

明 細 書

発明の名称：細菌、組成物及び組成物の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、細菌、組成物及び組成物の製造方法に関する。

本願は、2023年8月31日に日本に出願された特願2023-141728号、及び、特願2023-141717号について優先権を主張し、両出願の内容をここに援用する。

背景技術

[0002] 近年、動物に良い影響を与える細菌（いわゆる善玉菌、「プロバイオティクス」ともいう。）を積極的に摂取して腸内環境を整えることで、病気の発生抑制又は健康増進等を目的とする研究が盛んに行われている。

例えば、特許文献1は、免疫調節効果を有し、免疫系の変化に関連した病変の処置に有用なプロバイオティクスを開示している。

[0003] また、善玉菌を含む腸内菌叢を改善して病気の発生抑制又は健康増進するための研究も行われている。腸内菌叢の改善は、主に善玉菌の増殖促進が挙げられ、整腸作用、炎症性腸疾患への予防及び改善作用等のヒトの健康に有益な効果があることが知られている（非特許文献1～3）。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特表2013-521335号公報

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Cannarella et al., “Mixture of probiotics reduces inflammatory biomarkers and improves the oxidative/nitrosative profile in people with rheumatoid arthritis”, Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.), vol. 89, 2021

非特許文献2：Kim et al., “Probiotic Supplementation Improves Cognitive Function and Mood with Changes in Gut Microbiota in Community-Dwel

ling Older Adults: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicenter Trial” , Journals of Gerontology: Biological Sciences, vol. 76, No. 1, 2021

非特許文献3: Gomi et al., “Bifidobacterium bifidum YIT 10347 fermented milk exerts beneficial effects on gastrointestinal discomfort and symptoms in healthy adults: A double-blind, randomized, placebo-controlled study” , Journal of Dairy Science, vol. 101, No. 6, 2018

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] このように、プロバイオティクスの更なる研究及び開発が求められている。

本発明は、新規ビフィドバクテリウム・ビフィダムに属する細菌、当該細菌を含有する組成物及び当該組成物の製造方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明は、以下の態様を包含する。

[1] ビフィドバクテリウム・ビフィダム MCC2085 (NITE BP-03881) である細菌。

[2] [1] に記載の細菌を含有する、組成物。

[3] 前記組成物が、飲食品組成物である、[2] に記載の組成物。

[4] 前記飲食品組成物が、プロバイオティクス組成物又は栄養組成物である、[3] に記載の組成物。

[5] 前記栄養組成物が、調製乳である、[4] に記載の組成物。

[6] さらにヒトミルクオリゴ糖を含む、[4] 又は [5] に記載の組成物。

。

[7] 前記組成物が、医薬組成物である、[2] に記載の組成物。

[8] [1] に記載の細菌と、原料とを混合する工程を含む、組成物の製造方法。

[0008] 別の側面として、本発明は以下の態様を包含する。

[1] ビフィドバクテリウム・ビフィダム MCC2085 (NITE BP-03881) である細菌と、食品原料とを含む組成物であって、
前記細菌が生菌体であり、
前記組成物の前記細菌の含有量は、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^{12}$ CFU/g である、飲食品組成物。

[2] ビフィドバクテリウム・ビフィダム MCC2085 (NITE BP-03881) である細菌を含む飲食品組成物の製造方法であって、
前記細菌及び前記細菌の培養物の少なくとも一方と、食品原料とを混合する工程を含み、
前記混合する工程は、前記飲食品組成物に含まれる前記細菌の含有量が $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^{12}$ CFU/g となるように混合する工程である、
飲食品組成物の製造方法。

[3] ビフィドバクテリウム・ビフィダム MCC2085 (NITE BP-03881) である細菌を、摂取量が $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^{12}$ CFU/日 となるよう被投与者に投与することを含む、腸内菌叢改善方法。

[4] 腸内菌叢改善のための、ビフィドバクテリウム・ビフィダム MCC2085 (NITE BP-03881) である細菌の使用。

[5] ビフィドバクテリウム・ビフィダム MCC2085 (NITE BP-03881) を含む腸到達用経口組成物。

発明の効果

[0009] 上記態様によれば、プロバイオティクスとして作用する新規ビフィドバクテリウム属細菌、当該細菌を含有する組成物及び当該組成物の製造方法を提供することができる。

本発明は、ビフィドバクテリウム・ビフィダム ATCC29521 (pH 3.0 の人工胃液の存在下で 120 分間培養したときに 3.1% の生存率) と比較して優れた耐酸性を有する新規なビフィドバクテリウム・ビフィダム MCC2085 (受託番号 NITE BP-03881、pH 3.0 の人工胃液の存在下で 120 分間培養したときに 79% の生存率) を提供する。さらに

、新規なビフィドバクテリウム・ビフィダムMCC2085(NITE BP-03881)産生量はcontrolに対して3.2倍の増加であり、ATCC29521はcontrolに対して1.7倍の増加であった。このようにMCC2085はATCC29521と比較して、優れたセロトニン産生能力を有していた。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]試験例2における、MCC2085、及びATCC29521の菌体濃度(CFU/ml)の経時変化を示すグラフである。

[図2]試験例2における、MCC2085、及びATCC29521の生存率(%)の経時変化を示すグラフである。

[図3]MCC2085、ATCC29521によって産生されるセロトニンの量を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0011] 以下、本発明を実施するための好適な実施形態について説明する。なお、以下に説明する実施形態は、本開示の代表的な実施形態の一例を示したものであり、これにより本技術の範囲が狭く解釈されることはない。なお、本明細書において、数値範囲を「下限値～上限値」で表現するものに関しては、上限値及び下限値を含むことを意味する。

[0012] ビフィドバクテリウム属細菌は、様々な生理機能を有することが報告されている。これらの生理機能は、腸内での増殖、又はビフィドバクテリウム属細菌が産生する物質（例えば、酢酸等）が関与していると報告されている。従って、本実施形態のビフィドバクテリウム属細菌も、安全性が高く、かつ幅広い年齢層において、一般的にいられているビフィドバクテリウム属細菌による効能を期待することができる。このため、本実施形態のビフィドバクテリウム属細菌は、幅広い組成物、例えば飲食品、機能性食品用、医薬用及び飼料用等に用いることが可能である。また、本実施形態のビフィドバクテリウム属細菌は、プロバイオティクス効果を期待することができるので、健康増進、食生活改善及び腸内環境改善（整腸）等の目的に使用することも可

能である。

[0013] <ビフィドバクテリウム・ビフィダムMCC2085 (NITE BP-03881)>

ビフィドバクテリウム・ビフィダム MCC2085 (NITE BP-03881、以下、単に「MCC2085」とも記載する。)は、後記試験例1に示されるとおりヒト乳児の糞便から分離された新規なビフィドバクテリウム・ビフィダムであり、新規細菌として、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 (NPMD) (住所：〒292-0818 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室)に、2023年4月13日に、*Bifidobacterium bifidum* MCC2085 (受託番号：NITE BP-03881)として国際寄託された。この細菌は、前記保存機関より一般に入手可能である。

[0014] MCC2085は、pHの低い環境下での生存率が高い性質、すなわち、高い耐酸性能を有する。また、MCC2085を動物が摂取することでその整腸効果が期待される。本明細書においてpHは、25℃で測定した際の値を意味する。

