

明 細 書

発明の名称：

酪酸産生能を有するクロストリジウム・ブチリカムの新菌株

技術分野

[0001] 本発明は、酪酸産生能を有するクロストリジウム・ブチリカム (*Clostridium butyricum*) の新菌株及びこれを利用した整腸用組成物等に関する。

背景技術

[0002] 近年、酪酸菌の有用性が注目されている。腸内細菌である酪酸菌は、大腸で食物繊維を分解して酪酸を産生する。酪酸は大腸が正常に働くためのエネルギー源として利用されるので、酪酸菌は整腸剤の有効成分として使用されている（非特許文献1及び2）。

酪酸菌の代表例として、クロストリジウム・ブチリカムが知られている（非特許文献1～4）。クロストリジウム・ブチリカムは、酪酸に加えてギ酸を産生し、D-キシロース及びD-トレハロースを資化する（非特許文献3）。

先行技術文献

非特許文献

- [0003] 非特許文献1：内藤祐二著，「酪酸菌を増やせば健康・長寿になれる 今、話題の酪酸・酪酸菌のすべてが分かる！」，株式会社あさ出版，2022年2月11日
非特許文献2：江田証著，「すごい酪酸菌 病気になる人、ならない人の分かれ道」，株式会社幻冬舎，2022年3月25日
非特許文献3：Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition, Volume Three, The Firmicutes, p.739-742 (2009)
非特許文献4：腸内細菌学会，「用語集 クロストリジウム・ブチリカム (*Clostridium butyricum*) の項」，[online]，[令和5年8月5日検索]，インターネット<URL: <https://bifidus-fund.jp/keyword/kw002.shtml>>
非特許文献5：国際化学物質安全性カード (ICSC) データベース，「ギ酸」の

検索結果, [online], [令和5年11月1日検索], インターネット<URL: <https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.listCards3>>

非特許文献6: 国際化学物質安全性カード (ICSC) データベース, 「アセトン」の検索結果, [online], [令和5年11月1日検索], インターネット<URL: <https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.listCards3>>

非特許文献7: 腸内細菌学雑誌, 31:15-22, 2017

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] しかし、ギ酸には、経口摂取したときに腹痛、胃痙攣や下痢を引き起こす毒性があることが知られている（非特許文献5）。

また、アセトンにも、経口摂取したときに吐き気や嘔吐を引き起こす毒性があることが知られている（非特許文献6）。

そこで、本発明者は、ギ酸やアセトンの産生量が少なく、整腸剤等の有効成分としてより安全に利用可能な酪酸菌を提供することを課題として設定した。

課題を解決するための手段

[0005] この課題を鋭意検討した結果、本発明者は、有機栽培された国産大豆を発酵させて食品原材料を製造する過程で単離されたクロストリジウム・ブチリカム S I I D 2 9 2 1 5 - B 6 株（受託番号: N I T E B P - 0 3 9 1 6）が、（1）在来のクロストリジウム・ブチリカムとは異なる生理・生化学的性質（D-キシロース及びD-トレハロースを資化しない）を有する新規な菌株であること、（2）クロストリジウム・ブチリカムの基準株（N B R C 1 3 9 4 9 T 株）と比較したとき、前記新菌株よりギ酸及びアセトンの産生量が少ないことを見いだした。本発明は、これらの知見に基づいてなされたものである。

[0006] すなわち、本発明は、以下の〔1〕～〔19〕に関するものである。

〔1〕 n-酪酸を産生し、かつ、下記（1）～（3）の全ての特徴を有する、クロストリジウム・ブチリカム（*Clostridium butyricum*）。

(1) D-キシロース資化能を有しない
(2) D-トレハロース資化能を有しない
(3) クロストリジウム・ブチリカム基準株であるNBRC13949T株と比較して、37℃で72時間嫌気培養後の培養液に含まれるギ酸の産生量が少ない

〔2〕 クロストリジウム・ブチリカム (*Clostridium butyricum*) S I I D 2 9 2 1 5 - B 6 株 (受託番号: N I T E B P - 0 3 9 1 6) 又はその変異株、ここで、前記変異株は、n-酪酸を産生し、かつ、下記(1)～(3)の全ての特徴を有する。

(1) D-キシロース資化能を有しない
(2) D-トレハロース資化能を有しない
(3) クロストリジウム・ブチリカム基準株であるNBRC13949T株と比較して、37℃で72時間嫌気培養後の培養液に含まれるギ酸の産生量が少ない

〔3〕 クロストリジウム・ブチリカム (*Clostridium butyricum*) S I I D 2 9 2 1 5 - B 6 株 (受託番号: N I T E B P - 0 3 9 1 6)。

〔4〕 クロストリジウム・ブチリカム (*Clostridium butyricum*) S I I D 4 9 5 2 0 - 0 1 - B 1 株 (受託番号: N I T E B P - 0 4 1 9 0) 又はその変異株、ここで、前記変異株は、n-酪酸を産生し、かつ、下記(1)～(3)の全ての特徴を有する。

(1) D-キシロース資化能を有しない
(2) D-トレハロース資化能を有しない
(3) クロストリジウム・ブチリカム基準株であるNBRC13949T株と比較して、37℃で72時間嫌気培養後の培養液に含まれるギ酸の産生量が少ない

〔5〕 クロストリジウム・ブチリカム (*Clostridium butyricum*) S I I D 4 9 5 2 0 - 0 1 - B 1 株 (受託番号: N I T E B P - 0 4 1 9 0)。

〔6〕 クロストリジウム・ブチリカム (*Clostridium butyricum*) S I I D 5

0030-B1株（受託番号：NITE BP-04191）又はその変異株、ここで、前記変異株は、n-酪酸を産生し、かつ、下記（１）～（３）の全ての特徴を有する。

（１）D-キシロース資化能を有しない

（２）D-トレハロース資化能を有しない

（３）クロストリジウム・ブチリカム基準株であるNBRC13949T株と比較して、37℃で72時間嫌気培養後の培養液中に含まれるギ酸の産生量が少ない

〔７〕クロストリジウム・ブチリカム (*Clostridium butyricum*) S11D50030-B1株（受託番号：NITE BP-04191）。

〔８〕前記〔１）～〔７）のいずれか一項に記載のクロストリジウム・ブチリカムの菌体、芽胞又は培養液を有効成分として含む、整腸用組成物。

〔９〕前記〔１）～〔７）のいずれか一項に記載のクロストリジウム・ブチリカムの菌体、芽胞又は培養液を有効成分として含む、クロストリジオイデス・ディフィシル (*Clostridioides difficile*) の増殖抑制用組成物。

〔１０〕前記〔１）～〔７）のいずれか一項に記載のクロストリジウム・ブチリカムの菌体、芽胞又は培養液を有効成分として含む、抗炎症用組成物。

〔１１〕前記〔１）～〔７）のいずれか一項に記載のクロストリジウム・ブチリカムの菌体、芽胞又は培養液を有効成分として含む、制御性T細胞誘導用組成物。

〔１２〕医薬品の形態である、前記〔８）に記載の組成物。

〔１３〕医薬品の形態である、前記〔９）に記載の組成物。

〔１４〕医薬品の形態である、前記〔１０）に記載の組成物。

〔１５〕医薬品の形態である、前記〔１１）に記載の組成物。

〔１６〕飲食品の形態である、前記〔８）に記載の組成物。

〔１７〕飲食品の形態である、前記〔９）に記載の組成物。

〔１８〕飲食品の形態である、前記〔１０）に記載の組成物。

〔１９〕飲食品の形態である、前記〔１１）に記載の組成物。

発明の効果

[0007] 後述の実施例2～3で示されるように、本発明のクロストリジウム・ブチリカムの菌株は、在来株と比較してギ酸及びアセトンの産生量が少ない。また、後述の実施例8及び10で示されるように、本発明のクロストリジウム・ブチリカムの菌株は、在来株と比較してギ酸の産生量が少ない。したがって、本発明の菌株は、酪酸菌を利用した製品（整腸剤等）の有効成分として有用である。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]図1は、クロストリジウム・ブチリカムS I I D 2 9 2 1 5 - B 6株（受託番号：N I T E B P - 0 3 9 1 6）の16S rDNA部分塩基配列に基づく簡易分子系統樹を示す。

[図2]図2は、クロストリジウム・ブチリカムS I I D 4 9 5 2 0 - 0 1 - B 1株（受託番号：N I T E B P - 0 4 1 9 0）の16S rDNA部分塩基配列に基づく簡易分子系統樹を示す。

[図3]図3は、クロストリジウム・ブチリカムS I I D 5 0 0 3 0 - B 1株（受託番号：N I T E B P - 0 4 1 9 1）の16S rDNA部分塩基配列に基づく簡易分子系統樹を示す。

発明を実施するための形態

[0009] 本発明の菌株は、クロストリジウム・ブチリカム（*Clostridium butyricum*）である。

クロストリジウム・ブチリカムは、Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition, Volume Three, The Firmicutes, p.739-742 (2009)（非特許文献3）や、公益財団法人 腸内細菌学会のホームページ（「用語集 クロストリジウム・ブチリカム（*Clostridium butyricum*）の項」、URL: <https://bifidus-fund.jp/keyword/kw002.shtml>）（非特許文献4）に掲載されているとおり、クロストリジウム属の代表的な種（Type species）である。

[0010] 本発明の好ましい態様に該当する菌株は、ブダペスト条約の規定に基づく

国際寄託機関である独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター（〒292-0818 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室）に国際寄託されている（識別の表示：S I I D 2 9 2 1 5 - B 6。受託番号：N I T E B P - 0 3 9 1 6。寄託日（受託日）：2023年6月15日）。

本発明の別の好ましい態様に該当する菌株は、ブダペスト条約の規定に基づく国際寄託機関である独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター（〒292-0818 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室）に国際寄託されている（識別の表示：S I I D 4 9 5 2 0 - 0 1 - B 1。受託番号：N I T E B P - 0 4 1 9 0。寄託日（受託日）：2024年10月29日）。

本発明の別の好ましい態様に該当する菌株は、ブダペスト条約の規定に基づく国際寄託機関である独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター（〒292-0818 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室）に国際寄託されている（識別の表示：S I I D 5 0 0 3 0 - B 1。受託番号：N I T E B P - 0 4 1 9 1。寄託日（受託日）：2024年10月29日）。

[0011] [本発明の菌株の特徴]

以下、本発明の菌株の特徴を説明する。

(1) n-酪酸の産生

本発明の菌株は、n-酪酸を産生する。

n-酪酸の産生量は、菌株の培養濾液を、有機酸分析（例えば、高速液体クロマトグラフィー）に供することで測定できる。

[0012] (2) 糖の資化

本発明の菌株は、糖の資化能（糖を栄養源として利用する能力）に関する下記の特徴(1)～(2)のうち1つ、好ましくは2つ全てを有する。

(1) D-キシロース資化能を有しない

(2) D-トレハロース資化能を有しない

糖の資化能は、市場で入手可能な微生物同定検査キット（例えば、A P I 2 0 A (b i o M e r i e u x , F R A) ）を用いて判定できる。

[0013] Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition, Volume Three, The Firmicutes, p.739-742 (2009)（非特許文献3）には、クロストリジウム・ブチリカムは、D-キシロース及びD-トレハロースの資化能を有すると記載されている。

また、後述の実施例1（形態・生理・生化学的性状試験）で示されるとおり、クロストリジウム・ブチリカム基準株であるNBRC13949T株も、D-キシロース及びD-トレハロースの資化能を有していた。

したがって、糖の資化能において在来株と相違する本発明の菌株は、クロストリジウム・ブチリカムの新菌株である。

[0014]（3）ギ酸の産生

好ましい態様では、本発明の菌株によるギ酸の産生量は、クロストリジウム・ブチリカム基準株であるNBRC13949T株による産生量よりも少ない。

具体的には、37℃で72時間嫌気培養した後の培養液中に含まれるギ酸の産生量を基準に比較したとき、本発明の菌株による産生量は、NBRC13949T株による産生量よりも少なく、好ましくは、NBRC13949T株による産生量の12%以下である。

ギ酸の産生量は、菌株の培養濾液を、有機酸分析（例えば、高速液体クロマトグラフィー）に供することで測定できる。

[0015]（4）アセトンの産生

好ましい態様では、本発明の菌株によるアセトンの産生量は、クロストリジウム・ブチリカム基準株であるNBRC13949T株による産生量よりも少ない。

具体的には、37℃で48時間嫌気培養した後の培養液中に含まれるアセトンの産生量を基準に比較したとき、本発明の菌株による産生量は、NBRC13949T株による産生量よりも少なく、好ましくは、NBRC139

49T株による産生量の70%以下である。

アセトンの産生量は、菌株の培養上清を、GC/MS測定に供することで測定できる。

[0016] (5) 16S rDNA及びゲノムDNA

本発明の菌株は、16S rDNA (16S rRNAをコードする遺伝子) の部分塩基配列として、配列番号1、配列番号174又は配列番号175 (後述) に示される塩基配列に対して少なくとも99.6%以上、好ましくは99.8%以上、更に好ましくは99.9%以上の配列同一性を有する塩基配列を有していてもよい。

