

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】令和 4 年 4 月 15 日(2022.4.15)

【国際公開番号】WO2020/175690

【出願番号】特願 2021-502657(P2021-502657)

【国際特許分類】

A 23 L 33/135(2016.01)

A 61 K 35/745(2015.01)

A 61 P 1/00(2006.01)

A 61 P 43/00(2006.01)

A 61 K 31/192(2006.01)

C 12 N 1/20(2006.01)

10

【F I】

A 23 L 33/135

A 61 K 35/745

A 61 P 1/00

A 61 P 43/00 1 2 1

A 61 K 31/192

C 12 N 1/20

E

20

【手続補正書】

【提出日】令和 3 年 10 月 8 日(2021.10.8)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

30

3 - フェニルプロピオン酸及び / 又は 3 - (4 - ヒドロキシフェニル) プロピオン酸を有効成分として含有する、ビフィドバクテリウム (Bifidobacterium) 属細菌の線毛形成誘導用の組成物。

【請求項 2】

3 - フェニルプロピオン酸及び / 又は 3 - (4 - ヒドロキシフェニル) プロピオン酸を有効成分として含有する、ビフィドバクテリウム属細菌の腸内定着促進用の組成物。

【請求項 3】

前記ビフィドバクテリウム属細菌が、ビフィドバクテリウム・ロンガム (Bifidobacterium longum) である、請求項 1 又は 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

40

3 - フェニルプロピオン酸及び / 又は 3 - (4 - ヒドロキシフェニル) プロピオン酸を産生する微生物を含有する、ビフィドバクテリウム属細菌の線毛形成誘導用の組成物。

【請求項 5】

3 - フェニルプロピオン酸及び / 又は 3 - (4 - ヒドロキシフェニル) プロピオン酸を産生する微生物を含有する、ビフィドバクテリウム属細菌の腸内定着促進用の組成物。

【請求項 6】

前記微生物が、クロストリジウム (Clostridium) 属細菌である、請求項 4 又は 5 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記ビフィドバクテリウム属細菌が、ビフィドバクテリウム・ロンガムである、請求項 4

50

～ 6 の何れか一項に記載の組成物。

【請求項 8】

ビフィドバクテリウム属細菌、並びに 3 - フェニルプロピオン酸及び / 又は 3 - (4 - ヒドロキシフェニル) プロピオン酸を含有する、整腸用組成物。

【請求項 9】

ビフィドバクテリウム属細菌、並びに 3 - フェニルプロピオン酸及び / 又は 3 - (4 - ヒドロキシフェニル) プロピオン酸を含有する、腸内細菌叢改善用組成物。

【請求項 10】

前記ビフィドバクテリウム属細菌が、ビフィドバクテリウム・ロンガムである、請求項 8 又は 9 に記載の組成物。

10

【請求項 11】

飲食品である、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 12】

医薬品である、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の組成物。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0016】

20

【図 1】試験例 1 における、腸管モデル (KUHIMM) 培養液で培養したビフィドバクテリウム・ロンガムの透過型電子顕微鏡写真。 a : ヒト便の添加あり、 b : ヒト便の添加なし

【図 2】試験例 3 における、培養ビフィドバクテリウム・ロンガムの走査型電子顕微鏡写真。 P P A - : 3 - フェニルプロピオン酸非添加、 P P A + : 3 - フェニルプロピオン酸添加

【図 3】試験例 3 における、培養ビフィドバクテリウム・ロンガムのヒト腸管上皮細胞株への接着性を示すグラフ。各群左から、 P P A - : 3 - フェニルプロピオン酸非添加、 P P A + : 3 - フェニルプロピオン酸添加、 P P A + (FimA Ab) : 3 - フェニルプロピオン酸添加かつ抗 FimA 抗体添加

