

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2019年10月3日(03.10.2019)



(10) 国際公開番号

WO 2019/189388 A1

- (51) 国際特許分類:  
*C12N 1/20* (2006.01) *C12R 1/225* (2006.01)  
*C12P 17/06* (2006.01) *C12R 1/245* (2006.01)  
*C12R 1/01* (2006.01) *C12R 1/46* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2019/013241
- (22) 国際出願日: 2019年3月27日(27.03.2019)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2018-060179 2018年3月27日(27.03.2018) JP
- (71) 出願人: 株式会社ヤクルト本社 (KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA) [JP/JP]; 〒1058660 東京都港区東新橋1丁目1番19号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 佐藤 直(SATO, Tadashi); 〒1058660 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP). 森山 薫(MORIYAMA, Kaoru); 〒1058660 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP). 辻 浩和(TSUJI, Hirokazu); 〒1058660 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所(THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番8号 沢の鶴人形町ビル Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告 (条約第21条(3))  
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR CULTURING EQUOL-PRODUCING BACTERIA

(54) 発明の名称: エコール産生菌の培養方法

(57) Abstract: Provided is a culturing method for efficiently proliferating equol-producing bacteria belonging to Coriobacteriaceae. The present invention relates to a method for culturing equol-producing bacteria belonging to Coriobacteriaceae in an arginine-containing culture medium, wherein either a) or b) or both are carried out for culturing: a) adjusting the initial pH to a weakly acidic level; and b) mixing a lactic acid bacteria.

(57) 要約: コリオバクテリア科に属するエコール産生菌を効率よく増殖させるための培養方法を提供する。アルギニンを含む培地でコリオバクテリア科に属するエコール産生菌を培養する方法であって、以下の a) 又は b) のいずれか一方又は両方を行う、エコール産生菌の培養方法。 a) 初発 pH を弱酸性に調整して培養する b) 乳酸菌を混合して培養する



WO 2019/189388 A1

## 明 細 書

発明の名称： エコール産生菌の培養方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、エコール産生菌を効率的に増殖させるための培養方法に関する。

### 背景技術

[0002] 大豆食品に多く含まれるイソフラボンは、不定愁訴等の更年期障害の改善や骨粗鬆症の予防、高脂血症や動脈硬化の予防、乳がんや前立腺がんの予防等に効果がある機能性成分として知られている。近年の研究により、イソフラボンの一つであるダイゼイン (D a i d z e i n) は、体内の腸内細菌によってエストロゲン作用や抗酸化作用がより強力なエコール (E q u o l) に代謝されることが明らかになり、エコールは体内で上記の作用を奏する主要な有効成分の一つとして注目されている。

[0003] 体内でのダイゼインからエコールへの産生は全てのヒトで一律に行われるのではなく、その産生能には個人差があり、30～50%のヒトがエコール産生能を有することが報告されている(非特許文献1)。そこで、エコール産生能を有する腸内細菌の探索が精力的に行われており、エコール産生能を有する微生物として、バクテロイデス・オバタス、ストレプトコッカス・インターメディアス、ストレプトコッカス・コンステラータス(特許文献1)、ラクトコッカス・ガルピエ(特許文献2)、ビフィドバクテリウム・アドレスセンティス TM-1株、ビフィドバクテリウム・ブレーベ JCM 1273(特許文献3)、プロピオニバクテリウム・フレウンデレッキ、ビフィドバクテリウム・ラクチス、ラクトバチルス・アシドフィルス、ラクトコッカス・ラクチス、エンテロコッカス・フェシウム、ラクトバチルス・カゼイ、ラクトバチルス・サリバリウス(特許文献4)が報告されている。さらに、高いエコール産生能を有する微生物はコリオバクテリア科(C o r i o b a c t e r i a c e a e)に集中していることが知られており、アドレ

クロイチア・エクオリファシエンス、スラッキア・イソフラボニコンバーテンス、スラッキア・エクオリファシエンス、*Slackia* spp. TM-30株、*Eggerthella* sp. Y7918、SNU-Julong 732（非特許文献2）、*gram positive bacterium* do03（非特許文献3）が報告されている。また、本出願人は、ダイゼインからのエコール変換能が極めて高い微生物として、スラッキア（*Slackia*）属細菌である、*Slackia* sp. YIT 11861（FERM BP-11231）を見出している（特許文献5）。当該菌株を始めとするコリオバクテリア科に属するエコール産生菌は、その高い活性から、腸内でダイゼインをエコールへと効率的に変換することで上記疾患の予防に役立つ新たなプロバイオティクスとしての利用が期待される。さらには、エコールの効率的な製造にも利用できる。

[0004] 斯かるコリオバクテリア科のエコール産生菌をプロバイオティクスやエコールの製造に利用するためには、先ず当該菌体を多量に取得する方法の確立が必要となる。一般的に菌体を高い収率で得るためには液体培地を用いた培養が好ましい。しかしながら、コリオバクテリア科、特にスラッキア属のエコール産生菌は液体培地での増殖性が低いため、その多くが寒天培地により培養されている。加えて、スラッキア属細菌を含むコリオバクテリア科のエコール産生菌は菌体が増殖するまでにはおおよそ3日間、ときには7日間もの長い時間を要し、その産業上の利用性が著しく制限されている。

### 先行技術文献

### 特許文献

- [0005] 特許文献1：国際公開第99／7392号  
特許文献2：国際公開第2005／42号  
特許文献3：特開2006-204296号公報  
特許文献4：特表2006-504409号公報  
特許文献5：特許第5631862号公報

### 非特許文献

[0006] 非特許文献1 : Proc Soc Exp Biol Med, Vol.217, No.3, p335-339(1998)

非特許文献2 : Appl Environ Microbiol, Vol.71, p214-219(2005)

非特許文献3 : J Biosci Bioeng, Vol.102, p247-250(2006)

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、コリオバクテリア科のエコール産生菌を効率よく増殖させるための培養方法を提供することに関する。

### 課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは上記課題を解決するため鋭意検討した結果、コリオバクテリア科のエコール産生菌が、アルギニンを含む培地で、初発pHを弱酸性にして培養する、或いは乳酸菌と混合培養することにより、効率よく増殖できることを見出し、本発明を完成した。