本明細書において、「高い耐酸性能」とは、後記試験例2の生存率を算出することで評価することができる。MCC2085を、人工胃液 (pH3.0) 1mLに対して1v/v%となるよう接種し混合液を得る。得た混合液を37℃にて保持する。混合液を含む容器をインキュベータに設置した時点をも0分とし、0分及び120分後の混合液を分取して混釈培養を72時間行い、それぞれCFU (Colony Forming Unit:コロニー形成単位)を測定する。0分の混釈培養のCFUに対する120分後の混釈培養のCFUの割合 (%) が70%以上である場合、より好ましくは75%以上である場合、「pHの低い環境下での生存率が高い」、すなわち「高い耐酸性能を有する」と判断する。

[0015] MCC2085は、当該細菌名で前記の機関に寄託及び登録がなされている細菌そのもの (以下、説明の便宜上、「寄託細菌」ともいう)に限られず

、それと実質的に同等な細菌（「派生株」又は「誘導株」ともいう）も包含される。細菌について、「前記寄託細菌と実質的に同等の細菌」とは、上記寄託細菌と同一の種に属し、本件寄託細菌と同等以上の耐酸性能を有する細菌を意味する。上記寄託細菌と実質的に同等の細菌は、例えば、当該寄託細菌の派生株であってよい。派生株としては、寄託細菌から育種された細菌や寄託細菌から自然に生じた細菌が挙げられる。

[0016] 本実施形態では、MCC2085と実質的に同等の細菌とは、例えば、同属の細菌であって、16S rRNA遺伝子の塩基配列が、MCC2085の16S rRNA遺伝子の塩基配列と好ましくは99.9%以上、より好ましくは100%の相同性を有し、且つ、好ましくはMCC2085と同一の菌学的性質を有する細菌をいう。

[0017] 本実施形態では、MCC2085には、MCC2085の特性（例えば、pHの低い環境下での生存率が高い、セロトニン産生量が高い等）を有する限り、MCC2085の変異株も含まれる。また、この変異株は、MCC2085と同一の菌学的性質を有し、かつ、MCC2085と同等以上にpHの低い環境下での生存率が高い細菌であることが好ましい。ある変異株がMCC2085と「同等以上にpHの低い環境下での生存率が高い」か否かは、例えば、後述する試験例2の方法により確認することができる。

[0018] このような変異株は、MCC2085に非人為的に変異が導入されることで構築されてもよい。また、UV等の変異原を用いた処理により上記細菌に変異を導入して構築してもよく、種々の遺伝子操作法により上記細菌に変異を導入して構築してもよい。

[0019] 実質的に同等の細菌及び派生株としては、下記のような細菌が挙げられる。

(1) Randomly Amplified Polymorphic DNA法、Pulsed-field gel electrophoresis法により同一の細菌と判定される細菌 (Probiotics in food/Health and nutritional properties and guidelines for evaluation 85 Page43に記載)

(2) 当該寄託細菌由来の遺伝子のみ保有し、外来由来の遺伝子を持たず、DNAの同一性が95%以上（好適には98%以上）である細菌

(3) 当該細菌から育種された細菌（遺伝子工学的改変、突然変異又は自然突然変異を含む）と同一の形質を有する細菌

[0020] MCC2085は、同細菌を培養することにより増殖させることができる。培養する方法は、MCC2085が増殖できる限り特に限定されず、ビフィドバクテリウム属細菌の培養に通常用いられる方法を必要により適宜修正して用いることができる。例えば、培養温度は30～50℃でよく、35～45℃であることが好ましい。また培養は、嫌気条件下で行うことが好ましく、例えば、炭酸ガス等の嫌気ガスを通気しながら培養することができる。また、液体静置培養等の微好気条件下で培養してもよい。

[0021] MCC2085を増殖させるために培養する培地としては、特に限定されず、ビフィドバクテリウム属細菌の培養に通常用いられる培地を必要により適宜修正して用いることができる。例えば、炭素源として、ガラクトース、グルコース、フルクトース、マンノース、セロビオース、マルトース、ラクトース、スクロース、トレハロース、デンプン加水分解物及び廃糖蜜等の糖類を使用できる。窒素源としては、例えば、アンモニア、塩化アンモニウム及び硝酸アンモニウムなどのアンモニウム塩類や硝酸塩類を使用できる。また、無機塩類としては、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸カリウム、硫酸マグネシウム、塩化カルシウム、硝酸カルシウム、塩化マンガン及び硫酸第一鉄等を用いることができる。また、大豆粉、脱脂大豆粕、肉エキス及び酵母エキス等の有機成分を用いてもよい。また、調製済みの培地としては、例えばMRS培地を好適に用いることができる。

[0022] MCC2085は、培養後、得られた培養物をそのまま用いることが可能であり、希釈又は濃縮することが可能であり、培養物から菌体のみ回収することも可能である。本発明の効果を奏する限り、MCC2085は、培養後に加熱、乾燥、破碎及び殺菌等の追加の処理を行った菌体を用いることも可能である。これらの処理を適宜組み合わせて用いることが可能である。

乾燥法としては、噴霧乾燥法、凍結乾燥法が挙げられる。殺菌方法は、レトルト殺菌法、UHT (Ultra High Temperature) 殺菌法、加圧殺菌法、高圧蒸気滅菌法、乾熱滅菌法、流通蒸気消毒法、電磁波殺菌法、電子線滅菌法、高周波滅菌法、放射線滅菌法、紫外線殺菌法、酸化エチレンガス滅菌法、過酸化水素ガスプラズマ滅菌法及び化学的殺菌法（具体的には、アルコール殺菌法、ホルマリン固定法及び電解水処理法）等が挙げられる。

[0023] MCC2085は、例えば、菌体濃縮物、凍結乾燥菌体、噴霧乾燥菌体、殺菌体、加熱殺菌体及び菌体破碎物等の形態にすることができる。

[0024] <MCC2085を含む組成物>

本実施形態の組成物は、MCC2085を含有する。組成物は、飲食品組成物及び医薬組成物等を含む。MCC2085は、ヒト由来であるため副作用が少なく安全性が高いので、動物が継続して長期間摂取することも可能である。そのため飲食品組成物及び医薬組成物等の幅広い用途の製品に使用できる。

[0025] 本実施形態の組成物を動物が摂取することにより、その整腸効果が期待できる。MCC2085は、生菌体又は殺菌体を生理的、医薬品的若しくは飲食品的に許容される通常の担体若しくは希釈剤等と共に混合して用いることができる。

[0026] 本実施形態の組成物全体におけるMCC2085の含有量は、特に限定されないが、例えば 10^3 CFU/g又はmL以上、 10^4 CFU/g又はmL以上、 10^5 CFU/g又はmL以上、又は 10^6 CFU/g又はmL以上であってよく、 10^{12} CFU/g又はmL以下、 10^{11} CFU/g又はmL以下、又は 10^{10} CFU/g又はmL以下であってよい。

本発明の組成物におけるMCC2085の含有量は、 10^3 CFU/g又はmL～ 10^{12} CFU/g又はmLであってよく、 10^4 CFU/g又はmL～ 10^{11} CFU/g又はmLであってよく、 10^5 CFU/g又はmL以上～ 10^{10} CFU/g又はmLであってよい。

