



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118178372 A

(43) 申请公布日 2024. 06. 14

(21) 申请号 202410180043.6

(22) 申请日 2020.02.28

(30) 优先权数据

2019-036309 2019.02.28 JP

(62) 分案原申请数据

202080017273.0 2020.02.28

(71) 申请人 森永乳业株式会社

地址 日本东京都

申请人 国立大学法人神户大学  
学校法人北里研究所

(72) 发明人 清水金忠 大泽朗 西山启太  
冈田信彦 小山信裕 向井孝夫  
供田洋

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事  
务所(普通合伙) 11277

专利代理师 刘新宇 李茂家

(51) Int.Cl.

A61K 31/192 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 1/38 (2006.01)

A61K 35/742 (2015.01)

A61K 35/745 (2015.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A23L 33/135 (2016.01)

C12R 1/01 (2006.01)

C12R 1/145 (2006.01)

权利要求书1页 说明书11页 附图3页

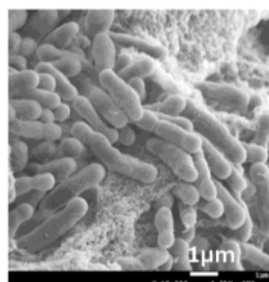
### (54) 发明名称

双歧杆菌属细菌的菌毛形成诱导用的组合物

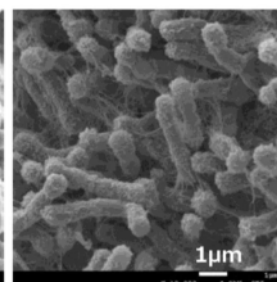
### (57) 摘要

本发明涉及双歧杆菌属细菌的菌毛形成诱导用的组合物。目的在于提供诱导双歧杆菌属细菌的菌毛形成的方法、和促进该细菌的肠道定居的方法。为将3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸作为双歧杆菌属细菌的菌毛形成诱导用的组合物、及该细菌的肠道定居促进用的组合物的有效成分。

PPA-



PPA+



1. 一种双歧杆菌 (*Bifidobacterium*) 属细菌的菌毛形成诱导用的组合物, 其含有3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基) 丙酸作为有效成分。
2. 一种双歧杆菌属细菌的肠道定居促进用的组合物, 其含有3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基) 丙酸作为有效成分。
3. 根据权利要求1或2所述的组合物, 其中, 所述双歧杆菌属细菌为长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*)。
4. 根据权利要求1~3中任一项所述的组合物, 其为饮食品。
5. 根据权利要求1~4中任一项所述的组合物, 其为药品。
6. 3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基) 丙酸在制造双歧杆菌属细菌的菌毛形成诱导用的组合物中的应用。
7. 3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基) 丙酸在诱导双歧杆菌属细菌的菌毛形成中的应用。
8. 用于诱导双歧杆菌属细菌的菌毛形成的3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基) 丙酸。
9. 一种诱导双歧杆菌属细菌的菌毛形成的方法, 其包括向动物给予3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基) 丙酸。
10. 3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基) 丙酸在制造双歧杆菌属细菌的肠道定居促进用的组合物中的应用。
11. 3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基) 丙酸在促进双歧杆菌属细菌的肠道定居中的应用。
12. 用于促进双歧杆菌属细菌的肠道定居的3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基) 丙酸。
13. 一种促进双歧杆菌属细菌的肠道定居的方法, 其包括向动物给予3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基) 丙酸。
14. 一种双歧杆菌属细菌的菌毛形成诱导用的组合物, 其含有产生3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基) 丙酸的微生物。
15. 一种双歧杆菌属细菌的肠道定居促进用的组合物, 其含有产生3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基) 丙酸的微生物。
16. 根据权利要求14或15所述的组合物, 其中, 所述微生物为梭菌 (*Clostridium*) 属细菌。
17. 根据权利要求14~16中任一项所述的组合物, 其中, 所述双歧杆菌属细菌为长双歧杆菌。
18. 一种肠调节用组合物, 其含有双歧杆菌属细菌、以及3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基) 丙酸。
19. 一种肠道菌群改善用组合物, 其含有双歧杆菌属细菌、以及3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基) 丙酸。

## 双歧杆菌属细菌的菌毛形成诱导用的组合物

[0001] 本申请是中国专利申请202080017273.0的分案申请,原申请202080017273.0的申请日为2020年02月28日,其名称为“双歧杆菌属细菌的菌毛形成诱导用的组合物”。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及3-苯基丙酸和3-(4-羟基苯基)丙酸的新的用途、即诱导双歧杆菌属细菌的菌毛形成的用途和促进前述细菌的肠道定居的用途。

### 背景技术

[0003] 双歧杆菌(Bifidobacterium)属细菌是定居在人体肠道中的细菌之一,已知对作为宿主的人体起到防止腹泻、减少有害细菌和毒性化合物、调节免疫、及抗致癌性活性等各种有利的作用(非专利文献1~3)。

[0004] 据推测,菌毛结构参与了宿主与细菌之间的相互作用(非专利文献4~5)。此外,已知双歧杆菌属细菌中存在有和菌毛形成相关的基因簇。然而,到目前为止在从人体分离出并在一般的条件下培养的双歧杆菌属细菌中尚未证实菌毛结构。

[0005] 然而,已知3-苯基丙酸是通过作为肠道细菌的生孢梭菌(*Clostridium sporogenes*)来自苯基丙氨酸的代谢产物(非专利文献6)。

[0006] 现有技术文献

[0007] 非专利文献

[0008] 非专利文献1:S.Fukuda et al.,Nature,2011,469,543-547.

[0009] 非专利文献2:S.Fanning et al.,PNAS,2012,109(6),2108-2113.

[0010] 非专利文献3:Sivan A.et al.,Science.2015,350(6264),1084-1089.

[0011] 非专利文献4:O'Connell Motherway et al.,PNAS2011,108(27),11217-11222.

