



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119013031 A

(43) 申请公布日 2024. 11. 22

(21) 申请号 202380027134.X

(22) 申请日 2023.03.14

(30) 优先权数据

2022-042917 2022.03.17 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.09.12

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2023/009929 2023.03.14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/176849 JA 2023.09.21

(83) 生物保藏信息

CECT 7480 2013.01.29

CECT 7481 2013.01.29

CECT 7483 2012.06.28

(71) 申请人 株式会社钟化

地址 日本大阪府

(72) 发明人 本田真一

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

专利代理师 沈雪

(51) Int. Cl.

A61K 35/747 (2006.01)

A23L 33/135 (2006.01)

A61P 5/30 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

G12N 1/20 (2006.01)

权利要求书2页 说明书28页

序列表(电子公布)

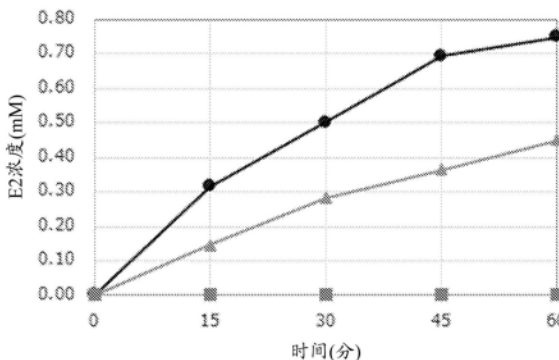
PCT/R0/134表3页 附图7页

(54) 发明名称

葡糖醛酸糖苷酶活化剂、医药组合物、食用组合物及口服用组合物

(57) 摘要

一种葡糖醛酸糖苷酶活化剂,其含有保藏号为 C E C T 7 4 8 0 的短促生乳杆菌(Levilactobacillus brevis)I-3141株作为有效成分。



1. 一种葡糖醛酸糖苷酶活化剂,其含有保藏号为CECT 7480的短促生乳杆菌(Levilactobacillusbrevis)I-3141株作为有效成分。

2. 根据权利要求1所述的葡糖醛酸糖苷酶活化剂,其进一步含有选自属于植物乳植杆菌(Lactoplantibacillusplantarum)的乳酸菌、以及属于乳酸片球菌(Pediococcusacidilactici)的乳酸菌中的至少任一种。

3. 根据权利要求2所述的葡糖醛酸糖苷酶活化剂,其中,
所述属于植物乳植杆菌(Lactoplantibacillusplantarum)的乳酸菌为保藏号:CECT 7481的植物乳植杆菌(Lactoplantibacillusplantarum)F-2096株。

4. 根据权利要求2或3所述的葡糖醛酸糖苷酶活化剂,其中,
所述属于乳酸片球菌(Pediococcusacidilactici)的乳酸菌为保藏号:CECT 7483的乳酸片球菌(Pediococcusacidilactici)F-1033株。

5. 根据权利要求1~4中任一项所述的葡糖醛酸糖苷酶活化剂,其用于增加体内的雌激素水平。

6. 根据权利要求1~4中任一项所述的葡糖醛酸糖苷酶活化剂,其用于改善雌激素代谢。

7. 根据权利要求1~4中任一项所述的葡糖醛酸糖苷酶活化剂,其用于改善更年期症状。

8. 一种增强葡糖醛酸糖苷酶活性的方法,该方法包括:
向对象给药保藏号为CECT 7480的短促生乳杆菌(Levilactobacillusbrevis)I-3141株而增强葡糖醛酸糖苷酶活性。

9. 一种医药组合物,其含有权利要求1~7中任一项所述的葡糖醛酸糖苷酶活化剂及药学上可接受的载体。

10. 根据权利要求9所述的医药组合物,其为口服用组合物。

11. 一种食用组合物,其含有权利要求1~7中任一项所述的葡糖醛酸糖苷酶活化剂及食用成分。

12. 根据权利要求11所述的食用组合物,其为益生菌组合物。

13. 根据权利要求11或12所述的食用组合物,其容纳于容器中,该容器具有显示选自以下作用中的至少任一作用作为所述食用组合物的作用的标签或说明书:

(a) 增高体内的雌激素水平、

(b) 改善雌激素代谢、以及

(c) 改善更年期症状。

14. 一种口服用组合物,其含有保藏号为CECT 7480的短促生乳杆菌(Levilactobacillusbrevis)I-3141株、保藏号为CECT 7481的植物乳植杆菌(Lactoplantibacillusplantarum)、以及保藏号为CECT 7483的乳酸片球菌(Pediococcusacidilactici)。

15. 一种增加雌激素水平的方法,该方法包括:

向对象口服给药权利要求1~4中任一项所述的葡糖醛酸糖苷酶活化剂、权利要求9或10所述的医药组合物、权利要求11~13中任一项所述的食用组合物、或者权利要求14所述的口服用组合物。

16. 一种改善雌激素代谢的方法,该方法包括:

向对象口服给药权利要求1~4中任一项所述的葡糖醛酸糖苷酶活化剂、权利要求9或10所述的医药组合物、权利要求11~13中任一项所述的食用组合物、或者权利要求14所述的口服用组合物。

17. 一种更年期症状的改善方法,该方法包括:

向对象口服给药权利要求1~4中任一项所述的葡糖醛酸糖苷酶活化剂、权利要求9或10所述的医药组合物、权利要求11~13中任一项所述的食用组合物、或者权利要求14所述的口服用组合物。

葡糖醛酸糖苷酶活化剂、医药组合物、食用组合物及口服用组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及葡糖醛酸糖苷酶活化剂、医药组合物、食用组合物及口服用组合物。

背景技术

[0002] 随着女性年龄的增长,卵巢的功能下降,由此,雌激素的分泌大幅减少。特别是,将绝经前的5年和绝经后的5年的总计10年称为更年期,在该时期,由于激素的失衡,身体会出现各种症状。将该更年期产生的症状称为更年期症状,其中,将症状严重而给日常生活带来障碍的状态称为更年期障碍。另外,在由于卵巢切除术、子宫切除术等原因而早期绝经的情况下,有时也会感到更年期症状。

[0003] 更年期症状无论程度的强弱均会对女性造成精神上的痛苦。在这样的状况下,需要通过预防或治疗更年期症状来提高女性的QOL(Quality of Life)。

[0004] 更年期症状主要分类为中枢神经系症状、皮肤、粘膜、或毛发的症状、性功能的症状、体重及代谢的变化、泌尿生殖器系统症状、肌肉骨骼系统症状等(参照非专利文献1)。更年期症状产生的最大原因被认为是更年期时体内的雌激素水平的急剧减少(参照非专利文献2)。因此,作为更年期症状的治疗方法,主要使用了用于补充缺乏的雌激素的激素补充疗法(HRT)。然而,对于激素补充疗法而言,作为其副作用,存在子宫出血、中风、心脏病发作、乳腺癌、子宫癌、胃肠病、血栓病、肝病等的发生风险增高的问题。

[0005] 因此,强烈希望开发没有副作用、能够预防或治疗更年期症状的安全性高的更年期症状的预防或治疗用组合物。

[0006] 雌激素在卵巢、肾上腺、脂肪组织、其他器官等中产生,在肝脏中代谢,一部分成为葡糖醛酸结合物。该葡糖醛酸结合物与胆汁酸一起被分泌至肠道内,随粪便排出。分泌至肠道内的葡糖醛酸结合物因肠内细菌所具有的 β -葡糖醛酸糖苷酶(GUS)活性的作用而解除结合,解除结合的雌激素被再吸收至体内(参照非专利文献3)。

[0007] 已知健康的状态和充分的雌激素水平可保持肠的微生物多样性。在这样的条件下,有益的细菌占优势,可阻止具有病原性的细菌的增殖,保持肠内菌群的稳定性。肠内菌群是在胃肠道形成菌落的微生物的复杂群落。另一方面,对于绝经后的女性而言,由于雌激素缺乏,肠内菌群发生变化,肠内细菌的多样性降低,肠内细菌的量减少。对此,已知作为包含有益微生物的营养辅助食品或医疗补充剂的益生菌与肠内的微生物协同发挥作用而保持宿主的健康(参照非专利文献4)。

[0008] 肠内细菌之一的乳酸菌长期以来被用于发酵食品等饮料食品、医药品、益生菌等,属于乳酪杆菌(Lacticaseibacillus)属的乳酸菌也是在各种用途中使用的安全性高的细菌。

[0009] 现有技术文献

[0010] 非专利文献

[0011] 非专利文献1:Patrizia Monteleone et al.,NatureReviewsEndocrinology,

2018,14(4),p.199-215

[0012] 非专利文献2:Nkechinyere Chidi-Ogbolu et al.,Front Physiol,2019,Vol.9, Article 1834

[0013] 非专利文献3:Maryann Kwa et al.,J Natl Cancer Inst,2016,8(8)

[0014] 非专利文献4:Xin Xu et al.,Bone Research,2017,5,17046

发明内容

[0015] 发明要解决的课题

[0016] 本发明的课题在于解决以往的上述各问题,实现以下的目的。即,本发明的目的在于提供具有优异的葡萄糖醛酸糖苷酶活性、安全性高的葡萄糖醛酸糖苷酶活化剂、医药组合物、益生菌组合物、以及食用组合物。

[0017] 解决课题的方法

[0018] 作为解决上述课题的方法,如下所述。

[0019] <1>一种葡萄糖醛酸糖苷酶活化剂,其含有保藏号:CECT 7480的短促生乳杆菌(*Levilactobacillus brevis*) I-3141株作为有效成分。

[0020] <2>一种增强葡萄糖醛酸糖苷酶活性的方法,其中,向对象给药保藏号:CECT 7480的短促生乳杆菌(*Levilactobacillus brevis*) I-3141株,增强葡萄糖醛酸糖苷酶活性。

[0021] <3>一种医药组合物,其含有上述<1>所述的葡萄糖醛酸糖苷酶活化剂及药学上可接受的载体。

[0022] <4>一种食用组合物,其含有上述<1>所述的葡萄糖醛酸糖苷酶活化剂及食用成分。

[0023] <5>一种口服用组合物,其含有保藏号:CECT 7480的短促生乳杆菌(*Levilactobacillus brevis*) I-3141株、保藏号:CECT 7481的植物乳植杆菌(*Lactoplantibacillus plantarum*)、及、保藏号:CECT 7483的乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*)。

[0024] <6>一种增加雌激素水平的方法,该方法包括:向对象口服给药上述<1>所述的葡萄糖醛酸糖苷酶活化剂、上述<3>所述的医药组合物、上述<4>所述的食用组合物、或上述<5>所述的口服用组合物。

[0025] <7>一种改善雌激素代谢的方法,该方法包括:向对象口服给药上述<1>所述的葡萄糖醛酸糖苷酶活化剂、上述<3>所述的医药组合物、上述<4>所述的食用组合物、或上述<5>所述的口服用组合物。

[0026] <8>一种改善更年期症状的方法,该方法包括:向对象口服给药上述<1>所述的葡萄糖醛酸糖苷酶活化剂、上述<3>所述的医药组合物、上述<4>所述的食用组合物、或上述<5>所述的口服用组合物。

[0027] 发明的效果

[0028] 根据本发明,能够解决以往的上述各问题,实现上述目的,可以提供具有优异的葡萄糖醛酸糖苷酶活性、安全性高的葡萄糖醛酸糖苷酶活化剂、医药组合物、益生菌组合物、以及食用组合物。

附图说明

[0029] 图1A是示出为了确定*Levilactobacillus brevis* I-3141株的基因型而在利用Sfi-I限制性酶的基因组消化后进行脉冲场凝胶电泳的电泳图案的图。“4”表示*Levilactobacillus brevis* I-3141株，“5”表示*Lacticaseibacillus casei* VSL#3，“6”表示*Lacticaseibacillus casei* DN114.001，“M”表示分子量标记。

[0030] 图1B是示出为了确定*Levilactobacillus brevis* I-3141株的基因型而在利用Sma-I限制性酶的基因组消化后进行脉冲场凝胶电泳的电泳图案的图。“4”表示*Levilactobacillus brevis* I-3141株，“5”表示*Lacticaseibacillus ca sei* VSL#3，“6”表示*Lacticaseibacillus casei* DN114.001，“M”表示分子量标记。

[0031] 图1C是示出为了确定*Lactoplantibacillus plantarum* F-2096株的基因型而在利用Sfi-I限制性酶的基因组消化后进行脉冲场凝胶电泳的电泳图案的图。“1”表示*Lactoplantibacillus plantarum* F-2096株，“2”表示*Lactoplan tibacillus plantarum* 299V，“3”表示*Lacticaseibacillus casei* VSL#3，“M”表示分子量标记。

[0032] 图1D是示出为了确定*Lactoplantibacillus plantarum* F-2096株的基因型而在利用Sma-I限制性酶的基因组消化后进行脉冲场凝胶电泳的电泳图案的图。“1”表示*Lactoplantibacillus plantarum* F-2096株，“2”表示*Lactoplan tibacillus plantarum* 299V，“3”表示*Lacticaseibacillus casei* VSL#3，“M”表示分子量标记。

[0033] 图1E是示出为了确定*Pediococcus acidilactici* F-1033株的基因型而在利用Not-I限制性酶的基因组消化后进行脉冲场凝胶电泳的电泳图案的图。“1”表示*Pediococcus acidilactici* F-1033株，“4”表示*Pediococcus acidilactici* Rossell 1001，“M”表示分子量标记。

[0034] 图1F是示出为了确定*Pediococcus acidilactici* F-1033株的基因型而在利用Sma-I限制性酶的基因组消化后进行脉冲场凝胶电泳的电泳图案的图。“1”表示*Pediococcus acidilactici* F-1033株，“4”表示*Pediococcus acidila ctici* Rossell 1001，“M”表示分子量标记。

[0035] 图2是示出在试验例2中使用了pNGP作为底物的情况下的GUS活性的结果的图。“●”表示*Levilactobacillus brevis* I-3141株的结果，“▲”表示*Levilactobacillus brevis* NBRC 107147的结果，“■”表示阴性对照的结果。

[0036] 图3是示出在试验例2中使用了E1-3G作为底物的情况下的GUS活性的结果的图。“●”表示*Levilactobacillus brevis* I-3141株的结果，“▲”表示*Levilactobacillus brevis* NBRC 107147的结果，“■”表示阴性对照的结果。

[0037] 图4是示出在试验例2中使用了E2-3G作为底物的情况下的GUS活性的结果的图。“●”表示*Levilactobacillus brevis* I-3141株的结果，“▲”表示*Levilactobacillus brevis* NBRC 107147的结果，“■”表示阴性对照的结果。

具体实施方式

[0038] (微生物)

