ラクトバチルス細菌株の細菌が腸粘液への付着および／または胃腸粘膜への付着が可能であるかどうかを判定すること(S15)；および

セロトニンが前記培地またはその試料において検出された場合、かつ前記ラクトバチルス細菌株の前記細菌が腸粘液への付着および／または胃腸粘膜への付着が可能である場合、対象のセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療に有効であるとして、前記ラクトバチルス細菌株を選択すること(S3)、

を含み、

前記セロトニン欠乏症に関連する疾患が、不安、憂鬱感、攻撃性、記憶不良、摂食障害、強迫性障害、パニック障害、心的外傷後ストレス障害、社会不安障害、過敏性腸症候群(IBS)、炎症性腸疾患(IBD)、心血管疾患、骨粗鬆症、胃腸運動性障害、自己免疫性多腺性内分泌不全症・カンジダ症・外胚葉ジストロフィー(APECED)、骨減少

症および骨量減少状態からなる群から選択される、上記方法。

【請求項 2】

嫌気性条件下で、前記ラクトバチルス細菌株の細菌を、トリプトファンを含む培地で培養すること（S10）；

嫌気性条件下で培養された場合の、前記培地またはその試料中の前記ラクトバチルス細菌株の前記細菌によって産生された任意のセロトニンを検出すること（S11）；および

好気性条件下で培養された場合の前記培地またはその試料中で検出されたセロトニンの濃度と、嫌気性条件下で培養された場合の前記培地またはその試料中で検出されたセロトニンの濃度との比を算出すること（S12）

をさらに含み、

前記ラクトバチルス細菌株を選択すること（S3）が、前記比が1.0以上である場合、かつ前記ラクトバチルス細菌株の前記細菌が腸粘液への付着および／または胃腸粘膜への付着が可能である場合、対象のセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療に有効であるとして、前記ラクトバチルス細菌株を選択すること（S3）を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記ラクトバチルス細菌株を選択すること（S3）が、前記比が1.0より大きい場合、かつ前記ラクトバチルス細菌株の前記細菌が腸粘液への付着および／または胃腸粘膜への付着が可能である場合、対象のセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療に有効であるとして、前記ラクトバチルス細菌株を選択すること（S3）を含む、請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

前記ラクトバチルス細菌株を選択すること（S3）が、前記培地またはその試料中にセロトニンが検出される場合、かつ前記ラクトバチルス細菌株の前記細菌がL.ロイテリ（*reuteri*）DSM 27131の粘液接着能力より高い粘液接着能力を有する場合、対象のセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療に有効であるとして、前記ラクトバチルス細菌株を選択すること（S3）を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

ラクトバチルス・ロイテリ（*Lactobacillus reuteri*）株DSM 33509。

【請求項 6】

ラクトバチルス・ロイテリ（*Lactobacillus reuteri*）株DSM 33632。

【請求項 7】

ラクトバチルス・ロイテリ（*Lactobacillus reuteri*）株DSM 33633。

【請求項 8】

ラクトバチルス・ロイテリ（*Lactobacillus reuteri*）株DSM 33634。

【請求項 9】

ラクトバチルス・ロイテリ（*Lactobacillus reuteri*）株DSM 33635。

【請求項 10】

ラクトバチルス・ムコサエ（*Lactobacillus mucosae*）株DSM 33291。

【請求項 11】

ラクトバチルス・ムコサエ（*Lactobacillus mucosae*）株DSM 33292。

【請求項 12】

ラクトバチルス・ムコサエ（*Lactobacillus mucosae*）株DSM 33293。

【請求項 13】

ラクトバチルス・ムコサエ (*Lactobacillus mucosae*) 株 DSM 33661。

【請求項14】

医薬品として使用するための医薬組成物であって、請求項5～9のいずれか一項に記載のラクトバチルス・ロイテリ (*Lactobacillus reuteri*) 株、または請求項10～13のいずれか一項に記載のラクトバチルス・ムコサエ (*Lactobacillus mucosae*) 株を含む、上記医薬組成物。

【請求項15】

セロトニン欠乏症に関連する疾患の治療に使用するための医薬組成物であって、前記医薬組成物が、請求項5～9のいずれか一項に記載のラクトバチルス・ロイテリ (*Lactobacillus reuteri*) 株、または請求項10～13のいずれか一項に記載のラクトバチルス・ムコサエ (*Lactobacillus mucosae*) 株を含み、前記セロトニン欠乏症に関連する疾患が、不安、憂鬱感、攻撃性、記憶不良、摂食障害、強迫性障害、パニック障害、心的外傷後ストレス障害、社会不安障害、過敏性腸症候群 (IBS)、炎症性腸疾患 (IBD)、心血管疾患、骨粗鬆症、胃腸運動性障害、自己免疫性多腺性内分泌不全症・カンジダ症・外胚葉ジストロフィー (APECED)、骨減少症および骨量減少状態からなる群から選択される、上記医薬組成物。

【請求項16】

前記セロトニン欠乏症に関連する疾患が、IBS、IBD、心血管疾患、骨粗鬆症、胃腸運動性障害、APECED、骨減少症および骨量減少状態からなる群から選択される、請求項15に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般に、乳酸産生細菌、特に、セロトニンの産生のためのそのような乳酸産生細菌のスクリーニング、ならびにセロトニン欠乏症の治療、およびセロトニン欠乏症に関連する障害および疾患の治療におけるそのような乳酸産生細菌の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

宿主と腸内微生物との間の相互作用が宿主の健康および幸福の基礎であることは、十分に確立されている。腸内微生物叢は、宿主に栄養素を提供するが、免疫応答ならびに宿主の免疫系の調節および発達にも関与し得る代謝産物を生成する。

【0003】

ラクトバチルスおよび他の乳酸産生細菌、例えばビフィズス菌は、様々な種類の食品、例えばヨーグルト中のプロバイオティクスとして一般的に使用されている。有害微生物の増殖および定着は、このような乳酸産生細菌が腸の生態系内で自身が定着することによって、例えばバイオフィルムの形成によって、利用可能な栄養素の競合によって、および／または腸のpHを低下させる特定の物質、例えば過酸化水素、バクテリオシンおよび／または乳酸および酢酸を含む有機酸の産生によって防ぐことができる。

【0004】

セロトニン、または5-ヒドロキシトリプトタミン (5-HT) は、芳香族アミノ酸トリプトファンから合成されたバイオアミンであり、行動、血小板活性化および凝固、腸内移送、腸神経系 (ENS) 成熟、発達、恒常性および活性、腸管免疫系活性、エネルギー代謝 (絶食適応、脂肪組織の褐色化および脂肪分解、肝臓グルコース産生、インスリン分泌)、腸脳軸活性ならびに骨の代謝および恒常性を含むいくつかの生理学的機能を有する。ヒトでは、セロトニンは主に胃腸 (GI) 管、血小板、および中枢神経系 (CNS) に見出される。哺乳動物細胞では、セロトニン産生は、5-ヒドロキシトリプトファン (5-HTP) を産生する律速酵素トリプトファンヒドロキシラーゼ (TPH) によって可能になる。5-HTPはセロトニンの即時型前駆体であり、芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC) によってセロトニンに変換される。TPHの2つのアイソフォームが存在する

10

20

30

40

50

。TPH1は主に末梢組織で発現されるのに対して、TPH2は主に脳（CNS）およびENSニューロンで発現される。TPH1は、内因性セロトニン産生の大部分を担う酵素であり、この酵素は、腸クロム親和性（EC）細胞と呼ばれる、GI管内の高度に特殊化した内分泌細胞によって発現される。腸内微生物叢は、EC細胞への代謝シグナル伝達によって内因性宿主セロトニン産生の調節に関与することが明確に実証されている。短鎖脂肪酸および二次胆汁酸など、腸内微生物叢由来の代謝産物は、マウスEC細胞においてTPH1の発現を誘導することが示されており、それに対応して、内因的に産生されるセロトニンのレベルがこれらの細菌によって直接調節される。その結果、血清セロトニンレベルは、微生物の定着なしで飼育されたマウス、例えば無菌（GF）マウスにおいて、標準的な微生物叢を有する従来通り定着した対照動物と比較して、実質的に低下する。

10

【0005】

セロトニン欠乏症は、身体が十分なセロトニンを有しない場合に起こり、いくつかの理由で起こり得る。腸または残りの身体における局所的なセロトニン欠乏症は、うつ病、不安、強迫性障害、過敏性腸症候群、心血管疾患、骨粗鬆症、異常な胃腸運動性、異常な血小板凝集、異常な血小板活性化、および異常な免疫応答を含む病的状態を引き起こし得る。したがって、セロトニン欠乏症は健康リスクを呈する。セロトニン欠乏症を治療するために、選択的セロトニン再取り込み阻害剤（SSRI）およびモノアミンオキシダーゼ（MAO）阻害剤などの様々な薬物が開発されている。しかしながら、これらの薬物は、下痢、便秘、不眠症、眩暈および口渴などの多かれ少なかれ重篤な副作用を伴うことが多い。さらに、これらの薬物は全ての人に適しているわけではなく、例えばSSRIは、妊婦、授乳中、18歳未満の者、糖尿病、てんかん、または腎臓疾患を有する者は、摂取すべきではない。さらに、SSRIおよびMAO阻害剤の両方は、他の薬剤、例えば鎮痛剤、他の抗うつ剤、ならびに風邪薬およびアレルギー薬と相互作用する可能性があり、したがって深刻な有害反応を引き起こす可能性がある。MAO阻害剤はまた、いくつかの食品および飲料と相互作用して、危険なほどの高血圧を引き起こす可能性がある。これらの特徴により、公知のセロトニン欠乏症薬物は、多数の患者群には適さず、したがって、セロトニン欠乏症またはセロトニン欠乏症に関連する障害のための、副作用が全くない、またはほとんどない代替の効果的な治療を提供することが大いに必要とされている。

20

【0006】

総合すると、セロトニン欠乏症の患者においてセロトニンレベルを増加させることができ、セロトニン欠乏症およびセロトニン欠乏症に関連する疾患または障害の治療に使用することができる安全な方法が必要とされている。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

一般的な目的は、セロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療に使用するために、乳酸産生細菌株をスクリーニングすることである。

【0008】

特定の目的は、胃腸管内で、粘膜の近くなど、腸のより酸素化されたニッチにおいて局所的にセロトニンを産生することができる乳酸産生細菌株をスクリーニングすることである。

40

【課題を解決するための手段】

【0009】

これらおよび他の目的は、本明細書に開示される実施形態によって満たされる。

【0010】

本発明は、独立請求項に定義される。本発明のさらなる実施形態は、従属請求項に定義されている。

【0011】

実施形態の一態様は、セロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療に使用するための細菌株を選択する方法に関する。方法は、好気性条件下で、ト

50

リプトファンを含む培地中で乳酸産生細菌株の細菌を培養することを含む。方法はまた、培地またはその試料中の乳酸産生細菌株の細菌によって産生された任意のセロトニンを検出することを含む。方法はさらに、培地またはその試料中にセロトニンが検出された場合、対象におけるセロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療に有効であるとして、乳酸産生細菌株を選択することを含む。

【0012】

実施形態の別の態様は、セロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療に使用するための細菌株を選択する方法に関する。方法は、無菌Tph1-/-対象に乳酸産生細菌株の細菌を供給することを含む。方法はまた、無菌Tph1-/-対象から採取した身体試料中の乳酸産生細菌株の細菌によって産生された任意のセロトニンを検出することを含む。方法はさらに、身体試料中にセロトニンが検出された場合、対象におけるセロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療に有効であるとして、乳酸産生細菌株を選択することを含む。

10

【0013】

実施形態の別の態様は、対象におけるセロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療に使用するための、好気性条件下でセロトニンを産生し、細胞外に放出することができる乳酸産生細菌株に関する。

【0014】

実施形態のさらなる態様は、ラクトバチルス・ムコサエ (*Lactobacillus mucosae*) DSM 33291、ラクトバチルス・ムコサエ (*Lactobacillus mucosae*) DSM 33292、ラクトバチルス・ムコサエ (*Lactobacillus mucosae*) DSM 33293、ラクトバチルス・ムコサエ (*Lactobacillus mucosae*) DSM 33661、ラクトバチルス・ロイテリ (*Lactobacillus reuteri*) DSM 33509、ラクトバチルス・ロイテリ (*Lactobacillus reuteri*) DSM 33632、ラクトバチルス・ロイテリ (*Lactobacillus reuteri*) DSM 33633、ラクトバチルス・ロイテリ (*Lactobacillus reuteri*) DSM 33634、ラクトバチルス・ロイテリ (*Lactobacillus reuteri*) DSM 33635、ラクトバチルス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*) DSM 33295、およびラクトバチルス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*) DSM 33662、および医薬品としてのそれらの使用、およびセロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療における使用に関する。

20

30

【0015】

実施形態に従って選択される乳酸産生細菌株は、哺乳動物の胃腸系においてセロトニンを産生することができる。特に、本発明に従って選択される乳酸産生細菌株は、腸のより酸素化されたニッチの条件で、例えばセロトニン受容体および／またはセロトニン輸送体 (SERT) が発現される、また腸クロム親和性細胞などの腸内分泌細胞が位置する腸の上皮内層の近くでセロトニンを産生することができる。この微生物産生セロトニンは生物活性であり、胃腸管内で局所的に効果を有するが、胃腸系に関して末梢的にも効果を有し得る。したがって、腸内細菌株によって産生されるセロトニンは、対象におけるセロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療に使用することができる。

40

【0016】

実施形態は、そのさらなる目的および利点と共に、添付の図面と共に以下の説明を参照することによって最もよく理解され得る。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】乳酸産生細菌株によるセロトニン産生の評価である。(A)セロトニンのレベルは、ラクトバチルス・ロイテリ (*Lactobacillus reuteri*)、ラクトバチルス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*)、ラク

50

トバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*) およびラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*) 細菌株をトリプトファン修飾脱炭酸酵素 (DECT) ブロス中で嫌気性および好気性条件下でそれらを培養した後、それらの培地 (ブロス) において測定した。試験した全ての *L. ロイテリ* (*reuteri*) 細菌株は、嫌気性条件下でセロトニンを産生することが見出され、それらは好気性条件下でさらに多くのセロトニンを産生することが見出されたが、*L. プランタルム* (*plantarum*) 36E、*L. カゼイ* (*casei*) LMG 6904 および *L. アシドフィルス* (*acidophilus*) ATCC 4365 の細菌株では、インビトロの対応する条件のいずれにおいてもセロトニン産生は観察されなかった。好気性セロトニン産生と嫌気性セロトニン産生との比を各細菌株について計算した。調査した全ての *L. ロイテリ* (*reuteri*) 細菌株は、インビトロで、嫌気性条件下と比較して、好気性条件下でより良好にセロトニンを産生した。(B) 血清セロトニン濃度を、無菌 (GF) Tph1-/-マウスの大静脈から、および、*L. ロイテリ* (*reuteri*) DSM 17938、*L. ロイテリ* (*reuteri*) DSM 27131 または *L. カゼイ* (*casei*) LMG 6904 のいずれかを与えられた (接種された) GF Tph1-/-マウスから得られた血液試料において測定した ($n=3\sim6$ /群)。データはグラフ中の箱ひげ図として提示され、各ドットは1匹のマウスを表し、最大値、最小値、中央値、および四分位範囲を示す。グラフは、GF Tph1-/-マウスにおいて非常に低いセロトニンレベルが、*L. ロイテリ* (*reuteri*) 細菌株の接種後にこれらのマウスにおいて回復することを示す。しかしながら、*L. カゼイ* (*casei*) LMG 6904 を接種したマウスから得られた血清試料では、セロトニンレベルの増加は観察されず、この細菌株がインビボでセロトニンを産生しないことを示した。統計学的有意性をスチューデントの t 検定 (データが正規分布している場合) またはマン・ホイットニー検定によって評価する前に、各群の正規性を分析した。3つ以上の群を比較する場合、一元配置分散分析を使用してデータを分析し、続いてデータが正規分布している場合は事後テューキーの多重比較検定を使用し、それ以外の場合はクラスカル・ウォリス検定を使用し、続いて事後ダンの多重比較を実施した。有意水準を $p < 0.05$ に設定した。

【図2】細菌産生されたセロトニンは胃腸管内で局所効果を有し、近位結腸内の腸神経系 (ENS) 成熟および陰窩神経支配に重要である。グラフは、結腸縦走筋腸筋神経叢 (LMMP) におけるセロトニン陽性面積 (A, D)、結腸陰窩の PGP 9.5 陽性面積 (B, E)、結腸陰窩の TUJ1 陽性面積 (C, F) を示す。(A~C) グラフ中の GF は、Tph1-/-無菌動物を示す。CONV-D 3d および CONV-D 14d は、Tph1+/+マウス盲腸をそれぞれ3日間または14日間接種した Tph1-/-無菌動物を示す。CONV-R は、正常な微生物叢を有する Tph1-/-動物を示す。DECT 定着化 14d は、接種前に DECT 中で 48 時間培養したマウス盲腸内容物を接種した Tph1-/-無菌動物を示す ($n=3\sim6$ /群)。D~F の結果は、*L. ロイテリ* (*reuteri*) DSM 27131 または *L. カゼイ* (*casei*) LMG 6904 を接種した 14 日後の GF Tph1-/-マウスから得られたデータを表す ($n=3\sim6$ /群)。(A) データは、マウス盲腸微生物叢の接種によって、GF Tph1-/-マウスの ENS 中のセロトニンのレベルと比較して、近位結腸の腸ニューロン中のセロトニンのレベルが増加したことを示す。3 日後の ENS 中のセロトニンレベルは、CONV-R マウスとほぼ同じレベルに回復する。(B, C) データはまた、胃腸管におけるマウス盲腸微生物叢の存在が、成熟腸ニューロンの十分に確立されたマーカー (PGP 9.5 および Tu j 1) を増加させることを示す。D のデータは、単一のプロバイオティクス細菌株である *L. ロイテリ* (*reuteri*) DSM 27131 の接種後に近位結腸の腸ニューロンにおいてもセロトニンレベルが増加するのに対して、*L. カゼイ* (*casei*) LMG 6904 は腸ニューロンのセロトニンレベルに影響を及ぼさないことを示している。さらに、*L. ロイテリ* (*reuteri*) DSM 27131 の接種は、マーカー PGP 9.5 および Tu j 1 で可視化されるように (E, F)、腸ニューロンの成熟を増加させたが、*L. カゼイ* (*casei*) LMG 6904 は、腸ニューロンの成熟についての

10

20

30

40

50

これら2つのマーカーに影響を及ぼさなかった。データは、最大値、最小値、中央値、および四分位範囲を示す箱ひげ図として提示されている。各ドットは1匹のマウスを表す。統計学的有意性をスチューデントのt検定（データが正規分布している場合）またはマン・ホイットニー検定によって評価する前に、各群の正規性を分析した。3つ以上の群を比較する場合、一元配置分散分析を使用してデータを分析し、続いてデータが正規分布している場合は事後チューキーの多重比較検定を使用し、それ以外の場合はクラスカル・ウォリス検定を使用し、続いて事後ダンの多重比較を実施した。有意水準を* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ に設定した。

【図3】ヒトドナーから単離された細菌株によるセロトニン産生を示す。2人のヒトドナーから得られた合計199の分離株のうち、グラフに示すように、24の分離株がインビトロで嫌気性および／または好気性条件下でセロトニンを産生することが分かった。ドナー#1からの合計6つの分離株およびドナー#2からの1つの分離株は、嫌気性条件下でのインビトロで、DECTプラス中で1nMを超えるセロトニンを産生することが見出された一方で、ドナー#1からの6つの分離株全て、およびドナー#2からの15の分離株は、好気性条件下で1nMを超えるセロトニンを産生した。興味深いことに、これらの株の大部分は、嫌気性条件下と比較して、好気性条件下でほぼ2倍のセロトニンを産生することが見出された。配列決定分析により、セロトニン産生分離株が*L. ムコサエ* (*mucosae*) ($n=13$)、*L. プランタルム* (*plantarum*) ($n=6$)、およびエンテロコッカス属 (*Enterococcus*) ($n=1$) の株として同定された。4つの分離株を同定することができなかったが、これらの分離株を、エシェリキア属、赤痢菌、またはブレネリア (*Brenneria*) 細菌株と密接にアライメントされた。