[0027] MCC2085を含む組成物は、治療目的使用であっても、非治療目的使用であってもよい。

「非治療目的」とは、医療行為、すなわち、治療による人体への処置行為を含まない概念である。例えば、健康増進、美容行為等が挙げられる。

「改善」とは、疾患、症状又は状態の好転；疾患、症状又は状態の悪化防止、遅延；疾患又は症状の進行の逆転、防止又は遅延をいう。

「予防」とは、適用対象における疾患若しくは症状の発症の防止や遅延、又は適用対象の疾患若しくは症状の危険性の低下をいう。

[0028] 本発明の組成物が非治療目的で使用される場合は、健常者を対象に投与され得る。健常者とは、健康な腸内菌叢を保有する者、腸内菌叢の乱れに起因する疾患に罹患していない者を意味してよい。腸内菌叢の乱れに起因する疾患としては、例えば、下痢、便秘が挙げられる。本発明の組成物が非治療目的で使用される場合は、健常者の保有する良好な腸内菌叢をさらに良好に整えるために使用され、特に、健常者の腸内でMCC2085を増殖させるために使用され得る。

[0029] 本発明の組成物が非治療目的で使用される場合は、健常者における腸内菌叢の調整が可能であり、下痢、及び／又は便秘の予防が可能である。

[0030] 本発明の組成物が治療目的で使用される場合は、非健常者を対象に投与され得る。非健常者としては、例えば、腸内菌叢の乱れに起因する疾患に罹患した者が挙げられる。

[0031] 本発明の組成物が治療目的で使用される場合は、非健常者の整腸が可能であり、下痢、便秘が改善、予防され、治療が可能になり得る。

[0032] 本発明の組成物が治療目的で使用される場合は、非健常者の保有する腸内菌叢を改善するために使用され、特に非健常者の腸内でMCC2085を増殖させるために使用され得る。

[0033] MCC2085を含む組成物は、適用対象であるヒト又は非ヒト動物（好適には哺乳類）に使用してもよく、ヒト及びペットが好ましく、より好ましくはヒトである。さらに、本技術の適用対象者は、プロバイオティクス効果

を望む者であれば特に限定されず、例えば、乳幼児、小児、大人、中高年、高齢者、健常者及び腸内環境の優れない者等が挙げられる。このうち、本技術は、乳幼児用、大人用、高齢者用及び腸内環境の優れない者に使用することが好ましい。

[0034] MCC2085の投与又は摂取は、少なくとも1週間継続して摂取することが好ましく、少なくとも4週間継続して摂取ことがより好ましい。MCC2085の投与又は摂取期間中は、MCC2085を毎日摂取することが望ましい。

[0035] MCC2085の使用量は、安全性が高いので特に制限されないが、例えば、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{12}$ CFU/kg体重/日が好ましく、 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{11}$ CFU/kg体重/日がより好ましく、 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{10}$ CFU/kg体重/日がさらに好ましい。又は、1個体(Body weight)あたりの使用量(言い換えれば、投与量)としては、 $10^7 \sim 10^{14}$ CFU/日が好ましく、 $10^8 \sim 10^{13}$ CFU/日がより好ましく、 $10^9 \sim 10^{12}$ CFU/日がさらに好ましい。MCC2085が殺菌体の場合、CFUは、個細胞(cells)と置き換えることができる。

[0036] また、MCC2085の使用量は、安全性が高いので特に制限されないが、菌体の乾燥重量として0.01~10000mg/体重kg/日であることが好ましく、0.01~1000mg/体重kg/日であることがより好ましく、0.1~100mg/体重kg/日であることがよりさらに好ましい。

MCC2085の使用量は、安全性が高いので特に制限されないが、0.001~100mL/体重kg/日であることが好ましく、0.1~10mL/体重kg/日であることがより好ましい。

[0037] <医薬組成物>

本実施形態の医薬組成物は、MCC2085を含有する限り特に制限されない。医薬組成物は、MCC2085を含有する、整腸用組成物等としても使用できる。

[0038] 本実施形態の医薬組成物の使用は、非健常者を対象とし、前記の治療目的として使用される。

[0039] 本実施形態の医薬組成物の剤形は、特に制限されない。具体的には、医薬組成物の剤形として、錠剤、丸剤、散剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤、カプセル剤、シロップ剤、坐剤、注射剤、軟膏剤、貼付剤、点眼剤、及び点鼻剤等を例示できる。また、製剤化にあたっては、製剤担体として通常使用される賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、安定剤、矯味矯臭剤、希釈剤、界面活性剤、及び注射剤用溶剤等の添加剤を使用することができる。

[0040] また、製剤化に際しては、本実施形態に係る医薬組成物には、通常製剤化に用いられている賦形剤、pH調整剤、着色剤及び矯味剤等の成分を用いることができる。また、本発明の効果を損なわない限り、本実施形態に係る医薬組成物には、公知の又は将来的に見出される本実施形態に関連する疾患又は症状に対する予防、改善及び／又は治療の効果を有する成分を使用することもできる。加えて、製剤化は、剤形に応じて適宜公知の方法により実施できる。製剤化に際しては、適宜、製剤担体を配合して製剤化してもよい。

[0041] 本実施形態の医薬組成物におけるMCC2085の含有量は、剤形、用法、患者の年齢、性別、疾患の種類、疾患の程度、及びその他の条件等により適宜設定されるが、通常、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{12} \text{ CFU/g}$ 又は $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{12} \text{ CFU/mL}$ の範囲内であることが好ましく、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{12} \text{ CFU/g}$ 又は $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{12} \text{ CFU/mL}$ の範囲内であることがより好ましい。MCC2085が殺菌体の場合、 CFU/g 又は CFU/mL は、個細胞/g 又は個細胞/mLと置き換えることができる。

[0042] 本実施形態の医薬組成物の投与時期は、特に限定されず、対象となる症状又は疾患の治療方法に従って、適宜投与時期を選択することが可能である。また、予防的に投与してもよく、維持療法に用いてもよい。また、投与形態は、製剤形態、患者の年齢、性別、その他の条件又は患者の症状の程度等に応じて決定されることが好ましい。なお、本実施形態の医薬組成物は、いずれの場合も1日1回又は複数回に分けて投与することができ、また、数日又

は数週間に1回の投与としてもよい。

[0043] <飲食品組成物>

本実施形態の飲食品組成物は、MCC2085を含有する限り特に制限されないが、プロバイオティクス組成物、栄養組成物、又は一般の飲食品組成物であってよい。

[0044] 本実施形態の飲食品組成物の剤形は特に限定されず、粉末、顆粒、ペースト、エマルション、オールドロップ、カプセル、タブレット等であってよい。

[0045] 本実施形態の飲食品組成物は、MCC2085を公知の飲食品に添加することによって製造してもよいし、MCC2085を飲食品の原料中に混合して新たな飲食品組成物として製造することもできる。

[0046] また、本実施形態における飲食品組成物は、本発明の効果を損なわない限り、プロバイオティクス効果を有する成分又はプロバイオティクス効果を補助する成分含む、プロバイオティクス組成物であってもよい。例えば、本実施形態における飲食品組成物は、ヒトミルクオリゴ糖等の炭水化物；ホエイタンパク質、カゼインタンパク質、大豆タンパク質、若しくはエンドウ豆タンパク質（ビープロテイン）等の各種タンパク質若しくはその混合物又は分解物；ロイシン、バリン、イソロイシン若しくはグルタミン等のアミノ酸；ビタミンB6若しくはビタミンC等のビタミン類；クレアチン；クエン酸；又はフィッシュオイル等の成分と、MCC2085とを組合せて調製することができる。