[0009] すなわち、本発明は、以下の1)～7)に係るものである。

1) アルギニンを含有する培地でコリオバクテリア科に属するエコール産生菌を培養する方法であって、以下のa)又はb)のいずれか一方又は両方を行う、エコール産生菌の培養方法。

a) 初発pHを弱酸性に調整して培養する

b) 乳酸菌を混合して培養する

2) 培地中のアルギニン含有量が0.4～2.5w/v%である、1)の方法。

3) 初発pHがpH5.5～6.5である、1)又は2)の方法。

4) 乳酸菌がラクトバチルス・カゼイ、ラクトバチルス・アシドフィルス、ラクトコッカス・ラクチス及びストレプトコッカス・サーモフィルスから選ばれる1種以上である、1)～3)のいずれかの方法。

5) エコール産生菌がスラッキア属細菌である、1)～4)のいずれかの方法。

6) エコール産生菌が*Slackia* sp. YIT 11861 (FERM BP-11231) 株である、1)～5)のいずれかの方法。

7) 乳酸菌がラクトバチルス・カゼイ YIT 9029株 (FERM BP-1366)、ラクトバチルス・アシドフィルス YIT 0198 (JCM1028)、ラクトコッカス・ラクチス YIT 2027 (FERM BP-6224) 及びストレプトコッカス・サーモフィルス YIT 2001 (FERM BP-7538) から選ばれる1種以上である、1)～6) のいずれかの方法。

### 発明の効果

[0010] 本発明によれば、コリオバクテリア科に属するエコール産生菌を、液体培地中で効率よく増殖させることができ、多量の生菌液を長期間に渡って供給することが可能となる。したがって、本発明は、コリオバクテリア科に属するエコール産生菌のプロバイオティクスとしての開発・研究等のために有用である。

### 図面の簡単な説明

- [0011] [図1] YIT 11861株の増殖性（アルギニンの影響）を示す図。  
[図2] YIT 11861株の増殖性（アルギニン含有培地の初発pHの影響）を示す図。  
[図3] YIT 11861株の増殖性（アルギニン含有培地のアルギニン濃度の検討）を示す図。  
[図4] YIT 11861株の増殖性（攪拌培養におけるpH条件の比較）を示す図。

### 発明を実施するための形態

[0012] 本発明において、コリオバクテリア科に属するエコール産生菌（以下、「エコール産生菌」と称する）としては、ダイゼイン類（ダイゼイン配糖体、ダイゼイン、ジヒドロダイゼイン）を資化してエコールを生成するコリオバクテリア科に属する微生物であれば特に限定されず、例えば、アドレクロイチア属、エガセラ属、スラッキア属等に属する微生物が挙げられ、より具体的には、アドレクロイチア・エクオリファシエンス、*Eggerthella* sp. Y7918、スラッキア・イソフラボニコンバーテンス、スラッ

キア・エクオリファシエンス、*Slackia* spp. TM-30株、*Slackia* sp. YIT 11861等が挙げられる。このうち、スラッキア属細菌が好ましく、より好ましくは、*Slackia* sp. YIT 11861株 (FERM BP-11231) である。

[0013] 本発明において、培地中に含有されるアルギニンとしては、L体、D体、それらの混合物でもよいが、好ましくはL-アルギニンである。アルギニンは塩の形態をとっても良く、塩としては、例えば塩酸塩、グルタミン酸塩、クエン酸塩等を挙げることができ、好ましくは塩酸塩である。

培地中のアルギニン含有量は、下限が0.4 w/v%、0.8 w/v%又は1.2 w/v%のいずれか一つから選択され、上限が10.0 w/v%、5.0 w/v%、2.5 w/v%、2.1 w/v%又は1.7 w/v%のいずれか一つから選択される、当該下限と上限との任意の組合せによって規定される含有量を指し、0.4~2.5 w/v%、好ましくは0.8~2.1 w/v%、より好ましくは1.2~1.7 w/v%である。尚、アルギニンの塩を使用した場合、アルギニンの含有量とは、遊離体のアルギニンに換算した量である。

[0014] 本発明の方法において用いられる培地は、嫌気性微生物の生存に適した公知の培地を使用することができる。培地は、液体、半固体、固体であり得るが、好ましくは液体培地である。例えば、日水製薬社製のGAMブイヨン培地や、変法GAMブイヨン培地、Difco社製のBHI培地等を使用することができる。

本発明で用いられる培地には、例えば、水溶性の有機物を炭素源として加えることができる。水溶性の有機物としては、グルコース、ガラクトース、フルクトース、アラビノース、キシロース、マンノース、ラムノース、リボース、ソルボース、トレハロース、セロビオース、ラクトース、マルトース、シュクロース、ラフィノース、メリビオース、メレジトース、ラクチュロース、グリコーゲン、エリスリトール、ソルビトール、アドニトール、マンニトール、イノシトール、ラクチトール、ガラクトオリゴ糖、フラクトオリ

ゴ糖、イヌリン、可溶性でんぷん等の糖類の他、ピルビン酸、リンゴ酸、コハク酸、乳酸、吉草酸、イソ吉草酸、イソ酪酸、酪酸、プロピオン酸及び酢酸など有機酸類等の化合物を挙げることができる。

[0015] 炭素源として培地に加える有機物の濃度は、効率的に培地中のエコール産生菌を発育させるために適宜調節することができる。一般的には、0.05～5 w/v%の範囲から添加量を選択することができる。

[0016] 上記の炭素源に加えて、培地には、窒素源を加えることができる。好ましい無機窒素源としては、アンモニウム塩や硝酸塩が挙げられ、例えば、硫酸、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、リン酸水素アンモニウム、クエン酸アンモニウム、硝酸カリウム、硝酸ソーダ等が挙げられる。有機窒素源としては、アミノ酸類、酵母エキス、ペプトン類、肉エキス、肝臓エキス、消化血清末等が挙げられ、好ましくは、アルギニン、シトルリン、オルニチン、リジン、酵母エキス、ペプトン類等が挙げられる。

[0017] 更に、炭素源や窒素源に加えて、エコール産生菌の培養に適した他の有機物あるいは無機物、例えばビタミンなどの補因子や各種の塩類等の無機化合物を培地に加えることもできる。無機化合物としては、例えば、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム、硫酸マグネシウム、硫酸マンガン、塩化ナトリウム、塩化コバルト、塩化カルシウム、硫酸亜鉛、硫酸銅、明ばん、モリブデン酸ソーダ、塩化カリウム、ホウ酸、塩化ニッケル、タングステン酸ナトリウム、セレン酸ナトリウム、硫酸第一鉄アンモニウム等が挙げられる。

また、ビタミン類としては、例えば、ビオチン、葉酸、ピリドキシン、チアミン、リボフラビン、ニコチン酸、パントテン酸、ビタミンB12、チオオクト酸、p-アミノ安息香酸が挙げられる。