[0039] 本发明的微生物为保藏号:CECT 7480的短促生乳杆菌(*Levilactobacillus brevis*) I-3141株,具有葡糖醛酸糖苷酶活性。上述微生物可以通过上述葡糖醛酸糖苷酶活

性而将雌激素的葡萄糖醛酸结合物解除结合。

[0040] 葡萄糖醛酸糖苷酶中存在 α -葡萄糖醛酸糖苷酶 (EC3.2.1.139) 及 β -葡萄糖醛酸糖苷酶 (EC3.2.1.31)。

[0041] 上述 α -葡萄糖醛酸糖苷酶是以 α -D-葡萄糖醛酸苷及水作为底物而生成醇和D-葡萄糖醛酸的水解酶。

[0042] 上述 β -葡萄糖醛酸糖苷酶是与D-葡萄糖醛酸的 β 型糖苷作用而将其葡萄糖苷酸键水解的酶的总称。上述 β -葡萄糖醛酸糖苷酶对糖苷配基具有广泛的特异性,也作用于醇、类固醇、羧酸等的 β -D-葡萄糖苷酸 (glucuronide)。

[0043] 其中,上述微生物优选具有 β -葡萄糖醛酸糖苷酶活性。

[0044] 作为确认上述微生物的葡萄糖醛酸糖苷酶活性的方法,没有特别限制,可以从公知的方法中适当选择,可以举出例如,使公知的葡萄糖醛酸糖苷酶的底物与上述微生物反应并确认有无反应生成物、或测定反应生成物的浓度的方法等。

[0045] 上述 *Levilactobacillus brevis* I-3141株如日本专利第5879349号 (国际公开第2012/022773号) 中的记载所述。以下示出分离方法及分类学特性。

[0046] 1. 微生物的分离

[0047] I-3141株是从热带的南美洲未开发地区的0岁~5岁的儿童来源的唾液分离到的。使唾液溶解于PBS缓冲液 (pH7.4), 进行移液, 接种于补充有10 μ g/ml的万古霉素 (SIGMA公司制) 的MRS (Man Rogosa Sharp, Sigma-Aldrich Chem公司制, Spain) 琼脂上。将细菌在37 $^{\circ}$ C、微氧条件 (5% CO₂) 下进行培养。使其增殖后, 在包含15质量%的脱脂奶粉的0.1 \times PBS中通过冷冻干燥保存分离到的菌株。

[0048] 2. 菌株的分类学特性

[0049] 2.1. 属及种的遗传鉴定

[0050] A) 方法

[0051] 将上述细菌在37 $^{\circ}$ C、包含5% CO₂的气体氛围中于MRS培养基 (pH6.4) 上培养过夜。进一步, 回收细菌并清洗, 再悬浮于上述溶解缓冲液 (480 μ L的EDTA 50mM pH8.0; 120 μ L的溶菌酶10mg/mL), 进一步在37 $^{\circ}$ C下孵育60分钟。使用Wizard基因组DNA纯化试剂盒 (Promega公司制) 提取出基因组DNA。以14000g将经前处理的细菌离心分离2分钟, 去除了上清后, 继续进行Promega的实验方案。简而言之, 将细菌再悬浮于核溶解溶液, 在80 $^{\circ}$ C下孵育5分钟, 接着, 冷却至室温。将细胞溶解物在RNase溶液中于37 $^{\circ}$ C下孵育60分钟, 向蛋白质中加入蛋白质沉淀溶液, 以高速使其旋转, 从而使其沉淀。将样品冷却, 以15000g离心3分钟。将包含DNA的上清转移至干净的1.5mL微量离心管, 通过倒置而与600 μ L的异丙醇混合。以15000g进行2分钟离心分离, 从而回收DNA, 小心弃去上清。通过轻轻翻转试管数次, 用600 μ L的70体积%乙醇清洗了DNA样品。在以15000g离心分离2分钟后, 通过抽吸去除了乙醇。最后, DNA颗粒通过在65 $^{\circ}$ C下孵育1小时而再悬浮于100 μ L的Rehydration溶液。在2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C下储藏样品。

[0052] 使用制备16S的基本上全部序列的片段 (1000个以上的核苷酸) 的通用引物Eub27f及Eub1492r, 通过PCR扩增了16S rRNA。接着, 使用QIA (注册商标) quick试剂盒 (Qiagen公司制) 对如上述说明所述得到的DNA进行了清洗。

[0053] 下述表1中示出了用于扩增、测序16S基因的引物。

[0054] 使用下述表1所示的引物及BigDye v.3.1试剂盒, 通过Genetic Analyze r 3130

(Applied Biosystems公司制)进行了4次连续测序反应。使用DNA Sequence Analysis v.5.2软件(Applied Biosystems公司制)进行数据回收并制作色谱图,通过Chromas (Technelysium Pty Ltd.公司制)及BioEdit(Ibis Biosciences公司制)的视觉分析进行了确认。

[0055] 属的鉴定使用Ribosomal Database Project工具进行(Wang Q et al.,“Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy”,Appl Environ Microbiol,2007,vol.73,p.5261-5267)。根据基于BLASTN方式的RefSeq数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>)、以及Ribosomal Database Project(<http://rdp.cme.msu.edu/>,J.R.Cole et al.,“The Ribosomal Database Project(RDP-II):introducing myRDP space and quality controlled public data”,Nucl.Acids Res.,2007,vol.35,p.169-172)这两者,通过将已知生物体的16S序列中得到的序列的比较而进行了种的鉴定。

[0056] [表1]

工序	引物	方向	5'→3'序列
扩增	Eub27f	正向	GAGTTTGATCCTGGCTCAG (序列号1)
	Eub1492r	反向	TACGGYTAOCTTGTTACGACTT (序列号2)
测序	27f	正向	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG (序列号3)
	357f	正向	CGCCCGCCGCGCCCGCCGCGCCCGGSCCCGCG CGCCCGCCGCGCCCGCTACGGGAGGCAGCAG (序列号4)
	907r	反向	CCGTCAATTGCTTTGAGTTT (序列号5)
	1492r	反向	GGTTACCTTGTTACGACTT (序列号6)

[0058] B) 结果

[0059] 通过RDP (Ribosomal Database Project) 工具,鉴定了I-3141株属于Levilactobacillus brevis种。

[0060] 2.2.菌株的基因型确定

[0061] A) 方法

[0062] 特性评价通过基因组消化及脉冲场凝胶电泳而进行。对I-3141株进行以前记载的实验方案(Rodas AM et al.,“Polyphasic study of wine Lactobacillus strains: taxonomic implications”,Int J Syst Evol Microbiol,2005,vol.55,p.197-207)。将作为市售的菌株的奶酪乳酪杆菌(Lacticaseibacillus casei)VSL#3及Lacticaseibacillus casei DN114.001作为对照株而包含于测试中。使全部菌株在MRS琼脂板上增殖,在37℃、5%CO₂下孵育18小时。回收细胞,在8mL的PET(10mM Tris pH7.6、1M NaCl)中清洗3次,接着,以6000rpm离心10分钟。将颗粒再悬浮于700μL的溶解缓冲液(6mM Tris、1MNaCl、0.1M EDTA、0.5% SLS、0.2%脱氧胆酸;1mg/mL溶菌酶;40U/mL变溶菌素;20g/mL RNase)。将同等容量的1.6%低熔点琼脂糖(FMC BioProducts,Rockland,ME,USA)加入至再悬浮的细胞中,并在4℃下使其凝固1小时。将插入物转移至2mL溶解缓冲液II(0.5M EDTA pH9.2、1%N-月桂酰肌氨酸及1mg/mL链霉蛋白酶),在50℃下孵育48小时。接着,在室温下用TE缓冲液(10mM Tris、1mM EDTA pH8.0)清洗插入物。通过Sfi-I限制性酶或Sma-I限制性酶(以上、

Roche Diagnostics公司制)进行了全DNA消化。

[0063] 使用CHEF DRIII装置(BioRad Laboratories)进行了脉冲场电泳。将插入物加载于1%琼脂糖凝胶(SeaKem ME agarose,FMC BioProducts,ME,USA)。下述表2记载了对于来自I-3141株的Sfi-I或Sma-I限制性基因组DNA的电泳状态。DNA分子量标记为Lambda ladder PFG Marker及Low Range PFG Marker(均为New England Biolabs制)。在电泳后,使用GelDoc System(BioRad制)用溴化乙锭及UV对凝胶进行了染色。

[0064] 需要说明的是,作为对照株使用的Lacticaseibacillus casei VSL#3是在MRS琼脂板上从VSL#3(注册商标)(Alfasigma USA,Inc.制)分离到的。另外,Lacticaseibacillus casei DN114.001是在琼脂板上从Actimel(注册商标)(Danone制)分离到的。均使用了在37℃、5%CO₂下培养的细胞。

[0065] [表2]

酶	阶段(block)	初始的脉冲(秒)	最终的脉冲(秒)	时间(小时)
Sfi-I	1	2	10	10
	2	15	25	6
Sma-I	1	05	5	16

[0067] B) 结果

[0068] 如图1A及图1B所示,通过对I-3141株的Sfi-I或Sma-I消化而得到的切断图案与非常相关的市售的Lacticaseibacillus casei菌株不同。

[0069] 根据以上的结果可以认为,I-3141株属于Levilactobacillus brevis。因此,将I-3141株作为Levilactobacillus brevis I-3141株(以下,有时简称为“I-3141株”)。

[0070] 需要说明的是,I-3141株由保藏人AB-BIOTICS S.A.(所在地:Av.Torre Blanca 57ESADE Creapolis Building Sant Cugat del Valles 08172Spain)在西班牙典型培养物保藏中心(COLECCION ESPANOLA DE CULTIVOS TIPO(CECT))(所在地:Edificio 3CUE.Parc Cientific Universitat de Valencia Catedratico Agustin Escardino, 946980Paterna (Valencia)Spain)申请保藏,于2013年1月29日以保藏号:CECT 7480进行了国际保藏。

[0071] 需要说明的是,由于以往报告了Lactobacillus属细菌是系统多样的、且生理学、生化学的特征也在菌种间有很大不同,因此,于2020年在基因组水平进行了属分类。(参照Zheng J et al.,Int J Syst Evol Microbiol,2020,Ap r;70(4),p.2782-2858)。

[0072] I-3141株所属的Levilactobacillus brevis对应于2020年的属分类以前的分类中的短乳杆菌(Lactobacillus brevis)。

[0073] 如在其它细菌中所见,I-3141株的性状有时发生变化,本发明的微生物中只要具有上述葡萄糖醛酸糖苷酶活性即可,也包括I-3141菌株的性状发生了变化的菌株。

[0074] 作为上述I-3141菌株的性状发生了变化的菌株,可以列举例如:I-3141株来源的突变株(例如,自然突变株、可以通过紫外线、X射线、放射线、化学药品等的突变处理而得到的人工突变株)、基因重组体(例如,转化体)等。

[0075] 作为培养上述微生物的方法,可以举出例如,将上述微生物接种于营养培养基(以下,有时简称为“培养基”)中,在可生长的温度下进行培养的方法等。

[0076] 作为上述营养培养基,没有特别限制,可以根据目的而适当选择,例如,可以使用以往的乳酸菌的培养所利用的公知的培养基。

[0077] 作为添加于上述营养培养基的营养源,没有特别限制,可以根据目的而适当选择。

[0078] 作为碳源,可以使用例如:D-核糖、D-半乳糖、D-葡萄糖、D-果糖、D-甘露糖、D-甘露醇、N-乙酰葡萄糖胺、苦杏仁苷、熊果苷、七叶苷、水杨苷、D-纤维二糖、D-麦芽糖、蔗糖、D-海藻糖、龙胆二糖、糖蜜、糖稀、油脂类等有机碳化合物等。

[0079] 作为氮源,可以使用例如:肉提取物、酪蛋白、蛋白胨、酵母提取物、干燥酵母、胚芽、大豆粉、尿素、氨基酸、肽、玉米浆(corn steep liquor)、铵盐等有机或无机氮化合物等。

[0080] 另外,也可以使用钠盐、钾盐、钙盐、镁盐、磷酸盐、铁盐、铜盐、锌盐、钴盐等无机盐类。

[0081] 此外,可以使用柠檬酸等有机酸、生物素、维生素B1等维生素类、胱氨酸、表面活性剂、油酸甲酯、猪油等促进生长的物质。

[0082] 这些营养培养基的材料只要I-3141株能够利用即可,可以全部使用公知的培养材料。

[0083] 作为上述培养基的pH,只要在上述微生物的生长实质上不受到妨害的范围即可,没有特别限制,优选为3.0~8.0。

[0084] 作为已制备的营养培养基,可以列举例如:MRS培养基、GAM培养基、Rogosa培养基等。

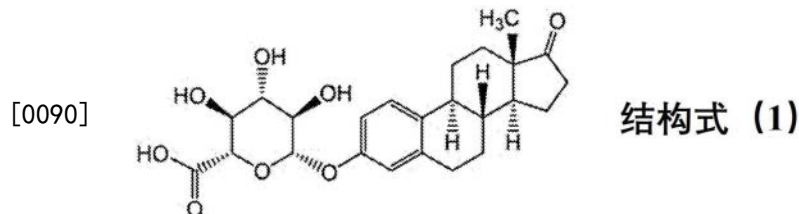
[0085] 作为上述微生物的培养条件,没有特别限制,可以依据针对Lactobacillus属微生物进行的一般培养条件而进行,在液体培养法的情况下,优选进行静置培养。作为培养的规模,没有特别限制,可以用试验管、烧瓶、发酵槽等进行培养。

[0086] 作为上述微生物的培养温度,只要是上述微生物的生长实质上不受到妨害的范围即可,没有特别限制,优选为15℃~45℃、更优选为30℃~40℃。

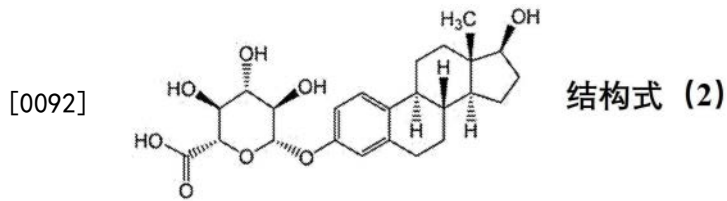
[0087] 作为上述培养期间,没有特别限制,可以根据目的而适当选择。

[0088] 作为体内存在的上述雌激素的葡萄糖醛酸结合物,已知有下述结构式(1)表示的雌酮(estrone)3-(β-D-葡萄糖苷酸)(E1-3G)、下述结构式(2)表示的雌二醇3-(β-D-葡萄糖苷酸)(E2-3G)、下述结构式(3)表示的雌二醇17-(β-D-葡萄糖苷酸)(E2-17G)、下述结构式(4)表示的雌三醇3-(β-D-葡萄糖苷酸)(E3-3G)、下述结构式(5)表示的雌三醇16-(β-D-葡萄糖苷酸)(E3-16G)、下述结构式(6)表示的雌三醇17-(β-D-葡萄糖苷酸)(E3-17G)等。