[0047] 本実施形態の飲食品組成物をプロバイオティクス組成物とすることができる。本実施形態の飲食品組成物は、MCC2085に加えて飲食品原料を含有することが可能である。飲食品原料としては、例えば、乳糖、白糖、ブドウ糖、マンニット及びソルビット等の糖誘導体；トウモロコシデンプン、馬鈴薯デンプン、 α -デンプン、デキストリン及びカルボキシメチルデンプン等のデンプン誘導体；結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース及びルボ

キシメチルセルロースカルシウム等のセルロース誘導体；アラビアゴム；デキストラン；プルラン；軽質無水珪酸及び合成珪酸アルミニウム、メタ珪酸アルミン酸マグネシウム等の珪酸塩誘導体；リン酸カルシウム等のリン酸塩誘導体；炭酸カルシウム等の炭酸塩誘導体；硫酸カルシウム等の硫酸塩誘導体等が挙げられる。

[0048] 本実施形態の飲食品組成物には、通常はその総乾燥重量あたりMCC2085を $1 \times 10^3 \text{CFU/g} \sim 1 \times 10^{12} \text{CFU/g}$ 含むことが可能であり、より好ましくは $1 \times 10^5 \text{CFU/g} \sim 1 \times 10^{11} \text{CFU/g}$ 含むことが可能である。

[0049] 本実施形態の飲食品組成物は、MCC2085を含有する限り特に制限されず、飲食品組成物としては、清涼飲料、炭酸飲料、栄養飲料、果汁飲料、及び乳酸菌飲料等の飲料（これらの飲料の濃縮原液及び調製用粉末を含む）；アイスクリーム、シャーベット、及びかき氷等の氷菓；飴、キャンディー、ガム、チョコレート、錠菓、スナック菓子、ビスケット、ゼリー、ジャム、クリーム、及び焼き菓子等の菓子類；加工乳、乳飲料、発酵乳、ドリンクヨーグルト、及びバター等の乳製品；パン等が例示される。また、飲食品は、サプリメントであってもよく、例えばタブレット状のサプリメントであってもよい。サプリメントである場合には、一日当りの食事量及び摂取カロリーについて他の食品に影響されることなく、MCC2085を摂取できる。

[0050] また、本実施形態で定義される飲食品組成物は、プロバイオティクス組成物として用いることができる。すなわち、本実施形態の飲食品組成物は、プロバイオティクス等の用途（保健用途を含む）が表示された飲食品として提供又は販売されることが可能である。また、飲食品の摂取対象として、「ビフィドバクテリウム属細菌と暮らす生活を望む方」、「腸内環境を改善したい方」、「お腹の調子を整えたい方」、「良好な腸内環境を形成したい方」、「生きて腸まで届くビフィズス菌を摂取したい方」等と表示して提供又は販売されることが可能である。「表示」行為には、需要者に対して前記用途を知らしめるための全ての行為が含まれ、前記用途を想起又は類推させ得る

ような表現であれば、表示の目的、表示の内容、表示する対象物及び媒体等の如何に拘わらず、全て本発明の「表示」行為に該当する。

[0051] また、「表示」は、需要者が上記用途を直接的に認識できるような表現により行われることが好ましい。具体的には、飲食品に係る商品又は商品の包装に前記用途を記載したものを譲渡し、引き渡し、譲渡若しくは引き渡しのために展示し、輸入する行為、商品に関する広告、価格表若しくは取引書類に上記用途を記載して展示し、若しくは頒布し、又はこれらを内容とする情報に上記用途を記載して電磁気的方法（具体的にはインターネット等）により提供する行為等が挙げられる。

[0052] 一方、表示内容としては、行政等によって認可された表示（例えば、行政が定める各種制度に基づいて認可を受け、そのような認可に基づいた態様で行う表示等）であることが好ましい。また、そのような表示内容を、包装、容器、カタログ、パンフレット及びPOP（Point of Purchase）公告等の販売現場における宣伝材並びにその他の書類等へ付することが好ましい。

[0053] また、「表示」には、健康食品、機能性食品、経腸栄養食品、特別用途食品、保健機能食品、特定保健用食品、栄養機能食品、又は機能性表示食品等としての表示も挙げられる。この中でも特に、日本における消費者庁によって認可される表示、例えば、特定保健用食品、栄養機能食品、若しくは機能性表示食品に係る制度、又はこれらに類似する制度にて認可される表示等が挙げられる。具体的には、特定保健用食品としての表示、条件付き特定保健用食品としての表示、身体の構造や機能に影響を与える旨の表示、疾病リスク減少表示、科学的根拠に基づいた機能性の表示等を挙げることができ、より具体的には、健康増進法に規定する特別用途表示の許可等に関する内閣府令（平成二十一年八月三十一日内閣府令第五十七号）に定められた特定保健用食品としての表示（特に保健の用途の表示）及びこれに類する表示が典型的な例である。

[0054] 本実施形態のプロバイオティクス組成物は、非健常者を含むあらゆる対象

に投与され得るが、特定の用途（特に保健の用途）や機能が表示された飲食品とする場合は、上記の非治療目的として使用される。

[0055] 本実施形態に係る飲食品組成物は、栄養組成物として用いることができる。本実施形態において、「栄養組成物」は、栄養摂取を主な目的として経口摂取される飲食品を指す。本実施形態で用いることができる栄養組成物の種類は特に限定されないが、好ましくは調製乳、離乳食、流動食（経腸栄養食、おかゆ等）、又はスポーツ飲料等であり、より好ましくは調製乳である。摂取対象は、乳児、幼児、小児及び成人を問わないが、好ましくは乳児及び幼児である。

[0056] 調製乳には、調製粉乳及び調製液状乳が含まれる。本明細書において調製粉乳は、「牛由来の生乳、生山羊乳、生めん羊乳、殺菌山羊乳、牛乳、特別牛乳、又はこれらを原料として製造した食品を加工し、又は主要原料とし、乳幼児に必要な栄養分を加え粉末状にしたもの」として定義される。本明細書において調製液状乳は、「牛由来の生乳、生山羊乳、生めん羊乳、殺菌山羊乳、牛乳、特別牛乳、又はこれらを原料として製造した食品を加工し、又は主要原料とし、乳幼児に必要な栄養分を加え液状にしたもの」として定義される。

[0057] 本実施形態の調製乳は、さらにヒトミルクオリゴ糖を含んでいてもよい。ヒトミルクオリゴ糖としては、ヒトの乳に通常含まれるオリゴ糖であれば特に限定されないが、2'-フコシルラクトース、3'-フコシルラクトース、ラクトジフコテトラオース、2', 3'-ジフコシルラクトース、ラクト-N-トリオースII、ラクト-N-テトラオース、ラクト-N-ネオテトラオース、ラクト-N-フコペンタオースI、ラクト-N-ネオフコペンタオース、ラクト-N-フコペンタオースII、ラクト-N-フコペンタオースIII、ラクト-N-フコペンタオースIV、ラクト-N-ネオフコペンタオースV、ラクト-N-ジフコヘキサオースI、ラクト-N-ジフコヘキサオースII、6'-ガラクトシルラクトース、3'-ガラクトシルラクトース、ラクト-N-ヘキサオース及びラクト-N-ネオヘキサオース等の中性ヒト