また、ポルフィリン化合物であるヘミンを添加することも可能である。

[0018] 本発明において、コリオバクテリア科に属するエコール産生菌の培養は、一態様として、a) 初発pHを弱酸性に調整して培養することが挙げられる。

ここで、「弱酸性」とは、下限がpH 5.5、5.7又は6のいずれか一つから選択され、上限がpH 6.5、6.3又は6のいずれか一つから選択される、当該下限と上限との任意の組合せによって規定されるpH条件を指し、pH 5.5～6.5、より好ましくはpH 5.5～6の条件を指す。

pH調整は、塩酸、硫酸等の酸を添加することにより行われる。

[0019] 上記培地へのエコール産生菌の播種量は、例えば0.01～50 v/v%、好ましくは0.1～5 v/v%、より好ましくは0.5 v/v%程度とすればよい。

[0020] 培養は、嫌気雰囲気下で行われる。嫌気雰囲気を構成する嫌気性ガスとしては、窒素ガス単独、窒素ガスと二酸化炭素の混合ガス、又は窒素ガスと二酸化炭素と水素の混合ガスが挙げられるが、窒素ガスが好ましく、窒素ガスと二酸化炭素と水素の混合ガスを用いるのがより好ましい。混合ガスは、水素ガスの割合が0.1～80%であるのが好ましく、1～10%であるのがより好ましい。例えば、3種混合ガス（窒素：炭酸ガス：水素＝88%：5%：7%）を用いることができる。

[0021] 培養温度は、25～42℃とするのが好ましく、30～40℃がより好ましく、35～39℃がより好ましい。

また、培養時間は、5～96時間とするのが好ましく、10～72時間がより好ましく、12～48時間がより好ましい。

[0022] また、培養は静置培養でも良いが、攪拌するのが好ましく、50～650 rpm程度の攪拌速度で行うのがより好ましい。

[0023] 本発明におけるコリオバクテリア科に属するエコール産生菌の培養は、上記のa)の態様に加えて、又は別の一態様として、b)乳酸菌を混合して培養することが挙げられる。

ここで用いられる乳酸菌としては、例えばラクトバチルス・カゼイ (L. casei)、ラクトバチルス・アシドフィルス (L. acidophilus)、ラクトバチルス・プランタラム (L. plantarum)、ラクトバチルス・ブヒネリ (L. buchneri)、ラクトバチルス・ガリナ

ラム (*L. gallinarum*)、ラクトバチルス・アミロボラス (*L. amylovorus*)、ラクトバチルス・ブレビス (*L. brevis*)、ラクトバチルス・ラムノーザス (*L. rhamnosus*)、ラクトバチルス・ケフィア (*L. kefir*)、ラクトバチルス・クルバタス (*L. curvatus*)、ラクトバチルス・ゼアエ (*L. zeaee*)、ラクトバチルス・ヘルベティカス (*L. helveticus*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*L. salivarius*)、ラクトバチルス・ガセリ (*L. gasseri*)、ラクトバチルス・ファーメントム (*L. fermentum*)、ラクトバチルス・ロイテリ (*L. reuteri*)、ラクトバチルス・クリスパータス (*L. crispatus*)、ラクトバチルス・デルブルッキ サブスピーシーズ、ブルガリカス (*L. delbrueckii subsp. bulgaricus*)、ラクトバチルス・デルブルッキ サブスピーシーズ、デルブルッキ (*L. delbrueckii subsp. delbrueckii*)、ラクトバチルス・ジョンソニー (*L. johnsonii*) 等のラクトバチルス属細菌、ストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*) 等のストレプトコッカス属細菌、ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ、ラクチス (*Lactococcus lactis subsp. lactis*)、ラクトコッカス・ラクチス サブスピーシーズ、クレモリス (*Lactococcus lactis subsp. cremoris*) 等のラクトコッカス属細菌等が挙げられ、このうちラクトバチルス・カゼイ (*L. casei*)、ラクトバチルス・アシドフィルス (*L. acidophilus*)、ラクトコッカス・ラクチス (*Lac. lactis*)、ストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*) が好ましい。また、ラクトバチルス・カゼイとしては、好ましくは、ラクトバチルス・カゼイ YIT 9018 (FERM BP-665)、ラクトバチルス・カゼイ YIT 9029 (FERM BP-1366)、ラクトバチルス・カゼイ YIT 10003 (FERM BP-77

07) が挙げられ、このうちラクトバチルス・カゼイ YIT 9029 (FERM BP-1366) がより好ましい。ラクトコッカス・ラクチスとしては、好ましくは、ラクトコッカス・ラクチス YIT 2027 (FERM BP-6224) が挙げられる。ストレプトコッカス・サーモフィルスとしては、好ましくは、ストレプトコッカス・サーモフィルス YIT 2001 (FERM BP-7538) が挙げられる。これらの菌株は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（現在は、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許生物寄託センター）に寄託されている。ラクトバチルス・アシドフィルスとしては、好ましくは、ラクトバチルス・アシドフィルス YIT 0198 (JCM1028) が挙げられる。この菌株は、微生物材料開発室 (JCM) に寄託されている。斯かる乳酸菌は、単独で用いてもよく、2種以上を混合して用いても良い。

[0024] 乳酸菌は、予めMRS培地等の培地で前培養し、当該前培養物を、上述したエコール産生菌を播種した培地に添加して培養される。

乳酸菌の播種量は、例えば0.01~50 v/v%、好ましくは0.05~5 v/v%、より好ましくは0.5 v/v%程度とすればよい。

[0025] エコール産生菌と乳酸菌を混合して行われる培養は、嫌気条件もしくは微好気条件で行われ、培養温度は25~42℃とするのが好ましく、30~40℃がより好ましく、35~39℃がより好ましい。

また、培養時間は、5~96時間とするのが好ましく、10~72時間がより好ましく、12~48時間がより好ましい。

また、培養は静置培養でも良いが、50~650 rpm程度の攪拌速度で行っても良い。

## 実施例

[0026] (A) 接種菌液の調製

嫌気グローブボックス内で1.0 w/v%グルコース添加変法GAM (Gifu anaerobic medium) 平板培地 (日水製薬) に *S Slackia* sp. YIT 11861株 (以下「NATTS株」とも称す

る)の凍結菌株(分散媒 20%グリセロール溶液)を200 $\mu$ L接種し、37 $^{\circ}$ Cで24時間培養した。生育したコロニーを平板1枚あたり1.0w/v%グルコース添加変法GAM培地(日水製薬)2mLに懸濁し、接種菌液とした。