【図4】選択された単離ヒト細菌株は、インビボで機能性セロトニンを産生する。嫌気性および好気性の両方の条件下においてインビトロでセロトニンを産生することが見出された、ヒトドナーから単離された細菌株のうちの2つ、*L. プランタルム* (*plantarum*) DSM 33662および*L. ムコサエ* (*mucosae*) DSM 33661を選択し、無菌Tph1-/-マウスに接種するために使用した。グラフは、これらの細菌株が、無菌Tph1-/-マウスで見られるレベルと比較して、局所的腸内腔内 (A)、および全身循環 (血清試料) (B) の両方においてインビボでセロニンレベルを増加させたことを示す。さらに、両株は近位結腸のENSのセロトニン陽性面積を増加させた (C)。したがって、これらの細菌株は、インビボで腸内腔 (盲腸) において局所的にセロニンレベルを上昇させることができ、この局所的に産生されたセロトニンは生物活性であり、全身循環 (血清) および近位結腸の腸神経系のニューロンに輸送され得る。データは、最大値、最小値、中央値、および四分位範囲を示す箱ひげ図として提示されている。各ドットは1匹のマウスを表す。

【図5】一実施形態による細菌株を選択する方法を示すフローチャートである。

【図6】一実施形態による、図5に示す方法への任意選択の追加工程を示すフローチャートである。

【図7】一実施形態による、図5に示す方法への任意選択の追加工程を示すフローチャートである。

【図8】別の実施形態による細菌株を選択する方法を示すフローチャートである。

【図9】好気性条件下で十分に増殖しない2つのラクトバチルス・ロイテリ (*Lactobacillus reuteri*) 株、A株およびB株は、培養中に酸素でチャレンジされ、より酸素耐性の高い新しい株に進化した。この方法によって、それぞれA株およびB株に由来する2つの新しい株、*L. ロイテリ* (*reuteri*) DSM 33632およびDSM 33634を同定した。培養24時間後の光学密度 (OD) を測定することで細菌株による増殖を定量したところ、株と比較して、いずれの新株も好気性条件下でODが有意に改善されていた (A)。この増殖の改善は、最大100世代にわたって安定していた (B, C)。より酸素耐性の高い新たな細菌株は、さらに数回の酸素ストレスによってさらにチャレンジされ、追加の凍結乾燥工程および加速された貯蔵ストレスによって、さらに酸素耐性が向上したさらなる株へとさらに進化した。これらのさらなるストレス

10

20

30

40

50

工程によって、2つのさらなる新たな細菌株、すなわちDSM 33632に由来するL.ロイテリ(reuteri)DSM 33633およびDSM 33634に由来するL.ロイテリ(reuteri)DSM 33635が同定および選択された。これらの2つの新たな株は、DSM 33632およびDSM 33634と比較して、好気性条件下でわずかに改善された増殖特性、ならびにA株およびB株と比較して、好気性条件下で有意に改善された増殖特性を示した(D)。

【図10】セロトニン産生乳酸菌株L.ロイテリ(reuteri)DSM 27131、DSM 32465、DSM 33632、DSM 33633、DSM 33634、DSM 33635およびDSM 33509、L.ムコサエ(mucosae)DSM 33291、DSM 33292、DSM 33293およびDSM 33661、ならびにL.プランタルム(plantarum)DSM 33662の粘液接着能力を示す。インビトロで好気性条件下においてセロトニンを産生することができ、インビボでセロトニンの全身プールに寄与することができるL.ロイテリ(reuteri)DSM 27131は、粘液に付着することもできる(A, B)。粘液付着性はまた、試験した他の全てのL.ロイテリ(reuteri)、L.ムコサエ(mucosae)およびL.プランタルム(plantarum)株についても観察された(A, B)。結果は、これらのセロトニン産生細菌株も腸粘膜に付着することができることを示している。

【発明を実施するための形態】

【0018】

TPH1は、胃腸管における内因性セロトニン産生を担う酵素である。それにもかかわらず、マウスモデルにおいてTph1遺伝子を欠失させた場合(すなわち、Tph1-/-動物が生じる)、一部のセロトニンが残存しており、セロトニンの一部は内因性のTPH1媒介機構で産生されるのではないことを示している。本発明の発明者らは、驚くべきことに、無菌としてTph1-/-マウス(すなわち、胃腸微生物叢が欠乏している動物)を再誘導すると、セロトニンがほぼ完全に枯渇することを見出した。次の驚くべき発見は、無菌Tph1-/-マウスに野生型マウス盲腸微生物叢またはセロトニン産生ラクトバチルス細菌株を接種すると、腸内のセロトニンレベルが十分に回復したことであった。これらの新規な発見は、正常な胃腸管内の細菌が、以前に知られていたように内因性(宿主)セロトニン産生に影響を及ぼすことができるだけでなく、驚くべきことに、自身による胃腸管内における局所的なセロトニン産生が可能であることも示唆した。次いで、本発明者らは、乳酸菌の特定の株がインビトロでの嫌気性条件下および好気性条件下の両方でセロトニンを産生することができることを見出した。さらに、特定の株について、セロトニン産生は、嫌気性条件下でのセロトニンの産生と比較して、好気性条件下で大きく改善された。したがって、本発明は、ある特定の細菌株、特に、通常は嫌気性である乳酸産生細菌のある特定の株が、好気性条件下でセロトニンを産生することができるという知見に基づいている。したがって、目的は、好気性条件下でセロトニンを産生し、細胞外に放出することができるような細菌をスクリーニングし、選択することである。好気性条件下でセロトニンを産生し、細胞外に放出することができるこれらの細菌は、特に、対象の胃腸管内で、例えば、腸の粘膜/上皮内層に近い、腸のより酸素化されたニッチでセロトニンを局所的に産生し、放出するように適合されている。これらの、腸のより酸素化されたニッチでは、腸クロム親和性細胞などの腸内分泌細胞が位置し、セロトニン受容体および/またはセロトニン輸送体(SERT)が発現される。選択された任意の細菌株は、好ましくは粘液に付着することができるか、または胃腸管の酸素化されたニッチに特有の比較的高い酸素分圧に曝される粘膜に少なくとも存在するか、もしくはその近くに存在することができる。

【0019】

このような細菌のスクリーニングは、乳酸産生細菌株を好気性条件下または嫌気および好気性条件下で培養し、好気性条件下のみで、または嫌気および好気性条件下の両方でセロトニンを産生できると特定された細菌を選択することによって、インビトロで行われ得る。対象に投与する場合、次いで選択された細菌をその対象の胃腸管内で局所

10

20

30

40

50

的にセロトニンを産生するために使用して、セロトニン欠乏症を有するか、またはセロトニン欠乏症に関連する疾患もしくは障害に罹患している対象におけるセロトニンのレベルを増加させることができる。

【0020】

そのような細菌のスクリーニングはまた、乳酸産生細菌株を与えられた無菌（GF）Tph1-/-哺乳動物対象を使用してインビボで行われ得る。次いで、GF Tph1-/-対象の胃腸管内での乳酸菌株によるセロトニン産生を、GF Tph1-/-対象から採取した身体試料で評価または分析して、乳酸菌株がセロトニン欠乏症またはセロトニン欠乏症に関連する疾患もしくは障害の治療に有効であるかどうかを決定することができる。

10

【0021】

さらに、微生物的に産生されたセロトニンは生物活性であり、胃腸管内で局所的に効果を有するだけでなく、胃腸管の上皮内層を超えて全身循環へと輸送されることもでき、その場合、胃腸系に関して末梢的に作用する、すなわち全身効果を有することができる。細菌により産生されたセロトニンが全身循環に達するためには、セロトニンの産生が、酸素レベルが腸内腔と比較して一般に高い、腸粘膜および腸上皮の近くで起こることが好ましい。したがって、特定の実施形態では、実施形態に従って選択されるセロトニン産生細菌はまた、好ましくは、胃腸管のより酸素化されたニッチにおいて粘液に付着することができ、または少なくともとも粘膜にもしくは粘膜の近くに存在することができ、かつ／または胃腸管の粘膜に定着することもでき、細菌と胃腸管の上皮細胞との間の近接性を確保している。

20

【0022】

さらに、乳酸産生細菌株によって産生されるセロトニンは、胃腸管の上皮細胞の近くで産生される場合、胃腸神経系（ENS）の成熟およびその中の伝達に影響を及ぼすなど、胃腸管自体に対する局所作用が可能である。ENSは、胃腸管の内層に埋め込まれた神経膠細胞および神経細胞からなり、この神経系は、例えば、胃腸系の運動制御および胃腸酵素の分泌を担う。さらに、この神経系は、アセチルコリン、ドーパミン、およびセロトニン経路を含む、多くの神経伝達物質を介して連絡し、それは中枢神経系における連絡と類似している。

【0023】

したがって、セロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する障害および疾患を治療するために、胃腸管でセロトニンを産生する乳酸産生細菌株を胃腸管内で局所的に使用することができるが、セロトニンが胃腸内層を越えて全身循環に、さらには末梢組織に輸送される場合には身体の他の部分でも使用することができる。

30

【0024】

乳酸菌株とも呼ばれる乳酸産生細菌株は、グラム陽性、低GC、耐酸性、一般に非孢子形成性、非呼吸性であり、炭水化物発酵の主要代謝最終産物として乳酸を産生することができる棒状または球状細菌である。乳酸産生細菌は嫌氣的に増殖するが、ほとんどの嫌気性菌とは異なり、耐気性、または相対的酸素耐性嫌気性菌として酸素の存在下でも増殖することができる。乳酸産生細菌は、一般に安全であると認識されており（GRAS）、ラクトバチルス目（*Lactobacillales*）の属が含まれ、これは、アエロコッカス属（*Aerococcus*）、カルノバクテリウム属（*Carnobacterium*）、エンテロコッカス属（*Enterococcus*）、オエノコッカス属（*Oenococcus*）、テトラゲノコッカス属（*Tetragenococcus*）、バゴコッカス属（*Vagococcus*）およびワイセラ属（*Weissella*）に加えて、ラクトバチルス属（*Lactobacillus*）、ロイコノストック属（*Leuconostoc*）、ペディオコッカス属（*Pediococcus*）、ラクトコッカス属（*Lactococcus*）およびストレプトコッカス属（*Streptococcus*）を含み、ビフィドバクテリウム目（*Bifidobacteriales*）のビフィドバクテリウム属（*Bifidobacterium*）も含まれる。

40

50

【0025】

過去数十年において、新たな分析ツールによって、科学者は多くの新しい細菌種を発見すること、加えて歴史的にラクトバチルス属 (*Lactobacillus*) の下にグループ化された種が互いにあまりにも異なっていたことを認識することが可能になった。したがって、プロバイオティクス群を正確で組織化した状態に保つために、ラクトバチルス属 (*Lactobacillus*) を25の異なる属に分けた。その結果、近年多くのプロバイオティクスに新たな属名が付与されている。したがって、ラクトバチルス・ロイテリ (*Lactobacillus reuteri*) の代替属名はリモシラクトバチルス・ロイテリ (*Limosilactobacillus reuteri*) であり、ラクトバチルス・ムコサエ (*Lactobacillus mucosae*) の代替属名はリモシラクトバチルス・ムコサエ (*Limosilactobacillus mucosae*) であり、ラクトバチルス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*) の代替属名はラクチプランチバチルス・プランタルム (*Lactiplantibacillus plantarum*) であり、ラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*) の代替属名はラクチカゼイバチルス・カゼイ (*Lacticaaseibacillus casei*) である。

10

【0026】

図5は、セロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療に使用するための細菌株を選択する方法を示すフローチャートである。方法は、好気性条件下で、トリプトファンを含む培地中で乳酸産生細菌株の細菌を培養することを含む、工程S1で始まる。次の工程S2は、培地またはその試料中の乳酸産生細菌株の細菌によって産生された任意のセロトニンを検出することを含む。方法はまた、培地またはその試料中にセロトニンが検出された場合、対象におけるセロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療に有効であるとして、工程S3において乳酸産生細菌株を選択することを含む。

20

【0027】

このような細菌は、したがって、腸のより酸素化されたニッチの条件で、例えば胃腸粘膜、ならびにセロトニン受容体および／またはセロトニン輸送体 (SERT) が発現される、また腸クロム親和性細胞などの特定の腸内分泌細胞が位置する腸の上皮内層の近くでセロトニンを産生する、それらの能力で選択される。

30

【0028】

図5に示す選択方法は、トリプトファンを含む培地中での乳酸産生細菌株の培養および試験を含む。トリプトファンは、セロトニンの産生における出発物質である。より詳細には、2つのアイソフォーム、TPH1およびTPH2が存在するトリプトファンヒドロキシラーゼ (TPH) (EC 1.14.16.4) が、トリプトファンから5-ヒドロキシトリプトファン (5-HTP) を合成する。次いで、5-HTPは、芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC) (EC 4.1.1.28) によってセロトニン (5-HT) に変換される。したがって、試験される乳酸産生細菌株の細菌が培養される培地は、乳酸産生細菌株による任意のセロトニンの産生のための出発物質としてトリプトファンを含む。

【0029】

本発明によれば、乳酸産生細菌株の細菌は、好気性条件下でトリプトファン含有培地に接種される。したがって、選択された乳酸産生細菌株は、少なくとも好気性条件下でセロトニンを産生することができなければならない。酸素分圧の差は、トリプトファンなどの芳香族L-アミノ酸の細菌代謝を異なる代謝産物にシフトするという点で、細菌代謝に有意な影響を及ぼし得る。これは、所与の乳酸産生細菌株が、異なる酸素分圧、すなわち好気性条件対嫌気性条件で培養された場合に、トリプトファンから異なる代謝産物を産生することを意味する。言い換えれば、好気性条件下でセロトニンを産生することができる乳酸産生菌は、必ずしも嫌気性条件下でセロトニンを産生するとは限らず、逆に、嫌気性条件下でセロトニンを産生することができる乳酸産生菌は、必ずしも好気性条件下でセロトニンを産生するとは限らない。

40

50

【0030】

腸内および胃内の酸素分圧は、一般に、小腸（十二指腸、空腸および回腸からなる）および大腸（盲腸、直腸および肛門管からなる結腸）の内部と比較して、腸粘膜に近い方が高い。これは、腸上皮に存在する酸素が勾配に対応し、粘膜に近くなると酸素濃度が上がり、管腔側に向かって酸素濃度が下がることを意味する。したがって、図5の工程S1は、腸粘膜に近い好気性条件または酸素化ニッチを模倣するために、好気性条件下、すなわち酸素の存在下で実施される。図5に示す方法に従って選択された乳酸産生細菌株は、好ましくは、胃腸管の腸粘膜または上皮内層に付着および／または定着することができるか、または少なくとも腸粘膜に、またはその近くに存在することができ、そこで、図7に関連してさらに論じるように、比較的高い酸素分圧に曝される。これは、対象の胃腸系においてインビボでセロトニンを産生するために、および微生物的に産生されたセロトニンが対象によって胃腸管から全身循環に効率的に取り込まれるために、図5に示される方法で選択される乳酸産生細菌株は、腸粘膜またはその近くの条件を模倣する好気性条件でのセロトニン産生が可能でなければならないことを意味する。

10

【0031】

用語「嫌気性菌」および「嫌気性」という用語は、嫌気性培養条件に関連して本明細書で使用され、酸素（ O_2 ）を含まない条件、すなわち溶存酸素および培養チューブのヘッドスペースが0%または0 ppmの O_2 、少なくとも0%または0 ppmに近い O_2 を有することを特徴とするような培養条件を包含する。例示的な例として、嫌気性培養は、気密血清バイアルまたはハンゲートチューブなどの密閉培養容器内の培地中で乳酸産生細菌を培養することを含み得る。培地は、乳酸産生細菌を添加する前に脱気してもよい。加えて、または代替的に、培養容器は、容器の閉鎖の前または後に、例えば N_2 でパージされてもよく、または代替的に15～20分間煮沸され、窒素流下で冷却されて、培地中に存在する溶存酸素または密閉培養容器内の封入ガス容積を除去してもよい。

20

【0032】

対応して、用語「好気性菌」および「好気性」という用語は、好気性培養条件に関連して本明細書で使用され、100%飽和または8.87 ppmの溶存酸素に相当する、培養チューブのヘッドスペース中の遊離酸素（ O_2 ）の存在を特徴とするような培養条件を包含する。増殖培地中の溶存酸素の初期量は、任意の検出可能なレベルから、例えば、29.3%飽和に相当する2.41 ppmから、好ましくは64%飽和に相当する4.8 ppmから、好ましくは約103%飽和に相当する9 ppmまでの溶存酸素の範囲であり得る。大気中の酸素レベルは約21%である。例示的な例として、好気性培養は、開放培養容器内の培地中で乳酸産生細菌を培養することを含み得る。あるいは、密閉培養容器に酸素を添加すれば、密閉培養容器内で乳酸産生細菌を培養することができる。

30

【0033】

図5の工程S1は、所定の期間中に実行することができる。例えば、乳酸産生細菌株の細菌を培地中で好氣的に少なくとも1時間、少なくとも複数時間、すなわち少なくとも2時間、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または12時間インキュベートし、培養することができる。乳酸産生細菌株の細菌は、例示的であるが非限定的な例として、より長い期間、例えば24時間、36時間、48時間または60時間培養することもできる。

40

【0034】

一実施形態では、図5の工程S2は、培地から試料を採取すること、および試料中の乳酸産生細菌株の細菌によって産生された任意のセロトニンを検出することを含む。一実施形態では、培地の試料は無細胞試料である。そのような実施形態では、試料を細胞含有ペレットとセロトニンを含み得る上清とに分離するために、試料中に存在する任意の細胞、特に細菌細胞を最初に、例えば試料を1回以上の遠心分離に、例えば10,000×gで1～4分間、例えば2分間供することによって除去する。次いで図5の工程S2は、上清中の乳酸産生細菌株によって産生された任意のセロトニンを検出することも含む。加えて、または代替的に、培地試料は、細菌を捕捉するが、同時に培地試料中のセロトニンがフ

50

フィルターを通過できるように構成された1つ以上のフィルターを通して濾過されてもよい。そのような実施形態では、セロトニンの検出を濾液中で行うことができる。

【0035】

セロトニンは、任意の公知のセロトニン測定アッセイまたは技術を使用して、培地、試料または上清中で測定することができる。例えば、セロトニンは、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）または質量分析（MS）アッセイを使用して測定することができる。

【0036】

セロトニンの測定により、培地中、試料中または特定の乳酸産生細菌株からの上清中のセロトニンが同定される場合、これにより、乳酸産生細菌株がセロトニンを産生し、細胞外に放出することができることが確認され、試験された乳酸産生細菌株は、セロトニンの産生に有効であり、それにより、対象のセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療にも有効であるとして図5の工程S3で選択されるだろう。

【0037】

したがって、培地中のセロトニンの存在を検出することは、培地の試料、または培地の加工された試料、例えば培地試料の遠心分離後の上清または培地試料の濾過後の濾液中のセロトニンの存在を検出することも包含し、これによって工程S2では、乳酸産生細菌株の細菌は、セロトニンを産生することができるだけでなく、培地中にセロトニンを細胞外放出することもできる。このようなセロトニンの細胞外放出は、対象におけるセロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療のための乳酸産生細菌株の使用に重要である、というのも、細菌的に産生されたセロトニンは、対象の胃腸管に局所的に到達するか、かつ／または上皮によって吸収されて全身循環に到達する必要があるからである。

【0038】

一実施形態では、培地は、トリプトファンに加えて炭素源を含む。試験する乳酸産生細菌株によって使用され得る任意の炭素源は、限定されないがグルコースを含み、培地に含めることができる。培地はまた、好ましくは、アミノ酸などの窒素化合物の供給源；マンガニン；サルファート；ビタミンおよび、例えば酵母エキスおよび／または牛肉エキスの形態での成長因子を含む。図5の方法で使用することができる培地の例は、トリプトファン脱炭酸およびセロトニンの微生物的産生を促進するように設計された新規トリプトファン修飾脱炭酸酵素（DECT）ブロスである。そのようなDECTブロスまたは培地は、トリプトファン、グルコース、牛肉エキスおよび酵母エキスを含む。

【0039】

一実施形態では、培地は、培地100ml当たり、少なくとも0.4g／100mlのトリプトファン、好ましくは少なくとも0.5g／100ml、例えば少なくとも0.6g／100ml、少なくとも0.7g／100ml、より好ましくは少なくとも0.8g／100ml、例えば少なくとも0.9g／100mlまたは約1gのトリプトファンを含む。