[0012] 非专利文献5:F.Turroni et al.,PNAS2013,110(27)11151-11156.

[0013] 非专利文献6:S.R.Elsden,et al.,Archives of Microbiology April 1976,107(3),283-288.

### 发明内容

[0014] 发明要解决的问题

[0015] 本发明人等推测双歧杆菌属细菌在肠道中形成了菌毛,假设在肠道存在诱导在该细菌内形成菌毛的物质。由于推测菌毛结构促进该细菌的肠道定居,因此可认为上述物质具有双歧杆菌属细菌的肠道定居促进作用,可能对肠道菌群改善有用。

[0016] 鉴于上述状况,本发明的目的在于提供,诱导双歧杆菌属细菌的菌毛形成的方法、及促进该细菌的肠道定居的方法。

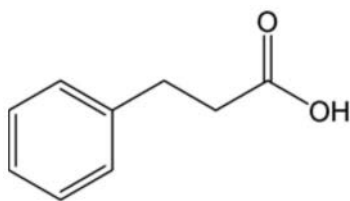
[0017] 用于解决问题的方案

[0018] 本发明人等为了解决上述课题而进行了深入研究,结果发现在模拟了肠道的模型培养液中培养的双歧杆菌属细菌中观察到菌毛形成。此外,将3-苯基丙酸鉴定为由该培养

液诱导菌毛形成的物质。进而,诱导了菌毛形成的双歧杆菌属细菌中,发现与构成肠上皮的物质的粘附性提高,也想到了3-苯基丙酸能促进双歧杆菌属细菌的肠道定居。另外,还发现:由梭菌属细菌产生的、作为苯基丙氨酸的代谢产物的3-苯基丙酸和作为酪氨酸的代谢产物的3-(4-羟基苯基)丙酸分别诱导双歧杆菌属细菌的菌毛形成,也想到了梭菌属细菌处于诱导双歧杆菌属细菌的菌毛形成或能促进肠道定居的串扰关系。

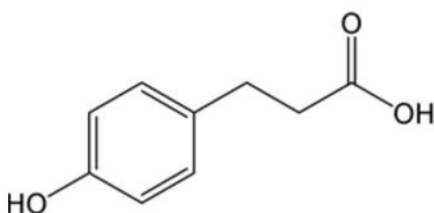
[0019] 即,本发明的一方式为双歧杆菌 (*Bifidobacterium*) 属细菌的菌毛形成诱导用的组合物,其含有3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸作为有效成分。

[0020] 另外,本发明的其它方式为双歧杆菌属细菌的肠道定居促进用的组合物,其含有3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸作为有效成分。



3-苯基丙酸

[0021]



3-(4-羟基苯基)丙酸

[0022] 这些方式中,前述双歧杆菌属细菌优选为长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*)。

[0023] 另外,这些方式中的组合物优选为饮食品或为药品。

[0024] 本发明的其它方式为3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸在制造双歧杆菌属细菌的菌毛形成诱导用的组合物中的应用。

[0025] 本发明的其它方式为3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸在诱导双歧杆菌属细菌的菌毛形成中的应用。

[0026] 本发明的其它方式为用于诱导双歧杆菌属细菌的菌毛形成的3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸。

[0027] 本发明的其它方式为诱导双歧杆菌属细菌的菌毛形成的方法,其包括向动物给予3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸。

[0028] 本发明的其它方式为3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸在制造双歧杆菌属细菌的肠道定居促进用的组合物中的应用。

[0029] 本发明的其它方式为3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸在促进双歧杆菌属细菌的肠道定居中的应用。

[0030] 本发明的其它方式为用于促进双歧杆菌属细菌的肠道定居的3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸。

[0031] 本发明的其它方式为促进双歧杆菌属细菌的肠道定居的方法,其包括向动物给予3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸。

[0032] 本发明的其它方式为双歧杆菌属细菌的菌毛形成诱导用的组合物,其含有产生3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸的微生物。

[0033] 本发明的其它方式为双歧杆菌属细菌的肠道定居促进用的组合物,其含有产生3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸的微生物。

[0034] 这些方式中,前述微生物优选为梭菌(*Clostridium*)属细菌。

[0035] 这些方式中,前述双歧杆菌属细菌优选为长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)。

[0036] 本发明的其它方式为肠调节用组合物,其含有双歧杆菌属细菌、以及3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸。

[0037] 本发明的其它方式为肠道菌群改善用组合物,其含有双歧杆菌属细菌、以及3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸。

[0038] 发明的效果

[0039] 根据本发明,能够诱导双歧杆菌属细菌的菌毛形成,而且由此能够促进该细菌的肠道定居。本发明还能将肠道菌群改善至双歧杆菌属细菌占优势的状态。

## 附图说明

[0040] 图1是试验例1中的、在肠道模型(KUHIMM)培养液中培养的长双歧杆菌的透射型电子显微镜照片。a:添加人粪便、b:未添加人粪便

[0041] 图2是试验例3中的、培养长双歧杆菌的扫描型电子显微镜照片。PPA-:未添加3-苯基丙酸、PPA+:添加3-苯基丙酸

[0042] 图3是示出试验例3中的、培养长双歧杆菌与人肠道上皮细胞系的粘附性的图。各组从左边起,PPA-:未添加3-苯基丙酸、PPA+:添加3-苯基丙酸、PPA+(FimA Ab):添加3-苯基丙酸且添加抗FimA抗体

[0043] 图4是示出试验例4中的、与生孢梭菌共培养的长双歧杆菌的菌毛形成的蛋白质印迹的照片。

[0044] 图5是示出试验例5中的、在添加了氨基酸代谢物的GAM培养基中培养的长双歧杆菌的菌毛形成的蛋白质印迹的照片。苯基丙氨酸及其代谢物1:苯基丙氨酸、2:苯基乳酸、3:苯基丙烯酸、4:3-苯基丙酸、酪氨酸及其代谢物1:酪氨酸、2:4-羟基苯基乳酸、3:4-羟基苯基丙烯酸、4:3-(4-羟基苯基)丙酸、色氨酸及其代谢物1:色氨酸、2:吲哚乳酸、3:吲哚丙烯酸、4:3-(吲哚)丙酸