[0027] (B) 増殖性の評価

培養開始0時間、24時間後のOD<sub>600</sub>を測定し、0時間からの $\Delta$ OD<sub>600</sub>を求めて増殖の指標とした。

[0028] (C) NATTS株・乳酸菌の菌数測定

培養液200 $\mu$ Lを400 $\mu$ LのRNA Later™ (Ambion)と混合し、10分間室温で静置した。その後、4 $^{\circ}$ Cのもと12,000rpmで5分間遠心して上清をデカンテーションで除去した後、RNA抽出まで-80 $^{\circ}$ Cで保存した。凍結保存したペレットは融解後、定法[1) Tsuji, H. et al. Isolation and characterization of the equol-producing bacterium *Slackia* sp. strain NATTS. Arch Microbiol. 192, 279-87 (2010)、2) Matsuda, K et al. Establishment of an analytical system for the human fecal microbiota, based on reverse transcription-quantitative PCR targeting of multicopy rRNA molecules. Appl Environ Microbiol. 75:1961-1969 (2009)]に従ってRNA抽出を行い、RT-qPCR法によりNATTS株の菌数を測定した。使用したプライマーは表1のとおりである。

乳酸菌の菌数は、上記のRNAを鋳型に用い、定法[2) Matsuda, K. et al. Establishment of an analytical system for the human fecal microbiota, based on reverse transcription-quantitative PCR targeting of multicopy rRNA molecules. Appl Environ Microbiol. 75, 1961-1969 (2009)、3) Kubota, H. et al. Detection of human intestinal catalase-negative, gram-positive cocci by rRNA-targeted reverse transcription-PCR. Appl Environ Microbiol. 76, 5440-5451 (2010)]に従って測定した。使用したプライマーは表2のとおりである。

[0029]

[表1]

標的菌種	プライマー	配列 (5'-3')	配列番号	文献
<i>Slackia</i> sp. YIT 11861 (NATTS株)	eq430F	GGGACGAAGTCATTCGTGA	1	1)
	eq665R	GCATCCGAGGCTTCCAGTT	2	

1) Tsuji, H. et al. Isolation and characterization of the equol-producing bacterium *Slackia* sp. strain NATTS. Arch Microbiol. 192, 279-87 (2010)

[0030] [表2]

標的菌種	プライマー	配列 (5'-3')	配列番号	文献
<i>Lactobacillus acidophilus</i> YIT 0198	sg-Lgas-F	GATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGAT	3	2)
	sg-Lgas-R	TAAAGGCCAGTTACTACCTCTATCC	4	
<i>Lactobacillus casei</i> YIT 9029	sg-Lcas-F	ACCGCATGGTTCTTGGC	5	3)
	sg-Lcas-R	CCGACAACAGTTACTCTGCC	6	
<i>Lactococcus lactis</i> YIT 2027	sg-Lclac-F	TGTAGGGAGCTATAAGTTCTCTGTA	7	3)
	sg-Lclac-R	GGCAACCTACTTYGGTACTCCC	8	

2) Matsuda, K. et al. Establishment of an analytical system for the human fecal microbiota, based on reverse transcription-quantitative PCR targeting of multicopy rRNA molecules. Appl Environ Microbiol. 75, 1961-1969 (2009)

3) Kubota, H. et al. Detection of human intestinal catalase-negative, gram-positive cocci by rRNA-targeted reverse transcription-PCR. Appl Environ Microbiol. 76, 5440-5451 (2010)

### [0031] 試験例 1 アルギニンの添加効果

(1) アルギニン塩酸塩を最終濃度が 1.0 w/v% (遊離体のアルギニン量に換算すると、0.8 w/v%) となるように変法 G A M 培地に添加し、115℃で15分間オートクレーブした後、嫌気グローブボックス (COY LABORATORY PRODUCTS) 内において予め2日以上嫌気置換し、試験培地を調製した。嫌気ガスは窒素、炭酸ガス及び水素の3種混合ガス (窒素 : 炭酸ガス : 水素 = 88% : 5% : 7%) を使用した。

アルミキャップ付き試験管に分注した試験培地 4 mL に上記 (A) に従い調製した菌液を 1/200 量接種し、嫌気グローブボックス内で 37℃、24 時間培養した。その際、対照として、アルギニン塩酸塩を添加しない変法 G A M 培地 (0.1% アルギニンを含む) を使用した。菌体の増殖性を上記 (B) に記載の方法に従って評価した。

## [0032] (2) 結果

1. 0 w/v % アルギニン塩酸塩を変法 G A M 培地に添加した結果、非添加と比べて  $\Delta O D_{600}$  値が約 2.6 倍増加した (図 1)。

## [0033] 試験例 2 初発 pH 及びアルギニン濃度の検討

## (1) 初発 pH の影響

アルギニン塩酸塩を 1.0 w/v % (遊離体のアルギニン量に換算すると、0.8 % w/v %) 添加した変法 G A M 培地 (0.1 % アルギニンを含む)、又はアルギニン塩酸塩を添加しない変法 G A M 培地について、塩酸を用いて初発 pH を 5.0、5.5、6.0 及び 6.5 に調整し、115°C で 15 分間オートクレーブした後、嫌気グローブボックス (COY LABORATORY PRODUCTS) 内において予め 2 日以上嫌気置換し、試験培地を調製した。嫌気ガスは窒素、炭酸ガス及び水素の 3 種混合ガス (窒素 : 炭酸ガス : 水素 = 88 % : 5 % : 7 %) を使用した。その際、対照としてアルギニン塩酸塩を添加しない pH 未調整の変法 G A M 培地を使用した。

アルミキャップ付き試験管に分注した試験培地 4 mL に、上記 (A) に従い調製した菌液を 1/200 量接種し、嫌気グローブボックス内で 37°C、24 時間培養した。菌体の増殖性は上記 (B) に記載の方法に従って評価した。

[0034] その結果、初発 pH が 5.5、6.0 及び 6.5 において pH 未調整 (pH 6.9) の培地と比べて  $\Delta O D_{600}$  値がそれぞれ 1.2、1.3 倍及び 1.1 倍増加した (図 2)。なかでも初発 pH が 6.0 の場合が最も高い  $\Delta O D_{600}$  値を示した。一方、pH 5.0 では増殖が著しく抑制された。一方、アルギニン塩酸塩非添加の条件では、対照と比べて  $\Delta O D_{600}$  値にほとんど差はなかった。