【0040】

現在の好ましい培地、上述のDECTブロスは、好ましくはトリプトファン1g／100ml、グルコース0.05g／100ml、牛肉エキス0.5g／100mlおよび酵母エキス0.1g／100mlを含む。

【0041】

一実施形態では、方法は、図6に示すような追加の工程を含む。そのような実施形態では、方法は工程S10で始まるか、または図5の工程S2から継続する。工程S10は、嫌気性条件下で、トリプトファンを含む培地中で乳酸産生細菌株の細菌を培養することを含む。方法は次いで、嫌気性条件下で培養された場合に、培地またはその試料中の乳酸産生細菌株の細菌によって産生された任意のセロトニンを検出することを含む工程S11へと続く。工程S10は、好ましくは、培養時間、培地などを含む、図5の工程S1に関連して前述したものと同様の方法で行われるが、図5の工程S1では、乳酸産生株の細菌が好気性条件下で培養されるのに対して、図6の工程S10では、乳酸産生株の細菌が嫌気

10

20

30

40

50

性条件下で培養されるという点が異なる。これに対応して、図6の工程S11におけるセロトニンの検出を、図5の工程S2に関連して論じたのと同じ方法で行うことができた。

【0042】

この実施形態は、好ましくは、図6に示す工程S12も含む。この工程S12は、好気性条件下で培養した場合（図5の工程S2参照）の培地またはその試料中で検出されたセロトニンの濃度と、嫌気性条件下で培養した場合（図6の工程S11参照）の培地またはその試料中で検出されたセロトニンの濃度との比または商を計算することを含む。次いで、方法は、計算された比または商を1.0などの閾値と比較する任意選択の工程S13に続く。比または商が閾値以上、好ましくは閾値より大きい、例えば1.0以上、好ましくは1.0より大きい場合、方法は図5の工程S3に続く。したがって、この実施形態では、工程S3は、比が1.0以上、好ましくは1.0より大きい場合、対象におけるセロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療に有効であるとして、乳酸産生細菌株を選択することを含む。

10

【0043】

特定の実施形態では、任意選択の工程S13で比または商が比較される閾値は、1.5、好ましくは2.0、例えば2.5、より好ましくは3.0、例えば3.5、またはさらに高く、例えば4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、またはさらに10.0である。閾値は、いくつかの実施形態では、さらに高く、例えば15、20、25、30、40または50またはさらにそれ以上であってもよい。

20

【0044】

特定の乳酸産生細菌株の細菌のセロトニン産生効率は、好気性条件下で培養した場合、嫌気性条件下で培養した場合と比較して著しく向上する。いくつかの乳酸産生細菌株では、その試料の培地中で検出されるセロトニンの量は非常に少なく、セロトニンを検出するために使用されるアッセイの検出限界、すなわち特定のアッセイを使用して正確に検出することが可能なものを下回る場合さえある。したがって、そのような乳酸産生細菌株は、非常に高い比または商を有する。したがって、任意の実施形態では、図6に示されるような方法は、嫌気性条件下で培養された場合の、工程S11で検出された培地またはその試料におけるセロトニンの濃度が閾値未満であるかどうかを決定する追加の任意の工程（図6には示されない）を含み、閾値は、培地またはその試料中のセロトニンを検出し、検出されたセロトニンの濃度を決定するために工程S11で使用されるアッセイの検出限界などである。この任意の実施形態では、嫌気性条件下で培養した場合の工程S11で検出された培地での濃度がこの閾値以上である場合にのみ、比または商が工程S12で計算される。

30

【0045】

乳酸産生細菌株が好気性条件で培養された場合にセロトニンを産生および放出することができるが、嫌気性条件で培養された場合にはそうでない場合、上清中のセロトニンの濃度が、さらに後述するように、少なくとも0.4 nM、好ましくは少なくとも0.5 nM、例えば少なくとも0.75 nMまたは少なくとも1 nM、好ましくは少なくとも2 nM、より好ましくは少なくとも3 nM、例えば少なくとも4 nMまたは少なくとも5 nMまたは少なくとも6 nMまたは少なくとも7 nMである場合、図6に示される実施形態に従って、対象のセロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療に有効であるとして、工程S3において乳酸産生細菌株を依然として選択することができる。

40

【0046】

それにより、本発明のこの実施形態は、好気性条件下で特に良好にセロトニンを産生する、すなわち、嫌気性条件下と比較して好気性条件下で少なくとも多くの、好ましくはより多くのセロトニンを産生する乳酸菌株を選択する。ほとんどの乳酸産生細菌株は嫌気性であり、その一部は嫌気性条件下でセロトニンを産生し得る。しかしながら、本発明は、好気性条件下で生存および増殖することができるだけでなく、そのような好気性条件下でセロトニンを産生および細胞外放出することもできる乳酸菌株を選択する。さらに、図6

50

に示されるような実施形態に従って選択された乳酸菌株は、実際には、嫌気性条件と比較して、好気性条件下で少なくとも同じ量、またはそれ以上の量のセロトニンを産生する。そのような乳酸菌株は、酸素レベルが胃腸管の他の部分よりも相対的に高い対象の胃腸系または管のニッチに存在する場合、生物学的に有効な量のセロトニンを産生および分泌することができ、したがってセロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療での使用に特に適している。

【0047】

一実施形態では、図5の工程S2は、培地またはその試料中の乳酸産生細菌株によって産生されたセロトニンの濃度を測定することを含む。工程S3は、この実施形態では、培地またはその試料中のセロトニンの濃度が少なくとも定義された閾値以上である場合、対象のセロトニン欠乏症を治療するのに有効であるとして乳酸産生細菌株を選択することを含む。

10

【0048】

培地またはその試料中で測定される所与の乳酸産生細菌株のセロトニンの濃度は、少なくとも部分的に、セロトニンを分析するために使用されるアッセイまたは技術、例えばELISA対MSに依存する。したがって、上記の閾値の値は、培地中のセロトニンの濃度を測定するために使用される特定のアッセイに依存する。

【0049】

特定の実施形態では、乳酸産生細菌株の細菌を、トリプトファン含有培地、好ましくはDECT培地で24時間好気性条件下で培養し、続いて培地試料を採取し、培地試料を少なくとも一回の遠心分離に供して上清およびペレットを得る。そのような場合、通常の質量分析アッセイを使用して、細菌乳酸産生細菌株によって産生されたセロトニンの濃度を上清で測定する。この実施形態では、工程S3は、上清中のセロトニンの濃度が少なくとも0.4 nM、好ましくは少なくとも0.5 nM、例えば少なくとも0.75 nMまたは少なくとも1 nM、好ましくは少なくとも2 nM、より好ましくは少なくとも3 nM、例えば少なくとも4 nMまたは少なくとも5 nMまたは少なくとも6 nMまたは少なくとも7 nMである場合、対象のセロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療に有効であるとして、乳酸産生細菌株を選択することを含む。

20

【0050】

一実施形態では、方法は、図7に示すような追加の工程S15を含む。方法は、この工程S15で開始されるか、または図5の工程S2から、または実際には図6の工程S13から継続する。工程S15は、乳酸産生細菌株の細菌が腸粘液への付着および／または胃腸粘膜への付着が可能であるかどうかを判定することを含む。この実施形態では、図5の工程S3は、セロトニンが培地またはその試料中に検出された場合、および乳酸産生細菌株の細菌が腸粘液に付着することができ、かつ／または胃腸粘膜に付着することができる場合、対象のセロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療に有効であるとして乳酸産生細菌株を選択することを含む。

30

【0051】

この実施形態はまた、図6に示す実施形態と組み合わせることができ、すなわち、比と閾値との比較に基づいて、および乳酸産生細菌株の細菌が腸粘液に付着することができ、かつ／または胃腸粘膜に付着することができるかどうかに基づいて選択を行うことができる。

40

【0052】

ムチン（高分子量の高グリコシル化タンパク質のファミリー）を主な構成成分とする粘液は、哺乳動物および鳥類、および両生類、魚類、ヌタウナギ、カタツムリおよびナメクジの粘膜によって産生される。したがって、腸粘液に付着することにより、乳酸産生細菌株の細菌は胃腸管の粘膜に付着することができる。

【0053】

例えば、例6に開示されているように、乳酸産生細菌株の細菌が胃腸管の粘膜に付着する能力を調べることができる。簡単に説明すると、胃腸粘膜を抽出し、表面にプレーティ

50

ングする。次いで、乳酸産生細菌株の細菌を、プレーティングされた粘液に添加し、粘液に付着させる。次いで、非結合細菌を1回以上の洗浄によって除去する。次いで付着細菌の量を、粘液上で直接、または酵素処理、例えばトリプシン処理などによって最初に付着細菌を放出し、次いで放出された細菌を定量することによって間接的に定量することができる。

【0054】

一実施形態において、乳酸産生細菌株は、例6に示されるように、ラクトバチルス・ロイテリ (*Lactobacillus reuteri*) DSM 27131の粘液接着能力と少なくとも同程度に良好な粘液接着性を有する。このような実施形態では、図7の工程S15は、乳酸産生細菌株の細菌が、L.ロイテリ (*reuteri*) DSM 27131の細菌の粘液接着能力と同等またはそれ以上の粘液接着能力を有するかどうかを判定することを含む。この実施形態では、図5の工程S3は、セロトニンが培地またはその試料中に検出される場合、および乳酸産生細菌株の細菌がL.ロイテリ (*reuteri*) DSM 27131の細菌の粘液接着能力と同等またはそれ以上の粘液接着能力を有する場合、対象のセロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療に有効であるとして乳酸産生細菌株を選択することを含む。

【0055】

上記の方法およびその実施形態は、対象におけるセロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療に有効な乳酸産生細菌を同定および選択するためのインビトロ方法である。

【0056】

しかしながら、本発明はこれに限定されない。図8は、セロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療に使用するための細菌株を選択する、インビボ方法として実施される方法を示すフローチャートである。方法は、工程S20において、無菌 (GR) Tph1-/-対象に乳酸産生細菌株の細菌を供給する、すなわち接種することを含む。次の工程S21は、GF Tph1-/-対象から採取した身体試料で乳酸産生細菌株の細菌によって産生された任意のセロトニンを検出することを含む。方法はさらに、工程S22において、身体試料中にセロトニンが検出された場合、対象におけるセロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療に有効であるとして、乳酸産生細菌株を選択することを含む。

【0057】

したがって、この方法では、酵素TPH1の産生を欠く無菌試験対象に関する試験対象は、すなわちTph1ノックアウト対象である。GF Tph1-/-対象は、非ヒトGF Tph1-/-動物対象であり、好ましくは、マウス、ラット、モルモット、ブタ、ブタ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ウマ、非ヒト霊長類、サルまたは鳥からなる群から選択され、より好ましくは、マウスまたはラットである。GF Tph1-/-マウスは、例1に開示されるように得ることができる。

【0058】

図8に示される方法において試験されるべき乳酸産生細菌株の細菌は、例えば、細菌を含む可溶化粉末、カプセルもしくは錠剤、または細菌を含む溶液の形態で、GF Tph1-/-対象に供給、すなわち、接種、例えば、強制経口投与される。

【0059】

GF Tph1-/-対象から身体試料を採取し、任意のセロトニンの存在について工程S21で分析する。対象は無菌であり、すなわち、胃腸微生物叢が欠けているか、または不足しており、さらに、内因性セロトニン産生の大部分を担う酵素であるTPH1を欠いている。したがって、工程S21で身体試料で検出されたセロトニンは、工程S20で対象に与えられた乳酸産生細菌株の細菌、または接種された細菌から得られた細菌によって産生される。

【0060】

身体試料は、GF Tph1-/-対象から採取された任意の試料であり得、対象がT

p h 1 - / - でない場合、すなわち、同じ種の非 G F T p h 1 + / + 対象である場合、通常、セロトニンを含有するであろう。例えば、試料は、胃腸試料、対象から、例えば胃腸組織から採取された組織試料、または体液試料、例えば血液試料、血漿試料もしくは血清試料であり得る。特定の実施形態では、身体試料は体液試料、好ましくは血液試料、血漿試料または血清試料である。このような体液試料中で検出されたセロトニンは、乳酸産生細菌株の細菌が G F T p h 1 - / - 対象の胃腸系においてセロトニンを産生し、細胞外で産生することができることを示すだけでなく、細菌的に産生されたセロトニンが取り込まれ、G F T p h 1 - / - 対象の全身循環、すなわち血液系に輸送されることも示す。

【0061】

一実施形態では、乳酸産生細菌株はラクトバチルス細菌株である。特定の実施形態では、ラクトバチルス細菌株は、L. ロイテリ (reuteri) 細菌株、L. ムコサエ (mucosae) 細菌株および L. プランタルム (plantarum) 細菌株からなる群から選択される。

10

【0062】

一実施形態では、図5～図8のいずれかに示されるような本発明に従って選択される乳酸産生細菌株は、セロトニンを産生し、細胞外に放出することができるだけでなく、対象に投与された場合に内因性セロトニン産生を誘導することもできる。

【0063】

別の実施形態では、図5～図8のいずれかに示されるような本発明に従って選択される乳酸産生細菌株は、セロトニンを産生し、細胞外に放出することができるが、対象に投与された場合に内因性セロトニン産生を誘導することはできない。

20

【0064】

本発明の別の態様は、対象におけるセロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療に使用するための、好気性条件下でセロトニンを産生し、細胞外に放出することができる乳酸産生細菌株に関する。

【0065】

一実施形態では、乳酸産生細菌株はまた、嫌気性条件下でセロトニンを産生し、細胞外に放出することができるが、好気性条件下で乳酸産生細菌株の細菌によって産生され、細胞外で産生されたセロトニンの量と、嫌気性条件下で乳酸産生細菌株の細菌によって産生され、細胞外で産生されたセロトニンの量との比は、1以上、好ましくは1より大きい。

30

【0066】

一実施形態では、乳酸産生細菌株はさらに、腸粘液への付着および／または胃腸粘膜への付着が可能である。

【0067】

一実施形態では、乳酸産生細菌株は、対象の腸粘膜において、または少なくともそれに関連してセロトニンを産生することができる。

【0068】

本明細書で前述したように、乳酸産生細菌株の細菌が粘液に付着することができるか、または少なくとも胃腸粘膜、特に腸粘膜の近くに存在することができ、それによって、乳酸産生細菌株の細菌によって産生および分泌されたセロトニンの腸粘膜による、特に腸上皮による取り込みを促進すれば、一般に好ましい。次いで、腸上皮によって取り込まれたセロトニンは、対象の特定の位置に末梢的または全身的に輸送され得、そこでセロトニンはその生物学的効果を発揮する。

40

【0069】

本明細書では、「治療」という用語は、特定の医学的状態、疾患または障害の症状の緩和、ならびに症状の発症の予防の両方を包含し得る。したがって、この用語は、セロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患の予防、リスクの低減、減退、阻害および予防を含む。

【0070】

一実施形態では、好気性条件下でセロトニンを産生することができる乳酸産生細菌株は

50

、上記および図5～図8のいずれかに示される方法またはその実施形態に従って選択される。

【0071】

セロトニンは、行動、血小板活性化および凝固、腸運動性および腸神経系（ENS）恒常性および活性の調節、腸管免疫系活性、エネルギー代謝（絶食適応、脂肪組織の褐色化および脂肪分解、肝臓グルコース産生、インスリン分泌）、腸脳軸活性ならびに骨の代謝および恒常性を含むいくつかの生理学的機能を有する。したがって、セロトニンレベルの不均衡、特に欠乏は、対象における多くの生物学的プロセスおよび機能に異常を引き起こし得る。

【0072】

一実施形態では、セロトニン欠乏症に関連する疾患は、本明細書ではセロトニン依存性疾患とも呼ばれ、不安、憂鬱感、攻撃性、記憶不良、摂食障害、強迫性障害、パニック障害、心的外傷後ストレス障害、社会不安障害、胃腸運動性障害（便秘など）、過敏性腸症候群（IBS）、炎症性腸疾患（IBD）、心血管疾患、骨粗鬆症、自己免疫性多腺性内分泌不全症・カンジダ症・外胚葉ジストロフィー（APECED）、骨減少症、骨量減少状態、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される疾患または障害である。

【0073】

一実施形態では、セロトニン欠乏症に関連する疾患は、IBS、IBD、心血管疾患、骨粗鬆症、胃腸運動性障害、APECED、骨減少症および骨量減少状態からなる群から選択される。

【0074】

一実施形態では、セロトニン欠乏症に関連する疾患は、中枢神経系の疾患または障害、例えば不安、憂鬱感、攻撃性、記憶不良、摂食障害、強迫性障害、パニック障害、心的外傷後ストレス障害、および社会不安障害からなる群から選択されるものである。

【0075】

好ましい実施形態では、セロトニン欠乏症に関連する疾患は、胃腸系の疾患または障害、例えば胃腸運動性障害、IBSまたはIBDである。

【0076】

一実施形態では、セロトニン欠乏症に関連する疾患は、骨粗鬆症、骨減少症および骨量減少状態、例えば糖質コルチコイド関連骨量減少に関連する疾患である。

【0077】

一実施形態では、乳酸産生細菌株はラクトバチルス細菌株である。特定の実施形態では、ラクトバチルス細菌株は、L.ロイテリ（reuteri）株、L.ムコサエ（mucosae）株およびL.プランタルム（plantarum）株からなる群から選択される。

【0078】

一実施形態では、L.ロイテリ（reuteri）株は、L.ロイテリ（reuteri）DSM 32846、L.ロイテリ（reuteri）DSM 32848、L.ロイテリ（reuteri）DSM 32849、L.ロイテリ（reuteri）DSM 27131、L.ロイテリ（reuteri）DSM 33509、L.ロイテリ（reuteri）DSM 33632、L.ロイテリ（reuteri）DSM 33633、L.ロイテリ（reuteri）DSM 33634、L.ロイテリ（reuteri）DSM 33635、L.ロイテリ（reuteri）ATCC PTA 5289、L.ロイテリ（reuteri）DSM 17938、L.ロイテリ（reuteri）ATCC PTA 6475、およびL.ロイテリ（reuteri）DSM 32465からなる群から選択される。

【0079】

特定の実施形態では、L.ロイテリ（reuteri）株は、L.ロイテリ（reuteri）DSM 32846、L.ロイテリ（reuteri）DSM 32848、L.ロイテリ（reuteri）DSM 32849、L.ロイテリ（reuteri）DSM

10

20

30

40

50

27131、*L. ロイテリ (reuteri)* DSM 33509、*L. ロイテリ (reuteri)* DSM 33632、*L. ロイテリ (reuteri)* DSM 33633、*L. ロイテリ (reuteri)* DSM 33634、*L. ロイテリ (reuteri)* DSM 33635、*L. ロイテリ (reuteri)* ATCC PTA 5289、および *L. ロイテリ (reuteri)* DSM 32465 からなる群から選択される。

【0080】

別の実施形態では、*L. ロイテリ (reuteri)* 株は、*L. ロイテリ (reuteri)* DSM 32846、*L. ロイテリ (reuteri)* DSM 32848、*L. ロイテリ (reuteri)* DSM 32849、*L. ロイテリ (reuteri)* DSM 27131、*L. ロイテリ (reuteri)* DSM 33509、*L. ロイテリ (reuteri)* DSM 33632、*L. ロイテリ (reuteri)* DSM 33633、*L. ロイテリ (reuteri)* DSM 33634、*L. ロイテリ (reuteri)* DSM 33635、*L. ロイテリ (reuteri)* DSM 17938、および *L. ロイテリ (reuteri)* DSM 32465 からなる群から選択される。

【0081】

さらなる実施形態では、*L. ロイテリ (reuteri)* 株は、*L. ロイテリ (reuteri)* DSM 32846、*L. ロイテリ (reuteri)* DSM 32848、*L. ロイテリ (reuteri)* DSM 32849、*L. ロイテリ (reuteri)* DSM 27131、*L. ロイテリ (reuteri)* DSM 33509、*L. ロイテリ (reuteri)* DSM 33632、*L. ロイテリ (reuteri)* DSM 33633、*L. ロイテリ (reuteri)* DSM 33634、*L. ロイテリ (reuteri)* DSM 33635、*L. ロイテリ (reuteri)* ATCC PTA 6475、および *L. ロイテリ (reuteri)* DSM 32465 からなる群から選択される。