ミルクオリゴ糖、3'-シアリルラクトース、6'-シアリルラクトース、3-フコシル-3'-シアリルラクトース及びジシアリル-ラクト-N-テトラオースなどの酸性ヒトミルクオリゴ糖が好ましく挙げられる。これらのうち、2'-フコシルラクトース、3-フコシルラクトース、3'-シアリルラクトース、及び6'-シアリルラクトースが好ましく、2'-フコシルラクトースが特に好ましい。

[0058] 調製乳は、各種のタンパク質、油脂、炭水化物、ミネラル類及びビタミン類等の栄養成分が配合されたものであって、粉末状又は液状に加工されたものも含まれる。栄養成分としては、上述の各栄養成分を使用することができる。調製乳にはさらに、健康増進法で規定される特別用途食品における「乳児用調製粉乳」、「乳児用調製液状乳」及び「妊産婦、授乳婦用粉乳」が含まれ、0～12か月の乳児を対象とする乳幼児用調製粉乳、6～9か月以降の乳児及び年少幼児（3歳まで）を対象とするフォローアップミルク、出生時の体重が2500g未満の新生児（低出生体重児）を対象とする低出生体重児用調製粉乳、牛乳アレルギーや乳糖不耐症等の病的状態を有する乳幼児の治療に用いられるアレルギー用調製粉乳、乳糖不耐症用調製粉乳、先天代謝異常用調製粉乳、幼児向け調製粉乳、成人用栄養粉末及び高齢者用栄養粉末等の態様も含まれる。

[0059] 本実施形態の調製乳は健常者、非健常者を含むあらゆる対象に投与され得る。

本実施形態の調製乳が健常者に投与される場合は、乳児用調製粉乳、フォローアップミルク、低出生体重児用調製粉乳、幼児向け調製粉乳、成人用栄養粉末、高齢者用栄養粉末に用いられ、上記の非治療目的として使用され得る。

[0060] 本実施形態の調製乳が非健常者に投与される場合は、アレルギー用調製粉乳、乳糖不耐症用調製粉乳、先天代謝異常用調製粉乳に用いられ、上記の治療目的として使用され得る。

[0061] 本実施形態に係る栄養組成物は、保健機能食品や病者用食品に適用するこ

とができる。保健機能食品制度は、内外の動向、従来からの特定保健用食品制度との整合性を踏まえて、通常の食品のみならず錠剤又はカプセル等の形状をした食品を対象として設けられたもので、個別許可型である特定保健用食品と規格基準型である栄養機能食品の2種類の類型からなる。

[0062] <組成物の製造方法>

本実施形態の組成物の製造方法について、以下に説明する。本実施形態の組成物の製造方法において、MCC2085の添加工程は、組成物の製造工程におけるいずれの段階で行ってもよい。

[0063] 組成物の製造方法は、MCC2085と原料とを混合する工程を少なくとも含む。MCC2085は、前記のものを使用することができる。原料としては、上述の飲食品組成物の原料、プロバイオティクス効果を有する成分、プロバイオティクス効果を補助する成分及び製剤担体等が挙げられる。飲食品用組成物の製造方法である場合、原料として、上述の飲食品組成物の原料を少なくとも含む。飲食品用組成物の製造方法である場合、原料として、プロバイオティクス効果及を有する成分、プロバイオティクス効果を補助する成分及び製剤担体等の少なくとも1種を含んでいてよい。

[0064] MCC2085と原料とを混合する際、MCC2085の含有量が組成物の総質量に対し $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^{12}$ CFU/gとなるように混合することが好ましく、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{11}$ CFU/gとなるように混合することがさらに好ましい。

[0065] 組成物の製造方法は、MCC2085と原料との混合物を乾燥する工程をさらに含んでいてもよい。乾燥方法は、本実施形態の効果を損なわない限り特に限定されない。具体的な乾燥法としては、噴霧乾燥法及び凍結乾燥法が挙げられる。

組成物の製造方法は、MCC2085と原料との混合物を殺菌する工程をさらに含んでいてもよい。殺菌方法は、本実施形態の効果を損なわない限り特に限定されないが、例えばレトルト殺菌法、凍結乾燥法、UHT殺菌法、加圧殺菌法、高圧蒸気滅菌法、乾熱滅菌法、流通蒸気消毒法、電磁波殺菌法

、電子線滅菌法、高周波滅菌法、放射線滅菌法、紫外線殺菌法、酸化エチレンガス滅菌法、過酸化水素ガスプラズマ滅菌法及び化学的殺菌法（具体的には、アルコール殺菌法、ホルマリン固定法及び電解水処理法）等が挙げられる。

[0066] 組成物の製造方法は、さらに前記混合物にプレバイオティクスを混合する工程及びさらにMCC2085又は前記混合物に乳成分を混合する工程の少なくとも一方を含んでもよい。

[0067] 組成物の製造方法は、MCC2085以外のビフィドバクテリウム属細菌及び乳酸菌等のプロバイオティクスの少なくとも1種の菌を混合する工程をさらに含んでもよい。

[0068] 乳成分は、粉体が好適であり、MCC2085の菌末と混合することがより好適である。

[0069] 乳成分としては、本実施形態の効果を損なわない限り特に限定されない。例えば、乳成分として、牛乳、水牛乳、羊乳、山羊乳、馬乳、脱脂乳、脱脂濃縮乳、脱脂粉乳、濃縮乳、全脂粉乳、クリーム、バター、バターミルク、練乳及び乳タンパク質等を挙げることができ、これらからなる群から選ばれる1種又は2種以上を使用することができる。また、乳タンパク質は、特に限定されないが、例えば、ホエイ、カゼイン、及びこれらの加水分解物等が挙げられ、これらからなる群から選ばれる1種又は2種以上を用いることができる。乳成分は、牛乳由来の成分が好適である。

[0070] 前記加水分解物は、前記乳成分（好適には乳タンパク質）を加水分解することで、ホエイ加水分解物やカゼイン加水分解物等を製造することができる。加水分解として、例えば、酸又はアルカリ加水分解及び酵素加水分解等が挙げられる。このうち、酵素加水分解が好適である。酵素加水分解に用いられる酵素としては、タンパク質分解酵素が好適である。タンパク質分解酵素として、例えば、プロテアーゼ、トリプシン、キモトリプシン、プラスミン、ペプシン、パパイン、ペプチダーゼ及びアミノペプチダーゼ等が挙げられる。加水分解反応の際のpHは、使用する酵素の至適pHに適宜調整して、

例えばpH2～6等で行うことができる。加水分解反応の際の温度は、特に限定されず、通常30～60℃の範囲で行うことが好適である。反応時間は、2～10時間が好ましい。

[0071] また、本発明の組成物として、サプリメント又はタブレットを製造する場合、本実施形態の組成物の製造方法は、MCC2085を含む培養物と製剤担体等を混合して混合物を得る工程、サプリメント又はタブレットの所定の形状に成形する工程を含むことができる。成形工程として、例えば、打錠等が挙げられる。打錠の一例としては、例えば、粉末や顆粒の混合物を圧縮成形してタブレットを得ること等が挙げられる。