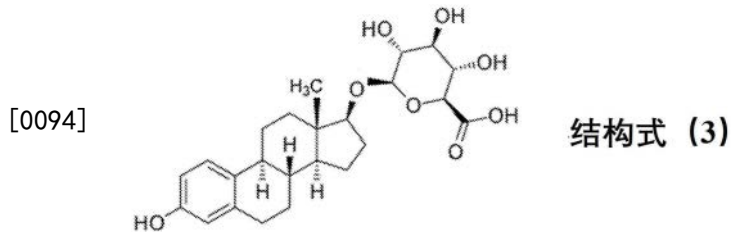
[0089] [化学式1]



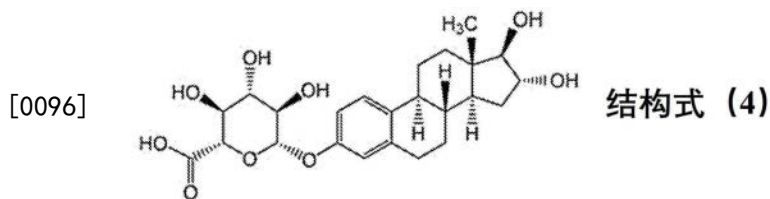
[0091] [化学式2]



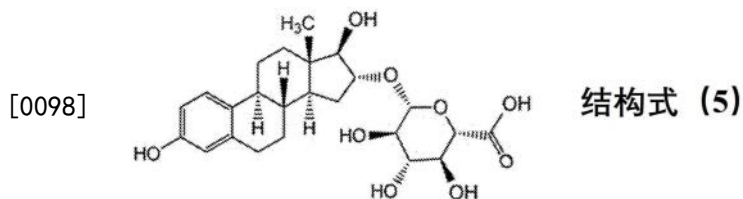
[0093] [化学式3]



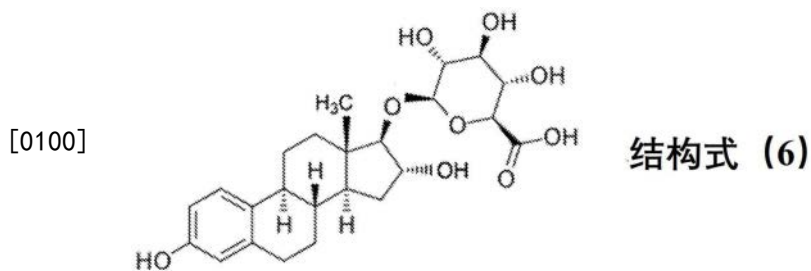
[0095] [化学式4]



[0097] [化学式5]



[0099] [化学式6]



[0101] 雌激素存在雌酮(E1)、雌二醇(E2)及雌三醇(E3)这3种,绝经以前产生的主要雌激素为雌二醇(E2)。

[0102] 上述E1-3G解除结合后成为雌酮(E1),上述E2-3G或上述E2-17G解除结合后成为雌二醇(E2),上述E3-3G、上述E3-16G或上述E3-17G解除结合后成为雌三醇(E3)(参照 Samantha M.Ervin et al., J Biol Chem, 2019 Dec 6, 294(49), p.18586-18599)。

[0103] 上述微生物可以将上述E1-3G、上述E2-3G、上述E2-17G、上述E3-3G、上述E3-16G及上述E-17G中的任一者解除结合,优选将葡萄糖醛酸结合物E2-3G解除结合。

[0104] -用途-

[0105] 上述微生物具有葡萄糖醛酸糖苷酶活性,安全性高。因此,上述微生物可以优选用于体内的雌激素水平的增加、体内的雌激素代谢的改善、更年期症状的改善、或肠道内的葡萄糖

醛酸糖苷酶活性的增强。另外,上述微生物也可以优选用于后述的葡糖醛酸糖苷酶活化剂、医药组合物、益生菌组合物、食用组合物、口服用组合物、以及含有微生物的组合物。另外,可以优选用作将上述微生物向对象给药而增强葡糖醛酸糖苷酶活性的葡糖醛酸糖苷酶活性的增强方法。这些均包含在本发明的范围内。

[0106] 需要说明的是,在本说明书中,“雌激素水平的增加”是指,与上述葡糖醛酸糖苷酶活化剂的给药前或非给药组相比,在上述葡糖醛酸糖苷酶活化剂的给药后或给药组中,体内的雌激素浓度增加。

[0107] 作为测定体内的雌激素水平的方法,没有特别限制,可以从公知的方法中适当选择,可以列举例如通过酶免疫测定法、化学发光免疫测定法、化学发光酶免疫测定法、液相色谱法、气相色谱法、液相色谱质量分析法等来测定血液中的雌激素的浓度的方法等。

[0108] 另外,在本说明书中,“雌激素代谢的改善”是指通过上述葡糖醛酸糖苷酶活化剂所含有的上述Levilactobacillus brevis I-3141菌株的葡糖醛酸糖苷酶活性而使体内的雌激素水平或雌激素代谢接近健康的状态、或恢复至健康的状态。

[0109] 另外,在本说明书中,“健康的状态”是指雌激素代谢与绝经前同等的状态、或感受不到更年期症状的状态。

[0110] 在使用上述微生物作为葡糖醛酸糖苷酶活化剂的方法中,可以与后述的选自属于植物乳植杆菌(Lactoplantibacillus plantarum)的乳酸菌、以及属于乳酸片球菌(Pediococcus acidilactici)的乳酸菌中的至少任意乳酸菌一起使用,从增强葡糖醛酸糖苷酶活性的观点出发,优选使用上述微生物(I-3141株)、属于Lactoplantibacillus plantarum的乳酸菌、以及属于Pediococcus acidilactici的乳酸菌这3种乳酸菌,更优选使用上述微生物(I-3141株)、保藏号为CECT 7481的Lactoplantibacillus plantarum、以及保藏号为CECT 7483的Pediococcus acidilactici这3种乳酸菌。

[0111] (葡糖醛酸糖苷酶活化剂)

[0112] 本发明的葡糖醛酸糖苷酶活化剂含有保藏号为CECT 7480的Levilactobacillus brevis I-3141株作为有效成分,根据需要可进一步含有其它成分。

[0113] 通常,分泌至肠道内的雌激素的葡糖醛酸结合物由于肠内细菌所具有的 β -葡糖醛酸糖苷酶活性而使雌激素的葡糖醛酸结合物解除结合,变为雌激素,被肠道再吸收。然而,随着绝经、年龄增加,体内的雌激素水平会降低。

[0114] 对此,上述葡糖醛酸糖苷酶活化剂所含有的I-3141株由于具有葡糖醛酸糖苷酶活性,因此能够将雌激素的葡糖醛酸结合物解除结合,且安全性高,因此,例如可以通过摄取上述葡糖醛酸糖苷酶活化剂而促进分泌至肠道内的雌激素的葡糖醛酸结合物的结合解除,由此,从增大体内的雌激素水平的观点出发是有利的。

[0115] <I-3141株>

[0116] 上述葡糖醛酸糖苷酶活化剂中含有的保藏号为CECT 7480的Levilactobacillus brevis I-3141株如上述的(微生物)的项目中的记载所述。

[0117] 作为上述葡糖醛酸糖苷酶活化剂中含有的I-3141菌株的状态,没有特别限制,可以根据目的而适当选择,优选为I-3141菌株的活菌体或菌体的破碎物。

[0118] 作为上述活菌体,可以为湿润菌体,也可以为干燥菌体,作为具体例,可以列举:I-3141菌株的培养物、上述培养物的浓缩物、上述培养物的干燥物、上述培养物的稀释物等。

[0119] 作为使上述培养物干燥的方法,只要不损害本发明的效果,就没有特别限制,可以从公知的方法中适当选择,可以列举例如:喷雾干燥法、冷冻干燥法、真空干燥法、转鼓干燥法等。

[0120] 上述菌体的破碎物是指在显微镜观察下没有未破碎菌体的状态。

[0121] 作为得到上述菌体的破碎物的方法,只要不损害本发明的效果,就没有特别限制,可以从公知的方法中适当选择,可以列举例如:珠破碎法、压力破碎法、超声波破碎法、旋转刀破碎法等。

[0122] 作为上述葡萄糖醛酸糖苷酶活化剂中的I-3141株的含量,只要能够起到葡萄糖醛酸糖苷酶活性,就没有特别限制,可以根据目的而适当选择。需要说明的是,上述葡萄糖醛酸糖苷酶活化剂可以为I-3141株本身。

[0123] <其它成分>

[0124] 作为上述葡萄糖醛酸糖苷酶活化剂中的上述其它成分,只要不损害本发明的效果,就没有特别限制,可以根据剂型等适当选择公知的医药品、食品、化妆品等所使用的成分,可以列举例如:赋形剂、粘结剂、崩解剂、润滑剂、矫味剂、气味矫正剂、防湿剂、防腐剂、增强剂、增粘剂、乳化剂、抗氧化剂、甜味剂、酸味剂、调味剂、着色剂、香料、油性成分、紫外线吸收剂、表面活性剂、增粘剂、醇类、粉末成分、调色剂、水性成分、水、油脂、I-3141株以外的乳酸菌等。这些可以单独使用1种,也可以组合使用2种以上。

[0125] 作为上述葡萄糖醛酸糖苷酶活化剂中的上述其它成分的含量,只要不损害本发明的效果,就没有特别限制,可以根据目的而适当选择。

[0126] <<I-3141株以外的乳酸菌>>

[0127] 作为I-3141株以外的乳酸菌,只要不损害本发明的效果,就没有特别限制,可以从公知的乳酸菌中适当选择,从体内的雌激素水平的增加、体内的雌激素代谢的改善、或更年期症状的改善的观点考虑,优选为属于植物乳植杆菌 (Lactopantibacillus plantarum) 乳酸菌、属于乳酸片球菌 (Pediococcus acid ilactici) 乳酸菌。这些可以单独使用1种,也可以组合使用2种以上。

[0128] 属于Lactopantibacillus plantarum的乳酸菌-

[0129] 作为上述属于Lactopantibacillus plantarum的乳酸菌,只要不损害本发明的效果,就没有特别限制,优选为保藏号:CECT 7481的植物乳植杆菌 (Lactopantibacillus plantarum)F-2096株。

[0130] 上述Lactopantibacillus plantarum F-2096株如国际公开第2012/022773号的记载所述。以下示出分离方法及分类学特性。

[0131] F-2096株与I-3141株同样,是从热带的南美洲未开发地区的0岁~5岁的儿童来源的唾液分离到的菌株,可通过I-3141菌株的“1.微生物的分离”中记载的方法分离,通过I-3141菌株的“2.菌株的分类学特性”的“2.1.属及种的遗传鉴定”的“A)方法”中记载的方法,鉴定了F-2096株属于Pediococcus acidilactici种。

[0132] 另外,通过以下的方法进行了F-2096菌株的基因型确定。

[0133] 在I-3141菌株的“2.2.菌株的基因型确定”的“A)方法”中,将作为市售的菌株的Lacticaseibacillus casei VSL#3及Lacticaseibacillus casei DN114.001作为对照株而包含于测试中变更为将作为市售菌株的植物乳植杆菌 (Lactopantibacillus

plantarum) 299V及奶酪乳酪杆菌 (Lacticaseibacillus casei) VSL#3作为对照株而包含于测试中,除此以外,通过与I-3141菌株的“2.2.菌株的基因型确定”的“A)方法”相同的方法进行了F-2096菌株的基因型确定。

[0134] 需要说明的是,作为对照株使用的Lactoplantibacillus plantarum 299V使用了在MRS琼脂板上从IdealBowelSupport (注册商标) (Jarrow Formula公司制)分离并在37°C、5%CO₂下培养的菌株。

[0135] 其结果是,如图1C及图1D所示,通过对F-2096株的Sfi-I或Sma-I消化而得到的切断图案与非常相关的市售的Lactoplantibacillus plantarum 299V及Lacticaseibacillus casei VSL#3不同。

[0136] 根据以上的结果可以认为,F-2096株属于Lactoplantibacillus plantarum。因此,将F-2096株作为Lactoplantibacillus plantarum F-2096株(以下,有时简称为“F-2096株”)。

[0137] 需要说明的是,F-2096株由保藏人AB-BIOTICS S.A.(所在地:Av.Tor re Blanca 57ESADE Creapolis Building Sant Cugat del Valles 08172Spain)在西班牙典型培养物保藏中心(COLECCION ESPANOLA DE CULTIVOSTIPO(CECT))(所在地:Edificio 3CUE.Parc Cientific Universitat de Valencia Catedratico Agustin Escardino,9 46980Paterna (Valencia) Spain)申请保藏,于2013年1月29日以保藏号:CECT 7481进行了国际保藏。

[0138] 需要说明的是,由于以往报告了Lactoplantibacillus属细菌是系统多样的、且生理学、生化学的特征也在菌种间有很大不同,因此,于2020年在基因组水平进行了属分类。(参照Zheng J et al.,Int J Syst Evol Microbiol,2020,Apr;70(4),p.2782-2858)。

[0139] F-2096株所属的Lactoplantibacillus plantarum对应于2020年的属分类以前的分类中的植物乳杆菌(Lactobacillus plantarum)。

[0140] 如在其它细菌中所见,F-2096株的性状有时发生变化,对于上述葡糖醛酸糖苷酶活化剂,能够保持或增强本说明书中记载的相关的特征及优点,只要不损害本发明的效果,则也包括F-2096菌株的性状发生了变化的菌株。

[0141] 作为上述F-2096菌株的性状发生了变化的菌株,可以列举例如:F-2096株来源的突变株(例如,自然突变株、可以通过紫外线、X射线、放射线、化学药品等的突变处理而得到的人工突变株)、基因重组体(例如,转化体)等。

[0142] 作为培养上述属于Lactoplantibacillus plantarum的乳酸菌的方法,可以通过与培养本发明的微生物的方法同样的方法进行培养,培养基等也可以使用同样的条件。

[0143] 作为上述葡糖醛酸糖苷酶活化剂中含有的上述属于Lactoplantibacillus plantarum的乳酸菌的状态,没有特别限制,可以根据目的而适当选择,优选为上述属于Lactoplantibacillus plantarum的乳酸菌的活菌体或菌体的破碎物。