## [0035] (2) アルギニン濃度の検討

アルギニン塩酸塩を最終濃度が 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 及び 3.0 w/v % (遊離体のアルギニンに換算すると、0.4、0.8、1.2、1.7、2.1 及び 2.5 w/v %) となるように変法 G A M 培地

に添加し、塩酸で初発pHを5.5もしくは6.0に調整した後、115℃で15分間オートクレーブした後、嫌気グローブボックス（COY LABORATORY PRODUCTS）内において予め2日以上嫌気置換し、試験培地を調製した。嫌気ガスは窒素、炭酸ガス及び水素の3種混合ガス（窒素：炭酸ガス：水素＝88%：5%：7%）を使用した。

アルミキャップ付き試験管に分注した試験培地4 mLに、上記（A）に従い調製した菌液を1/200量接種し、嫌気グローブボックス内で37℃、24時間培養した。菌体の増殖性は上記（B）に記載の方法に従って評価した。

[0036] その結果、アルギニン塩酸塩濃度が0.5 w/v%以上で未添加と比べて有意な増殖促進効果が認められ（図3）、初発pH5.5及び6.0の条件とも2.0%の添加効果が最も高かった。

#### [0037] 試験例3 攪拌の影響

アルギニン塩酸塩を2.0 w/v%（遊離体のアルギニン量に換算すると、1.7 w/v%）添加した変法GAM培地（初発pH5.5もしくは6.0）200 mL（500 mLコルベンを使用）を115℃で15分間オートクレーブした後、嫌気グローブボックス（COY LABORATORY PRODUCTS）内において予め2日以上嫌気置換し、試験培地を調製した。嫌気ガスは窒素、炭酸ガス及び水素の3種混合ガス（窒素：炭酸ガス：水素＝88%：5%：7%）を使用した。

試験培地に上記（A）に従い調製した菌液を1/200量接種し、750 rpmの攪拌速度で攪拌子を回転させながら、嫌気グローブボックス内で37℃、24時間培養した。

また、上記と同じ組成の培地で回転を加えずに静置培養したものを対照とした。なお、攪拌培養の回転速度は、気相のガスを培地全体に拡散させることができ、かつ24時間安定して回転させることができる速度に設定した。菌体の増殖性は上記（B）に記載の方法に従って評価した。

[0038] その結果、どちらのpH条件においても静置培養と比べて攪拌培養を行う

ことで増殖性の向上が見られた（図4）。攪拌条件下で初発pH5.5と6.0を比べた場合、pH6.0よりもpH5.5の条件がより高い $\Delta OD_{600}$ 値を示し、pH5.5では同じ培地組成の静置培養と比べて約1.7倍に増加した。

[0039] 試験例4 乳酸菌との混合培養

(1) 乳酸菌株

・ *L. acidophilus* YIT0198、*L. casei* YIT9029 (LcS)

・ *Lac. lactis* ss. *lactis* YIT2027、

・ *St. thermophilus* YIT2001

[0040] (2) NATTS株の接種菌液は、上記(A)と同様に調製した。各種乳酸菌は、菌体を吸着させたマイクロバンク（イワキ）凍結ビーズを4mLのMRS培地に接種し、37℃で24時間好気培養した。試験培地は窒素ガスを飽和させてブチル栓で試験管に密封した0.5w/v%グルコース/1.5w/v%アルギニン塩酸塩添加一変法GAM（pH未調整）10mLとした。試験培地に乳酸菌とNATTS株との組み合わせ、もしくはそれぞれ単独で0.5%接種し、37℃で24時間嫌気培養した。なお、NATTS単独培養には乳酸菌培養液の代わりにMRS培地を、乳酸菌単独培養にはNATTS株の培養液の代わりに変法GAM培地を加えた。

培養24時間後に培養液について、前記(C)に記載の方法によりNATTS株及び各乳酸菌の菌数を測定した。

[0041] (3) 結果

*L. acidophilus* YIT0198、*Lac. lactis* YIT2027、*St. thermophilus* YIT 2001及びLcSを混合培養した際、培養24時間後のNATTS株の菌数がNATTS株単独培養と比べて高くなり、特に*L. acidophilus* YIT0198及びLcSを混合培養した際、有意に高くなった（表2、 $p < 0.05$ ）。特にLcSと混合培養した際のNATTS株の菌数は最も高く、こ

れまでに確立した至適培地で培養した際の菌数とほぼ同等であった（表3）。また、L c Sの菌数についても単独培養と比較してNATTS株と混合培養した場合に有意に高かった（表3,  $p < 0.05$ ）。

[0042] [表3]

培養24時間後における培養液中の菌数測定結果

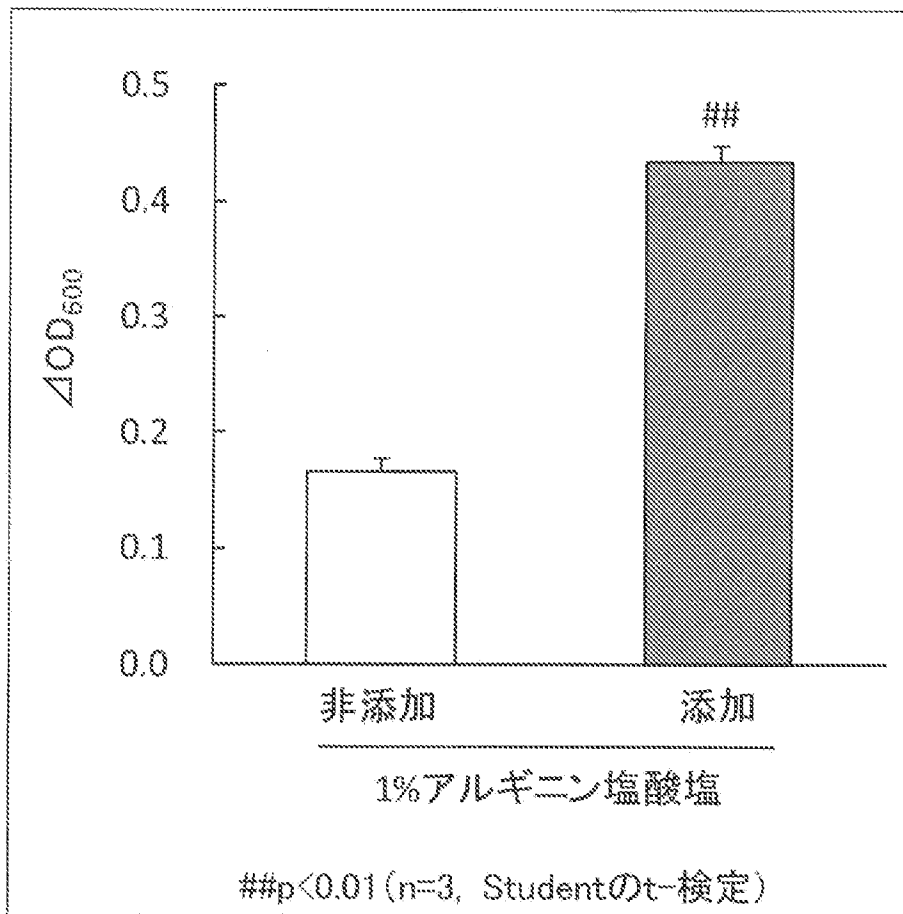
菌 株	菌数 $\log_{10}$ (cells/ml)		pH
	NATTS	乳酸菌	
NATTS	7.7	NT	7.43
<i>L. acidophilus</i> YIT 0198	ND	8.0	4.55
<i>L. acidophilus</i> YIT 0198 + NATTS	8.4**	7.7 <sup>†</sup>	5.83 <sup>††</sup>
<i>L. casei</i> YIT 9029	ND	8.3	4.53
<i>L. casei</i> YIT 9029 + NATTS	8.8**	8.7 <sup>†</sup>	7.38 <sup>††</sup>
<i>Lac. lactis</i> YIT 2027	ND	7.9	5.50
<i>Lac. lactis</i> YIT 2027 + NATTS	7.8	7.6	6.99 <sup>†</sup>
<i>St. thermophilus</i> YIT 2001	ND	9.2	4.96
<i>St. thermophilus</i> YIT 2001 + NATTS	7.9	9.1	6.57 <sup>††</sup>