30

【図 4】試験例 4 における、クロストリジウム・スポロゲネスと共培養したビフィドバクテリウム・ロンガムの線毛形成を示すウェスタン・ブロッティングの写真。

【図 5】試験例 5 における、アミノ酸代謝物を添加した G A M 培地で培養したビフィドバクテリウム・ロンガムの線毛形成を示すウェスタン・ブロッティングの写真。フェニルアラニン及びその代謝物 1 : フェニルアラニン、2 : フェニル乳酸、3 : フェニルアクリル酸、4 : 3 - フェニルプロピオン酸、チロシン及びその代謝物 1 : チロシン、2 : 4 - ヒドロキシフェニル乳酸、3 : 4 - ヒドロキシフェニルアクリル酸、4 : 3 - (4 - ヒドロキシフェニル) プロピオン酸、トリプトファン及びその代謝物 1 : トリプトファン、2 : インドール乳酸、3 : インドールアクリル酸、4 : 3 - (インドール) プロピオン酸

40

【図 6】試験例 6 における、ノトバイオートマウス糞便中のビフィドバクテリウム・ロンガムの走査型電子顕微鏡写真。 B L : ビフィドバクテリウム・ロンガム接種マウス、 B L + C S : ビフィドバクテリウム・ロンガム及びクロストリジウム・スポロゲネス接種マウス

【図 7】試験例 7 における、ノトバイオートマウスの盲腸粘液上のビフィドバクテリウム・ロンガムの菌数を示すグラフ。 B L : ビフィドバクテリウム・ロンガム接種マウス、 B L + C S : ビフィドバクテリウム・ロンガム及びクロストリジウム・スポロゲネス接種マウス

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

50

【補正対象項目名】 0 0 2 4

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 0 2 4 】

ビフィドバクテリウム属細菌の線毛の主要な構成タンパク質FimAはレクチン様の性質を有するため、これが線毛を介する該細菌の腸内上皮細胞への接着性に寄与すると考えられる。後述の試験例で示されるように、線毛形成が誘導されたビフィドバクテリウム属細菌では、腸上皮を構成する細胞に、線毛形成が誘導されていない場合よりも大きく結合する。

腸内上皮細胞へのビフィドバクテリウム属細菌の接着性が向上すると、該細菌の腸内定着が促されると考えられる。ここで「定着」とは、腸内上皮へ接着することにより、腸内に存在する菌量が組成物摂取（投与）前よりも増加すること、及び腸内から排出される菌量が組成物摂取（投与）前よりも減少することを含む。

したがって、本発明の組成物は、ビフィドバクテリウム属細菌の腸内定着を促進することができる。さらには、腸内細菌叢をビフィドバクテリウム属細菌が優勢な状態へと改善することも期待される。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 5 3

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 0 5 3 】

< 試験例 1 > 腸管モデル培養における線毛形成の確認

GAM培地でビフィドバクテリウム・ロンガム 1 - 1 株を培養し、該培養液をOD₆₀₀ = 0.1に調整した菌液1 mLを透析膜内に入れ、単一バッチ式嫌気性培養システム（KUHIMM、R. Takagi et. al., PLoS One. 2016, 11(8): e0160533.、D. Sasaki et. al., Sci. Rep. 2018, 8(1): 435.）内で、pHが6以下にならないよう1 MのNa₂CO₃液でコントロールしながら24時間37℃で嫌気培養を行った。なお、試験群の培地には生理食塩水で10%（w/v）に予め調整しておいたヒト糞便溶液100 μLを添加し、陰性対照群には添加しなかった。

培養後の細菌を酸化オスミウムで固定し、透過型電子顕微鏡で観察したところ、ヒト糞便を添加して培養した場合は、大きなファイバー状の線毛が観察された（図1）。

また、ヒト糞便を添加して培養した試験群のビフィドバクテリウム・ロンガム 1 - 1 株について、トランスクリプトーム解析を行ったところ、fimA、fimB、及びsrtC遺伝子を含むクラスターが、陰性対照群に比べて2倍以上発現が増強されていた。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 5 4

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 0 5 4 】

< 試験例 2 > 線毛形成誘導物質の同定

試験例 1 で用いたヒト糞便を添加したKUHIMM培養液（900 mL）を、活性炭カラム（樹脂容積：45 mL）を用いて、MilliQ水、50%メタノール、及び100%メタノール（各2