また、本発明の菌株は、ゲノム配列として、後述する配列番号2～173のいずれかに示される塩基配列に対して少なくとも99.6%以上、好ましくは99.8%以上、より好ましくは99.9%以上の配列同一性を有する塩基配列を有していてもよい。

(6) 芽胞形成性

好ましい態様では、本発明の菌株は芽胞形成性を有する。この態様では、本発明の菌株の芽胞を、酪酸菌を利用した製品 (整腸剤等) の有効成分として使用できる。

[0017] (7) その他の特徴

前記(1)～(6)の特徴の他、本発明の菌株は、後述の実施例に示されているクロストリジウム・ブチリカムS11D29215-B6株 (受託番号: NITE BP-03916) が持つ特徴 (例えば、耐熱性、クロストリジオイデス・ディフィシルの増殖抑制性等) の一つ以上を有していてもよい。

また、本発明の菌株は、後述の実施例に示されている、クロストリジウム・ブチリカムS11D49520-01-B1株 (受託番号: NITE BP-04190) 又はクロストリジウム・ブチリカムS11D50030-B1株 (受託番号: NITE BP-04191) が持つ特徴の一つ以上を有していてもよい。

[0018] 好ましい態様では、本発明の菌株は、クロストリジウム・ブチリカム S I I D 2 9 2 1 5 - B 6 株（受託番号：N I T E B P - 0 3 9 1 6）又はその変異株である。この変異株は、n-酪酸を産生し、かつ、下記（１）～（３）の全ての特徴を有する。

（１）D-キシロース資化能を有しない

（２）D-トレハロース資化能を有しない

（３）クロストリジウム・ブチリカム基準株である N B R C 1 3 9 4 9 T 株と比較して、37℃で72時間嫌気培養後の培養液中に含まれるギ酸の産生量が少ない

[0019] 好ましい態様では、本発明の菌株は、クロストリジウム・ブチリカム S I I D 4 9 5 2 0 - 0 1 - B 1 株（受託番号：N I T E B P - 0 4 1 9 0）の変異株である。この変異株は、n-酪酸を産生し、かつ、下記（１）～（３）の全ての特徴を有する。

（１）D-キシロース資化能を有しない

（２）D-トレハロース資化能を有しない

（３）クロストリジウム・ブチリカム基準株である N B R C 1 3 9 4 9 T 株と比較して、37℃で72時間嫌気培養後の培養液中に含まれるギ酸の産生量が少ない

[0020] 別の好ましい態様では、本発明の菌株は、クロストリジウム・ブチリカム S I I D 5 0 0 3 0 - B 1 株（受託番号：N I T E B P - 0 4 1 9 1）の変異株である。この変異株は、n-酪酸を産生し、かつ、下記（１）～（３）の全ての特徴を有する。

（１）D-キシロース資化能を有しない

（２）D-トレハロース資化能を有しない

（３）クロストリジウム・ブチリカム基準株である N B R C 1 3 9 4 9 T 株と比較して、37℃で72時間嫌気培養後の培養液中に含まれるギ酸の産生量が少ない

[0021] 前述した寄託菌株の変異株は、該寄託菌株に対して、薬剤処理及び／又は

紫外線照射等の突然変異を誘発したうえでスクリーニングする手法、自然突然変異（例えば、継代培養を重ねる過程で発生する自然突然変異）、形態変異や、トランスフェクション等の遺伝子工学的手法により、その物理的特性や化学的特性が改変されたものであり、*n*-酪酸を産生し、かつ、下記（１）～（３）の全ての特徴を有するものである。

（１）*D*-キシロース資化能を有しない

（２）*D*-トレハロース資化能を有しない

（３）クロストリジウム・ブチリカム基準株であるNBRC13949T株と比較して、37℃で72時間嫌気培養後の培養液中に含まれるギ酸の産生量が少ない

[0022] また、寄託菌株の変異株は、寄託株の16S rDNAの部分塩基配列として、配列番号1、配列番号174又は配列番号175（後述）に示される塩基配列に対して少なくとも99.6%以上、好ましくは99.8%以上、更に好ましくは99.9%以上の配列同一性を有する塩基配列を有していてもよい。

[0023] なお、クロストリジウム・ブチリカムSID29215-B6株（受託番号：NITE BP-03916）は「酪酸菌ユニラク株」と称することができる。

[0024] [本発明の菌株の培養条件]

本発明の菌株の培養にあたり特別な条件は不要であり、クロストリジウム・ブチリカムで一般的に用いられている条件で培養することができる。

培地は、嫌気性菌用培地であることが好ましい。培地は、天然培地及び合成培地のいずれでもよい。本発明の菌株を食品用途で用いる場合には、食品素材及び食品添加物のみで構成した培地を使用してもよい。

培養は、例えば30～45℃（好ましくは36～38℃）の温度下、嫌気条件下で実施できる。嫌気条件とは、クロストリジウム・ブチリカムが増殖可能な程度の低酸素環境をいう。嫌気条件は、脱酸素剤を入れた密閉容器若しくは袋等を用いて設定できる。

培養形式としては、静置培養、攪拌培養や、タンク培養等が挙げられる。

培養時間は、24～72時間（48時間を含む）が好ましい。

なお、芽胞の形成に特別な条件は不要であり、前述の条件で本発明の菌株を培養することで、芽胞が形成されるが、好ましくは55～60℃で30分加熱することで芽胞が形成される。

[0025] [本発明の菌株の入手方法]

前述のとおり、本発明の菌株として、3つの菌株が国際寄託されており、いずれも国際寄託機関から入手できる。

更に本発明の菌株は、国際寄託された3株と同様、大豆から単離することもできる。

本発明の菌株が属するクロストリジウム属細菌は土壌菌であるが、本発明の菌株の入手源としては、多種の土壌菌が生息している土壌よりも大豆が好ましい。本発明は特定の理論により制限されるものではないが、入手源として大豆が好ましい理由は以下のとおりである。

大豆は収穫時期になると、「さや」が割れて中の実が露出する。露出した実には、風等により土壌から巻き上げられたクロストリジウム属細菌（又はその芽胞）が付着する。大豆の実の薄皮は主に食物繊維から構成されている。また、実の中には、タンパク質が豊富に含まれている。食物繊維及びタンパク質は、いずれもクロストリジウム属細菌の増殖にとって好ましい物質である。したがって、収穫後の大豆の実（特に、農薬を使用せず有機栽培された大豆の実）にはクロストリジウム属細菌（又はその芽胞）が付着している可能性が高い。

大豆からは、例えば下記の手順に従い、クロストリジウム属細菌を取得できる。

大豆を、水、蜂蜜及び難消化性デキストリンと共に、好気性環境下、37℃で72時間発酵させる。発酵終了後、得られた発酵液と大豆をペースト状にする。この発酵大豆ペーストを、前掲[本発明の菌株の培養条件]欄に記載の嫌気条件に供する。

取得したクロストリジウム属細菌のなかから、クロストリジウム・ブチリカムの基準株（NBRC 13949T株）の配列情報（例えば、公知の16S rDNA部分の塩基配列）を使用して、クロストリジウム・ブチリカムを同定する。同定されたクロストリジウム・ブチリカムを、本発明の菌株が有する特徴（D-キシロース及びD-トレハロースの資化能や、ギ酸産生能等）を指標に更にスクリーニングすることで、本発明の菌株を取得することができる。

[0026] 〔本発明の菌株の用途〕

本発明の菌株は、公知の酪酸菌（特に、クロストリジウム・ブチリカム）と同様の用途、例えば、整腸剤、抗炎症剤や制御性T細胞誘導剤の有効成分として使用できる。

[0027] 〔整腸用組成物〕

酪酸菌は、酪酸産生を介して正常な腸内フローラを維持することができるので（非特許文献1及び2）、整腸剤の有効成分として使用されている。本発明の菌株は、酪酸産生能を有する（後述の実施例2、8及び10）。したがって、本発明の一態様は、本発明の菌株の菌体、芽胞又は培養液（以下、「本発明の菌体等」ともいう）を有効成分として含む整腸用組成物である。

有効成分は、菌体又は芽胞のいずれかであってもよく、菌体と芽胞との組合せであってもよい。培養液は、菌体又は芽胞のいずれかを含むものであってもよく、菌体と芽胞の双方を含むものであってもよい。

「有効成分として含有する」とは、組成物が、所望の整腸効果（腸内環境を整える効果）を発揮するのに十分な量（有効量）で、本発明の菌体等を含有することをいう。

本発明の菌体の含量は、組成物の形態（飲食品又は医薬品等）等を考慮して適宜設定できる。例えば、ヒト用の食品の場合、有効成分としての「菌体」の含量（菌数）は、一般的な整腸剤に含まれる酪酸菌数と同様に設定できる。例えば、1日あたりの菌体の摂取量が、好ましくは3億～25億個、更に好ましくは10億～20億個となるように、ヒト用食品中の菌体の含量を

設定できる。

整腸用組成物は、有効成分の作用を損なわない範囲で、一種以上の任意成分を含んでいてもよい。任意成分は、組成物の形態等に応じて適宜選択できる。

任意成分は飲食品用又は医薬用の添加物であってもよい。任意成分は公知物質であり、市場で容易に入手可能であるか、又は調製可能である。任意成分は単一種類を使用してもよく、複数種類を併用してもよい。任意成分の含量は、その配合目的等に応じて適宜設定できる。

整腸用組成物は、広範な動物種へ特に制限なく適用できる。適用対象は、好ましくは哺乳動物（ヒト及び非ヒト哺乳動物（例えばイヌやネコ））であり、より好ましくはヒトである。また、適用対象の性別や年齢は問わない。

整腸用組成物の摂取量は、適用対象の年齢及び体重、摂取回数や投与経路等に応じて適宜設定できる。

摂取間隔は、摂取量等に応じて適宜設定でき、1日に1回でもよく、数回に分けて摂取してもよい。

整腸用組成物は、有効成分（本発明の菌体等）と任意成分（例えば、飲食品用又は医薬用の添加物）とを混合することで調製できる。

[0028] [クロストリジオイデス・ディフィシルの増殖抑制用組成物]

抗菌薬の服用により腸内環境のバランスが崩れて特定の細菌が異常増殖すると、抗菌薬関連下痢症（下痢や軟便等）が起こることが知られている。クロストリジオイデス・ディフィシル (*Clostridioides difficile*) は、抗菌薬関連下痢症の代表的な原因菌である。

本発明の菌株は、クロストリジオイデス・ディフィシルの増殖を抑制できる（後述の実施例6）。したがって、本発明の一態様は、本発明の菌体等を有効成分として含む、クロストリジオイデス・ディフィシルの増殖抑制用組成物である。

有効成分は、菌体又は芽胞のいずれかであってもよく、菌体と芽胞との組合せであってもよい。培養液は、菌体又は芽胞のいずれかを含むものであ

てもよく、菌体と芽胞の双方を含むものであってもよい。

「有効成分として含有する」とは、組成物が、所望の増殖抑制効果を発揮するのに十分な量（有効量）で、本発明の菌体等を含有することをいう。

本発明の菌体の含量は、組成物の形態（飲食品又は医薬品等）等を考慮して適宜設定できる。例えば、ヒト用の食品の場合、有効成分としての「菌体」の含量（菌数）は、一般的な整腸剤に含まれる酪酸菌数と同様に設定できる。例えば、1日あたりの菌体の摂取量が、好ましくは3億～25億個、更に好ましくは10億～20億個となるように、ヒト用食品中の菌体の含量を設定できる。

増殖抑制用組成物は、有効成分の作用を損なわない範囲で、一種以上の任意成分を含んでいてもよい。任意成分は、組成物の形態等に応じて適宜選択できる。任意成分は飲食品用又は医薬用の添加物であってもよい。任意成分は公知物質であり、市場で容易に入手可能であるか、又は調製可能である。任意成分は単一種類を使用してもよく、複数種類を併用してもよい。任意成分の含量は、その配合目的等に応じて適宜設定できる。

増殖抑制用組成物は、広範な動物種へ特に制限なく適用できる。適用対象は、好ましくは哺乳動物（ヒト及び非ヒト哺乳動物（例えばイヌやネコ））であり、より好ましくはヒトである。また、適用対象の性別や年齢は問わない。

増殖抑制用組成物の摂取量は、適用対象の年齢及び体重、摂取回数や投与経路等に応じて適宜設定できる。

摂取間隔は、摂取量等に応じて適宜設定でき、1日に1回でもよく、数回に分けて摂取してもよい。

増殖抑制用組成物は、有効成分（本発明の菌体等）と任意成分（例えば、飲食品用又は医薬用の添加物）とを混合することで調製できる。

[0029] 〔抗炎症用組成物〕

酪酸菌は、酪酸産生を介して抗炎症作用（例えば、腸炎、潰瘍性大腸炎やクローン病の抑制作用）を有することが知られている（非特許文献1）。本

発明の菌株は、酪酸産生能を有する（後述の実施例2）。したがって、本発明の一態様は、本発明の菌体等を有効成分として含む抗炎症用組成物である。

有効成分は、菌体又は芽胞のいずれかであってもよく、菌体と芽胞との組合せであってもよい。培養液は、菌体又は芽胞のいずれかを含むものであってもよく、菌体と芽胞の双方を含むものであってもよい。