[0045] 图6是试验例6中的、悉生小鼠粪便中的长双歧杆菌的扫描型电子显微镜照片。BL:长双歧杆菌接种小鼠、BL+CS:长双歧杆菌和生孢梭菌接种小鼠

[0046] 图7是示出试验例7中的、悉生小鼠的盲肠粘液上的长双歧杆菌的菌数的图表。BL:长双歧杆菌接种小鼠、BL+CS:长双歧杆菌和生孢梭菌接种小鼠

## 具体实施方式

[0047] 接着,对本发明进行详细地说明。其中,本发明不限于以下的实施方式,可以在本发明的范围内进行自由变更。

[0048] 本发明的组合物中,含有3-苯基丙酸(也记为PPA)和/或3-(4-羟基苯基)丙酸(也记为HPPA)作为有效成分。其中从双歧杆菌属细菌的菌毛形成诱导作用强度的观点出发,优选将3-苯基丙酸作为有效成分。

[0049] 3-苯基丙酸和3-(4-羟基苯基)丙酸可以分别利用公知的合成方法制造,也可以使用市售品。

[0050] 另外,作为本发明的组合物的有效成分,也可以以产生3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸的微生物的形态使用。

[0051] 作为上述微生物,可优选列举出梭菌属细菌,更具体而言优选列举出生孢梭菌(*C. sporogenes*)、尸毒梭菌(*C. cadaveris*)等。这些细菌中,分别产生3-苯基丙酸作为苯基丙氨酸的代谢物,产生3-(4-羟基苯基)丙酸作为酪氨酸的代谢物。

[0052] 本发明的组合物为这种微生物制剂的方式时,通常为包含活菌体的形态。

[0053] 本发明的组合物中的3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸的量可以根据组合物的形态进行适宜设定,没有特别限定,例如,以总量计可以优选为组合物整体的0.01质量%以上,更优选为0.1质量%以上。3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸的含量的上限没有特别限制,例如以总量计可以为100质量%以下。

[0054] 本发明的组合物中,能够诱导双歧杆菌属细菌的菌毛形成。作为前述双歧杆菌属细菌,没有特别限定,优选为长双歧杆菌。

[0055] 对于双歧杆菌属细菌的菌毛,通过分选酶(SrtC和SrtA)使FimA蛋白在菌体表面上聚合,FimB蛋白与其顶端结合而形成成为巨大的纤维(K.Suzuki et al., B.M.F.H., 2016, 35(1), 19-27)。如后述的实施例所示,在3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸的存在下,参与菌毛形成的基因的、具体而言至少编码菌毛结构蛋白的基因(*fimA*、*fimB*)及编码使前述结构蛋白聚合的酶的基因(*srtC*)的表达增强、并诱导菌毛形成。

[0056] 菌毛形成可以通过例如利用扫描型电子显微镜观察双歧杆菌属细菌的菌体表面来直接确认。

[0057] 另外,也可以通过使用识别构成菌毛的蛋白的抗体例如抗FimA抗体等并利用蛋白质印迹等公知的方法进行确认。需要说明的是,在形成了菌毛的情况下,通常在作为FimA单体的分子量的约50kDa至约200kDa或更大的位置观察到表示梯状条带样的菌毛的条带。

[0058] 双歧杆菌属细菌的菌毛的主要组成蛋白FimA具有凝集素样的性质,因此可认为其有助于该细菌通过菌毛粘附于肠道上皮细胞上的粘附性。如后述的试验例所示,与未诱导菌毛形成的情况相比,诱导了菌毛形成的双歧杆菌属细菌更多地与构成肠上皮的细胞结合。

[0059] 可认为若改善双歧杆菌属细菌粘附于肠道上皮细胞上的粘附性,则可促进该细菌的肠道定居。此处,“定居”包括:由于粘附于肠道上皮上而存在于肠道中的菌量比摄取(给予)组合物之前增加;以及从肠道中排出的菌量比摄取(给予)组合物之前减少。

[0060] 因此,本发明的组合物中,能够促进双歧杆菌属细菌的肠道定居。进而也可期待将肠道菌群改善至双歧杆菌属细菌占优势的状态。

[0061] 给予(摄取)本发明的组合物的对象只要是动物就没有特别限定,优选人。另外,可以是成人、儿童、婴儿、新生儿(包括低体重儿)等中的任意者。

[0062] 本发明的其它方式为3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸在制造双歧杆菌属细菌的菌毛形成诱导用的组合物中的应用。

[0063] 本发明的其它方式为用于诱导双歧杆菌属细菌的菌毛形成的3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸的应用。

[0064] 本发明的其它方式为用于诱导双歧杆菌属细菌的菌毛形成的3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸。

[0065] 本发明的其它方式为一种诱导双歧杆菌属细菌的菌毛形成的方法,其包括向动物给予3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸。

[0066] 本发明的其它方式为3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸在制造双歧杆菌属细菌的肠道定居促进用的组合物中的应用。

[0067] 本发明的其它方式为用于促进双歧杆菌属细菌的肠道定居的3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸的应用。

[0068] 本发明的其它方式为用于促进双歧杆菌属细菌的肠道定居的3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸。

[0069] 本发明的其它方式为促进双歧杆菌属细菌的肠道定居的方法,其包括向动物给予3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸。

[0070] 本发明的其它方式为肠调节用组合物,其含有双歧杆菌属细菌、以及3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸。

[0071] 本发明的其它方式为肠道菌群改善用组合物,其含有双歧杆菌属细菌、以及3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸。

[0072] 本发明中,“肠调节”是指:“调节肠道菌群、改善与肠道菌群相关的疾病”。如后述的实施例所示,3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸能使双歧杆菌定居在肠道中,因此本方式的组合物能够减少所谓的有害菌、并将肠道菌群改善至双歧杆菌属细菌占优势的状态,其结果能够改善与肠道菌群相关的疾病。