[0144] 作为上述活菌体,可以为湿润菌体,也可以为干燥菌体,作为具体例,可以列举:上述属于Lactoplantibacillus plantarum的乳酸菌的培养物、上述培养物的浓缩物、上述培养物的干燥物、上述培养物的稀释物等。

[0145] -属于Pediococcus acidilactici的乳酸菌-

[0146] 作为上述属于Pediococcus acidilactici的乳酸菌,只要不损害本发明的效果,

就没有特别限制,优选为保藏号:CECT 7483的乳酸片球菌(Pediococcus acidilactici) F-1033株。

[0147] 上述Pediococcus acidilactici F-1033株如日本专利第5777640号公报(国际公开第2011/092261号)的记载所述。以下示出分离方法及分类学特性。

[0148] 1.微生物的分离

[0149] A) 方法

[0150] F-1033株是从0岁~5岁的儿童来源的排泄物及唾液(Daniel,C.,et al.,“Selecting Lactic Acid Bacteria for Their Safety and Functionality by Use of a Mouse Colitis Model”,Appl.Environ.Microbiol.,2006,vol.72,p.5799-5805.)分离到的。将新的排泄物及唾液溶解于PBS缓冲液(pH7.4),进行移液,接种于添加有各种抗生素的组合物的MRS琼脂板上。将细菌在37℃、微氧条件(5%CO₂)下进行培养。孵育时间取决于增殖速度,通常需要24小时~3天。为了进行最初的鉴定,实施了革兰氏染色。使其增殖后,在包含15质量%的脱脂奶粉的0.1×PBS中通过冷冻干燥储藏分离到的菌株。

[0151] B) 结果

[0152] 在添加了10μg/ml万古霉素(SIGMA公司制)的MRS琼脂上使分离到的细菌增殖。根据显微镜检查,判定了F-1033株为球菌形态的革兰氏阳性。

[0153] 2.菌株的分类学特性

[0154] 2.1.属及种的遗传鉴定

[0155] A) 方法

[0156] 在I-3141菌株的“2.菌株的分类学特性”的“2.1.属及种的遗传鉴定”的“A)方法”所记载的方法中,分离到的细菌,使用了确认为革兰氏阳性的上述细菌,除此以外,通过与I-3141菌株的“2.菌株的分类学特性”的“2.1.属及种的遗传鉴定”的“A)方法”相同的方法提取DNA,将得到的DNA颗粒在65℃下孵育1小时,由此,再悬浮于100μL的Rehydration溶液,得到了样品。得到的样品在2℃~8℃下储藏。

[0157] 使用制备基本完全长度的16S rRNA片段(1,465bp)的通用引物27f及1492r(Weisburg,W.G.,et al.,“16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study”,J.Bacteriol.,1991,vol.173,p.697-703.),通过PCR扩增了16S基因。接着,使用QIA(注册商标)quick试剂盒(Qiagen公司制、GmbH、Hilden、Germany)对如上述说明所述得到的DNA进行了清洗。

[0158] 下述表3中示出了用于扩增、测序16S基因的引物。

[0159] 使用下述表3所示的引物及BigDye v.3.1试剂盒,通过Genetic Analyzer 3130(Applied Biosystems公司制)进行了4次连续测序反应。使用DNA Sequence Analysis v.5.2软件(Applied Biosystems公司制)进行数据回收并制作色谱图,通过Chromas(Technelysium Pty Ltd.公司制)及BioEdit(Ibis Biosciences公司制)的视觉分析进行了确认。

[0160] 将得到的序列与已知的生物体的16S序列比较而进行了属及种的鉴定,所述已知的生物体的16S序列是从BLASTN search(Altschul,S.F.,et al.,“Basic local alignment search tool”,J.Mol.Biol.,1990,vol.215,p.403-410.)及上述Ribosomal Database Project工具的两者的RefSeq数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

的人工突变株)、基因重组体(例如,转化体)等。

[0174] 作为培养上述属于Pediococcus acidilactici的乳酸菌的方法,可以通过与培养本发明的微生物的方法同样的方法进行培养,培养基等也可以使用同样的条件。

[0175] 作为上述葡萄糖醛酸糖苷酶活化剂中含有的上述属于Pediococcus acidilactici的乳酸菌的状态,没有特别限制,可以根据目的而适当选择,优选为上述属于Pediococcus acidilactici的乳酸菌的活菌体或菌体的破碎物。

[0176] 作为上述活菌体,可以为湿润菌体,也可以为干燥菌体,作为具体例,可以列举:上述属于Pediococcus acidilactici的乳酸菌的培养物、上述培养物的浓缩物、上述培养物的干燥物、上述培养物的稀释物等。

[0177] 从增强葡萄糖醛酸糖苷酶活性的观点出发,上述葡萄糖醛酸糖苷酶活化剂优选包含I-3141株、属于Lactoplantibacillus plantarum的乳酸菌、以及属于Pediococcus acidilactici的乳酸菌这3种乳酸菌,更优选包含I-3141株、保藏号为CECT 7481的Lactoplantibacillus plantarum、以及保藏号为CECT 7483的Pediococcus acidilactici这3种乳酸菌。

[0178] 作为上述葡萄糖醛酸糖苷酶活化剂中的属于Lactoplantibacillus plantarum的乳酸菌及属于Pediococcus acidilactici的乳酸菌的含量,只要不损害本发明的效果,就没有特别限制,可以根据目的而适当选择。

[0179] -用途-

[0180] 上述葡萄糖醛酸糖苷酶活化剂具有优异的葡萄糖醛酸糖苷酶活性,因此,可以用于例如体内的雌激素水平的增加、体内的雌激素代谢的改善、更年期症状的改善、或肠道内的葡萄糖醛酸糖苷酶活性的增强。因此,给药上述葡萄糖醛酸糖苷酶活化剂的体内的雌激素水平的增加方法、给药上述葡萄糖醛酸糖苷酶活化剂的雌激素代谢的改善方法、给药上述葡萄糖醛酸糖苷酶活化剂的更年期症状的改善方法、以及给药上述葡萄糖醛酸糖苷酶活化剂的葡萄糖醛酸糖苷酶活性的增强方法也在本发明的范围内。

[0181] 另外,上述葡萄糖醛酸糖苷酶活化剂可以优选应用于后述的医药组合物、益生菌组合物、食用组合物等,也可以用作与葡萄糖醛酸糖苷酶活性相关的研究的试剂。

[0182] 作为上述葡萄糖醛酸糖苷酶活化剂的用法、剂型、对个体的给药量、给药间隔、成为对象的个体,没有特别限制,可以根据给药对象的年龄、状态、体重、体内的活性成分的吸收度、非活性率、排泄速度、组合使用的药物的有无或种类等而适当选择。

[0183] 作为上述葡萄糖醛酸糖苷酶活化剂的用法,没有特别限制,可以根据目的而适当选择,可以列举例如:口服、非口服等用法。

[0184] 作为上述非口服方式,可以列举例如:经皮、经肠、经粘膜、经静脉、经动脉、皮下、肌肉内等。

[0185] 其中,优选为口服用。

[0186] 作为上述葡萄糖醛酸糖苷酶活化剂的剂型,没有特别限制,可以根据用法等而从公知的剂型中适当选择。上述剂型可以为固体状,也可以为半固体状,还可以为液态,可以列举例如:片剂、粉剂、胶囊剂、软胶囊剂、颗粒剂、散剂、内服液体剂、酏剂、糖浆剂、饮剂、含片、嗽口药等口服给药剂;注射剂、输液剂、喷雾剂、吸入散布剂、栓剂等非口服给药剂等。

[0187] 上述剂型的葡萄糖醛酸糖苷酶活化剂可以通过公知的方法制造。

[0188] 作为成为上述葡糖醛酸糖苷酶活化剂的对象个体,优选应用于人,只要能够发挥各自的作用效果,也可以应用于人以外的动物(例如,小鼠、大鼠、仓鼠、犬、猫、牛、猪、猴、马、山羊、鸟等)。

[0189] (医药组合物)

[0190] 本发明的医药组合物含有葡糖醛酸糖苷酶活化剂及药学上可接受的载体,进一步根据需要而含有其它成分。

[0191] 需要说明的是,上述医药组合物并不限于行政区分上的医药品、准医药品等的区分,可以为医药品、准医药品的任一种。

[0192] <葡糖醛酸糖苷酶活化剂>

[0193] 上述医药组合物中含有的葡糖醛酸糖苷酶活化剂如上述的(葡糖醛酸糖苷酶活化剂)的项目的记载所述。

[0194] 作为上述医药组合物中的上述葡糖醛酸糖苷酶活化剂的含量,没有特别限制,可以根据目的而适当选择。

[0195] <药学上可接受的载体>

[0196] 作为上述药学上可接受的载体,没有特别限制,可以根据目的而适当选择,可以列举例如:添加剂、辅助剂、溶剂等。这些可以单独使用1种,也可以组合使用2种以上。

[0197] 作为上述添加剂或上述辅助剂,没有特别限制,可以根据目的而适当选择,可以列举例如:赋形剂、杀菌剂、防腐剂、粘合剂、增粘剂、增稠剂、粘结剂、着色剂、稳定剂、pH调整剂、缓冲剂、等渗剂、溶剂、抗氧化剂、紫外线防止剂、结晶析出防止剂、消泡剂、物性提高剂、防腐剂等。

[0198] 作为上述赋形剂,没有特别限制,可以根据目的而适当选择,可以列举例如:D-甘露醇、白糖(包含纯化白糖)、碳酸氢钠、淀粉(例如,玉米淀粉、马铃薯淀粉、小麦淀粉、大米淀粉、部分预糊化淀粉等)、结晶纤维素、轻质无水硅酸、钙(无水磷酸氢钙、沉降碳酸钙、硅酸钙、硬脂酸钙等)等。

[0199] 作为上述溶剂,没有特别限制,可以根据目的而适当选择,可以列举例如:水、生理盐水、缓冲液等。

[0200] 作为上述医药组合物中的上述药学上可接受的载体的含量,只要不损害本发明的效果,就没有特别限制,可以根据目的而适当选择。

[0201] 上述医药组合物可以单独使用,也可以与以其它成分作为有效成分的医药组合使用。另外,上述医药组合物可以以配合于以其它成分作为有效成分的医药等的状态而使用。

[0202] 作为上述医药组合物的用法、剂型、对个体的给药量、给药间隔、成为对象的个体,没有特别限制,可以根据目的而适当选择,例如,可以设为与上述的葡糖醛酸糖苷酶活化剂的用法、剂型、对个体的给药量、给药间隔、成为对象的个体相同。其中,上述医药组合物的用法优选为口服,上述医药组合物的剂型优选为口服给药剂。因此,上述医药组合物可以优选用作口服组合物。

[0203] 另外,上述剂型的医药组合物可以通过公知的方法来制造。

[0204] -用途-

[0205] 上述医药组合物含有具有优异的葡糖醛酸糖苷酶活性的上述葡糖醛酸糖苷酶活化剂,因此,例如可以优选用于体内的雌激素水平的增加、体内的雌激素代谢的改善、更年

期症状的改善、或肠道内的葡糖醛酸糖苷酶活性的增强。

[0206] (益生菌组合物)

[0207] 本发明的益生菌组合物含有葡糖醛酸糖苷酶活化剂,根据需要进一步含有其它成分。

[0208] 在本说明书中,“益生菌”是指在肠内发挥有益作用的细菌。

[0209] <葡糖醛酸糖苷酶活化剂>

[0210] 上述益生菌组合物中含有的葡糖醛酸糖苷酶活化剂如上述的(葡糖醛酸糖苷酶活化剂)的项目的记载所述。

[0211] 作为上述益生菌组合物中的上述葡糖醛酸糖苷酶活化剂的含量,没有特别限制,可以根据目的而适当选择。另外,上述益生菌组合物可以为上述葡糖醛酸糖苷酶活化剂本身。

[0212] <其它成分>

[0213] 上述益生菌组合物中含有的其它成分可以使用与上述的(葡糖醛酸糖苷酶活化剂)的<其它成分>项目中记载的成分相同的成分。

[0214] 作为上述益生菌组合物中的上述其它成分的含量,只要不损害本发明的效果,就没有特别限制,可以根据目的而适当选择。

[0215] 作为上述益生菌组合物的用法、剂型、对个体的给药量、给药间隔、成为对象的个体,没有特别限制,可以根据目的而适当选择,例如,可以设为与上述的葡糖醛酸糖苷酶活化剂的用法、剂型、对个体的给药量、给药间隔、成为对象的个体相同。其中,上述益生菌组合物的用法优选为口服用,上述益生菌组合物的剂型优选为口服给药剂。因此,上述益生菌组合物可优选用作口服用组合物。

[0216] 另外,上述剂型的益生菌组合物可以通过公知的方法来制造。

[0217] -用途-

[0218] 上述益生菌组合物含有具有优异的葡糖醛酸糖苷酶活性的上述葡糖醛酸糖苷酶活化剂,例如可以优选用于体内的雌激素水平的增加、体内的雌激素代谢的改善、更年期症状的改善、或肠道内的葡糖醛酸糖苷酶活性的增强。

[0219] (食用组合物)

[0220] 本发明的食用组合物含有葡糖醛酸糖苷酶活化剂及食用成分,根据需要进一步含有其它成分。

[0221] 上述食用组合物是指对人的健康造成危害的隐患少、且通常的社会生活中通过口服而摄取的物质。因此,上述食用组合物广泛包括构成口服摄取的一般食品、健康食品(功能性饮料食品)、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)、患者用食品等的食品。另外,也包括饮料。

[0222] <葡糖醛酸糖苷酶活化剂>

[0223] 上述食用组合物中含有的葡糖醛酸糖苷酶活化剂如上述的(葡糖醛酸糖苷酶活化剂)的项目的记载所述。

[0224] 作为上述食用组合物中的上述葡糖醛酸糖苷酶活化剂的含量,没有特别限制,可以根据目的而适当选择。

[0225] <食用成分>

[0226] 在本说明书中,“食用成分”是指葡糖醛酸糖苷酶活化剂所包含的物质以外的含有蛋白质、脂质、碳水化合物、钙、维生素、胡萝卜素等营养素的适于食用的成分。上述适于食用的成分优选为适于人、除人以外的动物食用的成分。