「有効成分として含有する」とは、組成物が、所望の抗炎症効果を発揮するのに十分な量（有効量）で、本発明の菌体等を含有することをいう。

本発明の菌体の含量は、組成物の形態（飲食品又は医薬品等）等を考慮して適宜設定できる。例えば、ヒト用の食品の場合、有効成分としての「菌体」の含量（菌数）は、一般的な整腸剤に含まれる酪酸菌数と同様に設定できる。例えば、1日あたりの菌体の摂取量が、好ましくは3億～25億個、更に好ましくは10億～20億個となるように、ヒト用食品中の菌体の含量を設定できる。

抗炎症用組成物は、有効成分の作用を損なわない範囲で、一種以上の任意成分を含んでいてもよい。任意成分は、組成物の形態等に応じて適宜選択できる。

任意成分は飲食品用又は医薬用の添加物であってもよい。任意成分は公知物質であり、市場で容易に入手可能であるか、又は調製可能である。任意成分は単一種類を使用してもよく、複数種類を併用してもよい。任意成分の含量は、その配合目的等に応じて適宜設定できる。

抗炎症用組成物は、広範な動物種へ特に制限なく適用できる。適用対象は、好ましくは哺乳動物（ヒト及び非ヒト哺乳動物（例えばイヌやネコ））であり、より好ましくはヒトである。また、適用対象の性別や年齢は問わない。

抗炎症用組成物の摂取量は、適用対象の年齢及び体重、摂取回数や投与経路等に応じて適宜設定できる。

摂取間隔は、摂取量等に応じて適宜設定でき、1日に1回でもよく、数回

に分けて摂取してもよい。

抗炎症用組成物は、有効成分（本発明の菌体等）と任意成分（例えば、飲食品用又は医薬用の添加物）とを混合することで調製できる。

[0030] 〔制御性T細胞誘導用組成物〕

酪酸菌は、酪酸産生を介して制御性T細胞を誘導することが知られている（非特許文献1及び7）。誘導には、制御性T細胞への分化の誘導と、制御性T細胞の増殖の誘導とが含まれる（非特許文献1及び7）。

制御性T細胞（Treg）は、自己に対する免疫応答を抑制（免疫寛容）する役割を有する。本発明の菌株は、酪酸産生能を有する（後述の実施例2）。したがって、本発明の一態様は、本発明の菌体等を有効成分として含む制御性T細胞誘導用組成物である。

有効成分は、菌体又は芽胞のいずれかであってもよく、菌体と芽胞との組合せであってもよい。培養液は、菌体又は芽胞のいずれかを含むものであってもよく、菌体と芽胞の双方を含むものであってもよい。

「有効成分として含有する」とは、組成物が、所望の制御性T細胞誘導効果を発揮するのに十分な量（有効量）で、本発明の菌体等を含有することをいう。

本発明の菌体の含量は、組成物の形態（飲食品又は医薬品等）等を考慮して適宜設定できる。例えば、ヒト用の食品の場合、有効成分としての「菌体」の含量（菌数）は、一般的な整腸剤に含まれる酪酸菌数と同様に設定できる。例えば、1日あたりの菌体の摂取量が、好ましくは3億～25億個、更に好ましくは10億～20億個となるように、ヒト用食品中の菌体の含量を設定できる。

制御性T細胞誘導用組成物は、有効成分の作用を損なわない範囲で、一種以上の任意成分を含んでいてもよい。任意成分は、組成物の形態等に応じて適宜選択できる。

任意成分は飲食品用又は医薬用の添加物であってもよい。任意成分は公知物質であり、市場で容易に入手可能であるか、又は調製可能である。任意成

分は単一種類を使用してもよく、複数種類を併用してもよい。任意成分の含量は、その配合目的等に応じて適宜設定できる。

制御性T細胞誘導用組成物は、広範な動物種へ特に制限なく適用できる。適用対象は、好ましくは哺乳動物（ヒト及び非ヒト哺乳動物（例えばイヌやネコ））であり、より好ましくはヒトである。また、適用対象の性別や年齢は問わない。

制御性T細胞誘導用組成物の摂取量は、適用対象の年齢及び体重、摂取回数や投与経路等に応じて適宜設定できる。

摂取間隔は、摂取量等に応じて適宜設定でき、1日に1回でもよく、数回に分けて摂取してもよい。

制御性T細胞誘導用組成物は、有効成分（本発明の菌体等）と任意成分（例えば、飲食品用又は医薬用の添加物）とを混合することで調製できる。

[0031] 〔本発明の菌体等を含む組成物の使用態様〕

前述した整腸用組成物、クロストリジオイデス・ディフィシルの増殖抑制用組成物、抗炎症用組成物及び制御性T細胞誘導用組成物は、飲食品又は医薬品として使用できる。

[0032] 〔飲食品〕

飲食品の形態は、経口摂取できる限り特に制限されない。具体例としては、液体飲料や、ゼリー飲料等が挙げられる。

飲食品には、健康食品、機能性食品、栄養補助食品、特定保健用食品、病者用食品や、疾病リスク低減表示を付した飲食品等が含まれる。

飲食品は、スポーツサプリメント製品（インフォームドスポーツ認証を受けた製品を含む）やシリアル製品であってもよい。

飲食品は、食品添加物を任意成分として含んでもよい。

液体飲料の添加物としては、pH調整剤、乳化剤、安定剤、香料や、甘味料等が挙げられる。ゼリー飲料の添加物としては、ゼラチン、食用色素や、増粘多糖類等が挙げられる。

[0033] 〔医薬品〕

医薬品の剤型は、経口投与又は直腸内投与（例えば浣腸等）できるものが好ましい。具体例としては、液剤、カプセル剤や、粉末剤等が挙げられる。

医薬品は、医薬品添加物を任意成分として含んでいてもよい。医薬品添加物としては、賦形剤、安定剤、防腐剤、湿潤剤、乳化剤、滑沢剤、甘味料、着色料、香料、緩衝剤、酸化防止剤や、pH調整剤等が挙げられる。

実施例

[0034] 以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

[0035] 〔供試菌株1〕

クロストリジウム・ブチリカム (*Clostridium butyricum*) S I I D 2 9 2 1 5 - B 6 株（以下、「B 6 株」ともいう）を使用した。

B 6 株は、ブダペスト条約の規定に基づく国際寄託機関である独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター（〒2 9 2 - 0 8 1 8 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2 - 5 - 8 1 2 2 号室）に国際寄託されている（識別の表示：S I I D 2 9 2 1 5 - B 6。受託番号：N I T E B P - 0 3 9 1 6。寄託日（受託日）：2 0 2 3 年6月1 5 日）。

[0036] クロストリジウム・ブチリカムの基準株として、クロストリジウム・ブチリカムNBRC13949T株（以下、「基準株」ともいう）を使用した。

[0037] 〔実施例1：形態・生理・生化学的性状試験〕

寒天培地（GAM Broth “Nissui”（Nissui Pharmaceutical, Japan）+寒天）を用い、嫌気培養キットとしてアネロパウチ・ケンキシシステム（Mitsubishi Gas Chemical, Japan）を用い、B 6 株及び基準株を3 7 °Cで7 2 時間嫌気培養した。

培養したB 6 株及び基準株の形態を、光学顕微鏡を用いて観察した。

更にB 6 株及び基準株の生理学的性状（カタラーゼ反応、オキシダーゼ反応、ブドウ糖からの酸/ガス産生、ブドウ糖の酸化/発酵(O/F)) を、Barrow & Felthamらの方法（Cowan and Steel’ s Manual for the Identification of

Medical Bacteria, 3rd edition, Cambridge: University Press; 1993) に基づいて試験した。結果を表 1－1 に示す。

[表1-1]

表 1－1. 形態観察及び生理学的性状試験 (その 1)

試験項目		B 6 株	基準株
培養温度		37°C	37°C
細胞形態		桿菌 (0.8～0.9×2.5～10.0 μm)	桿菌 (0.7～0.9×2.0～8.0 μm)
グラム染色性		+	+
芽胞の有無		+(準端立)	+(中央/準端立)
運動性		±	+
コロニー形態	培地	GAM寒天培地	GAM寒天培地
	培養時間	24時間	24時間
	直径	4～5mm	N/R
	色調	淡黄色	淡黄色
	形	不規則形	N/R
	隆起状態	レンズ状	N/R
	周縁	波状	波状
	表面の形状など	平滑	N/R
	透明度	不透明	N/R
	粘稠度	バター様	N/R
生育温度試験	30°C	+	+
	45°C	+	-
カタラーゼ反応		-	-
オキシダーゼ反応		-	-
グルコースからの酸/ガス産生 (酸産生/ガス発生)		-/-	-/N/R
O/Fテスト (酸化/発酵)		-/-	N/R

+ : 陽性、- : 陰性、+w : 反応弱い、N/R : 測定せず

[0038] 寒天培地 (GAM ブイヨン「ニッスイ」 (Nissui Pharmaceutical, Japan) +寒天) を用い、嫌気培養キットとしてアネロパウチ・ケンキシシステム (Mitsubishi Gas Chemical, Japan) を用い、B 6 株及び基準株を 37°C で 24 時間嫌気培養した。

培養した B 6 株及び基準株の生理・生化学的性状を、嫌気性菌生化学同定キット (API 20A (bioMérieux, FRA)) を用いて同定した。結果を表 1－2 に示す。

[表1-2]

表1-2. 生理・生化学的性状試験（その2）

試験項目	反応／酵素	B 6 株	基準株	試験項目	反応／酵素	B 6 株	基準株
IND	インドール産生*	—	—	GLY	グリセリン**	—	—
URE	ウレアーゼ*	—	—	CEL	D-セロビオース**	+	+
GLU	ブドウ糖**	+	+	MNE	D-マンノース**	+	+
MAN	D-マンニトール**	—	—	MLZ	D-メレチトース**	—	+
LAC	乳糖**	+	+	RAF	D-ラフィノース**	+	+
SAC	白糖**	+	+	SOR	D-ソルビトール**	—	—
MAL	マルトース**	+	+	RHA	L-ラムノース**	—	—
SAL	サリシン**	+	+	TRE	D-トレハロース**	—	+
XYL	D-キシロース**	—	+	CAT			
ARA	L-アラビノース**	+	+	SPOR			
GEL	ゼラチン加水分解*	—	—	GRAM			
ESC	エスクリン加水分解*	+	+	COC			

*生化学試験、**酸化試験

+：陽性、—：陰性

[0039] 更に、B 6 株の追加の生理・生化学的性状を、API ZYMキット（bioMérieux, FRA）を用いて試験した。結果を表1-3に示す。

[表1-3]

表 1 - 3. 生理・生化学的性状試験（その 3）

試験項目	B 6 株
アルカリホスファターゼ	－
エステラーゼ (C4)	＋
エステラーゼ リパーゼ (C8)	－
リパーゼ (C14)	－
ロイシン アリルアミダーゼ	－
バリン アリルアミダーゼ	－
シスチン アリルアミダーゼ	－
トリプシン	－
キモトリプシン	－
酸性ホスファターゼ	＋ w
ナフトール-AS-BI-ホスホハイドロラーゼ	＋ w
α -ガラクトシダーゼ	＋ w
β -ガラクトシダーゼ	－
β -グルクロニダーゼ	－
α -グルコシダーゼ	＋
β -グルコシダーゼ	－
N-アセチル- β -グルコサミニダーゼ	－
α -マンノシダーゼ	－
α -フコシダーゼ	－

＋：陽性、－：陰性、＋ w：反応弱い

[0040] B 6 株は、D-キシロース及びD-トレハロースの資化能を有していなかった（表 1 - 2）。

一方、基準株は、D-キシロース及びD-トレハロースの資化能を有していた。

したがって、B 6 株は、基準株とは異なる菌株であると判定した。

[0041] [実施例 2：有機酸産生能力試験]

液体培地（GAM Broth “Nissui”（Nissui Pharmaceutical, Japan））を用い、嫌気培養キットとしてア

ネロパウチ・ケンキシシステム (Mitsubishi Gas Chemical, Japan) を用い、B6株及び基準株を37℃で72時間嫌気培養した (培養液量: 5 mL)。

培養液を孔径0.20 μmのメンブレンフィルターでろ過し、試料溶液とした。

試料溶液に含まれる有機酸の濃度を、高速液体クロマトグラフィーで測定した。

測定条件は下記の通りである。

- ・システム: 島津有機酸分析システム (Shimadzu, Japan)
- ・カラム: Shim-pack Fast-OA、100mm×7.8mm ID、3本直列で使用
- ・ガードカラム: Shim-pack Fast-OA、10mm×4.0mm ID
- ・溶離液: 5 mmol/L p-トルエンスルホン酸
- ・反応液: 5 mmol/L p-トルエンスルホン酸、100 μmol/L EDTA、20 mmol/L Bis-Tris
- ・流速: 0.8 mL/min
- ・オープン温度: 50℃
- ・検出器: 電気伝導度検出器 CDD-10Avp

測定対象の有機酸は、コハク酸、乳酸、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、iso-酪酸、n-酪酸、iso-吉草酸及びn-吉草酸の9種類であった。結果を表2に示す。

[0042] [表2]

表2. 有機酸産生能力試験 (産生量の単位: μg/mL)