[0072] さらに、本実施形態の組成物の製造方法の一例として、MCC2085を含む発酵飲食品（好適には発酵乳）の製造方法が挙げられる。MCC2085と原料との混合物を乾燥させたものを、発酵乳原料に添加し、MCC2085を含む発酵乳を得る工程を行う。又は、MCC2085と原料との混合物を乾燥させたものと、発酵乳とを混合してMCC2085を含む発酵乳を得る工程を行う。組成物中のMCC2085の菌体量が上述の菌体量となるように発酵条件や配合量を調整する。これにより、MCC2085を含む発酵飲食品、好適には発酵乳又は発酵製品を提供することができる。

[0073] ＜腸内菌叢改善方法及び腸内菌叢改善のための細菌の使用＞

本発明の腸内菌叢改善方法は、ビフィドバクテリウム・ビフィダム MCC2085（NITE BP-03881）である細菌を、摂取量が $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^{12}$ CFU/日となるよう被投与者に投与することを含む。

[0074] 本実施形態の腸内菌叢改善方法では、MCC2085は前記の健常者、非健常者を含むあらゆる対象に投与され得る。MCC2085を摂取量が $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^{12}$ CFU/日となるよう便秘や下痢等の腸に問題を感じる被投与者に投与すると、腸内菌叢の改善が期待できる。MCC2085の被投与者の摂取は、継続的に行われることが好ましい。

[0075] つまり、ビフィドバクテリウム・ビフィダム MCC2085（NITE BP-03881）である細菌は、投与対象の腸内菌叢改善のために使用

することができる。

[0076] 本発明の別の側面によると、ビフィドバクテリウム・ビフィダム MCC 2085 (NITE BP-03881) を含む腸到達用経口組成物を提供することが可能である。

MCC 2085 は高い耐酸性能を有することから、経口摂取した際に、胃酸と共存した場合も生存率を高く保つことができる。その結果、MCC 2085 を経口摂取した際に、MCC 2085 が高い生存率を有するまま腸に到達することができる。

MCC 2085 に関する事項は、全て上記の内容に準じることが可能である。

実施例

[0077] 以下、実施例に基づいて本実施形態を更に詳細に説明する。なお、以下に説明する実施例は、本実施形態の代表的な実施例の一例を示したものであり、これにより本発明の範囲が狭く解釈されることはない。

[0078] [試験例 1]

(1) 目的

試験例 1 は、ビフィドバクテリウム・ビフィダム MCC 2085 の取得及び当該細菌の菌学的性質を明らかにするために行われた。

(2) ビフィドバクテリウム・ビフィダム MCC 2085 の取得と菌学的性質

MCC 2085 は乳児糞便より分離した。MCC 2085 を BL 寒天培地 (栄研化学株式会社、E-MG16、5%馬無菌脱繊維血添加) にて 37℃、48 時間の嫌気培養を行い、形成されたコロニーの観察を行った。菌学的性質を表 1 に示す。

[0079]

[表1]

	性質
直径	2～3mm
色調	茶
形	円形
隆起状態	扁平状
周縁	全縁
表面の形状等	スムーズ
透明度	不透明
粘稠度	バター状

[0080] (3) 16S rRNA 遺伝子塩基配列の解析

MCC2085の16SリボソーマルRNA (16S rRNA) 遺伝子塩基配列の解析を行った。上記(2)にて培養したMCC2085をもとにPCRに用いるサンプルDNA液を調製し、このサンプルDNA液を用いてPCRにて当該16S rRNA 遺伝子を増幅し、DNA増幅産物を得、これよりMCC2085の16S rRNA 遺伝子配列を決定した。

[0081] この塩基配列情報に基づき、NCBI (National Center for Biotechnology Information、国立バイオテクノロジー情報センター) の国際塩基配列データベース (Genbank) 上でBLAST (Basic Local Alignment Search Tool) による16S rRNA 遺伝子配列の全長についての相溶性検索を行った結果、ビフィドバクテリウム・ビフィダムATCC29521と100%の相溶性を示した。

[0082] 「ビフィドバクテリウム・ビフィダムATCC29521と100%の相溶性」という用語は、MCC2085(受託番号NITE BP-03881)及びATCC29521の両方がそれらの16S rRNA 遺伝子配列の間に100%の進化的関係を共有することを理解されるべきである。

したがって、両株は、それらが16S rRNAにおいて100%の配列同一性を共有することを本発明者らが観察したように、共通の進化的祖先を共

有する。これにより、ビフィドバクテリウム・ビフィダムMCC2085(受託番号NITE BP-03881)という名称で寄託された新規MCC2085は、実際にビフィドバクテリウム・ビフィダム種に属し、ATCC29521に進化的に関連することが示された。

さらに、ATCC29521とMCC2085の全ゲノム配列について、pyANI(v0.2.12)のANIblastを用いて、平均ヌクレオチド同一性(ANI)分析を行った。その結果、両者のANI値は99.00%であり、ATCC29521とMCC2085は互いに異なる株であることが明らかになった。

以下の試験例2及び試験例3に示されるように、MCC2085はATCC29521よりも驚くほど優れた耐酸性を有し、MCC2085はセロトニン産生量も有意高いことも示された。したがって、本明細書に記載されたビフィドバクテリウム・ビフィダムMCC2085(NITE BP-03881)はビフィドバクテリウム・ビフィダム種に属するが、ATCC29521とは異なる株でもあることが明らかである。

[0083] [試験例2]

(1) 目的

試験例2は、ビフィドバクテリウム・ビフィダムMCC2085の耐酸性能を評価するために行われた。

[0084] (2) 細菌

下記2種類の細菌を用いた。

ービフィドバクテリウム・ビフィダムMCC2085(NITE BP-03881)

ービフィドバクテリウム・ビフィダム(ATCC29521, Type strain)

[0085] ATCC29521は、American Type Culture Collectionより入手可能である。ATCCの所在地は米国、20110、ヴァージニア州、マナサス、ユニバーシティ ブルバード10801

(10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110, United States of America)

である。

(3) 人工胃液の調製

超純水に、最終濃度が塩化ナトリウム0.2質量%、ペプシン（富士フィルム和光純薬株式会社製）0.35質量%となるようそれぞれ添加し、スターラーで混合した。得られた混合液を塩酸を用いてpH3.0に調整した後、0.45 μm 孔のフィルターを用いて濾過し、人工胃液を得た。

[0086] (4) 菌の前培養

2種類の細菌を0.05質量%シス테인塩酸塩入りMRS培地で37℃、16時間嫌気培養した。

[0087] (5) 耐酸性試験

2種類の細菌を、人工胃液存在下で0分間、30分間、120分間それぞれ培養し経時的に菌数を確認した。

[0088] (5-1) 培養時間0分間

前培養後の菌を、生理食塩水を用いて10倍希釈した後、再度生理食塩水で100倍希釈を2回行うことで 10^5 倍希釈の菌体含有液を調製した。得られた 10^5 倍希釈の菌体含有液に対して10倍希釈を2回行うことで、それぞれ 10^6 倍希釈の菌体含有液、及び 10^7 倍希釈の菌体含有液を得た。これら3種類の希釈された菌体含有液を、人工胃液との反応時間0分間の試料とした。