[0073] 例如,由于肠道菌群中的一部分有害菌生成或激活突变原物质、致癌性物质,因此有时促进致癌,另一方面,已知一部分有益菌通过这些物质分化、灭活或者吸附等而去除,有助于预防癌症。另外,例如,还报道了如下研究,表明肠道菌群与肥胖、代谢综合征密切相关。进而,还报道如下启示:肠道菌群与自闭症、抑郁等精神病、对应激的应答、影响行为、学习等大脑功能相关的现象有关。

[0074] 因此,作为“与肠道菌群相关的疾病”,可列举例如溃疡性结肠炎等炎症性疾病、以IBS・功能性便秘・功能性腹泻为代表的功能性胃肠疾病、肠道系统的癌症、代谢综合征、神经疾病等。作为肠道系统的癌症,可列举例如十二指肠癌、小肠癌、大肠癌等。作为大肠癌,可列举例如盲肠癌、结肠癌、直肠癌等。作为代谢综合征,可列举例如肥胖(特别是,内脏脂肪型肥胖)、高血压症、脂质代谢异常症、糖尿病等。作为神经疾病,可列举例如焦虑症、自闭症、抑郁症等。

[0075] 本发明的组合物的摄取(给药)时期没有特别限定,可以根据给予对象的状态进行适宜选择。

[0076] 本发明的组合物的摄取(给药)量可根据摄取(给药)对象的年龄、性别、状态、其它条件等进行适宜选择。作为3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸的摄取量,优选以100~1000mg/天、更优选以100~500mg/天、进一步优选以100~300mg/天的范围的量作为基准。

[0077] 需要说明的是,无论摄取(给药)的量、期间如何,组合物可以1天给予1次或分成多次给予。

[0078] 本发明的组合物的摄取(给药)途径可以是经口或非经口中的任意者,但优选经口。另外,作为非经口摄取(给药),可列举出经皮、静注、直肠给药、吸入等。

[0079] 需要说明的是,摄取(给药)后,在肠道内维持有效量以上的3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸是理想的。

[0080] 将本发明的组合物制成经口摄取的组合物时,优选制成饮食品的形态。

[0081] 作为饮食品,只要在不损害3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸的效果的情况下能够经口摄取,形态、性状就没有特别限制,除了含有3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸以外,通常可以使用饮食品中使用的原料并利用通常的方法而制造。

[0082] 作为饮食品,无论液体、膏状、凝胶状固体、粉末等形态,可列举例如压片糖;流质食品(经管摄取用营养食品);面包、通心粉、意大利细面条、面类、蛋糕混合料、油炸粉、面包粉等小麦粉产品;方便面、杯面、蒸煮/烹调食品、烹调罐头、微波用食品、速溶汤/日式炖菜、速溶大酱汤/吸入物、罐装浓汤、冻/干食物、其它速食品等速食食品类;农作物罐头、水果罐头、果酱(jam)/橘子酱(Marmalade)类、咸菜、煮豆类、农产品干物类、谷物(谷物加工品)等农产加工品;水产罐头、鱼肉火腿/香肠、水产糜类产品、水产鱼贝类、佃煮类等水产加工品;畜产罐头/糊剂类、畜肉火腿/香肠等畜产加工品;加工乳、乳饮料、酸奶类、发酵乳、乳酸菌饮料类、乳酪、冰激凌类、配方奶粉类、奶油、其它乳制品等乳/乳制品;黄油、人造奶油类、植物油等油脂类;酱油、大酱、沙司(Sauce)类、西红柿加工调味剂、味醂类、食醋类等基础调味剂;烹调混合料、咖喱的原料类、鱼露类、沙拉(dressing)类、面汤类、香辛料类、其它复合调味剂等复合调味剂/食品类;材料冷冻食品、半烹调冷冻食品、经烹调的冷冻食品等冷冻食品;焦糖、糖果、口香糖、巧克力、曲奇(cookie)、饼干(biscuits)、蛋糕(cake)、馅饼(pie)、小吃(snack)、薄脆饼(cracker)、日本点心、米点心、豆点心、西式甜点、果子冻、其它点心等点心类;碳酸饮料、天然果汁、果汁饮料、带有果汁的清涼饮料、果肉饮料、带有果粒的果实饮料、蔬菜系饮料、豆奶、豆奶饮料、咖啡饮料、茶饮料、粉末饮料、浓缩饮料、运动饮料、营养饮料、酒精饮料、其它嗜好饮料等嗜好饮料类;婴儿食品、米饭伴侣、茶泡饭海带等其它市售食品等;育儿用配方奶粉;经肠营养食品;功能性食品(特定保健用食品、营养功能食品)等。

[0083] 另外,作为饮食品的一形态,也可以是饲料。作为饲料,可列举出宠物食品、家畜饲料、鱼饲料等。

[0084] 作为饲料的形态,没有特别限制,除了3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸之外,例如可以含有玉米、小麦、大麦、黑麦、蜀黍等谷类;豆粕、菜籽油粕、椰子油粕、亚麻仁油粕等植物性油粕类;麸皮、麦糠、米糠、脱脂米糠等糠类;玉米蛋白粉、玉米酱等制造粕类;鱼粉、脱脂奶粉、乳清、黄色油脂、牛脂等动物性饲料类;圆酵母、啤酒酵母等酵母类;磷酸三钙、碳酸钙等矿物质饲料;油脂类;单体氨基酸;糖类等。

[0085] 本发明的组合物为饮食品(包括饲料)的形态时,其中包含的3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸的量没有特别限定,可以进行适宜选择,例如,以总量计优选为饮食品整



体的0.01质量%以上,更优选为0.1质量%以上。3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸的含量的上限没有特别限制,例如可以优选为70质量%以下,更优选为40质量%以下,进一步优选为5质量%以下。