検体名	コハク酸	乳酸	ギ酸	酢酸	プロピオン酸	iso-酪酸	n-酪酸	iso-吉草酸	n-吉草酸
Control (培地のみ)	173	131	36	181			4		
基準株(NBRC13949T)	140	475	673	1091			1705		
B6株	144	1610	75	678			1642		

表中、空欄は定量下限未満を示す。定量下限は、コハク酸、乳酸、酢酸及びプロピオン酸は5 μg/mLであり、ギ酸、iso-酪酸、n-酪酸、iso-

o-吉草酸及びn-吉草酸は $10\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。各有機酸の値は、3つのサンプルの平均値である。

[0043] B6株はn-酪酸を産生した。また、B6株を 37°C で72時間嫌気培養した後の培養液中に含まれるギ酸の産生量は、基準株(NBRC13949T)よりも少なかった。

[0044] [実施例3：アセトン及びアルコール産生能力試験]

液体培地(GAM ブイヨン「ニッスイ」(Nissui Pharmaceutical, Japan))を用い、嫌気培養キットとしてアネロパウチ・ケンキシステム(Mitsubishi Gas Chemical, Japan)を用い、B6株及び基準株を 37°C で48時間嫌気培養した。

培養24時間後及び48時間後の培養液を滅菌チューブに分取した。培養液を遠心分離して得た上清(10mL 以上)を、 $0.2\mu\text{m}$ のセルロースアセテートフィルター(滅菌済)で濾過した。この濾過液を 4°C で冷蔵保管したものを試料とした。

試料約 1g をメスフラスコに入れ、メタノールにて 10mL に定容し、振とう機で1時間攪拌した後、3時間静置した。その後、上澄み液 $1\mu\text{L}$ をGC/MS測定に供した。

測定条件は下記の通りである。

- ・GC/MS: Agilent Technologies、6890N/5973inert
- ・カラム: HP-1 ($0.25\text{mm}\phi\times 30\text{m}$, $df=1.00\mu\text{m}$)
- ・カラム温度: 40°C (3min) $\rightarrow 10^{\circ}\text{C}/\text{min} \rightarrow 100^{\circ}\text{C} \rightarrow 20^{\circ}\text{C}/\text{min} \rightarrow 300^{\circ}\text{C}$ (10min)
- ・カラム圧力: 定流量モード (51kPa , Vac)
- ・カラム流量: $1\text{mL}/\text{min}$ (He)
- ・注入口温度: 250°C
- ・注入量: $1\mu\text{L}$

- ・ 注入方式：スプリット（１０：１）
- ・ 検出器：MS
- ・ イオン源温度：２３０℃
- ・ イオン化方法：EI（７０eV）
- ・ スキャン範囲：SIM（m/z：３１，４１，４３，４５，５８，５９，
２．０～３．５min）
：SIM（m/z：４１，４３，４５，５６，５９，７４、
３．５～２９．０min）
- ・ ゲイン：９７６V

[0045] 表３に示す各成分の純薬をメタノールで希釈して一定濃度の標品を調製した。標品１μLを前述の試料と同様に測定し、各定量成分のベースイオン又は分子イオンのマスクロマトグラフにおけるピーク面積と調製濃度から検量線を作成して、試料１gあたりの各成分の含有量を求めた。結果を表３に示す。

[0046] [表3]

表３．アセトン及びアルコール産生能力試験

成分名	含有量（μg/g）			
	基準株 培養24時間後	基準株 培養48時間後	B 6株 培養24時間後	B 6株 培養48時間後
エタノール	270	280	190	180
アセトン	1.7	4.0	2.8	2.7
イソプロパノール	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
tert-ブタノール	0.43	0.25	0.23	0.22
sec-ブタノール	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3
イソブタノール	0.75	0.81	0.62	0.58
n-ブタノール	4.9	5.1	5.0	4.8

<：定量下限値未満

[0047] B 6株を３７℃で４８時間嫌気培養した後の培養液中に含まれるアセトンの産生量は、基準株（NBRC 13949T）よりも少なかった。

[0048] [実施例４：芽胞形成確認試験]

液体培地（GAM ブイヨン「ニッスイ」（Nissui Pharmaceutical, Japan）又は寒天培地（GAM ブイヨン「ニッスイ」（Nissui Pharmaceutical, Japan）＋寒天）を用い、嫌気培養キットとしてアネロパウチ・ケンキシシステム（Mitsubishi Gas Chemical, Japan）を用い、B 6 株を 37℃で 24 時間、72 時間、7 日間及び 14 日間嫌気培養した。

培養後、菌体をグラム染色（フェイバーG「ニッスイ」（Nissui Pharmaceutical, Japan））し、顕微鏡観察（光学顕微鏡：BX50F4（Olympus, Japan））により芽胞形成能を確認した。結果を表 4 に示す。

[0049] [表4]

表 4． B 6 株の細胞形態観察

培地	培養時間	芽胞形成	グラム染色性
液体培地	24時間	－	陽性
	72時間	－	
	7日間	＋	
	14日間	＋	
寒天培地	24時間	＋	陽性
	72時間	＋	
	7日間	＋	
	14日間	＋	

＋：陽性、－：陰性

[0050] B 6 株は、芽胞形成性のグラム陽性細菌であった。

[0051] [実施例 5：耐熱性試験]

寒天培地（GAM ブイヨン「ニッスイ」（Nissui Pharmaceutical, Japan）＋寒天）を用い、嫌気培養キットとしてアネロパウチ・ケンキシシステム（Mitsubishi Gas Chemical, Japan）を用い、B 6 株を 37℃で 24 時間又は 72 時間、嫌気条件下で前培養した。

培養物を生理食塩水 10 mL に懸濁したものを菌液とした。滅菌中型試験

管（18×170mm）に菌液を5mL分注し、水浴槽中、60℃で30分間の加熱処理に供した。

加熱処理前の菌液5mLをコントロールとした。

加熱処理前後の生菌数を下記の条件に従い測定した。結果を表5に示す。

- ・培地：GAM　ブイヨン「ニッスイ」（Nissui Pharmaceutical, Japan）及び寒天
- ・培養温度：37℃
- ・培養時間：24時間～48時間
- ・希釈液：生理食塩水
- ・希釈倍率：原液～10⁵倍希釈
- ・測定方法：希釈平板法（0.1mL表面塗抹　CFU法）
- ・自動希釈・塗抹装置：easySpiralDilute（登録商標）（Interscience, France）
- ・塗抹枚数：同一希釈を各3枚
- ・その他：嫌気培養（アネロパウチ・ケンキシステム（Mitsubishi Gas Chemical, Japan））
- ・コロニー観察：実体顕微鏡（SMZ800N（Nikon, Japan））

[0052] [表5]

表5. 耐熱性試験（定量）

前培養時間	加熱処理	希釈倍率	コロニー数（CFU）			菌数（CFU/mL）
			平板1	平板2	平板3	
24時間	なし	10 ²	142	161	170	1.6×10 ⁵
	あり	10 ²	85	91	105	9.4×10 ⁴
72時間	なし	原液	23	27	28	2.6×10 ²
	あり	原液	5	13	17	1.2×10 ²

CFU：コロニー形成単位

[0053] 加熱処理後の菌液から生菌が増殖したので、B6株は耐熱性であると判定した。

[0054] [実施例6：クロストリジオイデス・ディフィシルの増殖抑制試験]

抗菌薬関連下痢症（抗菌薬の副作用として起こる下痢や軟便）の代表的原因菌であるクロストリジオイデス・ディフィシル（Clostridioides difficile）の増殖に対するB6株の影響を評価した。

（1）クロストリジウム・ブチリカムB6株の無菌濾過液の調製

液体培地（GAM ブイヨン「ニッスイ」（Nissui Pharmaceutical, Japan））を用い、嫌気培養キットとしてアネロパウチ・ケンキシステム（Mitsubishi Gas Chemical, Japan）を用い、B6株を37℃で72時間、嫌気条件下で培養した。培養液中の全菌数を、下記の条件に従い計数した。結果を表6-1に示す。

- ・希釈液：生理食塩水
- ・希釈倍率：原液～10⁴倍希釈
- ・血球計算盤：ディスポーザブル血球計算盤。C-Chip（DHC-N01：ノイバウエル改良型）（NanoEntek, Korea）。大区画の細胞数が100個以上、1000個以下の希釈倍率をカウントした。
- ・顕微鏡：光学顕微鏡（BX50（Olympus, Japan））

[0055] [表6-1]

希釈倍率	細菌数					全細菌数 (cells/mL)
	区画1	区画2	区画3	区画4	平均	
10 ³	104	124	114	139	120.25	1.2 × 10 ⁹

[0056] この培養液を0.2 μmのセルロースアセテートフィルターで濾過滅菌したものを、無菌濾過液とした。

[0057] （2）試験培地の調製

（1）で調製した無菌濾過液と、2倍濃度のGAM Broth「Nissui」（Nissui Pharmaceutical, Japan）とを等量混合したものを試験培地とした。

GAM Broth「Nissui」（Nissui Pharmace

utical, Japan) をコントロールとした。

[0058] (3) クロストリジオイデス・ディフィシルの菌液調製

寒天培地 (GAM ブイヨン「ニッスイ」 (Nissui Pharmaceutical, Japan) + 寒天) を用い、嫌気培養キットとしてアネロパウチ・ケンキシシステム (Mitsubishi Gas Chemical, Japan) を用い、クロストリジオイデス・ディフィシルの基準株 JCM1296T を、37℃で24時間、嫌気条件下で培養した。

培養液を滅菌生理食塩水に懸濁して、マクファーランド濁度標準液番号 0.5 (McFarland No. 0.5) 相当の濃度に調製した。この懸濁液を、血球計算盤を用いて計数し、菌液量が約 $1 \times 10^8 \text{ Cells/mL}$ になるように調製した。

[0059] (4) クロストリジオイデス・ディフィシルの培養

20 mL の試験培地を分注したメディウム瓶に、(3) で調製したクロストリジオイデス・ディフィシル菌液を 20 μL 接種し、嫌気培養キットとしてアネロパウチ・ケンキシシステム (Mitsubishi Gas Chemical, Japan) を用い、37℃、嫌気条件下で静置培養した。

培養24時間後及び48時間後に、培養液を2 mL 採取し、クロストリジオイデス・ディフィシルの菌数を下記の条件に従い測定した。結果を表6-2に示す。

・培地: GAM Broth「Nissui」 (Nissui Pharmaceutical, Japan) + 寒天

・培養温度: 37℃

・培養時間: 24時間～48時間

・希釈液: 生理食塩水

・希釈倍率: 原液～ 10^7 倍希釈

・測定方法: 希釈平板法 (0.1 mL 表面塗抹 コロニー形成単位 (CFU) 計数)

・自動希釈・塗抹装置: easySpiralDilute (登録商標) (

I n t e r s c i e n c e , F r a n c e)

- ・塗抹枚数：同一希釈を各3枚
- ・その他：嫌気培養（アネロパウチ・ケンキシシステム（Mitsubishi Gas Chemical, Japan））
- ・コロニー観察：実体顕微鏡（SMZ800N（Nikon, Japan））
- ・判定：適当な希釈段階の平板上に生育したコロニーを計数

[0060] [表6-2]

表6-2、クロストリジオイデス・ディフィシルの菌数

培養時間	試験培地	希釈倍率	コロニー数 (CFU)			菌数 (CFU/mL)
			平板1	平板2	平板3	
24時間	B6株の無菌濾過液添加	10 ⁻³	145	152	170	1.6 × 10 ⁶
	コントロール	10 ⁻⁵	132	156	162	1.5 × 10 ⁸
48時間	B6株の無菌濾過液添加	原液	0	0	0	未検出
	コントロール	10 ⁻⁵	47	57	66	5.7 × 10 ⁸

CFU：コロニー形成単位

[0061] B6株の無菌濾過液の添加により、クロストリジオイデス・ディフィシルの増殖が抑制された。これは、クロストリジオイデス・ディフィシルの増殖を抑制する物質をB6株が産生したことを示唆している。

[0062] [参考例1：16S rDNA部分塩基配列解析]

B6株の16S rDNA（16S rRNA遺伝子）の部分塩基配列（配列番号1）を解析して、その帰属を推定した。

[0063] [配列番号1]

GACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGATGAAGCTCCTTCGGGAGTGATTAGCG
GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTCATAGAGGGAATAGCCTTTCGAAAGGAAGATTAA
TACCGCATAAGATTGTAGTACCGCATGGTACAGCAATTAAGGAGTAATCCGCTATGAGATGGACCCGC
GTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGA
TCGGCCACATTGGGACTGAGACACGCCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAAT
GGGGGAAACCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGTGATGACGGTCTTCGGATTGTAAAGCTCTGTCTTTA
GGGACGATAATGACGGTACCTAAGGAGGAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGT
AGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTACTGGGCGTAAAGGAGCGTAGGTGGATATTTAAGTGGGATGTGA