[0227] 作为上述食用组合物中的上述食用成分的含量,没有特别限制,可以根据目标食用组合物的种类而适当选择。

[0228] 作为上述食用组合物的种类,没有特别限制,可以根据目的而适当选择,可以列举例如:乳酸菌饮料、茶饮料、清凉饮料、碳酸饮料、营养饮料、果汁饮料等饮料;冰激凌、雪酪(ice sherbet)、刨冰等冷冻甜食;荞麦面、乌冬面、粉丝、饺子皮、烧麦皮、中华面、速食面等面类;糖、糖果、口香糖、巧克力、糖片、零食、饼干、果冻、果酱、奶油、烤制点心、面包等点心类;螃蟹、鲑鱼、蛤蜊、金枪鱼、沙丁鱼、虾、鲣鱼、鲭鱼、鲸、牡蛎、秋刀鱼、鱿鱼、赤贝、扇贝、鲍鱼、海胆、鲑鱼子、杂色鲍等水产物或其加工食品;鱼糕、火腿、香肠等水产或畜产加工食品;发酵乳、发酵豆乳、加工乳、发酵乳、酸奶等乳制品;色拉油、天妇罗油、人造黄油、蛋黄酱、起酥油、搅打奶油、调味酱等油脂或油脂加工食品;酱料、酱汁等调味剂;咖喱、炖菜、亲子盖饭、粥、菜粥、中华盖饭、肉排盖饭、天妇罗盖饭、鳗鱼盖饭、肉丁洋葱盖饭、关东煮、麻婆豆腐、牛肉盖饭、肉酱、鸡蛋汤、蛋包饭、饺子、烧麦、肉饼、肉丸等蒸煮袋食品;色拉、腌菜等菜肴;各种形态的健康用、美容用或营养辅助用的食品等。

[0229] 作为上述食用组合物的制造方法,只要能够含有上述葡糖醛酸糖苷酶活化剂即可,没有特别限制,可以根据上述食用组合物的种类而适当选择公知的方法。

[0230] 上述食用组合物可以容纳在容器中。另外,上述容器可以具有显示选自以下作用中的任意作用作为上述食用组合物的作用的标签或说明书:

[0231] (a) 增高体内的雌激素水平; (b) 改善雌激素代谢; 以及 (c) 改善更年期症状。

[0232] -用途-

[0233] 上述食用组合物含有具有优异的葡糖醛酸糖苷酶活性的上述葡糖醛酸糖苷酶活化剂,因此,例如可以用于体内的雌激素水平的增加、体内的雌激素代谢的改善、更年期症状的改善、或肠道内的葡糖醛酸糖苷酶活性的增强。另外,也可以优选用作上述益生菌组合物。

[0234] (口服用组合物)

[0235] 本发明的口服用组合物含有保藏号为CECT 7480的短促生乳杆菌(Levilactobacillus brevis) I-3141株、保藏号为CECT 7481的植物乳植杆菌(Lactoplantibacillus plantarum)、以及保藏号为CECT 7483的乳酸片球菌(Pediococcus acidilactici),进一步根据需要含有其它成分。

[0236] 上述口服用组合物中的保藏号为CECT 7480的短促生乳杆菌(Levilactobacillus brevis) I-3141株、保藏号为CECT 7481的植物乳植杆菌(Lactoplantibacillus plantarum)、以及保藏号为CECT 7483的乳酸片球菌(Pediococcus acidilactici)如上述的(葡糖醛酸糖苷酶活化剂)的项目的记载所述。

[0237] <其它成分>

[0238] 上述口服用组合物中含有的其它成分可以使用与上述的(葡糖醛酸糖苷酶活化剂)的<其它成分>的项目中记载的成分、上述的(食用组合物)的<食用成分>的项目中记载的成分相同的成分。

[0239] 作为上述口服用组合中的上述其它成分的含量,只要不损害本发明的效果,就没有特别限制,可以根据目的而适当选择。

[0240] (含有微生物的组合)

[0241] 本发明的含有微生物的组合含有保藏号为CECT 7480的Levilactobacillus brevis I-3141株,根据需要进一步含有其它成分。

[0242] <I-3141株>

[0243] 上述含有微生物的组合中含有的I-3141株如上述的(微生物)的项目的记载所述。

[0244] 作为上述含有微生物的组合中的I-3141株的含量,没有特别限制,可以根据目的而适当选择。需要说明的是,上述含有微生物的组合可以为I-3141株本身。

[0245] <其它成分>

[0246] 作为上述含有微生物的组合中的上述其它成分,只要不损害本发明的效果,就没有特别限制,可以根据目的而适当选择,例如,可以使用与上述的(葡糖醛酸糖苷酶活化剂)的<其它成分>的项目中记载的成分相同的成分。

[0247] 另外,上述含有微生物的组合可以包含其它微生物。

[0248] 作为上述其它微生物,优选为上述属于Lactoplantibacillus plantarum的乳酸菌、以及上述属于Pediococcus acidilactici的乳酸菌的3种乳酸菌,更优选包含保藏号为CECT 7481的Lactoplantibacillus plantarum、以及保藏号为CECT 7483的Pediococcus acidilactici的3种乳酸菌。

[0249] 作为上述含有微生物的组合的制造方法,只要能够含有I-3141株即可,没有特别限制,可以根据目的而适当选择公知的方法。

[0250] -用途-

[0251] 上述含有微生物的组合也可以优选用于上述益生菌组合、上述葡糖醛酸糖苷酶活化剂、上述医药组合、上述食用组合等。

[0252] 实施例

[0253] 以下,列举试验例及制造例对本发明具体地进行说明,但本发明并不受这些试验例及制造例的任何限定。

[0254] (试验例1)

[0255] 通过以下的方法筛选出能够将雌激素的葡糖醛酸结合物解除结合的具有 β -葡糖醛酸糖苷酶活性的乳酸菌。

[0256] 使用MRS液体培养基(BD Difco™ Lactobacillus MRS broth、Becton Dickinson公司制),将包含作为Levilactobacillus brevis的基准株的NBRC 107147株(由NBRC获得的375株的乳酸菌分别在37℃下前培养(静置培养)24小时。

[0257] 接着,在以最终浓度200 μ g/mL添加有5-溴-4-氯-3-吡啶基- β -D-葡糖苷酸环己基铵(X-Gluc)(FUJIFILM Wako Pure Chemical公司制)的MRS液体培养基(BD Difco™ Lactobacillus MRS broth、Becton Dickinson公司制)中接种用上述MRS液体培养基进行了前培养的各乳酸菌,使得最终浓度为0.1%(v/v),在37℃下静置培养72小时。

[0258] 培养结束后,确认培养液的颜色,筛选出培养液由于X-Gluc水解而生成的蓝色色素(5,5'-二溴-4,4'-二氯靛蓝)的存在而从蓝色显示出蓝绿色的显色的乳酸菌作为具有

GUS活性的乳酸菌。

[0259] 筛选出的乳酸菌为I-3141株(保藏号:CECT 7480)。I-3141菌株的细菌学性状如上述的(微生物)的项目中的记载所述,是属于*Levilactobacillus brevis*的乳酸菌。

[0260] 另外可知,作为*Levilactobacillus brevis*的基准株的NBRC 107147株也具有GUS活性。

[0261] (试验例2)

[0262] 使用试验例1中筛选出的I-3141株及基准菌株的NBRC 107147株,对于GUS活性及底物特异性,通过以下的方法进行了确认。

[0263] <菌体破碎液的制备>

[0264] 使用MRS液体培养基(BD Difco™*Lactobacillus* MRS broth、Becton Dickinson公司制),将I-3141株或NBRC 107147株分别在37℃下前培养(静置培养)24小时。

[0265] 接着,在MRS液体培养基(BD Difco™*Lactobacillus* MRS broth、Becton Dickinson公司制)中以最终浓度0.1% (v/v)接种用上述MRS液体培养基进行了前培养的各乳酸菌,在37℃下培养48小时。

[0266] 培养结束后,对培养液进行离心分离,去除培养上清,得到了培养后的乳酸菌的菌体。向上述乳酸菌的菌体添加与上述去除的培养上清等量的GUS缓冲液(添加有2.5mM乙二胺四乙酸的100mM磷酸钠缓冲液、pH6.0),将上述菌体清洗后,进行离心分离,去除了上清。通过与此相同的方法进行第2次清洗,得到了乳酸菌的菌体。

[0267] 向得到的乳酸菌的菌体添加该菌体量的24倍量(v/w)的上述GUS缓冲液,将其悬浮,接着,加入该菌体量的20倍量(w/w)的玻璃珠,用Multi-Beads Shocker(注册商标)(安井器械株式会社制)破碎。接着,通过对上述破碎物进行离心分离而得到了上清(乳酸菌的菌体破碎液)。

[0268] <GUS活性的评价>

[0269] 在得到的各乳酸菌的菌体破碎液(用上述GUS缓冲液调整最终蛋白质浓度0.25mg/mL)中以最终浓度1.0mM添加作为底物的4-硝基苯基β-D-葡萄糖苷酸(pNGP)(FUJIFILM Wako Pure Chemical公司制)、雌酮3-(β-D-葡萄糖苷酸)(E1-3G)(FUJIFILM Wako Pure Chemical公司制)、或雌二醇3-(β-D-葡萄糖苷酸)(E2-3G)(FUJIFILM Wako Pure Chemical公司制),在37℃下使其反应,测定反应开始时(0分钟)及从反应开始起15分钟后、30分钟后、45分钟后及60分钟后的GUS活性所产生的生成物浓度,对其活性进行了评价。另外,使用上述GUS缓冲液代替菌体破碎液,并且仅使用上述底物,进行同样的试验作为阴性对照。

[0270] 具体而言,在使用了4-硝基苯基β-D-葡萄糖苷酸(pNGP)作为上述底物的情况下,反应开始每15分钟用酶标仪测定405nm的吸光度。基于另行测定的各种浓度的4-硝基苯酚(pNP)(FUJIFILM Wako Pure Chemical公司制)在405nm的吸光度的值,计算出由GUS活性生成的pNP的浓度。

[0271] 另外,在使用了雌酮3-(β-D-葡萄糖苷酸)(E1-3G)或雌二醇3-(β-D-葡萄糖苷酸)(E2-3G)作为底物的情况下,反应开始后每15分钟添加与反应液等量的25质量%三氯乙酸溶液(FUJIFILM Wako Pure Chemical公司制),使反应停止。在反应停止后,通过离心分离回收上清,在以下的条件下通过高效液相色谱(HPLC)法对上清中的E1-3G或E2-3G的浓度进行定量。根据E1-3G或E2-3G的浓度的减少,计算出由GUS活性生成的雌酮(E1)或雌二醇(E2)的浓

度。

[0272] 将结果示于下述表4及图2~4。

[0273] [HPLC分析条件]

[0274] • 装置: Prominence (株式会社岛津制作所制)

[0275] • 柱: YMC-Pack ODS-A (粒径5 μ m、细孔径12nm、内径4.6mm \times 长度250mm) (YMC公司制)

[0276] • 柱温: 40 $^{\circ}$ C

[0277] • 流动相: 0.1体积%甲酸乙腈溶液:0.1体积%甲酸水溶液=45:55 (v/v)

[0278] • 注入量: 10 μ L

[0279] • 流速: 0.7mL/分钟

[0280] • 检测器: 光电二极管阵列检测器SPD-M20A (株式会社岛津制作所制)

[0281] [表4]

菌株	底物	生成物	生成物浓度(nM)				
			反应开始时 (0分)	从反应开始 起15分钟后	从反应开始 起30分钟后	从反应开始 起45分钟后	从反应开始 起60分钟后
Levilactobacillus brevis CECT 7480 I-3141株	pNPG	pNP	0.00	0.28	0.46	0.59	0.69
	E1-3G	E1	0.00	0.28	0.56	0.67	0.74
	E2-3G	E2	0.00	0.32	0.50	0.69	0.75
Levilactobacillus brevis NBRC 107147株	pNPG	pNP	0.00	0.17	0.32	0.44	0.53
	E1-3G	E1	0.00	0.15	0.25	0.34	0.44
	E2-3G	E2	0.00	0.15	0.28	0.37	0.45
阴性对照	pNPG	pNP	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	E1-3G	E1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	E2-3G	E2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

[0282] 根据表4及图2~图4的结果可知, I-3141株与作为基准株的NBRC 107147株相比, 对于全部3种底物的生成物浓度高, 具有优异的葡萄糖醛酸糖苷酶活性。

[0284] (试验例3)

[0285] 使用试验例1中筛选的I-3141株, 通过以下的方法试验了对血液中雌激素的效果。

[0286] 将9周龄的雌性无菌小鼠 (品系名: C57BL/6N Jc1) (CLEA Japan公司) 分成2组, 设为溶剂对照组及I-3141给药组。

[0287] 溶剂对照组的小鼠 (n=7) 每周3次口服生理盐水2周。

[0288] I-3141给药组的小鼠 (n=7) 每周3次口服给药I-3141株2周。此时, 将I-3141株悬浮于生理盐水, 以 1×10^9 CFU/只/次的方式给药。

[0289] 在给药2周后 (各组的小鼠为11周龄时) 进行采血, 将血清分离。基于日本专利第6041125号中记载的方法通过液相色谱串联质量分析 (LC-MS/MS) 法测定了血清中的雌二醇 (E2) 的浓度 (LC-MS/MS分析委托于Asuka Pharmaceutical Medical公司)。具体的测定方法记载于以下。

[0290] 需要说明的是, 在试验例3中, 仅对通过以下的方法判断为处于发情期的个体进行了血清中的雌二醇 (E2) 的浓度的测定。

[0291] 与上述采血同时采集了阴道涂片。将阴道涂片涂布于载玻片, 干燥后, 进行姬姆萨染色, 制作了阴道涂片图像的切片。通过以下的方法测定根据阴道涂片图像而判断为处于

发情期的个体(溶剂对照组:3只、I-3141给药组:5只)的雌二醇浓度,计算出各组的平均值。2组间的差异使用Student的t检验进行分析,将p值(概率值)为 $p < 0.05$ 的情况视为统计上显著。将结果示于下述表6。

[0292] <校准曲线用试样的制备>

[0293] 作为校准曲线用试样,在试验管中分别添加雌二醇E2(FUJIFILM Wako Pure Chemical公司制)的甲醇溶液(0.01pg/50 μ L、0.05pg/50 μ L、0.1pg/50 μ L、1pg/50 μ L、10pg/50 μ L及100pg/50 μ L)50 μ L,用纯化水调整为1mL。

[0294] <测定用血清试样的制备>

[0295] <<工序1:雌二醇(E2)的溶出>>

[0296] 向用纯化水1mL稀释的小鼠血清0.075mL中加入内标(E2- $^{13}C_4$)10pg/50 μ L,进一步加入甲基叔丁基醚4mL,振荡5分钟。然后,将水相进行冷冻分离,蒸馏去除油相的溶剂之后,将残渣溶解于甲醇0.5mL,加入纯化水1mL。将其添加于预先用甲醇3mL并接着用纯化水3mL进行了调整的Oasis(注册商标)MAX Cartridge(Waters公司制)。然后,用1体积%乙酸1mL、30体积%乙腈1mL、1M氢氧化钠1mL、甲醇3mL、1体积%乙酸1mL及吡啶/60体积%甲醇(1:100(体积比))1mL清洗了上述Cartridge之后,用吡啶/90体积%甲醇(1:100(体积比))1mL将雌二醇(E2)溶出,用离心蒸发器蒸馏去除了溶出液。