[0086] 本发明的组合物为饮食品(包括饲料)的形态时,可以以标示为双歧杆菌属细菌的肠道定居促进这样的用途的饮食品的形式提供/贩卖。另外,本说明书的3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸可以用于制造这些饮食品等。

[0087] 上述“标示”行为包括用于使需要者知悉上述用途的全部行为,只要是可想起或类推上述用途的标示则不论标示目的、标示内容、标示对象物/介质等如何,均相当于本发明的“标示”。

[0088] 另外,“标示”优选通过需要者直接意识到上述用途的表现方式来标示。具体而言,可列举出对在饮食品的商品或商品的包装上记载了上述用途的物品进行转让、交货、为了转让或交货而进行展示、进口的行为;在与商品有关的广告、价格表或交易文件中记载上述用途并展示或发布、或在以这些为内容的信息中记载上述用途并通过电磁方法(互联网等)进行提供的行为等。

[0089] 另一方面,作为标示内容,优选为得到行政等许可的标示(例如,基于行政规定的各种制度而得到许可、并以基于这样的许可的形态进行的标示)。另外,优选将这样的标示内容标示在包装、容器、商品目录、宣传手册、POP等销售现场的宣传材料、其他文件中。

[0090] 另外,“标示”也可以示例出作为健康食品、功能性食品、经肠营养食品、特殊用途食品、保健功能食品、特定保健用食品、营养功能食品、功能性标示食品、准药物等的标示。其中,特别是,经消费厅许可的标示、可列举例如特定保健用食品、营养功能食品、或功能性标示食品相关的制度、或与这些类似的制度许可的标示等。具体而言,可以列举出作为特定保健用食品的标示、作为附加条件的特定保健用食品的标示、主旨为对身体的结构、功能带来影响的标示、降低疾病风险的标示、基于科学根据的功能性的标示等,更具体而言,典型的例子是作为关于健康增进法中规定的特别用途标示的许可等的内阁府令(平成二十一年八月三十一年内阁府令第五十七号)所确定的特定保健用食品的标示(特别是保健用途的标示)及与其类似的标示等。

[0091] 作为上述标示,可列举例如表示为“希望增加双歧杆菌者”,“用于改善肠道菌群”等。

[0092] 本发明的组合物中,可以制成药品的形态。

[0093] 药品的给药途径优选经口或非经口中的任意者,但优选经口。另外,作为非经口给予,可列举出经皮、静注、直肠给药、吸入等。

[0094] 作为药品的形态,可以根据给药方法制成适宜期望的剂型。例如,经口给予的情况,可以制成散剂、颗粒剂、片剂、胶囊剂等固体制剂;溶液制剂、糖浆剂、悬浮剂、乳剂等液体制剂等。另外,非经口给予的情况,可以制成栓剂、软膏剂、注射剂等。

[0095] 需要说明的是,希望给药后在肠道中维持有效量以上的3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸,因此经口制剂的情况下,优选列举出肠溶性胶囊剂、耐酸性的糖衣片等。

[0096] 进行制剂化时,除了3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸之外,可以使用通常用于制剂化的赋形剂、pH调节剂、着色剂、矫味剂等成分。另外,也可以组合使用其它药效成分、公知的或将来发现具有肠道菌群改善作用的成分等。

[0097] 此外,制剂化可以根据剂型利用适宜公知的方法来实现。在进行制剂化时,可以适宜配混制剂载体进行制剂化。

[0098] 作为赋形剂,可列举例如:乳糖、白糖、葡萄糖、甘露醇、山梨醇等糖衍生物;玉米淀粉、马铃薯淀粉、 $\alpha$ -淀粉、糊精、羧甲基淀粉等淀粉衍生物;结晶纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素、羧甲基纤维素钙等纤维素衍生物;阿拉伯胶;葡聚糖;普鲁兰多糖;轻质无水硅酸、合成硅酸铝、偏硅酸铝酸镁等硅酸盐衍生物;磷酸钙等磷酸盐衍生物;碳酸钙等碳酸盐衍生物;硫酸钙等硫酸盐衍生物等。

[0099] 作为结合剂,例如除了上述赋形剂以外还可列举:明胶;聚乙烯基吡咯烷酮;Macrogol等。

[0100] 作为崩解剂,例如除了上述赋形剂以外还可列举:交联羧甲基纤维素钠、羧甲基淀粉钠、交联聚乙烯基吡咯烷酮等经化学修饰的淀粉或纤维素衍生物等。

[0101] 作为润滑剂,可列举例如:滑石;硬脂酸;硬脂酸钙、硬脂酸镁等硬脂酸金属盐;硅胶;胶状硅酸镁铝(VEEGUM)、鲸蜡等蜡类;硼酸;甘醇;富马酸、己二酸等羧酸类;苯甲酸钠等羧酸钠盐;硫酸钠等硫酸盐类;亮氨酸;月桂基硫酸钠、月桂基硫酸镁等月桂基硫酸盐;硅酸酐、硅酸水合物等硅酸类;淀粉衍生物等。

[0102] 作为稳定剂,可列举例如:对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯等对羟基苯甲酸酯类;氯代丁醇、苯甲醇、苯乙醇等醇类;苯扎氯铵;乙酸酐;山梨酸等。

[0103] 作为矫味矫臭剂,可列举例如甜味剂、酸味剂、香料等。

[0104] 需要说明的是,作为经口给药用的液体制剂所使用的载体,可列举水等溶剂等。

[0105] 本发明的组合物为药品的形态时,其中包含的3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸的量没有特别限定,可以进行适宜选择,例如,以总量计优选为药品整体的40质量%以上、更优选为50质量%以上、进一步优选为97质量%以上。3-苯基丙酸和/或3-(4-羟基苯基)丙酸的含量的上限没有特别限制,例如可以为100质量%以下。