AATACYCGGGCTTAACCTGGGTGCTGCATTCCAACTGGATATCTAGAGTGCAGGAGAGGAAAGGAGAA
TTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTAGGAAGAATACCAGTGGCGAAGGCGCCTTTCTGGACT
GTAAGTACACTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
AACGATGAATACTAGGTGTAGGGTTGTCATGACCTCTGTGCCGCCGCTAACGCATTAAGTATTCGCC
TGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAGCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCAGCGGAGCATGT
GGTTTAATTGCAAGCAACGCCAAGAACCTTACCTAGACTTGACATCTCCTGAATTACTCTGTAATGGAG
GAAGCCACTTCGGTGGCAGGAAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGG
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCTACCATTTAGTTGAGCACTCTAGCGAGACT
GCCCCGGTTAACCGGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTAGGGCTACAC
ACGTGCTACAATGGTCGGTACAATGAGATGCAACCTCGCGAGAGTGAGCAAACTATAAAACCGATCTC
AGTTCGGATTGTAGGCTGAACTCGCCTACATGAAGCTGGAGTTGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTC
GCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTGGCAATACCCAAAGT
TCGTGAGCTAACCGCAAGGAGGCAGCGACCTAAGGTAGGGTCAGCGATTGGGGTGAAG

[0064] 解析は、下記の条件で実施した。結果を表7-1及び表7-2に示す。

[0065] ・DNA抽出：シカジーニアスDNA抽出試薬ST (Kanto Chemical, Japan)

・PCR増幅：TKS Gflex DNA Polymerase (Takara Bio, Japan)

・サイクルシーケンス：BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA)

・使用プライマー：

PCR増幅：9F、1510R

シーケンス（約1500bp）：9F、515F、1099F、536R、926R、1510R

・シーケンス：ABI PRISM 3500xL Genetic Analyzer System (Applied Biosystems)

・塩基配列決定：ChromasPro 2.1 (Technelysium)

m, AUS)

・BLAST 相同性検索：

解析ソフトウェア：ENKI v3.2 (TechnoSuruga Laboratory, Japan)

データベース：

DB-BA17.0 (TechnoSuruga Laboratory)

国際塩基配列データベース (DDBJ/ENA/GenBank)

・簡易分子系統樹解析：

系統樹の推定：近隣結合法

塩基置換モデル：Kimura-2-parameter

樹形の信頼性評価：ブートストラップ法 (1,000 反復)

[0066]

[表7-1]

表 7-1、B6 株のDB-B A に対するBLAST 検索結果：上位30 塩基配列との相関率

	登録名	株名	Accession No.	相関率	BSL
1	<i>Clostridium butyricum</i>	JCM1391	AB595129	1437/1438 (99.9%)	
2	<i>Clostridium pumicum</i>	DSM2619	X71837	1404/1438 (97.6%)	
3	<i>Clostridium beijerinckii</i>	DSM791	X68179	1406/1439 (97.7%)	
4	<i>Clostridium chromatroducens</i>	GCAF-1	AY228334	1400/1438 (97.4%)	
5	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>	N1-4	U16122	1389/1419 (97.9%)	
6	<i>Clostridium saccharobutylicum</i>	NCP262	U16147	1382/1419 (97.4%)	
7	<i>Clostridium neonatale</i>	CCUG46077	AF275949	1390/1440 (96.5%)	
8	<i>Clostridium paraputrificum</i>	JCM1293	AB536771	1379/1440 (95.8%)	1*
9	<i>Clostridium vincentii</i>	lac-1	X97432	1368/1440 (95.0%)	
10	<i>Clostridium charitabadium</i>	DSM5482	X71830	1365/1437 (95.0%)	
11	<i>Clostridium utiginosum</i>	CK25	AJ276992	1359/1422 (95.5%)	
12	<i>Clostridium saudiense</i>	JCC	HG726039	1364/1442 (94.6%)	
13	<i>Clostridium sardinense</i>	DSM2632	AB161367	1364/1442 (94.6%)	
14	<i>Clostridium tertium</i>	JCM6289	AB618789	1363/1442 (94.5%)	1*
15	<i>Clostridium dicaporicum</i>	DSM5521	Y18176	1364/1443 (94.5%)	1*
16	<i>Clostridium sartagiforme</i>	DSM1292	Y18175	1361/1442 (94.4%)	
17	<i>Clostridium colicanic</i>	DSM13834	AJ420008	1356/1436 (94.4%)	
18	<i>Clostridium baratii</i>	ATCC27638	X68174	1358/1442 (94.2%)	1*
19	<i>Clostridium gasigenes</i>	DSM12272	AF092548	1358/1442 (94.2%)	
20	<i>Clostridium chauvoei</i>	ATCC16092	U51843	1355/1441 (94.0%)	2
21	<i>Clostridium quinti</i>	DSM6736	X76745	1360/1442 (94.2%)	
22	<i>Clostridium moniliforme</i>	JCM9990	AB540883	1357/1442 (94.1%)	1*
23	<i>Clostridium tervandellae</i>	DSM3997	FR733677	1351/1438 (93.9%)	1*
24	<i>Clostridium septicum</i>	ATCC12464	U59278	1351/1441 (93.8%)	2
25	<i>Clostridium boidayi</i>	ATCC25541	AB618183	1349/1441 (93.6%)	
26	<i>Clostridium algidicantis</i>	NCFB2931	AF127023	1344/1441 (93.3%)	
27	<i>Beaustantimicrobium porci</i>	WCA-383-APC-5B	MF557551	1343/1442 (93.1%)	
28	<i>Clostridium putrefaciens</i>	DSM1291	AF127024	1343/1441 (93.2%)	
29	<i>Clostridium cavendishii</i>	BL-28	DQ196621	1331/1424 (93.5%)	
30	<i>Clostridium fluvisolvens</i>	TW1	LC020506	1343/1447 (92.9%)	

注1) BSL (バイオセーフティレベル) はレベル1* (日和見病原体) 以上を表記し、空欄はレベル1 を意味する。

注2) 株名中の “_ (アンダーバー)” は、スペースを意味する。

注3) 表中の上から11 株は、簡易分子系統解析に供した配列データを示す。

[表7-2]

表7-2. B6株の国際塩基配列データベースに対するBLAST検索結果：上位30塩基配列との相同率

登録名	株名	Accession No.	相同率
<i>Clostridium butyricum</i>	16-3	CP053292	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	CFSA3989	CP033249	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	CFSA3987	CP033247	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	NBRC 13949	AP019716	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	4-1	CP039705	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	MSK	MK571204	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	S-45-5	CP030775	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	TK520	CP016332	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	CBM588	CP132344	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	TOA	CP014704	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	DKU-11	CP128832	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	SJ1	CP127838	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	JKY6D1	CP013352	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	KNU-L09	CP013252	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	LV1	CP114763	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	NEC4	LN828931	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	QXYZ514	CP049778	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium</i> sp.	LQ25	CP111077	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	CD-M-8	OP491983	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	CFSA-TJ-E	CP053374	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	BUT1	ON142182	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium</i> sp.	BG-M-101	OK271747	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium</i> sp.	B2-M-100	OK271596	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	CBUT	CP073277	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	DS501	CP071447	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	CB1	MW447605	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	CB TO-A	AB687551	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	DSM 10702	CP040626	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	JCM 1391	NR_113244	1437/1438 (99.9%)
<i>Ruminococcus</i>	R4 91 51	EU124833	1437/1438 (99.9%)

[0068] B6株の16S rDNA部分塩基配列に基づく簡易分子系統樹を図1に示す。図中、SLID29215-B6がB6株を示す。また、SLID29215-04は、基準株（クロストリジウム・ブチリカムNBRC13949T株）を示す。左上の線はスケールバーを示す。系統枝の分岐に位置する数字は、樹形の信頼性を表す値であるブートストラップ値を示す。株名の末尾のTはその種の基準株（Type strain）を示す。BSLはバイオセーフティレベル（BSL1*（日和見病原体）以上を表記）を示す。

[0069] [参考例2：in silico DDH (DNA-DNA hybridization) 解析]
in silico DDH解析は、対照株と比較株の全ゲノム配列やドラフトゲノム配列をコンピュータ上で比較し、2株間の種の異同を評価する

方法である。

本参考例では、計算方法の異なるANI解析及びGGDC解析を実施した。

[0070] (1) ANI (Average Nucleotide Identity) 解析

ANI解析では、対照株のゲノム配列をコンピュータ上で1,020bpに断片化し、比較株のゲノム配列に対して各断片の相同性検索を行い、それらの相同値の平均値からゲノム配列間のANI値を求める。ANI値の算出には、公開プログラムANI Calculator (<http://enve-omics.coe.gatech.edu/ani/index>) を用いる。ANI解析では、ANI値が95%以上であった場合、同種と判定する。

本参考例では、B6株を比較株、基準株（クロストリジウム・ブチリカムNBRC13949T株）を対照株として用いてANI解析を行ったところ、B6株と基準株との間のANI値は100%であった。

[0071] (2) GGDC (Genome-to-Genome Distance Calculator) 解析

GGDC解析では、コンピュータ上で対照株と比較株のゲノム配列間の相同性の高い領域を特定し、それらのペアワイズ距離を求めることによりin silico DDH値を求める (BMC Bioinformatics 2013;14:60)。in silico DDH値の算出には、公開プログラムGenome-to-Genome Distance Calculator (<http://ggdc.dsmz.de/ggdc.php#>) を用いる。GGDC解析では、in silico DDH値が70%以上であった場合、同種と判定する。

本参考例では、B6株を比較株、基準株（クロストリジウム・ブチリカムNBRC13949T株）を対照株として用いてGGDC解析を行ったところ、B6株と基準株との間のin silico DDH値は99.9%であった。

[0072] 参考例1～2の結果より、B6株はクロストリジウム・ブチリカムであると判定した。

ここで、B6株は、D-キシロース及びD-トレハロースの資化能を有し

ていない（実施例1）。

一方、NBRC 13949T株（クロストリジウム・ブチリカムの基準株）は、D-キシロース及びD-トレハロースの資化能を有していた（実施例1）。

更に、公知のクロストリジウム・ブチリカムは、D-キシロース及びD-トレハロースの資化能を有することが知られている（Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition, Volume Three, The Firmicutes, p.739-742 (2009)（非特許文献3））。

したがって、B6株は、基準株を含む公知のクロストリジウム・ブチリカムとは異なる菌株であると判定した。

[0073] [参考例3：B6株のゲノム解析]

下記の方法に従いB6株のゲノム解析を実施した。

1. DNA抽出

- ・DNA抽出・精製：NucleoSpin Plant II (MACHEREY-NAGEL, GER)

2. ライブラリー調製

- ・使用キット：Nextera DNA Flex Library Prep Kit (Illumina, USA)
Nextera DNA CD Indexes (Illumina)

3. ゲノムシーケンス

配列決定は、シーケンサー付属のプロトコルに従った。

- ・シーケンサー：iSeq 100 System (Illumina)
- ・シーケンシングキット：iSeq 100 i1 Reagent kit (Illumina)
- ・シーケンス方法：2×151 bp ペアエンドシーケンス

4. データ解析

- ・クオリティーフィルタリング：trimmomatic ver 0.39
- ・de novo アセンブル：Spades ver 3.15.4
- ・ミスアセンブルの修正(polishing)：pilon ver 1.24
- ・coverage(depth)の算出：bowtie2 ver 2.3.5.1, samtools ver 1.10
depth coverageは最長contigに対してリードのマッピングを行い、サイト

あたりの平均値として算出した。

・ G+C含量の算出 : SeqKit ver 0.12.0

[0074] 結果を以下に示す。

	coverage	ゲノムサイズ (Mb) ^{a)}	G+C含量 (%) ^{b)}
B 6 株	7 0 . 5 ×	3 . 8 7	2 8 . 6

a) contig/scaffold 長の総和を示す。

b) アセンブル後の塩基配列から算出した値を示す。

[0075] 取得した B 6 株の 1 7 2 個のコンティグ配列をそれぞれ、配列番号 2 ～ 1 7 3 とする。なお、配列番号 2 ～ 1 7 3 で示される配列は、出願時における本件国際出願に含まれている配列表に記載されている。

[0076] [寄託生物材料への言及]

寄託機関名 : 独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター

連絡先 : 〒 2 9 2 - 0 8 1 8 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足 2 - 5 - 8
1 2 2 号室

受託番号 : N I T E B P - 0 3 9 1 6

識別のための表示 : S I I D 2 9 2 1 5 - B 6

寄託日 : 2 0 2 3 年 6 月 1 5 日

原産地 : 日本

分離源 : 岐阜県海津市にあるハイアマウント株式会社の食品原材料製造工場
で得られる培地を含む発酵液から単離。培地に日本国産の大豆を使用。大豆
は日本国内で農薬を使用せず有機栽培されたものを使用。

[0077] [供試菌株 2]

クロストリジウム・ブチリカム (*Clostridium butyricum*) S I I D 4 9 5
2 0 - 0 1 - B 1 株 (以下、「0 1 - B 1 株」ともいう) を使用した。

0 1 - B 1 株は、ブダペスト条約の規定に基づく国際寄託機関である独立
行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター (〒 2 9 2 - 0 8
1 8 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足 2 - 5 - 8 1 2 2 号室) に国際寄
託されている (識別の表示 : S I I D 4 9 5 2 0 - 0 1 - B 1。受託番号 :

N I T E B P - 0 4 1 9 0。寄託日（受託日）：2024年10月29日）。

[0078] 〔実施例7：形態・生理・生化学的性状試験〕

寒天培地（アキュディア G A M ブイヨン（Shimadzu Diagnostics Corporation, Japan）＋寒天）を用い、嫌気培養キットとしてアネロパウチ・ケンキシシステム（Mitsubishi Gas Chemical, Japan）を用い、O1-B1株を37℃で24時間嫌気培養した。