【0082】

ラクトバチルス・ロイテリ (*Lactobacillus reuteri*) DSM 27131 は、ブダペスト条約に従って、2013年4月18日に Leibniz Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany) に寄託された。

【0083】

ラクトバチルス・ロイテリ (*Lactobacillus reuteri*) DSM 32846、DSM 32848 および DSM 32849 は、ブダペスト条約に従って、2018年7月4日に Leibniz Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany) に寄託された。

【0084】

ラクトバチルス・ロイテリ (*Lactobacillus reuteri*) DSM 33509 は、ブダペスト条約に従って、2020年4月23日に Leibniz Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany) に寄託された。

【0085】

ラクトバチルス・ロイテリ (*Lactobacillus reuteri*) DSM 32465 は、ブダペスト条約に従って、2017年3月21日に Leibniz Institute DSMZ-German collection of Microorganisms and Cell Cultures (Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany) に寄託された。

【0086】

ラクトバチルス・ロイテリ (*Lactobacillus reuteri*) ATCC

PTA 5289は、ブダペスト条約に従って、2003年6月25日にAmerican Type Culture Collection (10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, U.S.) に寄託された。
【0087】

ラクトバチルス・ロイテリ (*Lactobacillus reuteri*) DSM 33632、DSM 33633、DSM 33634およびDSM 33635は、ブダペスト条約に従って、2020年9月9日にLeibniz Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany) に寄託された。

10

【0088】

ラクトバチルス・ロイテリ (*Lactobacillus reuteri*) DSM 17938は、ブダペスト条約に従って、2006年1月30日にDSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany) に寄託された。

【0089】

ラクトバチルス・ロイテリ (*Lactobacillus reuteri*) ATCC PTA 6475は、ブダペスト条約に従って、2004年12月21日にAmerican Type Culture Collection (10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, U.S.) に寄託された。

20

【0090】

特定の実施形態では、L. ロイテリ (*reuteri*) 株は、L. ロイテリ (*reuteri*) DSM 32846、L. ロイテリ (*reuteri*) DSM 32848、L. ロイテリ (*reuteri*) DSM 32849、L. ロイテリ (*reuteri*) DSM 27131、L. ロイテリ (*reuteri*) DSM 33509、L. ロイテリ (*reuteri*) DSM 33632、L. ロイテリ (*reuteri*) DSM 33633、L. ロイテリ (*reuteri*) DSM 33634、L. ロイテリ (*reuteri*) DSM 33635、およびL. ロイテリ (*reuteri*) DSM 32465からなる群から選択される。

30

【0091】

別の実施形態では、L. ロイテリ (*reuteri*) 株は、L. ロイテリ (*reuteri*) DSM 33632、L. ロイテリ (*reuteri*) DSM 33633、L. ロイテリ (*reuteri*) DSM 33634、L. ロイテリ (*reuteri*) DSM 33635、およびL. ロイテリ (*reuteri*) DSM 33509からなる群から選択される。

【0092】

さらなる実施形態では、L. ロイテリ (*reuteri*) 株は、L. ロイテリ (*reuteri*) DSM 33632、L. ロイテリ (*reuteri*) DSM 33633、L. ロイテリ (*reuteri*) DSM 33634、およびL. ロイテリ (*reuteri*) DSM 33635からなる群から選択される。これらのL. ロイテリ (*reuteri*) 株は、以下に記載されるように、酸素耐性がより高く、長期間の貯蔵に対して安定して生存可能であるように進化してきた。

40

【0093】

いくつかのラクトバチルス株は、嫌気性条件下で良好に増殖するが、好気性条件下では増殖しない。したがって、酸素耐性が低い2つのL. ロイテリ (*reuteri*) 株、A株およびB株は、酸素によってチャレンジされ (酸素ストレス)、それによって実験室制御環境で強制的に新しい株へと進化させられた、すなわち積極的に改変または適応された。この方法によって、2つの新たな株が同定され、L. ロイテリ (*reuteri*) DS

50

M 33632は親株Aに由来すると同定され、L. ロイテリ (*reuteri*) DSM 33634は親株Bに由来すると同定された。これらの新たな株は両方とも、新たに開発され改善された特性を示し、これらのうちの一つは酸素耐性の増加であり、これにより、100世代まで好気性条件下で著しく良好に増殖した(図9A)(図9Bおよび図9C)。
【0094】

さらに、プロバイオティクス製品に使用するための細菌培養物の保存安定性を改善することが一般的に必要とされており、これには、プロバイオティクス製品の貯蔵寿命を延ばすために、細菌の凍結乾燥プロセスに対する耐性を高めること、および長期保存中の安定性を高めることの両方が含まれる。したがって、酸素耐性が向上した新たな細菌株は、それらの好気性条件に対する耐性をさらに高めるためのより多い数回の酸素ストレス、ならびに追加の凍結乾燥および加速貯蔵ストレスを含む実験室制御環境でさらにチャレンジされ、それによってさらに2つの細菌株、DSM 33632に由来するL. ロイテリ (*reuteri*) DSM 33633およびDSM 33634に由来するL. ロイテリ (*reuteri*) DSM 33635が同定および選択された。これらの追加の2つの新たな株は、さらなる凍結乾燥工程および加速貯蔵ストレスに耐性があるだけでなく、DSM 33632およびDSM 33634と比較して、わずかに改善した好気性条件下での増殖特性を示し(図9D)、親株Aおよび親株Bと比較して、有意に改善した好気性条件下での増殖特性を示した。4つの改変株、L. ロイテリ (*reuteri*) DSM 33632、DSM 33633、DSM 33634およびDSM 33635の全てが、これらの適応／進化した特性を示し、少なくとも100世代にわたって安定したままであることが分かった。

【0095】

特定の実施形態では、L. ロイテリ (*reuteri*) 株は、L. ロイテリ (*reuteri*) DSM 33509である。このL. ロイテリ (*reuteri*) 株は、長期間の保存の間の生存力を増加する目的で安定な細菌株に進化するように、さらに胃腸管における生存率を改善するようにチャレンジされた。より詳細には、L. ロイテリ (*reuteri*) 株DSM 33509は、多段階選択プロセスでその親株から改変されており、多段階選択プロセスは、細菌の培養および凍結乾燥、ならびに凍結乾燥工程を生き延びたコロニーの選択を含み、胆汁に対する耐性が増加し、粘液に対する接着性が増加した株をもたらした。

【0096】

一実施形態では、L. ムコサエ (*mucosae*) 株は、L. ムコサエ (*mucosae*) DSM 33291、L. ムコサエ (*mucosae*) DSM 33292、L. ムコサエ (*mucosae*) DSM 33293およびL. ムコサエ (*mucosae*) DSM 33661からなる群から選択される。

【0097】

L. ムコサエ (*mucosae*) DSM 33291、DSM 33292およびDSM 33293は、ブダペスト条約に従って、2019年9月20日にLeibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany) に寄託された。

【0098】

L. ムコサエ (*mucosae*) DSM 33661は、ブダペスト条約に従って、2020年10月14日にLeibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany) に寄託された。

【0099】

一実施形態では、L. プランタルム (*plantarum*) 株は、L. プランタルム (*plantarum*) DSM 33295およびL. プランタルム (*plantarum*)

) D S M 3 3 6 6 2 からなる群から選択される。

【0100】

L. プランタルム (plantarum) D S M 3 3 2 9 5 は、ブダペスト条約に従って、2019年10月9日にLeibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany) に寄託された。

【0101】

L. プランタルム (plantarum) D S M 3 3 6 6 2 は、ブダペスト条約に従って、2020年10月14日にLeibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany) に寄託された。

10

【0102】

特定の実施形態では、乳酸菌株は、L. ロイテリ (reuteri) D S M 3 3 6 3 2、L. ロイテリ (reuteri) D S M 3 3 6 3 3、L. ロイテリ (reuteri) D S M 3 3 6 3 4、L. ロイテリ (reuteri) D S M 3 3 6 3 5、および L. ロイテリ (reuteri) D S M 3 3 5 0 9、L. ムコサエ (mucosae) D S M 3 3 2 9 1、L. ムコサエ (mucosae) D S M 3 3 2 9 2、L. ムコサエ (mucosae) D S M 3 3 2 9 3、L. ムコサエ (mucosae) D S M 3 3 6 6 1、L. プランタルム (plantarum) D S M 3 3 2 9 5、および L. プランタルム (plantarum) D S M 3 3 6 6 2 からなる群から選択される。

20

【0103】

上記の L. ムコサエ (mucosae)、L. プランタルム (plantarum) および L. ロイテリ (reuteri) 株から選択されるような、2つ以上の乳酸産生細菌株からの細菌の組み合わせを使用することも可能である。

【0104】

一実施形態では、乳酸産生細菌株は、好ましくはプロバイオティクス細菌株である。

【0105】

一実施形態では、セロトニン欠乏症に関連する疾患が I B S、不安、憂鬱感、心的外傷後ストレス障害、I B D および胃腸運動性障害からなる群から選択される場合、乳酸産生細菌株はラクトバチルス・ロイテリ (Lactobacillus reuteri) D S M 1 7 9 3 8 以外である。別の実施形態では、乳酸産生細菌株は、ラクトバチルス・ロイテリ (Lactobacillus reuteri) D S M 1 7 9 3 8 以外である。

30

【0106】

一実施形態では、セロトニン欠乏症に関連する疾患が骨粗鬆症、骨減少症、骨量減少、憂鬱感、I B S および I B D からなる群から選択される場合、乳酸産生細菌株はラクトバチルス・ロイテリ (Lactobacillus reuteri) A T C C P T A 6 4 7 5 以外である。別の実施形態では、乳酸産生細菌株は、ラクトバチルス・ロイテリ (Lactobacillus reuteri) A T C C P T A 6 4 7 5 以外である。

40

【0107】

本発明のさらなる実施形態は、ラクトバチルス・ムコサエ (Lactobacillus mucosae) 株 D S M 3 3 2 9 1、例えば、凍結乾燥形態または他の方法で乾燥された形態の L. ムコサエ (mucosae) 株 D S M 3 3 2 9 1、医薬品として使用するための L. ムコサエ (mucosae) 株 D S M 3 3 2 9 1、セロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療に使用するための L. ムコサエ (mucosae) 株 D S M 3 3 2 9 1、ならびにセロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患を治療するための医薬品を製造するための、L. ムコサエ (mucosae) 株 D S M 3 3 2 9 1 の使用に関する。

【0108】

50

本発明のさらなる実施形態は、ラクトバチルス・ムコサエ (*Lactobacillus mucosae*) 株DSM 33292、例えば、凍結乾燥形態または他の方法で乾燥された形態の *L. ムコサエ* (*mucosae*) 株DSM 33292、医薬品として使用するための *L. ムコサエ* (*mucosae*) 株DSM 33292、セロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療に使用するための *L. ムコサエ* (*mucosae*) 株DSM 33292、ならびにセロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患を治療するための医薬品を製造するための、*L. ムコサエ* (*mucosae*) 株DSM 33292の使用に関する。

【0109】

本発明の実施形態はさらに、ラクトバチルス・ムコサエ (*Lactobacillus mucosae*) 株DSM 33293、例えば、凍結乾燥形態または他の方法で乾燥された形態の *L. ムコサエ* (*mucosae*) 株DSM 33293、医薬品として使用するための *L. ムコサエ* (*mucosae*) 株DSM 33293、ならびにセロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療に使用するための *L. ムコサエ* (*mucosae*) 株DSM 33293、ならびにセロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患を治療するための医薬品を製造するための、*L. ムコサエ* (*mucosae*) 株DSM 33293の使用に関する。

【0110】

本発明の実施形態はまた、ラクトバチルス・ムコサエ (*Lactobacillus mucosae*) 株DSM 33661、例えば、凍結乾燥形態または他の方法で乾燥された形態の *L. ムコサエ* (*mucosae*) 株DSM 33661、医薬品として使用するための *L. ムコサエ* (*mucosae*) 株DSM 33661、ならびにセロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療に使用するための *L. ムコサエ* (*mucosae*) 株DSM 33661、ならびにセロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患を治療するための医薬品を製造するための、*L. ムコサエ* (*mucosae*) 株DSM 33661の使用に関する。

【0111】

本発明のさらなる実施形態は、ラクトバチルス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*) 株DSM 33295、例えば、凍結乾燥形態または他の方法で乾燥された形態の *L. プランタルム* (*plantarum*) 株DSM 33295、医薬品として使用するための *L. プランタルム* (*plantarum*) 株DSM 33295、ならびにセロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療に使用するための *L. プランタルム* (*plantarum*) 株DSM 33295、ならびにセロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患を治療するための医薬品を製造するための、*L. プランタルム* (*plantarum*) 株DSM 33295の使用に関する。

【0112】

本発明の実施形態はさらに、ラクトバチルス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*) 株DSM 33662、例えば、凍結乾燥形態または他の方法で乾燥された形態の *L. プランタルム* (*plantarum*) 株DSM 33662、医薬品として使用するための *L. プランタルム* (*plantarum*) 株DSM 33662、ならびにセロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療に使用するための *L. プランタルム* (*plantarum*) 株DSM 33662、ならびにセロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患を治療するための医薬品を製造するための、*L. プランタルム* (*plantarum*) 株DSM 33662の使用に関する。

【0113】

本発明のさらなる実施形態は、ラクトバチルス・ロイテリ (*Lactobacillus reuteri*) 株DSM 33509、例えば、凍結乾燥形態または他の方法で乾燥された形態の *L. ロイテリ* (*reuteri*) 株DSM 33509、医薬品として使用

10

20

30

40

50

するためのL.ロイテリ(reuteri)株DSM 33509、セロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療に使用するためのL.ロイテリ(reuteri)株DSM 33509、ならびにセロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患を治療するための医薬品を製造するための、L.ロイテリ(reuteri)株DSM 33509の使用に関する。

【0114】

本発明の実施形態は、ラクトバチルス・ロイテリ(Lactobacillus reuteri)株DSM 33632、例えば、凍結乾燥形態または他の方法で乾燥された形態のL.ロイテリ(reuteri)株DSM 33632、医薬品として使用するためのL.ロイテリ(reuteri)株DSM 33632、セロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療に使用するためのL.ロイテリ(reuteri)株DSM 33632、ならびにセロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患を治療するための医薬品を製造するための、L.ロイテリ(reuteri)株DSM 33632の使用に関する。

10

【0115】

本発明の実施形態はまた、ラクトバチルス・ロイテリ(Lactobacillus reuteri)株DSM 33633、例えば、凍結乾燥形態または他の方法で乾燥された形態のL.ロイテリ(reuteri)株DSM 33633、医薬品として使用するためのL.ロイテリ(reuteri)株DSM 33633、セロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療に使用するためのL.ロイテリ(reuteri)株DSM 33633、ならびにセロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患を治療するための医薬品を製造するための、L.ロイテリ(reuteri)株DSM 33633の使用に関する。

20

【0116】

本発明のさらなる実施形態は、ラクトバチルス・ロイテリ(Lactobacillus reuteri)株DSM 33634、例えば、凍結乾燥形態または他の方法で乾燥された形態のL.ロイテリ(reuteri)株DSM 33634、医薬品として使用するためのL.ロイテリ(reuteri)株DSM 33634、セロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療に使用するためのL.ロイテリ(reuteri)株DSM 33634、ならびにセロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患を治療するための医薬品を製造するための、L.ロイテリ(reuteri)株DSM 33634の使用に関する。

30

【0117】

本発明のさらなる実施形態は、ラクトバチルス・ロイテリ(Lactobacillus reuteri)株DSM 33635、例えば、凍結乾燥形態または他の方法で乾燥された形態のL.ロイテリ(reuteri)株DSM 33635、医薬品として使用するためのL.ロイテリ(reuteri)株DSM 33635、セロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療に使用するためのL.ロイテリ(reuteri)株DSM 33635、ならびにセロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患を治療するための医薬品を製造するための、L.ロイテリ(reuteri)株DSM 33635の使用に関する。

40

【0118】

したがって、本発明は、ラクトバチルス・ムコサエ(Lactobacillus mucosae) DSM 33291、L.ムコサエ(mucosae) DSM 33292、L.ムコサエ(mucosae) DSM 33293、L.ムコサエ(mucosae) DSM 33661、L.プランタルム(plantarum) DSM 33295、L.プランタルム(plantarum) DSM 33662、L.ロイテリ(reuteri) DSM 33509、L.ロイテリ(reuteri) DSM 33632、L.ロイテリ(reuteri) DSM 33633、L.ロイテリ(reuteri) DSM 33634、およびL.ロイテリ(reuteri) DSM 33635からなる群から

50

選択される、例えば凍結乾燥または別の乾燥形態の乳酸産生細菌株に関する。本発明はまた、セロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療に使用するための医薬品として使用するための上記群から選択される乳酸産生細菌、ならびにセロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療のための医薬品を製造するためのその使用に関する。

【0119】

本発明の一態様は、好気性条件下でセロトニンを産生し、細胞外に放出する細菌株に関する。一実施形態では、細菌株は、ラクトバチルス・ムコサエ (*Lactobacillus mucosae*) DSM 33291、*L. ムコサエ (mucosae)* DSM 33292、*L. ムコサエ (mucosae)* DSM 33293、*L. ムコサエ (mucosae)* DSM 33661、*L. プランタルム (plantarum)* DSM 33295、*L. プランタルム (plantarum)* DSM 33662、*L. ロイテリ (reuteri)* DSM 33509、*L. ロイテリ (reuteri)* DSM 33632、*L. ロイテリ (reuteri)* DSM 33633、*L. ロイテリ (reuteri)* DSM 33634、および *L. ロイテリ (reuteri)* DSM 33635 からなる群から選択される。

10

【0120】

特定の実施形態では、細菌株は、*L. ムコサエ (mucosae)* DSM 33291、*L. ムコサエ (mucosae)* DSM 33292、*L. ムコサエ (mucosae)* DSM 33293 および *L. ムコサエ (mucosae)* DSM 33661 からなる群から選択されるラクトバチルス・ムコサエ (*Lactobacillus mucosae*) 株である。

20

【0121】

別の特定の実施形態では、細菌株は、*L. プランタルム (plantarum)* DSM 33295 および *L. プランタルム (plantarum)* DSM 33662 からなる群から選択されるラクトバチルス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*) 株である。

【0122】

さらなる特定の実施形態では、細菌株は、*L. ロイテリ (reuteri)* DSM 33509、*L. ロイテリ (reuteri)* DSM 33632、*L. ロイテリ (reuteri)* DSM 33633、*L. ロイテリ (reuteri)* DSM 33634 および *L. ロイテリ (reuteri)* DSM 33635 からなる群から選択されるラクトバチルス・ロイテリ (*Lactobacillus reuteri*) 株である。

30

【0123】

本発明の別の態様は、好気性条件下でセロトニンを産生し、細胞外に放出し、粘液に付着することができる細菌株に関する。一実施形態では、細菌株は、ラクトバチルス・ムコサエ (*Lactobacillus mucosae*) DSM 33291、*L. ムコサエ (mucosae)* DSM 33292、*L. ムコサエ (mucosae)* DSM 33293、*L. ムコサエ (mucosae)* DSM 33661、*L. プランタルム (plantarum)* DSM 33662、*L. ロイテリ (reuteri)* DSM 33509、*L. ロイテリ (reuteri)* DSM 33632、*L. ロイテリ (reuteri)* DSM 33633、*L. ロイテリ (reuteri)* DSM 33634、および *L. ロイテリ (reuteri)* DSM 33635 からなる群から選択される。

40

【0124】

特定の実施形態では、細菌株は、*L. ムコサエ (mucosae)* DSM 33291、*L. ムコサエ (mucosae)* DSM 33292、*L. ムコサエ (mucosae)* DSM 33293 および *L. ムコサエ (mucosae)* DSM 33661 からなる群から選択されるラクトバチルス・ムコサエ (*Lactobacillus mucosae*) 株である。

【0125】

50

別の特定の実施形態では、細菌株は、ラクトバチルス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*) DSM 33662である。

【0126】

さらなる特定の実施形態では、細菌株は、L. ロイテリ (*reuteri*) DSM 33509、L. ロイテリ (*reuteri*) DSM 33632、L. ロイテリ (*reuteri*) DSM 33633、L. ロイテリ (*reuteri*) DSM 33634およびL. ロイテリ (*reuteri*) DSM 33635からなる群から選択されるラクトバチルス・ロイテリ (*Lactobacillus reuteri*) 株である。