[0106] 给药本发明的药品的时机例如在餐前、餐后、进餐过程中、睡前等没有特别限定。

[0107] 实施例

[0108] 以下使用实施例对本发明进行进一步具体地说明,但本发明不限于这些实施例。

[0109] <试验例1>肠道模型培养中的菌毛形成的确认

[0110] 在GAM培养基中培养长双歧杆菌1-1株,将该培养液调整为 $OD_{600}=0.1$ 的菌液1mL加入透析膜内,在单批次厌氧性培养系统(KUHIMM,R.Takagi et.al.,PLoS One.2016,11(8):e0160533、D.Sasaki et.al.,Sci.Rep.2018,8(1):435.)内,边用1M的 $Na_2CO_3$ 液进行控制以不使pH为6以下边在37°C下厌氧培养24小时。需要说明的是,试验组的培养基中添加预先用生理盐水调整至10%(w/v)的人粪便溶液100 $\mu$ L,在阴性对照组中未添加。

[0111] 用氧化钬固定培养后的细菌,用透射型电子显微镜进行观察,结果添加人粪便并进行培养的情况,观察到大的纤维状的菌毛(图1)。

[0112] 另外,对于添加人粪便并进行培养的试验组的长双歧杆菌1-1株,进行了转录组解析,结果包含fimA、fimB和srtC基因的簇与阴性对照组相比,表达增加了2倍以上。

[0113] <试验例2>菌毛形成诱导物质的鉴定

[0114] 对于添加了试验例1中使用的人粪便的KUHIMM培养液(900mL),使用活性炭柱(树

脂容积:45mL),按MilliQ水、50%甲醇和100%甲醇(各250mL)的顺序进行分级。在各级分中,将100 $\mu$ L回收至其它容器中并进行减压干固,然后用MilliQ水50 $\mu$ L进行再溶解。接着,在GAM培养基中培养长双歧杆菌1-1株,在将该培养液调整至 $OD_{600}=0.1$ 的菌液1mL中添加上述的分级级分的再溶解液50 $\mu$ L,以37 $^{\circ}$ C培养24小时。培养后通过离心分离(4000 $\times$ g、5分钟)回收了菌体。通过包含变溶菌素和溶菌酶的提取液(参考组合:提取缓冲液(50mM Tris-HCl [pH7.0],40% [w/v]蔗糖,0.1mg [w/v]溶菌酶,25U变溶菌素[Sigma-Aldrich,M9901],cOmplete[Roche])对菌体进行处理,由此分级了包含菌毛的菌体表层级分。接着,通过三氯乙酸沉淀将蛋白质浓缩,供于SDS-PAGE。转录至PVDF膜上后,通过使用了抗FimA抗体的蛋白质印迹来实施,检测菌毛的信号,由此评价了菌毛诱导活性。用100%甲醇洗脱的级分中,观察到菌毛诱导活性。

[0115] 进而,用HPLC(柱:PEGASIL ODS SP100  $\phi$  20 $\times$ 250mm、溶剂条件:15-55%CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O-0.1%HCO<sub>2</sub>H 40分钟梯度、流速:6.0mL/分钟、检测:UV 210nm)将该级分分级/纯化,对确认了菌毛诱导活性的洗脱峰(保留时间38分钟)进行重复分级。接着,通过对该回收液进行减压干固,由此以4.8mg的产量得到目标活性物质。通过质谱分析和NMR解析对该物质进行结构确定,结果将该级分中包含的化合物鉴定为3-苯基丙酸。

[0116] 另外,在添加了3-苯基丙酸的(最终浓度0.01、0.1、0.5、1.0、2.5、10、20、40或80 $\mu$ g/mL)GAM琼脂培养基中,将长双歧杆菌1-1株以37 $^{\circ}$ C厌氧培养24小时,结果确认依赖于3-苯基丙酸的用量地诱导了菌毛聚合。特别是,以高于0.1 $\mu$ g/mL的高浓度添加至培养基中时,菌毛形成得到显著诱导。

[0117] <试验例3>PPA的菌毛形成诱导活性的确认

[0118] 在添加了3-苯基丙酸10 $\mu$ g/mL的GAM琼脂培养基中,将长双歧杆菌1-1株以37 $^{\circ}$ C厌氧培养24小时。

[0119] 通过扫描型电子显微镜观察培养后的细菌,结果添加3-苯基丙酸并进行培养的情况,观察到大的纤维状的菌毛(图2)。

[0120] 对于前述菌毛形成得到确认的细菌,通过定量逆转录PCR解析了菌毛形成相关基因的表达状况,结果与阴性对照组相比,包含fimA、fimB和srtC基因的簇的表达增强了约3~5倍。

[0121] 进而,对前述培养细胞与人肠道上皮细胞系(Caco-2或HT29-MTX)的粘附性进行了评价。具体而言,将长双歧杆菌1-1株在添加了10 $\mu$ g/mL PPA的GAM培养基中进行37 $^{\circ}$ C、15小时培养。将菌体离心分离(4000 $\times$ g,1分钟,4 $^{\circ}$ C)并回收后,以成为 $OD_{600}=0.5$ 的方式悬浮于Dulbecco改进Eagle培养基(DMEM)中。将本菌液0.2mL添加至对HT29-MTX或Caco-2细胞进行单层培养的腔室载玻片中,以37 $^{\circ}$ C静置2小时。用DMEM培养基清洗后,用4%多聚甲醛固定粘附的长双歧杆菌,通过水晶紫进行染色。在显微镜下计数了每个孔的菌数。