[0297] <<工序2:E2-3-四氟吡啶基醚的制作>>

[0298] 向工序1中得到的残渣添加五氟吡啶0.05mL、乙腈0.1mL及三乙胺0.02mL,充分振荡混合后,在室温下放置20分钟。反应后,在减压下将反应试剂蒸馏去除。

[0299] <<工序3:E2-3-四氟吡啶基醚的溶出>>

[0300] 向工序2中得到的残渣添加在1体积%三氟乙酸-乙腈(1:1,400(体积比))中溶解有2-胍基-1-甲基吡啶1mg的溶液0.14mL,在室温下放置1小时。需要说明的是,2-胍基-1-甲基吡啶的制作方法记载于日本特开2010-36810号公报。

[0301] 反应后,在减压下将溶剂蒸馏去除。用甲醇0.5mL将残渣溶解后,加入纯化水0.5mL。将其添加于预先用甲醇3mL并接着用纯化水3mL进行了调整的Oasis(注册商标)WCX Cartridge。然后,对于上述Cartridge,用0.1M磷酸二氢钾1mL、纯化水2mL及40体积%乙腈1mL清洗了Cartridge柱之后,用甲醇1mL将E2-3-四氟吡啶基醚溶出,在减压下将溶剂蒸馏去除。

[0302] <<工序4:E2-3-四氟吡啶基醚-17-镰孢菌酸(fusaric acid)衍生物的制作>>

[0303] 将包含工序3中得到的E2-3-四氟吡啶基醚的残渣在减压下干燥30分钟以上,然后,添加衍生化试剂(镰孢菌酸40mg、2-甲基-6硝基苯甲酸酐40mg、4-二甲基氨基吡啶20mg/乙腈1mL)0.05mL、以及三乙胺0.01mL,在室温下放置30分钟。反应后,向反应液加入己烷/乙酸(50:1(体积比))0.5mL,充分振荡混合。将其添加于预先用乙酸乙酯3mL并接着用己烷3mL进行了调整的InertSep(注册商标)SI Cartridge。然后,用己烷1mL及乙酸乙酯/己烷(15:85(体积比))2mL清洗了上述Cartridge之后,用乙酸乙酯/己烷(45:55(体积比))将E2-3-四氟吡啶基醚-17-镰孢菌酸衍生物(E2-TfpyFU)溶出,在减压下将溶出液蒸馏去除。残留物用80体积%乙腈0.1mL溶解,制成了E2-TfpyFU溶液。

[0304] <雌二醇(E2)浓度的测定>

[0305] 将工序4中得到的E2-TfpyFU溶液0.02mL注入LC-MS/MS,在下述表5所示的测定条

件下进行了测定。通过质量分析仪测定E2-TfpyFU时的ESI质谱图在m/z583检测到了完整的质子化离子(intact protonated ion)。另外,以m/z583作为前体离子进行了MS/MS测定,结果是m/z308为特异性最高的产物离子,因此,使用这些离子进行选择反应监测(SRM)测定,并进行了定量。

[0306] [表5]

[0307] E2-TfpyFU的LC-MS/MS测定条件

HPLC条件	
自动进样器	: SHIMADZU SIL HTC
泵	: SHIMADZU LC-20AD
第1柱	: Acentis Express Phenyl-Hexyl (2.7 μ m, 2.0x100 mm)
第2柱	: Kinetex C18 (2.6 μ m, 2.0x100 mm)
流动相(1st)	: Acetonitrile-H ₂ O水溶液 (3:1)
流动相(2nd)	: A: H ₂ O B: Acetonitrile
	0.00→2.00 (min) A/B=0:100
	2.00→2.01 (min) A/B=0:100→30:70
	2.01→5.80 (min) A/B=30:70
	5.80→6.00 (min) A/B=30:70→10:90
	6.00→7.50 (min) A/B=10:90→0:100
	7.50→7.70 (min) A/B=0:100
柱温	: 40°C
[0308] 流量(1st)	: 0.25 mL/min
流量(2nd)	: 0.5 mL/min
注入量	: 0.02mL (溶解于80% Acetonitrile 0.1mL)
运行时间	: 7.7 min
MS/MS条件	
MS/MS	: API5000 (AB Sciex)
离子化法	: ESI (Positive)
CAD	: 6 psi
CUR	: 12 psi
气体1	: 20 psi
气体2	: 70 psi
离子喷雾电压	: 5500 volts
离子源温度	: 600 °C
测定离子(m/z)	
E2-TfpyFU	: 583 → 308
E2- ¹³ C ₄ -TfpyFU	: 587 → 311

[0309] [表6]

组	雌二醇(E2)浓度 (pg/mL)
[0310] 溶剂对照组	2.0±0.6
I-3141株给药组	5.3±2.1*

[0311] *:p<0.05

[0312] 根据表6的结果可以确认,通过给药I-3141菌株,血液中的雌二醇的浓度显著上升。

[0313] (制造例1)

[0314] 通过以下的方法制造了含有试验例1中筛选出的I-3141株的食品。

[0315] 基于下述配方,将以下3种乳酸菌的混合粉末(由AB-BIOTICS S.A.公司获得)、和作为赋形剂的干燥淀粉及硬脂酸钙进行混合,得到了胶囊填充用的粉末组合物。接着,使用胶囊填充机(LIQFIL-superJCF、Qualicaps公司制)在硬胶囊(QUALI-V(注册商标)-N、

Qualicaps公司制)中填充平均每1个胶囊280mg的上述粉末组合物,制造了食品。

[0316] <粉末组合物的配方>

[0317] • 3种乳酸菌的混合粉末(I-3141菌株的干燥粉末(0.5×10^9 CFU/胶囊)、Lactoplantibacillus plantarum CECT 7481 (0.25×10^9 CFU/胶囊)、以及Pediococcus acidilactici CECT 7483 (0.25×10^9 CFU/胶囊)):75mg

[0318] • 干燥淀粉(干燥马铃薯淀粉、松谷化学工业株式会社制):199mg

[0319] • 硬脂酸钙(硬脂酸钙(植物性)、太平化学产业株式会社制):6mg

[0320] (试验例4)

[0321] 使用制造例1中制造的食品(以下有时称为“试验食品”),通过以下的方法试验了该食品对于血液中雌激素的效果。

[0322] <对照食品的制造>

[0323] 在制造例1中,未配合3种乳酸菌,将3种乳酸菌的合计配合量75mg变更为干燥淀粉(干燥马铃薯淀粉、松谷化学工业株式会社制)75mg,除此以外,通过与制造例1相同的方法制造了对照食品。

[0324] <试验方法>

[0325] 将绝经期女性111名分成2组,设为对照食品摄取组(57名、平均年龄 49.95 ± 0.32 岁)及试验食品摄取组(54名、平均年龄 50.35 ± 0.40 岁)。对照食品摄取组1天1次在早餐后摄取1个胶囊的上述对照食品,并且连续口服摄取12周。试验食品摄取组1天1次摄取1个胶囊的上述试验食品,并且连续口服摄取12周。在试验开始时(最初的摄取前)及12周的摄取结束后进行采血,分离出血清。

[0326] <<雌二醇(E2)浓度的测定>>

[0327] 通过与试验例3相同的方法测定了血清中的雌二醇(E2)的浓度。

[0328] <<雌酮(E1)浓度的测定>>

[0329] 基于日本专利第6041125号中记载的方法通过液相色谱串联质量分析(LC-MS/MS)法测定了血清中的雌酮(E1)的浓度(LC-MS/MS分析委托于AsukaPharmaceutical Medical公司)。具体的测定方法记载于以下。

[0330] <校准曲线用试样的制备>

[0331] 作为校准曲线用试样,在试验管中分别添加雌酮(E1)(FUJIFILM WakoPure Chemical公司制)的甲醇溶液(0.05pg/50 μ L、0.1pg/50 μ L、0.25pg/50 μ L、1pg/50 μ L、10pg/50 μ L及100pg/50 μ L)50 μ L,用纯化水调整为1mL。

[0332] <测定用血清试样的制备>

[0333] <<工序1:雌酮(E1)的溶出>>

[0334] 向用纯化水1mL稀释的小鼠血清0.075mL中加入内标($E1-^{13}C_4$)10pg/50 μ L,进一步加入甲基叔丁基醚4mL,振荡5分钟。然后,将水相进行冷冻分离,蒸馏去除油相的溶剂之后,将残渣溶解于甲醇0.5mL,加入纯化水1mL。将其添加于预先用甲醇3mL并接着用纯化水3mL进行了调整的Oasis(注册商标)MAX Cartridge(Waters公司制)。然后,用1体积%乙酸1mL、30体积%乙腈1mL、1M氢氧化钠1mL、甲醇3mL、1体积%乙酸1mL及吡啶/60体积%甲醇(1:100(体积比))1mL清洗了上述Cartridge后,用吡啶/90体积%甲醇(1:100(体积比))1mL将雌酮(E1)溶出,用离心蒸发器蒸馏去除了溶出液。

[0335] 需要说明的是,如试验例3的记载所述,在该方法中,在雌酮(E1)的溶出时,雌二醇(E2)也同时溶出。

[0336] <<工序2:E1-3-四氟吡啶基醚的制作>>

[0337] 向工序1中得到的残渣添加五氟吡啶0.05mL、乙腈0.1mL及三乙胺0.02mL,充分振荡混合后,在室温下放置20分钟。反应后,在减压下将反应试剂蒸馏去除。

[0338] <<工序3:E2-3-四氟吡啶基醚的溶出>>

[0339] 向工序2中得到的残渣添加在1体积%三氟乙酸-乙腈(1:1,400(体积比))中溶解有2-胍基-1-甲基吡啶1mg的溶液0.14mL,在室温下放置1小时。反应后,在减压下将溶剂蒸馏去除。用甲醇0.5mL将残渣溶解后,加入纯化水0.5mL。将其添加于预先用甲醇3mL并接着用纯化水3mL进行了调整的Oasis(注册商标)WCX Cartridge。然后,对于上述Cartridge,用0.1M磷酸二氢钾1mL、纯化水2mL及40体积%乙腈1mL清洗了Cartridge柱之后,用甲醇1mL将E2-3-四氟吡啶基醚溶出,在减压下将溶剂蒸馏去除。

[0340] 接着,用乙腈2mL、纯化水0.5mL及甲酸/65体积%甲醇(1:50(体积比))1mL清洗了Cartridge之后,用甲酸/甲醇(1:50(体积比))1mL将E1-3-四氟吡啶基醚-17-(1'-甲基吡啶鎓-2')-腈衍生物(E1-TfpyHMP)溶出。对于溶出液,在减压下将溶剂蒸馏去除。残留物用70体积%乙腈0.1mL溶解,制成了E1-TfpyHMP溶液。

[0341] <雌酮(E1)浓度的测定>

[0342] 将工序3中得到的E1-TfpyHMP溶液0.02mL注入LC-MS/MS,在下述表7所示的测定条件下进行了测定。通过质量分析仪测定E1-TfpyHMP时的ESI质谱图在m/z525检测到了完整的质子化离子。另外,以m/z525作为前体离子进行了MS/MS测定,结果是m/z308为特异性最高的产物离子,于是,使用这些离子进行选择反应监测(SRM)测定,并进行了定量。

[0343] [表7]

[0344] E1-TfpyHMP的LC-MS/MS测定条件

HPLC条件	
自动进样器	: SHIMADZU SIL HTC
泵	: SHIMADZU LC-20AD
柱	: Kinetex C18 (2.6 μ m, 3.0x150 mm)
流动相	: A: 10mM HCOONH ₄ B: Acetonitrile 0.00→2.00(min) A/B=40:60→10:90 2.00→3.50(min) A/B=10:90→0:100 3.50→5.50(min) A/B=0:100 5.50→5.51(min) A/B=0:100→40:60 5.51→6.50(min) A/B=40:60
柱温	: 50℃
流量	: 0.6 mL/min
注入量	: 0.02mL (溶解于70% Acetonitrile 0.1mL)
运行时间	: 6.5 min
MS/MS条件	
MS/MS	: API5000(AB Sciex)
离子化法	: ESI (Positive)
CAD	: 5 psi
CUR	: 11 psi
气体1	: 40 psi
气体2	: 70 psi
离子喷雾电压	: 5500 volts
离子源温度	: 600 ℃
测定离子(m/z)	
E1-TfpyHMP	: 525 → 308
E1- ¹³ C ₄ -TfpyHMP	: 529 → 312

[0346] <<统计分析>>

[0347] 对于测得的血清中的雌酮(E1)浓度及雌二醇(E2)浓度,实施协方差分析(ANCOVA),用试验开始时(最初的摄取前)的血清中的E1浓度或试验开始时(最初的摄取前)的血清中的E2浓度及年龄进行了修正。对于2组间的差异,将p值(概率值)为p<0.05的情况视为统计上显著。将结果示于下述表8。

[0348] [表8]

组	浓度(pg/mL)	
	雌酮(E1)	雌二醇(E2)
对照食品摄取组	25.12 ± 1.08	13.18 ± 1.16
试验食品摄取组	31.62 ± 1.08*	21.38 ± 1.17*

[0350] *:p<0.05

[0351] 根据表8的结果可以确认,在包含3种乳酸菌的试验食品摄取组中,血液中的雌激素(E1及E2)浓度显著上升。

[0352] 作为本发明的方式,可举出例如以下的方式等。

[0353] <1>一种葡糖醛酸糖苷酶活化剂,其含有保藏号为CECT 7480的短促生乳杆菌(*Levilactobacillus brevis*) I-3141株作为有效成分。

[0354] <2>根据上述<1>所述的葡糖醛酸糖苷酶活化剂,其中,上述短促生乳杆菌(*Levilactobacillus brevis*) I-3141株为干燥物或破碎物。

[0355] <3>根据上述<1> ~ <2>中任一项所述的葡萄糖醛酸糖苷酶活化剂,其进一步含有选自属于植物乳植杆菌 (*Lactoplantibacillus plantarum*) 的乳酸菌、以及属于乳酸片球菌 (*Pediococcus acidilactici*) 的乳酸菌中的至少任一种。

[0356] <4>根据上述<3>所述的葡萄糖醛酸糖苷酶活化剂,其中,上述属于植物乳植杆菌 (*Lactoplantibacillus plantarum*) 的乳酸菌为保藏号:CECT 7481的植物乳植杆菌 (*Lactoplantibacillus plantarum*)F-2096株。