【0127】

乳酸産生細菌株の好ましい投与様式は経口である。他の投与様式には、経鼻、眼内、局所、または皮膚、直腸、鼻、眼、膣もしくは歯肉への何らかの他の形態の局所投与が含まれる。

【0128】

本明細書で定義される乳酸産生細菌株の適切な用量は、治療されるセロトニン欠乏症に関連する疾患、投与様式、対象および関連する製剤に応じて容易に選択することができる。例えば、本発明に従って対象に投与される乳酸産生細菌が所望の治療効果、予防効果または健康上の利益をもたらす得るように、投与量および投与レジメンが選択される。したがって、好ましくは、投薬量は、哺乳動物のタイプおよび治療されるセロトニン欠乏症に適切である、治療的または予防的に有効な投薬量である。例えば、細菌の総コロニー形成単位 (CFU) $10^4 \sim 10^{11}$ 、例えば $10^5 \sim 10^9$ 、または $10^6 \sim 10^8$ 、または $10^8 \sim 10^{10}$ の1日用量を使用することができる。好ましい1日用量は、約 10^8 の総CFU、例えば $10^7 \sim 10^9$ または $10^8 \sim 10^9$ CFUである。

【0129】

乳酸産生細菌株は、好ましくは、純粋な、単離された、乾燥された、凍結乾燥された、またはフリーズドライの形態で投与される。乳酸産生細菌は、凍結または活性製剤（例えば、発酵食品）で投与することもできる。したがって、乳酸産生細菌株は、好ましくは、凍結乾燥またはフリーズドライの形態で製造または調製される。

【0130】

乳酸産生細菌株は、好ましくは凍結乾燥形態で、乳酸産生細菌株に加えて、少なくとも1つの賦形剤および／または他の活性剤を含む組成物に含まれてもよい。このような賦形剤の非限定的であるが例示的な例としては、充填剤、付着防止剤、結合剤、コーティング、着色剤、崩壊剤、香味剤、流動促進剤、潤滑剤、保存剤、吸着剤、甘味料およびビヒクルが挙げられる。

【0131】

組成物に含まれ得る他の活性剤としては、セロトニン欠乏症疾患または障害の上記の例のいずれかの治療に使用されるような活性剤が挙げられる。

【0132】

本発明の関連する態様は、対象におけるセロトニン欠乏症および／またはセロトニン欠乏症に関連する疾患を予防、阻害または治療する方法を定義する。方法は、好気性条件下でセロトニンを産生し、細胞外に放出することができる乳酸産生細菌株の細菌を対象に投与することを含む。

【0133】

上記の投与経路のいずれも使用することができる。乳酸産生細菌株は、有利には、上記の組成物の形態で投与され得る。

【0134】

乳酸産生細菌株または組成物で治療される対象は、哺乳動物または鳥であり、好ましくはヒトである。しかしながら、乳酸産生細菌株または組成物は、さらに、または代替的に獣医学目的に使用することができる。そのような場合、対象は、例えば、例示的であるが非限定的な例として、ネコ、イヌ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ウマの中から選択され得る。

【0135】

10

20

30

40

50

例

腸内微生物叢は、二次胆汁酸および短鎖脂肪酸など、宿主の生理学に影響を及ぼす広範囲の代謝産物を産生する。しかしながら、微生物叢は、芳香族アミノ酸の形質転換のための広大で比較的調査されていない可能性を有する。本例は、ラクトバチルスなどの腸内微生物によって内腔で産生されるセロトニンが吸収され、局所的小および末梢的の両方に効果を有することを実証する。微生物的に産生されたセロトニンは生物活性であり、腸神経系の発達表現型を救助することができる。本例はまた、特異的に良好なセロトニン産生細菌を単離し、好気性条件下でセロトニンを産生するその能力について選択することができることを示す。このようなセロトニン産生細菌は、インビボでセロトニンを産生することができることも示されている。

10

【0136】

例1—セロトニンのインビトロおよびインビボ産生ならびに適切な細菌株の評価

材料および方法

動物

8~12週齢のTph1+/+（同腹仔対照として）マウスおよびTph1-/-（C57BL/6バックグラウンド）マウスを、12時間の明/暗サイクル（7:00 AM~7:00 PM）に供した気候制御室（22±2℃）に収容し、水および食物を自由に摂取させた。Tph1-/-マウスは、以前に説明されている（Cell 135:825-837（2008））。全ての動物処置は、スウェーデン、ヨーテボリのEthics Committee on Animal Care and Useによって承認された。動物をヘテロ接合育種から得て、実験前に遺伝子型決定した。実験後の各動物から、近位結腸、大静脈からの血清、腸内腔からの物質および盲腸を得た。TPH1は、胃腸管を含む末梢における内因性セロトニン合成に関与する律速酵素である。したがって、Tph1ノックアウト（Tph1-/-）マウスは、脳の外側でのセロトニンの内因性産生が欠損している。Tph1-/-マウス胃腸管におけるTph1発現のノックアウトを、定量的ポリメラーゼ連鎖反応（qPCR）によって確認した。これらのノックアウト動物における一部の非常に低レベルのセロトニンは、無菌（GF）として動物を再誘導した後でさえ残った。これらの低レベルは、ノックアウト動物で一般的な代償機序によって、例えば腸内のフェニルアラニンまたはチロシンヒドロキシラーゼによるトリプトファンの非特異的ヒドロキシル化によって産生された可能性がある。

20

30

【0137】

細菌培養、ラクトバチルス

インビトロ実験のために、ラクトバチルス・ロイテリ（*Lactobacillus reuteri*）（DSM 17938、DSM 32846、DSM 32848、DSM 32849、DSM 27131およびATCC PTA 6475）、*L. plantarum*（*plantarum*）36E（Culture Collection University of Gothenburgから「CCUG 61730」として入手した）、*L. casei*（*casei*）LMG 6904（Belgian Coordinated Collections of Microorganismsから入手した）および*L. acidophilus*（*acidophilus*）ATCC 4356（American Type Culture Collectionから入手した）を、トリプトファン修飾脱炭酸酵素（DECT）ブロス中、嫌気性条件下、すなわちCoyチャンバー内で培養した。並行実験では、ラクトバチルス・ロイテリ（*Lactobacillus reuteri*）株（DSM 17938、DSM 32846、DSM 32848、DSM 32849、DSM 27131およびATCC PTA 6475）を、周囲好気性条件下、トリプトファン修飾DECTブロス中で培養した。各培養物を24時間で試料採取し、試料を遠心分離した（10,000×g、4℃、2分）。ペレットを回収し、20%グリセロール（凍結保護物質）中に保存し、使用するまで-80℃で凍結した。

40

【0138】

トリプトファン修飾DECTブロスを、トリプトファン脱炭酸および細菌によるセロト

50

ニンの産生を促進するように設計した。DECTは、蒸留水中に0.5%の牛肉エキス（BD Biosciences #212303）、0.1%の酵母エキス（Oxoid Fisher-Scientific #LP0021）、d-グルコース0.05%（Millipore #346351）、L-トリプトファン1%（Sigma-Aldrich #93659）、および嫌気性条件のための0.05%のシステインを含有した。DECTの無酸素変種を得るために、システイン0.05%を還元剤として添加した。DECTを121℃、15PSIで30分間オートクレーブ処理した。

【0139】

マウス接種実験、ラクトバチルス

これらの実験のために、細菌株L.ロイテリ（reuteri）（DSM 17938、DSM 27131）およびL.カゼイ（casei）（LMG 6904）を嫌気性条件下、DECTブロスの代わりにDe Man, RogosaおよびSharpe（MR S）培地で上記のように培養した。培養試料を24時間で収集し、遠心分離し（4500×g、20分、4℃）、その後、上清を除去した。細菌ペレットを、5mlの滅菌還元緩衝液（NaHCO₃ 4g/Lの存在下でNa₂S・9H₂O 0.24g/Lおよびシステイン0.5g/Lと混合した還元滅菌PBS）を含むハンゲートチューブに再懸濁した。成体Tph1-/-マウスを実験アイソレーターに移し、4時間絶食させた。次いで、マウスに、細菌株のいずれかを含有する200μLの溶液を強制経口投与した（給餌、接種）。接種の14日後、近位結腸、縦走筋-腸筋神経叢（LMMP）、および大静脈からの血清をこれらの動物から収集し、さらなる分析のために処理した。

【0140】

ELISAによる血清セロトニン測定

遠心分離（5分；10,000×g；室温（RT）、20~25℃）後、Microvette（登録商標）500 Z-Gel（Sarstedt）チューブを使用して、大静脈から採取した血液試料から血清を調製した。血清試料中のセロトニン濃度を、ELISAキットADI-900-175（Enzo Life Sciences）を製造者の説明書に従って使用して評価した。

【0141】

質量分析（MS）によるブロス中のトリプトファン代謝産物の測定-広範なMS法

ブロス上清（50μL）を、内部標準としてd6-キヌレニン500nM、d5-5-HIAA 1.25μMおよびd4-セロトニン250nM（Sigma-Aldrich、ストックホルム、スウェーデン）を含有する500μLのメタノール/酢酸[99/1；v/v]で抽出した。ボルテックスおよび遠心分離後、試料を、陽圧マニホールド（Biotage AB、ウプサラ、スウェーデン）を使用してOSTRO SPE 96プレート（Waters, Milford, MA）を通して上清を移すことによって精製した。40℃の窒素流下で溶出液を蒸発させた後、試料を150μLの注入溶媒（メタノール：水[10：90]+0.1%塩酸（v/v））中で再構成した。セロトニン、トリプトファン、5-HIAA、キヌレニン、インドール、トリプタミンおよび5-ヒドロキシトリプトファン（Sigma-Aldrich、ストックホルム、スウェーデン）を含む標準曲線をメタノール/酢酸[99/1；v/v]中で作成し、試料と同じ方法で処理した。試料および検量線試料を、Waters BEH C18カラム（2.1×100mm；1.7μm粒径）を備えたWaters Acquity UPLCシステムに注入した。カラム温度は60℃に維持し、流速は0.4ml/分であった。自動試料採取器の温度は10℃に維持した。移動相は、0.1%ギ酸を含む水（A）、および0.1%ギ酸を含むアセトニトリル（B）からなっていた。勾配溶出は、1分間にわたる1% Bでのアイソクラチック溶出から開始した。次に勾配は、2分間にわたってBを1~15%へ、続いて1分間にわたってBを15~99%へと直線的に増加された。99% Bでの1分間のアイソクラチック溶出後、勾配は1% Bに戻り2分間保持し、総実行時間は7分間であった。トリプトファン代謝産物は、陽性エレクトロスプレーを使用するXevo TQ-XS（Waters, Milford, MA）を使用して検出した。最適化後、イオン源

パラメータは、毛細管：1.00 kV、脱溶媒温度500℃、脱溶媒ガス流1000 L/h、コーンガス流150 L/h、ネブライザーガス圧力7.0 bar、コーン電圧 (V) および衝突エネルギー (eV)：セロトニン30 Vおよび10 eV；トリプトファン25 Vおよび25 eV；5-HIAA 20 Vおよび20 eV；キヌレニン20 Vおよび18 eV；インドール50 Vおよび23 eV；トリプタミン20 Vおよび18 eV；5-ヒドロキシトリプトファン25 Vおよび18 eVであった。最も強い前駆体／生成物イオン遷移を選択した。その結果、使用したMRM遷移は、以下の通りであった：セロトニン m/z 177.1>160.3；トリプトファン205.2>118.25；5-HIAA 192.4>146.2；キヌレニン209.1>146.1；インドール118.2>91.2；トリプタミン161.3>144.3；5-ヒドロキシトリプトファン221.2>162.2；d6-キヌレニン215.1>152.1；d4-セロトニン181.2>164.2；d5-5-HIAA 197.3>151.2。滞留時間は24 msであった。

【0142】

質量分析 (MS) によるブロス中のセロトニン測定—セロトニン特異的、高感度、MS ブロス上清 (50 μ L) を、キャリブレータとしてセロトニン (非標識)、および内部標準としてd6-キヌレニン500 nM (Sigma-Aldrich、ストックホルム、スウェーデン) を含むメタノール／酢酸 [99/1; v/v] 250 μ Lで抽出した。ボルテックスおよび遠心分離後、試料を、陽圧マニホールド (Biotage AB、ウプサラ、スウェーデン) を使用してOSTRO SPE 96プレート (Waters, Milford, MA) を通して上清を移すことによって精製した。40℃の窒素流下で溶出液を蒸発させた後、試料を150 μ Lの注入溶媒 (メタノール：水 [10:90] + 0.1%塩酸 (v/v)) 中で再構成した。セロトニン (Sigma-Aldrich、ストックホルム、スウェーデン) を含む標準曲線をメタノール／酢酸 [99/1; v/v] 中で作成し、試料と同じ方法で処理した。試料および検量線試料を、Waters BEH C18カラム (2.1×100 mm; 1.7 μ m粒径) を備えたWaters Acquity UPLCシステムに注入した。カラム温度は60℃に維持し、流速は0.4 mL/分であった。自動試料採取器の温度は10℃に維持した。移動相は、0.1%ギ酸を含む水 (A)、および0.1%ギ酸を含むアセトニトリル (B) からなっていた。勾配溶出は、1分間にわたる1% Bでのアイソクラチック溶出から開始した。次に勾配は、2分間にわたってBを1~15%へ、続いて1分間にわたってBを15~99%へと直線的に増加された。99% Bでの1分間のアイソクラチック溶出後、勾配は1% Bに戻り2分間保持し、総実行時間は7分間であった。セロトニンは、陽性エレクトロスプレーを使用するXevo TQ-XS (Waters, Milford, MA) を使用して検出した。最適化後、イオン源パラメータは、毛細管：1.00 kV、脱溶媒温度500℃、脱溶媒ガス流1000 L/h、コーンガス流150 L/h、ネブライザーガス圧力7.0 bar、コーン電圧 (V) および衝突エネルギー (eV)：セロトニン30 Vおよび10 eVであった。最も強い前駆体／生成物イオン遷移を選択した。その結果、使用したMRM遷移は、セロトニン m/z 177.1>160.3であった。滞留時間は27 msであった。

【0143】

結果

乳酸産生細菌株はヒトの腸に一般的に存在し、多くの乳酸産生細菌株が、よく研究されたプロバイオティック細菌でもある。したがって、株種L. ロイテリ (reuteri)、L. プランタルム (plantarum)、L. カゼイ (casei) およびL. アシドフィルス (acidophilus) を含む多くのラクトバチルス株のセロトニン産生能力を、セロトニンを含む特定のトリプトファン代謝産物に対して最適化された広範な質量分析 (MS) アッセイで試験して、嫌気性および好気性条件下でセロトニンを産生する能力を有する細菌株を同定した。この方法で、試験した全てのL. ロイテリ (reuteri) 株が、DECTブロス中で24時間嫌氣的に培養した場合にセロトニンを産生する

ことが分かった（図1Aおよび表1）。驚くべきことに、*L. ロイテリ*（*reuteri*）細菌株が、DECTブロス中で24時間好気的に培養された場合にセロトニンを産生することも分かった（図1Aおよび表1）。重要なことに、さらに驚くべきは、好気性条件下で*L. ロイテリ*（*reuteri*）株によって産生されるセロトニンレベルは、嫌気性条件下と比較して好気性条件下では著しく高く、1.0を超える（ >1.0 ）好気性／嫌気性セロトニン産生の比をもたらした。逆に、試験した他の細菌株、すなわち*L. カゼイ*（*casei*）LMG 6904、*L. プランタルム*（*plantarum*）36 Eまたは*L. アシドフィルス*（*acidophilus*）ATCC 4356では、それらが嫌気性条件下で培養された場合、セロトニン産生は見られなかった（表1）。

【表1】

表1－広範なMS法によって測定した、DECT、好気性または嫌気性条件での種々のラクトバチルス菌株のセロトニン産生（nM）

菌株	DECT、 好気性条件での セロトニン産生 (nM)	DECT、 嫌気性条件での セロトニン産生 (nM)	好気性／嫌気性 セロトニン産生比
<i>L. ロイテリ</i> (<i>reuteri</i>)DSM 17938	7.0	1.8	3.9
<i>L. ロイテリ</i> (<i>reuteri</i>)DSM 32846	10.0	2.5	4.0
<i>L. ロイテリ</i> (<i>reuteri</i>)ATCC PTA 6475	6.1	1.7	3.6
<i>L. ロイテリ</i> (<i>reuteri</i>)DSM 32848	8.8	1.0	8.8
<i>L. ロイテリ</i> (<i>reuteri</i>)DSM 32849	7.8	1.0	7.8
<i>L. ロイテリ</i> (<i>reuteri</i>)DSM 27131	9.1	3.1	2.9
<i>L. プランタルム</i> (<i>plantarum</i>) 36E	試験せず	0.0	n/a
<i>L. カゼイ</i> (<i>casei</i>)LMG 6904	試験せず	0.0	n/a
<i>L. アシドフィルス</i> (<i>acidophilus</i>)ATCC 4356	試験せず	0.0	n/a

【0144】

3つの株、*L. カゼイ*（*casei*）LMG 6904、*L. プランタルム*（*plantarum*）36 Eおよび*L. アシドフィルス*（*acidophilus*）ATCC 4356はまた、別の、セロトニン特異的で感度のより高い質量分析法を用いてセロトニン産生について試験された。この方法を使用すると、嫌気性条件下で培養した後、これら全ての細菌株から得られた、低レベルまたは非常に低レベルのセロトニンが培地中で検出された（表2）。しかしながら、これらの細菌株を好気性条件下で培養した後、この高感度セロトニン特異的方法ではセロトニンは検出されなかった（表2）。

【表 2】

表 2—セロトニン特異的、高感度MS法によって測定した、DECT、好気性または嫌気性条件での種々のラクトバチルス菌株のセロトニン産生 (nM)

菌株	DECT、 好気性条件での セロトニン産生 (nM)	DECT、 嫌気性条件での セロトニン産生 (nM)
L. プランタルム (plantarum) 36E	0.0	0.3
L. カゼイ (casei) LMG 6904	0.0	0.1
L. アシドフィルス (acidophilus) ATCC 4356	0.0	0.9

10

【0145】

これらの結果は、全てではないが一部の乳酸産生細菌株が、嫌気性および／または好気性条件下でセロトニンを産生することができることを示している。また、一部の乳酸産生細菌株は、嫌気性条件下ではセロトニンを産生することができるが、好気性条件下ではセロトニンを産生することができない。結果はまた、種々の乳酸産生細菌株が、胃腸管のインビボ条件を模倣するインビトロ条件下で、他の乳酸産生細菌株よりも良好にセロトニンを産生することを実証する。

20

【0146】

さらなる実験では、L. ロイテリ (reuteri) 細菌株によって産生されるセロトニンが生物活性であるかどうか、Tph1-/-GFマウスにおいてインビボで循環セロトニンプールに輸送され、それに寄与することができるかどうかを調べる。内因性セロトニン産生が欠損しているこれらのマウスに、L. ロイテリ (reuteri) DSM 17938またはL. ロイテリ (reuteri) DSM 27131を接種した。いずれかのL. ロイテリ (reuteri) 株を接種した後、Tph1-/-GFマウスにおける血清セロトニンレベルの増加がELISAを使用して観察され (図1B)、増加は、DSM 17938と比較してDSM 27131においてより顕著であった。対照的に、GF Tph1-/-マウスに、インビトロでセロトニンを産生しなかったL. カゼイ (casei) LMG 6904 (図1A、表1、表2) を接種した場合、セロトニンの血清レベルは増加しなかった (図1B)。これらの実験の結果は、特定のラクトバチルス種および特定の乳酸産生細菌株が、宿主にとって生物学的に利用可能であり、胃腸管から末梢に輸送され得るセロトニンを胃腸管内で局所的に産生する能力を有することを明確に示し、したがって胃腸および全身のセロトニンプールの両方に寄与している。