培養したO1-B1株の形態を、光学顕微鏡を用いて観察した。

更にO1-B1株の生理学的性状（カタラーゼ反応、オキシダーゼ反応、ブドウ糖からの酸/ガス産生、ブドウ糖の酸化/発酵(O/F))を、Barrow & Felthamらの方法（Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria, 3rd edition, Cambridge: University Press; 1993）に基づいて試験した。結果を表8-1に示す。

なお、表8-1中の基準株の結果は、実施例1で取得したものである。

[表8-1]

表8-1. 形態観察及び生理学的性状試験（その1）

試験項目		01-B1株	基準株
培養温度		37℃	37℃
細胞形態		桿菌 (0.9~1.1×2.0~5.0 μm)	桿菌 (0.7~0.9×2.0~8.0 μm)
グラム染色性		+	+
芽胞の有無		+	+(中央/準端立)
運動性		—	+
コロニー形態	培地	GAMブイヨン寒天培地	GAM寒天培地
	培養時間	24時間	24時間
	直径	2~5mm	N/R
	色調	淡黄色	淡黄色
	形	不規則形	N/R
	隆起状態	レンズ状	N/R
	周縁	波状	波状
	表面の形状など	平滑	N/R
	透明度	不透明	N/R
	粘稠度	バター様	N/R
生育温度試験	30℃	+	+
	45℃	+	—
カタラーゼ反応		—	—
オキシダーゼ反応		—	—
グルコースからの酸/ガス産生 (酸産生/ガス発生)		—/—	—/N/R
O/Fテスト (酸化/発酵)		—/—	N/R

+：陽性、—：陰性、+w：反応弱い、N/R：測定せず

[0079] 寒天培地（アキュディア GAM ブイヨン（Shimadzu Diagnostics Corporation, Japan）+寒天）を用い、嫌気培養キットとしてアネロパウチ・ケンキシステム（Mitsubishi Gas Chemical, Japan）を用い、01-B1株を37℃で24時間嫌気培養した。

培養した01-B1株の生理・生化学的性状を、嫌気性菌生化学同定キット（API 20A（bioMérieux, FRA））を用いて同定した。結果を表8-2に示す。

なお、表8-2中の基準株の結果は、実施例1で取得したものである。

[表8-2]

表8-2. 生理・生化学的性状試験（その2）

試験項目	反応／酵素	01-B1株	基準株	試験項目	反応／酵素	01-B1株	基準株
IND	インドール産生 [*]	—	—	GLY	グリセリン ^{**}	—	—
URE	ウレアーゼ [*]	—	—	CEL	D-セロビオース ^{**}	+	+
GLU	ブドウ糖 ^{**}	+	+	MNE	D-マンノース ^{**}	+	+
MAN	D-マンニトール ^{**}	—	—	MLZ	D-メレチトース ^{**}	—	+
LAC	乳糖 ^{**}	+	+	RAF	D-ラフィノース ^{**}	+	+
SAC	白糖 ^{**}	+	+	SOR	D-ソルビトール ^{**}	—	—
MAL	マルトース ^{**}	+	+	RHA	L-ラムノース ^{**}	—	—
SAL	サリシン ^{**}	+	+	TRE	D-トレハロース ^{**}	—	+
XYL	D-キシロース ^{**}	—	+				
ARA	L-アラビノース ^{**}	+	+				
GEL	ゼラチン加水分解 [*]	—	—				
ESC	エスクリン加水分解 [*]	+	+				

^{*}生化学試験、^{**}酵化試験

+:陽性、—:陰性

[0080] 更に、01-B1株の追加の生理・生化学的性状を、API ZYMキット（bioMérieux, FRA）を用いて試験した。結果を表8-3に示す。

[表8-3]

表 8 - 3、生理・生化学的性状試験（その 3）

試験項目	01-B1株
アルカリホスファターゼ	—
エステラーゼ (C4)	+ w
エステラーゼ リパーゼ (C8)	—
リパーゼ (C14)	—
ロイシン アリルアミダーゼ	—
バリン アリルアミダーゼ	—
シスチン アリルアミダーゼ	—
トリプトシン	—
キモトリプトシン	—
酸性ホスファターゼ	+ w
ナフトール-AS-BI-ホスホヒドロラーゼ	+ w
α-ガラクトシダーゼ	+ w
β-ガラクトシダーゼ	—
β-グルクロニダーゼ	—
α-グルコシダーゼ	+
β-グルコシダーゼ	—
N-アセチル-β-グルコサミニダーゼ	—
α-マンノシダーゼ	—
α-フコシダーゼ	—

+：陽性、—：陰性、+ w：反応弱い

[0081] 01-B1株は、D-キシロース及びD-トレハロースの資化能を有していなかった（表8-2）。

一方、基準株は、D-キシロース及びD-トレハロースの資化能を有していた。

したがって、01-B1株は、基準株とは異なる菌株であると判定した。

[0082] [実施例8：有機酸産生能力試験]

液体培地（アキュディア GAM ブイヨン（Shimadzu Diagnostics Corporation, Japan））を用い、嫌気培養キットとしてアネロパウチ・ケンキシ

ステム (Mitsubishi Gas Chemical, Japan) を用い、01-B1株、B6株 (供試菌株1) 及び基準株を37℃で72時間嫌気培養した (培養液量: 200 mL)。

培養液を孔径0.20 μmのメンブレンフィルターでろ過し、試料溶液とした。

試料溶液に含まれる有機酸の濃度を、高速液体クロマトグラフィーで測定した。

測定条件は下記の通りである。

- ・ システム : Nexera有機酸分析システム (株式会社 島津製作所)
- ・ 機種 : LC-40D (株式会社 島津製作所)
- ・ 検出器 : 電気伝導度計 CDD-10Avp (株式会社 島津製作所)
- ・ カラム : Shim-pack SCR-102H×2, φ8.0mm×300mm (株式会社 島津製作所)
- ・ カードカラム : SCR-102H, φ6.0mm×50mm (株式会社 島津製作所)
- ・ カラム温度 : 45℃
- ・ 移動相 : 5mmol/L p-トルエンスルホン酸
- ・ 反応液 : 0.1mmol/L EDTA及び20mmol/L Bis-Tris含有
5mmol/L p-トルエンスルホン酸
- ・ 流量 : 移動相 0.8mL/min, 反応液0.8mL/min
- ・ 注入量 : 10 μL

測定対象の有機酸は、乳酸、ギ酸、酢酸及びn-酪酸の4種類であった。
結果を表9に示す。

[0083] [表9]

表9. 有機酸産生能力試験 (産生量の単位 :g/100g)

検体名	乳酸	ギ酸	酢酸	n-酪酸
Control (遠地のみ)	0.01		0.02	
基準株(NBRC13949T)	0.10	0.06	0.14	0.16
B6株	0.10		0.13	0.18
01-B1株	0.13		0.13	0.18

表中、空欄は定量下限未滿を示す。定量下限は、0.01g/100gであつた。

[0084] O1-B1株はn-酪酸を産生した。また、O1-B1株を37℃で72時間嫌気培養した後の培養液中に含まれるギ酸の産生量は、基準株(NBR C13949T)よりも少なかった。

[0085] [参考例4: 16S rDNA部分塩基配列解析]

O1-B1株の16S rDNA(16S rRNA遺伝子)の部分塩基配列(配列番号174)を解析して、その帰属を推定した。

[0086] [配列番号174]

GACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGATGAAGCTCCTTCGGGAGTGGATTAGCG
GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTCATAGAGGGGAATAGCCTTTCGAAAGGAAGATTAA
TACCGCATAAGATTGTAGTACCGCATGGTACAGCAATTAAGGAGTAATCCGCTATGAGATGGACCCGC
GTGCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGA
TCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAAT
GGGGAAACCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGTGATGACGGTCTTCGGATTGTAAAGCTCTGTCTTTA
GGGACGATAATGACGGTACCTAAGGAGGAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
AGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGAGCGTAGGTGGATATTTAAGTGGGATGTGA
AATACYCGGGCTTAACCTGGGTGCTGCATTCCAACTGGATATCTAGAGTGCAGGAGAGGAAAGGAGAA
TTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTAGGAAGAATACCAGTGGCGAAGGCGCCTTTCTGGACT
GTAAGTACACTGAGGCTCGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
AACGATGAATACTAGGTGTAGGGTTGTCATGACCTCTGTGCCGCCGCTAACGCATTAAGTATTCCGCC
TGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAGTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAGCAGCGGAGCATGT
GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTAGACTTGACATCTCCTGAATTACTCTGTAATGGAG
GAAGCCACTTCGGTGGCAGGAAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGG
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCTACCATTTAGTTGAGCACTCTAGCGAGACT
GCCCCGGTTAACCGGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTAGGGCTACAC
ACGTGCTACAATGGTCGGTACAATGAGATGCAACCTCGCGAGAGTGAGCAAACTATAAAACCGATCTC
AGTTCGGATTGTAGGCTGAAACTCGCCTACATGAAGCTGGAGTTGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTC

GCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTGGCAATACCCAAAGT
TCGTGAGCTAACCGCAAGGAGGCAGCGACCTAAGGTAGGGTCAGCGATTGGGGTGAAG

[0087] 解析は、下記の条件で実施した。結果を表10-1及び表10-2に示す。

。

[0088] ・DNA抽出：アクロモペプチダーゼ (FUJIFILM Wako Pure Chemical, Japan)

・PCR増幅：TKS Gflex DNA Polymerase (Takara Bio, Japan)

・サイクルシーケンス：BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA)

・使用プライマー：

PCR増幅：9F、1510R

シーケンス (約1500bp)：9F、515F、1099F、536R、926R、1510R

・シーケンス：ABI PRISM 3500xL Genetic Analyzer System (Applied Biosystems)

・塩基配列決定：ChromasPro 2.1 (Technelysium, AUS)

・BLAST相同性検索：

解析ソフトウェア：ENKI v3.2 (TechnoSuruga Laboratory, Japan)

データベース：

DB-BA17.0 (TechnoSuruga Laboratory)

国際塩基配列データベース (DDBJ/ENA/GenBank)

・簡易分子系統樹解析：

系統樹の推定：近隣結合法

塩基置換モデル：Kimura-2-parameter
樹形の信頼性評価：ブートストラップ法（1,000反復）

[0089] [表10-1]

表10-1. 01-01株のDB-BAに対するBLAST検索結果：上位30塩基配列との相関率

	登録名	株名	Accession No.	相関率	BSL
1	<i>Clostridium butyricum</i>	JCM1391	AB595129	1437/1438 (99.9%)	
2	<i>Clostridium beijerinckii</i>	NCIMB9362	X68180	1408/1439 (97.8%)	
3	<i>Clostridium pasteurianum</i>	DSM2619	X71857	1404/1438 (97.6%)	
4	<i>Clostridium beijerinckii</i>	DSM791	X68179	1406/1439 (97.7%)	
5	<i>Clostridium chromatireducens</i>	GCAF-1	AY228334	1400/1438 (97.4%)	
6	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>	NI-4	U16122	1389/1419 (97.9%)	
7	<i>Clostridium saccharobutylicum</i>	NCP262	U16147	1382/1419 (97.4%)	
8	<i>Clostridium neonatale</i>	CCUG46077	AF275949	1390/1440 (96.5%)	
9	<i>Clostridium parvum</i>	JCM1293	AB516771	1379/1440 (95.8%)	1*
10	<i>Clostridium vincentii</i>	lac-1	X97432	1368/1440 (95.0%)	
11	<i>Clostridium charitabidum</i>	DSM5482	X71850	1365/1437 (95.0%)	
12	<i>Clostridium uginosum</i>	CK33	AJ276992	1355/1422 (95.3%)	
13	<i>Clostridium saudiense</i>	JCC	HG726039	1364/1442 (94.6%)	
14	<i>Clostridium zardindense</i>	DSM2632	AB181367	1364/1442 (94.6%)	
15	<i>Clostridium tertium</i>	JCM6389	AB618789	1363/1442 (94.5%)	1*
16	<i>Clostridium disporicum</i>	DSM5521	Y18176	1364/1443 (94.5%)	1*
17	<i>Clostridium sartagiforme</i>	DSM1292	Y18175	1361/1442 (94.4%)	
18	<i>Clostridium colonicum</i>	DSM15634	AJ420008	1356/1436 (94.4%)	
19	<i>Clostridium baratii</i>	ATCC27638	X68174	1358/1442 (94.2%)	1*
20	<i>Clostridium gasigenes</i>	DSM12272	AF692548	1358/1442 (94.2%)	
21	<i>Clostridium chirovici</i>	ATCC16092	U51843	1355/1441 (94.0%)	2
22	<i>Clostridium quin</i>	DSM6736	X76745	1360/1443 (94.3%)	
23	<i>Clostridium manihiforme</i>	JCM9990	AB540985	1357/1442 (94.1%)	1*
24	<i>Clostridium tarantellae</i>	DSM3997	FR733677	1351/1438 (93.9%)	1*
25	<i>Clostridium septicum</i>	ATCC12464	U59278	1351/1441 (93.8%)	2
26	<i>Clostridium budayi</i>	ATCC25541	AB018183	1349/1441 (93.6%)	
27	<i>Clostridium albidum</i>	NCFB2931	AF127023	1344/1441 (93.3%)	
28	<i>Inconstantimicrobium porci</i>	WCA-383-APC-5B	MN537551	1343/1442 (93.1%)	
29	<i>Clostridium putrefaciens</i>	DSM1291	AF127024	1343/1441 (93.2%)	
30	<i>Clostridium cavendishii</i>	BL-28	DQ196621	1331/1424 (93.5%)	