[0089] (5-2) 培養時間30分間、120分間

前培養後の菌を、生理食塩水を用いて10倍希釈した後、人工胃液で10倍希釈し、ヒートブロックを用いて37℃にて、30分間又は120分間反応させた。反応終了後、光岡バッファーを用いて10倍希釈し、さらに生理食塩水で10倍希釈を4回行い、 10^5 倍希釈、 10^6 倍希釈、及び 10^7 倍希釈の菌体含有液をそれぞれ調製した。光岡バッファーは、超純水1Lに対し、リン酸二水素カリウムを4.5g、リン酸水素二ナトリウムを6.0g、

Ｌ－システイン塩酸塩を 0.5 g、Twee n（登録商標）80を 0.5 g 及びA g a rを 1.0 g 含む。

[0090] （５－３）生菌数の測定

各培養時間（０分間、３０分間、１２０分間）にて調製した３種類の希釈された菌体含有液を、それぞれＴＯＳ培地（ヤクルト薬品工業株式会社）に 100 μ L（／d i s h）添加し嫌気条件下で混釈培養した。混釈培養後、37℃で72時間培養した。培養後、コロニーをカウントし、菌体濃度（C F U／m l）を算出した。

菌体濃度は、前記（５－１）～（５－３）の手順を、各培養時間（０、３０、１２０分間）における各菌体希釈液（10⁵、10⁶、10⁷倍希釈の菌体含有液）それぞれについて、３回ずつ行い算術平均値を求めることで算出された（n＝３）。

[0091] 下記の式により、各培養時間における菌の生存率を算出した。

生存率（％）＝任意の培養時間における菌体濃度（C F U／m l）／培養時間 0 分間における菌体濃度（C F U／m l）× 100

[0092] （６）結果

菌体濃度の経時変化の結果を図 1 に示す。M C C 2 0 8 5 は 10⁷倍希釈の菌体含有液、A T C C 2 9 5 2 1 は 10⁶希釈の菌体含有液のデータである。図 1 に示されるように、M C C 2 0 8 5 の菌体濃度は、培養時間 120 分間経過時であっても培養 0 時間の菌体濃度とほとんど変化なく、10⁹ C F U／m l 程度の菌体濃度を保持した。一方、A T C C 2 9 5 2 1 の菌体濃度は、培養 0 分間では 10⁹ C F U／m l 程度であったが、培養時間 120 分間では、10⁷ C F U／m l 程度に減少した。

[0093] 菌体の生存率の経時変化の結果を図 2 に示す。

図 2 に示されるように、M C C 2 0 8 5 の培養 120 分間の生存率は 79％であった。一方、A T C C 2 9 5 2 1 の培養 30 分間では 23％、培養 120 分間では 3.1％であった。

[0094] 以上より、M C C 2 0 8 5 は人工胃液に対する高い耐酸性能を有すること

が明らかとなった。

[0095] [試験例3]

(1) 目的

試験例3は、ビフィドバクテリウム・ビフィダムMCC2085(NITE BP-03881)及びビフィドバクテリウム・ビフィダムATCC29521によるセロトニン産生量を定量するために行われた。

[0096] (2) 菌体含有培養液の調製

MRS培地(Difco™ Lactobacilli MRS Broth、型番288130)を121℃にて15分間滅菌処理を行った。滅菌後のMRS培地にて、嫌気条件下でMCC2085、又はATCC29521をそれぞれ37℃で16時間培養した。培養後の培養液を遠心分離にかけて各菌体を集菌した後、集菌された菌体をリン酸緩衝生理食塩水(Phosphate buffered saline: PBS)にそれぞれ懸濁し、 $1 \times 10^9 \text{ cells/ml}$ となるように調整しMCC2085、又はATCC29521を含む溶液を得た。

[0097] (3) RIN14B細胞の培養と播種

RIN14B細胞(ATCC CRL-2059、ラット脾臓がん由来のエンテロクロマフィン様細胞)を10%のウシ胎児血清(FBS)及び1%のペニシリンストレプトマイシンが添加されたRPMI 1640培地(富士フィルム和光純薬社製)で37℃、5%CO₂条件で培養し、3～4日に一回ずつ継代培養を行った。

培養後のRIN14B細胞を0.25w/v%トリプシン/EDTA(gibco)を用いて37℃、5分間インキュベートを行い、10%のFBSと1%のペニシリンストレプトマイシンが添加されたRPMI 1640培地を用いて希釈し、 $2.5 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ のRIN14B細胞含有液を得た。このRIN14B細胞含有液を24ウェルプレートに500μL/1ウェルずつ播種した後、37℃、5%CO₂条件でさらに48時間培養した。

[0098] (4) セロトニン産生量の定量

前記(3)にて培養後のR I N 1 4 B細胞をH B S S (+) 溶液(富士フイルム和光純薬株式会社)で一度洗浄した。前記(2)にて調製したM C C 2 0 8 5 又はA T C C 2 9 5 2 1 含有液を、1%のペニシリンストレプトマイシンが添加されたR P M I 1 6 4 0 培地を用いて20倍に希釈し、500 μ L / 1 ウェルとなるようにウェルに添加し、37℃、5%CO₂条件下で24時間培養した。24時間の培養後、培養上清を回収し、培養上清に含まれるセロトニン含有量をE L I S A キット(D L D 社製、型番E A 6 0 2 / 9 6)を用いて測定した。

なお、菌体含有液を添加しない以外は前記と同様の手順を行い、c o n t r o l とした。

[0099] (5) 結果

M C C 2 0 8 5 及びA T C C 2 9 5 2 1 のセロトニン産生量を図3に示す。統計解析に関しては、T検定で群間比較を実施し、bonferroniを用いて、p値で補正を行った。

M C C 2 0 8 5 及びA T C C 2 9 5 2 1 によるセロトニン産生量は無添加の対照と比較して有意に増加した。M C C 2 0 8 5 によるセロトニン産生量はA T C C 2 9 5 2 1 によるものと比較して有意に増加した。各細菌によるセロトニン産生量の対照に対する比はM C C 2 0 8 5 で3. 2、A T C C 2 9 5 2 1 で1. 7であった。

[0100] 他の細菌株も試験されている(データ未掲載)。これらの細菌株のセロトニン産生効果をE L I S A キット(D L D 社製、型番E A 6 0 2 / 9 6)を用いて測定した。測定された上清中のセロトニン産生量は、A T C C 2 9 5 2 1 の産生量と同程度であった。しかし、ビフィドバクテリウム・ビフィダム M C C 2 0 8 5 (N I T E B P - 0 3 8 8 1) はこれらの試験株より優れていた。

[0101] [製造例]

下記に本実施形態の組成物、医薬組成物、発酵乳、調製粉乳、及び飲食品

組成物の製造例を示すが、本実施形態の組成物は、これに限定されない。

[0102] 〔製造例 1〕

MCC2085を、MRS液体培地(Difco™ Lactobacilli MRS Broth、型番288130)3mLに添加し、32～39℃で5～25時間嫌気培養後、培養液を濃縮し、凍結乾燥を行い、細菌の凍結乾燥粉末(つまり菌末)を得る。菌末と、ホエイタンパク質濃縮物(Whey protein concentrate; WPC)を均一に混合して組成物を得る。この組成物20gを200gの水に溶かし、MCC2085を含む組成物を得る。