30

【0147】

したがって、結果は、L. ロイテリ (reuteri) DSM 17938およびL. ロイテリ (reuteri) DSM 27131が、それらの好気性セロトニン産生、好気性／嫌気性セロトニン産生の高い比に基づいて選択され得る乳酸産生細菌株の例であり、それらを使用してインビボでセロトニンレベルを増加させ得ることを示している。したがって、これらの2つの細菌株、および、例えば表1のL. ロイテリ (reuteri) 細菌株など、好気性条件下でセロトニンを産生する同じまたは類似の能力を有する他の乳酸産生細菌株は、セロトニン欠乏症およびセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療に有効であると考えられる。一方、嫌気性条件下で低レベルのセロトニンを産生することができるにもかかわらず、L. プランタルム (plantarum) 36E、L. カゼイ (casei) LMG 6904またはL. アシドフィルス (acidophilus) ATCC 4356などの細菌株は、インビトロで好気性条件下でセロトニンを産生する能力がないことに基づいて、セロトニン欠乏症の治療において選択されないかまたは有効であると思われない。

40

【0148】

50

例 2 - セロトニンのインビトロおよびインビボ産生ならびにさらなる適切な細菌株の評価

例 1 のラクトバチルス・ロイテリ (*Lactobacillus reuteri*) 細菌株は、嫌気性条件下および好気性条件下の両方でセロトニンを良好に産生することが分かったので、いくつかの追加の *L. royeri* (reuteri) 細菌株 (表 3) をそれらのセロトニン産生について評価した。

【0149】

材料および方法

全ての細菌培養法およびセロトニン測定法は、セロトニン特異的かつ高感度 MS 法を使用する例 1 に記載されるように行った。本例で試験した乳酸産生細菌株および検出されたセロトニンのレベルを以下の表 3 に列挙する。

【0150】

結果

追加の *L. royeri* (reuteri) 細菌株を DECT で嫌気的および好気的の両方で 24 時間培養し、次いで、それぞれの培地中のセロトニンの濃度を評価した (表 3)。これらの追加の *L. royeri* (reuteri) 細菌株は全て、嫌気性条件下で低量であるが検出可能な量のセロトニンを産生することができることが分かった。これらの *L. royeri* (reuteri) 細菌株は全て、嫌気性条件下と比較して、好気性条件下でより多くのセロトニンを産生したことがさらに分かった (表 3)。したがって、これらの *L. royeri* (reuteri) 株は全て、セロトニン欠乏症およびセロトニン欠乏症に関連する疾患の治療に使用するための、本発明による適切な株として選択することができた。

10

20

30

40

50

【表 3】

表 3－セロトニン特異的高感度MS法によって測定した、DECT、好気性または嫌気性条件での追加のラクトバチルス・ロイテリ (*Lactobacillus reuteri*) 菌株のセロトニン産生 (nM)

菌株	DECT、 好気性条件での セロトニン産生 (nM)	DECT、 嫌気性条件での セロトニン産生 (nM)	好気性／嫌気性 セロトニン産生比
L. ロイテリ(reuteri) DSM 27131	1. 1	0. 4	2. 8
L. ロイテリ(reuteri) DSM 32465	1. 3	0. 4	3. 3
L. ロイテリ(reuteri) ATCC PTA 6475	0. 8	0. 7	1. 1
L. ロイテリ(reuteri) DSM 33634	0. 8	0. 4	2. 0
L. ロイテリ(reuteri) DSM 33635	1. 3	0. 4	3. 3
L. ロイテリ(reuteri) ATCC PTA 5289	1. 3	0. 5	2. 6
L. ロイテリ(reuteri) DSM 33632	1. 5	0. 4	3. 8
L. ロイテリ(reuteri) DSM 33633	1. 4	0. 2	7. 0
L. ロイテリ(reuteri) DSM 33509	0. 9	0. 2	4. 5

【0151】

例 3－細菌的に産生されたセロトニンはENS発達にインビボで効果を有し、結腸の陰窩神経支配に重要である

材料および方法

細菌培養、マウス盲腸

盲腸を従来のTph1+/+マウスから採取し、37℃の嫌気性条件下で48時間DECT中で培養した。この時点で、試料を遠心分離し(10,000×g、4℃、2分)、ペレットを回収した。ペレットを20%グリセロール(凍結保護物質)中に保存し、使用するまで-80℃で凍結した。

【0152】

細菌培養、ラクトバチルス

インビボ実験のために、L. ロイテリ(reuteri) DSM 27131およびL. カゼイ(casei) LMG 6904を嫌気性条件下でMRS中で培養した。各培養物を24時間で試料採取し、試料を遠心分離した(10,000×g、4℃、2分)。ペレットを20%グリセロール(凍結保護物質)中に保存し、使用するまで-80℃で凍結した。

【0153】

マウス接種実験、マウス盲腸およびラクトバチルス

これらの実験のために、マウス盲腸、マウス盲腸内容物のDECTブロス中の48時間

培養物、またはL.ロイテリ(reuteri)DSM 27131およびL.カゼイ(casei)LMG 6904のMRS中の24時間培養物を使用した。マウス盲腸およびラクトバチルス培養物から得られたペレットを、5mlの滅菌還元緩衝液(NaHCO_3 4g/Lの存在下で $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0.24g/Lおよびシステイン0.5g/Lと混合した還元滅菌PBS)を含むハンゲートチューブに再懸濁した。成体Tph1-マウスを実験アイソレーターに移し、4時間絶食させた。マウスに、マウス盲腸またはラクトバチルス由来の細菌を含有するいずれかの溶液200 μL を強制経口投与した。接種の14日後、近位結腸、LMMP、大静脈からの血清、結腸の管腔内容物および盲腸をこれらの動物から収集した。

【0154】

免疫組織化学

近位結腸試料をPFA 4%中4℃で一晩固定し、70% EtOH中4℃で維持した後、切片化した。組織をパラフィンに包埋し、Leica Systemを用いて連続工程(TissuClear 2×12分; 99% EtOH 2×2分; 95% EtOH 2×2分)によって脱パラフィンした10 μm の厚さに切片を作製した。抗原回復のために、スライドを10mMクエン酸ナトリウム/0.05% TWEEN(登録商標)20溶液(pH6.0)とインキュベートし、20分間水浴(95℃)で加温し、20分間室温でインキュベートし、PBS-0.05% TWEEN(登録商標)20で2回すすいだ。次に、スライドを、室温で1時間、ブロッキング溶液(PBS/4% BSA/4%ロバ血清); 4℃にて一晩、ブロッキング溶液で希釈した一次抗体(表4); 室温で1時間、ブロッキング溶液で希釈した二次抗体(表4); および室温で5分間、Hoechst溶液と共にインキュベートした。一次抗体とのインキュベーションから、各インキュベーション工程の後にPBS中で2回の洗浄工程を行った。スライドを封入剤(Dako)と共に装着した。

【表4】

表4—免疫組織化学のための抗体

一次抗体	製造業者	基準	希釈
ラット抗セロトニン	Abcam	ab6336	1/400
ウサギ抗PGP9.5	Sigma Aldrich	SAB4503057	1/400
ウサギ抗TUJ1	Abcam	ab18207	1/400
二次抗体	製造業者	基準	希釈
ロバ抗ラット488	Life technologies	A21208	1/500
ロバ抗ウサギ568	Life technologies	A10042	1/500

【0155】

解剖後、LMMP試料をPFA 4%中に4℃で一晩固定し、冷PBSで10分間3回すすいだ。次に、LMMPを免疫染色まで4℃のNaN₃溶液(PBSで希釈した0.1% NaN₃)中に保った。LMMP試料を300 μL のブロッキング溶液(NaN₃ 0.1%溶液中のTriton X 100 0.5%、BSA 4%およびロバ血清4%)中で1時間インキュベートした。次に、組織をブロッキング溶液で希釈した一次抗体(表4)と一晩インキュベートし、続いてPBSで10分間3回洗浄し、二次抗体(表4)と1.5時間インキュベートした。組織をPBSで3回、10分間洗浄し、Hoechst溶液と5分間インキュベートし、PBSで再び3回、10分間洗浄した。LMMP試料を蛍光封入溶液剤で装着した。

【0156】

免疫染色された組織を、20×/0.8 NA対物レンズおよびBlack Zenソフトウェア(Carl Zeiss)を備えたZeiss Laser Scanning

Inverted Microscope LSM-700を使用して共焦点顕微鏡法によって画像化した。

【0157】

PGP9.5およびTuJ1は、成熟腸ニューロン用の十分に確立されたマーカーである。したがって、近位結腸については、結腸組織内のPGP9.5またはTuJ1の免疫陽性面積の割合を定量化し、セロトニンについて陽性である上皮細胞の数を計数し、粘膜面積で割った。組織ごとに2〜3枚の画像を分析し、動物ごとに3つの組織試料を分析した。

【0158】

ENS免疫染色のために、セロトニンについて陽性の蛍光面積を定量化した。組織試料ごとに2〜3枚の画像を分析した。

【0159】

結果

セロトニンはENSの正常な発達および成熟に必須であるので、マウスENS発達に対する微生物産生セロトニンの効果を調べた(図2A〜図2F)。免疫染色により、GF Tph1-/-マウスにマウス盲腸微生物叢を定着させると、近位結腸の腸ニューロン内のセロトニンレベルが増加したことが明らかになった(図2A)。盲腸微生物叢の存在はまた、成熟腸ニューロンの十分に確立されたマーカー、PGP9.5およびTuJ1を結腸組織内で増加させ(図2Bおよび2C)、細菌産生セロトニンがENSの発達および成熟において役割を果たすことを実証している。GF Tph1-/-マウスに、L.ロイテリ(reuteri)DSM 27131またはL.カゼイ(casei)LMG 6904も14日間接種し、ENSのセロトニン補充について評価した。インビトロならびにインビボで好気性条件下でセロトニンを産生することが以前に示されていたL.ロイテリ(reuteri)DSM 27131の接種により、ニューロンのセロトニンレベルが増加すること(図2D)、およびDSM 27131は、近位結腸において成熟ニューロンのマーカー、PGP9.5およびTuJ1も増加させるが、非セロトニン産生L.カゼイ(casei)LMG 6904は、ニューロンのセロトニンレベルまたは近位結腸におけるニューロン成熟のマーカーのいずれにも影響を及ぼさないことが分かった。

【0160】

例4-セロトニン産生ヒト細菌株の単離および選択

材料および方法

ヒト糞便収集

ヒト糞便試料採取は、30〜50歳の3人の健康なドナーから行った。治療未経験のボランティアであり、抗生物質を全く服用していなかった。ヒト糞便試料採取およびその後の試料の使用は、スウェーデンの倫理方針および規制に従って実施した。

【0161】

細菌培養-ヒト糞便

新しく排泄されたヒト糞便(1%(w/v)接種材料)を、嫌気性条件下、すなわちCoyチャンバー内、または周囲好気性条件下でDECTブロスに接種した。各培養物を異なる時点(0時間、すなわち接種前、12時間、24時間、36時間、48時間、60時間)で試料採取し、試料を遠心分離した(10,000×g、4℃、2分)。上清およびペレットを-80℃で凍結した。上清をセロトニン測定のために使用し、ペレットを使用して、16S rRNA遺伝子分析を利用することによって試料内の細菌群を分析した。各試料の1つのグリセロールストックも、上記の各時点から保持した。

【0162】

細菌セロトニン産生株の単離

DECTブロスを例1に従って作製した。LYBHI培地は、ブレインハートインフュージョン(BHI)3.7%(Oxoid Fisher-Scientific #CM 1135)、L-システイン0.05%(Sigma-Aldrich #W 326305)、D-(+)-セロビオース0.1%(Sigma-Aldrich #221

10

20

30

40

50

50)、マルトース0.1%およびヘミン0.0006%(Sigma-Aldrich #51280)を含有した。DECTおよびLYBHIの無酸素変種を得るために、システイン0.05%を還元剤として添加した。増殖培地を121℃、15PSIで30分間オートクレーブ処理した。DECTブロス中で培養したヒト糞便から得られた36時間グリセロールストックを、LYBHI(2%寒天を含むLYBHIブロス;Nordic Biolabs #214010)、DECT(2%寒天を含むDECTブロス)およびMRS(2%寒天を含む蒸留水1L中の50gのSigma-Aldrich製MRS粉末(Sigma-Aldrich #69966)および1mlのTWEEN(登録商標)80(Sigma-Aldrich #P8074))プレートで嫌気性条件下でプレATINGした。プレATINGが3回行われたのは、第2の培養プレATINGが、第1のプレート中の最も豊富な領域から第2のプレート上への試料採取から、および第2のプレートから第3のプレートへ行われたことを意味する。次いで、各単離コロニーをLYBHI、DECTおよびMRS中でそれぞれ培養して、グリセロールストックを作製し、遠心分離(10,000×g、4℃、2分)後にDNAを回収した。16S rRNA遺伝子を配列決定して各細菌株を同定するために、DNAを回収した。各分離株の純度をグラム染色によって確認した。セロトニン産生動態のために、各分離株をDECTブロス中、好気性および嫌気性条件下で24時間培養した。その後、培養物からの試料を回収し、遠心分離(10,000×g、4℃、2分)して上清を回収し、セロトニンのレベルを分析した。

【0163】

全糞便ゲノムDNAゲノムの抽出

NucleoSpin Soilキット(MACHEREY-NAGEL、ドイツ)を製造者の説明書に従って使用するが、細胞溶解工程を変更して、1.5mlの培養試料から得られたペレットからDNAを単離した。試料をSXを添加したSL2緩衝液に懸濁し、次いで水平アダプターを備えたボルテックスで2分間最高速度で混合した。細胞を、90℃で10分間加熱し、続いてFastPrep-24機器(MP Biomedicals)を使用して、5.5m/sで60秒間のビーズビーティングを3回行うことによって溶解した。加熱およびビーズビーティング工程をさらに1回繰り返し、2つの抽出物からの上清をプールした後、キット中のカラムを使用して精製した。DNAを溶出緩衝液を用いて溶出し、DNAの濃度および質をNanoDrop分光光度計を用いて確認した。

【0164】

分離株の16S rRNA遺伝子配列決定および同定

デュアルインデクシング用に設計された27Fおよび1492Rプライマーを使用して、16S rRNA遺伝子の全長を増幅した(Appl Environ Microbiol 79:5112-5120(2013))。HotStarTaq Master Mix 2X(QIAGEN)、各プライマー10μmol/L、および250ngのゲノムDNAを含む50μLの反応物中で各試料を増幅した。PCRは、以下の条件下で行った:94℃で5分間の初期変性、続いて94℃で30秒間の26サイクルの変性、52℃で40秒間のアニーリングおよび72℃で90秒間の伸長、および72℃で7分間の最終伸長工程。試料をNucleoSpin GelおよびPCR Clean-upキット(Macheray-Nagel)で精製し、NanoDrop分光光度計を使用して定量化した。体積40μLの10ng/μLの希釈物を調製し、配列決定のためにEurofinsに送った。それぞれの分離株について順方向および逆方向増幅配列を得、コンセンサス配列を見出すためにアライメントした。次いで、NCBIのBasic Local Alignment Search Toolを使用してコンセンサス配列をブラストして細菌を同定した。

【0165】

セロトニン特異的高感度MS法によるブロス中のセロトニン測定

これらの細菌株によって産生されたセロトニンを、例1に記載のセロトニン特異的かつ高感度質量分析法を用いて定量化した。

【0166】

結果

セロトニン産生

ヒトの腸からのセロトニン産生微生物を同定するために、総セロトニン産生量が最も高い2人のドナー、すなわちドナー#1およびドナー#2からの糞便試料を嫌気性条件下でDECT中で培養した。LYBHI、DECTおよびMRS寒天プレートを使用して、ドナー#1からの122の細菌分離株およびドナー#2からの77の細菌分離株、合計で199の分離株が得られた。次いで、これらの単離物によるセロトニン産生のレベルを、得られた分離株を嫌気性または好気性条件下で単一培養物として増殖させることによって決定した。199の分離株のうち、ドナー#1由来の6つの分離株およびドナー#2由来の11の分離株のみが、嫌気性条件下でDECTブロス中に検出可能なレベルのセロトニンを産生した(表5; 図3)。199の分離株のうち、合計24の分離株が好気性条件下でセロトニンを産生することが見出され、これらの分離株は、嫌気性条件下でもセロトニンを産生した分離株を含んでいた。これらの24の分離株全てについて、セロトニン産生は、嫌気性条件下と比較して好気性条件下で改善された。全長16S rRNA配列決定分析により、24の分離株がラクトバチルス・ムコサエ(*Lactobacillus mucosae*) (n=13)、ラクトバチルス・プランタルム(*Lactobacillus plantarum*) (n=6)、およびエンテロコッカス種(*Enterococcus* spp.) (n=1)として同定された(表5)。最終的に、ドナー#2からの4つの分離株は明確に同定されなかったが、これらの分離株は、エシェリキア属、赤痢菌、またはブレネリア(*Brenneria*)細菌株と密接にアライメントされた(表5)。それにもかかわらず、これらの結果は、嫌気性条件下および好気性条件下の両方でのセロトニン産生における、ラクトバチルス属の重要な役割、特にラクトバチルス・ムコサエ(*Lactobacillus mucosae*)およびラクトバチルス・プランタルム(*Lactobacillus plantarum*)細菌株の重要な役割を示唆している。

【0167】

好気性条件下で良好にセロトニンを産生する、L・ムコサエ(*mucosae*)またはL・プランタルム(*plantarum*)のいずれかに属する乳酸産生細菌株を選択した(表5)。より詳細には、細菌株L・ムコサエ(*mucosae*) h1D22g、h1M31d、h1M31g、およびh1M32d、ならびにL・プランタルム(*plantarum*) h2M3Eおよびh2M3iを選択し、好気性条件下でのそれらのセロトニン産生に基づいてDSMZに寄託した(対応する寄託番号はそれぞれ、DSMZ 33291、DSMZ 33292、DSMZ 33293、DSMZ 33661、DSMZ 33662、およびDSMZ 33295)。

10

20

30

40

50

【表 5 - 1】

表 5 - 単離されたヒトセロトニン産生株およびセロトニン特異的高感度MS法で測定したインビトロでのセロトニン産生

ID	16S rRNAの同定	DECT、 好気性条件 でのセロトニ ン産生 (nM)	DECT、 嫌気性条件 でのセロトニ ン産生 (nM)	セロトニン 産生比 好気性条件 ／嫌気性条 件
h1D22g; DSM 33291	ラクトバチルス・ムコサエ (<i>Lactobacillus mucosae</i>)	7.7	1.5	5.1
h1M1a	L. ムコサエ (<i>mucosae</i>)	4.5	2.3	2.0
h1M31D; DSM 33292	L. ムコサエ (<i>mucosae</i>)	5.7	2.9	2.0
h1M31g; DSM 33293	L. ムコサエ (<i>mucosae</i>)	5.8	1.6	3.6
h1M32b; DSM 33661	L. ムコサエ (<i>mucosae</i>)	5.2	2.8	1.9
h1M32d	L. ムコサエ (<i>mucosae</i>)	5.3	1.7	3.1
h2D1a	不明	1.3	0.4	3.25
h2D1b	不明	0.4	0.03	13.3
h2D1c	エシエリキア・フェルグソニ・コリ (<i>Escherichia fergusonii</i>); 赤痢菌 <i>sonnei</i> , <i>boydii</i> 、 <i>flexneri</i> ; ブレネリア・アルニ (<i>Brenneria alni</i>) *	0.9	0.0	n/a
h2D1d	E. フェルグソニ・コリ (<i>E. fergusonii</i>); <i>S. sonnei</i> , <i>flexneri</i> ; <i>B. alni</i> *	0.7	0.2	3.5
h2M1a	L. ムコサエ (<i>mucosae</i>)	2.2	0.0	n/a
h2M1b	L. ムコサエ (<i>mucosae</i>)	3.2	0.1	32.0
h2M1c	L. ムコサエ (<i>mucosae</i>)	4.5	0.1	45.0
h2M1d	L. ムコサエ (<i>mucosae</i>)	2.8	0.3	9.3
h2M1e	L. ムコサエ (<i>mucosae</i>)	3.2	0.6	5.3
h2M1h	L. ムコサエ (<i>mucosae</i>)	3.5	0.4	8.8
h2M1i	L. ムコサエ (<i>mucosae</i>)	3.2	0.000	n/a

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

h2M2h	エンテロコッカス・フェシウム (Enterococcus faecium)、ヒラエ (hirae)、デュラン (duranus)、ムンディティ (mundti) *	6. 6	0. 2	33. 0
h2M3c	L. プランタルム (plantarum)	2. 1	1. 0	2. 1
h2M3e; DSM 33662	L. プランタルム (plantarum)	2. 5	1. 5	1. 7
h2M3f	L. プランタルム (plantarum)	3. 1	0. 0	n/a
h2M3g	L. プランタルム (plantarum)	2. 7	0. 0	n/a
h2M3h	L. プランタルム (plantarum)	2. 4	0. 0	n/a
h1M3i; DSM 33295	L. プランタルム (plantarum)	3. 4	0. 0	n/a