表中の値は平均値(n=3)で示した。ND; 検出下限値(3.0  $\log_{10}$  cells/ml)未満、NT; not tested. \*\* $p < 0.01$  v s NATTS (Dunnnettの多重比較検定)、<sup>†</sup> $p < 0.05$ 、<sup>††</sup> $p < 0.01$  (単独培養vs 混合培養、Studentのt検定)。

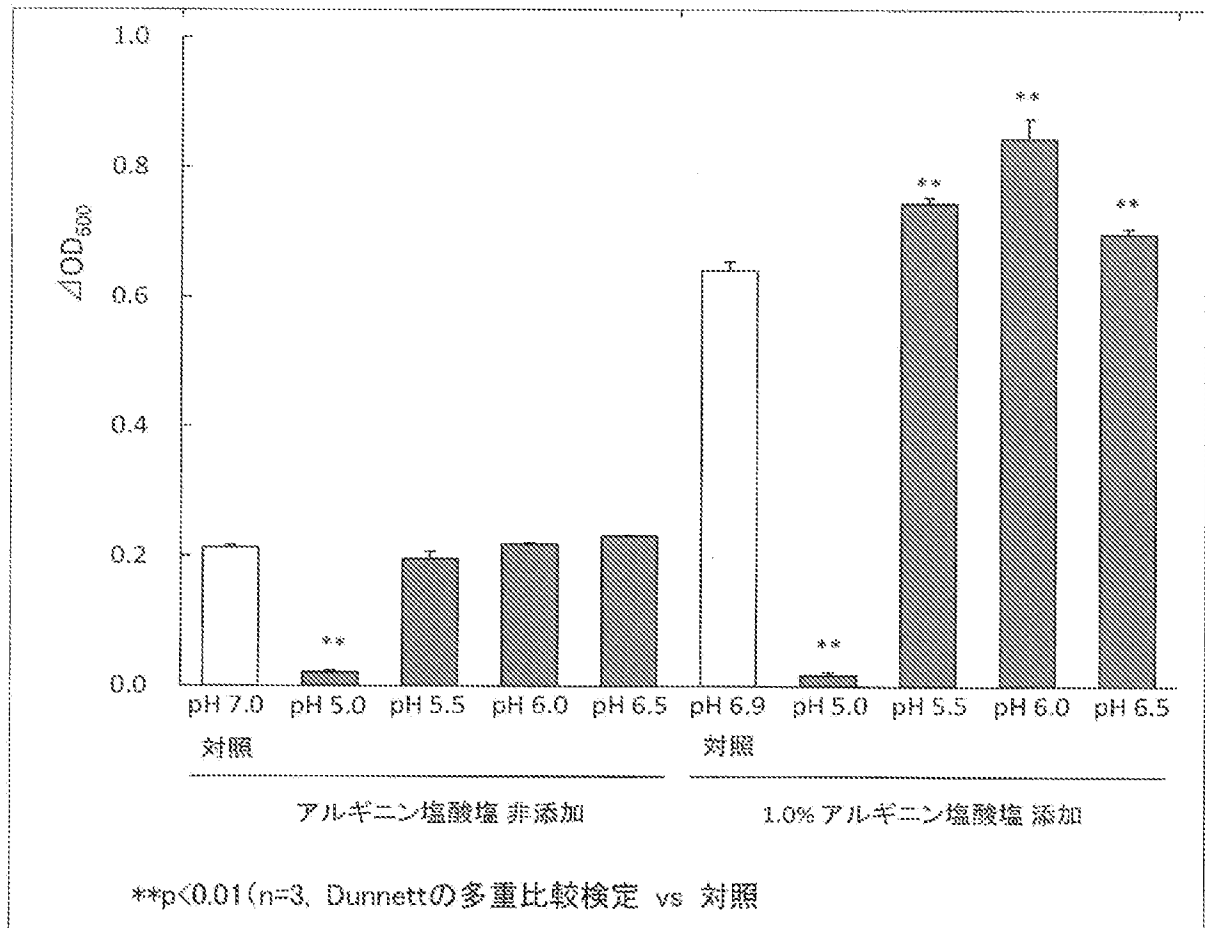
## 請求の範囲

- [請求項1] アルギニンを含有する培地でコリオバクテリア科に属するエコーラ産生菌を培養する方法であって、以下のa)又はb)のいずれか一方又は両方を行う、エコーラ産生菌の培養方法。
- a) 初発pHを弱酸性に調整して培養する
  - b) 乳酸菌を混合して培養する
- [請求項2] 培地中のアルギニン含有量が0.4～2.5 w/v%である、請求項1記載の方法。
- [請求項3] 初発pHがpH5.5～6.5である、請求項1又は2記載の方法。
- [請求項4] 乳酸菌がラクトバチルス・カゼイ、ラクトバチルス・アシドフィルス、ラクトコッカス・ラクチス及びストレプトコッカス・サーモフィルスから選ばれる1種以上である、請求項1～3のいずれか1項記載の方法。
- [請求項5] エコーラ産生菌がスラッキア属細菌である、請求項1～4のいずれか1項記載の方法。
- [請求項6] エコーラ産生菌が*Slackia* sp. YIT 11861株 (FERM BP-11231)である、請求項1～5のいずれか1項記載の方法。
- [請求項7] 乳酸菌がラクトバチルス・カゼイ YIT 9029株 (FERM BP-1366)、ラクトバチルス・アシドフィルス YIT 0198 (JCM1028)、ラクトコッカス・ラクチス YIT 2027 (FERM BP-6224)及びストレプトコッカス・サーモフィルス YIT 2001 (FERM BP-7538)から選ばれる1種以上である、請求項1～6のいずれか1項記載の方法。