[0103] 〔製造例 2〕

MCC2085を、MRS液体培地3mLに添加し、32～39℃で5～25時間嫌気培養後、培養液を濃縮し、凍結乾燥を行い、細菌の凍結乾燥粉末(つまり菌末)を得る。菌末と、乳タンパク質濃縮物の乾燥粉末(MPC480、フォンテラ社製、タンパク質含量80質量%、カゼインタンパク質：ホエイタンパク質＝約8：2)を均一に混合して、組成物を得る。この組成物20gを200gの水に溶かし、MCC2085を含む組成物を得る。

[0104] 〔製造例 3〕

MCC2085を、MRS液体培地3mLに添加し、32～39℃で5～25時間嫌気培養後、培養液を濃縮し、凍結乾燥を行い、ビフィドバクテリウム・ビフィダム MCC2085(NITE BP-03881)を含む細菌の凍結乾燥粉末(つまり菌末)を得る。次に、菌末と結晶セルロースを攪拌造粒機に投入し混合する。その後、精製水を加え造粒し、造粒物を乾燥し、賦形剤を含有してなる造粒物(医薬組成物)を得る。このようにして、MCC2085を含む造粒物を得ることができる。

[0105] 〔製造例 4〕

MCC2085を添加した発酵乳の製造法を下記に示す。

まず、乳原料、及び必要に応じた水、その他の成分等を混合し、好ましくは均質化処理を行い、加熱殺菌処理する。均質化処理及び加熱殺菌処理は常法により行うことができる。加熱殺菌された殺菌調乳液に乳酸菌スターター

を添加（つまり接種）し、所定の発酵温度に保持して発酵させ、発酵物を得る。発酵によりカードが形成される。

[0106] 乳酸菌スターターとしては、例えば、ラクトバチルス・ブルガリクス (*Lactobacillus bulgaricus*)、ラクトコッカス・ラクチス (*Lactococcus lactis*) 及びストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*) 等のヨーグルト製造に通常用いられている乳酸菌を用いることができる。pHが目標の値に達したら、形成されたカードを攪拌により破碎し、10℃以下に冷却して発酵物を得る。10℃以下に冷却することにより、乳酸菌の活性を低下させて酸の生成を抑制することができる。

[0107] 次いで、発酵工程で得られた発酵物を加熱処理して加熱後発酵物を得る。発酵物を適度に加熱することにより、加熱後発酵物中の乳酸菌による酸の生成を抑えることができる。これによって、その後の製造工程中及び／又はビフィズス菌入り濃縮発酵乳の保存中のpHの低下を抑えることができる。その結果、ビフィズス菌の生残性を向上させることができる。

[0108] 次いで、加熱処理工程で得られた加熱後発酵物に、MCC2085を添加する。MCC2085の添加量は、加熱後発酵物に対して $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{11}$ CFU/mLが好ましく、 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{10}$ CFU/mLがより好ましい。MCC2085が殺菌体の場合、CFU/mLは、個細胞/mLと置き換えることができる。

[0109] 加熱後発酵物に、MCC2085を添加した後、濃縮を行う。濃縮工程は公知の濃縮方法を適宜用いて行うことができる。例えば遠心分離法又は膜分離法を用いることができる。遠心分離法では、被濃縮物（つまり、MCC2085が添加された加熱後発酵物）中のホエイが除去されて、固形分濃度が高められた濃縮発酵乳が得られる。

[0110] 上述のようにして得られたMCC2085を含む発酵乳を製造することができる。

[0111] 〔製造例5〕

MCC2085を添加した調製粉乳の製造法を下記に示す。

- [0112] 脱塩牛乳乳清蛋白質粉末（ミライ社製）10kg、牛乳カゼイン粉末（フォンテラ社製）6kg、乳糖（ミライ社製）48kg、ミネラル混合物（富田製薬社製）920g、及びビタミン混合物（田辺製薬社製）32g、ラクチュロース（森永乳業社製）500g、ラフィノース（日本甜菜製糖社製）500g、ガラクトオリゴ糖液糖（ヤクルト薬品工業社製）900gを温水300kgに溶解し、さらに90℃で10分間加熱溶解し、調製脂肪（太陽油脂社製）28kgを添加して均質化した。その後、殺菌及び濃縮の工程を行って噴霧乾燥し、調製粉乳約95kgを調製した。これに、澱粉に倍散したMCC2085の菌体粉末（ $10^8 \sim 10^{11}$ CFU/g、森永乳業株式会社製）100gを加えてビフィズス菌・オリゴ糖配合調製粉乳約95kgを調製する。得られた調製粉乳を水に溶解して、標準調乳濃度である総固形分濃度14%（w/V）の調乳液としたとき、調乳液中のビフィズス菌数は $10^6 \sim 10^9$ CFU/100mLを得ることができる。
- [0113] 上述のようにして得られたMCC2085を含む調製粉乳を摂取又は投与することにより、ヒトの腸内環境を改善することができる。
- [0114] 〔製造例6〕
MCC2085を添加した腸内環境改善食の製造法を下記に示す。
- [0115] MCC2085を、MRS液体培地3mLに添加し、32～39℃で5～25時間嫌気培養後、培養液を濃縮し、凍結乾燥を行い、細菌の凍結乾燥粉末（つまり菌末）を得、本実施形態の組成物を得る。セルロースが多く含有される食品（例えば野菜又はサラダ等）に本実施形態の菌末を加えて調理することもでき、これにより本実施形態の組成物を得ることもできる。
- [0116] もしくは、菌末を、食事をする際に、食前、食中又は食後に摂取する。規則正しい食事（主食、副菜及び主菜のある食事）を行えば必然的に食物繊維を摂取するため、本実施形態の乾燥菌末製品を、食事の際に一緒に摂取することで、大人の腸内環境の改善効果が期待できる。
- [0117] 本実施形態の腸内環境改善食を、便秘や下痢等の腸に問題を感じる方が継続摂取することで、より腸内環境の改善効果が期待できる。

[0118] 以上のことから、ビフィドバクテリウム・ビフィダム MCC2085 (NITE BP-03881)、及びビフィドバクテリウム・ビフィダム MCC2085 (NITE BP-03881) を含む組成物は、腸内でのビフィドバクテリウム属細菌の増殖を手助けすることができ、また、良好な腸内フローラ形成及び腸内環境の改善等に有効に使用することができる。

請求の範囲

- [請求項1] ビフィドバクテリウム・ビフィダム MCC2085 (NITE BP-03881) である細菌。
- [請求項2] 請求項1に記載の細菌を含有する、組成物。
- [請求項3] 前記組成物が、飲食品組成物である、請求項2に記載の組成物。
- [請求項4] 前記飲食品組成物が、プロバイオティクス組成物又は栄養組成物である、請求項3に記載の組成物。
- [請求項5] 前記栄養組成物が、調製乳である、請求項4に記載の組成物。
- [請求項6] さらにヒトミルクオリゴ糖を含む、請求項4又は5に記載の組成物。
- [請求項7] 前記組成物が、医薬組成物である、請求項2に記載の組成物。
- [請求項8] 請求項1に記載の細菌と、原料とを混合する工程を含む、組成物の製造方法。