*この分離株の種を同定することは不可能であり、16S rRNAベースの同定は、列挙された全ての種を分離株の潜在的な種として示した。

【0168】

例 5 - ヒトセロトニン産生細菌株を用いたマウス接種実験

材料および方法

ヒトセロトニン産生細菌株のマウス接種

マウス接種を、無菌 T p h 1 - / - マウスを使用して行った。動物に、例 3 に記載したのと同じ方法を用いて、ラクトバチルス・ムコサエ (Lactobacillus mucosae) DSM 33661 またはラクトバチルス・プランタルム (Lactobacillus plantarum) DSM 33662 のいずれかを接種した。血清および腸内腔試料、ならびに近位結腸からの組織を接種の 14 日後に収集し、セロトニンについて分析した。

【0169】

E L I S A による血清および腸内腔でのセロトニン測定

遠心分離 (5 分; 10,000 × g; 室温 (RT)、20 ~ 25 °C) 後、Microvette (登録商標) 500 Z-Gel (Sarstedt) チューブを使用して、大静脈から採取した血液試料から血清を調製した。近位結腸または盲腸から胃腸管の管腔内容物を試料採取した。管腔内容物を秤量し、急速凍結した。次いで、管腔内容物からのセロトニンを以下のように抽出した。一定量の T r i s - H C l 25 mM / E D T A 1 mM / E G T A 1 mM 溶液を各試料に添加し (1 mg / 2 μL ほどの w / v)、5 mm 銅ビーズおよび T i s s u e L y s e r (Q i a g e n、25 Hz、2 分) で均質化し、4 °C で一晩インキュベートし、4 °C、20 分、10,000 × g で遠心分離した。各試料の上清を回収し、分析まで -80 °C に保った。細菌培養物からブロス上清を得てセロトニンを測定し、非培養ブロスをブランクとして使用した。全ての試料からのセロトニンを、E L I S A キット A D I - 900 - 175 (Enzo Life Sciences) を製造者の説明書に従って使用して評価した。

【0170】

近位結腸におけるセロトニン免疫陽性面積

近位結腸からの組織試料中のセロトニン免疫陽性面積を、例 3 に記載されるように分析および定量化した。

【0171】

結果

2 つの単離されたヒト細菌株、L. ムコサエ (mucosae) DSM 33661 お

よび *L. plantarum* (DSM 33662) を、インビトロでの嫌気性および好気性条件下でのそれらのセロトニン産生に基づいて選択した。これらの株は、インビボでも機能性セロトニンを産生することが見出された (図4)。グラフは、これらの両方の細菌株が、対応する無菌マウスで見られるレベルと比較して、局所的に腸内腔で (図4A)、および全身循環 (血清試料、図4B) でセロトニンレベルを増加することができたことを示す。さらに、これらの両方のヒト株は、近位結腸のENSのセロトニン陽性面積を増加させることが見出された (図4C)。したがって、これらのヒト細菌株は、インビボで腸内腔 (盲腸) において局所的にセロトニンレベルを上昇させることができ、この局所的に産生されたセロトニンは生物活性であり、全身循環 (血清) および近位結腸の腸神経系のニューロンに輸送され得る。結果は、セロトニンを産生するヒト共生細菌株を単離し、同定し、インビボでセロトニンレベルを増加させるように選択することができることを示している。

【0172】

例6 - セロトニン産生細菌株の粘液への接着

材料および方法

粘液の調製およびプレートコーティング

粘液をブタ小腸から調製した。5cmの腸の内部をスパチュラでこすり、材料を取り出し、5mlの氷冷PBSに回収した。細胞および粒子状物質を除去するために、得られた懸濁液を最初に11,000×gで10分間、次いで26,000×gで15分間遠心分離した。粘液調製物を使用するまで-20℃で保存した。粘液材料をPBS pH6.0中でA₂₈₀=0.1 (280nmでの吸光度=0.1) に希釈し、マイクロタイターウェル (Nunc MaxiSorb) (150μl/ウェル) 中、4℃で一晩、ゆっくり攪拌しながらインキュベートした。その後、ウェルを0.05% TWEEN (登録商標) 20 (PBST) を含むPBS (pH6.0) で洗浄し、その後、1% TWEEN (登録商標) 20を含む0.2mlのPBS pH6.0で1時間ブロックし、最後にPBSTで2回洗浄した。

【0173】

細菌の調製

以下の細菌株を用いて粘液接着実験を行った：ラクトバチルス・ロイテリ (*Lactobacillus reuteri*) DSM 27131、DSM 32465、DSM 33632、DSM 33633、DSM 33634、DSM 33635、およびDSM 33509；ラクトバチルス・ムコサエ (*Lactobacillus mucosae*) DSM 33291、DSM 33292、DSM 33293、およびDSM 33661；ラクトバチルス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*) DSM 33662。各ラクトバチルス株を-70℃の凍結ストックから接種し、10mlのMRSブロス (Merck) 中で37℃で16時間増殖させた。ODを600nmで測定し、試料をOD 0.5に希釈した (総体積は1mlである)。その後、希釈した細菌溶液をPBST pH7.4で2回洗浄し、PBST pH6.0に再懸濁した。最後に洗浄し、PBST pH6.0に再懸濁した後、開始値 (コロニー形成単位 (cfu) / ml) を分析するために、細菌を希釈し、MRS寒天上にプレーティングした。同じ細菌懸濁液を結合実験に使用した。

【0174】

粘液結合、トリプシン放出および定量化

細菌懸濁液 (150μl) を各ウェルに添加し、ゆっくり攪拌しながら37℃で4時間インキュベートした。ウェルをPBST (pH6.0) で4回洗浄して、未結合細菌を除去した。洗浄後、150μlのトリプシンEDTA溶液 (ハンクス平衡塩溶液中0.25%ブタトリプシンおよび1mM EDTA・4Na) をウェルに添加し、37℃で30分間インキュベートした。次いで、放出された細菌を完全に混合し、連続希釈し、MRS寒天プレートにプレーティングした。プレートを37℃で24時間嫌気性条件でインキュベートし、その後、コロニーを計数し (コロニー形成単位 (cfu))、ウェル当たりの付

着細菌数を計算した。

【0175】

結果

セロトニン産生乳酸菌がインビトロで粘液に付着することもできるかどうかを調査し、それらがインビボでも、特に腸粘膜に付着することができ、それによって細菌で産生および分泌されたセロトニンの腸粘膜による、特に腸上皮による取り込みを可能にすることを示している。接着について試験した細菌株を、好気性条件下でセロトニンを産生する能力に基づいて選択した。インビトロで好気性条件下でセロトニンを産生することができ、インビボでセロトニンの全身プールに寄与することもできる *L. ロイテリ* (*reuteri*) DSM 27131 は、粘液に付着可能であることが見出された (図10A)。この能力はまた、試験した他の全ての *L. ロイテリ* (*reuteri*) 株 (DSM, 32465, DSM 33632, DSM 33633, DSM 33634, DSM 33635, DSM 33509)、および試験した他の全ての *L. ムコサエ* (*mucosae*) 株 (DSM 33291, DSM 33292, DSM 33293, DSM 33661) および *L. プランタルム* (*plantarum*) 株 DSM 33662 で観察され、さらに増加した (図10 Aおよび図10 B)。 *L. ロイテリ* (*reuteri*) 細菌株 DSM 33632、DSM 33633、DSM 33634、DSM 33635、および DSM 33509 の各々の付着能力は、それらの対応する親株の付着能力と比較して改善されていることが分かった (データは示さず)。これらの結果は、ラクトバチルス・ロイテリ (*Lactobacillus reuteri*)、ラクトバチルス・ムコサエ (*Lactobacillus mucosae*) およびラクトバチルス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*) の種の特定の乳酸菌株が腸粘膜に付着することができ、そこでセロトニンなどの代謝産物が胃腸管の内側を覆う腸上皮の近くで産生され、分泌され得ることを示している。

【0176】

例7—セロトニン欠乏症に使用するための油性製剤化プロバイオティクス製品の製造

本例では、セロトニン欠乏症に使用するためのプロバイオティクス製品を製造する。好気性条件下でセロトニンを産生することができる乳酸産生細菌株、例えば、例1、2、4または6のラクトバチルス細菌株のいずれかが、本明細書に開示されるように選択される。次いで、ラクトバチルス細菌株を増殖させるための業界での標準的な方法を使用して、これらの株を純粋な培養物として別々に増殖させ、凍結乾燥する。製品は、良好な安定性および貯蔵寿命のために作製された、単一の (純粋な) 細菌株を有する油性製剤である。製造プロセスの独自の特徴は、真空下に置くことによって油を乾燥させて、油中の水の大部分を除去し、製剤の安定性を高める工程である。本明細書で使用される油は、純粋な食用植物油、好ましくはヒマワリ油および中鎖トリグリセリドである。

【0177】

成分を混合する。

1. 中鎖トリグリセリド、例えば Akomed R (Karlshamns AB、カールスハムン スウェーデン) およびヒマワリ油、例えば Akosun (Karlshamns AB、カールスハムン スウェーデン) を二酸化ケイ素 (Cab-o-sil M5 P、M5 P、Cabot) と共に Bolz ミキサー／タンク (Alfred BOLZ Apparatebau GmbH、Wangen im Allgau、ドイツ) 中で混合する。

2. 均質化 Sine ポンプおよび dispax (Sine Pump, Arvada, Colorado) を Bolz ミキサーに連結し、混合物を均質化する。

3. 真空乾燥する。混合物を Bolz タンク内で 10 mBar の真空下で 12 時間乾燥させる。

4. ラクトバチルス細菌を添加する。約 20 kg の乾燥油混合物を 50 リットルのステンレス鋼容器に移す。ラクトバチルス細菌粉末は、好ましくは凍結乾燥されている。使用されるラクトバチルス細菌の量は、油中に必要とされる量に応じて変わるであろうが、一

例は、 10^{11} CFU/gを有する培養物0.2kgを添加することであろう。均質になるまでゆっくりと混合する。

5. 混合ラクトバチルス細菌を含むプレミックスをBolzミキサーに戻す。

6. 放出懸濁液を200リットルのガラス容器に放出し、窒素で覆う。懸濁液は、セロトニン欠乏症の予防または治療のためにヒトへの経口投与に使用されるスプレーボトルに充填されるまで容器に保持される。

【0178】

例8—セロトニン欠乏症に使用するための錠剤形式のプロバイオティクス製品の製造

本例では、好気性条件下でセロトニンを産生することができるラクトバチルス株を使用して、ヒトにおけるセロトニン欠乏症の予防、阻害および／または治療に使用するための錠剤を製造する。ラクトバチルス株は、業界においてラクトバチルスを増殖させるための標準的な方法を使用して増殖され、凍結乾燥される。

【0179】

以下の工程は、グルコース封入を含む、選択された細菌株を含有する錠剤の製造プロセスの一例を示す。錠剤製品の賦形剤、充填剤、香味剤、カプセル化剤、潤滑剤、固化防止剤、甘味料および他の成分は、当該技術分野で知られているように、製品の有効性に影響を及ぼすことなく使用され得ることが理解される。

【0180】

1. 溶融SOFTEISAN（商標）154（SASOL GMBH、Bad Homburg、ドイツ）を容器中で溶融させ、70℃に加熱して結晶構造の完全な破壊を確保する。次いで、これを52–55℃（硬化点のすぐ上）まで冷却する。

2. 顆粒化ラクトバチルス細菌凍結乾燥粉末をDiosna高剪断ミキサー／グラニュレーターまたは同等物に移す。溶融したSOFTEISAN（商標）154を、ラクトバチルス細菌粉末にゆっくり約1分間添加する。添加中はチョッパーを使用する。

3. 湿式ふるい分け造粒直後に、トルネードミルを用いて1mmのふるい網に通過させる。ふるい分けした顆粒を、PVC被覆アルミニウム箔から作製されたアルミパウチに詰め、ヒートシーラーで密封して、乾燥剤パウチと共にパウチを形成し、混合まで冷蔵保存する。顆粒化バッチを2つの錠剤バッチに分割する。

4. 当該技術分野で公知の標準的なマイクロカプセル化方法を使用してカプセル化されたカプセル化D-グルコース（G 8270、>99.5%グルコース、Sigma）を添加する。糖の量は、添加された乾燥ラクトバチルス細菌の粉末の総CFUに依存し、標準レベルは、 10^8 の細菌の総CFU当たり1グラムの糖であり得るが、これは、0.1グラムまで、または0.01グラムから10グラムまで、さらには100グラムまでで糖を変動させてもよい。

5. 混合全ての成分をミキサーで均質なブレンドに混合する。

6. 圧縮最終ブレンドを回転式錠剤プレス機のホッパーに移し、Kilian圧縮機で総重量765mgの錠剤を圧縮する。

7. バルク包装錠剤は、モレキュラーシーブの乾燥パウチと共にアルミパウチに包装される。アルミパウチは、最終的な包装の少なくとも1週間前に、プラスチックのバケツに入れられ、低温の場所に保管される。水素化パーム油であるSOFTEISAN（商標）を使用すると、ラクトバチルス細胞を脂肪内にカプセル化し、環境的に保護することができる。

【0181】

上述のように、実施形態の製品は、錠剤以外の形態であってもよく、当該技術分野で知られている基本的な製品を調製する標準的な方法を有益に使用して、選択されたラクトバチルス培養物を含む本発明の製品を調製する。

【0182】

上記の実施形態は、本発明のいくつかの例示的な例として理解されるべきである。当業者であれば、本発明の範囲から逸脱することなく、実施形態に様々な修正、組み合わせ、および変更を加えることができることを理解するであろう。特に、異なる実施形態におけ

10

20

30

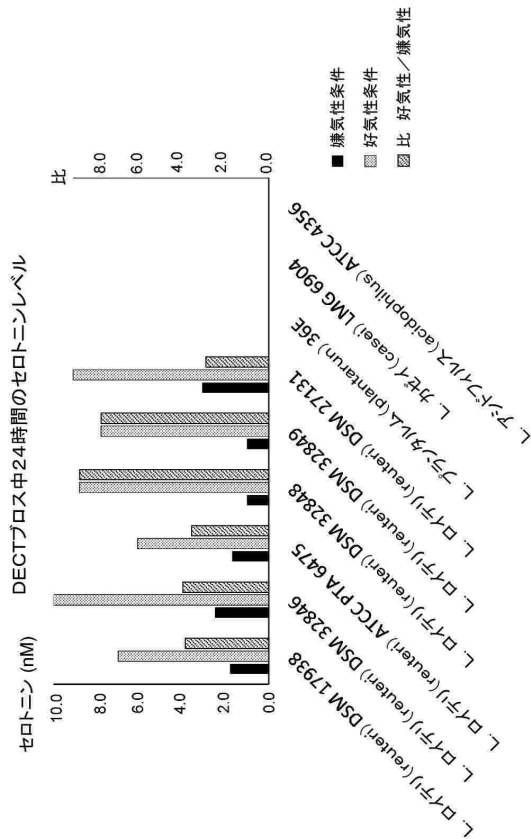
40

50

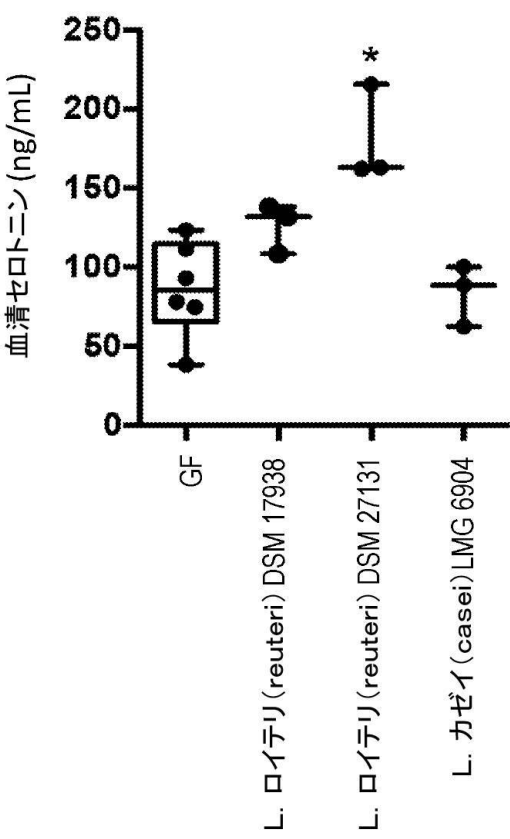
る異なる部分の解決策は、技術的に可能な場合、他の構成で組み合わせることができる。
しかしながら、本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によって定義される。