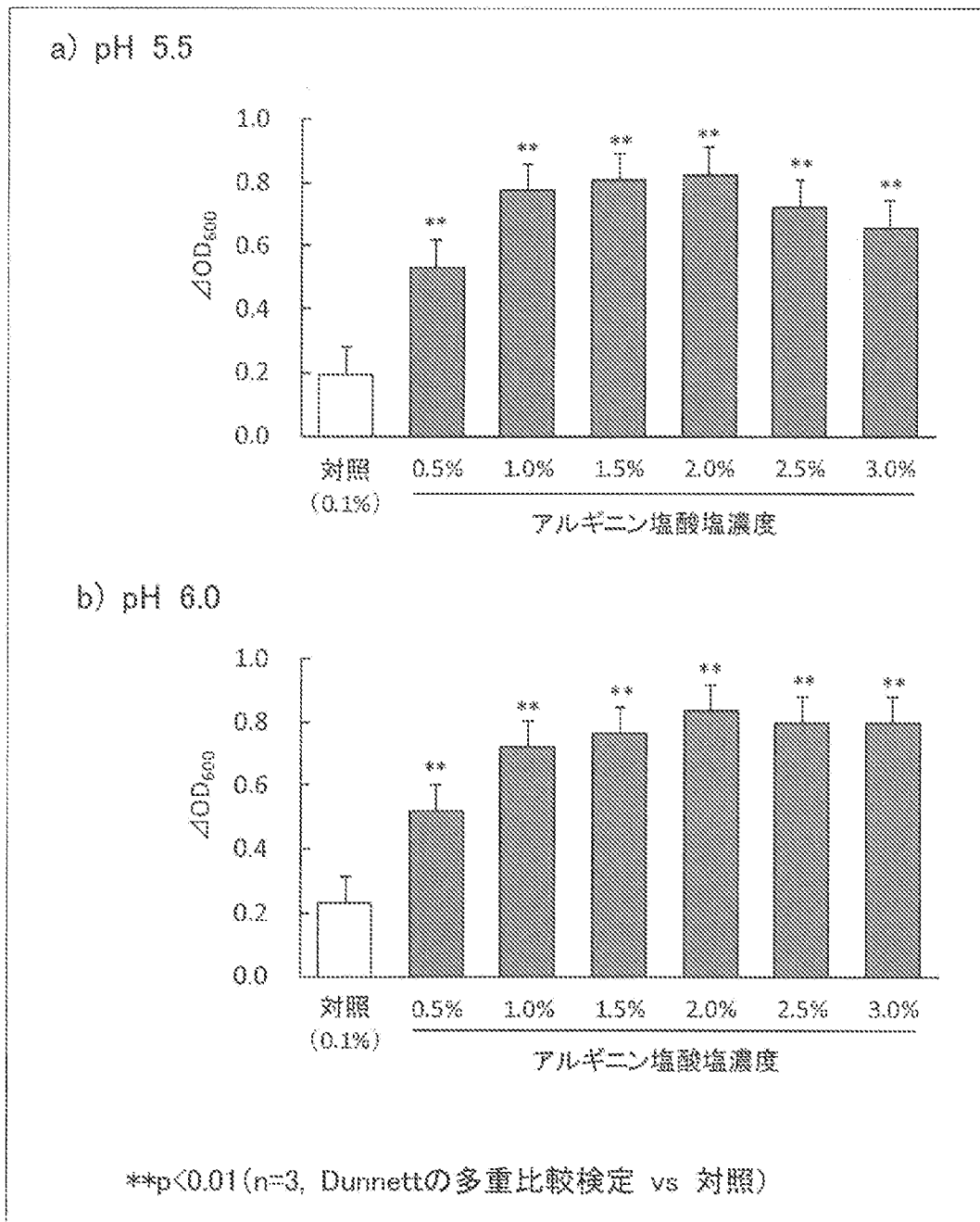
[図1]



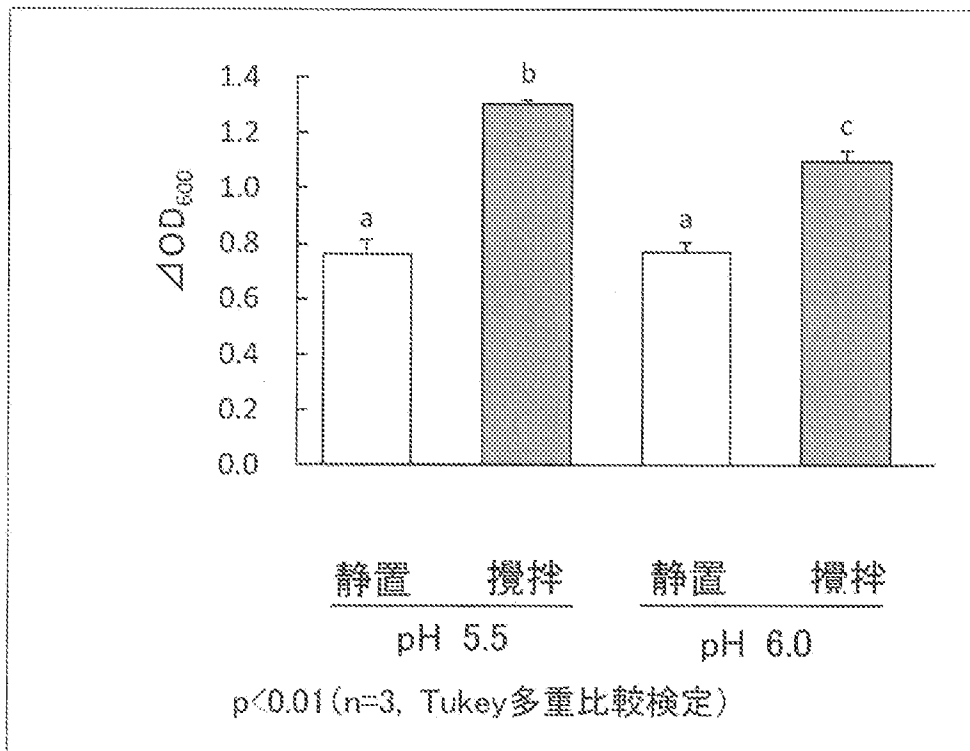
[図2]