50 mL）の順で分画した。各画分のうち、100 μLを別の容器に回収し減圧乾固した後、MilliQ水50 μLで再溶解した。次に、GAM培地でビフィドバクテリウム・ロンガム 1 - 1 株を培養し、該培養液をOD₆₀₀ = 0.1に調整した菌液1 mLに上記の分取画分の再溶解液50 μLを添加し、37℃、24時間培養した。培養後に遠心分離（4,000 × g、5分間）により菌体を回収した。ムタノリシンおよびリゾチームを含む抽

10

20

30

40

50

出液 (参考組成: extraction buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.0], 40% [w/v] sucrose, 0.1 mg [w/v] lysozyme, 25 U mutanolysin [Sigma-Aldrich, M9901], cOmplete [Roche])により菌体を処理することで線毛を含む菌体表層画分を分画した。次いで、トリクロロ酢酸沈殿によりタンパク質を濃縮し、SDS-PAGEに供した。PVD膜に転写後、抗FimA抗体を用いたウェスタン・ブロッティングにより実施し、線毛のシグナルを検出することで、線毛誘導活性を評価した。100%メタノールで溶出した画分において、線毛誘導活性が認められた。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0056

10

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0056】

<試験例3> PPAの線毛形成誘導活性の確認

3-フェニルプロピオン酸 10 µg/mL を添加した GAM 寒天培地で、ビフィドバクテリウム・ロンガム 1-1 株を 24 時間 37 °C で嫌気培養した。

培養後の細菌を走査型電子顕微鏡で観察したところ、3-フェニルプロピオン酸を添加して培養した場合は、大きなファイバー状の線毛が観察された (図2)。

前記線毛形成が確認された細菌について、定量的逆転写 PCR により線毛形成関連遺伝子の発現状況を解析したところ、fimA、fimB、及び srtC 遺伝子を含むクラスターが、陰性対照群に比べて約 3 ~ 5 倍発現が増強されていた。

20

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0061

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0061】

<試験例6> クロストリジウム属細菌摂取マウスにおけるビフィドバクテリウム属細菌の線毛形成の確認

無菌マウスに、クロストリジウム・スポロゲネス ATCC11437 株及びビフィドバクテリウム・ロンガム 1-1 株 (BL + CS 群、n = 4) またはビフィドバクテリウム・ロンガム 1-1 株 (BL 群、n = 5) を 1 日目に 1 度投与した。クロストリジウム・スポロゲネス ATCC11437 株は 2.0×10^7 CFU/100 µL、ビフィドバクテリウム・ロンガム 1-1 株は 3.4×10^7 CFU/100 µL を投与した。実験期間を通して、1 週間毎に糞便中の細菌数を T. Matsuki et al., Appl. Environ. Microbiol. (2004) 70(1):167-73 の方法に従い定量的 PCR により測定した。ビフィドバクテリウム・ロンガムの検出に使用したプライマーは、BiLON-1 / BiLON-2 (T. Matsuki et al., Appl. Environ. Microbiol. (2004) 70(1):167-173)、ク

30

ロストリジウム・スポロゲネスの検出に使用したプライマーは、Sporog-F / Sporog-R (S. Morandi et al., Anaerobe. 2015, 34: 44-49.) である。

40

BL + CS 群では実験期間を通してクロストリジウム・スポロゲネスが安定してコロニーを形成することを確認した。また、BL + CS 群では糞便中の PPA が平均 21 ~ 38 µM で検出されたが、BL 群では PPA は検出されなかった。

投与開始 7 週間後にマウスを解剖し、各群マウスの腸上皮に接着したビフィドバクテリウム・ロンガムを走査型電子顕微鏡で観察したところ、BL + CS 群では、大きなファイバー状の線毛が観察された (図6)。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0062

【補正方法】変更

50

【補正の内容】

【 0 0 6 2 】

また、マウス糞便を100 mg採取し、300 μ Lのムタノリシンおよびリゾチームを含む抽出液に完全に懸濁し、3時間37℃でインキュベートした。遠心分離(8,000 x g, 10 min, 4℃)し、上清200 μ L回収した。次いで、トリクロロ酢酸沈殿によりタンパク質を濃縮し

、SDS-PAGEに供した。PVDF膜に転写後、抗FimA抗体を用いるウェスタン・ブロッティングを行って線毛のシグナルを検出したところ、BL + CS群ではFimA重合体を検出され線毛形成が認められた。

10

20

30

40

50