注1) BSL (バイオセーフティレベル) はレベル1* (日和見病原体) 以上を表記し、空欄はレベル1を意味する。

注2) 株名中の “_ (アンダーバー)” は、スペースを意味する。

注3) 表中の上から1~3番目及び5~12番目の11株は、簡易分子系統解析に供した配列データを示す。

[0090]

[表10-2]

表 10-2. 01-B1 株の国際塩基配列データベースに対するBLAST検索結果：上位30塩基配列との相関率

登録名	株名	Accession No.	相関率
Clostridium butyricum	16-3	CP053292	1437/1438 (99.9%)
Clostridium butyricum	CFSA3989	CP933249	1437/1438 (99.9%)
Clostridium butyricum	CFSA3987	CP033247	1437/1438 (99.9%)
Clostridium butyricum	NBRC 13949	AP019716	1437/1438 (99.9%)
Clostridium butyricum	4-1	CP039705	1437/1438 (99.9%)
Clostridium butyricum	MSK	MK571204	1437/1438 (99.9%)
Clostridium butyricum	TMN60	LC784037	1438/1438 (100.0%)
Clostridium butyricum	TMN59	LC784036	1437/1438 (99.9%)
Clostridium butyricum	TK520	CP016332	1437/1438 (99.9%)
Clostridium butyricum	CBM588	CP132344	1437/1438 (99.9%)
Clostridium butyricum	TOA	CP014704	1437/1438 (99.9%)
Clostridium butyricum	DKU-11	CP128832	1437/1438 (99.9%)
Clostridium butyricum	8J1	CP127838	1437/1438 (99.9%)
Clostridium butyricum	JKY8D1	CP013352	1437/1438 (99.9%)
Clostridium butyricum	KNU-L09	CP013252	1437/1438 (99.9%)
Clostridium butyricum	LV1	CP114763	1437/1438 (99.9%)
Clostridium butyricum	NEC4	LN838931	1437/1438 (99.9%)
Clostridium butyricum	QXYZ514	CP049778	1437/1438 (99.9%)
Clostridium sp.	LQ25	CP111077	1437/1438 (99.9%)
Clostridium butyricum	CD-M-8	CP491983	1437/1438 (99.9%)
Clostridium butyricum	CFSA-TJ-E	CP053374	1437/1438 (99.9%)
Clostridium butyricum	BUT1	ON142182	1437/1438 (99.9%)
Clostridium sp.	BG-M-101	OK271747	1437/1438 (99.9%)
Clostridium sp.	B2-M-100	OK271596	1437/1438 (99.9%)
Clostridium butyricum	CBUT	CP073277	1437/1438 (99.9%)
Clostridium butyricum	DS501	CP071447	1437/1438 (99.9%)
Clostridium butyricum	CB1	MW447805	1437/1438 (99.9%)
Clostridium butyricum	CB TO-A	AB687551	1437/1438 (99.9%)
Clostridium butyricum	DSM 10702	CP040626	1437/1438 (99.9%)
Clostridium butyricum	JCM 1391	NR_113244	1437/1438 (99.9%)

[0091] 01-B1株の16S rDNA部分塩基配列に基づく簡易分子系統樹を図2に示す。図中、SID49520-01-B1が01-B1株を示す。左上の線はスケールバーを示す。系統枝の分岐に位置する数字は、樹形の信頼性を表す値であるブートストラップ値を示す。株名の末尾のTはその種の基準株 (Type strain) を示す。BSLはバイオセーフティレベル (BSL1* (日和見病原体) 以上を表記) を示す。

[0092] [寄託生物材料への言及]
寄託機関名：独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター
連絡先：〒292-0818 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8
122号室
受託番号：NITE BP-04190

識別のための表示：S I I D 4 9 5 2 0 - 0 1 - B 1

寄託日：2024年10月29日

原産地：日本

分離源：岐阜県海津市にあるハイアマウント株式会社の食品原材料製造工場
で発酵された培地を含む発酵液から単離。培地に日本国産の大豆を使用。大豆は日本国内で農薬を使用せず有機栽培されたものを使用。

[0093] 〔供試菌株3〕

クロストリジウム・ブチリカム (*Clostridium butyricum*) S I I D 5 0 0 3 0 - B 1 株（以下、「B 1 株」ともいう）を使用した。

B 1 株は、ブダペスト条約の規定に基づく国際寄託機関である独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター（〒292-0818 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室）に国際寄託されている（識別の表示：S I I D 5 0 0 3 0 - B 1。受託番号：N I T E B P - 0 4 1 9 1。寄託日（受託日）：2024年10月29日）。

[0094] 〔実施例9：形態・生理・生化学的性状試験〕

寒天培地（アキュディア G A M ブイヨン (Shimadzu Diagnostics Corporation, Japan) + 寒天）を用い、嫌気培養キットとしてアネロパウチ・ケンキシシステム (Mitsubishi Gas Chemical, Japan) を用い、B 1 株を37℃で24時間嫌気培養した。

培養したB 1 株の形態を、光学顕微鏡を用いて観察した。

更にB 1 株の生理学的性状（カタラーゼ反応、オキシダーゼ反応、ブドウ糖からの酸/ガス産生、ブドウ糖の酸化/発酵(O/F)) を、Barrow & Felthamの方法 (Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria, 3rd edition, Cambridge: University Press; 1993) に基づいて試験した。結果を表11-1に示す。

なお、表11-1中の基準株の結果は、実施例1で取得したものである。

[表11-1]

表 11-1. 形態観察及び生理学的性状試験（その1）

試験項目		B 1 株	基準株
培養温度		37℃	37℃
細胞形態		桿菌（0.9～1.1×2.0～8.0μm）	桿菌（0.7～0.9×2.0～8.0μm）
グラム染色性		+	+
芽胞の有無		+	+(中央／半端立)
運動性		—	+
コロニー形態	培地	GAMブイヨン寒天培地	GAM寒天培地
	培養時間	24時間	24時間
	直径	1～4mm	N/R
	色調	淡黄色	淡黄色
	形	不規則形	N/R
	隆起状態	レンズ状	N/R
	周縁	波状	波状
	表面の形状など	平滑	N/R
	透明度	不透明	N/R
	粘稠度	バター様	N/R
生育温度試験	30℃	+	+
	45℃	+	—
カタラーゼ反応		—	—
オキシダーゼ反応		—	—
グルコースからの酸／ガス産生 （酸産生／ガス発生）		—／—	—／N/R
O/Fテスト（酸化／発酵）		—／—	N/R

＋：陽性、－：陰性、＋w：反応弱い、N/R：測定せず

[0095] 寒天培地（アキュディア GAM ブイヨン（Shimadzu Diagnostics Corporation, Japan）＋寒天）を用い、嫌気培養キットとしてアネロパウチ・ケンキシシステム（Mitsubishi Gas Chemical, Japan）を用い、B 1 株を3 7℃で2 4時間嫌気培養した。

培養したB 1 株の生理・生化学的性状を、嫌気性菌生化学同定キット（API 20A（bioMerieux, FRA））を用いて同定した。結果を表 1 1－2 に示す。

なお、表 1 1－2 中の基準株の結果は、実施例 1 で取得したものである。

[表11-2]

表 11-2. 生理・生化学的性状試験（その2）

試験項目	反応／酵素	B1株	基準株	試験項目	反応／酵素	B1株	基準株
IND	インドール産生*	—	—	GLY	グリセリン**	—	—
URE	ウレアーゼ*	—	—	CEL	D－セロビオース**	+	+
GLU	ブドウ糖**	+	+	MNE	D－マンノース**	+	+
MAN	D－マンニトール**	—	—	MLZ	D－メレチトース**	—	+
LAC	乳糖**	+	+	RAF	D－ラフィノース**	+	+
SAC	白糖**	+	+	SOR	D－ソルビトール**	—	—
MAL	マルトース**	+	+	RHA	L－ラムノース**	—	—
SAL	サリシン**	+	+	TRE	D－トレハロース**	—	+
XYL	D－キシロース**	—	+				
ARA	L－アラビノース**	+	+				
GEL	ゼラチン加水分解*	—	—				
ESC	エスクリン加水分解*	+	+				

*生化学試験、**酸化試験

＋：陽性、—：陰性

[0096] 更に、B 1 株の追加の生理・生化学的性状を、A P I Z Y Mキット（bioMerieux, F R A）を用いて試験した。結果を表 1 1－3 に示す。

[表11-3]

表11- 3. 生理・生化学的性状試験（その3）

試験項目	B1株
アルカリホスファターゼ	—
エステラーゼ (C4)	+ w
エステラーゼ リパーゼ (C8)	—
リパーゼ (C14)	—
ロイシン アリルアミダーゼ	—
バリン アリルアミダーゼ	—
シスチン アリルアミダーゼ	—
トリプトシン	—
キモトリプトシン	—
酸性ホスファターゼ	+ w
ナフトール-AS-BI-ホスホヒドロラーゼ	+ w
α-ガラクトシダーゼ	+ w
β-ガラクトシダーゼ	—
β-グルクロニダーゼ	—
α-グルコシダーゼ	+
β-グルコシダーゼ	—
N-アセチル-β-グルコサミニダーゼ	—
α-マンノシダーゼ	—
α-フコシダーゼ	—

＋：陽性、－：陰性、＋w：反応弱い

[0097] B 1 株は、D－キシロース及びD－トレハロースの資化能を有していなかった（表 1 1－2）。

一方、基準株は、D－キシロース及びD－トレハロースの資化能を有していた。

したがって、B 1 株は、基準株とは異なる菌株であると判定した。

[0098] [実施例 1 0：有機酸産生能力試験]

液体培地（アキュディア G A M ブイヨン（Shimadzu Diagnostics Corporation, Japan））を用い、嫌気培養キットとしてアネロパウチ・ケンキシ

ステム (Mitsubishi Gas Chemical, Japan) を用い、B 1 株、B 6 株 (供試菌株 1) 及び基準株を 3 7 °C で 7 2 時間嫌気培養した (培養液量 : 2 0 0 m L) 。

培養液を孔径 0 . 2 0 μ m のメンブレンフィルターでろ過し、試料溶液とした。

試料溶液に含まれる有機酸の濃度を、高速液体クロマトグラフィーで測定した。

測定条件は下記の通りである。

- ・ システム : Nexera有機酸分析システム (株式会社 島津製作所)
- ・ 機種 : LC-40D (株式会社 島津製作所)
- ・ 検出器 : 電気伝導度計 CDD-10Avp (株式会社 島津製作所)
- ・ カラム : Shim-pack SCR-102H×2, φ8.0mm×300mm (株式会社 島津製作所)
- ・ カードカラム : SCR-102H, φ6.0mm×50mm (株式会社 島津製作所)
- ・ カラム温度 : 45°C
- ・ 移動相 : 5mmol/L p-トルエンスルホン酸
- ・ 反応液 : 0.1mmol/L EDTA及び20mmol/L Bis-Tris含有
5mmol/L p-トルエンスルホン酸
- ・ 流量 : 移動相 0.8mL/min, 反応液0.8mL/min
- ・ 注入量 : 10 μL

測定対象の有機酸は、乳酸、ギ酸、酢酸及び n - 酪酸の 4 種類であった。
結果を表 1 2 に示す。

[0099] [表12]

表 12. 有機酸産生能力試験 (産生量の単位 : g / 100g)

検体名	乳酸	ギ酸	酢酸	n-酪酸
Control (培地のみ)	0.01		0.02	
基準株(NBRC13949T)	0.10	0.06	0.14	0.16
B6株	0.10		0.13	0.18
B1株	0.10		0.13	0.19

表中、空欄は定量下限未滿を示す。定量下限は、0.01g/100gであつた。

[0100] B1株はn-酪酸を産生した。また、B1株を37℃で72時間嫌気培養した後の培養液中に含まれるギ酸の産生量は、基準株(NBRC13949T)よりも少なかった。

[0101] [参考例5:16S rDNA部分塩基配列解析]

B1株の16S rDNA(16S rRNA遺伝子)の部分塩基配列(配列番号175)を解析して、その帰属を推定した。

[0102] [配列番号175]

GACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGATGAAGCTCCTTCGGGAGTGGATTAGCG
GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTCATAGAGGGGAATAGCCTTTCGAAAGGAAGATTAA
TACCGCATAAGATTGTAGTACCGCATGGTACAGCAATTAAGGAGTAATCCGCTATGAGATGGACCCGC
GTGCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGA
TCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAAT
GGGGGAAACCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGTGATGACGGTCTTCGGATTGTAAAGCTCTGTCTTTA
GGGACGATAATGACGGTACCTAAGGAGGAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
AGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGAGCGTAGGTGGATATTTAAGTGGGATGTGA
AATACYCGGGCTTAACCTGGGTGCTGCATTCCAACTGGATATCTAGAGTGCAGGAGAGGAAAGGAGAA
TTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTAGGAAGAATACCAGTGGCGAAGGCGCCTTTCTGGACT
GTAACCTGACACTGAGGCTCGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
AACGATGAATACTAGGTGTAGGGTTGTCATGACCTCTGTGCCGCCGCTAACGCATTAAGTATTCGCC
TGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAAGCAGCGGAGCATGT
GGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTAGACTTGACATCTCCTGAATTACTCTGTAATGGAG
GAAGCCACTTCGGTGGCAGGAAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGG
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCTACCATTAGTTGAGCACTCTAGCGAGACT
GCCCCGGTTAACCGGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTAGGGCTACAC
ACGTGCTACAATGGTCGGTACAATGAGATGCAACCTCGCGAGAGTGAGCAAACTATAAAACCGATCTC
AGTTCGGATTGTAGGCTGAAACTCGCCTACATGAAGCTGGAGTTGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTC

GCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTGGCAATACCCAAAGT
TCGTGAGCTAACCGCAAGGAGGCAGCGACCTAAGGTAGGGTCAGCGATTGGGGTGAAG

[0103] 解析は、下記の条件で実施した。結果を表13-1及び表13-2に示す。

。

[0104] ・DNA抽出：アクロモペプチダーゼ (FUJIFILM Wako Pure Chemical, Japan)

・PCR増幅：TKS Gflex DNA Polymerase (Takara Bio, Japan)

・サイクルシーケンス：BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA)

・使用プライマー：

PCR増幅：9F、1510R

シーケンス (約1500bp)：9F、515F、1099F、536R、802R、1510R

・シーケンス：ABI PRISM 3500xL Genetic Analyzer System (Applied Biosystems)

・塩基配列決定：ChromasPro 2.1 (Technelysium, AUS)

・BLAST相同性検索：

解析ソフトウェア：ENKI v3.2 (TechnoSuruga Laboratory, Japan)

データベース：

DB-BA17.0 (TechnoSuruga Laboratory)

国際塩基配列データベース (DDBJ/ENA/GenBank)

・簡易分子系統樹解析：

系統樹の推定：近隣結合法

塩基置換モデル：Kimura-2-parameter
樹形の信頼性評価：ブートストラップ法（1,000反復）

[0105] [表13-1]

表13-1. BI株のDB-BAに対するBLAST検索結果：上位30塩基配列との相関率

	登録名	株名	Accession No.	相関率	BSL
1	<i>Clostridium butyricum</i>	JCM1391	AB595129	1437/1438 (99.9%)	
2	<i>Clostridium beijerinckii</i>	NCIMB9362	X68180	1408/1439 (97.8%)	
3	<i>Clostridium putriceum</i>	DSM2619	X71857	1404/1438 (97.6%)	
4	<i>Clostridium beijerinckii</i>	DSM791	X68179	1406/1439 (97.7%)	
5	<i>Clostridium chromatireducens</i>	GCAF-1	AY228334	1400/1438 (97.4%)	
6	<i>Clostridium saccharoperbutylacetanicum</i>	N1-4	U18122	1389/1419 (97.9%)	
7	<i>Clostridium saccharobutylicum</i>	NCP262	U16147	1382/1419 (97.4%)	
8	<i>Clostridium neonatale</i>	CCUG46077	AF273949	1390/1440 (96.5%)	
9	<i>Clostridium paraputrificum</i>	JCM1293	AB336771	1379/1440 (95.8%)	1*
10	<i>Clostridium vincentii</i>	lac-1	X97432	1368/1440 (95.0%)	
11	<i>Clostridium charatahidum</i>	DSM5482	X71850	1365/1437 (95.0%)	
12	<i>Clostridium uliginosum</i>	CK35	AJ276992	1355/1422 (95.3%)	
13	<i>Clostridium saudiense</i>	JCC	HG726039	1364/1442 (94.6%)	
14	<i>Clostridium sardinense</i>	DSM2632	AB181367	1364/1442 (94.6%)	
15	<i>Clostridium tertium</i>	JCM6289	AB618789	1363/1442 (94.5%)	1*
16	<i>Clostridium diaporicum</i>	DSM5521	Y18176	1364/1443 (94.5%)	1*
17	<i>Clostridium cartagense</i>	DSM1292	Y18175	1361/1442 (94.4%)	
18	<i>Clostridium colicanis</i>	DSM13634	AJ420008	1356/1436 (94.4%)	
19	<i>Clostridium baratii</i>	ATCC27638	X68174	1358/1442 (94.2%)	1*
20	<i>Clostridium gasigenes</i>	DSM12272	AF092548	1358/1442 (94.2%)	
21	<i>Clostridium chaetovos</i>	ATCC16092	U51843	1355/1441 (94.0%)	2
22	<i>Clostridium quinii</i>	DSM6736	X76745	1360/1443 (94.2%)	
23	<i>Clostridium moniliforme</i>	JCM9990	AB540985	1357/1442 (94.1%)	1*
24	<i>Clostridium tarentellae</i>	DSM3997	FR733677	1351/1438 (93.9%)	1*
25	<i>Clostridium septicum</i>	ATCC12464	U59278	1351/1441 (93.8%)	2
26	<i>Clostridium butoxy</i>	ATCC25541	AB018183	1349/1441 (93.6%)	
27	<i>Clostridium algidicarnis</i>	NCFB2931	AF127023	1344/1441 (93.3%)	
28	<i>Jeikeium maritimum</i>	WCA-383-APC-5B	MX337551	1343/1442 (93.1%)	
29	<i>Clostridium putrefaciens</i>	DSM1291	AF127024	1343/1441 (93.2%)	
30	<i>Clostridium cavendishii</i>	BL-28	DQ196621	1331/1424 (93.5%)	

注1) BSL (バイオセーフティレベル) はレベル1* (日和見病原体) 以上を表記し、空欄はレベル1を意味する。
注2) 株名中の “_ (アンダーバー)” は、スペースを意味する。
注3) 表中の上から1～3番目及び5～11番目の10株は、簡易分子系統解析に供した配列データを示す。

[0106]

[表13-2]

表13-2. B1株の国際塩基配列データベースに対するBLAST検索結果：上位30塩基配列との相関率

菌名	株名	Accession No.	相関率
<i>Clostridium butyricum</i>	16-3	CP055292	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	CFSA3989	CP033249	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	CFSA3987	CP033247	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	NBRC 13949	AP019716	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	4-1	CP039705	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	MSK	ME571204	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	TMN60	LC784037	1438/1438 (100.0%)
<i>Clostridium butyricum</i>	TMN59	LC784036	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	TK520	CP016532	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	CBM588	CP132544	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	TOA	CP014704	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	DKU-11	CP128832	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	6J1	CP127838	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	JKY6D1	CP013152	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	KNU-L09	CP013252	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	LV1	CP114763	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	NEC4	LN828931	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	QXYZ514	CP049778	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium</i> sp.	LQ25	CP111077	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	CD-M-8	Q2491983	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	CFSA-TJ-E	CP053374	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	BUT1	ON142182	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium</i> sp.	BG-M-101	OK271747	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium</i> sp.	B3-M-100	OK271596	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	CBUT	CP073277	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	DS501	CP071447	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	CB1	MW447605	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	CB TO-A	AB687551	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	DSM 10702	CP040626	1437/1438 (99.9%)
<i>Clostridium butyricum</i>	JCM 1391	NR_115744	1437/1438 (99.9%)

[0107] B1株の16S rDNA部分塩基配列に基づく簡易分子系統樹を図3に示す。図中、SLID50030-B1がB1株を示す。左上の線はスケールバーを示す。系統枝の分岐に位置する数字は、樹形の信頼性を表す値であるブートストラップ値を示す。株名の末尾のTはその種の基準株 (Type strain) を示す。BSLはバイオセーフティレベル (BSL1* (日和見病原体) 以上を表記) を示す。

[0108] [寄託生物材料への言及]

寄託機関名：独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター
連絡先：〒292-0818 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8
122号室
受託番号：NITE BP-04191

識別のための表示：S I I D 5 0 0 3 0－B 1

寄託日：2 0 2 4 年 1 0 月 2 9 日

原産地：日本

分離源：岐阜県海津市にあるハイアマウント株式会社の食品原材料製造工場
で発酵された培地を含む発酵液から単離。培地に日本国産の大豆を使用。大豆は日本国内で農薬を使用せず有機栽培されたものを使用。

[0109] なお、O 1－B 1 株（供試菌株 2）と B 1 株（供試菌株 3）とは以下の点
で相違していた。したがって、O 1－B 1 株は、B 1 株と異なる菌株であると
判定した。

	O 1－B 1 株	B 1 株
細胞形態	桿菌 (0.9～1.1×2.0～5.0μm)	桿菌 (0.9～1.1×2.0～8.0μm)
コロニーの直径	2～5mm	1～4mm
乳酸の産生量	0.13g/100g	0.10g/100g
n-酪酸の産生量	0.18g/100g	0.19g/100g

産業上の利用可能性

[0110] 本発明は、飲食品や医薬等に利用可能である。

請求の範囲

- [請求項1] n-酪酸を産生し、かつ、下記（１）～（３）の全ての特徴を有する、クロストリジウム・ブチリカム（*Clostridium butyricum*）。
- （１）D-キシロース資化能を有しない
- （２）D-トレハロース資化能を有しない
- （３）クロストリジウム・ブチリカム基準株であるNBRC 13949T株と比較して、37℃で72時間嫌気培養後の培養液中に含まれるギ酸の産生量が少ない
- [請求項2] クロストリジウム・ブチリカム（*Clostridium butyricum*）S11D29215-B6株（受託番号：NITE BP-03916）又はその変異株、ここで、前記変異株は、n-酪酸を産生し、かつ、下記（１）～（３）の全ての特徴を有する。
- （１）D-キシロース資化能を有しない
- （２）D-トレハロース資化能を有しない
- （３）クロストリジウム・ブチリカム基準株であるNBRC 13949T株と比較して、37℃で72時間嫌気培養後の培養液中に含まれるギ酸の産生量が少ない
- [請求項3] クロストリジウム・ブチリカム（*Clostridium butyricum*）S11D29215-B6株（受託番号：NITE BP-03916）。
- [請求項4] クロストリジウム・ブチリカム（*Clostridium butyricum*）S11D49520-01-B1株（受託番号：NITE BP-04190）又はその変異株、ここで、前記変異株は、n-酪酸を産生し、かつ、下記（１）～（３）の全ての特徴を有する。
- （１）D-キシロース資化能を有しない
- （２）D-トレハロース資化能を有しない
- （３）クロストリジウム・ブチリカム基準株であるNBRC 13949T株と比較して、37℃で72時間嫌気培養後の培養液中に含まれるギ酸の産生量が少ない

- [請求項5] クロストリジウム・ブチリカム (*Clostridium butyricum*) S I I D 4 9 5 2 0 - 0 1 - B 1 株 (受託番号: N I T E B P - 0 4 1 9 0)。
- [請求項6] クロストリジウム・ブチリカム (*Clostridium butyricum*) S I I D 5 0 0 3 0 - B 1 株 (受託番号: N I T E B P - 0 4 1 9 1) 又はその変異株、ここで、前記変異株は、*n*-酪酸を産生し、かつ、下記(1)～(3)の全ての特徴を有する。
- (1) D-キシロース資化能を有しない
 - (2) D-トレハロース資化能を有しない
 - (3) クロストリジウム・ブチリカム基準株であるNBRC 13949T株と比較して、37℃で72時間嫌気培養後の培養液中に含まれるギ酸の産生量が少ない
- [請求項7] クロストリジウム・ブチリカム (*Clostridium butyricum*) S I I D 5 0 0 3 0 - B 1 株 (受託番号: N I T E B P - 0 4 1 9 1)。
- [請求項8] 請求項1～7のいずれか一項に記載のクロストリジウム・ブチリカムの菌体、芽胞又は培養液を有効成分として含む、整腸用組成物。
- [請求項9] 請求項1～7のいずれか一項に記載のクロストリジウム・ブチリカムの菌体、芽胞又は培養液を有効成分として含む、クロストリジオイデス・ディフィシル (*Clostridioides difficile*) の増殖抑制用組成物。
- [請求項10] 請求項1～7のいずれか一項に記載のクロストリジウム・ブチリカムの菌体、芽胞又は培養液を有効成分として含む、抗炎症用組成物。
- [請求項11] 請求項1～7のいずれか一項に記載のクロストリジウム・ブチリカムの菌体、芽胞又は培養液を有効成分として含む、制御性T細胞誘導用組成物。
- [請求項12] 医薬品の形態である、請求項8に記載の組成物。
- [請求項13] 医薬品の形態である、請求項9に記載の組成物。
- [請求項14] 医薬品の形態である、請求項10に記載の組成物。

- [請求項15] 医薬品の形態である、請求項 11 に記載の組成物。
- [請求項16] 飲食品の形態である、請求項 8 に記載の組成物。
- [請求項17] 飲食品の形態である、請求項 9 に記載の組成物。
- [請求項18] 飲食品の形態である、請求項 10 に記載の組成物。
- [請求項19] 飲食品の形態である、請求項 11 に記載の組成物。