[図3]



[図4]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2019/013241

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

Int.Cl. C12N1/20 (2006.01) i, C12P17/06 (2006.01) n, C12R1/01 (2006.01) n,  
C12R1/225 (2006.01) n, C12R1/245 (2006.01) n, C12R1/46 (2006.01) n

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

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. C12N1/20, C12P17/06, C12R1/01, C12R1/225, C12R1/245, C12R1/46

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2019
Registered utility model specifications of Japan	1996-2019
Published registered utility model applications of Japan	1994-2019

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2010/032838 A1 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 25 March 2010, abstract, claims 1-19, paragraphs [0020], [0029], [0034], [0144], table 3 & US 2011/0189134 A1, abstract, claims 1-19, paragraphs [0054], [0063], example 2, table 3 & US 2015/0299748 A1 & EP 2335500 A1	1-3, 5 1-7

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 10 May 2019 (10.05.2019)	Date of mailing of the international search report 28 May 2019 (28.05.2019)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer  Telephone No.
--	---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/013241

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2010-187647 A (TOYOHAKKO CO., LTD.) 02 September 2010, claims 1-11, paragraphs [0006], [0033], [0036], [0042]-[0045], fig. 1 (Family: none)	1-7
Y	WO 2010/098103 A1 (YAKULT HONSHA CO., LTD.) 02 September 2010, abstract, claims 1, 4, paragraph [0027] & US 2011/0318309 A1, abstract, claims 1, 4, paragraph [0034] & EP 2402429 A1	6, 7
Y	JP 09-238647 A (YAKULT HONSHA CO., LTD.) 16 September 1997, table 2 (Family: none)	7
Y	JP 2001-340059 A (YAKULT HONSHA CO., LTD.) 11 December 2001, paragraph [0024] (Family: none)	7
A	MINAMIDA, K. et al., "Production of equol from daidzein by gram-positive rod-shaped bacterium isolated from rat intestine.", Journal of bioscience and bioengineering, 2006 September, vol. 102, no. 3, pp. 247-450.	1-7

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>Int.Cl. C12N1/20(2006.01)i, C12P17/06(2006.01)n, C12R1/01(2006.01)n, C12R1/225(2006.01)n, C12R1/245(2006.01)n, C12R1/46(2006.01)n</p>												
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>Int.Cl. C12N1/20, C12P17/06, C12R1/01, C12R1/225, C12R1/245, C12R1/46</p>												
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:30%;">日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2019年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2019年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2019年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2019年	日本国実用新案登録公報	1996-2019年	日本国登録実用新案公報	1994-2019年	
日本国実用新案公報	1922-1996年											
日本国公開実用新案公報	1971-2019年											
日本国実用新案登録公報	1996-2019年											
日本国登録実用新案公報	1994-2019年											
<p>国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)</p>												
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width:10%;">引用文献の カテゴリー*</th> <th style="width:70%;">引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th style="width:20%;">関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 2010/032838 A1（大塚製薬株式会社）</td> <td>1-3, 5</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>2010.03.25, 要約, 請求項1-19, [0020], [0029], [0034], [0144], 表3 &amp; US 2011/0189134 A1, abstract, claim 1-19, [0054], [0063], example 2, table 3 &amp; US 2015/0299748 A1 &amp; EP 2335500 A1</td> <td>1-7</td> </tr> </tbody> </table>				引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	X	WO 2010/032838 A1（大塚製薬株式会社）	1-3, 5	Y	2010.03.25, 要約, 請求項1-19, [0020], [0029], [0034], [0144], 表3 & US 2011/0189134 A1, abstract, claim 1-19, [0054], [0063], example 2, table 3 & US 2015/0299748 A1 & EP 2335500 A1	1-7
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号										
X	WO 2010/032838 A1（大塚製薬株式会社）	1-3, 5										
Y	2010.03.25, 要約, 請求項1-19, [0020], [0029], [0034], [0144], 表3 & US 2011/0189134 A1, abstract, claim 1-19, [0054], [0063], example 2, table 3 & US 2015/0299748 A1 & EP 2335500 A1	1-7										
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。</p>		<p><input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>										
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）</p> <p>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>		<p>の日の後に公表された文献</p> <p>「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&amp;」同一パテントファミリー文献</p>										
<p>国際調査を完了した日</p> <p style="text-align: center;">10.05.2019</p>		<p>国際調査報告の発送日</p> <p style="text-align: center;">28.05.2019</p>										
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p style="text-align: center;">日本国特許庁（ISA/J P） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>		<table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td colspan="2"> <p>特許庁審査官（権限のある職員）</p> <p style="text-align: center;">中野 あい</p> </td> <td style="width:10%; text-align: center;">4B</td> <td style="width:10%; text-align: center;">3758</td> </tr> <tr> <td colspan="4"> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p> </td> </tr> </table>		<p>特許庁審査官（権限のある職員）</p> <p style="text-align: center;">中野 あい</p>		4B	3758	<p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>				
<p>特許庁審査官（権限のある職員）</p> <p style="text-align: center;">中野 あい</p>		4B	3758									
<p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>												

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2010-187647 A (株式会社東洋発酵) 2010.09.02, 請求項1-11, [0006], [0033], [0036], [0042]-[0045], Fig.1 (ファミリーなし)	1-7
Y	WO 2010/098103 A1 (株式会社ヤクルト本社) 2010.09.02, 要約, 請求項1, 4, [0027] & US 2011/0318309 A1, abstract, claim1,4, [0034] & EP 2402429 A1	6,7
Y	JP 09-238647 A (株式会社ヤクルト本社) 1997.09.16, 表2 (ファミリーなし)	7
Y	JP 2001-340059 A (株式会社ヤクルト本社) 2001.12.11, [0024] (ファミリーなし)	7
A	MINAMIDA K., et al., "Production of equol from daidzein by gram-positive rod-shaped bacterium isolated from rat intestine.", Journal of bioscience and bioengineering, 2006 Sep, vol. 102, no. 3, pp. 247-450.	1-7