【図面】

【図 1 A】



【図 1 B】



10

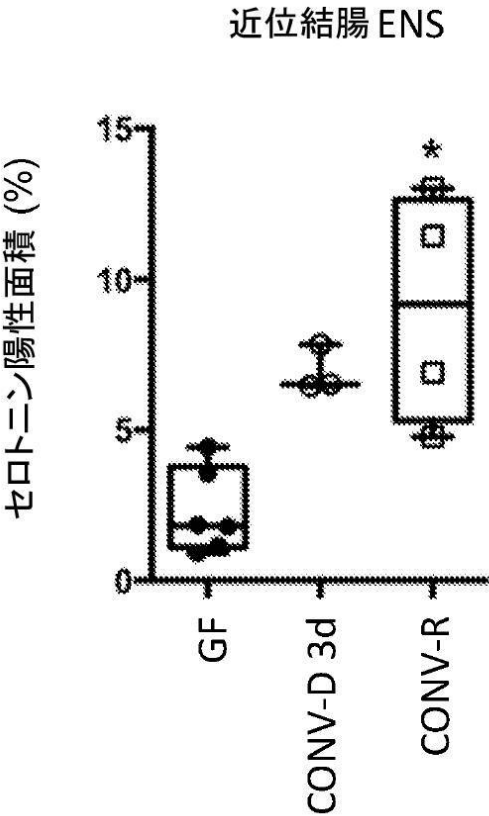
20

30

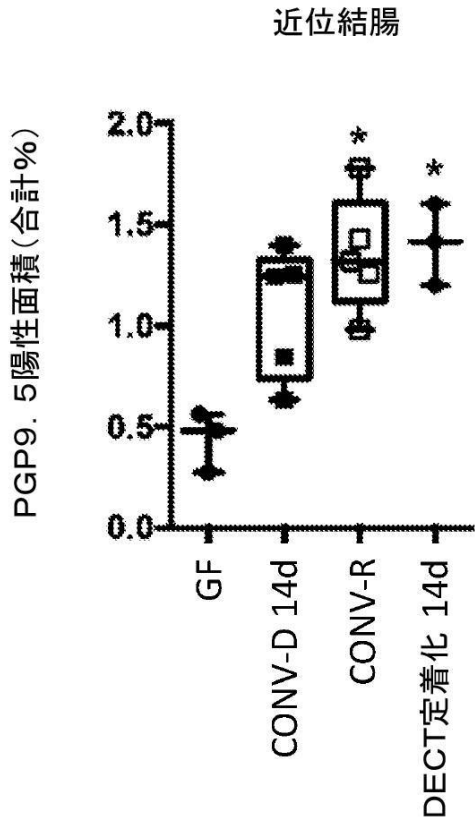
40

50

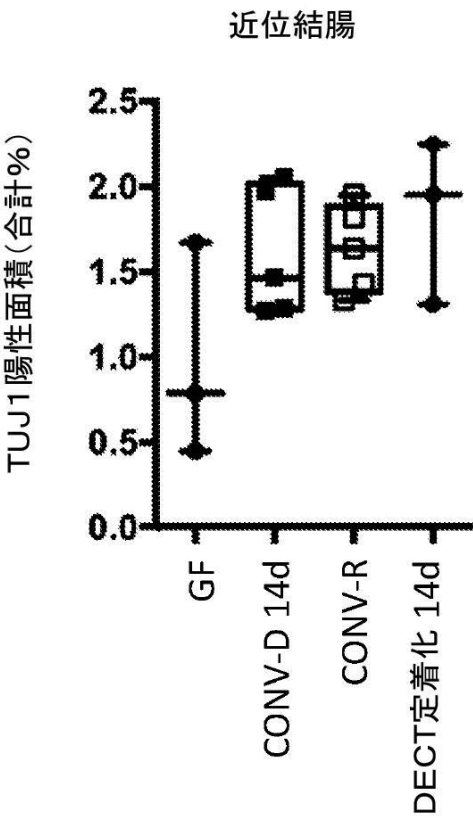
【図 2 A】



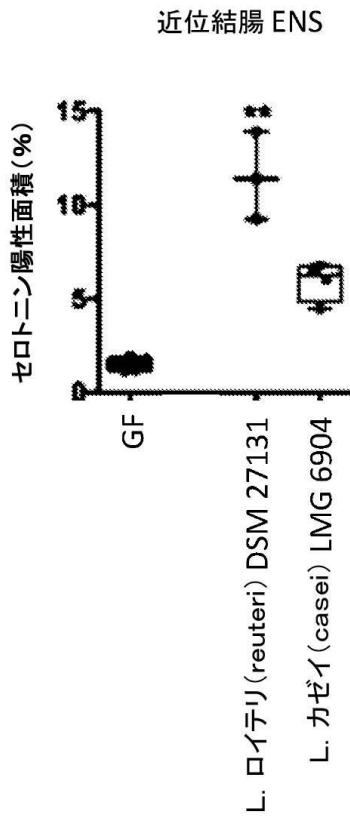
【図 2 B】



【図 2 C】



【図 2 D】



10

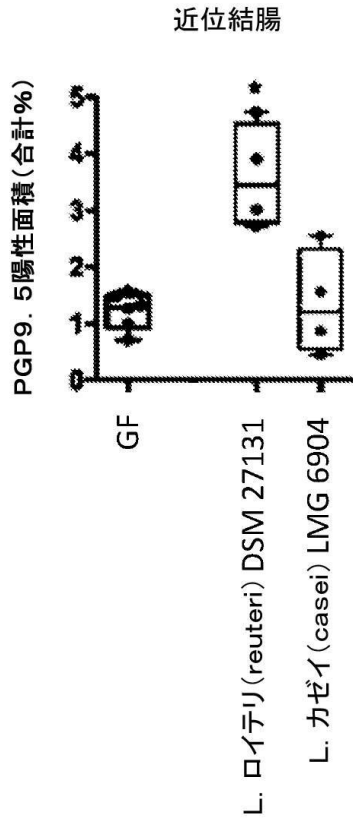
20

30

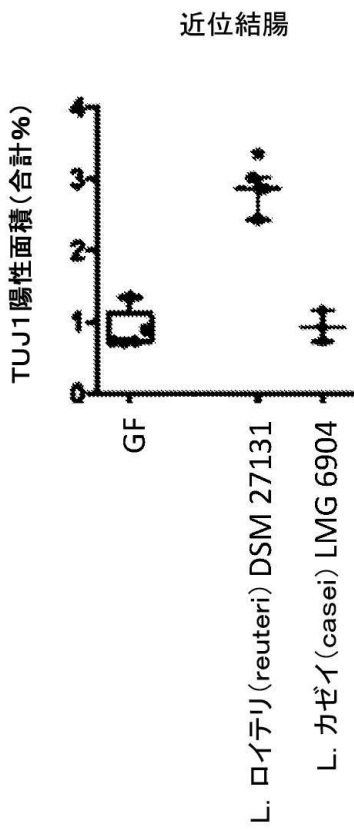
40

50

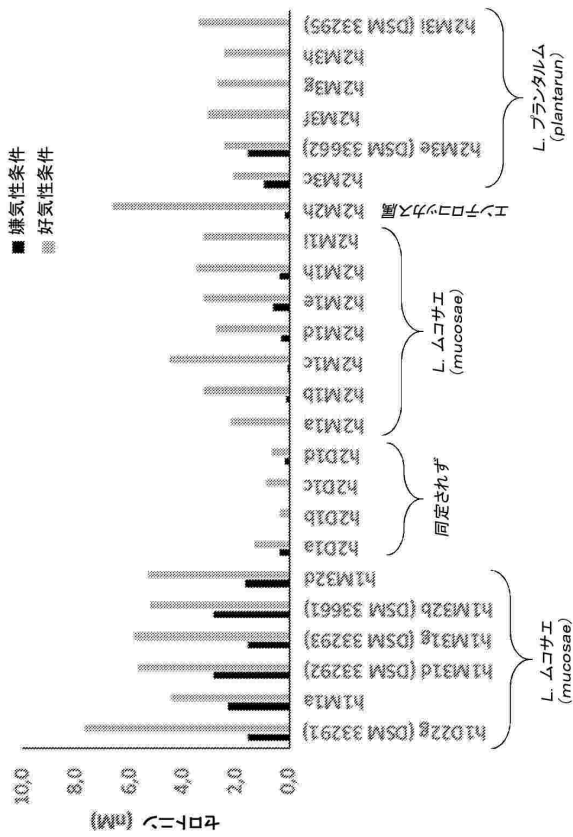
【図 2 E】



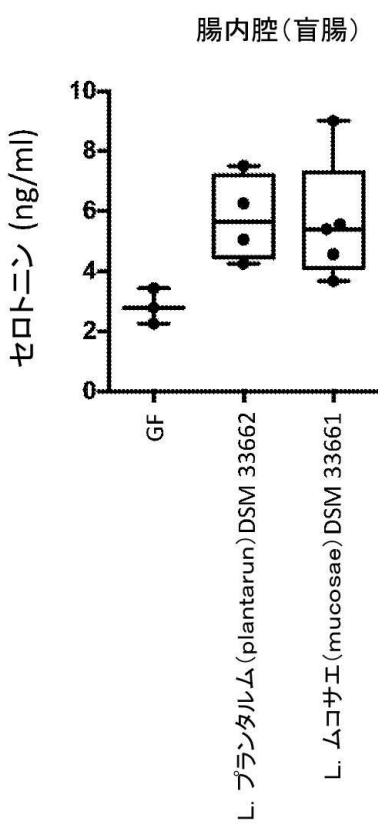
【図 2 F】



【図 3】



【図 4 A】



10

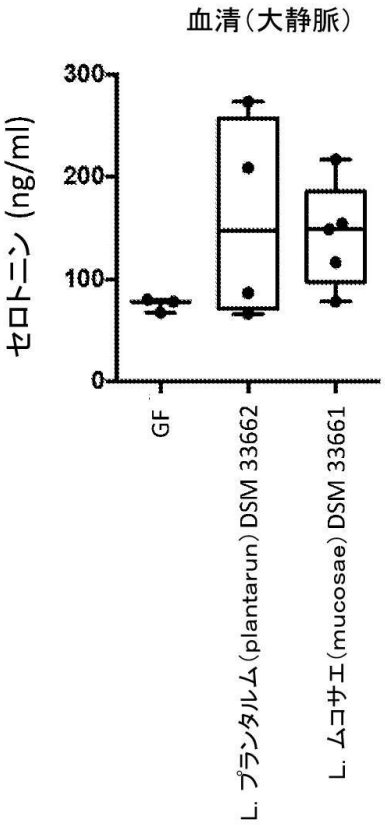
20

30

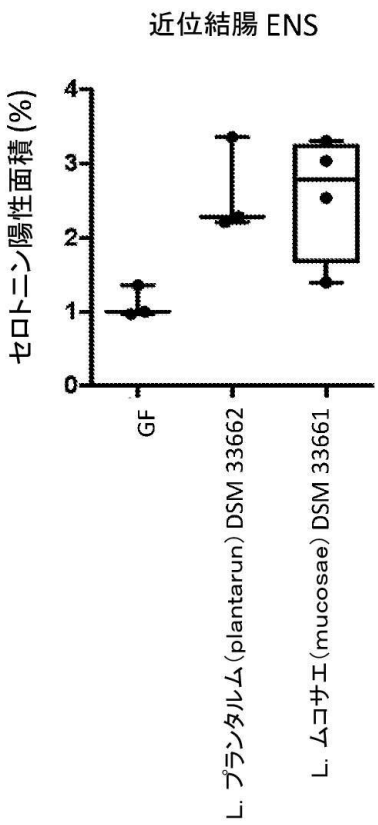
40

50

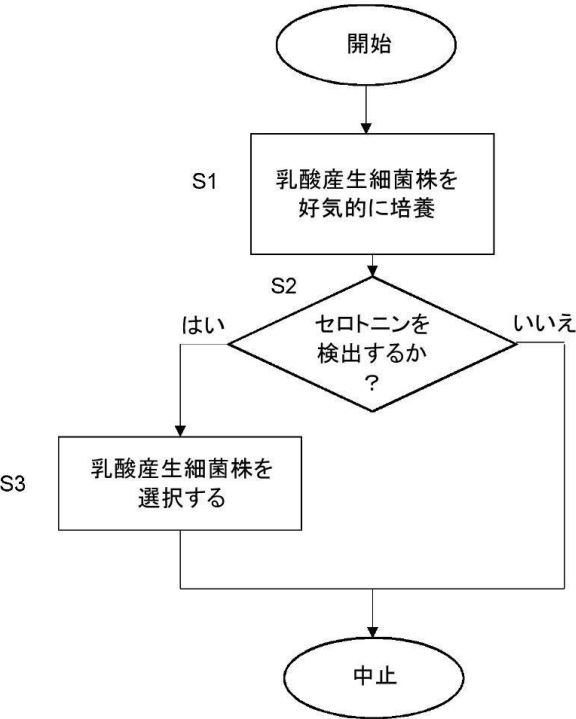
【図 4 B】



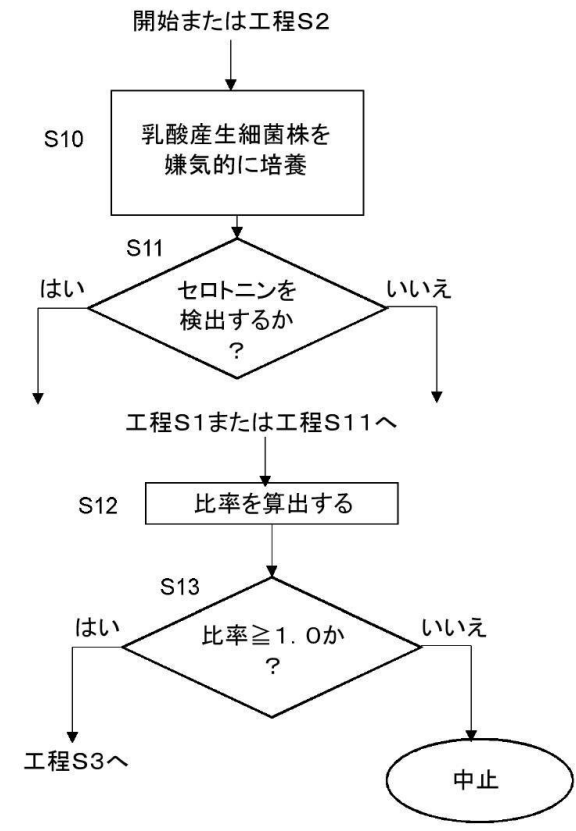
【図 4 C】



【図 5】



【図 6】



10

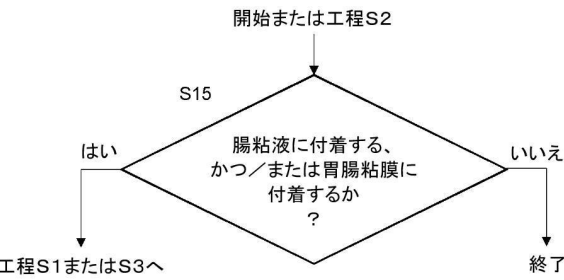
20

30

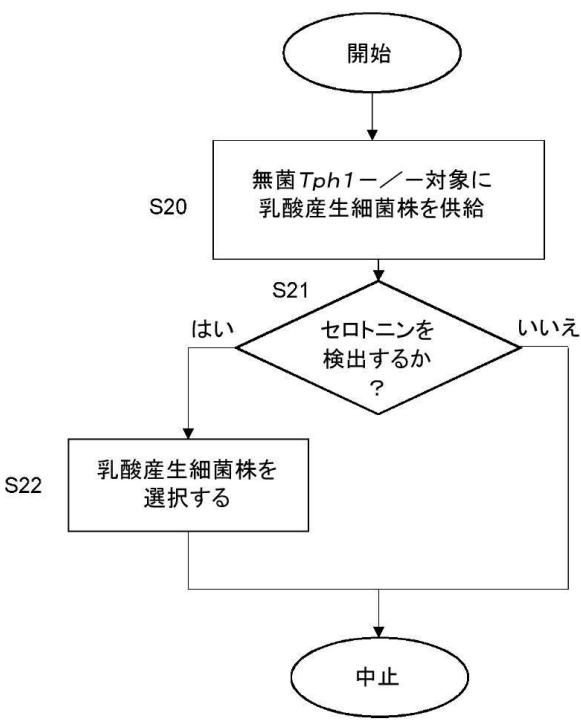
40

50

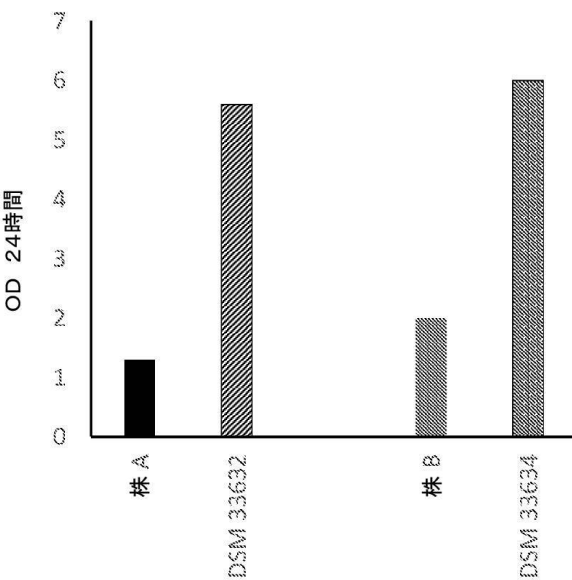
【図 7】



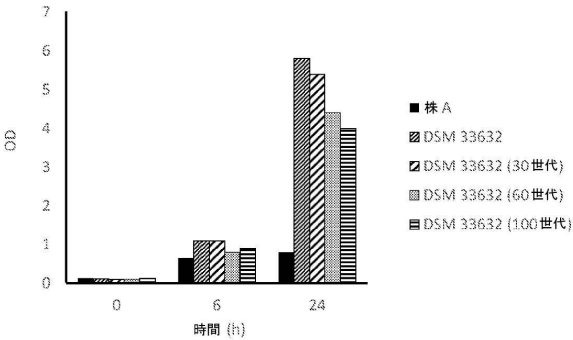
【図 8】



【図 9 A】



【図 9 B】



10

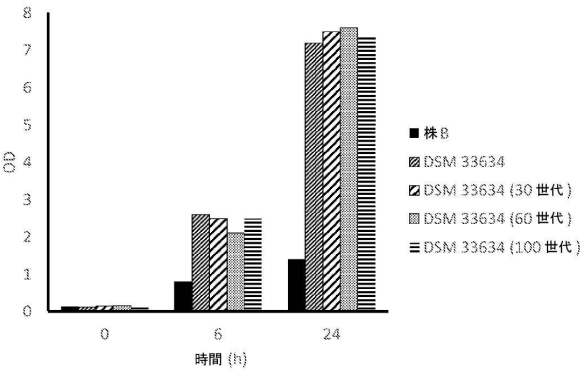
20

30

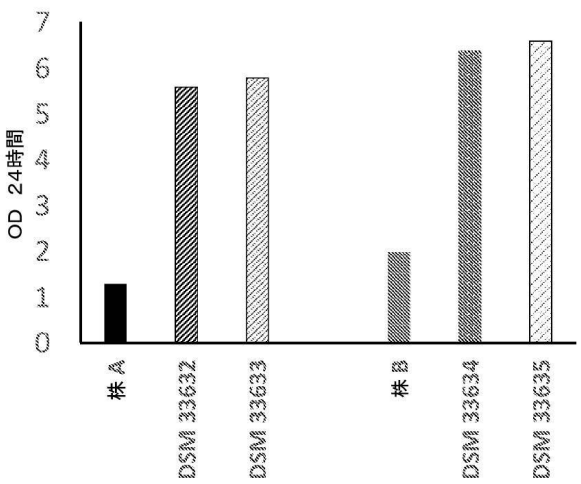
40

50

【図 9 C】

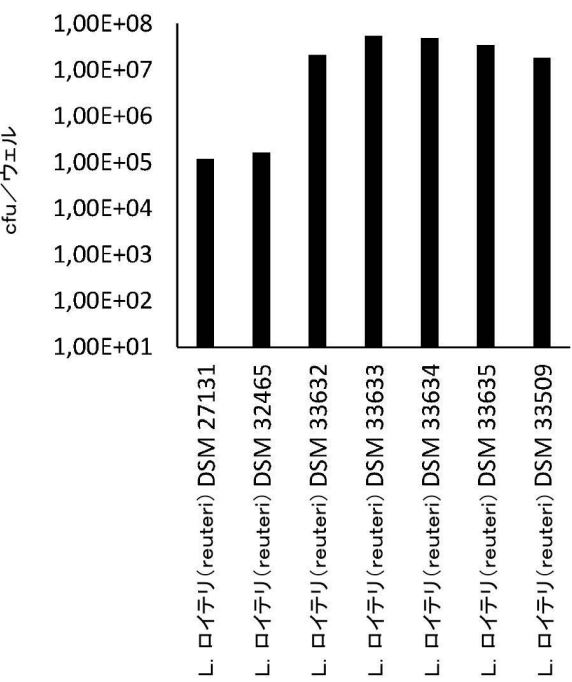


【図 9 D】

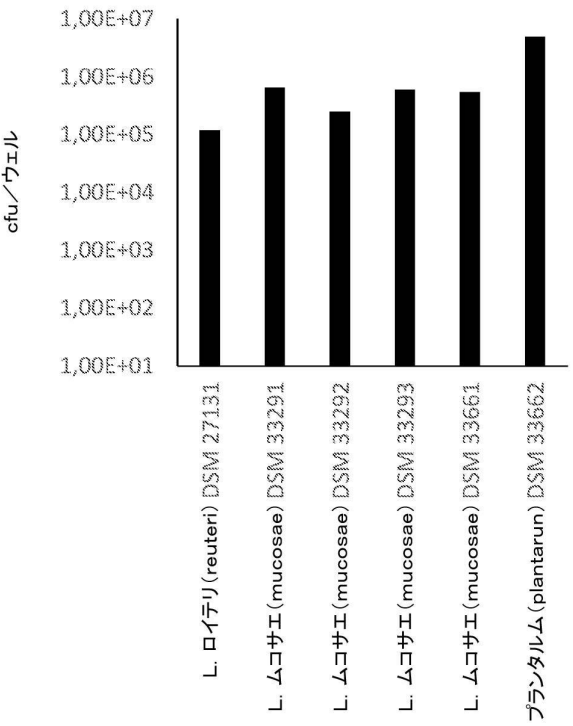


10

【図 10 A】



【図 10 B】



20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	1/04 (2006.01)	A 6 1 P	1/04
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02
A 6 1 P	19/08 (2006.01)	A 6 1 P	19/08

DSMZ DSM 33633

DSMZ DSM 33634

DSMZ DSM 33635

DSMZ DSM 33291

DSMZ DSM 33292

DSMZ DSM 33293

DSMZ DSM 33661

(72)発明者 ルース、ステファン

スウェーデン王国、ウプサラ、ベストゲターレサン 57

審査官 大西 隆史

(56)参考文献

特開平10-295395 (JP, A)

特表2019-531757 (JP, A)

特表2009-539372 (JP, A)

国際公開第2018/181380 (WO, A1)

特表2004-523241 (JP, A)

OLESKIN, Alexander V. et al., Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences, 2014年06月05日, Vol. 4, No. 3, pp. 199-206, DOI: 10.6000/1927-5951.2014.04.03.5

JENSEN, Hanne et al., Microbiology, 2014年04月01日, Vol. 160, Issue 4, pp. 671-681, DOI: 10.1099/mic.0.073551-0

JIAO, Jian et al., frontiers in Plant Science, 2016年09月21日, Vol. 7, Article ID: 1387, DOI: 10.3389/fpls.2016.01387

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N 1/00-7/08

A61P 1/00-43/00

A61K 35/00-51/12

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

PubMed