[0357] <5>根据上述<3> ~ <4>中任一项所述的葡萄糖醛酸糖苷酶活化剂,其中,上述属于乳酸片球菌 (*Pediococcus acidilactici*) 的乳酸菌为保藏号:CECT 7483的乳酸片球菌 (*Pediococcus acidilactici*)F-1033株。

[0358] <6>根据上述<1> ~ <5>中任一项所述的葡萄糖醛酸糖苷酶活化剂,其用于增加体内的雌激素水平。

[0359] <7>根据上述<1> ~ <5>中任一项所述的葡萄糖醛酸糖苷酶活化剂,其用于改善雌激素代谢。

[0360] <8>根据上述<1> ~ <5>中任一项所述的葡萄糖醛酸糖苷酶活化剂,其用于改善更年期症状。

[0361] <9>一种葡萄糖醛酸糖苷酶活性的增强方法,该方法包括:

[0362] 向对象给药保藏号为CECT 7480的短促生乳杆菌 (*Levilactobacillus brevis*)I-3141株而增强葡萄糖醛酸糖苷酶活性。

[0363] <10>根据上述<9>所述的葡萄糖醛酸糖苷酶活性的增强方法,其中,上述短促生乳杆菌 (*Levilactobacillus brevis*)I-3141株为干燥物或破碎物。

[0364] <11>根据上述<9> ~ <10>中任一项所述的葡萄糖醛酸糖苷酶活性的增强方法,其进一步使用选自属于植物乳植杆菌 (*Lactoplantibacillus plantarum*) 的乳酸菌、以及属于乳酸片球菌 (*Pediococcus acidilactici*) 的乳酸菌中的至少任一种。

[0365] <12>根据上述<11>所述的葡萄糖醛酸糖苷酶活性的增强方法,其中,上述属于植物乳植杆菌 (*Lactoplantibacillus plantarum*) 的乳酸菌为保藏号:CECT 7481的植物乳植杆菌 (*Lactoplantibacillus plantarum*)F-2096株。

[0366] <13>根据上述<11> ~ <12>中任一项所述的葡萄糖醛酸糖苷酶活性的增强方法,其中,上述属于乳酸片球菌 (*Pediococcus acidilactici*) 的乳酸菌为保藏号:CECT 7483的乳酸片球菌 (*Pediococcus acidilactici*)F-1033株。

[0367] <14>一种医药组合物,其含有上述<1> ~ <8>中任一项所述的葡萄糖醛酸糖苷酶活化剂及药学上可接受的载体。

[0368] <15>根据上述<14>所述的医药组合物,其为口服用组合物。

[0369] <16>一种食用组合物,其含有上述<1> ~ <8>中任一项所述的葡萄糖醛酸糖苷酶活化剂及食用成分。

[0370] <17>根据上述<16>所述的食用组合物,其为益生菌组合物。

[0371] <18>根据上述<16> ~ <17>中任一项所述的食用组合物,其容纳于容器中,该容器具有显示选自以下作用中的至少任一作用作为上述食用组合物的作用的标签或说明书:

[0372] (a) 增高体内的雌激素水平、

[0373] (b)改善雌激素代谢、以及

[0374] (c)改善更年期症状。

[0375] <19>根据上述<18>所述的食用组合物,其中,上述食用组合物为保健功能食品。

[0376] <20>一种口服用组合物,其含有保藏号为CECT 7480的短促生乳杆菌(Levilactobacillus brevis) I-3141株、保藏号为CECT 7481的植物乳植杆菌(Lactoplantibacillus plantarum)、以及保藏号为CECT 7483的乳酸片球菌(Pediococcus acidilactici)。

[0377] <21>一种含有微生物的组合物,其含有保藏号为CECT 7480的短促生乳杆菌(Levilactobacillus brevis) I-3141株。

[0378] <22>根据上述<21>所述的含有微生物的组合物,其进一步含有选自属于植物乳植杆菌(Lactoplantibacillus plantarum)的乳酸菌、以及属于乳酸片球菌(Pediococcus acidilactici)的乳酸菌中的至少任一种。

[0379] <23>根据上述<22>所述的含有微生物的组合物,其中,上述属于植物乳植杆菌(Lactoplantibacillus plantarum)的乳酸菌为保藏号:CECT 7481的植物乳植杆菌(Lactoplantibacillus plantarum) F-2096株。

[0380] <24>根据上述<22> ~ <23>中任一项所述的含有微生物的组合物,其中,上述属于乳酸片球菌(Pediococcus acidilactici)的乳酸菌为保藏号:CECT 7483的乳酸片球菌(Pediococcus acidilactici) F-1033株。

[0381] <25>保藏号为CECT 7480的短促生乳杆菌(Levilactobacillus brevis) I-3141菌株的用途,其用于增强葡糖醛酸糖苷酶活性。

[0382] <26>保藏号为CECT 7480的短促生乳杆菌(Levilactobacillus brevis) I-3141菌株的用途,其用于增加雌激素水平。

[0383] <27>保藏号为CECT 7480的短促生乳杆菌(Levilactobacillus brevis) I-3141菌株的用途,其用于改善雌激素代谢。

[0384] <28>用于增加雌激素水平的、上述<1> ~ <8>中任一项所述的葡糖醛酸糖苷酶活化剂、上述<14> ~ <15>中任一项所述的医药组合物、上述<16> ~ <19>中任一项所述的食用组合物、上述<20>所述的口服用组合物、或者上述<21> ~ <24>中任一项所述的含有微生物的组合物。

[0385] <29>用于改善雌激素代谢的、上述<1> ~ <8>中任一项所述的葡糖醛酸糖苷酶活化剂、上述<14> ~ <15>中任一项所述的医药组合物、上述<16> ~ <19>中任一项所述的食用组合物、上述<20>所述的口服用组合物、或者上述<21> ~ <24>中任一项所述的含有微生物的组合物。

[0386] <30>用于改善更年期症状的、上述<1> ~ <8>中任一项所述的葡糖醛酸糖苷酶活化剂、上述<14> ~ <15>中任一项所述的医药组合物、上述<16> ~ <19>中任一项所述的食用组合物、上述<20>所述的口服用组合物、或者上述<21> ~ <24>中任一项所述的含有微生物的组合物。

[0387] <31>一种微生物,其为保藏号:CECT 7480的Levilactobacillus brevis I-3141株,具有葡糖醛酸糖苷酶活性。

[0388] <32>一种葡萄糖醛酸糖苷酶活性的增强方法,该方法包括:

[0389] 向对象口服给药上述<1>~<8>中任一项所述的葡萄糖醛酸糖苷酶活化剂、上述<14>~<15>中任一项所述的医药组合物、上述<16>~<19>中任一项所述的食用组合物、上述<20>所述的口服用组合物、或者上述<21>~<24>中任一项所述的含有微生物的组合物。

[0390] <33>一种体内的雌激素水平的增加方法,该方法包括:

[0391] 向对象口服给药上述<1>~<8>中任一项所述的葡萄糖醛酸糖苷酶活化剂、上述<14>~<15>中任一项所述的医药组合物、上述<16>~<19>中任一项所述的食用组合物、上述<20>所述的口服用组合物、或者上述<21>~<24>中任一项所述的含有微生物的组合物。

[0392] <34>一种雌激素代谢的改善方法,该方法包括:

[0393] 向对象口服给药上述<1>~<8>中任一项所述的葡萄糖醛酸糖苷酶活化剂、上述<14>~<15>中任一项所述的医药组合物、上述<16>~<19>中任一项所述的食用组合物、上述<20>所述的口服用组合物、或者上述<21>~<24>中任一项所述的含有微生物的组合物。

[0394] <35>一种更年期症状的改善方法,该方法包括:

[0395] 向对象口服给药上述<1>~<8>中任一项所述的葡萄糖醛酸糖苷酶活化剂、上述<14>~<15>中任一项所述的医药组合物、上述<16>~<19>中任一项所述的食用组合物、上述<20>所述的口服用组合物、或者上述<21>~<24>中任一项所述的含有微生物的组合物。

[0396] 本国际申请主张基于2022年3月17日提出申请的日本专利申请第2022-042917号的优先权,通过参照将日本专利申请第2022-042917号的全部内容援引至本国际申请。

[0397] 保藏号

[0398] CECT 7480

[0399] CECT 7481

[0400] CECT 7483。

关于微生物保藏的说明

申请人或代理人档案号 P24H96065A	国际申请号 PCT/JP2023009929
-----------------------	------------------------

关于微生物保藏的说明

(专利合作条约实施细则 13 之 2)

微生物保藏的说明	
A.对说明书第 13 页, 第 3 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项	更多的保藏在附加页说明 <input type="checkbox"/>
保藏单位名称CECT-西班牙典型培养物保藏中心	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 西班牙	
保藏日期 2012-6-28	保藏号 CECT 7483
C.补充说明 (必要时)	更多信息在附加页中 <input type="checkbox"/>
[0001]	
D.本说明是为下列指定国作的 (如果说明不是为所有指定国而作的)	
E.补充说明 (必要时) 下列说明将随后向国际局提供 (写出说明的类别, 例如: “保藏的编号”)	

由受理局填写
<input type="checkbox"/> 本页已经和国际申请一起收到
授权官员

由国际局填写
<input type="checkbox"/> 国际局收到本页日期
授权官员

附页

微生物保藏(2)	
A.对说明书第 <u>7</u> 页, 第 <u>26</u> 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项	更多的保藏在附加页说明 <input type="checkbox"/>
保藏单位名称CECT-西班牙典型培养物保藏中心	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 西班牙	
保藏日期 2013-1-29	保藏号 CECT 7480
C.补充说明(必要时)	更多信息在附加页中 <input type="checkbox"/>
D.本说明是为下列指定国作的(如果说明不是为所有指定国而作的)	
E.补充说明(必要时) 下列说明将随后向国际局提供(写出说明的类别,例如:“保藏的编号”)	
微生物保藏(3)	
A.对说明书第 <u>13</u> 页, 第 <u>2</u> 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项	更多的保藏在附加页说明 <input type="checkbox"/>
保藏单位名称CECT-西班牙典型培养物保藏中心	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 西班牙	
保藏日期 2013-1-29	保藏号 CECT 7481
C.补充说明(必要时)	更多信息在附加页中 <input type="checkbox"/>

[0002]

附页

[0003]