[0122] 对于该粘附性,确认了:与不存在3-苯基丙酸的情况相比,存在3-苯基丙酸的情况显著增大,而且抗FimA抗体被抑制而显著变小(图3)。

[0123] 由这些结果可知:3-苯基丙酸具有诱导长双歧杆菌的菌毛形成的作用;以及是菌毛与肠道上皮的粘附因子。

[0124] <试验例4>与PPA代谢酶缺损梭菌属细菌共培养的双歧杆菌属细菌中的菌毛形成

[0125] 根据Dodder等人的方法(ClosTron-mediated engineering of Clostridium (PMID:22750794)、The ClosTron:Mutagenesis in Clostridium refined and streamlined (PMID:19891996)),在生孢梭菌ATCC11437株的f1dC (PMID:29168502)中插入ClosTron盒,由此破坏了f1dC亚基。需要说明的是,f1dC是编码生孢梭菌中的PPA代谢酶苯基乳酸脱氢酶的基因。将该f1dC缺损生孢梭菌在GAM培养基中培养36小时,结果确认在培养上清液中未检测到PPA。

[0126] 将生孢梭菌的前述f1dC缺损株或野生株和长双歧杆菌1-1株在GAM培养液中共培养24小时。

[0127] 对于培养后的长双歧杆菌,与试验例1同样地进行蛋白质印迹,结果在与生孢梭菌f1dC缺损株共培养的情况下,未观察到菌毛形成(图4)。

[0128] <试验例5>芳香族氨基酸及其代谢物的菌毛形成诱导活性的确认

[0129] 在添加了芳香族氨基酸或生孢梭菌所产生的前述氨基酸的代谢物10 $\mu$ g/mL的GAM琼脂培养基中,将长双歧杆菌1-1株以37 $^{\circ}$ C厌氧培养24小时。对于添加物质,使用苯基丙氨酸、苯基乳酸、苯基丙烯酸、或3-苯基丙酸作为酪氨酸及其代谢物,使用酪氨酸、4-羟基苯基乳酸、4-羟基苯基丙烯酸、或3-(4-羟基苯基)丙酸作为色氨酸及其代谢物,使用色氨酸、吲哚乳酸、吲哚丙烯酸、或3-(吲哚)丙酸作为苯基丙氨酸及其代谢物。

[0130] 与试验例1同样地,从培养后的长双歧杆菌的培养液中提取表层蛋白质,进行了蛋白质印迹,结果添加3-苯基丙酸并进行培养的情况,观察到菌毛形成。另外,添加3-(4-羟基苯基)丙酸并进行培养的情况,虽然比前者小但也观察到菌毛形成(图5)。

[0131] <试验例6>梭菌属细菌摄取小鼠中的双歧杆菌属细菌的菌毛形成的确认

[0132] 对无菌小鼠在第一天给予1次生孢梭菌ATCC11437株和长双歧杆菌1-1株(BL+CS组、n=4)或长双歧杆菌1-1株(BL组、n=5)。生孢梭菌ATCC11437株给予 $2.0 \times 10^7$ CFU/100 $\mu$ L、长双歧杆菌1-1株给予 $3.4 \times 10^7$ CFU/100 $\mu$ L。在整个实验过程中,每周依据T.Matsuki et al.,Appl.Environ.Microbiol.(2004)70(1):167-73的方法通过定量PCR对粪便中的细菌数进行测定。长双歧杆菌的检测中使用的引物为BiLON-1/BiLON-2(T.Matsuki et al.,Appl.Environ.Microbiol.(2004)70(1):167-173),生孢梭菌的检测中使用的引物为Sporog-F/Sporog-R(S.Morandi et al.,Anaerobe.2015,34:44-49.)。

[0133] 确认了:BL+CS组在整个实验过程中生孢梭菌稳定并形成菌落。另外,以平均21~38 $\mu$ M检测到BL+CS组中粪便中的PPA,但在BL组未检测到PPA。

[0134] 在给予开始7周后将小鼠解剖,利用扫描型电子显微镜观察粘附于各组小鼠的肠上皮上的长双歧杆菌,结果BL+CS组中观察到大的纤维状的菌毛(图6)。

[0135] 另外,采集100mg小鼠粪便,将其完全悬浮于300 $\mu$ L的包含变溶菌素和溶菌酶的提取液中,在37 $^{\circ}$ C下孵育3小时。进行离心分离(8000 $\times$ g,10分钟,4 $^{\circ}$ C),回收了上清液200 $\mu$ L。接着,通过三氯乙酸沉淀将蛋白质浓缩,供于SDS-PAGE。转录于PVDF膜上后,使用抗FimA抗体进行蛋白质印迹检测了菌毛的信号,结果BL+CS组中检测出FimA聚合物,观察到菌毛形成。

[0136] <试验例7>双歧杆菌属细菌与小鼠肠道的粘附性的评价

[0137] 在给予开始7周后,将给予了生孢梭菌ATCC11437株和长双歧杆菌1-1株(BL+CS组、n=4)或长双歧杆菌1-1株(BL组、n=5)的小鼠解剖。用生理盐水清洗盲肠,用刮刀回收了粘