D.本说明是为下列指定国作的（如果说明不是为所有指定国而作的）
E.补充说明（必要时）
下列说明将随后向国际局提供（写出说明的类别，例如：“保藏的编号”）

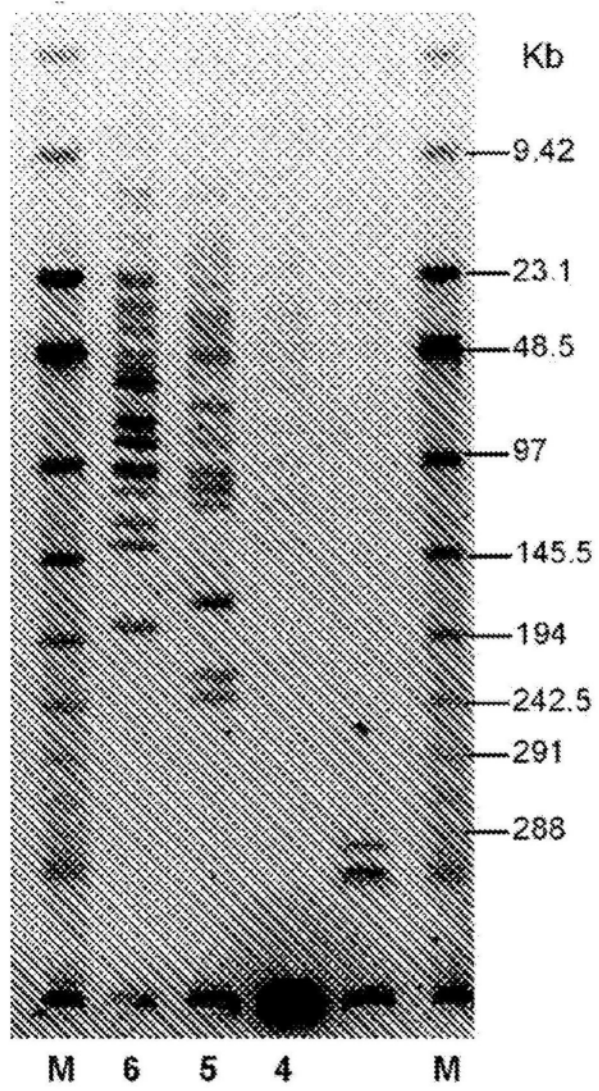


图1A

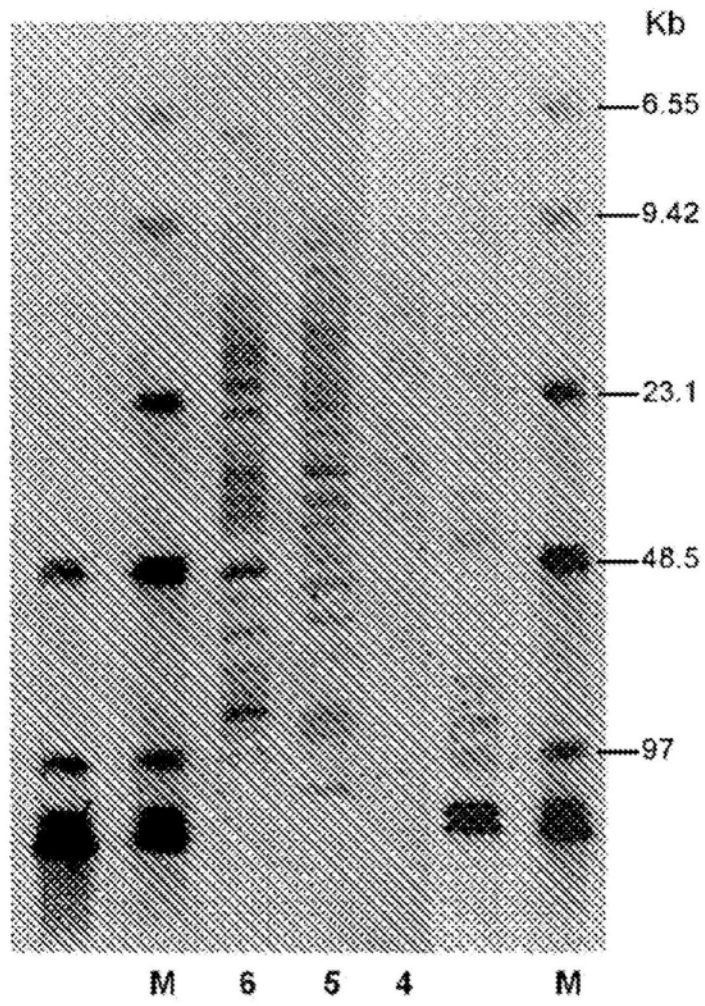


图1B

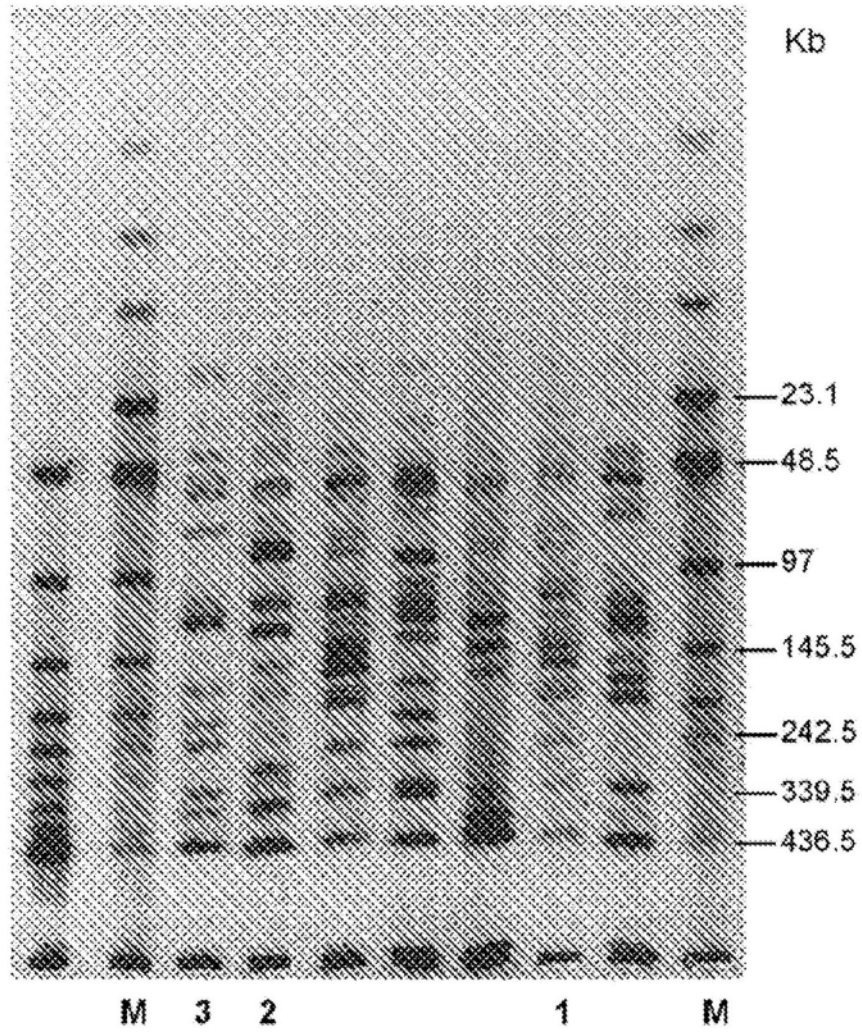


图1C

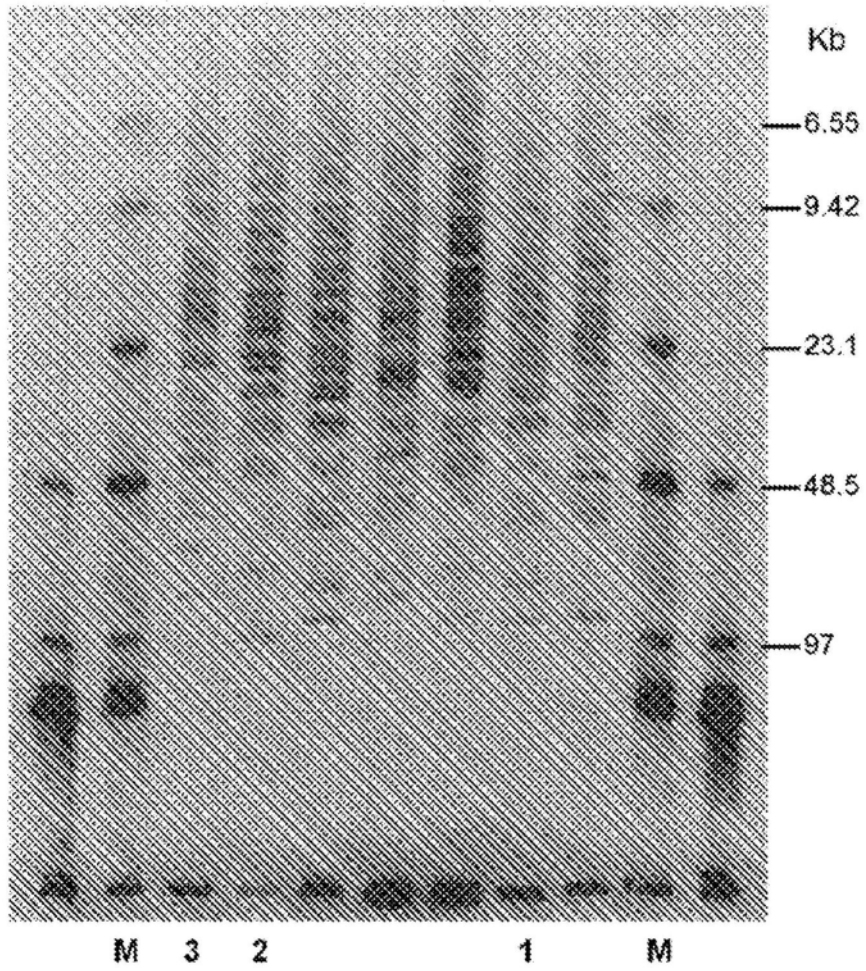


图1D

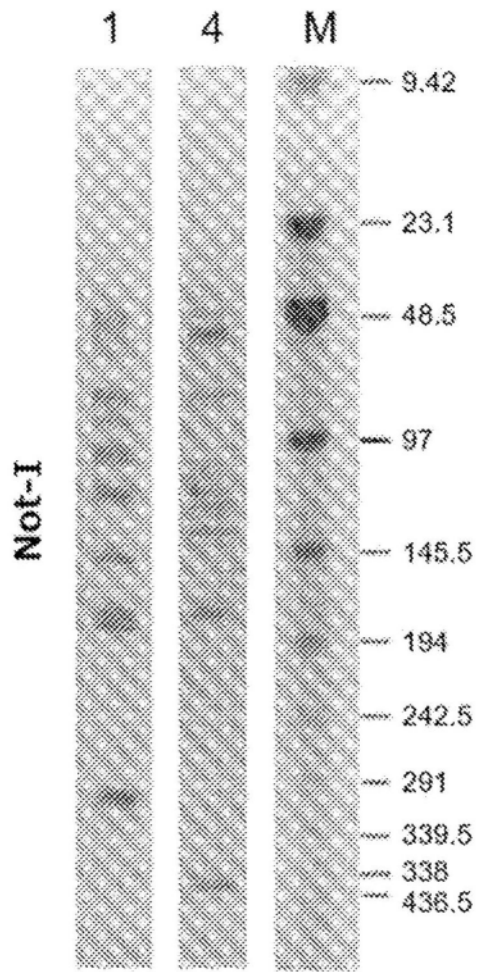


图1E

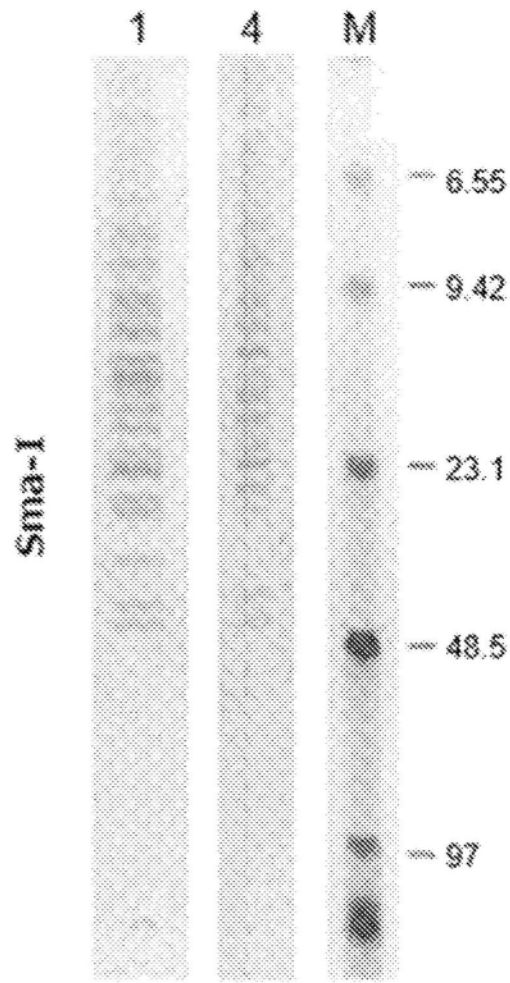


图1F

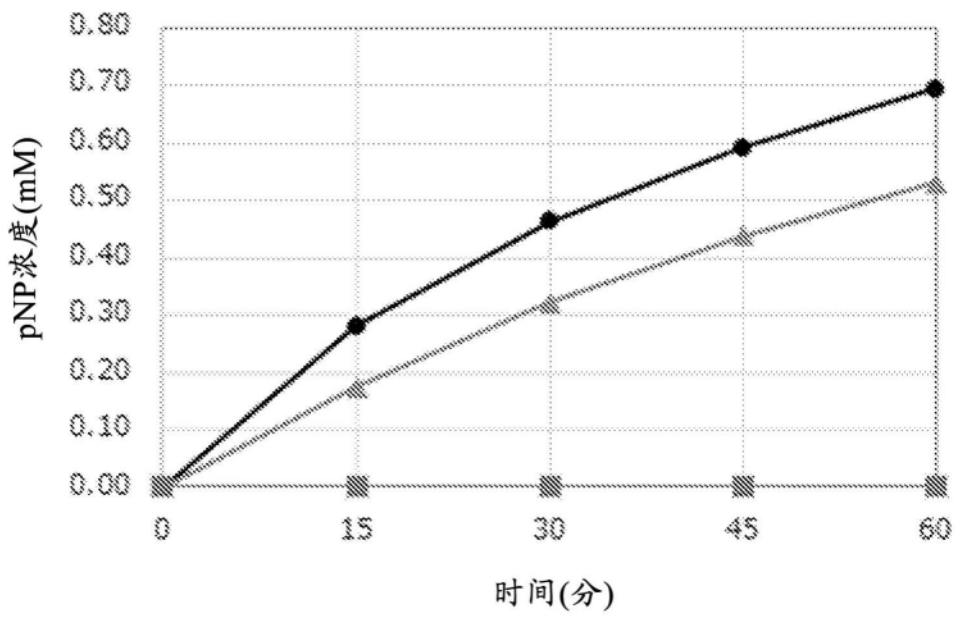


图2

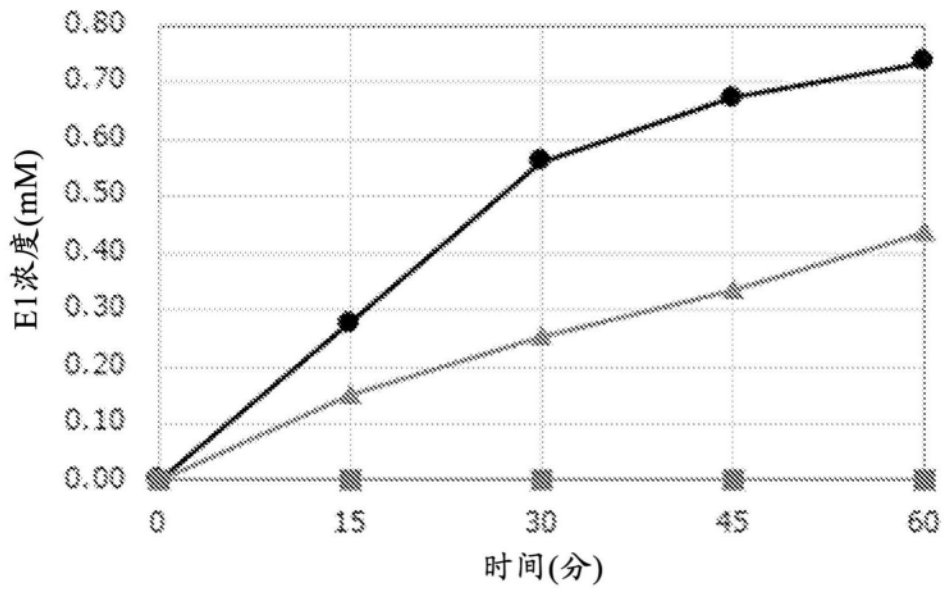


图3

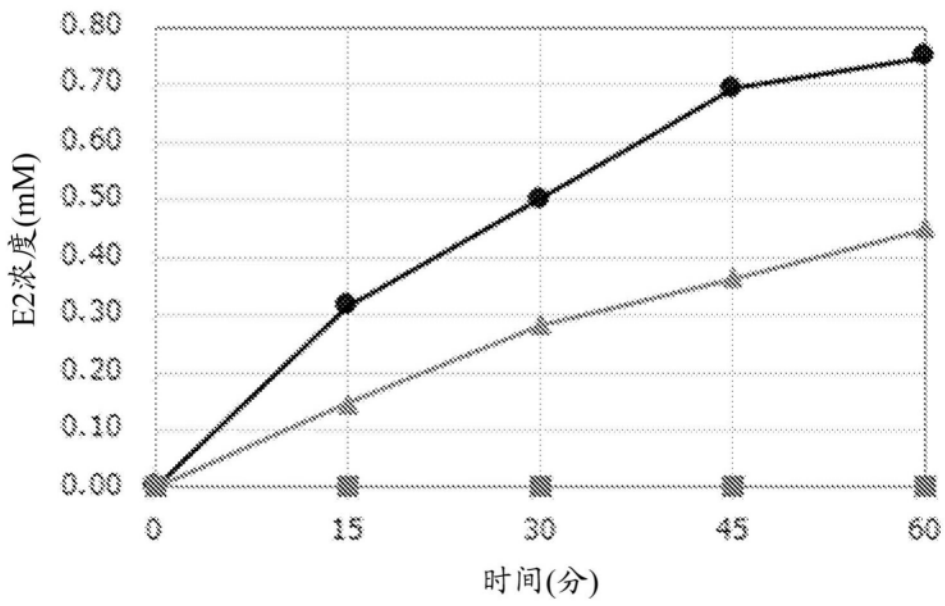


图4