附于肠上皮上的细菌。与试验例6同样地通过qPCR测定了生孢梭菌和长双歧杆菌的菌数。

[0138] 图7示出结果。与BL组相比,观察到菌毛的BL+CS组中,观察到小鼠盲肠上皮的粘附菌数的显著(\* $p < 0.05$ )改善。

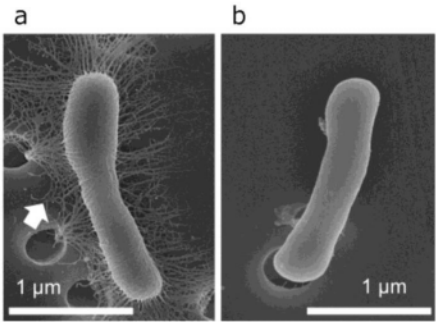


图1

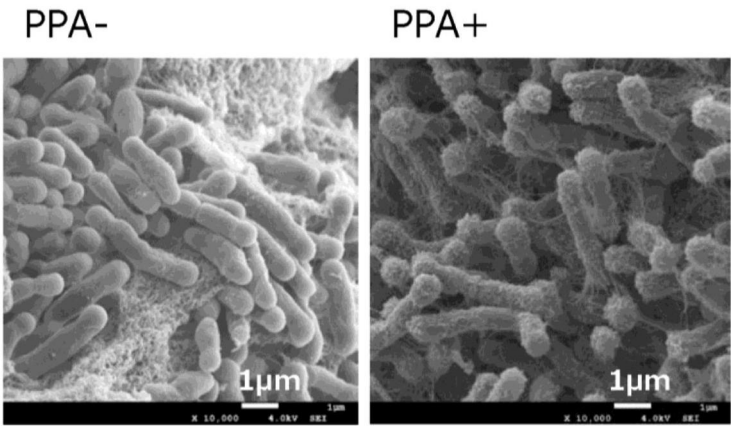


图2

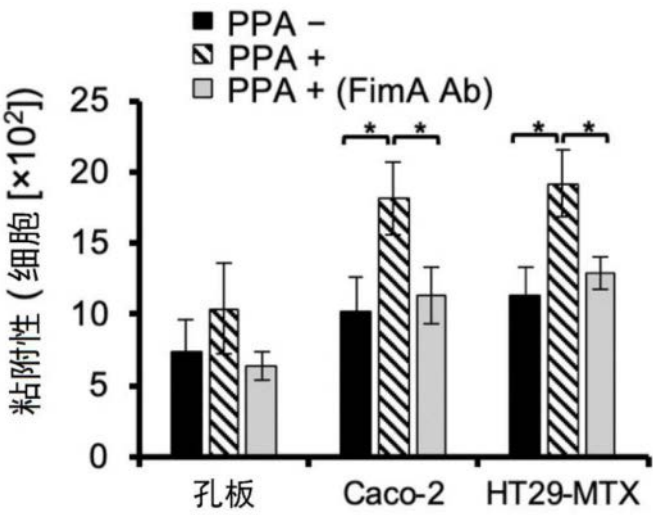


图3

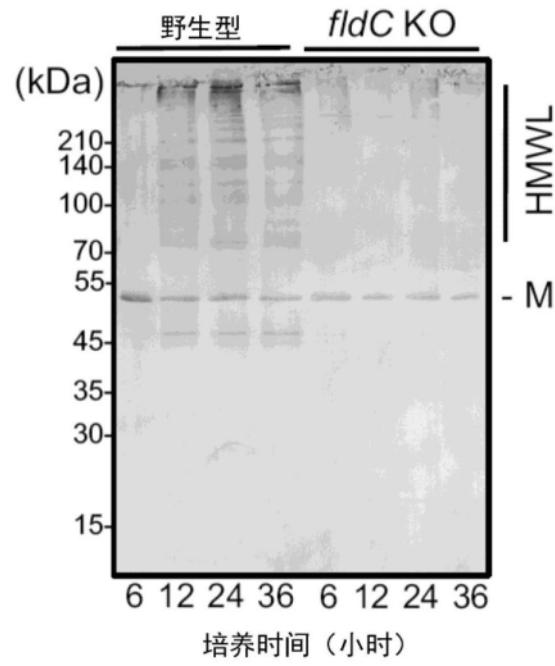


图4

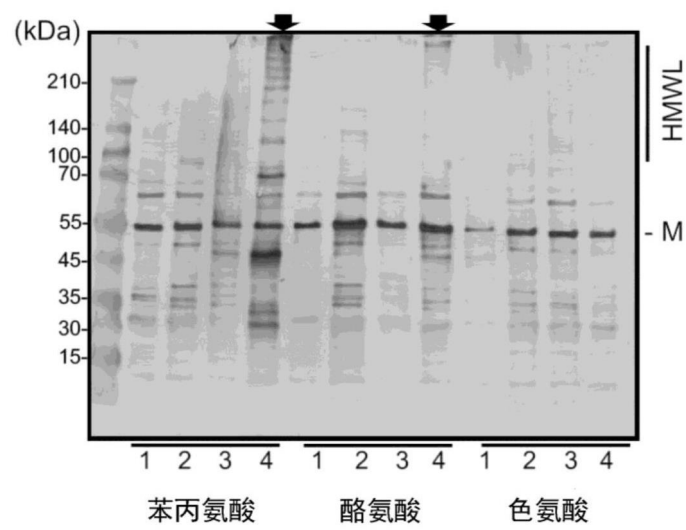


图5

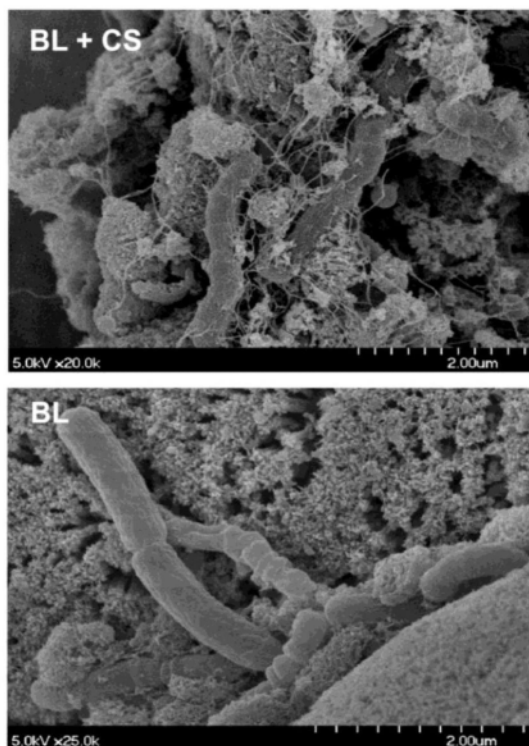


图6

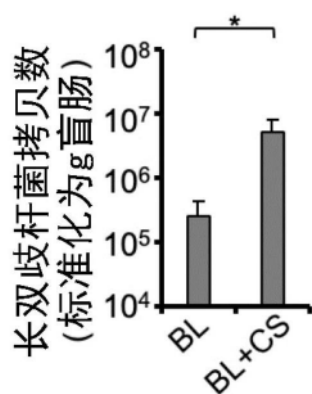


图7